

## Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ratio가 하이브리도마 세포의 physiology와 CHO 세포의 morphology에 미치는 영향

박준영, 박홍우

한양대학교 화학공학과 생물공학연구실

전화 (02) 2290-0531, FAX (02) 2299-9496

### Abstract

In hybridoma cell culture, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> is the most important toxic byproduct so far identified. It has been postulated that NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, which is similar to K<sup>+</sup> in size, is taken up non-specifically by the cells through a potassium transport system, and that the addition of K<sup>+</sup> to the culture medium may have a detoxifying effect of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Thus, in this study the effects of varying Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ratios by adding potassium were investigated for hybridoma physiology and CHO cell morphology respectively. The possible use of potassium addition for the adaptation of CHO cells to suspension culture is discussed.

### 서론

하이브리도마 세포는 단클론항체(Monoclonal antibody)생산에 널리 이용되는 세포주이다.

단클론항체의 대량생산을 위해 회분식 배양법이 주로 사용되는데, 조작이 간편하다는 장점이 있는 반면 영양분의 제한, 젖산과 암모니아 등의 부산물의 축적 등으로 인해 세포성장이 제한된다는 단점이 있다.

세포대사과정에서 생성된 암모니아는 대부분이 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 형태로 존재하는데, 크기가 K<sup>+</sup>와 비슷한 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>는 다양한 potassium transport system에 의해 비선택적으로 받아들여져 세포에 해로운 영향을 준다. 한편 K<sup>+</sup>의 첨가는 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>의 독성을 감소시키는 효과가 있음이 보고되었는데, 이와 같은 K<sup>+</sup>의 효과는 낮은 K<sup>+</sup>농도에서만 조사되었다.(2)

CHO(Chinese Hamster Ovary)cell은 인간화항체를 생산하는 세포로 부유식 세포인 하이브리도마 세포와는 달리 배양용기 표면에 붙어 자라는 부착식 세포이다. S 항원에 특이적으로 반응하는 인간화된 항체의 대량배양 체계를 확립하기 위해서 부유식배양으로의 적응이 필수적이다. 세포의 morphology변화와 세포의 부유식 배양 가능성에 대한 연구가 보고된 바 있다.

따라서, 본 연구에서는 고농도 potassium 농도에서 세포성장이 가능함을 보여주었다. 또한, 기본배지와 강화배지(하이브리도마 세포)에 고농도의 potassium을 첨가하

여  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio에 따른 spinner flask에서 하이브리도마 세포의 physiology와 T-175 flask에서 CHO cell의 morphology를 관찰하였다.

### 재료 및 방법

본 연구에 사용된 세포주는 EPO와 결합하는 IgG을 분비하는 5F12AD3 하이브리도마(ATCC HB 8209)와 간염 B 바이러스의 S 표면항원에 특이적으로 결합할 수 있는 인간화항체를 생산하는 S/CHO hu-17 A3 세포주이다. 5%FBS를 포함하는 IMDM(GibcoBRL)과 MEM  $\alpha$ 을 기초로 하였으며, 여기에 sodium과 potassium의 양을 조절하여 배지를 제작하였다(Table 1, 2). 하이브리도마 세포의 경우 basal IMDM에  $\times 2$  glutamine,  $\times 1$  glucose,  $\times 2$  vitamins가 첨가된 강화배지가 사용되었다. 제작된 배지는  $0.22\mu\text{m}$ 의 pore size를 가지는 cellulose acetate 재질의 filter system(Corning Co.)으로 최종여과를 하였다.

하이브리도마 세포의 경우 본 실험에 들어가기 전, sodium과 potassium 양이 조절된 각 배지에서 adaptation을 실행하여 cell line을 획득하였으며, CHO 세포의 경우는 따로 adaptation 없이 본 실험에 들어갔다. 배양은  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  조건에서 하이브리도마세포는 40rpm, 500ml spinner flask(working volume 200ml), CHO세포는 T-175 flask에서 행해졌다.

pH는 0.5M의 sodium bicarbonate(SIGMA)를 이용하여 7.0~7.2로 조절하였으며, 각 배양에서 세포를  $2 \times 10^5$  cells/mL의 농도로 접종하였다.

세포농도는 12시간 간격으로 trypan blue exclusion 방법을 이용한 hemocytometer와 전자현미경을 이용하여 측정하였다.

	NaCl	KCl	NaHCO <sub>3</sub>	KHCO <sub>3</sub>	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>
control (IMDM)	77.59	4.4	36	0	25.8
IMDM with 10 mM K <sup>+</sup>	74	10	36	0	11
IMDM with 40 mM K <sup>+</sup>	44	40	36	0	2
IMDM with 60 mM K <sup>+</sup>	24	60	36	0	1
IMDM with 80 mM K <sup>+</sup>	4	80	36	0	0.5
IMDM with 100 mM K <sup>+</sup>	4	80	16	20	0.2

Table 1. Concentrations of K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> in Hybridoma cell culture media (mM)

	NaCl	KCl	NaHCO <sub>3</sub>	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>
control (MEM $\alpha$ )	117	5.3	26	27
MEM $\alpha$ with 10 mM K <sup>+</sup>	112.3	10	26	13.8
MEM $\alpha$ with 20 mM K <sup>+</sup>	102.3	20	26	6.4
MEM $\alpha$ with 40 mM K <sup>+</sup>	82.3	40	26	2.7
MEM $\alpha$ with 60 mM K <sup>+</sup>	62.3	60	26	1.5

Table 2. Concentrations of K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> in CHO cell culture media (mM)

## 결과 및 고찰

### Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ratio가 하이브리도마 세포의 physiology에 미치는 영향

IMDM배지에 sodium과 potassium의 양을 조절하여 potassium의 양이 10mM, 40mM, 60mM, 80mM, 100mM 첨가된 배지(Table 1. 참고)를 만들었으며, 세포는 본 실험에 들어가기 전 각 potassium 농도에 adaptation되었다.

실험은 basal IMDM배지와 basal IMDM배지에 amino acids, glucose, vitamins가 강화된 배지에 각 농도의 potassium을 첨가한 배지에서 이루어졌으며, pH는 1 N NaOH를 사용하여 7.0~7.2로 유지시켰다.

Basal IMDM에 10, 40, 60mM potassium을 첨가한 배지에서 세포의 성장을 관찰한 결과 control인 IMDM과 10, 40mM에서의 세포의 성장과 항체생산량은 뚜렷한 차이가 없었으나 60mM potassium 농도에서는 세포농도와 항체생산량이 다소 나은 결과를 보였다. 그러나 glutamine과 glucose이 72시간에 거의 고갈되었으므로 amino acids와 glucose, vitamins가 강화된 배지에 각 potassium농도를 첨가하여 세포의 성장을 관찰하였다. 이 때, 첨가된 potassium의 농도는 40, 60, 80, 100mM이다.(Fig. 1) 그 결과 60mM potassium 농도에서 가장 나은 세포성장을 보였으며 100mM의 경우 세포성장이 상당히 떨어짐을 알 수 있었다.

### Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ratio가 CHO 세포의 morphology에 미치는 영향

MEM  $\alpha$  배지에 sodium과 potassium의 양을 조절하여 potassium의 양이 10mM, 20mM, 40mM, 60mM 첨가된 배지(Table 2. 참고)를 만들었다.

하이브리도마 세포의 실험과는 달리 본 실험에 들어가기 각 potassium농도에서 따로 세포의 adaptation을 실시하지 않았으며, 96시간에 걸쳐 세포의 성장과 morphology를 관찰하였다.

그 결과 control인 basal MEM  $\alpha$ 와 10, 20, 40mM potassium 농도에서 비슷한 성장과 morphology를 보였으나, 60mM potassium이 첨가된 배지에서의 세포는 그 성장이 매우 둔화되었고 부착되어 길게 늘어지는 속도가 매우 느려 동글동글한 모양으로 자람을 관찰할 수 있었다.(Fig 2, 3, 4)

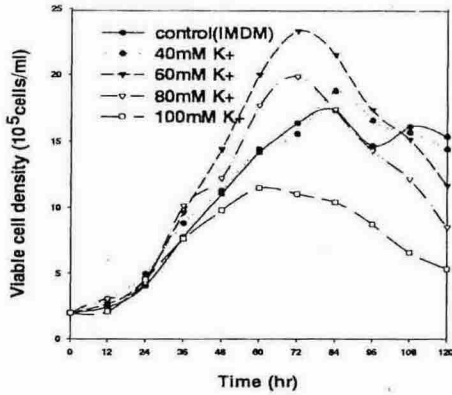


Figure 1. Viable cell density on variable potassium conc. (Fortified medium, Hybridoma cell)

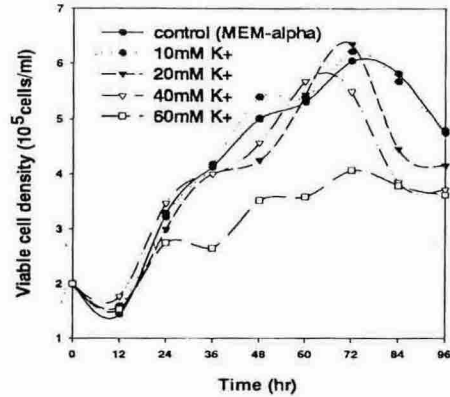


Figure 2. Viable cell density on potassium conc. (CHO cell)

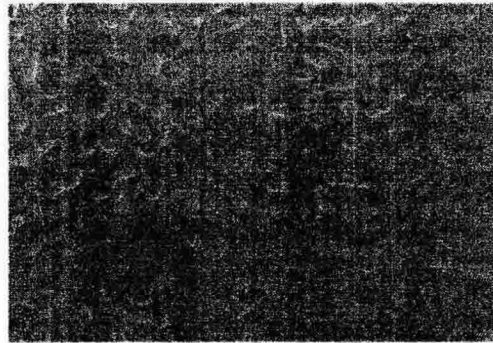
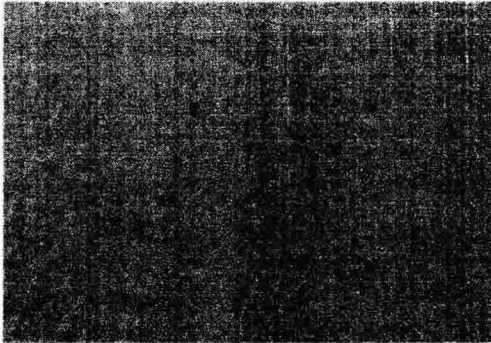


Figure 3. CHO cell morphology on basal MEM  $\alpha$  (left) and 60mM  $K^+$  (right)

#### 참고문헌

- 1) Bibila et al., "Monoclonal antibody process development using medium concentrates"(1994), *Biotechnol. Prog.*, 10, 87-96
- 2) Martinelle K. and Haggstrom L., "Effect of  $NH_4^+$  and  $K^+$  on the energy metabolism in Sp2/0-Ag14 myeloma cells"(1999), *Cytotech.*, 29, 45-53
- 3) Mirabet M., Navarro A., Lopez A., Canela E. I., Mallol J., Lluís C. and Franco R., "Ammonium toxicity in different cell lines"(1997), *Biotech. Bioeng.*, 6, 530-537
- 4) 임동진, "A study on the ammonium toxicity for high-density hybridoma cell culture"(1999), 한양대학교 대학원