

합성 올리고데옥시뉴클레오타이드의 피부투과

이영미 · 이성희 · 김재백 · 손동환[†]

원광대학교 약학대학
(1995년 10월 17일 접수)

Skin Transport of Synthetic Oligodeoxynucleotide

Young Mi Lee, Sung Hee Lee, Jae Baek Kim and Dong Hwan Sohn[†]

College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan, Geonbuk 570-749
(Received October 17, 1995)

Antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide(PS-ODN) against TGF- β was developed as scar formation inhibitor. The scar was caused collagen deposition due to overexpression of TGF- β in wounded skin. The percutaneous absorption of partially modified PS-ODN(25 mer) was investigated for the purpose of its effective delivery. Though PS-ODN has high molecular weight (MW=8,000) and polyanionic charge, it was permeated through skin. The skin permeation of PS-ODN was markedly increased by the removal of stratum corneum and dermis. Moreover, the skin permeation of PS-ODN was decreased in the following order: hairless mouse skin>rat skin>human cadaver skin. Thus, PS-ODN represents a logical candidate for further evaluation due to the potential for delivery into the wounded skin.

Keywords — Antisense, Phosphorothioate, Oligodeoxynucleotide, Fluorescence, Human Cadaver Skin

안티센스 올리고데옥시뉴클레오타이드(antisense oligodeoxynucleotide)는 DNA의 염기서열에 대해 특이성을 갖는 합성 올리고데옥시뉴클레오타이드로서 개개 유전자의 발현을 차단하거나 유도할 수 있다.¹⁾ 안티센스의 치료영역으로는 바이러스 감염²⁾, 암³⁾ 및 유전적 질환⁴⁾ 등에 이르고 있다. 안티센스의 치료제로서의 가장 큰 특징은 기존 약물에 비해 친화성과 특이성이 크다는 것이다. 그러나 안티센스는 분자량이 크고, 다가음이온 전하를 갖고 있어 생체막을 투과하기가 힘들고 생체액에서의 반감기가 짧기 때문에 표적세포(target cell)내로의 전달이 문제가 되어 왔다. 치환하지 않은 올리고데옥시뉴클레오타이드는 주로 혈청뿐 아니라 세포질이나 핵내에 존재하는 뉴클레아제에 의해 분해된다.

따라서, 뉴클레아제에 대한 안정성을 증진시키기 위해 여러가지 화학적 치환^{5,7)}이 시도되고 있으나 세포내 이동^{8,9)}과 세포내 분포를 조절하는 것도 중요하다. 이러한 문제는 화학적 치환을 통해 전부 이룰 수 없기 때문

에 효과적인 배송 시스템¹⁰⁻¹²⁾이 요구되고 있다. 현재 우수한 효력을 가진 phase II 단계에 있는 약물도 있으나 약물을 투여한 후 표적세포내에 있는 유전자에 도달하게 하는 데는 많은 문제점이 있어 국소에 적용하는 약물이 오히려 큰 효과가 있을 것이라고 예견되어 왔다. 본 저자 등은 이 점에 착안하여 안티센스를 국소에 적용 가능한 상흔제거제로의 개발을 시도하게 되었다.

상처치유과정에서 생기는 상흔의 원인은 상처시 생기는 TGF- β 의 자가유도(auto-induction)에 의한 과다발현(overexpression)으로부터 콜라겐이 축적되었기 때문이므로 TGF- β ¹³⁻¹⁵⁾에 대한 안티센스 올리고데옥시뉴클레오타이드는 반흔형성 억제제로서 TGF- β 의 발현을 차단한다. 이 사실로부터 TGF- β mRNA의 5'-말단에 대한 25mer 안티센스 올리고데옥시뉴클레오타이드를 이용하여 생체내에서 TGF- β mRNA의 발현을 효과적으로 차단하였다. 본 논문에서는 안티센스 올리고데옥시뉴클레오타이드를 정상 및 손상피부에 국소적용시 피부투과에 대한 정보를 얻고자 실험을

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

수행하였다.

실험방법

시약

Flureprime® NAP-10 칼럼은 Pharmacia LKB Biotechnology로부터 구입하였으며, ^{35}S -ATP γS 와 T4-Polynucleotide kinase는 Amersham International로부터 구입하였다. Microcon-3는 Amicon으로부터 구입하고 Franz-diffusion cell은 Crow Glass Co.로부터 구입하였으며, Multimagnetic 교반기는 Cole Parmer로부터 구입하여 사용하였다.

안티센스 올리고데옥시뉴클레오타이드의 합성

본 실험에서는 25개의 뉴클레오타이드로 구성된 올리고데옥시뉴클레오타이드의 25개 인산의 산소 원자 대신 6개를 황(sulfur)원자로 치환한 올리고데옥시뉴클레오타이드를 사용하였다. 이 안티센스 올리고데옥시뉴클레오타이드는 Gene Assembler Special(Pharmacia LKB Biotechnology)로 합성한 후 25~35% 암모니아수 1 ml를 넣고 70°C에서 1시간 반응시켜 합성 과정에서 필요했던 protect group을 제거하였다. 합성된 부분치환체 올리고데옥시뉴클레오타이드와 5'-말단을 형광으로 라벨한 올리고데옥시뉴클레오타이드는 NAP-10칼럼을 사용하여 정제하였다.

안티센스 올리고데옥시뉴클레오타이드의 ^{35}S 라벨

안티센스 올리고데옥시뉴클레오타이드의 ^{35}S 라벨은 Hoke등⁶⁾의 방법에 준하여 실시하였다. 간단히 설명하면, 안티센스 올리고데옥시뉴클레오타이드는 반응혼합액(300 mM Tris Cl(pH 7.6), 50 mM MgCl_2 , 1.65 μM ATP, 75 mM 2-mercaptoethanol)에서 ^{35}S -ATP γS 와 T4-polyunucleotide kinase를 사용하여 5'-말단에 ^{35}S 를 라벨하였다. 반응액을 잘 혼합한 후 37°C에서 45분간 반응시키고 T4-Polynucleotide kinase를 불활성화 시키기 위해 68°C에서 10분간 가열하였다. 라벨된 안티센스 올리고데옥시뉴클레오타이드를 정제하기 위해 Microcon-3를 사용하였다. Microcon-3의 시료용기에 시료 500 μl 를 넣고 25°C, 14,000 g에서 95분간 원심분리하여 통과하지 않은 액을 사용하였다.

경피투과 실험

랫트와 무모마우스(hairless mouse) 피부는 등부분으로부터 전체두께피부(full thickness skin)을 취하

였으며, 사람피부는 원광대학교 의과대학 부속병원에서 제공받았다. 손상피부는 피부가 반짝거릴 때까지 테이프를 각질층을 벗겨서 얻었으며, 진피는 60°C에서 1분간 침적시켜 제거하였다. 경피흡수실험은 Nolen III등¹⁶⁾의 방법을 약간 수정하여 실시하였다. 각 Franz-diffusion cell의 수용체 부분은 pH 7.4 phosphate buffered saline(PBS)용액 10 ml을 채웠다. Receptor 부분은 $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 를 유지시켰으며, 피부의 유효면적은 1.77 cm^2 이었다. 각 시료(0.1 mg/ml)를 피부에 적용 후 파라필름으로 덮었다. 일정시간에 receptor액 100 μl 를 취한 후 37°C로 유지되어 있는 신선한 수용체액 100 μl 를 채워 넣었다. 약물투과 실험은 24시간동안 수행되었다.

현미경 관찰

약물적용 12시간 후에 그 랫트 피부를 취해 pH 7.4 phosphate buffered saline(PBS)로 세척한 다음 유도 파라핀으로 고정한 후 6 μm 의 두께로 절단한 후 현미경으로 피부층에 흡수된 형광으로 라벨된 올리고데옥시뉴클레오타이드를 관찰하였다.

데이터 분석

경피흡수 파라메타들은 다음 식에 의해 투과 데이터로부터 계산하였다.

$$D = l^2/6T$$

$$J_s = DKmCs/l$$

$$Kp = DKm/l$$

여기서, J_s 는 투과속도, D 는 피부내로의 확산계수를 나타낸 것이며, Km 은 약물의 피부와 vehicle간의 분배계수이다. T 는 flux와 시간간의 기울기로부터 구한 지연시간(lag time)이다. Kp 는 각질층을 통과하는 투과계수이며, C_s 는 제제중의 약물농도를 나타낸 것이다.

결과 및 고찰

Fig. 1은 약물의 랫트 피부에 적용후 12시간만에 관찰한 결과이다. 여기서, (A)는 올리고데옥시뉴클레오타이드를 적용하지 않은 피부이며 (B), (C)는 올리고데옥시뉴클레오타이드를 적용한 정상피부와 손상피부이다. 정상피부에서는 올리고데옥시뉴클레오타이드가 약간 분포되었으나 손상피부에서는 피부전체에 상당량의 올리고데옥시뉴클레오타이드가 분포되었다. 이 결과로부터 거대분자이며 전하를 갖고 있으므로 피부 투과가 어렵다는 예상과는 달리 약간의 투과가 되고 있

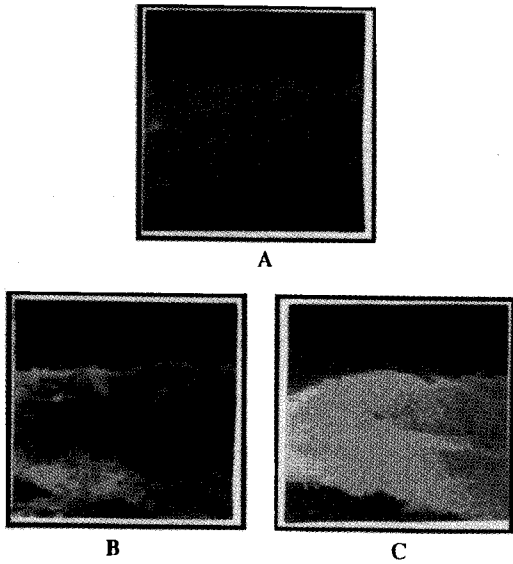


Figure 1—Fluorescence photomicrograph of fluorescence labeled PS-ODN within rat skin at 12hrs after permeation study(magnification×40). (A)Control skin, (B) Normal skin, (C) Damaged skin

음을 알 수 있다. 비록 이것은 경피투과 실험동안 피부층에 있는 뉴클레아제의 의해 어느정도 분해되었다 할지라도 테이프로 장벽(barrier)인 각질층을 제거한 손상피부에는 상당량의 올리고데옥시뉴클레오타이드가 투과되고 있음을 가시적으로 확인할 수 있었다. 그러나 5'-말단 형광 라벨법을 이용하여 피부를 투과한 올리고데옥시뉴클레오타이드의 양을 정량하고자 하였으나 공(blank) 피부 자체에서도 라벨에 사용한 형광과 같은 파장에서 방사되는 물질이 존재하고 있어 올리고데옥시뉴클레오타이드의 정량을 방해받기 때문에 올리고데옥시뉴클레오타이드의 5'-말단에 형광대신 ³⁵S를 라벨하여 정량하였다.

Fig. 2는 receptor액을 PBS로 하여 24시간 동안 랫트 피부를 투과한 올리고데옥시뉴클레오타이드의 누적량을 나타낸 그래프이다. 8시간 동안 정상피부를 투과한 누적량(cumulative amount)는 $0.234 \pm 0.041 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 인 반면 손상피부를 투과한 누적량은 $1.077 \pm 0.31 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 으로 정상피부에 비해 같은 시간동안 약 4.6배 투과량이 증가하였다. Fig. 3은 8시간까지 진피를 제거한 랫트와 사람피부를 투과한 누적량을 나타낸 그래프이다. 8시간까지 랫트, 사람의 정상피부를 투과한 누적량은 각각 $0.234 \pm 0.041 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $0.192 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 이었으며, 손상피부 사용시는 각각 $1.077 \pm 0.301 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $0.87 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 이었다. 랫트가 사람 피부보다 투과량이

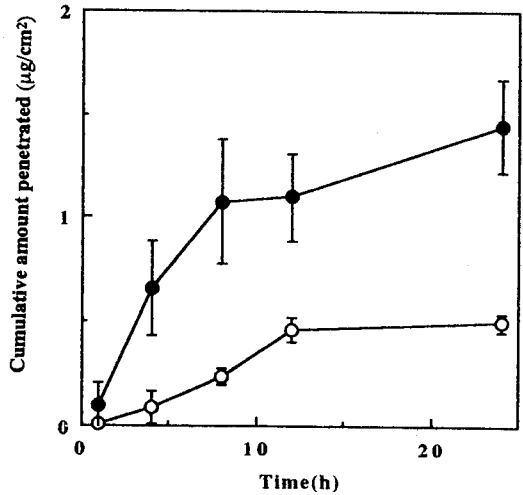


Figure 2—In vivo permeation profiles of PS-ODN across rat skin. Each point represents the mean±SD (n=3)
Key : ○ : Normal skin, ● : Damaged skin

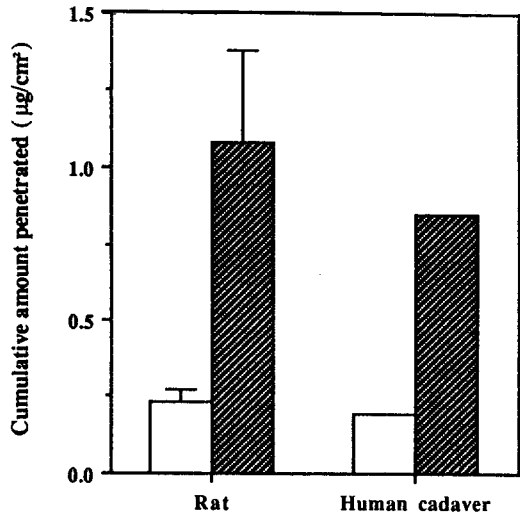


Figure 3—The effect of skin without dermis on skin flux of PS-ODN at 8hrs. Rat represents the mean±SD value in triplicate and human cadaver skin represents data from single experiment.
Key : □ : Normal skin, ■ : Damaged skin

많았으나 통계적으로 유의한 결과는 제시할 수 없었다. 지금까지의 본 시험에서는 피부두께에 대한 오차를 줄이기 위해 진피를 제거하고 수행했으나 진피에 대한 효과를 보려고 진피 존재하에 실험을 했고 특히 무모마우스의 경우 진피제거가 곤란해 랫트의 경우와 비교했다. Fig. 4는 PBS를 receptor액으로 하고 진피가 있는 정상적인 무모마우스와 랫트 피부를 사용하여

Table 1—Penetration Parameters of PS-ODN across the Damaged Rat Skin at 8hrs after Permeation Study

Flux (ng/cm ² · h)	Lag time (h)	Permeability coefficient (Kp, cm/h × 10 ³)	Diffusion constant (D, cm ² /h × 10 ⁶)	Partition coefficient (Km)
134.63 ± 37.67	0.70 ± 0.02	1.346 ± 0.376	12.438 ± 0.07	1.766 ± 0.46

Each value represents the mean ± S.E. (n=3)

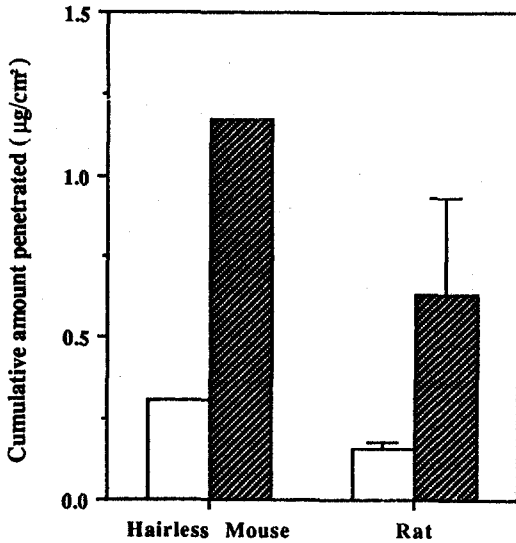


Figure 4—The effect of skin with dermis on skin flux PS-ODN at 8hrs. Rat represents the mean ± SD value in triplicate and hairless mouse represents data from single experiment.
Key : □ : Normal skin, ■ : Damaged skin

경피투과 실험 8시간 동안 투과된 누적량을 나타낸 것으로 각각 0.305 µg/cm², 0.159 ± 0.02 µg/cm²이었고, 손상된 무모마우스와 랫트 피부를 투과한 누적량은 각각 1.177 µg/cm², 0.633 ± 0.300 µg/cm²이었다. 정상적인 랫트 피부를 투과한 누적량을 볼 때 진피가 있을 때는 0.159 ± 0.020 µg/cm²이었으나, 진피를 제거하였을 때는 0.234 ± 0.041 µg/cm²으로 1.47배 증가하였다. 또한 손상피부를 사용하였을 때는 각각 0.633 ± 0.300 µg/cm², 1.077 ± 0.301 µg/cm²으로 1.70배 증가하였다. 진피의 제거로 올리고데옥시뉴클레오타이드의 투과가 증가되었고 진피에 대한 효과를 고려시 올리고데옥시뉴클레오타이드의 투과량은 무모마우스, 랫트 그리고 사람 피부순으로 투과량이 감소하였다. Table I 은 올리고데옥시뉴클레오타이드가 8시간까지 랫트 손상피부를 투과한 누적량으로부터 Chow 등¹⁷⁾의 식에 의해 구한 투과 파라메타를 나타낸 것이다. 올리고데옥시뉴클레오타이드의 flux가 13.46 ± 37.67 ng/cm²h 지

연시간 (lag time)은 0.70 ± 0.02 h이었으며, 투과계수 (Kp)는 1.346 ± 0.376 × 10⁻³ cm/h이었다. 이상과 같은 결과들로부터 안티센스 올리고데옥시뉴클레오타이드는 손상된 피부를 통해 상당량 분포되고, 투과될 수 있음을 알 수 있었다. 정상피부를 통해서도 올리고데옥시뉴클레오타이드의 투과가 관측되는 것은 이해가 힘든 상황이라 이것은 부분적으로 치환된 올리고데옥시뉴클레오타이드가 치환하지 않은 올리고데옥시뉴클레오타이드보다는 비교적 안정하지만 생체액에서의 분해로 인해 정상피부에서도 투과되었으므로 이는 좀 더 많은 실험이 필요하다. 결국 올리고데옥시뉴클레오타이드를 손상된 피부에 적용하는 제제로 만드는 것은 안정된 형태라면 별다른 문제가 없으리라 본다.

결론

상흔의 원인인 TGF-β mRNA의 발현을 효과적으로 차단할 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 국소에 적용가능한 상흔제거제로의 개발을 시도하였다. 이 안티센스 올리고데옥시뉴클레오타이드를 정상 및 손상 피부에 국소 적용후 얻은 피부투과에 대한 결과는 다음과 같다.

1. 거대분자이며 다가음이온 전하를 띠는 올리고데옥시뉴클레오타이드도 피부를 투과한다.
2. 피부투과의 장벽(barrier)인 각질층의 제거로 상당량의 올리고데옥시뉴클레오타이드가 투과된다.
3. 진피의 제거로 피부 투과량이 증가한다.
4. 피부투과량은 무모마우스, 랫트, 그리고 사람피부순으로 감소하였다.

이상의 결과로부터 안티센스 올리고데옥시뉴클레오타이드는 손상 피부에 적용하는 상흔제거제로 만드는 것은 안정한 형태라면 별다른 문제가 없으리라 본다.

감사의 말씀

본 연구는 1994년 원광대학교 교내연구비에 의해서

수행되었습니다. 연구에 도움을 준 (주) 일양약품에 감사드립니다.

문헌

- 1) E. Uhlman and A. Peyman, Antisense oligonucleotides: A new therapeutic principle, *Chem. Rev.*, **90** 544 (1990).
- 2) G.Y. Wu and C.H. Wu, Specific inhibition hepatitis B viral gene expression in vitro, *J. Biol. Chem.*, **267**, 12436 (1992).
- 3) R.A. Weinberg, Oncogenes, antioncogenes, and molecular bases of multistep carcinogenesis, *Cancer Res.*, **49**, 3713 (1989).
- 4) S. Akhtar, Y. Shiji, R. Kole and R. Juliano, Degradation and membrane transport characteristics of modified antisense oligonucleotides, *J. Cell. Biochem.*, **150**, 15 (1991).
- 5) S. Agrawal, J. Temsamani and J.Y. Tang, Pharmacokinetics, biodistribution and stability of oligonucleotide phosphorothioates in mice, *proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **88**, 7595 (1991).
- 6) G.D. Hoke, K. Draper, S.M. Freier, C. Gonzalez, V.B. Driver, M.C. Zounes and D. Eckler, Effect of phosphorothioate capping on antisense oligonucleotides stability, hybridization and antiviral efficacy versus herpes simplex virus infection, *Nucleic Acids Res.*, **19**, 5743 (1991).
- 7) S. Akhtar, R. Kole and R.L. Juliano. Stability of antisense DNA oligodeoxynucleotide analogs in cellular extracts and sera, *Life Sci.*, **49**, 1793 (1991).
- 8) Y., Shoji, S. Akhtar, A. Periasamy, B. Herman and R.L. Juliano, Mechanism of cellular uptake of modified oligodeoxynucleotides containing methylphosphonate linkages, *Nucleic Acids Res.*, **19**, 5543 (1991).
- 9) J.W. Jaroszewski and J.S. Cohen. Cellular uptake of antisense oligodeoxynucleotides, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **6**, 235 (1991).
- 10) K. Sharples, G.D. Plowman, T.M. Rose, D.R. Twardzik and A.F. Purchio. Cloning and sequence analysis of simian transforming growth factor- β cDNA, *DNA*, **6**, 239 (1987).
- 11) R. Derynck, J.A. Jarrett, E.Y. Chen, D.H. Eaton, J.R. Bell, R.K. Assoian, A.B. Roberts, M.S. Sporn and D.V. Goeddel, Human transforming growth factor- β complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells, *Nature*, **316**, 701 (1985).
- 12) M. Saffran, G.S. Kumar, C. Savariar, J.C. Burnham, F. Williams D.C. Neckers, A new approach to the oral administration of insulin and other peptide drugs, *Reports*, **233**, 1081 (1986).
- 13) D.J. Whitby and M.W.J. Ferguson, Immunohistochemical localization of growth factors in fetal wound healing, *Dev. Biol.*, **147**, 207 (1991).
- 14) D.T. Cromack, M.B. Sporn, A.B. Roberts, M. J. Merino, M.J. Merino, L. L Dart and J. A. Norton, Transforming growth factor- β levels in rat wound chambers, *J. Sur. Res*, **42**, 622 (1987).
- 15) M.B. Sporn and A.B. Roberts, Transforming Growth Factor- β : Multiple actions and potential clinical applications, *JAMA*, **262**, 938 (1989).
- 16) H.W. Nolen III, P. Catz and D.R. Friend, Percutaneous penetration of methylphosphonate antisense oligonucleotides, *Int. J. Pharm.*, **107**, 169 (1994).
- 17) D.S.L. Chow, I. Kaka and T.I. Wang. Concentration-dependent enhancement of 1-dodecylazacycloheptan-2-one on the percutaneous penetration kinetics of triamcinolone acetonide, *J. Pharm. Sci.*, **73**, 1794 (1984).