

단일클론항체 생산 및 분비에 대한 생물분자공정의 모델링

박재성 · †박선호

계명대학교 공과대학 화학·재료공학부
(접수 : 1998. 3. 5., 게재승인 : 1998. 4. 16.)

Modelling of a Biomolecular Processing for the Production and Secretion of Monoclonal Antibody

Jae Sung Park and †Sun Ho Park

School of Chemical Engineering and Materials Engineering,
Keimyung University, Taegu 704-701, Korea
(Received : 1998. 3. 5., Accepted : 1998. 4. 16.)

To analyze the unique aspects of biomolecular processing for monoclonal antibody (MAb) production and secretion, the simple working model based on 3-compartment (endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, and extracellular medium) was developed. Based on *in vitro* MAb assembly experimental results, the kinetic model for MAb assembly in the endoplasmic reticulum was proposed. The dynamics of MAb assembly and secretion was simulated using mathematica program. According to the simulation results, the proposed 3-compartment model provides an efficient means to predict the specific MAb productivity as well as intracompartamental concentrations of MAb in endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, and extracellular medium. *In vivo* profiles of MAb intermediates gave good agreements with the simulation profiles predicted by the intracellular compartment model. Furthermore, results of such analysis can help in directing the control strategy for optimum biomolecular processing in a mammalian cell culture system.

Key Words : monoclonal antibody, secretion, biomolecular processing, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, 3-compartment model

서론

동물세포배양기술을 이용한 인간성장호르몬, 인터페론, 혈전용해제, 바이러스 백신, 단일클론항체와 같은 의학적으로 중요한 당단백질의 생산은 동물세포의 소기관들을 통해 얻어지고 있다. 최근에는 이러한 동물세포내의 소기관들에 대한 생물분자공정을 보다 정확히 이해하고 또한 이들의 미세 환경을 인위적으로 조절함으로써 세포당 생산성을 극대화시키고자 하는 노력이 계속되고 있다. 그 중 소포체는 번역후(post-translational) 변형과정에서 분비와 소포체내 거주 단백질, resident ER 단백질, 골지체와 라이소솜 membrane 단백질들의 합성뿐만 아니라 대부분의 접힘과 조립이 일어나는 중요한 기관의 하나로 알려져 있다(1, 2). 특히 대부분의 분비되는 당단백질들은 이황화결합(disulfide bonds)을 갖고 있기 때문에 소포체 내에서의 올바른 이황화결합의 형성과 전위 반응은 생성된 단백질들의 효율적인 수송에 필수적인 반응이다. 즉 접혀지지 않거나 조립되지 않은 폴리펩타이드들은 대개 aggregates를 형성하여(3) 정낭에 들어가

못하고 BiP(heavy chain binding protein)와 결합하고 완전한 접힘과 조립이 될 때까지 소포체내에 체류하게 된다(4). 또한 잘못 접혀지거나 조립된 폴리펩타이드들도 소포체에 머물게 되어 결국은 분해된다(5).

이와같은 소포체내에서의 되접힘과 조립공정은 동물세포로부터 유도되는 여러가지 소포체내 효소와 단백질 인자들에 의해 촉진될 수 있는데, prolyl-4-hydroxylase, lysyl hydroxylase, glucosyltransferase, galactosyl transferase, prolyl isomerase, protein disulfide isomerase(PDI)와 oligosaccharyl transferase 등이 소포체내에서 발견되고 있으며 번역후 변형에 관여하는 것으로 알려져 있다(6-8). 또한 다른 소포체 거주 단백질로는 GRP78, GRP94(glucose regulatory proteins) 등이 있는데 이 두가지 단백질이 PDI와 더불어 영구히 소포체에 존재하는 단백질로서 카르복시 최말단에 공통된 아미노산 배열(KDEL: lys-asp-glu-leu)을 공유하고 있어 이 배열이 소포체내 거주 signal로 밝혀져 있다.

Immunoglobulin(Ig)생합성의 경우에도 PDI와 BiP가 IgG 조립 및 분비에 직접 관여하고 있는 것으로 밝혀지고 있는데 PDI는 heavy chain과 light chain간의 이황화결합에 만드는데 필요한 효소로서 세포내 PDI level과 분비 activity와 밀접한 상관관계를 보이고 있다. 또한 BiP는 chaperon의 하나로 잘 알려진 GRP78과 동일한 것임이 밝혀졌으며, 이는 아직 완전히 조립되

† Corresponding Author : 1000 Shindang-dong, Dalseo-gu, Taegu 704-701, Korea
Tel : 053-580-5457, FAX : 053-633-4929
e-mail : park@kmucc.keimyung.ac.kr

지 않은 heavy chain들 또는 그 중간체들과 결합함으로써 불완전한 펩타이드들의 분비를 방지하는 작용을 하고 있다.

본 연구실에서는 하이브리도마 세포 배양에 의한 단일클론항체(Monoclonal Antibody)의 생산을 예로하여 세포당 단일클론항체의 생산성을 향상시키기 위한 목적으로 이러한 생물분자공정들에 관한 연구를 수행중에 있다. 본 연구에서는 세포체내에서의 항체의 조립 및 분비공정을 보다 정확히 이해하고 해석하기 위하여 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 수행하였으며 이를 기초로 하여 세포내의 항체의 조립 반응역학 및 분비공정에 대한 모델을 제시하였다. 또한 이 모델을 이용하여 항체 조립 공정 및 이송에 영향을 주는 생물분자공정 매개변수들의 영향을 전산모사를 통하여 조사하였다.

이론

본 연구에서 사용된 하이브리도마 세포인 66F11이 생성하는 단일클론항체(MAB)는 IgG₁ subtype으로 2개의 heavy chain과 2개의 light chain으로 구성되어 있으며 heavy chain과 heavy chain사이, heavy chain과 light chain사이에는 각각 2개의 이황화결합으로 형성되어 있다(Figure 1). 이러한 구조로 이루어진 단일클론항체는 세포체에서 조립되며 매우 복잡한 매커니즘을 통해 세포밖으로 이송되어진다. 이들 단일클론항체의 생성 및 분비공정에 대한 간단한 모식도를 Figure 2에 나타내었다. 핵에서 전사된 mRNA가 리보솜으로 옮겨져 heavy chain과 light chain을 번역하게 되고 이렇게 만들어진 단백질들은 각종 signal을 통해 세포체내로 translocation 되어 세포체내에서 folding과 assembly 과정을 거쳐 단일클론항체를 생성하게 된다. 이렇게 세포체내에서 조립된 단일클론항체는 다시 골지체에서 번역후 변형과정등을 거치면서 세포밖 배지로 이동되는 경로를 갖는다(9). 이 과정에서 대부분의 동물세포들은 핵에서의 전사나 번역과정보다는 세포체내에서 단일클론항체가 조립되고 세포밖으로 분비되는 번역후의 과정이 유속단계인 것으로 알려져 있다(10-14). 따라서 본 연구에서는 *in vitro*와 *in vivo* 실험을 통해 세포체내의 조립과정을 중점적으로 조사하였으며 이를 기반으로 단일클론항체 조립반응 및 분비공정에 대한 모델식을 수립하였다. 이 모델식에 사용된 매개변수들인 R_A, K_{ER}, K_G, μ값들은 실제 세포가 성장하고 단일클론항체가 생산되는데 있어 유효

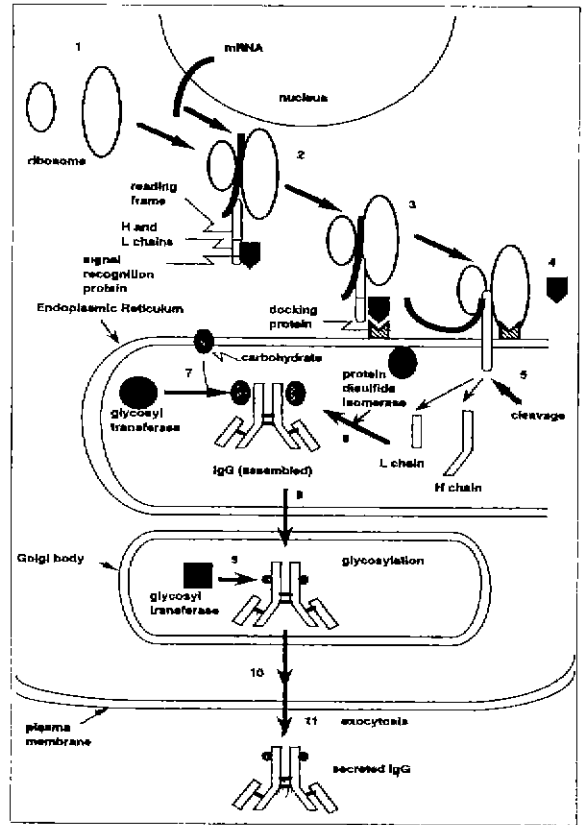


Figure 2. Schematic diagram of MAb production and secretion process.

속단계로 작용할 수 있는 변수들이며 이러한 매개변수들은 온도와 같은 주위 환경이나 protein disulfide isomerase, calcium 농도, ethanol과 같은 물질들의 인위적인 조작들에 의해 조절될 수 있다. 또한 이 매개변수들을 실제공정에서 조절함으로써 세포의 성장뿐만 아니라 단일클론항체의 생산성을 증대시킬 수 있을 것으로 기대되며 이러한 공정에서 본 연구는 이론적인 기반을 구축할 것으로 기대된다.

단일클론항체의 조립 반응

단일클론항체의 조립반응은 *in vitro* 실험결과 protein disulfide isomerase에 의해 촉진되며 3개의 중간생성물(H₂, HL, H₂L₂)들이 발견되었다(15). 따라서 *in vitro* 실험 결과를 기초로 단일클론항체 조립 경로는 Figure 3과 같이 표시될 수 있으며 이러한 메커니즘에 따라 반응 속도식을 세우면 다음과 같이 표시될 수 있다.

$$\frac{d[L]}{dt} = -k_2[H][L] - k_4[H_2][L] - k_6[H_2L][L] \tag{1}$$

$$\frac{d[H]}{dt} = -k_1[H]^2 - k_2[H][L] - k_3[HL][H] \tag{2}$$

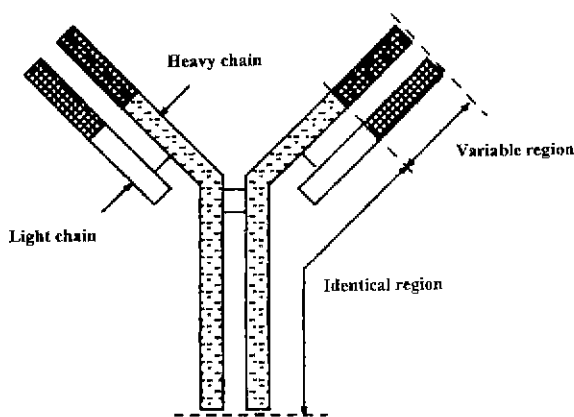


Figure 1. Structure of immunoglobulin G1(IgG₁) type.

$$\frac{d[HL]}{dt} = k_2[H][L] - k_3[HL][H] - k_5[HL]^2 \quad (3)$$

$$\frac{d[H_2]}{dt} = k_1[H]^2 - k_4[H_2][L] \quad (4)$$

$$\frac{d[H_2L]}{dt} = k_3[HL][L] + k_4[H_2][L] - k_3[H_2L][L] \quad (5)$$

$$\frac{d[H_2L_2]}{dt} = k_6[H_2L][L] + k_5[HL]^2 \quad (6)$$

여기서, [L]는 light chain의 농도(μM), [H]는 heavy chain의 농도(μM), [HL]은 heavy chain과 light chain 복합체의 농도(μM), [H₂]는 heavy chain 이합체의 농도(μM), [H₂L]은 heavy chain 이합체와 light chain 복합체의 농도(μM), [H₂L₂]는 조립된 MAb의 농도(μM)이다. 그리고 k₁, k₂, k₃, k₄, k₅, k₆는 각 조립반응에 관여하는 속도상수들이다.

모든 속도방정식들에서 중간생성물사이의 이화화결합 형성 속도는 1차 반응으로 가정하였으며 heavy chain과 heavy chain 사이, heavy chain과 light chain사이에서의 이화화결합 속도가 연속적이라는 것을 가정하였다.

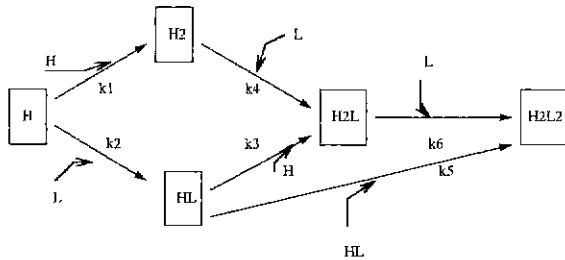


Figure 3. Proposed reaction mechanism for the MAb assembly from heavy chain and light chain monomers.

단일클론항체 분비공정에 대한 3 격실(Compartment) 모델

MAb 조립반응과 분비공정에 대한 모델로서 세포에서 조립된 MAb가 골지체를 거쳐 medium으로 이송되는 과정을 3격실 모델을 이용하여 나타내었다(Figure 4). 3격실 모델에 대한 MAb 물질 수지식은 다음과 같다.

$$ER: \frac{d[MAB]_{ER}}{dt} = -(K_{ER} + \mu)[MAB]_{ER} + R_A \quad (7)$$

$$Golgi: \frac{d[MAB]_G}{dt} = K_{ER}[MAB]_{ER} - (K_G + \mu)[MAB]_G \quad (8)$$

$$Medium: \frac{d[MAB]_M}{dt} = q_{MAB} = K_G[MAB]_G \quad (9)$$

여기서 [MAB]_{ER}은 세포당 세포체에서의 MAb농도 (molecules/cell), [MAB]_G는 세포당 골지체에서의 MAb농도(molecules/cell), [MAB]_M는 세포당 배지에서의 MAb농도 (molecules/cell), R_A는 세포체에서의 MAb 조립 속도 (molecules/cell/min), K_{ER}은 세포체에서 골지체로의 진행 속도상수 (min⁻¹), K_G는 골지체에서 세포밖 배지로의 진행 속도상수 (min⁻¹), μ 는 specific growth rate (day⁻¹), q_{MAB}는 specific MAb secretion rate (molecules/cell/min)이다.

즉 세포체와 골지체에서의 MAb 축적량은 MAb 조립속도, 세포체에서 골지체로의 이동속도, 골지체에서 세포밖 배지로의 이송속도에 따라 결정되는데 여기서 이들 이송속도는 모두 MAb 농도에 비례하는 것으로 가정하였다. 또한 세포가 분열되면서 희석될 수 있기 때문에 μ 값의 영향도 고려하였다. 그러나 만일 비성장속도 μ 의 영향이 작다고 가정하면 위의 물질수지식들을 모두 더할 경우 격실간의 이송속도는 서로 상쇄되어

$$\frac{d[MAB]_T}{dt} = \frac{d[MAB]_{ER}}{dt} + \frac{d[MAB]_G}{dt} + \frac{d[MAB]_M}{dt} = R_A \quad (10)$$

가 된다.

결국, 비성장속도가 무시될 때 세포내 총 MAb 생성속도는 세포체내에서 MAb 조립속도(R_A)와 일치한다는 것을 알 수 있다. 그러나 실제 세포 성장의 영향을 고려하면 각종 parameter 들이 세포체에서 생성된 MAb의 이송에 어떤 영향을 미치는지 구체적으로 조사해 보아야 한다. 이를 위해 실제 공정에서 얻어지는 포유동물세포들에 대한 유효 parameter 값들의 사용 범위를 Table 1에 나타내었으며 이 상수값들의 범위내에서 MAb 조립 및 분비 공정을 정상상태와 비정상상태로 나누어 각각 전산모사하였다.



Figure 4. The three-compartment model of MAb assembly and secretion.

Table 1. Values of the MAb assembly and secretion kinetic parameters.

Parameter	Unit	Range
R _A	molecules/cell/hr	0.06-0.5
K _{ER}	hr ⁻¹	0-1
K _G	hr ⁻¹	0-1
μ	hr ⁻¹	0.01-0.07

(a) 정상상태의 해법

정상상태에서 세포체와 골지체에서의 MAb 농도 변화는

$$\frac{d[MAB]_{ER}}{dt} = \frac{d[MAB]_G}{dt} = 0 \quad (11)$$

이 되므로, 식 (7)과 (8)로부터 $[MAb]_{ER}$, $[MAb]_G$ 에 대해 정리하면,

$$[MAb]_{ER} = \frac{R_A}{(K_{ER} + \mu)} \quad (12)$$

$$[MAb]_G = \frac{K_{ER}R_A}{(K_{ER} + \mu)(K_G + \mu)} \quad (13)$$

이 되며

$$q_{MAb} = \frac{K_{ER}K_G R_A}{(K_{ER} + \mu)(K_G + \mu)} \quad (14)$$

로 유도된다. 따라서 정상상태에서 식 (12), (13) 그리고 (14)는 소포체와 골지체에서의 MAb 농도가 R_A , K_{ER} , K_G 그리고 μ 에 의해 어떻게 영향을 받으며 궁극적으로 배지내에 축적되는 MAb의 분비속도를 예측할 수 있게 한다.

(b) 비정상상태의 해법

격실모델 물질수지식에서 격실을 통한 MAb의 이송이 비정상 상태일 경우 MAb 조립반응역학 모델의 식인 (1), (2), (3), (4), (5)와 (6)식을 풀후 그 결과를 이용하여 MAb 이송에 대한 격실 모델식인 (7), (8)과 (9)식을 풀면 시간에 따른 상태변수들의 변화를 구할 수 있다. 본 연구에서는 정상상태 및 비정상상태에서의 수치해석을 위해 mathematica의 NDSolve, Plot 함수를 이용하였다[16].

재료 및 방법

세포주 및 배양 조건

Cephalexin Synthesizing Enzyme (CSE)으로 번역시킨 Balb/c 쥐의 비장세포와 P3-X63-Aq8.653 mouse myeloma 세포를 융합시켜 만든 66F11이란 하이브리도마 세포를 캘리포니아 대학(UC DAVIS)으로부터 분양 받아 사용하였다. 이 cell line이 생성하는 항체는 IgG₁ subtype으로 10% 혈청(Gibco)이 첨가된 RPMI-1640(Sigma) 배지를 이용하여 100U penicillin G 와 100mg/ml streptomycin(Sigma)을 첨가한 후 5.5% CO₂ Incubator를 이용하여 T-flask상에서 배양하였다.

In vivo pulse labeling 실험

MAb 중간생성물을 관찰하기 위해 방사능 pulse labeling기술이 사용되었다[17]. L-leucine deficient한 RPMI-1640(Sigma) 배지에 방사능을 가진 50 μ Ci ³H L-leucine (NET-135H, NEN Research Products)을 몇분간 살아있는 세포에 uptake시킨 후 7.6mM leucine을 첨가하여 더 이상의 uptake를 막은 후 disulfide interchange를 막기 위해 40-100mM iodoacetamide 가 더해졌다 시간에 따라 채취된 샘플들은 세포 용해후 immunobead(anti-H+L, Biorad)를 이용하여 면역침강되었고 10% SDS 폴리아크릴아마이드 젤(crosslinker: DHEBA, Biorad)에 의해 분리된 후 coomassie blue에 의해 staining, 그리고 destaining과정을 거친후 나타난 band들을 칼로 잘라내어

60°C에서 25mM periodic산에 녹인후 cocktail 용액(Ready Gel, Beckman)을 첨가하여 scintillation counter에서 분석되었다.

결과 및 고찰

단일클론항체 조립중간체의 in vivo 분석

하이브리도마 세포 66F11에 의해 항체가 생성되는 동안 IgG₁ 중간생성물들의 시간에 따른 변화를 Figure 5에 나타내었다. 실험 결과 3개의 중간생성물(H₂, HL, H₂L)들이 발견되었고 light chain 이합체(L₂)는 발견되지 못했는데 이는 Immunoglobulin G의 경우 2개의 heavy chain과 2개의 light chain사이의 이황화결합이 존재하며 L-chain사이의 티오기 형태의 이황화결합이 다른 중간생성물들에 비해 반응이 매우 느린 것으로 추측된다. 이 결과는 in vitro 항체 조립 실험결과와도 잘 일치하였다(15). 또한 light chain과 heavy chain의 방사능 비가 추적시간동안 약 21로 유지되어 늘 light chain들이 heavy chain에 비해 과잉으로 생산되는 것을 알 수 있다. 그리고 heavy chain과 light chain들의 초기 증가는 cold 아미노산의 첨가후에도 약간 uptake된 ³H-leucine 때문으로 생각된다.

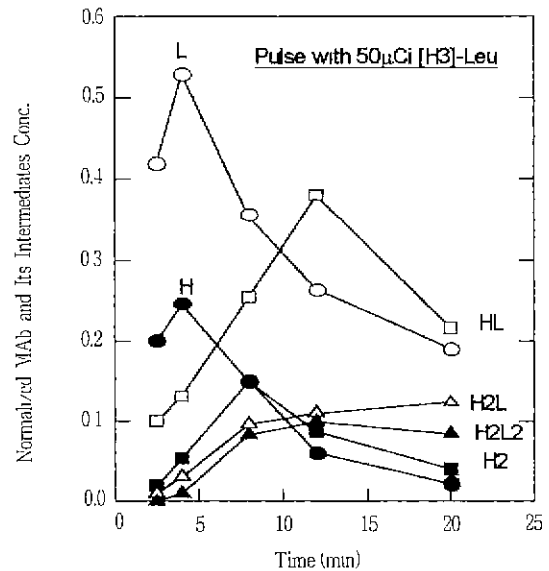


Figure 5. In vivo MAb assembly kinetics.

단일클론항체 조립 및 분비공정에 대한 해석

정상상태에서 3격실을 통한 MAb 조립반응 및 이송에 관한 매개변수들의 영향을 조사하였다. Figure 6 (A)는 세포의 비성장속도 μ 값이 0.05 hr⁻¹로 일정할때 MAb 조립 속도인 R_A 값을 0.06-0.5 molecules/cell/hr 로 변화시켜주면서 소포체에서 K_{ER} 값에 따른 MAb의 농도 변화를 나타낸 것이다. K_{ER} 값이 적을 경우 소포체에서 골지체로의 이송속도가 조금만 변하여도 소포체내 MAb 농도는 크게 달라지지만 K_{ER} 값이 클수록 K_{ER} 값의 영향보다는 R_A 값에 따라 1 molecules/cell 이하에서 각각 거의 일정하게 유지됨을 알 수 있다. Figure 6 (B)는 R_A 값이 0.5 molecules/cell/hr로 일정할 때 비성장속도 μ 의 값을 0.01-0.07 hr⁻¹로 변화시켜주면서 K_{ER} 값에 따른 소포체에서의 MAb 농도

변화를 나타낸 것으로 μ 값이 감소할수록 소포체내에서의 MAb 농도가 증가하며 μ 값이 R_A 값보다(Figure 6 (A)) 소포체에서의 MAb 농도에 더 큰 영향을 미침을 알 수 있다. 또한 K_{ER} 값이 0.08 hr^{-1} 이상에서는 소포체에서 유지되는 MAb 농도도 μ 값에 따라 3-5 molecules/cell 정도로 일정하게 유지됨을 볼 수 있다.

Figure 7 (A)와 (B)는 μ 값이 0.05 hr^{-1} 로 일정할 때 MAb 조립속도인 R_A 의 값을 $0.06-0.5 \text{ molecules/cell/hr}$ 로 변화시켜 준 결과이다. Figure 7 (A)에서 보는 바와 같이 R_A 값이 증가할수록 골지체에서 MAb 농도가 높으며 또한 K_{ER} 값이 작을 때 소포체에서 골지체로의 이송속도가 조금만 증가하여도 골지체에서의 MAb 농도가 급격히 증가함을 알 수 있다. 소포체에서의 MAb 농도와 마찬가지로 K_{ER} 값이 클 경우 골지체에서의 MAb 농도는 R_A 값에 따라 일정해짐을 볼 수 있고 K_{ER} 값이 약 0.4 hr^{-1} 이상에서의 골지체에서의 농도 변화는 거의 R_A 값에 의존함을 알 수 있다. Figure 7 (B)에서 보는 바와 같이 골지체에서 K_G 값에 따른 MAb 농도 변화도 K_G 값이 적을 경우 MAb 농도가 민감하게

변화되는 반면 K_G 값이 약 0.4 hr^{-1} 에서는 R_A 값에 따라 $0.8 \text{ molecules/cell}$ 이하의 MAb 농도에서 일정하게 유지되었다. 그리고 소포체에서 K_{ER} 값에 의해 골지체로 이송되는 MAb 농도 영향(Figure 6(A))과 골지체에서 K_G 에 의해 이송되는 MAb 농도의 영향(Figure 7(B))을 비교해 보면 K_{ER} 값에 의한 영향이 더 큼을 알 수 있다. Figure 7 (C)와 (D)는 R_A 값이 $0.5 \text{ molecules/cell/hr}$ 로 일정할 때 비성장속도 μ 의 값을 $0.01-0.07 \text{ hr}^{-1}$ 로 변화시켜준 결과이다. μ 값이 작을수록 골지체에서의 MAb 농도가 높으며 K_{ER} 값이 증가하여 그 값이 0.15 hr^{-1} 이상에서는 골지체에서 MAb 농도가 μ 값에 따라 일정하게 유지되어 약 $1.5-2.6 \text{ molecules/cell}$ 로 유지된다. K_G 값에 대한 영향은 K_G 값이 작을수록 감소되는 농도값이 크며 K_G 값이 $0.25-0.3 \text{ hr}^{-1}$ 이상에서는 골지체에서 세포밖 배지로 MAb가 완전히 이송되지 않고 골지체내에 $2-3 \text{ molecules/cell}$ 정도의 MAb 농도가 잔류하고 그 변화값이 R_A 값의 영향보다(Figure 7 (B)) 더 큰 영향을 미침을 알 수 있다.

Figure 8 (A)는 세포의 비성장속도 μ 값이 0.05 hr^{-1} 로 일정할 때 MAb 조립속도인 R_A 값을 $0.06-0.5 \text{ molecules/cell/hr}$ 로 변화시켜주면서 K_{ER} 과 K_G 값을 변화시킬 때 분비속도 q_{MAB} 의 영향을 나타낸 것으로 K_{ER} 과 K_G 값이 q_{MAB} 에 미치는 영향이 동일함을 알 수 있고 R_A 값이 증가할수록 q_{MAB} 값이 증가함을 알 수 있다. 또한 K_{ER} 과 K_G 값이 작을 때 소포체에서 골지체로의 이송속도와 골지체에서 세포밖 배지로의 이송속도가 조금만 변하여도 분비속도는 크게 변하며 K_{ER} 과 K_G 값이 0.2 hr^{-1} 이상에서는 분비속도 q_{MAB} 가 R_A 값에 따라 $0.04-0.38 \text{ molecules/cell/hr}$ 로 일정하게 유지됨을 알 수 있다. Figure 8 (B)는 R_A 값이 $0.5 \text{ molecules/cell/hr}$ 로 일정할 때 비성장속도 μ 의 값을 $0.01-0.07 \text{ hr}^{-1}$ 로 변화시켜주면서 μ 값이 변할 때 K_{ER} 과 K_G 값에 따른 q_{MAB} 의 영향을 나타내었으며 K_{ER} 과 K_G 값이 q_{MAB} 에 미치는 영향이 동일함을 알 수 있다. 또한 μ 값이 작을수록 분비속도 q_{MAB} 값이 증가함을 알 수 있고 K_{ER} 과 K_G 값이 0.1 hr^{-1} 이하일 때 분비속도값은 큰 영향을 받음을 알 수 있으며 K_{ER} 과 K_G 값이 $0.15-0.2 \text{ hr}^{-1}$ 이상에서는 분비속도 q_{MAB} 값이 $0.32-0.56 \text{ molecules/cell/hr}$ 로 일정하게 유지됨을 알 수 있다.

이상으로 정상상태에서 R_A 값과 μ 값이 변할 때 K_{ER} 과 K_G 값에 따른 소포체와 골지체에서의 MAb 농도 변화와 분비속도 q_{MAB} 의 변화를 보았으며 R_A 값이 증가할 때 소포체와 골지체에서의 MAb 농도가 증가할 뿐만 아니라 분비속도인 q_{MAB} 도 항상 시킴을 알 수가 있다. 또한 소포체와 골지체에서 K_{ER} 과 K_G 값의 영향을 보면 소포체에서는 K_{ER} 값의 영향만을 받는데 비해 골지체에서는 K_{ER} 과 K_G 값의 영향을 동시에 받음을 알 수 있다. 그리고 K_{ER} 과 K_G 값이 작을 때 MAb 농도가 더 큰 영향을 받음을 알 수 있다. 또한 μ 값의 변화에 따른 소포체와 골지체에서의 MAb 농도는 비성장속도인 μ 값이 감소할수록 증가하며 세포밖으로 이동하는 분비속도인 q_{MAB} 도 증가시킴을 알 수 있다. K_{ER} 과 K_G 값은 MAb 조립속도인 R_A 의 영향에서와 같이 소포체내에서는 K_{ER} 만의 영향을 받고 골지체에서는 K_{ER} 과 K_G 의 영향을 동시에 받으며 K_{FR} 과 K_G 값이 작을수록 그 값들이 조금만 증가하여도 MAb 농도가 급격히 변화하며 격실에서 많은 양이 이송됨을 알 수 있다. 그러나 소포체와 골지체에서의 MAb 농도 변화와 분비속도 q_{MAB} 값의 영향을 보면 소포체내 MAb 조립속도보다 세포의 비성장속도의 영향이 더 큰 것을 알 수 있는데

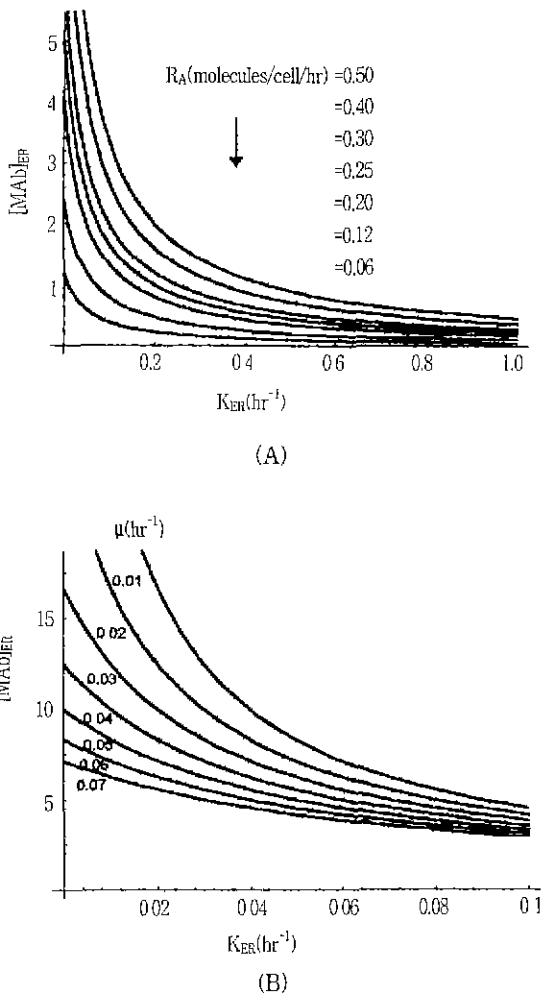


Figure 6. Effects of rate constants for MAb transport on steady state MAb concentration in the ER. (A) $K_G = 0.21 \text{ hr}^{-1}$ and $\mu = 0.05 \text{ hr}^{-1}$, (B) $K_G = 0.21 \text{ hr}^{-1}$ and $R_A = 0.5 \text{ molecules/cell/hr}$

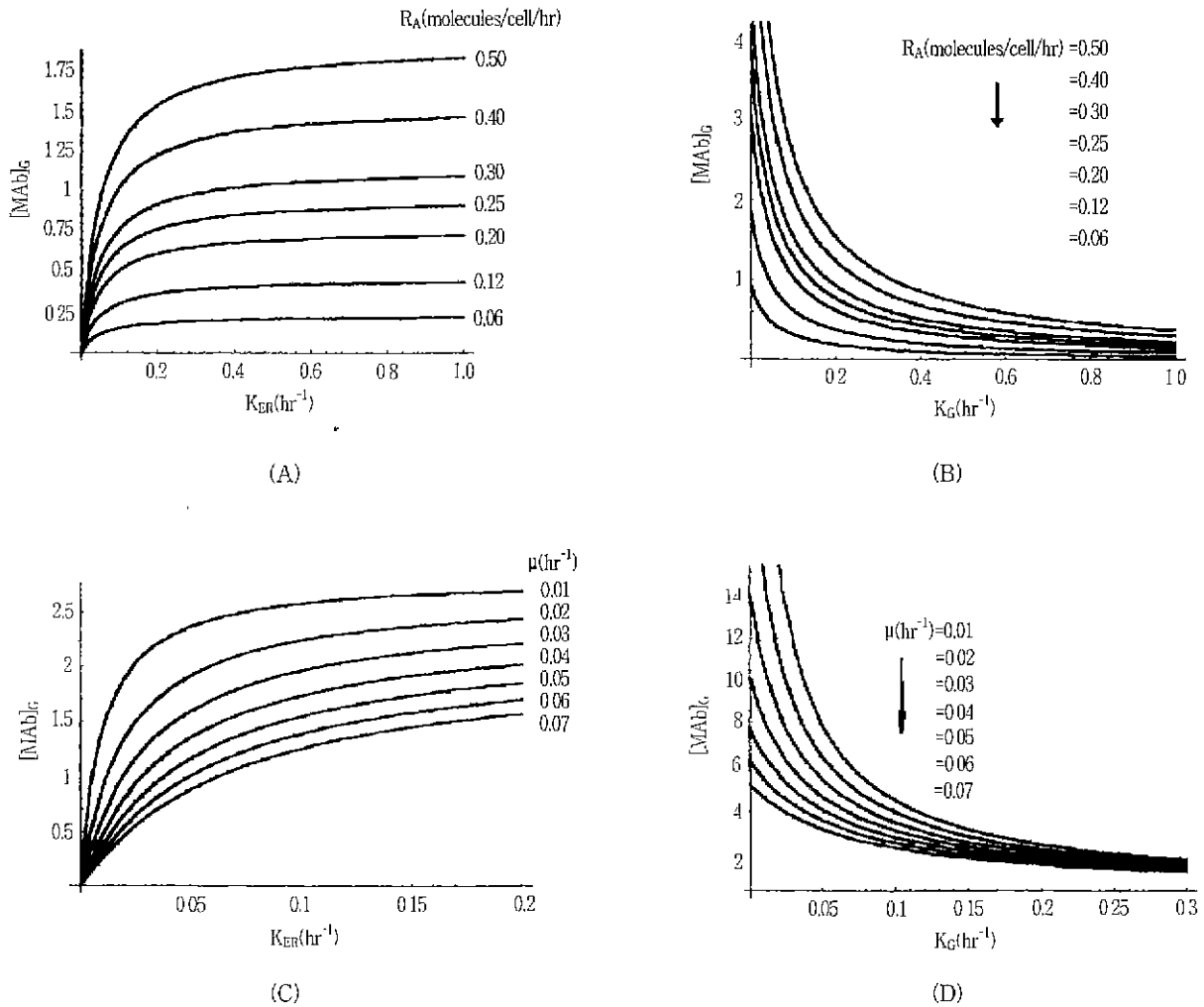


Figure 7. Effects of rate constants for MAb transport on steady state MAb concentration in the Golgi apparatus. (A) $K_G = 0.21 \text{ hr}^{-1}$ and $\mu = 0.05 \text{ hr}^{-1}$, (B) $K_{ER} = 0.166 \text{ hr}^{-1}$ and $\mu = 0.05 \text{ hr}^{-1}$, (C) $K_G = 0.21 \text{ hr}^{-1}$ and $R_A = 0.5 \text{ molecules/cell/hr}$, (D) $K_{ER} = 0.166 \text{ hr}^{-1}$ and $R_A = 0.5 \text{ molecules/cell/hr}$.

이것은 $[MAB]_{ER}$, $[MAB]_G$ 또는 Q_{MAB} 가 R_A 에 비례하는 반면에 $[MAB]_G$ 와 Q_{MAB} 는 μ 의 2차식에 반비례하기 때문이다. 또한 MAB 조립속도보다는 세포의 비성장속도의 값이 적기 때문에 상대적으로 μ 에 대한 영향이 크게 나타나는데 이것은 세포의 성장속도가 느린 경우에도 세포의 성장에 따른 회색영향을 무시할 수 없다는 것을 잘 보여주고 있다.

이상 살펴본 바와같이 정상상태에서 R_A 값과 K_{ER} 값, K_G 값, μ 값이 MAB의 생성과 이송에 영향을 주는 정도를 알 수 있었으며 R_A 값이 클수록, K_{ER} , K_G , μ 의 값이 작을수록 스포체와 골지체에서 MAB의 농도 및 분비속도 Q_{MAB} 에 미치는 영향이 크다는 것을 알수가 있었다. 그리고 4개의 매개변수중 μ 값이 R_A 값보다, K_{ER} 값이 K_G 값보다 MAB 생산에 미치는 영향이 더 큼을 알 수 있었다.

비정상상태에서 매개변수들을 변화시키면서 전산모사 한 결과를 Figure 9 - 11에 나타내었다.

여기서, (1)-(6)식에 사용된 속도상수값들은 $k_1=0.06$, $k_2=0.07$, $k_3=0.09$, $k_4=0.08$, $k_5=0.06$, $k_6=0.1 \text{ hr}^{-1}$ 를 사용하였으며 이 값들은 실험치와 비슷한 형태의 이론적 plot에서 구해진 값들이다.

Figure 9 (A)는 K_G 값을 0.21 hr^{-1} 로 일정하게 두고 K_{ER} 값을 변화시켰을 때, Figure 9 (B)는 K_{ER} 값을 0.166 hr^{-1} 로 일정하게 두고 K_G 값을 변화시켜줄 때 시간에 따른 분비속도 Q_{MAB} 의 변화만을 나타낸 것으로 시간이 0-15 min 일 때 분비속도 Q_{MAB} 값이 증가하다가 시간이 경과할수록 K_{ER} 값에 대한 분비속도는 $0.15-0.35 \text{ molecules/cell/hr}$ 로, K_G 값에 대한 분비속도는 $0.17-0.32 \text{ molecules/cell/hr}$ 로 일정해짐을 알 수가 있고 K_{ER} 과 K_G 값이 증가할수록 Q_{MAB} 값이 증가함을 볼 수 있으며 K_{ER} 값과 K_G 값의 변화 형태는 비슷하나 K_{ER} 값이 조금 더 큰 영향을 미치고 있음을 알 수가 있다.

Figure 10은 K_{ER} 값을 0.166 hr^{-1} 로, K_G 값을 0.21 hr^{-1} 로, μ 값을 0.05 hr^{-1} 로 일정하게 두고 R_A 값을 변화시켜 줄때 시간에 따른 분비속도 Q_{MAB} 의 변화만을 나타낸 것으로 시간이 0-15 min 일 때 분비속도 Q_{MAB} 값이 증가하다가 시간이 경과할수록 $0.04-0.3 \text{ molecules/cell/hr}$ 로 일정해짐을 알 수가 있으며 R_A 값이 증가할수록 Q_{MAB} 값이 증가함을 알 수 있다. 그러나 K_{ER} 과 K_G 값을 변화시켜줄 때는 Q_{MAB} 의 최저값은 0.15 와 0.17 로 유지되나 R_A 값을 변화시켜줄 때는 더 낮은 값인 0.04 로 유지됨을 알

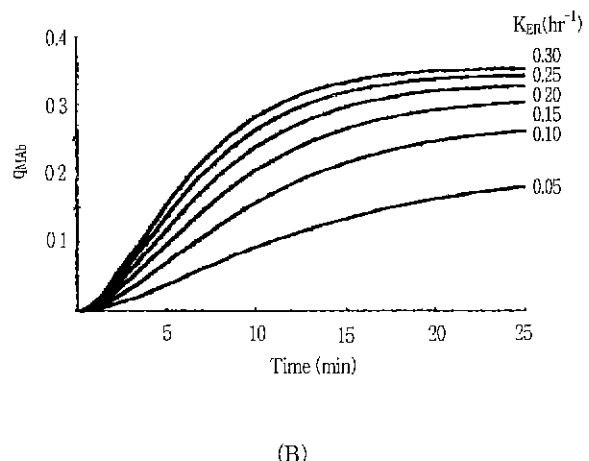
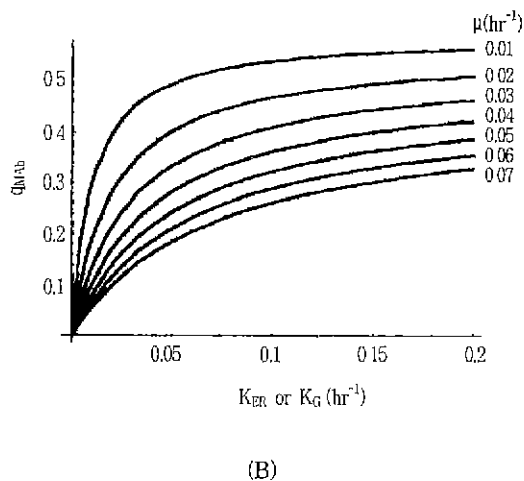
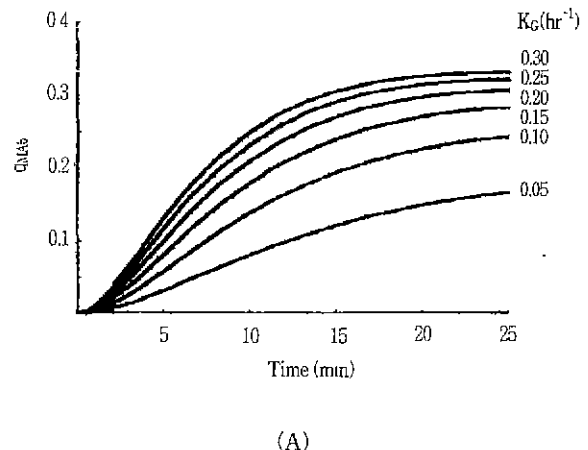
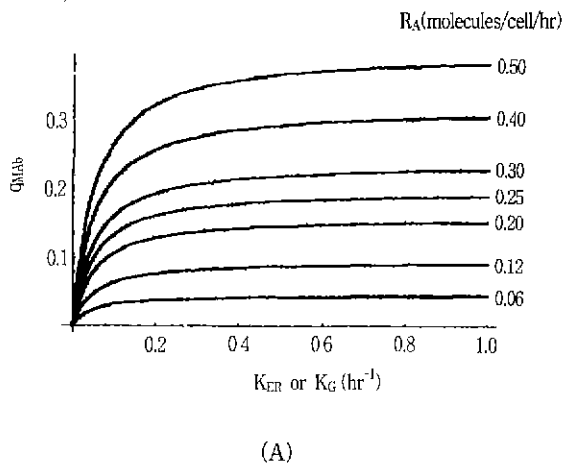


Figure 8. Effects of rate constants for MAb transport on specific MAb rate at steady state. (A) $\mu = 0.05 \text{ hr}^{-1}$, (B) $R_A = 0.5 \text{ molecules/cell/hr}$.

Figure 9. Changes in specific MAb production rate with time by varying rate constants for MAb transport at unsteady state. (A) $K_{ER} = 0.166 \text{ hr}^{-1}$, $R_A = 0.5 \text{ molecules/cell/hr}$, and $\mu = 0.05 \text{ hr}^{-1}$, (B) $K_G = 0.21 \text{ hr}^{-1}$, $R_A = 0.5 \text{ molecules/cell/hr}$, and $\mu = 0.05 \text{ hr}^{-1}$.

수 있었다.

Figure 11은 K_{ER} 값을 0.166 hr^{-1} 로, K_G 값을 0.21 hr^{-1} 로, R_A 값을 $0.5 \text{ molecules/cell/hr}$ 로 일정하게 두고 μ 값을 변화시켜줄 때 시간에 따른 분비속도 Q_{MAB} 의 변화만을 나타낸 것으로 시간이 0-15 min 일 때 분비속도 Q_{MAB} 값이 R_A 값의 영향과 같음을 알 수 있으며 시간이 경과할수록 분비속도는 $0.26-0.44 \text{ molecules/cell/hr}$ 로 일정해짐을 알 수 있으며 μ 값이 증가할수록 Q_{MAB} 값이 증가함을 알 수 있다.

이상의 결과로부터 정상상태에서 R_A 값이 증가할수록 배지에서 MAb 농도가 증가하고 μ 의 값이 작고 K_{ER} , K_G 값이 클수록 배지에 MAb 농도가 증가한다는 것을 알 수가 있다. 그러나 R_A 값보다는 μ , K_{ER} , K_G 값을 변화시켜줄 때가 배지에서 MAb 농도가 큼을 알 수 있었고 비정상상태에서 4개의 매개변수중 μ 값의 영향이 가장 큼을 확인할 수 있었다.

요 약

변역후 세포체 공정에서 단일클론항체의 생산에 대해 *in vivo*

실험을 통해 MAb 중간생성물과 H_2L_2 의 생성 농도를 알 수가 있었으며 이를 통해 단일클론항체 조립반응역학 모델식을 세울 수 있었고 또한 조립반응역학 및 분비공정에 대한 모델링 하였으며, 3격실 모델 물질수지식을 이용하여 항체 조립공정 및 이송에 관한 생물분자공정 변수들에 대한 영향들을 전산모사하였다.

단일클론항체 조립반응역학 모델을 이용하여 중간생성물 형성의 속도상수값들을 계산한 결과 Light chain 이합체의 생성이 다른 중간생성물들보다 느리며 light chain이 heavy chain보다 2.1배 더 과잉으로 생산된다는 것을 알 수 있었다. 3격실 모델 물질수지식을 통해 정상상태와 비정상상태에서 매개변수들의 영향을 분석해 본 결과 MAb 조립속도가 증가하고 세포의 비성장속도가 감소할수록 소포체에서와 골지체에서 MAb의 농도는 증가하며 세포막 배지로의 분비속도도 상승함을 알 수 있었다. 각 인자들에 대한 영향을 보면 정상상태에서 비성장속도와 소포체에서 골지체로의 이송속도가 소포체내에서 MAb의 조립속도와 골지체에서 세포막 배지로의 이송속도보다 소포체와 골지체의

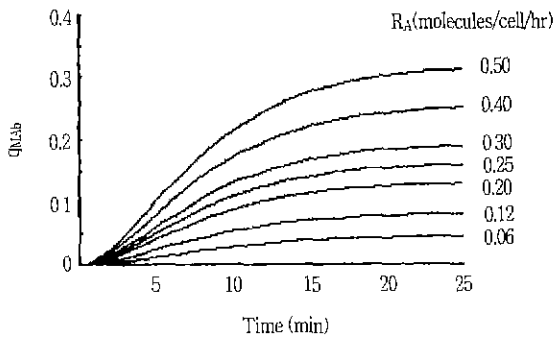


Figure 10. Effect of rate of MAb assembly on specific MAb production rate at unsteady state. The values of μ , K_{ER} and K_G fixed are 0.05 hr^{-1} , 0.166 hr^{-1} and 0.21 hr^{-1} , respectively.

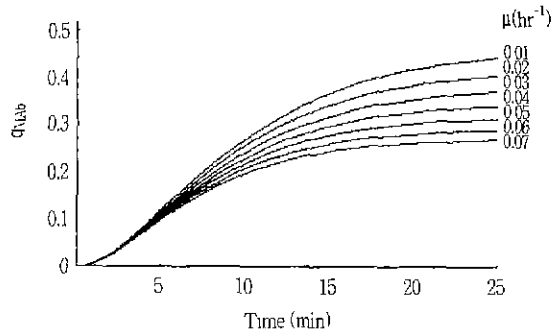


Figure 11. Effect of specific growth rate on specific MAb production rate at unsteady state. The values of R_A , K_{ER} and K_G fixed are $0.5 \text{ molecules/cell/hr}$, 0.166 hr^{-1} and 0.21 hr^{-1} , respectively.

MAb 농도와 분비속도에 더 큰 영향을 미치며 비정상상태에서는 비성장속도가 분비속도에 가장 큰 영향을 미치는 것으로 해석되었다.

감 사

본 연구는 한국과학재단 핵심전문 연구비(951-1104-002-2)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

용 어 설 명

- $k_1, k_2, k_3, k_4, k_5, k_6$: rate constants for MAb refolding and assembly
- K_{ER}, K_G : rate constants for MAb processing from ER to Golgi or Golgi to extra-cellular medium (hr^{-1})
- R_A : rate of MAb assembly in the ER (molecules/cell/hr)
- $[H2L2]$: concentration of assembled MAb (μM)

- $[H2L]$: concentration of heavy chain dimer and light chain complex (μM)
- $[H2]$: concentration of heavy chain dimer complex (μM)
- $[HL]$: concentration of heavy and light chain complex (μM)
- $[L]$: concentration of light chain monomer (μM)
- $[H]$: concentration of heavy chain monomer (μM)
- $[MAB]_{ER}$: MAb concentration in the ER (molecules/cell)
- $[MAB]_G$: MAb concentration in the Golgi (molecules/cell)
- $[MAB]_M$: MAb concentration in the Medium (molecules/cell)
- μ : specific growth rate (hr^{-1})
- q_{MAB} : specific MAb production rate (molecules/cell/hr)

참 고 문 헌

1. Gething, M. and Sambrook, J. (1992), "Protein folding in the cell", *Nature*, 355, 33-45.
2. Hurty, S. M. and Helenius, A. (1989), "Protein oligomerization in the ER", *Ann. Res. Cell Biol.*, 5, 277-307.
3. Marquardt, T. and Helenius, A. (1992), "Misfolding and aggregation of newly synthesized proteins in the endoplasmic reticulum", *J. Cell Biol.*, 117, 505-513.
4. Machamer, C. E., Doms, R., Bole, D. G., Helenius, A. and Rose, J. K. (1990), "Heavy chain binding protein recognizes incompletely disulfide-bonded forms of vesicular stomatitis virus G protein", *J. Biol. Chem.*, 265, 6879-6883.
5. Wikstrom, L. and Lodish, H. F. (1992), "Endoplasmic reticulum degradation of a subunit of the asialoglycoprotein receptor *in vitro*", *J. Biol. Chem.*, 267, 5-8.
6. Chidgey, M. A. J. (1993), "Protein targeting to dense-core secretory granules", *Bioessays*, 15, 317-321.
7. Freedman, R. B. (1989), "Protein disulfide isomerase: Multiple roles in the modification of nascent secretory proteins", *Cell*, 57, 1069-1072.
8. Freedman, R. B., Brockway, B. E. and Lambert, N. (1984), "Protein disulfide-isomerase and formation of native disulfide bonds", *Biochem Soc. Trans.*, 12, 929-932.
9. Bruce Alberts., Dennis Bray., Julian Lewis., Martin Raff., Keith Roberts. and James D. Watson. (1994), *Molecular biology of the cell*, 3rd ed., pp. 551-598. Garland Publishing, Inc., New York.
10. Bibila, T. and Flickinger, M. C. (1991), "A model of interorganelle monoclonal antibody transport and secretion in mouse hybridoma cells", *Biotechnol. Bioeng.*, 38, 767.
11. Flickinger, M. C., Goebel, N. K., Bibila, T. and Boyce-Jacino, S. (1992), "Evidence for posttranscriptional stimulation of monoclonal antibody secretion by L-glutamine during slow hybridoma growth. *J. Biotechnol.*, 22, 201-

- 226.
12. Leno, M., Marten, O. and Hache, J. (1992), "Kinetic studies of cellular metabolic activity, specific IgG production rate, IgG mRNA stability and accumulation during hybridoma batch culture", *Enz Microb. Technol.*, **14**, 135-140.
 13. Lodish, H. F. (1988), "Transport of secretory and membrane glycoproteins from the rough endoplasmic reticulum to the golgi". *J. Biol. Chem.*, **263**, 2107-2110.
 14. Lodish, H. F., Kong, N., Snider, M. and Strous, G. (1983), "Hepatoma secretory proteins migrate from rough endoplasmic reticulum to golgi at characteristic rates", *Nature*, **304**, 80-83.
 15. Park, S. H. and Ryu, D. D. Y. (1996), "Monoclonal antibody refolding and assembly: Protein disulfide isomerase reaction kinetics", *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **1**, 13-17.
 16. 류재구 (1995), "메스메티카", 크라운 출판사, 서울, 301-378.
 17. Scharff, M. D. and Bauman, R. (1973), *Transplant. Rev.*, **14**, 163-183.