

## 리포솜-아미노산 결합체의 제조와 포도당 민감성에 대한 연구

문제열 · 이기영<sup>1</sup> · 김진철<sup>2</sup> · 박기남<sup>3</sup>전남대학교 고분자공학과, 화학공학부<sup>1</sup>, LG 화학기술연구원(서)<sup>2</sup>, Purdue 대학교 약학과<sup>3</sup>

(062)530-0327, FAX (062)530-1849

## Abstract

Glucose sensitive liposomes-amino acid conjugates were prepared by DPPC and asparagine derivatives. Liposomes(amino acid added) have higher glucose binding affinity than liposome(amino acid non-added) or distilled water. The liposomes stability were increased by adding cholesterol. Liposomes(cholesterol non-added) particles size were bigger than cholesterol added liposomes.

## 서론

Bangham 과 Horne<sup>1)</sup>은 인지질이 물에 분산되어 지질막이 이분자층 소포체를 자발적으로 형성하는 것을 처음으로 발견하여 이를 리포솜이라고 하였다. 세포막은 일정한 유동성을 유지하고 있으며 인지질의 종류나 acyl 사슬의 길이 또는 콜레스테롤 함량에 조절에 따라 유지된다고 알려지고 있다<sup>2)</sup>. 생체막을 구성하고 있는 성분으로서 콜레스테롤이 또한 중요하다. 콜레스테롤은 지질막의 유동성을 낮추고 투과성을 감소시켜 지질막에 기계적 강도를 부여한다고 알려져 있다<sup>3)</sup>. 1960년대에 인지질 계통의 계면 활성제들이 수상의 매질에서 생체막과 같은 이중층막을 스스로 형성한다는 사실<sup>4)</sup>이 발견된 이래로 리포솜은 생체막 연구의 모델로서 뿐만 아니라 약제학 분야에서 생체내 약물 수송체로의 적용에 많은 연구가 되어왔다<sup>5)</sup>. 일반적으로 포도당 결합 효소(glucose-binding enzyme)의 binding site에 관여하는 아미노산은 13가지인데 그 중에서도 빈도 높게 발견되는 아미노산은 asparagine (asn), glutamine (gln), glutamic acid (glu)이다<sup>6)</sup>.

본 실험에서는 인지질과 비수용성 아미노산 유도체<sup>7)</sup>를 혼합하여 리포솜을 제조하여 포도당과의 결합력을 측정하였고, 콜레스테롤을 첨가하였을 때 리포솜의 안정성에 관하여 측정하였다.

## 재료 및 방법

포도당은 Junsei사에서 구입하여 사용하였고, dipalmitoyl phosphatidylcholine, distearoyl phosphatidylcholine, cholesterol, N-t-boc asparagine, octadecylamine (ODA), sodimu bicarbonate, trifluoroacetic acid 등은 Sigma사에서 microdialyzer (10-well, 500 $\mu$ l) 및 membrane (MWCO : 6-8,000)은 Spectra/Por<sup>®</sup>, glucose enzyme

kit는 영동제약에서 구입하여 사용하였다. 아미노산은 수용성이므로 octadecylamine이라는 소수성 물질과 반응시켜 비수용성 아미노산 유도체를 제조한다. DPPC와 asparagine-ODA를 7:3, 8:2, 9:1, 19:1의 비율로 혼합하여 리포솜-아미노산 결합체를 제조한다. 포도당의 농도를 10mg/ml로 하여 microdialyzer(Fig. 1)에 흘려 보낸 후 시간에 따른 포도당의 결합정도를 측정하였다. 포도당 측정은 증류수 500 $\mu$ l, 측정시약 400 $\mu$ l에 포도당 결합 리포솜 100 $\mu$ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후 UV-VIS spectrophotometer로 505nm에서 흡광도를 측정함으로써 포도당의 결합정도를 계산하였다. 리포솜에 대한 콜레스테롤의 영향을 알아보기 위해서 DPPC만을 사용하여 제조한 리포솜과 DPPC : cholesterol을 (8 : 2 v/v)로 첨가하여 제조한 리포솜의 입도를 제조시와 7일 후에 zeta sizer로 각각 측정하였다. 또한 DPPC : 콜레스테롤을 19:1, 9:1, 8:2, 7:3의 부피비율로 혼합한 후 리포솜을 제조하여 37 $^{\circ}$ C에서 17일동안 보관하며 탁도를 측정하였다.

#### 결과 및 고찰

DPPC와 asparagin-ODA를 7 : 3, 8 : 2, 9 : 1, 19 : 1 의 비율로 제조된 리포솜이 DPPC만으로 제조된 리포솜과 증류수만을 사용한 것에 비해 포도당 결합도가 상대적으로 높은 것으로 보아 asparagin-ODA이 포도당과 결합하여 시료안에 더 많이 확산되어 들어왔다고 생각할 수 있다. 그리고 DPPC : asparagine-ODA (8 : 2 v/v)로 제조된 리포솜이 다른 비율로 제조된 리포솜보다는 조금 높은 결합도를 보였다(Fig. 2). 리포솜에 대한 콜레스테롤의 영향을 알아보았다. 콜레스테롤을 첨가하지 않은 리포솜의 경우에는 처음 제조시에는 작은 입자가 많았으나 7일 후에는 입들이 서로 뭉쳐서 입자의 크기가 커진 것을 볼 수 있다(Fig. 3). 반면에 DPPC : cholesterol을 (8 : 2 v/v)로 첨가하여 제조한 리포솜의 입도는 처음 제조시와 7일 후의 입자 크기의 변화가 그다지 크지 않다(Fig. 4). 그리고 콜레스테롤의 함량이 많아질수록 리포솜의 안정성이 좋다는 것을 볼 수 있다(Fig. 5).

#### 요약

포도당 결합성 효소의 결합 부위에 관여하는 아미노산중 하나인 asparagine을 이용하여 리포솜 표면에 결합시켜 포도당 민감성 리포솜-아미노산 결합체를 제조하였다. Asparagine이 결합된 리포솜이 그렇지 않은 리포솜이나 증류수에 비해 포도당 결합정도가 컸다. DPPC에 대한 콜레스테롤 함량이 증가할수록 리포솜의 안정성도 증가하였고, zeta sizer로 입도를 측정한 결과 그 분포를 관찰할 수 있었다.

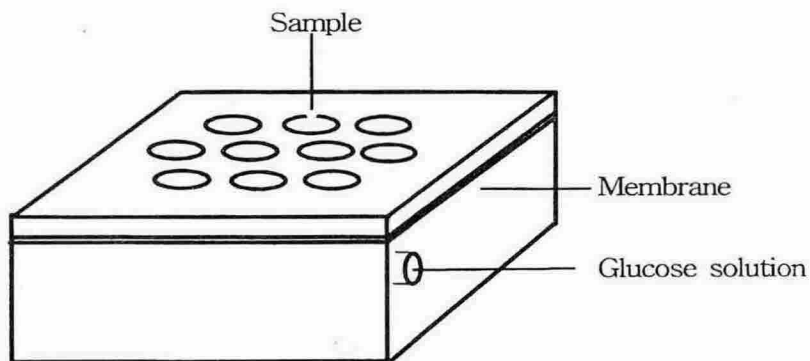


Fig. 1. Principles of Microdialyzer.

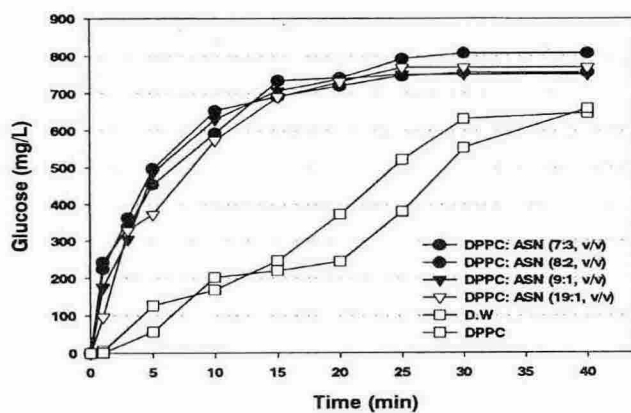


Fig. 2. Profiles of glucose binding affinity to DPPC-Asparagine liposomes. Glucose buffer conc.(10 mg/mL)

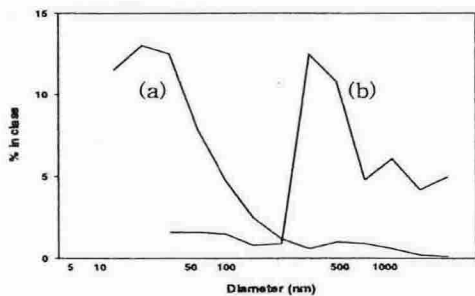


Fig. 3. Size distribution of DPPC liposome. (a) 1day, (b) 7day.

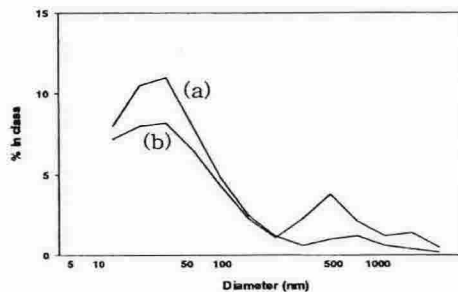


Fig. 4. Size distribution of DPPC : cholesterol (8:2 v/v) liposomes. (a) 1day, (b) 7day.

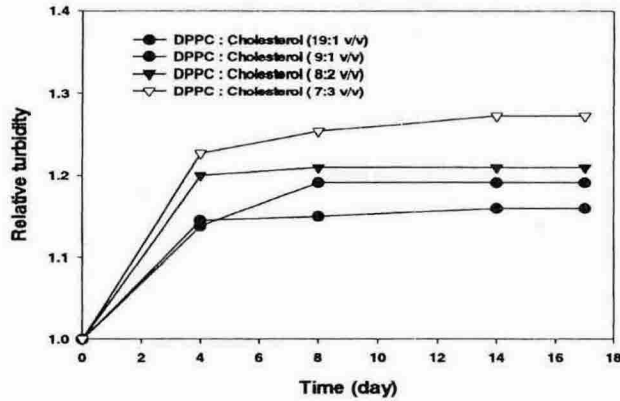


Fig. 5. Effect of cholesterol on the stability of DPPC liposomes at 37°C  
 ( DPPC : 20mg/ml, cholesterol : 20mg/ml)

참고문헌

1. Bangham, A. D. and R. W. Horne (1962), *Nature.*, **196**, 952.
2. Aloia, R. C., "Membrane fluidity in biology." (1983), Academic press, N.Y.
3. Houslay, M. D and K. K. Stanley., " Dynamics of biological membrane." (1982), John Wiley and Son, N.Y.
4. Banghem, A. D., M. M. Standish. and J. C. Watkins., " Diffusion of univalent ions across the lamellar of swollen phospholipids." (1965), *J. Mol. Biol.*, **13**, 238-252.
5. Szoka, F. and D. Papahadjopoulos., "Comparatives properties and methods of preparation of lipid vesicles." (1980), *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **9**, 467-508.
6. Li, T. and K. Park. "Comparative stereochemical analysis of glucose-binding proteins for rational design of glucose-specific agents" (1998), *J. Biomaterials. Science-polymer edition*, **9**, 4, 327-344.
7. 문제영, 이기영, 김진철, "리포솜-아미노산 결합체의 제조와 안정성 측정", 한국생물공학회지, **15**, 1, 96-99