

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>  
A61K 47/42

(45) 공고일자 1990년07월06일  
(11) 공고번호 특1990-0004801

(21) 출원번호	특1986-0005125	(65) 공개번호	특1987-0000423
(22) 출원일자	1986년06월26일	(43) 공개일자	1987년02월18일
(30) 우선권주장	749,955 1985년06월26일 미국(US)		
(71) 출원인	세투스 코포레이션 알버트 피. 할루인 미합중국 캘리포니아 94608 에머리빌 53번 스트리트 1400		
(72) 발명자	난디니 카트레 미합중국 캘리포니아 94530 엘 케리토 조르단 애버뉴 6107 미카엘 제임스 나프 미합중국 캘리포니아 94066 산 브루노 툴라레드라이브 121		
(74) 대리인	이병호		

심사관 : 정진수 (책자공보 제1933호)

(54) 중합체 접합된 단백질, 상기 단백질이 용해되어 있는 약제학적 조성물 및 상기 조성물의 제조방법

요약

내용 없음.

대표도

도1

명세서

[발명의 명칭]

중합체 접합된 단백질, 상기 단백질이 용해되어 있는 약제학적 조성물 및 상기 조성물의 제조방법

[도면의 간단한 설명]

제1도는 IL-2 1몰당 0, 10, 20, 50 및 100몰 활성화 PEG(PEG\*)의 반응에서 수득된 PEG-개질(PEG화) IL-2의 분자량 분석용 14% SDS-폴리아크릴아미드겔의 밀도계 스캔(scan).

제2도는 흡광 스캔 200 내지 650nm에 의한 2가지 pH에서의 비개질 IL-2와 비교한 PEG화 IL-2의 용해도.

제3도는 마우스에 정맥내 주사한 후 PEG화 및 비개질 IL-2 약리역학표시.

제4도는 마우스에 피하내 주사한 후 PEG화 비개질 IL-2 약리역학표시.

제5도는 IFN-β 1몰당 0, 10, 20 및 50몰 PEG\*의 반응에서 수득된 PEG화, IFN-β의 분자량 분석용 14% 비감소 SDS-폴리아크릴아미드겔의 밀도계 스캔.

제6도는 흡광 스캔 200 내지 650nm에 의한 2가지 pH에서의 비개질 IFN-β와 비교한 PEG화 IFN-β의 용해도.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 생물학적으로 활성인 단백질의 화학적 및/또는 생리적 특성을 변화시키는 단백질의 화학적 개질(modification)방법에 관한 것이다. 더 구체적으로는, 본 발명은 친유성 수-불용성 단백질을 중합체에 선택적 접합시켜 단백질이 생리적 pH에서 가용성이 되도록 하는 방법에 관한 것이다.

미생물 숙주 세포에서 생성된 많은 이종성 단백질은 굴절체(refractile body) 중 불용성물질로서 발견된다. 통상적인 배양 조건하에서 굴절체 형성하는 이종성 단백질의 예에는 인터로이킨-2(IL-2), 인터페론-β(IFN-β), 고양이의 백혈병 바이러스(FeLV) 외피(envelop) 단백질, 인간의 성장호르몬(h호), 소의 성장호르몬(b호), 돼지의 성장호르몬(p호) 및 바이러스(예를 들면 FMD바이러스)로 코팅 또는 융합된 특정 단백질이 포함된다. 이외에, 이들 단백질 대부분은 실제로 소수성이며, 용액 중에 남기보다는 다른 물질이나 그 자체에(즉, 응집체로) 달라붙는 경향이 있다.

또한 이들 재조합 단백질 대부분은, 이들의 천연 대응물이 수-용성, 글리코실화 분자인 반면, 비글

리코실화되어 있다. 단백질의 용해성을 변화시키는 개질 방법은 이들 단백질의 제조 수율을 증가시킬 뿐 아니라 요법적 용도를 위해 이들의 제형화를 촉진시키는데 바람직한 것이다. 이외에도, 개질 방법은, 단백질이 생체내 도입될 시, 단백질의 응집성을 감소시키거나 제거시킴으로써 그의 면역원성(immunogenicity)을 감소시킬 수 있다.

특수한 생리적 반응을 일으키기 위해 순환계에 폴리펩티드를 사용하는 것은 의학 분야에 공지되어 있다. 폴리펩티드를 임상적으로 사용할 시 유효한 요법적 장점에 대한 제한은 순환계에서 면역반응을 유도하는 이들의 능력이다. 이 면역반응은 주사전 물질 중 응집체에 의해 야기될 수 있다.

[참조 : J.Clin.Endocrin.,31, 679-688, R.Illig,1970, J.Clin.Endocrinol.Metab.,46, 20-27, W.Moore, 1978 및 J.Clin.Endocrinol.Metab., 51, 691-697, W.Moore 및 P.Leppert, 1980]. 이 반응은 이들을 주사한 순환계에 의해 폴리펩티드에 대한 항체를 생성하는 것도 포함한다. 이 항체 생성은, 때로 순환계에서 체류시간 감소(반감기 감소) 또는, 항체-폴리펩티드 상호작용에 의한 분자의 개질에 의해 폴리펩티드의 목적하는 생리적 작용을 감소시키거나 제거시킬 수 있다.

폴리펩티드의 목적하는 생리적 활성을 유지시키면서, 면역 반응을 방지하거나 적어도 감소시키기 위한, 이들 유용한 유효 요법적 폴리펩티드의 개질 방법은 상술한 단점 없이 포유동물의 순환계에 이들 폴리펩티드를 사용할 수 있도록 한다. 이외에도, 순환 폴리펩티드의 반감기가 증가하기 때문에, 목적하는 요법적 효과를 내기 위하여 지금까지 보다 더 소량의 폴리펩티드가 필요할 것이다.

상술한 순환계의 면역원성 및 짧은 반감기 및, 특정 단백질의 다른 바람직하지 않은 특성은 잘 인지도 있어 있고, 이러한 문제를 해결하기 위해 폴리펩티드의 여러가지 개질 방법이 연구되어 왔다. 이러한 방법에는 단백질의 거의 직쇄 중합체 [예를 들면 폴리에틸렌글리콜(PEG) 또는 폴리프로필렌글리콜(PPG)]로 개질시키는 방법이 포함된다. 예를 들면, 미합중국 특허 제 4,261,973호에는 면역원성 알레르겐 분자를 비 면역원성 수-용성 중합체(예를 들면 PEG)와 접합시켜 알레르겐의 면역원성을 감소시키는 방법이 기술되어 있다. 미합중국 특허 제 4,301,144호에는 헤모글로빈을 PEG, PPG, 에틸렌글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 이러한 중합체의 에테르, 에스테르 또는 탈수 생성물에 접합시켜 헤모글로빈 분자의 산소-수반성을 증가시키는 방법이 기술되어 있다. 유럽 특허 공보 제 98,110호(1084, 1. 11 공고)에는 폴리펩티드 또는 당단백질을 폴리옥시-에틸렌-폴리옥시프로필렌-공중합체에 접합시켜 그의 생리적 활성 길이를 증가시키는 방법이 기술되어 있다. 이 폴리펩티드 또는 당단백질이 수-용성 효소 또는 천연 인터페론인 것이 바람직하다. 미합중국 특허 제 4,179,337호에는 수-용성 폴리펩티드(예를 들면 효소 및 인슐린)를 PEG 또는 PPG에 접합시켜, 그의 목적하는 생리적 활성을 대부분 보유하면서, 폴리펩티드의 면역원성을-감소시키는 방법이 기술되어 있다. 미합중국 특허 제 4,002,531호에는 알데히드 유도체를 통해 효소를 PEG에 접합시키는 또 다른 방법에 기술되어 있다.

미합중국 특허 제 4,055,635호에는 중합물질(예를 들면 다당류)에 공유결합에 의해 연결된 단백질 분해효소의 수-용성 착화합물로 이루어진 약제학적 조성물이 기술되어 있다.

미합중국 특허 제 3,960,830호에는 폴리알킬렌글리콜 중합체(예를 들면 폴리에틸렌글리콜)에 결합된 펩티드가 기술되어 있다. 미합중국 특허 제4,088,538호에는 유기중합체(예를 들면 폴리에틸렌글리콜)에 공유결합적으로 결합된 효소로 이루어진 가역 용성 효소적 활성 중합체 효소 생성물이 기술되어 있다. 미합중국 특허 제 4,415,665호에는 하나 이상의 1급 또는 2급 아미노 그룹, 하나 이상의 티올 그룹 및/또는 하나 이상의 방향족 하이드록시 그룹-함유 유기리간드(col.3, lines 19-36)를 하나 이상의 하이드록실 그룹-함유 중합 담체(col.2, lines 42-66)에 접합시키는 방법이 기술되어 있다.

미합중국 특허 제 4,495,285호에는 결합제를 통해 비-면역원성 플라스미노겐 활성화제의 아미노산 측쇄가 폴리알킬렌 글리콜에 결합된 활성화제가 기술되어 있다. 미합중국 특허 제 4,412,989호에는 아미드 결합을 통해 폴리에틸렌 또는 폴리프로필렌글리콜에 공유결합에 의해 결합된 헤모글로빈-함유 산소-수반 물질 또는 그의 유도체가 기술되어 있다.

미합중국 특허 제 4,496,689호에는 중합체(예를 들면 PEG 또는 메톡시폴리에틸렌글리콜)와 알파-1-단백질 분해효소 억제제의 공유결합 착화합물이 기술되어 있다. 미합중국 특허 제 3,619,371호에는 화학적으로 결합된 생리적 활성물질 함유 중합 매트릭스(matrix)가 기술되어 있다. 미합중국 특허 제 3,788,948호에는 단백질을 중합체에 결합시키기 위한 유기 시아네이트 화합물의 용도가 기술되어 있다.

미합중국 특허 제 3,876,501호에는 수-용성 카보하이드레이트를 브롬화시안으로 활성화시켜 효소 및 다른 단백질에 대한 그의 결합성을 개선시키는 방법이 기술되어 있다.

미합중국 특허 제 4,055,635호에는 중합물질에 공유결합에 의해 결합된 단백질 분해효소의 약제학적 조성물이 기술되어 있다.

유럽 특허 제 152,847호에는 효소접합체, 칼슘염 및 폴리에틸렌글리콜로 이루어진 효소 접합 조성물이 기술되어 있다.

일본국 특허 제 5,792,435호(1982. 11. 26. 공고)에는 아미노 그룹의 모두 또는 일부가 폴리에톡실 잔기로 치환된 개질 폴리펩티드가 기술되어 있다. 독일연방공화국 특허 제 2,312,615호(1973. 9. 27. 공고)에는 중합체를 하이드록시 또는 아미노 그룹-함유 화합물에 접합시키는 방법이 기술되어 있다.

유럽 특허 제 147,761호에는 공유결합에 의한 알파-1-단백질 분해효소 억제제와 수-용성 중합체(예를 들면 폴리에틸렌글리콜)의 접합체가 기술되어 있다.

미합중국 특허 제 4,414,147호에는 인터페론을 디카복실산 무수물 [예를 들면 폴리(에틸렌 석신산 무수물)]에 접합시켜 덜 소수성으로 만드는 방법이 기술되어 있다. 이들 특허 및 특허공보

이외에도, 단백질(예를 들면 효소, IgG 및 알부민)의 개질제로서 활성화된 PEG 또는 PPG를 사용하는 개념이 여러 논문에 기술되어 있다.

예를 들면, 하기 문헌[참조 : Biochem and Biophys.Res.Comm.,Inada 등, 122, 845-850, 1984]에는 PEG를 접합시키기 위해 시아누르산 클로라이드를 사용하여 수-용성 지방 단백질 리파제를 개질시켜 유기용매(예를 들면 벤젠) 중에서 용성이 되도록 만드는 방법이 기술되어 있다. 하기 문헌[참조 : Biochem.and Biophys.Res.Comm., Takahashi 등, 121, 261-265, 1984]에는 PEG와 시아누르산 클로라이드 트리야진을 사용하여 고추냉이(Horsera-dish) 과산화 효소를 개질시켜 수-용성 효소활성 및 벤젠용성으로 만드는 방법이 기술되어 있다. 하기 문헌[참조 : Biochem.Biophys.Acta.,Suzuki 등, 788, 248-255, (1984)]에는 시아누르산 클로라이드에 의해 활성화된 PEG를 사용하여 IgG의 응집을 억제하는 방법이 기술되어 있다. 하기 문헌[참조 : Cancer Biochem.Biophys.,Abuchowski 등, 7, 175-186, 1984]에는 석시니디닐 석시네이트에 의해 활성화된 PEG를 사용하여 이.콜라이(E.coli) 및 비브리오 석시노게네스(Vibrio succinogenes)로부터 아스파라기나제를 개질시켜 단백질의 반감기를 증가시키고 면역원성을 감소시키는 방법이 기술되어 있다.

하기 문헌[참조 : Biomedical Polymers, Davis 등, New York : Academic Press, 1980, p441-451]에는, 상세한 설명없이, 통상적으로 불용성인 효소를 PEG 부착에 의해 용해시킬 수 있다는 것이 기술되어 있다. 또 다른 여러 논문에는 효소(예를 들면 우리카제, 스트렙토키나제, 카탈라제, 아르기나제 및 아스파라기나제)를 석신-이미달 석시네이트 또는 시아누르산 클로라이드에 의해 활성화된 PEG로 개질시켜 단백질의 반감기를 증가시키고 면역원성을 감소시키는 방법이 기술되어 있다.

그러나 이들 참보 문헌 중의 어느 것에도 수-용성 재조합 단백질 소수성이므로 생리적 pH의 수성 매질 중에서 제형화되지 않는 단백질, 예를 들면 IL-2 및 IFN- $\beta$ )에 중합체 개질방법을 어떻게 사용할 것인가에 대해서는 상술되어 있지 않다. 여러 단백질의 약리역학 및 물리적 특성이 매우 다르기 때문에, 어느 선택된 단백질이 중합체 처리에 적절하게 반응성일지는 선형적으로 예측할 수 없다. 또 한 어느 참조 문헌에도, 단백질이 생체 내에 도입될 시, 면역 반응을 일으키는 현상인 단백질의 응집을 감소 또는 제거시키는 방법이 기술되어 있지 않다.

유럽 특허 제 154,316호(1985. 9. 11. 공고, Takeda Chemical Industries, Lid.)에는 화학적 개질 림포킨(Lymphokin)(예를 들면 림포킨의 하나 이상의 1급 아미노 그룹에 직접 결합된 PEG 함유 IL-2)이 기술되고 청구되어 있다.

즉, 본 발명은 주변 조건하 약제학적으로 허용되는 pH 범위에서 원래 수-불용성인,  $\beta$ -인터페론, 인터로킨-2 및 면역독소 중에서 선택된 이들 단백질을 개질시켜 이들을 이러한 조건하 수성 완충제 중에 가용성이 되도록 하는 방법을 제공한다. 이 개질 방법은 단백질의 글리코실화와 비슷한다, 이에 의해 놀랍게도, 천연 글리코실화 단백질이 가용성인 것처럼, 단백질이 가용성으로 된다. 이 개질 방법은 단백질을 용액 중에 보유하기 위하여 외부로부터 용해 첨가제(예를 들면 정화제 또는 변성제)를 가할 필요가 없다. 이 개질 단백질은 초기 및 후기 모두 비개질 단백질의 생물학적 활성을 보유한다.

두번째 장점으로, 어떤 조건하에서 본 개질 방법은 단백질의 응집을 감소시키거나 제거시킴에 의해, 또는 항원성 결정인자(determinant)를 차폐(mask) 시킴에 의해 면역원성을 감소시킬 수 있다. 또한 이러한 반감기의 연장은 단백질의 효능에 관련된 것으로 밝혀졌다. 생체내 반감기는 적절한 조건 및 중합체를 선택하여 조절할 수 있다.

더욱 구체적으로, 본 발명은  $\beta$ -인터페론, 인터로킨-2 및 면역독소로 이루어진 그룹 중에서 선택된 생물학적 활성인 선택적 접합된 단백질 [여기에서 단백질은 폴리에틸렌글리콜 단일(homo)중합체 및 폴리옥시에톡실화 폴리올(여기에서 상기 단일 중합체는 한쪽 말단이 알킬 그룹으로 치환되거나 비치환되고, 상기 폴리올은 비치환되어 있다)로 이루어진 그룹 중에서 선택된 수-용성 중합체에 공유결합에 의해 접합되어 있고, 비접합 형태의 상기 단백질은 통상적으로 소수성이며 가용화제 부재시 pH 6 내지 8의 비독성 불활성의 약제학적으로 허용되는 수성담체 매질 중에서 불용성이다] 이 용해된 비독성 불활성, 약제학적으로 허용되는 수성담체 매질로 이루어진 약제학적 조성물에 관한 것이다.

이 중합체는 비치환된 폴리에틸렌글리콜(PEG), 모노메틸 PEG(mPEG) 또는 폴리옥시에틸화 글리세롤(POG)인 것이 바람직하고, PEG, mPEG 또는 POG 카복실산의 4-하이드록시-3-니트로벤젠 설포네이트 에스테르 또는 N-하이드록시 석신이미드 에스테르로부터 형성된 아미드 결합을 통해 단백질에 결합된다.

본 발명의 또 다른 국면은, (a) 하나 이상의 말단 반응성 그룹을 갖는 수-용성 중합체(여기에서 중합체는 폴리에틸렌글리콜 단일 중합체 및 폴리옥시에틸화 폴리올로 이루어진 그룹 중에서 선택하는 데, 상기 단일 중합체는 한쪽 말단이 알킬 그룹으로 치환되거나 비치환되고, 상기 폴리올은 비치환되어 있다)를 제조하고 ; (b)  $\beta$ -인터페론, 인터로킨-2 및 면역독소로 이루어진 그룹 중에서 선택된, 생물학적으로 활성인 통상 소수성 수-불용성 단백질을 상기 중합체의 반응성 그룹과 반응시켜 수-용성, 생물학적으로 활성인 선택적 접합된 단백질을 제조하고 ; (c) 상기 단백질을 비-독성, 불활성, 약제학적으로 허용되는 수성담체 매질 중에서 제형화시킴을 특징으로 하여 약제학적 조성물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

본 명세서에서 '통상 소수성, 수-불용성' 단백질이라는 용어는 pH 약 6 내지 8(즉, 약 중성 또는 생리적 pH)에서 실온 및 대기압의 주변 조건하에서 물 또는 수성 매질에 불용성 또는 난용성인 단백질을 의미한다. 이러한 단백질을 이러한 생리적 조건하에 도입할 경우, 본 개질 방법에 의해 단백질의 용해도가 증가한다. 본 발명의 목적을 위하여, 용해도를 (1) 혼탁도(분광광도계로 측정), (2) S값(초원심 분리로 측정하며, 응집 침강을 보다 더 큰 단량체 단백질 침강율이 용해도를 나타낸다) 및 (3) 외관상 천연 분자량(크기 제한 크로마토그래피로 측정하며, 가용성 단백질은 불용성 단백질 보다 이 값에 가깝다)에 의해 시험한다. 이러한 시험 각각에 있어서, 정확한 용해도 수치는 단백질을 제형화하는 완충액 종류, 완충액 pH 및 완충액의 이온강도에 의거한다.

본 명세서의  $\beta$ -인터페론과 인터로인-2는 조직배양 또는 재조합법에 의해서 또는 어떠한 포유동물 (예를 들면 마우스, 랫트, 토끼, 영장류, 피그 및 인간)로부터 수득할 수 있다. 이러한 단백질은 인간으로부터 추출하는 것이 바람직하고, 인간의 재조합 단백질이 더욱 바람직하다.

IFN- $\beta$ , 바람직하게는 인간의 IFN- $\beta$ 로 나타낸 '재조합 인터페론- $\beta$ '라는 용어는 본 분야에 공지된 재조합 DNA법으로 제조한 원 IFN- $\beta$ 에 비해 상당한 생물학적 활성을 갖는 섬유아세포 인터페론을 의미한다. 통상적으로 인터페론의 유전자코딩(coding)을 그의 원플라스미드로부터 잘라내어 클론화 벡터에 삽입시켜 클론화 시킨 후, 숙주 생물, 바람직하게는 미생물, 가장 바람직하게는 이.콜라이의 변환에 사용하는 발현(expression) 벡터에 삽입시킨다. 숙주 생물은 특정 조건하에서 외부 인터페론 유전자를 발현시켜 IFN- $\beta$ 를 생성한다.

IFN- $\beta$ 가 무테인(mutein, 참조 : 미합중국 특허 제 4,588,585호)인 것이 더욱 바람직하며, 여기에서 야생형 또는 원분자의 위치 17에서 통상 생성되는 시스테인은 중성 아미노산(예를 들면 세린 또는 알라닌)으로 치환된다. IFN- $\beta$  무테인이 IFN- $\beta$  serin인 것이 가장 바람직하다.

IL-2, 바람직하게는 인간 IL-2로 나타낸 '재조합 인터로인-2'라는 용어는 재조합 DNA법(참조 : Nature, Taniguchi 등, 302 : 305-310, 1983 및 Nucleic Acids Research, Devos, 11 : 4307-4323, 1983)으로 제조한 원 IL-2에 비해 상당한 생물학적 활성을 갖는 인터로인-2를 의미한다. 통상적으로, IL-2의 유전자코딩을 그의 원 플라스미드로부터 잘라내어 클론화 벡터에 삽입시켜 클론화시킨 후, 숙주 생물, 바람직하게는 미생물, 가장 바람직하게는 이.콜라이의 변환에 사용하는 발현 벡터에 삽입시킨다. 숙주 생물은 발현 조건하에서 외부 유전자를 발현시켜 IL-2를 생성한다.

IL-2가 무테인(참조 : 미합중국 특허 제 4,518,514호)인 것이 더욱 바람직하며, 여기에서 야생형 또는 원분자의 위치 125에서 통상 생성되는 시스테인은 중성 아미노산(예를 들면 세린 또는 알라닌)으로 치환된다. 이와는 달리 또는 접합적으로, IL-2 무테인은 야생형 또는 원 분자의 위치 104에서 통상 생성되는 메티오닌을 중성 아미노산(예를 들면 알라닌)으로 치환한 것일 수도 있다.

바람직하게는, IL-2는, 위치 58 및 105에서 시스테인의 이황화물 결합을 포함하여, 인간의 원 IL-2의 아미노산 서열과 적어도 거의 동일한 아미노산 서열로 단백질을 코드화시킨 인간의 IL-2 cDNA 서열로 변환되고, 원 인간 IL-2에 공통된 생물학적 활성을 갖는 미생물 또는 효모에 의해 생성된 단백질이다. 아미노산 서열이 거의 동일하다는 것은 IL-2 사이에서 역기능적인 차이를 야기하지 않는 하나 이상의 아미노산 변화(삭제, 첨가, 치환)만이 다른 것을 의미한다. 이러한 특성을 갖는 IL-2 단백질의 예는 참조 문헌(Supra, Taniguchi 등, Supra, Devos, 유럽 특허 공보 제 91,539호 및 88,195호, 미합중국 특허 제 4,518,584호)에 기술되어 있다. IL-2가 ser<sup>125</sup> IL-2, des-ala<sub>1</sub>ser<sup>125</sup> IL-2, des-ala<sub>1</sub> IL-2, des-ala<sub>1</sub>ala<sub>104</sub> IL-2, 또는 des-ala<sub>1</sub>ala<sub>104</sub>ser<sup>125</sup> IL-2인 것이 바람직하며, 여기에서 'des-ala<sub>1</sub>'은 IL-2의 N-말단 알라닌 잔기가 삭제된 것을 나타낸다.

본 발명 단백질의 정확한 화학적 구조는 인수(因數)에 의거한다. 이온성 아미노 및 카복실 그룹이 분자중에 존재하므로, 산성 또는 염기성염, 또는 중성형태의 특정한 단백질을 수득할 수 있다. 적절한 주변환경이 주어질 경우, 그의 생활성(bioactivity)을 보유하는 이러한 모든 제조방법은 본 명세서의 단백질 정의에 포함된다. 또한 단백질의 1급 아미노산 서열은 당 잔기를 사용한 유도화(글리코실화) 또는 다른 보충 분자(예를 들면 지질, 인산염, 아세틸 그룹등)에 의해, 더욱 통상적으로는 당류로 접합시켜 증대시킬 수 있다. 이러한 증대의 특정한 국면은 생성 숙주의 후 번역 처리계를 통해 이루어 ; 이러한 다른 개질 방법을 시험관내에 도입할 수 있다. 어쨌든, 단백질의 생활성이 파괴되지 않는 한 이러한 개질 방법은 본 발명의 단백질 정의에 포함된다. 물론 여러 분석에서 단백질의 활성을 증가시키거나 감소시키기에 의해 이러한 개질 방법이 생활성에 정량적으로 또는 정성적으로 영향을 미칠 것으로 생각된다.

따로 재조합 DNA 함유 변환 숙주 세포로부터 생성된 IL-2 및 IFN- $\beta$ 와 같은 소수성 재조합 단백질은, 세포배양액에 가용성인 것과는 달리, 세포 내에서 침전된다.

세포내 생성된 단백질은 정제된 생물학적 활성물질로 재형화시키기 전에 세포상 조각으로부터 분리시키고 세포로부터 회수해야 한다. 이러한 굴절물질을 분리시키는 방법에 있어서, 변환 숙주 미생물의 세포막을 분쇄시키고, 99중량% 이상의 염을 분쇄물로부터 제거하고, 이 탈염 분쇄물을 재파괴하고, 물질, 바람직하게는 당(예를 들면 수크로스)을 분쇄물에 가하여 분쇄물 내 액체의 밀도 또는 점도를 변화시키고, 굴절물질을 고속원심 분리(즉, 약 10,000 내지 40,000xg)에 의해 세포모양 조각으로부터 분리시킨다. 염을 격리여과(diafiltration) 또는 원심 분리에 의해 분쇄물로부터 제거하고, 수크로스를 가하여 액체의 밀도를 약 1.1 내지 1.3g/ml로 증가시키는 것이 바람직하다.

원심 분리시킨 후, 굴절체 함유 펠렛을 변성제(예를 들면 나트륨 도데실 설페이트)와 함께 용해시키고, 생성된 현탁액을 원심 분리시키고, 단백질 함유 상층을 처리하여 단백질을 분리시킨다. 이 단백질을 적절한 장치(예를 들면 역성 고압 액체 크로마토그래피(RP-HPLC) 및/또는 겔 여과 크로마토그래피)에 의해 상층으로부터 분리시킨다. 이렇게 분리시킨후, 단백질을 산화시켜 그의 대응물과 가장 유사한 형태의 재조합 단백질을 고수율로 제조하는 것이 바람직하다[참조 : 미합중국 특허 제 4,530,787호(Z.Shaked등)], 산화는 또한 용해형태의 단백질 함유 수용액을 공기중에서 pH 약 5.5 내지 6에서 유효량 이상의 Cu<sup>+2</sup> 함유 산화 촉진제와 반응시켜 수행할 수 있다[참조 : 미합중국 특허 제 4,572,798호(K.Koths 등)]. 바람직한 산화 촉진제 또는 산화제는 CuCl<sub>2</sub> 또는 (O-페난트롤린)<sub>2</sub> Cu<sup>+2</sup>이다. 산화시킨 후, 하기와 같이 활성 중합체로 개질시키기 전에 단백질을 경우에 따라 RP-HPLC로 정제하고, 회석/격리여과, S-200겔 크로마토그래피 및 한외여과법에 의해 탈염시키고 정제할 수도 있다. 그러나 이종단백질을 요법적 용도에 생물학적 활성이 되도록 충분히 순수한 형태로 분리시킨 후, 어떠한 단계에서라도 중합체 개질화를 수행할 수 있다. 개질화를 수행하는 때는 최종 약제학적 제형 및 용도에 필요한 단백질의 최종 순도에 의거한다.

본 명세서에서 단백질의 세번째 유형으로서 사용된 '면역독소'라는 용어는 항체 및 세포독성 잔기의

접합체를 의미한다. 면역 독소의 세포독성 잔기에는 세포독성 약물 또는, 박테리아성 또는 식물성 효모적 활성 독소 또는 이러한 독소의 효소적 활성 조각('A쇄')이 포함된다. 효소적 활성 독소 및 그의 조각의 예에는 디프테리아 A쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 조각, 외독소(exotoxin) A쇄(슈도모나스 아에루기노사로부터), 리신 A쇄, 모덱신 A쇄, 알파-사르신, 장강기름오동 단백질, 디안틴 단백질, 양중자리공 단백질(PAP I, PAP II 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(momordica charantia) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 거품장구채 억제제, 켈로닌, 미토겔린, 리스트릭톡신, 페노마이신 및 에노마이신이 포함되는데, 리신 A쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성조각, 아브린 A쇄 및 PAP II가 바람직하고, 중합체와의 반응에 의해 개질된 리신 A쇄가 가장 바람직하다.

면역 독소에서 사용하는 항체는 특정한 병리적 상태(예를 들어 유방암, 전립선암, 결장암, 난소암, 흑종 또는 골수종등)에 대한 단일 클론성 항체가 바람직하다.

항체와 세포독성 잔기의 접합체는 여러가지 이작용성 단백질 개질제를 사용하여 제조할 수 있다. 이러한 시약의 예에는 N-석신이미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(SPDP), 이미노 티올레이트(II), 이미노에스테르의 이작용성 유도체(예를 들면 디메틸디아디프이미데이트, HCl), 활성에스테르(예를 들면 디석신이미딜수베레이트), 알데히드(예를 들면 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물(예를 들면 비스(p-아지도벤조일)헥사디아민), 비스-아지노용 유도체(예를 들면 글루타르알데히드), 비스-(p-디아조움-벤조일)-에틸렌디아민), 디아소시아네이트(예를 들면 톨루엔-2,6-디아소시아네이트) 및 비스-활성 불소 화합물(예를 들면 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)이 포함된다.

본 명세서에서, 단백질을 서술하는데 사용된 '선택적 접합된'이라는 용어는 반응조건, 최종용도, 중합체의 분자량 및 사용하는 특정 단백질에 주로 의거하여 단백질의 하나 이상의 아미노산 잔기를 통해 공유결합에 의해 결합된 단백질을 나타낸다. 잔기는 하나 또는 두개의 시스테인 또는 N-말단 아미노산 그룹과 같은 단백질의 어떠한 반응성 아미노산도 될 수 있지만, 바람직한 반응성 아미노산은 유리  $\epsilon$ -아미노 그룹을 통해 활성화 중합체의 반응성 그룹에 연결된 리신 또는, 아마이드결합을 통해 중합체에 연결된 글루탐산 또는 아스파르트산이다.

단백질의 한 바람직한 양태는 최대 생물학적 활성을 위해 단백질의 하나 또는 두개의 아미노산 잔기, 바람직하게는 리신을 통해 공유결합에 의해 결합된 것이다. 또다른 바람직한 양태로서, 단백질은 단백질의 10개 까지의 아미노산 잔기, 바람직하게는 리신을 통해 단백질의 순환 수명을 일반적으로 증가시키는 고급 치환체와 공유결합에 의해 결합된다.

본 발명의 방법에 있어서, 통상 소수성 수-불용성인 상기 3종류의 단백질은 단백질을 특정 중합체에 접합시켜 개질시킴에 의해, 용해제를 사용하지 않고도, 수성 담체 매질, 바람직하게는 pH 약 5 내지 8, 더욱 바람직하게는 약 6 내지 8, 가장 바람직하게는 6.5 내지 7.8에서 가용성으로 된다. 단백질을 그의 리신 잔기와 반응시킬 경우, 반응의 pH는 바람직하게는 약 7 내지 9, 더욱 바람직하게는 8 내지 9이다. 이들 단백질 개질 방법의 성공은 수-용성 효소 및 호르몬을 미리 중합체 개질시키는 것으로부터 예측할 수는 없다.

단백질이 부착되는 중합체는 폴리에틸렌글리콜(PEG)의 단일 중합체 또는 폴리옥시에틸화 폴리올인데, 단 모든 경우에 있어서, 중합체는 실온에서 수-용성이어야 한다. 폴리옥시에틸화 폴리올의 예에는 폴리옥시에틸화 글리세롤, 폴리옥시에틸화 소르비톨, 폴리옥시에틸화 글루코즈 등이 포함된다.

폴리옥시에틸화 글리세롤의 글리세롤 주쇄(backbone)은, 예를 들면 모노-, 디-, 및 트리글리세라이드 중 동물 및 인간의 천연 주쇄와 동일한 것이다. 즉, 이러한 분지형성(branching)은 체내 외부제(foreign agent)로서 필요하다고 간주되지는 않는다.

본 중합체는 특정한 분자량을 가질 필요는 없지만, 예를 들면 사용하는 특정 단백질에 의거하여 분자량이 바람직하게는 약 300 내지 100,000, 더욱 바람직하게는 350 내지 40,000이다.

PEG 단일 중합체는 비치환된 것이 바람직하지만, 또한 한쪽 말단이 알킬 그룹으로 치환될 수도 있다. 바람직한 알킬 그룹은 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬 그룹이며, 메틸 그룹이 가장 바람직하다. 가장 바람직한 중합체는 비치환 PEG 단일 중합체, 모노메틸-치환 PEG 단일 중합체 또는 폴리옥시에틸화 글리세롤이며, 분자량은 약 350 내지 40,000이다.

본 단백질은 중합체 상에 말단 반응성 그룹을 통해 접합되어 있다. 반응성 그룹과의 중합체는 본 명세서에서 활성화 중합체로서 나타낸다. 반응성 그룹은 유리아미노 또는, 단백질상의 다른 반응성 그룹과 선택적으로 반응한다. 그러나 최적 결과를 얻기 위하여 선택된 반응성 그룹의 유형 및 양뿐 아니라 사용하는 중합체의 유형은 반응성 그룹이 단백질상 너무 많은 특정 활성 그룹과 반응하는 것을 피하기 위하여 사용하는 단백질에 의거한다. 이것을 완전히 피할 수는 없지만, 단백질 농도에 의거하여 단백질 1몰당 일반적으로 약 0.1 내지 1000몰, 바람직하게는 2 내지 200몰 활성화 중합체를 사용하는 것이 적절하다. 특히 IL-2일 경우, 사용하는 활성화 중합체의 양은 궁극적으로 목적하는 특수한 성질에 의거하여 IL-2 1몰당 바람직하게는 50몰 이하, 가장 바람직하게는 약 2 내지 20몰(즉, 최종 양은 가능한한 단백질의 반감기를 최적화시키면서 동시에 최적 활성을 보유하는 값이다)이다. 단백질의 생물학적 활성을 바람직하게는 약 50% 이상, 가장 바람직하게는 100% 보유한다.

본 공유결합 개질 반응은 단백질상의 반응성 그룹이 리신 그룹일 경우, 바람직하게는 pH 약 5 내지 9에서 불활성 중합체와 반응성 생물학적 활성물질에 일반적으로 사용되는 어떠한 적절한 방법으로도 수행할 수 있다. 일반적으로, 본 발명은 활성화 중합체(하나 이상의 하이드록실 그룹 함유)를 제조한 후, 단백질과 활성화 중합체와 반응시켜 제형에 적절한 용해된 단백질을 제조하는 것을 포함한다.

상기 개질 반응은 하나 이상의 단계를 포함할 수도 있는 여러 방법으로 수행할 수 있다. 단일 단계 반응으로 활성화 중합체를 제조할 수 있는 적절한 개질제의 예는 시아누르산 클로라이드(2,4,6-트리클로로-S-트리아진) 및 시아누르산 플루오라이드를 포함한다.

바람직한 양태로서, 개질 반응은 2단계로 수행하는데, 먼저 중합체를 산무수물(예를 들면 석신산 무수물 또는 글루타르산 무수물)과 반응시켜 카복실산을 제조한 후, 카복실산을, 카복실산과 반응할 수 있는 화합물과 반응시켜, 단백질과 반응할 수 있는 반응성 에스테르 그룹 함유 활성화 중합체를 제조한다. 이러한 화합물의 예에는 N-하이드록시 석신이미드, 4-하이드록시-3-니트로벤젠 설폰산 등이 포함되며, N-하이드록시 석신이미드 또는 4-하이드록시-3-니트로벤젠 설폰산을 사용하는 것이 바람직하다. 예를 들면, 모노 메틸 치환된 PEG는 승은, 바람직하게는 100 내지 110°C에서 4시간 동안 글루타르산 무수물과 반응시킬 수 있다. 이렇게 제조된 모노 메틸 PEG-글루타르산을 그후 카보디이미드 시약(예를 들면 디시클로헥실 또는 이소프로필카보디이미드) 존재시 N-하이드록시 석신이미드와 반응시켜 활성화 중합체, 메톡시-폴리에틸렌글리콜-N-석신이미드 글루타레이트를 제조하는데, 이것은 단백질과 반응시킬 수 있다.[참조 : Cancer Biochem. Biophys., 7, 175-186, 1984]. 또 예를 들면 모노 메틸 치환된 PEG를 글루타르산 무수물과 반응시킨 후, 디시클로헥실 카보디이미드 존재시 4-하이드록시-3-니트로벤젠 설폰산(HNSA)[참조 : Peptides : Synthesis-Structure-Function, Proceedings of the Seventh American Peptide Symposium, Bhatnagar 등, (eds.)(Pierce Chemical Co., Rockford IL, 1981), p.97-100, Rich 등 및 High-Technology Route to Virus Vaccines, Nitecki 등(American Society for Microbiology : 1986) entitled 'Novel Agent for Coupling Synthetic Peptides to Carriers and Its Application.']과 반응시켜 활성화 중합체를 제조할 수 있다.

에스테르 결합이 아마이드 결합보다 화학적 및 생리적으로 덜 안정하기 때문에, 동시에 에스테르를 제조하지 않으면서, 카복실산 또는 아마이드를 제조하는 접합 반응에서 화학적 변환을 사용하는 것이 바람직할 것이다.

이렇게 개질된 단백질을 그후 바람직하게는 pH 약 3 내지 8, 더욱 바람직하게는 6 내지 8에서 비독성 불활성, 약제학적으로 허용되는 수성담체 매질 중에서 제형화한다. 진단용 면역 독소로서 시험관 내에서 수행할 경우, 투여 및 제형방식은 중요하지 않다. 배양액 또는 환류매질과 병용시킬 수 있는 수서 제형을 통상적으로 사용한다. 치료용으로서 생체내에서 사용할 경우, 멸균 생성물은, 혼합물을 재조성할 경우, 약제학적으로 허용되는 pH를 제공할 수 있는 양으로 수성완충액내에 용해시킨 단백질 혼합물로 이루어져 있다. 수-용성 담체(예를 들면 만니톨)를 경우에 따라 매질에 가할 수도 있다. 방금 제형화시킨 비개질 IL-2는 4°C에서 6달 이상 안정하다.

제형화된 단백질의 용량 농도는 증상발현전(preclinical) 시험후 수득한 생체내 효능 자료에 의거하여, 주로 사용하는 단백질 및 최종 용도에 의거한다.

제형을 동결 건조시킬 경우, 동결 건조 혼합물을 약병중 용이한 비경구 수성주사액(예를 들면 증류수)에 주사하여 재조성할 수 있다.

상술한 바와 같이 재조성된 제형은 치료에 요법적 유효량(즉, 환자의 병리적 증상을 제거하거나 경감시키는 양)으로 인간 또는 다른 포유동물에 비경구 투여하는데 적절하며, 치료유형은 단백질 유형에 의거한다. 예를 들면, IL-2 요법은 여러가지 면역조절 지시[예를 들면 T세포 돌연변이 유발, 세포독성 T세포의 유도, 천연 킬러(killer) 세포활성의 증대, IFN- $\gamma$ 의 유도, 세포상 면역의 회복 또는 증대(예를 들면 면역 부속증세의 치료) 및 세포 매개 항-종양 활성의 증대]에 적절하다.

IL-2를 직접 투여하는 것과는 달리, IL-2를 약제학적으로 허용되는 담체중에서 분리된 임포킨-활성화 임파구와 함께 채용가능한 면역요법으로 투여할 수 있는데, 여기에서 IL-2를 종양환자에게 투여할 경우, 임파구는 종양에 대해 반응성이다[참조 : New England Journal of Medicine, 1985, Rosenberg 등, 313 : 1485-1492].

IFN- $\beta$  요법은 항암, 항비루성 및 항 건선(psoriasis)치료에 적절하다. IFN- $\beta$ 가 다소 효능을 나타내는 특정한 암은 임파종, 골수종, 모발 세포백혈병이고, 비루스성 질병에는 서해임파절종 및 리노비루스가 포함된다.

면역 독소 요법은 목적 항체가 유효한 질병, 통상적으로 암치료에 대해 적절하다. 특히, 면역독소는 유방암과 같은 암치료에 적절하다.

면역 독소의 용량 및 용량 양생법은, 예를 들면 약물의 약리역학, 암의 특성(1차 및 전이) 및 그의 집단, 중합체의 유형 및 길이, 특정 면역 독소의 특징(예를 들면 그의 치료지수, 환자, 환자의 병력)에 의거할 것이다. IL-2 또는 IFN- $\beta$ 의 용량 및 용량 양생법은 단순히, 예를 들면 약물의 약리역학, 질병의 특성, IL-2 또는 IFN- $\beta$ 의 특징, 환자 및 병력에 의거할 것이다. 예를 들면, 다른 개질 IL-2 단백질은 다른 투여경로에 적절한 다른 약리역학 및 요법적 특성을 갖는 것으로 간주된다. 장기 유효(long-acting) eiranf은 3 내지 4일, 매주 또는 격주에 한번씩만 투여할 수 있다. 정화율(clearance rate)을 변화시켜 변화(예를 들면 중합체의 유형 및 부착된 중합체의 크기)에 따라 환자의 특수한 요구를 만족시킬 수 있는 최종 유연성을 얻을 수 있다.

본 발명을 더 예시하는 다음 실시예에서 모든 부 및 % 는 달리 명시되지 않는 한 중량비이며, 모든 온도는 섭씨이다.

[실시예 1]

[PEG화 인터로이킨-2(IL-2)의 제조]

[A. PEG-에스테르의 제조]

시판용 모노 메틸 PEG-5000을 100 내지 110°C에서 4시간 동안 참조문헌[Cancer Biochem.Biophys. Abuchowsk ; 등, 7, 175-186, 1984]의 방법과 비슷한 방법으로 글루타르산 무수물과 먼저 반응시켜 분자량이 5000인 선형 모노 메틸 치환된 PEG 에스테르를 수득할 수 있다. 생성된 PEG-글루타레이트를 디시클로헥실 카보디이미드 존재하에 N-하이드록시 석신이미드와 반응시켜(참조 : supra,

Abuchowski 등, 176), 하기에서 PEG\*로 나타내는 메톡시 폴리에틸렌글리콜 N-석신이미드 글루타레이

트를 제조한다.

마찬가지로, 석신산 무수물을 모노 메틸 PEG-5000과 반응시키고, 생성된 PEG-석시네이트를 N-하이드록시 석신이미드와 반응시켜 메톡시 폴리에틸렌 글리콜릴 N-석신이미드 석시네이트를 제조한다.

다른 단계에서 비슷한 방법에 의해, N-하이드록시 석신이미드 대신 HNSA를 사용하여 PEG-카복실산 에스테르-HNSA를 제조한다(참조 : supra, Bhatnagar 등 및 Nitecki 등). PEG 카복실산 에스테르 HNSA를 이 실시예 및 후속 실시예에 기술된 방법으로 활성화 PEG로서 사용할 수 있다.

[B. PEG\*와 IL-2의 접합]

RP-HPLC 정제 재조합 des-alanyl, Ser<sub>125</sub> IL-2(여기에서 위치 125의 시스테인은 세린으로 치환되고, N-말단 알라닐 잔기는 삭제된다)(참조 : 미합중국 특허 제 4,518,584호 및 4,530,787호, supra) 또는 상기 제조방법으로부터 후-격리여과시킨 des-ala<sub>1</sub>, Ser<sub>125</sub> IL-2를 이 실시예에서 사용한다. 완충액(붕산나트륨, pH 9, 0.1% SDS) 1.0ml 중 정제된 IL-2 0.5mg에 IL-2 1몰당 0, 2.5, 5, 10, 20, 50 및 100몰 PEG\*의 몰비로 새로 제조한 수성 PEG\*를 가한다. 충분히 혼합시킨 후, 용액을 실온(23°C)에서 30분 동안 교반시킨다. 각각의 반응 혼합물을 Sephadex G-25컬럼(Pharmacia)에 넣어 저분자량 물질로부터 IL-2 및 PEG화 IL-2를 분리시킨다. 이 Sephadex G-25컬럼을 SDS를 함유하지 않는 pH 9인 10mM 붕산나트륨 중에서 작동시키고, 또한 단백질로부터 SDS 대부분을 제거한다. 반응 혼합물을 혼합 배드 이온 지연 수지(Bio-Rad AG11A8)에 가하여 비개질 IL-2 및 SDS 대부분을 이와 달리 제거한다. 아크리딘-오린지 시험으로 측정된 PEG화 IL-2 샘플중 잔류 SDS의 농도는 단백질 mg당 3 내지 7μg SDS이다(참조 : Anal. Biochem, R. Sokoloff and R. Frigon, 118, 138-141, 1981).

[C. 개질 IL-2의 정제]

소수성 교환 크로마토그래피(Bio-Rad : Biogel-phenyl-5-PW)를 사용하여, 정제 PEG화 IL-2를 수득한다. 염을 감소시키면서 1차 구배에 의해(용매 A는 pH 7, 50mM 인산나트륨 중 1,7M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>이고 : 15분 동안 100 내지 0% ). PEG화 IL-2와 비개질 IL-2를 잘 분리시킨다. 용매 B에 10% 에탄올을 가하고 컬럼을 염용 욕조에 보유시켜 PEG화 IL-2의 회수 및 단리를 각각 매우 향상시킨다. 분획의 앨리 퀴트를 참조문헌[J. Immunol., Gillis, S. 등, 120, 2027-2032, 1978)에 기술된 방법으로 IL-2 생활성(세포증식)에 대해 분석한다.

[실시예 2]

[PEG화 IL-2의 특성화]

[A. IL-2에 대한 PEG\*의 몰비를 변화시키면서 반응으로부터 개질 IL-2 생성물의 크기 특성화]

실시예 1, A.의 반응으로부터, 0, 10, 20, 50 또는 100몰 PEG\* 함유 생성물의 SDS-PAGE(14%)는 IL-2에 대한 PEG\*의 몰비를 증가시키면서 개질도가 증가되는 것을 나타낸다. 제1도에 나타난 바와 같이 Shimadzu 이축 파장 스캐너(CS-930)를 사용하여 여러가지 겔 레인(lane)의 밀도계 스캔을 수득한다. 10 PEG/IL-2 및 20 PEG\*/IL-2 샘플은 소량의 비개질 IL-2 이외에 외관상 분자량 약 25kd의 개별 물질을 나타낸다. 50 PEG\*/IL-2 및 100 PEG\*/IL-2에서는, 광범한 PEG화 단백질의 특징인 고분자량 지역에서 반점이 있으며, 비개질 IL-2가 없다.

TSK-250 컬럼(Bio-Rad ; 25×0.4cm in PBS)상 PEG-IL-2 용액의 크기 제한도 또한 IL-2에 대한 PEG\*의 몰비를 증가시키면서 개질도가 증가하는 것을 증명한다.

[B. 개질도에 따른 PEG화 IL-2의 생활성]

IL-2 1몰당 0, 2.5, 5, 10, 20, 50 또는 100몰 PEG\* 함유하는 IL-2 PEG화 반응의 상기 생겔(Biogel)-패널 컬럼 용출로부터의 분획을 실시예 1, C.에 기술된 IL-2 세포증식 생물검사에 의해 분석한다. 아미노 그룹이 더 많이 개질될 수록, IL-2는 불활성화가 천천히 증가한다. 100 PEG\*/IL-2의 몰비로 반응을 수행하면, 개질 IL-2 생성물의 고유 활성이 비개질 IL-2의 활성의 약 10% 만으로 현저하게 낮아진다.

[표 1]

개질도에 따른 PEG화 IL-2의 생활성

IL-2 1몰당 처음에 가한 PEG-에스테르의 몰수	생활성(BRMP표준단위/mg IL-2)
1. 0 PEG*/IL-2	7.36±4.83×10 <sup>6</sup>
2. 2.5 PEG*/IL-2	9.20±3.45×10 <sup>6</sup>
3. 5 PEG*/IL-2	11.50±2.30×10 <sup>6</sup>
4. 10 PEG*/IL-2	10.35±4.37×10 <sup>6</sup>
5. 20 PEG*/IL-2	7.82±2.76×10 <sup>6</sup>
6. 50 PEG*/IL-2	3.45±2.30×10 <sup>6</sup>
7. 100 PEG*/IL-2	0.69±0.23×10 <sup>6</sup>

\* 이 숫자는 IL-2생물검사에서 큰 가변성을 나타낸다.

[C. 비개질 IL-2와 비교한 PEG화 IL-2의 용해도]

개질 반응과 후속 Sephadex G-25 크로마토그래피에서 SDS 제거를 수행한 후, PEG화 IL-2의 pH는 6.5 내지 7로 저하된다. 저 SDS 중 비개질 IL-2는 pH 5 내지 7에서 침전한다. 표 1의 PEG<sup>\*</sup>/IL-2 양에 비해 낮은 몰비로 수행된 반응으로부터의 개질 IL-2는, AG11A8수지, 생겔 페닐(HPLC)크로마토그래피에 의해 계속 제거할 수 있는 비개질 IL-2 때문에 약간의 탁도를 갖는다. PEG<sup>\*</sup>/IL-2의 몰비가 높은 반응으로부터의 개질 IL-2용액은 장시간 투명하다. pH-조절한 용액을 한외여과(50,000rpm, SW60 rotor, 5°C에서 12시간)시킨다. 상층을 제거하고 보관한다. SDS-PAGE로 잔사와 상층 모두의 앨리퀀트를 분석하면, 상층이 PEG화 IL-2를 함유하는 반면 잔사는 IL-2인 것이 나타난다. SDS 또는 또 다른 변성제 부재하에, 중성 pH 수성 매질 중에서 PEG화 IL-2와 비개질 IL-2의 용해도의 큰 차이는 제 2도의 흡광도 스캔(Hewlett-Packard 8450A 분광 광도계)으로 나타낸다. 특정한 스펙트럼이 없는 것에 의해 증명되듯이, pH 7에서 비개질 IL-2가 용액으로부터 침전된다.

정제된 PEG화 IL-2(HPLC-페닐 컬럼 후)는 어떠한 정화제 또는 변성제 없이도 수성 완충액 중 pH 7에서 완전히 가용성이다. 정제된 PEG화 IL-2는 용액 중에 남고 시험시간(적어도 5달)동안 그의 생활성을 보유한다. SDS 없이 중성 pH에서 가용성인 PEG화 IL-2는 0.1% SDS 존재시 비개질 IL-2와 비교하여 다음의 고유 활성을 갖는다 :

IL-2 1몰당 처음에 가한 PEG <sup>*</sup> 몰수	고유활성(BRMP 표준단위/mg IL-2)
0	7.36×10 <sup>6</sup>
10	12.88×10 <sup>6</sup>
20	8.51×10 <sup>6</sup>

10PEG<sup>\*</sup>/IL-2와 20PEG<sup>\*</sup>/IL-2의 NK(천연 킬러 : 참조 : 미합중국 특허 제 4,518,584호)와 LAK(림포킨-활성화킬러 : 참조 : J.Exp.Med., Grimm 등, 155 : 1823-41, 1982) 활성은 비개질 IL-2와 동일하다. 20배 몰과량의 비개질 IL-2중 유리 PEG(1K daltons)를 가해도 NK 또는 LAK 활성은 영향을 받지 않는다.

[D. pH에 따른 PEG화 IL-2의 안정성]

IL-2 1몰당 50몰 PEG<sup>\*</sup>를 사용하여 개질 반응으로부터 PEG화 IL-2를 3시간 동안 실온 및 여러 pH에서 배양시킨후, IL-2 폴리펩티드로부터 아미드-연결 PEG의 가수분해에 대해 14% SDS-PAGE로 분석한다. PEG화 IL-2를 0.1% 트리플루오로아세트산(pH 2.5) 함유 10% 아세토니트릴 중에서 3배로 희석하고 또한 pH 7.5, 10 및 11에서 배양한다. pH 9에서 NaOH를 붕산나트륨 완충액에 가하여 알칼리성 pH를 보유한다. 이러한 조건하에서 pH 11 이하일 경우, 가수분해의 증거가 나타나지 않는다. 그러나, pH 11에서는 PEG화 IL-2는 가수분해되기 쉽다. 3시간 동안 실온(20 내지 23°C) 및 pH 2.5에서 PEG화 IL-2가 안정하다는 관찰은, 비슷한 조건하에서 수행된 RP-HPLC 단계를 포함하는 IL-2회수 방법을 기술했던 참고문헌[미합중국 특허 제4,569,790호(1986.2.11허여)]의 견지에서 볼때 특히 유용하다.

[E. 마우스에서 비개질 IL-2와 비교한 PEG화 IL-2의 약리 역학]

[1. 정맥내 투여]

총 36마리와 마우스에 각가 D 5W(물중 5% 덱스트로즈) 중 단백질 12.5µg을 정맥내 투여한 후, 비개질 IL-2와 PEG화 IL-2의 2제제의 약리역학적 자료를 수득한다. 주사용 샘플(100ml 볼루스)은 하기와 같으며 다음 활성을 갖는다.

샘플	IL-2활성(BRMP 표준 단위/mg IL-2)
A. 비개질 IL-2 (lot LP-263)	5.98±0.46×10 <sup>6</sup>
B. PEG화 IL-2 (10몰 PEG <sup>*</sup> /1몰 IL-2반응)	12.19±4.14×10 <sup>6</sup>
C. PEG화 IL-2 (50몰 PEG <sup>*</sup> /1몰 IL-2반응)	4.37±0.23×10 <sup>6</sup>

샘플 A는 0.1% SDS 최종 농도를 갖는 D 5W 중 주사에 의해 응집물질로부터 유리된다. PEG화 IL-2 샘플(B와 C)은 보통 수성 조건하에서 응집되지 않으며 완전히 가용성이기 때문에 SDS를 함유하지 않는다.

12마리의 암컷 Balb/C 마우스 32그룹에서 각각의 마우스에 꼬리 정맥으로 3샘플 중 하나를 주사하고 모두 1.5분에서 후안화(retro-orbitally)로 채혈(bleed)한다. 주사한지 수시간 후, 100µl 혈액 샘플을 페파린화 모세관으로 후안화로 제거한다. 원심 분리(1분)에 의해 플라즈마를 즉시 제조하고, 실시예 1, C에 기술된 바와 같이 생물분석을 하기 위해 분석 매질에 앨리퀀트를 희석시킨다. 제3도는 비개질 IL-2와 PEG화 IL-2 샘플 2제제의 약리 역학이 나타나 있다. 제3도에서 IL-2의 초기분포의 반감기(50% 생활성에서)는 다음과 같다 :



샘 플	t 1/2
A. 비개질 IL-2	2분
B. PEG화 IL-2(10PEG*/IL-2)	10분
C. PEG화 IL-2(50PEG*/IL-2)	35분

즉, IL-2를 PEG화 시키면 세포증식 분석에서 측정된 바와 같이 10PEG\*/IL-2를 사용한 마우스의 순환 반감기가 5배 증가하고 50PEG\*/IL-2를 사용하면 순환 반감기가 17배가 증가하게 된다.

IL-2 각 유형당 12마리의 마우스에 비개질 IL-2, PEG화 IL-2(10몰 PEG\*/1몰 IL-2 반응) 및 PEG화 IL-2(50몰 PEG\*/1몰 IL-2 반응)를 정맥내 주사할 경우, 주사한지 1.5분 후 총 주사된 IL-2 단위의 생활성 회수 % 는 하기와 같다 :

샘 플	IL-2생활성의 회수 %
A. 비개질 IL-2	57
B. PEG화 IL-2(10PEG*/IL-2)	72
C. PEG화 IL-2(50PEG*/IL-2)	100

이러한 결과는 PEG\*의 개질도에 따라 IL-2 생활성의 회수 % 가 매우 증가하는 것을 나타내며, IL-2 1몰당 50몰 PEG\*의 개질도에서 100% 가 회수된다.

[2. 피하내 투여]

48마리의 마우스에 멸균수 중 단백질 12.5µg을 피하투여한 후, 비개질 IL-2 및 PEG화 IL-2의 약리역학 자료를 얻는다. 마우스의 어깨 피하주사(단일 100µl 볼루스)에 사용하는 샘플에는 비개질 IL-2, PEG화 IL-2(20몰 PEG\*/1몰 IL-2 반응) 및 PEG화 IL-2(50몰 PEG\*/1몰 IL-2 반응)가 포함된다. 3 샘플 모두 0.125mg/ml이다. 비개질 IL-2 샘플은 중성 pH 수용액 중 그의 불용성 때문에 0.1% SDS를 함유한다.

수회 샘플 100µl을 상술한 바와 같이 후안와로 헤파린화관으로 제거한다. 플라스마를 제조하고, 생물검사를 위해 얼리퀴트시킨다.

3 샘플 각각에 대해 16마리의 마우스씩 45분, 그밖의 다른 시간에서는 샘플당 2 내지 5마리의 마우스를 검사한다. 제4도는 마우스에 피하주사를 놓은 후, 비개질 IL-2 및 PEG화 IL-2의 약리역학을 나타낸다. 하기에 나타난 바와 같이 플라스마에서 나타나는 주사된 총 IL-2 생활성의 최대 % 가 PEG화 IL-2보다 매우 높을 뿐 아니라, PEG화 IL-2의 정화율은 현저히 낮다(제4도 참조).

샘 플	플라스마에서 나타나는 IL-2생활성 최대 %
A. 비개질 IL-2	0.5
B. PEG화 IL-2(20PEG*/IL-2)	7.0
C. PEG화 IL-2(50PEG*/IL-2)	17.5

[F. PEG화 IL-2 및 비개질 IL-2 주사후 토끼의 면역 반응]

이 시험은 각각의 그룹당 4마리씩 3그룹으로 수행한다.

그룹 A는 상기 제조방법(lot LP 304)으로부터 제조한 비개질 후-격리 여과시킨 des-alanyl, Ser<sub>125</sub> IL-2를 주사한 토끼들이다. 그룹 B는 상기와 같이 20배 과량의 PEG\*를 사용하여 lot LP 304로부터 제조한 PEG화 IL-2를 주사한 토끼들이다. 그룹 C는 또한 50배 과량의 PEG\*를 사용하여 LP 304로부터 제조한 PEG화 IL-2를 주사한 토끼들이다. 주사전에 각각의 IL-2 제제를 멸균수로 희석시킨다.

암컷 뉴질랜드 화이트 토끼(무게~2.2kg)에 각 부위당 적절한 IL-2 또는 PEG화 IL-2를 0.5ml(1-2×10<sup>5</sup>단위)씩 2부위에 근육내 주사한다.

여러시간 간격에서, 모든 토끼의 주연이(marginal ear)정맥 또는 중이(middle ear)동맥으로부터 채혈한다. 혈액을 응고시키고 원심 분리시켜 혈청을 수득한다. 혈청 얼리퀴트를 IL-2 분석 매질로 5배 희석시키고, 실시예 1, C의 세포증식 분석에 의해 생물검사를 한다. 근육내 주사한 후 순환 혈액중 IL-2 및 PEG화 IL-2의 약리역학은 마우스에서 얻은 자료와 비슷하다.

주사한지 1주일 후, 모든 토끼에게 적절한 IL-2 또는 PEG화 IL-2로 2번째 근육내 주사한다. 주사단위는 상기와 같다.

첫번째 주사한 지 3주후, 모든 토끼를 1-2×10<sup>4</sup>단위/kg의 적절한 비개질 IL-2 또는 PEG화 IL-2로 부우스트(boost)시킨다. 표지시약으로서 고추냉이 과산화효소 연결된 염소 안티래비츠(goat antirabbit) IgG 및 기질로서 오르토펜렌 디아민을 사용하여 ELISA 분석에 의해 규칙적인 간격으로 혈청(상기와 같이 수득된)중에서 항원-고유항체 반응을 측정한다. 492nm에서 흡광도를 측정한다. 항원을 2유형의 ELISA 평판, 폴리스티렌 및 폴리비닐(Dynatech Laboratories, Inc.)에 코팅시킨다.

혈청에서 시험하는 항원은 비개질 IL-2(LP 304), PEG화 IL-2(20배 과량 PEG\*) 및 PEG화 IL-2(50배 과량 PEG\*)이다. 첫번째 주사한지 5주후 결과는 다음과 같다.

그룹 A : 이들 토끼는 모두 ELISA 중  $10^4-10^5$ 으로 희석시켜 나타나는 IL-2 고유 1g MS를 갖는다. 4마리의 토끼중 2마리(A3 및 A4)는 또한  $10^4$  희석액 까지에서 높은 IL-2 고유 IgMs를 갖는다. 토끼 A2는 IgGs 농도가 약간 낮다. 토끼 A1은 최소 IL-2 고유 Igs를 갖는다.

그룹 B : 이들 토끼는 검출가능한 IL-2 고유 IgGs를 갖지 않는다. 모두 ELISA 분석에서  $10^2$  희석액에서 검출되는 IL-2 고유 IgGs를 갖는다.

ELISA 평판상에서 항원으로서 PEG화 IL-2를 사용하여 이들 분석을 반복하면, 같은 결과가 나온다.

그룹 C : 이들 토끼는 검출 가능한 IL-2 고유 IgGs를 갖지 않는다. 모두 항원으로서 PEG 화 IL-2를 사용한 ELISA 분석에서  $10^2$  희석액에서 검출되는 IL-2 고유 Ig Ms를 갖는다.

이들 연구는 비개질 IL-2, 항원-고유 Igs가 시간에 따라 나타나는 반면, PEG화 IL-2가 항원일 경우 항원-고유 IgG 반응은 감소하는 것을 나타낸다.

[G. Meth-A를 사용한 Balb/c 마우스 중 PEG화 IL-2의 효과 시험]

마우스에 매일 투여하는 이 실험에서, 비개질 IL-2가 단지 약한 효과만 가지는 용량에서 Meth A 육종에 대해 PEG화 IL-2는 강한 효과를 갖는다.

66마리의 Balb/c 마우스에, Balb/c 마우스의 복수증(ascite)액으로부터 세포 현탁액으로서 sloan-kettering로 수득한 마우스 섬유 육종 세포선에  $6 \times 10^5$  메타콜란테닌-A(Meth A)를 목뒤에 각각 피하 주사한다.

마우스를 대·중·소 중앙수가 비슷한(5 내지 10mm) 3그룹으로 분리시킨다. 그후 3그룹에 시험물질을 복강내 투여한다. 그룹 A에는 PEG(모노 메틸 5000) 0.01mg/ml 함유 PBS 0.5ml를 투여한다.

그룹 B에는 10% 송아지 혈청과, IL-2 보다 20배 과량의 PEG\*를 사용하여 수득한 PEG\*화 IL-2 3 $\mu$ g을 함유하는 조직 배양 매질 0.5ml를 투여한다. 그룹 C에는 10% 송아지 혈청과, 상기 비개질 후 격리 여과시킨 des-ala1, ser125 IL-2 3 $\mu$ g을 함유하는 조직 배양 매질을 투여한다.

3그룹에 7일 동안 매일 주사한다. 4일째에 마우스의 무게를 달고, 그의 중앙 크기를 측정한다. 8일째 되면, 세 그룹은 체중이 달라진다.

**PEG 조절 26.0g**

**PEG\*/IL-2 21.1g**

**IL-2 23.6g**

	0일째 중량용적 (mm <sup>3</sup> )	6일째 중량용적 (mm <sup>3</sup> )	8일째 중량용적 (mm <sup>3</sup> )	9일째 중량용적 (mm <sup>3</sup> )
그룹 A (PEG 조절 부형제)	138 ± 48	3259 ± 919	5597 ± 1877	7333 ± 1403
그룹 B (PEG/IL-2)	129 ± 42	424 ± 129	341 ± 218	353 ± 148
그룹 C (IL-2)	130 ± 63	2523 ± 808	2034 ± 997	4405 ± 1471

8일째 되면, 제형화 IL-2로 처리한 마우스는 64% 중앙 성장 억제를 나타낸다. 그러나, 9일째가 되면 억제는 단지 40% 만 되며, 종량은 급속히 성장한다. 고통을 막기 위하여 이 그룹은 희생시킨다. PEG\*화 IL-2로 처리한 마우스는 8일 및 9일째 모두 94% 중앙 성장 억제를 나타낸다. 이들 마우스도 또한 고통을 막기 위하여 희생시킨다.

[실시에 3]

[분자량 350인 PEG화 IL-2의 제조]

[A. PEG-에스테르의 제조]

다음 방법으로 분자량 350인 선형, 모노 메틸-치환된 PEG 에스테르를 수득한다. 총 모노 메틸 PEG-350(Aldrich chemical Co.) 10g을 110℃로 가열하다. 여기에 석신산 무수물(Aldrich) 14.3g을 가한다. 혼합물을 방재도록 교반시킨후, 냉각시킨다. 벤젠을 가하고, 벤젠 용액을 여과한다. 여과액으로부터 시약을 분리시킨다.

생성된 PEG-350-석시테이트 2g을 디메틸 포름아미드 25ml, 디시클로헥실카보디이미드 3.531g 및 HNSA(실시에 1에서 제조한) 6.914g과 혼합시킨다. 혼합물을 어둠 속에서 48시간 동안 실온에서 교반 시키고, 여과한다. 여과액에 천천히 에테르 1L를 가하여 시약을 침전시킨다. 총 조화합물 150mg H2O 1ml에 가하고, 원심 분리시키고, 기울여서 따라버린다. 상층을 수 중 Sephadex G-25 컬럼에 넣고 적절한 분획을 모으고 동결 건조시킨다. 정제된 생성물을 하기에서 PEG\*로 나타낸다.

[B. PEG\*와 IL-2의 접합]

des-ala<sub>1</sub> ser<sub>125</sub> IL-2(참조 : 미합중국 특허 제4,518,584호 및 제4,572,798호, supra)를 이 실시예에서 사용한다. 완충액(0.1M 붕산나트륨, pH 9, 0.1% SDS) 1.0ml 중 이 정제된 IL-2 0.4mg에 IL-2 1몰당 PEG\* 10몰의 몰비로 새로 제조한 수성 PEG\*를 가한다. 충분히 혼합시킨 후, 용액을 32°C에서 15분, 1시간, 5시간 및 20시간 동안 교반시킨다. 각각의 시간에서, 용액 125 μl을 제거하고, 1mg/ml 이프실론-NH<sub>2</sub>-카프로산 40 μL에 가하고, 4°C에서 보관한다.

[C. PEG화 IL-2의 특성화]

반응 B의 생성물을 SDS-PAGE(14, 감소) 분석하면 15분 후에 상당량의 개질이 수행되는 것이 나타난다.

PEG-350 IL-2를 실시예 1.C에서 상술한 시험관내 IL-2 세포증식 생물 검사에 의해 시험하면 활성이다.

[D. 마우스에스 비개질 IL-2와 비교한 PEG화 IL-2의 약리역학]

실시예 3·E에 기술된 것과 비슷한 방법으로 약리역학적 분석을 위해 PEG-350 IL-2 및 비개질 IL-2를 마우스에 정맥내 투여한다. 결과를 표 11에 나타낸다 :

[표 11]

PEG 화 IL-2의 약리역학(PEG-350 IL-2)

시간	BRMP 표준단위*/회수%	
	개질 IL-2	IL-2 PEG*
0분(총 주사단위)	176,913	80,046
1.5분	81,880/ 46.3	25,035/ 31.3
8분	9602/ 5.43	3158/ 3.94
20분	4950/ 2.80	2772/ 3.46
45분	1178/ 0.67	564/ 0.70
1시간	212(2)**/ 0.12	129/ 0.16
2시간	46(2)**/ 0.03	0
3시간	0	0

\* 이 단위는 마우스에서의 단위(BRMP 단위×20배 회석액)이다.

\* 괄호는 그룹중 마우스가 4마리 미만일 경우를 나타낸다.

[실시예 4]

분자량 400 및 1000인 PEG화 IL-2의 제조

실시예 3의 방법으로 각각 비치환 PEG-400 및 -1000을 사용하여 분자량 400 및 1000인 선형 디하이드록시(비치환) PEG화 IL-2 유도체를 일반적으로 제조한다.

[실시예 5]

분자량 10,000, 20,000 및 35,000인 PEG화 IL-2의 제조

실시예 1.A의 방법으로 PEG 10,000(Union Carbide)를 사용하여 분자량 10,000인 선형 모노 메틸 치환된 PEG화 IL-2 유도체를 일반적으로 제조한다. 실시예 1.A(승온보다는 실온에서 용매중 염기를 사용하여)와 비슷한 방법(참조 : Abuchowski 등, supra)으로 PEG-20,000 및 PEG-35,000(Fluka)를 사용하여 분자량 20,000 및 35,000인 디하이드록시 PEG화 IL-2 유도체를 제조한다. 생성된 개질 IL-2 단백질은 상기 세포증식 분석에 의해 분석하면 생활성이다.

[실시예 6]

분자량 5000인 PEG화 IFN-β의 제조

실시예 1.A 및 1.B에서 IN-2에 대해 기술된 방법으로 IFN-β 1몰당 0, 10, 20 또는 50몰 PEG\*

함유 반응에 의해 활성화 PEG-에스테르를 제조하고 위치 17에서 시스테인 잔기를 세린 잔기(SER<sub>17</sub> IFN-β)로 치환시켜(참조 : 미합중국 특허 4,518,584호) 활성화 PEG-에스테르와 RP-HPLC 정제된 재조합 IFN-β의 접합을 수행한다. 0.1% SDS 함유 pH 5, 50mM 아세트산나트륨 중 Sephacryl S-200 컬럼 및 분자 제한 크로마토그래피를 사용하여 비개질 IFN-β로부터 PEG화 IFN-β의 분리를 수행할 수 있다. S-200 분획으로부터의 앨리퀀트를 세포변성효과(CPE) 분석법(참조 : 'The Interferon System', W.E. Stewart, Springer-Verlag, p17-18, 1979)을 사용하여 IFN-β 항바이러스 활성에 대해

분석하면, 실시예 7에 기술된 바와 같이 활성이다. CPE 분석은 원칙적으로 인터페론 처리된 세포를 인터페론이 바이러스 영향으로부터 보호하는 것을 나타낸다. 바이러스에 대해 감응성인 세포는 세포변성 효과를 나타내고 사멸하는 반면, 바이러스에 대해 저항력이 강한 세포는 생존한다.

[실시예 7]

분자량이 5000인 PEG화 IFN-β의 특성화

[A. IFN-β에 대한 PEG\* 몰비를 변화시키는 반응으로부터 개질된 IFN-β 생성물의 크기 특성과 실시예 VI에 기술된 반응으로부터 제조된 IFN-β 1몰당 0, 10, 20 또는 50몰 PEG\*를 함유하는 생성물의 SDS-PAGE(14%, 비강소)는, IL-2의 경우에 있어서, IFN-β에 대한 PEG\*의 몰비가 증가하면서 개질도가 증가하는 것을 나타낸다.

밀도계 스캔(제5도)은 IFN-β에 대한 PEG이 몰비가 증가하면서 분자량 20,000의 비개질 IFN-β의 양이 감소하는 것을 나타낸다. 시험하는 모든 3몰비의 IFN-β를 PEG 개질시킨후(10 PEG\*/IFN-β, 20 PEG\*/IFN-β 및 50 PEG\*/IFN-β A:C 50 PEG\*/IFN-β), 외관상 분자량 30000 내지 35000인 개별물질이 나타난다.

IFN-β 1몰당 50몰 PEG\*에서 반응을 수행하면, 고급 개질된 IFN-β 분자를 나타내는 고분자량 물질의 증가가 명백하게 나타난다.

[B. 비개질 IFN-β와 비교한 PEG화 IFN-β의 생활성]

IFN-β 1몰당 0, 10, 20, 또는 50몰 PEG\*

함유하는 PEG화 반응의 S-200 분리의 분획을 실시예 3에 기술된 바와 같이 항비루성 활성에 대해 분석하다. 모든 3개질 반응에서 수득된 PEG화 IFN-β의 생활성은 표 III에 나타난 바와 같이 비개질 IFN-β에 상응한다.

[표 III]

표 III  
CPE 분석으로 측정된 비개질 IFN-β와 PEG 화 IFN-β의 생활성

IFN-β 1몰당 처음에 가한 PEG* 몰수	생활성(단위/mg)
0	2.2±0.6×10 <sup>7</sup>
10	2.2±1.6×10 <sup>7</sup>
20	2.0±0.1×10 <sup>7</sup>
50	4.1±0.8×10 <sup>7</sup>

[C. 비개질 IFN-β와 비교한 PEG화 IFN-β의 용해도]

개질 반응과 S-200 분획화시킨후, 실시예 1에 기술된 바와 같이 Sephadex G-25-크로마토그래피를 사용하여 SDS를 제거하고, PEG와 IFN-β 및 비개질 IFN-β를 모두 pH 7로 각각 조절한다.

200 내지 650mm의 흡광도 스캔에 나타난 바와 같이 PEG화 IFN-β가 용액중에 남아 있는 반면, 비개질 IFN-β는 pH 7에서 용액 중에서 남아 있는 반면, 비개질 IFN-β는 pH 7에서 용액중에 침전된다.

(제6도). 개질 IFN-β 및 비개질 IFN-β 모두 pH 9에서 가용성이다. 시험한 모든 PEG화 IFN-β 샘플에서 비슷한 결과가 수득된다.

[D. 비개질 IFN-β와 비교한 PEG화 IFN-β의 약리역학]

생체내 반감기는 비개질 IFN-β와 비교하여 PEG화 IFN-β를 사용한 랫트 및 마우스 중 IL-2의 반감기와 마찬가지로 개선된다.

[실시예 8]

[PEG화 리신(Ricin) A의 제조 및 특성화]

[A. PEG화 리신 A쇄의 제조]

하기의 방법으로, 정제 및 세포독성을 나타내기 위해 용해시킬 필요가 없는 가용성 재조합 리신 A를 제조한다. 리신 A의 코딩 서열을 pho A의 DNA 코딩화 전구물 서열의 직접 해석 구성물에 도입하면, 전구물 서열이 전구물/리신 A 키메라의 N-말단 부분이며 이렇게 배열된 리신 A 서열은 가용성 세포 독성 물질이 된다.

pRT3(ATCC 기탁번호 67,027, 1986.3.7. 기탁), pRT 17(ATCC 기탁번호 67,026, 1986.3.7. 기탁) 및 pRT 38(ATCC 기탁번호 67,025, 1986.3.7. 기탁) 또는 그의 변이유발화 형태에 함유된 전구 단백질 유전자 함유 발현 벡터를 구성한다. 이들 발현 벡터와 변환 숙주 세포는 코드화 전구 단백질을 용해시킨다.

arg-arg 개질 전구체는 트립신으로 분해되고, 전구체의 A 및 B 부분은 본 명세서에 기술된 바와 같이 분리 단백질로서 생성된다.

pho A 발현계에서, 필수 성분은 리신 A 코드화 서열의 구성물 부근 및 외부의 말단 pho A 전구물 서열 상류(upstream)인데, 리신 A 코드화 서열은 ATG 코돈으로 시작한다. 이 2코딩화 서열에는, 물론, 전구물과 이미 결합된 pho A 촉진제인, 병용 가능한 박테리아성 촉진제를 제공한다. 이외에, 비.투링기엔시스(B.thuringiensis)의 결정 단백질과 결합된 양성 역조절 서열인 양성 역조절 서열 존재시 제조가 개선된다. 이에 의해 레플리콘(replicon) 및 선택성 표지물을 포함하는 박테리아성 운반 벡터가 공급된다.

그후, 이 벡터를 사용하여 선택된 특정 숙주에 적절한 조건하, 가장 빈번하게는 발현계 조저라의 촉진제를 억제하는 조건하에서 성장한 적절한 프로카리오성(procaryotic) 숙주를 변환시킨다. 그후 선택된 촉진제 조절하에 발현을 시행하는 조건을 제공하여 리신 A의 생성을 유도하고, 생성물의 목적하는 축적을 시행하기에 충분한 시간 동안 생성을 진행시킨다. 그후, 세포를 분열시켜 단백질 생성물을 분리시키고, 세포상 조각을 제거한다. 그후, 자유 용성 단백질에 적용하는 본 분야에 공지된 표준 방법을 사용하여 생성된 리신 A를 더 정제한다.

그러나 부분적 정제된 추출물을 페닐 세파로즈로 처리하여 추출 및 정제의 효율을 증가시킨다. 소니케이트(막 또는 다른 결합물질로부터 분리시킨)중 리신 A의 용해도는, 소니케이트를 고속으로 10,000×g 30분 동안 원심 분리시켜 불용성 단백질을 나선 강하시킬시, 상층에 남는 그의 능력으로 나타난다.

새로운 β-머르캅토에탄올 2μl(0.1% 까지)를 가하고 실온에서 방새도록 배양시켜 이 총 가용성 리신 A(9.0mg/ml) 2ml를 재감소시킨다.

0.10M NaPO<sub>4</sub> pH 8.0, 그후 완충액 0.5ml로 평형화시킨 G-25 컬럼(Pharmacia)에 감소 리신 A 2ml를 가하여 샘플 적용 용적 2.50ml로 만든다. 다음 용출액(완충액을 사용한) 3.0ml를 탈염리신 A로서 모른다.

탈염리신 A(약 6mg) 1.0ml를 1.5ml 미세퓨즈(fuge)관으로 옮긴다. 리신 A에 실시예 1.A에서 수득한 PEG 2000의 N-하이드록실화 석신이미드 에스테르(활성화 PEG) 4.5mg을 가한다. 이 활성화 PEG 4.5mg은 리신 A보다 11배 과량의 활성화 PEG를 나타낸다.

활성화 PEG를 천천히 혼합시켜 리신 A 용액에 용해시킨다. 여러 시점에서, 반응 혼합물 앨리퀴트 100μl을 다음 G-25 컬럼 방법에 의해 탈염시켜 미반응 활성화 PEG를 제거하고 PEG화 반응을 중지시킨다 :

PEG 100 μl /사용한 리신 A

0.10M NaPO<sub>4</sub> 2.4ml pH 8.0 사용

0.10M NaPO<sub>4</sub> 1.1ml pH 8.0 사용 및 용출액을 탈염리신 A로서 모음.

시간 : 10', 20', 30', 45', 1시간, 2시간, 3시간, 4시간 및 5시간.

반응 생성물을 처음에는 얼음에 보유시킨다.

15% 미니-겔을 사용하여 PEG 화 도를 측정한다.

결과는 PEG 화가 잘되어 있고, 반응이 급속히 일어나는 것을 나타낸다.

항체 접합용 PEG 화 리신 A 새 샘플을 제조한다. 상기 리신 A 약 40mg을 1% β-머르캅토에탄올과 pH 8.5 트리스 완충액 약 10ml와 혼합시킨다. 이것을 약 5ml로 농축시키고 2개의 G-25 컬럼상 EDTA 완충액 중에서 탈염시켜 총 완충액 6.37ml를 수득한다. 총 PEG(약 2000)의 N-하이드록시 석신이미드 에스테르 24.6mg을 리신 A에 가하고, 혼합물을 15분 동안 얼음상에서 반응시킨다.

(이 양은 활성화 PEG의 10배 과량이다).

PEG 화 리신 A 혼합물을 4°C에서 보관한다.

50mM(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 40mM NaPO<sub>4</sub>, pH 6.5의 완충액을 사용하여 총 PEG 화 리신 A 혼합물 50μgMF 예비 Zorbax GF-250 크기 컬럼(Dupont)에 유속 1ml/분으로 주사한다.

첫번째 피크는 예비 분획화로부터 분획 5ml의 1.5% 미니겔 처리에 의해 측정된 PEG 화 리신 A이다.

첫번째 처리에서 수득된 푸울(pool)을 약 2ml로 농축시킨후, 흡광도 280nm으로 검사하여 Zorbax GF-250 컬럼상 HPLC에 의해 정제된다. 각각의 처리의 분획 15 내지 23을 PEG 화 리신 A로서 모은다.

그후 상기 정제법과 비슷한 조건하에서 HPLC상 분자량 표준(Bio Rad)법으로 처리하여 PEG 화 리신 A의 분자량을 측정한다. PEG 화 리신 A가 약 22K(1-mer), 44K(2-mer) 및 59K(3-mer)의 외관상 분자량을 갖는다는 것을 나타내는 선상 회귀(regression)가 나타난다.

[B. PEG 화 리신 A의 특성화]

키트(Promega Brotec)를 사용하여 Zorbax GF-250상에서 PEG 화 리신 A 2mg으로부터의 앨리퀴트를 망상적혈구 분서(번역)중 생활성에 대해 시험한다. 주어진 샘플은 분획 28(고분자량), 34(2-mer), 40(1-mer) 및 약간의 비정제 PEG 화 리신 A/비개질 리신 A 혼합물이다. 토끼 망상적혈구 세포-유리번역계 분석은 방사성 메티오닌을 병용시켜 단백질 합성을 측정한다.

표 IV에 나타난 결과는 정제된 1-mer의 유리 리신 A에 가까운 억제만을 나타낸다는 것을 표시한다.

2-mer 및 3-mer 분획은 50% 상승억제 용량(elevated Inhibitory Doses, ID 50)에 의해 측정된 매우 감소된 억제를 나타낸다 :

[표 IV]

물 질	ID 50 (ng/ml)	ID 50 (M)
리신 A	0.16	$5.2 \times 10^{-12}$
고분자량	158.5	$5.2 \times 10^{-9}$
2-mer	5011.9	-
1-mer	3.16	$103.6 \times 10^{-12}$

즉, 혼합물로부터 1-mer 만을 생성하고 고 mer을 제거하기 위하여 리신을 PEG 화 시켜야 할 것으로 나타난다.

PEG 화의 용해도 장점을 관찰한다 :

비 PEG 화 리신 A를 사용하면 PEG 화 리신 A의 농도를 20mg/ml로 만들 수 없다.

[C. PEG 화 리신 A와 항체의 접합]

유방 모노클론성 항체 520C 9[기탁 : Accession No. HB 8696 on January 8, 1985 in th American Type Culture Collection, Rockville, MD]를 실온에서, 5,5'-디티오비스-(2-니트로벤젠산)과 반응시킨후, 냉각시키고 충분한 2-이미노티올란(IT)를 가하여 항체 분자당 2.5IT 분자를 수득한다.

총 프로필렌 글리콜 166µl을 IT-유도된 항체 0.84ml에 가한다. 상기 PEG 화 리신 A쇄 2.32ml를 가하여 접합반응을 시작한다. 혼합물을 실온에서 2시간 동안 배양시킨다.

용출 완충액 0.15M NaPO<sub>3</sub>, pH 8.0을 사용하여 Zorbax-GF 250-크기(겔 여과 HPLC 컬럼에 접합반응 혼합물을 넣는다. 컬럼으로부터 총 정제된 면역 접합체가 78% 회수된다.

[D. 접합물의 특성화]

[1. 리보솜 번역 분석]

접합 푸울을 멸균 후드하에서 멸균관으로 여과-멸균시키고, 앨리쿼트를 여러 멸균 미세퓨즈관으로 멸균 피펫으로 옮긴다. 최종 멸균여과 면역 독소 앨리쿼트 200µL을 토끼 망상적혈구, 35S

메티오닌, mRNA 및 mRNA 합성용 다른 요인으로부터 정제된 추출물로 배양시킨다. 리보솜 번역 억제제없이/함께 분석물을 측정한다. 용량 반응곡선은 단백질 합성을 측정한다. 대조 샘플은 비 PEG화 면역 독소, 리신 A쇄 및 PEG화 리신 A쇄의 접합물을 포함한다. 결과를 다음과 같이 나타낸다 :

시험 물질	ID 50 (M : 리신 A쇄를 기준으로 하여)
리신 A쇄	$5.9 \times 10^{-12}$
PEG화 리신 A쇄	$52.0 \times 10^{-12}$
리신 A쇄와 520C 9의 접합물	$60.8 \times 10^{-12}$
PEG화 리신 A쇄와 520C 9의 접합물	$141.0 \times 10^{-12}$

이 분석은 PEG화 접합물과 비 PEG화 접합물의 ID 50이 각각 15.85 및 7.94ng/ml임을 나타낸다. 이 분석의 정확도가 약 ±100% 이하이기 때문에, 모두의 억제값은 동일하다. 리신 A에 항체만을 가하면 비접합 리신 A와 비교하여 ID 50을 감소시키는 것이 명백하다. 즉, PEG화는 항체 첨가보다 더 리신 A 활성을 감소시키지 않는다. 독소보다는 면역 독소의 PEG화가 결과를 개선시킬 것으로 간주된다.

[2. 시험관내 세포독성 분석]

40000시험 유방암세포(시판용 세포라인 SKBR3)/ml 매질을 8ml 유리병 세트에 넣은후, PEG화 및 비 PEG화 접합 희석액[소의 혈청 알부민(BSA)100mg/ml 함유 인산 완충염수(PBS)중]을 가한다. 22시간 동안 37°C에서 배양한 후, 매질은 흡입시키고, 단일층을 PBS로 세척하고, <sup>35</sup>S 메티오닌을 추가한, 메티오닌-유리 매질을 가한다.

유리병을 37°C에서 2시간 동안 더 배양시키고, 매질을 제거하고, 메틸오닌 1mg/ml 함유 10% 트리클로로 아세트산 2ml로 2회 세척한다. 세포를 건조시키고, 신타레이션(scintillation)액을 가하고, 신타레이션 계수기로 방사능을 측정한다. 세포독성을, 50% 대조(비처리) 단백질 합성(TCID 50%)을 초과하는 접합물의 조직 배양 억제 용량으로서 표시한다. 분석 결과는 다음과 같다 :

접합물	TCID 50% (nM)
비 PEG화	0.216
PEG화	<0.422

이 분석의 정확도도 또한 약 ±100% 이하이므로, 둘다의 TCID 값은 같다. 세포상 중독에 있어서, 속도-제한 단계는 리신 A쇄 활성을 포함하는 것으로 보이지는 않지만, 접합물결합, 전이 및/또는 세포내 추적(routing)을 포함할 것이다.

[실시예 9]

폴리옥시에틸화그리세롤(POG)로 개질된 IL-2의 제조 및 특성화

[A. 활성 POG화 IL-2의 제조]

분자량 5000인 POG는 통상적으로 폴리사이언스로 합성한다. POG 10g에 글루타르산 무수물 2.28g(POG 보다 10배 과량)을 가한다. 혼합물을 110°C에서 2시간 동안 교반시키고 냉각시킨다. 이것을 CHCl<sub>3</sub>, 20ml에 용해시키고, 진탕시키면서 에테르 500ml에 천천히 붓는다. 생성물을 모으고, 에테르로 세정하여 약 90% POG-글루타레이트 생성물을 수득한다. 이 생성물을 실시예 1.A에 기술된 바와 같이 N-하이드록시 석신이미드와 반응시켜 활성 에스테르 POG-글루타릴 N-하이드록시 석신이미드(POG\*)를 수득한다. 그후 실시예 1.B에 기술된 바와 같이 0.1M 붕산나트륨, pH 9, 0.1% SDS중 0.25mg/ml IL-2 20ml를 실온에서 30분 동안 POG\*와 반응시킨다.

반응 혼합물 10ml를 2ml로 농축시키고, 10mM 붕산나트륨, pH 9중 Sephadex G-25 컬럼에 넣는다. 이것을 pH 9(가용성)으로 조절하고 농축시킨다. 농축액 2ml에 1.7M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50mM 인산나트륨, pH 7로 이루어진 용매를 가한다. 그후 이것을 0°C에서 페닐-TSK 컬럼에 넣는다. 분획의 SDS-PAGE(14%, 감소)는 우수한 분리를 나타낸다.

pH 5로 조절한 후, 또다른 POG화 IL-2 10ml를 3ml로 농축시킨다. 이것을 Sephacryl S-200 컬럼에 넣는다. 분획 SDS-PAGE(14%, 감소)는 균질 POG화 IL-2 생성물을 나타낸다.

[B. POG화 IL-2의 특성화]

반응 혼합물을 S-200 분리한 분획을 실시예 1.C에 기술된 바와 같이 생활성에 대해 분석한다. 결과를 표 V에 나타낸다 :

[표 V]

샘플	생활성(BRMP 표준 단위/mg IL-2)
비개질 IL-2(평균)	12×10 <sup>6</sup>
POG화 IL-2최대량과 2꾸울분획(평균)	15×10 <sup>6</sup>

리신 A쇄 제조에 사용하는 서열의 플라스미드와 항체 520 cp를 제조하는 하이브리도마는 American Type Culture Collection(ATCC)(12301 Perklawn Drive, Rockville, Maryland 20852-1776,USA)에 기탁되어 있다. 기탁 샘플의 ATCC 기탁(accession) 번호와 기탁일은 다음과 같다 :

백터/하이브리도마표시	기탁일	기탁번호
520C 9	1/8/85	HB 8696
pRT3	3/7/86	67,027
pRT17	3/7/86	67,026
pRT38	3/7/86	67,025

상기 기탁은 ATCC와 본 특허원 양수인인 세투스 코포레이션 사이의 계약에 따라 수행됐다.

ATCC와의 계약은, 기탁 또는 공보의 기술 및 확인 또는 어느것이 먼저이든 미합중국 또는 외국 특허원을 일반에게 공개하는 미합중국 특허 허여에 따라 일반에게 이들 플라스미드의 번식물 및 세포 라인의 영구 이용 및, 35usc § 및 심사관의 규칙(37 SFR § 1.14를 포함.L 886 0638 참조)에 따라 미합중국 특허 및 상표 심사관에 의해 결정된 이들 플라스미드의 번식물 및 세포 라인의 이용을 제공한다.

본 특허원의 양수인의 적절한 조건하에서 배양된 기탁 플라스미드 또는 세포 라인이 사멸, 손실 또는 파괴될 경우, 동일한 플라스미드 및 세포 라인이 생육 배양액으로 신속하게 대체해줄 것을 동의하였다.

결론적으로, 본 발명은 PEG 단일중합체 또는 폴리옥시에틸화 폴리올에 선택적 집합되어 이에 의해 가용성 또는 생리적 pH의 수성 매질 주에서 더 가용성인, 생물학적으로 활성인 특정 단백질이 이러한 매질에 용해된 약제학적 조성물을 제공하는 것이다. 집합은 통상 소수성 단백질의 응집을 감소시키거나 제거함으로써, 또는 그의 항우너성 결정인자를 차폐시킴으로써 통상 소수성 수-불용성 단백질을 pH 6 내지 8의 물중에 용해시킬 뿐만 아니라, 그의 생리적 반감기를 증가시키고, 그의 면역원성을 감소시킬 수도 있다. 집합시키지 않을 경우, 단백질은 가용화제(예를 들면 정화제 또는 변성제)를 가하거나, 안정화 제하여 pH를 올리거나 pH를 낮춤으로써 용해시켜야 한다.

상기 명세서에는 본 분야의 전문가들이 본 발명을 수행하기에 충분할 것으로 간주된다. 기탁 양태를 본 발명의 한 국면의 단이한 예시이며, 작용적으로 동등한 어떠한 플라스미드 및 세포 라인도 본 발명의 범주내에 있기 때문에, 본 발명은 기탁된 플라스미드 및 세포 라인에 의해 범주가 제한되지 않는다. 본 발명의 기탁물질은 본 발명에 포함된 기술이 본 발명의 어떠한 국면(그의 가장 우수한 국면을 포함하여)을 실시하는데에도 부적절하다는 허가를 나타내지 않으며, 또한 이들이 본 특허청구의 범주의 이들이 나타내는 특정한 예시로만 제한하는 것으로서 나타내지도 않는다.

(57) 청구의 범위

**청구항 1**

(a) 하나 이상의 말단 반응성 그룹을 갖는 수-용성 중합체(여기에서 중합체는 폴리에틸렌글리콜 단일(homo) 중합체 및 폴리옥시 에틸화 폴리올로 이루어진 그룹 중에서 선택하는데, 상기 단일 중합체는 한쪽 말단이 알킬 그룹으로 치환되거나 비치환되고, 상기 폴리올은 비치환되어 있다.)를 제조하고 : (b)  $\beta$ -인터페론, 인터로이킨-2 및 면역 독소로 이루어진 그룹 중에서 선택된, 생물학적으로 활성인 통상 소수성 수-불용성 단백질을 상기 중합체의 반응성 그룹과 반응시켜 수-용성, 생물학적으로 활성인, 공유결합에 의해 선택적 접합된 단백질(상기 비접합 형태의 단백질은 통상 소수성이며, 가용화제 부재시 pH 6 내지 8의 비독성 불활성, 약제학적으로 허용되는 수성 담체 매질 중에서 제형화시킴을 특징으로 하여, 생물학적으로 활성인 선택적 접합된 단백질이 용해되어 있는 비독성 불활성, 약제학적으로 허용되는 수성 담체 매질로 이루어진 약제학적 조성물을 제조하는 방법.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 중합체의 분자량이 약 300 내지 100,000인 방법.

**청구항 3**

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 중합체를, 상기 중합체의 카복실산의 4-하이드록시-3-니트로벤젠 설포네이트 에스테르 또는 N-하이드록시 석신이미드 에스테르를 통해 단백질에 접합시키는 방법.

**청구항 4**

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 중합체가 비치환 폴리에틸렌글리콜 단일 중합체, 모노 메틸 폴리에틸렌글리콜 단일 중합체 또는 폴리옥시에틸화 글리세롤인 방법.

**청구항 5**

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 단백질이 인간의 재조합 단백질인 방법.

**청구항 6**

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 단백질이 무테인인 방법.

**청구항 7**

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 단백질이 Ser125 IL-2, des-ala1 IL-2, des-ala1 Ser125 IL-2, des-ala1ala104, IL-2, des-ala1, ala104 Ser125 IL-2, Ser17 IFN- $\beta$ , 또는 재조합 리신(ricin) A쇄-함유 면역 독소인 방법.

**청구항 8**

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 단백질이 단백질상의 1 내지 10개의 리신(lysine)잔기를 통해 선택적으로 접합된 방법.

**청구항 9**

$\beta$ -인터페론, 인터로이킨-2 및 면역 독소로 이루어진 그룹 중에서, 선택되고 폴리에틸렌 글리콜 단일 중합체 및 폴리옥시에틸화 폴리올로 이루어진 그룹중에서 선택된 수용성 중합체(상기 단일 중합체는 한쪽 말단이 알킬 그룹으로 치환되거나 비치환되고, 상기 폴리올은 비치환되어 있다)에 공유결합에 의해 선택적으로 접합된 생물학적으로 활성인 단백질(비접합 형태의 상기 단백질은 통상 소수성이며 가용화제 부재시 pH 6 내지 8의 비독성, 불활성, 약제학적으로 허용되는 수성 담체 매질에 불용성이다) 이 용해되어 있는 비독성, 불활성, 약제학적으로 허용되는 수성 담체 매질로 이루어지는 약제학적 조성물.

**청구항 10**

제9항에 있어서, 상기 중합체의 분자량이 약 300 내지 100,000인 조성물.

**청구항 11**

제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 중합체를, 상기 중합체의 카복실산의 4-하이드록시-3-니트로벤젠 설포네이트 에스테르 또는 N-하이드록시 석신이미드 에스테르를 통해 단백질에 접합시킨 조성물.

**청구항 12**

제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 중합체가 비치환 폴리에틸렌글리콜 단일 중합체, 모노 메틸 폴리에틸렌글리콜 단일 중합체 또는 폴리옥시에틸화 글리세롤인 조성물.

**청구항 13**

제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 단백질이 인간의 재조합 단백질인 조성물.

**청구항 14**

제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 단백질이 무테인인 조성물.

**청구항 15**



제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 단백질이 Ser<sub>125</sub> IL-2, des-ala<sub>1</sub> IL-2, des-ala<sub>1</sub> Ser<sub>125</sub> IL-2, des-ala<sub>1</sub>ala<sub>104</sub> IL-2, des-ala<sub>1</sub> ala<sub>104</sub> Ser<sub>125</sub> IL-2, Ser<sub>17</sub> IFN-β, 또는 재조합 리신(ricin) A쇄 잔기를 통해 선택적으로 접합된 조성물.

#### 청구항 16

제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 단백질이 단백질상의 1 내지 10개의 리신(lysine)잔기를 통해 선택적으로 접합된 조성물.

#### 청구항 17

β-인터페론, 인터로이킨-2 및 면역 독소로 이루어진 그룹중에서 선택되고, 폴리에틸렌 글리콜 단일 중합체 및 폴리옥시에틸화 폴리올로 이루어진 그룹 중에서 선택된 수용성 중합체(상기 단일 중합체는 한쪽 말단이 알킬 그룹으로 치환되거나 비치환되고, 상기 폴리올은 비치환되어 있다.)에 공유결합에 의해 선택적으로 접합된 생물학적으로 활성인 단백질(비접합 형태의 상기 단백질은 통상 소수성이며 가용화제 부재시 pH 6 내지 8의 비독성, 불활성, 약제학적으로 허용되는 수성 담체 매질에 불용성이다)로 이루어진 접합 단백질.

#### 청구항 18

제17항에 있어서, 상기 중합체의 분자량이 약 300 내지 100,000인 접합 단백질.

#### 청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 중합체의 카복실산의 4-하이드록시-3-니트로 벤젠 설포네이트에스테르 또는 N-하이드록시 석신이미드 에스테르를 통해 단백질에 접합시킨 접합 단백질.

#### 청구항 20

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 중합체가 비치환 폴리에틸렌글리콜 단일 중합체, 모노 메틸 폴리에틸렌글리콜 단일 중합체 또는 폴리옥시에틸화글리세롤인 접합 단백질.

#### 청구항 21

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 단백질이 인간의 재조합 단백질인 접합 단백질.

#### 청구항 22

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 단백질이 무테인인 접합 단백질.

#### 청구항 23

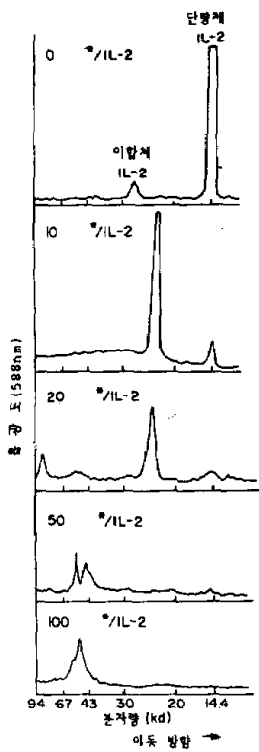
제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 단백질이 Ser<sub>125</sub> IL-2, des-ala<sub>1</sub> IL-2, des-ala<sub>1</sub> Ser<sub>125</sub> IL-2, des-ala<sub>1</sub>ala<sub>104</sub> IL-2, des-ala<sub>1</sub> ala<sub>104</sub> Ser<sub>125</sub> IL-2, Ser<sub>17</sub> IFN-β, 또는 재조합 리신(ricin) A쇄-함유 면역 독소인 접합 단백질.

#### 청구항 24

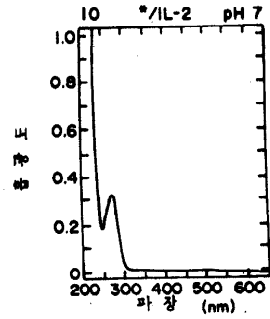
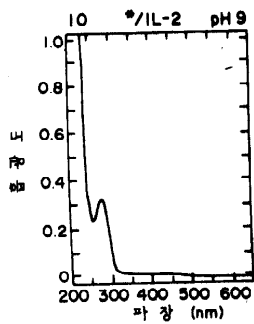
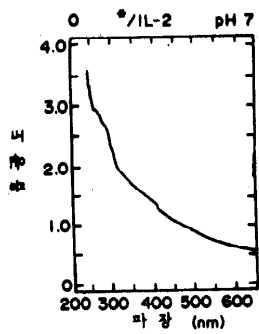
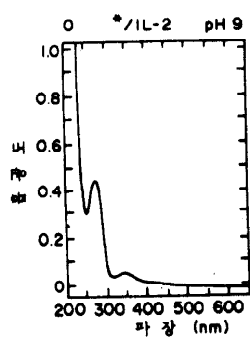
제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 단백질이 단백질상의 1 내지 10개의 리신(lysine) 잔기를 통해 선택적으로 접합된 접합 단백질.

**도면**

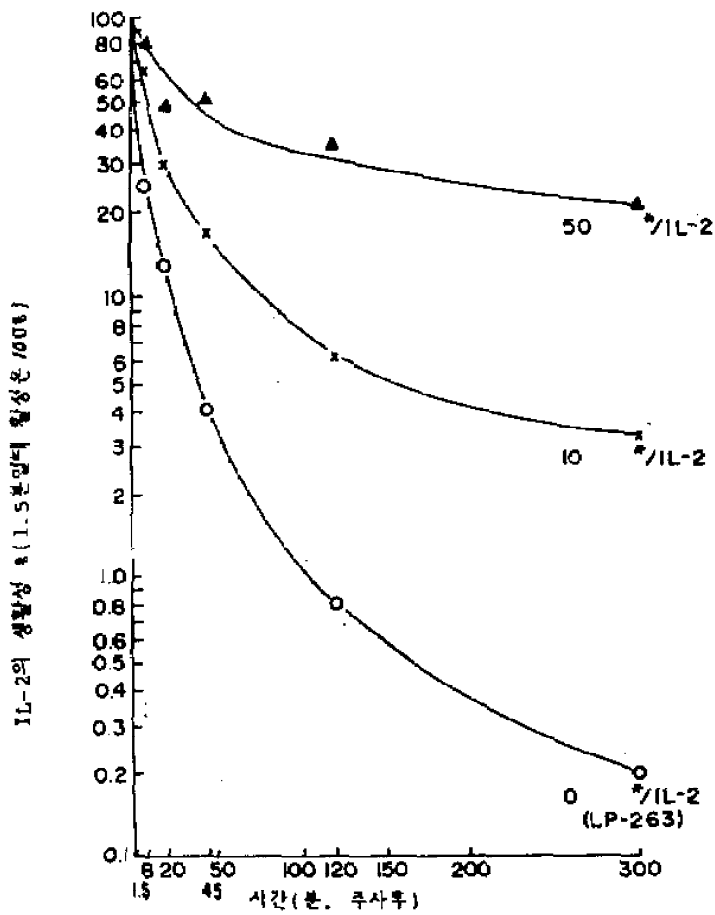
도면1



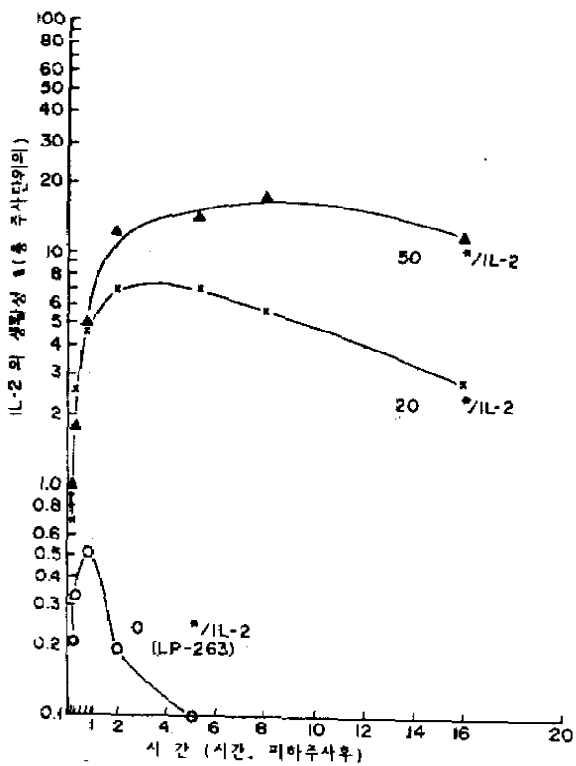
도면2



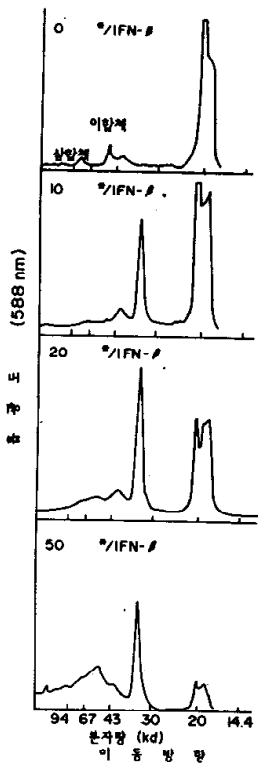
도면3



도면4



도면5



도면6

