

메토트렉세이트가 표면수식된 알부민미립구의 표적성

황성주[†] · 조항범 · 이계주 · 김종국*

충남대학교 약학대학, *서울대학교 약학대학
(1996년 5월 2일 접수)

Targetability 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, Taejon 305-764, Korea

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

(Received May 2, 1996)

The surface of albumin microspheres was 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. The organ-targeting ability of free [³H]MTX, [³H]MTX-BSA conjugate and the above microspheres was evaluated after i.v. administration of the preparations, equivalent to 150 nCi via the tail vein of mice. The total radioactivity in the lung increased immediately in a few minutes after i.v. injection of the microspheres, and then declined for the period of 3-4 weeks. However, the radioactivity in the liver, spleen and kidney increased slowly during the rapid decrease in radioactivity in the lung. This suggested that the microspheres could be entrapped rapidly in the lung through mechanical filtration because of their large size and slowly redistributed to the liver, spleen and kidney due to either the microspheres being degraded enough for the size to allow passage through the capillary beds of the lung and/or the release of [³H]MTX or [³H]MTX-BSA conjugates from the microspheres. The amount of 60~70% of the dose was targeted to the liver after the i.v. injection of SAMS, SAMSF and SAMSC, and the values of ($R_{er}^*_{eliv}$) from the microspheres were 5~7 compared to free MTX. This suggested that the liver-targeting ability from surface-modified albumin microspheres could be 5~7 times as that of free MTX. The liver-targeted drug was accumulated in the Kupffer cells at the initial stage, thereafter the drug in the Kupffer cell was slowly transferred into the hepatocytes. The value of AUQ for liver from SAMS was higher than that from SAMSF, but much lower than that from SAMSC. This suggests that MTX bound to their surface could be eliminated slower than the entrapped free MTX, and faster than the entrapped MTX-BSA conjugates. This is consistent with the *in vitro* release rates order in the presence of a proteolytic enzyme. Also, surface-modified MTX was scarcely released in the absence of a proteolytic enzyme¹¹. Therefore, the surface-modified MTX may be released (or eliminated) rapidly from SAMSC at the target site, and thereafter MTX may be released (or eliminated) slowly from the entrapped MTX-BSA conjugates in SAMSC for a long period..

Keywords— Surface-modified albumin microspheres, Methotrexate, Methotrexate-bovine serum albumin conjugates, Release, Kupffer cell, Hepatocyte, Liver targeting

표적지향성과 아울러 약물의 방출을 원하는 속도로 제어하거나, 지속화시킬 수 있는 특정부위표적용 제어 방출형 약물수송체로서 알부민미립구에 대한 연구가 활발하게 진행되어 왔다.¹⁻⁵⁾ 현재까지의 연구들에서와 같이 알부민미립구에 free drug을 봉입하게 되면, 초

기의 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.⁶⁻¹⁰⁾ 그러나, 약물-고

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

분자 공유결합체를 알부민미립구에 봉입하였을 경우에는 표적부위에 도달한 후에도 약물의 방출이 매우 지연되어, 초기에는 표적부위에서 신속하게 유효농도에 도달되게 하는 데는 문제점이 있다.⁷⁻¹⁰⁾ 따라서, 항암제를 투여할 때, 표적부위에 도달하기 전에는 약물의 방출이 일어나지 않고 표적부위에 도달한 후에는 신속하게 효소에 의해서 분해되어 방출되도록 할 수 있음과 동시에 장기간에 걸쳐서 지속적으로 약물이 방출되어 장기간 유효농도를 유지할 수 있도록 약물수송체를 설계할 필요가 있다. 이에 저자 등은 알부민미립구의 내부에 항암제를 봉입하고, 그 미립구 표면에도 항암제를 결합시켜 알부민미립구를 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 관해서는 이미 전보에 보고하였다.¹¹⁾

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. 동물실험시 tissue solubilizer로는 Soluene-350® (0.5 N quaternary ammonium hydroxide in toluene: C25H55NO, Packard Instrument Co. A Canberra Co., Downers Grove, IL)을 사용하였으며, scintillation cocktail용액으로는 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 사용하였다. hepatocyte를 분리 정제하는 실험에는 Collagenase (Type IV, Sigma Chemical Co.)를 사용하였다. 그 외 다른 시약들은 1급 시약을 사용하였으며 더 이상의 정제는 하지 않았다.

기구 및 기기

방사성동위원소인 [³H]-MTX의 radioactivity 측정에는 Packard사의 Liquid scintillation counter를 사용하였다. 기타 기구로는 Microcentrifuge (Beckman, USA), Socorex dispenser, Millipore filter (Micro filtration system, 0.45 μm), Peristaltic pump (Vision Scientific Co., Seoul) 등을 사용하였다.

[³H]-MTX-BSA 공유결합체의 합성

저자 등¹¹⁾이 이미 보고한 방법으로 합성하였다.

표면수식된 알부민미립구의 제조

표면수식된 알부민미립구로서 1) [³H]-MTX가 표면수식된 알부민미립구(SAMS), 2) [³H]-MTX-BSA 공유결합체가 봉입되고, [³H]-MTX가 표면수식된 미립구(SAMSC), 3) Free [³H]-MTX가 봉입되고, [³H]-MTX가 표면수식된 미립구(SAMSF) 등은 앞서 보고된 방법¹¹⁾과 동일한 방법으로 제조하였다.

실험동물

서울대학교 동물사육장에서 구입한 20~30g의 웅성 ICR 마우스를 사용하였고, 사육조건은 온도는 20±1°C, 습도는 60~70%, 일광시간은 12시간으로 하고 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 했다.

정맥주사

저자 등이 보고한 방법과 유사한 방법으로 투여하였다.^{9,10)} 즉, 생리 식염수 0.2 ml 당 [³H]-MTX로서 150 nCi에 해당하는 SAMS, SAMSC 및 SAMCF 미립구를 생리 식염수에 분산시킨 다음, 한 마리당 0.2 ml 씩을 마우스의 꼬리정맥에 10-20초간 주사하였으며, 대조군으로 free [3H]-MTX와 [3H]-MTX-BSA 공유결합체도 150 nCi에 해당하는 양을 주사하였다. 주사 후 4 주간에 걸쳐서 계획된 시간마다 4마리에 대하여 우선 심장에서 혈액을 채취한 다음 간(liver), 폐(lung), 비장(spleen), 신장(kidney)을 적출하여 각 장기의 무게를 측정하였다. 간에 대해서는 그 중 일부분인 약 0.2g을 무게를 달아 취하고, 신장은 무게를 달아 2개 중 1개를 사용하며, 폐와 비장은 전체를 그대로 사용하였다. 이들 각 장기를 scintillation vial에 담아, 각 장기 0.3g 당 tissue solubilizer인 Soluene-350 1 ml를 가하여 50°C에서 24 시간 정도 처리하여 투명하게 용해시킨 다음 isopropanol 0.2 ml를 가하고, color quenching을 극소화 하기 위하여 30% 과산화수소수 0.4 ml를 가하여 표백 탈색시켰다. 이 때 발열반응에 의하여 열이 많이 발생하므로 방치하여 실온으로 냉각

되면 5 N-HCl을 Soluene-350 사용량의 1/10 만큼 가하여 중화시킨 후 Insta-Gel XF 3 ml와 PPO/POPOP cocktail 10 ml를 dispensor로 가하고 vortexing하였다.

Total radioactivity 측정

상기의 생체 시료를 실온에서 차광한 상태로 24 시간 이상 보관하여 평형에 도달하게 한 후 liquid scintillation counter로 [^3H]의 radioactivity를 측정하였다. 또한, 심장에서 채취한 혈액은 microcentrifuge로 10,000 rpm 에서 원심분리한 후, 혈장(plasma)을 0.15 ml를 취하여 scintillation vial에 넣고 isopropanol 0.2 ml와 30% 과산화수소수 0.4 ml를 가한 후 Insta-Gel XF 3 ml와 PPO/POPOP cocktail 10 ml를 dispensor로 가하고 vortexing하였다. 이 시료를 실온에서 차광한 상태로 24 시간 이상 보관하여 equilibration 시킨 후 liquid scintillation counter로 [^3H]의 radioactivity를 측정하였다.^{9,10)}

표적성 평가

약물수송체의 표적성 평가에 사용한 파라메타로는 AUQ (area under the amount of drug vs time curve), 각 장기에서의 중량평균 약물노출비 (weighted-average relative drug exposure, $(R_e^*)_i$) 및 중량평균 전약물표적효율 (weighted-average overall drug liver targeting efficiency, $(T_e^*)_i$)를 사용하였으며, 대조 제제로는 free MTX 용액을 사용하여 다음과 같이 계산하였다.^{9,10)}

$$AUQ_{\infty} = AUC_{\infty} \times (\text{weight or volume}) \quad (1)$$

$$(R_e^*)_i = \frac{(AUQ_{\infty})_i \text{ test targeted DDS}}{(AUQ_{\infty})_i \text{ free MTX}} \quad (2)$$

$$(T_e^*)_i \% = \frac{(AUQ_{\infty})_i}{\sum AUQ_{\infty}} \times 100 \quad (3)$$

여기서 i 는 간, 폐, 비장, 신장 및 혈장 등의 장기 또는 조직을 뜻한다.

생쥐 간세포의 분리(mouse hepatocyte isolation)

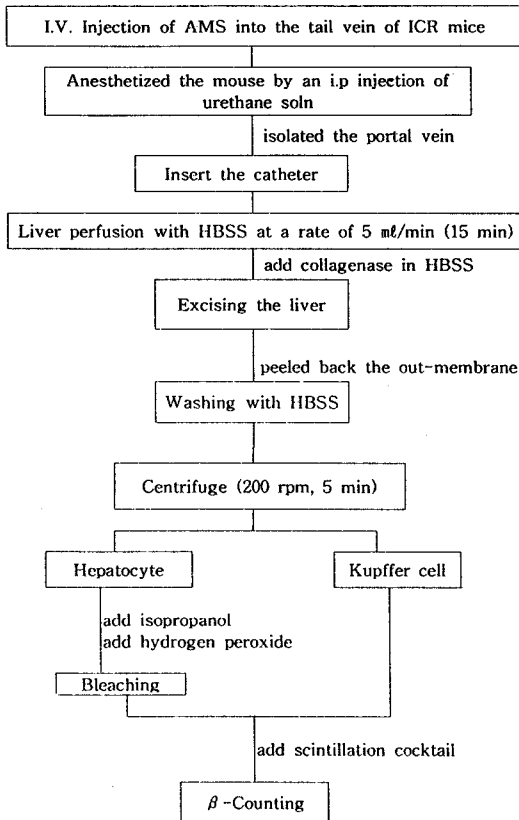
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Table I) 50 ml를 삼구 플라스크에 담아 약 40°C의 항온조에 미리 담가 놓고 silicon tube를 peristaltic pump에 연결하여 한쪽을 삼구 flask에 잠기게 하였다. 우레탄(1.5 g/4 ml) 1 ml를 20~25 g의 생쥐에 복강 주사하여 마취시킨 후 수술대에 반창고로 사지를 고정시키고 복부에 70% 에탄올을 뿌린 후, 횡경막 아래까지만 개방하

Table 1—Composition of Hank's Balanced Salt Solution (HBSS).

Components	Concentration
Potassium chloride	0.40 mg/ml
Potassium phosphate, monobasic	0.06 mg/ml
Sodium chloride	8.00 mg/ml
Sodium bicarbonate	1.12 mg/ml
Sodium phosphate, dibasic	0.12 mg/ml
Phenol red	0.01 mg/ml

였다. 조심스럽게 장을 오른쪽으로 밀어내 간문맥(portal vein)을 찾은 후, 간문맥을 손으로 약간 잡아당기면서 catheter(24G 3/4 19 mm, Jelco)를 간문맥으로 조심스럽게 삽입한다. catheter로 혈액이 나오는 것을 확인한 후, peristaltic pump를 5 ml/min의 속도가 되도록 작동시키면서 silicon tube의 다른 한쪽을 catheter에 연결시킨다. catheter에 연결된 silicon tube를 반창고로 수술대에 잘 고정시킨 후, 하대 정맥을 끊어 간에 있던 혈액이 완전히 흘러나오게 한다. 충분히 혈액을 빼 준 후 falcon tube에 미리 넣어 둔 collagenase (type IV) 15 mg에 HBSS 20 ml를 넣어 용해시킨 후, 그 용액을 water bath에 있는 삼구 flask에 넣고 잘 흔들어 완전히 섞어 준다. 1분 간격으로 끊어진 하대 정맥의 윗부분을 핀셋으로 10초 동안 막아 간의 내부에 buffer가 차게 하여 collagenase의 효율을 높였다. 약 15분간 liver perfusion을 지속하면 간이 커지면서 허물허물해지는 것을 볼 수 있으며 이때 perfusion을 중단한다. pump를 끄고 catheter를 뽑은 후 조심스럽게 간을 적출하여 HBSS가 적당량 담겨져 있는 petri dish에 간을 옮긴 후 핀셋으로 조심스럽게 간의 껍질을 벗겨 내면 single cell로 얻을 수 있다. cell을 보호하기 위해 입구가 큰 pipet으로 조심스럽게 cell을 falcon tube로 옮기고 petri dish에 다시 동량의 HBSS를 붓고 위 조작을 2~3회 반복하여 약 80 ml 정도의 volume이 되게 얻는다. 이 액을 200 rpm, 5분간 원심분리 하여 hepatocyte (침전), Kupffer cell (상징액)을 분리한다. 상징액은 따로 모으고 침전에 다시 동량의 HBSS를 넣고 다시 원심분리하여 완전히 hepatocyte와 Kupffer cell을 분리하였다.¹²⁾

hepatocyte는 총량이 10 ml가 되도록 HBSS를 가한 후 이중 1 ml를 취하여 scintillation vial에 넣고 isopropanol 0.4 ml와 30% 과산화수소수 0.8 ml를 가하여 탈색시킨 후 PPO/POPOP cocktail 10 ml와 Insta-Gel XF 3 ml를 dispensor로 가하고 vor-



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

texting한 후 radioactivity를 측정하였다. 이 실험에서는 전체 cell중에 있는 총약물량을 측정하였으므로 전처리 과정중의 cell viability나 cell의 수는 측정하지 않았다.

Kupffer cell은 얻어진 volume을 측정하고 이중 1 ml를 취하여 vial에 넣고 PPO/POPOP cocktail 10 ml와 Insta-Gel XF 3ml를 dispenser로 가하고 vortexing한 후 radioactivity를 측정하였다 (Scheme I).

결과 및 고찰

투여후 시간에 따른 각 장기의 분포특성과 소실 양상

Free MTX, MTX-BSA 공유결합체 및 항암제로 표면수식된 미립구로서 SAMS, SAMSF, SAMSC를 각각 마우스의 꼬리정맥에 투여한 후 폐, 간, 비장, 신장

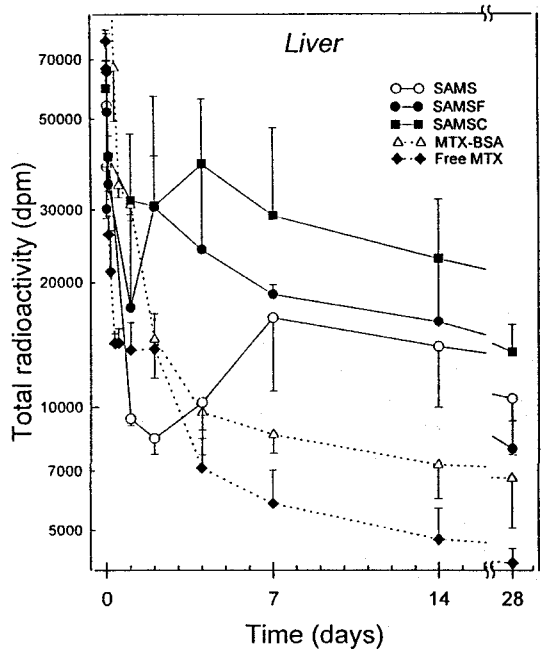


Figure 1—Mean total radioactivity - time curves in the liver after intravenous injection of free MTX, MTX-BSA conjugate, SAMS, SAMSF and SAMSC (mean±SD, n=4)..

등에 존재하는 약물량을 total radioactivity로 측정하였으며, 혈장 중의 약물농도를 측정하여 이 농도로부터 마우스의 체중 100 g당 총혈류량이 7.78 ml라는 문헌치¹³⁾를 이용하여 혈장중 약물량을 계산하였다. 이 데이터로부터 폐, 간, 비장, 신장 및 혈장 중의 total radioactivity-시간 곡선을 각각 Fig. 1 ~ Fig. 5에 나타내었다. Free MTX와 MTX-BSA 공유결합체는 모두 간에 가장 많이 분포하고, 그 다음 신장, 폐, 비장의 순서로 분포하였으며, MTX-BSA 공유결합체가 Free MTX보다 이들 장기에서 3~5배 더 많은 양이 분포하였고 서서히 소실되는 것을 볼 수 있었으며, 혈장중에서도 역시 MTX-BSA 공유결합체가 Free MTX보다 소실속도가 더 느렸다. 이 결과는 저자 등이 이미 보고한 바와 일치하였다.⁹⁾

항암제로 표면 수식한 미립구도 전체적인 분포양상은 저자 등이 이미 보고한 바와 유사하였다.¹⁰⁾ 즉, 초기에는 폐에 많이 분포하다가 시간이 지날수록 그 양은 빠른 속도로 감소하고, 간에서는 약물량이 서서히 감소되는 것을 볼 수 있으며, 비장에서의 약물도 서서히 감소되는데 이는 폐에 분포된 약물이 간이나 비장으로 재분포하기 때문이다. 투여 초기에 폐에 많은 양의 약

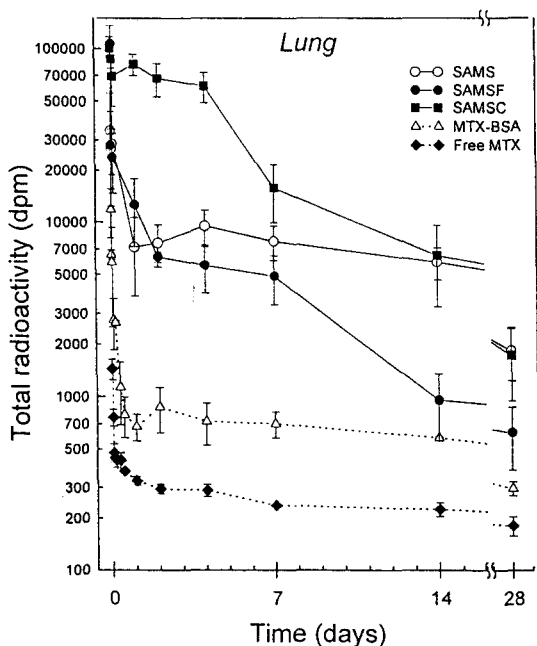


Figure 2—Mean total radioactivity - time curves in the lung after intravenous injection of free MTX, MTX-BSA conjugate, SAMS, SAMSF and SAMSC (mean±SD, n=4)..

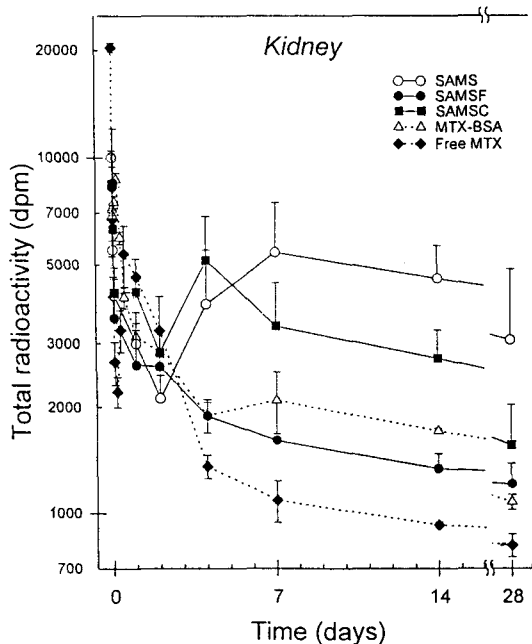


Figure 4—Mean total radioactivity - time curves in the kidney after intravenous injection of free MTX, MTX-BSA conjugate, SAMS, SAMSF and SAMSC (mean±SD, n=4)..

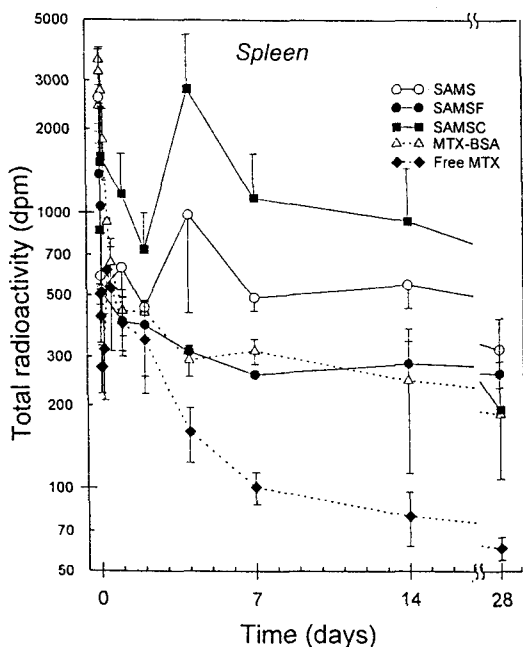


Figure 3—Mean total radioactivity - time curves in the spleen after intravenous injection of free MTX, MTX-BSA conjugate, SAMS, SAMSF and SAMSC (mean±SD, n=4)..

물이 분포하는 이유는 입자의 크기에 의한 결과로 보인다. 예를 들어, 공유결합체를 봉입한 미립구들의 경우 미립구가 약간 크기 때문에 4일 정도까지도 폐에 더 많이 분포하는 것을 볼 수 있다. 시간이 지날수록 각 장기에 분포하는 약물량은 간, 폐, 신장, 비장의 순서로 감소하며, 간에 분포하는 약물량은 서서히 감소하는 것을 알 수 있다.

미립구 투여시 폐에서의 약물량은 초기에는 매우 많은 양이 분포하다가 시간이 경과함에 따라 감소하는 경향을 나타내었으나(Fig. 2), 간(Fig. 1), 비장(Fig. 3) 및 신장(Fig. 4)에서의 약물량은 미립구 투여 초기 1~2일간은 약물의 양이 감소하였다가 그 후 다시 증가한 후 감소하는 양상을 나타내었는데, 다시 증가하는 이유는 초기에 폐에 분포한 약물이 다시 다른 장기로 재분포되기 때문이라 생각된다.

Fig. 1~Fig. 5의 total radioactivity-시간 곡선으로부터 구한 Free MTX, MTX-BSA 공유결합체 및 미립구들의 AUQ는 Table II와 같았다. Table II에서 보면 간에서의 AUQ 값은 SAMSF < SAMS << SAMSC의 순서로 나타났으며, 저자 등¹⁰⁾이 이미 보고한 표면수식되지 않은 미립구로서 내부에 free MTX

가 봉입된 알부민미립구(AMSF)와 내부에 MTX-BSA 공유결합체가 봉입된 알부민미립구(AMSC)의 AUQ 데이터를 합쳐서 비교해 볼 때에도 AMSF < SAMSF < SAMS < SAMSC < AMSC의 순서가 됨을 알 수 있다. 이는 미립구 내부에 봉입된 Free MTX의 소실속도가 가장 빠르고, 미립구 표면에 수식된 MTX의 소실속도가 그 다음이며, 미립구 내부에 봉입된 MTX-BSA 공유결합체가 가장 느리게 소실됨을 의

미하는데, 이 결과는 전보¹¹⁾의 in vitro 방출속도 순서인 (내부에 봉입된 free MTX) > (표면에 수식된 MTX) > (내부에 봉입된 MTX-BSA 공유결합체)의 결과와 일치한다. 미립구 내부에 봉입된 free MTX는 분해효소가 없어도 방출이 되는데 반하여, 미립구 표면에 수식된 MTX는 분해효소가 없을 경우에는 거의 방출되지 않을 뿐만 아니라 내부에 봉입된 MTX-BSA공유결합체 보다 방출이 빠른 특징이 있다.^{8,11)}

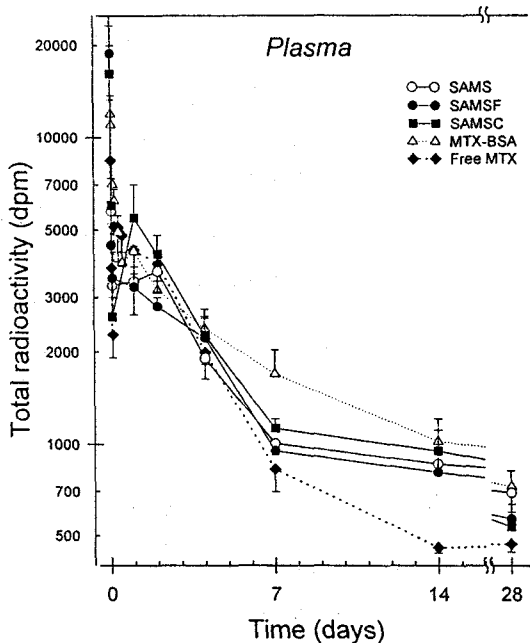


Figure 5— Mean total radioactivity - time curves in the plasma after intravenous injection of free MTX, MTX-BSA conjugate, SAMS, SAMSF and SAMSC (mean ± SD, n=4).

Table II— Area under the Amount (Total Radioactivity) of [³H]-MTX vs. Time Curve (AUQ_∞) from the Administration of Free MTX, MTX-BSA Conjugate and Microspheres.

Pre- paration	AUQ(×103 dpm · day)					Sum
	Liver	Lung	Spleen	Kidney	Plasma*	
Free MTX	150	7.35	2.85	30.5	25.5	216
MTX-BSA	494	24.1	15.8	80.9	55.6	670
SAMS	860	191	22.6	127	34.9	1240
SAMSF	744	91.2	27.7	114	32.4	1010
SAMSC	1040	515	26.7	113	38.4	1730
AMSF**	699	332	30.3	85.6	8.27	1160
AMSC**	1300	795	68.8	109	15.3	2290

* Total plasma volumes was considered as 7.78 ml per 100 g of body weight of mice.

** Data extracted from Kim, Hwang and Lee¹⁰⁾, 1993

MTX-BSA 공유결합체 및 표면수식된 미립구의 표적성

Table II의 AUQ 데이터로부터 free MTX투여시의 AUQ값을 기준으로 하여 계산한 각 장기에서의 중량평균 약물노출비 (R₀^{*}),를 Table III에 나타내었으며, 각 장기에서의 중량평균 표적효율 (T₀^{*})%을 Table IV에 나타내었다. Table III의 MTX-BSA 공유결합체를 보면, Free MTX보다 간에서의 중량평균 약물노출비가 3.3 배 증가하였고, 다른 장기에도 3 5배 정도의 증가되는 양상을 보였다. 각 장기에서의 중량평균 전 약물표적효율을 보면 간표적효율은 69.3%에서 73.3%로 증가하였으며(Table IV), 폐와 비장에서의 전 약물 표적효율은 약간 증가하였고 혈장에서는 약간 감소하였다. MTX의 부작용으로 알려진 신독성은 MTX-BSA 공유결합체의 투여시 Free MTX 보다 AUQ는 2.7 배 증가하였으나 신장표적효율은 14.1%에서 12.1%로 감소하였으므로 바람직한 현상이며 저자 등⁹⁾

Table III— Weighted-Average Relative Tissue Exposure (R₀^{*}), of Various Preparations to Free MTX

Pre- paration	(R ₀ [*]),					Sum
	Liver	Lung	Spleen	Kidney	Plasma	
MTX-BSA	3.3	3.3	5.5	2.7	2.2	3.1
SAMS	5.7	26.0	7.9	4.2	1.4	5.7
SAMSF	5.0	12.4	9.7	3.7	1.3	4.7
SAMSC	6.9	70.2	9.4	3.7	1.5	8.0

Table IV— Weighted-Average Overall Targeting Efficiency (T₀^{*}),

Preparation	(T ₀ [*]),				
	Liver	Lung	Spleen	Kidney	Plasma
Free MTX	69.3	3.40	1.31	14.1	11.8
MTX-BSA	73.7	3.59	2.36	12.1	8.29
SAMS	69.6	15.5	1.83	10.3	2.82
SAMSF	73.7	9.04	2.74	11.3	3.21
SAMSC	60.6	29.7	1.54	6.52	2.22

이 이미 보고한 결과와 일치한다.

Table III의 미립구의 결과를 보면, 간에서의 (R_e^*)는 5~7배 증가하였다. 또, 각 장기에서의 AUQ도 많이 증가한 것을 볼 수 있다. free MTX가 봉입된 미립구(SAMSF)의 경우 공유결합체가 봉입된 미립구(SAMSC)보다 낮은 R_e^* 를 보이는데 이는 초기에 burst out effect에 의한 결과로 보여진다. SAMSC 미립구를 투여한 경우 SAMS 또는 SAMSF 미립구보다 폐에서의 R_e^* 가 많이 증가하였는데 이는 전보¹¹⁾에서 보고한 입자도의 차이에 기인한 결과로 생각된다 (평균직경: SAMS=6.8 μ m, SAMSF=5.4 μ m, SAMSC=7.7 μ m). MTX는 신장독성이 많은 약물 중의 하나인데, 공유결합체와 미립구 투여시 신장에서의 AUQ가 free MTX에 비하여 더 크지만 다른 장기와 비교해보면 그 증가율은 낮았고, 중량평균 전약물신장 표적효율 (T_e^*)_{kidney}이 free MTX의 경우 14.1%이었으나 SAMSC 미립구의 경우에는 6.52%로 감소하므로 상대적으로 신장독성을 줄일 수 있으리라 생각된다. 또한, 혈장중 약물량은 free MTX에 비하여 MTX-BSA 공유결합체의 경우 소실속도가 가장 느렸으며 (Fig. 5), AUQ값을 비교해 볼 때 MTX-BSA의 경우 2.2배, 미립구의 경우 1.3~1.5배로 free MTX에 비해서는 약간 증가하였다(Table II 및 III).

간세포로의 표적성

Free MTX, MTX-BSA 공유결합체, SAMS, SAMSF, SAMSC 미립구를 투여하여 1 시간 후와 1 일 후에 hepatocyte와 Kupffer cell을 분리하여 그 중에 있는 약물량을 정량한 후, 총세포 중에 함유된 약물량으로 계산한 결과 Fig. 6과 같았다. Fig. 6에서 보는 바와 같이, 1 시간 후에는 공유결합체의 경우가 hepatocyte에 가장 많이 분포하였는데, 이는 미립구는 입자성이지만 공유결합체는 고분자로서 수용성이므로 크기가 작아 Kupffer cell에서 hepatocyte로 빨리 이행되다 때문이라 생각된다. 투여후 1시간에서 미립구들은 hepatocyte와 Kupffer cell에서의 약물량에는 큰 차이가 나지 않았다. 1일 후에는 Free MTX, MTX-BSA 공유결합체의 hepatocyte와 Kupffer cell에서의 약물량이 크게 감소하였는데, 이는 약물의 체내 소실속도가 미립구에 비해 전체적으로 빠르기 때문이라 생각되며, 미립구에 비해 hepatocyte와 Kupffer cell에서의 약물량은 적지만 현저히 적지는 않았는데 그 이유는 미립구의 경우 폐와 같은 다른 장기에 상당히 많은 양이 분포되어 있기 때문이라 생각된다. 미립구의 경우

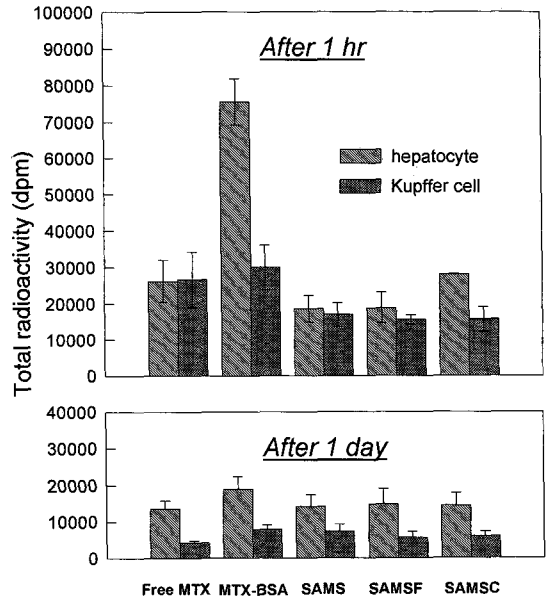


Figure 6—Mean total radioactivity in the hepatocyte and Kupffer cell at 1 hr and 1 day after intravenous injection of free MTX, MTX-BSA conjugate, SAMS, SAMSF and SAMSC (mean±SD, n=4).

1시간 후와 1일 후를 비교했을 때 hepatocyte에서 별로 줄지 않았는데 아마도 Kupffer cell에 잡혀 있던 약물이 hepatocyte로 이행되었으리라는 추측을 할 수 있다. 간장에는 세망내피계 세포인 Kupffer cell이 혈관벽의 내측에 정착하고 있다. 따라서 혈관의 공간으로 유출되지 않는 미립자도 Kupffer cell에 잡혀서 간장에 들어가게 된다. 그러므로, 미립구의 형태로 약물을 투여할 경우 초기에는 Kupffer cell에 의해 잡혀 있다가 시간이 지날수록 서서히 hepatocyte로 이행되리라는 예측을 할 수 있다. 그리고, 간은 약 70%의 parenchymal cells (hepatocytes)과 30~40%의 non-parenchymal cell (endothelial cell, Kupffer cell)로 구성되어 있으므로¹²⁾, 미립구 투여시 양쪽 세포 중의 약물 농도로 비교해 보면 Kupffer cell중의 농도가 hepatocyte중의 농도에 비해 1시간 후에는 2-3배 더 높았으며, 1일 후에는 비슷하거나 약간 더 높다는 것을 알 수 있다.

결론

미립구 투여시 입자크기에 따라 차이가 있으나 60~75%가 간으로 표적되었으며, 간으로 표적된 약물은 Kupffer cell에 고농도로 분포하였다가 시간이 경과할

수록 hepatocyte로 이행함을 알 수 있었다. *in vitro* 방출시험과 *in vivo* 실험을 통하여 알부민미립구 표면에 수식된 MTX는 미립구 내부에 봉입된 free MTX보다 느리게 방출 및 소실되었으며, 미립구 내부에 봉입된 MTX-BSA 공유결합체보다는 신속하게 방출 및 소실되었다. 미립구 내부에 봉입된 free MTX는 분해효소가 없어도 방출이 되는데 비하여, 미립구 표면에 수식된 MTX는 분해효소가 없을 경우에는 거의 방출되지 않을 뿐만 아니라 내부에 봉입된 MTX-BSA공유결합체 보다 방출이 빠른 특징이 있다. 이 연구에서 알부민미립구 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 수 있는 약물수송체가 될 것으로 예상된다.

감사의 말씀

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

문 헌

- 1) 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).
- 2) 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).
- 3) S. Pande, S. Vyas and V.K. Dixit, Preparation, characterization and performance evaluation of neomycin-HSA microsphere. *J. Microencapsulation*, **7**(2), 155-165 (1990).
- 4) S.K. Pande, S.P. Vyas and V.K. Dixit : Hydroxy-urea bearing albumin microspheres - Preparation, characterization and evaluation. *J. Microencapsulation*, **8**(1), 9-19 (1991).
- 5) 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).
- 6) S.J. Hwang, Preparation and targetability of albumin microspheres, *Pharmacol.*, **21**(4), 517-529 (1991).
- 7) 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).
- 8) 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).
- 9) 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).
- 10) 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).
- 11) S.J. Hwang, H.B. Jo, G.J. Rhee and C.-K. Kim, Preparation and characteristics of surface-modified albumin microspheres with methotrexate, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **25**(2), 101-108(1995).
- 12) J.G. Lewis and J.A. Swenberg, Differential repair of O⁶-methylguanine in DNA of rat hepatocytes and nonparenchymal cells, *Nature (London)*, **288**, 185 (1980).
- 13) 이영순, 실험동물의학, p158, 서울대학교 출판부, 서울, (1989).