

수용성 고분자물질-단백질 접합체의 합성 및 응용

용철순[†] · 손영택*

영남대학교 약학대학, *덕성여자대학교 약학대학
(1993년 11월 13일)

Conjugation of Protein and Peptide Drugs with Hydrophilic Polymers and Their Applications

Chul-Soon Yong[†] and Young-Taek Sohn*

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 713-749, Korea
*College of Pharmacy, Duk Sung Women's University, Seoul 132-714, Korea
(Received November 13, 1993)

Since the advent of recombinant DNA technology coupled with other biotechnology a variety of therapeutically effective proteins and peptides have been extensively investigated and many of them are now on clinical trial. They, however, suffer from some problems such as immunogenicity, antigenicity, instability and short half-life in circulation due to their proteinous natures. These drawbacks can be overcome successfully by conjugating proteins and peptides with hydrophilic polymers such as polyethylene glycol (PEG), albumin or dextran. The resulting soluble conjugates showed reduced antigenicity and immunogenicity, increased circulatory half-life, enhanced stability against proteolytic degradation. Comparing with the unmodified proteins and peptides, the therapeutic potential of conjugates is greatly enhanced. Clinical applications of these conjugates have shown promising results for the future use.

Keywords—Protein-polymer conjugate, Polyethylene glycol, Dextran, Stability, Half-life, Immunogenicity

단백질 및 펩티드 약물은 경구투여시 위장관에서 단백질분해효소 등에 의해 신속하게 분해되어 불활성화된다. 비록 효소에 의한 분해에 안정하다라도 분자량이 커 장관 벽을 통해 흡수되기가 어렵다. 그러므로 이러한 약물의 투여 경로로 경비,^{1,2)} 설하,^{3,4)} 질내⁵⁻⁸⁾ 및 직장⁹⁾ 등에 대한 다양한 연구가 진행되어 왔으나 변화가 많고 낮은 생체이용률 때문에 모든 단백질 및 펩티드 약물의 일반적인 투여경로로 사용될 수 없는 한계점을 가지고 있다.¹⁰⁻¹²⁾ 결과적으로 현재까지 단백질 및 펩티드 약물의 가장 일반적인 투여경로는 피하, 근육, 정맥주사 등이다.¹³⁾ 그러나 대부분의 경우 치료효과를 갖는 단백질 및 펩티드

약물은 짧은 생체반감기를 가지고 있으므로 효과적인 치료효과를 얻기 위해 자주 주사해야 하는 단점이 있으며, 혈중에서 불안정하기 때문에 임상적 사용에 커다란 제약을 받고 있다.¹⁴⁾ 혈액내에서의 반감기가 몇초 내지 몇분으로 매우 짧은 이유는 간이나 신장에서의 신속한 소실을 들 수 있다.^{15,16)} 이러한 문제점을 극복하기 위해 단백질을 변형시켜 물리화학적 혹은 생물학적 특성을 바꾸어 독성을 줄이거나 최소화함으로써 효능을 증진시키거나 흡수를 개선시킬 수 있다.^{17,18)}

임상적으로 광범위하게 사용되는 인슐린이나 혈액응고인자인 Factor VIII 등처럼 재조합 DNA 기술

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

및 유전공학¹⁹⁾의 발달에 힘입어 다양한 단백질과 펩티드가 현재 치료목적에 이용하거나 임상시험 중에 있다.²⁰⁾ 과거 치료제로 사용되었던 대부분의 단백질 약물은 사람으로부터 얻지 않았으므로 반복사용시 종종 면역반응을 야기시켜 과민성을 나타내거나 극심한 경우 사망을 초래하기도 하였다.²¹⁾ 면역반응은 단백질 약물의 클리어런스를 증가시키며 약효를 지속시키기 위한 용량의 증가는 다시 급격한 면역반응을 유발하여 용량을 더욱 증가시켜야 하는 악순환을 거듭하게 만든다. 사람에서 얻은 단백질 약물은 최소한 이러한 면역반응에 의한 문제를 일으키지는 않는다. 클로닝 기술을 이용하여 human recombinant protein의 생산이 가능하게 된 이후 현재 임상시험 중이거나 FDA의 허가를 기다리는 많은 단백질 약물이 있다.²²⁾ 이러한 human recombinant protein을 사용한 치료방법은 면역반응에 의한 문제는 해결할 수 있으나, 짧은 생체반감기와 낮은 안정성으로 인해 필요한 치료효과를 위해 다량의 단백질을 사용해야 하는 단점을 극복할 수 없다. 이러한 단백질 약물의 여러 문제점을 해결하기 위해 새로운 약물전달 방법이 고안되었으며, 펩티드나 단백질 약물의 여러 문제점을 해결하기 위해 새로운 약물전달 방법이 고안되었으며, 펩티드나 단백질의 생체반감기를 연장시키기 위해 크게 두 가지 방법이 시도되었다.

첫째, 고분자매트릭스,²³⁾ 리포솜²⁴⁾ 그리고 삼투압 펌프²⁵⁾ 등의 서방성 약물전달계에 펩티드나 단백질을 집어 넣어 사용하며, 일반적으로 단백질의 특성을 변화시키지 않고 서서히 약물을 방출하는 방식을 취하고 있다.

두번째 방법은 펩티드나 단백질을 PEG,²⁶⁾ 덱스트란,²⁷⁾ 그리고 알부민과²⁸⁾ 같은 수용성 고분자물질과 공유결합시키는 방법으로 콜로이드의 표면에 수용성의 고분자물질을 도입하여 입체적으로 안정한 표면을 만들면 높은 potential energy barrier가 형성되는 원리를 이용한다. 이러한 목적으로 단백질의 표면을 수식할 경우 혈관내에서의 내성을 증진시킬 수 있으며 이것은 주로 다른 거대분자들이 에너지 면에서 작용부위로의 접근이 쉽지 않도록 표면을 변화시키기 때문이다. 이러한 단백질 약물의 안정성을 높이기 위한 목적에 사용되는 합성 혹은 천연의 고분자물질로 poloxamer류, poloxamine류, 면역글

로불린 G, carboxymethylcellulose, natural xanthan류과 sorbitan류 등도 사용될 수 있으며,²⁹⁾ 단백질이나 효소와 접합체를 형성시킬 수 있다.^{30,31)}

수용성 고분자물질과 공유결합시키는 방법은 원래 면역성을 감소시킬 목적으로 개발되었으며 PEG를 사용해 인터루킨-2,³²⁾ 카타라제, 알기나제, 아스파라기나제,³³⁾ 유로키나제, 유리카제 및 superoxide dismutase(SOD)³²⁾ 등 다양한 약물 및 단백질 약물의 접합체가 합성되어 특성변화가 연구되었다.^{1,2)}

이렇게 면역성이 없는 친수성의 고분자 물질로 수식된 접합체는 반복투여를 위해 면역성이 없거나 작아야 하며, 일반적으로 원래의 단백질에 비해 *in vivo* 및 *in vitro*에서 안정하고,³³⁾ 단백질분해효소에 의한 불활성이 감소하며, 혈중 반감기가 길어지고 독성이 감소하고, 면역반응성이 감소하였다.^{32,34-40)} 약물동태학적 및 약물동력학적 생체반감기의 증가는 접합체를 형성한 단백질이 단백질분해효소에 대한 안정성이 증가하고 또한 분자량의 증가로 인해 신장에서의 클리어런스가 감소하기 때문이며⁴¹⁾ 이러한 접합체의 치료효능 또한 크게 증진되었다.

접합체의 응용

항암 효소

이 분야에서 가장 광범위하게 연구되고 있는 효소인 아스파라기나제는 임상시험에서 알레르기반응과 아나필락시스 쇼크를 유발시키는 문제점이 보고되었다.⁴²⁻⁴⁴⁾ 또한 아스파라기나제는 생체반감기가 길지 않아 충분한 약효 유지를 위해 빈번히 주사해야 하는 단점을 가지고 있어⁴³⁾ 최근 이러한 문제점을 보완하기 위해 mPEG를 공유결합시킨 아스파라기나제가 급성 임파아구성 백혈병,⁴⁵⁾ 개의 임파육종 그리고 비 Hodgkin's 임파종의 치료제로 각광을 받기 시작하였다. MacEwen 등⁴⁶⁾은 개의 임파종 모델에 있어서 PEG로 수식된 아스파라기나제가 원래의 효소에 비해 효과가 있음을 보고하였으며 아스파라기나제에 대한 항체가 효소의 활성을 감소시키지는 않지만⁴⁷⁾ 체내에서의 소실속도를 증가시킬 수 있음을 보고하였다.⁴⁸⁾ Fuertges 등⁴⁹⁾에 의하면 mPEG-아스파라기나제를 사람에게 투여하였을 때 반감기가 20시간에서 357시간으로 연장되었고 현저하게 과민반응이 줄어들거나 면역반응을 보이지 않았다.⁵⁰⁾

PEG를 결합시킨 아스파라기나제를 악성 임파종을 지닌 개에 단독 혹은 다른 화학요법제와 병용하여 복강주사시 높은 농도(1200 IU/kg)에서 안정성을 나타내며 큰 부작용 없이 치료효과가 있음이 입증되었다.⁵¹⁾ T70-아스파라기나제 접합체는 50%의 활성을 가지고 있고 트립신과 키모트립신에 대해 안정하였으며 원래의 반감기(8시간)에 비해 연장된 반감기(55.9시간)를 나타내었다.⁵²⁾

L-아스파라기나제-알부민 접합체는 한개의 효소당 12개의 알부민이 공유결합해 있으며 원래의 효소와 비교시 트립신에 의한 분해에 안정하며 C3HED 임파육종을 갖는 C3H/HeJ 마우스의 수명을 연장해 주었다.⁵³⁾

알기나제,⁴⁰⁾ 카르복시펩티다제,^{55,56)} G 글루타미나제-아스파라기나제 및 페닐알라닌, 암모니아리아제³⁶⁾ 등에 mPEG나 텍스트란을 결합한 암치료제의 개발에 대한 많은 연구가 진행중이다. PEG 5,000을 사용한 알기나제-접합체는 마우스에서 반감기가 1시간 미만에서 12시간으로 연장되면서 면역성을 소실하였으며⁴⁰⁾ 글루타미나제-아스파라기나제를 접합체로 만들 경우 반감기가 2시간에서 24시간으로 연장되어 L5178Y 암을 가지고 있는 BDF₁ 마우스의 수명을 연장시켰다.⁵⁶⁾

효소보충요법

특정한 효소가 부족하거나 결핍된 경우 특별한 질병을 유발시킬 수 있으며 효소보충요법으로 치료가 가능하다. 아테노신디아미나제를 mPEG로 변형시켜 아테노신디아미나제 결핍을 보여 주는 severe combined immunodeficiency disease(SCID)치료에 사용할 수 있다.⁵⁷⁻⁵⁹⁾

Levy 등⁵⁹⁾은 아테노신디아미나제 결핍 환자에게 PEG-아테노신디아미나제 접합체를 근육주사하여 아테노신디아미나제 결핍에 기인하는 제증상을 완화시켰다.

항산소독성 효소

산소대사물에 의한 독성을 방지하기 위해 방어효소인 SOD나 카타라제가 산소독성과 관련된 여러 질병의 치료 및 예방에 효과가 있음이 보고되어 왔다. 그러나 이러한 효소의 치료제로서의 가능성은 면역반응 유발 및 짧은 생체반감기에 의해 많은 제한을 받아 왔다.

SOD는 흰쥐에서의 반감기가 6-10분이고, 카타라

제는 23분이었다.⁶⁰⁾ 그러나 mPEG를 결합시킬 경우 반감기가 40시간까지 연장되었으며,^{32,39)} 사람의 경우 근육주사로 8.5일, 정맥주사로 4.4일까지 반감기를 연장할 수 있었다.⁴⁹⁾ McGoff 등⁶¹⁾은 SOD-PEG 접합체의 특성과 체내동태를 다양한 방법으로 규명하였다. White 등⁶²⁾은 항산화효소에 PEG를 결합시켜 흰쥐를 사용한 폐에서의 산소독성을 감소시켰으며, 피하에 이식한 삼투압 펌프를 사용해 10일 혹은 20일 동안 PEG를 공유결합시킨 SOD와 카타라제를 투여할 경우 석면으로 유발시킨 랫트의 염증모델에 효과가 있었다.⁶³⁾ 또한 급성 염증에 효과를 나타내는 PEG-SOD는 랫트를 사용한 만성 염증 모델인 adjuvant 관절염에도 항염증 작용을 지속적으로 나타내었으나 원래의 SOD는 효과가 없었다.⁶⁴⁾ Conforti 등⁶⁵⁾에 의하면 PEG-SOD는 흰쥐를 사용한 카라게닌 늑막염에 항염증 작용을 지속적으로 나타내고 늑막 삼출액으로 확산될 수 있었다. 소간의 SOD를 알부민과 수용성 결합체를 만들 경우 70%의 활성을 유지하였으며 반감기는 6분에서 15시간으로 연장되었고 면역반응성이 감소되어 카라게닌을 사용한 흰쥐의 염증모델에서 탁월한 항염증작용을 나타내었다.⁶⁶⁾

Liu 등⁶⁷⁾은 PEG-SOD와 PEG-카타라제를 흰쥐를 사용한 뇌 허혈증에 정맥주사로 투여하여 경색된 부피를 줄일 수 있었다. 개를 사용한 모델에서 SOD-PEG접합체는 재혈류에 기인하는 심근경색에 효과가 있었으며,⁶⁸⁾ 마취한 흰쥐에서 재혈류에 기인하는 부정맥에 지속적인 효과를 나타내었다.⁶⁹⁾ Lehman 등⁸¹⁾은 허혈이 발생하기 24시간 전에 PEG-SOD를 투여하여 재혈류시의 독성을 경감시킬 수 있었다.

Asplund 등⁷⁰⁾은 streptozotocin으로 유발시킨 당뇨병에 PEG-SOD가 부분적으로 억제효과가 있음을 보고하였다. 돼지의 endotoxemia에 PEG로 수식된 SOD와 카타라제가 효과가 있었다.⁷¹⁾ Suzuki 등⁷²⁾은 기니아피그의 septic lung injury에 PEG-SOD가 효과가 있음을 보고하였다.

PEG를 효소의 표면에 수식할 경우 SOD와 카타라제의 생체반감기를 연장시키고 면역성을 감소시키며 단백질분해에 대한 안정성을 증가시킬 뿐 아니라, 배양된 상피세포내로 효소가 이입되기 쉬워진다. 이것은 PEG가 표면활성화 특성이 있어 세포융합을

유도하기 때문이며 이러한 특성을 이용해 세포에 결합해 막투과가 어려운 효소의 투과를 촉진시킬 수 있을 것이다.⁷³⁾

적혈구 대용물질

헤모글로빈을 적혈구 대용으로 산소를 운반하기 위해 사용할 수 있으나 신장을 통해 신속하게 제거되는 단점을 극복하기 위해 mPEG⁷⁴⁾나 polyanionic 고분자물질⁷⁵⁾을 공유결합시켜 반감기를 연장할 수 있다. Iwasaki 등⁷⁶⁾은 헤모글로빈-이눌린 접합체를 사용할 경우 흰쥐에서 3시간의 반감기가 21시간으로 연장되고 산소운반능력이 5배 증진하여 혈액대용물로 이용될 수 있음을 보고하였다.

항혈전 효소

스트렙토키나제는 강력하게 면역반응을 유발할 수 있는 박테리아성 단백질이며 치료효과를 얻기 위해 처음 스트렙토키나제를 투여한 2주후 면역반응을 일으키지 않는 것이 필요하다.⁷⁷⁾ 이러한 목적으로 개발된 아실-플라스민-스트렙토키나제 접합체는 활성부위가 혈장내 프로테아제 저해제로부터 보호받고 있는 표적지향성 혈전용해제로 사용될 수 있다. 그러나 원래의 스트렙토키나제를 임상적으로 사용할 경우 이 약물의 혈전용해력은 스트렙토키나제에 대한 항체로 인해 소실될 수 있다. Tomiya 등⁷⁸⁾에 의하면 이러한 접합체를 사용할 경우 항체에 의한 중화반응이 현저히 감소하였다. Rajagopalan 등⁷⁹⁾은 스트렙토키나제-PEG 접합체를 만들어 면역반응의 감소와 반감기의 증가로 혈전성 질환에 효과적인 치료제로 사용될 수 있음을 보고하였으며, Berger 등⁸⁰⁾은 재조합 tissue plasminogen activator와 PEG를 결합하여 반감기를 5분에서 16분으로 증가시키고 면역성을 감소시켜 혈전용해제로서의 가능성을 보고하였다.

기타

PEG를 공유결합시켜 물리화학적 혹은 생리화학적 특성의 변화를 연구한 단백질 약물로 칼시토닌, 인슐린, 소의 성장호르몬, 인터루킨-2⁸¹⁾, 항체⁸²⁾ 등을 들 수 있다. *Escherichia coli*에서 얻은 재조합 인터루킨-2는 중성 pH에서 용해도가 낮으며 짧은 반감기를 가지고 있으나 PEG로 수식하여 마우스 Meth A 종양 모델에 적용할 경우 반감기와 효능이 증가하였다.⁸²⁾

빌리루빈-옥시다제는 빌리루빈을 biliverdin으로

전환시키며 고빌리루빈혈증 치료에 사용된다. PEG-빌리루빈-옥시다제 접합체는 황달을 나타내는 Gunn 흰쥐에서의 반감기를 2.5분에서 190분으로 연장시키며 항원반응을 감소시켜 고빌리루빈혈증에 사용될 수 있음을 시사한다.⁸³⁾

Maeda 등⁸⁴⁾은 수용성 중합체인 styrene/maleic acid 공중합체를 항암제인 neocarzinostatin에 공유결합시켜 지용성으로 만들 경우 화학적/생물학적 안정성을 증진시켜 암치료에 효과적으로 사용될 수 있음을 보고하였다.

단백질 약물 외에도 텍스트란을 항암제인 다우노루비신과 결합시켜 독성을 감소시키는 데 이용할 수 있으며⁸⁵⁾ mitomycin C-텍스트란 접합체의 체내분포는 분자량의 크기 및 전하에 따라 크게 영향을 받는다. 예를 들어 영전하를 띤 접합체는 간 세포표면에 쉽게 흡착되며 이것은 정전기력에 기인하는 것으로 생각된다.⁸⁶⁾

Takakura 등⁸⁷⁾에 의하면 대두 트립신 저해제를 PEG이나 텍스트란과 접합체를 만들어 마우스를 사용한 모델에서 트립신-유발 쇼크와 흰쥐를 사용한 급성췌장염 모델에 효능이 있었다.

접합체의 합성방법

1977년 Abuchowski 등³⁴⁾이 monomethoxy PEG (mPEG)를 단백질에 공유결합시키는 방법을 보고한 이래 다양한 방법이 개발되어 왔다.^{26,88)} PEG는 선형으로 전하가 없고 면역성이 없으며 유연성이 있고 다양한 분자량을 가지고 있다.^{89,90)} 인체에 투여시 매우 낮은 독성을 나타내며 분자량 1000-6000의 PEG는 대부분 신장을 통해 배설된다.⁸⁹⁾ 일반적으로 HO-(CH₂-CH₂)_n-OH와 같은 구조를 갖고 있으며 혈액에 적합성을 나타낸다. PEG에 있는 두개의 수산기가 접합체간의 가교형성을 일으킬 수 있으므로 이러한 문제를 극복하기 위해 PEG의 monofunctional 유도체인 mPEG를 사용하는 것이 바람직하다. 접합체형성은 세포가 효소를 포획하고 융합하는 것을 촉진한다.⁵¹⁾

수산기를 가지고 있는 고분자물질을 결합시키는 가장 일반적인 방법은 단백질과 고분자물질 사이에 공유결합이 형성될 수 있도록 수산기를 충분히 활성화시키는 것이다. 활성화시키는 가장 일반적인

방법은 단백질에 존재하는 친핵체와 반응을 하기 쉽게 친전자성 기를 고분자물질에 도입하는 것이다. 이때 단백질의 화학적 특성과 활성이 손상되지 않도록 세심한 조건하에서 결합반응을 진행시켜야 한다. 리신의 ϵ -아미노기와 N-말단 아미노기가 PEG나 텍스트란의 활성화된 수산기와 가장 흔히 결합하는 단백질의 부분이다. 때때로 카르복실기가 사용되기도 한다. 대부분의 경우 mPEG를 활성화시켜 반응할 수 있는 기능을 도입한 후 단백질의 특정부위에 결합시키는 방식을 사용한다. 가장 보편적으로 변형시키는 부위는 아미노기이며, mPEG를 활성화시키는 물질로는 trichloro-s-triazine(cyanuric chloride)³⁴, carbonyldiimidazole,⁹¹ succinic anhydride,³⁵ 및 succinimidyl carbonate 등을 들 수 있다. Succinic anhydride를 사용할 경우 활성이 잘 보존된 단백질을 얻을 수 있으나^{35,57,92} 형성된 에스테르 결합이 생리 pH에서 서서히 가수분해되거나, 혈중에서 비특이적으로 가수분해효소의 공격을 받는다. mPEG를 활성화시켜 우레탄 linker를 도입할 경우는 mPEG의 반응성이 낮으므로 mPEG-접합체를 얻기 위해 많은 시간이 필요하나 효소의 활성이 소실되지 않는 장점이 있다.⁹¹

결합제(coupling agent)의 선택, mPEG의 분자량,³³ 변화반는 정도,^{36,37,93} 변화시킬 단백질의 독특한 성질등에 의해 mPEG-접합체의 특성이 결정된다. 그러므로 필요한 특성을 지닌 mPEG-접합체를 얻기 위해 전술한 변수를 바꿀 수 있다. mPEG로 단백질에 결합시켜 안정성, 용해도, 활성, 생체반감기 및 면역반응의 변화를 얻을 수 있으며 이것은 mPEG가 단백질 주위에 막을 형성해 면역 세포와 반응하는 것을 입체적으로 방해하거나, 분해효소에 의한 불활성을 막아 주고,^{36,94} 단백질의 활성을 저하시키기 때문이다.³³ 또한 mPEG는 수용성이 크므로 단백질 주위에 수층을 형성하여 용해도를 증가시킨다.⁹⁵⁻⁹⁷ 대부분의 단백질이 mPEG와 공유결합하여 활성을 잃지만^{38,98,99} 생체반감기의 증가로 상쇄될 수 있다. 면역반응성은 단백질에 따라 다르게 감소하며 단백질 표면에 결합된 mPEG의 양에 영향을 받는다.^{33,38,98,99}

텍스트란은 불활성의 D-글루코스가 주로 α D(1→6)로 연결된 고분자물질이며 분자량이 40,000, 70,000 및 110,000인 텍스트란의 생체 반감기는 약

6-50시간이다. 고분자물질을 단백질에 결합시키기 위해 α -1,6-결합된 포도당 잔기를 다음과 같이 이용한다. Vicinal diol을 화학적으로 변형시킨 친전자성기를 만들어 단백질의 친핵성 아미노산 측쇄기와 반응할 수 있게 한다. Cyanogen bromide^{52,54,100}를 사용해 반응성이 강한 이미도카보네이트기를 도입하고 sodium periodate를 사용해 텍스트란을 산화시켜 디알데히드로 만드는 것이 가장 일반적인 방법이다.^{55,101,102} 당이 없는 단백질에 당을 결합시킬 경우 단백질의 반감기가 길어질 수 있는데 이것은 자연에 존재하는 당단백질이 당이 없는 단백질에 비해 안정하기 때문이다.¹⁰³ 또한 *E. coli*에 의해 생성된 인터페론-베타 등의 재조합 단백질은 당이 없으며 당이 있는 원래의 단백질과 상이한 체내동태를 나타낸다.¹⁰⁴ 텍스트란을 단백질에 결합시킬 경우 단백질의 안정성을 고려해야 한다. 리신 잔기와 당에 도입된 친전자성기 간에 반응이 일어나기 위해 염기성 pH의 수용성 완충액이 필요하다. *Erwinia carotovora* 및 *E. coli*에서 얻은 아스파라기나제는 많은 리신 잔기를 가지고 있으며 약염기성 조건에서 안정하다. pH 9.0에서 이 효소는 텍스트란 이미도카보네이트 혹은 디알데히드 텍스트란^{55,101,102}과 쉽게 반응한다. 효소와 텍스트란 이미도카보네이트 간의 반응은 한 과정에 일어나는 장점이 있으나 반응물질과 부산물이 독성이 강한 단점이 있다. 또한 이미도카보네이트가 수용액 중에서 불안정하며 활성화된 텍스트란은 즉시 겔 크로마토그래피를 이용해 정제한 후 즉시 사용해야 한다. 반면 periodate로 산화된 텍스트란은 이미도카보네이트에 비해 쉽게 만들 수 있고 수용액 중에서 안정하다. 그러나 이 방법의 단점은 중간물질인 칼비놀아민이 sodium borohydride에 의해 환원되어 안정한 알킬아민으로 존재해야 불가역적으로 단백질이 고분자물질에 결합되는 것을 방지할 수 있다. 텍스트란을 단백질에 결합시킬 경우 접합체는 약리학적 특성을 보유하면서 생체이용률과 효능에 차이를 나타낸다.

다음은 수용성의 고분자물질을 단백질에 결합하기 위해 일반적으로 많이 사용되는 방법들이다.

Epichlorhydrin 방법

텍스트란을 2.5% zinc borofluoride 용액에 녹인 후 이 용액에 epichlorhydrin을 가하여 반응시킨다. 침전시킨 활성 텍스트란을 아세톤으로 세척한 다음

STI를 함유한 pH 10 borate 완충액에 가한 후 4°C에서 밤새 교반하면서 반응시킨다.

시아노브로마이드 (CNBr) 활성화법¹⁰⁵⁻¹⁰⁷⁾

증류수에 녹인 텍스트란을 시아노브로마이드로 활성화시킨다. 혼합액을 증류수를 사용하여 초원심분리와 냉동건조한다. 단백질을 완충액에 녹인 다음 STI를 가한 후 밤새 동안 냉동건조된 활성화 텍스트란과 반응시킨다. 알칼리(pH 10-12) 상태에서 진행시키며 NaOH대신 triethylamine을 사용해 높은 결합율을 얻을 수 있다. 그러나 이 방법은 다음과 같은 단점이 있다. 시아노브로마이드는 독성이 매우 강하며 N-치환된 isourea유도체는 특히 다른 친핵체가 존재하는 경우 불안정하다.

카르보닐디이미다졸 (Carbonyldiimidazole) 활성화법¹⁰⁸⁾

PEG와 텍스트란은 N,N-카르보닐디이미다졸과 같은 카르보닐화제를 사용하여 활성화시킬 수 있으며, PEG 수산기의 imidazole carbamate 유도체를 만든 후 이렇게 활성화된 PEG를 단백질의 리신 잔기에 결합시킨다.⁹¹⁾

결합효능은 시아노브로마이드 활성화법과 비슷하다. 이 방법은 펩티드와 유사한 결합을 형성하며 반응시약의 독성이 작다. 수식된 정도는 PEG와 텍스트란의 활성화 정도에 따라 조절될 수 있으며, 이 방법에 의해 만들어진 접합체는 안정하며 전하를 띠지 않는다.

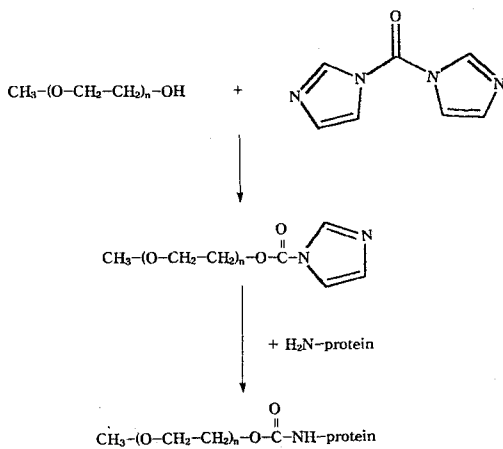


Figure 1—Modification of mPEG by 1,1'-carbonyldiimidazole and subsequent reaction with proteins.

Oxirane을 이용한 방법

1,4-Butanediol diglycidoxy ether과 같은 bis-oxirane은 알칼리 상태에서 수산기나 아미노기를 갖는 물질과 쉽게 반응하여 긴 사슬을 가지며 활성이 강한 수용성의 oxirane 유도체를 형성한다. 이 oxirane과 결합한 접합체는 매우 안정하다. 단백질을 PEG와 텍스트란에 결합시킬 때 사용되는 bifunctional reagent로 divinylsulphone¹⁰⁹⁾과 organic sulphonyl chloride가 있다.

Cyanuric Chloride (2,4,6-Trichloro-s-triazine)방법

PEG활성—Cyanuric chloride는 아미노기, 수산기와 안정한 결합을 형성한다. pH 9.0인 수용액에서 첫번째 염소는 4°C에서 쉽게 반응하며, 두번째는 25°C, 세번째는 80°C에서 반응한다. PEG를 cyanuric chloride와 반응시켜 2-O-methoxypolyethylene glycol-4,6-dichloro-S-triazine을 만든 후 단백질의 유리아미노기에 결합시킨다.

텍스트란 활성화¹¹⁰⁾—증류수에 녹인 텍스트란을 pH 7에서 cyanuric chloride와 반응시킨다. 침전된 텍스트란 유도체를 아세톤으로 세척한 후 단백질과 STI를 함유한 pH 10 borate 완충액에서 반응시킨다.

Cyanuric chloride를 사용할 경우 몇몇 효소의

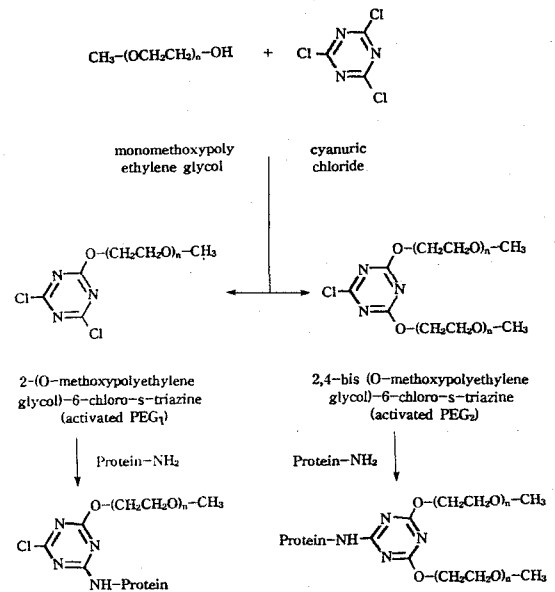


Figure 2—Modification of mPEG by cyanuric chloride and subsequent reaction with proteins.

경우 현저한 효능의 감소와^{33,36)} cyanuric chloride 유도체에 의한 독성의 증가가 보고되었다.⁹⁵⁾ 또한 cysteinyl기 혹은 tyrosyl기 등 아민이외의 기능기에도 결합할 수 있는 단점을 가지고 있다.⁹⁵⁾

Periodate 산화 방법

텍스트란의 카르보닐기와 단백질의 유리 아미노기 사이에 Schiff's base 결합을 형성한다. 이 방법은 sodium metaperiodate(NaIO_4)를 사용하여 텍스트란의 cis-vicinal 수산기를 산화시켜 알데히드 기능을 갖게 한다. 이러한 디알데히드가 pH 4-6에서 일급 아민과 반응하여 Schiff's base를 형성한 후 NaBH_4 (sodium borohydride)나 NaBH_4CN (sodium cyanoborohydride)로 환원되어 안정한 2급 아민을 형성한다. 이 방법으로 신속하고 간단하게 화학적으로 안정한 텍스트란-단백질 결합을 만들 수 있다.

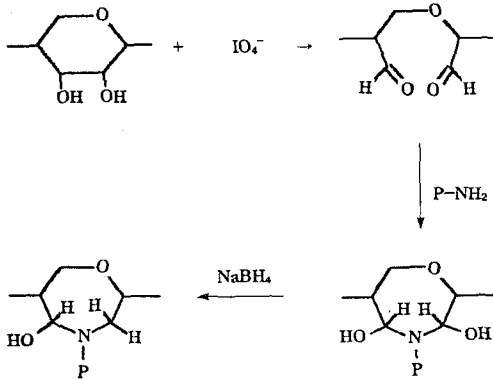


Figure 3—Periodate oxidation method of coupling carbohydrate with proteins.

Aminoethyl Carboxymethyl 방법

매우 강한 용액에서 chloroacetate와 다당류를 반응시켜 수산기를 O-carboxymethyl ether를 ethylene diamine과 반응시켜 아미드화한다. 생성된 aminoethyl carboxymethyl 유도체는 단백질의 카르복실기와 반응하여 접합체를 형성하게 된다.

Carbodiimide 방법

6-Bromohexanoic acid를 알칼리성 pH에서 텍스트란과 반응시켜 카르복실기를 도입시킨다.¹¹¹⁾ 카르복실기가 도입된 텍스트란을 냉동건조한다. STI를 녹인 용액에 텍스트란을 녹인다. 이 용액에 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide와 단백질

을 가한 후 pH를 5.0에서 5.5로 유지시키며 밤새 반응을 진행시킨다.

Glutaryl-N-hydroxysuccinimide Ester의 제조

단백질과 결합시킬 PEG를 활성화시키는 가장 일반적인 방법이다. 이렇게 만들어진 접합체는 단백질의 면역성을 감소시키고 생체반감기를 연장하려는 다양한 *in vivo* 실험에 사용되어 왔다.^{112,113)}

N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP) 방법

Eldjarn과 Jellum의 방법¹¹⁴⁾으로 합성된 aminoethyl-dextran을 SPDP와 반응시킨 후 과량의 시약을 평형투석하여 제거한다. sulfhydryl기를 dithiothreitol로 환원시켜 얻은 후 pH 4.5 acetate buffer 용액을 사용해 투석시킨다. STI를 SPDP를 사용하여 텍스트란과 동일한 조건으로 반응시킨 후 sulfhydryl기를 가지고 있는 텍스트란과 반응시킨다.

Succinimidyl carbonate와 반응한 mPEG는 단백질과 반응성은 낮으나 linker로서는 높은 선택성을 가지고 있다.⁹⁵⁾

전술한 방법에 의해 합성된 접합체는 투석법,⁹¹⁾ 미세여과법, gel filtration,¹¹⁵⁾ hydrophobic interaction chromatography 등¹¹⁶⁾에 의해 정제한다.

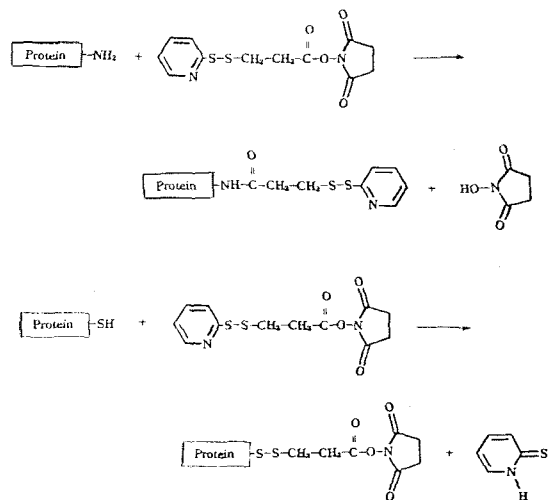


Figure 4—Modification of proteins by SPDP.

- a) Introduction of 2-pyridyl disulphide groups into a non-thiol protein by aminolysis.
- b) Introduction of N-hydroxy-succinimide ester into a thiol protein by thiol-disulphide exchange.

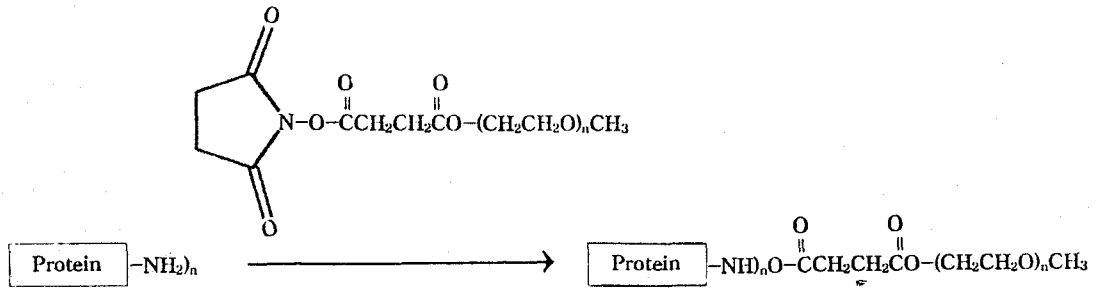


Figure 5—Modification of proteins with mPEG by succinimidyl succinate.

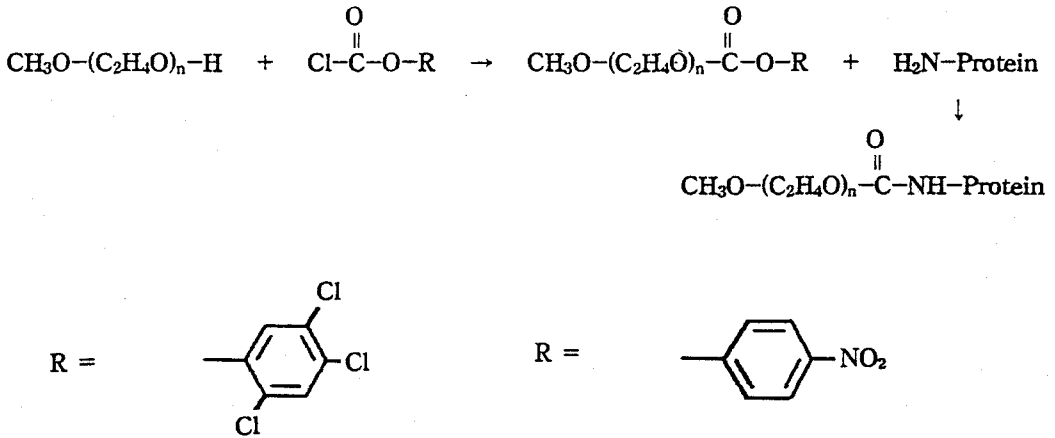


Figure 6—Modification of mPEG by phenylchloroformate and reaction of the phenylcarbonate derivative with proteins.

Phenylchloroformate Method¹¹⁷⁾

mPEG를 하나의 단순한 과정의 반응을 통해 단백질과 접합체를 형성할 수 있는 방법이다. 2,4,5-trichlorophenylchloroformate 혹은 p-nitrophenylchloroformate와 반응하여 PEG-phenylcarbonate 유도체는 알칼리성에서 안정하며 건조상태에서 1년 동안 보관할 수 있으며 활성기를 쉽게 정량할 수 있다.

접합체의 In Vitro 특성

PEG나 텍스트란과 공유결합된 효소가 단백질분해 작용에 안정성을 나타내는 여러 연구결과가 보고되었다. 트립신이 2시간내에 자가소화되는 반면 텍스트란 접합체는 같은 시간내에 분해되지 않았다.¹¹⁵⁾ 카타라제,³⁹⁾ 카르복시펩티다제 G2 그리고 유리카제¹¹⁸⁾ 등의 효소를 PEG나 텍스트란과 공유결합시킬

때 트립신에 의한 분해를 덜 받았다. PEG-카타라제는 트립신 뿐만 아니라 *Streptomyces griseus*에서 분리한 키모트립신이나 프로테아제에 의한 분해에도 안정하였다. 트립신에 의한 분해를 덜 받는 것은 트립신의 기질인 리신 및 알기닌이 PEG나 텍스트란과의 공유결합에 관여하기 때문이다. 그러나 방향성 아미노산이나 부피가 큰 측쇄기를 기질로 사용하는 키모트립신에 대해 접합체가 안정성을 나타내는 이유는 명확히 밝혀지지 않았다. PEG나 텍스트란이 단백질분해효소에 대해 입체적 장애물을 형성하지만 이것이 근본적인 작용기전을 설명하지는 못한다. Melton 등⁵⁴⁾은 훨씬 더 큰 항체가 텍스트란과 접합체를 형성한 이후에도 carboxypeptidase G2에 결합할 수 있음을 보고하였다. 그러나 Hadley와 Sato가 보고하였듯이 글루코노라톤 옥시다제를 PEG와 접합체를 만들어도 트립신에 의한 불활성화

로부터 보호할 수 없는 예외도 있었다.

열에 대한 안정성을 높이거나 유기용매에 대한 용해도를 증진시키기 위해 mPEG를 이용할 수 있다. mPEG를 특성 부위에 결합 혹은 비공유결합시키거나 mPEG의 분자량이나 전하를 조절하여 결합시킴으로서 원하는 특성을 갖는 단백질을 얻을 수 있으며, 불안정한 결합을 이용한 프로드럭으로도 이용할 수 있다. 트립신-텍스트란 공유체는 원래의 효소에 비해 60°C로 가열할 때 변성을 덜 받았다.¹¹⁵⁾ PEG-글루코노락톤 옥시다제는 37°C로 24시간 항온처리할 때 50% 이상의 활성을 유지한 반면 원래의 효소는 10분 이내에 50%의 활성을 잃었다. 그러나 PEG-카타라제 접합체의 경우 높은 온도에서 카타라제의 안정성에 PEG가 영향을 미치지 않았다.³⁹⁾ 즉 PEG나 텍스트란의 공유결합이 항상 효소의 열변성에 대한 안정성을 높이지는 않았다.³⁹⁾ 즉 PEG나 텍스트란의 공유결합이 항상 효소의 열변성에 대한 안정성을 높이지는 않았다. 트립신을 PEG 접합체로 만들 경우 열, 자가산화, 변성, 트립신 저해제인 ovomucoid 등에 안정성을 나타내었고¹¹⁵⁾ Burteau 등¹¹⁹⁾은 텍스트란에 페니실린 아마이드제를 접합체로 만들어 열에 안정성을 갖게 하였다. 일반적으로 효소는 유기용매에 녹지 않지만 불용성 단백질의 용해도를 증진시키기 위해⁵²⁾ 표면을 PEG를 변형시킨 리파제, 키모트립신, 카타라제와 펠록시다제는 다양한 유기용매에서 활성을 나타내었다.¹²⁰⁾

L-아스파라기나제를 cyanuric chloride를 사용하여 접합체를 합성한 경우 8%의 활성을 유지하였고 K_m 과 최적의 pH는 변하지 않았으며¹²¹⁾ 일반적으로 접합체 형성시 효소의 최적 pH에 큰 영향이 없었다.^{54,94,122,123)} 수용성 다당체에 결합된 아밀라제의 안정성은 증가되었으며 Marshall과 Rabinowitz¹¹⁵⁾는 트립신을 텍스트란과 공유결합시킬 때 K_m 값에 영향을 미치지 않는다고 보고하였다. 반면 Melton 등⁵⁴⁾은 카르복시펩티다제 G2를 텍스트란과 공유결합시킬 때 K_m 값이 약간 상승했으며 분자량이 작은 텍스트란이 효소에 많이 결합할수록 K_m 값이 상승한다고 보고하였다. β -글루코시다제와 α -갈락토시다제를 PEG로 접합체를 만들 경우 K_m 은 증가하며 V_{max} 는 감소하였다.⁹⁸⁾ 이것은 PEG가 렉틴 특이성 당잔기와 항원결정기를 은폐시키기 때문이다. 반면 polyvinylpyrrolidone¹²⁵⁾이나 polyvinyl alcohol¹²⁶⁾로

만든 접합체는 면역성을 나타낸다. 수용체 인식부위를 PEG로 은폐하여 특정부위로 효소가 전달되는 것을 방해할 수 있다. 예를 들어 α -갈락토시다제는 표면의 갈락토즈 잔기를 간세포가 선택적으로 인식할 수 있으나 PEG 수식에 의해 간으로의 표적화가 제한될 수 있다.¹²⁷⁾

이러한 문제를 해결하기 위해 PEG 말단부위에 특별한 인식기를 결합시키거나 리포솜 및 적혈구 ghost내에 접합체를 포획하여 사용할 수 있다.

접합체의 *In Vivo* 특성

생체반감기

PEG 혹은 텍스트란을 공유결합한 단백질과 펩티드 물질의 생체반감기는 현저하게 증가하며 일반적으로 원래의 효소와 상이한 체내동태를 나타낸다.¹²⁸⁾ Horse raddish peroxidase를 텍스트란과 결합시킬 경우 반감기가 증가하고 동시에 간에서의 uptake도 줄어들었으며¹²⁹⁾ 세포내 안정성이 증가하였다.¹³⁰⁾ 반감기가 증가한 것은 간의 쿠퍼 세포에 의한 uptake가 감소한 것에 다소 영향을 받는다. Katre 등¹¹⁶⁾에 의하면 PEG와 결합한 γ -인터투킨-2의 수용체 결합능력은 상실되지 않았으며 horse raddish peroxidase (만노스 함유 당단백질)는 간의 쿠퍼 세포에 있는 만노스-특이수용체에 대해 다소 결합능력을 상실하였다.¹³¹⁾ 반감기의 증가에는 몇 가지 요인이 관여한다. PEG 혹은 텍스트란 잔기에 의해 단백질 표면에 일종의 입체적 표면 장애물이 형성된다. Dowben 등은 비이온성 계면활성제 존재하에 수용성 특성을 나타내는 PEG와 결합한 단백질이 이온교환수지에 달라붙지 않음을 보고하였다. 계면활성제의 지용성 부분인 옥타페닐이 단백질의 지용성 부분에 달라붙는 반면 PEG 가닥은 단백질 주위의 용매로 돌출해 있을 것으로 생각하였으며 이것은 PEG-알부민 접합체의 특성을 연구한 Abuchowski 등³⁴⁾의 실험 결과와 비슷하다. PEG-알부민 접합체는 이러한 입체적 장애 때문에 이온교환 칼럼에 부착하지 않으며 접합체가 식세포에 쉽게 포획되지 않는 것도 같은 맥락으로 설명할 수 있다. 혈류에서 분자가 uptake되는 것은 혈장의 구성성분인 옵소닌에 의해 매개된다고 밝혀졌으며 이 옵소닌이 분자의 지용성부분과 결합한다. PEG 혹은 텍

스트란을 공유결합한 단백질과 펩티드 물질의 표면은 수용성을 갖게 된다. 그러므로 단백질의 흡수된 결합부위가 차폐되어 반응할 수 없는 상태로 존재하게 된다. 결국 PEG 혹은 텍스트란은 효소의 흡수된 작용을 방해하여 효소의 반감기를 연장시킬 수 있다. *In vitro* 연구에 의하면 PEG 혹은 텍스트란은 단백질의 단백질분해 반응을 받기 쉬운 부위를 보호하여 클리어런스를 감소시킨다.³⁷⁾ 이러한 관점에서, *in vitro*에서 PEG를 결합하더라도 트립신에 의한 단백질분해를 받는 글루코노락톤 옥시다제는 생체반감기의 증가를 보여 주지 못하였다. 반감기를 증가시키는 인자중의 하나는 신장에서 사구체 여과에 의한 클리어런스의 감소를 들 수 있다.^{91,132)} Knauf 등¹³²⁾은 γ -인터루킨-2와 70 kDa까지의 분자량을 갖는 몇몇의 PEG- γ -인터루킨-2를 이용해 분자량이 작은 단백질의 사구체 여과와 클리어런스와의 상관관계를 예측하였다.¹³³⁾ PEG- γ -인터루킨-2의 분자량이 클수록 사구체 여과가 감소하므로 신장에서의 배설속도가 감소하였다. PEG로 단백질과의 접합체를 만들 경우 PEG의 수화때문에 분자량에서 예측할 수 있는 것보다 더 큰 크기의 접합체를 얻게 된다. 수식의 정도를 크게 할수록 단백질의 크기가 증가하여 사구체 여과에 의한 손실을 줄일 수 있다. 즉 접합체의 유효한 크기는 수식정도와 사용된 PEG의 크기에 달려 있다. 텍스트란을 접합시키는 경우도 반감기는 사용된 텍스트란의 분자량에 영향을 받는다.¹³⁴⁾ 카르복시펩티다제 G와 알기나제를 텍스트란과 접합체를 만들어 정상적인 마우스와 암을 갖고 있는 마우스로 시험한 결과 반감기가 3.5시간에서 17시간으로, 14시간에서 12시간으로 각각 증가하였다.⁵⁵⁾ 수식을 받지 않은 카르복시펩티다제 G는 텍스트란 접합체에 비해 혈중에서 신속하게 제거되었으며(3.1시간) 정상적인 마우스에 있어서, 일반적으로 텍스트란의 분자량이 증가할수록 반감기가 증가하였다. 즉 T40 접합체는 14.3시간, T150 접합체는 45.6시간의 반감기를 갖는다.⁵⁴⁾ 전술한 모든 인자와 면역반응의 감소로 생체반감기가 증가한다. L-아스파라기나제를 텍스트란과 접합체를 형성하여 토끼에 대해 실험한 결과 반감기가 7.5시간에서 28시간으로 연장되었으나 cyanogen bromide와 dinitrofluorobenzene의 독성으로 인해 적합한 방법이 아니었다.¹²⁹⁾ Kamisak 등¹²¹⁾은 L-아스파라기나제를 cyanuric ch-

loride를 사용하여 접합체를 합성하여 면역반응성을 감소시킴으로써 반감기가 2.9시간에서 56시간으로 증가되는 것을 보고하였다.

엽산을 제거하여 항암제로 사용되는 카르복시펩티다제 G2를 분자량 70,000의 텍스트란과 공유결합된 접합체는 마우스에서의 반감기가 3.1시간에서 16.3시간으로 연장되며, 트립신과 키모트립신에 안정하고⁵⁴⁾ 원래의 효소와 상이한 분포와 체내동태를 보여 주었다.¹³⁵⁾ 리포솜내의 hydrolase β -glucuronidase가 결핍되는 경우 과도하게 세포내에 acid mucopolysaccharides의 축적이 일어난다. PEG와 결합된 hydrolase β -glucuronidase는 단백질분해에 안정하고 면역반응이 감소하였으며 매우 짧은(<1시간) 반감기가 10시간 정도로 증가하였다.³⁷⁾

Beauchamp 등⁹¹⁾은 PEG를 결합시킨 접합체를 만들어 락토페린의 반감기를 3에서 60분으로, SOD의 반감기 3.5분에서 9시간 이상으로 연장시켰으며 SOD, 락토페린 및 α_2 -마크로글로불린-트립신의 PEG 접합체가 보통 2상의 약물동태를 나타내는 것을 관찰하였다.

인터페론을 N-succinilimidyl 3-(2-pyridylthio) propionate(SPDP)를 사용하여 알부민 접합체를 제조한 후 마우스에서의 클리어런스를 비교할 경우 접합체의 클리어런스가 원래의 인터페론보다 다소 작았고 알부민 접합체의 반감기는 인터페론보다는 알부민(10일)과 비슷하였다. 그러나 접합체의 클리어런스는 인터페론의 클리어런스와 비슷하였다.¹³⁶⁾

면역반응성

임상적으로 사용할 단백질성 약물을 유전공학적으로 생산하는 것이 가능하지만 이러한 약물은 종종 면역반응에 의한 부작용을 일으킬 수 있다.¹³⁷⁾ PEG나 텍스트란 등 수용성 고분자물질을 효소에 공유결합시켜 효소의 기능을 최대 한도로 보유하면서 효과적으로 면역성을 감소시킬 수 있다.^{54,91,118,129)} PEG 혹은 텍스트란과 공유결합한 단백질을 항체를 만들지 않거나 현저히 감소된 면역반응성을 나타낸다.^{138,139)} Lee 등¹⁴⁰⁾은 PEG를 항원으로 작용하는 난 알부민에 결합시켜 면역반응성이 감소하는 것을 보고하였다. 또한 PEG 결합으로 접합체를 형성한 소혈청 알부민은 토끼에서 반응을 일으키지 않거나³⁴⁾ 면역반응성이 현저히 감소되었다.¹⁴¹⁾ 물론 이것은 충분한 PEG가 단백질에 결합한 경우이다. 단백질의

아미노기가 PEG에 의해 변화를 많이 받을수록 접합체의 면역반응성은 감소한다. 수용성이 강한 항원이 대식세포에 의한 processing를 거친 후 MHC-I에 의해 encoding되어 적절한 유전자 물질과 연계되어 T 세포 표면에 전달되어야 비로소 T-helper cell은 활성화 된다. 반면, 대식세포에 의한 processing이 T-suppressor cell의 활성화에는 필요하지 않다.^{142,143} Lee와 Sehn⁹⁰은 PEG를 특정 알레르겐에 공유결합시켜 면역반응을 일으키지 않으면서 DNP-OA나 RAG에 일차 혹은 이차적 IgE 반응을 억제할 수 있었다. 이 접합체는 IgM나 IgG 반응도 감소시켰으나 IgE 반응에 비해서 매우 작았다. 이러한 면역반응의 감소는 주로 T suppressor 세포의 활성화 기인하는 것으로 밝혀졌으며 접합체가 면역반응을 억제하는 것은 대식세포에 의한 processing에 저항력을 지니고 있어 반감기가 증가하기 때문이다.

Savoca등 알기나제가 PEG 공유결합에 의해 비항원적, 비면역적이 되며, PEG-알기나제는 원래의 효소에 대해 내성을 일으키지 않는다고 보고하였다. 이와 비슷한 결과가 PEG와 결합한 카타라제에 대해서도 보고되었다.³⁹ PEG(M.W. 5000)-카타라제를 마우스에 반복주사할 경우 이 마우스는 원래의 카타라제에 대해서는 면역반응을 나타내었다. PEG 혹은 덱스트란을 공유결합한 단백질과 펩티드 물질의 대부분은 비면역성을 나타내었다. 그러나 몇몇의 경우 접합체는 실험동물이 원래의 항원에 대해 면역반응을 보이는 것을 억제할 수 있었다. Yasuda 등¹¹⁸은 유리카제를 PEG나 덱스트란으로 수식하여 면역반응을 보이는 것을 억제할 수 있었다. PEG 5000을 고노산혈증이나 통풍치료에 사용되는 urate oxidase에 공유결합시켜 면역반응의 감소 및 반감기의 연장⁹⁵을 볼 수 있었으며, 돼지의 췌장 elastase를 PEG 5000으로 접합체를 만들 경우 35% 활성을 유지하면서 면역반응성은 감소하였다.⁹⁹ 또한 PEG 5000은 트립신과 접합체를 형성하여 면역반응성을 감소시킬 수 있다.⁹⁴

접합체의 치료효능

면역 반응을 일으키는 단백질에 PEG와 덱스트란을 공유결합시켜 면역성을 감소, 조절 혹은 제거시킨 후 임상적으로 사용하려는 많은 연구가 진행

되어 왔다.¹⁴⁴ *E. Coli*로부터 유전공학적으로 얻어진 인터루킨-2¹⁴⁵는 암치료제로서 높은 가능성을 가지고 있다.^{146,147} 그러나 동물에서 얻은 인터루킨-2나 유전공학적으로 얻어진 인터루킨-2는 흰쥐와 마우스¹⁴⁸의 혈관에서 신속하게 제거되어 낮은 생체이용율을 나타내는 문제점을 가지고 있다. Katre 등^{116,149}은 γ -인터루킨-2의 생체이용율을 증가로 역가를 높여 단백질이 효과적인 약물로 사용될 수 있음을 시사하였다. 또한 그들은 γ -인터루킨-2를 PEG로 공유결합시켜 용해도를 증진시키고 혈액중에서의 클리어런스를 감소시켜 마우스의 Methy A murine sarcoma 치료시 원래의 γ -인터루킨-2에 비해 60 배 정도 효능이 증가함을 보고하였다.

헤모글로빈 용액을 혈액대용물로 사용하려는 가능성은 오래전부터 연구되어 왔으며 스트로마가 없는 헤모글로빈에 대한 연구는 임상실험의 단계에까지 이르렀다. 그러나 혈액내로 주입된 헤모글로빈은 크기가 작아 신장 및 여러 대사경로를 통해 신속하게 제거되어 임상적으로 사용하기에는 문제점이 있다. Tam 등¹⁵⁰은 수용성 헤모글로빈-덱스트란 공유체를 혈액대용물로 개발하였다. 이 접합체는 가역적으로 산소를 결합하거나 방출하며 긴 생체반감기를 가지고 있어 헤모글로빈의 기능적 수명을 연장시킬 수 있다.

Hershfield 등¹⁵¹은 아테노신디아미나제 결핍증과 SCID(severe combined immunodeficiency disease)를 나타내는 두 어린이를 PEG-아테노신디아미나제로 치료하여 아테노신디아미나제 결핍 증세를 완전히 없애고 몸무게 및 감염증의 회복등 임상적 호전을 보고하였다. PEG-아테노신디아미나제의 반감기는 수 분에서 24시간으로 증가하였고 면역반응성이 감소하였으며 근육주사시 신속히 흡수된 후 48-72시간의 반감기를 나타내었다.⁵⁷

고노산혈증 치료를 위해 PEG-유리카제를 투여하여 혈중 요산을 정상치로 낮출 수 있었으며¹⁵² Lee와 Sehn은¹⁴⁰ 알레르기반응 치료에 PEG로 수식한 접합체가 뛰어난 효능이 있음을 보고하였다.

L-아스파라기나제-PEG 접합체를 기관지암을 지닌 환자에게 1000 IU/m²을 정맥주사시 반감기가 2시간에서 72시간으로 연장되었으며 면역반응이 감소된 접합체는 혈액중의 L-글루타민이나 L-아스파라긴을 고갈시켜 병세의 호전을 가져 왔다.¹⁵³ T70

접합체를 환자에게 사용하여 혈중 아스파라긴을 원래의 효소에 비해 장시간(7일에서 100일)동안 감소시킬 수 있었으며 이러한 접합체를 사용할 경우 효소에 대한 면역반응인 치명적인 과민반응을 최소화시킬 수 있으며 환자에게 편리하게 투여할 수 있다.¹⁰¹⁾

기종치료에 사용되는 α 1-프로티나제 저해제를 PEG로 접합체를 형성해 반감기를 연장하여 대체 치료요법에 이용할 수 있다.¹⁵⁴⁾ Leonard 등¹⁵⁵⁾은 tissue plasmin activator와 스트렙토키나제를 PEG로 수식한 접합체의 임상적 이용에 대해 보고하였다. 이상과 같은 치료효능의 증진은 PEG나 텍스트란으로 접합체를 만들 경우 원래의 효소에 비해 면역반응성이 감소하며 생체반감기가 증가하여 생체이용율이 커지기 때문이다.

Cynthia 등¹⁵²⁾은 임상적으로 PEG로 수식한 *Arthrobacter protoformiae* 유리카제를 비 Hodgkin's 임파종을 갖는 환자의 고노산혈증을 치료하기 위해 처음 사용하였으며 근육주사시 신속히 흡수되어 요산의 혈중농도를 감소시켰다.

결 론

단백질 및 펩티드 약물의 대량생산과 사람의 효소에 대한 클로닝이 가능해짐에 따라 면역반응성을 감소시켜 이러한 약물의 임상적 사용이 가능하게 되었다. 그러나 이러한 약물의 대부분이 상대적으로 작은 분자량 때문에 사구체로 신속하게 여과되어 치료효과를 나타내지 못하는 경우가 많다. 또한 제제학적 측면에서 *in vivo* 및 *in vitro*에서의 안정성 증가가 요구되며 수용성 고분자로 수식하는 경우 이러한 여러 단점을 극복할 수 있다. 접합체를 경제적으로 만드는 방법의 개발과 보다 개선된 고분자물질의 개발은 여러 단백질 및 펩티드 약물의 치료제로서의 임상적 사용을 가능하게 할 수 있다.

문 헌

1) A.W. Petri, R. Seidel and J. Sandow, Pharmaceutical approach to long-term therapy with peptides, *Int. Cong. Series-Excerpta Medica*, **656**, 63-76 (1984).

- 2) P. Edman, E. Bjork and L. Ryden, Microspheres as a nasal delivery system for peptide drugs, *J. Controlled Release*, **21**, 165-172 (1992).
- 3) R. Anders, H.P. Merkle, W. Schurr and R. Ziegler, Buccal absorption of protirelin: an effective way to stimulate thyrotropin and prolactin, *J. Pharm. Sci.*, **72**, 1481-1483 (1983).
- 4) H.P. Merkle and G. Wolany, Buccal delivery for peptide drugs, *J. Controlled Release*, **21**, 155-164 (1992).
- 5) H. Okado, I. Zamazaki, Y. Ogawa, S. Hirai, T. Yashiki and H. Mima, Vaginal absorption of a potent luteinizing hormone-releasing hormone analog (leuprolide) in rats I: Absorption by various routes and absorption enhancement, *J. Pharm. Sci.*, **71**, 1367-1371 (1982).
- 6) H. Okado, I. Zamazaki, T. Yashiki and H. Mima, Vaginal absorption of a potent luteinizing hormone-releasing hormone analog (leuprolide) in rats II: Mechanism of absorption enhancement with organic acids, *J. Pharm. Sci.*, **72**, 75-78 (1983).
- 7) H. Okado, I. Zamazaki, T. Yashiki and H. Mima, Vaginal absorption of a potent luteinizing hormone-releasing hormone (euprolide) in rats III: Effect of estrous cycle on vaginal absorption of hydrophilic model compounds, *J. Pharm. Sci.*, **72**, 173-176 (1983).
- 8) H. Okado, I. Zamazaki, T. Yashiki, T. Shimamoto and H. Mima, Vaginal absorption of a potent luteinizing hormone-releasing hormone analog (leuprolide) in rats IV: Evaluation of the vaginal absorption and gonadotrophin response by radioimmunoassay, *J. Pharm. Sci.*, **73**, 298-302 (1984).
- 9) G.G. Liversidge, Rectal route of administration for peptides, *Biochem. Soc. Trans.*, **17**, 942-943 (1989).
- 10) V.H.L. Lee, Peptide and protein drug delivery systems, *Biopharm. Manuf.*, **1**, 24-31 (1988).
- 11) A.K. Banga and Y.W. Chien, Systemic delivery of therapeutic peptides and proteins, *Int. J. Pharm.*, **48**, 15-50 (1988).
- 12) L.L. Wearley, Recent progress in protein and

- peptide delivery by noninvasive routes, *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Sys.*, **8**, 331-394 (1991).
- 13) X.H. Zhou and A.L.W. Po, Peptide and protein drugs: II. Non-parental routes of delivery, *Int. J. Pharm.*, **75**, 117-130 (1991).
 - 14) V.H.L. Lee, Problems and solutions in peptide and protein drug delivery, *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, **3**, 80-89 (1991).
 - 15) T. Maack, Renal handling of low molecular weight proteins, *Am. J. Med.*, **58**, 57-64 (1985).
 - 16) D.C. Kim, Y. Sugiyama, H. Satoh, T. Fuwa, T. Iga and M. Hanano, Kinetic analysis of *in vivo* receptor-dependent binding of human epidermal growth factor by rat tissues, *J. Pharm. Sci.*, **77**, 200-207 (1988).
 - 17) H. Bundgaard, The utility of the prodrug approach to improve peptide absorption. *J. Controlled Release*, **21**, 63-72 (1992).
 - 18) J.W. Payne, Polymerization of proteins with glutaraldehyde. Soluble molecular-weight markers. *Biochem. J.*, **135**, 867-873 (1973).
 - 19) P.H. Abelson, Biotechnology: An overview, *Science*, **219**, 611-613 (1983).
 - 20) P. Goddard, Therapeutic proteins—A pharmaceutical perspective, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **6**, 103-131 (1991).
 - 21) M. Konard, Immunogenicity of proteins administered to humans for therapeutic purposes, *TIBTECH.*, **7**, 175-179 (1989).
 - 22) C. Holden, Drugs and biotechnology, *Science*, **248**, 964 (1990).
 - 23) R. Langer and J. Folkman, Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules, *Nature*, **263**, 797-800 (1976).
 - 24) C.R. Alving, Liposomes as carriers for vaccines. In: *Liposomes. From Biophysics to Therapeutics*, M.J. Ostro(Ed), New York, Marcel Dekker, pp 195-218, (1987).
 - 25) J.W. Fara, Osmotic delivery systems for research, *Meth. Enzymol.*, **112**, 470-484 (1985).
 - 26) J.M. Harris, Laboratory synthesis of polyethylene glycol derivatives, *Rev. Macromol. Chem. Phys.*, **C25**, 325-373 (1985).
 - 27) R. Axen and S. Ernback, Chemical fixation of enzymes to cyanogen halide activated polysaccharide carriers, *Eur. J. Biochem.*, **18**, 351-360 (1985).
 - 28) M.J. Poznansky, Enzyme-protein conjugates: New possibilities for enzyme therapy, *Pharmacol. Ther.*, **21**, 53-76 (1983).
 - 29) E. Tomlinson, Design of site-specific protein drugs, *Sci. Total Environ.*, **109/110**, 9-16 (1991).
 - 30) S. Mumtaz and B.K. Bachhawat, Conjugation of proteins and enzymes with hydrophilic polymers and their applications, *Ind. J. Biochem. Biophys.*, **28**, 346-351 (1991).
 - 31) F.F. Davis, G.M. Kazo, M.L. Nucci, and A. Abuchowski, Reduction of immunogenicity and extension of circulating half-life of peptides and proteins, In: V.H.L Lee(Ed). *Peptide and Protein Drug Delivery*, Marcel Dekker, New York, pp. 831-864 (1991).
 - 32) P.S. Pyatak, A. Abuchowski, F.F. Davis, Preparation of polyethylene glycol: superoxide dismutase adduct, and an examination of its blood circulating life and anti-inflammatory activity, *Re. Comm. Chem. Path Pharmacol.*, **29**, 113-127 (1980).
 - 33) Y. Ashihara, T. Kono, S. Yamazaki and Y. Inada, Modification of *E. coli* asparaginase with polyethylene glycol: disappearance of binding ability to anti-asparaginase serum, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **83**, 385-91 (1978).
 - 34) A. Abuchowski, T. Van Es, N.C. Palczuk, and F.F. Davis, Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol, *J. Biol. Chem.*, **252**, 3578-3581 (1977).
 - 35) A. Abuchowski, G.M. Kazo, C.R. Verhoest, T. Van Es, D. Kafkewitz, M.L. Nucci, A.T. Viau and F.F. Davis, Cancer therapy with chemically modified enzymes. I. Antitumor properties of polyethylene glycol-modified asparaginase conjugates, *Cancer Biochem. Biophys.*, **7**, 175-186 (1984).
 - 36) K.J. Wieder, N.C. Palczuk, T. Van Es, F.F. Davis, Some properties of polyethylene gly-

- col: phenylalanine ammonia lyase adducts, *J. Biol. Chem.*, **254**, 12579-12587 (1979).
- 37) P.J. Lisi, T. Van Es, A. Abuchowski, N.C. Palczuk, and F.F. Davis, Enzyme therapy: Polyethylene glycol: β -glucuronidase conjugates as potential therapeutic agents in acid mucopolysaccharidosis, *J. Appl. Biochem.*, **4**, 19-33 (1982).
 - 38) H. Nishimura, K. Takahasi, K. Sakurai, K. Fujinuma, Y. Imamura, M. Ooba and Y. Inada, Modification of batroxobin with activated polyethylene glycol: reduction of binding ability towards anti-batroxobin antibody and retention of defibrinogenation activity in circulation of preimmunized dogs, *Life Sci.*, **33**, 1467-1473 (1985).
 - 39) A. Abuchowski, J.R. McCoy, N.C. Palczuk, T. Van Es and F.F. Davis, Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase, *J. Biol. Chem.*, **252**, 3582-3586 (1977).
 - 40) K.V. Savoca, A. Abuchowski, T. Van Es and F.F. Davis, Preparation of a non-immunogenic arginase by the covalent attachment of polyethylene glycol, *Biochim. Biophys. Acta*, **578**, 47-53 (1979).
 - 41) D.H. Ho, N.S. brown, A. Yen, R. Homlmes, M. Keating, A. Abuchowski, R.A. Newman and I.H. Krakoff, Clinical pharmacology of polyethylene glycol-L-asparaginase, *Drug Metab. Disp.*, **14**, 349-352 (1986).
 - 42) C.T. Dellinger and T.D. Miale, Comparison of anaphylatic reactions to L-asparaginase derived from *E. coli* and *Erwinia* cultures, *Cancer*, **38**, 2843-1846 (1976).
 - 43) U. Fabry, D. Koerholz, H. Jurgens, U. Goebel and V. Wahn, Anaphylaxis to L-asparaginase during treatment for acute lymphoblastic leukemia in children—Evidence of a complement mediated mechanism, *Pediatr. Res.*, **19**, 400-408 (1985).
 - 44) D. Killander, A. Dahlwitz and L. Engstedt, Hypersensitivity reactions and antibody formation during L-asparaginase treatment of children and adults with acute leukemia, *Cancer*, **37**, 220-227 (1976).
 - 45) D.H. Ho and E. frei, Clinical pharmacologic studies of L-asparaginase. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **11**, 408-417 (1970).
 - 46) E.G. MacEwen, R.C. Rosenthal, L.E. Fox, A.S. Loar and I.D. Kurzan, Evaluation of L-asparaginase: polyethylene glycol conjugate versus native L-asparaginase combined with chemotherapy. a randomized double-blind study in canine lymphoma., *J. Vet. Intern. Med.*, **6**, 230-234 (1992).
 - 47) V. Wahn, U. Fabry, D. Koerholz, D. Reinhardt, H. Jurgens and U. Goebel, Modified pharmacokinetics of L-asparaginase from *E. coli* by the formation of specific antibodies to L-asparaginase of different immunoglobulin classes in children with acute lymphoblastic leukemia, *Pediatr. Pharmacol.*, **3**, 303-311 (1983).
 - 48) A.I. Goldberg, D.A. Cooney, J.P. Glynn, E.R. Homan, M.R. Gaston and H.A. Milman, The effects of immunization to L-asparaginase on antitumor and enzymatic activity, *Cancer Res.*, **33**, 256-261 (1973).
 - 49) F. Fuertges and A. Abuchowski, The clinical efficacy of polyethylene glycol-modified proteins, *J. Controlled Rel.*, **11**, 139-148 (1990).
 - 50) J. Kurtzberg, J.O. Moore, D. Scudieri and A. Franklin, A phase II study of polyethylene glycol (PEG) conjugated L-asparaginase in patients with refractory acute leukemias, *Proc. AACR*, **29**, 213 (1988).
 - 51) E.G. MacEwen, R. Rosenthal, R. Matus, A.T. Viau and A. Abuchowski, A preliminary study on the evaluation of asparaginase: Polyethylene glycol conjugate against canine malignant lymphoma, *Cancer*, **59**, 2011-2015 (1987).
 - 52) A. Kato, K. Shimokawa and K. Kobayashi, Improvement of the functional properties of insoluble gluten by pronase digestion followed by dextran conjugation, *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1053-1056 (1991).
 - 53) M.J. Poznansky, M. Shandling, M.A. Salkie, J. Elliott and E. Lau, Advantages in the use of L-asparaginase-albumin polymer as an an-

- titumor agent, *Cancer Res.*, **42**, 1020-1025 (1982).
- 54) R.G. Melton, C.N. Wiblin, R.L. Foster and R.F. Sherwood, Covalent linkage of carboxypeptidase G₂ to soluble dextrans. I. Properties of conjugates and effects on plasma persistence in mice. *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 105-112 (1987).
- 55) R.F. Sherwood, J.K. Baird, T. Atkinson, C.N. Wiblin, D.A. Rutter and D.C. Ellwood, Enhanced plasma persistence of therapeutic enzymes by coupling to soluble dextran, *Biochem. J.*, **164**, 461-464 (1977).
- 56) A. Abuchowski, T. Van Es, N.C. Palczuk, J.R. McCoy and F.F. Davis, Treatment of L5178Y tumor-bearing BDF₁ mice with a nonimmunogenic L-glutaminase-L-asparaginase, *Cancer Treat. Reports*, **63**, 1127-1132 (1979).
- 57) M.S. Hershfield, R.H. Buckley, M.L. Greenberg, A.L. Melton, R. Schiff, C. Hatem, J. Kurtzberg, M.L. Markert, R.H. Kobayashi, A.L. Kobayashi and A. Abuchowski, Treatment of adenosine deaminase deficiency with polyethylene glycol-modified adenosine deaminase, *N. Eng. J. Med.*, **316**, 589-596 (1987).
- 58) A.L. Kobayashi, R.H. Kobayashi, R.I. Schiff, J. Claasen and M.S. Hershfield, The use of bovine polyethylene glycol modified adenosine deaminase (PEG-ADA) in correcting the immunodeficiency in a child with severe combined immunodeficiency-adenosine deaminase deficiency (SCID-ADA(-)), *J. Allergy Clin. Immunol.*, **81**, 237 (1988).
- 59) Y. Levy, M.S. Hershfield, C. Fernandez-Mejia, S.H. Polmar, D. Scudieri, M. Berger and R.K. Sorenson, Adenosine deaminase deficiency with later onset of recurrent infections: response to treatment with polyethylene glycol modified adenosine deaminase, *J. Pediatr.*, **113**, 312-317 (1988).
- 60) J.T. Turrens J.D. Crapo and B.A. Freeman, Protection against oxygen toxicity by intravenous injections of liposome entrapped catalase and superoxide dismutase, *J. Clin. Invest.*, **78**, 87-95 (1984).
- 61) P. McGoff, A.C. Baziotis and R. Maskiewicz, Analysis of polyethylene glycol modified superoxide dismutase by chromatographic, electrophoretic, light scattering, chemical and enzymatic methods, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 3079-3091 (1988).
- 62) C.W. White, J.H. Jackson, A. Abuchowski, G. M. Kazo, R.F. Mimmack, E.M. Berger, B.A. Freeman, J.M. McCord and J.E. Repine, Polyethylene glycol-attached antioxidant enzymes decrease pulmonary oxygen toxicity in rats, *J. Appl. Physiol.*, **66**, 584-590 (1989).
- 63) B.T. Mossman, J.P. Marsh, A. Sesko, S. Hill, M.A. Shatos, J. Doherty, J. Petruska, K.B. Adler, D. Hemenway, R. Mickey, P. Vacek and E. Kagan, Inhibition of lung injury, inflammation and interstitial pulmonary fibrosis by polyethylene glycol-conjugated catalase in a rapid inhalation model of asbestosis, *Am. Rev. Respir. Dis.*, **141**, 1266-1271 (1990).
- 64) A. Conforti, P. Caliceti, L. Sartore, O. Schiavon, F.M. Veronese and G.P. Velo, Anti-inflammatory activity of monomethoxypolyethylene glycol superoxide dismutase on adjuvant arthritis in rats, *Pharmacol. Res.*, **23**, 51-56 (1991).
- 65) A. Conforti, L. Franco, R. Milanino, G.P. Velo, E. Boccu, E. Largajolli, O. Schiavon and F.M. Veronese, PEG superoxide dismutase derivatives: anti-inflammatory activity in carrageenan pleurisy in rats, *Pharmacol. Res. Commun.*, **19**, 287-294 (1987).
- 66) K. Wong, L.G. Cleland and M.J. Poznansky, Enhanced anti-inflammatory effect and reduced immunogenicity of bovine liver superoxide dismutase by conjugation with homologous albumin, *Agents Actions*, **10**, 231-239 (1980).
- 67) T.S. Liu, J.S. Beckman, B.A. Freeman, E.L. Hogan and C.Y. Hsu, Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase and catalase reduced ischemic brain injury, *Am. J. Physiol.*, **256**, H589-H593 (1989).
- 68) Y. Tamura, L. Chi, E.M. Driscoll Jr., P.T. Hoff, B.A. Freeman, K.P. Gallagher and B.R. Lucchesi, Superoxide dismutase conjugated to polyethylene glycol provides sustained

- protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in canine heart, *Circulation Res.*, **63**, 944-959 (1988).
- 69) M. Galcia-Alves, Y. Kadowaki, Y. Iwashita and K. Nishi, Pretreatment with a single bolus injection of polyoxyethylene-modified superoxide dismutase prevents reperfusion induced arrhythmias in the anesthetized rat, *Japan. J. Pharmacol.*, **51**, 199-209 (1989).
- 70) K. Asplund, K. Grankvist, S. Marklund and L.-G. Taljedal, Partial protection against streptozotocin-induced hyperglycaemia by superoxide dismutase linked to polyethylene glycol, *Acta Endocrinologica*, **107**, 390-394 (1984).
- 71) D.C. Olson, M.K. Grizzle and D.L. Anderson, Effect of polyethylene glycol-superoxide dismutase and catalase on endotoxemia in pigs, *J. Appl. Physiol.*, **63**, 1526-1532 (1987).
- 72) Y. Suzuki, T. Tanigaki, D. Heimer, W. Wang, W.G. Ross, H.H. Sussman and T.A. Raffin, Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase attenuates septic lung injury in guinea pigs, *Am. Rev. Respir. Dis.*, **145**, 388-393 (1992).
- 73) J.S. Beckman, R.L. Minor, C.W. White, J.E. Repine, G.M. Rosen and B.A. Freeman, Superoxide dismutase and catalase conjugated to polyethylene glycol increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance, *J. Biol. Chem.*, **263**, 6884-6892 (1988).
- 74) M. Leonard, J. Neel and E. Dellacherie, Synthesis of monomethoxypolyoxyethylene-bound haemoglobins, *Tetrahedron*, **40** 1581-1584 (1984).
- 75) E. Dellacherie, M. Grandgeorge, F. Prouchayret, G. Fasan, Hemoglobin linked polyanionic polymers as potential red blood cell substitutes, *Biomater. Artif. Cells Immobilization Biotechnol.*, **20**, 309-317 (1992).
- 76) K. Iwasaki, K. Ajisaka and Y. Iwashita, Hemoglobin-inulin conjugate as an oxygen carrying blood substitute, *Biochem. Res. Commun.*, **113**, 513-518 (1983).
- 77) A. Koide S. Suzuki and S. Kobayashi, Preparation of polyethylene glycol-modified streptokinase with disappearance of binding ability towards anti-serum and retention of activity, *FEBS Letter*, **143**, 73-76 (1982).
- 78) N. Tomiya, K. Watanabe, J. Awaya, M. Kurono and S. Fujii, Modification of acyl-plasmin-streptokinase complex with polyethylene glycol: Reduction of sensitivity to neutralizing antibody, *FEBS Letter*, **193**, 44-48 (1985).
- 79) S. Rajagopalan, S.L. Gonias and S.V. Pizzo, A nonantigenic covalent streptokinase-polyethylene glycol complex with plasminogen activator function, *J. Clin. Invest.*, **75**, 413-419 (1985).
- 80) H. Berger, Jr. and S.V. Pizzo, Preparation of polyethylene glycol-tissue plasminogen activator adducts that retain functional activity: Characteristics and behavior in three animal species, *Blood*, **71**, 1641-1647 (1988).
- 81) N.V. Kater, M.J. Knauf and W.J. Laird, Chemical modification of recombinant interleukin-2 by polyethylene glycol increases its potency in the murine Meth A sarcoma model, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 1487-1491 (1987).
- 82) K. Takahasi, A. Ajima, T. Yoshimoto, N. Okada, A. Matsushima, Y. Tamaura and Y. Inada, Chemical reactions by polyethylene modified enzymes in chlorinated hydrocarbons, *J. Org. Chem.*, **50**, 3414 (1985).
- 83) K. Sugi, M. Inoue and Y. Morino, Degradation of bilirubin by a bilirubin oxidase derivative which has a relatively long half-life in the circulation, *Biochim. Biophys. Acta*, **991**, 405-409 (1989).
- 84) H. Maeda, J. Takeshita and R. Kanamaru, A lipophilic derivative of neocarzinostatin, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **14**, 81-87 (1979).
- 85) F. Level-Schaffer, A. Bernstein, A. Meshorer and R. Arnon, Reduced toxicity of daunorubicin by conjugation to dextran, *Cancer Treatment Reports*, **66**, 107-114 (1982).
- 86) S. Nakane, S. Matsumoto, Y. Takakura, M. Hashida and H. Sezaki, The accumulation mechanism of cationic mitomycin C-dextran conjugates in the liver: *In vivo* cellular localization and *in-vitro* interaction with hepatocytes, *J. Pharm. Pharmacol.*, **40**, 1-6 (1988).

- 87) Y. Takakura, T. Fujita, M. Hashida, H. Maeda and H. Sezaki, Control of pharmaceutical properties of soybean trypsin inhibitor by conjugation with dextran II: Biopharmaceutical and pharmacological properties, *J. Pharm. Sci.*, **78**, 219-222 (1989).
- 88) S. Zalipsky, R. Seltzer, S. Menon-Rudolph, Evaluation of a new reagent for covalent attachment of polyethylene glycol to proteins, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **15**, 100-114 (1992).
- 89) C.B. Shaffer and F.H. Critchfield, The absorption and excretion of the solid polyethylene glycols (Carbowax compounds), *J. Am. Pharm. Assoc.*, **36**, 152-157 (1947).
- 90) H.F. Smyth, C.P. Carpenter and C.S. Weil, The toxicology of the polyethylene glycols, *J. Am. Pharm. Assoc.*, **39**, 349-354 (1950).
- 91) C.O. Beauchamp, S.L. Gonias, D.P. Menapace and S.V. Pizzo, A new procedure for the synthesis of polyethylene glycol-protein adducts: Effects on function, receptor recognition, and clearance of superoxide dismutase, lactoferrin and α_2 -macroglobulin, *Anal. Biochem.*, **131**, 25-33 (1983).
- 92) K.B. Hadley and P.H. Sato, Catalytic activity of administered gulonolactone oxidase polyethylene glycol conjugates, *Enzyme*, **42**, 225-234 (1989).
- 93) H. Nishimura, A. Matsushima and Y. Inada, Improved modification of yeast uricase with polyethylene glycol accompanied with non-immunoreactivity towards anti-uricase serum and high enzyme activity, *Enzyme*, **26**, 49-53 (1981).
- 94) A. Abuchowski and F.F. Davis, Preparation and properties of polyethylene glycol-trypsin adducts, *Biochem. Biophys. Acta*, **578**, 41-46 (1979).
- 95) R.H.L. Chen, A. Abuchowski, T. Van Es, N.C. Palczuk and F.F. Davis, Properties of two urate oxidases modified by the covalent attachment of poly(ethylene glycol), *Biochem. Biophys. Acta*, **660**, 293-298 (1981).
- 96) A. Abuchowski and F.F. Davis, Soluble polymer enzyme adducts, In: *Enzyme as Drugs*, J.C. Holcenberg and J. Roberts(Eds) pp. 367-383, John Wiley, New York, 1981.
- 97) D. Hilvert, Extending the chemistry of enzymes and abzymes, *TIBTECH.*, **9**, 11-17 (1990).
- 98) K.J. Wieder and F.F. Davis, Enzyme therapy: II. Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on biochemical parameters and immunological determinants of β -glucosidase and α -galactosidase, *J. Appl. Biochem.*, **5**, 337-347 (1983).
- 99) A. Koide and S. Kobayashi, Modification of amino groups in porcine pancreatic elastase with polyethylene glycol in relation to binding ability towards anti-serum and to enzyme activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **111**, 659-667 (1983).
- 100) J.J. Marshall, J.D. Humphreys and S.L. Abramson, Attachment of carbohydrate to enzymes increases their circulatory lifetime, *FEBS Lett.*, **83**, 249-252 (1977).
- 101) T. Wileman, M. Bennett and J. Lilleyman, Potential use of an asparaginase-dextran conjugate in acute lymphoblastic leukaemia, *J. Pharm. Pharmacol.*, **35**, 762-765 (1983).
- 102) T. Wileman, R.L. Foster and P.N.C. Elliott, Soluble asparaginase-dextran conjugates show increased circulatory persistence and lowered antigen reactivity, *J. Pharm. Pharmacol.*, **38**, 264-271 (1986).
- 103) J.H. Pazur, H.P. Knull and D.L. Simpson, Glycoenzymes: Role for the carbohydrate moieties, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 110-116 (1970).
- 104) Y. Satoh, K. Kasama, A. Kajita, H. Shimizu and N. Ida, Different pharmacokinetics between natural and recombinant human interferon beta in rats, *J. Interferon Res.*, **4**, 411-422 (1984).
- 105) R. Axen, J. Porath and S. Ernback, *Nature*, **214**, 1302 (1967).
- 106) T. Z. Wong, *Can. J. Biochem.*, **55**, 398 (1977).
- 107) R. Axen and S. Ernback, Chemical fixation of enzymes to cyanogen halide activated polysaccharide carriers, *J. Biochem.*, **18**, 351-360 (1971).
- 108) G.S. Bethell, J.S. Ayers, W.S. Hancock and

- M.T.W. Hearn, A novel method of activation of cross-linked agarose with 1,1'-carbonyldiimidazole which gives a matrix for affinity chromatography devoid of additional charged groups, *Bio. Chem.*, **254**, 2572-2574 (1979).
- 109) J. Porath and L. Sundberg, *Nature*, **238**, 262 (1972).
- 110) M. Usui and T. Matsubayashi, IgE-selective and antigen-specific unresponsiveness in mice. Induction of the unresponsiveness by administration of ovalbumin-pullulan conjugate, *J. Immunol.*, **122**, 1266-1272 (1979).
- 111) Y. Takaura, M. Kitajima, S. Matsumoto, M. Hashida and H. Sezaki, Development of a novel polymeric prodrug of mitomycin C, mitomycin C-dextran conjugate with anionic charge. I. Physicochemical characteristics and *in vivo* and *in vitro* antitumor activities, *Int. J. Pharm.*, **37**, 135-143 (1987).
- 112) N.V. Katre, Immunogenicity of recombinant IL-2 modified by covalent attachment of polyethylene glycol, *J. Immunol.*, **144**, 208-213 (1990).
- 113) G.W. Anderson, J.E. Zimmerman and F.M. Callahan, The use of esters of N-hydroxy-succinimide in peptide synthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 1839-1842 (1964).
- 114) L. Eldjarn and E. Jellum, *Acta Chem. Scand.*, **17**, 2610-2612 (1963).
- 115) J.J. Marshall and M.L. Rabinowitz, Preparation and characterization of a dextran-trypsin conjugate, *J. Biol. Chem.*, **3251**, 1081-1087 (1976).
- 116) N.V. Katre, M.J. Knauf and W.J. Laird, Chemical modification of recombinant interleukin 2 by polyethylene glycol increases its potency in the murine Meth A sarcoma model, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**, 1487-1491 (1987).
- 117) F.M. Veronese, R. Largajolli, E. Boccu, C.A. Benassi and O. Schiavon, Surface modification of proteins: Activation of monomethoxy-polyethylene glycols by phenylchloroformates and modification of ribonuclease and superoxide dismutase, *Appl. Biochem. Biotech.*, **11**, 141-152 (1985).
- 118) Y. Yasuda, T. Fujita, Y. Takakura, M. Hashida and H. Sezaki, Biochemical and biopharmaceutical properties of macromolecular conjugates of uricase with dextran and polyethylene glycol, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2053-2056 (1990).
- 119) N. Buretteau, S. Burton and R.R. Crichton, Stabilization and immobilization of penicillin amidase, *FEBS Letter*, **258**, 185-189 (1989).
- 120) Y. Inada, K. Takahashi, T. Yoshimoto, A. Ajima, A. Matsushima, and Y. Saito, Application of polyethylene glycol-modified enzymes in biotechnological processes: Organic solvent-soluble enzymes. *TIBTECH*, July, 190-194 (1986).
- 121) Y. Kamisaki, H. Wada, T. Yagura, A. Matsushima and Y. Inada, Reduction in immunogenicity and clearance rate of *Escherichia coli* L-asparaginase by modification with monomethoxypolyethylene glycol, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **216**, 410-414 (1981).
- 122) R.H.L. Chen, A. Abuchowski, T. Van Es, N.C. Palczuk, and F.F. Davis, Properties of two urate oxidase modified by the covalent attachment of poly(ethylene glycol), *Biochim. Biophys. Acta.*, **660**, 293-298 (1981).
- 123) M. Naoi, K. Kiuchi and T. Sato, Alteration of the substrate specificity of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase by modification with polyethylene glycol, *J. Appl. Biochem.*, **6**, 91-102 (1984).
- 124) Strivastava, Studies on stabilization of amylase by covalent coupling to soluble polysaccharides, *Enzyme. Microb. Technol.*, **13**, 164-170 (1991).
- 125) B. Geiger, B. von Specht and R. Arnon, Stabilization of human β -D-N-acetylhexaminidase A towards proteolytic inactivation by coupling it to poly(N-vinylpyrrolidone), *Eur. J. Biochem.*, **73**, 141-147 (1977).
- 126) J.S. Holcenberg, S. Gottfried and D.C. Teller, Biologic and physical properties of succinylated and glycosylated *Acinetobacter* glutaminase-asparaginase, *J. Biol. Chem.*, **250**, 4165-4170 (1975).
- 127) R.O Brady, J.F. Tallmann E.G. Johnson, A.E.

- Gal, W.R. Leathy, N.J. Quirk and A.S. Dekaban, *N. Engl. J. Med.*, **289**, 9-14 (1973).
- 128) T. Fujita, Y. Yasuda, Y. Takakura, M. Hashida, H. Sezaki, Tissue distribution of ¹¹¹In-labeled uricase conjugated with charged dextrans and polyethylene glycol, *J. Pharmacobiodyn.*, **14**, 623-629 (1991).
- 129) J.E. Benbough, C.N. Wiblin, T.N. Rafter and J. Lee, The effect of chemical modification of L-asparaginase on its persistence in circulating blood of animals, *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 833-839 (1979).
- 130) S. Mumtaz and B.K. Bachhawat, Enhanced intracellular stability of dextran-horse radish peroxidase conjugate: an approach to enzyme replacement therapy, *Biochem. Biophys. Acta.*, **1117**, 174-178(1992).
- 131) S. Mumtaz and B.K. Bachhawat, Conjugation of proteins and enzymes with hydrophilic polymers and their applications, *Ind J. Biochem. Biophys.*, **28**, 346-351 (1991).
- 132) M.J. Knauf, D.P. Bell, P. Hirtzer, Z.P. Luo, J.D. Young and N.V. Katre, Relationship of effective molecular size to systemic clearance in rats of recombinant interleukin-2 chemically modified with water-soluble polymers, *J. Biol. Chem.*, **263**, 15064-15070 (1988).
- 133) M.A. Venkatachalam and H.G. Rennke, The structural and molecular basis of glomerular filtration, *Circulation Res.*, **43**, 337-347 (1978).
- 134) I. Seppala and O. Makela, Antigenicity of dextran-protein conjugates in mice: Effect of molecular weight of the carbohydrate and comparison of two modes of coupling, *J. Immunol.*, **143**, 1259-1264 (1989).
- 135) R.G. Melton, C.N. Wiblin, A. Baskerville, R.L. Foster and R.F. Sherwood, Covalent linkage of carboxypeptidase G₂ to soluble dextrans-II: *In vivo* distribution and fate of conjugates, *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 113-121 (1987).
- 136) A. Traub, B. Payess, S. Reuveny and A. Mizrahi, Interferon-albumin conjugate with conserved biological activity, *J. Gen. Virol.*, **53**, 389-392 (1981).
- 137) M. Konrad, Immunogenicity of proteins administered to humans for therapeutic purposes, *BIBTECH*, **7**, 175-179 (1989).
- 138) T.E. Wileman, Properties of asparaginase-dextran conjugates, *Adv. Drug Del. Rev.*, **6**, 167-180 (1991).
- 139) A.H. Sehon, Suppression of antibody response by conjugates of antigens and monomethoxypoly(ethylene glycol), *Adv. Drug Del. Rev.*, **6**, 203-217 (1991).
- 140) W.Y. Lee and A.H. Sehon, Abrogation of reaginic antibodies with modified allergens, *Nature*, **267**, 618-619 (1977).
- 141) A. Matusushima, H. Sasaki, Y. Kodera, Y. Inada, Reduction of immunoreactivity of bovine serum albumin conjugated with polyethylene glycol (PEG) in relation to its esterase activity, *Biochem. Int.*, **26**, 485-490 (1992).
- 142) K. Takatsu and K. Ishizaka, Regaining antibody formulation in the mouse. IX. Enhancement of suppressor and helper cell activities of primed spleen cells, *J. Immunol.*, **118**, 151-158 (1977).
- 143) B.J. Skidmore and D.H. Katz, Haplotype preference in lymphocyte differentiation. I. Development of haplotype-specific helper and suppressor activities in F₁ hybrid-activated T cell populations, *J. Immunol.*, **119**, 694-701 (1977).
- 145) S.A. Rosenberg, E.A. Grimm, M. McGrogan, M. Doyle, E. Kawasaki, K. Kohts and D.F. Mark, Biological activity of recombinant human interleukin-2 produced in *Escherichia coli*, *Science*, **223**, 1412-1415 (1984).
- 146) A. Wang, S.-D. Lu and D.F. Mark, Site-specific mutagenesis of the human interleukin-2 gene: structure-function analysis of the cysteine residues, *Science*, **224**, 1431-1433 (1984).
- 147) J.J. Mule, S. Shu and S.A. Rosenberg, The anti-tumor efficacy of lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin 2 *in vivo*, *J. Immunol.*, **135**, 646-652 (1985).
- 148) J.H. Donohue and S.A. Rosenberg, The fate of interleukin-2 after *in vivo* administration, *J. Immunol.*, **130**, 2203-2208 (1983).
- 149) R.J. Zimmerman, S.L. Aukerman, N.V. Katre,

- J.L. Winkelhake and J.D. Young, Schedule dependency of the antitumor activity and toxicity of polyethylene glycol-modified interleukin 2 in murine tumor models, *Cancer Res.*, **49**, 6521-6528 (1989).
- 150) S.C. Tam, J. Blumenstein and J.T. Wong, Soluble dextran-hemoglobin complex as a potential blood substitute, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2128-2131 (1976).
- 151) M.S. Hershfield, R.H. Buckley, M.L. Greenberg, A.L. Melton, R. Schiff, C. Hatem, J. Kurtzberg, M.L. Markert, R.H. Kobayashi, A.L. Kobayashi and A. Abuchowski, Treatment of adenosine deaminase deficiency with polyethylene glycol-modified adenosine deaminase, *New Eng. J. Med.*, **316**, 589-596 (1987).
- 152) C.C. Cynthia, M.L. Greenberg, A.T. Viau, M. Nucci, W.D. Brenckman and M.S. Hershfield, Use of polyethylene glycol-modified uricase (PEG-uricase) to treat hyperuricemia in a patient with non-hodgkin lymphoma, *Ann. Intern. Med.* **109**, 114-117 (1988).
- 153) A. Abuchowski, F.F. Davis and S. Davis, Immunosuppressive properties and circulating life of *Achromobacter* glutaminase-asparaginase covalently attached to polyethylene glycol in man, *Cancer Treat. Rep.*, **65**, 1077-1081 (1981).
- 154) A.E. Mast, G. Salvesen, H.-P. Schnebli and S.V. Pizzo, Evaluation of the rapid plasma elimination of recombinant α proteinase inhibitor: Synthesis of polyethylene glycol conjugates with improved therapeutic potential *J. Lab. Clin. Med.*, **116**, 58-65 (1990).
- 155) S.V. Pizzo, Preparation, *in vivo* properties and proposed clinical use of polyoxyethylene-modified tissue plasminogen activator and streptokinase, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **6**, 153-166 (1991).