

## Solid phase N-terminal mono-PEGylated rhIFN- $\alpha$ -2a: Chemical, Physical, Biological Characterization

Byung Kook Lee, Chang Woo Suh, Sun Kyung Lee, Sang Yun Hwang, <sup>1</sup>Yong Suk Lee, Eun Kyu Lee<sup>†</sup>  
Bioprocessing Research Lab., Dep. of Chemical Engineering, Hanyang University, Ansan Korea 425-791

<sup>1</sup>Korean Green Cross R&D, Yong-In

Tel 82-31-400-4072 FAX 82-31-408-3779

### 서 론

유전자 재조합 기술을 이용하여 생산되고 있는 인터페론은 혈액 내 순환 수명이 짧아 주 3회의 높은 빈도로 주사해야 하는 단점이 있고 면역원성이 높아 주사 시 발열, 구토 등의 여러 부작용을 초래하게 된다. 또한 수용액 상에서 안정성이 낮아 유통 과정에서 초기 활성을 그대로 유지 못하는 단점도 있는 실정이다. 이러한 문제점을 해결하기 위한 방법으로 무독성 수용성 고분자의 일종인 PEG를 이용하여 단백질 표면을 수식하는 방법이 진행 되어 왔다. 그러나 PEG 분자를 단백질에 수식함에 있어서 무작위적인 수식과 수식에 의한 단백질의 생물학적 활성 감소 등이 문제시 되어 왔다<sup>1,2)</sup>.

고체상에서 reductive alkylation 반응을 진행시킴으로 해서 액상 PEGylation시 발생할 수 있는 부반응(multi-PEGylation)<sup>3)</sup>과 미 반응된 PEG와 환원제의 제거가 용이 해졌다. 이에 본 연구에서는 기존의 액상에서 반응하는 것이 아닌 고체상 담체에 IFN을 흡착 시킨 후에 reductive alkylation 반응을 통하여 IFN의 N-terminal amine 잔기에만 특이적으로 수식시킨 PEGylated-IFN에 대한 characterization, 열 안정성 및 효소 저항성, 생물학적 활성, 그리고 면역원성의 변화에 대한 연구를 수행하였다.

### 재료 및 방법

본 실험에 사용된 IFN- $\alpha$ -2a(IFN)는 (주)녹십자R&D에서 acetate buffer에 2 mg/mL로 농축된 단백질 용액의 형태로 제공 받았다. 실험에 이용된 활성화 PEG는 (주)선바이오에서 구입하였으며, 평균 분자량이 5, 10, 20 kDa인 mPEG-aldehyde를 사용하였다. Reductive alkylation 환원제인 sodium cyanoborohidride는 Sigma-Aldrich사에서 구입하였다.

### 고체상 N-terminal mono-PEGylated IFN 준비

5 ml의 IFN(2 mg/ml, pH 4.0, 20 mM acetate buffer)을 0.1 M pH 4.0 SPB(sodium phosphate buffer)로 평형을 잡은 CM-Sepharose (Amersham, Sweden, column volume 5 mL)에 1 mL/min의 유속으로 주입하여 흡착시킨다. 동일한 buffer 10 bed volume(BV)을 칼럼에 주입하여 비 결합된 IFN을 세척한 후, IFN 대비 몰 비율이 15배의 PEG 용액(20 mM NaCNBH<sub>3</sub>) 3 BV을 120분 동안 주입하여 IFN을 PEGylation 시킨다. PEGylation 후에 1 M NaCl gradient로 PEGylated IFN을 용출시킨다.

### 2DE, IEF

2DE는 IPGphor(Amersham, Sweden)을 이용하였다. GPC로 정제된 샘플을 준비하여 12시간 rehydration 시키고 12시간 IEF(iso electric focusing)하여 SDS-PAGE로 전기 영동하였다. IEF는 Novex<sup>®</sup> IEF gel(pH3~7)을 사용하여 5시간의 step IEF를 실시하여 분석하였다.

### 열 안정성, 효소 안정성

온도 안정성은 50°C에서 aggregation되는 정도를 340 nm에서 시간에 따른 흡광도의 변화로 측정하였다<sup>4)</sup>. 효소 저항성은 동일한 농도의 monomeric IFN과 PEGylated IFN을 trypsin 처리하여 시간에 따른 절단 비율을 HPLC를 통해서 분석하였다.

### 생물학적 활성, 면역원성 측정

PEGylated IFN의 생물학적 활성은 MDBK(Madin-Darby bovine kidney) cell line을 IFN을 주입하여 배양한 뒤 VCV(vesicular stomatitis virus)를 이용하여 MDBK cell 이 virus에 견디는 정도를 표준 IFN(100 IU/ml)과 비교하여 PEGylated IFN의 생물학적 활성을 측정하였다<sup>5)</sup>. 면역원성은 SPR과 ELISA를 이용 monoclonal Ab와 IFN의 binding level을 비교하여 면역원성을 측정하였다<sup>6)</sup>.

## **결과 및 고찰**

IFN은 고체상에서 PEGylation과 분리를 하였고 monomeric IFN과 PEGylated IFN이 혼합되어 있는 부분은 GPC를 이용하여 회수하였다. 이는 monomeric IFN과 PEGylated IFN의 특성의 차이로 분리가 된 것이라 판단된다. 이온교환 수지에서

볼 수 있었던 IFN과 PEG-IFN의 분리는 pI값의 변화에 의한 것이 아니라는 것은 2DE와 IEF를 통해서 확인하였다(Fig. 1). 그렇다면 이온교환 수지에서 분리되는 원인은 고체상 표면과 IFN에 있는 양이온의 상대적 감소로 인한 것으로 판단이 되고 있으며 이에 대해서 분석을 진행 중이다.

일반적으로 의약품 단백질에 PEG가 수식됨으로 해서 의약품 단백질의 생활성이 감소되는 것으로 보고 되고 있다. 그러나 면역원성역시 크게 감소를 시키며 혈액 내 순환수명을 크게 향상시켜 의용성을 증가시키는 것으로 알려져 있다<sup>7)</sup>. 이는 동물실험을 직접 실시해야 하지만 본 연구에서는 이를 간편화 하여 혈액 내 순환 수명에 영향을 미치는 인자인 단백질 분해 효소에 대한 저항성과 온도 안정성을 알아봄으로 해서 간접적으로 이를 평가하였다. 절단 효소가 IFN을 절단하기 위해서는 효소의 활성화 부위가 IFN을 인식을 해야 하는데 이를 PEG가 위치적으로 방해해 절단효소에 대한 저항성이 증가한 것으로 판단된다(Figure. 2). IFN의 온도 안정성을 측정함으로 해서 혈액 내에서의 순환수명을 예측해 보았다. 물리적으로 긴 순환 수명을 가지기 위해서는 용액 내에서 용해도가 증가 하여야 한다. PEG분자가 IFN에 수식됨으로 해서 IFN 대비 용해도가 증가한 것을 Figure 3에서 확인 할 수 있다. 이들은 혈액 내에서 안정성을 예상할 수 있는 결과라고 판단된다.

① 생물학적 활성과 면역원성은 PEGylated IFN이 monomeric IFN에 비해 감소한 것으로 나타났다(Table. 1). 이는 PEG분자가 IFN과 receptor와의 결합과 IFN과 Ab의 결합을 방해하여 나타난 것으로 판단된다. Receptor와 epitope site가 IFN을 인식하는 부위가 N-terminal amino acid 부위에 있다<sup>8)</sup>는 것이 이를 잘 나타내준다고 판단된다.

## 감 사

본 연구는 산업자원부의 공통핵심연구개발사업의 연구비 지원으로 수행되었습니다(A2A-02-01). 또한 (주)녹십자 R&D의 연구지원에 감사합니다.

## 참고문헌

1. Lee E. K. (2001), Method for producing protein-polymer conjugate with solid-phase column, Korean patent application No. 10-2001-73592.
2. Kinstler, O., G. Molineux, M. Treuheit, D. Ladd, C. Gegg (2002), Mono-N-terminal

- poly(ethylene glycol)-protein conjugates, *Advanced Drug Delivery* **54**, 477-485.
3. Suh, C. W., and E. K. Lee (1997), Characteristics and Application of Conjugation Between Protein and Activated PEG, *J. Biotechnol. Bioeng.* **12**, 314-322.
  4. Kim C. S., and E. K. Lee (2000), Effect of Operating Parameters in in Vitro Renaturation of a Fusion Protein of Human Growth Hormone and Glumathione S Transferase from Inclusion Body, *Process Biochemistry* **36**, 111-117.
  5. Meager, A. (2002), Biological Assays for Interferons, *J. Immun. Methods* **261**, 21-36.
  6. Takacs, M. A., S. J. Jacobs, R. M. Bordens, and S. J. Swanson (1999), *J. Interferon and Cytokine Res.* **19**, 781-789.
  7. Harris, J. M., N. E. Martin and M. Modi (2001), PEGylation: A Novel Process for Modifying Pharmacokinetics, *Clin. Pharmacokinet* **40**, 539-551.
  8. Piehler, J., L. C. Roisman, and G. Schreiber (2000), New Structural and Functional Aspects of the Type I Interferon-Receptor Interaction Revealed by Comprehensive Mutational Analysis of The Binding Interface, *J. Biological Chemistry* **275**, 40425-40433.

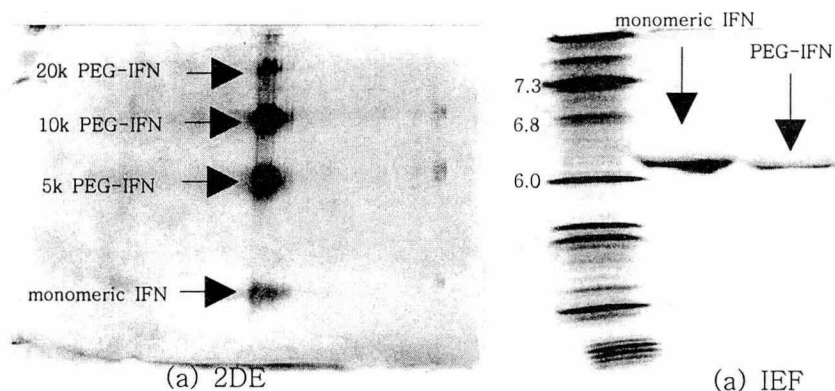


Figure. 1 Characterization of monomeric IFN and PEGylated IFN by using 2DE and IEF. (a) is 2DE PAGE and (b) is IEF PAGE.

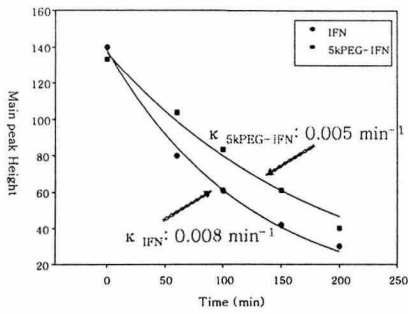


Figure. 2 Time course of IFNs digestion by trypsin.

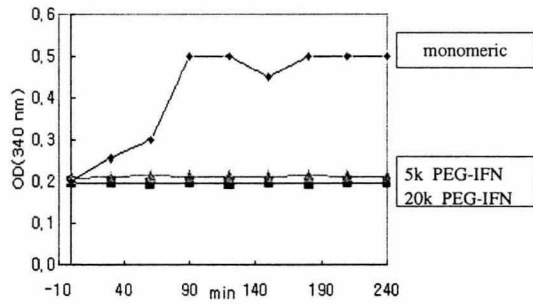


Figure. 3 Thermal stability test at 50°C.

Table 1. Biological activity and immunogenicity

	Mean biological activity (MIU/mg)	Relative activity (%)	SD	C (%)	V Relative immunogenicity (%)
IFN	201.2	100.0	19.2	9.5	100
5kPEG-IFN	141.3	70.6	37.0	26.0	46
10kPEG-IFN	110.6	55.3	-	-	21
20kPEG-IFN	43.0	21.3	-	-	11