

PEGylation 기술을 이용한 단백질 의약품 개발

나동희*

Development of Protein Drugs by PEGylation Technology

Dong Hee Na*

접수: 2011년 7월 16일 / 게재승인: 2011년 8월 3일
© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: PEGylation, the attachment of polyethylene glycol (PEG) to proteins, is currently main technology for improving efficacy of protein drugs. This technology can prolong the plasma half-life, augment the *in vivo* stability, and diminish the immunogenicity of therapeutic proteins. Therefore, PEGylated proteins have the enhanced therapeutic efficacy and the reduced undesirable effects versus their native therapeutics. Since the first PEGylated protein product appeared on the market in the early 1990s, currently ten PEGylated protein products have been launched. These marketed drug products have proved the applicability and safety of the PEGylation technology. This review presents overview of PEGylation technology and addresses characteristics of PEGylation methods applied for the development of several protein drugs.

Keywords: Biopharmaceuticals, PEGylation, Poly(ethylene glycol), Protein drugs

1. 서론

유전자재조합기술 (recombinant DNA technology)을 이용하여 1982년 세계 최초의 생명공학의약품인 유전자재조합 휴먼 인슐린 (recombinant human insulin)이 등장한 이후, 30년 동안 급속한 기술의 발전과 더불어 수많은 단백질의약품들이 개발되어 의약품으로 임상에 사용되고 있다. 생명공학 및 의

약품 개발 기술이 발전함에 따라 단백질의약품의 개발 및 의약품시장에서의 비중도 나날이 커지고 있는데, 2007년 Nature Biotechnology 저널에 발표된 자료에 따르면 2006년 기준으로 연매출액 10억 달러 이상의 블록버스터 의약품에 해당하는 단백질 의약품은 적어도 23개 이상이며, 이들 의약품의 시장 규모는 520억 달러를 기록했었다 [1]. 임상에서 비중 있게 사용되고 있는 주요 단백질 의약품을 살펴보면, 류마티스 관절염 치료제로 사용되는 융합단백질 또는 항체단백질 의약품인 Enbrel® (Amgen), Remicade® (J&J), Humira® (Abbott) 등의 항 tumor necrosis factor (TNF)- α 계열 의약품, Epogen® (Amgen), Procrit® (J&J), Aranesp® (Amgen) 등의 erythropoietin (EPO) 계열 의약품, Novolin® (Novo Nordisk), Humulin® (Lilly), Lantus® (Sanofi Aventis) 등의 인슐린 계열 의약품, PEG-Intron® (Shering-Plough), Pegasys® (Roche), Avonex® (Biogen Idec), Rebit® (Sereno) 등의 인터페론 의약품, Neulasta® (Amgen)와 Neupogen® (Amgen)으로 대표되는 granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) 의약품, Rituxan® (Genentech), Herceptin® (Genentech), Avastin® (Genentech) 등의 항암제로 사용되는 항체의약품들이 있다.

단백질 의약품은 여러 질환에서 치료제로서 중요한 위치를 차지하고 있고 시장에서도 기존의 저분자합성의약품 보다 매우 빠른 속도로 성장하고 있으나, 의약품으로서의 여러 문제점, 예를 들면, 경구투여시 매우 낮은 생체이용률을 보이며, 정맥 또는 피하 등의 주사시에도 혈액중에서 짧은 반감기로 인해 주사 투여 간격이 짧은 경우가 많아 환자의 불편이 심하고, 경우에 따라서는 면역원성을 나타내는 등으로 인해 의약품으로서의 유용성이 상당히 제한되어 왔다. 이러한 문제점들을 해결할 수 있는 방안으로 개발된 기술중 하나가 단백질에 생체적합성 고분자인 poly(ethylene glycol) (PEG)을 결합시키는 PEGylation 기술이다 (Fig. 1).

경성대학교 약학대학
College of Pharmacy, Kyungshung University, 309 Suyeong-ro,
Nam-ku, Busan 608-736, Korea
Tel: +82-51-663-4881, Fax: +82-51-663-4809
e-mail: dhna2@ks.ac.kr

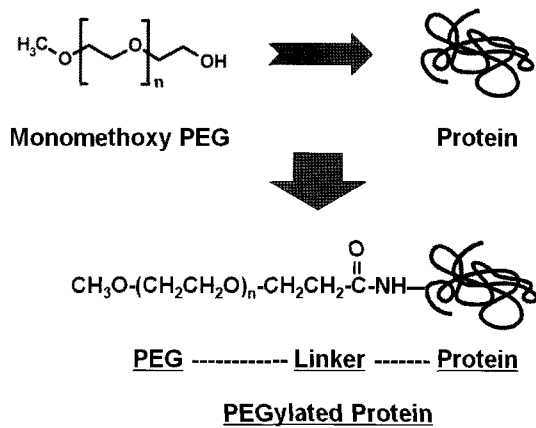


Fig. 1. Structure of PEGylated Protein.

PEGylation 기술은 1977년 Abuchowski와 Davis가 선도적인 연구 결과를 발표한 이후 단백질을 비롯한 여러 바이오약물들을 대상으로 연구되어온 대표적인 생접합기술 (bioconjugation technology)로서 약물의 혈중 반감기 증가, 면역원성 및 독성 감소, 용해도 증가 등의 효과로 인해 단백질 의약품의 치료 효과를 크게 향상시키는 기술로 주목 받아 왔다 [2,3]. 1990년에 최초로 PEG-adenosine deaminase (Adagen[®])가 개발된 이후 1994년 PEG-asparaginase (Oncaspar[®]), 2000년 PEG-interferon α -2b (PEG-intron[®]), 2002년 PEG-interferon α -2a (Pegasys[®]), PEG-G-CSF (pegfilgrastim, Neulasta[®]), PEG-growth hormone receptor antagonist (Pegvisomant, Somavert[®]), 2004년 PEG-anti-VEGF aptamer (Pegaptanib, Macugen[®]), 2007년 PEG-erythropoietin beta (Methoxy polyethylene glycol-epoetin beta, Mircera[®]), 2008년 PEG-

anti-TNF Fab (Certolizumab pegol, Cimzia[®]) 그리고 최근 2010년에 PEG-uricase (Pegloticase, Krystexxa[®]) 등이 PEGylation 기술을 이용하여 개발되어 시판되고 있다 (Table 1). 이들 중 Neulasta[®]와 Pegasys[®]는 연매출 30억 달러와 15억 달러 이상을 올리는 블록버스터급 의약품이다. 이들 초대형 매출을 기록하는 의약품들을 비롯하여 꾸준히 개발되고 있는 PEG-단백질 의약품들은 그 자체로서 PEGylation 기술이 단백질 약물전달을 위한 효과적인 기술임을 입증한다고 볼 수 있다.

2. PEGylation 효과

단백질이 PEGylation에 의해 구조가 변형됨으로써 가지게 되는 주요 장점은 (1) PEG결합으로 인해 분자 크기가 커짐으로써 신사구체 여과로 인한 신장에서의 소실 (renal clearance)이 감소되고 그 결과 약물의 혈중 반감기 증가, (2) 비면역원성의 PEG가 단백질 표면에서 항체가 인식하는 epitope를 가림으로써 투여된 단백질이 발현하는 면역원성 감소, (3) PEG의 steric hindrance에 의해 체내 단백분해효소 (proteolytic enzyme)의 접근이 막아짐으로써 단백분해효소 (proteolytic enzymes)에 대한 안정성 증가, (4) PEG의 친수성 성질에 의해 수용액중에서의 용해도 증가 등을 들 수 있다 [4,5]. 반면 단점으로는 PEG의 결합으로 인해 약물작용 수용체와의 결합률이 낮아지고 이에 따라 약물 자체의 활성이 감소할 수 있으며, PEG로 인해 약물의 구조가 더욱 복잡해지고 규격 설정을 비롯한 분석이 어려워진다는 점을 들 수 있다 [6]. 이와 같은 문제점을 극복하거나 최소화시키는 방안들이 다각적인

Table 1. Biopharmaceuticals developed by PEGylation technology

PEG conjugates (Product name)	Manufacturer	PEGylation Chemistry	Disease	Year
PEG-adenosine deaminase (Adagen [®])	Enzon	Linear PEG-5kDa, random, multiple amine PEGylation	Severe combined immunodeficiency disease (SCID)	1990
PEG-asparaginase (Oncaspar [®])	Enzon	Linear PEG-5kDa, random, multiple amine PEGylation	Acute lymphoblastic leukemia	1994
PEG-interferon α -2b (PEG-intron [®])	Schering-Plough/ Enzon	Linear PEG-12kDa, random, mono amine PEGylation	Hepatitis C	2000
PEG-interferon α -2a (Pegasys [®])	Roche/Nektar	Branched PEG-40kDa, random, mono amine PEGylation	Hepatitis C	2002
PEG-G-CSF (pegfilgrastim, Neulasta [®])	Amgen	Linear PEG-20kDa, N-terminally site-specific PEGylation	Neutropenia	2002
PEG-growth hormone receptor antagonist (Pegvisomant, Somavert [®])	Pfizer	Linear PEG-5kDa, random, multiple amine PEGylation	Acromegaly	2002
PEG-anti-VEGF aptamer (Pegaptanib, Macugen [®])	Pfizer	Branched PEG-40kDa, random, mono amine PEGylation	Macular degeneration	2004
PEG-erythropoietin beta (Methoxy PEG-epoetin beta, Mircera [®])	Roche	Linear PEG-30kDa, random, mono amine PEGylation	Anemia associated with chronic kidney disease	2007
PEG-anti-TNF Fab (Certolizumab pegol, Cimzia [®])	UCB	Branched PEG-40kDa, site-specific thiol PEGylation	Rheumatoid arthritis and Crohn's disease	2008
PEG-uricase (Pegloticase, Krystexxa [®])	Savient	Linear PEG-10kDa, random, multiple amine PEGylation	Chronic gout	2010

Table 2. Advantages and disadvantages of PEGylation technology

Advantages	Disadvantages	Approaches to overcome limitations
- Increased circulating half-life	- Loss of biological activity	- Site-specific PEGylation
- Reduced immunogenicity	- Incomplete characterization	- Development of analytical methods
- Increased proteolytic stability	- Polydispersity of PEG	- Monodisperse PEG
- Enhanced aqueous solubility		

로 연구되고 있으며 (Table 2), 주목할만한 시도들로는 단백질 비활성부위에 선택적으로 PEG를 결합시키는 site-specific PEGylation 방법과 prodrug 개념으로 PEG를 결합시켜 생체 내에서 PEG가 단백질로부터 분리되도록 하는 방법 등이 있다 [7]. 또한 PEG는 합성폴리머 (synthetic polymer)의 특성상 다분산성 (polydispersity)을 가지므로 PEG 원료의 규격 설정 및 균일성 확보가 쉽지 않다는 점이 문제가 될 수 있다. 이에 대한 해결방안으로 최근에 단분산성 (monodisperse) PEG가 개발되었으나, 아직까지는 분자량 4,000이상의 고분자를 만들 수 없다는 한계가 있어 유용성이 낮다 [8].

3. PEG의 특성과 유도체

PEGylation이 단백질에 미치는 영향은 PEG 자체의 특성으로부터 나온다. PEG는 말단에 알콜기를 가진 폴리에테르 폴리머이다. PEG는 물과 유기용매 (toluene, methylene chloride, ethanol, acetone 등)에 모두 용해되는 양쪽성 물질이다. PEG는 ethylene oxide (44 Da) 구조가 반복되는 폴리머로 다분산성 (polydispersity)를 가지며, PEG의 다분산성은 다른 폴리머들과 비교했을 때 좁은 범위에 해당하는 1.01~1.10에 해당한다. 하지만, PEG의 다분산성은 PEGylation을 통해 의약품으로 개발할 때 불균질 혼합물 (heterogeneous mixture)을 생성하는 원인이 되므로 규격 설정 및 품질관리 등에서 어려움을 가져올 수 있다.

PEG는 인체에 무해하다고 입증되어 식품의약품안전청으로부터 인체 사용이 허가된 몇 안 되는 합성폴리머 중 하나이다. PEG의 독성 연구에 의하면 분자량 400 Da 이하의 작은 PEG는 체내 alcohol dehydrogenase에 의해 독성을 가진 diacid와 hydroxy acid 대사물로 산화되어 뇨로 배설되는 것으로 알려져 있으나, 분자량 1,000 이상의 PEG는 이런 경로로 대사되지 않으며, 특이한 독성을 나타내지 않는다 [9]. 따라서 1,000 Da 이상에서 40,000 Da 범위의 PEG 유도체는 안전하게 사용할 수 있는 폴리머에 해당한다. 또한 PEG는 인체에서의 면역원성이 매우 낮은 폴리머이다 [10,11]. 단백질에 결합되었을 때 PEG분자 자체의 낮은 면역원성으로 인해 분자 크기의 증가에도 불구하고 면역원성의 문제를 일으키지 않음과 동시에 오히려 항체 결합 부위를 가림으로 인해 단백질이 가지는 면역원성까지도 저하시키는 효과를 나타낸다 [2]. 현재까지 다수의 PEG-단백질 약물의 임상시험에서 PEG에 대한 항체가 생성되었다는 보고는 없다.

PEG는 체내에서 일반적으로 구조의 변화 없이 배설되고 알려져 있으며, 그 소실 (clearance)은 분자크기에 의해

주로 좌우된다. 분자량 20 kDa 이하의 PEG는 뇨 (urine)를 통해 주로 배설되며, 그보다 큰 PEG는 느린 속도로 뇨보다는 주로 대변을 통해 배설된다. PEG의 신장 소실 속도는 신장에서의 신사구체 여과 속도 (glomerular filtration rate)에 의해 조절되는데, PEG는 수용액에서 다량의 물분자와 결합하여 수화반경 (hydrodynamic radius)이 커지므로 단백질에 비해 같은 분자량에서도 신사구체 여과 속도가 많이 느리다 [12,13].

PEGylation에 사용하는 PEG는 일반적으로 양쪽의 알콜기중 한쪽 말단 부위를 methoxy group으로 치환한 monomethoxy PEG (mPEG)를 사용하며, 다른 한 쪽 말단 알콜기는 단백질과 화학적 반응을 할 수 있는 기능기로 유도체화하여 사용한다. 따라서 치환된 PEG 기능기의 화학적 반응성에 따라 단백질의 결합부위가 결정된다. PEG결합 부위로 고려되는 주요 아미노산 부위는 lysine, cysteine, histidine, N-terminal amino group, C-terminal carboxylic acid이다. 목적하는 PEGylation 부위에 따라 다양한 PEG 유도체가 상용화되어 있으며, 단백질 결합 부위 (amine, thiol, N-terminus 등), PEG conjugate의 활성과 약물동력학적 특성, multi-PEG species (PEG-mers)와 positional-PEG isomer의 생성, PEG conjugate의 면역원성 등을 고려하여 적절한 PEG 유도체 선정이 중요하다.

단백질에 PEG를 결합시키기 위한 목적으로 가장 많이 이용되는 부위는 lysine (Lys) 잔기나 N-terminus에 존재하는 primary amino group이다. 이 부위의 PEGylation을 위해서는 PEG-carboxylic acid의 N-hydroxysuccinimide (NHS) ester 유도체가 가장 많이 이용된다. 단백질과 PEG-NHS ester 유도체간의 반응은 단백질의 Lys 잔기나 N-terminus에 존재하는 primary amine의 nucleophilic attack에 의해 일어나며, 상온에서 pH 7~9의 용액중에서 반응이 잘 일어난다 [14]. PEG-NHS 유도체는 단백질의 primary amine에 무작위적으로 결합하여 결합부위를 조절하기 힘들다. 따라서 특정 부위만을 타겟 부위로 하기 위해서는 특이적인 기능을 가진 PEG 유도체가 필요하다.

단백질의 N-terminus 만을 선택적으로 PEGylation하는 방법으로는 PEG-aldehyde 유도체가 많이 이용된다. PEG-aldehyde를 이용한 N-terminal PEGylation 반응은 5~20 mM sodium cyanoborohydride (NaCNBH₃)을 함유한 pH 5~6의 완충액에서 주로 이루어진다 [15,16]. 이 반응은 N-terminal α-amine과 Lys의 ε-amine간의 pKa의 차이를 이용하여 이루어지는데, 일반적으로 단백질의 N-terminal α-NH₂의 pKa는 약 7.6~8.0 정도로 lysine 잔기 primary amine (ε-NH₂)의 pKa (10.0~10.2)와 차이를 보인다. 따라서 mPEG-NHS ester 유도

체와 반응시 일반적으로 pH 8 이상에서는 ϵ -NH₂이 먼저 반응하지만, pH 5-6 범위에서는 α -NH₂의 반응이 상대적으로 더 우수하다. 이러한 특성을 이용하여 N-terminus와 Lys 간의 선택적인 반응 조절이 가능하다 [17,18].

단백질에 free cysteine (Cys)이 존재하는 경우 Cys의 thiol (-SH)을 타겟으로 하여 PEGylation 반응이 가능하다. Thiol PEGylation을 위해 사용되는 PEG 유도체로는 PEG-maleimide, PEG-vinylsulfone, PEG-iodoacetamide, PEG-pyridyldisulfide가 대표적이다 [19]. PEG-maleimide, PEG-iodoacetamide, PEG-vinylsulfone은 단백질과 PEG간에 안정한 thioether 결합을 형성하는 반면, PEG-pyridyldisulfide는 disulfide 결합을 형성하여 체내에서 glutathione 등에 의해 환원될 수 있다 [20]. 일반적으로 단백질에 free Cys이 존재하지 않는 경우가 대부분인데, 이 경우에는 site-directed mutagenesis에 의해 Cys 잔기를 특정 위치에 도입한 후, 이 부위에 선택적으로 PEG를 결합시키는 방법이 주로 응용된다 [21]. Thiol PEGylation은 단백질의 생리활성 부위에 영향을 미치지 않는 부위에 선택적으로 PEG의 결합이 가능하므로 활성 저하를 최소화시키면서 반감기증가 및 면역원성 감소 등의 원하는 효과를 얻어낼 수 있는 효과적인 site-specific PEGylation 방법이 된다.

당단백질 (glycoprotein)의 경우 당 (carbohydrate) 부위가 site-specific PEGylation의 타겟 부위가 될 수 있다 [22]. 당을 glucose oxidase나 sodium periodate를 이용하여 화학적으로 산화한 후, 생성된 aldehyde group에 PEG-hydrazide를 반응시키면 hydrazone 결합을 형성하는 PEG conjugate를 만들 수 있다. Hydrazone 결합은 sodium cyanoborohydride에 의해 좀 더 안정한 구조인 alkyl hydrazide로 되고, Schiff's base는 환원되어 secondary amine을 형성한다.

PEGylation 반응을 위해 일반적으로 선형구조 (linear structure)의 PEG가 주로 사용되나, 최근에는 가지형 구조 (branched structure)를 비롯해 다양한 구조의 PEG 유도체들이 개발되고 있다 [19]. Monfardini *et al.*은 아미노산 Lys의 α -amine과 ϵ -amine에 각각 선형 PEG를 amide bond로 결합시킨 Y형 구조를 개발하였는데, 이 구조는 Lys의 C-terminal을 NHS-ester로 치환하여 유도체를 만들면하나의 반응기에 PEG 분자량이 60 kDa까지 되는 고분자량의 PEG 유도체를 만들 수 있다 [20]. 가지형 구조 PEG는 선형 구조 PEG에 비해 단백질 분해효소 및 항체의접근성을 차단하는 능력이 우수해 단백질의 안정성 향상 및 면역원성 감소 효과가 크고, 하나의 결합반응기에 두 개의 PEG chain을 결합시키는 효과를 가져와 PEG 결합시 단백질 활성 저하 효과를 감소시킬 수 있는 장점을 가진다.

4. 주요 PEG-단백질 의약품

4.1. PEG-adenosine deaminase (Adagen[®])

Adagen[®]은 PEGylation 기술을 이용하여 개발된 첫 번째 의약품으로 bovine adenosine deaminase에 분자량 5 kDa의 PEG 여러 분자를 결합시켜 만든 PEG-adenosine deaminases

를 주성분으로 한다. 선천적 유전질환인 severe combined immunodeficiency disease (SCID)의 치료제로 사용되고 있다 [23,24]. PEG-adenosine deaminase는 PEGylation을 통해 이중단백질이 나타내는 면역원성을 줄이고, 단백질의 혈중 반감기를 크게 증가시켜 우수한 치료효과를 나타낸다. Bovine adenosine deaminase는 마우스에 정맥주사시 혈중 반감기가 30분에 지나지 않을 정도로 짧은 반감기를 가지는 반면, PEG-adenosine deaminase는 혈중 반감기가 약 28시간으로 약 56배 정도 긴 반감기를 나타냈다 [25].

4.2. PEG-asparaginase (Oncaspar[®])

Oncaspar[®]은 급성 림프구성 백혈병 (acute lymphoblastic leukemia) 치료제로 사용되며, L-asparaginase에 분자량 5 kDa의 PEG 여러 분자를 결합시켜 만든 PEG-L-asparaginases를 주성분으로 한다. 이 약물 또한 PEGylation을 통해 *E. coli* 또는 *Erwinia caratovora*에서 생산되는 L-asparaginase의 면역원성을 크게 줄이고, 단백질의 혈중 반감기를 크게 증가시켰다 [26]. 랫트에 복강주사시 L-asparaginase는 혈중 반감기가 약 2.9시간이었던 반면, PEG-L-asparaginase는 약 56시간의 혈중 반감기를 나타냈고 [27], 임상실험에서는 L-asparaginase의 혈중 반감기가 약 20시간이었던 반면, PEG-L-asparaginase는 약 357시간의 혈중 반감기를 나타내 약 18배의 증가를 나타냈다 [28]. 따라서 기존의 L-asparaginase는 일주일에 2~3번 투여되는 것에 비해 PEG-L-asparaginase는 2주에 1번 투여되어 환자의 편의성을 크게 개선시킬 수 있었다. 또한 L-asparaginase 투여시 나타나던 toxic hypersensitivity도 PEG-L-asparaginase 투여시 크게 감소하였다 [26].

4.3. PEG-interferon alfa-2b (PEG-Intron[®])

C형 간염 (hepatitis C) 치료제로 사용되고 있는 PEG-Intron[®]은 앞서 소개한 두 의약품이 5 kDa의 PEG를 다발적으로 결합시킨 것과 달리 12 kDa의 PEG를 단백질 분자당 한 분자 결합시킨 mono-PEG-interferon alfa-2b를 주성분으로 한다. PEGylating agent로 mPEG-succinimidyl carbonate (12 kDa)를 사용하였으며, sodium phosphate buffer (pH 6.5)에서 제조하였을 때 mono-PEG-interferon 중에서 PEG 결합위치가 다른 14개의 위치이성질체 (positional isomer)가 생성됨이 확인되었고, 그 중 histidine-34 위치에 47%로 가장 많은 결합을 하는 것으로 분석되었다 [29-31]. Mono-PEG-interferon alfa-2b의 *in vitro* 활성은 native interferon alfa-2b의 28%인 것으로 나타났으나, 임상실험에서 PEG-Intron[®]의 혈중 반감기는 약 40시간으로 기존의 Intron A[®]에 비해 약 10배 이상 긴 반감기를 보였다 [32]. 이를 바탕으로 기존 Intron A[®]는 2일에 한 번 주사 받는 반면, PEG-Intron[®]은 일주일에 한 번 주사하여 환자의 편의성을 크게 증가시켰다. Histidine 위치에 결합한 PEG접합체는 수용액에서 장시간 보관시 불안정하기 때문에 이 의약품은 동결건조 제형으로 개발되었다.

4.4. PEG-interferon alfa-2a (Pegasys[®])

Pegasys[®]은 PEG-Intron[®]에 사용된 interferon alfa-2b와 아미노산 서열이 하나가 다른 interferon alfa-2a를 사용하여 제조

된 PEG-interferon alfa-2a를 주성분으로 하며 마찬가지로 C형 간염 치료제로 사용되고 있다. 처음 PEGylation 연구는 분자량 5 kDa mPEG를 이용하여 PEG-5K-interferon alfa-2a가 임상2상까지 진행되었으나, 기존의 인터페론 의약품 (Roferon-A[®])에 비해 뚜렷한 약물동력학적 특성과 치료 효과의 개선 효과를 얻지 못해 중단되었다. 이후 혈중 반감기를 크게 증가시키기 위한 목적으로 크기가 큰 PEG의 효과를 연구하게 되었고, 최종적으로 분자량 20 kDa의 PEG 두 분자가 가지형으로 결합된 40 kDa의 branched succinimidyl PEG (PEG2-NHS)를 결합시킨 mono-PEG-interferon alfa-2a가 개발되었다 [33]. PEG2-NHS를 interferon alfa-2a에 몰비 (PEG:단백질) 3:1로 50 mM sodium borate buffer (pH 9)에서 반응시켰을 때, 전체 단백질중 45-50%에 해당하는 mono-PEG-interferon alfa-2a가 얻어졌으며, PEG 결합의 주요 부위는 Lys-31, Lys-121, Lys-131, Lys-134인 것으로 밝혀졌다 [34]. 즉, 주된 위치이성질체는 4종류가 존재하는 것으로 확인되었으며, 이는 PEG-5000을 결합시켰을 때 생성된 mono-PEG-interferon alfa-2a의 위치이성질체 종류가 11가지였던 것에 비하면 매우 적은 수에 해당한다 [35]. 이는 PEG2-NHS의 크기와 가지형 구조로 인한 steric hindrance로 인해 PEGylation 반응률이 낮아지기 때문으로 보인다. 또한 PEG2-NHS의 구조는 생성된 mono-PEG-interferon alfa-2a의 수용체 결합력을 저하시켜 *in vitro* 활성이 native interferon 대비 7%에 지나지 않는 결과를 가져왔다. 하지만 Pegasys[®]는 임상실험에서 소실 반감기가 61-110시간으로 소실반감기가 27.2~39.3시간인 PEG-Intron[®]보다 2배 이상 긴 반감기를 나타냈다 [36]. Pegasys[®]의 PEG-interferon alfa-2a는 PEG와 단백질간의 결합에 대한 안정성이 좋아 용액으로 제형화되어 시판된다.

4.5. PEG-G-CSF (Neulasta[®])

Neulasta[®]는 *E. coli*에서 생산된 recombinant methionyl human granulocyte colony stimulating factor (rmetHuG-CSF, 상품명 Filgrastim[®])의 N-terminus에 20 kDa의 PEG를 선택적으로 결합시킨 mono-PEG-rmetHuG-CSF를 주성분으로 하며 항암치료를 위한 호중구감소증 (neutropenia) 치료를 위해 사용된다 [37]. 앞서 개발된 제품들은 모두 단백질의 lysine 잔기에 PEG를 무작위적으로 결합시키는 방법을 이용하였는데, Neulasta[®]는 mPEG-aldehyde 유도체를 이용하여 pH 5의 sodium acetate buffer에서 환원제인 sodium cyanoborohydride 존재하에 alkylation 반응에 의해 단백질 N-terminus의 α-amine에 PEG를 선택적으로 결합시키는 방법을 이용하였다 (Fig. 2) [17]. 선택적인 N-terminal PEGylation은 N-terminus의 α-amino group의 pKa (7.6~8.0)와 lysine의 ε-amino group의 pKa (10.0~10.2) 차이를 이용하여 pH 5의 산성 조건에서 이루어졌다. 선택적인 반응을 통해 mono-PEG-G-CSF는 90% 이상의 제조수율을 보였다 [18].

Filgrastim을 주성분으로 하는 Neupogen[®]은 혈중 반감기가 3.5~3.8시간으로 매우 짧아 매우 주사 투여해야 했는데, PEG-Filgrastim을 주성분으로 하는 Neulasta[®]는 임상실험에서 혈중 반감기가 46.3~62.1시간을 나타내어 화학요법 주기당 1회 주사 (one injection per chemotherapy)로 투여된다 [38].

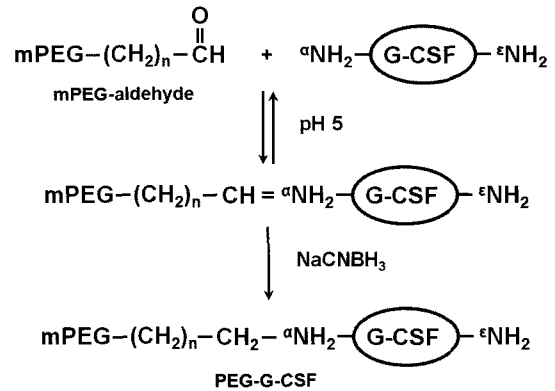


Fig. 2. N-terminally site-specific PEGylation reaction process of G-CSF.

4.6. Pegvisomant (Somavert[®])

Somavert[®]는 성장호르몬수용체 길항제 (growth hormone receptor antagonist)인 B2036 단백질에 4~6개 분자의 분자량 5 kDa의 PEG를 결합시켜 제조된 PEG-B2036을 주성분으로 하여 말단비대증 (acromegaly) 치료제로 개발되었다. 성장호르몬 수용체 (GHR)는 성장호르몬의 2개 결합 부위 (binding site 1 and 2)에 순차적으로 결합하여 (site 1에 일차 결합한 뒤 site 2에 결합) receptor dimerization과 signal transduction 기능을 하는 데, B2036 단백질은 binding site 2에 해당하는 glycine-120을 lysine으로 치환하고 (hGH G120K), 8개 부위를 추가적으로 mutation시켜 만든 GHR antagonist이다 [39]. B2036 단백질은 혈중 반감기가 15~20분으로 매우 짧아 반감기를 늘리기 위해 PEGylation이 시도되었고, 4~6개 분자의 5 kDa PEG를 B2036의 primary amino group에 다발적으로 결합시켜 만든 Pegvisomant는 GHR에 대한 친화도가 B2036보다 20배 낮았으나 혈중 반감기는 72~75시간으로 크게 증가됨을 보였다 [40,41]. Somavert[®]는 외과적 수술이나 방사선 치료 또는 somatostatin 유도체 같은 약물 치료에 부적절한 반응을 보이는 말단비대증 환자의 치료에 효과적인 것으로 나타나고 있다 [42].

4.7. Certolizumab pegol (Cimzia[®])

Cimzia[®]는 항TNF-α (anti-tumor necrosis factor-α) 모노클로날 항체 (monoclonal antibody, mAb)의 Fab' fragment에 분자량 40 kDa의 PEG를 결합시킨 PEG-Fab' conjugate를 주성분으로 하여 류마티스성 관절염 치료제로 개발되었다. Certolizumab pegol은 TNF-α에 결합하여 중화시키는 데, membrane-bound TNF를 중화시키는 데는 etanercept (Enbrel[®])보다 더 강력하고, soluble TNF를 중화시키는 데는 adalimumab (Humira[®])과 infliximab (Remicade[®])보다 더 강력한 것으로 밝혀졌다 [43]. Certolizumab pegol은 *E. coli*에서 생산된 humanized anti-TNF-α mAb의 Fab' heavy chain의 C-terminus 227번 위치 cysteine에 40 kDa의 branched PEG-maleimide를 thioether linkage로 결합하여 만들어진 다 [44]. 이 PEGylation 반응은 Fab'의 cysteine에 존재하는 free thiol에 PEG-maleimide를 선택적으로 결합시키는 것으로 균일한 조성의 PEG-conjugate를 높은 수율로 만들 수 있

는 장점을 가진다. 전체 구조를 가진 항체와 달리 Fab'은 작은 크기로 인해 혈중 반감기가 상당히 짧은 데, Certolizumab pegol은 결합된 PEG로 인해 인체에서 약 14일에 이르는 반감기를 가진다 [45]. 따라서 2주에 한 번 또는 한 달에 한 번 주사할 수 있는 제형으로 개발되었다. 일반적으로 항체가 Fc 부위에 존재하는 당쇄로 인해 동물세포 배양을 통해 고가로 생산되는 데 반해, Certolizumab pegol은 *E. coli*에서 생산되는 Fab'을 사용하여 다른 anti-TNF- α mAb 의약품인 Infliximab (Remicade[®]), adalimumab (Humira[®]) 그리고 TNF- α receptor와 Fc 부위의 퓨전단백질인 etanercept (Enbrel[®])과 비교해 충분한 가격 경쟁력을 가질 수 있는 장점을 가지고 있다.

5. 결론

PEGylation 기술은 단백질의 혈중 반감기를 증가시키고 면역 원성을 낮추어주며 단백질분해효소에 대한 안정성과 용해도를 증가시키는 등의 효과로 인해 단백질 약물이 치료학적으로 가지는 문제점을 해결함과 동시에 약물 치료효과를 증가시키는 기술로서 인정받고 있다. 1990년에 발매된 PEG-adenosine deaminase (Adagen[®])와 연매출 30억 달러 이상을 올리는 PEG-G-CSF (Neulasta[®])을 비롯하여 지금까지 발매된 10개 PEG-conjugate 의약품은 PEGylation 기술의 완성도와 안전성을 증명한다. 본 총설에서 살펴본 바와 같이 1990년대 개발된 의약품으로부터 2000년대를 넘어오면서 PEGylation 기술의 발전에 따라 새로운 의약품이 개발되어 왔다. 1990년 대 초기 의약품이 5 kDa의 비교적 작은 분자 크기의 PEG를 사용하여 non-specific multiple PEGylation으로 만든 PEG-conjugate를 주성분으로 한 이후, 2000년 초기 개발된 PEG-Intron[®]은 12 kDa의 PEG를 단백질 분자당 한 분자가 결합된 mono-PEG-interferon alfa-2b를 주성분으로 하였으며, 뒤 이어 발매된 Pegasys[®]는 20 kDa의 PEG 두 분자를 연결해 만든 40 kDa의 가지형 PEG로 만든 mono-PEG-interferon alfa-2a를 가지고 혈중 반감기가 더욱 증가된 의약품이었다. 이후 Neulasta[®]는 이전 제품들이 모두 PEG 결합부위가 무작위적인 non-specific PEGylation방법을 이용한 것과 구별되게 PEG-aldehyde를 이용하여 N-terminus에만 선택적으로 PEG를 결합시키는 site-specific PEGylation방법을 이용하였다. 비교적 최근에 개발된 Cimzia[®]는 분자량 40 kDa의 가지형 PEG-maleimie를 이용하여 free cysteine 잔기에 특이적으로 PEG를 결합시키는 site-specific PEGylation방법을 이용하였다. 이상에서 살펴본 바와 같이 PEGylation 기술은 혈중 반감기를 증가시키기 위해 크기가 크고, 단백질 활성 저하를 최소화시키며 물질의 균일성 확보를 위해 PEG 결합부위를 선택적으로 조절할 수 있는 기능을 가진 PEG 유도체를 개발하고 그 반응공정을 최적화하는 방향으로 발전되어 왔다. 그리고 이렇게 발전된 기술들이 제품화에 기여하여 왔다는 것을 현재까지 발매된 주요 의약품을 통해 살펴볼 수 있다. 앞으로도 PEGylation 기술은 단백질 의약품의 효과적인 약물전달을 위해 더욱 발전해나갈 것이며 이러한 기술들이 더욱 더 다양한 단백질 약물에 적용되어 우수한 바이오

의약품 개발을 주도해 갈 것이라 기대된다.

감사

이 논문은 2011학년도 경성대학교 학술연구비지원에 의하여 연구되었음.

References

1. Lawrence, S. (2007) Billion dollar babies-biotech drugs as blockbusters. *Nature Biotech.* 25: 380-382.
2. Abuchowski, A., J. R. McCoy, N. C. Palczuk, T. van Es, and F. F. Davis (1977) Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. *J. Biol. Chem.* 252: 3582-3586.
3. Abuchowski, A., T. van Es, N. C. Palczuk, and F. F. Davis (1977) Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. *J. Biol. Chem.* 252: 3578-3581.
4. Veronese, F. M. and A. Mero (2008) The impact of PEGylation on biological therapies. *BioDrugs* 22: 315-329.
5. Kang, J. S., P. P. Deluca, and K. C. Lee (2009) Emerging PEGylated drugs. *Expert Opin. Emerg. Drugs* 14: 363-380.
6. Gaberc-Porekar, V., I. Zore, B. Podobnik, and V. Menart (2008) Obstacles and pitfalls in the PEGylation of therapeutic proteins. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 11: 242-250.
7. Filipula, D. and H. Zhao (2008) Releasable PEGylation of proteins with customized linkers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60: 29-49.
8. Mero, A., B. Spolaore, F. M. Veronese, and A. Fontana (2009) Transglutaminase-mediated PEGylation of proteins: direct identification of the sites of protein modification by mass spectrometry using a novel monodisperse PEG. *Bioconjug. Chem.* 20: 384-389.
9. Herold, D. A., K. Keil, and D. E. Bruns (1989) Oxidation of polyethylene glycols by alcohol dehydrogenase. *Biochem. Pharmacol.* 38: 73-76.
10. Richter, A. W. and E. Akerblom (1983) Antibodies against polyethylene glycol produced in animals by immunization with monomethoxy polyethylene glycol modified proteins. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 70: 124-131.
11. Richter, A. W. and E. Akerblom (1984) Polyethylene glycol reactive antibodies in man: titer distribution in allergic patients treated with monomethoxy polyethylene glycol modified allergens or placebo, and in healthy blood donors. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 74: 36-39.
12. Yamaoka, T., Y. Tabata, and Y. Ikada (1994) Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice. *J. Pharm. Sci.* 83: 601-606.
13. Caliceti, P. and F. M. Veronese (2003) Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55: 1261-1277.
14. Park, E. J. and D. H. Na (2008) Optimization of octreotide PEGylation by monitoring with fast reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 380: 140-142.
15. Lee, K. S. and D. H. Na (2010) Capillary electrophoretic separation of poly(ethylene glycol)-modified granulocyte-colony stimulating

- factor. *Arch. Pharm. Res.* 33: 491-495.
16. Park, E. J., K. S. Lee, K. C. Lee, and D. H. Na (2010) Application of microchip CGE for the analysis of PEG-modified recombinant human granulocyte-colony stimulating factors. *Electrophoresis* 31: 3771-3774.
 17. Kinstler, O. B., D. N. Brems, S. L. Lauren, A. G. Paige, J. B. Hamburger, and M. J. Treuheit (1996) Characterization and stability of N-terminally PEGylated rhG-CSF. *Pharm. Res.* 13: 996-1002.
 18. Kinstler, O., G. Molineux, M. Treuheit, D. Ladd, and C. Gegg (2002) Mono-N-terminal poly(ethylene glycol)-protein conjugates. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54: 477-485.
 19. Roberts, M. J., M. D. Bentley, and J. M. Harris (2002) Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54: 459-476.
 20. Na, D. H., Y. S. Youn, and K. C. Lee (2004) Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for monitoring and optimization of site-specific PEGylation of ricin A-chain. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18: 2185-2189.
 21. Pepinsky, R. B., R. I. Shapiro, S. Wang, A. Chakraborty, A. Gill, D. J. Lepage, D. Wen, P. Rayhorn, G. S. Horan, F. R. Taylor, E. A. Garber, A. Galdes, and T. M. Engber (2002) Long-acting forms of Sonic hedgehog with improved pharmacokinetic and pharmacodynamic properties are efficacious in a nerve injury model. *J. Pharm. Sci.* 91: 371-387.
 22. Youn, Y. S., D. H. Na, S. D. Yoo, S. C. Song, and K. C. Lee (2005) Carbohydrate-specific polyethylene glycol-modified ricin A-chain with improved therapeutic potential. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37: 1525-1533.
 23. Davis, F. F. (2003) PEG-adenosine deaminase and PEG-asparaginase. *Adv. Exp. Med. Biol.* 519: 51-68.
 24. Chan, B., D. Wara, J. Bastian, M. S. Hershfield, J. Bohnsack, C. G. Azen, R. Parkman, K. Weinberg, and D. B. Kohn (2005) Long-term efficacy of enzyme replacement therapy for adenosine deaminase (ADA)-deficient severe combined immunodeficiency (SCID). *Clin. Immunol.* 117: 133-143.
 25. Davis, S., A. Abuchowski, Y. K. Park, and F. F. Davis (1981) Alteration of the circulating life and antigenic properties of bovine adenosine deaminase in mice by attachment of polyethylene glycol. *Clin. Exp. Immunol.* 46: 649-652.
 26. Graham, M. L. (2003) Pegaspargase: a review of clinical studies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55: 1293-1302.
 27. Kamisaki, Y., H. Wada, T. Yagura, A. Matsushima, and Y. Inada (1981) Reduction in immunogenicity and clearance rate of Escherichia coli L-asparaginase by modification with monomethoxypolyethylene glycol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 216: 410-414.
 28. Ho, D. H., N. S. Brown, A. Yen, R. Holmes, M. Keating, A. Abuchowski, R. A. Newman, and I. H. Krakoff (1986) Clinical pharmacology of polyethylene glycol-L-asparaginase. *Drug Metab. Dispos.* 14: 349-352.
 29. Wylie, D. C., M. Voloch, S. Lee, Y. H. Liu, S. Cannon-Carlson, C. Cutler, and B. Pramanik (2001) Carboxyalkylated histidine is a pH-dependent product of pegylation with SC-PEG. *Pharm. Res.* 18: 1354-1360.
 30. Wang, Y. S., S. Youngster, J. Bausch, R. Zhang, C. McNemar, and D. F. Wyss (2000) Identification of the major positional isomer of pegylated interferon alpha-2b. *Biochemistry* 39: 10634-10640.
 31. 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. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54: 547-570.
 32. Glue, P., J. W. Fang, R. Rouzier-Panis, C. Raffanel, R. Sabo, S. K. Gupta, M. Salfi, and S. Jacobs (2000) Pegylated interferon-alpha2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. *Clin. Pharmacol. Ther.* 68: 556-567.
 33. Rajender Reddy, K., M. W. Modi, and S. Pedder (2002) Use of peginterferon alfa-2a (40 KD) (Pegasys) for the treatment of hepatitis C. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54: 571-586.
 34. 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, W. Berthold, and M. Graves (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. *Bioconjug. Chem.* 12: 195-202.
 35. Monkarsh, S. P., Y. Ma, A. Aglione, P. Bailon, D. Ciolek, B. DeBarbieri, M. C. Graves, K. Hollfelder, H. Michel, A. Palleroni, J. E. Porter, E. Russoman, S. Roy, and Y. C. Pan (1997) Positional isomers of monopegylated interferon alpha-2a: isolation, characterization, and biological activity. *Anal. Biochem.* 247: 434-440.
 36. Zeuzem, S., J. E. Heathcote, N. Martin, K. Nieforth, and M. Modi (2001) Peginterferon alfa-2a (40 kDa) monotherapy: a novel agent for chronic hepatitis C therapy. *Expert Opin. Investig. Drugs* 10: 2201-2213.
 37. Molineux, G. (2003) Pegfilgrastim: using pegylation technology to improve neutropenia support in cancer patients. *Anticancer Drugs* 14: 259-264.
 38. Roskos, L. K., P. Lum, P. Lockbaum, G. Schwab, and B. B. Yang (2006) Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of pegfilgrastim in healthy subjects. *J. Clin. Pharmacol.* 46: 747-757.
 39. Fuh, G., B. C. Cunningham, R. Fukunaga, S. Nagata, D. V. Goeddel, and J. A. Wells (1992) Rational design of potent antagonists to the human growth hormone receptor. *Science* 256: 1677-1680.
 40. Pradhananga, S., I. Wilkinson, and R. J. Ross (2002) Pegvisomant: structure and function. *J. Mol. Endocrinol.* 29: 11-14.
 41. Roelfsema, F., N. R. Biermasz, A. M. Pereira, and J. Romijn (2006) Nanomedicines in the treatment of acromegaly: focus on pegvisomant. *Int. J. Nanomedicine* 1: 385-398.
 42. Roelfsema, F., N. R. Biermasz, A. M. Pereira, and J. A. Romijn (2008) The role of pegvisomant in the treatment of acromegaly. *Expert Opin. Biol. Ther.* 8: 691-704.
 43. Barnes, T. and R. Moots (2007) Targeting nanomedicines in the treatment of rheumatoid arthritis: focus on certolizumab pegol. *Int. J. Nanomedicine* 2: 3-7.
 44. Lu, Y., S. E. Harding, A. Turner, B. Smith, D. S. Athwal, J. G. Grossmann, K. G. Davis, and A. J. Rowe (2008) Effect of PEGylation on the solution conformation of antibody fragments. *J. Pharm. Sci.* 97: 2062-2079.
 45. Choy, E. H., B. Hazleman, M. Smith, K. Moss, L. Lisi, D. G. Scott, J. Patel, M. Sopwith, and D. A. Isenberg (2002) Efficacy of a novel PEGylated humanized anti-TNF fragment (CDP870) in patients with rheumatoid arthritis: a phase II double-blinded, randomized, dose-escalating trial. *Rheumatology* 41: 1133-1137.