

최 종
연구보고서

생물공학적 고농도 동물세포 배양을 이용한
뉴캐슬병 백신의 대량 생산

The Mass Production of Newcastle Disease
Vaccine through High Density
Animal Cell Culture in a Bioreactor

뉴캐슬병 백신의 효율적 생산을 위한 고생산성 동물세포주의 개발
Development of high productive host cell lines for efficient
production of Newcastle Disease Vaccine

고농도 동물세포 배양을 이용한 뉴캐슬병 백신의 최적 생산 전략 개발
Development of an optimum strategy for Newcastle Disease
vaccine production through high density cell culture

뉴캐슬병 백신의 대량 생산을 위한 자동화 공정 개발 및 scale-up
Development of an automatic process for large scale
Newcastle Disease vaccine production and scale-up

강 원 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농 립 부 장 관 귀 하

본 보고서를 “생물공학적 고농도 동물세포 배양을 이용한 뉴캐슬병 백신의 대량 생산”의 최종보고서로 제출합니다.

2003. 7. 28.

주관연구기관: 강원대학교

협동연구기관: 고려대학교

총괄연구책임자(제1세부): 정 연 호

제2세부 연구책임자: 전 계 택

협동 연구책임자: 김 의 환

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 생물공학적인 고농도 동물세포 배양을 이용한 뉴캐슬병 백신의 대량 생산 (영문) The Mass Production of Newcastle Disease Vaccine through High Density Animal Cell Culture in a Bioreactor		
주관연구기관	강원대학교	총괄 연구	(소속) 강원대학교 생명공학부
참여기업	(주)에스티알바이오텍	책임자	(성명) 정연호
총연구개발비	계	300,000 천원	총연구기간
(300,000 천원)	정부출연금	240,000 천원	2000. 7. 29~2003. 7. 28(3년)
	기업부담금	60,000 천원	
	연구기관부담금		
	총인원	30	총 참여 연구원 수
		내부인원	12
		외부인원	18

○ 연구개발 목표 및 내용

본 연구의 최종 목표는 고농도 동물세포 배양을 이용하여 뉴캐슬병 백신을 효율적으로 대량 생산하기 위한 생물반응기 시스템을 구축하는데 있다. 이를 위해서 뉴캐슬병 백신의 효율적 생산을 위한 고생산성 동물세포주를 확립하였고, 고농도 동물세포 배양을 이용한 뉴캐슬병 백신의 최적 생산 시스템 구축 및 그 최적 운전 전략을 개발하였으며, 뉴캐슬병 백신의 대량 생산을 위한 자동화 공정 및 scale-up 전략을 확립하였다.

○ 연구결과

협동과제에서는 primary chick fibroblast와 이들의 transformant 들 그리고 다양한 cell line들에 대하여 ND 백신의 생산성을 비교 검토한 후 우수 세포주를 선별하였으며 확보된 세포주들의 배양 특성을 비교 조사하였다. 또한 Primary fibroblast를 PMA를 이용하여 형질전환함으로써 세포주를 개량하는 한편 재조합 세포주를 확립하였다. 제1세부과제에서는 배지의 최적화 및 고농도 동물세포 배양 시스템 구축을 위한 기본 조사를 바탕으로 생물반응기를 이용한 고정화 세포배양 시스템을 확립하였고, 제오라이트를 이용한 고정화 흡착법의 도입과 세포사멸 방지제의 첨가에 의한 새로운 고농도 세포배양시스템을 제시하였다. 또한 고 생산성 ND 백신 생산 시스템 구축 및 운전 전략의 확립을 위해 백신생산배지의 최적화, 첨가제의 최적화, MOI, 감염시기, 추수시기 등의 운전 변수의 최적화를 수행하였다. 세포배양과 백신 생산을 결합한 유가식배양 공정 개발을 통하여 백신의 생산성을 100배 향상 시켰으며, 자동화 시스템, 고농도 동물세포 배양 공정과 백신 생산 공정이 병합된 유가식 생물반응기 시스템의 구축을 통해 백신 생산성을 획기적으로 증진시켰다. 제2세부과제에서는 microsparger를 기반으로 pH와 용존산소를 정밀 조절할 수 있는 동물세포 배양기를 자체 설계·제작하였고, 배양공정 데이터 수집 및 분석을 위한 컴퓨터 프로그램을 완성하였으며, 이를 바탕으로 scale-up 인자인 산소전달계수 값의 온라인 추정, 세포농도의 온라인 추정 등 공정변수들을 컴퓨터 상에서 분석하고, 적시에 배양공정을 조절해 주기 위한 세포배양공정 계측 및 제어시스템을 확립하였다. 한편 세포 고정화 배양의 scale-up 전략 개발을 위해 수학적인 모델링과 이의 다양한 동물세포 배양 모델에의 적용을 통한 simulation 연구에 의해 회분식 배양, 반복회분식 배양, 유가식 배양 및 perfusion 배양공정의 최적화에 필요한 중요한 요인들을 분석하였다.

○ 연구성과 활용실적 및 계획

본 연구에 의해 확립된 고농도 동물세포배양을 이용한 자동화 ND백신 생산시스템의 핵심 요소 기술 및 scale-up 기술은 ND 백신뿐만 아니라 다양한 동물 또는 인간 바이러스 백신의 생산, 더 나아가서 고부가가치 치료용 단백질의 생산에 활용될 수 있다. 본 연구에서 확립한 기술은 참여 기업체에 기술이전된 후에 안정성 검사 및 현장 실험을 거쳐서 GMP시설을 갖춘 제3의 산업체와 공동으로 산업화 시켜나갈 예정이다.

요 약 문

I. 제 목

생물공학적 고농도 동물세포 배양을 이용한 뉴캐슬병 백신의 대량 생산

II. 연구개발의 목적 및 필요성

현재 뉴캐슬병 백신의 경우 수정란을 이용하여 생산하고 있으나, 이러한 생산 방법은 대부분 수작업에 의존하므로 넓은 공간과 많은 인력이 필요하며, 오염의 확률도 높아 비효율적이어서 동물 백신의 생산 단가가 높은 문제점을 가지고 있다. 또한 막대한 양의 수정란이 사용되고 있으며 사용하고 남은 수정란의 폐기 처리 시 위생문제 및 환경 문제를 일으키고 있다. 따라서 기존의 수정란에 의한 뉴캐슬병 백신 생산 방법 보다 효율적이고 경제적이며 환경문제가 적은 새로운 뉴캐슬병 백신의 생산 방법의 개발이 절실히 요구되고 있으며, 수정란 대신 동물세포를 이용한 백신의 생산이 기존의 문제점들을 해결할 수 있는 대안이 될 수 있다.

동물세포를 이용한 백신의 생산을 위해 주로 roller bottle를 사용하고 있으나, scale-up시 bottle의 수를 막대하게 증가시켜야 하는 단점과 비싼 인건비 및 오염 문제로 인해 최근에는 생물반응기에서 미립담체에 의한 동물세포 배양을 이용하여 백신을 생산하는 것이 세계적인 경향이다. 하지만 국내에서는 기술적으로 미흡하여 아직도 생물반응기를 이용한 동물백신의 산업적 생산이 미약한 실정이다. 따라서 생물반응기에서 동물세포를 배양하여 뉴캐슬병 백신을 비롯한 동물백신을 산업적으로 생산할 수 있는 산업화 기술의 개발이 절실히 요구된다.

생물반응기에서 동물세포를 배양함으로써 뉴캐슬병 백신을 비롯한 동물백신을 산업적으로 생산할 수 있는 산업화 기술의 개발을 통해 생산비용의 획기적 감축을 달성하기 위해서는 백신 생산을 위한 고생산성 숙주 세포주의 개발, 고농도 동물세포 배양을 통한 최적 생산 전략 개발, 자동화 및 scale-up 공정 개발 등이 필요하다. 왜냐하면 고생산성 숙주 동물세포주의 개발을 통해 단위세포 당 생산성을 높이고, 고농도 배양을 기반으로 하는 최적 생산 전략의 확립을 통해 단위 생물반응기 부피 당 생산성을 높이고 자동화를 통해 작업 공간 및 노동력을 절약할 뿐 만 아니라 대형화를 통해 생산 단가를 줄일 수 있기 때문이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

따라서 본 과제에서는 생물공학적 고농도 동물세포 배양을 이용한 뉴캐슬병 백신의 효율적 대량 생산을 목표로 협동과제에서는 뉴캐슬병 백신의 효율적 생산을 위한 고생산성 동물세포주를 확립하고, 제1세부과제에서는 고농도 동물세포 배양을 이용한 뉴캐슬병 백신의 최적 생산 전략을 개발하였고, 제2세부과제에서는 뉴캐슬병 백신의 대량 생산을 위한 자동화 공정 및 scale-up 전략을 확립하였다.

이를 위해 협동과제에서는 세포주 및 바이러스주 확립, 세포주 개량 및 우수 세포주 선발, 재조합 세포주 개발 및 Super 세포주 선발 등을 수행하였고, 제1세부과제에서는 고농도 동물세포 배양 시스템 구축 및 운전 전략 확립, 고생산성 뉴캐슬병 백신 생산 시스템 구축 및 운전 전략 확립, 고농도 동물세포 배양 및 뉴캐슬병 백신 생산 공정 최적화 등을 수행하였고, 제2세부과제에서는 생물반응기에서의 고농도 동물세포 배양을 위한 scale-up 전략 확립 및 뉴캐슬병 백신 대량 생산을 위한 배양공정의 자동 계측/제어 기술 확립, 고농도 동물세포 배양 및 뉴캐슬병 백신 대량생산 공정 확립 등을 수행하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

ND 바이러스 백신 생산에 적합한 세포주 개발에서는 primary Chick fibroblast와 이들의 transformant 들 그리고 다양한 cell line들에 대하여 ND 백신의 생산성을 비교 검토하였으며, 최적 세포주의 배양 조건을 검토하였다. ND 백신의 생산에 적합한 세포주 확보를 위하여 다양한 동물 세포주를 세포주 기탁기관들로부터 확보하였다. 또한 Chick 수정란으로부터 Primary 세포주를 확보하였으며, 형질 전환을 이용하여 세포주를 개량하였다. 확보된 세포주들의 배양 특성을 비교 조사하였으며 백신 생산성을 검토한 결과 DF-1과 MDBK 세포주가 가장 우수하였다. 또한 Primary fibroblast를 PMA를 이용하여 형질전환 하였을 때 우수한 백신 생산성을 갖는 것을 확인하였으며, Chick fibroblast를 이용한 ND 백신 생산에서 항산화제를 처리할 경우 약 20%의 생산성 증대 효과를 얻을 수 있었다. 본 연구결과는 ND 백신 생산뿐만 아니라 다양한 동물 바이러스 백신 생산에 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

동물세포를 이용하여 뉴캐슬병 바이러스를 효과적으로 생산하기 위해서는 고생산성의 고밀도 세포 배양 시스템의 개발이 필수불가결하다. 따라서 본 연구에서는 영양물질 소모 및 노폐물 생산 kinetics의 조사와 함께 영양물질 및 노폐물에 대한 세포성장의 민감성 조사를 통해 배지의 최적화 및 고농도 동물 세포 배양 시스템 구축을 위한 기본 전략을 확립하였다. 생물반응기에서 고정화 세포배양 시스템을 확립하기 위해 최적 미립담체로 Cultispher-G를 선정하였고, 최적 미립담체 농도를 선정하였으며, 최적 고정화 방법을 제시하였고, serial propagation이 가능함을 확인하였다. 또한 세포 성장뿐만 아니라 뉴캐슬병 백신의 생산성도 저해하는 주요 인자인 암모늄 이온의 축적 문제를 해결할 수 있는 암모늄 이온 선택성 제오라이트를 이용한 고정화 흡착법을 도입함으로써 고농도 동물세포 배양 시스템의 기반을 마련하였다. 더구나 세포의 지수적 성장 후 세포의 사멸(apoptosis)이 증가하는 현상은 동물세포의 고농도 배양을 방해하는 결정적 인자이므로 본 연구에서는 세포 사멸인자 3종을 선별하여 동물세포배양시스템에 첨가함으로써 세포 사멸을 방지하는 새로운 고농도 세포배양시스템을 제시하였다.

동물세포를 이용하여 뉴캐슬병 바이러스를 효과적으로 생산하기 위해서는 우선 고생산성의 고밀도 세포 배양 시스템의 개발과 함께 고 생산성 뉴캐슬병 백신 생산 시스템 구축 및 운전 전략의 확립이 필수 불가결하다. 따라서 확립된 고밀도 세포 배양 시스템을 바탕으로, 백신생산 동안 영양물질 소모 및 노폐물 생산 kinetics 조사, 최적 serum 농도 조사 및 배지 무교환 조건 등을 통해 백신 생산배지를 최적화하였으며, 최적 pH, 최적 MOI, 감염시기, 추수시기 등의 최적 생산 조건을 확립하였고, 또한 생산성 향상을 위해 DEAE-dextran, ascorbic acid, poly-L-lysin, CaCl₂ 등의 첨가제를 최적화하였다. 한편 3종의 세포사멸억제제 후보물질이 백신 생산에 미치는 영향을 조사함으로써 세포사멸억제제의 백신생산 시스템으로의 응용가능성을 조사하였고, 암모늄 이온의 백신 생산에 대한 영향 조사와 고정화 흡착제의 적용 가능성 조사 등을 통해 미립담체 및 고정화 흡착제를 이용한 바이러스 생산 시스템을 확립하였으며, 확립된 시스템에서의 생산성 향상을 위해 유가식 배양을 도입하였다. 또한 고농도 세포배양과 백신 생산을 결합한 유가식배양 공정 개발을 통하여 백신의 생산성을 100배 향상 시켰다. 이러한 여러 가지 기초 연구를 통해 bioreactor를 기반으로 하는 최적 백신생산 시스템을 구축하고 이러한 시스템을 위한 최적 운전 전략을 확립하였다.

구축된 bioreactor를 기반으로 하는 세포배양 및 백신 생산 시스템과 자동화 시스템의 통합 및 scale-up을 위하여, 우선 MOI, infection time, harvest time 등의 백신생산 관련 운전변수를 최적화하였으며, 제2세부에서 확립된 자동화 시스템을 이용하여 고농도 동물세포 배양 공정과 백신 생산 공정이 병합된 유가식 생물반응기 시스템을 구축하였다. 이들을 바탕으로 협동과제에서 선정된 세포주를 이용하여 구축된 생물반응기 시스템에서 생산함으로써 확립된 시스템에서의 ND백신의 생산성을 조사한 결과 9×10^{10} pfu/ml 정도의 획기적인 백신 생산성을 얻을 수 있었다.

생물반응기에서의 배양을 위한 기초실험으로 T-flask와 spinner flask에서 기초배양 조건을 조사했으며, 이 결과를 토대로 생물반응기의 운전 전략을 확립하였다. T-flask와 spinner flask에서의 배양 결과,

배양 중 용존산소의 부족 현상과 pH의 감소가 세포 성장에 심각한 부정적인 요인이 관찰되었다. 따라서 이러한 저해 요인들을 극복하기 위하여 pH와 용존산소를 정밀 조절할 수 있는 동물세포 배양기를 자체 설계·제작하여 사용하였다.

생물반응기 내의 용존산소량이 세포 성장에 미치는 효과와 효율적인 산소 전달을 위해 배양액 내에 정밀한 microsparger를 설치하여, 적은 양의 직접 공급된 공기에 의해 배양액내의 용존산소를 정밀 조절하는 전략을 개발하였다. 한편 microsparging aeration의 경우, 생성된 미세한 공기방울이 터짐으로써 세포 성장에 부정적인 영향을 미칠 수 있으므로, 이러한 현상을 극복하기 위해 동물세포배양기 내에 다공성의 실리콘튜브 또는 PTFE polymer 튜브를 설치하여 용존산소를 공기방울 없이 공급하는 방법을 설계하였다. 또한 세포배양기의 scale-up시 가장 중요한 산소전달계수 (k_La) 측정을 위해 용존산소의 물질수지식을 이용하는 dynamic method에 대해 실험방법을 확립하였으며, 상기에서 언급한 다양한 공기전달 방법에 대해 실제로 k_La 값을 온라인 상에서 측정하여 용존산소 공급의 효율성을 비교 검토하는 방법을 완성하였다. 이와 함께 배양공정 데이터 수집 및 분석을 위해 컴퓨터 프로그램을 완성하였으며, 이를 기초로 배양공정 자동제어시스템을 설계하여 동물세포의 대사특성을 조사하였다. 특히 동물세포 성장과 관련된 변수 (즉 specific oxygen uptake rate, oxygen uptake rate, cell concentration 등)에 대한 온라인 측정을 통해 세포농도를 컴퓨터상에서 자동 추정하였으며, 이를 위해 가장 적합한 제어방법을 확립하였다.

본 실험 결과 microsparging aeration system과 항거품제를 함께 이용함으로써, 소량으로 기체산소를 지속적으로 공급하여도 공정상에서 문제점이 발생하지 않는 결과를 확인하였으므로, direct microsparging에 의한 산소공급 시 사용할 수 있는 기체산소의 물질수지식과 가스분석장치에 의해 세포 배양공정 변수를 자동으로 측정하는 방법을 확립하였다. 즉 중요 배양공정 변수의 실시간 측정 및 모니터링을 위한 이론식을 확립해서, 이들 주요 공정변수들을 컴퓨터상에서 분석하고, 적시에 배양공정을 조정해 주기 위한 배양공정 계측 및 제어시스템을 확립하였다. 또한 세포배양 및 바이러스 생산을 위한 유가식배양 공정 개발 연구를 동시에 수행하였다. 유가식배양에 의한 숙주세포의 배양생리적 특성을 규명함으로써, 고농도 세포배양이 가능해졌으며 또한 ND 바이러스의 생산성이 큰 폭으로 증가됨을 확인할 수 있었다.

세포 고정화 배양의 경우, 담체 내 균일한 균체분포와 담체내로의 기질 (글루코스 및 글루타민) 공급이 효율적으로 이루어지기 위해서는 수학적 모델링과 제어기법, 아울러 불균일 시스템의 특성을 나타내는 효율인자와 담체 중심에서의 기질농도 등에 대한 정밀한 계산이 필수적이다. 이를 위해 고정화 Vero 세포배양의 kinetics data를 바탕으로, 물질수지에 의거한 미분방정식을 도입하여 효율인자, Thiele modulus 및 담체내의 기질구배 등을 구할 수 있었다. 특히 확산계수, 담체의 균체부하량 (cell loading) 등이 효율인자 및 담체 중심의 기질농도에 미치는 영향을 예측하여, 다양한 동물세포 배양 모델에 적용하였으며, modelling 및 simulation 연구에 의해 회분식배양, 반복회분식배양, 유가식배양 및 perfusion 배양공정의 최적화에 필요한 중요한 요인들을 분석할 수 있었다.

결론적으로 본 연구에서 확립된 자동화 고정화 생물반응기에서 고농도 동물세포배양을 통한 최적 ND 백신 생산 시스템은 기존의 수정란에 의한 뉴캐슬병 백신 생산 방법 보다 효율적이고 경제적이며 환경문제가 적은 새로운 뉴캐슬병 백신의 생산 방법으로, 이 시스템의 확립을 위한 핵심 요소 기술 및 scale-up 기술은 ND 백신뿐만 아니라 다양한 동물 또는 인간 바이러스 백신의 생산에 활용될 수 있다. 또한 본 연구에 의해 축적된 자동화 고농도 동물세포배양 공정의 know-how는 동물백신 이외에도 기존 동물세포 배양에 의해 생산되고 있는 인간 백신 및 단일클론항체, 치료용 단백질 등의 고부가가치 유용 생물약품들의 국내 개발에도 적용이 되어서 가격 경쟁력 확보가 가능하며 이들 제품군들의 국내 생산을 앞당길 수 있다. 본 연구에서 확립한 기술은 참여 기업체에 기술이전 한 후에 안정성 검사 및 현장 실험을 거쳐서GMP 시설을 갖춘 제3의 산업체와 공동으로 산업화 시켜나갈 예정이다.

Summary

Newcastle disease virus (ND) vaccine has been produced by fertilized SPF chick embryos. The conventional production method has several problems like labour-intensive process, impossibility of automation, and the disposal of used eggs. A new production method using animal cell culture could be one of the promising alternatives to overcome these problems, so the development of an industrial ND vaccine production system employing animal cell bioreactor is keenly required. The development of highly productive host cell lines, the establishment of an optimized ND production strategy through high density animal cell culture, and the development of automatized and scaled-up bioreactor system are necessary in order to accomplish substantial reduction in production cost through development of a novel ND vaccine production system based on animal cell bioreactor.

In this work, cell lines were developed to be used for the production of ND vaccine. Primary chick fibroblasts and their transformants, and various mammalian cell lines were tested for their ND vaccine productivity. The optimization of the cell culture process was also investigated. Mammalian cell lines were obtained from various type culture collections. Primary fibroblasts were prepared from chick embryos. Transformation of the primary cells were carried out by mutagens. Finally, DF-1 and MDBK cells were selected as the most useful cell lines. Transformants from the primary fibroblasts were also a recommendable cells for the production of ND vaccine. Anti-oxidants increased the vaccine productivity 20%. The cell lines and results obtained in this work could be used in the production of other various vaccines.

The development of a high density cell culture system with high productivity is prerequisite to the efficient production of New Castle's Disease Vaccine (NDV) using animal cells. Therefore this study set up a basic strategy for the development of optimized media and a high density cell culture system through the investigation of the kinetics and cell growth sensitivities of nutrients and waste byproducts. In order to establish immobilized cell culture in a bioreactor system, Cultispher-G was selected as a optimum microcarrier, optimum microcarrier concentration was determined, optimal cell immobilization method was suggested, and the feasibility of serial propagation was verified. Ammonia was identified as a key component which inhibited both cell growth and NDV production. Thus, a high density cell culture system was devised by introducing a immobilized adsorbent system using ammonium ion selective zeolite which reduced ammonia accumulation problem. Furthermore, three apoptosis inhibitors were screened out because the increase of apoptosis after exponential growth of cells is a key factor preventing from high density cell culture, and a novel high density cell culture system employing these apoptosis inhibitors was suggested.

The efficient production of New Castle's Disease Vaccine (NDV) also requires the development of a highly productive NDV production system and its optimum operating strategy as well as the development of high density cell culture system. Therefore the production medium was optimized through the studies of nutrient consumption kinetics and waste production kinetics, optimum serum concentration, and media-replacement-free condition. The optimum operation conditions including pH, MOI, infection time, and harvest time were also determined, and the additives such as DEAE-dextran, ascorbic acid, poly-L-lysine, CaCl_2 were optimized for the enhancement of productivity. The applicability of apoptosis inhibitors to vaccine production system was examined through the studies of the effects of three apoptosis inhibitors on virus propagation. Besides, a novel

virus production system employing immobilized adsorbents and microcarriers was devised based on the study of the effect of ammonium ion on virus production and applicability of immobilized adsorbents, and fed-batch operation mode was introduced to the developed system for the productivity improvement. In addition to that, the ND vaccine productivity was increased by 100 times through the development of a novel system combining a fed-batch high density cell culture system and a fed-batch vaccine production system. An optimum vaccine production system based on bioreactor and its optimum operation strategies were established through the various basic studies mentioned above.

Prior to the integration and scale up of cell culture system, vaccine production system, and automation system, operation variables of vaccine production such as MOI, infection time, harvest time were optimized based on bioreactor system. And a scaled-up bioreactor system incorporating not only high density culture system and vaccine production system but also fed-batch and automation was developed. ND vaccine was produced in a developed system employing cell lines selected by cooperative team(Korea University), and it was possible to achieve the considerably high titer of 9×10^{10} pfu/ml.

Efficient aeration systems using porous silicone tubing or PTFE polymer tubing were designed for supplying dissolved oxygen into the cell culture medium without formation of excess forms. Experimental method for measuring oxygen mass transfer rate ($k_L a$), the most important factor in the scale-up process was established by applying mass balance for the dissolved oxygen in the bioreactor (i.e. dynamic method), and then various aeration systems were compared for their oxygen-supplying efficiency through on-line measurement of the intrinsic value of $k_L a$. For data acquisition and analysis in the Vero cell cultures, automatic computer-controlled cell culture process was developed, thus enabling on-line estimation of the important cultivation parameters such as oxygen uptake rate and cell concentration. Notably a special antifoam agent was found to efficiently eliminate viscous forms generated when dissolved oxygen was continuously supplied with direct microsparging aeration system. This results made it possible to directly estimate valuable cells' physiological features during the Vero cell culture by applying a theory of gaseous oxygen mass balance and installing vent gas analyzer. In parallel, an efficient fed-batch culture process was developed for mass production of Vero cells, leading to highly enhanced titre of ND virus. Finally, based on kinetic growth data of the immobilized Vero cells, effectiveness factor, Thiele modulus and concentration profiles of carbon and energy sources (glucose and glutamine) inside a microcarrier were estimated. These process parameters were then successfully utilized for modelling and simulation studies for the optimization of various cell culture modes such as batch, repeated fed-batch, fed-batch and perfusion operation processes.

In conclusion, the ND production system developed in this study based on high density animal cell culture in a bioreactor is a novel production method which is more efficient and environmentally friendly than conventional methods. And key technologies and know-hows accumulated during the development of the ND production system could be applied to the production of other animal or human vaccines.

목 차

제1장 연구개발과제의 개요	12
1절 연구개발의 필요성	12
2절 연구개발의 목적 및 범위	16
제 2장 국내외 기술 개발 현황	19
1. 동물백신의 현황	19
2. 모델 시스템으로서 뉴캐슬병 바이러스 백신 현황	20
3. 동물세포를 이용한 백신 생산의 연구 현황	20
4. 동물세포를 이용한 자동화된 scale-up 백신 생산 공정의 현황	21
제 3장 연구개발 수행 내용 및 결과	23
1절 협동과제: 뉴캐슬병 백신의 효율적 생산을 위한 고생산성 동물세포주의 개발	23
1. 세포주 기탁 기관으로부터 동물세포주 확보	23
2. 수정란으로부터 primary 세포주 확보	31
3. 뉴캐슬병 백신용 바이러스주 확보	35
4. 확보된 세포주들의 ND 백신 생산능 조사	36
5. 형질전환을 이용한 세포주의 개량	37
6. 형질전환 세포주의 ND 백신 생산성 조사	41
7. 우수 형질전환 세포주 선별	44
8. 선별된 세포주 특성조사	45
9. 우수 세포주의 다양한 동물백신 생산성 조사	48
10. 세포 대사조절을 통한 우수 재조합 세포주 개발	49
11. 재조합 세포주의 백신 생산성 조사	54
12. 최우수 뉴캐슬병 백신 생산 세포주 선발	54
13. 최우수 세포주 Characterization 및 형질전환을 이용한 세포주의 개량	57
2절 제1 세부: 고농도 동물세포 배양을 이용한 뉴캐슬병 백신의 최적 생산 전략 개발	59
1. 연구수행방법	59
2. 연구수행내용	61
1) 1차년도 연구 개요	61
2) 영양물질의 세포 성장에 대한 민감성 조사	61
3) 노폐물의 세포 성장에 대한 민감성 조사	64
4) 노폐물의 뉴캐슬병 백신의 생산에 대한 민감성 조사	64
5) 암모늄 이온의 동시제거를 위한 고정화 흡착제의 개발	65
6) 고농도 배양 시스템에의 응용을 위한 최적 고정화 흡착제 선정	66
7) 세포사멸 방지제의 첨가에 의한 고농도 세포배양 시스템 확립	67
8) 최적 미립담체 선정 및 고정화 방법의 최적화	69
9) 2차년도 연구 내용 개요	71
10) 고농도 동물세포 배양시스템 구축을 위한 최적 세포사멸억제제의 선정	71
11) 백신 생산의 기초 조건의 확립	76
12) 백신 생산성 향상을 위한 첨가제 최적화	77
13) 암모늄 이온이 백신 생산성에 미치는 영향 조사	78
14) 미립담체 동물세포 배양 및 고정화 흡착제를 이용한 바이러스 생산	78
15) 유가식 배양과 고정화 흡착제를 이용한 바이러스 생산	79

16) 고농도 세포배양과 백신 생산을 결합한 유가식배양 공정 개발	82
17) 3차년도 연구내용 개요	85
18) 운전 변수의 최적화 및 설계인자 도출	85
19) 유가식 시스템 개발 및 고농도 동물세포 배양 공정과 백신 생산 공정의 병합	90
20) 생산 백신 안정성 검사 및 현장 실험	93
3절 제2 세부: 뉴캐슬병 백신의 대량 생산을 위한 자동화 공정 개발 및 scale-up	94
1. 연구수행 방법	94
2. 연구수행 내용 및 결과	97
1) T-flask를 이용한 뉴캐슬병 바이러스 최적 배양 조건 조사	97
2) Spinner flask에서 회전속도가 고정상세포의 성장에 미치는 영향	97
3) 생물반응기에서 용존산소 조절을 통한 세포배양	99
4) 동물세포배양의 scale-up시 가장 중요한 변수인 산소전달계수(k_La) 측정법 확립	101
5) 컴퓨터를 이용한 동물세포 배양공정 계측 및 제어 시스템 구축	106
6) 다양한 산소공급시스템에 따른 세포 성장 측정	108
7) 동물세포배양의 scale-up시 가장 중요한 변수인 산소전달계수 (k_La) 측정 및 배양 중 k_La 를 일정하게 유지시키는 공정 개발	108
8) 생물반응기에서 산소흡수율 (OUR)의 측정에 의한 동물세포 배양기내의 세포농도 자동 추정법 확립	112
9) 동물세포 자동화제어 배양에서 세포농도와 OUR 의 pattern 비교	115
10) 항거품제 (antifoam agent) 사용으로 인한 연속 microsparging 가능성 및 가스 분석시스템 사용 가능성 조사	120
11) Direct microsparging에 의한 산소 공급 시 기체산소의 물질수지식과 가스분석 장치에 의한 세포배양 공정변수의 자동 측정법 확립	122
12) 바이러스 생산성을 증대시키기 위한 유가식배양 공정 개발	132
13) 동물세포 배양공정의 Modelling 및 simulation	134
14) 백신생산을 위한 동물세포배양공정 자동화시스템 적용	147
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	148
1절 목표달성도	148
2절 관련분야에의 기여도	151
제5장 연구개발결과의 활용계획	152
1. 추가연구의 필요성	152
2. 타 연구에의 응용	152
3. 기업화 추진 방향	152
제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	153
1. 백신제품의 해외개발동향	153
2. 동물세포배양 기술 관련 해외기술 동향	154
3. 동물백신 관련 해외기술 동향	156
제7장 참고문헌	157

Contents

Chapter 1 Overview of research project	12
Section 1 Necessity and significance of research and development	12
Section 2 Objectives and scopes of research and development	16
Chapter 2 Trends of technology development	19
1. Trends of animal vaccines	19
2. Trends of Newcastle Disease Vaccine as a model system	20
3. Trends of vaccine production by animal cell culture	20
4. Trends of automatized and scaled-up vaccine production process	21
Chapter 3 Accomplishments and results of the research	23
Section 1 Development of high productive host cell lines for efficient production of ND Vaccine	23
1. Establishment of host cell line from cell collection institute	23
2. Establishment of primary host cell line from fertilized eggs	31
3. Establishment of viruses for ND vaccine	35
4. Investigation of ND vaccine production performance of established host cell lines	36
5. Improvement of host cell line by transformation	37
6. Investigation of ND vaccine production performance of transformed host cell lines	41
7. Screening of a transformed host cell line	44
8. Characterization of a screened cell line	45
9. Investigation of vaccine production performance of screened host cell lines	48
10. Development of recombinant host cell line through modification of cell metabolism	49
11. Investigation of vaccine production performance of recombinant host cell lines	54
12. Selection of a best ND vaccine producing cell line	54
13. Characterization of a best cell line and improvement of a cell line by transformation	57
Section 2 Development of an optimum strategy for ND vaccine production through high density cell culture	59
1. Materials and methods	59
2. Results and discussions	61
1) Summary of 1st year project	61
2) Investigation of the sensitivity of nutrients on cell growth	61
3) Investigation of the sensitivity of waste metabolites on cell growth	64
4) Investigation of the sensitivity of waste metabolites on ND virus production	64
5) Development of immobilized adsorbent for ammonia removal	65
6) Selection of an optimum immobilized adsorbent for application to high density cell culture	66
7) Establishment of high density cell culture system by adding apoptosis inhibitors	67
8) Selection of a optimum microcarrier and optimization of cell immobilization method	69
9) Summary of 2nd year project	71
10) Selection of an optimum apoptosis inhibitor for the high density cell culture system	71
11) Establishment of elementary production conditions for ND vaccine	76
12) Optimization of additives for productivity enhancement	77
13) Investigation of the effect of ammonia on vaccine productivity	78
14) Virus production using microcarrier animal cell culture and immobilized adsorbent	78
15) Virus production using fed-batch cell culture and immobilized adsorbent	79
16) Development of fed-batch system incorporated high density cell culture and virus production	82
17) Summary of 3rd year project	85

18) Optimization of operation variables and determination of design parameters	85
19) Development of scaled-up fed-batch system and incorporation of high density cell culture system and virus production system	90
20) Vaccine safety test and field test	93
Section 3 Development of an automatic process for large scale ND vaccine production and scale-up	94
1. Materials and methods	94
2. Results and discussions	97
1) Investigation of optimum culture condition of ND virus using T-flask	97
2) Effect of rotating speed of spinner flask on the immobilized cell growth rate	97
3) Cell culture in the bioreactor with dissolved oxygen control	99
4) Establishment of the measurement method of K_{La} , the most important parameter in scale-up	101
5) Establishment of instrument and control system for animal cell culture using computer	106
6) Measurement of cell growth according to various aeration system	108
7) Measurement of K_{La} , the most important parameter in scale-up and development of process maintaining constant K_{La}	108
8) Establishment of automatic cell density estimation method by measuring OUR (Oxygen Uptake Rate) in bioreactor	112
9) Comparison of cell density and OUR pattern in an automatic animal cell bioreactor	115
10) Survey of applicability of continuous microsparging system by using antifoam and of gas analyser system	120
11) Establishment of oxygen gas mass balance and automatic cell culture parameter estimation method by gas analyser	122
12) Development of fed-batch system for improvement of virus production	132
13) Modelling and simulation of animal cell culture system	134
14) Application of automatic animal cell culture system for vaccine production	147
Chapter 4 Evaluation of achievement and contribution to relative field	148
Section 1 Evaluation of achievement	148
Section 2 Evaluation of Contribution to relative field	151
Chapter 5 Plan for the application of research results	152
1. Necessity for further research and development	152
2. Application to other research field	152
3. Direction for industrialization	152
Chapter 6 Oversea technology information accumulated during the research and development	153
1. Oversea trends of vaccine	153
2. Oversea trends of animal cell culture technology	154
3. Oversea trends of animal vaccine	156
Chapter 7 References	157

제1장 연구개발과제의 개요

1절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

1) 생물공학적 고농도 동물세포 배양을 이용한 뉴캐슬병 백신의 대량 생산

- 전세계적으로 동물병으로 인해 1년에 약 1,000억 \$의 비용이 가축의 병에 의한 사망, 치료, 및 생산성 저하로 인한 손실로 집계됨. 따라서 가축 치료제와 그 예방제인 동물백신의 생산이 축산 분야에 큰 공헌을 할 것임. 이러한 가축 질병발생을 제어하기 위해 주요 전염성질환에 대한 백신이 개발되어 왔음.
- 우리 나라의 경우 생산하는 동물 백신의 종류 및 생산량이 점점 증가하고 있음에도 불구하고 아직도 대부분 동물이나 수정란에 의존하여 생산하고 있음.
- 하지만 이러한 생산 방법은 대부분 수작업에 의존하여 넓은 공간과 많은 인력이 필요하며 오염의 확률도 높아 비효율적이어서 동물 백신의 생산 단가가 높으며 이로 인해 축산 농민들에게 큰 부담이 되고 있음.
- 뉴캐슬병의 경우, 우리 나라에서 뉴캐슬병 백신의 생산을 위해서 사용되는 수정란은 수입 SPF 종란이 약 40만개, 국내 종란 300만개 정도로 막대한 양의 수정란이 사용되고 있으며 사용하고 남은 수정란의 폐기 처리 시 위생문제 및 환경 문제를 일으키고 있음.
- 따라서 기존의 수정란에 의한 뉴캐슬병 백신 생산 방법 보다 효율적이고 경제적이며 환경문제가 적은 새로운 뉴캐슬병 백신의 생산 방법의 개발이 절실히 요구됨.
- 백신의 생산 시 동물세포 배양을 이용하면 동물이나 수정란을 이용할 때보다 적은 공간, 낮은 비용, 그리고 소규모 인력으로 환경 문제 없이 쉽게 생산할 수 있기 때문에 동물세포를 이용한 백신의 생산이 기존의 문제점들을 해결할 수 있는 대안이 될 수 있음.
- 일부 백신의 경우, 수정란에 의한 생산보다 한 단계 발전된 백신 생산 기술로서 roller bottle를 사용하여 생산하고 있음. 하지만 대량 생산을 위한 scale-up시 bottle의 수를 막대하게 증가시켜야 하는 단점과 수정란이나 동물에서의 백신 생산과 마찬가지로 값비싼 노동력과 오염도의 증가로 인해 최근에는 대규모 생물반응기에서 미립담체에 의한 동물세포 배양에 의해 인간 백신을 생산하는 것이 세계적인 새로운 경향임.
- 하지만 우리 나라에서는 기술적으로 미흡하여 아직도 생물반응기를 이용하여 동물백신을 산업적으로 생산하지는 못하고 있는 실정임. 따라서 생물반응기에서 동물세포를 배양하여 뉴캐슬병 백신을 비롯한 동물백신을 산업적으로 생산할 수 있는 산업화 기술의 개발이 절실히 요구됨.

- 이러한 생물반응기에서 동물세포를 배양하여 뉴캐슬병 백신을 비롯한 동물백신을 산업적으로 생산할 수 있는 산업화 기술의 개발을 통해 생산비용의 획기적 감축을 위해서는 백신 생산을 위한 고 생산성 숙주 세포주의 개발, 고농도 동물세포 배양을 통한 최적 생산 전략 개발, 자동화 및 scale-up 공정 개발 등이 필요함. 왜냐하면 고생산성 숙주 동물세포주의 개발을 통해 단위 세포 당 생산성을 높이고, 고농도 배양을 통한 최적 생산 전략을 통해 단위 생물반응기 부피 당 생산성을 높이고 자동화를 통해 작업공간 및 노동력을 절약할 뿐 만 아니라 대형화를 통해 생산 단가를 줄일 수 있기 때문임.

2) 뉴캐슬병 백신의 효율적 생산을 위한 고생산성 동물세포주 개발의 필요성

- 동물백신의 최적 생산공정의 개발이 목적이거나 모든 동물백신을 대상으로 개발하기는 불가능하여 model system으로 뉴캐슬병 백신 생산용 세포주를 개발할 예정임.

- 뉴캐슬병(Newcastle disease)은 남극을 제외한 전세계 모든 대륙에서 발생하여 양계농가에 막대한 손실을 입히는 아주 치명적인 질병으로, 대량 사육되는 지역에서 특히 심각한 발병을 보이며, 병의 전파는 고밀도 양계, 양계장내 강제 통풍, 새의 이동, 배설물의 농경지 투기 등이 복합적으로 작용하여 촉진됨.

- 이의 통제를 위해서는 배설물과 감염된 개체를 매장 또는 소각 처리하는 것이 필요하며 감염된 지역 밖으로의 이동을 통제하는 것이 중요하며 이렇게 양계농가에 치명적인 뉴캐슬병으로 인한 손실을 줄이기 위해서는 백신예방접종이 꼭 필요함.

- 뉴캐슬병 바이러스(ND virus)는 살아 있는 숙주세포를 필요로 하는데, 세포배양을 이용하면 동물이나 수정란을 이용할 때보다 더 적은 공간, 적은 비용, 그리고 적은 인력으로 쉽게 바이러스를 생산할 수 있음에도 불구하고, 현재까지는 주로 수정란을 이용하여 백신이 생산되고 있음.

- 이러한 이유는 아직까지 적절한 백신 생산용 세포주가 개발되어 있지 않아서 수정란에 비하여 백신의 생산성이 많이 떨어지기 때문임. 그러나 수정란을 사용할 경우 노동집약적일 수밖에 없어서 많은 인력이 필요하며, 백신 생산공정의 자동화도 불가능하고, 폐기 시 심각한 공해문제를 유발함.

- 본 연구에서는 수정란을 이용한 백신 생산의 문제점 해결을 위하여 우수한 ND virus 백신 생산용 세포주를 개발하고 이를 다양한 동물백신 생산에 응용할 것임.

3) 고농도 동물세포 배양을 이용한 뉴캐슬병 백신의 최적 생산 전략 개발의 필요성

- 개발된 세포주를 이용하여 자동화되고 scale-up된 산업화 공정까지 개발하기 위해서는 그 중간 개발 단계로서 숙주 세포주의 특성을 잘 이해하여 백신의 생산성을 증가시키기 위한 다양한 기본전략을 확립하고 scale-up 공정의 개발에 필요한 여러 기초 정보와 설계 자료를 도출하는 것이 필요함.

- 생물반응기 단위 부피 당 백신의 생산성을 높이기 위해서는 단위 부피당 숙주세포농도와 단위 숙주세포 당 백신 생산량을 동시에 높이는 전략이 필요하며, 또한 이들 전략을 실현할 수 있는 세포 배양 및 백신 생산 공정의 개발이 필요함.

- 따라서 최적 백신 생산 전략의 확립은 크게 세 단계로 나누어 접근할 수 있음. 첫째 단계는 단위 부피당 숙주세포농도를 높이기 위한 고농도 세포 배양 전략의 개발이고, 둘째 단계는 단위 숙주세포당 백신 생산량을 증가시키기 위한 백신 고생산 전략 개발이며, 셋째 단계는 이러한 전략을 실현 할 수 있는

세포 배양 및 백신 생산 공정의 개발과 이들 공정의 scale-up을 위한 설계 자료의 도출임.

- 첫째 고농도 세포 배양 전략의 개발에서는 선정 숙주 세포주에 대한 영양물질의 소모 속도 및 부산물에 대한 생산 속도 등의 kinetics 연구, 영양물질 및 부산물에 대한 민감도에 대한 연구 등을 바탕으로 종합적 고농도 배양 전략의 확립이 필요함. 그리고 이를 위한 최적 성장용 배지의 개발, 최적 세포 고정화 방법, 유가식 배양 및 perfusion 등의 최적 운전 방식의 개발 및 이에 따른 암모늄 이온의 저해 문제가 없는 새로운 고농도 세포 배양용 생물 반응기의 구축이 필요함.
- 둘째 동물백신 고생산 전략 개발에서는 비록 단위 숙주세포 당 백신 생산량이 세포주가 선정되면 크게 향상되지 않더라도 최적 MOI, 최적 감염시기 등 기본적인 운전 변수의 확립은 물론이고, 감염 시 영양물질 소비 속도, 부산물 생성 속도, 영양물질 및 부산물에 대한 민감도를 고려한 배지의 최적화, 유가식 등 운전 방식의 최적화 및 이에 따른 암모늄 이온의 저해 문제가 없는 새로운 바이러스 생산용 생물 반응기의 구축이 필요함.
- 셋째 단계는 system integration으로 각각 개발된 세포 배양공정과 백신 생산 공정을 통합한 백신 생산 공정을 개발하고 이 공정의 운전 변수의 최적화를 통하여 공정 scale-up을 위한 설계 자료의 도출이 궁극적으로 산업화된 scale-up 공정의 개발에 필요함.

4) 뉴캐슬병 백신의 대량 생산을 위한 자동화 공정 및 scale-up 공정 개발의 필요성

- 동물백신의 효율적 대량생산을 위해서는 생산세포주인 동물세포를 경제적으로 대량으로 배양할 수 있는 기술 개발이 매우 중요하며 이를 위해서는 대규모로 배양하고자 하는 동물세포의 배양생리학적 특성을 잘 파악하여야 함.
- 생물반응기를 이용한 동물세포 대량배양 과정에서 우선적으로 고려할 점은 반응기 내에서 매우 빠른 성장률 (specific growth rate)과 안정성을 나타내는 동물세포주 및 배양환경을 개발하도록 타 과제 팀과의 긴밀하고 유기적인 협조가 필수적임.
- 타 세부과제 팀에서 개발한 가능성 있는 생산 세포주들을 scale-up된 생물반응기 수준에서 세포성장 및 동물백신의 생산성을 검증하기 위해서는 효과적인 생물반응기의 설계 및 자동화 공정 제어기술이 확립되어야 함.
- 궁극적으로 동물백신의 고농도 생산을 극대화하기 위해서는 선별된 동물세포주를 가능한 단시간 내에 생물반응기 내에서 고농도로 배양해야 하므로, 생물반응기를 이용한 동물세포배양 공정의 자동화 및 배양 환경의 최적화에 대한 연구가 반드시 이루어져야 함.
- 동물세포 배양공정의 scale-up시 배양액 내에 충분한 산소를 전달하기 위한 생물반응기 운전조건을 확립하는 것이 가장 중요한 요소임. 세포벽이 없는 동물세포는 기계적 교반에 의한 전단응력에 의해 쉽게 손상받게 되므로 교반 시 정밀한 조절이 필요하며, 공기를 직접 배양액 내로 주입시킬 경우 거품발생 현상 때문에 통기량의 조절도 매우 중요함. 따라서 고농도 동물세포 배양 시 높은 산소요구량에도 불구하고 배양액 내로의 제한된 산소 공급능력으로 인한 산소전달 문제는 산업화를 위한 scale-up 과정에서 항상 큰 문제점으로 지적되고 있음.
- 회분식 현탁배양에서 세포농도를 획기적으로 증가시킬 수 없는 이유는 대체로 두 가지로 생각될 수 있는데 하나는 필수 영양분이 고갈되는 경우이고 또 다른 하나는 ammonia와 lactic acid와 같은 부산물

이 생성되어 세포 성장 저해인자로 작용하기 때문임. 이러한 문제점을 극복하기 위해서는 배양기간 동안 배양액 내에 필수영양분인 glucose와 glutamine의 농도를 세포성장에 저해를 주지 않도록 정밀 조절을 통해 낮은 농도로 계속적으로 유지시키며, 새로운 배지를 연속적으로 공급할 수 있는 유가식배양법(fed-batch culture)이 반드시 개발되어야 함.

- 한편 고정상세포배양법 (microcarrier cell culture)을 개발할 경우, 생물반응기에서 부착성 세포의 배양을 가능하게 하여 최적 생산 조건의 유지 및 자동화로 인한 생산성 향상, 외부의 전단응력으로부터 세포의 보호, 그리고 tissue matrix와 비슷한 3차원적인 환경의 제공을 통한 세포의 활성 증가 등의 효과를 기대할 수 있기 때문에 자동화와 함께 이의 개발이 필요함.

2. 경제·산업적 측면

- WTO체제 이후 물밀듯이 밀려오는 외국 농수산물의 영향으로 국내 동물사육 농가의 경쟁력이 날로 약해지고 있는 실정임.

- 동물사육 농가의 어려움은 가격 경쟁력의 주요 원인인 비싼 사료 값에도 있지만 그 외에도 동물들의 전염성 질병으로 인한 도산의 염려가 늘 도사리고 있음.

- 동물사육 농가의 경쟁력을 높이기 위해서는 동물들의 질병을 예방하는 백신을 값싸게 공급하는 것이 매우 중요함.

- 우리나라 전체 동물백신의 시장은 약 400억원이며 그 중에서 닭에 특이하게 발병하는 뉴캐슬병백신의 국내 시장은 약 45억원임.

- 대규모 동물세포 배양에 의하여 백신 생산이 산업화 될 경우 생산성의 증가, 비용절감, 오염 감소 등의 공정상의 효율성으로 인하여 기존의 전통적인 roller bottles등의 생산 공정에 비해 단위부피당 생산력은 50배 이상 증가하는 것으로 발표되고 있음.

-본 연구에서는 기존의 동물세포 배양에 의한 백신 생산 공정에 비해 효율성이 획기적으로 증진된 새로운 고농도 및 대규모 자동화 백신 생산의 개발을 목표로 하고 있음. 이 새로운 공정이 개발될 경우 기존의 수정란에 의한 뉴캐슬병 백신 생산 방법보다는 생산성이 막대하게 증진될 것으로 예상됨.

- 따라서 본 연구를 통하여 기존의 동물세포 배양에 의한 백신 생산 공정보다 효율적인 새로운 고농도 및 대규모 자동화 백신 생산 공정이 개발될 경우 그 경제적인 효과는 실로 막대할 것으로 예상되며 생산비용의 절감에 따른 축산 농민에게 돌아올 부담의 절감 효과도 클 것으로 예상되어 본 동물 백신 생산 공정 기술의 개발이 절실하게 요구됨.

3. 사회·문화적 측면

-개발된 기술로 제조된 뉴캐슬병 백신을 축산 농가에 저렴하게 공급함으로써 축산업의 수익이 증대되고 이에 따른 축산업의 대외 경쟁력이 향상되어 UR에 대비할 수 있음.

- 동물세포를 이용한 뉴캐슬병 백신의 생산은 수정란에서 생산할 때 문제가 되는 산업 폐기물을 줄일 수 있는 청정공정으로 약취와 병원균의 증식 등의 환경 문제의 해결에 큰 도움을 줄 수 있음.

- 본 기술 개발로 인한 축산 농가의 수익 증대에 따른 농민들의 사기 함양과 도·농간의 위화감 해소는 사회구성원의 유대감 강화로 나타나 안정된 국가 사회를 기대할 수 있을 것임. 또한 농민의 소득 증대에 따른 지역의 균형적 발전에도 효과가 있을 것임.

- 더구나 경쟁력 있는 생산방법의 개발로 가격 경쟁력을 갖추어 동물백신의 상품화로 수출까지 연결되면 무역수지 개선 뿐 만 아니라 수출품 중 첨단제품의 비율을 늘림으로써 수출품의 첨단화 및 고부가가치화를 통한 국민의 자긍심 함양에도 큰 도움이 될 것임.

- 뉴캐슬병 백신의 상업화로 획득한 know-how는 다른 동물 백신의 생산에도 확대 적용될 수 있을 뿐 아니라 개발한 고농도 세포배양기술은 tPA, EPO등 인간 의약품의 생산에도 적용할 수 있을 것으로 판단되어 국가의 첨단 기술 발전에도 도움이 될 것임.

-따라서 본 뉴캐슬병 백신 생산 공정 기술의 개발이 절실하게 요구됨.

2절 연구개발의 목적 및 범위

1. 연구개발 목표

최종 목표: 생물공학적 고농도 동물세포 배양을 이용한 뉴캐슬병 백신의 대량 생산

- 제1세부과제:고농도 동물세포 배양을 이용한 뉴캐슬병 백신의 최적 생산 전략 개발
- 제2세부과제:뉴캐슬병 백신의 대량 생산을 위한 자동화 공정 개발 및 scale-up
- 협동과제:뉴캐슬병 백신의 효율적 생산을 위한 고생산성 동물세포주의 개발

2. 연구개발 목표, 내용 및 범위

1) 협동과제 연차별 연구개발 목표 및 내용 (고려대)

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2000)	세포주 및 바이러스주 확립	- 세포주 기탁기관으로부터 동물세포주 확보 - 수정난으로부터 Primary 세포주 확보 - 백신용 바이러스주 확보 - 확보된 세포주들의 ND 백신 생산능 조사
2차 년도 (2001)	세포주 개량 및 우수 세포주 선별	- 형질전환을 이용한 세포주의 개량 - 형질전환 세포주의 ND 백신 생산성 조사 - 우수 형질전환 세포주 선별 - 선별된 세포주 Characterization - 우수 세포주의 다양한 동물백신 생산성 조사
3차 년도 (2003)	재조합 세포주 개발 및 Super 세포주 선별	- 세포 대사조절을 통한 우수 재조합 세포주 개발 - 재조합 세포주의 백신 생산성 조사 - 최우수 뉴캐슬병 백신 생산 세포주 선별 - 최우수 세포주 Characterization

2) 제1 세부과제 연차별 연구개발 목표 및 내용 (강원대)

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발내용 및 범위
1차 년도 (2000 년)	고농도 동물세포 배양 시스템 구축 및 운전 전략 확립	<ul style="list-style-type: none"> -영양물질 소모 및 노폐물 생산 kinetics -영양물질 및 노폐물에 대한 세포 민감성 조사 -배지의 최적화 -미립담체 선정 및 최적 고정화 방법 개발 -최적 배양 조건 확립 -고농도 세포 배양 시스템 확립 -고농도 배양을 위한 최적 운전 전략 확립
2차 년도 (2001 년)	고 생산성 뉴캐슬병 백신 생산 시스템 구축 및 운전 전략 확립	<ul style="list-style-type: none"> -영양물질 소모 및 노폐물 생산 kinetics -생산 배지의 최적화 -최적 생산 조건 확립 (최적 MOI, 감염시기) -첨가제 최적화 연구 -최적 바이러스 생산 시스템 구축 -최적 운전 전략 확립
3차 년도 (2002년)	고농도 동물세포 배양 및 뉴캐슬병 백신 생산 공정 최적화	<ul style="list-style-type: none"> -고농도 동물세포 배양 공정과 백신 생산 공정의 병합 -연속식 및 유가식 시스템 개발 -운전 변수의 최적화 -설계인자 도출 -생산 백신 안정성 검사 및 현장 실험

3) 제2 세부과제 연차별 연구개발 목표 및 내용 (강원대)

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발내용 및 범위
1차 년도 (2000 년)	생물반응기에서의 고농도 동물세포 배양을 위한 scale-up 전략 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 생물반응기 scale-up 전략 확립 - 단위세포당 뉴캐슬병 백신 생산농도의 극대화를 위한 배양조건 조사. - 생산세포주의 shear sensitivity를 고려한 용존산소 자동조절 공정 확립 - 고정화세포배양에 적합한 생물반응기 탐색
2차 년도 (2001 년)	뉴캐슬병 백신 대량 생산을 위한 배양공정의 자동 계측/제어 기술 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 고정상 세포주의 대사 특성 조사 - on-line 가스분석기를 이용한 세포의 배양생리학적 특성에 대한 조사 (즉 비성장속도, 세포당 산소흡수율, 이산화탄소배출율 등) 및 뉴캐슬병 백신 생산공정에의 적용 - 생물반응기의 산소전달율의 on-line 분석을 통한 최적 배양 조건 조사 및 생물반응기 설계 - 유해 부산물 최소 배출 공정 확립
3차 년도 (2002년)	고농도 동물세포 배양 및 뉴캐슬병 백신 대량생산 공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> - on-line 가스 분석과 연계된 탄소원 제한조건의 유가식배양 공정 확립 - 고정상 세포연속배양 공정 개발 - 최적 공정운영을 위한 공정변수들의 최적 제어 기술 확립 - 전 공정의 flow sheet analysis를 통한 배양공정 scale-up

제 2장 국내외 기술 개발 현황

1. 동물백신의 현황

- 20세기에 들어서 생활수준의 향상과 더불어 적절한 위생시설, 위생관념의 고양으로 질병 발생율이 낮아졌으나 여전히 많은 종류의 풍토병이나 감염성질환의 발생을 완전히 제어할 수는 없었음. 이러한 질병발생을 제어하기 위해 주요 감염성질환에 대해 인간 및 동물백신이 개발되어 왔고 현재까지 개발되어 이용 중인 동물 백신은 표1에 정리되어 있음.

- 백신은 크게 나누어서 약독화 생균백신 (live attenuated vaccine), 사균백신 (killed vaccine), 혼합백신 (mixed vaccine)으로 크게 나눌 수 있음. 약독화 생균백신은 고온배양, 계대배양 등과 같은 방법을 이용하여 병원미생물의 면역성은 남기고 균력이나 병원성을 변화시킨 생존상태의 약독화 또는 무독화된 미생물을 이용하여 만든 것으로 인위적으로 직접 주사하거나 또는 기타의 방법으로 체내에 투여함으로써 매우 가벼운 감염상태를 발생시켜 면역을 획득하는 백신을 말함. 사균백신은 물리 화학적 또는 기타의 방법으로 병원미생물을 죽여서 제조하는데 병원미생물을 55-65℃로 30-60분간 가열처리하고, 살균이 확실하면 0.5%의 석탄산을 첨가하여 만든 것을 가열 백신이라고 함. 혼합백신은 몇 가지 종류의 백신을 용액에 부유시킨 것을 말하는데, 여러 번 접종해야 할 번잡성을 피하기 위한 목적으로 사용되며 또 각종 항원이 서로 협동작용을 나타내는 장점이 있음. 현재는 자연감염과 유사하고 백신 효과가 오래 지속되는 약독화 생균백신의 개발이 활발한 상태에 있음.

표 1. Veterinary vaccines

Vaccine	Substrate
FMDV	BHK cells, calf and pig kidney cells
Newcastle disease	Pig kidney, chick embryo cells
Marek's disease	Chick embryo
Rabies	Chick embryo and BHK cells
Pseudorabies	Pig kidney cells
Canine distemper	Dog kidney cells
Bovine diarrhea	Embryonic kidney cells
Louping illness	Primary kidney cells
Bluetongue	Sheep kidney cells
Avian influenza	Vaccinia vector
Insect. bromchitis	Vaccinia vector
Swine fever	Live attenuated virus
Fowl pox	Live attenuated virus

2. 모델 시스템으로서 뉴캐슬병 바이러스 백신 현황

- 동물백신의 최적 생산공정의 개발이 목적이거나 모든 동물백신을 대상으로 개발하기는 불가능하여 model system으로 Newcastle disease vaccine을 중심으로 세포주를 개발하였음.

- 뉴캐슬병(Newcastle disease)은 1926년에 인도, 영국, 인도네시아 등의 나라에서 최초로 보고된 병으로서 그 이후 단계별로 동남아시아, 유럽, 중동의 각국으로 전파되었으며 양계산업이 국제적으로 방대한 시장을 형성하고 대규모화하기 시작한 1970년대까지 아프리카의 남미, 북미 등이 전부 피해권대로 들어가는 등 전 세계적으로 퍼져나가게 되어 현재는 남극을 제외한 전 세계 모든 대륙에서 발생하는 질병임. 뉴캐슬병은 모든 닭에서 발생하는 질병으로, 대량 사육되는 지역에서 특히 심각한 발병을 보이며 병의 전파는 고밀도 양계, 양계장내, 강제통풍, 새의 이동, 배설물의 농경기 투기 등이 복합적으로 작용하여 촉진됨. 이의 통제를 위해서는 배설물과 감염된 개체를 매장 또는 소각하는 효과적인 처리가 필요하며 감염된 지역 밖으로 이동을 통제하는 것 또한 중요함.

- 뉴캐슬병의 병원체는 paramyxovirus(PMV)에 속하는 Newcastle disease virus(NDV)임. PMV에는 9개의 서로 다른 혈청형이 있으며, 그 중 1형과 2형이 닭에서 병을 일으킬 수 있으나 뉴캐슬병 바이러스는 모두 1형에 속함. 2형은 주로 참새류와 칠면조에서 문제가 되는 혈청형임. 우리나라에서는 1929년 닭에서 처음 보고된 후 현재까지 그 발생이 계속되고 있으며 호흡기, 소화기, 신경계의 다양한 증상, 산란율 저하와 함께 전파율과 폐사율이 높아서 양계산업의 주요 피해요인이 되고 있음. 뉴캐슬병으로 인한 치사율 및 병으로부터의 손실을 줄이기 위해서 백신이 대량으로 필요한 상태임.

- 뉴캐슬병 바이러스는 한가닥의 RNA 바이러스로 독특한 nucleocapsid 구조를 지니고 있음. Nucleocapsid protein인 L, P, NP와 envelope glycoprotein인 HN, F, M 등의 바이러스 항원물질들을 생산하는 유전자가 존재함. 이들 중 HN 항원은 숙주세포의 바이러스 수용체에 대한 부착능력을 나타내며, F 항원은 숙주 세포질 막과 융합하여 세포질 내로 NDV를 침입하게 함으로써 이들 항원물질은 뉴캐슬병의 발병과 밀접한 관계가 있으며 중화항체 생산을 유도함.

- Ribonuclease의 공격으로부터 RNA를 보호해 주는 nucleocapsid는 지름이 18nm인 helix로 유연하고 길이가 김(1000nm). Paramyxovirus는 그 모양이 매우 불규칙해서 거의 구형에서 필라멘트형까지 다양한 형태적이고 지름은 150-300nm 정도이며 표면은 짧은 spike로 덮여 있음. RNA 게놈의 분자량은 $5-7 \times 10^6$ dalton으로 알려져 있음.

- 뉴캐슬병을 예방하기 위한 백신의 종류에는 생독과 사독백신이 있으며, 생독백신에는 약독 중간형 백신 2종류가 있음. 그 중 국내에서는 약독화 생균백신만 사용되고 있으며, La Sota 백신은 면역원성이 좋은 반면 호흡기 반응이 강한 편에 속하므로 4주령 이후의 병아리에 2차 접종용으로만 사용해야 함.

- 호흡기 반응이 아주 낮고 면역원성은 높으면서 환경이나 열에 대한 저항성이 높은 백신 바이러스의 생산에 대한 연구가 필요한 상태에 있음.

3. 동물세포를 이용한 백신 생산의 연구 현황

- 동물세포배양을 이용하면 동물이나 수정란을 이용할 때보다 적은 공간, 적은 비용, 그리고 적은 인력으로 쉽게 바이러스 백신을 생산할 수 있어서 1950년대부터 시작되었음. 대부분의 동물세포들이 표면에 부착하여 증식하기 때문에 이때의 기술은 주로 roller bottle이나 Roux bottle을 이용하였음.

- 하지만 roller bottle이나 Roux bottle을 이용하는 방법도 scale-up시 bottle의 수를 증가시켜야 하는 단점과 수정란이나 동물에서의 백신생산과 마찬가지로 값비싼 노동력과 오염도의 증가로 인해 미립담체 배양(microcarrier culture)이 그후에 시작되었음. 왜냐하면 동물세포는 크게 부착성 세포와 비부착성 세포로 나눌 수 있는데 대부분의 백신 생산을 위한 숙주세포는 부착성 세포로서 세포가 자라기 위한 표면이 필요하고 이를 위한 효율적인 방법으로 미립담체가 이용되기 때문임.

- 미립담체 배양으로는 1968년 Van Wezel이 최초로 DEAE-Sephadex A-50 bead를 이용해 부착성 동물세포를 배양하였는데, 음이온 교환수지인 DEAE-Sephadex A-50의 표면을 양전기로 하전시켜 음전하의 세포막과 정전기적 인력에 의하여 세포가 잘 부착되도록 하여 미립담체 배양에 성공하였음. 이후 1979년 MIT의 Levin 등이 DEAE-Sephadex 계통의 미립담체의 표면전하량을 최적으로 조절함으로써 세포의 증식 수율을 증가시키는 등 미립담체의 개량과 배양방법의 개발에 많은 진전이 있었음.

- 담체의 종류는 크게 나누어 담체표면에만 세포가 부착되어 증식할 수 있는 비다공성 미립담체 (solid microcarrier)와 세포가 담체의 구멍조직 내에서 증식할 수 있는 다공성 미립담체 (macroporous microcarrier)로 나눌 수 있음. 현재 미립담체 동물세포 시스템을 이용하여 생산하고 있는 백신으로는 소아마비(polio), 풍진(rubella), 광견병(rabies), 유행성 감기(influenza), 구제역(foot-and-mouth disease)백신 등이 있음.

- 실제로 동물세포 시스템을 사용하여 백신을 생산할 경우 생산성의 증가, 비용절감, 다른 세포 배양 방법과 비교했을 때 오염 감소 등이 확인되었음. 그 예로 Sinsky는 미립담체 배양에서 Sindbis virus의 단위부피당 생산력은 roller bottles 보다 50배 이상 증가된 것을 관찰하였음. 또한 Von Seefried 와 Chun은 Cytodex에서 자라는 human fibroblasts (MRC-5)를 사용했을 때 소아마비 바이러스의 높은 생산성과 낮은 감염성을 보고하였음. Giard에 의해 소아마비 바이러스 유형III의 미립담체 배양 시 (6.5pfu/cell), roller bottles(4.0pfu/cell)에 비해 높은 생산성을 지닌다고 보고되었음.

- 동물 세포배양을 이용할 경우 밝혀진 장점이 있음에도 불구하고 아직까지 국내에서는 뉴캐슬병 백신 제조에 수정란을 이용하여 바이러스백신이 생산되고 있음. 하지만 바이러스와 세포간의 특이성, 바이러스 복제 검사 방법, 그리고 바이러스 복제에 영향을 미치는 물리 화학적, 생물학적 조건 등의 기초적인 연구와 함께 본 연구에서 시도한 고효율 세포주 개발, 고농도 동물세포 배양 시스템 및 고생산성 백신 생산 시스템의 개발, 그리고 이러한 시스템의 자동화 및 scale-up에 관한 일련의 연구는 국내에서도 생물반응기에서 동물세포의 대량배양을 통하여 뉴캐슬병 백신을 생산하게 하여 생산 단가를 줄임으로써 축산 농가의 부담을 줄일 수 있는 중요한 계기가 될 것임.

4. 동물세포를 이용한 자동화된 scale-up 백신 생산 공정의 현황

1) 국내동향

- 미생물을 이용한 1차대사물질 생산 또는 2차대사물질생산 발효생산기술은 현재 국제경쟁력을 확보하고 있으나, 동물세포배양 공정의 경우 scale-up 단계에 이르는 자동화공정 기술은 매우 초보적인 단계로서 체계적인 연구가 전혀 이루어지고 있지 않음.

- 특히 동물백신 생산 기술의 경우 scale-up된 동물세포배양 공정기술에 의한 국내 개발 실적은 거의 보고된 바 없으며 기술 수준도 매우 낙후되어 있음.

- 소규모 다량의 동물세포배양용 roller bottle 배양시스템을 이용한 전통적인 동물백신 생산기술은 어느 정도 경쟁력을 보유하고 있으나, 선진국형의 자동화된 동물세포반응기를 이용하는 새로운 생물공정 개발 기술은 매우 초보적인 단계임.

- 특히 대규모 동물세포배양용 생물반응기 운전기술 중 가스분석기와 같은 제어/계측기기를 응용하는 기술이 산업적으로 적용된 경우는 거의 전무하며, 산업계 자체의 이 분야에 대한 기술기반은 매우 취약한 실정임.

- 자동화된 동물세포 배양공정 및 scale-up 기술에 대한 산업계 수요는 매우 높으나 전문기술 인력의 부족, 기술개발 투자비의 부족 등으로 관련기업의 자체개발 의욕은 매우 미미한 상태임.

2) 국외 동향

-백신 생산, 또는 생물의약품 생산을 위한 대규모 동물세포배양기술은 생물산업의 know-how 및 경제성을 결정하는 가장 중요한 기술로 인식되어져 선진국에서 기술개발 노력이 매우 치열한 분야임.

- 최근에 급속도로 발달한 생물반응기 기술, 생촉매인 동물세포의 대사 생리학적 연구의 급진진, 컴퓨터 및 관련 제어/계측기기의 괄목할 만한 성장에 힘입어 동물세포배양용 생물공정 전반에 대해서도 컴퓨터 제어시스템의 도입을 통한 최적제어 기술의 개념이 활발히 추진되고 있으며, 인공지능형 공정 제어 생산기술에 대한 연구도 활발히 진행되고 있음.

- 생물반응기 조업방식에 있어서도 기존의 회분식공정 외에 막 이용기술을 도입한 동물세포배양용 생물반응기 시스템 개발, 기존의 촉매 이론에 생물공학적 개념이 첨가된 생촉매고정화 생물반응기 시스템 개발, 생산세포주주의 생리학적 특이성을 훌륭히 활용하기 위한 연속배양기 시스템 개발에 대한 산업적 연구가 활발히 추진되고 있음.

제 3장 연구개발 수행 내용 및 결과

1절 협동과제: 뉴캐슬병 백신의 효율적 생산을 위한 고생산성 동물세포 주의 개발 (고려대 김익환교수)

1. 세포주 기탁 기관으로부터 동물세포주 확보

Table 1.1. ND 바이러스 백신의 생산을 위해 확보된 동물세포주

Cell Line	Organism / Tissue	Culture Medium
BHK-21	Hamster / Kidney	MEM Eagle, 10% serum
LLC-PK1	Swine / Kidney	DMEM, 5% serum
MDBK	Bovine / Kidney	MEM Eagle, 10% serum
PC-12	Rat / Pheochromocytoma	RPMI 1640, 10% serum
SL-29	Chicken / embryo	MEM Eagle, 5% serum
Vero	Monkey / Kidney	MEM Eagle, 10% serum

뉴캐슬병(Newcastle Disease; ND)은 ND 바이러스에 의해 발생하는 닭의 급성 전염병으로 1927년도에 국내 최초 발생이 보고된 이래로 오늘날까지 지속적으로 발생이 계속되고 있는 제1종 법정전염병이다. ND 바이러스는 살아 있는 숙주세포를 필요로 하기 때문에, 이의 백신을 생산하기 위해서 수정란이 사용되어왔다. 그런데 수정란을 사용할 경우, 백신 생산 산업은 노동집약적일 수밖에 없어 많은 인력이 요구되며, 생산공정의 자동화도 불가능하다. 백신 생산에 사용되는 수정란은 수입 SPF 종란이 약 40만 개, 국내 종란 300만개 정도로 막대한 양이 소모되고 있어 그의 비용도 상당하다. 수정란을 이용한 백신 생산의 문제점 해결을 위하여 동물세포배양을 이용하면 더 적은 공간, 적은 비용, 그리고 적은 인력으로 쉽게 바이러스를 생산할 수 있을 것이다. 따라서 본 연구에서는 우수한 ND 바이러스 백신 생산용 동물 세포주를 개발하고 이를 다양한 동물백신 생산에 응용하고자 한다.

본 연구에서는 현재까지 위의 **Table 1.1** 에서 보이는 동물세포주를 확보하였다. 확보된 세포주들은 **Table 1.1** 에서 보여준 적절한 배지에서 배양하여 계대하면서 유지하였다.

확보된 동물세포주들은 다음과 같은 조건에서 배양하여 각각의 세포 특성을 규명하였다. 계대하면서 유지해 오던 위의 6가지 세포들을 실험을 위해 건강한 exponential phase 시기까지 배양한 다음, 이 때의 세포들을 trypsin-EDTA를 이용하여 떼어내어 trypan blue exclusion 방법으로 cell counting을 수행한다. 특성 관찰을 위해 준비된 여러 well 중에서 각 세포주당 2 개의 well 씩 회수하여 cell counting과 pH 측정 후 여러 metabolites의 kinetics를 확인하기 위한 분석에 쓰일 시료를 채취해서 -20℃ 냉동고에 보관한다. 실험 종료 후, -20℃ 냉동고에 보관 중이던 시료를 녹여 glucose, lactate, glutamine, ammonia 등의 metabolites의 kinetics를 얻기 위한 분석을 수행한다. Ammonia의 경우 indophenol blue법을 이용한 분석법을 따랐으며, 그 외의 대사물에 대한 분석은 Yellow Springs Instruments 제품 기기인 Model 2700 biochemistry analyzer를 이용하였다.

BHK-21은 baby hamster kidney 세포이다. 이는 FMDV, Rabies, Bluetongue 바이러스 등의 다양한 바이러스 백신을 생산할 때 주로 쓰이는 세포로 알려져 있어, 본 연구에서 ND 바이러스를 생산할 동물 세포의 후보 세포로 선택하여 확보하였다. 아래의 Fig. 1.1 은 BHK-21 세포를 배양하여 exponential phase의 후반에 관찰한 세포의 사진이다.

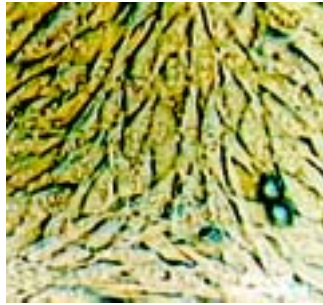


Fig.1.1 BHK-21 세포

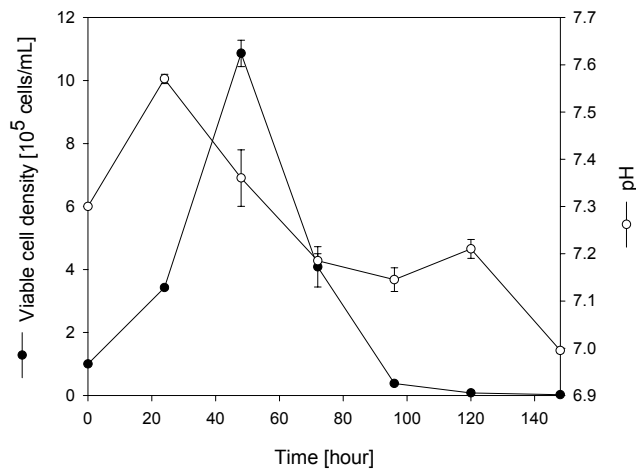


Fig.1.2 BHK-21 세포의 성장과 pH 변화

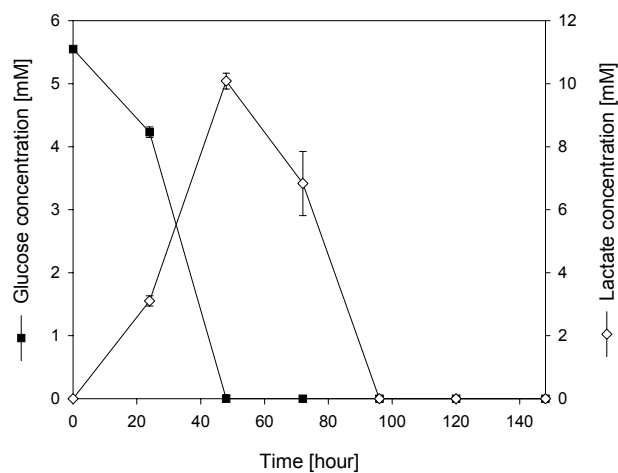


Fig.1.3 BHK-21 세포 배양 과정중의 glucose 소모와 lactate 분비 kinetics

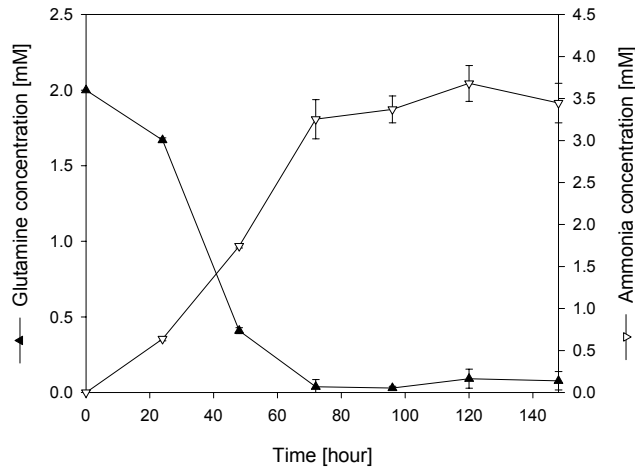


Fig.1.4 BHK-21 세포 배양 과정중의 glutamine 소모와 ammonia 분비 kinetics

Fig. 1.2 에 나타난 BHK-21 세포의 성장 곡선에 의하면 이 세포는 성장률이 매우 빠르며 그에 따른 glucose 소모가 빠르게 일어나 배지 내 glucose의 고갈을 야기하며, 이러한 glucose의 고갈은 곧바로 세포의 사멸과 이어짐을 알 수 있다. 소모된 glucose는 대사과정을 거쳐 소모된 양의 90% 이상이 lactate로 전환되어 배지로 분비됨을 Fig. 1.3 에서 확인할 수 있다. 축적된 lactate는 배양액의 pH를 저하시켜 세포의 사멸을 한층 더 가속화시킨다. 탄소원인 glucose 뿐만 아니라 질소원인 glutamine의 소모 또한 상당히 크며 그러한 소모에 따른 ammonia의 축적 또한 상당함을 Fig. 1.4 에서 알 수 있다. BHK-21은 영양분의 소모가 상당하며 그에 따른 대사 노폐물의 축적 또한 매우 큰 세포인 것으로 판단된다.

LLC-PK1은 돼지의 신장에서 유래하는 세포이다. 여러 동물백신의 생산에 이용되는 숙주를 조사해보니, ND 그리고 FMDV, pseudorabies 등의 질병과 관련된 백신 생산에서 돼지의 신장이 쓰였다는 보고가 많았다. Fig. 1.5 은 LLC-PK1의 배양 과정 중 관찰한 세포의 모양이다.

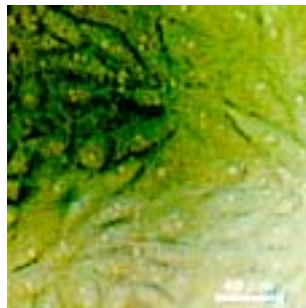


Fig.1.5 LLC-PK1 세포

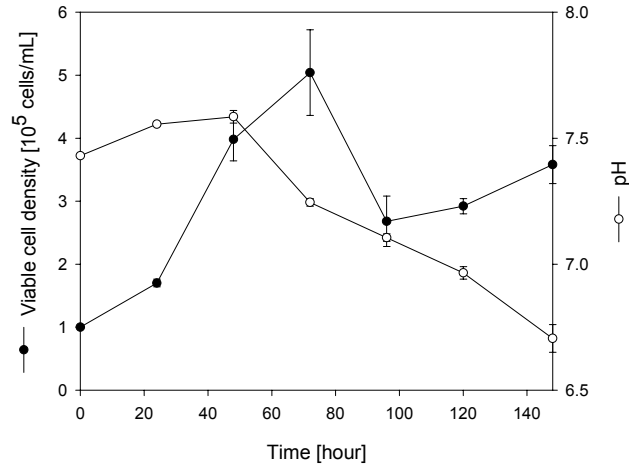


Fig.1.6 LLC-PK1 세포의 성장과 pH 변화

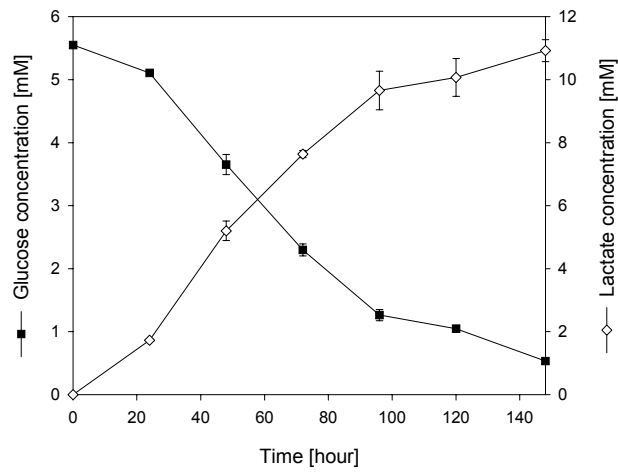


Fig.1.7 LLC-PK1 세포 배양 과정중의 glucose 소모와 lactate 분비 kinetics

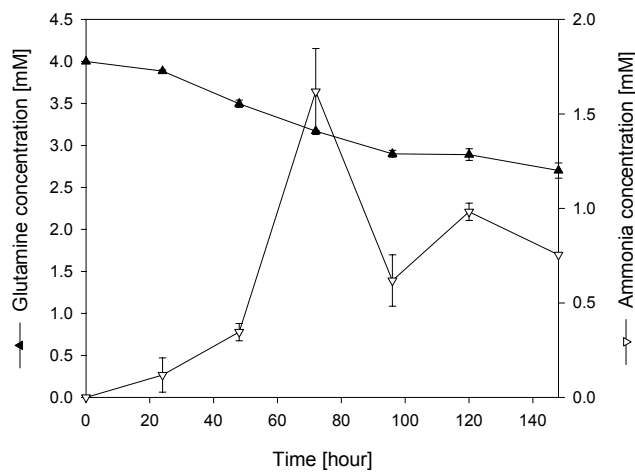


Fig.1.8 LLC-PK1 세포 배양 과정중의 glutamine소모와 ammonia 분비 kinetics

LLC-PK1의 경우 배양에 의해 얻어지는 final cell density 가 그리 크지 않았으며 (Fig. 1.6) glucose 소모 또한 서서히 일어났다 (Fig. 1.7). 게다가 glutamine의 섭취는 거의 일어나지 않았다 (Fig. 1.8). 그렇지만 느리게 발생한 glucose의 소모에도 불구하고 배양액으로의 lactate의 분비량은 다소 많았으며 그로 인한 배양액의 pH 저하는 매우 크게 나타났다.

MDBK는 소의 신장에서 유래된 세포이다. FMDV 백신 생산에 송아지의 신장 세포가 쓰였다는 보고와 함께 일본에서 ND 백신용 바이러스인 strain TCND를 생산할 때에 이 MDBK 세포를 이용하였다는 논문이 1998년에 발표된 바 있다. 이러한 사실을 기초하여 본 연구에서도 MDBK를 하나의 연구 후보로 고려하였다. 이 세포의 배양 과정에서의 모양이 Fig. 1.9 에 나타나 있다.

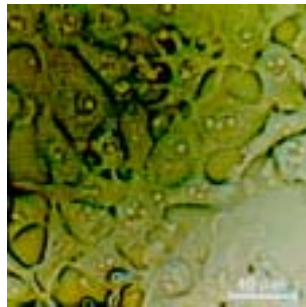


Fig.1.9 MDBK 세포

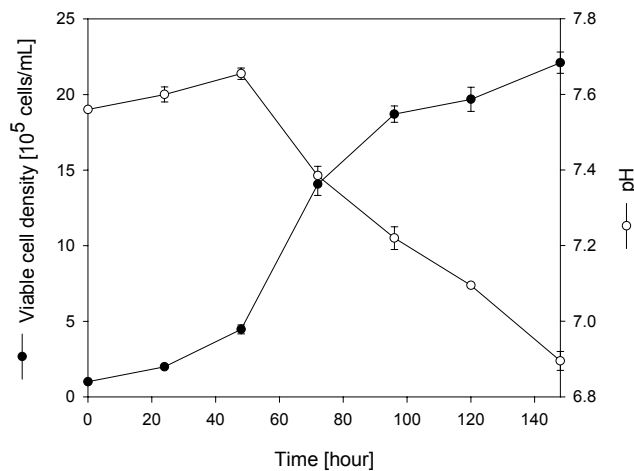


Fig.1.10 MDBK 세포의 성장과 pH 변화

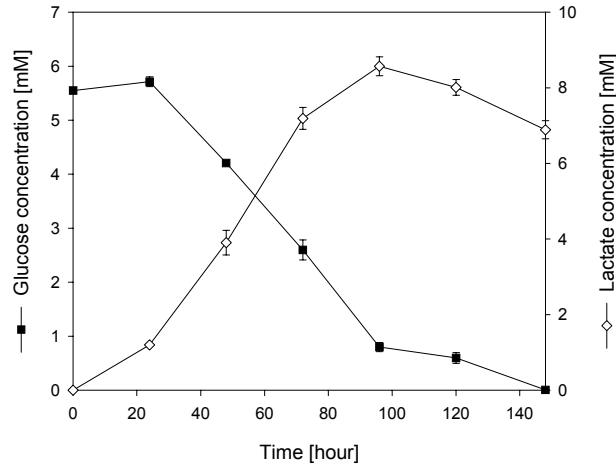


Fig.1.11 MDBK 세포 배양 과정중의 glucose소모와 lactate분비 kinetics

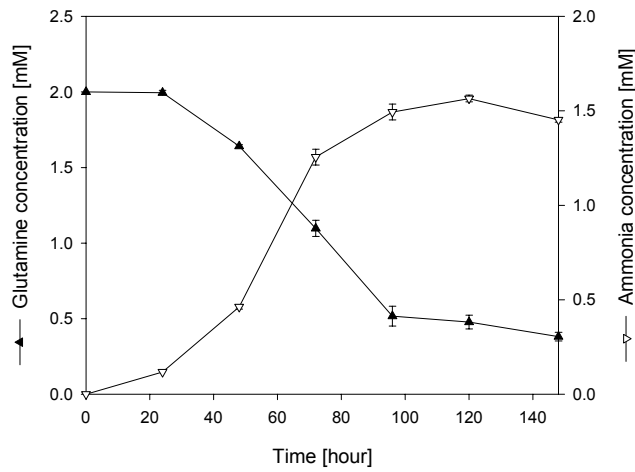


Fig.1.12 MDBK 세포 배양 과정중의 glutamine 소모와 ammonia 분비 kinetics

MDBK는 빠른 성장 (Fig. 1.10)을 보였나 그에 비해 glucose (Fig. 1.11)나 glutamine (Fig. 1.12)의 소모는 크지 않았다.

PC-12는 쥐의 pheochromocytoma로 신경의 발생과 기능을 연구하는데 주로 이용되는 세포이다. 그런데 ND 바이러스는 닭의 신경에 작용한다고 보고된 바 있다. 확보된 PC-12를 Fig. 1.13 에서 보였다.

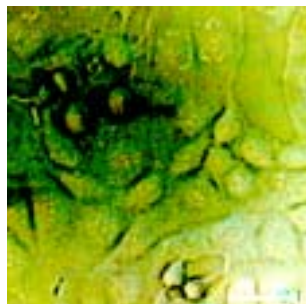


Fig.1.13 PC-12 세포

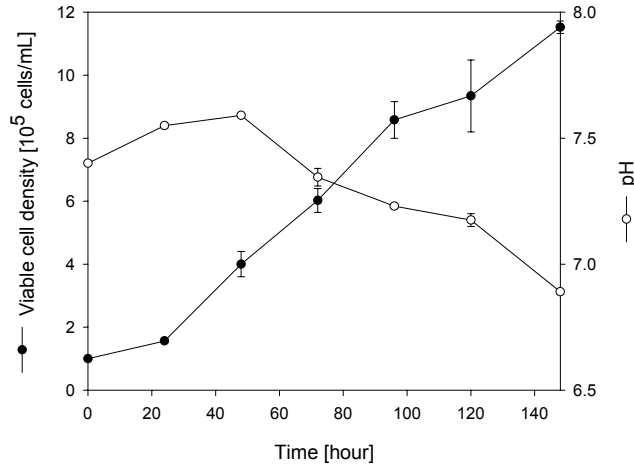


Fig.1.14 PC-12 세포의 성장과 pH 변화

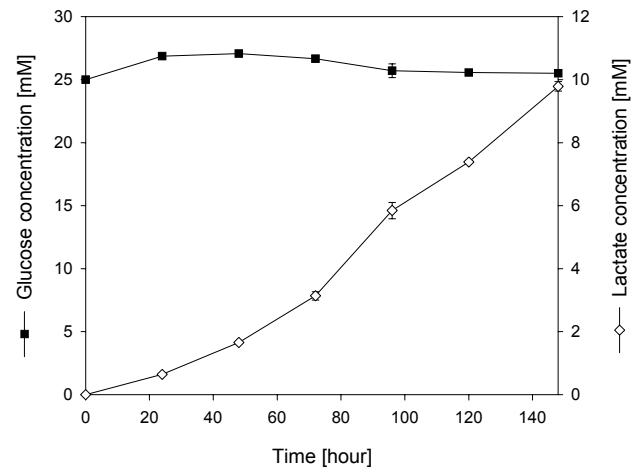


Fig.1.15 PC-12 세포 배양 과정중의 glucose 소모와 lactate 분비 kinetics

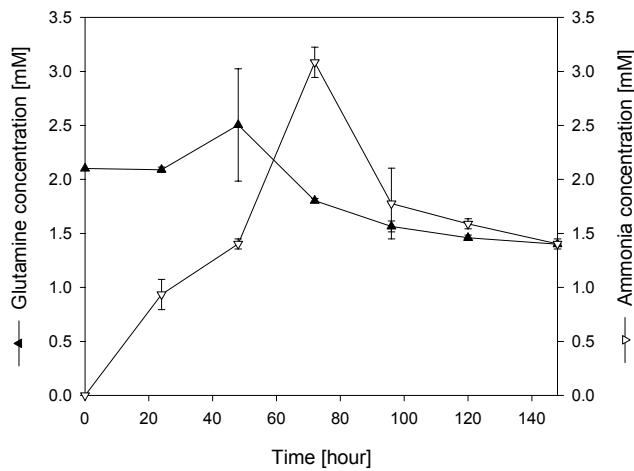


Fig.1.16 PC-12 세포 배양 과정중의 glutamine 소모와 ammonia 분비 kinetics

Glucose의 소모가 거의 관찰되지 않고 있음에도 불구하고 세포의 농도는 매우 높다 (Fig. 1.14 와 Fig. 1.15). Neuron의 특성을 보이는 세포라서 일반적인 세포의 특성과는 차이를 보이는 것이 아닌가 싶다. Glucose의 소모는 거의 없으나 배양액으로의 lactate의 분비는 5 mM 정도의 glucose가 소모되었을 때 생성되는 농도로 Fig. 1.15 에서 나타나고 있다.

ND 바이러스는 닭에 기생하기 때문에 ND 바이러스 백신의 생산에 수정란 외에도 chick embryo cells을 사용한 예가 있다. 그런데 primary로 얻는 chick embryo cells은 확보가 비교적 용이하지 않기 때문에 chick embryo 에서 유래한 continuous cells 인 **SL-29**를 확보하였다. 다음 Fig. 1.17 은 SL-29 를 보인 것이다.

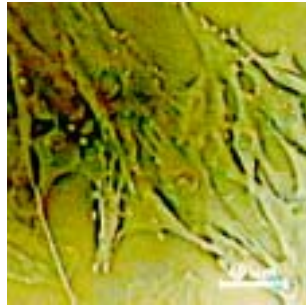


Fig.1.17 SL-29 세포

마지막으로, 기존의 바이러스 백신 생산에 주로 사용된다고 알려져 있는, Africa green monkey kidney 유래의 **Vero** 세포를 확보하였다. 세포는 Fig. 1.18 에 나타내었다.

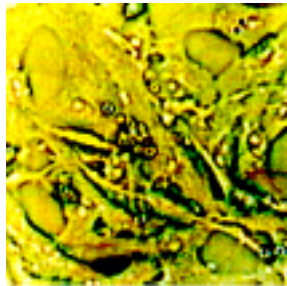


Fig.1.18 Vero 세포

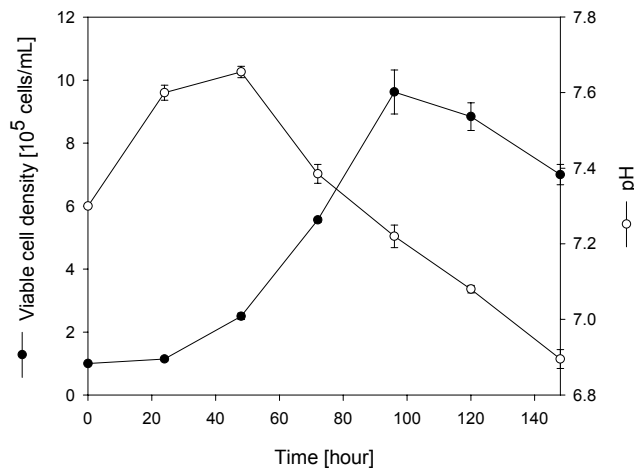


Fig.1.19 Vero 세포의 성장과 pH 변화

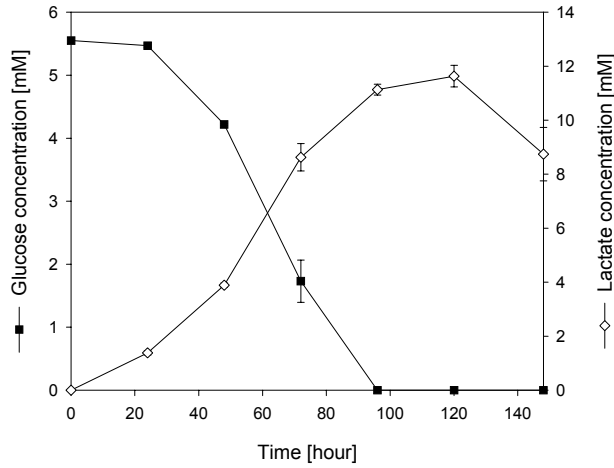


Fig.1.20 Vero 세포 배양 과정중의 glucose 소모와 lactate 분비 kinetics

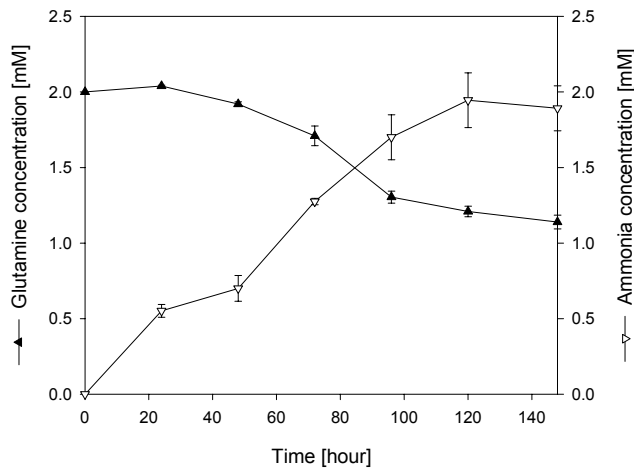


Fig.1.21 Vero 세포 배양 과정중의 glutamine 소모와 ammonia 분비 kinetics

Vero 세포는 비교적 우수한 세포 성장을 보이며 그에 따른 glucose와 glutamine의 소모가 고르게 일어남을 관찰할 수 있었다. 소모된 영양분은 대사과정을 거치면서 분해된 glucose와 glutamine의 양이 거의 대부분 lactate와 ammonia로 전환되어 배양액으로 분비되고 있다는 것을 Fig. 1.20 과 1.21에서 알 수 있었다.

2. 수정란으로부터 primary 세포주 확보

Primary cells을 얻는 방법에는 기계적인 방법과 화학적인 방법, 그리고 효소적인 방법이 있다. 본 연구에서 primary chick-embryo cells을 얻기 위해 효소적인 방법 중에서 trypsin을 이용하는 방법을 사용하고 있다.

실험방법에 따라 다양한 일령의 chick embryo로부터 primary cells을 얻었다. Embryo는 발생과정에서 각 일령에 따라 고유한 특성을 지닌다. 이에 다른 일령으로부터 얻은 primary cells은 그 특성이 각기 다를 수 있으며, 그러한 다른 특성에 의해 보다 우수한 ND 백신 생산능을 보일 수도 있다. 본 연구에서는 6일령부터 13일령에 이르는 embryo로부터 cells을 회수하였다.



6 day-embryo

10 day-embryo

세포주로 확립된 primary cells을 일령별로 나누어 각각의 세포성장과 대사 작용에 대한 kinetics를 살펴보았다. 초기 접종량은 1×10^5 cells/mL로 하였으며 하루 간격으로 관찰되었다. 6일령과 7일령 그리고 10일령의 embryo는 embryo의 부위를 구분 짓지 않고 전체로부터 cells을 얻었다. 그 결과 Fig. 1.22와 같은 세포성장 곡선과 pH 변화 결과를 얻었다.

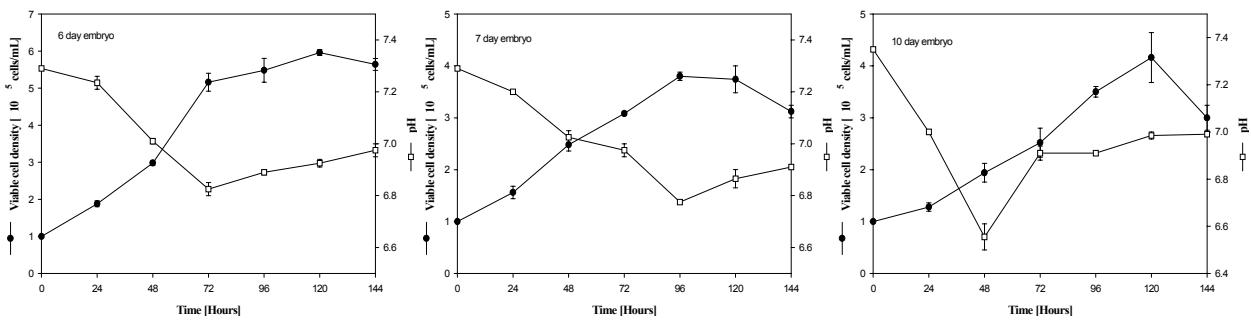
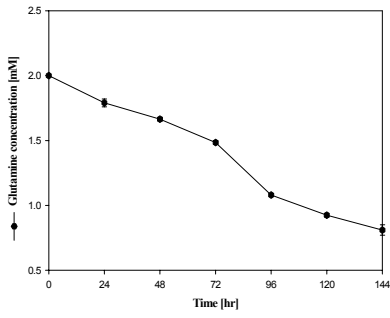
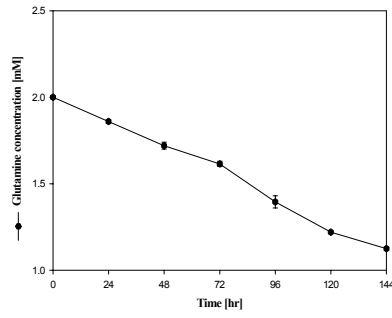


Fig.1.22. 6일, 7일, 10일령 primary chick embryo fibroblast (CFC)세포의 성장 및 pH변화.

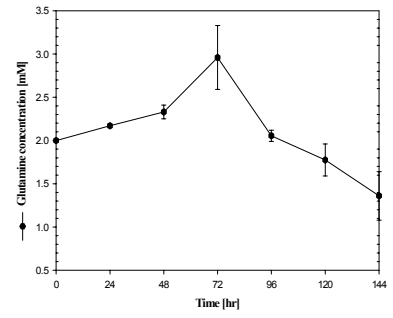
성장 경향은, 일령에 따라 큰 차이를 보이지는 않았다. 6일령의 최대 세포농도가 다른 일령의 세포농도에 비하여 다소 높게 나타났으며 그의 stationary phase가 보다 길게 유지되고 있었다. 이는 6일령 embryo 유래의 cells이 다른 일령 유래의 cells에 비하여 ND 백신 생산에 유용함을 나타낸다. 이들의 대사 결과를 Fig. 1.23에 나타내었다. Glutamine 소모 정도에서도 6일령의 CFC가 다른 일령의 CFC보다 서서히 glutamine을 소모하면서 보다 높은 농도의 cells을 얻는 것으로 보아서 6일령의 CFC가 보다 효율적인 glutamine 대사를 수행하는 것으로 사료된다. 이상의 Fig. 1.22과 1.23의 결과로부터 얻어진 6일령 CFC가 ND 백신 생산 세포주로 비교적 적합하리라 생각한다. 이에 대한 ND 백신 생산능의 확인이 필요하다. 11일령에서 13일령의 embryo는 각기 head와 body로 구분하여 그로부터 primary cells을 얻었다. 이들의 growth와 metabolite의 kinetics를 다음의 Fig. 1.24 부터 1.27에서 보았다. 각 일령의 head 유래 cells의 경우 death phase로 진행되는 것이 일반적이었으며, body로부터 얻은 cells이 연장된 stationary phase 안에서 머무는 경향이 크을 알 수 있었다. 이 두 부위 유래의 cells이 동일한 ND 백신 생산능을 갖고 있다면 head보다는 body 유래의 cells이 ND 백신 생산에 보다 유리할 것이다.



6 day embryo



7 day embryo



10 day embryo

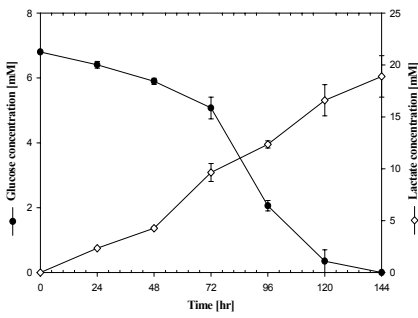
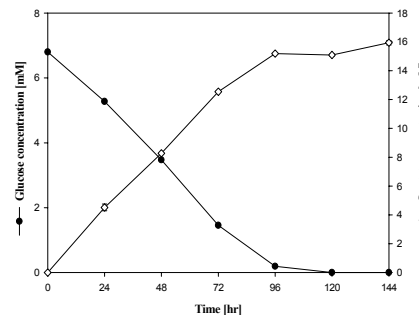
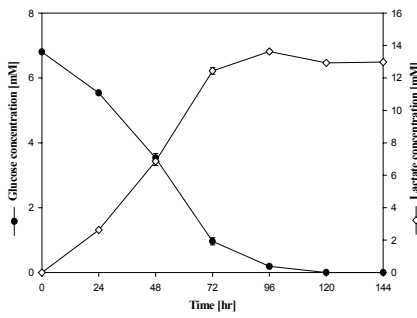
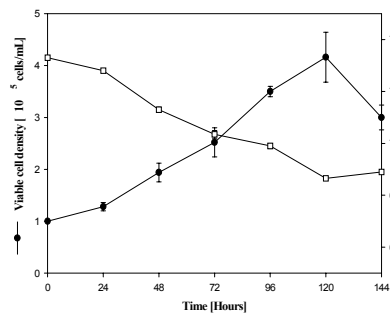
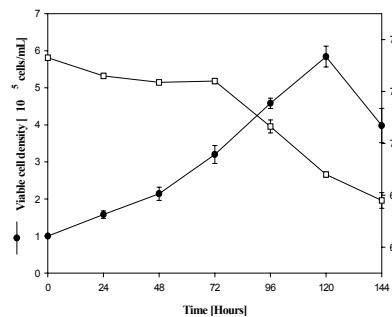


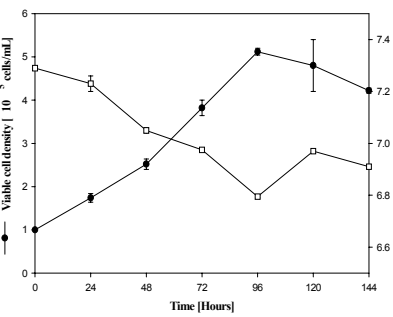
Fig. 1.23 6일, 7일, 10일령 CFC 세포의 대사 kinetics



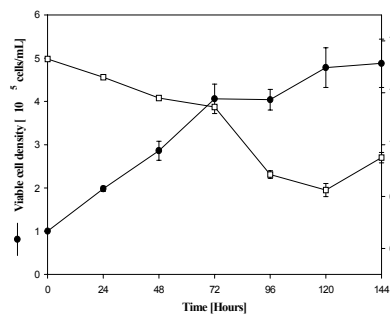
11 day-head



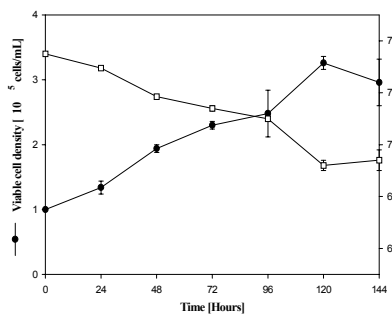
12 day-head



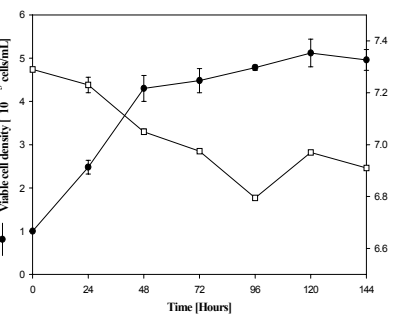
13 day-head



11 day-body

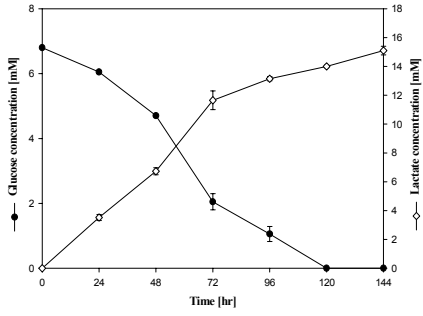


12 day-body

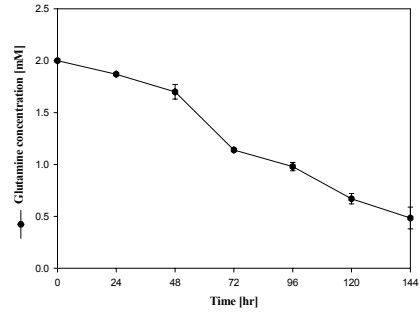


13 day-body

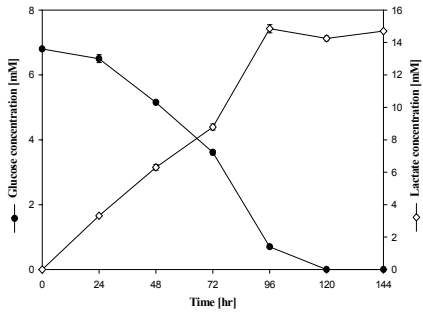
Fig.1.24. 11일, 12일, 13일령 CFC 세포의 성장 및 pH 변화



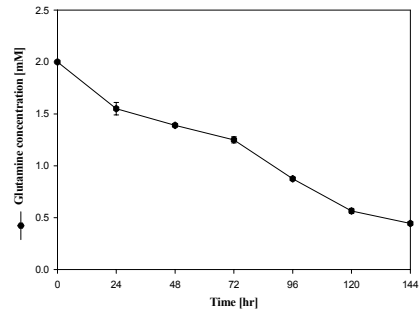
(a)



(b)

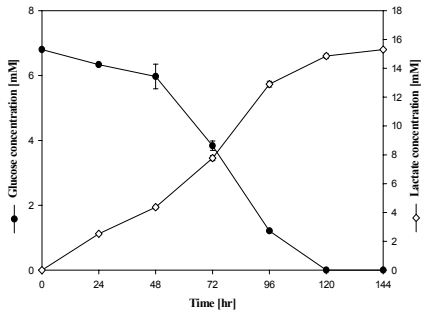


(c)

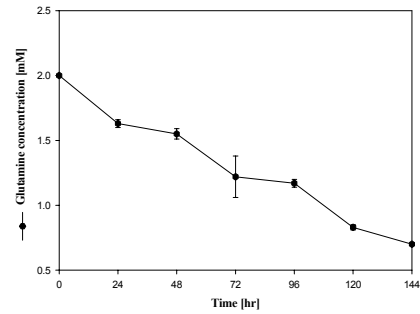


(d)

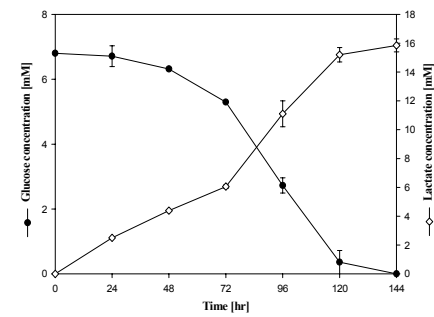
Fig.1.25 11일령 CFC 세포의 대사 kinetics: head (a, b) & body (c, d).



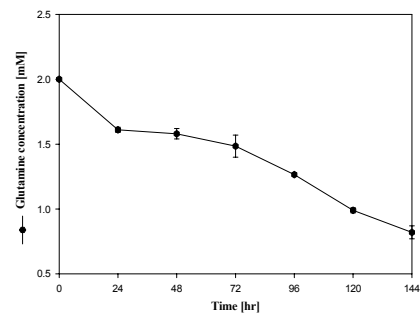
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig.1.26 12일령 CFC 세포의 대사 kinetics: head (a, b) & body (c, d)

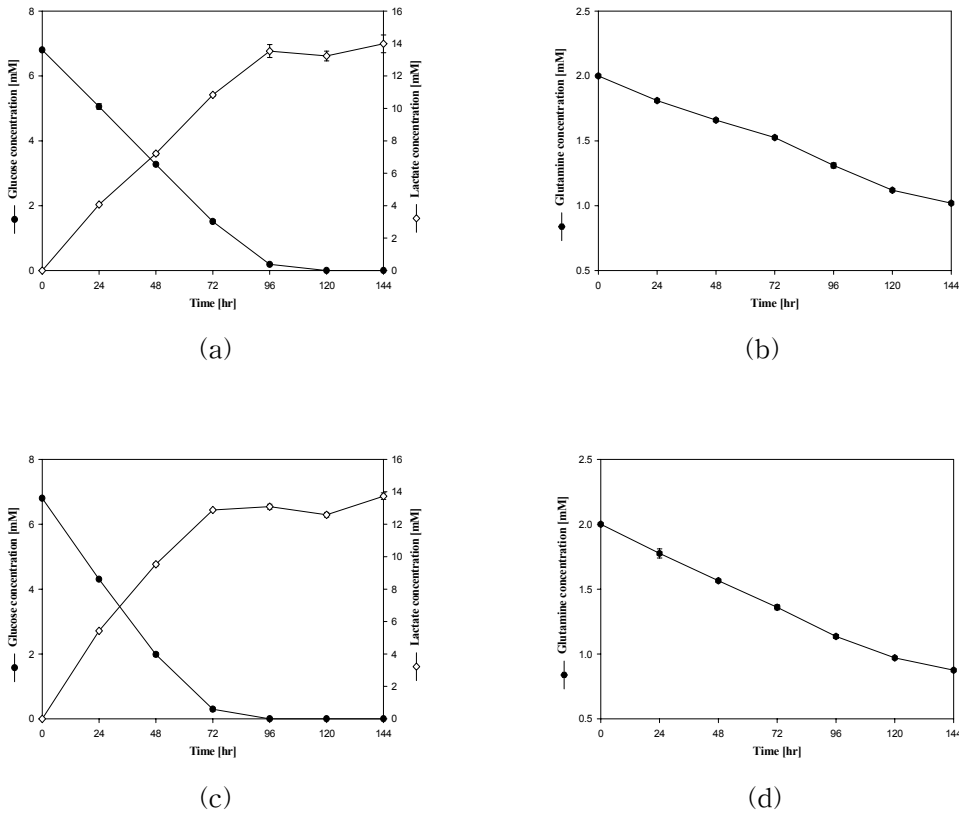


Fig. 1.27 13일령 CFC 세포의 대사 kinetics: head (a, b) & body (c, d)

3. 뉴캐슬병 백신용 바이러스주 확보

뉴캐슬병의 병원체는 paramyxovirus(PMV)에 속하는 Newcastle disease virus(NDV)이다. PMV에는 9개의 서로 다른 혈청형이 있으며, 그 중 1형과 2형이 닭에서 병을 일으킬 수 있으나 뉴캐슬병 바이러스는 모두 1형에 속한다. 뉴캐슬병 바이러스는 한가닥의 RNA 바이러스로 독특한 nucleocapsid 구조를 지니고 있다. Nucleocapsid protein인 L, P, NP와 envelope glycoprotein인 HN, F, M 등의 바이러스 항원물질들을 생산하는 유전자가 존재한다. 이들 중 HN 항원은 숙주세포의 바이러스 수용체에 대한 부착능력을 나타내며, F 항원은 숙주 세포질 막과 융합하여 세포질 내로 NDV를 침입하게 함으로써 이들 항원물질은 뉴캐슬병의 발병과 밀접한 관계가 있으며 중화항체 생산을 유도한다.

수정란으로부터 얻은 primary cells을 형질전환 시켜 ND 백신 생산에 보다 유리한 continuous cells로 유도하고자 phorbol-12 myristate 13-acetate (PMA)를 형질전환 유발 물질로 사용하였다. Cell cycle에서 PKC enzyme은 cells을 G2에서 M으로 전환하는 역할을 수행한다. PMA는 이러한 PKC의 activator로 작용하여 G2 delay를 유발한다. 이로 인해 cell cycle의 arrest에 의한 cell differentiation이 유도된다. 이러한 원리를 이용하여 PMA를 통한 primary cells의 continuous cells로의 전환을 도모하고자 하였다.

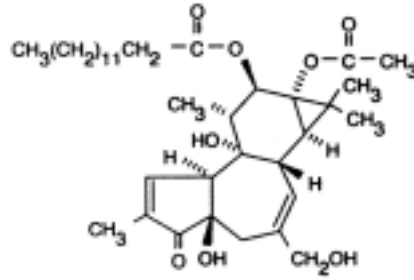
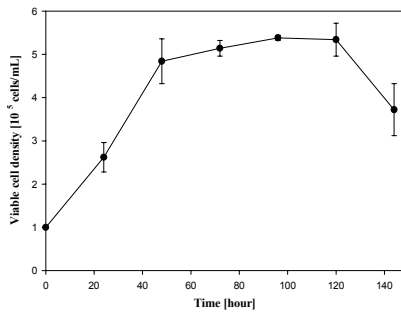
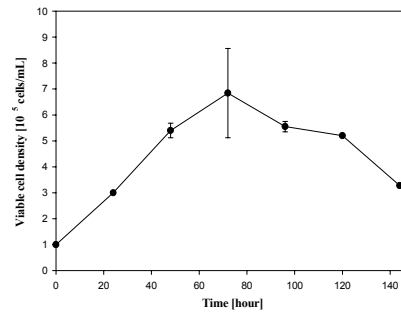


Fig. 1.28 PMA 구조



(a) 100 nM, 6 hr-treatment



(b) 100 nM, 24 hr-treatment

Fig. 1.29 12일령 CFC 세포의 PMA 처리후 kinetics.

Fig. 1.24 에서의 12 day-cells의 결과를 Fig. 1.29 에서의 결과와 비교해 보면, PMA 처리에 의해 구축된 primary cells 유래의 transformants는 transformation 이전에 비하여 성장속도가 상당히 빨라져 배양 초기에 최대 세포농도에 도달하게 되며 그 이후에도 비교적 장기간동안 일정농도의 세포를 건강한 상태로 유지하고 있음을 알 수 있다. 동일한 primary cells을 이용하여 PMA를 동량 처리 후 그 처리 시간을 달리하여 얻어진 transformants의 결과에서 차이가 나타나는 것으로 보아 PMA 처리 시간에 따른 transformant 형성 효과에도 차이가 있음을 알 수 있었다.

4. 확보된 세포주들의 ND 백신 생산능 조사

이상에서 확보한 cells에 ND virus를 infection 시킨 후 생산되는 virus의 양을 측정함으로써 host로 사용하는 cells의 ND vaccine 생산능을 살펴보았다. Fig.1.30에서는 ND virus를 다양한 희석배율로 희석 후 cells에 infection 시킨 다음 얻어지는 세포농도를 조사하였다. 이를 통해 test cells에 대한 ND virus의 infection 여부와 각 cells에 대한 적절한 ND virus의 희석배율을 간접적으로 확인할 수 있었다. 실험을 위하여 test 하고자 하는 cells을 1×10^5 cells/mL로 접종하여 48 시간동안 배양과정을 거친 후 다양한 희석 배율(0, 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , media)로 희석된 virus solution을 준비된 cells에 1 ml 씩 첨가한다. Virus 처리 60 시간 후 cells의 viability를 측정하였다.

아래의 결과로부터 primary cells과 vero가 MDBK에 비하여 virus infection의 의한 생존율의 저하가 크 을 알 수 있었다. Primary cells의 경우 희석배율이 1000배 이하에서 민감한 virus infection 결과를 보였 으나 MDBK는 100 이하의 희석배율에서 민감하게 반응하였다. Fig.1.30과 같은 방법 외에도 plaque assay를 통해 비교적 정확한 정량을 할 수 있다.

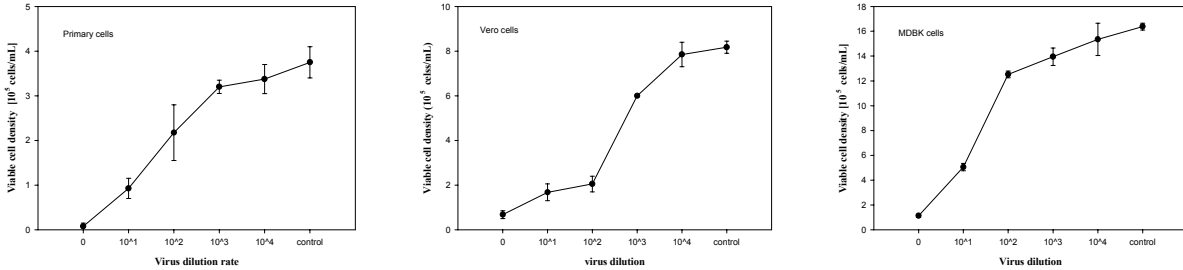


Fig. 1.30 ND 바이러스가 다양한 세포들의 성장에 미치는 영향

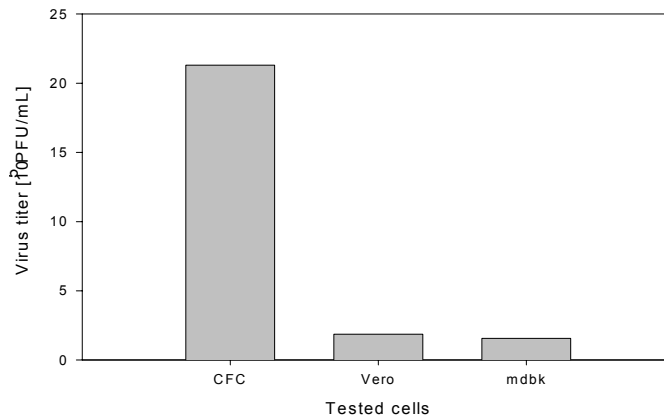


Fig. 1.31 다양한 세포들의 ND 바이러스 생산성

Primary chick embryo fibroblast cells(CFC)과 Vero 그리고 MDBK 각각에 대한 ND virus의 infection titer를 plaque assay를 통해 비교하였다 (Fig. 1.31). Vero나 MDBK에 비하여 CFC가 약 10배 정도 높은 virus titer를 보였다. 이미 확립되어 있는 continuous cells보다 primary cells이 ND 백신 생산에 매우 유리함을 알 수 있었다. 닭의 급성 전염병으로 알려져 있는 Newcastle Disease가 ND virus에 의해 발생되기 때문에, ND virus는 chick 유래의 primary cells에 보다 친화적으로 infection 하는 것 같다.

5. 형질전환을 이용한 세포주의 개량

1차년도 연구를 통해 얻은 chick primary cells의 성장, nutrient의 소모, 그리고 waste의 생성 결과들을 토대로 chick primary cells를 각각 발생 초기의 5일령, 형태와 기관을 형성하는 10일령, 그리고 발생 마지막 단계인 15일령의 3가지 group으로 나누어 실험을 진행하였다. 각 group 세포들의 배양 과정 중 2번째 계대에서, 각 group 세포들의 세포 성장 (Fig. 1.32)과 nutrient의 소모 (Fig. 1.33), 그리고 waste의 생성 결과 (Fig. 1.34)를 관찰하였다.

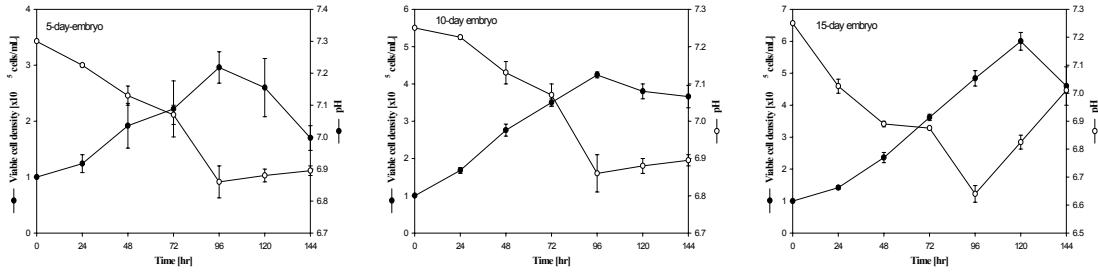


Fig 1.32 다양한 세포들의 성장 및 pH 변화.

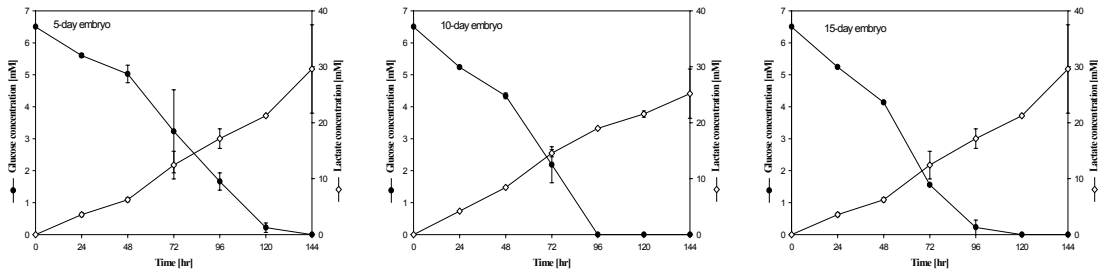


Fig 1.33 다양한 세포들의 glucose 소모와 lactate 분비 kinetics.

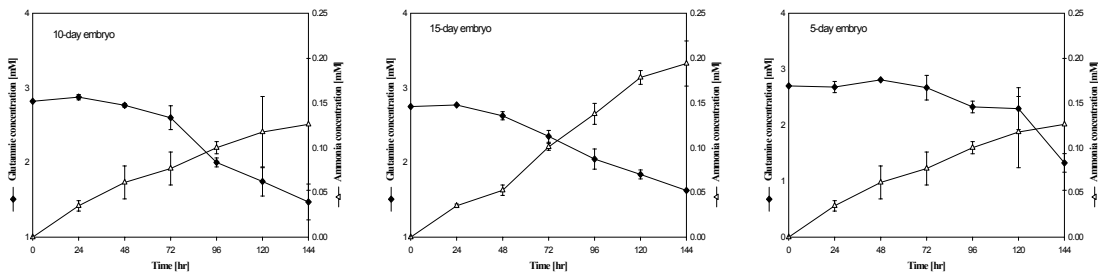


Fig. 1.34 다양한 세포들의 glutamine 소모와 ammonia 분비 kinetics.

이상과 같이 chick primary cells의 성장을 각 group별로 나누어 관찰한 결과, 10, 15일령의 chick primary cells가 5일령보다 우수한 성장 결과를 보임을 확인할 수 있었다. Nutrient의 소모 또한 10, 15일령의 chick primary cells에서 보다 빠르게 일어나고 있음을 알 수 있었다. 그러나 glutamine의 소모에는 큰 차이를 보이지 않았다. Ammonia와 lactate의 축적 역시 group에 따른 차이는 거의 없었으나 10일령의 chick primary cells에서 가장 적은 축적량을 나타내었다.

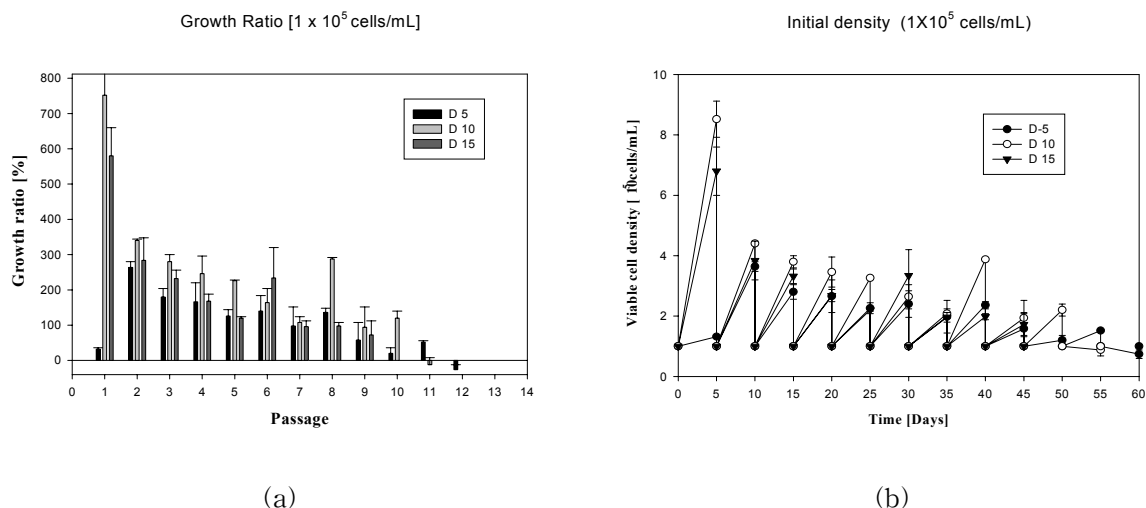


Fig. 1.35 다양한 세포들에서 chick primary cells의 kinetics:
 (a) viable cell density (b) growth ratio at each passage.

Chick primary cells의 계대배양시마다 측정된 세포성장의 결과(Fig. 1.35(a))는 다음과 같은 경향을 보였다. Chick primary cells의 계대초반에는 활발한 세포성장이 관찰되었지만, 계대가 진행될수록 세포 성장이 저하됨을 확인할 수 있었다. 이 때의 세포성장으로 약 200~300% 정도의 세포성장을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1.35(b)). 이상의 실험 결과들로부터 10일령의 chick primary cells가 가장 안정적이고 우수한 성장을 하는 세포임을 확인할 수 있었다. Primary cells의 안정적 성장은 보통 cell passage 9 까지 진행되다가 그 이후 서서히 둔화되는 cell growth을 보였다. 이로부터 primary cells의 정상적인 세포성장의 증가는 cell passage 9 까지임을 예측할 수 있었다. 정상적 growth를 보이는 단계를 거치고 나면, primary cells의 성장률은 저하될 뿐 아니라 morphology에도 변화가 생겨 점차 사멸하게 된다. 그림 2.5와 같이 세포질 내에 많은 구멍을 가지고 있는 세포가 형성된다. 이런 상태의 cells는 cell passage 11 이후에 점차 증가하게 된다. 이와 같은 세포질의 비정상적인 변화는 검사되는 다양한 group 내 세포들에서 발생한다.

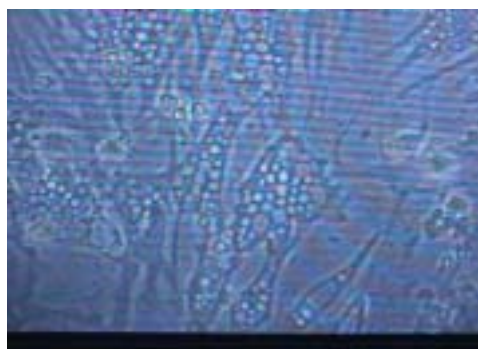


Fig. 1.36 Primary cells에서 나타나는 세포질내의 변화

다양한 chick primary cells를 통해 얻은 결과로부터 10일령 이후의 chick primary cells가 가장 활발한 성장을 한다는 결론을 내리고, 이들의 chick primary cells를 세포주로 확립시키기는 실험에서는, 10일령 이후의 primary cell culture를 통해 얻은 fibroblast cells을 사용하였다. 형질전환 세포주의 확립을 위해서는 PKC activator로 알려진 PMA를 이용하였다. 형질전환 세포주의 확립을 위해서는, 세포들이 안정적으로 성장하는 cell passage 5에서 PMA를 처리해 주었다. 이로부터 얻어진 형질전환 세포주들은, 첨가 PMA 농도에 따라 다음과 같은 성장 경향을 보였다.

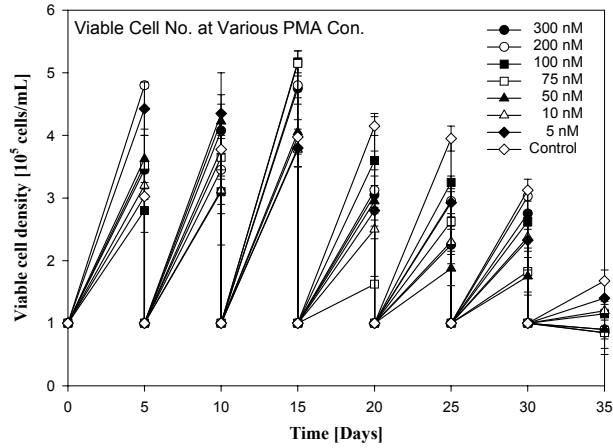


Fig. 1.37 Chick primary 세포의 형질전환에서 PMA 농도의 영향.

Fig. 1.37에서 보이는 바와 같이, PMA가 처리된 cells는 PMA가 처리되지 않은 cells 보다 계대 초반에 약간 더 우수한 성장 결과를 보였다. 그러나 PMA 처리 후, 3회의 계대과정을 겪으면서 PMA가 처리되지 않은 세포들이 보다 우수한 성장 결과를 보였다. PMA가 처리되지 않은 control에서의 세포의 경우, 7회의 계대를 거치면서 안정된 세포성장을 관찰할 수 있었지만 PMA를 처리하여 준 세포들의 성장정도는 cell passage 별로 비교적 큰 차이를 보였다. 3회의 계대배양 후 PMA가 처리된 세포들의 성장 증가율은 오히려 control에서의 cells에 비하여 높게 나타났으나 그 이후의 세포들에서는 저하되는 성장결과를 관찰할 수 있었다.

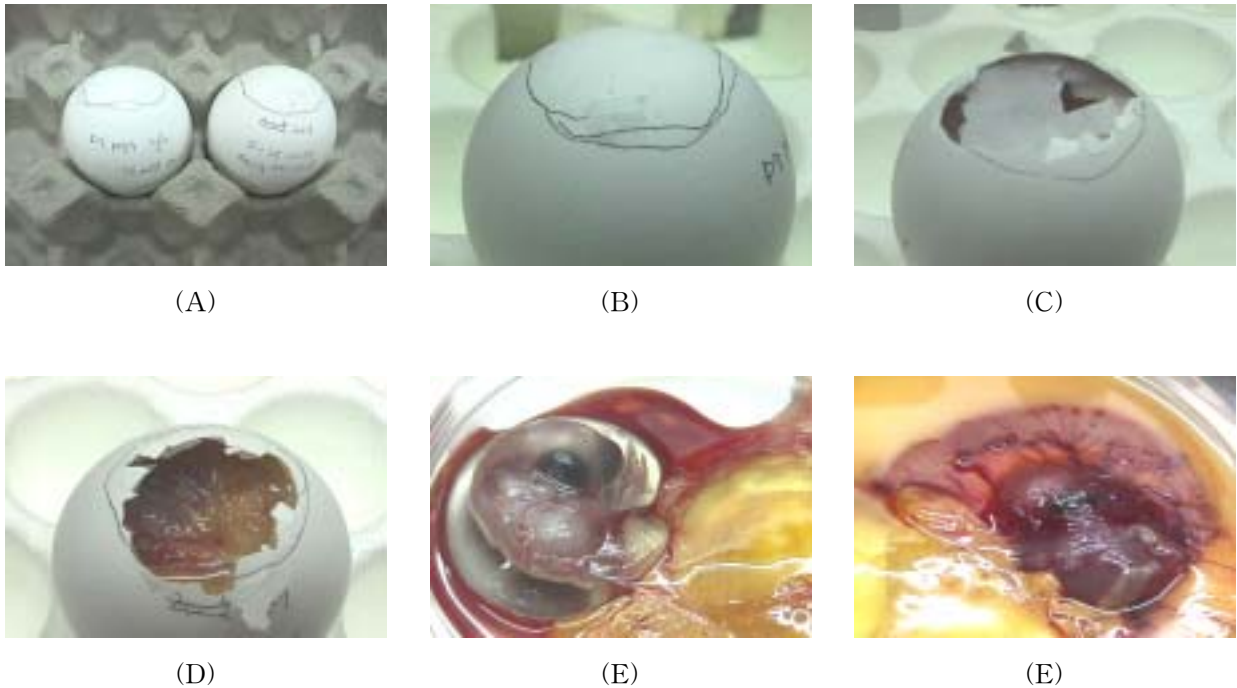


Fig. 1.38 *In vivo* transformation. (A) 할로젠 램프에 SPF egg를 비취 air sac 부분과 embryo 부분을 표시한 그림. (B) Carcinogen을 syringe로 injection한 후 paraffin으로 sealing한 상태. (C) PMA 처리 후 11일령에서 air sac을 해체한 모습. membrane이 손상되어있다. (D) MCA 처리 후 11일령에 air sac을 해체한 모습 PMA 처리 시 보다 membrane 손상이 좀 더 심하였다. (E) PMA 처리한 11일령의 embryo. (F) MCA를 처리한 11일령의 embryo. PMA보다 훨씬 붉은색을 띠었다.

발생중인 SPF egg에 carcinogen을 직접 처리함으로써 cell transformation을 유도하였다. Carcinogen은, *in vitro* 상에서 처리하였던 PMA와 3-methylcholanthrene (MCA)를 사용하였다. Carcinogen 처리는 7일령에서 수행하였다. PMA는 30, 3, 0.3 μM . MCA는 2.5, 0.25, 0.025 mM의 stock solution을 각각 200 μl 씩 주입시켰다.

30 μM PMA를 넣어준 SPF egg의 embryo는 발생을 못하고 사멸하였다. 반면 3, 0.3 μM 의 PMA를 넣어준 SPF egg의 embryo는 정상 발생하여 primary culture를 수행하였다. 2.5, 0.25 mM의 MCA를 처리해 준 embryo는 사멸하여 녹아버렸지만, 0.025 mM의 MCA를 처리한 embryo는 정상적으로 primary culture를 수행하였다. 이것으로 보아 발생중인 chick embryo가 견딜 수 있는 PMA농도는 3 μM , 200 μl 이하, MCA는 0.025 mM, 200 μl 이하임을 알 수 있었다. Fig. 1.38 (E)와 (F)를 비교해 봤을 때, PMA를 처리한 embryo보다 MCA를 처리한 embryo의 색이 진붉은색을 띠었다. 뿐만 아니라 크기도 작았다. 접종 농도만을 비교해봤을 때, MCA의 양이 훨씬 많았는데, PMA보다 MCA가 더 toxic하게 작용하여 그런 결과가 나온 것 같다.

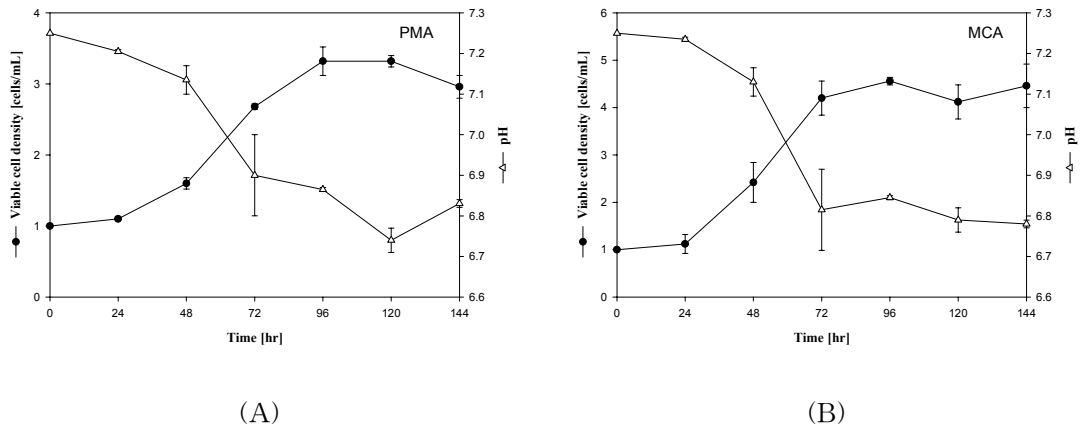


Fig. 1.39 In vivo carcinogen을 처리한 passage 4에서 CFC의 growth rate과 pH 변화. 5% FBS를 포함한 MEM 배지에서 culture하였으며, 6 well plate에 1×10^5 cells/mL로 접종하여 매 24hr 마다 viable cell density와 pH 변화를 측정하였다. (A) PMA treated cell. (B) MCA treated cell

Primary culture후 초기 passage 4 에서 cell kinetics를 측정하였다. 초기 passage의 growth curve와 pH 변화는 carcinogen을 처리하지 않은 11일령의 primary cell kinetics와는 크게 차이가 없었다.

6. 형질전환 세포주의 ND 백신 생산성 조사

Chick primary cells의 ND 백신 생산성을 조사하기 위해 각 group별로 NDV와 반응시키고, MDBK를 host cells로 하여 plaque assay를 수행하였다.

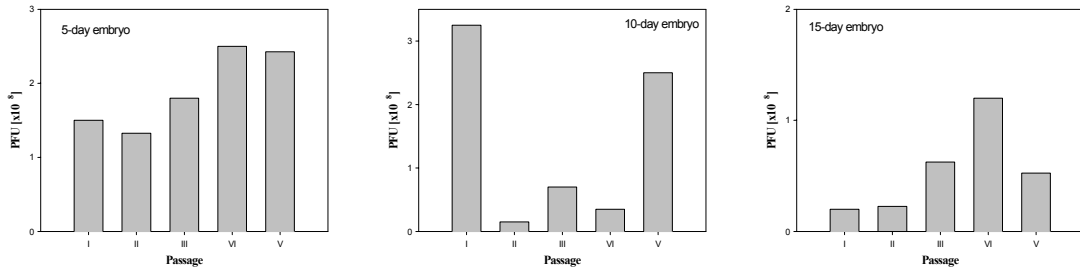


Fig. 1.40 다양한 세포에서 passage에 따른 바이러스 생산수율.

Fig. 1.40에서 보는 바와 같이 10일령의 cell passage 1 에서 가장 많은 virus의 생산량을 보였지만 안정적 virus의 생산성을 얻지는 못하였다.

Chick primary cells를 통한 virus 생산량을 관찰하면서 이미 확립되어 다양한 세포주들을 통한 virus 생산정도도 함께 조사하였다.

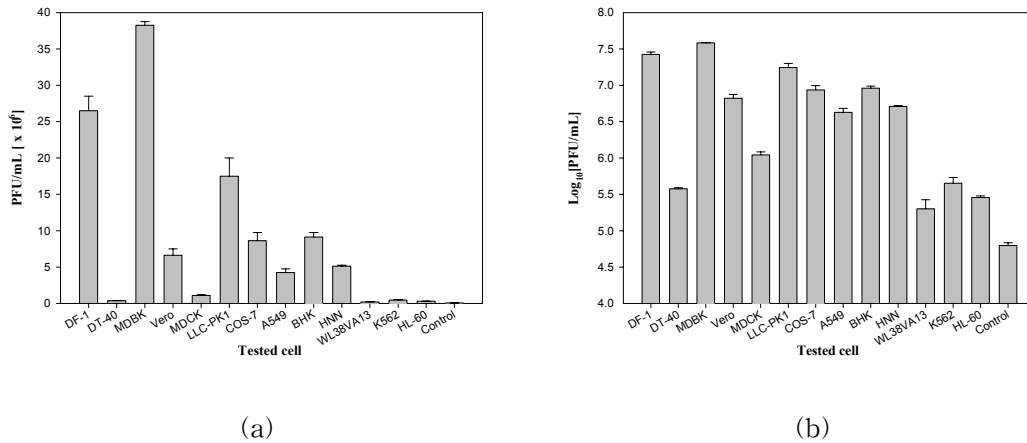


Fig 1.41 다양한 세포주에서의 바이러스 생산수율:

(a) virus titre - PFU/mL (b) virus titre - log₁₀[PFU/mL]

다양한 cell lines를 가지고 virus 생산성을 관찰한 결과 (Fig. 1.41), MDBK와 DF-1 (ATCC)이 우수한 virus 생산성을 보였다. 위의 결과로부터, fibroblast cells가 virus 생산에는 보다 효율적임을 예상할 수 있었다. 많은 vaccine 생산에 kidney cells가 이용되는데, 본 연구에서도 여러 가지 kidney cells에서 우수한 virus 생산성을 관찰할 수 있었으며, 그 중에서도 MDBK가 가장 우수한 생산성을 보였다.

ND virus 생산성을 조사하기 위해 plaque assay외에 hemagglutination (HA) assay를 수행하였다.

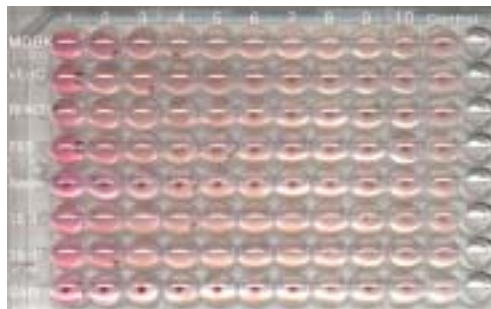


Fig 1.42 HA assay시 나타난 혈구 응집. U-bottom 96 well plate에 virus sample을 2ⁿ으로 희석하고 sample과 같은 양의 0.5% sheep RBC를 넣어준 후 2 시간 후 혈구의 응집을 보이는 상태

HA assay를 수행한 결과 Fig 1.42.에서 보듯이 MDBK는 2⁹에서 Vero는 2⁵에서 BHK-21에서는 2⁵에서 293에서는 2³, Saos에서는 응집이 일어나지 않았고, chick primary cell에서는 2⁸에서 최종응집 현상을 보였다. 이런 결과를 plaque assay와 비교했을 때, MDBK와 chick primary cell에서 NDV 생산성이 높게 나타나는 경향은 같았으나 나머지 cell에 대해서는 Vero와 BHK-21의 결과가 같게 나타나는 결과에는 차이가 있었다.

실험의 정확성과 재현성 실험을 위해 반복실험을 하고, HA/mL unit을 측정된 결과, 아래와 같았다.

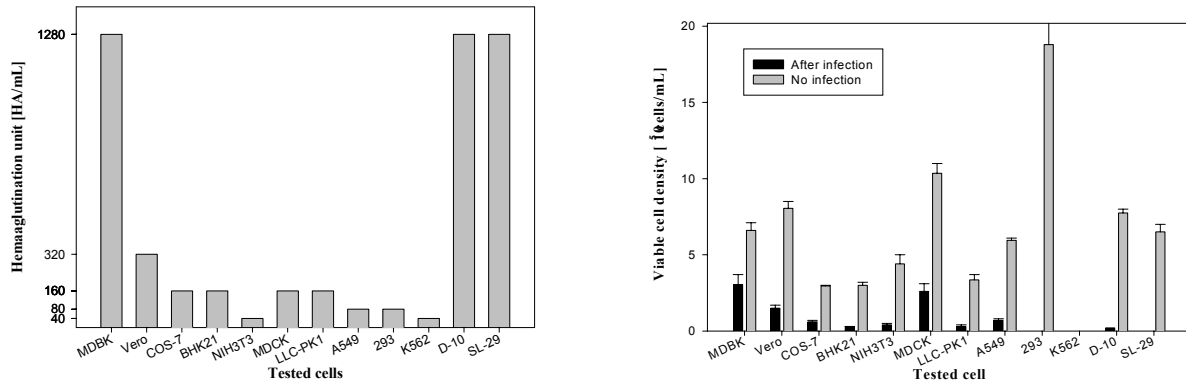


Fig. 1.43 HA assay (A) U-bottom 96 well plate에 virus sample을 2ⁿ으로 희석하고 sample과 같은 양의 0.5% sheep RBC를 넣어준 후 2 시간 후 혈구의 응집을 관찰하고 이것을 HA/mL의 unit으로 환산한 값. (B) Virus에 대한 cell의 생존을 보기위해 virus를 넣고 sample을 취할 때의 viable cell density와 normal culture후 viable cell density를 비교한 결과.

반복실험의 결과 Fig. 1.43(A)를 통해 MDBK와 chick 유래의 primary cells과 SL-29에서 제일 높은 HA unit을 보였다. MDCK의 경우는 많이 살아남았지만, 생산량은 많지 않았고, chick fibroblast cells의 경우는 많은 세포들이 사멸하였지만, 또한 많은 virus 생산량을 보였다. 이것으로 미루어 virus 생산량과 세포 생존 간에는 일정한 개연성이 있는 것이 아니라, 세포 개개의 특성으로 보여 진다.

In vivo transformation을 유도한 세포의 NDV 생산성을 조사하는 방법은 이전과 마찬가지로 각 cell 별로 NDV와 반응시키고, MDBK를 host cell로 하여 plaque assay를 수행하였다.

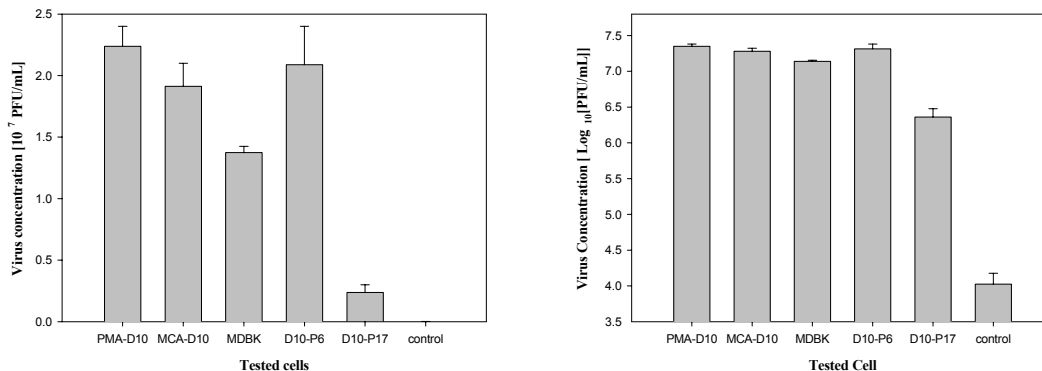


Fig. 1.44 Plaque assay. Carcinogen *in vivo* 처리한 cell과 다른 cell들의 virus productivity를 비교하기 위해 plaque assay를 MDBK를 이용하여 수행하였다.

PMA와 MCA를 *in vivo* 처리한 passage 10의 primary cells의 생산성은 culture 초기의 passage 6의 primary cells과 비슷하게 나왔고 MDBK보다 높게 나타났다. 이전 실험결과에서의 passage 10을 전후로 primary cells의 성장이 급속히 감소했던 것과 비교해 본다면, *in vivo* carcinogen 처리가 세포성장과 virus 생산에 긍정적 영향을 미친다고 할 수 있다.

7. 우수 형질전환 세포주 선별

보통의 primary cells은 passage 10 이 넘으면 growth rate 많이 감소하는데 반하여 carcinogen을 *in vivo* 처리한 세포는 passage 11에서도 우수한 성장을 보였다.

PMA를 처리한 세포는 대사가 활발해졌다. carcinogen을 처리하지 않은 세포들이 보통 72 hr 이후에 최대 viable cell density를 보이는 반면, PMA 처리 세포들은 48 hr에 최대 viable cell density를 보였으며, 이후 완만한 감소를 보였다. Nutrient 소모에 있어서도 최대 cell density와 일치하게 48 hr에서 glucose를 거의 소모하였고, glucose양의 2배가 되는 lactate 생성량을 보였다. 반면 MCA를 처리한 세포들은 96 hr에서 최대 viable cell density를 보였고, 72 hr에서 거의 모든 glucose를 소모하고 최대 lactate 생성을 보였다.

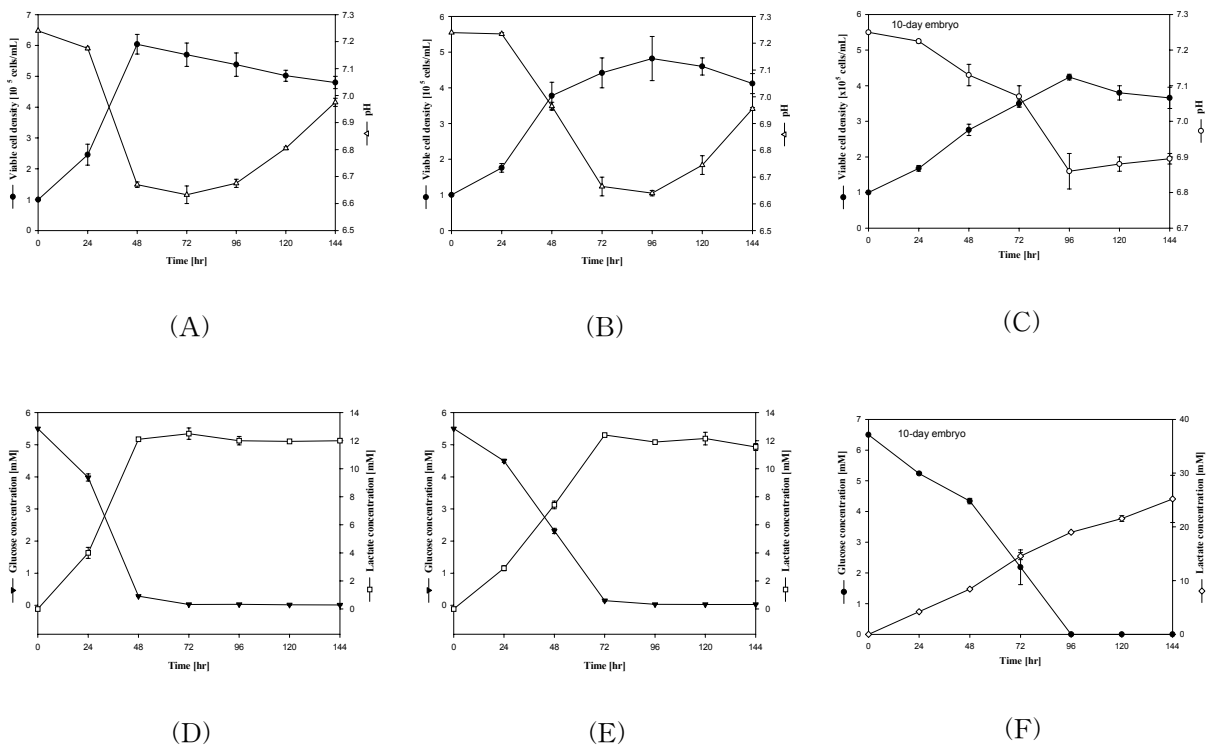


Fig. 1.45 In vivo transformed cell kinetics. In vivo carcinogen을 처리한 passage 11에서 CFC의 growth rate과 pH 변화. 5% FBS를 포함한 MEM 배지에서 culture하였으으며, 6 well plate에 1×10⁵ cells/mL로 접종하여 매 24hr 마다 viable cell density와 pH 변화, glucose 소모도와 lactate 생성량을 측정하였다. (A) PMA treated cell의 성장곡선과 pH 변화. (B) MCA treated cell의 성장곡선과 pH 변화 (C) No carcinogen의 성장곡선과 pH 변화. (D) PMA treated cell의 Glu 소모와 Lac 생성. (E) MCA treated cell의 Glu 소모와 Lac 생성. (F) No carcinogen treated cell의 Glu 소모와 Lac 생성.

8. 선별된 세포주 특성조사

ATCC로부터 분양받은 DF-1을 이용하여, primary cells에 하였던 동일한 방법으로, cell growth, glucose와 glutamine 소모, lactate와 ammonia의 축적에 관하여 실험하였다.

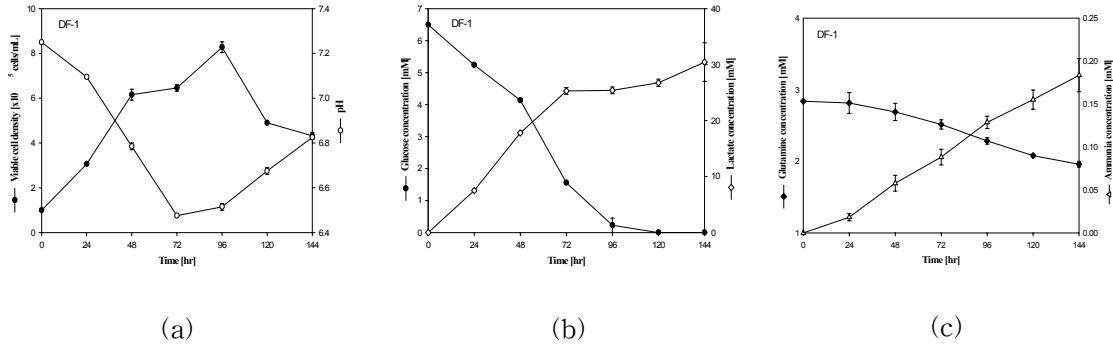


Fig. 1.46 DF-1 세포의 대사 kinetics.

(a) growth & pH, (b) glucose & lactate, (c) glutamine & ammonia

DF-1에서는 primary cells 보다 빠른 성장 및 증식을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1. 46) Fig. 1. 45로부터 선별된, 우수한 바이러스 생산능을 지닌 DF-1, MDBK를 이용하여 매 24hr 마다 생성되는 바이러스 양을 측정하여 비교하였다.

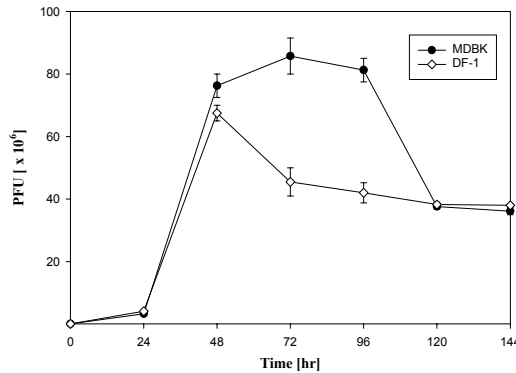


Fig. 1.47 DF-1 and MDBK 세포에서의 바이러스 생산수율.

48hr 후 host cells가 사멸하기 시작하기 때문에 72hr 경과 후 생성되는 virus의 양은 최대가 되고, 일정 수준으로 virus의 양이 유지되다가 MDBK의 경우에는 96hr 이후부터 그 양이 줄어들기 시작하였다. DF-1의 경우, MDBK에 비하여 NDV에 의해 host cells가 더 빠르게 손상되기 때문에 48hr 이후부터 virus의 양이 감소하기 시작하였다.

DF-1 cells를 여러 가지 M.O.I로 infection 시켜 virus의 생산성을 관찰하였다. 72hr 배양 후 시료를 채취하여 plaque assay를 실시하였다. 그로부터 다음과 같은 결과를 얻었다.

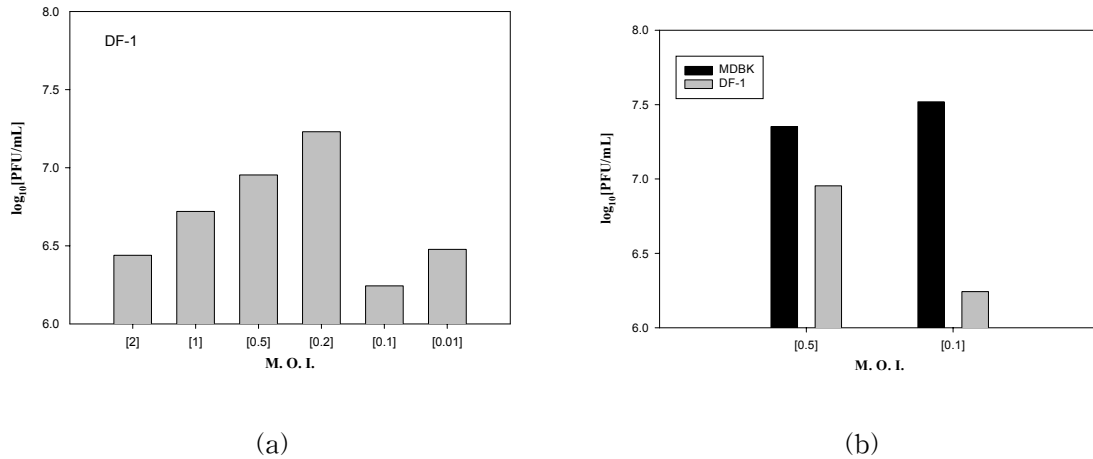


Fig. 1.48 DF-1과 MDBK 세포의 M.O.I에 따른 바이러스 생산수율.
(a) DF-1 (b) MDBK and DF-1.

Fig. 1.48(a) 에서 보는 바와 같이 DF-1의 경우, 0.2 M.O.I.에서 최적의 바이러스 생산성을 보였다. 동일한 M.O.I.에서 MDBK와 DF-1의 바이러스 생산성을 비교해 보면(Fig. 1.48(b)), MDBK가 보다 높은 바이러스 생산성을 보유함을 알 수 있었다.

세포의 senescent를 알아보는 assay 방법에 β -galactosidase (SA- β) activity assay가 있는데, 세포가 senescent 단계에 이르게 되면 cell division이 중지하게 되고 이후 세포가 부피 성장을 하면서 세포질 내에 β -galactosidase가 축적된다고 알려져 있다.

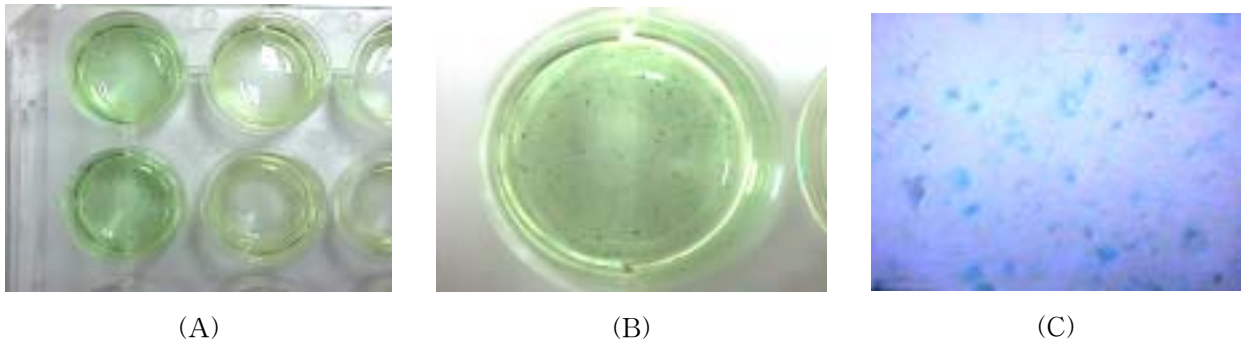
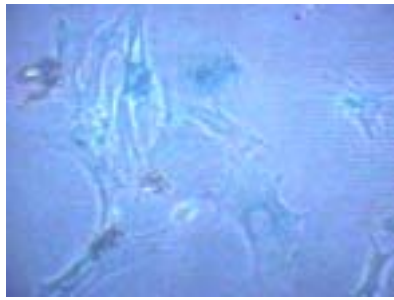
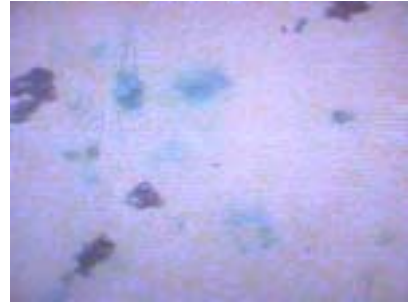


Fig. 1.49 β -galactosidase activity 분석. (A) Staining solution 처리 후 12 hr 후의 상태 (B) PMA treated cell의 passage 20에서 군데 파랗게 염색된 상태. (C) 염색된 부분을 40배 확대한 그림.

SA- β assay를 수행하기 위해 PMA를 in vivo처리한 passage 20 CFC와 아무것도 처리하지 않은 passage 6의 CFC를 선택하였다. Fig. 1.49(A)에서 보는 듯이 좌측은 passage 20의 cell이고 우측은 passage 6의 cell이다. 전체적으로 세포 노화가 의심되는 cell의 staining solution은 색이 푸르게 변화하였고, 상대적으로 노화가 덜 이루어졌다고 생각되는 세포들의 staining solution은 색이 변하지 않고 시약의 색인 연두색을 유지하고 있었다. 노화가 진행 중인세포의 plate well을 확대해서 보면 (B)에서 보이는 바와 같이 푸르게 염색된 blue spot을 볼 수 있는데, 세포질 내에 β -galactosidase가 축적된 결과이다. (C)는 40배 확대된 cell의 모습인데, 군데군데 푸르게 염색된 세포를 관찰할 수 있다.



(A)

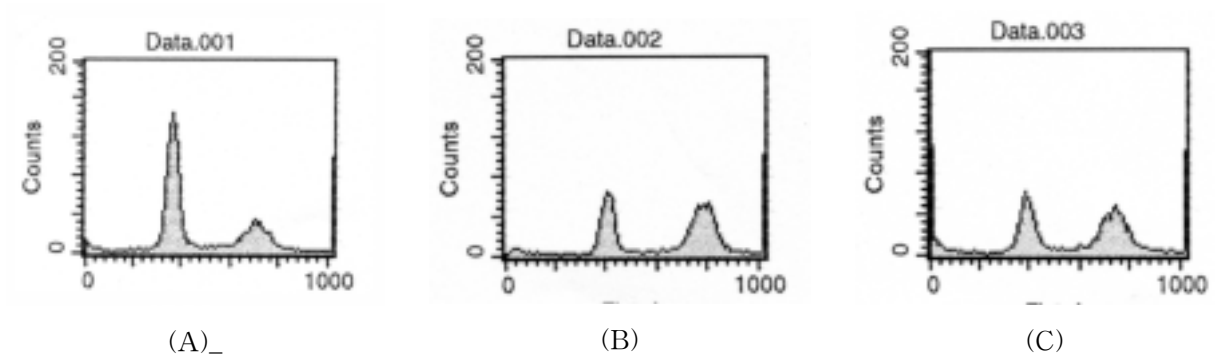


(B)

Fig. 1.50 β -galactosidase activity 분석. PMA treated passage 20 cell (A) 100배 확대한 일반적 현미경 사진. (B) 빛을 조절하면 염색된 푸른 부위가 두드러지게 한 사진.

Fig. 1.50는 염색된 cell을 촬영한 같은 사진인데 빛을 조절하여 염색된 푸른색 부위가 더욱 두드러지게 하였다. (A)와 (B)를 비교해서 보면 세포의 핵을 중심으로 푸르게 염색된 것을 볼 수 있는데, 노화 단계에서 β -galactosidase가 핵에서 나와 바로 세포질 내로 축적되는 것이 아닌가 생각하였다.

Carcinogen을 처리한 cell의 cycle을 보기 위해 FACS분석을 수행하였다.



(A)

(B)

(C)

Fig. 1.51 FACS 분석 (A) No carcinogen treated passage 4 cell. (B) In vitro PMA treated cell (C) In vitro MCA treated cell.

Fig. 1.51은 12 hr starving 시킨 passage 4의 primary CFC와 PMA를 *in vitro* 처리한 CFC, MCA를 *in vitro* 처리한 CFC이다. (A)에서 보이는 좌측에 높은 peak는 G1 phase를 의미하고, 우측의 낮은 peak는 G2/M phase를 의미한다. 가운데는 S phase이다. 정상적으로 분열하는 세포들이 (A)와 같은 cell phase를 보였는데, carcinogen을 처리한 (B), (C)에서는 문헌에 보고된 것처럼 G2 phase arrest가 일어나 있었다. 이로 인해 G1 phase의 양은 상대적으로 줄어들어 있었고, G2의 양은 늘어나 있었다.

PMA *in vivo* 처리한 cell cycle 분석을 위해 매 시간 별로 starving 시킨 cell sample을 만들어 FACS 분석을 수행하였다.

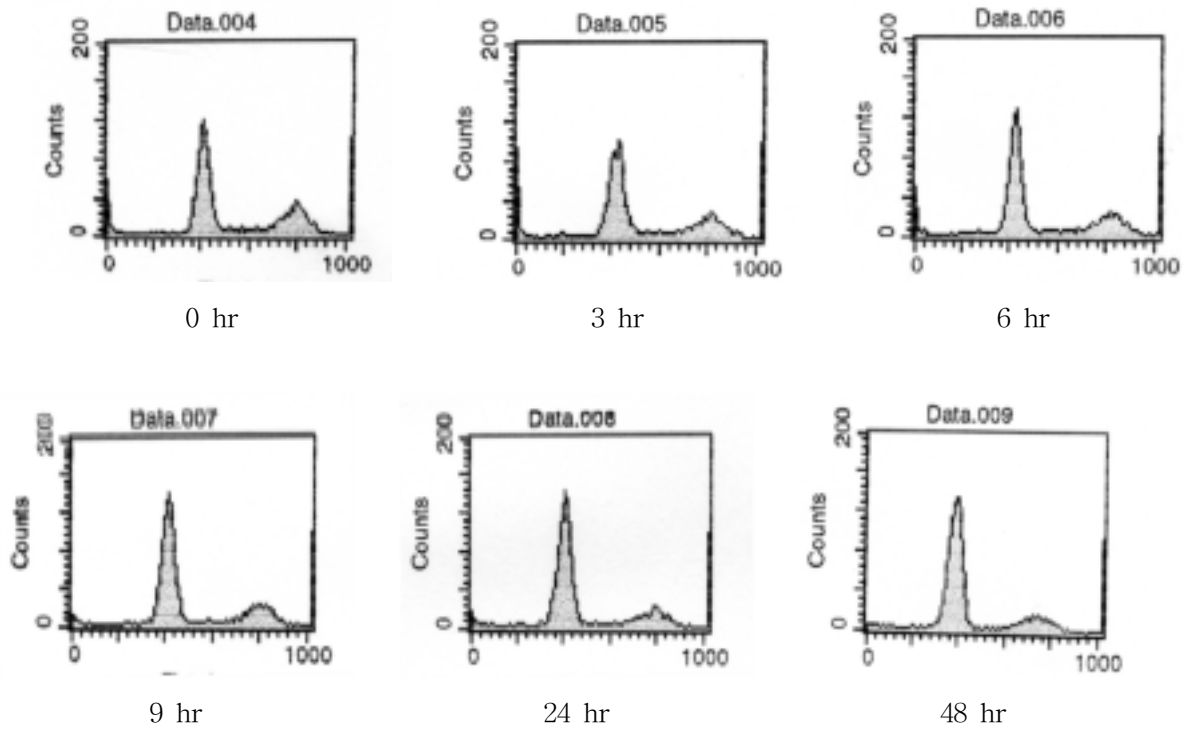


Fig. 1.52 *In vivo* PMA treated cell passage 4 에서 시간별 cell cycle의 변화

시간별로 PMA *in vivo* 처리한 cell cycle을 분석한 결과 Fig. 1.51(A)와 유사하게 G1 phase의 양이 가장 많은 모양을 보였다.

Mouse embryo 유래의 NIH3T3 세포가 Lactalbumin Enzymatic Hydrolysate (LEH - Edamin S)를 growth factor처럼 이용한다는 사실을 알고, CFC에서도 그러한 효과를 보이는지 실험해 보았다. 실험을 수행한 결과 Fig. 1.53과 같이 normal 세포보다 carcinogen을 처리한 세포가 LEH가 있는 상황에서 좀더 높은 성장률을 보였다. 그러나 serum이 들어간 세포보다는 성장은 매우 낮은 결과를 보였다.

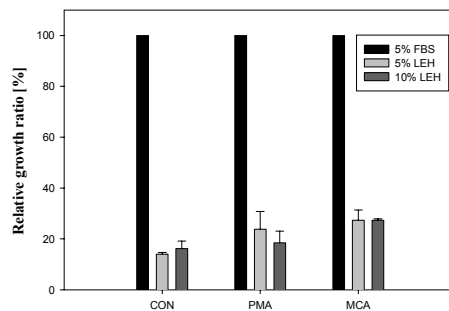


Fig. 1.53 Lactalbumin enzymatic hydrolysate의 효과

9. 우수 세포주의 다양한 동물백신 생산성 조사

다양한 동물백신의 생산성 조사를 위해 우선 국내에서 많이 NDV 생독 vaccine으로 사용되고 있는 B1, La sota를 수의과학검역원에서 분양받아 생산성을 조사하였다. B1, La sota 모두 약독균주라 plaque assay 형성에 어려움이 있어, HA assay를 수행하였다.



Fig. 1.54 HA분석. (A) NDV stock virus (B) B1 (C) La sota.

처음 분양받은 virus의 titer를 조사한 결과 지금까지 실험에 사용한 2×10^6 PFU/mL의 virus stock을 control (A)로 잡고 B1 (B), La sota (C)의 응집을 조사하였다. 결과 control 에서는 2^6 에서 응집을 보였고, B1에서는 2^1 에서 응집을 보여 매우 적은 양의 virus titer가 나왔다, La sota에서는 실험 범위 내에서 응집이 보이지 않아 많은 virus particle들이 있음을 예상할 수 있었다. 이 실험 후에 SPF egg에 B1과 La sota를 injection하여 virus stock을 만들었다.

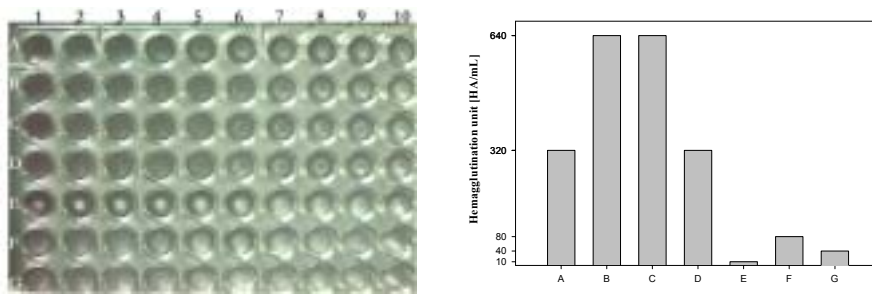


그림 2.24 HL-60을 이용한 응집실험

10. 세포 대사조절을 통한 우수 재조합 세포주 개발

Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)와 3-Methylcholanthrene(MCA)를 이용한 cell transformation에서 *in vivo* 처리하여 얻은 cell들이 *in vitro* 처리해서 얻은 cell보다 life span 증가에 있어 긍정적 결과를 보였다. 3 μ M의 PMA 100 μ l와 0.25 mM MCA 100 μ l를 발생중인 SPF egg에 넣어 주고 5일 후 primary cell culture 를 통해 얻은 세포를 가지고 매 6 passage 마다 cell growth cure, pH change, metabolite change 등을 조사하였다.

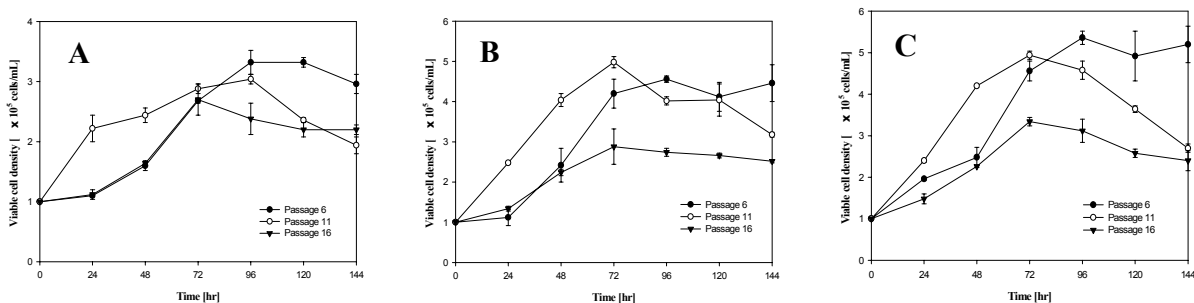


Fig. 1.55 Carcinogen이 처리된 *in vivo* primary CEF 세포의 성장곡선. PMA와 MCA를 5일령 SPF의 allantonic fluids에 주입하였다. 5일후 primary culture를 수행하였다. 초기 세포농도는 1×10^5 cells/mL. 전체 volume was 2.5 mL. 배지는 MEM supplemented with Tryptose phosphate broth (1.5 g/L). 6일간 24시간마다 Viable cell density를 측정하였다. (A)PMA treated CEF. (B)MCA treated CEF. (C)No carcinogen treated.

Fig. 1.55에서 보는 바와 같이 PMA와 MCA를 *in vivo* 처리한 세포들은 아무것도 처리하지 않은 세포와는 다른 세포성장 경향을 보였다. Passage 6의 세포들을 보면 carcinogen을 처리하지 않은 세포들은 96 hr 후에 최대 cell viability를 보였다 (Fig. 1.55 C). 반면 passage 11의 세포 성장을 보면 72 hr 후 최대 cell density를 보였다. Passage 16에서 측정된 viable cell density는 처음보다 약 50% 이상 감소하였다. 이후 세포들은 passage 22까지 성장하다 대사가 멈추면서 사멸하였다.

이에 반해 PMA를 처리한 세포들은 MCA를 처리한 세포나, 아무것도 처리하지 않은 세포보다 maximum cell density는 낮았다. 이들은 carcinogen을 처리하지 않은 세포와 유사하게 passage 11 이후부터 초기 성장속도가 급격히 증가하였다. PMA를 처리한 세포들은 96 hr 후 최대 cell density를 보인 반면 MCA를 처리한 세포들은 72 hr 후 최대 cell density를 보였다.

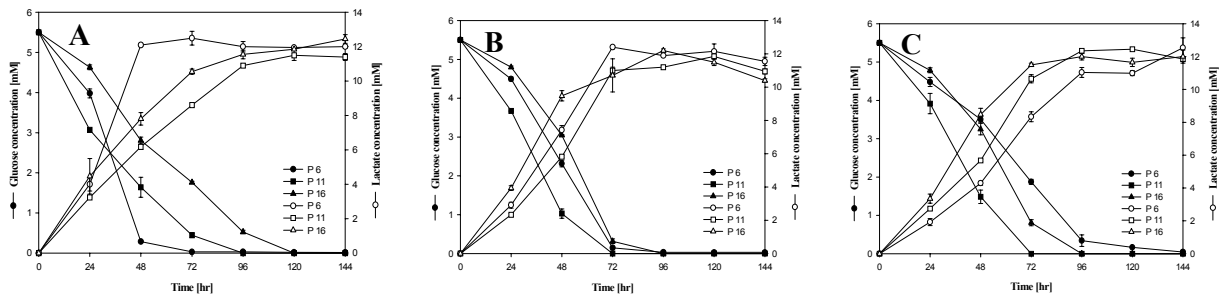


Fig. 1.56. In vivo에서 carcinogen을 처리한 primary CEF 세포의 Glucose 소모와 lactate 분비 kinetics. 초기 세포농도는 1×10^5 cells/mL. 전체 부피는 2.5 mL. 배지는 MEM supplemented with Tryptose phosphate broth (1.5 g/L). 6일간 24시간마다 YSI 2700 analyzer로 측정하였다. (A) PMA treated CFE cells. (B) MCA treated CEF cells. (C) No carcinogen treated primary CFE cells.

세포의 성장에 따른 대사물질의 변화를 살펴본 결과는 그림 3.2와 같다. 보통 동물 세포는 *in vitro* culture 시에 1 mole의 glucose로부터 2 mole의 lactate를 생산한다. 주 탄소원인 glucose 소모는 세포수가 증가할수록 빨라지는데 glucose 소비속도가 빨라질수록 lactate의 생성속도도 빨라진다. PMA에 의해 형질 변환이 유도된 cell의 경우 다른 세포들보다 lactate를 상대적으로 적게 생성하는 경향을 보였지만, 모든 glucose (5.5 mM)를 다 소비하였다. Passage가 낮은 세포들은 glucose소비 속도가 passage가 오래된 다른 세포들 보다 천천히 소비하는 경향을 보였다. 이런 결과로 미루어 세포의 노화가 많이 진행된 세포일수록 젊은 세포들 보다 glucose를 빠르게 소비하는 것으로 판단된다. (Fig. 1.56)

Normal cell 들은 그들의 life span이 한정되어 있어서 노화단계에 이르게 되면 세포의 생화학적 대사적 변화가 일어나게 되고, 세포의 모양도 변하게 된다. Fibroblast cell의 경우 길쭉했던 모양의 세포들이 크고 둥글게 변하게 된다. 이런 노화단계를 극복한 세포들은 immortalization의 단계에 이르게 된다. Immortal cell들은 여러 가지 특징을 가지게 되는데 그중 하나가 telomere의 길이가 유지되는 것이다. Telomeric DNA와 특정 단백질이 chromosome의 안정된 단편을 만들고 유지하는데 중심 역할을 하게 되는데, 세포의 immortalization과 telomerase activity 유지로 인한 mechanism은 서로 매우 밀접한 관계를 유지하는 것으로 알려져 있다. 모든 immortal cell들은 telomere 길이의 감소를 보이지 않았고, normal cell에서 telomere의 감소는 replicative 노화로 이어지는 것으로 알려져 있다.

Telomerase의 activity를 세포별로 확인하기 위해 Telosay kit (Intron Biotechnology, Korea)를 사용하였다. 실험에 사용한 세포는 chicken lymphocyte인 DT-40, PMA을 처리한 primary chick embryonic fibroblast (CEF) cell, passage 16, MCA를 처리한 passage 4의 primary chick embryonic fibroblast, 아무것도 처리하지 않은 chick fibroblast cell, passage 3의 세 가지 세포를 사용하였다.

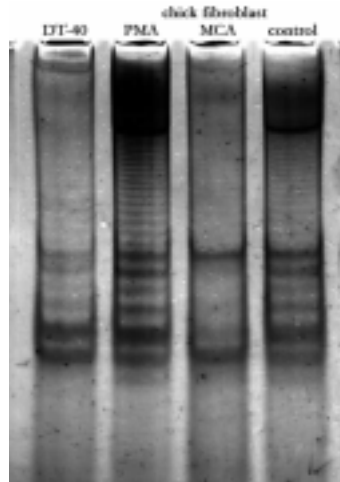


Fig. 1.57 PMA와 MCA를 passage 3에서 처리한 후 DT-40, primay CEF 세포의 Telomerase 분석. 모든 telomere fragments는 30 cycles at 95°C 5min, 95°C 40 sec, 60°C 50 sec, 72°C 1 min, 72°C 5 min for each cycle의 조건에서 증폭되었다. Lane 1은 DT-40, lane 2는 primary CEF cells transformed by PMA and its passage was 16, lane 3은 primary CEF cells transformed by MCA and its passage was 16 그리고 lane 4는 passage 3 non-transformed primary CEF cells.

Telomerase activity의 활성은 telomere 단편들의 발현 정도에 따라 간접적으로 관찰하게 되었는데, Fig. 1.57에서 보는 바와 같이 PCR product들은 다양한 경향의 단편발현을 보였다. Chick lymphocyte인 DT40의 발현과 다른 세포들의 발현을 보면 초기 primary cell의 발현과 PMA를 처리한 다른 cell들의 발현이 비슷하였다. 이미 cell line화된 DT-40보다 이들 두 세포의 telomerase activity가 높게 나타났다. PMA를 처리한 결과 telomerase activity는 passage가 지나도 유지되는 결과를 보였다. MCA를 처리한 세포구의 경우 passage가 지나면서 telomerase의 activity가 떨어졌으나, 이미 cell line화 된 세포와 비교해 보면 telomerase activity가 높게 나온 것은 아니었다. 세포의 immortalization시 중요한 것은 강력한 telomerase activity가 아니라 telomerase activity를 일정하게 유지하느냐가 중요한 요인인 것으로 판단된다.

DF-1과 MDBK는 다른 cell line에 비해 우수한 NDV vaccine 생산성을 보였다. 일반적으로 NDV에 의해 세포들은 96 hour post infection (hpi)후 사멸하는데 MDBK가 virus에 의해 성장을 저해 받기 시작하는 시점은 48 hr였고 DF-1이 성장에 저해를 받기 시작하는 시점은 24 hr 후부터였다 (Fig.1.58 A).

세포의 viable cell density가 최대가 되는 시점이 NDV virus 량이 최대가 되는 시점이었다. 세포가 사멸기에 들어서면서부터 pH의 값은 증가하는데, 본 실험결과에서 보면 세포가 virus에 의해 성장을 저해 받기 시작하는 시점부터 pH의 값이 증가하기 시작하였다 (Fig.1.58 B). 성장을 저해 받으면서부터 glucose의 소비량도 감소하였고 자연히 lactate 생성량도 감소하였다 (Fig.1.58 C, D). 이런 결과를 보면 virus가 세포성장을 저해하면서 초기에 ammonia 생성을 촉진하는 것으로 보여 진다. 결과적으로 세포의 metabolite는 virus에 의해 영향을 받지만, 궁극적으로는 세포성장에 의한 변화라 생각되어진다.

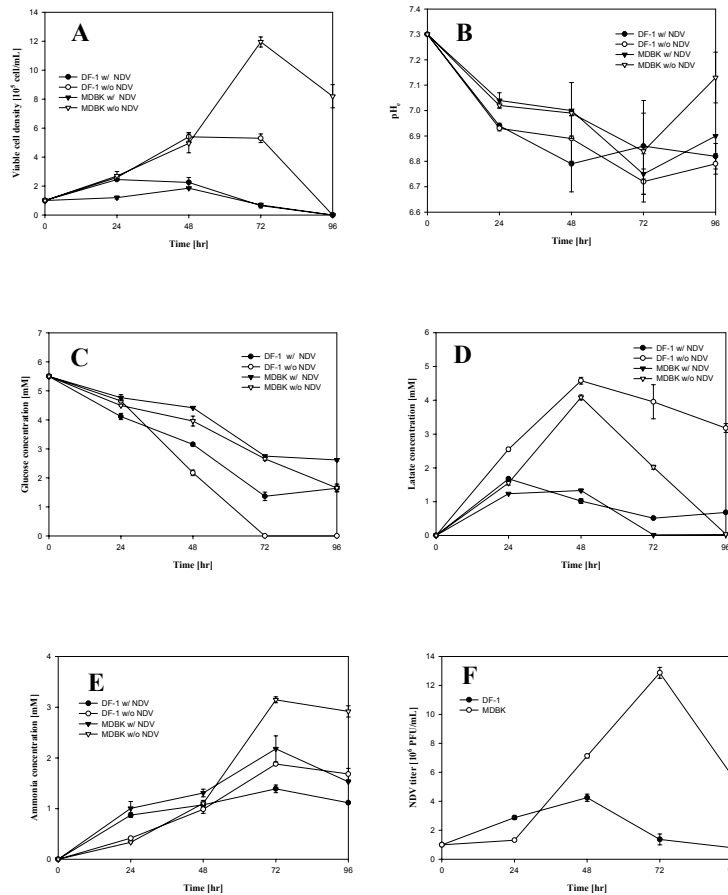


Fig. 1.58. DF-1 and MDBK 세포에서의 glucose 소모와 성장 및 pH 변화 그리고 바이러스 생산수율. 배양 배지는 MEM supplemented with 5% FBS. 세포는 1 M.O.I로 주입되었고, 초기 세포농도는 1×10^5 cells/well, 4일간 24시간마다 세포농도, pH 변화, glucose 소모량, lactate 분비량 그리고 ammonia 분비량을 측정하였다. ND 바이러스 생산수율은 72시간 후 측정하였다.. (A) Comparison of cell growth between NDV infect and non-infected cells. (B) Comparison of pH changes of NDV infected and non-infected cells. (C) Comparison of Glucose consumption on interacting cells with NDV. (D) Production of lactate on NDV infect and non-infected cells. (E) Comparison of ammonia production of NDV infected and non-infected cells. (F) NDV productivity every 24 hrs.

Lactate dehydrogenase (LDH)는 lactate를 pyruvate로 전환하는 역할을 하는 효소이다. LDH의 isozyme으로는 LDH-1 (H4), LDH-2 (H3M), LDH-3 (H2M2), LDH-4 (HM3)와 LDH-5 (M5)가 있다. 여기에서 H-type의 LDH는 lactate를 pyruvate로 전환시키는 효소로 알려져 있다.

일반적으로 세포는 glucose를 탄소원으로 사용하게 되는데, H type의 LDH가 다량 존재한다면 lactate를 pyruvate로 전환하여 TCA cycle내로 들어가 다시 에너지원 생성에 이용될 수 있을 것이다. 이런 관점에서 virus vaccine 생산 시 저비용의 glucose free 배지의 사용가능성을 살펴보기 위해 우수한 virus 생산성을 보인 DF-1과 MDBK의 LDH typing을 수행하였다.

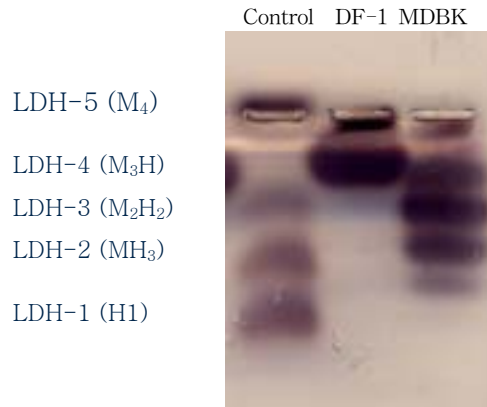


Fig. 1.58 DF-1 and MDBK 세포에서의 Lactate dehydrogenase typing. LDH isozymes은 1% agarose gel에서 전기영동으로 분리되었다. A marker containing five types of human LDH isoenzymes는 identify LDH에 사용되었다.

Fig. 1.58결과를 보면 DF-1은 type 4의 LDH를 보였다. 반면 MDBK는 다양한 LDH type을 가지고 있었다. 가장 진하게 보이는 것이 type 2, 3, 4였다. 희미하게 type 1과 2사이에 다른 type의 LDH를 보였고, type 4와 5사이에 다시 다른 LDH를 가지고 있었다. 이 결과만으로 MDBK가 DF-1보다는 lactate 이용성이 높을 것으로 예상되었다.

Lactate adaptation을 알아보기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다. Glucose free배지에 탄소원으로 sodium lactate를 사용하여 0, 5, 10, 20, 40, 80 (mM)의 배지를 만들었다.

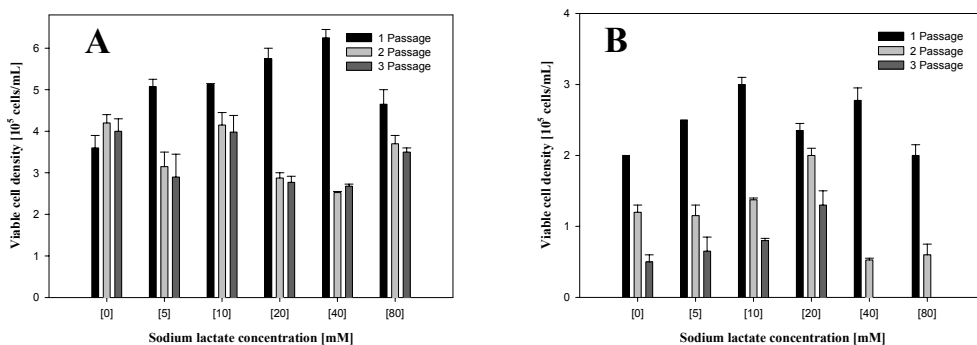


Fig. 1.59 Lactate 배지에서의 세포의 성장

배양 배지는 glucose free MEM supplemented with 5% FBS. Sodium lactate는 0, 5, 10, 20, 40 and 80 mM의 다양한 농도로 처리하였다. 초기 세포농도는 1×10^5 cells/mL. 72시간마다 Viable cell density를 측정하였다.

Fig. 1.59의 결과를 보면 첫 계대배양에서 lactate배지에 영향을 적게 받다 두 번째 계대배양부터는 세포수가 크게 감소하기 시작하였다. 그림.3.6 A의 MDBK를 보면 두 번째 계대서부터 세포수가 감소하지만 세 번째 계대에서는 감소 폭이 줄어 점차 lactate에 적응하는 결과를 보였다. 반면 DF-1의 경우 계대가 증가하면서 세포수도 감소하여 40, 80 mM의 배지에서 배양한 세포는 세 번째 계대에서 모두 사멸하였다. 각 lactate농도별로 세포의 반응은 다르게 나타났지만, MDBK의 lactate adaptation능력이 DF-1보다는 우수함을 알 수 있었다.

11. 재조합 세포주의 백신 생산성 조사

PMA와 MCA를 *in vivo* 처리하여 얻은 CEF cell을 가지고 virus 생산성을 봤다. 1×10^5 cell/mL을 접종하고 1 M.O.I로 반응 시켰다. 72 hpi후에 plaque assay를 수행하여 virus productivity를 살펴보았다.

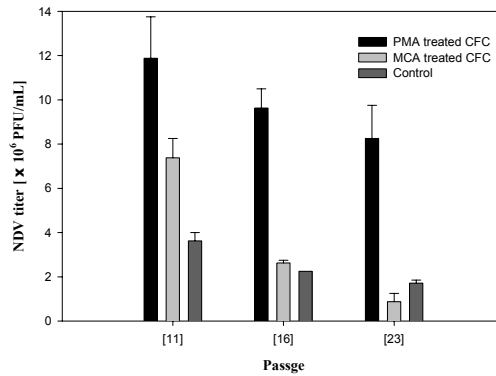


Fig. 1.60 Carcinogen이 처리된 *in vivo* primary CEF 세포에서의 바이러스 생산 수율.

초기 세포농도는 1×10^5 cells/mL. 전체 volume was 2.5 mL. 배양 배지는 MEM supplemented with Tryptose phosphate broth (1.5 g/L). 바이러스는 1 M.O.I로 주입되었으며 72 시간 후, MDBK 세포에서 plaque assay를 수행하였다.

Fig. 1.60의 결과를 보면 passage가 증가하고 세포가 노화되면서 virus productivity 역시 감소하는 것을 알 수 있다. 그러나 PMA를 처리한 세포를 보면 성장은 다른 세포들 보다 좋지 않았지만 (Fig.1.55) virus 생산성은 우수하였고 passage가 증가하여도 상대적으로 높은 virus 생산성을 보이는 결과를 얻었다. PMA의 처리가 virus의 생산성을 증진시켜줄 수 있었다.

12. 최우수 뉴캐슬병 백신 생산 세포주 선발

배지 내에 항산화제(antioxidant)를 처리함으로써 바이러스 백신 생산량을 증가시키고자 하였다. 항산화제는 Cellular reactive oxygen species (ROS) toxicity를 줄여주는 작용을 한다. $O_2 \cdot^- + O_2 \cdot^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ 이런 과정을 통해 oxide radical을 제거한다. ROS는 cell membrane에서 지질을 산화시키거나 직접 유전자를 공격하면서 세포에 손상을 입힌다. 또한 중성친화성 세포의 apoptosis에서 중간단계 signal로 작용하기도 한다. 신호전달 체계를 망가뜨리거나 적혈구를 파괴하기도 한다. 지질의 과산화화(lipid peroxidation)는 세포막에서 지속적으로 일어나는 생리작용으로 불포화지질의 산화적 손상을 의미하며 이 반응이 극심한 경우에는 다양한 질병으로 진전될 수도 있다. 위와 같이 세포가 대사작용을 할 때 생기는 안 좋은 영향들을 줄여주기 때문에 세포가 잘 성장을 할 수 있다는 생각을 하였고 성장이 좋아지면 백신 생산성도 좋아질 것이라 가정하였다.

실험에서 사용한 항산화제로 DD-004란 물질을 사용하였다. DD-004 (Decursin derivative-004; 3-methylbut-2-enoic acid-7-hydroxy-2,2-dimethylchroman-3-yl ester)는 당귀(*Angelica gigas*)에서 분리된 테커신(Decursin)의 유도체로, 테커신에서 one ring of coumarin structure의 한 개 고리가 없고 분자량이 적으며 독성이 약하다. 아래의 그림은 테커신의 유도체들이다.

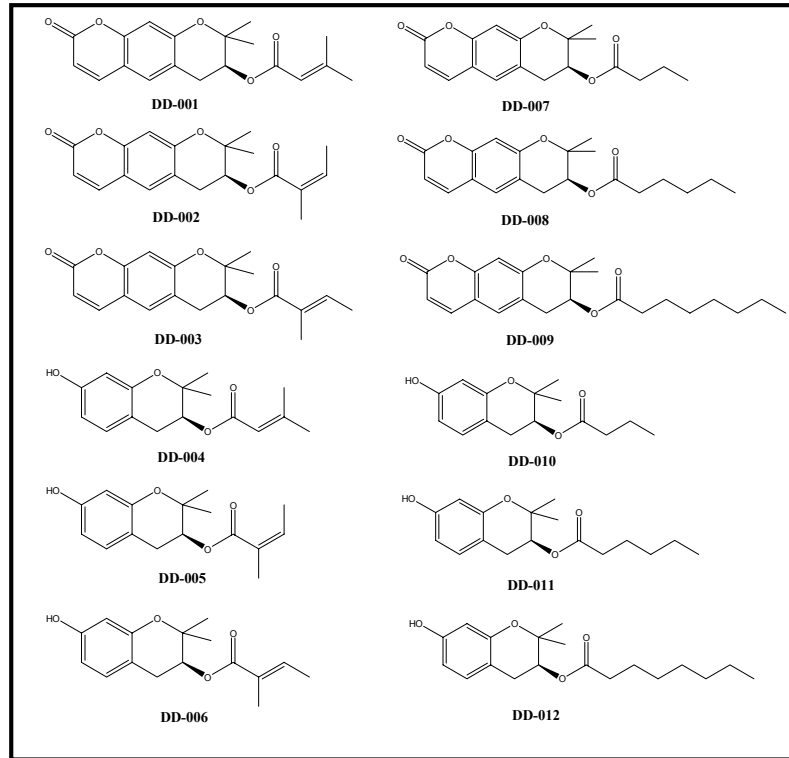


Fig. 1.61 테커신과 테커신 유도체들의 구조

DD-001; Decursin, DD-002; Decursinol angelate, DD-003; Decursinol tiglate, DD-004; 3-methylbut-2-enoic acid-7-hydroxy-2,2-dimethylchroman-3-yl ester, DD-005; cis-2-methylbut-2-enoic acid-7-hydroxy-2,2-dimethylchroman-3-yl ester, DD-006; trans-2-methylbut-2-enoic acid-7-hydroxy-2,2-dimethylchroman-3-yl ester, DD-007; butyric acid 2,2-dimethyl-8-dihydro-2H,8H-pyrano[3,2-g]chromen-3-yl ester, DD-008; Hexanoic acid 2,2-dimethyl-8-dihydro-2H,8H-pyrano[3,2-g]chromen-3-yl ester, DD-009; Octanoic acid 2,2-dimethyl-8-dihydro-2H,8H-pyrano[3,2-g]chromen-3-yl ester, DD-010; Butyric acid-7-hydroxy-2,2-dimethyl-chroman-3-yl ester, DD-011; Hexanoic acid-7-hydroxy-2,2-dimethyl-chroman-3-yl ester, DD-012; Octanoic acid 7-hydroxy-2,2-dimethyl-chroman-3-yl ester.

DD-004를 처리했을 때 세포의 성장을 억제하지 않고, 성장상태를 유지하거나 증식하는 효과를 보이는 최적 농도를 찾기 위해 실험을 수행하였다. DD-004의 효과를 비교하기 위해 이미 항산화제로 잘 알려진 비타민 C를 처리하였다. 세포를 접종할 때, DD-004와 비타민 C를 다양한 농도로 배지에 첨가한 후, 72시간 후에 세포의 농도를 측정하였다. 그 결과를 보면, DD-004 25 μM 처리했을 때가 처리하지 않은 세포에 비해 약 2배 가까이 세포수가 증가하였고 같은 농도의 비타민 C에 비해 더 좋은 결과를 보여주고 있다. 아무것도 처리하지 않은 세포의 경우 원래의 성장보다 적게 증가했다. 항산화제를 처리했을 때 두 배까지는 증가하지 않는다고 생각된다. DD-004 50 μM 은 세포 수 증가량이 크지 않았다. 따라서 배지 내에 처리할 항산화제로 DD-004 25 μM 로 결정하고 다음 실험을 수행하였다.

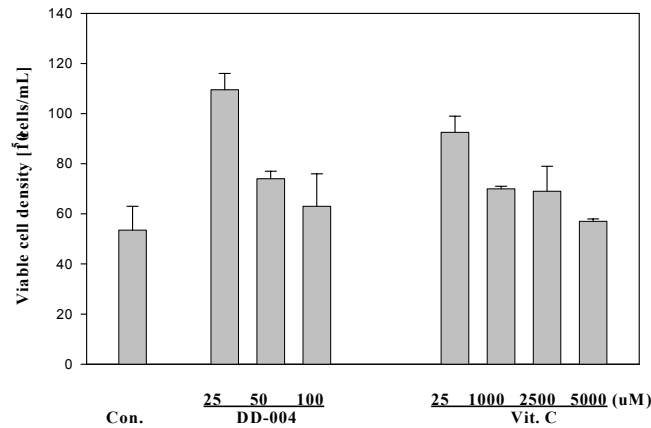


Fig. 1.62 DD-004와 비타민 C를 농도별로 처리한 후, 세포 성장의 비교.

초기 세포 농도는 5×10^4 cells/mL. 전체 volume was 2 mL. 배양 배지는 DMEM supplemented with/without DD-004 0.1%(v/v) and ascorbic acid 0.1%(v/v). 4일 후 viable cell density를 측정하였다. 모든 세포들은 passage 7에서 수행하였다.

DD-004를 배지 내에 처리했을 때와 처리하지 않았을 때의 성장곡선을 비교하였다. DD-004의 농도는 25 μ M과 50 μ M을 처리하였다. 배지 내에 처리는 0.1 % (v/v), 초기 농도는 5×10^4 cells/mL이고 7일간 24시간마다 세포수를 측정하였다. Fig. 1.62를 보면 DD-004를 25 μ M 첨가하여 키운 세포가 5일째까지 성장하는 것을 알 수 있다. DD-004가 세포 대사 중에 나오는 reactive oxygen species (ROS) toxicity를 줄여주기 때문에 세포 성장이 증가되는 것으로 보인다.

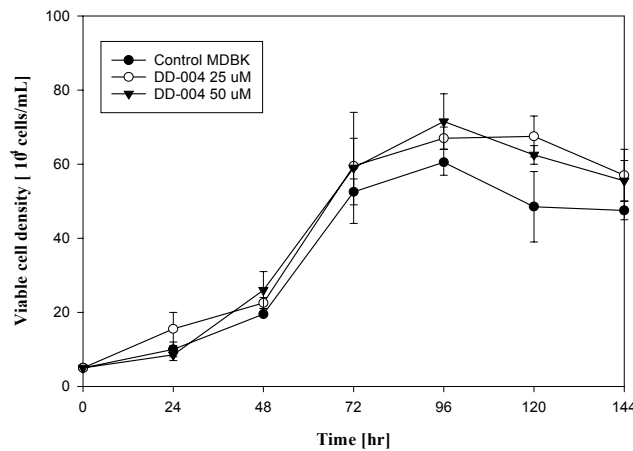


Fig. 1.63 DD-004를 처리한 후, 성장 곡선의 비교.

초기 세포농도는 5×10^4 cells/mL. 전체 volume was 2 mL. 배양 배지는 DMEM supplemented with/without DD-004 0.1%(v/v). 6일간 24시간마다 viable cell density를 측정하였다. 모든 세포들은 passage 7에서 수행하였다. .

ND 백신 생산성을 조사하기 위해 DD-004를 처리한 것과 처리하지 않은 것으로 나누어 NDV와 반응시키고, MDBK를 host cells로 하여 plaque assay를 수행하였다. 12 well plate에 각 group별 1×10^5 cells를 각 well에 접종하고 virus를 1 MOI로 첨가 후 72시간 배양한 다음 배지를 취하여 plaque assay를 수행하였다. Plaque assay는 MDBK가 confluent하게 자란 6 well plate에, -70°C 에서 보관한 virus sample을 녹여 media(w/o FBS)로 희석 후 각 well에 0.4 mL씩 넣어준 후 40분 동안 반응 시켰다. 이후 배지를 제거하고 배지와 agarose를 혼합한 overlay를 도말하여 주고 상온에서 굳혔다. 72hr 후, plaque가 보이면 formalin으로 cell을 고정시킨 후 overlay를 제거한 다음 crystal violet로 살아있는 cells를 염색시킨다. Plaque를 counting한 후 PFU/mL로 나타낸다. 이와 같은 과정으로부터 얻은 ND 백신 생산성에 대한 결과는 다음과 같다.

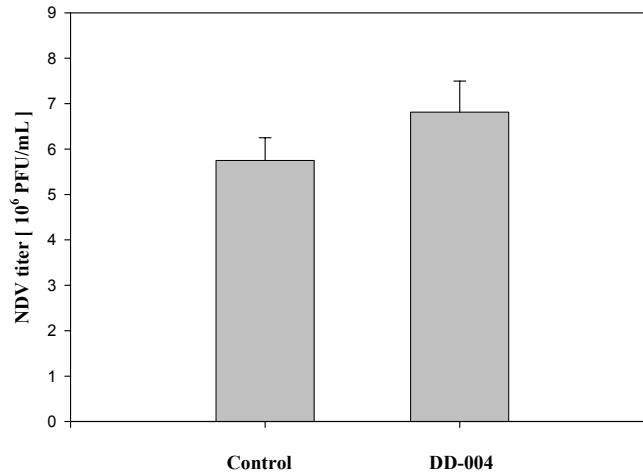


Fig. 1.64 DD-004를 처리한 세포와의 바이러스 생산성 비교.

초기 세포농도는 1×10^5 cells/mL. 전체 volume was 2.5 mL. 배양 배지는 DMEM-LG supplemented with/without DD-004 0.1 % (v/v). 바이러스는 1 MOI로 주입되었으며, 72 시간 후, MDBK 세포에서 plaque assay를 수행하였다. 72시간 후, 세포를 0.3 % formalin으로 고정하고, agarose over-lay를 제거하였다. 살아있는 세포들은 crystal violet으로 염색되었고 plaque를 세었다.

위 결과로 볼 때, DD-004를 배지 내에 처리한 세포에서 처리하지 않은 세포에 비해 약 1×10^6 PFU/mL 만큼의 바이러스 백신이 증가하였다. 세포의 농도와 성장 기간이 증가하면서 그만큼 바이러스가 증식할 수 있는 host의 수와 시간이 증가한 것으로 보여 진다. 성장곡선(Fig. 1.63)에서 DD-004 25 μ M을 처리한 세포와 성장 증가와 바이러스 백신 증가량을 비교해볼 때, 그 증가량이 비슷하기 때문에 항산화 작용과 백신 생산성 사이에 연관성이 있다고 생각된다.

13. 최우수 세포주 Characterization 및 형질전환을 이용한 세포주의 개량

Bovine의 erythrocytes에서 superoxide radicals을 제거하는 효소가 발견되었다. 이 효소를 superoxide dismutase (SOD)라고 하는데 $O_2 \cdot^- + O_2 \cdot^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ 이런 과정을 통해 oxide radical을 제거한다. SOD의 isozyme으로는 cytosolic copper/zinc SOD (Cu/Zn SOD), mitochondrial manganese SOD (Mn SOD)등이 있다. DF-1에서 Mn SOD mRNA의 발현은 다른 CEF에서 보다 증가하는 것으로 알려졌다. 반면 CAT의 mRNA 발현은 감소된 것으로 나타났다. 일부 endothelial cell에서 phorbol ester류의 물질에 의해 SOD의 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다.

세포주 개량의 방법으로 DF-1에서 SOD gene을 분리하고 이것을 MDBK cell에 넣어 radical stress를 감소시키고자 했다. 세포내 radical 감소가 virus 생산에 긍정적 영향을 미칠 것이라 생각하고 DF-1의 SOD gene을 분리하였다.

DF-1을 10^7 cells를 취했다. PBS로 두 차례정도 washing해준 다음 easy-BLUE (Intron Biotech. Korea) solution을 처리해 mRNA를 분리해 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR에 사용한 primer는 GenBank를 통해 얻은 chicken의 Cu/Zn SOD, Mn SOD의 sequence를 가지고 제작하였다.

Cu/Zn SOD의 primer sequence는 다음과 같고 F5-AGAATTCATGGCGACGCTGAAGGCC, R5-AAAGTCGACTTAGCACTTGGCTATTCCA 482 bp의 band가 RT-PCR로 발현이 예상되었다. Mn SOD의 primer sequence는 다음과 같고 F5-AGAATTCATGTTGTGCCGCTGGCG, R5-AAAAGCTAGCCTACTTTCTGCAAGATTCATA 692 bp의 band가 RT-PCR로 발현이 예상되었다. control로 사용된 β -Actin의 primer sequence는 다음과 같다. F5-CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT, R5-TAGAGCCACCAATCCACACA and 253 bp band가 발현이 예상되었다.

PMA가 일부 cell에서 SOD gene 발현을 activation시키는데 이것이 MDBK cell에서도 발현되는지 알아보기 위해 다음과 같이 200 nM PMA를 4, 8, 12 시간 처리하여 gene의 발현이 어떻게 변하는지 살펴보았다.

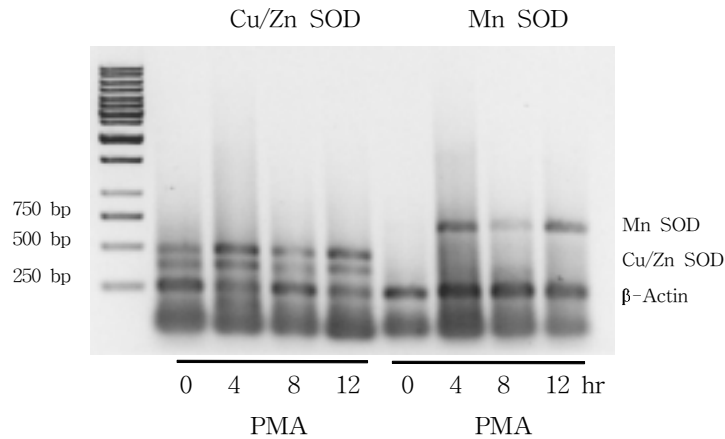


Fig. 1.65 DF-1 세포에서 PMA에 의한 Cu/Zn SOD and Mn SOD 유전자 발현. PMA 200 nM을 처리한 후, Cu/Zn SOD와 Mn SOD 유전자를 detecting하기 위해서 RT-PCR를 수행하였다. lane 1 : 1kb marker, lane 2~lane 5: Cu/Zn SOD gene (475 bp), from lane 6 to lane 9 : Mn SOD gene (685 bp).

DF-1 cell에 PMA를 처리해 주었을 경우 시간의 변화에 따른 SOD gene 발현의 차이를 관찰 하였다. 결과에서 보는 바와 같이 4시간 후에 Cu/Zn SOD와 Mn SOD gene 발현이 activation되었다. 이후 8 시간에는 발현이 약해지다 12시간 처리했을 때 다시 SOD gene 발현이 activating되었다. 보는 바와 같이 PMA 처리가 시간에 따라 SOD gene 발현을 조절하는 것으로 나타났다. 여기서 얻은 세포들을 가지고 virus의 생산성을 측정하였다.

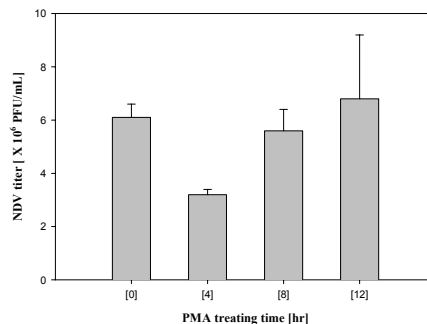


Fig. 1.66 SOD 발현에 따른 바이러스 생산수율

SOD발현에 따른 virus 생산성을 비교해 보았다. SOD gene이 발현되면서 virus 생산성은 오히려 감소하였고 이후 시간이 증가하면서 virus의 생산량은 증가하였다. 처음 4시간 처리 후 virus 생산성은 처음보다 감소하였지만, SOD gene발현이 낮아지면서 virus생산량은 증가하였다. 이후 다시 SOD gene 발현이 증가하였지만, 오히려 발현되지 않은 때 보다 증가한 경향을 보였다 (Fig. 1.66).

2절 제1세부: 고농도 동물세포 배양을 이용한 뉴캐슬병 백신의 최적 생산 전략 개발 (강원대 정연호 교수)

1. 연구수행방법

1) 세포주 및 세포배양

본 실험에서 뉴캐슬병 바이러스 생산을 위해 사용한 숙주세포는 바이러스 백신 개발 및 생산에 널리 쓰이고 있는 African green monkey kidney (Vero) 세포주를 이용하였다. 세포 성장을 위한 기본배지로는 powder 상태인 RPMI 1640을 이용하였으며 5% fetal bovine serum (FBS, Gibco.), streptomycin sulfate (100 μ g/ml), penicillin G (100units/ml), 10mM sodium bicarbonate 및 10mM HEPES를 첨가하여 배지 1L를 만든 후 autoclave로 완전하게 멸균 (121 $^{\circ}$ C, 21min)된 여과장치 (0.22 μ m pore size membrane 사용)를 사용하여 clean bench 내에서 진공여과 하였다. 배지는 냉장 보관하였고, 사용할 때 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 pre-incubation하여 사용하였다.

본 실험 및 계대배양은 모두 1×10^4 cells/ml로 접종하여 humidified CO₂ incubator (5% CO₂, 95% air)에서 37 $^{\circ}$ C의 조건으로 배양했으며 flask바닥에 세포가 완전히 monolayer를 형성할 때 (접종 후 약 3일)를 계대배양 시기로 판단하여 새로운 flask로 세포를 옮겨 주었다. 계대배양 방법은 flask에 있는 배지를 제거하고, phosphate-buffered saline(PBS)으로 2회 세척한 후 0.25% trypsin (Sigma)을 5ml 첨가하여 세포를 완전하게 떼어내었다. 이들을 1300rpm에서 5분간 원심 분리한 후 상등액을 버리고 새로운 배지를 이용하여 잘 혼합한 후 일부의 sample을 취하여 trypan blue dye로 염색하여 haemocytometer상에서 세포 농도를 측정하였다.

2) 암모늄 이온과 Glucose의 분석

암모늄 이온 농도는 ammonium ion electrode(Orion)를 이용하여 측정하였다. 먼저 시료 5mL에 ammonia pH-adjusting ISA(Orion) 200 μ l를 넣고 stirrer로 잘 혼합하면서 mV 단위의 기전력을 측정하였다. Ammonium chloride 0, 2, 4, 6, 8, 10mM 용액으로 먼저 calibration curve를 작성하고 시료의 mV를 측정하여 mM 단위로 환산하였다.

Glucose 농도는 hexokinase법을 이용한 효소법(Sigma, No. 115)으로 520nm에서 spectrophotometer로 측정하였다.

3) 고정화 흡착제에 의한 암모늄 이온의 동시제거를 통한 고농도 배양

본 연구에서는 powder 형태인 Phillipsite-Gismondine synthetic zeolite(UOP)를 membrane type, chip type, bead type의 세가지 형태로 응용하여 배양에 이용하였다. Membrane type의 경우 dialysis tube(retain M.W. 12000, Sigma)를 running water에 3~4 시간동안 씻어 glycerin을 제거하고, 80 $^{\circ}$ C에서 1분 동안 0.3% sodium sulfide로 처리하여 sulfur compound를 제거한 다음 0.5g Phillipsite-Gismondine Synthetic zeolite를 packing시켜서 사용하였다. Packing된 membrane type immobilized adsorbent는 25 cm² tissue culture flask에 2개를 넣고 배양하였다.

Bead type(calcium alginate)의 경우 zeolite powder 30g을 100mL의 1.4% alginate solution(Sigma)에 넣고 잘 혼합한 후 이 혼합 용액을 펌프로 0.4mm nozzle을 통하여 50mM calcium chloride solution(Sigma)에 dropping시켜서 zeolite가 calcium alginate matrix에 포획된 형태로 제조한다. Bead type은 10mL 배양액에 3g을 첨가하여 배양하였다.

Chip type(cellulose acetate)의 경우 zeolite 10g을 cellulose acetate(Sigma) polymer 용액에 넣어 균

일하게 혼합한 후 slurry를 특수 제작된 유리판에 옮겨 부어 유리판 표면에서 film을 형성하게 한다. Film이 형성된 후 유리판 전체를 0°C chamber에서 1시간 동안 curing한다. Chip type은 10mL 배양액에 1g 을 첨가하여 배양하였다. 이러한 membrane type, chip type, bead type의 세 가지 형태의 고정화 흡착제의 암모늄 이온 제거 능력 및 세포 증진 효과를 비교하여 고농도 배양 시스템에 사용할 최적 고정화 흡착제의 형태를 선정하였다.

4) 미립담체를 이용한 숙주세포 대량배양 및 바이러스 배양

본 실험에서 사용한 미립담체는 비다공성 Cytodex-1,3은 각각 1g/l, 1.3g/l로 다공성 Cultispher-G는 1.7g/l를 PBS (Phosphate-buffered saline)에 충분히 swelling 한 후 여러 번 세척하여 멸균하였다. Spinner flask 표면에 세포가 부착하는 것을 방지하기 위하여 실리콘으로 코팅 (Sigmacoat, Sigma Co.) 하여 건조 후 멸균하였다. 세포가 미립담체에 잘 부착하도록 배지 50ml와 cell solution(1×10^5 cells/ml), 미립담체를 spinner flask에 넣고 초기 24시간 동안 33분마다 3분씩 40rpm에서 간헐적으로 교반하였다. 그 후 나머지 배지 50ml를 넣어 24시간 동안 40rpm에서 계속 교반하였으며, 24시간 후부터는 60rpm으로 연속적으로 교반하였다. 24시간마다 5ml씩 sampling하여 미립담체를 침전시킨 후 상등액은 암모니아 분석에 이용하였다.

5) Cultispher-G 미립담체에 배양되는 Vero cell의 serial propagation

가) ① 100ml spinner flask에서 1×10^5 cells/ml inoculum (microcarrier culture)

(0.17g/100ml microcarrier concentration)

② exponential phase (72시간 후부터 1/2 new media change)에서 supernatant remove

③ PBS washing (PBS ml/bead ml)

④ 0.25% trypsin 15min 처리 (1ml microcarrier pellet/2ml trypsin solution)

⑤ new media trypsin과 동일한 양으로 첨가

⑥ centrifugation (1500rpm, 5min)

⑦ supernatant remove

⑧ microcarrier resuspension

⑨ cell counting

⑩ new culture inoculation

나) ① 100ml spinner culture에서 얻은 microcarrier free cell + used microcarrier을 250ml spinner flask에 inoculum

② 1)과 동일한 방법으로 배양한 후 500ml spinner에 inoculum

다) 100ml - 250ml - 500ml 순으로 serial culture

6) 생물반응기에서의 백신 생산

생물반응기에서 microcarrier를 이용하여 협동과제에서 우수세포주로 선발된 MDBK세포를 배양하면서 백신 생산을 수행하였다. 이때 배양온도는 37°C, pH 7.2로 조절하였으며, 용존 산소량은 공기/ 질소 / 산소/ 이산화탄소를 이용하여 제2세부 과제에서 구축된 자동화 시스템을 이용하여 50%로 유지시켰다. 바이러스 감염 후 배양온도를 34°C로 조절하였고, 그 외의 조건들은 세포 배양과 동일하게 유지하였다. 백신의 생산을 위해 세포 배양 4일 후에 MOI 0.1로 감염시켜 백신생산을 하였고, 제2세부에서 확립한 유가식 배양을 위해 glucose 2g/l, glutamine 2mM의 fed-batch feeding을 infection 후 48hr에 실시하였다.

2. 연구수행내용

1) 1차년도 연구 개요

동물세포를 이용하여 뉴캐슬병 바이러스를 효과적으로 생산하기 위해서는 우선 고생산성의 고밀도 세포 배양 시스템의 개발이 필수 불가결하지만 배양환경의 변화, 영양성분의 고갈 독성 노폐물의 축적 등으로 인하여 고밀도 세포배양이 쉽게 이루어지지 않고 있다. 따라서 고밀도 세포배양을 위해서는 여러 가지 고밀도 세포배양을 제한하는 제한 인자를 규명하고 규명된 제한 인자의 특성 파악 및 세포성장에 미치는 영향연구를 수행하여 구체적인 세포성장 조절 및 제한인자의 해결 방안을 제시하여야만 고생산성 고밀도 세포배양 시스템을 확립할 수 있게 된다.

따라서 본 연구에서는 고농도 동물세포 배양 시스템 구축을 목표로 영양물질 소모 및 노폐물 생산 kinetics의 조사와 함께 영양물질 및 노폐물에 대한 세포성장의 민감성 조사를 통해 배지의 최적화 및 고농도 동물세포 배양 시스템 구축을 위한 기본 전략을 모색하였다. 또한 영양물질 및 노폐물에 대한 세포성장의 민감성 조사로부터 암모늄 이온의 축적이 세포 성장뿐만 아니라 뉴캐슬병 백신의 생산성도 저해하는 주요 인자임을 알게 되어 암모늄 이온의 축적 문제를 해결할 수 있는 고정화 흡착법을 도입함으로써 고농도 동물세포 배양 시스템의 기반을 마련하였다. 더구나 세포의 지수적 성장 후 세포의 사멸 (apoptosis)이 증가하는 현상은 동물세포의 고농도 배양을 방해하는 결정적 인자이다. 본 연구에서는 세포 사멸인자를 첨가하여 세포 사멸을 방지하는 새로운 고농도 세포배양시스템을 제시하였다. 한편 1차년도의 연구내용 중 미립담체 선정 및 최적 고정화 방법 개발에 관련해서는 제 2세부에서 생물반응기에서의 고농도 동물세포 배양을 위한 scale-up 전략 확립을 위해 최적 고정화 방법이 신속히 선정되어야 하므로 미립담체는 제1세부에서 선정하였고 최적 고정화 방법 개발은 제 2세부에서 진행하였다.

2) 영양물질의 세포 성장에 대한 민감성 조사

뉴캐슬병 바이러스의 대량 생산을 위한 숙주세포의 배양을 위해서는 glutamine과 glucose가 그 주요한 에너지와 carbon공급원으로 공급되어야 한다. 이러한 glucose metabolism과 glutamine metabolism은 세포에 필요한 에너지와 proteins, nucleotides, lipid 등의 precursors를 공급해준다. 또한 숙주세포는 여러 가지 호르몬, 성장인자, 표면접촉인자, spreading factor, transport factor, pH 완충제등 여러 가지 미세한 조절인자를 필요로 한다. 따라서 배양 시 특히 고농도 배양을 위해서는 이러한 물질들이 고갈되지 않도록 하는 전략의 개발이 가장 중요하며 이를 위해 이러한 여러 영양물질 및 조절인자의 상대적 농도가 숙주 세포 성장에 미치는 특성을 파악하는 것이 이러한 전략개발에 기본적으로 필요하다.

협동과제에서 뉴캐슬병 바이러스 생산을 위한 여러 가지 세포주를 개발하고 있으나, 배지의 최적화 및 고농도 동물세포 배양 시스템 구축을 위한 영양물질의 세포 성장에 대한 민감성 조사를 모든 세포에 다 적용하기 어렵고 우선 Vero세포를 대상으로 조사하였다. 왜냐하면 숙주세포로 사용한 Vero 세포는 백신 개발 시 숙주세포로 많이 사용되고 있으며, WHO에서 viral 백신 생산 세포로 승인되었고 현재 인간 소아마비 백신뿐만 아니라 인간과 동물 광견병 백신의 상업적인 제조에 사용되고 있기 때문이다. 이에 따라 Vero 세포의 기본 성장배지로 RPMI 1640을 사용하였으며, 주요 탄소원으로 쓰이는 glucose, 에너지원으로 사용되는 glutamine, 그리고 여러 가지 미세한 조절인자를 포함한 serum을 농도별로 첨가하여 고농도 동물세포 배양 시스템 구축을 위한 영양물질의 세포 성장에 대한 민감성 조사와 배지의 최적화를 위한 최적 농도의 조사를 수행하였다.

이를 위해 25cm² T-flask에 glucose, glutamine, 및 serum을 농도별로 첨가한 RPMI 1640 배지를 9ml씩 각각 넣고 숙주세포를 1×10⁴ cells/ml이 되게 접종하여 CO₂ incubator내에서 6일간 배양하였다. Trypsin-EDTA 용액을 사용하여 매일 세포를 회수한 후 hemocytometer로 세포농도를 각각 측정하여 세포성장 정도를 관찰하였다.

Fig.2.1은 초기 glucose의 농도에 따른 세포성장 곡선을 보여주고 있다. Glucose는 glycolysis를 통하

여 세포에 필요한 에너지를 공급하기 때문에 세포성장에 영향을 미친다. 이 그림에 의하면 glucose의 농도가 증가하면 세포의 성장이 증가하다가 3.2g/l glucose에서 최대의 세포농도를 나타내었고 그 이상의 농도에서는 glucose의 농도 증가에 따라 오히려 세포성장이 감소됨이 확인되었다. 동물세포의 배양을 위해 glucose가 주요한 에너지원과 탄소원으로 제공되어야 하나 세포의 에너지 대사를 위해 필요한 glucose metabolism에서는 주로 lactate가 발생되고, 이러한 lactate의 발생은 배지 내에 있는 glucose의 농도가 과도할 때 특히 증가되며 배지내의 pH의 감소를 통해 세포성장을 저해하는 것으로 많은 연구자들에 의해 보고되고 있다. 그러므로 Fig.2.1에서 배지내의 glucose농도의 증가는 glucose의 소비속도를 증가시키고 이와 동시에 lactate의 생산속도를 증가시켜 배지내의 pH를 감소시키고, 이러한 pH 감소가 직접적으로 세포성장을 저해한 것이다. 따라서 세포성장을 위한 최적배지를 위해 초기에 3.2g/l의 glucose농도를 공급하는 것이 필요하며, glucose의 경우 처음부터 고농도 배양에 필요한 양을 한꺼번에 공급하기보다는 lactate의 축적이 문제되지 않도록 유가식으로 공급해주는 전략이 고농도 배양을 위해 필요한 전략이다.

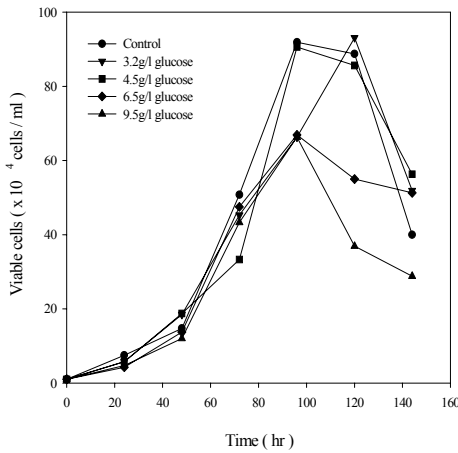


Fig.2.1 Comparison of cell growth kinetics of Vero cells between different glucose concentrations.

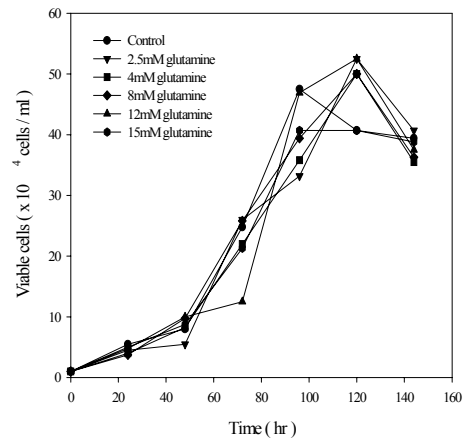


Fig.2.2 Comparison of cell growth kinetics of Vero cells between different glutamine concentrations.

Fig.2.2는 초기 glutamine의 농도에 따른 세포성장 곡선을 보여주고 있는데 glucose의 경우와 비슷한 경향을 보여주고 있다. Glutamine는 glutaminolysis를 통하여 세포에 필요한 물질과 에너지를 공급하기 때문에 세포성장에 영향을 미친다. 이 그림에 의하면 glutamine의 농도가 증가하면 세포의 성장이 증가하다가 2.5mM glutamine에서 최대 성장을 보여주고, 그 이상 농도에서는 오히려 세포 성장이 감소하는 경향을 보여주고 있다. 여기에서 glutamine은 주요 에너지를 공급할 뿐만 아니라 다른 amino acids, lipids, cell protein, antibodies, nucleotides, purine, pyrimidine을 합성하는데 탄소와 질소의 공급원으로 사용되는 필수 아미노산이다. 이러한 glutamine은 보통 glutamate를 거쳐 α -keto glutarate의 형태로 TCA cycle에 들어가서 CO_2 로 완전히 연소하거나 lactate로 부분 연소하게 되어 세포가 에너지를 얻게 되는데, 이때 α -keto glutarate로 전환될 때까지 2mol의 암모늄 이온 발생이 불가피하다. 또한 glutamate가 부분 연소하면 1mol의 암모늄 이온이 발생한다. 세포가 어떤 경로를 택할지는 세포의 에너지 요구도에 따라 달라지나, 그 어떤 경우에도 glutamine이 에너지를 생산하고 다른 세포 구성 물질을 합성하기 위해서는 1mol에서 2mol의 암모늄 이온 발생이 불가피하다. 이러한 암모늄이온의 발생속도는 배지내의 glutamine의 농도가 과도할 때 특히 증가되며 배지내의 암모늄 이온의 축적은 세포성장을 저해하는 것으로 많은 연구자들에 의해 보고되고 있다. 그러므로 Fig.2.2에서 배지내의 glutamine농도의 증가는 glutamine의 소비속도를 증가시키고 이와 동시에 암모늄 이온의 생산

속도를 증가시켜 배지 내에 암모늄 이온이 축적됨으로써 세포성장을 저해한 것이다. Fig.2.3은 glutamine의 농도에 따른 세포 성장에서 발생하는 암모늄 이온의 생성 kinetics를 보여주는 것으로 어느 정도 이상의 glutamine 농도에서 glutamine 농도가 증가하면서 암모늄 이온의 생성 속도가 증가함을 확실하게 보여주고 있으며 이에 따라 세포성장이 저해되는 현상을 뒷받침해주고 있다. 따라서 세포성장을 위한 최적배지를 위해 초기에 2.5mM glutamine을 공급하는 것이 필요하며, glutamine의 경우도 glucose와 마찬가지로 처음부터 고농도 배양에 필요한 양을 한꺼번에 공급하기보다는 ammonium ion의 축적이 문제되지 않도록 유가식으로 공급해주는 전략이 고농도 배양을 위해 필요하다.

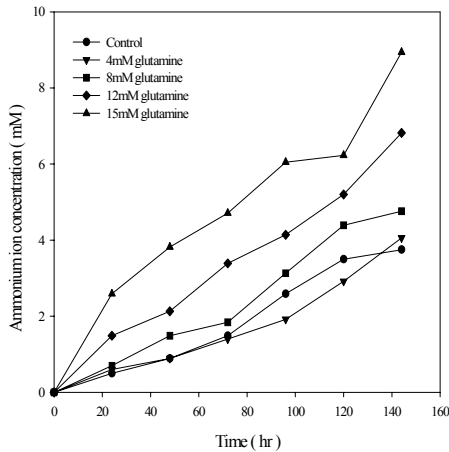


Fig.2.3 Residual ammonium ion concentration of Vero cell culture media with different glutamine concentrations.

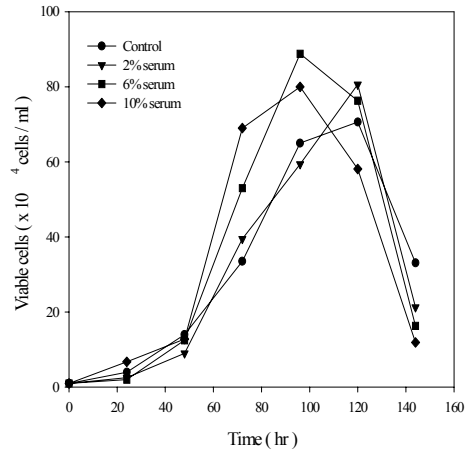


Fig.2.4 Comparison of cell growth kinetics of Vero cells between different serum concentrations.

Fig.2.4는 초기 serum의 농도에 따른 세포성장 곡선을 보여주고 있다. 아주 미량으로 들어가는 성분들은 배지성분에 포함되어 있기보다는 혈청에 의해 주로 공급된다. 혈청성분의 정확한 기능은 아직도 자세히 알려지지 않았지만 주로 albumin, transferrin, fibronectin과 같은 단백질류, insulin 혹은 이와 유사한 polypeptide 계통의 호르몬과 성장 인자들 그리고 lipid 및 mineral들로 구성되어 있기 때문에 세포성장에는 필수적이다. 혈청의 역할은 일차적으로 세포 성장에 필요한 영양분과 성장인자들을 공급하고, 이차적으로는 배양액의 삼투압 혹은 pH를 조절하거나 protease의 작용을 억제하는 등 배지내의 물리화학적 성질을 조절하여 세포의 생존에 적합한 환경을 조성하는 역할을 한다. 따라서 혈청을 배지 내에 농도별로 첨가하여 최적 농도를 조사하였다. Fig.2.4는 그 결과로서 serum의 농도가 증가할수록 세포 성장과 세포 수율이 증가하여 serum이 세포성장 전반에 걸쳐 큰 영향을 나타내고 있다는 것을 알 수 있었고, 6% 혈청 첨가 시 8.9×10^5 cells/ml로 가장 좋은 세포성장을 보여주고 있다. 하지만 일반적으로 숙주세포인 Vero세포는 5% 혈청 농도에서 배양되기 때문에 6%와 큰 차이가 없어 이후 모든 세포배양은 5%의 혈청을 첨가하여 사용하였다. 하지만 serum은 값이 비싸기 때문에 serum이 아닌 다른 영양물질의 보강으로 세포성장의 증진을 모색하는 것이 바람직하다.

3) 노폐물의 세포 성장에 대한 민감성 조사

동물세포의 배양을 위해 glutamine과 glucose가 주요한 에너지원과 탄소원으로 제공되어야 한다. 그러나 세포의 에너지 대사를 위해 필요한 glucose metabolism에서는 주로 lactate가, glutamine metabolism에서는 주로 ammonium ion이 발생된다. 즉 glucose, glutamine은 필수적으로 요구되나 이 과정에서 lactate와 ammonium ion의 발생은 불가피하다. 이러한 lactate와 ammonium ion의 배지내의 축적은 세포 성장 및 세포 생성물의 생산성을 저해한다. 따라서 배양 시 특히 고농도 배양을 위해서는 이러한 물질들이 축적되지 않도록 하는 전략의 개발이 가장 중요하며 이를 위해 이러한 노폐물들의 상대적 농도가 숙주 세포 성장에 미치는 특성을 파악하는 것이 이러한 전략개발에 기본적으로 필요하다.

노폐물 중 lactate의 경우는 pH를 낮춤으로써 세포성장을 저해하는 것으로 보고되어 있으나 이 경우는 pH controller가 장착된 bioreactor를 사용하면 쉽게 해결이 가능하다. 하지만 동물세포에서 에너지를 얻는 과정의 어쩔 수 없는 부산물인 암모늄 이온은 세포 성장과 세포 생성물의 생성에 심한 저해 효과를 나타내는 것으로 그 해결이 쉽지 않다. 여러 보고에 의하면 Mouse L cell은 0.5mM, 3T3 cell과 BHK cell은 1mM 이하, mouse hybridoma는 2~3mM, MDCK cell은 4mM 이상의 암모늄 이온 농도에서 세포 성장이 저해되는 것으로 보고되었다. 이러한 암모늄 이온의 저해 효과는 뉴캐슬병 바이러스의 숙주 세포인 Vero세포의 경우도 예외는 아니다. 따라서 본 연구에서는 배지의 최적화 및 고농도 동물세포 배양시스템 구축을 위한 노폐물의 세포 성장에 대한 민감성 조사로 초기 암모늄 이온의 농도가 세포 성장에 미치는 영향을 조사하였다.

Fig.2.5는 초기 암모늄 이온의 농도에 따른 세포성장 곡선을 보여주고 있다. 이 그림에 의하면 4mM 이상의 암모늄 이온 농도에서 성장이 저해되었고, 그 후 암모늄 이온의 농도가 높을수록 Vero 세포의 성장이 더욱 더 둔화되어 암모늄 이온에 의한 세포 성장 저해 현상을 정형적으로 보여주고 있다. 이러한 암모늄 이온은 glutaminolysis 과정에서 발생하는 부산물이므로 Fig.2.2에서 보여준 과도한 glutamine 농도에서 세포성장이 저해되는 현상을 뒷받침해주고 있다. 암모늄 이온에 의한 세포성장의 저해 현상이 심각하나 암모늄 이온의 발생은 피할 수 없기 때문에 뉴캐슬병 바이러스 생산을 위한 고농도 숙주세포 배양 시스템의 개발을 위해 암모늄 이온의 축적 문제를 반드시 해결해야 할 것이다.

4) 노폐물의 뉴캐슬병 백신의 생산에 대한 민감성 조사

동물세포 배양액내의 암모늄 이온의 축적은 세포성장 뿐만 아니라 바이러스 증식을 저해한다. Fig. 2.6은 암모늄 이온에 의한 뉴캐슬병 바이러스의 저해효과를 보여주고 있다. 이 그림에 따르면 배양액 내의 암모늄 이온의 농도가 높을수록 뉴캐슬병 바이러스의 titer가 낮아짐을 알 수 있었고 더구나 4mM 이상의 암모늄 농도에서 바이러스 생산성이 약 100배정도 낮아지는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 암모늄 이온이 바이러스 복제를 저해하기 때문이다. 이러한 저해 현상은 바이러스에 의한 숙주세포의 cytopathic effect의 방해에 의해 이루어진다. Fig.2.7은 보통의 회분식 배양에서의 암모늄 이온의 생성 kinetics를 나타내며 숙주세포로 사용된 Vero 세포의 경우 T-flask에서 약 4mM의 암모늄 이온이 생성됨을 알 수 있다. 이러한 수준의 농도는 세포의 성장뿐만 아니라 뉴캐슬병 백신의 생산성도 저해하는 농도이므로 고농도 숙주세포 배양 시스템의 개발뿐만 아니라 고생산성 백신 생산 시스템의 개발을 위해서도 암모늄 이온의 축적 문제를 반드시 해결해야 한다. 더욱이 숙주세포의 대량배양과 바이러스 백신의 대량생산을 위한 전략으로 유가식 배양을 이용할 경우, 암모늄 이온에 의한 뉴캐슬병 바이러스 증식에 더 큰 영향을 줄 것으로 생각되어 암모늄 이온의 축적 문제의 해결은 더욱더 중요해진다.

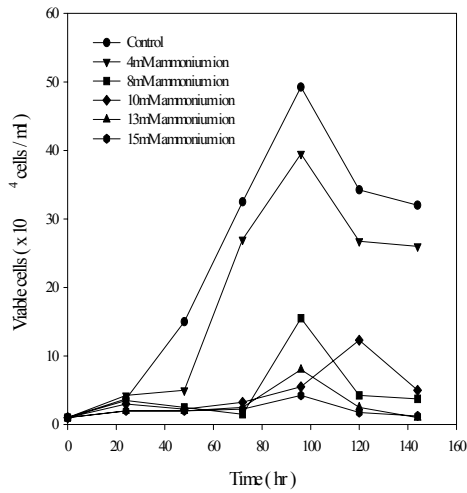


Fig.2.5 Comparison of cell growth kinetics of Vero cells between different ammonium ion concentrations.

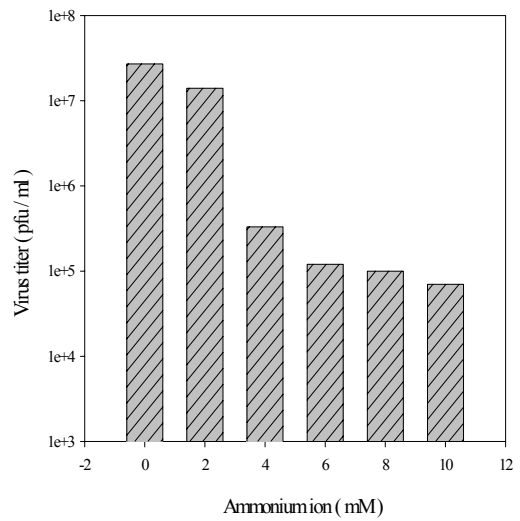


Fig.2.6. Inhibition of NDV production by ammonium ion in Vero cell culture.

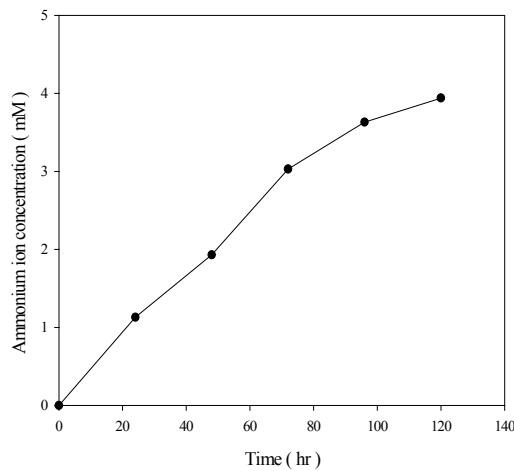


Fig. 2.7. Kinetics of ammonium ion production by Vero cells on Cultispher-G microcarrier.

5) 암모늄 이온의 동시제거를 위한 고정화 흡착제의 개발

개발된 고정화 흡착제의 암모늄 이온 흡착성을 조사하기 위하여 bead 형태의 흡착제 20g 을 50mL 의 배양액에 넣고 37°C shaker에서 300rpm으로 흔들며 주면서 흡착실험을 수행하였고, 그 결과를 Fig. 2.8에 나타내고 있다. Fig. 2.8에 의하면 불과 10 여분 만에 평형에 다다르고 있으며 제거율도 85% 정도를 나타내고 있어서 개발된 흡착제가 세포배양액으로부터 암모늄 이온의 제거에 효과적으로 이용될 수 있음을 보여주고 있다. 이러한 bead type의 immobilized bead는 reactor안에서 microcarrier 형식 또는 cage 형식으로 사용되거나 reactor 밖에서 column 형식으로 packing하여 external closed loop 형태로 사용될 수 있다.

Fig.2.9는 film 형태의 고정화 흡착제의 성능 실험을 위해 3mm x 3mm로 자른 chip형태의 흡착제를

3mM ammonium chloride solution 40mL에 무게를(0.3, 0.7, 1.6, 3.0, 4.5g) 달리하여 집어넣어 37°C shaker 에서 24 시간 접촉한 후, 잔류 암모늄 이온의 농도를 측정된 결과를 나타낸 것이다. Chip 형태의 흡착제를 많이 집어넣을수록 잔류 암모늄 이온의 농도가 낮아짐을 알 수 있어 암모늄 이온 흡착이 잘 이루어짐을 확인할 수 있었다. 이 형태의 흡착제는 잘게 나누어 chip형태로 반응기에 적용하거나 반응기 벽면에 장착시키는 형태로 암모늄 이온의 동시제거를 수행할 수 있다. Membrane type의 고정화 흡착제는 이미 powder 형태의 성능이 입증된 상태라 흡착능의 확인실험을 생략하였다.

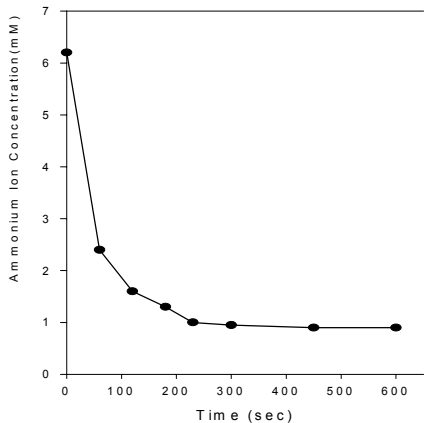


Figure 2.8 Ammonium ion adsorption kinetic with bead type immobilized adsorbent

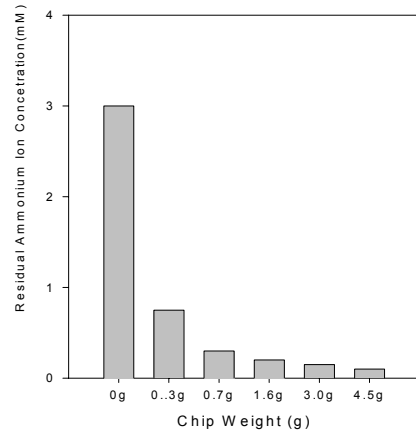


Figure 2.9 Residual ammonium ion concentration after adsorption with various amounts of chip type immobilized adsorbents.

6) 고농도 배양 시스템에의 응용을 위한 최적 고정화 흡착제 선정

Anchorage-dependent CHO 세포의 배양 시 암모늄 이온의 동시 제거를 위한 최적의 고정화 흡착제를 선정하기 위해 membrane, chip, bead type의 흡착제를 T-flask에 첨가하여 배양한 후 세포 성장과 세포생존율의 관점에서 최적 고정화 흡착제를 선정하였다. 세 가지 형태의 고정화 흡착제를 첨가한 것과 첨가하지 않은 CHO 세포의 배양에서 4일 경과 후 세포 밀도와 생존율, 잔류 암모늄 이온의 농도를 Fig.2.10에 나타내었다. 세포 농도 측면에서 비교해 보았을 때 membrane type 고정화 흡착제를 첨가한 배양에서 9.5×10^5 cells/mL로 가장 높게 나타났고, 고정화 흡착제를 첨가하지 않은 배양이 6.0×10^5 cells/mL로 나타났다. Chip과 bead type의 경우 5.5×10^5 cells/mL과 5.0×10^4 cells/mL로 고정화 흡착제를 첨가하지 않은 배양보다 더 낮게 나타났다. 이런 결과는 chip이나 bead type의 경우 matrix가 견고하지 못하여 일부의 작은 zeolite particle들이 빠져나와 tissue culture flask 바닥에 존재함으로써 anchorage-dependent CHO 세포가 flask 표면에 붙는 것을 방해하기 때문으로 추정된다. 생존율을 보면 고정화 흡착제를 첨가하지 않은 경우와 membrane type, chip type의 고정화 흡착제를 첨가한 경우에 95% 이상으로 유사하게 유지되었고, bead type의 고정화 흡착제를 첨가한 경우에는 75% 정도로 낮게 유지되었다. 이러한 결과로 미루어서 anchorage-dependent cell의 경우에는 alginate bead나 cellulose acetate chip은 적절하지 못함을 알 수 있었다.

암모늄 이온의 농도는 고정화 흡착제를 첨가하지 않은 경우보다 고정화 흡착제를 첨가한 배양에서 모두 1 mM이하로 낮게 나타남을 볼 수 있어 암모늄 이온 흡착 자체는 문제가 없음을 알 수 있었다. 이 상에서 membrane, chip, bead type 고정화 흡착제 모두 암모늄 이온에 대해 높은 선택성 흡착을 나타내지만, 세포 성장과 생존율 면에서 보았을 때 anchorage-dependent cell을 배양할 경우에는 membrane type의 고정화 흡착제가 최적의 흡착제임을 알 수 있었다. 또한 membrane type의 고정화 흡착제를 사용하였을 경우에 암모늄 이온의 흡착으로 말미암아 control의 경우보다 세포농도가 60% 정도 증가됨을 알 수 있어서, 암모늄 이온의 동시제거를 통한 고농도 동물세포배양 시스템의 구축이 membrane type의 고정화 흡착제의 사용으로 가능함을 알 수 있었다.

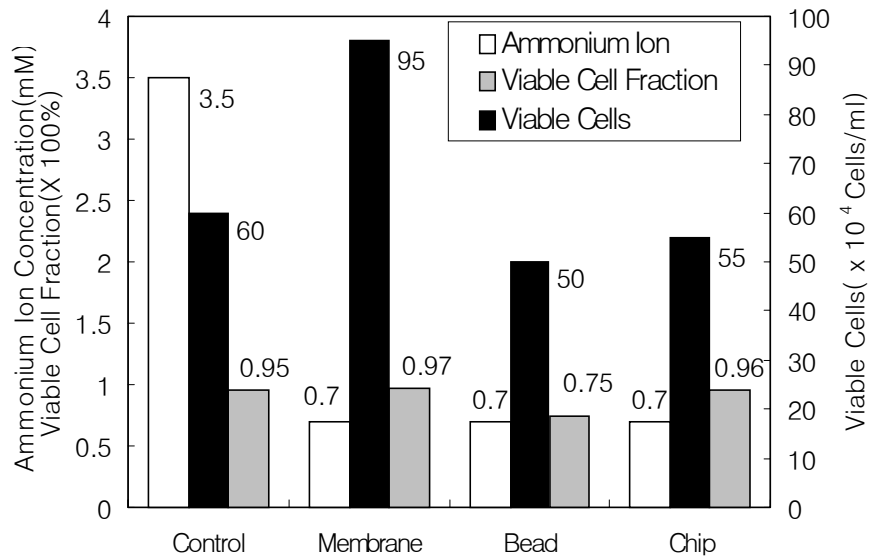


Fig.2.10 Performance comparison of various forms of immobilized adsorbents in terms of final cell density, viability, and ammonium ion concentration. Data were obtained after 4 days culture of Vero cells

7) 세포사멸 방지제의 첨가에 의한 고농도 세포배양 시스템 확립

세포의 지수적 성장 후 세포의 궤사(necrosis)와 세포의 사멸(apoptosis)이 증가하는 현상은 동물세포의 고농도 배양을 방해함으로써 생산성을 저해시키는 결정적인 인자이다. 이 중 apoptosis는 세포 배양 중 glutamine, glucose, 또는 용존산소의 부족으로 발생하는 것으로 cell이 수축하여 크기가 작아지며 DNA분열을 일으키고 chromatin이 응축된다. 본 연구에서는 세포 사멸인자를 첨가하여 세포 사멸을 방지하는 새로운 고농도 세포배양시스템을 제시하였다.

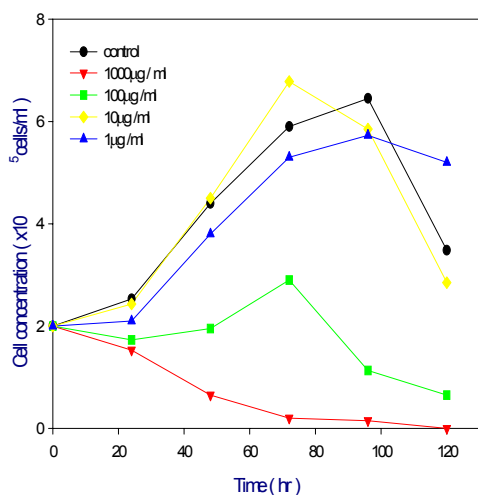


Fig.2.11 Effect of apoptosis inhibitor on Vero cell growth kinetics (high concentration range)

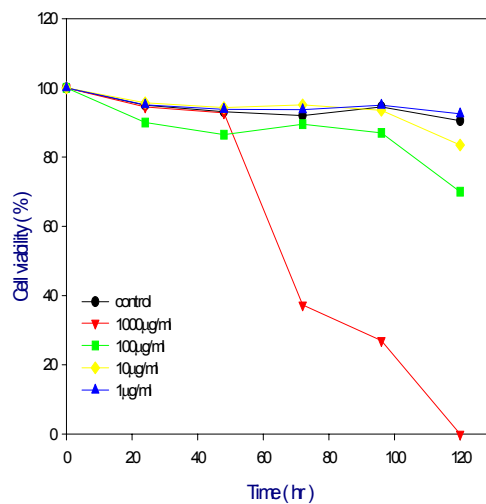


Fig.2.12 Effect of apoptosis inhibitor on the viability of Vero cells (high concentration range)

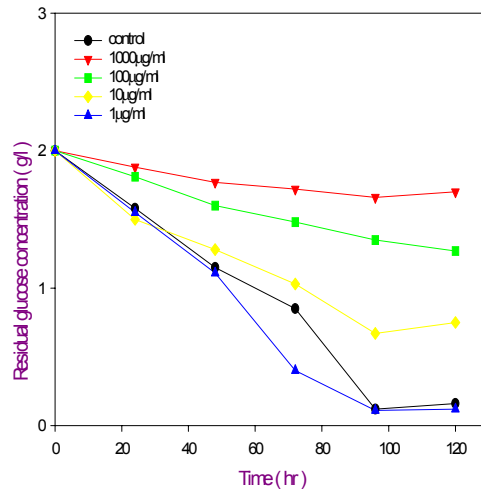


Fig.2.13 Effect of apoptosis inhibitor on glucose consumption kinetics on Vero cell (high concentration range)

Fig.2.11은 세포사멸 방지제의 농도변화에 따른 Vero세포의 세포성장곡선을 나타낸다. 첨가량이 10 µg/ml일 경우에는 세포 증진 효과가 있지만 100 µg/ml 이상일 때에는 control보다 낮아짐을 알 수 있어서 100 µg/ml 이상일 경우에는 세포성장을 저해함을 알 수 있었다. Fig.2.12는 이 경우의 세포의 생존율을 조사한 결과로 특히 1000 µg/ml의 고농도가 첨가되었을 경우에는 세포 생존율이 급격히 떨어짐을 알 수 있어서 고농도의 세포사멸 방지제는 오히려 세포의 사망률을 증가시킴을 알 수 있었다. Fig.2.13은 세포사멸 방지제의 농도변화에 따른 glucose 소모 kinetics를 나타낸다. 100 µg/ml 과 1000 µg/ml의 경우에는 세포가 자라지 못하여 glucose가 소모되지 못하였으나, 특이한 점은 10 µg/ml 경우에 세포 성장이 증대되었음에도 불구하고 glucose의 소모가 control에 비해 작다는 점이며 이것이 사실일 경우 다른 에너지 source의 소모가 증가되는지를 확인할 필요가 있다.

한편 세포사멸 방지제가 100 µg/ml 이상일 경우에는 세포성장을 저해함이 확인되었기 때문에 최적의 세포사멸 방지제의 첨가 농도는 10 µg/ml 근처의 세포사멸 방지제의 농도 변화에 따른 세포성장곡선을 조사함으로써 결정할 수 있다. Fig.2.14은 그 결과를 나타낸 것으로 3 µg/ml 이 최적의 세포성장을 보여주며 control보다 50% 정도 세포 농도가 증가됨으로써 적절한 농도의 세포사멸 방지제의 첨가가 고농도 동물세포 배양 시스템의 구축에 필수적임을 알 수 있었다. Fig.2.15는 이 경우의 세포의 생존율을 조사한 결과로 10 µg/ml 이하로 세포사멸 방지제를 첨가하는 경우 모두 다 세포 생존율이 control보다 증진됨을 보여줌으로써 세포사멸 방지제로서의 역할을 충분히 하고 있음을 알 수 있었다.

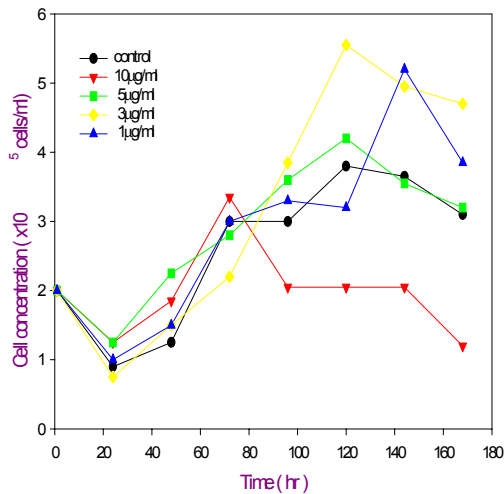


Fig.2.14 Effect of apoptosis inhibitor on Vero cell growth kinetics (low concentration range)

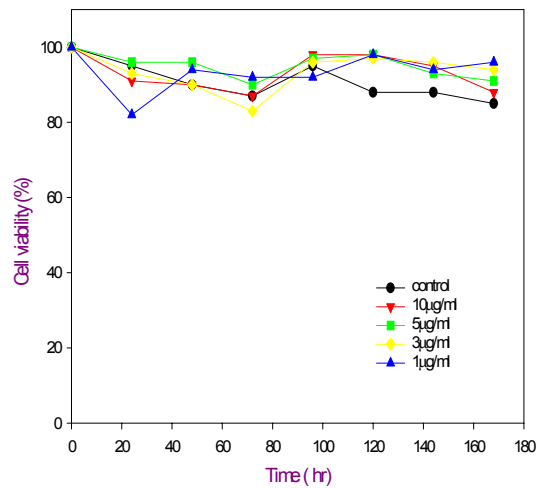


Fig.2.15 Effect of apoptosis inhibitor on the viability of Vero cells (low concentration range)

8) 최적 미립담체 선정 및 고정화 방법의 최적화

최적 고정화 방법 개발을 위한 최적 미립담체를 선정하기 위해 여러 가지 다양한 미립담체를 조사하였다. 비 다공성 미립담체인 Cytodex-1, 3과 다공성 미립담체인 Cultispher-G를 사용하여 최적 미립담체를 선정하였다. 세포가 미립담체에 잘 부착하도록 배지 50ml와 cell solution(1×10^5 cells/ml), 미립담체를 spinner flask에 넣고 초기 24시간 동안 33분마다 3분씩 40rpm에서 간헐적으로 교반하였다. 그 후 나머지 배지 50ml를 넣어 24시간 동안 40rpm에서 계속 교반하였으며, 그 후부터는 60rpm으로 연속적으로 교반하였다. Fig.2.16에서 나타난 바와 같이 Vero 세포의 경우에는 Cultispher-G에서 가장 좋은 세포 성장률(9.55×10^5 cells/ml)을 보였다. Cultispher-G 미립담체는 240 μ m의 평균 직경, 20 μ m의 pore 크기를 지닌 젤라틴 미립담체이다. Cultispher-G 미립담체는 Vero, CHO, vascular endothelial 세포의 성장을 위한 지지체로 spinner flask에서 사용되었다. 비다공성 미립담체와 비교 시 다공성 미립담체인 경우 더 높은 성장 표면적을 제공하기 때문에 이러한 결과가 나온 것으로 판단된다. 따라서 이후 모든 실험에서 Cultispher-G를 사용할 예정이다. 또한 세포 성장률을 증가시키기 위해 선정된 Cultispher-G의 양을 증가시켜 표면적을 증가시키므로써 세포 성장률을 비교하였다(Fig.2.17). Cultispher-G 양이 증가함에 따라 세포 성장률이 저하됨을 확인하였다. 이러한 결과는 미립담체 배양 시 부착성 세포가 부유성 세포보다 훨씬 더 전단력에 약해 미립담체 배양에서 교반 시 bead간의 충돌 그리고 유체 역학적인 측면에서 볼 때 bead 주변에 생기는 작은 소용돌이 때문이다. Fig.2.17에 의해 최적의 Cultispher-G 양은 1.7g/l로 결정하였다.

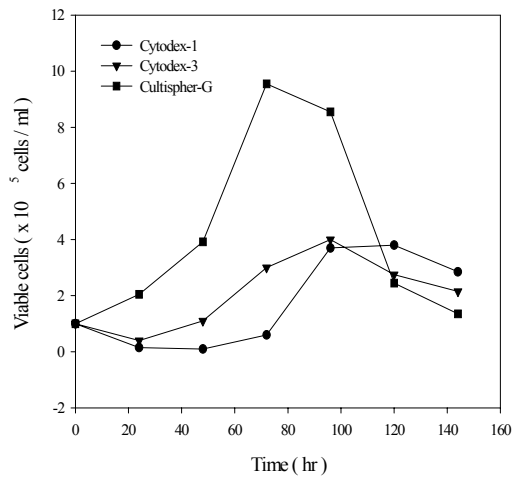


Fig.2.16. Comparison of cell growth kinetics of Vero cell cultured with different type of microcarriers

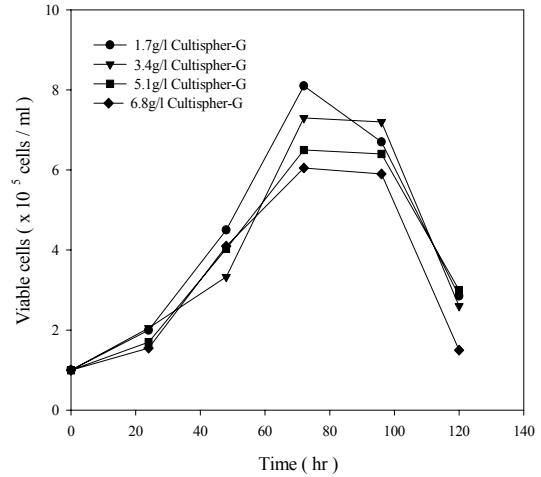


Fig.2.17 Comparison of cell growth kinetics of Vero cells between different Cultispher-G microcarrier concentrations.

Fig.2.18은 미립담체 배양 후 24시간 후 세포 성장을 보여주고 있으며, Fig.2.19은 96시간 후 미립담체에 세포가 confluent 하게 자란 모습과 미립담체의 뭉침 현상을 보여주고 있다. 이는 Vero 세포가 뭉치는 경향을 지니고 있기 때문으로 생각된다. 그러므로 세포와 미립담체 사이의 관계를 최대화시키기 위한 최적의 배양조건이 고려되어야 한다.

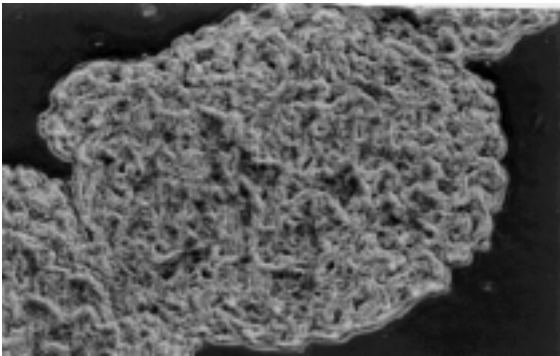


Fig.2.18 Microscope picture of Vero cells growing on Cultispher-G (1 day after inoculation)

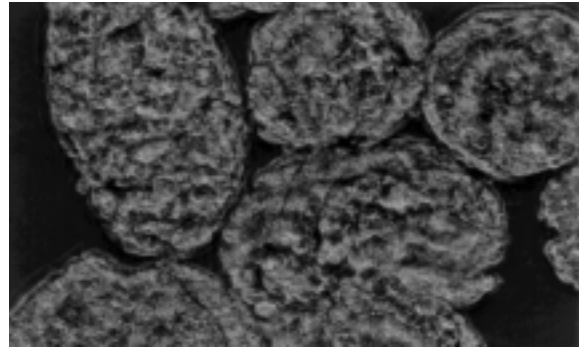


Fig.2.19 Microscope picture of confluent monolayer of Vero cells on Cultispher-G (4 days after inoculation).

Cultispher-G 미립담체의 가격이 비싸기 때문에 이의 재사용 가능성 및 scale-up 가능성을 타진하기 위하여 Cultispher-G 미립담체에 배양되는 Vero cell의 serial propagation에 대해 조사하였고 그 결과를 Fig. 2.20에 나타내었다. 이 그림에 의하면 2-3회 까지는 미립담체의 재사용이 가능하며 큰 scale로의 scale-up도 가능하나 재사용 횟수나 scale-up의 한계는 있는 것으로 나타났다.

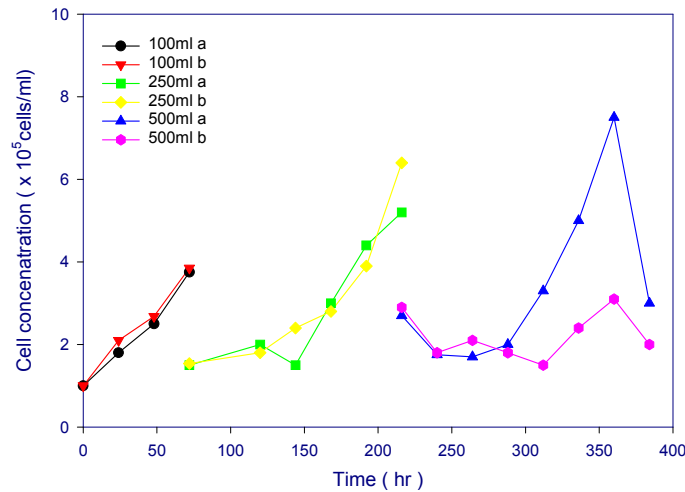


Fig.2.20 Serial propagation of Vero cells on Cultispher-G

9) 2차년도 연구 내용 개요

동물세포를 이용하여 뉴캐슬병 바이러스를 효과적으로 생산하기 위해서는 우선 고생산성의 고밀도 세포 배양 시스템의 개발과 함께 고 생산성 뉴캐슬병 백신 생산 시스템 구축 및 운전 전략의 확립이 필수 불가결하다. 따라서 1차년도에서는 고밀도 세포 배양 시스템을 개발하였고 이를 바탕으로 2차년도에서는 고 밀도 배양 시스템 확립을 위한 추가 전략 개발과 함께 백신 생산 배지의 최적화, 최적 생산 조건 확립, 첨가제 최적화 연구 등 여러 가지 기초 연구를 통해 Bioreactor를 기반으로 하는 최적 백신생산 시스템을 구축하고 이러한 시스템을 위한 최적 운전 전략을 확립하였다.

따라서 지금까지 2차년도 연구에서는 1차년도에서 확인한 세포사멸억제제 외 두 종의 세포사멸억제제 후보물질의 성능을 조사함으로써 고밀도 세포 배양 시스템 및 백신 생산 시스템에서의 응용 가능성을 조사하였고 이미 1차년도에서 확립한 최적 MOI와 최적 감염 시스템, 최적 미립담체 및 고정화 조건을 바탕으로 pH와 혈청 농도 등 기본 백신 생산 조건의 확립, 생산성 향상을 위한 첨가제 조사, 암모늄 이온의 백신 생산에 대한 영향 조사, 고정화 흡착제의 적용 가능성 조사 등을 통해 고 생산성 뉴캐슬병 백신 생산 시스템 구축을 위한 기본 전략을 모색하였다.

10) 고농도 동물세포 배양시스템 구축을 위한 최적 세포사멸억제제의 선정

세포의 지수적 성장후 세포의 괴사(necrosis)와 세포의 사멸(apoptosis)이 증가하는 현상은 동물세포의 고농도 배양을 방해함으로써 생산성을 저해시키는 결정적인 인자이다. 이 중 apoptosis는 세포 배양 중 glutamine, glucose, 또는 용존산소의 부족으로 발생하는 것으로 cell이 수축하여 크기가 작아지며 DNA분열을 일으키고 chromatin이 응축된다. 1차년도 연구에서는 세포사멸억제제 I를 첨가하여 세포 사멸을 억제함으로써 control보다 50% 정도 최대 세포 농도가 증가됨을 확인하였고, 이 사실을 바탕으로 적절한 농도의 세포사멸억제제를 첨가하는 새로운 고농도 세포배양시스템을 제시한 바 있다. 1차년도에서 발견한 세포사멸억제제 I외에 비슷한 계열의 세포사멸억제제 R 및 N의 성능을 조사하여 비교함으로써 최적 세포사멸억제제를 선정하였다.

가)세포사멸억제제 R의 사용 가능성 조사 및 최적 조건 확립

(1)세포사멸억제제 R의 Vero 세포 성장에 대한 영향

세포사멸억제제 후보물질 R이 Vero세포의 성장에 미치는 영향을 알아보았다. Culture vessel로는 ϕ 60 mm dish, 세포사멸억제제 R 투여농도 범위는 우선 0.01, 0.1, 0.5, 1 μ g/ml을 사용하였다. 투여방법은 ethanol에 녹인 세포사멸억제제 R을 배지를 이용해 원하는 농도까지 희석하였고, cell을 접종한 뒤 2 시간 후 세포가 바닥에 부착된 것을 확인하고 여러 다양한 농도로 희석된 배지를 기존의 배지와 교체하였다.

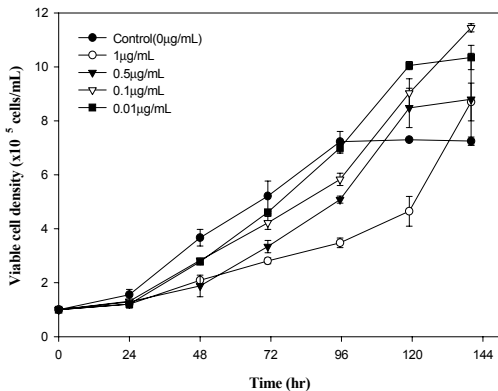


Fig.2.21 Effect of apoptosis inhibitor R on Vero cell growth kinetics (high concentration range)

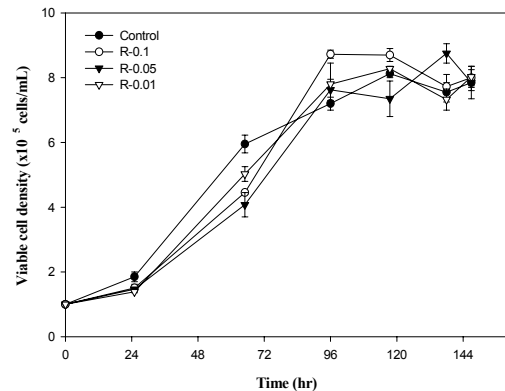


Fig.2.22 Effect of apoptosis inhibitor R on Vero cell growth kinetics (low concentration range)

Fig. 2.21에 의하면 배양 96시간까지 control이 가장 좋은 세포성장을 보였으나 그 이후 세포가 사멸되는 시점에서 0.01~0.5 μ g/ml의 세포사멸억제제 R이 함유된 배양에서 control보다 더 좋은 세포성장을 보여줌으로써 세포사멸억제제 후보물질 R이 세포사멸억제제로서 사용될 수 있음을 알았다.

이에 따라 Fig. 2.21에서 좋은 세포성장을 보여준 농도 범위인 0.01~0.1 μ g/ml의 낮은 농도 구간에서 Vero 세포의 성장을 조사함으로써 세포사멸억제제 R의 성능 확인하고 최적 첨가 농도를 선정하려 하였으며 그 결과를 Fig. 2.22에 나타내었다. 이 실험에 사용된 세포사멸억제제 R 농도 모두 control과 비교했을 때 약간 우수한 세포성장을 보여주었고 대략 0.05~0.1 μ g/ml의 첨가 농도가 최적임을 알 수 있었다.

(2) Ethanol과 methanol의 Vero세포 성장 저해 농도 조사

세포사멸억제제 R은 물에 불용성인 물질로써 DMSO, ethanol 등과 같은 유기용매에 잘 녹는다. 앞의 실험에서는 ethanol에 녹인 세포사멸억제제 R stock을 배지로 희석하여 원하고자 하는 농도로 조절하여 첨가하였다. 하지만 물에 불용성인 물질을 수용액으로 희석하는 경우 석출이 일어날 수 있으므로 희석의 과정을 거치지 않고 stock에서 곧바로 배지로 투여되어 최종농도로 맞추는 직접투여의 방법이 바람직하다. 그러나 이 경우 용매로 쓰이는 ethanol, methanol 등이 cell에 독성을 미칠 것이 예상되므로 어느 정도의 농도범위에서 사용할 것인지를 조사하기 위한 실험이 수행되었으며 그 결과를 Fig. 2.23에 나타내었다.

Fig. 2.23에서 보여주듯이 유기용매가 적게 들어갈수록 저해 현상이 줄어들음을 알 수 있으나, 0.1%의 경우 투여되는 양이 너무 적으므로 세포 성장에 크게 영향을 미치지 않는 1%의 투여농도로 사용하고자 한다.

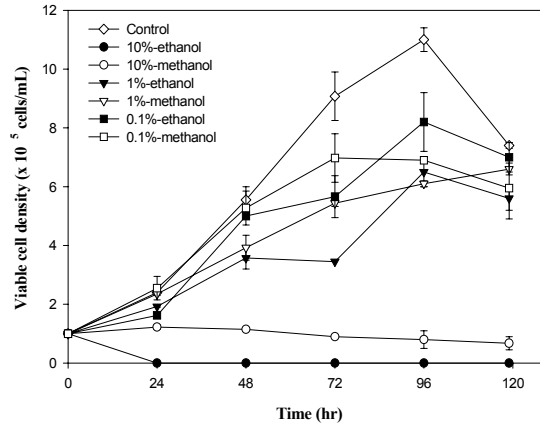


Fig.2.23 Effect of solvents on Vero cell growth kinetics

(3) 세포사멸억제제 R의 직접투여(Direct injection)와 간접투여(Indirect injection) 방식의 비교

Fig. 2.21과 Fig. 2.22에서 사용된 세포사멸억제제 R stock을 배지에 희석하여 투여하는 간접투여 방식과 2.23에서 사용되었듯이 1%의 농도로 세포사멸억제제 R stock을 배양중인 배지에 직접투여 방식을 비교하기 위해 각 방식에 따른 세포 성장을 조사하였고 그 결과를 Fig.2.24와 Fig.2.25에 나타내었다.

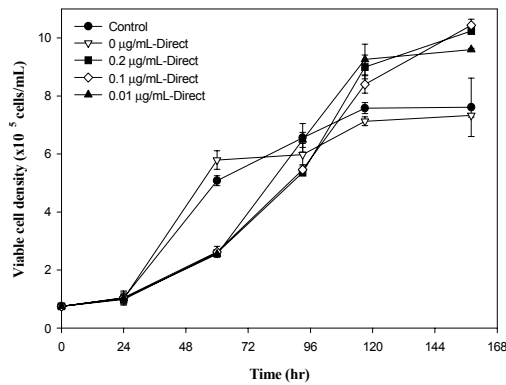


Fig.2.24 The cell growth kinetics of Vero cells with direct feeding of apoptosis inhibitor R

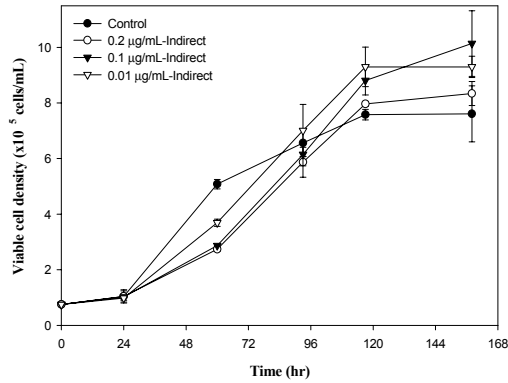


Fig.2.25 The cell growth kinetics of Vero cells with indirect feeding of apoptosis inhibitor R

Fig.2.24와 Fig.2.25에 의하면 직접투여방식과 간접투여방식 사이에 큰 차이는 없었으나 0.2µg/ml의 농도에서 직접투여방식의 경우 간접투여방식보다 높은 세포성장을 보이고 있다. 따라서 앞으로 불용성의 세포 사멸제를 투여할 경우에는 배양중인 배지에 첨가제를 직접 넣는 직접투여방식을 사용하고자 한다.

(4) 저산소 및 정상산소 배양조건에서 세포사멸억제제 R 투여농도에 따른 Vero cell의 성장 조사

배양 말기 산소 공급이 불충분한 저산소 상태에서 세포 사멸 방지 효과를 simulation하기 위해서, 저산소 상태에서 세포사멸억제제 R이 Vero cell에 어떤 영향을 미치는지 조사하여 Fig. 2.26에 나타내었다. 한편 정상 산소조건과 비교하기 위해 정상상태에서의 실험 결과를 Fig. 2.27에 나타내었다. Fig. 2.26에 의하면 저산소 배양조건에서 0.0001, 0.001, 0.01µg/ml의 rapamycin 첨가 배양이 control보다 다소 좋거나 비슷한 세포성장을 보이고 있다. 배양 72와 96시간에서의 0.01, 0.001µg/ml의 rapamycin 첨가 배양 결과는 counting 잘못된 것 같다. Fig. 2.27의 정상산소 배양조건에서 배양 96시간까지 rapamycin 첨가 배양은 control과 다소 비슷한 세포성장을 보이나 120시간에 0.01µg/ml의 rapamycin 첨가 배양이 가장 좋은 세포성장을 보인다. 이 결과에 의하면 세포사멸억제제 R의 효과는 정상 상태보다 저산소 상태에서 더 크다는 것을 알 수 있었고 이는 정상 산소 상태 보다 저 산소 상태가 더 많이 apoptosis를 유발하나 세포사멸억제제 R의 효과에 의해 효율적으로 억제되기 때문이다. 따라서 세포사멸억제제 R은 백신의 생산성 향상을 위해 낮은 산소 농도가 유지되어야 하는 경우 백신의 생산성 향상에도 기여 할 수 있는 가능성이 있어 추후 이 부분을 조사할 예정이다.

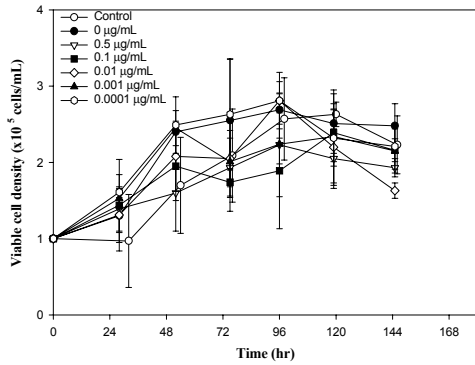


Fig.2.26 Effect of apoptosis inhibitor R on the cell growth kinetics of Vero cells in low oxygen state

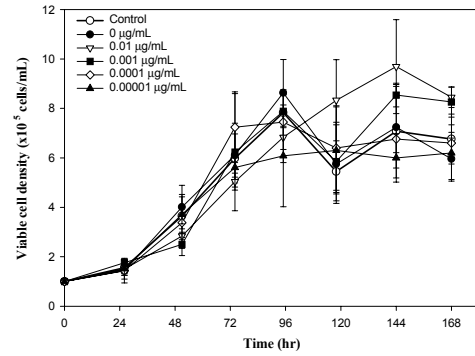


Fig.2.27 Effect of apoptosis inhibitor R on the cell growth kinetics of Vero cells in normal oxygen state

나) 세포사멸억제제 N의 사용 가능성 조사 및 최적 조건 확립

세포사멸억제제 N은 1차년도에 세포사멸억제제 I와 같은 계열의 구조를 가지고 있다. 이미 1차년도에 Vero cell에서의 세포사멸억제제 I의 효과는 확인하였기 때문에 세포사멸억제제 N도 세포사멸억제제 I과 같은 세포사멸억제능이 있는지 조사하였다. 이를 위해 12 well plate의 각 well에 1.5×10^5 cells/ml로 cell을 접종하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양 9시간 후 cell이 바닥에 부착된 것을 확인하고 배지를 교환하였다. 동시에 원하는 농도의 세포사멸억제제 N을 배양배지 내에 1%가 되도록 직접 투여하고 일정한 시간 간격으로 cell counting하여 세포 성장 kinetics를 조사하였고 그 결과를 Fig. 2.28에 나타내었다.

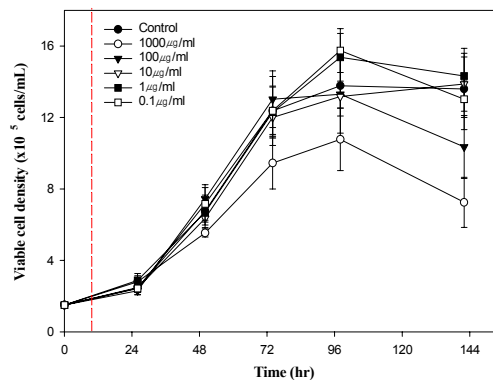


Fig.2.28 Effect of apoptosis inhibitor N on the cell growth kinetics of Vero cells

Fig.2.28에 의하면 배양 96시간에서 0.1, 1 µg/ml의 세포사멸억제제 N 첨가 배양이 무첨가 배양인 control보다 좋은 세포성장을 보였으나 첨가에 따른 세포 성장의 증진 효과는 그렇게 크지 않았다.

이러한 결과를 종합하면 세포사멸억제제 후보물질 I,R,N 모두 세포사멸억제 효과를 통해 고밀도 세

포 배양을 위한 세포 성장의 증진 효과가 있음이 밝혀졌고 이중에서는 세포사멸억제제 I가 가장 우수한 세포 성장 증진 효과가 있는 물질임을 알 수 있었다. 또한 저 산소 상태에서 세포사멸억제제의 증진 효과가 증폭됨을 알 수 있어서 세포사멸억제제의 첨가가 바이러스 생산에도 긍정적인 영향을 미칠 가능성이 있어 향후 백신 생산성 향상을 위한 전략에도 사용할 수 있으리라 생각된다.

11) 백신 생산의 기초 조건의 확립

가) 혈청 농도 최적화

세포에 바이러스가 감염된 후 숙주세포의 유지, 성장과 바이러스의 증식정도가 사용 혈청 농도에 따라 달라진다. 세포 유리 바이러스를 숙주세포에 감염시킬 때 혈청의 단백질 성분이 바이러스를 중화시키거나 숙주세포에 바이러스가 부착되는 것을 방해하는 작용을 하므로 혈청 농도를 적절한 농도로 낮추어 사용하는 것이 일반적이다. 본 실험에서는 0, 2, 4, 6, 8, 10% FBS 혈청 농도가 뉴캐슬병 바이러스 생산에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 2.29에 나타낸 결과에서는 혈청의 농도는 바이러스 생산성에 큰 영향을 나타내지 않았으며 2% FBS를 함유한 배지를 사용했을 때 1.65×10^7 pfu/ml로 최대 바이러스 생산을 보였다. 따라서 바이러스의 감염 시 추가적인 serum의 첨가는 최소화 하는 것이 경제적인 측면에서 바람직함을 알 수 있었다. 또한 결과로 보여 지고 있지는 않지만 감염 후 세포농도의 감소는 바이러스가 감염되면 세포 융합, 바이러스 증식시의 독성 물질 분비, 또는 바이러스 증식 시 독성 기작 등의 현상 때문에 감소하는 것으로 생각된다.

나) 초기 pH 영향

세포의 대사과정을 최대화하는 조건이 반드시 바이러스나 바이러스 산물 생산을 최대화하지는 않기 때문에 초기 pH에 따른 바이러스 생산성을 조사하였다. 따라서 초기 pH를 6.4에서 8.0까지 변화시키면서 바이러스 복제에 미치는 영향을 조사하였고 그 결과를 Fig. 2.10에 나타내었다. Fig. 2.30에 의하면 초기 pH 6.4~7.6에서는 바이러스 역가가 $3 \sim 4 \times 10^2$ pfu/ml로 큰 차이가 없으나, 6.4 이하의 초기 pH는 바이러스 생산을 크게 감소시켰으며, pH 8.0에서 1×10^3 pfu/ml로 가장 높은 역가를 보였다. 따라서 바이러스 감염 시 pH를 높이는 전략을 고려해 볼 수 있다.

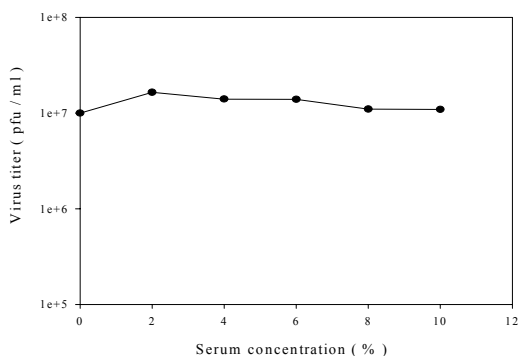


Fig.2.29 Effect of serum concentration on NDV production.

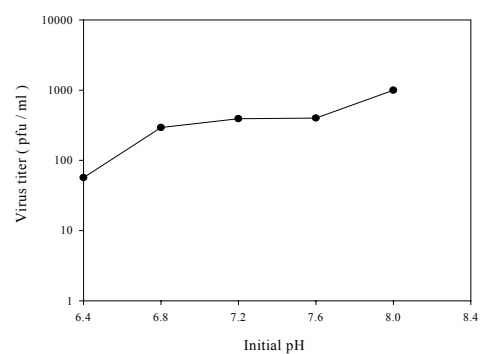


Fig.2.30 Effect of initial pH on NDV production.

12) 백신 생산성 향상을 위한 첨가제 최적화

뉴캐슬병 바이러스의 세포 결합부위는 세포막의 phospholipase 또는 neuraminidase 작용에 의해 파괴되며 음전하를 띤 head group을 가진 인지질과 당지질은 바이러스가 숙주세포에 부착하는 것을 저해한다. 이러한 문제를 해결하기 위해서는 효소 처리하거나, 전기적 상호작용을 이용하여 바이러스와 세포간의 부착을 증진시킬 수 있다. 따라서 NDV 생산을 증진시킬 목적으로 polycation인 DEAE-dextran과 poly-L-lysine을 처리한 결과, DEAE-dextran은 20 μ g/ml에서 6.9×10^7 pfu/ml로 최대 바이러스 역가를 보였으며(Fig. 2.31), Poly-L-lysine 처리의 경우는 3 μ g/ml에서 최대 바이러스 역가로 2.9×10^7 pfu/ml을 나타내었다(Fig. 2.32). 위 결과는 polycation이 바이러스와 세포간의 상호작용을 도와 바이러스 감염능 증대에 효과적이었다는 여러 보고와 일치함을 보여준다. 또한 미량원소로는 Ca^{2+} , Mg^{2+} 등이 감염능 증대 효과를 보이는 것으로 알려져 있다. 하지만 Fig. 2.34에서 나타낸 바와 같이 $CaCl_2$ 의 농도가 높을수록 바이러스 생산에 해로운 영향을 주는 것으로 나타났다.

세포에서 산소가 물로 완전 환원되는 과정 중 불완전 환원이 일어나면 과산화수소가 되거나 superoxide radical(O_2^-)이 된다. 반응성이 강한 이들 부산물들은 막 지질의 불포화 지방산 성분과 반응하여 막 구조에 손상을 주기 때문에 세포에 강한 독성을 보인다. 이에 근거하여 비효소적 항산화 적용에 관여하는 물질로 산소의 유독성 유도체들을 중화시키는 ascorbic acid를 0.1~0.5mM 범위로 첨가하여 바이러스 복제에 비효소적 항산화제가 미치는 영향에 대하여 조사해 보았다. 그 결과 0.1mM ascorbic acid를 첨가하는 것이 가장 효과가 좋았으며(Fig. 2.33) 그 이상의 농도에서는 큰 효과가 없는 것으로 보아 최적농도로 첨가할 필요가 있다고 판단된다.

이와 같이 여러 가지 증진 물질 첨가 시 바이러스 생산성이 증진되었으나 이러한 물질들을 복합적으로 처리하였을 경우 오히려 대조군에 비해 낮은 생산성을 보였다(Fig. 2.35). 이러한 결과는 증진 물질 성분들이 서로 저해적인 영향을 주는 것으로 생각되어진다. 이러한 결과를 종합하면 가장 우수한 첨가제는 ascorbic acid로 그 최적 농도는 0.1 mM임이 밝혀졌다.

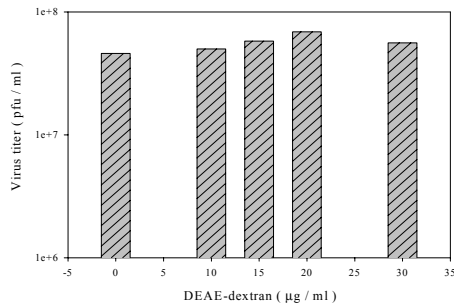


Fig. 2.31 Effect of DEAE-dextran on NDV production.

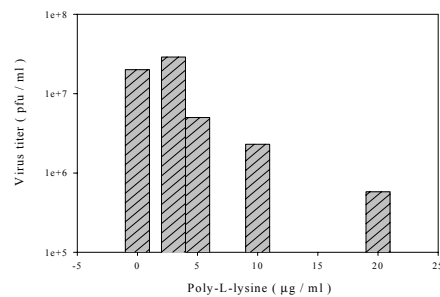


Fig. 2.32 Effect of poly-L-lysine on NDV production.

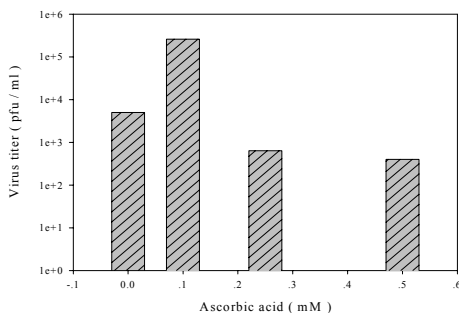


Fig. 2.33 Effect of ascorbic acid on NDV production.

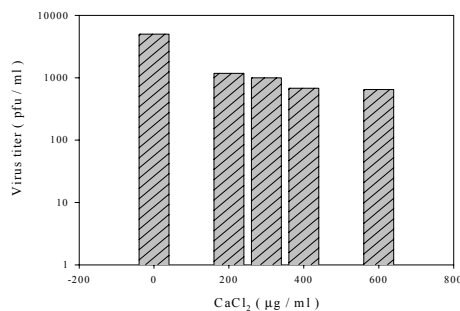


Fig. 2.34 Effect of $CaCl_2$ on NDV production.

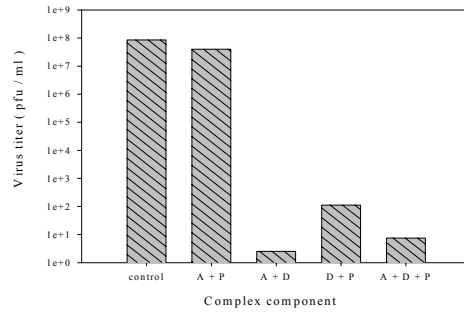


Fig. 2.35 Effect of complex component on NDV production. A: Ascorbic acid, D:DEAE-dextran, P: Poly-L-lysine

13) 암모늄 이온이 백신 생산성에 미치는 영향 조사

동물세포 배양액내의 암모늄 이온의 축적은 세포성장 뿐만 아니라 바이러스 증식을 저해한다. Fig. 2.36은 암모늄 이온에 의한 뉴캐슬병 바이러스의 저해효과를 보여주고 있다. 4mM 이상의 암모늄 농도에서 바이러스 생산성이 약 100배정도 낮아지는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 암모늄 이온이 바이러스 복제를 저해하기 때문이다. 이러한 저해 현상은 바이러스에 의한 숙주세포의 cytopathic effect의 방해에 의해 이루어진다. Fig. 2.37에 따르면 숙주세포로 사용된 Vero 세포의 경우 T-flask에서 약 4mM의 암모늄 이온이 생성된다. 또한 숙주세포의 대량배양과 바이러스 대량생산을 위한 전략으로 유가식 배양을 이용할 경우 글루타민의 계속적인 공급으로 암모늄이온의 축적이 예상되며, 이 때 암모늄 이온에 의한 뉴캐슬병 바이러스 증식에 더 큰 영향을 줄 것으로 생각된다.

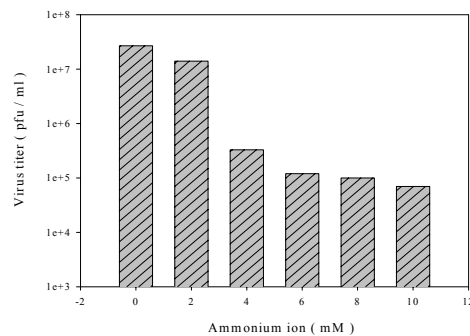


Fig. 2.36 Inhibition of NDV production by ammonium ion in Vero cell culture.

14) 미립담체 동물세포 배양 및 고정화 흡착제를 이용한 바이러스 생산

일반적으로 숙주세포를 confluent하게 배양한 후 배지를 90% 제거하고 바이러스를 감염시킨다. 이러한 이유는 숙주세포의 유지, 성장을 도모할 뿐만 아니라 바이러스 생산성에 크게 영향을 미치는 waste product를 제거하기 위한 것으로 생각되어진다. 하지만 배지에는 혈청을 비롯한 여러 가지 값비싼 배지 성분을 포함하고 있어서 배지의 교환 없이 waste product인 암모늄 이온을 제거하여 바이러스 생산비용 절감을 시도하였다.

동물세포 배양 중 암모늄 이온 축적 문제를 해결하기 위한 많은 연구 보고가 있지만, Phillipsite-Gismondine 같은 zeolite를 이용한 흡착법이 현재까지 가장 효과적인 것으로 보고되었다. 그렇지만 zeolite 분말을 직접 생물 반응기에 응용하는 것은 세포 및 배양액과의 분리가 용이하지 않고, 생성물의 손실 등의 문제점이 발생하기 때문에 본 실험에서는 zeolite 분말을 투석막을 이용한 고정화 흡착제를 이용하였다.

Fig. 2.37은 미립담체 배양 시 생성되는 암모늄 이온의 농도를 측정한 결과이다. 숙주세포의 배양에서 4mM 이상의 암모늄 이온이 생성된 것을 확인하였다. 생성된 암모늄 이온은 바이러스 감염 후 바이러스 증식을 저해할 것이다. 이에 본 실험에서는 세포 배양 48시간 후 membrane type의 고정화 흡착제를 투여하여 바이러스를 증식시켰고 그 결과를 Fig. 2.38에 나타내었다. Fig. 2.38에 의하면 배지를 교환한 대조군에 비해 바이러스 생산성이 낮았지만 생산 비용 면에서 가능성을 보여주었다. 하지만 zeolite를 처리하지도 배지를 교환하지도 않은 배양에서도 zeolite를 처리한 배양과 거의 비슷한 바이러스 생산성을 보여주었다. 이러한 결과는 세포 배양 48시간 후 zeolite 처리에 의한 세포 성장이 증가함에 따라 미립담체간의 뭉침 현상이 증가했기 때문으로 생각되어진다. 그러므로 바이러스 감염 후 바이러스의 다른 세포로의 감염이 저해된 것으로 추정된다.

또한 배지를 교환하지 않은 배양에서는 영양분의 고갈로 인한 숙주세포 유지, 성장 및 바이러스 증식이 저해된다. 이에 따라 앞으로 최적의 zeolite 투여 시간을 조사하고 영양분을 공급해 주는 유가식 배양 공정(fed-batch culture system)을 병행한 백신 생산 시스템을 bioreactor를 중심으로 진행하였다.

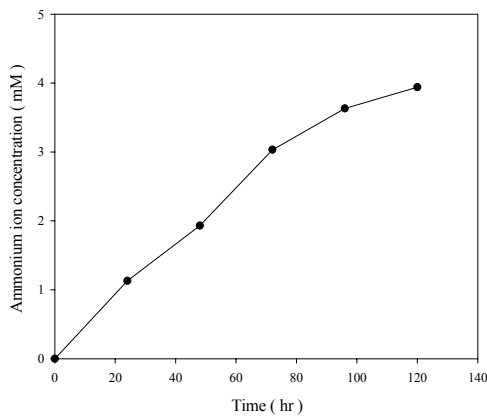


Fig. 2.37 Kinetics of ammonium ion production by Vero cells on Cultispher-G microcarrier.

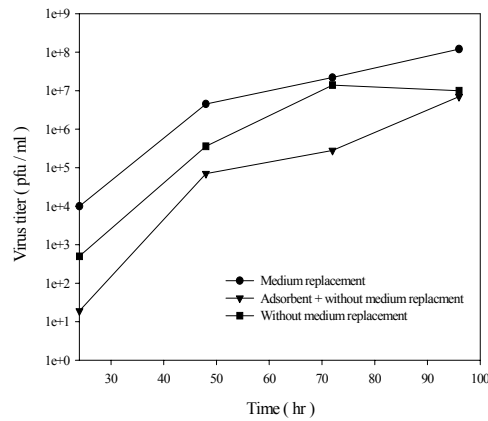


Fig. 2.38 NDV propagation of Vero cells in Cultispher-G microcarrier cultured with 1g of membrane type immobilized adsorbent.

15) 유가식 배양과 고정화 흡착제를 이용한 바이러스 생산

유가식 배양은 영양분이 계속 공급되기 때문에 영양분의 고갈은 해결 할 수 있으나 배양기 밖으로의 배출이 없어 대사 노폐물의 축적문제는 해결할 수 없는 한계를 가지고 있다. 더구나 glutamine을 비롯한 영양분의 계속되는 공급으로 세포의 glutaminolysis metabolism이 왕성하여 암모늄 이온의 축적문제가 회분식 보다 심각하다. 따라서 유가식 배양과 고정화 흡착제에 의한 암모늄 이온의 동시 제거 방법이 병합되어 영양분고갈 문제와 암모늄 이온의 축적 문제를 동시에 해결하는 배양공정을 개발함으로써 고 생산성 백신생산 공정을 확립하려 하였다.

이에 따라 membrane 형태의 고정화 흡착제를 사용하여 뉴캐슬병 바이러스를 유가식으로 배양한 새로운 백신 생산 시스템에서의 뉴캐슬병 백신의 생산성 증진 여부를 조사하였다. 고정화 흡착제는 바이러스 감염 시 고정화 흡착제가 설치된 agitator로 교환하였고 유가식 배양도 바이러스 감염 직후부터 시작하였다.

Fig. 2.39는 고정화 흡착제와 유가식 배양이 결합된 배양에서 뉴캐슬병 바이러스의 최대 titer를 비교하고 있다. 이 그림에 의하면 바이러스 감염 시 배지를 교환해 주지 않고 고정화 흡착제의 투여와 유가식 배양을 병행하여 배양한 결과 기존의 방법인 배지를 교환한 대조군과 거의 비슷한 바이러스 증식을 보였다. 이러한 결과로부터 바이러스 증식에 있어서 glucose, glutamine이 긴요하게 사용되는 것이 확인되었고, 이러한 영양물질의 유가식 공급과 이로 인한 암모늄 이온의 축적 문제를 해결할 수 있는 고정화 흡착제의 동시 사용으로 값 비싼 serum배지의 교환 없이 동일한 titer를 얻을 수 있음을 알 수 있게 되었다. 한편 유가식 배양만을 사용한 공정에서는 titer의 증가를 목격하지 못하였는데, 이러한 결과로부터 glutamine의 계속되는 공급으로 인한 암모늄 이온의 축적 문제 해결 없이 단순한 유가식 배양만으로는 백신의 생산성을 증가시키지 못한다는 사실을 알 수 있었다. 이러한 유가식 배양에서의 암모늄 이온의 축적은 Fig. 2.41의 결과로부터 바로 확인할 수 있다.

한편 고정화 흡착제의 최적 투여시기를 결정하기 위해 백신 생산에 유리한 배양방법인 배지 교환과 유가식 배양을 병행한 방법을 이용하여 백신의 생산성을 조사하였다(Fig. 2.40). Fig. 2.40에서 나타난 바와 같이 감염 24시간 후에 고정화 흡착제를 투여한 경우 바이러스 증식이 가장 좋았다.

Fig. 2.41은 이때 배지교환과 결합된 유가식 배양에서 생성된 암모늄 이온 농도를 측정된 결과이다. 고정화 흡착제를 투여하지 않았을 때 7mM 이상의 암모늄 이온이 생성되는 것을 확인할 수 있었다. 한편 고정화 흡착제를 투여했을 시 4mM 정도로 암모늄 이온의 농도가 유지되었다. 이때 바이러스 증식에 밀접하게 관여하는 필요 glucose 양을 결정하기 위해 우선 기본 배지에 포함된 양으로 유가식 배양을 한 후 잔여 glucose 양을 측정하였다(Fig. 2.42). 세포 배양 72시간 후에 glucose가 다 소비되었으며 회분식 배양에서는 바이러스 감염 직후 배지 교환에 의해 glucose의 농도가 약간 증가하다가 급속하게 소비되었다. 이에 따라 glucose도 바이러스 증식에 따라 급격히 소모하는 것을 확인할 수 있었다. 한편 유가식 배양에서는 glucose의 소비 속도가 공급 속도에 비해 낮아 glucose가 축적됨을 알 수 있었다. 따라서 유가식 배양에서는 첨가하는 glucose와 glutamin의 공급속도의 최적화가 무엇보다도 중요함을 알 수 있었다. 이상을 종합하여 유가식 배양에서는 고정화 흡착제양의 증가와 투여시기, glucose와 glutamine의 공급 농도와 공급 시기를 다르게 한 새로운 공급 전략 방법으로 유가식 백신 생산을 시도하였다.

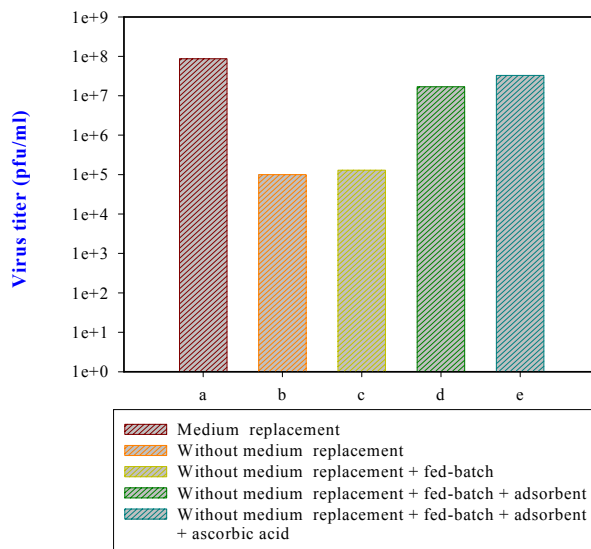


Fig. 2.39 Comparison of NDV production kinetics of Vero cells in microcarrier cultured in 100ml spinner reactors. For "adsorbent-" run, agitator attached with 1g of dialysis membrane type immobilized adsorbent was used. For "fed-"run, fed batch adding of glucose and glutamine was started after NDV infection.

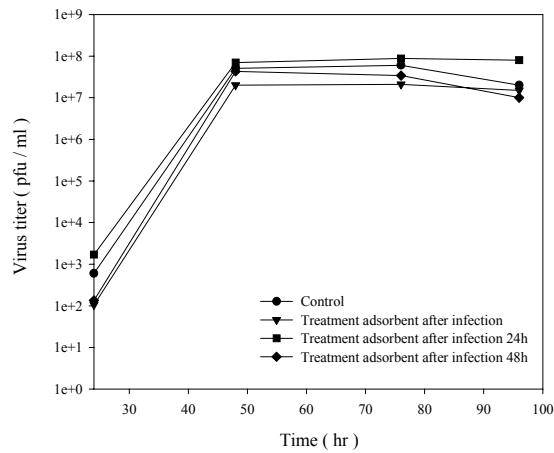


Fig. 2.40 Comparison of NDV production kinetics of Vero cells in microcarrier cultured with different adsorbent treatment time

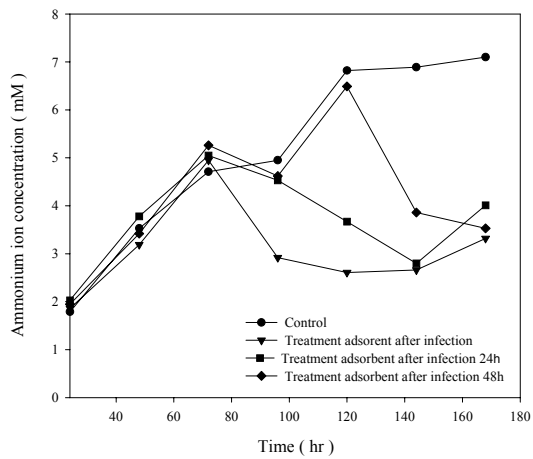


Fig. 2.41 Comparison of ammonium ion production kinetics of Vero cells cultured with different adsorbent treatment time

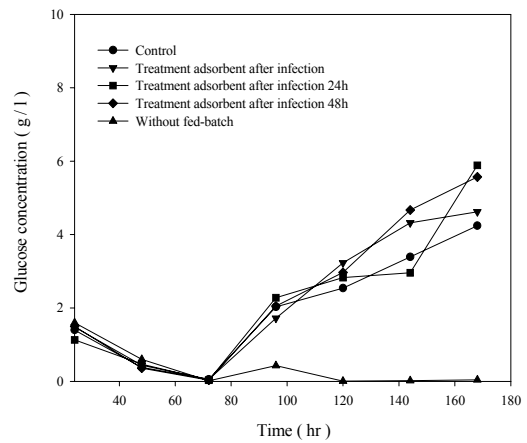


Fig. 2.42 Comparison of residual glucose concentrations of Vero cells cultured with different adsorbent treatment time

새로운 공급전략으로 감염 시 1g/l/day의 속도로 glucose를 첨가하였으며, 감염 24시간 후 2g zeolite를 충전시킨 흡착제와 2mM/day의 속도로 glutamine을 공급하였다. 그 결과 데이터로 보여주고 있지는 않지만 glucose는 2g/l로 축적되었고 암모늄이온은 1mM 이하로 유지되었다. 하지만 다시 최적화된 조건에서 암모늄이온의 제거에도 불구하고 바이러스 생산성에서는 크게 차이가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 투석막에 바이러스가 흡착되었을 가능성과 다른 배지 성분의 제한 때문으로 생각되어진다. 하지만 대조군에 비해 유가식 배양 시 바이러스 생산성이 크게 증대하는 것으로 확인되었다(Fig. 2.43).

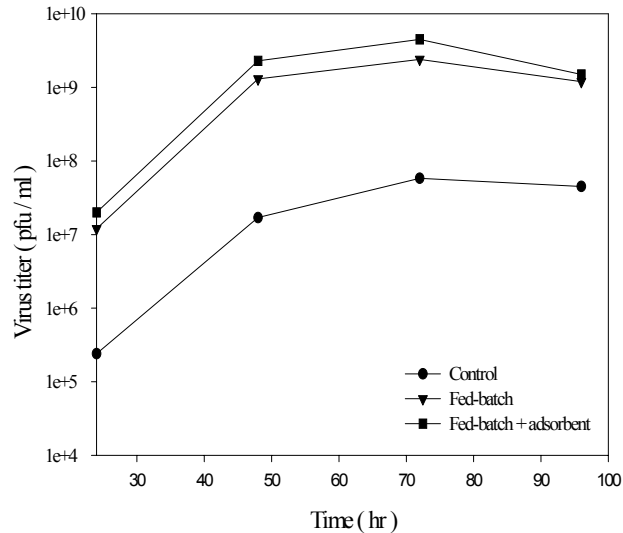


Fig. 2.43 Comparison of NDV production kinetics of Vero cells in microcarrier cultured with new feeding strategy

16) 고농도 세포배양과 백신 생산을 결합한 유가식배양 공정 개발

한편 위의 방법과 같이 백신 생산 단계에서만 유가식 공급을 하는 것이 아니라 생물반응기에서 먼저 유가식으로 배양하여 고농도 세포밀도 상태에서 바이러스를 감염시키고, 그 이후 백신 생산단계에서도 유가식 배양으로 배양함으로써 바이러스의 생산성을 증대시키기 위한 방법으로 고농도 세포배양과 백신 생산을 결합한 유가식배양 공정을 개발하고자 하였다. 우선 기초실험으로서 세포배양의 주된 탄소원인 glutamine과 glucose의 배지 공급 전략을 테스트하였다. 배양 48시간 이후부터 glucose는 1g/l로, glutamine은 1mM로 24시간마다 첨가해주었다. Glutamine을 공급해 준 경우가 회분식배양인 control에 비해 높은 세포농도를 보여 주었으며, glucose를 첨가해 준 경우도 control에 비해 세포농도가 높게 나타났다 (Fig. 2.44). 또한 세포의 배양생리학적 특성을 알아보기 위해 Fig. 2.45에 각 경우의 잔여 glucose 농도를 측정해서 나타내었다. Glucose를 첨가해 준 경우 glucose의 양이 3g/l로 축적되는 것으로 나타나, glucose 첨가 농도를 재조정하고 glutamine의 분석을 통한 정밀한 배지 공급 전략을 개발 중에 있다.

바이러스의 생산성을 증대시키기 위해서는 일반적으로 숙주세포를 confluent하게 배양한 후 배지를 90% 제거하고 바이러스를 감염시킨다. 이러한 이유는 숙주세포의 유지, 성장을 도모하기 위해서이다. 본 연구에서는 생산비용의 절감 효과가 있는지 확인하기 위해 값비싼 배지를 교환하지 않은 경우와 배지를 일정한 양 교환한 경우의 바이러스 생산성을 비교 조사하였다 (Fig. 3.46). 그 결과 예상했던 대로 배지를 교환한 경우가 교환하지 않는 경우에 비해 높은 생산성을 보이는 것으로 나타났다. 이 결과는 유가식배

양의 가능성을 제시하므로, 이번 실험에서는 유가식배양을 배지만 교환한 대조군 배양과 비교하여 바이러스의 생산성을 조사하였다 (Fig. 3.47). Fig. 3.47에 나타난 바대로 바이러스 감염 후 glucose 2g/l, glutamine 2mM로 24시간마다 공급한 유가식배양의 경우에서, 배지만 교환한 대조군에 비해 바이러스의 생산성이 약 100배 정도 증가하는 주목할 만한 결과를 얻을 수 있었다. 상기 결과는 유가식배양 공정을 도입할 때, 정밀한 배지 공급 전략이 개발되면 바이러스의 생산성을 보다 획기적으로 증가시킬 수 있는 가능성을 제시해 준다. 따라서 지속적인 연구를 통해 유가식배양에서의 숙주세포의 배양 생리적 특성을 규명함과 동시에, 유가식배양 공정을 지금까지 개발한 자동화 세포배양 공정과 연계시킬 때, 그 시너지적 효과는 더욱 커질 것이라고 생각된다. 즉 배양중의 용존산소의 정밀조절에 의한 자동화 유가식배양 공정을 개발할 경우, 고농도배양이 가능해져서 바이러스의 생산성을 큰 폭으로 증가시킬 수 있을 것으로 판단된다.

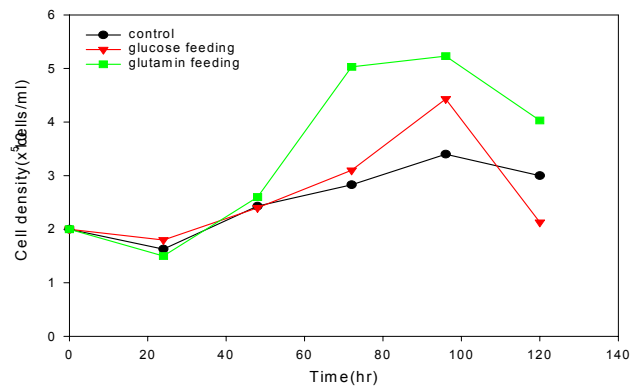


Fig. 2.44 Time-course profiles of cell density when three different modes of feeding strategy were used (batch mode control; glucose-feeding fed batch mode; glutamine-feeding fed-batch mode)

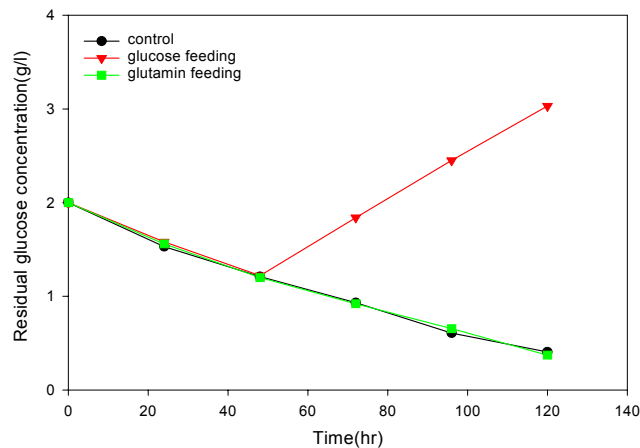


Fig. 2.45 Time-course profiles of residual glucose concentration when three different modes of feeding strategy were used (the same feeding strategy as above)

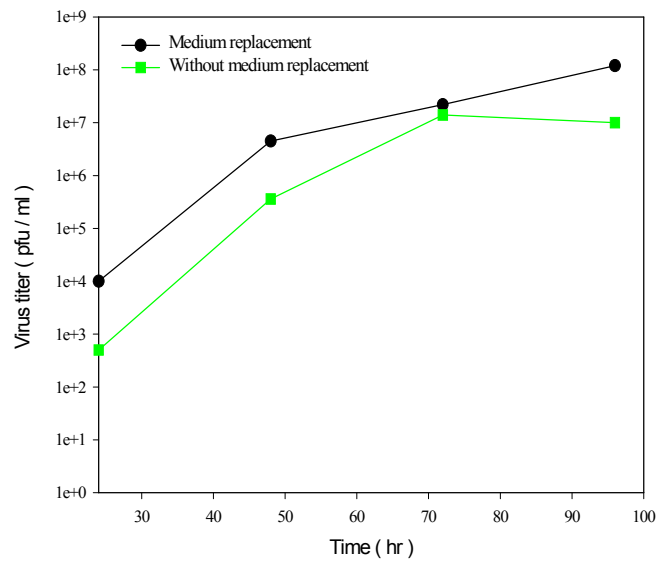


Fig. 2.46 Comparison of time-course virus titer between cultivation methods with and without medium replacement

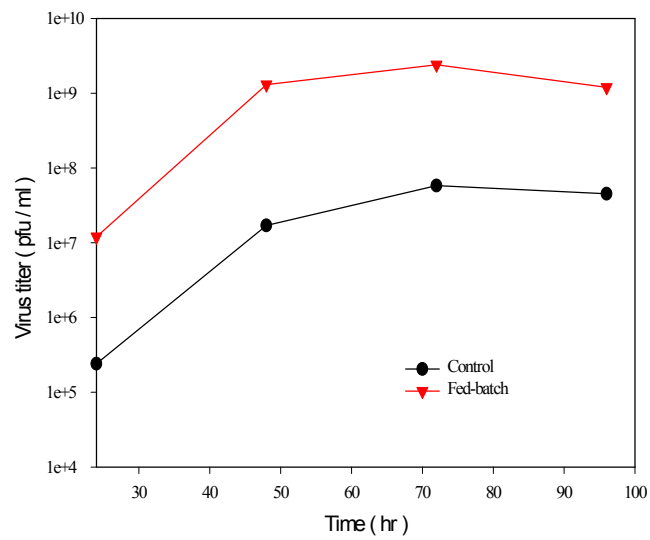


Fig. 2.47. Comparison of time-course virus titer between control culture (with medium replacement) and fed batch culture

17) 3차년도 연구내용 개요

3차년도에는 우선 생물반응기에서의 세포배양 및 ND 백신생산을 위해 MOI, infection time, harvest time 등의 운전변수를 최적화하였으며, 제2세부에서 확립된 자동화 시스템을 이용하여 고농도 동물세포 배양 공정과 백신 생산 공정이 병합된 유가식 생물반응기 시스템을 구축하였다. 이들을 바탕으로 협동과제에서 선정된 세포주를 이용하여 구축된 생물반응기 시스템에서 생산함으로써 확립된 시스템에서의 ND백신의 생산성을 조사하였다.

18) 운전 변수의 최적화 및 설계인자 도출

여태까지 사용하였던 MOI, infection time, harvest time 등의 주요 운전 변수들은 다른 독립 변수들을 일정하게하고 목적 독립변수들을 변화시켜 최적 값을 얻는 방식에 의해서 최적변수를 구하였다. 하지만 이러한 방법은 각 독립변수 상호간에 영향이 없는 경우에만 적용될 수 있고, 실제로는 독립변수의 combination에 따라 그 최적 값이 달라진다. 이러한 세 가지 변수의 상관관계를 고려하여 최적화하기 위하여 변수가 많지 않을 경우에는 흔히 factorial design에 의하여 최적화한다. 여기에서는 full factorial design은 여전히 실험 개수가 많으므로 먼저 여러 harvest time에서의 MOI에 대한 영향을 조사하여 optimum MOI를 구한 후, 확정된 MOI의 조건 아래에서 infection time과 harvest time을 변화시켜 최대의 virus titer를 생산해내는 optimum infection time과 harvest time을 구하였다. 확정된 harvest time에서 여러 infection time에서의 MOI에 대한 영향을 조사하지 않은 이유는 실제로 infection time의 영향이 세포농도의 영향이 되고 세포농도의 영향은 MOI를 계산 할 때 고려가 되므로 결국 infection time에 따라서는 MOI의 영향이 달라지지 않을 것으로 예상되기 때문이다.

가) Dish Culture에서의 운전 변수의 최적화

Dish Culture에서의 운전 변수의 최적화를 위해 먼저 여러 harvest time에서의 MOI에 대한 영향을 조사하여 optimum MOI를 구한 후, 확정된 MOI의 조건 아래에서 infection time과 harvest time을 변화시켜 최대의 virus titer를 생산해내는 optimum infection time과 harvest time을 구하였다. 먼저 최적의 MOI를 구하기 위해서 세포 농도 2×10^6 cells/ml의 세포에 2.5×10^5 pfu/ml의 titer를 가진 virus를 MOI 10, 1, 0.1, 0.01로 infection 시킨 후 1, 2, 3, 4 day의 harvest time에 sampling하여 plaque assay로 titer를 비교하였고, 그 결과를 Fig.2.48에 나타내었다. Fig.2.48에 의하면 MOI에 따라 최대의 titer를 가지는 harvest time이 다름을 알 수 있다. 즉 최적 MOI 및 harvest time은 서로 연관이 되어 있음을 알 수 있었고 따라서 어느 MOI와 harvest time의 적절한 combination에 의해서만 최적의 결과를 얻을 수 있음을 알 수 있었다. 그림에 의하면 MOI가 높을 경우에는 harvest time이 1-2 day에서 최대치를 나타내고 있다. 그러나 MOI가 0.1, 0.01로 떨어지면서 최대치를 나타내는 harvest time은 3day로 늘어나고 titer는 크게 증가함을 알 수 있었고, 최고의 titer를 나타내는 0.1MOI와 3day의 harvest time이 최적 조건임을 알 수 있었다. 이는 MOI가 높은 경우 감염은 충분하지만 세포에서 다른 virus가 증식되기 전에 lysis가 일어나 충분히 증식되기도 전에 virus의 inactivation이 일어나기 때문에 최대 titer도 낮고 최대 titer를 나타내는 harvest time도 짧아지기 때문이다. 반대로 MOI가 낮으면 일부 세포만 감염된 후 감염된 세포에서 virus가 충분히 증식되어 titer가 높아지고 lysis가 일어나서 2차 감염에 의해 다른 세포도 감염되어 virus를 생산하기 때문에 titer는 높아지나 최대 titer를 나타내는데 걸리는 시간은 길어진다. 하지만 MOI가 더 낮아지면 1차 감염 및 그 후의 감염에 걸리는 시간이 더욱더 길어지고 virus 증식보다는 inactivation되는 율이 많아지기 때문에, 그림에서 MOI 0.1 및 3 day harvest time이 최적 조건이 됨을 알 수 있다.

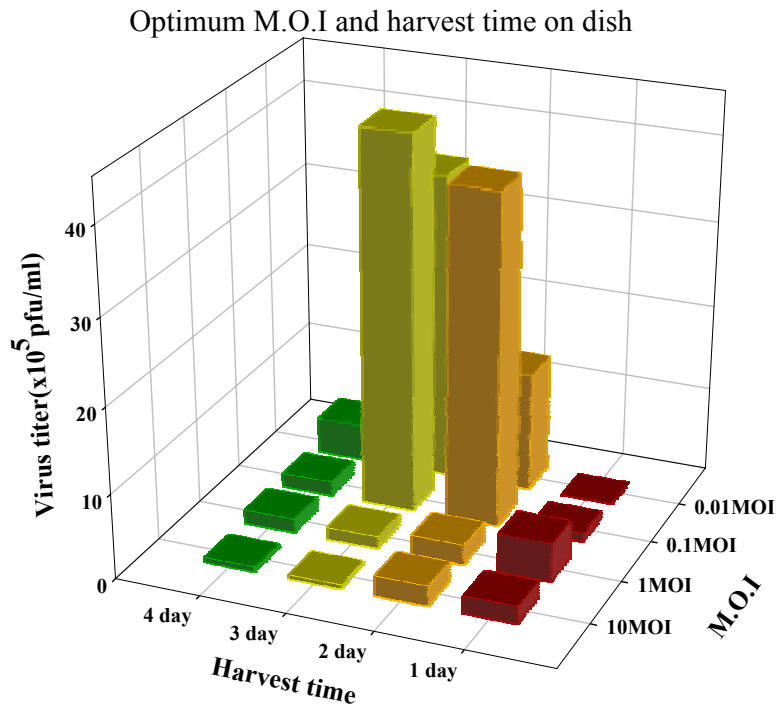


Fig. 2.48 Optimum MOI and harvest time on dish culture

Virus의 inactivation은 protease에 의한 coat protein의 분해 및 산화 등에 의해서 시간이 지남에 따라 virus의 활성이 떨어지는 현상을 말하며, 온도의 증가에 따라 inactivation 되는 속도가 (속도상수가) 증가한다. 또한 virus의 infectivity도 시간이 지남에 따라 떨어질 수 있기 때문에 harvest time이 길어지면 titer가 감소하기 때문에 그림에서 알 수 있듯이 모든 조건에서 최적 harvest 시간 이후에서는 titer가 감소한다. 이러한 virus inactivation 현상은 MOI가 낮아 감염의 진행속도가 낮은 경우에도 현저히 나타날 수 있기 때문에 최적 MOI가 존재하게 된다.

이상에서 구한 최적 MOI 0.1에서 최적 harvest time이 3day인지 여부와 최적 infection time을 구하기 위해 infection time과 harvest time을 변화시켜 가면서 titer의 변화를 조사하였다. 이를 위해 여러 infection time에서 virus를 0.1 MOI로 infection한 후 harvest time 별로 sampling하여 titer를 조사였고, 그 결과를 Fig.2.49에 나타내었다. 그림 2.49에 의하면 infection time에 관계없이 0.1 MOI의 경우 최적 harvest time은 Fig. 2.48의 결과와 같이 감염 후 3 day임을 알 수 있었고, infection time은 48 시간 보다는 72 시간이 전반적으로 titer가 높음을 알 수 있어서 최적의 infection time은 72시간임을 알 수 있었다. 이는 세포의 농도가 72 시간에서 최대가 되기 때문에 같은 MOI인 경우 세포의 활성이 현저히 떨어지지 않는 한 세포농도가 높을수록 백신생산에 유리하기 때문이다.

따라서 dish culture(T-flask)에서의 최적 운전 조건은 최적 infection time 72시간, 최적 MOI 0.1, 그리고 최적 harvest time 72시간이다.

Optimum infection and harvest time in dish

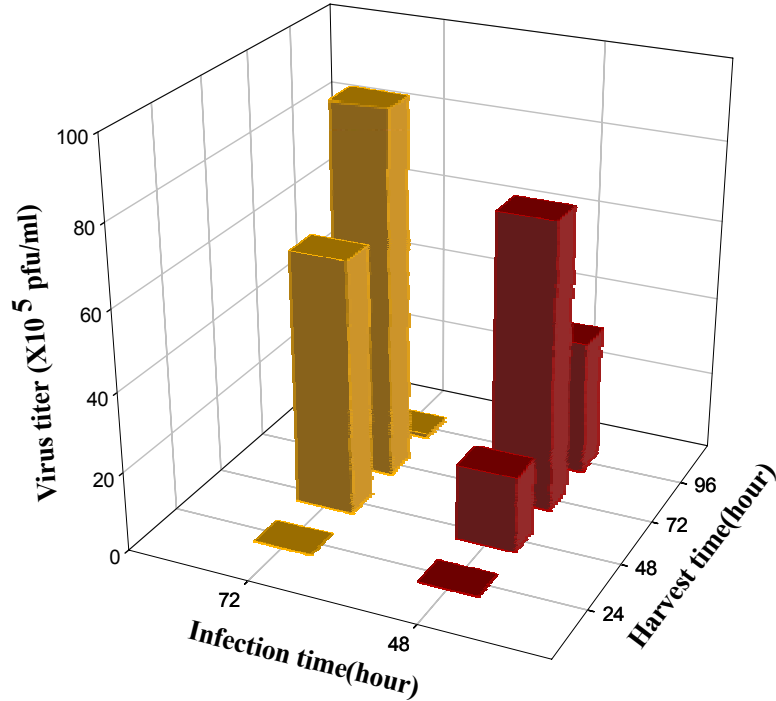


Fig. 2.49 Optimum harvest time and infection time on dish culture (MOI=0.1)

나) Spinner reactor에서의 최적 운전 조건

Bioreactor에서의 백신 생산의 최적 조건은 flask culture의 경우와는 다를 수 있다. 왜냐하면 bioreactor를 이용하기 위해서는 microcarrier를 사용하여야 하기 때문이다. Microcarrier에 부착되어 자라는 세포의 성장곡선이 flask와 다를 수 있고, infection시 microcarrier에 부착되어 있는 세포의 availability가 flask의 경우와 다르며, lysis 후 virus의 2차 감염 시 물질전달 현상이 달라지기 때문이다.

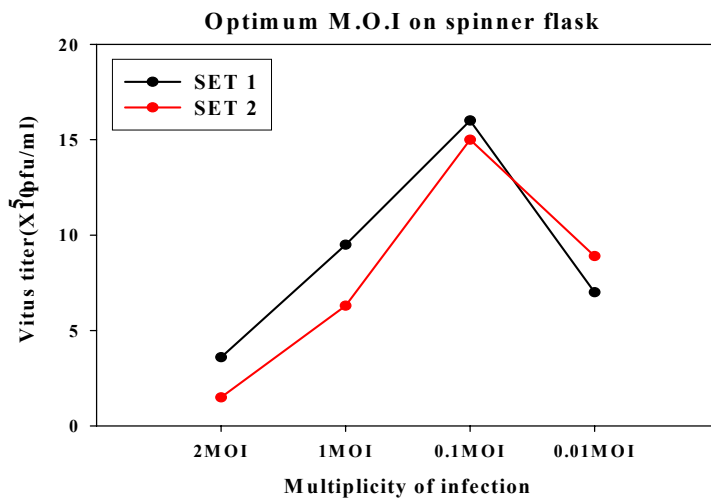


Fig.2.50 Optimum MOI in spinner culture (4days infection time and 3 day harvest time)

Fig. 2.50은 먼저 주어진 infection time과 harvest time에서의 최적 MOI를 구하기 위해, 각 spinner flask에 cell과 microcarrier를 넣고 배양한지 4일 후에 10, 1, 0.1, 0.01MOI로 각각 infection하고 3일 후에 상등액을 걷어내 원심분리 후 plaque assay한 결과를 나타내고 있다.

Fig. 2.50에 의하면 감염시간 4일 harvest time 3일에서의 최적 MOI는 flask culture와 마찬가지로 0.1임을 알 수 있었다.

하지만 다른 harvest time에서도 최적 MOI가 0.1인지 조사하기 위하여, 먼저 각 spinner flask에서 microcarrier에 세포를 고정화하여 배양한지 4일 후에 10, 1, 0.1, 0.01MOI로 각각 infection 하였다. 그 후 24시간마다 sampling하여 각 sample을 plaque assay하였으며, 그 결과를 Fig.2.51에 나타내었다. Fig.2.51에 의하면 harvest time이 바뀌더라도 최적 MOI는 0.1임을 알 수 있어서 Fig. 2.50의 결과 및 Fig. 2.48의 flask culture에서의 결과와도 일치함을 알 수 있었다.

한편 최적 harvest time은 4일로 dish culture(flask culture)의 경우 3일인데 비하여 하루가 연장되었음을 알 수 있었다. 그 이유는 사용한 최적의 microcarrier는 다공성의 gelatin bead로서 세포가 pore 안에 고정화되어 있어서 virus의 2차 감염 시 옆의 세포로 이동하는데 pore안에서 이동해야 한다. 따라서 virus가 다음 세포로 이동하는데 시간이 더 걸릴 수 있기 때문에, 2차 감염 및 증식 속도가 전체적으로 느려지게 되어 최적 harvest time이 느려지는 것으로 생각된다.

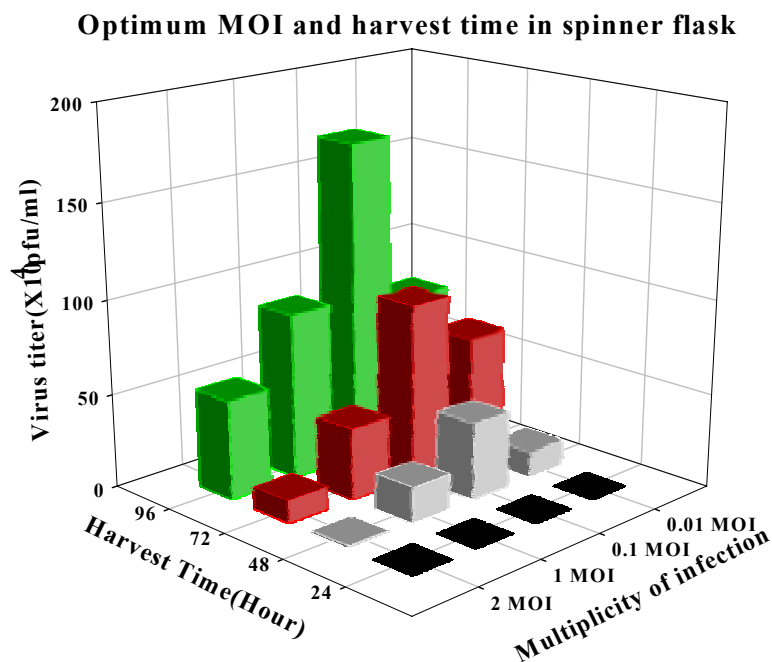


Fig. 2.51 Optimum MOI and harvest time in spinner culture

이상 microcarrier를 이용한 spinner culture에서 확인한 최적 MOI 0.1에서 최적 harvest time이 4day인지 여부와 최적 infection time을 구하기 위해 infection time과 harvest time을 변화시켜 가면서 titer의 변화를 조사하였다. 이를 위해 여러 infection time에서 virus를 0.1 MOI로 infection한 후 harvest time 별로 sampling하여 titer를 조사였고, 그 결과를 Fig.2.52에 나타내었다. 그림 2.52에 의하면 infection time에 관계없이 0.1 MOI의 경우 최적 harvest time은 Fig. 2.51의 결과와 같이 감염 후 4 day임을 알 수 있었고, 또한 harvest time에 관계없이 infection time이 증가하면서 전반적으로 titer가 높음을 알 수 있어서 최적의 infection time역시 4day(96hr)임을 알 수 있었다. 최적 harvest time이 dish culture보다 하루 연장된 4일인 이유는 이미 위에서 설명을 하였다. 또한 최적의 infection time이 96시

간인 이유는 dish culture의 경우와 동일하다. 이는 spinner flask의 경우 Fig. 2.53에서 보여주듯이 세포의 성장속도가 dish culture의 경우보다 느리며 세포의 농도가 96 시간에서 최대치에는 도달하지 않으나 여전히 활성을 가지고 성장하기 때문이며, 같은 MOI인 경우 세포의 활성이 현저히 떨어지지 않는 한 세포농도가 높을수록 백신생산에 유리하기 때문이다. 즉 dish culture와 microcarrier culture에서의 세포 성장 속도의 차이에 의하여 최적 infection time이 달라졌다.

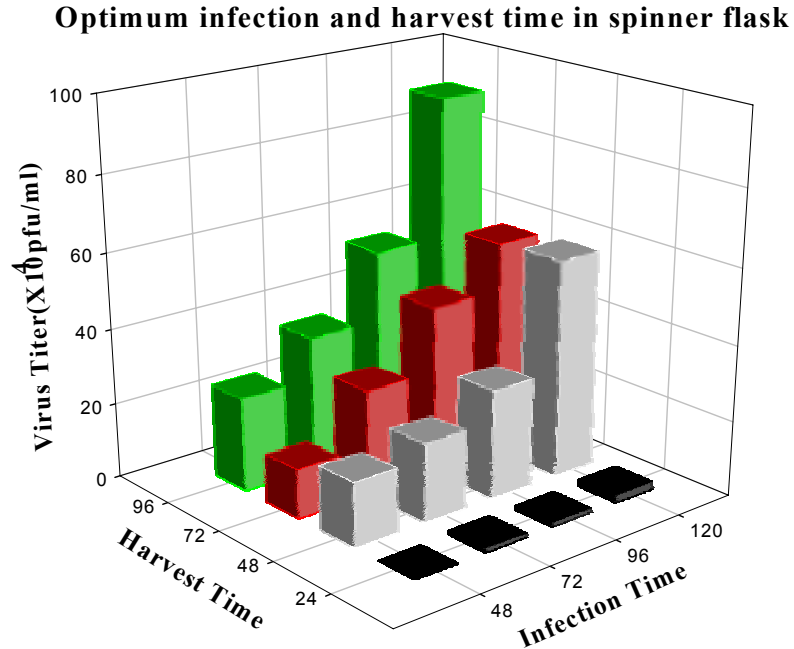


Fig.2.52 Optimum infection time and harvest time in spinner flask

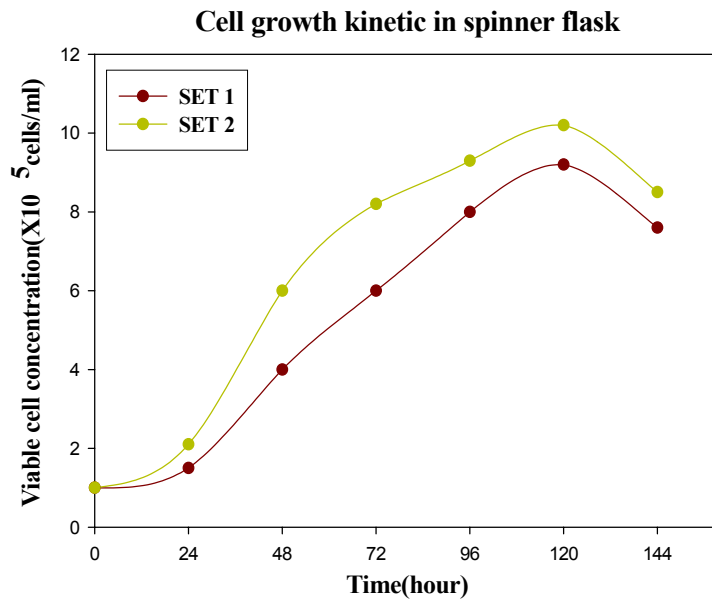


Fig.2.53 Cell growth kinetics in spinner flask

19) 유가식 시스템 개발 및 고농도 동물세포 배양 공정과 백신 생산 공정의 병합

Bioreactor를 이용하여 뉴캐슬병 바이러스의 large-scale 생산을 시도하였다. 유가식 등의 고농도 배양 시에 critical DO level (약 30% DO) 이상으로 용존산소 농도를 유지하기 위해서는 기체 산소공급이 계속적으로 이루어져야 한다. 본 연구에서의 배지 성분 중에는 serum이 포함되어 있어 미생물 배양에서와 같이 일반적인 sparger를 사용하여 산소를 공급할 경우, serum내의 단백질 성분 때문에 다량의 거품이 생성되어 미생물에 의한 오염의 가능성이 증가될 뿐만 아니라 배지로부터 세포를 이탈시켜 cell lysis를 일으키며, 거품이 생성되었다 터질 경우에 세포의 손상을 받게 된다. 따라서 bioreactor를 이용한 세포배양을 통해 백신을 생산하기 위해서는 먼저 생물반응기에서 거품현상을 줄일 수 있는 특별한 방법이 고안되어야 한다. 본 연구에서는 제3 세부과제에서 제안한 microsparging aeration system과 simethicone emulsion sup (DOW CORNING) antifoam을 이용하여 생물반응기에서의 거품 문제를 해결하려 하였다. 먼저 antifoam을 생물반응기에서 이용하기 위해서 세포 성장에 영향을 미치지 않을 정도의 antifoam의 농도를 조사하였다. 이를 위해 여러 농도의 antifoam을 배지에 첨가하여 세포 성장에 영향이 없는지를 조사하였으며 그 결과를 Fig. 5.24에 나타내었다. 이 그림에 의하면 1.0 % 까지 antifoam을 첨가할 경우 세포 성장에 영향을 거의 끼치지 아니하며 그 이상을 첨가하면 성장에 저해를 받음을 알 수 있었다.

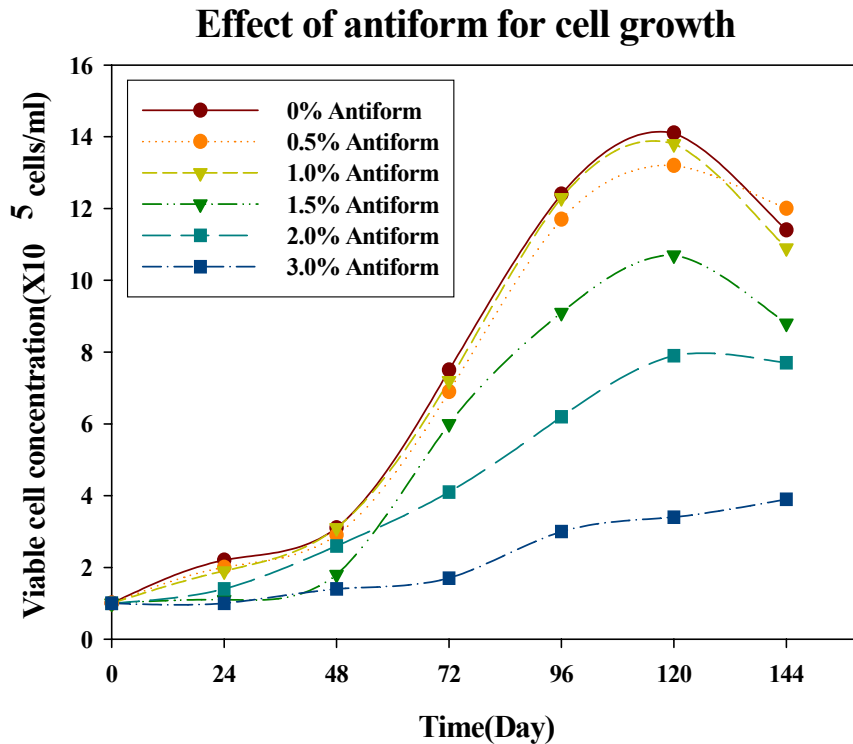


Fig.2.54 Effect of antifoam on cell growth

한편 거품의 형성은 antifoam의 농도뿐만 아니라 용존산소 및 pH의 조절을 위해 공급되는 산소, 질소, 탄소 가스 혼합물의 공급속도에 따라 달라진다. 따라서 용존산소 및 pH의 조절을 위해 주어진 antifoam의 농도에서 거품의 발생없이 공급 가능한 가스혼합물의 유속을 구하는 것은 안정적인 생물반응기의 조업을 위하여 필수적이다. Table 2. 1은 bioreactor에서 50 rpm으로 교반하면서 여러 antifoam 농도와 가스 공급속도에서의 거품 형성 여부를 조사한 것이다. 표에 의하면 antifoam의 농도가 높을수록 거품이 생성되지 않는 최대 유속이 증가됨을 알 수 있었고, 또한 세포 성장에 영향을 끼치지 않는 농도인 1.0 %에서 안전하게 거품이 생성되지 않는 유속은 0.2 L/min임을 알 수 있어서, 용존산소 및 pH 조절용 가스 혼합물의 유속을 0.2 L/min로 조정하여 세포배양 및 백신 생산을 수행하였다.

Table 2. 1 Antifoam 농도 및 가스 유량에 따른 거품의 생성 유무 조사

Flow rate Antifoam 양	0 (L/min)	0.1 (L/min)	0.2 (L/min)	0.3 (L/min)	0.4 (L/min)	0.5 (L/min)	1.0 (L/min)	1.5 (L/min)
0.0 %	X	○	○	○	○	○	○	○
0.5 %	X	△	○	○	○	○	○	○
1.0 %	X	X	X	△	○	○	○	○
1.5 %	X	X	X	X	△	△	○	○

(○: 거품 발생 및 축적, X: 거품 미발생, △: 거품 소량 발생)

세포 배양 동안 배양온도는 37°C, pH 7.2로 조절하였으며, 용존 산소량은 공기/ 질소/ 산소/ 이산화탄소를 이용하여 제3세부 과제에서 구축된 자동화 시스템을 이용하여 50%로 유지시켰다. 바이러스 감염 후 배양온도를 34°C로 조절하였고, 그 외의 조건들은 세포 배양과 동일하게 유지하였다. 앞에서 구한 최적 MOI 0.1, infection time 4day를 기준으로 백신생산을 하였고, 제3세부에서 구축한 유가식 배양의 도입을 위해 glucose와 glutamine의 fed-batch feeding을 infection 후 48hr에 실시하였으며 두 번 feeding 한 경우 영양물질의 축적이 확인이 되어 한번만 glucose 2g/l, glutamine 2mM의 feeding을 실시하였다. Fig. 2.55는 구축된 생물반응기 시스템을 보여주고 있다. Fig. 2.56은 bioreactor 운전 시 세포의 성장곡선을 보여주고 있다. 세포 배양 96시간 후 0.1 MOI로 바이러스를 감염시켰고 이에 따라 세포는 바이러스 감염 후부터 계속적으로 감소하는 경향을 보였으며 fed-batch로 영양물질을 추가로 공급하더라도 세포수는 바이러스 감염으로 계속 줄어들을 알 수 있었다.



Fig.2.55 구축된 생물반응기 시스템

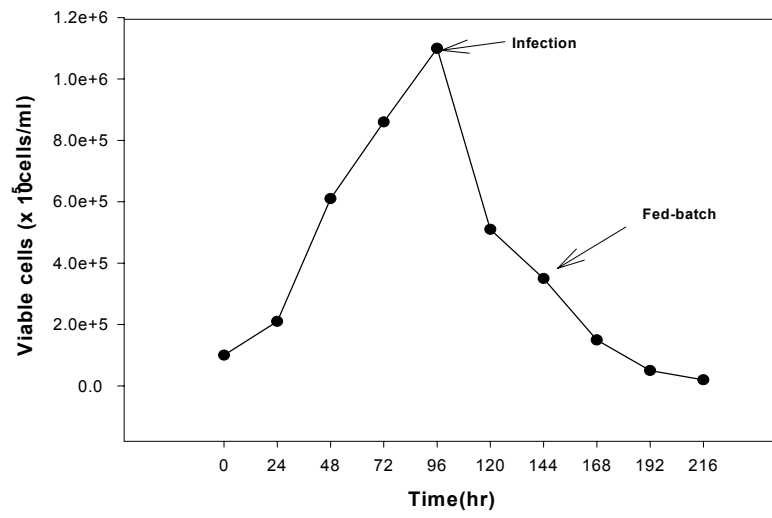


Fig.2.56 Cell growth in bioreactor operation

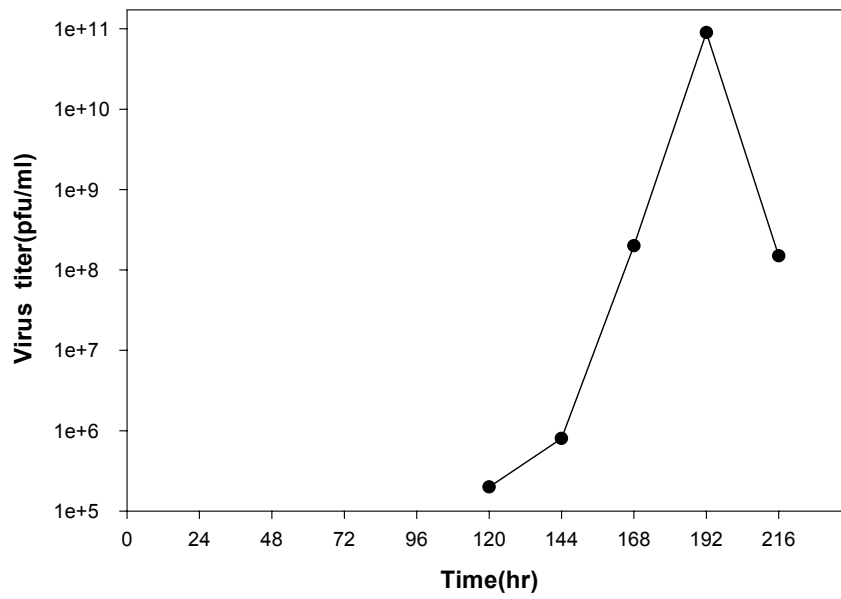


Fig.2.57 NDV propagation in bioreactor operation

Fig.2.57은 bioreactor 운전 시 바이러스의 증식 kinetics를 나타낸 것이다. 바이러스 감염 96시간 후 9×10^{10} pfu/ml의 바이러스가 증식되었다. 이와 같이 virus의 titer가 높은 이유는 낮은 온도에서의 조업으로 인해 virus의 deactivation 속도가 낮아졌고, 자동화 등 여태까지의 백신 생산 최적화를 위한 모든 핵심 기술이 모두 결집되었을 뿐 만 아니라, 특히 bioreactor에서 일정한 pH와 용존 산소를 유지할 수 있었기 때문이라고 생각된다. 왜냐하면 vaccine 생산이 용존 산소에 크게 의존한다는 보고가 있기 때문에 자동화에 의한 일정한 용존 산소의 유지가 생산성 증대에 큰 영향을 미친 것으로 생각된다. 따라서 3년에 걸친 본 연구의 결과를 통하여 축적된 기술을 바탕으로 생물반응기에서 세포배양을 통한 ND백신의 생산을 통해 바이러스의 생산성을 획기적으로 증진시켰을 뿐만 아니라 large-scale 생산을 위한 scale-up의 기초를 마련하였다.

20) 생산 백신 안정성 검사 및 현장 실험

생산 백신의 안정성 검사 및 현장 실험은 많은 경비가 소요되므로 참여기업에 기술이전한 후에 참여기업에서 실시하는 방향으로 추진 중이다.

3절 제2세부: 뉴캐슬병 백신의 대량 생산을 위한 자동화 공정개발 및 scale-up (강원대 전계택교수)

1. 연구수행 방법

1) 세포주 및 세포배양

뉴캐슬병 바이러스 생산을 위해 사용한 숙주세포는 바이러스 백신 개발 및 생산에 널리 쓰이고 있는 African green monkey kidney (Vero) 세포주를 이용하였다. 세포 성장을 위한 기본배지로는 powder 상태인 RPMI 1640을 이용하였으며 5% fetal bovine serum (FBS, Gibco), streptomycin sulfate (100µg/ml), penicillin G (100units/ml), 10mM sodium bicarbonate 및 10mM HEPES를 첨가하여 배지 1L를 만든 후, autoclave로 완전하게 멸균 (121°C, 21min)된 여과장치 (0.22µm pore size membrane 사용)를 사용하여 clean bench 내에서 진공 여과하였다. 배지는 냉장 보관하였고, 사용할 때 37°C에서 30분간 pre-incubation하여 사용하였다.

본 실험 및 계대배양은 모두 1×10^4 cells/ml로 접종하여 humidified CO₂ incubator (5% CO₂, 95% air)에서 37°C의 조건으로 배양했으며, 플라스크 바닥에 세포가 완전히 monolayer를 형성할 때 (접종 후 약 3일)를 계대배양 시기로 판단하여 새로운 플라스크로 세포를 옮겨 주었다. 계대배양 방법은 플라스크에 있는 배지를 제거하고, phosphate-buffered saline (PBS)으로 2회 세척한 후 0.25% trypsin (Sigma)을 5ml 첨가하여 세포를 완전하게 떼어내었다. 이들을 1,300rpm에서 5분간 원심 분리한 후, 상등액을 버리고 새로운 배지를 이용하여 잘 혼합한 후 일부의 sample을 취하여 trypan blue dye로 염색하여 hemocytometer 상에서 세포 농도를 측정하였다.

2) 바이러스주 및 바이러스 배양

바이러스주로는 뉴캐슬병 바이러스 중 비강독인 B1주를 국내에서 강독화시킨 교정원주를 대성미생물연구소로부터 제공받아 사용하였으며 -70°C deep freezer에 보관하여 사용하였다. 바이러스 접종을 위해서, T-flask 또는 생물반응기의 세포농도가 지수기 말기에 도달하면 배지를 제거하고 phosphate-buffered saline로 2회 세척한 후, 0.1MOI로 뉴캐슬병 바이러스를 감염시키고 1시간 동안 흡착하면서 간헐적으로 흔들어 주었다. CO₂ 배양기 또는 생물반응기에서 3-4일간 배양한 후 수확하여 역가를 측정하였다.

3) 바이러스 역가 측정

뉴캐슬병 바이러스의 plaque assay를 수행하기 위해서 6 well plate에 5% FBS가 함유된 RPMI 1640 배지를 이용하였다. Well 당 1×10^5 cells/ml로 세포를 접종하여 confluent하게 자랄 때까지 37°C humidified CO₂ 배양기에서 배양하였다. 한편 FBS가 함유되지 않은 RPMI 1640으로 시료를 10배로 단계적 희석하여 적당량 바이러스를 함유한 희석시료를 준비하였다. 각 well의 배지를 제거하고 PBS로 2회 세척한 후, 1ml씩 바이러스 희석액을 각 well에 접종하고 가끔 흔들어 주면서 37°C humidified CO₂ 배양기에서 정치 배양하였다. 60분 후 4% agarose와 2배 농축된 RPMI 1640을 1:2로 혼합한 agarose 배지를 각 well에 2ml 씩 첨가하고, 4-5일 후 각 well에 나타난 plaque 수를 0.03% neutral red solution으로 염색시켜 측정하였다.

4) 미립담체를 이용한 숙주세포 배양 및 바이러스 배양

본 실험에서 사용한 미립담체인 다공성의 Cultispher-G (1.7g/l)를 PBS에 충분히 swelling 한 후 여러 번 세척하여 멸균하였다. Spinner flask 또는 생물반응기 표면에 세포가 부착하는 것을 방지하기 위하여 이들을 실리콘으로 코팅 (Sigmacoat, Sigma Co.)하여 건조한 후 멸균하였다. 세포가 미립담체에 잘 부착하도록 적정량의 배지와 cell solution (1×10^5 cells/ml) 및 미립담체를 spinner flask 또는 생물반

응기에 넣고 초기 2시간 동안 33분마다 3분씩 40rpm에서 간헐적으로 교반하였다. 그 후 나머지 배지 적정량을 넣고 24시간 동안 40rpm에서 계속 교반하였으며, 그 후부터는 60rpm으로 연속적으로 교반하였다.

정상세포가 완전하게 자라면 1ml의 배양액을 sampling하여 최종 세포농도를 측정 한 후, 배지를 90% 제거하고 0.1MOI로 뉴캐슬병 바이러스를 감염시켰다. 초기 1시간 동안은 40rpm에서 12분마다 1분씩 교반하였다. 그 후 적정량의 새로운 배지를 넣고, 연속 교반하며 배양을 수행하였다. 3way valve를 이용하여 자체 제작한 sampling port를 사용해서, 오염을 방지하면서 안정적으로 반응기 내의 균질한 sample을 취할 수 있었음은 주목할 만하다.

5) 부착률 조사

Free cell이 미립담체에 부착되는 비율을 다음 식으로 나타내었다.

$$C_t = C_0 \cdot e^{-kt}$$

여기서 C_t 는 t 시간에서의 cell-free 농도, C_0 는 초기 접종농도, 그리고 k는 상수이다. 이 식은 다음과 같이 대수적으로 표현할 수 있다.

$$-\ln(C_t/C_0) = k \cdot t$$

따라서 $-\ln(C_t/C_0)$ 대 t로 그래프화 하면 k는 기울기가 된다. k 값을 specific attachment rate (min^{-1})로 정의하였다.

6) 생물반응기 배양에서 pH control system 확립

동물세포는 탄소원 및 에너지원으로 glucose와 glutamine을 이용하고 있다. 세포가 glucose 및 glutamine을 이용할 때 glutamine의 탈 amine반응 (deamination)에 의해 ammonia가 생성되며, glucose 이용 시 해당작용 (glycolysis pathway)에 의해 유기산인 lactic acid가 발생된다. 이처럼 동물세포의 대사과정 중 부산물의 생성은 pH의 저하, 또는 증가에 의한 배양환경의 변화를 초래하여 세포성장의 저해 요인으로 작용한다. 본 연구에서는 정밀하게 pH를 조절하기 위해 염기로 1N NaOH를 사용하였으며, 산으로 CO₂ gas를 이용하였다. 특히 CO₂ gas의 정밀 공급을 위해 on, off-timer에 연결되어 있는 solenoid valve를 pH controller에 부착하여, pH를 7.2로 조절하면서 실험을 수행하였다.

7) 생물반응기에서 용존산소 조절을 통한 세포배양

1, 2 또는 5 liter 부피의 생물반응기에서, 온도는 37°C로 조절하였으며, 용존 산소량은 공기/ 질소/ 산소/ 이산화탄소를 이용하여 조절하였다. 숙주세포 배양을 위한 미립담체 배양은 spinner flask 배양 방법과 동일한 방법으로 수행하였다. 배양중의 배지 내에 녹아 있는 용존산소 농도는 다음 방법에 의해 결정되었다: 배지를 멸균 후 seed를 생물반응기에 접종하기 전에 질소 가스를 1 vvm의 속도(이때 교반 속도는 90rpm)로 공급함으로써, 용존산소 농도가 최하점에 도달된 후 더 이상의 변화가 없는 점을 용존산소 농도가 0%인 점으로 정하였다. 그 다음 질소 공급을 중단하고 공기를 1 vvm의 속도(이 때 교반속도는 100rpm)로 약 3시간 동안 공급함으로써, 용존산소 전극에 의해 측정된 용존산소 농도가 최고점에 도달된 후 더 이상의 변화가 없는 점을 용존산소 농도가 100%인 점(포화용존산소 농도)으로 정하였다.

8) 생물반응기에서의 동물세포 배양 시 대한 산소전달 방법

일반적으로 동물세포배양기를 이용하여 용존산소를 전혀 조절하지 않은 상태에서 세포를 회분식 배양하였을 때, 배지내의 용존산소 (Dissolved Oxygen, DO)의 농도가 0% 상태로 떨어진다. 이로부터 지수기 때의 세포성장에 있어서 영향을 미치는 제한요소로서 glucose와 glutamine의 고갈이나, 세포성장 저해물질인 ammonia, lactic acid 같은 부산물뿐만 아니라 용존산소의 고갈도 세포성장에 심각한 영향을 미치는 것을 알 수 있다. 따라서 높은 세포농도를 얻기 위해서는 용존산소를 일정수준 이상으로 유지시켜야 한다. 한편, 동물세포의 배지 성분 중에는 10% serum이 포함되어 있어 미생물과 같이 일반적인 sparger를 사용하여 산소의 직접 공급방식인 sparging에 의한 산소 공급시 다량의 거품이 생성되어 미

생물에 의한 오염의 위험성이 있다. 또한 동물세포의 특성상 세포벽이 없어 거품이 생성되었다 터질 경우에 손상을 받을 수 있는 원인 (전단응력, shear stress)이 될 수 있기 때문에 특수한 장치를 이용한 산소공급이 수행되어야만 한다. 또한 지속적으로 산소를 공급한다면 배지내의 거품의 축적을 고려하지 않을 수 없다. 관찰한 방에 따르면 0.2 vvm의 속도로 지속적으로 산소를 공급할 시에 배양기의 최대 부피로 거품이 축적되는 시간은 불과 6분여 정도 밖에 걸리지 않았다. 이러한 문제점의 발생으로 인해 본 연구에서는 (i) PTFE membrane system을 이용한 공기공급 방법과, (ii) microsparging aeration system과 시간조절장치를 이용하여 간헐적으로 공기산소를 배지 중에 공급하는 방법, 또한(iii) 항거품제를 배지 내에 첨가하면서 microsparging에 의해 연속적으로 공기산소를 공급하는 방법을 이용하였다. 본 연구에서 적용한 microsparger는 공기방울의 크기를 최대한 작게 하여 기체산소가 용존산소로 넘어가는 gas bubble에서 liquid film을 통과할 때의 저항성을 줄임과 동시에 배지와 접촉하는 공기방울의 표면적을 증가시킴으로써, 적은 양의 기체산소를 주입하더라도 주입된 많은 양의 기체산소가 용존산소로 쉽게 전환될 수 있게 하는 특징을 가지고 있다. 미생물과 달리 동물세포는 많은 양의 산소를 빠르게 흡수하지 못하기 때문에 이와 같이 간헐적으로 공기를 적정량 공급하거나, 또는 지속적으로 매우 소량의 공기만 공급하여도 일정한 용존산소의 수준을 유지 할 수 있는 것으로 관찰되었다.

9) 용존산소 또는 기체산소의 물질수지식에 근거한 산소전달계수 (k_La) 측정

세포의 산소흡수율 (oxygen uptake rate, OUR)과 배양액 내로의 산소전달율 (oxygen transfer rate, OTR) 및 산소전달계수 (oxygen transfer rate coefficient, k_La)를 측정하기 위해, 본 연구에서는 용존산소 전극을 이용하여 세포 배양 중에도 적용할 수 있는 dynamic method를 이용하였다. Dynamic method는 기체산소의 용존산소로의 산소전달율 ($OTR = \text{oxygen transfer rate}$)과 미생물의 산소흡수율 ($OUR = \text{oxygen uptake rate}$)을 측정하여 용존산소에 근거한 물질수지식으로부터 산소전달계수를 측정하는 방법이다. 또한 기체산소의 물질수지식을 이용하는 direct method를 사용하였다. 이를 위해 생물반응기의 입구와 출구에서의 기체가스의 성분을 분석할 수 있는 가스분석시스템의 설치가 필수적이다. 산소전달계수의 측정을 위하여 초당 하나의 데이터를 컴퓨터를 이용하여 받아들여서 물질수지식에 의해 계산하는 과정을 모두 컴퓨터가 수행하도록 하였다. 모든 전기적 신호를 컴퓨터에서 읽을 수 있도록 컴퓨터 내부에 Adventech의 Data Acquisition Card PCL-812PG를 설치하여 동물세포배양기로부터 전달되는 모든 데이터 신호를 컴퓨터로 읽어 들이고, 데이터 acquisition과 logging 프로그램인 Labtech Software를 이용하여 일정 시간동안 전달되는 데이터를 컴퓨터에 저장한 후 분석하였다. 이에 대한 자세한 실험내용과 결과는 다음 장에 자세히 나타내었다.

10) 생물반응기 배양시 배양공정 변수의 실시간 모니터링

생산세포주의 생물반응기 배양 중에 변화하는 여러 공정변수의 수집 및 분석을 통하여 배양 상태를 최적화 할 수 있는 on-line computer 자동화 공정을 구축하였다. 배양공정 데이터 수집 및 분석을 위한 프로그램으로는 Autolab V2.0을 이용하였고, 생물반응기에는 배양 중 발생하는 가스의 성분 분석을 위해 가스분석기 (GMate LK930A)를 연결하였다. 배양기간 동안 생물반응기 내부로 공급 또는 배출되는 가스를 60초 간격으로 측정하고, 측정된 데이터를 실시간 분석하여 산소흡수율 (OUR), 세포비성장속도 (μ), 세포량(X) 및 산소전달계수 (k_La)등을 측정하고자 하였다.

11) 유가식배양 공정 (fed-batch culture bioprocess)

Spinner flask를 이용하여 유가식 방법에 의하여 백신 생산을 할 경우의 NCD백신 생산성을 조사하였다. 이를 위해 spinner flask 5 set에 초기 glucose 2g/l, glutamine 0.3g/l을 포함하는 RPMI 1640의 배지를 이용하여 microcarrier에 세포를 부착하여 세포를 배양하고 4일 후에 0.1 MOI로 virus를 infection 하였다. Infection한지 2일 후에 glucose(2g/l), glutamine(0.3g/l), glucose+glutamine, 농축배지($\times 5$)로 각각의 spinner에 feeding한 후 하루에 한번 씩 sampling하여 virus titer 및 glucose, ammonia, lactate의 농도를 측정하였다.

12) 생물반응기에서의 고정화담체의 기질확산저항 및 다양한 배양방법에 대한 modelling 및 simulation 연구

미립담체내의 세포는 확산저항으로 인해 입자내부와 액체배지내의 기질 및 산소농도의 차이가 크게 되어 전체적인 반응속도나 효율이 떨어지게 되므로, 세포 고정화 배양에 있어서 제어전략을 수립할 경우 이러한 확산저항에 의한 효과를 분석하는 것이 매우 중요하다. 본 연구에서는 고정화 동물세포배양의 kinetics data를 바탕으로 물질수지에 의거한 미분방정식을 도입하여 효율인자, Thiele modulus, 그리고 담체내의 기질구배 등을 구하였다. 특히 확산계수, 담체의 균체부하량 (cell loading)등이 효율인자 및 담체 중심의 기질농도에 미치는 영향을 예측하여, 다양한 Vero 세포 배양공정, 즉 회분식배양, 반복회분식배양, 유가식배양 및 연속 perfusion 배양공정의 최적화를 위한 modelling 및 simulation연구를 수행하였다.

2. 연구수행 내용 및 결과

1) T-flask를 이용한 뉴캐슬병 바이러스 최적 배양 조건 조사

가) M.O.I.의 최적화

바이러스 생산에서는 M.O.I.(세포에 대한 바이러스의 감염비)가 바이러스 증식에 영향을 주는 중요한 변수이다. 높은 M.O.I로 감염시킬 경우, 단시간 내에 많은 바이러스가 급속하게 증식되므로 생산성 면에서 좋지 않은 영향을 줄 수 있다. 따라서 Vero 세포에서 M.O.I.에 따른 뉴캐슬병 바이러스 증식을 비교하고 바이러스 복제가 최대가 되는 최적 M.O.I.를 결정하기 위하여 0.01, 0.1, 1 M.O.I.로 접종하여 그 최대 역가를 확인하였다. 따라서 Vero 세포를 이용한 뉴캐슬병 바이러스 생산 시 0.1 M.O.I.를 최적으로 결정하여, 그 후 모든 세포에 0.1 M.O.I.로 바이러스를 감염시켰다.

나) 감염시기 결정

세포배양에서 바이러스 생산은 감염시 세포의 활성 및 밀도와 M.O.I.에 영향을 받는다. 일반적으로 세포가 confluent하게 자란 후 바이러스를 감염시켜 증식시킨다. 따라서 본 연구에서는 최적의 감염시기를 결정하였다. 세포 접종 72시간 후에 바이러스를 감염시켰을 때 바이러스 역가가 최대 (3.1×10^8 pfu/ml)인 것으로 나타났다. 96시간 후 감염시켰을 경우 급속한 감소를 보였다. 즉 최적의 감염시기는 세포의 성장 단계 중 지수기에서 정지기 사이로 확인되었다. 또한 이러한 결과는 세포의 활성 및 밀도에 따른 영향을 보여주고 있다.

2) Spinner flask에서 회전속도가 고정상세포의 성장에 미치는 영향

바이러스 생산성을 알아보기 전에 고농도 세포배양이 우선되어야 하므로 세포에 대한 영향을 조사하는 실험을 집중적으로 진행하였다. 숙주세포로 사용된 Vero 세포는 부착성 세포이므로 T-flask 상에서는 고농도 세포배양의 한계점이 있다. 따라서 고농도 세포배양을 위해서 미립담체를 이용하여 다양한 교반속도로 세포를 증식시켰다.

가) 세포 부착시간 측정 및 부착률 조사

미립담체 1.7g/l를 PBS에 충분히 swelling 한 후 여러 번 세척한 후 멸균하여 사용하였다. 세포가 미립담체에 잘 부착하도록 배지 50ml에 세포농도를 달리하여 접종한 후 33분마다 3분씩 간헐적으로 교반하였다. 30분 마다 배지 1ml씩 채취하여 미부착 세포의 농도를 측정하여 접종농도에 따라 미립담체에 부착되는 정도를 측정하였다. Fig 3.1과 Table 3-1에 나타난 바와 같이 3시간 이내에 75-70% 정도로 세포가 미립담체 표면에 부착되었고, 1×10^5 cells/ml로 접종한 경우가 세포부착이 우수하였다.

나) 회전속도에 따른 세포농도 조사

부착을 조사와 마찬가지로 spinner flask에 미립담체(1.7g/l), 배지, cell solution을 넣고 초기 2시간 동안 33분마다 3분씩 간헐적으로 교반하였다. 그 후 회전속도를 30rpm, 40rpm, 60rpm, 80rpm으로 교반하여 배양하였다. 24시간 마다 5ml씩 sampling하여 미립담체를 침전시키고 상등액을 제거한 후 0.25% trypsin-EDTA 용액을 사용하여 세포농도를 hemocytometer로 측정하였다. Fig 3.2에서 보는 바와 같이 30rpm으로 교반하였을 경우가 4.3×10^5 cells/ml로 가장 높은 세포농도를 보였으나 aggregation이 심하게 관찰되었다. 그러므로 이후 실험에서는 60rpm으로 교반하여 배양하기로 결정하였다.

Table 3-1. Attachment rate constant k ($\times 10^{-2} \text{min}^{-1}$) to Cultisphere-G microcarriers under various inoculum cell concentration. Cultures were stirred intermittently (3min stirring every 33min) for 180min.

Inoculum cell concentration	$k \times 10^{-2} \text{min}^{-1}$
$2 \times 10^5 \text{ cells/ml}$	0.53
$2 \times 10^5 \text{ cells/ml}$	0.5
$1 \times 10^5 \text{ cells/ml}$	0.85
$1 \times 10^5 \text{ cells/ml}$	0.93

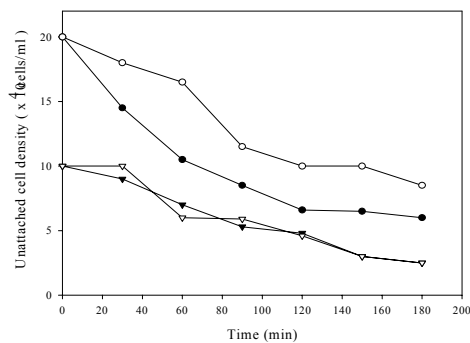


Fig 3. 1 Attachment of Vero cells on Cultisphere-G microcarriers.

●, ○: 2×10^5 cells/ml inoculum cell concentration
 ▼, ▽: 1×10^5 cells/ml inoculum cell concentration

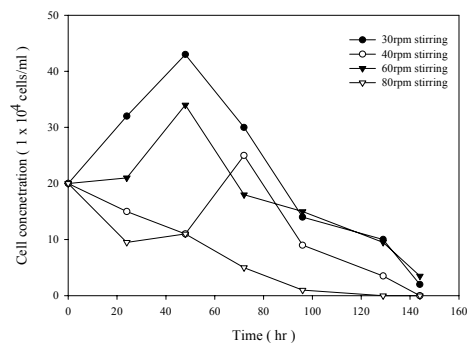


Fig 3. 2 Effect of stirring speed on the growth of Vero cells cultured with Cultisphere-G microcarriers.

3) 생물반응기에서 용존산소 조절을 통한 세포배양

고농도 동물세포 배양 시 높은 산소요구량에도 불구하고, 배양액 내로의 제한된 산소 공급능력으로 인해 산소요구량 만큼의 적정량의 산소를 제때에 공급한다는 것은 매우 어려운 일이기 때문에, 산업화를 위한 scale-up 과정에서 배양액내로의 산소전달은 항상 큰 문제점으로 지적되고 있다. 실제로 1 liter 배양기를 이용한 고정상배양 결과 용존산소를 전혀 조절하지 않은 경우 배지내의 용존산소의 농도가 0%로 떨어져서 심한 산소부족 현상이 관찰되었다. 이로부터 세포배양기를 이용한 고농도 배양의 경우, 지수기 동안에 탄소원이면서 에너지원인 glucose와 glutamine의 고갈이나, 세포성장 저해물질인 ammonia, lactic acid 같은 부산물뿐만 아니라 용존산소의 결핍현상도 세포성장에 심각한 저해효과를 미치는 것을 알 수 있었다. 이는 백신생산 시 가장 중요한 고농도의 세포를 배양하기 위해서는 용존산소가 일정 수준 이상으로 정밀하게 조절되어야 함을 제시해 준다.

충분한 산소를 전달함으로써 배양 중의 용존산소 부족 현상을 극복하기 위해 다음과 같이 생물반응기 운전조건을 확립하였다. 동물세포는 기계적 교반에 의한 전단응력에 의해 쉽게 손상되기 때문에 교반 시 섬세한 조절이 요구되며, 공기를 직접 배양액 내로 주입할 경우 공기방울과 세포와의 접촉에 의한 세포막 파괴 현상 및 배양액내의 단백질 성분에 의한 거품발생 현상 때문에 통기량의 조절이 매우 중요하다. 효과적인 산소 전달을 위해 배양액 내에 정밀한 microsparger를 설치하여 적은 양의 산소를 시간의 간격을 두고 간헐적으로 배양액 내로 산소를 직접 전달하는 방식을 고안하였다 (Fig 3.3). 이는 지속적으로 공기를 공급할 경우(0.2 vvm) 배지 내에 포함된 10% serum으로 인해 배지 내에 거품이 급속도로 축적되어 더 이상 배양기 운전이 불가능하였기 때문에 취한 운전전략이다. 한편 주목할 점은 동물세포는 미생물과 달리 많은 양의 산소를 빠르게 흡수하지 못하기 때문에 이와 같이 간헐적으로 공기를 적정량 공급하여도 일정한 용존산소의 수준을 유지할 수 있었다는 점이다.

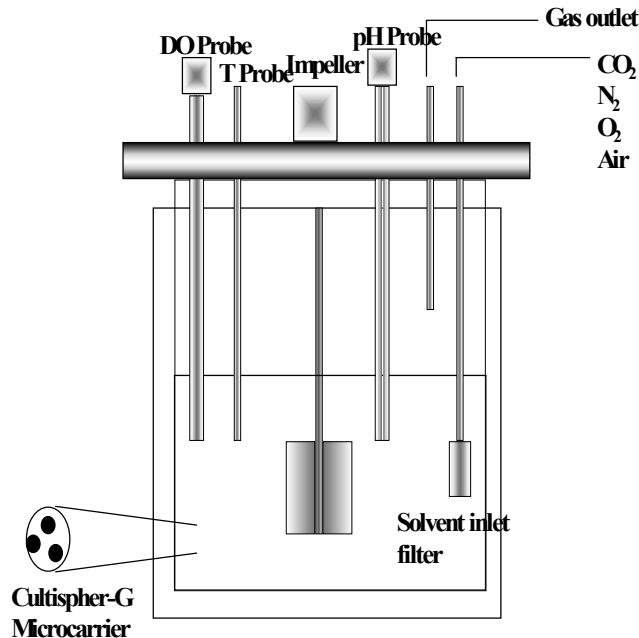


Fig 3. 3 Bioreactor systems for Vero cell culture.

세포배양 온도는 37°C, pH 7.2로 조절하였으며, 용존산소량을 포화용존산소의 30%와 50%로 조절하며 배양하였다. Fig 3.4에 제시한 바와 같이 용존산소 농도가 원하는 수준에서 비교적 정밀하게 조절되는 것으로 관찰되었다. 이로부터 본 실험에서 적용한 microsparger 시스템을 이용하였을 때 동물세포 배양 시 용존산소의 조절이 충분히 가능함을 확인할 수 있었다. Fig 3.5에 각 포화 용존산소에 대한 세포성장 곡선을 나타내었다. 50% 포화용존산소의 수준에서 더욱 높은 세포 생산성을 보였다. 이 보다 앞선 실험에서 접종 후 24시간 동안 33분마다 3분씩 간헐적으로 교반하여 배양한 경우 고농도 세포배양이 되는 것으로 관찰됐었다. 그러나 이번 실험의 경우 접종 후 2시간 동안 간헐적으로 교반했기 때문에 부착율이 50% 정도로 낮았으며 (부착율 조사 결과 참조), 그 결과 낮은 초기 세포농도로 인해 전반적으로 세포 생산성도 감소한 것으로 판단된다.

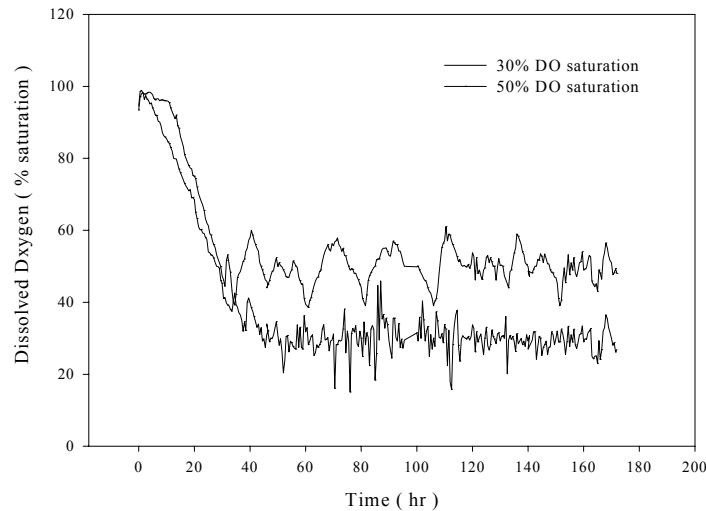


Fig 3. 4 Profiles of dissolved oxygen(DO) according to DO control.

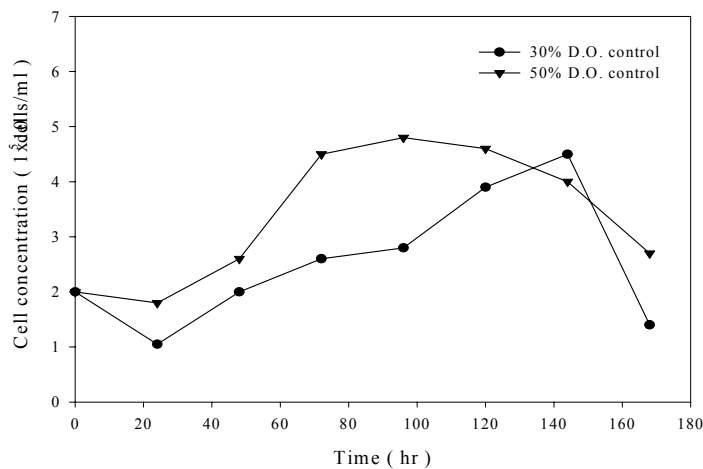


Fig 3. 5 Comparison of Vero cell growth kinetics under the various concentrations of dissolved oxygen in bioreactor cultures.

4) 동물세포배양의 scale-up시 가장 중요한 변수인 산소전달계수 (k_{La}) 측정법 확립

실험실 내의 2 liter 생물반응기를 이용한 소규모 배양에서 나온 중요한 결과를 100-500 liter 규모의 대규모 생물반응기의 배양 시에도 동일하게 얻기 위해서는, scale-up시 가장 중요한 산소전달계수에 대한 측정이 이루어져야 한다. 일반적으로 용존산소를 제외한 거의 모든 배양 조건 (예를 들면 각 배지 성분의 농도, pH, 온도 등)은 두 규모의 배양기에서 동일하게 유지될 수 있으나, 용존산소의 경우는 그 용해도가 매우 낮으므로 (30°C에서 약 7ppm 정도), 배양 중 지속적으로 산소를 공급해 주어야만 용존산소의 결핍현상이 극복될 수 있다. 이 경우 기체산소를 용존산소로 변화시키는 속도인 산소전달계수 (k_{La})가 가장 중요한 인자가 된다. 즉 소규모 배양기에서의 산소전달계수의 값과 대규모 생물반응기에서의 값이 거의 동일한 수준으로 유지되어야 비로서 용존산소를 포함한 모든 배양조건이 거의 비슷하다고 결론지을 수 있다. 산소전달계수(k_{La}) 측정을 위해 용존산소의 물질수지식을 이용하는 dynamic method에 대한 실험방법을 우선적으로 확립하였다. 한편 기체산소의 물질수지식을 이용하는 direct method에 대해서는 후반부의 결과에 제시하였다.

가) Dynamic method에 의한 산소전달계수 측정법 확립

기체산소의 용존산소로의 산소전달율 ($OTR = \text{oxygen transfer rate}$)과 세포의 산소흡수율($OUR = \text{oxygen uptake rate}$)을 측정하여 용존산소에 근거한 다음의 물질수지식으로부터 산소전달계수를 측정하였다.

$$\frac{dC_L}{dt} = OTR - OUR \quad (1)$$

여기서,

$$OTR = k_{La}(C_L^* - C_L) \quad (2)$$

OTR : 산소전달율 (mg O_2 /L/hr) ;

k_{La} : 산소전달계수 (1/hr);

C_L^* : 배지 내 용존산소의 포화용해도 (mg O_2 /L) ;

C_L : 배지 내 용존산소 농도(mg O_2 /L).

한편 산소전달계수는 다음과 같이 표현된다.

$$k_{La} = (P/V)^{\alpha}(V_s)^{\beta}(\eta_{app})^{-\gamma} \quad (3)$$

P/V : 단위 부피당 power input ;

V_s : 배지 내로 공급되는 공기의 superficial velocity ;

η_{app} : 배지의 점도.

동물세포의 경우는 세포 배양 시 곱팡이 또는 균사형성 세균인 방선균처럼 높은 점도가 거의 형성되지 않아 점도가 산소전달계수에 미치는 영향이 미미하므로, 위의 (3)식에서 점도의 조건 (η_{app})은 고려하지 않았다. 또한 세포가 성장하면서 소비하는 용존산소에 대한 산소소비속도는 다음의 식으로 표현될 수 있다.

$$OUR = Q_{O_2} = q_{O_2}X \quad (4)$$

X : 세포농도 (g cell/L) ;

q_{O_2} : 세포당 산소흡수율 (mg O_2 / g cell/hr).

상기의 수식들을 이용하면 세포 배양 시 용존산소에 대한 물질수지식은 다음과 같이 표현될 수 있다.

$$\frac{dC_L}{dt} = k_{La}(C_L^* - C_L) - q_{O_2}X \quad (5)$$

이 식으로부터 세포를 접종하지 않은 배양액 ($OUR=0$)을 이용하여 다양한 조건에서 산소전달계수 (k_{LA})를 측정하였다. 측정은 질소를 이용하여 용존산소를 어느 정도의 농도까지 (약10~20% 용존산소수준) 제거한 후, 산소 또는 공기를 공급하여 용존산소 (C_L)가 변화하는 양상을 chart recorder 또는 on-line computer software를 이용하여 기록하였다.

위에서 제시한 관계식에 의하여 2 liter 세포배양용 반응기를 이용하여 k_{LA} 값을 측정하였다. 즉 $\frac{dC_L}{dt} = k_{LA}(C_L^* - C_L)$ 에서 변수를 분리하여 양변을 적분하면 $k_{LA} = -\ln(C_L^* - C_L)$ 으로 나타나고, 이것을 시간(t)에 대한 $-\ln(C_L^* - C_L)$ 값으로 plotting하여 직선화시킨 후, 직선의 기울기로부터 k_{LA} 값을 측정하였다.

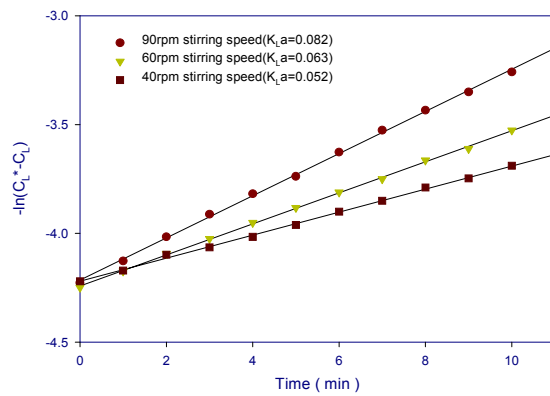
Fig 3.6과 3.7에 k_{LA} 값의 측정을 위해 시간(t)과 $-\ln(C_L^* - C_L)$ 을 plotting한 결과를 제시하였다. 이 경우 배양 배지로의 용존산소 공급은 순수산소를 이용해서 polymer tube를 통해 이루어 졌다. Fig 3.6은 각각의 일정한 산소 공급속도 (0.14vvm, 0.28vvm, 0.42vvm)에서 교반기의 교반속도의 변화 (40, 60, 90rpm)에 따른 결과이며, Fig 3.7는 각각의 일정한 교반속도 (40, 60, 90rpm)에서 산소 공급속도의 변화 (0.14vvm, 0.28vvm, 0.42vvm)에 따른 결과를 나타낸 것이다. 모든 경우에서 얻어진 기울기의 값이 직선화가 된 것으로 보아 실험방법이 정확한 것으로 판단되었으며, 그 결과 계산된 산소전달계수의 값을 각각의 그래프 내에 제시하였다.

Table 3-2에 1.5 liter의 배지와 증류수의 부피에서 공기를 다양한 속도로 공급할 때 측정된 k_{LA} 값을 제시하였다. 이 경우 용존산소 공급을 위한 공기 공급시스템으로 (i) 실리콘튜브, (ii) polymer (PTFE) 튜브, 또는 (iii) 실리콘튜브 위에 PTFE polymer 튜브를 덧씌운 이중튜브를 사용하여 k_{LA} 값을 비교하였다. 모든 경우에서 PTFE polymer 튜브만을 사용한 경우에 산소전달계수가 가장 높은 것으로 관찰되었다. 한 예로 0.42 vvm, 90rpm의 조건하에서 polymer 튜브를 이용해서 배양배지로 공기가 공급된 경우 실리콘튜브 시스템에 비해 1.76배, 실리콘튜브 위에 polymer 튜브를 덧씌운 이중튜브 시스템에 비해 5.6 배로 k_{LA} 값이 증가하는 것으로 나타났다.

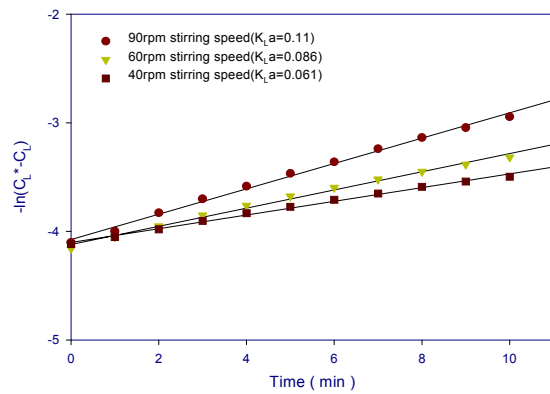
또한 증류수로 공기가 공급되는 경우에도, polymer 튜브로 공기가 공급되는 경우가 다른 두 경우에 비해 k_{LA} 값이 각각 1.86배와 6.1배 증가하였다. 한편 배양액내로 산소를 효율적으로 전달하기 위해서는 통기량을 증가시키는 것보다 교반속도를 증가시키는 것이 더 효과가 있는 것으로 판명되었다. 특히 교반속도를 60rpm에서 90rpm으로 증가시킬 경우, 조사된 모든 공기 공급속도에서 k_{LA} 값이 큰 폭으로 증가되는 것으로 나타났다. 교반속도를 더 증가시킬 경우 그 효과가 더욱 클 것으로 예상되나, 실제로 동물세포를 배양할 때 세포주의 전달능력에 대한 민감성으로 인해 일반적으로 100rpm 이하의 낮은 교반속도로 생물반응기를 운전하므로 본 실험에서는 90rpm 까지 조사하였다. 한편 튜브시스템을 사용하지 않고 배지 표면만을 통해 공기가 공급될 때인 surface aeration (이 조건이 실제 spinner flask에서의 배양조건과 동일함)에서의 k_{LA} 값도 측정하여 상기의 공기공급 시스템의 경우와 비교하였다. 하기의 표에 나타난 바와 같이 surface aeration에만 의존하는 경우 PTFE polymer 튜브에 의한 공기공급 방법에 비해 산소전달속도가 평균적으로 약 20배 이상 감소하는 것으로 보아 단순 T-flask 배양이나 spinner flask 배양 시 용존산소 부족 현상이 매우 심각한 것으로 파악되었다.

agitation speed (rpm)	50 rpm	60 rpm	80 rpm	100 rpm
k_{LA} (min^{-1}) (surface aeration)	0.0041	0.0042	0.0052	0.0065

(A) 0.14vvm (pure oxygen supplied into culture medium via polymer tube system)



(B) 0.28vvm (pure oxygen supplied into culture medium via polymer tube system)



(C) 0.42vvm (pure oxygen supplied into culture medium via polymer tube system)

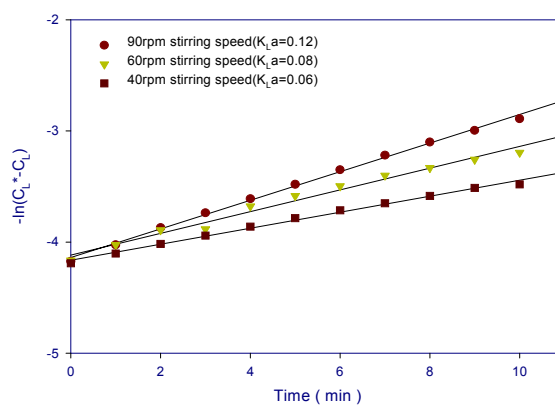
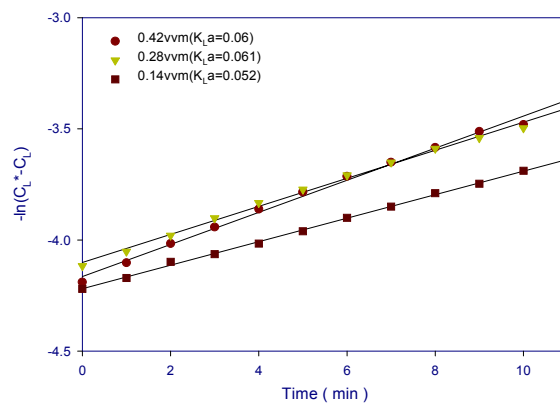
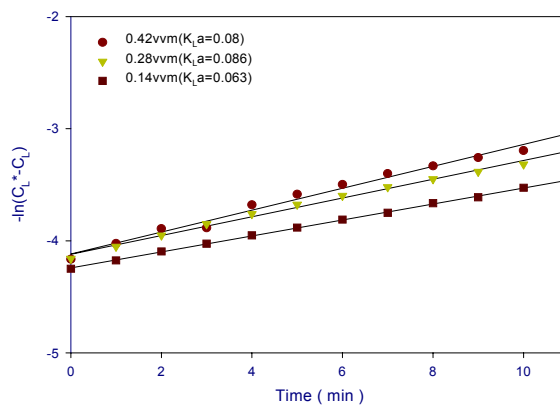


Fig 3. 6 Detemination of oxygen mass transfer rate (k_{LA}) according to various agitation rates at each fixed supply rate of pure oxygen.

(A) 40rpm (pure oxygen supplied into culture medium via polymer tube system)



(B) 60rpm (pure oxygen supplied into culture medium via polymer tube system)



(C) 90rpm (pure oxygen supplied into culture medium via polymer tube system)

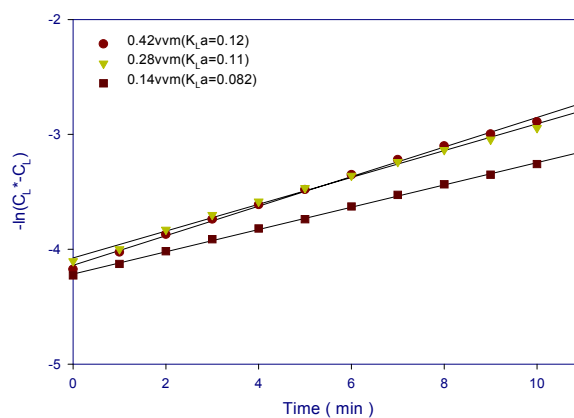


Fig 3. 7 Determination of oxygen mass transfer rate ($k_L a$) according to various supply rates of pure oxygen at each fixed agitation rate.

Table 3-2. Comparison of oxygen mass transfer rate (k_{La}) (min^{-1}) under various aeration and agitation conditions when air was supplied to 0.7 liter of culture medium or distilled water via silicon or PTFE polymer tube system.

Air supply condition	Test on culture medium volum 0.7L					
	k_{La} (min^{-1})					
	Aeration via silicon tube system			Aeration via polymer tube system		
	40rpm	60rpm	90rpm	40rpm	60rpm	90rpm
0.14vvm	0.032	0.03	0.067	0.052	0.063	0.082
0.28vvm	0.044	0.042	0.072	0.061	0.086	0.11
0.42vvm	0.037	0.033	0.07	0.06	0.08	0.123
Air supply condition	Test on distilled water volum 0.7L					
	k_{La} (min^{-1})					
	Aeration via silicon tube system			Aeration via PTFE tube system		
	40rpm	60rpm	90rpm	40rpm	60rpm	90rpm
0.14vvm	0.022	0.04	0.053	0.053	0.072	0.097
0.28vvm	0.03	0.034	0.05	0.062	0.084	0.12
0.42vvm	0.035	0.036	0.07	0.071	0.097	0.13
Air supply condition	k_{La} (min^{-1})					
	Aeration via silicon + PTFE tube system					
	Test on distilled water volume 0.7L			Test on culture medium volume 0.7L		
	40rpm	60rpm	90rpm	40rpm	60rpm	90rpm
0.14vvm	0.0357	0.0242	0.0202	0.021	0.018	0.015
0.28vvm	0.0213	0.0234	0.0249	0.023	0.019	0.02
0.42vvm	0.0219	0.0217	0.0213	0.028	0.018	0.022

5) 컴퓨터를 이용한 동물세포 배양공정 계측 및 제어 시스템 구축

배양공정 데이터 수집 및 분석을 위해 소프트웨어 프로그램을 완성하였으며, 이를 기초로 컴퓨터 제어 동물세포 배양시스템을 제작하였다 (Fig 3.8). 본 연구에서 확립한 자동화 제어시스템의 특징은 용존 산소 조절을 위해 산소, 질소, 공기의 양이 기체공급조절장치(mass flow controller, MFC)를 통해 정밀하게 자동 조절되며, 가스분석기가 gas mixer를 통해 나온 혼합가스 중의 산소의 양을 정확하게 측정하여 interface를 통해 컴퓨터로 데이터를 전송함으로써, 배양 중 필요한 다양한 공정변수 (예를 들면 세포 비성장속도, 세포농도, 산소흡수율, 산소전달계수 등)를 온라인으로 60초 간격으로 분석할 수 있게 한 점이다. Vero 세포 배양공정의 용존산소 조절과 주요 공정변수를 온라인으로 측정하기 위해 본 연구팀이 설계한 소프트웨어의 컴퓨터 스크린 화면과 자동화시스템 제어조건을 Fig 3.9와 Table 3-3에 각각 제시하였다.

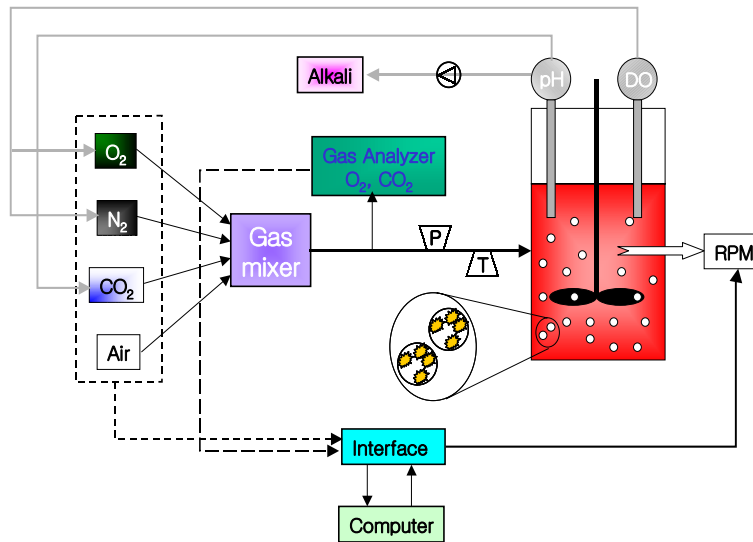


Fig 3. 8 Schematic diagram of computer-controlled Vero cell culture system for automatic control of dissolved oxygen and for on-line estimation of valuable cell culture parameters.

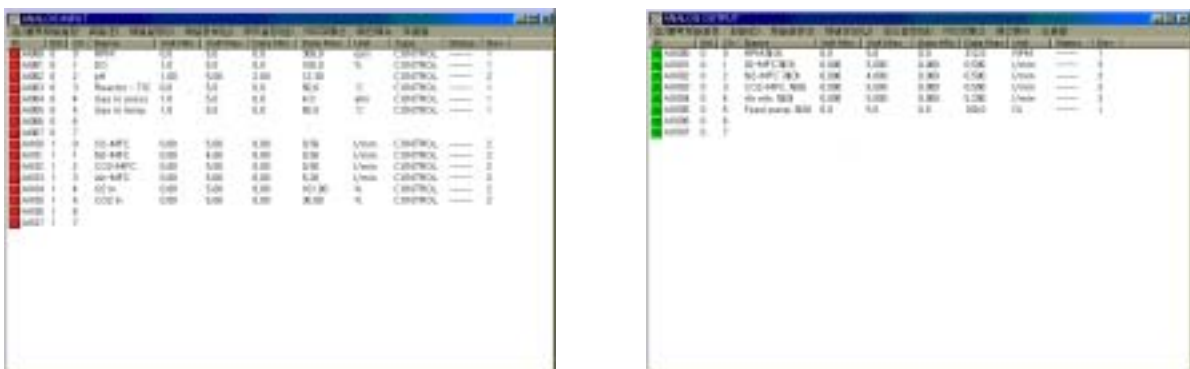


Fig 3. 9 Computer screen for automatic control of dissolved oxygen and for on-line estimation of valuable cell culture parameters.

Table 3-3. Control conditions for the computer-controlled cell culture system.

순번	제어명	running 조건	출력연산(조건)식	on time / off time / A. delay	출력채널
1	rpm motor on/off 제어	always	run time < 24시간	yes/yes/no	rpm motor on/off 제어
		always	run time > 24시간	no	
	rpm motor set 값 제어	run time < 24시간	gui 가상채널 설정값	no	rpm motor set 값 제어
		run time > 24시간	gui 가상채널 설정값	no	
2	pH 알칼리제어	pH < set 값	always	yes/yes/yes	
	pH CO ₂ 제어	pH > set 값	[(set-현재값)×(적용율)] + 현재 CO ₂ mfc 출력값	no/no/yes	CO ₂ mfc set값
3	DO O ₂ mfc 제어	DO < set 값	[(set-현재값)×(적용율)] + 현재 O ₂ mfc 출력값	no/no/yes	O ₂ mfc set값
	DO N ₂ mfc 제어	DO > set 값	[(set-현재값)×(적용율)] + 현재 N ₂ mfc 출력값	no/no/yes	N ₂ mfc set값
4	Total volum	always	gui 가상채널 설정값	no	
	Air mfc 제어	always	total volume - CO ₂ , O ₂ , N ₂ mfc 출력값	no/no/yes	Air mfc set값
5	Feeding pump set 값 제어		[(연산된 X 값) × (적용율)] + 현재 feeding 출력값		
6	reactor temp. 제어		circulator		

6) 다양한 산소공급시스템 (aeration system)에 따른 세포 성장 측정

세포배양 자동화 시스템 적용을 위해 동물세포 배양에 일반적으로 사용하는 silicon membrane aeration system과, 본 연구에서 사용하고자 하며 높은 산소전달계수를 보이는 gas-permeable membrane aeration system (PTFE tubing)으로 Vero 세포를 배양하여 세포농도를 비교하였다. 다공성 미립담체 (Cultispher-G) 1.7g/L를 PBS에 충분히 swelling한 후, 여러 번 세척한 후 멸균하여 사용하였다. 세포가 미립담체에 잘 부착하도록 250ml을 vessel에 넣고 1×10^5 cells/ml로 세포를 접종한 후, 24시간 동안 33분마다 3분씩 간헐적으로 교반하였다. 배양 24시간 후 배지 250ml를 첨가하여 계속 배양하였다. 24시간마다 sampling하여 미립담체를 침전시킨 후 상등액을 제거하고 0.25% trypsin-EDTA를 사용하여 세포농도를 hemocytometer로 측정하였다. Silicon membrane aeration system 보다는 PTFE membrane aeration system이 좋은 세포 성장률을 보였지만 control에 비해 낮았다 (Fig 3.10). 이것은 배양 시 관찰되었던 membrane과 membrane 사이에 microcarrier들이 끼어 들어 dead volume이 생겼기 때문이다. 이 문제를 해결하기 위해 본 연구에서 membrane과 membrane을 어느 정도 간격을 두고 감는 방법을 적용하기로 하였다.

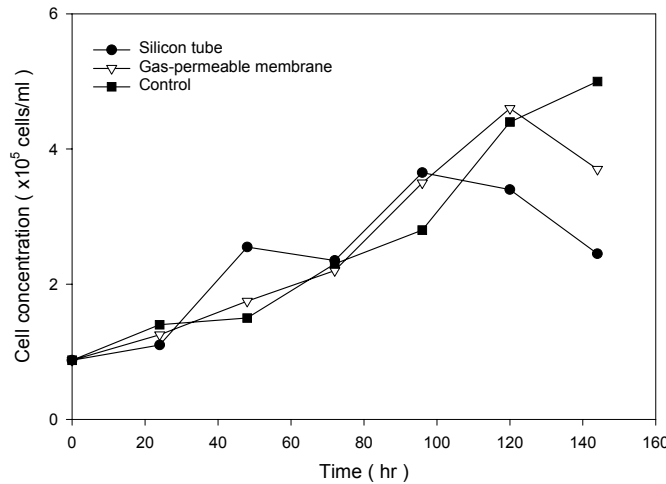


Fig 3. 10 Comparison of cell growth kinetics of vero cells cultured in different aeration systems.

7) 동물세포배양의 scale-up시 가장 중요한 변수인 산소전달계수 (k_{La}) 측정 및 배양 중 k_{La} 를 일정하게 유지시키는 공정 개발

앞 절에서 설명한 바대로, scale-up시 대규모 배양기에서의 산소전달계수의 값이 실험실 배양기의 값과 거의 동일한 수준으로 유지되어야 비로소 용존산소를 포함한 모든 배양조건이 거의 비슷하다. 또한 세포의 배양생리적 특성 중 가장 중요한 변수인 세포비성장속도 (specific growth rate), 산소흡수량, 세포농도 등을 세포배양 중 실시간으로 온라인 상에서 추정하기 위해서도 산소전달계수의 측정이 매우 중요하다. 본 연구에서는 용존산소의 물질수지식을 이용하는 dynamic method를 이용하여 산소전달계수를 측정하여, on-line 상에서 세포농도를 자동 추정하는데 이용하고자 하였다.

자동화 제어시스템을 구축하기 위한 제어 조건 중 용존산소 (DO) 조절 시 사용되는 N_2 mfc 제어는 이론적으로 볼 때, 배양 중에 k_{La} 값에 변화를 일으킬 것으로 판단되었다. 그러나 배양공정 중 k_{La} 값을 일정하게 유지시키는 것이 자동화 제어시스템 구축을 통한 세포농도 자동 측정을 위해 필수적이므로

(이에 대한 이유는 하기에서 설명), 이를 위해 공급되는 질소량과, 다양한 질소공급 제어방법을 조사하였다. 우선적으로 oxygen과 nitrogen을 일정한 양으로 계속 공급하면서, oxygen flow rate와 nitrogen flow rate를 다르게 하여 (즉 nitrogen percentage를 다르게 하여), k_{LA} 값의 변화 동향을 조사하였다. Nitrogen percentage가 높을수록 k_{LA} 값이 감소하는 경향을 보여 주었으며, 만약 DO 조절 시 nitrogen 제어 조건을 이미 정해 놓은 제어방법 [(set-현재값) × (적용률) + 현재 N_2 mfc 출력값]으로 조절할 경우, k_{LA} 값이 배양공정 중에 변화하는 것으로 나타나 문제점으로 대두되었다 (Fig 3.11, 3.12).

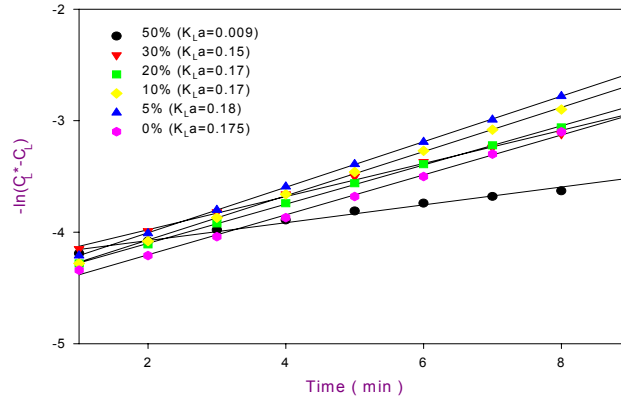


Fig 3. 11 Determination of oxygen mass transfer rate (k_{LA}) according to various nitrogen percentage at fixed pure oxygen supply rate.

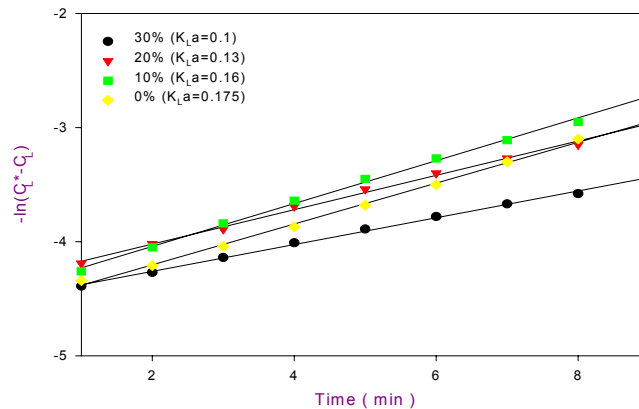


Fig 3. 12 Determination of oxygen mass transfer rate (k_{LA}) according to various nitrogen percentage in the system where oxygen flow rate was changed with nitrogen rate fixed.

그러므로 k_{LA} 값에 큰 영향을 미치지 않을 범위의 nitrogen flow rate와, 다양한 제어조건을 조사해야 할 필요성이 제기되었다. 한 방법으로서 공기를 일정하게 공급하면서 nitrogen percentage를 다르게 하여 조사하는 실험을 수행해 보았다. 즉 일정한 양의 공기 공급 (2 L/min) 시, N_2 비율의 변화에 따른 산소전달계수를 조사하였다. 질소 비율이 증가함에 따라 산소전달계수가 감소하는 것으로 나타났다 (Fig 3.13). 이번에는 k_{LA} 값의 변화에 영향을 주지 않는 범위의 nitrogen flow rate를 조사하였으며, 또한 상기와는 다른 방식의 질소공급 제어방식을 조사하였다. Nitrogen flow rate는 0.25L/min, 또는 0.5L/min으

로 공급하고, 공급방식은 on/off 제어로 하여 실험을 수행하였다. 질소를 0.5L/min, 또는 0.25L/min으로 공급하되 1sec 동안만 공급하고, 5sec, 10sec 또는 20sec의 off time을 주어 공급한 결과를 Fig 3.14에 나타내었다. 질소를 공급하지 않고 공기만을 공급한 경우 (0%) 보다, on/off 방식으로 조절했을 경우에 k_{LA} 가 증가하였다. 질소가 공급되면 k_{LA} 가 감소하는 것은 이전의 다른 결과들로부터 확인된 바 있으나, 이러한 결과를 보임으로 인해 공기의 양을 질소가 첨가된 양과 동일하게 하여 다시 실험을 수행하였다. 주목할 만하게도 Fig 3.15의 결과로부터, on/off 제어 시 k_{LA} 값의 변화가 거의 없는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 조건을 세포배양 시 DO를 정밀 조절하기 위한 제어 조건으로 확정하였다.

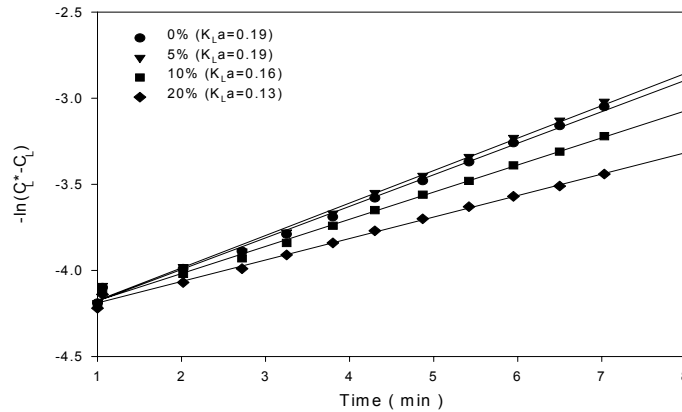


Fig 3. 13 Determination of oxygen mass transfer rate (k_{LA}) according to various nitrogen percentage at fixed supply of air (2L/min) instead of oxygen.

(a) air 2L/min + N₂ 0.5 L/min

(b) air 2L/min + N₂ 0.25 L/min

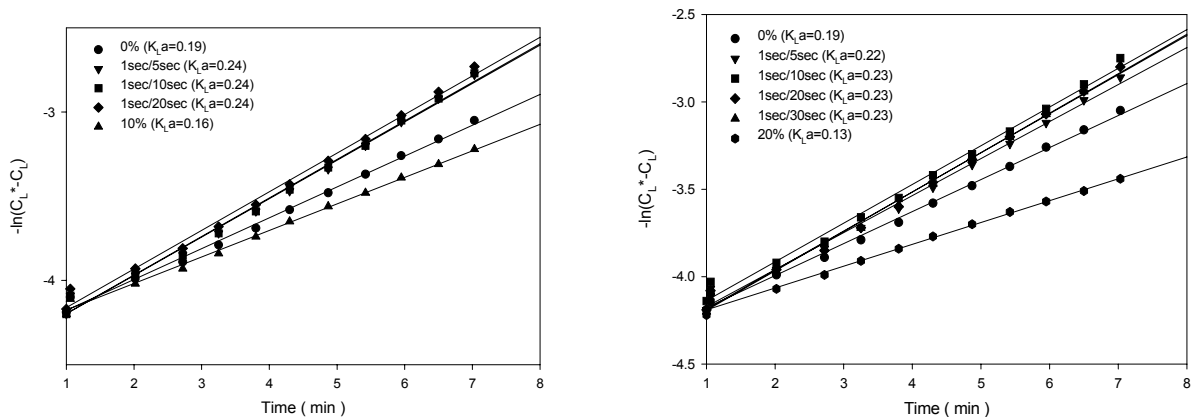


Fig 3. 14 Determination of oxygen mass transfer rate (k_{LA}) according to various nitrogen percentage at fixed air supply rate (on/off control system for nitrogen supply was used).

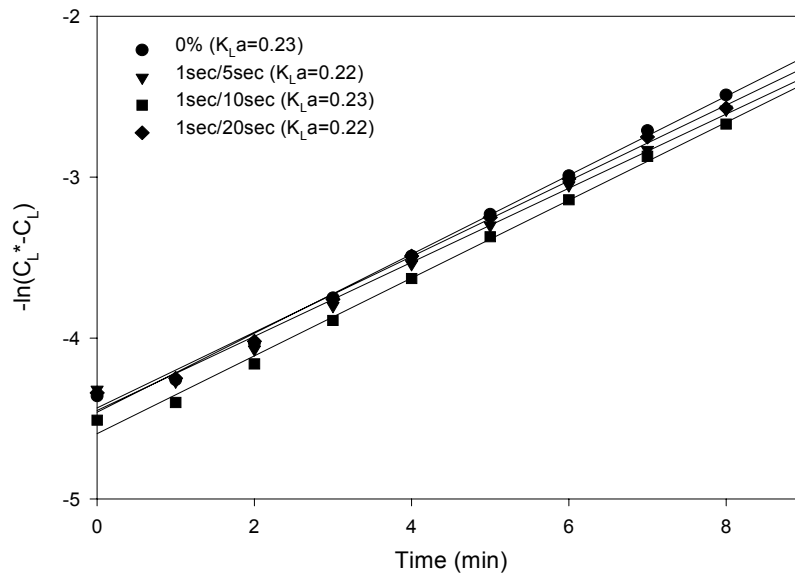


Fig 3. 15 Determination of oxygen mass transfer rate ($k_L a$) according to various nitrogen percentage at fixed air (2L/min) supply rate (on/off control system for nitrogen supply was used).

이들 결과들로부터 흥미로운 결론을 유출할 수 있었다. 본 연구에서 사용되는 membrane aeration system은 일반적인 aeration system과는 달리 membrane의 pore를 통해 공기가 확산되기 때문에 상기에서 관찰된 현상이 나타나는 것으로 생각된다. 즉 공기에 의해 membrane 안에 일정한 압력이 존재하며, 여기에 질소가 순간적으로 공급됨으로써 membrane 안의 압력이 증가되어 분자운동이 활발해지므로 membrane의 pore를 통과하는 산소량이 늘어나게 되는 것으로 판단되었다. 이러한 현상을 Fig 3.16에 체계적으로 요약하여 제시하였다.

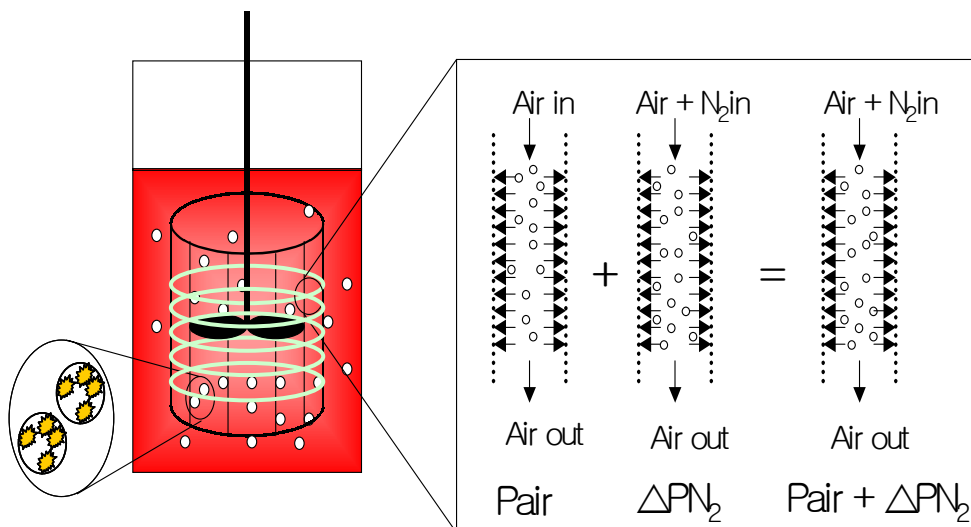


Fig 3. 16 Schematic diagram for molecular motion of air and nitrogen in the membrane aeration system.

8) 생물반응기에서 산소흡수율 (OUR)의 측정에 의한 동물세포 배양기내의 세포농도 자동 추정법 확립

실험실 수준의 미생물 발효기에서는 적정한 시간에 시료를 채취하여 세포농도를 측정할 수 있으나 scale-up된 동물세포배양기의 경우 오염의 문제로 인해 시료를 채취하기 어려운 점이 있다. 따라서 동물 세포배양의 경우 industrial plant 배양 중 실시간으로 세포 농도를 측정하는 것은 거의 불가능하다.

본 연구에서는 동물세포 배양 중의 세포농도를 실시간으로 측정하기 위해 기체산소의 물질수지식에 근거하여 세포의 산소흡수율 (OUR)을 on-line 상에서 측정이 가능하도록 하는 방법을 개발하고자 하였다. 한 방법으로서 “stationary liquid phase balance” 방식의 물질수지식을 이용하여 실험을 수행하였다. 이를 위해 개발된 이론적 근거는 다음과 같다: 이 방법을 통해 배양 중에 DO를 일정하게 유지시키면 세포의 산소흡수율 (OUR)은 배지내로의 산소전달율 (OTR)과 같게 될 수 있다. 즉,

$$OUR = OTR = k_L a (C_L^* - C_L) = k_L a C_L^* (1 - DO/100) \quad (6)$$

C_L 은 발효배양액 내의 용존산소 농도 (mmolO₂/L)이며 P_{O2} probe에 의해 측정된다. 본 연구에서는 DO를 일정하게 유지하기 위해 컴퓨터상에서 연산에 의해 DO를 조절하였다. C_L^* 는 포화용존산소 농도 (mmolO₂/L)로서 Henry's law에 의해 계산된다. 하기에 설명하겠지만, (6)식을 적용하여 배양 중의 세포농도의 온라인 추정을 위해서는, 배양 중에 $k_L a$ 값을 일정하게 유지시켜야만 한다. 산소를 배지 내로 직접적인 sparging 방식에 의해 공급하면 $k_L a$ 값이 매우 다양하게 변화하므로, 이와 같은 방법을 적용할 수 없다. 한편 $k_L a$ 값을 일정하게 유지시키기 위해 surface aeration 방식을 대신 사용할 수 있지만, bioreactor headspace surface를 통한 산소의 diffusion 방식은 일반적으로 배양 시 충분한 산소를 공급하지 못하는 큰 단점이 있다. 따라서 본 연구에서는 gas-permeable membrane을 통해 bubble-free aeration이 되도록 하는 간접적인 용존산소 공급 방식을 사용하였다. PTFE membrane의 경우 일정한 $k_L a$ 값과 배양 동안 충분한 산소를 제공할 수 있어, DO의 부분압 조절을 가능하게 하는 것으로 관찰되었다. 또한 이 방법을 적용함으로써, 산소의 직접적인 sparging에 의해 생산되는 거품으로 인한 오염을 방지할 수 있었으며, 동시에 hydrodynamic shear에 매우 민감한 동물 세포의 배양 문제점을 해결할 수 있었다. 본 연구에서는 이전 연구에서 측정된 $k_L a$ 값인 0.15/min을 컴퓨터 제어에 이용하였다.

PTFE membrane을 이용하여 공정상에서 온라인으로 세포농도를 자동 추정하기 위해 본 연구에서 개발한 수식은 다음과 같다: 상기 (6)식에 나타난 바와 같이 배양 중의 용존산소가 어느 정도 일정하게 유지될 경우, OTR은 OUR과 동일하다. 한편 OUR은 다음 식에 의해 계산될 수 있다.

$$OUR = qO_2 \cdot X$$

배양 동안 일정한 값의 qO₂ (specific oxygen uptake rate) 값을 알고 있다면, 위의 식과 (6)식을 이용하여 computer가 계산한 OUR 값을 온라인상에서 monitoring하여 간접적으로 세포 농도를 측정할 수 있다 (specific oxygen uptake rate에 대한 측정 결과는 하기에 상세히 설명). 한편 (6)식의 C_L^* 는 다음의 Henry's law에 의해 계산될 수 있다.

$$P_{O_2} = H \cdot C_L^* \quad (7)$$

여기서, P_{O2} = partial pressure of oxygen 이다.

37°C에서 water의 부분압은 대기압의 6.028%인 것으로 관찰되었다. 또한 배양액에서 산소용해도는 aeration 실험 동안 물보다 2.7% 낮게 측정되어 다음 식으로 나타내었다.

$$C_L^* = [y_{O_2} (P_t/760) (1-0.06028) 0.973] / H \quad (8)$$

여기서,

y_{O_2} = mole fraction of oxygen

H = Henry 상수

P_t = total gas pressure

위의 (8)식을 구하기 위해 다음의 식을 이용하였다.

$$y_{O_2} = V_{O_2}/V_t \quad (9)$$

V_{O_2} = flow rate of oxygen

V_t = total gas flow rate

또한,

$$P_{O_2} = y_{O_2} P_t \quad (10)$$

여기서 P_t 는 공급되는 가스의 total pressure이며, y_{O_2} 는 식 (9)에 의해 구할 수 있다. 한편 H는

$$1/H = (1.385 - 2.635) \times 10^{-2}(T-20) + 4.288 \times 10^{-4} (T-20)^2 \quad (11)$$

로 표현될 수 있으며, 여기서 T는 배양액의 온도이다.

결과적으로 (9), (10) 및 (11)식을 (8)식에 대입하여 C_L^* 를 구할 수 있었으며, 또한 C_L^* 를 (6)식에 대입하여 OTR을 구할 수 있었다. 앞에서 설명한 대로 배양액내의 용존산소를 일정하게 유지할 경우 OTR과 OUR은 동일하므로, $OUR = q_{O_2} \cdot X$ 식에 의해 온라인상에서 세포농도를 자동 측정할 수 있을 것으로 판단되었다. 따라서 본 연구에서는 Table 3-3에 명시한 공정제어 조건에 의해 이들 변수들을 컴퓨터상에서 측정/조절하는 방법을 개발하고자 하였다. 참고삼아 본 연구에서 사용된, PTFE membrane을 사용한 생물반응기의 자동제어시스템에 대한 전체 공정도를 Fig 3.17에 나타내었다.

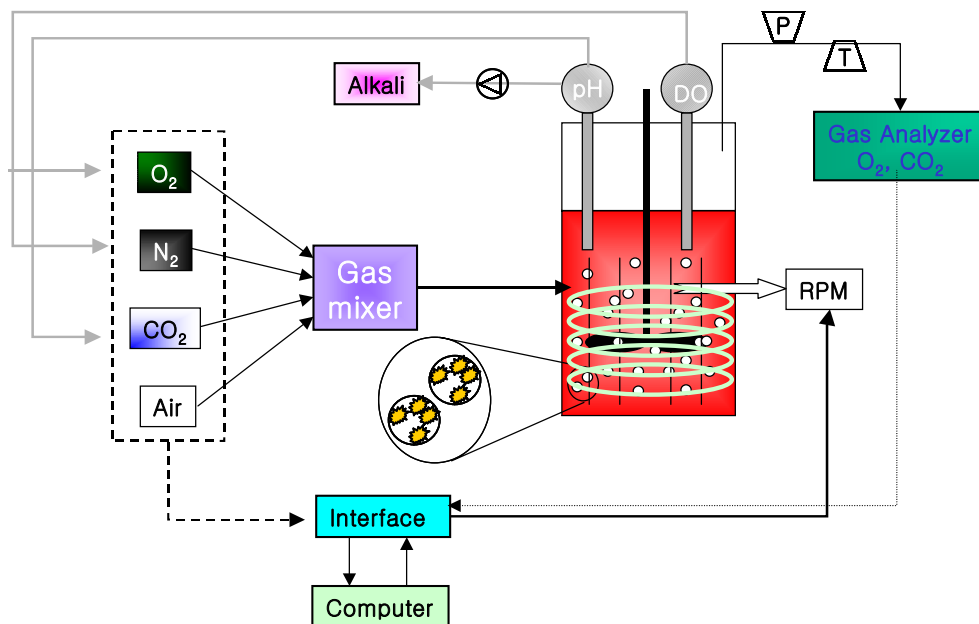


Fig 3. 17 Schematic diagram for computer-controlled Vero cell culture system for automatic control of DO and on-line estimation of valuable cell culture parameters.

가) 세포의 specific oxygen uptake rate 조사

본 연구팀이 자체 설계한 소프트웨어 및 자동화시스템을 이용해서 공정변수인 specific oxygen uptake rate를 조사하였다. 1 liter의 동물세포배양기에 PTFE membrane을 적당한 길이로 감아 고정시켜 사용하였다. 세포 배양온도는 37°C, pH는 7.2로 조절하였다. 다공성 미립담체 (Cultispher-G) 1.7g/L를 PBS에 충분히 swelling한 후 여러 번 세척한 후 멸균하여 사용하였다. 24시간마다 sampling하여 미립담체를 침전시킨 후 상등액을 제거하고 0.25% trypsin-EDTA를 사용하여 세포농도를 heamocytometer로 측정하였으며, 배양 도중 공급하는 air를 중단하여 specific oxygen uptake rate를 측정하였다. 즉 air가 공급되지 않으면 배양액 내에 존재하는 oxygen은 세포에 의해서만 소모되어 DO가 떨어지게 된다. 배양 62시간째와 68시간째 specific oxygen uptake rate를 측정한 결과 $0.67 \times 10^{-12} \text{ mol O}_2/\text{cell/hr}$ 로 일정한 값을 보였다 (Fig 3.18). 이는 본 연구의 세포농도의 자동화 추정 목적에 부합하는 결과로 판단되었다.

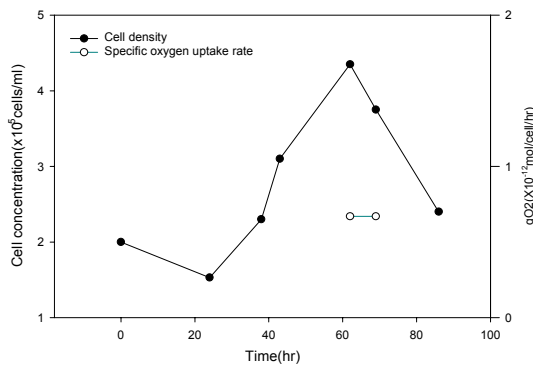


Fig 3. 18 Time course profiles of cell concentration and specific oxygen uptake rate in batch culture of Vero cells.

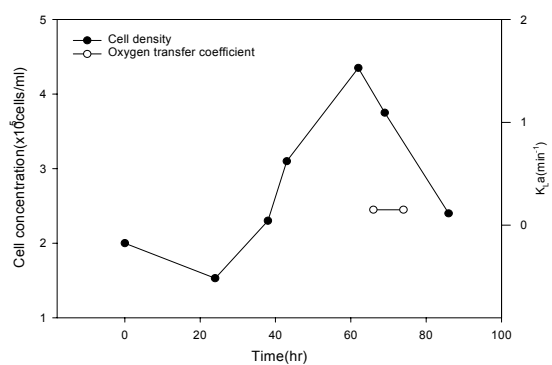


Fig 3. 19 Time course profiles of cell concentration and oxygen transfer coefficient in batch culture of Vero cells.

나) 배양 전후 산소전달계수 (k_{La}) 비교 조사

고농도 동물세포 배양 시 높은 산소요구량에도 불구하고, 배양액 내로의 제한된 산소 공급 능력으로 인해 산소요구량만큼의 적정량의 산소를 적시에 공급한다는 것은 매우 어려운 일이기 때문에, 산업화를 위한 scale-up과정에서 배양액 내로의 산소전달은 항상 큰 문제점으로 지적되고 있다. 효과적인 산소전달을 위해 본 연구에서는 gas-permeable membrane을 사용하는 방식을 고안하였다. 전통적으로 사용되는 silicon membrane system은 세포가 membrane에 부착되어 aeration 효과가 떨어지는 단점이 있는 것으로 나타났다. PTFE membrane은 소수성 (hydrophobicity)의 성질을 가지고 있어 membrane 표면에 세포가 부착하는 것을 막는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과는 배양 동안 일정한 산소전달계수가 유지되는 현상으로도 알 수 있었다. 세포 접종 전과, 세포 배양 66시간째와 74시간째의 산소전달계수는 0.15/min으로 일정하게 유지되는 것으로 관찰되었다 (Fig 3.19).

다) 동물세포 배양을 통한 자동화 제어

본 연구에서 확립한 자동화 제어시스템의 특징은 용존산소 조절을 위해 산소, 질소, 공기의 양이 기체공급조절장치(mass flow controller)를 통해 정밀하게 자동 조절된다는 점이다. 이러한 자동 조절은 다음 연산에 의해 이루어질 수 있었다: [(DO 설정값 - DO 현재값 X 적용률) + 현재 공급되고 있는 산소량].

한 예로 DO 50%로 설정값을 주어 위의 연산에 의해 용존산소가 조절되는지 알아보았다. 배양 동안

공기가 공급되는 양은 가스의 전체 부피 2 liter에서 DO와 pH 조절에 사용되어 들어가는 산소, 질소, 이산화탄소의 양을 뺀 나머지만큼 계속해서 들어가도록 하였다. 적용률은 0.001로 설정하여 배양하였다. 또한 조절 반응시간은 120sec로 설정하였다. 조절 반응시간이 너무 길어 배양이 진행됨에 따라 소모되는 산소량은 증가하지만, 공급되는 양이 적기 때문에 점점 설정값보다 낮은 값으로 조절되는 것으로 나타나서 (Fig 3.20), 이를 해결하기 위해 조절 반응시간을 조정하고자 하였다.

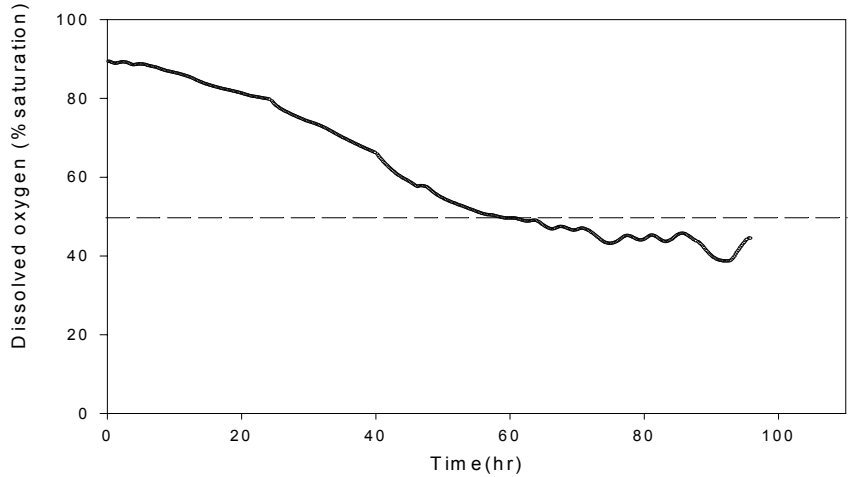


Fig 3. 20 Dissolved oxygen profile in batch culture of Vero cells.

9) 동물세포 자동화제어 배양에서 세포농도와 OUR의 pattern 비교

Fig 3. 20에서 나타난 결과로 인해 조절 반응시간을 120sec에서 0sec로 조정하여 배양하였다. 즉 계속적으로 연산에 의해 조절되도록 한 결과, DO가 설정값 $\pm 2\%$ 로서 비교적 훌륭히 조절되었다 (Fig 3. 21, 3.22). Oxygen uptake rate와 세포농도가 exponential phase 기간 동안에는 비교적 일치하는 경향을 보여 주었으나, decline phase로 접어들면서 점점 불일치하는 것으로 나타났다 (Fig 3.23).

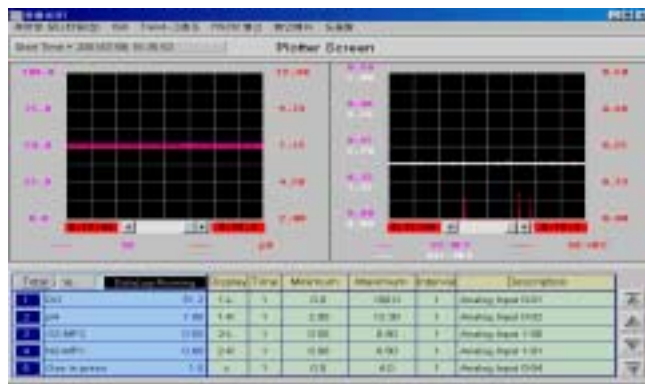


Fig 3. 21 Computer screen for automatic control of dissolved oxygen and for on-line estimation of valuable cell culture parameters.

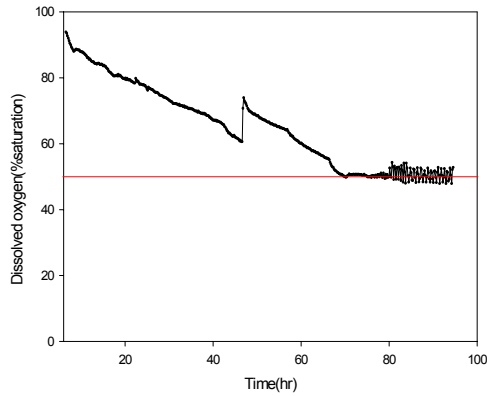


Fig 3. 22 Dissolved oxygen profile in batch culture of Vero cells.

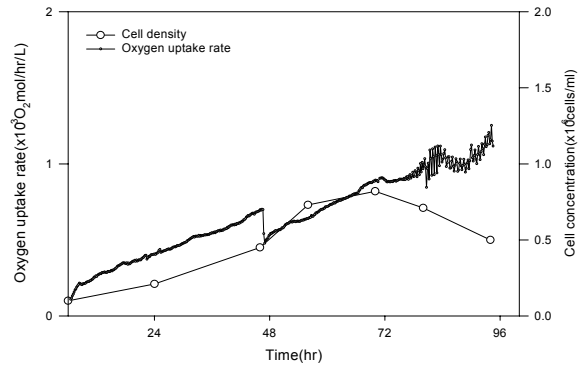


Fig 3. 23 Time-course profiles of cell concentration and oxygen uptake rate measured by computer system in batch culture of Vero cells (DO was controlled by use of oxygen and nitrogen gas).

Fig 3.20, 3.21 및 3.23의 경우 DO 조절을 위해 산소/질소를 이용하였으나, Fig 3.24 및 3.25은 산소 대신 공기를 공급하여 용존산소가 조절되는지 조사한 결과를 나타낸 것이다. 즉 $[(DO \text{ 설정값} - DO \text{ 현재값}) \times \text{적용률}] + \text{현재 공급되고 있는 공기량}$ 에 의한 조절 방식이다. 여기서 적용률은 0.001로 설정하였고 반응 조절시간은 공정을 진행하면서 조절하였다. 배양 시작부터 60시간까지는 120sec, 61시간부터 70시간까지 100sec, 71시간부터 97시간까지 60sec의 반응 조절시간을 적용시키면서 배양하였다. DO가 설정값 보다 약간 낮은 범위에서 조절되었을 지라도 (Fig 3.24), oxygen uptake rate와 세포 농도가 배양 전 기간 동안 비교적 일치하는 경향을 보여 주었다 (Fig 3.25).

요약하면, 본 연구에서 설계한 컴퓨터 program에 의해 DO가 조절되는 것을 확인할 수 있었으며, 대략 $1 \times 10^{-3} \text{ molO}_2/\text{hr/L}$ 의 oxygen uptake rate에서 최대 세포 농도는 $0.8 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ 로서 거의 비슷한 결과를 보여주었다. 이 결과는 자동제어시스템을 이용할 때, 세포농도를 자동으로 추정할 수 있는 가능성을 확실하게 제시해 주는 것이다. 한편 여러 번의 실험 결과 산소로 조절하는 제어 방식이 공기에 의한 방법보다 더욱 정밀한 것으로 판명되어, 앞으로는 산소에 의한 조절방식을 채택하기로 하였다. 한편 DO가 더욱 정밀하게 조절될 수 있도록 적용률 조사가 더 진행되어야 할 것으로 판단되어 다음과 같이 (i) 일정한 값의 적용률을 시간에 대한 함수로 변화시켜 적용하는 실험과, (ii) PI controller에 의한 DO 조절 실험을 수행하였다

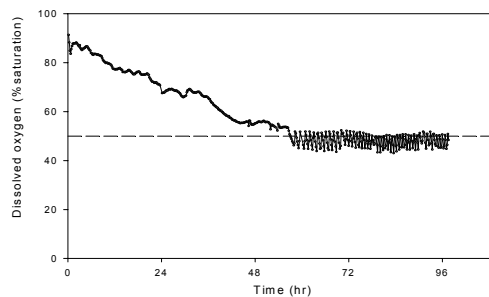


Fig 3. 24 Dissolved oxygen profile in batch culture of Vero cells.

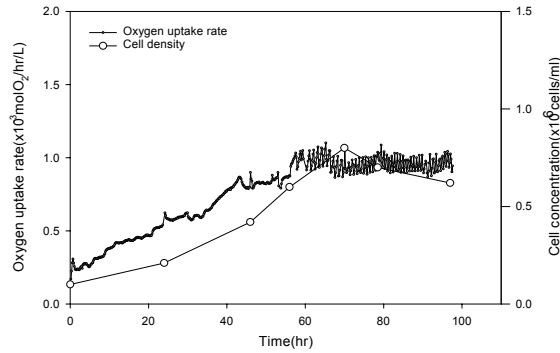


Fig 3. 25 Time-course profiles of cell concentration and oxygen uptake rate measured by computer system in batch culture of Vero cells (DO was controlled by use of air and nitrogen gas).

가) 시간에 대한 함수 조절에 의한 DO control

일정한 적용률을 시간에 대한 함수로 조절하도록 제어식을 다음과 같이 변경하였다. 즉 $\{[DO \text{ 설정값} - DO \text{ 현재값} \times (0.002 + 0.0001 \times t)] + \text{현재 공급되고 있는 산소량}\}$ 에 의한 조절 방법이다. 여기서 반응 조절시간은 60sec로 고정하였으며, 배양 시간이 증가하면 적용률도 따라서 증가하도록 하면서 DO를 조절하고자 하였다. 그 결과 Fig 3.26에 나타난 바대로 DO가 설정값보다 낮은 범위에서 조절되었다. 또한 이 경우에 세포 농도의 증가율보다 oxygen transfer rate가 더디게 증가하는 것으로 나타났다 (Fig 3.27).

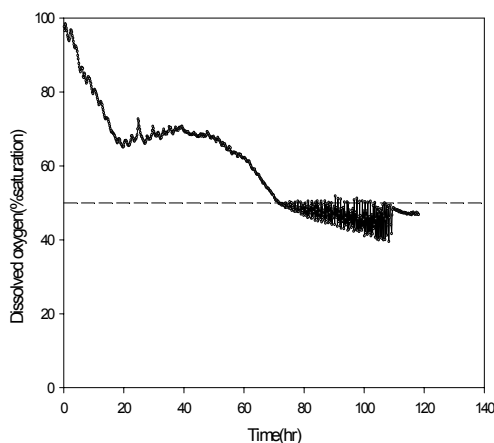


Fig 3. 26 Dissolved oxygen profile when the following linear control equation was applied; $[\text{set value of DO} - (\text{current value of DO} \times 90.002 + 0.0001 \times t)] + \text{currently supplied amount of oxygen}$.

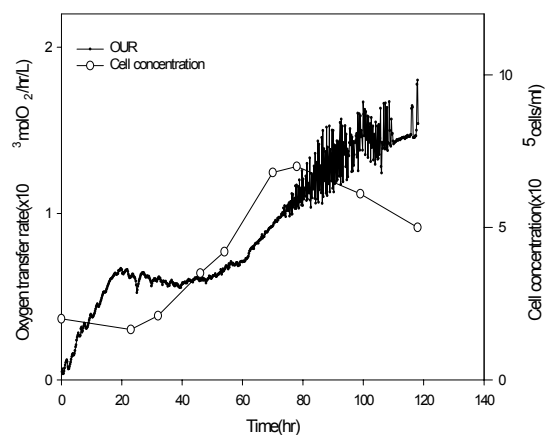


Fig 3. 27 Time-course profiles of cell concentration and oxygen uptake rate measured by computer system (DO was controlled by applying the same linear control equation as described in Figure 3-28).

이러한 문제점을 해결하기 위한 한 방법으로 이번에는 배양시간에 따른 exponential 함수를 적용하여 적용률을 증가시켜 DO를 조절하고자 하였다. 즉 $\{[DO \text{ 설정값} - DO \text{ 현재값} \times (0.002 \times \exp(0.035 \times t))]\} + \text{현재 공급되고 있는 산소량}$ 에 의한 조절 전략을 테스트하였다. Fig 3.28에 시간에 대한 함수를 적용했을 경우와, exponential 함수를 적용했을 경우의 적용률의 변화를 나타내었다. 배양시간에 대한 함수로 적용했을 경우보다 exponential 함수를 적용할 경우가 더 높은 적용률을 보이므로 설정값 보다 낮은 부분에서 조절되지 않도록 할 수 있을 것으로 판단되었다. 이 경우 넓은 적용 범위를 보고자 DO 설정값을 70% 정도로 조정하며 실험을 진행하였다. DO가 설정값 $\pm 5\%$ 내에서 조절되었으며 (Fig 3.29), 또한 세포 농도와 oxygen transfer rate의 pattern이 exponential phase에서 비교적 일치하는 것으로 나타났다 (Fig 3.30). 그렇지만 본 경우에도 정밀한 DO 조절이 이루어지지 않아서 실험의 오차가 발생하는 것으로 판단되어, PI controller를 도입하여 실험의 정확도를 증가시키고자 다음과 같은 실험을 수행하였다

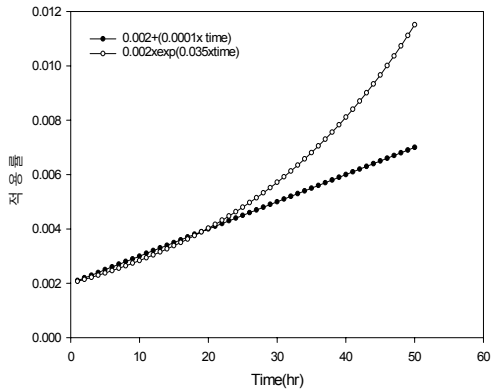


Fig 3. 28 Comparison of application rate (factor) when a linear function and a exponential function of the cultivation time were applied respectively.

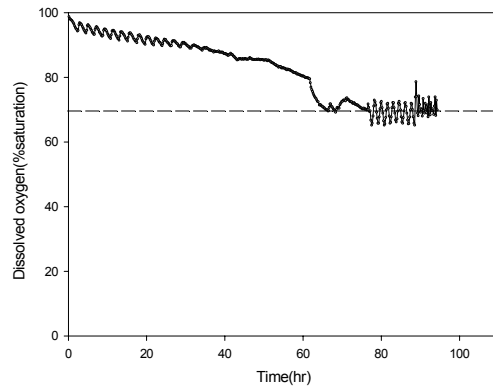


Fig 3. 29 Dissolved oxygen profile when the following exponential control equation was applied: [set value of DO - (current value of DO \times 0.002 $\exp(0.035 t)$) + currently supplied amount of oxygen].

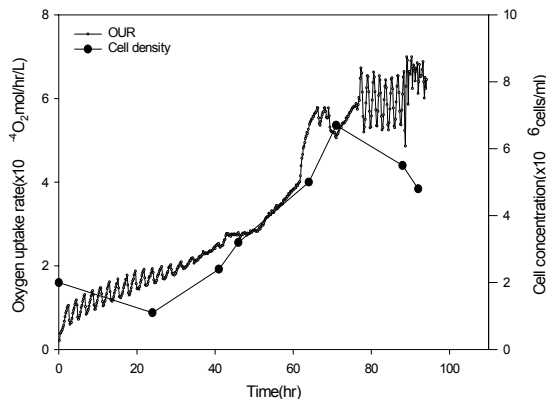


Fig 3. 30 Time-course profiles of cell concentration and oxygen uptake rate measured by computer system (DO was controlled by applying the same exponential control equation as described in figure 3-31).

나) PI controller에 의한 DO control

실험의 정확도를 증가시킬 목적으로 다음의 식을 컴퓨터 program에 포함시켜 실험을 진행하였다: $P_n(O_{2n} \text{ mfc}) = P_{n-1}(O_{2n-1} \text{ mfc}) + [(DO_{n-1} - DO_n) + (DO \text{ set} - DO_n) * 20/3500]$. 여기서 Kc은 0.002, 그리고 I 는 3500으로 이전 data의 분석에 의해 결정된 값이다. Fig 3.31에 PI controller에 의해 적용률을 변화 시킨 배양에서, DO를 80%로 유지시킨 경우의 DO profile을 나타내었다. 여기에 제시된 바와 같이 DO가 설정값 $\pm 2\%$ 내에서 정밀하게 조절되는, 매우 주목할 만한 결과를 얻을 수 있었다. 또한 DO를 포화 용존산소 농도의 60%로 조절한 경우에도 (Fig 3.32), PI controller를 사용하지 않았던 이전의 결과와는 대조적으로, DO 설정값 $\pm 1\%$ 이내의 범위에서 용존산소 농도가 매우 정밀하게 조절됨을 관찰할 수 있었다. 이와 같이 용존산소 농도가 정밀하게 조절되었으므로, Fig 3.33에 나타난 바와 같이 세포농도와 산소흡수율 (OUR)의 변화 패턴이 배양 전 기간 (초기 adaptation 기간 제외)에 걸쳐 훌륭하게 일치하는 것으로 나타났다. Y축을 OUR로, X축을 세포농도로 지정하여 상기 데이터를 다시 plotting한 결과, 매우 훌륭한 직선식을 얻을 수 있었다 (Fig 3.34). 이 직선식의 기울기로부터 본 연구에 사용된 Vero cell의 specific OUR의 평균값이 약 0.13×10^{-9} mmol O₂/cell/hr 임을 비교적 정확하게 추정할 수 있었다. 즉 PI controller를 도입하여 DO 조절에 대한 실험의 정확도를 최대화 시킨 결과, OUR 측정을 통해 세포농도를 자동으로 거의 정확히 추정할 수 있는 동물세포배양 자동화시스템을 구축할 수 있었음은 주목할 만하다.

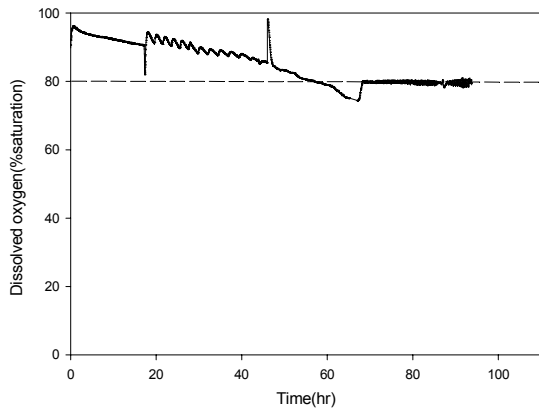


Fig 3. 31 DO profile when PI control system was applied (DO controlled at 90% saturation).

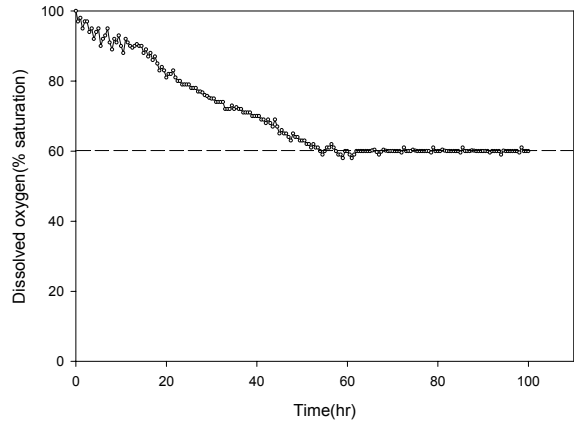


Fig 3. 32 DO profile when PI control system was applied (DO controlled at 60% saturation).

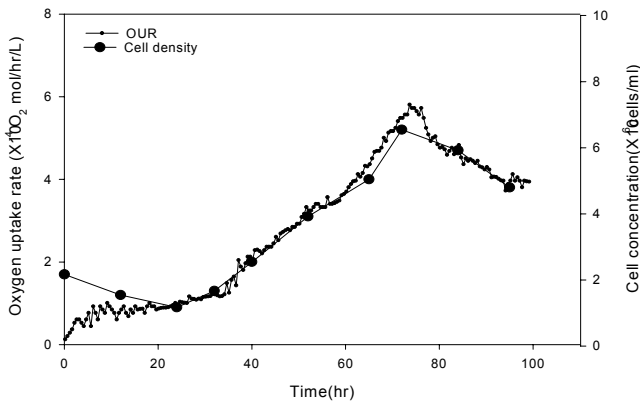


Fig 3. 33 Time-course profiles of cell concentration and oxygen uptake rate measured by computer system (DO was controlled by applying PI control system).

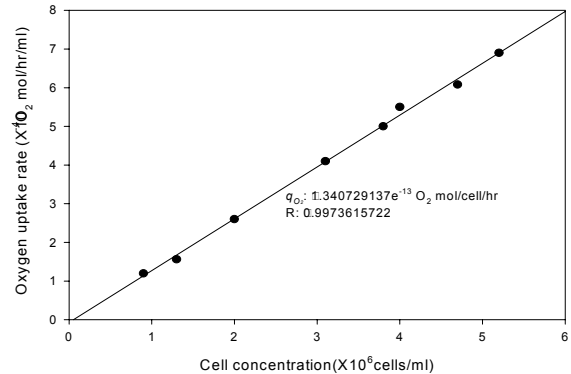


Fig 3. 34 Plotting of oxygen uptake rate as a function of cell concentration (The slope of the regressed linear line represents the specific oxygen uptake rate of the Vero cells).

10) 항거품제 (antifoam agent) 사용으로 인한 연속 microsparging 가능성 및 가스분석시스템 사용 가능성 조사

일반적으로 유가식 배양조건 하에서는 약 10^7 cells/ml 이상의 세포 농도를 얻을 수 있는 것으로 알려져 있다. 이처럼 고농도의 세포배양 시에 critical DO level (약 30% DO) 이상으로 용존산소 농도를 유지하기 위해서는 기체 산소공급이 계속적으로 이루어져야 한다. 앞서 설명한 바와 같이 동물세포의 배지 성분 중에는 10% serum이 포함되어 있어 미생물 배양에서와 같이 일반적인 sparger를 사용하여 산소의 직접공급방식인 sparging에 의한 산소 공급 시, 다량의 거품이 생성되어 미생물에 의한 오염의 위험성이 있다. 또한 동물세포의 특성상 세포벽이 없어 거품이 생성되었다 터질 경우에 손상을 받을 수 있는 원인 (전단응력, shear stress)이 될 수 있기 때문에 특수한 장치를 이용한 산소공급이 수행되어야만 한다. Microsparging aeration system을 이용하는 생물반응기에서 세포농도가 높아질 경우에, 계속되는 산소공급으로 인한 거품의 축적을 방지하기 위해 계면활성제 (surfactant)인 항거품제 (antifoam)를 이용하였다. 현재 의약품 생산이나 세포 배양 시 사용되고 있는 항거품제에는 여러 종류가 있으나 본 연구에서 사용된 항거품제는 세포배양 시 세포성장에 영향이 없는 것으로 관찰된 30% simethicone emulsion sup (DOW CORNING)을 이용하였다. 즉 실제 실험에서 항거품제를 적정량 첨가하여 거품을 제거하면서 배양했을 때, 항거품제를 첨가하지 않은 배양과 비교 시 세포성장속도 (μ_m)가 유사하게 나타난 것으로 보아 (데이터 미 제시), 본 항거품제가 세포성장에 별로 영향을 미치지 않는다고 판단할 수 있었다.



Fig 3.35 Formation of forms when air was supplied continuously by the microsparger in 2 liter bioreactor system (Left: when antifoam agent was not supplemented; Right: when antifoam agent was supplemented).

Fig 3.35은 microsparging에 의한 공기산소 공급 시 항거품제 조절장치를 이용하여 항거품제제를 적시에 첨가하면서 세포배양을 하였을 때 거품의 생성 양상을 나타낸 것으로, 지속적인 공기 공급으로 인해 과량 생성된 거품이 항거품제를 첨가하였을 때 효과적으로 제거되는 것을 관찰할 수 있었다. 한편 주목할 점은 항거품제를 사용 시, microsparging aeration system을 이용하여 지속적으로 공기산소를 공급했음에도 불구하고, 배지 중에 과량으로 생성되는 거품 축적의 문제점을 해결할 수 있었으며, 그 결과, 보다 정밀하게 용존산소 농도를 조절할 수 있었다는 점이다. Fig 3.36에 항거품제와 microsparging aeration system을 사용하여 30%로 용존산소 농도를 조절하였을 때, recorder에 기록된 용존산소의 변화 추세를 나타내었다. 항거품제를 적정량 사용하며 배양을 수행하였을 때, 용존산소 수준을 30%에서 일정하게 유지시킬 수 있었으며, 이와는 대조적으로 항거품제를 첨가하지 않은 경우에는 용존산소 수준이 큰 폭으로 변화되는 것으로 나타났다. 이처럼 배양액내의 거품축적의 제거와 더불어 정밀한 용존산소 조절을 위해 항거품제의 사용은 필수적임을 알 수 있었다. 또한 본 실험 결과 항거품제를 microsparging aeration system과 동시에 이용함으로써 소량으로 지속적인 기체산소 공급이 가능한 것으로 판명되었다. 따라서 direct microsparging 배양 시 기체산소의 물질수지식과 가스분석장치에 의한 세포배양공정 변수의 자동 추정법이 가능할 것으로 판단되어, 중요 배양 공정변수의 실시간 측정 및 모니터링을 위한 이론식을 확립해서 이를 실제 배양공정에 적용하고자 하였다.

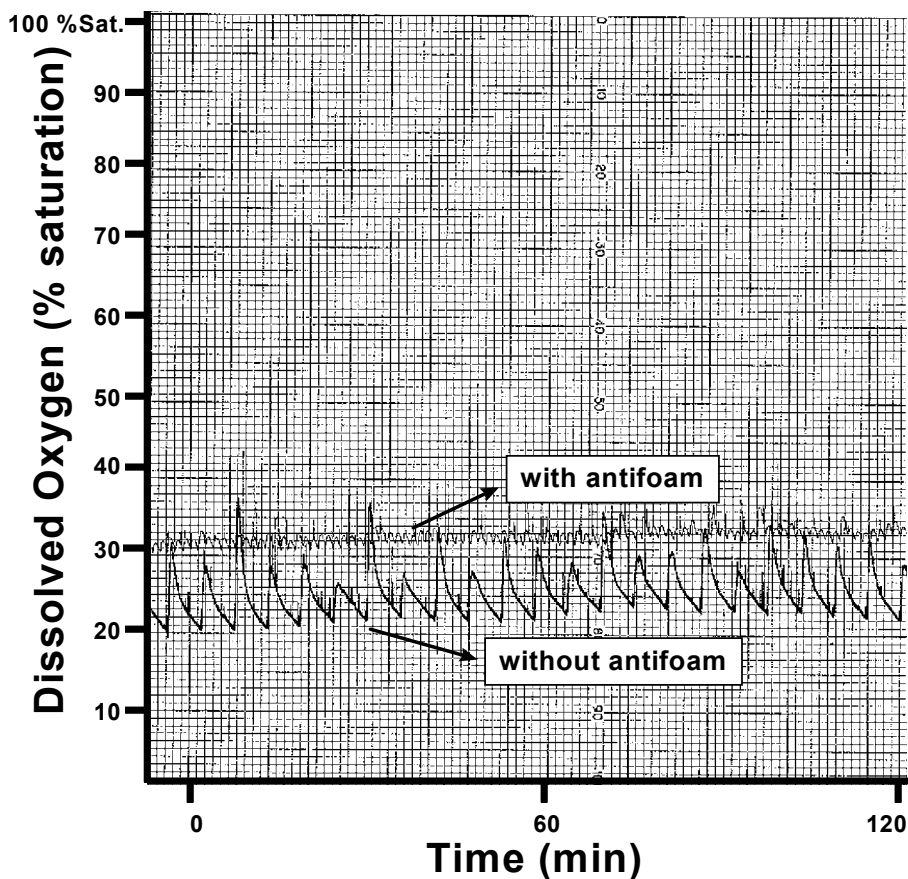


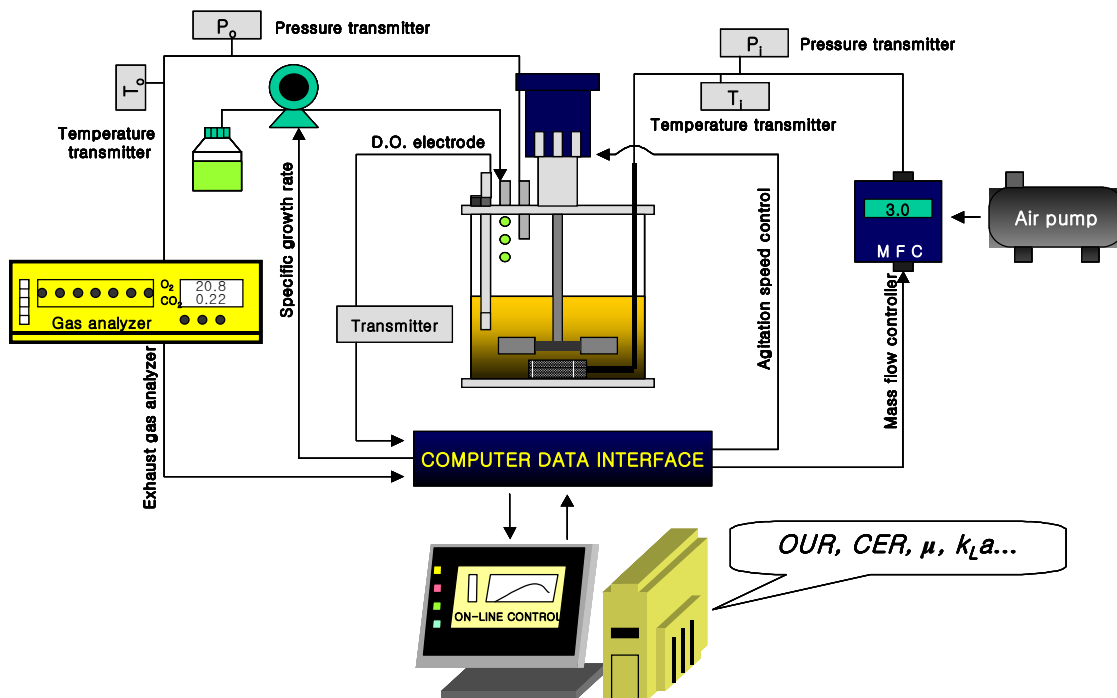
Fig 3. 36 Dissolved oxygen profiles recorded in chart paper when air was supplied by the microsparger in 2 liter bioreactor system (Without antifoam: when antifoam agent was not supplemented; With antifoam: when antifoam agent was supplemented).

11) Direct microsparging에 의한 산소 공급 시 기체산소의 물질수지식과 가스분석장치에 의한 세포배양 공정변수의 자동 측정법 확립

생리학적 특성이 매우 까다로운 동물세포의 경우 생물반응기에서 배양 상태를 최적화하는 것은 꽤 어려운 작업이다. 즉 배양조건, 온도, pH, 통기량, 교반속도 및 세포의 성장속도 등에 따라 동물백신의 생산성은 크게 영향을 받는다. 본 연구에서는 최적의 배양조건을 실시간으로 조사 및 점검하기 위한 한 방법으로서, direct microsparging에 의한 산소 공급 시 기체산소의 물질수지식과 가스분석장치를 이용하여 세포배양 공정변수를 자동으로 측정하는 방법을 확립하고자 하였다. 즉 중요한 공정변수들을 온라인 컴퓨터상에서 분석하고, 배양조건에 만족하도록 공정을 적시에 조정해 주기 위한 배양공정 계측 및 제어시스템을 확립하고자 하였다.

가) 배양공정 변수의 실시간 모니터링을 위한 이론식 확립

생산세포주의 생물반응기 배양 중에 변화하는 여러 공정변수의 수집 및 분석을 통하여 배양 상태를 최적화 할 수 있는 on-line computer 자동화 공정을 구축하였다 (Fig 3.37). 배양공정 데이터 수집 및 분석을 위한 프로그램으로는 Autolab V2.0을 이용하였고, 생물반응기에는 배양 중 발생하는 가스의 성분 분석을 위해 가스분석기(GMate LK930A)를 연결하였다. 배양 기간 동안 생물반응기 내부로 공급 또는 배출되는 가스를 60초 간격으로 측정하고, 측정된 데이터를 실시간 분석하여 산소흡수율 (OUR), 세포비성장속도 (μ), 세포량 (X) 및 산소전달계수 (k_{La})등을 분석하고자 하였다.



1

Fig. 3. 37 Schematic diagram for data acquisition and parameter analysis system.

(1) 생물반응기에서의 가스 물질수지식 확립

산소흡수율의 측정은 생물반응기 내부의 세포 상태를 추정하는데 매우 필수적인 요소이다. 일반적으로 산소흡수율 (OUR) 및 이산화탄소 발생율 (CER)을 측정하는 가장 효과적인 방법은 생물반응기 내로 공급되어 생산세포주에 의해 이용된 후 배출되는 가스 중 산소의 분압을 조사하는 방법인 산소물질수지 방법 (oxygen-balance method)으로 알려져 있다. 이를 응용할 경우 산소흡수량, 세포성장속도, 산소전달 속도 등과 같이 생산성에 큰 영향을 미치는 데이터를 컴퓨터를 통해 실시간으로 추정하고 조절함으로써 최적의 배양 상태로 생물반응기를 운전할 수 있다. 중요한 배양변수의 온라인 계측을 위해 가장 중요시 되는 OUR 및 CER 값의 측정은 다음의 가스 물질수지식에 의해 구할 수 있었다.

$$OUR = OTR = N_A = \frac{7.32 \times 10^5}{V} \left(\frac{Q_i \cdot P_i \cdot Y_i}{T_i} - \frac{Q_o \cdot P_o \cdot Y_o}{T_o} \right) \quad (12)$$

$$CER = \frac{7.32 \times 10^5}{V} \left(\frac{Q_i \cdot P_i \cdot C_i}{T_i} - \frac{Q_o \cdot P_o \cdot C_o}{T_o} \right) \quad (13)$$

N_A : oxygen transfer rate (OTR) (mmol/L/hr)

$Q_i=Q_o=Q$: volumetric air flow rate (L/min)

P_i, P_o : total pressure of inlet and outlet air (atm)

Y_i, Y_o : mole fraction of oxygen at inlet and outlet air

T_i, T_o : temperature at inlet and outlet (K)

C_i, C_o : mole fraction of carbon dioxide at inlet and outlet air

7.32×10^5 : conversion factor [$PV=nRT$]

(60min/1hr) · [mole/22.4 liter (STP)] · [273K/1atm]

(2) 온라인상에서 OUR 값의 측정에 의한 생물반응기 내의 세포농도 추정식 확립

소규모의 생물반응기인 경우, 일정시간 이후에 시료를 채취하여 세포농도를 측정할 수 있지만, scale-up된 industrial plant의 경우 시료를 채취하기 어려운 점이 있다. 또한 세포농도를 측정하는데 상당한 시간이 소요되는 고정상배양 (microcarrier culture)과 같은 경우에는 배양 중 실시간으로 세포농도를 추정하는 것이 거의 불가능하다. 따라서 이러한 경우 생물반응기 내에서 세포의 성장 정도를 실시간으로 추정하기 위하여 다음과 같은 이론식을 확립하였다.

(가) 세포유지를 위한 산소흡수율 (maintenance term)을 무시하는 경우:

$$OUR = Y_{o/x} \frac{dx}{dt} = \frac{1}{Y_{x/o}} \frac{dx}{dt} \quad (14)$$

이 식을 좌우 변을 이항하여 세포 성장속도를 다음과 같은 식으로 구할 수 있었다.

$$\frac{dx}{dt} = Y_{x/o}(OUR) \quad (15)$$

$$\int_0^x dx = Y_{x/o} \int_0^t (OUR) dt, \text{ at } t=0, x=0$$

$$\approx Y_{x/o} \sum_{t=0}^t (OUR) \Delta t$$

$$\dot{X}(t) = Y_{x/o} \cdot SOUR(t) \quad (16)$$

여기서

$\hat{X}(t)$: calculated cell concentration by use of OUR (g/L)

X : real cell concentration from experiment (g/L)

$Y_{x/o}$: cell yield based on oxygen (g cell/mmol O_2)

한편

$$SOUR(t) = SOUR(t-1) + \frac{1}{2}[OUR(t-1) + OUR(t)]\Delta t \quad (17)$$

(8)

여기서

$OUR(t)$: current oxygen uptake rate (mmol/L/hr)

$OUR(t-1)$: last oxygen uptake rate (mmol/L/hr)

$SOUR(t)$: total oxygen consumed until time, t (mmol/L)

$SOUR(t-1)$: total oxygen consumed until time, t-1 (mmol/L)

(나) 세포유지를 위한 산소흡수율 (maintenance term)을 고려하는 경우:

생산세포주의 증식과는 별도로 세포의 유지에 이용되는 산소의 양을 무시한다면, 상기의 $SOUR$ 을 이용한 세포 농도의 추정은 부정확할 가능성이 높다. 따라서 용존산소의 물질수지식에 세포의 유지 (maintenance)를 위한 산소흡수율을 고려해야 하며, 이는 다음 식과 같이 ($m_s X$)항을 추가함으로써 나타낼 수 있었다.

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = OTR - OUR = OTR - \left(\frac{\mu X}{Y_{x/O_2}} + m_s X \right) \quad (18)$$

가정상상태 (pseudo-steady state)라고 가정할 경우, $\frac{dC_{O_2}}{dt} = 0$ 이므로 (18) 식의 좌우 변을 재조정하면,

$$\left(\frac{\mu}{Y_{x/O_2}} + m_s \right) X = OUR \quad (19)$$

을 얻는다. 이식의 양변을 세포 농도인 X 로 나누면,

$$\left(\frac{\mu}{Y_{x/O_2}} + m_s \right) = \frac{OUR}{X} \quad (20)$$

가 되며, 여기서 비성장속도인 μ 는 정의에 의하여, $\mu = \frac{dx}{dt} \frac{1}{X}$ 이므로, (20) 식은 다음과 같이 표현될 수 있다.

$$\frac{dx}{dt} = Y_{x/O_2} (OUR - m_s X) \quad (21)$$

본 계산식에서 필요한 상수인 $Y_{x/o}$ 와 m_s 의 값은 측정이 가능한 상수로서 다음의 방법에 의해 구할

수 있다: OUR 을 실제로 측정된 세포농도 X 로 나누어 결정된 specific OUR (즉 $q_{O_2} = \frac{OUR}{X}$)과, 실제 측정된 비성장속도 (μ)에 대한 직선의 그래프를 작성하였다. 이 때 Y축 좌표를 q_{O_2} 로, X축 좌표를 비성장속도 (μ)로 하여 직선의 그래프를 얻게 되면, 식 (20)에 의해 이 그래프의 기울기가 Y_{X/O_2} 가 된다. 이에 대한 역수를 취하면 $\frac{1}{Y_{X/O_2}}$ (mmol O_2 /g cell)이 되어 계산하고자 하는 Y_{X/O_2} 를 구할 수 있었고, 얻은 직선의 Y 절편이 m_s 가 됨을 알 수 있었다. 따라서 생물반응기 내 세포의 농도를 시료를 직접 채취하지 않고도 온라인 컴퓨터에 의해 추정이 가능하고, 그 결과에 따라 적절히 배양조건을 변화시키는 것이 가능한 것으로 확인되었다.

(3) 온라인 상에서 단위시간당 세포비성장속도 (μ)의 추정식 확립

동물세포배양에 의한 백신 생산 공정은 생산세포주의 단위시간당 세포성장속도 (μ)와 제한기질의 특성에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 실제 실험에서의 μ 값의 측정은 다음의 과정에 의해 추정할 수 있다: 시간에 따른 세포성장곡선을 그래프로 나타내었을 때, 특정 시간 t_n 에서의 접선의 기울기 값이 시간에 따른 세포의 증가량이며, 이것을 그 때까지의 세포농도로 나누어 주면 단위시간당 세포의 성장속도인 μ 값을 얻을 수 있다.

한편 상기 식들의 적용을 통해 이미 OUR 값과 $SOUR$ 값을 측정할 수 있었으므로, 다음의 간단한 논리에 의해서도 μ 값을 측정할 수 있었다. 즉 세포농도인 X 값은 식(16)에 의해 $Y_{X/O_2} \cdot SOUR(t)$ 이고, $\frac{dx}{dt}$ 의 값은 식 (15)에 의해 $\frac{dx}{dt} = Y_{X/O_2}(OUR)$ 로 계산되므로, 다음의 수식을 적용함으로써 단위시간당 세포성장속도 (μ)를 추정할 수 있었다:

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} = \frac{Y_{X/O_2} \cdot OUR(t)}{Y_{X/O_2} \cdot SOUR(t)} = \frac{OUR(t)}{SOUR(t)} \quad (22)$$

(4) 기체산소의 물질수지식에 의해 온라인상에서 산소전달계수 (k_La) 추정식 확립

컴퓨터를 통해 실시간으로 수집한 산소흡수율 (OUR)을 이용하여 산소전달계수를 측정하는 방법으로 다음의 수식을 세울 수 있었다:

$$k_La = \frac{OUR}{C_L^* \left(1 - \frac{D \cdot O_2}{100}\right)} \quad (23)$$

여기서 OUR 은 식(1)에 의해 구할 수 있고, C_L^* 는 Henry의 법칙에 따라 $C_L^* = \frac{P_{O_2, out}}{H_{O_2}(T)}$ 의 공식을 이용하여 계산된다. 산소분압인 $P_{O_2, out}$ 은 배지내의 수압과 대기압을 고려하여 측정되어야 하나, 실험실 수준의 5 liter 이하의 생물반응기에서는 수압을 고려하지 않고 1기압으로 가정해도 별 무리가 없는 것으로 관찰되었다. 그리고 Henry의 상수인 $H_{O_2}(T)$ 는 chemistry handbook에서 구할 수 있다. 그러나 큰 규모 생물반응기의 경우 교반이 균질하게 이루어진다고 가정할 수 없다. 또한 배지의 양이 증가하여 산소의 분압이 대기압보다 커지게 되므로, 이러한 경우 산소분압인 $P_{O_2, out}$ 은 용존산소가 유입되는 sparger와 생물반응기에서 빠져 나가는 용존산소의 로그평균값을 사용하는 것이 적절하다고 판단되어, 다음의 식을 적용할 수 있는 것으로 나타났다.

$$P_{O_2, lm} = \frac{P_{O_2, sparger} - P_{O_2, out}}{\ln\left(\frac{P_{O_2, sparger}}{P_{O_2, out}}\right)} \quad (24)$$

$$P_{O_2, sparger} = P_{O_2, out} + P_L$$

$P_L = \rho gh$ (hydrostatic pressure at the sparger)

나) 생물반응기 고정상배양에서 상기에서 확립한 이론식 테스트

상기에서 확립한 이론식을 백신생산을 위한 동물세포 배양에 직접 적용하기에 앞서, 배양하기가 매우 까다로운 *Aspergillus sp.* 세포의 고정상배양공정 (microcarrier culture)에 대해 시범 적용시킴으로써, 상기에서 확립한 이론식의 정확성 여부를 점검하고자 하였다. 즉 생산세포주의 고정상 배양 시, 세포주의 비성장속도 (specific growth rate) (μ) 등의 배양 중요 변수들 (즉 용존산소 (DO), 산소흡수율 (OUR), 이산화탄소발생율 (CER), 총산소흡수량 (SOUR), 총이산화탄소 배출량 (SCER), 산소전달계수 (k_La), 세포농도 등)을 온라인상에서 직접 측정할 수 있는 상기의 이론식을 실제 배양 공정에 적용하였다. 본 연구에서 사용한 microsparging aeration system이 갖춰진 5 리터 생물반응기의 배양공정 자동화 시스템 사진을 Fig 3.38에 제시하였다. 세포 고정화를 위해 celite bead를 담체 (microcarrier)로 사용하였다.



Fig 3. 38 Photograph of on-line measurement system for the estimation of cell cultivation parameters.

(1) 산소흡수율 (OUR) 및 이산화탄소생성율 (CER)의 온라인 분석

산소흡수율은 가스분석기를 이용하여 생물반응기로부터 배출되는 가스를 이용하여 분석하였다. 배출되는 가스의 성분 농도를 나타낸 Autolab V2.0의 구성을 Fig 3.39에 제시하였다. 산소흡수율의 측정을 위하여 생물반응기로부터 배출되는 가스로부터 이산화탄소 및 산소 농도를 조사하였다. 생물반응기로부터 배출되는 산소의 농도가 감소하는 시기와 이산화탄소의 농도가 증가하는 시기가 대체로 일치하였다 (Fig 3.40). 이는 세포가 공급되는 산소를 세포대사에 활발히 이용하면서 대사산물로서 이산화탄소를 방출하는 전형적인 결과이다. 한편 식(12)에 의해 배양 중 온라인으로 계산이 가능한 산소흡수율은 배양 기간 동안 생산세포주의 대사상태를 나타내 주는 중요한 지표이다. 또한 배양 기간 동안 누적된 산소흡수율로부터 총 산소소모량을 계산하는 경우, 식(22)에 의해 세포의 비성장속도 또한 예측이 가능하므로

산소흡수율의 정확한 측정은 매우 중요한 의미를 지닌다. Fig 3.41에 계산된 산소흡수율 및 이산화탄소 생성율을 제시하였다. 산소흡수율의 경우 배양 시작 후 24시간까지 천천히 증가하다가 배양 72시간까지 급격히 증가하여 25 mmol/L/hr을 나타낸 후 천천히 감소하여 약 15 mmol/L/hr를 유지하였다. 이로부터 산소흡수율 및 이산화탄소 생성율이 세포의 상태를 간접적으로 확인할 수 있는 유용한 지표가 될 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

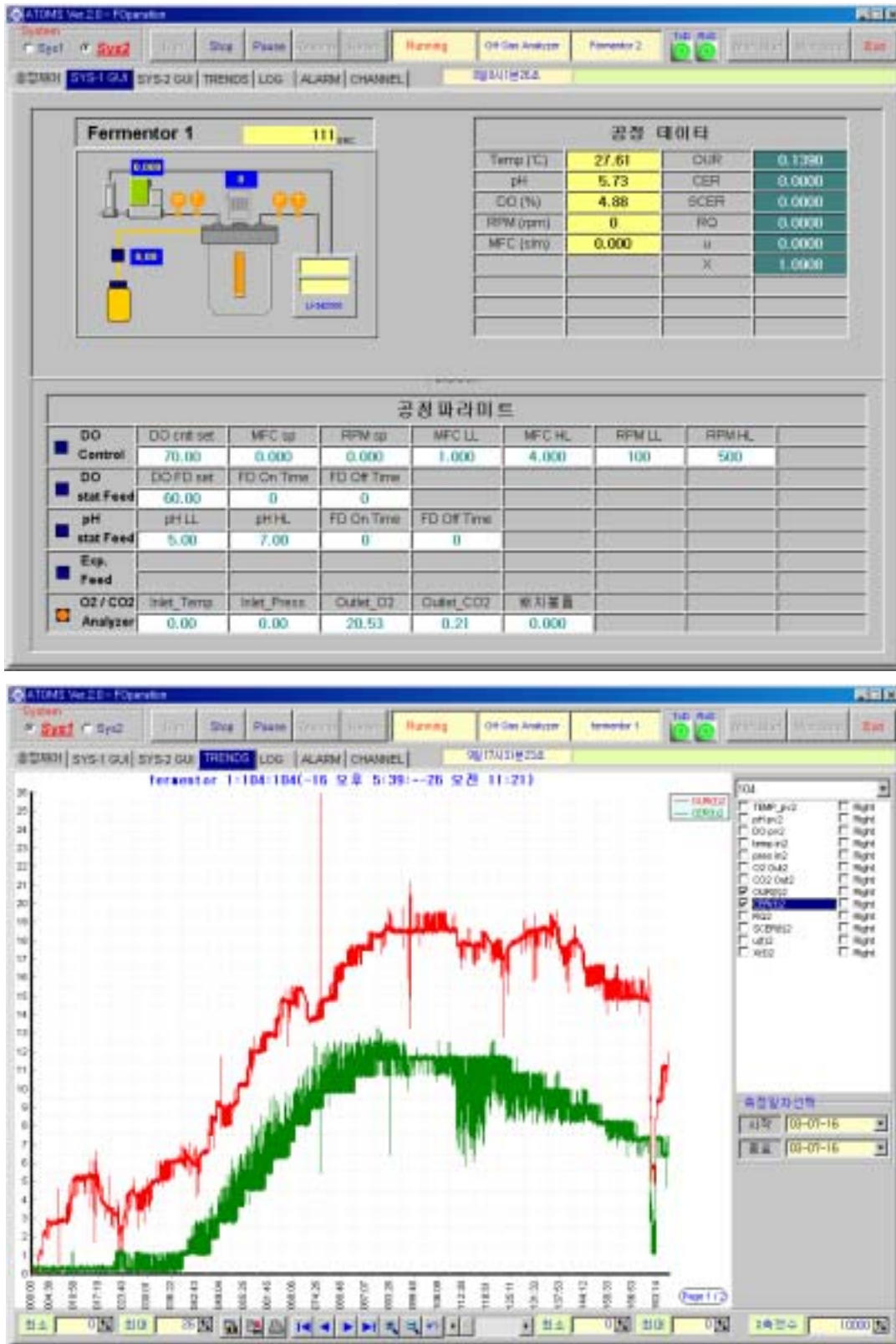


Fig 3. 39 Table of data aquisition and parameter analysis system.

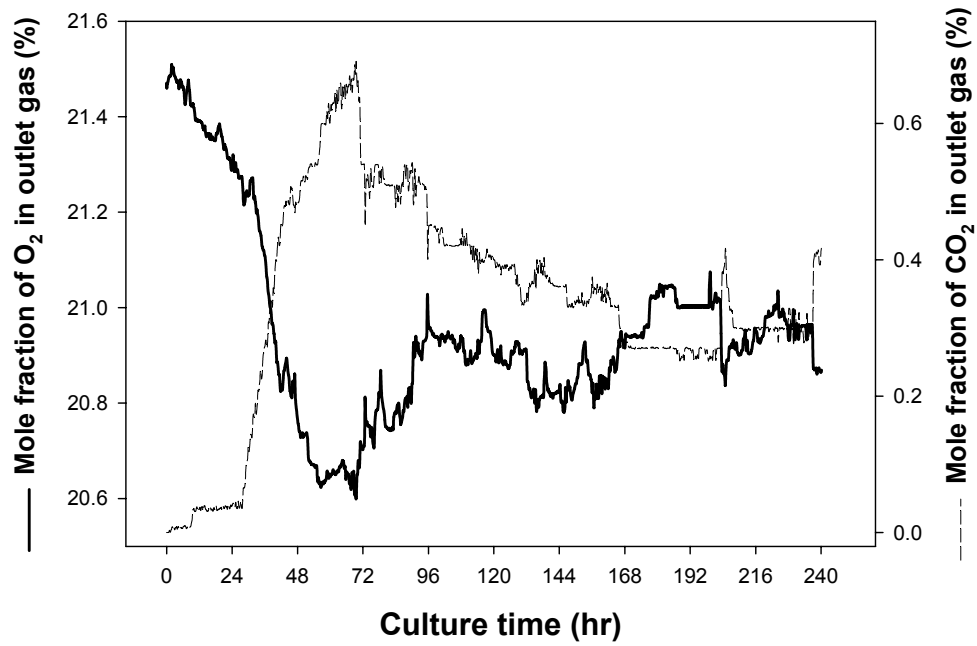


Fig 3. 40 Time-course profiles of mole fraction of oxygen and carbon dioxide in outlet gas in the immobilized cell cultivation performed with cells (5 L bioreactor used).

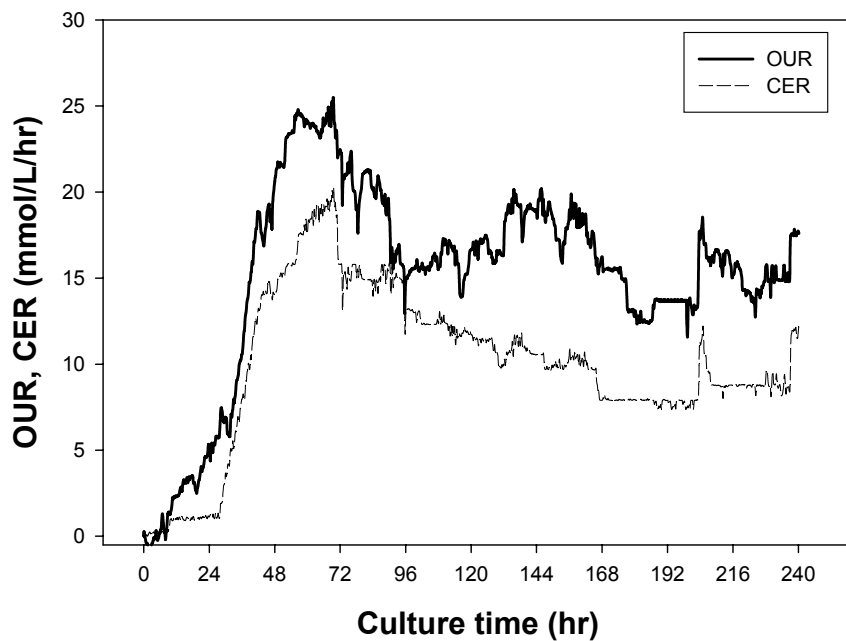


Fig 3. 41 Time-course profiles of oxygen uptake rate (*OUR*) and carbon dioxide evolution rate (*CER*) in the immobilized cell cultivation performed with cells (5 L bioreactor used).

(2) 세포비성장속도(specific growth rate; μ) 온라인 분석

세포비성장속도는 산업적으로 유용한 대사산물, 또는 백신등의 생합성 속도에 영향을 미치는 매우 중요한 요소이다. 본 실험에서는 배양기간 동안 세포비성장속도를 실시간으로 모니터링함으로써 배양 세포주의 대사상태를 정확하게 파악하고자 하였다. 총 산소흡수량과 산소흡수율에 대한 분석 데이터를 이용하여 배양기간 동안 실시간으로 세포비성장속도를 계산할 수 있었다. Fig 3.41의 산소흡수율과 식 (17)에 의해 계산된 총 산소흡수량 (Fig 3.42)을 이용하여 세포비성장속도를 추정하였고, 그 결과를 Fig 3.43에 제시하였다. 세포비성장속도는 배양 24시간 이후 급격히 감소하여 배양 전반에 걸쳐 0.05 hr^{-1} 이하로 유지되는 것을 관찰할 수 있었다. 즉 배양 초반에 세포의 성장이 과량으로 이루어졌음을 알 수 있었다.

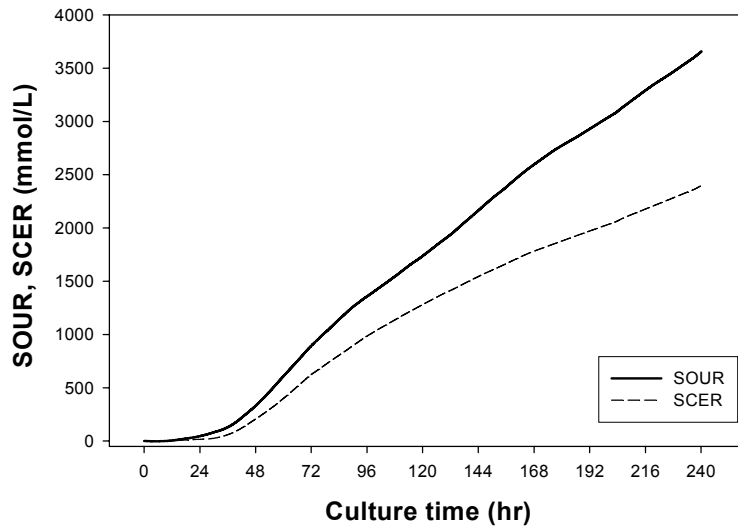


Fig 3. 42 Time-course profiles of summation of *OUR* and *CER* in the immobilized cell cultivation performed with cells (5 L bioreactor used).

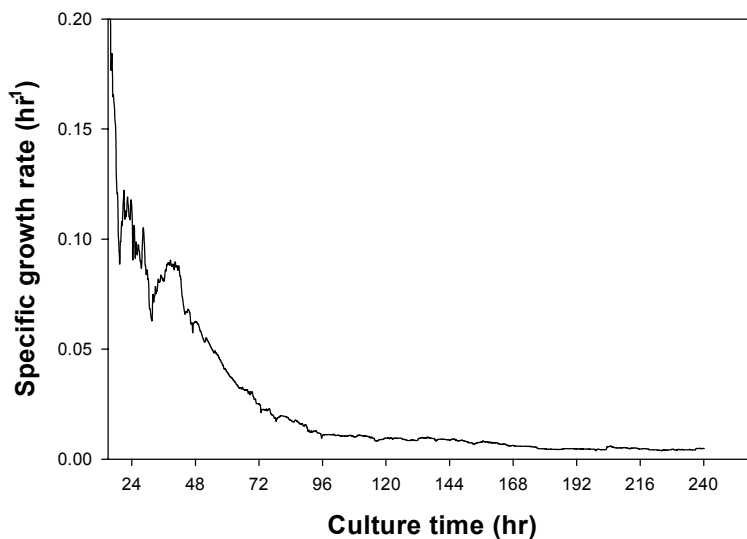


Fig 3. 43 Time-course profile of specific growth rate in the immobilized cell cultivation performed with cells (5 L bioreactor used).

(3) 세포량 온라인 분석

온라인 상에서 비산소흡수율과 비성장속도의 연관성이 직선 관계를 보이므로, linear regression 분석을 통해 산소에 근거한 세포수율 $Y_{x/o}$ (yield factor)와 m_s (maintenance coefficient)를 산출할 수 있었다. 식 (21)를 이용해서 온라인 분석을 통해 예측된 세포량과, 실험적으로 오프라인 상에서의 측정을 통해 얻은 실제 세포량을 비교한 실험결과를 제시하였다 (Fig 3.44). 배양기간 동안 실제 실험적으로 구한 세포량의 증가 경향이 실시간으로 온라인 분석에 의해 예측한 세포량의 증가 경향과 비교적 일치하는 것으로 나타났다. 이는 시료 채취를 하지 않고도 실시간으로 세포의 총 산소흡수량을 온라인으로 분석함으로써 건조세포량을 유추할 수 있음을 제시해 주는 매우 유용한 결과이다.

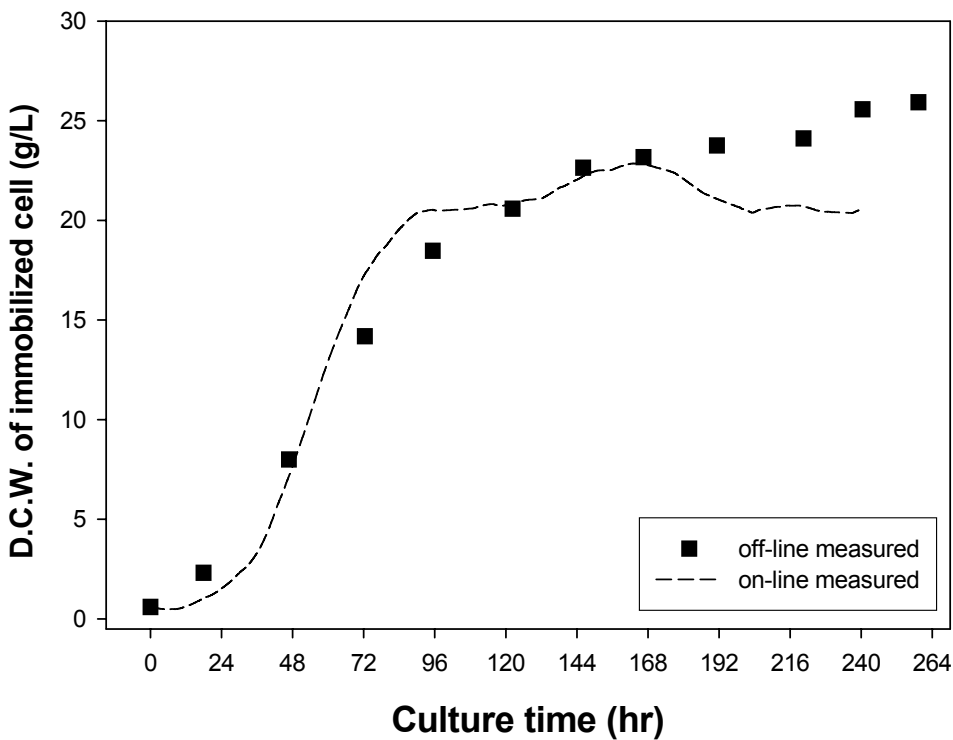


Fig 3. 44 Comparison of cell concentration estimated based on the on-line data of yield factor (Y_{x/o_2}) and maintenance coefficient (m_s) against actual dry cell weight in the immobilized cell cultivation performed with cells (5 L bioreactor used).

(4) 산소전달계수 (k_{La}) 측정

대부분 세포주의 성장 및 유용물질 또는 백신의 생합성에 있어서 산소전달은 매우 중요한 요소로 작용한다. 산소요구 정도는 세포주에 따라 다르므로, 각 세포주의 산소요구도에 따라 최적 상태로 산소공급을 하는 것이 중요하다. 생물반응기내로 공급되는 산소량을 효율적으로 측정하는 한 방법이 산소전달계수 (k_{La})를 실험적으로 측정하는 것이다. 실지로 배양 중 산소전달계수를 모니터링하는 시스템을 확립하였으며, 실시간으로 식 (23)에 의해 산소전달계수를 측정할 수 있었다. 배양 전반에 걸친 산소전달계수를 Fig 3. 45에 나타내었다. 산소전달계수는 배양 2일이 경과한 후부터 약 70-80 hr⁻¹ 범위로 유지되는 것을 관찰할 수 있었다. 본 결과로부터 고정상세포의 성장이 지속되어도 배양액의 점도가 증가하지 않으며, 그 결과 산소전달이 제한받지 않았음을 알 수 있었다. 또한 주목할 점은 용존산소 전달의 기준이 될 뿐만 아니라 발효조 scale-up시 가장 중요한 인자로 사용되는 산소전달계수를, 용존산소 물질수지식에 기초해서 계산하는 dynamic method를 이용하지 않고 (dynamic method의 경우 배양액의 용존산소 농도가 낮으면 배양 중 산소전달계수를 측정할 수 없음), 기체산소의 물질수지식에 근거해서 측정할 수 있는 시스템이 본 연구 결과 확립되었다는 점이며, 따라서 배양액의 용존산소 수준에 관계없이 언제든지 온라인상에서 산소전달계수를 측정할 수 있게 되었다는 점이다. 또한 상기에서 확립한 이론식을 배양 현장에 직접 적용할 때, 배양 중요변수들, 즉 용존산소 (DO), 산소흡수율 (OUR), 이산화탄소 발생율 (CER), 총산소 흡수량 (SOUR), 총이산화탄소 배출량 (SCER), 산소전달계수 (k_{La}), 세포농도 (X) 등을 온라인상에서 정확하게 측정할 수 있는 시스템이 구축되었음을 주목할 만한 연구결과라고 판단된다.

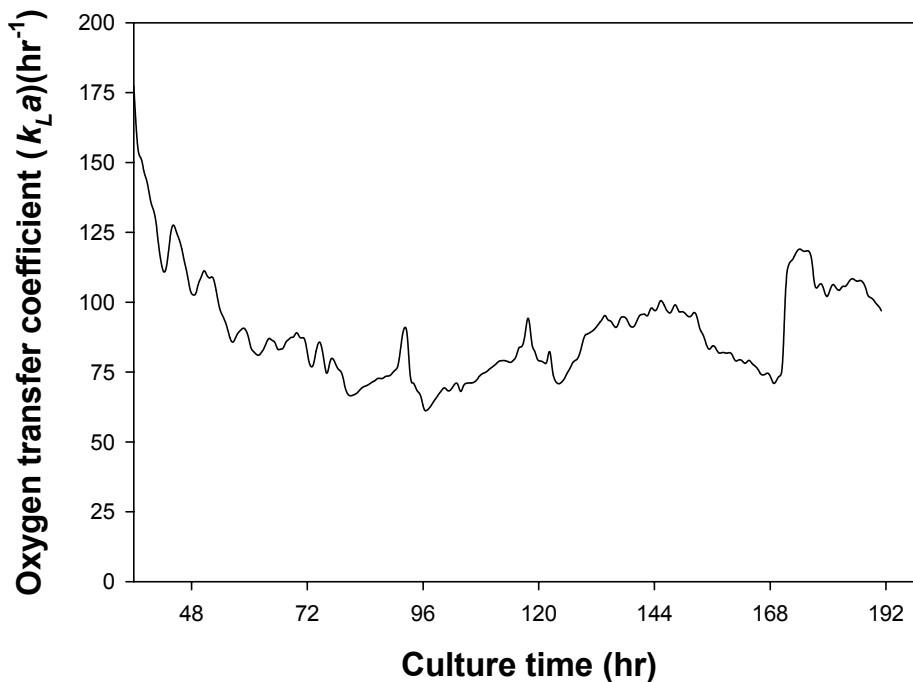


Fig 3. 45 Time-course profile of oxygen transfer coefficient in the immobilized cell cultivation performed with *A. terreus* cells (5 L bioreactor used).

12) 바이러스 생산성을 증대시키기 위한 유가식배양 공정 개발

바이러스 생산 시에도 많은 탄소원과 에너지가 소모되어 영양원이 고갈 될 수 있다. 이때 영양원의 고갈을 유가식 배양으로 해결할 수 있다. 바이러스의 생산성을 증가시키기 위한 효율적 유가식 배양 시스템을 확립하기 위해 spinner flask를 이용하여 여러 가지 유가식 방법에 따른 NCD백신의 생산성을 조사하였다. 이를 위해 spinner flask 5 set에서 RPMI 1640의 배지로 microcarrier에 의해 생산세포주를 배양하고 4일 후에 0.1 MOI로 virus를 infection하였다. Infection한지 2일 후에 glucose(2g/l), glutamine(0.3g/l), glucose+glutamine, 농축배지(x5)로 각각의 spinner에 feeding하였다.

Fig.3.46은 여러 harvest time에서 여러 가지 형태의 유가식 생산에 따른 NCD virus titer를 나타내고 있다. 그림에 의하면 control 보다는 어떠한 형태로든지 유가식 배양이 바이러스의 생산성을 획기적으로 증가시킨다는 것을 알 수 있었다. 그 중에서도 glutamine과 glucose를 동시에 공급한 set의 백신 생산성이 가장 우수하였고 이로부터 바이러스 생산 시 가장 고갈이 심한 영양원은 주요 탄소원이며 에너지원인 glucose와 glutamine임을 알 수 있었다. 농축배지의 공급으로도 생산성이 향상되는 것을 보아서 glucose 및 glutamine이외에 다른 성분의 고갈 현상도 있다고 해석 할 수 있으나, 농축배지에도 glucose 및 glutamine이 포함되어 있기 때문에 다른 성분의 고갈현상은 크지 않다고 생각된다. 따라서 glucose와 glutamine의 적절한 공급은 백신의 생산성을 크게 증가시킬 수 있으므로 향후 적절한 feeding rate를 산정하기 위한 simulation study가 중요함을 알 수 있었고, 현재의 feeding rate 하에서는 최적 harvest time이 infection 후 72시간임도 알 수 있었다.

Comparison of virus production on Fed batch culture

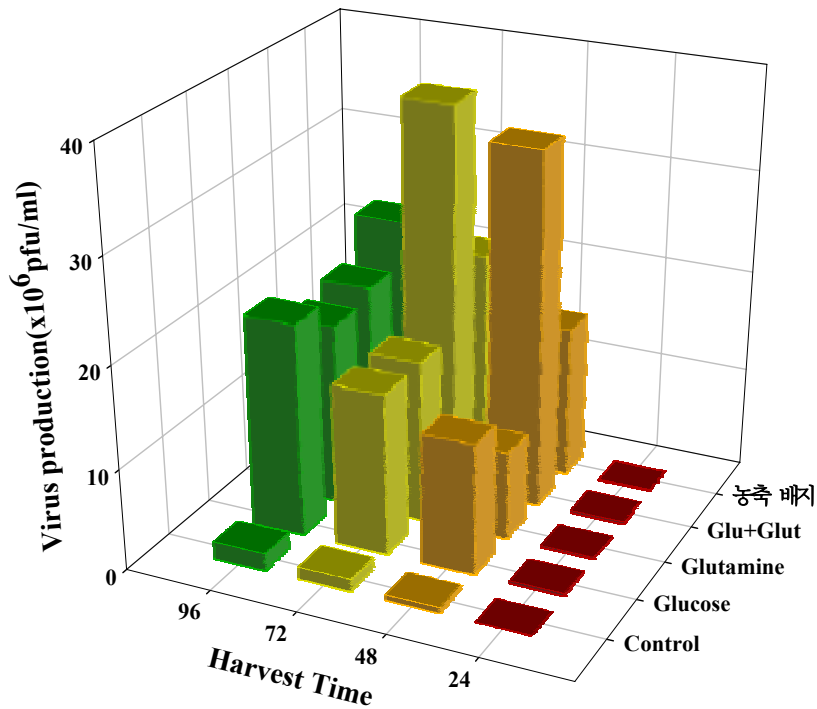


Fig 3. 46 NCD virus production in fed batch culture

Fig. 3.47, 48, 49는 이 때의 영양분 및 노폐물의 시간에 따른 변화를 나타내고 있다. Fig. 3.47은 시간에 따른 glucose의 농도 변화를 나타낸 것으로, glucose는 control이라도 크게 고갈되지 않았음을 알 수 있었고, 이러한 이유로 glucose의 유가식 공급이 virus의 생산성을 크게 증진 시키지 않음을 알 수 있었다. 또한 농축배지(concentrate medium)의 경우도 어느 정도 glucose를 함유하고 있음도 알 수 있어서 다시 한번 탄소원이나 에너지원의 고갈이 문제됨을 알 수 있었다. Fig.3.48은 시간에 따른 ammonia 농도의 변화를 나타낸 그림으로 어느 경우에도 ammonia의 축적은 거의 일정함을 알 수 있었으며 batch의 경우보다 더 많이 축적이 일어나지 않아서 유가식으로 천천히 glucose나 glutamine을 첨가하여 주는 것이 노폐물의 축적을 방지 하는 좋은 전략임을 알 수 있었고, 이에 따라 주어진 feeding rate하에서는 특별히 ammonia를 제거해야할 필요성은 없는 것으로 판단되었다.

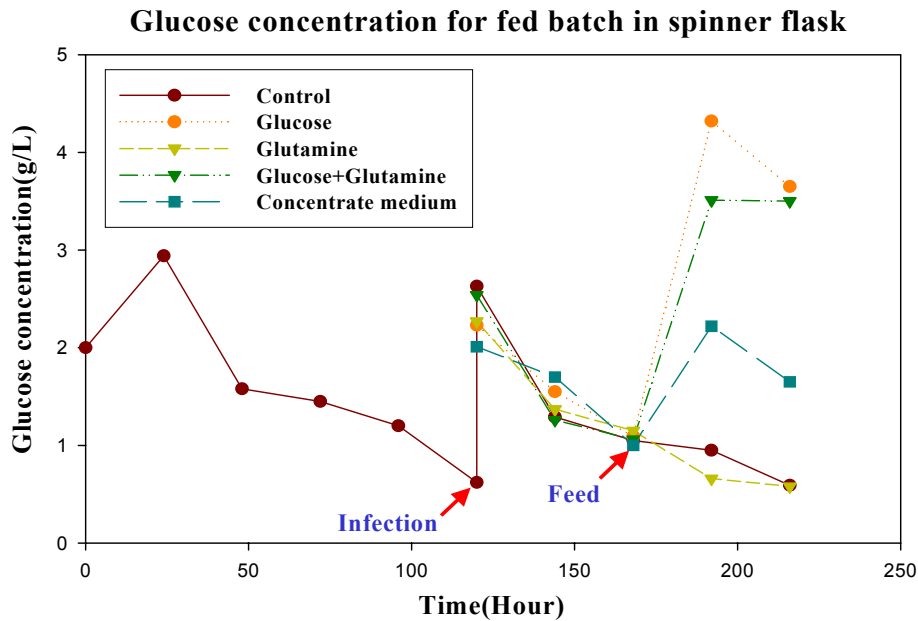


Fig 3. 47 Glucose concentration change for fed batch operation

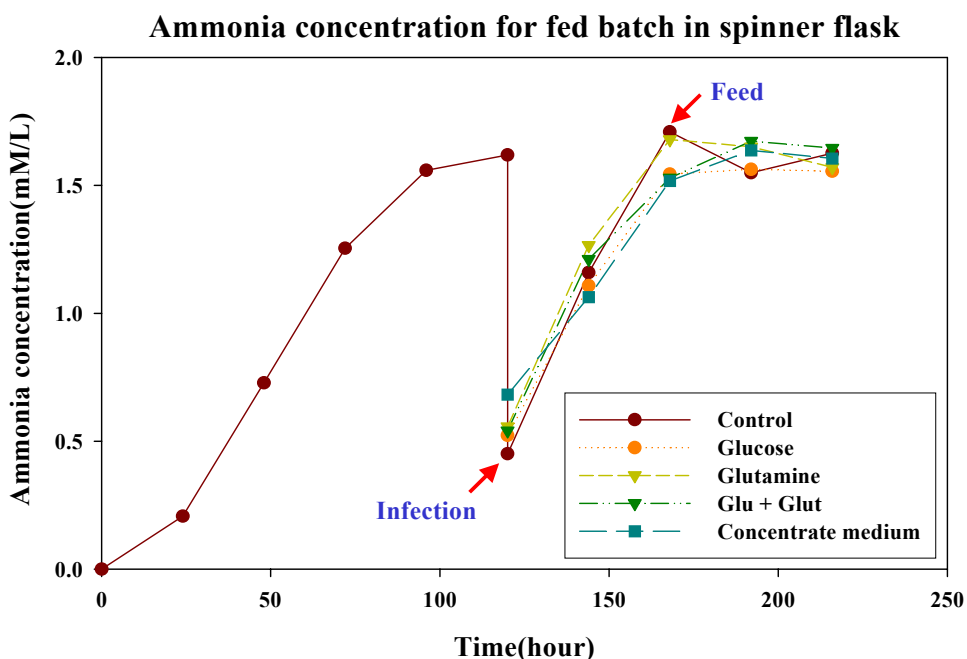


Fig 3. 48 Ammonia concentration change for fed batch operation

Fig.3.49는 시간에 따른 lactate 농도의 변화를 나타낸 그림으로 Fig.3.47에서 glucose가 batch이상으로 축적이 되었음에도 불구하고, lactate는 batch 이상으로 축적이 되지 않았음을 알 수 있어서 ammonia의 경우와 마찬가지로 유가식 배양이 lactate등의 노폐물의 축적을 방지하면서 영양물질의 고갈을 막을 수 있기 때문에 백신의 생산성을 향상시키는 좋은 전략이 될 수 있음을 확인하였다.

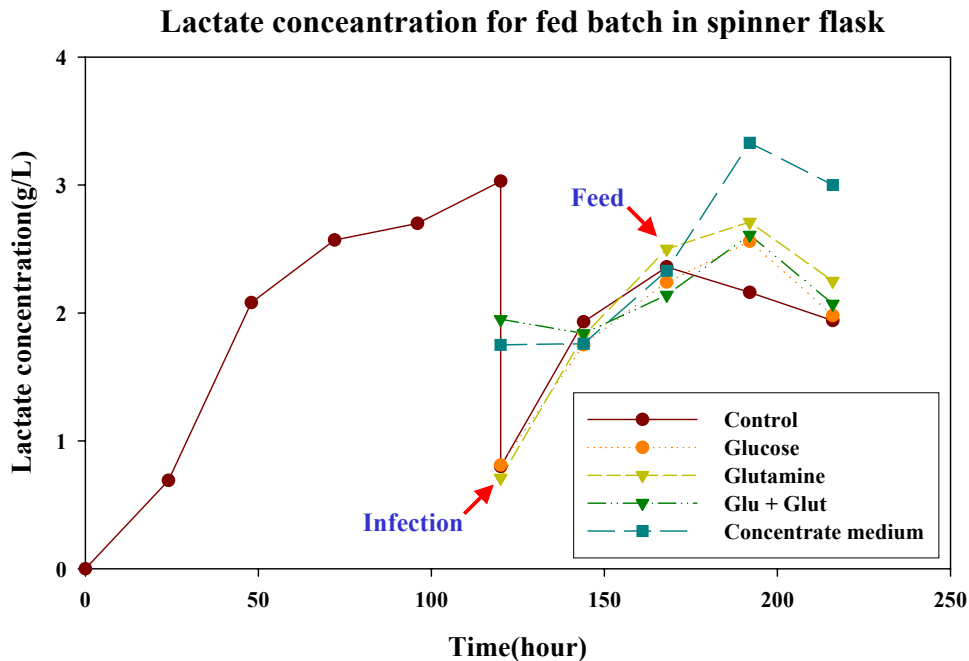


Fig 3. 49 Lactate concentration change for fed batch operation

13) 동물세포 배양공정의 Modelling 및 simulation

가) 뉴캐슬병 (NCD) 백신 생산 세포 고정상태배양에서 효율인자의 계산

세포 고정화배양 (microcarrier cell culture)에 의한 동물세포배양은 동물세포 유래 유용물질의 대량 생산을 가능하게 하였다. 동물세포는 세포벽이 없으므로 배양 중 외부의 전단응력에 의해 세포가 쉽게 lysis 되지만, 미립담체에 고정화된 세포는 담체에 의해 보호받으므로 세포 생장이 외부 환경에 민감하게 영향을 받지 않는 장점을 지니고 있어, 최근에 그 연구가 급속도로 진행되고 있다. 세포 고정화배양의 장점에도 불구하고 공학적인 접근은 현재까지 제한적으로만 이루어지고 있는 실정인데, 그 이유는 고정화 담체내의 물질수지나 고정화된 세포의 생리학적 변화에서 기인된 시스템의 복잡성과 비균일성 때문으로 생각된다.

세포 고정화배양에서 고려해야 하는 가장 중요한 요소 중의 하나는 담체 내부로의 기질 (포도당 및 글루타민)의 확산이다. 균일한 담체내 균체분포와 담체내로의 기질 공급이 효율적으로 이루어지기 위해서는 적절한 제어 전략이 필수적이며, 이 때 수학적 모델링과 제어기법, 아울러 불균일 시스템의 특성을 나타내는 효율인자와 담체 중심에서의 기질농도 등에 대한 정밀한 계산이 필수적이다. 미립담체내의 세포는 확산저항으로 인해 입자내부와 액체배지내의 기질 및 산소농도가 크게 차이나게 되어, 전체적인 반응속도나 효율이 떨어지게 된다. 따라서 세포 고정화배양에 있어서 제어전략을 수립할 경우 이러한 확산저항에 의한 효과를 분석하는 것이 매우 중요한 과정이라 할 수 있다.

본 연구에서는 고정화 Vero 세포 배양의 kinetics data를 바탕으로 물질수지에 의거한 미분방정식을 도입하여 효율인자, Thiele modulus, 담체내의 기질구배 등을 구하였다. 특히 확산계수, 담체의 균체부하

량 (cell loading) 등이 효율인자 및 담체 중심의 기질농도에 미치는 영향을 예측하여 배양 모델에 적용하였다.

(1) 효율인자의 계산

확산저항은 외부 확산저항과 내부 확산저항으로 나누어 진다. 본 연구에서는 충분한 교반과 기질 공급을 통해 외부 확산저항은 발생하지 않는 것으로 가정하였다. 고정화세포 성장이 Monod식에 의해 표현될 수 있으므로, 이를 이용하여 구형좌표계에 의한 확산 및 기질소모에 의한 담체내의 제한기질 (포도당 및 글루타민)에 대한 물질수지식을 세우면 다음과 같다.

$$v_p \frac{\partial S}{\partial t} = D_e \left(\frac{\partial^2 S}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial S}{\partial r} \right) - \left(\frac{1}{Y_{X/S}} \right) \rho_b \frac{\mu_{\max} S}{K+S} X \quad (25)$$

동물세포의 기질 소모속도는 기질의 확산속도에 비해 확연히 느리므로 입자내의 기질분포가 정상상태 (pseudo-steady state)를 유지한다고 하면 식 (26)을 얻을 수 있다.

$$D_e \left(\frac{d^2 S}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dS}{dr} \right) = \left(\frac{1}{Y_{X/S}} \right) \rho_b \frac{\mu_{\max} S}{K+S} X \quad (26)$$

B.C. : $S = S_l$ at $r = R$

$$\frac{dS}{dr} = 0 \text{ at } r = 0$$

식의 계산을 단순화하기 위해 정규화하면,

$$\frac{d^2 S^*}{d r^{*2}} + \frac{2}{r^*} \frac{d S^*}{d r^*} - \phi^2 \frac{S^*}{1 + S^*(S_l/K_m)} = 0 \quad (27)$$

여기서 $S^* = \frac{S}{S_l}$, $r^* = \frac{r}{R}$, $\phi = R \sqrt{\frac{v_{\max}}{D_e K_m}}$, $v_{\max} = \frac{1}{Y_{X/S}} \rho_b \mu_{\max} X^{sat}$ 이며, ϕ 는 Thiele modulus이다.

만일 액체배지내의 기질농도가 K_m 보다 매우 작으면 다음과 같은 단순화된 식을 얻을 수 있다.

$$\frac{d^2 S^*}{d r^{*2}} + \frac{2}{r^*} \frac{d S^*}{d r^*} - \phi^2 S^* = 0 \quad (28)$$

B.C. : $S^* = 1$ at $r^* = 1$, $\frac{dS^*}{dr^*} = 0$ at $r^* = 0$

이 식은 상미분방정식으로 쉽게 해를 구할 수 있는데, 액체배지내의 기질농도에 대한 각 입자반경에 따른 기질농도는 다음과 같이 주어진다.

$$S^* = \frac{1}{r^*} \frac{\sinh(\phi r^*)}{\sinh(\phi)} \quad (29)$$

미립담체내로의 확산저항을 고려하는데 있어 지표로 삼는 공정변수가 효율인자 (effectiveness factor)이다. 이는 확산저항이 없을 때의 반응속도와 있을 때의 반응속도의 비율이다. 효율인자는 정의에 의해서 식 (30)으로 표시될 수 있다. 이로부터 실험에 의해 구배된 Monod식의 μ_{\max} 와 K_m 를 이용하여 효율인자 및 담체내의 기질농도구배와 중심에서의 기질농도를 계산하였다.

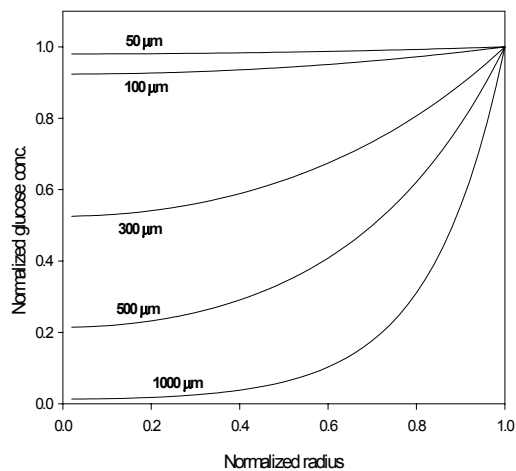
$$\begin{aligned}
\eta &= \frac{\text{observed rate}}{\text{rate with no conc. gradient in bead}} \\
&= \frac{\text{transfer rate of substrate on bead surface}}{\text{rate at bulk conc.}} \\
&= \frac{\frac{A_p}{V_p} D_e \left(\frac{dS}{dr} \right)_{r=R}}{\left(\frac{1}{Y_{X/S}} \right) \frac{\rho_b \mu_{\max} S_l X}{K_m + S_l}} \\
&= \frac{3 \left(\frac{dS^*}{dr^*} \right)_{r^*=1} \left(1 + \frac{S_l}{K_m} \right)}{\phi^2} \\
&= \frac{3 \left(\frac{dS^*}{dr^*} \right)_{r^*=1}}{\phi^2} \quad (\text{If } S_l \ll K_m) \\
&= \frac{3}{\phi} \left(\frac{1}{\tanh \phi} - \frac{1}{\phi} \right)
\end{aligned} \tag{30}$$

where, $\left(\frac{dS^*}{dr^*} \right)_{r^*=1} = \frac{\phi}{\tanh \phi} - 1$

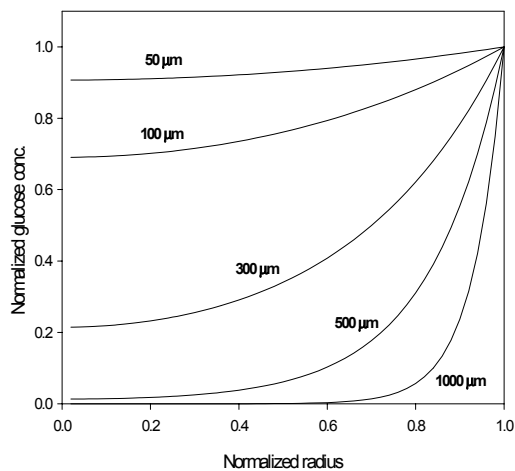
(2) 담체입자 크기에 따른 담체내의 기질구배

세포 고정화배양에서 균체부하가 적을 때에는 확산의 영향은 무시할 만 하다. 그러나 담체내의 균체량이 증가할수록 입자내 확산저항은 무시할 수 없게 된다. 고농도 고정화세포를 이용한 세포 배양에서는 1차의 기질소모속도식을 가정할 수 있다. 이러한 경우 식 (28)의 미분방정식에 대한 해인 식 (29)에 의해 담체내의 기질농도의 구배를 구할 수 있다. 먼저 각 담체입자크기에 따른 규정화된(normalized) 기질(포도당, 글루타민)의 담체내 구배를 모사하여 이를 Fig 3.50과 Fig 3.51에 나타내었다. 또한 전산모사에 사용한 매개변수의 값을 Table 3-4에 정리하였다. 이 매개변수들은 본 과제에서 사용된 Vero cell의 회분식 배양으로부터 얻은 kinetics data와 미립담체 Cultispher-G의 물성 data를 사용하여 계산한 것이다. Cultispher-G의 입자직경은 170 ~ 500 μm 로서, 이때 담체 직경에 따른 담체내부의 Thiele modulus를 Table 3-5와 3-6에 나타내었다.

두 경우 모두 담체입자크기의 증가에 따라 확산저항에 의해 입자중심에서의 규정화 기질농도가 감소하는 경향을 보인다. 물에서의 포도당 분자확산계수인 $D_e = 6.9 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{sec}$ 의 경우, 담체 입자반경이 200 μm 까지는 입자중심에서의 규정화 포도당농도가 90%를 유지했다. 이는 이 조건하에서는 물질전달속도가 충분히 크므로 기질소모반응이 율속단계(limiting step)라는 것을 보여준다. 본 연구에 사용된 Cultispher-G의 경우 입자반경이 240 μm 정도이므로 낮은 세포 밀도에서는 확산저항이 배양에 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있다. 그러나 만일 담체에 부하된 세포량이 증가하여 물에서의 유효확산계수가 분자확산계수의 10% 수준 ($1.4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{sec}$)으로 감소한다면 100 μm 이상의 담체에서는 규정화된 기질농도가 심각하게 감소하는 것을 알 수 있다. 이 경우는 기질소모속도가 물질전달속도보다 크므로 전체 과정을 확산저항(diffusion-control)으로 볼 수 있다. 반면 글루타민의 경우, 포도당보다 담체내로의 확산이 더 큰 영향을 미침을 알 수 있었다. 이러한 확산저항에 의한 효과는 부하 세포량이 증가할수록 두드러지는데 Fig 3.51(B)를 보면 담체의 반경이 20 μm 이상만 되더라도 기질소모보다 물질전달단계가 율속단계로 작용함을 알 수 있다.



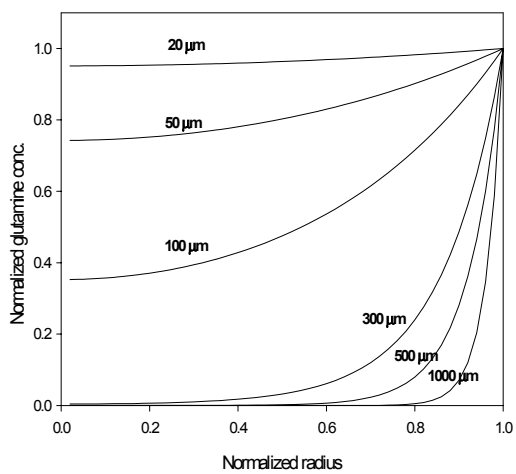
(A)



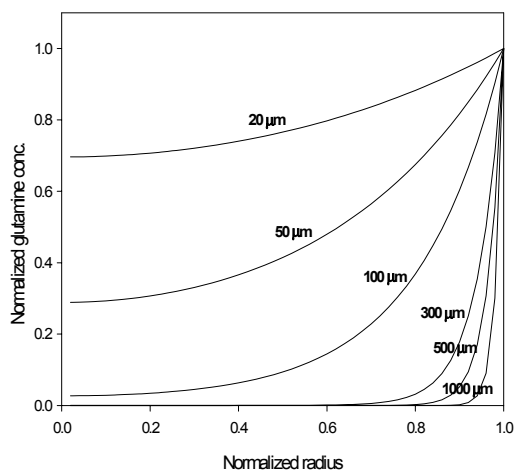
(B)

Fig 3. 50 Profiles of glucose concentration inside a microcarrier (bead).

(A) $De = 6.9 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ (B) $De = 1.4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$



(A)



(B)

Fig 3. 51 Profiles of glutamine concentration inside a microcarrier (bead).

(A) $De = 6.9 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$

(B) $De = 1.4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$

Table 3-4. Lists of parameters for modelling and simulation..

$Y_{X/S}$	45	10^7 cells/g-glucose
$Y_{X/G}$	19.2	10^7 cells/mmol-glutamine
K_{sS}	1.0	g/L
K_{sG}	0.15	mM
μ_m	0.045	hr ⁻¹
$D_{e,S}$	$1.4e^{-6} \sim 6.9e^{-6}$	cm ² /sec
$D_{e,G}$	$1.4e^{-6} \sim 6.9e^{-6}$	cm ² /sec
ρ_p	1.02	g/mL

Table 3-5. Thiele modulus according to microcarrier diameter (glucose).

diameter [μm]	Thiele modulus [-]
50	0.174
100	0.348
150	0.522
200	0.696
250	0.870
300	1.044
350	1.218
400	1.392
450	1.566
500	1.740

Table 3-6. Thiele modulus according to microcarrier diameter (glutamine).

diameter [μm]	Thiele modulus [-]
50	0.687
100	1.375
150	2.063
200	2.752
250	3.439
300	4.127
350	4.815
400	5.503
450	6.191
500	6.878

(3) 유효확산계수와 담체입자크기가 효율인자에 미치는 영향

담체의 종류나 균체부하의 정도에 따라 담체 내에서의 유효확산계수는 다르며 대부분 물에서의 고유 분자확산계수 ($6.9 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{sec}$)보다 낮은 수치이다. 본 연구에서는 이러한 다양한 경우를 예측하기 위해 담체내에서의 유효확산계수의 범위를 분자확산계수의 100%에서 20%까지로 가정하고 그 영향을 살펴 보았다.

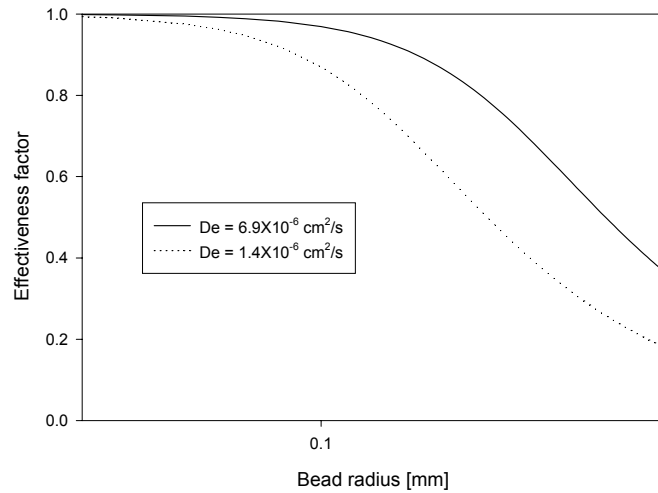


Fig 3. 52 Effectiveness factor according to microcarrier diameter.
(diffusion of glucose into the microcarrier)

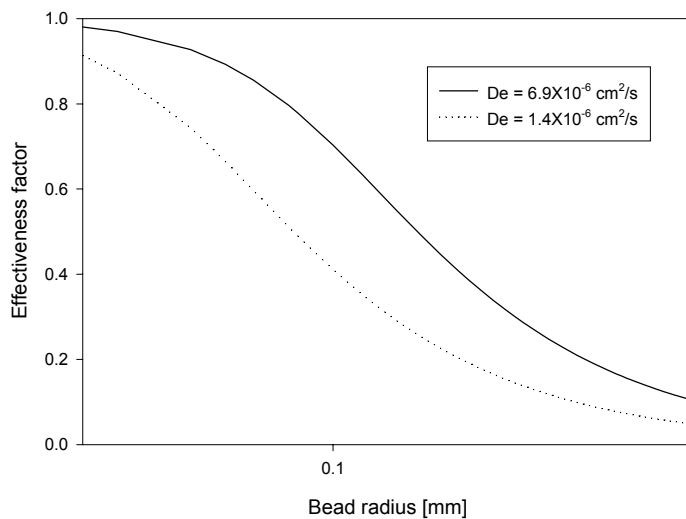


Fig 3. 53 Effectiveness factor according to microcarrier diameter.
(diffusion of glutamine into the microcarrier)

Fig 3.52과 Fig 3.53에 유효확산계수와 담체입자크기에 따른 효율인자를 나타내었다. 담체반경이 50 μ m보다 작은 경우 효율인자 값은 포도당이나 글루타민의 유효확산계수와는 무관하게 0.9 이상을 유지하고 있음을 보여 준다. 또한 균체부하의 정도에 의존하는 유효확산계수가 순수 물에서의 확산도의 30%만 유지해도 반경 100 μ m까지의 담체를 이용할 수 있음을 알 수 있다. 담체반경의 증가에 따라 효율인자는 크게 감소하였다. 효율인자 또는 담체중앙에서의 기질농도는 담체내부의 세포 사멸 방지 측면에서도 매우 중요한데, 만일 균체가 활성을 유지하기 위해 필요한 최소의 기질농도 이상으로 담체 중앙의 기질농도가 유지된다면 전체 담체에서 거의 균일하게 균체가 자란다고 볼 수 있다. 담체크기가 커질수록, 그리고 유효확산계수가 감소할수록 담체중앙의 규정화 기질농도는 작아짐을 알 수 있었다. 이는 열악한 배양조건의 경우 담체내부 공간에서의 균체밀도가 표면에서보다 낮아져서 담체에서 자라는 균체의 비균일한 분포를 야기한다는 것을 의미한다.

본 연구에서 구한 효율인자와 담체내부의 기질 분포를 다음 절에서 서술할 동물세포배양 모델링에 적용하였다.

나) 고정화 Vero 세포 배양공정의 수학적 모델식 개발 및 배양공정 최적화

(1) 물질수지식

고정화 Vero 세포 배양공정에서의 물질수지식은 아래와 같다.

$$(가) \text{ 세포성장 : } \frac{dXV}{dt} = (\mu - k_d)XV \quad (31)$$

(나) 기질소비 :

$$\text{포도당 : } \frac{dSV}{dt} = FS_F - q_SXV \quad (32)$$

$$\text{글루타민 : } \frac{dGV}{dt} = FG_F - k_GGV - q_GXV \quad (33)$$

(다) 노폐물 생산 :

$$\text{락테이트 : } \frac{dLV}{dt} = q_LXV \quad (34)$$

$$\text{암모늄 : } \frac{dAV}{dt} = k_GGV + q_AXV \quad (35)$$

$$(라) \text{ 배양기 부피 : } \frac{dV}{dt} = F \quad (36)$$

여기서 X 는 활성이 있는 Vero 세포의 농도 [cells/mL]; S , 포도당 농도 [g/L]; G , 글루타민 농도 [mM]; L , 락테이트 농도 [g/L]; A , 암모늄 농도 [mM]; V , 발효조 조업부피 [L]; μ , Vero 세포의 비성장속도 [1/hr]; k_d , 세포 사멸 속도 [1/hr]; q_S , 포도당 소모 속도 [1/hr]; k_G , 글루타민 분해 속도 [1/hr]; q_G , 글루타민 소모 속도 [1/hr]; q_L , 락테이트 생성 속도 [1/hr]; q_A , 암모늄 생성 속도 [1/hr]; S_F , 배지중 포도당 농도 [1/hr]; G_F , 배지중 글루타민 농도 [mM]; F , 기질공급속도 [L/hr]를 뜻한다.

본 연구에서는 Vero 세포의 성장만을 모델링하였다. 백신 생산공정의 경우 Vero 세포 자체가 기질로 작용하므로 세포의 대량배양이 본 연구에서 추구하는 NCD 백신 공정의 성패를 좌우하기 때문에 세포 생산성 극대화에 초점을 두고 연구를 진행하였다.

(2) 모델 수립

모델링에 사용된 가정은 다음과 같다.

(가) 산소는 충분한 교반과 통기에 의해 원활하게 공급되므로 영양분만이 유일한 속도제한기질로 작용한다:

본 연구에서 개발한 용존산소 농도 제어 알고리즘을 사용할 경우 용존산소농도를 원하는 수준으로 충분히 유지시킬 수 있으므로 모델식에서는 산소의 영향을 배제하였다.

(나) 혈청은 충분히 공급된다.

(다) 글루타민 농도가 세포 배양의 율속을 결정한다:

Vero 세포의 회분식 배양 결과 (이전의 연구결과 참조), 포도당 농도가 10 g/L까지는 세포 생장이 크게 차이 나지 않았고, 포도당에 의해 생성되는 노폐물인 락테이트 역시 위 농도까지는 과량 생산되지 않음을 알 수 있었다. 반면, 글루타민의 경우, 글루타민 분해로 생기는 암모늄 이온이 세포 생장은 물론, 백신 생산에도 큰 영향을 미치게 되므로 글루타민과 글루타민에 의해 생성되는 암모늄이온 농도를 모델에 반영하였다. 글루타민의 대사는 두 가지를 고려할 수 있는데, 첫째, 배양액 중에서 분해되어 암모늄으로 전환되는 대사와, 둘째, 세포에 의해 에너지원으로 사용되고 부산물로 암모늄을 생성하는 대사이다. 본 연구에서는 두가지 영향을 모두 모델에 반영하였으며, 배양액 중에서 일어나는 글루타민 분해와 세포에 의해 소모되는 글루타민 섭취는 모두 1차 속도식에 의해 표현된다고 가정하였다.

(라) 영양분의 소모 속도는 일정하다.

(마) 고정화 세포는 담체내에서 균일하게 성장한다:

앞 절에서 살펴본 바와 같이 Cultispher-G를 사용한 미립담체 배양에서 고정화배양으로 인한 확산저항은 무시할 만하였으므로 담체내에서의 균일 성장을 가정해도 될 것으로 판단되었다.

(바) 고정화세포로부터 떨어져 나온 유리현탁세포는 다른 담체로 빠르게 이동하거나 사멸되어 유리현탁세포의 농도는 무시할 만하다.

(사) Cultispher-G 담체의 최대 부하량은 1.18×10^9 cells/g-bead이다.

(아) 담체는 훌륭한 물리적인 강도를 지니고 있어서 교반에 의해 파쇄되지 않으며, 화학적으로도 안정하므로 배양중 분해되지 않는다.

① 비성장속도

Vero 세포의 비성장속도(μ)가 Monod kinetics를 따른다면 배지 중의 제한기질인 글루타민 농도를 이용하여 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\text{비성장속도 : } \mu = \frac{\mu_m G}{K_G + G} \quad (37)$$

미립담체에 부착되어 성장하는 Vero 세포의 경우 세포의 농도가 증가하면 담체의 세포 부하능과 물질전달 저항으로 인해 점차 비성장속도가 감소하게 된다. 또한, 글루타민에 의해 생성되는 암모늄 이온의 존재는 세포 성장에 악영향을 미치므로 위 (37)식을 아래와 같은 변형하였다.

$$\text{비성장속도 : } \mu = \frac{\mu_m G}{(K_G (\frac{X}{X_s}) + G) (1 + \frac{A^2}{K_A})} \quad (38)$$

② 세포사멸

배지내의 영양분이 고갈되거나 세포의 농도가 증가되어 비성장속도가 감소하면 Vero 세포의 viability는 감소하게 된다. 본 연구에서는 이러한 영향을 나타내기 위해 세포사멸 항을 모델에 첨가하였으며 그 식은 다음과 같다.

$$\text{세포사멸속도 : } k_d = 0.051 e^{-101.2\mu} \quad (39)$$

모델링에 사용한 매개변수들은 이전에 수행한 Vero 세포의 회분식배양에서 얻은 실험값들을 fitting하여 계산하거나 문헌값 들로부터 얻었다. Table 3-7에 모델링 매개변수들을 정리하였다.

Table 3-7. Lists of modeling parameters.

parameter	value	unit
μ_m	0.048	1/hr
K_G	0.15	mM
X_s	10^5	cells/mL
k_G	0.0048	1/hr
K_A	26	26mM^2
q_G	7×10^{-11}	$\text{mmol hr}^{-1}/\text{cell}$
q_A	5×10^{-11}	$\text{mmol hr}^{-1}/\text{cell}$

다) 전산모사에 의한 동물세포배양 kinetics 연구

(1) 세포 고정화 회분식배양에 의한 세포 생산

초기 글루타민 농도를 3 mM로 하여 세포 고정화 배양을 수행하였을 때의 전산모사 결과를 Fig 3.54에 나타내었다. Fig 3.54에서, 기호는 실험 데이터를, 실선은 모델 예측치를 나타낸다. 본 결과에 나타나듯이 모델이 Vero 세포 회분식 배양을 매우 정확하게 모사함을 알 수 있었다.

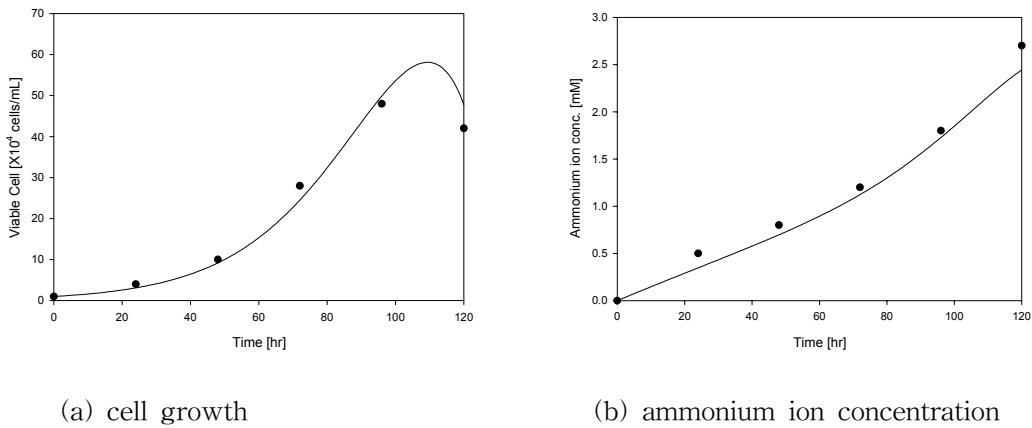


Fig 3. 54 Vero cell growth and ammonium production kinetics in batch culture.
(symbol: experimental data, line: estimated value by modelling)

(2) 초기 글루타민 농도에 따른 세포 성장 및 암모늄 이온 축적

글루타민에 의해 생성되는 암모늄이온이 세포 성장에 어떠한 영향을 미치는 살펴보기 위해 초기 글루타민 농도를 3 ~ 15 mM까지 변화시키면서 회분식배양을 전산모사하였다. Fig 3.55을 보면, 글루타민의 초기 농도가 6 mM를 넘으면 세포의 성장이 지체되고, 15 mM을 넘으면 성장이 거의 이루어지지 않음을 알 수 있다. 이러한 성장 저해는 40시간을 넘어가면서 확연히 드러나는데, 이 때 암모늄이온의 농

도는 각기 0.58 mM (3 mM), 1.10 mM (6 mM), 1.63 mM (9 mM), 2.15 mM (12 mM), 2.67 mM (15 mM)로서 암모늄이온의 농도가 2.0 mM을 넘으면 세포성장 저해가 일어남을 알 수 있다. 따라서 암모늄이온의 농도가 2.0 mM이 되었을 때 배지를 교환하여 세포의 성장이 지체되지 않으면서 지속적으로 성장할 수 있도록 반복회분식배양을 시도하였다.

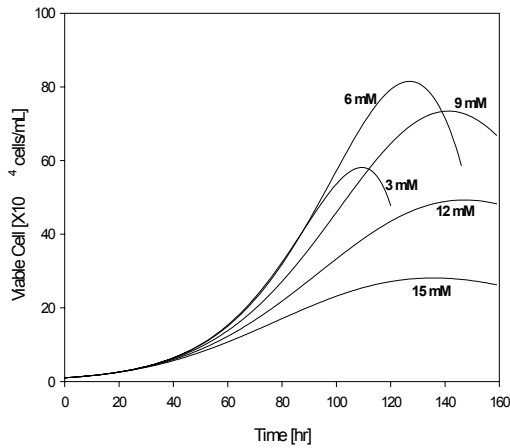


Fig 3. 55 Vero cell growth kinetics according to initial glutamine concentration in batch cultures.

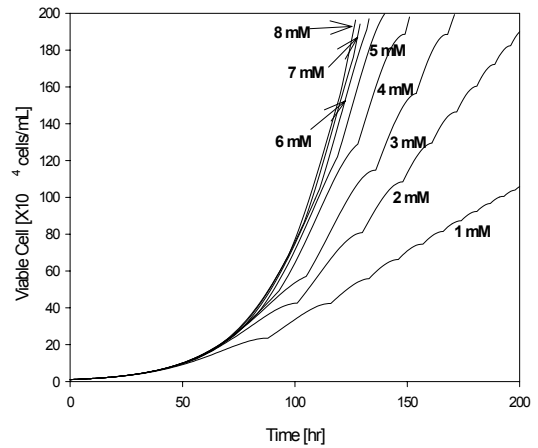


Fig 3. 56 Vero cell growth kinetics according to initial glutamine concentration in repeated fed-batch cultures.

(3) 반복회분식배양에 의한 Vero 세포의 고농도 배양

윗 절에서 암모늄이온의 농도가 2 mM을 넘으면 세포 성장 저해가 발생하며, 따라서 배양 중 암모늄이온의 농도가 2 mM을 넘었을 때 배지를 교환하여 암모늄이온의 농도를 적절히 유지하는 반복회분식배양이 효과적일 수 있음을 알 수 있었다. 반복회분식배양에서 주요한 설계 인자는 초기 글루타민 농도인데, 최적 글루타민 농도를 찾기 위해 초기 글루타민 농도를 1 ~ 8 mM로 달리 하며 반복회분식배양을 수행하였다.

Fig 3.56에 제시된 바와 같이 배지의 교환을 통해 암모늄이온에 의한 저해를 효과적으로 해결할 수 있음을 알 수 있다. 반복회분식배양을 통해 세포수 및 세포 생산성을 2.4배 향상시킬 수 있었다 (Table 3-8).

Table 3-8. Comparison of maximum Vero cell concentration and cell productivity between batch culture and repeated fed-batch culture.

operation mode	maximum cell concentration [$\times 10^4$ cells/mL]	cell productivity [$\times 10^4$ cells/mL/hr]	remarks
batch	81.50	0.64	initial glutamine concentration: 6 mM
repeated fed-batch	196.26	1.55	initial glutamine concentration: 8 mM numbers of repaeated fed-batch run : 4회

(4) 유가식배양에 의한 Vero 세포 배양

미생물을 이용한 산업적 발효 공정에서 유가식배양 공정이 이용되고 있다. 유가식배양은 특히 기질 저해나 catabolite repression이 있는 공정에 효과적이다. 본 연구의 Vero 세포 배양 공정 역시 글루타민 농도가 높을 경우 암모늄이온이 과도하게 생성되어 세포 성장을 저해하는 현상이 발생하므로 회분식배양만으로는 충분한 성과를 거둘 수 없으며, 이는 앞 절의 전산모사 결과로부터 다시 확인할 수 있었다.

유가식 세포배양에서 시간에 따른 최적의 기질 공급속도식을 구하고자 할 때에는, 조작변수인 기질 공급속도가 목적함수인 생산량에 선형적인 관계를 가지게 되어 profile optimization에 널리 사용되는 Pontryagin의 maximum (minimum) principle로는 해를 얻을 수 없는 구간이 생기게 된다. 이러한 singular problem을 해결하기 위해 많은 시도가 이루어져 왔으나, 대부분 문제의 복잡성으로 과도한 계산량이 필요하여 실질적인 적용이 이루어지지 않고 있는 실정이다. 본 연구에서는 글루타민 농도를 여러 범위에서 제어하면서 Vero 세포 성장을 극대화할 수 있는 유가식배양을 전산모사하였다.

Vero 세포 배양에서 배양액내 글루타민 농도를 일정하게 유지한다면 기질에 대한 물질수지식은 다음과 같이 생각할 수 있다.

$$\frac{dG}{dt} = \frac{F}{V}(G_F - G) - k_G G - q_G X = 0 \quad (40)$$

따라서 이 때 기질공급속도는

$$F = \frac{(k_G G + q_G X)V}{G_F - G} \quad (41)$$

전산모사에 사용한 여러 매개변수들과 환경조건을 Table 3-9에 나타내었다.

Table 3-9. Modelling parameters used in fed-batch cultures.

X_0 [$\times 10^4$ cells/mL]	1
G_0 [mM]	3
V_0 [L]	1 L
V_f [L]	2 L
F_{max} [L/hr]	0.01 L/hr
G_F [mM]	50

생물반응기내에 글루타민 농도가 낮게 유지될 때는 충분한 세포 성장이 이루어지지 않게 되고, 너무 높게 유지될 때는 암모늄이온의 축적에 의해 세포 성장이 저해되므로 최적 글루타민 set point를 찾는 것이 중요하다. 따라서 배양기내의 글루타민 농도를 1 mM ~ 15 mM로 조절하면서 유가식배양시 최적 글루타민 농도를 찾고자 하였다. Fig 3.57을 보면 배양기내 글루타민 농도가 7 mM까지는 글루타민 농도가 올라갈수록 세포 생산성이 좋아지나, 그 후 오히려 생산성이 감소하는 것을 확인할 수 있다. 유가식배양과 회분식배양의 성능을 Table 3-10에 정리한 결과, 유가식배양을 통해 세포수는 1.58배, 세포 생산성은 1.31배 향상시킬 수 있음을 알 수 있었다.

글루타민 set point를 7 mM로 조절하였을 때 배양 profile을 Fig 3.58에 나타내었다. 유가식배양에 의해 생산성을 크게 증진시킬 수 있었으나, 본 시스템에서 유가식배양의 적용에는 다소 한계가 존재한다. 글루타민의 존재시, 노폐물인 암모늄이온의 생성을 완전히 막을 수 없고, 암모늄이온은 세포에 의해 대사되지 않으므로 결국 배양기내에 계속 축적된다. 즉 암모늄이온의 제거가 이루어지지 않을 경우 생산성 향상에는 한계가 있을 수밖에 없다. 따라서 세포가 충분히 성장할 수 있는 글루타민 농도를 유지

하면서 암모늄이온의 동시 제거가 가능하게 되어, 최적의 배양환경을 유지할 수 있는 perfusion 배양 방식이 고정화 Vero 세포 배양에 가장 적합한 시스템일 것으로 판단되었다.

Table 3-10. Comparison of maximum Vero cell concentration and cell productivity between batch culture and fed-batch culture.

operation mode	maximum cell concentration [$\times 10^4$ cells/mL]	cell productivity [$\times 10^4$ cells/mL/hr]	remarks
batch	81.50	0.64	initial glutamine concentration: 6 mM
fed-batch	128.89	0.84	initial glutamine concentration: 3 mM glutamine set point : 7 mM

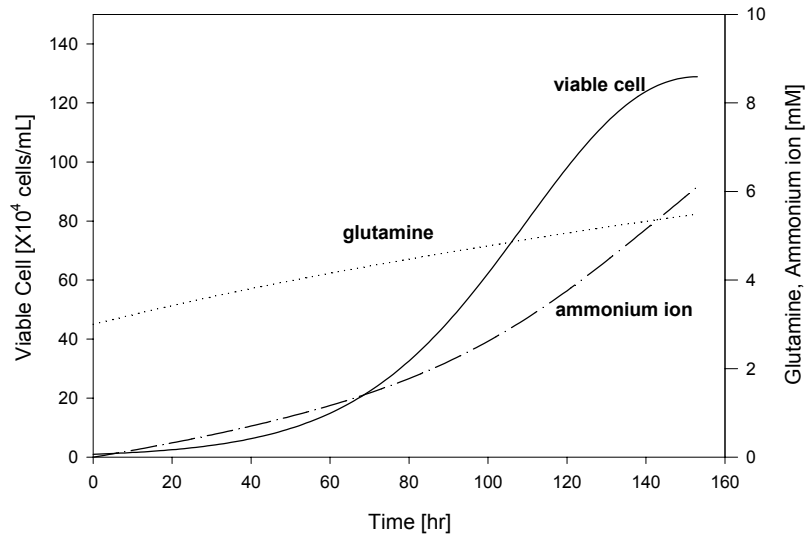


Fig 3. 58 Concentration of profiles of vial cells, glutamine and ammonium ion in fed-batch culture ($G_{set} = 7$ mM).

(5) perfusion 배양에 의한 Vero 세포 배양

Perfusion 배양에서 세포와 기질, 노폐물의 물질수지식은 아래와 같이 나타낼 수 있다.

(가) 세포성장 :
$$\frac{dX}{dt} = (\mu - k_d)X \quad (42)$$

(나) 기질소비 :

글루타민 :
$$\frac{dG}{dt} = \frac{F}{V}(G_F - G) - k_G G - q_G X \quad (43)$$

(다) 노폐물 생산 :

암모늄 :
$$\frac{dA}{dt} = k_G G + q_A X - \frac{F}{V} A \quad (44)$$

회분식배양 결과 암모늄이온 농도가 2 mM을 넘을 경우 세포 성장이 저해되었으므로, 암모늄이온 농도를 2 mM로 유지하기 위한 희석속도 D 는 (44)식으로부터 유도될 수 있다.

$$\frac{dA}{dt} = k_G G + q_A X - \frac{F}{V} A = 0 \quad (45)$$

$$\therefore \frac{F}{V} = D = \frac{(k_G G + q_A X)}{A}$$

희석속도를 0.002 ~ 0.01 hr⁻¹로 바꿔주며 perfusion 배양을 수행하였다. 전산모사에 사용한 조건들은 Table 3-11에 제시하였으며, 각 희석속도에 따른 Vero 세포 생산성을 Fig 3.59에 나타내었다. Fig 3.59에서 알 수 있듯이 perfusion 배양에서는 충분한 글루타민 농도와 적절한 암모늄이온 농도를 동시에 만족시킬 수 있으므로 높은 생산성을 얻을 수 있다.

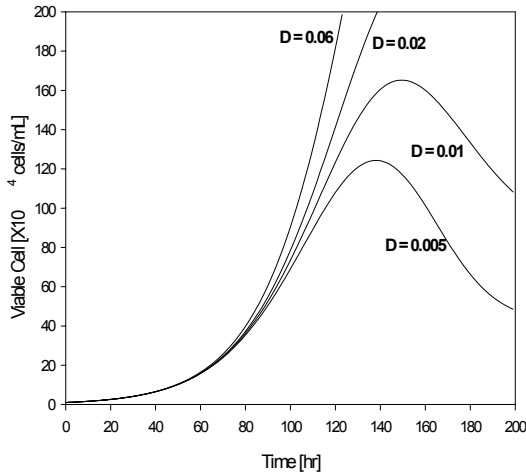


Fig 3. 59 Vero cell growth kinetics according to dilution rate (D).

Table 3-11. Modelling parameters used in perfusion cultures.

X_0 [$\times 10^4$ cells/mL]	1
G_0 [mM]	3
V_0 [L]	1 L
D [1/hr]	0.002 - 0.01
G_F [mM]	10

각 조업모드에 따른 생산성을 Table 3-12에 정리하였다. Perfusion 배양은 세포가 부착된 담체와 배양액을 연속적으로 분리할 수 있는 세포 분리장치가 필요하나, 반복회분 배양은 부가적인 장치가 필요 없이 세포를 가라앉힌 후 배지를 교체하면 되므로 조업의 수월성 측면에서 보았을 때 효과적인 수 있다.

Table 3-12. Maximum Vero cell concentration and cell productivity obtained according to various operation modes in cell cultures.

operation mode	maximum cell concentration [$\times 10^4$ cells/mL]	cell productivity [$\times 10^4$ cells/mL/hr]	remarks
batch	81.50	0.64	initial glutamine concentration: 6 mM
fed-batch	128.89	0.84	initial glutamine concentration: 3 mM glutamine set point : 7 mM
repeated fed-batch	196.26	1.55	initial glutamine concentration: 8 mM numbers of repaeated fed-batch run: 4회
perfusion	198.52	1.62	dilutaion rate : 0.06 hr ⁻¹

본 연구에서는 혈청에 의한 효과나, 기타 미량 영양소의 영향은 살펴보지 못하였다. 또한 백신생산 공정 모델링과 최적화 역시 궁극적으로 필요하리라 생각된다. 이러한 부분들이 보완된다면, Vero 세포에 의한 NCD 백신 생산은 물론, 다양한 동물 백신과 인간 백신, 치료용 단백질 의약품 생산에도 본 연구를 통해 얻어진 know-how를 효율적으로 적용할 수 있을 것으로 기대된다.

14) 백신생산을 위한 동물세포배양공정 자동화시스템 적용

상기의 모델 세포주로 확립한 자동화 배양시스템이 실제 고정화 배양공정에 훌륭하게 적용되는 것으로 판명되어, 이제는 실제로 이 공정을 microsparging aeration system과 거품제거시스템을 부착한 동물 세포 생물반응기에 적용시켜 백신을 효과적으로 생산하고자 하였다. 이렇게 구축된 동물세포배양공정 자동화 시스템을 이용하여 제 1세부과제에서 생물반응기에서 백신 생산을 수행하였다.

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 목표달성도

1. 협동과제: 뉴캐슬병 백신의 효율적 생산을 위한 고생산성 동물세포주의 개발

1) 1차년도: 세포주 및 바이러스주 확립

당해연도 추진계획	진척도 (%)
<ul style="list-style-type: none"> - 세포주 기탁 기관으로부터 동물세포주 확보 - 수정란으로부터 primary 세포주 확보 - 뉴캐슬병 백신용 바이러스주 확보 - 확보된 세포주들의 ND 백신 생산능 조사 	<p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p>

2) 2차년도: 세포주 개량 및 우수 세포주 선별

당해연도 추진계획	진척도 (%)
<ul style="list-style-type: none"> - 형질전환을 이용한 세포주의 개량 - 형질전환 세포주의 ND 백신 생산성 조사 - 우수 형질전환 세포주 선별 - 선별된 세포주 Characterization - 우수 세포주의 다양한 동물백신 생산성 조사 	<p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p>

3) 3차년도: 재조합 세포주 개발 및 Super 세포주 선발

당해연도 추진계획	진척도 (%)
<ul style="list-style-type: none"> - 세포 대사조절을 통한 우수 재조합 세포주 개발 - 재조합 세포주의 백신 생산성 조사 - 최우수 뉴캐슬병 백신 생산 세포주 선발 - 최우수 세포주 Characterization 	<p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p>

2. 제1세부과제: 고농도 동물세포 배양을 이용한 뉴캐슬병 백신의 최적 생산 전략 개발

1) 1차년도: 고농도 동물세포 배양 시스템 구축 및 운전 전략 확립

당해연도 추진계획	진척도 (%)
- 영양물질 소모 및 노폐물 생산 kinetics	100
- 영양물질 및 노폐물에 대한 세포 민감성 조사	100
- 배지의 최적화	100
- 미립담체 선정 및 최적 고정화 방법 개발	100
- 최적 배양 조건 확립	100
- 고농도 세포 배양 시스템 확립	100
- 고농도 배양을 위한 최적 운전 전략 확립	100

2) 2차년도: 고 생산성 뉴캐슬병 백신 생산 시스템 구축 및 운전 전략 확립

당해연도 추진계획	진척도 (%)
-영양물질 소모 및 노폐물 생산 kinetics	100
-생산 배지의 최적화	100
-최적 생산 조건 확립 (최적 MOI,감염시기)	100
-첨가제 최적화 연구	100
-최적 바이러스 생산 시스템 구축	100
-최적 운전 전략 확립	100

3) 3차년도: 고농도 동물세포 배양 및 뉴캐슬병 백신 생산 공정 최적화

당해연도 추진계획	진척도 (%)
- 고농도 동물세포 배양 공정과 백신 생산 공정의 병합	100
- 연속식 및 유가식 시스템 개발	100
- 운전 변수의 최적화	100
- 설계인자 도출	100
- 생산 백신 안정성 검사 및 현장 실험	

3. 재2세부: 고농도 동물세포 배양을 이용한 뉴캐슬병 백신의 최적 생산 전략 개발

1) 1차년도: 생물반응기에서의 고농도 동물세포 배양을 위한 scale-up 전략 확립

당해연도 추진계획	진척도 (%)
- 생물반응기 scale-up 전략 확립	100
- 단위세포당 뉴캐슬병 백신 생산농도의 극대화를 위한 배양조건 조사	100
- 생산세포주의 shear sensitivity를 고려한 용존산소 자동조절 공정 확립	100
- 고정화세포배양에 적합한 생물반응기 탐색	100

2) 2차년도: 뉴캐슬병 백신 대량 생산을 위한 배양공정의 자동 계측/제어 기술 확립

당해연도 추진계획	진척도 (%)
- 고정상 세포주의 대사 특성 조사	100
- on-line 가스분석기를 이용한 세포의 배양생리학적 특성에 대한 조사 및 뉴캐슬병 백신 생산공정에의 적용	100
- 생물반응기의 산소전달율의 on-line 분석을 통한 최적 배양 조건 조사 및 생물반응기 설계	100
- 유해 부산물 최소 배출 공정 확립	100

3) 3차년도: 고농도 동물세포 배양 및 뉴캐슬병 백신 대량생산 공정 확립

당해연도 추진계획	진척도 (%)
- on-line 가스 분석과 연계된 탄소원 제한조건의 유가식 배양 공정 확립	100
- 고정상 세포연속배양 공정 개발	100
- 최적 공정운영을 위한 공정변수들의 최적 제어 기술 확립	100
- 전 공정의 flow sheet analysis를 통한 배양공정 scale-up	100

제2절 관련 분야에의 기여도

- 본 연구에서 확립된 형질전환을 이용한 세포주의 개량 방법은 고생산성 숙주 동물세포주의 개발을 통해 단위세포 당 바이러스 생산성 증대를 달성하기 위한 핵심 기술이며, ND 뿐만 아니라 다양한 동물 또는 인간바이러스 백신 세포주의 개발에 활용될 수 있다.
- 암모늄 이온의 동시제거, 세포사멸 방지제의 도입, 유가식 배양 등 종합적 고농도 배양 전략의 확립을 통해 구축한 새로운 고농도 동물세포 배양 시스템은 단위 생물반응기 당 세포수를 증진시킬 수 있는 획기적인 방법으로 바이러스 백신 생산뿐만 아니라 단일클론항체, 치료용 단백질 등의 고부가가치 유용 생물의약품의 생산에도 범용으로 활용될 수 있다.
- 백신 생산 운전 변수의 최적화 기법뿐만 아니라 암모늄 이온의 동시 제거, 유가식 배양 등을 통해 확립한 새로운 개념의 바이러스 생산용 고효율 생물 반응기 시스템은 단위 생물반응기 부피 당 바이러스 생산성을 증대시킬 수 있는 최적의 바이러스 생산 시스템으로서 여러 동물 또는 인간 백신의 생산뿐만 아니라 유전자치료 용 전달체의 대량 생산에도 활용될 수 있다.
- 본 연구에서 확립한 백신 생산 공정의 자동화는 작업공간과 인건비를 절약할 뿐만 아니라 배양환경을 정밀 조절함으로써 고농도 동물세포배양이 가능하게 하여 백신의 경제성을 증대시킬 수 있는 핵심기술이다. 또한 이러한 동물세포 배양용 생물반응기 제어기술 확립을 통해 대규모 동물세포배양용 생물반응기 운전기술의 산업적 적용이 가능하게 되어 동물 또는 인간 백신뿐만 아니라 재조합 단백질 의약품 등 다양한 제품에 대한 산업계 기술 기반이 갖추어질 수 있다.
- 결론적으로 본 연구에서 확립된 자동화 고정화 생물반응기에서 고농도 동물세포배양을 통한 최적 ND 백신 생산 시스템 확립을 위한 핵심 요소 기술 및 scale-up 기술은 기존의 수정란에 의한 뉴캐슬병 백신 생산 방법 보다 효율적이고 경제적이며 환경문제가 적은 새로운 뉴캐슬병 백신의 생산 방법으로 ND 백신뿐만 아니라 다양한 동물 또는 인간 바이러스 백신의 생산에 활용될 수 있다.
- 본 연구를 통해 개발된 새로운 자동화 고농도 동물세포 배양 공정에 의한 고생산성 동물백신의 생산 공정이 산업화 될 경우 생산성의 증가, 비용절감, 오염 감소 등의 공정상의 효율성으로 인하여 산업 경쟁력을 갖출 수 있다. 현재 우리 나라 전체 동물백신의 시장이 약 400억 원이며 그 중에서 닭에 특이하게 발병하는 뉴캐슬병백신의 국내 시장은 약 45억 원임을 고려할 때 본 공정의 산업화에 따른 경제적인 효과는 실로 막대할 것으로 예상된다.
- 개발된 공정의 산업화는 백신 생산비의 획기적 감축으로 이어지며, 이에 따라 동물들의 질병을 예방하는 백신을 값싸게 축산 농가에 공급함으로써 동물사육 농가의 경쟁력의 향상이 기대된다.

제 5장 연구개발 결과의 활용계획

1. 추가 연구의 필요성

생산 백신의 안정성 검사 및 현장 실험은 많은 경비 및 시간이 소요되므로 참여기업인 (주)에스티알바이오텍에 기술이전한 후에 참여기업에서 실시하는 방향으로 추진 중이다.

2. 타 연구에의 응용

- 생물반응기에 의한 대규모 동물세포 배양을 통해 뉴캐슬병 백신 생산이 상업화되었을 때 이 기술은 동물 백신뿐만 아니라 여타 인간 백신생산에 그대로 적용될 수 있으므로 해외시장을 포함하는 막대한 규모의 백신시장에 물량을 효율적으로 공급할 수 있다.

- 본 연구에 의해 축적된 자동화 고농도 동물세포배양 공정의 know-how는 동물백신 이외에도 기존 동물세포 배양에 의해 생산되고 있는 인간 백신 및 단일클론항체, 치료용 단백질 등의 고부가가치 유용 생물약품들의 국내 개발에도 적용이 되어서 가격 경쟁력 확보가 가능하며 이들 제품군들의 국내 생산을 앞당길 수 있다.

3. 기업화 추진 방향

- 참여 기업체인 (주)에스티알바이오텍에 기술이전 한 후에 (주)에스티알바이오텍에서 수의과학검역원에 안정성 검사 및 현장 실험을 의뢰하여 제품 승인을 획득하고, GMP 시설을 갖춘 제3의 산업체와 공동으로 산업화 시켜나갈 예정이다.

제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 백신 제품의 해외 개발 동향

1) 기존 백신에 대한 개량형 백신개발

(1) 개량형 백신

소아마비 백신의 경우 경구용이 성공적으로 사용되었으나 최근 백신 접종으로 인한 부작용이 보고되면서 1999년부터 독일과 미국은 사독 백신인 IPV로 전환하였다. 그러나 IPV의 낮은 면역 유도능 때문에 IPV/OPV 복합 백신 프로그램을 도입하고 있으나 IPV의 방어면역 때문에 OPV의 면역이 효과적으로 유도되지 못하는 문제가 있어 이를 해결하기 위해서 OPV의 면역 유도능을 가지면서도 안전한 재조합 OPV의 개발 등이 시도되고 있다.

(2) 면역 보강제 (Adjuvant) 개발

기존 백신에 안전하고 면역력을 보강한 새로운 형태의 백신으로의 개량이 연구되고 있는데, 백신의 면역반응에 있어서 면역 증강제 (Adjuvant)의 사용은 매우 중요한 것으로 알려져 있고, 새로운 면역 증강제에 대해서도 매우 활발히 연구되고 있다. 현재 FDA에 등록된 면역보강제는 Alum이 유일한 것으로 새로운 천연물, 합성 화합물을 소재로 한 면역 보강제, Lymphokine, Cytokine, Costimulatory Molecules와 같은 Molecular Adjuvants, Conjugation의 연구가 진행 중에 있다.

(3) Conjugate vaccines 개발 연구

면역원성이 없는 당 (polysaccharide) 항원을 항원성이 높은 단백질에 결합 (conjugation)시켜 항원 특이 T cell 면역을 유도하는 방법으로 헤모필러스 인플루엔자 백신이 개발되었으며, typhoid, shigella, ETEC 등의 백신 개발에 적용되고 있다.

(4) 혼합백신 (combined vaccines) 개발 연구

기존에 개발되어 사용하고 있는 여러 종류의 백신들을 혼합하여 한번의 접종으로 여러 가지 질병을 동시에 예방하는 방법이다. 그러나 각 백신마다 접종 시기, 접종 방법 등이 상이하여 해결해야 할 과제로 남아 있다.

(5) 식용 백신 (Plant edible vaccine);

재조합 백신의 안전성과 경구백신의 접종에 있어서의 수월성과 효용성을 접목시킨 식물체를 이용한 경구백신이라는 새로운 백신기술이 제안되고 있는데, 이 기술의 기본 원리는 항원유전자를 식물에 형질 전환 시키거나 식물 바이러스에 발현시켜 식물체에서 합성하는 백신단백질을 식품을 섭취하듯이 경구투여를 시행함으로써 면역반응을 유도하는 것이다.

식물경구백신 기술은 접종의 수월성이 중요시되는 소아용 백신, 질병이 소화기 계통에 국한되어 있는 전염성 질병, 보건의료 시설 및 인력이 확보되지 않아 백신의 보관 및 접종이 어려운 후진국, 그리고 백신의 접종비용이 경제성과 밀접한 연관이 있는 축산업의 경우에 아주 유용할 것으로 판단되고 있음. 그동안의 연구로 현재 일부 식물체에서 발현된 항원은 동물실험에서 면역반응을 유도하는 것이 확인되었고 임상시험 진행 중이다.

(6) 분무용 백신

폐, 코, 입, 장, 비뇨기계통의 점막세포의 수용체를 통해 항원이 면역세포에 전달되게 하여 면역을 유도하는 방법으로 면역반응을 보다 안전하고 효과적으로 일으킬 수 있어 많은 연구가 진행되고 있다. 현재는 코에 분무하는 형태의 비강 흡수형 약독 Flu 예방백신이 개발되어 곧 시판될 예정이다. 이렇듯

점막면역을 유도하는 경구용 백신의 개발은 가장 이상적인 차세대 백신으로 주목받고 있다.

2) 점막 면역용 백신 개발

(1) Live vector-based vaccine;

Poliovirus Sabin 주나 enteric virus처럼 호흡기나 소화기 계통의 점막에 감염되며 기존에 이미 백신으로 사용되고 있어 안전성과 점막면역 유도능이 검증된 virus 나 장내세균을 백신 개발의 벡터로 개발하고 여기에 백신 유전자를 도입하여 재조합 생백신으로 개발하는 방법으로 이 재조합 백신을 투여하면 감염 부위에서 도입한 백신 유전자에 대해 점막면역을 효과적으로 유도 할 것으로 기대된다. 또한 국부적으로 면역이 유도되어도 점막면역의 특성상 모든 점막에 동일한 면역이 전파되어 점막을 통해 들어오는 병원균을 초기에 차단 할 수 있다. 점막면역 유도용 백신은 또한 효과적으로 전신면역을 유도하는 것으로 알려져 있어 점막에서 제거되지 않은 잔여 병원균은 2차 감염시 유도된 전신면역에 의해 제거된다.

(2) 점막면역 유도용 Adjuvant를 이용한 백신개발;

Cholera Toxin이나 *E. coli*의 Exotoxin 같은 점막면역용 항원을 사용할 경우 IL-2 생성과 그에 따른 세포증식이 저지되는 반면 IL-4 생성은 영향을 받지 않아 세포증식이 촉진되고 결과적으로 임파구 숫자의 불균형은 여러 다른 항원에 대한 점막면역을 증가시켜 주게 된다.

(3) Microencapsulation 방법을 이용한 점막면역 백신 개발;

항원을 microencapsulation하여 투여하므로 항원이 소화기관을 지날 때 파괴되는 것을 막아주고 장점막에서 흡수효과를 높여 주므로 효과적으로 점막면역을 유도하는 방법으로 이는 백신의 접종횟수를 줄이는 효과적인 방법이다.

3) DNA 백신

1993년 Science지에 처음 세상에 알려진 방법으로 항원을 coding하는 유전자 (naked DNA)를 백신으로 사용하는 것으로 인플루엔자, 말라리아 등 여러 종류의 질병에 있어서 우수한 방어 효과를 나타냄으로서 현재 각광을 받고 있다.

이 백신은 CTL을 잘 유도하면서도 위험성이 적기 때문에 기존의 백신으로는 예방이 어려운 에이즈, 암, C형 간염 등에 대한 이상적인 차세대 백신으로 주목을 받고 있다. 만일 이 DNA 백신이 성공적인 백신으로 자리를 잡게되면 기존의 백신에 비하여 생산의 단순성, 저렴성, 보관의 편리성등 많은 장점이 있다.

1996년 미국 식품의약국 (FDA)에서 임상실험을 허가, 현재 에이즈 바이러스(HIV)를 비롯한 천식, B형 간염, 말라리아, 독감, 암에 대한 임상실험이 진행되고 있다. 그러나 효과적으로 면역을 유도하기 위해서는 DNA 접종 후 반듯이 순수분리한 단백질로 boosting 하여야 하는 문제점이 있다.

2. 동물세포배양 기술 관련 해외기술 동향

1) 동물세포관련 시장

현재 세계 제약시장의 규모는 2800 억달러를 상회하고 있으며, 이 중 재조합 단백질 분자의약품 산업 시장은 130 억달러 수준에 미치고 있다. 그러나 EPO, CSF, 백신, 단일클론 항체를 비롯한 각종 재조합 단백질 분자의약품의 개발 및 제품화로 그 시장 규모가 급속히 확대되고 있다. 이 중에서 동물세포 배양으로 생산되는 제품은 생물의약품의 70% 이상을 차지하고 있으며, 향후 지속적으로 증대될 것으로 예상되고 있다. 21세기 미국 생명공학시장 전망에 의하면, 2000-2010년에는 연평균 12%의 성장률이 예측되며 2010년도 생물의약품 시장규모는 500억 달러에 이를 것으로 예상되며, genome project가 완결되어 감에 따라 유용단백질을 생산하기 위한 숙주로서 동물세포주의 수요가 급증할 것이다.

현재 전세계적으로 동물세포 대량배양 시스템의 총 용량은 425,000L로 추정되나, 수요의 증가로 향후 4-5년 뒤에 꾸준히 증설될 것으로 예상되어 2006년에는 전체적으로 1,490,000L의 생산 용량이 될 것으로 예측된다. 하지만 증설시 3-5년의 시간이 요구되고, 총 자본 소요가 50억달러에 이르며, 이 정도의 규모의 plant들을 가동하는 데 필요한 인적자원의 확보도 불가능하기 때문에 계속적인 동물세포 대량배양 시스템의 용량 부족이 예측된다. 현재에도 1,000,000L 정도의 shortage는 가지고 있는 상황이기 때문에 새로운 plant의 설치보다는 생산효율을 증가시키고, 자동화를 통한 공정효율 개선, 공정개선을 통한 생산성 제고 등을 통해 문제를 해결하는 방향으로 나가는 것이 세계적인 추세이다.

2) 세포주 개발 기술

virus vaccine 생산에는 diploid human cell strain들이 주로 이용되어 왔으나 이후 재조합 단백질 분자의약품 생산에는 CHO, BHK 등과 같은 동물 세포주들이 이용되고 있다. 산업용 숙주 세포주는 우선 유전자 cloning에 필요한 유전적 정보와 발현 벡터들이 개발되어 있어야 하고 높은 발현율과 함께 발현 단백질의 전사 후 변형이 올바르게 수행되어야 하며, 외래 virus 등과 같은 biohazard가 없어야 한다. 선진국에서는 자신들이 이용하는 동물 세포주를 독자적으로 개발하여 사용하고 있으며, 이는 특허문제, 단백질 발현문제, 세포주 검증 문제들을 확실히 해결하기 위한 방안이다.

단백질 유전자의 효율적인 발현을 위해서 스크리닝이 용이하며 세포내에서 유전자의 수를 용이하게 향상시킬 수 있게 하는 유전자 전달 벡터에 대한 연구도 다각적으로 진행하고 있다. 이에 따라 새로운 유전자 발현 체계, 염색체내 삽입 및 mRNA와 plasmid 안정화 기술 등이 중요하게 대두될 것으로 예상되고 있다.

또한 대사공학 모델 및 bioinformatics를 이용하여 주요 대사 관련 유전자를 조작함으로써 생화학적 대사경로를 조절하여 보다 발현량이 많고, 세포 성장이 빠르며, 배지 소모량을 줄일 수 있는 발현체제와 세포주의 개발이 진행되고 있다.

한편 세포주기에 대한 연구, 향상된 promotor, enhancer 및 증폭 체계, 전사후(post-translational)과정을 조절하는 획기적인 방법의 개발이 진행될 전망이다.

무혈청배지의 사용이 점점 요구되고 있기 때문에 무혈청 배지에서의 생산이 향상된 새로운 세포주의 개발이 추진되고 있으며, 이와 동시에 생물반응기에서의 배양이 용이하도록 현탁배양에 잘 적응하는 세포주의 개발이 활발히 진행되고 있다.

3) 배양 기술

특히 동물유래의 단백질, 펩타이드 등 관련 물질들을 함유하지 않는 무단백질 배지의 개발이 세계적 추세이며 세포배양용 배지와 배지 첨가물, 혈청 및 무혈청 배지 등도 거의 대부분 선진국들에 의해 공급되고 있으며 연간 세계시장 규모는 10억불 정도이나 향후 동물세포 배양산업이 빠른 속도로 증가할 것을 감안하면 앞으로 상당히 큰 시장이 형성될 것으로 전망되어 무혈청 배지를 중심으로 한 배지 개발이 계속 진행되고 있다. 특히 1996년 이래 광우병의 발병에 따른 우려가 확산되기 때문에 무혈청 배지의 개발 시 동물유래 원료를 배제하고 있으며, 무혈청, 무단백을 넘어 조성과 농도를 모두 정의할 수 있는 chemically defined 배지를 목표로 개발되고 있다.

동물 세포 배양용 배지의 또 다른 개발 경향은 기존의 부착성 세포의 현탁배양을 용이하게 하는 배지 개발이 활발히 이루어지고 있다. 왜냐하면 주로 연구단계에서는 부착성으로 배양하다가 생산 단계에서는 생물반응기에서의 배양 용이성 때문에 현탁배양을 하게 되기 때문이다. 이들 세포의 현탁배양은 대부분의 경우 배지 적응 과정이 필요한 것이 일반적이며 전통적인 방법으로는 6개월 가량이 소요되나, 최근에는 이러한 장기간의 배양에서 오는 개발 단계의 위험성에서 벗어나기 위해서 적응기간을 현저히 줄이면서도 고농도 배양이 가능한 현탁배양 배지를 활발히 개발하고 있다.

한편 동물세포 배양장치 산업은 대체로 선진국들이 독점하고 있으며 일반적인 회분식 배양장치 보다

는 perfusion 배양과 같은 고농도 배양장치와 hollow fiber를 이용한 간편한 배양장치를 선호하고 있다. 세포 배양장치 외에도 유가식이나 perfusion 고농도 배양같이 다양한 배양방법에 관한 연구도 활발히 수행되고 있다. 이를 위해 다양한 탄소원을 이용한 fed-batch 방법, ammonia 감소 연구, sodium butyrate titration, acoustic perfusion, expanded-bed adsorption 등 여러 가지 다양한 배양 방법의 개발 연구가 활발하게 진행되고 있다.

3. 동물백신 관련 해외기술 동향

동물백신의 경우에도 인간백신의 개발 방향과 거의 개발동향이 일치하며 그 생산방식도 동물세포배양기술의 개발 동향을 따르고 있다. 즉 재조합 subunit 등의 개량형 백신, 면역 보강제 (adjuvant) 개발, conjugate백신, 식물경구백신, 분무형 백신뿐만 아니라 최근에는 돼지 PEDV/TGE 등 혼합 백신의 개발이 활발하게 진행 중이다. 또한 PEDV/TGE 등 장에 관련된 동물백신의 경우 microencapsulation을 이용한 점막면역 백신 등 새로운 방법들이 시도되고 있으며, DNA 백신등도 연구되고 있다.

한편 현재 미립담체 동물세포배양시스템을 이용하여 생산하고 있는 구제역(foot-and-mouth disease) 백신 등의 백신들도 면역 부반응을 줄이기 위한 무혈청 배지를 사용하는 방향으로 연구가 진행되고 있으며 미립담체의 단점을 보완하기 위해 현탁배양 적응 세포주 개발도 시도되고 있다. 그 외에 유가식 배양 등 고농도 세포 배양을 통한 동물백신 생산 시스템의 개발이 한창 진행 중이다.

제 6장 참고문헌

가. 제1 세부과제

- Batt, B. C. and Kompala, D. S. 1989, A structured kinetic modeling framework for the dynamics of hybridoma growth and monoclonal antibody production in continuous suspension cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, 34:515-531.
- Beale, A. J. 1992. The production of viruses for human vaccines from animal cells in culture. In: Spier, R. E. and Griffiths, J. B. editors. *Animal cell biotechnol.* Oxford, U. K.: Butterworths Publishers: Vol. 5, p 189-200.
- Butler, M., Imamura, T., Thomas, J., Thilly, W. G. 1983, High yields from microcarrier cultures by medium perfusion. *J Cell Sci.*, 61:351-363.
- Butler, M. and Spier, R. E. 1984, The effects of glutamine utilization and ammonia production on the growth of BHK cells in microcarrier cultures. *J. Biotechnol.*, 1:187-196.
- Charles, L., Crespi and William, G. Thilly. 1981, Continuous cell propagation using low-charge microcarriers. *Biotech. Bioeng.*, 13:983-993.
- Commo Chevalier, M. J., Robert Gailiot, B. and Chany, C. 1978, Effects of ammonium salts on the interferon-induced antiviral state in mouse L cells. *J. Gen. Virol.*, 41:541-547.
- Dalili, M., Sayles, G. D. and Ollis, D. F. 1990, Glutamine-limited batch hybridoma growth and antibody production experiment and model. *Biotechnol. Bioeng.*, 36:74-82.
- Doyle, C. and Butler, M. 1990, The effect of pH on the toxicity of ammonia to a murine hybridoma. *J Biotechnol.*, 15:91-100.
- Eaton, M. D. and Scala, A. R. 1961, Inhibitory effect of glutamine and ammonia on replication of influenza virus in ascites tumor cells. *Virology.*, 13:300-307.
- El-Karamany R. M. 1987, Production in Vero cells of an inactivated rabies vaccine from strain FRV/K for animal and human use. *Acta Virol.*, 31:321-328.
- Frank J. Fenner, E. Paul J. Glbbs, Frederick A. Murphy, Rudolf Rott, Michael J. Studdert, and David O. White. 1993, *Veterinary virology.*, Second Edition.
- Giard, D. J., Thilly, W. G., Wang, D. I. C. et al. 1977, Virus production with a newly developed microcarrier system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 34:668-672.
- Glacken, M. W., Fleischaker, R. J. and Sinskey, A. J. 1986, Reduction of waste product excretion via nutrient control: possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 28:1376-1389.
- Glacken, M. W., Adema, E. and Sinskey, A. J. 1988, Mathematical descriptions of hybridoma culture kinetics: 1. Initial metabolic rates. *Biotechnol. Bioeng.*, 32:491-506.
- Ito, M. and Mc Limans, W. F. 1981, Ammonia inhibition of interferon synthesis. *Cell Biol. Int. Rep.* 5:661-666.
- Jensen, E. M. and Liu, O. C. 1961, Studies of inhibitory effects of ammonium ions in several virus-tissue culture systems. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 107:834-838.
- Jeong, Y. H. 1992, Increase of cell density and monoclonal antibody productivity by in situ removal of ammonium ion from hybridoma cell culture media. Ph. D. Thesis, Rutgers University, U.S.A.
- Jeong, Y. H. and Wang, S. S. 1995, Role of glutamine in hybridoma cell culture: Effect on cell growth, antibody production and cell metabolism. *Enzyme and Micorbial Technol.*, 17:47-55.
- Lee, K. W., Kim, I. H., and Kim, D. I. 1995, Production of Newcastle disease virus using Vero cell culture. *Korean J. Biotechnol. Bioneng.*, 10:292-297.
- Lim Hyun Soo. 1993, Immobilization of animal cells using macroporous gelatin microcarriers and its application for virus production. *Department of Biotechnology.*, p 1-99.

- Litwin, J. 1992, The growth of Vero cells as suspended aggregates in serum-free medium. pp 411-417. In: R. E. Spier, J. B. Criffiths, and C. MacDonald (eds), *Animal cell technology: Developments processes and products*. ESACT 11. Butterworth-Heinemann, Oxford.
- Maribel, M., Navarro, a., Lopez, A., Canela, E. I., Malll, J., Lluís, C. and Franco, R. 1997, Ammonium toxicity in different cell lines. *Biotechnol. Bioeng.*, 56:530-537.
- Martinelle, K. and Haggstrom, L. 1993, Mechanism of ammonia and ammonium ion toxicity in animal cells: transport across cell membranes. *J. Biotechnol.*, 30:339-350.
- Mckeehan, W. L. 1986, Glutaminolysis in animal cells carbohydrate metabolism in cultured cells (Morgan, M. J., eds), p 111-150, Plenum Press, New York.
- McQueen, A. and Bailey, J. E. 1991, Growth inhibition of hybridoma cells by ammonium ion : correlation with effects on intracellular pH. *Bioprocess Eng.*, 6:49-61.
- Miller, W. M., Wilke, C. R. and Blanch. H. W. 1988, Transient responses of hybridoma cells to lactate and ammonia pulse and step changes in continuous culture. *Bioprocess Engineering.*, 3:113-122.
- Nardelli, L., Panina, G. F. 1976, 10-years experience with a 28,800 roller bottle plant for FMD vaccine production. *Dev Biol Stand.*, 37:133-137.
- Nikolai, T. J. Hu W-S. 1992, Cultivation of mammalian cells in macroporous microcarriers. *Enzyme Microb Technol.*, 14:203-208.
- Nilsson K, Buzsaky F, Mosbach K. 1986, Growth of anchorage-dependent cells macroporous microcarriers. *Bio/Technology.*, 4:989-990.
- Raivio, K. O. and Seegmiller, J. E. 1973, Role of glutamine in purine synthesis and in guanine nucleotide formation in normal fibroblasts and in fibroblasts deficient in hypoxanthine phosphoribosyltransferase activity. *Biotechnol. Bioeng. Acta.*, 299:283-292.
- Reitzer, L. J., Wice, B. M. and Ozand, P. T. 1984, Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J. Biol. Chem.*, 254:2669-2676.
- Reuveny, S., Velez, D., Macmillan, J. D. and Miller, L. 1986, Factors effecting cell growth and monoclonal antibody production in stirred reactor. *J. Immunol. Methods.*, 86:53-59.
- Ryan, W. L. and Cardin, C. 1966, Amino acids and ammonia of fetal calf serum during storage. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 123:27-30.
- Ryll, T., Vally, U. and Wagner, R. 1994, Biochemistry of growth inhibition by ammonium ions in mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 44:184-193.
- Shevitz, J., LaPorte, T. L., Stinnett, T. E. 1990, Production of viral vaccine in stirred bioreactors. In: Mizrahi A, editor. *Advances in biotechnological processes. Viral vaccines.*, New York: Wiley-Liss Publishers. 14:1-35.
- Sinskey, A. J., Fleischaker, R. J., Tyo, M. A. et al. 1981, Production of cell derived products: virus and interferon. *Annals N. Y. Acad. Sci.*, 369:47-64.
- Van Wezel, A.S., van Steenis, G. 1978, Production of an inactivated rabies vaccine in primary dog kidney cells. *Develop. Biol. Standard.*, 40:69-75.
- Van Wezel, A. L., van der Velden-de Groot, C. A. M., van Herwaarden, J. A. M. 1980, The production of inactivated polio vaccine on serially cultivated kidney cells gram captive-bred monkeys. *Develop. Biol. Standard.*, 46:151-158.
- Van Wezel, A. L., van Herwaarden, J. A. M., van de Heuvel-de Rijk. 1979, Large-scale concentration and purification of virus suspension from microcarrier culture for the preparation of inactivated virus vaccines. *Develop. Biol. Standard.*, 42:65-69.
- Visek, W. J., Kolodny, G. M. and Gross, P. R. 1972, Ammonia effects in cultures of normal and

- transformed 3T3 cells. *J. Cell Physiol.*, 80:373-382.
- Zielke, H. R., Zielke, C. L., and Ozand, P. T. 1984, Glutamine : a major energy source for cultured mammalian cells. *Federation Proc.*, 43:121-125.
- 박병곤, 전계택, 김익환, 정연호. 1998, Development of an immobilized adsorbent for in situ removal of ammonium ion from mammalian cell culture media and its application to a mammalian cell bioreactor: I. Development of immobilized adsorbent system. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 13(4):404-410.
- 박병곤, 이해익, 전계택, 김익환, 정연호. 1998, Development of an immobilized adsorbent for in situ removal of ammonium ion from animal cell culture media and its application to animal cell culture system: II. Application to cell culture system. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 13(4):411-417.
- 정연호, 이해익, 전계택, 김익환, S. S. Wang. 1996, Ammonium ion effects and its *in situ* removal by using immobilized adsorbent in hybridoma cell culture. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 6:341-346.

나. 제2 세부과제

- W.R. Arathoon and J.R. Birch. Large-scale cell culture in biotechnology. *Science*, 1986, 232, 1390.
- J.R. Birch and T. Cartwright. Environmental factors influencing the growth of animal cells in culture. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 1982, 32, 313.
- M. Butler. *Animal cell technology - Principles and products*, 1987, Taylor & Francis, New York.
- M. Butler. Processes with animal cell and tissue cultures. In *Biotechnology - A comprehensive treatise in 8 volumes*. H. -J. Rehm, Ed., 1988, p. 250-316, VCH Publishers, New York.
- R.S. Cherry and E.T. Papoutsakis. Hydrodynamic effects on cells in agitated tissue culture reactors. *Bioprocess Engineering*, 1986, 1, 29.
- M. Dalili and D.F. Ollis. Transient kinetics of hybridoma growth and monoclonal antibody production in serum-limited cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, 1989, 33, 984.
- T.C. Dodge, G.Y. Ji, and W.S. Hu. *Enzym. Microb. Technol.*, 1987, 9, 607.
- M.W. Glacken, R.J. Fleischaker, and A.J. Sinskey. Reduction of waste product excretion via nutrient control: Possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 1986, 28, 1376.
- M.W. Glacken, E. Adema, and A.J. Sinskey. *Biotechnol. Bioeng.*, 1988, 32, 491.
- A. Handa-Corrigan, A.N. Emery, and R.E. Spier. Effect of gas-liquid interfaces on the growth of suspended mammalian cells: Mechanisms of cell damage by bubbles. *Enzyme Microb. Technol.*, 1989, 11, 230.
- Y.H. Jeong, G.-T. Chun, and I.H. Kim, Growth kinetics of CHO cells for tPA production in a spinner bioreactor: Selection of an anchorage-independent subline and medium improvement. 한국 생물공학회 추계학술발표회, 전문대학교, 아산, 1995a.
- Y.H. Jeong, G.-T. Chun, and I.H. Kim. Increase of hybridoma cell density and monoclonal antibody productivity by in-situ removal of ammonium ion with immobilized adsorbent beads. in JACCT Meeting, Japan, November, 1995b.
- A.J. Knights, Immobilized Cells: Basics and Applications, *Progress in Biotechnology* (R. H. Wijffels, R. M. Buitelaar, C. Bucke and J. Tramper, eds.), 1988, Vol. 11, p.162, Elsevier, Amsterdam.
- C. Leist, H-P. Meyer, and A. Fiechter. Process control during the suspension culture of a human melanoma cell line in a mechanically stirred loop bioreactor. *J. Biotechnol.*, 1986, 4, 235.

- J. Ljunggren, and L. Haggstrom. Control of the energy metabolism and growth rate in hybridoma cells by glucose and glutamine limited fed batch culture. In: Proc. BPERC Int. Symp. , p 29, 1995, Daejon, South Korea.
- B.K. Lydersen. Large Scale Cell Culture Technology. B.K. Lydersen, Ed., 1987, Hanser Publishers, New York.
- A. McQueen, J.E. Bailey. Biotchnol. Bioeng., 1990, 35, 1068
- W.M. Miller. A Kinetic Analysis of Hybridoma Growth and Metabolism. 1987, Ph.D. Thesis, University of California, Berkeley.
- W.M. Miller, C.R. Wilke, and H.W. Blanch. Transient response of hybridoma cells to lactate and ammonia pulse and step changes in continuous culture. Bioprocess Engineering, 1988, 3, 113.
- P.W. Runstadler, and S. R. Cernek, Immobilized Cultivation of Animal Cells at High Densities. Animal Cell Biotechnol. 1988, 3, 306-320.
- G.E. Smith, M.D. Summers, and M.J. Fraser. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. Molecular and Cellular Biology, 1983, 3, 2156.
- G.E. Smith, J. Grace, B.L. Ericson, J. Moschera, H.W. Lahm, R. Chizzonite, and M.D. Summers. Modification and secretion of human interleukin 2 produced in insect cells by a baculovirus expression vector. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, 8404.
- R.E. Spier and F. Horaud. The biotechnological future for animal cells in culture. In Animal Cell Biotechnology. R.E. Spier and J.B. Griffiths, Eds., 1985, p. 431-458, Academic Press, New York.
- R.E. Spier, Animal cells in culture: moving into exponential phase. Tibtech, 1988, 6, 2.
- D.I.C. Wang, New directions and Technologies in Cell Cultures. Key Note Lecture in Cell Culture Engineering V, 1996, San Diego.
- J.D. Watson, J. Witkowski, M. Gilman, and M. Zoller. Transferring genes into mammalian cells. In Recombinant DNA. 2nd Ed., 1992, p. 213-234, Scientific American Books, New York.

다. 협동과제

- Alexander, D. J. 1991, Newcastle disease and other paramyxovirus infections. In: Diseases of poultry, 9th edition, edited by Calnek, B. W., Barnes, H. J., Beard. C. W., Reid, W. M. and Yoder Jr, H. W., Iowa State University press, Ames, Iowa: pp. 496-519.
- Allan, W. H., Lancaster, J. E. and Toth, B. 1978, Newcastle disease vaccines-Their production and use. FAO press, Rome. Italy: pp. 93-108.
- Furusawa, E. and Cutting. W. 1962, Inhibitory effects of ammonia sulfate on Columbian SK virus propagation in mouse ascites tumor cells in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 111:71-75.
- Karl, Maramorosch., et al. 1985, Advance in cell culture vol.4, *Academic Press*.
- Kilburn, D. G., van Hemert, P., van Wezel, A. L. 1969, Homogeneous cultivation of animal cells for the production of virus and virus products. *Biotechnol. Bioeng.*, 11:875-885.
- Mircharmsy, H., Shafiyi, A., Bahrami, S., Kamali, M., Nazari, P. 1977, Use of human diploid cell MRC-5 for production of measles and rubella virus vaccines. *Dev Biol Stand.*, 37:297-305.
- Montagnon, B. J., Fanget, B., Nicolas, A. J. 1981, The large-scale cultivation of Vero cells in microcarrier culture for virus vaccine production preliminary results for killed poliovirus vaccine. *Develop. Biol. Standard.*, 47:55-64.
- Schrimpf G, Friedl P. 1993, Growth of human vascular endothelial cells on various types of microcarriers. *Cytotechnology.*, 13:203-211.
- Van Wezel, A. L. 1967, Growth of cell-strains and primary cells on microcarriers in homogeneous

culture. *Nature.*, 216:64-65.

Van Wezel, A. L., van Steenis, G., Hannik, C. A. et al. 1978, New approach to the production of concentrated and purified inactivated polio and rabies tissue culture vaccines. *Develop. Biol. Standard.*, 41:159-168.

Von Seefried, A., Chun, J. H. 1981, Serially subcultivated cells as substrates for poliovirus production for vaccine. *Develop. Biol. Standard.*, 47:25-33.