

Soybean Trypsin Inhibitor와 황산 콘드로이친 포합체의 약리 효과 평가

최윤림 · 남현규 · 신영희[†]

경성대학교 약학대학
(2000년 2월 11일 접수)

Evaluation of Pharmacological Effect of Soybean Trypsin Inhibitor-Chondroitin Sulfate Conjugates

Youn-lim Choi, Hyun-gu Nam and Young-hee Shin[†]

College of Pharmacy, Kyungshung University, Pusan 608-736, Korea

(Received February 11, 2000)

ABSTRACT—Kunitz-type soybean trypsin inhibitor (SBTI) and chondroitin sulfate (A, and C type) were conjugated using sodium periodate method. And the physicochemical, pharmacokinetic properties and immunogenicity of the conjugates (Chon-A-SBTI or Chon-C-SBTI) were characterized. We expected the conjugation using chondroitin sulfate to reduce the immunogenicity and to improve the pharmacological effect. As the results, the mean molecular weight of the conjugate highly increased. After I.V. injection of the radiolabeled conjugates or native SBTI into mice, it was found that native SBTI showed rapid elimination from plasma, whereas Chon-A-SBTI and Chon-C-SBTI were slowly eliminated. Organ distribution of the two agents at 30 min after I.V. injection was different : Chon-A-SBTI or Chon-C-SBTI accumulated to a large extent in the liver (13% in Chon-A-SBTI and 16% in Chon-C-SBTI), whereas native SBTI was taken up more rapidly by the kidney (107% dose/g of tissue) and excreted into the urine (26%). In addition we evaluated the therapeutic value of the conjugates by using the sublethal septic shock model caused by *pseudomonal elastase* and tested the immunogenicity by passive cutaneous anaphylaxis shock (PCA). The conjugates were more effective than native SBTI against *pseudomonal elastase* induced septic shock in guinea pig. In case of the conjugates, the pharmacological and therapeutic effect lasted over 3 hours long. In immunogenicity test, both of the conjugates showed the reduction of their immunogenicity, especially Chon-A-SBTI looked most effective.

Keywords—Soybean trypsin inhibitor, Chondroitin sulfate, Polymer-conjugate, *Pseudomonal elastase* induced septic shock model, Immunogenicity

최근 단백질공학의 발달과 함께 생리활성이 현저한 생리 활성 단백질/펩타이드를 약물로서 응용하려는 많은 노력과 연구가 행해지고 있다. 그러나, 이들 생리활성 단백질/펩타이드를 약물로 적용할 경우에는 빠른 뇨 배설, 생리학적 또는 생화학적 불안정성 및 면역원성 등 극복해야 할 몇 가지 문제점^{1,2)}이 있다. 분자량이 적은 대부분의 단백질들은 사구체 여과에 의해서 체외로 급속히 배설되어 체내 반감기가 매우 짧다. 또한 생리학적 또는 생화학적 불안정성은 생체에 존재하는 다양한 종류의 프로테아제에 의한 단백질분해와 세망 내피계에서의 클리어런스에 기인한다. 뿐만 아니라 면역원성은 생리활성 단백질을 임상에 적용할 때의 가장 큰 걸림돌로서 생리활성 단백질 자체가 항원으로 작용하여 생성된 항체와 반응하는 항원성, 면역반응을 유도하는 면역원성

이 있고, 인간유래 재조합 단백질조차도 반복적인 사용에 의하여 면역반응을 일으킨다는 보고³⁾가 있다. 따라서 이런 문제점들을 극복하려는 많은 제제학적 방법들이 연구되고 있으며⁴⁻¹⁰⁾ 그 중 가장 효과적으로 검토되고 있는 방법중의 하나는 단백질을 적당한 고분자로 수식하는 방법이다. 천연 또는 합성 고분자를 이용한 복합 화합물들은 일반적으로 생체 적합성이 높으며, 항원성이 감소되며 안정성이 증가하고 고분자의 성질을 이용한 표적 약물수송이 가능한 이점을 가지고 있다. 실제로 adenosine deaminase-PEG, neocarzinostatin-poly(styrene-maleic acid)(SMANCS)¹¹⁾ 등은 이미 개발되어 현재 임상에 응용되고 있다.

본 실험에서는 자연에 존재하는 폴리사카라이드중의 하나인 황산 콘드로이친을 수송매체로 선택하여 단백질-고분자 포합체를 합성하고 그 치료학적 계수를 평가하고자 하였다. 황산 콘드로이친은 체내에 풍부하게 존재하는 푸로테오글리칸으로 N-아세틸 갈락토사민과 글루쿠로닌산의 이당체 단위

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 051)620-4886, E-mail : yhshin@star.kyungshung.ac.kr

가 반복적으로 되풀이되는 구조를 가지며, N-아세틸 갈락토사민이 슬론화된 위치에 따라 A 타입(4-sulfate), 및 C 타입(6-sulfate)으로 나누어 볼 수 있다. 더우기 인체에 존재하는 세린 프로테아제 억제제 중의 하나로 현재 임상에 응용되고 있는 human urinary trypsin inhibitor(UTI)에서 A 타입 황산 콘드로이친은 단백질의 세린 잔기에 결합하여 존재하고 있음이 밝혀져 있다.¹²⁻¹⁴⁾ 황산 콘드로이친의 생체 내 기능은 정확히 규명되지 않았으나 중요한 생체기능을 담당하고 있으리라 예측되며 이와 관련된 연구가 진행중이다. 따라서, 일반적으로 항원성이 적은 폴리사카라이드를 이용한 고분자 포합체를 합성하는 것은 면역원성을 감소시킬 수 있으리라 기대하며, 생체내에 특징적인 결합형태로 존재하는 황산 콘드로이친의 이용은 더욱 효과적일 것이라고 생각되었다.

대두로부터 추출한 kunitz 타입의 세린 프로테아제 억제제인 soybean trypsin inhibitor(SBTI)^{15,16)}는 혈장 칼리크레인 억제효과가 커 약물로 강력히 추천되고 있는 물질이나, 생체 반감기가 짧고 이중 단백질에 기인한 항원성 문제로 약물로서의 응용에 어려운 점이 있다. 저자 등은 천연 고분자 물질인 젤라틴을 SBTI와 결합하여 포합체를 합성하고 그 성질 등에 관하여 이미 보고한 바 있으나¹⁷⁾ 면역원성 문제를 극복하지 못하였다. 본 실험에서는 생체 내 반감기를 연장시키고 동시에 항원성도 감소시켜 치료학적 계수를 증가시킬 목적으로 SBTI와 황산 콘드로이친(A or C 타입)을 이용한 SBTI-황산 콘드로이친 포합체를 합성하고 이들의 물리화학적, 체내동태학적 성질과 치료학적 계수를 평가하고자 하였다.

실험방법

실험동물

실험동물로서는 대한실험동물센터에서 분양 받은 BALB/c 마우스(웅성, 25±1 g, 5주령)와 기니아 픽(Hartley albino, 250-300 g, 웅성), sprague dawley계 흰쥐(250±10 g, 웅성), 및 ddY 마우스(25±1 g, 5주령, 웅성, 일본 SLC, Shizuoka, Japan)를 일정한 조건(온도: 22±1°C, 습도: 55±3%, 명암: 12시간 주기)에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

시약 및 기기

Sodium periodate, sodium cyanoborohydride, N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid](HEPES), diethylenetriaminepentaacetic acid anhydride(DTPA), soybean trypsin inhibitor(SBTI), trypsin(type III) 등은 Sigma사(MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. chondroitin sulfate(A 타입 평균 분자량: 10,000와 C 타입 평균분자량: 25,000)는 일본 생화

학공업사에서 기증 받아 사용하였고, benzoyl-L-arginine-4-methyl-coumarin-7-amide(Bz-Arg-MCA)는 일본 Peptide 연구소 제품(Osaka, Japan)을 사용하였다. *Pseudomonas elastase*(PE.)는 일본의 Nagase Biochemical 사(Kobe, Japan)로부터 기증 받아 사용하였다. 그 외 시약들은 특급시약 또는 HPLC 급을 사용하였다. 실험에 사용한 기구로는 UV-Vis spectrophotometer(Shimadzu UV-1601), spectrofluorometer(Jasco FP-750), blood pressure transducer(TP-400T, Nihon Koden, Japan), ultrafiltration system(Amicon 8200), 동결건조기(EYELA CA-1500, EYELA FD-5N, GLD-100, Japan), γ -counter(ARC-2000, Aloka, Japan)등을 사용하였으며, Win-nonlin pro-gram(Scientific consulting incorporates사, USA)을 이용하여 체내동태학적 자료를 분석하였다.

SBTI-황산 콘드로이친 포합체의 합성

산화 황산 콘드로이친의 합성 - 과요오드산 나트륨법⁷⁾에 따라 A 및 C 타입의 황산 콘드로이친(1 g)를 각각 과요오드산나트륨(107 mg/10 ml)용액에 용해하여 상온, 암소에서 24시간 반응시킨 후, amicon ultrafiltration system(3,000 cut membrane)을 이용하여 미반응의 과요오드산 나트륨을 제거하고, 동결건조하여 산화 황산 콘드로이친을 얻었다.

SBTI-황산 콘드로이친 포합체의 합성, 분리 및 정제 - 산화 황산 콘드로이친(90 mg)을 SBTI(30 mg)와 0.2 M 염화나트륨과 0.3% 시안 수소화 붕소 나트륨을 함유한 20 mM 인산염 완충액(pH 7.4) 5 ml에 용해하여 상온에서 24시간 교반, 반응하여 포합체를 합성하였다. 합성한 SBTI-황산 콘드로이친 포합체를 Sephacryl S-200 column(3.5×65 cm, Pharmacia-LKB, Uppsala, Sweden)에 loading한 후, 100 mM 인산염 완충액(pH 7.4)으로 40 ml/hr의 속도로 용출하였다. 분획 크기는 5 ml로 하였으며, 각각의 분획은 280 nm에서 흡광도를 측정하여 용출 패턴을 구하였다. 용출 패턴에서 미반응의 SBTI 피크와 포합체의 피크가 분리된 것으로 보여지며, A 타입과 C 타입의 차이는 거의 볼 수 없었다. 포합체만의 분획(fraction No. 45-68)을 모아서 Amicon ultrafiltration system(3,000 cut membrane)으로 농축하였고, 이를 정제수로 3회 세척하여 탈염 한 후 동결 건조하여 포합체로서 실험에 사용하였다.¹⁷⁾

SBTI-황산 콘드로이친 포합체의 효소 활성

다양한 농도의 SBTI-황산 콘드로이친 포합체 용액 50 μ l씩을 함유한 시험관에 트립신용액(1 μ g/40 μ l in 0.02 M-CaCl₂ 함유 50 mM Tris-HCl, pH 8.2)을 가하여 교반한 후 37°C에서 10분간 반응시키고, 기질액으로 디메틸설폭사

이드에 용해한 5 mM Bz-Arg-MCA 10 μ l를 가하여 다시 교반하고 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응정지액으로 17% 초산용액 1 ml를 가한 후, 생성된 7-아미노-4-메칠쿠마린을 형광광도계를 이용하여 여기파장 380 nm, 발광파장 460 nm에서 형광세기를 측정하여 트립신의 활성을 50% 억제하는 농도(IC₅₀)를 구하였다.

체내동태학적 특성

DTPA coupling 및 방사성 표지 단백질 조제 - 킬레이팅화제로 DTPA를 이용하여 SBTI 및 합성한 포합체를 ⁵¹CrCl₃으로 각각 방사성 표지단백질을 만들었다.¹⁷⁾ 먼저 native SBTI와 SBTI-황산콘드로이친 포합체 20 mg 씩을 각각 0.1 M HEPES 용액(pH 7.0) 2 ml에 용해시킨 후, 5 배량의 DTPA를 가하고 실온에서 30분간 교반 반응시켰다. 이 반응물을 Sephadex G-25 column(2×15 cm)에서 정제수로 용출한 다음 각 분획을 280 nm에서 흡광도를 측정하고 화합물을 취하여 동결 건조하였다. 이들 단백질 적당량을 각각 0.1 M HEPES용액(pH 7.0)에 용해시킨 후 ⁵¹CrCl₃ 용액을 가하여 실온에서 24시간 방치해 방사성 표지한 다음 Sephadex G-25 column(PE-10, Pharmacia)으로 분리 정제하여 감마 카운터로 방사능 활성을 측정하였다.

Native SBTI와 SBTI-황산 콘드로이친 포합체의 체내 동태학적 계수 - 생리식염수로 적절히 희석한 각각의 방사성 표지 단백질(약 5×10⁵ cpm)을 ddY 마우스 꼬리 정맥으로 투여한 후 1, 3, 5, 10, 15, 20, 및 30 분에 꼬리 정맥으로부터 혈액 20 μ l씩을 채취하여 방사성 활성을 감마 카운터로 측정하여 약동력학적 데이터를 구하였다. Win nonlin computer program(Scientific consulting Inc., NC., USA)을 이용해 비컴파트먼트 모델로 해석하여 혈중 반감기(t_{1/2}), 혈중 농도곡선하면적(AUC), 및 전신 클리어런스(CL)을 구하였다.

Native SBTI와 SBTI-황산 콘드로이친 포합체의 생체내 분포 - 방사성 표지 단백질(약 5×10⁵ cpm)을 ddY 마우스 꼬리 정맥으로 투여한 후 30분이 경과하면 마우스를 희생시키고 각 조직장기를 적출하여 각 조직장기내의 방사성 활성을 측정하여 생체내 분포 상태를 관찰하였다.

치료학적 계수 평가

Septic shock caused by pseudomonas elastase in guinea pig^{18,19)} - 펜토바르비탈 나트륨을 복강주사(30 mg/kg)하여 마취한 기니아 피그의 경정맥을 약물주입을 위하여 PE-50 튜브로 케뉴레이션하고, MABP(Mean Arterial Blood Pressure) 측정을 위해 경동맥을 케뉴레이션하여 blood pressure transducer(Nihon Koden, TP-400T)에 연결하였다.

경정맥에 연결된 케뉴라에 대조군으로 생리식염수, 시료로서 native SBTI(33 mg/kg), Chon-A-SBTI 및 Chon-C-SBTI 포합체(각각 33 mg/kg native SBTI 상당량)를 생리식염수에 녹여 전처치하였고, 일정시간 후 *pseudomonas elastase*(P.E., 0.8 mg/kg)를 투여하여 MABP의 변화를 관찰하였다.

Immunogenicity test(Passive Cutaneous Anaphylaxis shock)²⁰⁾ - 8군으로 나눈 BALB/c 마우스 각각의 그룹에 대조군으로 Freund's adjuvant액을, 시료로서 ovalbumin(OVA 2 mg/kg), native SBTI의 고용량(25 mg/kg)과 저용량(2.5 mg/kg)을, SBTI-황산 콘드로이친 포합체의 고용량(25 mg/kg native SBTI 상당량)과 저용량(2.5 mg/kg native SBTI 상당량)의 Freund's adjuvant 현탁액을 마우스에 1주일 간격으로 3회 복강 주사하였다. 최종 주사 후 2주 후에 마우스의 혈액으로부터 혈장을 얻었다. 생리식염수를 이용해 다양한 농도로 희석한(x3, x10, x30, x100) 혈장 100 μ l를 랫트의 복부에 피내 주사하였다. 피내 주사 후 24시간이 경과한 후 랫트의 꼬리정맥을 통해 5% 에반스 블루와 대조군으로 생리식염수를 그리고 약물로서 native SBTI 또는 포합체를 각각 투여하고, 30분이 경과하면 랫트를 희생시켜 복부 피하에 나타난 푸른 반점의 직경을 측정하여 양성반응을 판단하였다.

결과 및 고찰

SBTI-황산 콘드로이친 포합체의 합성

고분자로 수식한 포합체의 물리화학적 성질들은 일반적으로 수송매체로 사용하는 고분자의 성질에 의하여 지배된다. 따라서, PEG나 텍스트란 등을 이용한 포합체인 PEG-SBTI 나 Dextran-SBTI²¹⁾의 경우 native SBTI에 비해 혈중에서의 생물학적 반감기가 대략 30배 정도가 길다고 보고되어 있으며, Shin 등¹⁷⁾은 석시닐 젤라틴을 이용한 SBTI와의 포합체에서 혈중농도시간 곡선하면적(AUC)이 native SBTI에 비하여 약 4배 증가하였다고 보고하였다. 이런 경향은 현재 임상에 사용되고 있는 SMANCS(neocarzinostatin-poly(styrene-maleic acid))의 혈장내 반감기가 neocarzinostatin보다 20배 증가된 예와도 잘 일치하고 있다. SMANCS의 경우 생체내 반감기의 증가는 약물의 분자량 증가 외에도 지용성이 커짐에 따라 약물의 혈장 알부민과의 결합력이 증가되고 결과적으로 전체 체순환으로부터의 배설이 지연되는 까닭에 기인한다.¹¹⁾

본 연구에서 수송매체로 사용된 황산 콘드로이친은 생체내 존재하는 물질로서 생체적합성이 높으며, 황산 콘드로이친 구조 중에 있는 카르복실기와 황산기는 황산 콘드로이친

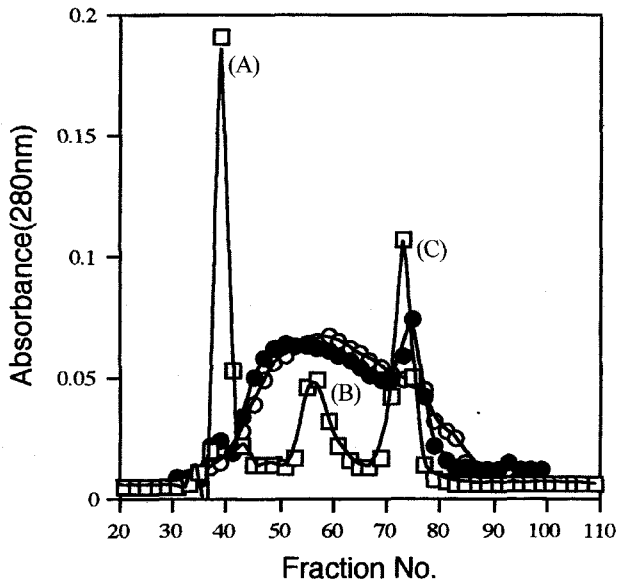


Figure 1— Elution profile of SBTI-chondroitin sulfate conjugates and marker. key, □; marker[A; dextran blue (MW. 2,000 KDa), B; BSA (MW. 69 KDa), and C; SBTI (MW. 21 KDa)]. ●; Chon-A-SBTI, ○; Chon-C-SBTI.

분자가 음전하를 띄게 하여 결합조직에서 운할체와 지지대로서의 역할을 가능케하는 요인이 된다. 특히, 황산 콘드로이친은 많은 양의 물을 흡수하여 높은 점성과 탄력성을 가진 용액을 만들기 때문에 조직에서 안정적이면서도 지지대 역할을 할 수 있는 섬유와 세포구성요인으로 역할을 수행할 수 있으며, 신체의 수분과 염류의 균형유지에도 기여한다.

Figure 1은 SBTI- 황산 콘드로이친 포함체의 Sephacryl S-200 칼럼에서의 용출 패턴이다. SBTI- 황산 콘드로이친 포함체(Chon-A-SBTI, and Chon-C-SBTI)의 용출 패턴이 native SBTI보다 광범위하고 또 빨리 용출되는 것으로 보아 포함체가 native SBTI에 비하여 분자량이 증가하였음을 보여주었다. Table I은 native SBTI와 포함체의 물리화학적 성질을 나타내었으며, Lowry 법에(22) 따라 측정된 단백질 량으로 환산한 결과로 부터 황산 콘드로이친 A 타입(평균분자량: 10,000)의 경우, SBTI 1mole에 대해 고분자가 9.3 mole의 비율로, C 타입(평균분자량: 25,000)의 경우 3.5 mole의 비율로 결합하고 있음을 알 수 있다. Native SBTI의 트립신

Table I—Physicochemical Properties of Native SBTI, Chon-A-SBTI, and Chon-C-SBTI

Properties	Native SBTI	Chon-A-SBTI	Chon-C-SBTI
Mean molecular weight	21,000	114,000	110,000
Polymer attached	-	9.30 moles	3.51 moles
IC ₅₀ against trypsin ^a (1 µg)	0.25	2.00	1.79 µg

^a 기질액으로 Bz-Arg-MCA 를 사용

1 µg에 대한 50% 억제 농도(IC₅₀)은 0.25 µg인데 비하여, 분자량이 증가함에 따라 Chon-A-SBTI는 약 2 µg, Chon-C-SBTI는 1.79 µg 정도를 나타내었다. 이는 분자량으로 환산하였을 때 IC₅₀ 활성을 Chon-A-SBTI는 약 68%, 그리고 Chon-C-SBTI는 약 73% 정도 함유하는 것으로 고분자 수식에 의하여 다소 활성이 감소되기는 하였으나 SBTI의 활성 부위인 잔기63(Arg)과 잔기64(Ile)가 잘 보호되고 있음을 알 수 있다. 일반적으로 화학적 수식법의 가장 어려운 문제는 생리활성 단백질의 활성부위에 직접 결합 또는 구조 장애로 인한 단백질 활성의 현저한 감소이다. 그러나 본 실험에서는 Chon-A-SBTI 및 Chon-C-SBTI 두 합성 화합물 모두 효소 활성이 상당히 유지되고 있다.

Native SBTI와 SBTI- 황산 콘드로이친 포함체의 체내동태학적 계수

Figure 2는 ddY 마우스에서 방사성 표지 native SBTI 및 포함체의 시간에 따른 혈중농도를 나타내었다. Native SBTI가 혈장내에서 급속히 사라지는 반면, 포함체들은 오랜 시간동안 혈장에 존재하고 있음을 보여주고 있으며, Chon-A-SBTI 및 Chon-C-SBTI 포함체의 AUC가 약 2배 가량 증가하였고, 전신 클리어런스는 반으로 감소하였다(Table II). 또한, 방사성 표지 native SBTI, Chon-A-SBTI 및 Chon-C-SBTI를 각각 ddY 마우스에 투여하고 30 분 후에 생체내 분포를 각 조직 장기별로 살펴 보았을 때, native SBTI가

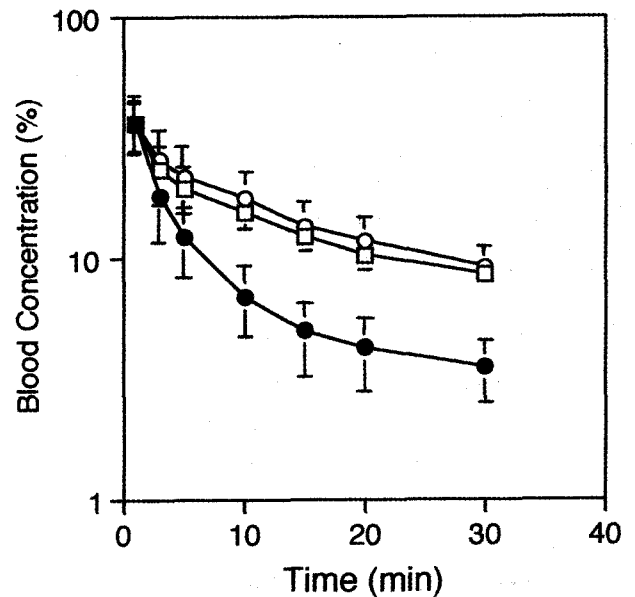


Figure 2— Blood concentration of ⁵¹Cr-labeled Native SBTI, Chon-A-SBTI and Chon-C-SBTI into male ddY mice after I.V. administration. The values are mean ± S.D. (n=4). key, ●; native SBTI, □; Chon-A-SBTI, ○; Chon-C-SBTI.

Table II—Pharmacokinetic Parameters of Native SBTI and SBTI-chondroitin Sulfate Conjugates

Materials	AUC ^a , % of dose (min/ml)	CL _{total} ^b
Native SBTI	426	0.24
Chon-A-SBTI	703	0.15
Chon-C-SBTI	856	0.12

^aTotal area under the blood-time concentration curve^bTotal body clearance (CL=Dose/AUC)**Table III**—Biodistribution of Radioactivity of ⁵¹Cr-labeled Native SBTI and SBTI-chondroitin Sulfate Conjugates at 30 min after I.V. injection in ddY Mice

Organ or tissue	Radioactivity (% of injected dose/g of organ or dose/ml of blood)		
	Native SBTI	Chon-A-SBTI	Chon-C-SBTI
Blood (1 ml)	3.30 ± 1.2	9.65 ± 0.9	10.4 ± 0.7
Urine (total)	26.2 ± 3.9	18.9 ± 3.8	20.7 ± 3.0
Liver	1.21 ± 0.1	13.3 ± 1.9	15.7 ± 2.4
Kidney	107 ± 12	16.5 ± 1.9	16.9 ± 1.9
Heart	0.69 ± 0.2	1.40 ± 0.4	1.00 ± 0.2
Lung	0.17 ± 0.0	0.37 ± 0.2	0.44 ± 0.1
Spleen	0.17 ± 0.1	0.27 ± 0.1	0.57 ± 0.2
Brain	0.0300 ± 0.0	0.0400 ± 0.0	0.0700 ± 0.0
Stomach	0.34 ± 0.2	0.28 ± 0.1	0.27 ± 0.1
Small intestine	0.17 ± 0.2	0.29 ± 0.1	0.45 ± 0.1
Muscle	0.21 ± 0.1	0.39 ± 0.2	0.47 ± 0.2

The values are mean ± S.D. for 3 or 4 mice.

뇨(26%)나 신장(107% dose/g of tissue)에서 높은 농도를 보여 빠른 시간내에 뇨로 배설되고 있음을 보이는 반면, 포합체들은 혈중에 오랜 시간 잔존하고 있음을 알 수 있었다. Chon-A-SBTI는 간장에 13.3% 그리고, Chon-C-SBTI는 15.7%로 native SBTI에 비하여 다량 축적되는 것으로 보아 간장으로의 타케팅이 가능함을 보여 주었다(Table III). 이 결과에서 A 및 C 타입 사이에는 유의성 있는 차이가 없으며, 간장이 프레칼리크레인의 생성 장소로 알려져 있음으로²³⁾ 포합체의 간장으로의 타케팅은 효과적이라 하겠다.

치료 효과

Pseudomonal elastase induced sublethal septic shock model—대부분의 박테리아 푸로테아제는 hageman factor(Hf)와 프레칼리크레인 혹은, Hf와 키니노겐의 활성화에 의한 키닌 생성 증가에 관여하는 것이 알려져 있다.²⁴⁾ 키닌생성경로에 박테리아 푸로테아제들이 직접적으로 관여함이 증명^{25,26)}되면서 serpin의 치료학적 계수를 평가하기 위한 동물 병태 모델의 작성 및 응용이 보고되고 있다. 주로 많이 사용되는 병태 모델은 균혈증을 야기하는 주 물질로 알려진 리포폴리사카라이드 유발 속 모델이 있다. Khan등^{18,19)}

은 *pseudomonal elastase*를 기니아 픽에 주사하였을 때, 프레칼리크레인이 칼리크레인으로 변환되므로 프레칼리크레인의 농도가 낮아지며 동시에 실험동물의 혈중에서 칼리크레인과 박테리아 푸로테아제 모두를 억제하는 혈장 푸로테아제 억제제인 α_2 -마크로구로블린의 농도가 낮아진다는 사실을 보고하였다. 이에 Shin 등^{17,27)}은 기니아 픽에 *pseudomonal elastase*를 주사하여 패혈성 속 모델을 작성한 뒤 native SBTI와 석시닐 젤라틴을 이용한 포합체(Suc-gel-SBTI)를 투여하여 Suc-gel-SBTI의 치료 효과를 평가하였다. 그 결과 Suc-gel-SBTI는 native SBTI에 비해 저혈압을 억제하는 효과가 오래동안 지속됨을 관찰하였다. 동시에 실험동물의 혈액으로부터 브라디키닌의 혈중농도를 분석하여 브라디키닌이 패혈성 속 유발에 관여하는 매개체임을 밝혔다. 그 외에도 Katori등²⁸⁾은 랫트에 LPS를 주사하여 순간적인 저혈압 속을 유발시키고, SBTI를 정맥 점적시 현저한 혈압강하 변화가 관찰되지 않음을 보고하였다. Maeda등²⁹⁾은 LPS에 의한 저혈압은 음전하로 하전된 박테리아의 표면이 Hf를 자극하여 키닌을 생성하는 동시에 LPS가 혈관계에서 산화질소(NO)를 합성하여 혈장내에 높은 농도로 존재하는 NO가 속을 유발한다고 보고하였다.

본 실험에서는 SBTI-황산 콘드로이친 포합체의 치료학적 계수를 평가하기 위하여 기니아 픽에 *pseudomonal elastase* induced septic shock의 병태 모델을 작성하고 포합체를 일정시간 전에 전처치하여 그 치료학적 계수를 평가하였다. 그 결과를 Figure 3~6에 나타내었다. 그림에서처럼 *pseudomonal elastase*(P.E., 0.8 mg/kg)만을 기니아 픽에 투여하였을 때, 뚜렷한 저혈압이 나타나지만 native SBTI(33 mg/kg)나 포합체(33 mg/kg native SBTI 상당량)를 P.E. 투여 1분 전에 전처치함으로써 심각한 저혈압을 억제할 수 있었다. 한편, native SBTI를 전처치하고 3시간 후에 P.E.를 투여한 결과 Figure 4에서처럼 심각한 저혈압 속이 유발되었다. 그러나, 포합체들은 저혈압 억제 효과가 3시간 이상 지속되어 Chon-A-SBTI 및 Chon-C-SBTI 화합물의 패혈증 속에 대한 치료효과가 native SBTI에 비하여 우수한 것으로 나타났다.

Immunogenicity test(Passive Cutaneous Anaphylaxis)—면역원성(immunogenicity)이란 이종 단백질과 같은 어떤 물질이 면역반응을 유발시키는 성질을 말하는 것으로, 생리활성 단백질/펩타이드를 약물로서 사용할 때 대두되는 가장 큰 문제점이다. 알러지(과민증)는 대표적인 면역반응으로 크게 즉시형 알러지(immediate type hypersensitivity)와 지연형 알러지(delayed type hypersensitivity)가 있다. 아나필락시스 반응은 즉시형 알러지에 속한 것으로 수동형 피부 아나필락시스와 같은 국소형과 혈청 질환, 아르투스 반응, 아토피성

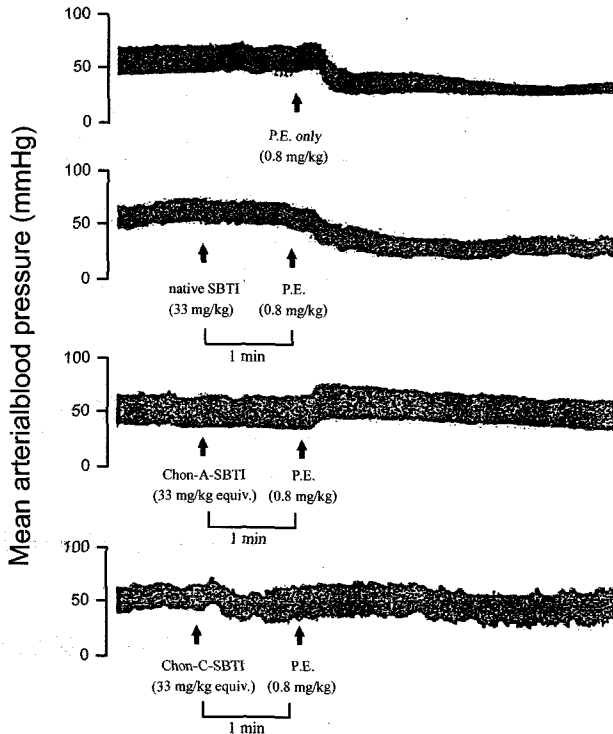


Figure 3—Tracing of the arterial blood pressure after the pre-treatment on the guinea pig with native SBTI, Chon-A-SBTI and Chon-C-SBTI and followed by the I.V. injection of *pseudomonal elastase*.

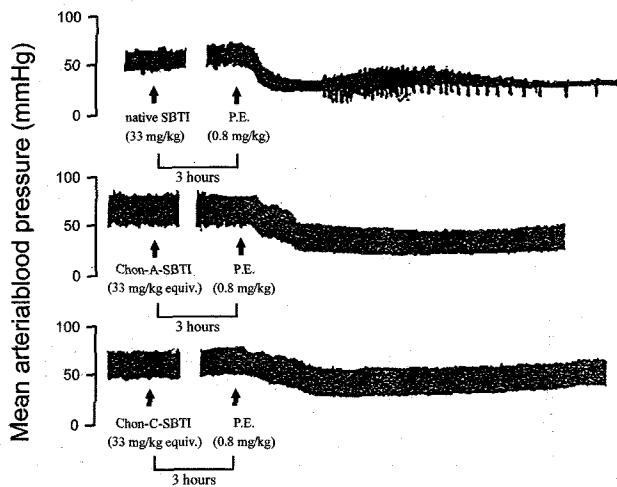


Figure 4—Tracing of the arterial blood pressure after the pre-treatment on the guinea pig with native SBTI, Chon-A-SBTI and Chon-C-SBTI and then 3 hrs later with the I.V. injection of *pseudomonal elastase*.

알러지 같은 전신형으로 나누어진다. 국소형의 아나필락시스 반응의 하나인 피동적 피부 아나필락시스(passive cutaneous anaphylaxis, PCA)는 약 0.1 μg 의 항체 단백질까지도 검출할 수 있는 유용한 방법이다. 시험할 항체를 실험동물의 피부에 피내 주사 한 뒤, 항체가 피부에 고정되도록 적당 시

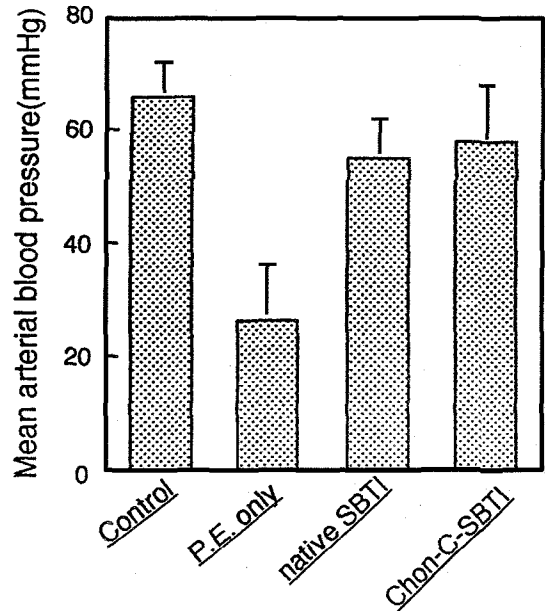


Figure 5—Effect of 1 min-pretreated of control (saline), native SBTI (33 mg/kg), Chon-A-SBTI (33 mg/kg equivalent of SBTI) and Chon-C-SBTI (33 mg/kg equivalent of SBTI) on the mean arterial blood pressure of guinea pigs induced by *pseudomonal elastase* (0.8 mg/kg). The values are mean \pm S.D. (n=4).

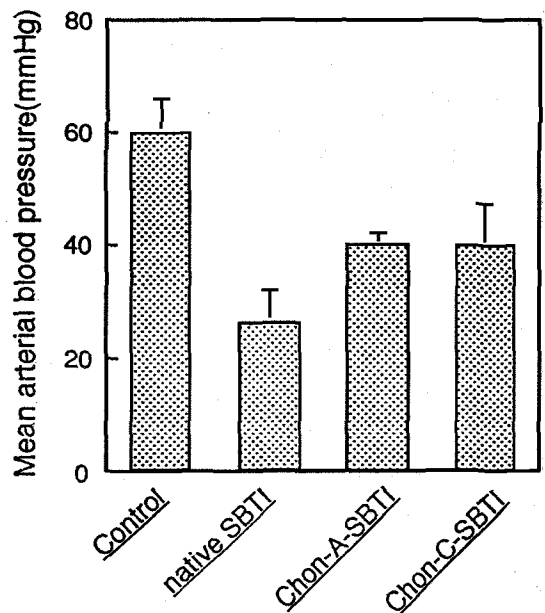


Figure 6—Effect of 3hrs-pretreated of control (saline), native SBTI (33 mg/kg), Chon-A-SBTI (33 mg/kg equivalent of SBTI) and Chon-C-SBTI (33 mg/kg equivalent of SBTI) on the mean arterial blood pressure of guinea pigs induced by *pseudomonal elastase* (0.8 mg/kg). The values are mean \pm S.D. (n=4).

간이 경과하고 나서 염색약과 함께 항원을 정맥 주사한다. 항원-항체 반응이 유발되어 복합체가 생성되면 아르투스 반응에서와 같이 히스타민, 세로토닌이 유리되어 혈관투과성이

Table IV—Passive Cutaneous Anaphylaxis Shock of Native SBTI and SBTI-chondroitin Sulfate Conjugate in Rats using BALB/c Mice Serum

약물	희석배수	x100	x30	x10	x3	0	total
Control						6(100%)	6
OVA		6(100%)					6
Native SBTI(high)		2(25.0%)	2(25.0%)	3(37.5%)		1(12.5%)	8
Chon-A-SBTI(high)				3(33.3%)	5(55.5%)	1(11.1%)	9
Chon-C-SBTI(high)				5(71.4%)	2(28.6%)		7
Native SBTI(low)			1(9.10%)	2(18.2%)	6(54.5%)	2(18.2%)	11
Chon-A-SBTI(low)				2(18.2%)	3(27.3%)	6(54.5%)	11
Chon-C-SBTI(low)				3(27.3%)	7(63.6%)	1(9.10%)	11

양성판정은 푸른 반점의 직경이 5 mm 이상인 것으로 하였다.

표안의 수치는 양성판정을 나타낸 rat 의 마리 수이다.

Control : saline only

OVA : Ovalbumin 2 mg/kg

Native SBTI (high or low) : SBTI 25 mg/kg or 2.5 mg/kg

Chon-A-SBTI (high or low) : Chon-A-SBTI 25 mg/kg or 2.5 mg/kg equivalent of native SBTI

Chon-C-SBTI (high or low) : Chon-C-SBTI 25 mg/kg or 2.5 mg/kg equivalent of native SBTI

증가된 결과 반응 부위 조직으로 염색약이 삼출하여 푸른 반점을 나타내게 된다.

본 실험에서는 SBTI의 항원성을 경감시킬 목적으로 황산 콘드로이친을 수송매체로 하여 고분자 포합체를 합성하였다. 더우기 인체내에 존재하는 UTI는 단백질에 A 타입 황산 콘드로이친이 결합되어 있다. 뿐만 아니라 일반적으로 폴리사카라이드류는 생체내에서 항원반응을 거의 야기시키지 않는 물질로 알려져 있으므로 고분자 수식 방법에 의하여 SBTI의 면역원성이 많이 경감될 것으로 예측하였다. PCA 시험은 푸른 반점의 직경이 5 mm 이상일 때를 양성으로 판정하여 본 결과 Table 4에 나타난 바와 같이 native SBTI는 저용량에 해당하는 약물량을 주사했던 마우스 혈장을 30배 희석한 곳까지 면역반응이 관찰된 반면, Chon-A-SBTI 혹은 Chon-C-SBTI 모두 고용량의 약물을 투여했던 마우스 혈장을 10배 희석한 곳까지만 반점이 관찰되었다. 특히, Chon-A-SBTI는 Chon-C-SBTI와 비교했을 때 면역원성이 더욱 감소되었음을 알 수 있었다.

결 론

본 실험에서는 대표적인 세린 푸로테아제 억제제의 하나로서 칼리크레인 억제효과가 매우 커 약물로 강력히 추천되고 있는 soybean trypsin inhibitor(SBTI)를 모델 약물로 선정하고 황산 콘드로이친(A, 및 C 타입)와의 포합체를 합성하였다. 합성된 SBTI-황산 콘드로이친 포합체의 물리화학적, 생체동태학적 특징을 살펴보고 *pseudomonal elastase* 유발 패혈증 속 모델을 이용하여 치료학적 계수를 평가하였으며,

PCA(passive cutaneous anaphylaxis shock)을 이용한 면역원성 시험을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. SBTI를 과요오드산 나트륨법에 의하여 황산 콘드로이친과 포합체를 합성하여 물리화학적 성질을 검토하였다. 그 결과 분자량은 현저히 증가되었으며, 효소활성은 70~73% 이상 함유하였다.

2. SBTI- 황산 콘드로이친 포합체는 생체내 분포에 있어 간장에 다량 분포된 반면, native SBTI는 뇨와 신장을 통한 빠른 배설을 보였다.

3. *Pseudomonal elastase* 유발 패혈증 속 모델에서 SBTI- 황산 콘드로이친 포합체는 native SBTI에 비해 치료학적 계수가 증가되었다.

4. SBTI- 황산 콘드로이친 포합체는 native SBTI에 비해 면역원성이 감소하였고, 특히 Chon-A-SBTI가 Chon-C-SBTI보다 면역원성이 더욱 감소하였다.

감사의 말씀

이 논문은(1997년) 한국학술진흥재단의 학술연구비에 의하여 지원되었음.

문 헌

- 1) *Delivery systems for peptide Drugs*, S.S. Davis, L. Illum and E. Tomlinson (Eds.), Plenum, New York, PP. 1-21 (1986).
- 2) V.H.L. Lee, Enzymatic barriers to peptide and protein absorption, *CRC Crit. Rev., Therapeutic Drug Carrier Syst.*, 5, 69 (1988).

- 3) J.B. Cannon and H.W. Hui, Targeted Therapeutic System: In *Immunoconjugates in Drug Delivery System*, Dekker, pp. 121-139 (1990).
- 4) G.E. Means and R.E. Feeney, Reviews, Chemical modifications of proteins: History and applications, *Bioconjugate Chem.*, **1**, 2-12 (1992).
- 5) M.J. Poznansky, Tailoring enzyme for more effective use as therapeutic agents: In *Protein Tailoring for food and medical uses*, R.E. Feeney and J.R. Whitaker (Eds.) Dekker, pp. 317-337 (1986).
- 6) W.R. Gombtz and D.K. Pettit, Biodegradable polymers for protein and peptide drug delivery, *Bioconjugate Chem.*, **6**, 332-351 (1995).
- 7) T. Fujita, Y. Yasuda, Y. Takakura, M. Hashida and H. Sezaki, Alteration of biopharmaceutical properties of drugs by their conjugation with water-soluble macromolecules: Uricase-Dextran conjugate, *J. Controlled Release*, **11**, 149-156 (1990).
- 8) Y. Yasuda, T. Fujita, Y. Takakura, M. Hashida and H. Sezaki, Biochemical and Biopharmaceutical properties of macromolecular conjugates of Uricase with Dextran and Polyethylene Glycol, *Chem. pharm. Bull.*, **38**, 2053-2056 (1990).
- 9) L.W. Seymour, Passive tumor targeting of soluble macromolecules and drug conjugates, *CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **9**, 135-187 (1992).
- 10) Y. Takakura, Y. Kaneko, T. Fusita, M. Hashida, H. Maeda and H. Sezaki, Control of pharmaceutical properties of Soybean trypsin inhibitor by conjugation with Dextran I: Synthesis and characterization. *J. Pharm. Sci.*, **78**, 117-121 (1989).
- 11) *Neocarzinostatin, The Past, Present and Future of an Anti-cancer Drug*, H. Maeda, K. Edo and N. Ishida (Eds.), Springer-Verlag, Tokyo (1997).
- 12) H. Toyoda, S. Kobayashi, S. Sakamoto, T. Toida and T. Imanari, Structural analysis of a low-sulfated chondroitin sulfate chain in human urinary trypsin inhibitor, *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 945-947 (1993).
- 13) M. Balduyck, C. Mizon, H. Loutfi, C. Rochet, P. Roussel and J. Mizon, The major human urinary trypsin inhibitor is a proteoglycan, *Eur. J. Biochem.*, **158**, 417-422 (1986).
- 14) J.J. Enghild, G. Salvesen, S.A. Hefta, I.B. Thogersen, S. Rutherford and S.V. Pizzo, Chondroitin 4-sulfate covalently cross-links the chains of the human blood protein pre- α -inhibitor, *J. Biol. Chem.*, **266**, 747-751 (1991).
- 15) B. Kassell, Trypsin and chymotrypsin inhibitors from Soybeans, *Methods in Enzymology*, **19**, 853-862 (1970).
- 16) Y. Birk, Trypsin and chymotrypsin inhibitors from Soybeans, *Methods in Enzymology*, **19**, 700-707 (1970).
- 17) Y.H. Shin, Y. Kojima, H. Maeda and M. Otagiri, Conjugation of succinylated gelatin to soy bean trypsin inhibitor, *Bioactive Compat. Polymers*, **11**, 3-16 (1996).
- 18) M.M.H. Khan, T. Yamamoto, H. Araki, Y. Ijiri, Y. Shibuya, M. Okamoto and T. Kambara, Pseudomonal elastase injection causes low vascular resistant shock in guinea pigs, *Biochem. Biophys. Acta*, **1182**, 83 (1993).
- 19) M.M.H. Kahn, T. Yamamoto, H. Araki, Y. Shibuya and T. Kambara, Role of Hageman factor/Kallikrein-Kinin systemic pseudomonal elastase induced shock model, *Biochem. Biophys. Acta.*, **1157**, 119 (1993).
- 20) J.S. Garvey, N.E. Cremer and D.H. Sussdorf, Antibody-mediated hypersensitivity, *Methods in Immunology*, Addison-Wesley Publishing Com. Inc., pp. 451-462 (1977)
- 21) Y. Takakura, T. Fusita, M. Hashida, H. Maeda and H. Sezaki, Control of pharmaceutical properties of Soybean trypsin inhibitor by conjugation with Dextran II: Biopharmaceutical and pharmacological properties, *J. Pharm. Sci.*, **78**, 210-222 (1989).
- 22) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
- 23) T. Ikenaka, S. Odani, and T. Koide, *Bayer-Symposium V proteinase*, Springer-Verlag Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag, pp. 325 (1974).
- 24) R.A. Pixley and R.W. Colman, The Kallikrein-Kinin system in sepsis syndrome: In *The Kinin System*, Academic Press Limited pp. 173-186 (1997).
- 25) H. Maeda and A. Molla, Pathogenic potentials of bacterial protease, *Clin. Chim. Acta.*, **185**, 357 (1989)
- 26) A. Molla, T. Yamamoto, T. Akaike, S. Miyoshi and H. Maeda, Activation of hageman factor and prokallikrein and generation of kinin by various microbial proteinase, *J. Biol. Chem.*, **264**, 10589 (1989).
- 27) Y.H. Shin, T. Akaike, M.M.H. Khan, Y. Sakata and H. Maeda, Further evidence of bradykinin involvement in septic shock: reduction of kinin production in vivo and improved survival rate by use of polymer tailored SBTI with longer $t_{1/2}$, *Immunopharmacology*, **33**, 369-373 (1996).
- 28) M. Katori, M. Majma, R. Odoi-Adome, N. Sunahara and Y. Uchida, Evidence for the involvement of a Kallikrein-Kinin system in the immediate hypotension produced by endotoxin, *Br. J. Pharmacol.*, **98**, 1381 (1989).
- 29) H. Maeda, Y.H. Shin, T. Akaike and M. Yoshida, Septic Shock: Prevention by NO-scavenger (PTIO) and by kinin inhibitor, *Third International Shock Congress-Shock '95*, Hamamatsu, Japan (1995).