

## [<sup>3</sup>H]-메토트렉세이트-락토오스아미노화한 소 혈청 알부민 공유결합체의 간표적성 및 체내동태

김종국\* · 이용두 · 박호군\*  
서울대학교 약학대학, \*한국과학기술연구소  
(Received October 20, 1992)

### Liver Targetability and Pharmacokinetics of [<sup>3</sup>H]-Methotrexate-Lactosaminated Bovine Serum Albumin Conjugates

Chong-Kook Kim\*, Woong-Doo Lee and Ho Koon Park\*  
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea  
\*Korea Institute of Science & Technology, Seoul 130-650, Korea

**Abstract**—The organ distribution of [<sup>3</sup>H]-methotrexate-lactosaminated bovine serum albumin conjugates ([<sup>3</sup>H]-MTX-LBSA) was investigated to examine their role as a liver-specific anticancer drug. Synthesis of lactosaminated bovine serum albumin(LBSA) with BSA, lactose and sodium cyanoborohydride through reductive amination was followed by its conjugation with methotrexate (MTX) and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC), thereby synthesizing [<sup>3</sup>H]-MTX-LBSA conjugates. Organ distribution and plasma elimination profiles were studied in male Wistar rats after intravenous injection of [<sup>3</sup>H]-MTX-LBSA conjugates. The fates of [<sup>3</sup>H]-MTX and the [<sup>3</sup>H]-MTX-BSA conjugates' fates were also investigated for comparison. The results showed that the plasma level of [<sup>3</sup>H]-MTX-LBSA conjugates declined more rapidly than those of [<sup>3</sup>H]-MTX-BSA and their liver concentration was significantly higher than those of other treatment ( $p < 0.01$ ). In addition, their uptake compared to the amount taken up by the liver (1 : 33.1 at 10 min, 1 : 24.1 at 120 min). All these suggested that MTX-LBSA conjugate is one of the drug delivery system (DDS) that is advanced in concentrating MTX in the liver and minimizing the renal toxicity of MTX.

**Keywords** □ Methotrexate, lactosaminated bovine serum albumin, methotrexate-lactosaminated bovine serum albumin conjugates, pharmacokinetics, organ distribution, liver targetability, drug targeting.

Ashwell<sup>1)</sup> 등이 sialic acid 잔기가 없는 당단백이 신속하게 간으로 이행된다는 사실을 발견한 뒤 당단백 중의 당잔기의 역할에 대하여 관심을 갖게 되었다. 현재까지 당단백 중의 당잔기의 역할에 대하여 명확히 밝혀져 있지는 않지만 노출된 당의 종류에 따라 당단백이 각각 다른 특정 세포에 선택적으로 이행된다는 사실이 밝혀졌다<sup>2)</sup>. 갈락토오스 잔기가 노출된 당단백은 간실질세포,  $\alpha$ -mannose 잔기가 있으면 간의 Kup-

per cell 및 폐포의 대식세포로, mannose 6-phosphate는 선유아 세포에 주로 이행된다. 이러한 사실에 근거하여 당단백에 약물을 공유결합시켜 당단백-약물 공유결합체를 동물체내에 정맥투여하면 당잔기의 종류에 따라서 특정 장거나 세포 등에 약물을 선택적으로 운반할 수 있다.

그러나 asialofetuin 처럼 천연에 존재하는 당단백에 약물을 공유결합시킨 당단백-약물공유결합체를 생체에 투여하면 항원-항체반응과 같은 면역반응을 일으키는 단점을 가지고 있다<sup>3)</sup>. 생체내에 존재하는 혈청

\*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

알부민에 당잔기를 결합시켜 동종의 동물에 투여한다면 이러한 단점은 제거될 수 있을 것으로 생각된다<sup>3)</sup>.

당잔기를 알부민에 공유결합시키는 방법은 여러 가지가 있지만 현재 가장 많이 사용되는 것은 다음의 두 방법이다. 첫째 방법은 이당류를 환원성 아미노화 방법에 의해 결합시키는 방법이고<sup>4,5)</sup> 둘째 방법은 2-imino-2-methoxyethyl-1-thioglycoside를 알부민에 직접 결합시키는 방법이다<sup>17)</sup>. 이 두 방법은 각기 장단점을 가지고 있다. 본 실험에서 사용한 방법은 첫째 방법이다. 첫째 방법의 특징은 실험조작이 간편하고 알부민에 붙은 당잔기의 수가 시간에 대한 함수로 나타나므로 재현성이 뛰어나다는 점이다. 그러나 일정한 수의 당잔기를 도입시키기 위해서는 다른 방법에 비해 시간이 많이 소비된다는 단점이 있다.

본 연구에서는 약물을 간에 선택적으로 운반할 수 있는 수송체로서 갈락토오스 잔기를 가진 lactosaminated bovine serum albumin(LBSA)을 합성하고 이에 [<sup>3</sup>H]-methotrexate ([<sup>3</sup>H]-MTX)를 공유결합시킨 [<sup>3</sup>H]-MTX-LBSA 공유결합체의 합성방법을 확립한 다음 이 공유결합체를 흰쥐의 경정맥에 투여한 후 장기 분포와 혈중 소실 양상 등을 [<sup>3</sup>H]-MTX, [<sup>3</sup>H]-MTX-BSA 공유결합체를 투여한 경우와 비교함으로써 MTX-LBSA 공유결합체의 장기 분포, 간표적성 및 체내 동태에 대하여 알아보고자 하였다.

### 실험방법

**시약 및 재료**—Methotrexate(MTX)는 (주)중외제약(Seoul, Korea)에서 제공받았으며 감식물질로 사용한 [3', 5', 7-<sup>3</sup>H]-methotrexate sodium salt(250 mCi/mmol, TRK 224, 이하 [<sup>3</sup>H]-MTX라 약칭함)는 Amersham International사(Buckinghamshire, U.K.)로부터 구입하였다. Bovine serum albumin(Fraction V, 이하 BSA라 약칭함), 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide · hydrochloride(이하 EDC라 약칭함)는 Sigma Chemical Co.(Saint Louis, MO, U.S.A.)로부터 구입하였다. 락토오스 1수화물과 과산화수소는 Junsei Chemical Co.(Tokyo, Japan)로부터 구입하였다.

동물 실험시 조직용해제로는 Soluene-350<sup>®</sup> (0.5N Quaternary ammonium hydroxide in toluene ; C<sub>25</sub>H<sub>55</sub>NO, Packard Instrument Co., Inc)를 사용하였으며,

scintillation cocktail 용액으로는 Scinti-A<sup>®</sup> XF(Packard Instrument Co.)와 2,5-Diphenyloxazole(PPO, Sigma Chemical Co.), 1,4-[2-(5-Phenyloxazolyl)] benzene(POPOP, Sigma Chemical Co.), Triton X-100 (GR reagent, Duksan Pharmaceutical Co., Ltd.) 등을 사용하여 만든 cocktail solution을 1:1의 비율로 혼합하여 사용하였다.

그 외 다른 시약들은 1급 시약을 사용하였으며 더 이상 정제 하지는 않았다.

**Lactosaminated BSA(LBSA)의 합성**—환원당과 단백질이 중성 수용액에서 Schiff base를 형성하고 pH 5 이상에서는 선택적으로 Schiff base만을 환원하는 cyanoborohydride anion을 사용하여 환원성아미노화 반응을 진행시켰다<sup>4,5)</sup>. BSA 중의 리신기에 존재하는 ε-NH<sub>2</sub> 작용기에 환원당 락토오스 중의 갈락토오스 잔기를 다음과 같이 결합시켰다.

BSA(68 mg, 1 μmol)와 lactose monohydrate(100 mg, 292 μmol)를 0.2 M phosphate buffer(pH 8) 5 ml에 용해시켰다. 이 용액에 sodium cyanoborohydride(100 mg, 1.59 mmol)을 첨가하고 즉시 밀봉한 후 37°C 항온조에서 200시간 동안 진탕시켰다. 이 반응물에 증류수를 가하면서 molecular cut off 10,000의 polycarbonate filter를 통하여 한외여과를 반복하면서 가용성 저분자를 여과 분리 제거한 다음 동결건조하였다. 대략의 반응 메커니즘을 Fig. 1에 표시하였다.

**LBSA 중의 당과 단백질의 비율 측정**—단백질의 양은 Lowry method<sup>6)</sup>를 변형하여 정량하였고, BSA에 도입된 당의 양은 phenol/sulfuric acid method<sup>7)</sup>에 따라 galactose에 대해 각각 다음과 같이 정량하였다.

(a) **LBSA 중의 단백질 정량**—용액 A(2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1% sodium dodecyl sulfate, 0.16% sodium citrate가 용해되어 있는 0.1 N NaOH 용액)와 용액 B(4% CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O)를 제조한 후 용액 A와 용액 B를 1:1의 비율로 용시 혼합하여 용액 C를 만들었다. LBSA 용액(150 μg/ml)을 만든 다음 2 ml를 취해 시험관에 넣고 2 ml의 용액 C를 가하고 15분 방치시킨 후 0.2 ml의 1 N Folin-Ciocalteu 용액을 가하여 즉시 섞은 다음 45분간 방치시켰다. 이 용액을 660 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 용액(0.03-0.3 mg/ml BSA 용액)과 비교·정량하였다.

(b) **LBSA 중의 galactose 정량**—LBSA 용액(300 μg/ml) 2 ml를 시험관에 넣고, 80% phenol 용액 0.05

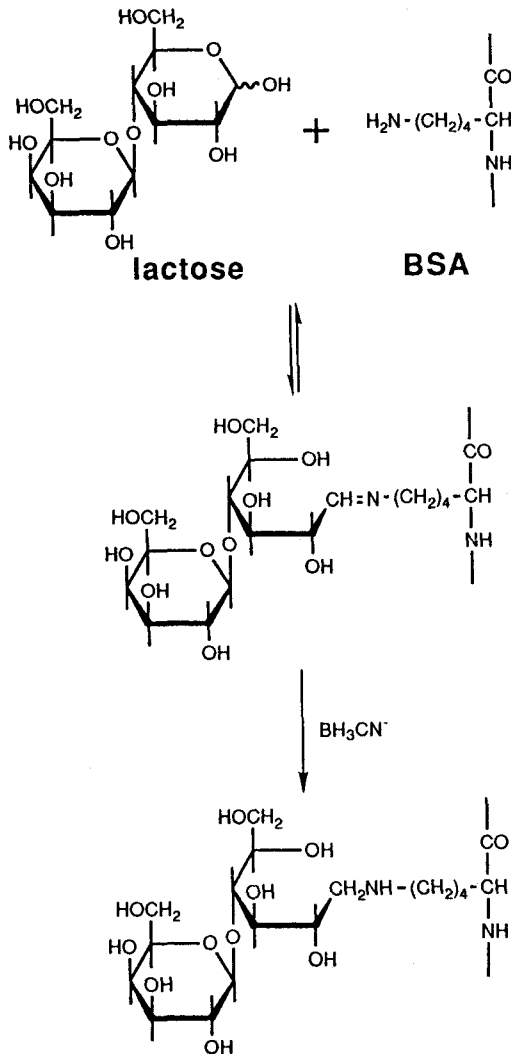


Fig. 1—Synthesis of lactosaminated BSA by reductive amination.

m/을 가한 다음 황산 5 ml/을 가하고 즉시 혼합하였다. 10분 방치후 30°C의 수욕상에서 20분 진탕하여 반응을 완결시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정한 다음 표준용액(8-80 µg/ml galactose soln.)과 비교·정량하였다.

**[<sup>3</sup>H]-MTX-LBSA 및 [<sup>3</sup>H]-MTX-BSA 공유결합체의 합성**—[<sup>3</sup>H]-MTX-LBSA 및 [<sup>3</sup>H]-MTX-BSA 공유결합체는 Chu 등과 Kim 등의 방법<sup>8,9)</sup>을 일부 수정하여 다음과 같이 합성하였다.

LBSA(또는 BSA) 100 mg을 증류수 4 ml에 녹여 알부민 용액을 만들고 [<sup>3</sup>H]-MTX 150 µCi가 섞여

있는 MTX 7.5 mg를 2 ml의 0.05 N NaOH에 녹인 [<sup>3</sup>H]-MTX 용액을 만든 다음 알부민 용액에 [<sup>3</sup>H]-MTX 용액을 모두 가하고, 0.1 N HCl로 pH 6.0이 되도록 조절하였다. 차광한 상태에서 알부민과 [<sup>3</sup>H]-MTX 혼합 용액에 EDC 100 mg을 0.05 N HCl 2 ml에 녹여 만든 EDC 용액을 서서히 점적하여 가하면서 약 7시간에 걸쳐 가하면서 반응을시켰다. 계속해서 4°C에서 차광하고 pH는 5.0-6.0을 유지하면서 24시간 교반한 다음 동일 조건에서 EDC 용액 1 ml/을 4시간에 걸쳐 가하면서 반응을 완결시킨다. 이 반응액을 Sephadex G-50 column에 loading시킨 다음 0.05 M sodium phosphate 완충용액(pH 7.4)으로 용리시켜 [<sup>3</sup>H]-MTX-LBSA 공유결합체 분획을 분리하고, 이 분획물에 증류수를 가하면서 polycarbonate membrane filter(molecular cut off 10,000)을 통하여 계속 한외여과하여 저분자의 모든 화합물을 제거한 다음 동결건조시켰다.

[<sup>3</sup>H]-MTX-LBSA 및 [<sup>3</sup>H]-MTX-BSA 공유결합체 내의 MTX 정량은 액체 섬광계수기(liquid scintillation counter)로 [<sup>3</sup>H]-MTX를 정량하여 환산하였고 알부민은 Lowry method<sup>6)</sup>로 정량하였다.

**동물실험**—체중 230-270g의 웅성 흰쥐(Wistar albino)를 urethane(1.125 g/kg *i.p.*)으로 마취시킨 다음 왼쪽 경정맥과 오른쪽 경동맥을 분리시킨 후 25 cm의 polyethylene cannula를 삽입하고 heparin으로 처리한 생리식염수로 cannula안을 채웠다. [<sup>3</sup>H]-MTX, [<sup>3</sup>H]-MTX-BSA 공유결합체 그리고 [<sup>3</sup>H]-MTX-LBSA 공유결합체를 각각 MTX로서 200 µg/kg ([<sup>3</sup>H]-MTX로서는 4 µg/kg)을 왼쪽 경정맥을 통하여 투여한 다음 heparin으로 처리한 생리식염수로 cannula 내부를 세척해 주었다.

혈액은 약물 투여후 1, 3, 5, 10, 20, 40, 60, 120분에 오른쪽 경동맥으로 부터 채혈하였고 채혈한 즉시 혈액을 10,000 rpm에서 20분동안 원심분리하여 혈장 100 µl를 취하여 액체섬광계수기로 측정하였다. 장기 분포 실험은 왼쪽 경정맥을 통하여 약물투여후 10분, 120분에 흰쥐를 실험치사시켜 혈액을 몸에서 제거한 다음 간, 신장, 비장, 폐, 위를 취하였다. 취한 장기를 생리 식염수에 잘 세척한 다음 여과지를 이용하여 장기에 묻어 있는 물기를 제거하고 무게를 달았다.

**Radioactivity 측정**—동물 실험에서 취한 혈장과 각 장기의 조직 일부(0.1-0.2 g)를 counting vial에 담은

**Table I**—Tissue distribution of [<sup>3</sup>H]-MTX, [<sup>3</sup>H]-MTX-BSA and [<sup>3</sup>H]-MTX-LBSA at 10 min after intravenous injection

Organ	[ <sup>3</sup> H]-MTX		[ <sup>3</sup> H]-MTX-BSA		[ <sup>3</sup> H]-MTX-LBSA	
	% dose	% dose/g	% dose	% dose/g	% dose	% dose/g
Liver*	9.489±0.517	1.659±0.217	20.53±1.445	2.118±0.262	67.35±4.771	7.525±0.714
Kidney*	2.938±1.110	2.037±0.719	5.645±0.413	3.068±0.488	2.022±0.216	1.152±0.142
Spleen*	0.088±0.010	0.260±0.022	0.544±0.030	1.272±0.117	0.606±0.133	1.497±0.471
Lung*	0.517±0.176	0.401±0.131	1.652±0.350	1.229±0.198	0.868±0.227	0.583±0.121
Stomach	0.563±0.154	0.472±0.125	0.361±0.051	0.227±0.030	0.240±0.047	0.195±0.041
Plasma*	6.380±1.009	0.658±0.104	63.75±4.249	6.572±0.438	24.14±2.900	2.489±0.299

\*The means of 3 groups are significantly different ( $p < 0.01$ ).

다음 Soluene-350®(1 ml/0.2 g)을 넣고 50°C 에서 투명하게 용해시켰다. 용해된 시료에 0.2 ml의 이소프로필알코올과 0.4 ml의 과산화수소수를 가해 표백·탈색시키고 5 N HCl을 사용하여 중화시킨 다음 10 ml의 scintillation cocktail(Scinti-A XF® : PPO/POPOP=1 : 1)을 가하여 실온에서 24시간 방치시켰다. 평형이 이루어진 시료를 액체섬광계수기로 [<sup>3</sup>H]의 방사능을 측정할 다음 channel ratio method로 dpm(disintegration per minute)으로 환산하였다. 동물 실험 결과는 ANOVA test로 유의성( $p < 0.01$ )을 검정하였다.

### 결과 및 고찰

**[<sup>3</sup>H]-MTX-LBSA 공유결합체의 합성**—합성된 [<sup>3</sup>H]-MTX-LBSA 공유결합체의 당잔기, BSA, 그리고 MTX의 몰비는 BSA 1몰당 갈락토오스 19몰, MTX 9.8몰이었다. BSA는 59개의 리신기를 가지고 있다. 갈락토오스는 락토오스의 당 1개가 개환되면서 BSA의 리신기에 도입되며 MTX는 BSA의 리신기 뿐만 아니라 -COOH기를 가진 아미노산에도 붙을 수도 있다<sup>10</sup>. 그러나 대부분의 MTX는 BSA의 리신기에 도입되므로 갈락토오스가 많이 도입된 LBSA에는 MTX가 많이 도입되지 못할 것이다. Fiume 등<sup>11,12</sup>은 BSA 1 분자당 2개의 갈락토오스 잔기가 도입되었을 때 BSA가 간에 많이 분포된다고 보고하였다. 따라서 MTX의 몰비를 고려해야 한다. 간실질세포표면에 친화력을 높이기 위해서는 BSA에 갈락토오스를 많이 도입시키는 것이 바람직하지만<sup>13</sup> BSA에 도입되는 MTX의 양은 줄어들게 될 것이다. 그러한 경우 간에서 유효농도 이상의 유리 MTX 수준을 유지하기 위해

서는 전체 MTX-LBSA 공유결합체의 투여량을 늘리게 되고 간 실질세포표면의 수용체는 포화가 일어나게 되므로 결과적으로 MTX를 간에 수송하는 능력은 떨어질 것으로 생각된다. 이러한 이유로 MTX, BSA, 당간의 몰비는 좀 더 많은 동물실험을 통하여 가장 합리적인 몰비를 찾는 것이 매우 중요하다고 생각된다.

**정맥투여 후 약물의 장기분포 및 혈중농도 변화**—본 논문에서는 각 장기와 혈중의 약물농도는 삼중수소(<sup>3</sup>H)의 총 방사선량을 측정하여 이에 해당하는 약물의 농도로 환산하였다. 즉, MTX의 경우에는 [<sup>3</sup>H]-MTX와 그 대사물의 방사능의 합, MTX-단백질 공유결합체의 경우에는 [<sup>3</sup>H]-MTX, [<sup>3</sup>H]-MTX-단백질 공유결합체, 그리고 그 대사물의 방사능의 합을 약물량으로 환산해 주었다.

Table I과 II는 [<sup>3</sup>H]-MTX, [<sup>3</sup>H]-MTX-BSA 공유결합체, [<sup>3</sup>H]-MTX-LBSA 공유결합체를 정맥주사한 후 10분 및 120분에서의 장기분포를 표시한 것이다. 정맥 투여후 10분에서의 장기분포(Table I)는 [<sup>3</sup>H]-MTX의 경우 약물이 간(9.5%), 혈장(6.4%), 신장(2.9%), 위(0.6%), 폐(0.5%), 비장(<0.1%) 순으로 분포되었고 그양은 전체 투여량에 비해 적었다. 이것은 [<sup>3</sup>H]-MTX가 신체 전신의 체액으로 신속히 분포되었음을 나타낸다. [<sup>3</sup>H]-MTX-BSA 공유결합체의 경우 주로 혈장(63.8%)에 머물러 있었고 간(20.5%), 신장(5.65%), 폐(1.7%), 비장(0.5%), 위(0.4%) 순으로 분포되었으며, 간 및 신장에 분포된 양은 [<sup>3</sup>H]-MTX에 비해 약 2배, 비장은 약 5배, 폐에는 약 3배 정도 많았다.

[<sup>3</sup>H]-MTX-LBSA 공유결합체는 간(67.4%), 혈장

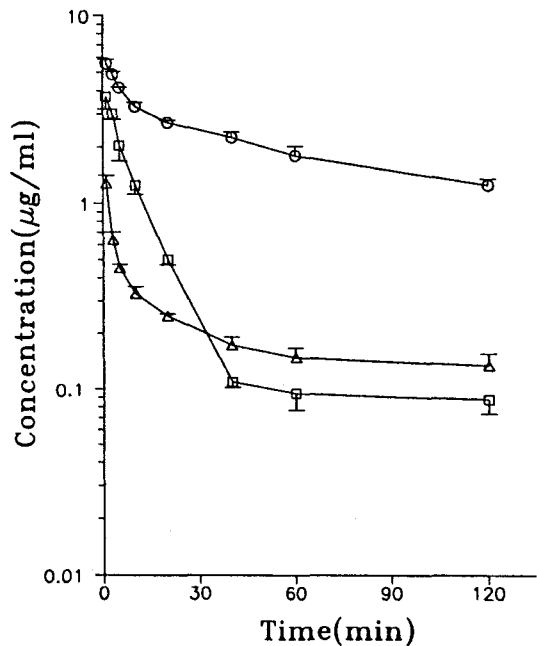
**Table II**— Tissue distribution of [<sup>3</sup>H]-MTX, [<sup>3</sup>H]-MTX-BSA and [<sup>3</sup>H]-MTX-LBSA at 120 min after intravenous injection

Organ	[ <sup>3</sup> H]-MTX		[ <sup>3</sup> H]-MTX-BSA		[ <sup>3</sup> H]-MTX-LBSA	
	% dose	% dose/g	% dose	% dose/g	% dose	% dose/g
Liver*	8.561± 1.047	1.313± 0.178	26.01± 2.963	3.049± 0.142	58.49± 6.014	6.710± 0.372
Kidney*	3.953± 1.612	2.133± 0.680	7.762± 0.939	4.204± 0.424	2.436± 0.142	1.337± 0.838
Spleen*	0.111± 0.070	0.323± 0.247	0.675± 0.113	1.673± 0.207	0.606± 0.129	1.818± 0.155
Lung*	0.152± 0.013	0.133± 0.024	1.504± 0.197	1.208± 0.145	1.365± 0.160	1.126± 0.099
Stomach	0.622± 0.258	0.577± 0.307	0.703± 0.183	0.527± 0.134	0.656± 0.259	0.475± 0.171
Plasma*	2.604± 0.718	0.268± 0.074	24.36± 3.376	2.511± 0.348	1.781± 0.514	0.177± 0.053

\*The means of 3 groups are significantly different (p<0.01).

(24.1%), 신장(2.0%), 폐(0.9%), 비장(0.6%), 위(0.2%) 순으로 분포되어 있으며 특히 간에 분포된 약물량은 투여량의 67.4%로서 다른 장기에 비해서 압도적으로 높았다. 또한, [<sup>3</sup>H]-MTX, [<sup>3</sup>H]-MTX-BSA 공유결합체를 투여한 후 10분에서 간에 분포된 약물량에 비해서도 각각 약 7배, 3.3배로 높게 나타났다. 이것은 간실질세포의 갈락토오스 잔기 인식기구에 의해 혈장중의 약물이 신속히 간으로 이행된 것을 의미한다<sup>13)</sup>. 각 장기에 분포된 약물농도를 장기 g당 %dose로 환산하여 비교하였을 때, [<sup>3</sup>H]-MTX와 [<sup>3</sup>H]-MTX-BSA 공유결합체의 경우는 간중 약물농도가 신장중 약물농도보다는 낮게 나타났으나 (1.7 vs 2.0%, 2.1 vs 3.1%) [<sup>3</sup>H]-MTX-LBSA 공유결합체의 경우 신장 중의 약물농도가 [<sup>3</sup>H]-MTX 및 [<sup>3</sup>H]-MTX-BSA에 비하여 유의성 있게 상당히 감소하였으며(1.2 vs 2.0%, 1.2 vs 3.1%, p<0.01), 또한 간중 약물농도는 신장중 약물농도 보다 높게 나타났고(7.5 vs 1.2%) 다른 장기에 비해서도 약물농도가 상당히 높게 나타났다. 이것은 약물이 간에 선택적으로 수송된다는 것이 실험적으로 입증되었음을 의미한다.

정맥 투여후 120분에서의 장기분포(Table II)는 [<sup>3</sup>H]-MTX-LBSA 공유결합체의 경우 간에 분포된 약물량이 10분에서 전체 투여량의 67.4%였던 것이 58.5%로 약간 감소된 경향은 있으나 주장기로서는 변함이 없으며 타장기에 분포된 약물량은 10분의 경우와 큰 차이가 없었으나 혈장 중의 약물량은 10분에서 전체 투여량의 24.1% 존재하던 것이 1.7%로 감소되었다. [<sup>3</sup>H]-MTX, [<sup>3</sup>H]-MTX-BSA 공유결합체의 경우에는 혈장중 약물량이 감소되었고 신장에 분포된 약물량이 10분에 비해서 조금 늘어난 것으로



**Fig. 2**— Plasma concentration-time profiles of [<sup>3</sup>H]-MTX, [<sup>3</sup>H]-MTX-BSA conjugates and [<sup>3</sup>H]-MTX-LBSA conjugates after intravenous injection.

Keys: —△—, [<sup>3</sup>H]-MTX; —○—, [<sup>3</sup>H]-MTX-BSA conjugates; —□—, [<sup>3</sup>H]-MTX-LBSA conjugates.

나타났다.

[<sup>3</sup>H]-MTX, [<sup>3</sup>H]-MTX-BSA 공유결합체, [<sup>3</sup>H]-MTX-LBSA 공유결합체를 정맥주사하였을 때 혈중에서 소실되는 양상을 Fig. 2에 나타내었다.

[<sup>3</sup>H]-MTX의 경우는 초기에 혈중에서 신속히 소

실되며 경시변화에 따른 혈장 중의 농도변화 추이는 biphasic pattern을 나타낸다. 이는 MTX가 저분자량의 약물이므로 각 장기 및 체액으로 신속하게 분포되고 그후 신장배설을 받게된 것으로 생각된다<sup>14)</sup>.

그러나 [<sup>3</sup>H]-MTX-BSA 공유결합체의 경우는 고분자에 결합된 일반적인 약물처럼 신속히 체액으로 분포되지 못하고, 일부는 조직 중으로 uptake되고 나머지는 혈장 중에 장시간 머물러 있기 때문에<sup>15)</sup> 혈장 중에서 높은 농도를 나타내었다. 또한 신배설과 대사를 받기 위해서는 약물-고분자 공유결합체로부터 약물이 유리되어야만 하기 때문에 혈중에서 [<sup>3</sup>H]-MTX보다 훨씬 소실속도가 느리며 2시간까지 높은 혈중농도를 유지하고 있다.

[<sup>3</sup>H]-MTX-LBSA 공유결합체의 경우, [<sup>3</sup>H]-MTX-BSA 공유결합체를 정맥주사하였을 때와는 아주 다른 혈중소실 양상을 나타내었다. 40분까지 직선적으로 혈중농도가 신속히 감소되며 그 이후부터는 서서히 감소되었다. 이는 갈락토오스 잔기를 가진 당단백으로서 간으로 신속하게 이행되기 때문이다<sup>1)</sup>. 이것은 앞의 장기분포에서 정맥 투여 후 10분 이내에 전체 투여량의 67.4%가 간에 이행되는 결과로 잘 설명된다.

MTX는 신장독성이 큰 약물로 알려져 있다. 그러므로 MTX를 병소가 위치하고 있는 어떤 특정조직에 수송하고자 할 경우 신장으로는 약물이 가지 않게 하고 표적 부위에만 선택적으로 수송하는 것이 바람직하다. 즉, 표적부위 대 독성을 나타내는 부위간의 약물 분포비를 높히는 것이 약물 수송체의 바람직한 조건이라 할 수 있다.

본 실험에서 표적부위인 간과 독성을 나타내는 부위인 신장의 약물분포비를 각각의 약물에 대하여 비교하면 10분에서는 [<sup>3</sup>H]-MTX의 경우 3.2 : 1이며 [<sup>3</sup>H]-MTX-BSA 공유결합체의 경우 3.6 : 1인데 비해 [<sup>3</sup>H]-MTX-LBSA 공유결합체는 33.3 : 1로 앞의 두 경우보다 약 10배 높게 나타났다. 120분에서는 [<sup>3</sup>H]-MTX는 2.2 : 1이고, [<sup>3</sup>H]-MTX-BSA 공유결합체는 3.4 : 1, [<sup>3</sup>H]-MTX-LBSA 공유결합체의 경우 24.0 : 1로 나타났다. 이 결과는 [<sup>3</sup>H]-MTX-LBSA가 [<sup>3</sup>H]-MTX 및 [<sup>3</sup>H]-MTX-BSA에 비하여 신장 독성이 적으며 간에 집중적으로 이행되어 항암작용을 발현할 수 있는 가능성을 제시하고 있다. 또한 [<sup>3</sup>H]-MTX-BSA 공유결합체와 [<sup>3</sup>H]-MTX-LBSA 공유결합체의 약물표적(또는 선택) 계수(Drug targeting index or

selectivity index, SI)를 다음과 같은 식으로 계산하여 비교하였다<sup>16)</sup>.

$$SI = \frac{\text{투여후 시간 } t \text{에서의 표적부위 중의 약물량}}{\text{투여후 시간 } t \text{에서의 비표적부위 중의 약물량}}$$

[<sup>3</sup>H]-MTX-LBSA 공유결합체의 SI는 10분에서는 18.1, 120분에서는 11.6로 나타났고 [<sup>3</sup>H]-MTX-BSA 공유결합체의 SI는 10분에서는 2.5, 120분에서는 2.4로 나타났다.

## 결 론

이상의 결과를 종합하면, 간에 종양이 발생한 경우 MTX-LBSA 공유결합체를 정맥투여한다면 신장독성을 줄이면서 간의 종양부위에 높은 약물농도를 장시간 유지할 수 있으므로 치료계수를 증가시킬 수 있다고 생각된다. 그러나 MTX-LBSA의 간 표적성, 약효발현장애, 지속적인 약효발현 등을 체계적으로 연구하기 위해서는 좀 더 많은 동물실험을 통하여 MTX-LBSA를 구성하는 MTX, BSA, 당간의 가장 합리적인 물비를 찾는 것이 매우 중요하다고 생각된다.

## 감사의 말씀

본 연구는 서울대학교 신의약품 개발 연구센터와 과학기술처 특정연구과제의 연구비 지원으로 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) Ashwell, G. and Morell, A. G.: The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. *Adv. Enzymol.*, **41**, 99-128 (1974).
- 2) Ashwell, G. and Harford, J.: Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Ann. Rev. Biochem.*, **51**, 531-534 (1982).
- 3) Fiume, L., Busi, C. and Mattioli, A.: Targeting of antiviral drugs with protein carriers. *FEBS Lett.*, **153**, 6-10 (1983).
- 4) Gray, G. R.: The direct coupling of oligosaccharides to proteins and derivatized gels. *Arch. Biochem. Biophys.*, **163**, 426-428 (1974).

- 5) Schwartz, B. A. and Gray, G. R.: Proteins containing reductive aminated disaccharide: Synthesis and chemical characterization. *Arch. Biochem. Biophys.*, **181**, 542-549 (1977).
- 6) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 7) Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350-356 (1956).
- 8) Chu, B. C. F. and Whiteley, J. M.: High molecular weight derivatives of methotrexate as chemotherapeutic agents. *Mol. Pharmacol.*, **13**, 80-88 (1977).
- 9) Kim, C. K. and Oh, Y. K.: Development of hydrophilic human serum albumin microspheres using a drug-albumin conjugate. *Int. J. Pharm.*, **47**, 163-169 (1988).
- 10) Kim, C. K., Lee, M. G., Park, M. K., Lee, H. J. and Kang, H. J.: *In vitro* drug release characteristics of methotrexate-human serum albumin and 5-fluorouracil-acetic acid-human serum albumin conjugates. *Arch. Pharm. Res.*, **12**, 186-190 (1989).
- 11) Fiume, L., Busi, C. and Mattioli, A.: Lactosaminated human serum albumin as hepatotropic drug carrier: rate of uptake by mouse liver. *FEBS Lett.*, **146**, 42-46 (1982).
- 12) Fiume, L., Busi, A., Mattioli, A., Balboni, P. G. and Barbanti-Brodano, G.: Hepatocyte targeting of adenine-9- $\beta$ -D-arabinofuranoside 5'-monophosphate (ara-AMP) coupled to lactosaminated albumin. *FEBS Lett.*, **129**, 261-264 (1981).
- 13) Wall, D. A., Wilson, G. and Hubbard, A. L.: The galactose-specific recognition system of mammalian liver: the route of ligand internalization in rat hepatocytes. *Cell*, **21**, 19-93 (1980).
- 14) Huffman, D. H., Wan, S. H., Azarnoff, D. L. and Hoogtraten, B.: Pharmacokinetics of methotrexate. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **14**, 572-579 (1973).
- 15) Yoon, E. J., Chang, H. W., Lee, M. G., Lee, H., Park, M. K. and Kim, C. K.: Pharmacokinetics of methotrexate after intravenous infusion of methotrexate-rabbit serum albumin conjugate to rabbits. *Int. J. Pharm.*, **67**, 177-184 (1991).
- 16) Gupta, P. K. and Hung, C. T.: Quantitative evaluation of targeted drug delivery systems. *Int. J. Pharm.*, **56**, 217-226 (1989).
- 17) Lee, Y. C., Stowell, C. P. and Krantz, M. J.: 2-Imino-2-methoxyethyl 1-thioglycosides: new reagents for attaching sugars to proteins. *Biochem.*, **18**, 3956-3963 (1976).