

Study on stability test of in process sample of recombinant Protein A

Yoo Gon Kim[★], Woo Jong Lee, Chan Hee Won¹ and Chul Soo Shin²

Korea Institute of Industrial Technology

GyeongGi Bio-Center, 864-1, Lui-Dong, Yeongtong-Gu, Suwon-City, Gyeonggi-Do, Korea 443-766

¹*Department of Environmental Engineering, Chonbuk National University 664-14*

²*Advanced Protein Technologies(Co.)*

(Received September 26, 2012; Revised November 30, 2012; Accepted November 30, 2012)

제조합 단백질 A 제조공정시료의 안정성실험에 관한 연구

김유곤[★] · 이우종 · 원찬희¹ · 신철수²

한국생산기술연구원, ¹전북대학교 환경공학과

²Advanced Protein Technologies(Co.)

(2012. 9. 26. 접수, 2012. 11. 30. 수정, 2012. 11. 30. 승인)

Abstract: This study is to investigate the issues on how to secure stability during the purification process for the production of recombinant protein A. The final recombinant protein A is produced by passing through the cation exchange column (SP) and the anion-exchange column (Q) during the production process, for which the samples produced by the step-by-step processes can be exposed to trouble in securing stable storage in case the next process cannot be taken within the proper time period. Accordingly, this study aims to evaluate the proper storage conditions and length of time when storing samples produced in the production process. That is, in this study, how to store fair samples, how long the storage period should be set up, and how to evaluate the security of its quality depending on time are dealt with. The items to be experimented with were endotoxin, SDS-PAGE, HPLC purity and concentration. Experimental results showed that after passing the cation exchange column, when stored at 4 °C or room temperature, SDS-PAGE showed a major band, endotoxin is 5.0 Eu/mg or less, and concentration is on average of 8.21 to 8.24 mg/mL and RSD% 0.10~0.62%. In addition, HPLC purity showed somewhat stable results; at the HPLC purity 214 nm, the average is 99.24% to 99.37% and RSD% is 0.22~0.29%, while the average is 89.72% to 89.80% and RSD% 0.62~1.26% at 280 nm. On the contrary, after passing the anion exchange column, when stored at 4 °C or room temperature, SDS-PAGE revealed the major band, endotoxin is 0.5 Eu/mg or less, and concentration is on average of 5.59 mg/mL and RSD% 0.03~0.10%. when it comes to HPLC purity, the result showed that at the HPLC purity 214 nm, the average is 99.74% and RSD% is 0.10~0.11%, while the average is 96.16% to 96.85% and RSD% 0.72~1.13%. In conclusion, the stability of fair samples of recombinant protein A during the manufacturing process could be obtained without substance decomposition for 7~8 days at 4 °C or 20~21 days at room temperature.

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)10-8237-8239 Fax : +82-(0)33-251-3991

E-mail : kyg00789@hanmail.net

요약: 본 연구는 재조합 단백질 A를 생산하기 위한 정제공정 즉, 생산공정은 양이온교환칼럼(SP)과 음이온교환칼럼(Q)을 통하여 정제한 후 최종 재조합 단백질 A를 생산하게 되는데, 공정단계별로 생산된 시료를 바로 다음단계 공정으로 가지 못하는 경우 보관을 하는데 있어 안정성 확보 문제를 가지고 있다. 이에 본 연구에서 생산공정에서 생산된 시료를 보관 했을때 적정 보관조건과 시간을 알아보고자 하는데 목적이 있다. 즉, 공정시료의 저장방법 및 저장기간 설정과 경시변화에 따른 품질의 안정성의 평가를 목적으로 한다. 실험항목은 엔도톡신, SDS PAGE, HPLC 순도 그리고 농도이다. 실험결과 양이온교환칼럼 통과 후 냉장(4 °C), 실온보관에서 SDS PAGE는 major band, 엔도톡신은 5.0 Eu/mg이하, 농도에서는 평균 8.21~8.24 mg/mL, RSD% 0.10~0.62%, 그리고 HPLC 순도 214 nm에서 평균 99.24~99.37%, RSD% 0.22~0.29%, 280 nm에서 평균 89.72~89.80%, RSD% 0.62~1.26%로서 다소 안정된 결과를 나타내었다. 음이온칼럼통과 후 냉장(4 °C), 실온보관에서 SDS PAGE major band, 엔도톡신 0.5 Eu/mg이하, 농도는 평균 5.59 mg/mL, RSD% 0.03~0.10% 그리고 HPLC 순도 214 nm에서 평균 99.74%, RSD% 0.10~0.11%, 280 nm에서 평균 96.16~96.85%, RSD% 0.72~1.13%의 결과를 보였다. 상기의 실험결과로 재조합 단백질 A 제조공정시료의 실온과 4 °C에서 7~8 일 그리고 20~21 일 보관은 물질분해 특성이 없이 안정성이 확보 되었다는 결론을 얻을 수 있었다.

Key words: recombinant protein a, stability, endotoxin, SP, Q, HPLC

1. 서 론

본 실험의 목적은 rProtein A의 제조공정시료의 안정성실험을 목적으로 한다. 즉, 양이온교환칼럼과 음이온교환칼럼을 통과하여 정제된 공정시료의 실온보관과 4 °C에서의 보관조건에서 얼마 시간동안 안정성을 확보하는가를 보자고 하였으며, 실험항목은 엔도톡신, SDS PAGE, HPLC 순도, 농도등의 실험을 진행하였다.

1.1. Recombinant Protein A

Protein A는 *Staphylococcus aureus* 유래의 천연형(natural) 부터 다양한 재조합형태(recombinant)가 제품화되어 있으며 원천특허에 해당하는 “리플리젠(Repligen)”사의 DNA를 포함하는 재조합형이 미국에서 2009년 까지 보호되어 천연형 단백질에 이의 다른 단백질은 독점적 지위를 유지했으나 최근 특허가 만료되었고 단클론항체 시장 확대와 함께 다른 참여자의 등장이 예상되고 있다. 한편 항체시장 성장과 함께 소재단백질의 중요성이 부각되면서 단백질에 이의 표준화가 요구되어 4종이 미국약전(USP)에 등재되어 널리 이용되고 있다.

단클론항체(monoclonal antibody)는 유전자 조작된 동물세포의 배양 시 배지 중으로 분비 생산되며, 세포가 분비하는 다른 단백질들과 배지내의 성분 등이 섞여 매우 낮은 농도로 존재한다. 따라서 목적단클론항

체 이외의 불순물 제거가 항체생산에서 중요한 단계이며, 단클론항체 분리정제공정은 배지로부터 단클론항체만 선택적으로 포획하기 위하여 항체친화성 리간드(antibody affinity ligand)인 단백질에이(protein A)를 이용한 크로마토그래피(chromatography)가 표준으로 채택되고 있고 protein A를 이용할 경우 정제 첫 단계에서 세포배양액으로부터 목적 항체를 95% 이상의 순도로 분리가 가능하고 농축효과도 얻을 수 있다.

항체 친화성 리간드로는 protein A, G, L 등이 있으며, 단백질에이와 지는 각각 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)와 스트렙토코커스 속(*Streptococcus* sp.)에서 유래하며 친화도의 차이가 있지만 모두 다양한 종의 면역글로블린지(immunoglobulin G, IgG)의 에프씨 부위(constant region, Fc)에 친화성을 가지는 반면 단백질에이는 펩토스트렙토코커스 마그너스(*Peptostreptococcus magnus*)에서 유래하며 면역글로블린지의 카파라이트사슬(kappa light chain)에 친화성을 보이고 특히 카파라이트사슬 I, III, IV에 강하게 흡착하며 다양한 종류의 면역글로블린과 반응이 가능하며 scFv나 Fab과 같은 항체단편(antibody fragment)들과도 흡착할 수 있다(Fig. 1, Table 1).¹

1.2. 안정성실험

의약품 및 의약품의 안정성시험 수행을 위해서는 ‘의약품의 안정성 시험 기준’을 준수해야 하며 생물의약품의 경우에도 일반적인 사항은 이 기준을 적용하

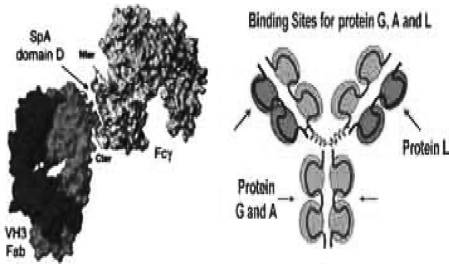


Fig. 1. Structure of antibody domain and affinity ligand.

Table 1. Affinity ligand of monoclonal antibody used on purification

Ligand	Origin microbe	Binding domain
Protein A	<i>Staphylococcus aureus</i>	Fc region of IgG
Protein G	<i>Streptococcus</i> sp.	Fc region of IgG
Protein L	<i>Peptostreptococcus magnus</i>	kappa light chain of IgG

고 있다. 그러나 생물의약품의 경우 온도변화, 산화, 광선(빛)과 같은 환경적 요인에 매우 민감하므로, 생물학적 활성을 유지하고 변성을 방지하기 위해 엄격한 조건에서 보관하는 것이 필수적으로 요구된다. 또한 제품의 유효성과 순도 등 품질에 영향을 미칠 수 있는 외적 조건을 충분히 고려하여 사용(유효)기간 및 보관조건을 설정해야 한다.

의약품등의 저장방법 및 사용 기간 등을 설정하기 위하여, 경시변화에 따른 품질의 안정성을 평가하는 시험을 말한다.

생물의약품 안정성시험 가이드라인에서 온도 보존 조건은 별도의 저장온도가 설정된 경우에는 그 설정 온도로 실험할 수 있다. 라고 언급하고 있으며 냉장보관의약품 5±3 °C, 냉동보관의약품 -20±5 °C로 규정하고 있다.^{2,5}

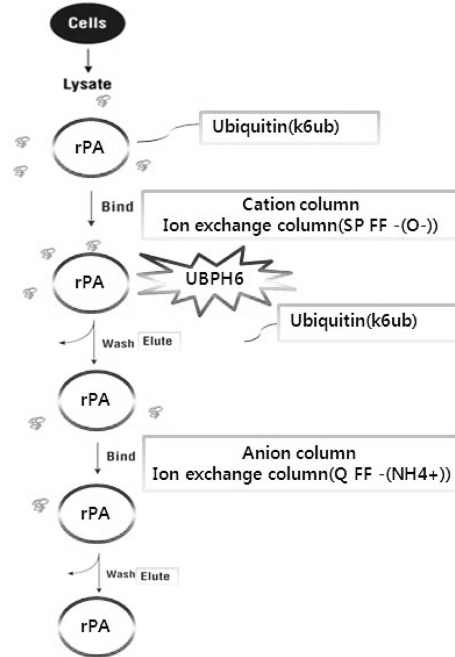
1.3. 재조합 단백질 A의 제조공정

미생물(E.Coli)를 이용하여 발효를 거쳐 원심분리하여 cell만을 모은 다음 cell lysis를 한 후 양이온교환 칼럼(SP Column)을 거쳐 정제한 후 다시 음이온교환 칼럼(Q Column)을 거쳐 정제 후 최종여과(UF)를 거쳐 제조 한다. 제조공정에 관한 절차를 Table 2에 나타내었다.^{6,7}

1.4. 이온교환 크로마토그래피

이온교환 크로마토그래피는 단백질이 가진 각각의 총 전하의 차이를 이용하여 목적의 단백질을 반대의

Table 2. Production process of rProtein A



하전기를 가진 담체에 정전기적으로 결합시켜, 분리, 정제하는 방법이다.이온교환 크로마토그래피는 대량의 샘플을 한번에 칼럼에 거르는 것이 가능하며, 일반적으로 분리능도 높기 때문에 단백질 정제의 초기 단계에서 이용되는 경우가 많다. 단 이온 교환체와 단백질간의 흡착은 완충액의 pH와 이온강도에 크게 의존한다. 그리고 이온교환크로마토그래피로 이용되는 이온교환체(담체)에는 양이온교환체와 음이온교환체의 2종류가 있으며, 각각에 반대부호의 이온인 대이온(Na⁺, Cl⁻ 등)이 정전기적으로 결합되어 있다. 따라서 목적의 단백질이 (+)로 하전되는 염기성 단백질의 경우는 (-)전하를 가진 담체(양이온 교환체)에 결합시키고, (-)로 하전되는 산성단백질의 경우에는 (+)의 전하를 가진 담체(음이온 교환체)에 결합시킨다. 결합의 강도는 단백질의 총 전하의 크기에 따라 강해진다. 결합한 단백질은 용출 완충액의 이온강도(염농도)를 서서히 높이면 결합이 약한 단백질부터 결합이 강한 단백질의 순서로 용출된다.⁸

1.5. 엔도톡신

발열성물질 중에서 가장 강력한 발열물질이 그람 음성간균 엔도톡신이다. 이는 그람음성간균의 엔도톡신으로 그람음성간균의 세포벽 성분 중 “리포다당질

(lipopolysaccharide)”을 말한다. 즉 그람음성간균의 세포벽 표층에 있는 지질과 다당의 복합이다. 엔도톡신 실험은 발열성물질 중 그람음성간균에서 유래하는 엔도톡신이라는 불순물이 함유되었는지 여부를 검사하는 시험법이며, 실험원리는 그람음성간균에서 유래하는 엔도톡신이 첨가의 혈구추출성분을 활성화하여 겔화를 일으키는 반응에 기초하여 검출 또는 정량하는 방법이다. 또한 발열성 물질이 혈류에 유입하게 되면 면역반응을 기본으로 한 발열반응이 일어난다.⁹

2. 실험장비 및 방법

2.1. 실험장비 및 시약

2.1.1. 장비 및 기구

HPLC system은 Waters HPLC를 사용하였으며, Column은 Phenomenex사의 300×7.80 mm (BioSep-Sec-S2000)을 사용하고 UV는 GE사의 GeneQuant를 사용하였다.

Endotoxin Gel Clot은 LONZA, Limulus Amebocyte Lysate PYROGENTplus Single Test Kit 그리고 Electrophoresis system은 BIO-RAD PowerPac, Invitrogen Novexminicell & XCell SureLock을 사용하였으며, SDS Pre made gel은 KOMA 4-12% Tris, KG5012 그리고 Autopipete (20~1000 µL), Incubator, Volumetricflask, pH meter, Clean bench 등의 실험 기구를 사용하였다.

2.1.2. HPLC기기조건

이동상 조건은 Sol. 1, 0.3 M Dibasic anhydrous sodium phosphate (21.3 g/500 mL water), Sol. 2, 0.3M Monobasic anhydrous sodium phosphate (18.0 g/500 mL water) 각각을 만든 다음 Sol. 1. 400 mL를 1 L 비커에 넣고 pH가 7.0이 될 때 까지 Sol. 2를 넣은 후 0.45 µm membrane filter로 여과한다.

파장은 214 nm, 280 nm (Mode: Dual), 칼럼은 L35 (BioSep-Sec-S2000), 유속은 1 mL/min, 주입량은 20 µL 그리고 체류시간은 20 분 이다.

2.1.3. 시약 및 용매

본 연구에 사용된 시약 및 용매는 Anhydrous sodium phosphate, Monobasic anhydrous, sodium phosphate, 초순수 그리고 Lal water등을 사용 하였다.

2.2. 실험방법

재조합단백질 A를 생산하기 위해 정제단계를 거친,

먼저 양이온교환칼럼(SP)을 통과시킨 공정시료를 4 °C에서 20 일 까지, 실온에서 7 일 까지 보관하면서 지정된 일자에 꺼내어 실험을 수행하였다. 그리고 음이온교환칼럼(Q)을 통과시킨 공정시료를 4 °C에서 21 일 까지, 실온에서 8 일 까지 보관하면서 지정된 일자에 꺼내어 실험을 수행하였다.

실험항목은 HPLC 순도, 농도, SDS Page, 엔도톡신 등 4개의 실험 항목에 대하여 실험을 수행하였다.

2.2.1. HPLC 순도 실험방법

본 실험은 순도를 보는 실험으로서 214 nm, 280 nm에서 HPLC Chromatogram의 순도를 확인하는 실험이다. 즉, Chromatogram상에서 주 peak이외에 다른 peak가 얼마정도의 %를 함유하는지 확인 하고자 하였다. 그리고 실험은 초기 즉, 양이온교환칼럼을 통과시킨 시료 4 °C 보관에서 처음 실험한 값을 초기라고 하였으며, 1, 2, 3, 6, 7, 10, 15 그리고 20 일에 각각 냉장 보관 되어 있던 시료를 꺼내어 실험을 수행하고 실온보관에서는 초기, 1, 2, 3, 6, 7 일에 걸쳐 실험을 수행하였다. 그리고 음이온교환칼럼을 통과시킨 4 °C 보관 시료에서 초기, 1, 2, 3, 7, 8, 11, 15 그리고 21 일에 상기와 같은 방법으로 실험을 수행하였으며 실온보관 시료는 초기, 1, 2, 3, 7, 8 일에 걸쳐 실험을 수행하였다.

실험순서는 농도를 알고 있는 재조합단백질 A 공정시료를 1 mg/mL로 희석(희석액 이동상)후 Blank 시료를 준비(이동상)하여 준비된 시료를 HPLC에 주입(주입량 : 50 µL)하여 241 nm, 280 nm dual mode로 분석 하였다.

2.2.2. 농도 실험방법

본 실험에 사용된 UV는 GE, GeneQuant이며 측정 파장은 280 nm 이었다. 농도 기준은 5.0 mg/mL 이상으로서, 양이온 및 음이온교환칼럼정제 시료 초기 농도를 기준으로 4 °C 20~21 일, 실온 7~8 일 동안 농도 변화 여부를 살펴보았다. 또한 함량 실험은 미국약전(USP)에서 UV 방법으로 하게 되어 있다.

실험순서는 시료를 1 mg/mL로 제조(희석액 초순수) 후 UV 파장 280 nm에서 흡광도를 분석 하였으며, 결과는 3 번 측정 하였고 결과가 %CV, 5%이내 인지를 확인 하였다.

2.2.3. SDS PAGE 실험방법

본 실험에서는 발현되는 단백질 major band가 깨지

는지 여부를 살펴보는 실험으로서 양이온교환칼럼 후 4 °C에서는 초기, 6, 10 그리고 20 일에 실험을 수행하였으며, 실온에서는 초기, 3, 7 일에 실험을 수행하였다. 그리고 음이온교환칼럼 정제 후 4 °C에서는 초기, 3, 11, 그리고 21 일, 실온에서는 초기, 3 그리고 8 일에 각각 실험을 수행하였다.

실험순서는 전기영동장치의 전압을 130V로 세팅하고 Maker 15 µL를 gel에 loading 후 시료 15 µL를 gel에 loading 한다. Loading시간 50 분이여 염색 후 결과를 확인하였다.

2.2.4. 엔도톡신 실험방법

본 실험에서 엔도톡신 기준은 양이온교환칼럼 정제 후 5.0 EU/mg 이하이며, 음이온교환칼럼 정제 후 0.5 EU/mg 이하이다. 이온교환칼럼 후 4 °C에서는 초기, 6 일, 10 일 그리고 20 일에 실험을 수행하였으며, 실온에서는 초기, 3, 7 일에 실험을 수행하였다. 그리고 음이온교환칼럼 정제 후 4 °C에서는 초기, 3, 11, 그리고 21 일, 실온에서는 초기, 3 그리고 8 일에 각각 실험을 수행하였다. 본 실험에 사용된 Gel clot은 LONZA, Limulus Amebocyte Lysate PYROGENT Plus Single Test Kit를 사용 하였다.

실험순서는 UV로 시료의 농도결정(mg/mL) 후 희석 하여 Serial dilution을 하고 희석된 시료 250 µL를 엔도톡신 kit에 주입 한 후 Incubation (37 °C, 60 min) 시킨 다음 결과를 확인 하였다.

3. 실험결과

3.1. 양이온교환칼럼공정(SP)시료 4 °C 보관

본 실험은 rProtein A를 제조하기위해 양이온교환칼

럼 통과 후의 시료를 냉장(4 °C)보관 했을때 안정성 여부를 확인하고자 하였다. 실험항목은 SDS PAGE, 엔도톡신, 농도 그리고 HPLC 순도 등이며, HPLC 순도 실험에서는 214 nm, 280 nm에서 실험을 수행하였으며, 실험기간은 초기에서 20 일에 걸쳐 실험을 수행 하였다.

실험결과 SDS PAGE에서는 초기 major band에서 20 일 차에서도 major band로 나타났으며, 엔도톡신은 초기 5.0 Eu/mg이하에서 20 일 차에서도 5.0 Eu/mg이하의 결과를 보였다. 그리고 농도에서는 초기 8.28 mg/mL에서 20 일차 8.31 mg/mL의 결과로 평균 8.21 mg/mL, RSD% 0.1%로서 다소 안정된 결과를 나타내어 농도에 있어서 변화하는 결과를 나타내지 않음을 알 수 있었다. 또한 HPLC 순도에서 초기의 실험결과는 214 nm에서 99.12%, 20 일차 99.39%로 전체범위 98.86~99.65%로서 RSD% 0.29%, 280 nm에서는 초기 90.58%에서 20 일차 89.85%로 평균 89.72%, RSD% 0.62%로서 다소 안정된 결과를 나타내어 순도 실험에서도 다른 물질로의 변화나 물질분해 특성이 없다는

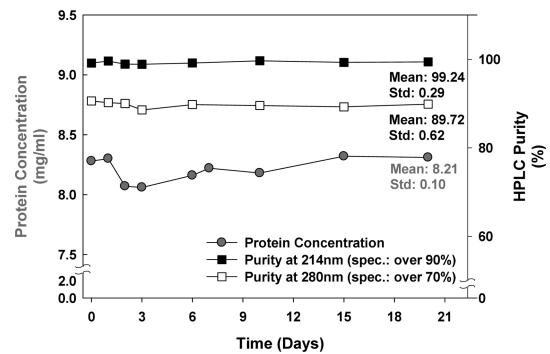


Fig. 2. Result of SP sample at 4 °C storage.

Table 3. Raw data of SP sample at 4 °C storage

<D : Day, - : Not Test>

Time	Items	Initial	1D	2D	3D	6D	7D	10D	15D	20D
	SDS PAGE	Major band	-	-	-	Major band	-	Major band	-	Major band
	<Criteria: Major band>									
	Endotoxin	≤5.0	-	-	-	≤5.0	-	≤5.0	-	≤5.0
	<Criteria: ≤5.0 EU/mg>									
	Concentration	8.28	8.30	8.07	8.06	8.16	8.22	8.18	8.32	8.31
	<Criteria: ≥5.0 mg/mL>									
	214 nm	99.12	99.58	98.90	98.86	99.15	-	99.65	99.29	99.39
	<Criteria: ≥90%>									
	280 nm	90.58	90.20	90.00	88.55	89.77	-	89.55	89.24	89.85
	<Criteria: ≥70%>									

결과를 알 수 있었다.

상기의 실험결과 양이온교환칼럼 통과 후 시료의 4 °C에서 20 일 동안의 보관은 다른 물질로의 변화나 물질이 변화하는 특성 없이 안정하다는 결론을 얻을 수 있었다.

Fig. 2에서는 SP 시료의 4 °C에 대한 실험결과를 보여주고 있다. 그리고 Table 3은 실험결과 Raw data를 보여주고 있다.

3.2. 양이온교환칼럼공정(SP)시료 실온보관(RT)

본 실험은 양이온교환칼럼 통과 후의 시료를 실온 보관 했을때 안정성 여부를 확인하고자 하였다. 실험 항목은 SDS PAGE, 엔도톡신, 농도 그리고 HPLC 순도 등이며, HPLC 순도실험에서는 214 nm, 280 nm에서 실험을 수행하였으며, 실험기간은 초기에서 7 일에 걸쳐 실험을 수행하였다.

실험결과 SDS PAGE에서는 초기 major band에서 7 일 차에서도 major band로 나타났으며, 엔도톡신은 초기 5.0 Eu/mg이하에서 7 일차에서도 5.0 Eu/mg이하의 결과를 보였다. 그리고 농도에서는 초기 8.28 mg/mL에서 7 일차 8.31 mg/mL의 결과로 평균 8.24 mg/mL, RSD% 0.11%로서 다소 안정된 결과를 나타내어 농도에 있어서 변화하는 결과를 나타내지 않음을 알 수 있었다. 또한 HPLC 순도에서 초기의 실험결과는 214 nm에서 99.12%, 7 일차 99.44%로 전체범위 99.12~99.71%로서 평균 99.37%, RSD% 0.22%, 280 nm에서는 초기 90.58%에서 7 일차 90.25%로 평균 89.80%, RSD% 1.26%로서 다소 안정된 결과를 나타내어 순도 실험에서도 다른 물질로의 변화나 물질분해 특성이 없다는 결과를 알 수 있었다.

상기의 실험결과 양이온교환칼럼 통과 후 시료의 실험

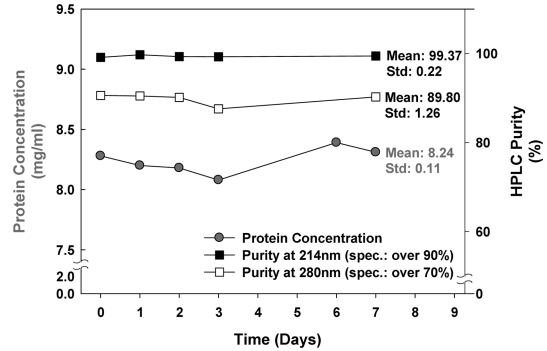


Fig. 3. Result of SP sample at room temperature storage.

온에서 7 일 동안의 보관은 다른 물질로의 변화나 물질이 변화하는 특성 없이 안정하다는 결론을 얻을 수 있었다.

Fig. 3에서는 SP 시료의 4 °C에 대한 실험결과를 보여주고 있다. 그리고 Table 4은 실험결과 Raw data를 보고여주고 있다.

3.3. 음이온칼럼공정(Q)시료 4 °C 보관

본 실험은 음이온교환칼럼 통과 후의 시료를 냉장 (4 °C)보관 했을때 안정성 여부를 확인하고자 하였다. 실험항목은 SDS PAGE, 엔도톡신, 농도 그리고 HPLC 순도 등이며, HPLC 순도실험에서는 214 nm, 280 nm에서 실험을 수행하였으며, 실험기간은 초기에서 21 일에 걸쳐 실험을 수행하였다.

실험결과 SDS PAGE에서는 초기 major band에서 21 일 차에서도 major band로 나타났으며, 엔도톡신은 초기 0.5 Eu/mg 이하에서 21 일차에서도 0.5 Eu/mg 이하의 결과를 보였다. 그리고 농도에서는 초기 5.62 mg/mL에서 21 일차 5.49 mg/mL의 결과로 평균 5.59

Table 4. Raw data of SP sample at room temperature storage

<D : Day, - : Not Test>

Time	Items	Initial	1D	2D	3D	6D	7D
SDS PAGE	<Criteria: Major band>	Major band	-	-	Major band	-	Major band
	Endotoxin	≤5.0	-	-	≤5.0	-	≤5.0
	<Criteria: ≤5.0 EU/mg>						
Concentration	<Criteria: ≥5.0 mg/mL>	8.28	8.20	8.18	8.08	8.29	8.31
HPLC Purity	214 nm <Criteria: ≥90%>	99.12	99.71	99.31	99.28	-	99.44
	280 nm <Criteria: ≥70%>	90.58	90.46	90.14	87.56	-	90.25

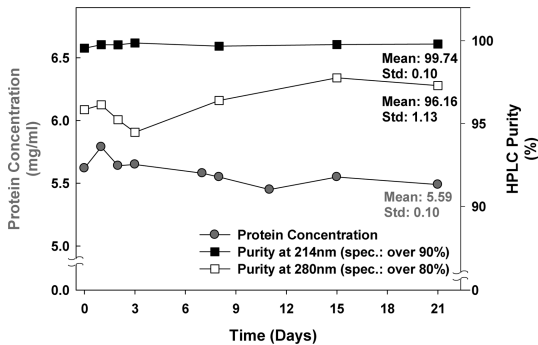


Fig. 4. Result of Q sample at 4 °C storage.

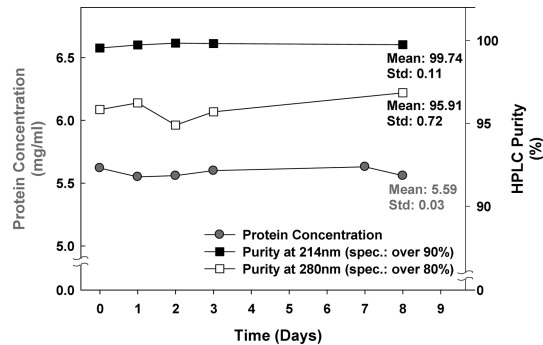


Fig. 5. Result of Q sample at room temperature storage.

mg/mL, RSD% 0.10%로서 다소 안정된 결과를 나타내어 농도에 있어서 변화하는 결과를 나타내지 않음을 알 수 있었다. 또한 HPLC 순도에서 초기의 실험 결과는 214 nm에서 99.55%, 21 일차 99.80%로 전체 범위 99.55~99.80%로서 RSD% 0.10%, 280 nm에서는 초기 95.84%에서 21 일차 97.29%로 평균 96.16%, RSD% 1.13%로서 다소 안정된 결과를 나타내어 순도 실험에서도 다른 물질로의 변화나 물질분해 특성이 없다는 결과를 알 수 있었다.

상기의 실험결과 음이온교환칼럼 통과 후 시료의 실온에서 21 일 동안의 보관은 다른 물질로의 변화나 물질이 변화하는 특성 없이 안정하다는 결론을 얻을 수 있었다.

Fig. 4에서는 Q 시료의 4 °C에 대한 실험결과를 보여주고 있다. 그리고 Table 5은 실험결과 Raw data를 보고여주고 있다.

3.4. 음이온칼럼공정(Q)시료 실온보관

본 실험은 음이온교환칼럼 통과 후의 시료를 실온

보관 했을때 안정성 여부를 확인하고자 하였다. 실험 항목은 SDS PAGE, 엔도톡신, 농도 그리고 HPLC 순도 등이며, HPLC 순도 실험에서는 214 nm, 280 nm에서 실험을 수행하였으며, 실험기간은 초기에서 8 일에 걸쳐 실험을 수행하였다.

실험결과 SDS PAGE에서는 초기 major band에서 8 일 차에서도 major band로 나타났으며, 엔도톡신은 초기 0.5 Eu/mg 이하에서 8 일차에서도 0.5 Eu/mg 이하의 결과를 보였다. 그리고 농도에서는 초기 5.62 mg/mL에서 8 일차 5.56 mg/mL의 결과로 평균 5.59 mg/mL, RSD% 0.03%로서 다소 안정된 결과를 나타내어 농도에 있어서 변화하는 결과를 나타내지 않음을 알 수 있었다. 또한 HPLC 순도에서 초기의 실험결과 214 nm에서 99.55%, 8 일차 96.75%로 전체 범위 95.55~99.84%로서 RSD% 0.11%, 280 nm에서는 초기 95.84%에서 21 일차 96.85%로 평균 95.91%, RSD% 0.72%로서 다소 안정된 결과를 나타내어 순도 실험에서도 다른 물질로의 변화나 물질분해 특성이 없다는 결과를 알 수 있었다.

Table 5. Raw data of Q sample at 4 °C storage

Time	Items	<D : Day, - : Not Test>								
		Initial	1D	2D	3D	7D	8D	11D	15D	21D
SDS PAGE	<Criteria: Major band>	Major band	-	-	Major band	-	-	Major band	-	Major band
	Endotoxin	≤0.5	-	-	≤0.5	-	-	≤0.5	-	≤0.5
	Concentration	5.62	5.79	5.64	5.65	5.58	5.55	5.45	5.55	5.49
HPLC Purity	214 nm	99.55	99.76	99.75	99.86	-	99.67	-	99.77	99.80
	280 nm	95.84	96.13	95.23	94.47	-	96.39	-	97.79	97.29

Table 6. Raw data of Q sample at room temperature storage <D : Day, - : Not Test>

Time	Items	Initial	1D	2D	3D	7D	8D
	SDS PAGE <Criteria: Major band>	Major band	-	-	Major band	-	Major band
	Endotoxin <Criteria: ≤0.5 EU/mg>	≤0.5	-	-	≤0.5	-	≤0.5
	Concentration <Criteria: ≥5.0 mg/mL>	5.62	5.55	5.56	5.60	5.63	5.56
HPLC	214 nm <Criteria: ≥90%>	99.55	99.73	99.84	99.82	-	99.75
Purity	280 nm <Criteria: ≥70%>	95.84	96.24	94.90	95.70	-	96.85

상기의 실험결과 음이온교환칼럼 통과 후 시료의 실온에서 8 일 동안의 보관은 다른 물질로의 변화나 물질이 변화하는 특성 없이 안정하다는 결론을 얻을 수 있었다.

Fig. 5에서는 Q 시료의 4 °C에 대한 실험결과를 보여주고 있다. 그리고 Table 6은 실험결과 Raw data를 보여주고 있다.

4. 결 론

rProtein A를 제조하기 위한 정제공정단계별 시료의 보관시 안정성 여부를 판단하기 위한 실험으로서 양이온교환칼럼과 음이온교환칼럼 정제 후 냉장(4 °C)보관과 실온보관 그리고 기간은 냉장보관에서 20~21 일, 실온보관은 7~8 일 동안 보관하였으며, 실험항목은 SDS PAGE, 엔도톡신, HPLC 순도, 농도 등 이었다. 각 공정단계 시료의 안정성 실험을 통한 저장방법 및 보관기간 설정과 경시변화에 따른 품질의 안정성을 평가할 목적으로 수행된 실험결과 양이온교환칼럼 통과 후 냉장(4 °C)보관에서는 SDS PAGE는 major band, 엔도톡신은 5.0 Eu/mg 이하, 농도에서는 평균 8.21 mg/mL, RSD% 0.10%로서 다소 안정된 결과를 나타내었다. 그리고 HPLC 순도에서 초기의 실험결과는 214 nm에서 99.12%, 20 일차 99.39%로 전체범위 98.86~99.65%로서 RSD% 0.29%, 280 nm에서는 초기 90.58%에서 20 일차 89.85%로 평균 89.72%, RSD% 0.62%로서 다소 안정된 결과를 나타내었다. 양이온교환칼럼 통과 후 실온보관 실험결과는 실험결과 SDS PAGE에서는 major band, 엔도톡신은 5.0 Eu/mg 이하, 농도 평균 8.24 mg/mL, RSD% 0.11%로서 다소 안정된 결과를 나타내었고 HPLC 순도는 214 nm에서 전

체범위 99.12~99.71%로서 평균 99.37%, RSD% 0.22%, 280 nm에서 평균 89.80%, RSD% 1.26%로서 다소 안정된 결과를 나타내었다.

음이온칼럼 통과 후 냉장(4 °C)보관 후 SDS PAGE major band, 엔도톡신 0.5 Eu/mg 이하, 농도는 초기 5.62 mg/mL에서 21 일차 5.49 mg/mL의 결과로 평균 5.59 mg/mL, RSD% 0.10% 그리고 HPLC 순도에서 초기의 실험결과는 214 nm에서 99.55%, 21 일차 99.80%로 전체범위 99.55~99.80%로서 RSD% 0.10%, 280 nm에서는 초기 95.84%에서 21 일차 97.29%로 평균 96.16%, RSD% 1.13%의 결과를 보였다. 음이온칼럼 통과 후 실온보관에서 실험결과는 SDS PAGE major band, 엔도톡신은 0.5 Eu/mg 이하, 농도는 초기 5.62 mg/mL에서 8 일차 5.56 mg/mL의 결과로 평균 5.59 mg/mL, RSD% 0.03% 그리고 HPLC 순도에서 초기의 실험결과는 214 nm에서 전체범위 95.55~99.84%로서 RSD% 0.11%, 280 nm에서는 초기 95.84%에서 21 일차 96.85%로 평균 95.91%, RSD% 0.72%의 결과를 나타내었다.

상기의 실험결과로 rProtein A의 제조공정시료(SP)는 냉장(4 °C) 보관 20 일, 실온 7 일 동안의 보관은 안정하였으며, 또한 제조공정시료(Q)에서도 냉장(4 °C) 보관 21 일, 실온 8 일 동안의 보관은 안정하였다. 상기의 보관조건과 시간동안 물질분해 특성이 없고, 안정성이 확보 되었다는 결론을 얻을 수 있었다.

참고문헌

1. S. Aldington and J. Bonnerjea, Scale-up of monoclonal antibody purification processes. *J. Chrom B*, **848**, 64-78 (2007).

2. Guideline on Stability Testing of Biological Product - KFDA(2008).
3. ICH guideline Q5C - Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products.
4. ICH guideline Q1A(R2) - Stability Testing of New Drug Substance and Products.
5. ICH guideline Q1E - Evaluation for Stability Data.
6. G. Strohle, L. Aumann, T. Muller-Spath and M. Morbidelli, The multicolumn counter current solvent gradient purification process., *BioPharm Int.*, 42-48 (2007).
7. D. Agalloco, Control, et al., Process simulation testing for steril bulk pharmaceutical chemicals, PDA Technical Report No. 28, *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, **52**, Supplement S3 (1998).
8. S. R. Gallant, S. Vunnum and S. M. Cramer, Optimization of preparative ion-exchange chromatography of proteins: linear gradient separations, *J. Chromatogr. A*, **725**, 295-314 (1996).
9. S. Liu, R. Tobias and G. Jackowski, Removal of Endotoxin from Recombinant Protein Preparations, *Clinical Biochem.*, **30**(6), 455-463 (1997).