

아시클로버-아시알로페투인 접합체의 간 포획 및 안정성

손성호 · 허근 · 이영대 · 오두만* · 용철순†

영남대학교 약학대학

*대구효성가톨릭대학교 약학대학

(1996년 10월 11일 접수)

Hepatic Uptake and Stability of Acyclovir-Asialofetuin Conjugate

Sung Ho Son, Keun Huh, Young Dae Lee, Doo-Man Oh* and Chul Soon Yong†

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

*College of Pharmacy, Taegue Hyosung Catholic University,

Hayang, Kyungbuk 713-702, Korea

(Received October 11, 1996)

For the purpose of improving the chemotherapeutic index of acyclovir(ACV), it was conjugated with asialofetuin(AF), which has been reported to enter into hepatocytes. When (H^3) acyclovir in itself or its conjugate were administered to rats, the latter was taken up more selectively by the liver than any other tissues. The stability of ACVMP-AF conjugate in phosphate buffer (pH 5.0) and rat liver homogenate showed a pseudo-first order profile. ACVMP-AF, however, was relatively stable in pH7.4 phosphate buffer and rat plasma. The conjugate was added to the isolated rat hepatocyte and cellular uptake was monitored by scintillation counting for up to 6 hours at 37°C. Hepatocytes incubated with the conjugate exhibited radioactivities significantly enhanced over control levels dose-dependently, i.e., a 3-40 fold increase in radioactivities was observed over controls at the conjugate concentrations of 0.1-10 $\mu\text{g/ml}$. The AUQ in the liver, kidney, spleen, intestine and lung was higher in treatment with ACVMP-AF than that in treatment with ACV. In treatment with ACVMP-AF, the weighted-average overall drug targeting efficiency(T_e) for the liver was higher than in treatment with ACV(57.00 vs 13.31 %), and the weighted-average tissue exposure(R_e) was 5.03 for the liver. These results indicated that ACVMP-AF conjugate was rapidly taken up by hepatocytes and could be an efficient and selective hepatic targeting system.

Keywords—Hepatic uptake, Asialofetuin, Acyclovir, Stability, Drug targeting

질병의 치료시 약효를 극대화시키고 원하지 않는 부작용을 최소화하기 위한 다양한 방법이 연구되고 있으며, 항암제의 경우 적절한 표적지향성 운반체를 이용하여 원하는 부위로 약물을 집적시켜 치료계수를 증진시킬 수 있다. 표적화 방법중의 하나로 소립자 형태의 운반체를 사용하여 간, 폐, 신장 등에서의 약물농도를 높일 수 있는 많은 연구결과가 보고되었다.¹⁻³⁾ 또한 약물송달체에 자성을 부여하여 외부의 자장에 의해 특정 부위로 약물을 표적화시킬 수도 있다.⁴⁾

대부분 약물의 부작용이나 독작용은 주로 비표적 부위에서 약물이 작용하기 때문이다. 그러므로 특별한 수

송체를 사용하여 약물의 불필요한 분포를 억제하고 비 표적 부위를 보호하여 표적 부위로만 약물을 전달하려는 방법들이 다양하게 시도되고 있다.^{5,9)} 이러한 약물 표적화를 위한 이상적인 시스템 개발을 위해서 생물 수용체의 선택성을 이용하여 특정 부위나 병소에서만 작용을 나타낼 수 있는 물질을 개발하기 위해서는 세분화된 수용체를 발견하는 것이 선행되어야 한다.¹⁰⁾ 효과적인 표적화를 위해서 표적 특이성이 있는 물질은 약물수송체로서 사용될 가능성이 크다. 그러므로, 항체는 처음 발견된 이후 약물수송체로서의 가능성에 대해 깊이 연구되어 왔다.¹¹⁾ 예를 들어, 항암제나 세포 독성이 강한 독소를 항체와 결합시킨 후, 특정 암세포 표면에 표적화시킬 수 있다. 암세포 표면에 결합한 포합체는 en-

† 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

docytosis에 의해 세포 내로 이입된 후 암세포를 파괴할 수 있다.¹²⁾ 또한 항바이러스 화학 요법에 리소좀 지향적 접근 방법에 기초하여, 간세포에 5-fluoro-deoxyuridine와 cytosine arabinoside를 선택적으로 도입하고 만성 B형 간염 치료에서의 부작용을 줄이기 위해 5-fluorodeoxyuridine와 cytosine arabinoside를 lactosaminated 알부민과 공유결합시켰다.¹³⁾ Low-density lipoprotein을 사용해 항암제인 acrylophenone의 특정 세포로의 표적화가 가능하며¹⁴⁾, 갈락토즈 잔기를 결합시킨 poly(l-lysine)을 약물 수송체로 사용하여 항바이러스제인 9-β-D-arabino-furanosyladenine 5'-monophosphate와 acyclovir (ACV)를 흰쥐의 간세포에 선택적으로 표적화시켰다.¹⁵⁾

Receptor-mediated endocytosis는 폴리펩티드, 호르몬, 성장 인자 및 여러 생리 물질의 생물학적 작용 발현에 깊이 관여함이 밝혀졌고^{16,17)}, 포유 동물의 hepatic asialoglycoprotein receptor(ASGP-R)는 효과적으로 갈락토즈나 N-acetylgalactosamine 잔기를 가지고 있는 여러 종류의 glycoconjugate¹⁸⁾ 및 sialic acid가 제거된 혈청 당단백질을 endocytosis로 포획한 후 리소좀에서 분해시키는 과정에 관여한다.^{19,20)}

Sialic acid가 제거되어 갈락토즈 잔기가 노출된 당단백질은 ASGP-R에 선택적으로 결합되어 단백질 수용체의 복합체가 간세포 내로 이입되며, 이 당단백질이 리소좀에서 분해되는 동안 수용체는 분해되지 않고 신속하게 세포 표면으로 되돌아온다.²¹⁾ 결과적으로 간에서의 asialoglycoprotein의 제거 속도는 시간이 경과함에 따라 일정하게 유지될 수 있다.²²⁾ 이러한 원리를 이용하여 간 실질세포에 작용하는 acyclovir(ACV)를 선택적으로 간에 전달하기 위해 fetal calf serum에서 분리된 α₁ 당단백질인 fetuin(분자량=48000; 등전점=pH 3.3)의 말단 sialic acid가 제거된 asialofetuin(AF)을 본 실험에서 약물 수송체로 선택하였다.

B형 간염은 수혈 및 여러 경로를 통해 확산될 수 있으며 만성 간 질환과 일차 간암에 관여한다.²³⁾ ACV를 단독 혹은 인터페론과 병용 투여하여 만성 B형 간염의 치료에 사용할 수 있다.²⁴⁾ 그러나 정자 형성의 감소, 오심 및 구토, 들연변이 등과 같은 ACV의 부작용 때문에 치료 계수를 높이는 것이 필요하다. ACV의 항바이러스 작용은 이 약물의 인산화 반응에 달려있으며, 삼인산화된 형태인 acyclovir triphosphate(ACVTP)가 가장 활성이 크다. 바이러스에 감염되지 않은 세포

의 thymidine kinase(TK)는 효과적으로 ACV를 기질로 사용할 수가 없다. 주로 헬피스 바이러스에 의해 encode된 TK는 효과적으로 ACV를 acyclovir monophosphate (ACVMP)로 전환시킨다.²⁵⁾ 이 ACVMP는 세포내 guanylate kinase에 의해 acyclovir diphosphate로 전환된 후, 세포내 효소에 의해 계속해서 삼인산화된 형태인 ACVTP로 전환된다.²⁶⁾ 이 ACVTP가 바이러스의 DNA 복제를 저해한다. 헬피스 바이러스에 의해 encode된 thymidine kinase가 없을 경우, 포유 동물의 세포에 있어서 ACV에서 ACVMP로의 인산화 반응은 제한된 정도로만 일어나며, 결과적으로 다른 바이러스에 대한 ACV의 활성은 상대적으로 낮게 된다.²⁷⁾ 화학적으로 ACV를 ACVMP로 전환시킬 경우, 효소에 의한 ACV의 인산화 작용을 우회하여 결과적으로 헬피스 이외의 바이러스에 대해 ACV가 활성을 나타낼 수 있다. 이러한 접합체는 혈액 중에서는 안정하며 간세포에 포획된 후 ACVMP를 방출하는 것이 필요하다.

전술한 원리에 기초하여, 본 실험에서는 AF가 선택적으로 간세포를 통과할 수 있는 것을 이용하여 약물 수송체로서 AF를, 약물로서는 ACV를 활성화되기 쉬운 ACVMP로 전환시킨 형태를 AF에 공유 결합시켜 간에 선택적으로 분포되는 약물 전달 시스템을 개발하고자 하였다.

실험방법

시료, 시약 및 기기

본 실험에 사용된 ACV는 경동 제약으로부터 제공받았으며, side chain의 2번 위치(*)에 tritium으로 label된 ACV를 NEN에서 구입하여 사용하였다(Figure 1). Asialofetuin, dialysis tubing, sodium dodecyl-sulfate(SDS), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride(EDC), SDS molecular weight marker 200 kit, Tris(hydroxymethyl)aminomethane, acrylamide, N,N'-methylene-bis-acrylamide, ammonium persulfate, N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamine, Dowex 1 strongly basic anion exchanger, Sepadex G-100 등은 Sigma사로부터 구입하였고, Soluene-350 (0.5 N quaternary ammonium hydroxide in toluene)은 Packard Instrument Co.로부터 구입하였다. Yakuri사로부터 triethyl phosphate를, Hanawa사로부터 phosphorus

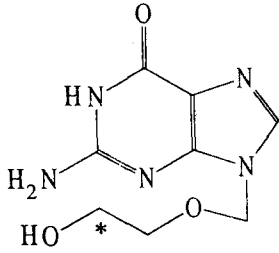


Figure 1—The structure of [³H] ACV.

oxychloride, Bio-rad사에서 Bio-rad protein assay kit, Coomassie brilliant blue, Merck사로부터 ethylenediaminetetra acetic acid를 구입하였고, Thomas Scientific사의 polyethylene tube No. 50을 동물 실험에서 cannula로 사용하였다. 이외의 모든 시약은 특급 혹은 일등급을 사용하였고, 실험에 사용한 모든 buffer는 증류수를 사용하여 제조하였다.

본 연구 수행에 이용된 주요 기기와 기구는 magnetic stirrer(Corning, USA), liquid scintillation counter(Pakard SE 4000 series, USA), plastic filter holder(Gelman Sciences Inc., USA), shaking water bath(KMC-1205SW1, hematocytometer (Kayagaki, No. H6727) Vision Co., Ltd., Korea), spectrophotometer(Shimadzu UV-1201, Japan), peristaltic pump(Cole-Parmer instrument Co., Masterflex model 7518-00) 등이다.

실험 동물 및 처치

실험 동물은 외관상 건강한 체중 200~250 g의 웅성 흰쥐(Sprague-Dawley, Life Science Co., Taegu, Korea)를 사용하였고 고형사료(삼양사료) 및 물을 충분히 공급하였다. 동물은 hepatic metabolism의 variation을 줄이기 위해 실험 전 24시간 동안 물만 주고 절식시켰다.

[³H] ACVMP-AF 접합체 제조

[³H] ACVMP는 Yoshikawa 등²⁸⁾의 방법을 적용하여 제조하였으며, [³H] ACVMP-AF는 Fiume 등²⁴⁾의 방법을 약간 변형한 Yong 등²⁹⁾의 방법으로 다음과 같이 제조하였다. [³H] ACVMP(180 mg)을 3 ml의 증류수에 용해시킨 후, NaHCO₃를 가하여 액성을 pH 6.5로 조정하고 1 ml의 증류수에 용해된 EDC (180 mg)를 가하였다. 25°C에서 10분 동안 반응시킨 후, 1 ml의 증류수에 용해된 AF (90 mg)를 가하면서 저어 주었다. 혼합물을 25°C에서 24시간 동안 반응시킨 후, Sephadex G-100 칼럼에 반응액을 loading하여 접합체에

해당하는 분획을 모아서 동결건조하고 건조된 conjugate의 NaCl을 제거하기 위해 4°C에서 24시간 동안 2회 정도 증류수를 교환하며 물에 대해 투석하고, 다시 동결건조 하여 정제된 conjugate를 얻은 후 -70°C에서 보관하였다. AF에 결합한 ACVMP의 몰수는 liquid scintillation counter에 의해 ACVMP에 대한 radioactivity를 측정하고, AF의 농도는 immunoglobulin G를 표준품으로 하여 Bradford³⁰⁾의 방법에 따른 kit로 595 nm에서의 흡광도를 측정하여 구하였다.

약물동태 및 장기분포

24시간 절식시킨 흰쥐를 에텔로 가볍게 마취시킨 후 좌측 대퇴부 동맥과 정맥에 폴리에틸렌 튜브(PE 50, Clay Adams사)를 삽입하였다. 마취가 완전히 회복된 후에 [³H] ACVMP-AF 접합체(0.9% 주사용 생리식염수 1 ml에 용해) 및 [³H] ACV를 대퇴부정맥으로 각각 투여하였다. 약물투여후 일정 시간 간격에서 대퇴부동맥으로부터 약 200 μl의 혈액을 취하고, 매회 채혈 후 튜브 내에 남아 있는 혈액은 100 unit/ml헤파린을 함유한 생리식염수를 주입하여 혈액 내로 이입시켰다. 헤파린 처리된 튜브에 채취된 혈액은 즉시 원심 분리한(10,000 rpm, 30 sec) 후 총 혈장 radioactivity를 측정하였다. 채혈 후 흰쥐를 참수하여 폐, 간, 비장, 소장 및 신장을 적출하여 차가운 0.9% 생리식염수로 세척하고, 여지를 사용하여 흡착 건조시켜 무게를 측정한 후 마쇄하였다. 각각의 장기에서 1 g씩을 취하여 total radioactivity를 측정함으로써 약물의 장기분포를 구하였다. 위의 모든 조작은 4°C에서 시행하였다.

담즙을 채취하기 위하여 흰쥐의 총담관에 폴리에틸렌 튜브(PE 10)를 삽입한 후 [³H] ACVMP-AF (0.354 mg/g)를 정맥투여하였다. 4시간까지 연속적으로 담즙을 채취하여 total radioactivity를 측정하였다. Acid soluble radioactivity를 측정하기 위하여 trichloroacetic acid를 사용하여 침전시킨 후 상층액의 radioactivity를 측정하였다.

표적부위의 약물농도 정도를 평가하기 위하여 다음과 같은 두 지표를 AUQ를 사용하여 구하였으며³¹⁾, AUQ(the areas under the total amount radioactivity-time curves; the product of AUC times weight of tissue)은 trapezoidal rule-extrapolation 방법으로 구하였다.³²⁾

$$(Re)_i = \frac{(AUQ)_B}{(AUQ)_A}$$

Re : The weighted-average relative tissue exposure

$$(Te)_i = \frac{(AUQ)_i}{\sum (AUQ)_i}$$

Te : The weighted-average overall drug targeting efficiency

i는 각각의 조직을 나타내며, A는 [^3H] ACV를 투여한 경우이고 B는 [^3H] ACVMP-AF 접합체를 투여한 경우를 각각 나타낸다.

Total radioactivity의 측정

Counting vial 안에 1 g에 해당하는 혈장과 각각의 장기를 넣고 4 ml의 Soluene 350으로 용해하였다. 50°C에서 12시간 동안 유지한 후 color quenching을 줄이기 위해 0.2 ml의 isopropyl alcohol과 0.4 ml의 30 % hydrogen peroxide를 가한다. 용액을 중화하기 위해 0.4 ml의 5 N HCl을 가하고 10 ml의 scintillation cocktail을 가한다. Counting하기 전에 적어도 24시간 동안 암소에서 equilibration시키고 liquid scintillation counter를 사용하여 total radioactivity를 측정하였다.

간세포의 제조

간세포 적출에 관한 Seglen³³⁻³⁶⁾의 방법을 다음과 같이 변형하여 실험하였다. 흰쥐의 간에 peristaltic pump(Cole-Parmer instrument Co., Masterflex model 7518-00)를 사용해서 5-6 분동안 15-20 ml/min의 속도로 칼슘이 제외된 Hanks' 용액을 미리 주입한 다음, 간문맥에 18G catheter로 cannulation하였다. 혈액을 세척한 다음, 아래쪽 대정맥을 유출이 자유롭도록 절단하고 신정맥부분 위쪽을 동여맨다. 흉부를 개방하여 상부 대정맥을 16G catheter로 cannulation하였다. 간문맥으로 주입되는 용액이 in situ하에 간문맥-간-상부 대정맥 사이를 50-60 ml/min의 속도로 재순환시킨다. 처음 어떤 효소도 들어있지 않은 50 ml의 용액은 간을 통과해 바로 밖으로 내보내고 나서, 25 mg의 collagenase type I(0.05%)와 50 mg의 hyaluronidase type V (0.1%)가 포함된 50 ml용액은 재순환되도록 하였다. 10-30분 동안 간이 팽창되어 용액이 흘러나오다가 용액주입을 멈추면 조심스럽게 간을 절개하여 37°C에서 효소가 없는 배지 50 ml의 비이커로 옮긴 다음, 가위로 잘게 자른다. 세포 현탁액은 가아제로 여과한 다음 4°C에서 2분간 50 g로 원심분리하여 세포를 파편으로부터 분리하였다.

상층액은 제거하고 세포는 4°C의 새 배지로 다시 현탁화하였다.

세포 현탁액의 생존력은 Seglen³³⁾의 방법에 따라 4°C, 5분간 0.95%(w/v) NaCl에서 0.4%(w/v) trypan blue 300 μl 와 세포 현탁액 100 μl 를 혼합해서 trypan blue uptake에 살아남은 세포의 퍼센트를 hemacytometer(Kayagaki, No. H6727)로 카운트해서 측정하였다. 85%이상의 생존력이 있는 세포 현탁액을 이 실험에서 사용하였다.

In vitro에서 [^3H] ACVMP-AF접합체의 간 포획

최종 농도가 0.1, 1, 10 mg/ml가 되도록 PBS용액(pH 7.4)과 1 ml의 분리된 간세포($1.2 \times 10^7/\text{ml}$)를 포함한 conical tube에 다양한 양의 ACVMP-AF(100 mg/ml in 0.9% NaCl)를 가하였다. 37°C water bath에서 혼합한 다음, 즉시 0°C에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 조심스럽게 제거하고 3 ml PBS용액으로 세번에 걸쳐서 세척하였다. 세포를 LSC vial로 옮겨 2.5 ml의 Soluene 350으로 파괴하였다. 그런 다음 0.5 ml PBS 용액과 8 ml cocktail을 가하였다. 10시간후 시료의 radioactivity를 LSC(Packard SE 4000 series, USA)로 측정하였다. [^3H] ACV의 간세포로의 포획을 비교군으로 산출하였다. 1시간 동안 배양후 radioactivity를 측정하였다.

수용액에서의 [^3H] ACVMP-AF 접합체의 안정성

안정성실험은 37°C에서 phosphate buffer system(pH 5.0, 6.0, 7.4, 9.0, $\mu=0.3$)을 사용하여 시행하였다. ACVMP-AF를 pH 7.4인 PBS(1 mg/ml)에 녹여 ACVMP-AF용액을 제조하였다. ACVMP-AF용액을 미리 온도를 높인 PBS 용액에 가하여 50 g/ml의 농도가 되도록 하여 실험을 시작하였다. 적당한 시간에 1 ml의 시료를 취하여 10% phosphotungstic acid를 함유한 2N HCl동량을 가하여 혼합하고 10분간 얼음 위에서 배양하였다. 원심분리하여 침전을 pellet화하고 상층액을 버린 다음, pellet의 radioactivity를 측정하였다.

혈장 및 간 homogenate에서 [^3H] ACVMP-AF 접합체의 안정성

간을 생리 식염수로 세번 관류한 다음, glass-Teflon homogenizer로 균질화시킨 후 10분간 600×g에서 원심분리하여 상층액을 실험에 사용하였다. 실험은 최종농도가 50 g/ml가 되도록 ACVMP-AF용액을 가하여 시작시켰다. 혈장내 ACVMP-AF의 안정성은 미리 37°C로 온도를 조정한 흰쥐의 회색하지 않은 혈장

10 ml에서 배양하여 시행하였다. 배양혼합액으로부터 24시간까지 각각의 시료 1 ml를 취하여 산에 불용성인 분획을 앞서 기술한 방법으로 radioactivity를 측정하였다.

결과 및 고찰

[³H] ACVMP-AF접합체 제조 및 확인

위의 제조 과정에서 합성한 [³H] ACVMP는 thin layer chromatography (TLC)와 NMR spectroscopy로 확인하였다. [³H] ACVMP-AF접합체는 carbodiimide 반응을 이용하여 pH 6.5에서 AF과 [³H] ACVMP를 conjugation시켰으며, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis에 의해 제조된 conjugate의 대부분이 monomer로 존재함을 확인하였다.²⁹⁾

[³H] ACVMP-AF접합체의 약물동태 및 조직분포

[³H] ACVMP-AF접합체를 흰쥐에 정맥 주사하여 얻은 혈중에서의 소실 속도는 two phase elimination pattern을 보였으며, 초기 걸보기 소실속도 상수는 [³H] ACV보다 큰 0.191 min⁻¹이었고, 후기 걸보기 소실속도 상수는 0.021 min⁻¹이었다.²⁹⁾ 이 결과로부터 [³H] ACV보다 [³H] ACVMP-AF접합체가 혈중에서 신속하게 소실되는 것을 알 수 있었다.

[³H] ACVMP-AF접합체를 흰쥐에 정맥 주사한 후, 장기에 분포한 정도를 total radioactivity를 측정함으로써 각각의 장기에 대한 [³H] ACVMP-AF 접합체의

분포 profile을 total radioactivity (AUQ) 대 시간의 curve로 나타내었다. [³H] ACV (specific activity, 13.6 10⁶ cpm/mg)와 [³H] ACVMP-AF 접합체 (specific activity, 3.5×10⁴ cpm/mg)를 각각 0.9 μg/g body weight와 0.354 mg/g body weight로 흰쥐에 정맥 주사하였다. [³H] ACV가 투여된 흰쥐의 경우, 간장(Figure 2), 허파(Figure 3), 소장(Figure 4), 및 비장(Figure 5)에서 비슷한 분포 양상을 보이며 소실되었으며, 특히 신장(Figure 6)에서 높은 분포율을

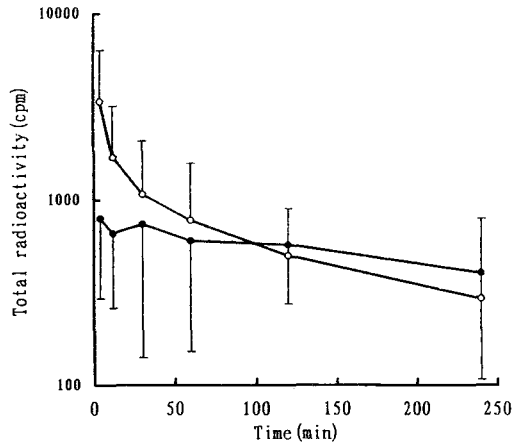


Figure 3—The mean total radioactivity curves in lung after i.v. administration of [³H] ACVMP-AF conjugate(●) and [³H] ACV(○). Each point represents the mean value(±S.D) of result from 3 animals.

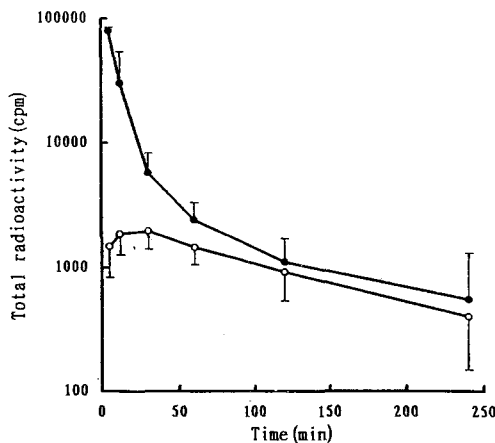


Figure 2—The mean total radioactivity curves in liver after i.v. administration of [³H] ACVMP-AF conjugate(●) and [³H] ACV(○) at a dose of 0.354 mg/g. Each point represents the mean value(±S.D) of result from 3 animals.

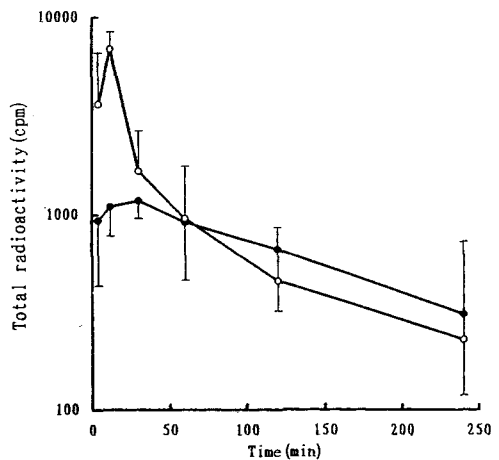


Figure 4—The mean total radioactivity curves in intestine after i.v. administration of [³H] ACVMP-AF conjugate(●) and [³H] ACV(○). Each point represents the mean value(±S.D) of result from 3 animals.

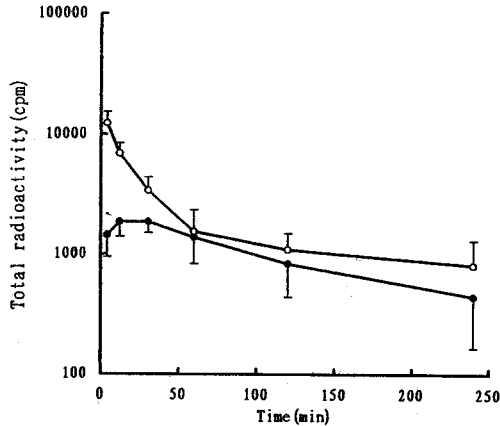


Figure 5—The mean total radioactivity curves in spleen after i.v. administration of [^3H] ACVMP-AF conjugate(●) and [^3H] ACV(○). Each point represents the mean value(\pm S.D) of result from 3 animals.

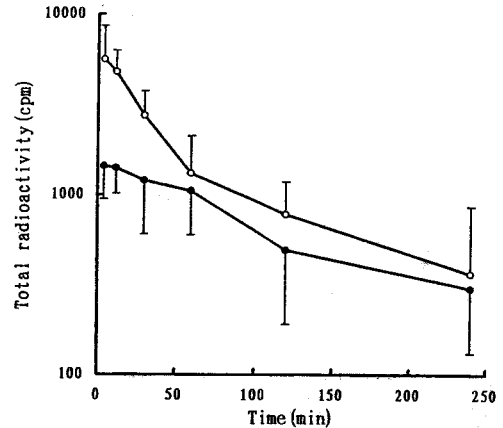


Figure 6—The mean total radioactivity curves in kidney after i.v. administration of [^3H] ACVMP-AF conjugate(●) and [^3H] ACV(○). Each point represents the mean value(\pm S.D) of result from 3 animals.

Table I—The Area Under the Total Radioactivity Versus Time Curve(AUC) from Each Tissue, Weighted-average Relative Exposure(Re), and Weighted-average Overall Drug Targeting Efficiency(Te) After i.v. Administration of [^3H] ACV and [^3H] ACVMP-AF Conjugate in Rats.

Tissue	[^3H] ACV		[^3H] ACVMP-AF conjugate		Re
	AUC(cpm · min)	(Te) _i %	AUC(cpm · min)	(Te) _i %	
Liver	336,596	13.31	1,480,859	57.00	5.03
Kidney	1,056,453	38.20	472,094	15.82	0.49
Spleen	320,576	8.51	296,188	4.10	0.56
Lung	344,120	9.69	332,486	5.63	0.68
Intestine	265,536	7.71	208,165	4.60	0.70
Plasma	552,219	22.57	412,342	13.28	0.70
Total	2,003,600	100 %	2,352,134	100 %	

나타내었다. 이 것은 ACV가 대부분 신장에서 배설되는 것으로 설명될 수 있다. Table 1은 약물에 label된 [^3H] ACVMP-AF접합체의 정맥투여후 AUC가 다른 장기(비장, 소장, 허파, 신장)보다 간에서 몇 배 높게 나타났음을 보여준다. 그리고, [^3H] ACVMP-AF 접합체가 투여된 흰쥐의 경우에는, 다른 장기보다 간에서의 AUC값이 약 3배(신장) 내지 7배(소장) 높았다. Figure 2에서 보듯이 [^3H] ACVMP-AF접합체를 정맥투여한 후에 측정된 간에서의 total radioactivity는 [^3H] ACV를 투여한 후의 total radioactivity보다 신속하게 최고 농도에 도달함을 알 수 있었으며, 이러한 경향은 다른 간 이외의 장기들로 표적화되는 정도가 유의성 있게 감소하는 것에 비해 간으로는 선택적으로 접합체가 집중되는 것을 알 수 있었다. 이상의 결과로부터 [^3H] ACVMP-AF접합체는 혈중에서 신속하게 소실되어 다른 장기에 비해 간에 선택적으로 분포한다

는 것을 알 수 있었다. 또한 [^3H] ACV의 정맥투여 후 측정된 신장에서의 AUC가 간이나 다른 장기에서의 AUC보다 유의성 있게 큰 것은 [^3H]가 주로 신장으로 제거됨을 나타낸다. 반면 [^3H] ACVMP-AF접합체를 투여할 경우 신장에서의 소실은 감소됨을 알 수 있으며, 이 것은 간으로의 신속한 표적화의 영향으로 사료된다. Table I에서 보듯이 특정 조직으로의 약물송달 정도를 평가할 수 있는 Re값이 간의 경우 1보다 큰 5.03으로서, 이것은 이러한 특정 장기로의 표적화가 성공적으로 이루어졌음을 나타내며, 그 밖의 장기에서의 Re값이 1보다 작은 것은 ACV를 AF에 접합시킬 경우 원하지 않는 부위로의 비표적화를 가능하게 할 수 있음을 시사하여 주고 있다.³⁷⁾

Figure 7에서 보여주듯 담낭에서 측정된 total radioactivity는 급속히 증가하고 [^3H] ACVMP-AF접합체의 정맥주사 1시간후 plateau level의 약 90%에

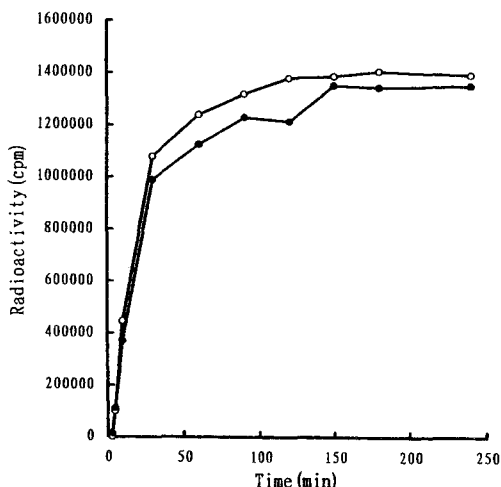


Figure 7—Biliary excretion of total radioactivity after i.v. administration of [³H] ACVMP-AF. Key: ● : Total radioactivity, ○ : Acid-soluble radioactivity

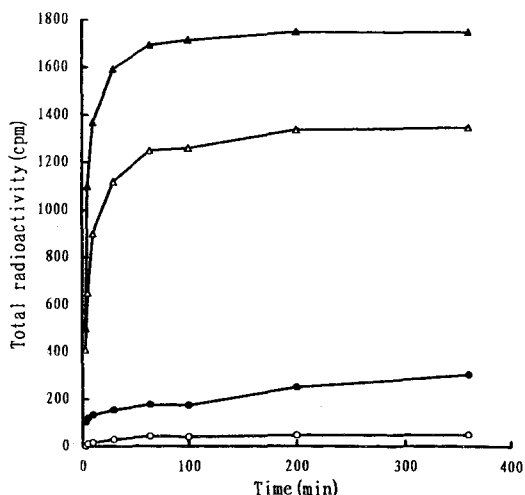


Figure 8—In vitro hepatic uptake of [³H] ACVMP-AF at concentrations of 0.1, 1 and 10 mg/ml at 37°C. Key: ▲ : 0.1, △ : 1, ● : 10, ○ : [³H] ACV

도달하였다. 담즙에서의 total radioactivity는 주로 acid-soluble radioactivity이었으며, 이것은 간으로 신속하게 포획된 [³H] ACVMP-AF접합체가 간 실질 세포 내에서 free drug으로 분리된 후 담즙으로 배설되는 것으로 사료된다. Table I에 나타난 바와 같이, 간에 ACV의 선택적인 전달은 다른 조직에 대한 독성을 낮추고 결과적으로 바이러스 복제를 더 효율적으로 저해할 수 있게 된다. 최근의 연구에 의하면, Hubbard 등^{38,39)}은 ¹²⁵I-labeled asialoglycoprotein-페리틴 접합체 및 asialofetuin-horse radish peroxidase 접합체의 세포내에서의 경로를 밝히기 위해 전자 현미경을 사용하였다. 이들은 ¹²⁵I-labeled AF이 흰쥐에서 빠르고 선택적으로 간 실질 세포에 결합하고 내재화한다는 것을 발견하였다. 이러한 결과는 흰쥐에서 정맥 주사 후 ACVMP-AF접합체도 또한 혈중에서 재빨리 소실됨을 반영한다. 간의 동양 구조는 단백질에 대해서 장벽으로 작용하지 않으므로 당단백질인 AF은 간세포 표면의 특정 수용체와 결합할 수 있다. ACVMP-AF 접합체는 AF이 결합할 수 있는 수용체가 존재하는 간에 선택적으로 도입된다. 갈락토스 잔기를 가지는 당단백질에 대해서 간 수용체는 리간드 결합에 따르는 내재화 후에도 파괴되지 않고, 결합하지 않은 수용체 분자는 신속하게 세포 표면으로 되돌아온다. 결과적으로 갈락토스 잔기를 가지는 당단백질의 간에서의 흡수 속도는 시간이 경과함에 따라 일정하다.²⁶⁾ 유리된 약물은 간에 높은 농도로 남아있고 약물학적 작용은 이 기

관에 국한된다. ACVMP-AF접합체는 리소좀 지향성이 있는 약물-수송체 복합체에 필요한 조건을 만족하고 ACV의 간 표적화에 적당한 성질을 가지고 있다. 이것과 관련하여 lactosaminated albumin과 ara-AMP의 접합체, 또한 강력한 리소좀 지향성이 있는 약물-수송체 복합체로서 연구되었다.⁴⁰⁾ 간세포의 asialoglycoprotein 수용체는 이 접합체에 의해 in vivo에서 표적 조직의 독작용을 최소화하는 데 있어서 매우 중요하다.

[³H] ACVMP-AF접합체의 in vitro에서의 간 포획

[³H] ACVMP-AF접합체와 함께 배양한 간세포는 비교군보다 용량 의존적으로 radioactivity가 증가하였다. 배양 60분 후 측정된 [³H] ACV의 radioactivity는 43±19 cpm이었다. Figure 8에서 보여주듯이 hepatic uptake는 60분내에 거의 완전히 이루어지며 비교군보다 접합체의 농도가 0.1, 1, 10 mg/ml로 증가할 경우 radioactivity는 각각 약 3, 30 및 40배 증가하였다. 이러한 결과는 AF와 디프테리아 독소의 A 조각을 공유 결합시킬 경우 흰쥐의 배양 간세포에 대해 1800배의 강한 독성을 나타낸 것과 유사한 양상을 보여주었다.⁴¹⁾

[³H] ACVMP-AF접합체의 수용액에서의 안정성

Figure 9는 37°C에서 phosphate buffer system (pH 5.0, 6.0, 7.4, 9.0, μ=0.3)에서 [³H] ACVMP-AF접합체의 stability profile을 나타낸 그림이다. pH 5.0에서 [³H] ACVMP-AF접합체는 실험실적 농도에서

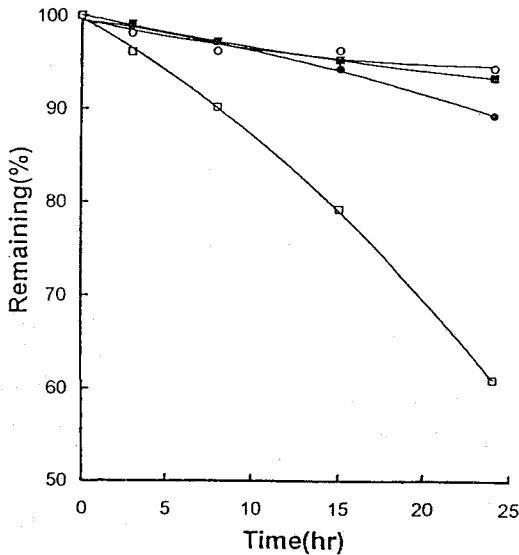


Figure 9—Stability profile of $[^3\text{H}]$ ACVMP-AF in phosphate buffer solutions ($\mu=0.3$) of pH 5.0(□), 6.0(■), 7.4(○), and 9.0(●) at 37°C.

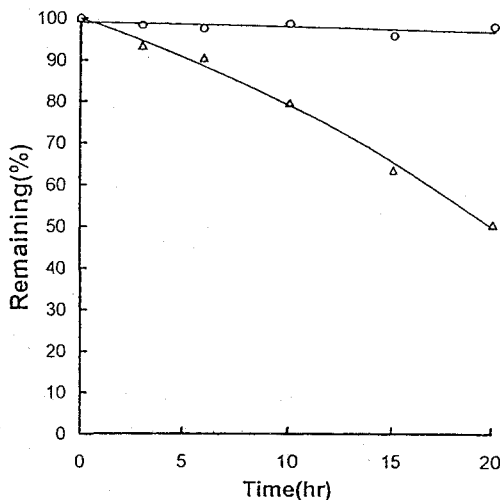


Figure 10—Stability profile of $[^3\text{H}]$ ACVMP-AF in plasma(○) and liver homogenate(△) at 37°C.

pseudo-first order kinetics를 따라 분해되었다. 그러나 pH 6.0, 7.4, 9.0의 phosphate buffer system에서는 비교적 안정하였다.

$[^3\text{H}]$ ACVMP-AF접합체의 혈장 및 간 homogenate에서의 안정성

Figure 10은 흰쥐의 혈장과 liver homogenate에서 $[^3\text{H}]$ ACVMP-AF접합체의 분해를 나타낸 그림이다. Liver homogenate는 pseudo-first order kinetics로 $[^3\text{H}]$ ACVMP-AF접합체의 분해를 촉진시켰으나, 흰

쥐의 혈장에서는 특별히 분해되지는 않았다. Arabinoside A와 결합된 AF⁴²과 ACVMP와 결합된 lactosaminated 알부민⁴³은 간에서 활성약물을 방출하며, 본 실험 성적도 $[^3\text{H}]$ ACVMP-AF접합체가 간에서 활성약물을 방출할 수 있음을 시사해 주고 있다.

결론

$[^3\text{H}]$ Acyclovir monophosphate를 asialofetuin과 접합체를 형성하여 선택적으로 간에 표적화하는 것이 본 실험의 목적으로, in vivo실험 결과 다른 조직에 비해 간에 선택적으로 표적화됨을 알 수 있었으며, 1시간 내에 대부분 담즙으로 배설되었다. In vitro에서의 간 포획실험 결과 $[^3\text{H}]$ ACVMP-AF접합체와 함께 배양한 간세포는 비교군보다 용량의존적으로 radioactivity가 증가하였으며 간포획은 60분내에 거의 완전히 일어났다. $[^3\text{H}]$ ACVMP-AF 접합체는 pH 5.0에서 pseudo-first order kinetics로 분해되었으며, pH 6.0, 7.4, 9.0의 완충액에서는 비교적 안정하였다. 또한 접합체가 간세포에서, 효율적으로 free drug을 방출하는 가를 알기 위한 실험에서 ACVMP-AF는 백서의 간 homogenate에서는 pseudo-first order kinetics로 분해가 신속하게 일어났으나 혈장에서는 안정하였다. 이러한 결과는 $[^3\text{H}]$ ACVMP-AF접합체를 체내에 주사할 경우 혈중에서는 안정하게 존재하면서 원하는 부위인 간세포에 의해서 신속하게 포획되고 원하지 않는 부위인 신장 및 그 밖의 장기로는 비표적화되어 부작용의 가능성을 감소시키고, 간실질세포내에서 free drug을 유리하여 약물작용을 나타낼 수 있는 이상적인 간 표적화 시스템으로 개발될 수 있을 것으로 사료된다.

문헌

- 1) L. Illum and S.S. Davis, Effect of the nonionic surfactant poloxamer 338 on the fate and deposition of polystyrene microspheres following intravenous administration, *J. Pharm. Sci.*, **72**, 1086-1089(1983).
- 2) A. Singhal and C.M. Gupta, Antibody-mediated targeting of liposomes to red cells in vivo, *FEBS*, **201**, 321-326(1986).
- 3) L. Illum and S.S. Davis, The organ uptake of intravenously administered colloidal particles can be altered using a non-ionic surfact-

- ant(Poloxamer 388), *FEBS*, **167**, 79-82(1984).
- 4) J.M. Gallo, P.K.Gupta, C.T. Hung and D.G. Perrier, Evaluation of drug delivery following the administration of magnetic albumin microspheres containing adriamycin to the rat, *J. Pharm. Sci.*, **78**, 190-194(1989).
 - 5) C.R. Gardiner, "Drug delivery-where now?", In : *Drug delivery systems*, P. Johnson & J.G. Lloyd-Jones(Eds), pp 11-31, Ellis Horwood, Chichester(1987).
 - 6) M.Z. Poznansky and L.G. Cleland, "Drug delivery systems." (Ed), p. 253, R.L. Juliano, Oxford University Press, New York (1980).
 - 7) H. Sezaki and M. Hashida, "Directed drug delivery," (Ed), p. 189, R.T. Borchardt, A.J. Repeta and V.J. Stella, Humana Press, Clifton (1985).
 - 8) E.B. Roche, *Bioreversible carriers in drug design*, Maecel Dekker, New York(1988).
 - 9) W. Kramer, G. Wess, G. Schubert, M. Bickel, F. Girbig, U. Gutjahr, S. Kowalewski, K. H. Baringhaus, A. Erhsen, H. Glombik, S. Muller, G. Neckerman, S. Schulz, E. Petzinger, Liver-specific drug targeting by coupling to bile acids, *J. Biol. Chem.*, **267**, 18598-18604(1992).
 - 10) E. Tomlinson, "Biological dispersion and the design of site-specific protein therapeutic systems." G. Gregoriadis et al.(Eds), pp 1-19, In : *Targeting of drugs 2*, Plenum Press, New York(1989).
 - 11) J.D. Rodwell(Ed), *Antibody-mediated delivery systems*, Marcel Dekker, New York(1988).
 - 12) A.E. Frankel L.L. Houston, B.F. Issel, Prospects for immuontoxin therapy in cancer, *Ann. Rev. Med.*, **37**, 125-142(1986).
 - 13) P.G. Balboni, A. Minia, M.P. Grossi, G. Barbanti-Brodano, A. Mattioli and L. Fiume, Activity of albumin conjugates of 5-fluorodeoxyuridine and cytosine arabinoside on poxviruses as a lysomotropic approach to antiviral chemotherapy, *Nature*, **264**, 181-183(1976).
 - 14) S. Lestavel-Delattre, F. Martin-Nizard, V. Clavey, P. Testard, G. Favre, G. Doualin, H. S. Houssaini, J.M. Bard, P. Duriez et al., Low-density lipoprotein for delivery of an acrylophenone antineoplastic molecule into malignant cells, *Cancer Res.*, **52**, 3629-3635 (1992).
 - 15) L. Fiume, B. Bassi, C. Busi, A. Mattioli, G. Spinosa and H. Faulstich, Galactosylated poly(L-lysine) as a hepatotropic carrier of 9- β -D-arabinofuranosyladenine 5'-monophosphate, *FEBS Letters*, **203**, 203-206(1986).
 - 16) S.C. Silverstein, R.M. Steinman and Z.A. Cohn, Endocytosis, *Annu. Rev. Biochem.*, **46**, 669-722(1977).
 - 17) J. Kaplan, Polypeptide-binding membrane receptors: analysis and classification, *Science*, **212**, 14-20(1981).
 - 18) G. Ashwell and A.G. Morell, The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins, *Adv. Enzymol. Related Areas Mol. Biol.*, **41**, 99-128(1974).
 - 19) G. Ashwell and J. Harford, Carbohydrate-specific receptors of the liver, *Ann. Rev. Biochem.*, **51**, 531-554(1982).
 - 20) P.P. Breitfeld, C.F.Jr. Simmons, Ger J.A. Strous, H.J. Geuzé, A.L. Schwartz, Cell biology of the asialoglycoprotein receptor system: A model of receptor-mediated endocytosis, *Int. Rev. Cytol.*, **97**, 47-95(1985).
 - 21) K. Brides, J. Harford, G. Ashwell and R.D. Klausner, Fate of receptor and ligand during endocytosis of asialoglycoproteins by isolated hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 350-354(1982).
 - 22) E. Regoeczi, M.T. Debanne, M.W.C. Hatton and A. Koj, Elimination of asialofetuin and asialoorosomuroid by the intact rat: Quantitative aspects of the hepatic clearance mechanism, *Biochim. Biophys. Acta*, **541**, 372-384(1978).
 - 23) A.J. Zuckerman, Hepatitis B vaccine, *Nature*, **267**, 578-579(1977).
 - 24) S. Sherlock and H.C. Thomas, Treatment of chronic hepatitis due to hepatitis B virus, *Lancet*, **2(8468)**, 1343-1346(1985).
 - 25) G.B. Elion, P.A. Furman, J.A. Fyfe, P.De Miranda, L. Beauchamp, and H.J. Schaeffer, Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanosine, *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5716-5720(1977).
 - 26) W.H. Miller and R.L. Miller, Phosphorylation of acyclovir (acycloguanosine) monophosphate by GMP kinase, *J. Biol. Chem.*, **255**, 7204-7207(1980).
 - 27) R. Dolin, Antiviral chemotherapy and chemoprophylaxis, *Science*, **227**, 1296-1303(1985).
 - 28) M.Yoshikawa, T. Kato and T. Takenishi, A novel method for phosphorylation of nucleosides to 5'-nucleotides, *Tetrahedron Letters*, **50**, 5065-5068(1967).
 - 29) C.S. Yong, S.H. Son, C.S. Jun and D.-M. Oh, Hepatic targeting of acyclovir using asialofetuin as a drug carrier, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **24**, 217-225(1994).
 - 30) M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quan-

- tities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254(1976).
- 31) M. Weiss, On pharmacokinetics in target tissues, *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, **6**, 57-66(1985).
 - 32) M.G. Lee, C.Y. Lui, M.L. Chen and W.L. Chiou, Pharmacokinetics in blood IV: unusual distribution, storage effect and metabolism of methotrexate, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, **22**, 530-537(1984).
 - 33) Seglen P. O., Preparation of rat liver cells III. Enzymatic requirements for tissue dispersion, *Exp. Cell. Res.*, **82**, 391-398(1973).
 - 34) Seglen P. O., Preparation of rat liver cells II. Effects of ions and chelators on tissue dispersion, *Exp. Cell. Res.*, **76**, 25-30(1976).
 - 35) Hanks, J. H., and R. E. Wallace., Relation of oxygen and temperature in the preservation of refrigeration., *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.*, **71**, 196(1949).
 - 36) Berry M. N., and Friend D. S., High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells., *J. Cell. Biol.*, **43**, 506-520(1969).
 - 37) L. Fiume, B. Bassi, C. Busi and A. Mattioli, Preparation of a lactosaminated albumin-ara-AMP conjugate which remains soluble after lyophilization, *Pharm. Acta. Helv.*, **60**, 318-320(1985).
 - 38) A.I. Hubbard, G. Willson, G. Ashwell and H. Stukenbrok, An electron microscope autoradiographic study of the carbohydrate recognition systems in rat liver, *J. Cell Biol.*, **83**, 47-64(1979).
 - 39) D.A. Wall G. Willson and A.I. Hubbard, The galactose-specific recognition system of mammalian liver: the route of ligand internalization in rat hepatocytes, *Cell*, **21**, 79-93(1980).
 - 40) A. Trouet, M. Masquelier, R. Baurain, and D. Campeneere, A covalent linkage between daunorubicin and proteins that is stable in serum and reversible by lysosomal hydrolases, as required for a lysosomotropic drug-carrier conjugate: In vitro and in vivo studies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 626-629(1982).
 - 41) D.B. Cawley, D.L. Simpson and H.R. Herschman, Asialoglycoprotein receptor mediates the toxic effects of an asialoglycoprotein-diphtheria fragment A conjugate on cultured rat hepatocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3383-3387(1981).
 - 42) L. Fiume, A. Mattioli, P.G. Balboni, M. Tognon, G.B. Barbanti, J. De Vries, T. Wieland, Enhanced inhibition of virus DNA synthesis in hepatocytes by trifluorothymidine coupled to asialofetuin, *FEBS Lett.*, **103**, 47-51(1979).
 - 43) L. Fiume, C. Busi, A. Mattioli, C. Spinelli, and G. Spinosa, A conjugate of acyclovir monophosphate with lactosaminated albumin release the phosphorylated drug in liver cells, *Naturwissenschaften*, **76**, 74-76(1989).