

하이브리도마 세포의 유가식 배양에서 배지첨가속도가 단일클론 항체 생산에 미치는 영향

곽원재^o · 최태부* · 박정극¹

건국대학교 미생물공학과, ¹동국대학교 화학공학과

The Effect of Media Feeding Rate on the Production of Monoclonal Antibody Production in the Fed-batch Culture of Hybridoma

Kwag, Won-Jae, Tae-Boo Choe and Jung-Kug Park¹

Department of Microbial Engineering, Konkuk University, Seoul 133-701, Korea

¹Department of Chemical Engineering, Dongkug University, Seoul 100-715, Korea

Abstract — The effect of media feeding rate on cell growth and monoclonal antibody production in the fed-batch culture of hybridoma A4W was studied. In the batch culture, the highest specific antibody production rate was observed at the beginning of the culture period but its value tended to decrease rapidly with the culture time. The final antibody concentration and volumetric productivity was 65 µg/ml and 13 mg Mab/l/day, respectively. In the fed-batch culture, the specific antibody production rate, q_p , rebounded sharply within a few hours after the media feeding was started and it remained high until the end of culture if the media feeding was continued. The final antibody concentration was 220 µg/ml and the volumetric productivity was 45.1 mg/l/day. Further increase in final antibody concentration was achieved by applying a modified media of which component was fortified with glucose and glutamine, hence the final antibody concentration in this case was 270 µg/ml and the volumetric productivity was 51.8 mg/l/day, which is as four times as high comparing to that of batch culture.

단일클론 항체의 상업적 이용이 초기에는 주로 체외 진단시약(혈액형 판정 및 임신초기 진단 등)으로 사용되었으나 최근에는 종양세포의 체내 진단과 치료, 가축의 수태조절 및 질병 치료제 등으로 이용될 수 있으며 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(1). 이와 같이 단일클론 항체의 이용이 단순한 체외 진단시약 뿐 아니라 체내 진단시약 및 면역요법에 의한 치료제 등으로 이용됨에 따라 그 수요가 크게 증대할 것으로 전망하고 있다(2-4). 이처럼 급격히 증가하는 수요에 따라 항체의 대량생산이 필요하게 되었으나 종래의 항체생산 방법인 쥐의 복강을 이용하거나 Tissue flask 혹은 Roller bottle 등을 이용한 실험실적

방법으로는 대량생산이 불가능 하게 되었다. 따라서 단일클론 항체의 공업적인 대량생산을 위해 여러 가지 형태의 배양장치에 관한 연구(5) 뿐만 아니라 배양액의 조성이나 배양조건과 같은 환경인자들의 조절을 통하여 생산성을 향상시킬 수 있는 배양방법의 개발에 관한 연구(6)도 활발히 진행되어 왔다.

하이브리도마 세포의 배양에서 항체의 단위 체적당, 단위 시간당 생성속도(volumetric productivity) ($\mu\text{g Mab/ml/hr}$)는 단위 세포당, 단위 시간당, 항체 생성속도(specific antibody production rate, q_p) ($\mu\text{g mab}/10^6 \text{ cells/hr}$)와 배양액내의 생존세포 농도(n , 10^6 cells/ml)의 곱으로 나타낼 수 있다. 또, 최종 생성된 항체농도(C_{final})는 volumetric productivity를 배양시간(t_f)에 따라 적분한 값이 된다. 즉,

$$C_{final} (\mu\text{g Mab/ml}) = \int_0^{t_f} q_p \cdot n \, dt \quad (q_p, n=f(t))$$

Key words: Hybridoma, fed-batch culture, monoclonal antibody production

*Corresponding author

^o현주소: 유한양행 생물공학연구소

따라서, 주어진 세포주를 이용하여 최대의 항체를 얻기 위해서는 높은 q_p 값을 가진 세포들을 고농도로 장시간 배양할 수 있어야 한다. 그러나 회분식 배양에서는 배양액 중의 영양분이 연속적으로 소비되어 고갈되고 toxic waste products인 ammonia와 lactic acid가 축적되므로 세포의 고농도 배양이나 장시간 배양이 어려워 최종 생성되는 항체농도가 매우 낮아 대량생산에서 중요한 문제점으로 지적되고 있다(7). 회분식 배양에서의 이러한 문제점을 극복하기 위하여 회분식 배양보다 항체생산 수율이 높고 보다 더 오랫동안 조업이 가능한 유가식 배양법(fed-batch culture)이나, 고농도 관류 배양법(high density perfusion culture)이 현재 많이 개발되고 있다(8-10). 하이브리도마 세포의 유가식 배양법은 고농도 관류 배양에 비해 생산성이 떨어지기는 하나 별도의 세포 고정화 과정이 필요없고 회분식 배양기를 이용할 수 있어 scale-up이 용이하며 고가의 배지를 효과적으로 이용하여 항체를 고농도로 얻을 수 있는 장점이 있다. Reuveny 등(11)에 의하면 하이브리도마를 유가식 배양법으로 배양할 경우 새배지를 연속적으로 공급하여 배양 후반부에 영양분이 고갈되는 현상을 극복할 수 있었으며, 새배지의 첨가속도를 조절함으로써 waste products의 생성을 조절할 수 있어 회분식 배양에 비해 최고 세포농도가 증가되고 세포의 생존기간이 연장되며 배양 후반부에서도 항체의 생성이 계속되어 배양액 중의 최종 항체농도와 생산성이 2배 이상 향상되었다고 보고했다.

그러나 현재 하이브리도마 세포의 유가식 배양법은 항체 생산에 대한 수학적 model이 없어 이를 시도하는 사람이 매우 적은 실정이다. 최근에 Glacken 등(12)이 유가식 배양에서 하이브리도마 세포의 배양을 수학적 수식 model에 의해 simulation를 시도했지만 항체 생성에 대한 예측은 실제와 큰 차이가 있음을 보여주었다. 따라서 새배지의 첨가속도와 배지성분의 조성변화가 최종 항체농도를 결정하는 인자인 항체의 비생성속도, q_p 와 생존세포 농도, n 에 미치는 영향을 체계적인 실험을 통해 종사되어야만 유가식 배양에서 수학적 model에 의한 항체생성의 simulation이 가능하리라 생각된다.

Reuveny 등(11)이 실시한 하이브리도마 세포의 유가식 배양에서는 세포농도에 관계없이 새배지를 일정한 속도로 첨가하였으나 본 연구실에서 행한 예

비실험의 결과에 의하면(15) 배지의 첨가속도가 항체의 비생산속도에 많은 영향을 주는 것으로 나타났으므로 본 연구에서는 배지의 첨가속도와 첨가배지의 성분 조성을 변화시켜 이들이 세포증식과 항체생산 속도에 미치는 영향을 조사해 최종 항체농도를 향상시킬 수 있는 방안을 모색해 보았다.

재료 및 방법

세포주

β -HCG(Human Chorionic Gonadotropin)로 면역시킨 Balb/C 쥐의 비장세포와 sp2/0-Ag/4 mouse myeloma를 융합(fusion)시켜 쥐 하이브리도마 A4W를 얻었다(18). A4W는 β -HCG에 대해 특이성을 갖은 IgG₁(Immunoglobulin G₁)을 생산한다.

사용배지

사용한 기본배지는 IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Sigma)과 Ham's Nutrient F-12 media(Sigma)를 1:1로 혼합 하고(I/F (1:1) 배지) 2.1 g/l sodium bicarbonate(Sigma), 10 mM HEPES(Sigma), 그리고 1%(v/v) antibiotics mixture(penicillin 50,000u, streptomycin 50 mg, neomycin 100 mg, Sigma)를 첨가한 기본배지에 Iron-supplemented bovine calf serum(BCS, Hy-clone)을 첨가하여 사용했다. 배지의 멸균방법은 membrane filtration(pore size 0.22 μ m) 방법으로 제공하였다.

계대배양과 세포배양장치

세포주의 계대배양은 조직배양 플라스크(tissue flask, 25 cm², Costa)를 이용하여 humidified CO₂ incubator(5% CO₂, 95% air, 37°C, KMC) 속에서 배양했고 2~3일 마다 새배지로 갈아주어 세포를 계속 유지시켰다. 이 때 세포농도는 5~6 \times 10⁴ cells/ml이 되게 접종하였다.

세포배양실험은 2l stirred tank culture system (working volume 1l, SGI)을 이용하였으며 배양온도는 37°C로 조절하였고 용존산소(D.O.)는 air와 pure oxygen를 사용하여 20~40%되게 surface aeration 방법으로 조절했다. pH는 CO₂ gas 및 0.2 N NaOH 용액을 이용하여 7.2 \pm 0.2이 되게 유지시켰다. 그리고 세포의 농도는 0.4% trypan blue로 염색하여 hemacy-

tometer상에서 생존세포수를 세어 결정하였다.

단일클론 항체의 농도측정

배양액내의 항체농도는 SRID(Single radial immunodiffusion)법(13)을 이용하여 goat antimouse IgG antisera가 1% 첨가된 agarose gel(1%, w/v)에 배양액 10 μl씩을 첨가한 후 24시간 이상 상온에 방치하여 형성된 "halo"의 직경을 측정하여 계산하였다.

Glucose와 Ammonia 농도측정

배양액내의 잔류 glucose 농도는 glucose oxidase와 peroxidase(영동제약)를 이용한 colorimetric method에 의해 결정하였다(14). 그리고 ammonia 농도는 Wako Pure Chemi. Ind. Ltd.(Japan)에서 구입한 assay kits(Indophenol method)에 의해 측정하였다.

유가식 배양

유가식 배양은 초기 배양액의 부피를 250~300 ml로 하여 초기 세포농도를 6~8×10⁴ cells/ml로 접종해 약 48시간 동안은 회분식으로 세포를 배양한 후 49시간부터 배지를 첨가했다. 배양액의 첨가속도는 personal computer에 연결된 digital peristaltic pump (cole parmer)를 사용하여 조절했다. 본 유가식 배양에서의 배지첨가속도는 배양액내의 총생존세포수에 비례하여 feeding rate가 결정되는 growth-dependent feeding mode를 이용했다. 즉,

$$F = q_f \cdot N_t$$

F : feeding rate(ml/hr).
 q_f : specific feeding rate(ml/10⁹ cells/hr),
 N_t : total viable cell number(10⁹ cells)

여기서 q_f 는 단위 시간당, 단위 세포당 배양액의 첨가속도를 의미하며 배지의 첨가속도에 대한 실험에서는 6, 12 그리고 18 ml/10⁹ cells/hr로 점차 증가시켜 세포증식과 항체생성에 미치는 영향을 조사했다. 6 ml의 배지속에는 약 20 mg의 glucose와 2.2 mg의 glutamine이 들어있어 전 실험(15)에서 구한 A4W 세포의 glucose 최대 소비속도인 80 mg/10⁹ cells/hr와 glutamine 최대 소비속도인 10.8 mg/10⁹ cells/hr의 각각 20~25%에 해당하는 양의 glucose 및 glutamine을 매시간 공급하는 셈이고, 12 ml/hr는 40~50%, 그리고 18 ml/hr는 65~75%의 glucose와 gluta-

mine을 공급하는 셈이된다. 그리고 배양액 성분의 조성을 변화시킨 실험에서는 첨가배지의 성분 중 I/F (1:1) 기본배지에 혈청농도를 0.5%로 낮추거나 glucose와 glutamine의 농도를 2배로 강화한 첨가배지를 사용했으며 q_f 는 12 ml/10⁹ cells/hr로 고정시켰다. 따라서 여기서는 glucose와 glutamine 최대 소비속도의 약 100%에 해당하는 양이 매시간 공급되는 셈이다.

결과 및 고찰

회분식 배양

Fig. 1은 회분식 배양에서 하이브리도마 세포 A4W의 전형적인 성장곡선과 항체생성을 나타낸 것으로 시간에 따른 glucose 및 ammonia의 농도변화도 함께 나타냈다. 초기 세포농도를 5×10⁴ cells/ml로 했을 때 약 15시간 정도의 성장잠재기와 40~50시간의

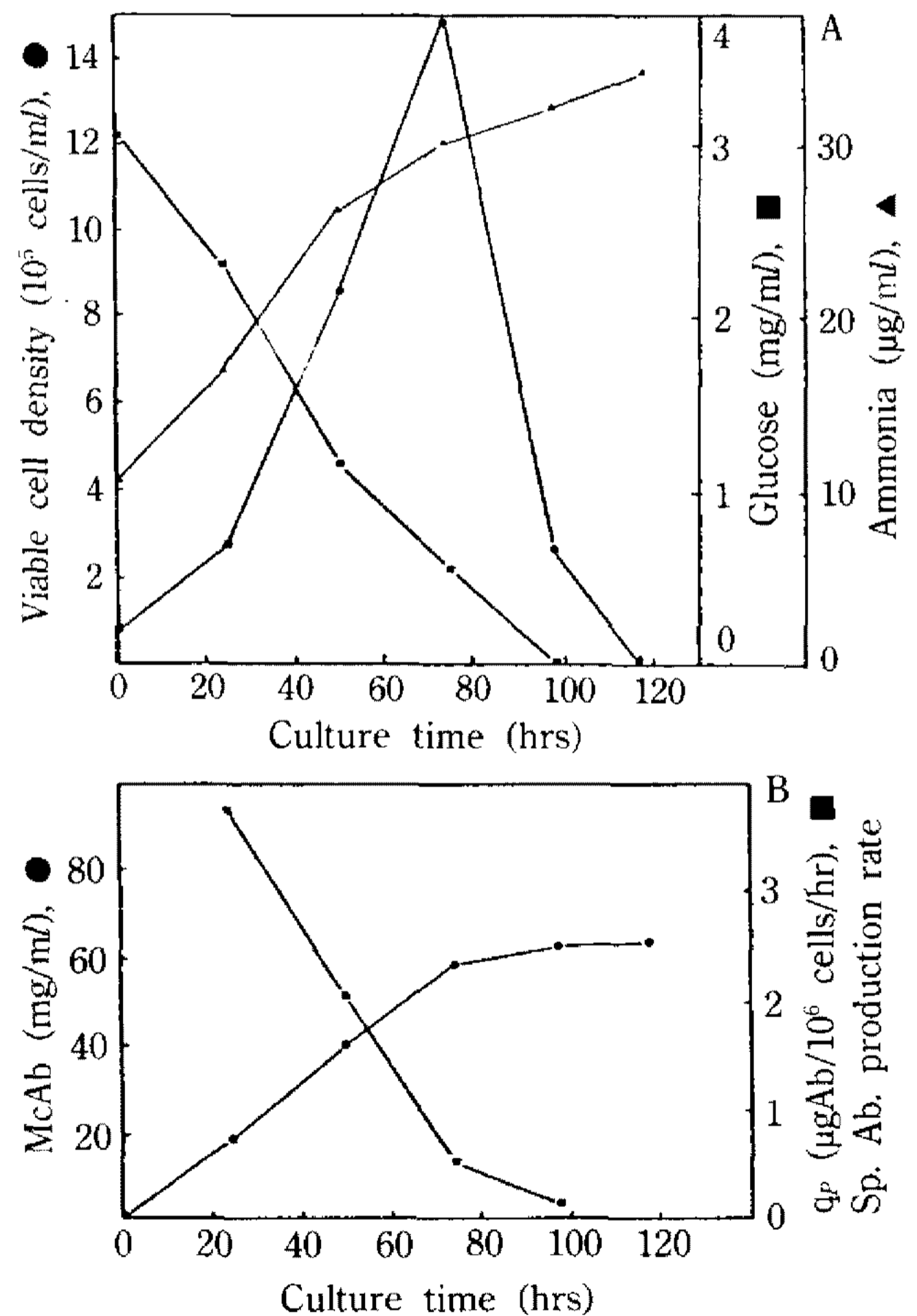


Fig. 1. Growth curve of hybridoma A4W in the batch culture (I/F(1:1)+5% BCS), B; Profile of antibody concentration and specific antibody production rate in the batch culture of hybridoma A4W.

대수증식기를 거쳐 배양 70시간을 전후에 최고 세포 농도 1.5×10^6 cells/ml에 도달한 후 곧바로 급격한 세포 사멸기에 들어가는데 이에 소요되는 총 배양시간은 110~120시간 정도였다. Glucose는 대체로 배양 90시간 이내에 거의 소모되었으며 생성되는 ammonia의 농도는 최종적으로 약 $40 \mu\text{g/ml}$ (2.2 mM) 정도로 이것으로 보아 첨가되는 glutamine (2.5 mM)이 거의 소모된 것으로 보인다(예비실험을 통하여 glutamine 1 mM 이 소비될 때 ammonia 약 1 mM 이 생성됨을 확인하였다).

한편, 생성되는 항체의 농도변화를 보면 배양 80시간까지는 계속 증가되나 그 이후부터는 거의 증가되지 않아 최종 항체농도는 약 $65 \mu\text{g/ml}$ 정도였다. 이로부터 평균 volumetric productivity를 계산하면 약 13 mg Mab/l/day 에 해당한다. 항체의 비생성속도 q_p 는 배양 초기에 $3.8 \mu\text{g}/10^6 \text{ cells/hr}$ 로 가장 높았다가 계속 감소하는 경향을 보였으며 특히 배양 80시간 이후에는 q_p 값이 0.5 이하로 매우 낮아 실질적으로 항체농도는 거의 증가하지 않았는데 이 때 생존세포 농도는 $1 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ 로 높게 나타냈다. 이처럼 배양 후반부에서 생존세포의 농도는 높지만 q_p 값이 낮아 항체농도가 거의 증가하지 않는 이유는 크게 두 가지로 볼 수 있다. 즉 배양액내의 glucose나 glutamine과 같은 영양분의 고갈현상과 이들의 부산물인 lactic acid 및 ammonia 등의 축적으로 인한 toxic effect가 바로 그것이다. 특히 에너지원으로 이용되는 glutamine의 고갈현상이 항체 생성속도를 낮추는 가장 주된 요인으로 생각되어지며 이에 대한 상세한 설명은 뒤에서 다시할 것이다.

Fig. 2와 Table 1은 I/F(1:1) 기본배지(glucose

17.5 mM , glutamine 2.5 mM)에 glucose나 glutamine의 농도를 보다 높여 배양했을 때 얻은 세포 증식곡선과 생성된 항체의 농도를 나타낸 것으로 기본배지에 glucose와 glutamine의 농도를 각각 2배씩 높였을 때 세포의 증식속도는 거의 영향이 없었으나 최고 세포농도는 다소 감소하는 경향을 보였다. 그

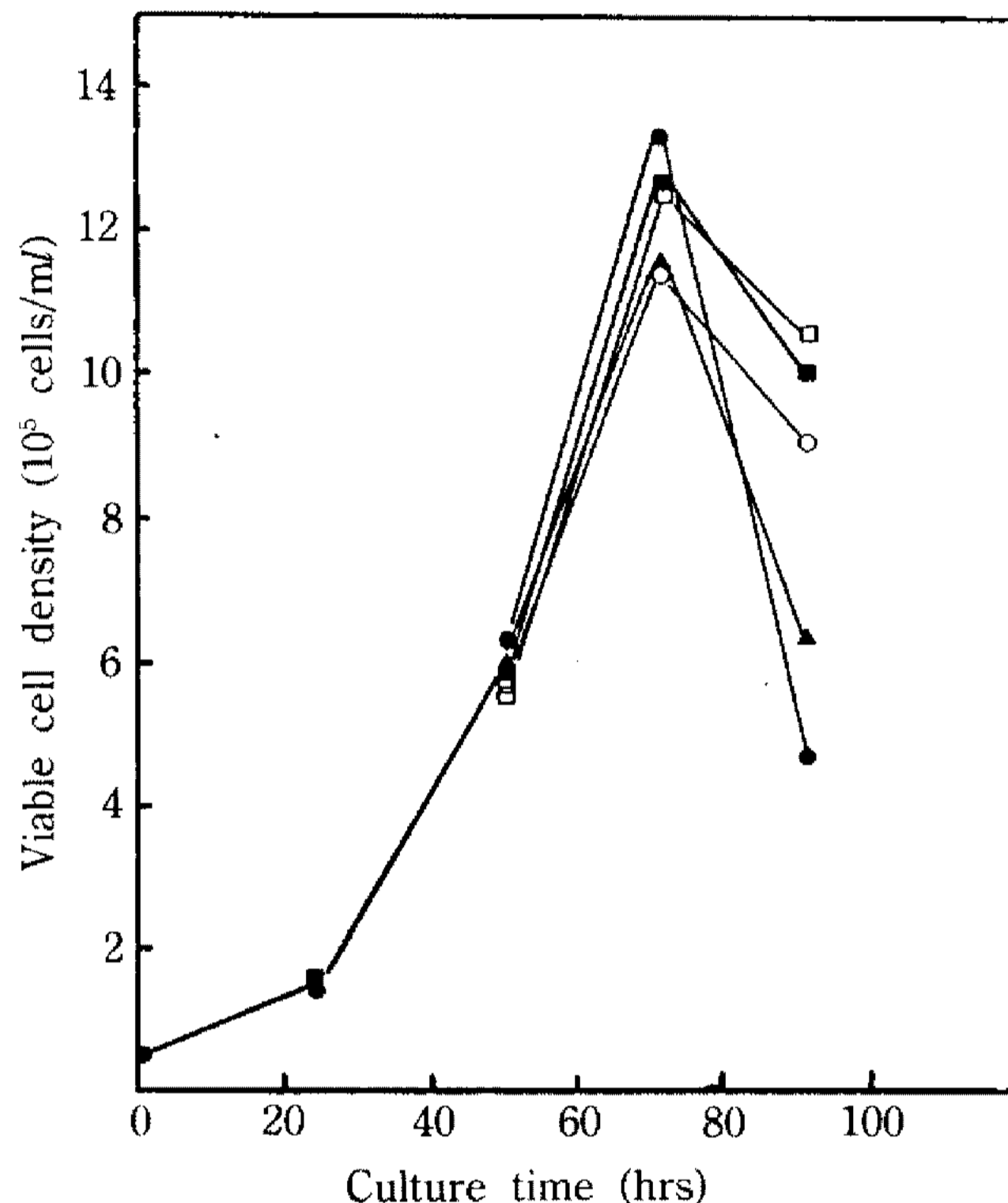


Fig. 2. Growth of hybridoma A4W in the batch culture at various glucose and glutamine concentration.

●: I/F (1:1), control; 17.5 mM glucose & 2.5 mM glutamine; ■: I/F (1:1) with 35 mM glucose; ▲: I/F (1:1) with 5 mM glutamine; ○: I/F (1:1) with 26.3 mM glucose & 3.75 mM glutamine; □: I/F (1:1) with 35 mM glucose & 5 mM glutamine

Table 1. Effect of glucose and glutamine supplement on the cell viability and Mab production in the bath culture of hybridoma

Supplement	Control I/F (1 : 1)	Glucose 35 mM	Glutamine 5 mM	Glucose 26.3 mM Glutamine 3.75 mM	Glucose 35 mM Glutamine 5 mM
q_p^1 ($\mu\text{g}/10^6 \text{ cell/hr}$)	0.18	0.85	0.75	0.34	1.21
Viability ¹ (%)	26	66	38	54	63
C_{final} ($\mu\text{g/ml}$)	68	78	72	98	112
Final glucose concentration (mg/ml)	0.05	3.09	0.20	2.03	3.33
Final ammonia concentration ($\mu\text{g/ml}$)	40.9	53.7	89.8	77.9	91.2

¹ Values at 90 hrs of culture

러나 배양 90시간 때의 세포생존도를 보면 glucose 혹은 glutamine이 강화된 경우가 기본배지에 비해 높게 유지되었으며 생성되는 최종 항체농도도 역시 크게 높아져 control의 68에서 최고 112 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 증가했다. 이는 배양 후반부의 세포생존도 향상 뿐만 아니라 항체생성속도 q_p 값이 control에 비해 4~6배 가량 높아진 이유 때문인 것으로 보여지며(Table 1) 이 실험을 토대로 하여 배양도중 새배지를 주입하는 유가식 배양을 실시하게 되었다. 한편, 이 때 생성되는 ammonia의 농도를 보면, I/F(1:1) 기본배지를 사용했을 때에는 ammonia의 최종농도가 2.5 mM를 넘지 못했으나 glutamine의 농도가 5 mM까지 강화되었을 때에는 ammonia 농도도 5 mM 이상으로 생성되는 것으로 나타나 glutamine의 첨가농도에 따라서 ammonia의 생성농도가 결정된다는 것을 알 수 있다.

유가식 배양

배지의 첨가속도가 항체생성에 미치는 영향:

Growth-dependent feeding mode는 배양액내의 전체 생존세포수에 비례하여 배지를 첨가해주는 방법이므로 단위 시간당, 단위 세포당 배지의 주입량(specific

rate) q_f 를 미리 정하고 매시간 마다 배양액내의 총 생산세포수를 결정하면 매시간당 배지의 첨가속도가 결정된다.

Fig. 3은 하이브리도마 A4W의 유가식 배양에서 배지의 비첨가속도를 6, 12 그리고 18 $\text{ml}/10^9$ cells/hr로 점차 증가시켜 가면서 구한 세포의 증식곡선과 항체농도의 변화량을 나타낸 것이다. 전체적으로 볼 때 회분식 배양에서의 최고 세포농도보다는 다소 증가된 $1.6\sim 2.0 \times 10^6$ cells/ml의 세포농도를 보였고, 최고 항체농도는 회분식 배양에서 얻은 65 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 보다 3배 이상 향상된 220 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 증가했다. 그리고 배양시간 또한 20시간 정도 연장되었다.

q_p 를 6에서 12 $\text{ml}/10^9$ cells/hr로 증가시키면 최고 세포농도는 배지에 의한 희석효과에 의해 다소 감소함을 보였으나 최종 항체농도는 오히려 200에서 225 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 증가했다. 그러나 q_f 를 18 $\text{ml}/10^9$ cells/hr로 더욱더 증가시켰을 때에는 최근 세포농도 뿐만 아니라 항체농도도 감소함을 보였다.

Fig. 4는 이 실험결과로부터 세포의 비증식속도 μ (hr^{-1}), 그리고 항체의 비생성속도 q_p (mg Mab/ 10^9 cells/hr)를 계산하여 나타낸 것이며 Table 2는 각 실험에서 생산된 항체의 총량과 평균 volumetric pro-

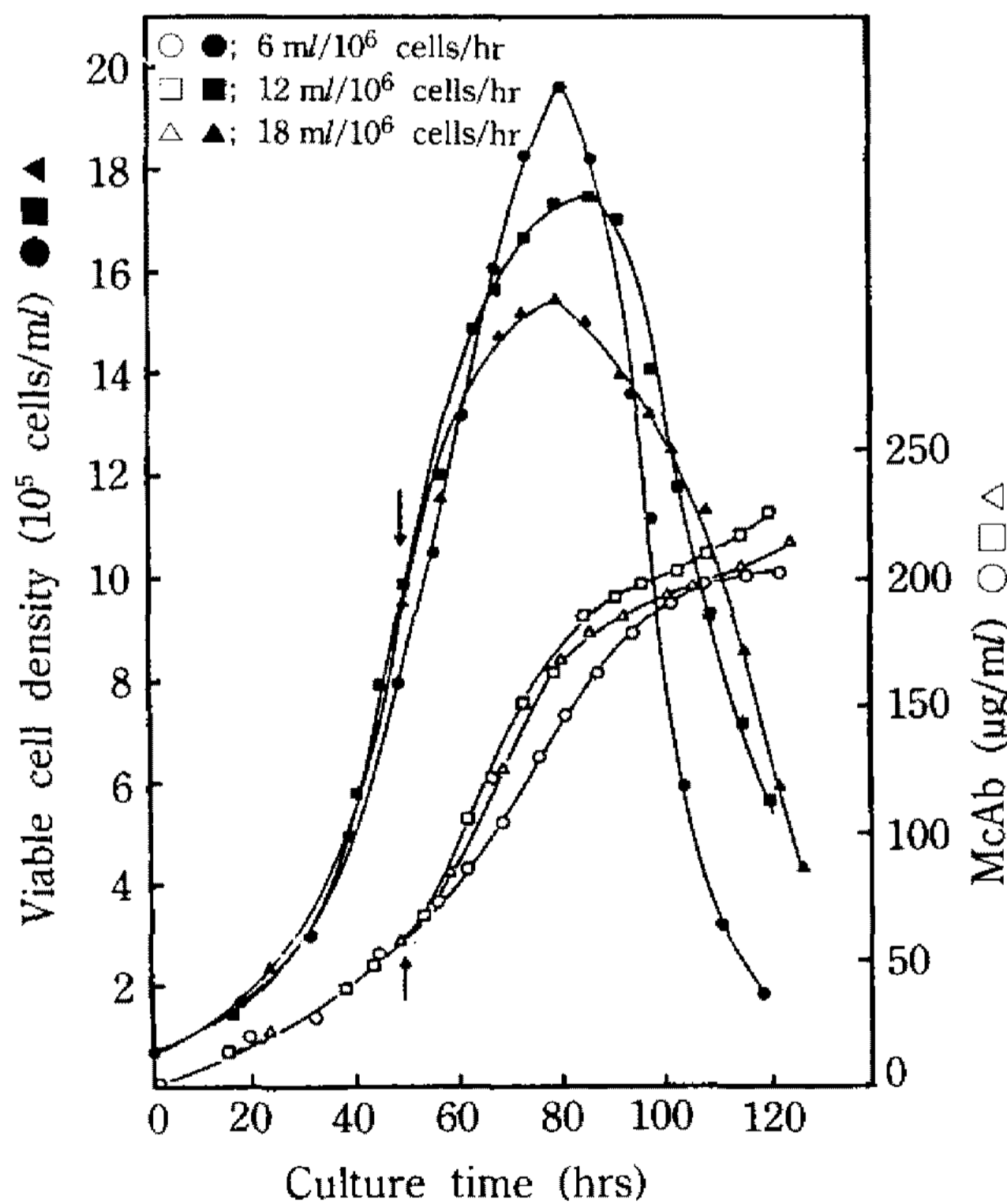


Fig. 3. Growth of hybridoma A4W and concentration of McAb profile in the fed-batch culture. Arrow indicates the start of fed-batch culture (feeding media; I/F(1:1)+5% BCS)

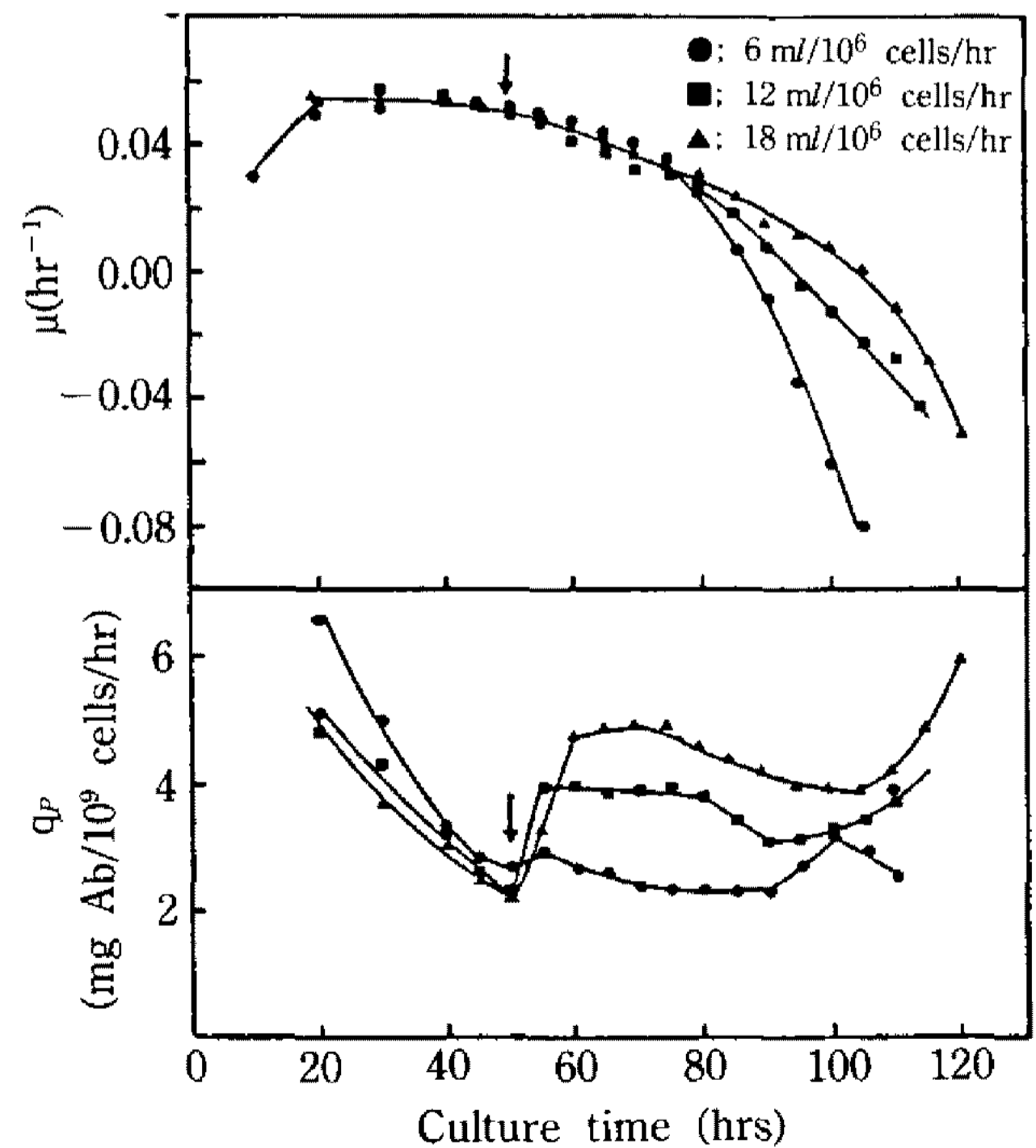


Fig. 4. The change of specific growth rate μ and specific antibody production rate q_p in the fed-batch culture of hybridoma A4W. Arrow indicates the start of fed-batch culture.

Table 2. Production of monoclonal antibody at various specific feeding rates of media in the fed-batch of hybridoma A4W

	Sp. feeding rate, q_f		
	6 ml/10 ⁹ cells/hr	12 ml/10 ⁹ cells/hr	18 ml/10 ⁹ cells/hr
Total feeding volume(ml)	200	650	1050
Total antibody produced(mg)	100	215	280
Volumetric productivity (mg Ab/l/day)	42.0	45.1	41.5

ductivity(mg Mab/l/day)를 나타낸 것이다. q_f 가 비증식속도에 미치는 영향은 배양 80시간 전까지는 거의 영향이 없었으나 80시간 이후부터는 q_f 가 증가될 수록 μ 의 감소속도가 둔화됨을 보이는데 이는 배양 80시간 이후부터 배양액내의 glucose 고갈현상이 뚜렷하게 나타나기 시작하고(Data 나타내지 않았음), 따라서 배지 첨가속도가 증가할수록 세포의 사멸속도가 점차 감소되기 때문인 것으로 보인다. 한편 항체의 비생성속도도 q_f 값의 변화를 보면, 회분식 배양의 경우에서 배양 초기에 가장 높았다가 배양시간이 경과함에 따라 계속 감소하는 경향은 이 실험에서도 마찬가지였으나 48시간 이후 유가식 배양이 시작되어 배지의 주입이 시작되면 빠른 속도로 q_f 값이 다시 회복되기 시작하여 배양이 끝날 때까지 계속해서 높은 값을 유지하는 현상을 보였다. 그리고 배양 후반부의 q_f 값은 q_f 의 증가에 따라 매우 민감하게 변화함을 알 수 있었는데 예를들어 q_f 가 6 ml/hr에서 12, 18 ml/hr로 증가함에 따라 배양 후반부의 q_f 의 평균값도 2.5에서 4.0, 4.5 mg Mab/10⁹ cells/hr로 점차 증가하는 경향을 보였다. 그러나 배양후반의 q_f 값이 크게 높아져도 세 실험 모두 생성된 최종 항체농도에는 큰 차이 없이 거의 비슷한 수준을 보였는데 그 이유는 이미 지적한 대로 q_f 가 증가하면 배양액의 부피가 증가하여 생존 세포의 농도는 희석되어 오히려 감소하기 때문이다. 그러나 Table 2에서 알 수 있듯이 q_f 가 증가하면 항체농도는 감소하나 최종적으로 생산된 총 항체량은 100 mg에서 280 mg으로 더 많아짐을 알 수 있다. 이상의 결과들을 볼 때 유가식 배양에서 배지의 첨가속도를 증가시키면 q_f 값은 향상시킬 수 있으나 배

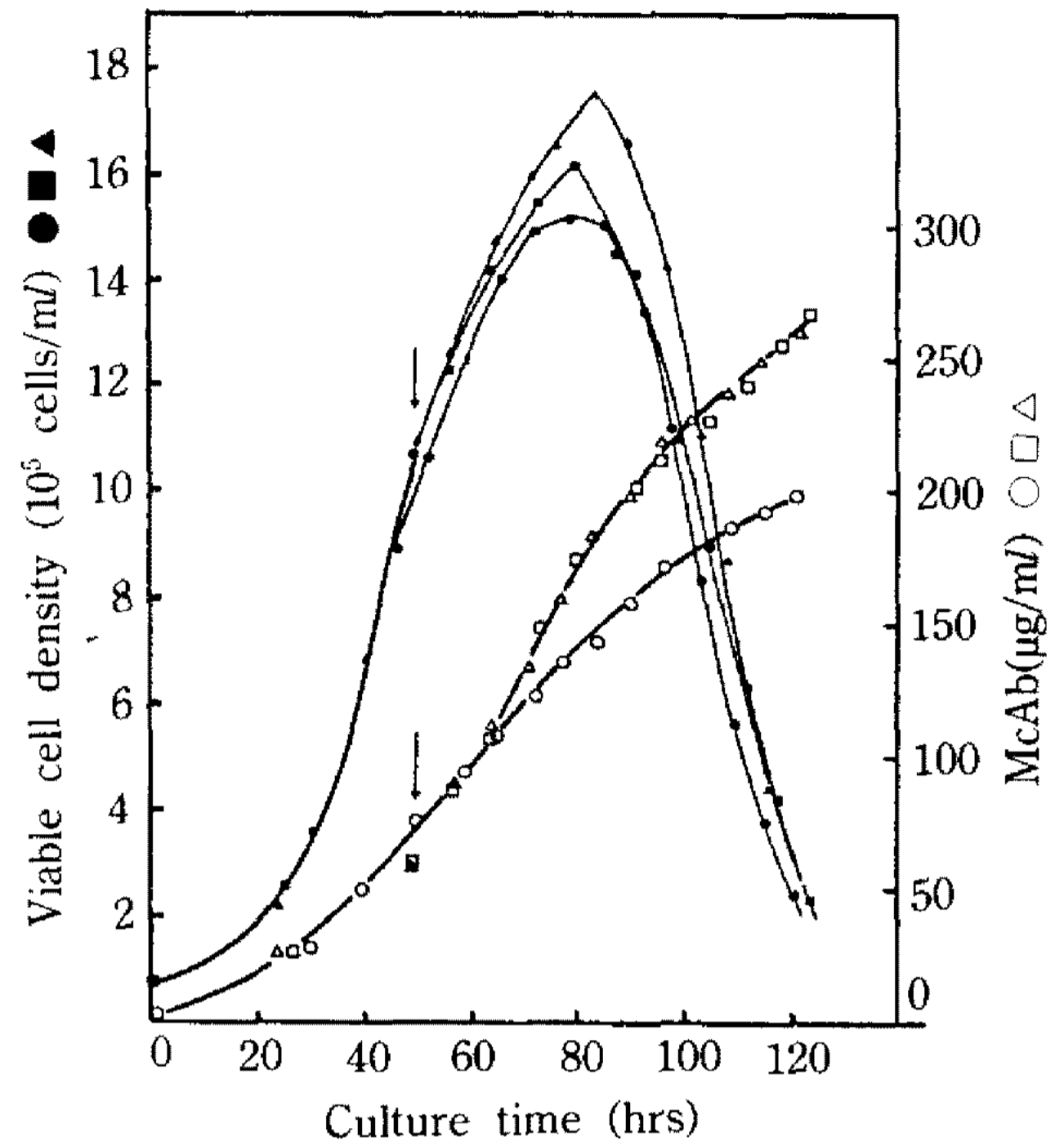


Fig. 5. Growth of hybridoma A4W and concentration of McAb profile in the fed-batch culture with modified composition of feeding media.

Arrow indicates the start of fed-batch culture. Specific feeding rate; 12 ml/10⁹ cells/hr. feeding media; ●,○ I/F (1:1) with 17.5 mM glucose & 2.5 mM glutamine + 0.5% BCS; □,■ I/F (1:1) with 35 mM glucose & 5 mM glutamine + 0.5% BCS; △,▲ I/F (1:1) with 35 mM glucose & 5 mM glutamine + 5% BCS

양액의 조성을 바꾸지 않는한 최종 항체의 농도를 더 이상 증가시키는 데에는 한계가 있다고 생각된다.

첨가배지의 성분변화가 항체생성에 미치는 영향: 배지의 첨가속도를 변화시킨 실험에서 q_f 가 12 ml/10⁹ cells/hr일 때 최종 항체의 농도가 가장 높게 나타났으므로 q_f 를 12로 고정하고 이번에는 첨가배지의 성분 중에서 세포증식과 항체생성에 영향이 큰 것으로 밝혀진 혈청농도와 glucose 및 glutamine의 농도를 변화시켜 가면서 실험을 했다.

Fig.5는 첨가배지의 성분 중 혈청농도를 0.5%로 낮춘 경우와 glucose, glutamine의 농도를 2배로 높인 경우 그리고 혈청농도를 0.5%로 낮추고 glucose, glutamine의 농도를 2배로 높여 실험한 결과를 나타낸 것이다. 첨가배지의 성분 중 혈청농도를 5에서 0.5%로 크게 낮추었을 때 최고 세포농도와 최종 항체농도가 약간씩 감소함을 보였다. 그러나 혈청농도를 0.5%로 낮추고 glucose와 glutamine의 농도를 2배로 강화시킨 배지를 첨가했을 때에는 최고 세포농도에는 큰

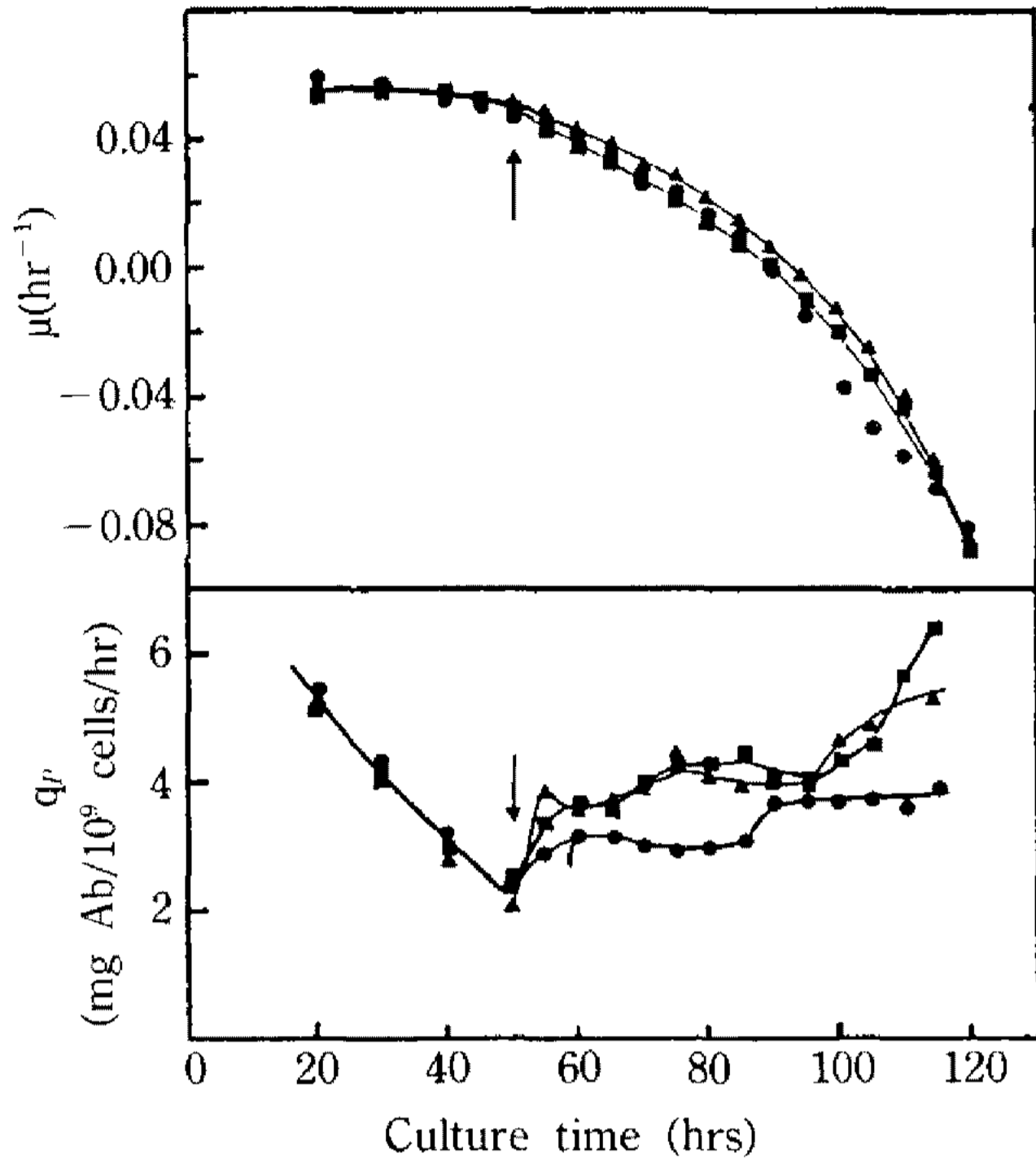


Fig. 6. The change of specific growth rate μ and specific antibody production rate q_p in the fed-batch culture of hybridoma A4W.

Arrow indicates the start of fed-batch culture (culture condition; see Fig. 5).

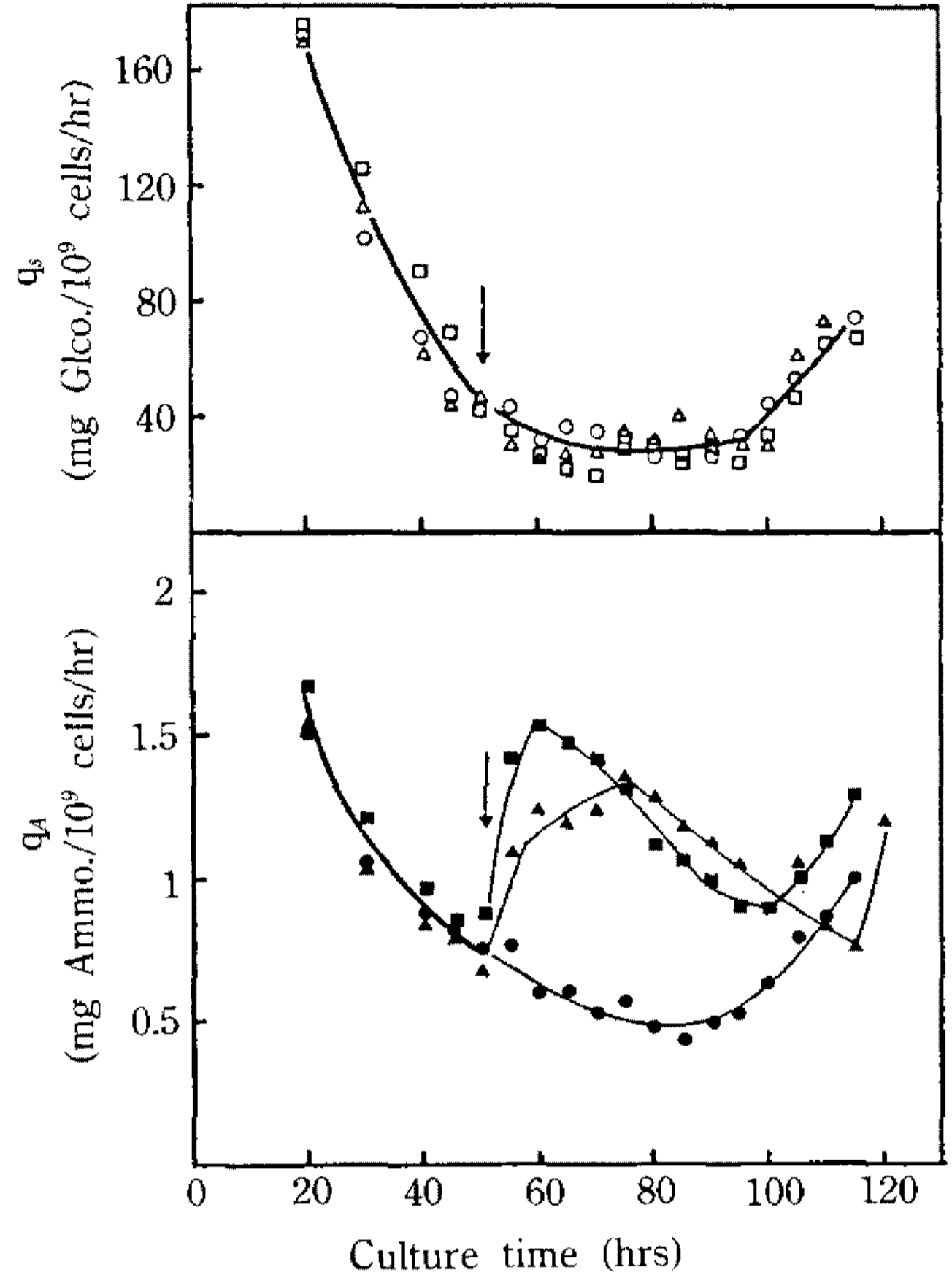


Fig. 7. The change of specific glucose consumption rate q_s and specific ammonia production rate q_A in the fed-batch culture of hybridoma A4W.

Arrow indicates the start of fed-batch culture (culture condition; see Fig. 5).

차이가 없었으나 최종 항체농도에서는 혈청농도만을 낮춘 경우가 200 $\mu\text{g}/\text{m}$ 인데 반해 여기서는 270 $\mu\text{g}/\text{m}$ 까지 향상됨을 보였다. 따라서 이 실험에서 계산된 volumetric productivity는 51.8 $\text{mg}/\text{l}/\text{day}$ 로써 희분식 배양의 그것에 비해 4배 정도 증가된 값이다. 또한, 혈청농도를 5%로 유지시키고 glucose와 glutamine의 농도만을 2배로 강화시켰을 때에는 최고 세포농도에 거의 차이가 없었으나 항체농도는 다시 270 $\mu\text{g}/\text{m}$ 까지 증가해 Fig. 3의 같은 배지 첨가속도($q=12$)에서 보인 225 $\mu\text{g}/\text{m}$ 보다 다소 향상되었다.

Fig. 6은 앞 실험에서 계산하여 구한 비증식속도 μ 와 항체의 비생성속도 q_p 를 나타낸 것이다. μ 의 변화를 보면 희분식 배양에서는 혈청농도를 낮추면 일반적으로 비증식속도가 크게 감소하지만 유가식 배양에서는 혈청농도를 0.5%까지 낮추어도 5% 혈청을 첨가한 경우와 비교해서 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 이러한 이유는 5%의 혈청이 포함된 배양액을 사용해 먼저 세포를 일정세포농도까지 배양한 후 혈청농도가 낮은 배지를 점차로 첨가해 주기 때문에 저혈청 배지를 첨가한다해도 실제의 배양액 중의 혈청농도는 서서히 낮아져 세포의 증식속도에는 큰 영

향을 미치지 않는다고 생각된다. 그리고 q_p 값에 대한 영향도 혈청농도에는 관계없이 glucose와 glutamine의 농도를 강화할 경우에는 평균 4.0 $\text{mg Mab}/10^9$ cells/hr로 높은 값이 유지되었으며 배양 후반부에도 계속 증가되는 경향을 보여 결과적으로 최종 항체농도를 향상시키는데 아무런 문제가 없음을 알 수 있다. 이처럼 유가식 배양에서는 첨가배지의 혈청농도를 매우 낮추어도 세포증식이나 항체생산에 지장이 없을 것으로 보인다. 한편, 배지의 첨가가 시작되면 q_p 값이 빠른 속도로 증가하는 이유에 대한 설명은 다음과 같다. Fig. 3과 5를 보면 새배지의 첨가가, 그 중에서도 glucose와 glutamine의 첨가가 항체생산력을 크게 향상시킴을 알 수 있다. 이는 배지내의 에너지원이 부족해짐에 따라 잃었던 항체생산력이 배지첨가와 함께 회복된 것임을 알 수 있다. 특히 배양된 세포에서는 에너지원으로 glucose보다 glutamine이 더 많이 이용되어 진다는 것이 일반적인 설명인데(16,

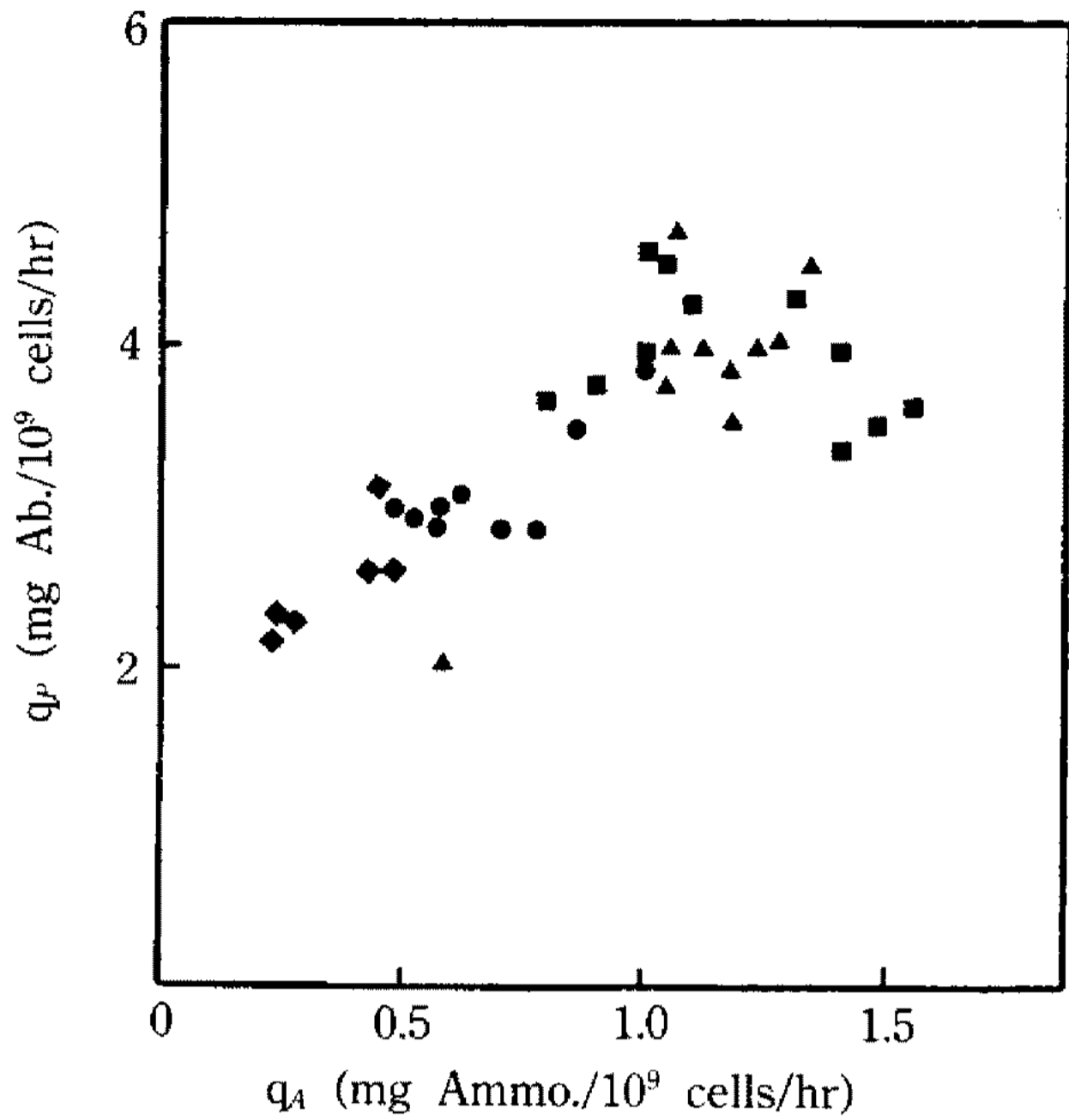


Fig. 8. Effect of specific ammonia production rate q_A on specific antibody production rate q_P in fed-batch culture of hybridoma A4W. (culture condition; see Fig. 5).

17) 본 실험에서도 이와 유사한 결과를 관찰할 수 있었다. Fig. 7은 앞 실험에서 측정한 glucose의 비소비속도와 ammonia의 비생성속도를 나타낸 것이다. Glucose의 비소비속도는 glucose를 2배로 강화한 경우나 그렇지 않은 경우 모두 배양 후반부에서 30~40 mg/10⁹ cells/hr로 변화가 거의 없는 반면에 ammonia의 비생성속도는 glutamine의 농도를 2배로 강화한 경우 그 속도가 2배 가량 증가하는 것을 볼 수 있다. 따라서 만약 ammonia의 생성속도가 glutamine의 소비속도와 직접 비례한다고 가정하면 배양 후반부에서 배지성분 중 주된 에너지원으로 소비되는 성분은 glucose보다는 glutamine이라고 볼 수 있으며 따라서 배양 후반부의 세포증식이나 항체생산을 제한하는 주된 제한요소도 glutamine의 결핍이라고 생각되어진다. 실제로 유가식 배양에서 배지첨가 후 q_P 값의 증가는 glutamine의 소비속도와 비례하여 증가하였는데 이를 간접적으로 알 수 있는 것이 Fig. 8이다. 본 유가식 배양에서는 glutamine의 농도를 직접 측정하지 않았기 때문에 ammonia의 농도를 측정해 간접적으로 살펴보면 Fig. 8에서 나타난대로 항체의 비생성속도 q_P 가 ammonia의 비생성속도 q_A 에 직접 비례하여 증가함을 알 수 있고 이로부터 배양된 세포에서는 ATP와 같은 에너지원이 glutamine의 소비

로 만들어 진다고 하는 설명이 합당한 것으로 보여진다. 본 실험실에서는 최근에 세포내 ATP 양을 측정해본 일이 있는데, 그 결과 배양 후반부에서 세포내의 ATP 양은 glutamine의 소비속도와 비례하여 변화한다는 것을 알 수 있었다(실험결과 나타내지 않았음).

결론적으로, 하이브리도마 세포 A4W의 유가식 배양에서 배지첨가 속도는 항체 생성속도 q_P 값에 직접적인 영향을 미치지만 세포배양기간이나 최종 항체농도에는 큰 영향이 없었다. 그리고 첨가배지의 성분 중 혈청농도는 세포증식이나 항체생성에 큰 영향을 미치지 못하며 ammonia 농도를 측정해 간접적으로 구해 본 glutamine의 소비속도가 항체 생성속도에 큰 영향을 미치고 있음을 알 수 있었다. 따라서, 유가식 배양에서 항체생성을 최적화하기 위해서는 배양액내의 glutamine 농도 혹은 ammonia 농도를 측정하여 이를 근거로 하여 배지의 첨가속도를 조절하는 배양 시스템이 개발되어야 할 것으로 생각되어진다.

요 약

유가식 배양에서 배지첨가속도가 하이브리도마 세포의 증식과 항체생성속도에 미치는 영향을 조사하였다. 항체 비생성속도 q_P 값이 변화는, 회분식 배양의 경우 배양 초기에 가장 높았다가 계속 감소하는 경향을 보였으나, 배양 48시간 이후부터 배지의 첨가가 시작되는 유가식 배양에서는 q_P 값이 배지첨가 직후부터 빠른 속도로 증가하기 시작해 배양이 끝날 때까지 높은 값으로 유지되었다. 그리고 배지의 비첨가속도 q_A 가 증가되면 항체의 비생성속도 q_P 도 민감하게 증가하는 경향을 보였다. 생성된 최종 항체농도 C_{final} 은 배지첨가속도에 큰 영향을 받지 않고 거의 비슷한 값을 보였지만 평균적으로 회분식 배양보다는 그 값이 3배 이상 증가되어 최고 220 µg/ml까지 향상되었다. 유가식 배양에서, 첨가배지의 성분 중 혈청농도를 0.5%까지 낮추고 glucose와 glutamine의 농도를 2배로 강화시킨 배지를 사용했을 때는 q_P 값이 더욱 더 높아져 최종 항체농도가 회분식 배양에서 보다 4배 이상 높은 270 µg/ml까지 향상되었다. 이때 항체 비생성속도 q_P 는 glutamine의 소비속도와 밀접한 관계가 있는 곳으로 나타났다.

참고문헌

1. Klausner, A.: *Bio/Technology*, **4**, 185 (1986)
2. Clark, T.J.: *Biofuter*, **44**, 121 (1986)
3. Karkare, S.B. and P.G. Phillips: in *Large-Scale mammalian cell culture*, (Tolbert, W.R. and J. Feder, eds.) Academic Press, New York (1985)
4. Ratafia, M.: *Bio/Technology*, **5**, 692 (1987)
5. Feder, J. and W.R. Tolbert: *Science American*, **248**, 3643 (1983)
6. Altshuler, G.L., D.M. Dziewulski, J.A. Soweck and G. Belfort: *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 646 (1986)
7. Geaugey, V., D. Duval, I. Geahel, A. Marc and J.M. Engasser: *Cytotechnology*, **2**, 119 (1989)
8. Evans, T.L. and R.A. Miller: *Bio-Techniques*, **6**, 762 (1988)
9. Takazawa, Y., M. Tokasaki, K. Hamamoto and H. Murakami: *Cytotechnology*, **1**, 171 (1988)
10. Choe, T.B. and B.Y. Cho: *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **4**, 143 (1989)
11. Reuveny, S., D. Velez, L. Miller and J.D. Macmillan: *J. Immunol. Methods*, **86**, 61 (1986)
12. Glacken, K.W., C. Huang and A.J. Sinsky: *J. Immunol. Methods*, **86**, 61 (1966)
13. Reuveny, S. et al.: *Develop. Biol. Standard.*, **60**, 185 (1985)
14. Bergmeyer, H.U.: *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd ed., **4**, 178 (1983)
15. Choe, T.B. et al.: 연구보고서, 단일클론항체 대량 생산기술개발(1), 과학처, 118 (1988)
16. Miller, W.M., C.R. Wilke and H.W. Blanch: *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 487 (1989)
17. Ramirez, O.T. and R. Mutharasan: *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 839 (1990)
18. Fazekas, S.St.G. and D. Scheidegger: *J. Immunol. Methods*, **35**, 1 (1980)

(Received March 29, 1991)