

## 리포솜에 봉입한 5-플루오로우라실 프로드럭의 세포독성, 안정성 및 항암효과

이계원 · 지웅길\*

충남대학교 약학대학

(Received July 3, 1996)

### Cytotoxicity, Stability and Antitumor Activity of 5-Fluorouracil Prodrugs Entrapped in Liposomes

Gye Won Lee and Ung Kil Jee\*

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

**Abstract**—5-fluorouracil(5-FU) derivatives synthesized with four N-acyloxycarbonyl group such as 1-(N-t-butyloxycarbonyl)glycyloxymethyl-5-FU(BGFU), 1-(N-t-butyloxycarbonyl)leucyloxymethyl-5-FU(BLFU), 1-(N-t-carbobenzyloxymethyl)glycyloxymethyl-5-FU(CGFU) and 1-(N-t-carbobenzyloxymethyl)leucyloxymethyl-5-FU(CLFU) were entrapped into liposomes with different lipid compositions. The entrapment efficiency and release rate of drugs from each liposomes were evaluated. The particle size of liposomes, cytotoxicity and stability of drug-entrapped in liposomes were evaluated. The entrapment efficiency in 5-FU derivatives liposomes was dependent on the lipophilicity of N-acyloxymethyl derivatives. The drug entrapment efficiency also increased on the content of lipid increased up to 200  $\mu\text{mol}$  of lipid per milliliter of liposomal solution. However, inclusion of additives such as cholesterol, di-cetylphosphate and stearylamine decreased the entrapment efficiency. The mean particle size and size distribution were varied with lipid compositions and lipophilicity of prodrugs. The release rates of drugs from liposomes were not affected by additives, but those of BGFU and CGFU entrapped in liposomes with cholesterol decreased. Cytotoxicity of BLFU and CLFU entrapped in liposomes decreased by 3~5 fold compared with those of free two prodrugs. Liposome-entrapped 5-FU prodrugs were more stable either at pH 7.4 or in human plasma. Especially, 5-FU prodrugs entrapped in liposome with dipalmitoylphosphatidylcholine(DMPC) was the most stable in human plasma. Compared with free BLFU, BLFU entrapped in DMPC liposome showed a superior antitumor activity at all doses used. In contrast, CLFU entrapped in liposomes were more toxic than free prodrug.

**Keywords** □ 5-FU, prodrugs of 5-FU, liposome, entrapment efficiency, particle size, cytotoxicity, stability, antitumor activity.

리포솜은 1960년대 Bangham 등에 의하여 처음으로 인지질이 수상에서 자발적으로 생체막과 같은 이중막을 형성한다는 사실이 발견된 이래<sup>1)</sup> 체내에서 분해 가능하며, 독성이 없고, 항원성이 없다는 점 그리고 약물의 물리화학적 성질과 조성에 따라 인지질 이중막 혹은 수상에 봉입시킬 수 있는 장점 때문에 최근까지 생체

막 연구의 모델뿐만 아니라 항암제와 같은 여러 가지 약물의 운반체로서 그리고 생체내에서의 약물의 표적 부위 도달(drug targeting) 및 약물의 지속적인 방출 등에 널리 이용되어 왔다.<sup>2)</sup>

일반적으로 리포솜은 인지질 이중막의 수에 따라 multilamellar vesicles(MLV), small unilamellar vesicles(SUV)<sup>3)</sup>, large unilamellar vesicles(LUV)<sup>4)</sup> 등으로 분류할 수 있으며 이들은 주로 제조 방법에 따라 서로 다른 모양을 나타낸다.

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 042-821-5934 (팩스) 042-821-5903

5-Fluorouracil(이하 5-FU로 약함)은 경구투여시 위장관과 간에서의 초회통과효과가 크고 유수분배계수가 적으므로 위장관 점막을 통한 약물의 흡수가 적어 생체이용률이 매우 낮다. 또한 친수성과 소수성의 성질을 모두 가지고 있는 양친매성 물질이므로 수상 및 리포솜을 이루는 지질 성분에도 잘 녹아 리포솜을 만드는 지질 성분의 선택에 주의를 요하는 약물이며<sup>5)</sup> 리포솜 제조시 봉입률이 매우 낮고 약물의 방출도 빠르게 일어나며 현탁액으로 보관할 때 안정성이 매우 떨어지는 경향을 나타낸다.<sup>6)</sup>

따라서 이러한 약물을 프로드럭으로 하여 물리화학적 성질을 변화시키면 다양한 제형에 적용할 수 있는 가능성이 높아진다. 따라서 최근에는 프로드럭을 합성하여 리포솜과 같은 운반체에 봉입시키면 봉입률과 안정성 등의 문제점을 해결할 수 있기 때문에 주목받고 있다.<sup>7-10)</sup> 즉, Stephen 등<sup>6)</sup>은 5-FU의 유도체로서 fluoxuridine을 리포솜에 응용하여 5-FU보다 봉입률과 안정성이 더 증가하였음을 보고하였고, Hashida 등<sup>7)</sup>은 5-FU의 봉입률을 높이기 위해 alkylcarbonyl 기를 도입하여 봉입률과 안정성이 크게 증가함을 보고한 바 있다.

저자는 5-FU에 4종의 N-acyloxycarbonyl 유도체를 결합시킨 1-(N-t-butyloxycarbonyl)glycyloxymethyl-5-FU, 1-(N-t-butyloxycarbonyl)leucyloxymethyl-5-FU, 1-(N-t-carbobenzyloxymethyl)glycyloxymethyl-5-FU and 1-(N-t-carbobenzyloxymethyl)leucyloxymethyl-5-FU를 제조하여 수종의 리포솜에 봉입시킨 후 리포솜의 조성변화에 따른 약물의 봉입률, 방출속도 및 리포솜의 입자크기에 미치는 영향 등을 검토하였다. 또한 봉입률이 높은 BLFU와 CLFU를 선택하여 *in vitro*에서 세포독성시험과 안정성 시험 및 *in vivo*에서 항암실험을 실시하였다.

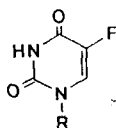
### 실험방법

**시약 및 기기** - 1-(N-t-butyloxycarbonyl)glycyloxymethyl-5-FU(BGFU), 1-(N-t-butyloxycarbonyl)leucyloxymethyl-5-FU(BLFU), 1-(N-t-carbobenzyloxymethyl)glycyloxymethyl-5-FU(CGFU) 및 1-(N-t-carbobenzyloxymethyl)leucyloxymethyl-5-FU(CLFU)는 5-FU의 프로드럭으로서 실험실에서 합성하였으며 soybean phosphatidylcholine(Epikuron

200<sup>®</sup>, 95%)는 Pacific사, dimyristoylphosphatidylcholine(DMPC), cholesterol(96%), dicetylphosphate(DCP), stearylamine(SA),  $\alpha$ -tocopherol acetate(95%,  $\alpha$ -TA) 및 dialysis sack(MWCO 12,000)은 Sigma사에서 구입하여 사용하였으며 기타 시약 및 용매는 일급 또는 특급을 사용하였다.

기기로는 자외/가시부 분광광도계(UVIKON 860, Kontron, Switzerland), 액체크로마토그래피 (SPD 10A UV-Vis Detector, LC-10AD Liquid Chromatograph, C-R6A Chromatopac, Shimadzu, Japan), 미량 원심분리기 (Vision, VS-15000, Korea), 증발 농축기 (Rotavapor R 110, Büchi, Germany), 고압 진공펌프 (Vacuum pump DD-40, Precision Scientific, U.S.A.), Vortex mixer (Model 1801, Dong Yang Scientific Co., Korea), 바이오믹서 (Ultra Turrax T25, Original Ika Co., Japan), 광산란 측정기 (He-Ne laser Model 127, Lexel Laser, Inc. Analysis Software: BI-8000AT Digital Correlator), 진탕 배양기 (KMC-8480S, Vision Scientific Co. Ltd., Korea), 초음파기 (Cavitator, Mettler Electronics Co., U.S.A.) 및 기계식 교반기 (Chang Shin Scientific Co. Ltd., Korea) 등을 사용하였다.

**5-FU 프로드럭을 봉입한 리포솜의 제조** - 5-FU의 프로드럭으로서 5-FU에 4종의 N-acyloxycarbonyl 유도체를 결합시킨 BGFU, BLFU, CGFU 및 CLFU를 합성하여 약물로서 사용하였으며 이들에 대한 구조 및 물리적 성질을 Scheme I과 Table I에 나타내었다. 리포솜은 먼저 지질과 약물(0.01 M)을 정확히 평량하여 30 ml 용량의 바이알에 함께 넣고 클로로포름과 메탄올의 혼합액 5 ml를 가하여 완전히 용해시킨 후, 회전 증발 농축기에 장치하였다. 40~50°C로 유지되는 수욕상에서 질소 가스를 천천히 도입하는 동시에 바이알을 회전시키면서 유기 용매를 완전히 증발시켜 바이알 내부에 얇고 균일한 막을 만들었다. 이 때 700 bar 정도의 감압을 유지하도록 질소 가스량을 조절하면서 유기 용매를 천천히 증발시켰다. 유기 용매가 제거된 후 30분 정도 더 증발 건조시킨 다음 바이알을 분리하여 다시 고압 진공펌프에 연결하여 질소가 충전된 상태에서 2시간 동안 더 건조시켜 남아 있는 미량의 유기 용매를 완전히 제거하였다. 유의성 있는 가수분해가 일어나지 않았던 0.9% NaCl 용액 3 ml를 미리 질소로 포화



|  |                |
|--|----------------|
| R = a) - H   | 5-Fluorouracil |
| b) - CH <sub>2</sub> OCOCH <sub>2</sub> NHOCO(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>               | BGFU           |
| c) - CH <sub>2</sub> OCOCH <sub>2</sub> NHOCOCH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> | CGFU           |
| d) - CH <sub>2</sub> OCOCHCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                | BLFU           |
|  |                |
| NHOCO(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>   |                |
| e) - CH <sub>2</sub> OCOCHCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                | CLFU           |
|  |                |
| NHOCOCHC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>   |                |

**Scheme I**— Structure of 5-fluorouracil and 5-fluorouracil prodrugs.

**Table I**— Physical properties of 5-fluorouracil and 5-fluorouracil prodrugs.

| Compound | M.W    | Solubility(mg/ml) | P.C <sup>b</sup> |
|----------|--------|-------------------|------------------|
| 5-FU     | 130.08 | 7.26              | 0.001            |
| BGFU     | 317.2  | 0.89              | 0.67             |
| CGFU     | 351.3  | 0.57              | 1.74             |
| BLFU     | 373.3  | 0.31              | 6.77             |

a : Solubility in H<sub>2</sub>O

b : Apparent partition coefficient between chloroform and pH 7.4 phosphate buffer solution

시켜 가하고 바이알을 질소 가스로 충전한 뒤 회전 증발 농축기에 장치하고 상압에서 2시간 동안 30 rpm 정도로 회전시키면서 수화를 시켰다. 이를 vortex mixer로 10분 동안 격렬히 혼합한 후, 다시 3분 동안 초음파 처리하여 균일한 지질 현탁액인 리포솜을 제조하였다.

이 때 인지질은 soybean PC와 DMPC를 60과 200 μmol/ml로 고정하여 먼저 콜레스테롤(CH)의 양을 20과 40 mol%로 변화시켜 봉입률의 변화를 관찰하였으며 다음에 지질막에 (-)와 (+) 하전을 주는 물질로서 10 mol%의 DCP와 SA를 20 mol%의 콜레스테롤과 같이 첨가하여 프로드럭의 봉입률에 미치는 영향을 검토하였다. 또한 약물 방출의 지속화를 기대하기 위하여 DMPC를 soybean PC와 50/50 mol%로 첨가하여 리포솜을 제조하였으며 항산화제로서 α-토코페롤 아세이트(α-TA)를 PC 양에 대해 1 mol%가 되도록 첨가하였다.

### 리포솜의 평가

**봉입률의 측정**<sup>11,12)</sup> - 리포솜에 봉입된 각 약물의 양은 투석과 원심 분리를 이용하여 봉입된 약물과 봉입되지 않은 약물을 각각 분리한 후, UV와 HPLC로 정량

하였다.

**1) 투석법(dialysis method)** - 리포솜 용액 0.3 ml를 취하여 미리 활성화시킨 반투막 sack(MWCO : 12,000)에 넣고 이를 질소로 포화시킨 0.9% NaCl 용액 100 ml에 넣어 하룻밤 동안 냉장고에 방치하였다. 반투막 밖의 액을 취하여 적당한 농도로 희석한 다음 흡수극대 파장인 272 nm에서 흡광도를 측정하여 봉입되지 않고 유리된 약물의 양을 계산하였다.

얻어진 유리약물의 농도를 다음과 같은 식에 대입하여 봉입된 효율을 계산하였다.

봉입률(%)=

$$\frac{\text{총 약물양} - \text{리포솜에 봉입되지 않은 약물의 양}}{\text{총 약물양}} \times 100$$

**2) 원심분리법** - 리포솜 현탁액 0.5 ml를 취하여 0.9% NaCl 용액 0.5 ml를 가하여 1 ml로 한 다음 microcentrifuge를 이용하여 15,000 rpm으로 15분 동안 원심 분리하였다. 상층액을 제거하여 얻어진 침전에 0.9% NaCl 용액 0.5 ml를 가하여 분산시킨 다음 여기에 에탄올 1.5 ml를 가하여 리포솜을 완전히 파괴시켰다. 이 용액을 0.45 μm의 막 여과기로 여과하여 HPLC로 직접 주입하여 얻어진 피크를 원심 분리하지 않은 처음의 리포솜 현탁액 중에 함유된 약물의 농도 피크와 비교하여 리포솜에 봉입된 약물의 효율을 구하였다.

이 때 HPLC 조건은 다음과 같다.

Detector : UV-VIS detector (SPD-10A, Japan)

컬럼 : Novapak C<sub>18</sub> column

이동상

① BGFU, CGFU

메탄올 : 물 (45 : 55)

② BLFU, CLFU

메탄올 : 물 (55 : 45)

**입자 크기 및 분포 측정** - 제조한 각각의 리포솜에 대한 입자 크기와 분포는 동적 광산란(dynamic light scattering : DLS) 기법을 이용하여 측정하였다.

먼저 리포솜 현탁액을 vortex mixer로 잘 혼합하고 리포솜 입자에 의한 레이저 광선의 산란이 유효한 범위를 유지하도록 하기 위하여 일정량을 취하여 100배 희석하였다. 이 때 사용한 광원은 He-Ne laser, 측정 파장은 632.8 nm, 온도는 25°C로 일정하게 유지되도록 하였고 pin hole size는 100(unit)으로 하였다. 산란

각도는 빛의 흔들림이나 불순물 등에 의해 영향을 가장 적게 받는 90°로 설정하였다. 이러한 조건으로 측정된 결과의 분석은 Brook Haben사의 BI-800 AT Digital Correlator 프로그램을 이용하였다.

**리포솜들로부터의 방출 속도<sup>13)</sup>** - 제조한 각 리포솜 현탁액 0.3 ml를 미리 활성화시킨 반투막 sack안에 넣고 이를 100 ml의 0.9% NaCl 용액에서 37°C, 100 rpm으로 진탕하면서 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 및 24 시간마다 3 ml의 액을 취하여 방출되어 나온 각 약물의 양을 흡수 극대 파장인 272 nm에서 흡광도를 측정하여 점량선 식에 대입하여 계산하였다.

**80% 사람 혈장 및 완충액에서의 가수분해<sup>8-10)</sup>** - 약물을 리포솜에 봉입하지 않은 경우와 리포솜에 봉입한 경우에 80% 사람 혈장과 pH 7.4 인산염 완충 용액에서 가수분해되는 경향을 37±0.5°C에서 3회씩 실시하여 HPLC로 정량하였다. 겔보기 1차 속도 정수는 남아 있는 약물량을 시간에 대하여 semilog plot한 그래프의 기울기로부터 얻었다. 약물은 봉입률과 안정성이 좋은 CLFU와 BLFU를 선택하여 전체 지질 농도가 200 µmol/ml, 지질 조성이 soybean PC 단독, soybean PC : CH : α-TA(10 : 2 : 0.1) 및 soybean PC : DMPC : CH : α-TA(5 : 5 : 2 : 0.1)인 리포솜에 봉입하였으며 봉입되지 않은 약물은 원심 분리로 제거하였다.

리포솜 현탁액을 80% 사람 혈장 용액 10 ml에 첨가하여 약물의 농도가 1×10<sup>-4</sup> M이 되게 하였다. 수용상에서 일정하게 온도를 유지하며 30분 간격으로 200 µl의 용액을 취하여 원심 분리관에 넣고, 에탄올 1 ml를 가하여 1분 동안 vortexing한 후 15,000 rpm으로 2분 동안 원심 분리하였다. 상층액을 직접 HPLC에 주입하여 얻어진 피크 높이와 표준액의 피크 높이를 비교하여 가수분해되지 않고 남아 있는 약물의 양을 구했다.

pH 7.4 인산염 완충액에서 가수분해는 1, 2, 4, 6, 8, 10 및 24 시간마다 200 µl의 반응액을 취하여 여기에 에탄올 1000 µl를 가해 리포솜을 파괴시킨 다음 액을 직접 HPLC에 주입하여 위와 같은 방법으로 남아 있는 약물의 양을 구했다.

**L1210 세포에 대한 세포 독성 실험** - 배양액은 냉장고(4~6°C)에 보관하면서 일주일 이내에 사용하였으며 L1210 세포는 37°C의 CO<sub>2</sub> 배양기(CO<sub>2</sub> 5%)로 1주일에 두번 계대 배양하였다.

일정 농도로 희석된 시료용액의 실험군과 대조군을

37°C, CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간 배양하여 haemocytometer를 사용하여 세포수를 계산하였다.

ED<sub>50</sub>값은 대조군의 50% 수준으로 L1210 세포의 성장을 억제하는 시료의 농도(µg/ml)로 주어지며 여기에서는 미국립 암연구소(NCI, National Cancer Institute, USA) manual의 방법<sup>14)</sup>에 의해 결정하였다. 시험군의 각 농도에 대한 성장율 Y(%)는 다음과 같이 계산하였다.

$$Y(\%) = \frac{T - C_0}{C - C_0} \times 100$$

T = 시험군의 48시간 배양후 평균 세포수(cells/ml)

C = 대조군의 48시간 배양후 평균 세포수(cells/ml)

C<sub>0</sub> = 배양 시작시 평균 세포수 (cells/ml)

각각 농도의 Y(%)값과 Log<sub>10</sub> dose를 도식화하고 회귀선 Y=A+BX를 얻었으며 회귀선의 기울기와 절편으로부터 ED<sub>50</sub> 값을 계산하였다. 이 때 각각의 농도에 대하여 계산한 Y(%)값이 55%보다 크거나, 45%보다 작으면 재실험을 실시하였다. NCI manual에 따르면 L1210 세포에 대한 세포 독성 평가는 식물 추출물인 경우 20 µg/ml 이하, 합성물인 경우 4 µg/ml 이하일 경우 항암 작용이 있다고 규정하고 있다.

**Sarcoma 180 세포를 이용한 항암력 실험<sup>15-17)</sup>** - 20~30 g의 ICR계 마우스 용성을 사용하여 Sarcoma 180 세포 부유액을 0.1 ml씩 복강내에 이식하여 복수암을 유발하였다. 이식 후 24시간이 지난 다음부터 각 군을 6마리로 하여 하루에 1회 7일간 연속하여 복강내에 주사했다. 이때 대조군에는 50% PEG 400, PC 단독 및 PC : DMPC : CH : α-TA(5 : 5 : 2 : 0.1)의 조성으로 된 리포솜 현탁액을 투여하였고, 실험군에는 50% PEG 400 용액에 용해시킨 5-FU, BLFU 및 CLFU 그리고 프로드럭들의 리포솜 현탁액을 20, 10 및 5 mg/kg/day(5-FU로서 용량)의 농도로 0.1 ml/10 g으로 주사하였다. 마우스를 60일까지 관찰하여 T/C(%), % 생명연장기간, 치료계수를 다음과 같은 식에 의하여 계산하였다.

$$\text{생존비}(\%) = \frac{T}{C} \times 100$$

$$\text{ILS}(\%) = \frac{T}{C}(\%) - 100$$

T = 처치군의 평균 생존일수

**Table II**—Entrapment efficiency of 5-fluorouracil prodrugs entrapped into liposomes containing phosphatidylcholine and various additives(Mean±S.D., n=3)

| Lipid Composition                   | Entrapment efficiency(%) |            |            |            |
|-------------------------------------|--------------------------|------------|------------|------------|
|                                     | BGFU                     | BLFU       | CGFU       | CLFU       |
| PC                                  | 10.51±0.21               | 56.12±1.8  | 16.52±0.66 | 72.40±1.29 |
| PC : CH(4:1)                        | 13.24±1.73               | 45.08±1.1  | 14.87±1.32 | 65.92±0.99 |
| PC : CH(2:1)                        | 14.42±0.76               | 30.17±0.5  | 13.28±0.44 | 58.81±0.45 |
| PC : CH : DCP(8:2:1)                | 25.96±1.08               | 30.17±3.1  | 20.49±2.4  | 59.02±0.77 |
| PC : CH : SA(8:2:1)                 | 18.19±1.51               | 39.68±1.4  | 21.15±1.24 | 57.52±0.52 |
| PC : CH : DCP : α-TA<br>(8:2:1:0.1) | 15.60±1.94               | 39.55±0.22 | 25.73±2.41 | 61.21±0.15 |
| PC:CH:SA:α-TA                       | 20.78±1.94               | 44.08±1.73 | 19.18±1.36 | 60.04±0.95 |

PC was 60 μmol/ml.

Lipid : Drug was 6 : 1

C=대조군의 평균 생존일수

또한 치료 계수(therapeutic ratio)는 다음식으로 계산하였다.

$$\text{Therapeutic Ratio} = \frac{ILS_{\max}}{ILS_{30\%}}$$

$ILS_{\max}$  = % 생명연장기간을 최대로 나타내는 용량

$ILS_{30\%}$  = 30%의 생명연장기간을 나타내는 용량

$ILS_{30\%}$ 는 각 용량과 % 생명연장기간을 이용하여 구하였다.

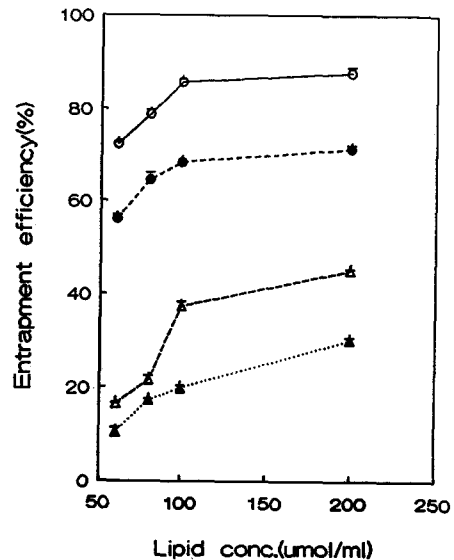
## 결과 및 고찰

### 봉입 효율

**첨가제의 영향** - 5-FU를 리포솜으로 제제화할 때 인지질의 농도와 콜레스테롤의 함량을 적당히 증가시키므로서 약물의 봉입률은 53%까지 향상시킬수는 있었으나 400 μmol/ml 이상에서는 점도가 증가하여 리포솜 제제의 제조는 잘 형성되지 않았다.<sup>18)</sup>

5-FU의 프로드럭들을 인지질 조성을 여러 가지로 하여 리포솜을 제조하였으며 이때 봉입 효율은 Table II와 같다. 또한 과량의 DCP나 SA는 리포솜 제조에 적당치 않을뿐만 아니라 봉입율도 감소하여 10 mol%로 고정하였다.

5-FU는 10%이하의 낮은 봉입률을 보인 반면 지용성이 높아진 프로드럭들은 모두 봉입률이 높아져서 지용성이 가장 큰 CLFU의 경우 PC 단독일 때 72.40%, 콜레스테롤을 20과 40 mol%로 첨가하면 각각 65.92%와 58.81%로 감소했으며 20 mol%의 콜레스테롤과 10 mol%의 DCP 또는 SA를 같이 첨가했을 경우 각각



**Fig. 1**—The effect of total lipid concentration on the entrapment efficiency of 5-fluorouracil prodrugs into multilamellar vesicles.

Key:—○—: CLFU, —●—: BLFU, —△—: CGFU, —▲—: BGFU

59.02%와 57.52%이었다. 그러나 지용성이 떨어지는 BGFU나 CGFU는 콜레스테롤에 의해 영향을 적게 받아 BGFU는 20과 40 mol% 콜레스테롤을 첨가했을 때 PC 단독의 10.51%에서 각각 13.24와 14.42%로 변화였고 DCP나 SA에 의해서도 봉입효율이 증가되었다. 또한 CGFU는 콜레스테롤에 의해서는 봉입률이 감소되었으나 DCP나 SA의 첨가에 의해서는 20.49과 21.15%로서 오히려 증가되었다.

수용성 약물은 리포솜의 내부 수상에 주로 봉입되지만 지용성 약물들은 지질막 사이에 끼이므로 콜레스테롤, DCP 및 SA와 같은 첨가제와 경합하므로 봉입률이

감소되는 것으로 추정되며<sup>19)</sup> 항산화제인  $\alpha$ -TA를 첨가했을 때 첨가하지 않은 경우에 비하여 봉입률이 약간 증가했다.

일반적으로 약물을 리포솜에 적용시킬 때 제제학적 면에서 높은 봉입 효율을 가지면서 처리하는데 적당한 지질 농도의 범위를 유지하여야 하므로 수용성 약물인 5-FU보다는 지용성이 높은 프로드럭을 합성하여 이를 리포솜에 적용하는 방법이 봉입률을 향상시키는 좋은 방법으로 사료된다.

**지질농도의 영향** - 지질 농도에 따른 봉입률의 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 즉 모든 프로드럭의 봉입효율은 리포솜 현탁액 중의 지질 농도가 100  $\mu\text{mol/ml}$ 까지 높아질수록 비례적으로 증가하였으나 그 이상의 농도인 200  $\mu\text{mol/ml}$ 에서는 크게 증가되지 않았다. 따라서 이 실험에서는 리포솜의 전체 지질 농도를 200  $\mu\text{mol/ml}$ 로서 하여 제조하도록 하였다.

**첨가제에 따른 입자 크기 및 분포** - 제조된 여러가지 조성의 리포솜의 입자 크기를 측정하여 Table III에 나타내었는데 대부분의 리포솜 현탁액은 단분산을 나타내었으며 입자의 평균크기로 비교하였다.

일반적으로 수용성 약물에서 콜레스테롤은 지질막 사이에 끼어 들어가서 막을 견고하게 만들며 내부 수상의 용적을 증가시켜 입자 크기를 증가시키는 것으로 알려져 있으나 지용성 약물에서의 전반적인 입자 분포는 PC 단독에 비하여 넓어졌지만 봉입된 약물의 물리적인 성질에 따라 달랐다. 즉 지용성이 높은 CLFU와 BLFU는 오히려 약간 감소되었고 지용성이 약간 떨어

지는 CGFU와 BGFU는 입자 크기가 증가한 것을 볼 수 있었다.

수용성 약물인 5-FU의 경우에는 DCP와 SA를 첨가했을 때 입자 크기가 훨씬 증가하였으나 프로드럭들은 입자분포가 넓어지면서 감소된 평균 입자 크기를 나타내었다. 이것은 지질막 사이에 약물이 끼어 들어가면서 수용성 약물인 5-FU보다는 입자 크기가 감소하여 작은 크기의 입자도 존재하게 되지만 DCP와 SA 같이 지질막에 하전을 주는 물질을 첨가해 주면 지질막에 끼어 막 사이에 동일한 전하의 반발력을 일으켜 입자 크기를 증가시키는 현상으로 설명되어질 수 있다.

지질 전체 농도를 200  $\mu\text{mol/ml}$ 로 증가시켜 BLFU와 CLFU를 봉입한 리포솜의 입자크기를 측정하여 Table IV에 나타내었다. 전체 지질 농도가 60  $\mu\text{mol/l}$

**Table IV**—The size distribution and mean size of three lipid composition liposomes entrapped BLFU and CLFU

| Lipid Composition        | CLFU                                      | BLFU          |
|--------------------------|---|---------------|
| PC                       | 1413 <sub>a</sub>                         | 1022          |
| PC:CH: $\alpha$ -TA      | (105~4058 <sup>b</sup> , 1 <sup>c</sup> ) | (471~1184, 2) |
| PC:DMPC:CH: $\alpha$ -TA | (562~1000, 1)                             | (442~1169, 1) |
|                          | 994                                       | 3810          |

\* All type of liposomes were made from total lipid 200  $\mu\text{mol/ml}$  (Phosphatidylcholine)  
 \* CH, DMPC and  $\alpha$ -TA content was mol ratio of phosphatidylcholine concentration  
 a: Mean particle size(nm), b: Size distribution, c: Polydispersity index (1 : monodisperse, 2 : bidisperse)

**Table III**—The size distribution and mean size of various lipid composition liposomes entrapped N-acetyloxycarbonyl derivatives of 5-fluorouracil

| Lipid Composition           | BGFU                                      | BLFU          | CGFU           | CLFU          |
|-----------------------------|---|---------------|----------------|---------------|
| PC                          | 629 <sup>a</sup>                          | 766           | 768            | 762           |
| PC : CH(4:1)                | (420~1110 <sup>b</sup> , 1 <sup>c</sup> ) | (562~1000, 1) | (562~1000, 1)  | (559~995, 1)  |
| PC : CH(2:1)                | 752                                       | 1531          | 768            | 766           |
|                             | (553~984, 1)                              | (994~2625, 1) | (1233~2356, 1) | (562~1000, 1) |
| PC : CH : DCP(8:2:1)        | 684                                       | 993           | 1609           | 671           |
|                             | (442~1169, 1)                             | (659~1740, 1) | (405~1069, 1)  | (446~1000, 1) |
| PC : CH : SA(8:2:1)         | 508                                       | 633           | 606            | 458           |
|                             | (373~663, 1)                              | (411~1085, 1) | (137~1261, 2)  | (336~698, 1)  |
| PC : CH : DCP: $\alpha$ -TA | 576                                       | 579           | 499            | 489           |
| (8:2:0.1)                   | (266~1057, 1)                             | (159~1461, 1) | (266~697, 1)   | (369~642, 1)  |
| PC : CH : SA : $\alpha$ -TA | 512                                       | 563           | 489            | 502           |
| (8:2:0.1)                   | (376~668, 1)                              | (262~1045, 2) | (65~668, 1)    | (369~657, 1)  |
| PC : CH : SA : $\alpha$ -TA | 602                                       | 1166          | 987            | 768           |
| (8:2:0.1)                   | (601~694, 1)                              | (137~2979, 2) | (92~4798, 1)   | (562~1000, 1) |

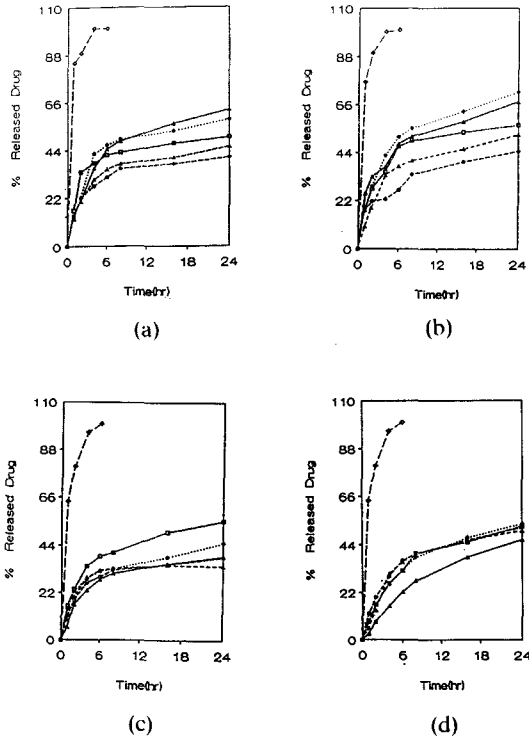
\* All type of liposomes were made from total lipid 60  $\mu\text{mol/ml}$  (phosphatidylcholine)  
 \* CH, DCP, SA content was mole ratio of phosphatidylcholine concentration  
 a: mean particle size(nm), b: Size distribution(nm), c: Polydispersity index (1 : monodisperse, 2 : bidisperse)

인 경우에 비하여 전반적으로 평균입자크기는 입자 분포가 다양해지고 증가되었으며 PC와 DMPC를 1 : 1 mol 비율로 첨가한 조성에서는 입자 크기가 증가된 것을 볼 수 있었다. 특히 BLFU의 경우에는 1056에서 9084 nm의 분포를 가지면서 2분산으로 나타나는 다양

한 입자 분포를 나타내었다.

**리포솜로부터의 방출 속도** - Bangham 등<sup>1)</sup>에 의하면 DCP나 SA와 같이 하전을 띄는 리포솜으로부터 약물의 방출은 사용하는 약물의 물리적 성질에 따라 영향을 받았다. 그러나 5-FU와 이의 유도체의 경우에는 0.9% NaCl 용액에서는 일부분만 해리하여 대부분은 비전해질로 존재하므로 지질막의 표면 전하에 따라 방출 속도에 큰 영향을 받지 않을 것으로 생각된다.

Ganapathi 등<sup>20)</sup>에 따르면 5-FU와 같은 수용성이 큰 약물은 일반적으로 지질에 콜레스테롤을 첨가하면 지질막을 이루는 인지질의 탄화수소 사슬의 회전 자유도를 감소시켜 지질막을 견고하게 만들고 상전이역제되어 방출 속도가 지연되므로 지질 성분이나 첨가된 콜레스테롤의 양에 따라 서로 다른 방출 양상을 나타내었다. 그러나 프로드럭들은 Fig. 2에서 보면 모든 리포솜 조성에서 더 느리게 방출되면서 24시간후에도 50% 전후의 방출률을 나타내었고 지용성이 낮은 BGFU와 CGFU는 BLFU와 CLFU의 두가지 약물보다는 더 많이 방출된 것을 볼 수 있었다. 지용성이 더 큰 BLFU와 CLFU의 경우에는 콜레스테롤의 양에 큰 영향을 받지



**Fig. 2**—Release of 5-fluorouracil prodrugs entrapped in liposome(a: BGFU, b: CGFU, c: BLFU, d: CLFU)

Key:  $\triangle$ —: PC only,  $\blacktriangle$ —: CH 20 mol%,  $\circ$ —: CH 40 mol%,  $\bullet$ —: DCP 10 mol%,  $\square$ —: SA 10 mol%

**Table VI**—Cytotoxicity of free BLFU, CLFU and prodrugs entrapped in three lipid composition liposomes against L1210(Mean±S.D., n=3)

| Lipid Composition                 | ED <sub>50</sub> (μg/ml) |             |
|-----------------------------------|--------------------------|-------------|
|                                   | BLFU                     | CLFU        |
| Drug                              | 0.08±0.019               | 0.07±0.006  |
| PC                                | 0.23±0.014               | 0.31±0.0014 |
| PC : CH : α-TA(10:2:0.1)          | 0.32±0.028               | 0.34±0.071  |
| PC : DMPC : CH : α-TA (5:5:2:0.1) | 0.61±0.100               | 0.37±0.035  |

\* All type of liposomes were made from total lipid 200 μmol/ml (phosphatidylcholine)

**Table V**—Hydrolysis of free BLFU, CLFU and prodrugs entrapped in three lipid composition liposomes in 0.05 M phosphate buffer(pH 7.4) and 80% human plasma(Mean±S.E., n=3)

| Lipid Composition | K <sub>obs</sub> (hr <sup>-1</sup> , ×10 <sup>-1</sup> ) |                 |           |           | t <sub>1/2</sub> (hr) |      |        |      |
|-------------------|--|-----------------|-----------|-----------|-----------------------|------|--------|------|
|                   | BLFU   |                 | CLFU      |           | BLFU                  |      | CLFU   |      |
|                   | PBS <sup>a</sup>   | HP <sup>b</sup> | PBS       | HP        | PBS                   | HP   | PBS    | HP   |
| 1                 | 0.11±0.01  | 1.91±0.10       | 0.19±0.09 | 5.13±1.02 | 60.80                 | 3.63 | 37.30  | 1.35 |
| 2                 | 0.08±0.17  | 1.58±0.23       | 0.15±0.10 | 4.82±0.18 | 86.63                 | 4.38 | 46.20  | 1.44 |
| 3                 | 0.07±0.06  | 1.45±0.15       | 0.14±0.19 | 3.95±0.48 | 99.00                 | 4.76 | 49.50  | 1.76 |
| 4                 | 0.05±0.03  | 1.39±0.27       | 0.10±0.08 | 3.76±1.20 | 138.60                | 4.98 | 69.130 | 1.84 |

\* All type of liposomes were made from total lipid 200 μmol/ml (phosphatidylcholine)  
1: Free prodrug, 2: PC, 3: PC : CH : α-TA(10:2:0.1), 4: PC : DMPC : CH : α-TA(5:5:2:0.1)  
a: pH 7.4 phosphate buffer solution, b: 80% human plasma

**Table VII**—Body weight change, mean survival days, antitumor activity and therapeutic ratio of 5-FU, BLFU, CLFU and prodrugs entrapped in liposome against sarcoma 180 by intraperitoneal injection

| Compound    | Dose <sup>a</sup><br>(mg/kg/<br>day) | Change in Body Weight(%) <sup>b</sup> |        |        | Mean survival T/C(%)<br>days <sup>c</sup> | ILS over Therapeutic Antitumor |        |                       |       |
|-------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--------|--------|---|--------------------------------|--------|-----------------------|-------|
|             |                                      | Day 4                                 | Day 7  | Day 10 |   | control(%)                     | ratio  | activity <sup>d</sup> |       |
| control(1)  |                                      | -0.53                                 | +6.56  | +11.11 | 22.4±6.66                                 |                                |        |                       |       |
| control(2)  |                                      | +4.43                                 | +7.02  | +11.19 | 23.83±2.40                                |                                |        |                       |       |
| control(3)  |                                      | +1.68                                 | +18.57 | +18.57 | 13.17±3.37                                |                                |        |                       |       |
| 5-FU        | 20                                   | -10.88                                | -14.39 | -15.54 | 24.6±22.04                                | 109.82                         | 9.82   |                       | ++    |
|             | 10                                   | -3.38                                 | +6.29  | +10.28 | 36.80±18.79                               | 164.29                         | 64.29  | 1.64                  | +++   |
|             | 5                                    | +1.03                                 | +1.45  | +1.37  | 233±10.03                                 | 104.15                         | 4.15   |                       | +     |
| BLFU        | 57.43(20)                            | +0.66                                 | +1.53  | -4.60  | 31.17±17.02                               | 139.15                         | 39.15  |                       | +++   |
|             | 28.72(10)                            | +0.77                                 | +8.10  | +9.18  | 37.5±7.66                                 | 165.18                         | 65.18  | 1.45                  | +++   |
|             | 14.36(5)                             | +3.17                                 | +8.32  | +9.52  | 46.33±12.68                               | 206.83                         | 106.83 |                       | +     |
| CLFU        | 62.66(20)                            | -3.26                                 | -3.53  | +0.23  | 39.67±11.76                               | 177.10                         | 77.10  | 3.44                  | +++   |
|             | 31.33(10)                            | +1.95                                 | +4.38  | 7.47   | 37.5±7.66                                 | 167.41                         | 67.41  |                       | +++   |
|             | 15.67(5)                             | 1.76                                  | +6.20  | +10.02 | 32.67±19.21                               | 145.85                         | 45.85  |                       | +++   |
| BLFU (PC)   | 57.43(20)                            | +0.99                                 | +5.83  | 0.00   | 45±18.11                                  | 188.84                         | 88.84  | 2.95                  | +++   |
|             | 28.72(10)                            | -0.11                                 | +7.65  | +9.11  | 34.22±1.37                                | 143.52                         | 43.52  |                       | +++   |
|             | 14.36(5)                             | +6.31                                 | +8.39  | +8.61  | 18.17±7.54                                | 76.25                          | -23.75 |                       | toxic |
| BLFU (DMPC) | 57.43(20)                            | +3.68                                 | -1.32  | -8.40  | 22.83±15.78                               | 173.35                         | 73.35  | 2.82                  | +++   |
|             | 28.72(10)                            | +1.12                                 | +0.58  | +3.13  | 26.62±1.57                                | 201.97                         | 101.97 |                       | +++   |
|             | 24.36(5)                             | -2.65                                 | -5.35  | -9.80  | 25.83±7.46                                | 196.28                         | 96.28  |                       | +++   |
| CLEU (PC)   | 62.66(20)                            | -2.65                                 | -5.35  | +9.80  | 15.83±10.80                               | 66.43                          | -33.57 | e                     | toxic |
|             | 31.33(10)                            | 4.33                                  | -7.73  | +2.55  | 7±3.35                                    | 46.16                          | -53.84 |                       | toxic |
|             | 15.67(5)                             | -0.17                                 | +2.09  | -0.26  | 25.51±7.37                                | 107.01                         | 7.01   |                       | +     |
| CLFU (DMPC) | 62.66(20)                            | -10.00                                | -1.32  | +3.72  | 7.33±0.58                                 | 55.66                          | -44.34 | e                     | toxic |
|             | 31.33(10)                            | -2.25                                 | +0.52  | -      | 8.2±2.17                                  | 62.26                          | -37.74 |                       | toxic |
|             | 15.67(5)                             | -1.56                                 | -5.35  | +13.08 | 13.67±5.39                                | 103.80                         | 3.80   |                       | +     |

a: ICR mice were intraperitoneally implanted with 10<sup>6</sup> cells of Sarcoma 180 and were administered intraperitoneally once daily for 7 days starting after transplantation. ( ) are the dose as 5-FU  
 b: The increase or decrease in the ratio of the mean body weight at day 4, 7 and 10 to that at day c  
 c: The mice were observed until 60 days after the tumor implantation. Values are Mean±S.D.  
 e: Can not be calculated because value was-value

않았으며 DCP와 SA와 같은 첨가제의 종류에 따라 약간 더 높은 방출률을 보였다. 그러나 지용성이 약간 낮은 BGFU와 CGFU는 5-FU와 비슷한 경향을 나타내 콜레스테롤의 양이 증가하면 약간 느리게 방출되었다. 또한 첨가된 DCP나 SA에 의해서 BGFU는 거의 영향을 받지 않았으나 CGFU와 BLFU는 오히려 DCP에 의해서 방출 속도가 증가되었다.

따라서 봉입률이 높으면서 첨가제의 영향을 받지 않고 방출이 억제되는 BLFU와 CLFU의 두가지 약물을 선택하여 지질 농도를 증가시켜 리포솜을 제조하고 방출을 더 지연시키기 위하여 DMPC를 soybean PC와 1 : 1 mol 비율로 리포솜을 제조하여 실험하였다.

**80% 사람 혈장 및 원충액에서의 가수분해** - Table V는 가수분해를 측정한 결과이며 pH 7.4 인산염 완충

액에서는 3가지 조성 리포솜에 봉입된 약물이 훨씬 안정하여 반감기가 아주 높게 증가되었으며 특히 DMPC가 들어간 리포솜에 봉입된 BLFU에서는 2배 정도 연장된 반감기를 가졌다. 80% 사람 혈장에서는 약물 자체에 비해서는 안정하였지만 완충 용액에 비해서는 분해속도가 매우 빨랐으며 이는 혈장 중에 존재하는 단백질이 리포솜막을 불안정하게 하여 약물의 방출을 증가시킨다는 Ganapathi 등<sup>20)</sup>의 보고와 일치하고 있다. 특히 PC : DMPC(1 : 1)로 구성된 리포솜이 약간 더 안정하여 CLFU와 BLFU가 각각 1.84와 4.98시간이었다.

**세포 독성** - Table VI은 L1210에 대한 세포 독성 정도를 나타낸 것으로 리포솜 현탁액이 약물 자체에 비해서 3에서 5배 정도 높은 ED<sub>50</sub> 값을 나타내며 세포독



성이 낮아진 것을 볼 수 있다. 즉 BLFU는 PC : DMPC(1 : 1)로 구성된 리포솜에 봉입시킨 것의 ED<sub>50</sub> 값이 0.77로 아주 높은 값을 나타내었으나 CLFU는 세 가지 조성의 리포솜 현탁액이 별 차이 없이 모두 약물 자체에 비해서 높은 값을 나타내었다.

효과를 나타내기 위해서는 모약물인 5-FU로 전환되어야 하는데 리포솜은 약물 자체에 비해서 훨씬 느린 속도로 전환되므로 세포 독성 정도가 낮아진 것으로 보인다.

따라서 가수분해 실험과 세포 독성 정도의 실험 결과를 가지고 볼 때 PC : DMPC (1 : 1) 조성의 리포솜에 약물을 봉입시켜 생체에 적용시 안정할 것으로 사료된다.

**항암력** - 항암 실험 결과는 Table VII에 나타낸 바와 같이 60일 이상은 일괄적으로 60일로 하여 계산하였다. BLFU를 봉입한 리포솜 제제는 모두 BLFU 자체보다 항암 효과가 우수했으며 특히 DMPC 리포솜의 경우 모든 용량에서 우수하여 20, 10 및 5 mg/kg에서 생존비가 각각 173.35, 201.97 및 196.28%이었다. 이 때 DMPC 함유 리포솜을 대조군으로 투여하였을 때 생존일수가 13.17일로 오히려 감소하고 약간의 체중감소를 동반하면서 효과를 나타낸 것으로 보아 지질에 의한 약간의 독성이 있는 것으로 사료된다. 또한 CLFU를 봉입한 리포솜의 경우에는 약간 달라 평균 생존일수가 대조군보다 모든 용량에서 감소되었는데 이러한 현상은 doxorubicin을 MLVs의 형태로 투여하여 항암 실험을 한 경우에도 관찰되었다.<sup>12)</sup>

## 결 론

일반적으로 상용되고 있는 항암제인 5-FU에 N-a-cyloxycarbonyl 유도체를 결합시킨 BGFU, BLFU, CGFU 및 CLFU의 4종의 프로드럭을 제조하여 이들 약물을 여러 조성의 리포솜에 봉입시킨 후 인지질 조성에 따른 봉입률의 변화, 입자 크기 및 방출 실험 그리고 *in vitro*에서 세포독성과 안정성을 검토하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 봉입률은 5-FU보다는 높아졌고 유수분배계수가 높을수록 증가하여 봉입 정도는 CLFU > BLFU > CGFU > BGFU이었다.
2. 콜레스테롤, DCP 및 SA가 첨가된 리포솜에서는 봉입률이 감소되었으며 리포솜 현탁액 중 지질 농도가

100 μmol/ml일때까지는 비례적으로 증가되었다.

3. 제조된 리포솜들의 크기는 인지질 조성 및 약물의 물리화학적 성질에 따라 다양했고, 이들의 방출 속도는 BGFU와 CGFU에서 콜레스테롤에 의하여 방출속도가 감소되는 경우를 제외하고 첨가제에 의하여 영향을 받지 않았다.

3. 리포솜에 봉입시킨 BLFU와 CLFU의 세포 독성은 약물 자체보다 3~5배 정도 감소되었다.

4. 약물은 pH 7.4 인산염 완충액에서는 매우 안정하였으나 혈장에서는 완충액에서보다 가수분해가 빨리 진행되었고 가장 안정한 DMPC가 함유 리포솜에서 약물의 반감기는 각각 4.98과 1.89 시간이었다.

5. BLFU를 봉입한 리포솜은 모든 용량에서 아주 우수한 항암효과를 보여 주었지만 CLFU를 봉입시킨 모든 리포솜은 독성을 나타내었다.

## 감사의 글

이 논문은 1994. 3~1996. 2 한국과학재단 핵심전문 연구비에 의해 연구되었다. 이에 감사드린다.

## 문 헌

- 1) Bangham, A. D., Standish, M. M. and Watkins, J. C. : Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* **13**, 238 (1965).
- 2) Mayer, L. D., Bally, M. B., Hope, K. J. and Cullis, P. R. : Techniques for encapsulating bioactive agent into liposomes. *Chem. Phys. Lipids*. **40**, 335 (1986).
- 3) Huang, C. H. : Studies on phosphatidylcholine vesicles formation and physical characteristics. *Biochemistry* **8**, 344 (1969).
- 4) Beamer, D. W. and Bangham, A. D. : Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochim. Biophys. Acta*. **443**, 629 (1976).
- 5) Tyrrell, D. A., Heata, T. D., Colley, C. M. and Brenda, E. R. : New aspects of liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*. **457**, 259 (1976).
- 6) Stephen, P. S. and Paul, A. K. : Liposomal entrapment of fluoxuridine. *J. Pharm. Sci.* **66**, 984 (1977).

- 7) Sasaki, H., Matsukawa, Y., Hashida, M. and Sezaki, H. : Characterization of alkylcarbonyl derivatives of 5-fluorouracil and their application to liposome. *Int. J. Pharm.* **36**, 147 (1987).
- 8) Tokunaga, Y., Iwasa, T., Fusisaki, J., Sawai, S. and Kagayma, A. : Liposomal sustained-release delivery systems for intravenous injection III. Antitumor activity of lipophilic mitomycin C pro-drug-bearing liposomes. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 3565 (1988).
- 9) Tokunaga, Y., Iwasa, T., Fusisaki, J., Sawai, S. and Kagayma, A. : Liposomal sustained-release delivery systems for intravenous injection IV. Antitumor activity of newly synthesized lipophilic 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine prodrug-bearing liposomes. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 3574 (1988).
- 10) Tokunaga, Y., Iwasa, T., Fusisaki, J., Sawai, S. and Kagayma, A. : Liposomal sustained-release delivery systems for intravenous injection V. Biological disposition of liposome-entrapped lipophilic prodrug of 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 4060 (1988).
- 11) Kim, C. K. and Park, D. K. : Stability and drug release properties of liposomes containing cytarabine as a drug carrier. *Arch. Pharm. Res.* **10**, 75 (1987).
- 12) Rustum, Y. M., Dave, C., Mayhew, E. and Papahadjopoulos, D. : Role of liposome type and route of administration in the antitumor activity of liposome-entrapped 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine against mouse L1210 leukemia. *Cancer Res.* **39**, 1390 (1979).
- 13) Guo, L. S. S., Hamilton, R. L., Goerke, J. and Weinstein, J. N. : Interaction of unilamellar liposomes with serum lipoproteins and apolipoproteins. *J. Lipid Res.* **21**, 993 (1980).
- 14) Thayer, P. S., Himmelfarb, P. and Watt, G. L. : Cytotoxicity assay with L1210 cell *in vitro*, comparison with L1210 *in vitro* and KB cells *in vitro*. *Cancer Chemother. Rep.* **2**, 1 (1971).
- 15) Hoshiko, T., Ozaki, S., Watanabe, Y., Ogasawara, T., Yamauchi, S., Fujiwara, K., Hoshi, A. and Iigo, M. : 5-fluorouracil derivatives V. Synthesis and antitumor activities of (alkylthio) carbonyl-5-fluorouracils. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 2832 (1985).
- 16) Perez-Soler, R., Khokhar, A. R., Hacker, M. P. and Lopez-Berestein, G. : Toxicity and antitumor activity of cis-bis-cyclopentene-carboxylato-1, 2-diaminocyclohexane platinum(II) encapsulated in multilamellar vesicles. *Cancer Res.* **46**, 6269 (1986).
- 17) Hisaoka, M., Tsukada, K., Morioka, T., Inomata, T. and Arakawa, M. : Studies on liposome-encapsulated carboquone IV. Enhancement of antitumor activity of carboquone against Ehrlich ascites carcinoma by encapsulation. *J. Pharm. Dyn.* **5**, 34 (1982).
- 18) Jee, U. G., Park, M. S., Lee, G. W. and Lyu, Y. G. : Characteristics and drug release profiles of multilamellar vesicles (MLV) and microemulsified liposome (MEL) entrapped 5-fluorouracil and its derivatives. *J. K. Pharm. Sci.* **25**, 249 (1995).
- 19) Betageri, G. V. and Parsons, D. L. : Drug encapsulation and release from multilamellar and unilamellar liposomes. *Int. J. Pharm.* **81**, 235 (1992).
- 20) Ganapathi, R. and Krishan, A. : Effect of cholesterol content of liposomes on the encapsulation, efflux and toxicity of adriamycin. *Biochim. Pharmacol.* **33**, 698 (1984).