

당단백질의약품의 당구조 특성분석 및 규격관리를 위한 가이드라인(안)

2009. 05. 28.

식품의약품안전청 바이오생약국
식품의약품안전평가원 의료제품연구부

당분석 협의체 추진경과

성명	소속
강현아	중앙대학교
김수현	한국기초과학지원연구원
김은정	한국표준과학연구원
김하형	중앙대학교
박범수	동아제약
박용일	가톨릭대학교
서정근	KGIT BT연구센터
오두병	한국생명공학연구원
이승주	제넥셀-세인
정철호	LG생명과학
홍성화	식약청 재조합의약품과
서수경	식약청 재조합의약품과
권오석	식약청 재조합의약품과

▶ 그간의 추진경과

- 07년 당분석 협의체 운영

: 관련 업계 및 학계 6인

: 당분석 시험법 길라잡이 마련

- 08년 당분석 협의체 운영

: 관련 업계 및 학계 10인

: 당분석 가이드라인 관련 자료수집 및 검토

▶ “당단백질의약품의 당구조 특성분석 및 규격관리를 위한 가이드라인 (안)” 마련

당단백질의약품의 평가기준 연구 추진전략

당의 구조의 다양성

품질평가 관리

발현시스템별 당사슬의 특성 분석 및 당화 확인

생산속주별 발현시스템 확립

당단백질 내 성분당 조성분석

당단백질 품질평가기술개발

당단백질 내 당사슬 구조 분석

제조방법변경에 따른 당단백질 분석법 연구

당분석 시험법 길라잡이 마련 ('07)

당분석 평가가이드(안) 마련 ('08)

특성분석

품질 & 유효성

규격 및 공정관리

목 차

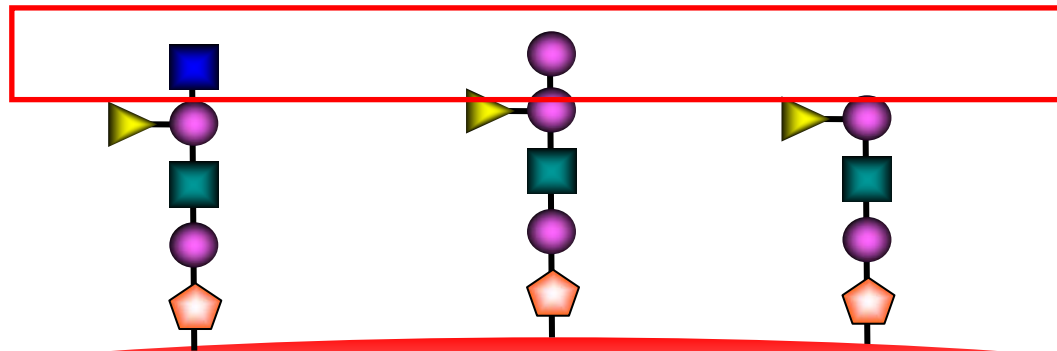
- 당의 역할 및 당사슬 구조
- 당분석의 필요성
- 규정 및 동향
- 당구조 분석 가이드라인(안)
- 향후 추진계획

생체내에서 당의 역할; ABO 혈액형

A형

B형

O형



적혈구, 혈관내피세포, 상피세포 등

■ GalNAc; ■ GlcNAc; ▲ Fucose; ● Galatose; ⬠ Glucose

당단백질에서 당의 역할

특징

복잡한 구조와 다양성을 갖는 고분자량 물질
10개 내외의 단당류로 구성되어 있으나, template이 없어
매우 복잡하고 다양하게 존재하게 됨

역할

구조 단백질뿐만 아니라, 생체 내 각종 인식, 호르몬 조절,
수송, 혈액 응고, 효소, 면역반응 등 생명활동에 매우 중요

종류

아미노산 결합 위치에 따라 *N*-glycan과 *O*-glycan으로 구분

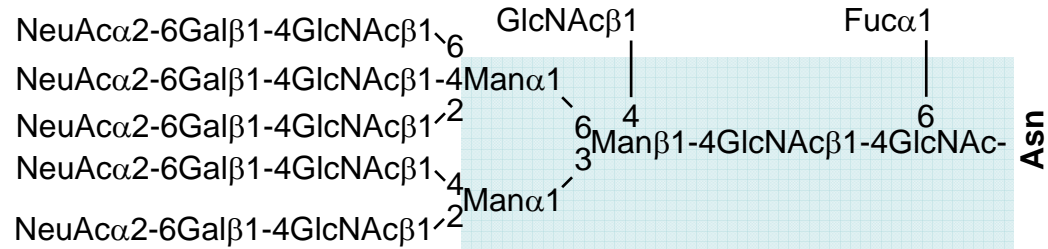
N-당화와 O-당화의 차이

	N -	O -
전구체	Sugar-Nucleotides, Lipid-linked Sugars	Sugar-Nucleotides
위치	Asn-Xaa-Ser/Thr	Ser/Thr
어디서	소포체와 Golgi	Golgi
언제	단백질의 생합성과 동시에 발생	단백질 생합성 완료 후에 발생
어떻게	당과 함께 단백질 접힘과 조립	단백질 접힘과 조립 후에 당 부가

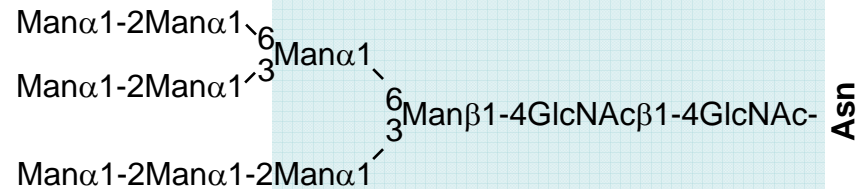
(김수현, 한국기초과학지원연구원)

N-당화의 대표적인 구조

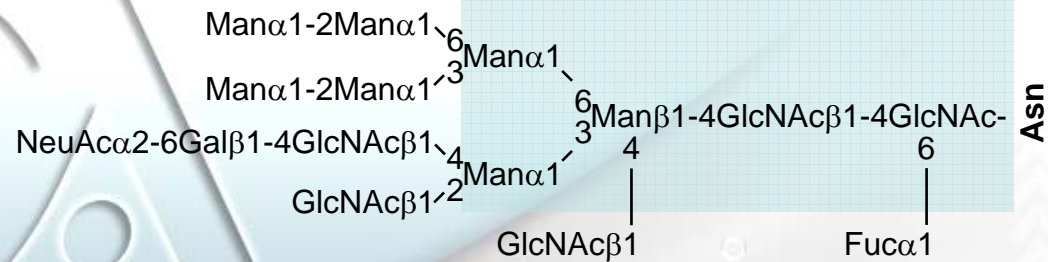
Complex Type



Oligo-Mannose Type



Hybrid Type



(김수현, 한국기초과학지원연구원)

당단백질 의약품의 개발 현황

구분	당단백질
호르몬	hCG, LH, FSH, TSH
사이토카인	Erythropoietin, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, Interferon- α (천연형), Interferon- β , Interferon- γ , Interleukin-2, Interleukin-5, OCIF (파골세포형성억제인자)
효소 및 효소조절인자	tPA, Urokinase(UK), pro-UK, Glucocerebrosidase, Protein C, Superoxide dismutase, Thrombomodulin, Thrombopoietin, Antitrombin III
성장인자	Hepatocyte Growth Factor (HGF), Nerve Growth Factor (NGF)
혈액응고인자	Factor VIII, Factor IX
단클론항체	IgG

당단백질의약품의 당분석 필요성

당단백질의 특성

- 숙주세포에 따라 단당류 구성과 당쇄 구조에 차이가 있음
- 발현시스템별로 당구조가 다양
- 동일 생산공정이더라도 여러 glycoform이 존재
- 생산조건 등에 따라 당 구조에 변화
- 배양조건, 스케일 등 제조방법 변경에 따른 당쇄 구조의 영향

⇒ N-glycan의 경우 사슬의 수와 길이가 같은 발현시스템과 생산 공정에서도 다양하여 여러 glycoform을 형성

당분석 필요성

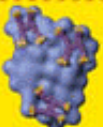
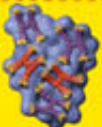
- 당의 glycoform 형성에 있어 불균일성에 대한 확인 필요
- 생물활성 등 유효성에 영향
- 체내 동태, 안정성, 생물학적 활성 변화
- 사람이 아닌 숙주세포의 경우 일부 당구조가 항원성을 나타낼 수 있음

- ✓ 철저한 특성 분석 필요
- ✓ 생산제품에 대한 일관된 품질관리를 위하여 규격 설정 필요
- ✓ 당 구조 분석법 개발 필요

사례 ; 당질화 추가를 이용한 반감기 증가

- Aranesp (darbepoetin alfa): EPO에 2개의 당사슬을 추가시켜 **시알산(Sialic acid)**이 증가되도록 설계
 - 기존 EPO제제보다 2~3배나 긴 반감기를 나타냄
 - 주 2~3회 투여하던 환자의 상태에 따라 주 1회 혹은 2주 1회 투여가 가능해짐

Aranesp® is a unique molecule

	Epoetin alfa		Aranesp®
Molecules		2 additional sialic-acid-containing carbohydrate chains	
Maximum number of sialic-acid residues†	14	Up to 8 more sialic-acid residues	22
Half-life (IV)	8.5 h	Approximately 3x longer	25.3 h
Approved dosing	TIW	Dosed less frequently	QW (de novo) or Q2W (conversion)

<표 3-14> EPO 브랜드별 예상매출 규모(2003-2010)

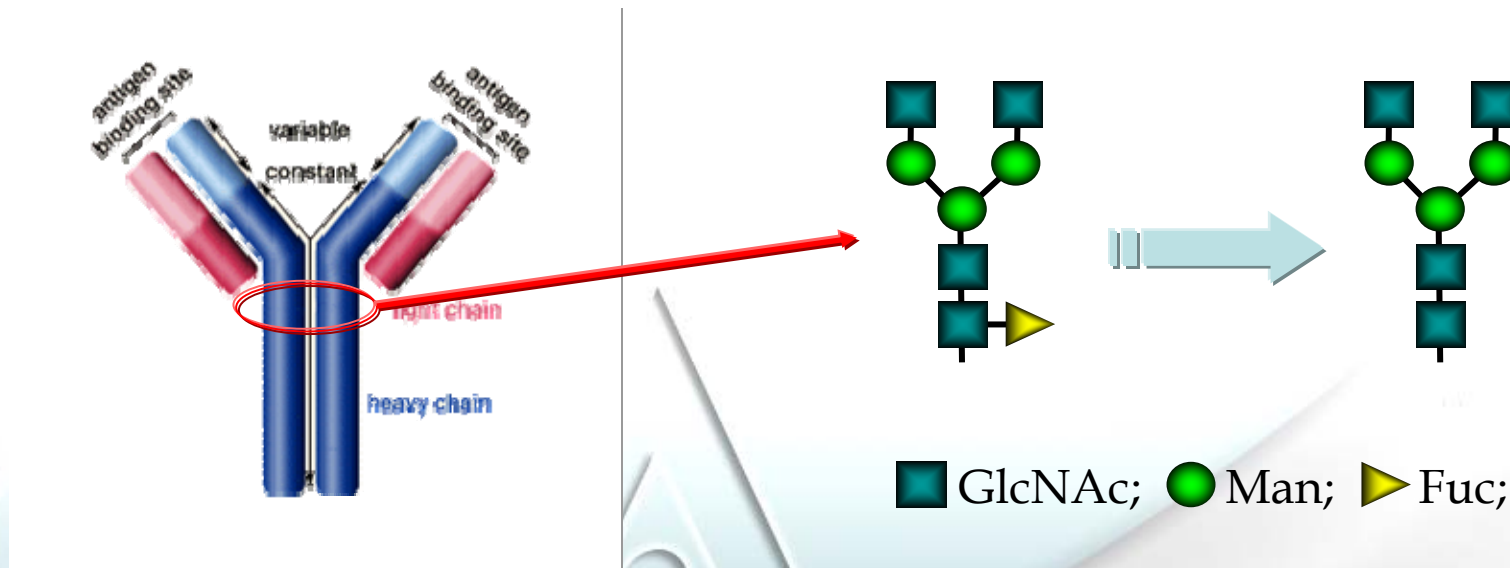
(단위 : 백만달러)

	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Aranesp	1,543	2,073	2,422	2,638	2,858	3,091	3,305	3,440
Epogen	2,435	2,605	2,709	2,790	2,874	2,931	2,960	3,019
Procrit/Eporex	3,986	3,975	3,877	3,695	3,489	3,200	2,816	2,478
NeoRecormon/Epogin	1,318	1,429	1,560	1,748	1,857	1,683	1,515	1,485
Generic(EPO)	0	50	68	86	110	151	233	367
Espo	183	207	350	329	296	240	230	221
Dynepo	0	0	50	72	96	126	162	207
R744	0	0	0	0	80	107	132	161
Total	9,465	10,339	11,036	11,358	11,660	11,529	11,353	11,378

자료: Datamonitor, *Recombinant Therapeutic Proteins*, 2004. 4, p.125.

사례 ; 당구조 변화에 따른 ADCC 증가

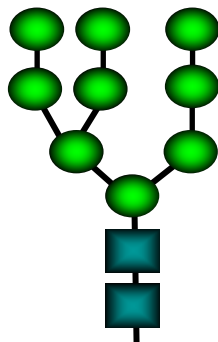
- 항체의약품 당질화 구조(주로 **Asn297**)에서 **푸코오즈 제거 시**,
 - ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity)의 증가가 보고됨
 - 항원·항체 결합에는 영향없음
 - 리툭산 (비호지킨 림프종 치료제), 허셉틴 (유방암 치료제)에서는 ADCC가 50~100배 증가함



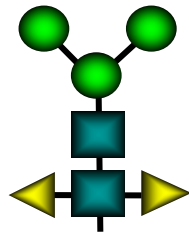
(Comprehensive glycoscience, Volume 4, Elsevier, 2007)

발현시스템에 따른 다양한 당질화 양상

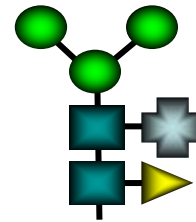
효모



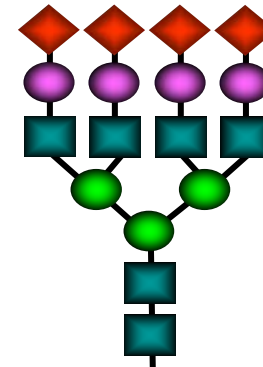
곤충 세포주



식물



포유류 세포주



■ GlcNAc; ● Man; ► Fuc; ● Gal; ◆ ;SA; + ;Xyl

재조합 단백질 생산 숙주 시스템 비교

Characteristics	Glycoprotein expression systems			
	<i>E. coli</i>	Yeast/Fungi	Insect cells	Mammalian cells
Cell growth	Rapid (30 min)	Rapid (90 min)	Slow (18-24 h)	Slow (24 h)
Cost of growth medium	low	low	high	high
Expression level	high	low to high	low to high	low to moderate
Extracellular expression	secretion to periplasm	secretion to medium	secretion to medium	secretion to medium
Protein folding	refolding usually required	proper folding	proper folding	proper folding
Posttranslational modifications				
N-linked glycosylation	none	high mannose	simple, no sialic acid	complex
O-linked glycosylation	no	yes	yes	yes
Phosphorylation	no	yes	yes	yes
Acetylation	no	yes	yes	yes
Acylation	no	yes	yes	yes

에리스로포이에틴의 국제일반명

- INN (International Nonproprietary Names) -

- Epoetin

- *darbepoetin alfa*
- *epoetin alfa*
- *epoetin beta*
- *epoetin gamma*
- *epoetin delta*
- *epoetin epsilon*
- *epoetin zeta*
- *epoetin theta* (selected during the 41st Consultation)
- *epoetin iota* (selected during the 42nd Consultation)
- *epoetin omega*

(<http://www.who.int/druginformation/general/innlists.shtml>)

가이드라인 (ICH/KFDA)

- ICH 가이드라인

(생명공학의약품/생물학적제제의 규격설정에 관한 가이드, 2004, Q6B)

--- 살아있는 생물체에 의해 생산되기 때문에 단백질에서 내인적으로 구조적 불균일성(heterogeneity)이 발생하며, 목적산물은 번역 후 수식으로 변형된 형태 (예, glycoform)들의 혼합물이 될 수 있다. ---

--- 제조자들은 목적산물의 불균일성을 결정해야 하고 ---

--- f) 탄수화물 구조; 당단백질의 경우, 탄수화물 **함량**(neutral sugars, amino sugars and sialic acids)을 결정하여야 한다. 또한 **당사슬의 구조와 과당류의 형태(안테나 구조)와 폴리펩타이드 사슬의 당화 위치**를 가능한 범위까지 분석하도록 한다. ---

USP

- Planned Glycoprotein and Glycan Chapter -

<1084>

Glycoprotein and Glycan Analysis

- Introduction and Choice of Analysis Methods -

<1085>

Glycoprotein and
Glycan Analysis

- Deglycosylation of
Glycoproteins -

<1094>

Glycoprotein and
Glycan Analysis

- Monosaccharide
Analysis -

<1095>

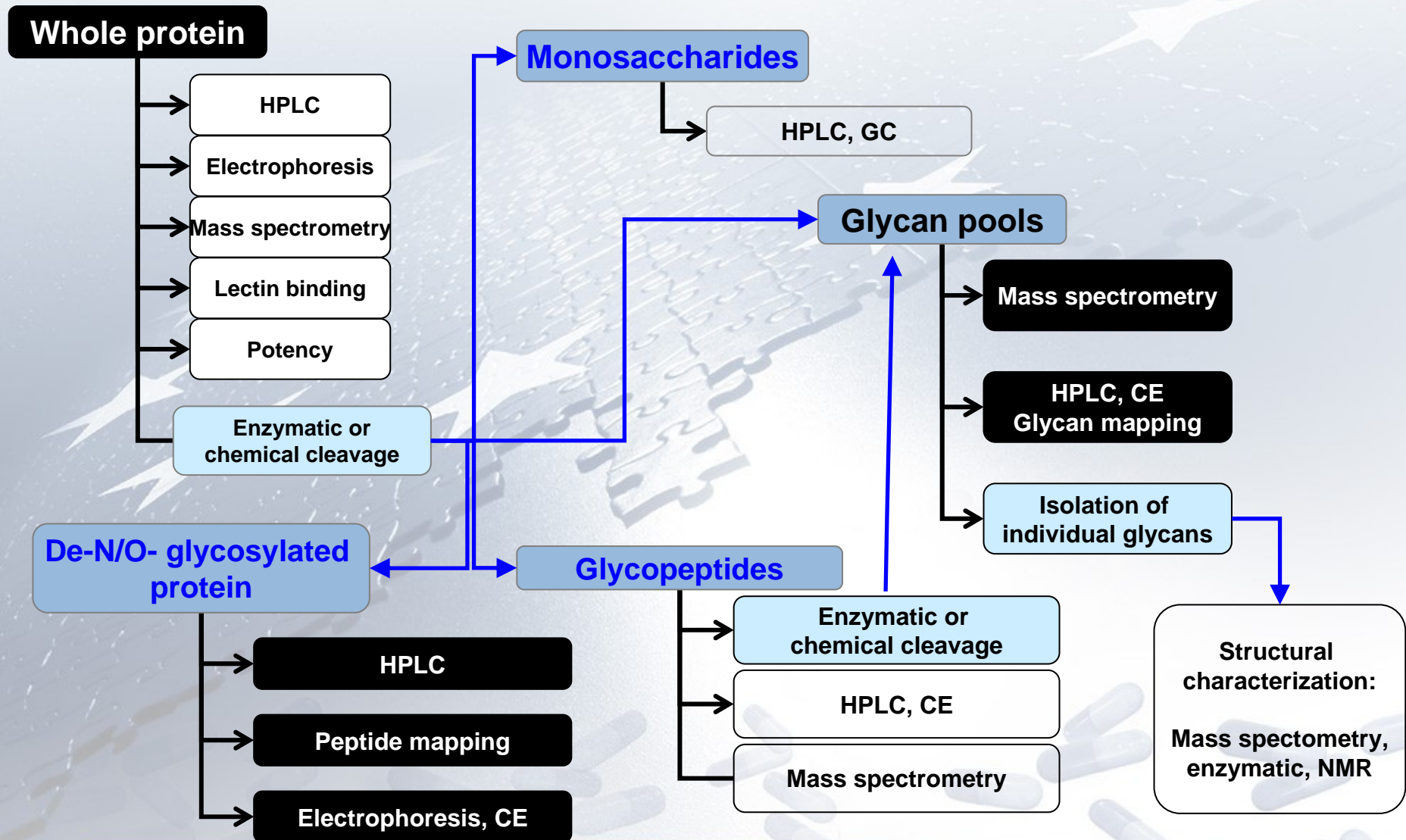
Glycoprotein and
Glycan Analysis

- Oligosaccharide
Analysis -



Making Medicines Affordable

The analysis of complex glycoproteins requires a combination of multiple analytical methods



당구조 분석 시험법 길라잡이

- I. 당구조 분석에 대한 현황
- II. 발현시스템별 당사슬의 특성
- III. 당단백질 내 당화 확인
- IV. 당단백질 내 성분당 조성 분석
- V. 당단백질 내 당사슬 구조 분석
- VI. 당화 위치 확인 및 각 당화 위치에서의 당사슬 구조 분석
- VII. 참고문헌



가이드라인 목차

- I. 목적
- II. 적용범위
- III. 일반적인 고려사항
- IV. 재조합의약품의 당구조 특성분석
- V. 용어 해설
- VI. 참고문헌
- VII. 부록

가이드라인 주요내용_일반사항

I. 목적

- 기준 및 시험방법 심사, 안전성유효성 심사
- 특성분석 자료, 규격설정 자료

II. 적용범위

- 재조합의약품 중 당단백질의약품

가이드라인 주요내용_일반사항

III. 일반적인 고려사항

- 당사슬의 종류 (M-당사슬, O-당사슬)
- 효모, 식물, 동물세포 등 다양한 발현시스템
- 생산 조건에 따라 당질화 여부와 당사슬 구조 다를 수 있음
; 숙주세포 종류, 재조합체 조작방법, 배양 조건 등
- 당사슬은 당단백질의 활성과 체내 동태에 영향을 줌

가이드라인 주요내용_특성분석

IV. 재조합의약품의 당구조 특성분석

4.1 당질화 확인

4.1.1 당질화 여부

- 목적 단백질이 당단백질임을 확인할 수 있는 자료
; 당사슬 분해효소 처리 후 분자량 변화, 렉틴 결합 여부

4.1.2 당질화의 유형

- 당이 차지하는 비율
- *N*-당질화 혹은 *O*-당질화 확인

⇒ 당사슬 구조 분석에 앞서 여러 단계의 시험계획 수립 가능

가이드라인 주요내용_특성분석

IV. 재조합의약품의 당구조 특성분석

4.2 단당류(성분당) 조성 분석

4.2.1 총 당함량(%)

- 당단백질 양 대비 총 당함량(%) 분석

4.2.2 몰 비 (단당류의 몰/당단백질의 몰)

- 복합형 *N*-당사슬의 경우, 만노오즈에 대한 표준화를 통하여 단당류의 양, 평균 당사슬 구조를 추정 가능함
- 몰 비를 분석함으로써 고 만노오즈형, 혼합형의 *N*-당사슬 또는 *O*-당사슬의 존재를 파악할 수 있음

⇒ 당사슬 구조 분석으로 발현 가능한 모든 성분당을 제시할 수 있는 경우에는 생략 가능 (예외; 만노오즈-6-인산)

가이드라인 주요내용_특성분석

IV. 재조합의약품의 당구조 특성분석

4.3 당사슬 구조 분석

4.3.1 당사슬 양상

- 당사슬에 따른 발현 양을 정량적으로 확인
; 크로마토그램, 질량분석 스펙트럼 모두 가능

4.3.2 당사슬 서열 분석

- 여러 시험을 단독 혹은 조합하여 결과를 도출하고 해석
; 순차적 당분해효소 처리 후 크로마토그램, 질량분석결과 등
⇒ 소량의 당사슬 서열까지 분석하기는 어려우므로 가능한 정도까지
분석

당분식 길라잡이_당사슬 구조 분석 흐름도

PNGase F, SDS-PAGE 등으로 확인

당단백질?

산가수분해/HPAEC-PAD

단당 조성

당사슬 type

당사슬 크기 및 서열 확인

Enzyme array/순상HPLC

No

MALDI MS

Yes

Yes

No

당사슬 구조 해석

음이온교환 HPLC

가이드라인 주요내용_특성분석

IV. 재조합의약품의 당구조 특성분석

4.4 당질화 자리별 당사슬 프로필

4.4.1 당질화 자리

- 목적 단백질에서 당질화된 아미노산을 규명
; O-당질화 자리는 가능한 범위까지 분석

4.4.2 각 당질화 자리별 당사슬 종류 및 구조별 상대 함량

- 생산 세포주 및 배양 조건에 따라 당질화의 정도가 달라짐
; 배지조성에서 소혈청을 제거한 후 당질화 자리별 당사슬 종류는 동일하나 상대 함량이 변경된 사례 있음

⇒ 국내 분석기술의 현황을 고려하여 당사슬 양상 분석을 통한 배치간 동등성으로 대체 가능

가이드라인 주요내용_특성분석

IV. 재조합의약품의 당구조 특성분석

4.5 기타

4.5.1 당사슬공학 (glycoengineering)

- 목적 단백질의 당을 인위적으로 조작한 경우에는 목적 및 경위에 대하여 상세히 서술하여야 함

; 아미노산 변경 여부, 숙주세포 종류, 당전이효소 유전자 (glycosyltransferase gene) 도입 여부, 배양 조건 등

⇒ 당사슬 구조 특성분석은 앞의 제출자료 요건에 따라 수행

가이드라인 주요내용_부록

VII. 부록

A. 당구조 분석 수행 시 고려사항

A.1 단당류 조성 분석

- 시알산(sialic acid)은 품질관리를 위한 **규격으로 설정 가능함**
; 시알산은 많은 당단백질의 활성 및 체내 동태에 영향을 미침

A.2 당사슬 양상 분석

- 품질관리를 위한 **규격으로 설정 가능함**
; 단일 시험법으로도 당사슬이 일관성 있게 발현되는지 확인 가능함

가이드라인 주요내용_부록

VII. 부록

A. 당구조 분석 수행 시 고려사항

A.3 O-당사슬에 대한 분석

- O-당사슬은 N-당사슬에 비해 복잡하고 다양한 형태로 생성되며 정형화되어 있지 않음

; O-당사슬이 당단백질의약품의 효능 및 체내 동태에 중요한 역할을 하고 있다면 가능한 정도까지 분석하여 결과를 제출하는 것이 바람직함

⇒ O-당사슬의 존재 여부와 당질화 자리 등의 자료만 제출하고 구조에 대한 자료는 제출하지 않을 수 있음

가이드라인 주요내용_부록

VII. 부록

A. 당구조 분석 수행 시 고려사항

A.4 당질화 자리별 당사슬 프로파일 분석

- 각 당질화 자리의 당사슬 종류 및 구조별 상대 함량을 분석하기 어려운 경우에는 당사슬 양상 분석법으로 대체 가능함 ; 펩타이드 맵핑과 같은 glycan mapping을 이용

가이드라인 주요내용_부록

VII. 부록

A. 당구조 분석 수행 시 고려사항

A.5 각 당질화 자리에서의 당질화 점유율 (site occupancy)

- 각 당질화 자리의 당질화 정도를 점유율(%)로서 제시

A.6 기타 고려사항

- 당사슬공학을 이용한 경우 목적 단백질의 생물학적 특성에 미치는 영향을 고려하여 당구조를 관리하는 것이 바람직함
- 글리케이션(glycation) 비율 및 생물학적 특성 평가
; 배지에 글루코오즈를 많이 넣어주므로 가능성 높음

가이드라인 주요내용_부록

VII. 부록

B. 시험방법 고려사항

B.1 당사슬 유리

- PNGase F, 하이드라진

B.2 당사슬 프로파일 분석

- 형광 표지/HPLC, 과메칠화/질량분석, HPAEC

B.3 당사슬 서열 분석

- 덱스트란 표준품과의 상대이동거리 비교 (GU값)
- MALDI-TOF, LC-MS를 이용한 당사슬 분자량 측정

B.4 당질화 자리 분석

- N-말단 서열분석법, 펩타이드 맵핑/질량분석법

가이드라인 주요내용_부록

	정량성	재현성	해상도	경제성	비고
<u>액체크로마토그래프법 (LC)</u>	높다	당사슬 종류에 따라 다름	상대적으로 낮음	높다	<ul style="list-style-type: none"> • 텍스트란 표준품의 상대이동거리는 실험실 및 실험조건에 따라 차이가 있음 • 다양한 분리 모드에서 이성체 구분이 가능함
<u>질량분석법 (MS)</u>	낮다	상대적으로 낮음	높다	낮다	<ul style="list-style-type: none"> • 과메칠화을 통해 정량성, 재현성 개선 가능함 • 고가의 장비이며 유지비가 높으나 분석 자체에 들어가는 비용이 낮고 분석 시간이 빠른 장점이 있음

당분석 가이드라인(안) 의견 수렴 결과

1. 당단백질의약품의 규격설정 혹은 기준및시험방법 설정
 - ▶ 시알산 함량, 당사슬 양상 수준의 규격설정 (부록?)
2. 특성분석 시 시험법의 적합성 자료
 - ▶ 개발사의 제품 특성에 따라 결정? (밸리데이션 아님)
3. 당사슬 양상 분석 시 질량분석 스펙트럼의 정량성
 - ▶ 질량분석 스펙트럼을 당사슬 양상 확인법으로 인정? (특성분석)
4. 당질화 자리별 당사슬 종류 및 구조별 상대함량
 - ▶ 당사슬 양상 분석으로도 가능?
5. O-당사슬 분석
 - ▶ 구체적인 가이드라인 마련 필요함

당분석 가이드라인 발간 계획

▶ 그 간의 추진현황

- 가이드라인(안) 작성 (2008.04~2008.10)
- 제약 협회 등을 통한 의견 수렴 (2009.01~2009.03)

▶ 추진계획

- 평가가이드 의견 수렴 (~2009.06.12)
- 평가가이드 최종 검토 및 수정 (~2009.06.19)
- 평가가이드 발간 (~2009.06.30)

식약청 가이드라인 찾아보기

- 식약청 홈페이지 - 정보마당 - 식약청 자료실 - 간행물/지침
- <http://www.kfda.go.kr/>

KFDA 식품의약품안전청
WWW.KFDA.GO.KR

HOME | LOGIN | MEMBER JOIN | SITEMAP | ENGLISH SITE | MOBILE

음성권드론박스 ON OFF 글자 + -

정보공개 참여마당 알림마당 **정보마당** 식약청소개

KFDA분아별정보 법령자료 **식약청자료실** 연구보고서 사진자료실 국내외안전정보 인체조직정보방 고위공무원단체의이해

Home > 정보마당 > 간행물/지침

간행물/지침

제목	생명공학의약품/생물학적제제의 규격설정에 관한 가이드		
담당부서	생물의약품팀	담당자	오일웅
등록일	2005.01.13	조회수	2493

생물의약품과 생명공학의약품은 생체에서 유래된 물질로서, 기존의 일반의약품과는 달리 복잡한 분자구조를 가진 물질로 불안정하며 흡성과 기능이 완벽하게 밝혀져 있지 않고 기존의 물리·화학적 분석 만으로는 제품의 효능과 안전성을 평가하기 어려운 특성을 갖고 있습니다. 이러한 신개념의 생명공학 / 생물학적 의약품에 대한 완전한 특성파악과 기준 및 시험방법을 설정하는 것은 이들의 생산 및 관리에 있어 가장 중요한 사항들이며 또한 안전하고 효과적인 생명공학 / 생물학적 의약품을 공급하는 초석이 될 것이라고 생각합니다.

따라서 생물의약품평가부에서는 생명공학 / 생물학적 의약품의 연구자 및 생산자들에게 이들 의약품의 올바른 규격 및 시험방법 설정 방향을 제시하고자 ICH의 생명공학 / 생물학적 의약품의 규격 설정 자료를 번역, 정리하여 본 가이드를 발간하게 되었습니다.

첨부파일 75guide.hwp

스크린 인쇄 목록

감사합니다!

가이드라인 관련 의견 제출



첨단제제과

- 전화 : 02-380-1740, 1741
- 팩스 : 02-387-7429



첨단바이오제품과

- 전화 : 02-380-1797, 1798
- 팩스 : 02-383-8322
- 메일 : sacsac77@kfda.go.kr