

유트로핀(인간성장호르몬)의 개발

송지용(럭키중앙연구소 연구위원)

(주) 럭키의 인간성장 호르몬

송 지 용

I. 서 론

인간성장호르몬 (Human growth hormone) 은 사람의 뇌하수체 전엽에서 분비되는 191개의 아미노산으로 구성된 펩타이드 호르몬의 일종이다. 뇌의 시상하부 (Hypothalamus) 에 외부의 자극이 가해지면 성장 호르몬 방출 호르몬 (Growth hormone releasing hormone) 이 분비되고, 이 호르몬이 뇌하수체를 자극하여 성장 호르몬이 분비된다. 방출된 성장 호르몬은 체내를 순환하여 간 (Liver), 신장 (Kidney) 등에 도달하며 이들 기관에서는 또 다른 호르몬인 IGF-1 (Insulin-like growth factor-1) 이 분비되는데, IGF-1 에 의하여 골, 연골등의 성장이 촉진된다.

성장호르몬은 골, 연골등의 성장 촉진 뿐만 아니라 체내의 조직에 직접 작용하여 세포 대사에 관여하기도 한다. 예를들면, 피하 및 근육의 저장 지방의 분해를 촉진시켜 혈장 중의 유리 지방산을 증가시키거나, 핵산 합성을 유발시킴으로써 단백질의 합성을 촉진시키는 등 여러 체내 대사 작용에 직접적으로 관여한다.

사람의 뇌하수체에서 추출한 성장 호르몬이 뇌하수체성 왜소증 (Hypopituitarism) 치료에 쓰일 수 있다는 가능성은 1958년 Raben에 의하여 처음으로 제시된 이후 인간 성장 호르몬의 요구는 폭발적으로 증가하였다. 그러나, 왜소증 치료에는 1인당 연간 50~80인분의 사체로부터 추출한 성장 호르몬이 필요하며 따라서 가격이 매우 비싸서 치료를 받을 수 있는 사람은 매우 제한적이었다.

1985년 미국의 Genentech사가 최초로 대장균에서 유전공학적인 방법에 의해 재조합 인간성장 호르몬의 FDA 허가를 득하게 되면서 뇌하수체 유래 성장 호르몬의 사용은 재조합 제품으로 대체 되었다. 특히, 천연형 성장 호르몬을 사용한 환자들에서 Creutzfeldt-Jacob 병이라는 치명적인 신경계 질환이 종종 발생한다는 보고가 나오에 따라 천연형 성장 호르몬의 사용은 거의 중단되기에 이르렀다.

왜소증 치료제로 허가를 받은 재조합 성장 호르몬은 공급면에서 문제점을 해결하였다고는 하나 매우 고가의 의약품임에는 틀림없다. 왜소증 환자는 대개 인구 4,000~5,000명당 1명꼴로 발생하며 국내에도 정확한 통계는 없지만 상당수의 환자들이 있는 것으로 알려지고 있다. 우리나라에도 1987년경 부터 성장호르몬의 지료가 서서히 자리잡게 되었다. 그러나 워낙 가격이 비싸서 일반인들이 사용하는데는 엄청난 경제적 부담을 감수하여야만 했다. 이에 국내에서 성장 호르몬을 개발하여 저렴한 가격으로 우수한 의약품을 공급하고자 하는 의도에서 본 Project를 시작하였다.

(주) 럭키에서는 자체 개발한 유전공학 기술을 이용하여 효모에서 인간 성장 호르몬을 생산하기로 계획에 착수한것이 지난 1986년 말이었다. 그 후 실험에 착수한 후 6년만에 비임상, 임상을 완벽히 거쳐 1992년 말에 국내에서 신약으로서 개발하는데 성공하였다. (주)럭키에서 개발한 재조합 인간 성장 호르몬은 외국의여 타 재조합 인간 성장 호르몬들이 대장균을 숙주로 한 것과는 달리 효모를 숙주세포로 하고 있다는 점에서 그 특징을 찾을 수 있다. 본 기고는 (주) 럭키의 재조합 성장호르몬의 개발과정을 단계별로 요약한 것이다.

II. 개발과정

1. 유전자 조작

인간 성장 호르몬의 유전자 조작은 (주) 럭키의 미국내 현지 법인인 Lucky Biotech Corp (LBC) 에서 수행되었다. 1986년 후반기에 인간의 뇌하수체 조직에서 인간 성장 호르몬의 mRNA가 분리되었고 이어서 cDNA를 만드는 작업이 진행되었다. 성장 호르몬을 암호화하는 cDNA는 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)에

서 복제될 수 있는 Vector에 넣어져서 성장 호르몬이 효모에서 발현될 수 있도록 하는 작업들이 수행되었다. 일단, 효모에서 성장 호르몬이 발현됨을 확인한 후에 발현을 증대를 위한 일련의 실험들이 수행되었다. 성장 호르몬은 인체 투여량이 인터페론 등과 비교하여 상당히 많은 편이다.

따라서, 상업화 성공 여부의 제 1차 과제는 (주) 럭키가 보유하고 있는 효모발현 체계에서 재조합 성장 호르몬의 발현율을 높이는 일이었다. 효모에서 선택적으로 사용되는 유전자 code로의 치환등 여러가지 작업끝에 경제성 있을 정도로 발현 체계를 완성시킨 것이 1988년 초반이었다.

2. 제조공정의 개발

대덕에 위치한 (주) 럭키 바이오텍연구소에서는 LBC에서 전해 받은 재조합 효모 균주를 가지고 발효 및 정제의 개발에 착수하였다. 발효조건의 확립을 통한 효모내 성장 호르몬의 발현율 증대는 (주) 럭키 연구소가 가지고 있는 유전공학의 여러가지 Know-how중의 하나라고 할 수 있다. 이미 이 당시에 재조합 인터페론-감마(1990년초 상업화, 상품명 : 인터맥스-감마) 를 통하여 효모균의 발효공정 기술이 어느 정도 취득된 상태이었으나 인간 성장 호르몬의 경우는 인터페론과 또 다른 경험을 요구하였다.

인터페론과 같이 많은 종류의 이종단백질들은 효모나 박테리아에서 발현될 때 inclusion body의 형태로 존재한다. 인간 성장 호르몬도 효모에서 발현될때 이와 비슷한 상태로 존재하는데, 기존의 인터페론 감마나 혹은 인터페론 알파와는 그 양상이 다르다. 따라서 발효 최적화는 그 자체로 떼어서 생각할 수가 없고 그 이후 단계인 정제과정의 효율성과 밀접한 관계가 있다. 아무리 재조합 단백질의 발현율을 높여도 오히려 정제과정이 더 복잡해지거나 수율이 저하된다면 그 만한 가치를 상실하게 될 수도 있다. 인간성장 호르몬의 경우 발효 최적화는 항상 정제과정의 개선을 통해 정보가 feedback되었고, 새로운 정보에 의하여 또 개선되고 하는 작업이 계속되었다. 재조합 성장 호르몬의 숙주세포로 효모를 사용하여 발효 최적화를 거친 경우 세포내에서의 단백질의 발현율은 높이면서도 발현된 양상은 대장균을 숙주세포로 사용하였을 경우와는 달리 정제하기가 용이한 형태라는 장점이 있다.

유전공학 제품개발의 모든 과정이 다 중요하지만 성장 호르몬의 정제과정 확립은 특히 그 중요성이 더욱 강조되는 부분이다. 앞서 기술한 바와 같이 성장 호르몬은 타 재조합 단백질들과는 달리 인체 투여 용량이 상당히 많고 또한 기간이 길다. 따라서, 최종 정제된 단백질에는 우선 endotoxin 용량이 현저히 낮아야 하고, pyrogen이 없어야 하며, 숙주세포에서 유래하는 핵산 및 단백질들이 검출될 수 없는 한계까지 제거되어야 한다. 그 외에도 단백질의 순도가 높아야 한다. 성장 호르몬의 일차 치료대상이 건강한 어린아이들이라는 점에서 우리는 자체 Q.C에서 최종 정제된 성장호르몬의 순도를 99% 이상으로 설정하였다. 재조합 효모를 이용한 장점중의 하나는 대장균과는 달리 endotoxin 이 아주 낮다는 점이다. 따라서, 최종 정제되는 성장 호르몬에서 endotoxin 함량은 거의 검출한계 미만이 되도록 노력하였다.

숙주세포에서 유래하는 물질들 특히 단백질 제거는 성장 호르몬의 제조에서 가장 중요한 과정이라고 할 수 있다. 재조합 성장 호르몬을 장기간 투여할때 일부의 사람들에서 항체 형성이 되는데 이는 필연적인 결과라고 할 수도 있다. 인체에서 생성되는 단백질을 효모나 박테리아에서 만든 후 사람에게 장기간 투여하면 체내에는 항체가 형성되는 경우가 있다. 박테리아에서 추출한 재조합 성장 호르몬의 경우 함유된 숙주 유래 단백질의 함량이 높으면 성장 호르몬에 대한 항체가 생성된다는 보고가 있다 (The Lancet, 29 March 1986). 따라서, 우리는 효모 유래 단백질의 제거에 가장 큰 중점을 두고 정제 작업을 수행하였다.

성장호르몬의 정제 방법확립은 상기의 모든 조건을 만족시켜야 하지만 또한 정제 공정이 너무 복잡해서도 안된다는 명제를 극복하여야만 하였다. 칼럼을 많이 사용하면 할수록 단백질의 순도는 높아지겠지만 산업적으로 경제성을 염두에 두고 공정개발을 하기 위해서는 항상 정제공정의 단순화라는 서로 상반되는 요구를 충족시켜야 하는 어려움이 있었다. 실제로 성장 호르몬 정제 공정 확립 및 Scale-Up 실험, 그에 수반되는 정제방법의 개선등의 작업을 거쳐 정제방법이 완성되기까지에는 거의 2년에 달하는 시간이 걸렸다.

3. 물리화학, 생물학적 특징

재조합 단백질의 정제에서 빼놓을 수 없는 것이 물리화학적, 생물학적 성질규명이 라고 할 수 있다. 정제된 단백질이 어떠한 구조를 가지고 있는지, 천연형의 단백질과

비교하여 다른점은 없는지, 생물학적 활성은 제대로 유지되고 있는지 검증하는 것은 정제 방법의 확립에 있어서 필수적인 확인 절차라고 할 수 있다.

물리화학적 성질 규명에서는 각종 HPLC 및 FPLC를 이용하여 용액내에서의 성질을 확인하였고, SDS-PAGE를 이용한 순도측정은 물론 S-S 결합의 확인등이 수행되었다. 구조의 규명에서는 amino acid composition과 amino acid sequencing을 이용하여 cDNA에서 유추되는 성장 호르몬의 아미노산 배열과 같은지 혹은 변형된 아미노산은 없는지 등이 확인되었으며, circular dichroism을 통한 이차구조의 확인, N.M.R을 이용한 용액내에서의 단백질의 균질성 및 구조등이 규명되었다. 또한, peptide mapping을 통하여 S-S 결합의 위치확인 등이 수행되었다.

생물학적 활성 측정을 위해서는 radio receptor binding assay를 이용하여 재조합 성장 호르몬의 비역가를 결정하였는데 이때 표준 물질로는 WHO의 부설기관에서 구입한 뇌하수체 유래 성장 호르몬의 표준품을 이용하였다. 최종 정제된 재조합 성장 호르몬의 비역가는 항상 천연형 성장 호르몬보다 높았다. In vivo assay로는 무게 증가법 (Weight gain assay)를 이용하였는데 쥐의 뇌하수체를 제거하여 성장을 중지시킨 후 재조합 성장 호르몬과 대조군으로 국제 표준품을 주사하여 쥐의 무게 증가를 기록하는 것이었다. 국내 민간 연구소로는 아주 드물게 (주) 럭키 중앙연구소내의 안전성 센터에서는 쥐의 뇌하수체를 제거하는 기술을 자체 연마하여 각종 실험에 사용할 수 있게 되었다. 또한, 생물학적 비활성 측정 assay를 매 실험마다 차질없이 수행할 수 있도록 연마하는데 상당한 노력을 기울였다. 이 사실들은 지원 업무가 의약의 성공적인 개발을 위해서 얼마나 중요한지를 단적으로 보여주는 실례이다.

이상의 실험들을 통하여 정제된 성장 호르몬의 성질규명이 이루어졌다. 이 실험들은 정제과정 확립중에 수시로 이용되었다. 예를 들면 refolding시에 비역가를 올리기 위해 방법을 달리한다든지, 성장 호르몬의 경우 정제 과정중에 흔히 발생하는 특정 아미노산의 de-amination을 줄이기 위한 방법의 고안등에 이용됨은 물론 현재는 각 정제 step의 validation용으로 이용되기도 한다.

4. Q.C

의약품 제조과정중 소비자와 가장 큰 함수관계를 지닌 부분이 바로 Q.C. (Quality Control) 일 것이다. 최종 정제된 성장 호르몬 원액의 시험은 물론 동결 건조형으로 제조된 완제품의 검증에 이르기까지 Q.C. 상의 수많은 항목중 어느 하나라도 부적격일때 그 제품은 출고되지 못한다.

원액의 경우 생물학적 역가측정, 단백질 정량, 효모 단백질 부정시험, 효모 DNA 부정시험, 무균시험, 발열성 물질시험, 순도시험, 분자량 시험, pH, 삼투압, endotoxin등을 매 batch마다 수행하였다.

재조합 단백질 제제의 Q.C. 항목의 기준을 설정하고 시험방법을 완성하여 매 batch마다 안정되게 실험을 할 수 있도록 하는 것도 쉬운일은아니었다. 우리 연구소에서 이미 인터페론 감마의 상업화를 통해 상당히 많은 기술 습득이 이루어 졌으나 인터페론과는 다른 시험방법이 필요로 하는 경우에는 자체 개발을 통하여 기술을 축적해 나갔다.

5. 제형연구 및 안정성 시험

성장 호르몬은 단백질 제제이므로 동결건조후 역가의 손실이 없고, 순도를 유지하는 제형을 선택하는 것이 중요하다. 사실 이 과정은 의약품개발에서 간과되기 쉬운 부분이지만 어떻게 보면 가장 중요한 단계라고 할 수 있다. 성장 호르몬의 경우 동결건조 후 주사용 증류수로 용해시킬때 용액이 완전 용해된 상태를 유지시킬 수 있도록 제제하는 기술을 터득하는 것도 쉽지는 않았다.

제형선택은 개발초기에 여러가지 첨가제를 가하여 LNS (Lineaar Nonisothermal Stability) test를 통한 screening과정을 거쳐 제형을 결정한 후, 가속시험 및 장기보존시험을 수행하여 제형 및 안정성을 결정한다. 장기 보존 시험의 경우 2년 이상 제품의 역가 측정을 통하여 안정성을 확인하였다.

6. 비임상시험

성장호르몬의 비임상 시험은 시험의 객관성이나 공신력을 유지하기 위하여 외부의 KGLP 적격 기관에 의뢰하여 수행하였다. 독성시험은 급성 독성시험, 아급성 독성시험과 같은 일반 독성 시험과 변이원성 시험, 항원성 시험, 국소자극시험, 생식독성 시험과 같은 특수 독성시험을 수행하였다. 급성독성의 경우 제조합 성장 호르몬을 mice와 rat에 10~40IU/kg 을 정맥주사, 근육주사 또는 경구투여시 유의성 있는 부작용이 관찰되지 않았으며, 아급성 시험에서 제조합 성장 호르몬을 매일 5, 10, 20 IU/kg을 13주동안 피하주사 하여도 유의성 있는 부작용이 관찰되지 않았다. 결론적으로 제조합 인간 성장 호르몬은 인체 투여용량의 몇 십배에 달하는 고용량을 실험 동물에 투여하여도 이상을 발견할 수 없었다. 독성 시험외에 수행한 비임상 시험으로는 효력시험, 일반약리시험, 약물동태시험이 있다. 이들중 일반약리와 약물동태는 외부기관에 의뢰하였으나 효력시험은 (주) 럭키 중앙연구소에서 자체 시험한 후 시험 자료를 공신력 있는 발표 매체에 게재함으로써 인정을 받았다. 비임상시험 기간중 가장 힘들었던 점은 시험용 sample 의 안정성 공급이었다. 단기간내에 엄청난 양의 성장호르몬이 소요되므로 시험에 차질이 없도록 제품을 공급하기란 쉽지 않았다.

7. 임상시험

제조합 성장 호르몬도 어느 신약개발과 마찬가지로 3단계의 임상시험을 거쳤다. 1989년 9월에 Phase I 임상시험에 착수하였고, 이때 인체 안전성 및 인체에서의 약물동태학 시험을 수행하였다. 이어서 1989년 10월부터 국내 의약품 임상시험 관리 기준 (KGCP)에 따라 3개 대학 종합병원에서 Phase II 및 Phase III 임상시험을 실시하였다.

임상시험에서 대상환자의 선정 기준의 연령은 4~14세 사이의 남, 여로서 신장이 같은 성(性), 같은 연령 환아의 3% 이내이거나 연 성장 속도가 4cm이하로 저하되어 있는 환아 : 골 연령이 2년이상 지연되어 있는 환아 : 갑상선 기능이 정상이면서 2가지의 성장 호르몬은 자극 검사시 성장 호르몬 농도가 10 μ g/ml 이하인 환아이었다.

일반적으로 치료전에는 년 평균 성장 속도가 2.9cm~3.1cm 이던 아이들이 (주) 럭키의 재조합 성장 호르몬 투여후 6개월 뒤에는 년 평균 성장 속도가 7.5cm~9.0cm 로 급성장하였고 12개월 뒤에는 7.6cm~7.8cm로 증가하였다. 투여 방법은 통상적으로 0.15IU/kg의 용량을 주 3회 피하 혹은 근육주사였다. 이상의 임상결과는 외국에서 이미 상업화된 재조합 성장호르몬의 임상예와 비교 하여도 별 차이가 없었다. 또한, 3년간의 임상시험에서도 투여기간중에 국소 및 전신부작용은 한예도 발견할 수 없을 정도로 안전함을 인정받았다. (주) 럭키의 재조합 인간성장호르몬을 일년 이상 투여할 경우 생성되는 항체는 천연형의 인간성장호르몬의 항체 생성율과 유사하게 낮았다. 또한, 이때 생성된 항체는 중화항체 (Neutralizing antibody)가 아니므로 성장에 거의 영향을 미치지 않았다. 이미 정제과정의 개발에 기술한 바와 같이 숙주유래 물질 특히 단백질의 완벽한 제거가 성장호르몬에 대한 항체 생성의 관건이므로 임상시험을 통하여 (주) 럭키 성장호르몬의 제조방법의 우수성이 입증되었다고 할 수 있다.

8. 허가과정

국립보건원에서 기준 및 시험방법에 대한 검토가 완료된 시점이 1991년 9월 이었다. 안전성·유효성 검토 역시 91년 9월에 중앙약심 심의를 통과하였다. 이어서 임상 조건부 허가를 받고 임상시험 보고서를 제출한 후 제품에 대한 품목허가를 보사부로부터 받은 것이 1992년 12월 이었다.

재조합 인간성장 호르몬이 외국에서 이미 상업화되었고 우리나라에도 몇개의 수입 제품들이 판매되고 있어서 이 제품의 약효성이라든가 안전성등이 이미 간접적으로 입증되었다고 볼 수 있다. 그러나, 우리가 만든 성장호르몬은 이와 유사한 품목으로는 국내 최초의 개발이었으며 모든 절차가 신약개발의 절차를 밟아서 행해졌기 때문에 허가과정에 우여곡절도 많았고 그에 대응하는데도 무척 힘이 들었다. 한편으로는 여지껏 전세계적으로 효모를 이용하여 유전자 재조합 성장호르몬을 개발한 전례가 없기 때문에 당연하다고 여길 수도 있었으나, 허가 과정이 우리가 예측한대로 진행되지 않고 사업화 시점이 지연될 때에는 이 project에 참여한 관련된 모든 사람들이 좌절할 때도 있었다. 각 단계마다 요구되는 보충설명, 보충시험, 보완자료등은 힘들고 긴 기간이었으며 당 연구소내의 허가를 담당한 연구진들의 불퇴진의 노력이 있었기에 현재 상업화 완료가 다되어서 시판되었다고 볼 수 있다.

III. 성공요인

재조합 인간성장 호르몬은 (주) 럭키 바이오텍연구소에서 신약개발의 과정을 거쳐서 제품화 된 유전공학 의약품으로는 재조합 인터페론 감마에 이어서 두번째이다. 유전공학제품 개발은 유전자 조작, 발효, 정제, assay, 제제등의 연구업무와 독성, 임상, 허가등을 순조로이 이끌어가는 기획업무가 빈틈없이 협조하는 가운데서 성공할 수 있다고 믿는다. 국내에서 신약개발 절차를 밟아 제품을 개발한다는 것은 실험 당사자들이나 허가를 심의하는 사람들이나 모두가 배워가면서 일을 수행하기 때문에 외국에서의 신약개발과는 또 다른 차원에서 힘들고 어려운 일이라고 할 수 있다. 내부적으로 눈을 돌리자면 우선 회사가 미래를 기대하며 오랜기간동안 끊임없이 지원해주었다는 것이 성공의 가장 큰 요인으로 부각될 것이다. 개발의 각 단계마다 필요한 연구인력을 고용하여 배치하고 그들로하여금 Know-how를 습득하게 하는 것이 절대적으로 필요하였다. 또한, 연구원들의 사명감과 책임의식이 매번 나타나는 장애물을 극복하고 성공적으로 제품개발을 완성시킬 수 있는 원동력이었음을 부인할 수 없을 것이다.

IV. 향후전략

재조합 성장호르몬의 상업화이후 제 2세대 성장호르몬의 개발, 성장호르몬의 약물 전달체제의 개량연구등 앞으로 성장호르몬과 관련되어 수행되어야 할 연구는 끊임없다. 현재 우리 연구소에서는 이 업무를 계속하고 있으며 어떤 분야에서는 거의 완성 단계에 와 있는것도 있다. (주) 럭키의 재조합 성장호르몬은 일차적으로 뇌하수체성 왜소증으로 그 적응증을 받았지만, 그 동안의 임상시험결과를 보면 성인에서 노화억제에도 뚜렷한 효과를 보여주고 있다. 국내의 종합병원에서 성인 및 노인층을 대상으로 그 동안 행한 임상시험 결과를 보면 성장호르몬을 투여할 경우 체지방이 감소하며, 근력 및 악력이 증가 하는 등 뚜렷한 운동능력이 증가함을 확인하였다. 따라서, 임상시험을 확대하여 성장호르몬의 적응증을 넓혀 가고자한다. 재조합 인간 성장 호르몬은 전세계적으로 93년도 약 \$ 10억을 예상할 만큼 거대한 시장을 가지고 있다. 국내에는 아직 시장형성이 성숙되어 있지않으나 필자의 견해로는 이제 성장기의 초기 단계라고 생각한다. 따라서 끊임없는 적응증 확대를 통하여 국내시장을 넓히는 것도 의약개발의 중요한 과제중의 하나라고 생각한다.

마지막으로, 국내에서 생산된 유전공학제품의 국제화를 모색하는 차원에서 해외수출에도 적극적으로 매진하고 있다. 국내시장의 한정된 영역을 벗어나 해외 수출을 시도하여 제품을 수출할 경우 국내 유전공학 산업의 위상을 올려 놓을 수 있는 좋은 계기라고 생각한다.