

유전자 재조합 대장균의 세포성장과 Pyruvate Dehydrogenase Complex-E2 특이성 인간 모노클론 항체 생산에 대한 포도당과 초산의 영향

이 미 숙·전 주 미·차 상 훈·*정 연 호
강원대학교 식품생명공학부
(접수 : 2000. 8. 23., 게재승인 : 2000. 10. 23.)

Effects of Glucose and Acetic Acid on the Growth of Recombinant *E.coli* and the Production of Pyruvate Dehydrogenase Complex-E2 Specific Human Monoclonal Antibody

Mi-Sook Lee, Joo-Mi Chun, Sang-Hoon Cha, and Yeon-Ho Jeong†
Division of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea
(Received : 2000. 8. 23., Accepted : 2000. 10. 23.)

The Fab fraction of PDC-E2 specific human monoclonal antibody was produced using recombinant *E. coli*, and the effects of glucose and acetate were investigated to develop an optimal strategy for recombinant human antibody production. Higher glucose concentration in the culture media resulted in higher cell growth and glucose consumption rate, which in turn resulted in an increased acetate production rate. When glucose was depleted, cells began to consume acetate as an energy source, and this consumption rate depended on the glucose concentration. When the residual glucose concentration was high, the accumulation of acetate was accelerated due to an increase in the acetate production rate and a decrease in the acetate consumption rate. Furthermore, it was found that a high accumulation of acetate, accompanied by a high glucose concentration, inhibited human antibody formation; the critical acetate concentration was 0.6 g/l. During production, a high glucose concentration enhanced cell growth, but inhibited antibody formation due to catabolic repression. Therefore, it is important to keep the concentration of both glucose and acetate as low as possible to increase antibody production after induction. Accordingly, it is important to accurately control the concentration of glucose and acetate in the culture media to obtain high cell densities and high productivity levels of recombinant human antibody.

Key Words : PDC-E2, Fab, human monoclonal antibody, recombinant *E. coli*, acetic acid effect, glucose effect

서 론

Kohler와 Milstein에 의해 처음 개발된 하이브리도마 결합 기술을 이용하여 지금까지 수없이 많은 종류의 모노클론 항체가 제작되어 사용되어왔다. 이러한 모노클론 항체들은 현재 생물학 관련 연구 분야에 광범위하게 사용되고 있을 뿐만 아니라 백혈병, 유방암 및 폐암 등의 암 질환과 조직·이식 거부 반응, 류마티스성 관절염, AIDS 등의 자가면역 또는 바이러스성 질병, 그 외에 박테리아에 의한 전염성 질환 등과

같은 다양한 종류의 인간 질병에 대한 *in vitro* 또는 *in vivo* 상태의 진단제 또는 치료제로서 오래 전부터 사용되어 왔다 (1). 또한 최근에는 보다 이상적인 면역 치료제의 개발을 위하여 모노클론 항체의 유전자를 인위적으로 조작하여 면역독성물(immunotoxin)과 같은 인체내의 유해한 세포 조직만을 선택적이며 효과적으로 파괴할 수 있도록 설계된 특수한 기능의 모노클론 항체를 제작하는 연구가 활발히 진행되고 있다(2). 하지만 현재의 모노클론 항체들은 주로 설치류의 B세포(항체 분비 세포)로부터 기원하였기 때문에 인간 모노클론과는 면역체계가 상이하다. 따라서 인체내에 직접 투입할 경우 인체 내에서 항체 의존성 세포 독성 작용(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)의 기능을 다하지 못하게 된다. 또한 설치류 기원의 모노클론 항체는 인체 내에서 일어나는 면역작용에 의해 단시간 내에 혈액 순환계로부터 제거될 뿐만 아니라 적지 않은 부작용을 일으키는 등 인체에 직접 *in vivo*

†Corresponding Author : Division of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

Tel : +82-33-250-6484, Fax : +82-33-254-3835

E-mail : jeongyh@cc.kangwon.ac.kr

상태로 사용될 진단제 또는 치료제의 용도로서는 적당치 않음이 이미 자세히 밝혀진 바 있다(3,4).

설치류에서 기원한 모노클론 항체의 이러한 단점을 보완하기 위해 설치류 기원의 모노클론 항체의 일부를 재조합 유전자 기술을 이용하여 인간 모노클론 항체의 일부와 교환하는 이른바 **complementary-determining region grafting** 기술이 개발되었으나 그 과정이 매우 복잡하고 또한 상기에 열거한 설치류 기원의 모노클론 항체의 단점을 완전히 제거하지는 못하였다(5,6). 따라서 인체에 직접 사용될 항체 치료제의 개발을 위해 인간 모노클론 항체를 만들어 사용하는 것이 가장 이상적인 것인데 지금까지 개발되어온 종래의 하이브리도마 결합기술이나 또는 Epstein-Barr 바이러스를 이용한 인간 B 세포의 transformation 기술에 의한 인간 모노클론 항체의 생산은 만들어진 cell line들의 불안정성과 낮은 항체 생산량 등과 같은 기술적인 한계로 인하여 실용화되지 못하고 있는 실정이다.

하지만 기존의 세포학적 방법에 의한 인간 모노클론 항체 생산의 실패와 꾸준히 증대되고 있는 인간 모노클론 항체의 요구에 부응하기 위하여 그 동안 급속히 진보된 분자 생물학적 실험 기술을 바탕으로 antibody repertoire cloning이라는 기술이 최근에 개발되었다 (7,8). 이 기술은 항체 유전자의 heavy chain 일부 (VH와 CH1) 그리고 light chain (VL과 CL)을 인체내의 B 세포로부터 분리하여 대장균내에 발현함으로써 원하는 항원 반응 특이성을 지닌 모노클론 항체 (Fab 분자)를 제작하는 방법이다. Antibody repertoire cloning 기술에 의해 현재 tetanus toxoid (9), human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)의 항원인 gp120 (10), 일차 담관성 간경화 (primary biliary cirrhosis)의 자가 항원인 PDC-E2 (11) 등에 특이적으로 반응하는 재조합 인간 모노클론 항체가 개발되었고, 현재 활발한 연구가 계속 진행되고 있다.

이렇듯 이 기술은 기존의 방법으로 얻기 힘든 인간 모노클론 항체의 유전자를 재조합 유전자 기술에 의해 쉽게 조작할 수 있기 때문에 magic bullet과 같은 새로운 기능을 지닌 항체의 제작이 쉽고, 항체의 각기 다른 생물학적 기능을 지니고 있는 Fc 부분을 원하는 항체형으로 교체하기가 용이하다는 매우 유리한 장점을 지니고 있다. 따라서 이 기술은 앞으로 인체의 *in vivo* 상태에서 사용되어질 항체 진단제 또는 치료제의 개발에 관한 응용 가능성이 매우 크기 때문에 장래가 유망하며 이에 따라 이의 실용화를 위한 체계적인 연구가 시급한 실정이다.

이에 따라 본 연구에서는 재조합 대장균을 이용한 인간 항체 생산의 한 모델로서 항 pyruvate dehydrogenase complex-E2 인간 모노클론 항체를 람다 바이러스 벡터를 이용해 제작하였으며, plasmid에 삽입되어진 항체 유전자를 대장균 (Topp2)에서 발현, 생산하였다. 이때 한 개의 plasmid에 함께 삽입되어진 각각의 heavy와 light chain은 대장균의 세포질에서 생산된 후 pelB leader sequence에 의해 periplasmic space로 이동하게 되며, 이곳에서 heavy와 light chain 사이에 disulfide 결합이 형성되어 항원 결합 능력이 있는 Fab 분자가 생성된다.

이러한 인간 모노클론 항체의 대량생산 기술의 실용화를 최종 목표로, 본 연구에서는 재조합 대장균을 이용한 생물반응기에서의 인간 모노클론 항체의 대량 생산을 위한 최적의

전략을 제시하기 위한 기초 연구로 세포 성장과 항체 생산에 미치는 포도당과 초산의 영향에 대해 조사하였다. 왜냐하면, 대장균은 여러 가지 장점으로 인하여 가장 먼저 여러 종류의 재조합 단백질의 산업적 생산을 위한 숙주세포로 널리 사용되어 왔으나 대장균의 세포성장이 배양 중 분비 축적되는 초산 및 에타놀 등에 의해 저해를 받으며, 특히 호기성 조건에서는 초산이 세포 성장 및 유전자 재조합 단백질의 생산성을 저해하는 주된 원인으로 보고되었기 때문이다(12).

대장균의 호기적 배양시 배지내의 포도당은 pyruvate, acetyl-CoA, TCA cycle을 거치는 대사과정을 통해 생장에 필요한 ATP와 NAD(P)H로 전환된다. 이때 대장균이 포도당을 섭취하여 이용하는 이러한 대사 과정에는 한계가 있다. 만약 배지 내에 과다한 양의 포도당이 존재하면 여분의 포도당을 이용해 acetyl-CoA로부터 초산이 생성되는 과정이 유도된다. 초산 생성 과정에서 포도당 한 분자 당 두 분자의 ATP가 생성되며, 축적된 초산은 이후 배지내 포도당 고갈시 대장균에 의해 탄소원으로 섭취된다. 그런데 대장균의 배양 중 초산이 지속적으로 생산되어 배지 내에 축적되면 세포 성장과 유전자 재조합 생산물 생산에 저해 작용을 미치게 된다(13). 따라서 재조합 대장균의 고농도 세포 배양과 생산성 향상을 위해서는 대장균의 대사에서 형성되는 부산물의 하나인 초산의 영향에 대한 이해가 필요하다. 이에 따라 본 연구에서는 미토콘드리아의 내막에 존재하면서 해당작용의 결과물인 pyruvate를 acetyl CoA로 변환시키는데 촉매 역할을 하는 것으로 알려진 pyruvate dehydrogenase complex-E2 (PDC-E2)에 특이적으로 반응하는 인간 모노클론 항체(항체의 Fab 부분)를 모델로 하여 유전자 재조합 대장균의 세포성장과 인간 모노클론 항체 생산에 대한 포도당과 초산의 영향을 조사함으로써 재조합 대장균에 의한 인간 모노클론 항체의 대량생산을 위한 전략 개발에 기초 정보를 제공하고자 한다. 이를 위해 먼저 포도당이 세포성장에 미치는 영향과 이로 인해 축적된 초산이 항체 생성에 미치는 영향을 조사하였으며, 그 후에 인위적으로 첨가된 초산에 의하여 세포성장과 항체 생성에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주

Pyruvate dehydrogenase complex-E2(PDC-E2)에 특이적으로 반응하는 인간 모노클론 항체의 Fab 부분을 생산하는 균주인 Topp2 세포를 강원대학교 식품생명공학부의 차상훈 교수로부터 제공받았다. Fab를 발현하는 플라스미드 DNA에는 inducer로 IPTG (isopropyl β -D-thiogalactopyranoside)를 사용하는 lac promoter가 쓰였으며 ampicillin에 저항성을 갖는다. 한 개의 플라스미드에 함께 삽입되어진 각각의 heavy와 light chain은 대장균의 세포질에서 생산된 후 pelB leader sequence에 의해 periplasmic space로 이동하게 되며, 이 periplasm에서 heavy와 light chain 사이에 disulfide 결합이 형성되어 항원 결합 능력이 있는 Fab 분자가 생성되도록 하였다.

배양조건

Seed culture는 -80°C 에 저장된 재조합 대장균을 25 mg/ℓ

의 ampicillin이 포함된 Luria Broth (LB) 배지 10 ml에서 24 시간 배양하였다. 배양은 37°C, pH 7.0, 200 rpm의 조건에서 rotary shaker를 이용하여 수행하였으며, 발현 유도는 1 mM의 IPTG를 첨가하여 26°C, 200 rpm의 rotary shaker에서 10 시간 배양함으로써 이루어졌다. 고체배양은 ampicillin이 포함된 LB 고체배지에 seed culture로부터의 세포를 적절히 도말하여 37°C에서 배양하였다.

분 석

세포농도는 UV spectrophotometer를 이용하여 600 nm에서 측정된 값을 dry cell mass로 환산하였다. 포도당의 농도는 hexokinase법을 이용한 enzyme kit (Sigma, No. 115)를 사용하여 520 nm에서 spectrophotometer로 측정하였다. 한편 초산의 농도는 HPLC (Aminex HPX-87H Column; Bio-Rad Laboratories)를 이용하여 분석하였으며, 65°C에서 0.005 M H₂SO₄를 용리용매로 사용하여 0.6 ml/min의 유속으로 흘려주면서 분리하여 210 nm에서 검출하였다.

인간 모노클론 항체 Fab의 농도는 enzyme-linked immunoassay (ELISA) 방법을 이용하여 405 nm에서 측정하였다. Fab 발현 유도가 끝난 후 배양액을 20분 동안 14,000 rpm에서 원심분리하여 상등액을 시료로 얻었다. ELISA 방법에 사용된 항원은 Fab에 특이적으로 반응하는 PDC-E2(Sigma, No. p-7032)로서 carbonate-coating buffer와 함께 최종농도가 10 µg/ml가 되도록 하여 4°C에서 하룻밤동안 coating하였다. 여기에 분리한 상등액을 적절히 희석하여 37°C에서 1시간동안 반응시킨 후 이차 항체인 alkaline phosphatase conjugated goat anti-human IgG(Fab specific)을 반응시켰다. 그 후 p-nitrophenyl phosphatate (Sigma, No. N9389)를 기질로 사용하는 alkaline phosphatase-nitrophenyl phosphatate 방법을 이용하여 밝은 노란색으로 발색시켜 ELISA reader로 분석하였다.

세포성장 및 항체 생성에 미치는 포도당과 초산의 영향에 관한 조사

제조할 대장균에 탄소원으로서 포도당이 배양초기에 첨가되었을 경우 (growth phase)와 발현을 유도할 때 첨가된 경우 (production phase)에, 포도당 및 포도당을 대사하는 과정에서 우회하여 생성되는 초산이 세포성장 및 Fab 항체 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 한편 인위적으로 여러 농도의 초산을 배양초기에 첨가하거나 (growth phase), 발현을 유도할 때 첨가하여 (production phase) 세포성장과 Fab 생성에 미치는 초산의 저해 효과를 조사하였다.

결과 및 고찰

Growth phase에서 포도당의 영향

여러 농도의 포도당을 배양초기에 첨가해줌으로써 이에 따른 세포 성장, 포도당 소모 kinetics, 축적된 초산 농도와 항체 생산성을 비교 검토하였다. Figure 1에서는 포도당의 농도가 높을수록 세포 성장 속도가 빨라지는 것을 알 수 있었으며, 포도당의 농도가 낮을수록 빠른 시간 내에 영양분 고갈 현상이 일어났다. 그러나 포도당 3 g/l 경우와 0.5 g/l의 경우를 비교해 보면 3 g/l의 경우가 단위 시간당 포도당의

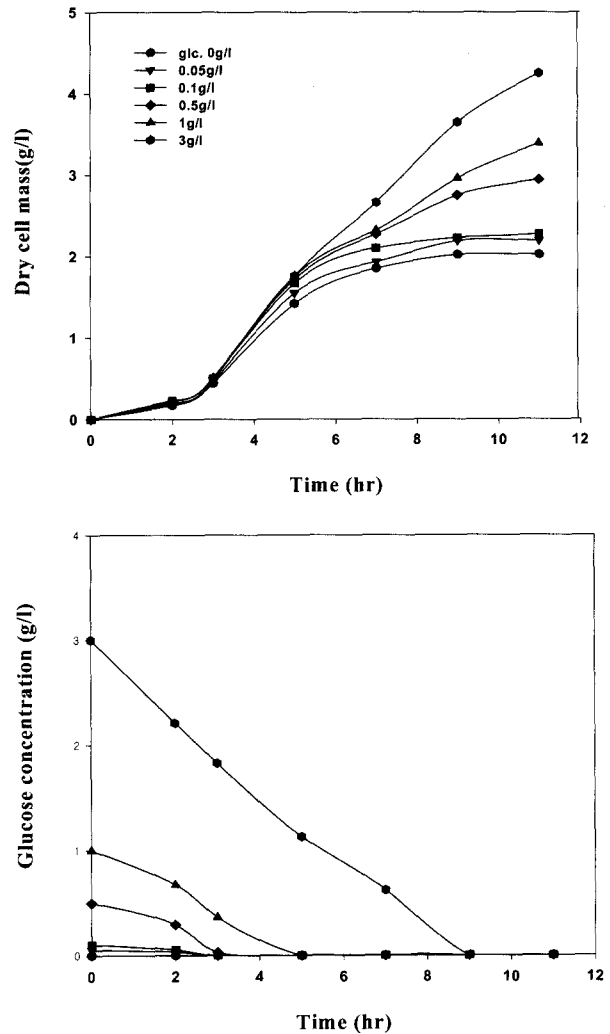


Figure 1. (A) Effect of glucose on cell growth of Topp2 (growth phase). (B) Effect of glucose on glucose consumption kinetics (growth phase).

소모속도가 더 빠른 것을 알 수 있어서 배지내의 포도당 농도가 높을수록 포도당의 소모속도가 증가함을 알 수 있었다.

Figure 2a는 세포 내에 축적된 초산의 변화를 나타내는 것으로 포도당의 소모속도가 빨라질수록 초산의 축적속도는 빨라짐을 알 수 있었다. 이는 고농도의 대장균 배양을 위해 필수적인 탄소원으로서의 포도당의 도입이 대사 부산물로서의 초산의 생성을 증가시키는 요인으로 작용한다는 것을 나타낸다. 대개 대장균이 호기성 조건에서 증식할 때 초산, 젖산 등의 유기산을 대사산물로 배지에 분비한다. 탄소원이 세포 안에서 분해되어 여러 대사 중간체를 거쳐 세포 구성물질의 전구체, 생합성용 에너지 운반체 (NADPH, ATP, Acetyl CoA 등)들과 네트워크를 구성하게 된다. 중앙대사경로 (central metabolic pathway)를 중심으로 탄소공급과 생합성, 탄산가스 그리고 대사 분비물로 배출되는 균형이 평소에 이루어지다가 탄소공급이 과잉이 되면 대사 중간체는 탄소의 균형을 맞추기 위해 결과지 경로로 빠지게 된다. 중앙대사경로의 잉여 중간 대사산물인 acetyl CoA는 phosphoacetyltransferase와 acetate kinase의 작용에 의해 초산이 되며 배양액으로 분비된다. 따라서 포도당의 농도가 높을 경우 탄소공급이 과잉되어 대사

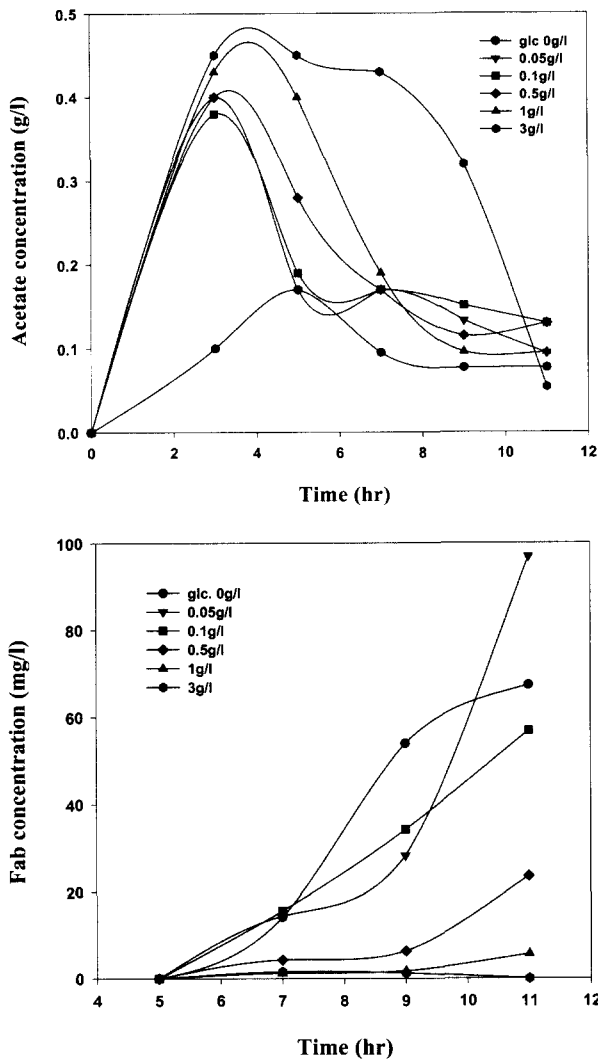


Figure 2. (A) Effect of glucose on acetate accumulation (growth phase). (B) Effect of glucose on product formation (growth phase).

가 초산을 생성하는 방향으로 진행된다.

그러나 Figure 2a에서 보여주듯이 일단 축적된 초산은 포도당의 고갈이 일어나기 시작하면 에너지원으로 소모되기 시작하면서 농도가 줄어들기 시작하며, 이때의 소모속도는 직접적으로는 포도당의 농도에 의존하며, 또한 축적된 초산의 농도에 따라 간접적으로 영향을 받는다. 즉 초기 포도당의 농도가 낮은 경우에는 초산의 축적이 적어서 초산의 에너지원으로서의 소모속도가 낮은 것으로 예상되었지만, 포도당 고갈현상이 심각하여 에너지원으로서의 소비속도가 급증하므로 전체적으로 초산의 소모속도가 빨라짐을 알 수 있다. 또한 초기 포도당의 농도가 높아 잔여 포도당이 높게 존재할수록, 대사 부산물로서 초산이 과량으로 생산되는 반면, 포도당이 아직 남아있기 때문에 초산의 에너지원으로서의 소모속도는 작아져서 배양액내 초산의 축적은 기하급수적으로 증가하게 된다.

Figure 2b는 3시간 배양 후 항체 발현을 유도했을 때의 시간에 따른 항체 생산성을 보여주고 있다. 포도당이 고갈되어 축적된 초산이 다시 에너지원으로 소모됨으로서 배지내의 초

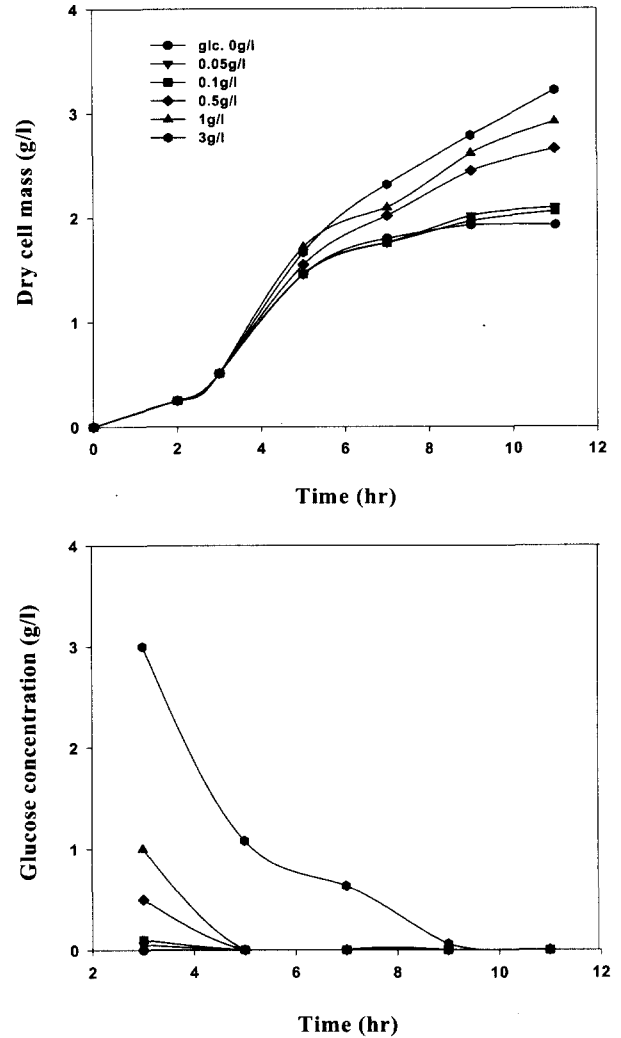
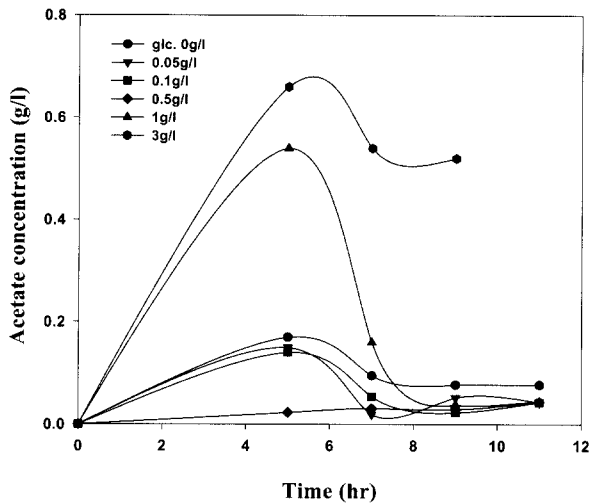


Figure 3. (A) Effect of glucose on cell growth of Topp2 (production phase). (B) Effect of glucose on glucose consumption kinetics (production phase).

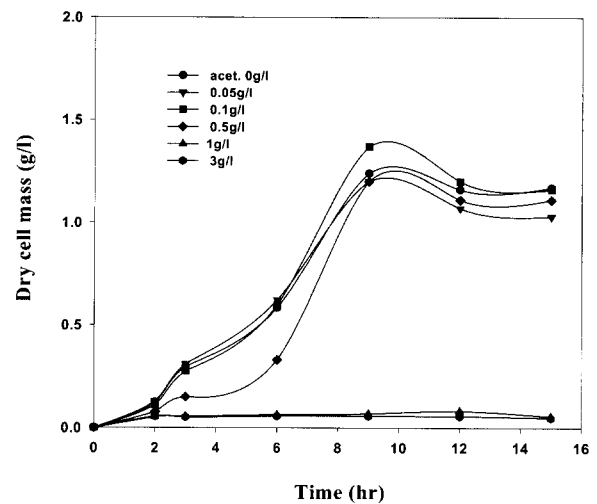
산의 농도가 가장 적게 유지되었던 경우 (포도당 0.05 g/l)가 항체 생산성이 가장 높아, 초산의 축적이 항체 생산을 저해하였음을 보여주고 있다. 따라서 포도당의 농도에 의해 결정되는 축적된 초산의 배양액내의 농도가 항체 생산에 중요한 영향을 끼침을 알 수 있었다. 이러한 growth phase에서의 초산의 축적은 배양액을 교환해주지 않는 한 production phase에 연결된다. 따라서 세포의 고밀도 배양을 위해 고농도의 포도당이 필요하나 그에 따른 초산의 축적에 의해 항체 생산이 저해되는 현상을 해결할 수 있는 배양 및 생산 방법의 개발이 유전자 재조합 인간항체의 산업화 대량생산을 위해 절실히 요구된다.

Production phase에서 포도당의 영향

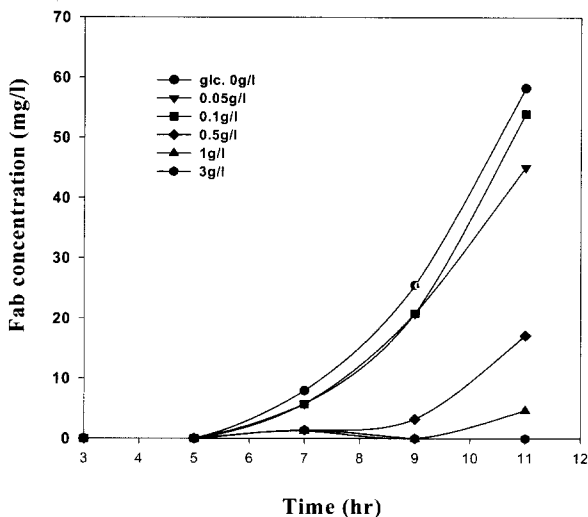
항체 발현을 유도할 때에 포도당을 첨가한 경우의 세포 성장, 포도당 소모 kinetics, 초산 생성 및 항체 생산 kinetics에 대해 조사하였다. 이 실험은 lac promoter에서 발생할 수 있는 catabolic repression에 대한 확인 실험이라고 볼 수 있다. Figure 3에서는 Figure 1의 결과와 마찬가지로 포도당 농도가



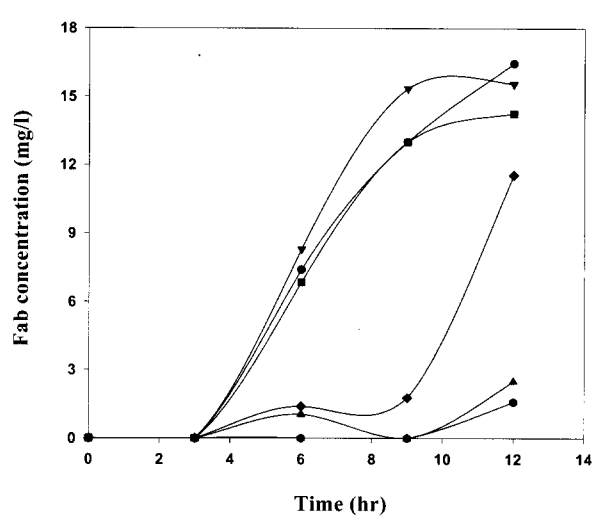
Time (hr)



Time (hr)



Time (hr)



Time (hr)

Figure 4. (A) Effect of glucose on acetate accumulation (production phase). (B) Effect of glucose on product formation of Topp2 (production phase).

Figure 5. (A) Effect of acetate on cell growth (growth phase). (B) Effect of acetate on product formation (growth phase).

높을수록 세포성장이 증대되나 그 증대되는 정도는 둔화되었으며, 포도당 소모속도는 다소 빨라졌음을 확인하였다. Figure 4a는 배양액 내에 축적된 초산의 시간에 따른 profile을 보여주고 있다. 이 경우는 Figure 2a와는 다른 현상을 보여주고 있다. 포도당이 0 g/l에서 0.5 g/l인 경우까지는 포도당의 농도가 증가할수록 점점 낮은 초산의 축적을 보였으며, 포도당이 1 g/l와 3 g/l일 때의 경우는 정상대로 농도가 증가할수록 높은 초산의 축적을 보였다. 반면 초산의 에너지원으로서의 소모속도는 포도당이 1 g/l일 때 가장 빨랐다. Figure 4b에서 보이듯이 항체 생산은 포도당의 소모에 따른 세포 성장 증가와는 거의 반비례하여 포도당이 첨가되지 않은 경우가 가장 항체 생산이 높았다. 이러한 결과로 볼 때 growth phase에서는 초산의 농도가 낮을수록, 그리고 production phase에서는 잔여 포도당 농도가 낮을수록 항체 생산에 더 기여하는 것을 확인할 수 있었다. 그 이유로서는 물론 포도당 농도가 감소함에 따른 초산 저해현상의 감소가 직접적인 영향이 되겠지만 본 연구에서 사용한 세포가 lac promoter를 사용하기 때문에 inducer인 IPTG의 작용을 포도당이 repression하는

catabolic repression이 발생한 것도 다른 이유로 추측할 수 있다.

Growth/Production phase에서 초산의 영향

앞서도 설명한 바와 같이 초산은 세포의 성장과 인간항체 Fab의 생성에 중요한 영향을 미친다. 이를 실험적으로 증명하기 위해 인위적으로 여러 농도의 초산을 배양초기 (growth phase)에 첨가하거나, 발현을 유도할 때 (production phase) 첨가함으로써 그 저해 효과를 확인하였다. Figure 5a와 Figure 6a는 growth phase 및 production phase에서의 세포 성장을 비교한 것으로 포도당을 첨가했을 때 보다 세포 성장이 2.5배 이상 낮은 것으로 보아 초산은 탄소원으로서의 작용이 미약할 뿐만 아니라 오히려 세포성장을 저해하는 것을 확인하였다. Figure 5b와 Figure 6b은 항체 생산성을 보여주고 있는데 포도당을 첨가했을 때보다 항체의 생산성이 약 7배 이상 저하되었다. 이로써 초산이 세포 성장뿐만 아니라 항체 생산성에도 치명적인 저해현상을 초래함을 확인하였다.

Figure 7은 위의 결과를 종합하여 초산이 최종 항체 생산성에 미치는 효과를 나타낸 결과로써 초산의 농도가 증가할수록 최종 항체 생산성이 낮아지는 것을 알 수 있으며, 특히

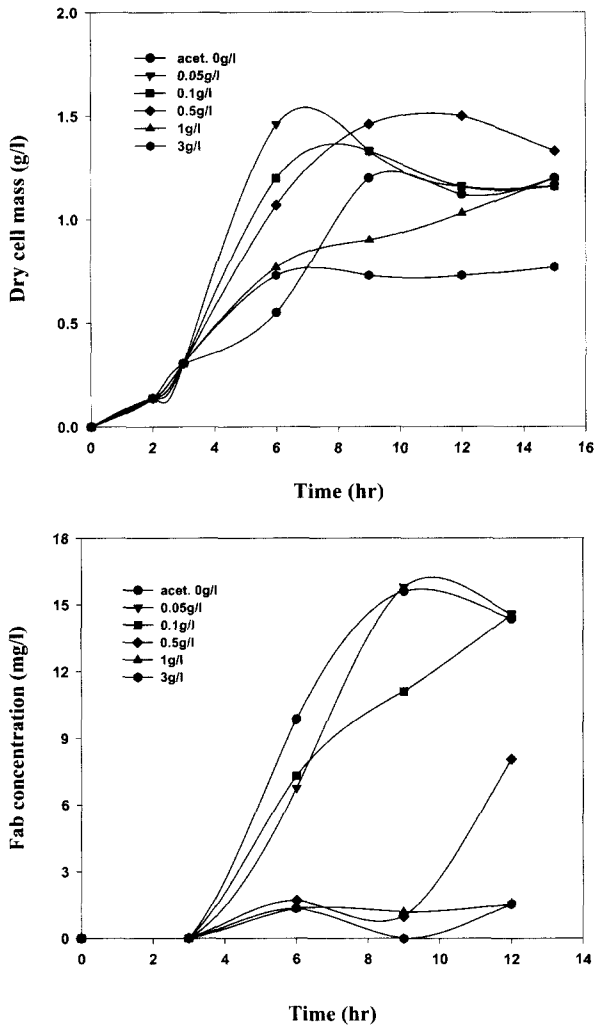


Figure 6. (A) Effect of acetate on cell growth (production phase). (B) Effect of acetate on product formation (production phase).

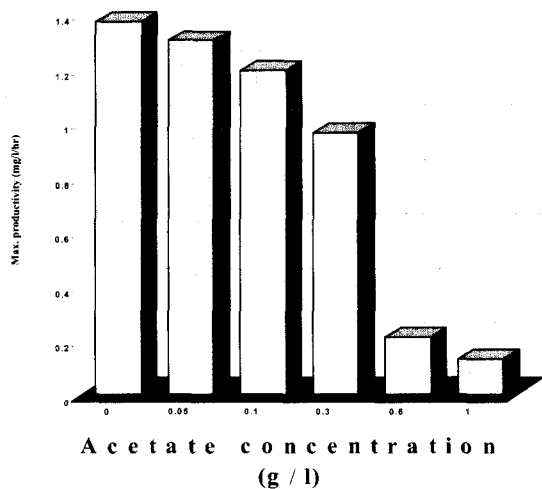


Figure 7. Effect of acetate on maximum productivity

초산이 0.6 g/l 첨가되었을 경우의 최종 항체 생산성이 급격히 떨어지는 것으로 미루어 보아 이 농도가 항체 생산 저

해의 임계농도로 생각되어진다. 이러한 결과에서 보여주듯이 발현 유도할 때에 초산의 농도는 재조합 단백질의 생성에 치명적인 영향을 미치므로 초산 축적 속도 및 이와 연관된 포도당의 공급속도를 정밀하게 잘 조절하는 것이 고농도 배양을 통한 항체 생산성 향상을 위한 전략으로 가장 중요하다.

최근에 유가식 배양에서 초산의 형성을 줄이기 위하여 탄소원이나 질소원과 같은 필수 영양분들의 제한적 공급에 의한 비성장속도를 조절하는 방법, 투석을 이용하여 배양액으로부터 직접 제거함으로써 감소시키거나 배지의 최적 배합을 통해 감소시키는 방법 등을 도입하고 있다. 또한 탄소원으로 glycerol을 사용하거나 아미노산 (특히, glycine과 methionine)을 첨가하여 초산의 저해효과를 경감시키는 방법(14) 등이 있다. 그외에 metabolic engineering(15)을 통하여 초산 생성을 감소시키는 방법 등 여러 가지 다양한 방법들이 개발되고 있다. 따라서 유전자 재조합 대장균을 이용하여 pyruvate dehydrogenase complex-E2 특이성 인간 모노클론 항체의 Fab부분을 생산할 경우 초산 농도의 조절은 생산성 향상을 위해 매우 중요하며, 대량 생산에서는 위에 언급된 초산의 형성을 줄이기 위한 전략이 적어도 하나 이상이 결합되어야 경제성 있는 생산이 보장될 것이다.

요약

유전자 재조합 대장균을 이용하여 pyruvate dehydrogenase complex-E2 특이성 인간 모노클론 항체의 Fab부분이 생산되었다. 재조합 대장균의 고밀도 배양과 이를 통한 재조합 인간 항체의 고생산성을 확보하기 위한 최적 전략을 개발하기 위해 포도당과 초산의 영향에 대해 조사하였다. 포도당의 농도가 높을수록 세포의 성장속도는 빨라지고 포도당의 소모속도도 빨라짐을 알 수 있었다. 이때 포도당의 소모속도가 빨라질수록 초산의 대사 부산물로서의 생성속도도 빨라졌다. 그러나 포도당이 고갈되면 일단 축적된 초산은 에너지원으로 소모되기 시작하고 이때의 소모속도는 배지내의 포도당의 농도에 의존함을 알 수 있었다. 즉 초기 포도당의 농도가 어느 정도 높아 잔존 포도당의 농도가 높은 경우, 초산의 생성 속도는 높고 에너지원으로 소모되는 속도는 느려져서 초산의 축적현상이 기하급수적으로 증가한다. 이렇게 높은 포도당 농도에 따라 축적된 초산은 항체 생산을 저해하였고, 저해를 위한 임계 초산 농도는 0.6 g/l이었다. 발현에 의해 항체를 생산하는 시기에서는, 포도당 농도가 높을수록 세포성장이 증대되나 초산에 의한 저해 현상 및 catabolic repression의 영향으로 항체 생산이 감소하였다. 따라서 발현 후 항체의 생산을 증진시키기 위해서는 포도당과 초산의 농도를 가능한 한 낮게 유지하는 것이 중요하다. 그러므로 고밀도 배양과 재조합 인간 항체의 높은 생산성을 확보하기 위해서는 배양액내의 포도당과 초산의 농도를 정밀하게 조절하는 것이 절실히 요구된다.

감사

본 연구는 한국과학재단의 핵심전문연구비(961-1105-034-2)로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Tomson, K., T. Paalme, P. S. Laakso, and R. Vilu (1995), Automatic laboratory-scale fed-batch procedure for production of recombinant proteins using inducible expression systems of *Escherichia coli*, *Biotechnol. Tech.*, **9**, 793-798.
2. De Sutter, K. and W. Fiers (1994), A bifunctional murine: human chimeric antibody with one antigen-binding arm replaced by bacterial beta-lactamase, *Molecular Immunology*, **31**(4), 261-267.
3. Colnaghi, M. I., S. Menard, and S. Canevari (1993), Evolution of the therapeutic use of new monoclonal antibodies, *Current Opinion in Oncology*, **5**(6), 1035-1042.
4. Monbouquette, H. G. and D. F. Ollis (1986), Even live catalysts die, *Chemtech.*, September, 542-551.
5. Stranberg, L. and S. -O. Enfors (1991), Batch and fed batch cultivations for the temperature induced production of a recombinant protein in *Escherichia coli*, *Biotechnol. Lett.*, **13**, 609-614.
6. Winter, G. and W. J. Harris (1993), Humanized antibodies, *Trends in Pharmacological Sciences*, **14**, 139-143.
7. Huse, W. D., L. Sastry, S. A. Iverson, A. S. Kang, M. Alting-Mees, D. R. Burton, S. J. Benkovic, and G. Winters (1989), Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda, *Science*, **246**, 1275-1281.
8. Griffiths, A. D. (1993), Production of human antibodies using bacteriophage, *Current Opinion in Immunology*, **5**(2), 263-267.
9. Mullinax, R. L., E. A. Gross, J. R. Amberg, B. N. Hay, H. L. Hogrefe, M. M. Kubitz, and A. Greener (1990), Identification of human antibody fragment clones specific for tetanus toxoid in a bacteriophage lambda immunoeexpression library, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 8095-8099.
10. Burton, D. R., C. F. Barbas III, M. A. A. Persson, S. Koenig, R. M. Chanock, and R. A. Lerner (1991), A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries asymptomatic seropositive individuals, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 10134-10137.
11. Cha, S., P. S. C. Leung, R. L. Coppel, J. Van de Water, A. A. Ansari, and M. E. Gershwin (1993), Combinatorial autoantibodies to dihydrolipoamide acetyltransferase, the major autoantigen of primary biliary cirrhosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 2527-2531.
12. Meyer, H. P., C. Leist, and A. Fiechter (1984), *J. Biotechnol.*, **1**, 355.
13. Han, K., H. C. Lim, and J. Hong (1992), Acetic acid formation in *Escherichia coli* fermentation, *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 663-671.
14. Han, K., J. Hong, and H. C. Lim (1993), Relieving effects of glycine and methionine from acetic acid inhibition in *Escherichia coli* fermentation, *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 316-324.
15. Aristos, A. A., K. Y. San, and G. N. Bennett (1995), Metabolic engineering of *Escherichia coli* to enhance recombinant protein production through acetate reduction, *Biotechnol. Prog.*, **11**, 475-478.