

장기표적용 약물수송체의 개발에 관한 연구(제 3보)
알부민 미립구를 이용한 Adriamycin 의 간 표적용
수송체에 관한 *in vitro* 연구

김종국[†]·황성주·양지선*
서울대학교 약학대학
*국립보건안전연구원 일반약리학
(1989년 11월 20일 접수)

Development of Specific Organ-Targeting Drug Delivery System (III)
In Vitro Study on Liver-Targeting Adriamycin Delivery System using Human
Serum Albumin Microspheres

Chong-Kook Kim[†], Sung-Joo Hwang and Ji-Sun Yang*

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

*Division of General Pharmacology, National Institute of Safety Research, Seoul 122-020, Korea

(Received November 20, 1989)

In attempt to improve the chemotherapeutic activity of adriamycin, adriamycin-entrapped HSA microspheres were prepared and investigated by the various *in vitro* experiments. The shape, surface characteristics and size distribution of HSA microspheres are observed by scanning electron microscopy. The *in vitro* drug release, albumin matrix degradation by protease of HSA microspheres were studied. The shape of HSA microspheres were spherical and the surface was smooth and compact. The size of HSA microspheres ranged from 0.4 to 2.5 μm and have average diameters of 0.5 to 0.7 μm . The size distribution of HSA microspheres prepared by ultrasonication was mainly affected by albumin concentration and heating time in the process of hardening. In *in vitro*, almost all adriamycin was released from HSA microspheres for 8 hr. Analysis of the resulting adriamycin release profiles demonstrated that adriamycin is released from the microspheres in two distinct steps, a fast phase (until 30 min) followed by a much slower sustained release phase. Drug release, which is due to diffusion, was depended on the rate of matrix hydration. Drug release was largely affected by albumin concentration and heating temperature during the process of hardening. Albumin matrix degradation of HSA microspheres was affected by heating temperature and albumin concentration. Higher temperature and longer times generally produce harder, less porous, and slowly degradable microspheres.

Keywords— Human serum albumin, Drug delivery system, Adriamycin, Cottonseed oil, Size distribution, Labeling of adriamycin with ³H, Preparation of albumin microspheres, Drug release from albumin microspheres, Albumin microsphere matrix degradation by protease.

질병의 치료를 위하여 약물을 투여할 경우 목적 부위에 치료농도 만큼의 약물을 보내는 것이 필요하다. 약물이 목적 부위에 선택적으로 도달하여

그 약효를 나타내고 다른 부위에 대한 부작용이 없다면 치료효과가 크게 상승할 것이다.

이론적으로 target selectivity는 2가지 방법,

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

즉 differential sensitivity와 differential accessibility로 얻을 수 있다. Differential sensitivity는 새로운 약물의 개발에 의해 얻어지고, differential accessibility는 약물 수송체를 통해 얻어진다.¹⁾ 지금까지 약물의 specificity를 높이고자 하는 시도는 약물분자의 변형, 투여경로의 변화, 투여계획의 조절, 약물 조절체의 체내이식 등으로 계속되어 왔으며, 최근 약물 수송체를 이용하는 연구가 활발히 진행 중이다.²⁻⁴⁾

특정장기에의 선택적 분포 및 약물방출조절을 주 목적으로 하는 약물 수송체인 알부민 미립구는 미립구 속에 봉입되는 약물의 종류, 제조법, 미립구의 크기, 약물 봉입율, 방출 양식, 약물 및 미립구의 안정성 등 여러 약제학적 요인을 고려하여 다각적으로 연구되어 왔다.⁵⁾

알부민 미립구는 그 용도에 따라 진단용과 약물 수송용으로 나눌 수 있다. 1968년 Zolle 등⁶⁾이 최초로 방사성 알부민 미립구를 체순환 진단에 사용한 이래 방사성 알부민 미립구는 혈액순환의 진단 및 폐 scan에 일반적으로 사용되고 있다.⁷⁻¹⁰⁾ 알부민 미립구는 1974년 Kramer^{11,12)}가 약물 수송체로서의 가능성을 검토한 바 있으며 1980년 Sugibayashi 등은 플루오로우라실 등의 항암제를 알부민 미립구에 봉입시켜 암세포 조직 투과성을 실험하였다.¹³⁻¹⁵⁾ 또한 선택 부위로의 specificity를 높이기 위해 친수성 알부민 미립구¹⁶⁾ 및 자기성 알부민 미립구¹⁷⁻²⁰⁾의 개발이 연구되었다.

알부민 미립구는 물리·화학적으로 안정하고, 생체 적합성과 생체 분해성이 있으며, 다양한 약물을 적용시킬 수 있고, 주사시 현탁이 가능하며 scale up이 용이한 장점이 있다.²¹⁾

Adriamycin은 anthracyclic group을 가진 항암성 항생제이다. 1969년 암치료에 쓰이기 시작한 adriamycin은 단독 또는 다른 화학요법제와 병용하여 사용되고 있다.²²⁾ Adriamycin은 정맥 주사 후 혈중에서 빠른 속도로 소실되어 간, 비장, 신장, 폐, 심장 등에 널리 분포된다.²³⁾ Adriamycin은 체내 분포용적은 크고 대사속도는 느리다.²⁴⁾ Adriamycin의 여러 독성을 가지는데, 특히 심장독성의 부작용이 크다.^{25,26)} Adriamycin은 광범위한 항암 활성을 가지고 있으나, 그 치료

효과가 축적시 나타나는 심장독성에 의해서 제한을 받으므로, 본 연구에서는 사람 혈청알부민 미립구에 adriamycin을 봉입하여 특정 장기에의 표적화를 위해 *in vitro* 실험을 행하였다.

각기 다른 여러 제조조건에서 adriamycin을 봉입시킨 사람 혈청알부민 미립구를 제조하고, 알부민 미립구의 크기, 약물 봉입효율, 약물방출 양식, 단백질분해효소에 의한 알부민 미립구 기질의 분해 정도를 검토하였다.

실험방법

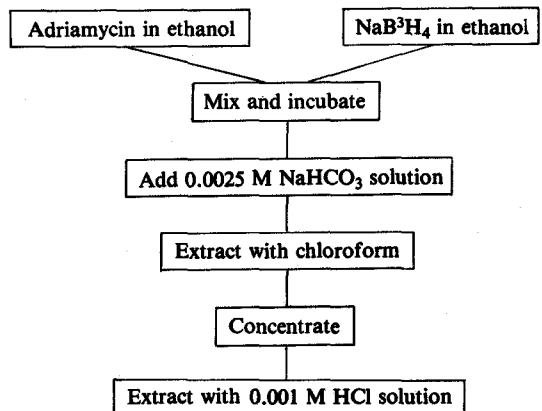
시약 및 기기

Adriamycin은 일동제약, 사람 혈청알부민 fraction V는 Sigma 사, 단백질분해효소는 동아제약, ³H-표지화 sodium borohydride(NaB³H₄, 25 mCi)는 Amersham Internationale Place에서 구입하여 사용하였고, 그 외 다른 시약은 모두 특급 시약을 사용하였다.

Liquid scintillation counter(Packard Instrument Inc.), 주사형 전자현미경(Jeol JSM-35), 원심분리기(Beckman Instruments Inc.), 초음파기(Lab-line Instruments Inc.)를 사용하였다.

Adriamycin의 ³H 표지화

Adriamycin은 Georges 등²⁷⁾의 방법에 의해 Scheme 1과 같이 조작하여 ³H으로 표지화하였다.



Scheme 1—Schematic diagram of labeling of adriamycin with ³H.

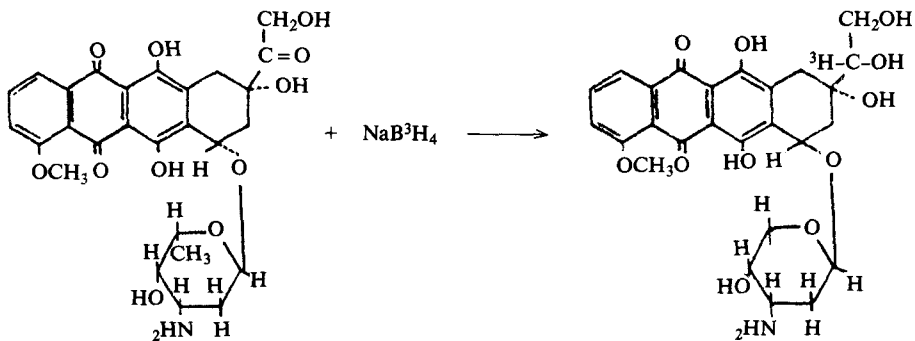
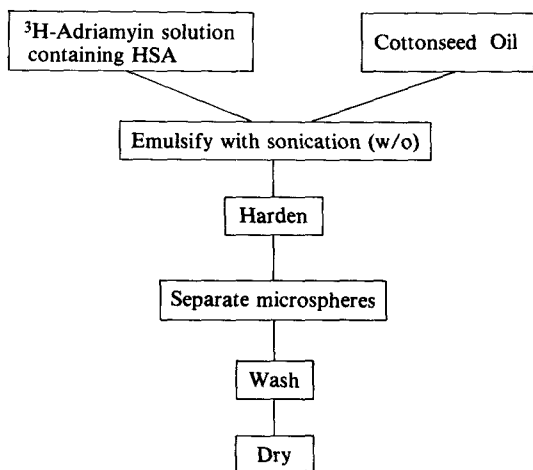


Figure 1—Labeling of adriamycin with ^3H .



Scheme 2—Schematic diagram of preparation of human serum albumin microspheres.

즉, sodium borohydride을 사용한 환원반응에 의해 Fig. 1과 같이 표지화되었다. ^3H 으로 표지화된 adriamycin은 박층 크로마토그래피, 자외선 분광광도계에 의해 분리 확인하였다.

사람 혈청알부민 미립구의 제조

Adriamycin을 봉입시킨 사람 혈청알부민 미립구를 Scheffel 등²⁸⁾의 방법을 변형시켜 열변성에 의해 제조하였다(Scheme 2).

알부민 미립구의 제조조건은 Table I과 같고 제조한 알부민 미립구는 냉동건조하여 4°C 에 보관하였다.

알부민 미립구의 크기 및 표면성질은 전자현미경으로 관찰하였다.

Adriamycin 봉입효율 측정

알부민 미립구의 기질분해에 따른 ^3H -adri-

Table I—Seven Conditions of HSA Microspheres Preparation.

HSA concentration (mg/ml)	Heating temperature ($^\circ\text{C}$)	Heating time (min)
300	170	50
300	170	30
300	170	10
300	140	30
300	110	30
500	140	30
200	140	30

amycin의 방출량을 liquid scintillation counter로 측정하였다. 알부민 미립구 10 mg을 5% 염산 10 ml에 넣고 25°C 에서 24시간 동안 배양하면서 관찰하였다.

In Vitro 약물방출시험

알부민 미립구 10 mg을 등장 인산염완충액 30 ml에 현탁시켜 자석식 교반기를 사용하여 3000 rpm으로 저으면서 실험하였다. 검체는 각 시간별로 취해 여과하고, 여액을 liquid scintillation counter로 분석하였다. 실험은 37°C 에서 행하였다.

In Vitro 약물방출에 미치는 단백질분해효소의 영향

알부민 미립구 10 mg을 30 ml 등장성 인산염완충액에 현탁시킨 다음, 10 mg의 단백질분해효소를 가하고, *in vitro* 약물방출시험에서와 같은 방법으로 방출된 약물을 정량하였다.

실험결과 및 고찰

알부민 미립구의 물리화학적 성질

전자현미경으로 관찰한 알부민 미립구의 형태는 구형이며, 그 표면은 매끄럽고 치밀하였다. 알부민 미립구가 완전히 건조되지 않을 경우는 응집이 일어나므로 알부민 미립구는 동결 건조를 통하여 완전히 수분을 제거하였다. 알부민 미립구를 에탄올이나 에테르에 현탁시켰을 때 처음의 형태와 크기를 그대로 유지하였으며, 수중에 현탁시킬 경우는 약간의 팽윤현상이 일어났으나 그 형태는 그대로 유지되었다. 알부민 미립구 표면의 성질은 경화온도와 경화시간에 영향을 받아서 고온에서 오래 가열한 것의 표면이 더 매끄럽고 치밀하였다.

알부민의 크기 분포

Phagocytic activity에 중요한 영향을 미치는 알부민 미립구의 크기는 여러 제조조건에 따라 변화하였다.²⁹⁾ 알부민 미립구의 크기 분포는 유화과정에서의 분산력에 따라 큰 영향을 받았다. 본 실험에서는 초음파에 의해 분산력을 조절하여 비교적 분포도가 좁은 크기의 알부민 미립구를 얻고, 또 다른 사람 혈청알부민의 농도와 경화시간 및 온도가 크기에 미치는 영향을 검토하였다 (Fig. 2-4). 알부민 미립구의 평균직경은 0.5-0.7 μm 이었다. 알부민 농도가 200에서 300 mg/ml로 높아질 때는 크게 변화가 없었으나 500 mg/ml

일 때는 0.56 μm 에서 0.70 μm 로 크기가 커졌다. 이것은 알부민 농도가 증가함에 따라 야기된 점도의 증가가 유화과정에서 좀 더 작은 크기의 알부민 droplet으로 분리되는 것을 막기 때문이라고 생각된다. 또한 경화온도가 높고 경화시간이 길수록 기계적 분산과 변성의 정도가 커짐으로, 알부민 미립구의 크기는 작고, 분포도도 좁은 것으로 나타났다. 경화온도 110°C와 140°C간의 차이는 140°C와 170°C의 차이보다 훨씬 컸으며 10분과 30분의 차이가 30분과 50분의 차이보다 훨씬 컸다. 이 때 제조된 알부민 미립구의 크기는 정맥주사하

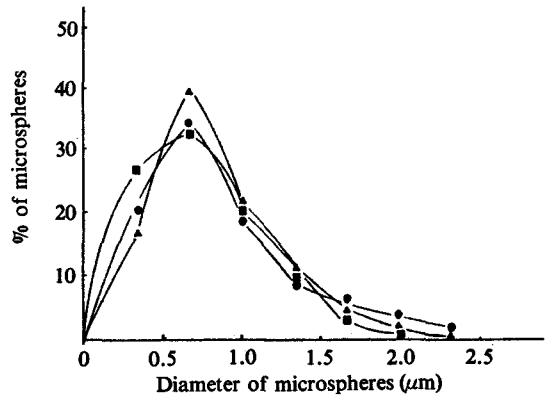


Figure 3—Size distribution of microspheres. Constant albumin concentration (300 mg/ml) and heating time (30 min), with heating temperature varied. Key: \blacktriangle , 170°C; \blacksquare , 140°C; \bullet , 110°C.

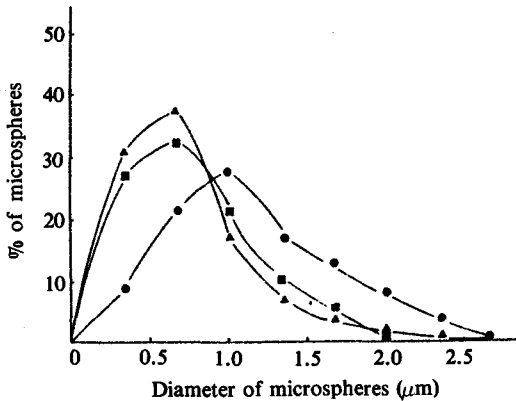


Figure 2—Size distribution of microspheres. Constant heating temperature (140°C) and time (30 min), with albumin concentration varied. Key: \blacktriangle , 200 mg/ml; \blacksquare , 300 mg/ml; \bullet , 500 mg/ml

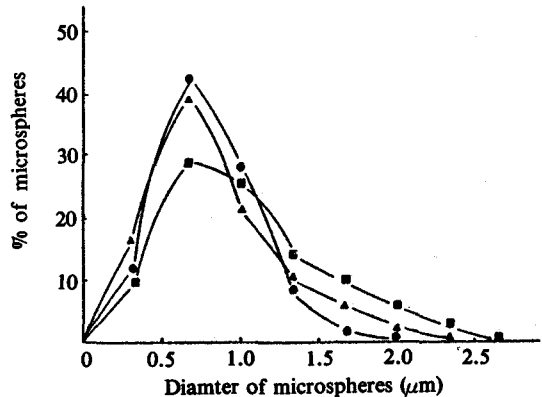


Figure 4—Size distribution of microspheres. Constant albumin concentration (300 mg/ml) and heating temperature (170°C), with heating time varied. Key: \bullet , 50 min; \blacktriangle , 30 min; \blacksquare , 10 min.

Table II—Relationship between the Preparation Condition of HSA Microspheres and Amount of ³H-Adriamycin Entrapment.

Preparation condition			
HSA (mg/m)	Heating temp.(°C)	Heating time (min)	Entrapment (%)
300	170	50	36.76
300	170	30	44.10
300	170	10	44.48
300	140	30	37.53
300	110	30	37.32
500	140	30	46.30
200	140	30	35.74

여 reticuloendothelial system 으로 uptake 되기에 적당한 것으로 생각된다.

Adriamycin 의 봉입효율

Adriamycin 의 분해온도는 204-205°C 이다. 본 실험에서 알부민 미립구를 제조시, adriamycin 은 분해되지 않는 것으로 나타났다. 또한, adriamycin 은 물, 메탄올 등에는 잘 용해하고, 아세톤, 클로로포름, 벤젠 등에는 거의 용해하지 않으므로, 본 조건에서 알부민 미립구에 adriamycin 을 봉입시킬 경우 약물의 손실은 거의 없다.

Adriamycin 의 봉입효율은 제조된 알부민 미립구의 알부민 기질분해 및 adriamycin 의 추출에 따라 구하였다. 각 제조조건에 따른 adriamycin 의 총 봉입율은 Table II와 같다.

총 봉입율은 약 35-46%이었으며 알부민 농도가 높을수록, 경화온도가 낮고 경화시간이 짧을수록 커졌다. 약물의 봉입효율은 여러 제조조건에 의해서 뿐만 아니라 약물 자체의 용해도, 단백질결합 친화성, 분자량 등에 의해서도 영향을 받는다.¹¹⁾

In Vitro 에서의 약물방출

약물의 방출 media 상에서 *in vitro* 로 실험하였을 때 8시간까지 방출되었으며, 그 후에는 거의 방출이 없었다. 알부민 미립구 내의 약물의 방출은 2단계로 진행이 되는데, 처음 30-60분까지는 빠른 방출속도를 보이고, 그 이후에는 서서히 방출되었다. 초기의 빠른 방출은 알부민 미립구의

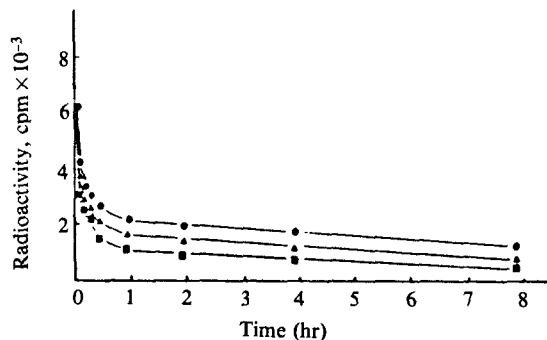


Figure 5—Effect of albumin concentration in the microsphere preparation on the drug release from HSA microspheres prepared at 140°C in 30 min.

Key: ●, 500 mg/m; ▲, 300 mg/m; ■, 200 mg/m.

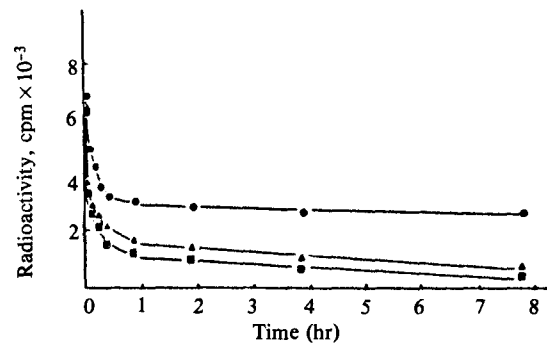


Figure 6—Effect of heating temperature in the microsphere preparation on the drug release from HSA microspheres prepared using 300 mg/m/ albumin solution in 30 min.

Key: ●, 170°C; ▲, 140°C; ■, 110°C.

표면 가까이에 있던 약물이 나오는 것이고, 그 이후의 느린 방출은 알부민 미립구 내부에 봉입되어 있던 약물이 방출되는 것으로 생각된다.

Fig. 5-7에서 나타난 것처럼, 모든 알부민 미립구 내의 adriamycin 은 2상으로 방출되는 양상을 나타내었다.

경화시간이 길고, 경화온도가 높을수록 미립구 표면에 느슨하게 붙어있는 adriamycin 의 양이 적어서 초기의 방출속도는 느려진다. 방출 시험 후 알부민 미립구의 형태가 유지되는 것으로 보아 약물의 방출은 기질의 파괴에 의한 것보다 기질의 수화작용에 의해 일어난다. 즉 알부민 미립구 내의 약물은 수화된 알부민 미립구 기질속에 있는 작은

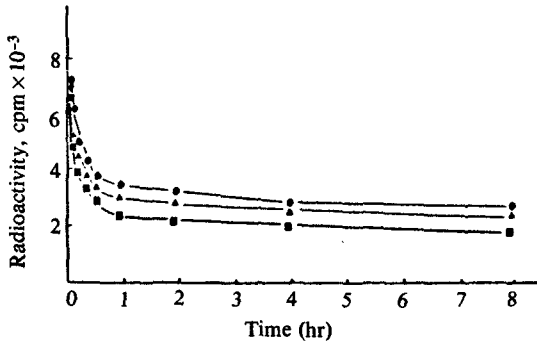


Figure 7—Effect of heating time in the microsphere preparation on the drug release from HSA microspheres prepared using 300 mg/ml albumin solution at 170°C.
Key: ●, 50 min; ▲, 30 min; ■, 10 min.

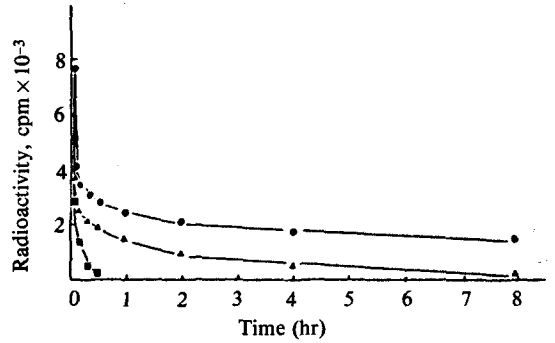


Figure 9—Effect of heating temperature on the *in vitro* protease digestion of HSA microspheres prepared using 300 mg/ml albumin solution in 30 min.
Key: ●, 170°C; ▲, 140°C; ■, 110°C.

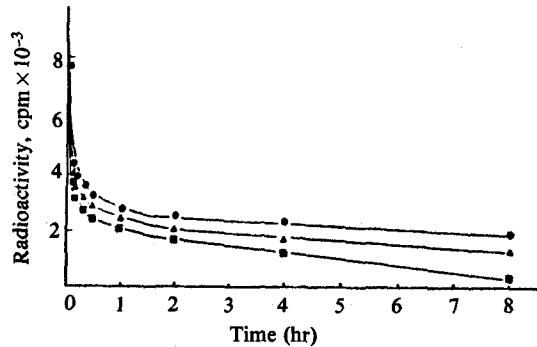


Figure 8—Effect of heating time on the *in vitro* protease digestion of HSA microspheres prepared using 300 mg/ml albumin solution at 170°C.
Key: ●, 50 min; ▲, 30 min; ■, 10 min.

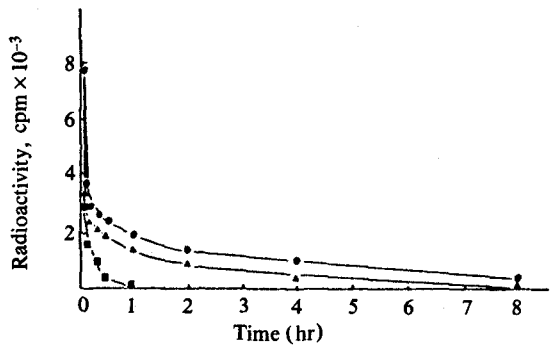


Figure 10—Effect of albumin concentration on the *in vitro* protease digestion of HSA microspheres prepared at 140°C in 30 min.
Key: ●, 500 mg/ml; ▲, 300 mg/ml; ■, 200 mg/ml.

세공이나 channel을 통해서 일어난다. 경화온도가 높을수록, 방출속도가 느려지는 것은 기질의 다공성 감소와 channel의 폭로도의 증가에 의한 것으로 생각된다. 경화시간이 방출속도에 미치는 영향이 적은 것은 충분히 높은 온도에서 경화한 것 때문이다. 알부민 농도가 높을수록 방출이 느린 것은 기질의 밀도와 점도의 증가가 공극률을 감소시켜서 생긴다고, Ishizaka 등³⁰⁾이 보고하였다.

단백분해효소에 의한 알부민 미립구 기질의 분해

알부민 미립구 기질은 단백분해효소(protease)에 의해서 분해된다. 알부민 미립구를 현탁시킨 용액에 단백분해효소를 가하면 알부민 미립구 기질이 분해됨에 따라 현탁액의 탁도가 감소된다.²⁹⁾

Fig. 8-10에서 보듯이 170°C에서 제조된 알부민 미립구는 경화시간에 관계없이 모두 단백분해효소에 의한 분해가 어려웠다. 반면, 경화온도는 단백분해효소의 작용에 크게 영향을 미쳤다. 110°C에서 제조된 알부민 미립구는 30분만에 분해가 완결된 반면, 140°C에서 제조된 알부민 미립구에서는 1시간만에 75%, 170°C에서 제조된 것에서는 3시간만에 75%의 adriamycin이 방출되었다. 알부민 농도가 단백분해효소의 분해에 미치는 영향은 200 mg/ml의 저농도에서 두드러져, 1시간만에 분해가 완결되고, 고농도의 경우에 비해 분해가 매우 용이하였다.

이상의 것으로 볼 때 체내에 알부민 미립구가 투여되면, lysosome 효소에 의해 분해되므로, 그

분해 및 약물의 방출은 알부민 미립구의 제조온도에 의해 조절될 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

알부민 농도, 경화온도 및 시간을 변화시켜 adriamycin을 봉입시킨 사람 혈청알부민 미립구를 만든 후 제조된 사람 혈청알부민 미립구의 *in vitro* 상의 물리·화학적 특성을 검토하였다.

1. 초음파법으로 제조된 사람 혈청알부민 미립구의 크기는 0.5-0.7 μ m이었으며 이 크기분포는 알부민의 농도와 경화시간에 영향을 받았다.

2. adriamycin의 총 봉입효율은 약 35-46%였으며 알부민 농도가 높을수록 컸다.

3. *in vitro* 상의 adriamycin의 방출은 초기의 빠른 방출과 그 후의 느린 방출로 나타났으며, 방출 정도와 속도는 경화온도와 알부민 농도에 영향을 받았다.

4. 단백질분해효소에 의한 알부민 미립구의 기질 분해는 110°C에서 제조된 경우는 30분만에 분해가 완결된 반면, 그 이상의 온도에서 경화한 것은 매우 느렸다.

감사의 말씀

본 연구는 1986-1989년도 한국과학재단의 목적기초연구비 지원에 의해 이루어졌음을 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) G. Mosby, *Medical pharmacology*, 9th ed., The C.V. Mosby Company, Sant Louis U.S.A. (1978)
- 2) K.J. Widder, A.E. Senyei and B. Sears, *Experimental methods in cancer therapeutics*, *J. Pharm. Sci.*, **71**, 379 (1982)
- 3) Y.W. Chien, *Novel drug delivery systems*, Marcel Dekker Inc. (1982)
- 4) G. Gregoriadis, *Drug carriers in biology and medicine*, Academic Press, London (1981)
- 5) E. Tomlinson, J.J. Burger, E.M.A. Schoon-

derwoerd and J.G. Mcvje, Human serum albumin microspheres for intraarterial drug targeting of cytostatic compounds. *Pharmaceutical aspects and release characteristics, Microspheres and Drug Ther.*, **75**, 75 (1984)

- 6) I. Zolle, B.A. Rhodes and H.N. Wager, Properties and uses of radioactive albumin microspheres, *J. Nucl. Med.*, **9**, 363 (1968)
- 7) M.A.A. AL-Janabi and S.O. Moussa, J. of Radioanal; Labelling of human serum albumin millimicrospheres (HAMM) with 99m Tc, *Nucl. Chem.*, **88**(2), 403 (1985)
- 8) M.A.A. AL-Janabi, H.Y. Ali and A.M. Al-Salen, Preparation, analysis and application of [99m Tc] human albumin microspheres ([99m Tc] HAM) for lung scanning, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, **35**(3), 209 (1981)
- 9) D.R. Turton, F. Brady, V.W. Pike, A.P. Selwyn, M.J. Shea, R.A. Wilson and C.M. De Landsheere, Preparation of human serum [methyl-¹⁴C] methyl albumin microspheres and human serum [methyl-¹⁴C] methylalbumin for clinical use, *Int. I. Appl. Radiat. Isot.*, **35**(5), 337 (1984)
- 10) J.J. Burger, E. Tomlinson, J.E. De Roo and J. Palmer, Technetium-99m labeling of albumin microspheres intended for drug targeting, *Methods in Enzym.*, **112**, 43 (1985)
- 11) P.A. Kramer, Albumin microspheres as vesicles for achieving specificity in drug delivery, *J. Pharm. Sci.*, **63**, 1646 (1974)
- 12) P.A. Kramer and T. Burnstein, Phagocytosis of microspheres containing an antitumor agent by tumor cells *in vitro*, *Life Sci.*, **19**, 515 (1976)
- 13) K. Sugibayashi, Y. Morimoto, T. Nadai and Y. Kato, Drug-carrier property of albumin microspheres in entrapped 5-fluorouracil in mice, *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 3433 (1977)
- 14) K. Sugibayashi, Y. Morimoto, T. Nadai and Y. Kato, A. Hasegawa and T. Arita, Drug-carrier property of albumin microspheres in chemotherapy II. Preparation and tissue distribution in mice of microsphere-entrapped 5-fluorouracil, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 204 (1979)

- 15) K. Sugibayashi, M. Akimoto, Y. Morimoto, T. Nadai and Y. Kato, Drug-carrier property of albumin microspheres in chemotherapy IV. Antitumor effect of single-shot or 5-fluorouracil on Ehrlich Ascites or solid tumor in mice, *J. Pharm. Dyn.*, **2**, 305 (1979)
- 16) C.K. Kim and Y.K. Oh, Development of hydrophilic human serum albumin microspheres using a drug-albumin conjugate, *Int. J. Pharm.*, **47**, 163 (1988)
- 17) Y. Morimoto and S. Fujimoto; Albumin Microspheres as drug carriers, *CRC Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier System*, **2**(1), 19 (1985)
- 18) Y. Morimoto, M. Akimoto, K. Sugibayashi, T. Nadai 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.*, **28**, 3087 (1980)
- 19) Y. Morimoto, K. Sgibayashi and Y. Kato, Biomedical applications of magnetic fluids. II Preparation and magnetic guidance of magnetic albumin microsphere for site specific drug delivery *in vivo*, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 1433 (1981)
- 20) E. Senyei, C.F. Driscall and K.J. Widder, Biophysical drug targeting, Magnetically responsive albumin microspheres, *Methods in Enzymol.*, **112**, 956 (1985)
- 21) R.S. Benjamin, P.H. Wiernik, D.H. Huffman and N.R. Bachur, Clinical and biochemical studies of intermittent adriamycin and daunorubicin dosage schedules in solid tumor patients, *Clin. Res.*, **20**, 563 (1972).
- 22) G. Bonadonna, S. Monfardini, M. Delena, F. Fossatibellani and G. Beretta, *Phase I and preliminary phase II evaluation of adriamycin* *Cancer Res.*, **30**, 2572 (1970)
- 23) G. Difronzo, Distribution and metabolism of adriamycin in mice, *Eur. J. Clin. Biol. Res.*, **16**, 572 (1971)
- 24) G. Difronzo, Distribution and excretion of adriamycin in mice, *Biomedicine*, **19**, 169 (1973)
- 25) T.S. Herman, K.J. Henle, W.A. Nagle, A.J. Moss and T.P. Monson, Effect of step-down heating on the cytotoxicity of adriamycin, bleomycin and cisdiamminedichloroplatinum, *Cancer Res.*, **44**, 1823 (1984)
- 26) E. A. Lefrak, S. Rosenheim, J. Pitha and J.A. Fottleib, A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity, *Cancer*, **32**, 304 (1973)
- 27) Societe des Usines chimiques Phone-poulenc; Fr. Demande 2, 160, 716, 10 Aug (1973).
- 28) U. Scheffel, B.A. Rhodes, J.K. Natarjan and H.N. Wagner, Albumin microspheres for study of the reticuloendothelial system. *J. Nucl. Med.*, **13**, 498 (1972).
- 29) C.K. Kim, E.J. Jeong, J.S. Yang, S.H. Kim and Y.B. Kim, Development of specific organ-targeting drug delivery system I: Physico-pharmaceutical characteristics of thermally denatured albumin microspheres containing cytarabine., *Arch. Pharm. Res.*, **8**(3), 159 (1985).
- 30) T. Ishizaka and M. Koishi, *In vitro* drug release from egg albumin microcapsules, *J. Pharm. Sci.*, **72**, 1057 (1983).