

식물세포배양에 의한 항암제 Paclitaxel의 대량 생산

최형균 · 손주선 · 나광휘 · 홍승서 · 송재영
삼양제넥스 생명공학연구소

Mass Production of Paclitaxel by Plant Cell Culture

CHOI, Hyung-Kyoon · SON, Joo-Sun · NA, Gwang-Hwee · HONG, Seung-Suh · SONG, Jai-Young
Samyang Genex Biotech Research Institute, Daejeon 305-348, Korea

ABSTRACT Samyang Genex succeeded in commercialization of anticancer agent-paclitaxel by plant cell culture technology. The core technology of Samyang Genex relating paclitaxel production includes cell line development, cell line preservation, cell culture, scale-up technology, and purification technology. On the basis of the research, Samyang Genex built the factory operated by CGMP (current good manufacturing practice). The paclitaxel-GenexolTM-is commercially available in Korea, and it will be launched to world market including USA after approval of US FDA.

Key words: Cell culture, cell line development, commercialization, GenexolTM, purification technology, scale-up technology

서 론

식물체는 무한한 자원의 보고이며 인류에게 기본적으로 식량이 될 뿐만 아니라 향료, 의약품, 색소들의 원료로 사용되고 있다. 실제로 현재 사용되고 있는 의약품의 25% 이상이 식물에서 유래된 물질이나 현재까지 의약 개발의 용도로 연구가 진행된 식물종은 전체 30만종의 식물체 중, 5000여 종에 지나지 않는다 (Payne et al. 1991). 식물체에서 유용한 물질을 추출하여 상업화하는 것은 여러가지 제약이 따르는데 환경적인 요건, 기후적인 요건, 그밖에 정치적인 요건을 들 수 있으며 이를 극복하기 위한 대안으로 각광을 받은 것이 식물조직배양법이다.

식물세포배양에 의해서 이차대사산물을 생산하려는 연구는 일본에서 shikonin이 개발됨으로써 새로운 장을 열었다고 할 수 있겠으며 (Tabata and Fujita 1985), 이어서 일본의 Nitto Denko 에서는 20,000~25,000 L 규모의 발효조 배양을 통하여 인삼세포의 상업화에 성공함으로써 식물조직배양에 의한 유용물질 생산에 대한 가능성을 재확인할 수 있는 계기가 되었다 (Ushiyama and Hibino 1997).

그러나 식물세포 또는 조직배양에 의해서 유용물질을 생산

하는 것에도 여러가지 문제점이 있다. 우선, 경쟁이 되는 미생물이나 동물 세포에 비해서 세포증식 속도가 늦다. 또한 일반적으로 식물세포배양에 의해서 생산되는 이차대사산물의 생산성이 낮으며 장기간의 배양기간으로 인하여 완벽한 무균공정이 이루어지도록 하는데 필요한 초기시설투자가 많이 필요하다. 이러한 문제점들이 있기 때문에 원하는 물질을 고농도로 생산하려는 여러가지 방법이 시도되고 있는데, 배지 및 배양조건의 optimization, 이차대사산물의 생산성을 높이기 위한 elicitation, process의 optimization 등이 그것이다.

Paclitaxel은 1950년대부터 미국의 NCI (National Cancer Institute)가 중심이 된 항암물질 선별 프로그램에서 발견된 항암물질이다 (Suffness and Wall 1995). 1970년대에 이미 물질의 구조와 (Wani et al. 1971) 작용기작이 (Schiff et al. 1979) 밝혀졌으나, 1992년에 들어서야 Bristol Myers Squibb (BMS) 에 의하여 상업화에 성공하였다. 초기에 난소암 치료제로서 FDA의 허가를 받은 paclitaxel 은 점차 적용증이 확대되어 1995년에는 유방암치료제로, 그리고 1997년에는 Kaposi Sarcoma에 대한 치료제로도 허가를 받아서 사용되고 있다. 개발초기의 paclitaxel은 천연 태평양산 주목 (*Taxus brevifolia*)을 벌목하여서 추출하여 얻었으므로 자원의 고갈 위험 및 환경파괴 문제를 야기하였다. 이에 따라 1995년부터

는 전구물질을 renewable biomass인 주목의 잎에서 추출하여서 side chain을 붙이는 반합성 방법으로 paclitaxel을 생산하게 되었다. 그러나 이 반합성 방법 역시 주목의 잎에 존재하는 전구체의 양이 제한적이라는 점과, 천연물로부터 전구체의 추출과 이의 화학적 변형이라는 두 단계를 거치게 되어 원가 절감에는 한계가 있었다. 삼양제넥스는 이러한 문제점을 해결하기 위한 대안으로 식물세포배양법을 이용한 paclitaxel의 생산을 1992년부터 미국의 ESCAgenetics와 공동연구를 진행하였다. 이후 삼양제넥스는 1995년에 3,000 L 발효조에서 성공적으로 paclitaxel을 생산할 수 있는 기술 개발에 성공하였고, 1997년에는 식물세포배양 전용공장에서 32,000 L 규모의 bioreactor로 paclitaxel를 양산하는 데 성공하였다. 삼양제넥스의 식물세포 대량배양 기술을 통하여 생산된 paclitaxel은 기존의 cremophore 제형으로는 국내 임상을 마치고 제일제당을 통하여 2001년부터 국내 시판중이다 삼양제넥스는 또한 삼양사와 공동으로 기존제형의 부작용을 줄이는 독자적인 제형연구도 추진하여서 현재 제넥솔-PM (Paclitaxel-Polymeric Micelle) 제형으로 임상이 진행되고 있다. 다음은 삼양제넥스에서 이루어졌던 주요 연구 개발내용의 요약이다.

당 첨가공정

식물세포의 증식과 이차대사산물 생산에 중요한 영향을 준다고 알려져 있는 여러 종류의 당성분들을 실험해 보았다 (Choi et al. 2000a). Sucrose를 day 7일째 1%, day 21일째 3%를 첨가하여 세포 성장 기간을 연장하였을 때 가장 높은 paclitaxel 생산성을 보였으며, 이 실험 결과를 바탕으로 하여서 당의 종류를 변화시켜서 실험한 결과, sucrose를 초기당으로 하고 maltose를 첨가당으로 하였을 때 상대적으로 높은 paclitaxel 생산성을 나타내었다.

온도 변화 공정

일반적으로 식물세포의 증식에 이용하는 온도는 24~30°C 정도이다. 본 실험에서는 우선 각 온도별 세포증식도를 알아 보았고, 그 결과를 바탕으로 배양중간에 배양온도를 변화시켜 주는 공정을 고안하게 되었다 (Choi et al. 2000b). 실험 결과, 세포증식은 24°C에서 가장 우수하였고 그보다 낮거나 높은 온도에서는 세포증식이 저해되었다. 일반적으로 세포의 증식도와 이차대사산물의 생산성은 반비례하는 경우가 많기 때문에 24°C에서 초기 세포 성장이 이루어진 후 세포 성장을 저해할 수 있도록 온도를 변화시켰다. 그 결과 배양 21일째 29°C로 하여 세포 성장을 약간 지연시켰을 때 가장 높은 제넥솔 생산성을 확인할 수 있었다.

고농도 공정의 개발

고농도 세포와 당이 paclitaxel에 미치는 영향을 알아보았다. 초기 당농도를 6%로 하였을 때 높은 paclitaxel 생산성을 확인할 수 있었다. 다른 종류의 osmoticum을 사용하였을 때에도 어느 정도 paclitaxel 향상이 이루어지는 것으로 미루어 보아서 고농도 당의 osmotic pressure에 의하여 생산성 향상이 이루어진 것으로 생각된다 (Kim et al. 2001).

반연속식 배양 공정의 개발

식물세포배양을 통하여 원하는 이차대사산물을 상업적인 규모로 대량생산하기 위해서는 scale-up 단계가 필수적이며 세포증식 기간이 길고, 오염의 가능성이 높은 식물세포배양의 경우 적절한 배양공정의 개발이 필수적이다. 우리사에서는 seed 발효조의 숫자를 최소화하고 안정적으로 높은 생산성의 paclitaxel을 얻기 위하여 반연속식 배양공정을 고안하였다 (Choi et al. 2001). Figure 1은 반연속식 공정의 대략적인 모식도이다. 반연속식배양공정에 이용하는 경우에 회분식 배양에 비해서 높은 제넥솔 생산성을 얻을 수 있었으며 일정한 기간동안에 얻을 수 있는 제넥솔의 생산량도 증가시킬 수 있었다. 반연속식 배양공정을 통하여 높은 paclitaxel 생산성을 얻을 수 있었던 것은 silver nitrate의 전처리 효과 때문인 것으로 판단된다.

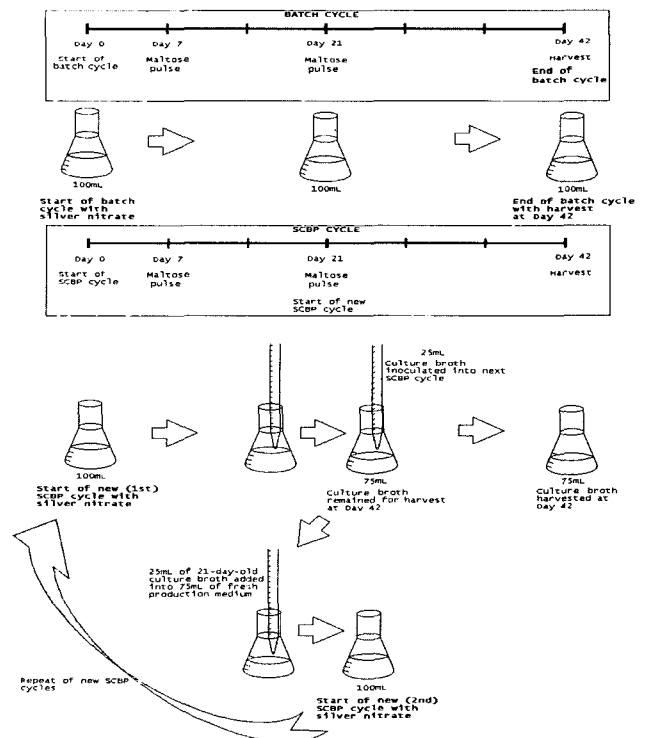


Figure 1. Schematic diagram of SCBP (semi-continuous batch process) and BP (batch process).

기타

cGMP의 관점에서 보면 세포주의 장기 보관기술은 원료의 약품의 안정적인 공급을 위하여 필수적이므로, paclitaxel 생산 세포주를 장기적으로 cryopreservation 방법에 의하여 보관하는 방법을 통하여 안정적인 생산을 도모할 수 있었다 (Kim et al. 2001). 또한 computer simulation을 통하여 발효조 내에서의 대량 배양환경을 최적화하였고 (Figure 2), immunolocalization 실험을 하여 배양액에서 paclitaxel이 존재하는 곳을 밝혀 낸 후 (Figure 3) 대량 추출정제공정을 개발할 수 있었다. 최근에는 paclitaxel 생합성 과정을 조절하는 metabolic engineering 방법으로 paclitaxel의 생산성을 더욱 높이는 연구를 진행중이다.

결론 및 전망

삼양제넥스의 paclitaxel 생산관련 핵심기술은 크게 세포주 개발 및 보존기술, 세포배양 및 scale-up 기술, 분리 정제 기술 등의 3분야로 나눌 수 있으며 현재 이들 분야에서 세계적인 기술을 확보하고 있다. 그 동안 이들 핵심기술의 개발을 통하여 국내외에 36건의 특허를 출원하여 그 중 18건이 최종 등록된 상태이며 나머지 건들에 대해서는 심사가 진행중이다.

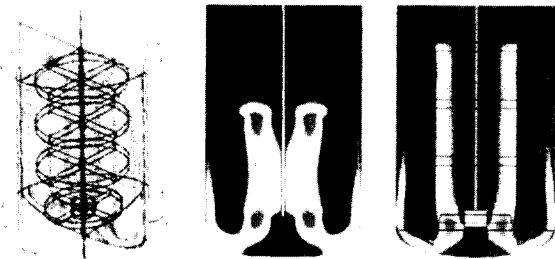


Figure 2. Schematic diagrams of mixing in bioreactor by computer simulation.

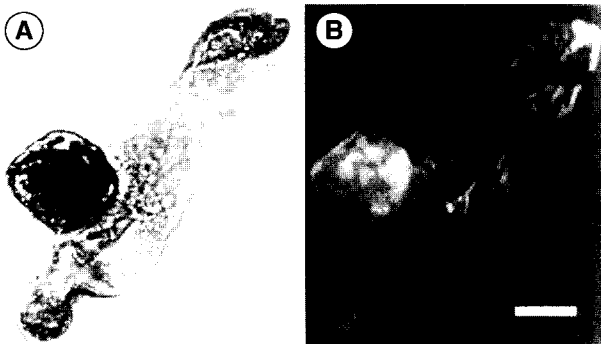


Figure 3. Micrographs of representative suspension cell of *taxus chinensis* at day 35. (A) Micrograph of cell obtained by conventional microscope; (B) Three-dimensional micrograph of cell obtained by confocal laser-scanning microscope. Green parts indicate paclitaxel in cell. Bar represents 20 μ m.

이러한 연구결과 들을 바탕으로 하여서 미국 FDA 규정에 준한 공장을 건설하여 이미 국내에서는 paclitaxel을 제백솔이라는 상표명으로 생산 판매하고 있다. 1999년 8월에 미국 시장 진출에 필수적인 절차인 DMF (drug master file)을 미국 FDA에 제출하였고 조만간 FDA inspection을 통과하여서 cGMP 규격에 준하는 생산공장에서 생산된 paclitaxel로 세계시장에 본격 진출 예정이다.

식물세포배양에 의하여 고부가가치 산물인 paclitaxel 개발의 성공으로 삼양제넥스는 세계적 수준의 특수 기반 기술을 확보할 수 있었다. 식물세포의 대량배양기술을 이용하여 향후 여러 의약품질을 생산하는 산업을 독보적으로 일으켜 갈 수 있을 것이며, 이로써 삼양제넥스의, 나아가 한국의 식물세포배양 관련 기술 수준은 세계적인 기술로 인정받을 수 있을 것이다.

인용 문헌

Choi HK, Kim SI, Son JS, Kim HR, Song JY, Kim JH, Hong SS (2001) Enhanced production of paclitaxel by semi-continuous batch process (SCBP) in suspension culture of *Taxus chinensis*. *Enzyme Microb Technol* 29:583-586

Choi HK, Kim SI, Son JS, Hong SS, Lee HS, Chung IS, Lee HJ (2000) Intermittent maltose feeding enhances paclitaxel production in suspension culture of *Taxus chinensis* cells. *Biotechnol Lett* 22:1793-1796

Choi HK, Kim SI, Son JS, Hong SS, Lee HS, Lee HJ (2000) Enhancement of paclitaxel production by temperature shift in suspension culture of *Taxus chinensis*. *Enzyme Microb Technol* 27:593-598

Kim SI, Choi HK, Kim JH, Lee HS, Hong SS (2001) Effect of osmotic pressure on paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus chinensis*. *Enzyme Microb Technol* 28:202-209

Kim SI, Choi HK, Son JS, Yun JH, Jang MS, Kim HR, Song JY, Kim JH, Choi HJ, Hong SS (2001) Cryopreservation of *Taxus chinensis* suspension cell cultures. *Cryoletters* 22:43-50

Payne G, Bringi V, Prince C, Shuler M (1991) Suspension culture. In: *Plant cell and tissue culture in liquid systems*, Oxford University Press, New York, pp 146-176

Schiff PB, Fant J, Howbitz SB (1979) Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 22:665-667

Suffness M, Wall ME (1995) Discovery and development of taxol. In: Suffness M, (ed), *Taxol: science and application*, CRC Press, Boca Raton, pp 3-25

Tabata M, Fujita Y (1985) Production of shikonin by plant cell culture. In: Zaitlin M, Day P, and Hollaender A (eds), *Biotechnology in plant science: relevance to agriculture in the eighties*, Academic Press, New York, pp 207-218

Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPail AT (1971) Plant

antitumor agents VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. J Am Chem Soc **93**:2325-2327

Ushiyama K, Hibino K (1997) Commercial production of ginseng by plant cell culture. Am. Chem. Soc. 213 National Meeting, San Francisco, CA, Abstract, Pt. 1, AGFD057