

생물고분자 막 형성을 이용한 동물세포 배양 및 단클론항체 생산

손정화·유선희·†김성구

부경대학교 생물공학과

(접수 : 1997. 6. 26., 게재승인 : 1997. 11. 5.)

Animal Cell Culture and the Production of Monoclonal Antibody(MAb) Using Biopolymer Membrane

Jeong-Hwa Son, Sun-Hee Yu, and Sung-Koo Kim†

Dept. of Biotechnology and Bioengineering, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

(Received : 1997. 6. 26., Accepted : 1997. 11. 5.)

Biopolymer membrane was prepared using two oppositely charged natural biopolymers. The biopolymer membrane was used for the encapsulation of two hybridoma cell lines(ATCC CRL-1606, ATCC HB-8852) to produce monoclonal antibodies. In order to reduce the down stream steps, the pore size of the membrane was controlled to retain the monoclonal antibodies in the capsules based on the diffusion experiments with standard proteins. T-flask culture showed cell densities of 8×10^7 cells/mL and 3×10^7 cells/mL, and MAb concentrations of $506 \mu\text{g/mL}$ and $109 \mu\text{g/mL}$ for encapsulated ATCC CRL-1606 and HB-8852, respectively. Two liter perfusion cultures with encapsulated ATCC HB-8852 were performed to enhance the MAb production. The MAb production of the encapsulated hybridoma increased considerably comparing to the culture using silicon tubing for oxygen transfer.

Key word : encapsulation, monoclonal antibody, biopolymer membrane, hybridoma

서론

생물고분자 막은 산업적인 면 혹은 생물 의학적인 면에서 많은 이점을 가지고 있다(1). 생물고분자막의 중요한 기능중 하나는 투과성의 조절이다. 이 기능은 투과성의 조절로 막을 통해 분자량이 큰 물질들의 투과가 저해되는 반면, 작은 분자량을 가진 물질들을 선택적으로 투과할 수 있게 하는 것이다. 결과적으로 막의 pore 크기의 조작을 통해 동물세포를 배양하여 대사 노폐물(저분자 물질)을 제거하고 product인 단클론항체는 막내에 포집할 수 있다. 여러 종류의 인공막 혹은 생물막이 산업적으로 생산되고 있지만, 막의 pore 크기를 구하거나 예측하는 것은 여전히 어려운 문제로 남아있다.

생물고분자 막은 다가의 양이온 고분자와 반대의 전하를 가진 고분자 사이의 이온성 상호반응에 의해 형성될 수 있고, 고분자 용액이 반대의 전하를 가진 고분자 용액에 떨어졌을 때 이온반응에 의해 고분자막을 형성하여 캡슐을 제조할 수 있다(2). Chitosan과 같은 다가 양이온 고분자의 양이온 그룹과 alginate 혹은 carrageenan과 같은 다가 음이온 고분자의 음이온 그룹사이의 전기적

반응으로 생물고분자 막을 형성하여 캡슐을 만들 수 있다(3).

생물고분자를 이용한 캡슐화는 생물학적으로 안전하고, 캡슐 제조공정이 간단하며, 세포의 생존율도 높으므로 미생물은 물론이고 동물세포도 키울 수 있다. 그러므로 생물고분자를 이용한 캡슐화는 동물세포의 고정화 특히 단클론항체를 생산하는 분야 및 primary cell의 분리 및 고정화를 통한 인공장기로의 이동 등 다양한 기능성을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다(4-6).

세포고정화 방법으로 Ca^{2+} -alginate를 이용한 bead를 사용했는데 이 방법은 세포가 bead내에 고정화됨으로서 세포 성장의 저해를 초래하고, 세포의 생존율이 떨어지는 단점이 있었고(7), 또 polylysine-alginate 캡슐은 Ca^{2+} 이온을 추출하는 등의 공정으로 캡슐 제조시 시간이 오래 걸리고 이로인한 세포의 생존율이 떨어지는 단점이 있다(8). 그러나 본 실험에서 이용한 캡슐화 방법은 Ca^{2+} 이온 추출이 필요 없을 뿐만 아니라 안정하며 캡슐화 공정에 걸리는 시간 또한 이전의 방법보다 훨씬 짧아서(약 10분) 세포의 생존율을 높일 수 있는 장점을 가지고 있다.

본 실험에서는, 생물고분자 막의 형성에 chitosan과 alginate를 이용하였다. Chitosan은 poly- β -(1-4)-2-amino-2-deoxy- β -D-glucan 으로서 glucose단위의 2번 탄소에 amine group이 치환되어 있고, alginate는 mannuronic acid와 guluronic acid를 가지고 있어, 용액 중에 이들 두 고분자들 사이에서 정전기적 상호반응을 통해 생물고분자 막을 형성한다. 본 연구에서는 반대 전하를 가진 고분자간의 전기적 상호 반응에 의해 형성된 생물

† Corresponding Author : Dept. of Biotechnology and Bioengineering, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

Tel : 051-620-6188, Fax : 051-620-6188

고분자 막을 가진 캡슐을 제조하고, pore의 크기를 표준 단백질을 이용한 확산실험으로 결정한 뒤 pore의 크기를 조절할 수 있는 영향인자를 결정하였다. 이를 바탕으로 동물세포 배양 및 단백질용체를 생산하기 위한 pore의 최적크기를 구하여 최대의 세포밀도 및 단백질용체 생산 조건을 도출하였다.

재료 및 방법

세포 및 단백질

Chitosan(MW=150,000 : Degree of Deacetylation = 85%, Madera Products Inc., Albany, OR)은 다가 양이온의 고분자로 사용하였고, sodium alginate (Kelco gel LV, 150 mesh size, and 50 cpm at 1%, Kelco Co., San Antonio, CA)는 음이온의 고분자물질로 이용하였다. Glutamic acid(Fluca Chemie AG, Switzerland)는 chitosan을 녹이기 위한 용매로 이용되었다. 표준 단백질로서 ; β -lactoglobulin(MW=32,000, long axis=38Å), ovalbumin(MW=45,000, long axis=114Å), bovine serum albumin(MW=66,000, long axis=140Å), conalbumin(MW=76,000, long axis=170Å), γ -globulin(MW=156,000, long axis=220Å), 그리고 fibrinogen(MW=400,000, long axis=700Å)은 Sigma Chem. Co(St. Louis, MO)에서 구입하였고 확산 실험을 통해서 생물고분자 막의 pore 크기를 결정하였다.

Hybridoma(ATCC CRL-1606과 ATCC HB-8852)는 ATCC에서 구입하였고 캡슐화 및 MAb생산을 하기 위한 model 세포로 이용되었다. 세포 배양에 이용한 배지는 Delbulco's Modified Eagles Medium(DMEM)에 10% fetal calf serum을 첨가한 배지를 이용하였다.

용액 준비

Chitosan (0.5% w/v)은 glutamic acid 용액 (0.5% w/v)에 첨가하여, 하루동안 교반 후에, 녹지 않는 부분은 whatman No.1 필터를 이용하여 제거시켰다. Chitosan 용액의 pH는 제조된 Chitosan 용액을 강하게 교반하면서 5N NaOH 혹은 HCl를 몇방울 떨어뜨려 원하는 pH(pH 6.0)로 조정하였다. Alginate (0.5%w/v)는 증류수에 녹여 사용하였다. Glycerol 용액(0.25w/v)은 만들어진 캡슐들을 세척하는 용액으로 이용하였다. Chitosan과 alginate 용액은 5시간 동안 UV아래서 살균하였으며, glycerol solution은 가열 살균하였다.

캡슐의 제조

캡슐을 제조하기 위한 순서는 Figure 1에 나타내었다. 캡슐화 장치는 Pyrex 유리로 만들었으며, 세포용액과 chitosan 용액사이의 접촉 시간을 줄이기 위해 3중의 orifice를 사용하였다. 단백질 혹은 hybridoma는 중간 orifice로, 중심에서 2번째 orifice에서는 chitosan용액이 나오도록 장치를 제작하여 캡슐화에 사용하였다.

바깥쪽 공기가 들어오는 관(ID=2.03mm)의 공기 유속은 캡슐의 크기(2.0mm 평균 직경)를 조절하기위해 4L/min으로 조정되었다. 3분간의 캡슐화과정뒤, 형성된 캡슐은 mesh로 걸러서 glycerol용액 (0.25% w/v)으로 3번 세척하였다. 그 후 캡슐은 단백질 확산 실험을 위한 완충용액(10mM phosphate buffer, pH 7.2) 혹은 배양을 위한 배지(DMEM w/10% FCS)로 옮겨졌다. 세포의 캡슐화 공정은 무균상태에서 실시되었다.

캡슐의 평균 크기는 2.0 ± 0.2 mm이었으며 생물고분자막 외부

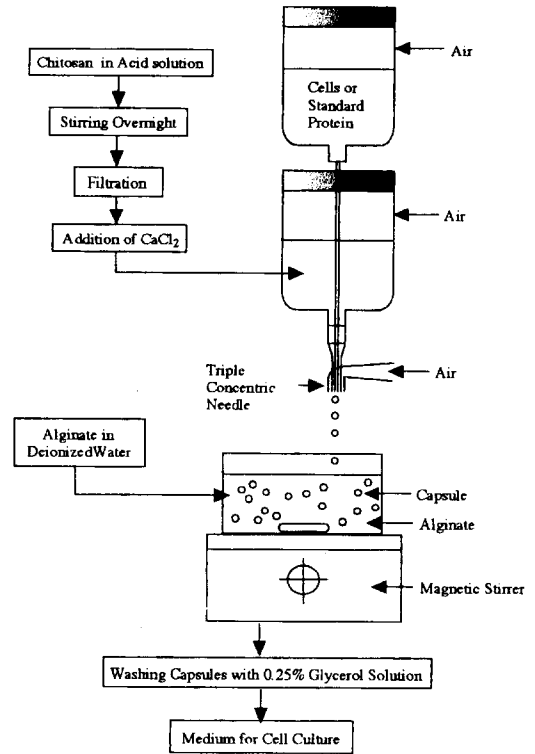


Figure. 1. Encapsulation Procedure

에는 평균 0.2mm의 Ca^{2+} -alginate gel layer를 가지고 있었다.

동물 세포 배양

캡슐막의 pore 크기를 조절하여 높은 농도의 단백질용체를 캡슐내에 포집하고 아울러 영양분과 세포 대사 노폐물의 자유로운 확산으로 항상 최적의 배양조건을 유지하여 캡슐안의 세포 수를 최대한으로 하는 조건에서 배양을 실시하였다.

세포 캡슐화

Chitosan 용액에 0.15M glucose를 첨가하여 osmolarity를 조절하였다. pH는 영양분과 대사 노폐물의 자유로운 확산이 가능하고 생산된 단백질용체(MAb)의 확산을 억제하는 pore 크기인 200Å으로 조정하기 위해 6.0으로 조정되었다. Alginate 용액에도 등장액을 만들기 위해 glucose를 첨가하였다. 각 용액은 UV에 의해 살균되었다. 3분간 캡슐화로 40mL의 캡슐을 만든 후, 캡슐 4mL씩을 10개의 T-flasks로 각각 옮겨 Delbulco's Modified Eagle's Medium(DMEM)에 10% fetal calf serum (FCS)을 첨가시켜 30mL로 맞춘 후 CO₂가 조절된 37°C 배양기에서 배양하였다.

캡슐화된 세포의 배양

캡슐화된 hybridoma 세포(ATCC CRL-1606, HB-8852)를 배양하면서 세포 생존수, 비성장 속도 그리고 MAb 생산 속도를 구하였다.

10개의 T-flask 중 한 개의 T-flask를 24시간마다 배양기로부터 꺼내어 캡슐을 외과용 칼로 절단하여 캡슐내액을 포집한뒤 캡슐내의 세포수 및 MAb의 농도를 측정하였다. 세포 생존수를

trypan blue염색 방법으로 측정하여 세포 성장 및 doubling time(T_d)과 비성장 속도(μ)를 구하였다. 캡슐의 현미경 사진은 도립 광학 현미경(Olympus Corp., Model CK 2, Lake Success, NY w/ Polaroid Type 52 film)을 이용하였다.

Perfusion 배양

캡슐화 세포의 배양 및 MAb의 생산의 최대화를 위해 perfusion 배양을 실시하였다. 2L Chemstat fermenter를 이용하여 air flow rate 0.2vvm, impeller speed 200rpm으로 캡슐화 ATCC HB-8852 을 배양하였다. 2일에 1번씩 전체의 배지를 교체하였다. 비교실험으로 같은 fermenter에 silicon tubing aeration 및 100rpm의 조건으로 세포배양을 실시하였는데 배지는 2일에 한번씩 medium의 반을 새 배지로 교환하는 배양(semi-perfusion culture) 및 2일에 한 번씩 medium전체를 새 배지로 교환하고 세포는 recycle시키는 배양(perfusion culture)을 하였다.

단클론항체(MAb)의 분석

캡슐 안의 단클론항체(MAb) 생산 속도와 일반 세포 배양법에 의한 단클론항체의 생산속도를 비교하였다. Fibronectin 혹은 lactoferrin에 대한 단클론항체의 농도는 ELISA에 의해 측정되었다. Fibronectin 혹은 lactoferrin 용액을 각 well에 붓고, 4°C에서 배양한 후(overnight) 0.5% BSA 혹은 skim milk를 넣어서 3시간 동안 배양하였다. BSA 혹은 skim milk를 버린 후 plate의 well을 0.5% BSA 혹은 skim milk 용액으로 세척한 후, 적당히 희석한 시료와 표준 시료를 2시간 동안 반응시켰다. Plate를 3번 씻은 후에 IgG(Sigma cat no. H2080, 67 times dilution)와 결합된 peroxidase를 각 well에 첨가하였다. 4시간 동안 배양 후에 ABTS 용액 200 μ L을 각 well에 첨가하였다. 5% hydrogen peroxide 50 μ L을 첨가한 후 10분 후에 반응을 종결하였다. microtiter reader로 420nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 결정하였다.

결과 및 고찰

Pore size의 결정 : 표준 단백질을 이용한 확산 시험

표준 단백질을 이용한 확산 실험으로부터 얻어진 단백질의 overall permeability는 Table 1에 나타내었다. 캡슐화에 사용한 chitosan 용액의 pH 증가로 단백질의 overall permeability는 증가하였다. Chitosan 용액의 pH변화에 따른 각 표준단백질의 overall permeability 증감을 표로 나타내면 자유확산과 비확산의 상태의 구분이 되는 경계선을 찾을 수 있다. 이 경계선이 각각의 용액상태에서 제조된 캡슐 막의 pore의 크기라고 할 수 있으며, 각각의 pH에 따른 pore 크기는 overall permeability의 자유 확산 및 비확산 상태의 표준단백질 크기의 중간점을 pore의 크기로 정하였다. Pore의 크기가 커짐에 따라 β -lactoglobulin, ovalbumin, BSA의 경우에 overall permeability가 커짐을 알 수 있었으나, γ -globulin이나 fibronectin의 경우 단백질의 크기가 이러한 용액 조건하에서 제조된 캡슐 막의 pore 크기보다 훨씬 커서 투과되지 않음을 보여주고 있다. 이러한 결과 특히 γ -globulin이 투과되지 않는 조건하에서 캡슐을 제조하면 hybridoma가 생산한 단클론항체를 캡슐내에 포집할 수 있고 아울러 인공간, 인공혈관을 만들 경우 immunoisolation을 할 수

Table 1. Overall permeabilities* of proteins through the membrane prepared with chitosan solution at different pH

Proteins	Size(Å)	Overall Permeability($\times 10^{-3}$ cm/sec.)		
		pH of Chitosan Solution		
		pH 3.2 (P=127Å)	pH 4.5 (P=155Å)	pH 6.0 (P=205Å)
β -lactoglobulin (MW=32,000)	38Å	15.3 \pm 1.2	14.2 \pm 1.0	20.6 \pm 2.9
Ovalbumin (MW=45,000)	114Å	11.5 \pm 2.0	25.6 \pm 1.8	32.7 \pm 2.1
Bovine Serum Albumin (MW=66,000)	140Å	1.1 \pm 0.1	21.7 \pm 2.1	30.2 \pm 2.8
Conalbumin (MW=76,000)	170Å	2.3 \pm 0.2	3.0 \pm 0.3	25.6 \pm 1.5
γ -Globulin (MW=156,000)	220Å	1.0 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	1.4 \pm 0.2
Fibrinogen (MW=400,000)	700Å	0.9 \pm 0.1	1.0 \pm 0.2	1.0 \pm 0.2

* The overall permeability(U) was calculated according to:

$$U = w/(A \cdot \Delta C_{im})$$

where, U Overall permeability(cm/min)

w Mass of materials passing through the membrane (g/min)

A Total membrane area(cm²)

ΔC_i The log mean of the concentration (g/ml)

$$\Delta C_{im} = (\Delta C_1 \cdot \Delta C_2)/2.303 \cdot \log(\Delta C_1/\Delta C_2)$$

where, ΔC_1 The initial concentration difference between the inside and the outside of the capsule

ΔC_2 The final concentration difference between the inside and outside of the capsule

있을 가능성을 보여준다(6, 9).

Hybridoma 세포 배양

복잡한 구조, 특히 glycosylation 이나 post-translational modification등을 가진 생물체제를 생산하는데는 동물세포배양이 가장 효과적이다(4, 10, 11). 유전자재조합 단백질이 E. coli와 같은 미생물에서 생산되고 있지만 이러한 단백질 제제의 경우 당류 및 di-sulfide bond의 첨가 등의 post translational modification이 되지 못하므로 단백질의 안정성 등에 문제가 있다. 동물 세포 배양으로 in vitro에서 여러 종류의 단백질 생산이 가능하지만 세포 배양에서 sparging이나 aeration등의 문제로 인한 생산되는 단백질의 농도가 매우 낮은 단점이 있다. 그러므로 면역 반응이나 독성이 없는 생물고분자를 이용한 캡슐화로서 세포 수와 최종 생산물의 농도를 높일 수 있다.

생물고분자 막의 pore 크기 조절의 연구결과를 기초로 하여 특정 pore 크기로서 단클론항체를 생산하는 hybridoma 세포를 캡슐화하였다. 높은 세포 밀도와 캡슐안에 MAb을 포집하기 위해

서는 영양분과 대사 산물의 자유로운 확산이 필요하며, MAb의 투과 및 확산을 막는 pore 크기가 필요하다. Chitosan 용액의 pH를 6.0으로 조절하여 캡슐막의 pore 크기를 200Å로 조절하였다. 이 pore 크기에서 영양분은 자유 확산되어 세포가 증식할 수 있고, lactic acid와 ammonium 같은 대사 산물도 쉽게 확산되어 제거될 수 있다. 이 pore 크기로서 가장 중요한 생산물인 단클론항체가 캡슐안에 포집되어질 수 있으므로 down stream의 step을 줄일 수 있다. 결과적으로 캡슐화 상태에서는 단클론항체를 높은 농도로 얻을 수 있고, 또한 단클론항체의 정제 과정을 줄일 수 있는 것이다. 실제 MAb생산성 및 세포농도를 free cell culture와 비교하기 위해 flask 전체의 농도로 환산하여 서술하였다.

Figure 2는 human fibronectin에 대한 단클론항체를 생산하는 ATCC CRL-1606 cells의 성장곡선을 보여준다. 이 세포의 대수기는 캡슐화된 상태에서 1~8일 동안 관찰되어졌다. 캡슐화된 CRL-1606의 세대 시간은 21.4시간이고, 비성장속도(μ)는 $3.24 \times 10^{-2}/hr$ 였다. 캡슐화 세포 배양에서의 최대 세포 밀도는 일반 세포의 배양(7×10^5 cells/mL)의 경우 보다 약 18배 더 높게 나타났다. 즉 1개의 T-flask당 일반 세포의 최대 농도는 2.1×10^7 cells/T-flask인데 반해서 캡슐화된 세포의 최대 농도는 3.2×10^8 cells/T-flask이므로 일반 세포의 경우보다 약 15배의 높은 세포농도를 보여주고있다.

Figure 3은 단클론항체의 농도는 배양 5일째부터 대수적으로 증가되는 것을 보여준다. 캡슐화된 단클론항체의 최대 농도는 배양 8일째에서 $506 \mu g/mL$ 였다. 즉 캡슐안에서 단클론항체의 최대 농도는 $2.0 \times 10^3 \mu g/T-flask$ 로서 4일째 일반 세포 배양시의 단클론항체 최대 농도(약 $9.0 \times 10^2 \mu g/T-flask$) 보다 더욱 높게 나타났다. 캡슐화된 ATCC CRL-1606의 단클론항체 비생산 속도는 $8.2 \text{ pg/cell} \cdot \text{day}$ 였다.

Figure 4는 캡슐화된 세포 배양 시스템으로 bovine lactoferrin에 대한 단클론항체를 생산하는 ATCC HB-8852의 성장 곡선을 보여준다. 대수 성장기는 배양 1~7일 동안 관찰되었다. 90%의 생존율을 가진 집중 세포가 캡슐화 과정동안 생존율이

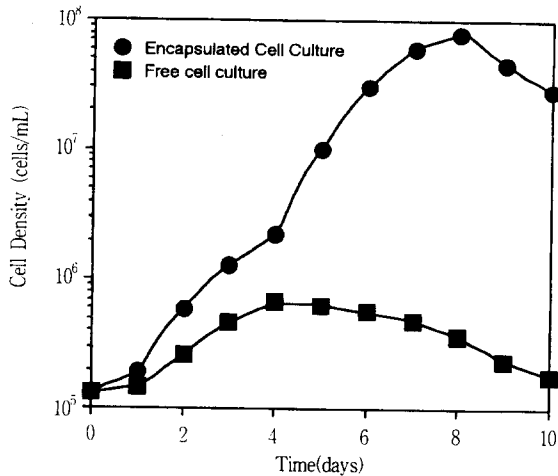


Figure 2. Growth curve of encapsulated hybridoma(ATCC CRL-1606) for the production of MAb against human fibronectin in T-flask(w/o medium change)

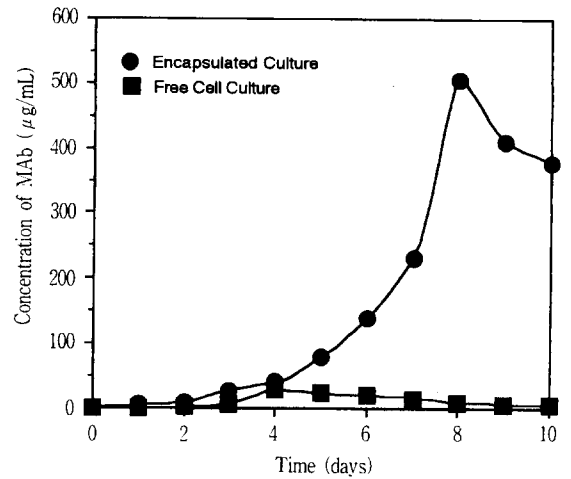


Figure 3. Production of MAb against human fibronectin (ATCC CRL-1606) from the encapsulated mouse-mouse hybridoma in T-flask(w/o medium change)

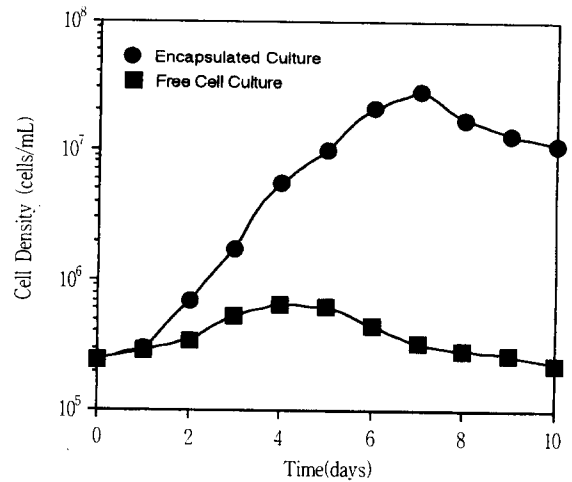


Figure 4. Growth curve of encapsulated hybridoma(ATCC HB-8852) for the production of MAb against bovine lactoferrin in T-flask(w/o medium change)

50%로 줄어들고 그 후 캡슐안의 상태가 안정하여 배양 6일째 90%로 다시 회복하였다. 최대 세포의 밀도는 캡슐화된 세포배양에서 일반 세포 배양시 보다 25배이상 더 많이 얻을 수 있었다. 캡슐화된 ATCC HB-8852의 세대 시간과 비증식속도(μ)는 각각 22시간이고 $3.1 \times 10^{-2}/hr$ 이었다.

캡슐화된 ATCC HB-8852의 단클론항체 생산은 7일째에서 최대 농도로 $106 \mu g/mL$ (Figure 5)이고 이는 일반세포 배양시의 최대 농도인 $5 \mu g/mL$ (4일째) 보다 약 20배 더 높은 것을 알 수 있다. 캡슐화된 HB-8852를 위한 항체 비생산 속도는 $4.0 \text{ pg/cell} \cdot \text{day}$ 이었다. 또한 hybridoma에 의해 생산되는 항체는 캡슐안에서 그 최대 농도가 $424 \mu g/T-flask$ 이고 일반세포 배양시에는 그 최대 농도가 $150 \mu g/T-flask$ 로서 캡슐화 배양이 약 3배 더 높은 단클론항체 수율을 보여주고 있다.

Figure 6은 배양 10일간의 캡슐화 세포(ATCC HB-8852)의

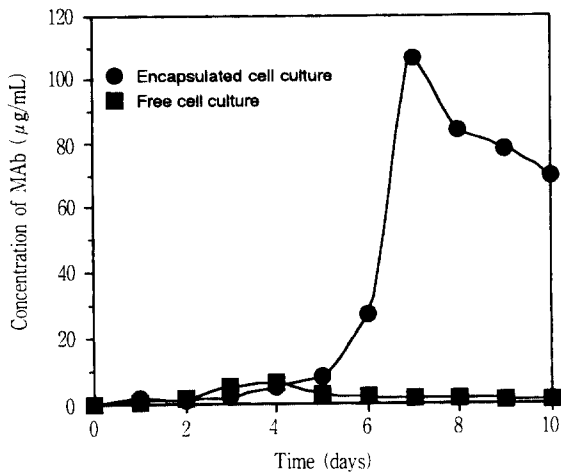


Figure 5. Production of MAB against bovine lactoferrin from the encapsulated mouse-mouse hybridoma(ATCC HB-8852) in T-flask(w/o medium change)

현미경 사진으로서 세포 군락은 배양 3일째부터 관찰할 수 있었고, 세포 성장 및 분열에 의해 시간이 지남에 따라 군락의 크기가 커짐을 알 수 있었다. 배양 7일 후에 세포 성장으로 캡슐내의 모든 부분이 검은색 세포 군락으로 채워졌다. 세포의 밀도 혹은 세포 성장곡선을 보면 7일째 최대의 생존 세포 밀도를 나타내는데 이 이후부터는 캡슐안의 세포가 영양분 및 산소의 확산의 제한(limitation of diffusion)에 의해 세포가 더 이상은 자라지 못하는 세포 밀도가 되었으리라 추론할 수 있다. 사진에서 보는 바와 같이 7일째부터는 거의 모든 캡슐내 공간이 세포로 차 있다. 실제적으로 세포 밀도 2.5×10^7 cells/mL일 경우 확산의 제한이 없는 즉 effectiveness factor(η , 식1)가 1.0이 되는 캡슐의 크기는 1.8mm이하이다(12).

$$\eta = \frac{\gamma_s}{\gamma_s \text{ without } O_2 \text{ conc. gradient in cell floc}} \quad (1)$$

η Effectiveness factor

γ_s Respiration rate of cells

하지만 본 실험에 사용된 캡슐(2mm)의 경우 세포가 캡슐내에 차 있지 않다가 세포 분열 및 성장에 따라 세포가 점차 차 들어감으로써 7일째 최대 수용 가능한 세포 밀도가 되었으며, 이 이후 성장의 제한을 받고서 점차 세포수가 줄어드는 정지기에 접어든다. 세포 성장곡선이 캡슐내 세포의 현미경 사진과 잘 일치하고 있음을 보여주고 있다.

MAB를 회수하기 위해 본 실험에서 사용된 캡슐의 경우 간단히 배지를 제거하여 캡슐을 surgical knife로 잘라 내용액을 포집할 수 있으나 alginate gel의 경우 이러한 세포 배양액이나 단클론항체의 분리가 용이하지 않다.

Hybridoma(ATCC HB-8852)의 perfusion 배양 및 단클론항체생산

T-flask batch culture의 결과에 기초하여, 캡슐화 ATCC HB-8852의 Perfusion 배양을 통해 세포 밀도 및 MAB의 농도의 증가를 시도하였다. Feeding을 하지 않았던 T-flask의 배양과는 달리 2L fermenter에 2일에 한번씩 배지 전체를 교환하였다. 그 결과를 silicon tubing을 이용한 semi perfusion culture 및 세포를 recycle한 perfusion culture와 비교하여 보았다(13).

Figure 7은 캡슐화된 ATCC HB-8852와 silicon tubing 발효기에서 배양된 ATCC HB-8852의 성장을 보여주고 있다. 배지공급에 의한 희석 때문에 silicon tubing 배양기의 세포 배양에서 세포 밀도는 서서히 증가하여 그 세포 밀도는 10^6 cells/mL에 도달하였다. 그러나 세포가 캡슐화 되었을 때는 배지를 공급하는 동안

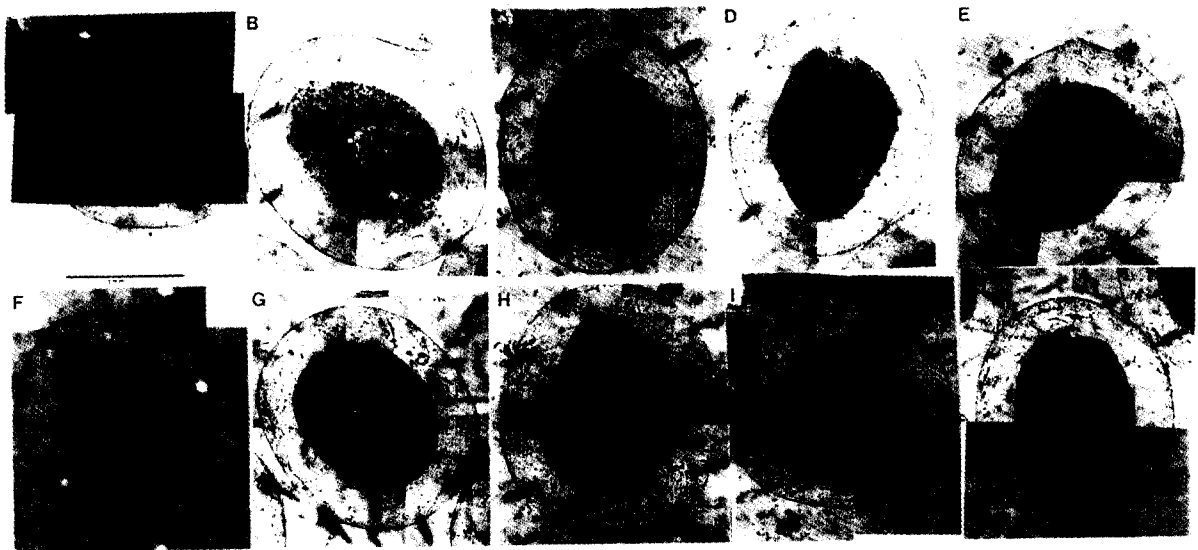


Figure 6. Growth of encapsulated hybridoma(ATCC HB-8852) : Bar indicates 1mm

A : 1st day of incubation, B : 2nd day of incubation, C : 3rd day of incubation, D : 4th day of incubation, E : 5th day of incubation, F : 6th day of incubation, G : 7th day of incubation, H : 8th day of incubation, I : 9th day of incubation, J : 10th day of incubation

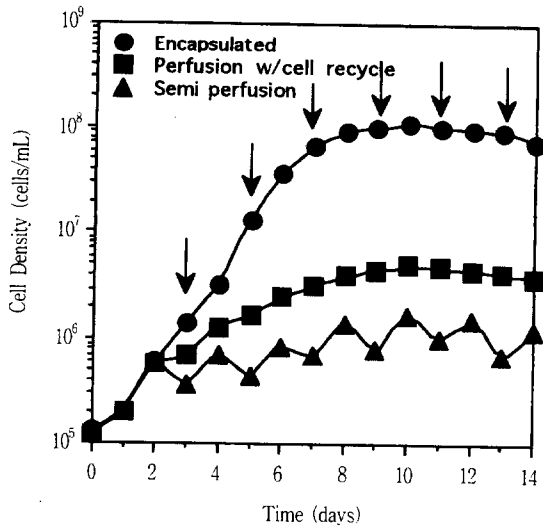


Figure 7. Growth curve of encapsulated hybridoma(ATCC HB-8852) in direct sparged and aerated 2L fermenter by feeding DMEM + 10%FCS. Free cell cultures as control were oxygenated by silicon tubing(Arrows indicate feeding the medium).

Fermenter specifications : Sparging(0.2VVM) W/marine type impeller 200rpm (tip speed = 40cm/s) with 50ppm antifoam type AF emulsion (Dow Corning)

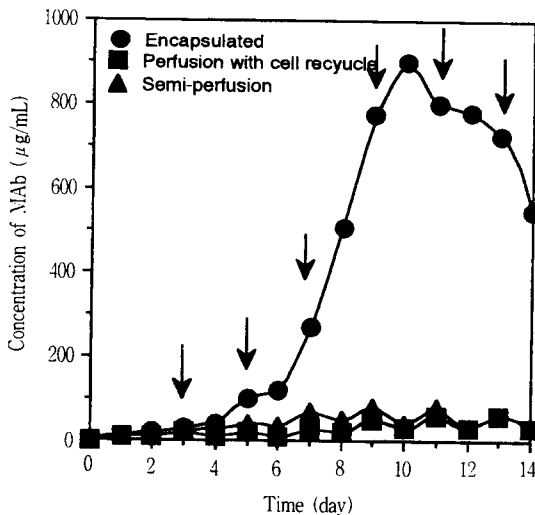


Figure 8. Production of MAb against bovine lactoferrin from the encapsulated mouse-mouse hybridoma(ATCC HB-8852) in direct sparged and aerated 2L fermenter by feeding DMEM + 10%FCS. Free cell cultures as control were oxygenated by silicon tubing(Arrows indicate feeding the medium).

Fermenter specifications : Sparging(0.2VVM) W/marine type impeller 200rpm (tip speed = 40cm/s) with 50ppm antifoam type AF emulsion(Dow Coning)

세포의 소실이 없는 상태이므로 세포의 밀도는 10^8 cells/mL까지 증가하였다. 단클론항체 생산도 $900\mu\text{g/mL}$ 으로 silicon tubing 배양기내의 세포 배양시 보다 약 100배 이상의 높은 농도를 보

였다(Figure 8). 실제로 발효기간에 25%의 캡슐 부피를 고려한다면, 그 단클론항체 농도는 일반 세포 배양의 경우 보다 25배 더 높은 농도를 얻을 수 있다. 즉 캡슐화 상태에서 MAb 농도는 $9 \times 10^5\mu\text{g/L}$ 이고, silicon tubing 배양기내의 MAb농도는 $3.6 \times 10^4\mu\text{g/L}$ 로 나타낼 수 있다. 그러므로 고농도의 단클론항체 생산으로 분리정제 공정의 단위공정의 수를 줄일 수 있다.

요 약

Chitosan과 alginate 용액 사이의 전기적 상호 작용을 이용한 생물고분자 막 형성을 통해 캡슐을 만들었다. 여러 가지의 용액 조건에서 조제된 캡슐의 생물고분자 막 pore 크기는 표준 단백질의 확산실험으로 측정하였다. 단백질 확산실험으로 얻은 pore의 크기를 hybridoma (ATCC CRL-1606, HB-8852)의 배양 및 MAb생산에 응용하였다. 영양분 및 대사노폐물은 자유 확산하지만 생산물결인 단클론항체는 투과하지 못하여 캡슐내에 포집할 수 있는 pore 크기인 200Å로 조절하여 세포 캡슐화를 행하였다. T-flask배양 및 2L 배양기실험을 통한 캡슐화 세포가 일반세포 배양시보다 지수단위 2단위(100배) 큰 세포밀도 및 단클론항체농도를 얻을 수 있었다.

감 사

본 연구는 1996년도 교육부 지원 생물화학공학 학술연구조성비 96 B(4)-3에 의하여 연구 되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Kim, S. K. (1994), Encapsulation을 이용한 세포 고정화와 그 응용, 생물공학 NEWS, 1(3), 28-32.
- Rha, C. K. and D. Rodriguez-Sanchez (1988), Process for Encapsulation and Encapsulated Active Material System, US Patent 4, 774,937.
- Lee, S. J. and S. K. Kim (1996), Preparation and Applications of Synthetic Fish Capsules from Marine Polysaccharides, Korean Journal of Life Science, 6(1), 34-39.
- Kim, S. K. and C. K. Rha (1989,a), Transmembrane Permeation of Protein in Chitosan Capsules, Chitin and Chitosan-Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications (G. Skjak-Braek, T. Anthonsen, and P. Sandford eds.), pp. 636-642, Elsevier Science Pub., New York.
- Kim, S. K. and C. K. Rha (1989,b), Chitosan for the Encapsulation of Mammalian Cell Culture, Chitin and Chitosan-Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications (G. Skjak-Braek, T. Anthonsen, and P. Sandford eds.), pp. 644-652, Elsevier Science Pub., New York.
- Gupta, S., S. K. Kim, R. P. Vemure, E. Aragona, P. R. Yerneni, R. D. Burk, and C. K. Rha (1993), Hepatocyte Transplantation : An Alternative System for Evaluating Cell Survival and Immunoisolation, The International

- Journal of Artificial Organs, 16(3), 155-163.
7. Chang, T. (1964), Semipermeable Membrane, Science, 146, 524-527.
 8. Lim, F. (1983), Microcapsules Containing Viable Tissue Cells, US Patent 4,391,900.
 9. Gullberg, D., L. Terracio, and K. Rubin (1988), Membrane Glycoprotein Involved in Hepatocyte Adhesion to Collagen Type I, Experimental Cell Research, 175, 388-395.
 10. Posillico, E. (1986), Microencapsulation Technology for Large-Scale Antibody Production, Bio/technology, 4, 114-122.
 11. Glacken, M. W., R. J. Fleischaker, and A. J. Sinskey (1983), Mammalian Cell Culture : Engineering Principles and Scale-Up, Trend in Biotechnology, 1(4), 102-112.
 12. Bailey, J. E. and D. F. Ollis (1986), Biochemical Engineering Fundamentals, 2nd, pp. 208-218, McGraw-Hill Publishing Company, New York.
 13. Lee, J. S., J. W. Park, and S. K. Kim (1995), Encapsulated Animal Cell Culture, Abstracts of International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, p. 277.