

메토트렉세이트가 표면수식된 알부민 미립구의 제조 및 특성

황성주* · 조항범 · 이계주 · 김종국*

충남대학교 약학대학, *서울대학교 약학대학

(1995년 1월 6일 원고접수)

Preparation and Characteristics of Surface-Modified Albumin Microspheres with Methotrexate

Sung-Joo Hwang[†], Hang Bum Jo, Gye Ju Rhee and Chong-Kook Kim*

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

*College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-741, Korea

(Received January 6, 1995)

The surface of albumin microspheres could be modified with methotrexate (MTX) by using 1,3-dicyclohexylcarbodiimide (DCC). Surface-modified albumin microspheres entrapping no MTX (SAMS), free MTX (SAMSF) and MTX-bovine serum albumin (BSA) conjugates (SAMSC) were prepared, respectively, and their release characteristics were investigated in the presence of trypsin using a dissolution tester. The mean diameters of all the microspheres were 5~8 μ m, and their shapes was small and uniform. MTX bound to their surfaces was released slower than the entrapped free MTX, and faster than the entrapped MTX-BSA conjugates. Also, surface-modified MTX was scarcely released in the absence of a proteolytic enzyme. Therefore, the surface-modified MTX may be released rapidly from SAMSC at the target site, and thereafter MTX may be released slowly from the encapsulated MTX-BSA conjugates in SAMSC for a long period.

Keywords—Surface-modified albumin microspheres, Methotrexate, Methotrexate-bovine serum albumin conjugates, Release, 1,3-dicyclohexylcarbodiimide

의약품의 치료효과는 약물분자가 특정 장기나 악성 세포와 같은 세포군, 효소, 세포 수용체, 병원 미생물 등과 같은 특정 표적부위에 작용함으로써 나타나며, 생체에 투여된 약물 중 표적부위에 도달하지 못한 약물들은 치료효과를 나타내지 못하거나 경우에 따라서는 불필요한 부위에 작용하여 부작용을 일으킬 수 있다. 특히, 항암제와 같이 독성이 강한 약물을 체내에 투여하였을 경우에는 항암제를 표적부위인 특정장기나 특정세포에만 선택적으로 수송하고, 그 특정부위에서의 약물의 방출을 제어할 수 있어서 최대의 치료효과를 나타내며, 비표적부위인 다른 장기나 정상세포에는 거의 영향을 미치지 않게 함으로써 부작용을 극소화시킬 수 있는 특정장기 표적용 약물수송체의 개발에 많은 관심이 집중되고 있다. 대부분의 항암제는 증식세포에 작용하므로 약물이 종양조직이나 암세포에 일정기간 동안 유효농도를 유지하지 못할 경우

에 종양조직 중 휴지기에 있던 암세포가 다시 성장, 분열, 번식하여 종양조직이 성장함에 따라 휴지기는 그 기간이 점점 길어지므로 바람직한 항암효과를 얻기 위하여 표적지향성과 아울러 약물의 방출을 원하는 속도로 제어하거나, 지속화시킬 수 있는 특성을 함께 가지고 있는 특정부위 표적용 제어방출형 약물수송체가 이상적인 수송체라 할 수 있다. 이러한 약물수송체 가운데 약물을 함유한 알부민 미립구가 정맥주사시 망상세포조직(RES)에 선택적으로 식균되는 것을 착안하여 간, 지라, 골수 등과 같이 RES가 주로 분포된 부위에 생성된 종양이나 세균감염을 치료하는데 약물수송체로서 알부민 미립구의 이용가능성이 Kramer 등^{1,2)}에 의해 제시된 이래 현재까지 많은 연구가 진행되어 왔다.³⁻¹⁶⁾ 현재까지의 연구들에서와 같

[†]본 논문에 대한 문의는 이 저자에게로

이 알부민 미립구에 free drug을 봉입하게 되면, 초기의 burst out effect 때문에 표적부위에 도달하기 전에 약물이 방출되므로 소기의 목적을 달성하기 곤란한 문제점이 있었으나, 약물-고분자 공유결합체를 알부민 미립구에 봉입함으로써 초기의 burst out effect가 일어나는 문제를 해결할 수 있었다.⁹⁻¹³⁾ 그러나, 약물-고분자 공유결합체를 알부민 미립구에 봉입하였을 경우에는 표적부위에 도달한 후에도 약물의 방출이 매우 지연되어, 초기에는 표적부위에서 신속하게 유효농도에 도달되게 하는데는 문제점이 있다.¹⁰⁻¹³⁾ 따라서, 항암제를 투여할 때, 표적부위에 도달하기 전에는 약물의 방출이 일어나지 않고 표적부위에 도달한 후에는 신속하게 효소에 의해서 가수분해되어 방출되도록 할 수 있음과 동시에 장기간에 걸쳐서 지속적으로 약물이 방출되어 장시간 유효농도를 유지할 수 있도록 약물수송체를 설계할 필요가 있다. 이에 저자 등은 알부민 미립구의 내부에 항암제를 봉입하고, 그 미립구 표면에도 항암제를 결합시켜 알부민 미립구를 제조하여, 투여 후에는 표적부위로 선택적으로 도달할 수 있고, 그 표적부위에 도달한 후에는 표면에 있는 항암제는 신속하게 방출되도록 하고, 내부에 있는 항암제는 장시간에 걸쳐서 서서히 방출되도록 할 수 있는 간표적용 제어방출형 약물수송체를 개발하고자 하는 연구의 일환으로, 항암제가 표면수식된 미립구의 제조방법과 그 특성에 관하여 보고하고자 한다.

실험 방법

시약 및 재료

항암제로서 메토포렉세이트(이하 MTX라 약칭함)를 사용하였으며, tracer로 사용한 [L-glutamyl-3,4-³H]-methotrexate(37 MBq/ml, 1.0 mCi/ml, NET-730, 이하 [³H]-MTX라 약칭함)는 Du Pont Company (Wilmington, DE)제품을 사용하였다. 소혈청 알부민 (bovine serum albumin Fraction V, 이하 BSA라 약칭함)과 1-ethyl-3-(3-dimethyl-amino-propyl) carbodiimide hydrochloride (Protein sequencing reagent, 이하 EDC라 약칭함)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) 시약을 구입하여 사용하였으며, 1,3-dicyclohexyl-carbodiimide (이하 DCC라 약칭함)는 Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI) 시약을 사용하였고, 트립신(Trypsin, 1:250, Difco laboratories, Detroit, USA)은 유전공

학연구소에서 제공받았다. 공유결합체를 분리 정제하는 목적으로 Sephadex G-50 (particle size : 10~40 μ m, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)과 투석막 (Spectra/Por membrane tubing, Mol. wt. cut off : 6,000~8,000; cylinder diameter : 14.6 mm, Spectrum Medical Ind. Terminal Annex, Los Angeles, CA)을 사용하였다. 면실유 (cotton seed oil)는 Junsei Chemical Co. 제품을, 글루타르알데히드 용액 (25% 수용액, 이하 Glu-CHO라 약칭함)은 Kokusan Chemical Works Co. 제품을, 톨루엔 (EP grade)은 Duksan Pharmaceutical Co. 제품을 사용하였다. Scintillation cocktail 용액으로는 Insta-Gel XF (Packard Instrument Co.) 또는 2,5-diphenyloxazole (PPO, Sigma Chemical Co.), 1,4-(2-(5-phenyloxazolyl))benzene (POPOP, Sigma Chemical Co.), Triton X-100 (GR reagent, Duksan Pharmaceutical Co., Seoul, Korea)등을 사용하여 cocktail을 조제하여 사용하였으며, 그 외 다른 시약들은 1급 시약을 사용하였고, 더 이상의 정제는 하지 않았다.

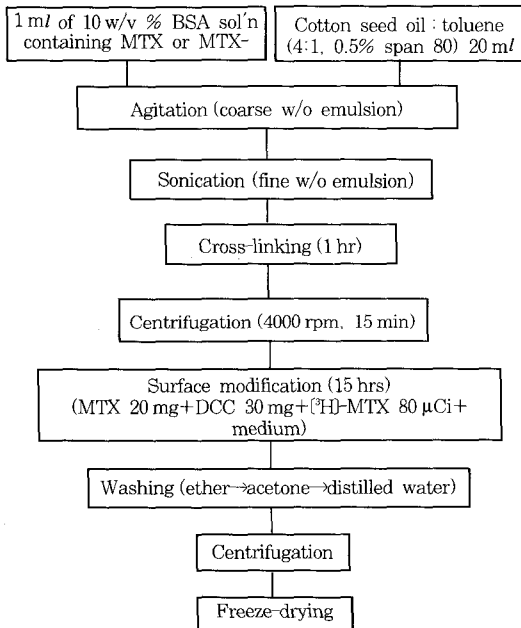
기구 및 기기

공유결합체와 알부민 미립구의 제조시 사용한 기구로는 동결건조기 (freeze dryer, Labomens Export), 호모게나이저 (ultrasonicator, Sonics & Materials Inc. Danbury, Connecticut, USA), 원심분리기 (Wifug), motor driven glass stirrer (Chang Shin Scientific Co.), 자석교반기 (DMS Co.), Digital pH/mV meter (DMS Co.)등을 사용하였다. 용출시험기는 대한약전 규격품인 용출시험기 (DST-200, Fine Scientific Instruments, Korea)에 용기와 paddle을 소량의 용출시험액으로도 용출시험이 가능하게 자체 제작하여 사용하였다. 분석기 기로는 자외부 분광광도계 (Pye Unicam and Milton Roy, Spectronic 3000 array)를 사용하였고, 방사성동위원소인 [³H]-MTX의 방사능 측정에는 Packard사의 liquid scintillation counter를 사용하였다. 미립구의 크기 측정에는 Coulter counter (140 μ m aperture, Coulter Channelyzer 256 ZM, Coulter Electronics LTD, Northwell drive, Luton, Beds, England)를 사용하였다. 기타 기구로는 Socorex dispenser, Millipore filter (micro filtration system, 0.45 μ m) 등을 사용하였다.

[³H]-MTX-BSA 공유결합체의 합성

[³H]-MTX-BSA 공유결합체는 저자 등¹¹⁾이 보고한 방법을 약간 수정하여 합성하였다. 즉, BSA 150 mg을 50 ml 비이커에 넣고 증류수 10 ml로 용해하여 BSA 용액을 조제하고, 따로 바이알에 [³H]-MTX 용액 (120 μCi/0.05 M sodium phosphate buffer 1.2 ml)과 MTX 30 mg을 넣어 녹인 용액에 0.01 N NaOH 3 ml를 가한 MTX 용액을 제조하였다. 이 MTX 용액을 위의 BSA 용액에 가하고 자석교반기로 교반하면서 0.1 N HCl을 사용하여 pH를 5.0~6.0으로 조절한 후, 4℃ 정도의 저온실에서 교반하면서 EDC 150 mg을 0.05 N HCl 3 ml에 녹인 용액을 약 7 시간에 걸쳐 서서히 가했다. 이 때 반응중인 용액의 pH는 5.0~6.0으로 조절하였고 차광 하에 하룻밤을 계속 교반한 후 EDC 75 mg을 0.05 N HCl 1.5 ml에 녹인 액을 약 4 시간에 걸쳐 가하였다. 이 액을 Sephadex G-50 column (2.5×30 cm)에 주입하고 0.05 M 인산나트륨완충액(pH 7.4)을 전개액으로 사용하여 공유결합체 분획을 분리하였다. 이 분획물을 전처리한 투석막에 넣고 2 l의 2차 증류수로 3회 반복 투석하고 정제된 것은 -50℃에서 동결 건조하여 실험에 사용하였다.

[³H]-MTX-BSA 공유결합체 중의 약물 정량



Scheme 1—Schematic diagram of the preparation of surface-modified albumin microspheres with methotrexate (MTX).

PPO/POPOP cocktail 조제—갈색 유리병에 PPO 5.5 g과 POPOP 0.1 g을 넣고 톨루엔 667 ml와 Triton X-100 333 ml를 메스실린더로 맞추어 가한 다음, 자석교반기로 교반하여 완전히 용해시킨 용액을 scintillation counter용 cocktail로 사용하였다.

MTX-/[³H]-MTX-BSA 공유결합체 중의 MTX 정량—MTX-BSA 공유결합체 중에 존재하는 MTX의 양은 MTX 표준액과 비교하여 370 nm에서 UV Spectrophotometer로 흡광도를 측정하여 정량하였다. [³H]-MTX-BSA 공유결합체 중의 MTX의 양은 공유결합체 1~2 mg을 정밀하게 달아 scintillation 바이알에 담고 소량의 솔루엔-350을 가해 50℃에서 방치하여 완전히 녹인 후 PPO/POPOP cocktail 10 ml를 dispenser를 사용하여 가하고 vortexing한 후 24 시간 방치하여 평형에 이른 후 liquid scintillation counter로 [³H]-MTX의 방사능을 측정하였다.

표면수식된 알부민 미립구의 제조

[³H]-MTX가 표면 수식된 알부민 미립구 (SAMS)의 제조—저자 등¹¹⁾이 보고한 방법을 약간 수정하여 미립구를 제조하고 Scheme I과 같이 표면에 항암제를 수식하였다. 즉, falcon tube에 BSA 100 mg을 증류수 1 ml에 용해시킨 BSA 용액을 넣고 면실유:톨루엔 (4:1, 0.5% Span 80 함유)의 혼액 20 ml를 가해 3분간 vortexing하였다. 따로 반응기에 면실유:톨루엔의 혼액 30 ml를 넣고 파스퇴르 피펫을 이용하여 위의 vortexing한 액을 점적한 후 20분간 약 1500 rpm으로 glass stirrer를 이용하여 교반하였다. 이 액을 2분간 3회 sonication하여 미세한 유탁액을 제조한 후, 여기에 가교제로 25% Glu-CHO 0.5 ml를 면실유:톨루엔의 혼액 7 ml에 가하여 vortexing한 유탁액을 서서히 가해 1시간 동안 자석교반기로 교반하면서 경화시켰다. 이 액을 원심분리(4000 rpm, 15분)하여 과잉의 Glu-CHO를 제거하고, 여기에 MTX-DCC액 (MTX 20 mg과 80 μCi에 해당하는 [³H]-MTX을 0.2 M 인산나트륨완충액(pH 7.4)에 녹이고 DCC 30 mg과 면실유:톨루엔의 혼액 47 ml를 가해 분산시킨 액을 가해 15시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 반응이 끝난 후 원심분리(4000 rpm, 15분)하고 에틸, 아세톤으로 각각 2회씩 세척하고 2차 증류수로 1회 세척한 후 -50℃에서 동결 건조하여 SAMS를 제조하였다.

[³H]-MTX-BSA 공유결합체가 봉입되고, [³H]-MTX가

표면 수식된 미립구 (SAMSC)의 제조— $[^3\text{H}]$ -MTX-BSA 공유결합체 70 mg (MTX로 4 mg, $[^3\text{H}]$ -MTX로서 16 μCi 에 해당)과 BSA 100 mg에 해당하는 양을 증류수 1 ml에 용해시키고 면실유:톨루엔 (4:1, 0.5% span 80 함유)의 혼액 20 ml를 가해 3분간 vortexing한 후 따로 반응기에 면실유:톨루엔의 혼액 30 ml를 넣고 파스퇴르 피펫을 이용하여 위의 vortexing한 액을 점적하였다. 이하의 표면수식과정은 SAMS 미립구와 동일한 방법으로 제조하였다.

Free $[^3\text{H}]$ -MTX가 봉입되고, $[^3\text{H}]$ -MTX가 표면 수식된 미립구 (SAMSF)의 제조—Free $[^3\text{H}]$ -MTX 4 mg ($[^3\text{H}]$ -MTX로서 16 μCi 에 해당)과 BSA 100 mg을 증류수 1 ml에 용해시키고 면실유:톨루엔 (4:1, 0.5% span 80 함유)의 혼액 20 ml를 가해 3분간 vortexing한 후 이하의 과정은 SAMS 미립구와 동일한 방법으로 제조하였다.

미립구 중의 약물 봉입량 정량

미립구 중의 MTX 정량—pH 7.4 인산나트륨완충액 50 ml에 MTX가 봉입된 미립구 5 mg을 가하여 분산시킨 후, 트립신 100 mg을 가하여 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 약 12 시간 동안 digestion하여 용출시킨 다음, 5% trichloroacetic acid (TCA)로 제단백한 후 원심분리하였다. 상정액을 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과한 후 이 여액을 자외부 분광광도계로 370 nm에서 흡광도를 측정하여 MTX를 정량하였다.

미립구 중의 $[^3\text{H}]$ -MTX 정량— $[^3\text{H}]$ 로 표지된 미립구 1~2 mg을 정밀하게 달아 scintillation 바이알에 넣고 소량의 솔루엔-350을 가해 50°C 에서 방치하여 완전히 녹인 후 PPO/POPOP cocktail 10 ml를 dispenser를 사용하여 가하고 vortexing 한 후 24 시간 방치하여 평형에 이른 후 liquid scintillation counter로 $[^3\text{H}]$ -MTX의 방사능을 측정하였다.

미립구의 크기 및 크기분포 측정 (Coulter counter법)

알부민 미립구를 ISOTON II 액에 가하여 분산시킨 다음, Coulter counter로 140 μm aperture를 사용하여 미립구의 수를 기준으로 한 빈도분포와 누적분포를 얻었으며, 이로부터 평균직경과 다분산성의 척도인 SPAN factor를 구하였다.

$$\text{SPAN} = \frac{D_{90\%} - D_{10\%}}{D_{50\%}}$$

$D_{90\%}$, $D_{50\%}$ 및 $D_{10\%}$ 는 입자의 크기가 작은 쪽에서부

터 누적하여 각각 90%, 50% 및 10%가 될 때의 미립구의 직경을 나타낸 것이다.

트립신에 의한 In Vitro 방출시험

약전 규격품인 용출시험기 (DST-200, Fine Scientific Inst.)에 자체 제작한 용기와 패들을 부착한 후, $[^3\text{H}]$ 로 표지된 알부민 미립구 10 mg을 가하고 인산나트륨완충액 (pH 7.4 PBS) 100 ml를 가한 다음 트립신 100 mg을 가하여 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 100 rpm으로 계속 교반하면서 계획된 시간마다 2 ml씩 취하여 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과한 후 이 중 0.5 ml를 취해 바이알에 넣고 PPO/POPOP cocktail 10 ml와 Insta-Gel XF 3 ml를 가하고 vortexing 한 후 liquid scintillation counter로 방사능을 측정하였다. 검액은 채취시마다 균질하게 분산된 상태에서 취하였으므로 방출된 양을 계산할 때 따로 용량에 대한 보정은 하지 않았다.

결과 및 고찰

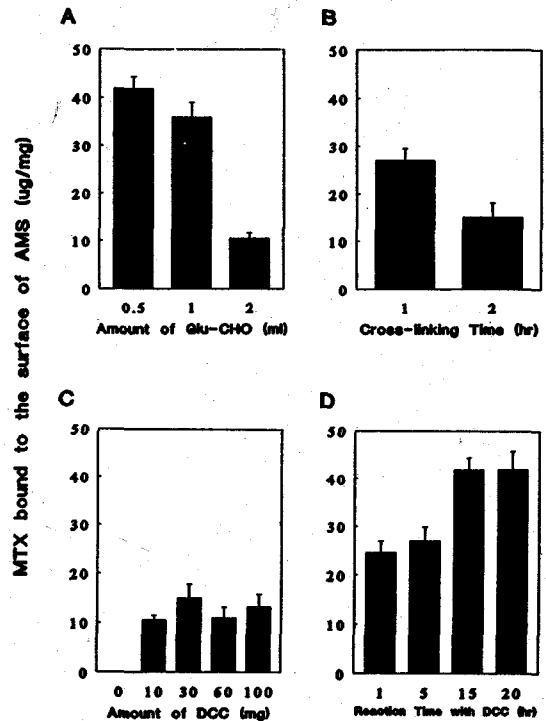


Figure 1—Effect of reaction conditions on the binding of methotrexate (MTX) to the surface of albumin microspheres. (A) Amount of 25% glutaraldehyde solution (Glu-CHO), (B) Cross-linking time, (C) Amount of 1,3-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), (D) Reaction time with DCC.

표면수식된 알루미늄 미립구의 제조조건

미립구 제조시 Glu-CHO의 양에 따른 영향—DCC시약을 사용하여 카르복시기와 아민기 사이에 아마이드결합을 형성시킴으로써 알루미늄 미립구 표면에 MTX를 수식시킬 수 있었다. 표면수식된 미립구 제조시 다른 제조조건을 동일하게 하고 (경화시간 = 1 시간; MTX 20 mg; DCC 30 mg; 반응시간 = 15 시간), 경화제인 Glu-CHO의 양을 0.5, 1.0, 2.0 ml로 달리하여 제조한 후 표면에 수식되는 MTX의 양을 측정해 본 결과, Fig. 1A에서와 같이 미립구 표면에 결합되는 MTX의 양은 미립구 1 mg당 각각 41.9, 36.0, 10.5 μg 으로 Glu-CHO의 양이 증가할수록 감소하였다. 이는 미립구 제조시 Glu-CHO를 다량 사용하여 과도하게 가교시키면 미립구 표면에 있는 알루미늄의 카르복시기와 아민기의 양이 감소하므로 DCC로 표면수식시 MTX와 결합할 수 있는 관능기가 감소되기 때문이라 생각된다.

미립구 제조시 경화시간에 따른 영향—표면수식된 미립구 제조시 다른 제조조건을 동일하게 하고 (Glu-CHO 0.5 ml; MTX 20 mg; DCC 30 mg; 반응시간 = 5시간), 경화시간을 1시간 및 2시간으로 달리하였을 때, 미립구 표면에 결합되는 MTX의 양은 각각 27.0 및 15.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 경화시간이 길수록 감소하였다(Fig. 1B). 이는 동일량의 Glu-CHO를 사용하더라도 경화시간을 길게 하면 앞의 결과와 마찬가지로 과도하게 가교된 미립구가 만들어지므로 표면에 결합되는 MTX의 양이 감소되는 결과를 초래한 것으로 생각된다. 따라서, 표면에 많은 양의 MTX를 결합시키기 위해서는 미립구 제조시 미립구가 잘 생성되는 범위에서 가능한 한 mild하게 가교시키는 것이 바람직하다고 생각된다.

표면수식시 DCC의 사용량에 따른 영향—동일하게 제조한 미립구를 사용하여 다른 제조조건을 동일하게 하고 (Glu-CHO 0.5 ml; 경화시간 = 2시간; MTX 20 mg), DCC의 사용량을 각각 0, 10, 30, 60 및 100 mg을 사용하여 15시간 반응시킨 결과, Fig. 1C에서 보는 바와 같이 미립구 표면에 결합되는 MTX의 양은 각각 0, 10.6, 15, 11.0 및 13.3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 DCC의 사용량이 30 mg까지는 MTX의 결합량이 증가하였으나, 그 이상일 때에는 거의 증가하지 않거나 감소하였다. Carbodiimide 시약인 DCC를 이와 같이 과도하게 많이 사용할 경우에는 미립구 표면에 결합되는 양이 더 이상 증가하지 않거나 오히

려 감소하는 경향이 있는 것은 특이한 현상인데, 그 이유는 DCC가 과량으로 존재할 경우에는 미립구 표면이나 MTX자체에 존재하는 관능기끼리 반응이 일어나기 때문이 아닌가 추측되지만 그 기전에 관해서는 더 연구할 필요가 있다고 생각된다. 따라서, 본 실험에서는 DCC를 30 mg 사용하였다. 또한, 물리적 흡착정도를 알아보기 위하여 DCC를 사용하지 않고 반응시킨 결과 미립구 표면에 MTX가 거의 결합되지 않으므로 물리적 흡착은 무시할 수 있음을 알 수 있었다.

표면수식시 반응시간에 따른 영향—동일하게 제조한 미립구를 사용하여 다른 제조조건을 동일하게 하고 (Glu-CHO 0.5 ml; 경화시간 = 1시간; MTX 20 mg; DCC 30 mg), 반응시간을 1, 5, 15 및 20시간으로 달리하여 MTX를 결합시킨 결과 미립구 표면에 결합되는 MTX의 양은 각각 24.5, 27.0, 41.9 및 42.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 반응시간이 길수록 MTX가 많이 결합하였으나, 15시간 이후에는 거의 증가하지 않았다(Fig. 1D). 따라서, 본 실험에서는 반응시간을 15시간으로 하였다.

표면수식시 MTX의 사용량에 따른 영향—동일하게 제조한 미립구를 사용하여 MTX의 사용량을 20 mg과 50 mg으로 달리하여 15시간 반응시킨 결과, 미립구 표면에 결합되는 MTX의 양은 각각 41.9와 42.4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 MTX의 사용량이 증가할수록 결합되는 양이 약간 증가하였으나, 사용한 MTX의 양에 비해 MTX의 손실량이 매우 증가하였으므로 본 실험에서는 MTX의 양을 20 mg으로 하였다.

표면수식된 미립구의 크기와 분포

Coulter counter를 사용하여 측정한 SAMS, SAMSF, SAMSC 미립구들의 입자도 분포를 수를 기준으로 빈도분포와 누적분포로 Fig. 2에 나타내었으며, 이 크기분포도로부터 평균직경과 SPAN factor를 구하여 Table I에 나타내었다. 이 Table에서 보는 바와 같이 SAMSF 미립구가 가장 평균직경이 작았으며, 공유결합체가 봉입된 SAMSC 미립구가 약간 큰 것을 알 수 있었다. 전체적으로 평균 입자크기는 5~8 μm 로서 정맥주사시 폐에서의 기계적 여과를 피해서 많은 양이 간으로 송달될 수 있을 것으로 생각된다. 입도분포 폭은 SAMSF 미립구에서 약간 크게 나타났다. 전체적으로는 3종 미립구 모두 비교적 균일한 분산성을 나타내었다.

미립구 중의 봉입량

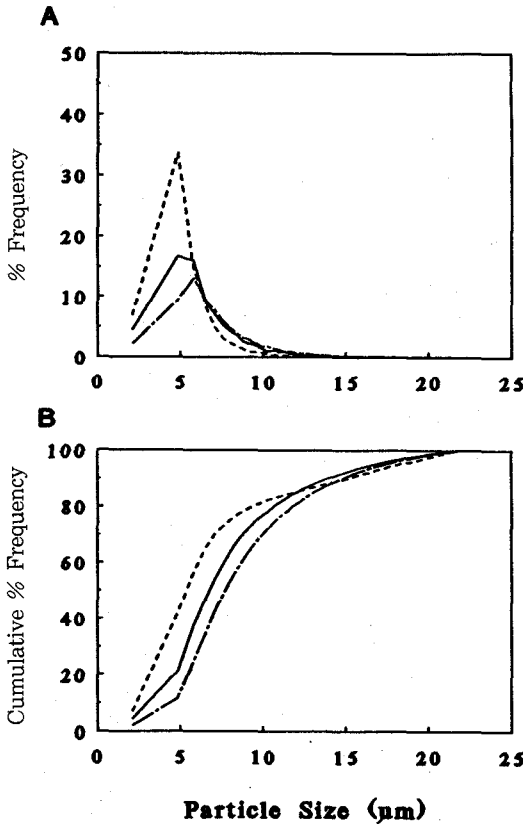


Figure 2—Particle size distribution on a number basis of surface-modified albumin microspheres entrapping no methotrexate(MTX) (SAMS : —), free MTX (SAMSF : - - -) and MTX-bovine serum albumin (SAMSC : · · · · ·). (A) Frequency distribution, (B) Cumulative frequency distribution.

Table I—Particle Size on the Number of Albumin Microspheres and the Content of Methotrexate (MTX) Entrapped in Microspheres

Type	Mean Diameter (µm)	SPAN	Entrapped MTX (µg per mg of microspheres)
SAMS	6.8	1.59	26.8
SAMSF	5.4	2.35	53.1
SAMSC	7.7	1.35	60.1

알부민 미립구중에 봉입된 약물량은 Table I과 같았다. 미립구 제조시 free MTX 대신에 MTX-인혈청 알부민 (MTX-HSA) 공유결합체를 사용할 경우에는 봉입효율이 54.5%에서 98.0%로 현저히 증가된다는 사실을 저자 등이 이미 보고한 바 있다.¹¹⁾ 본 실험에서도 MTX-BSA 공유결합체를 미립구 내부에 봉입시킨 SAMSC 미립구에서 약물의 봉입량이 가장 높게 나타났다. 또한, 3종 모두 표면에 결합된 MTX의 양

은 유사하리라 추정된다.

트립신에 의한 In Vitro 방출

알부민 미립구에 저분자량의 유리 약물만을 봉입하게 되면, 초기에 burst-out effect가 일어나며 제제 중에서도나 생체 내에서 표적부위에 도달하기 전에 확산에 의해서 약물이 방출되기 때문에 문제가 있었다. 저자 등도 free MTX만을 알부민 미립구에 봉입했을 때 이러한 문제점을 확인할 수 있었으며, 이러한 문제는 약물-고분자 공유결합체를 알부민 미립구에 봉입함으로써 방지할 수 있었다.^{11, 13)} 즉, 공유결합체를 봉입하게 되면 표적부위에 도달한 후 생체내의 효소에 의해서 매트릭스가 분해되어 약물이 방출된다. 그러나, 이 경우에는 표적부위에 도달한 후에도 약물의 방출이 매우 지연되어, 초기에 표적부위에서 신속하게 유효농도에 도달되게 하는데는 문제점이 있다.¹⁰⁻¹³⁾ 따라서, 항암제를 투여할 때, 표적부위에 도달하기 전에는 약물의 방출이 일어나지 않고 표적부위에 도달한 후에는 신속하게 효소에 의해서 가수분해되어 방출되도록 할 수 있음과 동시에 장기간에 걸쳐서 지속적으로 약물이 방출되어 장시간 유효농도를 유지할 수 있도록 할 필요가 있다. 이러한 목적으로 본 실험에서는 알부민 미립구표면에 MTX를 공유결합시킴으로써 표적부위에 도달하기 전에는 약물의 방출이 일어나지 않고 표적부위에 도달한 후에는 신속하게 약물을 방출하도록 하며, 미립구 내부에는 MTX-BSA 공유결합체를 봉입함으로써 장시간에 걸쳐서 서서히 방출되도록 설계하였다. 예비실험 결과 SAMS 미립구는 pH 7.4 인산나트륨 완충액중에서 24시간까지 3% 이내로 거의 방출이 일어나지 않음을 알 수 있었으며, free MTX를 봉입한 경우에는 저자 등¹¹⁾이 이미 보고한 바와 같이 30.2%가 방출되었다. SAMS, SAMSF 및 SAMSC 미립구를 각각 10 mg씩 취해 트립신을 첨가하여 용출시험을 한 결과 Fig. 3과 같았다. 미립구 표면에만 MTX가 수식된 SAMS 미립구는 초기 4시간까지 신속하게 방출되고 그 후에는 서서히 방출되었다. 내부에 free MTX가 봉입되고 표면에 MTX가 수식된 SAMSF 미립구는 초기 2시간까지 신속하게 약물이 방출되고, 그 후 12시간까지 약물이 서서히 방출되었다. SAMSF미립구의 방출량(D_{SAMSF})에서 SAMS 미립구의 방출량(D_{SAMS})을 뺀 값(D_{SAMSF} - D_{SAMS})은 SAMSF 미립구 중에서 free MTX로 봉입된 약물의 방출을 나타내는데 Fig. 3에서 보는 바와 같이 내부에 봉입된 free MTX는 대부분 2시간 이내

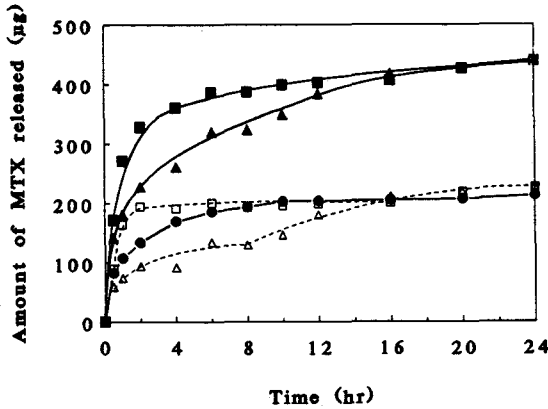


Figure 3—The difference of methotrexate (MTX) release pattern in three types of microspheres in the presence of trypsin at $37\pm 1^\circ\text{C}$. Key: ●: SAMS, ■: SAMSF, ▲: SAMSC, □: The difference of release amount between SAMSF and SAMS, △: The difference of release amount between SAMSC and SAMS.

에 방출됨을 알 수 있으며, 그 방출속도는 표면에 수식된 MTX 보다도 더 빠름을 알 수 있다. 따라서, 초기의 신속한 방출은 내부의 free MTX에 주로 기인되며, 그 후의 느린 방출은 표면에 수식된 MTX에 주로 기인하는 것으로 생각된다. 내부에 MTX-BSA 공유결합체가 봉입되고 표면에 MTX가 수식된 SAMSC 미립구는 초기 2시간까지 비교적 신속하게 방출되며, 그 이후에도 장시간에 걸쳐서 일정하게 약물이 방출되었다. SAMSC미립구의 방출량(D_{SAMSC})에서 SAMS 미립구의 방출량(D_{SAMS})을 뺀 값($D_{\text{SAMSC}} - D_{\text{SAMS}}$)은 SAMSC 미립구 중에서 MTX-BSA 공유결합체로 봉입된 약물의 방출을 나타내는데 Fig. 3에서 보는 바와 같이 내부에 봉입된 MTX-BSA 공유결합체는 장시간에 걸쳐서 지속적으로 방출됨을 알 수 있으며, 그 방출속도는 미립구 표면에 수식된 MTX 보다도 더 늦었다. 따라서, SAMSC 미립구에서 초기의 신속한 방출은 표면에 수식된 MTX에 기인되며, 그 후의 지속적인 방출은 내부에 봉입된 MTX-BSA 공유결합체에서 기인된 것으로 생각된다. 미립구에 봉입된 MTX의 형태에 따라 방출속도를 비교해 보면, 그 순서는 (내부에 봉입된 free MTX) > (표면에 수식된 MTX) > (내부에 봉입된 MTX-BSA 공유결합체)로 나타났다. 또한, 방출된 양을 방출%로 나타내 보면, 그 순서는 SAMSF > SAMS > SAMSC로 나타났다. 따라서, SAMSC 미립구는 표적부위에 도달되기 전에는 약물의 방출이 거의 일어나지 않고, 표적부위에 도

달한 후에는 표면에 수식된 MTX가 신속하게 방출되어 유효농도에 신속하게 도달하게 하며, 그 이후에는 미립구 내부에 봉입된 MTX-BSA 공유결합체로부터 약물이 장시간에 걸쳐서 지속적으로 방출될 것으로 예상되므로 가장 목적에 부합되는 약물수송체라 할 수 있다.

결 론

DCC를 촉매로 사용하여 알부민 미립구의 표면에 MTX를 수식할 수 있었으며, 표면수식된 미립구의 평균 입자크기는 $5\sim 8\ \mu\text{m}$ 로 균일한 분포를 나타내었고, 공유결합체가 봉입된 미립구의 크기가 약간 크게 나타났다. 또한, 알부민 미립구 표면에 수식된 MTX는 미립구 내부에 봉입된 free MTX 보다 느리게 방출되었으며, 미립구 내부에 봉입된 MTX-BSA 공유결합체 보다는 신속하게 방출되었다. 이 연구에서 알부민 미립구 내부에 MTX-BSA 공유결합체가 봉입되고 그 표면에 MTX가 수식된 미립구는 표적부위에 도달되기 전에는 약물의 방출이 거의 일어나지 않고, 표적부위에 도달한 후에는 표면에 수식된 MTX가 신속하게 방출되어 유효농도에 신속하게 도달하게 하며, 그 이후에는 미립구 내부에 봉입된 MTX-BSA 공유결합체로부터 약물이 장시간에 걸쳐서 지속적으로 방출될 것으로 예상된다.

감사의 말씀

본 연구는 1992년도 한국과학재단 핵심전문연구비 (과제번호: 923-1600-010-2)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드린다.

문 헌

- 1) P.A. Kramer, Albumin microspheres as vehicles for achieving specificity in drug delivery, *J. Pharm. Sci.*, **63**, 1646 (1974).
- 2) P.A. Kramer and T. Burnstein, Phagocytosis of microspheres containing an anti-cancer agent by tumor cells *in vitro*, *Life Sci.*, **19**, 515 (1976).
- 3) G. Gregoriadis, Targeting of drugs, *Nature*, **265**, 407-411 (1977).

- 4) K. Sugibayashi, Y. Morimoto, T. Nadai and Y. Kato, Drug carrier property of albumin microspheres in chemotherapy. I. Tissue distribution of microsphere entrapped 5-fluorouracil in mice, *Chem. Pharm. Bull.*, **25**(12), 3433-3434 (1977).
- 5) Y. Morimoto, K. Sugibayashi and Y. Kato, Drug-carrier property of albumin microspheres in chemotherapy. V. Antitumor effect of microsphere-entrapped adriamycin on liver metastasis of AH 7974 cells in rats, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**(5), 1433-1438 (1981).
- 6) A.E. Longo, H. Iwata, T.A. Lindheimer and E.P. Goldberg, Preparation of hydrophilic albumin microspheres using polymeric dispersing agents, *J. Pharm. Sci.*, **71**, 1323-1328 (1982).
- 7) P.K. Gupta, C.T. Hung and D.G. Perrier, Albumin microspheres. III. Synthesis and characterization of microspheres containing adriamycin and magnetite, *Int. J. Pharm.*, **43**, 167-177 (1988).
- 8) C.K. Kim, S.J. Hwang and J.S. Yang, Development of specific organ-targeting drug delivery system (III), *J. Kor. Pharm. Sci.*, **19**(4), 195-202 (1989).
- 9) S.J. Hwang, Preparation and targetability of albumin microspheres, *Pharmakon*, **21**(4), 517-529 (1991).
- 10) C.K. Kim and Y.K. Oh, Development of hydrophilic human serum albumin microspheres using a drug-albumin conjugate, *Int. J. Pharm.*, **47**, 163-169 (1988).
- 11) S.J. Hwang, M.G. Lee and C.K. Kim, Preparation and in vitro release characteristics of hydrophilic albumin microspheres containing methotrexate and methotrexate-human serum albumin conjugates, *Arch. Pharm. Res.*, **15**(2), 162-168 (1992).
- 12) C.K. Kim and S.J. Hwang, Pharmacokinetics and organ-distribution of ^3H -methotrexate and ^3H -methotrexate-human serum albumin conjugates in mice, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **19**(8), 961-970 (1993).
- 13) C.K. Kim, S.J. Hwang and M.G. Lee, The organ targetability of small and large albumin microspheres containing free and HSA conjugated methotrexate, *Int. J. Pharm.*, **89**, 91-102 (1993).
- 14) S.K. Pande, S.P. Vyas and V.K. Dixit, Localized rifampicin albumin microspheres, *J. Microencapsulation*, **8**(1), 87-93 (1991).
- 15) J. Okada, S. Asano and T. Kondo, A new concept for interpretation of first-order release from albumin microspheres, *J. Microencapsulation*, **8**(4), 483-496 (1991).
- 16) K.P. Tripathi and J. Singh, Aminophylline targeting to lung : Optimization of the size and drug loading of albumin microspheres, *J. Microencapsulation*, **9**(2), 229-235 (1992).