

쥐 하이브리도마 세포배양을 위한 무혈청 배지개발(II) — 각 성분의 역할과 최소배지의 결정 —

곽원재 · 조보연¹ · 최태부*

건국대학교 미생물공학과 ¹한국과학기술연구원 유전공학센터

Development of Serum-free Media for the Culture of Mouse Hybridoma (II) ; Determination of the Role of Each Component and a Minimum Composition Media

Kwag, Won-Jae, Bo-Yeon Cho¹ and Tae-Boo Choe*

Department of Microbial Engineering, Kon Kuk University, Seoul 133-701, Korea
¹Genetic Engineering Center, KIST, Seoul 136-791, Korea

The role of each supplement in serum-free medium KM3 for the growth of hybridoma and the production of monoclonal antibody was investigated. Transferrin, ethanolamine and bovine serum albumin were shown to be indispensable for the growth of four kinds of hybridoma tested in this work, especially transferrin for Alps 25-3, and ethanolamine for A4W and KW hybridoma. The addition of β -mercaptoethanol to the culture medium of HCGK showed a good influence of both the cell growth and the production of monoclonal antibody. Upon the experimental results, we suggested a serum-free medium containing a minimum composition for the culture of hybridoma.

단일클론항체의 이용 가치와 수요가 증대하면서 단일클론항체를 생성하는 하이브리도마의 대량배양 기술이 최근 여러가지 방법에 의해서 개발되고 있으나 아직 많은 문제점들이 지적되고 있다. (1, 2). 특히, 배지 내에 첨가되어지는 혈청은 배지가격을 10 배 이상 증가시킬 뿐만 아니라 단일클론항체의 분리정제에도 많은 어려움을 주고 있다(3, 4). 그러므로 혈청배지에서의 문제점을 극복하기 위해 무혈청 배지개발이 이루어지고 있다(5-7).

본 연구에서는 전 보문(8)에서 결정한 무혈청 배지 KM3의 각 성분이 세포증식과 항체 생성에 미치는 영향을 재조사하여 무혈청 배지의 첨가물을 최소화함으로써 실질적으로 대량배양에 이용할 수 있는 방안을 모색하였다.

재료 및 방법

세포주와 배양액

β -HCG와 w-HCG로 면역시킨 Balb/c 쥐의 비장

세포와 SP 2/0-Ag 14 mouse myeloma를 융합시켜 얻은 쥐 하이브리도마 Alps 25-3, A4W, KW와 HCGK cell line을 이용하였다. 사용한 배지는 IMDM과 Ham's F-12(Sigma)를 1:1로 혼합한 배지를 기본으로 하여 2-5% Iron-supplement Bovine calf serum을 첨가하여 배양하였다. 계대배양과 세포배양은 전 보문(9)과 같다.

무혈청 배지준비

IMDM과 Ham's F-12를 1:1로 혼합한 배지를 기본으로 하여 여기에 전 단계로부터 결정한 무혈청 배지 KM3(insuline 10 μ g/ml, transferrin 10 μ g/ml, ethanolamine 10 μ M, selenium 30 nM, bovine serum albumine(BSA) 100 μ g/ml, polyethylene glycol (PEG) 0.1% and mineral cocktail 1 μ l/ml(9))의 각 성분을 한 가지씩 제거하는 방법으로 각각의 성분이 세포증식과 항체 생산에 어떤 영향을 주는가를 조사하였다. 무혈청 배지 KM4는 KM3에 β -mercaptoethanol 10 μ M이 첨가된 배지를 뜻하며 HCGK

Key words: Mouse hybridoma, serum-free media, monoclonal antibody

*Corresponding author

Table 1. Effect of media compositions on the growth and production of monoclonal antibody in Alps 25-3.

	Lag time (hr.)	Doubling time (hr.)	Maximum cell density (cells/ml)	Maximum Mab conc. ($\mu\text{g/ml}$)
2% Iron-BCS	13	11.7	1.4×10^6	35
KM3	13	11.6	1.33×10^6	28
-Mineral	13	11.2	1.32×10^6	28
-PEG	13	12.6	1.32×10^6	31
-Insulin	13.5	12.0	1.33×10^6	27
-Selenium	13.5	12.1	1.2×10^6	30
-BSA	14	13.2	1.36×10^6	27
-Ethanalamine	14.5	13.5	1.23×10^6	20
-Transferrin	16	16.6	3.4×10^5	18
-Mineral	13.5	13.0	1.38×10^6	29
-PEG				
-Transferrin	16	18.8	2.6×10^5	14
-Ethanalamine				
-Mineral	13.5	12.3	1.3×10^6	27
-PEG				
-Insulin				
I/F (1:1)	24	25.5	1.7×10^5	17

- : Subtraction from KM3

세포배양에 사용하였다.

또 쥐 하이브리도마 Alps 25-3를 이용하여 KM3 배지에서 각 성분의 역할을 조사하여 최소 무혈청 배지 KM5와 KM6를 결정하였다.

세포농도 측정과 항체농도 측정

세포배양을 통한 세포농도의 측정과 이 때 생성된 항체의 농도는 전 보문과(8) 동일한 방법으로 실행하였다.

결과 및 고찰

KM3의 각 성분이 Alps 25-3에 미치는 영향

쥐 하이브리도마 Alps 25-3를 이용하여 혈청 배지와 동일한 증식곡선을 나타내는 무혈청 배지 KM3를 결정하였으나(전 보문(8) Fig.5 참조) KM3에는 지나치게 많은 성분들이 포함되어 있어 공업적인 대량배양에 이용하기에는 부적합하고 아직까지 각 성분들이 세포증식이나 항체 생성에 어

Table 2. Effect of media compositions on the growth and production of monoclonal antibody in Alps 25-3.

	Lag time (hr.)	Doubling time (hr.)	Maximum cell density (cells/ml)	Maximum Mab conc. ($\mu\text{g/ml}$)
KM3	13	12.2	1.24×10^6	22
+ Transferrin	18	15.0	5.2×10^5	21
+ Ethanalamine	20	15.0	4.9×10^5	19
+ BSA	19	13.3	6.4×10^5	21
+ Transferrin	14	13.0	8.8×10^5	22
+ Ethanalamine				
+ Transferrin	15	10.3	7.6×10^5	22
+ BSA				
+ Ethanalamine	17	12.5	6.2×10^5	19
+ BSA				
KM5	14	10.6	1.23×10^6	22

+ : Addition to I/F (1:1)

떠한 역할을 하는지를 알 수 없으므로 이들을 재 조사하고 무혈청 배지의 성분을 최소화함으로써 실질적으로 대량배양에 이용할 수 있는 방안을 모색하였다.

우선 KM3의 각 성분을 차례로 한 가지 혹은 두 세 가지씩 제거하면서 Alps 25-3을 배양하여 KM3의 경우와 비교하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 KM3 성분 중 mineral, PEG, insulin, selenium 등은 세포증식과 항체 생성에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 그러나 transferrin을 제외했을 경우에는 doubling time(T_d)이 17시간으로 증가했을 뿐만 아니라 세포분열도 2-3회에 그쳐 최고 세포농도는 3×10^5 cells/ml에 이르렀다가 천천히 사멸기로 접어드는 양상을 보였다. 이 때 생성되는 최종 항체 농도는 KM3에 비해 약 64%, 그리고 혈청배지에 비해 약 51% 정도를 나타냈다. 한편 ethanalamine이나 BSA를 한 가지씩 제외시켰을 경우에는 최종 세포농도와 최종 항체생성 농도에는 비교적 변함이 없었으나 T_d 가 약 1-2 시간 증가됨을 알 수 있었다.

이상의 결과로 보아 mineral, PEG, insulin, selenium 등은 Alps 25-3의 증식에 크게 영향을 미치지 못하는 것으로 나타나고 있다. Insulin, transferrin, selenium, ethanalamine은 무혈청 배지에서 많은 하이브리도마 세포배양시 요구되는 성

장인자(growth factor)로 알려져 있다(10). 이 성분들 중 insulin과 transferrin 성분은 cell line에 따라 그 요구성과 적정농도에 차이를 보이고 있으며 selenium은 본 실험에서 사용한 기본배지의 하나인 IMDM에 포함되어 있는 성분 중 하나로 부가적인 첨가에 인한 영향이 거의 없는 것으로 보인다. 따라서 이들을 제외한 3가지 성분 즉 transferrin, ethanolamine 그리고 BSA에 대한 효과를 다시 조사하여 Table 2에 정리하였다. 먼저 I/F(1 : 1) 기본배지이 transferrin만을 첨가하여 배양하였을 때 성장잠재기가 KM3에 비해 약 5시간 정도 연장되었으며 T_d 도 3시간 정도 증가되었고 배양일 3일째에 최고 세포농도 5.2×10^5 cells/ml로 KM3에 비해 45% 정도였다. 그러나 이 때 생성된 항체의 농도는 초기에는 상당히 낮았으나 최종 항체농도는 KM3에서와 거의 비슷한 양상이었다. Transferrin과 ethanolamine을 동시에 가했을 때에는 transferrin만 첨가했을 경우보다 성장잠재기가 4시간 정도 짧아지고 T_d 도 2시간 정도 감소하였으며 배양일 3일째에 최고 세포농도는 8.8×10^5 cells/ml로 향상되었다. 이 경우에도 최종 항체생성 농도는 KM3와 같았다.

한편 transferrin과 BSA를 함께 첨가했을 때에는 성장잠재기는 transferrin과 ethanolamine을 함께 가했을 경우와 비슷했지만 증식초기에 급격히 증식하여 최고 세포농도 7.6×10^5 cells/ml를 정점으로 사멸기에 들어가는 증식곡선을 보였으며 이 때 생성된 최종 항체농도는 역시 KM3와 같았다. 따라서 I/F 배지에 3가지 성분을 모두 혼합한 배지를 KM5라 명명하고 이 배지에 배양한 Alps 25-3의 세포 증식속도와 항체생성은 KM3와 동일한 양상을 보였다(Table 2).

Table 1에서 보면 KM3 성분들 중에서 ethanolamine이나 BSA를 제외시키면 성장잠재기가 연장되고 doubling time이 약간 증가되었을 뿐 최고 세포농도에서는 KM3와 거의 비슷한 양상을 보임을 확인할 수 있었다. 그러나 KM5에서는 이들 성분 중 어느 하나라도 제외시키면 최고 세포농도가 KM3에 비해 약 60-70% 정도의 수준을 보이는 것으로 보아 KM3의 경우에서는 기타 다른 첨가성분들이 보완 작용을 통해 이들 두 성분에 대체되고 있음을 짐작할 수 있다.

KM3의 각 성분이 다른 쥐 하이브리도마에 미치는 영향

KM3의 각 성분이 Alps 25-3 이외의 다른 쥐 하

Table 3. Effect of media compositions on the growth and production of monoclonal antibody in A4W.

	Lag time (hr.)	Doubling time (hr.)	Maximum cell density (cells/ml)	Maximum Mab conc. (μ g/ml)
5% Iron-BCS	16	14	1.0×10^6	100
KM3	19	18.4	6.0×10^5	100
-Transferrin	24	41.2	2.5×10^5	73
-Ethanolamine	60	39.1	3.0×10^5	45
-BSA	21	22	5.5×10^5	92
-Insulin	20	29	5.5×10^5	95
KM5	19	23	6.3×10^5	94

--: Subtraction from KM3

이브리도마 cell line에서 어떤 영향을 하는지를 조사하였다.

A4W : 혈청배지에서 A4W는 접종농도를 5×10^4 cells/ml로 했을 때 doubling time은 약 14시간이고 최고 생존 세포농도는 1×10^6 cells/ml 전후로 나타나며 최종 항체 생성농도는 100μ g/ml을 보여주고 있다(Table 3 참조).

그러나 무혈청 배지 KM3에 A4W를 배양시키면 성장잠재기가 약 3시간 연장되고 doubling time이 4시간 정도 증가된다. 최고 세포농도는 배양일 4일째에 혈청배지에 비해 60% 수준을 보였고 성장정지기가 연장됨으로써 천천히 사멸기에 접어들었다. 이에 비해 최종 항체 생성농도는 혈청배지와 거의 동일한 양상을 보여주고 있다.

KM3에서 transferrin이나 ethanolamine을 제거하였을 경우 Alps 25-3의 경우와는 달리 세포의 증식이 현저히 둔화되었으며 배양일 5일이 경과할 때까지 1회 정도 분열하여 배양일 6일째에 최고 세포농도 3.0×10^5 cells/ml을 보였다. 이 때 항체 생성농도는 KM3에 비해 매우 낮은 45% 정도만을 보였다. 한편 무혈청 배지 KM5에 A4W를 배양했을 때에는 KM3에 비해 성장잠재기는 거의 비슷하였으나 doubling time은 약 23시간으로 KM3에 비해 5시간이 증가되었고 항체생성은 배양 초기에는 KM3에 비해 매우 낮았지만 최종 항체생성농도는 약 94% 정도를 유지하였다. 이상의 결과로 볼 때 A4W의 경우에는 세포증식이 transferrin과 ethanolamine을 필수적으로 요구함을 알 수 있었고 최종 항체농도에도 크게 영향을 미치는 것으로 나타났다.

KW : 쥐 하이브리도마 KW를 2% 혈청배지에 배양

Table 4. Effect of media compositions on the growth and production of monoclonal antibody in KW.

	Lag time (hr.)	Doubling time (hr.)	Maximum cell density (cells/ml)	Maximum Mab conc. ($\mu\text{g/ml}$)
2% Iron-BCS	13	16	1.2×10^6	68
KM3	14	18.2	6.7×10^5	61
-Transferrin	16	18.3	1.0×10^5	58
-Ethanolamine	48	42	1.5×10^5	37
-BSA	35	24.8	5.4×10^5	56
KM5	18	18	6.0×10^5	58

- : Subtraction from KM3

시키면 배양일 4일 째에 최고 세포농도 1.2×10^6 cells/ml을 보이며 급격히 사멸기에 들어가는 증식 곡선을 갖는다. 이 때 doubling time은 약 16시간이며 최종 항체농도는 $68 \mu\text{g/ml}$ 이었다. 이에 비해 KM3에서 배양시키면 최고 세포농도는 혈청배지에 비해 56% 정도이며 생성된 항체의 농도도 90% 수준으로 보여지고 있다(Table 4).

한편, KM3에서 transferrin, ethanolamine과 BSA를 차례로 제외시켰을 때의 결과는 Table 4와 같다. Transferrin을 제외시킨 경우에는 KM3와 거의 비슷한 양상을 보였지만 ethanolamine을 제외시켰을 때에는 A4W와 마찬가지로 세포증식이 거의 일어나지 않다가 배양일 5일째에 최고 세포농도 1.5×10^5 cells/ml을 보였으며 이 때 최종 항체의 농도도 KM3의 60% 정도에 머물렀다.

KW 세포를 무혈청 배지 KM5에서 배양시켰을 경우 KM3에 비해 성장잠재기가 약간 연장되었으나 최고 세포농도는 거의 같은 수준을 보였고 최종 항체농도에서도 약 95% 수준을 유지하였다.

HCGK : 전 보문(8)에서 이미 밝힌 바와 같이 HCGK를 무혈청 배지 KM3에서 배양할 경우 성장잠재기가 길어지고 최고 세포농도도 현저히 낮게 나타나고 있다(Table 5 참조). 그러므로 KM3에 β -mercaptoethanol $10 \mu\text{M}$ 을 첨가하여 KM4를 결정한 바 있다.

2% 혈청배지에서 HCGK는 배양일 4일 째에 최고 세포농도 9.6×10^5 cells/ml에 도달했다가 비교적 완만하게 사멸기에 접어든다. 이 때 생성된 최종 항체의 농도는 약 $74 \mu\text{g/ml}$ 으로 나타났다. 한편 무혈청 배지 KM4에서 배양시켰을 때에는 배양일 4일째에 최고 세포농도가 혈청배지에 비해 약 50% 정도였으며 이 때 생성된 최종 항체농도는

Table 5. Effect of media compositions on the growth and production of monoclonal antibody in HCGK.

	Lag time (hr.)	Doubling time (hr.)	Maximum cell density (cells/ml)	Maximum Mab conc. ($\mu\text{g/ml}$)
2% Iron-BCS	14	16.5	9.6×10^5	74
KM3	20	23.8	1.8×10^5	41
KM4	15	23	5.0×10^5	63
-Ethanolamine	45	48	9.0×10^4	42
KM6	17	19.2	5.4×10^5	56

- : Subtraction from KM4

약 85%였다(Table 5). KM4 성분 중 ethanolamine을 첨가하지 않고 배양했을 경우에는 세포가 거의 증식하지 않는 것을 확인할 수 있었으며 transferrin과 BSA는 크게 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 무혈청 배지 KM5에 β -mercaptoethanol을 첨가하여(KM6) 배양시켰을 경우에 세포 증식면에서는 KM4 보다 오히려 좋은 편이었지만 최종 항체농도에서는 KM4에 비해 10%가 감소하는 것으로 나타났다.

이상의 결과들을 종합하여 볼 때 다음과 같은 결론을 내릴 수 있었다. 본 실험에서 조사한 4종의 쥐 하이브리도마 배양에는 transferrin, ethanolamine과 BSA가 필수적으로 요구되며 Alps 25-3의 경우에는 특히 transferrin이(Table 1), 그리고 A4W와 KW의 경우에는 ethanolamine이(Table 3, 4) 세포증식에 크게 영향을 미치고 있다. 그리고 HCGK의 경우에는 위의 3가지 성분 외에도 β -mercaptoethanol이 세포증식에 좋은 효과를 나타내었다.

Ethanolamine은 많은 하이브리도마 세포배양에 필수적인 성분으로 cell line 세포막의 phosphatidylethanolamine의 함량을 변화시키는 중요한 성분 중 하나이며(11) peroxide 독성에 대해 세포를 보호하는 glutathione peroxidases의 중요성분으로 알려져 있다.

무혈청 배지 KM3나 KM5에서의 하이브리도마 배양이 혈청 첨가배지에 비해 최고 세포농도가 50-90%의 수준인데 비해 생성된 단일클론 항체의 농도는 거의 85-100% 수준에 이르는 것으로 나타났다으며, 이에 대한 정확한 설명은 아직 불가능하나 항체의 농도가 반드시 최고 세포농도와 비례하지 않는다는 것은 타 실험을 통해 이미 밝힌 바 있다(12).

요 약

쥐 하이브리도마 Alps 25-3를 이용하여 무혈청 배지 KM3의 각 성분이 세포증식과 항체생성에 미치는 영향을 조사하여 무혈청 배지를 최소화한 KM5를 결정하였다. Alps 25-3에 영향을 미치는 것으로 조사된 transferrin, ethanolamine 그리고 BSA만을 혼합하여 결정된 KM5를 다른 쥐 하이브리도마인 A4W, KW 그리고 HCGK에 적용시켰다. KM5를 KM3와 비교하였을 때 세포증식과 항체생성이 거의 동일한 양상을 보였다. 그러나 혈청배지와 비교하여 보면 최고 세포농도는 50-90%, 최종 단일클론항체의 농도는 85-100%의 수준을 보였다. 본 연구의 결과로 쥐 하이브리도마 세포를 무혈청 배지에서 배양시킬 때 필수적으로 첨가되어야 하는 성분들이 조사되었으므로 대량배양에 응용하거나 대사를 연구하는데 유용하게 이용되어지리라 본다.

참고문헌

1. Hu, W.S. and T.C. Dodge: *Biotechnology Progress*,

- 1, 209 (1985).
2. Merten, O.W.: *Trends in Biotechnology*, **5**, 230 (1987).
3. Cleveland, W.L., I. Wood and B.F. Erlanger: *J. Immuno. Methods*, **56**, 221 (1983).
4. Griffiths, B.: *Trends in Biotechnology*, 268 (1986).
5. Kovar, J. and F. Franek: *Biotechnology Letters*, **9**, 259 (1987).
6. Cole, S.P.C., E.H. Vrecken, S.E.L. Mirski and B.G. Campling: *J. Immuno. Methods*, **97**, 29 (1987).
7. Takazawa, Y. and M. Tokashiki: *Biotech. Bioeng.*, **31**, 168 (1988).
8. 조보연, 최태부: 한국산업미생물학회지, submitted
9. 최태부, 정용근: 한국산업미생물공학지, **16**, 335 (1988)
10. Barnes, D. and G. Sato: *Anal. Biochem.*, **102**, 255 (1980).
11. Murakami, H., H. Masui, G.H. Sato, N. Sueoka, T.P. Chow and T.K. Sueoka: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1158 (1982).
12. 최태부, 조보연: 한국생물공학지, **4**, 31 (1989)

(Received July 12, 1989)