한국생물공학회지 제7권 제2호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 7. No. 2. 92-95(1992)

Hybridoma 배양을 위한 저혈청 배지의 개발

제 1 부 : 혈청 역할모델을 이용한 혈청 성분의 역할 연구

*제 훈 성 · 최 차 용
서울대학교 공과대학 공업화학과, *럭키바이오텍중앙연구소

Development of Low-serum Medium(LSM) for Mouse-mouse *Hybridoma*

Part I. A Study of the Role of Serum Components Using a Serum Model

*Hoon Sung Jeh and Cha Yong Choi
Department of Chemical Technology, College of Engineering,
Seoul National University.
*Central Reasearch Laboratory, Lucky Biotech Inc.

ABSTRACT

A model for the role of serum was proposed to develop a low serum medium for the large scale culture of mammalian cell. The strategy of medium development adopted in this study facilitated the understanding of the role being carried out by the serum in the culture of hybridoma KA112 cell line. In this model, the serum components were divided into two main groups : the first group encompasses the nutrient factors that determine the maximum cell density and the second group includes the growth factors that regulate the cell growth rate. The model prediction was compared with the experimental results. The model enabled us to find out several useful aspects of medium composition for cell growth. 1) One particular component in the basal medium became limiting factor when serum concentration level was more than 7%. 2) The growth regulating factors and nutrient factors limited the cell growth at 3% and 5% serum concentration levels respectively.

서 론

미생물의 유전자 재조합에 의하여 목적 단백질을 수율높게 생산하는 것이 생물공학의 대표적인 흐름이었으나, 근래에는 미생물 발현의 한계성에 대한 문제점이 제기되어 숙주를 동물세포로 전환하려는 연구가 주목받게 되었다(6).

동물세포에서 단백질이 발현되면 자연적인 형상으로 구조의 재형성(refolding)이 이루어지고 세포외부로 분비까지되어, 무혈청 배지를 사용할 경우에는 배지가격의 저렴화와 손쉬운 분리정제 등을 도모할 수 있다. 항체와 같이 비교적 분자량이 크며 복잡한 구조를 갖는 단백질의 경우라든지 또는 특정 글리코실화를 필요로 하는 단백질의 경우에 있어서는 동물세포의 배양을 통한 생산이 불가피하므로 대량 배양기술의 개발이 특히 필요하다. 단일군항체(monoclonal antibody)는 현재 수백종의 진단용 kit에 사용되고 있으며 면역반응 개조 및 치료제에의 사용도 급속히 발전되고 있다(1).

이러한 항체의 생산 등을 위한 동물세포 배양에 있어서의 가장 큰 문제는 고가의 배양비용과 정제비용을 유발하는 혈청의 사용이라고 할 수 있다. 실험실 규모에서는 주로 여러 영양소를 포함한 기저배지(basal medium)에 높은 농도(예 : 10% v/v)의 FBS(fetal bovine serum)를 첨가하여 사용해 왔는데 이를 상업적인 규모로 옮길 경우 혈청의 비용이

막대하여 큰 문제가 되어 왔다. 또한 배지에 혈청을 다량 첨가하여 배양할 경우 배지내의 불순 단백질 함량이 커지므로 분리 정제에도 곤란을 가져다 준다. 이를 해결하기 위한 저혈청 배지 및 무혈청 배지의 개발이 동물세포 유래 단백질 제품의 상업화에 있어서는 필요불가결하며 이에 대한 많은 연구가 진행 중이다(2, 3, 4).

본 연구에서는 hybridoma를 이용하여 혈청 역할의 모델을 통해 저혈청 배지를 개발하며 이 배지를 이용하여 부유배양(suspension culture)에 적용하였다.

실험방법 및 재료

사용 세포주

안질환과 비임질성 성병을 유발하는 그람양성 병원균인 *Chlamyidia trachomatis* 를 생쥐에 면역하여 얻은 지라(Spleen)의 임파세포와 mouse myeloma P3U1(다니구찌 박사, 일본 찌바대학)을 세포 융합하여 얻었다(5).

KA-112는 무한 희석법(5)에 의해 클로닝된 5가지 클론중 성장과 항체생산이 가장 뛰어난 것으로 선택 사용하였으며, 여기서 항체생산의 정량은 잘 알려진 ELISA법(5, 7)을 사용하였다.

사용 배지

Hybridoma의 대량배양 및 배지 개발시에 사용된 기저배지는 RPMI-1640배지와 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM No. 240−6309 : GIBCO, NY, U. S. A.)이었으며 sodium bicarbonate(2.0g/L)와 수용성 황산 가나마이신(0.3g/L : kanamycin, 동아제약, 서울)을 첨가한 후, 세공직경 0.22 μm를 갖는 직경 47mm의 필터로 2회 멸균여과하여 사용하였다.

세포 배양

배지 개발시에는 소규모로 24 well tissue culture plate(NUNC, Denmark)를 사용하였으며 cell line 유지와 장기적응 시험을 위하여 직경 60mm 및 100 mm의 tissue culture dish(녹십자 의료공업, 서울)가 사용되었다. KA-112 clone은 FBS 20%(V/V)와 1% DMSO(Hanawa, Japan)가 함유된 저장배지(storage medium)로 냉동튜브(cryotube : NUNC, Denmark)에 분주, 액체질소 탱크에 저장하였다. 세포배양은 온도 36.5-37℃, 수분포화 상태인 CO_2 incubator내에서 수행되었다. 저혈청배지 및 무혈청 배지의 부유배양(suspension culture)에의 적합성 검토를 위해서는 250ml와 1L 스피너 플라스크(Bellco, U. S. A.)가 사용되었다. 기타 필요한 실험방법은 알려진 방법들을 사용하였다(8).

결과 및 고찰

혈청의 역할 모델과 개발 접근 방식

Fig. 1은 배지에 첨가된 혈청이 세포성장에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 기저배지는 RPMI-1640을 사용하였으며 혈청(FBS)함유량을 0, 3, 5, 7, 10% (V/V)로 변화시키며 매일 세포 농도를 측정하였다. 24 well plate에 동일량의 세포를 접종하여 1일이 지난 후 여러농도의 혈청을 함유한 배지로 교체하여 샘플링을 시작하였다. 혈청을 전혀 첨가하지 않은 배지에서는 전혀 세포가 자라지 않았으며 4일째에 모두 사멸하였다. 3%(V/V)혈청 첨가시에는 초기부터 매우 느린 성장속도로 성장하다가 5일 이후에 사멸하기 시작하였다. 5%(V/V)이상의 혈청이 첨가되었을 때는 세포 성장속도가 모두 같았으나 5% FBS첨가시에는 세포성장이 빨리(2일째) 정지 하였

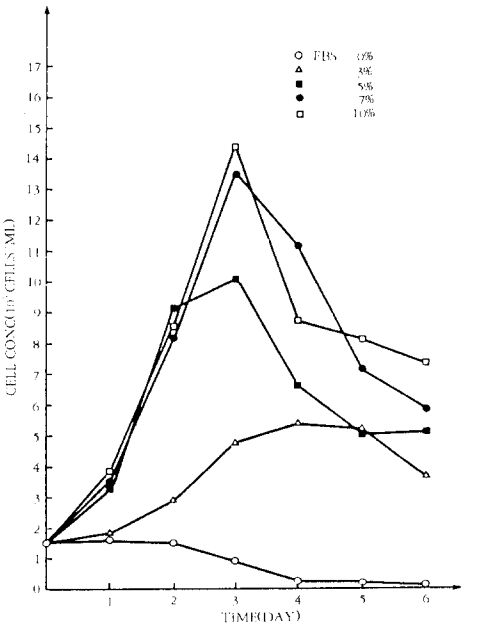

Fig. 1. Effect of serum on cell growth kinetics. (Cells were cultured in 24 well tissue culture plate. Inoculum size = 1.5×10^5 cell/ml.
viable cell counting was done once per day. Balance was RPMI-1640 medium.)

다. 7% 첨가시와 10% 첨가시에는 거의 동일한 양상을 보였다. 혈청 농도 3% 이하에서의 성장곡선 기울기, 즉 성장속도가 5% 이상의 그것에 비교하여 낮은 것은 성장속도에 영향을 주는 혈청내의 중요 인자의 부족이 3-5% 사이의 혈청 농도에서까지 나타나고 있음을 말해 주고 있다. 혈청농도 5%에서 초기 세포 성장속도는 동일하나 최고 도달 세포 농도가 7%나 10%의 그것에 비하여 낮으며 세포성장 정지도 더 빨리 일어나는 것은, 성장속도 관련 중요 인자의 농도가 더 빨리 결핍되거나 배양액의 조성변화에 따른 세포 내부 활동도 변화에 기인한다고 볼 수 있으며 여기에 추가하여 성장속도와는 별도로 최고 도달농도에 영향을 주는 또다른 인자가 있을 수 있음을 의미하기도 한다.

이러한 현상이 혈청 첨가량이 7% 이상이 됨에 따라 해소되며 또한 7% 이상에서 세포성장이 거의 동일한 시기에 멈추는 것으로 보아 혈청의 부족으로 인한 고갈요인은 사라지는 것으로 판단되었다. 즉 7% 이상에서는 혈청내의 물질이 아닌 기저배지 내의 물질(glucose 또는 amino acid)이 먼저 고갈되는 것으로 간주된다. 이것에 대한 보다 구체적 실험근거는 제 2부 논문에 제시되어 있다.

위의 사실들을 토대로 KA-112세포주 배양시의 혈청의 역할에 대한 개념적 모델을 Fig. 2에 나타내었다. 소모성 인자가 최종 도달 세포농도뿐만 아니라 세포 성장속도도 제어할 수 있겠으나 저자들은 혈청의 구성인자를 크게 두 가지로 나누어, 그 하나는 소량으로 세포 성장속도에 영향을 미치는 성장제어 인자(growth regulating factor)이며, 다른 하나는 소모되는 성향을 가지면서 세포성장 속도에는 큰 영향을 미치지 않고 세포의 증식량에 영향을 미치는 영양인자(nutrient factor)로 하여 고려해 보았다. 소모성 인자는 그 인자의 초기농도(Si*)를 해당인자의 수율계수($Y_{si/X}$)로 나눈 양을 그림에 나타냈는데 이것은 주어진 양(Si*)의인자 "i"가 생산할 수 있는 세포의 양(g-cell/ml)과 같다. $Y_{si/X}$는 최대치에 도달한 세포농도와 그 때의 기질 농도로부터 계산할 수 있다. 기저배지의 각 구성인자에 대해서도 마찬가지의 기준을 적용할 수 있으며 소모성 인자 가운데 수율계수값이 가장 작은 인자가 가장 먼저 고갈되고 이에따라 최고 세포농도가 결정될 것임을 예상할 수 있다. 이와는 달리 성장제어인자(growth regulating factor)의 경우는 그 함량에 따라 최종세포 증가량이 결정되는 것이 아니라 성장속도가 결정되므로 각 인자의 농도를 성장속도에 영향을 주기 시

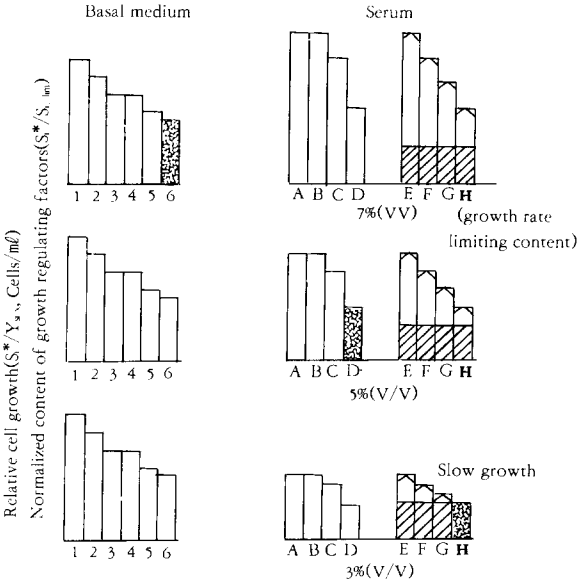

Fig. 2. Model for the role of serum. (1-6; nutrient components in basal medium, A-D; nutrient factors in serum, E-H; growth regulating factors in serum, components marked by black; growth controlling components at each serum content)

작하는 농도($Si^*/Si_{,lim}$)를 사용하였다. 만약 이값이 1보다 작은 값을 갖는 혈청농도를 사용하게되면 (예 : 3% 첨가시)배양시에 더 낮은 성장속도를 보이게 될 것이다. 이러한 모델에 따라 본 실험의 결과와 비교해 보면 그림 2와 같은 경우가 된다. 즉, 7% 이상의 혈청첨가시에는 기저배지중의 한 인자가 제한요소가 되며, 5% 첨가시에는 혈청내의 고갈성 인자가, 그리고 3% 첨가시에는 성장속도제어인자의 부족에 의해 느린 성장속도를 보이게 된다. 흑색으로 표시한 인자가 각 경우의 제한인자들이다. 혈청내의 수많은 성분들 가운데 성장제어인자 역할을 하거나 영양인자 역할을 할 성분들은 각각 많이 있을 것이나 실제로 영향을 미칠 인자들은 각 인자들의 해당 제한농도 이하로 존재하는 것들일 것이므로 그 숫자는 제한될 것이다. 혈청의 농도를 변화시킴에 따라 성장에 영향을 미치는 인자의 종류가 변할 것이다. 이러한 모델을 통해서 사용되는 세포주에 따라, 또는 배지의 조성이나 첨가물의 양에 따라 각 경우에 세포성장에 제한을 주는 인자를 발견, 첨가하여 준다면 더 낮은 농도의 혈청으로 동일한 세포성장을 얻을 수 있을 것으로 생각되었다.

본 실험에서는 성장제어인자의 제한방식이 혈청농도 3%에서 5%로 증가됨에 따라 전환되는 것을 볼 수 있었는데, 성장제어 기능에서 기질공급적 기능으로 바뀌었다. 이것은 혈청내의 고갈성 단일인자가 높은 혈청농도 영역에서는 최대비성장속도 plateau 내에서 성장속도에는 영향을 미치지 않고 최종도달 세포농도에만 영향을 끼치다가 혈청농도가 limiting하게 되는 시점에서는 성장속도에도 동시에 영향을 끼치는 것으로 부분적으로 설명될 수 있다. 이러한 관점에서 혈청첨가농도에 따른 최고도달세포농도의 경향을 그림 1로부터 알 수 있다. 혈청농도 7%에서 최고세포농도는 거의 증가되지 않는 포화현상을 보였는데 이는 혈청중의 여러 인자들 중의 하나가 우선 고갈됨에 따른 성장제한 현상이 혈청농도 7%이상에서는 없어짐을 보여주는 것이다. 즉, 7%이상에서는 혈청중의 인자보다 기저배지내의 기질이 먼저 고갈된다. 따라서 혈청내의 인자중 우선 고갈되는 인자를 발견하고 충분량을 첨가하여 다음 고갈되는 인자에 의해 적정혈청량을 다시 결정할 수 있는 가능성을 보였다. 0% 와 3%사이에서 현격한 성장차이를 나타내고 3% 첨가시에는 느리지만 성장이 일어났으므로 약간의 보완을 통해 적어도 3%수준으로 혈청 요구량을 낮출 수 있을 것으로 생각되었다.

요 약

동물세포 대량 배양의 저혈청 배지를 개발하기 위하여 융합제작한 하이브리도마 KA112를 대상으로 혈청의 역할을 살펴본 다음, 혈청의 구성인자를 최고세포 농도를 결정하는 소모성 영양인자와 세포성장속도를 결정하는 성장 제어인자로 나눈 혈청 역할 모델을 개발하여 실험 결과와 비교 검토하였다. 이 모델에 의하면 7%이상의 혈청 첨가시에는 혈청내의 소모성 인자가 그와 같은 역할을 맡게 되며, 3%첨가시에는 성장 제어 인자의 고갈로 인해 세포성장속도가 제한을 받는다. 동시에 소모성 단일 인자가 혈청농도에 의하여 limiting하게 됨에 따라 최고 도달 세포 농도와 세포 성장 속도를 제어함을 설명할 수도 있다. 이러한 실험결과들은 혈청농도와 기저배지 성분들의 농도를 항상 균형있게 고려해 주어야 함을 보여주고 있다.

참고문헌

1. James, K. and Bell, C. T., J. Immunol. Methods, **100**, pp. 5-40 (1987)
2. Zwernen, R. K., Cox, R, M., Lynn, J. B. and Acton, R. T., Biotech. Bioeng., **23**, pp. 2717-2735 (1981)
3. Brown, B. L., Commercial Production of Monoclonal Antibody, Marcel Dekker Inc. pp. 35-48 (1987)
4. Sato, T., Minamoto, Y., Yamane, I., Kudo, T. and Tachibana, T., Exp. Cell Res., **138**, pp. 127-134 (1981)
5. Yim, C. B., M. S. Thesis, Seoul National University, Korea (1986)
6. Ramabadran, T. V., Trends in Biotechnol., **5**, pp. 175-178 (1987)
7. Park, H. W., Ph.D. Thesis, Massachusetts Institute of Technology, U. S. A. (1991)
8. Jeh, H. S., M. S. Thesis, Seoul National University, Korea (1989)