



PER.C6[®] 세포주 기반기술 : 혁명적인 생물학적제제 생산방법

Berna Biotech Korea **배경동** kdbae@bernabiotech.co.kr
 Crucell **Mark de Vries, Wouter Verhoeven**
 인하대학교 생물공학과 허병기

오늘날 급변하는 생물학적 제제 시장에서, 생물학적 제제 제조업체들은 몇 가지 어려운 도전에 직면해 있다. 즉, 제품 수요 및 안전성에 대한 요구는 증가하고 있고 경쟁은 치열해지고 있어서(특히 치료용 단일군항체 생산의 경우에) 기존의 제조공정으로는 이러한 요구사항들을 만족시킬 수 없는 관계로 생물학적 제제 제조업체들은 새로운 생산방법을 추구하고 있는 실정이다. 이런 측면에서, 크루셀(Crucell)은 인체 망막세포를 최신 생물학적 기법으로 불멸화시킨 PER.C6[®] 세포주를 개발하였고, 제조업체들이 당면하고 있는 상기의 요구사항들을 충족시키기 위해서 지속적으로 PER.C6[®] 기반 생산기술을 개발하고 있다. 기존의 생산기술과 비교했을 때, PER.C6[®] 세포주 및 관련 기술은 탁월한 안전성, 용이한 스케일업 및 무혈청배지에서 고생산성에 그 장점이 있다. 이들 장점 때문에 PER.C6[®] 기술은 새로운 제조방법에 대한 platform technology가 되었고 현재 까지 50개 이상의 제약업체에서 상업적 라이선스를 취득한 바 있다.

▶ PER.C6[®] 제조기술 소개

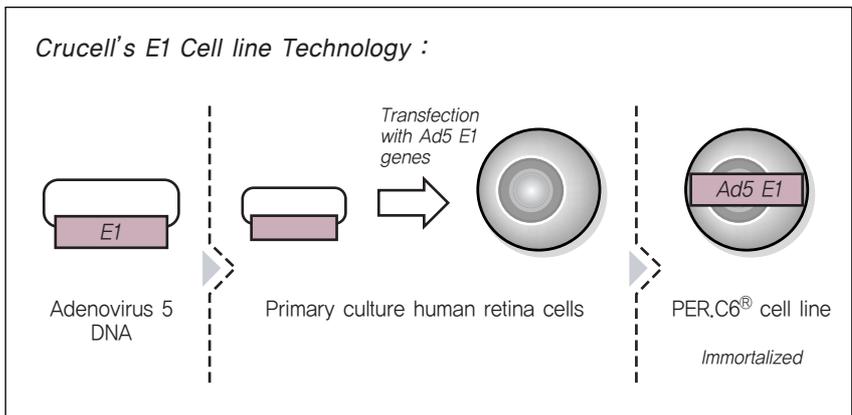
크루셀의 PER.C6[®] 세포주는 백신, 항체, 치료용 단백질 및 유전자치료제에 이르기까지 광범위 생물학적 제제의 생산에 사용될 수 있도록 개발된 불멸화 인간세포주이다.

PER.C6[®] 세포주는 인체 망막세포에서 단일 세포를 분리한 후 재조합 DNA 기술, 즉, 아데노바이러스 E1 유전자를 이용하여 transfection 시킴으로서 불멸화되었다(E1A 유전자는 영구

적인 세포분열을 야기하고, E1B 유전자는 apoptosis를 억제한다). 따라서, PER.C6[®] 세포주는 무한히 증식할 수 있고, 더욱이 무혈청 배지에서 대규모로 증식할 수 있는 장점이 있다.

▶ PER.C6[®] 기술을 선택하는 이유

>> **생산성** : PER.C6[®] 세포주 및 관련기술을 이용하면 고생산성과 생산의 효율성을 모두 기대할 수 있다. 따라서, 제조업자는



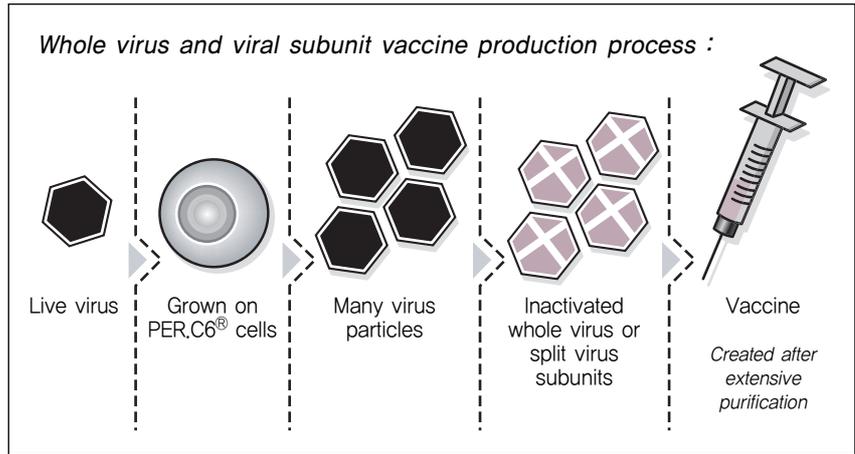
훨씬 낮은 생산단가(COGs)를 가지고 시장에 좀더 빠르게 진출할 수 있는 장점이 있다.

>> **유연성** : PER.C6[®] 세포주는 인체 및 동물 바이러스들 거의 대부분을 다양한 배양형태, 공정 및 배지에서 증식시킬 수 있다. 또한, PER.C6[®] 세포주는 인체나 동물유래 단백질이 없는 무혈청배지에서도 잘 증식한다. 이러한 유연성 때문에 PER.C6[®] 세포주는 roller bottle에서 20,000L bioreactor에 이르기까지 모든 배양형태 및 규모에서 최대 1.5×10⁸/mL 까지 증식할 수 있다.

>> **전문가 지원** : 라이선스 취득사의 경우 PER.C6[®] 전문기술, 예를 들면, 기술지원, 공정개발, cGMP 에 적합한 대규모 생산 기술에 아주 쉽게 접근할 수 있다. 더불어 임상시료의 생산지원도 가능하다.

>> **완벽한 문서** : PER.C6[®] 세포주는 오늘날 까지 개발된 어떤 세포주 보다도 훨씬 더 잘 문서화 되어있다. 개발초기부터, 세포주 수립, 세포주 특성분석(characterization) 및 안전성 시험등과 관련된 모든 자료가 BMF(Biologics Master File)의 형태로 미국 규제기관인 US-FDA에 제출 및 등록 되어있다. 더욱이, PER.C6[®] 라이선스 취득사 중의 하나인 Merck & Co. 와 협력하여 기존 BMP에 매년 자료를 추가하고 있다. 따라서, 크루셀의 모든 라이선스 취득사들은 BMF에 접근하여 자료를 열람할 수 있고, 궁극적으로 제품을 등록하는데 있어 등록절차를 상당히 간소화 시킬 수 있다.

>> **안전성** : US-FDA에 등록된 BMF에 PER.C6[®] 세포주의 탁월한 안전성에 관한 자료가 포함되어있다. 더욱이, PER.C6[®] 세포주를 host로 사용하여 유전자치료제, 백신, 단일군항체 등에 대해 총 5,000명 이상의 subject에게 이루어진 35건 이상의 임상시험결과는 PER.C6[®] 세포주에 어떤 부작용도 없음을 입증하고 있다.



➔ **지속적 혁신**

PER.C6[®] 세포주 및 관련기술 개발은 1990년대 초에 네덜란드의 교육도시인 라이덴에서 시작되었다. 그 당시에 크루셀의 창립자인 Dinko Valerio는 생물학적제제에 특화된 세포주의 개발필요성을 인식하였고, 이에 크루셀은 라이덴 대학교수인 Alex van der Eb과 협력하여 아데노바이러스의 E1 유전자(E1A-E1B)를 사용하여 인체세포를 불멸화할 수 있는 방법을 발견하였고 결국 인체망막 세포를 이용한 PER.C6[®] 세포주를 개발하기 시작하였다. 처음부터, PER.C6[®] 세포주를 개발하기 위한 모든 공정은 명확히 문서화 되었고 이는 미국 규제기관인 US-FDA에 PER.C6[®] 기반 제품개발에 유용하게 쓰일 수 있는 BMF를 등록할 수 있는 단초가 되었다.

PER.C6[®] 기술은 초기에 인체세포를 host로 할 수 밖에 없는 유전자 치료제의 제조를 위해 개발되었지만 다른 부분, 즉 백신(whole virus vaccine, live-attenuated vaccine, live-vector vaccine, subunit vaccine, recombinant vaccine), 재조합 치료용 단백질 및 단일군 항체 등에도 유용하게 사용될 수 있음이

발견되었다. 이후에, PER.C6[®] 기술은 이들 개개의 제품목적에 맞게 끊임없이 개발되어 왔고 그 중의 대표적인 예가 단일군항체를 대량으로 생산할 수 있는 혁신적인 “XD 발효 기술”로서 이 기술을 활용할 경우 최소 10g/broth L 이상의 단일군항체를 얻는 것이 가능하다.

PERCIVIA PER.C6[®] 개발센터 : PER-CIVIA PER.C6[®] 개발센터는 크루셀과 네덜란드 소재 세계적인 발효전문회사인 DSM Biologics와 협력하여 2006년 11월에 미국 Cambridge(Massachusetts)에 설립한 PER.C6[®] 개발센터로 PER.C6[®] 세포주에서 인체단백질 및 단일군항체의 생산성을 향상시키기 위해 전문적으로 연구개발에 매진하고 있다. 이 개발센터에서 나오는 모든 결과들은 PER.C6[®] 기술을 사용하는 라이선스 취득사에게 기술지원 자료로 제공된다.

Valerio building : Valerio building은 최신 GMP 공정기술센터로 2008년 초 개관을 목표로 현재 qualification이 진행 중에 있다.

이 센터는 크루셀의 창립자인 Dinko Valerio의 이름으로부터 명명되었고 개관후

크루셀(Crucell)은 인체 망막세포를 최신 생물학적 기법으로 불멸화시킨 PER.C6[®] 세포주를 개발하였고, 제조업체들이 당면하고 있는 상기의 요구 사항들을 충족시키기 위해서 지속적으로 PER.C6[®] 기반 생산기술을 개발하고 있다. 기존의 생산기술과 비교했을 때, PER.C6[®] 세포주 및 관련기술은 탁월한 안전성, 용이한 스케일업 및 무혈청배지에서 고생산성에 그 장점이 있다.

에는 라이선스 취득사로부터 제기되는 거의 모든 요구사항들, 즉 백신, 단백질, 단일균향체의 공정설계 및 개발에 이르기까지의 제반 사항을 지원할 것이다. 더불어 Valerio building은 biosafety-level 2 및 3의 기준에 맞는 건물로 지어졌고 개관 후에 라이선스 취득사로부터 관련된 요구가 있을 경우 충분한 지원이 가능할 것이다.

➔ **백신**

오늘날 수많은 백신은 유정란, 마우스 뇌와 같은 동물유래의 기질을 사용하여 제조되고 있다. 이들 제조방법에는 제한된 스케일업, 복잡한 공정, 동물유래기질과 관련된 안전성 문제로 인한 낮은 성공률 등 몇 가지 문제점들이 내재되어 있다. 반면에, PER.C6[®] 인간 세포주는 탁월한 안전성과 고생산성으로 기존 제조방법에 대한 최신의 효율적인 대안이 될 수 있다. 인체질환을 일으키는 수많은 바이러스는 PER.C6[®] 세포주에서 효율적으로 높은 농도까지 증식할 수 있음이 입증되어 왔고, 따라서, PER.C6[®] 세포주는 inactivated whole virus, live-attenuated, live-vector, subunit vaccines 등의 정제 및 최종 조제를 위해 효과적으로 bulk material을 제공할 수 있다.

또한, PER.C6[®] 기술은 live adenovirus-based vector와 같은 재조합 백신 제조에도 이용될 수 있고, 더불어, 크루셀의 독점기술인 AdVac[®] 기술은 adenovirus를 이용한 재조합 백신개발에 유용하게 사용될 수 있다(E1-deleted adenovirus vector를 사용함으로써 E1 유전자를 포함하고 있는 PER.C6[®] 세포주에서 복제할 경우 replication-deficient 재조합 아데노바이러스를 생산할 수 있다).

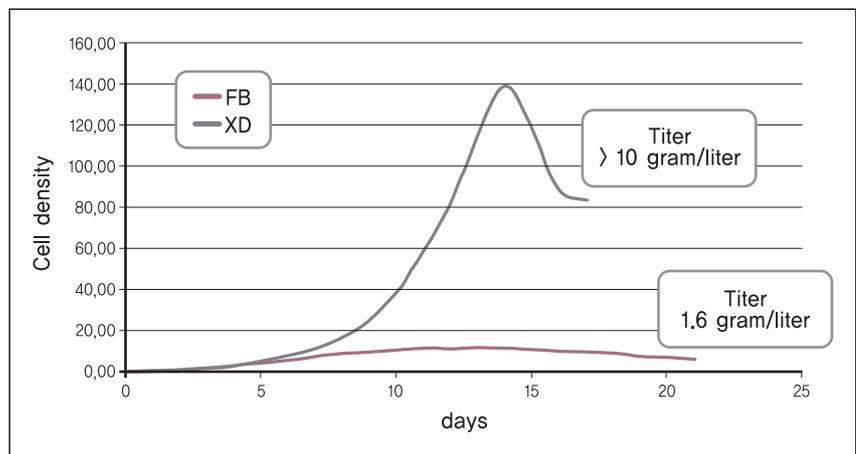
Sanofi-aventis 그룹의 백신전문부문이며 전세계 최대규모의 백신제조업체인 Sanofi Pasteur의 경우 최근 PER.C6[®] 세포주를

이용하여 influenza 백신에 대한 임상2상을 미국에서 시작하였다. 더욱이, Novartis나 Merck와 같은 백신 회사들도 PER.C6[®] 세포주를 새로운 백신제품개발에 이용하기로 하였다.

➔ **단백질**

오늘날, 항체와 치료용 단백질에 대한 시장은 팽창하는 제품수요를 충족시킬 수 있고, 제조 단가를 낮추고, 국제기준에 걸맞은 안전성을 확보할 수 있는 제조기술을 요구하고 있는데, 지금까지 언급한 PER.C6[®] 세포주는 이런 모든 요구사항을 충분히 충족시킬 수 있는 것으로 사료된다. 인체단백질과 단일균향체의 생산을 위한 발현균주로서 PER.C6[®] 세포주는 전례없는 신뢰성, 안전성, 생산성, 효율성 및 인간세포주라는 장점을 포괄하고 있다.

Rodent cell 및 hybridoma의 경우 glycosylation pattern이 인체세포주와는 확연히 다르고 이는 생체내에서 단백질의 분해를 가속시키며 결국에는 인체내 치료효율성을 감소시킨다. 크루셀은 PER.C6[®] 세포주를



쉽게 transfection 시킬 수 있는 DNA 발현 벡터 시스템을 보유하고 있고, 이 시스템을 적용하면 6개월 내로 고발현 세포주를 확립할 수 있다. 복잡한 융합단백질을 포함한 재조합 단백질의 수율은, PER.C6[®] 세포주의 경우 통상적인 동물세포시스템에 비해 대략 10배 정도 높다. 크루셀의 독점기술인 “XD 발효 기술”을 사용하면, 재조합 PER.C6[®] 세포주에서 단일군 항체의 생산수율은 전례가 없는 수준인 배양액 1L당 10g 정도까지 상승하게 되며, 이 경우 세포농도는 1.5×10^8 cells/mL 정도의 고농도에 도달하게 된다. 전임상과 임상 용시로 개발을 위해 고수율 PER.C6[®] 세포주가 필요할 경우, 전술한 크루셀과 DSM Biologics의 협업시스템으로 인해 대략 3~6개월 내로 필요한 세포주의 공급이 가능하다. 만일 세포주 생산에만 국한되지 않고 250L 규모 발효시스템을 통해 임상 1상과 2상 시료 공급도 필요하다면 총 12개월 내로 이러한 모든 요구를 수용할 수 있다. 전술한 바와 같이, 2006년 11월에 크루셀과 DSM Biologics는 PER.C6[®] 세포주 및 관련기술 전문연구기관인 PER-CIVIA PER.C6[®] 개발센터를 설립하였고, 이 센터는 치료용 재조합 단백질(특히, 단일군 항체)의 대량생산시스템을 개발하기 위한 연구를 수행하고 있으며 전세계의 PER.C6[®] 세포주 licensee에게 관련된 기술을 제공한다(www.percivia.com).

▶ 라이선스 취득

현재까지 대략 50여개의 선진제약회사들이 크루셀의 PER.C6[®] 세포주와 관련기술에 대한 라이선스를 취득하여 다양한 백신, 단일군 항체, 단백질 및 유전자치료제의 개발에 사용하고 있다. PER.C6[®] 세포주에 대한 라이선스에는 연구용과 상업용 라이선스의 2가지가

있고, 라이선스 취득사는 크루셀로부터 다음의 몇몇 사항에 대한 기술적 지원을 받을 수 있다.

예를 들면, cell bank 수립을 위한 PER.C6[®] 세포주 및 관련 기술, PER.C6[®] 세포주 사용을 위한 광범위 know-how 파일에 대한 접근권, 기타 기술지원에 대한 접근권 등을 들 수 있다.

더욱이, 재조합 단백질과 항체 개발을 추진할 경우에는 PERCIVIA PER.C6[®] 개발센터로부터 필요한 기술지원을 받을 수 있다. 크루셀의 라이선스 정책은 기본적으로 비독점라이선스(non-exclusive)를 목표로 하지만 몇몇 합의된 경우에는 독점라이선스(exclusive)를 체결하는 것도 가능하다. 더불어, 연구용 라이선스는 필요할 경우 상업용 라이선스로 전환될 수 있다.

PER.C6[®] 세포주 및 관련기술의 라이선스 취득에 관심이 있다면 www.cruce.com에 접근하면 상세한 내용을 열람할 수 있다.

<참고문헌>

HAVENGA, M., VOGELS, R., ZUIJDEEST, D., RADOSEVIC, K., MUELLER, S., SIEUWERTS, M., WEICHOLD, F., DAMEN, I., KASPERS, J., LEMCKERT, A., MEERENDONK, M.V., VLUGT, R.V.D., HOLTERMAN, L., HONE, D., SKEIKY, Y., MINTARDJO, R., GILLISSEN, G., BAROUCH, D., SADOFF, J., and GOUDSMIT, J.(2006).

Novel replication-incompetent adenoviral B-group vectors : high vector stability and yield in PER.C6 cells.

J Gen Virol 87(Pt 8) : 2135-2143.

LEDWITH, B.J., LANNING, C.L., GUMPRECHT, L.A., ANDERSON, C.A., COLEMAN, J.B., GATTO, N.T., BALASUBRAMANIAN, G., FARRIS, G.M., KEMP, R.K., HARPER, L.B., BARNUM, A.B., PACCHIONE, S.J., MAUER, K.L., TROILO, P.F., BROWN, E.R., WOLF, J.J., LEBRONL, J.A., LEWIS, J.A., and NICHOLS, W.W.(2006).

Tumorigenicity assessments of Per.C6 cells and of an Ad5-vectored HIV-1 vaccine produced on this continuous cell line.

Dev Biol(Basel) 123 251-263 ; discussion 265-256.

LEWIS, J.A., BROWN, E.L., and DUNCAN, P.A. (2006).

Approaches to the release of a master cell bank of PER.C6 cells ; a novel cell substrate for the manufacture of human vaccines.

Dev Biol(Basel) 123 165-176 ; discussion 183-197.

YALLOP, C., CROWLEY, J., COTE, J., HEGMANS-BROUWER, K., LAGERWERF, F., GAGNE, R., MARTI, J.C., OOSTERHUIS, N., OPSTELTEN, D.-J., and BOUT, A.(2005).

PER.C6[®] Cells for the Manufacture of Biopharmaceutical Proteins. In : *Modern Biopharmaceuticals*, J. Knäblein, ed.(Wiley-VCH, Weinheim), 779-807

XIE, L., METALLO, C., WARREN, J., PILBROUGH, W., PELTIER, J., ZHONG, T., PIKUS, L., YANCY, A., LEUNG, J., AUNINS, J.G., and ZHOU, W.(2003).

Large-scale propagation of a replication-defective adenovirus vector in stirred-tank bioreactor PER.C6 trade mark cell culture under sparging conditions.

Biotechnol Bioeng 83 (1) : 45-52.

PAU, M.G., OPHORST, C., KOLDIJK, M.H., SCHOUTEN, G., MEHTALI, M., and UYTDEHAAG, F.(2001).

The human cell line PER.C6 provides a new manufacturing system for the production of influenza vaccines.

Vaccine 19 (17-19) : 2716-2721.

FALLAUX, F.J., BOUT, A., VELDE, I.V.D., WOLLENBERG, D.J.van, HEHIR, K.M., KEEGAN, J., AUGER, C., CRAMER, S.J., ORMONDT, H.V., EB, A.J. van der, VALERIO, D., and HOEBEN, R.C.(1998).

New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses.

Hum Gene Ther 9 (13) : 1909-1917.