

## 적혈구를 이용한 약물 수송

용철순<sup>†</sup> · 박경아

영남대학교 약학대학  
(1992년 1월 17일 접수)

### Erythrocyte as Drug Carrier

Chul-Soon Yong<sup>†</sup> and Kyong-Ah Park

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 713-749, Korea  
(Received January 17, 1992)

The use of erythrocyte as drug carrier has been reviewed. Carrier erythrocytes have proven to offer many advantages for delivery of therapeutic agents, especially in the treatment of inherited enzyme deficiency and cancer. Carrier erythrocytes are biodegradable and nonimmunogenic. Encapsulated drugs may be protected from premature degradation, inactivation and excretion. Carrier erythrocytes may be used as a slow-release system. Targeting of encapsulated drugs directly to a site of action is another possibility. Methods for encapsulating drugs into erythrocytes, the fate of carrier erythrocytes *in vivo*, the strategies of targeting carrier erythrocytes to special organs and *in vivo* applications of erythrocytes have been discussed. The encapsulation of drugs in erythrocytes has shown attractive possibilities in future use.

**Keywords**—carrier erythrocyte, targeting, encapsulation, slow-release

기존의 약물투여 방식인 경구, 피하, 근육, 정맥 등의 한계점을 극복하기 위해 새로운 투여방식에 대한 다양한 연구가 진행되어 왔다.<sup>1)</sup> 그 중에서 약물수송체를 이용하여 특정 부위에 생리활성물질을 표적시키려는 여러 방법이 최근 소개되었다.<sup>2)</sup> 특히 효소 결핍을 수반하는 유전적 질병을 치료하기 위해, 리포솜,<sup>3-5)</sup> nanoparticles,<sup>6)</sup> 알부민 microbeads,<sup>7)</sup> erythroosomes,<sup>8,9)</sup> 적혈구<sup>10-13,14)</sup>에 효소를 포획시켜 체내로 투여할 수 있다. 이러한 방법의 장점은, 혈액과의 incompatibility, 불활성화 및 파괴, 세망내피로부터의 신속한 제거, 면역반응 등으로부터 생리활성물질을 보호할 수 있다는 점이다. 약물의 효과적인 전달을 위해 다양한 제어방출계가 개발되었으며,<sup>15)</sup> 순환하고 있는 carrier erythrocyte(CE)가 서방성 약물방출계로 작용할 경우 일반적인 방법으로 투여한 약물에 비해 높은 혈중농도를 장시간 지속시킬 수 있다.<sup>16,17)</sup> 또한 암치료를 위한 화학요

법을 시행할 경우, 화학요법제가 암세포 뿐만 아니라 정상세포에 대한 강한 독성을 나타내므로 암세포에 만 특이하게 약물을 전달하는 것이 중요한 문제로 제기된다. 그러므로, 약물이나 혹은 치료효과를 지닌 효소를 필요한 분위에만 선택적으로 전달하기 위한 여러 방법이 시도되었으며, 그 중 리포솜과 적혈구가 가장 적합한 약물수송계로서의 가능성을 보여 주고 있다.

이미 적혈구막의 구성성분과 구조에 대해 광범위한 연구가 진행되어 왔으며,<sup>18-20)</sup> 막생화학의 개념과 방법을 시험하기 위해 많은 연구자들이 적혈구막을 model system으로 사용하여 왔다. Zimmerman<sup>24)</sup> 과 Ihler 등<sup>10)</sup>은 적혈구 안에 효소나 약물 등을 포획시켜 약물전달계로 사용하여, biocompatibility의 문제를 감소시킬 수 있는 가능성을 처음으로 제시하였고, 그 이후로 적혈구를 사용하여 약물의 약리학적 반감기를 연장하려는 많은 연구가 시도되어 왔다.<sup>25,26)</sup>

<sup>†</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

적혈구의 생체내 약물수송체로서의 장점은 생체내에서 분해될 수 있으며, 적혈구내의 작은 공간에 많은 양의 외부물질을 포획할 수 있고,<sup>27)</sup> *in vivo*에서 순환하여<sup>28,29)</sup> 특별한 장기에 표적시킬 수 있는 것이다.

### 약물의 적혈구내 포획방법

약물이나 외인성 효소 등의 물질은 보통 hypo-osmotic lysis, dielectric breakdown 혹은 endocytosis에 의해 적혈구내에 쉽게 포획된다. 포유동물은 물론, 핵이 있는 조류의<sup>30)</sup> 적혈구에도 이러한 방법을 적용할 수 있다. 적혈구는 0.6% 염류용액에서 세포내물질을 방출하여 용혈을 시작하여 0.4% 염류용액에서 완전히 용혈한다. 적혈구는 저장액에서 임계부피 혹은 임계압력에 도달할 때까지 팽창한 후 막이 파열되어 이온은 물론, 거대분자의 막투과도 가능하게 한다. 이때 20-50 nm 정도의 구멍 및 막 파열을 관찰할 수 있다.<sup>31)</sup> 적혈구의 일반적인 형태는 biconcave disc이며, 이러한 형태를 갖기 때문에 저장액 용혈시 부피의 변화에 의해 약물을 포획할 수 있다. 저장액에서 팽창할 때 biconcave disc에서 구형(spherocyte)으로 변하며 이 시점에서는 디이상막이 늘어날 수 없고 삼투압이 계속 낮아지면 내부압력이 증가하여 막이 파괴된다. 저장액에서 신속한 용혈현상이 일어날 경우 세포막이 파괴되며 등장액에서 다시 복원되어 "white ghost"를 형성한다. 용혈이 되기전 많은 세공을 볼 수 있으며 약물을 포획하기 위해서는 용혈현상이 시작되기전 적혈구가 최대한도로 팽창하는 것이 필요하다.<sup>32)</sup>

실험동물의 종류, 채취한 혈액을 저장한 기간, 그리고 CE를 만드는 방법 등에 따라 CE 막의 투과성은 달라지며, 포획되는 약물의 정도와 적혈구의 형태에도 변화를 줄 수 있다. 만드는 방법을 조절하여 CE의 혈중 반감기를 보통 적혈구의 반감기까지 늘일 수도 있으며, 경우에 따라 특별한 세포에 표적될 수 있도록 적혈구에 변화를 가할 수 있다. 적혈구 막의 구조와 성분<sup>18-23,33)</sup> 및 투과성<sup>34-37)</sup>에 대한 광범위한 연구가 진행되어 왔으며, 대부분의 헤모글로빈이 제거된 후 만들어진 erythrocyte ghost를 막투과 연구를 위한 모델로 사용해 왔다. Holm 등,<sup>38)</sup> Roos 등<sup>22)</sup>과 Deziel 등<sup>23)</sup>도 적혈구막을

막투과성 연구를 위한 생체막 모델을 사용하였다. Nash 등<sup>39)</sup>은 erythrocyte ghost를 만드는 과정에서, 온도, medium의 삼투압, 등장액에 처리하는 시간 등에 변화를 주었을 때, 현저하게 막의 탄력성에 영향을 미치지 않는, 저장액에 노출된 시간이 길수록 막의 점도를 증가시키며, 막을 경화시키지는 않는다고 보고했다. 이러한 변화의 원인으로는 세포골격 단백질의 spectrin이 점차 막으로부터 소실되거나 4중합체에서 2중합체로 구조적 재배열을 하는 것으로 알려졌다.

과거에 사용하던 대부분의 포획방법은 저장액에서 적혈구를 용혈시킨 후 등장액에서 세포를 봉합(sealing)한다. 저장액 하에서 급속히 세포가 팽창하여 막에 큰 구멍이 형성되거나 막이 부분적으로 파열하여 포획한 물질이 통과한 후 등장액에서 원래의 상태를 회복한 다음 37°C에서 단련(annealing)시켜 안정화시킨다. 이때 세포내물질이 대부분 손실되며 용액중에 있던 약물을 소량 포획한다. 이 과정중 칼슘의 역할은 막 구성 성분인 단백질과 인지질의 결합, 분배, 조직의 변화로 인한 막의 불투과성 회복을 유도한다고 알려졌다.<sup>40)</sup>

이러한 방법으로 만드는 CE는 혈액중에 순환시 망상내피계에 의해 신속하게 제거된다. 최근에 사용되는 방법은 순환계에서 반감기를 연장할 수 있는 방향으로 발전·개선되어 왔다. 격한 조건하에서 약물을 적혈구내로 포획시킬 경우 *in vivo*에서 신속하게 제거된다. 이러한 단점을 극복하기 위해 보다 개선된 방법인 preswelling 혹은 투석막을 이용한 방법이 사용되게 되었다. 이 방법이 효과적이기 위해서는 *in vivo*상에서 적혈구 본래의 구조와 특성이 보존되어야 한다. 온화한 상태에서 효소를 포획시킨 적혈구는 혈중에서 일종의 서방성약물수송체의 역할에 의해 내인성 기질을 제거할 수 있다.

### Hypo-Osmotic Procedure

가장 간단하고 광범위하게 사용되는 방법으로 다음과 같이 분류된다.<sup>12,25)</sup>

#### Dilution

저장액이나 물속에서 적혈구를 희석시키면 즉시 세공이 열리며 1분 이내에 평형에 도달하게 된다. 1:3 혹은 1:4 정도로 희석시켜 60-70% 정도의

세포내물질을 제거한다. 많은 양으로 희석시켜 세포내용물이 모두 빠져나갈 경우 "white ghost"를 얻을 수 있으며, 이 white ghost는 *in vivo*에서 식세포에 의해 신속하게 제거된다.

#### Pre-Swell Dilution

Reichsteiner가<sup>41)</sup> 처음 사용하였으며 그 방법은 다음과 같다. 약간 저장액에 적혈구를 넣어 용혈현상을 방지한 상태에서 적혈구를 팽창시킨다. 낮은 회전수로 원심분리시켜 팽창이된 적혈구를 분리시킨 후 비교적 적은 분량의 물을 가해 용혈시킨다. 이렇게 완만하게 팽창되었던 적혈구는 세포내물질을 잘 보존하며 긴 반감기를 갖는다. Alpar 등<sup>17)</sup>은 이 방법을 사용하여 propranolol 및 prodrug인 O-acetyl propranolol, O-pivaloyl propranolol을 쥐의 적혈구에 포획시켜 서서히 방출하게 했으며, Kruse 등<sup>42)</sup>은 마우스의 적혈구를 preswell시킨 후 서서히 투석시켜 methotrexate를 포획시켰다.

#### Dialysis Techniques

Ihler 등<sup>10)</sup>에 의해 처음 시도되었으며, 수정된 여러 방법에 의해 병아리,<sup>30)</sup> 토끼,<sup>43)</sup> 마우스,<sup>44,45)</sup> 원숭이,<sup>28)</sup> 개,<sup>46)</sup> 말,<sup>47)</sup> 소<sup>29)</sup> 등의 적혈구를 이용한 약물전달체로서의 가능성에 대해 광범위한 연구가 시도되어 왔다. 이 방법은 원심분리에 의해 얻은 적혈구를 저장액에 담겨있는 투석 튜브에 넣어, 세포내물질이 손실되는 것을 방지할 수 있다. 천천히 투석하는 동안 세포가 팽창하며 세포막에 미세한 세공이 형성된다. 이때 외부의 약물이나 단백질 등이 막을 가로질러 세포내로 들어간 후 평형상태에 도달하게 된다. 삼투압을 300-310 mOsm/kg으로 재조절하여 세공을 닫히게 한다. 이후 annealing에 의해 세포막지질이 재구조를 갖게 한다. 투석방법에 의해 만든 적혈구<sup>46)</sup>의 반감기는 electrical hemolysis에 의해 제조된 적혈구<sup>48)</sup>에 비해 길다. 이 방법에 의해 CE를 만들 경우, oxalic acid, glycolic acid, glyoxylic acid 그리고 benzoic acid 등의 분자량이 작은 유기산들이 처음의 적혈구와 동일한 성질을 지닌 CE의 막을 신속하게 통과할 수 있다.<sup>49)</sup> DeLoach 등<sup>47)</sup>은 다량의 CE를 만들기 위해 투석낭을 이용하였으며, Leung 등<sup>50)</sup>은 이 방법을 이용하여 쥐의 적혈구에 thiosulfate와 미토콘드리아 효소인 rhodanase를 포획시켰다.

위에서 열거한 방법을 혼용하거나 개선하여 CE를

만들려는 다양한 연구가 진행되어 왔으며, DeLoach 등<sup>51)</sup>은 사람적혈구를 저장액에서 투석방법으로 처리할 때의 약물포획 기전에 대한 연구를 보고하였다.

Pitt 등<sup>52)</sup>은 인슐린,  $\alpha$ -1-antitrypsin, cortisol-21-phosphate, methotrexate 그리고 cyclophosphamide를 포획하기 위해 적혈구의 막을 파괴하지 않고 저장액에서 팽창시켜 CE를 만들었다. 이 방법은 적혈구의 생존력에 손상을 주지 않아 순환계에서 긴 반감기를 보여 주었다. Hypotonic hemolysis와 isotonic resealing에 의해 적혈구에 5-fluoro-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate(FdUMP)<sup>53)</sup>나 L-asparaginase<sup>54)</sup>를 포획시킬 수 있으며, hypo-osmotic dialysis 방법을 이용해 gentamicin<sup>55)</sup>이나 desferrioxamine<sup>56)</sup>을 함유한 CE가 제조되었다. Dale<sup>57)</sup>은 투석낭을 사용해 단백질을 적혈구에 포획시켰으며, 그 효율은 40%에 달하였다.

#### Dielectric Breakdown

적혈구를 포함한 대부분의 세포가 강한 전기장의 영향을 받으면 완전히 용혈현상이 일어나기 전에 세공을 형성하게 된다. Kinoshita 등<sup>58)</sup>은 electric pulse를 이용하여 용혈현상을 유도한 후 재봉합 과정을 거쳐 세포내 조성이 변한 적혈구를 만들었으며, 펄스를 가하는 시간이 160  $\mu$ s가 초과하지 않을 경우 반감기에 큰 변화가 없음을 보고했다. 이 방법의 사용시 낮은 온도에서는 세공이 열려 있으나 37°C에서 단련시키면 세공이 닫힌다. 사람의 적혈구를 등장액상태에서 높은 전압의 펄스를 가했을 경우 용혈현상을 유발한다. Voltage pulsation을 적혈구 현탁액에 가할 경우 막 양쪽에 전압차가 형성되며 임계점에서 세공을 만들게 된다. 등장상태에서는 작은 세공으로 칼륨 혹은 나트륨 이온이 통과하나 sucrose와 헤모글로빈은 통과할 수 없다. 그러나 저장액 하에서 형성된 커다란 세공으로는 sucrose가 통과할 수 있다.<sup>59)</sup> Electrophoresis에 의해 적혈구에 포획된 interleukin-2는 서방성 약물수송체의 가능성을 갖는다.<sup>60)</sup> Weaver 등<sup>61)</sup>은 이 방법을 효과적으로 개선하였다. 이 방법은 세포내물질의 손실이 없다는 장점을 가지고 있다.

전술한 방법들 이외에 endocytosis에 의해 약물이 적혈구내로 직접 포획될 수 있으며,<sup>62)</sup> 적혈구와 포

획시키려는 약물을 함께 incubation시켜 적혈구의 막을 파괴하지 않고 포획시키는 방법도 있다.<sup>1)</sup> 암포테리신 B와 같은 폴리엔계 항생제는 대사물과 이온에 대한 막투과성을 증진시켜 미생물을 손상시킨다. 이러한 특성을 이용하여 용혈과정을 거치지 않고 daunomycin을 적혈구에 포획시켜 L1210 세포를 갖는 C57BLxDBA/2F<sub>1</sub> 마우스에 주사할 경우 적혈구의 막구조가 변화를 받지 않아, CE의 혈중 반감기를 연장시킬 수 있었다.<sup>63)</sup>

### 생체내에서의 운명 및 동태

Fiddler 등<sup>64)</sup>은 CE의 제조방법이 *in vivo*에서의 CE의 반감기에 미치는 영향에 대한 연구를 하였으며, 대부분의 연구보고에 의하면 CE의 20-80%가 초기에 순환계에서 신속하게 제거되며 잔여의 CE는 서서히 혈중에서 사라진다. 초기에 신속하게 제거되지 않은 CE는 손상을 적게 받거나 정상적인 대사능력을 상실하지 않은 CE로서 정상적인 적혈구에 비해서는 빠르게 혈중에서 제거된다.<sup>1)</sup> 그러므로 세포 내용물과 효소의 보전 혹은 ATP를 생성할 수 있도록 glucose, adenosine 그리고 phosphate를 CE내에 포함시킬 경우 반감기를 연장할 수 있다. 쥐를 사용한 모델에서, CE에 포획된 interleukin-2는 피하주사시, 서서히 방출되어 외전상 분배가 지연되는 것으로 나타난다.<sup>65)</sup> 또한 투석법으로 만든 sucrose를 함유한 CE의 반감기는 sucrose의 양을 기준하여 22일이었으며, 유리 sucrose의 반감기의 4시간<sup>66)</sup>에 비해 연장되었다.

열처리한 적혈구, doxorubicin을 함유하며 glutaraldehyde로 처리한 쥐의 적혈구,<sup>67,68)</sup> 항체 혹은 avidin을 결합시킨 적혈구, 적혈구<sup>69)</sup> 항체와 반응을 하는 적혈구<sup>70)</sup>는 주로 간과 비장에 존재하는 식세포에 의해 신속하게 제거되므로 이러한 특별한 세포에 약물을 선택적으로 전달할 수 있는 가능성을 시사해주고 있다. 이는 간으로의 혈류량이 많고 간에 활동성이 강한 식세포가 존재하기 때문이다.<sup>43)</sup> 개의 CE의 소실 경향은 2상으로 나타나며, 마지막 상의 반감기는 36일이다. 이러한 혈중소실경향은 소의 CE에서도 관찰되었다.<sup>29)</sup> DeLoach 등에 의하면<sup>71)</sup> 테트라사이클린을 송아지의 적혈구에 포획시켜 사용했을 때 3-콤파트먼트 약물동태에 따랐으며 생체

반감기가 6.7시간이었다. 이때 약물의 상당부분이 간과 비장에 이행되었다. Methotrexate(MTX)를 함유한 CE를 glutaraldehyde로 처리해 MTX가 적혈구막을 쉽게 빠져나가는 것을 방지할 수 있으며, MTX의 혈류내 동태는 3-콤파트먼트 모델로 해석되고 CE는 37일의 긴 반감기를 갖는다.<sup>72)</sup> 일반적으로 CE의 생체내 동태는 biphasic curve를 보여준다. 초기에 혈중에서 신속히 제거되며 이후 긴 생체반감기를 갖고 서서히 제거된다. 초기에 급속히 제거되는 원인으로서 투석 시행시 세포물질이 유실되거나 세포막이 손상을 받기 쉬운 형태로 변형되며, 세포가 응집체를 형성하거나, 세포의 변형능력 상실 및 식세포에 의한 식균작용의 증가 등을 들 수 있다.<sup>73)</sup> 손상을 적게 받은 대부분의 CE는 비장에서 제거되며, 손상을 많이 받은 CE는 주로 간에서 제거된다.

#### 면역반응

환자 자신의 혈액을 재수혈할 경우 최소한의 면역반응을 생각할 수 있다. 또한 용혈 및 재봉합 과정에서 새로운 항원이 형성될 수도 있으나 Fiddler 등<sup>44)</sup>은 적혈구에 포획된 단백질은 면역반응을 일으키지 않는다고 보고하였다. Asparaginase의 반복 사용시 과민성, 아나필락시스 및 장기에 대한 독성 등의 부작용이 나타나며 이 효소의 짧은 생체반감기는 치료효과를 감소시킨다. 이러한 단점을 극복하기 위해 asparaginase를 원숭이의 적혈구에 포획하여 다시 정맥주사할 경우 반감기의 연장과 함께 간이나 비장으로의 표적이 가능했으며 guinea pig 모델에서도 아나필락시스를 방지할 수 있었다.<sup>74)</sup> Updike 등<sup>28)</sup>도 asparaginase을 적혈구에 포획시켜 알레르기반응을 감소시켰으며, Naqi 등<sup>75)</sup>은 투석방법으로 L-asparaginase를 개의 적혈구에 함유시켜 L-asparaginase의 생체반감기를 6.5일로 연장하고, L-asparaginase에 대한 항체의 생성이 없음을 보고하였다.

#### 투여경로

DeLoach 등<sup>76)</sup>에 의하면 CE를 쥐에 피하주사했을 경우 포획된 약물(<sup>14</sup>C-sucrose, <sup>3</sup>H-inulin, <sup>51</sup>Cr-hemoglobin)은 주사부위에서, 혹은 주사부위에서 림프계로 이동한 후 흉부 림프관을 통해 순환계로 들어온 적혈구로부터 서서히 방출되었다. CE는 대부분 정맥주사하여 순환계나 세망내피계에 국한되어

효과를 나타내는 것이 일반적인 투여경로이나, 최근 개<sup>77)</sup>에 복강주사한 적혈구가 혈액순환계에서 이행하여 7일간의 반감기를 갖고 정상적으로 체순환하는 사실이 밝혀짐에 따라 복강내 식세포로 약물을 표적시킬 수 있는 투여경로로서의 가능성을 시사해 주었다. DeLoach 등<sup>76)</sup>은 적혈구가 효과적인 약물 수송체로서 가능성이 밝혀짐에 따라 다양한 투여경로의 개발에 대한 연구를 수행하였다. 예를 들어, 피하주사로 투여했을 경우 약물이 주사부위나 림프절에서 서서히 방출되거나 림프관을 통해 혈액순환계로 이행된 적혈구로부터 약물이 방출될 수 있음을 보고하였다

### 표적화(Targeting)

적혈구는 몇가지 방법에 의해 특정 장기로 표적시킬 수 있으며, 적어도 가장 쉽게 세망내피계로 표적될 수 있다.<sup>43)</sup> 이는 식세포가 손상을 입거나 노쇠한 적혈구를 취하려는 자연적인 성향이 있기 때문이다. 세망내피계 내에서도 좀 더 특이하게 간이나 혹은 비장에 표적하는 것이 필요한데, 이것은 약물의 부작용을 경감시키거나 불필요하게 약물을 소비하지 않도록 하기 위함이다. 토끼,<sup>43)</sup> 래트,<sup>43)</sup> 개<sup>72)</sup>의 적혈구를 2작용 교차결합제인 glutaraldehyde로 처리했을 경우 간에 특이하게 표적되며, 쥐<sup>45)</sup>의 적혈구를 desialylation 혹은 과산화수소로 처리했을 경우 간과 비장으로 표적된다. Zocchi 등<sup>45)</sup>은 쥐의 적혈구를 투석처리를 한 후, 열처리하여 세포내 에너지 고갈시키거나, neuraminidase에 의해 desialylation시켜 간으로 표적시키거나, 과산화수소 처리하여(oxidative stress) 비장에서 대부분의 적혈구가 제거되게 하였다.

Zocchi 등<sup>67,68)</sup>은 adriamycin을 함유한 쥐의 적혈구를 glutaraldehyde로 처리하여 간과 폐로 신속하게 이행되며 심장에는 소량이 이행되어, 특별한 장기에 약물을 표적하고, 그 외의 장기에 대한 부작용을 감소시키며, 포획된 약물을 서서히 방출하는 새로운 약물수송체로의 가능성을 보고하였다. DeLoach 등<sup>71)</sup>은 glutaraldehyde로 적혈구를 처리할 때 삼투압과 혈류의 소용돌이에 의한 스트레스에 견딜 수 있으며, 간이나 비장에 선택적으로 표적시킬 수 있음을 보고하였다.

과량의 철이 주로 존재하는 세망내피계 세포로 적혈구가 이행되는 성질을 이용하여, Green 등<sup>78)</sup>은

desferrioxamine을 함유한 적혈구가 세망내피계에서 철과 킬레이트 화합물을 형성해 체외로 배설됨을 보고하였다. Eichler 등<sup>55)</sup>은 항체를 피복시킨 적혈구에 gentamicin을 포획시켰다. 이 항체로 감작된 CE가 신속하게 세망내피계에 약물을 전달한다. Godfrey 등<sup>69)</sup>도 항체나 혹은 avidin을 적혈구에 결합하여 특정한 세포에 표적하는 방법을 시도하였다.

### 약물수송체로의 응용

CE를 유전적 질병 및 암치료<sup>13)</sup>를 위한 약물수송체로서의 가능성에 대한 다양한 연구가 보고되었으며<sup>25,79)</sup> 적혈구에 포획되어 이용될 수 있는 효소로 insulin,<sup>80)</sup>  $\beta$ -glucosidase,<sup>81)</sup>  $\beta$ -galactosidase,<sup>82)</sup> asparaginase,<sup>54,83)</sup>  $\beta$ -fructofuranosidase,<sup>84)</sup> glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PD)<sup>84)</sup> 등을 들 수 있다. Beutler 등<sup>70)</sup>은 투석방법으로 적혈구에 포획시킨 glucocerebrosidase를 Gaucher's disease 치료에 사용하였다. DeLoach 등<sup>65)</sup>은 마우스모델을 사용하여 interleukin-2를 적혈구에 포획시켜 정맥주사했을 때 서서히 방출되는 것을 보고하였다.

항암제로 사용되는 MTX<sup>42,48,82)</sup>와 adriamycin<sup>16,66,68,86)</sup>을 적혈구에 포획시켜 간과 췌장에 선택적으로 이행시키거나,<sup>84)</sup> adriamycin을 개의 적혈구에 포획시켜 약물방출속도를 지연시킬 수 있었다.<sup>87)</sup> 또한 투석방법에 의해 적혈구에 포획된 adriamycin은 순환계에서 서서히 방출되어 암환자 치료시 야기되는 가장 큰 부작용인 심장독성을 줄일 수 있었다.<sup>16)</sup>

약물의 포획율과 효율적인 방출을 위해 prodrug을 포획시키려는 연구가 시도되어 왔다. 적혈구에 5-fluoro-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate(FdUMP)를 포획시켜 간에 선택적으로 5-fluoro-2'-deoxyuridine(FdUrd)를 전달시키는 내인성 생체반응계(endogenous bioreactor)로 이용하며, 이때 prodrug인 FdUMP가 FdUrd로 변화된 후 방출된다.<sup>53)</sup> DeLoach<sup>83)</sup>은 개와 사람의 적혈구에 cytosine arabinoside를 포획시킬 경우 *in vitro*에서 유출되는 반감기가 각각 10분 및 4일이었으나, cytosine arabinoside monophosphate 사용시 13일 이상으로 연장된다고 보고하였다. 이것은 prodrug인 cytosine arabinoside monophosphate가 적혈구 안에서 dephosphorylation에 의해 cytosine arabinoside로 전환된 후 서서히 방출되기 때문이다. Alpar 등<sup>17)</sup>은 preswelling 방법을 사용하여 propranolol 및 prodrug인 O-acetyl prop-

ranolol, O-pivaloyl propranolol을 쥐의 적혈구에 포획시켜 서서히 방출시킴으로써 부작용 및 과도하게 간에서 제거되는 것을 방지할 수 있었다.

세망내피 세포에 존재하는 철을 효과적으로 제거하기 위해 desferrioxamine을 적혈구에 포획시켜 파랑의 철이 주로 존재하는 세망내피계 세포로 전달하여 킬레이트 화합물을 형성하기 쉽게 할 수 있으며,<sup>76)</sup> Green 등<sup>80)</sup>은 이러한 원리를 이용해 CE에 함유된 desferrioxamine을 가지고 임상실험을 했다.

DeLoach 등<sup>81)</sup>은 적혈구를 이용하여 맹독소인 T2 독소를 간의 식세포에 선택적으로 전달하여 식세포의 단백질 합성을 저해한다고 보고하였다.

또한 당뇨병 치료제인 인슐린은 혈장 내에서 안정성이 낮을 뿐 아니라, 간, 신장, 비장 및 적혈구 내에서도 빠르게 분해되므로 CE에 포획시켜도 다른 약물과는 달리 효과적인 치료효과를 기대할 수 없었다. 그러나 분해저해제인 tolbutamide를 함께 포획시킬 경우 인슐린의 안정성을 높일 수 있었다.<sup>79)</sup>

Leung 등<sup>82)</sup>은 hypotonic dialysis를 이용하여 쥐의 적혈구에 thiosulfate와 미토콘드리아 효소인 rhodanase를 포획시켜 cyanide 독성의 해독제로서의 가능성을 시사해 주었으며, 이는 외인성 유독물질의 해독에 적혈구를 이용하려는 최초의 시도였다.

현재로서는 CE를 이용해 간이나 비장등으로의 선택적 약물수송이 가능하다. 그러나 다른 조직이나 장기에도 선택적으로 약물을 표적하는 것이 필요하므로, 앞으로의 연구과제는 여러 방법, 예를 들어 특별한 부위에 존재하는 항원에 대한 항체를 CE에 부착시켜 원하는 부위에 약물을 집중시키는 것 등이 되리라 사료된다. 또 다른 연구 분야로서 막의 변화를 통한 약물의 방출속도를 조정하는 것 등을 생각할 수 있다.

## 문 헌

- 1) G. Ihler (Ed.), *Methods of Drug Delivery*, Pergamon Press Inc., New York, 1986.
- 2) G. Gregoriadis, Targeting of drugs, *Nature*, **265**, 407-411 (1977).
- 3) G. Gregoriadis, In: *Drug Carriers in Medicine and Biology*, Academic Press, Inc., New York, 1980.
- 4) G. Gregoriadis, The carrier potential of liposomes in biology and medicine, *New Eng. J. Med.*, **295**, 704-710 and 765-770 (1976).
- 5) G. Gregoriadis, Targeting of drugs, *Nature*, **265**, 407-410 (1977).
- 6) R.C. Oppenheim, Nanoparticles. In: *Drug Delivery Systems*, pp. 177-188, Juliano, R.L. (Ed.) Oxford University Press, 1980.
- 7) T.K. Lee, T.D. Sokoloski, G.P. Royer, Serum albumin beads: an injectable, biodegradable system for the sustained release of drugs, *Science*, **213**, 233-235 (1981).
- 8) J. Cuppoletti, E. Mayhew, C.R. Zobel, and C.Y. Jung, Erythroosomes: Large proteoliposomes derived from crosslinked human erythrocyte cytoskeletons and exogenous lipid, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 2786-2790 (1981).
- 9) C.Y. Jung, Erythroosomes: Erythrocyte cytoskeletons coated with exogeneous phospholipid as an encapsulating system, *Method Enzymol.*, **149**, 217-221 (1987).
- 10) G. Ihler, R.H. Glew, and F.W. Schnure, Enzyme loading of erythrocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 2663-2666 (1973).
- 11) G. Ihler, Potential use of erythrocytes as carriers for enzymes and drugs, in *Drug Carriers in Medicine and Biology*, pp. 129-153. G. Gregoriadis (Ed.), Academic Press, Inc. New York, 1980.
- 12) G. Ihler, Erythrocyte carriers, In *Methods of Drug Delivery*, pp. 3-21, G. Ihler (Ed.), Pergamon Press Inc., New York, 1986.
- 13) M. Saleemuddin, Therapy through red blood cells: Potential in the treatment of genetic disorders and cancer, *J. Sci. Ind. Res.*, **41**, 573-679 (1982).
- 14) E. Beutler, G.L. Dale, and W. Kuhl, Enzyme replacement with red cells, *New Eng. J. Med.*, **296**, 942-943 (1977).
- 15) D. Rachev, N. Lambov, and E. Minkov, Some aspects of controlled-release dosage forms, *Pharmazie*, **44**, 186-189 (1989).
- 16) A. DeFlora, U. Benatti, L. Guida, and E. Zocchi, Encapsulation of adriamycin in human erythrocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 7029-7033 (1986).
- 17) H.O. Alpar, E. Salt, A. Jolly, K.A. Belaid, W.J.

- Irwin, Erythrocytes as a slow release carrier system for propranolol and its prodrugs, *J. Pharm. Pharmacol.*, **38**, Suppl., 1179 (1986).
- 18) G. Fairbanks, T.L. Steck, and D.F.H. Wallach, Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane, *Biochem.*, **10**, 2606-2617 (1971).
  - 19) J.V. Staros, B.E. Haley, and F.M. Richard, Human erythrocytes and resealed ghosts: A comparison of membrane topology, *J. Biol. Chem.*, **249**, 5004-5007 (1974).
  - 20) S. Lux and S.B. Shohet, The erythrocyte membrane skeleton: Biochemistry, *Hospital Practice*, Oct., 77-83 (1984).
  - 21) V.T. Marchesis, The cytoskeletal system of red blood cells, *Hospital Practice*, Nov., 113-131 (1985).
  - 22) D. Roos, C.M. Eckmann, M. Yazdanbakhsh, M.N. Hamers, and de M. Bohr, Excretion of superoxide by phagocytes measured with cytochrome c entrapped in resealed erythrocyte ghosts, *J. Biol. Chem.*, **259**, 1770-1775 (1984).
  - 23) M.R. Deziel, A.W. Girotti, Photodynamic action of bilirubin on liposomes and erythrocyte membrane, *J. Biol. Chem.*, **255**, 8192-8198 (1980).
  - 24) U. Zimmerman, Germ Pat. 2326161, 23 May 1973; *Chem. Abstr.*, **82** (1975) 151837.
  - 25) J.R. DeLoach, Carrier erythrocytes, *Med. Res. Rev.*, **6**, 487-504 (1986).
  - 26) U. Hellwig, Rote Blutzellen als Trägersysteme für Pharmaka, *Pharmazie*, **45**, 824-826 (1990).
  - 27) J.R. DeLoach, and G.M. Ihler, A dialysis procedure for lading erythrocytes with enzymes and lipids, *Biochim. Biophys. Acta*, **496**, 136-145 (1977).
  - 28) S.J. Updike, R.T. Wakamiyu, and E.N. Lightfoot, Asparagenase entrapped in red blood cells: Action and survival, *Science*, **193**, 681-683 (1976).
  - 29) J.R. DeLoach, K. Culler, and R.L. Harris, *In vivo* survival of sucrose-loaded bovine erythrocytes, *J. Appl. Biochem.*, **2**, 177-182 (1980).
  - 30) E. Ang, R. Glew, and G.M. Ihler, Enzyme loading of nucleated chicken erythrocytes, *Exp. Cell Res.*, **104**, 430-434 (1977).
  - 31) P. Seeman, Transient holes in the erythrocyte membrane during hypotonic hemolysis and stable holes after lysis with saponin and lysolecithin, *J. Cell. Biol.*, **32**, 55-70 (1967).
  - 32) E.J. Pitt, C.M. Lewis, D.A. Jenner, and R.E. Offord, Encapsulation of drugs in intact erythrocytes: An intravenous delivery system, *Biochem. Pharmacol.*, **32**, 3359-3368 (1983).
  - 33) H.P. Ting-Beall, M.J. Costello, D. Shoemaker, and V.F. Holland, Ultrastructure of hemoglobin-depleted erythrocyte resealed ghosts, *Biochim. Biophys. Acta.*, **640**, 807-811 (1981).
  - 34) H. Pitterich, and R. Lawaczek, On the water and proton permeabilities across membranes from erythrocyte ghost, *Biochim. Biophys. Acta.*, **821**, 233-242 (1985).
  - 35) J.A. Dix, A.K. Solomon, Role of membrane proteins and lipids in water diffusion across red cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **773**, 219-230 (1984).
  - 36) M.F. Lukacovic, A.S. Verkman, J.A. Dix, A.K. Solomon, Specific interaction of the water transport inhibitor, pCMBS, with band 3 in red blood cell membranes, *Biochim. Biophys. Acta.*, **778**, 253-259 (1984).
  - 37) R.E. Lynch, and I. Fridovich, Permeation of the erythrocyte stroma by superoxide radical, *J. Biol. Chem.*, **253**, 4697-4699 (1978).
  - 38) A.C. Holm, c. Jacquemin, Membrane transport of L-triiodothyronine by human red cell ghosts, *Biochim. Biophys. Res. Commu.*, **89**, 1006-1017 (1979).
  - 39) G.B. Nash, R. Tran-Son-Tay, and H.J. Meiselman, Influence of preparative procedures on the membrane viscoelasticity of human red cell ghosts, *Biochim. Biophys. Acta.*, **855**, 105-114 (1986).
  - 40) R.B. Moore, and J.F. Manery, Resealing to small solutes of white erythrocyte membranes after incubation with EDTA, Ca<sup>2+</sup>, salt, sucrose and phospholipase C, *Arch. Biochem. Biophys.*, **211**, 179-191 (1981).
  - 41) M.C. Reichsteiner, Uptake of protein by red cells, *Exp. Cell Res.*, **93**, 487-492 (1975).
  - 42) C.A. Kruse, C.L. Freehauf, K.R. Patel, and J.D. Baldeschwiler, Mouse erythrocyte carriers osmotically loaded with methotrexate, *Biotech.*

- Appl. Biochem.*, 9, 123-140 (1987).
- 43) J.R. DeLoach, S. Peters, O. Pinkard, R. Glew, and G. Ihler, Effect of glutaraldehyde treatment on enzyme-loaded erythrocytes, *Biochim. Biophys. Acta*, 496, 507-515 (1977).
  - 44) M.B. Fiddler, L.D.S. Hudson, R.J. Desnick, Immunological evaluation of repeated administration of erythrocyte-entrapped protein to C<sub>3</sub>H-HeJ mice, *Biochem. J.*, 168, 141-145 (1977).
  - 45) E. Zocchi, L. Guida, U. Benatti, N. Canepa, L. Borgiani, T. Zanin, and A. DeFlora, Hepatic or splenic targeting of carrier erythrocytes: A murine model, *Biotech. Appl. Biochem.*, 9, 423-434 (1987).
  - 46) J.R. DeLoach, C. Barton, and K. Culler, Preparation of resealed carrier erythrocytes and *in vivo* survival in dogs, *Am. J. Vet. Res.*, 42, 667-669 (1981).
  - 47) J.R. DeLoach, R.L. Harris, G.M. Ihler, An erythrocyte encapsulator dialyzer used in preparing large quantities of erythrocyte ghosts and encapsulation of a pesticide in erythrocyte ghost, *Anal. Biochem.*, 102, 220-227 (1980).
  - 48) U. Zimmermann, G. Pilwat, and B. Esser, The effect of encapsulation in red blood cells on the distribution of methotrexate in mice, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 16, 135-144 (1978).
  - 49) A.r. Hubbard, U. Sprandel, and A. Chalmers, Transport of oxalic acid, glycollic acid, glyoxylic acid and benzoic acid by resealed erythrocyte 'ghosts' prepared by a dialysis technique, *Biochem. Soc. Trans.*, 7, 958-959 (1979).
  - 50) P. Leung, L.E. Ray, C. Sander, L. John, D.M. Sylvester, and L. Way James, Encapsulation of thiosulfate: cyanide sulfurtransferase by mouse erythrocytes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 83, 101-107 (1986).
  - 51) J.R. DeLoach, R.E. Drolesky, and K. Andrews, Encapsulation by hypotonic dialysis in human erythrocytes: A diffusion or endocytosis process, *Biotech. Appl. Biochem.*, 13, 72-82 (1991).
  - 52) E. Pitt, C.M. Johnson, and D.A. Lewis, Encapsulation of drugs in intact erythrocytes: An intravenous delivery system, *Biochem. Pharmacol.*, 32, 3359-3368 (1983).
  - 53) A. DeFlora, E. Zocchi, L. Guida, C. Polvani, and U. Benatti, Conversion of encapsulated 5-fluoro-2'-deoxyuridine 5'-monophosphate to the antineoplastic drug 5-fluoro-2'-deoxyuridine in human erythrocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85, 3145-3149 (1988).
  - 54) R. Karavtsoff, C. Ropars, M. Laguerre, J.P. Muh, and M. Chassaigne, Erythrocytes as carriers for L-asparaginase. Methodological and mouse *in-vivo* studies, *J. Pharm. Pharmacol.*, 42, 473-476 (1990).
  - 55) H.G. Eichler, S. Gasic, K. Bauer, A. Korn, and S. Bacher, *In vivo* clearance of antibody-sensitized human drug carrier erythrocytes, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 40, 300-303 (1986).
  - 56) U. Hellwig, Factors influencing the formation of methemoglobin in desferioxamine loaded erythrocytes, *Biomed. Biochim. Acta*, 49, S340-S343 (1990).
  - 57) G.L. Dale, D.G. Villacrote, and E. Beutler, High-yield entrapment of proteins into erythrocytes, *Biochem. Med.*, 18, 220-225 (1977).
  - 58) K. Kinoshita, Jr., and T.Y. Tsong, Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane, *Nature*, 268, 438-441 (1977).
  - 59) K. Kinoshita, Jr., and T.Y. Tsong, Hemolysis of human erythrocytes by a transient electric field, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74, 1923-1927 (1977).
  - 60) D.H. Mitchell, G.T. James, and C.A. Kruse, Bioactivity of electric field-pulsed human recombinant interleukin-2 and its encapsulation into erythrocyte carriers, *Biotech. Appl. Biochem.*, 12, 264-275 (1990).
  - 61) J.C. Weaver, G.L. Harrison, J.G. Bliss, J.R. Mourant, and K.T. Powell, Electroporation: high frequency of occurrence of a transient high-permeability state in erythrocytes and intact yeast, *FEBS Letter*, 229, 30-34 (1988).
  - 62) S.L. Schrier, K.G. Bensch, M. Johnson, I. Junga, Energized endocytosis in human erythrocyte ghosts, *J. Clin. Invest.*, 56, 8-22 (1975).
  - 63) T. Kaito, K. Hattori, Erythrocyte entrapment of daunomycin by amphotericin B without hemolysis, *Cancer. Res.*, 40, 1351-1353 (1980).



- 64) M.B. Fiddler, L.D.S. Hudson, J.G. White, and R.J. Desnick, Comparison of methods of enzyme entrapment in human erythrocytes. In: *Enzyme Therapy*. pp. 307-317, C.V. Mosby Co., 1980.
- 65) J.R. DeLoach, K. Andrews, and C.L. Sheffield, Encapsulation of interleukin-2 in murine erythrocytes and subsequent deposition in mice receiving a subcutaneous injection. *Biotech. Appl. Biochem.*, **10**, 183-190 (1988).
- 66) J.R. DeLoach, K. Culler, and R.L. Harris, *In vivo* survival of sucrose-loaded bovine erythrocytes, *J. Appl. Biochem.*, **2**, 177-182 (1980).
- 67) E. Zocchi, M. Tonetti, C. Polvani, L. Guida, U. Benatti, and A. DeFlora, *In vivo* liver targeting of adriamycin encapsulated in glutaraldehyde-treated murine erythrocytes, *Biotech. Appl. Biochem.*, **10**, 555-562 (1988).
- 68) E. Zocchi, M. Tonetti, C. Polvani, L. Guida, U. Benatti and A. DeFlora, Encapsulation of doxorubicin in liver-targeted erythrocytes increases the therapeutic index of the drug in a murine metastatic model, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 2040-2044 (1989).
- 69) W. Godfrey, B. Doe, E.F. Wallace, B. Bredt, and L. Wofsy, Affinity targeting of membrane vesicles to cell surfaces, *Exp. Cell Res.*, **135**, 137-145 (1981).
- 70) E. Beutler, G.L. Dale, E. Guinto, and W. Kuhl, Enzyme replacement therapy in Gaucher's disease: Preliminary clinical trials of a new enzyme preparation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 4620-4623 (1977).
- 71) J.R. DeLoach, G.G. Wagner, Pharmacokinetics of tetracycline encapsulated in bovine carrier erythrocytes, *Am. J. Vet. Res.*, **45**, 640-642 (1984).
- 72) J.R. DeLoach, and C. Barton, Glutaraldehyde-treated carrier erythrocytes for organ targeting of methotrexate in dogs, *Am. J. Vet. Res.*, **42**, 1971-1974 (1981).
- 73) J.R. DeLoach, G.G. Wanger, Survival of carrier erythrocytes in splenectomized calves, *Am. J. Vet. Res.*, **44**, 751-754 (1983).
- 74) H.O. Alpar, D.A. Lewis, Therapeutic efficacy of asparaginase encapsulated in intact erythrocytes, *Biochem. Pharmacol.*, **3A**, 257-262 (1985).
- 75) A. Naqi, J.R. DeLoach, K. Andrews, W. Satterfield, and M. Keeling, Determination of parameters for enzyme therapy using L-asparaginase entrapped in canine erythrocytes, *Biotech. Appl. Biochem.*, **10**, 365-372 (1988).
- 76) J.R. DeLoach, and D.E., Corrier, Subcutaneous administration of carrier erythrocytes: slow release of entrapped agent, *Biotech. Appl. Biochem.*, **10**, 359-364 (1988).
- 77) J.R. DeLoach, K. Andrews, W. Satterfield, and M. Keeling, Intraperitoneal administration of carrier erythrocytes in dogs: An improved method for delivery of L-asparaginase, *Biotech. Appl. Biochem.*, **12**, 331-335 (1990).
- 78) R. Green, J. Miller, W. Crosby, Enhancement of iron chelation by desferrioxamine entrapped in blood cell ghosts, *Blood*, **57**, 866-872 (1981).
- 79) D.A. Lewis, H.O. Alpar, Therapeutic possibilities of drugs encapsulated in erythrocytes, *Int. J. Pharm.*, **22**, 137-146 (1984).
- 80) J. Bird, R. Best, and D.A. Lewis, The encapsulation of insulin in erythrocytes, *J. Pharm. Pharmacol.*, **35**, 246-247 (1983).
- 81) G.M. Ihler, R.H. Glew, and F.W. Schnure, Enzyme loading of erythrocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 2663-2666 (1973).
- 82) H.O. Alpar, and D.A. Lewis, The prolongation of the survival times of mice implanted with TLX5 cells by treatment with methotrexate encapsulated in erythrocytes, *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 3081-3083 (1987).
- 83) S. Updike, and R. Wakamiya, Infusion of red blood cell-loaded asparaginase in monkey. Immunologic, metabolic, and toxicologic consequences, *J. Lab. Clin. Med.*, **10**, 679-691 (1983).
- 84) D.A. Tyrrell, and B.E. Ryman, The entrapment of therapeutic agents in resealed erythrocyte 'ghosts' and their fate *in vivo*, *Biochem. Soc. Tans.*, **4**, 677-680 (1976).
- 85) A. Morelli, U. Benatti, F. Salamino, B. Sparatore, M. Michetti, E. Mellono, S. Pontremoli, and A. DeFlora, *In vitro* correction of erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6

- PD) deficiency, *Arch. Biochem. Biophys.*, **197**, 543-550 (1979).
- 86) A. DeFlora, U. Benatti, L. Guida and E. Zocchi, Encapsulation of adriamycin in human erythrocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 7029-7033 (1986).
- 87) M. Tonetti, B. Astroff, W. Satterfield, A. DeFlora, U. Benatti, J.R. DeLoach, Construction and characterization of adriamycin-loaded canine red blood cells as a potential slow delivery system, *Biotech. Appl. Biochem.*, **12**, 621-629 (1990).
- 88) J.R. DeLoach, Comparative encapsulation of cytosine arabinoside monophosphate in human and canine erythrocytes with *in vitro* drug efflux, *J. Appl. Biochem.*, **4**, 533-541 (1982).
- 89) R. Green, J. Lamon, and D. Curran, Clinical trial of desferrioxamine entrapped in re cell ghosts, *Lancet*, 327-330 (1980).
- 90) J.R. DeLoach, K. Andrews, A. Naqi, Targeting of mycotoxins to reticuloendothelial system of mic with erythrocytes, *Biotech. Appl. Biochem.*, **10**, 154-160 (1988).