

마이크로플루리다이를 이용한 아클라루비신 리포솜의 제조 및 평가

박목순* · 박진규* · 이계원 · 백명기* · 지웅길

충남대학교 약학대학, *동국 제약 주식회사

(Received November 3, 1997)

Preparation and Evaluation of Aclarubicin Liposome using Microfluidizer

Mork Soon Park*, Jin Kyu Park*, Gye Won Lee,
Myoung Ki Baek* and Ung Kil Jee

College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

*Dongkook Pharm. Co. Ltd.,

Abstract—In order to attain a sustained release at targeted organs in a prolonged time which can reduce the side effects and maximize the therapeutic effect, aclarubicin (ACL) was entrapped into liposomes of different lipid compositions using Microfluidizer, and dry liposomes were prepared by lyophilization. The dry aclarubicin-entrapped liposomes were evaluated in terms of mean particle size and size distribution, entrapment efficiency and *in vitro* drug release profile. The Entrapment efficiency of liposome, when the concentration of aclarubicin and lipid were 0.5 to 1.0 mg/ml and 200 μ mol/ml, respectively, was over 80% using Microfluidizer, in contrast to 70% of entrapment efficiency using hand-shaking method. Mean particle size and size distribution of aclarubicin-entrapped liposomes of various lipid compositions did not change considerably by the freeze drying. The range of particle size was between 80 and 200 nm. Among aclarubicin-entrapped liposomes, ACL-liposome of PC/DPPC/CHOL/TA displayed the most significant sustained release. The addition of DPPC appeared to be favorable for the control of release. In general, aclarubicin entrapped in liposomes was less stable than free aclarubicin either in pH 7.4 phosphate buffer or in human plasma. Formulation I($t_{1/2}$, 20.3 hr) devoid of lipid additive was the most unstable in the phosphate buffer solution while formulation II($t_{1/2}$, 40.7 hr) with cardiolipin was the most stable. Half lives of aclarubicin-entrapped liposomes in human plasma were 43.2, 50.7, 35.9 and 35.3 hr for formulation I, II, III and IV, respectively, in contrast to 57.8 hr for free aclarubicin.

Keywords □ Aclarubicin, liposome, microfluidizer, dipalmitoylphosphatidyl choline, cardiolipin, dry liposome.

아클라루비신(이하 ACL로 약함)은 안트라사이클린계의 항암제로서 RNA polymerase I에 의한 전사(transcription)를 선택적으로 저해하여 각종 고형암 및 혈액암의 치료에 사용되어 왔다. 그러나 ACL은 다른 안트라사이클린 약물계열보다 쉽게 대사되어 높은 항암효과¹⁾를 얻기 위해서는 반복 투여하거나 투여량을

높여야 하는 단점이 있다. 또한 안트라사이클린계 항암제는 세포분열이 빠른 백혈구, 임파구 세포들이 존재하는 골수나 비장 등에서 부작용을 초래하여 골수 저하증, 백혈구 감소증, 비장결손 등을 유발시키고, 그 외에 조식괴사, 탈모증, 오심, 구토의 증상도 유발한다. 특히 심장근의 이상으로 인한 급성, 아급성 및 만성으로 분류되는 심장 독성이 큰 문제로 대두되고 있다.

1960년대에 인지질 계통의 계면 활성제들이 수상의 매질에서 생체막과 같은 이중막을 자발적으로 형성한

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 042-821-5934 (팩스) 042-821-6566

다는 사실²⁾이 발견된 이래 리포솜은 생체막 연구의 모델로서 뿐만 아니라 약제학 분야에서 표적지향화, 지속적 작용 및 부작용 경감을 위한 생체내 약물 수송체로의 적용에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다.^{3, 4)}

일반적으로 리포솜은 입자 크기와 수상을 둘러싼 인지질 이중막의 수에 따라 multilamellar vesicle(MLV), large unilamellar vesicle(LUV),⁵⁾ small unilamellar vesicle(SUV)⁶⁾ 등으로 분류되는데 이들은 주로 만드는 제법에 따라 서로 다른 모양을 나타낸다.

리포솜이 실제 제약 산업에서 실용화되고 있지 않은 이유는 현탁액 상태에서의 낮은 안정성, 봉입 효율 등에서 재현성이 매우 떨어진다는 점, 봉입시킨 약물의 누출, 현재까지 확립된 리포솜 제조 방법들이 대체로 대량 생산에 부적합하다는 점, 생산 공정 및 원료의 가격이 고가라는 점, 주사제 제형의 경우 멸균이 어렵다는 점등이다.

그러므로 또한 리포솜을 산업화하기 위해서는 안정성과 봉입 효율의 재현성, 입자 분포의 균일성 등을 보장할 수 있어야 하는데 이는 실제 리포솜을 입상에 적용했을 때 체내 동태에 크게 영향을 미치는 요인이기 때문이기도 하다. 또한 주사제의 경우 멸균할 수 있어야 한다는 것도 반드시 고려해야 할 점이다. 이러한 문제를 해결할 수 있는 방법으로 최근에 Mayhew 등⁷⁾은 마이크로플루다이저(MicrofluidizerTM)를 사용해 고농도의 지질 현탁액으로부터 작은 크기의 MLV를 제조하는 방법을 보고하였다. 즉 수용성 약물을 봉입시키는 리포솜의 경우 사용하는 지질의 양이 봉입율에 영향을 미치는데 마이크로플루다이저를 사용해 리포솜을 제조할 경우 보통 MLV를 제조하는 방법에서 사용할 수 없는 고농도의 지질을 사용할 수 있다. 실제로 약 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^3$ 의 지질을 사용해 리포솜을 만든 경우 봉입 효율이 78%로 나타난 보고가 있다.⁸⁾ 그러나 아드리아마이신의 경우는 오히려 크기가 증가한 결과를 보이고 있는데 이의 확실한 이유는 알려져 있지 않다. 마이크로플루다이저를 사용하여 리포솜을 제조하는 경우의 장점은 1) 연속적인 공정으로 리포솜을 대량 생산할 수 있어 산업화에 적합하다는 것 2) 종래의 방법으로 제조할 때 시간이 많이 걸리는 문제를 극복할 수 있다는 것 3) 제조한 리포솜의 평균 입자 크기를 조절할 수 있다는 것 4) 수용성 약물을 높은 효율로 봉입시키기 위해 고농도의 지질을 사용할 수 있다는 것 5) 지질 현탁액이 직접 공기와 접촉하는 기회가 적으므로 질소와 같은 불활성 가스를 사용할

필요가 적다는 것 6) 리포솜의 입자 크기와 봉입 효율 등에 있어 재현성이 보장된다는 점 7) 입자가 매우 미세하므로 여과에 의한 멸균이 가능하다는 점이다.⁹⁾

이에 저자는 제제화에 적합한 방법인 마이크로플루다이저를 이용해 ACL를 봉입하는 동시에 균일한 입자분포를 갖는 리포솜을 제조하였고 동결 건조법을 이용하여 제조된 리포솜을 건조함으로써 ACL 함유 리포솜제제의 향상된 봉입효율 및 안정화를 위해 제제설계를 하고자 하였다.

실험방법

시약 및 기기 - 시약은 ACL · HCl($\text{C}_{42}\text{H}_{53}\text{NO}_{15}$ · HCl), L- α -Phosphatidylcholine dipalmitoyl(DP-PC), L- α -Phosphatidyl-L-Serine(PS), Cholesterol(CHOL), Dicetyl phosphate(DCP), Stearylamine(SA), Phosphatidylcholine-hydrate, α -Tocopherol acetate(TA), Dialysis sack(MWCO 12,000), Benzoylated dialysis sack MWCO 2,000) 및 Trehalose은 Sigma사에서 구입하였고 Soy bean phosphatidylcholine(Epikuron 200[®], PC)는 Pacific Pharmaceuticals사에서 Polycarbonate membrane filter(HITP type)는 Millipore에서 구입하였으며 기타 시약은 일급 및 특급을 사용하였다.

실험에 사용한 기기는 자외/가시부 분광광도계(UV-IKON 860, Kontron, Switzerland), 액체크로마토그래프(SPD 10A UV-Vis Detector, LC-10AD Liquid Chromatograph, C-R6A Chromatopac, Shimadzu, Japan), 마이크로플루다이저(MicrofluidizerTM 110Y, Microfluidics Co., Massachusetts, U.S.A), 미량 원심분리기(Vision, VS-15000, Korea), 용점 측정기(Electrothermal 9100, Germany), 한외여과 장치(Vision Scientific Co., Korea, membrane : XM300, Diameter 62 mm, membrane Diaflo Amicon Co.), 냉동 원심분리기(Mse Scientific Instruments), 증발 농축기(Rotavapor R 110, Buchi, Germany), 고압 진공 펌프(Vacuum pump DD-40, Precision Scientific, U.S.A.), Vortex mixer(Model 1801, Dong Yang Scientific Co., Korea), Homomixer(Ultra Turrax T25, Original Ika Co., Japan), 광산란 측정기(He-Ne laser Model 127, Lexel Laser, Inc. Analysis Software : BI-8000AT Digital Correlator),

진탕 배양기(KMC-8480S, Vision Scientific Co. Ltd., Korea), 초음파기(Cavitator, Mettlet Electronics Co. U.S.A.), 기계식 교반기(Chang Shin Scientific Co. Ltd., Korea), Thawing zone determinator with usitec system(Usifroid Co., France) 및 동결 건조기(SMH50, Usifroid Co., France) 등이다

ACL의 안정성실험 - pH 및 온도에 의한 안정성 실험은 ACL·HCl을 0.01M의 Tris 완충액(pH4.0)과 인산염 완충액(pH 6.0과 7.4)에 10 µg/µl의 농도로 하여 3회씩 실시하였다. 약물 용액을 1.5 ml씩 취하여 질소로 충전시켜 밀봉한 후, 30, 40 및 50°C에서 일주일 동안 방치하면서 24시간 간격으로 0.2 ml를 취하여 메탄올로 희석하고 HPLC에 직접 주입하여 분해되지 않고 남아 있는 약물의 양을 측정하였다.

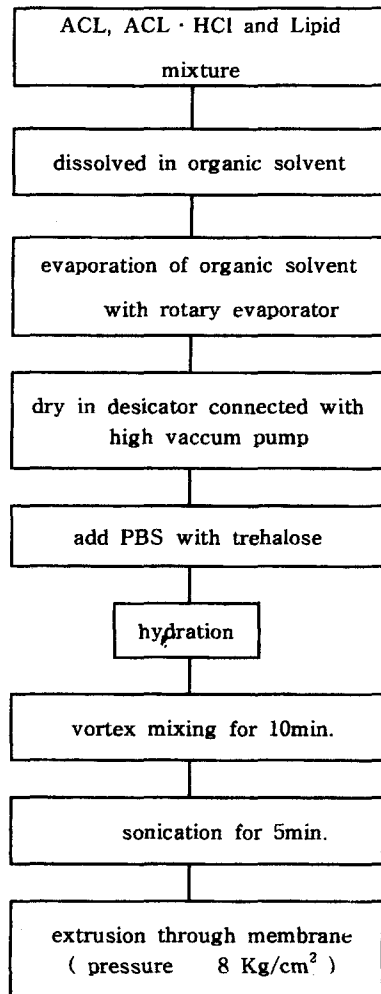
또한 증류수에 용해시킨 약물 용액 25 ml에 증류수, pH 7.4 PBS 및 PC 용액(메탄올에 PC를 100 µmol/ml의 농도로 용해시킨 용액) 25 ml를 각각 넣고 완전히 혼합시킨 후, 바이알에 넣고 질소로 치환, 밀봉하여 40°C에 보관하면서 1, 2, 4 및 7일에 0.2 ml씩 취하여 메탄올로 희석하여 HPLC로 정량 하였다.

이들 피크의 높이 또는 면적을 측정하여 똑같은 조건으로 하여 얻은 표준액의 피크와 비교하여 남아있는 약물의 양을 구했다. 이 때 칼럼은 Bondclone 10 C₁₈ Column(3.9×300 mm., 10 µm), 이동상은 55% Acetonitrile+45% 0.01M NaCl 용액(1M 과염소산으로 pH 2.3으로 조정), 유속은 1.0 ml/min의 조건으로 268 nm에서 측정하였다. 또한 각각의 걸보기 1차 속도 정수는 분해되지 않고 남아 있는 약물의 양을 시간에 대해 semilog plot한 그래프의 기울기로부터 얻었다.

ACL의 실험실적 리포솜 제조

리포솜 제조 - Table I과 같은 조성의 지질을 사용하여 리포솜을 제조하였다. 이미 보고된 독소루비신의 리포솜 제조 방법¹⁰⁾에 따라 ACL 또는 ACL·HCl 2.5

mg 및 지질 총량 500 µmol을 취하여(Table I) 50 ml 바이알에 넣고 클로로포름과 메탄올 혼합액 10 ml를 가하여 완전히 용해시킨 후, 회전 증발 농축기에 장치하여 45~50°C 수욕상에서 질소가스를 천천히 도입하며 800 bar정도의 감압으로 바이알을 회전시키면서 유기용매를 천천히 증발시켜 지질의 얇은 막이 형성되도록 하였다. 유기용매를 완전히 증발시키고 질소로 충전한 다음 고압진공펌프에 연결된 데시케이터에서 2시간동안 건조를 계속하였다. 10% trehalose를 함유하는 pH 7.4 인산염 완충액(이하 PBS)5 ml를 지질막에 가하고 50°C를 유지하면서 2시간동안 회전시켜 수화시킨 다음 vortex mixer로 10분동안 격렬히 혼합하고 5분간 초음파 처리하여 리포솜을 제조하였다. 제조된 리포솜을



Scheme I—Preparation of aclarubicin entrapped liposome.

Table I—Lipid composition of the aclarubicin-entrapped liposome

Lipid composition	Molar ratio
① PC : CHOL	5 : 4
② PC : CHOL : TA	15 : 4 : 0.2
③ PC : CHOL : DCP : TA	15 : 4 : 4 : 0.2
④ PC : PS : CHOL : TA	10 : 5 : 4 : 0.2
⑤ PC : DPPC : CHOL : TA	10 : 5 : 4 : 0.2
⑥ PC : DPPC : DCP : CHOL : TA	10 : 5 : 4 : 4 : 0.2

50~60°C에서 8 kg/cm³의 압력으로 pore size 0.2, 0.4, 0.6 및 0.8 μm의 Polycarbonate membrane filter를 통과시켜 분산을 균일화하였다(Scheme I).

또한 지질농도에 따르는 약물의 봉입율을 측정하기 위하여 PC : CHOL : TA = 15 : 4 : 0.2 (mole ratio)의 지질 조성에서 약물과 지질의 총농도 비를 1 : 100, 1 : 200 및 1 : 300 (mg : μmol)로 하여 Scheme I과 동일한 방법으로 리포솜을 제조하였다.

봉입율 측정 - 제조된 리포솜 현탁액 1 ml를 취해 미리 활성화시킨 dialysis sac에 넣어 이를 10 mM Tris buffer (pH 4.0)액에 넣고 12시간동안 냉장 보관하여 평형에 도달시킨 후, 3 ml를 취하여 268과 445 nm에서 흡광도를 측정하고 유리된 약물의 양을 산출하여 전체양에서 제한 후 지질에 봉입된 양을 산출하였다.

마이크로플루다이저를 이용한 리포솜의 제조

리포솜 제조 - Table II와 같은 조성으로 1 l 용량의 둥근 플라스크에 지질 30,000 μmol과 ACL 100 mg를 칭량하여 일반 리포솜 제조와 같은 방법으로 지질의 얇은 막을 제조하여 10 mM Tris buffer 150 ml (pH 4.0)를 가하고 45°C 정도로 유지되는 수욕에서 30분간 회전시키면서 수화시킨 후, Homomixer로 15,000 rpm에서 5분간 격렬히 혼합하여 MLV를 제조하였다.

제조된 MLV를 마이크로플루다이저를 이용하여 압력 5,000 p.s.i., reservoir에 100 ml의 리포솜액을 넣고 200 ml/min의 유속으로 30분간 순환시키면서 리포솜을 제조하였다.

봉입되지 않은 약물의 분리 - Roberta Cavalli^{11, 12)} 등의 한외여과 방법에 따라 한외여과 장치에 넣고 자석 교반기를 이용하여 교반 하면서 질소 가스를 4 kg/cm² 압력으로 막 여과지(XM 30만, 지름 62 mm)를 통해 먼저 50 ml를 여과하고 다시 10 mM Tris buffer (pH 4.0) 50 ml를 가하여 두번 여과한 후, 동결방지제 (Cryoprotectant)^{13, 14)}인 Trehalose를 10% (W/V) 되도록 가하여 전체량을 100 ml로 하여 동결건조용 바이

알에 10 ml씩 넣었다.

리포솜의 동결건조 - 동결건조 조건을 확립하기 위하여 공용점을 측정했으며 ACL · HCl 및 ACL-리포솜을 증류수에 용해시켜 이를 측정 용기에 넣고 Sensing head (temperature sensor : Pt100 와 2개의 Platinum electrodes로 구성)를 Setting한 후, 냉동고에서 -40°C까지 서서히 동결시켜 측정하였다.

마이크로플루다이저를 이용하여 제조한 리포솜을 각 조성의 공용점에 유의하여 동결건조의 각 공정 (loading → pre-freezing → freezing → primary drying → secondary drying → unloading)에 맞는 진공도, 온도 및 공정 시간을 정한 다음 동결건조하여 건조리포솜을 만들었다.

봉입율의 측정 - 총 약물량은 리포솜 현탁액 1 ml에 메탄올 4 ml를 가하여 용해시켜 이를 HPLC로 측정하였으며 봉입된 약물량은 동결건조된 리포솜 1 바이알에 증류수 10 ml를 가하고 3분간 초음파 처리하여 재분산된 리포솜 현탁액 1 ml에 메탄올 4 ml를 가해 이를 HPLC로 측정하여 봉입율을 계산하였다. 이 때 10% 정도 증가한 부피를 보정시켜 봉입율을 계산하였다.

$$\text{봉입율(\%)} = \frac{\text{총 약물량} - \text{리포솜에 봉입되지 않은 약물량}}{\text{총 약물량}} \times 100$$

리포솜의 평가

입자크기 및 분포 측정 - 제조한 각각의 리포솜에 대한 입자 크기와 분포는 동결건조전의 리포솜액과 동결건조 시킨 후 재수화시켜 제조한 리포솜액에 대하여 동적 광산란 (dynamic light scattering : DLS) 기법을 이용하여 측정하였다.

먼저 리포솜 현탁액을 vortex mixer로 잘 혼합하고 리포솜 입자에 의한 레이저 광선의 산란이 유효한 범위를 유지하도록 하기 위하여 일정량을 취하여 100배 희석하였다. 이 때 사용한 광원은 He-Ne laser, 측정 파장은 632.8 nm, 온도는 25°C로 일정하게 유지되도록 하였고 pin hole size는 100 (unit)으로 하였다. 산란 각도는 빛의 흔들림이나 불순물 등에 의해 영향을 가장 적게 받는 90°로 설정하였다. 이러한 조건으로 측정된 결과의 분석은 Brook Haven 사의 BI-8000 AT Digital Correlator 프로그램을 이용하였다.

리포솜의 약물 방출 실험 - 약물의 농도가 5.47 μg/ml가 되도록 제조한 각 리포솜 현탁액을 일정량씩

Table II—Lipid composition of the Aclarubicin and Aclarubicin hydrochloride entrapped liposome

Lipid composition	Molar ratio
I: PC : CHOL : TA	15 : 4 : 0.2
II: PC : Cardiolipin : CHOL : TA	14.92 : 0.08 : 4 : 0.2
III: PC : PC-hydrate : CHOL : TA	11 : 4 : 4 : 0.2
IV: PC : DPPC : CHOL : TA	10 : 5 : 4 : 0.2

Table III—Pseudo-first order rate constants for the degradation of aclarubicin in various solutions at 30, 40 and 50°C (Mean±S.D., n=3)

Temp. (°C)	$k \times 10^{-2}$ (day ⁻¹)			$t_{1/2}$ (day)		
	Tris Buffer	PBS		Tris Buffer	PBS	
	pH 4.0	pH 6.0	pH 7.4	pH 4.0	pH 6.0	pH 7.4
30	0.2±0.2	3.2±0.2	11.0±0.7	293.6	21.99	6.32
40	2.8±0.9	6.0±0.3	23.8±1.3	24.9	11.6	2.91
50	7.9±0.6	3.8±2.9	85.9±15.5	8.7	2.92	0.81

(Formulation I, II, III 및 IV : 1.5, 1.29, 0.95 및 0.95 ml) 취하여 미리 활성화시킨 반투막 sack안에 넣고 이를 50 ml의 Tris buffer(pH 4.0) 용액에서 37°C, 100 rpm으로 진탕하면서 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 30, 36 및 48시간마다 0.1 ml를 취하여 방출되어 나온 각 약물의 양을 HPLC로 측정하였다. 또한 각 리포솜 제제의 표준 약물 농도는 리포솜액을 각각 150, 129, 95 및 95 µl를 취하여 1 ml의 메탄올을 넣어 완전히 파괴시킨후 Tris buffer 용액을 가하여 전체를 5 ml로 맞추어 준 다음 이를 원심분리하여 상등액을 직접 HPLC에 주입하였다.¹⁵⁾

Tris buffer 용액이 존재시 약물의 피크 높이는 순수한 메탄올 용액에서의 피크 높이보다 약 2% 정도 낮아지므로 이를 보정하여 용출된 %를 계산하였다.

리포솜의 사람 혈장과 완충액에서 안정성 시험 - 약물을 리포솜에 봉입하지 않은 경우와 리포솜에 봉입한 경우에 80% 사람 혈장과 pH 7.4 인산염 완충액에서 분해되는 경향을 37±0.5°C에서 2회씩 실시하였으며 HPLC 방법에 의하여 정량하였다. 결보기 1차 속도 정수는 남아있는 약물량을 시간에 대하여 Semilog plot 한 그래프의 기울기로부터 얻었다.

각 formulation의 리포솜 현탁액을 80% 사람 혈장 용액 10 ml에 첨가하여 약물의 농도가 10 µg/ml가 되게 하였다(formulation I, II, III 및 IV; 0.55, 0.47, 0.34 및 0.34 ml). 수욕상에서 온도를 일정하게 유지하며 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36 및 48시간 간격으로 200 µl의 용액을 취하고 여기에 메탄올 800 µl를 가하여 1분동안 Vortexing하여 15,000 rpm으로 3분 동안 원심분리하였다. 상등액을 50 µl씩 직접 HPLC에 주입하여 얻어진 피크를 같은 조건으로 주입하여 얻어진 표준액의 피크와 비교하여 남아있는 약물의 양을 구했다.

pH 7.4 인산염 완충액에서의 가수분해는 80% 사람 혈장용액과 동일한 조건으로 실시하였다.

결과 및 고찰

ACL의 안정성 - ACL의 분해산물¹⁵⁾에 따른 색상은 7-deoxyaklavinone, aklavinone, bisanhydroaklavinone는 노란색을 띠며, Cinerubin A, Cinerubin B, pyrromycin, 7-deoxypyrrromycinone, ε-pyrromycinone은 적색을 띠는데 이들 모두의 중성 혹은 산성 용액에서 흡수 극대파장은 거의 비슷하여 각각 230, 259, 290 및 432 nm인 것으로 보고¹⁶⁾되었다.

pH 4.0 Tris buffer, pH 6.0 및 7.4 PBS를 사용하여 30, 40 및 50°C에서 일주일동안 약물의 안정성을 검토한 결과를 Table III에 나타내었다. 즉 30°C일 때 pH 4.0 Tris buffer와 pH 6.0 및 7.4 PBS에서의 반감기는 각각 294, 22.0 및 6.32 day였고, 40°C일 때 각 용액에서의 반감기는 24.9, 11.6 및 2.9 day, 또한 50°C에서는 각각 8.74, 2.92 및 0.81 day였다.

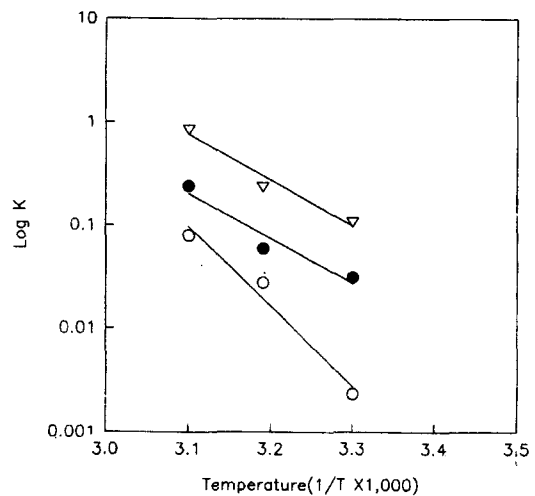


Fig. 1—Arrhenius plots for the degradation of aclarubicin. Key: -○-; pH 4.0 Tris buffer solution, -●-; pH 6.0 phosphate buffer solution, -▽-; pH 7.4 phosphate buffer solution.

Table IV—Pseudo-first order rate constants for the degradation of aclarubicin in various solutions at 40°C (Mean±S.D., n=3)

Solution	k_{obs} (day ⁻¹)	$t_{1/2}$ (day)
Distilled water	5.7±0.7	0.12
Phosphatidylcholine solution	9.7±1.0	0.07
pH 7.4 phosphate buffer solution	12.9±3.1	0.05

Fig. 1은 Arrhenius식에 따라 소실 속도 정수와 절대 온도 역수(1/T)와의 관계를 나타낸 것으로 온도와 pH가 상승할수록 약물이 불안정함을 알 수 있으며 이러한 결과는 Mori 등^{16,17)}이 ACL·HCl은 pH 4~5에서 가장 안정하다는 보고와 일치하는 것이다.

증류수, PC 용액 및 PBS에서 시간에 따른 분해과정의 약물의 잔존율을 plot하였을 때 얻어지는 그래프는 1차 속도식에 따랐으며 이 직선의 기울기로부터 구한 분해속도상수(k_{obs}) 및 반감기($t_{1/2}$)는 Table IV와 같다. 즉 분해속도 상수는 각각 5.70±0.7, 9.67±1.0 및 12.9±3.1 day⁻¹으로 PBS에서 가장 불안정하였고 증류수에서 가장 안정하였다. 또한 PC 자체도 ACL의 분해에 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 이는 Storm 등¹⁸⁾에 의한 안트라사이클린계 약물인 독소루비신이 PC 용액에서 불안정하였다고 보고된 내용과 일치한다.

ACL의 실험실적 리포솜 제조

ACL의 봉입율 - ACL base와 ACL·HCl의 두가지 약물을 리포솜에 봉입시킨 결과를 Table V에 나타내었다. formulation ②, ⑤ 및 ⑥의 봉입율은 평균 25~30%로 지질의 구성에 따라 큰 차이가 없었으며 ACL base와 ACL·HCl은 각각 formulation ⑥과 ②에서 26.47과 23.56%로 약간 낮았다. 또한 ACL

Table V—Entrapment efficiency of aclarubicin and aclarubicin·HCl into liposomes formed by hand shaking method in various lipid composition

Composition	Entrapment Efficiency (%)	
	Aclarubicin	Aclarubicin HCl
PC:CHOL:TA	31.2	23.6
PC:DPPC:CHOL:TA	30.2	32.7
PC:DPPC:DCP:CHOL:TA	26.5	31.4

* All types of liposomes were made from total lipid 100 µmol/ml (PC)

Table VI—Entrapment efficiency of aclarubicin into liposomes formed by the hand-shaking method in various ratios of drug and lipid

Lipid Concentration (µmol/ml)	Drug Efficiency (%)	
	0.5 (mg/ml)	1.0 (mg/ml)
100	74	69
200	76	76
300	78	80

* Lipid composition was PC:CHOL:TA (15:4:0.2 molar ratio)

base는 DPPC에 의해서 영향을 받지 않았지만 ACL·HCl은 봉입율이 8%정도 향상되었으며 음하전 물질인 DCP 첨가로 5%정도 감소되는 경향을 볼 수 있었다.

약물의 봉입율은 지질농도의 증가와 함께 증가한다는 보고⁷⁾에 따라 약물 농도와 지질 농도를 변화시켜 봉입율을 측정된 결과를 Table VI에 나타내었다. 즉 봉입율은 지질 농도가 100, 200 및 300 µmol/ml로 증가함에 따라 0.5와 1 mg/ml의 약물농도에서 각각 74과 69, 76 및 78과 80%이었다.

이상의 실험에서 약물 농도는 0.5~1 mg/ml로 하고 지질의 농도는 200 µmol/ml 정도로 설계를 하면 봉입율은 70%이상 가능한 것으로 나타났다.

마이크로플루이디저를 이용한 리포솜의 제조

동결건조 - 공용점은 동결시킨 검체의 온도를 서서히 증가시켜 용융되는 온도 즉 전기적 저항이 급격히 저하되는 점으로서 동결건조 공정에서 동결 후 건조시 공용점보다 높을 경우 제품에 변질을 가져오게 되므로 아주 중요하며 그 측정 결과를 Table VII에 나타내었다. 즉 ACL 농도가 1.39와 2.7%(w/v)에서 각각 3±1과 0±1°C로서 농도가 높을수록 공용점이 내려감을 알 수 있었다.

Table VII—Eutectic temperature for Aclarubicin·HCl and Aclarubicin-entrapped four lipid composition liposomes

Sample	Eutectic temp.	Conc. (W/V%)
Aclarubicin·HCl	3±1	1.39
Aclarubicin	0±1	2.7
I	-11±1	14
II	-10±1	14
III	-10±1	14
IV	-10±1	14

* All types of liposomes were made from total lipid 200 µmol/ml (PC)

또한 각 조성에 대한 리포솜의 공용점은 formulation I이 $-11 \pm 1^\circ\text{C}$ 이며 formulation II, III 및 IV는 $-10 \pm 1^\circ\text{C}$ 였다.

동결방지제로서 trehalose를 사용하여 동결건조 리포솜을 얻었다. 즉 동결시 제품의 온도를 공용점 이하인 -45°C 로 도달시켜 2.5시간 정도 유지시킨 후 승화시 진공도 60 mtorr에서 제품의 온도를 11.5시간에 걸쳐서 25°C 까지 서서히 상승시킨 후 다음 2차 건조 공정에서는 진공도 20 mtorr에서 제품에 잔류하는 수분을 탈착시켜 건조리포솜을 얻은 상태에서 고무마개를 동결 건조기 내부에서 자동 밀봉시킨 후 꺼냈다.

봉입효율 - 마이크로플루다이저 및 동결 건조기를 이용하여 제조한 리포솜에 봉입된 약물을 측정된 결과 Table VII에 나타냈다.

리포솜 제조후 유리 약물 제거전과 후의 약물의 농도는 formulation I, II, III 및 IV에서 각각 234.1와 182.5, 233.0와 212.3, 368.0와 290.0 및 395.1와 $291.6 \mu\text{g/ml}$ 으로 모두 80%이상의 높은 봉입율을 보였으며 특히 formulation II는 100.2%로서 거의 모

든 약물이 봉입됨을 볼 수 있었다.

리포솜의 평가

첨가제에 따른 입자 크기 및 분포 - 마이크로플루다이저를 이용하여 제조한 리포솜액과 동결건조법으로 제조한 건조 리포솜을 다시 재수화시킨 리포솜액을 동적 광산란 기법을 이용하여 측정된 결과를 Table IX에 나타내었다.

Table IX에서 보면 formulation II의 경우 이분산으로 나타나 평균 입자 크기가 큰 의미를 지니지 않으나 다른 처방의 경우 모두 단분산을 나타내었으므로 평균 입자 크기로 비교하였다.

모든 리포솜에서 동결건조 전후에 평균 입자크기 및 분포에 큰 차이가 없었는데 이러한 결과는 Crowe와 Samir 등의 실험결과로서 설명할 수 있다. 즉 Crowe 등¹⁰⁾에 의하면 입자크기가 50~100 nm인 리포솜에서는 동결 건조시키는 동안 대단히 안정하지만 SUV나 입자크기가 큰 LUV는 동결방지제가 충분히 존재하는 조건에서도 불안정하다고 하였다.

그러나 Samir S 등²⁰⁾에 의하면 동결이나 동결건조에 의해서 LUV의 입자크기를 감소시켜 water permeability를 증가시키지만 동결 속도에 의해서는 리포솜 입자크기에 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 보고하였다.

일반적으로 콜레스테롤은 리포솜을 이루는 지질막 사이에 끼어 들어가서 막을 견고하게 만들면서 내부 수상의 용적을 증가시켜 입자크기를 증가시키는 것으로 알려져 있다. 이 실험에서의 입자크기는 콜레스테롤의 비율을 일정하게 첨가하였으므로 주로 PC-hydrate나 DPPC, cardiolipin과 같은 다른 지질 종류에 의해서 영향을 받을 것으로 예측할 수 있다. 즉 동결건조 전후

Table VIII— Entrapment efficiency of aclarubicin · HCl entrapped into liposomes containing phosphatidylcholine and various additives (Mean±S.D., n=3)

Sample	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)		Efficiency (%) ^a
	Free Drug		
	With	Without	
I	234.08±3.22	182.49±2.37	85.76±1.34
II	233.04±4.32	212.34±6.24	100.23±1.48
III	368.00±3.24	290.01±3.21	86.69±2.31
IV	395.11±2.67	291.45±4.34	81.14±1.69

* All type of liposomes were made from total lipid 200 $\mu\text{mol/ml}$ (PC)

^a Increased 10% value

Table IX— The size distribution and mean size before and after the freeze-drying with various lipid composition liposomes entrapped aclarubicin-HCl

Sample	Size (nm)				P.Ia	
	Before		After		Before	After
	Mean	Range	Mean	Range		
I	85	60~110	79	58~103	1	1
II	165	40~300	195	29~413	2	2
III	160	53~289	155	38~366	1	1
IV	140	60~255	134	62~246	1	1

* All types of liposomes were made from total lipid 200 $\mu\text{mol/ml}$ (PC)

CHOL, TA, Cardiolipin and PC-hydrate content was mol ratio of PC concentration

^a Polydispersity index (1: monodisperse, 2: bidisperse)

평균입자 크기를 비교했을 때 formulation II가 165와 195 nm로서 비교적 컸으며 입자분포는 formulation II와 III가 29~413 및 38~366 nm로서 입자가 작은 것에서부터 큰 리포솜에 걸쳐 다양한 크기의 리포솜으로 되어있다.

리포솜들로부터의 약물 방출 거동 - Ganapathi 등¹⁰⁾에 따르면 일반적으로 지질에 콜레스테롤을 첨가하면 지질막을 이루는 인지질의 탄화수소 사슬의 회전 자유도를 감소시켜 지질막을 견고하게 만들고 상전이이 억제되어 방출 속도가 지연된다고 한다.

또한 Inoue 등²¹⁾은 콜레스테롤을 첨가하여 지질막의 유동성을 변화시켜 약물의 방출을 조절할 수 있다고 하였는데 20 mol%의 콜레스테롤이 첨가되면 온도에 따른 약물의 방출이 증가되는 반면 33 mol% 이상이 되면 온도에 따른 지질막의 투과를 감소시킨다고 하였다.

콜레스테롤의 농도를 일정하게 유지하고 지질 첨가제를 사용하여 방출 거동을 살펴본 결과를 Fig. 2에 나타내었으며 방출률은 4가지 처방 모두 5시간까지는 비슷한 양상을 보였으나 cardiolipin을 첨가한 formulation II 리포솜은 6시간 이후 방출속도가 빨라져 24시간에 약물이 거의 다 방출되었다.

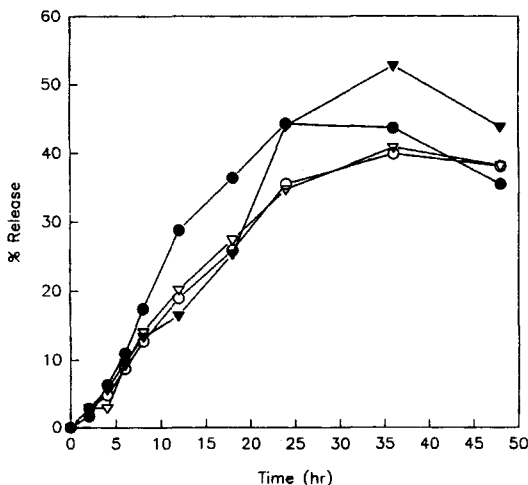


Fig. 2— Release from aclarubicin-entrapped liposomes in pH 4.0 Tris buffer solution.
Key: -○-: Formulation I (PC:CHOL:TA=15:4:0.2), -●-: Formulation II (PC:Cardiolipin:CHOL:TA=14.92:0.08:4:0.2), -▽-: Formulation III (PC:PC-hydrate:CHOL:TA=11:4:4:0.2), -▼-: Formulation IV (PC:DPPC:CHOL:TA=10:5:4)

첨가제를 넣지 않은 formulation I과 첨가제로서 PC-hydrate를 넣은 formulation III는 리포솜의 방출율이 비슷하여 36시간에 약물이 거의 방출되었다.

첨가제로서 DPPC를 첨가한 formulation IV 리포솜의 방출속도는 가장 느리게 나타났는데 이는 독소루비신의 경우 지질 첨가제로서 DPPC를 사용한 solid type liposome이 다른 fluid type liposome보다는 방출 지연 효과가 있었다는 이론과 일치한다. 또한 DPPC가 콜레스테롤과 함께 리포솜의 막을 견고하게 해주어 약물의 방출지연 효과가 나타난 것으로 사료된다.

사람 혈장과 완충액에서 리포솜의 안정성시험 - Table X에서 보는 바와 같이 pH 7.4 PBS에서 free ACL의 분해속도상수는 $0.6 \pm 0.1 (\times 10^{-2} \text{ hr}^{-1})$ 로 각 지질조성의 리포솜보다 안정하였다. 이는 약물의 분해에 지질 조성물질이 관여한다는 Storm 등¹⁷⁾의 보고와 마찬가지로 리포솜의 지질조성 물질이 ACL의 분해를 촉진하는 것으로 사료된다.

또한 지질첨가제를 넣은 formulation II, III 및 IV 리포솜이 formulation I 리포솜보다 안정하여 formulation I의 반감기 20.3시간에 비하여 각각 40.7, 38.7 및 35.5시간으로 약 2배정도 반감기가 연장되었다.

80% 사람혈장을 첨가했을 때에는 free ACL보다 각 지질 조성의 리포솜들의 분해속도가 빠르게 나타났다. 또한 지질첨가제로 PC-hydrate를 첨가한 formulation III 리포솜과 DPPC를 첨가한 formulation IV 리포솜의 분해가 formulation I이나 II 리포솜보다 약간 빨랐다.

Table X— Pseudo-first order rate constant for the degradation of aclarubicin · HCl and aclarubicin-entrapped liposomes in pH 7.4 phosphate buffer solution and 80% human plasma at $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$

Sample	Kobs ($\times 10^{-2}$)		t _{1/2} (hr)	
	PBS	HP	PBS	HP
Aclarubicin · HCl	0.59±0.10	1.20±0.08	117.26	57.80
I	3.42±0.18	1.60±0.13	20.28	43.23
II	1.70±0.10	1.37±0.16	40.72	50.73
III	1.79±0.11	1.93±0.24	38.69	35.87
IV	1.95±0.15	1.96±0.27	35.52	35.30

* All types of liposomes were made from total lipid 200 $\mu\text{mol/ml}$ (PC)
PBS: pH 7.4 phosphate buffer solution
HP: 80% human plasma

결 론

안트라사이클린계열인 아클라루비신을 리포솜에 의한 수송체를 만들어 표적 부위에서 항암제가 장시간에 걸쳐 지속적으로 방출되게 함으로서 치료효과를 극대화시키고 부작용을 경감시키기 위하여 마이크로플루다이저 및 동결건조법을 이용하여 인지질을 이용한 건조 리포솜을 제조한 후 지질, 조성에 따른 봉입률의 변화 및 약물방출 시험을 행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. ACL의 농도가 0.5~1 mg/ml일때 지질의 농도가 200 μmol/ml이면 봉입율이 70%이상인데 비하여, 마이크로플루다이저를 이용하여 제조한 리포솜의 봉입율은 80%이상이었다.

2. 마이크로플루다이저를 이용하여 제조한 리포솜액과 동결건조 리포솜을 재분산시켜 측정된 평균 입자크기는 80~200 nm로 큰 차이점이 없었다.

3. DPPC를 넣은 리포솜의 약물 방출지연 효과가 가장 커서 지질 조성 비율의 변화에 의한 약물 방출 속도 조절이 가능하다.

4. 최적의 동결건조법을 이용하여 안정성이 높은 ACL의 건조 리포솜을 제조할 수 있었다.

5. pH 7.4 인산염 완충액과 혈장에서는 리포솜이 ACL 단독보다 분해가 빨랐으며, 혈장에서는 더 빨리 분해되었다. 또한 지질 첨가제를 넣지 않은 formulation I에서 분해가 가장 빨랐다. 혈장에서 반감기는 각각 ACL이 57.8, formulation I이 43.23, cardiolipin을 첨가한 formulation II가 50.7, PC-hydrate를 첨가한 formulation III가 35.9, DPPC를 첨가한 formulation IV가 35.3 시간이었다.

문 헌

1) Juni, K., Ogata, J., Matsui, N., Kubota, M. and Nakano, M. : Modification of the release rate of aclarubicin from polylactic acid microspheres by using additives, *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 1734 (1985).
 2) Banham, A. D., Standish, M. M. and Watkins, J. C. : Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *J. Mol. Biol.* **13**, 238 (1965).
 3) Mayer, L. D., Bally, M. B., Hope, K. J. and Cullis, P. R. : Techniques for encapsulating bioac-

tive agents into liposomes, *Chem. Phys. Lipids.* **40**, 335 (1986).
 4) Gabizon, A. : Liposomes as a drug delivery system in cancer chemotherapy, *Drug Carrier System*, edited by Roerdink, F.H.D. and Kroon, A. M. 185 (1989).
 5) Beamer, D. W. and Banham, A. D. : Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochim. Biophys. Acta.* **443**, 629 (1976).
 6) Huang, C. H. : Studies on phosphatidylcholine vesicles formation and physical characteristics. *Biochemistry* **8**, 344 (1969).
 7) Mayhew, E., Lazo, R., Vail, W. J., King, J. and Green, A. M. : Characterization of liposomes prepared using a microemulsifier, *Biochim. Biophys. Acta.* **775**, 169 (1984).
 8) Mayhew, E., Lazo, R., Vail, W. J., King, J. and Green, A. M. : Characterization of liposomes prepared using a microemulsifier, *Biochim. Biophys. Acta.*, **775**, 174 (1984).
 9) Mayhew, E., Conroy, S., King, J., Razo, R., Nikolopoulos, G., Sciliano, A. and Vail, W. J. : High-pressure continuous-flow system for drug entrapment in liposomes, "*Methods in enzymol.*" **149**, 64 (1987).
 10) Ganapathi, R. and Krishnan, A. : Effect of cholesterol content of liposomes on the encapsulation, efflux and toxicity of adriamycin, *Biochem. Pharmacol.* **33**, 698 (1984).
 11) Cavalli, R., Caputo, O. and Gasco, M. R. : Solid lipospheres of doxorubicin and idarubicin, *Int. J. Pharm.* **89**, R9 (1993).
 12) Gasco, M. R., Cavalli, R. and Caputo, O. : Doxorubicin lipospheres from microemulsions, *Proceed, Intern. Symp. Control. Rel. Bioact Mater.* **19**, 391 (1992).
 13) Crowe, L. M., Crowe, J. H., Rudolph, A., Womersley, C. and Appel, A. : Preservation of freeze-dried liposomes by trehalose, *Arch. Biochem. Biophys.* **242**, 240 (1985).
 14) Harrigan, P. R., Madden, T. D. and Cullis, P. R. : Protection of liposomes during dehydration or freezing, *Chemistry, Physics, Lipids.* **52**, 139 (1990).
 15) Guo, L. S. S., Hamilton, R. L., Goerke, J. and

- Weinstein, J. N. : Interaction of unilamellar liposomes with serum lipoproteins and apolipoproteins, *J. Lipid Res.* **21**, 993 (1980).
- 16) Oki, T., Kitamura, I., Matsuzawa, Y. Shibamoto, N., Ogasawara, T., Yoshimoto, A. and Inui, T. : Antitumor anthracycline antibiotics, aclacinomycin A and analogues, *Antibiotics* **32**, 801 (1979).
- 17) Mori, S., Ogasawara, T., Nishimura, M. and Miura, H. : Physicochemical properties and stability of aclacinomycin A hydrochloride, *Antibiotics*, **33**, 618 (1980).
- 18) Storm G. : Liposomes as delivery system for doxorubicin in cancer chemotherapy. Optimax, university of Groningen, Neotherland. p 45 (1987).
- 19) Crowe, J. H. and Crowe, L. M. : Factors affecting the stability of dry liposomes, *Biochim. Biophys. Acta.* **939**, 327 (1988).
- 20) Abu-Zaid, S. S., Morii, M. and Takeguchi, N. : Effects of freezing, freeze-drying and cold storage on the size and membrane permeability of multilamellar liposomes, 膜(MEMBRANE). **9**, 43 (1984).
- 21) Keize, I. : Permeability properties of liposomes prepared dipalmitoyllecithin, dimyristoyllecithin, egg lecithin, rat liver lecithin and beef brain sphingomyelin, *Biochim. Biophys. Acta.* **339**, 390 (1974).