

# 단일클론항체 정제에서 Mabselect Sure를 이용한 용출조건 최적화

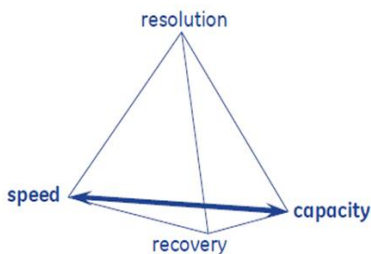
## <Summary>

### Mabselect Sure에서의 용출조건 변화에 따른 최적화 전략

- pH level: pH가 낮으면 용출력이 강하나 안정성이 떨어지고, pH가 높으면 안정성은 좋으나 용출력이 낮아지므로 용출된 단일클론항체의 특성에 따른 적절한 pH 조건 선택
- Stabilizer/Enhancer: 낮은 pH에서의 단일클론항체의 안정성을 높이기 위해 NaCl 등의 Stabilizer를 사용하거나, 높은 pH에서의 용출력을 향상시키기 위한 Urea 등 사용
- pH 전환도: 버퍼농도에 따른 pH 전환에 따라 용출되는 패턴이 달라지며 일반적으로 빠른 pH 전환이 선호됨

## <Introduction>

세포배양을 통해 얻은 단백질을 정제할 경우, 첫번째 Capture 단계는 세포에서 유래된 효소 (특히, protease) 들로 인한 단백질 변성들을 방지하고 기타 유래된 불순물들을 제거하기 위한 가장 중요한 단계입니다. Capture 단계의 경우, 정제의 주요 factor인 수용력(Capacity), 품질 (Quality & Resolution), 수율 (Yield & Recovery), 속도 (Speed) 중에서 많은 양 (High capacity)을 빠른 시간(high speed)안에 정제하는 것이 중요합니다.



이 단계에서 항체의 경우 친화성을 이용한 Protein A 컬럼을 사용하는 것이 많은 장점이 있으며, 이 경우 기본적으로 중성 pH 조건에서 흡착을 시킨 뒤, 낮은 pH를 이용하여 목적물질을 탈착 시키게 됩니다. 하지만 낮은 pH에서는 단백질의 변성이 일어나기 때문에 안정제 또는 용출을 돕기위한 enhancing agent들을 첨가하기도 하며, buffer 자체의 농도를 조절하기도 합니다. 이러한 과정에서 목적물질이 잘 탈착되면서도 안정성을 유지하는 적절한 조건을 선별하는 것이 필요합니다

## <Purpose>

이번 application note에서는 단일클론항체를 정제하기 위해서, Akali-stable하여 CIP (cleaning-in-place) 가 용이하도록 디자인된 Mabselect Sure 컬럼을 사용하여 용출 pH 조건 검색 및 첨가제 또는 pH 전환에 대한 조건을 찾는 실험을 하였습니다. 즉, 각각의 조건에서 정제된 검체를 가지고, 흡광도를 이용한 단백질 정량, SEC를 통한 응집체 (Dimer/Aggregate, D/A) 비율 분석 및 용출 부피와 pH 등의 분석을 함으로서 1> 수율이 높고, 2> 응집체의 비율이 낮으면서도, 3> 다음 단계를 위한 용출 불륨이 작은 조건을 찾는 최적화 실험을 진행하였습니다.

**<Materials & Experiment Conditions>**

- 컬럼: MabSelect SuRe packed in Tricon5/10 (CV=2ml)
- 시스템: AKTA System (AKTAavant, AKTApurifier plus)
- 유속: 250cm/hr (RT: 2.4 min for 10cm bed height)
- 검체: 22 ml \* CHO-CCF (검체 내 단클론항체 농도 - 약 1.8mg/ml)
- 버퍼: Phosphate buffer +150mM NaCl (pH 7.4), Citrate buffer (pH 3.2-3.8) with/without additives

실험	목적	buffer A (loading buffer)	buffer B (elution buffer)
실험 1	pH 검색	20mM Phosphate + 150mM NaCl	20mM Citrate (pH 3.2/3.4/3.6/3.8)
실험 2	용출력 ↑	20mM Phosphate + 150mM NaCl	20mM Citrate + 1M Urea
	안정도 ↑	20mM Phosphate + 150mM NaCl	20mM Citrate + 0.1M NaCl
실험 3	pH전환도	20mM Phosphate + 150mM NaCl	100mM Citrate (for sharp curve)
		50mM Phosphate + 150mM NaCl	10mM Citrate (for shallow curve)

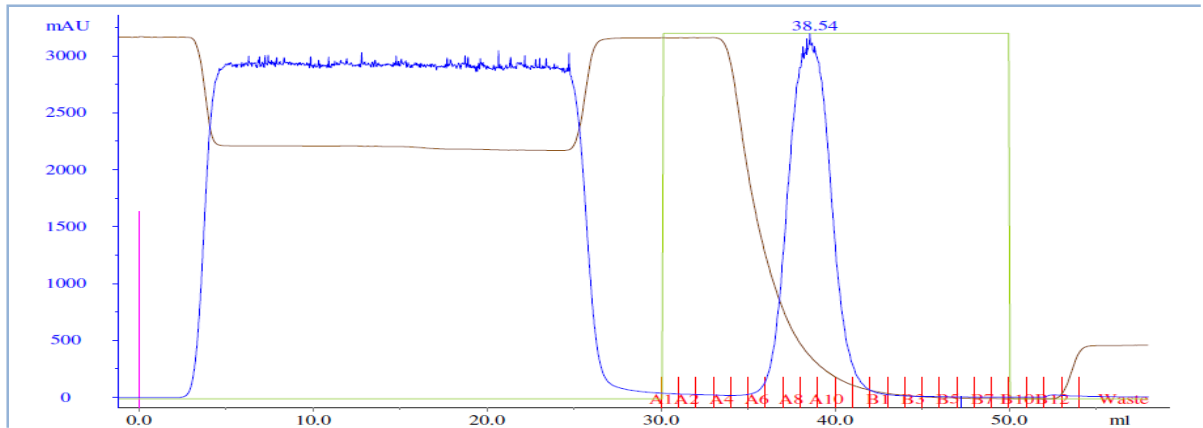
**<Analysis>**

- pH측정: pH monitor
- 농도측정: UV Absorbance at 280nm
- Dimer/Aggregate (D/A) : SEC on Superdex 200 in Tricorn 10/300

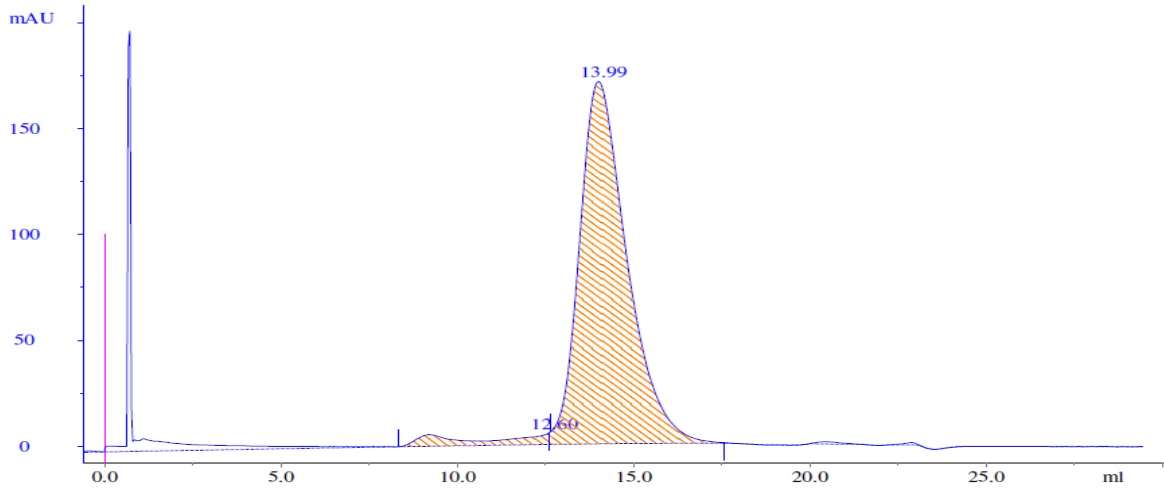
**<Experiments>**

실험 1: 용출 pH 조건 검색

단클론 항체의 경우 대부분 중성 pH에서 protein A 리간드에 흡착하고 산성조건에서 탈착되게 됩니다. 산성도가 높을수록 용출력이 높아지지만 단백질의 변성도도 같이 올라가기 때문에 해당 검체에서의 적절 조건을 찾기 위해 pH 3.2~3.8 용출 조건에 대해서 실험을 진행하였으며, 각 조건에서의 용출된 검체에 대해 침전물 (육안) 또는 이량체/응집체의 생성여부 (SEC), 산출량 계산을 위한 농도 측정 (UV)를 측정하여 평가를 진행하였습니다.



<그림 1. Mabselect Sure column에서의 chromatogram의 예시>



<그림 2. Superdex 200 column에서의 chromatogram의 예시>

이에 대한 결과를 요약하면 아래와 같습니다.

pH	Pool vol	Precipitation	D/A (%)	Yield (conc.)
pH 3.2	2.5 CV	O	22%	78%
pH 3.4	2.5 CV	O	9%	80%
pH 3.6	6 CV	X	1.1%	89.1%
pH 3.8	8 CV	X	0.33%	54.6%

기본적으로 1단계에서의 응집체의 비율은 10%가 넘지 않는 것이 좋습니다. 이러한 조건에서 Yield가 높은 pH 3.4와 3.6를 비교하자면, pH 3.6은 침전도 없고 응집체의 비율은 높지만 용출부피가 상대적으로 너무 크며, pH 3.4의 경우는 용출부피는 적절하지만 침전물이나 응집체의 형성이 상대적으로 높은 부분이 있습니다. 이 두 조건을 이용하여 실험 2에서 각 조건에 대한 modification을 진행하였습니다.

### 실험 2: 용출 조건 최적화

실험 1에서 검색된 조건에 대해서 pH 3.6의 경우는 상대적으로 높은 pH에서 단백질의 안정성은 높아졌지만 용출력이 작아져서 용출부피가 늘어났기 때문에 해당 pH에서 용출력을 늘려줄 수 있는 enhancer로서 Urea를 사용하였습니다. 반대로 pH 3.4의 경우는 용출부피는 적절하지만 산성도에 따른 단백질의 변성을 낮추기 위해 안정제로서 NaCl을 사용하여 실험을 진행하였으며, 각각의 실험은 실험 1과 동일한 방법으로 결과를 분석하였습니다.

용출력을 증가시키기 위한 첨가제를 사용한 실험 비교 결과는 아래와 같습니다.

	Elution Buffer	Elution vol	Precipitation	D/A	Yield
실험 1	20mM Citrate (pH 3.6)	6.0 CV	X	1.1 %	89.1 %
실험 2	상동+1M Urea (pH 3.6)	3.0 CV	X	4.6 %	87.5 %

Urea를 첨가한 경우 비슷한 level의 Yield와 낮은 D/A level을 유지하면서도 용출력의 증가로 인해 용출부피가 50% 정도 줄어든 것을 볼 수 있었습니다.

낮은 전도도에서의 항체의 안정성이 저하되는 경향이 있기 때문에 안정제의 일종으로 NaCl을 첨가하여 실험한 결과는 아래와 같습니다.

	Elution Buffer	Elution vol	Precipitation	D/A	Yield
실험 1	20mM Citrate (pH 3.4)	2.5 CV	O	9.0%	80.0 %
실험 2	상동+100mM NaCl (pH 3.4)	3 CV	X	3.2 %	82.6 %

NaCl을 첨가한 경우 침전물의 생성도 관찰되지 않으면서도 D/A level도 60% 정도 낮아진 것을 통하여 전반적인 안정성이 높아진 것을 확인할 수 있었습니다.

### 실험 3: buffer strength에 따른 pH 전환도 영향 조사

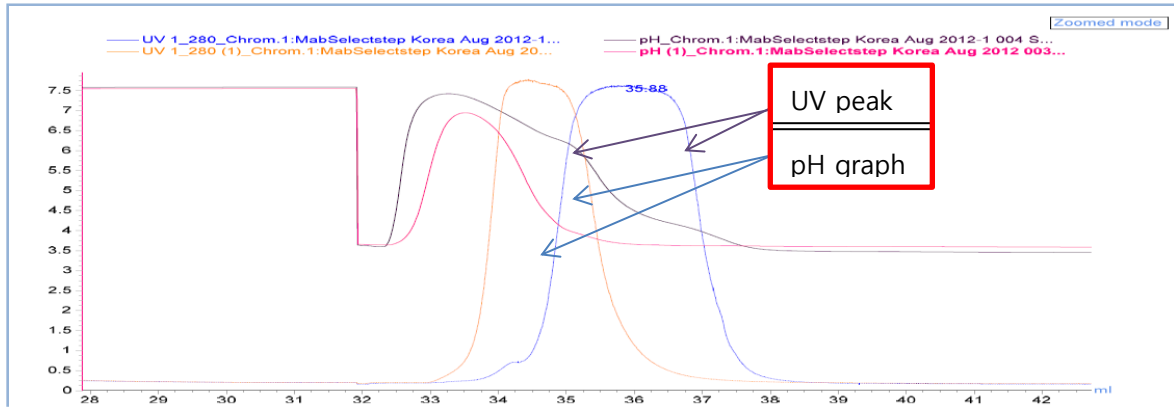
실험 1, 2에서 일정 조건하에서의 pH와 첨가제 추가 유무에 따른 용출 조건의 최적화를 간단하게 살펴보았다면, 이에 추가하여 buffer strength에 따라서 step gradient에서의 pH의 변화가 단백질의 용출에 어떠한 영향을 미치는 지에 대해서 살펴보도록 하겠습니다.

이에 대한 실험 분석 결과는 아래와 같습니다.

	Buffer	pH 전환시 소요된 Vol	Precipitation	D/A	Yield
실험 3A (Sharper)	20mM Phosphate → 100mM Citrate	1.1 CV	X	6.0 %	77.8%
실험 1 (Standard)	20mM Phosphate → 20mM Citrate	1.7 CV	O	9.0 %	77.8 %
실험 3B (Shallower)	50mM Phosphate → 10mM Citrate	2.5 CV	O	4.4 %	74.4 %

Buffer 농도에 따라서 pH 전환에 걸리는 용량이 달라지는 것을 볼 수 있으며, 각각의 경우 침전물의 생성여부를 볼 수 있었습니다.

pH 전환도가 sharp한 경우와 shallow 한 경우에 따른 크로마토그램의 profile은 아래의 그래프를 통해 살펴보도록 하겠습니다.



Elution buffer의 buffer strength가 강한 경우에는 pH가 sharp하게 변하기 때문에 앞쪽에서 elution이 일어나게 되며 피크가 sharp하게 나타나며, binding buffer의 strength가 강하고 elution buffer strength가 약한 경우에는 binding buffer에서의 완충효과가 크게 나타나기 때문에 pH 전환이 느리게 나타나면서 elution peak가 뒤쪽에서 나타나면서도 약간 broad해지는 경향을 볼 수 있습니다. 이를 보아서 pH전환이 sharp 한 경우, 용출부피가 작으면서도 용출버퍼의 농도에 따른 전도도가 높아짐에 따른 안정성이 높아져서 침전물도 관찰되지 않은 것을 기반으로 pH 전환이 shallow한 것에 비해 이로움을 관찰하였습니다.

#### <Conclusion>

상기의 실험에서 해당 단일클론항체의 경우, 수율과 용출부피 및 응집체의 비율을 고려하여 pH 3.4와 pH 3.6의 조건을 선택하여 각각의 조건을 향상할 수 있도록 실험을 설계하였습니다. 즉, pH 3.4의 경우에는 응집체의 비율을 줄일 수 있도록 안정제를 첨가하는 전략과, pH 3.6의 경우에는 용출부피를 줄일 수 있는 향상제를 첨가하는 전략을 사용하여 해당 조건에서의 향상된 점을 확인 하였습니다. 또한 buffer 자체의 농도를 변화시켜 pH의 transition rate가 정제에 미치는 영향을 통해 기본적으로는 빠른 pH 전환이 정제 조건을 조금 더 향상시킬 수 있는 점도 확인할 수 있었습니다. 이러한 결과를 통해 단일클론항체를 protein A 컬럼을 사용하여 정제할 경우 낮은 pH에서는 용출력은 높아서 쉽게 흡착된 물질이 분리되지만 안정성이 낮아 침전물이나 응집물이 생기기 쉽기 때문에 목적 단백질의 특성에 적절한 pH를 찾는 것이 필요함을 확인하였습니다. 또한 선택한 pH 조건에서 Enhancer/Stabilize와 같은 첨가제를 사용하는 경우, 안정성 증가 (침전X, D/A level 60% 감소) 및 용출력 증가에 따른 용출부피가 50% 줄어든 것을 통해 목적에 따른 결과가 향상됨을 관찰하였습니다. 마지막으로 흡착과 탈착에 사용된 buffer 농도에 따른 pH 전환도에 따라 용출부피의 감축 및 목적 단백질의 안정성이 다름을 살펴봄으로서 빠른 pH 전환이 프로세스에 유리함을 확인할 수 있었습니다.

이번 실험에서는 단순히 수율과 응집체 비율 등으로 평가를 진행하였지만, 추가적으로 단백질의 특성에 맞는 추가적인 분석이 실제의 프로세스에는 필요합니다. 하지만 이번 실험을 통한 이해도를 기반으로 “조건 screening → 프로세스 최적화 조건 적용 → 프로세스 조건 확립” 과 같은 정제 전략을 실제 조건에서 적용할 수 있을 것입니다.

#### <References>

Affinity Chromatography & Experimental Parts in FastTrak MAB1 Training, GE Healthcare Lifesciences