

HrSOD-폴리에틸렌 접합체의 아세트아미노펜 간독성에 미치는 영향

용철순[†] · 박경아 · 오두만^{*}

영남대학교 약학대학[†], 대구효성가톨릭대학교 약학대학^{*}
(1995년 7월 31일 접수)

The Effect of Human Recombinant Superoxide Dismutase Conjugated with Polyethylene Glycol on the Hepatic Toxicity of Acetaminophen

Chul Soon Yong[†], Kyong-Ah Park and Doo-Man Oh^{*}

[†]College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

^{*}College of Pharmacy, Taegu Hyosung Catholic University, Gyongsan, 713-702, Korea

(Received July 31, 1995)

The covalent conjugation of human recombinant superoxide dismutase (hrSOD) with trichloro-s-triazine activated polyethylene glycol (PEG) 5000 formed soluble conjugates with molecular weight of 92KD, which retained 90~98% of original activity with a markedly prolonged plasma half-life of enzyme activity. The effect of hrSOD-PEG conjugates on acetaminophen (ACP)-induced hepatotoxicity was tested in male rats which were pretreated with 3-methylcholanthrene. HrSOD-PEG conjugates inhibited the hepatotoxicity produced by ACP, on the other hand, native hrSOD had no protective effect. The above results indicated that oxygen radicals might participate in the mechanism of the ACP-induced hepatotoxicity and that polymer conjugated-protein drugs with prolonged half-lives could be employed as an effective therapeutic agent.

Keywords—Human recombinant superoxide dismutase, Polyethylene glycol, Hepatotoxicity, Acetaminophen, Oxygen radicals

유전자 재조합 방법과 hybridoma technique이 도입된 이래, 단백질 약물의 대량생산이 가능하게 되었으며, 생명공학의 발달로 이들의 생리학적 역할 및 치료제로서의 가능성에 대한 다양한 연구가 진행되고 있으며,¹⁾ 현재 치료목적에 이용되거나 임상시험 중에 있는 여러 단백질 약물이 있다.²⁾

단백질 약물은 강력하고 특이한 생리활성을 나타내지만, 단백질 분해 반응을 받기 쉬우며, 비록 효소에 의한 분해에 안정하다라도 장관벽을 통해 흡수되기 어려워 구투여가 불가능하다. 그러므로 효과적인 투여를 위해 경비,³⁾ 구강,⁴⁾ 질내⁵⁾ 및 직장⁶⁾ 투여 등의 다양한 경로가 검토되어 왔다. 그러나 이러한 투여경로는 흡수정도의 변화가 크고 생체이용률이 낮은 한계점을 갖고 있다. 결과적으로 현재까지 단백질 약물의 가장 일반적인 투여 경로는 피하, 근육, 및 정맥주사 등이다. 단백질 약물은 혈중에서 매우 불안정하며 단백질의 2차, 3차 구조가

제제시 변화를 받아 생리활성이 저하되고, 새로운 항원 결정기가 노출되어 면역반응을 일으킬 수도 있다. 이러한 단점을 극복하고 생체이용률을 높이기 위해 새로운 약물수송방법에 대한 연구가 진행중이다.⁷⁾

Superoxide dismutase(SOD)는 1969년에 McCord와 Fridovich⁸⁾에 의해 superoxide anion을 dismutation하는 기능이 처음 밝혀진 이후 산소를 이용하는 여러 종의 동물과 식물에서 분리, 정제되었다. 산소는 호흡을 하는 유기체에 절대적으로 필요한 기체로 그 중 1~2%는 univalent reduction으로 반응성이 크고, 세포독성이 큰 superoxide anion(O₂⁻·), hydrogen peroxide(H₂O₂), hydroxyl radical(OH·) 등의 산소 radical을 생성한다.⁹⁾ 산소 radical은 염증부위에서 활성화된 대식세포로부터 유리되어 신체에 침입한 병원균을 죽이는 생체방어기관의 중요한 역할¹⁰⁾을 갖기도 하지만, 유기체 자신의 세포와 조직에도 손상을 가하는 양면성을 갖는다.¹¹⁾ 이들

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

radical은 염증을 유발하는 여러 질환,¹²⁾ 방사선조사에 의한 질환,¹³⁾ 암,¹⁴⁾ 당뇨병,¹⁵⁾ 허혈/재관류,¹⁶⁾ 노화,¹⁷⁾ 동맥경화증¹⁸⁾ 등과 adriamycin,¹⁹⁾ paracetamol, ethanol, carbon tetrachloride^{20,21)} 등의 독성에도 관여하는 것으로 보고되고 있으므로, 이러한 질병의 치료제로 SOD를 사용하려는 연구가 활발히 이루어지고 있다.²²⁾ 그러나, 32KD의 분자량을 갖는 SOD는 정맥주사 후 대부분 신장으로 신속히 배설되어 생체반감기가 6분²³⁾ 내외로 짧아 그 자체를 치료제로 사용하는 데는 문제점이 있다. 이러한 단점을 극복하기 위해 liposome내에 SOD를 봉입한 지속성 방출제제화약 효소를 증대시키는 방법^{24,25)}과 homologous albumin,²⁶⁾ poly(styrene-co-maleic acid) butyl ester(SMA),²⁷⁾ 텍스트란, ficoll, pyran,²⁸⁾ PEG, polyvinylpyrrolidone 등의 다양한 고분자를 공유결합시키는 방법이 연구되고 있다.²⁹⁾

본 실험에서는 생체적합성이 크고, 항원성이 없으며, 수소결합한 물분자 때문에 친수성이 커 접합된 단백질의 수용성을 증가시키고, 전하를 띄지 않으며, 유동적이고, 다양한 분자량을 쉽게 구할 수 있는 PEG³⁰⁾를 이용하여 hrSOD-PEG 접합체를 합성하였다. 합성한 hrSOD-PEG 접합체는 원래의 hrSOD에 비해 분자량이 증가하여 신사구체 여과량이 감소하고, 생체반감기를 증가시켜 치료효과를 증가시킬 것으로 기대되었다. 한편, acetaminophen(ACP)의 간독성 기전은 대사과정 중에 생성된 산소 radical이 관여한다는 보고가 있고,³¹⁻³⁴⁾ liposome 내에 봉입한 SOD가 ACP-유발 간독성을 억제한다는 보고가 있다.^{24,26)} 따라서 본 실험에서는 ACP로 유발된 렫트의 간독성에 hrSOD-PEG 접합체가 미치는 영향을 원래의 hrSOD와 비교함으로써 간독성에 대한 소견을 얻고자 하였다.

실험방법

시약 및 기기

LG화학 중앙연구소에서 제공받은 hrSOD와 Sigma에서 구입한 trichloro-s-triazine activated PEG5000⁴³⁾을 사용하였다. Sephadex G-200, sodium dodecylsulfate(SDS), SDS molecular weight markers 200kit(carbonic anhydrase 29KD, ovalbumin 45KD, bovine plasma albumin 66KD, phosphorylase b 97.4KD, β -galactosidase 116KD, myosin 205KD), dialysis tubing, 3-methylcholanthrene, corn oil, xanthine, xanthine oxidase

(EC 1.1.3.22) from buttermilk(grade I No.X-1875), trinitrobenzenesulfonic acid(TNBS), bovine serum albumin, sodium borate, glycine, Tris(hydroxymethyl)aminomethane, acrylamide, N,N'-methylene-bis-acrylamide, ammonium persulfate, TEMED, nitrobluetetrazolium(NBT), dithiothreitol(DTT), 2-mercaptoethanol 등은 Sigma사(St.Louis, MO., USA)에서 구입하여 사용하였고, dimethylsulfoxide(DMSO)는 YAKURI Pure Chemicals Co. Ltd.(Japan) 제품을 사용하였다. 영동제약으로부터 GOT, GPT kit, 일약약품으로부터 acetaminophen, Bio-Rad에서 Coomassie brilliant blue, Merck사로부터 K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA)를 구입하였고, filter membrane은 Alltech에서 구입한 nylon 66(pore size 0.2 μ m) 제품을 사용하였으며, microconcentrators로 CentriconTM-10(10,000 MW cutoff)을 Amicon에서 구입하였다. Thomas Scientific사의 polyethylene tube No.50(Thomas No. 9565-S22, S24)을 동물실험에서 cannula로 사용하였다. 이외의 모든 시약은 특급 혹은 일등품을 사용하고, 실험에 사용한 모든 완충액은 증류수를 사용하여 만들었다.

실험에 사용한 주요기기는 fraction collector (Bio-Rad model 2110, USA), spectrophotometer (Shimadzu UV-1201, Japan), electrophoresis apparatus (Mighty small SE250, Hoeffer, USA), freeze dryer (LABCONCO, LYPH-LOCK 7530, USA), high speed centrifuge (Hitachi koki Co. Ltd., Japan), power supplier (KMC-101, 비전과학) 등이다

동물 및 처치

본 대학 동물사육장에서 일정한 조건으로 사육한 건강한 200 g 내외의 웅성 Sprague-Dawley 랫트를 사용하였다. HrSOD 생체반감기 측정에 사용한 랫트는 실험 전 24시간동안 물만 주고 금식시키고, ACP 독성 실험에 사용한 랫트는 3-methylcholanthrene을 복강 주사한 이후부터 물만 주고 금식시켰다.

HrSOD-PEG 접합체의 합성

HrSOD 45.5 mg를 0.1 M borate buffer(pH 9.8) 8 ml에 가하여 완전히 용해시킨후, 활성화된 PEG 5000 142.2 mg(20 molar excess)을 서서히 가하면서 교반하였다. 4°C에서 2시간 교반하여 hrSOD-PEG 접합체를 얻었다(Fig. 1). 위의 반응액을 CentriconTM-10으로 4°C에서 1시간 30분 동안 3000 g의 속도

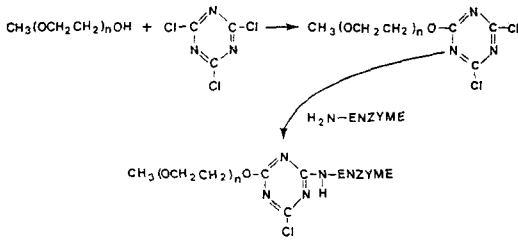


Figure 1—Trichloro-s-triazine activation of monomethoxy polyethylene glycol and coupling to an enzyme.

로 원심분리하여 미반응의 PEG5000을 제거하고 농축하였다. 이 농축액을 0.05 M potassium phosphate buffer(pH 6.8)로 미리 평형시켜 둔 Sephadex G-200 column(1.5 cm×100 cm)에 loading 하여 동일한 완충액으로 분당 0.2 ml의 유속으로 유출시키고 1.5 ml씩 분획시켰다. 분획기에 수집한 분획을 260 nm에서 흡광도를 측정하였다. 분획기로 수집한 접합체를 피크별로 모아 4°C에서 24시간 동안 2번 정도 증류수를 바꾸어 주면서 투석하여 염을 제거한 후, 냉동건조하여 -20°C에서 보관하였다. SDS-PAGE³⁵⁾를 이용해 hrSOD-PEG 접합체를 확인하였다. 8% SDS-polyacrylamide gel을 사용하였으며, 전압은 50volt로 시작하여 tracking dye(0.001% bromphenol blue)가 stacking gel을 통과하는 순간부터 100volt로 하여 separating gel을 통과시켰다. 전기영동 후 gel은 0.1% Coomassie brilliant blue R-250로 4시간 이상 염색시킨 후, 증류수로 세척하여 30% methanol, 10% acetic acid로 이루어진 탈색용액으로 탈색시켰다. Standard protein으로는 ovalbumin(45KD), bovine plasma albumin(66KD), phosphorylase b(97,4KD), β -galactosidase(116KD)를 사용하였다.

효소활성 측정

Beauchamp 등의 방법³⁶⁾을 다소 변화시켜 실시하였다. Xanthine(1×10^{-4} M), NBT(2.5×10^{-5} M), EDTA(10^{-4} M), Na_2CO_3 (0.05 M)의 혼액에 산소를 포화시키고, pH 10.2로 조절한 assay solution을 만들었다. Xanthine oxidase 현탁액은 아래 조건에서 10 μ l가 분당 0.025의 흡광도 변화를 일으키는 농도로 희석하였다.

3 ml cuvette에 위의 assay solution 2.5 ml를 넣고, xanthine oxidase 10 μ l를 가한 후 교반하면서 30초마다 흡광도 변화를 측정하였다. 4분간 실시한 후, plotting하여 기울기에 해당하는 분당 흡광도 변화가

0.025가 되도록 xanthine oxidase 액을 0.05 M potassium phosphate buffer(pH 7.8)로 적절하게 희석하여 이후 실험에 사용하였다. 활성의 감소를 고려하여 xanthine oxidase 액은 실험 시작 전에 희석하였다. Assay solution 2.5 ml를 넣고 0.05 M potassium phosphate buffer(pH 7.8)로 적절하게 희석한 hrSOD 용액 10 μ l를 가한 후, 30초간 교반하여 섞은 다음, xanthine oxidase 10 μ l를 가하여 반응을 시작하였다. 이후 4 분간 흡광도 변화를 30 초마다 측정하여 plotting하고 기울기로부터 분당 흡광도 변화 속도를 계산하였다. HrSOD 용액을 가하지 않고, xanthine oxidase 만을 가한 상태의 흡광도 변화(0.025)를 100%로 두고, hrSOD 용액을 가한 후, 측정된 흡광도의 감소량을 % inhibition 양으로 사용하였다.

$$\% \text{Inhibition} = \frac{(0.025 - \text{absorbance})}{0.025} \times 100$$

다양한 농도의 hrSOD 용액 10 μ l를 가한 후, 흡광도 변화를 측정하여, % inhibition대 hrSOD 양으로 plotting하였다. 직선상이 되는 범위를 결정하여, 측정하는 모든 hrSOD 용액이 이 범위에 포함되도록 적절히 희석하여 활성을 측정하였다. 동일한 조건에서 50% inhibition이 일어나는 hrSOD의 양을 1 unit로 정하였다.

TNBS 방법

HrSOD에 결합된 PEG의 수를 확인하기 위해 Ha-beeb³⁷⁾의 방법을 사용하였다. 증류수에 hrSOD를 녹인 시액(0.6~1.0 mg/ml) 1 ml를 취하여 4% NaHCO_3 (pH 8.5) 1 ml와 0.1% TNBS용액 1 ml를 가하여 충분히 교반한 후, 40°C의 항온조에 2시간 방치하였다. 10% SDS 용액 1 ml를 가하고, 1N HCl 0.5 ml를 가하여 교반하여 반응을 종료시킨 후 335 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 대 hrSOD의 단백질 농도를 plotting하여 standard curve를 작성하였다. 동일 조건에서 hrSOD-PEG 접합체를 실험하여 흡광도를 측정하고, hrSOD의 단백질 농도에 대하여 standard curve에서 기대되는 흡광도 수치보다 감소한 정도로부터 hrSOD의 lysine 잔기 중에서 PEG로 수식되어 TNBS와 반응하지 않는 lysine의 수를 환산하였다.

$$\% \text{ of hrSOD modification} = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

A = hrSOD 농도에 따라 기대되는 흡광도

B = 접합체의 실제 흡광도

단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 Biuret과 Lowry법³⁸⁾을 응용한 Ohnishi 등의 방법³⁹⁾으로 제조한 kit로 측정하였다.

Acetaminophen-유발 간독성 억제시험

랫트에 3-methylcholanthrene 25 mg/kg을 mineral oil (12.5 mg/ml)에 녹여 복강주사하여 cytochrome P450 의존성 mixed function oxidase를 유도하였다.⁴⁰⁾ 18시간후에 DMSO 1 ml/kg만을 복강주사한 group 1과, ACP 500 mg/kg을 DMSO(500 mg/ml)에 녹여 주사한 group 2, ACP (500 mg/kg)와 함께 hrSOD(60 mg/kg)를 투여한 group 3, ACP (500 mg/kg)와 hrSOD-PEG 접합체(group 3에 투여한 hrSOD와 동일한 당량)를 투여한 group 4로 두었다. ACP는 복강으로 주사하고, hrSOD 및 hrSOD-PEG 접합체는 생리식염수에 녹여 membrane filter (pore size 0.2 μ m)로 여과한 후, 대퇴부 정맥에 삽입한 cannula를 통해 주사하였다. 6 시간 후에 cardiac puncture로 혈액을 취하여 상온에서 10분간 응고시킨 후, 3000 rpm으로 5분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. Reitman-Frankel법⁴¹⁾으로 혈청중의 alanine aminotransferase (GPT), aspartate aminotransferase(GOT) 수치를 측정하여 간괴사의 지표로 사용하였다. 통계처리는 Student's t-test를 이용하였다.

간조직 검사

광학현미경적 조직관찰은 각 group을 전술한 방법으로 처리한 후 간을 적출하여 10% buffered neutral formaline에 1일간 고정시킨 후 수세하고 60%에서 100%까지의 alcohol을 사용하여 순차적으로 탈수하였으며 paraffin에 포매(包埋)하여 간 조직마다 block을 만든다음 4 μ m의 두께로 조직절편을 만들고 hematoxylin-eosin⁴²⁾으로 염색한 후 관찰하였다.

실험결과

HrSOD-PEG 접합체의 분리 및 정제

합성한 hrSOD-PEG 접합체 용액을 CentriconTM-10 으로 원심분리하여 미반응의 PEG5000을 제거하여 농축하고, 이 농축액을 Sephadex G-200으로 gel filtration한 결과 세개의 peak(A, B, C)로 분리되었으며, 각 분획의 SOD 활성을 Fig. 2에 표시하였다. 이후 접합체의 활성시험에서는 peak A에 해당하는 분획들

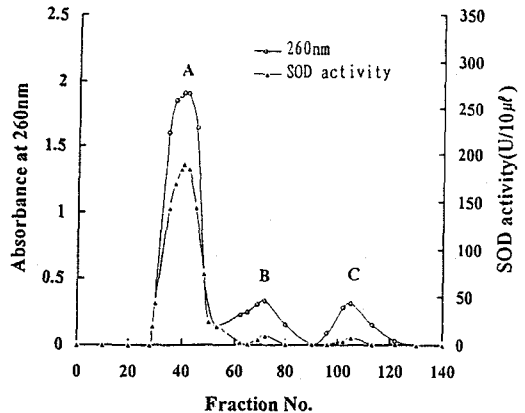


Figure 2—Elution profile of hrSOD-PEG conjugates on Sephadex G-200 column. Column: 1.5×100 cm, flow rate: 0.2 ml/min, elution buffer: 0.05 M potassium phosphate buffer(pH6.8).

을 모아 하루동안 증류수에 투석하여 염을 제거한 후, 동결건조하여 사용하였다.

SDS-PAGE

Polyacrylamide gel electrophoresis에 의해 합성된 접합체를 확인하였다. Fig. 2에 표시된 각 분획들을 모아 8% separating gel에서 전기영동하여 다음과 같은 결과를 얻었다. Peak A와 peak B의 분획의 band는 실지의 분자량보다 높은 위치에서 넓게 퍼지고 끌린 band로 나타났으며 정확한 분자량을 예측하기 어려웠다. 이는 단백질과 결합한 PEG chain이 polyacrylamide matrix와 gel 상에서 뒤엉켜 이동이 지연되는 것으로 사료된다.⁴³⁾ Peak C의 분획은 단일한 band를 나타냈으며 분자량이 44KD 이하인 것으로 나타났다. 각 분획의 정확한 분자량을 얻기 위해 TNBS법을 실시하였다.

In vitro에서의 효소활성

10 μ l에 1.66×10^{-8} g(단백질 함량)의 hrSOD가 포함된 용액에서 9.1×10^{-6} g(단백질 함량)까지 효소 활성을 측정하여 plotting하였다(Fig. 3). 그래프 상에서 직선의 비례 관계($r=0.9908$)가 성립하는 범위(18~60% inhibition)에 측정하려는 hrSOD가 해당하도록 적절히 희석하여 효소활성을 측정하였다. Fig. 2의 peak A, B에 해당하는 분획들을 모아서 활성을 측정한 결과, 원래의 단백질 약물에 비해 90~98%의 활성을 유지하였고, peak C는 95~100%의 활성을 유지하였다.

접합체의 분자량 결정

TNBS방법에 의한 hrSOD(0.6~1.0 mg/ml)의

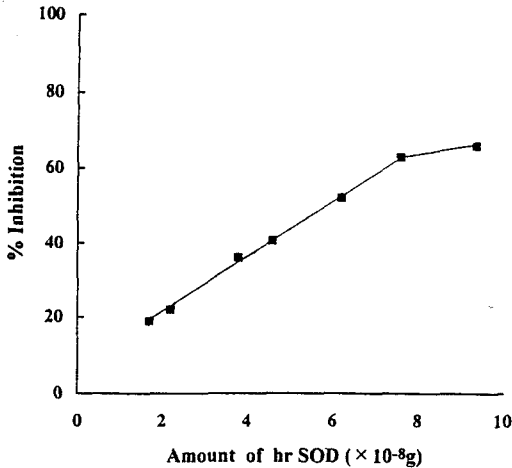


Figure 3—Standard curve for hrSOD enzyme activity

standard curve를 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 2의 peak A에 해당하는 분획은 hrSOD의 lysine 잔기 중 60%가 PEG5000으로 수식된 분자량 92KD의 접합체였고, peak B는 28%가 수식된 분자량 60KD의 접합체였다. Peak C는 반응하지 않은 hrSOD이었다 (Table I).

Acetaminophen-유발 간독성 억제작용

Table II에는 3-methylcholanthrene으로 cytochrome P450 의존성 mixed function oxidase를 유도하고, 18시간 후에 500 mg/kg의 acetaminophen을 복강주사하고 동시에 hrSOD 60 mg/kg, hrSOD-PEG 접합체(hrSOD와 동일한 당량)를 정맥주사하고, 6시간 후에 측정된 GOT, GPT 수치를 나타내었다. ACP를 투여한 group 2의 GOT 수치인 509 ± 98 와 GPT 수치인 117 ± 28 에 비해 hrSOD-PEG 접합체를 주사한 group 4에서는 353 ± 35 의 GOT수치($p < 0.05$)와 42 ± 8 의 GPT수치($p < 0.01$)를 나타내어 유의성 있는 간독성 억제효과를 나타내었다. HrSOD를 주사한 group 3의 경우 498 ± 100 의 GOT 수치와 100 ± 26 의

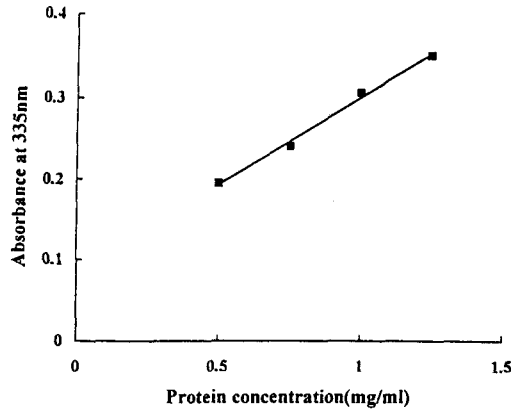


Figure 4—Standard curve for TNBS method

GPT 수치를 나타내어 group 2의 간독성 유발군과 비교하여 유의성 있는 억제효과를 나타내지 않았다.

간조직 검사

사진에서 볼 수 있는 것처럼 대조군인 group 1의 간조직은(Fig. 5, A) 실질세포, 중심정맥 및 portal tract가 잘 보존되어 있음을 볼 수 있었다. 그러나 ACP(500 mg/kg)만을 투여한 group 2의 간조직(Fig. 5, B)은 중심정맥주위에 울혈을 동반한 괴사가 관찰되었으며 세포경계가 명확하지 않았고, ACP (500 mg/kg)와 함께 hrSOD(60 mg/kg)를 투여하는 group 3의 경우도 괴사 및 울혈현상이 관찰되었다(Fig. 5, C). 그러나 hrSOD-PEG(60 mg/kg)와 ACP(500 mg/kg)를 동시에 투여한 group 4의 경우는 ACP만을 투여한 실험군에서 볼 수 있는 괴사 및 울혈현상을 거의 관찰할 수 없었다(Fig. 5, D).

고찰 및 결론

치료제로 사용되는 단백질이나 효소의 표면을 독성이 없고, 면역반응을 일으키지 않으며 생체적합성을 갖는 덱스트란이나 폴리에틸렌글리콜(PEG)^{44,45}과 같

Table I—Properties of hrSOD-PEG Conjugates

Fraction ^a	Degree of modification ^b (%)	Approximate MW(KD)	Remaining enzymatic	Half-life ^c
A	60	92	90-98	1.4hr(α) 1.54hr(β)
B	28	60	90-98	not determined
C	0	32	95-100	5min

^aRefer to Fig.2

^bEstimation of conjugates molecular weight by TNBS method

^cDetermined by RSTRIP⁵²⁾

Table II—Effect of hrSOD, hrSOD-PEG Conjugates on ACP-induced Elevation of Serum Aminotransferases

Group	Treatment*	GOT(U/L)**	GPT(U/L)**
1	Control	138±21 ^a	46±9 ^b
2	ACP	509±98 ^c	117±28 ^d
3	ACP+hrSOD	498±100 ^e	100±26 ^f
4	ACP+hrSOD-PEG conjugate	353±35	42±8 ^g

*ACP was 500mg/kg body weight i.p.; hrSOD 60mg/kg body weight, equimolecular amount of rSOD-PEG conjugate i.v.

**Determined at 6 hr after ACP treatment

Results are means standard deviations for four rats.

^ap<0.001 versus Group 2, Group 3, Group 4

^bp<0.05 versus Group 2, p<0.01 versus Group 3

^cp<0.05 versus Group 4

^dp<0.01 versus Group 4

^ep<0.05 versus Group 4

^fp<0.01 versus Group 4

Student's t-test was used to compare means between groups of rats.

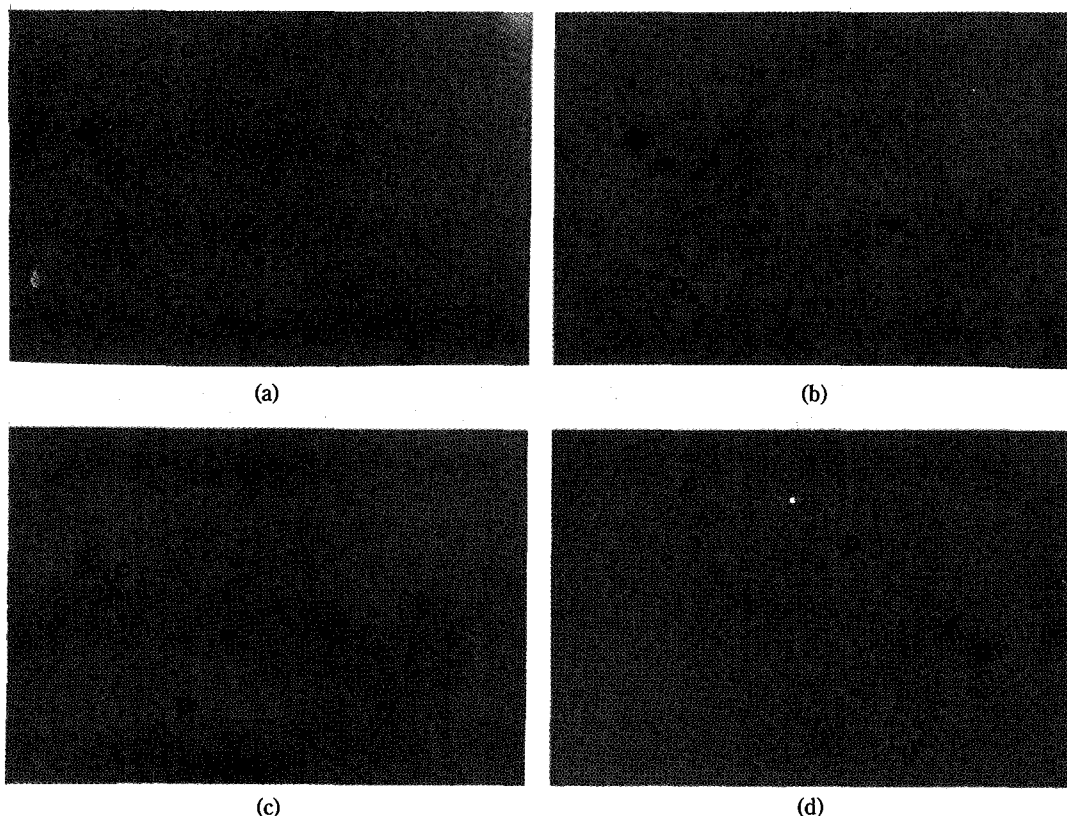


Figure 5—Photomicrographs of hepatic tissue in rat (Hematoxylin and eosin stain, ×100).

A: Liver section from control rats in group 1. The liver structure is essentially normal. B: Liver section from rats in group 2, treated with acetaminophen (500 mg/kg). Massive centrilobular necrosis with congestion is evident.

C: Liver section from rats in group 3, treated with hrSOD and acetaminophen (500 mg/kg). The structure of liver tissue shows centrilobular necrosis with congestion.

D: Liver section from rats in group 4, treated with hrSOD-PEG conjugates (60 mg/kg) and acetaminophen (500 mg/kg). The structure of liver tissue shows no centrilobular necrosis with congestion.

Key : C: central vein, P: portal tract.

은 중합체와 공유결합시켜 수식하는 방법은 단백질 약물의 여러가지 단점을 극복하기 위해 이용되는 방법중의 하나이다.^{46,47)} 이렇게 변화를 받은 접합체는 분자량이 증가하여 신장으로의 소실이 감소하여 생체반감기가 현저히 증가하고, 접합된 고분자 물질이 단백질 표면에 노출된 항원결정기를 둘러싸서 단백질 자체의 면역유발성을 감소시키며,⁴⁸⁾ 일반적으로 *in vivo* 및 *in vitro*에서 단백질분해효소에 의한 불활성이 감소하여⁴⁹⁾ 안정성이 증가하고⁵⁰⁾ 독성도 감소하여 치료효능을 증진시킬 수 있다.

PEG는 표면활성을 갖는 분자로, 세포융합을 유도하기 위해 광범위하게 사용된다.⁵¹⁾ PEG는 소수성 및 친수성 특성을 갖고 있어 수용액 및 소수성 환경 모두에서 활성을 나타낼 수 있으며 이러한 특성때문에 세포막과 작용할 수 있다. 그러므로 PEG 접합체를 합성하는 경우 일반적으로 세포막을 투과할 수 없는 효소의 세포막 결합과 세포내 투과를 증진시킬 수 있다.²⁸⁾ PEG의 수산기와 SOD의 lysine 잔기를 cyanuric chloride와 같은 bifunctional reagent를 사용하여 결합시킬 수 있다. PEG의 불활성은 단백질 약물의 면역성을 감소시키며, 단백질분해효소에 의한 가수분해를 억제할 수 있다.⁵⁰⁾ 또한 수용액에서의 효소의 안정성이 종종 크게 증가한다.

HrSOD에 PEG를 공유결합하여 얻은 접합체를 TNBS법으로 측정하였을 때, 이 접합체는 hrSOD의 lysine 잔기 중 60%에 PEG가 결합한 분자량 92KD의 접합체로 나타났다. 또한 HrSOD-PEG 접합체는 원래의 hrSOD 활성의 90~98%를 유지하고 있어 접합체 합성 과정 중에 활성의 소실이 거의 없었다. 랫트에 정맥주사하여 생체반감기를 측정하였을 때, 원래의 hrSOD가 5분인데 비하여 hrSOD-PEG 접합체는 α 상에서 1.4시간, β 상에서 15.4시간의 현저히 증가된 생체반감기를 갖는 2 compartment model을 나타내었다.⁵²⁾

Superoxide ions은 호기성 유기체의 세포내에서 많은 대사반응의 부산물로 생성되며,⁵³⁾ 이러한 독성이 강한 부산물이 효소에 의해 독성이 감소되어 활성이 약한 hydrogen peroxide로 전환되고 모든 호기성 유기체의 cytoplasm과 미토콘드리아내에 존재하는 활성이 매우 높은 SOD에 의해 분자상태의 산소로 변하게 된다. 그러므로 SOD는 free superoxide radical을 비정상적으로 과도하게 생성하는 다양한 질병의 치료에 새로운 항염증제로 이용될 수 있다.⁵³⁻⁵⁵⁾ SOD는 현재 Orgotein이라는 상품명으로 시판되고 있으며 여러 염증성 질환⁵⁵⁻⁵⁷⁾

과 심장 허혈^{58,59)}에 사용되고 있다.

접합체의 혈장소실 반감기는 충분히 길어 *in vivo*에서 SOD의 superoxide ions에 대한 영향을 관찰할 수 있다. 즉, ACP의 간독성에는 superoxide anion이 관여하는 것으로 사료되고 생체반감기가 길고 면역유발성이 낮은 SOD를 사용할 경우 ACP로 유발된 간독성에 대한 억제 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

3-methylcholanthrene(25 mg/kg)으로 전처리하고, 18시간 후에 ACP(500 mg/kg)를 투여하여 간독성을 유발한 랫트에서, ACP의 복강투여와 동시에 hrSOD(60 mg/kg), hrSOD-PEG 접합체(equimolecular amount of hrSOD)를 정맥주사할 때, hrSOD 투여군에서는 간독성 억제 효과가 없는 반면, hrSOD-PEG 접합체를 투여한 군에서는 유의성 있는 간독성 억제 효과를 얻었다. 또한 간조직검사에서도 hrSOD-PEG 접합체는 hrSOD에 비해 현저한 간독성 억제효과를 나타내었다. 이상 실험 결과로 보아, ACP-유발 간독성 기전에는 산소 radical이 관여하는 것으로 추측되며, hrSOD에 PEG를 공유결합시킨 hrSOD-PEG 접합체는 원래의 hrSOD에 비해 생체반감기가 현저히 증가하여 결과적으로 치료효과를 증가시킬 수 있었다. 이는 hrSOD-PEG 접합체의 생체반감기 증가로 인해 혈중에 hrSOD가 장시간 일정 농도 이상을 유지하여 활성이 현저히 증가하였고, 또한 SOD의 반복 주사시 혈중에서 처음에 비해 더 빠르게 제거되었으나, SOD-PEG 접합체의 반복 정맥주사시에는 혈중에서 제거되는 속도에 변화가 없다는 보고⁵¹⁾를 통해 접합체가 원래의 단백질 약물에 비해 면역학적으로도 더 안정한 제제가 밝혀졌다. 또한 동결건조시킨 접합체는 활성의 손실없이 reconstitution시킬 수 있으므로 사용전 오랫동안 보존하기 위해 적합한 제형이다.

본 연구 결과를 바탕으로 최근에 대량 생산이 가능한 단백질 약물과 다양한 고분자 물질을 접합시킨 단백질-고분자 접합체의 합성으로 원래의 단백질 약물의 단점들을 극복하고, 치료효능 증대를 위한 지속적인 연구가 기대되며, 또한 superoxide anion이 관련된 다른 여러 질병들을 model로 접합체의 치료효과적인 면과 안정성 문제가 지속적으로 연구되어야 할 과제로 사료된다.

감사의 말씀

이 논문은 1994학년도 영남대학교 학술연구조성비에 의해 수행되었다.

문헌

- 1) S.S. Davis, Advanced delivery systems for peptides and proteins—pharmaceutical considerations; In *Delivery systems for Peptide Drugs*. S.S. Davis, L. Illum and E. Tomlinson(Eds.), Plenum, New York, pp.1-21 (1986).
- 2) C. Holden, Drugs and biotechnology, *Science*, **248**, 964 (1990).
- 3) W. Petri, R. Seidel and J. Sandow, Pharmaceutical approach to long-term therapy with peptides, Int. Cong. *Series-Excerpta Medica*, **656**, 63-76 (1984).
- 4) R. Anders, H.P. Merkle, W. Schurr and R. Ziegler, Buccal absorption of protirelin: An effective way to stimulate thyrotropin and prolactin, *J. Pharm. Sci.*, **72**, 1481-1483 (1983).
- 5) H. Okado, I. Zamazaki, Y. Ogawa, S. Hirai, T. Yashiki and H. Mima, Vaginal absorption of a potent luteinizing hormone-releasing hormone analog(Leuprolide) in rats I: Absorption by various routes and absorption enhancement, *J. Pharm. Sci.*, **71**, 1367-1371 (1982).
- 6) T. Nishihata, Y. Okamura, H. Inagaki, M. Sudho, A. Kamada, T. Yagi, R. Kawamori and M. Shichiri, Trials of rectal insulin suppositories in healthy humans, Int. *J. Pharmacol.*, **34**, 157-161 (1986).
- 7) H.L.L. Vincent(Ed.), *Peptide and protein drug delivery*, Marcel Dekker, New York, USA, 1991.
- 8) J.M. McCord and I. Fridovich, Superoxide dismutase: An enzymatic function for erythrocyte(hemocuprein), *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049-6055(1969).
- 9) R.F.D. Mastro, An approach to free radicals in medicine and biology, *Acta Physiol. Scand.*, **492**, 153-168 (1980).
- 10) B.M. Babior, R.S. Kipnes and J.T. Curnutte, Biological defense mechanisms, *J. Clin. Inv.*, **52**, 741-744 (1973).
- 11) P.A. Ward, J.S. Warren and K.J. Johnson, Oxygen radicals, inflammation, and tissue injury, *Free Rad. Biol. Med.*, **5**, 403-408 (1988).
- 12) J.M. McCord, K. Wong, S.H. Stokes, W. Petrone and D. English, Superoxide and inflammatory activity of superoxide dismutase, *Acta Physiol. Scand.*, **492**(Suppl), 25-30 (1980).
- 13) W.S. Lin, F. Wong and R. Anderson, Role of superoxide in radiation-killing of *Escherichia Coli* and in thymine release from thymidine, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **147**, 778-786 (1987).
- 14) P.A. Cerutti, Prooxidant states and tumor promotion, *Science*, **227**, 375-381 (1985).
- 15) L.W. Oberley, Free radicals and diabetes, *Free Rad. Biol. Med.*, **5**, 113-124 (1988).
- 16) D.N. Granger, G. Rutili and J.M. McCord, Superoxide radicals in feline intestinal ischemia, *Gastroenterology*, **81**, 22-29 (1981).
- 17) A.E. Taylor, S. Matalon and P. Ward (Eds.), *Physiology of oxygen radicals*, American Physiological Society, pp.251-285 (1986).
- 18) B. Hennig and C.K. Chow, Lipid peroxidation and endothelial cell injury: Implications in atherosclerosis, *Free Rad. Biol. Med.*, **4**, 99-106 (1988).
- 19) J. Goodman and P. Hochstein, Generation of free radicals and lipid peroxidation by redox cycling of adriamycin and daunomycin, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **77**, 797-803 (1977).
- 20) R.O. Recknagel, E.A. Glende and A.M. Hruszkewycz, Chemical mechanisms in carbon tetrachloride toxicity: In *Free radicals in biology*, Vol 3, W.A. Pryor(Ed.), Academic Press, New York, pp.97-132 (1977).
- 21) H. Kappus and H. Sies, Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: Redox cycling and lipid peroxidation, *Experientia*, **37**, 1233-1241 (1981).
- 22) R.A. Greenwald, Superoxide dismutase and catalase as therapeutic agents for human diseases, *Free Rad. Biol. Med.*, **8**, 201-209 (1990).
- 23) A. Bayati, O. Kallskog, B. Odland and M. Wolgast, Plasma elimination kinetics and renal handling of copper/zinc superoxide dismutase in the rat, *Acta Physiol. Scand.*, **134**, 65-74 (1988).
- 24) D. Nakae, K. Yamamoto, H. Yoshiji, T. Kinugasa, H. Maruyama, J.L. Farber and Y. Konishi, Liposome-encapsulated superoxide dismutase prevents liver necrosis induced by acetaminophen, *Amer. J. Pathol.*, **136**, 787-95 (1990).
- 25) D. Nakae, H. Yoshiji, K. Yamamoto, H. Maruyama, T. Kinugasa, Y. Takashima, A. Denda and Y. Konishi, Influence of timing of administration of liposome-encapsulated superoxide dismutase on its prevention of acetaminophen-induced liver cell necrosis in rats, *Acta. Pathol. Jpn.*, **40**, 568-73 (1990).
- 26) K. Wang, L.G. Cleland and M.J. Prozansky,

- Enhanced anti-inflammatory effect and reduced immunogenicity of bovine liver superoxide dismutase by conjugation with homologous albumin, *Agents Actions*, **10**, 231-239 (1980).
- 27) T. Ogino, M. Inoue, Y. Ando, M. Awai, H. Maeda and Y. Morino, Chemical modification of superoxide dismutase. Extension of plasma half life of the enzyme through its reversible binding to the circulating albumin, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **32**, 153-159 (1988).
- 28) T. Oda, T. Akaike, T. Hamamoto, F. Suzuki, T. Hirano and H. Maeda, Oxygen radicals in influenza-induced pathogenesis and treatment with pyran polymer-conjugated SOD, *Science*, **244**, 974-976 (1989).
- 29) C.S. Yong and Y.T. Sohn, Conjugation of protein and peptide drugs with hydrophilic polymers and their applications, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **23**, 187-206 (1993).
- 30) M.J. Schick(Ed.), *Nonionic Surfactants*, Marcel Dekker, New York, pp.794-821 (1967).
- 31) R.J. Gerson, A. Casini, D. Gilfor, A. Serroni and J.L. Farber, Oxygen mediated cell injury in the killing of cultured hepatocytes by acetaminophen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **126**, 1129-1137 (1985).
- 32) M.E. Kyle, S. Miccadei, D. Nakae and J.L. Farber, Superoxide dismutase and catalase protect cultured hepatocytes from the cytotoxicity of acetaminophen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **147**, 889-896 (1987).
- 33) M.E. Kyle, D. Nakae, A. Serroni and J.L. Farber, 1,3-(2-Chloroethyl)-1-nitrosourea potentiates the toxicity of acetaminophen both in the phenobarbital-induced rat and in hepatocytes cultured from such animals, *Mol. Pharmacol.*, **34**, 584-589 (1988).
- 34) J.L. Farber, T.B. Leonard, M.E. Kyle, D. Nakae, A. Serroni and S.A. Rogers, Peroxidation-dependent and peroxidation-independent mechanisms by which acetaminophen kills cultured rat hepatocytes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **267**, 640-650 (1988).
- 35) K. Webwe and M. Osborn, The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406(1969).
- 36) C. Beauchamp and I. Fridovich, Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, *Anal. Biochem.*, **44**, 276-287 (1971).
- 37) A.F.S.A. Habeeb, Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid, *Anal. Biochem.*, **14**, 328-336 (1966).
- 38) H.T. Tobin, T. Staehelin and J. Gordon, Electrophoretic transfer of the assembly of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 4350-4354 (1979).
- 39) S.T. Ohnishi and J.K. Barr, A simplified method of quantitating proteins using the Biuret and phenol reagents, *Anal. Biochem.*, **86**, 193-200(1978).
- 40) R.J. Gerson, A. Casini, D. Gilfor, A. Serroni and J.L. Farber, Oxygen-mediated cell injury in the killing of cultured hepatocytes by acetaminophen., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **126**, 1129-1137 (1985).
- 41) S. Reitman and S. Frankel, A calorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases, *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**, 56-63 (1957).
- 42) L.P. Ambrogi, *Manual of histologic and special staining techniques*, Armed Forces Institute of Pathology, Washington D.C., (1975).
- 43) P. McGoff, A.C. Baziotis and R. Maskiewicz, Analysis of polyethylene glycol modified superoxide dismutase by chromatographic, electrophoretic, light scattering, chemical and enzymatic methods, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 3079-3091 (1988).
- 44) J.S. Holcenberg, Enzyme therapy: Problems and solutions, *Annu. Rev. Biochem.*, **51**, 795-812 (1982).
- 45) C.O. Bouchamp, S.L. Gonias, D.P. Meenapace and S.V. Izzo, A new procedure for the synthesis of polyethylene glycol-protein adducts: Effects on function, receptor recognition, and clearance of superoxide dismutase, lactoferrin, and alpha1-macroglobulin, *Anal. Biochem.*, **131**, 25-33 (1985).
- 46) S. Mumtaz and B.K. Bachhawat, Conjugation of proteins and enzymes with hydrophilic polymers and their applications, *Ind. J. Biochem. Biophys.*, **28**, 346-351 (1991).
- 47) M.L. Nucci, R. Shorr and A. Abuchowski, The therapeutic value of poly(ethylene glycol)-modified proteins, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **6**, 133-151 (1991).
- 48) A. Abuchowski, G.M. Kazo, C.R. Verhoest,

- T. Van Es, D. Kafkewitz, M.L. Nucci, A.T. Viau and F.F. Davis, Cancer therapy with chemically modified enzymes I: Antitumor properties of polyethylene glycol-modified asparaginase conjugates, *Cancer Biochem. Biophys.*, **7**, 175-186 (1984).
- 49) M.S. Hershfield, R.H. Buckely, M.L. Greenberg, A.L. Melton, R. Schiff, C. Hatem, J. Kurtzberg, M.L. Markert, R.H. Kobayashi, A.L. Kobayashi, and A. Abuchowski, Treatment of adenosine deaminase deficiency with polyethylene glycol-modified adenosine deaminase, *N. Eng. J. Med.*, **316**, 589-596 (1987).
- 50) A. Abuchowski, T. Van Es, N.C. Palczuk and F.F. Davis, Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol, *J. Biol. Chem.*, **252**, 3578-3581 (1977).
- 51) J.W. Wojcieszyn, R.A. Schlegal, K. Lumley-Sapanski and K.A. Jacobson, Studies on the mechanism of polyethylene glycol-mediated cell fusion using fluorescent membrane and cytoplasmic probes, *J. Cell. Biol.*, **96**, 151-159 (1983).
- 52) C.S. Yong, D.H. Nam and K. Huh, Comparison of Cu(II)-DIPS and human recombinant superoxide dismutase, an antioxidant, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **25**, 1-8(1995).
- 53) I. Fridovich, The biology of oxygen radicals, *Science*, **201**, 875-880 (1978).
- 54) M. Rister, K. Bauermeister, U. Gravert and E. Glatke, *Lancet*, **1**, 1094 (1978).
- 55) K. Lund-Olesen and K.B. Menander, Orgotein: A new antiinflammatory metalloprotein drug: Preliminary evaluation of clinical efficacy and safety in degenerative joint diseases, *Curr. Ther. Res.*, **7**, 706-717 (1974).
- 56) K.M. Goebel and V. Storck, Effect of intra-articular orgotein versus a corticosteroid on reumatoid arthritis of the knee, *Am. J. Med.*, **74**, 124-128 (1983).
- 57) H. Marberger, W. Huber, G. Bartsch, T. Schulte and P. Swoboda, Orgotein: A new anti-inflammatory metalloprotein drug. Evaluation of clinical efficacy and safety in inflammatory conditions of the urinary tract, *Int. Urol. Nephrol.* **6**, 61-74 (1986).
- 58) M. Huhn-Edholm, E. Osling and E. Feltenius, Superoxide dismutase enhances recovery following myocardial ischemia/reperfusion in vivo and in vitro: In *Superoxide and Superoxide Dismutase in Chemistry, Biology and Medicine*, G. Rotilio (Ed.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 591-593 (1986).
- 59) E. Riva, A.S. Manning and D.J. Hearse, Superoxide dismutase and reduction of reperfusion-induced arrhythmias: In vivo dose-response studies in the rat, *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **1**, 133-139 (1987).