

## 리포솜-아미노산 결합체의 제조와 안정성 측정

문 제 영 · <sup>1,2</sup>이 기 영 · <sup>3</sup>김 진 철  
전남대학교 고분자공학과, <sup>1</sup>생물화학공학과, <sup>2</sup>촉매연구소, <sup>3</sup>LG 화학기술연구원(사)  
(접수 : 2000. 1. 28., 게재승인 : 2000. 2. 21.)

## Preparation and Stability Measurement of Liposome-amino Acid Conjugates

Je-Young Moon, <sup>1,2</sup>Ki-Young Lee, <sup>3</sup>Jin-Chul Kim  
Department of Polymer engineering, <sup>1</sup>Biochemical Engineering,  
<sup>2</sup>The Research Institute for Catalysis, Chonnam Nat'l Univ, Kwangju, 500-757, Korea,  
<sup>3</sup> LG Chem./Research Park(W), #84, Jang-dong, Yusong-gu, Taejon, 305-600, Korea  
(Received : 2000. 1. 28., Accepted : 2000. 2. 21.)

Liposome-amino acid conjugates were prepared using phospholipid (dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) or distearoylphosphatidylcholine(DSPC)) and hydrophobically modified amino acids (glutamic acid(glu), glutamine(gln) or asparagine(asn)). The size of liposomes was about 100 nm. According to the glucose-induced turbidity changes, liposomes composed of DPPC and glutamic acid have higher glucose binding affinity than liposomes of DPPC-glutamine or DPPC-asparagine. Also, the liposomes were more stable in terms of aggregation or fusion than the others (DPPC-glutamine, DPPC-asparagine and DSPC-amino acids). As a result, stable liposomes with an affinity for glucose could be prepared with DPPC and glutamic acid

**Key Words** : liposomes, amino acid, affinity for glucose

### 서 론

리포솜은 인지질 이중층막으로 이루어진 소포로서 생체 적합성이 우수하기 때문에 약물전달자로서 많은 연구가 되어 왔다. 그러나 리포솜은 수상에 분산된 형태로 보존하였을 때 안정성이 나쁘기 때문에 그 응용에 한계가 있다(1) 이와 같은 문제점을 극복하기 위하여 프리 리포솜(2-4), 동결건조 리포솜(5-7) 등의 여러 방법들이 연구되었다. 한편, 특정 리셉터를 targeting하거나 특정 외부온도에서 내용물을 방출하도록 리포솜을 설계하기 위해서 리포솜 표면을 특정 리간드 혹은 기능성 분자로 수식하는 연구가 수행되었다[8]. 본 연구의 목적은 리포솜 표면을 아미노산으로 수식하여 글루코스 결합성 리포솜(glucose-binding liposome)을 제조하는 것이다. 일반적으로 포도당 결합성 효소(glucose-binding enzyme)의 binding site에 관여하는 아미노산은 13가지인데 그 중에서도 빈도 높게 발견되는 아미노산은 asparagine(asn), glutamine(gln), glutamic acid(glu)이다(9). 본 연구에서는 상전이온도가 각각 42.

56℃인 DPPC, DSPC 인지질과 hydrophobically modified amino acid (glu, gln, asn)을 이용하여 아미노산이 수식된 리포솜을 제조하였고 포도당에 대한 이 리포솜의 친화성 및 안정성을 관찰하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용시약

포도당은 Junsei사에서 구입하여 사용하였고 DPPC, DSPC, N-t-boc glutamine, N-t-boc glutamic acid, N-t-boc asparagine, octadecylamine (ODA), 4-dimethylaminopyridine, 1-ethyl-3-(dimethylaminopropyl)carbodiimide, phosphotungstic acid 등은 Sigma사에서 구입하여 사용하였다

#### 아미노산 수식

아미노산으로 리포솜 표면을 수식하기 위해서 아미노산에 소수성 탄화수소 사슬을 결합시켜야 한다. ODA의 아민과 아미노산의 카복실기를 반응시키면 화학적으로 안정한 아미드 결합을 얻을 수 있다. ODA 1.0당량(0.27g)과 N-t-boc-amino-acid 1.2당량 (Asn : 0.28g, Gln : 0.3g, Glu : 0.4g), 4-dimethylaminopyridine 0.1당량(0.012g)을 dichloromethane (DCM) 25ml에 용해시킨다. 용해된 혼합용액에 1-ethyl-3-

†Corresponding Author : Dept. of Biochemical Engineering,  
Chonnam Nat'l Univ, Kwang-ju 500-757, Korea  
Tel · 062-530-1843, Fax : 062-530-1849  
E-mail : kilee@chonnam.chonnam.ac.kr

(dimethylaminopropyl)carbodiimide 1.2당량(0.21g)을 첨가하여 냉욕조에서 약 1시간 동안 교반시킨 후 상온에서 약 12시간 동안 교반하여 반응시킨다. 회전증발기 (Rotavapor R-114, Switzerland, BUCHI)를 이용하여 DCM을 제거한 후 sodium bicarbonate 포화수용액을 첨가하여 1시간 교반한다. 여과지로 여과한 후 증류수로 2~3회 세척한다. N-t-boc group을 제거하기 위하여 Trifluoroacetic acid (TFA) 5ml을 생성물300mg에 가하여 1시간 동안 교반시킨 후 TFA를 회전증발기에서 제거한다. 또한 N-t-boc glutamic acid의 벤조일 (benzoyl) 그룹을 제거하기 위하여 수소화반응을 행하였다. 합성물질 30 mg을 혼합 용매 (methanol : chloroform = 1 : 1 (v/v)) 50 ml로 녹인 후 Palladium(Pd/C) 촉매 10 mg을 가하고 수소 가스를 공급하여 약 36시간동안 반응시킨다. Pd/C를 여과하여 제거하고 유기용매를 증발시킨 후 건조한다. 생성물의 합성여부는 <sup>1</sup>H NMR (ARX-R300, Germany, Bruker Co.)로 확인하였다.

**포도당 민감성 리포솜제조**

DPPC, DSPC를 혼합용매 (methanol : chloroform = 1 : 1 (v/v))에 녹여 인지질 용액(20 mg/ml)을 준비하고 아미노산 유도체들 즉, ODA-glutamine, ODA-asparagine, ODA-glutamic acid을 혼합용매에 20 mg/ml, 20 mg/ml, 10mg/ml이 되도록 녹여 아미노산 유도체 용액을 준비하였다. 인지질과 아미노산 유도체의 무게비가 7 : 3, 8 : 2, 9 : 1, 19 : 1이 되도록 혼합하여 회전증발기에서 약 2시간 동안 건조시켜 박막을 제조한 후 증류수로 지질의 농도가 0.1%가 되도록 혼합시켜 vesicle을 제조하였다 작고 균일한 리포솜을 얻기 위하여 tip-type sonicator (VCX-400, U.S.A, Sonics & Materials INC)로 초음파 처리하였다. 제조된 리포솜 현탁액에 20 mg/ml이 되게 포도당을 첨가한 후 incubator에서 인지질 막의 상전이

온도 (DPCC: 42℃, DSPC : 56℃) 이상으로 24시간동안 항온시켜 포도당 결합부위를 유도 시켰다. 그 다음 리포솜 막의 상전이 온도 이하로 냉각시켜 결합부위를 고정시킨 후 투석막 (M.W cut off. 5,000)을 사용하여 48시간동안 투석시켜 아미노산에 결합되어 있는 포도당을 제거하였다.

**ODA에 의한 아미노산 수식 확인**

<sup>1</sup>H NMR spectrum상에서 관찰되는 각각의 proton peak들의 상대 면적비를 고려하여 아미노산과 ODA의 화학적 결합 여부를 확인하였다.

**투과전자현미경(TEM)을 통한 리포솜 관찰**

제조된 리포솜의 형상 및 크기는 TEM (JEM-2000 FXII, Japan)을 통하여 확인하였다. 리포솜 현탁액과 phosphotungstic acid (2%, pH 6.8)을 1 : 1 (v/v)로 혼합하여 약 1시간동안 staining한 후 formvar/carbon이 코팅된 grid(200mesh)에 침지시킨 후 상온에서 24시간 동안 건조한 후 전자현미경으로 관찰하였다.

**포도당과 리포솜-아미노산 결합체의 친화도 측정**

리포솜-아미노산 결합체가 포도당 분자에 친화력을 가지면 포도당 분자를 중심으로 리포솜들이 서로 뭉칠 수 있다. 포도당 결합부위가 유도된 리포솜 현탁액에 최종 농도가 40 mg/ml이 되게 포도당 용액을 가하여 24시간동안 상온에 방치한 후 UV-VIS 분광광도계 (Shimadzu UV-1201, Japan)을 사용하여 600nm에서 상대탁도를 측정하였다. 상대탁도는 포도당을 가하지 않은 리포솜 현탁액 탁도에 대한 포도당을 가한 리포솜 현탁액탁도의 비율이다.

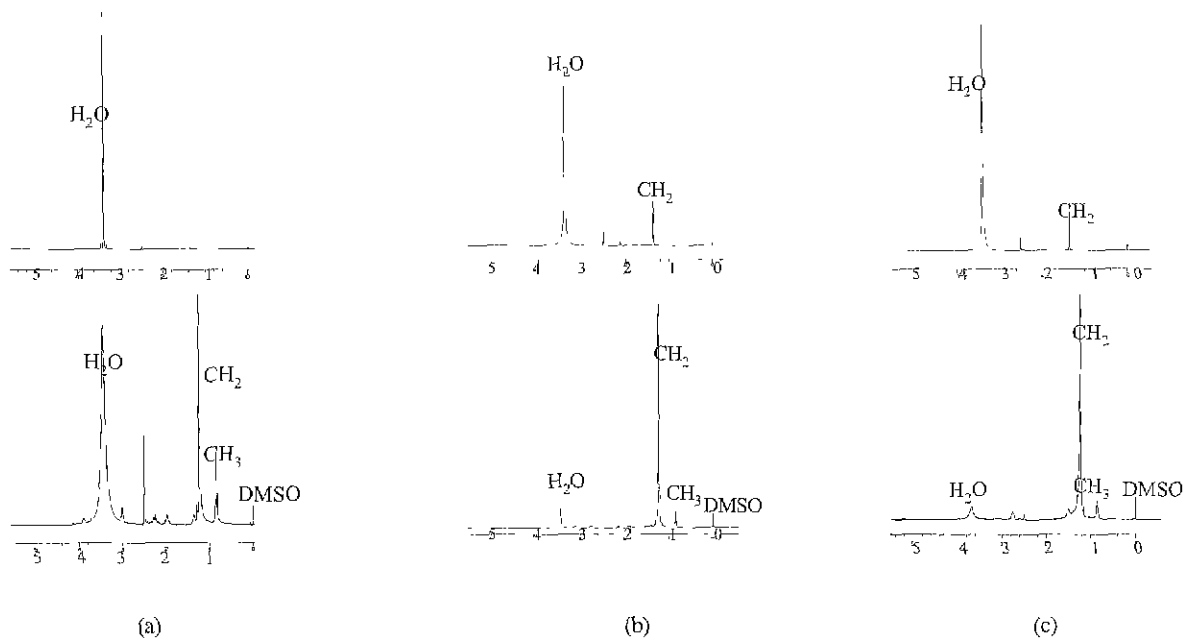


Figure 1. <sup>1</sup>H NMR of soluble A A(top) and insoluble A.A(bottom) (a) Glutamic acid, (b) Glutamine, (c) Asparagine.

**리포솜의 안정성 측정**

리포솜은 37°C에 보관하여 2일 간격으로 2주동안 600nm에서의 상대탁도를 측정하였다.

상대 탁도는 초기 탁도에 대한 측정 시간에서의 탁도 비율이다.

**결과 및 고찰**

**아미노산 수식 확인**

아미노산과 ODA의 결합은 <sup>1</sup>H NMR spectrum으로 확인하였다(Figure 1). 반응 전후의 아미노산의 proton peak을 비교하여 보면 반응 후 1.2ppm에서 ODA의 탄화 수소 사슬에 있는 -CH<sub>2</sub>의 proton peak이 크게 나타나는데 이것은 아미노산과 ODA가 결합되었다는 것을 의미한다.

**TEM을 통한 리포솜 관찰**

포도당 결합부위를 유도하여 포도당을 제거한 리포솜을 TEM (JEM-2000 FXII, Japan)을 통하여 확인한 결과 리포솜의 크기는 대략 100nm 정도였으며 모양은 구형이었다(Figure 2).

**포도당과 리포솜-아미노산 결합체의 친화도 측정**

리포솜의 포도당에 대한 친화도는 포도당을 첨가하기 전, 후의 탁도를 비교하여 평가되었다. Figure 3에서 DPPC는 글루탐산을 사용했을 때 3이상으로 글루타민이나 아스파라긴을 사용했을 때보다 높았다. 특히 DPPC : 글루탐산의 비가 7 : 3이었을 때 5.6의 최대값을 보였다. 이는 DPPC 리포솜에

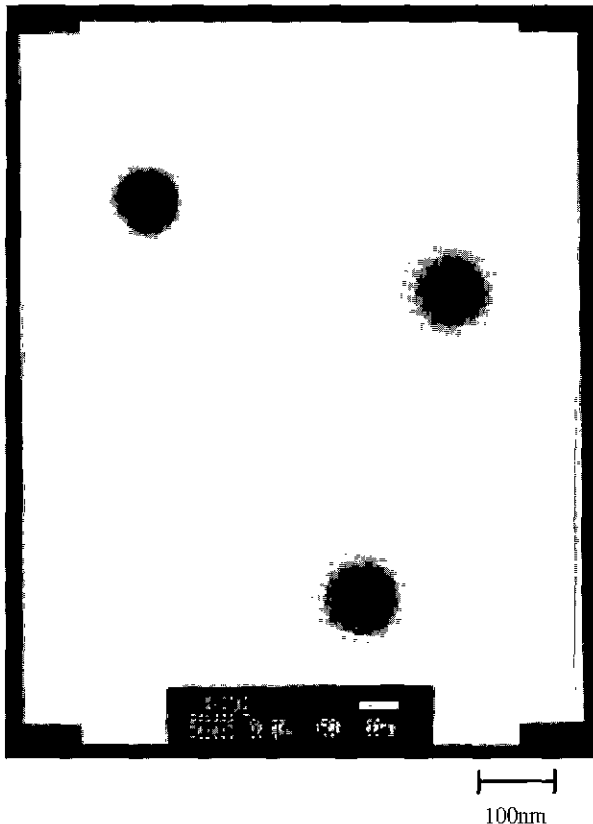


Figure 2. Photograph of negatively stained liposomes by TEM ( $\times 50,000$ )

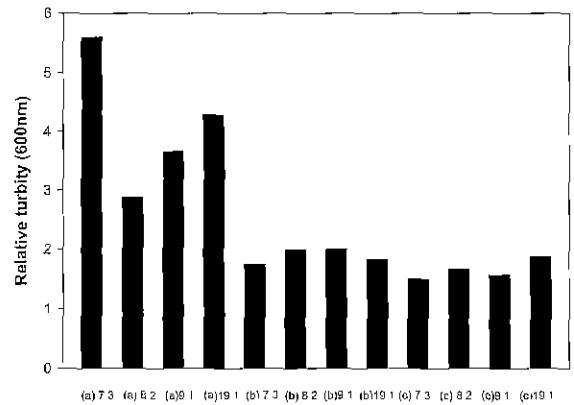


Figure 3. Glucose-induced turbidity changes of DPPC liposomes suspension (a) Glutamic acid (b) Glutamine (c) Asparagine

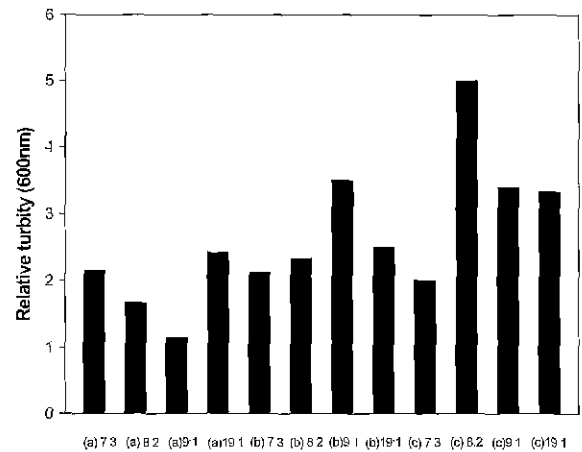


Figure 4. Glucose-induced turbidity changes of DSPC liposomes suspension (a) Glutamic acid (b) Glutamine (c) Asparagine

결합된 글루탐산이 포도당과 잘 결합한다는 것을 의미한다. Figure 4는 DSPC 리포솜의 결과로서 글루탐산과의 비가 9 : 1인 경우와 아스파라긴과의 비가 8 : 2, 9 : 1, 19 : 1일 때 3이상의 상대 탁도를 보였다. 그 중에서도 아스파라긴과의 비가 8 : 2일 때 5정도의 최대 상대 탁도를 보였다.

**리포솜의 안정성 측정**

리포솜은 시간의 경과에 따라 리포솜간의 뭉침현상에 의해 탁도가 증가한다 Figure 5는 DPPC 리포솜의 결과로서 글루탐산이 부착된 리포솜의 상대탁도가 14일 동안 1.5이하를 보였다. 그 중에서도 DPPC : 글루탐산의 비가 7 : 3, 8 : 2, 9 : 1인 경우 상대탁도가 1.2이하를 보였는데 이는 리포솜이 서로 뭉치거나 융합되지 않고 안정한 상태로 존재한다는 것을 의미한다. Figure 6은 DSPC의 결과로서 14일 후의 상대탁도가 모두 1.5이상을 보였다.

**최적 리포솜 아미노산 결합체**

Figure 3 ~ Figure 6의 결과를 통해 DPPC에 글루탐산을 7 : 3의 비율로 결합시킨 리포솜이 포도당 친화력도 크고 안정성도 뛰어난을 알 수 있었다.

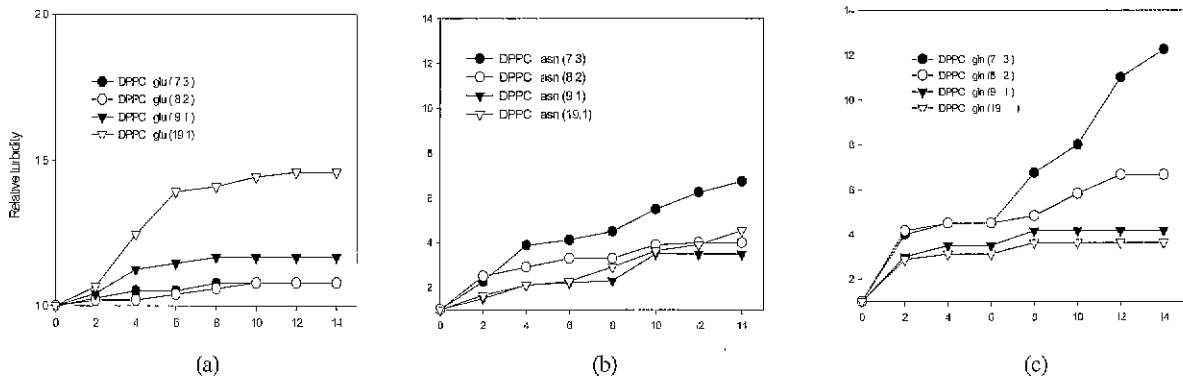


Figure 5. Stability of DPPC liposomes-amino acids conjugates at 37°C (a) Glutamic acid, (b) Glutamine, (c) Asparagine

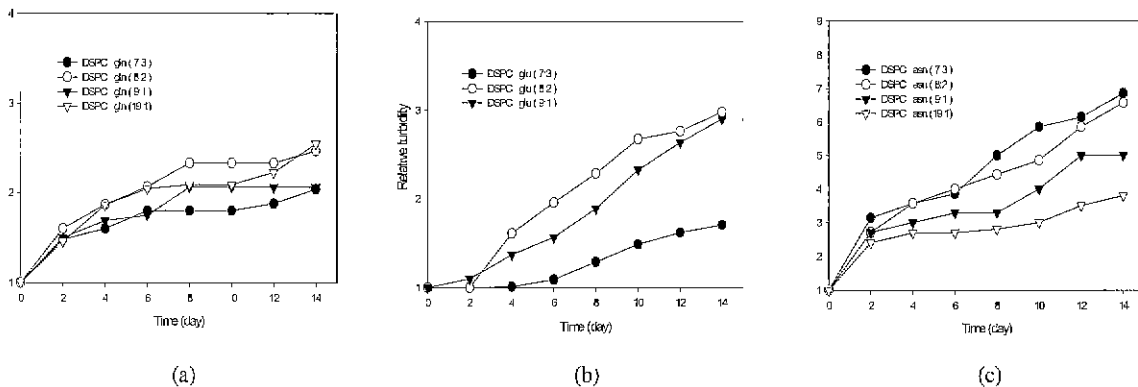


Figure 6. Stability of DSPC liposomes - amino acid conjugates at 37°C. (a) Glutamic acid, (b) Glutamine, (c) Asparagine

요 약

Octadecylamine으로 수식된 아미노산을 DPPC 혹은 DSPC와 혼합하여 리포솜-아미노산 결합체를 제조하였다. 리포솜의 크기는 100nm이고 구형이었다. DPPC와 글루탐산을 혼합하여 제조한 리포솜-아미노산 결합체가 글루타민이나 아스파라긴을 사용했을 때보다 포도당과의 친화성이 컸다. 제조한 리포솜의 안정성 면에서도 DPPC와 glutamic acid으로 구성된 리포솜-아미노산 결합체의 안정성이 높았다. 결국 포도당 친화성과 안정성을 갖춘 리포솜은 DPPC와 글루탐산의 비가 7 : 3 으로 제조된 리포솜이었다.

감 사

이 논문은 (1998)년 한국학술진흥재단의 학술연구비에 의하여 지원되었으므로 이에 감사 드립니다.

REFERENCES

1. Hunt, C.A. and S Tsang (1981),  $\alpha$ -Tocopherol retards autoxidation and prolongs the shelf-life of liposomes, *Int. J. Pharm.*, **8**, 101-110.
2. Payne, N.I., P. Timmis, C.V. Ambrose, M.D. Ward and F. Ridgway (1986), Proliposomes : A noble solution to

an old problem, *J. Pharm. Sci.*, **75**, 315-319.

3. Perrett, S., M. Golding and W.P. Williams (1991), A simple method for the preparation of liposomes for pharmaceutical applications; Characterization of the liposomes, *J. Pharm. Pharmacol.*, **43**, 154-161.
4. Katare, O.P., S.P. Vyas and V.K. Dixit (1991), Preparation and performance evaluation of plain proliposomal system for cytoprotection, *J. Microencapsulation.*, **8**(3), 295-300.
5. Crowe, L.M., J.H. Crowe, A. Rudolph, C. Womersley and A. Appel (1985), Preservation of freeze-dried liposomes by trehalose, *Arch. Biochem., Biophys.*, **242**(1), 240-247
6. Ohsawa, T., H. Miura and K. Harada (1985), Improvement of encapsulation efficiency of water-soluble drugs in liposomes formed by the freeze-thawing methods, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**(9), 3945-3952.
7. Keiko, T., T. Tokuji and K. Fujii (1991), Freeze-drying of liposomes prepared by sonication and extrusion techniques, *Chem. Pharm. Bull.*, **39**(10), 2653-2656.
8. Kim, J.C., S.K. Bae and J.D. Kim (1997), Temperature-sensitivity of liposomal lipid bilayers mixed with poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid), *J. Biochem.*, **121**, 15-19.
9. Li, T., K. Park (1998), Comparative stereochemical analysis of glucose-binding proteins for rational design of glucose-specific agents, *J. Biomaterials. Science-polymer edition*, **9**,4, 327-344.