

Erythropoietin *in vivo* 시험법의 *in vitro* 대체 시험법 확립

† 백 상 훈 · 김 진 만 · 권 기 성 · 박 송 용 · 허 재 옥
(주) 녹십자 R&D, 종합연구소
(접수 : 2003. 3. 21. 게재승인 : 2003. 7. 11)

Replacement of the *in vivo* Bioassay for Erythropoietin with the *in vitro* Bioassay

Sang-Hoon Paik†, Jin-Man Kim, Gi-Sung Kwon, Song-Yong Park, and Jae-Wook Huh
Central Research Center, Green Cross R&D Corporation, Yong-in 449-770, Korea
(Received : 2003. 3. 21. Accepted : 2003. 7. 11.)

In vivo bioassays for biological medicines have been considered final resort to unequivocally assess the biological activities for them because there are some cases in which the biological activities obtained from *in vivo* bioassay and *in vitro* bioassay quite differ each other. The *in vivo* biological activity of EPO depends on its sialic acid contents which confer microheterogeneity-isoforms to this protein. We have devised a method which consists of a *in vitro* bioassay using BaF3 cell line and a capillary zone electrophoresis (CZE) for the measurement of the EPO isoform distribution. The biological activity of EPO obtained using *in vitro* bioassay with BaF3 cell line showed good correlation (C.V.(%) 7.34, 5.85, 8.16, 8.08, 8.8) to EPO content measured either spectrophotometric assay (A280 0.1% =0.743) or radio immunoassay. The assay validation results of *in vitro* bioassay with 3 lot of in house EPO showed good results to EPO content measured either *in vivo* assay or radio immunoassay. and also showed good results the robustness of our method in terms of precision, accuracy, repeatability.

The isoform distribution for EPO-BRP (1 : 1 mixture of epoetin- α and epoetin- β , European Pharmacopoeia) by CZE method resulted in isoform 2 through isoform 8. The major peaks in electrophoregram were composed of isoform 3 through 7. Our recombinant EPO (epoetin- α) having equivalent *in vivo* biological activity showed the isoform distribution of isoform 3 through 9. The major peaks consisted of isoform 4 through 8. The peak area of isoform 4 was always smaller than that of isoform 5. The preparations of recombinant epoetin- α with lower *in vivo* biological activity than EPO-BRP showed the isoform 2 through 8 in their electrophoregrams whose major peaks consisted of the isoform 3 through 7. The peak area of isoform 4 was larger than that of isoform 5.

Key Words : Erythropoietin, EPO, isomer, *in vitro*, *in vivo*, bioassay

서 론

만성 신부전증 환자의 빈혈 치료의 목적으로 사용되고 있는 재조합 erythropoietin 제제의 역가 측정에 이용되는 동물실험 (*in vivo* bioassay)은 whole animal의 사용에 수반되는 비용 및 윤리적인 문제, 그리고 동물 시험의 많은 경우에 발생하는 laboratory to laboratory variance로 인해 이러한 요소들을 극복할 수 있는 대체시험법 개발이 요청되었으며 재조합

erythropoietin은 국내에서 이미 자체 개발하여 여러 제약회사에서 시판 중에 있으나 상술한 제반 문제점들로 *in vivo* bioassay를 대체할 수 있는 reliable한 assay 법의 개발이 요청되고 있고 유럽의 European Department for the Quality Medicines (EDQM), 영국의 National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) 등의 국제적으로 명망있는 기관에서 이미 현재 사용되고 있는 *in vivo* 시험법을 대신할 수 있는 *in vitro* 시험법의 개발하여 수년 내에 EP 등의 공정서에 게재할 것을 목적으로 연구를 진행하고 있다(1).

재조합 erythropoietin은 이미 그 물질의 특성이 잘 밝혀졌고 제조공정 등이 일정하게 관리되고 있는 제품이므로 현재 사용되고 있는 *in vivo* 시험법을 대신할 수 있는 적절한 *in vitro* 시험법의 개발이 매우 타당하게 사료된다(4, 5). 재조합

† Corresponding Author : Central Research Center, Green Cross R&D, Yong-in 449-770, Korea
Tel : +82-31-280-6255, Fax : +82-31-280-6259,
E-mail : shpaik@greencross.com

Erythropoietin의 생물학적 활성을 정량하기 위하여 mouse을 이용한 *in vivo* bioassay를 대체하기 위해서는 재조합 Erythropoietin의 Ba/F3 cell line을 이용하는 *in vitro* bioassay 법이 확립되어야 하며(6, 7) 재조합 Erythropoietin의 isoform 분석법 (capillary zone electrophoresis)과 재조합 Erythropoietin의 sialic acid 함량(2) 및 당쇄 구조 분석법을 확립하여 재조합 Erythropoietin의 *in vivo* assay 결과와 상술한 연구 내용과 상관관계 (correlation)를 보여야 한다.

재료 및 방법

세포주 및 배양

본 실험에 사용한 세포주 BaF3-EPOR은 BaF3 세포주를 형질전환시켜서 만들었으며, EPO를 흡수하여야만 성장할 수 있는 세포주이다. 세포주를 계대배양 하는 경우 배양액에 혈청을 10% 첨가하고 EPO를 1 unit/ml이 되도록 첨가하였다. BaF3-EPOR 세포를 IMDM 배양액을 이용하여 4일간 5% CO₂가 포함된 37°C 배양기에 넣고 배양하고 세포수는 trypan blue를 이용하여 측정하였다.

T-flask 이용한 EPO *in vitro* assay 실험 (MTS 방법)

10%의 혈청이 포함된 배양액에 0.1 unit/ml부터 0.7백배 serial dilution을 실시하여 각각의 flask에 미리 배양액을 첨가한 후 세포를 각 flask당 세포수가 3×10^5 cell/ml이 되도록 넣어준 다음, 5% CO₂가 포함된 37°C 배양기에 넣고 2일간 배양하였다. 배양이 끝난 후 배양액을 골고루 흔들어서, 96 well에 200 μ L씩 옮긴 다음 MTS를 20 μ L 넣어주고 4시간 후에 formazan 양을 490 nm의 흡광도로 측정하였다.

Assay validation

이 실험법 검증을 수행하기 위한 기준 및 시험방법은 (주) 녹십자의 방법서 "QC assay validation" 과 ICH guideline과 European Pharmacopoeia를 참조하여 시험하였다.

Capillary Zone Electrophoresis (CZE)

Pharmeuropa (1999)에서 발표한 "Assessment of the suitability of a capillary zone electrophoresis method for determining isoform distribution of erythropoietin"의 방법으로 실험하였다. Mobile buffer concentrate (0.1 M sodium chloride, 0.1 M tricin, 0.1 M sodium acetate : -20°C에서 6개월 안정)와 1 M putrescine solution (0.882 g putrescine을 10 ml 증류수에 용해 : -20°C에서 6개월 안정)을 조제한 다음, CZE 실험을 할 때 CZE electrophoresis buffer를 조제하였다. CZE buffer (0.01 M sodium chloride, 0.01 M tricin, 0.01 M sodium acetate, 7 M urea, 2.5 mM putrescine)는 21 g Urea를 25 ml 증류수에 넣은 다음, 30°C water bath 상에서 용해하였다. Urea가 용해된 후, mobile buffer concentrate 5 ml과 1 M putrescine 0.125 ml을 넣은 후 증류수로 50 ml로 조정하였다. 2 M acetic acid를 이용하여 30°C에서 pH 5.55로 조정된 다음, 0.45 μ m 여과하여 사용하였다(실온에서 7일 동안 안정). uncoated fused silica capillary (100 cm effective length, 50 μ m internal diameter)를 capillary electrophoresis

instrument에 장착시켰다. Capillary 온도는 35°C로 유지시키고, UV detector는 214 nm에 조정하였다. 여과된 0.1 M sodium hydroxide로 60분 동안 capillary를 세척하여 주고 CZE buffer로 60분 동안 세척하고 12시간 동안 20 KV를 걸어 주어 precondition 상태로 만들어 주었다. precondition이 끝나면 증류수로 10분, 0.1 M sodium hydroxide로 5분, 증류수로 5분, CZE buffer로 10분 동안 세척하여 준 다음, 처리된 표준품과 검액을 low pressure로 15초 동안 injection한 다음 새로운 CZE buffer에서 15.4 KV (143 V/cm)로 150분 동안 분석을 하였다.

Sialic acid 함량

Sialic acid의 함량은 resorcinol reagent를 이용한 colorimetric method를 사용하였다. sialic acid 표준액 5, 10, 15, 20, 25 μ g/ml, 검액 (약 200 ~ 300 μ g/ml) 1 ml을 cap 달린 glass tube에 넣고 resorcinol reagent (conc. hydrochloric acid 80 ml에 0.1 M Cupric acid 0.25 ml, 2% resorcinol solution 10 ml을 넣은 후 증류수로 100 ml로 조정 : 4°C에서 1주일 동안 안정) 1 ml을 넣고 강하게 교반하였다. 30분 동안 끓인 후 얼음물에 넣어 10분 동안 식혔다. 2 ml 추출액 (Butyl acetate : Buthanol = 85 : 15)을 넣고 강하게 교반한 다음, 4°C, 2500 rpm에서 5분 동안 원심 분리하여 위층을 분리하였다. 추출액을 blank로 580 nm에서 분리한 층의 흡광도를 측정하였다. 측정 흡광도 값을 이용하여 검액의 sialic acid 함량을 정량하였다. 정량된 sialic acid의 함량을 erythropoietin mol 당 sialic acid mol로 환산하였다(sialic acid 분자량 = 309, erythropoietin의 분자량 = 30400).

결과 및 고찰

BaF3 cell을 이용한 MTS *in vitro* bioassay

국제 공인 표준품 European pharmacopeia BRP 와 (주) 녹십자의 제품 217-1을 RIA를 이용해서 정확한 EPO 양을 측정된 다음, 각 농도별로 표준액과 시료 모두 10단계의 serial dilution을 실시하여 배양한 후 MTS 측정법을 실시하였다. 실험은 모두 6회 반복하여 측정하였으며 결과를 Fig. 1과 Table 1의 그래프와 도표에 나타내었다.

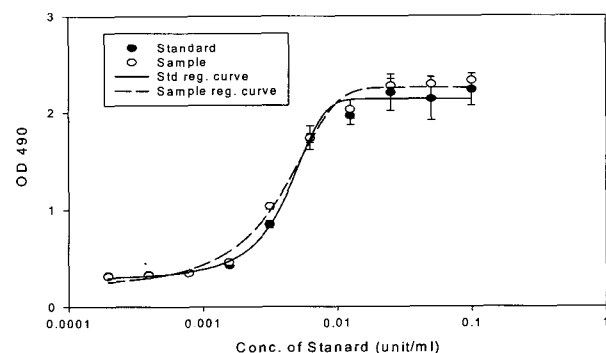


Figure 1. Comparison of biological activity by MTS assay (*in vitro* test); Standard (EPO-BRP, ●) VS Sample (Green Cross product B, ○).

Table 1. Results of MTS assay

구분	1차	2차
1	107.9	103.7
2	103.4	94.9
3	115.5	89.3
4	125	92.4
5	104	98.7
6	110.6	-
평균	111.07	95.8
Std. Dev.	8.16	5.6
C.V.(%)	7.34	5.85

* C.V. : Coefficient of Variation

RIA를 이용해서 서로 농도를 동일하게 맞추어 놓았기 때문에 측정값이 100%이어야 한다. 실험 결과를 분석하여 보면, 측정값이 표준품 대비 111.1%와 95.8%로 측정되었으며, 이를 평균하면 104%이므로 기대값인 100%와 거의 일치한 결과를 나타냈으며 C.V. (%)도 각각의 실험이 모두 10% 이내에 들어오는 것으로 보아서 실험은 상당히 재현성이 높은 것으로 사료된다. 표준곡선을 이용해서 미지의 시료의 농도를 측정하는 경우 시료의 농도를 적절하게 희석하여 표준곡선 안에 들어오게 하여 이를 표준곡선의 회귀분석 곡선을 이용해서 측정한다. 한 점을 택해서 측정을 하는 경우 그 점의 위치가 표준곡선의 중간이 아니면 오차가 크다. 따라서 2점이나 3점 이상을 측정하여 이를 평균하는 방법이 있다. 하지만 이 경우에도 시료의 각 점이 표준곡선에서의 위치가 항상 다르기 때문에 실험 간의 정확성에 의문이 된다. 일반적으로 이러한 경우에는 parallel line assay를 이용하여 측정한다(Fig. 2). 본 실험에서는 parallel line assay를 이용해서 측정하였다(Fig. 2, Table 2). 이 방법은 EPO의 *in vivo* 활성측정 시에도 사용되는 방법이다.

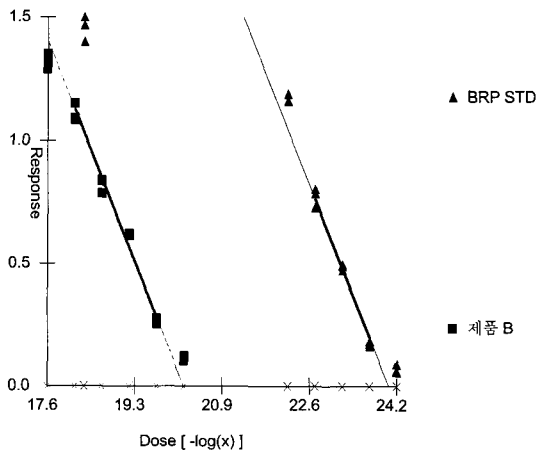


Figure 2. Test for parallelism by parallel line assay; Standard (EPO-BRP, ▲) VS Sample (Green Cross product B, ■).

***In vitro* assay의 validation**

In vitro assay 실험의 validation의 주요 결과를 요약하면 Table 3과 같다.

Table 2. Analysis of the parallel line assay

Test of Linearity	PASSED	PASSED
Fquadratic	0.6836	2.3582
Fcritical	5.9874	5.1174
P	95.0%	95.0%
r2	0.9939	0.9886
Test of Slope	PASSED	PASSED
Fmodel	1,019.9472	685.8334
Fcritical	5.5914	4.9646
P	95.0%	95.0%
r2	0.9932	0.9856
Test of Parallelism	PASSED	
Fdiff of models	2.370	
Fcritical	4.451	
P	95.00%	
r2	0.9979	
Relative Potency	0.069	
95% Fiducial Limits	0.066 - 0.072	
Relative fiducial limits	95.9% - 104.3% (8.4%)	
Conc. of Standard	32,500.000	
Conc. of EPO	2,228.074	
Fiducial limits	2,136.226 - 2,323.845	

Table 3. Summary of the *in vitro* assay validation

Parameters	Results	Reference
Precision	Repeatability	C.V. 2.5%
	Analyst A	C.V. 2.7%
	Analyst B	C.V. 2.5%
	Different analysts	C.V. 6.1%
Accuracy	C.V. 2.3%	RIA 6.7%, <i>in vivo</i> assay 5.6%
Linearity	98.8%	
Range	0.026 ~ 0.071 unit/mL	

* C.V. : Coefficient of Variation

제조합 erythropoietin의 생물학적 활성 (*in vivo* test)

제조합 erythropoietin의 생물학적 활성측정은 CBA mouse 을 이용한 *in vivo* polycythemic mice 방법을 사용하였다. 표준품 대비 결과는 아래 Table 4와 같다.

Table 4. Biological activity of recombinant erythropoietin by *in vivo* test

Samples (products)	A	B	C
Biological activity VS Standard	98.0 %	109.7 %	105.3 %

* A, B, C : Manufactured by Green Cross Corporation

Capillary Zone Electrophoresis (CZE)

Capillary zone electrophoresis로 EPO-BRP와 여러 종류의 제조합 erythropoietin의 isoform들의 분포를 분석한 결과를 Table 5에 보여주었다. EPO-BRP는 epoetin- α 와 epoetin- β form이 50 : 50으로 혼합되어 있기 때문에 isoform 2와 isoform 3이 electrophoretogram에 보이며 major peak들은 isoform 4, 5, 6, 7이다(Fig. 3). 정제과정에서 sialic acid의 함량이 낮은 erythropoietin을 제거하기 위해 $pI \geq 4.5$ isoform 을 제거한 erythropoietin 원액은 생물학적 활성이 약 70% 가지며 electrophoretogram에서 isoform 2가 보이며 isoform 3이 major peak를 보여주고 있다(Fig. 5). $pI \geq 4.8$ isoform을 제

Table 5. Distribution of EPO isoform by Capillary zone electrophoresis (CZE)

Biological activity		Iso 1	Iso 2	Iso 3	Iso 4	Iso 5	Iso 6	Iso 7	Iso 8	Iso 9
EPO-BRP	100%		2.965	6.529	18.115	28.305	27.962	14.743	1.380	
pH ≥ 4.2 removed	100%			3.094	21.651	33.167	23.322	12.454	4.803	1.581
pH ≥ 4.5 removed	70%		7.173	28.793	27.001	20.858	11.728	3.760	0.688	
pH ≥ 4.8 removed	< 50 %	18.441	20.188	19.958	16.787	12.453	7.482	3.382	1.146	0.489
EPO substance	81%			6.554	33.792	31.340	18.006	7.394	2.913	
Product A	98%			2.381	19.505	32.402	24.438	13.804	5.831	1.639
Product B	110%			1.120	12.928	32.790	27.704	17.163	6.710	1.585
Product C	105%			2.253	14.925	31.803	26.940	15.935	6.514	1.630

거한 erythropoietin 원액에서는 isoform 1, 2, 3이 major peak들로 보였다(Fig. 6). 그러나 EPO-BRP와 동등한 생물학적 활성을 갖는 erythropoietin 원액 (pI ≥ 4.2 isoform 제거)은 isoform 3의 면적은 5.5% 이하이고(Table 4), isoform 4, 5, 6, 7이 major peak들로 electrophoretogram이 보여주었고 isoform 4의 면적은 isoform 5 면적보다 항상 작았다(Fig. 4). 그리고 isoform 1, 2는 제거되었으나 isoform 4의 면적이 5의 면적보다 큰 erythropoietin 원액의 경우 생물학적 활성이 81%로 낮게 측정되었다(Fig. 7). (주) 녹십자에서 제조한 제조합 EPO 제품 3 LOTS (A, B, C)의 isoform 분포는 Table 5와 Fig. 8~10에 나타내었다.

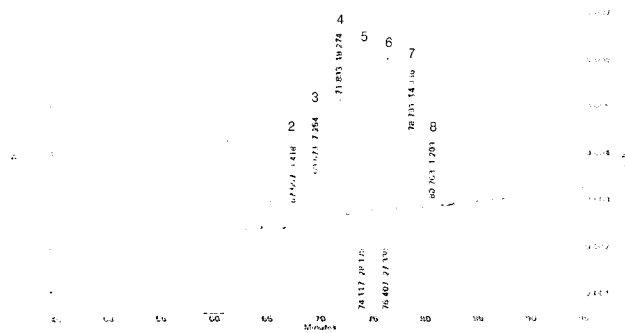


Figure 3. Analysis of EPO-BRP isoform distribution by CZE.

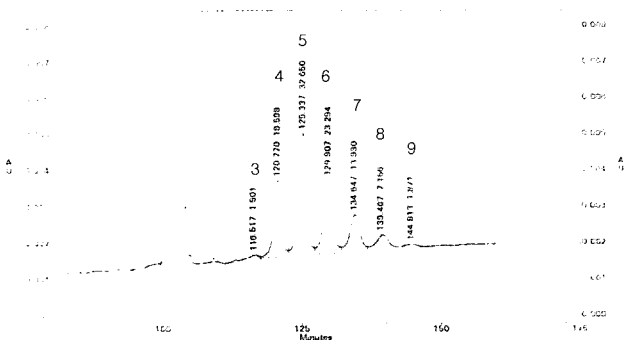


Figure 4. Analysis of EPO (pI ≥ 4.2 removed) isoform distribution by CZE.

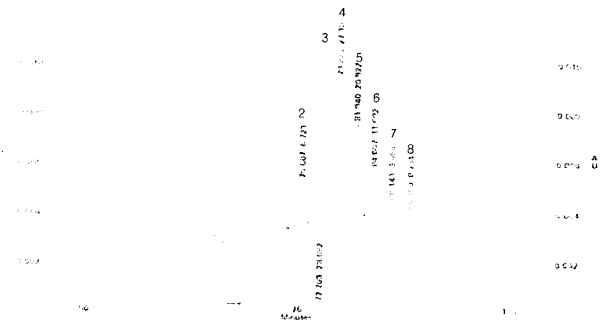


Figure 5. Analysis of EPO (pI ≥ 4.5 removed) isoform distribution by CZE.

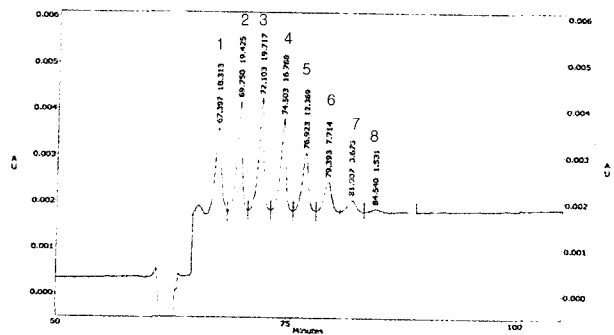


Figure 6. Analysis of EPO (pI ≥ 4.8 removed) isoform distribution by CZE.

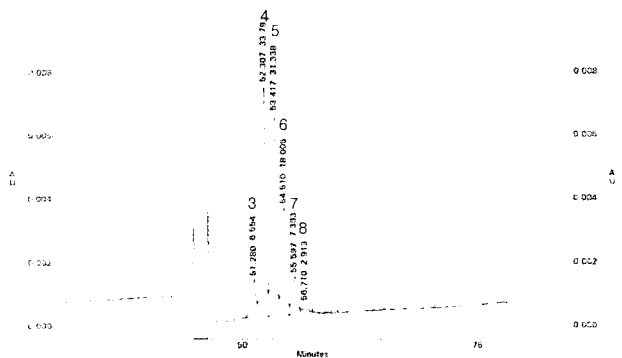


Figure 7. Analysis of EPO substance isoform distribution by CZE.

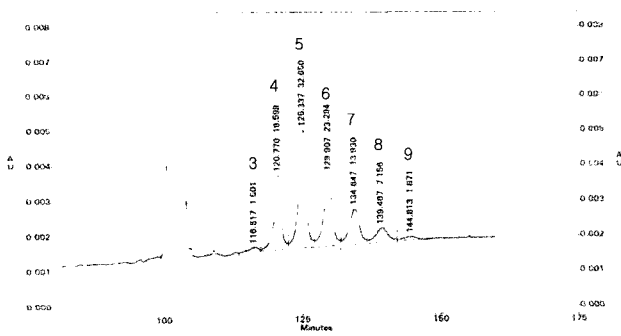


Figure 8. Analysis of Green Cross product A isoform distribution by CZE.

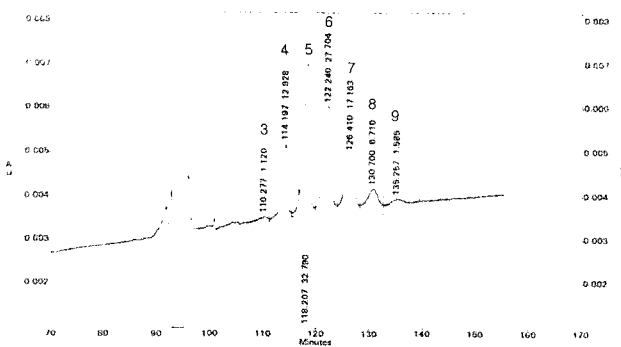


Figure 9. Analysis of Green Cross product B isoform distribution by CZE.

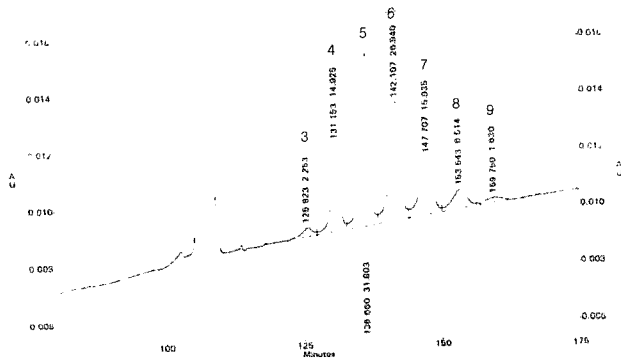


Figure 10. Analysis of Green Cross product C isoform distribution by CZE.

생물학적 활성과 erythropoietin의 isoform들의 분포와의 관계

EPO-BRP는 epoetin- α 와 epoetin- β 가 50 : 50으로 혼합된 것이기 때문에 isoform 2, 3이 존재한다. 그러나 (주) 녹십자에서 생산되는 erythropoietin은 epoetin- α 이기 때문에 EPO-BRP와 동등한 생물학적 활성이 갖기 위해서는 isoform 3이 5% 이하로 존재하고 isoform 4, 5, 6, 7이 major peak들이어야 하며, isoform 4의 면적은 isoform 5의 면적보다 항상 적어야 함을 알 수 있다. Fig. 7에서 보인 생물학적 활성이 81%로 낮게 나오는 erythropoietin에서는 isoform 3이 6%가 되고 동시에 isoform 4의 면적이 isoform 5의 면적보다 큼을 볼 수 있으며, 생물학적 활성이 약 70%로 낮은 $pI \geq 4.5$ isoform을 제거한 재조합 erythropoietin에서는 isoform 2가 존재하고

major peak들이 isoform 3, 4, 5, 6임을 볼 수 있다(Fig. 11).

Sialic acid 함량

재조합 erythropoietin 원액의 sialic acid를 정량하여 Table 6과 같은 결과를 얻었다

Table 6. Sialic acid content of erythropoietin substance.

	Product A		Product B		Product C	
	Average	STDV	Average	STDV	Average	STDV
mol/mol	11.95	0.135	12.02	0.130	12.38	0.034

(주) 녹십자에서 재조합 erythropoietin을 제조할 때 sialic acid가 9 - 14개 되는 재조합 erythropoietin을 정제하기 때문에 모든 원액에서 11 mol/mol 이상의 sialic acid 함량을 보임을 알 수 있다.

재조합 erythropoietin은 동물 세포 배양의 배양 조건에 따라 sialic acid의 함량이 다른 여러 가지의 isoform distribution으로 배양액 상으로 secretion되며 sialic acid 함량에 따라 재조합 erythropoietin의 생물학적 활성이 다르다는 것이 보고되어 있다. (주) 녹십자에서 실험한 결과를 보면 sialic acid의 함량이 낮으면 major isoform이 3, 4, 5, 6이고 sialic acid의 함량이 높으면 major isoform이 4, 5, 6, 7로 이동하는 것을 볼 수 있다. 동시에 재조합 erythropoietin의 생물학적 활성도 변화는 것을 볼 수 있다.

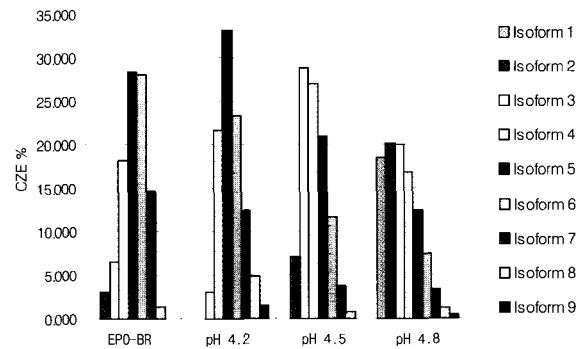


Figure 11. Comparison of biological activity and EPO isoform distribution.

요약

현재는 재조합 Erythropoietin의 생물학적 활성을 mouse를 이용한 *in vivo* bioassay로 실시하고 있으나, 이 방법의 여러 가지 불편함으로 인하여, 이를 대체하기 위해 Ba/F3 세포주를 이용한 *in vitro* assay 방법을 확립하였으나, 위에 상술한 바와 같이 *in vitro* assay는 erythropoietin의 당분포에 의한 차이를 보이지 않기 때문에, 이를 보완하기 위해서는 *in vivo* bio-activity와 정량적인 상관관계가 있는 당단백질의 isoform 분석법인 Capillary zone electrophoresis (CZE) 와 sialic acid 함량 결과를 동시에 분석해야 했다.

위의 결과 sialic acid 함량은 erythropoietin 원액에서 10 mol/mol, EPO 이상의 sialic acid 함량을 가져야 되며, CZE 결과는 재조합 erythropoietin의 isoform 분포가 isoform 3의 경

우 5.594~0.593%, isoform 4의 경우 31.598~11.704%, isoform 5의 경우 37.033~29.301%, isoform 6의 경우 27.837~18.807%, isoform 7의 경우 17.085~7.824%, isoform 8의 경우 7.642~1.964%을 보여줌과 동시에 isoform 4의 면적은 isoform 5의 면적보다 항상 작아야한다.

이상 두 가지 시험결과와 *in vitro* assay 결과를 combine 해서 *in vivo* assay를 대체할 수 있다는 좋은 실험적 data를 얻었으므로 이상 위의 3가지 분석법을 활용한 combined *in vitro* bioassay 법의 기초를 확립하였다.

감 사

본 연구 과제는 식품의약품안전청에서 지원한 용역연구개발사업 (2001~2002)의 연구결과 일부이며, 이에 감사합니다.

REFERENCES

- Bristow, A. and E. Charlton (1999), Assessment of the suitability of a capillary zone electrophoresis method for determining Isoform distribution of erythropoietin, *Pharmeuropa* **11**(2), 290-300.
- Takeuchi, M., N. Inoue, T. W. Strickland, M. Kibota, M. Wada, R. Shimizu, S. Hoshi, H. Kozutsumi, S. Takasaki, and A. Kobata (1989), Relationship between sugar chain and biological activity of recombinant human erythropoietin produced in chinese hamster ovary cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7819-7822.
- Takeuki, M., S. Takasaki, M. Shimada, and A. Kobata (1990), Role of sugar chains in the *in vitro* biological activity of human erythropoietin produced in recombinant chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **265**, 12127-12130.
- Bristow, A. (1999), Standardization of recombinant somatropin, The third annual KFDA international symposium II, regulatory issues in biologics and biotechnological products.
- Huh, J. W. (2000), Personal communication with Dr. Adrian F. Bristow in NIBSC.
- Kitamura, T., T. Tange, T. Terasawa, S. Chiba, T. Kuwaki, K. Miyagawa, Y. F. Piao, K. Miyazono, A. Urabe, and F. Takaku (1989), Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or Erythropoietin, *J. Cell. Physiology* **140**, 323-334.
- Jones, S. S., A. D. D'Andrea, L. L. Haines, and G. G. Wong (1990), Human erythropoietin receptor : cloning, expression and biological characterization, *Blood* **76**, 31-35.
- Egrie, J. C., and J. K. Browne (2001), Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP), *British J. Cancer* **84**, 3-10.
- Slater T. F. et al. (1963), *Biochim. Biophys. Acta* **77**, 383.
- Mossman, T. (1983), *J. Immunol. Methods* **65**, 55.
- Denizot, F. and R. Lang (1986), *J. Immunol. Methods* **89**, 271.
- Carmichael, J. et al. (1987), *Cancer Research* **47**, 936.
- Bartrop, J. A. et al. (1991), *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **1**, 611.
- Cory, A. H. et al. (1991), *Cancer Commun.* **3**, 207.
- Riss, T. L. and R. A. Moravec (1992), *Mol. Biol. Cell* **3** (Suppl.), 184a.
- CellTiter 96R Non-Radioactive cell proliferation assay technical bulletin, #TB112, Promega Corporation.
- Crowther, J. R. (1995), Theory and practice ELISA, Methods in Molecular Biology.
- Dunnett, C. W. (1964), Biometrics, New tables for multiple comparisons with a control.