

재조합 인터페론 알파-2a의 부위 특이적 수식을 위한 고체상 PEGylation : 공정 성능, 특성화 및 생물학적 활성

¹이 병국 · 권진숙 · †이은규
한양대학교 화학공학과 생물공정연구실
(접수 : 2005. 11. 28., 게재승인 : 2006. 4. 4.)

Solid-phase PEGylation for Site-Specific Modification of Recombinant Interferon α -2a : Process Performance, Characterization, and In-vitro Bioactivity

Byung Kook Lee¹, Jin Sook Kwon, and E. K. Lee[†]

[†] Bioprocessing Research Laboratory, Department of Chemical Engineering, Hanyang University, Ansan 426-791, Korea

¹Meditox, Inc., ChunAn, Korea.

(Received : 2005. 11. 28., Accepted : 2006. 4. 4.)

In 'solid-phase' PEGylation, the conjugation reaction occurs as the proteins are attached to a solid matrix, and thus it can have distinct advantages over the conventional, solution-phase process. We report a case study: rhIFN- α -2a was first adsorbed to cation exchange resin and then N-terminally PEGylated by aldehyde mPEG of 5, 10, and 20 kD through reductive alkylation. After the PEGylation, salt gradient elution efficiently recovered the mono-PEGylate in a purified form from the unwanted species such as unmodified IFN, unreacted PEG, and others. The mono-PEGylation and its purification were integrated in a single chromatographic step. Depending on the molecular weight of the mPEG aldehyde used, the mono-PEGylation yield ranged 50-64%. We could overcome the major problems of random, or uncontrollable, multi-PEGylation and the post-PEGylation purification difficulties associated with the solution-phase process. N-terminal sequencing and MALDI-TOF MS confirmed that a PEG molecule was conjugated only to the N-terminus. Compared with the unmodified IFN, the mono-PEGylate showed the reduced anti-viral activity as measured by the cell proliferation assay. The bioactivity was reduced more as the higher molecular weight PEG was conjugated. Immunoreactivity, evaluated indirectly by antibody binding activity using a surface plasmon resonance biosensor, also decreased. Nevertheless, trypsin resistance as well as thermal stability was considerably improved.

Key Words : Solid-phase PEGylation, protein modification, bioconjugation

서론

유전자 재조합 기술을 이용해 생산되는 인터페론의 일종인 알파-인터페론 (Interferon α -2a)은 항바이러스성 면역증강제로 개발되어 최근에는 만성 B형 및 C형 간염치료용뿐만 아니라 각종 암 치료제 (Kaposi's sarcoma, hairy-cell leukemia 등)로 사용되고 있다(1). 그러나 혈액 내 순환수명

(blood circulation lifetime)이 짧아 수개월 동안 주 3회의 높은 빈도로 주사해야 하는 단점이 있고(2-4), 면역원성 (immunogenicity)이 높아 주사 시 발열, 구토 등의 여러 부작용을 초래하게 된다(5, 6). 또한 수용액상에서의 안정성이 낮아 유통과정에서 초기 활성을 그대로 유지하지 못하는 단점도 있는 실정이다(7-9). 이러한 문제점을 해결하기 위해 무독성 수용성 고분자인 PEG (polyethylene glycol)를 단백질 표면에 수식시키는 방법을 사용하고 있다. PEGylation의 장점으로 안정성 향상에 의한 반감기의 증가는 알려져 있고(10, 11), PEGylated IFN α -2a는 현재 판매되고 있다.

전통적인 PEGylation 방법은 활성화 PEG와 단백질 표면의 lysine과 같은 특정 아미노산 잔기를 무작위적으로 결합

[†] Corresponding Author : Bioprocessing Research Laboratory, Department of Chemical Engineering, Hanyang University, Ansan 426-791, Korea

Tel : +82-31-400-4072, Fax : +82-31-408-3779

E-mail : eklee@hanyang.ac.kr

시키는 것이었다. 이런 방법은 단백질의 수용체 결합부위를 가리게 되어 생물학적 활성을 급격히 감소시키는 multi 그리고 random PEGylation을 초래한다(12-14). 이런 문제점을 해결하기 위해, site-specific PEGylation이 사용되고 있다. 특히 N-terminus amine의 reductive alkylation은 산성 조건에서 methoxy PEG와의 결합에 의해 수행되고(15-17), PEG 분자 하나만을 단백질에 접합시킴으로써 단백질의 생물학적 활성을 유지할 수 있다. 그러나 현재까지의 reductive alkylation 방법은 액상에서 반응이 이루어져 환원제, 미반응된 PEG, multi-PEGylates 등 불순물을 제거하는 3-4 단계의 정제 공정을 필요로 하는 문제점이 있었다(18-21).

본 연구에서는 interferon α -2a의 N-terminal mono-PEGylation을 위한 'solid-phase PEGylation'을 수행하였다. 여기서 먼저 단백질을 이온교환수지에 흡착시킨다. 활성화된 PEG 분자들은 낮은 pH의 환원제 조건에서 N-terminal α -amine기에 선택적으로 반응한다. 단백질은 담체에 결합된 상태에서 PEGylation되고, 따라서 'solid-phase PEGylation'이라 부른다. 이 공정은 N-terminal mono-PEGylate의 재현성 있는 수율을 나타내었고 원하는 PEGylate만을 적절한 정제 공정으로 분리해낼 수 있다(22, 23). Edman degradation, trypsin-digested peptide mapping, MALDI-TOF와 같은 다양한 분석방법을 이용하여 특이적으로 N-terminal mono-PEGylation 되었는지 확인하였다. 2-DE를 통해 mono-PEGylate의 분자량의 변화와 pI 값의 변화를 알아보았다. 세포 병변법을 통해 생물학적 활성인 항바이러스 역가를 평가하였고 SPR (surface plasmon resonance biosensor)을 이용하여 면역반응성을 측정하였다. 그리고 온도 안정성과 단백질 분해 효소에 대한 안정성을 평가하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 rhIFN- α -2a는 유전자 변형된 대장균(MC1061)으로부터 정제한 것을 (주)녹십자 R&D에서 용액(50 mM acetate buffer, pH 4.0에 2.0 mg/mL)의 형태로 제공받았다. 활성화 PEG는 (주)선바이오에서 구입하였으며, 평균 분자량이 5 kD, 10 kD, 20 kD (허용 범위 \pm 500)인 mPEG-aldehyde를 사용하였다. PEGylation 버퍼로 이용된 sodium phosphate, 환원제로 사용된 sodium cyanoborohydride (NaBH₃CN) 및 기타 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)사에서 구입하였다. Solid-phase PEGylation 조건을 최적화하기 위해 사용된 CM-Sepharose와 SP-Sepharose는 Amersham Bioscience (Uppsala, Sweden)사에서 구매하였다. 단백질량을 위한 Bradford dye와 SDS-PAGE 시약은 Bio-Rad (USA)사에서 구입하였다. SPR을 사용하기 위한 CM5 칩은 Biacore (Uppsala, Sweden)사에서 구매하였다. Gel permeation chromatography에 사용된 Superose 12HR 10/30과 2-DE를 위한 Ettan IPGphor IEF system은 Amersham Bioscience (Uppsala, Sweden)사에서 구매하였다.

mPEG aldehydes를 이용한 재조합 인터페론-알파-2a의 고체상 PEGylation

IFN 수용액 1 mL (2 mg/mL, pH 4.0)을 0.1 M SPB (sodium phosphate buffer, pH 4.0)로 평형을 잡은 CM-Sepharose 컬럼 (bed volume 1 mL)에 1 mL/min으로 주입하여 CM-Sepharose에 흡착시켰다. 동일한 버퍼로 6 CV (column volume)을 1 mL/min으로 흘려주어 비 결합된 IFN을 세척하였다. 이후 IFN 대비 물 비율이 20배의 PEG 용액 (aldehyde mPEG, NaBH₃CN 25 mM) 15 mL을 준비하고 10 mL을 먼저 컬럼 내부에 주입하여 컬럼 내부의 조성을 PEG 용액 조성으로 맞추어 준 뒤 0.01 mL/min으로 120 분간 반응시켰다. 이후 평형 버퍼 10 CV를 컬럼 내부로 흘려주어 미 반응된 PEG를 씻어내고 0.5 mL/min 유속으로 1 M NaCl이 함유된 SPB로 0.1 M부터 0.6 M까지 35분 동안 용출시켰다. 용출된 샘플은 Bradford assay를 통해서 PEGylation 수율을 계산하였고 용출된 혼합물은 GPC (bed volume 25 mL)를 통해 분석하였다.

N-terminus, mono-PEGylation의 분석

GPC를 통해 PEGylation 여부와 수식부위를 분석하였다. 첫 번째 단계로 MALDI-TOF MS로 질량분석을 통해서 PEGylate의 분자량을 측정하였다. 샘플은 narrow GELoader tip (Eppendorf, Germany)를 이용하여 Poros R2 resin으로 염을 제거하였다. PEGylate solution 1 μ L와 matrix solution (sinapinic acid saturated in 0.1% TFA: acetonitrile, 7:3) 1 μ L을 섞고, 혼합액의 1 μ L를 MALDI target plate에 주입한다. Positive ionization mode에서의 mass spectra는 Burker Ultraflex instrument (Burker Daltonik, Germany)에 기록되었고, 가속전압은 25 kV이고 사용된 N₂ laser는 337 nm, 39 ns 파장이었다(20).

두 번째 단계로 native 그리고 mono-PEGylate는 tryptic digestion으로 밝혀내었다. N-terminus를 포함하는 peptide 절편 (1313.6 Da)을 database를 통해 확인하고, tryptic digest 한 native IFN의 mass spectra를 확인한다. 마지막으로 N-terminal 서열을 확인하는 Edman degradation을 이용하여 FDNB (1-fluoro-2, 4-dinitrobenzene)에 의한 peptide 결합 파괴가 일어나지 않는 것을 확인함으로써 N-terminal 부위가 수식되었음을 확인할 수 있다.

RP-HPLC를 이용한 순도 분석

RP-HPLC C4 (Phenomenex, California, CA, USA) 칼럼으로 PEGylate의 순도를 분석하였다. 평형버퍼는 100% DDW (distilled deionized water)에 0.1% TFA를 사용하고 용출버퍼는 80% acetonitrile에 0.1% TFA (trifluoroacetic acid)를 사용하였다. 시료 20 μ L를 컬럼 내로 주입하고 10분 동안 평형 버퍼를 흘렸다. 동일한 유속으로 60분 동안 용출버퍼의 비율이 0%에서 100%가 되는 조건으로 용출하였다.

Far UV CD (circular dichroism) 분석

PEGylation에 의한 1차 및 2차 구조 변화를 분석하기 위해 Far-UV CD spectropolarimeter (Jasco, model J-715)를 사용하였다. CD 스펙트럼은 190-250 nm이고 excitation 파장

은 200-230 nm이었다. Path length는 0.5 mm이었다.

항바이러스 역가와 면역반응성 분석

항바이러스 역가 측정은 MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) 세포가 VSV (Vesicular Stomatitis Virus)에 감염된 후 표준 IFN (100 IU/mL)에 의해 생존한 세포를 기준으로 하여 측정시료 (IFN, mono-PEGylated IFNs)에 의해 세포가 바이러스에 저항해 생존한 정도를 통해 정량화 하여 측정하였다(25, 26). 면역반응성은 일정량의 항 인터페론 단일 클론 항체 (product no. 21100-2, R&D systems, Minnesota, USA)와 항원 (IFN, PEGylated IFNs) 간의 결합을 통해 CM5 chip이 장착된 SPR (Biacore 3000, Biacore AB, Uppsala, Sweden)를 이용하여 측정하였다. 칩 표면에 항체를 고정화하고 항원으로 PEGylated IFN을 흘려주어 control 인 unmodified IFN과 비교하였다. SPR 기술에 기반을 둔 in vitro immunoassay는 면역반응성의 신뢰성 있는 정보를 제공하고 있다(27-29).

절단효소에 대한 안정성과 온도 안정성 분석

IFN PEGylate의 serum에서의 안정성은 항 trypsin 안정성을 측정하고 비교함으로써 간접적으로 평가하였다. GPC를 이용하여 정제된 IFN PEGylate는 진공건조 하였다. Trypsin (Promega, Wisconsin, USA)은 50 mM ammonium bicarbonate 버퍼 (pH 7.8)에 100 mg/mL로 재용해하였다. Trypsin대 IFN의 질량 비율이 1대 30이 되도록 건조된 IFN 또는 IFN PEGylate에 trypsin 용액을 주입하였다. 37°C 항온조에서 12 시간 반응시켰다. 30분 단위로 시료를 취하고 sample은 20% TFA (trifluoroacetic acid)를 50 µL 첨가하여 반응을 정지 시킨다. 이후 RP-HPLC를 통해서 IFN이 절단되어 줄어드는 양을 peak 높이의 변화로 측정하여 1차 반응속도식에 적용하여 반응속도 상수를 구하여 trypsin에 대한 안정성을 비교하였다. 온도 안정성은 50°C에서 단백질이 변성 혹은 응집되어 침전될 때 340 nm에서의 흡광도 변화를 통해 평가하였다(30).

결과 및 고찰

고체상 PEGylation의 조건

Resin과 pH에 따른 PEGylation 수율 변화는 pH 3.0, 3.5, 4.0 그리고 4.5에서의 CM-Sepharose와 SP-Sepharose를 이용한 실험을 통하여 연구되었다. CM-Sepharose, pH 4.0에서 가장 높은 PEGylation 수율이 나타났다. 이와 같은 조건에서 단백질 대비 PEG 몰 비율을 10, 20, 30, 40배로 변화시키고 환원제 농도 역시 10, 20, 40 mM로 변화시키면서 PEG의 몰 비율과 환원제에 대한 영향을 연구하였다. 최대 수율을 나타낼 수 있는 조건은 NaBH₃CN 농도 20 mM, 단백질 대비 20배율의 PEG 농도였다.

고체상, mono-PEGylate의 분리

Fig. 1은 CM-Sepharose column으로부터 얻은 크로마토그램이다. PEGylated IFN은 첫 번째 peak에서 0.2-0.3 M NaCl 농도에서 용출되었고, 미반응된 native IFN은 두 번째 peak인

0.3-0.4 M NaCl 농도에서 용출되었다. PEGylated IFN이 먼저 용출된 이유는 PEGylation으로 인한 resin과 단백질의 약해진 결합으로 질소말단기의 아민기가 가려졌기 때문이다. 최근 Seely et al.은 PEGylates의 단백질과 PEG의 몰 비율이 양이온이나 음이온 교환 컬럼으로부터 용출되는 순서를 결정한다고 주장하였다(31). Fig. 1은 그들의 주장을 뒷받침하고 있다. 2-DE를 이용하여 5, 10, 20 kD의 PEGs의 mono-PEGylate의 등전점과 분자량을 측정하였을 때, PEGylation 반응에 의해 pI 값은 변화하지 않았고 분자량만 증가하였다(Fig. 2). 동일한 pI 값은 column 상에서 같은 체류시간을 갖는 이온 교환 수지와와의 동일한 전기적 결합을 의미한다. 그러므로 Fig. 1에서 보여준 용출시간의 차이는 결합된 PEG에 의한 가림 효과 때문이라고 생각된다.

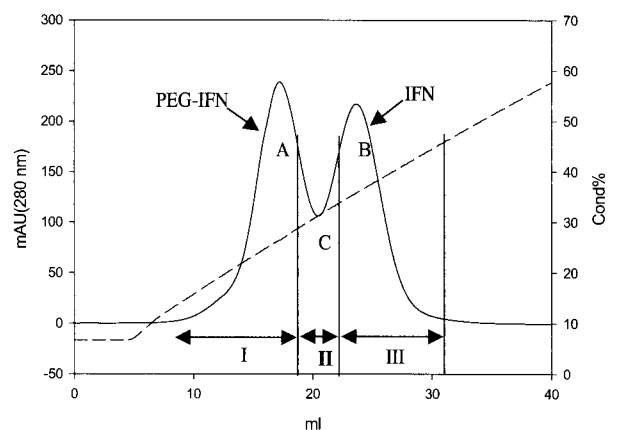


Figure 1. Elution chromatogram from the CM-Sepharose. The column was eluted by feeding the SPB containing 1 M NaCl at 0.5 mL/min by applying a salt gradient from 0.1 M to 0.6 M NaCl for 35 min.

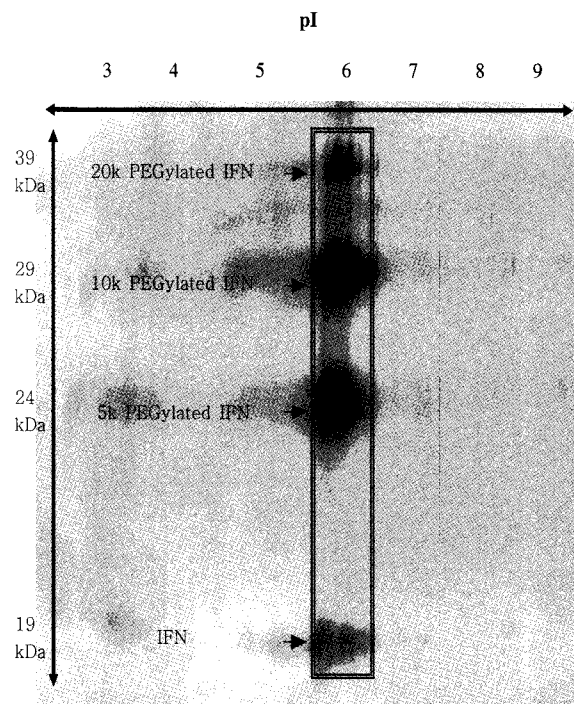


Figure 2. Two dimensional electrophoresis of the mono-PEGylated IFNs with 5, 10, and 20 kD mPEG aldehydes.

두 peak 사이의 분리가 힘든 부분으로 IFN과 PEGylated IFN이 공존하는 부분이다. 이 부분을 GPC (Superose 12 HR)을 이용해 분리한 것을 Fig 3.에서 보여준다. Mono-PEGylate (5 kD mPEG aldehyde 사용)와 미수식된 IFN은 5분 차이의 다른 용출 시간에 의해 완벽하게 분리할 수 있었다. 더 나아가 Fig. 4는 10 kD과 20 kD의 PEG들로 수식된 PEGylate들이 각각 분리됨을 보여주고 있다. 이것은 GPC가 원하는 PEGylate를 얻는데 강력한 분리 방법이라는 것을 뒷받침해 준다. Fig. 5는 native IFN과 mono-PEGylate가 C4 resin을 사용한 RP-HPLC로 분리되는 것을 보여준다. 여기서 mono-PEGylate가 native IFN보다 더 늦게 용출되는 것은 PEGylation에 의해 표면의 소수성이 증가함을 보여준다. Circular dichroism 분석은 mono-PEGylation에 의해 2 차구조가 조금씩 변화함을 보여준다.

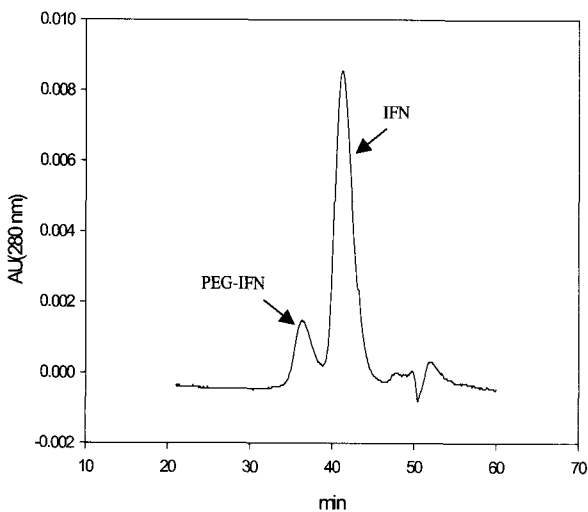


Figure 3. Resolution of the PEGylation mixture by GPC (Superose 12HR 10/30). The column was eluted isocratically by 0.1 M SPB (pH 4.0) at 0.4 mL/min.

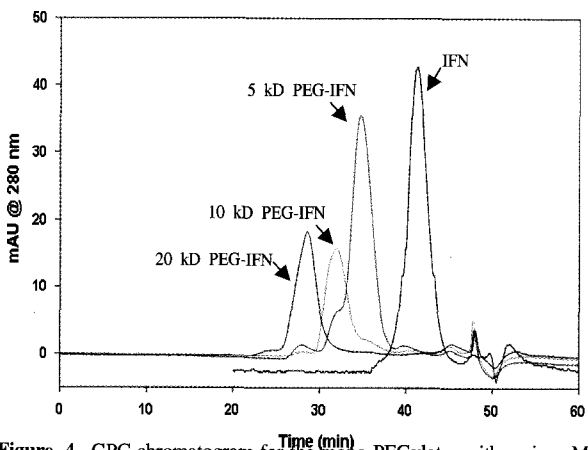


Figure 4. GPC chromatogram for the mono-PEGylates with various MW PEGs.

Solid-phase PEGylation을 통해 무작위적인 반응에 의한 multi-PEGylation을 피할 수 있었다. 첫째, 반응에 참여할 수 있

는 lysine 잔기들은 reductive alkylation 조건 (낮은 pH)에 의해 반응성이 줄어들었다(12). 둘째, 이 lysine 잔기들이 고체 담체에 의한 가림 현상으로 반응성이 줄어들었을 수도 있다(13). 셋째, 단백질이 고체 표면에 흡착하게 되어 PEG 분자들의 반응 접촉 빈도가 액상에 비하여 줄어들었다.

줄어든 반응성은 solid-phase PEGylation의 줄어든 수율과 관계가 있다. 5, 10, 20 kD PEG의 mono-PEGylate의 수율은 각각 62, 58, 51%로 나왔다(미반응된 IFN은 약 32%였다). Liquid-phase PEGylation의 경우 PEG 대 단백질의 비율이 낮을 경우 multi-PEGylate 보다 mono-PEGylate이 많았지만, PEG 대 단백질의 비율이 5 이상이 되면 multi-PEGylate가 급격히 증가하여 mono-PEGylate를 회수하는데 많은 문제점이 있다(data not shown). 반면, solid-phase PEGylation은 미반응된 IFN을 Fig. 1에서 보여주듯 쉽게 회수하고 재사용 할 수 있다. PEG의 분자량이 증가함에 따라 수율이 감소하는 원인으로 CM-Sepharose resin의 micropore에서의 기하학적인 방해가 있기 때문이라고 판단된다.

Solid-phase PEGylation 공정이 liquid-phase PEGylation 공정에 비한 장점으로서는 재현성 높은 반응, 불순물 제거 및 PEGylates 분리를 위한 별도의 공정부담이 줄어든다는 점, 그리고 반응 후 분리 정제 단계에서의 위험요인들을 제거할 수 있다는 점이 있다.

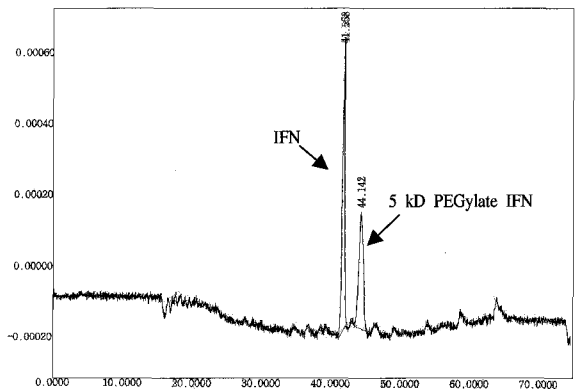


Figure 5. RP-HPLC (C4) separation of the native and mono-PEGylated IFNs.

mono-PEGylated IFN의 생물학적 활성 분석

PEGylation 후의 단백질의 생물학적 활성은 감소한다고 알려져 있으며, PEG의 분자량이 증가할수록 활성이 더욱 감소한다. 이번 IFN에 대한 실험에서도 같은 현상이 관찰되었다. 5, 10, 20 kD인 PEG와 mono-PEGylated된 IFN의 항바이러스성은 각각 native PEG의 약 70.6%, 55.3%, 21.3%였다. IFN의 수용체 결합 도메인은 Cys 29 - Asp 35와 Phe 123 - Trp 140으로 보고되어 있다(14). N-terminus가 4개의 활성 부위로부터 떨어져있고 생물학적 활성을 필요로 하지 않기 때문에, 생물학적 활성의 큰 손실은 PEGylation으로부터 얻는 안정성 향상에 의해 상쇄될 수 있다(31).

PEGylates의 면역반응성은 항체-항원 반응에 의해 간접적으로 측정하였다. 5, 10, 20 kD PEG와 mono-PEGylated된 IFN의 면역반응성은 각각 native IFN의 약 48%, 23%, 15%

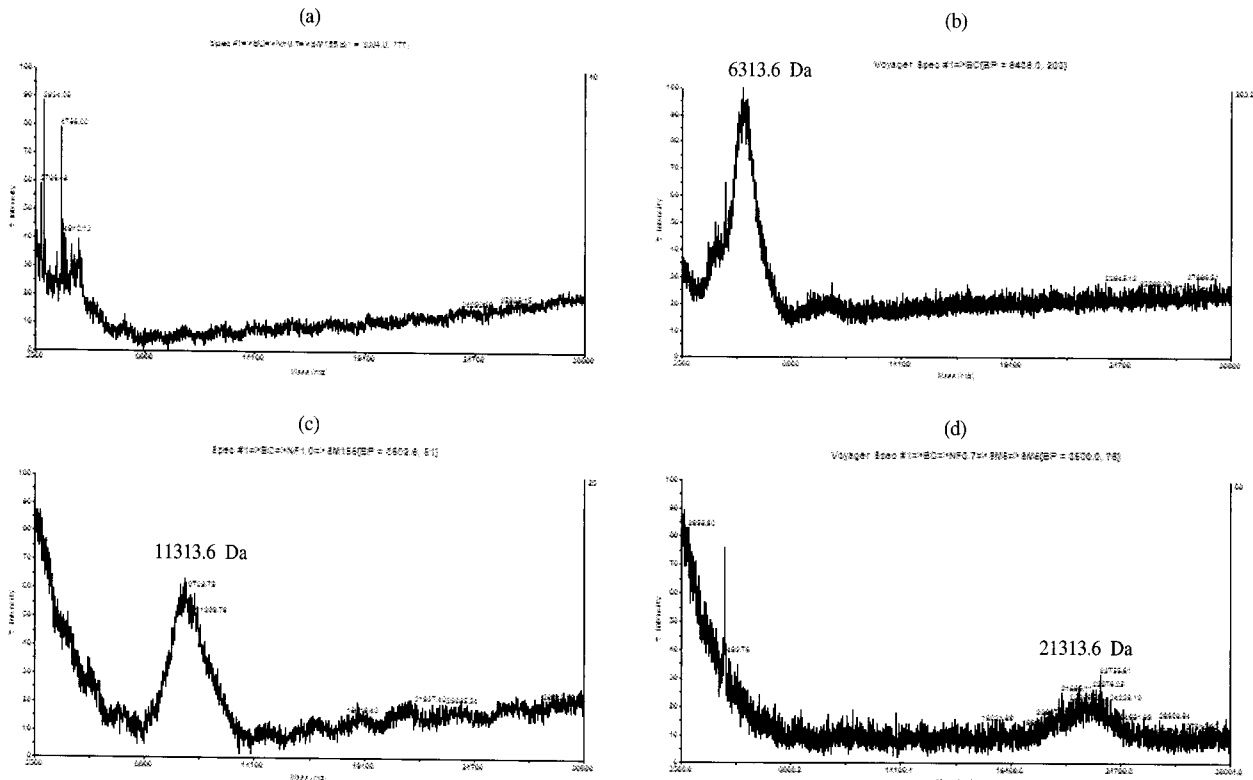


Figure 6. Mass spectra of the peptide fragment containing N-terminus ((a) native IFN, (b) 5 kD mono-PEGylated IFN, (c) 10 kD mono-PEGylated IFN, (d) 20 kD mono-PEGylated IFN).

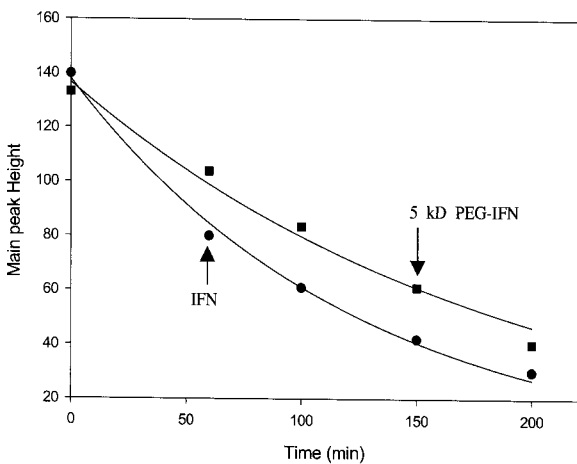


Figure 7. Time course profiles of trypsin digestion of native (●) and mono-PEGylated (■) IFNs.

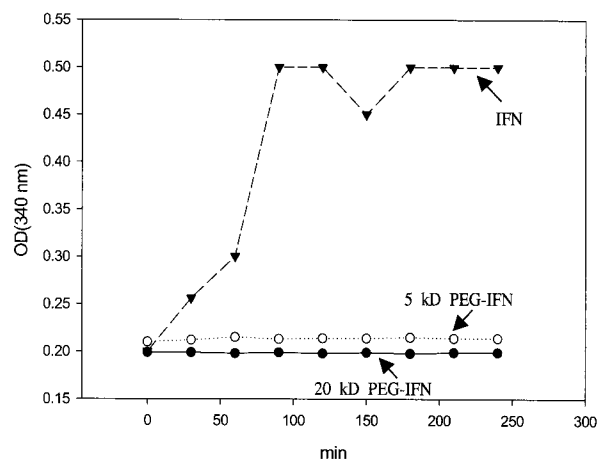


Figure 8. Thermal stability of the native (▼) and the modified IFNs conjugated by 5 kD PEG (○) and 20 kD PEG (●).

로 감소하였다. 또한 PEG와 결합되어 항체-항원 반응을 포함하는 단백질의 초기 활성이 감소되고, 그 양은 PEG 분자량과 비례한다는 이전의 연구와 동일하였다. 일반적으로 단일 클론 항체의 epitope 부위는 Leu 30 - Ile 53사이에 있는 3개의 sites로 이루어져 있다고 알려져 있다(16, 17). 이 epitope 부위가 N-terminus와 근접해 있기 때문에 PEG의 결합에 의해 PEGylates의 항체-항원 반응이 많은 영향을 받는 것으로 판단된다.

mono-PEGylate의 위치 특이성 분석

PEGylate의 digest mass spectra로부터 N-terminus 부위를 포함한 peptide 절편이 사라졌는지 확인하였고, PEG 결합 때문에 증가된 질량이 반영된 새로운 peak가 생긴 것을 확인하였다 (24). Fig. 6은 질소말단기를 포함하는 peptide 절편의 질량 (1313 kD)이 결합된 PEG 분자량만큼 증가됨을 보여준다. 이 결과는 PEG가 N-terminus에 결합되었음을 보여준다. 그리고 Edman degradation에 의한 N-terminal sequencing은 4 cycle 이후

에도 N-terminus가 절단되지 않음을 보여준다. 왜냐하면 결합으로 변성된 amine은 FDNB (1-fluoro-2,4-dinitrobenzene)에 의한 peptide 절단을 막아준다고 알려져 왔기 때문에 PEG가 N-terminus에 결합된 것으로 판단하였다.

mono- PEGylated IFN의 안정성 분석

대부분의 주사용 의약 단백질은 혈액 내 순환 시 단백질 분해 효소에 의한 반응으로 생물학적 활성이 급격히 감소하게 되지만(14, 17), 수용액상의 안정성은 PEGylation에 의해 크게 향상될 수 있다. 본 연구에서는 in vitro에서 trypsin 저항을 측정함으로써 mono-PEGylate의 안정성 향상을 평가하였다. 수식된 PEG가 trypsin에 의한 절단을 방해하면서, native IFN과 mono-PEGylated IFN의 단위 시간당 분해속도가 달라진(17). 이 변화를 1차 반응 속도식에 적용시켜 1차 반응 속도상수 (k)를 구하여 안정성 향상효과를 정량적으로 결정하였다. Fig. 7은 5 kD PEG를 이용한 mono-PEGylate의 반응 속도상수 (k)가 $0.82 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ 에서 $0.50 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ 로 감소함을 보여준다. 이의 차이를 통해서 PEGylated IFN이 몸 안에 주입되었을 때 단백질 분해효소에 대한 저항성이 향상됨을 예상할 수 있다. 그리고 PEG의 분자량이 커질수록 이 효과는 더욱 커질 것으로 예측한다.

Mono-PEGylate의 열 안정성 향상은 50°C에서 변성을 관찰함으로써 측정하였다. Fig. 8에서 보듯이 native IFN은 100분 내에 급격히 변성되는 반면 mono-PEGylate는 240분 동안 변성이 일어나지 않음을 볼 수 있다. 접합된 PEG는 hydrophobic 표면 주위에서 단백질 분자 사이의 소수성 인력작용을 방해하여 응집되는 것을 방지한다(32). 요약하면, 항 trypsin과 열 안정성은 N-terminus mono-PEGylation에 의해 현저하게 증가한다.

요 약

혈액 내 순환시 안정성 향상과 면역원성의 감소를 위해, rhIFN- α -2a은 N-terminus의 α -아미기에 mPEG aldehyde를 solid-phase PEGylation 시킨다. CM-Sepharose와 같은 양이온 교환 수지가 고체 지지체로 사용되었다. Mono-PEGylate는 양이온 교환 수지에서 unmodified 단백질과 분리되어 용출된다. Site-specific PEGylation과 mono-PEGylate의 분리가 한 단계의 공정으로 얻어진다는 점은 solid-phase PEGylation의 이점을 뒷받침해 준다. 위치 특이성은 peptide digest의 질량 분석과 Edman degradation을 이용한 N-terminal sequencing에 의해 확인하였다. Mono-PEGylate는 항바이러스 활성과 면역원성의 감소를 나타내고, 감소 정도는 결합되는 mPEG의 분자량에 비례한다. Trypsin 저항성과 온도 안정성은 mono-PEGylation에 의해 두드러지게 개선되었다. Solid-phase PEGylation을 통해 종래의 액상 반응에서 나타날 수 있는 재현성 낮은 반응, 부 반응물 생성, 부 반응물 제거 공정 등의 단점을 극복할 수 있었다. 그러나 solid-phase PEGylation의 문제점인 액상 반응에 비교하여 많은 양의 PEG를 사용하여야 한다는 점은 개선되어야 한다.

감 사

교육인적자원부, 산업자원부, 노동부 지원의 최우수 실험실 지원사업 (차세대 바이오의약 생산을 위한 생물인식공학 기술개발)을 통해 본 연구의 연구비를 지원해 준 (주)녹십자에 감사드립니다. 인하대학교 초정밀생물분리기술센터의 연구비 지원에도 감사드립니다.

REFERENCES

1. Corssmit, E. P. M., J. D. Metz, H. P. Sauerwein, and J. A. Romun (2000), Biologic responses to IFN- α administration in humans, *J. Interferon and Cytokine Research* **20**, 1039-1047.
2. Potera, C. (2003), Pegylation for improving polypeptidedrugs, *Genetic Engineering News* **23**, 58-60.
3. Perry, C. M. and Blair, J. (2001), Peginterferon-alpha-2a (40kD), *Drugs* **61**, 2263-2288.
4. Bailon, P., A. Palleroni, C. A. Schaffer, C. L. Spence, W. J. Fung, J. E. Porter, G. K. Ehrlich, W. Pan, Z. X. Xu, M. W. Modi, A. Farid, and W. Berthold (2001) Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: A 40 kDa branched polyethylene glycol-conjugated interferon alpha 2a for the treatment of Hepatitis C, *Bioconjugate Chemistry* **12**, 195-202.
5. Harris, J. M., N. E. Martin and M. Modi (2001), PEGylation: A novel process for modifying pharmacokinetics, *Clinical Pharmacokinetics* **40**, 539-551.
6. Liptakova, H., P. Kontsek (1990), Problem of recombinant interferon alpha 2-immunogenicity in therapy, *Do Redakcie Dosto* **100**, 139-143.
7. Reddy, K. R., T. L. Wright, P. J. Pockros, M. Shiffman, G. Eversom, R. Reindollar, M. W. Fride, P. P. Purdum III, D. Jensen, C. Smith, W. M. Lee, T. D. Boyer, A. Lin, S. Pedder, and J. Depamphilis (2001), Efficacy and safety of PEGylated(40 kDa) interferon alpha 2a compared with interferon alpha 2a in noncirrhotic patients with chronic Hepatitis C, *Hepatology* **33**, 433-438.
8. Pepinsky, R. B., J. L. Doreen, G. Alan, and etc. (2001), Improved pharmacokinetic properties of a polyethyleneglycol modified form of interferon-beta-1a with preserved in vitro bioactivity, *The J. pharmacology and experimental therapeutics* **297**, 1059-1066.
9. Bailon, P., and W. Berthold (1998), Polyethylene glycol- conjugated pharmaceutical proteins, *P. S. T. T.* **1**, 352-356.
10. Hinds, K. D. and S. W. Kim (2002), Effect of PEGconjugation on insulin properties, *Advanced Drug Delivery Reviews* **54**, 505-530.
11. Kodera, Y., A. Matsushima, M. Hiroto, H. Nishimura, A. Ishii, T. Ueno, and Y. Inada (1998), PEGylation of proteins and bioactive substances for medical and technical applications, *Progress Polymer Science* **23**, 1233-1271.
12. Zalipsky, S. (1995), Chemistry of polyethylene glycolconjugates with biologically active molecules, *Advanced Drug Delivery Reviews* **16**, 157-182.
13. Conover, C. D., R. B. Greenwald, A. Pendri and K. L. Shum (1999), Camptothecin delivery systems: the utility of amino acid spacers for the conjugation of camptothecin with polyethylene glycol to create prodrugs, *Anti-cancer Drug Design* **14**, 499-506.
14. Means, G. E., and R. E. Feeney (1995), Reductive alkylation of proteins, *Analytical Biochemistry* **224**, 1-16.
15. Kinstler, O. B., Brems, D. N., Lauren, S. L., Paige, A. G., Hamburger, J. B. and Treuheit, M. J. Characterization and stability of N-terminally PEGylated rhG-CSF. *Pharm. Res.* **13**, 996-1002 (1996)
16. Kinstler, O. B., US patent, 19, 5824784 (1998).
17. Kinstler, O., G. Molineux, M. Treuheit, D. Ladd, C. Gegg (2002), Mono-N-terminal poly(ethylene glycol)-proteinconjugates, *Advanced Drug Delivery* **54**, 477-485.

18. Wang, Y. S., S. Youngster, M. Grace, J. Bausch, R. Bordens, and D. F. Wyss (2002), Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha 2b and its therapeutic implications, *Advanced Drug Delivery Reviews* **54**, 547-570.
19. Lee, H. S., I. H. Jang, S. H. Ryu, and T. G. Park (2003), N-Terminal site-specific mono-PEGylation of epidermal growth factor, *Pharmaceutical Research* **20**, 818-825.
20. Yamamoto, Y., Y. Tsutsumi, Y. Yoshioka, T. Nishibata, K. Kobayashi, T. Okamoto, Y. Mukai, T. Shimizu, S. Nakagawa, S. Nagata, and T. Mayumi (2003), Site-specific PEGylation of a lysine-deficient TNF-alpha with full bioactivity, *Nature Biotechnology* **21**, 546-552.
21. You, C. H. (2001), Solid-phase mono-PEGylation for functionally improved recombinant interferon-alpha-2a, M. S. Thesis, Dep. of Chemical Engineering, Hanyang University, Korea.
22. Lee, B.K., Lee, J.D. and Lee, E.K. (2004), Solid-phase, N-terminus-specific, mono-PEGylation of Recombinant Interferon- α -2a: Purification, Characterization, and Bioactivity, presented at ISPPP 2004, Aachen, Germany.
23. Lee, B.K., Korean patent #0453185(2004).
24. Allen, D., R. Baffi, J. Bausch, J. Bongers, M. Costello, J. Dougherty, Jr. M. Federici, R. Garnick, S. Peterson, R. Riggins, K. Sewerin, and J. Tuls (1996), Validation of peptide mapping for protein identity and genetic stability, *Biologicals* **24**, 255-275.
25. Takacs, M. A., S. J. Jacobs, R. M. Bordens, and S. J. Swanson. (1999), Detection and characterization of antibodies to PEG-IFN-alpha 2b using surface plasmon resonance, *J. Interferon and Cytokine Research* **19**, 781-789.
26. Rubinstein, S., P. C. Familletti, and S. Pestaka (1981), Convenient assay for interferons, *J. Virology* **37**, 755-758.
27. Gillis, E. H., J. P. Gosling, J. M. Sreenan, and M. Kane (2002), Development and validation of a biosensor-based immunoassay for progesterone in bovine milk, *J. Immunological Methods* **267**, 131-138.
28. Lofas, S., M. Malmqvist, I. Ronnberg and E. Stenberg (1991), Bioanalysis with surface plasmon resonance, *Sensors and Actuators B* **5**, 79-84.
29. Hellman, U., C. Wernstedt, J. Gonez, and C. Heldin (1995), Improvement of an "In-Gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing, *Analytical Biochemistry* **224**, 451-455.
30. Ghorbel, B., A. S. Kamoun, M. Nasri (2003), Stability studies of protease from bacillus cereus BG1, *Enzyme and Microbial Technology* **6261**, 1-6.
31. Seely, J. E., Buckel, S. D., Green, P. D. and Richey, C. W. (2005), Making site-specific PEGylation work, *BioPharm International*, March 2005, p.30-41.
32. Kim, C.S. and Lee, E.K. (2000), Effect of operating parameters in in-vitro renaturation of a fusion protein of human growth hormone and glutathione S transferase from inclusion body, *Process Biochemistry*, **36**, 111-117.