

## Effect of pH on the binding of hGM-CSF to ion exchange resin

Hyun-Jong Myoung<sup>1</sup>, Sang-Yoon Lee<sup>1</sup>, Kyoung-Hoon Lee<sup>1</sup>,  
Kyu-Boem Han<sup>2</sup> and Dong-Il Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon, Korea

<sup>2</sup>Hanson Biotech Co., Ltd., Daejeon, Korea

TEL +82-32-863-5946, FAX +82-32-872-4046

### Abstract

The effects of pH on the binding of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF) expressed from transgenic plant cell suspensions to cationic and anionic exchange resins were investigated. In terms of stability, the optimum pH was found to be 5-7. In the case of using buffer exchange, when CM-sepharose was used as a cationic exchange resin, the best binding pH was 4.8 (77%) and when DEAE-sepharose was used as an anionic exchange resin, the best binding pH was 5.5 (74%). Without using buffer exchange, the optimum pH was 4.6 and the adsorption yield was 84%. From these results, a possibility of overcoming the degradation and instability of secreted protein product by *in situ* adsorption was found.

### 서 론

Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF)는 최초로 정제화된 cytokine의 하나로서 T-cell, B-cell, macrophage, endothelial cell 및 fibroblast 등의 많은 cell type에 의해 생산된다. 그리고 이것은 granulocyte, macrophage, eosinophil colony의 성장을 자극하고 기능적 활성을 교체하며 T-cell의 증식을 자극하여 면역기능을 강화시킨다.<sup>1)</sup>

이러한 의료용 단백질을 분리하는 일반적인 방법 중의 하나로서 흔히 쓰이는 방법이 ion-exchange chromatography이다. 이는 목적 단백질과 resin 사이의 상보적인 정전기적 인력을 통하여 분리하는 것으로서 일반적으로 조건이 mild하며 다른 분리 방법에 비해 비용이 저렴하고 많은 용량을 처리할 수 있으며 쉽게 scale-up이 가능하다.<sup>2)</sup>

본 연구에서는 형질전환된 식물세포에서 생산된 의료용 단백질인 hGM-CSF를 목적단백질로 하여 cationic exchange resin인 CM-sepharose와 anionic exchange resin인 DEAE-sepharose를 이용한 흡착에서 pH가 미치는 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 시료

본 실험에 사용된 hGM-CSF sample은 Hanson Biotech에서 배양하고 있는 secreted system을 가진 형질전환된 rice cell에서 얻은 배지를 사용하였다.

### 흡착 실험

흡착에 사용된 resin은 CM-sepharose 및 DEAE-sepharose이었다. CM-sepharose를 이용한 흡착 실험에 사용한 buffer는 100 mM sodium acetate buffer였으며 DEAE-sepharose를 이용한 흡착 실험에는 100 mM sodium phosphate buffer를 사용하였다. Sample의 흡착 전에 resin volume의 10배 이상의 buffer를 흘려주어 pH가 충분히 평형이 되도록 하였다. 흡착 실험은 15 mL 용량의 syringe에 각각의 resin을 1 mL씩 충전하여 0.5 mL/min의 flow rate로 25°C의 온도에서 수행하였다.

### hGM-CSF의 정량분석

분리된 배지 내의 hGM-CSF의 농도는 ELISA 방법을 이용하여 450 nm에서 정량 분석하였다.

## 결과 및 고찰

양이온 및 음이온 교환 수지에 대한 hGM-CSF의 흡착시에 pH가 미치는 영향을 알아보기에 앞서 pH의 변화에 따른 hGM-CSF의 안정성을 알아보았다. pH 5.5에서 거의 100%에 가까운 안정성을 보였으나 4.5 이하인 산성 조건일 경우 80% 이하로 떨어지는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 1). 이 실험을 근거로 하여 대부분의 hGM-CSF가 안정한 범위의 pH 4.5에서 6.5 사이를 resin 흡착 실험의 pH 범위로 결정하였다. 흡착 실험에 사용한 시료는 hGM-CSF를 생산하는 식물세포의 배지를 흡착시 사용하는 equilibrium buffer로 10배 희석하여 buffer exchange시킨 후 pH를 맞춘 상태에서 양이온 교환수지인 CM sepharose를 packing한 column으로 통과시켰다. 이 경우 pH가 높아질수록 점점 흡착율이 낮아짐을 확인할 수 있었다 (Figure

2). 이후 좀더 좁은 범위에서 흡착율을 알아본 결과 pH 4.8에서 가장 높은 흡착율(약77%)을 보였다. 또한 음이온 교환수지인 DEAE-sepharose 역시 buffer exchange를 할 경우 pH가 높아질수록 흡착율이 다소 낮아지는 사실을 확인할 수 있었으며 pH 5.5에서 74%로 가장 높았다 (Figure 3). 이러한 결과를 근거로 하여 각각의 resin에서 buffer exchange시 높은 흡착율을 보인 pH에서 equilibrium buffer로 buffer exchange를 하지 않고 배지를 바로 pH만 맞춘 상태에서 위와 같은 방식으로 실험을 수행한 결과 CM-sepharose의 경우 pH 4.8에서 가장 높은 흡착율(84%)을 보였다. 그러나 DEAE-sepharose는 buffer exchange를 하지 않은 경우에는 CM-sepharose보다 낮은 흡착율을 보였다(Figure 4). 이러한 결과는 세포 배양 중에 배지의 pH를 조절하여 흡착율이 높은 조건으로 맞추어 준다면 ion exchange column을 이용하여 *in situ* adsorption을 통한 복합생물공정에의 응용도 가능할 것이라 사료된다.

### 요 약

본 연구에서는 형질전환된 식물세포배양으로 생산한 hGM-CSF를 cationic exchange resin인 CM-sepharose와 anionic exchange resin인 DEAE-sepharose에 통과키며 pH의 변화를 주었을 때 흡착 여부를 확인하였다. hGM-CSF는 pH가 5-7사이의 범위에서 가장 안정함을 보였으며 이 결과를 바탕으로 각각의 pH 범위를 결정하였다. Buffer exchange를 했을 때 cationic exchange resin인 CM-sepharose의 경우 pH 4.8에서 상대적으로 가장 높은 흡착율(77%)을 보였으며 anionic exchange resin인 DEAE-sepharose를 이용한 흡착에서는 pH 5.5에서 높은 흡착율(74%)을 보였다. 이러한 결과를 바탕으로 buffer exchange 없이 hGM-CSF가 secretion된 배지를 pH를 맞춘 후 좁은 범위에서의 흡착 실험을 수행하였다. 그 결과 pH 4.6에서 CM-sepharose를 이용했을 때 흡착율이 84%로 가장 좋았다. 이러한 결과를 이용하면 외래 단백질을 생산하는 식물세포 배양시에 가장 문제가 되는 protease에 의한 목적 단백질의 degradation을 해결할 수 있는 *in situ* adsorption이 가능하리라 사료된다.<sup>3)</sup>

### 감사의 글

본 연구는 산업자원부의 차세대신기술개발사업(A18-06-03)의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

1. Zhang, X. W., T. Sun, X. Liu, D. X. Gu, and Z. Q. Tang (1999), "Production of granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) by high cell density fermentation of secretory recombination *Escherichia coli*", *Process Biochem.* **34**(1), 55-58.
2. Staby, A. and I. H. Jensen (2001), "Comparison of chromatographic ion-exchange resins II. More strong anion-exchange resins", *J. chromatogr. A.* **908**(1), 149-161.
3. James, E., D. R. Mills, and J. M. Lee (2002), "Increased production and recovery of secreted foreign proteins from plant cell cultures using an affinity chromatography bioreactor", *Biochem. Eng. J.*, **12**(3), 205-213.

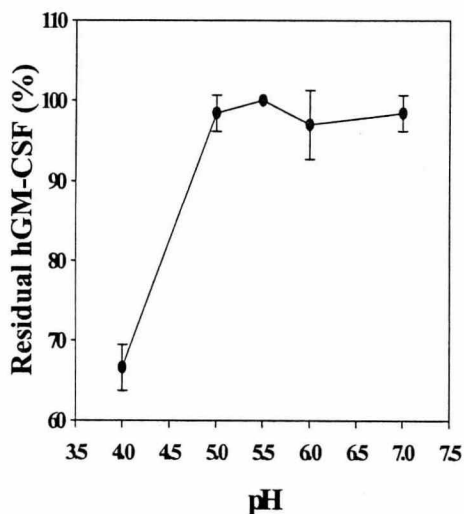


Figure 1. Effect of pH on the stability of hGM-CSF.

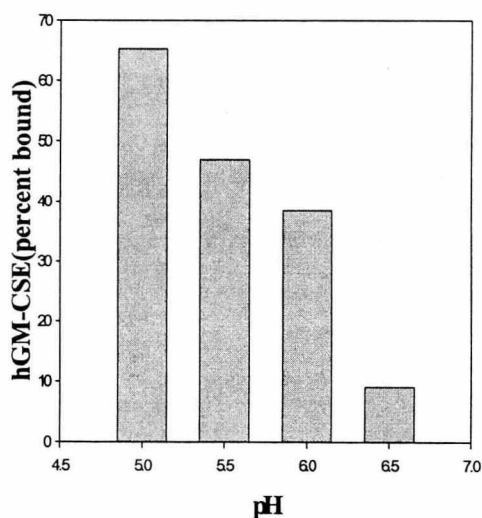


Figure 2 . Effect of pH on the binding of hGM-CSF to cationic exchange resin (CM-sepharose in sodium acetate buffer).