

Mab Select Sure Elution Optimization using AKTA Avant DoE

<Introduction>

A사에서는 CHO cell에서 생산되어 나온 Ab를 정제하기 위해 Mab Select Sure를 주로 사용해 왔다. 그러나 Elution 조건에 대한 Optimization의 필요성이 있어서 AKTA Avant150의 DoE 기능을 이용해서 Mab Select Sure의 Elution 조건을 Optimization 하였다.

4. Sample loading: 40 ml with Sample Pump.
5. Working flow rate: 150 cm/h
6. Elution Buffer: Sodium Acetate Buffer
7. Elution Step and Vol : Isocratic, 10 CV

<Aim and Goal>

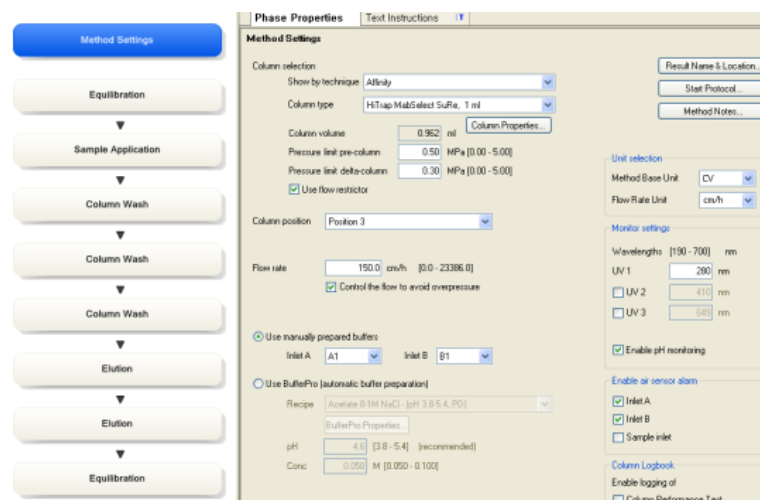
- * Aim: Hitrap Mab Select Sure Elution Optimization
- * Goal: Aggregation: 10이하
Protein Amount: 8.5 mg/ml 이상
Purity: 85% 이상

<System, Method and Materials>

1. System: AKTA Avant 150
2. Sample: Clarified CHO feed
3. Column: Mab Select Sure Hitrap 1ml

<Design of Experiment Design>

이번 DoE Optimization 에서 사용할 Mab의 경우에 pH와 Salt 농도가 Elution에 영향을 준다는 사실을 A사에서 이미 알고 있었다. 그러나 구체적으로 이 2개의 요인이 특정 범위에서 어떤 영향을 주며, 어떤 optimization 범위를 가지는지는 알 수가 없었기 때문에 Factor(투입)는 pH와 Salt 농도로 하기로 정하였고, Response(산출) 항목으로는 Aggregation, Protein Amount, Purity로 하기로 결정하였다. 한편, 2개의 요인에 대한 범위 값의 구체적인 입력은 Method Editor에서



Method Editor for setting purification parameters



Purification에 대한 항목을 입력을 한 후, DoE 설정 창에서 아래와 같이 factor의 범위와 Response 항목을 입력하였다.

1. Factor : Elution buffer condition

(1) Elution buffer pH:

pH 3.0 ~ 3.8

(2) Elution buffer Salt Concentration:

20mM ~ 100mM

2. Response :

(1) Aggregation,

(2) Protein Amount

(3) Purity

3. Transfer Model: Quadratic

(recommended by AKTA Avant 150 DoE S/W)

4. RSM Model: CCF

(recommended by AKTA Avant 150 DoE S/W)

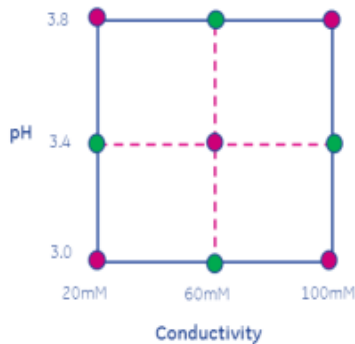


Fig 1. Face centered composite design used for experimental setup.

<Result>

AKTA Avant 150 DoE Software상에서 2개 factor (elution pH, elution salt concentration)의 범위를 입력하고, optimization을 선택하였을 때, CCF (Center Composition Face) RSM (반응표면분석법) model을 추천 하였으며(Fig 1), factor들의 중간 값 3반복을 포함한 총 11번의 Running을 하는 DoE Running Method를 얻었다(Table 1). DoE running Method 순서에 따라 다음과 같은 chromatography (Fig 2) 및 fraction을 얻고 난 뒤 외부에서 분석하여 각 running에 대한 aggregation, Protein amount, Purity의 값을 얻었다 (Table1). Aggregation, Protein amount, Purity에 대한 DoE Optimization 분석결과는 다음과 같다.

1) Aggregation: 우선 Aggregation에 관한 실험결과가 Quadratic 모델에 얼마나 잘 fitting이 되는지를 알려 주는 척도인 R2, Q2 값을

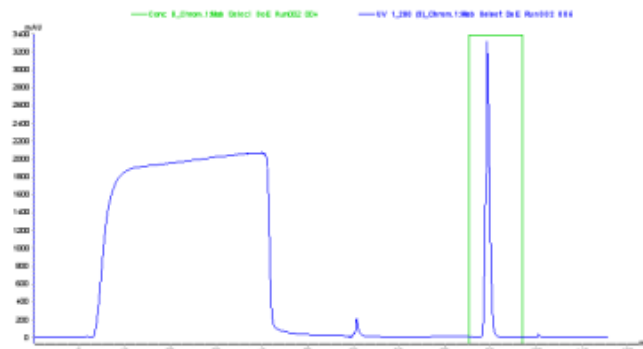


Fig 2. Chromatogram from HiTrap Mab Select Sure optimizini design.

Exp. No	Run Order	Elution pH	Elution Salt (mM)	Aggregation	Protein Amount	Purity
1	8	3.0	20	17.59	11.00	77.05
2	10	3.8	20	5.06	6.98	92.60
3	9	3.0	100	18.36	9.58	64.96
4	3	3.8	100	10.67	9.82	85.16
5	6	3.0	60	17.11	9.97	72.68
6	7	3.8	60	7.22	8.76	89.26
7	4	3.4	20	18.23	10.88	76.82
8	5	3.4	100	19.67	11.07	75.27
9	1	3.4	60	18.34	10.88	76.54
10	2	3.4	60	20.59	10.51	74.21
11	11	3.4	60	18.01	11.14	76.99

Table 1. Design layout of the DoE for optimizing of elution pH, salt concentration and results from the optimization



살펴보면 R2: 0.96 Q2: 0.88로 실험 결과가 Quadratic 모델에 잘 맞는다는 것을 확인 할 수 있었다. Model validity는 실험결과와 fitting 한 model간의 타당성을 나타내는데, 0.25이상 이 되면 신뢰할 수 있는 fitting 결과임을 의미한다. 여기서 0.89로 타당성이 매우 높다는 것을 알 수 있었다. 재현성(reproducibility)의 결과도 0.93으로 아주 반복 실험의 재현성이 높음을 확인하였다 (Fig 3). 한편, 각 model terms에 관한 coefficient plot을 살펴 보면, elution pH는 낮을 수록, elution salt 농도는 높을수록 Aggregation 수치가 높아 지는데 영향을 주는 것을 확인할 수 있었다 (Fig 4). 마지막으로 aggregation에 관한 elution pH와 elution salt 농도의 상관 관계를 contour plot으로 확인해 보면, 직선형의 관계가 아닌 곡선형의 상관관계가 있음을 확인할 수 있는 동시에 aggregation 수치가 낮기 위해서는 높은 elution pH와 낮은 elution salt 농도가 필요함을 알 수가 있었다 (Fig 5).

2) Protein Amount: R2: 0.97, Q2: 0.95, model validity: 0.9, reproducibility: 0.94 의 결과를 얻었다 (Fig 6). Protein Amount의 optimization 결과도 Quadratic 모델에 잘 맞는 것을 확인하였다. 각 model terms에 관한 coefficient plot을 살펴 보면, elution pH는 낮을 수록, elution salt 농도는 높을수록 Protein Amount 수치가 높아 지는데 영향을 주는 것을 확인할 수 있었다 (Fig 7). 더불어 elution pH의 coefficient plot bar 의 길이가 elution salt 농도 bar 보다 길다는 것은 elution salt 농도 보다는 elution pH가 더 Protein Amount에 영향을 준다는 것을 알려 준다. 마지막으로

Protein Amount에 관한 elution pH와 elution salt 농도의 상관 관계를 contour plot으로 확인해 보면, 곡선형의 상관관계가 있음을 확인할 수 있는 동시에 protein amount 수치가 높기 위해서는 낮은 elution pH와 높은 elution salt 농도가 필요함을 알 수가 있었다. 그러나 aggregation optimization 결과와는 약간 다르게 직선형과 유사한 관계를 보여준다 (Fig 8). 따라서 coefficient plot과 연관해서 살펴보면 protein amount 결과는 elution salt concentration 보다는 elution pH에 더 많은 영향을 받는다고 할 수 있다.

3) Purity: R2: 0.94, Q2: 0.84, model validity: 0.69, reproducibility: 0.96 의 결과를 얻었다 (Fig 9). R2: 0.94 로 Quadratic 모델에 잘 맞는 것을 확인 하였고, 각 model terms에 관한 coefficient plot을 살펴 보면, elution pH는 높을 수록, elution salt 농도는 낮을 수록 Purity가 높아 지는데 영향을 주는 것을 확인할 수 있었다(Fig 10). 그리고 protein amount 결과와 마찬가지로 elution pH가 purity optimization 결과에 영향을 더 많이 주는 것을 확인하였다.

4) Optimization Region study: Aggregation, Protein Amount, Purity 3가지에 대한 결과를 총합하여, 목표로 삼았던 Aggregation: 10이하, Protein Amount: 8.5 mg/ml 이상, Purity: 85% 이상을 만족하는 조건을 도출 하면, elution pH: 3.7 ~ 3.8, elution Salt 농도: 30 ~ 40 mM 으로 도출이 된다, 이 영역은 각각의 contour plot 을 비교, 조합하여 쉽게 알 수 있었다.



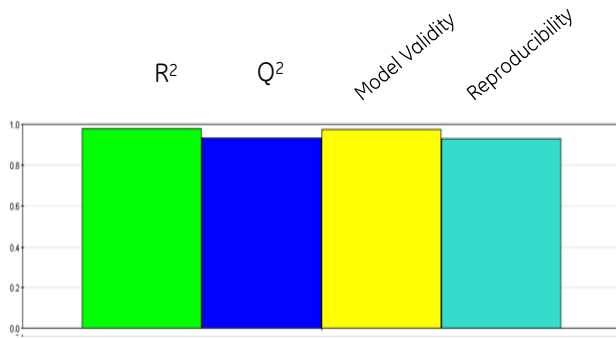


Fig 3. The summary of fit for Aggregation Response

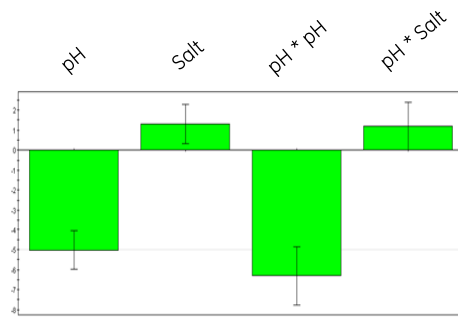


Fig 4. Coefficients Plot for Aggregation Response

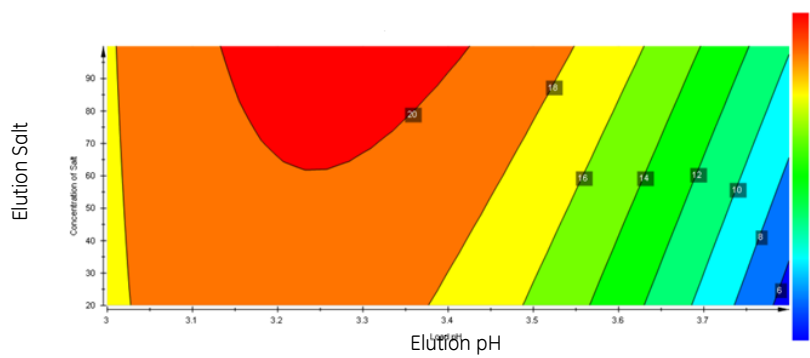


Fig 5. Contour plot for Aggregation Response

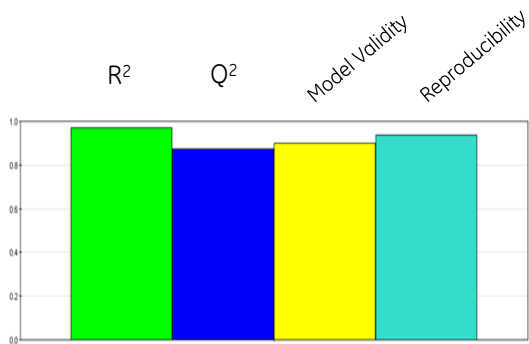


Fig 6. The summary of fit for Protein Amount Response

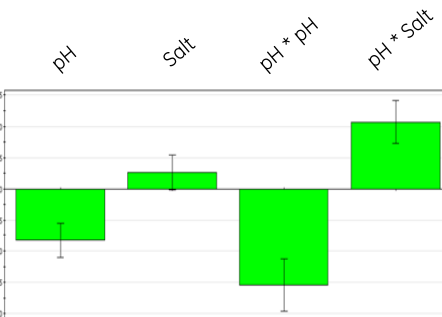


Fig 7. Coefficients Plot for Protein Amount Response

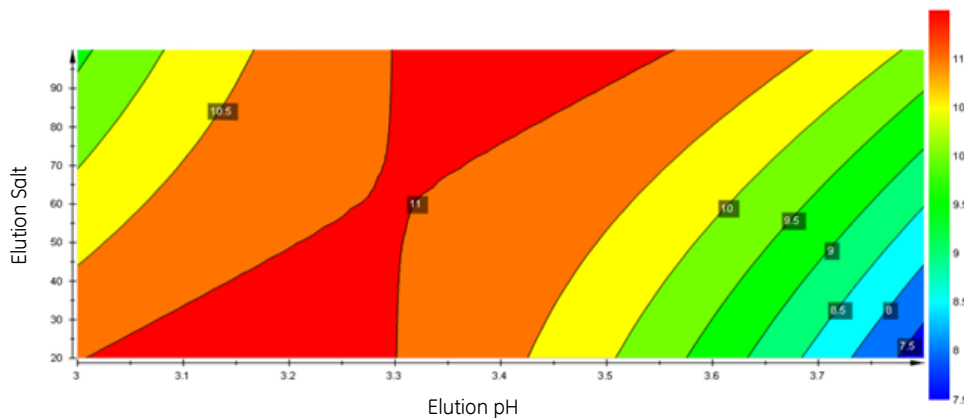


Fig 8. Contour plot for Protein Amount Response



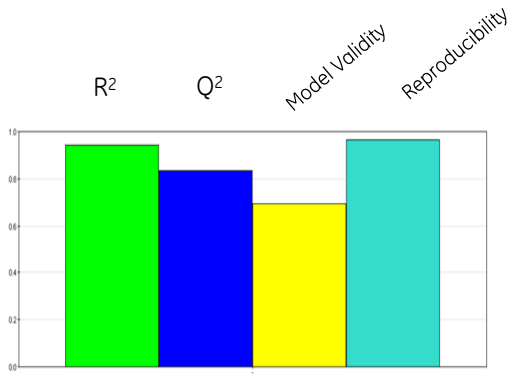


Fig 9. The summary of fit for Purity Response

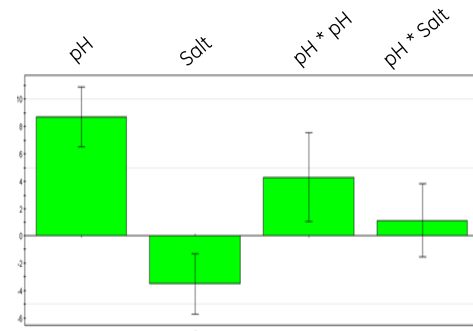


Fig 10. Coefficients Plot for Purity Response

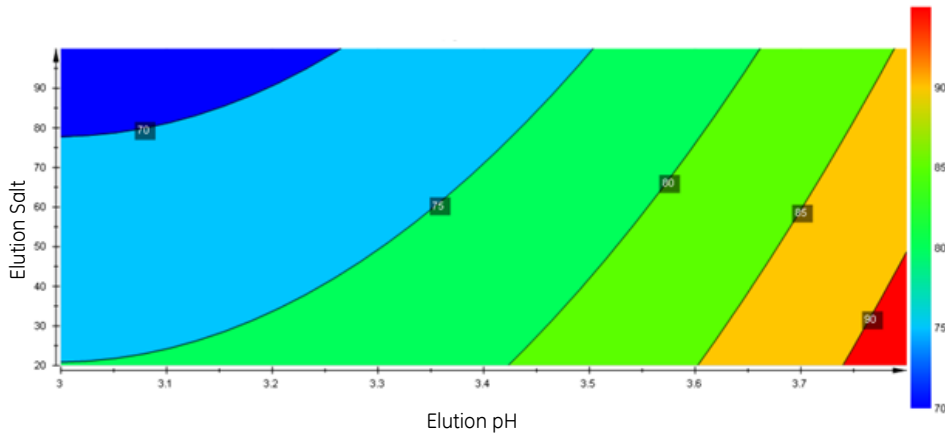


Fig 11. Contour plot for Purity Response

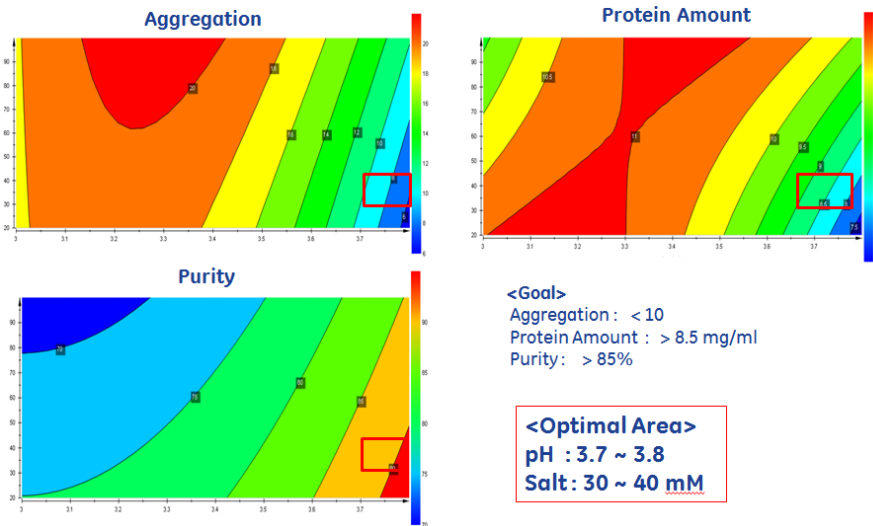


Fig 12. Optimal Area with the following criteria aggregation (<10, protein amount (>8.5mg/ml) and purity (>85%).



<Summary>

A사의 CHO cell에서 생산되어 나온 Ab에 대한 Mab Select Sure를 이용한 elution 조건에 대하여 AKTA Avant 150의 DoE 프로그램을 이용하여 Optimization 실험을 수행하였다. 그리고 Aggregation, protein amount, yield의 목표에 도달할 수 있는 Elution pH 와 Salt 농도의 영역을 찾았다. 그리고 이 찾은 영역은 A사에서 사용해 보고자 하는 factor 영역과 거의 일치하는 것으로 나와서 AKTA Avant150 DoE 실험이 신뢰할 만하다는 의견이었다. 한편, AKTA Avant 150 DoE는 편리한 프로그램 셋팅 법과 다양한 Plot을 보여 줌으로서 DoE 실험 분석을 쉽고 편하게 할 수 있다는 것을 보여 주었다.

