

Subacute Toxicities of All-trans-Retinoic Acid Encapsulated in the Poly(D,L-Lactide) Microspheres

최용두, 박경순¹, 김상윤², 김선희³, 변영로¹

광주과학기술원 신소재공학과¹, 울산의과대학 이비인후과², 성균관의과대학 임상병리과³

Abstract

All-*trans*-retinoic acid (RA) plays essential roles in the regulation of differentiation and proliferation. It has been proved that RA is effective in the treatments of epithelial and hematologic malignancies. However, in spite of its pronounced effects, the clinical applications of RA are limited due to the retinoid acute resistance. Although RA induces complete remission in a high proportion of the patients of acute promyelocytic leukemia (APL), the cancer was relapsed in many patients after a brief remission in spite of a continued RA treatment. Patients who relapsed from remission that was initially induced by RA had clinically resistant to further RA treatment. That is, specific cytochrome P450 enzymes in the liver were induced by the continuous oral administration of RA, thereby accelerating the metabolism of RA. To overcome this problem, biodegradable microspheres were proposed by us, previously. And, several microsphere formulations for RA delivery have been prepared and studied on their effectiveness. Recently, poly(D,L-lactide) (PDLLA) microsphere formulation was optimized, And, from the animal studies by using a mouse and a rat, it have appeared to be effective on both the inhibition of tumor growth and chemoprevention of a carcinogenesis.

In this study, subacute toxicities of the PDLLA microsphere formulation have been investigated as a preclinical test. For the test, the microspheres was injected subcutaneously into the back site of rats, and body weight change, clinical signs, hematological changes, blood biochemistry were evaluated. As a result, severe toxicities such as mortality were observed at the dose of 100mg RA/kg, and toxicities were not observed at the dose of 50 mg RA/kg, which is the effective dose against carcinogenesis. Bone fracture, observed at several rats, might be inhibited by treating them with anti-inflammatory drugs.

1. 서론

레티노익 산은 세포의 증식과 분화를 조절할 수 있는 중요한 기능이 있으며¹⁾, 혈액암 및 상피세포 암들에 대한 치료 및 예방에 효과가 있는 것으로 밝혀져 왔다^{2) 5)}. 특히, 레티노익 산은 백혈병의 초기 치료효과가 뛰어난 것으로 알려져 있다. 하지만, 이러한 밝혀진 효능들에도 불구하고, 레티노익산의 경구 투여시 나타나는 retinoid acute resistance 때문에 임상 적용에 한계를 가지고 있다. 레티노익 산은 백혈병 환자에 대한 높은 초기 치료율을 보이지만, 많은

환자들이 레티노익 산을 계속해서 투여함에도 불구하고 4-5개월 내에 암이 다시 재발하는 것이 관찰되었다⁵⁾. 이것은, 레티노익 산을 반복해서 경구 투여 시, 간에서의 특정 P450 효소들이 유발되고, 이 효소들에 의한 가속적인 대사 작용으로 인해 혈중 농도가 효과적으로 유지되지 못하기 때문인 것으로 밝혀졌다⁶⁾. 따라서, 본 연구 그룹에서는 경구 투여시 생기는 이러한 문제점들을 극복하기 위하여 레티노익 산을 미립구에 봉입시킨 서방형 약물 방출 제재를 개발하여, 제조된 미립구를 피하 경로로 투여함으로써 레티노익 산이 갖고있는 근본적인 문제점을 효과적으로 해결하고자 하였다⁷⁾. 여러 가지 미립구 제재를 제조하고 이에 대한 효과를 *in vitro* 및 *in vivo* 동물실험을 통하여 확인하면서 조건을 최적화 시켜왔으며, 최근에는 poly(D,L-lactide)와 poly(ethylene glycol)-poly(L-lactide) 이중블럭 공중합체를 이용한 레티노익 산의 미립구 제재를 제조하였다. 이 미립구 제재에 대한 *in vitro* 약물 방출 실험으로부터는 한달 동안 약물이 지속적으로 방출되는 것을 확인하였으며, 랫을 이용한 동물 실험으로부터는 생체 적합성이 있음을 확인하였다. 특히, athymic nude 마우스 및 F344 랫을 이용한 동물 실험으로부터는 제조된 미립구 제재가 두경부암 성장 억제와 예방에 뛰어난 효과를 보이는 것을 확인하였다.

본 연구에서는, 제조된 poly(D,L-lactide) 미립구 제재에 대한 전임상 시험으로서 미립구내에 봉입된 레티노익 산에 대한 아급성 독성 시험을 행하고, 각각의 투여 용량에 따른 독성 효과를 관찰하여 임상 실험에 적용하기 위한 자료를 수집하였다.

2. 재료 및 방법

시험 물질은 레티노익산이 10%, poly(ethylene glycol)-poly(L-lactide)가 8% 함유되어 있는 poly(D,L-lactide) 미립구를 사용하였으며, 미립구의 크기는 20~100 μm 로 조절되었다. 시험을 위하여 총 80 마리의 SD rat(6주령)이 사용되었다. 미립구는 25 kGy의 선량으로 감마선 조사하여 살균한 후, 주사용 식염수에 분산시켜 rat 등쪽 피하에 투여하였다. 미립구의 투여량은, 레티노익산을 기준으로 해서 25, 50, 및 100mg/kg를 투여하였으며, 컨트롤 그룹에는 레티노익산이 함유되지 않은 미립구를 최고 투여량에 해당하는 양만큼 투여하였다.

Table 1. 시험군의 구성, 투여농도 및 용량

시험은 미립구 투여 일로부터 4주 동안 행하였으며, 주기적으로 체중변화, 사료 및 물의 섭취량, 임상 증상등을 관찰하였다. 4주 후, 생존한 개체에 대하여 X-ray사진 촬영을 통해 뼈 골절을 관찰하고, 혈액을 채취하여 혈액학적 및 혈액 생화학적 분석을 행하였다. 혈액학적 검사를 위해서는 백혈구, 적혈구, hemoglobin, hematocrit, platelet, neutrophil, lymphocyte, monocyte, eosinophil, basophil, reticulocyte count, aPTT, PT를 측정하였으며, 혈액 화학적 검사를 위해서는 total protein, albumin, total bilirubin, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, blood urea nitrogen, creatinine, glucose, cholesterol,

triglyceride, Na, K, Cl를 측정하였다. 또한, 부검시 장기 이상을 유관으로 관찰하였다.

군	성별	동물수	동물번호	투여액량 (ml/kg)	투여량, mg/kg	
					미립구	레티노익산
control	Male	10	1~10	2.5	1184.8	0
T1	Male	10	11~20	2.5	296.2	25
T2	Male	10	21~30	2.5	592.4	50
T3	Male	10	31~40	2.5	1184.8	100
control	Female	10	1~10	2.5	1184.8	0
T1	Female	10	11~20	2.5	296.2	25
T2	Female	10	21~30	2.5	592.4	50
T3	Female	10	31~40	2.5	1184.8	100

3. 결과 및 고찰

사망동물은 수컷 T3 투여군 에서만 4례가 관찰되었고, 암컷은 모두 생존하였다. 본 시험에서 관찰된 주요한 일반증상은 쇠약, 마비성 보행, 투여부위의 고형화, 적색유루, 비출혈, 호흡곤란, 부정교합, 혈변, 입모, 탈모였다. 수컷에서 쇠약은 T3군에서 8례가 관찰되었다. 마비성보행은 T2군에서 2례가, T3군에서는 모든 개체에서 관찰되었다. 투여부위의 고형화는 T1군에서는 7례가, T2군에서는 8례가, T3군에서는 5례가 관찰되었다. 적색유루는 T3군에서 9례가 관찰되었다. 비출혈은 T3군에서 3례가 각각 관찰되었다. 부정교합은 T3군에서 2례가 관찰되었다. 호흡곤란은 T3군에서 1례가 관찰되었다. 혈변은 T3군에서 2례가 관찰되었다. 입모는 T3군에서 8례가 관찰되었다. 탈모는 T1군에서 1례가 관찰되었다. 암컷에서 쇠약은 T3군에서 8례가 관찰되었다. 마비성보행은 T2군에서 7례가, T3군에서는 모든 개체에서 관찰되었다. 투여부위의 고형화는 T1군과 T2군에서는 각각 7례가, T3군에서는 모든 개체에서 관찰되었다. 적색유루는 T3군에서 4례가 관찰되었다. 비출혈은 T3군에서 9례가 각각 관찰되었다. 입모는 T3군에서 8례가 관찰되었다. 탈모는 T1군에서 2례가, T3군에서 1례가 관찰되었다.

수컷에서는 T1군과 T2군의 체중은 대조군과 비교하여 유의한 차이가 관찰되지 않았다. T3군은 투여후 6일차까지 체중증가가 억제되다가 통계학적으로 유의하게 14일차까지 체중이 감소하였고 그 후 체중은 다시 증가하였다. 암컷에서는 T1군과 T2군은 대조군의 체중과 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. T3군은 투여후 6일차까지 체중증가가 억제되다가 14일차까지 체중이 감소하였고 그 후 체중은 다시 증가하였다.

사료 섭취량은, 투여 후 2주차에 T2군과 T3군에서 감소하였다가 점차 회복되는 것이 관찰되었다. 물섭취량도 투여 후 2주차 T1, T2군 및 T3군에서 감소하였다가 점차 회복되는 것이 관찰되었다.

투여량이 높을수록 골절이 나타나는 개체가 증가하였으며, 복합 골절의 숫자도 증가하였다.

백혈구, 적혈구, 헤모글로빈의 숫자들을 검사한 혈액학적 검사로부터는 암수 모두에서 특별한 변화는 관찰되지 않았다. 혈액 생화학적 검사로부터는, 레티노익 산의 독성 현상으로서 일반적으로 나타나는 alkaline phosphatase의 활성 증가가 수컷 T3군에서 대조군에 비해 유의적으로 증가함을 관찰하였다.

4. 요약

아급성 독성 시험으로부터, 미림구내의 레티노익 산을 기준으로 한 투여량이 100mg/kg 일때는 4마리의 치사 개체가 보이는 등의 심각한 독성 효과가 유발되었으며, 25 및 50mg/kg인 경우에 독성 효과가 거의 나타나지 않음을 관찰하였다. 50mg/kg의 투여량의 경우, 일부 동물에서 뼈골절 현상이 나타났지만, 이러한 독성효과는 항염증제를 같이 투여함으로써 극복될 수 있을 것으로 생각되어졌다. 따라서, 앞으로의 실험에서는 항염증제를 이용하여, 가능한 독성을 억제하면서, 보다 빠른 기간 내에 상태가 회복될 수 있도록 하는 연구를 행할 것이다.

5. 참고 문헌

- 1) Gillis, J.C., Goa, K.L., Tretinoin : A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and use in the management of acute promyelocytic leukaemia.(1995) *Drugs*, 50, 897-923 .
- 2) Toma, S., Isnardi, L., Raffo, P., Dastoli, G., De Francisci, E., Riccardi, L., Palumbo, R., Bollag, W., "Effects of all-trans-retinoic acid and 13-cis-retinoic acid on breast-cancer cell lines : growth inhibition and apoptosis induction" (1997) *Int. J. Cancer*, 70, 619-627.
- 3) Kalmekierian, G.P., Jasti, R.K., Celano, P., Nelkin, B.D., Marby, M., "All-trans retinoic acid alters *myc* gene expression and inhibits in vitro progression in small-cell lung cancer" (1994) *Cell Growth differ.*, 5, 55-60.
- 4) Giannini, F., Maestro, R., Vukosa, T., Vljevic, T., Pomponi, F., Boiocchi, M., "All-trans, 13-cis and 9-cis retinoic acids induce a fully reversible growth inhibition in HNSCC cell lines" (1997) *Int. J. Cancer*, 70, 194-200 .
- 5) Warrell, R.P., Frankel, S.R., Miller, W.H., Scheinberg, D.A., Itri, L.M., Hittelman, W.N., Vyas, R., Andreeff, M., Tafuri, A., Jakubowski, A., Gabrilove, J., Gordon, M.S., Dmitrovsky, E., "Clinical pharmacology of oral all-trans retinoic acid in patients with acute promyelocytic leukemia" (1991) *New Engl. J. Med.*, 324, 1385-1393.
- 6) Achkar, C.C., Bentel, J.M., Boylan, J.F., Scher, H.I., Gudas, L.J., Miller, W.H., "Differences in the pharmacokinetic properties of orally administered all-trans-retinoic acid and 9-cis-retinoic acid in the plasma of nude mice" (1994) *Drug metabolism and disposition*, 22, 451-458.
- 7) Choi, Y., Kim, S. Y., Kim, S. H., Lee, K-S., Kim, C., Byun, Y. "Long-term delivery of all-trans retinoic acid using biodegradable PLLA/PEG-PLLA blended microspheres" (2001) *Int. J. Pharm.* 215 67-81 .