

사람 혈장으로부터 고순도 혈액응고 제9인자의 산업적 생산

¹강 용 · ^{1,2}최 용 운 · ^{1,4}성 학 모 · ¹손 기 환 · ^{1,2}신 정 섭 · † ^{3,4}김 인 섭

¹(주)녹십자 종합연구소, ²아주대학교 분자과학기술학과,
³한남대학교 생명과학과, ⁴한남대학교 대학원 생명나노융합기술학과
(접수 : 2007. 10. 1., 게재승인 : 2008. 1. 17.)

Industrial-Scale Production of High-Purity Antihemophilic Factor IX from Human Plasma

Yong Kang¹, Yong Woon Choi^{1,2}, Hark Mo Sung^{1,4}, Ki Whan Sohn¹, Jeong Sup Shin^{1,2}, and In Seop Kim^{3,4†}

¹Central Research Center, Green Cross Corp., Yongin City, Kyunggi-Do 449-900, Korea

²Department of Molecular Science and Technology, College of Engineering, Ajou University, Suwon 443-749, Korea

³Department of Biological Sciences, College of Life Science and Nanotechnology, Hannam University, Daejeon 305-811, Korea

⁴Graduate Program in BT-NT Fusion Science and Technology, Hannam University, Daejeon 305-811, Korea

(Received : 2007. 10. 1., Accepted : 2008. 1. 17.)

The use of antihemophilic factor IX complex has been associated with a variety of thrombotic complications, the major cause of which was the contamination of thrombogenic proteins such as vitamin K-dependent clotting factors II, VII, and X. In order to produce a commercial factor IX (GreenNine VF) free from thrombogenic potential, industrial-scale production process for high-purity factor IX from human plasma has been developed. The purification process contains cryo-precipitation, DEAE-sephadex A-50 anion-exchange chromatography, DEAE-toyopearl 650M anion-exchange column chromatography, heparin-sepharose 6FF affinity column chromatography, and CM-sepharose FF cation-exchange column chromatography. Also the process includes two viral inactivation and removal procedures, solvent/detergent treatment and nanofiltration using Viresolve NFP filter. The purification yield was 35.4%. The specific activity in the purified concentrate was 190.8 IU/mg which exceeded that in the factor IX complex (FacNine) by a factor of 48. The activities of factor II, VII, and X were not detected in GreenNine VF. SDS-PAGE analysis showed that GreenNine VF had the highest purity in comparison with commercially available high purity factor IX concentrates, Mononine, Octayne, Berinin HS, and Immunine STIM plus 600. One batch size of the production was 2,400 vials of 250 IU product or 1,200 vials of 500 IU product from 1,600 L cryo-poor plasma.

Key Words : high purity antihemophilic factor IX, chromatography, vitamin K-dependent clotting factors, industrial-scale production

서 론

사람 혈액응고 제9인자는 혈액응고과정에 있어서 필수적인 당단백질이다. 유전적인 요인 또는 병리적 요인에 의하여 혈액 내에 제9인자가 존재하지 않거나 부족할 경우, 혈액에서의 혈액응고 과정이 제대로 일어나지 않아 B형 혈우병을 야기시킨다. B형 혈우병은 주로 유전적으로 발생하며, 남아 신생아 30,000~50,000명 중 1명꼴로 발병하여 희귀질환으로 분류

된다. 이러한 B형 혈우병 환자의 치료를 위해 사람의 혈액으로부터 제9인자를 정제 농축하여 환자에게 투여하고 있다(1, 2).

제9인자는 간에서 합성될 때 비타민 K를 필요로 한다. 비타민 K-의존성 당단백질에는 혈액응고 제2인자, 제7인자, 제10인자 등도 포함되는데 이들은 여러 가지 공통적 특징을 가지고 있다. 혈액응고 과정에 관여하는 사람혈장 내에 존재하는 제9인자의 농도는 0.1 μmol (5 $\mu\text{g/mL}$)로 매우 낮다. 따라서 B형 혈우병 환자 치료를 위해 전혈 또는 혈장을 투여하는 경우에 많은 양을 필요로 하며, 혈장내에 존재하는 피브리노겐 (fibrinogen) 등과 같은 다른 단백질의 과량 투여를 동반하게 된다.

이러한 부작용을 줄이기 위해 1950년대 말에 처음으로 농축된 제9인자가 개발되었다. 그 방법은 혈장으로부터 제9인자를 바륨설페이트 (barium sulfate)에 흡착시켜 침전시킨 후 세

† Corresponding Author : Department of Biological Sciences, Hannam University, Daejeon 305-811, Korea

Tel : +82-42-629-8754, Fax : +82-42-629-8751

E-mail : inskim@hannam.ac.kr

척에 의해 다른 단백질들을 제거한 후 바륨설페이트에 흡착된 제9인자를 분리해 내는 것이었다. 나중에 바륨설페이트를 비독성 염인 트리칼슘포스페이트 (tricalcium phosphate)로 대체하여 사용하였다. 이러한 흡착과 침전에 의한 제9인자의 농축 공정은 다른 비타민 K-의존성 당단백질인 제2인자, 제7인자, 제10인자도 함께 농축시킨다. 이러한 농축물을 프로트롬빈 복합체 농축물 (PCCs: Prothrombin Complex Concentrates) 또는 제9인자 복합체 (Factor IX complex)라 부른다. 위와 같은 방식으로 농축시킨 제9인자 복합체가 1960년대부터 B형 혈우병 치료제로 널리 사용되어 왔다(3, 4).

혈장은 알부민, 글로불린, 혈액응고 제8인자, 안티트롬빈 III, 피부리노겐 등 다양한 혈장 유래 의약품의 원료로 사용된다. 따라서 제9인자 분리정제 공정은 다른 혈액 유래 의약품의 분리정제 공정을 고려하여 확립되어야만 한다. 혈장으로부터 알부민이나 글로불린 등을 효과적으로 분리정제하기 위해 사용하고 있는 냉에탄올 분획공정을 제9인자 분리정제에 적용하기란 쉽지 않다. 이러한 결점을 해소하기 위해 음이온 교환수지를 이용한 크로마토그래피 공정이 개발되었다. 즉 냉침전 (Cryo-precipitation)을 통해 제8인자가 풍부하게 존재하는 냉침전물 (cryo-precipitate)을 제거한 혈장을 음이온 교환수지에 통과시킴으로써 제9인자를 흡착시켜 정제하는 방법이다. 그렇지만 이러한 공정에서 제2인자, 제7인자, 제10인자도 함께 농축된다. 지금도 이러한 음이온 교환수지를 이용하여 생산된 제9인자 복합체가 B형 혈우병 환자의 치료를 위해 사용되고 있다. 그런데 제9인자 복합체의 투여 후에는 정맥 혈전증 (venous thrombosis)과 파종성 혈관내응고병증 (disseminated intravascular coagulation, DIC) 증상이 나타난다는 보고들이 있다(5, 6). 이런 부작용들은 제9인자와 함께 투여된 많은 양의 불필요한 응고 단백질 또는 농축물안의 불필요한 혈전형성 성분 (thrombogenic components)에 의해 초래된 과응고 현상 (hypercoagulable state)때문으로 생각되어진다. 제9인자 복합체를 다량으로 오랜 기간 투여하면 정상적인 제2인자의 양이 증가하게 되며, 혈장에서 소멸되는 시간도 길어지게 된다.

미국과 유럽의 경우 제9인자 복합체의 부작용을 줄이기 위해 헤파린 겔 (Heparin gel) 또는 단일세포항체 겔 (monoclonal antibody gel)을 이용한 컬럼 크로마토그래피 (column chromatography)를 사용하여 제2인자, 제7인자, 제10인자의 농도를 낮춘 고순도 제9인자를 1990년대부터 생산하기 시작하였다. 하지만, 다른 혈장 유래 단백질이 여전히 오염물질로 존재하고 있다(6-8). 단일세포항체를 이용하면 제9인자를 선택적으로 분리하여 낼 수 있지만, 배양에 사용된 동물세포 유래 바이러스에 의한 감염 위험과 크로마토그래피 공정시 용출될 수 있는 쥐 유래 IgG에 의한 부작용을 배제할 수 없다. Genetic Institute에서 1997년부터 CHO cell을 이용한 유전자 재조합 제9인자를 Benefix™라는 상품명으로 시판하고 있지만 고가의 단점이 있다(9).

혈액유래 혈우병 치료제의 가장 큰 문제점은 혈액 속에 오염되어 있을 수 있는 hepatitis virus (HBV, HCV, HAV), human immunodeficiency virus (HIV), 그리고 human parvovirus B19 (B19) 등과 같은 혈액 유래 바이러스 감염 위험이다(10-14). 따라서 혈액유래 응고인자의 바이러스 안전성을 위해 정제 농축시 반드시 바이러스에 대한 clearance 공정 (제거 및 불활화 공정)이 포함되어야 한다. 바이러스를 목적 단백질과

partitioning하여 제거하는 방법에는 침전, 크로마토그래피, 여과 (filtration) 등이 있고, 물리·화학적 처리를 통해 바이러스의 감염력을 감소시키는 바이러스 불활화방법에는 열처리, solvent/detergent 처리, low/high pH 처리, irradiation 등이 있다(15-18).

(주)녹십자는 혈장 유래 B형 혈우병 치료제인 핵나인을 생산 판매하고 있다. 핵나인은 혈액응고 제2인자, 제7인자, 제10인자가 함유된 제9인자 복합체로, 정맥 혈전증과 파종성 혈관내응고병증 같은 혈전형성 부작용이 일어날 가능성이 있어, 핵나인보다 순도, 유효성, 바이러스 안전성이 우수한 제품의 개발이 필요하였다. 본 연구에서는 단일세포항체 크로마토그래피 공정을 배제한 일반적인 크로마토그래피 방법을 이용하여 제2인자, 제7인자, 제10인자가 완벽하게 제거된 고순도 사람 혈액응고 제9인자 (GreenNine VF) 제조공정을 개발하고자 하였다. GreenNine VF 제조공정은 기존의 핵나인 생산 공정에 heparin 친화성 크로마토그래피와 양이온 크로마토그래피가 추가된 공정으로, 바이러스 안전성을 증진시키기 위해 solvent/detergent 처리공정과 바이러스 필터 공정을 포함하고 있다. GreenNine VF를 산업적 규모로 생산한 후 시판되고 있는 고순도 혈액응고 9인자 제제들과 생물학적, 물리·화학적 특성을 비교 분석하였다.

재료 및 방법

고순도 혈액응고 제9인자 (GreenNine VF)의 산업적 생산 공정

동결된 혈장을 녹여 4°C 이하에서 원심분리를 하면 혈액응고 제8인자가 풍부하게 존재하는 크라이오 침전물 (cryo-precipitate)과 혈액응고 제9인자가 풍부하게 존재하는 cryo-poor plasma로 나누어진다. 크라이오 침전물은 혈액응고 제8인자의 원료로 사용되며, cryo-poor plasma는 혈액응고 제9인자의 원료로 사용될 뿐만 아니라, 알부민, 면역글로불린, 안티트롬빈 III의 원료로 사용된다. cryo-poor plasma를 원료로 하여 고순도 혈액응고 제9인자 정제 공정을 확립하였다. Fig. 1은 고순도 사람 혈액응고 제9인자 정제 방법에 대한 공정도이다.

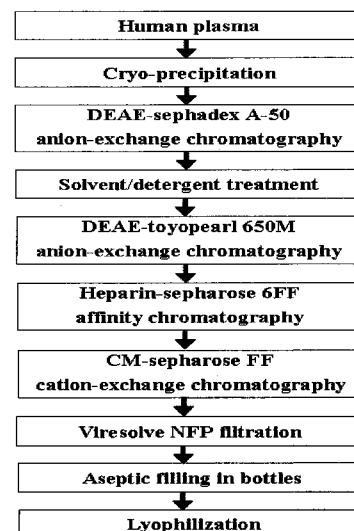


Figure 1. Flow diagram of the manufacturing process for high-purity factor IX from human plasma.

DEAE-sephadex A-50 anion-exchange chromatography : Cryo-poor plasma 900 L를 DEAE-sephadex A-50과 교반하여 흡착시킨 후 0.2 M NaCl이 포함된 Na-citrate 완충용액 (10 mM, pH 7.0)으로 세척 후 0.5 M NaCl이 포함된 Na-citrate 완충용액 (10 mM, pH 7.0)으로 혈액응고 제9인자를 용출하였다. 이 정제액 60 L를 Na-citrate 완충용액(10 mM, pH 7.0)으로 투석, 농축하여 -70°C에 보관하였다.

Solvent/detergent를 이용한 화학적 바이러스 불활화 : 동결된 정제액을 용해한 후 단백질 농도를 15 mg/mL로 조정하였다. 단백질 농도 조정액 65.4 L의 온도를 25±0.5°C로 보정한 후 Tween 80과 tri-(n-butyl) phosphate (TNBP)가 각각 1%와 0.3%가 되게 첨가한 후, 25±0.5°C로 8시간 동안 교반하면서 바이러스 불활화 공정을 수행하였다.

DEAE-toyopearl 650M anion-exchange column chromatography : 바이러스 불활화 후액을 0.12 M NaCl이 포함된 Na-citrate 완충용액 (10 mM, pH 7.0)으로 미리 평형을 시킨 DEAE-toyopearl 650M column (45 x 20cm)에 흡착시켰다. 그리고, 0.15 M NaCl이 포함된 Na-citrate 완충용액 (10 mM, pH 7.0)으로 1차 세척한 후 0.1 M NaCl이 포함된 Na-citrate 완충용액 (10 mM, pH 7.0)으로 2차 세척을 하였다. 그 다음 0.3 M NaCl이 포함된 Na-citrate 완충용액 (10 mM, pH 7.0)으로 혈액응고 제9인자 활성 분획 16.3 L를 용출하였다.

Heparin-sepharose 6FF affinity column chromatography : DEAE-toyopearl 650M 컬럼 용출액의 NaCl 농도를 0.2±0.05 M로 조정 후 Na-citrate 완충용액 (20 mM, pH 7.4)으로 평형을 시킨 heparin-sepharose 6FF column (30 x 18cm)에 흡착시켰다. Na-citrate 완충용액 (20 mM, pH 7.4)으로 1차 세척 후 0.15 M NaCl이 포함된 Na-citrate 완충용액 (20 mM, pH 7.4)으로 2차 세척하였다. 그 다음 L-arginine (1 g/L)과 0.3 M NaCl이 포함된 Na-citrate 완충용액 (20 mM, pH 7.4)으로 혈액응고 제9인자 활성분획 27.5 L를 용출하였다. 용출액의 pH를 1 M HCl을 사용하여 4.1±0.02로 조정하였다.

CM-sepharose FF cation-exchange column chromatography : pH 4.1로 조정된 용출액을 L-arginine (1 g/L)과 0.3 M NaCl이 포함된 Na-citrate 완충용액 (20 mM, pH 4.1±0.02)으로 평형시킨 CM-sepharose FF column (20 x 5cm)에 흡착시키며 비흡착액을 수집하였다. 비흡착액의 pH를 6.0±0.2로 조정된 후 한외여과기를 사용하여 5 L로 농축하였다.

나노 필터를 이용한 바이러스 제거 : 농축된 혈액응고 제9인자 활성분획을 Viresolve NFP 필터 (Millipore, 10 opticap type)를 사용하여 2 기압의 압력으로 여과하였다. Viresolve NFP filter는 20 nm pore size를 갖는 바이러스 제거용 필터이다(18).

최종원액의 조제 및 분병, 동결건조 : Viresolve NFP 필터 여과액을 120 mM glycine, 220 mM NaCl이 포함된 Na-citrate 완충용액 (10 mM, pH 7.0)으로 투석 농축한 후 최종원액의 역가기준에 적합하게 희석하였다. 제균여과를 실시한 후 최종원액을 20 mL 바이알에 5 mL 씩 분주한 후 동결건조하였다.

혈액응고 제9인자 활성 측정

혈액응고 제9인자 역가는 혈액응고 제9인자가 결핍된

혈장을 사용한 clotting 방법으로 측정하였다. 정상인 10명 이상의 혈장을 혼합한 혈장과 검체를 2배 단계로 희석한 후 각 0.1 mL을 시험관에 취하였다. 제9인자가 결핍된 혈장 0.1 mL과 인지질, 활성화제를 함유한 용액 0.1 mL을 첨가한 후 37°C에서 혼합하고 충분히 활성화시킨 후, 0.025 mol/L CaCl₂ 용액 0.1 mL을 첨가해 응고시간을 KC10 coagulometer (Amelung, Lem해, Germany)로 측정하였다. 응고 시간과 정상인 혈장 농도 사이의 관계를 표준곡선으로 하여 검체의 혈액응고 제9인자 역가를 측정하였다. 이때 정상인 혈장 1 mL에 함유된 혈액응고 제9인자 역가를 1 IU로 정의하였다.

혈액응고 제2인자, 제7인자, 제10인자 활성 측정

혈액응고 제2인자, 제7인자, 제10인자 역가는 각 혈액응고 인자가 결핍된 혈장을 사용한 clotting 방법으로 측정하였다. 혈액응고 제2인자를 측정하기 위해 정상인 10명 이상의 혈장을 혼합한 혈장과 검체를 2배 단계로 희석한 후 각 0.1 mL을 시험관에 취하였다. 혈액응고 제2인자가 결핍된 혈장 0.1 mL을 첨가해 37°C에서 혼합하고 충분히 활성화시킨 후, 0.0125 M CaCl₂을 함유한 조직 트롬보플라스틴 용액 0.2 mL을 첨가해 응고시간을 측정하였다. 혈액응고 제7인자를 측정하는 경우에는 제2인자가 결핍된 혈장대신 제7인자가 결핍된 혈장으로, 혈액응고 제10인자를 측정하는 경우에는 제10인자가 결핍된 혈장으로 교환하여 측정하였다. 응고시간은 KC10 coagulometer (Amelung, Lemgo, Germany)로 측정하였다. 응고 시간과 정상인 혈장 농도 사이의 관계를 표준곡선으로 하여 검체의 혈액응고 인자 역가를 측정하였다. 이때 정상인 혈장 1 mL에 함유된 각 혈액응고 인자 역가를 1 IU로 정의하였다.

단백질 농도 분석

단백질 농도는 Bradford 방법을 사용하여 분석하였다(19). Bovine serum albumin을 표준물질로 사용하였다.

GreenNine VF의 물리·화학적 특성 분석

SDS-PAGE : GreenNine VF의 순도와 분자량을 확인하고, 현재 시판되고 있는 제9인자 제제와 비교하기 위해 SDS-PAGE 분석을 하였다. 연속해서 생산된 3 Lot의 GreenNine VF와 제9인자 복합체인 웨나인 (621A1031, 녹십자, Korea), 고순도 혈액응고 9인자인 Mononine (U22409A, Centeon, USA), Octanyne (022009230, Octapharma, Austria), Berinin HS (2326327C, Aventis Behring, Germany), Immunine STIM plus 600 (05D1301H, Baxter, Austria)을 비교 분석하였다. 이를 위해 Novex사의 4~20% Tris-Glycine Gel (1.0 mm x 10 well)과 Bio-Rad사의 Prestained protein molecular weight standards를 이용하여 30 mA/gel의 조건으로 SDS-PAGE를 실시하였다. 전기 영동 후 Coomassie Blue로 염색하였다.

HPLC 분석 : Size exclusion 컬럼인 TSK gel G 3000 SW (7.5 × 600 mm)을 이용하여 GreenNine VF와 Mononine, Octanyne, Berinin HS, Immunine STIM plus 600의 retention time을 비교분석하였다. Na₂HPO₄ 1.741 g, Na₂HPO₄ 4.873 g, NaCl 11.69 g과 NaN₃ 0.05 g을 칭량한 후 당일 조제한

탈이온수를 넣어 1 L가 되게 하여 0.45 μ m membrane filter 로 여과한 후 초음파 진탕기에 20분간 탈기시켜 이동상으로 사용하였다. 유속은 0.6 mL/min 이었으며, 280 nm UV 검출기로 단백질을 검출하였다.

N-말단 아미노산 서열분석 : 분리 정제한 혈액응고 제9인자의 N 말단 아미노산 서열은 한국기초과학연구원 서울분소에 의뢰하여 Procise cLc Protein sequencing system (Applied Biosystems)을 이용하여 분석하였다. 분석된 N-말단 아미노산 서열을 SWISS-PROT Protein database (<http://ca.expasy.org/uniprot/P00740>)와 비교 검색하였다.

탄수화물 분석 : 분리 정제한 혈액응고 제9인자의 탄수화물 종류 및 함량은 한국기초과학연구원 대전분원에 의뢰하여 Bio-LC DX-300 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA)을 이용하여 분석하였다. 분리 정제한 혈액응고 제9인자 50 mg을 취하여 가수분해한 후, CarboPac PA1 column (4.5 x 250mm)을 사용하여 분리·분석하였다.

등전집속 (Iso-Electric Focusing) : GreenNine VF의 등전점을 확인하기 위해 Mini-protein II electrophoresis system을 이용하여 등전집속 분석을 실시하였다. 표준액은 Broad pI Kit pI 3-10 (Code No. 17-0471-01, pharmacia)을 사용했으며, 시료의 단백질 농도는 1~3 mg/mL, 염 농도는 50 mmol/L 이하가 되도록 하여 사용하였다. Prefocusing은 700V, 6mA 조건에서 20분간 실시하였으며, 시료 주입은 500V, 4mA 조건에서 20분, 등전집속은 2000V, 7mA 조건에서 1시간 30분 동안 실시하였다. 비교품으로 Mononine 을 사용하였다.

이상독성과 발열성 물질 분석

GreenNine VF의 이상독성과 발열성 물질 존재 여부를 Korean Pharmacopoeia, British Pharmacopoeia, US Pharmacopoeia 에 기술된 시험방법에 따라 측정하였다. 시료를 쥐의 복강에 주사한 후 7일 동안 이상 증세 여부와 피부 변화를 관찰한 후 이상독성 여부를 판단하였다. 토끼의 귀 정맥에 시료를 주사 한 후 토끼의 체온을 연속적으로 측정하여 발열성 물질(pyrogen)의 양을 측정하였다.

바이러스 검출 시험

GreenNine VF 완제품에서 혈액유래 바이러스 안전성을 검증하기 위해 HIV antibody, HCV antibody, HBs Antigen을 AxSYM HIV AgAg combo (Abbott), AxSYM HCV V.3 (Abbott), AxSYM HBsAg V.2 (Abbott) 검출 키트를 사용하여 검사하였다. HAV의 경우에는 아래와 같은 primer를 사용하여 nested PCR을 이용하여 검사하였다(20). HAV6, 5'-TGTCTGGAGCA CTGGATGG-3' (2839-2857); HAV7, 5'-CATTTCAAGAGTCCACACA CTTCT-3' (3357-3380); HAV8, 5'-TGGTTTCTATTTCAGATTGCAA ATTA-3' (2890-2914); HAV9, 5'-TTCATTATTTTCATGCTCCTCAGT-3' (3264-3286).

무균 시험

GreenNine VF의 세균 및 곰팡이 오염 여부를 Korean Pharmacopoeia, British Pharmacopoeia, US Pharmacopoeia 에 기술된 무균시험방법에 따라 검사하였다.

결과 및 고찰

고순도 혈액응고 제9인자(GreenNine VF) 생산 공정

동결된 사람혈장을 4°C 이하에서 용해한 후, 혈액응고 제8인자가 풍부하게 존재하는 냉침전물(cryo-precipitate)을 원심분리하여 제거한 혈장(Cryo-poor plasma)을 원료로 하여 고순도 혈액응고 제9인자 정제 공정을 확립하였다(Fig. 1). Cryo-poor plasma에 존재하는 제9인자를 DEAE-sephadex A-50 음이온 교환수지에 흡착시켜 1차 정제하였다. DEAE-sephadex A-50 음이온 교환수지 비흡착액은 알부민, 면역글로불린 등의 생산을 위한 원료로 사용하였다. 1차 농축 정제된 제9인자를 투석농축한 후 생산공정을 고려하여 동결보관하였다.

동결 보관된 1차 정제액을 용해한 후 solvent/detergent를 이용한 바이러스 불활화 공정을 수행하였다. Solvent/detergent를 이용한 화학적 바이러스 불활화 방법은 1985년 New York Blood Center에서 개발하여 상용화된 방법으로써 혈장 유래 단백질의 활성에 큰 영향을 미치지 않고, HIV, HBV, HCV 등 외피보유바이러스 (Enveloped virus)를 효과적으로 사멸시키는 방법이다(21, 22). 주로 사용되는 solvent는 TNBP 이며, detergent로는 Tween 80, Triton X-100, 또는 sodium cholate가 사용된다. 이들은 외피보유바이러스의 지질막을 파괴함으로 해서 바이러스를 불활화 시키며, 그 불활화 효과는 처리 시간과 온도에 따라 달라진다.

Solvent/detergent를 이용한 바이러스 불활화 후 DEAE-toyopearl 650M 음이온 교환수지에 흡착시켜 2차 정제 및 농축을 하였다. 이러한 크로마토그래피 공정에서 제2인자, 제7인자, 제10인자도 함께 농축된다. 이들 불순물을 제거하기 위해 혈액응고 인자에 친화성이 있는 헤파린(heparin)을 리간드로 하는 heparin-sepharose 6FF 친화성 크로마토그래피를 사용하여 3차정제를 하였다.

3차정제 단계 이후에도 미량으로 존재하는 불순물을 완전히 제거하기 위해 CM-sepharose FF 양이온 교환수지 크로마토그래피를 사용하여 4차 정제하였다. 제9인자의 등전점 (isoelectric point)은 제9인자에 존재하는 탄수화물의 종류와 양에 따라 4.0~4.6 정도의 다양성을 나타낸다(23). pH 를 4.1 정도로 낮추게 되면 제9인자는 대부분 중성 또는 음전하를 띠게 되지만 다른 혈장 유래 단백질들은 양전하를 띠게 된다. 이러한 원리를 이용하여 3차정제액의 pH를 4.1로 낮춘 후 CM-sepharose FF 양이온 교환수지 크로마토그래피에 통과시켜 양전하를 띤 불순 단백질들만 흡착시켰다. 수집된 비흡착액의 pH를 6.0으로 조정한 후 한외여과기를 사용하여 5 L로 농축하였다.

농축된 혈액응고 제9인자를 20 nm pore size를 갖는 바이러스 제거용 필터 (Viresolve NFP)를 사용하여 여과하였다. 바이러스 필터는 원하는 단백질에 변성을 일으키지 않으면서, 효율적으로 size exclusion에 의해 다양한 종류의 바이러스를 제거시킬 수 있다. 특히 바이러스 필터 공정은 물리·화학적 처리에 매우 큰 저항성을 갖는 HAV, B19 같은 외피비보유 바이러스 (Non-enveloped virus)를 효과적으로 제거할 수 있어 생물학적 의약품의 안전성을 증진시킬 수 있는 매우 우수한 공정이다(24-26).

바이러스 필터를 통과한 원액은 안정제로 120 mM glycine,

등장화제로 220 mM NaCl이 포함된 Na-citrate 완충용액 (10 mM, pH 7.0)으로 투석 농축한 후 제9인자의 농도를 100~120 IU/mL로 조절하여 최종원액을 조제하였다. 제균여과를 실시한 후 최종원액을 20 mL 용기에 5 mL 씩 분주한 후 동결건조하였다.

GreenNine VF의 산업적 규모 생산결과 분석

실험실 규모로 확립된 고순도 혈액응고 제9인자 생산 공정을 산업적 규모로 scale-up하여 250 IU 용량 2,000병 이상, 500 IU 용량 1,000병 이상을 생산할 수 있는 산업적 스케일로 시험생산하였다. 시험생산 결과의 한 예를 들면 cryo-poor plasma 1,600 L를 원료로 사용하여 500 IU 용량 분병제품 1,200여병을 생산하였다. 정제수율은 35.4%였으며, 최종원액에서 비활성은 190.78 IU/mg이었다(Table 1). 각 정제 단계에서의 수율과 정제도를 비교 분석한 결과 DEAE-sephadex A-50과 heparine-sepharose 6FF 크로마토그래피 공정에서 타단백질들이 효과적으로 제거됨을 알 수 있었다. 최종원액의 순도는 cryo-poor plasma 대비 11,924배 증가되었다. 현재 생산되고 있는 제9인자 복합체 (핵나인)의 비활성은 4.0 IU/mg이므로, GreenNine VF의 순도는 핵나인 대비 약 48배 이상 증가하였다. DEAE-sephadex A-50 크로마토그래피 활성분획을 투석 농축한 후 동결 보관한 다음 용해하여 solvent/detergent 바이러스 불활화 공정을 수행하였는데, 용해 과정 중에 제9인자 활성의 소실이 일어나 solvent/detergent 바이러스 불활화 공정 후 회수율과 비활성이 감소하였다. 공정을 개선하여 DEAE-sephadex A-50 크로마토그래피 활성분획의 동결 보관 과정 없이 정제가 진행된다면 고효율로 제9인자를 회수할 수 있을 것으로 판단된다. CM-sepharose FF 크로마토그래피 공정에서 잔존하는 고분자량의 타단백질들의 제거가 일어나 heparine-sepharose 6FF 크로마토그래피 활성분획 대비 순도가 2배 증가하였다. 바이러스 제거를 위한 nanofiltration 공정에서도 약간의 순도 증가가 있었는데, 고분자량의 단백질과 단백질 aggregate들이 제거되었기 때문인 것으로 사료된다.

Table 1. Industrial scale purification of antihemophilic factor IX from human plasma

Procedure	Volume (L)	Total protein (g)	Total activity (IU)	Specific activity (IU/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Cryo-poor plasma	1,600.0	112,000.0	1,800,000	0.016	1	100.00
DEAE-sephadex A-50	60.0	1,056.6	1,249,200	1.18	74	69.4
Solvent/Detergent	65.4	980.2	880,600	0.90	56	48.9
DEAE-toyopearl 650M	16.3	201.0	802,775	3.99	249	44.6
Heparin sepharose 6FF	27.5	7.62	677,325	88.89	5,556	37.6
CM sepharose FF	5.0	3.69	668,500	181.17	11,323	37.1
Nanofiltration	5.0	3.39	643,528	189.83	11,865	35.8
Final active solution	5.0	3.34	637,208	190.78	11,924	35.4

제2인자, 제7인자, 제10인자 활성

핵나인에는 제9인자의 비활성이 4 IU/mg인데 반해, 제2인자, 제7인자, 제10인자도 3.12 IU/mg, 0.02 IU/mg, 0.26 IU/mg의 고농도로 혼합되어 있다. GreenNine VF 제조 과정 중 제2인자, 제7인자, 제10인자가 제거되는 공정을 확인하기 위해 각 공정 별로 활성을 측정하였다(Table 2). 제2인자는 heparin sepharose 6FF 친화성 크로마토그래피 공정에서 완벽하게 제거되었다.

제7인자와 제10인자는 DEAE-toyopearl 650M 음이온 크로마토그래피 공정에서 97% 이상 제거되었으며, 잔존하는 제7인자와 제10인자는 heparin-sepharose 6FF 친화성 크로마토그래피 공정에서 완벽하게 제거되었다.

Table 2. Removal of factor II, factor VII, and factor X during the factor IX purification process

Procedure	Total activity (IU)		
	Factor II	Factor VII	Factor X
Cryo-poor plasma	1,800,000	1,674,000	1,800,000
DEAE-sephadex A-50	1,347,240	ND*	1,360,320
DEAE-toyopearl 650M	1,105,140	326	33,252
Heparin sepharose 6FF	0	0	0
CM sepharose FF	0	0	0
Nanofiltration	0	0	0
Final active solution	0	0	0

*Not determined.

GreenNine VF의 물리·화학적 특성 분석

산업적 규모로 생산된 고순도 혈액응고 제9인자의 순도를 현재 시판되고 있는 제9인자 제제와 비교하기 위해 SDS-PAGE 분석을 하였다(Fig. 2). 연속해서 생산된 3 Lot의 고순도 혈액응고 제9인자는 순도가 일정하였으며, 시판되고 있는 제9인자 복합체인 핵나인, 고순도 혈액응고 9인자인 Mononine, Octanyne, Berinin HS, Immunine STIM plus 600보다 순도가 더 높았다.

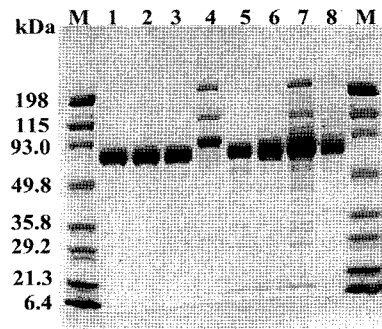


Figure 2. SDS-PAGE of different human factor IX concentrates. M, standard protein markers [myosin (198 kDa), galactosidase (115 kDa), bovine serum albumin (93 kDa), ovalbumin (49.8 kDa), carbonic anhydrase (35.8 kDa), soybean trypsin inhibitor (29.2 kDa), lysozyme (21.3 kDa), aprotinin (6.4 kDa)]; 1, GreenNine VF (GNA2001); 2, GreenNine VF (GNA2002); 3, GreenNine VF (GNA2003); 4, Facnine; 5, Mononine; 6, Octanine; 7, Berinin HS 600, 8, Immunine STIM plus 600.

Mononine은 DEAE-Sephарose와 monoclonal antibody 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 고순도로 정제된 제제로 sodium thiocyanate로 바이러스를 불활화한다. Berinin HS는 DEAE-sephadex와 heparine affinity 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 고순도로 정제된 제제로 60°C로 10시간 동안 열처리를 하여 바이러스를 불활화한다. Octanyne은 ion exchange와 affinity 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 고순도로 정제된 제제로 TNBP/Tween 80 화학적 바이러스 불활화 방법과 바이러스 필터를 사용하여 바이러스를 불활화 및 제거한다. Immunine은 ion exchange와 hydrophobic interaction 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 고순도로 정제된 제9인자 제제로

Tween 80 처리와 60°C로 10시간 동안 열처리를 하여 바이러스를 불활화한다(27).

TSK gel G 3000 SW (7.5 × 600 mm) 컬럼을 사용한 HPLC 분석결과 GreenNine VF와 Mononine, Octanine, Berinin HS, Immunine STIM plus 600의 retention time이 거의 동일하게 나와 동일한 단백질을 확인할 수 있었다(Table 3). Spectrophotometer를 이용한 분광학적 분석결과 220 nm와 280 nm에서 최대 흡광도를 나타내었다(자료 미제시).

Table 3. HPLC pattern of different human factor IX concentrates. HPLC was performed using TSK gel G 3000 SW (7.5 × 600 mm) and the retention time of each product was compared

Sample	Retention time (min)
GreenNine VF (GNA2001)	23.395
GreenNine VF (GNA2002)	23.397
GreenNine VF (GNA2003)	23.402
Mononine	23.340
Octanine	23.349
Berinin HS 600	23.393
Immunine STIM plus 600	23.335

GreenNine VF의 N-terminal amino acid sequence는 Y-N-S-G-K-L-E-E-F-V-Q-G-N-L-E-R-E-C-M-E-E-K-C-S-F이었으며, SWISS-PROT Protein database와 비교 검색하였을 때 사람 혈액응고 제9인자의 N-말단 아미노산 서열과 일치하였다.

단당류 분석결과 GreenNine VF에는 fucose, galactosamine, glucosamine, galactose, glucose, mannose, N-acetylneuraminic acid, N-glycolylneuraminic acid가 관찰되었으며 그 중에서도 glucosamine과 galactose가 높은 비율로 존재함을 확인할 수 있었다. 또한 단당 조성 결과로 보면, N-부위가 3곳, O-부위가 1곳이며, N-올리고당은 tetra-antennary 구조로 대부분 sialylation, fucosylation 되어 있는 것으로 추정되었다(Table 4).

Table 4. Analysis of carbohydrate composition of purified factor IX

Sugars	mol/mol
Fucose	3.8
Galactosamine	0.8
Glucosamine	16.8
Galactose	15.7
Gglucose	1.5
Mannose	10.9
N-acetylneuraminic acid	9.4
N-glycolylneuraminic acid	.*
Total carbohydrate content	20.8 % (w/w)

*Content of N-glycolylneuraminic acid was not quantified.

GreenNine VF의 등전점은 4.11~4.61로 나타났으며, 비교 품으로 사용한 Mononine의 등전점도 4.11~4.61로 나타났다. 순도시험결과에서는 평균 97.9%를 나타내었다(자료 미제시).

GreenNine VF의 물리·화학적 특성은 제9인자의 특성에 대한 문헌 보고와 일치하였다. 문헌 보고에 의하면 제9인자는 약 17.5% 정도의 당 (4.7% hexose, 6.8% N-acetylhexamine, 6% sialic acid)을 함유하는 단쇄구조(monomer)의 당단백질로, 세린

프로테아제(serine protease)의 일종이다(23, 28). 분자량은 제9인자에 존재하는 탄수화물의 양에 따라 결정되며, 그 크기는 약 55,000~75,000 Da이다. 아미노산 서열에 근거하여 계산된 단백질만의 분자량은 약 47,054 Da이다. 분자구조내 N 말단 부근에 12개의 γ -카르복시글루탐산(carboxyglutamic acid)을 가지는 영역이 존재하며, 활성화시에는 포스포리피드(phospholipid)와 Ca^{2+} 를 필요로 한다. 제9인자 1분자당 산성 올리고당(acidic oligosaccharide)인 시알릭산(sialic acid)을 10분자 정도 함유하고 있어 매우 낮은 등전점을 가진다. 제9인자에 존재하는 탄수화물의 종류와 양에 따라 pI 4.0~4.6 정도의 다양성을 나타낸다.

GreenNine VF 완제품의 특성

연속해서 생산된 3 batch 완제품의 특성은 Table 5와 같다. 분명하여 동결 건조된 완제품의 함유도는 0.9~1.2%로써 생물학적인약품 기준인 3% 이하를 만족하였다. 멸균된 주사용수로 동결 건조된 GreenNine VF를 녹였을 때 1분안에 녹았으며, 무색 투명한 용액이 되었다. pH는 평균 6.99이었으며, 제9인자 비활성은 194.9 IU/mg 이었다. 활성화된 혈액응고인자 존재 여부를 시험하는 응고 시간 측정에서도 응고시간이 120 시간 이상으로 나타나 활성화된 혈액응고인자가 존재하지 않음을 알 수 있었다. HIV antibody, HCV antibody, HBsAg, HAV RNA 시험 결과 전혀 검출되지 않아 감염성 바이러스로부터 안전함을 알 수 있었다. 발열성 물질도 평균 0.67°C로써 기준치 3°C보다 현저히 낮았다. 쥐를 대상으로 한 이상독성 시험에서도 전혀 이상독성을 나타내지 않았다. 무균 시험에서도 세균이나 곰팡이가 검출되지 않았다. 이와 같은 특성에서 GreenNine VF는 혈액응고관련 불순물이 검출한계 이하로 제거된 고순도 사람 혈액응고 제9인자 제제이며, 사람혈액유래 바이러스로부터 안전한 생물학적 의약품임을 확인할 수 있었다.

Table 5. Properties of GreenNine VF obtained from industrial scale production

Property	GNA2001	GNA2002	GNA2003
Moisture content (%)	0.9 %	1.2 %	1.2 %
Osmolarity (mosmol/kg)	525	524	524
Reconstitution time (min)	≤1	≤1	≤1
pH	6.95	6.99	6.99
Factor IX activity (IU/vial)	536	526	526
Specific activity (IU/mg)	194.9	194.8	194.8
Coagulation time (h)	120<	120<	120<
HIV antibody	ND*	ND	ND
HCV antibody	ND	ND	ND
HBs Ag	ND	ND	ND
HAV RNA	ND	ND	ND
Pyrogens (°C)	0.10	0.27	0.27
Abnormal toxicity	ND	ND	ND
Factor II activity (IU/vial)	ND	ND	ND
Factor VII activity (IU/vial)	ND	ND	ND
Factor X activity (IU/vial)	ND	ND	ND
Bacterial contaminants	ND	ND	ND
Fungal contaminants	ND	ND	ND

*Not detected.

요 약

(주)녹십자는 1986년 “핵나인”을 B형 혈우병 치료제로 제조품목허가를 받아 B형 혈우병치료제 공급을 시작하였다. 또한 1991년 New York Blood Center에서 solvent/detergent 바이러스 불활화 방법을 도입하여 제조공정에 추가한 후 혈액유래 바이러스로부터 안전한 제품을 생산하여 왔다. 하지만 이 제품은 혈액응고 제2인자, 제7인자, 제10인자가 함유된 제9인자 복합체로, 정맥 혈전증과 파종성 혈관내응고병증 같은 혈전형성 부작용이 일어날 가능성이 있어, 핵나인보다 순도, 유효성, 바이러스 안전성이 우수한 제품의 개발이 필요하였다. 이를 위해 고순도 제9인자 제제인 “GreenNine VF” 제조공정을 개발하였다. GreenNine VF 제조공정은 기존의 핵나인 생산 공정에 heparin 친화성 크로마토그래피와 양이온 크로마토그래피가 추가된 공정으로, 바이러스 안전성을 증진시키기 위한 바이러스 필터 공정도 포함하고 있다. 이러한 공정에 의해서 산업적 규모로 생산된 GreenNine VF는 핵나인에 비해 순도와 바이러스 안전성이 월등히 높은 것으로 확인되었다. 또한 고순도 혈액응고 제9인자 제제인 Mononine, Octanyne, Berinin HS, Immunine STIM plus 600보다 순도가 더 높았다. Cryo-poor plasma 1,600 L를 원료로 사용했을 때 1 batch 당 250 IU 분병제품 2,400병 이상, 500 IU 분병제품 1,200병 이상을 생산할 수 있었다.

감 사

이 논문의 일부는 2007년도 한남대학교 학술연구조성비 지원에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다. (주)녹십자 혈액제제 생산팀과 품질보증팀의 도움에 감사드립니다.

REFERENCES

- O'Connell, N. M. (2003), Factor XI deficiency-from molecular genetics to clinical management, *Blood Coagul. Fibrinolysis* **14**(Suppl 1), 59-64.
- Valentino, L. A. and V. M. Oza (2006), Blood safety and the choice of anti-hemophilic factor concentrate, *Pediatr. Blood Cancer* **47**, 245-254.
- Kasper, C. L. (1975), Clinical use of prothrombin complex concentrate: Report on thromboembolic complications, *Thromb. Diath. Haemorrh.* **33**, 640-644.
- Lusher, J. M. (1991), Thrombogenicity associated with factor IX complex concentrates, *Semin. Hematol.* **28**(suppl 6), 3-5.
- Köhler, M., P. Hellstern, E. Lechler, P. Überfuhr, and G. Müller-Berghaus (1998), Thromboembolic complications associated with the use of prothrombin complex and factor IX concentrates, *Thrombo. Haemost.* **80**, 399-402.
- Limentani, S. A., K. P. Gowell, and S. R. Deitcher (1995), High-purity factor IX concentrates for treatment of hemophilia B: relative purity and thrombogenic potential, *Acta Haematol.* **94**(suppl 1), 12-17.
- Hoots, W. K. (2001), Safety issues affecting hemophilia products, *Transfus. Med. Rev.* **15**(Suppl 1), 11-19.
- Tagariello G, P. G. Davoli, G. B. Gajo, E. De Biasi, R. Risato, R. Baggio, and A. Traldi (1999), Safety and efficacy of high-purity concentrates in haemophilic patients undergoing surgery by continuous infusion, *Haemophilia.* **5**, 426-30.
- Lambert, T., M. Recht, L. A. Valentino, J. S. Powell, C. Udata, S. T. Sullivan, and D. A. Roth (2007), Reformulated BeneFix: efficacy and safety in previously treated patients with moderately severe to severe haemophilia B, *Haemophilia.* **13**, 233-243.
- Yee, T. T. and C. A. Lee (2005), Transfusion-transmitted infection in hemophilia in developing countries, *Semin. Thromb. Hemost.* **31**, 527-537.
- Berkman, S. A. (1988), Infectious complications of blood transfusion, *Blood Rev.* **2**, 206-210.
- Mosley, J. W. and J. Rakela (1999), Foundling viruses and transfusion medicine, *Transfusion* **39**, 1041-1044.
- Roberts, P. (1996), Virus safety of plasma products, *Rev. Med. Virol.* **6**, 25-38.
- Schneider, B., M. Becker, H. H. Brackman, and A. M. Eis-Hubinger (2004), Contamination of coagulation factor concentrates with human parvovirus B19 genotype 1 and 2, *Thromb. Haemost.* **92**, 838-845.
- Klein, H. G. (2005), Pathogen inactivation technology: cleansing the blood supply, *J. Intern. Med.* **257**, 224-237.
- Shin, J. S., Y. W. Choi, H. M. Sung, Y. -W. Ryu, and I. S. Kim (2006), Enhanced virus safety of a solvent/detergent-treated antihemophilic factor IX concentrate by dry-heat treatment, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **11**, 19-25.
- Kim, I. S., Y. W. Choi, S. R. Lee, and H. M. Sung (2004), Cold ethanol fractionation and heat inactivation of hepatitis A virus during manufacture of albumin from human plasma, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **9**, 57-60.
- Kim, I. S., Y. W. Choi, and S. R. Lee (2004), Optimization and validation of a virus filtration process for efficient removal of viruses from urokinase solution prepared from human urine, *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 140-147.
- Bradford, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Grinde, B., K. Stene-Johansen, B. Sharma, T. Hoel, M. Jensenius, and K. Skaug (1997), Characterization of an epidemic of hepatitis A virus involving intravenous drug abusers-infection by needle sharing?, *J. Med. Virol.* **53**, 69-75.
- Horowitz, M. S., C. Rooks, B. Horowitz, and M. W. Hilgartner (1986), Virus safety of solvent/detergent treated antihemophilic factor concentrates, *Lancet* **2**, 186-189.
- Kim, I. S., Y. W. Choi, H. S. Woo, C. E. Chang, and S. Lee (2000), Solvent/detergent inactivation and chromatographic removal of human immunodeficiency virus during the manufacturing of a high purity antihemophilic factor VIII concentrate, *J. Microbiol.* **38**, 187-191.
- Suomela, H. (1976), Human coagulation factor IX isolation and characterization, *Eur. J. Biochem.* **71**, 145-154.
- Kim, I. S., Y. W. Choi, S. R. Lee, Y. Kang, K. M. Lee, D. H. Park, H. S. Woo, and S. Lee (2002), Removal and inactivation of hepatitis A virus during manufacture of urokinase from human urine, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **7**, 340-346.
- Burnouf, T. and M. Radosevich (2003), Nanofiltration of plasma-derived biopharmaceutical products, *Haemophilia.* **9**, 24-37.
- Oshima, K. H., T. T. Evans-strickfaden, A. K. Highsmith, and E. W. Ades (1996), The use of a microporous polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane filter to separate contaminating viral particles from biologically important proteins, *Biologicals* **24**, 137-145.
- World Federation of Hemophilia. (2004), Registry of clotting factor concentrates.
- Feldman, P. A., P. I. Bradbury, J. D. Williams, G. E. Sims, J. W. McPhee, M. A. Pinnell, L. Harris, G. I. Crombie, and D. R. Evans (1994), Large-scale preparation and biochemical characterization of a new high purity factor IX concentrate prepared by metal chelate affinity chromatography, *Blood Coagul. Fibrinolysis* **5**, 939-948.