

Suspension culture of anchorage-dependent cells in serum-free medium with biodegradable polymer nanospheres

Ju Hee Ryu^{1,2} Cha Yong Choi² Byung-Soo Kim¹

¹Department of Chemical Engineering, Hanyang University

²School of Chemical Engineering, Seoul National University

TEL +82-2-2297-0838 FAX +82-2-2298-4101

Abstract

Suspension culture in serum-free medium is important for the efficient large-scale culture of anchorage-dependent cells that are utilized to produce therapeutic recombinant protein(e.g., insulin, antibody, vaccine) and virus vector for therapeutic gene transfer. We developed a novel method for the suspension culture of anchorage-dependent animal cells in serum-free medium using biodegradable polymer nanospheres in this study. Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) polymer nanospheres (433nm in average diameter) were used to the culture of human embryonic kidney 293 cells in serum-free medium in stirred suspension bioreactors. The use of PLGA nanospheres promoted the aggregate formation and cell growth (3.8-fold versus 1.8-fold growth), compared to culture without nanospheres. Adaptation of the anchorage-dependent cells to suspension culture or serum-free medium is time-consuming and costly. In contrast, the culture method developed in our study does not require the adaptation process. This method may be useful for the large-scale suspension culture of various types of anchorage-dependent animal cells in serum-free medium.

서 론

단백질 의약품(예; 인슐린, 항체, 백신 등)이나 유전자 치료용 바이러스백터를 생산하는데 사용되는 부착성 동물세포의 효율적 대량배양을 위해서 3차원적 부유배양과 무혈청 배지 배양이 필수적이다. 3차원적 부유배양(예; stirred tank bioreactor)은 scale-up, 배양공간, 공정제어 면에서 2차원 배양(예; dish, T-flask, roller bottle 등)에 비해 장점을 가지고 있다. 또한 무혈청 배지 배양은 배지 가격, 생산된 단백질 분리 정제, 품질관리 면에서 혈청배지 배양에 비해 장점을 가지고 있다. 그러나 무혈청부

유 배양에 세포를 적응(adaptation)시키는 데에는 시간이 오래 걸리고 많은 비용이 든다.

본 연구에서는 세포부착인자가 코팅된 생분해성 고분자인 poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) 나노입자를 이용하여 세포 군집(cell aggregates) 형성을 촉진시켜^{1,2} 무혈청 배지에서의 부유배양이 가능한지 조사하였다.

재료 및 방법

PLGA 나노입자는 oil/water emulsion 과 solvent evaporation-extraction 방법에 의해 만들어졌다. HEK 293 세포(5×10^5 cells/ml)와 PLGA 나노입자(0.3 mg/ml)를 stirrer suspension bioreactor에서 교반속도 80rpm으로 14일 동안 배양하였다. 전체 세포의 수는 DNA 양으로 계산하였고, 세포군집의 모양을 확인하기 위해 광학현미경, 투과전자현미경과 주사전자현미경으로 관찰하였다. 또한 세포군집을 형성하는 세포의 생존력(viability)을 관찰하기 위해 FDA/EB 염색을 한 후 컨포칼 현미경으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

Poly(lactic-co-glycolic acid) 나노입자의 사용은 무혈청 배지 부유배양에서 부착성 동물세포인 HEK 293 세포의 세포군집 형성과 세포증식을 촉진하였다. 나노입자를 넣지 않고 세포만 배양한 대조군에서는 HEK 293 세포의 수가 1.8배 증가한 데 비해 나노입자와 세포를 함께 넣어 무혈청 배지에서 배양한 실험군에서는 세포의 수가 3.8배 증가하였다. 투과전자현미경과 주사전자현미경 관찰을 통해 나노입자가 세포 사이에 붙어 있음을 확인하였고, FDA/EB 염색을 통해 세포 군집 안에 있는 세포가 대부분 살아 있음을 확인하였다.

요 약

본 연구에서는 생분해성 고분자 나노입자를 이용하여 부착성 세포의 세포군집(cell aggregates) 형성을 촉진시켜 무혈청 배지에서 3차원적 부유 배양하는 방법을 개발했다. 생분해성 고분자 나노입자의 사용은 무혈청 배지 부유배양에서 부착성 동물세포인 HEK 293 세포의 세포군집 형성과 세포증식(나노입자를 사용하지 않은 대조군과 비교하여 2배 이상)을 촉진하였다. 일반적으로 무혈청배지 부유배양에 세포를 적응(adaptation)시키는 데에는 시간이 오래 걸리고 많은 비용이 드는데, 이 연구에서 개발된 방법은 이러한 세포적응 공정이 필요없다. 이 배양법은 여러 부착성 동물세포의 산업적 대량배양에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

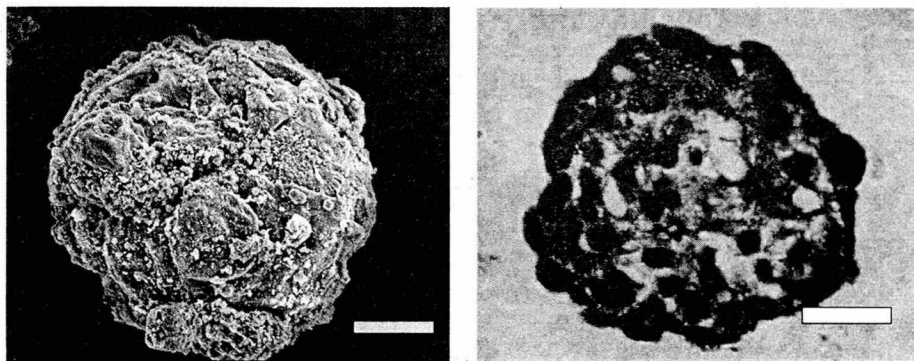


그림 1. HEK 293 세포(5×10^5 cells/ml)와 PLGA 나노입자(0.3 mg/ml)를 stirrer suspension bioreactor에서 배양한지 4일째 되는 날의 세포 군집 모양 (오른쪽) 주사전자 현미경 사진 (scale bar= $20 \mu\text{m}$) (왼쪽) 세포군집의 단면절편 사진. hematoxylin and eosin (H&E) 염색 (scale bar= $20 \mu\text{m}$).

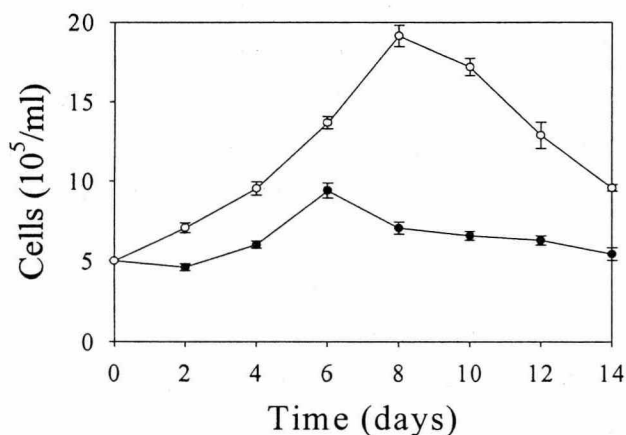


그림 2. Stirred suspension bioreactor에서 나노입자와 세포를 함께 넣어 무혈청배지에서 배양한 실험군(open circle)과 나노입자를 넣지 않고 세포만 배양한 대조군(closed circle)에서의 HEK 293 세포의 성장 곡선. 실험군의 세포성장이 대조군에 비해 2배 이상 높았다.

References

1. Goetghebeur S, et al. (1991), "Cultivation of anchorage-dependent animal cells in microsphere-induced aggregate culture", *Appl Microbiol Biotechnol.* **34**,735-41.
2. Ju Hee Ryu, et al. (2003), "Suspension culture of anchorage-dependent animal cells using nanospheres of the biodegradable polymer, poly(lactic-co-glycolic acid)", *Biotechnol. Lett.* **25**(16), 1363-67.