



바이오의약품 정제용 크로마토그래피 컬럼의 고효율 흐름 분배기 개발

고영석^{a,c}, 이화정^b, 최수림^b, 김동일^c, 박진호^{a*}, 이준철^a

Development of the Highly Efficient Flow Distributor of the Chromatography Column for Biopharmaceutical Purification

Young-Seok Ko^{a,c}, HwaJung Ri^b, Su-lim Choi^b, Dong-Il Kim^c, Jean-Ho Park^{a*}, Joon-Chul Lee^a^a Korea Institute of Industrial Technology, 143, Hanggaul-ro, Sangrok-gu, Ansan, Gyeonggi-do, 15588, Korea^b Amicogen, 700, Daewangpangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam, Gyeonggi-do, 13488, Korea^c Department of Biological Engineering, Inha university, 100, Inharo, Nam-gu, Incheon 22212, Korea

ARTICLE INFO

Article history:

Received	6	September	2019
Revised	10	October	2019
Accepted	14	October	2019

Keywords:

Flow distributor
Chromatography
Column
3D print
Biopharmaceutical purification

ABSTRACT

We developed a flow distributor for high-performance chromatographic processes during the purification of biopharmaceuticals. Twelve distributor candidates are provided, including four types of distributors with different-shaped holes, and three sub-types with different number of holes. We evaluated the flow distributor candidates by spreading bromophenol blue dye on the membrane, and selected the most suitable distributor Arc 45 deg. type. Using 10 ml columns with three different length-to-diameter (L/D) ratios (4.33, 0.92, and 0.34) of column, we measured peak asymmetry (As) values. The 10 ml column with 0.92 L/D ratio showed best As value. We also carried out flow experiments on the three sub-types of Arc 45 deg. distributors on the 0.92 L/D ratio 50 ml column and Arc 45 deg. 1:8 distributor showed best performance. The As values of this optimal flow distributor are 1.2 or less. In summary, this study provides optimal distributor values for chromatographic purification of biopharmaceuticals.

1. 서론

최근 바이오의약품 수요 증가에 따른 시장의 성장에 의하여 바이오의약품의 생산량이 대폭 증대되고 있으며, 이에 따른 생산공정의 생산성이 중요시되고 있다. 이를 위하여, 생산공정 중 크로마토그래피 정제공정에서 세포 배양액에서 바이오의약품에 해당하는 특정 단백질들을 최대한으로 얻어내는 정제율이 점점 중요하게 간주되고 있다. 실제로 이 중요성에 따라 정제를 구성하는 각 공정들에 관하여 많은 연구들이 수행되어 왔으며 크로마토그래피

정제 공정 효율을 꾸준히 증가시켜왔다^[1-3].

크로마토그래피 공정 중 사용되는 컬럼은 원통형으로, 입구 부분에서 액체가 들어가서 출구로 나오는 방식으로 처리되고 있다. 이러한 공정에서 입구 부분에서는 주입된 액이 퍼지지 않는 dead zone이 형성되어 불필요한 레진의 낭비를 초래하게 된다^[4-14]. 뿐만 아니라 dead zone이 형성 되게 되면 band broadening 현상이 발생하고^[15] 이는 peak 측정 시 tailing 현상이 발생하여 정제 효율이 감소하게 된다^[16]. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 dead zone을 최소화 할 수 있는 흐름 분배기 개발이 요구된다.

* Corresponding author. Tel.: +82-31-8084-8822

Fax: +82-31-8084-8830

E-mail address: Jeanho@kitech.re.kr (Jean-Ho Park).

Table 1 Specification of commercial flow distributor

	G* X model	G* H model	B* Q model	B* O model
Inlet diameter (mm)	3.0	0.9	1.0	1.5
Surface angle (deg.)	6.55	0	2.82	9.11
Flow way width (mm)	-	0.66	0.53	-
Flow way depth (mm)	-	0.58	0.43	-

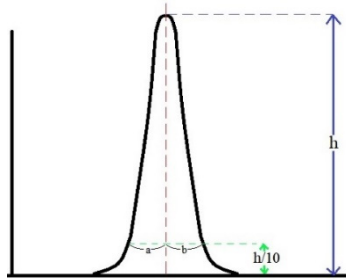


Fig. 1 Definition of peak asymmetry factor (As)

이를 위하여 먼저 기존에 상용화 된 흐름 분배기를 3D scanning 을 통하여 형상 분석을 하였고, 위 분석을 참고하여 다양한 흐름 분배기 디자인 후보를 선정하였다. 이 흐름 분배기 후보들에 대해 우수한 흐름 분배기 균을 결정 할 수 있었으며, 이후 3가지 L/D ratio (컬럼의 길이와 직경의 비)에 따른 컬럼을 제작하여 컬럼 성능 평가 기준 척도인 Fig. 1과 (1)로 정의된 As 값 측정을 통하여 성능을 확인하였고, 10 ml 컬럼에서 확인한 최적의 L/D ratio를 기반으로 50 ml 컬럼으로 스케일 업 하여 최적화를 수행 하였다^[17].

$$As = \frac{b}{a} \dots\dots\dots (1)$$

최종적으로 가장 최적의 흐름 분배기를 선정하였고 이 흐름 분 배기를 이용하여 항체 정제를 수행하고, 항체의 크로마토그래피 정제 시에도 이상이 없음을 입증하고자 하였다.

2. 실험 방법

2.1 3D 프린팅 설계 및 제작

흐름 분배기의 설계를 위해 시중에 판매 되고 있는 상용 컬럼으 로 Fig. 2에 나타난 바와 같이 smart SCAN R5 (HEXAGON MI, Germany)를 이용하여 3D scanning을 수행하였으며, 이 결 과 형상 분석을 하였으며, 이를 통하여 Table 1과 같은 입구 지름, 각도, 유로 폭, 깊이의 정보를 얻을 수 있었다.

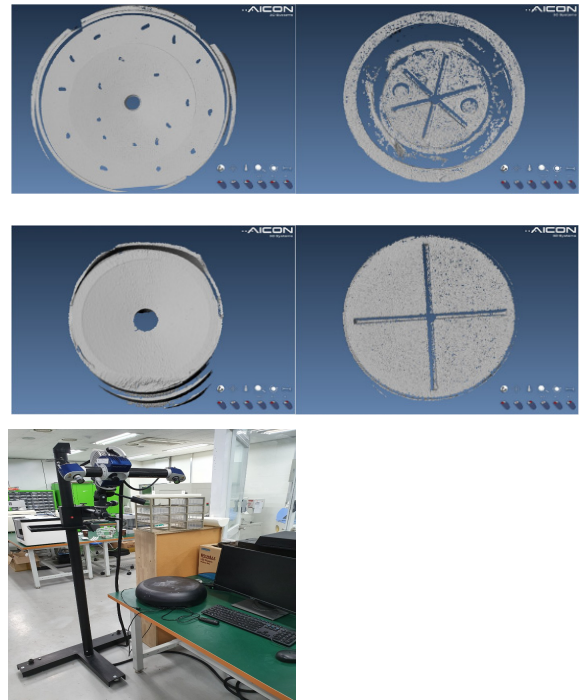


Fig. 2 3D scanning of flow distributor using 3D scanner

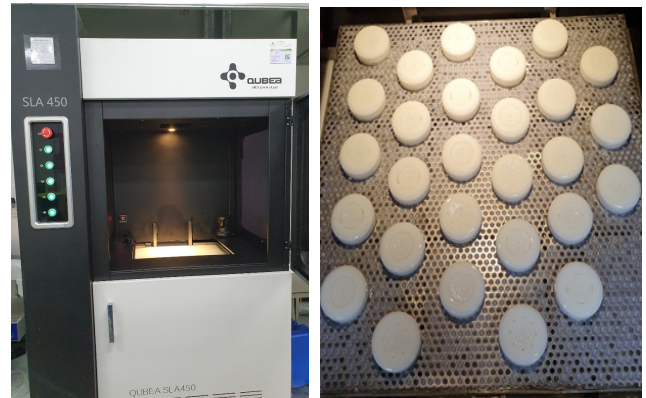


Fig. 3 Preparation of flow distributors by 3D printing

Fig. 3에서와 같이 Qubea SLA 450 3D printer (Fusin Tech, Korea)를 이용하여 3D printing을 진행하였고 12가지의 흐름 분 배기를 제작하였고 그 형상은 Table 2와 같다.

2.2 흐름 분배기를 이용한 Dye Intensity 변화율 측정

흐름 분배기의 dye intensity 변화를 측정하기 위하여 Fig. 4와 같이 실험 장치를 구성하였으며 AKTA purifier FPLC (GE Health care, USA) 장비를 이용하여 dye를 주입, 초고속 카메라 를 이용하여 관찰하였다^[4]. Dye는 bromophenol blue를 3차 증류 수에 0.05 %로 녹인 후 사용 전 Sartorius Minisart 0.45 μm (Sartorius, Germany)로 여과하여 사용하였다. 초고속 카메라의 경 우 membrane 단면에서의 dye의 확산을 중심으로 촬영속도 100

Table 2 3D images & 3D printing products of 12 flow distributors

		Full	Half	Quarter
Multi-Circle type	3D image			
	3D printing product			
Multi-Rectangle type	3D image			
	3D printing product			
		1:8	1:4	1:2
Arc 90 deg. type	3D image			
	3D printing product			
Arc 45 deg. type	3D image			
	3D printing product			

FPS (Frame per sec.)로 60초 동안 촬영하였다. Dye는 10 ml/min의 속도로 주입해주었으며 촬영 후 Image J (NIH, USA) 로 membrane dye intensity의 평균값을 측정하여, 흐름 분배기의 성능인 확산 정도를 측정하였다.

2.3 컬럼의 길이와 직경의 비율(L/D ratio)

컬럼의 길이(L) 및 직경(D)에 따른 정제 성능의 비교 평가를 위하여 Fig. 5와 같이 컬럼을 설계하였고, 흐름 분배기의 지지체 역할을 하는 기공 10 µm의 프리트(frit)을 얹고 흐름 분배기를 장착했다. AKTA purifier FPLC에 장착하여 0.4 M NaCl을 선속도 20 cm/h로 최소 3 Column Volume (CV, 컬럼의 부피)로 주입하여 평형화 시켰다. 그리고 1% CV에 해당하는 부피인 0.8 M NaCl 100 µl를 주입 해주었고 0.4 M NaCl을 선속도 20 cm/h로 최소 2 CV 만큼 주입하여 peak을 확인하고 As 값을 계산하였다. 2% CV와 5% CV의 경우 각각 그에 해당하는 부피인 0.8 M NaCl

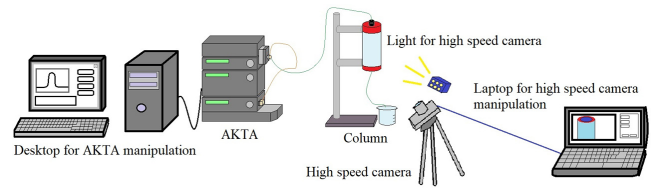


Fig. 4 Diagram for measurement of membrane dye intensity

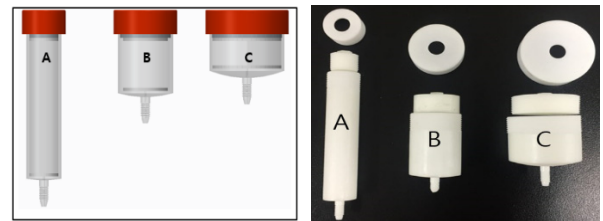


Fig. 5 3 type columns prepared by 3D printing for optimizing L/D ratio

200 µl, 0.8 M NaCl 500 µl을 주입 후 위와 동일한 방법으로 peak과 As 값을 확인하였다. 같은 실험을 컬럼 형태 별로 3회 진행 후 As 값들의 평균 값을 구했다.

2.4 최적의 L/D ratio를 갖는 컬럼의 Dye Intensity 변화를 측정

2.2의 실험 방법과 동일하나 액션 카메라를 추가하여 컬럼의 정면과 측면에 배치하여 컬럼 전체에서의 dye의 확산을 볼 수 있도록 8분 이상 촬영하였다.

2.5 최적의 흐름 분배기와 컬럼에서의 항체 분리능 분석

50 ml 컬럼에 protein A agarose 레진을 충전하고 AKTA prime plus (GE Healthcare, USA)에 장착하고 binding buffer (PBS, 항체 결합용 완충액)와 항체를 1:1로 혼합하여 5000 ml을 제조하였다. Binding buffer를 10 ml/min의 유속으로 10 분간 주입하여 컬럼을 평형화하였다. 그 후 항체를 10 ml/min의 속도로 100 분간 주입하여 컬럼에 항체를 결합시켰다.

그 다음 washing buffer (PBS, 세척용 완충액)를 10 ml/min의 속도로 10 분 간 주입하여 컬럼에 결합하지 못한 단백질들을 세척하였다. Elution buffer (0.1 M glycine, pH 3.0, 단백질 용출용 완충액)를 10 ml/min의 속도로 5 분간 주입하여 컬럼에 결합된 항체 단백질을 용출시켜 회수 하였다. 용출된 항체 약 225 ml과 neutralization buffer (1 M Tris-HCl, pH 8.0, 중화용 완충액) 25 ml과 혼합하여 pH 7.5로 맞추었다.

3. 실험 결과

크로마토그래피 공정에서 컬럼 입구 측의 양 끝의 dead zone을 활용 할 수 있다면, 사용 가능한 레진의 용량을 추가 확보 할 수

Table 3 Photos for 15 seconds compared to the initial spread of dye on membrane surface. (G*, R*: commercial distributor, control; MC-: Multi Circle, MR-: Multi Rectangle, F: Full, H: Half, Q: Quarter)

	0.0 sec	2.5 sec	5.0 sec	7.5 sec	10.0 sec	12.5 sec	15.0 sec
G*							
R*							
MCF							
MCH							
MCQ							
MRF							
MRH							
MRQ							
Arc90 1:8							
Arc90 1:4							
Arc90 1:2							
Arc45 1:8							
Arc45 1:4							
Arc45 1:2							

있어 경제적인 사용이 가능 할 수 있다.

따라서 이를 평가하기 위해 12가지의 후보 흐름 분배기 및 기존의 흐름 분배기 2가지를 상용화 되어 판매되고 있는 컬럼에 membrane 장착 후 초고속 카메라를 이용하여 60 초 간 측정하였으며 그 결과를 Table 3에 나타내었다.

이 이미지를 기반으로 Image J를 이용하여 membrane에서 dye intensity의 변화율을 수치화하여 Fig. 6에서와 같이 백분율로 나타내었다.

시중에서 판매되고 있는 컬럼의 흐름 분배기를 기준으로 dye intensity 변화를 비교 했을 때, main-type 별로 구분하면 Arc 45 deg. type들에서 구멍의 크기 비율에 관계없이 빠르게 membrane 표면의 dye intensity가 높아지는 경향성을 확인했다.

이후 선정 된 Arc 45 deg. type의 흐름 분배기에서 최적화 실험을 위하여 3D printing을 이용하여 Fig. 5와 Table 4의 규격에 따른 3가지 종류의 10 ml 컬럼을 제작하고, 이에 레진을 충전하여 컬럼 별로 As 값을 측정하여 Fig. 7과 같은 결과를 도출하였다.

3 type을 측정한 결과 L/D ratio는 1:1에 가까운 type B에서 샘

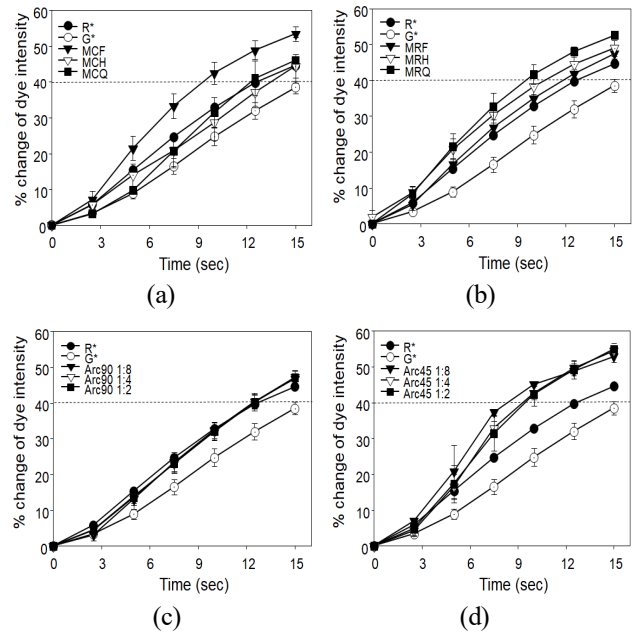


Fig. 6 Percentage of change for dye intensity of membrane on flow distributors (a) shows percentage of change for dye intensity of 3 Multi circle flow distributors and controls, (b) shows percentage of change 3 Multi rectangle flow distributors and controls, (c) shows percentage of change 3 Arc 90 deg. flow distributors and controls, and (d) shows percentage of change 3 Arc 45 deg. flow distributors and controls. (G*, R*: Commercial distributor *control, MC-: Multi Circle, MR-: Multi Rectangle, F: Full, H: Half, Q: Quarter)

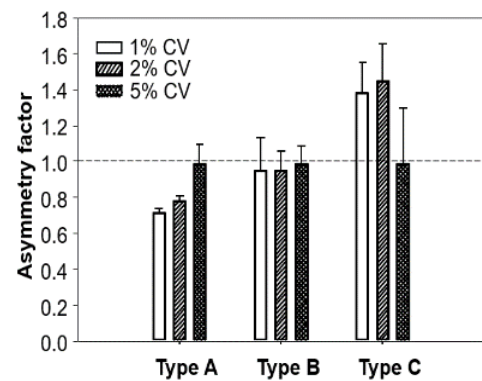


Fig. 7 As values on 3 type columns regarding injection volume

Table 4 Information about 3 types of 10 ml column to find the optimal L/D ratio

	Type A	Type B	Type C
Length of column (L)	65 mm	23 mm	12 mm
Diameter of Length (D)	15 mm	25 mm	35 mm
L/D ratio	4.33	0.92	0.34

플의 부피에 관련 없이 As 값이 1.2 이하임과 동시에 peak의 양쪽



Fig. 8 50 ml column based of type B

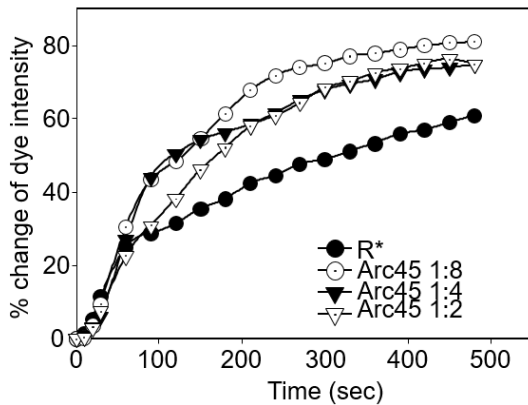


Fig. 9 Percentage of dye intensity change for 3 selected Arc 45 deg. type flow distributors

면적이 동일한 1에 가깝게 수치가 측정 되었고 type A에서는 As 값이 1.2 이하로 측정 되었지만 1% CV ~ 2% CV에서는 As 값이 0.8 아래로 측정되어 type B보다 이상적인 수치에서 벗어나는 결과 값이 측정되었으며 type C에서는 1% CV ~ 2% CV에서 정상 As 기준치인 1.2 이상으로 측정되어 type B에 비하여 부적합함을 알 수 있었다. 따라서 type B의 L/D ratio를 최적의 L/D ratio로 판단 하여 Fig. 8과 같이 50 ml로 스케일 업 과정을 진행하였다.

Fig. 8의 컬럼을 이용하여 이전 실험에서 선별한 Arc 45 deg. type의 3가지 sub-type 흐름 분배기 중 membrane의 영향을 배제한 흐름 분배기만의 성능으로 가장 우수한 sub-type을 선정하기 위하여 각 시간에 대한 컬럼 내의 dye intensity 변화를 Table 5와 같이 측정하였다.

이 결과 Fig. 9에서 Arc 45 deg. type의 3가지 sub-type 중 1:8 sub-type의 흐름 분배기가 가장 빠른 속도로 컬럼 내의 부피 전체를 염색함을 확인하여 가장 우수한 흐름 분배기 성능을 나타냄을 알 수 있었다.

위의 결과를 기반으로 Arc 45 deg. 1:8 sub-type의 흐름 분배기를 선정하여 Fig. 10과 같은 peak asymmetry (peak의 비대칭성) 평가를 5회 진행하여 Table 6에 나타내었다.

5회 측정 모두 As 값이 1.2 이하일 뿐만 아니라 peak의 날카로움을 나타내는 HETP/d 값(이론적으로 한 층에 몇 개의 레진이

Table 5 3 Flow measurement results of selected Arc 45 deg. type flow distributors

	0 sec	30 sec	90 sec	150 sec	210 sec	270 sec	330 sec	480 sec
R*								
Arc45 1:8								
Arc45 1:4								
Arc45 1:2								

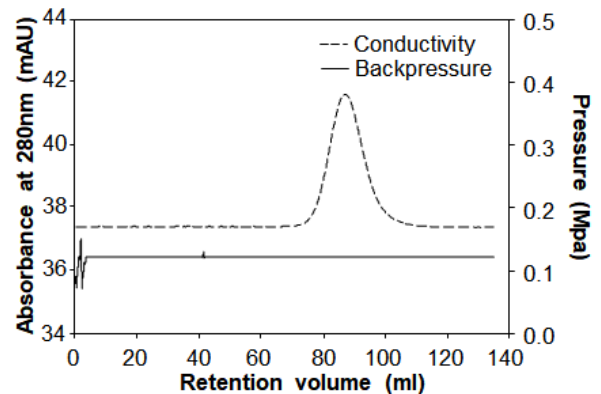


Fig. 10 Column peak containing optimal flow distributor

Table 6 As and HETP/d values of 50 ml column on optimal flow distributor

	#1	#2	#3	#4	#5	Avg	SD
As	1.17	1.14	1.20	0.93	1.01	1.09	0.05
HETP/d	2.01	2.32	2.71	3.89	2.26	2.64	0.33

쌓여있는지 계산한 값^{[18])}이 2~4 dp 범위 안에 들어 좋은 측정 값을 나타냄을 확인하여 Arc 45 deg. 1:8 sub-type 흐름 분배기의 성능을 확인하였다.

이 최적의 L/D ratio를 갖는 50 ml 컬럼과 최적의 흐름 분배기가 항체 정제 시에도 흐름 분배기의 역할을 잘 수행하는지 확인하기 위하여 Fig. 11과 같이 정제를 5회 수행하여 그 결과를 Table 7에 나타내었다.

이 결과 선정한 Arc. 45 deg. 1:8 흐름 분배기는 5회 연속 평균 29.4 mAb mg/resin ml을 정제 할 수 있어 크로마토그래피 정제를 수행 하였을 때 이상이 없음을 알 수 있었다.

4. 결론

크로마토그래피 정제를 위하여 고효율의 흐름 분배기를 개발하

Table 7 Antibody purification ratio using 50 ml column of type B on optimal flow distributor

	1st	2nd	3rd	4th	5th	Avg.	SD
Purification ratio (mAb mg /resin ml)	27.3	34.8	30.9	26.4	27.5	29.4	1.6

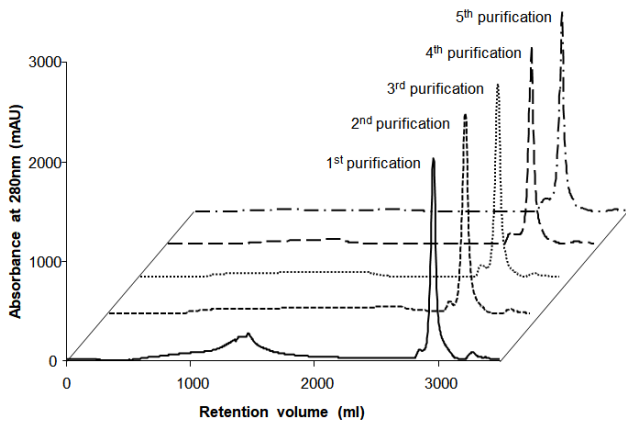


Fig. 11 Antibody purification using 50 ml column of type B on optimal flow distributor

고자 하기 위하여 상용화 된 컬럼의 흐름 분배기를 3D scanning을 통하여 분석하였고, 이를 기반으로 최적의 흐름 분배기를 찾기 위하여 4가지 type의 흐름 분배기를 디자인하였다.

또한 이 흐름 분배기를 상용화된 컬럼에 장착 가능하게끔 SLA 3D printing 기법을 통하여 제작하였고 상용화 된 컬럼에 체결 후 membrane을 장착하여 초고속 카메라를 사용하여 촬영 후 분석하였다.

위 분석을 통하여 Arc 45 deg. type의 흐름 분배기가 상용화 컬럼의 흐름 분배기 및 다른 type의 흐름 분배기들 보다 더 성능이 우수하다는 것을 확인하였다.

이 결과에 기반하여 상용화 된 컬럼에서 뿐만이 아니라 임의의 컬럼에서의 선정한 흐름 분배기들의 성능을 입증하기 위한 목적으로 최적의 L/D ratio를 찾기 위하여 3가지 type의 L/D ratio의 컬럼을 제작하여 As 값을 측정 한 결과 L/D ratio가 1:1에 가까운 type (type B)이 우수함을 알게 되었다.

이를 토대로 type B의 L/D ratio를 갖는 모형의 50 ml 컬럼을 제작하였고 이에 맞추어 Arc 45 deg. type의 3가지 sub-type (1:2, 1:4, 1:8)을 실험 하였다. 그 결과 type B 50 ml 컬럼에 Arc 45 deg. 1:8 흐름 분배기가 더 빠르게 컬럼 내부를 dye로 채웠다.

위의 결과들에 근거하여 선별 된 Arc 45 deg. 1:8 흐름 분배기를 장착한 type B 컬럼에 레진을 채운 후 As 값을 5회 측정 하였으며 컬럼 성능평가 결과 As 값은 1.2 이하 1.0 부근의 값을 얻을

수 있었고 peak의 대칭성을 확인할 수 있었으며 HETP/d 값이 평균 2.638로 이상적인 범위 안에 들은 확인하였으며 이는 일반적인 크로마토그래피 정제 업체에서는 As값이 1이 이상적이지만 1을 기준으로 0.8~1.2를 추천한다^[18]. 개발한 흐름 분배기를 장착함으로써 5회의 실험 평균 값이 1.09라는 이상적인 As 값에 더 근접하였다.

이후 최적으로 선정한 흐름 분배기인 Arc 45 deg. 1:8과 최적의 L/D ratio인 type B 컬럼에 레진을 채워서 항체 정제를 수행한 결과 문제 없이 정제가 진행됨을 확인 할 수 있었다.

위 실험들의 결과를 통해서 우리는 Arc 45 deg. 1:8 type의 흐름 분배기가 가장 우수한 성능을 나타냄을 확인할 수 있었다.

후 기

이 연구는 중소벤처기업부 산학연협력 기술개발사업의 지원으로 수행 되었으며, 이에 관계자 여러분께 감사드립니다(SE180029).

References

- [1] Stankovich, J., 2013, The Impact of Column Connection on Band Broadening in Very High Pressure Liquid Chromatography, *Journal of Separation Science*, 36:17 2709-2717.
- [2] Fekete, S., 2011, The Impact of Extra-Column Band Broadening on the Chromatographic Efficiency of 5 cm Narrow-Bore Very Efficient Columns, *Journal of Chromatography A*, 1218:31 5286-5291.
- [3] Smits, W., 2014, The Impact of Flow Distribution on Column Performance: A Computational Fluid Dynamics Study, *Journal of Chromatography A*. 1369:21 125-130, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.024>.
- [4] Farkas, T., 1996, Column Radial Homogeneity in High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography A*. 740:2 169-181, [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(96\)00107-0](https://doi.org/10.1016/0021-9673(96)00107-0).
- [5] Farkas, T., 1997, Radial Distribution of the Flow Velocity, Efficiency and Concentration in a Wide HPLC Column, *American Institute of Chemical Engineers Journals*. 43:8 1964-1974, <https://doi.org/10.1002/aic.690430806>.
- [6] Farkas, T., 1997, Contribution of the Radial Distribution of the Flow Velocity to Band Broadening in HPLC Columns, *Analytical Chemistry*. 69:22 4592-4600, <https://doi.org/10.1021/ac970530m>.

- [7] Tallarek, U., 1995, NMR Imaging of the Chromatographic Process Migration and Separation of Bands of Gadolinium Chelates, *Journal of Chromatography A*. 696:1 1-18, [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)01231-3](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)01231-3).
- [8] Tallarek, U., 1996, Measurement of Transverse and Axial Apparent Dispersion Coefficients in Packed Beds, *American Institute of Chemical Engineers Journals*. 42:11 3041-3054, <https://doi.org/10.1002/aic.690421106>.
- [9] Shalliker, A., 1999, Visualization of Sample Introduction in Liquid Chromatographic Columns Contribution of a Flow Distributor on the Sample Band Shape, *Journal of Chromatography A*. 865:1-2 83-95.
- [10] Pizzo, S. M., Moraes, D., 1998, Analysis of Liquid Distribution in a Packed Column on a Pilot Scale, *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 37:7 2844-2849, <https://doi.org/10.1021/ie970785q>.
- [11] Leva, M., 1953, *Tower Packings and Packed Tower Design*, United States Stoneware Co., Akron.
- [12] Treybal, R. E., 1980, *Mass-Transfer Operations*, McGraw-Hill Inc., New York.
- [13] Kister, H. Z., 1992, *Distillation Design*, McGraw-Hill Inc., New York.
- [14] Bemer, G. G., Zuiderweg, F. J., 1978, Radial Liquid Spread and Maldistribution in Packed Columns under Different Wetting Conditions, *Chemical Engineering Science*. 33:12 1637 - 1643, [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(78\)85140-9](https://doi.org/10.1016/0009-2509(78)85140-9).
- [15] Engelhardt, H., 2012, *Practice of High Performance Liquid Chromatography: Applications, Equipment, and Quantitative Analysis*, Springer Science & Business Media, Berlin, Heidelberg
- [16] Busnel, J.P., 2001, Investigation and Interpretation of Band Broadening in Size Exclusion Chromatography, *Journal of Chromatography A*, 930:1-2 61-71, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01159-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01159-1).
- [17] MicroSolv Technology Corporation, 23 Jul.2016, viewed 12 september 2019, Knowledge Base Home: Asymmetry Factor, <<http://kb.mtc-usa.com/article/AA-01463/0/Asymmetry-factor.html>>.
- [18] GE Life Sciences, n.d., viewed 18 October 2019, XK Column Packing, <http://www.gelifesciences.co.kr/wp-content/uploads/2017/01/XK-column-packing_narration.pdf>.