

재조합 항체의약품의 생산시 생산세포주 유래 단백질 검출을 위한 ELISA 방법 개발

¹정 찬 희 · ¹임 상 민 · † ¹구 윤 모 · ²이 용 윤 · ²손 영 수 · ²김 현 일 · ²박 흥 록
¹인하대학교 공과대학 생명화학공학과, ²이수앱지스
(접수 : 2006. 2. 28., 게재승인 : 2006. 2. 10.)

Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Residual Host Cell derived Proteins in Recombinant Antibody Drug Production

Chan-Hi Joung¹, Sang-Min Lim¹, Yoon-Mo Koo^{1†}, Yong-Yoon Lee²,
Young-Su Son², Hyun-Il Kim², and Heung-Rok Park²

¹Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

²ISU ABXIS Co. Ltd.

(Received : 2006. 2. 28., Accepted : 2006. 2. 10.)

The purpose of this study was to develop a assay system of host cell-derived residual proteins in final pharmaceutical products. Accurate and simple assay system for host cell-derived proteins (HCPs) is very important test item in pharmaceutical qualification control. In this study, methods for quantification of residual HCPs in recombinant anti-GPIIb/IIIa antibody were developed using a process-specific immunoligand assay which was based on the Enzyme linked Immunosorbent assay (ELISA) system. The assay had a detection limit of 10.8 ng/ml of HCPs with a product concentration of 1 mg/ml. The practical implication of these results is that the developed ELISA system can be used for HCPs qualification control and this system will be applicable to develop another ELISA system of different antibody drug.

Key Words : Host cell derived proteins, ELISA system, anti-GPIIb/IIIa antibody

서 론

1990년대 후반부터 유전자 재조합 항체는 신약 개발의 중요한 소재로 부각되기 시작하였다. 현재 Food and Drug Administration (FDA)의 허가를 받아 판매되고 있는 치료용 신약은 11개, 진단 목적의 인체 투여용 항체 신약은 6개 이다 (Table 1). 항체의약품의 시장규모는 2010년에 5억 달러 수준에 이를 것으로 추정되었으나 이미 2003년에 항체 약품 시장은 20억 달러를 넘어섰고, 그 시장 규모는 기하급수적으로 증가할 것으로 추정되고 있다(1)

이러한 종류의 재조합 생물의약품은 생물학적 체제로의 안전성이 확보 되어야 하며, 최근에는 그 기준이 점차 까다로워져 가고 있다. 안정성에 관련된 요인으로는 생산 중 오염원에

대한 검증이 제일 중요하다고 할 수 있다. 미생물이나, 바이러스, 엔도톡신 등에 의한 오염원 확인 시험은 오래전부터 실시되었다. 최근에는 생산세포주 유래 단백질이나 DNA 등이 제품 중에 얼마나 혼재되어 있는가를 검증하는 항목이 중요하게 되었다. 그 두 가지 항목은 환자에게 면역이상 반응을 일으킬 수 있는 중대한 요인이 되기 때문이다. 생물의약품 내의 잔존하는 오염물질 검출을 위한 상용화된 진단시약들이 판매되고 있으나, 이러한 방법들은 대부분의 오염물질에 대한 검량만 가능할 뿐, 제품마다의 특이성이나 고유정제 방법에 따라 변화될 수 있는 가능성을 지닌 process specific contaminant를 위해서는 부적합하다. 때문에 고유의 제품마다의 생산세포주 유래 오염물질을 검량하기 위한 방법이 개발되는 것이 적합하다 (7).

본 연구에 이용된 생산세포주인 Chinese hamster ovary (CHO) 세포와 다른 회사, 다른 제품의 생산세포주인 CHO 세포간에는, 근본적으로 같은 세포주일 수 있으나, 그 생산용 발현 벡터가 다르게 제작되었고, 사용 배지 등의 차이가 있다. 따

† Corresponding Author : Department of Biological Engineering,
Inha University, Incheon 402-751, Korea

Tel : +82-32-860-7513, Fax : +82-32-872-4046

E-mail : ymkoo@inha.ac.kr

라서 각 제조사는 자사의 생산세포주 특이적인 숙주유래 단백질 검출법을 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)나 threshold 방법 등을 통해 확립해 두어야 한다. 본 연구에서는 ELISA 방법을 통해 그 검출법을 확립하였다. 생산세포주 유래 단백질에 관한 규정은 정확한 수치로 명시되어 있지 않고, “case by case”로 명시되어 있으며(8), 이에 대한 충분한 이론적 근거와 자료를 요구하고 있다(9-11). 이는 1회 복용량 (dose), 분석용 또는 진단용 시약으로의 사용과 치료용으로의 사용용도, 발현균주 (prokaryotic vs. eukaryotic 또는 untransformed vs. transformed)의 차이 등을 고려해야 하기 때문이다(12). 일반적으로 재조합 의약품내의 생산세포주 유래 단백질을 통제하기 위한 방법은 silver stained SDS-PAGE와 immunoblot, 엄격한 process validation clearance studies, 그리고 정량적인 process specific HCPs assay가 개발되는 것이다(9). 이러한 생산세포주 유래 단백질의 검량을 위해서는 특이성이 높은 assay방법이 필요한데, 이에 다클론항체를 사용하게 된다(7). 다클론항체는 고유의 정제 공정 내에서 가장 대표성을 지니는 생산세포주 유래 단백질을 포함하는 process-specific immunogen에 의해 만들어진다(13). 이러한 다클론항체를 이용한 방법 개발 시 ‘sandwich’ format(13)이 많이 쓰이지만 제한된 것은 아니다.

본 연구에서는 항 혈전 항체 (anti-GPIIb/IIIa antibody)의 생산 공정과 제품내의 생산세포주 유래 단백질의 제거를 검증하고 정량화하기 위한 ELISA 방법을 개발하는데 있다. 이를 위해 null cell mock 배양 및 정제를 통해 대표성 있는 생산세포주 유래 단백질을 얻고, 이를 면역원 (immunogen)으로 하는 다클론항체를 토끼를 통해 생산하여 면역학적 반응을 이용한 정량 시스템을 개발하였다. 이렇게 개발된 ELISA 방법은 International conference on harmonization (ICH) 규정(14)에 따라 validation됨으로써 실험방법의 객관성을 입증하였다. 개발된 실험방법은 다른 재조합 항체의약품의 생산세포주 유래 단백질 분석을 위한 시험법 개발시 적용될 수 있다.

Table 1. The list of FDA-approved antibody drug

| Antibody | Antigen | Indication |
|-------------------------------|-------------|--|
| Therapeutic use | | |
| OKT3 | CD3 | Acute kidney transplantation rejection |
| Digibind | Digoxin | Digoxin poisoning |
| Herceptin | HER- 2 | Metastatic.breast cancer |
| Panorex | CA17-1A | Colorectal cancer |
| Remicade | TNFAlpha | Crohn’s disease |
| Reopro | Platelet | Ischemic cardiac complications |
| Syangis | RSV | RSV infection |
| Zenapax | IL2 R-alpha | Kindney transplantation rejection |
| Basiliximab | IL2 R-alpha | Acute organ rejection |
| Rituxan | CD20 | Non-Hodgkin’s lymphoma |
| Mylotarg | CD33 | Relapsed CD33-positive AML |
| In vivo diagnostic use | | |
| CEAScan | | |
| LeukoScan | | |
| OncoScint CR/OV | | |
| ProstaScint | | |
| RIGSCAN | | |
| CR49Verluma | | |

재료 및 방법

Null cell mock 배양

Null cell은 목적단백질인 재조합 항 혈전 항체를 생산하는 균주와 같은 Chinese hamster ovary (CHO) 세포이며, 목적단백질인 항혈전 항체 유전자만이 없는 세포이다. 배양은 1 L, 10 L, 100 L를 차례로 배양하며 scale-up이 이루어졌다. 본 연구에 사용된 생산세포주 유래 단백질은 100 L 배양액으로 14일간 유가식 배양하였고, 배양과정 중에는 pH 8.4로 일정하게 유지하였다.

Null cell의 생산세포주 유래 단백질 정제

배양이 끝난 후 배양액을 pH 7.3 ± 0.1로 맞추어 준다. 목적단백질 (anti-GPIIb/IIIa antibody)은 세포 외로 배출되는 단백질로 생산세포주 유래 단백질도 세포외로 배출된 것만을 얻기 위해 두 차례에 걸친 depth filtration을 통해 세포를 제거하고 상등액을 취하였다. ÄKTA pilot (Amersham biosciences, Sweden)을 이용하여 상등액을 다음과 같이 정제하여, 숙주유래 단백질을 제조하였다. 약 음이온 교환 크로마토 그래피 (DEAE-Sepharose Fast Flow, Amersham biosciences, Sweden)로 1단계 정제하였다. 1단계 정제용 컬럼은 BPG 140/500 (Amersham biosciences, Sweden)에 2.5 L의 고체상이 충전하였고, 평형 용매로는 20 mM sodium phosphate (pH 7.3)를 사용하였다. 2단계 정제는 약 양이온 교환 크로마토그래피 (CM-Sepharose Fast Flow, Amersham biosciences, Sweden)를 이용하였다. 2단계 정제용 컬럼은 BPG 200/300 (Amersham biosciences, Sweden)에 10.7 L의 고체상을 충전하였다. 평형 용매로는 20 mM sodium acetate (pH 5.3)을 사용하였다. 시료 희석 용매는 30 mM sodium acetate (pH 4.5), 탈착 용매로는 20 mM sodium acetate-1 M sodium chloride (pH 5.3)를 사용하였다. 기기는 ÄKTA pilot (Amersham biosciences, Sweden)을 사용하였고, UNICORN software (Amersham biosciences, Sweden)를 이용해 모니터링 하였다.

다클론항체 생산

생산세포주 유래 단백질을 면역원으로 다클론항체를 생산하기 위한 실험동물로 rabbit, *New Zealand White* 종을 2 마리 (rabbit A, B)를 사용하였다. 실험에 들어가기 전에 실험동물의 면역전 혈청을 이용해 Western blot을 수행하여 실험동물의 면역전 항체의 생성여부를 확인하였다. 실험은 300 g의 수컷 두 마리를 이용하여 2 주간의 안정화 기간을 가진 후 면역원인 생산세포주 유래 단백질에 adjuvant (Sigma, USA)를 같은 양 섞어 100 µg/dose로 1주일 간격으로 피하주사하여 3차 면역을 통해 다클론항체를 생성되게 하였다.

다클론항체 정제

3차 면역 후 전 채혈된 혈청은 1단계 정제로 HiTrap rProtein A Fast Flow (Amersham biosciences, Sweden) 컬럼을 이용하여 면역 후 혈청 내에 있는 모든 rabbit IgG를 정제하였다. 평형 용매로 20 mM sodium phosphate (pH 7.0)

를 사용하였고, 탈착 용매는 0.1 M glycine-hydrogen chloride (pH 2.7)를 사용하였다. 탈착된 분획의 pH 보정은 1 M Tris-hydrogen chloride (pH 9.0)를 사용하여 시료의 pH를 중성으로 맞추어 주었다. 2단계 정제는 rabbit IgG 중에 생산세포주 유래 단백질 (HCPs)과 반응하는 specific anti-HCPs IgG만을 정제하기 위한 것으로 이를 위한 컬럼은 자체 제작 하였다. 본 연구에 사용된 CNBr-HCPs coupled 컬럼은 CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow (Amersham biosciences, Sweden)을 사용하여 지지체 표면에 HCPs를 coupling시켰다. Coupling 정도는 OD280 nm에서의 반응 전후의 흡광도를 측정하여 확인하였다. 2단계 정제는 CNBr-HCPs coupled 컬럼에 1단계 정제시 사용하였던 용매와 같은 용매로 사용하여 specific rabbit anti-HCPs IgG만을 정제하였다.

발색효소 표지

2단계 정제를 마친 specific rabbit anti-HCPs IgG를 이용한 direct sandwich ELISA 방법을 개발하기 위해 발색효소인 Horse radish peroxidase (HRP)를 항체에 표지하였다. 항체에 Peroxidase labeling kit (Roche, Switzerland)를 이용하여 표지 한 후, 항체와 발색효소와의 결합을 silver stained SDS-PAGE를 통해 크기로 확인하고, 발색효소와 반응하는 기질 처리를 통해 발색됨을 확인하였다. 또한 반응 전후의 시료의 변화를 겔 여과 크로마토그래피 컬럼인 TSK 3000 column (TOSHO, Japan)을 이용한 HPLC분석을 통해 반응 시료의 함량변화를 분석함으로써 확인하였다.

Western blot

항체의 생성과 정제를 확인하기 위한 정성적 분석방법으로 Western blot을 사용하였다. 분석에 사용될 각 시료의 단백질 총량은 Modified Lowry proten assay (Pierce, USA)를 사용하여 분석하였다. 면역원으로 사용된 생산세포주 유래 단백질과 목적단백질인 anti-GPIIbIIIa antibody를 SDS-PAGE를 이용하여 분리한 후, 이를 PVDF membrane (Invitrogen, USA)으로 단백질을 이동시켰다. 1차 항체로는 rabbit의 면역 전 후 혈청 및 정제된 rabbit IgG를 1,000배 희석하여, 1시간 처리하였고, 2차 항체로는 Peroxidase labeled goat anti-rabbit IgG (H+L) (KPL, USA)를 2,500배 희석하여, 1시간 처리되었다. 정제된 항체에 발색 효소 표지 후에는 이를 항체로 1,000배 희석하여 처리하였다. 발색효소의 기질

로는 TMB membrane peroxidase substrate (KPL, USA)를 이용하였다.

Sandwich ELISA

정제된 항체를 50 mM carbonate buffer (pH 9.6)에 녹여 96 well plate (NUNC, USA)에 100 μ l씩 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 overnight coating하였다. Blocking은 2% fetal bovine serum을 phosphate buffered saline (PBS)에 녹인 후 이에 0.05% Tween 20 첨가하여 상온에서 2시간 동안 처리하였다. Detection을 위한 항체는 HRP conjugated rabbit anti-HCPs IgG를 사용하였다. 발색효소의 기질은 ABTS microwell peroxidase substrate (KPL, USA)를 사용하였고, 발생 후 ABTS peroxidase stop solution (KPL, USA)을 이용하여 반응을 정지하였다. 반응 정지 후 OD405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sandwich ELISA 방법을 최적화하기 위하여 coating하는 항체의 농도를 0.1-1.0 μ g/well로 비교실험하고 detection 항체의 농도를 1 : 500 ~ 1 : 5,000배까지 희석하여 비교 실험하였다. 또한 발색효소의 기질 반응시간을 15분, 30분의 비교 실험을 진행하였다.

항체의약품 내의 생산세포주 유래 단백질 함량 측정

목적단백질의 생산단계부터 각 정제단계별로 시료를 준비하여 이의 농도를 항체의약품 농도 기준으로 1 mg/ml로 동일하게 해주었다. 이를 가지고 Western blot과 sandwich ELISA를 수행하여, 항체의약품 1 mg당 생산세포주 유래 단백질 (ng)의 함량을 측정하였다.

Sandwich ELISA 방법 validation

개발된 sandwich ELISA 방법의 validation을 위해 ICH 규정(14)에 따라 시험항목을 정하고 시험방법을 계획하였다. 시험항목으로는 특이성 (specificity), 직선성 (linearity), 정확성 (accuracy), 병행정밀성 (repeatability), 실내재현정밀성 (intermediate precision), 검출한도 (detection limit), 정량한도 (quantitation limit)로 정하였다. 이는 각각 % 상대표준편차 (residual standard deviation), 상관관계수 (correlation coefficient, R²), % 평균회수율 (recovery)로 확인하였다.

표지항체의 안정성 시험

여러 정제과정과 발색 효소 표지를 통해 제작된 항체 (HRP conjugated rabbit anti-HCPs IgG)가 어느 정도의 기간

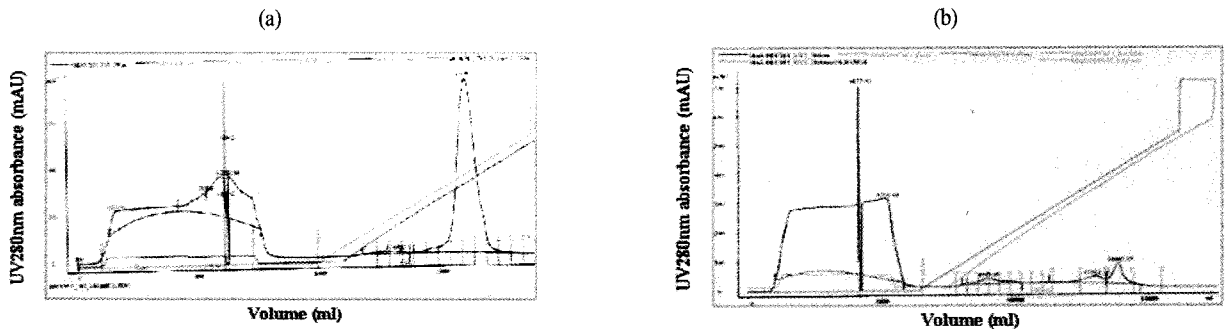


Figure 1. Comparison of weak cation exchange chromatogram using CM Sepharose FF packed BPG 200/300 column ((a) Target protein: anti-GPIIbIIIa antibody producing cell, (b) Null cell derived host cell proteins).

동안 신뢰할 만한 값을 보일 수 있는지 확인하기 위해 항체에 발색효소 표지 이후 1주, 2주, 3주 간격으로 sandwich ELISA 방법을 이용해 OD405 nm에서의 흡광도를 측정하여 확인하여 보았다. 또한 안정제 (stabilizer, Roche, Switzerland)의 사용 유무에 따른 안정성의 유지 정도를 비교실험을 통해 확인하였다.

결과 및 고찰

Null cell의 생산세포주 유래 단백질 정제

Null cell mock배양은 항체의약품인 anti-GPIIb/IIIa antibody의 배양과 마찬가지로 1 L, 10 L, 100 L의 scale-up과정을 거쳐, 100 L배양액을 정제하여 본 연구에 사용하였다. 목적단백질인 항체의약품과 null cell의 생산세포주 유래 단백질의 약 양이온 교환 크로마토그래피를 이용한 정제를 비교한 결과, 목적단백질이 나오는 부분 이외에도 근접한 부분에서 생산세포주 유래 단백질이 나오는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1). 이 때, 목적단백질이 탈착되는 부분에 혼재되어 나오는 생산세포주 유래 단백질과 같은 크기의 단백질이 탈착이 일어나는 전 부분에 걸쳐 나오는 것을 확인하였다. 이러한 이유로 null cell의 생산세포주 유래 단백질 정제시, 탈착이 이뤄지는 전 부분에서 얻을 수 있는 생산세포주 유래 단백질을 면역원으로 하였다. 약 양이온 교환 크로마토그래피의 정제 결과 0.7 mg/ml의 시료 16 L로 총 11.31 g의 생산세포주 유래 단백질을 얻었다.

다클론항체 생산 및 정제

실험동물인 rabbit의 면역 전 혈청으로 Western blot을 수행한 결과(Fig. 2), 면역 전 혈청에서는 생산세포주 유래 단백질이나 목적단백질인 항체의약품에 대한 반응을 볼 수 없었으며, 실험에 쓰인 2차 항체에 의한 반응도 없음을 확인하였다. 3차 면역과정을 통해 10,000 : 1의 역가를 가지는 면역 후 혈청을 얻을 수 있었으며, 이를 다시 Western blot(Fig. 2)과 2차 항체를 이용한 indirect sandwich ELISA를 통해 항체의 생성정도를 확인하였다(Fig. 3). 면역 후 혈청을 1단계 정제인 HiTrap rProtein A FF (Amersham biosciences, Sweden) 컬럼을 이용하여 면역 후 혈청내의 모든 rabbit IgG를 정제하였다. 실험결과 rabbit A의 혈청 중 16.9%의 IgG를 얻었고, rabbit B의 혈청 중 15.8%의 IgG를 얻었다. 이를 다시 CNBr-HCPs coupled 컬럼으로 specific rabbit anti-HCPs IgG만을 정제한 결과, 1단계에서 정제된 rabbit A IgG 중 9%, rabbit B IgG 중 10%만이 생산세포주 유래 단백질에 의해 형성된 IgG였다. 이를 Western blot을 통해 생산세포주 유래 단백질에 대한 반응을 확인하였다.

발색 효소 표지 확인

2차 항체를 사용하지 않는 direct sandwich ELISA 방법을 만들기 위해 2단계 정제된 항체에 발색효소인 Horse radish peroxidase (HRP)를 표지하였다. 항체의 발색효소 표지여부를 silver stained SDS-PAGE와 발색효소와 기질 반응을 이용한 발색 반응을 통해 확인하였다(Fig. 4). 또한 겔 여과 크로마토그래피 컬럼 (TOSHO, Japan)을 이용한 HPLC분석

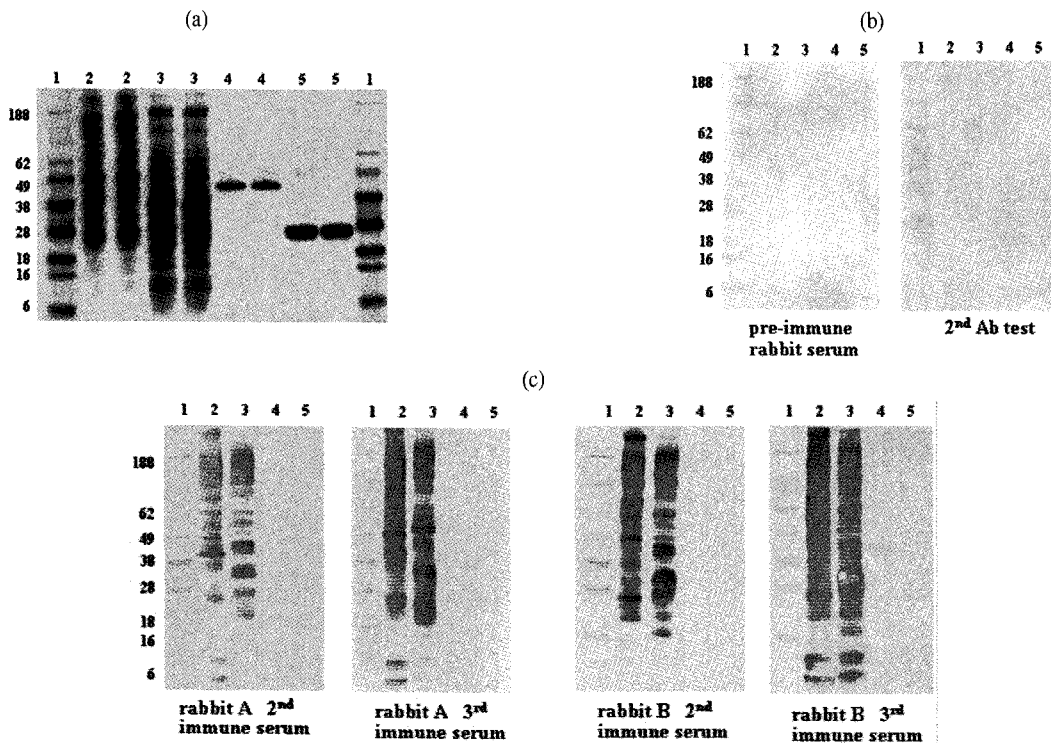


Figure 2. Silver stained SDS-PAGE and indirect Western blot analysis of rabbit anti-HCPs IgG production ((a) Silver stained SDS-PAGE, (b) pre-immune test, (c) 2nd and 3rd immunized serum test. Lane 1, marker; lane 2, non-reduced HCPs; lane 3, reduced HCPs; lane 4, non-reduced anti-GPIIb/IIIa antibody; lane 5, anti-GPIIb/IIIa antibody).

을 통해 반응 전의 시료인 specific rabbit anti-HCPs IgG, HRP, 반응 후 시료인 HRP conjugated rabbit anti-HCPs IgG의 함량을 확인하였다(Fig. 5). 그리고 이렇게 제작된 항체를 이용하여 40여 가지 이상의 생산세포주 유래 단백질에 대한 검출정도를 Western blot으로 확인한 결과 rabbit A, B의 항체를 함께 사용할 경우, 90% 이상의 생산세포주 유래 단백질에 대한 분석이 가능한 항체가 된 것을 확인하

였다(Fig. 6).

항체의약품 내의 생산세포주 유래 단백질 함량 측정

발색 효소가 표지된 항체를 이용하여, 목적단백질의 생산 및 정제단계 중의 생산세포주 유래 단백질의 제거를 확인하였다. 각 시료내의 목적단백질 함량을 1 mg/ml로 맞추고 이를 이용하여 Western blot과 direct sandwich ELISA

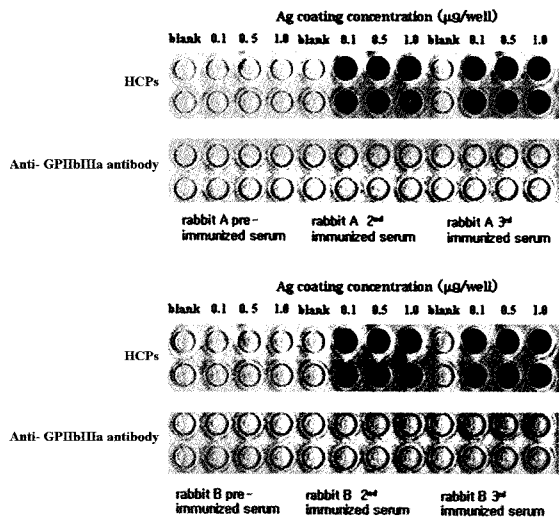


Figure 3. Indirect ELISA analysis of rabbit anti-HCPs IgG production. Compare observance of immune serum to pre-immune serum. And identified production of anti-target protein antibody.

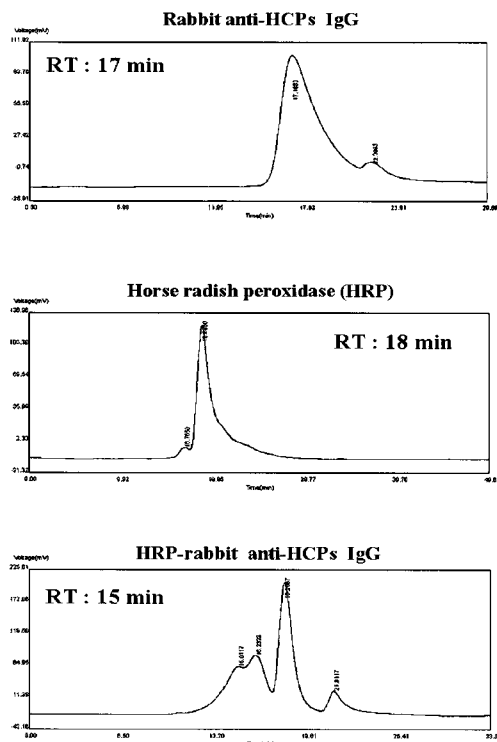


Figure 5. HPLC analysis with GFC column of HRP conjugated rabbit anti-HCPs IgG.

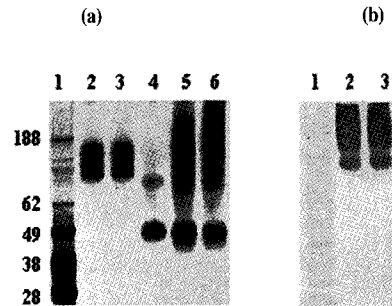


Figure 4. Silver stained SDS-PAGE and enzyme substrate reaction analysis of HRP conjugated rabbit IgG ((a) Silver stained SDS-PAGE analysis: lane 1, marker lane; 2, 3, HRP conjugated rabbit IgG; lane 4, rabbit IgG; lane 5, 6, activated HRP. (b) Enzyme-substrate reaction: lane 1, marker; lane 2 and 3, HRP conjugated rabbit IgG).

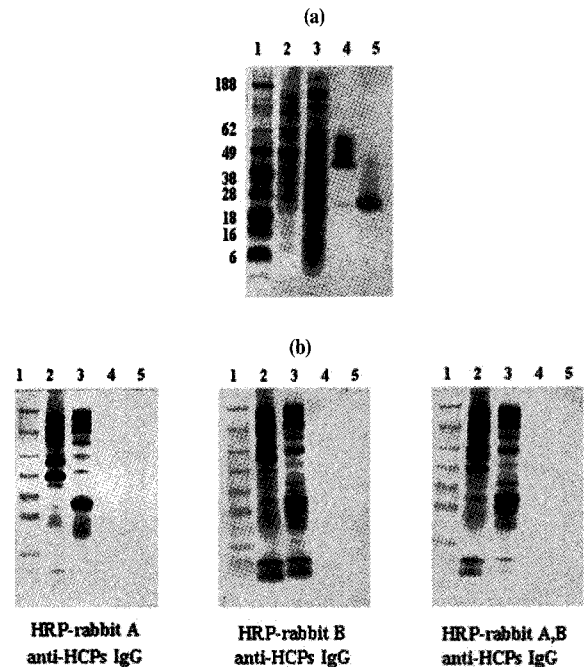


Figure 6. Silver stained SDS-PAGE and Western blot analysis of HRP conjugated rabbit anti-HCPs IgG ((a) Silver stained SDS-PAGE analysis, (b) Western blot analysis used rabbit A, B IgG, (c) Western blot analysis used HRP-rabbit A, B anti-HCPs IgG. Lane 1, marker; lane 2, non-reduced HCPs; lane 3, reduced HCPs; lane 4, non-reduced anti-GPIIb/IIIa antibody; lane 5, reduced anti-GPIIb/IIIa antibody).

를 수행하여 생산세포주 유래 단백질을 확인하고 정량하였다. Western blot 결과를 통해 항체의약품의 3번째 컬럼 정제단계에서 생산세포주 유래 단백질이 정성적으로 대부분 제거되는 것이 확인되었다. 또한 최적화 된 조건에서 direct sandwich ELISA를 수행한 결과를 통해 3번째 컬럼 정제단계 이후에는 생산세포주 유래 단백질의 함량이 300 ppm 이하가 되고 최종 제품원액 내의 생산세포주 유래 단백질의 함량은 5.8 ppm으로 확인되었다. 항체의약품의 생산 batch마다의 정제단계의 재현성을 확인하기 위해 3 batch의 항체의약품 제품원액에 대한 실험을 진행한 결과 모두 10 ppm이하의 값으로 나타났다.

Sandwich ELISA 방법 validation

개발된 실험방법의 객관적 검증을 위해 ICH guideline(14)에 따라 validation을 수행하였다(Table 2). 이와 함께 면역 후 혈청 정제시 1차 정제 컬럼인 HiTrap rProtein A FF (Amersham Biosciences, Sweden) 컬럼만을 이용해 정제된 rabbit IgG에 발색 효소를 표지한 항체를 이용한 direct ELISA 방법도 함께 validation을 수행하였다. 실험결과를 비교하여 총 2단계의 정제과정을 통해 얻어진 specific anti-HCPs IgG를 사용한 ELISA 방법이 특이성, 정확성, 검출 한도, 정량한도에서 더욱 좋은 결과를 보임을 확인할 수 있었다.

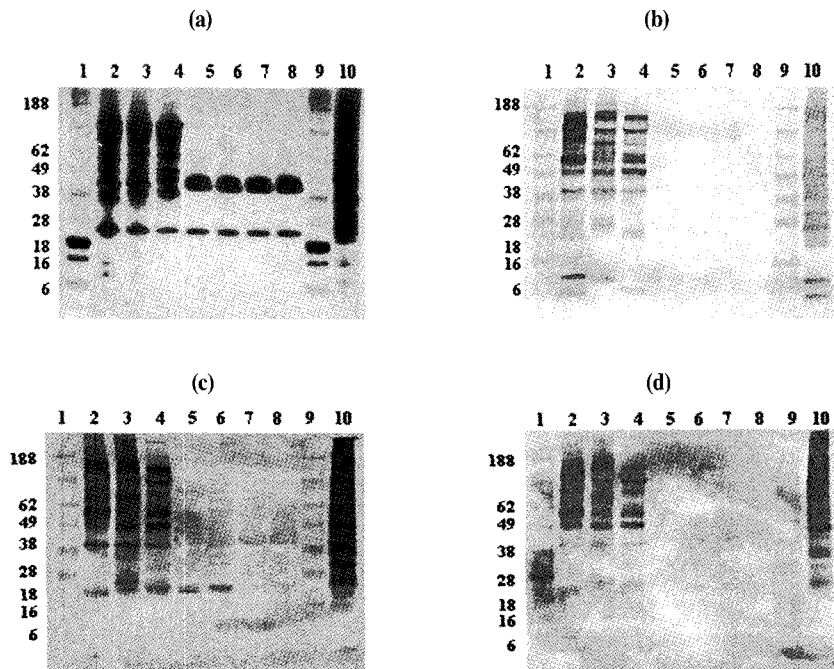


Figure 7. Silver stained SDS-PAGE and Western blot analysis of HCPs identification in anti-GPIIb/IIIa antibody purification process ((a) Silver stained SDS-PAGE analysis, (b) Western blot analysis used HRP-rabbit anti-HCPs IgG, (c) Western blot analysis used 1st rabbit IgG and 2nd peroxidase labeled goat anti-rabbit IgG, (d) Western blot analysis used HRP-rabbit IgG. Lane 1 and 9, marker; lane 2-8, anti-GPIIb/IIIa antibody purification step sample; lane 10, non-reduced HCPs).

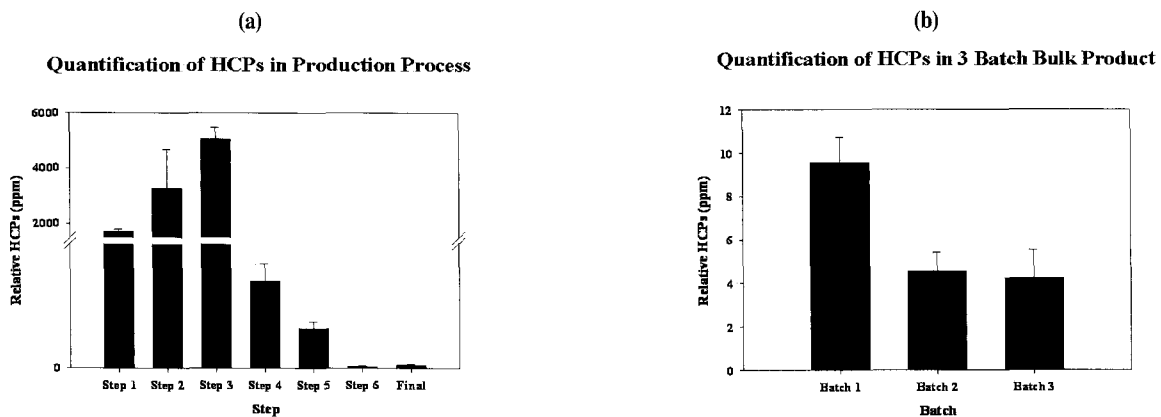


Figure 8. Sandwich ELISA analysis of HCPs quantification ((a) Anti-GPIIb/IIIa antibody purification process, (b) Anti-GPIIb/IIIa antibody 3 batch product).

Table 2. Validation of developed ELISA system

| | Value | Range | Result ¹ | Result ² |
|-------------|-------------------------------|------------|---------------------|---------------------|
| Specificity | % RSD | < 20% | < 17% | < 10% |
| Linearity | correlation(R ²) | > 0.95 | > 0.99 | > 0.97 |
| Accuracy | % recovery | 80-120% | 94-103% | 98-102% |
| Precision | Repeatability | % RSD | < 20 | < 5 |
| | Intermediate precision | % recovery | 80-120% | 94-104% |
| | Limit of detection [LOD] | | 28.5 ppm | 10.8 ppm |
| | Limit of quantification [LOQ] | 100 ppm | 85.6 ppm | 32.7 ppm |

¹ ELISA system used HRP-rabbit IgG.

² ELISA system used HRP-rabbit anti-HCPs IgG.

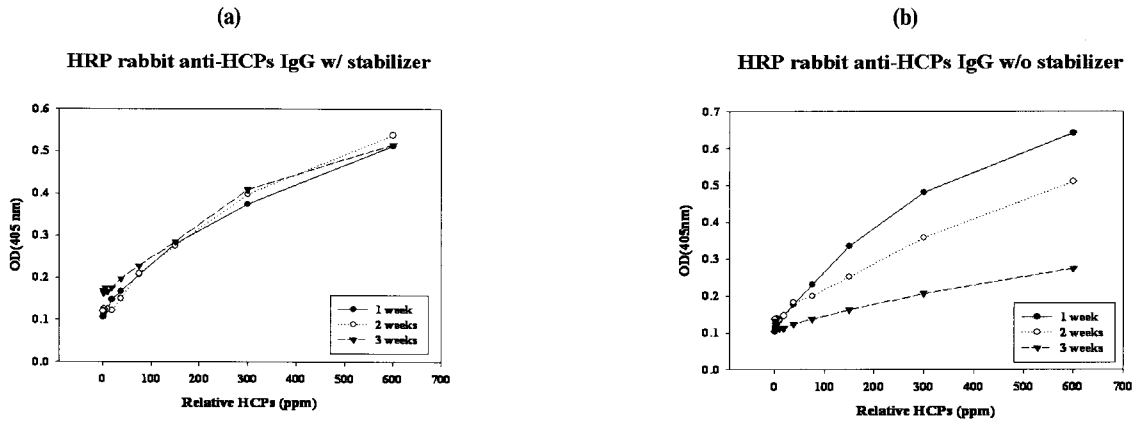


Figure 9. ELISA analysis of HRP conjugated IgG stability ((a) with stabilizer, (b) without stabilizer).

표지 항체의 안정성 시험

여러 정제과정과 발색 효소 표지를 통해 제작된 항체 (HRP conjugated rabbit anti-HCPs IgG)에 발색효소 표지 이후 1주, 2주, 3주 간격으로 sandwich ELISA 방법을 이용해 OD405 nm에서의 흡광도를 측정하여 확인하여 보았다. 또한 안정제 (stabilizer, Roche, Switzerland)의 사용 유무에 따른 안정성의 유지를 비교실험을 통해 확인하여 보았다(Fig. 9). 실험결과 발색 효소 표지 후, 시간이 지날수록 민감도는 떨어져 최저농도부터 최고농도까지의 흡광도 차이가 점점 작아짐을 알 수 있었다. 이러한 경향성은 안정제 (stabilizer)를 넣은 경우, 확연히 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 실험 결과 안정제를 넣은 경우는 1달 이상 4℃에 보관하여 사용가능함을 알 수 있었다.

요 약

재조합 생물약품 생산시, 오염물질의 유래는 외인성 (외래성 바이러스, 마이코플라즈마, 미생물) 및 내인성 (생산세포주 유래 단백질) 두 가지의 일반적인 가능성으로 존재한다. 이 중 생산세포주 유래의 불순 단백질은 환자에게 면역이상반응을 일으킬 수 있어 제품의 안정성과 사용자의 안전상의 문제가 될 수 있다. 따라서 이들 단백질의 오염 여부를 검출하는 방법의 개발이 요구된다. 상용화된 분석제품들은 일반적인 생산세포주 유래 단백질에 대한 분

석은 가능하지만, 생산 방법이나 재조합 된 세포의 특성에 따라 달라질 수 있는 고유한 생산세포주 유래 단백질에 대한 분석은 적합하지 못하다.

본 연구에서는 재조합 항체의약품 생산과 정제과정에서 목적단백질의 생산 유전자를 지니지 않는 null cell mock 배양에 의해 생산세포주 유래 모든 단백질을 얻어 이에 대한 다클론항체를 제작하여 면역학적 반응을 이용하여 생산세포주 유래 단백질을 정량 할 수 있는 ELISA 방법을 개발하였다. 생산세포주 유래 단백질에 대한 다클론항체는 rabbit에서 얻었으며, 이 중 생산세포주 유래 단백질에 특이적인 항체만을 정제하였다. 또한 direct sandwich ELISA 방법 개발을 위해 항체에 발색효소 (HRP)를 표지하였다. 이렇게 만들어진 항체를 이용하여 정성분석을 위한 Western blot과 정량분석을 위한 ELISA 방법을 개발하여 목적단백질의 정제과정 내에서 생산세포주 유래 단백질이 제거되는 것을 확인하였다. 또한 개발된 ELISA 방법은 ICH 규정에 따라 validation을 실시한 결과 되어 객관적 검증 받은 결과, 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성의 기준을 만족하며 검출한도가 10.8 ppm인 방법임을 확인하였다.

감 사

본 연구는 초정밀분리기술연구센터 및 이수엠지스(주)의 연구비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Nicholson, I. C., X. Zou, A. V. Popov, G. P. Cook, E. M. Corps, S. Humphries, C. Ayling, B. Goyenechea, J. Xian, M. J. Taussig, M. S. Neuberger and M. Bruggemann (1999), Antibody repertoires of four- and five-feature transgenic mice carrying human immunoglobulin heavy chain and kappa and lambda light chain yeast artificial chromosomes, *J. Immunol.* **163**, 6898-6906.
2. Lucas, C., C. Nelson, M. L. Peterson, S. Fire, D. Vetterlein, T. Gregory and A. B. Chen (1998), Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for the determination of contaminants resulting from the immunoaffinity purification of recombinant proteins, *J. Immunol. Methods* **113**, 113-122.
3. Himanen, J. P., M. Sarvas and I. M. Helander (1993), Assessment of non-protein impurities in potential vaccine proteins produced by *Bacillus subtilis*, *Vaccine* **11**, 970-973.
4. Eaton, L. C. (1989), Quantitation of residual *Escherichia coli* DNA in recombinant biopharmaceutical proteins by hybridization analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **7**, 633-638.
5. Briggs, J., V. T. Kung, B. Gomez, K. C. Kasper, P. A. Nagainis, R. S. Masino, L. S. Rice, R. F. Zuk and V. E. Ghazarossian (1990), Sub-femtomole quantitation of proteins with Threshold for the biopharmaceutical industry, *Biotechniques* **9**, 598-606.
6. Kung, V. T., P. R. Panfili, E. L. Sheldon, R. S. King, P. A. Nagainis, B. Gomez, D. A. Ross, J. Briggs and R. F. Zuk (1990), Picogram quantitation of total DNA using DNA-binding proteins in a silicon sensor-based system, *Anal. Biochem.* **187**, 220-227.
7. Eaton, L. C. (1995), Host cell contaminant protein assay development for recombinant biopharmaceuticals, *J. Chromatogr. A* **705**, 105-114.
8. Robey, F. A. (1986), In *Methods in Protein Sequence Analysis*, K. A. Walsh Eds.: Human Press, Clifton, NJ, pp67-78.
9. Jones, A. J. and J. V. O'Connor (1985), Control of recombinant DNA produced pharmaceuticals by a combination of process validation and final product specifications, *Dev. Biol. Stand.* **59**, 175-180.
10. Anicetti, V. R., B. A. Keyt and W. S. Hancock (1989), Purity analysis of protein pharmaceuticals produced by recombinant DNA technology, *Trends. Biotechnol.* **7**, 342-349.
11. Garg, V. K., M. A. Costello, and B. A. Czuba (1991), Purification and production of therapeutic grade proteins, *Bioprocess Technol.* **12**, 29-54.
12. Anicetti, V. R. (1990), Analytical Biotechnology: Capillary Electrophoresis and Chromatography, In ACS Symposium Series, Cs. Horvath and J. G. Nikelly Eds: American Chemical Society, Washington DC. No. **434**, 127-140.
13. Anicetti, V. R., E. F. Fehskens, B. R. Reed, A. B. Chen, P. Moore, M. D. Geier and A. J. Jones (1986), Immunoassay for the detection of *E. coli* proteins in recombinant DNA derived human growth hormone, *J. Immunol. Methods* **91**, 213-224.
14. Bass, R. (1996), ICH Topic Q 2 B Validation of Analytical Procedures; Methodology, Step 4 Consensus Guideline **6**, ICH-Technical Coordination.