

특집 : 재조합 단백질 생산을 위한 생물공정기술(V)

재조합 단백질 공정 모사를 통한 경제성 분석

정일형 · 이지원* · 박영훈* · 김성구

부경대학교 식품생명공학부 생물공학과, *생명공학연구소

서론

인체 Interleukin-2(IL-2)[1]는 미국의 Chiron사에 의해 1992년 신장암 치료제(ProleukinTM)로 상업화되었고, 악성 피부암 치료제로서 뿐만 아니라 HIV감염증 치료제로서 그 상업성이 상당히 증대될 전망이다. 최근 국내에서는 재조합 단백질 형태인 IL-2의 생산을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다[2].

이러한 재조합 단백질(IL-2)생산에 있어서 후발기업이 기술적으로 해결해야 하는 문제가 경제성이 있는 생산 공정의 개발이다. 그러므로 본 연구는 IL-2를 모델 단백질로 하여 실험실 규모의 발효 및 정제 공정의 unit operation별 운전 변수들의 데이터를 바탕으로 하여 공정 규모를 scale-up 하고자 한다[3]. 또한 이러한 scale-up의 전 단계로 공정을 모사하고, 최종적으로 생산공정의 경제성 및 제품화와 시장성의 가능성을 타진하고자 한다. 이러한 연구는 공정 설계, 특히 자본 및 생산 단가의 절감과 생산물의 품질의 향상을 꾀할 수 있다[4]. 아울러 공정 개발에 걸리는 시간을 절약할 수 있으므로, 연구개발에 많은 시간을 투자할 수 있다

재료 및 방법

경제성 분석 단계

5L 발효기에서 실험되어진 재조합 단백질(IL-2) 생산 데이터를 기초로 하여 simulation software를 이용하여 생산 공정 시뮬레이션 및 경제성 분석을 하였다. 이러한 경제성 분석 결과를 이용함으로써 실제 생산 공정에 투입되는 자본의 예상 및 조정이 가능하다.

공정 모사를 위한 IL-2 판매가격을 알기 위해 미국의 Chiron사의 Proleukin을 model로 삼았다. 현재(1999년), Chiron사는 Proleukin(patent No. 5,962,318에 의한 독점가격)을 1 dose(1.3mg IL-2) 당 535달러에 판매를 하고 있다. Chiron사에서 1년간 생산하고 있는 Proleukin의 양은 4.5million unit dose이며 1년 판매량은 5.85kg/yr이다. 그러나, 특허가 만료되는 시점부터는 현재 판매가격은 유효성이 없으므로 본 연구에서는 IL-2의 판매가격을 20달러로 대폭 낮추어서 공정모사를 실행했다. 또한, IL-2 시장 점유율은 20달러

Table 1. IL-2 Step yield from 5L fermenter

Purification step	Component	Step yield (%)	Overall yield (%)
Insoluble aggregates	G3 · IL-2	100	100
Solubilization	G3 · IL-2	100	100
Enterokinase cleavage	hIL-2	30	30
Ion-exchange chromatography	hIL-2	94	28
Gel filtration	hIL-2	99	28

의 판매가격을 기준으로 하여 Chiron사에서 판매하고 있는 5.85 kg/yr의 15%인 0.88kg/yr로 설정 하였다. 시뮬레이션의 결과로 생산되어지는 IL-2의 순도와 제품 실패율은 각각 99%와 전체생산량의 10%로 설정하였다. 그리고, 경제성 분석을 위한 시뮬레이션 프로그램으로 Intelligen 사(Newark, USA)의 Super pro-designer 4.0을 사용하였다.

공정 설계로는 세포 증식 발효조 및 IL-2 생산발효조의 2단계 fed-batch 발효조를 채택하였고, 각각 편의상 배양 개시 시간 및 종균 배양의 발효조는 생략하였다. 그리고, 분리·정제 과정에서 용이하게 IL-2를 얻기위해 3개의 glucagon을 binding시킨 G3 · IL-2 form으로 만들어서 primary recovery 공정에서 pH shift(pH8--pH12-pH8)에 의해 inclusion body를 용해시켜서 glucagon과 친화성을 가진 resin을 이용하여 G3 · IL-2만을 분리하게 된다.

G3 · IL-2의 form에서 glucagon을 분리하기 위해 enterokinase를 처리하여 정제를 하며, 효소 처리 이후 step yield는 30%로서 ion-exchange chromatography와 gel filtration을 이용한 최종 정제 과정을 거치게 되면 step yield는 94%이며, 전체 yield는 28%이다(Table 1). 각 공정은 3개의 큰 공정으로 분리할 수 있는 데 Fig.1에서 나타낸 바와 같이 배지의 혼합 및 살균, IL-2 생산까지의 up-stream 공정, 세포를 분쇄하여 inclusion body를 구하는 제 1차 회수 공정과 회수된 G3 · IL-2(1,2)를 active한 IL-2 form으로 만들고 순도를 99%까지 높이는 최종 분리 정제 공정으로 나눌 수 있다.

Flow diagram

Super-pro designer의 단위 조작을 선택하여 연결 시켜줌으

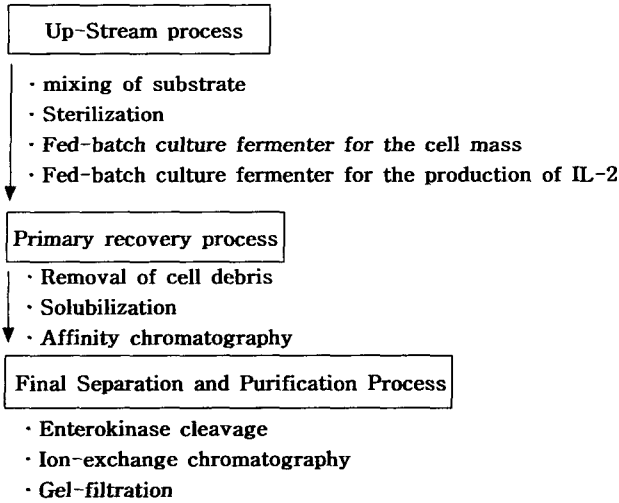


Fig. 1. Process block diagram for the production of IL-2.

로서 전체 공정을 완성하였다. Fig. 2에서 나타난 공정 흐름도는 일반적인 유전자 재조합에 의한 단백질 생산공정에 기초하여 작성하였다. IL-2 생산공정은 24시간 가동하는 3교대 작업으로 연속 발효공정으로 설계를 하였고, IL-2 분리 회수공정은 임시 저장조(V-107)를 경계로 하여 하루 8시간 작업하는 공정으로 설계를 하였다. 각각의 단위 조작의 크기를 결정하기 위해 IL-2 생산량과 회수율에 기초를 두고 간단한 계산을 행하여 그 공정의 크기 및 가격을 결정하였다

배지 혼합 탱크(V-101)

포도당(20g/l), mineral 및 thiamine을 첨가 한 뒤, 혼합을 하여 274 l/hr의 유속으로 배지 혼합물을 공급하도록 설계를 하였다. 그러므로, 2시간 체류시간을 가지도록 가정하면 배지 혼합 탱크의 크기는 700 l 이었으며 전력 소비는 0.5Kw/m²이었다.

세포증식 발효조(V-102)

균체 증식 발효조의 경우, 배지 혼합 탱크에서 유입되는 유량을 고려하면 발효조의 크기는 1000 l 이었으며, $\mu=0.06$ 으로 잡고, G3 · IL-2를 발현시키기 위한 유도체를 넣기 전 최종 균체 농도는 73.008(g/l)로 계산을 하였다[1].

생산물 발효조(V-103)

생산물 발효조의 경우는 탱크의 크기는 2000 l 로서 세포증식 발효조에서 유입되는 배양액에 lactose를 첨가하여 G3 · IL-2를 발현시키는 배양 탱크로서 발현되는 G3 · IL-2의 농도는 11.25(g/l)로 계산을 하였다[1].

정치조(V-105)

생산물 발효조에서 유입되는 발효액을 모아 놓는 탱크로서 생물산업

24시간 작업한 양의 발효액을 모아서 분리 · 회수공정에서는 8시간 작업으로 IL-2를 분리하도록 하는 공정이다.

디스크텍 원심분리기(DS-101)

세포 균체를 얻기 위해 발효액을 연속원심분리기로 제거한다.

고압 균질기(HG-101)

세포를 파쇄하여 세포속의 inclusion body를 얻기 위해 세포 파쇄를 고압균질기로서 800압력의 기압차로서 세포를 파쇄한다.

디스크텍 원심분리기(DS-102)

파쇄된 세포에서 나온 inclusion body을 회수하기 위한 공정으로서 원심분리를 하고 난후, 다시 과량의 물을 첨가하여 세척한다.

용해조(V-107)

원심분리를 하여 회수된 inclusion body를 용해 시키기 위한 공정으로서 pH-shift에 의해 inclusion body를 용해 시킨다. 우선 alkaline solution(0.05%(w/v)NaOH)을 첨가하여 pH를 12로 올린 다음, 다시 Tris-buffer(0.5M)를 첨가하여 pH 8로 낮춘다[1].

PBA chromatography(C-101)

이 공정에서는 pH-shift에 의해 용해된 inclusion body에서 G3 · IL-2를 회수하기 위한 공정으로서 eluent용액으로서 acetonitrile(10-60%)용액을 사용하였다[1].

효소 처리조(V-108)

회수된 G3 · IL-2에서 active한 IL-2의 형태를 얻기 위해 우선 urea(2M)을 첨가하여 G3 · IL-2를 용해 시킨 다음, 1 μ g G3 · IL-2당 0.1U EK(enterokinase)을 반응시키면, glucagon은 떨어져 나가게 된다[1].

Ion exchange chromatography(C-103)

효소 처리 이후, IL-2의 형태이외의 아직 떨어져 나가지 못한 G3 · IL-2와 떨어져 나간 glucagon을 분리하기 위해 ion exchange chromatography를 통과 시킨다..

Gel filtration(C-102)

최종적으로 99%의 IL-2를 얻을 수 있다[1].

Diafiltration(DF-101) and freeze drying(FDR-101)

최종적으로 회수된 IL-2에서 수분을 최대한 제거하는 공정으로서 freeze drying 공정에서 약 98%의 수분을 제거할 수 있다.

연구 결과 및 고찰

Super pro-designer 프로그램을 이용한 경제성 분석 결과, 자본금 투자, 운전비용 그리고 예상되는 이익에 대한 분석을 할 수 있었다.

자본금 투자(capital investment)

10% 정도의 여유를 감안한 결과, 약 3천 9백만불(한화 429억 원)의 자본이 들어가는 것으로 분석이 되었다.(Table 2).

운전비용(Operating cost)

년간 운전 비용을 보면 감가상각을 고려한 경우 9백만불(한화 90억원)이 투입되는 것으로 분석을 할 수 있었다.(Table 3). 운송비용과 그 외 제품 폐기물에 대한 처리비용과 같은 기타 세반사항을 고려하지 않은 경우, 연간 운전비용의 사용 비율을 보면 Fig. 3에 나타난 바와 같이 시설 의존비(equipment-dependent cost)의 경우가 77.49%로서 가장 많이 차지하고 있으며, 그 다음으로 재료비(raw materials cost)가 9.66%임을 알 수 있다.

이익 분석

IL-2 1.3mg당 \$20로 판매하여 시장 점유율 15% 를 달성하 게 될때 6천 2백만불의 순이익을 얻을 수 있으며, 자본 회수율이 1년에 40.63%라고 할 수 있고 은행 부채 상환기간은 2.46년임을 알 수 있었다.(Table 4).

Table 2. Fixed capital estimate summary (2000 prices)

TOTAL PLANT DIRECT COST(TPDC)(physical cost)	
1. Equipment Purchase Cost	\$6,306,000
2. Installation	2,034,000
3. Process Piping	2,207,000
4. Instrumentation	2,522,000
5. Insulation	189,000
6. Electricals	631,000
7. buildings	2,838,000
8. Yard Improvement	946,000
9. Auxiliary Facilities	2,522,000
TPDC = 20,195,000	
TOTAL PLANT INDIRECT COST(TPIC)	
10. Engineering	5,049,000
11. Construction	7,068,000
TPIC = 12,117,000	
TOTAL PLANT COST(TPDC+TPIC) TPC = 32,312,000	
12. Contractor's fee	1,616,000
13. Contingency	3,231,000
(12+13) = 4,847,000	
DIRECT FIXED CAPITAL(DFC) TPC+12+13 = 37,159,000	

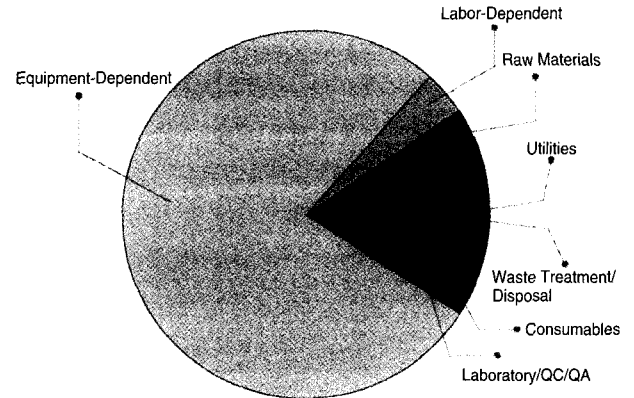


Fig. 3. Breakdown of an annual operating cost.

Table 3. Annual operating cost(2000 prices) calculated from super pro designer

Cost Item	\$/Year	%
Raw Materials	874,000	9.66
Labor-Dependent	342,000	3.78
Equipment-Dependent	7,007,000	77.49
Laboratory/QC/QA	51,000	0.57
Consumables	635,000	7.03
Waste Treatment/Disposal	127,000	1.4
Utilities	7,000	0.07
Transportation	0	0
Miscellaneous	0	0
Advertising and Selling	0	0
Running Royalties	0	0
Failed Product Disposal	0	0
TOTAL	9,043,000	100

Table 4. Profitability analysis(2000 prices)

A. DIRECT FIXED CAPITAL	37,159,000
B. WORKING CAPITAL	124,000
C. STARTUP COST	1,858,000
D. UP-FRONT R&D	0
E. UP-FRONT ROYALTIES	0
F. TOTAL INVESTMENT(A+B+C+D+E)	39,141,000
G. INVESTMENT CHARGED TO THIS PROJECT	39,141,000
H. REVENUE STREAM FLOWRATES	
kg/year of IL-2(in product)	1.227
I. PRODUCTION(UNIT) COST	
\$/kg of IL-2(in product)	7,369,667
J. SELLING/PROCESSING PRICE	
\$/kg of IL-2(in product)	26,863,739
K. REVENUES(\$/year) product	29,668,000
L. ANNUAL OPERATING COST	9,043,000
M. GROSS PROFIT(K-L)	20624000
N. TAXES(40 %)	8,250,000
O. NET PROFIT(M-N + Depreciation)	15,905,000
GROSS MARGIN	69.52%
RETURN ON INVESTMENT	40.63%
PAYBACK TIME(years)	2.46

경제성 변수 분석

앞선 경제성 분석의 결과는 특허 만료기간 이후의 sales cost에 대한 IL-2가격(20\$/dose)을 고려하여 분석을 하였다. 그러나, 실제로 생산되는 IL-2량에 대한 시장 점유율과, 특허가 끝나는 시점으로 IL-2의 가격에는 여러 가지 실제적인 변화 요인이 많을 수 있으므로 어느 변수에 가장 많은 영향을 받는 지 여부를 경제성 변수 민감도(sensitivity analysis)를 조사 하였다.

시장 점유율 목표 달성

시장 점유율의 목표는 현재 미국에서 IL-2를 판매하고 있는 Chiron사의 판매시장규모에서 15%를 점유한다라는 목표를 세웠다. 이 목표는 Chiron 사의 연간 판매량인 5.85kg의 15%인 0.88kg을 판매함을 의미한다. 그러나, 여러 가지 변수 특히 IL-2의 순도, 특허기간 만료로 인한 기업간의 판매 경쟁 등의 방해요소에 의해서 이 목표 달성이 쉽지 않으리라 예상이 된다. 이러한 요소들의 영향력을 고려하여 목표 달성 혹은 어느 정도의 조건을 갖추어야 목표달성에 접근할 수 있는지를 알아보았다. Fig. 4에서 Chiron사의 특허가 만료되는 2005년 이후 1 dose당 \$20로 판매가격을 낮추었을 때 15%의 목표가 달성됨을 알 수가 있었다.

IL-2 판매가

IL-2의 판매가격은 현재(1999년) 1 dose 당 535\$로 팔리고 있는 실정이다. 하지만 특허 기간이 만료되는 시점을 기준으로 이러한 가격은 형평성이 없기 때문에 만료가 되는 시점을 기준으로 여러 기업체에서 IL-2를 생산, 판매하는 경쟁 시기를 고려하여 가격을 예상 해본 결과, \$20로 책정을 하였다. 그러나 IL-2 정제 공정에서의 순도, 특허 만료후 기업간의 광고 효과등을 고려한다면 IL-2판매 가격에 편차가 있을 수 있다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 IL-2 1.3mg당 \$3이하로 판매가격이 떨어지게 되면 적자가 나게됨을 알 수 있다.

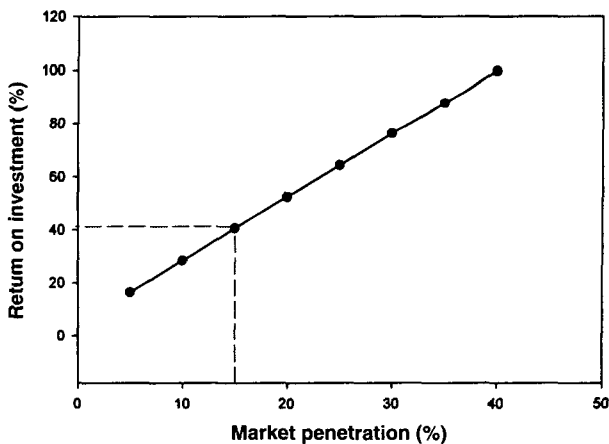


Fig. 4. Sensitivity analysis on the market penetration (\$20/dose, 1.3mg IL-2/dose).

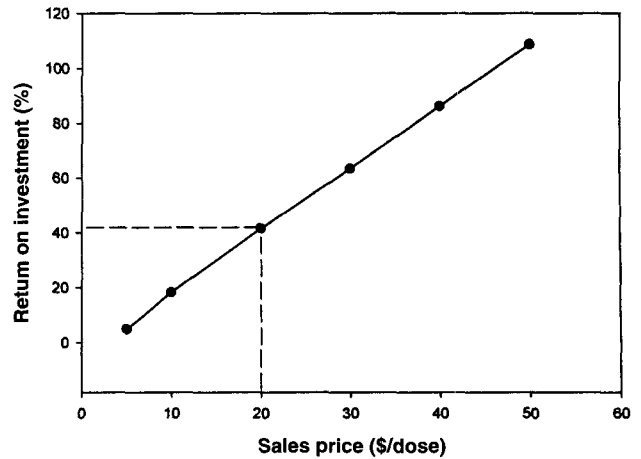


Fig. 5. Sensitivity analysis on the sales price of IL-2.

요약

1. Interleukin-2(IL-2)를 연간 1.227kg을 생산하는 공장의 공정 설계를 IBM PC를 사용한 Super-pro designer를 이용하여 공정 모사를 해보았다. 각 단위공정의 계산자를 정하기 위한 계산을 가정과 5L fermenter 배양의 결과를 이용하여 up-stream을 설계하고, downstream 에서는 28%의 분리정제 수율을 가정하고 전체 공정을 설계하였다.
2. 경제성 분석에 의하면 IL-2의 dose당 \$20로 할 때, 투자 상환율(return on investment)이 일년에 40.63%이었으며, 투자금액의 상환에 걸리는 시간은 약 2.46년이 걸리는 것으로 나왔다.

Reference

1. Hye-Soon Won, Jeewon Lee, In-Ho Kim, and Young-Hoon Park, 2000, Simple Purification of *Escherichia coli*-Derived Recombinant Human Interleukin-2 Expressed with N-terminus Fusion of Glucagon, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 5, 13-16
2. Vibhor Sarawat, Dae Young Kim, Jeewon Lee, Young-Hoon Park, 1999, Effect of specific production rate of recombinant protein on multimerization of plasmid vector and gene expression level, *FEMS Microbiology*, 179, 367-373
3. Sung-Koo Kim, In-Soo Kong, Jai-Yul Kong, Young-Sook Kim, Don-Hee Park, 1995, Process Simulation for the Production of Porcine Growth Hormone Using CAD Program, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 10, 97-104
4. Changhui Zhu and Parashar Dave, 1996, Engineering economic analysis of lab-size compounding equipment and their benefits, ANTEC 96 proceeding