

항체 역가(titer) 측정을 위한 견고하고 신뢰할 수 있는 재조합 Protein A Monolith 컬럼

저자

Te-Wei Chu 및 Andrew Coffey
Agilent Technologies, Inc.

개요

조세포 배양 상청액의 신속한 스크리닝을 통해 바이오 치료제 항체를 제조하는 동안 최적의 harvest 시기에 대한 결정을 내릴 수 있습니다. 재조합 Protein A 친화성 리간드와 함께 Bio-Monolith 컬럼을 사용하면 몇 가지 장점이 있습니다. 첫째, Bio-Monolith 구조는 막힘 위험을 최소화하는 넓은 관통 구멍을 가지고 있습니다. 둘째, 재조합 Protein A를 사용하면 비변성 Protein A와 관련된 IgG에 대해서는 선택성을 제공하면서도 더 높은 리간드 순도와 더 견고한 구조를 갖습니다. 마지막으로, 이 컬럼은 소규모 정제에도 사용할 수 있으므로 특히 주요 품질 속성(CQA)을 결정할 때 다른 분석 기술을 적용할 수 있습니다.

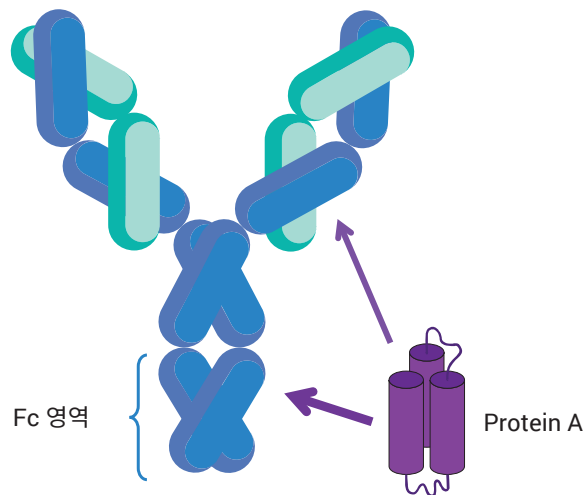


그림 1. Protein A와 면역글로블린 G(IgG)의 상호 작용

서론

비변성 Protein A는 황색 포도상구균 (Staphylococcus aureus)에서 분리된 표면 단백질로, 다양한 화학종의 다양한 면역글로블린 유형의 Fc 영역에 대해 높은 결합 친화성을 가지고 있습니다. 비변성 Protein A 친화성 크로마토그래피는 조세포 배양 상청액에서 단일 클론 항체를 정제하는 데 선택되는 방법입니다. 재조합 Protein A는 더 순수한 형태로 생산할 수 있고 고정상에 고정되어 최적의 결합을 위한 이상적인 방향을 형성하도록 설계할 수 있기 때문에 추가적인 이점을 제공할 수 있습니다.

또한 세포 배양 상청액의 조잡한 특성으로 인해 손상될 수 있는 컬럼 수명을 개선하는 데도 도움이 됩니다. 이는 비변성 Protein A 컬럼보다 컬럼 클린업에 필요한 가혹한 조건을 더 잘 견딜 수 있기 때문입니다.

이 응용 자료에서는 새로운 애질런트 재조합 Protein A Bio-Monolith 컬럼의 수명을 테스트합니다.

실험

시약 및 화학물질

모든 화학물질과 시약은 HPLC 등급 이상이었으며 Sigma-Aldrich(현재 Merck) 또는 VWR Scientific에서 구입했습니다. 물은 Milli-Q A10(Millipore)을 이용해 얻었습니다.

시료

1mg/mL의 재조합 IgG 단일 클론 항체를 포함하는 바이오투어에서 수집한 조약한 중국 햄스터 난소(CHO) 조세포 배양 상청액을 시료로 사용했습니다.

기기

Agilent 1260 Infinity II bio-inert LC 구성:

- Agilent 1260 Infinity II bio-inert 펌프 (G5654A)
- Agilent 1260 Infinity II bio-inert multisampler(G5668A), 시료 냉각기 (옵션 #100) 포함
- Agilent 1260 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(G7116A), 생체 불활성 열교환기(옵션 #019) 포함
- Agilent 1260 Infinity II 가변 파장 검출기 (G7114A)

분석법 조건

HPLC 조건	
컬럼	Bio-Monolith rProtein A, 4.95 × 5.2mm (품번 5190-6903)
결합 완충액 (용리액 A)	50mM 인산나트륨, pH 7.4
용리 완충액 (용리액 B)	100 mM 시트르산, pH 2.6
클린업 완충액	1) 100mM 인산나트륨 중 1M NaCl, pH 7.4 2) 50mM 인산나트륨 중 20% 이소프로판올, pH 7.4
그라디언트 프로파일	시간 %B 0.0 ~ 0.5 0 (결합) 0.6 ~ 1.8 100 (용리) 1.9 ~ 4.0 0 (재처리)
유속	1mL/분
컬럼 온도	24°C
검출	UV, 280nm
주입부피	필요한 만큼(1 ~ 20µL)

결과 및 토의

Bio Monolith rProtein A 컬럼의 견고성을 조사하기 위해 이전 연구¹보다 훨씬 더 높은 수준의 숙주 세포 단백질을 포함하는 조세포 배양 상청액을 선택했습니다.

결합, 용출 및 컬럼 재처리를 위한 단계적 기울기를 포함하는 반복적 시퀀스가 사용되었으며 매 250번째 주입의 결과를 그림 2, 3 및 4에 나타냈습니다. 1,500회 주입 후, 클린업 완충액을 사용하여 컬럼 재생 단계(분석법 조건 참조)를 도입했으며, 이후 500회 주입마다 수행했습니다. 이러한 까다로운 조 시료 매트릭스에서 예상되는 바와 같이 점진적인 압력 증가가 관찰되었습니다(그림 5).

그러나 정기적인 세척을 통해 컬럼은 그림 6 및 7에 나타낸 바와 같이 3,000회 주입 동안 일관되고 신뢰할 수 있는 피크 면적과 역가 (titer) 분석을 계속해서 제공했습니다.

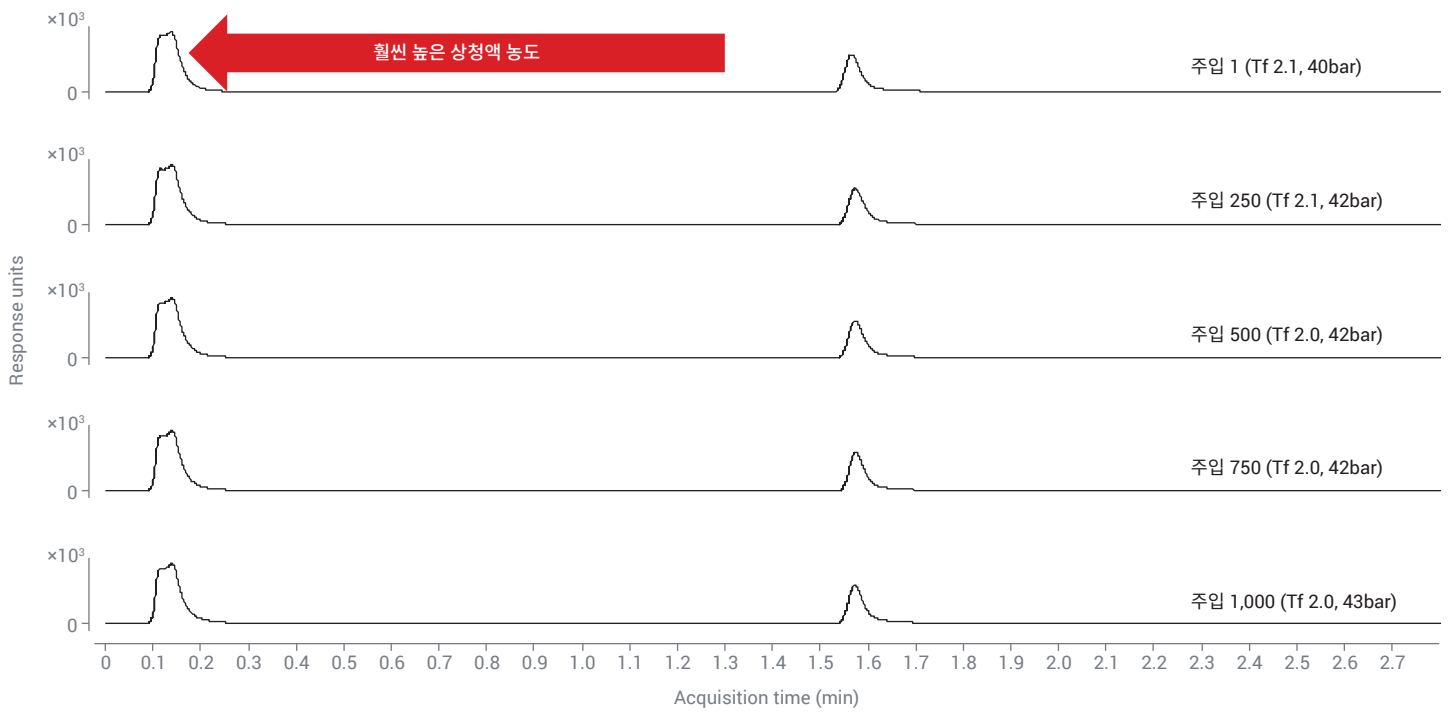


그림 2. Agilent Bio-Monolith rProtein A 컬럼 수명: 주입 횟수 1 ~ 1,000

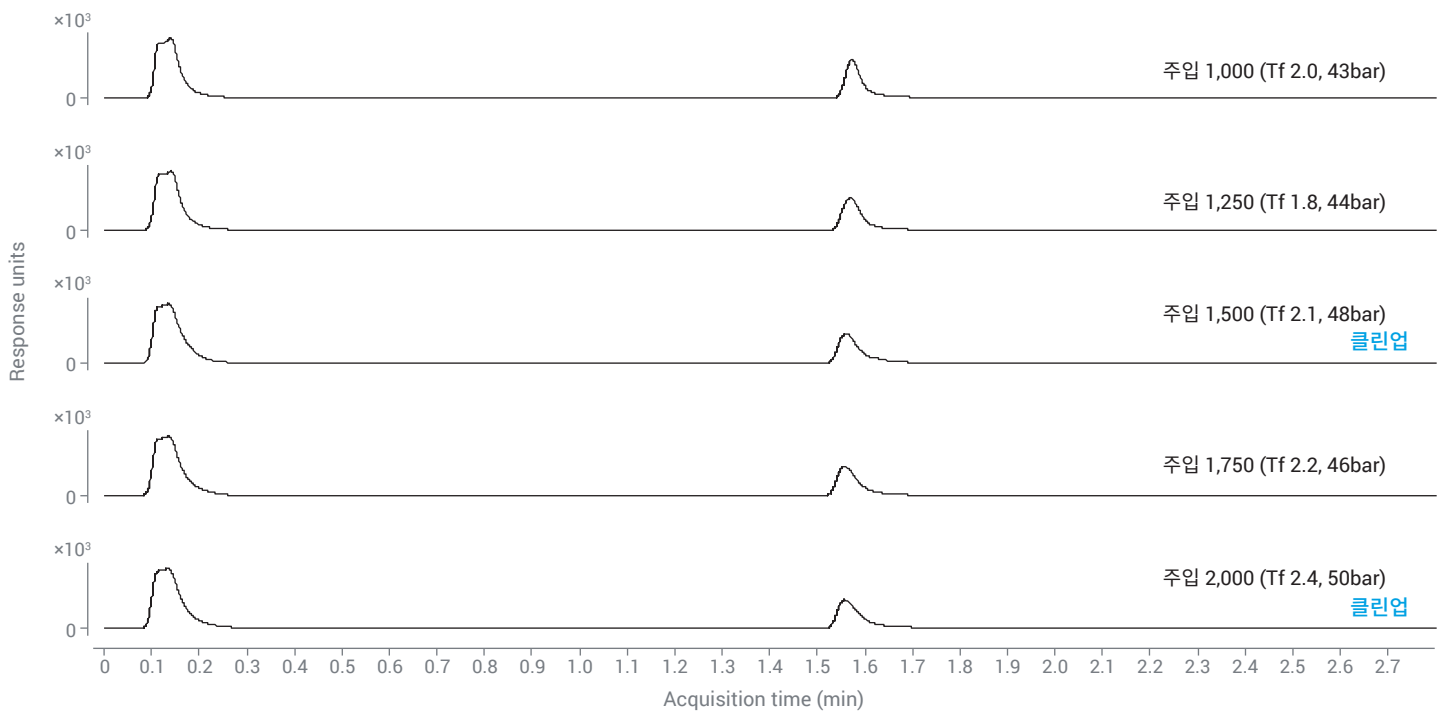


그림 3. Agilent Bio-Monolith rProtein A 컬럼 수명: 주입 횟수 1,000 ~ 2,000

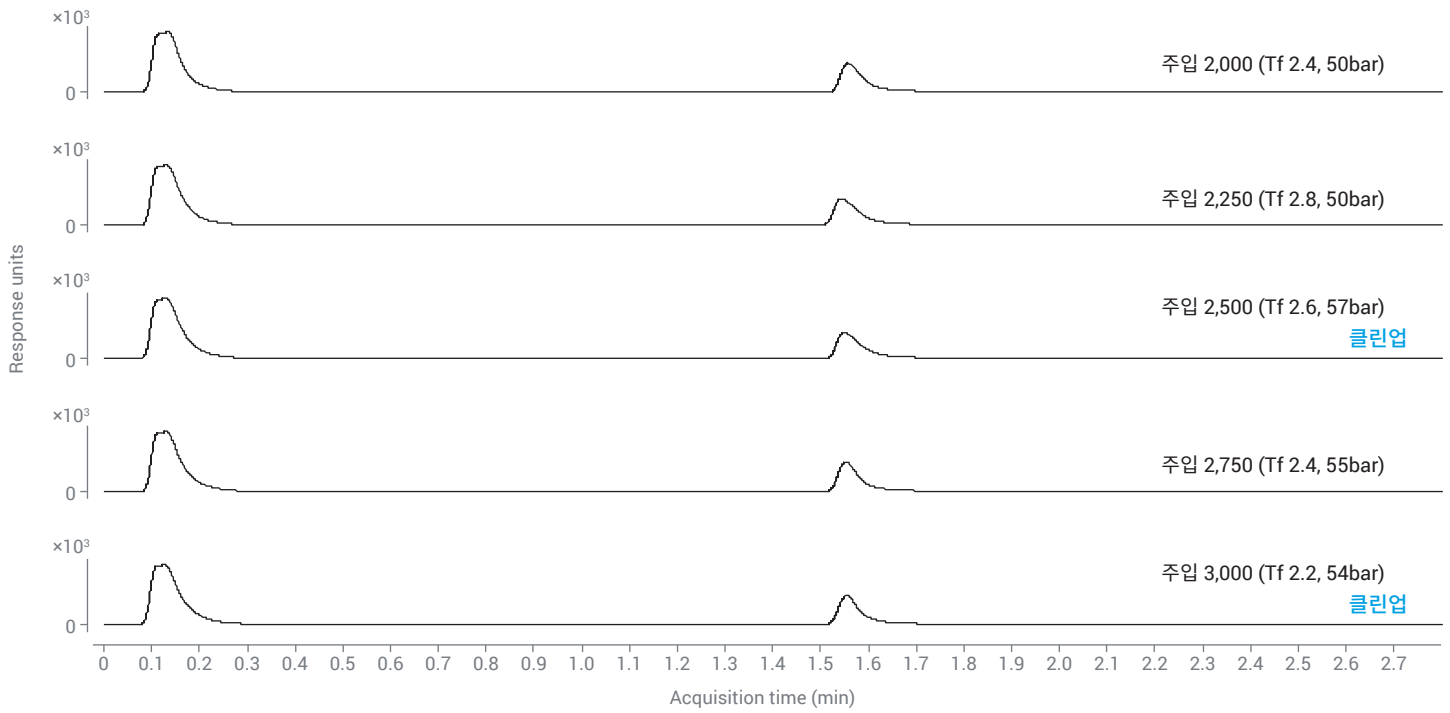


그림 4. Agilent Bio-Monolith rProtein A 컬럼 수명: 주입 횟수 2,000 ~ 3,000

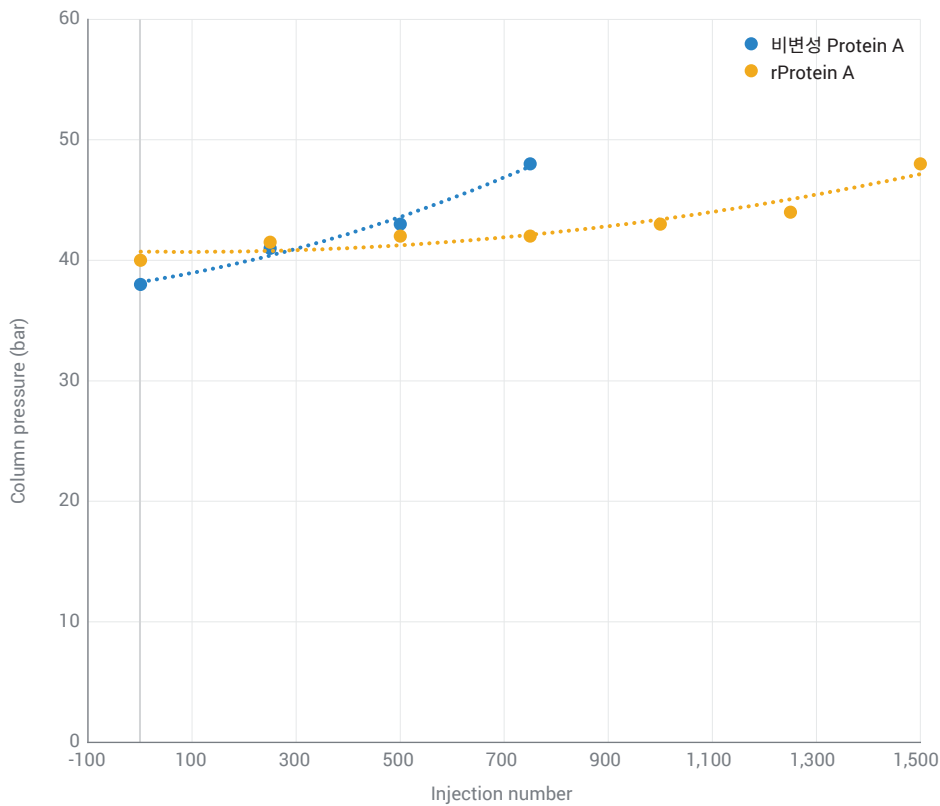


그림 5. 수명 기간 동안 컬럼 압력 대 주입 횟수

표 1. 수명 기간 동안 컬럼 압력 대 주입 횟수

주입	비변성 Protein A	rProtein A
1	38.0	40.0
250	41.0	41.5
500	43.0	42.0
750	48.0	42.0
1,000		43.0
1,250		44.0
1,500		48.0

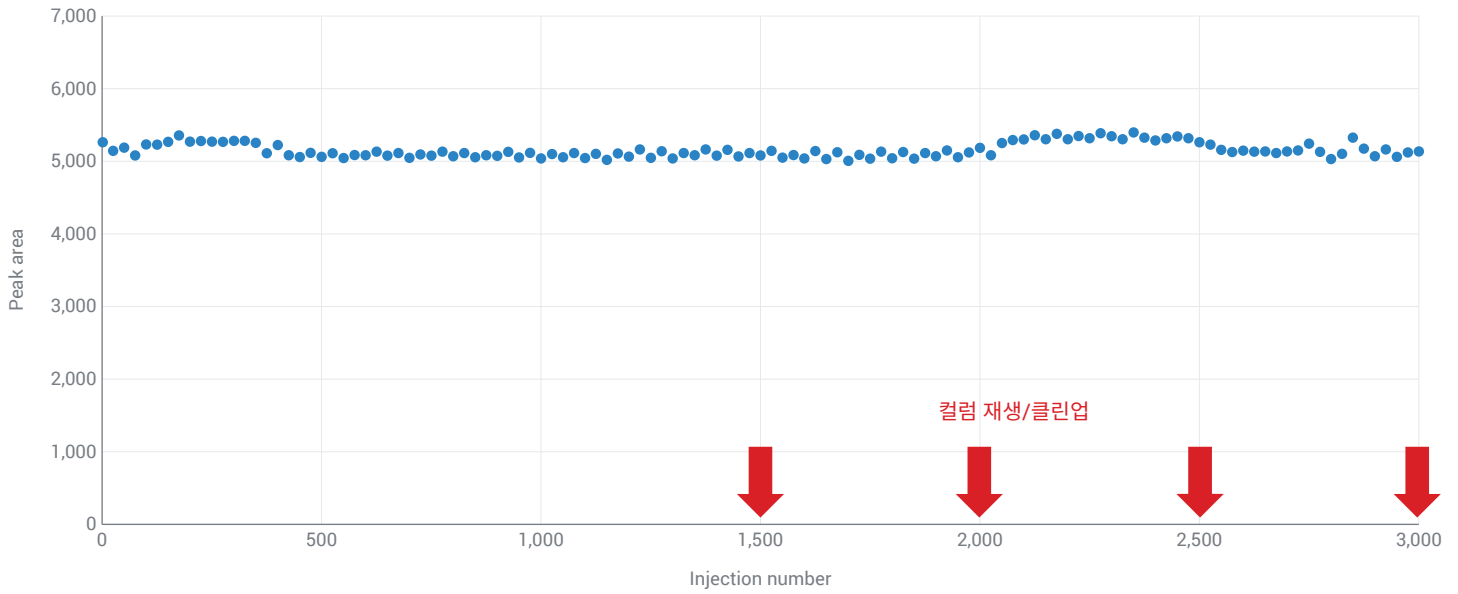


그림 6. 컬럼 수명 동안 피크 면적 대 주입 횟수

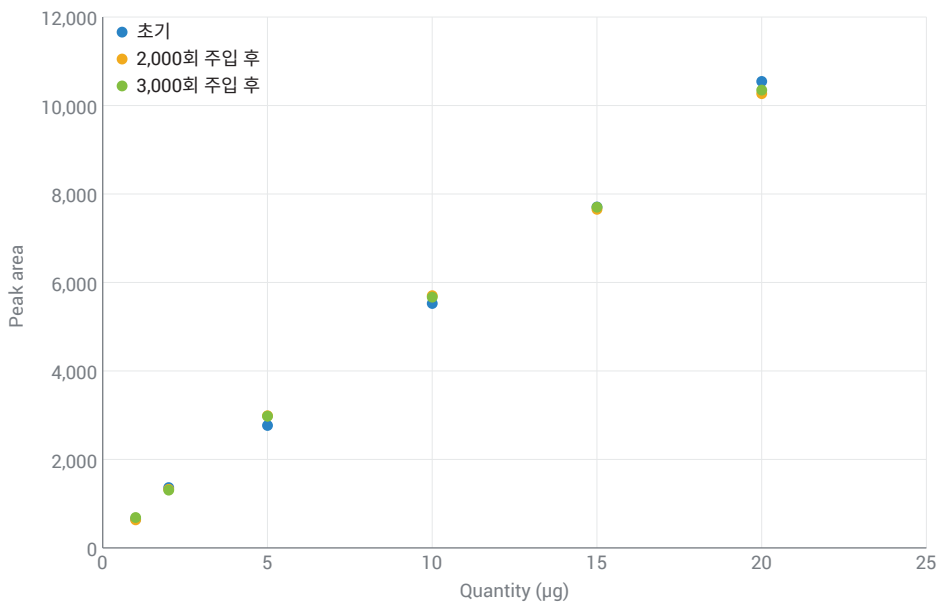


그림 7. 컬럼 수명 동안 피크 면적 대 주입량(µg)

표 2. 컬럼 수명 동안 피크 면적 대 주입량(µg)

주입량 (µg)	초기	2,000회 주입 후	3,000회 주입 후
1	654	633	688
2	1,363	1,323	1,308
5	2,766	2,984	2,979
10	5,526	5,699	5,666
15	7,706	7,653	7,699
20	10,541	10,268	10,347

결론

이 응용 노트에서는 Bio-Monolith rProtein A 컬럼이 동등한 비변성 Protein A 컬럼에서 관찰된 결과 이상으로 역가(Titer) 분석에서 일관되고 신뢰할 수 있는 성능을 발휘할 수 있음을 입증했습니다.

참조

1. Coffey, A.; Kondaveeti. Improved Lifetime of Bio-Monolith Protein A Columns for Titer Determination. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-2168EN, **2020**.

www.agilent.com/chem

DE44232.1414699074

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
2021년 2월 16일 화요일, 한국에서 인쇄
5994-3088KO

한국에질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com