

리포솜에 봉입된 아클라루비신의 약물동태, 세포독성, 항암효과 및 비장/혈구 세포독성

박목순* · 박진규* · 이계원 · 명평근 · 석대은 · 황성주 · 지웅길

충남대학교 약학대학, *동국제약 주식회사

(Received November 3, 1997)

Pharmacokinetics, Cell Toxicity, Antitumor Activity and Spleen/Blood Cell Toxicity of Aclarubicin-entrapped Liposomes

Mork Soon Park*, Jin Kyu Park*, Gye Won Lee, Pyung Keun Myung, Dai Eun Sok, Sung Joo Hwang and Ung Kil Jee

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

*DongKook Pharm. Co. Ltd.,

Abstract—Aclarubicin(ACL)-entrapped freeze dried liposomes were prepared using Microfluidizer to attain a sustained release at targeted organs in a prolonged time so that it can reduce the side effect and maximize the therapeutic effect. The freeze-dried liposomes were evaluated for pharmacokinetics, antitumor activity against Sarcoma 180, cytotoxicity against L1210 and A549 tumor cells, spleen toxicity and myelosuppressive action. The AUC_{0-4hr} values were 122 ± 42 , 382 ± 140 , 419 ± 171 , 835 ± 206 and $443 \pm 309 \mu g \cdot min/ml$ for free ACL, ACL-liposome formulation I, II, III and IV, respectively. Cytotoxicity of ACL-entrapped liposomes against L1210 and A549 tumor cells was 2~4 times higher than that of free aclarubicin. ACL-liposome formulation I(PC/CHOL/TA) showed the most potent antitumor activity against Sarcoma 180 in mice. The loss of body weight was much smaller with ACL-entrapped liposomes than free ACL after i.p. injection at a dose of 2mg/kg/day. Compared to free ACL, ACL-entrapped liposomes expressed a lower and delayed spleen toxicity up to 5th day after i.v. administration. Myelosuppression seemed to be lower with ACL-entrapped liposome of PC/PC-hydrate/CHOL/TA (formulation III) than free aclarubicin.

Keywords □ Aclarubicin, microfluidizer, pharmacokinetics, cytotoxicity, freeze dried liposome, antitumor activity, myelosuppression.

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 위해서 반복 투여나 투여량을 높여야 하는 단점이 있으며 골수 저하증, 백혈구 감소증, 비장

결손, 조직괴사, 탈모증, 오심, 구토의 증상을 유발한다. 그 외에 심장 독성이 큰 문제로 대두되고 있다.

일반적으로 수용성 약물을 리포솜에 봉입시킬 경우 봉입율이 매우 낮고 지용성 약물에 비해 봉입된 약물의 누출(leakage)이 쉽게 일어나는 문제점이 알려져 있고, 또한 리포솜을 수용액 상태로 보관할 경우 위해서 언급한 바와 같이 안정성이 매우 낮고 봉입율과 지질에 대한 물리, 화학적 성질의 변화가 다양하게 일어날 수 있다.^{2,3)} 더욱이 동결 건조를 이용하여 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 재현성 있는 조건을 확립해야 한다.

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

Crowe 등⁴⁾에 의하면 trehalose 와 같은 다당류를 첨가하여 리포솜을 동결건조할 때 multilamellar vesicle (MLV)의 경우 동결 건조 전후 vehicle 크기와 붕입율의 변화가 크게 일어났으며 리포솜의 크기가 50~200 nm인 single unilamellar vesicle(SUV)와 large unilamellar vesicle(LUV)는 상대적으로 안정한 결과를 얻었다. 그러므로 동결 건조를 위한 리포솜은 단일막에 가까우면서 크기 분포가 비교적 균일 해야 하고 입자 크기가 작아야 한다. 이를 위하여 Hauser 등⁵⁾은 초음파로 처리하여 SUV를 만든 후 동결 건조를 하였고 Ohsawa 등⁶⁾은 membrane filter 를 이용해 순차적으로 통과시킴으로써 원하는 크기 범위로 조절하였다. 그러나 이러한 방법은 비용과 시간이 많이 들고 복잡한 처리 과정을 거쳐야 하므로 대량 생산에는 부적합한 방법이라 할 수 있다.

이에 저자는 대량 생산에 적합한 방향으로 마이크로플루이다이저를 이용해 ACL 를 붕입한 리포솜을 제조함과 동시에 동결건조에 적합한 크기에 비교적 가까운 작은 크기의 리포솜을 제조하면서 좁은 입자 크기 분포를 갖도록 하여 약물 속도론적 성질 및 조직 분포 특성 및 항암 효과를 비교평가하고, 부작용 경감 정도를 기존 제제와 비교하고 평가하여 독성의 감소를 기대하였을 뿐만 아니라 지속성 제제로서의 가능성에 대해 살펴보고자 하였다.

실험방법

시약 및 기기 - 시약은 ACL·HCl(C₄₂H₅₃NO₁₅·HCl), L- α -Phosphatidylcholine dipalmitoyl(DP-PC), cholesterol(CHOL), α -tocopherol acetate(TA), trehalose, NaHCO₃, HCl, 페니실린(10만 units/l), 스트렙토마이신(0.1 g/l) 및 엠포테리신 B(0.25 mg/l)는 Sigma사에서 구입하였고 soy bean phosphatidylcholine(Epikuron 200[®], PC)는 Pacific Pharmaceuticals사에서 그리고 horse serum과 Fischer's media poedersms는 Gibco사에서 구입하였으며 기타 시약은 일급 및 특급을 사용하였다.

실험에 사용한 기기는 액체크로마토그래프(SPD 10A UV-Vis Detector, LC-10AD Liquid Chromatograph, C-R6A Chromatopac, Shimadzu, Japan), 마이크로플루이다이저(Microfluidizer[™] 110Y, Microfluidics Co., Massachusetts, U.S.A), 미량 원심분리기

(Vision, VS-15000, Korea), Ultrafiltration Cell (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), 진탕 배양기(KMC-8480S, Vision Scientific Co. Ltd., Korea), 초음파기(Cavitator, Mettler Electroics Co. U.S.A.), 기계식 교반기(Chang Shin Scientific Co. Ltd., Korea), Thawing zone determinator with usitec system(Usifroid Co., France) 및 동결 건조기(SMH 50, Usifroid Co., France) 등이다

약물 동태 실험(Pharmacokinetics)

시료의 투여 및 혈액 채취 - ACL·HCl 으로서 2.5 mg/kg의 용량으로 흰쥐(Sprague-Dawley rat, 200~250 g)의 꼬리 정맥을 통해서 ACL, Table I과 같은 지질 조성의 formulation I, II, III 및 IV 리포솜 현탁액을 투여한 후, 2, 5, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 360, 480분 및 24시간 경과후 안구동맥으로부터 혈액 0.3 ml를 채취하여 즉시 원심분리하여 혈장을 취한 다음 -20°C에서 동결시킨다.⁷⁻⁹⁾

혈장 시료의 전처리 - 혈장 0.2 ml를 취하여 여기에 내부표준물질로서 메탄올에 녹인 도노루비신(염산염)을 100 ng/ml의 농도로 넣어 3초간 vortexing하고 클로로포름 및 메탄올 혼합액(3:7 v/v) 1 ml를 넣고 10초간 혼합한 다음 1분간 vortexing하고 100 rpm에서 15분간 진탕, 추출한 다음 3000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 용매층 1 ml를 정확히 취하여 dry block

Table I—Lipid composition of the aclarubicin-entrapped liposome

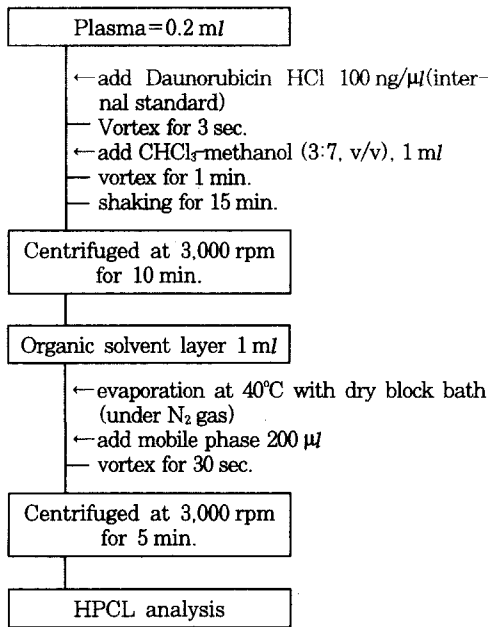
Lipid Composition	Molar Ratio
I: PC : CHOL : TA	15:4:0.2
II: PC : Cardiolipin : CHOL : TA	14.92:0.08:4:0.2
III: PC : PC-hydrate : CHOL : TA	11:4:4:0.2
IV: PC : DPPC : CHOL : TA	10:5:4:0.2

PC : Soya bean phosphatidylcholine, CHOL : Cholesterol

TA : α -Tocopherol acetate

PC-hydrate : Phosphatidylcholine-hydrogenated

DPPC : Dipalmitoyl phosphatidylcholine



Scheme I— Extraction procedure of aclarubicin·HCl from plasma.

bath(40°C, 질소기체 공급)에서 증발 건조하고, 이 잔류물에 이동상 200 μl를 넣어 잘 흔들어 녹인 다음 이 용액 100 μl를 HPLC에 주입하여 분석한다(Scheme I). 이때 사용된 조건은 컬럼은 Polygosil 10 μ C₁₈(100Å³. 9×300 mm, Metachem Tech, Inc.), 이동상 용매는 CH₃CN : 0.01M NaCl(1M 과염소산으로 pH 2.3으로 조정)=45:55, 유속은 1.0 ml/min으로 하여 파장 259 nm에서 측정하였다.

각각의 크로마토그램에서 ACL.HCl의 피크면적(A_i)과 내부표준물질의 피크면적(A_s)의 비(A_i/A_s)를 가지고 작성한 검량선으로부터 혈장시료 중의 ACL의 농도(ng/ml)를 계산하였다.

약물 속도론적 파라메타 산출 - 랫트 혈장중에서 ACL의 농도는 Damping Gauss-Newton법으로 계산하였으며 소실상수(elimination constant, Kel), 흡수속도정수(absorption rate constant, Ka) 및 분포용적(volume of distribution, V_d)을 최소 자승법으로 각각 산출하였다. 실험으로부터 얻은 데이터로부터 혈장중 약물 농도-시간 곡선을 그리고, AUC_{0-t}는 사다리꼴 공식에 의하여 구하였으며, AUC_{t-∞}는 C_t/K로 구하였다.

여기에서 K는 마지막 측정점의 직선 부분의 직선 회귀선으로부터 얻은 겉보기 소실속도 상수값을 의미하며

이 마지막 측정점에서의 겉보기 반감기(apparent terminal half-life, t_{1/2})도 계산하였다. 상대적 생체 이용률은 리포솜현탁액을 투여했을 때의 AUC를 ACL를 투여했을 때의 AUC로 나누어 계산하였다. 또한 전신 클리어런스(the time-averaged total body clearance, CL), 혈장중 약물농도-시간의 1차 모멘트 곡선 하면적(area under the first moment of the plasma concentration-time curve, AUMC) 및 평균 체류시간(mean residence time, MRT) 등은 다음 식에 의하여 계산하였다.

세포 독성 실험

부유세포주를 이용한 검색 - 배양액은 냉장고(4~6°C)에 보관하면서 일주일 이내에 사용하였으며 L1210 세포는 37°C의 CO₂ 배양기(CO₂ 5%)로 1주일에 두번 계대배양하였다. 일정 농도로 희석된 실험군과 대조군을 37°C, CO₂ 배양기에서 48시간 배양하였고 haemocytometer를 사용하여 세포수를 계산하였다.

ED₅₀값은 대조군의 50% 수준으로 L1210 세포의 성장을 억제하는 시료의 농도(μg/ml)로 주어지며 여기에서는 미국립 암연구소(NCI, National Cancer Institute, U.S.A.) 시험방법에 의해 결정하였다. 시험군의 각 농도에 대한 성장율 Y(%)는 다음과 같이 계산하였다.

$$Y(\%) = \frac{T - C_0}{C - C_0} \times 100$$

T=시험군의 48시간 배양후 평균 세포수(cells/ml)
 C=대조군의 48시간 배양후 평균 세포수(cells/ml)
 C₀=배양 시작시 평균 세포수(cells/ml)

각각 농도가 Y(%) 값과 Log10 dose 를 도식화하고 회귀선 Y=A+BX를 얻었으며 이 때 각각의 농도에 대하여 계산한 Y(%)값이 55%보다 크거나, 45%보다 작으면 재실험을 실시하였다.

NCI manual에 따르면 L1210 세포에 대한 세포독성 평가는 식물추출물인 경우 20 μg/ml이하, 합성물인 경우 4 μg/ml 이하일 경우 항암작용이 있다고 규정하고 있다.

부착세포주를 이용한 검색 - A 549세포는 RPMI 1640 배지로 최종농도가 5%가 되도록 fetal bovine serum을 넣어 사용하여 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 1주일에 1회 계대배양하며 최종농도가 8%가 되도록 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가한 배지를 사용하

여 액체질소에 보관하면서 필요시 사용하였다. 배양기 기벽에 부착한 세포를 기벽에서 분리할 때는 0.25% trypsin-EDTA 용액을 사용하였다.

Monolayer로 자란 A549 세포를 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 처리하여 현탁액으로 만든 후, 일정농도로 희석하여 microplate내 각 well에 1 ml씩 넣은 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 preincubation 하였다. 각 well에 실험군과 대조군을 가하여 최종 부피가 2 ml가 되도록 한 후 48시간 배양하였다. 배양후 상등액의 배지를 조심스럽게 제거하고 차가운 12% TCA를 각 well에 1.5 ml씩 가하고, 40°C에서 1시간 방치한 후, TCA를 버리고 물로 5회 세척하여 공기중에서 완전히 건조한다. 여기에 1% 초산용액에 녹인 0.4% sulforhodamine B(SRB) 용액을 각 well에 0.5 ml씩 가하여 상온에서 1시간 방치 염색한 후 과량의 SRB 용액을 1% 초산액으로 5회 세척하고 공기중에서 완전히 건조한다. 각 well에 10 mM Tris를 적당량 가하여 색소를 녹여 내어 microplate reader로 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 성장율(Y%)은 부유세포주를 이용해서 검색할 때와 같은 식에 따라 계산하였다. 대조물질로 5-fluorouracil을 사용하여 실험시 A549에 대한 ED₅₀(µg/ml)값의 범위가 1.5~2.4을 나타낸다.

In vivo 항암력 실험 - 음성 ICR계 마우스(20~25 g)를 사용하여 Sarcoma 180 세포 부유액을 0.1 ml (10⁶ cells/mouse)씩 복강내에 이식하여 복수암을 유발하였다. 이식 후, 24시간이 지난 다음부터 각군을 6마리로 하여 하루에 1회 5일간 연속하여 약물을 꼬리 정맥 및 복강내에 각각 주사했다. 이때 2군의 대조군에는 50% 폴리에틸렌 글리콜 400(PEG 400) 용액을 주사하였으며, 처치군에는 약물을 50% PEG 400에 용해시켜 꼬리 정맥 및 복강내에 각각 투여하고 60일간 수명을 관찰 하였다.

마우스를 60일까지 관찰하여 다음과 같은 식을 사용하여 생존비(T/C %)와 % 생명 연장기간(increase life span, ILS %)을 계산하였다.¹⁰⁾

$$\text{생존비}(\%) = \frac{T}{C} \times 100$$

$$\text{ILS}(\%) = \frac{T}{C}(\%) - 100$$

여기에서 T=처치군의 평균 생존일수

C=대조군의 평균 생존일수

비장 독성 및 골수 저하증(Myelosuppression) 평가

비장 무게 측정 - 실험은 음성 ICR계 마우스(28~32 g)을 고정대에 고정한 다음 꼬리 부분을 xylene을 문힌 솜으로 닦아 주어 꼬리 정맥의 혈관이 확장되면 free ACL 및 formulation I, II, III 및 IV처방의 리포솜 현탁액을 200 µl씩(ACL로서 6.7 mg/kg) 주사하였다. 별도의 실험에서 ACL와 처방 III 리포솜 현탁액을 7.5 mg/kg으로 복강주사하였다. 이 때 각군은 4 또는 5마리이었고 대조군에는 생리 식염수를 주사 하였으며 4, 5, 7 및 11일째마다 각군의 마우스를 경추 탈구(cervical dislocation)시킨 후 비장을 적출하여 각각의 무게를 측정하였다.¹¹⁾

Urine test - 상기 방법에서 경추탈구후 즉시 Al-bustix(三共 주식회사, 일본) Strip을 사용하여 뇨중 단백질의 양을 상대적으로 측정하였다.¹²⁾ 상대값의 구분 표시는 다음과 같다.

구 분	+1	+2	+3	+4
mg/dl	30	100	300	1000

혈액 백혈구 및 혈소판 측정 - 음성 ICR계 마우스(19~20 g)의 복강에 free ACL 용액 및 리포솜 현탁액(RIII)을 200 µl씩(ACL로서 6.7 mg/kg) 주사 했다. 이 때 각군은 5마리이었고 대조군에는 생리 식염수를 주사하였다. 주사 후 4일째 각군의 마우스를 에텔로 마취, 심장천자하여 0.5 ml의 혈액을 취하여 즉시 헤파린 처리된 CBS bottle에 넣어 약하게 흔들어 준 다음 혈구 분석기(Coulter counter T-540)로 백혈구 및 혈소판 수를 측정하였다.^{13, 14)}

결과 및 고찰

약물 동태 - Fig. 1는 약물과 리포솜 제제를 랫트에 정맥 주사한 후 얻어진 혈장 농도의 추이를 보여주고 있다. ACL 및 각 지질 조성의 리포솜 투여시 초기의 혈장 농도가 급격하게 떨어지는 양상을 나타내지만 각 지질 조성의 리포솜제제의 혈장농도는 ACL의 혈장 농도보다는 상당히 높은 상태로 유지되며 240분 이후 formulation I 리포솜은 ACL보다 혈장 농도가 낮게 나타났다. 지질 첨가제로 PC-hydrate를 첨가한 formulation III 리포솜은 혈장 중 리포솜에서 약물의 방출이 상당히 서서히 일어나면서 지속적으로 높은 농도를 유

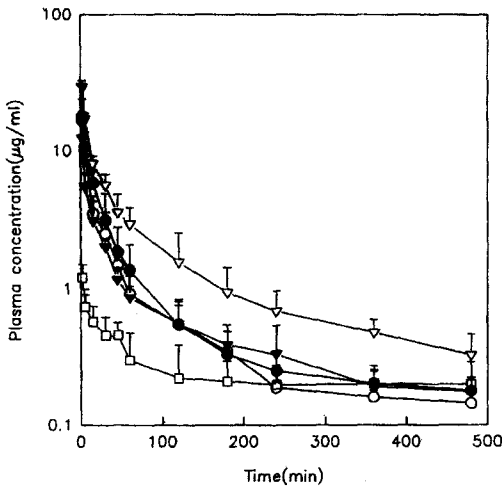


Fig. 1 — Mean plasma concentration profile of Aclarubicin and Aclarubicin-entrapped liposomes to rat (2.5 mg/kg as Aclarubicin, Mean±S.D., n=5). Key: □: Aclarubicin-HCl, ○: I(PC: CHOL: TA=15:4:0.2), ●: II(PC: Cardioplin: CHOL: TA=14.92:0.08:4:0.2), ▽: III(PC: PC-hydrate: CHOL: TA=11:4:4:0.2), ▼: IV(PC: DPPC: CHOL: TA=10:5:4:0.2)

지하였다. 따라서 장시간 치료 농도가 유지되므로 부작용을 줄이고 약효를 높일 수 있을 것으로 사료된다. Table II에 혈장농도추이로부터 각종 Parameter인 $t_{1/2\alpha}$, $t_{1/2\beta}$ 및 $t_{1/2\gamma}$, AUC, AUMC, MRT, V_{ss} , CL, BA를 구하여 나타내었다.

AUC_{0-8hr} 는 ACL보다 각 지질 조성의 리포솜들에서 높게 나타났으며 특히 formulation III에서는 480분까지의 AUC값이 $835 \pm 206 \mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{ml}$ 였으나 ACL은 $122 \pm 42 \mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{ml}$ 였다. 무한대 시간까지의 평균 체류시간(MRT)이 ACL가 9050분인데 반해 각 지질 조성의 formulation I, II, III 및 IV의 값은 각각 307, 7575, 465 및 261 분이었다. 상대적 생체 이용률(RBA)도 ACL 보다 각 지질 조성의 formulation I, II, III 및 IV에서 각각 314, 384, 686 및 364% 증가하였다. 따라서 리포솜 제제 특히 formulation III 리포솜은 ACL보다 생체 이용률의 증가를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

세포 독성 실험 - Table III은 L1210 및 A549에 대한 세포 독성 결과를 나타냈다.

L1210에 대한 세포 독성은 free ACL의 ED_{50} 값이 $5.01 \pm 0.038 \text{ ng}/\text{ml}$ 이고 각 지질 조성 I, II, III 및 IV의 리포솜들의 ED_{50} 값은 각각 2.52 ± 0.074 , $2.54 \pm$

0.068 , 2.53 ± 0.042 및 $2.55 \pm 0.083 \text{ ng}/\text{ml}$ 로서 free ACL의 값이 리포솜들의 값보다 2배 높았다. 또한 A549에 대한 formulation I, II, III 및 IV 리포솜 현탁액의 ED_{50} 값은 각각 0.021 ± 0.0012 , 0.012 ± 0.0023 , 0.010 ± 0.0048 , 0.0051 ± 0.00038 및 $0.012 \pm 0.0010 \mu\text{g}/\text{ml}$ 으로서 free ACL의 ED_{50} 값에 비해 2~4배 높은 것으로 관찰되었다.

따라서 L1210이나 A549에 대한 세포독성의 결과로부터 ACL을 리포솜 제제로 하였을 때 유용성이 증가될 수 있음을 알 수 있다.

In vivo 항암력 실험 - In vivo에서 Sarcoma 180 세포를 이용하여 마우스에 복수암을 유발 시켜 ACL 및 각 리포솜들을 치료약물로 복강 및 정맥 주사했을 때의 항암력 실험 결과와 체중의 변화를 Table IV와 V에 나타내었으며 생존일이 60일 이상인 것은 일괄적으로 60일로서 간주하여 생존비를 계산하였다.

약물을 복강 투여 2 mg/kg/day시 리포솜 제제들이 free ACL보다는 항암력이 낮지만 formulation I, II의 경우 생존비가 각각 166%, 147%로서 우수한 항암력을 나타냈으며, free ACL에서는 전신독성으로서 약물 투여 후 7, 9 및 13 일째 체중 감소 현상이 나타났지만 formulation I, II, III 및 IV 리포솜 현탁액에서는 체중 감소 현상이 나타나지 않았다. 이는 리포솜에서 약물의 서방성 방출로 인한 독성의 감소효과로 사료된다. 4 mg/kg/day에서는 free ACL보다 각 지질 조성 리포솜들의 평균 생존 일수가 증가 되었는데 마찬가지로 약물의 지속적 방출로 인한 독성의 감소 효과로 생각된다. 약물을 정맥 주사시 4 mg/kg/day에서 free ACL보다 formulation IV이 항암력이 2배 높았으며 free ACL은 전신독성으로서 체중 감소 현상이 나타났으나 formulation IV 리포솜 현탁액에서는 나타나지 않았다. 또한 평균 생존일수가 free ACL보다 formulation IV 리포솜 현탁액에서 증가되었다.

이러한 현상은 리포솜으로부터 약물의 방출이 지연되어 약물 자체의 독성이 감소되어 평균 생존 일수가 대조군이나 약물 자체보다 증가한 형태로서 독소루비신과 도노루비신의 약물을 리포솜의 형태로 투여시에도 관찰되었다.¹²⁾

비장 독성 및 골수 저하증(Myelosuppression) 평가

비장 무게 측정 - ACL 및 4가지 리포솜 현탁액을 마우스의 꼬리 정맥에 ACL로서 6.7 mg/kg 주사하여

Table II—Pharmacokinetics parameters of aclarubicin and aclarubicin-entrapped liposomes after tail vein injection with 2.5 mg/kg as aclarubicin to rats (Mean ± S.D., n=5).

Treat- ment	$t_{1/2}$		γ	AUC_{0-6hr} ($\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{ml}$)	$AUC_{0-\infty\text{min}}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{ml}$)	AUC_{0-6hr} ($\mu\text{g} \cdot \text{min}^2/\text{ml}$)	MRT (min)	CL (ml/min)	V_d (ml)	BA(%)
	α	β								
Free-	5.74±5.55	129.75±168.7	6368.70±7916.2	121.71±42.33	1645.31±626.7	23075±10168	9047.50±11330	6.97±1.89	1273.40±262.65	100
ACL										
I	2.66±1.87	18.65±5.53	349.23±317.75	382.10±140.14*	502.21±288.38	32185±12778	306.83±326.22	2.19±0.97	326.75±298.13**	313.50±115.09
II	2.98±2.24	17.19±8.75	6025.20±1294.30	419.05±171.30*	1992.10±3463.6	31170±14009	7574.50±16581	2.20±1.45**	486.67±341.05**	384.20±182.31
III	1.81±0.80	18.66±10.89	559.22±571.17	834.98±205.95**	1105.60±339.34	60180±32452	464.54±463.74	1.05±0.23**	697.85±339.65*	682.20±169.33
IV	1.16±0.60	17.97±5.21	333.16±188.10	443.23±309.00	521.11±313.45	32800±11502	260.55±171.86	2.41±1.31**	239.95±131.69**	364.20±253.80

$$RBA \text{ ("Relative bioavailability")} = \frac{AUC_{0-\infty} \text{ of liposome}}{AUC_{0-\infty} \text{ of aclarubicin}} \times 100$$

*p<0.001, **p<0.05

Table III—Cytotoxicity of Aclarubicin · HCl and Aclarubicin-entrapped four lipid composition liposomes against L1210 and A549

Lipid composition	L1210 ^a , ED ₅₀ (ng/ml)	A549 ^b , ED ₅₀ (μg/ml)
Aclarubicin · HCl	5.01±0.038	0.021±0.0012
I	2.52±0.074	0.012±0.0023
II	2.54±0.068	0.010±0.0048
III	2.53±0.042	0.0051±0.00038
IV	2.55±0.083	0.012±0.0010

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

^a Mean±SD, n=3

^b Mean±SD, n=6

4, 5, 7 및 11일 쯤마다 경추탈구방법으로 죽인 후 비장을 적출하여 무게를 측정된 결과를 Fig. 2에 나타냈다.

안트라사이클린계 약물은 세포분열이 빠른 임파 세포가 존재하는 비장에서 부작용을 초래 비장 결손을 야기시킨다. 따라서 약물 투여 후 비장의 무게를 측정하여 독성을 검토한 결과 free ACL를 주사시 독성으로 인해 비장 무게는 초기 4일째에 빠르게 감소되었으나 약물의 빠른 대사 배설 효과로 인해 서서히 증가되었고 7일째에는 완전히 회복되었다. 한편, formulation I, III 및 IV 리포솜 현탁액의 경우 비장에 대한 독성 효과가 작

Table IV—Body weight change, mean survival days and antitumor activity of Aclarubicin and Aclarubicin-entrapped liposomes against Sarcoma 180 by intraperitoneal injection

Compound	Dose ^a (mg/kg/d ^a y)	Change in Body Weight (%) ^b			Mean survival days ^c	T/C(%)	ILS over control(%)	60 days Survivors
		day 7	day 9	day 13				
Control	0	+4.5	+7.5	+17.4	19.7	100		0/6
Free-ACL	1	+2.7	+3.6	+5.1	33.7	171	71	2/6
	2	-1.9	-1.0	-0.1	40.7	207	107	2/6
	4	-7.2	-6.0	N.D	8.70	44	-56	0/6
I	1	+3.0	+4.1	+6.0	24.5	124	24	0/6
	2	+2.1	+4.8	+9.9	32.8	166	66	1/6
	4	-0.4	-1.6	+1.4	26.3	134	34	0/6
II	1	+1.9	+4.1	+9.2	23.5	119	19	0/6
	2	+0.7	+2.7	+4.4	29.0	147	47	0/6
	4	-2.7	-1.4	-0.3	16.8	85	-15	0/6
III	1	+4.2	+8.4	+14.8	22.3	113	13	0/6
	2	+1.7	+3.8	+4.8	24.5	124	24	0/6
	4	-2.2	-1.8	+0.2	23.7	120	20	1/6
IV	1	+4.2	+8.8	+26.5	13.8	70	-30	0/6
	2	+1.3	+4.0	+5.4	22.5	114	14	0/6
	4	-4.0	-4.8	-8.0	11.7	59	-41	0/6

^a ICR mice were intraperitoneal implanted with 10⁶ cells of Sarcoma 180 and were administered with each compound intraperitoneally once daily for 5 days, starting after transplantation. () are the dose as Aclarubicin · HCl.

^b The increase or decrease in the ratio of the mean body weight at day 7, 9 or 13 to that at day 0

^c The mice were observed until 60 days after the tumor implantation.

Table V—Body weight change, mean survival days and antitumor activity of Aclarubicin and Aclarubicin-entrapped liposome (RIV) against Sarcoma 180 by lateral tail vein injection

Compound	Dose ^a (mg/kg/day)	Change in Body Weight (%) ^b			Mean survival days ^c	T/C(%)	ILS over control (%)	60 days Survivors
		day 7	day 9	day 13				
Control	0	+1.6	+4.1	+6.5	20.7	100		0/6
Free-ACL	1	+4.7	+8.3	+13.4	16.8	81	-19	0/5
	2	+7.2	+10.1	+15.9	22.6	109	9	0/5
	4	-1.9	-1.6	+1.5	10.5	51	-49	0/6
IV	1	+8.1	+13.1	+119.4	24.8	120	20	0/6
	2	+5.1	+8.8	+17.23	20.8	100	0	0/6
	4	+2.2	+5.4	+9.1	21.2	102	2	0/6

^a ICR mice were intraperitoneal implanted with 10⁶ cells of Sarcoma 180 and were administered with each compound by lateral tail vein injection once daily for 5 days, starting after transplantation. () are the dose as Aclarubicin · HCl.

^b The increase or decrease in the ratio of the mean body weight at day 7, 9 or 13 to that at day 0

^c The mice were observed until 60 days after the tumor implantation.

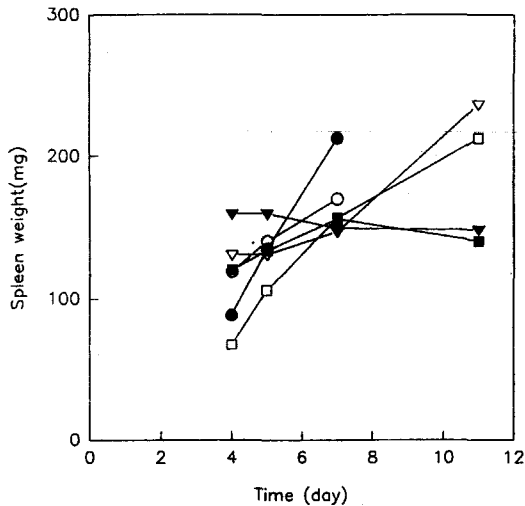


Fig. 2—Spleen Weight change of mice given free Aclarubicin-HCl and Aclarubicin-entrapped liposomes. Key: ■: Control, □: Aclarubicin-HCl, ○: I(PC: CHOL: TA=15:4:0.2), ●: II(PC: Cardiolipin: CHOL: TA=14.92:0.08:4:0.2), ▽: III(PC: PC-hydrate: CHOL: TA=11:4:4:0.2), ▼: IV(PC: DPPC: CHOL: TA=10:5:4:0.2)

아 비장 무게 감소가 낮은 편이었는데 이는 리포솜으로부터 약물의 방출이 지속적으로 방출되어 독성이 감소된 결과로 사료된다. 그러나 liposome size로 인한 RES uptake를 회피했을 가능성은 배제할 수 없다. 반면에 formulation II 리포솜에서는 초기 4일째에 독성이 크게 나타났고 그 이후에 가장 빠르게 회복되었다. 이는 음이온성 지질인 cardiolipin을 함유한 리포솜의 특성에 따라 비장으로의 이행이 쉽기 때문으로 사료된다. 이러한 결과는 도노루비신¹²⁾의 리포솜 제제에서 나타난 양상과 유사한 것이다. 별도로 ACL를 복강주사(7.5 mg/kg)하였을 때 비장무게는 대조군(181 mg)에 비해 free ACL과 처방 formulation III 리포솜 현탁액 투여시에 130과 151 mg으로 각각 감소하였고 formulation III 리포솜이 free ACL에 비해 감소효과가 적은 편이었다. 이는 리포솜으로부터 ACL의 방출이 서서히 이루어져 독성이 저하 되었음을 의미한다.

Urine test - 상기 방법에서 dislocation 후 Albu-stix strip을 사용하여 Urine내 protein양의 상대적 정도를 측정된 결과 모든 리포솜 현탁액에서 100~300 mg/dl정도의 값을 나타내어 유의성 있는 차이를 관찰할 수 없었다.

Table VI—Myelosuppression studies in ICR mice given free Aclarubicin and Aclarubicin-entrapped liposome (6.7 mg/kg as Aclarubicin i.p., Mean±S.D., n=4 or 5)

Compound	WBC (mm ⁻³)	Platelet (×10 ³ /mm ³)
Control	2771.4±623.74	635.33±114.85
Free ACL	1400.0±519.62	555.50±162.89
III	1733.3±305.51	611.83±93.05

WBC, White blood cell

혈액 백혈구 및 혈소판 측정 - ACL로서 7.5 mg/kg 복강 주사 후 혈구세포수를 측정한 결과를 Table VI에 나타내었는데 4일째 적혈구나 혈소판 수는 의미 있는 변화가 관찰되지 않은 반면에 백혈구 수는 대조군에 비해 free ACL 투여군과 리포솜 formulation III 투여군에서 감소하였는데 free ACL에서 더 큰 감소효과를 보였다.

이는 독소루비신 리포솜 제제에 대하여 보고한 Rahman 등¹³⁾등의 연구결과와 Cytosine Arabinoside의 리포솜제제에서 연구한 Rubas 등¹⁴⁾의 연구에서 나타난 바와 같이 free drug에 비해 리포솜 제제가 더 낮은 골수억제효과를 나타낸다는 보고와 일치한다. 일반적으로 리포솜을 혈액내 주사시 간이나 비장의 macrophages와 같은 RES(reticuloendothelial system)에 의해 리포솜을 포획하여 혈액순환계에서 쉽게 소실된다. 이 때 비장으로 이행된 리포솜으로부터 유리된 약물로 인한 독성은 비장 무게 감소나 비장 결손 등¹²⁾을 야기시키며 또한 백혈구 수를 감소시키는 현상을 수반한다. 따라서 간이나 비장으로 쉽게 이행되는 ACL의 독성을 감소시키기 위해서 ACL를 리포솜에 봉입시켜 약물의 지속적 방출을 유도하는 제제화가 바람직한 것으로 생각된다.

결 론

일반적으로 사용되고 있는 항암제인 Aclarubicin-HCl을 인지질(phospholipid)을 사용하여 동결건조를 이용한 건조 리포솜(dry liposome)화한 후 이를 정맥 투여 후 약물 동태 실험 및 독성 실험을 실시하였고, 항암력 실험 및 세포 독성을 검토하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Free ACL, formulation I, II, III 및 IV의 AUC_{0-8hr}은 각각 122±42, 382±140, 419±171, 835±206 및 443±309 μg·min/ml이었다.

2. L1210과 A 549에 대한 세포독성은 free ACL에 비해 2~4배정도 낮았다.

3. 약물을 복강 투여시 지질첨가제를 넣지 않은 formulation I(PC:CHOL:TA)이 다른 리포솜 현탁액들보다는 우수한 항암효과를 나타냈고, 용량이 2 mg/kg일 때 ACL에서 나타나는 체중감소의 독성 효과가 각 조성의 리포솜에서는 나타나지 않았다.

4. ACL 단독에 비해 리포솜 현탁액은 비교적 낮고 지연된 양상의 비장 독성을 보여 주었으며(formulation II>I>III>IV) 백혈구 감소(formulation III)도 적은 편으로 리포솜 현탁액은 부작용을 감소시킬 것으로 사료된다.

문 헌

- 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).
- Frokjaer, S., Hjorth, E. L. and Worts, O. : "Liposome Technology" Vol. 1, G. Gregoriadis, Ed., CRC Press Inc, Boca Raton, FL, 235 (1984).
- Yamamoto, Y., Niki, E., Eguchi, J., Kamiya, Y. and Shimasaki, H. : Oxidation of biological membranes and its inhibition, free radical chain oxidation of erythrocyte ghost membranes by oxygen, *Biochim. Biophys. Acta.* **819**, 29 (1985).
- Crowe, J. H. and Crowe, L. M. : Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms : The role of trehalose, *Science.* **223**, 701 (1984).
- Helmut, H. and Strauss, G. : Stabilization of small unilamellar phospholipid vesicles during spray-drying, *Biochim. Biophys. Acta.* **897**, 331 (1987).
- Ohasawa, T., Miura, H. and Harada, K. : A novel method for preparing liposomes with a high capacity to encapsulate proteinous drugs : Freeze-drying method, *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 2442 (1984).
- Tokunaga, Y., Iwasa, T., Fusisaki, J., Sawai, S. and Kagayma, A. : Liposomal sustained-release delivery systems for intravenous injection II. Design of liposome carriers and blood disposition of lipophilic mitomycin C prodrug-bearing liposome, *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 3557 (1988).
- Tokunaga, Y., Iwasa, T., Fusisaki, J., Sawai, S. and Kagayma, A. : Liposomal sustained-release delivery systems for intravenous injection III. Antitumor activity of lipophilic mitomycin C prodrug-bearing liposomes, *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 3565 (1988).
- Tokunaga, Y., Iwasa, T., Fusisaki, J., Sawai, S. and Kagayma, A. : Liposomal sustained-release delivery systems for intravenous injection IV. Antitumor activity of newly synthesized lipophilic 1- β -D-arabinofuranosyl-cytosine prodrug-bearing liposomes, *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 3574 (1988).
- Kurone, M., Sasaki, Y., Yokohama, H., Chiba, T. and Fujii, S. *Ono Pharm. Inc. japan patent open.* 53 (1978).
- Nagayasu, A., Shimooka, T., Kinouchi, Y., Uchiyama, K., Takeichi, Y. and Kiwada, H. : Effects of fluidity and vesicle size on antitumor activity and myelosuppressive activity of liposomes loaded with daunorubicin, *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 935 (1994).
- Storm, G., van Hoesel, Q. G. C. M., deGroot, G., Kop, W., Kruizinga, W., and Hillen, F. C. : In G. Storm(ed.), *Liposomes as delivery system for doxorubicin in cancer chemotherapy*, Optimax P. (Netherlands) pp. 185 (1987).
- Rahman, A., White, G., More, N. and Schein, P. S. : Pharmacological, toxicological and therapeutic evaluation in mice of doxorubicin entrapped in cardiolipin liposomes, *Cancer Res.* **45**, 796 (1985).
- Rubas, W., Supersaxo, A., Weder, H. G., Hartmann, H. R., Hengartner, H., Schott, H. and Schwendener, R. : Treatment of murine L1210 lymphoid leukemia and melanoma B16 with lipophilic cytosine arabinoside prodrugs incorporated into unilamellar liposomes, *Int. J. Cancer* **37**, 149 (1986).