

## The effect of high potassium adaptation on hybridoma cell growth

Chang-Kyun Son, Hong-Woo Park

Department of Chemical Engineering, Hanyang University, Seoul

TEL: +82-2-2290-0487, FAX: +82-2-2299-9496

### Abstract

Hybridoma cells were adapted in media containing up to 80 mM  $K^+$ . The adapted cells obtained tolerance at high osmotic pressure and low pH. The adapted cells showed a maximum viable cell density of  $1.1 \times 10^6$  cells/ml when a batch culture was progressed in a nutrient-fortified medium with Erlenmeyer flask at 450 mOsm/kgH<sub>2</sub>O, as compared to  $4.8 \times 10^5$  cells/ml for non-adapted cells grown under the same conditions. The adapted cells also showed a maximum viable cell density of  $7.8 \times 10^5$  cells/ml with the same method at initial pH 7.0 as compared to  $5.3 \times 10^5$  cells/ml for non-adapted cells. Adaptation of animal cells at high  $K^+$  levels may therefore lead to an improvement of their performance at limited conditions.

### 서론

동물세포는 shear stress에 민감하고, agitation은 scale-up시 배지 내의 pH homogeneity를 위해 중요하다. 또한 pH 조절을 위해 첨가하는 buffer에 의해 배지 내의 삼투압은 증가하게 된다.<sup>1), 5)</sup>

$K^+$ 은 세포막 안팎의 ammonium 이온 수송속도를 감소시켜 hybridoma의 대사에너지 요구량을 증가시키며, ammonia와 ammonium 이온이 intracellular pH와 extracellular pH를 변화시켜 나타내는 toxicity를 감소시킨다. 이런  $K^+$ 의 효과를 이용한 방법으로 배지내에 KCl 첨가하여 성장을 촉진하지만, 많은 KCl 첨가는 삼투압을 증가시켜 세포의 사멸을 유도하며,<sup>2), 4)</sup> 높은  $Na^+/K^+$  비율은 세포 성장의 저해를 일으킨다. 본 연구에서는 이러한  $K^+$ 의 역효과를 반감시키기 위해 삼투압을 조절하여  $K^+$ 농도를 높인 배지에서 세포를 적응시켰으며, scale-up시 발생하는 한계 조건에서 세포의 내성을 조사하였다.

### 재료 및 방법

### 세포주

실험에 사용된 세포주는 EPO(Erythropoietin)와 결합하는 IgG<sub>1</sub>을 분비하는 5F12 AD3 hybridoma(ATCC HB 8209)이다.

### 적응배지와 세포적응

기본 배지는 Iscove's modified Dulbecco's medium(IMDM, GIBCO BRL<sup>®</sup>)에 5%(v/v) FBS(Moregate)를 첨가하였고, K<sup>+</sup> 40, 60, 80 mM 배지는 기본 배지에서 KCl 첨가량만큼 NaCl의 양을 빼주어 제작하였다. 5F12AD3 hybridoma를 K<sup>+</sup> 40, 60, 80 mM 배지에서 각각 10계대 이상 순차적으로 계대하여 80 mM 농도로 적응시키고, K<sup>+</sup> 80 mM에 적응된 세포는 10계대를 걸쳐 그 적응 확인하였다.

### 세포배양과 조건

각 세포의 배양은 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% air humidified incubator에서 이루어졌다. Erlenmeyer flask(125 mL)에 working volume 30 mL으로 80 rpm의 orbital shaker를 사용하여 교반하였으며, 배지는 대사물질의 고갈을 막기위해 기본 배지에 7가지 amino acids(X2)와 glucose(X1), vitamin(X2)을 첨가한 배지를 사용하였다.<sup>3)</sup> 고삼투압 조건실험에서 NaCl을 이용하여 삼투압을 350, 400, 450, 500 mOsm/kg H<sub>2</sub>O로 조절하였으며,<sup>2)</sup> pH 조건실험에서 1.0 M HCl을 사용하여 배지의 pH를 7.0, 6.8, 6.6으로 조절하였다.<sup>5)</sup>

### 분석

12시간마다 sampling하여 세포농도는 trypan blue exclusion method로 측정하였고, pH는 pH meter를, 삼투압은  $\mu$  OSMETTE<sup>™</sup> Model 5004 Automatic Osmometer (Precision system INC.)를, glucose, glutamine, lactate는 YSI 2700 SELCET Biochemistry Analyzer를, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>는 Ion chromatography(DIONEX)를 사용하여 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 고삼투압 조건실험

배지의 삼투압을 350, 400, 450, 500 mOsm/kgH<sub>2</sub>O로 증가시켰을 때, 350 mOsm/kgH<sub>2</sub>O 이상으로 삼투압이 증가할수록 세포의 성장은 더 저해되며(Figure 1), K<sup>+</sup> 80 mM에 적응된 세포가 적응되지 않은 세포에 비해 고삼투압에 대한 내성을 가지고 있다. 특히 450 mOsm/kgH<sub>2</sub>O에서 회분식으로 배양했을 때, 적응된 세포의 최대 세포 농도가 1.1x10<sup>6</sup> cells/ml로 적응되지 않은 세포의 4.8x10<sup>5</sup> cells/ml보다 상

대적으로 130% 높다. 이것은  $K^+$  80 mM에 적응된 세포가 44%, 적응되지 않은 세포가 83%의 성장 저해를 받은 것으로 적응된 세포의 고삼투압 내성을 보여준다.

#### pH 조건실험

배지의 pH를 7.2로 맞추고, 초기 pH를 7.0, 6.8, 6.6으로 조절하였을 때, 세포성장은 전체적으로 pH가 낮아질수록 성장이 저해되고(Figure 2),  $K^+$  80 mM에 적응된 세포가 적응되지 않은 세포에 비해 성장 저해에 대한 내성을 가지고 있으며, 초기 배지의 pH 7.0에서 회분식으로 배양했을 때, 적응된 세포의 최대 세포 농도가  $7.8 \times 10^5$  cells/ml로 적응되지 않은 세포의  $5.3 \times 10^5$  cells/ml보다 상대적으로 47% 높은 것으로 나타났다. 이것은  $K^+$  80 mM에 적응된 세포가 58%, 적응되지 않은 세포가 70%의 성장 저해를 받은 것으로 pH가 감소할 때 적응된 세포의 pH 내성을 보여준다.

Glucose나 glutamine과 같은 에너지원의 고갈은 일어나지 않았고, lactate나  $NH_4^+$  축적에 의한 toxicity도 세포사멸수준에 미치지 못하였다.

세포는 각각의 조건에서 성장 저해를 받게 되는데  $K^+$  적응기술은 세포에 고삼투압과 pH에 대한 내성을 가지게 하였다. 이것은 공정의 scale-up시 사용하게 될 bioreactor에서 배지 내의 pH gradient가 세포에게 주는 충격과 buffer 첨가에 의한 삼투압 증가 경우에 세포가 받는 충격을 줄여줄 것이다.

### 요 약

본 연구에서 hybridoma 세포는  $K^+$  농도를 80 mM까지 높인 배지에 적응시켰다.  $K^+$  80 mM에 적응된 세포는 높은 삼투압과 낮은 pH에서 내성을 가졌다. 적응되지 않은 세포와  $K^+$  80 mM에 적응된 세포는 Erlenmeyer flask에서 강화 배지로 회분식으로 배양되었다. 배지의 삼투압이 450 mOsm/kgH<sub>2</sub>O일 때 적응되지 않은 세포의 최대 세포 농도가  $4.8 \times 10^5$  cells/ml로 낮은 성장을 보였고, 적응된 세포는  $1.1 \times 10^6$  cells/ml까지 성장하였다. 또한 배지의 초기 pH가 7.0일 때 적응되지 않은 세포는  $5.3 \times 10^5$  cells/ml인 반면,  $K^+$  80 mM에 적응된 세포 농도는  $7.8 \times 10^5$  cells/ml였다. 따라서, 동물세포의 높은  $K^+$  농도에의 적응은 세포배양의 한계조건에서 적응되지 않은 세포가 받는 성장 저해를 줄여줄 것이다.

### References

- 1) Zhou W., Chen C. C., Buckland B., Aunins J., Fed-batch culture of recombinant NS0

myeloma cells with high monoclonal antibody production(1997), *Biotechnol. Bioeng.* 55: 783-792

- 2) Cherlet M., Marc A., Hybridoma cell behavior in continuous culture under hyperosmotic stress(1998), *Cytotechnology* 29: 71-84.
- 3) Lee D.S., Park H.W. Influence of amino acid and vitamin addition on the growth and metabolism of hybridoma in batch culture(1998), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 13: 289-294.
- 4) Martinelle K., Häggström L., Effects of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{K}^+$  on the energy metabolism in Sp2/0-Ag14 myeloma cells(1999), *Cytotechnology* 29: 45-53.
- 5) Osman J. J., Birch J., Varley J., The response of GS-NS0 myeloma cells to pH shifts and pH perturbations(2001), *Biotechnol. Bioeng.* 75: 63-73

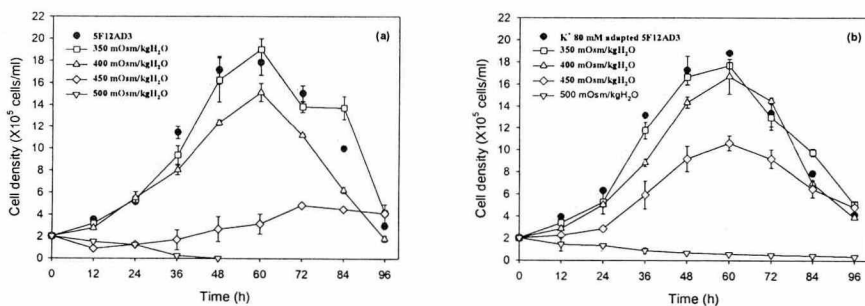


Fig. 1. Viable cell density of (a) non-adapted and (b)  $\text{K}^+$  80 mM adapted cells at high osmotic pressure.

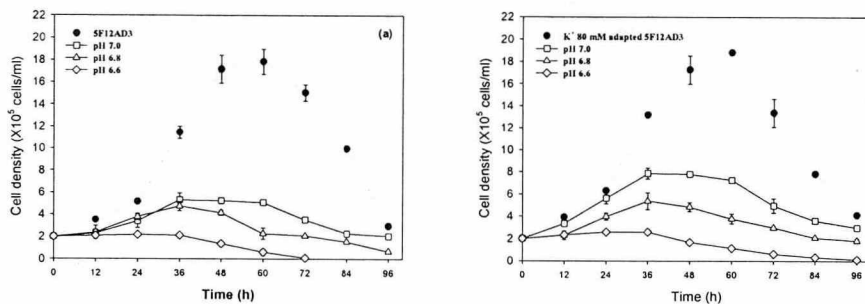


Fig. 2. Viable cell density of (a) non-adapted and (b)  $\text{K}^+$  80 mM adapted cells at various pH.