

## 재조합 인터페론-알파-2a의 고체상 N-terminal mono-PEGylation: Isolation, Separation, Characterization, and Biological Activity

이병국, 유창훈, 이선경, <sup>1</sup>이용석, <sup>2</sup>김진영, <sup>2</sup>이정화, 이은규<sup>†</sup>  
한양대학교 화학공학과 생물공정연구실, <sup>1</sup>(주)녹십자바이오텍,  
<sup>2</sup>한국기초과학지원연구원  
전화 (031) 400-4072 FAX (031) 408-3779

### 서 론

유전자 재조합 기술을 이용해 생산되는 인터페론의 일종인 알파-인터페론(IFN- $\alpha$ -2a)은 항 바이러스성 면역증강제로 개발되어 최근에는 만성 B형 및 C형 간염치료용 뿐만 아니라 각종 암 치료제(Kaposi's sarcoma, hairy-cell leukemia 등)로 그 적용이 계속 증가하는 추세이다. 그러나 혈액 내 순환수명(Blood circulation lifetime)이 짧아 수개월 동안 주 3회의 높은 빈도로 주사해야 하는 단점이 있고, 면역원성(immunogenicity)이 높아 주사 시 발열, 구토 등의 여러 부작용을 초래하게 된다. 또한 수용액상에서는 안정성이 낮아 유통과정에서 초기 활성을 그대로 유지하지 못하는 단점도 있는 실정이다.<sup>1)</sup>

이러한 문제점을 해결하는 방법으로 무독성 수용성 고분자의 일종인 PEG (polyethyleneglycol)를 이용하여 단백질 표면을 변형시켰다.<sup>1,2)</sup> 그러나 일반적으로 PEG가 여러 개 붙을 수록 단백질의 활성에 영향을 주어 본래의 활성을 내기 어렵고<sup>3)</sup> 제어가 불가능하기 때문에 정제의 어려움이 있다. 본 연구에서는 단백질을 변형시킬 때 이전의 액상에서 단백질을 PEGylation시키는 공정에서 PEG 분자가 무작위로 단백질 표면에 붙게되는 문제점을 해결하기 위해 고체상에서 IFN을 N-Terminal mono-PEGylation 시키고 분리 정제하는 공정을 연구하였다. 그리고 이 PEGylate를 characterization하고 biological activity를 측정하였다.<sup>4,5,6,7)</sup>

### 재료 및 방법

본 실험에 사용된 IFN- $\alpha$ -2a는 (주)녹십자바이오텍에서 phosphate buffer에 2.5 mg/mL로 농축된 단백질 용액의 형태로 제공 받았다. 실험에 이용된 활성화 PEG는 (주)선바

이오에서 구입하였으며, 평균 분자량이 5 kDa인 mPEG-aldehyde를 사용하였다. PEGylation buffer로 이용된 sodium phosphate, cyanoborohidride는 Sigma-Aldrich사에서 구입하였다.

### **IFN의 PEGylation**

Phosphate buffer에 2.5 mg/mL(pH 4.0) 농도의 IFN 500  $\mu$ L를 0.1 M SPB (sodiumphosphate buffer) pH 4.0으로 평형을 잡은 CM-Sepharose 컬럼(Hitrap 1 mL)에 1 mL/min으로 injection하여 고체상에 고정시킨다. 동일한 buffer 10 mL을 컬럼에 주입하여 비 결합된 IFN을 세척한 후, IFN 대비 몰 비율이 25배의 PEG 용액 10 mL(reductive alkylation agent는 PEG 용액에 35 mM녹인다.)을 100~120분 동안 반응시킨다. 이 단계에서 IFN은 PEGylation된다. PEGylation 후에 1 M NaCl gradient로 용출시킨다. 그 후 시료를 SDS-PAGE로 분석하고 GPC로 PEG-IFN과 IFN을 분리 정제하여 재사용 하였다.

### **Site-specific mono-PEGylation 분석**

현재는 3단계로 분석하였다. 먼저 첫 번째 단계로 MALDI-TOF 분석을 통해서 PEGylated IFN의 분자량이 정확히 PEG 분자량만큼 증가하였는지를 판단하였다. 두 번째 단계로 N-terminal amino acid sequencing과 trypsin 처리 후 질량분석을 통해서 정확히 N-terminal 에 PEG가 결합되어 있는지 판단하였다. 마지막으로 RP-HPLC C4(Phenomenex사) 컬럼으로 N-terminal mono-PEGylation이 확인된 시료의 순도를 분석하였다.

### **Biological activity(항바이러스 역가) 측정**

100 IU/mL의 표준 IFN 용액과 같은 예상 역가로 만든 후 96 well plate에 표준품과 같은 배율로 희석하여 96 well plate에 샘플을 채운다. 그 후 cell을 일정한 농도로 배양하여 각 샘플이 들어 있는 well plate에 넣는다. 그리고 96 well plate에 양쪽 사이드를 cell control(CV)과 virus control(VC)을 잡고 virus를 샘플이 들어있는 well plate에 주입하여 cell을 공격하게 만든다. 여기서 virus는 cell을 1:1로 공격을 한다. 배양을 시키고 나서 죽은 cell을 washing 한 후 염색 시켜 흡광도를 측정하여 IFN의 항바이러스 역가를 구하게 된다.

## **결과 및 고찰**

### **고체상 PEGylation**

CM-Sepharose에 고정화된 IFN을 PEGylation 시키므로 반응 조건을 일정하게 유지시켜 줄 수 있었으며, 부반응의 산물인 multi PEGylation되는 IFN과 미반응된 PEG를 제거할 수 있었다. 실제로 액상에서 IFN을 PEGylation 시키게 되면 Fig. 1에서 보듯이 multi-PEGylated IFN과 불순물(미반응된 활성화 PEG와 reductive alkylation 반응을 위한 첨가제 등)의 제거 공정, 농축후 monomeric IFN과 PEGylated IFN의 분리 정제 공정이 필요한데 반해 고체상에서 PEGylation을 시키게 되면 불순물의 제거, 농축 공정, 분리 정제 공정을 줄일 수 있게 된다.

첫 단계에서 PEGylated IFN을 CM-Sepharose 컬럼을 통해 분리하고 회수하였다 (Fig. 2). 이를 통해 PEGylated IFN과 monomeric IFN은 표면 전하에 차이가 있음을 알 수 있고 이를 이후의 정제공정에 이용할 수 있으리라 판단된다. 위의 단계에서 얻어진 샘플 중 PEG-IFN과 monomeric IFN의 분리가 되지 않은 샘플은 GPC를 이용하여 정제하였다. Fig. 3에서 확인할 수 있다. 단백질 정량한 결과 PEGylation 반응 수율은 65% 수준이었다. 고체상 PEGylation의 장점은: (1) 재현성 높은 반응, (2) 불순물 제거 및 PEGylate 분리를 위한 별도 공정이 필요 없는 점, (3) PEGylation 반응 시간 단축 등이 있다.

### **IFN mono-PEGylate의 분석**

분리된 mono-PEGylated IFN을 MALDI-TOF 분석과 N-terminal sequencing을 통해서 N-terminal PEGylation이 되었는지 확인하였다. 그리고 RP-HPLC 분석을 통해서 순도를 측정하였다(data not shown). 항바이러스 역가는 일반적으로 PEG 분자가 IFN을 modification시킴에 따라 줄어드는 것으로 알려져 있다.<sup>3)</sup> 이는 PEG 분자가 IFN의 receptor binding을 물리적으로 방해하는 것으로 유추된다. 그리고 Table 1에서 보듯이 IFN mono-PEGylate의 항바이러스 역가가 monomeric IFN에 비해 약 70% 수준을 나타내는 것으로 나타났다.

### **요 약**

고체상 site-specific mono-PEGylation 공정은 액체상 PEGylation 공정에서 나타날 수 있는 무작위적인 multi-PEGylation 문제점을 해결하고, 또한 고체상에서 PEGylation을 수행함으로써 액체상 PEGylation 공정에서 필요한 분리정제 단계를 줄일 수 있음을 제시하였다.

감 사

본 연구는 산업자원부의 신기술 실용화 사업의 연구비 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. Lee E. K. (2001), Method for producing protein-polymer conjugate with solid-phase column, Korean patent application No. 10-2001-73592.
2. Park. T. G. and K. H. Jung (2002), Sustained Release of PEGylated G-CSF from PLGA Microsphere, Korea J. Biotechnol. Bioeng. 17(1), 33-37.
3. Suh. C. W. and E. K. Lee (1997), Characteristics and Application of Conjugation Between Protein and Activated PEG, Korea J. Biotechnol. Bioeng 12(3), 14-322.
4. Andrew P. C. (1999), Therapeutic antibody fragments with prolonged in vivo half-lives, Nature Biotech. 17(1), 780-783.
5. Gary E. M. and E. F. Robert (1995), Reductive Alkylation of Proteins, Anal. Biochem. 224(8), 1-16.
6. Monkars, S. P. et al. (1997) Positional Isomers of Mono-pegylated interferon a-2a: Isolation, Characterization, and Biological Activity, Anal. Biochem. 247(18), 434-440.
7. Reza, M. (2000), Modulation of the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Proteins by Polyethylene Glycol Conjugation, J. Pharm. Sci., 3(1), 125-136.

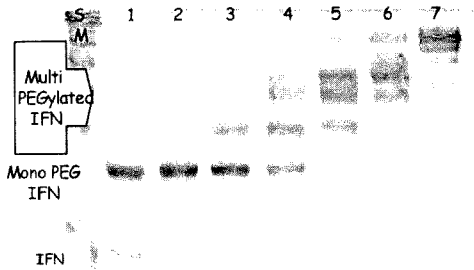


Fig. 1. Multi-PEGylation in liquid-phase PEGylation.

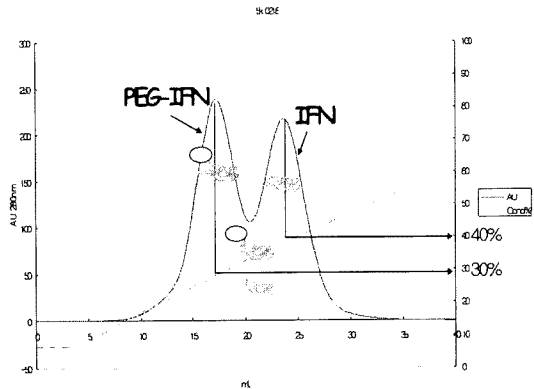


Fig. 2. Elution chromatogram from solid-phase PEGylation

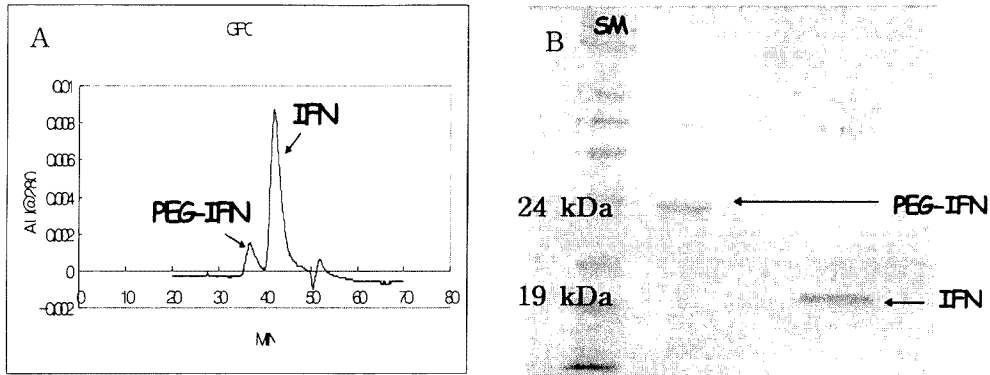


Fig. 3. A: GPC chromatogram for mixed IFN sample separation.  
 B: SDS PAGE of GPC eluates..

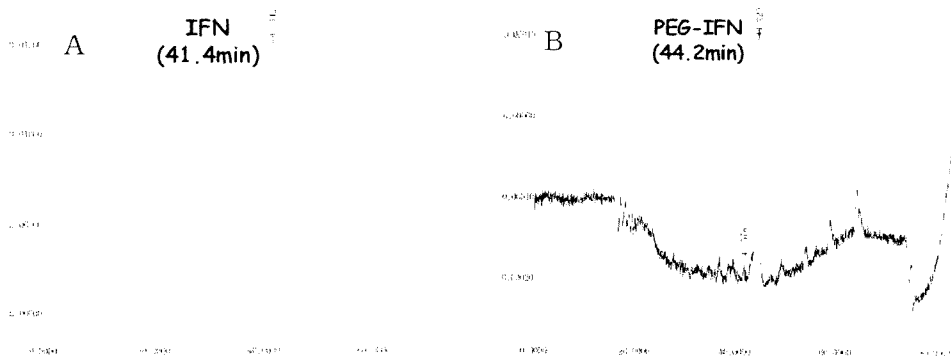


Fig. 4. RP-HPLC chromatograms A: monomeric IFN, B: IFN mono-PEGylate

Table 1. 항바이러스 역가

	Mean anti-viral activity (n=5) (MIU/mg)	Relative activity (%)	Standard Deviation	CV (%)
monomeric IFN	201.2	100	19.2	9.5
IFN mono-PEGylate	141.26	70.6	37	26