

젖산 생성 감소 및 단일균향체 생산성 향상을 위한 하이브리도마의 유가배양

이은열[†] · 김희숙

경성대학교 공과대학 식품공학과

Fed Batch Culture of Hybridoma for Reduction of Lactate and Higher Monoclonal Antibody Productivity

Eun-Yeol Lee[†] and Hee-Sook Kim

Department of Food Science and Technology, College of Engineering, Kyungshung University, Pusan 608-736, Korea

Abstract

Accumulation of toxic waste byproducts in hybridoma culture can limit cell growth and monoclonal antibody (MAb) productivity, and one of the major toxic metabolites is lactate produced *via* glycolytic pathway of glucose metabolism. The factors affecting the glucose to lactate conversion rate were investigated. The conditions of high initial glucose concentration and high growth rate stimulated glucose to lactate conversion rate. The glucose-controlled fed-batch culture was investigated, and 19 % reduction in lactate formation and 41% enhancement of MAb titer could be achieved by fed-batch culture.

Key words – Hybridoma, Monoclonal antibody, Fed-batch culture, Lactate, Glucose.

서 론

하이브리도마 세포(hybridoma cell)에 의해 생산되는 단일균향체(monoclonal antibody, MAb)는 각종 진단용 시약으로 널리 사용되고 있으며, 고부가가치성 단백질 분리 정제 및 치료용 의약품 등으로의 응용도 확대되고 있어 단일균향체의 대량 생산 기술 개발은 매우 중요하다[12]. 하이브리도마 세포 배양을 통한 단일균향체의 생산성을 높이기 위해서는 고농도 세포배양 및 높은 세포 활성도를 유지시키는 것이 필요하며, 이를 위해서는 영양원의 알맞은 공급 및 독성 노폐물 생성을 억제시켜야 한다[5,6]. 주요 영양분인 포도당은 산화해당과정을 통해 에너지 생산

및 pentose phosphate 대사를 통한 ribose 단위체 생산 등에 사용된다[10]. 그러나, 대사된 포도당의 많은 부분은 젖산(lactate)으로 전환되며 [13,14], 젖산이 배양액에 축적되면 세포 성장과 항체 생산성이 저해되므로 젖산 생성을 억제시킬 수 있는 생물반응기 운전전략 개발이 필요하다 [5]. Reitzer 등은 배지내의 포도당 농도가 증가되면 전체 포도당 소모량 대비 pentose phosphate 대사의 플럭스 비율이 감소하면서 젖산으로의 전환이 증가된다는 보고를 하였다 [10]. Miller 등은 mouse-mouse 하이브리도마에 대한 연속배양 연구를 한 결과, 포도당을 넣어주면 포도당 소비는 증가되고 산소 소비는 감소되는 형태의 상반적 조절이 일어남을 관찰하였고, 용존산소 농도가 줄어들 수록

[†] Corresponding author

해당과정에 의한 에너지 생산 기여도가 높아지면서 젖산 생성도 따라서 증가됨을 보고하였다 [1,7-9]. 포도당의 주요 대사 산물인 젖산이 배양상등액에 축적되면 pH 강하로 인해 세포 성장이 저해되는 것뿐만 아니라, CRL 1606 세포의 경우 젖산은 항체 생산과 암모늄이온 생성을 저해시키는 것으로도 알려져 있다[3,4]. 젖산의 항체 생산성 저해 작용에 대한 기작으로는 칼슘에 대한 킬레이터로서의 작용이 제시된 바 있는데, 세포내의 칼슘은 단백질 분비에 관여하기 때문에 젖산에 의한 칼슘 농도 저하는 항체 생산성의 감소를 가져온다는 것이다.

배양환경 조건에 대한 세포 성장 및 대사작용의 변화는 세포주에 따라 서로 상이한 결과가 나오는 경우도 많으므로, 특정 하이브리도마 세포를 이용한 단일군항체의 대량 생산을 위한 대규모화(scale-up) 및 배양조건 최적화를 위해서는 각 세포주에 대한 개별적 연구가 불가피한 실정이다. 본 논문에서는 안질환과 비임질성 성병을 유발하는 병원균인 *Chlamydia trachomatis* L2 type의 표면항원에 대한 IgM 형태의 단일군항체를 생산하는 KA112 하이브리도마 세포 배양시 분비되는 유해 대사산물 중에 하나인 젖산의 생성에 미치는 배양환경 조건들의 영향을 살펴보았다. 그리고 포도당 소비속도와 연계시킬 수 있는 세포 성장속도식을 바탕으로 최적으로 포도당을 공급해주는 유가배양을 통해 젖산의 생성을 줄이고, 사용된 포도당으로부터의 세포 수율을 향상시키며 적분세포농도(integrated cell concentration)를 증가시켜 단일군항체 생산성을 향상시키는 것이 본 논문의 연구목적이다.

재료 및 방법

세포주(Cell line) 및 계대 배양

세포주로는 안질환과 비임질성 성병을 유발하는 병원균인 *Chlamydia trachomatis* L2 type의 표면항원에 대한 IgM 형태의 단일군항체를 생산하는 KA112 하이브리도마를 사용하였다. 계대배양은 D-100 조직배양용 dish(녹십자, 서울)를 이용하여 CO₂ 인큐베이터(37°C, 5% CO₂)에서 실시하였다.

사용배지

사용배지는 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM)

을 기저배지로 하여 만든 저혈청 배지(low serum medium, LSM)와 무혈청 배지 (serum free medium, SFM)를 사용하였다[7].

분석

세포농도 측정은 trypan blue(Flow Lab, Australia)를 0.05% (v/v)로 사용하여 dye exclusion 방법으로 전체 세포 농도와 생존도(viability)를 측정하고, 헤모사이토미터로 2회 측정한 것을 평균치로 하여 결정하였다[2]. 하이브리도마 배양상등액의 항체역가 분석은 ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay)법으로 측정하였다. Peroxidase-labelled goat anti-mouse IgM (Kirkegaard and Perry Laboratories, U.S.A.)을 conjugate로 사용하였고 450 nm에서 microtiter reader CLS 962(Cambridge Life Sciences plc, UK)를 이용하여 측정하였다. 이때 사용한 KA112 군주에 대한 항원인 *Chlamydia trachomatis*는 McCoy 세포에 감염시켜 배양한 후 초원심분리하여 사용하였다. 포도당 및 젖산 농도분석은 효소측정키트(Sigma, U.S.A.)를 사용하여 정량하였다.

세포배양 조건 및 방법

초기 대수 성장기(early exponential phase)에 도달한 계대 배양중인 세포를 이용하여 접종하였다. 세포의 부유 배양을 위해 100 ml, 250 ml의 spinner flask(Bellco, U.S.A.)와 2L 생물반응기(Celligen, NBS, U.S.A.)를 사용하였다.

결과 및 고찰

하이브리도마 세포의 회분배양

Fig. 1은 KA112를 회분배양 한 결과로, 단일군항체는 세포 성장과 더불어 생산되는 경향(growth-associated production)을 보여주고 있으며, 포도당 소비에 따른 젖산 생성은 대수성장기에서 많이 되고 있음을 알 수 있다. Table 1에 초기 포도당 및 젖산 농도에 따른 비성장 속도의 변화가 제시되어 있다. 포도당의 경우 농도를 2.7~24 mM로 변화시키면서 회분배양시킨 결과 비성장속도가 거의 비슷한 반면 젖산의 경우 30 mM의 농도에서는 비성장 속도가 약 40% 정도 저해가 일어나, 젖산 생성 감소의 필요성을 알 수 있다. 단일군항체 생산은 일반적으로 적분생존세포

젖산 생성 감소 및 단일균향체 생산성 향상을 위한 하이브리도마의 유가배양

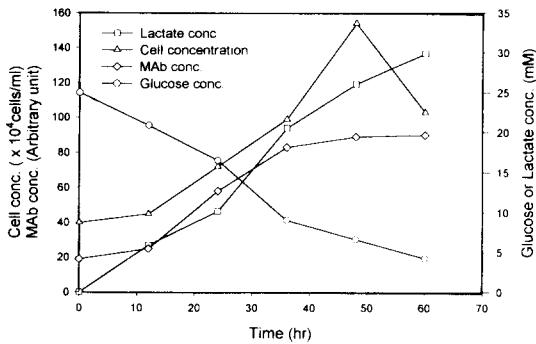


Fig. 1. Batch culture of hybridoma cell.
(initial glucose = 4.5 g/L, initial glutamine = 1 g/L in LSM).

Table 1. The effect of initial glucose and lactate concentration on growth rate of hybridoma cell.

	Concentration(mM)	Specific growth rate(1/h)
Glucose	2.7	0.030
	5.4	0.033
	16	0.032
	24	0.034
Lactate	0	0.034
	10	0.035
	20	0.028
	30	0.021

농도(integrated viable cell concentration)와 선형적 관계를 보이는데 [11], KA112의 경우도 배양시간에 대한 생존 세포(viable cell) 곡선 및 MAb titer 곡선을 다항함수를 이용하여 근사시킨 뒤 수치 적분을 한 결과를 분석해 보면 선형관계도 값이 0.997 정도로 매우 선형적 관계를 가지고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 2). 따라서 적분생존세포농도를 증가시켜 주는 것은 단일균향체 생산의 증가를 의미한다고 볼 수 있으므로 유가배양의 운전 결과를 평가하는 지표로 사용하기로 하였다.

포도당의 젖산으로의 전환에 영향을 주는 인자 분석

포도당 농도가 포도당의 젖산으로의 전환속도(glucose to lactate conversion rate)에 미치는 영향이 Fig. 3에 제시되어 있다. 회분배양시 초기 포도당 농도가 증가할수록 젖산으로의 전환률이 증가함을 알 수 있으므로 될 수 있으면 생물반응기내의 포도당 농도를 낮게 유지시켜 주는

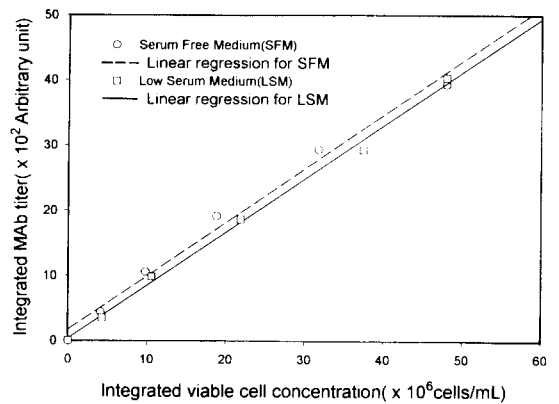


Fig. 2. Relation between integrated viable cell concentration and integrated MAb titer.

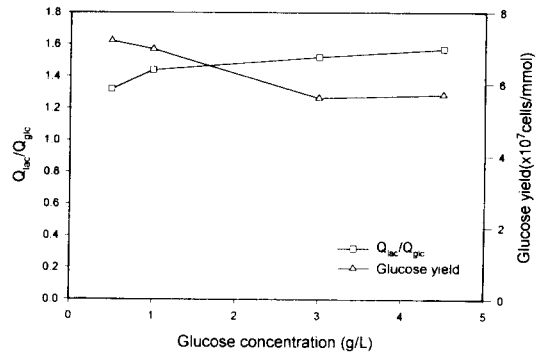


Fig. 3. Effect of glucose concentration on glucose to lactate conversion rate and glucose yield.
(Q_{lac}: specific lactate production rate; Q_{gc}: specific glucose consumption rate).

것이 바람직하다[6]. 또한, 포도당 농도가 증가할수록 포도당 수율이 감소함을 알 수가 있는데, 이것은 생물반응기내의 포도당 농도가 높을수록 세포들에 의하여 사용된 포도당이 대사부산물인 젖산으로의 전환률이 높아졌기 때문이다. 초기 젖산 농도를 0, 10, 20, 30 mM로 한 뒤 회분 배양을 하여 초기 대수성장기의 자료로부터 포도당의 젖산으로의 전환속도에 미치는 젖산의 영향을 분석하였다. Fig. 4에서와 같이 젖산으로의 전환율은 초기 젖산 농도가 30 mM까지는 큰 영향을 받지 않았으나, 포도당 수율(glucose yield)의 경우 초기 젖산 농도가 10 mM 이상의 농도에서부터 감소됨을 알 수가 있다. 미생물 배양의 경우

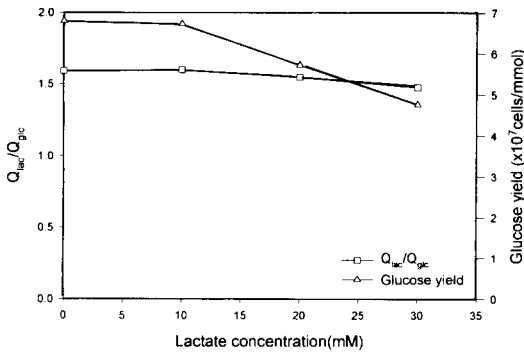


Fig. 4. Effect of lactate concentration on glucose to lactate conversion rate and glucose yield. (Q_{lac} : specific lactate production rate; Q_{glc} : specific glucose consumption rate).

에서도 발효부산물로 formic acid, 아세트산 등이 생성되는데, 이들은 약한 lipophilic acid로서 세포막을 자유로이 통과하는 oxidative phosphorylation uncoupler로 작용하여 세포막의 수소 이온 농도를 감소시키고 그 결과 metabolic drain이 유발되어 세포 성장에 유독한 영향을 줄뿐만 아니라 oxidative phosphorylation의 ATP 생산 효율도 줄여주어 포도당 수율도 역시 감소되는 것으로 알려져 있다. 하이브리도마 세포 역시 미생물과 유사한 이유로 인하여 포도당 수율 감소가 생기는 것으로 생각할 수 있다.

초기 글루타민 농도 변화와 초기 암모니아 농도 변화가 포도당의 젖산으로의 전환속도에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 글루타민 농도를 4 mM에서 12 mM로 변화시키고 암모니아 농도는 0 mM에서 10 mM로 변화시켜 회분배양을 실시한 결과, 이들 농도 변화에 따른 젖산 전환율은 큰 변화가 없었다 (data not shown).

Fig. 5에 세포 성장속도가 포도당의 젖산으로의 전환속도에 미치는 영향이 제시되어 있다. 이때 세포 성장 속도 변화는 초기 serum 농도, 초기 ammonia 농도, 초기 젖산 농도 등을 변화시키면서 회분배양 실험을 통해 구한 값들이다. 세포 성장 속도를 변화시킨 원인들에 따라서 정도의 차이는 있으나, 일반적으로 세포 성장 속도가 클수록 포도당의 젖산으로의 전환율이 높아지면서 세포의 대사작용이 좀 더 발효적인 성질을 보였으며, 세포 성장속도가 낮을수록 젖산으로의 전환율은 감소되었다. 이러한 결과들로부터 더 높은 세포 성장속도에서는 포도당의 소비속도가 증가

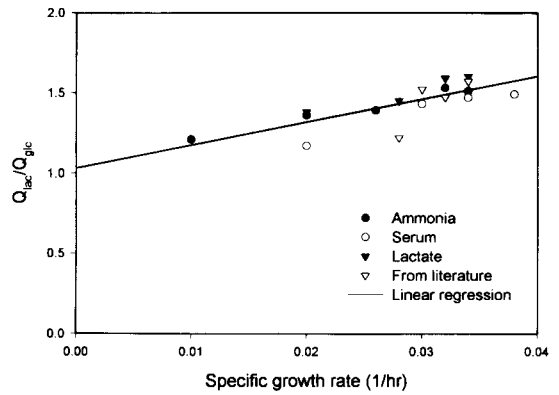


Fig. 5. Effect of growth rate changes by variations in initial ammonia, serum and lactate concentrations on glucose to lactate conversion rate. (Q_{lac} : specific lactate production rate; Q_{glc} : specific glucose consumption rate).

되어 pentose phosphate 대사경로를 통한 ribose 단위체의 공급, phospholipids 합성, TCA 회로를 통한 세포 구성물질의 제공 및 에너지 생산이 증가되지만 나머지 여분의 포도당은 젖산으로 전환됨을 알 수가 있다.

세포농도에 따른 비성장속도의 변화

회분배양에 있어서 초기 세포 접종농도가 세포 비성장속도(μ)에 미치는 영향을 살펴본 결과, Table 2에서와 같이 초기 세포농도를 10×10^4 cells/ml에서 54×10^4 cells/ml로 높여줌에 따라 비성장속도가 증가하다가 세포농도를 더이상 증가시켜주면 비성장속도는 오히려 감소하는 경향을 볼 수 있었다. 세포 배가시간도 초기세포농도에 따라 27.7 시간에서 83.3 시간까지 넓은 범위를 보여주고 있다. 이와 같이 세포농도에 따른 비성장속도의 변화 경향을 정량적인 모델식으로 표현하면 회분배양 및 유가배양에서 세포 성장속도 및 세포농도를 효과적으로 예상하는데 사용할 수 있을 것이다. 따라서, 세포 성장속도에 대한 세포농도의 영향이 기질저해 또는 산물저해 형태를 보여주고 있다는 실험 결과를 근거로 다음과 같은 모델식을 사용하기로 하였다.

$$\mu = \mu_m \frac{X}{K_x + X} \left[1 - \frac{X}{X_m} \right]^n \quad (1)$$

여기서 μ , K_x , X_m , n 은 각각 비성장속도 (1/h), 세포 저

Table 2. The effect of initial cell density on specific growth rate^a

Initial cell density (× 10 ⁴ cells/ml)	Specific growth rate (1/hr)
12	0.0230
17	0.0235
25	0.0289
37	0.0302
47	0.0331
54	0.0361
66	0.0325
76	0.0303
98	0.0203
123	0.0198
157	0.0120

^aThe specific growth rates were determined by linear regression of early exponential growth phase data and each value represents the average of three cultures.

해 상수 (cells/ml), 최대 세포농도 (cells/ml) 및 맞춤형수이다. 위의 모델식은 세포 농도 변화에 따른 비성장 속도 변화를 설명해 줄 수 있으며, 이 식은 하이브리도마 세포 회분 또는 유가배양시 성장 속도나 세포 농도를 예측하는데 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 유가배양에서 포도당 소비속도(q)에 맞추어 포도당을 최적으로 공급해주면 젖산의 생성을 줄일 수 있는데, 이 때 포도당 소비속도 변화는 수율이 일정한 경우 $q = \mu / Y_{x/s}$ 식을 이용하면 세포성장속도 변화를 이용하여 포도당 소비속도를 측정할 수 있으므로 유가배양에서 포도당 공급속도 결정에도 유용하게 사용될 수 있다.

포도당 농도 조절식 유가배양

하이브리도마 배양시 생물반응기내에 젖산 축적에 의한 항체 생산성 저하 방지 및 포도당 수율을 향상시키기 위해 포도당 소비속도만큼 포도당을 공급해주는 유가배양을 실시하였다. 이는 포도당의 젖산으로의 전환에 영향을 주는 인자 분석실험을 통하여 고농도의 포도당을 제공하는 것보다는 세포들이 소비하는 만큼 포도당을 적절히 공급하여 잉여분의 포도당이 젖산으로 전환되는 것을 막아주는 것이 필요함을 알 수 있었기 때문이다. 우선, 포도당 공급 전략을 세우기 위해 유가배양 상태방정식을 유도하였다. 포도당에 대한 물질수지식을 세우면,

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F(S_f - S)}{V} - qX \tag{2}$$

여기에서 S, S_f, F, V, X, q는 각각 생물반응기에서의 포도당 농도 (mol/L), feeding 용액에서의 포도당 농도 (mol/L), 포도당 공급 속도 (L/h), 생물반응기 부피 (L), 세포 농도 (cells/ml) 및 포도당 소비속도 (mol/cells · h)이다. 포도당은 공급된 만큼 소비되고 반응기내의 포도당의 축적이 없다고 하면, 위 식은 다음과 같이 변경시킬 수 있다.

$$F = \frac{qXV}{S_f} \tag{3}$$

위 식에서 q = $\mu / Y_{x/s}$ 식을 이용하여 포도당 공급속도는 세포 성장속도로 대체 시킬 수 있으며, (2)식은 다음과 같이 변경할 수 있다.

$$F = \frac{\mu XV}{Y_{x/s} S_f} \tag{4}$$

위 식에서 일정 농도의 농축된 포도당을 공급하므로 유가배양에서 부피 변화는 무시할 수 있으므로 S_f와 V는 일정하다고 볼 수 있고, 세포 배양 동안 포도당으로부터의 세포 수율도 비교적 일정하므로 포도당 공급속도는 μX 항에 의해 결정된다. KA-112 하이브리도마의 배수기간이 27 h 정도이므로 6 시간 간격으로 식 (1)을 이용하여 μ 값을 결정하고 이에 따른 해당 세포 농도를 $dX/dt = \mu X$ 식을 이용하여 결정한 후 해당되는 포도당 공급속도 F를 결정하여 공급하였다.

Fig. 6은 회분배양 (초기 포도당 농도: 4.5 g/L) 및 유가배양 결과를 나타내고 있다. 세포 농도의 경우 회분배양에 비해 유가배양에서 최고 세포농도에서는 약간의 증가만 가져왔으나, 회분배양에서는 성장정지기가 유지되지 못하고 사멸기로 직접 접어드는 반면 유가배양의 경우 성장정지기가 12시간 가량 더 유지되고 있음을 볼 수 있었다. 따라서 유가배양에서의 적분세포농도가 회분식에 비해 높아졌음을 알 수 있었다. 또한, Fig. 6에 제시된 바와 같이 회분배양 및 유가배양에서의 누적 포도당 농도 및 젖산 농도 변화 (cumulative glucose and lactate concentration)를 살펴보면, 유가배양에서는 소비된 전체 포도당은 더 많았음에도 불구하고 포도당 농도를 알맞게 유지시켜 공급해

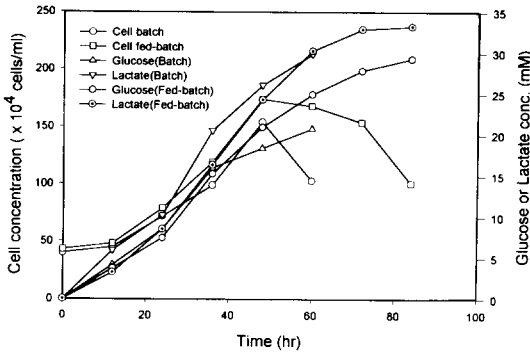


Fig. 6. Cell concentration profiles, cumulative glucose consumption and lactate production of batch and fed-batch cultures.

향상시키기 위해서는 배양환경에 의해 유해 대사산물 생산이 어떤 식으로 변화되는가에 대한 이해가 필요하다. 세포성장과 단일균향체 생산을 저해시키는 대사물질 중에 하나인 젖산의 생성을 줄이기 위해, 포도당의 젖산으로의 전환율에 영향을 미치는 인자들에 대해 연구하였다. 초기 포도당 농도가 높을수록, 세포 성장이 빠를수록 젖산으로의 전환율이 커짐을 알 수 있었다. 또한, 세포농도에 따른 비성장속도 변화에 대한 모델식을 기초로 하여 포도당 소비속도만큼 포도당을 공급하는 유가배양을 통해 젖산 생성을 19% 감소시켰고, 적분세포 농도 증가를 통해 단일균향체 생산성을 41% 향상시킬 수 있었다.

Table 3. Comparison of glucose-controlled fed-batch culture with batch culture

	Batch	Fed-batch
Integrated cell concentration ($\times 10^4$ cells/ml)	5276	9928 (88% inc.)
$\frac{\text{Integrated cell conc.}}{\text{Glucose consumption}}$ ($\times 10^4$ cells/mmol)	254	339 (33% inc.)
$\frac{\text{Produced Lactate conc.}}{\text{Used Glucose conc.}}$ (mmol lac/mmol glc)	1.44	1.33 (19% inc.)
Relative Final MAbs Titer (%)	100	141 (41% inc.)

중으로써 젖산 생성을 회분배양과 같은 수준으로 낮추어 줄 수 있었다. 소모된 포도당에 대한 생성된 젖산의 농도 비로 전환비율을 구해보면 회분배양에서는 1.44인데 비해 유가배양은 1.13으로 젖산으로의 전환율을 약 19% 정도 줄일 수 있었다. 또한, 적분세포농도 증가에 따른 최종 단일균향체 농도도 약 41% 정도 증가됨을 알 수 있다 (Table 3). 따라서, 젖산으로의 전환율에 영향을 미치는 인자들에 대한 실험 결과를 바탕으로 세포들의 포도당 소비 속도에 맞추어 포도당을 공급해 중으로써 젖산 생성을 줄일 수가 있었으며, 적분세포농도를 88% 정도 증가시켜 단일균향체 생산성도 41% 정도 향상시킬 수 있었다.

요 약

하이브리도마 세포 배양을 통한 단일균향체 생산성을

참 고 문 헌

1. Batt, B. C. and Kompala, D. S. 1989. A structured kinetic modelling framework for the dynamics of hybridoma growth and monoclonal antibody production in continuous suspension cultures. *Biotech. Bioeng.* **34**, 515-531.
2. Freshney, R. 1986. *Animal cell culture : a practical approach*. IRL press, New York.
3. Glacken, M. W. 1987. Development of mathematical description of mammalian cell culture kinetics for the optimization of fed batch bioreactors. Ph. D. Thesis, M.I.T., USA.
4. Glacken, M. W. 1988. Catabolic Control of Mammalian Cell Culture. *BioTechnology* **6**, 1041-1050.
5. Glacken, M. W., Fleishaker, R. J. and Sinskey, A. J. 1986. Reduction of waste product excretion via

- nutrient control : Possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian cells. *Biotech. Bioeng.* **28**, 1376-1389.
6. Hu, W. S., Dodge, T. C., Frame, K. K. and Himes, V. B. 1987. Effect of glucose on the cultivation of mammalian cells. *Develop. Biol. Standard* **66**, 279-290.
 7. Jeh, H. S. 1989. Development of LSM and SFM medium for mouse-mouse hybridoma and perfusion culture of hybridoma in the developed medium. M.S. Thesis, Dept. of Chem. Tech., Seoul Nat. Univ., Korea.
 6. Lee, D. and Park, H. 1998. Influence of amino acid and vitamin addition on the growth and metabolism of a hybridoma in batch culture. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **13**, 289-294.
 7. Miller, W. M., Wilke, C. R. and Blanch, H. W. 1987. Effects of dissolved oxygen concentration on hybridoma growth and metabolism in continuous culture. *J. Cell. Physiol.* **132**, 524-530.
 8. Miller, W. M., Wilke, C. R. and Blanch, H. W. 1988. A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in batch and continuous suspension culture: effect of nutrient concentration, dilution rate, and pH. *Biotech. Bioeng.* **32**, 947-965.
 9. Miller, W. M., Wilke, C. R. and Blanch, H. W. 1988. Transient and steady-state responses in continuous hybridoma culture, 196 ACS National Meeting, LA, U.S.A.
 10. Reitzer, L. J., Wice, B. M. and D. Kennell. 1980. The pentose cycle. *J. Biol. Chem.* **255**, 5616-5626.
 11. Rernard, J. M., Spagnoli, R., Mazier, C., Salles, M. F. and Mandine, E. 1988. Evidence that monoclonal antibody production kinetics is related to the integral of the viable cells curve in batch systems. *Biotech. Letters* **10**, 91-96.
 12. Stein, K. E. 1997. Overcoming obstacles to monoclonal antibody product development and approval. *Trends in Biotechnol.* **6**, 2-6.
 13. Zielke, H. R., Ozand, P. T., Tildon, J. T., Sevdalian, D. A. and Camblath, M. 1976. Growth of human diploid fibroblasts in the absence of glucose utilization. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **73**, 4110-4114.
 14. Zielke, H. R., Ozand, P. T., Tildon, J. T., Sevdalian, D. A. and Camblath, M. 1978. Reciprocal regulation of glucose and glutamine utilization by cultured human diploid fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* **95**, 41-48.