

DPPC-ODA-asparagine 리포솜의 포도당 친화도 및 콜레스테롤 첨가에 따른 안정성 측정

문 제 영^{1,2,*}·이 기 영³·김 진 철⁴·박 기 남⁴
전남대학교 고분자공학과, ¹생물화학공학과, ²촉매연구소, ³LG 화학기술연구원(서), ⁴Purdue 대학교 약학과
(접수 : 2001. 3. 2., 게재승인 : 2001. 4. 23.)

Glucose Binding Affinity of DPPC-ODA-asparagine and Stability of Liposomes Adding Cholesterol

Je-Young Moon, Ki-Young Lee^{1,2,*}, Jin-Chul Kim³, and Ki nam Park⁴

Department of Polymer Engineering, ¹Biochemical Engineering

²The Research Institute for Catalysis, Chonnam Nat'l Univ, Kwangju 500-757, Korea

³LG Chem./Research Park(W), #84, Jang-dong, Yusong-gu, Taejon 305-600, Korea

⁴Department of Pharmaceutics and Biomedical Engineering, Purdue Univ, West Lafayette, IN 47907, U.S.A.

(Received : 2001. 3. 2., Accepted : 2001. 4. 23.)

Liposome-amino acid conjugates were prepared using dipalmitoylphosphatidylcholine(DPPC) and hydrophobically modified asparagine. A microdialyzer was used to measure glucose diffusion. The glucose binding affinity of DPPC-ODA-asparagine liposomes higher than that of DPPC liposomes and distilled water. The size of DPPC-ODA-asparagine was approximately 75-150 nm. Cholesterol increased the stability of liposomes, and reduced the size of liposome particles.

Key Words : DPPC, amino acid, affinity for glucose, cholesterol

서 론

Bangham과 Home(1)은 인지질을 물에 분산시키면 지질 이중층막의 소포체(vesicles)가 자발적으로 형성되는 것을 처음으로 발견하였고 이를 리포솜이라고 명명하였다.

리포솜은 생체막과 유사한 기능을 하며 지질막을 구성하는 지질의 조성에 따라 막의 물리적 성질에 변화를 주어 지질막 안의 단백질 입체 구조나 유동성에 영향을 미친다고 알려져 있다(2-5). 리포솜은 친수성과 소수성을 모두 가진 양쪽성 물질이다. 그리하여 수용성 약물과 지용성 약물 모두를 포획할 수 있는 장점이 있다(6). 당뇨병 치료에 대한 접근법으로서 리포솜 표면을 아미노산으로 수식하여 포도당 민감성 리포솜-아미노산 결합체를 제조하는 방법이 문 등(7)에 의해 제시되었다.

리포솜은 시간이나 다른 외부환경 조건에 따라 안정성에 많은 영향을 받는다. 그렇기 때문에 리포솜 자체로는 불안정

하기 때문에 오랜 시간 보관하기가 힘들다. 그래서 콜레스테롤을 지질막에 첨가하여 안정화 해야할 필요성이 있다. 콜레스테롤은 지질막의 유동성 및 내부 물질의 투과성을 감소시켜 지질막에 기계적 강도를 부여한다고 알려져 있다(2).

본 연구에서는 상전이온도가 42°C인 DPPC와 소수성질을 가지게 고안된 asparagine을 이용하여 아미노산이 수식된 리포솜을 제조하고(7), 포도당에 대한 친화도 및 콜레스테롤을 첨가하였을 때의 안정성에 대해 관찰하였다.

재료 및 방법

재료 및 기기

Glucose는 Junsei사에서 그리고 DPPC, N-t-boc asparagine, octadecylamine (ODA), 4-dimethylaminopyridine, 1-ethyl-3-(dimethylaminopropyl)carbodiimide, sodimu bicarbonate, trifluoroacetic acid(TFA) 등은 Sigma사에서 Microdialyzer (10-well, 500 μ L) 및 Membrane(MWCO: 6-8,000)은 Spectra/Por[®], Glucose-E-Kit(GOD POD 효소법)는 영동제약에서 구입하여 사용하였다.

*Corresponding Author : Department of Biochemical Engineering, Chonnam Nat'l Univ., Kwang-ju 500-757, Korea
Tel : +82-62-530-1843, Fax : +82-62-530-1849
E-mail : kilee@chonnam.ac.kr

불용성 asparagine의 제조

Asparagine은 수용성이 있기 때문에 그 자체만으로는 리포솜 표면에 수식할 수 없다. 그러므로 ODA의 아민과 asparagine의 카르복실 그룹을 공유결합 시켜 불용화 시킬 필요가 있다.

Dichloromethane(DCM) 50 mL에 ODA 0.54 g, N-t-boc-asparagine 0.56 g 그리고 4-dimethylaminopyridine 0.024 g을 용해시킨다. 준비된 혼합용액에 1-ethyl-3-(dimethylaminopropyl)carbodiimide 0.42 g을 가하여 냉욕조에서 1시간 동안 반응시킨 후 상온에서 12시간 동안 교반하여 용해한다.

회전증발기 (Rotavapor R-114, Switzerland, BÜCHI)를 사용하여 DCM을 제거하고 침전물을 얻는다. 얻어진 침전물에 Sodium bicarbonate 포화수용액을 가하여 충분히 교반시켜 DCM을 완전히 제거한다. 얻어진 침전물은 여과지(Millipore 0.45 μm)로 여과한 후 증류수로 2~3회 세척하여 건조기에서 완전히 건조시킨다. T-boc(tertiary butyloxycarbonyl)그룹을 제거하기 위해서 TFA 5 mL을 생성물 300 mg에 가하여 1시간 동안 교반 시킨 후 회전증발기에서 TFA를 제거한다.

아미노산-리포솜 결합체 제조

DPPC를 methanol에 20 mg/mL가 되게 준비하고, 소수적으로 합성된 ODA-asparagine은 methanol에 20 mg/mL가 되도록 준비한다.

DPPC와 ODA-asparagine을 각각 7 : 3, 8 : 2, 9 : 1, 19 : 1로 혼합하여 둥근바닥 플라스크(round bottom flask)에 넣고 회전증발기에서 약 4시간 동안 회전증발시켜 건조 인지질막을 제조한 후 증류수를 가하고 45°C의 항온조에 담근 후 흔탁시켜 vesicle을 제조하였다. 작고 균일한 vesicle을 얻기 위하여 tip-type sonicator (VCX-400, U.S.A, Sonics & Materials INC)로 pulse on 2초, pulse off 9초로 하여 5분 동안 초음파 처리하였다.

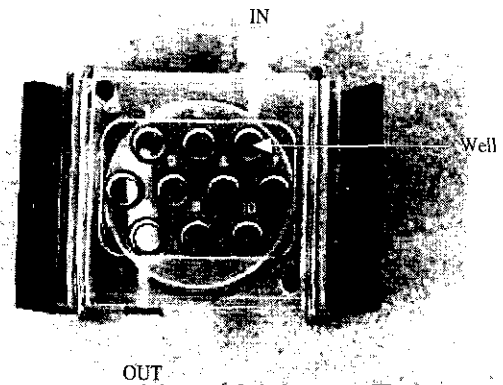
제조된 리포솜 현탁액에 20 mg/mL 포도당을 첨가한 후 진탕 항온수조에서 50°C에서 24시간 동안 반응시켜 포도당 결합부위를 유도 시켰다. 유도된 결합부위를 고정시키기 위해 상온으로 냉각시킨 후 투석막 (M.W cut off. 5,000)에 넣어 48시간 동안 투석시켜 asparagine에 결합되어 있는 포도당을 제거하였다.

TEM을 이용한 DPPC-ODA-asparagine 관찰

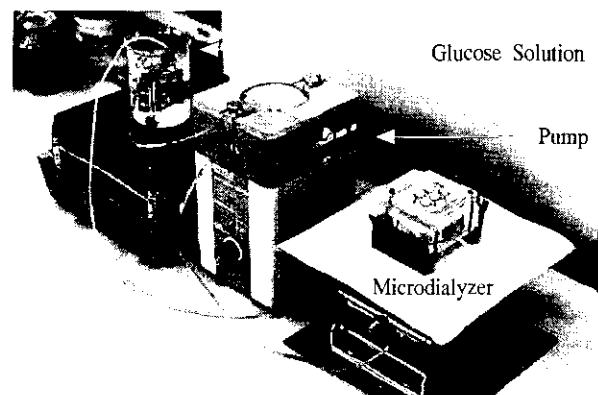
제조된 DPPC-ODA-asparagine의 형상은 TEM (JEM-2000 FXII, Japan)을 통하여 확인하였다. TEM을 찍기 위해서는 먼저 리포솜의 전처리가 필요하다. Phosphotungstic acid (2wt%)를 KOH(IN)로 pH 6.8이 되게 하여 준비한다. DPPC-ODA-asparagine 현탁액과 phosphotungstic acid를 1:1 (v/v)로 혼합하여 약 1시간 동안 staining 한다. 그리고 formvar/carbon이 코팅된 grid(200 mesh)에 침지 시킨 후 상온에서 24시간 동안 건조한 후 투과전자현미경으로 관찰하였다.

포도당과 DPPC-ODA-asparagine 결합체의 microdialyzer에 의한 친화도 측정

DPPC와 ODA-asparagine를 7:3, 8:2, 9:1, 19:1로 제조한 리포솜과 DPPC만으로 제조된 리포솜 그리고 증류수 등을 각각 microdialyzer(10-well, 500 μL)의 well 부분에 넣고 투석막



(a) Microdialyzer



(b) System

Figure 1. Microdialyzer and microdialysis system

(MWCO: 6-8,000)을 경계로 포도당(10 mg/mL)용액을 흘려보내 시간에 따른 포도당 결합도를 측정하였다(Figure 1). 포도당은 Glucose-E Kit를 사용하여 발색(자주색) 시킨 후 UV-VIS 분광광도계 (Shimadzu UV-1201, Japan)로 505 nm에서 흡광도를 측정하여 정량분석 하였다.

콜레스테롤의 리포솜에 대한 영향

콜레스테롤의 리포솜에 대한 영향을 알아보기 위해서 DPPC에 cholesterol을 8 : 2로 첨가하여 제조한 리포솜과 DPPC만을 사용하여 제조한 리포솜의 입자 크기 분포를 Zeta sizer (Zetasizer 3000, Malvern Instrument LTD., USA)로 제조 시와 7일 후 각각 측정하였다.

그리고 DPPC와 콜레스테롤의 양을 7:3, 8:2, 9:1, 19:1로 하여 리포솜을 제조하고, 시간에 따른 탁도 변화를 UV-VIS 분광광도계 (Shimadzu UV-1201, Japan)로 600 nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

TEM을 이용한 DPPC-ODA-asparagine 관찰

Figure 2와 같이 제조된 DPPC-ODA-asparagine의 형상은 TEM (JEM-2000 FXII, Japan)을 통하여 확인하였다. 크기는 150 nm~75 nm로 다양하였으며, 모양은 원형과 타원형으로 보인다.

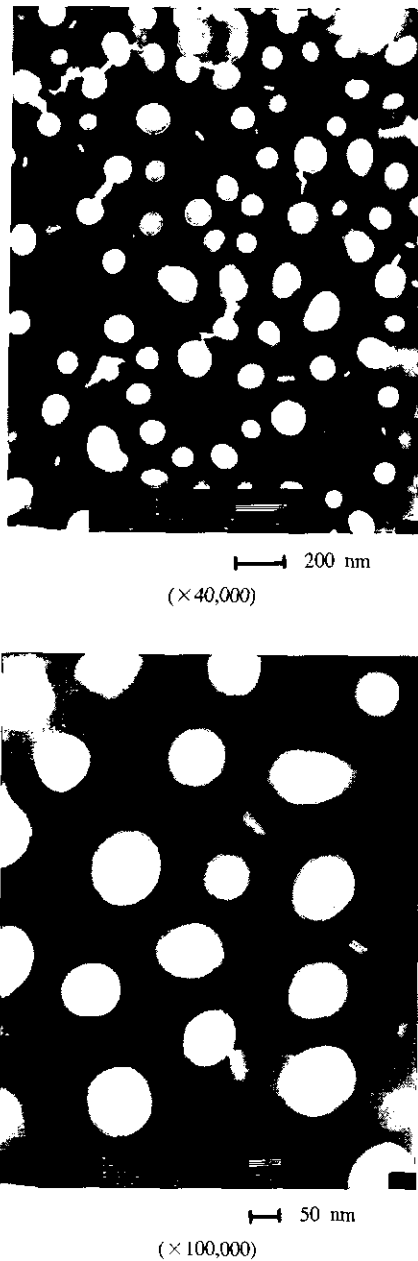


Figure 2. TEM photography of negatively stained DPPC-ODA-asparagine.

포도당과 리포솜-아미노산 결합체의 Microdialyzer에 의한 친화도 측정

DPPC와 asparagine을 7:3, 8:2, 9:1, 19:1로 제조한 리포솜이, DPPC만으로 제조된 리포솜과 증류수만을 사용한 것에 비해 포도당 결합도가 높은 것을 보여준다. 이것은 포도당 용액의 확산에 의해 asparagine이 포도당과 결합하기 때문에, DPPC만으로 제조된 리포솜이나 증류수보다 포도당농도가 높다고 생각할 수 있다(Figure 3).

콜레스테롤의 리포솜에 대한 영향

콜레스테롤이 리포솜의 안정성을 증가시키는 것에 대해 알아보기 위해서 DPPC에 cholesterol을 8 : 2로 첨가하여 제조한 리포솜과 DPPC만을 사용하여 제조한 리포솜과의 입자 크기 및 분포를 비교해 보았다.

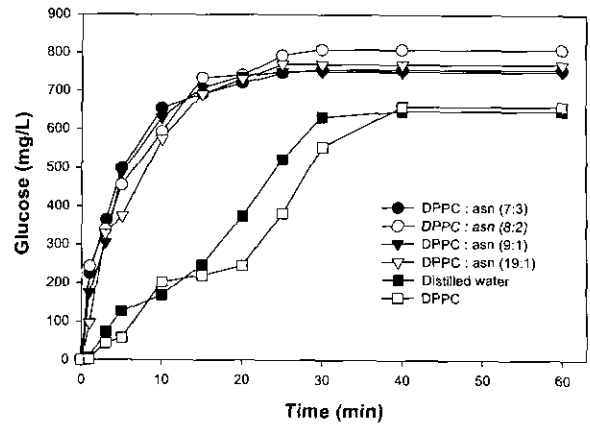


Figure 3. Profiles of glucose binding affinity to DPPC-ODA-asparagine liposomes. (Glucose buffer concentration : 10 mg/mL)

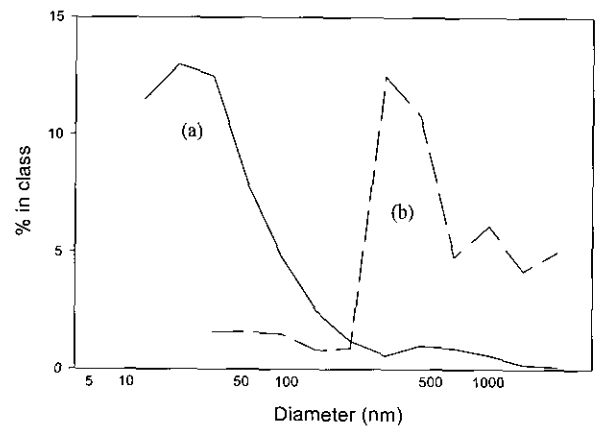


Figure 4. Size distribution of DPPC liposome. (a) 0 day, (b) 1 week

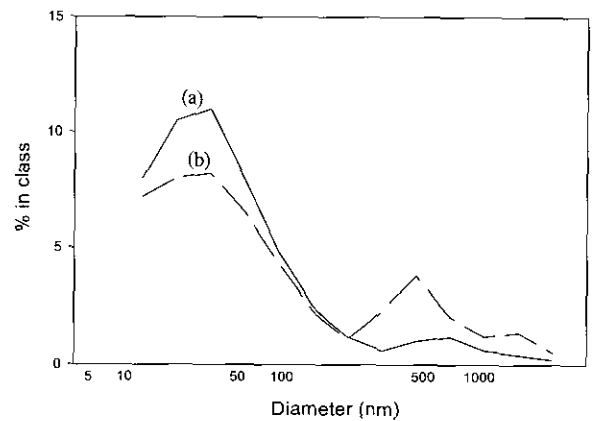


Figure 5. Size distribution of DPPC : cholesterol (8:2) liposomes. (a) 0day, (b) 1 week

Figure 4는 DPPC만으로 제조된 리포솜으로서 처음 제조시에는 작은 입자가 많은 분포를 보였으나, 7일 후 입자의 크기가 커지고 분포 또한 증가한 것을 볼 수 있다

그러나 Figure 5와 같이 콜레스테롤이 첨가된 리포솜은 초기에 비슷한 양상을 보이고, 7일 후에도 처음 입자 크기와 분포에서도 커다란 차이가 없는 것으로 보인다. 이는 콜레스테롤이 인지질막에 첨가되어 지질막의 유동성을 감소시키므

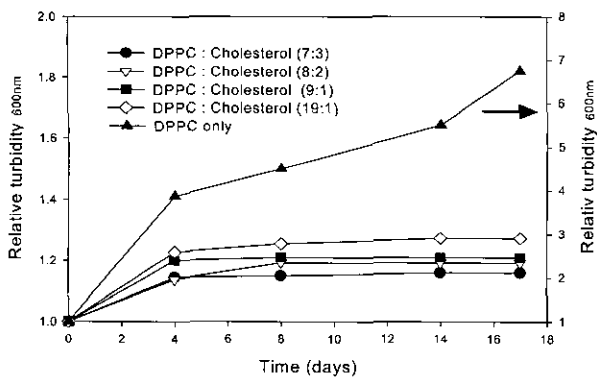


Figure 6. Effect of cholesterol on the stability of DPPC liposomes at 37°C.

로, 막이 경화되어 리포솜들간의 뭉침이 적어 입자 크기와 분포에 변화가 거의 없는 것으로 생각된다. 또한 Figure 6에서와 같이 DPPC에 대해 콜레스테롤의 비율이 증가함으로써 리포솜은 더욱 안정한 경향을 보였다.

요 약

포도당 결합성 효소의 결합 부위에서 발견된 아미노산중 하나인 asparagine을 이용하여, 리포솜 표면에 결합시켜 포도당 민감성 리포솜-아미노산 결합체를 제조하고 포도당 결합도를 측정 하였다.

DPPC와 ODA-asparagine을 혼합하여 제조한 리포솜의 포도당 친화도를 측정한 결과 아미노산이 존재할 때가 존재하

지 않을 때보다, 포도당 결합이 잘되는 것을 알 수 있었다. 콜레스테롤을 DPPC에 첨가했을 때 입자의 크기 및 분포의 변화를 방지하였다. 그리고 DPPC에 대한 콜레스테롤 함량이 증가할수록 리포솜의 안정성도 증가하였다.

감 사

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

REFERENCES

1. Bangham, A. D. and R. W. Horne (1962), *Nature.*, **196**, 952.
2. Houslay, M. D and K. K. Stanley (1982), *Dynamics of biological membrane*, John Wiley and Son, N.Y.
3. Singer, S. J. and G. L. Nicolson (1972), *The fluid mosaic model of the structure of cell membrane*, *Science.*, **175**, 720-732.
4. Joan, M. B (1980), *Intermolecular hydrogen bonding between lipids in membrane*, *J. Biochem.*, **58**, 755.
5. Winchil, L. C. Vans., G. K. Hans., S. Jurgen., S. Erich., and M. J. Thomas (1981), *Translation mobility of glycoporphin in bilayer membranes of dimyristoyl phosphatidylcholine*, *Biochemistry.*, **20**, 1392-1396.
6. Gregoriadis, G (1984), *Liposome technology*, CRC press.
7. Moon, J. Y., K. Y. Lee, and J. C. Kim (2000), *Preparation of liposomes-amino acid conjugates and its stability*, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **15**(1), 96-99.