

세포 침전장치를 이용한 하이브리도마 세포의 고농도 배양

최 대 부*, 조 보 연
전국대학교, 미생물공학과
*한국과학기술원, 유전공학센터

High Density Culture of Hybridoma Using Cell Sedimentation System

Tae Boo Choe and Bo Yeon Cho*
Dept. of Microbial Engineering, Kon-Kuk University
*KAIST, Genetic Engineering Center

ABSTRACT

A cell sedimentation system was designed and employed for the high density culture of hybridoma. An upward diverging cell settler allowed a good sedimentation of hybridoma but the accumulation of cell mass on the settler's wall side was a potential problem. Although a cylindrical cell settler was useful to solve this problem, this device was employable only at low dilution rate. A modified cell settler could support the high density culture of hybridoma at a concentration of 5×10^6 cells/ml during 1 week, producing 380mg of monoclonal antibody.

서 론

하이브리도마 세포는 동일한 특이성을 갖는 단일클론 항체를 반 영구적으로 생산할 수 있어 이를 질병의 진단이나 치료에 이용할 경우 복수 클론 항체가 갖지 못하는 장점을 가질 수 있다. 단일클론 항체가 단순히 진단시약의 제조뿐 아니라 면역학적 치료제와 같은 Immunotherapy 분야에 이용될 경우 연간 수요량은 수 kg단위로 증가할 수 있다(1). 이같은 수요의 증가에 따라 항체의 생산 방법도 쥐의 복강이나 roller bottle를 이용하여 하이브리도마를 배양하던 종래의 방법을 탈피하여 대형 세포 배양기를 이용한 새로운 세포 대량배양 방법을 이용하게 되었다.

최근 많이 이용되고 있는 대량생산 방법으로는, 하이브리도마를 Alginate(2) 혹은 Agarose bead(3)에 entrapment 시키거나 poly-lysine(4)과 같은 polymer를 이용하여 encapsulation 시키는 방법과, hollow fiber(5) 혹은 ceramic cartridge(6)등에 고정화 시키는 방법, 그리고 macroporous microcarrier(7)에 흡착시켜 배양하는 방법들이 있다. 이들은 모두 하이브리도마 세포를 고농도로 배양하기 위한 방법들로, 일반적인 회분식 배양에서는 1×10^6 cells/ml 정도의 세포농도를 유지할 수 있는데

반해 고농도 배양에서는 1×10^7 cells/ml 이상의 세포농도를 얻을 수 있다고 알려져 있다(8,9). 또한 고농도 배양은 생성되는 단일클론항체의 농도를 5-10배 가량 증가시켜 고가의 배지를 효율적으로 이용하게 할 뿐 아니라 반복되는 멸균과 집종의 과정을 피하고 비교적 장시간 동안 조업을 계속할 수 있는 장점이 있다.

본 연구에서는 현재 개발되어 사용되고 있는 많은 하이브리도마의 고농도연속배양 방법중에서 일종의 세포 침전장치라고 할 수 있는 cell settler를 이용하는 방법의 사용 가능성을 검토하여 보았다. 이것은 동물세포가 정체된 배양액내에서 1시간에 4-6cm의 침강속도를 가지므로(18) 적절한 침전조를 이용할 경우 연속배양에서 유출되는 세포를 회수할 수 있다는 점에서 착안한 것이다. 일반적인 고농도 배양법은 하이브리도마 세포를 고체 matrix에 고정화시켜 배양하는 경우가 많으므로 세포의 성장 과정을 monitor 할 수 없고, 세포 성장에 필요한 영양분과 산소의 공급이 원활하지 않는 등 배양기내에서의 물질 전달에 문제점이 있으므로 공정제어나 scale-up에도 어려움이 있다. 그러나 세포 침전장치를 이용하면 suspension culture를 통한 고농도 배양이 가능하게 되므로 pH, 온도, 용존산소와 같은 공정 변수들을 쉽게 조절할 수 있고, 또 장치가 간단하여 조작하기 쉬운 등, 고정화 세포배양에서 기대할 수 없는 많은 장점을 지니고 있다.

특히 실험실에서 이러한 장치를 간단히 제작할 수 있으므로 고농도 배양에 필요한 배지성분의 최적화 작업이나 고농도 배양의 특성을 연구하는데 도움을 줄 수 있을 것이다.

재료 및 방법

세포주와 배양액

본 실험에 사용한 세포주 Alps 25-3와 배양액은 전보문(10)과 같다.

계대배양과 세포배양

본 실험을 위한 계대배양은 전보문(10)과 같은 방법으로 실행하였다. 배양실험은 세포배양 시스템(2L, SET-2CV, SGI France)을 이용하였으며 온도, 용존산소는 각각 37°C, 30±10% 포화가 되게 silicone tube를 이용한 간접적인 방법과 surface aeration을 통한 직접적인 방법을 병용하여 조절하였다. pH는 CO₂ gas 및 0.2N NaOH 용액을 이용하여 7.0±0.005가 되게 조절하였다.

항체의 역가측정 및 암모니아, glucose농도 측정

배양과정 중 생성되는 항체와 암모니아, 그리고 세포가 증식하면서 감소되는 배양액 내의 glucose농도는 전보문(10)과 같은 방법으로 분석하였다.

Cell settler를 이용한 배양장치

본 연구에서 현재 개발되어 사용되어지고 있는 일종의 세포 침전장치라 할 수 있는 cell settler를 부착시킨 실험 장치의 모식도이다(Fig. 1). 하이브리도마 세포가 정제된 배양액에서 1시간에 4-6cm의 침강속도를 가지므로 적절한 침전조를 장치하여 세포가 출구 부분에서 침전이 되어 배양기 속으로 다시 환류, 연속배양시 유출되는 세포를 회수할 수 있다 (11, 12)는 점에서 착안하여 고안, 사용하였다.

그림 2는 pyrex 유리로 제작된 A와 B type의 세포침전조의 형태를 보여주고 있다. 침전조의 형태는 실험을 거치면서 여러번 수정되었다. A type은 세포배양장치 SET-2CV(working volume 500 ml)와 함께 사용하였고 B type은 실험실에서 제작한 spinner flask (Fig. 1 참조, working volume 100ml)에 부착하여 이용하였다. 각 침전조의 volume은 A,B, 각각 70 및 30ml이다. 침전조는 water jacket이 달려있어 침전조의 온도를 37°C로 유지시킬 수 있다. 침전조의 온도가 37°C이하로 내려가면 배양액의 온도와 차이가 생기므로 열대류에 의한 액체층의 혼합효과가 나타나 세포의 침전이 제대로 이루어지지 않는다.

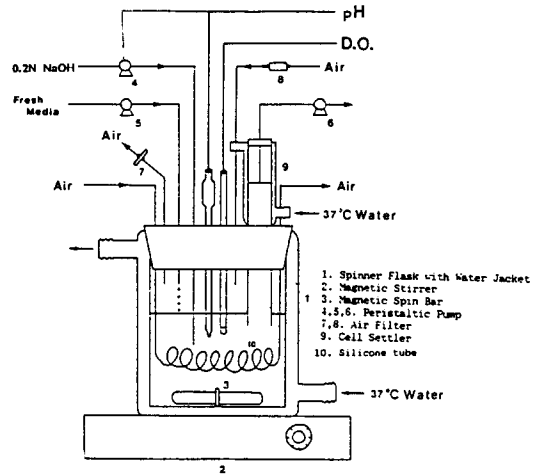


Fig. 1. Experimental Set-up for High Density Cell Culture using Cell Settler.

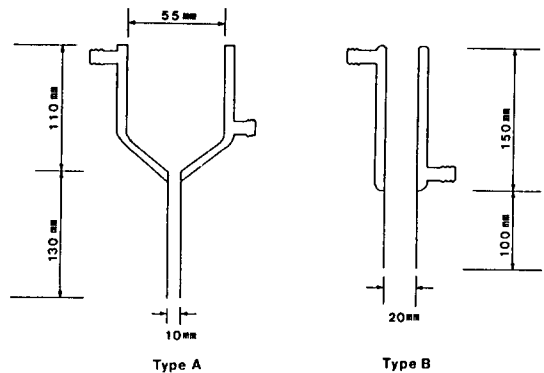


Fig. 2. Two types of Cell Settler.

결과 및 고찰

회분식 배양

그림 3은 회분식 배양에서 Alps 25-3의 전형적인 성장 곡선과 배양과정에서 측정된 변수들의 변화를 나타낸 것이다. 하이브리도마 세포의 회분식 배양은 doubling time 약 14시간의 대수증식기를 거쳐 성장정지기에 도달한 후 거의 동시에 세포사멸기에 들어가는데 이때 최고 세포농도는 약 1.0×10⁶ cells/ml에 달한다.

잔여 glucose의 농도는 초기 농도가 3.5mg/ml일 경우 약 0.5mg/ml 미만이었으며 생성된 ammonia의 최종 농도는 대체로 50ug/ml 전후로써 이 농도에서 하이브리도마에 대해 toxicity를 가지는 것으로 보인다(13). 단일클론 항체의 농도는 접종후 약 20시간이 경과되면서 증가하기

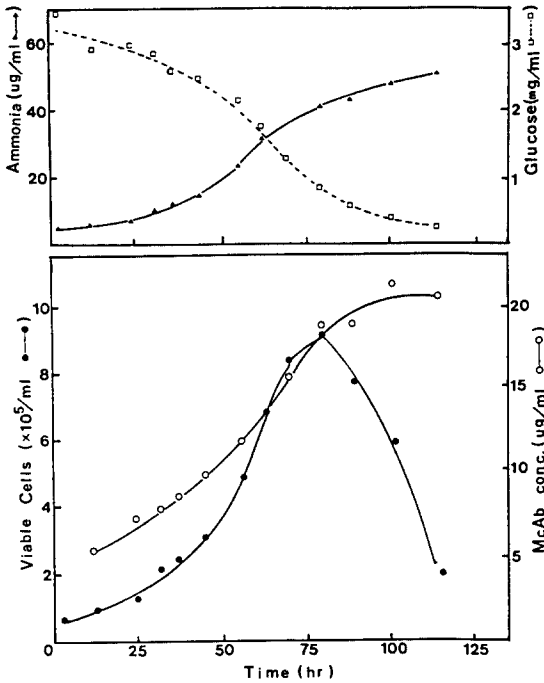


Fig. 3. Kinetics of monoclonal antibodies production, cell growth and other parameters monitored in batch culture (Alps 25-3).

시작하여 최종농도는 20ug/ml에 달하였다. 접종규모, 배지조성, 환경인자들을 변화시켜 여러가지 조건에서 배양해 보았으나 항체의 최종농도는 25ug/ml을 넘지 못하였고 생산 수율은 20 mg/1 media 정도였다. 경제적으로 의미를 가지려면 항체의 농도는 100ug/ml 이상이 되어야 하고 생산 수율은 적어도 100mg/1 media 이상이 되어야 하므로 단순한 회분식 배양만으로는 경제성이 없음을 알 수 있다. 따라서 하이브리도마 세포의 고농도 연속배양을 통하여 생산된 항체의 농도와 수율을 증가시킬수 있는 방법을 시도하여 보았다.

Cell Settler를 이용한 고농도 배양

그림2에서 보여준 A type의 침전조는 Kitano(14) 등이 고안한 것으로 위로 올라갈수록 직경이 점차 넓어지는 형태여서 배지가 pumping되어 윗쪽으로 이동할수록 유속이 느려지므로 결과적으로 하이브리도마 세포가 천천히 침전하게 된다.

이 침전조를 이용하여 초기농도 6×10^4 cells/ml에서 Dilution rate를 0.05 hr^{-1} 로 고정하여 Alps 25-3을 농축배양하여 본 결과 그림 4에서 확인할 수 있듯이 약 5일이 경과하였을때 viable cell농도가 1×10^6 cells/ml에 육박하였고 약 6.5일이 경과하였을때 2×10^6 cells/ml

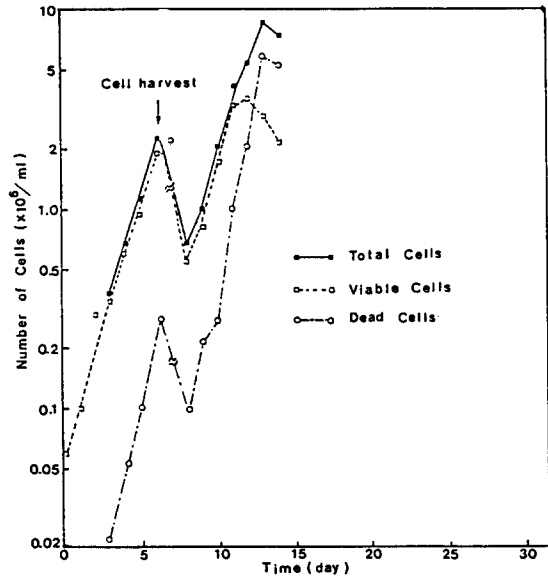


Fig. 4 Cell concentration profile of ALPS 25-3 along the culture time for cell settler system A.

까지 도달하였다. 이 지점에서 dead cell의 농도도 3×10^6 cells/ml까지 증가하였으므로 죽은 세포를 제거하기 위하여 90%의 배지를 새배지로 갈아준 후 다시 배양을 시작하였다. 그러나 이후 배양에서는 viable cell의 증가 속도보다 dead cell의 증가 속도가 더욱 빨라져서 viable cell 농도가 3×10^6 cells/ml에 이르렀을때 dead cell은 6×10^6 cells/ml까지 증가하였다. 이처럼 배양후기에 죽은 세포의 농도가 급격히 증가하는 이유는 뒤에 고찰 부분에서 좀더 자세히 논하게 될것이나 특히 이 장치에서는 silicone으로 표면처리를 하였어도 침전이 일어난 세포들이 침전조의 턱부분에 일단 쌓였다가 배양기 속으로 천천히 흘러내리는 현상이 문제가 되었다. 이렇게 쌓인 세포더미 속으로는 배양액이나 산소의 공급이 원활하지 않게 되고 따라서 이들 세포의 사멸속도를 가속화할 것으로 보이기 때문이다.

위의 문제점을 해결하기 위해 type B와 같이 아래위의 직경이 균일한 침전조를 준비하여 spinner flask에서 다시 test하여 보았는데 이 경우에는 침전된 세포가 침전조의 유리표면에 달라붙지 않고 곧장 배양기 속으로 환원될 수 있었다. 그림5는 type b의 침전조를 이용하여 초기 농도 1×10^6 cells/ml에서 희석율(Dilution rate) 0.03에서 0.066 hr^{-1} 까지 변화시키며 실험한 결과로 배양4일만에 세포농도가 4×10^6 cells/ml까지 증가하였다. 그러나 이 경우에도 세포의 사멸속도를 약간 늦출 수는 있었으나 5일이 경과한 후 부터는 여전히 죽은 세포의 농도가

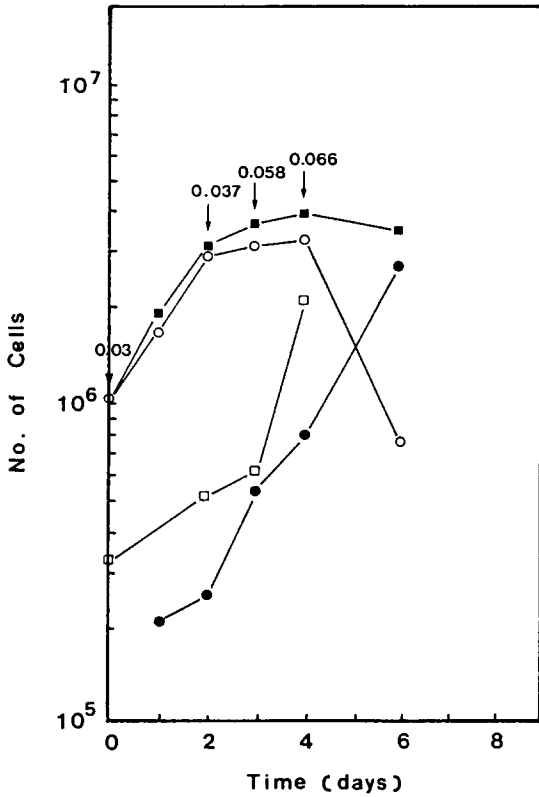


Fig. 5. Cell concentration profile of Alps 25-3 along the culture time for cell settler system B.

- : total cells
- : viable cells
- : dead cells
- : viable cells in effluent
- ↓ : dilution rate change

산 세포의 그것보다 높아지는 현상을 보였다. 또 회석율을 증가시킬 때마다 배양기 내의 살아있는 세포들이 유출되는 비율이 증가하여 $D(\text{Dilution rate}) = 0.037 \text{ hr}^{-1}$ 에서 전체 viable cell의 약 15%, $D = 0.058 \text{ hr}^{-1}$ 에서 약 30%, 그리고 $D = 0.066 \text{ hr}^{-1}$ 에서는 약 80%의 Viable cell이 유출되는 것으로 나타났다. 회석율 0.066 hr^{-1} 에서 배양액의 선속도는 2.1 cm/hr 로서 세포침강속도 4.6 cm/hr 보다 낮은 값이지만 조업하는 동안 배양기 내의 압력이 계속 변하여 침전조의 액주가 흔들기 때문에 세포가 제대로 침전되지 않고 유출되는 것으로 보인다.

그림5는 이 실험에서 측정한 glucose, ammonia 및 항체의 농도 변화를 나타낸 것으로 glucose는 1.2에서 1.8 mg/ml 까지, ammonia는 25에서 60 ug/ml 까지 변화하였으며 항체 농도는 최저 20 ug/ml 에서 최고 90 ug/ml 까지 증가하였다. 회분식 배양과 비교해 볼때 최고 세포농

도와 항체농도는 각각 $4 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ 과 90 ug/ml 로써 약 4배이상 증가하였고 항체의 생산수율은 50.6 mg/l media 로써 2.5배 가량 증가한 것으로 나타났으나 조업시간이 짧아 고농도 배양의 장점을 크게 살리지는 못하였다.

다시 SET - 2CV를 이용하여 회석율을 좀더 증가시키기 위해 working volume을 250ml로 낮춘 뒤 주기적으로 배지를 공급하므로써 $D = 0.05 \text{ hr}^{-1}$ 에서 0.16 hr^{-1} 까지 변화시키며 실험해 보았다. 그림 7과 8은 이 실험의 결과로 높은 회석율에도 불구하고 침전조를 통한 viable cell의 유출량은 전체 세포의 20% 미만이었다. 초기 세포농도 $1.3 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ 에서 배양을 시작하여 약 4일이 경과하였을 때 ml당 viable cell이 $3.2 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ 에 도달하였으며 이 농도가 약 6일간 유지되었고 dead cell의 증가속도도 그림5와 비교해서 비교적 둔화되었다. 회석율이 0.05에서 0.162 hr^{-1} 까지 변하는 동안 glucose농도는 0.63에서 2.08 mg/ml 까지, ammonia는 26에서 72 ug/ml 까지 변화하였고 최고 항체 농도는 70 ug/ml 였으며 이 기간동안 항체의 생산수율은 44 mg/l media 로 나타났다. 이 값은 그림6에서 구한 수율에 비해 다소 떨어지는 것으로써 그 원인은 세포농도는 같은 수준인데 비해 회석율이 3배가량 높아졌기 때문이다. 그림9는 A type과 B type의 cell settler단점을 서로 보완하기 위해 그 중간형의 침전조를 사용하여 배양한 결과이며, 이 결과를 회분식 배양결과와 비교하여 표1에 정리하였다. 회

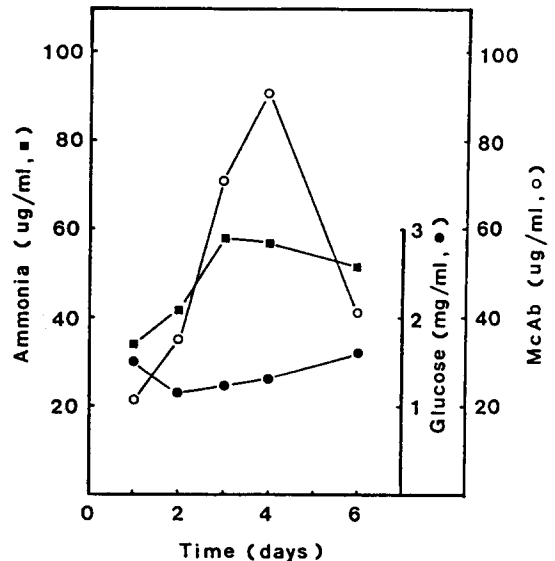


Fig. 6. Concentration profiles of Glucose, Ammonia and McAb in Alps 25-3 growth for cell settler system B.

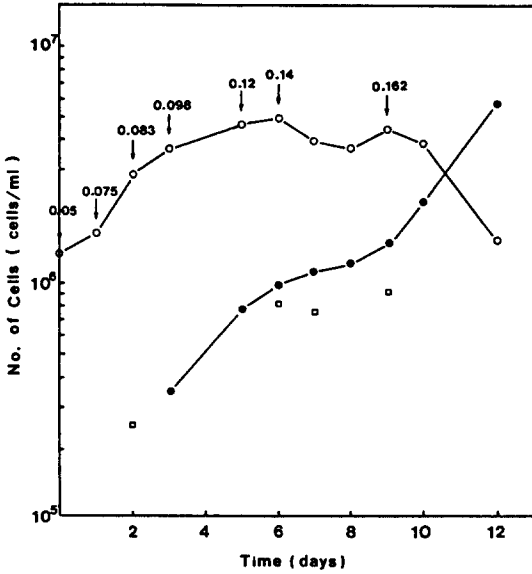


Fig. 7. Cell concentration profile of Alps 25-3 along the culture time for cell settler system B with periodic pumping.

- : viable cells
- : dead cells
- : viable cells in effluent
- : dilution rate change

석율은 0.05-0.36hr까지 증가시킬 수 있었으며 비교적 높은 세포 농도를 유지할 수 있었다. 또한 이때의 최고 항체의 농도는 150ug/ml에 달하였다. 전체 384mg의 항체를 얻어 생산수율은 81mg/l media로 회분식 배양보다

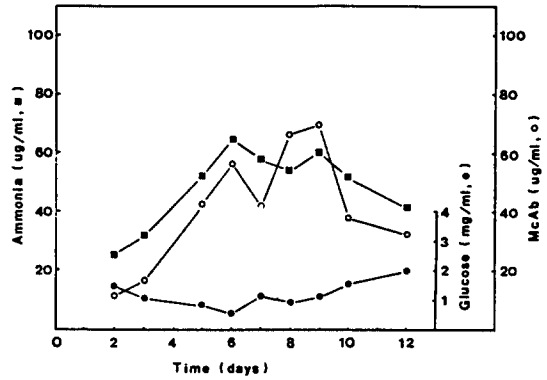


Fig. 8. Concentration profiles of glucose, ammonia and McAb in Alps 25-3 growth for cell settler system B with periodic pumping.

Table 1. Comparison of monoclonal antibody production processes.

	Batch	Cell settler
Culture Time(hrs)	116	168
Dilution rate(hr ⁻¹)	-	0.05-0.36
Medium consumed(L)	1	4.8
Maximum cell density (cells/ml)	0.9 x 10 ⁶	4.6 x 10 ⁶
Monoclonal antibody		
Max. McAb conc.(μg/ml)	20	150
Total McAb (mg)	20	384
Productivity(mg/L/hr)	0.17	1.02
Yield(mg/L)	20	81

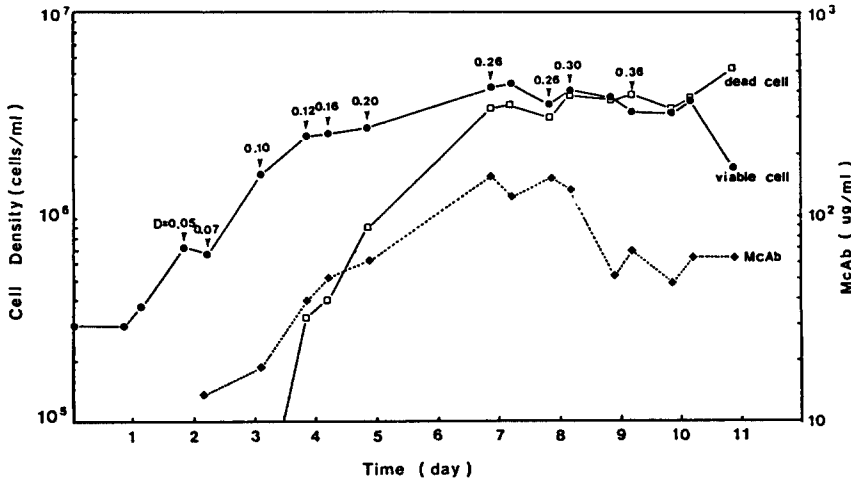


Fig. 9. Concentration profile of cell and McAb in Alps 25-3 growth for modified cell settler system.

약 4배, productivity는 약 6배 정도 높일 수 있었다.

이상에서 살펴본 바와 같이 세포 침전조를 이용한 하이브리도마의 고농도 배양은 세포의 농도를 증가시키는 일보다 증가된 세포의 viability를 유지하는 일이 더욱 어려운 것으로 보여진다. 배양시작후 5-6일이 경과하거나 세포농도가 4×10^6 cells/ml 부근에 도달하면서 죽은 세포가 갑자기 늘어나기 시작하는데 이에 대한 명확한 원인은 아직 규명되지 않았으나 배양과정에서 생성되는 성장저해요소 (ammonia, lactic acid 등)의 축적과 배양후기에 나타나는 필수 영양분 (glucose, glutamine 등)의 고갈현상을 들 수 있으며, 본 실험에서는 침전조의 결합에서 오는 제한 인자들도 고려해야 할 것이다.

첫번째 성장저해 요소로 지적되는 ammonia는 배지 성분중 L-glutamine이 energy원으로 이용될 때의 탈 amino 반응에서 주로 생성되는 것으로, 구체적으로 세포의 사멸에 대하여 어느 정도까지 영향을 미치는가에 대해서는 아직 미지수이고 그 영향도 cell line에 따라 크게 달라질 수 있지만 대체로 50-100ug/ml의 농도에서 세포에 toxicity를 가지는 것으로 보고 있다(13, 14, 15). 따라서 세포에 대한 ammonia의 영향을 줄이기 위해서 본 실험에서는 회석율 0.03 - 0.06 hr⁻¹ 까지 변화하였을 경우 최고 ammonia 농도는 60ug/ml이었으며 그림 8에서 회석율을 0.16 hr⁻¹ 까지 증가시켰을 때에도 ammonia 농도는 여전히 50ug/ml의 선을 유지하였다. 이것으로 보아 단순히 회석율을 증가시키는 방법 만으로는 ammonia의 농도를 낮출 수 없으며 배지성분을 조절함으로써 생성 ammonia의 농도를 낮추는 방법을 모색하여야 할 것이다.

세포 침전조를 이용한 고농도 배양에서 두번째 제한요소로 지적할 수 있는 것은 viable cell이 dead cell 보다 쉽게 유출된다는 점이다. 특히 높은 세포 농도에서는 10 - 20개의 세포들이 서로 뭉치는 cell agglomeration 현상이 나타나는데 이들은 비교적 쉽게 침전하여 배양기 속에 머물게 되며 이러한 세포덩어리는 대부분 dead cell로 이루어져 있으므로 침전조의 작동이 불완전하여 viable cell이 유출될 경우 배양기에는 Viable cell보다 dead cell 농도가 더 빨리 증가하게 되는 것이다. 그림 5에서 회석율이 0.066hr⁻¹으로 증가되면서 dead cell이 viable cell보다 더욱 빨리 증가하는 이유는 이러한 데에서도 기인한다고 볼 수 있다.

세포의 농도가 극히 높아질 때에는 배양기 내 필수 영양분의 고갈도 세포사멸의 한 원인으로 생각할 수 있으나 잔여 glucose의 농도가 1mg/ml 이상인 상황에서 이것이 주된 이유라고 보기 힘들며 또 이러한 문제는 회석율을 증가시키거나 배지성분을 조절하여 쉽게 해결할 수 있을 것이다. 그밖의 이유로 spinner flask에서 배지 교반을 위해 사용된 magnetic spin bar도 세포의 생존도에 나

쁜 영향을 줄 것으로 보인다. Magnetic bar의 사용이 세포 농도가 낮은 부분에서는 큰 영향을 미치지 않는다는 것이 입증되었으나(16) 세포농도가 증가할 경우 배양액의 점도와 세포끼리의 충돌 횟수가 크게 변하므로 이때 magnetic bar에 의해서 생기는 shear stress가 세포에 미칠 영향을 무시할 수 없기 때문이다. 참고로 SET-2CV에 사용된 modified angled turbine은 세포에 대한 damage를 최소화한 교반 장치이다.

이상의 결과들을 정리하여 보면 세포 침전조를 이용한 하이브리도마 고농도 배양은 높은 회석율에서도 viable cell의 유출현상을 극소화할 수 있고 비교적 세포에 damage를 적게 주는 교반장치를 이용할 경우 그 실험이 가능할 것으로 보인다. 다만 대규모 배양 장치에서는 세포의 침전이 완벽하게 일어나기를 기대하기는 어려울 것이므로 대량 배양 system에 이용하기에는 아직 많은 문제점이 남아 있다고 하겠으며 현재 침전장치를 개선중에 있다. 그러나 침전장치는 실험실에서 쉽게 제작할 수 있고 고정화 배양법에서는 불가능한 cell viability의 측정이 가능하므로 앞으로 이러한 장치의 개선이 고농도 배양에 필요한 배지 성분의 최적화 작업이나 고농도 배양의 특성을 연구하는데 큰 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

하이브리도마 세포를 고농도 배양하기 위하여 세포 침전장치를 고안하여 사용하였다. 위로 올라갈수록 직경이 넓어지는 침전조는 세포의 침전이 잘 일어나지만 침전된 세포가 침전조 벽에 누적되는 결점을 보였고, 아래 위의 직경이 균일한 침전조는 회석율이 높아질수록 유출되는 세포가 증가하는 문제점을 나타내었다. 특히 유출되는 세포속에는 dead cell보다 viable cell의 비율이 높아 배양기 내의 dead cell이 급격히 농축되는 현상을 보였다. 그러나 침전조를 적절히 고안하여 세포 누적현상을 막고 동시에 세포 유출을 완화시킬 경우 세포농도 5×10^6 cells/ml에서 일주일간 배양이 가능했다. Cell viability의 측정이 용이하므로 침전조를 이용한 하이브리도마 고농도 배양에 필요한 배지 성분의 최적화 작업이나 고농도 배양의 특성을 연구하는데 많은 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. T.J. Clark (1986), *Biofutur*, **44**, 121.
2. M.S. Sinacore, S. Geyer, M. Lynch, M. Frye, S. Dobbles, and R. Buechler (1985), *Hybridoma*, **4**, 64.
3. W. Scheirer, K. Nilsson, O.W. Merten, H.W.D. Katin-

- ger, and K. Mosbach (1984), *Develop. Biol. Standard*, **55**, 155.
4. J. VanBrunt (1985), *Bio/Technol.*, **3**, 408.
 5. G.L. Altshuler, D.M. Dziewulski, J.A. Soweck and G. Belfort (1986), *Biotech. Bioeng.*, **28**, 646.
 6. J.E. Putnam (1986), in *Commercial production of Monoclonal Antibodies* ed. by S.S. Seaver, Marcel Dekker pub., p. 119.
 7. K. Nilsson, F. Buzsaky and K. Mosbach (1986), *Bio/Technol.*, **4**, 989.
 8. N. Martin (1987), *Bio/Technol.*, **5**, 838.
 9. *Bio Response Technical Catalogue* (1987).
 10. 최태부, 조보연(1989), 한국생물공학회지, **4**, 31.
 11. S. Reuveny, D. Velez, AL Miller and, J.D. Macmillan (1986), *J. Immunol. Methods*, **86**, 61.
 12. K. Kitano, Y. Shintani, Y. Ichimori, K. Tsukamoto, S. Sasai, and M. Kida (1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 282.
 13. M. Butler (1985), *Dev. Biol. Stan.*, **60**, 269.
 14. W.J. Visek, Konodny, G.M. and P.R. Gross(1972), *J. Cell Physiol.*, **80**, 373.
 15. S. Reuveny, D. Velez, and J.D. Macmillan L. Miller(1986), *J. Immunol. Methods*, **86**, 53.
 16. 최태부 외 (1988), 단일클론항체 대량생산 기술개발에 관한 연구 보고서, 과거처.

(Received July 5, 1989)