

마약길항제의 방출 제어형 제제 (제2보): 나록손 이식제제의 생체적합성 및 약물속도론적 평가

문미란 · 박주애 · 이승진 · 김형국* · 김길수

이화여자대학교 약학대학 · *국립보건원

(1995년 2월 10일 원고접수)

Controlled Release Dosage Form of Narcotic Antagonist(II) : Biocompatibility and Pharmacokinetics of Naloxone Implant

Mi-Ran Moon, Joo-Ae Park, Seung-Jin Lee, Hyung-Kuk Kim* and Kil-Soo Kim†

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

*National Institute of Health, Seoul 122-020, Korea

(Received February 10, 1995)

For the effective administration of narcotic antagonist, the application of sustained release implantable systems with biodegradable polyphosphazene was examined. Using poly[(diethyl glutamate)-co-(ethyl glycinate) phosphazene], the implantable devices containing naloxone hydrochloride were prepared and *in vivo* implantation studies were carried out subcutaneously in rat and rabbit with this preparation for the biocompatibility and pharmacokinetics. The histological finding in rats at initial time period was the inflammation that occurred focally around the implants, but they were showed subsequent mild and limited chronic inflammations and the irreversible changes such as necrosis and degeneration of the muscle or connective tissues were not observed. Therefore the placebo and naloxone implants are considered to be biocompatible formulations histologically. In pharmacokinetic studies, the release of naloxone from the naloxone implants into blood plasma was maintained in 192 hours, but the initial burst effect was observed. If this problem was solved, the application for the narcotic antagonist sustained release systems can be expected.

Keywords—Narcotic antagonist, Biodegradable polyphosphazene, Biocompatibility, Pharmacokinetics.

마약 중독 환자 치료의 약물요법으로 주로 사용되는 나록손(이하 NLX), cyclazocine 및 naltrexone 등의 마약길항제는 체내 반감기가 대체로 매우 짧으며,¹⁾ euphoric effect 차단으로 인한 금단 증상 때문에 장기투여시 충분한 효과를 기대하기가 어렵다. 이러한 단점을 극복하기 위해 장기간 약효를 유지할 수 있는 약물송달시스템(DDS)의 개발이 요구된다.²⁾ 이에 가장 많이 쓰이고 있는 방법의 하나로서 생체분해성 고분자의 이식제제를 들 수 있으며, 고분자의 분해속도의 조절로 약물 방출속도가 조절되어 일정 기간동안 일정한 속도의 혈중농도를 유지하는 것을 목적으로 한다. 또한, 고분자에 대한 생체적합성의 확립도 제제화의 중요한 요인이 된다. 이식제제에 대

한 조직학적 반응은 이식과 외과적 수술이라는 관점에 대한 조직의 정상적인 방어기전으로 이식된 물질의 크기, 모양, 물리 화학적 성질, 방출되는 약물 및 분해산물등에 영향을 받으며 이러한 조직의 복합적인 반응을 이해하고 고분자 재료에 대한 안전성 확립의 목적으로 적합성 시험이 반드시 선행되어야 한다. 이에 사용되는 시험법으로는 *in vitro*로 bovine aortic endothelial cells,³⁾ smooth muscle cells³⁾과 mammalian cell³⁾을 사용한 예가 있으며, *in vivo*에서는 흰 쥐와 토끼의 피하,⁴⁾ 흰쥐의 뇌,⁵⁾ 토끼의 각막³⁾ 등에 대한 적합성 실험이 연구되어 왔다.

또한 나록손은 최소유효농도가 1 ng/ml로 미량인 혈중약물의 정확한 정량이 약물속도론적 평가를 위한

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

필수조건이다. 이의 정량에는 가스크로마토그래피,⁶⁾ 박층크로마토그래피(TLC),⁷⁾ radioimmunoassay⁸⁾와 고속액체크로마토그래피(HPLC)⁹⁻¹⁴⁾ 등이 사용되는데 그중 HPLC법에는 ultraviolet(UV),⁹⁾ electrochemical detector(ECD)¹⁰⁻¹⁴⁾ 등이 사용되고 있다. 그러나 UV검출기에 있어서 측정농도 한계가 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 단위이기 때문에 미량($\text{ng}\sim\text{pg}$)의 혈장 약물농도의 측정에는 부적합하며 ECD의 사용이 바람직하다. 이에 본 연구에서는 poly[(diethyl glutamate)-co-(ethyl glycinate) phosphazene](이하 PGGP)을 합성하여 10% 염산나록손 이식정을 제조한 후, 흰쥐의 등부위 피하에 대한 생체적합성 실험과 혈장 NLX의 HPLC(ECD)를 통한 정량법을 확립하고, 이에 의해 이식정을 토끼의 피하에 이식한 후의 혈장 NLX농도를 측정하여 마약길항제의 서방성 이식정으로서의 응용 가능성을 검토하고자 하였다.

실험방법

시약

염산나록손은 삼진제약에서 제공받았으며, 고분자의 주재료인 phosphonitrilic chloride trimer는 Aldrich Chemicals에서 구입하였다. 치환체인 glycine ethyl ester hydrochloride와 glutamic acid diethyl ester hydrochloride는 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였다. 기타 생체적합성 시험 및 나록손의 정량에 필요한 시약은 특급 또는 1급을 사용하였다.

기기

생체적합성 시험을 위한 조직처리에는 Automatic tissue processor (Histomatic MVPTM, Fisher Scientific Company), Embedding center (Fisher Histo centerTM, Fisher Scientific Company), Autoslide stainer (Fisher 172, Fisher Scientific Company), Microtome (Jung Histocut, Leica.)을 사용하였으며 조직관찰에는 Wide field photo microscope (Reichert-Jung Polyvar)을 사용하였다.

또한 정량에 사용된 HPLC 시스템은 Waters 510 HPLC pump, Waters 745B Data Module과 ECD로 Coulochem II (guard cell : Model 5020, analytical cell : Model 5011)이고, 기타 Deep freezer (REVCO), Microcentrifuge (Sorvall[®] MICRO-

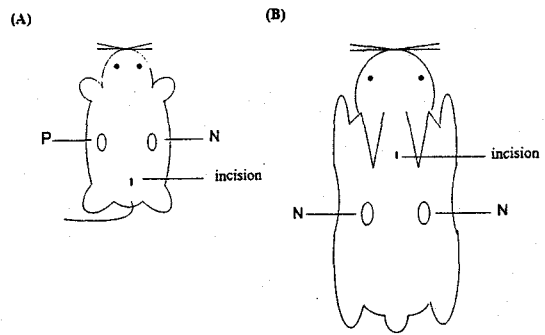


Figure 1—Implantation site in rat(A) and rabbit(B). Key : N: naloxone implant, P: placebo implant

SPIN 12S), Millipore filter paper ($0.22\ \mu\text{m}$, Millipore) 등이 사용되었다.

실험 동물

생체적합성 시험에는 200~300 g의 Sprague-Dawley (SD)계 암컷 흰쥐를 사용하였다. 온도 $18\pm 2^\circ\text{C}$, 12시간 명암 사이클 사육장에서 1주일 이상 동일한 사료와 수돗물을 자유로이 섭취할 수 있도록 하였다. 약물속도론적 평가에는 2.7~3.5 kg의 알바이노계 수컷 토끼를 사용하였다. 흰쥐의 경우와 같은 조건으로 사육하여 순화시켰다.

이식정의 제조

생체분해성 고분자인 PGGP를 Park 등¹⁵⁾의 방법으로 합성하여, casting법¹⁵⁾에 의해 10% NLX 이식정을 제조하였다. 또한 생체적합성 시험을 위해 NLX를 포함하지 않은 플라세보 이식정을 같은 방법으로 제조하였다.

흰쥐에 대한 생체적합성 시험

흰쥐를 에틸로 마취한 후 흰쥐의 꼬리 부위에서 3 cm 위쪽에 위치한 중앙 부위를 길이 약 10 mm 정도가 되도록 절개하였다. 절개한 부위를 통해 핀셋을 이용하여 왼쪽 등부위에는 플라세보 이식정을, 오른쪽에는 NLX 이식정을 삽입하고 봉합하였다(Fig. 1).

이식 후 7, 14, 21, 28, 35일이 경과시 흰쥐를 에틸로 마취시킨 후 이식한 부위의 조직을 떼어내어 10% formaldehyde phosphate buffer saline에 8일 이상 고정시켰다. 각각의 조직을 물로 세척한 후 에탄올의 농도를 높여가며 탈수시키고 키실렌을 침투시켜 파라핀에 embedding시킨후, $4\ \mu\text{m}$ 로 section 하였다. 헤마톡실린과 에오신으로 염색하거나, Masson's Trichrome으로 염색하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

염증반응 정도는 이식정주위와 이식정내로 침투한

염증 세포의 종류와 수, capsule의 형성과 두께, granulation의 진행 정도 위주로 관찰하였다.

HPLC 조건

0.04M-KH₂PO₄ 와 아세트니트릴을 88:12 로 섞은 액에 1-pentanesulfonic acid-Na (0.871 g/l)을 넣어 용해시킨 액을 이동상으로 하였고, μ -Bondapak C₁₈ column (Waters)을 사용하였으며, guard column으로 μ -Bondapak analytical guard pack insert를 사용하였다. 유속은 1.0 ml/min으로 하였으며 측정 시료는 20 μ l씩 주입하였다.

ECD의 산화전위는 E₁ 250 mV, E₂ 450 mV, guard cell은 700 mV로 하였으며, 감도범위는 100 nA로 분석하였다.

위 조건으로 분석하였을때, 혈장중의 NLX 농도 (0.5~100 ng/ml)와 내부표준물질 (naltrexone)에 대한 피크 높이의 비율은 직선성이 성립하며, 검량선은 다음과 같다.

$$Y=0.152915766X-0.005006944 (\gamma=0.995)$$

토끼에 대한 약물속도론적 평가

실험 24시간 전에 토끼의 등 부위를 면도하였다. 2% 리도카인 주사제로 국소마취 시킨 후, 목부위에서 10 cm 아래쪽 중양을 길이 10 mm 되도록 절개하여 NLX 이식정 (NLX hydrochloride로 20 mg/kg)을 양쪽으로 나누어 삽입하고 절개한 부위를 봉합하였다 (Fig. 1). 이식후, 1, 3, 5, 7, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192시간에 귀정맥을 통해 1 ml씩 채혈하였다. 혈액을 즉시 3000 rpm에서 15분 원심분리하여 얻은 혈장 200 μ l에 내부 표준액(50 ng/ml naltrexone)을 40 μ l씩 가하였다. 여기에 1 M sodium bicarbonate buffer (pH 9.1)를 250 μ l가한 후, CHCl₃:2-propanol을 9:1로 섞은 추출 용매 1 ml를 넣어 진탕하였다. 3000 rpm에서 10분간 원심분리 시킨 후 상층을 제거하고 유기층의 일정량 (500 μ l)을 취하여 상온에서 완전 건조시켰다. 다시 이동상 30 μ l에 녹여 HPLC로 정량하였다.

약물속도론적 파라미터는 퍼스널컴퓨터용 프로그램 (nkinetic)을 사용하여 산출하였으며 그 계산식은 다음과 같다.

$$AUC = \int_0^T C_p dt + \frac{C_p^*}{\lambda_n} \quad (1)$$

$$AUMC = \int_0^T t \cdot C_p dt + \frac{T \cdot C_p^*}{\lambda_n} + \frac{C_p^*}{\lambda_n^2} \quad (2)$$

$$MRT = \frac{AUMC}{AUC} \quad (3)$$

$$Cl_t = \frac{X_o}{AUC} \quad (4)$$

$$Vd_{ss} = Cl_t \cdot MRT \quad (5)$$

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{\lambda_n} \quad (6)$$

AUC는 혈장농도-시간 곡선하 면적을, AUMC는 혈장농도와 시간의 적을 시간에 대해 플롯했을때의 곡선하 면적을 의미하며, MRT는 약물의 체내 평균 체류시간을 나타낸다. 또한 Cl_t는 전신 클리어런스를, Vd_{ss}는 정상 상태에서의 분포 용적을 의미하며, t_{1/2}은 terminal phase의 반감기이고, C_{max}, T_{max}, 는 각각 최고 혈장농도 및 이에 도달되는 시간이다. T는 마지막 샘플시간을, Cp*는 마지막 샘플때의 농도를 나타내고, λ_n 는 terminal phase의 소실속도정수를 나타내며 AUC 및 AUMC는 마지막 샘플시간까지는 사다리꼴면적 공식으로 계산하였고, 그 이후부터 무한대 시간까지는 위의 계산식에 따라 구하여 두 면적을 합해서 산출하였다.

결과 및 고찰

생체적합성

35일 동안 이식정 주위에는 시간에 따른 국소적 염증 반응만이 관찰되었다. Fig. 2의 조직 사진에서 capsule의 두께, 이식정 내로의 cellular infiltration 등의 현상은 시간이 경과함에 따라 다음과 같은 변화를 보였다.

7일 NLX 이식정 주위에 neutrophil, histocyte, lymphocyte가 관찰되며, 이식정 내부에 까지 lymphocyte가 관찰되어 이식정 내로의 infiltration이 시작되었음을 알 수 있다. 이식정 주위에 capillary proliferation현상이 관찰되며, 부종 증상을 보이는 것도 관찰되었다. 플라세보 이식정은 염증세포의 수가 비교적 NLX 이식정보다 적으며 이식정 내로의 infiltration증상은 보이지 않았다. 대체로 NLX 이식정의 염증반응의 범위가 플라세보보다 넓게 나타났다.

14일 NLX 이식정 내부로의 cellular infiltration이 더 진행되어 이식정 내부에서도 FBGC(foreign body giant cell)과 lymphocyte가 관찰되었으며 고분자의 분해가 시작되었음을 알 수 있다. 또한 이식정

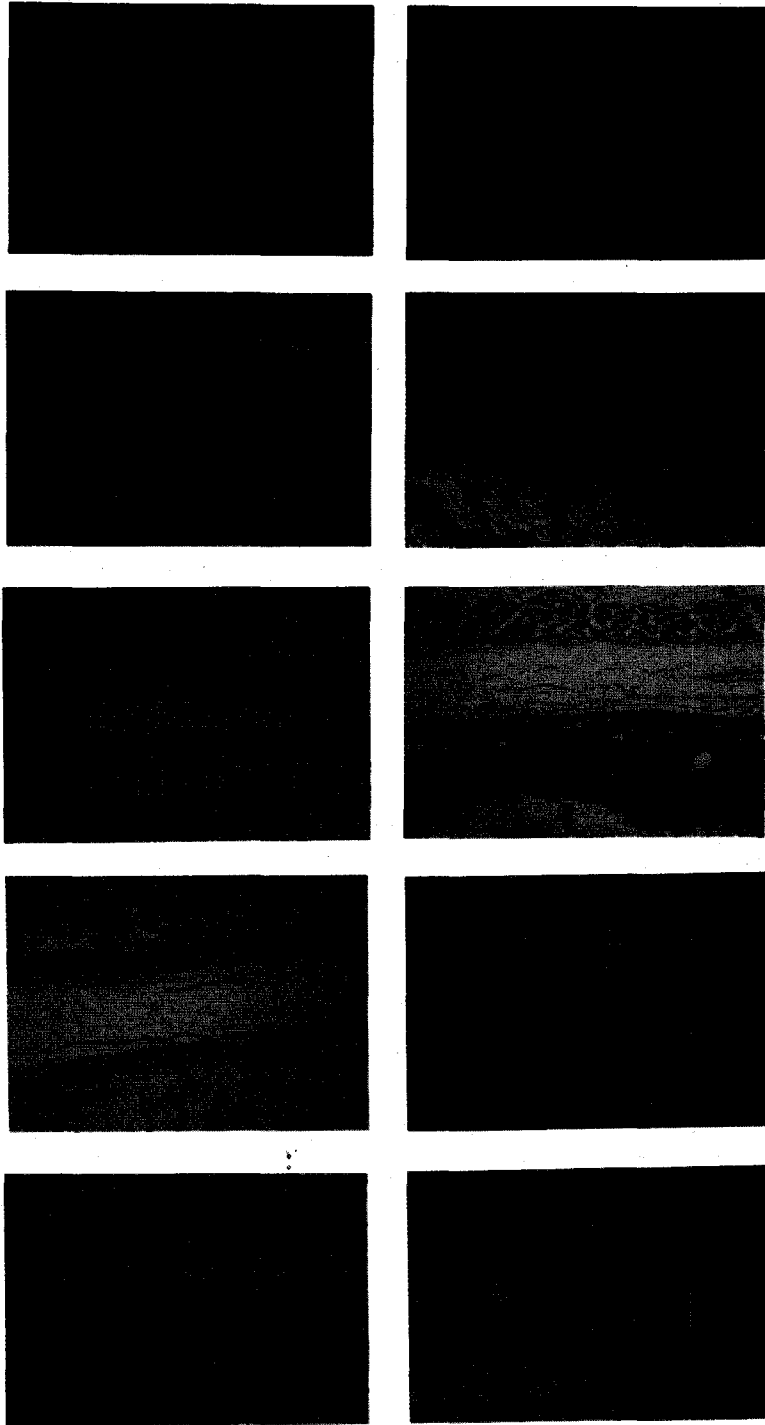


Figure 2—Subcutaneous implant sites in rats(A~F). Key : A: placebo implant at 7 days. B: NLX implant at 7 days. C: placebo implant at 14 days. D: NLX implant at 14 days. E: placebo implant at 21 days. F: NLX implant at 21 days. G: placebo implant at 28 days. H: NLX implant at 28 days. I: placebo implant at 35 days. J: NLX implant at 35 days. i: implant

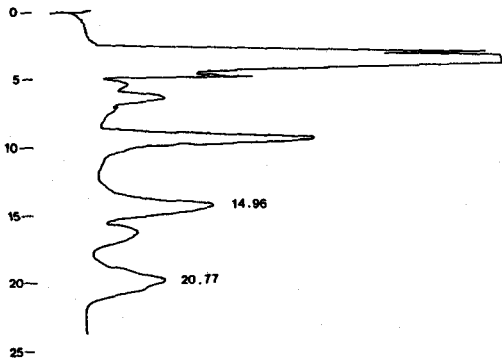


Figure 3—Chromatogram of naloxone in plasma. Retention time 14.96; naloxone, Retention time 20.77 naltrexone (internal standard).

주위의 capillary형성 등으로 보아 fibrous capsule형성과 조직의 granulation이 진행되고 있음이 관찰되었다. 플라세보 이식정의 경우에도 fibrous capsule이 형성되었으나 그 두께가 NLX 이식정의 경우보다 얇았다.

21일 NLX 이식정, 플라세보 이식정 모두 아직은 monocyte등의 염증 세포가 관찰되었으며 capsule의 두께가 14일에서보다 조금 두껍게 형성되었다. 그러나 부종증상은 정상으로 회복되었다.

28일 NLX 이식정은 분해가 진행됨에 따라 이식정 내로의 cellular infiltration이 관찰되나 이식정 주위의 염증 세포나 capsule의 두께는 더 이상 증가하지 않음을 볼 수 있다. 플라세보 이식정의 경우도 주위의 염증 세포가 감소되었으며 고분자의 분해가 서서히 진행되고 있음을 알 수 있다.

35일 NLX 이식정이나 플라세보 이식정 모두 염증 세포의 현저한 감소를 관찰할 수 있으며, NLX 이식정의 분해가 플라세보의 경우보다 빠르게 진행되어 있음을 알 수 있다. 이는 NLX이 용출되면서 나오는 염산이 고분자의 분해를 촉진시키기 때문이다.

이상의 결과로 보면 전체적으로 플라세보 이식정의 경우, 시간에 따른 염증세포수의 변화가 크지 않으며 mild하게 유지되다가 감소되었으며, 반면에 NLX 이식정 경우에는 시간에 따른 염증 세포의 수가 3주까지 증가하는 양상을 보이거나 그 후에는 역시 감소함을 볼 수 있었다. 일반적으로 염증반응의 정도와 확대에 영향을 미치는 것은 제제의 표면적, 분해 산물, 용출된 약물등이 있는데 NLX가 플라세보 이식정보다 염증반응의 정도가 심한 것은 Yamaguchi 등⁴⁾의 보고에

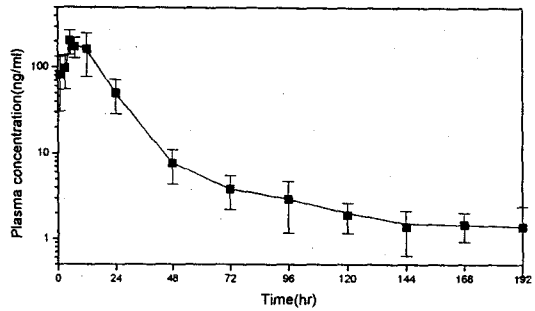


Figure 4—Plasma concentration of naloxone after the s.c. implantation (mean±S.D., n=3).

의하면 NLX 약물 자체의 염증반응 유도효과 때문인 것으로생각된다. 그러나, 여기서 나타난 정도의 염증반응은 이식수술시 외부자극에 의한 정상적인 방어작용으로 판정될 수 있을 정도이며 이식정 주변의 근육이나 결합조직의 조직 괴사, 변성등의 비가역적인 병변이 나타나지 않았으므로 이 제제가 이식시 조직에 무해하다는 것을 알 수 있었다.

약물속도론적 평가

HPLC(ECD)를 사용한 혈장 NLX의 분석에서 Fig. 3의 크로마토그램과 같이 분리 정량할 수 있었다. 사용한 ECD 시스템은 coulometric detection으로 specificity를 높이기 위해 3개의 electrode를 사용하였다. 그 3개의 electrode의 역할을 보면, 먼저 적절한 산화전위에서 목적물질의 검출 정량에는 detection cell (E₂)이 사용되며 이것의 바로 앞에 놓인 clean-up cell (E₁)은 detection cell의 산화전위보다 낮은 산화전위로 목적하는 물질은 산화되지 않고 다른 물질들은 최대로 산화시킴으로 이물질에 의한 간섭을 없애는 역할을 한다. 세번째의 guard cell은 injection line 전에 놓여서 높은 산화전위로 이동상으로 인한 baseline noise를 줄여준다. 이러한 ECD 시스템은 signal:noise의 비율을 크게 함으로 본 실험에서 NLX 0.1 ng/ml 농도까지 검출이 가능하였다. 그러므로 이 방법을 이용하여 토끼에 있어서의 이식제제로부터 혈중으로 흡수된 NLX의 농도를 측정할 수 있었다. Fig. 4의 혈장농도-시간곡선에서 보는 바와 같이 혈장 NLX의 농도는 약물 투여 후 5시간때에 최대농도인 200 ng/ml를 보였으며 192시간 동안 평균 2~3 ng/ml의 혈장농도가 유지되었다. 그러나 혈장농도가 유지된 시간에 비해 Table I의 속도론적 파라미터중에서 MRT값이 비교적 작게 나온 것은 초기

Table I—Pharmacokinetic Parameters of NLX after Implantation

Parameters ^a	Mean ± S. D.
t _{1/2} (hrs)	103.48 ± 67.00
AUC (ng · hr/ml)	4046.94 ± 1090.58
AUMC (ng · hr ² /ml)	196621.80 ± 168710.90
MRT (hrs)	44.80 ± 28.71
Cl _r (ml/hr)	5.22 ± 1.56
Vd _{ss} (ml)	214.73 ± 93.26
C _{max} (ng/ml)	204.53
T _{max} (hrs)	5

^aEach value represents the mean ± S.D. of three independent experiments.

의 burst effect 때문이다. Fig. 2에서 보는 것과 같이 이식 후 초반에 NLX 이식정의 내부 균열로 분해되는 표면적이 예상보다 증가되어 용출에서도 초반의 burst effect가 나타난 것으로 생각된다. 이것은 제제 형성시의 문제로 건조과정에서 내부균열을 방지하는 방법으로 개선될 수 있다. 그러나 전체적인 용출 패턴을 보면 적어도 192시간 동안 유효 혈장농도가 유지되었으므로, 초기의 burst effect만 개선된다면 서방성 제형으로 마약길항제의 지속성 이식제제로의 응용이 가능할 것으로 생각된다.

결 론

흰쥐에 대한 생체적합성 실험은 시간이 경과함에 따라 초기에 나타난 급성염증이 점차로 전형적인 mild한 만성염증의 양상을 보이고 주변 조직의 괴사나 변성등의 비가역적인 병변이 나타나지 않으므로 생체적합성이 있음을 알 수 있었다. 또한 토끼에 대한 약물속도론적 평가에서 적어도 192시간 동안의 NLX의 유효 혈장농도가 지속되었으므로 마약길항제의 장기 투여를 위한 서방성 이식정으로의 응용이 가능할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 1993년도 한국학술진흥재단의 자유 공모 과제 연구비에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) M.S. Gold, C.A. Dackis, L.C. Pottash, H.H. Sternbach and W.J. Annitto, Naltrexone, opiate addiction and endorphins, *Med. Res. Rev.*, **2**, 211-246 (1982).
- 2) S. Archer, Design consideration for long-acting antagonists, In : M.C. Braude, L.S. Harris, E.L. May, J.P. Smith and J.E. Vilarreal (Eds.) *Narcotic Antagonists* (Advanceds in Biochemical Psychopharmacology), Raven Press, New York, U. S. A., **8**, pp. 549-553 (1973).
- 3) K.W. Leong, P.D. Amore, M. Marletta, and R. Langer, Bioerodible polyanhydrides as drug-carrier matrices. II. Biocompatibility and chemical reactivity, *J. Biomed. Mater. Res.*, **20**, 51-64 (1986).
- 4) K. Yamaguchi and J.M. Anderson, Biocompatibility studies of naltrexone sustained release formulaions, *J. Controlled Release*, **19**, 239-314 (1992).
- 5) R.J. Tamargo, J.I. Epstein, C.S. Reingard, M. Chasin and H. Brem, Brain biocompatibility of a biodegradable, controlled release polymer in rats, *J. Biomed. Mater. Res.*, **23**, 253-266 (1989).
- 6) P.J. Meffin and K.J. Smith, Gas Chromatographic analysis of naloxone in biological fluids, *J. Chromatogr.*, **183**, 352-361 (1980).
- 7) G. Sprague and A. Takimore, Improved method for morphine extraction from biological samples, *J. Pharm. Sci.*, **68**, 660-668 (1979).
- 8) T. Moreland, J. Brece, C. Walker and A. Parija, Naloxone pharmacokinetics in the newborn, *Brit. J. Clin. Pharmacol.*, **9**, 609-620 (1980).
- 9) L.A. Asali, R.L. Nation and K.F. Brown, Determination of naloxone in blood by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **278**, 329-335 (1983).
- 10) H. Albeck, S. Woodfield and M.J. Kreek, Quantitative and pharmacokinetic analysis of naloxone in plasma using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection and solid-phase extraction, *J. Chromatogr.*, **488**, 435-445 (1989).
- 11) E.F. O'Connor, S.W.T. Cheng and W.G. North, Simultaneous extraction and chromatographic analysis of morphine, dilaudid,

- naltrexone and naloxone in biological fluids by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatogr.*, **491**, 240-247 (1989).
- 12) R.W. Reid, A. Deakin and D.J. Leehey, Measurement of naloxone in plasma using high-performance chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatogr.*, **614**, 117-122 (1993).
- 13) F.S. Tepperman, M. Hirst and P. Smith, Brain and serum levels of naloxone following peripheral administration, *Life Sciences*, **33**, 1091-1096 (1983).
- 14) E.R. Garrett, W.C. Shyu and A. Ulubelen, Pharmacokinetics of morphine and its surrogates VIII : Naloxone and naloxone conjugate pharmacokinetics in dogs as a function of dose and as affected by simultaneously administered morphine, *J. Pharm. Sci.*, **75**, 1127-1136 (1986).
- 15) J.A. Park, S.J. Lee, H.K. Kim and K.S. Kim, Controlled release dosage form of narcotic antagonist(I) : Synthesis of biodegradable polyphosphazenes and preparation and release characteristics of naloxone implant, *J. Kor. Pharm. Sci.*, submitted (1995).