

하이브리도마 세포의 증식속도와 단일클론 항체의 생산

최 태 부 · 조 보 연

전국대학교 미생물공학과, *한국과학기술원 유전공학센터

The Effect of Hybridoma Growth Rate on the Production of Monoclonal Antibodies.

T. B. Choe and B. Y. Cho*

Dept. of microbial engineering, Kon-KuK University,

*Genetic engineering research center, KAIST.

ABSTRACT

The effect of growth rate change on glucose consumption and Ammonia production rate in batch culture of hybridoma was studied. The methods regulating growth rate of hybridoma were 1) decrease of serum concentration, 2) decrease of culture temperature and 3) addition of growth inhibitor (thymidine). The experimental results showed that hybridoma growth rate was dropped by 20 ~ 50%, while glucose consumption and ammonia production rate was decreased up to 40%. On the other hand, the final concentration of monoclonal antibody was shown to be increased as high as 100% when the concentration of serum was decreased from 2% to 0.2%.

서 론

동물세포는 소위 G₁, S, G₂, M의 4단계로 나누어 지는 cell cycle을 거치며 성장과 분열을 반복하게 되는데 한 cycle에 걸리는 시간(doubling time)은 세포에 따라 적게는 12시간에서 많게는 수 100시간 이상까지 그 변화가 매우 다양하다. 세포의 증식 속도를 조절하는 인자로는 세포내적 인자와 세포외적 인자가 구분할 수 있는데 세포내적 인자는 세포의 크기와 형태 그리고 배양액내의 성분등이 세포 분열과 성장을 결정하는 인자를 말하며, 세포외적 인자는 세포간의 접촉여부, 세포 밀도, 성장저해 물질의 유무등을 말한다.

증식속도가 느린 세포는 정상세포에 비해 G₁ phase의 기간이 길어지며 다른 phase에 소요되는 시간은 거의 유사한 것으로 알려져 있다. (1,2) 세포에 따라 생존해 있기는 하나 전혀 분열하지 않는 nonproliferating cell(non-dividing cell)이 있는데 이 경우에는 G₁에서 S phase로 전환되지 않고 일종의 resting cell인 G₀ phase에 들어갔기 때문이라고 본다. (3) 정상세포의 경우에도 density inhibition과 같이 주위 환경에 따라 non-dividing cell로 오랫동안 지속되기도 한다. 하이브리도마 세포는 일종의

암세포로써 이러한 형태의 세포 성장 정지 현상이 없으며 환경이 허락하는한 계속 성장하다가 어느 시점에서 갑자기 사멸하기 시작한다. 하이브리도마의 doubling time은 15시간 안팎으로 정상세포에 비해 그 증식속도가 빠르며 이로 인한 기질의 소비속도와 암모니아와 같이 세포에 toxic한 부산물의 생성속도 역시 높은 편이다. 세포의 증식속도가 빠를 경우 짧은 시간내에 높은 세포 농도에 도달할 수 있는 잇점이 있기는 하나 앞에서 지적한 대로 기질의 소비속도가 빠르고 필수영양분이 고갈되면서 세포의 생존도가 낮아지므로 결과적으로는 배양시간이 짧아지고 이에 따라 생산되는 항체의 농도도 낮아지게 된다. 하이브리도마가 생산하는 단일클론항체의 최종 농도를 높이기 위하여 하이브리도마 고농도 배양법이 많은 연구의 대상이 되고 있으나 이 경우에도 소모되는 배지양은 여전히 많으므로 항체의 경제적 생산에는 큰 도움이 되지 못한다.

본 연구에서는 하이브리도마 세포의 증식속도를 인위적으로 낮추어 기질(glucose)의 소비속도와 Ammonia의 생성속도가 어느 정도 감소할 수 있는지를 조사하고 또, 이것이 궁극적으로 세포배양기간과 최종 항체농도의 증가에 기여할 수 있는지를 알아보았다. 세포증식속도를 조절하는 방법으로는 1) 혈청농도를 낮추는 방법 2)

배양온도를 낮추는 방법 3) 성장억제제를 첨가하는 방법 등을 조사하였다.

재료 및 방법

세포주와 배양액

β -HCG로 면역시킨 Balb/c 쥐의 비장세포와 sp 2/0-Ag14 mouse myeloma를 융합하여 Agls 25-3라는 하이브리도마를 얻었다. 배지는 IMDM과 Ham's 12(Gibco)를 1:1로 혼합한 배지에 sodium bicarbonate (2.1g/l), HEPES(1.2g/l) 및 2% 우태아 혈청을 첨가한 배지를 사용하였다.

계대배양과 세포배양

세포주의 계대배양은 조직배양 플라스크(25cm², Costa)를 이용하여 CO₂ incubator (5% CO₂, 95% air, 37°C, Lunaire)속에서 행하였다. Alps 25-3의 회분식 배양은 spinner flask를 이용하여 혈청농도와 배양온도를 달리하며 실시하였다.

항체 및 암모니아, glucose 농도 측정

항체의 농도는 SRID(Single radial immunodiffusion)법을 이용⁽⁴⁾하여 goat anti-mouse IgG-antiserum이 0.5% 첨가된 agarose gel(1%, w/v)에 배양액 10 μ l씩을 첨가한 후 24-48시간 상온에서 방치, 형성된 'halo'의 직경을 측정하여 계산하였다.

배지내 암모니아의 농도는 Wako pure Chem에서 구입한 kit를 이용하여 비색법(Indophenol method)으로 분석하였다. Residual glucose의 농도는 영동제약에서 구입한 kit를 이용하여 COD-POD법으로 분석하였다.

결과 및 고찰

정상배양에서 하이브리도마의 성장과 단일클론항체의 생산

그림1에서 4까지 하이브리도마 Alps 25-3의 회분식 배양에서 전형적인 성장곡선과 glucose, ammonia 및 항체의 농도변화를 보여주는 것으로 비증식속도(μ), 비glucose소비속도(qs), 비 ammonia (qamm) 및 항체 생성속도(qp)를 함께 나타내었다. 초기접종농도가 5 \times 10⁴ cells/ml일 경우 20시간미만의 성장잠재기와 40~50시간의 대수증식기를 거쳐 성장정지기에 도달한 후 곧바로 급격한 세포사멸기에 들어가는데 이에 소요되는 총 배양 시간은 120~130시간이다. 대수증식의 비증식속도는 0.05hr⁻¹(doubling time \approx 14시간)이고 이 기간동안 4~5회 분열하여 최고 세포농도(Viable cell)는 20배가량 증가한

1 \times 10⁶ cells/ml 전후가 된다.

glucose는 대체로 초기농도의 70~80%가 소모되고 있으며 비소비속도는 시간에 따라 0.02에서 0.2mg/10⁶ cells/hr까지 변화하고 있다.

glucose의 최고 비소비속도를 보이는 지점을 배양후 10~20시간대로써, 이는 성장 잠재기에서 대수 증식기로 옮겨가는 시기인 것으로 보여진다. ammonia의 생성속도 역시 대수증식기의 초기에 가장 높아졌다가 다시 감소하게 되는데, 배양이 끝나는 시기에는 그 농도가 50 μ g/ml에 까지 이른다. 항체의 생산속도는 대수증식기나 배양후기에 높을 것으로 예상했으나 이와는 달리 배양초기에 가장 높게 나타나는데 이는 이 시기에 항체 생산속도가 가장 높다고 보기보다는 세포내에 이미 만들어진 항체가 새 배지로 교환된 후 20시간을 전후하여 배양액 밖으로 많이 분비되는 것으로 볼 수 있다. 항체의 최종 농도는 20~25 μ g/ml였다.

하이브리도마의 성장억제와 단일클론항체의 생산

혈청에는 세포증식에 필요한 여러가지 성장인자가 대량 포함되어 있으므로 배지성분에서 혈청농도를 낮추면 세포의 증식 속도는 자연히 감소하게 된다. 그림5는 초기의 혈청 농도를 2%에서 0.2%까지 감소시켰을 때 구한 Alps 25-3의 성장곡선과 이때 측정된 배지내 glucose 및 암모니아의 농도 변화를 보여 주고 있다. 이 결과에 따르면 혈청농도가 2, 0.5, 0.2%로 감소함에 따라 doubling time은 14에서 18, 22시간으로 배양기간은 110, 140, 160시간으로 증가하였고 반면에 glucose 비소비량*은 0.1, 0.08, 0.075mg glucose/10⁶ cells/hr로 암모니아 비생성량*은 2.29에서 2.0, 1.35 μ g Ammonia/10⁶ cells/hr로 각각 25% 및 40%씩 감소하였음을 알 수 있다. (*, 세포농도 4 \times 10⁵ cells/ml일때의 값임). 이때 생성된 단일클론항체의 농도는 그림6에서 볼 수 있듯이 혈청농도가 감소함에 따라 그 최종 농도가 45, 65, 85 μ g/ml로 증가하였고 항체의 비생성속도(qp)도 2% 혈청 농도에서는 초기에 가장 높다가 시간이 지남에 따라 꾸준히 감소하는데 비해, 낮은 혈청농도에서는 배양시간이 경과하여도 초기와 비슷한 수준, 혹은 약간 더 높은 수준의 항체 생성속도를 보여주므로써 전자에 비해서는 월등히 높은 항체 생성속도를 계속 유지할 수 있음을 알 수 있었다.

이것은 의외의 결과로, 세포 증식속도가 느려질 경우 항체의 생성속도 역시 낮아질 것으로 예상하였으나 그 결과는 반대로 나타났다. 높은 혈청농도(2%)에서 항체의 비생성속도 재빨리 낮아지는 현상은 혈청내에 항체 생성을 저해하는 물질에 들어있다는 가정을 해볼 수 있으나, 이 경우에도 초기의 항체 생성속도는 충분히 높게

나타나고 있으므로 이러한 가정은 타당하지 않은 것으로 보인다. 따라서 낮은 혈청농도에서 배양한 하이브리도마가 더 많은 항체를 생성하는 이유는 하이브리도마의 증식속도가 감소하였기 때문이라고 볼 수 있으며 이것은 세포 증식에 소모되는 에너지 및 영양분의 여유분이 항체의 생성쪽으로 전환되었거나 배지내의 충분한 영양분으로 인한 세포의 활성도(activity)가 높게 유지될 수 있었기 때문인 것으로 해석할 수 있다.^(5,6,7)

하이브리도마의 성장을 억제하는 방법으로 배양온도를 낮추는 방법을 사용하였을 때 얻은 성장곡선은 그림 7과 같다. 이 결과에 의하면 배양온도를 37, 34, 31°C로 낮추어 감에 따라 세포 증식속도가 현저히 감소하고, 이에 따라 glucose 소비량과 ammonia 생성량도 동시에 감소한다는 사실을 알 수 있다. 그러나 이때 생성된 항체의 농도는 그림 8에 나타난대로 배양온도 낮아짐에 따라 45~15 µg/ml까지 감소하는 추세를 보였고, 비생성속도도 배양시간이 지남에 따라 급격히 감소하는 경향을 보였다. 특히 배양온도 34°C에서는 최고 세포농도가 37°C에 비해 더 높은 값임에도 불구하고 최종 항체의 농도는 30 µg/ml로 후자의 45 µg/ml에 비해 낮게 나타났다. 이러한 현상은 혈청농도 조절에 의한 증식 억제의 실험 결과와는 상반되는 것으로 다음과 같이 해석할 수 있는 것이다. 즉 혈청농도 감소에 의한 증식억제 방법은 배양액 내의 증식인자를 제거하여 세포 분열을 억제시키는데 비해서 배양온도의 저하에 따른 증식억제 방법은 낮은 온도에 의해 세포의 활성도 자체를 낮추어 주므로 배양액내의 영양분은 충분하지만 세포의 성장속도가 느려지고 동시에 세포가 생성하는 항체의 농도도 낮아지게 된다. 온도를 31°C로 낮출 경우 전체 배양시간은 200시간 이상으로 길어지는 현상을 이러한 설명을 뒷받침 해 주고 있다.

배양액 내의 혈청농도를 낮출 경우 증식인자뿐 아니라 세포 성장에 필요한 영양분도 동시에 감소될 수 있으므로 이를 방지하기 위하여 혈청의 농도는 정상배지와 같은 수준으로 넣어주되 성장억제제를 따로 첨가하여 세포 증식속도를 늦추는 방법을 조사하였다.⁽⁸⁾ 그림 9는 배지내에 thymidine를 첨가하여 얻은 세포 성장곡선과 이때 생성된 항체의 변화량을 보여주고 있다. thymidine의 첨가량을 200~200 µM까지 증가시켰을 때 하이브리도마의 증식속도는 현저히 감소하였으며 이때 항체의 생성량은 반비례하여 증가하는 경향을 보였다. 그러나 그 증가량은 혈청농도를 감소시켰을 때 보다는 낮은 값으로 그 효과가 뚜렷이 나타나지는 않았으며 세포의 생존기간도 크

게 개선되지는 않았다. 그러나 세포 생존도에 영향을 주지 않고 하이브리도마의 증식속도를 늦출 수 있는 성장억제제를 찾을 수 있다면 이는 세포 생존기간을 늘리고 최종 항체농도를 증가시키는데 효율적으로 이용될 수 있다고 보여진다.

요 약

하이브리도마의 회분식 배양에서 세포증식 속도가 기질의 소비 속도나 단일클론 항체의 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 세포의 증식속도를 조절하는 방법으로는 다음 3가지를 이용하였다. : 1) 배양액내 혈청의 농도를 낮추는 방법, 2) 배양온도를 낮추는 방법, 3) 세포증식 억제제를 첨가하는 방법.

실험결과에 따르면 위의 세 가지 방법에 의해 세포증식속도가 20~50% 감소하는 동안 기질의 소비속도와 암모니아의 생성 속도는 40%까지 감소하였다.

반면에 단일클론 항체의 최종농도는 하이브리도마 세포의 증식이 저해되지 않았을 경우에 비해 100%까지 증가되는 것으로 나타났다.

따라서 이 결과는 하이브리도마 배양에서 단일클론 항체 생산의 증가에 유용한 방법으로 이용될 수 있다.

참 고 문 헌

1. J.A. Smith and L. Martin(1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70** 1263
2. A.B. Pardee(1974), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 1286
3. P.W. Rossow, V.G.H. Riddle and A.B. Pardee(1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4446
4. A. Johnstor and R. Thorpe, *Immunochemistry in practice*, p. 122, Black well Scientific pub. London.
5. T.H. Chang, Z. Steplewski and H. Koprowski(1980), *J. Immunol. Methods*, **39**, 369
6. J.P. Tharakan and P.C. Chau(1986). *Biotechnology Letters*, **8**, 529
7. D. Velez, S. Reuveny, L. Miller and J.D. Macmillan (1986), *J. Immunol. Methods*, **86**, 45
8. T. Ashihara and R. Baserga(1979), *Methods in Enzymology*, **58**, 248

(Received January 17, 1989)