

Development of Recombinant Human Growth Hormone in Yeast: Efficacy Evaluation and Safety Assessment

Sangkyun Lee and Soon Jae Park

Biotech Research Institute, LG Chemical Ltd. Research Park

P.O. Box 61, Science Town, Taejon, 305-380, Korea

Human growth hormone is known as one of the peptide hormones which is consisted of 191 amino acids derived from the pituitary gland in humans. The objectives of this study were to supply inexpensive recombinant methionyl human growth hormones (rHGH) synthesized by the DNA technology in a yeast cell line and to reduce side effects. The developmental process of rHGH in Biotech Research Institute, LG Chemical Co. Ltd. was started first with the recombinant gene expression in a yeast cell line and followed by the establishment of protein purification techniques. The next steps of the research were to study its physico-chemical properties and biological properties, and to evaluate various preclinical aspects including pharmacokinetics study, general pharmacology study, general toxicity tests, and specific toxicity tests. Clinical phase I, II, III studies were also done against growth hormone deficient children to reveal that growth promoting effects were similar compared with the natural HGH extracted from pituitary glands and commercially available rHGHs. The results could be summarized that (1) this yeast derived rHGH have had excellent physico-chemical and biological properties in comparison with a natural HGH and other synthesized rHGHs, (2) we could not see any toxic side effects when very high doses were administered to the experimental animals, and (3) this growth hormone showed effectiveness in the growth stimulating to growth hormone deficient patients.

인간성장 호르몬은 191개의 아미노산으로 구성된 펩타이드 호르몬의 일종으로 사람의 뇌하수체에서 분비된다. 본연구의 목적은 저렴한 가격의 재조합 성장호르몬을 안정적으로 공급함은 물론 부작용을 최대한으로 줄이는데 있다. 효모에서의 성장호르몬 재조합 과정은 유전자조작과 이에따른 정제기술의 확립을 시작으로 물리 화학적 또는 생물학적 물성 연구, 다양한 전임상 시험 및 임상 시험의 단계를 수행한 후, 인허가 과정을 거쳐서 완료되었다. 다양한 실험 결과에 의하면 당소에서 재조합 기술로 생산한 고순도의 인간성장 호르몬은 안정된 물성을 보유하고 있을 뿐만아니라 전임상 시험 결과 인체 투여용량의 수십배의 고용량을 투여하여도 별다른 독성 증상을 관찰할 수 없었으며, 임상 시험에서도 대상 환자의 신장이 지속적으로 성장하는 등 만족할 만한 결과를 보여 주었다.

서 론

1985년 미국 Genentech사에 의해, 유전공학적인 방법에 의한 재조합 인간 성장 호르몬이 개발되어 회귀 의약품으로 FDA의 허가를 받게 되면서 사람의 뇌하수체에서

추출한 성장호르몬을 사용하는 시대는 막을 내리고 유전공학적인 재조합 제품으로 대체되었다. 사람의 뇌하수체에서 추출한 인간 성장 호르몬(human growth hormone)은 뇌하수체 전엽에서 분비되는 191개의 아미노산으로 구성된 펩타이드 호르몬의 일종으로 뇌하수체성 왜소증(hypopituitarism)의 치료에 쓰일 수 있다는 가능성이 1958년 Raben에 의해 제시되었으며, 그 이후 임상 시험과 실질적인 치료를 위한 인간 성장 호르몬의 수요는 폭발적으로 증가 하게 되었다. 많은 연구자들의 연구 결과에 의하면 뇌의 시상하부(hypothalamus)에서 생산된 성장 호르몬 방출 호르몬(growth hormone releasing hormone)이 뇌하수체를 자극하여 성장 호르몬을 방출하게 되면, 방출된 성장 호르몬은 체내를 순환하여 간, 신장 등에 머물며 이때 또 다른 호르몬인 IGF 1(insulin-like growth factor 1)을 분비하게 되는데, 이 IGF 1에 의해 뼈나 연골 등의 성장이 촉진되게 된다고 한다. 인간 성장 호르몬은 뼈나 연골 등의 성장 뿐만 아니라 체내의 조직에 직접적으로 작용하며, 세포 대사에 관여 하기도 한다.

이렇듯 왜소증 치료에 적용할 수 있는 천연 성장 호르몬은 인간의 사체에서 추출해야 하기 때문에 생산량과 그 가격에 있어서 매우 제한적이며, 특히 이런 천연 성장 호르몬이 투여된 환자들에서 Creutzfeldt Jacob disease라는 신경계 질환이 자주 보고됨에 따라 천연 성장 호르몬의 사용은 더욱 제한 될 수 밖에 없었다. 왜소증 환자는 대개 4,000 - 5,000 명당 한명 꼴로 발생한다는 통계가 있고 보면 국내에도 수많은 왜소증 환자가 있을 것으로 추정해 볼 수 있는데, 지금 까지 공급 되어 왔던 재조합 성장 호르몬은 안정적인 공급을 가능하게 하였으나 여전히 비싼 가격에 의해 일반 소비자 들이 쉽게 접근 할 수 없는 문제점이 있었다. 이에 보다 저렴한 가격대의 인간 성장 호르몬을 공급하고, 세포 자체에 endotoxin의 함유량이 거의 없는 효모를 숙주세포로 사용하는 연구를 진행하여 부작용이 없는 인간 성장 호르몬을 만들고자 본 연구를 시작하게 되었다.

실험재료 및 방법

유전자 조작 일반적으로 인간 성장 호르몬을 유전자 재조합 기술을 이용하여 만들고자 할 때 가장 많이 사용 하는 발현계는 대장균으로써 *E. coli*를 주로 사용하여 왔으며, 효모를 이용할 경우는 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용하기도 한다. 효모는 *E. coli*에 비해서 세포내에 endotoxin이 거의 없기에 성장 호르몬의 재조합 연구에 발현계로는 적절하다고 할 수 있다. 따라서 당 연구소에서는 인간의 뇌하수체 조직에서 mRNA를 추출하는 작업을 시작으로 cDNA를 만들어 vector와 함께 효모에 넣어져 성장 호르몬을 발현하게 하는 순으로 진행하였으며, 이와 병행하여 효모에서의 발현율을 높이는 연구를 수행 하였다.

일단 유전자 조작을 완성 하게되면 모든 중요한 과정 중에서 특히 성장 호르몬의 정제 기술을 확립 해야한다. 성장 호르몬은 다른 재조합 유전공학 제품에 비해서 인체에 투여 용량이 많고 투여 기간 또한 상대적으로 길기 때문에 최종 정제된 단백질에는 pyrogen이 없어야 함은 물론 endotoxin의 양도 현저히 낮아야 한다. 또한 정제된 단백질의 순도도 높아야 함으로 본 연구에서는 Q.C.를 통해 최종 정제된 인간 성장 호르몬의 순도를 99% 이상으로 설정하고 효모에서 유래하는 핵산과 유사 단백질 등을 검출 한계 미만이 되도록 하였다.

물성 연구 정제된 재조합 성장 호르몬은 어떠한 단백질 구조를 가지고 있는지, 천연형과 비교해서 다른 점은 없는지 등의 물리 화학적 성질과, 생물학적 활성은 제대로 유지되고 있는지를 검증 받아야 한다. 물리 화학적 성질을 규명 하기 위해서는 각종 HPLC 와 FTLC를 순도 측정은 SDS PAGE를 이용 하였으며, 구조의 규명에서는 amino acid

composition과 amino acid sequencing을 이용하여 cDNA에서 유추되는 성장 호르몬의 아미노산 배열과 같은지 또는 변형된 것은 없는지를 확인 하였다. 또한 circular dichroism을 통한 이차 구조의 확인, 용액 내에서의 단백질의 균질성과 구조 규명을 위한 NMR의 이용, 그리고 peptide mapping을 통한 S-S 결합의 위치 확인 등을 수행 하였다. 생물학적 활성은 radio receptor binding assay를 이용하여 성장 호르몬의 비역가를 결정 함으로 측정하였다. *In vivo* assay로는 뇌하수체를 제거하여 성장을 중지시킨 쥐를 이용하여 LG 화학 기술 연구원 바이오텍 연구소에서 생산한 재조합 성장 호르몬과 국제 표준품을 투여하고 주기적으로 쥐의 성장에 따른 무게의 증가를 기록하는 weight gain assay를 이용하였다.

전임상 시험 인간 성장 호르몬의 전임상 독성시험은 시험 성적의 객관성과 신뢰성의 확보를 위해서 KGLP 적격 기관인 한국 화학 연구소 안전성 연구센터와 서울대학교 수의과대학 수의과학 연구소에 의뢰하여 수행하였다. 수행된 독성시험 항목으로는 급성 경구, 경피, 근육 독성 시험, 아급성과 만성 독성 시험 등의 일반 독성 시험, 생식 독성 시험, 변이원성 시험, 항원성 시험 및 국소 독성 시험 등의 특수 독성 시험 등이 있다.

독성 시험외에 수행된 비임상 시험으로는 효력 시험, 다양한 일반 약리 시험, 약물 동태 시험 및 재조합 인간 성장 호르몬의 장기 보관과 장기간 사용시의 안정성 연구와 제형연구를 들 수 있으며 일부는 자체 시험후 결과를 인정 받았고, 그외의 시험은 서울대학교 생약 연구소, 동 대학 약학대학 부설 종합 약학 연구소 등의 공신력 있는 시험 기관에 의뢰하여 수행함으로써 시험 결과의 공정성과 신뢰성을 확보 하였다.

임상 시험 모든 신약 개발에서와 같이 재조합 성장 호르몬의 경우에도 세 단계의 임상 시험을 거쳐야 만 신약으로 등록, 판매가 허용 되는 만큼 당 소에서는 1989년 9월에 임상 시험 Phase I에 착수하여 인체에 대한 안전성 및 인체 내에서의 약물 동태학적 시험을 실시 하였으며, 이어서 국내 의약품 임상 시험 관리 기준(KGCP)에 의거하여 국내 3개 대학 종합병원을 선정하여 임상 시험 Phase II와 III를 진행하였다.

모든 임상 시험에서 환아는 연령 4 - 14 세의 남, 녀를 대상으로 몇가지 선정 기준 내에서 선별하였다. 이의 선정 기준을 보면, (a) 신장이 같은 성별, 비슷한 연령 그룹 내에서 3% 이내이거나 년 성장 속도 4 cm 이하로 저하 되어 있는 경우, (b) 골 연령이 2년 이상 지연되어 있는 경우, 그리고 (c) 갑상선 기능이 정상이면서도 2가지 성장 호르몬 자극 검사시 성장 호르몬 농도가 10 ng/ml 이하인 경우이다.

결과 및 고찰

유전자 조작 및 물성 연구 유전자 재조합적인 방법으로 인간 성장 호르몬을 만들고자 할 때 제일 먼저 결정하여야 하는 일은 발현계(expression system)를 선택해야 하는 것으로, 당소에서는 부작용이 거의 없어 안전하며 취급이 용이한 효모를 이용 하기로 하고 수년동안 효모에서 선택적으로 사용되는 유전자 code로의 치환 등 여러 가지 연구를 거듭한 결과 경제성이 있을 정도로 발현율을 높인 체계를 완성하게 되었고 이어서 정제 방법의 개발에 착수하였다. 유전자 재조합 기술에 의해 만들어진 단백질 들은 아무리 발현율을 높여도 정제 과정이 길고 복잡해 지거나 수율이 저하된다면 그의 가치는 더욱 떨어지게 된다. 따라서 최종 정제된 단백질에서는 endotoxin의 함량을 극히 낮추고 pyrogen도 없으며 숙주세포에서 유래 될 수 있는 핵산 및 단백질 들도 검출 한계 미만으로 제거되고 동시에 단백질의 순도도 높은 정제 방법을 개발 하였으며, 정제 공정의 단순화와 최적화를 통해

정제성을 확보 하였다.

물리 화학적 물성 규명을 위한 여러 가지 시험 결과, 정제된 인간 성장 호르몬은 단일 성분의 높은 순도를 갖고 있음이 확인 되었고 분자량은 약 22,000 달톤 이었으며 전기영동 상에서 성장 호르몬의 이중체나 다중체가 발견되지 않으면서 이동 거리에 차이가 나므로 인간 성장 호르몬에 존재하는 4개의 시스테인기가 2개의 다이설파이드 결합을 하고 있음을 확인 할 수 있었다. 이차 구조의 스펙트럼과 아미노산의 조성도도 외국 문헌에 발표된 것과 일치 하며 이는 재조합 인간 성장 호르몬이 상당히 정돈된 구조를 가지고 있음을 보여 주는 것이다. 정제된 성장 호르몬의 생물학적 활성도를 직접 측정하기 위해 뇌하수체가 제거된 쥐들에게 매일 주사한후 2주간 관찰한 결과 국제 표준 인간 성장 호르몬을 투여한 군에서는 4.4배, 당소에서 생산한 물질을 투여한 군에서는 4.3배의 체중 증가를 보이는 것으로 보아 당소의 인간 성장 호르몬은 국제 표준품에 비해 단백질결여가 면에서 차이가 없었다. 안정성 면에서는 건조시킨 주사용성장 호르몬의 사용 가능 기간은 냉장 보관시 24개월 이상이며, 가혹 조건 시험에서도 전시험 기간 동안 성장, pH, 역가의 변화가 크지 않았고 순도도 규격 이상으로 유지되었으며 분해 산물의 생성은 무시해도 좋을 정도였다.

진위상 시험 일반 약리에 대한 실험 결과로써 당소의 인간 성장 호르몬은 중추 신경계에 대한 작용, 정상 체온 하강 작용, 진통 작용, 진경 작용 및 호흡과 혈압에 대한 어떠한 영향도 보여주지 않았다. 각종 평활근 수용체 (adrenaline, acetylcholine, histamine, serotonin, kinin 및 oxytocin 수용체)에 대한 직접적인 작용이 없었으며, acetylcholine, serotonin 및 oxytocin에 의한 평활근 수축에 대한 길항 작용도 없었다. 정상 랫트에서 내당능 저하효과의 경향이 있었으며, 비교적 높은 용량에서 혈당 강하 작용이 입증되었는데 이와 같은 현상은 insulin양에 따른 긍정적인 작용의 하나로 생각된다. 또한 초기 단계에서 epinephrine 유발 지방분해의 억제 작용이 있음이 확인 되었다.

한국 화학 연구소 안전성 연구 센터에서 수행한 독성 시험에서 급성독성의 경우 재조합 성장호르몬을 마우스와 랫트에 대해 10 - 160 IU/kg을 각각 1회 경구, 피하, 근육 투여 한후 1 - 2주간 일반 증상, 체중 변화 및 부검 소견을 관찰한 결과 마우스와 랫트 공히 급성독성 시험에서 시험물질의 투여로 기인한 사망을, 일반 증상, 체중 및 부검 소견의 변화는 관찰되지 않았으며, LD₅₀치는 급성경구의 경우 임상 예정 용량 (0.15 IU/kg)의 약 1,000배인 160 IU/kg, 급성경피의 경우 약 500배인 80 IU/kg, 급성근육독성 시험의 경우 약 260배인 40 IU/kg을 넘을 것으로 사료되었다. 아급성독성 시험에 있어서는 마우스의 경우 재조합 성장호르몬을 매일 1, 3, 10 IU/kg을 13주 동안 피하로 투여한 결과 약효 약리 작용을 제외한 독성증상으로 고용량군의 암컷 동물에서 2건의 사망 예가 발생하였으며 투여 2 - 3주경 암컷에서 활동력 감소, 혈떡거림과 혼수상태등의 경미한 중독성 증상이 관찰되었으나, 수컷 동물의 경우 이 용량은 내성용량에 해당된다고 판단되었다. 90일 아급성독성 시험에서의 최대 내성용량은 암컷에 있어서는 3 - 10 IU/kg/day 사이의 용량이며, 중간 용량군인 3 IU/kg/day 군은 암, 수 동물 모두 시험물질에 의한 영향이 없으므로 무해 용량으로 판단되었다. 랫트에대한 아급성 시험에서 시험물질의 투여에 의한 변화로 여겨지는 체중 증가, 절대 및 상대 장기 중량의 증가와 혈액학적 변화의 관찰 결과는 독성에 의한 것으로 보기보다는 약리 작용에 의한 현상으로 여겨진다. 재조합 성장 호르몬의 암, 수 랫트에 대한 아급성피하독성 시험에서의 최대 내성 용량은 10 IU/kg/day 이상, 무해 용량은 3 IU/kg/day 이상일 것으로 추정되었다. 만성독성 시험의 경우에 대해서는 아급성독성 시험 결과 안전성이 입증되었을 뿐만 아니라 미국과 일본에서도 유전자 재조합 의약품의 경우 급성 및 아급성독성 시험 만을 요구하고 있으므로 당사의 재조합 인간 성장 호르몬에대한 만성독성 시험은 생략되었다. 특수독성 시험에 관해서는

생식독성 시험, 변이원성 시험, 항원성 시험과 국소독성 시험이 행하여 졌다. 생식독성 시험은 랫트에 대한 피하투여 수태능력 시험과 최기형 시험, 토끼에 대한 피하투여 최기형 시험, 랫트에 대한 주산기 및 수유기 피하투여 시험 등으로 세분 되어지며 랫트에 대한 수태능력 시험과 최기형 시험 결과 성장 호르몬 투여군과 음성 대조군 사이에는 교미율, 수태율 및 임신 말기의 부검시 황체수, 임신의 성립, 태자의 이상 등의 변화가 관찰되지 않았고 태자의 장기검사와 골격검사에서도 유의성있는 변화가 없었으며, 어미 동물에도 이상을 보이지 않았다. 따라서 성장 호르몬은 임신과 수태에 어떠한 영향도 주지 않을 뿐만아니라 생식의 전반적인 과정과 태자에 대한 독성이나 기형유발에 영향을 끼치지 않는 것으로 사료되었다. 토끼에 대한 최기형 시험 결과에서도 마찬가지로 모든 투여군에서 모체에 어떠한 영향이나 변화도 나타나지 않았으며, 임신기간, 태자 및 태반의 무게, 성비, 흡수된 태아, 사망태아 등의 검사항목에서도 유의성있는 변화가 없었다. 내장검사에서도 모든군에서 아무런 이상을 볼 수 없었으며, 골격형성에서도 이상이 없었다. 또한 성장 호르몬은 모든 처리군에서 주산기 및 수유기 동안 태자에 어떠한 영향도 미치지 않는 것으로 생각되며 분만 및 포육에도 영향을 미치지 않았다. 변이원성 시험은 살모넬라균을 이용한 복귀 돌연변이 시험, CHO-KI-BH4 세포를 이용한 염색체 이상시험과 마우스를 이용한 소핵시험으로 세분 되어졌다. 먼저 성장 호르몬의 변이원성을 검색하기 위해서 히스티딘 영양요구성인 살모넬라균주를 이용한 복귀 돌연변이를 시험한 결과 대사 활성계 적용여부에 상관없이 처리농도 전 범위에 걸쳐 복귀된 집락수의 유의적인 증가가 없었다. 따라서 성장 호르몬은 복귀 돌연변이를 유발하지 않는 것으로 사료된다. Chinese hamster의 ovary cell인 CHO-KI-BH4를 이용한 염색체 이상 (chromosome aberration) 유발 유무에 대해서는 염색체 이상의 출현빈도나 이상핵판 (aberrant metaphase)의 백분율이 음성 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 보이지 않았다. 마우스에 대한 소핵시험 결과 PCE / PCE + NCE의 비율에서 투여군과 대조군 간에 차이가 없는 것으로 보아 시험물질은 골수세포에 대해 독성이 없는 것으로 사료되며 소핵의 출현빈도도 유의성있는 증가를 볼 수 없었다. 성장 호르몬으로 감각시킨 마우스의 항혈청을 정상 랫트의 배부피내에 감각시켜 약물 특이적 세포친화성 항체 (IgE)을 조사하거나 아나필락시 쇼크반응 등을 보기위하여 실시한 항원성 시험 결과, 마우스-랫트체를 이용한 PCA (Passive cutaneous anaphylaxis) 반응 시험에 대해 임상 적용량인 0.15 IU/kg으로 감각하였을 때 최종 항체가가 10배 미만으로 ovalbumin의 640배와 비교해서 항원성을 나타내지 않았으며, 기니피그를 이용한 아나필락시 쇼크반응에 있어서도 항원성이 나타나지 않았다. 마지막으로 실시한 국소독성 시험 중 토끼에 있어서의 피부자극 시험 결과 New Zealand White계 토끼에 대한 성장 호르몬의 피부자극성은 없는 것으로 판단되었다.

임상시험 유전자 재조합 기술로 만들어진 인간성장 호르몬도 여타 신약과 마찬가지로 세단계의 임상시험을 몇 개의 대학 종합병원을 선정하여 실시하게 되었으며 이에 따른 투여 경로는 통상적인 것으로 0.15 IU/kg을 주 3회 피하 또는 근육주사 하는 것으로 결정하였다. 그에 따른 결과로는 일반적으로 투약 전까지는 신장의 년평균 성장 속도가 2.9 - 3.1 cm이던 환아 들이 재조합 성장 호르몬 투여 개시 6개월 부터는 년 평균 성장 속도가 7.5 - 9.0 cm로 급 신장하게 되었으며 12개월 후에는 7.5 - 7.9 cm로 안정적인 증가를 볼 수 있었다. 이러한 결과는 이미 상업화되어 시판되어지고 있는 외국회사의 임상 예와 큰 차이가 없었으며, 안전성 면에서도 3년간 진행한 임상시험에서 투여기간 중 국소 및 전신 부작용의 어떠한 예도 발견할 수 없었으므로 이의 안전성이 입증되었다. 또한 장기간의 투여에 따른 항체 생성율도 인체내에 존재하는 성장 호르몬의 자연항체와 비교해서 상당히 낮은 수준을 보였고, 이때 생성된 항체라 하더라도 이러한 항체는 중화항체 (neutralizing antibody)가 아니므로 재조합 성장 호르몬의 작용에는 거의 영향이 없는 것으로 사료된다..