

## Perfusion배양시 세포성장 및 항체생산 향상을 위한 아미노산의 보강

이수영·최병욱·오한규·윤정원·전복환·변태호·†박송용

(주) 녹십자 종합연구소

(접수 : 1998. 12. 5., 게재승인 : 1999. 3. 12.)

## Fortification of Amino Acids to Improve Hybridoma Cell Growth and Monoclonal Antibody Production in Perfusion Culture

Sooyoung Lee, Byungwook Choi, Hankyu Oh, Jeongwon Yun, Bokhwan Chun, Taeho Byun, and Songyong Park†

Central Research Center, Korea Green Cross Co.

(Received : 1998. 12. 5., Accepted : 1999. 3. 12.)

We have investigated the fortifying effect of amino acids on the cell growth and productivity during the perfusion culture of hybridoma vR8 cells in serum-free media. Through the quantitative analysis of amino acids and metabolites in perfusion culture, we found that many amino acids (glutamine, histidine, arginine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine, tryptophane) were heavily consumed at cell density of  $1.06 \times 10^7$  cells/mL. Due to amino acid depletion, cells died suddenly. So we supplemented the media with those amino acids by 30-170%. As a result, we could increase maximum cell density by 270%, average specific productivity by 175%, and average volumetric productivity by 560% in this fortified media, GC-HY-S2.

Key Words : hybridoma, amino acid, specific productivity, volumetric productivity

### 서론

하이브리도마세포 배양을 이용하여 생산된 단세포군 항체는 affinity chromatography, immunological assay, diagnostics, therapeutics 등 다양한 의약 및 실험분야에 폭넓게 이용되고 있다(1). 하이브리도마세포 배양을 이용한 항체생산시 회분식 배양의 경우, 세포성장을 저해하는 암모니아(2), 젖산(3) 등의 노폐물의 축적과 세포성장에 필요한 배지성분의 고갈로 인하여(8) 최대 세포농도가  $2 \times 10^6$  cells/ml 이하로 낮게 유지되어 단위배지당의 생산성이 매우 낮다. 이를 해결하기 위해 회전여과막(4), 원심분리기(5) 등의 물리적 장치를 이용하여 세포농도를 높이면서, 지속적인 배지교환으로 영양성분의 고갈을 막고, 젖산, 암모니아 등의 노폐물을 제거하는 방법이 연구되었다. 그러나 이렇게 세포를 고농도로 배양하게 되면 지속적인 배지공급에도 불구하고 일부 영양성분의 고갈로 인한 세포활성의 감소가 관찰되는데, 이중 특히 세포내의 주에너지 공급원인 아미노산의 고갈이 큰 영향을 미친다. 실제로 이전의 실험자들에 의해 일반적인 하이브리도마세포 배양 중 glutamine, leucine, isoleucine 등이 급격히 감소함이 관찰되었다(6). 이러한 세포 배양 중 아미노산 량의 변화는 각 세포주마다의 특

한 징질이기 때문에(7), 배양 중 아미노산 량의 변화를 조사하여 적절한 량의 첨가 및 제거를 통해 배지를 개선하려는 많은 노력이 있어 왔다(8, 9).

본 실험에서는 자체 개발된 무혈청배지(GC-HY-S1)를 이용하여 15L 배양기에서 vR8 하이브리도마세포를 perfusion배양하였다. 이때에 배양 중 아미노산 량의 변화를 HPLC를 이용하여 OPA유도체화 방법으로 분석하고, 부족한 아미노산을 첨가함으로써 배지 중 아미노산 량을 최적화 하였다. 그리고 최적화된 배지에서의 세포성장, 세포대사 및 항체생산성의 변화를 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 세포주 및 배지

본 실험에 사용된 세포주는 세포융합기술에 의해 자체 개발된 mouse-mouse 하이브리도마세포 vR8으로서 이 세포주는 vWF (von Willebrand Factor)에 대한 항체를 생산하며 혈장유래 및 유전자재조합 혈액응고 제 8인자의 affinity chromatography 정제에 이용하기 위해 개발된 것이다. 초기 세포배양은 t-flask에서 10% BCS(Bovine Calf Serum)가 포함된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Media)배지에서 이루어졌고 이후 자체 개발한 무혈청배지인 GC-HY-S1에 적응시켰다. 무혈청배지는 DMEM:F12:RPMI1640을 1:1:1로 혼합한 후 glucose 15g/L, glutamine 0.35g/L와 insulin, transferrin 등의 단백질 315 µg/mL을 첨가하였다. Reactor배양시에는 pluronic F-68 0.07%를 첨가하였다. 이렇게 개발된 무혈청배지(GC-HY-S1)는 스피너플라스크 및 reactor배양에 이용하였다.

† Corresponding Author : Central Resarch Center, Korea Green Cross Co. Kugal-Ri, Kiheung-Eup, Yong In City, Kyunggi-Do, Korea 449-900

Tei : 0331-282-2101, Fax : 0331-282-2295

e-mail : sypark@greencross.com

**Perfusion 배양**

Reactor 배양을 위한 seed 준비는 같은 lot의 WCB(Working Cell Bank)에서 매번 새로 vial을 녹여 준비하였다. T-175 flask 배양으로 불러진 세포는 BOD incubator안의 스피너플라스크에 옮겨 배양하였다. 스피너플라스크 배양을 통해 준비된 세포를  $1 \times 10^6$  cells/mL의 농도로 reactor에 접종하였다. 배양에 사용된 reactor는 15L Biostat<sup>®</sup> ED(B.BRAUN)로서 배양부피를 10L로 하였다. Perfusion 배양의 대략적인 구조도를 Figure 1에 나타내었다. 이때 DO(Dissolved Oxygen)값은 40% air saturation, pH는 7.15, 온도는 37°C, 교반속도는 세포농도의 증가에 따라 초기 50rpm에서 80rpm까지로 조정하였다. 하루 2번 시료를 채취하여 세포농도 및 활성, glucose, lactate 농도를 측정하였고 항체생산량을 조사하기 위해 시료는 냉동보관 하였다. Perfusion 속도는 아미노산 이외의 필수 영양성분의 고갈로 인해 세포성장이 저해되는 것을 막기 위해 glucose 잔류농도를 신선 배지의 70% 정도로 높게 유지시켜 조절하였다.

**분석**

세포농도는 현미경아래에서 hemocytometer를 이용하여 조사하였고, 활성은 trypan blue dye exclusion 방법을 이용하였다. Glucose, lactate의 농도는 YSI 2700 analyzer(Yellow spring instrument)를 이용하였다. 암모니아의 농도는 ammonia electrode(Orion Co.)를 이용하여 분석하였다. 아미노산 분석은 Amino Quant 표준 분석 방법(Hewlett-Packard 1100series)을 이용하였다. 아미노산 분석에는 0.01% triethylamine 및 0.3% tetrahydrofuran을 포함하는 20mM sodium acetate buffer와 100mM sodium acetate buffer, acetonitrile, methanol이 1:2:2의 비율로 들어간 buffer를 사용하였다. 시료는 OPA(Ortho-phthalaldehyde), FMOC(9-fluorenylmethyl chloroformate) 유도체화 반응을 거쳐 fluorescence detector에서 분석되었다. 하이브리도마세포의 항체생산성은 indirect ELISA 방법으로 spectramax 250(Molecular devices)을 이용하여 405nm에서의 흡광도를 조사하였다.

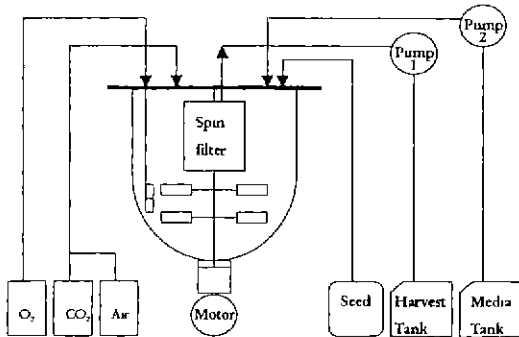


Figure 1. The schematic diagram of perfusion culture in bioreactor.

**결과 및 토론**

**GC-HY-S1에서의 세포성장, 세포대사, 항체생산성 및 아미노산 양의 변화**

GC-HY-S1에서 perfusion 배양을 행하며 세포성장, 세포대사 및 항체생산성을 조사하였는데 이를 Figure 2에 나타내었다. 그림

에서 보면 배양 초기 lag phase 없이 계속적인 세포성장이 이루어지다 배양 109시간에서 최대세포농도인  $1.06 \times 10^7$  cells/mL에 도달하였고 이후 갑작스런 세포활성의 저하로 배양을 중단하였다. 배양 중에 샘플을 취해 glucose, lactate 농도를 조사하였는데 perfusion이 이루어진 후에는 각각 4g/L, 0.9g/L로 일정하게 유지되었다. 특히 세포활성이 급격히 저하되는 118h에서의 값은 각각 4.34g/L, 0.7g/L로 glucose 고갈이나 lactate의 축적은 없었다. 암모니아의 농도도 회분식배양 말기에 3mM 정도의 값을 보이다 배지공급이 시작되면서 3-5mM로 유지되어 세포의 성장에 영향을 주지 않았다 또한 배양 중 pH는 6.97-7.17 사이로 조절되었고, DO 및 교반속도도 세포 성장에 영향을 주지 않는 범위에서 조절되었다.

GC-HY-S1에서의 배양 중 아미노산 분석결과를 Figure 3에 나타내었다.

그림에서 아미노산 양의 변화를 배양 초기값에 대한 상대 값으로 나타내었는데, 최대세포농도에 도달한 109시간에서와 세포활성이 급격히 감소하는 시점인 배양 118시간에서 glutamine, arginine, valine, methionine, isoleucine, leucine, tryptophan 등의 양이 배양초기에 비해 50% 이상 감소하였고, 특히 arginine은 모두 소모되었다. 이러한 아미노산의 고갈은 apoptosis를 유발하여 갑작스런 세포활성의 저하를 가져온다는 연구결과들과 일치하는 것으로 보인다 특히 배양 중 세포 성장에 필요한 에너지의 주요 공급원이 되는 glutamine의 양은 세포활성의 급격한 저하를 가져온 시점에서 배양초기의 20% 정도에 불과해 고농도 배양의 제한 요인이 된 것으로 생각된다. 반면, 세포성장이 급속히 이루어지기 시작하는 시점인 85시간에서와 세포가 최대

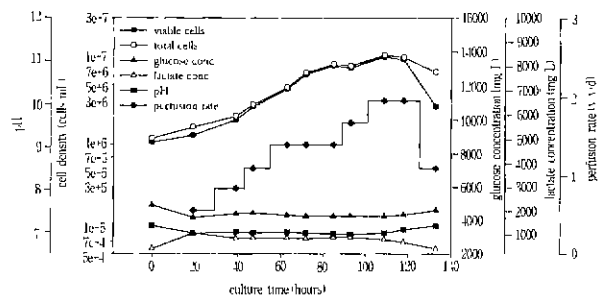


Figure 2 The variation of cell density, glucose concentration, lactate concentration, pH and perfusion rate during perfusion culture of vR8 hybridoma cells in GC-HY-S1.

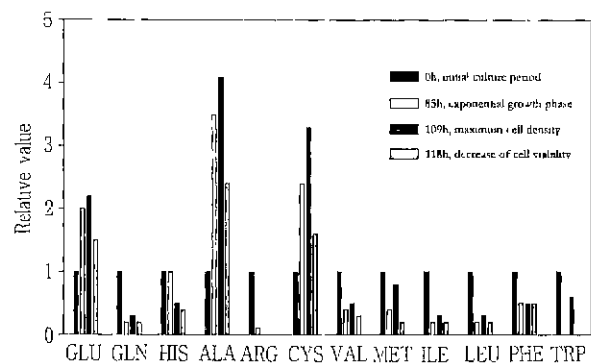


Figure 3. The consumption profiles of amino acids during perfusion culture of vR8 hybridoma cells in GC-HY-S1.

Table 1 Added amino acid ratio in GC-HY-S1.

added amino acids	added ratio(%)
L-arginine · HCl	170
L-glutamine	80
L-isoleucine	40
L-leucine	40
L-lysine · HCl	30
L-methionine	50
L-phenylalanine	30
L-tryptophane	30
L-tyrosine · 2Na · 2H <sub>2</sub> O	30
L-valine	40

세포농도에 도달한 109시간에서 glutamate, alanine, cysteine 등의 아미노산 량은 증가하였다. Alanine의 경우 배양초기 값에 비해 4배 이상 증가하였는데, 이것은 일반적인 하이브리도마세포의 대사과정에서 보여지는 glutamine의 소비에 의한 alanine 생성의 결과라고 생각된다. 이러한 분석결과를 토대로 배지에 아미노산을 첨가하였다. 이때 각 아미노산의 첨가비율의 조정은 최대세포농도에서의 아미노산 소비정도를 조사하고 그와 비례하여 부족한 아미노산을 첨가하였다. Table 1에 보강된 아미노산의 첨가비율을 나타내었다.

**배지변형에 따른 세포성장, 세포대사, 항체생산성 및 아미노산 양의 변화**

아미노산이 첨가된 배지(GC-HY-S2)를 이용하여 perfusion 배양을 행한 결과를 Figure 4에 나타내었는데, 배양 136시간에  $2 \times 10^7$  cells/mL의 농도에 도달한 후 배양 160시간에서 최대세포농도인  $2.91 \times 10^7$  cells/mL에 도달하였다.

이 값은 GC-HY-S1배지에서보다 2.7배 정도 증가된 값이다. GC-HY-S2에서 specific productivity는 1.75배 증가되었고, volumetric productivity는 5배 이상 증가하여 세포농도의 증가가 생산성의 향상을 가져왔음을 알 수 있다. 배양중의 부산물로 세포성장을 저해하는 lactate, ammonia의 농도는 배지변형에 따라 약간씩 증가하였다. 암모니아의 경우  $2 \times 10^7$  cells/mL 이상의 세포농도에서 6-7mM 정도의 값을 보였는데, 이는 세포성장에 저해를 가져오는 10-15mM 정도의 암모니아 농도에 비해(2)

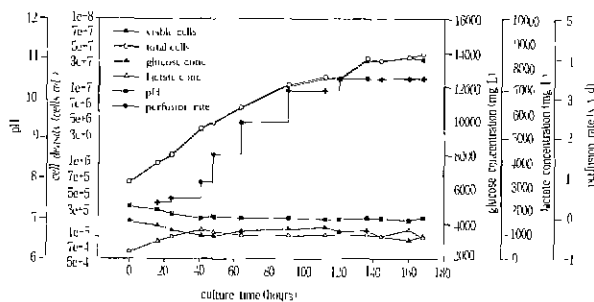


Figure 4. The variation of cell density, glucose concentration, lactate concentration, pH and perfusion rate during perfusion culture of vR8 hybridoma cells in fortified media, GC-HY-S2.

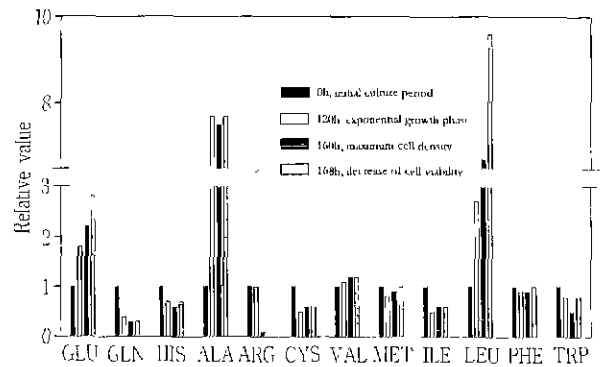


Figure 5 The consumption profiles of amino acids during perfusion culture of vR8 hybridoma cells in fortified media, GC-HY-S2

Table 2. The variation of cell growth, cell metabolism, and MAb productivity with amino acids supplement.

	Serum-free media	GC-HY-S1	GC-HY-S2 (fortified)
Cell growth, cell metabolism, and productivity			
Maximum viable cell density ( $\times 10^7$ cells/mL)		1.06	2.91
Average cell viability (%)		88	95
Average specific productivity ( $\mu$ g/ $10^6$ cells/day)		8	14
Average volumetric productivity (mg/L/day)		36	201
Average lactate concentration (mg/L)		788	929
Average ammonia concentration (mM)		3.04	4.23

매우 낮은 세포 성장에 영향을 주지는 않았다. 세포활성은 배양 중에 90% 이상으로 높게 유지되었으나 배지공급에 따른 어려움으로 배양을 중단하였다. Table 2에 배지변형에 따른 세포성장, 세포대사 및 항체생산성의 변화를 정리하였다.

GC-HY-S2에서의 배양 중 아미노산 량의 변화를 Figure 5에 나타내었는데, 최대세포농도에 도달한 시점인 160시간에서 arginine을 제외한 대부분의 아미노산이 90% 이상 잔류하였다.

Arginine의 경우 과량 첨가되었음에도 최대세포농도에서 고갈되었는데, 이는 빠른 속도로 glutamate로 전환되어 TCA cycle 상에서 생합성에 이용되었기 때문이라고 생각되어진다(10). 또한 isoleucine의 경우 많은 양이 증가하였는데, leucine 등의 아미노산이 전환된 것이라고 생각된다.

**요 약**

본 실험에서는 하이브리도마세포 배양 중 아미노산 량의 변화를 조사하여 세포성장, 세포대사 및 항체생산성에 미치는 아미노산의 영향을 조사하였다. 실험결과에 의하면 vR8 하이브리도마세포 배양 중 세포성장이 급속히 이루어지는 시점과 최대세포농도에 도달한 시점에서의 glutamine, arginine, leucine 등 다수 아미노산의 고갈이 관찰되었고, 이후 세포활성이 급속히 저하되었다. 이때 glucose농도, lactate, ammonia 등의 대사산물 농도 및 pH, DO, 교반속도 등은 적절하게 유지되었기 때문에

이들 요소에 의한 세포성장의 저해는 없었다 따라서 이들 아미노산의 고갈이 세포활성의 저하에 커다란 영향을 주었다고 생각된다. 한편, 고갈된 아미노산을 첨가한 배지(GC-HY-S2)로 배양을 해본 결과 세포농도를  $2.91 \times 10^7$  cells/mL까지 증가시킬 수 있었다. 즉, 변형배지에서는 세포활성의 저하를 가져오는 세포성장구간을 지나 지속적인 세포성장을 보여 27배 정도 더 높은 최대세포농도를 보였다. 세포농도의 증가로 specific productivity, volumetric productivity도 각각 1.75배, 5.6배 증가하였다. 최대세포농도에서의 아미노산량을 조사한 결과를 보면 충분한 양의 아미노산이 공급되었음을 알 수 있다. 고농도 하이브리도마세포 배양에서의 일부 아미노산의 고갈은 일반적으로 관찰되는 현상이다. 그러므로 세포를 고농도로 배양하기 위해서는 아미노산 분석을 통해 고갈된 아미노산을 첨가해 주어야 하는데, 아미노산의 요구는 세포주마다 다르므로 배지 최적화과정에서 아미노산 분석에 의한 배지의 개선이 필요하다고 생각된다.

### 감 사

본 연구는 1998년도 산업자원부 공업기반 기술 사업비 지원으로 연구되었음을 깊이 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

- Birch, J. R., R. Boraston, and L. Wood (1985), Bulk production of monoclonal antibodies in fermentors, *Trends Biotechnol.*, **3**, 162-166
- Schneider, M., I. W. Marison, and U. von Stockar (1996), The importance of ammonia in mammalian cell culture, *Journal of Biotechnology*, **46**, 161-185
- Kromenaker, S. J. and F. Sreenc (1994), Effect of lactic acid on the kinetics of growth and antibody production in a murine hybridoma: secretion patterns during the cell cycle, *Journal of Biotechnology*, **34**, 13-34
- Himmelfarb, P., P. S. Thayer, and H. E. Martin (1969), Spin-filter culture: The propagation of mammalian cells in suspension, *Science*, **164**, 555-557.
- Johnson, M., S. Lanthier, B. Massie, G. Lefebvre, and A. A. Kamen (1996), Use of the centrtech lab centrifuge for perfusion culture of hybridoma cells in protein-free medium, *Biotechnol. Prog.*, **12**, 855-864
- Stoll, T. S., K. Mühlethaler, U. von Stockar, and I. W. Marison (1996), Systematic improvement of a chemically-defined protein-free medium for hybridoma growth and monoclonal antibody production, *Journal of Biotechnology*, **45**, 111-123
- Jayne, D. W. (1991), Nutrient optimization for high density biological production applications, *Cytotechnology*, **5**, 15-30.
- Sanfeliu, A., J. J. Carió, C. Casas, C. Solà, and F. Gòdia (1996), Analysis of Nutritional Factors and Physical conditions Affecting Growth and Monoclonal Antibody Production of the Hybridoma KB-26.5 Cell line, *Biotechnol Prog*, **12**, 209-216.
- Hansen, H. A., B. Damgaard, and C. Emborg (1993), Enhanced antibody production associated with altered amino acid metabolism in a hybridoma high-density perfusion culture established by gravity separation, *Cytotechnology*, **11**, 155-166.
- Stryer, L. (1988), *Biochemistry*, Chapter 21, W. H. Freeman, New York.