

흰쥐에서 올리고펩타이드 함유 리포솜의 근육주사후 체내동태 및 임파이행

신대환 · 조병석 · 최규석 · 송석길 · 이종길 · 정연복[†]

충북대학교 약학대학 약동력학국가지정연구실, 충북BIT연구중심대학육성사업단
(2008년 6월 3일 접수 · 2008년 6월 19일 승인)

Pharmacokinetics and Lymphatic Delivery of Oligopeptide after Intramuscular Injection of Oligopeptide-bearing Liposomes to Rats

Dae Hwan Shin, Byung Suk Cho, Kyu Seok Choi, Sukgil Song, Chong Kil Lee and Youn Bok Chung[†]

National Research Laboratory of PK/ID, CBITRC, College of Pharmacy,
Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea
(Received June 3, 2008 · Accepted June 19, 2008)

ABSTRACT – The purpose of the present study was to examine the pharmacokinetics and lymphatic delivery of the oligopeptide, a model peptide of X antigen epitope peptides, after the intramuscular administration of the peptide-bearing liposomes in rats. ¹⁴C-labelled peptide was used as a tracer to analyze the peptide levels in plasma, bile, urine, tissue homogenates, and lymph nodes (superior cervical nodes, brachial nodes and superior mesenteric nodes). Model peptide rapidly disappeared from the plasma by 30 min (α phase) after i.v. administration, which was followed by the late disappearance. The apparent plasma half-lives ($t_{1/2(\alpha,app)}$) of the peptide at the α phase when administered at a dose of 0.2 - 1.0 mg/kg were about 5 min. The maximum plasma concentration (C_{max}) was 1.52 μ g/mL, after the i.m. administration of the peptide at a dose of 1.0 mg/kg. The bioavailability, which was calculated from the time zero to last quantitative time, of the i.m. administered peptide was over 60%. Of the various tissues tested, the peptide was mainly distributed in the kidney after the i.m. administration. The peptide levels in the kidney 3 hr after the i.m. administration were higher than those of maximum plasma concentration (C_{max}). The cumulative amounts of the peptide found in the urine 72 hr after the administration of 1.0 mg/kg were 2-fold higher than those in the bile, suggesting that the peptide is mostly excreted in the urine. Moreover, the concentrations of the peptide in the lymph nodes were as high as that of the plasma and the tissues. In conclusion, the peptide concentration in the lymph nodes was maintained by 24 hr after the i.m. administration of the peptide-bearing liposomes.

Key words – Oligopeptide, Pharmacokinetics, Lymphatic delivery, Liposomes

항원성 펩타이드 및 단백질이 면역반응에 관여하는 T세포를 효과적으로 활성화시키기 위해서는 투여 후 임파계로 이행시킬 필요가 있다. 정맥내 투여는 혈관벽의 낮은 투과성 때문에, 또한 임파관내 투여는 임상적용의 어려움 때문에 효율적인 투여경로라 할 수 없다. 한편, 소화관 또는 점막투여의 경우에는 분자량이 큰 수용성 약물의 흡수량은 극히 적다. 따라서 임파계로의 효율적인 투여경로로는 근육주사를 들 수 있다. 실제로 리포솜과 같은 적당한 수송체를 이용하여 임파계로의 약물송달을 위한 연구 결과가 많이 보고되고 있다.¹⁻³⁾

바이러스성 질환에 대한 면역반응은 체액성 면역반응과

세포성 면역반응으로 크게 구분된다. 항체에 의해 조절되는 체액성 면역반응은 혈액 또는 체액에 존재하는 바이러스 입자와 직접 결합하여 바이러스의 부착을 억제하거나 제거하게 되지만, 일단 세포 내로 들어간 바이러스를 선택적으로 제거하는 면역반응은 없으며, 세포독성 T 임파구(CTL)의 활성화에 의해 감염된 세포를 선택적으로 파괴함으로써 바이러스의 증식을 저해하게 된다. 따라서 바이러스 감염을 완전히 제거하기 위해서는 체내의 면역반응을 통하여 바이러스에 특이적으로 작용할 수 있는 CTL을 유도하여 감염세포를 직접 파괴할 수 있어야 한다.

B형 간염 바이러스(HBV)에 감염되면, 간세포는 HBV 유전자에 의해 네 가지 항원단백질을 생성하고 세포성 면역반응이 활발히 일어나서 자연치유가 되기도 하지만, 바이러스가 감염된 숙주세포는 다양한 기전으로 면역체계의 공격을

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 043)261-2824, E-mail : chungyb@chungbuk.ac.kr

피해갈 수 있기 때문에 일부는 만성간염, 간경화 혹은 간암으로 진행하게 된다.^{4,7)} 이렇게 정상적인 면역체계를 회피한 감염세포를 다시 면역세포로 하여금 인식하게 하여 질병을 치유하고자 하는 노력이 다양하게 시도되어 왔다.⁸⁻¹⁵⁾ 일례로서, HBV에 감염된 세포는 HBx(Hepatitis B virus X antigen)항원을 생성하게 되고, HBx 단백질이 세포의 MHC 분자의 발현을 억제하여 숙주의 면역체계를 피할 수 있다고 알려져 있다.¹⁶⁻²¹⁾

본 연구에서는 HBx 단백질 유래 펩타이드를 간염 및 간암세포를 특이적으로 제거하는 치료제로 개발하기 위한 선행 기초 연구로서 이와 유사한 모델펩타이드를 사용하였다. 즉, 9개의 아미노산서열을 갖는 올리고펩타이드를 사용하여 임파이행을 검토하였다. 또한, 펩타이드 항원 그 자체로는 체내에서 쉽게 분해되므로 리포솜을 사용하여 임파절로의 이행을 높이고자 하였다.²²⁾ 즉, HBx 단백질 유래 펩타이드와 유사한 모델펩타이드를 함유한 리포솜을 제조하여 흰쥐에 근육주사한 후 흡수, 분포 및 배설과정의 체내동태를 검토하였으며, 임파이행 가능성을 확인하였다.

실험 방법

실험재료 및 기기

Phosphatidyl- β -oleoyl- γ -palmitoyl ethanolamine(POPE) 및 cholesterol hemisuccinate(CHOH)는 Sigma Chemical사(St. Luis, MO, 미국)로부터 구입하여 사용하였다. 모델펩타이드(Cys-Leu-Phe-Lys-Asp-Trp-Glu-Glu-Leu) 및 표준품 등의 시약은 목암생명공학연구소(용인시, 경기도, 한국)로부터 공급받아 사용하였으며, [¹⁴C]-모델펩타이드는 Multiple Peptide System사(Sandiego, CA, 미국)로부터 공급받아 사용하였다. 에텔(Tedia Co., INC., 미국), 메탄올(Fisher Scientific Co., Ltd., 미국) 및 헤파린(Ujohn., No. 268-5, 미국)을 구입하여 사용하였으며, 기타 시약은 모두 특급 또는 HPLC급을 사용하였다.

기기로는 β -Counter(M1450, MicroBeta[®], TRILUX, WALLAC, 미국), pH 미터(M520, Orion Research Inc., 미국), 저온원심분리기(GS-6KR, Beckman Industries, 미국), 탁상용원심분리기(Microfuge E, Beckman Industries, 미국), 냉동고(OPR-DFU-250, Operon ENG. Co., 국산), 초음파세척기(M2010, Jinwoo ENG. CO., 국산), 진탕기(Eurostar, IKA-Labortechnik Co., 독일) 등을 사용하였다.

실험동물

실험동물은 240-280 g의 S.D.계 흰쥐를 샘타코(경기도 안

성, 한국)로부터 구입하여 온도 23 \pm 2°C, 상대습도 50 \pm 10%, 환기횟수 10-15회/hr, 조명주기 12 hr 점등/12 hr 소등, 조도 150-300 Lux의 환경하에서 사육상자에 1마리씩 수용하여 흰쥐용 사료(삼양유지사료(주), 강원도 원주시, 한국) 및 필터를 이용하여 여과된 정제수를 자유섭취시키면서 약 4주간의 순화기간을 거친 후, 실험에 사용하였다.

생체시료중 모델펩타이드의 분석

액체 scintillation counter(β -Counter)를 사용하여 [¹⁴C]의 방사활성을 측정하였다. 샘플 100 μ L를 3 mL 카테일을 함유한 바이얼에 가한 후 수초간 가볍게 진탕한 후 counter에 장착하였다. [¹⁴C]전용 프로그램의 사용자 번호로 고정된 후 자동으로 측정하였으며, 방사활성은 dpm(degradation per minute)값으로 계산하였다. 얻어진 dpm값으로부터 미리 작성한 검량선을 이용하여 [¹⁴C]-펩타이드의 농도를 각각 산출하였으며, 샘플중 비표식(unlabelled) 농도는 비례식을 이용하여 계산하였다.

리포솜의 제조

기존의 문헌²²⁾에 보고된 방법대로 제조하였다. 즉, POPE(Phosphatidyl- β -oleoyl- γ -palmitoyl ethanolamine)와 CHOH(cholesterol hemisuccinate)를 클로로포름에 7:3 몰 비로 용해시킨 후 유리관에서 질소가스로 건조시켰다. 10 mg의 리피드에 펩타이드 총량이 1 mg 되도록 하였다. 펩타이드는 0.1% 아세트산암모늄에 녹인 다음 유리관에 넣고 강하게 섞었다. 유화액을 기구(Extrude, Lipex Biomembranes, Vancouver, BC, 캐나다)에 장착한 두 겹의 0.4 μ m 폴리카보네이트 막을 통과시켜서 균질한 크기의 리포솜을 제조하였다. 제조한 리포솜은 4°C에 보관하였다.

정맥투여 및 근육주사 후 혈장중 농도 측정

흰쥐를 에텔로 마취시킨 후 좌측 대퇴부 동맥 및 정맥에 폴리에틸렌튜브(PE-50, Intramedic, Clay Adams, 미국)를 삽관하였다. 흰쥐가 마취에서 회복된 후 모델펩타이드를 함유한 리포솜 주사액을 정맥투여하였다. 정맥투여 용량은 [¹⁴C]-펩타이드(30 mCi/mmol, 8 μ Ci/kg)를 함유한 리포솜 제 0.2 mg/kg 및 1.0 mg/kg을 각각 투여하였다. 근육주사를 위해서는 좌측 대퇴부 동맥에만 폴리에틸렌튜브를 삽관한 후 정맥투여와 같은 용량을 근육주사하였다. 투여 후 혈액을 대퇴동맥으로부터 경시적으로 채취하였다. 혈액 100 μ L를 받아 탁상용 원심분리기를 사용하여 원심분리후 얻어진 혈장 50 μ L를 정량에 사용하였다.

근육주사 후 담즙 및 요중 배설 실험

흰쥐를 에텔로 가볍게 마취시킨 후 회복한 다음 폴리에틸렌 튜브(PE-10, Intramedic, Clay Adams, 미국)를 담관에 삽관하고, 복부를 다시 봉합하였다. 흰쥐가 마취로부터 회복된 후에 리포솜을 근육주사하였다. 투여 용량은 [¹⁴C]-펩타이드(30 mCi/mmol, 8 μCi/kg)를 함유한 리포솜 제제를 근육주사(0.2 mg/kg, 1.0 mg/kg)하였다. 투여 후 담즙을 경시적으로 채취하였다. 담즙 시료를 마이크로튜브에 받아서 무게를 측정 한 다음, 탁상용 원심분리기를 사용하여 원심분리 후 얻어진 50 μL를 정량에 사용하였다. 담즙의 체적은 담즙의 비중을 1.0으로 가정하여 무게를 측정하여 산출하였다.

요 시료의 채취를 위해서는 투여 후 흰쥐를 대사케이지(Model: 3700, Tecniplast, 이탈리아)에 넣어 자유롭게 활동시키면서 경시적으로 채취하였다. 투여 용량은 담즙배설 시험과 같은 용량으로 하였다. 요 시료는 담즙과 같은 방법으로 체적을 산출한 후, 새로운 마이크로튜브에 옮겨서 탁상용 원심분리기를 사용하여 원심분리 후 얻어진 50 μL를 정량에 사용하였다.

근육주사 후 조직분포 실험

흰쥐가 마취로부터 회복된 후에 [¹⁴C]-펩타이드(30 mCi/mmol, 8 μCi/kg)를 함유한 리포솜 제제를 근육주사(1.0 mg/kg)한 후 일정시간이 경과하였을 때, 흰쥐의 경동맥으로부터 전혈을 탈혈시켜 안락사시켰다. 즉시 회복하여 다음의 주요 조직 및 장기들을 절취하였다. 즉 간장, 신장, 비장, 위, 소장, 대장, 심장, 폐, 근육, 피부를 차례대로 적출하였다. 조직 적출 시간은 근육주사 후 체내 축적성을 검토하기 위해 3, 6, 12 및 24시간으로 하였다. 조직을 적출한 후에는 0°C 생리식염수로 세척하여 표면에 존재하는 혈액을 제거하였다. 적출한 각 조직중 일정량을 1N NaOH을 가한 후 24시간 방치하여 조직을 균질화시켰다. 정량시에는 같은 체적의 1N HCl을 가하여 중화시킨 후 50 μL를 취하여 정량에 사용하였다. 시료는 33.3%의 균질액을 사용하였으며 최종 조직농도의 산출에는 이를 보정하였다.

근육주사 후 임파이행 실험

흰쥐가 마취로부터 회복된 후에 [¹⁴C]-펩타이드(30 mCi/mmol, 8 μCi/kg)를 함유한 리포솜 제제를 근육주사(1.0 mg/kg)한 후, 임파절 채취시간 직전에 우레탄 마취(1 mg/kg, 복강주사)를 한 후 회복하여 채취시간에 맞추어 각 임파절을 절취하였다. 즉 상부임파절(목부위의 superior cervical node, 겨드랑이 부위의 brachial nodes), 하부임파절(장관 임파절인 superior mesenteric node)를 차례대로 적출하였다. 임파절 적출시간은

근육주사한 후 임파이행의 지속성을 검토하기 위해 3, 6, 12 및 24시간으로 하였다. 임파절을 적출한 후에는 0°C 생리식염수로 세척하여 표면에 존재하는 혈액을 제거하였다. 적출한 각 임파절 중 펩타이드의 정량은 조직분포와 같은 방법으로 하였다.

약물동태학적 해석

모델펩타이드 함유 리포솜 제제를 정맥주사한 후 혈장중 농도는 20-30분까지 급격한 소실을 보이며, 이후 혈장중 농도가 일시적으로 증가하는 현상이 나타나며 지속되었다. 전체의 혈장중농도-시간 데이터는 일반적인 컴파트먼트 해석이 불가능하다. 따라서, 초기 직선영역에서의 혈장중농도-시간 곡선 기울기로부터 분포전상(α상)에서의 겉보기 소실 속도정수(k_{e(α),app}) 및 겉보기 소실 반감기(t_{1/2α,app})를 다음식으로부터 각각 산출하였다.

$$k_{e(\alpha),app} = -2.303 \times \text{기울기}$$

$$t_{1/2\alpha,app} = \frac{0.693}{k_{e(\alpha),app}}$$

모델펩타이드 함유 리포솜 제제를 근육주사한 후의 각 혈장중 농도는 초기 시간(20-30분)대에서 일시적으로 상승되었다가 감소되며, 이후 혈장중 농도가 서서히 증가하는 현상을 나타내었다. 전체의 혈장중농도-시간 데이터는 일반적인 컴파트먼트 해석이 불가능하다. 따라서, 모델펩타이드를 근육주사한 후 4시간 이후의 영역에서의 직선의 기울기로부터 겉보기 소실 속도정수(k_{e,app}) 및 겉보기 소실 반감기(t_{1/2,app})를 각각 산출하였다.

모델비의존적 해석

AUC 같은 파라미터를 산출시 컴파트먼트모델을 미리 가정할 경우 오차가 발생할 수 있다. 따라서, 혈장 중 약물농도-시간 데이터로부터 시간 0에서 마지막 채혈시간까지의 혈장중 농도 곡선하 면적(AUC_{0-t})은 사다리꼴 면적 공식의 함으로부터 산출하였다.

결과 및 고찰

정맥주사 및 근육주사한 후 혈장 중 농도 패턴

모델펩타이드를 함유한 리포솜 제제를 정맥주사(0.2 mg/kg 및 1.0 mg/kg)한 후 혈장중 농도는 20-30분까지 급격한 소실을 보이며, 이후 혈장중 농도가 일시적으로 증가한 후 지속되는 현상이 나타났다(Figure 1). 전체의 혈장중농도-시간 데이터는 컴파트먼트 해석이 불가능하다. 따라서, 초기 시간

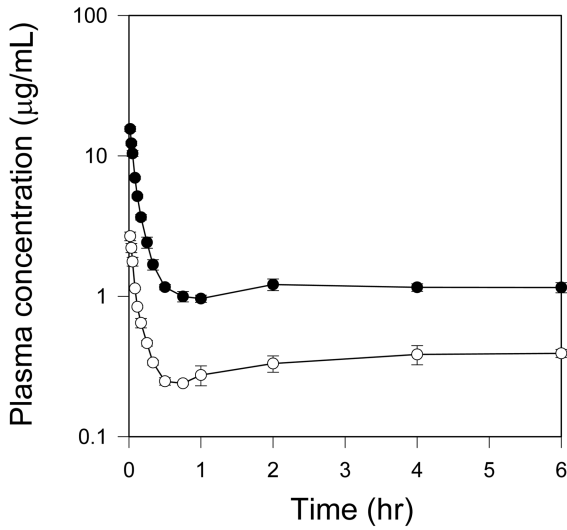


Figure 1—Plasma concentration-time plots of model peptide after i.v. bolus administration of the peptide-bearing liposomes at the dose of 0.2 mg/kg (○) and 1.0 mg/kg (●) in rats. Each point represents the Mean±S.E. of 3 rats.

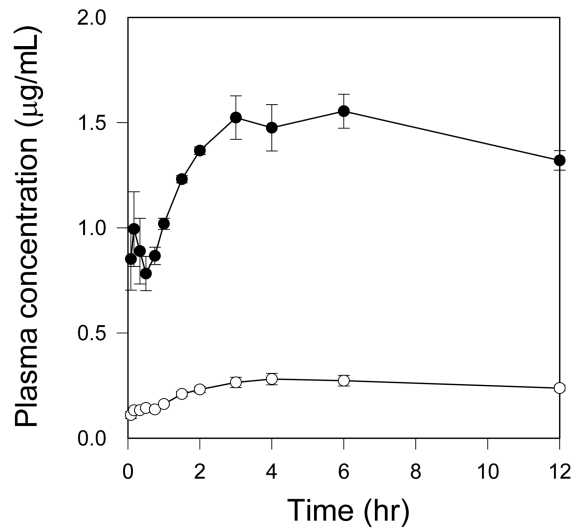


Figure 2—Plasma concentration-time plots of model peptide after i.m. administration of the peptide-bearing liposomes at the dose of 0.2 mg/kg (○) and 1.0 mg/kg (●) in rats. Each point represents the Mean±S.E. of 3 rats.

Table I—Pharmacokinetic Parameters of the Peptide after i.v. Bolus or i.m. Administration of the Peptide-bearing Liposomes at the Dose of 0.2 mg/kg and 1.0 mg/kg in rats^{a)}

Route	Parameter	Dose (mg/kg)	
		0.2	1.0
i.v.	AUC _{0-6 hr} (µg·hr·mL ⁻¹)	8.08±0.377	2.27±0.272
	t _{1/2α,app} (min)	5.96±0.199	5.72±0.578
i.m.	AUC _{0-6 hr} (µg·hr·mL ⁻¹)	8.03±0.288	1.42±0.108
	AUC _{0-12 hr} (µg·hr·mL ⁻¹)	17.0±0.607	3.17±0.010
	t _{1/2,app} (hr)	52.8±14.0	29.7±9.73

a) Mean±S.E. of three rats.

대(30분까지)에서의 데이터를 사용하여, 분포전상(α)에서의 겉보기 소실 반감기(t_{1/2α,app})를 산출하였다(Table I). 초기 시

간대에서의 반감기는 약 5분 정도로서 급속한 소실을 보였다. 이후의 혈장중농도가 일시적으로 증가된 후 완전한 소실을 보이는 것은 리포솜에 봉입된 펩타이드에 기인하는 것으로 추정된다. 투여량 0.2 mg/kg 및 1.0 mg/kg으로 흰쥐에 근육주사한 후의 혈장중 농도 패턴을 Figure 2에 각각 나타내었다. 정맥 주사한 후의 혈장중 농도 패턴과 유사한 양상을 나타내 주고 있다. 즉, 혈장중 농도가 일시적으로 감소한 후에 다시 서서히 증가하여 지속되는 경향을 나타내었다. 4시간 이후의 혈장중 소실을 반영하는 반감기(t_{1/2,app})는 저용량 및 고용량에서 30-50시간의 높은 값을 나타냈으며, 두 용량 간에는 유의한 차이는 보이지 않았다(Table I). 한편, 6시간까지의 AUC_t를 사용하여 산출한 근육주사시의 생체이용률은 모두 60% 이상의 값을 보였다.

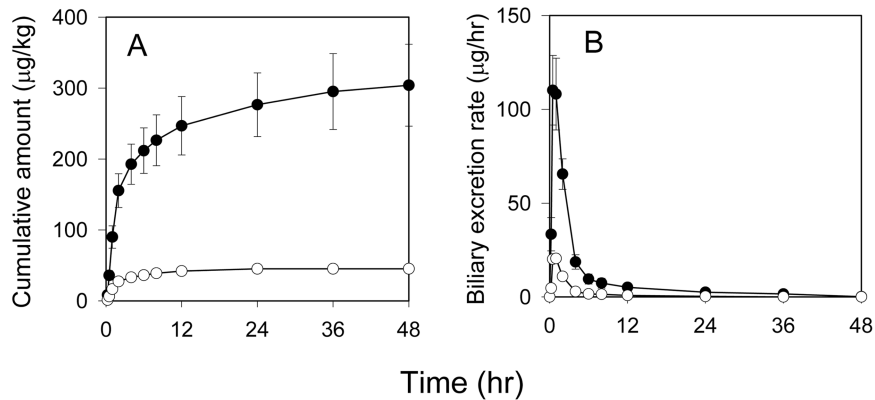


Figure 3—Biliary excretion (A) and biliary excretion rate (B) of model peptide after i.m. administration of the peptide-bearing liposomes at the dose of 0.2 mg/kg (○) and 1.0 mg/kg (●) in rats. Each point represents the Mean±S.E. of 3 rats.

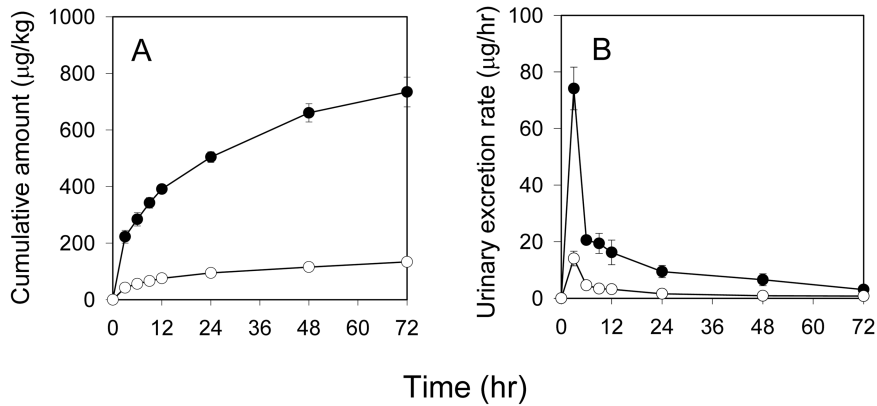


Figure 4—Urinary excretion (A) and Urinary excretion rate (B) of model peptide after i.m. administration of the peptide-bearing liposomes at the dose of 0.2 mg/kg (○) and 1.0 mg/kg (●) in rats. Each point represents the Mean±S.E. of 3 rats.

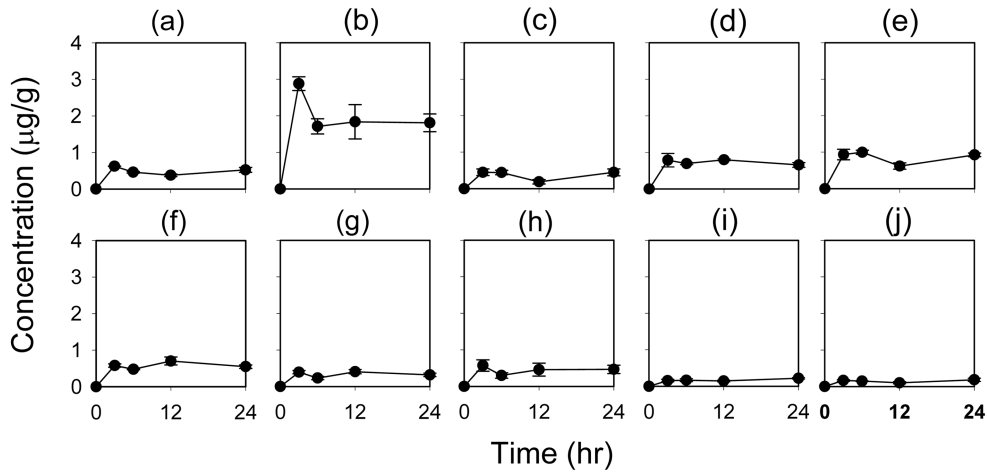


Figure 5—Tissue distribution of model peptide after i.m. administration of the peptide-bearing liposomes at the dose of 1.0 mg/kg in rats. Each point represents the Mean±S.E. of 4 rats.

Keys: (a) Liver, (b) Kidney, (c) Spleen, (d) Stomach, (e) Small intestine, (f) Large intestine, (g) Heart, (h) Lung, (i) Muscle, (j) Skin

근육주사한 후 담즙 및 요중 배설

투여량 0.2 mg/kg 및 1.0 mg/kg으로 흰쥐에 근육투여한 후의 담즙배설 양상을 Figure 3에 각각 나타내었다. 단위시간당 담즙배설량, 즉 담즙배설속도는 6시간까지 높은 값을 보였으며, 12시간이후는 낮게 나타났다. 즉, 모델펩타이드는 12시간 이내에 대부분 담즙배설되는 것으로 생각되었다.

72시간까지의 누적 요중배설(투여량 0.2 mg/kg 및 1.0 mg/kg)은 모두 12시간까지 높은 값을 보였으며, 24시간이후는 낮게 나타났다(Figure 4). 그러나 고용량(1.0 mg/kg)에서는 24시간 이후에도 요중배설이 양은 작지만 지속되는 경향을 보였다. 또한 요중 누적배설량은 담즙배설량과 비교하면 약 2배의 큰 값을 보였다.

근육주사한 후 조직분포

투여량 1.0 mg/kg으로 흰쥐에 근육투여한 후의 시간에 따

른 각 조직으로의 분포량을 Figure 5에 나타내었다. 조직 분포성은 신장>소장=위장=대장>간장>비장=심장=폐=근육=피부의 순서로 나타났으며, 특히 신장으로의 분포가 높았다. 한편 1 mg/kg을 근육주사한 후 최대 혈장중농도(C_{max})는 3시간대(t_{max})에서 1.52 µg/mL이었다(Figure 2). 조직중 농도-시간 그래프를 보면 신장의 조직중 농도는 근육주사후 3시간에서 최대 혈장중농도(C_{max})의 약 2배의 높은 값을 보이며, 24시간 이후에도 높은 신장 조직중 농도를 유지하였다(Figure 5(b)). 따라서, 신장으로의 이행성이 매우 높으며, 이로 인해 요중배설량이 담즙배설량보다 높은 것으로 추정된다.

근육주사한 후 임파이행

투여량 1.0 mg/kg으로 흰쥐에 근육투여한 후의 시간에 따른 각 임파절로의 분포량을 Figure 6에 나타내었다. 임파절

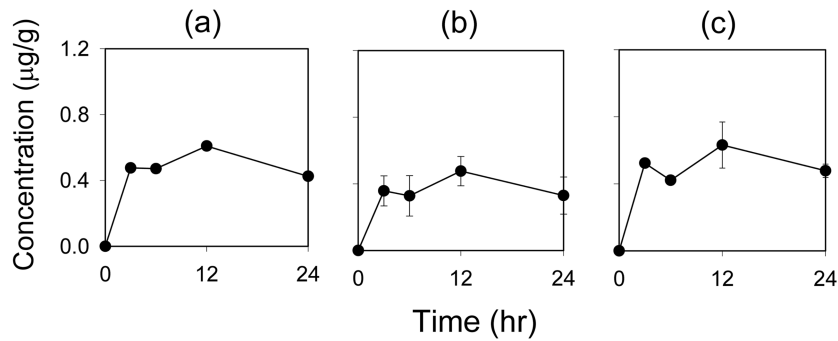


Figure 6—Lymphatic distribution of model peptide after i.m. administration of the peptide-bearing liposomes at the dose of 1.0 mg/kg in rats. Each point represents the Mean±S.E. of 4 rats.

Keys: (a) Superior cervical nodes, (b) Brachial nodes, (c) Superior mesenteric nodes

로의 분포성은 각 임파 조직에서 유사한 값을 보였다. 각 임파절 중 농도는 모두 신장중 농도에 비해 낮았지만 다른 주요 조직중 농도와 유사하거나 높은 값을 보였으며, 24시간 까지 지속적인 농도를 유지하였다.

본 연구에서는 대표적인 임파절로서 상부임파절(superior cervical node 및 brachial nodes) 및 하부임파절(superior mesenteric node)로의 이행을 검토하였다. 이상의 결과로부터 모델펩타이드를 함유한 리포솜 제제를 근육주사한 후에는 임파계로 이행시킬 수 있음을 확인할 수 있었다. 본 연구에서는 펩타이드를 정량하는 방법으로서 총 방사활성을 측정하였다. 따라서 본 연구에서 나타난 각 생체시료 중 모델 펩타이드 농도는 분해산물과 합한 총량으로 나타난 것으로서, 분해산물에 대해서는 추후 자세한 기전 연구가 필요하다. 그러나, 본 연구에서는 치료제 개발을 위한 선행 기초연구로서 모델펩타이드의 분해를 방지하고 임파계에 이행시킬 목적으로 리포솜 제제를 수송체로 이용하였다.²²⁾ 따라서 향후 면역체제로 개발되는 항원 유래 펩타이드의 분해를 가능한 한 억제하고 효율적으로 임파계에 이행시킬 수 있는 치료제¹⁶⁻²¹⁾로서의 개발에 활용 가능성이 높다고 생각된다.

결 론

1. 모델펩타이드를 함유한 리포솜 제제를 정맥주사한 후 혈장중 농도는 초기 시간대에서 급속한 소실을 보였으며, 이후 혈장중농도는 일시적으로 증가된 후 완만한 소실을 보였다. 흰쥐에 근육주사한 후에도 신속히 흡수된 후 완만한 소실을 보였다. 근육주사시의 생체이용률은 모두 60% 이상의 값을 보였다.

2. 근육투여한 후의 48시간까지의 누적 담즙배설량은 6시간까지 높은 값을 보였으며, 12시간 이내에 대부분 담즙배설되었다. 72시간까지의 요중배설은 12시간까지 높은 값을 보

였으며, 24시간이후는 낮게 나타났다. 담즙배설에 비해 요중 배설량이 약 2배 많았으며 또한 요중배설이 장시간 지속되는 경향을 나타내었다.

3. 각 조직으로의 분포성은 우수하였으며, 특히 신장으로의 분포가 높았다. 신장의 조직중농도는 최대 혈장중농도 (C_{max}) 이상의 높은 농도를 유지하였다.

4. 임파 조직중 농도는 신장중 농도에 비해 낮았지만, 주요 조직과 유사하거나 높은 농도를 장시간 유지하였다.

감사의 말씀

이 논문은 2006학년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) K. Hirano and C.A. Hunt, Lymphatic transport of liposome-encapsulated agents; effects of liposome size following intraperitoneal administration, *J. Pharm. Sci.*, **74**, 915-921 (1985).
- 2) H. Hanaue, T. Kurosawa, Y. Kitano, S. Miyakawa, F. Horie, A. Nemoto and J. Shikata, N1-(2-Tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil (FT-207) in the postoperative adjuvant chemotherapy of gastric cancer, *Cancer*, **57**, 693-698 (1986).
- 3) J. Sugihara, S. Furuuchi, K. Nakano and S. Harigaya, Studies on intestinal lymphatic absorption of drugs I. Lymphatic absorption of alkyl ester derivatives and a-momoglyceride derivatives of drugs, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **11**, 369-344 (1988).
- 4) F.V. Chisari and C. Ferrari, Hepatitis B virus immunopathogenesis, *Annu. Rev. Immunol.*, **13**, 29-60 (1995).
- 5) N. Yasunari, L.G. Guiditti, C.V. Kohien, P. Fowler and F.V. Chisari, Immune pathogenesis of hepatocellular carcinoma, *J. Exp. Med.*, **188**, 341-350 (1998).
- 6) U. Protzer and H. Schaller, Immune escape by Hepatitis B

- virus, *Virus Genes.*, **21**, 27-37 (2000).
- 7) M. Hohne, S. Schaefer, M. Seifer, M.A. Feitelson, D. Paul and W.H. Gerlich, Malignant transformation of immortalized transgenic hepatocytes after transfection with hepatitis B virus DNA. Malignant transformation of immortalized transgenic hepatocytes after transfection with hepatitis B virus DNA, *EMBO. J.*, **9**, 1137-1145 (1990).
 - 8) I. Mellman and R.M. Steinman, Dendritic cells specialized and regulated antigen processing machines, *Cell.*, **106**, 255-258 (2001).
 - 9) P.E. Harris, A.I. Colovai, A. Maffei, Z. Liu and N.S. Foca, Major histocompatibility complex class I presentation of exogenous and endogenous protein-derived peptides by a transfected human monocyte cell line, *Immunology*, **86**, 606-611 (1995).
 - 10) M.J. Garlepp, W. Chen, H. Tabarias, M. Baines, A. Brooks and J. McCluskey, Antigen processing and presentation by a murine myoblast cell line, *Clin. Exp. Immunol.*, **102**, 614-619 (1995).
 - 11) N. Murray and A. McMichael, Antigen presentation in virus infection, *Curr. Opin. Immunol.*, **4**, 401-407 (1992).
 - 12) T. Arichi, T. Saito, M.E. Major, I.M. Belyakov, M. Shirai and V.H. Engelhard, Prophylactic DNA vaccine for hepatitis C virus (HCV) infection: HCV-specific cytotoxic T lymphocyte induction and protection from HCV-recombinant vaccinia infection in an HLA-A2.1 transgenic mouse model, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **97**, 297-302 (2000).
 - 13) R. Schirmbeck, X. Zheng, M. Roggendorf, M. Geissler, F.V. Chisari and J. Reimann, Targeting murine immune responses to selected T cell- or antibody-defined determinants of the hepatitis B surface antigen by plasmid DNA vaccines encoding chimeric antigen, *J. Immunol.*, **166**, 1405-1413 (2001).
 - 14) D. Loirat, F.A. Lemonnier and M.L. Michel, Multiepitopic HLA-A*0201-restricted immune response against hepatitis B surface antigen after DNA-based immunization, *J. Immunol.*, **165**, 4748-4755 (2000).
 - 15) R. Nayersina, P. Fowler, S. Guilhot, G. Missale, A. Cerny, H.J. Schlicht, A. Vitiello, R. Chesnut, J.L. Person and A.G. Redeker, HLA A2 restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple hepatitis B surface antigen epitopes during hepatitis B virus infection. *J. Immunol.*, **150**, 4659-4671 (1993).
 - 16) A. Antonio and H.K. Ulrich, Viral mechanism of immune evasion. *Mol. Med. Today*, **6**, 365-372 (2000).
 - 17) A. Tamori, S. Nishiguchi, S. Kubo, N. Koh, Y. Moriyama and S. Fujimoto, Possible contribution to hepatocarcinogenesis of X transcript of hepatitis B virus in Japanese patients with hepatitis C virus, *Hepatology.*, **29**, 1429-1434 (1999).
 - 18) E. Lara-Pezzi, P.L. Majano, M. Gomez-Gonzalo, C. Garcia-Monzon, R. Moreno-Otero, and M. Levrero, The hepatitis B virus X protein up-regulates tumor necrosis factor alpha gene expression in hepatocytes, *Hepatology.*, **28**, 1013-1021 (1998).
 - 20) M. Takeuchi, J. Fujimoto, H. Niwamoto, Y. Yamamoto and E. Okamoto, Frequent detection of hepatitis B virus X-gene DNA in hepatocellular carcinoma and adjacent liver tissue in hepatitis B surface antigen-negative patients, *Dig. Dis. Sci.*, **42**, 2264-2269 (1997).
 - 21) S. Kobayashi, K. Saigoh, T. Urashima, T. Asano and K. Isono, Detection of hepatitis B virus x transcripts in human hepatocellular carcinoma tissues, *J. Surg. Res.*, **73**, 97-100 (1997).
 - 22) Q. Su, C.H. Schroder, W.J. Hofmann, G. Otto, R. Pichlmayr and P. Bannasch, Expression of hepatitis B virus X protein in HBV-infected human livers and hepatocellular carcinomas, *Hepatology.*, **27**, 1109-1120 (1998).
 - 23) J.S. Chang, M.J. Choi, T.Y. Kim, G.J. Woo, S. Chung and H.S. Cheong, Effect of dehydration and rehydration of the pH-sensitive liposomes containing chimeric gag-V3 virus like particle on their long-term stability, *Biotechnol. Bio-process. Eng.*, **4**, 66-71 (1999).