

## 독소루비신을 함유하고 단백질로 수식된 양이온성 리포솜의 제조 및 혈장 단백질흡착 특성

김성규<sup>†,‡</sup> · 정순화<sup>†</sup> · 정석현<sup>†</sup> · 성하수<sup>†</sup> · 지상철<sup>†</sup> · 조선행<sup>†</sup> · 신병철<sup>†,\*</sup>

한국화학연구원 신약기반기술연구센터

성균관대학교 약학대학

(2008. 1. 2 접수)

## Preparation of Protein-coated Cationic Liposomes Containing Doxorubicin and Their Binding Property of Blood Plasma Protein

Sung Kyu Kim<sup>†,‡</sup>, Soon Hwa Jung<sup>†</sup>, Suk Hyun Jung<sup>†</sup>, Hasoo Seong<sup>†</sup>, Sang Cheol Chi<sup>‡</sup>,  
Sun Hang Cho<sup>†</sup>, and Byung Cheol Shin<sup>†,\*</sup>

<sup>†</sup>Center for Drug Discovery Technologies, Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 305-343, Korea

<sup>‡</sup>College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-476, Korea

(Received January 2, 2008)

**요 약.** 리포솜은 나노 또는 마이크로 크기를 가지는 구형의 약물 전달체이다. 그러나 일반적인 리포솜은 혈류 순환시 혈장 단백질과의 흡착이 일어나 안정성이 떨어지고, 세망내피계의 대식세포에 의해 옅소닌작용이 일어나 혈중에서 쉽게 소실되는 단점이 있다. 이에 본 연구에서는 모델단백질로 소혈청 알부민(BSA)을 사용하였고, BSA의 등전점보다 높은 pH를 나타내는 수용액에 용해하여 BSA가 음이온성을 갖도록 제조하였으며 이를 양이온성 리포솜 표면에 정전기적 인력에 의해 결합시켰다. 그리고 리포솜 표면에 코팅된 알부민을 60 °C 이상의 온도에서 변성시켜 알부민이 코팅된 리포솜을 제조하였다. 대조 리포솜과 양이온성 리포솜의 입자크기는 104±1 nm를 나타내었고, 변성된 알부민이 결합된 리포솜은 109±1 nm의 입자크기를 나타내었다. 모델약물로서는 독소루비신(doxorubicin, DOX)을 사용하였고, 이온구배에 의한 리모트 로딩 방법을 사용하여 리포솜 내부에 DOX를 봉입시켰다. 혈장 내에서 리포솜의 안정성을 평가한 결과, 알부민이 결합된 리포솜은 입자크기의 변화가 관찰되지 않았고, 대조 리포솜과 양이온 리포솜에 비해 단백질 흡착이 억제되어 변성된 알부민으로 코팅된 리포솜은 혈류 내에서 장기 순환이 가능한 약물전달체로서 유용할 것이라 사료된다.

**주제어:** 리포솜, 안정성, 알부민, 단백질흡착, 독소루비신

**ABSTRACT.** Liposomes are nanometer or micrometer scale vesicles that can be used as drug delivery carriers. However, plain liposomes are plagued by rapid opsonization, making their circulation time in bloodstream be shortened. In this study, model protein, bovine serum albumin (BSA)-coated liposomes were prepared by coating cationic liposomes with BSA molecules at higher pH than isoelectric point of BSA. The BSA molecules coated on the liposomal surface were denatured by thermal treatment at above 60 °C. While both plain and cationic liposomes had about mean particle diameter of 104±1 nm, BSA-coated cationic liposomes (BCL) had mean particle diameter of 109±1 nm. Encapsulation of model drug, doxorubicin (DOX), in liposomes were carried out by using remote loading method and the loading efficiency of DOX to liposomes was about 90%. The mean particle diameter of BCL did not increase in blood plasma and adsorption of plasma protein was much less than plain or cationic liposomes. These results suggest that BCL can be used as a long-circulating liposomes in bloodstream.

**Keywords:** Liposome, Stability, Albumin, Protein binding, Doxorubicin

## 서 론

리포솜은 양친매성 지질의 이중 막으로 형성된 소포체로서 내부에 약물을 봉입할 수 있는 약물전달체이다. 이러한 리포솜의 막 구조는 세포막의 구조와 비슷하여 독성이 적고 세포와의 융합이나 세포내 이입을 통해 약물전달이 가능하기 때문에 약물전달체로의 연구가 활발히 진행되어 왔다.<sup>1,4</sup> 그러나 리포솜은 정맥 주사 투여시 간이나 비장의 세망내피계에 의해 흡수되고, 또한 대식세포에 의하여 쉽게 소실되어 혈류 내 반감기가 짧아지는 단점을 가지고 있고, 혈장 단백질의 흡착 및 리포솜간의 응집현상에 의해 구조적으로 불안정해지기 때문에 봉입된 약물이 누출되어 정상세포에 독성을 미치는 문제를 가지고 있다.<sup>5,7</sup> 이와 같은 문제점을 해결하기 위하여 폴리에틸렌글리콜과 같이 생체 적합성이 있고 유동성을 갖는 친수성 고분자와 지질을 공유결합시킨 복합체를 리포솜의 이중층에 도입하여 리포솜의 표면에 혈장 단백질의 흡착을 방지함으로써 리포솜의 혈류 내 안정성을 향상시키는 방법이 사용되어 왔다.<sup>6,8</sup> 이와 같은 폴리에틸렌글리콜-지질 유도체가 도입된 리포솜은 EPR (enhanced permeability and retention) 효과에 의해서 암 조직이나 염증 부위에 선택적으로 축적되어 결과적으로 병소로의 약물전달 효율을 높이는 방법이었다.<sup>6</sup> 그러나 폴리에틸렌글리콜-지질 유도체를 도입한 리포솜은 이러한 장점에 반해 생체 내 효소에 의해서 분해되지 않고 세포에 축적되어 세포 기능 장애를 유발하거나, 표적부위에서 약물의 방출을 저해하여 치료 효능이 감소되는 단점을 가지고 있다.<sup>9-12</sup>

따라서 리포솜의 혈류 내 안정성을 증진시키기 위하여 생체 적합성이 높고 생체 내 분해가 가능한 단백질 분자를 리포솜의 표면에 결합시켜 혈장 단백질의 흡착을 억제할 수 있는 약물전달체를 개발하고자 하였다. 알부민은 혈청에 존재하는 단백질 중 50~55%를 차지하며 5.82의 등전점을 가지는 즈비터(Zwitter) 이온으로 pH 1~4에서는 양이온성을 나타내고, pH 6~9에서는 음이온성을 나타낸다. 알부민과 같은 단백질에 열과 같은 물리적 자극이나 산알칼리와 같은 화학적 자극을 가하면 수소결합이 끊어지고 접힘이 풀어져서 열린 형태가 되는 일차 구조로의 변성이 일어난다.<sup>13,14</sup> 변성된 단백질은 효소작용, 호르몬의 생리작용, 독성, 면역성 등 단백질 특유의 성질을 상실하기

때문에 수용성 또는 난용성 약을 전달할 목적으로 나노입자 그리고 마이크로입자 등의 약물전달시스템으로의 적용 사례가 보고되었다.<sup>15-21</sup>

리포솜 표면에 혈장 단백질이 흡착되는 것을 억제하기 위하여 양전하를 갖는 리포솜의 표면을 음전하를 갖는 알부민으로 코팅하였으며, 알부민이 결합된 리포솜의 혈장 내 안정성을 강화하기 위하여 리포솜 표면에 결합된 알부민을 열에 의해 변성시켰다. 표면이 알부민으로 개질된 리포솜의 혈장 내 안정성과 단백질 흡착정도를 평가하기 위하여 대조 리포솜, 양이온성 리포솜, 그리고 변성된 알부민으로 개질된 리포솜의 물리적 특성을 고찰하였고 랫트 혈장 내에서의 시간에 따른 입자크기 변화와 단백질 흡착정도를 평가하여 알부민이 결합된 리포솜의 안정성을 확인하였다.

## 실험 및 방법

### 시약 및 재료

리포솜 제조에 사용된 지질인 L- $\alpha$ -phosphatidylcholine (soy-hydrogenated) (HSPC), cholesterol (CHOL), 1,2-distearoyl-3-trimethylammonium-propane (DSTAP)은 Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, USA)에서 구입하여 사용하였다. 소 혈청 알부민 (bovine serum albumin, BSA)과 (S)-2-amino-3-(4-imidazolyl)propionic acid (L-histidine)은 Sigma Aldrich Inc. (Milwaukee, USA)에서 구입하여 사용하였다. Bio-Rad Protein Assay 시약은 Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules California 94547 USA)에서 구입하여 사용하였고, 모델 약물로 사용한 독소루비신 (doxorubicin, DOX)은 Boruynng Inc. (Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 투석막은 분획 분자량 (molecular weight cut off, MWCO)이 12,000~14,000인 것을 Viskase Co. (Illinois, USA)에서 구입하여 사용하였고, 정제에 이용한 Centricon® (MWCO 100,000)은 Millipore Co., (Bedford, MA 01730, USA)에서 구입하여 사용하였다. 그 밖에 실험에 사용한 용매 및 시약은 일급시약 및 특급시약을 그대로 사용하였다.

### 기기

리포솜 제조는 회전응축증발기 (Rotavapor R-200, Buchi, Switzerland), 초음파 발생기 (Ultrasonicator, 500, Fisher Scientific, USA), 그리고 가압압출기 (Nothern

Lipids Inc. Canada)를 사용하였다. 제조된 리포솜의 입자크기는 광산란장치(ELS-Z, OTUSKA Electronics Co., Japan)를 사용하였고, 제타전위 측정은 제타전위 측정기(ELS-Z, OTUSKA Electronics Co., Japan)를 사용하였다. 리포솜 내의 약물 봉입률은 UV-VIS 분광광도계(UV mini 1240, Shimadzu, Japan)를 사용하여 측정하였고, 제조된 리포솜 용액의 삼투압은 삼투압 측정기(Osmomat 030, GONOTEC GmbH., Germany)를 사용하였으며, 리포솜에 결합된 알부민의 정량분석은 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay, EL808, Bio-Tek Ins. USA)를 사용하였다.

#### 리포솜의 제조

대조 리포솜은 HSPC와 CHOL를 12.6:8.3 mM의 비율로 제조하였고, 양이온성 리포솜은 HSPC와 CHOL 및 DSTAP을 11.3:8.3:1.4 mM의 비율로 제조하였으며 두 리포솜의 최종 지질 농도는 12.8 mg/ml가 되도록 하였다. 리포솜의 제조는 각각의 지질을 클로로포름에 용해시킨 후, 회전응축증발기를 사용하여 45 °C에서 감압 증류하며 둥근 바닥 플라스크 내벽에 얇은 지질막을 형성시켰다. 형성된 지질막은 250 mM의 암모늄설페이트 용액으로 지질막이 완전히 분산될 때까지 수화하여 리포솜 용액을 제조하였다. 제조된 리포솜 용액은 입자의 크기를 조절하기 위하여 가압압출기로 각각 200 nm, 100 nm, 그리고 80 nm의 공극을 갖는 폴리카보네이트 분리막(Whatman, USA)을 이용하여 각각 5 회 이상 가압 압출하였고, 리포솜 내부에 봉입되지 않은 암모늄설페이트는 4 °C에서 48시간 동안 막투석을 실시하여 제거하였다.

#### 리포솜의 약물봉입 및 알부민의 코팅

모델 약물인 DOX의 봉입은 리포솜 내부와 외부의 암모늄설페이트의 이온농도 구배를 이용한 리포트로딩법을 사용하였고, 암모늄설페이트가 봉입된 리포솜 용액과 DOX 수용액을 1:1 (v/v)로 혼합하여 60 °C에서 2시간 동안 교반하여 DOX를 리포솜 내부에 봉입시켰다. 봉입되지 않은 DOX는 4 °C에서 48시간 동안 막투석을 실시하여 제거하였고, 독소루비신의 봉입효율은 UV-VIS 분광광도계를 이용하여 최대 흡수파장 497 nm에서 DOX의 농도를 측정 후 계산에 의해 산출하였다.<sup>22</sup> 대조 리포솜과 양이온성 리포솜 용액을 20 mM의 L-histidine 완충용액(pH 6.5)과 수크로스를

가하여 pH 6.5와 0.3~0.4 osmol/kg이 되도록 하였다.

양이온성 리포솜의 표면에 알부민을 결합시키기 위해 BSA의 등전점보다 높은 pH 7.4의 PBS 수용액에 BSA를 용해시켜 BSA 분자가 음이온으로 하전된 BSA 수용액을 제조하였고, 리포솜의 양이온과 BSA 분자의 음이온간의 정전기적 인력에 의해 결합되도록 하였다. pH 7.4의 PBS 수용액에 BSA의 농도가 각각 100, 200, 400, 600, 800 그리고 1000 µg/ml가 되도록 제조한 BSA 수용액을 양이온성 리포솜 용액에 20 µl/min의 속도로 서서히 가하면서 37 °C에서 1시간 동안 교반하였고, 양이온성 리포솜 용액과 BSA 수용액이 최종적으로 1:1 (v/v)가 되도록 하였다. 리포솜의 표면에 결합하지 않은 BSA는 Centicon<sup>®</sup>을 이용하여 4,000 rpm에서 2회 이상 원심분리하여 제거하였다.

#### 리포솜에 결합된 알부민의 열 변성

리포솜에 결합된 알부민을 변성하기 위하여 BSA가 결합된 양이온성 리포솜 용액을 100 °C에서 30분간 열처리를 실시하였다.<sup>18,21</sup> 리포솜 표면에 결합된 변성된 알부민의 양은 브래드포드 단백질정량법(Bradford protein assay)으로 정량하였다.<sup>23</sup> 96 well plate의 각각의 well에 알부민이 결합된 리포솜 용액 0.1 ml과 Bio-Rad Protein Assay 시약 0.1 ml을 가한 후, ELISA로 최대 흡수파장 595 nm에서 흡광도를 측정하였고, BSA의 검량선은 각각 대조 리포솜과 양이온성 리포솜 용액에 BSA를 1 mg/ml의 농도가 되도록 용해시키고 100 °C에서 30분간 열처리한 시료를 사용하여 작성하였다.<sup>24</sup>

#### 변성 알부민으로 코팅된 리포솜의 혈장 내 인성성 평가

열처리에 의한 알부민의 변성 여부는 BSA 용액 또는 열처리한 BSA 용액의 표면전하값의 변화를 관찰하여 확인하였다. pH 7.4의 PBS 수용액에 BSA를 800 µg/ml의 농도로 용해한 후 수용액을 4 °C에서 30분간 보관한 후 용액의 표면전하값과 위의 용액을 각각 60, 80 그리고 100 °C의 온도에서 30분간 열처리한 후 용액의 표면전하값을 제타전위 측정기를 사용하여 측정하였다. 또한 열처리 온도가 변성 알부민으로 코팅된 리포솜(BSA-양이온성 리포솜)의 혈장 단백질 흡착 특성에 미치는 영향을 조사하기 위해 BSA를 양이온성 리포솜과 이온결합시킨 용액을 각각 60, 80 그리고 100 °C

에서 30분 동안 열처리한 리포솜 용액을 랫트 혈장과 1:3 (v/v)의 비율로 혼합하고 37 °C에서 48시간동안 교반하면서 시간에 따른 입자 크기 변화를 광산란 장치를 이용하여 측정하였다.<sup>25</sup> 혈장은 6주령의 Sprague-Dawley 랫트에서 혈액을 채취한 뒤 헤파린 용액과 1:1 (v/v)로 혼합하고 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 혈구를 제거한 혈장만을 얻어 사용하였다. 또한 리포솜의 표면에 결합된 변성 알부민의 양이 혈장 단백질의 흡착 특성에 미치는 영향을 알아보기 위해 각각 양이온성 리포솜을 100, 200, 400, 600, 800 그리고 1000 µg/ml 농도의 BSA 수용액으로 코팅하고 열처리한 BSA-양이온성 리포솜 용액을 혈장과 1:3 (v/v)로 혼합하여 37 °C에서 교반하면서 시간에 따른 입자 크기 변화를 광산란 장치를 이용하여 측정하였다.<sup>26</sup>

#### 대조 리포솜과 BSA-양이온성 리포솜의 혈장 내 안정성 비교

대조 리포솜, 양이온성 리포솜 및 BSA-양이온성 리포솜의 혈장에서의 안정성을 비교하기 위하여 상기 변성 알부민으로 코팅된 리포솜의 혈장 내 안정성 평가에서 제시한 것과 동일한 조건과 방법으로 입자크기의 변화를 관찰하였고, 혈장 단백질의 흡착량을 브래드포드 단백질정량법을 이용하여 리포솜 표면에 흡착한 단백질의 양을 측정하였다.<sup>23</sup> 제조된 리포솜 용액을 혈장과 1:3 (v/v)의 비율로 혼합하여 37 °C에서 교반하면서 일정시간마다 시료를 1 ml씩 채취한 후, Centricon<sup>®</sup>을 이용하여 4,000 rpm에서 원심분리하고 1 ml의 PBS로 세척하는 과정을 2회 반복하여 혈장 단백질이 흡착된 리포솜과 혈장 단백질을 분리하였다. 리포솜에 흡착된 단백질의 양은 상기 리포솜에 결합된 알부민의 열 변성에 제시한 방법과 동일하게 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 단백질의 열 변성

열처리에 의한 알부민의 변성여부를 확인하기 위하여 PBS (pH 7.4)에 용해시킨 800 µg/ml 농도의 BSA 수용액을 4 °C에서 30분간 보관한 시료의 표면전하값과 각각 60, 80 그리고 100 °C의 온도에서 30분간 열처리한 시료의 표면전하값을 Table 1에 나타내었다. 열처리를 하지 않고 4 °C에 보관한 BSA 수용액은 BSA의 등전점보다 높은 pH 7.4의 조건에서 -23.8±8.4 mV의 표면전하값을 나타내었고, 60 °C에서 30분간 열처리한 BSA 수용액의 표면전하값은 -21.9±2.5 mV로 4 °C에 보관한 BSA 수용액과 차이를 나타내지 않았다. 그러나 각각 80 °C와 100 °C로 30분간 열처리한 BSA 수용액의 표면전하값은 각각 -8.8±1.7 mV와 -0.3±0.1 mV로 열처리 온도가 높을수록 표면전하값이 점차 중성으로 변화되는 것이 확인되었다. 이는 BSA에 가해진 열에너지에 의해 BSA의 접힌 구조를 형성하는 수소결합이 끊어져 소수성 잔기가 BSA의 표면에 노출된 일차구조의 형태로 변성되었기 때문이고, 아미드기 및 카르복실기가 일차구조로 펼쳐진 BSA 분자의 표면으로 노출되어 표면전하값의 변화가 나타난 것으로 생각된다.<sup>13</sup> 이러한 결과로부터 BSA는 80 °C의 온도에서 30분간 처리하여 변성을 일으킬 수 있으며 열처리 온도가 높을수록 변성을 크게 유도할 수 있음을 확인하였다. 따라서, DOX가 봉입된 양이온성 리포솜에 800 µg/ml 농도의 BSA 용액으로 코팅한 BSA-양이온성 리포솜을 100 °C의 온도조건에서 열처리하였으며, 열처리하지 않고 4 °C에서 보관한 시료와 100 °C로 30분간 열처리한 시료의 입자크기, 표면전하값 그리고 약물봉입률을 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Physical properties of BSA solution and BSA-cationic liposomes after heat treatment

Group	Temp. of thermal denaturation (°C)	Mean particle diameter (nm)	Zeta potential (mV)	Drug loading efficiency (%)
Free BSA solution	4	N.D. <sup>1)</sup>	-23.8±8.3	N.D. <sup>2)</sup>
	60		-21.9±2.5	
	80		-8.8±1.7	
	100		-0.3±0.1	
BSA-cationic liposomes	4	120.8±9.8	-3.6±4.6	93.8
	100	107.8±2.4	-1.5±0.3	83.8

<sup>1)</sup>Not determined; mean particle diameter could not be characterized because BSA solution did not contain particle.

<sup>2)</sup>Not determined; doxorubicin was not added to BSA solution.

열처리하지 않고 4°C에 보관한 BSA-양이온성 리포솜의 입자크기, 표면전하값 그리고 약물봉입률은 각각 120.8±9.8 nm, -3.6±4.6 mV, 그리고 93.8%이었고, 100°C로 30분간 열처리한 BSA-양이온성 리포솜의 입자크기, 표면전하값 그리고 약물봉입률은 각각 107.8 ±2.4 nm, -1.5±0.23 mV 그리고 83.8%로 측정되었다. 100°C로 30분간 열처리에 의해 리포솜의 입자크기와 표면전하값은 큰 변화를 나타내지 않았으나 약물봉입률은 약 10% 정도 감소하였는데 이는 열처리 후 BSA-양이온성 리포솜을 Centricon\*으로 정제하는 과정에서 발생한 손실로 사료된다. 이러한 결과로부터 본 연구에서 이용한 열처리법은 리포솜 표면의 BSA를 변성시키면서 리포솜의 물리적 특성과 약물 봉입률에는 큰 영향을 미치지 않음을 확인하였다.

**리포솜의 물리적 특성**

BSA를 리포솜의 표면에 정전기적 인력에 의해 결합시키기 위하여 양이온성 리포솜을 제조하였고, 양이온성 리포솜의 구성성분으로서 DSTAP을 함유하지 않고 HSPC와 CHOL만으로 제조한 대조 리포솜을 제조하였으며 대조 리포솜과 양이온성 리포솜의 입자크기, 표면전하값, 약물의 봉입률 및 삼투압을 Table 2에 나타내었다. 대조 리포솜과 양이온성 리포솜의 입자크기는 약 102~107 nm 범위에서 분포하였고, 전기적으로 중성인 대조리포솜의 표면전하값은 0.3±0.2 mV의 값을 나타내었으며, 양이온성 지질로서 DSTAP를 구성성분으로 갖는 양이온성 리포솜은 39.8±2.2 mV의 표면전하값을 나타내었다. DOX의 봉입률은 두 가지 리포솜 모두 90% 이상이었고, 삼투압은 전혈(whole blood)의 삼투압인 0.3~0.4 osmol/kg 범위 내에 해당하였다.

양이온성 리포솜을 각각 100, 200, 400, 600, 800 그리고 1000 µg/ml 농도로 PBS (pH 7.4)에 용해시킨 용액으로 코팅한 BSA-양이온성 리포솜의 입자크기, 표면전하값, 리포솜에 결합된 알부민의 양 및 약물봉입률을 Fig. 1에 나타내었다. BSA의 등전점보다 높은 pH 7.4에서 BSA 용액의 표면전하값은 -23.8±8.4 mV

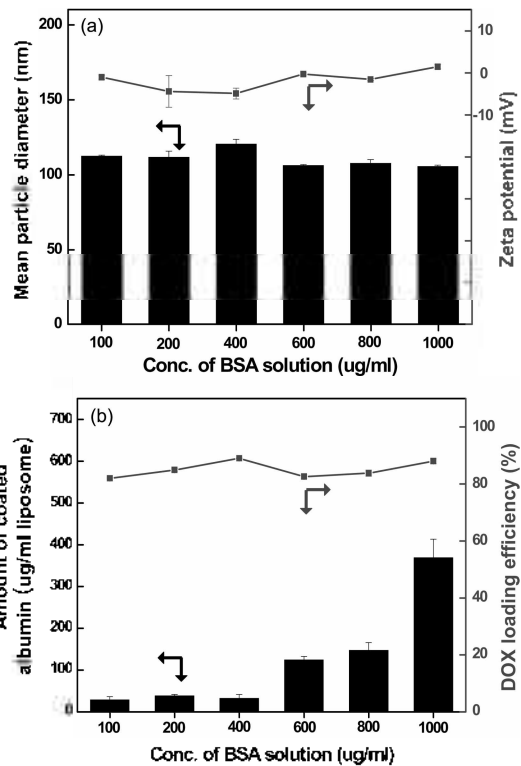


Fig. 1. Physical properties of cationic liposomes coated with various concentration of BSA solution; (A) Mean particle diameter (■) and zeta potential (▲); (B) The amount of coated albumin on the liposomal surface (■) and drug loading efficiency (▲). Mean and S.D. are shown (n=3).

였으며, +39.8±2.2 mV의 표면전하값을 갖는 양이온성 리포솜과 정전기적인 인력에 의해 리포솜과 BSA의 결합을 형성시켰다. Fig. 1의 (a)에 제시한 바와 같이 100~1000 µg/ml 농도의 BSA용액으로 코팅하고 열처리한 BSA-양이온성 리포솜의 입자크기는 평균 110.8±5.6 nm로 BSA를 코팅하지 않은 양이온성 리포솜에 비해 입자크기가 약 5 nm 정도 증가되었다. 또한 100~1000 µg/ml 농도의 BSA용액으로 코팅하고 열처리한 BSA-양이온성 리포솜은 평균 -1.8±2.5 mV의 표면전하값을 나타내었다. 이는 양이온성 리포솜의 표면전하값이 +39.8±2.2 mV인 것에 반해, 음이온으로

Table 2. Physical properties of plain and cationic liposomes

Liposomes	Mean particle diameter (nm)	Zeta potential (mV)	DOX loading efficiency (%)	Osmotic pressure (osmol/kg)
Plain liposomes	104.0±3.3	+0.33±0.2	90.5±1.2	0.315
Cationic liposomes	103.2±1.4	+39.8±2.2	92.0±0.7	0.361

하전된 BSA와의 이온결합과 열처리에 의해 전기적으로 중화되었기 때문에 중성의 표면전하값으로 변화된 것으로 사료된다. Fig. 1의 (b)는 100~1000 µg/ml 농도의 BSA-용액으로 코팅하고 열처리한 BSA-양이온성 리포솜의 표면에 결합된 BSA의 양과 약물봉입률을 나타낸 것이다. 각각 100, 200, 400, 600, 800 및 1000 µg/ml 농도로 PBS (pH 7.4)에 용해시킨 용액으로 코팅한 BSA-양이온성 리포솜의 표면에 결합된 BSA의 양을 브레드포드 단백질정량법으로 측정된 결과, 각각 28.9±7.7, 38.5±3.4, 32.4±9.5, 124.7±8.4, 147.3±18.5 및 368.9±44.6 µg/ml 리포솜의 값을 나타내었다. 양이온성 리포솜에 100~400 µg/ml 농도의 BSA 용액으로 코팅한 BSA-양이온성 리포솜은 BSA의 양과는 관계없이 일정량의 알부민이 결합되었고, 600~1000 µg/ml 농도의 BSA 용액으로 코팅한 BSA-양이온성 리포솜은 BSA 용액의 농도가 증가할수록 BSA-양이온성 리포솜에 결합된 알부민의 양도 점차 증가되었다. BSA-양이온성 리포솜에 결합된 BSA는 열처리에 의해 그 구조가 구상에서 선형의 일차구조로 변성되어 아미노산의 소수성 잔기가 분자의 표면에 드러나고, 수용액에서 용해도가 낮아지며 펼쳐진 선형의 분자가 리포솜 표면에 정전기적 인력과 소수성 인력에 의해 결합되어 있을 것으로 사료된다. 따라서 BSA-양이온성 리포솜에 결합된 BSA의 양과 입자크기간에 비례적으로 증가하지 않는 것으로 사료된다. 그리고 BSA-양이온성 리포솜은 정제과정에서의 손실로 인해 평균 85.0±2.9%의 약물봉입률을 나타내었다. 이상의 결과로부터 대조 리포솜, 양이온성 리포솜 그리고 BSA-양이온성 리포솜은 110 nm 이하의 입자크기를 나타내어 암의 신생혈관의 세포간극을 투과할 수 있는 약물전달체로 이용될 수 있을 것으로 판단하였다.

#### 혈장에서의 BSA양이온성 리포솜의 안정성 평가

양이온성 리포솜에 정전기적 인력에 의해 결합된 BSA를 변성시키는 열처리 온도가 BSA-양이온성 리포솜의 혈장 내 안정성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각각 60, 80 그리고 100 °C의 온도에서 30분간 열처리한 시료의 혈장 내에서의 입자 크기 변화를 관찰하였다. Fig. 2는 147.3±18.5 µg/ml 리포솜의 BSA가 결합되어 있는 BSA-양이온성 리포솜과 혈장을 1:3 (v/v)의 비율로 혼합한 후 37 °C 배양기에서 교반하면서 시간에 따른 입자크기를 변화를 나타낸 것이

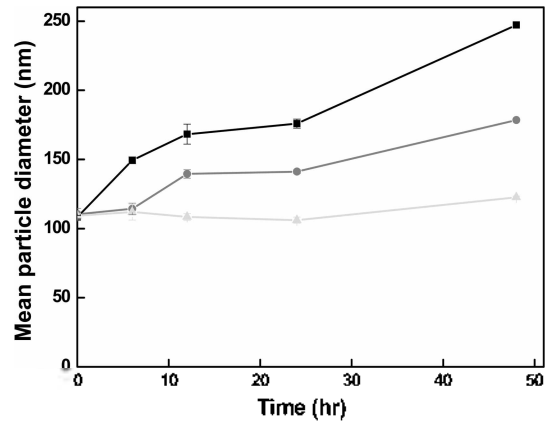


Fig. 2. Mean particle diameter of BSA-cationic liposomes at 60 °C (■), 80 °C (●), and 100 °C (▲) for 30 min. The amount of coated albumin by ionic complex on the BSA-cationic liposomes was 147 µg/ml liposome. Mean and S.D. are shown (n=3).

다. 48시간 후 60 °C와 80 °C로 30분간 열처리한 BSA-양이온성 리포솜의 입자크기는 각각 247.2±3 nm와 178.4±1.4 nm로 측정되었고, 100 °C로 30분간 열처리한 BSA-양이온성 리포솜의 입자크기는 117.4±1.6 nm로 48시간동안 입자크기의 변화가 관찰되지 않았다. 이는 열처리 온도가 높을수록 BSA의 변성이 크게 일어나기 때문에 60 °C나 80 °C로 열처리한 BSA-양이온성 리포솜의 BSA는 소수성 잔기가 표면에 완전히 드러나 있지 않아 단백질 고유의 활성에 의해 혈장 단백질과 흡착이 일어나고 또한 혈장 단백질이 흡착된 리포솜간에 상호응집이 일어나 입자크기가 증가한 것으로 사료된다. 그러나 BSA-양이온성 리포솜의 표면에 결합되어 있는 BSA를 100 °C로 30분간 열처리한 시료의 경우 BSA의 접힘이 풀어진 일차구조로 변성되면서 소수성 잔기가 리포솜 표면에 드러나 있는 형태가 되어 용해도와 혈장에서 활성이 감소되고, 따라서 친수성 그룹이 표면에 드러나 있는 혈장 단백질과의 친화도가 감소하여 혈장 단백질의 흡착이 감소하였기 때문인 것으로 사료된다.<sup>14,15</sup> 이상의 결과로부터 100 °C, 30분의 열처리 조건은 BSA-양이온성 리포솜의 표면에 결합되어 있는 BSA를 60 °C 또는 80 °C의 조건보다 BSA의 변성을 크게 유도하고, 변성된 알부민은 혈장 단백질 흡착을 효과적으로 억제함을 확인하였다.

100 °C, 30분간의 열처리 조건에서 BSA의 농도가

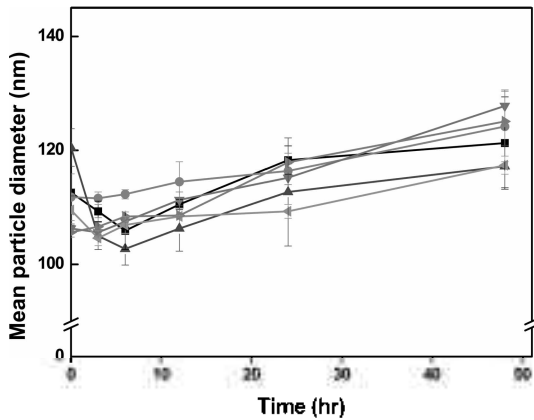


Fig. 3. Mean particle diameter of BSA-cationic liposomes at 100°C for 30 min.; The amount of coated albumin on the liposomal surface was 28.9±7.7 (-■-), 38.5±3.4 (-●-), 32.4±9.5 (-▲-), 124.7±8.4 (-▼-), 147.3±18.5 (-◀-), and 368.9±44.6 µg/ml liposome (-▶-), respectively. Mean and S.D. are shown (n=3).

혈장 단백질의 흡착 방지에 미치는 영향을 알아보기 위하여 각각 100, 200, 400, 600, 800 그리고 1000 µg/ml 농도의 BSA 용액으로 코팅하여 BSA가 각각 28.9±7.7, 38.5±3.4, 32.4±9.5, 124.7±8.4, 147.3±18.5 그리고 368.9±44.6 µg/ml 리포솜의 양으로 결합된 BSA-양이온성 리포솜을 혈장과 1:3 (v/v)의 비율로 혼합한 후 37°C 배양기에서 교반하면서 시간에 따른 입자크기를 관찰한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 모든 BSA-양이온성 리포솜은 48시간 후 평균 122.2±4.3 nm의 입자크기를 나타내어 48시간동안 입자크기가 거의 증가하지 않았다. 이와 같은 결과로 인해 리포솜 표면에 결합되어 있는 변성된 알부민이 단백질 흡착을 억제함을 확인하였고, 특히 800 µg/ml 농도의 BSA 용액으로 코팅하여 147.3±18.5 µg/ml 리포솜의 알부민이 결합된 BSA-양이온성 리포솜은 48시간동안 입자크기 증가가 가장 적게 나타나 각 농도의 BSA 용액으로 코팅한 BSA-양이온성 리포솜 중에서 안정성이 가장 우수한 제형임을 확인할 수 있었다.

**대조 리포솜과 BSA양이온성 리포솜의 혈장 내 안정성 비교**

Fig. 4는 대조 리포솜, 양이온성 리포솜 및 147.3±18.5 µg/ml 리포솜의 알부민이 결합되어 있는 BSA-양이온성 리포솜을 랫트 혈장과 1:3 (v/v) 비율로 혼합한 후 37°C에서 교반하며 시간에 따른 입자크기를 측정한

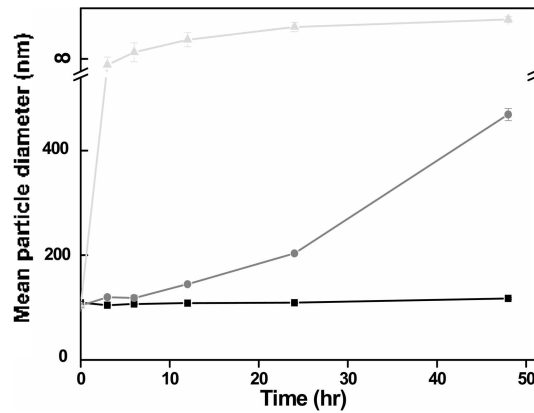


Fig. 4. Mean particle diameter of plain (●), cationic (▲) and BSA-cationic liposomes (■) after incubation in plasma at 37°C. The amount of coated albumin on the BSA-cationic liposomes was 147 µg/ml liposome. Mean and S.D. are shown (n=3).

결과이다. 대조 리포솜은 시간이 흐를수록 입자크기가 점차 비례적으로 증가하는 경향을 나타내었고, 양이온성 리포솜은 혈장과 혼합되자마자 입자크기가 급격하게 증가하는 것으로 나타났다. 대조 리포솜과 양이온성 리포솜은 시간이 지날수록 혈장 단백질이 리포솜 표면에 흡착되고, 혈장 단백질이 흡착된 리포솜 상호간의 응집현상에 의해서 입자크기가 증가된 것으로 사료된다. 특히 양이온성 리포솜은 혈장에서 음이온성을 나타내는 혈장 단백질과 정전기적 인력이 강하게 작용하여 혼합되자마자 급격하게 단백질이 흡착되고, 또한 혈장 단백질이 흡착된 리포솜들의 상호응집이 다른 리포솜들에 비해 많아서 48시간 이후에는 입자크기가 약 1,221±120 nm로 가장 크게 증가된 것이라 사료된다. 반면에 BSA-양이온성 리포솜의 경우 표면이 활성을 잃은 일차구조 형태의 소수성 산기가 드러나 있는 변성된 알부민이 결합되어 있기 때문에 친수성 그룹이 표면에 드러나 있는 혈장 단백질과 친화도를 갖지 못해 대조 리포솜과 양이온성 리포솜보다 혈장 단백질의 흡착이 적게 일어나므로 48시간 동안 입자크기가 117.4±1.6 nm로 거의 증가하지 않은 것으로 생각된다.<sup>13)</sup>

Fig. 5는 37°C 배양기에서 리포솜 수용액을 랫트 혈장과 1:3 (v/v) 비율로 혼합하여 교반하면서 시간에 따른 단백질 흡착량을 브래드포드 단백질정량법으로 측정된 결과이다.<sup>13)</sup> 모든 리포솜들의 표면에 흡착된 단백질의 양은 시간이 지남에 따라 점차 증가되는 것

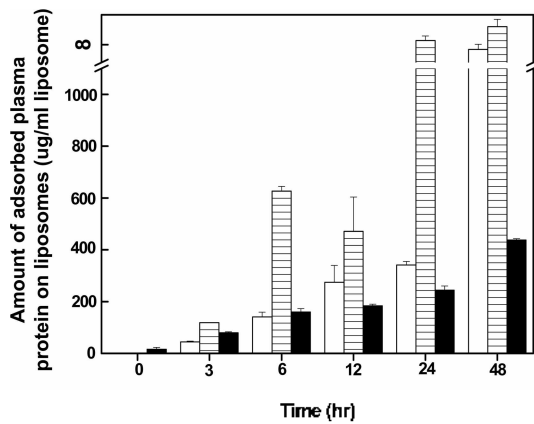


Fig. 5. Amount of adsorbed plasma protein on the plain (□), cationic (▨), and BSA-cationic liposomes (■) after incubation in plasma at 37 °C. The amount of coated albumin on the BSA-cationic liposome was 147 μg/ml liposome. Mean and S.D. are shown (n=3).

으로 관찰되었다. 특히 양이온성 리포솜은 입자크기가 증가한 이유와 마찬가지로 모든 리포솜들 중에서 혈장 단백질이 가장 많이 흡착되는 것으로 나타났고, 48시간 경과 후 약 8 mg/ml 리포솜의 단백질 흡착량이 관찰되었다. BSA-양이온성 리포솜의 경우에는 리포솜 표면에 결합되어 있는 변성된 알부민이 경계면을 형성하고 있기 때문에 48시간 이후 437.4±5.4 μg/ml 리포솜으로 가장 적은 단백질 흡착량이 측정되었다. 이러한 결과로 인해서 BSA-양이온성 리포솜은 대조 리포솜과 양이온성 리포솜보다 혈장 내에서 입자크기 변화가 가장 적고, 흡착된 단백질의 양도 가장 적은 것으로 나타나 안정성이 가장 뛰어난 것으로 관찰되었다.

대조 리포솜과 BSA-양이온성 리포솜을 비교했을 때, 두 리포솜은 약 100 nm~110 nm의 비슷한 입자크기와 중심의 표면전하값으로 비슷한 물리적인 특성을 가지고 있고, 대조 리포솜이 혈류 내에 순환할 때 혈장 단백질이 흡착되어 BSA-양이온성 리포솜과 동일한 형태인 혈장 단백질이 흡착된 대조 리포솜 형태로 존재할 수 있다. 그러나 혈장 내에서 대조 리포솜 표면에 흡착되는 혈장 단백질은 변성이 일어나지 않은 단백질이기 때문에 혈장 내에서 비가역적으로 흡착되는 활성을 가지고 있지만, BSA-양이온성 리포솜에 결합되어 있는 단백질은 변성된 단백질이므로 소수성 잔기가 경계면을 형성하여 유체역학적으로 자유에너지가 최소화되어 있기 때문에 친수성 그룹이

표면에 드러나 있는 혈장 단백질과 상호 흡착이 억제되는 것으로 사료된다.<sup>13,14,26,27</sup> 이러한 결과로 인해 BSA-양이온성 리포솜 표면에 결합되어 있는 변성된 알부민은 혈장 내에서 혈장 단백질과 동등하게 존재할 수 있고, 혈장 단백질과의 흡착을 억제시켜 단백질이 흡착된 리포솜간의 상호 응집을 방지할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

## 결론

본 연구에서는 리포솜의 혈류 순환시 혈장 단백질과의 흡착을 억제하기 위하여 양이온성 리포솜에 알부민을 정전기적 인력을 이용하여 코팅한 후, 리포솜 표면에 결합된 알부민을 열에너지에 의해 변성시켜 알부민이 결합된 리포솜을 제조하였다. 양이온성 리포솜에 결합된 알부민의 양은 브레드포드 단백질정량법으로 측정하였고, BSA-양이온성 리포솜을 랫트 혈장과 혼합하여 37 °C에서 시간에 따른 입자크기 변화와 혈장 단백질 흡착량을 측정하여 대조 리포솜 및 양이온성 리포솜과의 혈장 단백질 흡착특성을 비교, 평가하였다. 알부민이 결합된 리포솜은 혈장에서 48 시간동안 입자크기가 증가하지 않았고, 혈장 단백질의 흡착양도 대조 리포솜 및 양이온성 리포솜에 비하여 적었다. 이는 BSA-양이온성 리포솜에 결합되어 있는 알부민은 열에너지에 의하여 변성된 것으로서 유체역학적으로 자유에너지가 최소인 상태로 리포솜을 둘러싸는 경계면을 형성함으로써 친수성 그룹이 표면에 드러나 있는 혈장 단백질과의 흡착이 억제되는 것으로 사료된다. 이와 같이 변성된 알부민으로 결합된 리포솜은 일반 리포솜이 혈류 내에서의 불안정성으로 인해 봉입된 약물이 누출되거나 혈장 단백질의 흡착으로 인해 입자크기가 증가되어 간이나 비장의 세망내피계에 존재하는 대식세포에 의해 쉽게 소실되는 단점을 극복할 수 있고, 리포솜 내부에 봉입되어 있는 약물을 안정하게 전달할 수 있으므로 정상세포에 독성을 끼치는 문제점도 극복할 수 있을 것이다. 따라서 혈장 내에서 입자의 크기 변화가 없고, 단백질 흡착을 억제하는 BSA-양이온성 리포솜은 혈류 내에서 장기 순환 할 수 있는 안정한 약물전달체로서 응용할 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구는 산업기술연구회의 지원으로 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.



인용 문헌

1. Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkis, J. C. *J. Mol. Biol.* **1965**, *13*, 238.
2. Gregoriadis, G.; Florence, A. T. *Drugs* **1993**, *45*, 15.
3. Han, H. D.; Shin, B. C.; Choi, H. S. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2006**, *62*, 110.
4. Torchilin, V. P. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 145.
5. Woodle, M. C.; Lasic, D. D. *Biochim. Biophys. Acta.* **1992**, *1113*, 171.
6. Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K. *J. Controlled Release.* **2000**, *65*, 271.
7. Moghimi, S. M.; Szebeni, J. *Prog. Lipid Res.* **2003**, *42*, 463.
8. Torchilin, V. P.; Trubetskoy, V. S. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1995**, *16*, 141.
9. Gabizon, A.; Catane, R.; Uziely, B.; Kaufman, B.; Safra, T.; Cohen, R.; Martin, F.; Huang, A.; Barenholz, Y. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 987.
10. Boomer, J. A.; Inerowicz, H. D.; Zhang, Z.; Bergstrand, N.; Edwards, K.; Kim, J. M.; Thompson, D. H. *Langmuir.* **2003**, *19*, 6408.
11. Romberg, B.; Metselaar, J. M.; deVringer, T.; Motonaga, K.; Oussoren, C.; Storm, G.; Hennink, W.E. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 767.
12. Romberg, B.; Metselaar, J. M.; Baranyi, L.; Snel, C. J.; Bunger, R.; Hennink, W. E.; Szebeni, J.; Storm, G. *Int. J. Pharm.* **2007**, *331*, 186.
13. Drummond, I. A. S.; Steinhardt, R. A. *Exp. Cell Res.* **1987**, *173*, 439.
14. Nguyen, V. T.; Morange, M.; Bensaude, O.; *J. Biol. Chem.* **1989**, *25*, 10487.
15. Burgess, D. J.; Davis, S. S.; Tomlinson, E. *Int. J. Pharm.* **1987**, *39*, 129.
16. Gupta, P. K.; Hung, C. T.; Lam, F. C.; Perrier, D. G. *Int. J. Pharm.* **1988**, *43*, 167.
17. Willmott, N.; Harrison, P. J. *Int. J. Pharm.* **1988**, *43*, 161.
18. Leucuta, S. E.; Risca, R.; Daicoviciu, D.; Porutiu, D. *Int. J. Pharm.* **1988**, *41*, 213.
19. Dosio, F.; Brusa, P.; Crosasso, P.; Arpicco, S.; Cattel, L. *J. Controlled Release.* **1997**, *47*, 293.
20. Yokouchi, Y.; Tsunoda T.; Imura T.; Yamauchi H.; Yokoyama S.; Sakai H.; Abe M. *Colloids and Surfaces B.* **2001**, *20*, 95.
21. Croguennec, T.; Renault, A.; Beaufils, S.; Dubois, J.; Pezennec, S. *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *315*, 627.
22. Haran, G.; Cohen, R.; Bar, L.K.; Barenholz, Y. *Biochim. Biophys. Acta.* **1993**, *1151*, 201.
23. Bradford, M. M. *J. Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248.
24. Baumgarten, H. *J. Immunol. Methods.* **1985**, *82*, 25.
25. Lin, W.; Garnet, M. C.; Davies, M. C.; Bignotti, F.; Feruti, P.; Davis, S. S.; Illum, L. *Biomaterials* **1997**, *18*, 559.
26. Pelham, H. *Cell* **1986**, *46*, 959.
27. Pelham, H. *Nature*, **1988**, *332*, 776.