

## 재조합 사람성장호르몬(소마트로핀)의 KFDA 표준품(KS 98/674) 설정 연구

신 원<sup>#</sup> · 정지원 · 진재호 · Adrian F. Bristow\* · 손여원

식품의약품안전청 생물공학과, \*영국 National Institute for Biological Standards and Control(NIBSC)

(Received November 29 2000; Revised December 22, 2000)

### Collaborative Study for the Establishment of KFDA Reference Standard for Somatropin (KS 98/674)

Won Shin<sup>#</sup>, Jee Won Joung, Jae Ho Jin, Adrian F. Bristow\* and Yeo Won Sohn

Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea

\*National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Hertfordshire EN6 3QG, UK

**Abstract** — The complexity and variability of both the biologicals and the bioassays used to test them led to the use of the reference standard- a sample of the product of defined purity and potency, against which all preparations of that product must be calibrated. In order to prepare and establish KFDA reference standard for recombinant human growth hormone (somatropin), somatropin substance was filled in ampoules in National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC). The candidate KFDA reference standard for somatropin (designated as 98/674) was evaluated to determine the suitability of serving as a KFDA reference standard for somatropin by the collaborative study, in which 10 laboratories participated. Physico-chemical analysis and *in vivo* bioassay were performed by direct comparison with the international somatropin standard 88/624. 98/674 was identified as somatropin by SDS-PAGE, IEF, peptide mapping, and HPLC. Determination of somatropin content by SE-HPLC yielded a mean estimate of 2.01 mg somatropin per ampoule. Data from the study also yielded mean values of  $0.39 \pm 0.26\%$  for high molecular weight impurities by SE-HPLC and mean values of  $2.13 \pm 1.29\%$  for somatropin related proteins by RP-HPLC. Estimates of relative potency by weight gain bioassay in the hypophysectomised rats showed that relative potency of KS 98/674 was 1.07 against IS 88/624. Based on the results of the collaborative study, the candidate reference standard for somatropin is suitable to serve as a KFDA reference standard for somatropin.

**Keywords** □ Recombinant human growth hormone, somatropin, reference standard

WHO에서는 인간 및 몇몇 동물의 질병의 진단, 치료, 예방에 사용되며 물리 화학적 방법만으로는 특성을 적절하게 밝힐 수 없는 생물학적 또는 합성물질에 대하여 생물학약품 국제표준품(International Biological Standard) 및 생물학약품 국제참조품(International Biological Reference Reagent)을 설정한다.<sup>1)</sup> 생물학약품 국제표준품은 일차적으로 생물학약품의 활성을 전 세계적으로 같은 방법, 일반적으로 국제단위(IU:

International Units)로 나타낼 수 있도록 하기 위하여 국제 공동연구를 통하여 설정된다. 국제표준품은 실험실에서 일상적으로 수행되는 품질관리 시험에 사용될 수 있을 만큼 충분히 공급되지 못하나 국가표준품(national reference standard)의 보정(calibration) 용도로 국가기관에 제공되어 생물학약품의 활성이 국제 단위 또는 관련 단위로 표시될 수 있도록 하고있다. 국가표준품의 설정은 관련 국가 규제기관의 실험실 또는 국가 규제기관을 대신할 수 있는 실험실에서 수행된다. 제조회사들은 많은 배치(batch)의 생물학약품 분석을 위하여 다수의 국가표준품이 요구되므로 보통 실

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-380-1740 (팩스) 02-383-8322

험실의 작업용 표준품(working reference standard) 설정이 필요하며, 이 경우 활성은 국가표준품 또는, 이것이 불가능할 경우, 국제표준품과 직접 비교하여 보정(calibration) 한다.

유전자재조합 의약품은 동일한 유전자를 이용하여 제조하였다고 하더라도 숙주, 벡터, 정제과정 등의 차이에 의하여 다양한 형태와 생물활성을 갖는다. 따라서 이러한 의약품의 품질관리를 위해서는 그 물리화학적 특성과 생물활성 등이 검증된 표준품 확보가 필수적이다. 이미 미국, 유럽, 일본 등의 선진국에서는 국내에서 유통되고 있는 생물의약품에 대표하는 국가표준품을 설정하여 여러 실험실에서 수행되는 분석결과를 일관성 있게 검토함으로써 국가적 차원에서 생물의약품의 품질관리가 이루어지고 있다. 우리나라에서도 생물의약품, 특히 생명공학의약품의 생산 및 수출이 현저하게 증가하고 있으나 아직 생물의약품에 대하여 표준품이 설정되어 있지 않아 제조회사별로 상이한 표준품을 사용하고 있다. 따라서 우리나라에서도 국가차원의 품질관리와 국가 경쟁력 확보차원에서 생물의약품의 국가표준품 설정이 요구되고 있어, 그 첫 번째 대상으로 우리나라에서 생산 및 유통이 많으며 그 특성이 잘 밝혀진 재조합 사람성장호르몬(소마트로핀: Somatropin)을 선택하여, WHO의 국제표준품 개발기구인 NIBSC(National Institute for Biological Standards and Control)와 국내 제조사 및 수입사와 공동연구를 통하여 소마트로핀의 KFDA 표준품을 설정하고자 하였다.

소마트로핀은 사람 뇌하수체에서 생산되는 성장호르몬의 주요 구성성분(major component)으로 191개의 아미노산을 갖는 구조( $C_{990}H_{1528}N_{262}O_{300}S_7$ )이다. 1985년 이래 유전자 재조합 기술을 이용하여 고순도의 소마트로핀이 생산되고 있으며, 최근에는 국제 공동연구<sup>2-3)</sup>에서 소마트로핀의 제조과정 및 제품의 특성이 철저하게 검증(validation) 되었다면, 일련의 물리 화학적 시험방법(최소한 size-exclusion HPLC, peptide mapping, native or SDS-PAGE, reverse-phase HPLC 포함)을 통하여 소마트로핀 생산배치의 확인, 순도 및 역가를 평가 할 수 있다는 결론에 이르렀다. 또한 생물학적 및 물리화학적 분석에 사용될 비활성이 규정된 소마트로핀 국제표준품의 필요성이 인정됨에 따라 NIBSC 주관 하에 국제 공동연구가 수행되었으며, 1994년 소마트로핀의 제 1차 국제표준품(88/624)이 설

정되어 2.0 mg protein/앰플 및 비활성 3.0 IU/mg으로 규정하였다.<sup>4)</sup> 유럽약전에서 지역국가들의 공동연구를 통하여 소마트로핀의 Chemical Reference Standard(CRS)를 설정하고 비활성 3.0 IU/mg을 도입하였으며 그 결과 일상적인 배치 관리(control)에 더 이상 *in vivo* bioassay 법을 포함하지 않게 되었다.<sup>5)</sup> 일본에서도 소마트로핀의 *in vivo* bioassay 법을 물리 화학적 정량법으로 바꾸기 위하여 1996년 일본 국립 위생시험연구소(NIHS) 주관으로 국립위생시험소 인간 성장호르몬 표준품(Control 951)을 설정하기 위한 공동연구가 있었다.<sup>6)</sup>

본 연구에서는 소마트로핀의 KFDA 표준품을 설정하기 위하여 엘지화학으로부터 소마트로핀의 원료를 제공받아 영국 NIBSC에서 앰플로 충전하여 후보 표준품(KS 98/674)을 만들고, 이 후보 표준품이 국가표준품으로 적합한지를 평가하기 위하여 국내 소마트로핀의 제조사 및 수입사와 공동으로 후보 표준품의 물리, 화학, 생물학적 특성을 살펴보았다.

본 연구의 목적은 1) 후보 표준품 앰플을 열가속 분해 후 물리화학적 분석시험으로 안정성을 검토하고, 2) '99년 European Pharmacopoeia(EP)에 실려있는 size-exclusion chromatography(SE-HPLC) 법에 따라 기존 국제표준품에 대비한 후보 표준품의 소마트로핀(monomer) 함량(mg)을 결정하고, 3) Reverse-phase HPLC(RP-HPLC) 및 SE-HPLC를 이용하여 소마트로핀 고분자 불순물 및 유연 단백질 불순물의 %를 구하고, 4) 소마트로핀 후보물질의 생물활성을 성장촉진에 근거하는 적절한 *in vivo* 생물활성 측정법을 사용하여 국제적으로 공인된 3.0 IU/mg을 확인하고, 5) 후보표준품을 HPLC, peptide mapping, iso-electric focusing(IEF), 및 SDS-PAGE 등의 방법으로 소마트로핀임을 확인하여, 후보 표준품(KS 98/674)이 소마트로핀의 물리화학적 분석시험에 사용될 수 있는 KFDA 표준품으로 사용하기에 적합한지를 공동연구를 통하여 알아보 고자 하였다.

## 실험방법

### 표준품 대상물질

소마트로핀의 표준화에 대해서는 국제회의 및 공동연구에서 많은 논의가 있었으며 다수의 국가표준품과 국제표준품이 설정되어있다. 소마트로핀은 특성이 매

우 잘 밝혀진 순수 단백질로 물리화학적 분석방법으로 소마트로핀의 확인, 순도, 역가 등의 특성이 평가될 수 있음이 국제적으로 인정되고 있다. 따라서 본 연구에서는 여러 개의 소마트로핀 표준품 대상물질을 평가하여 비교하는 것보다는 지정된 후보 표준품을 국가표준품으로 설정하기에 적합한지를 물리화학적 및 생물학적 분석을 통하여 검토하고자 하였다. 표준품 후보물질은 기존의 국가표준품 및 국제표준품과의 일관성 (consistency)을 갖게하기 위하여 최소한 다음 조건, 즉 1) Size-Exclusion HPLC에서 소마트로핀 단량체 (monomer) 양은 96%를 초과하여야 하고, 2) Reverse-Phase HPLC에서 순도 94%를 초과하여야 하며, 3) Bioassay에서 3 units/mg(*in vivo* 생물활성을 측정하여봄으로써 현재 국제적으로 인정되고있는 비활성 3 IU/mg을 확인) 임을 충족하는 것이 NIBSC에 의해 권장되었다. 소마트로핀의 KFDA 표준품으로 설정될 원료(bulk)는 엘지화학으로부터 자사의 시험성적서와 함께 제공받은 것으로, 유전자재조합 기술을 이용하여 효모균(*S. cerevisiae*)으로부터 생산된 것이다.

**소마트로핀 후보표준품 (98/674) 조제**

WHO에서 권장하는 국제표준품 및 국가표준품 조제 조건<sup>1)</sup>에 따라 NIBSC에서 소마트로핀 원액을 앰플에 충전하여 동결건조 하였다. 엘지화학에서 제공받은 동결상태의 소마트로핀 원액(소마트로핀 5.97 g/l, glycine 20 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.7 g/l)을 녹인 후 기존의 국제표준품 88/624와 동일한 조성이 되도록, 부형제를 첨가하여 1 ml 당 조성을 아래와 같이 만들고 0.45 μm membrane을 통과시킨 후 유리 앰플에 1.0 ml 씩 분주하였다.

somatropin	2.0 mg
glycine	20 mg
mannitol	2 mg
lactose	2 mg
sodium bicarbonate	2.5 mg
pH 7.3	

동결건조가 미치는 영향을 평가하기 위하여 앰플 50 개는 -150°C에 저장하여 “frozen baseline(98/675)”으로 사용하였다. 남은 앰플을 동결건조 및 밀봉하여 KFDA 소마트로핀 후보표준품 98/674로 지정하였다. 후보표준품 일부는 안정성 시험을 위한 적정 온도에 저장하고 나머지는 -20°C에 저장하였다.

**안정성시험**

NIBSC에서 열가속 분해시험으로 후보 표준품의 안정성을 평가하였다. 앰플 25개씩을 20°C, 37°C, 45°C에서 137일간 저장 후 -20°C로 이동하여 예비시험을 실시하였다(SE-HPLC, RP-HPLC, IEF, SDS-PAGE, Peptide mapping).

**소마트로핀 KFDA 표준품 설정을 위한 후보 표준품에 대한 공동연구**

NIBSC에서 안정성 시험을 통하여 표준품으로서의 안정성을 확인 후 동결건조된 앰플을 받아 국내 10 개의 실험실에서 공동연구가 수행되었다. 물리화학적 실험을 위해서는 소마트로핀 국제표준품(88/624) 6 앰플과 KFDA 후보표준품(98/674) 4 앰플이 각 실험실에 제공되었고, 생물활성 측정법을 위해서는 국제표준품 및 KFDA 후보표준품 각각 8 앰플이 각 실험실에 제공되었다. 각 실험실에서는 일상적으로 사용하고 있는 작업용 표준품을 같이 실험하였다. 각 시험방법에 대하여 최소한 2 번 독립적으로 실험하여 평균한 값을 그 실험실의 결과로 하였다. 여기에서 독립적 실험이란 서로 다른 앰플(한 앰플을 분주하여 저장한 것이 아닌 것)을 사용하여 수행한 실험을 말하며 하나의 앰플로 2가지 이상의 실험을 하는 것은 가능하였다. 본 연구에 사용된 소마트로핀 국제표준품(88/624)의 표시(labeling)는 아래와 같다.

- 3.0 IU/mg (by definition)
- 2.0 mg protein/ampoule (by definition)

물리화학적 시험방법의 SE-HPLC, RP-HPLC, IEF, Peptide mapping은 '99 European Pharmacopoeia (EP)<sup>7)</sup>의 ‘소마트로핀’에 따라, SDS-PAGE, UV spectroscopy는 '97 USP Pharmacopoeial Forum, Vol 23, Number<sup>58)</sup>의 ‘소마트로핀’에 따라 실시하였다. 생물활성 측정은 '87 European pharmacopoeia<sup>9)</sup>의 ‘사람성장호르몬주, Assay, Method B, 체중 증가법’으로 실시하였다. 참여사에서 일상적인 품질관리에 사용하고 있는 검증된 시험방법은 인정되었다. 각 실험실에 배포한 '99 EP, 소마트로핀의 SE-HPLC, RP-HPLC 시험방법 및 '87 EP, 사람성장호르몬주의 생물활성 측정법을 간단히 요약하면 아래와 같다.

**SE-HPLC(size-exclusion HPLC)** – 소마트로핀 국제표준품 및 후보표준품을 1.0 mg/ml되게 각각 0.025

M phosphate buffer 용액(pH 7.0)에 녹여 표준액 및 검액을 만든다. Resolution 용액은 소마트로핀 국제표준품 1 바이알을 1-2% 이량체가 생기도록 충분시간 50°C 오븐에서 방치 후 0.025 M phosphate buffer 용액으로 1 mg/ml되게 녹인다. 검액, 표준액, 및 resolution 용액의 주입량은 20  $\mu$ l, 컬럼은 hydrophilic silica gel for chromatography(0.30 m $\times$ 7.8 mm ID, 5,000~150,000 molecular mass range)를 사용하고, 측정파장은 214 nm, 이동상은 3 용량의 2-propanol 과 97 용량의 0.063 M phosphate buffer 용액(pH 7.0)의 혼합액, 유량은 0.6 ml/min으로 한다. Resolution(기준선으로부터 단량체와 이량체 사이 valley 까지의 높이/이량체 피크높이)은 0.4 이하여야 한다.

**RP-HPLC(reverse-phase HPLC)** - 소마트로핀 국제표준품 및 후보표준품을 2.0 mg/ml되도록 0.05 M tris-hydrochloride buffer 용액(pH 7.5)에 녹인다. Resolution 용액은 소마트로핀 국제표준품을 2.0 mg/ml되도록 0.05 M tris-hydrochloride buffer 용액(pH 7.5)에 녹인 후 필터하여 상온에서 24시간 방치한다. 검액, 표준액, 및 resolution 용액의 주입량은 20  $\mu$ l, 컬럼은 butylsilyl silica gel(0.25 m $\times$ 4.6 mm ID, 5  $\mu$ m granulometry, 30 nm porosity)을 사용하고, 컬럼 온도는 45°C, 측정파장은 220 nm, 이동상은 29 용량의 propanol과 71 용량의 0.05 M tris-hydrochloride buffer(pH 7.5)의 혼합액, 유량은 0.5 ml/min으로 한다. 소마트로핀 피크와 desamido 소마트로핀 피크 사이의 resolution은 최소 1.0, 소마트로핀 피크의 symmetry factor는 0.9~1.8 이어야 한다.

**생물활성 측정(in vivo bioassay)** - 실험동물은 26-28 일령의 동일 성(sex) 및 동일 종(strain)의 쥐(rat)로 무게 차이가 15 g 이하를 사용하며, 시험 2-3 주 전에 무게를 측정하고 뇌하수체를 절제한다. 시험 첫 날에 무게를 측정하여 10% 이상 무게변화가 있는 쥐는 시험에서 제외하고 시험동물을 그룹 당 8 마리 이상으로 하여 무작위로 4 그룹으로 나눈다. 국제표준품 및 후보표준품 각각을 알부민(carrier 로서 약 0.5% 정도)을 포함하는 0.9%(m/v) NaCl용액으로 0.02 IU/ml~0.16 IU/ml 농도 사이에서 2 배 단계씩 희석한 2 농도의 용액으로 만든다. 2 농도의 표준액과 검액을 0.5 ml씩 각 그룹의 쥐 목 부위에 7 시간 간격으로 하루에 2 번, 4 일간 피하주사 한다. 최종 주사 16 시간 이후 무게를 재어 시험 첫날 몸무게를 뺀 값(무

계증가)을 반응 값으로 한다. 최종 주사 24 시간 이후 부검하여 뇌하수체가 남아있는 쥐는 시험결과에서 제외한다. 적절한 통계분석법으로 검액의 역가를 구한다.

식품의약품안전청에서 모든 참여자로부터 모은 실험 결과(raw data)를 분석하여, 각 실험실에서 제출한 실험결과 값을 그대로 사용 또는 일관성 있게 다시 계산하여 통계적인 분석을 수행하였다. 실험결과와 전체평균은 각 실험실에서 얻은 평균값을 평균하여 구하였으며, 도표에 나타난 실험실 Lab 번호는 순서 없이 무작위로 나열한 실험실 번호이다.

## 실험결과 및 고찰

### 안정성 시험

후보 표준품의 안정성 평가를 위한 열가속 분해시험의 SE-HPLC 결과(Fig. 1)는 후보 표준품이 -20°C, 20°C, 37°C에서는 매우 안정하여 국제표준품의 역가와 거의 유사하였지만, 45°C에 저장하였을 경우 소마트로핀 단량체 함량이 크게 감소하여 상대역가가 0.79로 감소되는 것을 보여주었다(Table I). RP-HPLC(Fig.

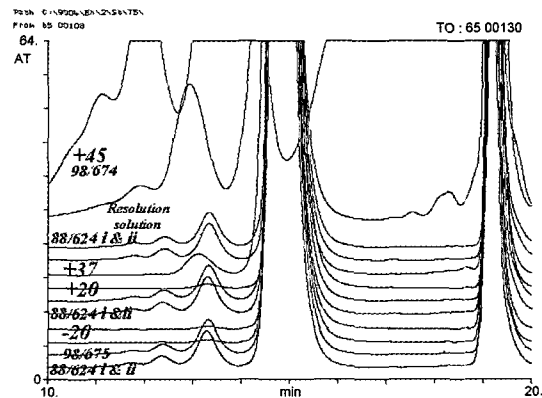


Fig. 1 - Analysis of the candidate KFDA reference standard for somatotropin (KS 98/674) by size-exclusion HPLC. The somatotropin preparations were compared with the 1st international standard (IS) for somatotropin 88/624 to assess the stability of 98/674 using the method described briefly in "Experimental Methods". 98/674 ampoules were held at -20°C, 20°C, 37°C, and 45°C for 137 days. Chromatographic conditions are; column, hydrophilic silica gel (0.30 m $\times$ 7.8 mm ID); mobile phase, 3 volumes of 2-propanol and 97 volumes of 0.063 M phosphate buffer (pH 7.0); flow rate, 0.6 ml/min; detector, 214 nm.

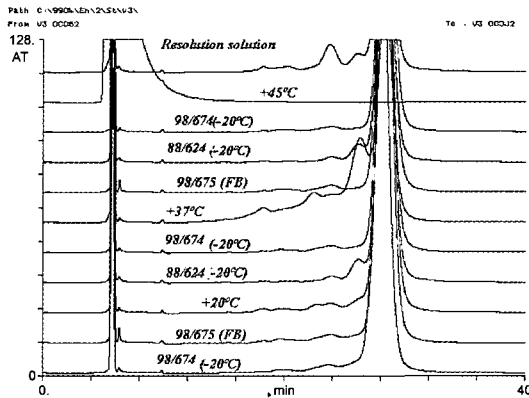
**Table I** – Summary of the stability data of KS 98/674 by SE-HPLC and RP-HPLC

NIBSC Ref.	Temperature Station (°C)	SE-HPLC		RP-HPLC			
		Relative Potency	cv (%)	Principle peak area relative to 88/624	Minor Impurities (%)	Main Impurity (%)	Principle Peak (%)
98/675	Frozen Baseline	1.038	0.27	1.253	4.21	1.02	94.77
98/674	-20°C	1.031	0.76	1.147	3.91	1.53	94.56
98/674	+20	1.030	0.72	1.482	5.04	2.16	92.80
98/674	+37	1.042	0.01	0.739	22.16	23.04	54.80
98/674	+45	0.796 <sup>a)</sup>	0.21	0.008 <sup>b)</sup>	1.74	0.29	97.97
Resolution Solution 37°C, 18 hrs, RP-HPLC; 56°C, 3 days, SE-HPLC		1.035	0.04	0.859	12.51%	4.55%	82.94%

The 98/674 preparations were compared with the 1st international standard for somatotropin 88/624 according to ‘SE-HPLC’ and ‘RP-HPLC’ in Somatotropin, ‘99 EP 873, which are described briefly in ‘Experimental Methods’. All ampoules were held at the respective temperatures for 137 days.

<sup>a)</sup>Ampoules held at +45°C produced principle peaks which were not identical with those for somatotropin; the retention time was 13.79 minutes, cf. range 14.79~14.84 minutes for all others.

<sup>b)</sup>Ampoules held at +45°C produced principle peaks which were not retained, and the peaks at the expected retention times are taken only for reference.



**Fig. 2** – Analysis of the KS 98/674 by reverse-phase HPLC.

The somatotropin preparations were compared with the IS 88/624 to assess the effect of storage at various temperatures using the method described briefly in ‘Experimental Methods’. The chromatographic conditions are; column, butysilyl silica gel (0.25 m × 4.6 mm ID); mobile phase, 29 volumes of propanol and 71 volumes of 0.05 M tris-hydrochloride buffer(pH 7.5); flow rate, 0.5 ml/min, detector, 220 nm.

2) 결과는 후보 표준품을 45°C에서 저장하였을 경우 예상한 것 이상으로 분해되었으나(즉 20주간 저장시 거의 분해되었음) -20°C, 20°C 저장조건에서는 안정성이 유지되었다고 볼 수 있으며, 37°C에서는 정상적인 양상으로 불순물이 생성되었음을 보여주었다(Table II). 또한 SE-HPLC(Fig. 1) 및 RP-HPLC(Fig. 2)의 결과는 후보표준품이 국제표준품에 비하여 좀 더 순도가

**Table II** – Determination of somatotropin content by size-exclusion HPLC. (Laboratory mean estimates and overall mean estimates in mg/ampoule)

Lab code	KS 98/674		IS 88/624
	Total protein	Somatropin	Somatropin
Lab 1	1.96	1.95	1.94
Lab 2	2.02	2.02	1.96
Lab 3	2.02	2.00	1.91
Lab 4	1.97	1.97	1.94
Lab 5	1.94**	1.89**	1.93**
Lab 6	2.03	2.03	1.96
Lab 7	2.01	1.99	1.93
Lab 8	2.11	2.11	1.98
Lab 9	1.98	1.97	1.94
Lab 10	2.03	2.02	1.98
<b>Overall mean</b>	<b>2.01</b>	<b>2.01</b>	<b>1.95</b>
SD	0.0445	0.0472	0.0232
RSD(%)	2.21	2.35	1.19

\*\*The results were excluded from the calculation of overall mean due to nonreproducibility (1.89 compared with 2.01) with those of other labs.

Somatropin content and protein content were calculated from the assigned content of 2.0 mg/ampoule of somatotropin IS (88/624).

$$\text{Somatotropin content of 88/624 (mg/ampoule)} = \frac{\text{monomer peak area of 88/624} \times 2.0 \text{ (mg/ampoule)}}{\text{total peak area of 88/624}}$$

$$\text{Total protein content of 98/674 (mg/ampoule)} = \frac{\text{total peak area of 98/674} \times 2.0 \text{ (mg/ampoule)}}{\text{total peak area of 88/624}}$$

$$\text{Somatotropin content of 98/674 (mg/ampoule)} = \frac{\text{monomer peak area of 98/674} \times 2.0 \text{ (mg/ampoule)}}{\text{total peak area of 88/624}}$$

높은 것을 보여주고 있다. 후보표준품의 IEF, SDS-PAGE, Peptide mapping 결과에서는 소마트로핀이 확인(결과제시 없음)되었다. 후보표준품을 45°C에 저장하였을 경우 국제 표준품에 비하여 안정성이 크게 떨어졌는데 이것은 후보표준품으로 제공받은 원료에 sodium bicarbonate가 첨가되어 있어서 국제표준품과 비교하였을 때 첨가되어있는 부형제의 차이에서 기인되는 것으로 보인다. 이상의 결과 후보표준품은 필요하다면 5~10년마다 소마트로핀 단량체 함량의 재평가가 필요할 수 있으나, 표준품의 저장조건(-20°C 이하)에서 보존할 경우 충분히 안정하다고 사료된다.

#### SE-HPLC에 의한 소마트로핀 함량

'99 EP, Assay 항의 size-exclusion HPLC법에 따라 소마트로핀 국제표준품(88/624)을 보정(calibration)을 위한 대조품으로 사용하여 KFDA 후보표준품(98/674)의 mg 함량을 구하였다. 소마트로핀의 함량은 국제공동연구 보고서<sup>4)</sup>에서도 보여주듯이 소마트로핀 함량을 구하는 분석방법에 따라 달라질 수 있다. EP에서 소마트로핀 정량법은 SE-HPLC 방법을 쓰고 있는데, 이것은 대부분의 단량체 분해산물(예, desamido, oxidized 등)은 활성이 있는 반면, 이량체(dimer), 덩어리(aggregates) 또는 분절형태(cleaved form)는 활성이 감소된다는 것이 알려져 있기 때문이다. 따라서 소마트로핀 함량(mg/앰플)은 앰플에 들어있는 총 단백질에서 이량체 및 덩어리를 제외한 소마트로핀 단량체 함량으로 구하였다. 즉 SE-HPLC 크로마토그램에서 국제표준품의 총 피크 면적인 2.0 mg protein/앰플에 대한 후보표준품의 총 피크 면적과 소마트로핀 단량체 피크 면적으로부터 후보표준품의 총 단백질량 및 소마트로핀(단량체) 함량을 구하였다. 각 실험실에서 구한 소마트로핀 함량의 평균값, 전체적인 평균값 및 편차를 Table II에 나타내었다. SE-HPLC에 의한 국제표준품 88/624의 소마트로핀 함량은 1.95 mg/앰플로 구하여 졌고, 후보표준품의 소마트로핀 함량과 총 단백질 함량은 2.01 mg/앰플로 동일하게 나타나 후보표준품이 매우 순수함을 보여주었다. 실험실간의 편차를 보여주는 상대표준편차(RSD)는 허용될 수 있는 범위내의 상대표준편차인 2~3% 범위 내에 속함을 볼 수 있었으나 Lab 5의 실험값은 전체 실험실의 평균값에서 비교적 크게 벗어나 전체 평균함량 계산

에서 제외하였다.

'99 EP에 의하면 resolution용액을 만들기 위하여 표준품을 50°C에서 12-24 시간 두어 1~2%의 이량체를 생성하게 하였으나, 후보표준품의 경우 아래 고분자 불순물을 구하는 실험결과에서도 보여주듯이 국제표준품에 비하여 고분자 불순물 함량이 적기 때문에 후보표준품으로 resolution 용액을 만들 경우에는 '99 EP 방법보다는 약 55°C에서 3일 이상 방치하는 것이 좋다고 보여진다.

#### UV 흡수 스펙트럼에 의한 단백질 함량

'97 USP Pharmacopeial Forum의 소마트로핀 단백질 함량 측정법에 따라 280 nm 근처에서 흡광도가 극대인 값 및 320 nm에서 흡광도를 구하여 희석용량×(A<sub>max</sub> - A<sub>320</sub>/0.82) 공식에 따라 단백질 함량을 구하였다. 개개 실험실의 평균값 및 전체평균값을 Table III에 나타내었다. UV 흡수 스펙트럼에 의한 후보표준품 98/674와 국제표준품 88/624의 단백질량은 둘 다 1.97 mg/앰플로 SE-HPLC에 의한 값과 거의 일치함을 보여 주었다.

Table III – Determination of total protein content by UV absorbance spectroscopy (Laboratory mean estimates and overall mean estimates in mg/ampoule)

Lab	KS 98/674 (mg/ampoule)	IS 88/624 (mg/ampoule)
Lab 1	1.988	2.020
Lab 2	1.965	1.961
Lab 3	1.978	1.981
Lab 4	1.960	1.920
Lab 5	2.040	1.967
Lab 6	1.929	2.078
Lab 7	1.940	1.935
Lab 8	1.950	1.950
Lab 9	1.979	1.947
Lab 10	2.003	1.950
<b>Overall mean</b>	<b>1.973</b>	<b>1.971</b>
SD	0.032	0.046
RSD(%)	1.643	2.357

UV absorbance test was performed according to 'Content of protein' in Somatropin, the USP Pharmacopeial Forum volume 23, number 5, 4668 (97. Sep.-Oct.). Samples were dissolved by adding 2.0 ml of 25 mM Phosphate buffer to each ampoule. Protein content was calculated by the formula  $2.0 \times (A_{\max} - A_{320})/0.82$ . Protein content of 98/674 calculated by SE-HPLC was 2.01 mg/ampoule.

**고분자 불순물 (Higher molecular weight impurities)**

'99 EP Assay 항의 SE-HPLC 방법에 따라 주피크 (단량체)를 제외한 다른 모든 피크면적의 합을 총 피크 면적에 대한 % 값으로 고분자 불순물의 함량을 구하였다. 각 실험실의 평균값과 전체 평균값을 Table IV에 나타내었다. 고분자 불순물의 함량은 후보표준품의 경우  $0.39 \pm 0.26\%$ , 국제표준품의 경우  $2.42 \pm 0.94\%$ 로 후보표준품이 국제표준품에 비하여 순도가 좀 더 높은 것으로 나타났다. Lab 5의 경우 다른 실험실 값에 비하여 편차가 심하여 전체 평균값 계산에서 제외하였다.

**소마트로핀 유연 단백질 (Related Proteins)**

소마트로핀의 desamido 및 oxidized form의 함량을 '99 EP의 reverse-phase HPLC 방법에 따라 측정하였다. 33분 경에 나오는 소마트로핀 주 피크의 앞에서 나오는 피크 면적의 합을 구하여 총 피크 면적에 대한 비율(%)을 구하였다. 대부분의 실험실에서 1~3개의 피크를 잡았으며 실험실 각각의 평균 측정값과

**Table IV** - Determination of high molecular weight impurities (%) by size-exclusion HPLC and related protein impurities (%) by reverse-phase HPLC (Laboratory mean estimates and overall mean estimates)

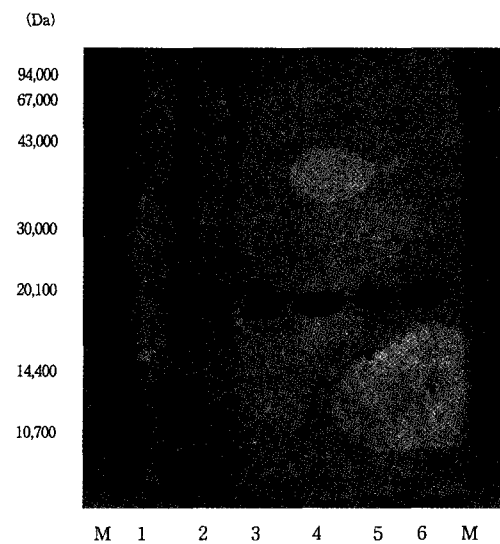
Lab code	SE-HPLC		RP-HPLC	
	Dimer+Polymer (%)		Related Proteins (%)	
	IS 88/624	KS 98/674	IS 88/624	KS 98/674
Lab 1	3.10	0.77	3.15	2.45
Lab 2	2.05	0.18	4.50	0.98
Lab 3	3.58	0.80	7.05	2.40
Lab 4	3.02	0.19	2.22	1.99
Lab 5	3.34**	2.69**	4.40	4.31
Lab 6	1.49	0.10	2.13	0.04
Lab 7	3.31	0.57	3.10	2.78
Lab 8	1.28	0.30	-	-
Lab 9	2.81	0.32	8.55	3.17
Lab 10	1.12	0.28	2.13	1.03
<b>Overall mean</b>	<b>2.01</b>	<b>0.39</b>	<b>4.13</b>	<b>2.13</b>
SD	0.9419	0.2604	2.2894	1.2930
RSD(%)	38.97	67.16	55.38	60.81

\*\*The results were excluded from the calculation of overall mean due to non-reproducibility (2.69 compared with 0.39) with those of other labs.  
 - The results were excluded from the calculation of overall mean because the data were not acceptable due to the lack of system suitability.

전체 평균값을 Table IV에 나타내었다. 불순물 측정값은 국제표준품의 경우 2.13%에서 8.55%까지로 나타났고 후보표준품의 경우에는 0.04%에서 4.31%까지 보여줌으로써 이 방법은 실험실간의 편차가 다소 큰 것을 보여준다. 유연단백질 평균함량도 후보표준품은  $2.13 \pm 1.29\%$ , 국제표준품의 경우  $4.13 \pm 2.29\%$ 로 나타나 후보표준품이 국제표준품에 비하여 좀 더 순도가 높은 것을 보여주고 있다. Lab 8의 경우 비 전형적인 크로마토그램으로 인하여 피크면적을 구하기 어려워 전체 평균값 계산에서 제외하였다.

**SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis**

'97 USP Pharmacopeial Forum의 확인시험항의 전



**Fig. 3** - Analysis of the KS 98/674 by SDS-PAGE, followed by silver staining (typical picture). Electrophoresis was performed according to 'Electrophoretic identification' in Somatropin, the USP Pharmacopeial Forum volume 23, number 5, 4664 (97. Sep.-Oct.). M, molecular weight marker; 1, control 1 (IS 88/624, 50 ng/25 µl load); 2, control 2 (IS 88/624, 20 ng/25 µl load); 3, standard 1 (IS 88/624, 20 µg/25 µl load); 4, standard 2 (IS 88/624, 30 µg/38 µl load); 5, test sample 1 (KS 98/674, 20 µg/25 µl load); 6, test sample 2 (KS 98/674, 30 µg/38 µl load). The intensity of the two major bands of the test solution should correspond to those in the standard solution. No new significant band should be observed in the test solution that is not present in the 38 µl application of the standard solution

기영동 방법에 따라 실험하였으며 실험실에 따라 사용한 젤의 크기 및 검체량에서 다소 차이가 있었으나, 모든 실험결과에서 국제표준품 및 후보표준품의 주 밴드의 위치는 22 KDa 근처에서 일치하여 나타났고 부(minor) 밴드의 패턴도 동일하게 나타났다. 검체를 한정된 수량만 제공하였기 때문에 실험실에 따라서는 사용하고 남은 검체를 오랜 기간 보관 후 사용한 관계로 분해된 부 밴드들이 많이 보였다. 전형적인 실험결과는 Fig. 3과 같다.

### Peptide Mapping

'99 EP, 확인시험항의 peptide mapping 방법에 따라 수행한 각 실험실의 결과를 EP 표준품(somatropin CRS)에 첨부되어있는 Ph. Eur.(European Pharmacopoeia) reference chromatogram of somatropin digest (Fig. 4)와 비교하였을 때 대부분이 정성적으로 유사하였고 국제표준품과 후보표준품을 비교하였을 때에도 정성적으로 유사한 양상을 보였다(결과 제시 않음).

### 등전집속 (Isoelectric Focusing, IEF)

'99 EP의 Isoform distribution 에 따라 실험하였으며 각 실험실마다 젤의 크기 및 검체량에서 차이가 있었으나 isoform을 확인하는데 있어서 커다란 차이는 보이지 않았다. 국제표준품 및 후보표준품에서 주 밴드가 pI 약 5 부근에서, 부 밴드가 pI 약 4.8 부근에서 일치하여 나타났다. 전형적인 실험결과는 Fig. 5와 같다.

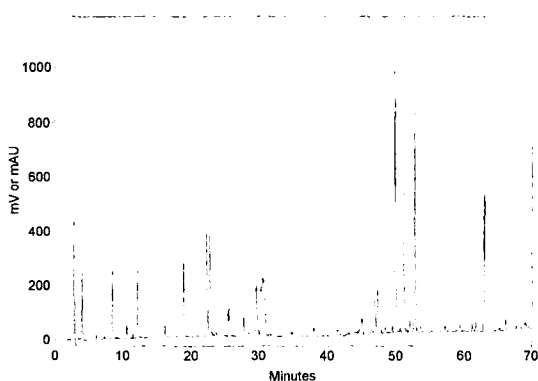


Fig. 4 - European Pharmacopoeia (EP) reference chromatogram of somatropin digest which comes with the EP somatropin chemical reference standard (CRS). The chromatogram of peptide mapping obtained from each lab was qualitatively similar to the chromatogram of EP somatropin CRS.

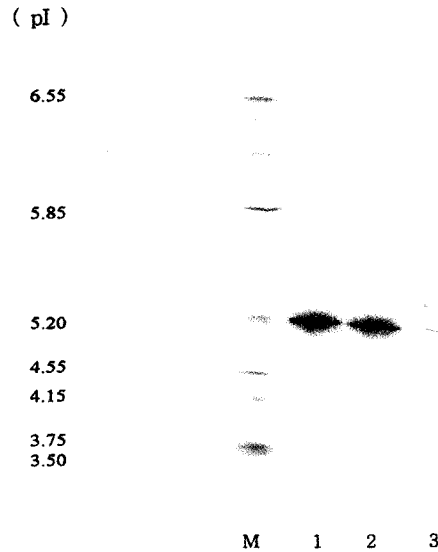


Fig. 5 - Analysis of the KS 98/674 by IEF ge. electrophoresis (typical picture). Electrophoresis was performed according to 'Isoform distribution' in Somatropin, '99 EP. M; pI marker 2.8~6.5; 1, 88/624 (2 mg/ml, 15  $\mu$ l); 2, 98/674 (2 mg/ml, 15  $\mu$ l); 3, 98/674 (100  $\mu$ g/ml, 15  $\mu$ l). No band apart from the major band in lane 2 should be more intense than the major band in lane 3.

### 생물활성 측정 (in vivo bioassay)

'87 EP의 사람성장호르몬 주사액, Assay 항의 method B, 체중 증가법에 따라 네 개의 실험실에서 실시하였다. 국제표준품과 후보표준품을 하루 투여량 0.02 IU/ml~0.16 IU/ml 범위에서 2 농도(Lab IV는 3 농도)를 잡아 0.5 ml씩 매일 2 회, 4 일간(Lab I은 5일간) 투여 후 체중증가를 측정하였다. 각 실험실 평균값과 실험결과의 통계처리(EP 부속서의 생물활성 시험의 평행분석 통계법)를 Table V에 나타내었다. 분석 결과의 유효성(validity)을 평가하기 위하여 Log용량-반응 직선의 평행(parallelism) 및 직선성(linearity)을 구하였을 때, Lab III-test 1을 제외하고는 평행(parallelism)에서 유의성 있게 벗어난 것이 없었으며, 세 농도에서 실험한 Lab IV의 경우 직선성(linearity)에서도 유의성 있게 벗어나지 않았다.

국제표준품 88/624 에 대한 후보표준품 98/674의 상대적 역가(relative potency: IU/IU) 의 각 실험실 평균값은 1.07로 국제적으로 공인된 3.0 IU/mg 도입에 무리가 없음을 보여준다. 통계적으로 유의성 있게 벗어난 LAB III-test1의 값을 제외하였을 경우 상대적



**Table V** – *In vivo* Bioassays (body weight gain)

Lab	Concentration (mIU/day)	Weight gain (g)		Slope		Relative potency	
		IS 88/624	KS 98/674	IS 88/624	KS 98/674	KS 98/674	Weight
Lab I (test1)	20	12.67	13.46	14.3009	13.9354	1.11727	300.66
	80	21.28	21.65				
Lab II (test1)	80	12.8	14.08	5.0036	2.2838	1.33417	27.88
	320	15.81	15.45				
(test2)	80	12.69	13.38	7.0175	4.7129	0.99754	65.37
	320	16.91	16.21				
Lab III (test1)	60	9.44	11.2	13.1493	4.1725**	1.09044	220.40
	120	13.5	12.5				
(test2)	60	12.93	12.14	8.6785	5.4811	0.41472	20.91
	120	16.96	13.8				
Lab IV (test1)	40	11.9	11.95	4.4638	7.1712	1.21361	108.02
	80	13.47	13.22				
	160	14.59	16.27				
(test2)	40	13.59	12.82	4.3802	5.1822	0.92689	65.27
	80	13.98	14.55				
	160	16.22	15.94				
Weighted geometric mean of all estimates						1.07	
Lower 95% limit						0.92	809
Upper 95% limit						1.26	
Omitting invalid assay						1.07	
Lower 95% limit						0.89	
Upper 95% limit						1.29	

\*\*Significant deviation from parallelism

The potency of KS 98/674 relative to IS 88/624 was estimated by the weight gain bioassay in hypophysectomised rat which is described briefly in "Experimental Method". Log dose-response lines did not deviate significantly from parallelism except in Lab III-test1, or from linearity in Lab IV(the only laboratory with tests for linearity).

역가의 전체 평균값은 변화하지 않았으나 95% 신뢰 상한 및 하한 값이 약간 넓어졌다.

**결 론**

소마트로핀의 KFDA 표준품 설정을 위하여 우리나라의 소마트로핀 제조사 5 곳, 수입사 4곳, 식품의약품안전청에서 수행한 공동연구의 결과는 다음과 같다.

1. HPLC, IEF, SDS-PAGE 및 peptide mapping 방법으로 소마트로핀 KFDA 후보표준품을 확인하였을 때 국제표준품의 시험결과와 잘 일치하였다.
2. 후보표준품의 소마트로핀 함량을 size-exclusion HPLC 방법으로 측정하였을 때 2.01 mg/앰플 이었다.
3. 소마트로핀 후보표준품의 고분자 불순물은 size-exclusion HPLC 방법으로 측정하였을 때 0.39% 이었다.
4. 소마트로핀 후보표준품의 유연 단백질은 reverse-phase HPLC 방법으로 측정하였을 때 2.13% 이었다.

**공동연구 참가 실험실**

NIBSC에서는 소마트로핀의 국가표준품 설정을 위하여 *in vivo* bioassay를 제외한 모든 분석에서 최소 6 개실 이상의 실험실에서 2 회 이상의 실험과 bioassay에서 최소 2 개실 이상의 실험실에서 2 회 이상 실험하는 것을 권장하였다. 본 공동연구에는 소마트로핀의 국내 제조사 5 개사(김성규, 녹십자; 김학범, 동신제약; 이성희, 동아제약; 이영필, 열지화학; 권세창, 한미약품)와 수입사 4 개사(Anders Vinther, 노보노디스크; 김재호, 파마시아업존; 양명환, 한국윌리; 지태현, 한국세르노) 및 식품의약품안전청이 참여하였다.

5. 소마트로핀 국제표준품 88/624에 대한 후보표준품 98/674 생물활성의 상대적 역가는 1.07로 후보표준품의 생물활성은 국제표준품과 거의 동일하였다.

6. 소마트로핀 KFDA 후보표준품을 국제표준품을 사용하여, 확인, 순도, 함량, 생물활성을 측정하였을 때, 이상의 결과로부터 소마트로핀 후보표준품은 현재 국내에서 유통되고 있는 소마트로핀의 물리화학적 분석 및 생물활성 측정에 표준품으로 사용하기에 적합하다고 사료된다.

## 문 헌

- 1) Guidelines for the preparation, characterization and establishment of international and other standards and reference reagents for biological substances. WHO Technical Report Series. No. 800, 181 (1990).
- 2) Bristow, A. F. and Jeffcoate, S. L. : Analysis of therapeutic growth hormone preparations; Report of an Inter-laboratory Collaborative Study on growth hormone methodologies. *Biologicals*. **20**, 221 (1992).
- 3) Bristow, A. F. and Jeffcoate, S. L. : Assay of rDNA growth hormone. *Pharmeuropa*. **3**(March), 1 (1991).
- 4) Bristow, A. F., Gaines-Das, R., Jeffcoate, S. L. and Schulster, D. : The first international standard for somatropin : Report of an international collaborative study. *Growth Reg.* **5**, 133 (1995).
- 5) Bristow, A. F. : Collaborative study for the establishment of somatropin chemical reference standard. *Pharmeuropa special issue. Bio* **96**, 70 (1996).
- 6) Yomota, C., Okada, S., Uchida, E., Morimoto, K. and Hayakawa, T. : 國立衛生試験所ヒト成長ホルモン標準品(Control 951). *Bull. Natl. Inst. Health Sci.* **114**, 130 (1996).
- 7) Somatropin. *Eur. Pharmacopoeia*. 873 (1999).
- 8) Somatropin. *USP Pharmacopeial Forum*. **23**, 4663 (1997).
- 9) Human growth hormone for injection. *Eur. Pharmacopoeia*. 556 (1987).