

프로리포솜의 제조 및 평가

정대식 · 심창구 · 이민화 · 김신근

서울대학교 약학대학

(Received July 23, 1988)

Preparation and Evaluation of Proliposome

Dae-Sik Chung, Chang-Koo Shim, Min-Hwa Lee and Shin-Keun Kim

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract—Proliposome of Sudan IV was prepared according to Payne et al. and evaluated for its size distribution, surface characteristics and conversion to liposome in aqueous medium. The manufacturing procedures for proliposomes involve the coating of phospholipid solution with Sudan IV on the surface of sorbitol particle in rotary vacuum evaporator. As a result, dry, free flowing and stable proliposome was obtained and multi-lamellar liposome of sudan IV was formed spontaneously when water were added to this. Proliposomes were expected as a probable answer for the physical instability of conventional liposomes.

리포솜은 인지질 이중막으로 이루어진 vesicle로서 생체막의 조성에 가까와 biodegradable하다는 등의 장점이 있으나 리포솜의 실질적인 응용 및 대규모 생산은 여러가지 이유로 제약되어 왔다. 일반적으로 리포솜이 실용화되기 위해서는 (1) 멸균처리된 제품을 대규모로 생산할 수 있겠는가? (2) 제품의 특성을 정밀하고 재현성있게 컨트롤할 수 있겠는가? (3) 제품은 물리적 또는 화학적으로 적절한 안정성을 가질 수 있겠는가? 등의 문제점이 해결되어야 할 것이다. 또, 일반적으로 종래의 경우, 대부분 리포솜을 등장수용액에 분산시킨 형태로 보관하였는데 이렇게 하면 (1) 회합(aggregation), (2) 침강, (3) 융합(fusion), (4) 인지질의 가수분해 등 때문에 제품의 물리화학적 성상이 유지되지 않아 실용성이 없었다.

이러한 리포솜의 문제점들을 개선하기 위해서 항산화제인 토코페롤을 첨가하여 리포솜을 제조¹⁾ 한다든지 하전을 띤 지질 또는 착화합물 형성제를 첨가하여 물리적 안정성을 증가시키는 연구²⁾도 보고된 바 있다. 그러나, 이러한 방법에는 한계³⁾가 있었다. 따라서, 리포솜의 적용을 가능케 하려는 많은 시도가 있어 왔다. 이

대부분의 시도는 건조한 상태로 보관하여 사용시에 물 또는 등장액을 넣어 제조하는 것들이다. ICI특허⁴⁾는 제조된 리포솜액을 동결건조시켰다가 사용시에 물이나 등장액을 넣어서 사용하게 하였으며, BMI특허⁵⁾는 dextran, albumin, PVA, povidone, acacia, sucrose 등을 안정화 및 용해 보조제로 이용하였다.

최근 Payne 등은⁶⁾ 수용성 담체(carrier)에 인지질과 약물을 녹인 유기용매를 침투시킨 뒤 건조하여 외관상 유동성이 좋은 과립을 얻을 수 있었는데 사용시에 물을 첨가하여 진탕하면 곧 리포솜이 되기 때문에 이 과립을 프로리포솜(proliposome)이라고 명명하였다. 프로리포솜은 기존의 리포솜과 달리 멸균할 수 있으며 비교적 균질의 제품을 재현성 있게 얻을 수 있고 무엇보다도 물리적 화학적 안정성이 뛰어나다는 장점을 가지고 있다. 이 프로리포솜에 물만 첨가하여도 담체가 녹아서 등장액이 되게 만들 수 있는 장점도 있다. 담체물질로서는 정맥주사가 가능하며 수용해성이 높고 유기용매 용해성이 낮은 포도당, 과당, 락토스, 열화나트륨, 솔비톨을 쓸 수 있는데 Payne 등은 솔비톨을 선택하였다. 이 프로리포솜에는 여러가지 약물을 봉입

이 논문은 정대식의 약학석사 학위논문(1988년 2월 서울대)의 일부임.

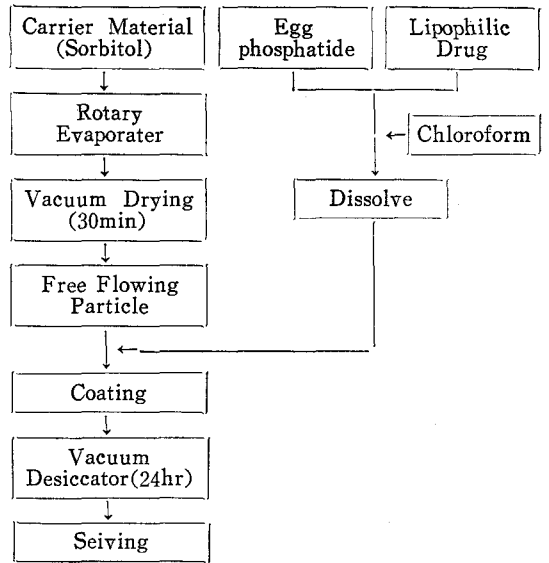
시킬 수 있으며, 담체의 종류, 담체의 표면적, 인지질의 양에 따라 프로리포솜의 크기도 조절할 수 있다.

한편 1987년 대만의 Chen과 All⁶⁾는 회전식 진공증발농축기를 사용하여 제조하는 Payne의 방법이 (1) 용매첨가와 증발이 불연속적이며, (2) 유기용매 과잉첨가 여부, 진공과피 등을 지속적으로 감시해야 하며, (3) 최종적으로 인지질을 침투시킨 뒤 레시케이터에서 하룻밤 이상 보존해야 하며, (4) 공업적 생산규모가 못되는 등의 문제를 해결하기 위해 유동층 코팅기를 이용하면 좋다고 주장함으로써 프로리포솜의 공업적인 생산에의 전망을 밝혀주었다.

본 연구에서는 우선 프로리포솜을 Payne의 방법에 따라 회전식 진공증발농축기를 써서 제조한 뒤 그 특성을 조사하였다. 담체로는 솔비톨을, 인지질로서는 egg phosphatide를, 약물로서는 물에 녹지 않고 유기용매에 잘 녹으며 식별이 용이한 색소인 sudan IV를 사용하였다.

실험 방법

실험 장치—실험장치로는 회전증발농축기(Tokyo Rikakikai), scanning electron microscope: SEM(JSM-35), transmission electron microscope



Scheme I—Manufacturing flow chart of proliposome

(Jeol 100 CXII)과 Autodilute Submicron Particle sizer NICOMP 270(HIAC/ROYCO) 등을 사용하였다.

시료 및 시약—Egg phosphatide(Asahi Chemical), sudan IV(Sigma Chemical), sorbitol (Junsei Chemical)과 ammonium molybdate: (NH)MoO₄HO(Shinyo Pure Chemical) 등의 시판품을 사용하였다.

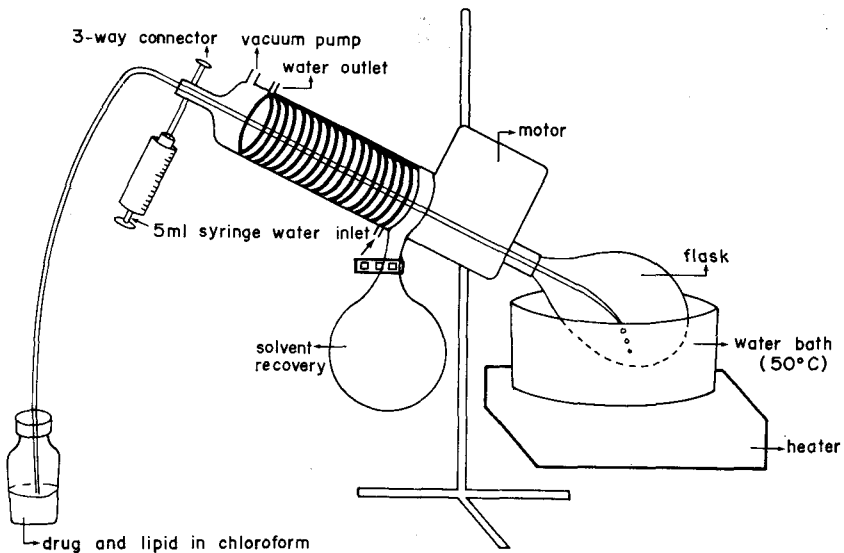


Fig. 1—Rotary vacuum evaporator for the manufacture of proliposomes.

프로리포솜의 제조—Scheme I에 제조공정을, Fig. 1에 제조장치를 보였다. 즉 (1) 24호체를 통과하고 48호체에 잔류하는 솔비톨을 20g 칭량하였다. (2) 이를 회전식 진공증발농축기의 플라스크에 넣어 장치한 후 수욕상에서 50°C로 유지하며 30분간 감압건조하였다. (3) Egg phosphatide 2.55g, Sudan IV 25mg을 칭량하여 클로로포름 300ml에 녹였다(A액). (4) 회전식 진공증발농축기의 fluid주입구에 3-way connector로 주사기를 연결하여 주사기로 A액 5ml을 취한 다음 3-way connector로 차단하였다. (5) 회전식 진공증발농축기의 회전수를 80~90rpm으로 유지하면서 A액이 들어있는 주사기의 3-way connector를 플라스크쪽으로 연결되도록 함으로써 일정량(5ml)씩 플라스크로 들어가게 하여 코팅하였다. (6) 솔비톨 입자가 완전히 건조되어 자유롭게 유동하는 것이 확인될 때 다시 A액 5ml를 추가하였다. (7) 마지막 용액을 가하고 건조시키고 나서 진공 데시케이터에서 24시간 건조하였다.

전자현미경 관찰—제조한 프로리포솜 1g을 10ml의 증류수에 넣어서 흔들어 녹인 다음 gride 위에 적당량을 올려 놓고 건조시키고 SEM으로 관찰하였다. 이 위에 2% ammonium molybdate 소용액을 적당량 떨어뜨리고 다시 건조시킨 후 transmission electron microscope(TEM)로 이를 80KV에서 20,000 및 53,000배로 관찰하였다.

실험결과 및 고찰

본 실험에서 솔비톨을 담체로 하여 소수성인 sudan IV를 egg phosphatide와 같이 코팅하여 사용시에 물을 가하여 교반함으로써 등장리포솜액을 만들 수 있는 프로리포솜의 제조에 대해 실험하였다. 용시에 리포솜을 만들어 쓰는 방법에는 여러가지가 있지만 일례로 lipid-film formation은 각 병마다 film을 만들어야 하는 어려움이 있고, 동결건조 리포솜이나 리포솜 component 등은 물을 가하고 진탕할 때 녹지 않고 끈적거리는 물질을 생성하는 등 난점이 있다. 이에 비해 담체형 프로리포솜은 담체 자체의 성질에 의해 담체가 녹으면서 등장액을 형성하고



Fig. 2—SEM of proliposome ($\times 10^2$).

담체의 다공성에 의해서 쉽게 multilamellar vesicle(MLV)을 형성하는 개념이다. 소수성 색소인 sudan IV에 대해서 프로리포솜을 제조한 결과 담체 : 지질 = 7.8 : 1의 비율까지 가능하였다.

Fig. 2는 제조한 프로리포솜의 SEM사진이다. 솔비톨의 다공성 구조 표면에 약물과 지질이 일부 덮여 있는 것이 보이는데 지질과 약물의 일부는 다공성 구조속에 침투되어 있는 것으로 생각되었다. 그러나, Payne 등⁴⁾이 제조한 프로리포솜에 비교하면 지질의 분산이 좋지 않았다. 솔비톨의 다공성 구조 내부 및 표면에 있던 지질과 약물을 가하면 솔비톨이 녹아나와 지질들이 3차원적으로 무작위 분산되는 상태가 될 것으로 생각되며 이 때문에 가벼운 진탕만으로

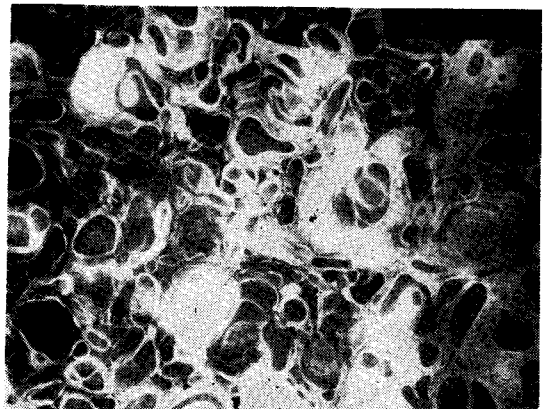


Fig. 3—TEM of liposome made by adding water to proliposome ($1.7 \times 20,000$).

도 MLV나 oligolamellar vesicle을 쉽게 형성할 것으로 생각되었다. 실제로 Sudan IV는 그 자체는 물론, 본 실험에서 사용한 인지질과 단순히 혼합하여도 물에 녹지 않았으나 프로리포솜으로 만들어 물을 가하고 가볍게 진탕하면 겉보기로 Sudan IV의 적색 수용액이 얻어졌다. 이는 리포솜 상태에서는 Sudan IV가 거의 분자 분산에 가깝게 분산되는 까닭으로 생각되었다. 이 적색 용액은 실온에서 1개월이상 용액상태를

유지하는 것으로 보아 상당한 안정성도 있는 것으로 생각되었다.

Fig. 3은 프로리포솜 1g에 물 10ml를 가해 녹인 리포솜액에 대해 전술한 방법에 따라 2% ammonium molybdate로 염색하여 80KV에서 TEM으로 관찰한 것이다. MLV 및 oligolamellar vesicle들이 형성된 것을 잘 보여주고 있다.

Fig. 4은 이 리포솜 용액에 대해서 submicron particle sizer로 측정된 리포솜의 크기 분포를

87709709 SAMPLE

SIZE nanometers (log scale)	REL. VOLUME
63.8	
69.0	
74.6	0.5
80.7	0.7
87.3	0.3
94.3	
102	
110	
119	
128	
139	
150	
163	
176	
190	
206	
222	2.5
240	6.9
260	5.1
281	0.6
304	
329	
355	
384	
415	
449	
486	
525	
568	
614	
664	
718	
776	
839	
907	8.3
981	53.0
1061	100.0
1147	56.6
1240	
1341	

RESULTS
Distribution Analysis

Peak #1
Diameter = 80.1
% Volume = 0.7

Peak #2
Diameter = 227.4
% Volume = 6.4

Peak #3
Diameter = 1058.3
% Volume = 92.9

Fit Error
1.1

Residual
24.7

Mean Diameter
998.2 (nm)

Standard Deviation
226.5 (nm)

=====
Gaussian Analysis
Volume Weighting

Mean Diameter
1101.8 (nm)

Standard Deviation
699.3 (nm)
63.5 %

Chi Squared
2104.2

Baseline Adjust
0.02 %

Data
10888.2 K

Scale Parameters

MIN DIAM = 40 PLOT SIZE = 60
SMOOTHING = 2 RANGE = 100

RUN TIME = 2 Hours 35 Mins 17 Secs
AVG COUNT RATE = 188.0 kHz

CHANNEL WIDTH = 110.0 USEC
TEMPERATURE = 23 DEGREES CENT
VISCOSITY = 0.9325 CENTIPOISE
INDEX OF REFRACTION = 1.323
PRINT AT DATA = 1000 K COUNTS
OF PRINTOUTS = 10

Fig. 4--Size distribution of liposome suspension prepared by mixing 1g of proliposome with 10ml of water

나타내고 있는데 대부분의 리포솜이 좁은 범위의 입자 크기를 가짐을 알 수 있다. Chen과 Alli⁵⁾는 유동층 코팅기를 이용함으로써 회전식 진공증발 농축기를 이용한 Payne 등의 방법⁴⁾을 개선할 수 있다고 하였다. 이 때 일반 공기에 의한 인지질 등의 산화를 막기 위해 질소를 사용한다고 하였는데 질소를 장시간 사용할 때의 비용문제와 빨리 증발하는 용매의 선택, 충격에도 부서지지 않고 과립이나 결정 상태를 유지하는 담체의 선택이 중요해 질 것이다. 이 실험에서의 솔비톨 : 지질 = 7.8 : 1로서 Payne⁴⁾의 4.13 : 1과는 차이가 있었다. 이 차이는 솔비톨의 다공성, 입자 크기 등에 의한 차이이거나, 지질의 종류가 다른데 따른 점성의 차이에 의한 것으로 생각 되었다.

결 론

종래의 리포솜이 물리화학적으로 불안정하여 실용화 하기가 어려웠던 점을 개선하기 위하여 새로운 제법으로서 솔비톨 입자 표면에 sudan IV가 녹아있는 인지질 액을 회전식 진공증발농축기내에서 진공 건조시키면서 코팅한 결과, 건조상태의 과립상 프로리포솜을 만들 수 있었으며, 사용 시에는 물을 첨가함으로써 MLV의 리포솜액을 형성함을 확인하였다.

감사의 말씀

저자중 특히 정은 이 논문 연구에 지원을 아끼지 않으신 동아제약 중앙연구소 관계자 여러 분께 깊은 감사를 드립니다.

문 헌

- 1) Hunt, C.A. and Tsang, S.: α -Tocopherol retards autooxidation and prolongs the shelf-life of liposomes, *Int. J. Pharm.* 8, 101 (1981).
- 2) Deamer, D.W., and Uster, P.S. in "Liposomes," Ostro, M.J. Ed., Marcel Dekker Inc., New York and Basel, 27 (1983).
- 3) Payne, N.I., Timmins, P., Ambrose, C.V., Ward, M.D. and Ridgway, F.: Proliposomes: A novel solution to an old problem. *J. Pharm. Sci.*, 75, 325 (1986).
- 4) Imperial Chemical Industries Ltd., Belgian Patent 866697 (1978).
- 5) Battelle Memorial Institute, UK Patent Application GB 2002, 319 A.
- 6) Chen, C.-M. and Alli, D.: Use of fluidized bed in proliposome manufacturing, *J. Pharm. Sci.* 76, 419 (1987).