

리포솜 봉입이 로다민 123의 소장 흡수에 미치는 영향

홍순선* · 이해리* · 이홍 · 정석재 · 김대덕 · 심창구*

서울대학교 약학대학 종합약학연구소

(Received March 4, 2005; Revised April 18, 2005)

Effect of Liposome Encapsulation on Intestinal Absorption of Rhodamine 123

Soon-Sun Hong*, Hae-Ree Lee*, Hong Li, Suk-Jae Chung, Dae-Duk Kim and Chang-Koo Shim*

Research Institute of Pharmaceutical Sciences and College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract — The absorption of a P-gp substrate, rhodamine 123, from a liposomal dosage form was investigated across Caco-2 cell monolayers, rat intestines and rat intestinal Peyer's patches in Ussing chamber. Rhodamine 123 was incorporated into liposomes according to the standard evaporation method, which led to a production of liposomes with a mean diameter of 71.3 nm. The permeability (P_{app}) of rhodamine 123 from a water solution across the monolayer was 2.45×10^{-6} cm/s for A→B (apical to basal) and 14.0×10^{-6} cm/s for B→A (basal to apical) directions, consistent with the fact that rhodamine 123 is one of the P-gp substrates. The transport of rhodamine 123 from the liposomal dosage form was much lower for both directions compared to the solution of rhodamine 123. The transport of rhodamine 123 across the rat intestine was also significantly decreased for both directions, i.e., influx and efflux, by the liposomal incorporation of the compound. The transport of rhodamine 123 across the Peyer's patch was substantially reduced by liposomal incorporation. No difference was found in the transport between the Peyer's patch and non-Peyer's patch. These observations suggest that the contribution of transport via Peyer's patches in the uptake of liposomes may be minimal, especially for rapidly absorbed compounds like rhodamine 123. Therefore, the increased absorption of P-gp substrates does not appear to be feasible by incorporating the compounds in liposomes, due to negligible involvement of Peyer's patches in the uptake of particulate dosage forms like liposomes. Liposomes may rather represent a sustained release dosage form of incorporated compounds.

Keywords □ liposome, rhodamine 123, P-gp, intestinal absorption, Caco-2, Peyer's patch

리포솜은 1972년 Bangham 등¹⁾에 의해 확인되었으며 생체막과의 유사성 때문에 생체막을 연구하는 사람들의 관심사가 되어 왔다. 리포솜은 내부 수상에 수용성 약물을, 인지질의 이중막 부분에 지용성 약물을 함유할 수 있으며, 생체유래 물질인 인지질을 사용하기 때문에 독성, 항원성 등이 문제되지 않으므로 약물의 운반체로도 주목받아 왔다.

리포솜에 약물을 봉입하여 경구로 투여하였을 때의 약효가 약물만을 경구 투여하였을 때보다 높다는 보고가 있다.^{2,3)} 그런데 이러한 예에서 대부분 그 증가분은 그다지 크지 않은 경우가 많았고 농도의존성도 보이지 않았다. 또한 대상 약물은 헤파린,²⁾ 인슐린³⁾ 등 고분자 약물, 즉 소장관 내에서의 불안정성이 문제

가 되는 경우가 많았다. 인슐린은 경구투여하면 거의 모두 분해되어 버리므로 만약 인슐린 등을 리포솜에 봉입한 후 경구 투여하였을 때 인슐린의 장관 흡수가 촉진된다면 리포솜 제형은 확실히 의미있는 것이 될 수 있다. 최근까지도 인슐린 리포솜의 장관 흡수에 관한 연구 결과가 보고되고 있다.⁴⁾ 그러나 인슐린 리포솜의 장관 투과에 대해 Patel,⁵⁾ Deshmukh 등⁶⁾은 부정적인 결과를 보고하였다. 또한 리포솜이 약물의 흡수를 촉진시킨다 해도 그 기전은 아직 불분명하다. 리포솜이 그 자체로 장관에서 흡수되는가에 대해서도 아직 단정적으로 말하기는 어려우나 경구 백신 수송의 도구로 리포솜이 연구되고 있다.⁷⁾

고형 입자의 흡수는 주로 입자의 크기에 의해 좌우되고 작은 입자일수록 흡수가 잘 되는 것으로 알려져 있다. 또 입자크기는 흡수된 뒤 입자의 체내 분포에도 영향을 미쳐 3000 nm 이상의 입자는 위, 소장, 대장에 존재하는 Peyer's patch나 장관막 림프관에서만 입자의 존재가 확인되고, 1000 nm 이하가 되면 간장과

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-880-7873 (팩스) 02-888-5969
(E-mail) shimck@snu.ac.kr

비장 중에서도 입자의 분포가 관찰되며, 300 nm 이하가 되면 혈액 중에도 관찰된다. 또한 50 nm 이하의 입자는 Peyer's patch 뿐 아니라 소장 상피세포 층으로 흡수된다.⁸⁻¹⁰⁾

장관 흡수 실험계로는 동물을 이용한 *in situ* 환류실험, 장관을 적출하여 튜브를 만들거나 잘라서 incubation하는 방법과, diffusion chamber를 이용하는 방법들이 있다. 이러한 방법들은 대부분 실험 동물을 사용하고 있으므로 그 결과가 사람의 것과는 차이가 있을 수 있다. Caco-2 cell line은 1970년대에 사람의 대장암 조직에서 분리되었으며 1989년 Hidalgo 등¹¹⁾에 의해 특성이 규명된 이래 흡수 실험계로 널리 쓰이고 있다. Artursson 등¹²⁾은 여러 약물들의 Caco-2 투과계수와 사람에게 있어서의 생체 내 이용률 사이에 상관관계가 있음을 보고하였다. Caco-2는 사람조직에서 유래되었다는 장점이 있으며, 많은 연구결과가 보고되어 있는 우수한 실험계이다.

P-glycoprotein은 암세포, 혈관-뇌장벽(blood brain barrier, BBB) 등에 과발현 되어있는 분자량 170 kDa의 efflux pump로서 verapamil, daunomycin, cyclosporin, rhodamine 123 등과 같이 구조나 성질에 있어서 유사성이 없는 많은 약물을 기질로 인식하여 수송하므로 그 기원 유전자를 multi drug resistant (MDR) gene이라 부른다.¹³⁾ 항암제를 적용하면 P-gp의 efflux 기능 때문에 항암제가 암세포내로 잘 이행하지 않으나 다른 P-gp 기질이나 P-gp modulator인 PSC 833 등을 함께 투여하면 암세포내로의 이행이 높아진다.¹⁴⁾ P-gp는 암세포 뿐만 아니라 간, 신장, 소장 등 일반 장기에도 발현되어 있으며 신장, 소장 등에서는 apical membrane에 발현되고 있다. 물론 Caco-2에도 발현됨이 알려져 있다.¹⁵⁾

미토콘드리아를 염색하는 물질로 알려진 형광물질 로다민 123은 암세포에 선택적으로 유입되는 것으로 알려져¹⁶⁾ 항암제로 쓰일 수 있는 가능성이 탐색되고 있으며, 또한 P-gp의 기질이기도 하다. 따라서 이 약물은 특정 세포주의 P-gp 발현정도를 검사하거나,¹⁷⁾ 신물질의 P-gp 저해제로서의 가능성을 평가하는 도구로 쓰일 수 있다.^{18,19)} 따라서 본 연구에서는 로다민 123을 모델약물로 하여 리포솜 봉입이 약물의 장관흡수에 미치는 영향을 알아보았다.

실험 방법

시약 및 기기

Extrusion device는 Avestin Inc.(Ottawa ON., Canada) 제품을 사용하였고, dialysis membrane Spectra/Por는 Spectrum Medical industries(California LA, USA) 제품을, NicompTM 370 submicron particle sizer는 Particle Sizing Systems Inc.(Santa Barbara CA, USA), voltohmmeter는 World Precision Instruments Inc.(Sarasota, USA) 제품을, transwell은

Corning(NY, USA)사, Ussing chamber는 Navicyte Inc.(Nevada, USA) 제품을 사용하였다. ¹⁴C-mannitol(specific activity 50 mCi/mmol)과 ³H-taurocholate(specific activity 3.47 Ci/mmol)는 New England Nuclear(Boston MA, USA)사에서, Fetal bovine serum(FBS)는 Hyclone(Logan UT, USA)사에서 구입하였으며 기타 시약들은 Sigma(St. Louis MO, USA)사에서 구입하여 사용하였다.

리포솜의 제조와 평가

로다민 123 함유 리포솜의 제조 - 50 ml 둥근 바닥 플라스크에 로다민 123 50 mg과 인지질 5 mg(egg phosphatidyl choline : cholesterol=3 : 1)을 녹인 메탄올 3 ml를 넣고 회전 감압 농축기에서 감압 하에 2시간 이상 메탄올을 날려 약물과 인지질의 박막을 만들었다. 그 다음 둥근 바닥 플라스크를 고정된 후 질소가스로 남아있는 유기용매를 가능한 한 제거하였다. 여기에 Hanks' balanced salt solution(HBSS; CaCl 21.26 mM, MgSO₄ 0.81 mM, KCl 5.37 mM, KH₂PO₄ 0.44 mM, NaCl 136 mM, Na₂HPO₄ 0.34 mM, NaHCO₃ 4.17 mM, D-glucose 15 mM, HEPES 10 mM) 2 ml를 가하고 박막이 보이지 않을 때까지 손으로 흔들어 주었다. 이것을 extrusion device를 이용해 두 장의 polycarbonate membrane(pore size 100 nm)에 3~5번 통과시켜서 크기를 고르게 하였다. 이렇게 만들어진 리포솜액에서 봉입되지 않은 약물을 제거하기 위해 24시간 동안 투석하였다. 5.5×2 cm 크기의 dialysis tubing(MWCO 3500)안에 제조한 리포솜액 1.5 ml를 넣고 이 tubing을 HBSS 1가 든 비이커에 담고 상온에서 외상의 농도가 평형에 이를 때까지 교반하며 방치했다. 경시적으로 외상에서 0.5 ml씩 sampling 하여 외상의 로다민 123 농도를 측정하였다. 제조한 리포솜액은 실험에 쓸 때까지 4°C 냉장고에 보관하였다.

리포솜의 크기 및 봉입률 측정 - 리포솜의 크기는 NicompTM 370 submicron particle sizer를 이용하여 측정하였다. 리포솜액을 주사용수로 희석하여 용액의 강도(intensity)를 200~300으로 맞춘 후 세포 안에 넣어 크기를 측정하였다. 리포솜의 봉입효율은 투석과 초원심분리의 두가지 방법으로 측정하였다. 투석법의 경우 봉입되지 않은 약물을 제거하기 위해 투석하였을 때 외상의 농도가 평형에 도달한 시점에서 투석을 멈추고 내상의 리포솜액을 50 ml 취하여 적당히 희석한 후 리포솜을 깨기 위해 Triton X-100 2% 용액을 가하였다. 외상에서도 0.5 ml 취하여 적당히 희석한 후 외상과 내상의 로다민 123의 농도를 형광분광광도계로 정량하였다($\lambda_{ex}/\lambda_{em}=485/530$). 초원심분리의 경우 리포솜 원액을 HBSS로 10배 희석한 후 200,000 g(70,000 rpm), 4°C에서 2.5시간 동안 원심분리 하였다. 상정액 중의 로다민 123의 농도와 원심분리기 전의 리포솜액의 로다민 123의 농도를 모두 spectrofluorometer로 정량하였다($\lambda_{ex}/\lambda_{em}=485/530$). 봉입률은 다

음 식에 따라 구하였다.

투석법의 경우

$$\text{봉입률} = \frac{\text{내상농도} \times \text{내상부피}}{\text{내상농도} \times \text{내상부피} + \text{외상농도} \times \text{외상부피}} \times 100$$

초원심분리의 경우

$$\text{봉입률} = \left(1 - \frac{\text{상징액중약물량}}{\text{총약물량}}\right) \times 100$$

단층 배양된 Caco-2 세포를 이용한 로다민 123의 수송실험

세포배양 - Caco-2 세포는 37°C, 5% CO₂, 95% 습도의 CO₂ incubator 에서 배양하였다. 배지는 5% fetal bovine serum, 1% non-essential amino acid, 100 unit/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin을 포함하는 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)을 사용하였으며 2일에 한번 배지를 교체해주었다. 3일 마다 계대 배양하였다. 수송 실험을 하기 위해 collagen coating 한 polycarbonate membrane 위에 세포를 심고 18~28일 사이에 실험에 사용하였으며 TEER value 300 Ω×cm² 이상인 것만을 사용하였다. 수송 실험에 사용한 세포의 계대 수는 40~48이었다.

단층 배양된 Caco-2 세포의 기능 확인 - EVOM voltohmmeter 를 이용하여 Caco-2 세포 단층의 TEER를 측정하였으며 TEER 값이 300 Ω×cm² 이상인 것만을 수송 실험에 사용하였다. 또한 mannitol 누출을 확인하기 위해 ¹⁴C-mannitol 용액으로 수송 실험을 실시하였으며 Caco-2 cell에 수송계가 잘 발현되어 있는지를 확인하기 위하여 ³H-taurocholate로 수송 실험을 실시하였다. 투과 실험용 배지는 HBSS용액을 사용하였다. Caco-2 세포 단층을 투과실험용 배지로 세 번 씻어준 후 ¹⁴C-mannitol(specific activity 50 mCi/mmol), ³H-taurocholate(specific activity 3.47 Ci/mmol)을 transwell의 apical side에 0.5 ml 가하고 basal side에는 투과실험용 배지를 1.5 ml 가하였다. 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105분에 transwell을 1.5 ml의 새 배지가 들어있는 well로 옮긴 후 basal side에서 0.5 ml씩 취하였다. 시료 0.5 ml에 cocktail 2 ml을 가하여 liquid scintillation counter로 방사활성을 측정함으로써 수송된 약물의 양을 정량하였다.

로다민 123의 수송 실험 - Caco-2 세포 단층을 투과 실험용 배지로 세 번 씻어준 후 로다민 123 용액 또는 로다민 123 리포솜액으로 Apical-Basal(A-B)방향과 Basal-Apical(B-A)방향으로 수송 실험을 하였다. A-B 방향의 수송 실험은 로다민 123, 로다민 123의 리포솜액을 transwell의 apical side에 0.5 ml 가하고 basal side에는 투과 실험용 배지를 1.5 ml 가하였다. 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105분에 transwell을 1.5 ml의 새 배지가 들어있는 well로 옮긴 후 basal측에서 0.5 ml씩 취하였다. B-A 방향의 수송 실험은 위와 마찬가지로 진행되되 로다민 123, 로다민 123의 리포

솜액을 transwell의 basal측에 각각의 시점에 apical측에서 0.4 ml를 취하고 같은 양의 배지를 보충하여 주었다. P-gp의 기질인 verapamil(200 mM)에 의한 영향도 관찰하였다. 로다민 123의 농도를 spectrofluorometer로 정량하였으며 (λ_{ex}/λ_{em}=485/530) 겔 보기 투과계수 P_{app}는 다음의 식에 의하여 구하였다.

$$P_{app}(\text{cm/s}) = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{A \times C_0}$$

dQ/dt - 시간당 이행량(ng/s)

A - 면적(cm²)

C₀ - 초기 농도(mg/ml)

Ussing chamber를 이용한 로다민 123의 transport

24시간 절식시킨 SD male rat(8~14주, 300~400 g)을 에테르 마취시켜 수술판에 고정하고 개복하여 소장을 적출하였다. 적출한 장을 ice cold saline으로 두 번 씻은 후 장 상부 12 cm는 절단하여 버리고 나머지 부분에서 Peyer's patch를 포함하는 부분과 포함하지 않는 부분을 골라 적당한 길이로 자르고 중앙선을 따라 잘라 펴서 Ussing chamber에 mount하였다. Ussing chamber의 양측에 Krebs-bicarbonate buffer(K-B buffer; MgCl₂ 1.1 mM, CaCl₂ 1.25 mM, NaCl 114 mM, KCl 5 mM, NaHCO₃ 25 mM, Na₂HPO₄ 1.65 mM, NaH₂PO₄ 0.3 mM, apical side; D-glucose 40 mM, basal side; mannitol 40 mM) 1 ml씩을 가하고 30분간 37°C에서 carbogen gas(95% CO₂, 5% O₂)로 포화시켜 안정화시킨 후 buffer를 제거하고, basal side에는 K-B buffer (glucose 40 mM)를 2 ml 가하고 mucosal side에는 K-B buffer (mannitol 40 mM)에 녹인 약액 2 ml 또는 K-B buffer(mannitol 40 mM)에 현탁시킨 리포솜액(로다민 123의 농도는 리포솜과 solution 모두 0.920 mM)을 2 ml 가하고 37°C에서 carbogen gas를 140회/min의 속도로 bubbling 해주었다. 30, 60, 90, 150분에 basal side에서 1.5 ml를 취하고 그만큼 새 K-B buffer를 보충해 주었다. 시료 1.5 ml에 2% Triton X-100을 0.15 ml 가하고 vortex하여 spectrofluorometer로 정량하였다(λ_{ex}/λ_{em}=485/530).

결과 및 고찰

리포솜 제조 및 확인

투석(dialysis)시 외상의 로다민 123 농도는 증가하다가 8 시간 이후로는 평형에 도달하였다(Fig. 1). 이때 내상의 농도(1.82 ± 0.41 mg/ml)는 외상의 농도(37.90 ± 3.29 ng/ml)의 48배로 월등히 높아서 tubing 안의 free 로다민 123의 농도는 리포솜에 봉입된 로다민 123에 비해 매우 낮았으므로 tubing 안의 리포솜은 free drug과 완전히 분리되었다고 보고 봉입률을 계산하였다 봉입률은 7.57 ± 5.38% 였다. 한편 초원심분리로부터 구한 봉입률

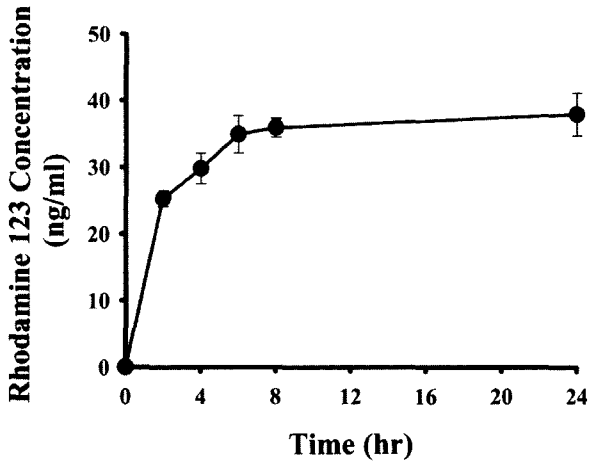


Fig. 1 - Preparation and dialysis of liposome containing rhodamine 123. Rhodamine 123 and lipid dissolved in methanol were evaporated to thin film and the thin film was hydrated to liposome solution and sized by passing through polycarbonate membranes. Liposome solution was dialyzed to remove unencapsulated drug to 24 hr (mean±SD, n=3).

은 $7.85 \pm 0.27\%$ 로 방법은 달라도 같은 봉입률이 얻어졌다. 제조 직후 리포솜의 평균 직경은 71.3 nm였다(number Gaussian analysis). 제조 후 시간이 지날수록 크기는 천천히 증가하여 30 일째는 평균 직경이 148 nm에 이르렀다. 이로부터 제조된 리포솜은 시간이 지날수록 서로 융합하여 크기가 커지는 것으로 추정된다. 이런 현상은 사용한 지질이 모두 중성일 때 관찰된다. 리포솜 제조시에 stearylamine, phosphatidylserin 등을 부가하여 전하를 부여하면 이런 현상을 막을 수 있을 것이다.

Caco-2 단층 세포 기능 확인

Caco-2 단층 세포의 TEER 값은 세포를 심은 후 1주일 간 증가하다가 그 이후로는 일정한 값을 유지하였으며 그 값은 $522.8 \pm 177.0 \Omega \times \text{cm}^2$ 이었다. 18일째의 Caco-2 단층 세포의 mannitol 수송은 $1.19 \pm 0.02\%/\text{hr}/\text{cm}^2$ 로서 세포가 없는 filter에서의 값 $39.31 \pm 3.06\%/\text{hr}/\text{cm}^2$ 에 비해 현저히 낮았다(Fig. 2A). 또한 이 값은 문헌치²⁰⁾와 비교해 보았을 때 유사한 값이었다. TEER 값과 ¹⁴C-mannitol 수송에서 단층 세포의 tight junction이 유지됨을 확인하였다. Caco-2 monolayer의 기능성을 평가하기 위해 taurocholate 수송 실험을 수행하였을 때 taurocholate 수송은 A→B 투과가 B→A 투과보다 훨씬 높아서($P_{\text{app, A} \rightarrow \text{B}}$, $7.08 \pm 0.14 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$; $P_{\text{app, B} \rightarrow \text{A}}$, $9.91 \pm 0.27 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$), Caco-2 단층세포에 담즙산 수송계가 발현됨을 시사하였다(Fig. 2B).

Caco-2 단층 세포에서 로다민 123의 수송

로다민 123의 P_{app} 값은 $P_{\text{app, A} \rightarrow \text{B}}$ 가 $2.4 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ 이고 $P_{\text{app, B} \rightarrow \text{A}}$ 가 $14.0 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ 로 양방향으로 모두 투과가 잘되는 편이었

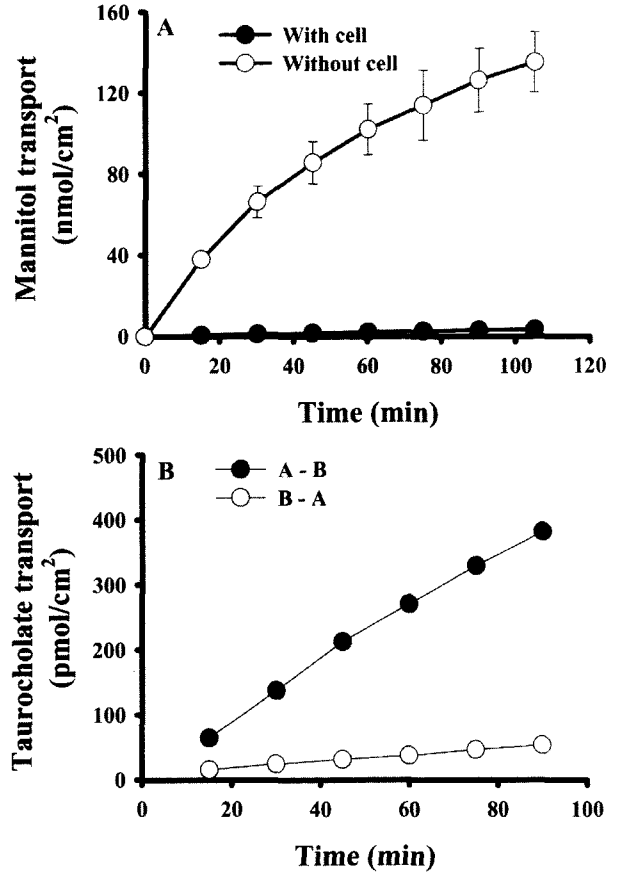


Fig. 2 - Characterization of Caco-2 cell monolayers. A) Mannitol leakage of Caco-2 cell monolayer. Mannitol (0.35 mM) was added to apical side of transwell and transport media was added to basal side. The Transwell was transferred at pre-determined time to new well containing fresh media and 0.5 ml samples were taken from basal side (means±SD, n=3). B) Taurocholate transport across Caco-2 cell monolayer. A→B : taurocholate (10 μM) in transport media was added to apical side of transwell and the transwell was transferred to new well containing fresh media at pre-determined times and 0.5ml samples were taken from basal side. B→A : taurocholate (10 μM) was added to basal side of Transwell. Samples were taken from apical side at pre-determined times and apical side was supplemented with fresh transport media (means±SD, n=3).

다. Artursson 등¹²⁾은 거의 완전하게 흡수되는 약물은 $P_{\text{app}} > 1 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ 이며, 흡수가 잘 안되는 약물은 $P_{\text{app}} < 1 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ 라고 보고하였으며, 이에 따르면 로다민 123는 P_{app} 값을 보았을 때 생체내 이용률이 거의 100%에 가까울 것으로 예상된다. 또한 $P_{\text{app, B} \rightarrow \text{A}}$ 가 $P_{\text{app, A} \rightarrow \text{B}}$ 보다 높았고(Fig. 3), P-gp 저해제인 verapamil 200 μM을 1시간 동안 전 처리하였을 때 이행량이 A→B는 증가, B→A는 감소하였다(Fig. 4). 이는 로다민 123가 P-gp의 기질이라는 보고¹²⁾와 일치하였다.

로다민 123를 리포솜에 봉입하였을 때 Caco-2 투과성은

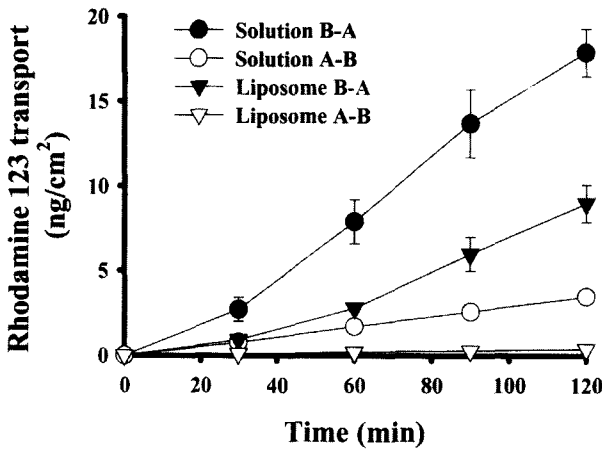


Fig. 3 - Transport of rhodamine 123 across Caco-2 cells. A→B : liposome or solution of rhodamine 123 (0.526 μM) was added to apical side of transwell and transport media was added to basal side. The transwell was transferred at pre-determined time to new well containing fresh media and 0.5 ml samples were taken from basal side. B→A: liposome or solution of rhodamine 123 (0.526 mM) was added to basal side of transwell and transport media was added to apical side. Samples were taken from apical side at pre-determined times and apical side was supplemented with fresh transport media (means±SD, n=3).

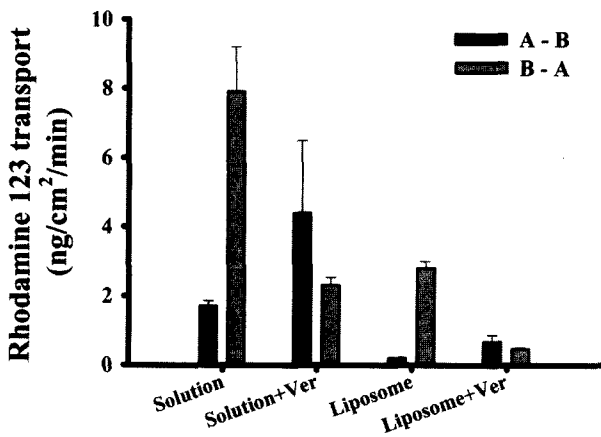


Fig. 4 - Effect of verapamil preincubation on the transport of rhodamine 123. Cells were preincubated with verapamil 200 μM in transport media and liposome or solution of rhodamine 123 (0.526 μM) was placed at the apical or basal side of transwell and transported amount of rhodamine 123 for 1 hr was counted (means±SD, n=3).

solution 에서보다 A→B, B→A 양 방향 모두 현저히 낮아졌다 (Fig. 3). 또한 verapamil을 전 처리하였을 때 로다민 123의 A→B 투과는 증가, B→A 투과는 감소하는 P-gp 저해효과도 solution 과 리포솜 투과시에 모두 관찰되었다(Fig. 4). 즉 리포솜에 봉입된 로다민 123는 리포솜에서 서서히 방출된 후 free drug 상태로 투과되기 때문에 투과 속도가 감소한 것으로 생각된다. 흡수 상피세포에서 endocytosis 등 제 3의 경로를 통한 흡수는 없거

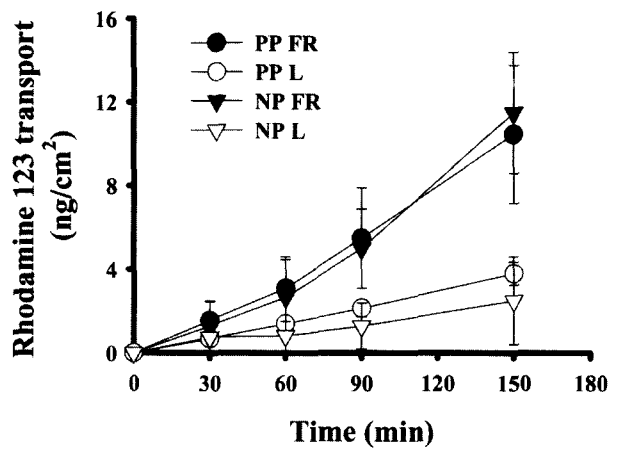


Fig. 5 - Transport of rhodamine 123 across rat intestine. Rat intestines were mounted to Ussing chamber and rhodamine 123 in Krebs bicarbonate buffer or rhodamine 123 liposome suspended in Krebs-bicarbonate buffer (rhodamine 123; 0.920 μM) was placed in mucosal side and samples were taken from basal side at predetermined time and basal side was supplemented with fresh Krebs-bicarbonate buffer (PP, Peyer's patch; NP, non Peyer's patch; L, liposome; FR, solution; n=5, means±S E).

나, 있더라도 그 기여는 매우 적을 것으로 생각된다. 이로부터 투과성이 좋은 약물을 리포솜에 봉입하면, 리포솜으로부터 봉입된 약물이 방출되어 나오는데 걸리는 시간만큼, Caco-2 단층 세포를 투과하는 시간이 지연됨을 알 수 있었다. 이는 리포솜을 흡수성이 좋은 약물의 지속성 경구투여제형으로 응용할 수 있음을 시사한다.

Peyer's patch와 non Peyer's patch를 통한 로다민 123의 투과

소장관의 Peyer's patch는 큰 입자를 유입하는 성질이 있음이 알려져 있으므로 Peyer's patch에서 리포솜의 흡수가 흡수상피에서보다 높은지 검토하고자 하였다. Peyer's patch에서 liposomal 로다민 123 투과는 흡수상피에서와 유의성있는 차이를 보이지 않았다(Fig. 5).

결론

Caco-2 투과의 P_{app} 값으로 부터 흡수가 잘 되리라고 예측되는 약물인 로다민 123를 리포솜에 봉입하였을 때 로다민 123의 1) Caco-2 세포, 2) 쥐 소장의 흡수상피, 3) 쥐 소장의 Peyer's patch 투과는 모두 solution 에 비하여 감소하였으며 liposomal 로다민 123의 쥐 소장과 쥐 소장의 Peyer's patch 투과는 크게 다르지 않았다. 또한 verapamil처리에 의한 P-gp 저해현상이 리포솜과 solution 양 쪽 모두에서 관찰되었다. 리포솜에 봉입된 약물이 소장관에서 흡수되려면 1) 리포솜으로부터 방출된 후 흡수

되거나 2) 리포솜이 그대로 장관 상피세포 등에 유입된 후 리포솜 자체가 serosal side 로 이동하거나, 약물이 cell 안에서 리포솜으로부터 방출된 후 흡수되어야 한다.

위의 실험결과로 미루어 볼 때 로다민 123는 대부분 리포솜으로부터 방출된 후 free drug 상태로 흡수되었으며 리포솜의 endocytosis가 있었다하더라도 약물의 흡수에 많이 기여하지 못한 것으로 보인다. 또 입자들을 유입한다고 알려진 Peyer's patch 부분에서도 리포솜의 흡수는 그다지 많이 일어나지 않는 것으로 보인다. 그러나 Tanguay 등²¹⁾은 형광 수식하여 경구투여한 리포솜이 폐, 신, 혈액 중에서 발견되는 것을 보고하였고, Caco-2 cell 이 endocytosis 능력을 갖는 것도 이미 알려져 있는 등,¹¹⁾ 위의 실험결과만으로도 리포솜의 유입을 부정하는 것은 어렵다고 생각된다. 게다가 로다민 123은 흡수가 매우 잘되는 약물이기 때문에 로다민 123 리포솜이 유입되었을 때 그 정도가 적다면 방출된 free drug의 흡수와 비교하여 이것을 평가하는 것은 어렵다. 수단 IV, mannitol 등 투과가 거의 전혀 안 되는 약물을 리포솜에 봉입하여 Caco-2 세포나 소장관에서의 흡수나 투과를 본다면 좀 더 확실한 결론을 얻을 수 있을 것으로 생각된다. 또한 위의 실험 결과에서 로다민 123 처럼 소장 상피세포 투과성이 높은 물질을 리포솜에 봉입하면, 그 물질의 위장관 흡수를 지속시킬 수 있다는 사실을 알았다. 이는 리포솜에 봉입된 약물이 유리되어 나와 free drug 상태로 흡수되며, 약물이 봉입된 리포솜은 그 상태로는 거의 소장관 상피세포를 투과하지 못하기 때문으로 생각된다.

감사의 말씀

이 연구는 식품의약품 안전청의 연구비 지원에 의한 것으로 이에 감사드린다.

참고문헌

- Bangham, A. D. : Lipid bilayers and biomembranes . *Annu. Rev. Biochem.* **41**, 753 (1972).
- Ueno, M., Nakasaki, T. and Hirikoshi, I. : Oral administration of liposomally-entrapped heparin to beagle dogs . *Chem. Pharm. Bull.* **30**, 2245 (1982).
- Dapergolas, G. and Gregoriadis, G. : Hypoglycemic effect of liposome-entrapped insulin administered intragastrically into rats. *Lancet* **2**, 824 (1976).
- Muramatsu, K., Maitani, Y. and Nagai, T. : Dipalmitoyl-phosphatidylcholine liposomes with soybean-derived sterols and cholesterol as a carrier for the oral administration of insulin in rats. *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 1055 (1996).
- Patel, H. M., Stevenson, R. W., Parson, J. A. and Ryman, B. E. : Use of liposomes to aid intestinal absorption of entrapped insulin in normal and diabetic dogs. *Biochim. Biophys. Acta* **716**, 188 (1982).
- Deshmukh, D. S., Bear, W. D. and Brockerhoff, H. : Can intact liposomes be absorbed in the gut? *Life Science* **28**, 239 (1981).
- Chandrasekhar, U., Shinba, S., Bhagar, H. R., Shinba, V. B. and Srivastava, B. S. : Comparative efficacy of biodegradable liposomes and microspheres as carriers for delivery of Vibrio cholerae antigens in the intestine. *Vaccine* **12**, 1384 (1994).
- Jani, P. U., Halbert, G. W., Langridge, J. M. and Florence, A. T. : Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa; Quantitation and particle size dependency. *J. Pharm. Pharmacol.* **42**, 821 (1990).
- Jani, P. U., McCarty, D. E. and Florence, A. T. : Nanosphere and microsphere uptake via Peyer's patches; observation of the rate of uptake in the rat after a single oral dose . *Int. J. Pharm.* **86**, 239 (1992).
- Jenkins, P. G., Howard, K. A., Blackhall, N. W., Thomas, N. W., Davis, S. S. and O'Hagan, D. T. : Microparticulate absorption from the intestine. *J. Control. Rel.* **29**, 339 (1994).
- Hidalgo, I. J., Raub, T. J. and Borchardt, R. T. : Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* **96**, 736 (1989).
- Artursson, P. and Karlsson, J. : Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells . *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **175**, 880 (1991).
- Lee, C. H., Bradley, G., Zhang J. T. and Ling, V. : Differential expression of P-glycoprotein genes in primary rat hepatocyte culture. *J. Cell. Physiol.* **157**, 392 (1993).
- Quesada, A. R., Barbacid, M. M., Mira, E., Aracil, G. and Marquez, G. : Chemosensitization and drug accumulation assays as complementary methods for the screening of multidrug resistance reversal agents . *Cancer Letters* **99**, 109 (1996).
- Hunter, J., Hirst, B. H. and Simmons, N. L. : Drug absorption limited by P-glycoprotein mediated secretory drug transport in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers . *Pharm. Res.* **10**, 743 (1993).
- Bernal, S. D., Lampidis, T. J., Summerhayes, I. C. and Chen, L. B. : Rhodamine 123 selectively reduces clonal growth of carcinoma cells *in vitro*. *Science* **218**, 1117 (1982).
- Fontaine, M., Elmquist, W. L. and Miller, D. W. : Use of rhodamine 123 to examine the functional activity of P-glycoprotein in primary cultured brain microvessel endothelial cell monolayers. *Life Science* **59**, 1521 (1996).
- Lee, J. S., Paull, K., Alvarez, M., Hose, C., Monks, A., Grever, M., Fojo, A. T. and Bates, S. E. : Rhodamine 123 efflux patterns

- predicts P-glycoprotein substrates in the national cancer institute drug screen. *Mol. Pharmacol.* **46**, 627 (1994).
- 19) de Lange, E. C. M., de Bock, G., Schinkel, A. H., de Boer, A. G. and Breimer, D. W. : BBB transport and P-glycoprotein functionality using MDR1A(-/-) and wild type mice. Total brain versus microdialysis concentration profiles of Rhodamine-123. *Pharm. Res.* **15**, 1657 (1998).
- 20) Cogburn, J. N., Donovan, M. G. and Schasteen, C. S. : A model of human small intestinal absorptive cells 1 transport barrier. *Pharm. Res.* **8**, 210 (1991).
- 21) Tanguay, S., Bucana, C. D., Wilson, M. R., Fidler, I. J., von Eschenbach, A. C. and Killian, J. J. : *In vivo* modulation of macrophage tumoricidal activity by oral administration of the liposome-encapsulated macrophage activator CGP 19835A. *Cancer Res.* **54**, 5882 (1994).