pISSN 1229-3008 eISSN 2287-6251
Progress in Superconductivity and Cryogenics
Vol.25, No.4, (2023), pp.60~64
https://doi.org/10.9714/psac.2023.25.4.060

Basic study on high gradient magnetic separation of nano beads using superconducting magnet for antibody purification

Jeongtae Kim[a, c], Insung Park[a], Gwantae Kim[a], Myunghwan Sohn[a], Sanghoon Lee[b], Arim Byun[b], Jin-sil Choi[b], Taekyu Kim[c], and Hongsoo Ha[a, *]

[a] *Cryogenic Apparatus Research Center, Korea Electrotechnology Research Institute, Changwon, Korea*
[b] *Department of Chemical and Biological Engineering, Hanbat National University, Daejeon, Korea*
[c] *Dept. of Nanomechatronics Engineering, Pusan National University, Busan, Korea*

(Received 13 December 2023; revised or reviewed 28 December 2023; accepted 29 December 2023)

Abstract

The manufacturing process of antibody drugs comprises two main stages: the upstream process for antibody cultivation and the downstream process for antibody extraction. The domestic bio industry has excellent technology for the upstream process. However, it relies on the technology of foreign countries to execute downstream process such as affinity chromatography. Furthermore, there are no domestic companies capable of producing the equipment for affinity chromatography. High gradient magnetic separation technology using a high temperature superconducting magnet as a novel antibody separation and purification technology is introduced to substitute for the traditional technology of affinity chromatography. A specially designed magnetic filter was equipped in the bore of the superconducting magnet enabling the continuous magnetic separation of nano-sized paramagnetic beads that can be used as affinity magnetic nano beads for antibodies. To optimize the magnetic filter that captures superparamagnetic nanoparticles effectively, various shapes and materials were examined for the magnetic filter. The result of magnetic separation experiments show that the maximum separation and recovery ratio of superparamagnetic nanoparticles are 99.2 %, and 99.07 %, respectively under magnetic field (3 T) and flow rate (600 litter/hr).

Keywords: high gradient magnetic separation, HTS magnet, antibody biomedicine, affinity chromatography

1. 서 론

항체의약품은 현재 전 세계적으로 바이오 의약품 시장에서 주목받고 있는 중요한 치료제 중 하나로, 이러한 의약품은 인체 내 항원에 대응하여 유발되는 면역 반응을 기반으로 한다. 현재까지의 통계에 따르면, 전 세계 바이오 의약품 시장에서 상위 20개 의약품 중 9개가 항체를 활용한 의약품이다.[1]

그러나 항체의약품은 생산 속도 및 가격 측면에서 개선되어야 할 사항들이 존재한다. 특히, 생산된 항체 현탁액을 정제하여 필요한 항체만 분리하는 다운스트림 공정에서 대표적으로 사용되는 친화성 크로마토그래피는 중력에 의존하는 컬럼 로딩 단계로 인해 생산 속도가 지나치게 느린 문제가 존재한다. [2-4] 더 나아가 이러한 기술을 적용하기 위한 장비의 복잡성[5, 6]은 국내 동등생물의약품(Biosimilar) 산업에 큰 제약 요인이 되고 있다.

본 연구에서는 이러한 한계를 극복하고 항체의약품의 생산 속도를 향상시키기 위해 나노 자성입자 및 HGMS(High gradient magnetic separation) 방법을 활용한 고속 항체 분리 시스템을 제안하였다. HGMS는 고구배 자기분리로 자기분리용 자석의 내부 유로에 자성필터를 삽입하여 그 필터 근방으로 큰 자기구배, 즉 자기장의 집속을 만들어 유체 중의 자성물질을 자성필터 표면으로 용이하게 포획하는 방법이다. 이를 위해 나노 자성입자에 목표하는 항체가 부착되었다 가정하고, 자성입자를 HGMS 방법으로 분리하여 항체를 효과적으로 추출할 수 있는 시스템을 구성하고 실험하였다.

이 시스템이 지속적으로 연구되어 기술 개발과 공정확립이 된다면 기존의 다운스트림 공정의 한계를 극복하고 항체의약품의 제조 속도 및 효율을 향상시킬 수 있을 것으로 기대하며 본 연구를 진행하였다.

* Corresponding author: hsha@keri.re.kr

2. 본 론

2.1. 항체 자기분리기술 개요

Fig. 1과 같이 항체 자기분리 기술은 특정 항체를 효과적으로 추출하기 위한 기술로, 오직 추출 대상인 항체와 결합하는 리간드를 자성입자 표면에 코팅한다. 이후, 이를 현탁액이

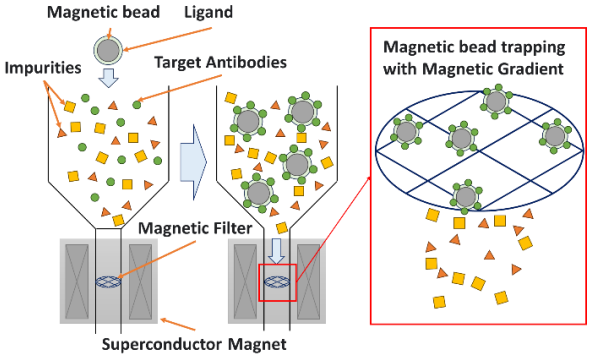

Fig. 1. Magnetic separation mechanism.

들어있는 컬럼에 주입하면 리간드가 상호작용하는 특정 항체만이 자성입자 표면에 결합한다. 이후 HGMS 방법을 활용하는데, 이 기술을 활용하여 현탁액을 자기장이 인가된 자기필터를 통과시키며 추출 대상인 항체와 결합되어 있는 자성입자를 현탁액에서 분리해낸다. [7, 8]

친화성 크로마토그래피는 용매와 용질을 분리하기 위해 컬럼내에 리간드로 코팅된 정지상을 채우고, 이동상인 현탁액을 컬럼 상단에 주입하면 중력에 의해 아래쪽으로 내려가면서 정지상에 의해 추출대상과 불순물이 분리가 된다.[9] 이 과정이 컬럼 로딩이며, 항체 자기분리에서는 이 과정을 중력에 의존하지 않고 다이어프램 펌프로 현탁액을 상대적으로 고속 순환시켜 분리 속도를 높인 기술이다.

2.2. 자기필터 선정 및 구조 설계

항체 자기분리 과정에서 자성입자를 분리함은 물론 회수하는 것이 매우 중요하며, 자기장을 제거한 후 자성입자 회수 시 잔류자화에 의하여 자성필터에 잔류하는 자성입자를 최소화하기 위하여 자성 필터는 잔류자화가 없는 것이 유리하다. 자성필터에 잔류자화가 있을 경우 자성입자 회수가 어려워 재활용율이 떨어질 수 있다. 따라서 실험에 사용된 필터의 선정과 구조 설계는 매우 중요하다.

필터는 유체의 흐름을 차단하지 않으면서 표면에 최대한 많은 자성입자를 포집하여 분리율을 높이기 위하여 유체와 접촉하는 표면적이 큰 메쉬로 선정하였으며, 실험에 사용된 메쉬는 Fig. 2에 나타내었으며, 각각 STS304 100, 200 mesh, STS430 350 mesh가 사용되었다. 그리고 이들은 VSM (Vibrating Sample Magnetometer)을 통하여 자화 특성을 확인하였다.

실험은 1 T의 분위기에서 진행되었으며, Fig. 3과 같이 STS430 350 mesh 샘플의 포화자화는 STS304의 40배 가량으로 측정되었으며, 히스테리시스 곡선의 면적이 거의 측정되지 않아 탈자 후에도 잔류자화가 거의 없을 것으로 판단되었다. 반면에 STS304의 경우에는 히스테리시스 곡선의 면적이 측정되었기 때문에 탈자시에도 잔류자화가 존재할 것으로 예상된다.

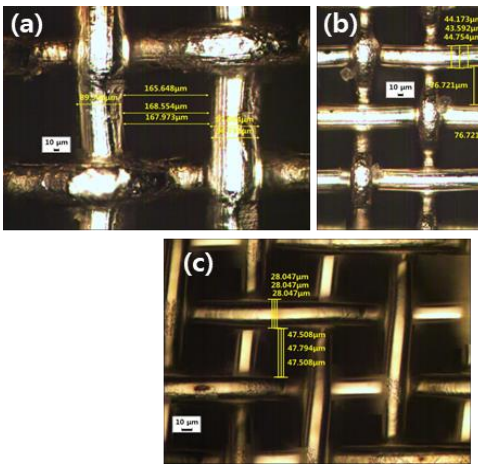

Fig. 2. Optical microscope images of STS304 (a)100 mesh, (b) 200 mesh, and (c) STS430 350 mesh.

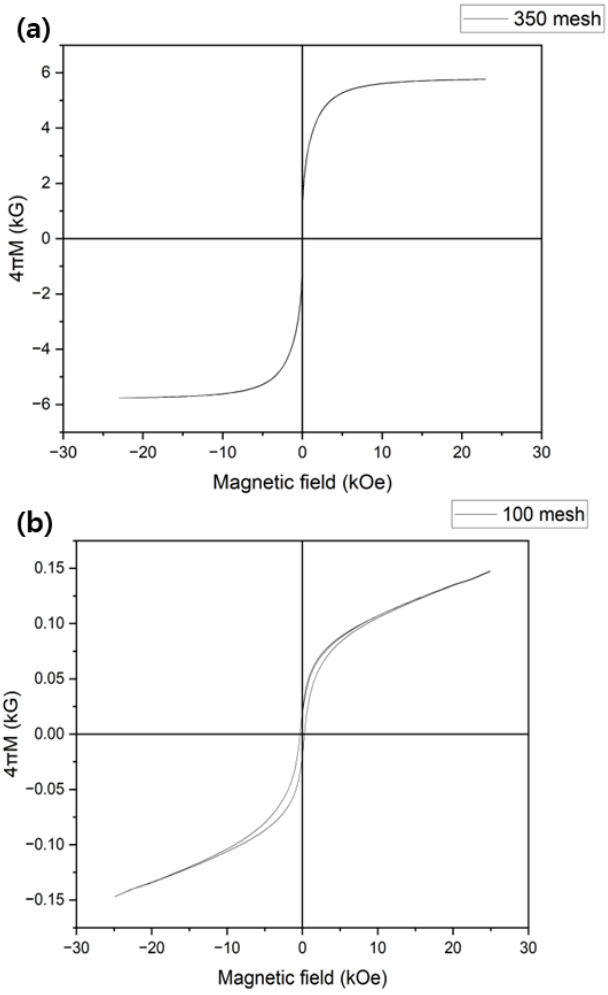

Fig. 3. The result of vsm (a) STS430 ferromagnetic mesh, (b) STS304 nonmagnetic mesh.

필터는 외경 8 mm, 내경 6 mm, 길이 300 mm의 쿼츠 재질의 원형 튜브에 원형 및 권선형으로 제작되었다. 원형 필터는 튜브 내 유체 흐름에 수직한 방향으로 500층이 쌓인 구조로 제작되었고, 이는 불소고무 오링을 사용하여 튜브 내에 고정되었다. 권선형 필터는 비자성 STS304 메쉬를 권선하면서 강자성 메쉬를 여러 겹 겹쳐 함께 권선하는 방식으로 제작되었으며 필터의 사진과 권선 방법은 Fig. 4에 나타내었다.

2.3. 나노상자성입자

Fig. 5는 실험에 사용된 자성입자의 사진이다. 이 자성입자는 평균 입경이 205.32 ± 35.98 nm인 Fe_3O_4이며, 이를 증류수에 희석시켜 농도 9.9 mg/ml 농도의 현탁액을 제조하였다.[10, 11]

실험 동안 모든 용액의 농도 분석은 UV spectroscopy 방법으로 분석하였으며 Jasco사의 V-770 UV-Visible/NIR spectrophotometer를 사용하였다.

2.4. 자기필터 성능 실험

자기필터의 성능 실험은 Fig. 6과 같이 자기장이 인가된 필터를 통과할 때 중력의 영향을 받지 않고 일정한 유속을 유지하기 위해 아래에서 위로 흐르게 구성하였다. 실험에서

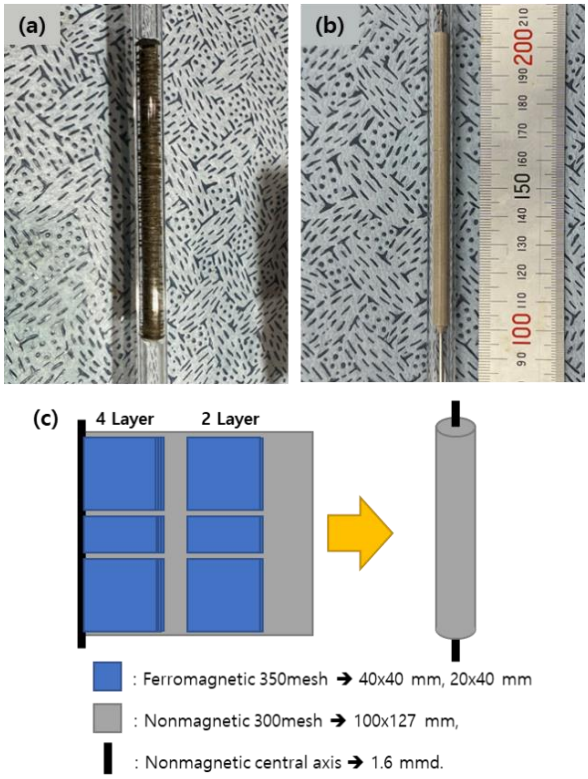

Fig. 4. Magnetic filter (a) staked type filter, (b) wound type filter manufacturing, and (c) wound type filter

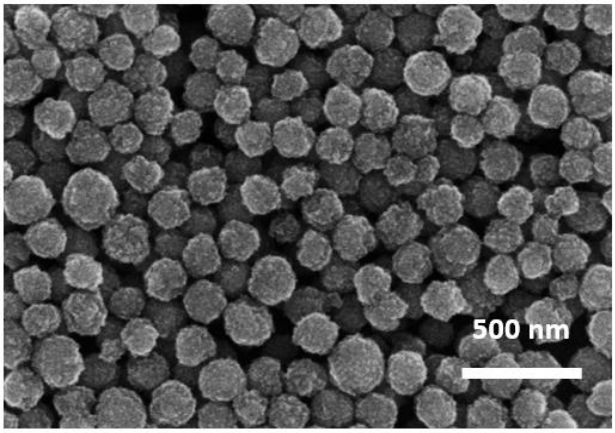

Fig. 5. SEM image of superparamagnetic nano particles.

사용된 다이어프램 펌프는 LEAD FLUID사의 WG600F모델이고, 사용된 자석은 3 T급 초전도자석을 활용하였다. 자기필터는 초전도 자석의 상온 보아(68 mmd.)의 정중앙에 위치시키고 자기필터를 착자하여 자기장을 인가한 후 다양한 조건에서 자성입자 분리 실험을 진행하였다.

분리실험 이후에는 자기필터에 포집된 자성입자를 분리하기 위해 탈자하여 필터에 인가된 자기장을 없앤 후 필터를 자석에서 분리하여 증류수를 흐르게 하여 세척하였다. 실험동안 자기장이 인가된 상태에서 필터를 통과한 현탁액을 “분리액”, 이후 자기장을 탈자한 상태에서 필터를 통과한 현탁액을 “세척액”이라 명명하였다. 이를 UV spectroscopy로 농도를 분석해 분리율과 회수율을 측정한 후 분리대비 회수율을 계산하였다.

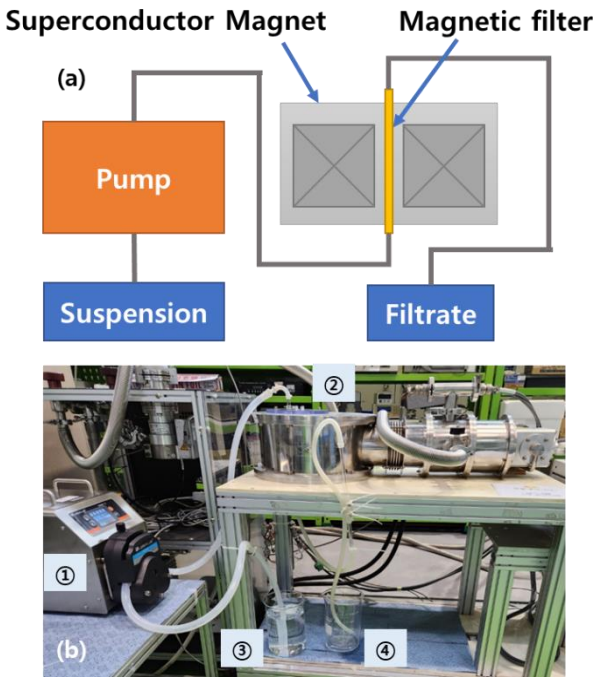

Fig. 6. (a) Design and (b) configuration of magnetic seperation system(① diaphragm pump, ② superconducting magnet, ③ suspension, ④ filtrate)

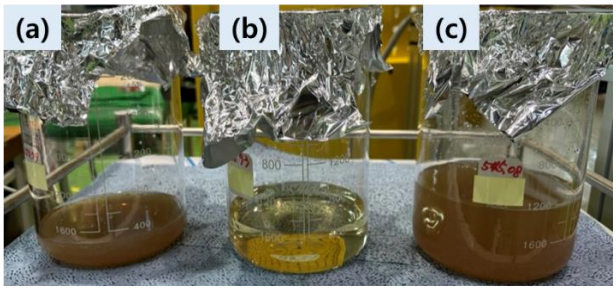

Fig. 7. Images of the (a) suspension, (b) after separation, and (c) recoverd suspension

2.5. 실험 결과 및 토의

실험 결과는 분리액 및 회수액이 육안으로도 뚜렷한 구분이 가능하였으며 Fig. 7(a)의 분리 전 현탁액과 Fig. 7(b)의 분리액을 살펴보면 뚜렷한 색의 차이가 나타나나, 분리액이 완전히 투명한 증류수의 색을 띄지는 않는다. 이는 미처 분리되지 못한 자성입자의 영향으로 보인다.

Table. 1에서 실험 결과를 살펴보면 여러가지 구분 기준에 따라 다른 특성이 나타나는 것을 확인할 수 있다.

필터 재질에 따라 강자성제 필터와 STS304필터 간에는 분리율에서 차이가 나타났는데, 같은 형태인 원형 STS430 필터는 90.66 %의 분리율을, STS304 필터는 평균 86.33 %의 분리율을 보여주었다. 이는 필터의 포화자화도의 차이에서 비롯된 것으로 보이며 회수율에서도 같은 형태의 STS430 필터가 89.33 %인 것에 비해 상대적으로 낮은 82.54 %로 나타났다. 이는 STS304의 잔류자화로 인하여 포집된 자성입자가 필터와 분리되지 않는 것으로 판단되었고, 따라서 STS430 필터가 더 우수한 것으로 나타났다. 추가적으로 원형

TABLE 1
RESULT OF MAGNETIC SEPARATION.

Filter Material	Filter Gap (mesh)	Filter Structure	Diluted Solution Concentration (mg/mℓ)	Flow Rate (L/h)	Concentration of the Separated Solution (mg/ml)	Separation Rate (%)	Cleaning Solution (Recoveries) Concentration (mg/ml)	Recovery Rate (%)	Separation to Recovery Ratio (%)
Ferro	**350**	**Stacked**	**0.04933**	**600**	**0.00447**	**90.66**	**0.03484**	**89.33**	**98.53**
Ferro	**350**	**Wound**	**0.04955**	**300**	**0.00433**	**91.25**	**0.0634**	**81.05**	**88.83**
Non	**100**	**Stacked**	**0.04944**	**600**	**0.00821**	**83.38**	**0.026**	**80.23**	**96.23**
Ferro	**350**	**Wound**	**0.00415**	**300**	**0.00032**	**92.2**	**0.00276**	**55.22**	**59.9**
Non	**200**	**Stacked**	**0.04881**	**600**	**0.00523**	**89.27**	**0.00986**	**84.84**	**95.05**
Ferro	**350**	**Stacked+Wound**	**0.0478**	**150**	**0.00403**	**91.55**	**0.02571**	**90.7**	**99.07**

필터 전체의 최대유량이 600 L/h로 100~350 mesh의 범위에서는 최대 유량에 차이가 없는 것으로 나타났다.

필터 형상에 따라서는 권선형 필터가 91.73 %로 STS430 원형 필터에 비해 우수한 분리율을 보였다. 하지만 회수율에서 권선형 필터가 68.14 %로 분리특성이 매우 떨어지는 것을 확인하였다. 이는 권선형 필터를 석영관 내에 위치시킬 때 끝부분이 구겨져 그곳에 포집된 자성입자들이 세척되지 않은 것이 원인이라고 보인다. 따라서 높은 분리율과 회수율을 얻기 위해서는 권선형 필터의 형태 및 가공 최적화가 필요하다. 또한 분리 속도에서 권선형에 비해 절반수준인 300 L/h를 보였다.

마지막으로 원형 필터와 권선형 필터의 연속 이중 분리 실험을 실시하였으며 우수한 분리율과 회수율을 보였다. 하지만 기댓값에 못 미치는 수준이며 연속 이중으로 필터를 배치하더라도 절대적인 분리율에는 큰 차이가 없는 것으로 확인되었다.

최근의 친화성 크로마토그래피는 회수율이 77.4 %에서 94 %인 것으로 조사되었으며[11-15], 이번 실험에서 원형 필터의 결과들이 거의 비슷하게 도달했다. 하지만 기존의 친화성 크로마토그래피의 최대유량[4]에 비해 최대 20000배, 고속 분리를 목적으로 하는 친화성 크로마토그래피[2]에 비해 23배가량 빠른 고속으로 분리를 할 수 있어, 매우 높은 효율성을 보인다.

실험 결과를 통해 STS430 필터가 STS304 필터에 비해 우수한 분리율과 회수율을 가진 것을 확인하였으며, 권선형 필터가 원형 필터에 비해 우수한 분리율을 가진 것을 확인하였다. 앞으로 필터 최적화 연구가 진행된다면 분리율을 100 %에 가깝게 향상시킬 수 있을 것으로 판단된다. 이 때 필터 설계 시 앞으로 더욱 고자기장의 분위기에서도 실험할 수 있도록 강한 자기장 하에서도 원형을 유지할 수 있도록 내구성을 감안한 설계가 필요하다.

3. 결 론

본 연구에서는 나노 자성입자 및 HGMS 방법을 활용한 고속 항체 분리 시스템을 제안하고, 분리 및 회수 효율 확인을 위해 항체 분리 시스템을 구성하고 실험하였다. 이를 통해 항체의약품의 생산 속도 및 효율을 향상시킬 수 있는 가능성을 확인하였다.

원형 필터의 분리대비 회수율은 거의 100%에 가깝게 도달하였지만 원형 필터보다 분리율이 높은 권선형 필터는 필터 제작 시 발생한 가공불량면에 자성입자가 갇히는 현상에 의해 분리 대비 회수율에서 성능 저하가 발생하였으며, 높은 분리율의 권선형 필터를 사용하기 위해서는 가공 및 형태의 최적화가 필요하다.

또한, 연속 이중 분리 실험 결과에서는 우수한 분리율과 회수율을 보였으나, 단일 필터와 비교하여 큰 차이는 나타나지 않았다. 연속 이중 분리 시스템을 적용하려면 이 원인을 찾아 개선해야 할 것이다.

ACKNOWLEDGMENT

This research was supported by National R&D Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by Ministry of Science and ICT (2022M3I9A1076881), (2023R1A2C100509111)

REFERENCES

[1] Soonman Kwon, et al., "Global Biopharmaceutical Industry R&D Trends and Implications from the Case of COVID-19 Vaccine and Treatment Development," *Khidi Brief*, vol. 332, 2021.

[2] Jian-Bo Qu, et al., "A novel matrix derivatized from hydrophilic gigaporous polystyrene-based microspheres for high-speed immobilized-metal affinity chromatography," *Journal of Chromatography B*, vol. 879, no. 15-16, pp. 1043-1048, 2011.

[3] Steffen Lippold, et al., "CD3 Target Affinity Chromatography Mass Spectrometry as a New Tool for Function–Structure Characterization of T-Cell Engaging Bispecific Antibody Proteoforms and Product-Related Variants," *Analytical Chemistry*, vol. 95, no. 4, pp. 2260-2268, 2023.

[4] Sazia Iftekhar, et al., "Preparation of entrapment-based microcolumns for analysis of drug-humic acid interactions by high-performance affinity chromatography," *Analytica Chimica Acta*, vol. 1239, pp. 340629, 2023.

[5] James Pollock, et al., "Optimising the design and operation of semi-continuous affinity chromatography for clinical and commercial manufacture," *Journal of Chromatography A*, vol. 1284, pp. 17-27, 2013.

[6] Erika L. Pfaunmiller, et al., "Affinity monolith chromatography: a review of principles and recent analytical applications," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 405, pp. 2133-2145, 2013.
[7] Zhicheng Hu, et al., "Development of a high-gradient magnetic separator for enhancing selective separation: A review," *Powder Technology*, pp. 118435, 2023.
[8] J. Oberteuffer, "High gradient magnetic separation," *IEEE Transactions on Magnetics*, vol. 9, no. 3, pp. 303-306, 1973.
[9] David S Hage, "Affinity chromatography: a review of clinical applications," *Clinical chemistry*, vol. 45, no. 5, pp. 593-615, 1999.
[10] Sanghoon Lee, et al., "Mag-spinner: a next-generation Facile, Affordable, Simple, and porTable (FAST) magnetic separation system," *Nanoscale Advances*, vol. 4, no. 3, pp. 792-800, 2022.
[11] Miseon Jeong, et al., "Hyperthermia effect of nanoclusters governed by interparticle crystalline structures," *ACS omega*, vol. 6, no. 46, pp. 31161-31167, 2021.
[12] Haotian Huang, et al., "Biomimetic affinity chromatography for antibody purification: Host cell protein binding and impurity removal," *Journal of Chromatography A*, vol. 1707, pp. 464305, 2023.
[13] Hiroto Takeuchi, et al., "Characterization of SpsQ from Staphylococcus pseudintermedius as an affinity chromatography ligand for canine therapeutic antibodies," *Plos one*, vol. 18, no. 1, pp. e0281171, 2023.
[14] Danyal Imani, et al., "Novel mouse monoclonal antibodies against Bordetella pertussis pertactin antigen with versatile applications," *Journal of Microbiological Methods*, vol. 211, pp. 106786, 2023.
[15] Zongqing Huang, et al., "A specific nanobody-based affinity chromatography resin as a platform for small ubiquitin-related modifier fusion protein purification," *Journal of Chromatography A*, pp. 464508, 2023.
[16] Yi Li, et al., "Selective capture and recovery of monoclonal antibodies by self-assembling supramolecular polymers of high affinity for protein binding," *Nano Letters*, vol. 20, no. 10, pp. 6957-6965, 2020.