

폴리에틸렌이민으로 개질된 리포솜의 표면 특성

박윤정 · 남다운 · 서동환 · 한희동 · 김태우 · 김문석 · 신병철[†]

한국화학연구원 화학소재부 나노생체재료연구팀
(2004년 7월 16일 접수, 2004년 11월 16일 채택)

Surface Properties of Liposomes Modified with Poly(ethylenimine)

Yun Jung Park, Da Eun Nam, Dong Hoan Seo, Hee Dong Han,
Tae Woo Kim, Moon Suk Kim, and Byung Cheol Shin[†]

Advanced Materials Division, KRICT,
100 Jang Dong, Yuseong, Daejeon 305-606, Korea

[†]e-mail : bcshin@pado.kRICT.re.kr

(Received July 16, 2004; accepted November 16, 2004)

초록 : 암을 치료하기 위한 양이온성 리포솜은 화학치료요법의 분야에서 발전되어 왔다. 양이온성 리포솜은 음이온성의 세포 표면에 정전기적 상호작용에 의해 결합이 된다. 본 연구의 목적은 음이온성 세포와 이온결합을 할 수 있는 양이온성 리포솜을 제조하는 것이다. 양이온성 리포솜은 지질인 1,2-디스테로일-*sn*-글리콜-3-포스포에탄올아민 (DSPE)과 양이온성 고분자인 폴리에틸렌이민 (PEI)을 그라프트 중합으로 합성된 물질로부터 제조하였다. 리포솜 표면의 이온 특성은 제타 포텐셜을 측정하여 확인하였다. 소 혈청 수용액에서 리포솜의 혈장 단백질 흡착 특성은 입자 크기와 탁도 변화를 측정하여 확인하였다. 완충 용액 속에서 리포솜 안정성을 예측하기 위하여 입자 크기를 7일 동안 상온에서 측정하였다. 양이온성 리포솜은 소 혈청 수용액에서 많은 양의 혈장 단백질이 흡착되었다. 이는 혈장 단백질은 음전하를 가지고 있어서 양이온성 리포솜의 표면과 잘 붙기 때문이다. 양이온성 폴리에틸렌이민을 이용한 리포솜의 표면 변형은 소 혈청 수용액 내에서 단백질 흡착을 강화시킨다는 것을 예상하게 한다. 또한, 제조된 리포솜의 완충 용액 내에서 7일 동안 안정한 상태를 관찰하였다.

ABSTRACT : Cationic liposomes for cancer treatment have been developed in the field of chemotherapy. It was well combined on the surface of anionic tumor cell membrane by electrostatic interaction. Thus, the object of this study was to prepare the cationic liposomes capable of forming an ionic complex with the anionic cell membrane. To prepare the cationic liposomes, 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DSPE) as a cationic lipid material and polyethylenimine (PEI) as a cationic polymer were synthesized. Ionic property on the surface of liposomes was determined by the zeta potential. The adsorption characteristics of plasma protein for liposome in bovine serum were determined by the particle size and turbidity change. To estimate the stability of liposome in buffered solution, the change of particle size was measured at room temperature for seven days. The cationic liposomes were absorbed a large amount of plasma protein in bovine serum because plasma protein having anionic charge was fixed on the surface of cationic liposomes. This result indicate that the modification on the surface of liposomes using cationic polyethylenimine enhances the protein adsorption in bovine serum. Additionally, cationic liposomes showed good stability in buffered solution for seven days.

Keywords : cationic liposomes, poly(ethylenimine), protein adsorption, stability.

1. 서론

리포솜은 자발적으로 이중막을 형성하고 체내에서 분해가 가능하며 안정성이 우수한 장점 때문에 생체막 연

구의 모델로 사용되고 있다.¹ 리포솜은 지질의 조성에 따라 지질 막을 형성하며 내부에 수용성 약물을 봉입시킬 수 있는 장점이 있기 때문에 항암제와 같은 여러 가지 약물의 운반체로 이용되고 있으며, 방사선 치료나 화학 치

료를 겸용하여 적용할 수 있고 체내에서 부작용이 적어 이를 이용한 항암약물 전달체의 연구가 활발히 진행되어지고 있다.^{2,3} 한편, 리포솜으로부터 약물의 방출 증가와, 세포막 표면에 접근을 용이하게 하기 위하여, 리포솜의 표면에 다양한 기능을 가진 고분자를 결합시키는 연구가 진행되어지고 있다.⁴ 그 중에서 리포솜 표면에 이온성 그룹을 도입하여 리포솜 표면과 반대의 이온을 가진 물질과의 결합을 용이하게 함으로써 약물의 전달 효율을 높이는 연구가 활발히 진행되고 있다. 음이온으로 수식된 리포솜은 양이온을 나타내는 고분자와 젤을 이루어 약물 운반체로써 이용되고 있고, 양이온으로 수식된 리포솜은 음전하를 지니고 있는 세포표면과 강하게 상호작용을 하기 때문에 세포이입유도를 위한 운반체로써 넓게 이용되어지고 있다.^{5,6}

본 연구에서는 양이온을 도입하여 리포솜 표면을 변형시켜 세포이입유도를 용이하게 하기 위한 운반체를 만들고자 하였다. 양이온을 도입하기 위한 수단으로 사용된 분자량 600의 폴리에틸렌이민은 인체에 사용할 경우 비교적 독성이 적고 쉽게 소변으로 배출될 수 있어 유전체 전달용 고분자 중에 널리 응용되고 있는 고분자이다.⁷⁻¹⁰ 그러나 PEI는 용액 상태로 직접 리포솜 지질 이중막에 수식하기에 부적합하기 때문에 DSPE와 PEI를 합성하여 사용하였다. 합성된 DSPE-PEI를 이용하여 리포솜 지질 이중막에 DSPE를 도입함으로써 양이온성이 표면에 수식된 리포솜을 제조하고자 하였다. 한편, 리포솜 표면에 결합된 PEI의 양은 PEI에 형광물질을 결합하여 형광 강도를 측정함으로써 정량하였다. 또한, 리포솜 표면의 PEI 영향에 의한 소 혈청 수용액 내에서 리포솜 분산 용액의 탁도 변화와 리포솜의 입자 크기 변화를 측정하여 혈장 내 단백질과 리포솜의 흡착 특성을 관찰하였다.

2. 실험

시약. 리포솜을 제조하기 위하여 사용된 지질로서 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC), *L*-α-phosphatidylcholine (soy-Hydrogenated) (HSPC), 콜레스테롤 (CHOL), 그리고 DSPE는 Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, USA)에서 구입하여 사용하였다. 모델 약물로는 항암성분을 지니고 있는 doxorubicin (DOX)을 Sigma-Aldrich Co. (Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 제조된 리포솜을 정제하기 위하여 투석 막 (MWCO 3,500; Slide-A-Lyzer dialysis cassette, USA)을 사용한다. PEI와 glutaric anhydride (GA)는 Sigma-Aldrich Co. (Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 리포솜에 결합된 PEI의 양을 평가하기 위하여 사용한 NHS-fluorescein (5(&6)-carboxyfluorescein N-succinimidyl ester)은 Sigma-Aldrich Co. (Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 소 혈청 수용액은 Sigma-Aldrich Co. (Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 클로로포름과 메틸 알콜, 메틸클로라이드 (MC), *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimidehydrochloride (EDC) 그리고 *N*-Hydroxy-succinimide (NHS) 등의 용매는 일급 또는 특급시약을 사용하였다.

기기. 리포솜 제조 시 사용된 기기로는 인지질 필름 형성을 위하여 회전응축 증발기 (Buchi Rotavapor R-200, Switzerland)를 사용하였고, 리포솜의 입자 크기 조절과 단일 이중막 제조를 위하여 가압압출기 (Northem Lipids Ins.)를 사용하였다. 제조되어진 리포솜의 크기 및 제타 포텐셜은 입도 분석기 (ELS-8000, Otus-ka, Japan)를 사용하였다. 약물의 봉입률과 리포솜 표면에 결합된 PEI의 양은 형광 분광 광도계 (Barnstead, Apogent Tech, USA)를 사용하여 측정하였다. 합성된 DSPE와 PEI는 ¹H 핵 자기 공명 분광계 (NMR, Bruker, Avance 500)를 이용하여 구조 분석을 하였다. 양이온 리포솜에 대한 단백질 흡착은 UV-visible 분광 광도계 (UV mini 1240, Shimadzu Inc., Japan)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

DSPE-PEI의 합성. DSPE와 PEI의 합성은 먼저, PEI (1 mmol, MW 600)를 둥근바닥 플라스크에 넣고 용매 MC 50 mL를 첨가하여 PEI를 용해시킨 후 10 mL MC로 용해시킨 GA (0.01 mmol) 용액을 1 mL/min의 속도로 천천히 첨가한 후 상온에서 10시간 동안 교반하면서 반응을 시켜주었다. 반응 후 20 °C에서 회전응축 증발기를 이용하여 MC를 제거하였고 카복시 그룹을 가지고 있는 PEI (PEI-co)를 합성하였다. PEI-co와 DSPE의 합성은 다음과 같은 방법으로 진행하였다. PEI-co (0.83 mmol)를 EDC (0.83 mmol)와 NHS (0.83 mmol) 그리고 클로로포름 50 mL를 잘 건조된 둥근바닥 플라스크에 넣고 30분 동안 상온에서 교반시키면서 진행하였다. DSPE (0.83 mmol)를 클로로포름 20 mL로 용해시켰고, 반응 후 PEI-co가 용해되어 있는 둥근바닥 플라스크에 DSPE 수용액을 첨가하였고 10시간 동안 교반하며 반응시켰다. 반응 후 20 °C에서 회전응축 증발기를 이용하여 클로로포름을 모두 제거하였고, 남아있는 DSPE-PEI 합성물질을 증류수로 용해시킨 후 투석 막에 담아 2 °C에서 72시간 동안 막투석을 실시하여 정제하였다. 막투석을 통해 정제된 용액을 동결 건조기로 건조하여 82% 수율로 DSPE가 그래프트된 PEI를 합성하였다.

리포솜 제조. Table 1은 리포솜에 대한 지질의 종류와 혼합 비율을 나타내었다. 리포솜은 전체 지질의 양을 10 mmol로 고정하였고 DPPC, CHOL, HSPC, DSPE와 DSPE-PEI의 몰 비율을 조절하여 제조하였다. 각각의 지질을 혼

Table 1. The Composition and the Formulation of Liposomes Modified with PEI

	Composition	Molar Ratio of Formulation
liposome	DPPC:HS ² C:CHOL:DSPE	100:50:30:6
liposome-PEI 10 mol%	DPPC:HSPC:CHOL:DSPE-PEI	100:50:30:10
liposome-PEI 20 mol%	DPPC:HSPC:CHOL:DSPE-PEI	100:50:30:20
liposome-PEI 30 mol%	DPPC:HSPC:CHOL:DSPE-PEI	100:50:30:30

합하여 각각 $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1 (v/v)) 혼합 용매에 용해시킨 후 둥근바닥 플라스크에 넣고, 회전응축 증발기를 이용하여 유기 용매를 증발시켜 지질로 이루어진 얇은 필름을 얻었다. DOX은 17 mmol/mL의 조건으로써 10 mmol PBS (Phosphate buffered saline) 완충 용액에 녹인 후 필름이 형성되어 있는 둥근바닥 플라스크에 혼합하고 60 °C에서 수화를 시켰다. 수화를 마친 후 약물의 봉입을 향상을 위하여 freeze-thaw 과정을 5회 시행하였으며, freeze와 thaw 과정은 -15, 60 °C에서 각각 7분 간격으로 시행 후 가압 압출기 (polycarbonate membrane pore size; 100 nm)를 50 °C에서 실시하여 리포솜의 입자 크기를 조절하였다. 리포솜에 봉입되지 않은 지질 성분과 약물은 4 °C에서 48시간 동안 막투석 (MWCO 3500)을 시행하여 정제하였다.

리포솜의 물리적 특성 측정. PEI로 수식된 리포솜의 입자 크기와 표면 이온 성질을 확인하기 위하여 입도 분석기를 이용하여 입자 크기와 제타 포텐셜을 측정하였다. 제조되어진 리포솜을 PBS 완충 용액으로 희석한 후, 25 °C에서 제타 포텐셜과 입자 크기를 측정하였다. 항암약물인 DOX의 봉입률 측정은 형광 분광 광도계를 사용하여 TritonX-100 (10%, v/v)를 첨가하여 리포솜을 붕괴시킨 후의 형광 강도와 초기 형광 강도의 비로 결정하였다.

리포솜 표면에 결합된 PEI의 양 측정. 리포솜의 외부/내부 표면에 결합된 PEI의 양은 형광 분광 광도계를 이용하여 측정하였다. DSPE-PEI의 말단기와 NHS-fluorescein을 결합시켜서 NHS-fluorescein의 형광 강도를 흡수 파장 490 nm, 방출 파장 520 nm에서 측정하였다. PEI와 결합된 NHS-fluorescein의 측정을 하기 위해 제조되어진 리포솜 용액을 2 mL에 NHS-fluorescein (0.1 mg/mL dimethylsulfoxide) 100 μL 를 가하고 2시간 동안 4 °C에서 교반하면서 반응을 시켜주었다. 그 후, 셀룰로오스 투석 막 (MWCO 3500)을 사용하여 4 °C에서 48시간 동안 막투석을 시행하였다. 막투석을 통하여 PEI와 결합되지 않은 NHS-fluorescein을 제거한 후, 형광 분광 광도계를 이용하여 NHS-fluorescein의 형광 강도를 측정하여 리포솜에 결합된 PEI의 양을 측정하였다. 이 때 리포솜에 결합되어 있는 전체 PEI의 양은 NHS-fluorescein을 가하기 전에 Triton X-100 (10%, v/v) 20 μL 를 리포솜 용액에 가하여 리포솜을 붕괴시킨

후에 NHS-fluorescein과 결합을 실시하여 측정하였다. 리포솜 내부에 결합되어 있는 PEI의 양은 전체 결합된 양에서 리포솜 외부 표면에 결합되어 있는 양을 뺀 값으로 계산하였다. 리포솜에 결합되어 있는 PEI의 양은 NHS-fluorescein의 검량선으로 결정하였다.

탁도 변화 측정. 소 혈청 수용액 안에 있는 리포솜에 대한 혈장단백의 흡착은 Lin그룹이 보고한 방법을 이용하여 시행하였다.¹¹ 리포솜과 혈장 혼합 용액의 탁도 변화는 다음의 과정에 의하여 진행하였다. 리포솜 용액 (1 mL) 과 소 혈청 수용액 (1 mL)을 혼합한 후, 37 °C에서 숙성시키며 일정한 시간 간격으로 혼합 용액의 탁도 변화를 UV-visible 분광 광도계를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

리포솜의 입자 크기 변화 및 안정성. 리포솜의 입자 크기는 입도 분석기를 이용하여 측정하였다. 리포솜 용액 (1 mL)을 소 혈청 수용액 (1 mL)과 혼합한 후, 37 °C에서 숙성하였으며 일정한 시간 간격으로 혼합 용액 내의 리포솜 입자 크기 변화를 측정하였다. 한편, 리포솜의 안정성을 확인하기 위하여 제조되어진 리포솜을 PBS 완충 용액으로 희석한 후, 상온 (25 °C)에서 보관하면서 입자의 크기를 시간에 따라 측정하였다.

3. 결과 및 토론

DSPE-PEI의 합성. PEI는 용액 상태이기 때문에 지질 이중막에 수식하기로는 부적합하기 때문에 지질의 형태로 만들기 위해 DSPE와 합성하여 이용하였다. PEI와 DSPE의 합성된 구조식을 Figure 1에 나타내었다. 나타낸 바와 같이 두 단계로 합성을 하였는데, 첫번째 합성 단계에서는 DSPE와의 합성을 할 수 있도록 PEI의 활성 그룹으로 카복시 그룹을 도입하기 위하여 GA의 개환을 통하여 합성하여 카복시 그룹을 도입하였다. 두 번째 단계로 PEI-co의 카복시 그룹을 EDC로 활성화 시킨 후 DSPE의 아민 그룹과의 반응으로 합성하였다. 두 단계의 합성 과정으로 DSPE와 PEI 사이의 아마이드 그룹이 생성되었을 것이라고 생각되어진다.

Figure 2는 합성된 PEI-co와 DSPE-PEI의 ¹H-NMR 측정 결과를 나타내었다. PEI-co의 피크에서 PEI에 기인한 특정 피크인 아민 그룹의 피크를 2.5-3.0 ppm에서 확인하였으며, GA에 기인한 메틸렌 피크를 2.2 ppm에서 확인함으로써 카복시 그룹이 도입된 것을 확인하였다. DSPE-PEI의 피크에서 PEI의 특정 피크들과 함께 DSPE에 기인한 특정 피크들이 0.9, 1.25, 1.6, 2.2, 3.75 ppm에서 확인됨으로써 PEI에 DSPE가 그래프트되었음을 확인하였다. 합성된 DSPE-PEI를 이용하여 양이온을 지닌 리포솜을 제조

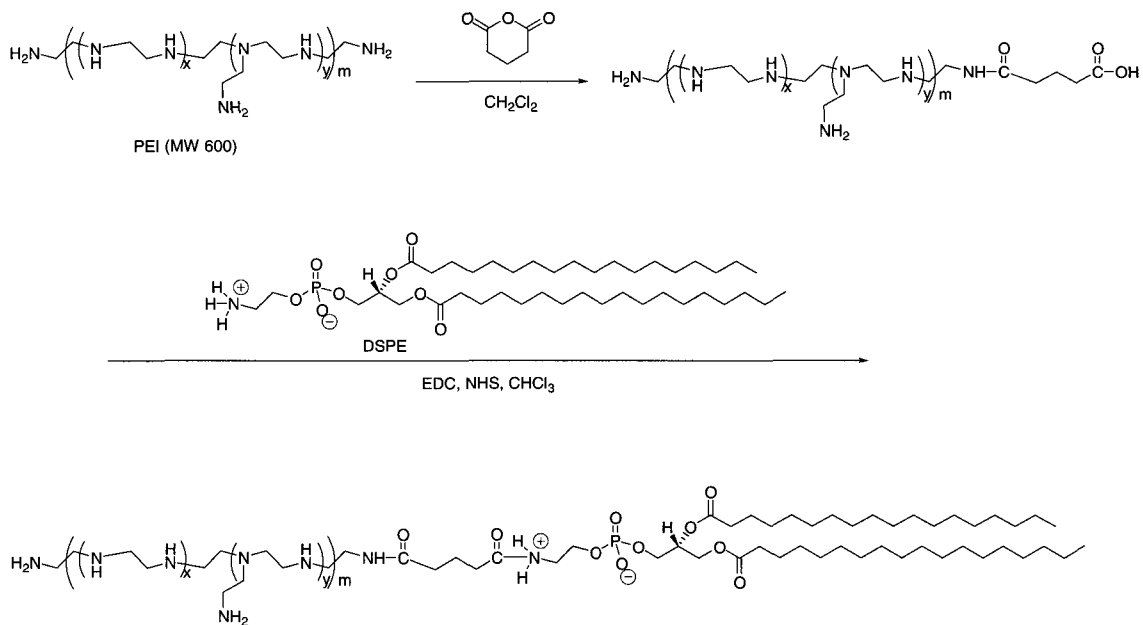


Figure 1. Synthesis of DSPE-PEI.

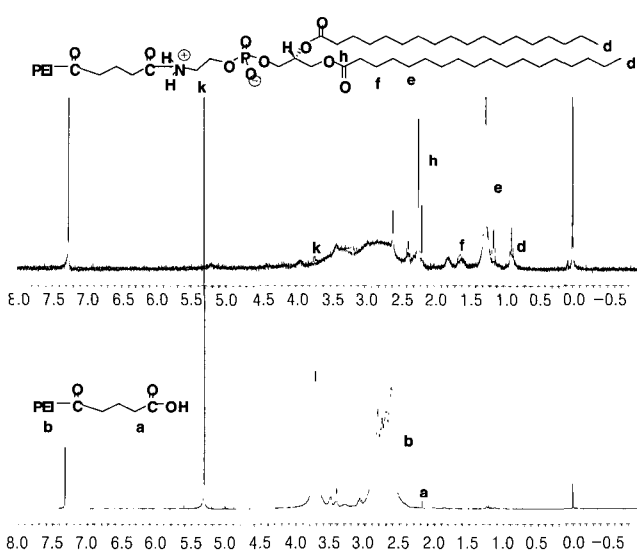


Figure 2. ¹H-NMR spectrum of the synthesis DSPE-PEI in CDCl₃.

하였다.

리포솜의 물리적 성질. 리포솜의 입자 크기와 표면 성질 및 약물의 봉입률은 Table 2에 나타내었다. 제조되어진 리포솜의 입자 크기를 알기 위하여 입도 분석기를 이용하여 리포솜의 크기를 측정하였다. 모든 입자 크기는 140~160 nm 범위에서 관찰됨으로써 비교적 균일한 입자 크기를 갖는 리포솜이 제조되었다. 그리고 PEI로 수식된 리포솜

Table 2. Physical Properties of Liposomes Modified with PEI Measured in PBS-buffered Solution at Room Temperature as a Function of mol% of PEI

	Diameter (nm)	Poly-dispersity	Zeta Potential (mV)	Mobility (cm ² /Vs, 10 ⁻⁵)	DOX Loading Efficiency (%)
liposome	141	2.8	0.14	0.10	67.5
liposome-PEI 10 mol%	164	2.2	5.16	4.09	53.7
liposome-PEI 20 mol%	160	1.9	11.62	9.22	35.2
liposome-PEI 30 mol%	141	1.6	16.65	13.23	38.5

표면의 이온성을 알아보기 위하여 제타 포텐셜을 측정하여 표면 전하를 확인하였다. DSPE-PEI의 몰 비율을 증가하여 제조된 리포솜 표면의 제타 포텐셜 값이 증가하였다. DSPE-PEI를 첨가하지 않은 리포솜은 거의 중성으로 관찰되었다. DSPE-PEI를 첨가한 리포솜의 표면 전하로 양이온성을 나타냄을 관찰할 수 있었고, DSPE-PEI의 몰 비율이 증가할수록 양이온성이 점차 증가하는 것을 관찰하였다. 이것은 양이온성 고분자인 PEI의 영향으로 리포솜이 양이온으로 수식된 것을 나타낸다. 또한, 제타 포텐셜의 이동도가 증가함에 따라 양이온성이 증가됨을 관찰할 수 있었다. 또한, 리포솜내의 항암약물인 DOX의 봉입률을 확인하여 약물 전달체로서의 가능성을 확인하였다.

리포솜 표면에 결합된 PEI 양의 측정. 리포솜 표면에 PEI가 결합이 되어있음을 확인하기 위해 결합된 PEI의 양

Table 3. Amount of the PEI on the Inner/Outer Surface of Liposomes

Liposome	Initial Concentration of PEI (mg/mL Liposome)	Inner Surface (mg/mL Liposome)	Outer Surface (mg/mL Liposome)	Total PEI (mg/mL Liposome)
PEI 10 mol%	0.7	0.33	0.14	0.47
PEI 20 mol%	1.4	0.17	0.25	0.42
PEI 30 mol%	2.1	0.14	0.29	0.43

을 측정하였다. 리포솜 표면에 결합된 PEI의 양은 PEI의 아민기에 결합된 NHS-fluorescein의 형광 강도를 측정하여 결정하였다. DSPE-PEI는 말단기에 아민기를 지니고 있어 NHS-fluorescein과 결합할 수 있는 구조를 가지고 있다. Table 3에 PEI의 농도에 따른 리포솜 표면에 결합하는 PEI의 양을 나타내었다. 리포솜 제조시 리포솜-PEI 10 mol%의 농도로 제조하였을 경우 리포솜 외부에 0.14 mg/mL 리포솜이 결합되어 있었다. 리포솜-PEI 20 mol%로 제조하였을 경우 외부에 0.25 mg/mL 리포솜의 양으로 PEI가 리포솜에 결합되어있고 리포솜-PEI 30 mol%로 제조시에는 외부에 0.29 mg/mL 리포솜의 양으로 결합되어 있는 것을 관찰할 수 있었다.

본 실험의 결과로써 PEI가 리포솜의 표면에 결합되어 있다는 것을 확인하였다. PEI의 농도가 증가할수록 외부 리포솜의 표면과 결합한 PEI의 양이 증가하는 경향을 볼 수 있었다. 따라서 리포솜 외부 표면의 표면 전하가 양이온성으로 증가되는 것을 관찰하였다. 그리고 물 비율이 증가하더라도 전체 리포솜 표면에는 비슷한 양의 PEI가 결합되어 있는 것을 알 수 있었다. Harashi 그룹은 초기 제조시 넣은 고분자의 양이 다르더라도 리포솜 표면의 고분자의 밀도가 비슷함으로 인해서 제조된 리포솜에 결합된 전체 고분자의 양은 서로 비슷하다고 하였다.¹²

리포솜의 탁도 변화. 리포솜의 소 혈청 수용액 내에서의 혈장 단백질 흡착을 관찰하기 위한 방법으로 리포솜과 소 혈청 수용액의 혼합 용액의 탁도를 측정하는 방법이 보고되었다.¹¹ 혼합 용액의 탁도 변화를 Figure 3에 나타내었다. 흡광도는 용액의 탁도에 기인하여 나타나기 때문에 흡광도의 변화로 탁도의 변화를 알아보았다. 리포솜 제조 시 첨가한 리포솜-PEI 10, 20, 30 mol%는 7시간 동안 흡광도가 서서히 증가하였다. 7시간 이후 흡광도가 큰 폭으로 증가하는 것을 볼 수 있었고, PEI의 양이 증가할수록 흡광도가 더 크게 나타내었다. PEI는 혈장 단백질과 리포솜 표면 사이의 단백질 흡착을 증대시키기 때문에 리포솜이 포함되어 있는 소 혈청 수용액의 탁도를 증가시키는데 기여함을 알 수 있었다. 탁도의 변화로써 리포솜이 단백질 흡착에 영향을 주는 것은 Liu 그룹과 Mercadal 그룹에 의하여 보고되었다.^{13,14} 탁도는 혈장 단백질이 리포솜의 표면에 흡착될 때 증가하였다. 이 결과로부터 리포

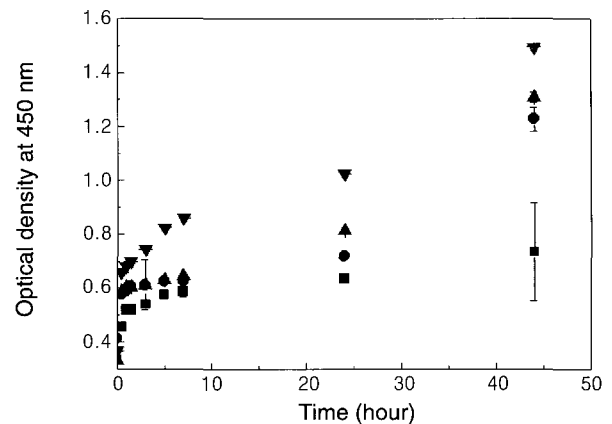


Figure 3. Turbidity change with time in bovine serum containing liposomes at 37°C : liposome (■), liposome-PEI 10 mol% (●), liposome-PEI 20 mol% (▲), liposome-PEI 30 mol% (▼).

솜 표면의 단백질 흡착은 PEI에 의해 양이온으로 수식되어서 음이온성 단백질들이 많이 붙기 때문에 단백질 흡착이 증대된다는 것을 알 수 있었다. 리포솜 표면의 단백질 흡착은 세포와의 흡착성을 판단하기 위한 중요한 요인으로 작용한다.

리포솜의 입자 크기 변화. Lin 그룹은 소 혈청 수용액에서 입자 크기의 변화가 리포솜에 있는 혈장 단백질의 흡착과 관련이 있다는 것을 보고하였다.¹¹ 리포솜의 혈장 단백질 흡착을 관찰하기 위한 방법으로 입자 크기 변화를 관찰하였다. 리포솜이 포함되어 있는 소 혈청 수용액의 단백질 흡착은 37°C에서 입자 크기의 변화를 측정하여 결정하였다. Figure 4에 소 혈청 수용액에 보관하는 동안에 시간에 따라 변화되는 리포솜의 입자 크기를 나타내었다. 상대적으로 비교하기 위하여 초기 입자 크기를 100 nm을 기준으로 하였다. 리포솜의 평균 입자 크기는 48시간 동안 소 혈청 수용액에 보관하는 동안에 100에서 700 nm 이상 증가하였다. PEI의 물 비율을 증가하며 제조된 리포솜은 입자의 크기가 900, 1000, 1100 nm 이상으로 증가하였다. 입자 크기도 탁도 변화와 함께 PEI의 양이 증가할수록 입자 크기가 더욱 커지는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 리포솜 입자의 표면이 양이온을 나타낼 경우 혈장내의 음이온성 단백질과 흡착이 용이하게 일어난다는 것을 관찰하였다. 그러므로 양이온성 리포솜은 정맥주사로 활용되

기보다는 특정 부위만을 선택적으로 주사할 수 있는 국부적 주사제제로서 활용이 가능하다.

완충 용액 내에서 리포솜의 안정성 예측. PEI로 수식된 리포솜 자체의 안정성을 알아보기 위하여 완충 용액내 리포솜을 상온 (25 °C)에서 7일 동안 시간에 따른 입자 크기를 측정하여 Figure 5에 나타내었다. 상대적으로 비교하기 위하여 초기 입자 크기를 100 nm을 기준으로 하였다. 리포솜의 입자 크기는 시간에 따라서 일정한 것을 관찰하였다. 양이온성을 나타내지 않는 리포솜은 입자의 크기가 변함이 없이 안정한 반면 DSPE-PEI가 첨가된 양이온성 리포솜의 입자 크기는 초기 6시간 동안에는 다소 증가하였으나 6시간 이후에는 리포솜의 크기가 변함없이 일정하였고, 이때 리포솜 자체의 붕괴나 응집 등의 변화가 관찰되지 않았다. 따라서 양이온성 리포솜은 상온에서 비

교적 안정하다고 예측할 수 있었다.

4. 결론

본 연구에서는 양이온성 리포솜을 제조하기 위하여 DSPE-PEI를 합성하여 리포솜을 제조하였고, 제조된 양이온성 리포솜의 혈장내의 단백질 흡착 특성을 관찰하였다. DSPE-PEI의 첨가로 인하여 리포솜의 표면은 양이온성을 지니고 있음을 확인하였고 제조되어진 리포솜에 NHS-fluorescein을 결합시켜 리포솜 표면에 PEI의 결합을 확인하였다. 리포솜을 포함한 소 혈청 수용액에서의 리포솜의 입자 크기, 탁도의 변화는 PEI의 첨가 비율이 증가할수록 증가하는 것을 관찰하였다. 또한 항암약물을 봉입하여 제조된 리포솜은 상온에서 비교적 안정하다고 예측할 수 있었다. 본 연구는 리포솜에 항암약물을 봉입하여 양이온을 갖도록 표면을 변형시킨 항암약물 전달체에 관한 것으로서 특정인체부위에 직접 주사하여 항암약물의 효과를 증진시킬 수 있는 약물전달체의 제조에 관한 기본적인 자료로 활용될 것이다.

감사의 글 : 본 연구는 과학기술부 기능성 화합물질 개발사업과 정보통신연구진흥원 IMT-2000 출연금 기술개발 지원사업으로 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

References

1. A. D. Bangham, M. Standish, and J. C. Watkis, *J. Mol. Biol.*, **13**, 238 (1965).
2. D. Needham and M. W. Dewhirst, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **53**, 285 (2001).
3. K. Engin, D. B. Leeper, L. Tupchong, F. Water man, and M. Clin, *Cancer Res.*, **1**, 1139 (1995).
4. H. Hayashi, K. Kono, and T. Takagishi, *Biochem. Biophys. Acta.*, **1280**, 127 (1996)
5. Y. Yamazaki, M. Nango, Y. Hawegawa, M. Has egawa, and N. Oku, *Gene Ther.*, **7**, 1148 (2000).
6. N. Oku, Y. Yamazaki, M. Matsuura, M. Sugiyama, M. Hasegawa, and M. Nango, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **52**, 209 (2001).
7. O. Boussif, F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, and M. Djvaheri, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 7297 (1995).
8. A. Boletta, A. Benigni, J. Lutz, G. Remuzzi, M. R. Soria, and L. Monaco, *Hum. Gene Ther.*, **274**, 1243 (1997).
9. I. Chemin, D. Moradpour, S. Wieland, W. B. Offensperger, E. Walter, J. P. Behr, and H. E. Blum, *J. Viral Hepatitis*, **5**, 369 (1998).
10. S. Ferrari, E. More, A. Pettenazzo, J. P. Behn, F. Zacchello, and M. Scarpa, *Gene Ther.*, **4**, 1100 (1997).

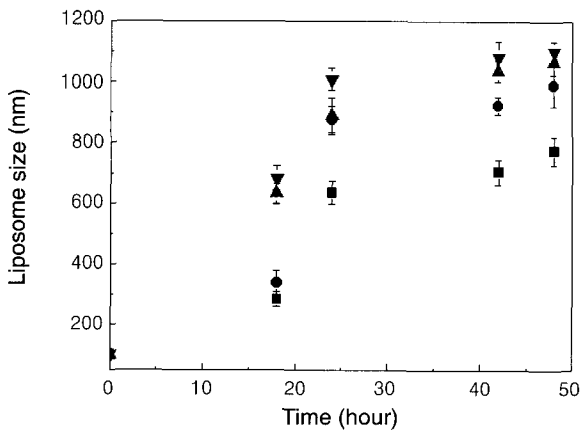


Figure 4. The particles size distribution with time in bovine serum at 37 °C : liposome (■), liposome-PEI 10 mol% (●), liposome-PEI 20 mol% (▲), liposome-PEI 30 mol% (▼).

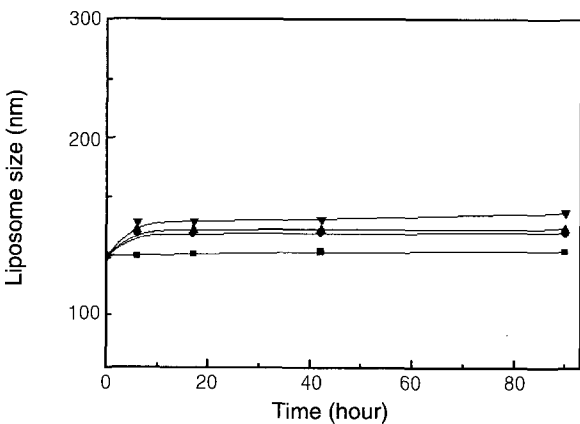


Figure 5. The estimation for stability of liposome via the particle size in buffered solution at room temperature : liposome (■), liposome-PEI 10 mol% (●), liposome-PEI 20 mol% (▲), liposome-PEI 30 mol% (▼).

11. W. Lin, M. C. Garnett, M. C. Davies, F. Bignotti, P. Ferruti, S. S. Davis, and L. Illum, *Biomaterials*, **18**, 559 (1997).
12. H. Hayashi, K. Kono, and T. Takagishi, *Bioconjugate Chem.*, **10**, 412 (1999).
13. R. Yoshida, K. Uchida, Y. Kaneko, K. Sakai, A. Kikuchi, Y. Sakurai, and T. Okano, *Nature*, **374**, 240 (1995).
14. M. C. Woodle, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **32**, 139 (1998).