

입체구조적으로 안정화된 리포솜의 특성 및 혈장내 안정성

이지혜 · 이상길 · 전호성 · 김하형 · 이도익 · 이민원 · 최영욱[#]

중앙대학교 약학대학

(Received April 3, 2000)

Characterization of Sterically Stabilized Liposomes and Their Stability in Rat Plasma in Vitro

Ji Hye Lee, Sang Kil Lee, Ho Seong Jeon, Ha Hyung Kim, Do Ik Lee,
Min Won Lee and Young Wook Choi[#]

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

Abstract — Sterically stabilized liposomes (SSL) composed of distearoylphosphatidylcholine, cholesterol, dicetylphosphate and distearoylphosphatidylethanolamine-N-poly (ethyleneglycol) 2000 (DSPE-PEG 2000) were made by reverse phase evaporation method to prolong biological half-life and decrease toxic side effect of drug. Streptozocin (STZ), a water-soluble antitumor agent with short half-life, was selected as a model drug. The size of SSL was controlled by polycarbonate extrusion to 100 nm which is adequate size for long circulation in plasma. The release rate of drugs from SSL in PBS was evaluated. And the stability of STZ-containing liposomes against drug leakage into rat plasma was evaluated in order to investigate the interaction of liposome and plasma protein. Incorporation of DSPE-PEG 2000 into conventional liposomes significantly decreased the drug leakage into rat plasma.

Keywords □ Sterically Stabilized Liposome, Drug Release, Stability, DSPE-PEG 2000, Streptozocin.

리포솜은 1960년대 Bangham 등¹⁾에 의하여 처음으로 인지질이 수상에서 자발적으로 생체막과 같은 이중막을 형성한다는 사실이 발견된 이래 체내에서 분해 가능하며, 독성이 없고, 항원성이 없다는 점 그리고 약물의 물리화학적 성질과 조성에 따라 인지질 이중막 혹은 수상에 봉입시킬 수 있는 장점 때문에 최근까지 생체막 연구의 모델뿐만 아니라 항암제와 같은 여러 가지 약물의 운반체로서, 또한 생체내에서의 약물의 표적 부위 도달 및 약물의 지속적인 방출등에 널리 이용되어 왔다. 또한, 생체내에서는 주로 RES(reticuloendothelial system)에 uptake된 후 lysosome 안에서 분해되어 제거된다. 이러한 특성을 이용하여 RES에 속한 세포로 구성된 주로 간이나 비장에 선택적인 약

물 송달이 필요할 때 리포솜을 이상적인 수송체로 사용할 수 있다. 실제로 항암요법제, 항생제, 백신 등에 적용하였을 때 기존의 제형보다 약효가 월등하고 부작용은 매우 낮은 연구 결과 때문에 리포솜을 약물 수송체로 이용한 제제를 개발하기 위하여 많은 연구가 활발하게 진행되고 있다.

그러나 리포솜이 생체 내에서 opsonin에 의해 opsonization되어 RES에 포획되거나 plasma lipoprotein과의 상호작용으로 리포솜막이 파괴되기 때문에 간이나 비장 이외의 표적 부위로의 약물송달이 어렵고, RES에 의해 순환계에서 빠르게 제거되므로, 이를 극복하여 반감기를 연장하기 위해 리포솜의 크기를 변화시키거나 혈장단백으로 리포솜 표면을 코팅하는 방법²⁾ 등이 시도되었다. 초기에는 리포솜 표면의 리간드를 변화시키거나 막 구성성분을 바꾸어 체내분포의 변화를 꾀하여 rigid한 지질과 콜레스테롤로 구성된 중성의 작

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-820-5609 (팩스) 02-826-3781

은 리포솜으로 혈중 농도 유지를 연장시킬 수 있었으며 최초의 실제적인 개발은 GM1(monosialoganglioside), phosphatidyl inositol의 첨가로 이루어졌다.³⁾ 그 이후 보다 효과적인 방법으로 polyethylene glycol (PEG) 등의 친수성 고분자를 리포솜 표면에 코팅하는 방법이 연구되었다.⁴⁾ PEG가 결합된 고분자는 리포솜 표면의 친수성을 증가시켜 opsonin과의 상호작용을 차단하며, 리포솜 표면에 protective layer를 형성해 plasma protein의 접근을 막아 리포솜을 입체 구조적으로 안정화시키므로 이러한 리포솜을 입체 구조적으로 안정화된 리포솜(sterically stabilized liposome, 이하 SSL이라 약함)이라 한다. 실제 이러한 SSL을 수송체로 이용한 제품은 SEQUUS Pharmaceuticals, Inc.사의 Doxil® (doxorubicin)이 대표적인 예이다.

따라서 본 논문에서는 항암제인 streptozocin을 모델 약물로 하여 PEG lipid 유도체를 함유하는 SSL을 제조하여 그 입자도와 봉입률을 측정하였고 *in vitro*에서 약물 방출 실험을 실시하여 지속성 제제로서의 특성을 평가하였다. 또한 혈장에 대한 안정성 실험을 통하여 SSL의 혈장 단백질과의 상호작용 및 혈중 농도 연장 효과와 PEG의 영향을 검토하고자 하였다.

실험방법

시약 및 기기

Streptozocin, distearoylphosphatidylcholine(DSPC), dicetylphosphate(DCP), 및 cholesterol (CH)은 Sigma (U.S.A.)에서, distearoylphosphatidylethanolamine-N-poly(ethylene glycol) 2000(DSPE-PEG 2000)은 Avanti polar lipids사(U.S.A.)에서 구입하여 그대로 사용하였다. Triton X-100(Sigma, U.S.A.), ether(R, Duksan Pharmaceutical Co., Ltd., Korea), methanol(HPLC grade, J.T. Baker, U.S.A.), acetonitrile(HPLC grade, J.T. Baker, U.S.A.)를 사용했으며, 그 외의 시약은 특급 및 1급 시약을 그대로 사용하였다.

기기로는 rotary vacuum evaporator(Eyela, Tokyo Rikakikai Co., Japan), extruder(LiposoFast, Avestin Inc., Canada), HPLC system(TSP Spectra system, U.S.A., degasser: SCM1000, pump: P4000, autosampler: AS1000, detector: UV1000, integrator: SN4000), Capcell Pak C₁₈(5 μm, 4.6×250 mm, Shiseido, Japan), microcentrifuge(Eppendorf No. 5415, Germany), so-

nicator(VCX600, Sonics & Material Inc., U.S.A.), shaking water bath(SWB03, Jeio Tech, Korea), hot plate stirrer(Model PC-351, Corning, U.S.A.), pH meter(Model 620, Orion, U.S.A.), vortex mixer (Vortex-Genie 2 G-560, Sci. Ind. Inc., U.S.A.), laser particle analyzer(PARIII, Ostuka Electronics, Japan)를 사용하였다.

Reverse-phase evaporation vesicle(REV)의 제조

수용성 약물인 streptozocin을 봉입하기 위해 내부 수상의 용적이 큰 REV를 제조하였으며, Szoka와 Papahadjopoulos에 의한 방법⁵⁾에 따라 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 적당한 비율의 인지질 혼합물을 3 ml의 ether와 0.8 ml의 MeOH 혼합액에 녹인 후 1 ml의 약물을 함유한 수용액을 첨가하면 상이 둘로 나뉘는데 이 혼합액을 cup-horn type의 초음파장치에서 초음파 처리하여 유화시키면 단일한 분산상을 형성하게 된다. 이 분산상을 회전 증발 농축기에서 감압하에 일정한 온도로 회전 증발시켜 유기용매를 제거하면 처음에는 semi-solid gel을 형성하고 계속 증발시키면 자발적으로 리포솜 현탁액을 형성한다. 이때 총 지질량은 60 μmol/ml로 하였고, 리포솜 이중막의 견고성을 향상시키기 위해 CH를 첨가(phospholipid: cholesterol로서 2:1의 비율)하였으며, 음전하를 띤 DCP를 5 mol% 첨가하여 conventional liposome(CL)을 제조하였다. 또한 SSL의 경우 DSPE-PEG 2000을 5 mol% 첨가하여 CL과 동일한 방법으로 제조하였다. 이렇게 제조된 리포솜 현탁액은 상전이온도 이상을 유지하며 extrusion을 실시하여 입자도를 조절하였고,⁶⁾ Sephadex G-25 column을 통과시켜 봉입되지 않은 유리 약물을 제거하였다.

입도분포의 측정

각각의 조성으로 제조된 리포솜은 extrusion 전후의 입자도를 비교하기 위해, 리포솜 현탁액 일정량을 취해 count per second(cps)가 8,000~12,000의 범위가 되도록 희석하여 laser particle analyzer를 이용하여 리포솜의 크기와 입도를 측정하였다.

봉입률 측정

STZ의 리포솜내 봉입률은 Sephadex G-25 컬럼을

이용한 gel-filtration에 의해 측정되었다. 이때 Sephadex G-25 컬럼은 미리 충전된 컬럼을 사용하였으며 제조된 리포솜 현탁액을 1 ml 취하여 gel bed에 가한 후 pH 4.0 phosphate buffer를 이동상으로 하여 유리 약물과 리포솜에 봉입된 약물을 분리하였다. 분리된 리포솜에 봉입된 약물은 HPLC에 의해 다음과 같은 방법으로 정량하였다. 분석조건은 역상 컬럼 Capcell Pak (4.6×250 mm, 5 μm)을 사용하여 검출과장 230 nm에서 측정하였고, 이동상은 2% 아세토니트릴과 98% 인산완충액(pH 4.0)으로 하여 유속은 1.0 ml/min, 주입량은 20 μl로 하였다. STZ은 문헌⁷⁾에서 보고된 바와 같이 α, β anomer 두 개의 피이크로 분석되며 retention time은 4분과 6분으로 각 피이크 면적의 합으로 계산된 검량선식을 작성하여 대입하였다. 리포솜 분획의 경우 Triton X-100(최종 농도 5%)으로 처리하여 분석하였다. 또한 Stewart method⁸⁾에 의해 phosphate assay를 실시하여 phospholipid 양을 측정하였다.

Encapsulation efficiency (%)

$$= \frac{\text{loaded drug amount (mg/}\mu\text{mol)}}{\text{initial drug amount (mg/}\mu\text{mol)}} \times 100$$

Drug entrapment

$$= \frac{\text{encapsulated drug amount (}\mu\text{g)}}{\text{phospholipid amount (}\mu\text{mol)}}$$

약물 방출 실험

제조한 리포솜의 약물 방출 지연 효과를 측정하기 위해 방출 실험을 실시하였다. 미리 활성화시킨 투석막(Molecular weight cut-off 12,000)의 한쪽 끝을 closure로 고정시킨 후 방출 용매인 PBS 1.5 ml를 넣고 약물을 함유하는 리포솜 현탁액 0.5 ml를 가하여 기포를 제거한다. Bag의 다른 한쪽 끝을 closure로 고정하고 잘 섞이도록 shaking한 후 Bag을 방출 매질인 PBS 98 ml에 넣고 37°C, 100 rpm으로 stirring하며 각 시간 별로 용출액 200 μl를 취해 HPLC로 방출된 약물량을 정량하였다. 100% 방출량은 Triton X-100(최종 농도 5%)으로 처리한 STZ의 양으로 하였다.

리포솜의 혈장성분에 대한 안정성 실험

CL 및 SSL의 혈장에 대한 안정성을 비교하기 위해 흰쥐 혈장을 PBS 대신 dialysis bag에 가하여 방출 실험을 행하였다. 또한 PEG 농도에 따른 혈장내 안정

화 효과를 측정하기 위해 PEG의 농도가 2.5, 5, 7.5 mol%로 증가함에 따른 혈장내 방출을 측정하였다.

결과 및 고찰

제조된 리포솜의 특징

일반적으로 phosphatidylcholine과 같은 낮은 상전이 온도의 fluid한 지질을 사용한 리포솜에 비해 보다 높은 상전이 온도를 가진 long-chain 지질로 구성된 리포솜이 혈중에서 오래 머물러 있다고 보고⁹⁾되어 있으므로 본 실험에서는 DSPC를 사용하여 리포솜을 제조하였다. 또한 콜레스테롤을 첨가하였는데 이러한 콜레스테롤의 첨가는 리포솜막의 지질 분자 사이의 공간을 채워서 지질 이중막을 밀착시키므로 리포솜의 투과성이 감소되어 약물 방출을 지연시킬 뿐만 아니라 혈장 단백질의 통과를 억제시키므로 혈장중의 리포솜을 안정화, 장시간 혈중 농도를 유지할 수 있는 것으로 보고되어 있다.¹⁰⁾ 또한 리포솜막에 음전하를 부여함으로써 리포솜 입자를 물리적으로 안정화시킬 수 있으므로¹¹⁾ DCP를 첨가하였다. 여기에 SSL의 경우 약물 방출을 제어하고 리포솜 표면의 친수성을 증가시켜 RES에 의한 소실을 피할 수 있도록 DSPE-PEG 2000을 첨가하였다.

입도분포 - 입도분포의 경우 Fig. 1에서와 같이 PEG를 함유하는 SSL이 일반 리포솜에 비해 작은 평균 입자 크기와 좁은 입도분포를 보이고 있다. 이는 DSPE-PEG 2000이 이온성 계면활성화제로 작용하여 작은 입자를 형성함에 기인된다. 또한 일반적으로 입

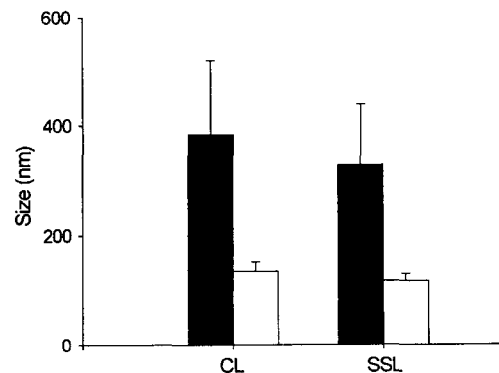


Fig. 1 - Size distribution of liposome formulations before (■) and after (□) extrusion. Bar represents geometric standard deviation.

자도의 경우 리포솜의 체내동태를 제어하는 요소가 된다. 보통 50 nm 이하의 입자는 간으로 분포되며, 200 nm 이상의 경우 비장으로 포획되므로 50~200 nm의 입자가 혈중에서 장시간 체류할 수 있다.^{12,13)} 그러나, CL과 SSL 모두 200 nm가 넘는 입자도를 나타내고 있으므로 extrusion을 실시하여 입자 크기를 100 nm 전후로 조절할 수 있었으며, 입자 분포폭도 현저히 줄일 수 있었다.

봉입률 - 봉입률은 CL의 경우 encapsulation efficiency가 6.8%, SSL의 경우 7.8%였다. 또 drug entrapment는 CL의 경우 123 μg STZ/ μmol phospholipid, SSL은 143 μg STZ/ μmol phospholipid로 큰 차이를 보이지 않고 유사한 결과를 나타내었다.

CL 및 SSL의 약물 방출 거동

Fig. 2는 free drug 및 CL, DSPE-PEG 2000으로 수식된 SSL의 인산완충액에서의 약물 방출을 나타낸 것으로 *in vitro* 약물 방출을 측정하여 리포솜의 *in vivo* 거동을 예측할 수 있다. 실제 리포솜의 방출이 free drug 보다 현저하게 감소되었는데 이는 리포솜이 약물방출을 제어할 수 있기 때문이며, DSPE-PEG 2000을 첨가한 SSL의 방출이 CL의 경우보다 다소 느리게 나타나는데 이는 친수성 고분자로 수식된 SSL의 지질 이중막이 입체구조적으로 보다 안정화되어 방출실험 중 리포솜막의 파괴로 인한 약물의 유출이 감소되었기 때문으로 생각된다. 또한 Dong과 Rogers¹⁴⁾가 제시한 바에 의하면 SSL의 경우 고분자 코팅으로 인해 리포솜 이중막의 응집성이나 구조적 변화를 초래하며 친수성 고분자가 필름을 형성해 확산용질에 대해

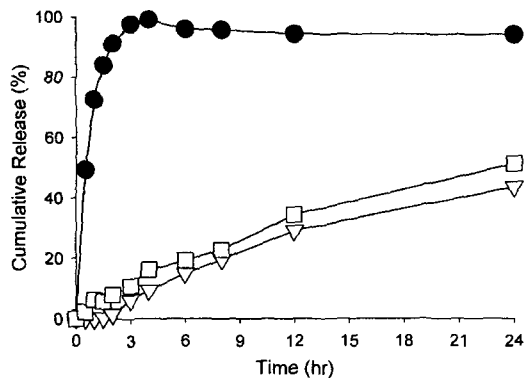


Fig. 2 - Cumulative release of STZ in PBS at 37°C. Key : ●, free drug; □, CL; ▽, SSL.

물리적 장벽 역할을 하므로 약물의 방출이 느려진 것으로 생각된다.

리포솜의 혈장에 대한 *in vitro* 안정성

Fig. 3은 리포솜의 혈장에 대한 안정성을 평가하기 위해 STZ를 봉입한 CL과 DSPE-PEG 2000을 5 mol% 첨가하여 제조한 SSL에 혈장을 가했을 때의 방출을 나타낸 것으로 혈장이 첨가되면 CL과 SSL 모두 방출이 증가되었다. 이것은 혈장중에 존재하는 단백질의 리포솜과의 상호작용에 의해 리포솜막이 불안정하게 되어 약물 방출이 증가되었기 때문으로 추측된다. 특히 24시간 후의 방출율이 CL의 경우 77%, SL의 경우 43%로서 SSL의 방출이 현저히 감소된 것은 SSL을 수식하는 친수성 고분자가 입체 구조적으로 리포솜막을 안정화시켜 혈장성분과의 상호작용이 감소, 약물 방출을 지연시키기 때문으로 사료된다. 실제 혈중에 투여된 SSL의 경우 이러한 입체 구조적 안정화에 의해 혈장 단백질과의 상호작용 감소뿐만 아니라 opsonin의 결합을 차단하여 opsonization을 피할 수 있다. 또한 고분자 첨가에 의한 친수성의 증가는 리포솜의 RES 세포와의 소수성 결합을 감소시키므로 RES로의 포획을 줄여 혈중에 장시간 체류할 수 있게 된다.⁴⁾

일반적으로 SSL 제조에 사용되는 PEG의 종류는 분자량 1000, 2000, 5000, 12000 등이 주로 사용되고 있다. Maruyama 등¹³⁾의 연구에 의하면 DSPC와 CH로 구성된 리포솜의 경우 저분자량의 DSPE-PEG 1000, 2000을 사용한 SSL이 고분자량 DSPE-PEG 5000, 12000의 혈중 농도 연장 효과 보다 좋은 것으

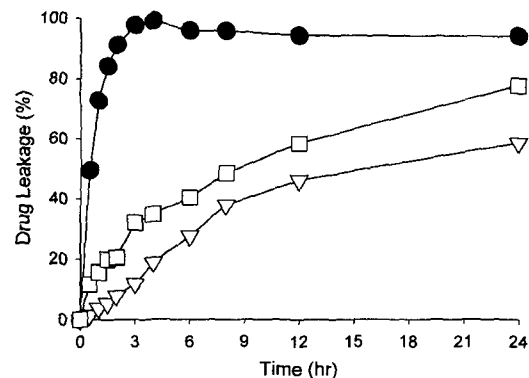


Fig. 3 - STZ leakage in rat plasma at 37°C. Key : ●, free drug; □, CL; ▽, SSL.

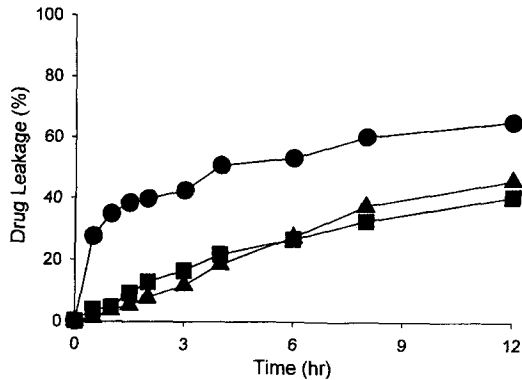


Fig. 4 - Effects of PEG concentrations on the stability of SSL in rat plasma at 37°C. Key : ●, PEG 2.5 mol%; ■, PEG 5 mol%; ▲, PEG 7.5 mol%.

로 보고되어 있다. 따라서 본 연구에서는 DSPE-PEG 2000을 사용하여 SSL을 제조하였다. 또한 리포솜의 혈장내 안정성에 대해 첨가되는 PEG의 농도도 중요한 인자로 작용되며 일반적으로 사용되는 PEG의 농도는 3~10 mol%로, 농도가 증가할수록 효과가 증가하나 리포솜의 구조나 PEG의 분자량에 따라 변화할 수 있고 PEG의 농도가 너무 높은 경우 입자의 불안정화를 유발할 수 있다.¹⁵⁾ 이에 본 실험에서는 PEG 농도에 따른 혈장내 안정화 효과를 측정하기 위해 PEG의 농도가 2.5, 5, 7.5 mol%로 증가함에 따른 혈장내 방출을 비교하였으며 2.5 mol%의 경우 현저한 방출 증가를 나타내었고 5 mol%와 7.5 mol%는 비슷한 양상을 보였다(Fig. 4). 따라서 PEG 농도가 2.5 mol%인 경우 리포솜이 안정화되지 못하며, PEG 5 mol%의 농도로 제조된 리포솜이 충분히 입체 구조적으로 안정화되어 혈장 성분과의 상호작용을 감소시킬 수 있는 것으로 사료된다.

결 론

수용성 항암제인 streptozocin을 모델 약물로 하여 PEG lipid 유도체를 함유하는 SSL을 제조하여 입자도와 봉입률을 측정하였고 약물 방출과 *in vitro*에서의 혈장에 대한 안정성 및 혈중 농도 연장 효과와 PEG의 영향을 검토하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 리포솜은 long-chain 지질을 사용하여 CH과 DCP를 첨가함으로써 혈중에서 보다 안정하도록 제조되었고, 리포솜의 크기는 100 nm 내외로 균일한 입도

분포를 나타내었다.

2. SSL의 경우 CL보다 약물방출이 더 지연되었고, 따라서 생체내에서 약물을 지속적으로 방출할 수 있을 것으로 예상되었다.

3. 리포솜에 혈장을 가하면 CL 및 SSL 모두 약물 방출이 증가되었으나, SSL은 CL 보다 혈장내에서 더 안정하였다.

4. 5 mol%의 DSPE-PEG 2000을 첨가함으로써 SSL의 *in vitro* 안정성을 높일수 있었다.

이상의 결과로부터 약물의 리포솜 봉입은 약물 방출을 지연시킬 수 있으며 특히 CL 보다 친수성 고분자인 PEG에 의해 입체 구조적으로 안정화된 SSL이 장시간 체류성 약물 전달 수송체로서 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 말씀

본 논문은 보건 의료기술연구개발사업(HMP-98-D-1-0016)에 의해서 수행된 연구 결과 중 일부를 정리한 것으로서 본 연구의 지원에 감사드립니다.

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) Torchilin, V. P., Berdichevsky, V. R., Barsukov, A. A. and Smirnov, V. N. : Coating liposomes with protein decreases their capture by macrophage, *FEBS Lett.* **111**, 184 (1980).
- 3) Lasic, D. D., Martin, F. J., Gabizon, A., Huang, S. K. and Papahadjopoulos, D. : Sterically stabilized liposomes : a hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times, *Biochim. Biophys. Acta* **1070**, 187 (1991).
- 4) Huang, A. L., Maruyama, K., Torchilin, V. P. and Huang, L. : Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes, *FEBS Lett.* **268**, 235 (1990).
- 5) Szoka, F. and Papahadjopoulos, D. : Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **75**, 4194 (1978).

- 6) MacDonald, P. C., MacDonald, R. I., M Menco, B. Ph., Takeshita, K., Subbarao N. K. and Hu, L. R. : Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles, *Biochim. Biophys. Acta* **1061**, 297 (1991).
- 7) Oles, P. J. : High-pressure liquid chromatographic separation and determination of anomeric forms of streptozocin in powder formulation, *J. Pharm. Sci.* **67**, 1300 (1978).
- 8) Stewart, J. C. M. : Calorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate, *Anal. Biochem.* **104**, 10 (1980).
- 9) Boman, N. L., Mayer, L. D. and Cullis, P. R. : Optimization of the retention properties of vincristine in liposomal systems, *Biochim. Biophys. Acta* **1152**, 253 (1993).
- 10) Dini, L., Giulio, A. D., Pavan, A., Ravagnan, G. and Mossa, G. : Size and stability of dipalmitoylphosphatidylcholine/cholesterol unilamellar vesicles are affected by interaction with proteins, *Biochim. Biophys. Acta* **1062**, 108 (1991).
- 11) Gabizon, A. and Papahadjopoulos, D. : The role of surface charge and hydrophilic groups on liposome clearance *in vivo*, *Biochim. Biophys. Acta* **1103**, 94 (1992).
- 12) Litzinger, D. C., Buiting, A. M. J., Van Rooijen, N. and Huang, L. : Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphipathic poly(ethylene glycol)-containing liposomes, *Biochim. Biophys. Acta* **1190**, 99 (1994).
- 13) Maruyama, K., Yuda, T., Okamoto, A., Kojima, S., Suginaka, A. and Iwatsuru, M. : Prolonged circulation time *in vivo* of large unilamellar liposomes composed of distearoyl phosphatidylcholine and cholesterol containing amphipathic poly(ethylene glycol), *Biochim. Biophys. Acta* **1128**, 44 (1992).
- 14) Dong, C. and Rogers, J. A. : Polymer-coated liposomes : stability and release of ASA from carboxymethyl chitin-coated liposomes, *J. Control. Rel.* **17**, 217 (1991).
- 15) Allen, T. M. : The use of glycolipids and hydrophilic polymers in avoiding rapid uptake of liposomes by the mononuclear phagocyte system, *Adv. Drug Delivery Rev.* **13**, 285 (1994).