

연고제로부터 α -인터페론의 흡수

심창구 · 김대덕 · 정인환* · 김현수* · 유무영*

서울대학교 약학대학 · 제일제당(주) 종합연구소*

(1986년 8 월 25일 접수)

Absorption of α -Interferon from Ointment after Topical Application to Nude Mice and Rats

Chang-Koo Shim, Dae-Duk Kim, In-Whoan Jung*, Hyun-Su Kim*
and Moo Yung Yoon

College of Pharmacy, Seoul National University and
R & D Center* Cheil Sugar Co

(Received August 25, 1986)

Time-concentration curves of recombinant human interferon alpha(rIFN- α A) in the skin and serum of nude mice or rats were studied after topical application of IFN ointment. IFN appeared in the skin and serum in less than 30 minutes and lasted for more than 10-12 hours at high concentration level after the application to nude mice at a dose of 9.0×10^5 IU/g mouse. But in the rats, IFN was not detected in the serum even 7 hours after the application at a dose of 6.0×10^5 IU/g rat. Topical application of IFN might be useful for the topical and systemic treatment if the human skin resembles that of nude mouse in respect to transport characteristics.

인터페론(이하 IFN이라 칭함)은 1957년 Issacs와 Lindenmann¹⁾에 의해 항바이러스 물질로 보고된 이래, 여러 분야에서 이에 대한 연구가 추진되어 왔다.

1966년 Strander와 Cantell은 human leukocyte IFN을 분리·생산하는 방법²⁾을 보고 하였고 1974년 Akio 등³⁾과 1976년 Torma 등⁴⁾은 human leukocyte IFN의 정제법을 보고 하였으며, 1978년 Cantell⁵⁾은 leukocyte IFN (α -IFN)의 대량생산법을 확립하여 암을 비롯한 바이러스성 질환치료 연구에 IFN을 사용할 수 있게 되었다.

국내에서는 임 등⁶⁾에 의한 human α -IFN의 대량생산에 관한 보고가 있고 그 임상적 효과에 대하여서도 신 등⁷⁾과 허 등⁸⁾의 보고가 있다. 그러

나 human leukocyte IFN은 사람 혈액으로부터 만들어야 하므로 그 생산에 제한을 받는 단점이 있으므로 human leukocyte IFN의 생산법이 개발·진행되는 동안 *in vitro*에서 세포배양에 의한 IFN 생산연구도 급속한 속도로 발전을 가져왔다.

1974년 Tan 등⁹⁾은 IFN의 somatic cell (mouse와 hybrid cell)에 대한 유전학적 연구를 발표하였고 Trinchieri 등¹⁰⁾은 virus transformed cell에 대하여 IFN 관련 연구를 하였으며, 1979년에는 Giard 등¹¹⁾에 의하여 human diploid cell (fibroblast)에 의한 IFN 생산법이 연구되었다.

EB virus로 transformed된 Namalva 세포를 이용하여 human lymphoblastoid IFN을 생산하는 연구는 1975년 Adams 등¹²⁾에 의한

lymphoid cell line 개발과 Klein 등¹³⁾, Bridgen 등¹⁴⁾ 및 1978년의 Zoon 등¹⁵⁾에 의해 그 기틀이 마련되었다.

그러나 Namalva 세포생산 IFN의 경우 EB virus의 genome 일부가 잔존하여 안전성에 영향을 줄 수 있다는 전제하에 이에 대한 연구가 진행되어 1979년 (IFN workshop, NIH)에 EB virus(genome)를 고의로 첨가하여 시험한 결과 정제과정에서 소실되어 최종제품에는 검출되지 않았다고 발표되었으며 최근 IFN의 정제법 발달과 특히 monoclonal antibody에 의한 정제법^{16,17)}의 발달로 정제 순도가 높아지고 대량생산의 추진이 가능해졌으며 1984년 김 등¹⁸⁾은 EM 바이러스로부터 transformed 된 lymphoblastoid IFN의 대량생산을 위한 배지조성, 배양기 조건, 반연속 배양 및 IFN 유발조건 등을 결정하였다.

어떤 물질을 약(藥)으로 개발하고자 할 때에는 그 물질을 인체에 적용하였을 경우의 생체내 동태를 파악해 두는 것이 반드시 필요하다. 이는 그 물질의 안전성과 유효성을 판단하는데 참고가 될 뿐만 아니라 이상적인 치료를 위한 최적의 투여계획 즉 투여경로, 투여용량 및 투여간격 등을 설정하는데 있어서 불가결의 자료가 되기 때문이다.

이런 중요성이 있음에도 불구하고 IFN의 생체내 동태에 관한 연구가 보고된 예가 극히 한정되어 있는 실정이다. Satoh 등¹⁹⁾은 β -IFN을 토끼에게 정맥 및 근육주사 하였을 때의 체내동태를, Bocci 등²⁰⁾은 적출 또는 관류상태하의 토끼 신장에서 α -IFN의 여과등을, Palleroni와 Bohoslawsc²¹⁾는 방사성 동위원소(I^{125})로 labelling 한 α -IFN을 마우스에 정맥주사하였을 때의 조직분포를, 그리고 Joyce와 Balkwill²²⁾은 IFN의 임상응용에 관한 중실 중에서 IFN의 생체내 동태를 소개하고 있는 정도이다.

이상의 어느 논문도 유전자 조작법으로 제조한 α -IFN을 정맥 투여하였을 때 및 피부에 도포하였을 때의 IFN의 혈청중 또는 피부조직중의 IFN 동태를 약물체내속도론적으로 규명하지 아니하였다.

다만 심 등^{23,24)}에 의해 실험동물에 정맥주사 및 경피로 투여된 α -인터페론(Namalva IFN- α)

의 체내 동태가 보고된 바 있다. 이때의 α -인터페론은 세포배양법으로 제조한 것이다.

본 연구에서는 유전자 조작법을 이용하여 대장균으로부터 생산한 사람 α -interferon (α -IFN)의 연고제를 nude 마우스 및 rat 피부에 도포한 다음 피부조직 및 혈청중의 IFN의 체내 동태를 연구하였다.

실험방법

시료

유전자 조작법을 이용하여 대장균으로부터 생산한 사람 α -interferon (rIFN- α A)을 써서 만든 연고제를 제일제당 종합연구소로부터 제공받아 실험에 사용하였다. 동결건조시킨 연고제의 표시역가는 1×10^5 IU/g이었다. 각 경우의 IFN 원료의 순도는 10^8 IU/mg protein 이상이었다.

세포 및 바이러스

IFN 역가 검정용 세포는 human amnion cell인 WISH 세포를 사용하였으며, Challenge virus는 vesicular stomatitis virus (이하 VSV로 칭함)를 사용하였다.

VSV의 역가측정

VSV의 역가측정은 정 등²⁵⁾의 방법에 따라 행하였다. IFN 역가 분석에는 100TCID 및 50TCID의 역가를 가진 VSV 액을 사용하였다.

IFN의 역가 분석

96 wells microplate (Linbo)의 각 well에 10% fetal bovine serum (이하 FBS로 칭함)이 함유된 EMEM 배지를 0.05ml씩 첨가한 후, 좌 단열 1번부터 9번째 well까지는 표품을, 10번째에는 IFN 표준액을 0.05ml씩 첨가하였으며, 11번째와 12번째에는 EMEM 배지를 0.05ml 첨가하였다. 2 단계씩 희석한 후 5×10^5 cell/ml의 농도를 갖는 WISH 세포 배양액을 각 well에 0.1ml 첨가하였다. 37°C가 유지되는 CO₂ 배양기 (5%)내에 plate를 16-24시간 방치한 후 배지를 제거하고 PBS(-) 완충용액으로 plate를 씻어 주었다. 1번부터 11번까지의 well에는 VSV를 0.1ml 첨가하고 12번째 well에는 1% FBS가 함유된 EMEM 배지를 0.1ml 첨가한 후 20-24시간

동안 37°C의 CO₂ 배양기 내에서 배양한 후 바이러스액을 제거하였다. 0.02% neutral red 용액을 0.1ml씩 각 well에 첨가한 다음, 30분 동안 방치한 후 neutral red를 제거하고 PBS(-) 완충 용액으로 2회 씻어 주었다.

引地一昌 등²⁶⁾의 방법으로 neutral red를 추출한 다음 Microelisa autoreader MR 580을 사용하여 545nm에서 흡광도(OD)를 측정하였다. IFN 역가산출은 11번 well과 12번 well의 OD 값의 평균치를 구해 50% CPE로 하고 각 well에서의 50% CPE 흡광도를 산출하였다. 각 시료와 표준액의 50% CPE 회색율을 비교하여 IFN의 역가를 산출하였다.

실험동물

청정 조건하에서 사육된 건강한 nude mouse (BALB/C 계, 20-30g)와 Sprague-Dawley 웅성 rat (250~300g)을 사용하였다.

연고의 도포 및 혈액 시료의 조제

마우스 등背部에 IFN 연고(4.5×10^5 IU/g) 2g씩을 약 5cm²의 넓이로 고루 도포한 후 한 cage에 한 마리씩 넣어 두었다. 도포한 후 0, 0.33, 0.67, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10시간 쯤에 한 마리씩 Pasteur pipette을, 사용하여 안구 채혈한 다음 원심분리하여 혈청을 얻어 -20°C 냉동고에 보관하였다. rat는 5마리를 한 군으로 하였다.

수술대에 rat의 사지를 묶은 후 전기 바리칸으로 배부(背部)의 털을 깎아내고 에텔 마취하에서 대퇴동맥에 카테터(PE-50, Intramedic, Clay Adams)를 cannulation 하였다. 30분 이상 방치하여 rat가 마취에서 완전히 깨었을 때 IFN 연고(1×10^5 IU/g) 6g을 약 10cm²의 피부에 고루 도포하였다.

연고를 도포한 후 10, 20, 40, 60, 120, 180, 300, 420분에 약 0.2ml의 동맥혈을 채취하여 serum을 얻었다.

연고의 도포 및 피부시료의 조제

마우스 등에 위와 같이 연고를 도포한 후 0, 0.33, 0.67, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12시간 쯤에 한 마리씩 경추를 절단하여 도살한 다음 마우스 피부에 남아 있는 연고를 멸균 gauze로 깨끗

이 닦아내고 그 부위를 떼어 내 무게를 단 다음 잘게 썰어 homogenize용 튜브에 넣었다. 피부 무게(g)와 동량(ml)의 멸균 생리식염수를 가하고 냉수로 식히면서 약 10분간 tissue homogenizer (Omega Electric, Sinagawa, Tokyo, Type SM-3)로 homogenize시킨후 15,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 상층액을 취하였다. 이 액은 분석할 때까지 -20°C에서 보존하였다.

마우스 혈청 중의 IFN 정량

채취한 혈청은 상기한 「IFN의 역가분석」 방법에 따라 IFN을 정량하였다. 이 역가분석은 같은 시료에 대해 duplicate로 시행하였다.

마우스 및 Rat 피부조직 중의 IFN 정량

시료를 취한지 24시간 이내에 혈청중의 IFN 정량과 동일한 방법으로 생리식염수 중의 IFN을 정량하여 회색배수를 보정하여 피부조직 중의 IFN 역가를 산출하였다. 동일 시료에 대해 duplicate로 역가를 정량하였다.

결 과

Mouse 및 Rat의 피부에 도포한 IFN 연고로부터의 흡수와 체내동태

Fig.1은 nude mouse 피부 5cm에 1.0×10^5

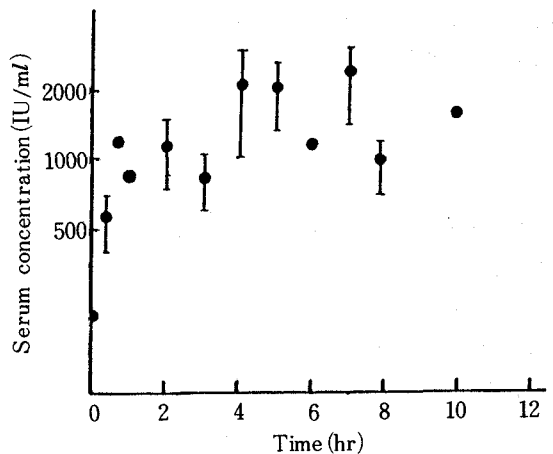


Figure 1 — Mean serum concentration of rIFN- α A after topical administration of IFN ointment at the dose of 6.0×10^5 IU/body (6.0g/body). Each point represents mean \pm S.E. of 1-3 nude mice.

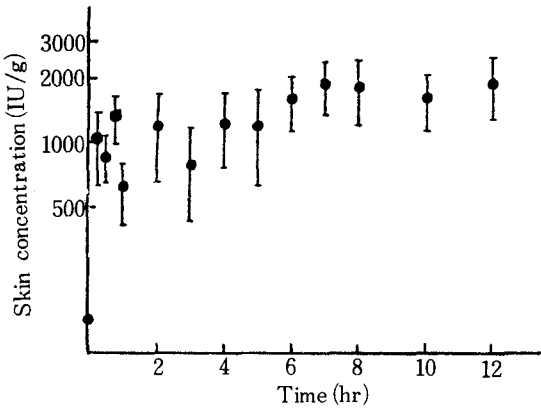


Figure 2—Skin concentration-time curve rIFN- α A after topical administration of IFN ointment at the dose of 6.0×10^5 IU/body (6.0g/body). Each point represents the mean \pm S.E. of 3-9 nude mice.

IU/g의 연고를 6g씩 도포한 후의 혈청중 역가의 mean \pm S.E.를 보인 것이다.

Fig.2는 Fig.3에서와 동일한 방법으로 nude mouse 피부에 도포한 IFN 연고로부터 피부조직 중에 이행된 IFN의 역가 변화를 경시적으로 plot한 것이다.

한편 rat의 털을 바리칸으로 삭제한 후 IFN 연고(1.0×10^5 IU/g)를 $10\text{cm}^2/\text{rat}$ 피부에 6g/rat씩 도포한 후의 혈청중 IFN 역가를 5마리의 rat에 대해 0-6시간에 걸쳐 측정해 본 결과, nude mouse의 경우와는 달리 혈청중에 IFN의 역가가 유의성있게 검출되지 않았다.

고 찰

nude mouse의 피부에 도포된 연고로부터 마우스의 혈중으로의 IFN 흡수를 나타내는 Fig.1을 보면 IFN은 피부에 도포된 후 신속히 피부를 통과하여 순환혈액계에 흡수됨을 알 수 있었다. 즉 도포 10분 후부터 혈청중 농도가 상승하여 10시간 후까지도 거의 일정한 농도를 유지하였는 바, 이는 피부를 통한 흡수와 IFN의 순환 혈액으로부터의 소실이 도포 직후부터 거의 평형을 이루고 있음을 반영하는 것으로 생각된다.

이와 같은 가정은 IFN이 연고로부터 신속히 피부에 이행된다고 해야 가능한 가정이다. Fig.2를

볼 때 IFN은 연고로부터 신속히 마우스 피부내에 이행하였으므로 이 가정은 타당하다고 생각된다. 즉 IFN은 연고 기재로부터 마우스 피부에 신속히 이행한 다음 피부를 지나 순환 혈액 중으로 흡수되는데 피부중 농도와 혈청중 농도가 거의 동일한 사실로 미루어 생리적조건 하에서 IFN의 조직/혈청간 분배 계수는 1에 근접하는 값이 아닌가 생각된다. 따라서 도포된 연고중에 포함되어 있는 대과량의 IFN이 피부내에 이행되어 피부내 농도가 증가되려는 경향을 보일 때에 피부내의 IFN이 혈청으로 그 분배비가 약 1이 될 때까지 단순 확산에 의해 흡수됨으로 인해서 피부중·혈청중 농도가 신속히 상승한 후 pseudo steady-state 상태를 보여주는 것으로 사료된다.

이와 같은 결과중 조직중 농도 추이는 세포배양 IFN (Namalva IFN- α)에 대한 전보²³⁾의 결과와 다소 상이하였는 바, 이는 IFN의 생산방법의 차이에 기인한 것인지, 아니면 도포된 IFN의 양이 전보에서는 본 연구의 경우보다 적어 혈청중으로의 흡수에 의해 조직중 농도의 감소가 보인 것인지는 추후 연구가 필요하리라 생각된다. 다만 이 두 가지 연구에서 피부조직 내까지 이행된 IFN은 생산방법의 차이에 관계없이 혈청중으로 신속히 흡수된다는 사실을 알았다.

한편 마우스 대신에 rat의 피부에 도포한 연고로부터 IFN의 혈액으로의 흡수는 매우 미미하여 혈청중에서 IFN의 역가가 검출되지 않았다. 이는 아마도 동물종 간의 피부 특성의 차이를 반영하는 것으로 rat의 피부가 nude mouse의 피부보다 두껍고 그 투과성이 나빠 IFN이 rat 피부에 흡착되어 고정되는 것이 아닌가 생각된다. 사람의 피부의 경우 어느 종의 피부와 IFN 흡수 특성이 유사할 것인가는 추후 연구가 더욱 필요하리라 생각된다.

결 론

nude 마우스 피부에 연고 상태로 도포된 rIFN- α A는 신속히 피부에 이행한 다음 곧이어 혈액으로 흡수되어, 도포 직후부터 거의 일정한 조직중 농도 및 혈청중 농도를 유지하였다. 이는 이 연

고제의 피부국소적 효용은 물론, 경피흡수를 통한 전신적인 효용의 가능성을 시사해 주는 것으로 생각되었다.

그러나 rat 피부에 도포한 IFN 연고로부터의 혈액으로의 IFN 흡수가 인정되지 않은 사실은 아마도 동물종 간의 차이를 반영하는 것으로 인체의 피부의 모델로 두 동물중 어떤 동물을 택하여야 할 것인가는 추후 검토가 필요하다고 생각되었다.

문헌

- 1) A. Issacs and J. Lindenmann, Virus interference I. The interferon, *Proc. Royal Soc. B*, **147**, 258-267 (1957)
- 2) H. Strander and K. Cantell, Production of interferon by human leukocytes *in vitro*, *Ann. Med. Exp. Fenn.* **44**, 265-273 (1966)
- 3) A. Matsuo, *et al.*, Production and purification of human leukocyte interferon, *Japan. J. Microbiol.*, **18**, 21-27 (1974)
- 4) E.T. Torma and P. Kurt, Purification and characterization of human leukocyte interferon components, *J. Biol. Chem.*, **251**, 4810-4816 (1976)
- 5) K. Cantell and S. Hirvonen, Large-scale production of human leukocyte interferon containing 10 units per ml, *J. Gen. Virol.*, **39**, 541-543 (1978)
- 6) S.D. Lim, K.H. Kim, C.S. Woo and C. Haw, Large scale production of human α -interferon for clinical use, *조영식 박사 회갑 기념 논문집*, pp. 971-980 (1980)
- 7) S.M. Shin, *et al.*, The effect of human leukocyte interferon on epidemic keratoconjunctivitis and herpetic keratitis, *The New Medical Journal*, **26**, 96-100 (1983)
- 8) C-R, Haw, *et al.*, A double blind study of interferon ointment in the treatment of viral skin disease, *The New Medical Journal*, **26**, 101-108 (1983)
- 9) Y.H. Tan, *et al.*, The somatic cell genetic of human interferon, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **71**, 2251-2255 (1974)
- 10) G. Trinchieri and D. Santoli, Anti-viral induced by culturing lymphocytes with tumor derived or virus-transformed cells, *J. Exp. Med.*, 1314-1333 (1977)
- 11) D.J. Giard, *et al.*, Human interferon production with diploid fibroblast cells on microcarriers, *Biotechnology and bioengineering*, John Wiley and Sons Inc. XXI 433-442 (1979)
- 12) A. Alice, H. Strander and K. Cantell, Sensitivity of the esptein-barr virus transformed human lymphoid cell lines to interferon, *J. Gen. Virol.*, **28**, 207-217 (1975)
- 13) K. Frederick, *et al.*, Large-scale production and concentration of human lymphoid interferon, *Ant. Agents Chemotherapy*, **15**, 420-427 (1979)
- 14) P.J. Bridgen, *et al.*, Human lymphoblastoid interferon. Large scale production and partial purification, *J. Biol. Chem.*, **252**, 6585-6587 (1977)
- 15) K.C. Zoon, *et al.*, Production of human lymphoblastoid interferon by namalva cells, *J. Clin. Microbiol.*, 44-51 (1978)
- 16) D.S. Secher, *et al.*, A monoclonal antibody for large-scale purification of human leukocyte interferon, *Nature*, **285**, 446-450 (1980)
- 17) D. Novick, *et al.*, Monoclonal antibody to human α -interferon and their use for affinity chromatography, *J. Immunol.*, **129**, 2244-2247 (1982)
- 18) W.Y. Kim, E.Y. Choi, H.S. Kim, C.H. Son, J.C. Bae, J.H. Yu and W.Y. Lee, Mass production of human lymphoblastoid interferon by namalva cells I. Production of human lymphoblastoid interferon in submerged culture, *J. Kor. Soc. Virology*, **14**, 27-33 (1984)
- 19) Y.I. Satoh, K. Kasama, A. Kajita, H. Shimizu and N. Ida, Different pharmacokinetics between natural and recombinant human interferon beta in rabbits, *J. Interferon Res.*, **4**, 441-442 (1984)
- 20) V. Bocci, A. Pacini, M. Muscettola, L. Paulesu, G.P. Pessina, M.K. Santiano and

- I. Viano, Renal filtration, absorption and catabolism of human alpha interferon, *J. Interferon Res.*, 347-352 (1981)
- 21) A.V. Palleroni and O. Bohoslawsc, Use of 125 I-interferon in pharmacokinetic and tissue distribution studies, *J. Interferon Res.*, 4, 493-498 (1984)
- 22) T.P. Joyce and F.R. Balkwill, Implications for clinical application of new developments in interferon research, *Biochim. Biophys. Acta*, 695, 49-67 (1982)
- 23) C.K. Shim D.D. Kim, I.W. Jung, W. Chang, H.S. Kim and M.Y. Yoo, Pharmacokinetic study of α -interferon administered intravenously and topically in experimental animals, *J. Kor. Soc. Virol.*, 15, 91-97 (1985)
- 24) C.K. Shim, D.D. Kim, I.W. Chung and H. S. Kim, Pharmacokinetics of human interferon alpha in rats, *J. Interferon Res.*, submitted.
- 25) 정인환, 장 욱, 김현수, 배중찬, 이원영 : Hep-2 : VSV system 을 이용한 인터페론 역가측정 연구, 산업미생물학회지, 13, 27-31 (1985)
- 26) 引地一昌, SRL Report, 6, 28-32 (1982)