

입체 구조적으로 안정화된 리포솜의 동결건조에 따른 물리적 특성

전호성 · 이상길 · 최영욱[†]

중앙대학교 약학대학
(2001년 2월 7일 접수)

Physical Characteristics of Sterically Stabilized Liposomes after Lyophilization and Rehydration

Ho Seong Jeon, Sang Kil Lee and Young Wook Choi[†]

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

(Received February 7, 2001)

ABSTRACT—Sterically stabilized liposomes (SSL) have been introduced for longer circulation in blood than conventional liposomes (CL). However, there are a couple of problems in SSL preparation due to the instability of phospholipid and the degradation of drug in aqueous conditions. To solve these problems, it is necessary to go through lyophilization process. Therefore, in this study, effects of lyophilization on SSL were evaluated for physical characteristics changes upon rehydration of lyophilized SSL such as the particle size, efficiency of drug entrapment, turbidity and drug release. SSL containing streptozocin, a water-soluble anticancer drug as a model compound, were prepared with DSPC and DSPE-PEG 2000. The size was controlled to 100 nm by extrusion with polycarbonate membrane, and sucrose was used as a cryoprotectant for lyophilization at the 1:3 (lipid:sucrose) ratio. Upon rehydration of lyophilized SSL, the average size was in the range of 50~200 nm which is adequate for longer circulation in blood, and the encapsulation efficiency was kept as its initial state. Rehydrated SSL were not adsorbed to rat plasma protein and revealed a similar drug release profile to that of fresh SSL before lyophilization. Therefore, lyophilization could be introduced efficiently to overcome aqueous instability problems of SSL.

Keywords—Sterically stabilized liposomes, Lyophilization, Rehydration, Particle size, Stability

리포솜은 생체적합성이 매우 우수한 약물 수송체이며 리포솜에 약물을 봉입함으로써 약물의 독성을 줄일 수 있고 치료 효과를 높일 수 있는 약물수송체로 잘 알려져 있다.¹⁾ 그러나 정맥으로 투여된 리포솜은 mononuclear phagocyte system(MPS)에 의해서 대부분 간과 비장에 의해서 빠르게 제거되고, 폐와 골수에 의해서도 서서히 제거되어 혈중에 장시간 체류하지 못하게 된다. 이에 비하여 입체 구조적으로 안정화된 리포솜(sterically stabilized liposome, SSL)은 리포솜 표면을 PEG와 같은 친수성 고분자로 코팅하여 입체 구조적인 막을 형성하여 혈장 내에서의 안정성을 증가시킨 것으로서, 혈장 단백질의 흡착을 억제하고 혈장성분인 high density lipoprotein(HDL)에 의하여 리포솜이 분해되는 것을 막아주며, opsonin등과의 상호작용을 차단하여 opsonization에 의한 리포솜의 제거를 억제함으로써 일반적인 리포솜(conventional liposome, CL)과는 달리 혈액중에서 오래 머

무르며 약물을 제어방출 하게 된다.²⁾ 그러나 일반적으로 리포솜 제제는 수용액상에서 인지질이 분해될 수 있을 뿐만 아니라, 봉입대상 약물이 쉽게 가수분해되는 경우에는 제제화에 상당한 제한을 받기 때문에 동결 건조를 통하여 리포솜 제제의 안정성을 높일 필요가 있다.

따라서, 본 연구에서는 반감기가 짧으며 수용액상에서 비교적 불안정한 약물로 알려진 스트렙토조신을 모델 물질로 하여 SSL을 제조한 뒤, 동결 건조 전후의 물리적 특성을 비교하였다. 즉 SSL의 혈장에서의 안정성을 확인하고, 동결 건조가 SSL에 미치는 영향을 알아보기 위하여 입자도와 봉입률, 탁도변화, 흰쥐혈장에서의 *in vitro* 약물 방출 특성 등을 평가하였다.

실험방법

시약 및 기기

Streptozocin, distearoylphosphatidylcholine(DSPC)은 Sigma (U.S.A.)에서 구입하였고, distearoylphosphatidylethanolamine

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : (02)820-5609, E-mail : ywchoi@cau.ac.kr

-N-poly(ethyleneglycol) 2000(DSPE-PEG2000)은 Avanti Polar Lipids(U.S.A.)에서 구입하여 그대로 사용하였으며, 그외의 일반 시약은 특급 및 1급 시약을 사용하였다.

기기로는 rotary vacuum evaporator(Eyela, Tokyo Rikakikai Co., Japan), extruder(Liposofast, Avestin Inc., Canada), HPLC system(Chromatointegrator D2500, Pump L7100, UV detector L4200H, Hitachi, Japan), Masterflex(Cole-Parmer Instrument Co., U.S.A.), Economic centrifugal vacuum concentrator(Ecospin 314, Hanil Research and Development, Korea), laser particle analyzer(LPA PARIII, Ostuka Electronics, Japan), vacuum freeze dryer(BETA-A, Martin Christ Co., Germany), UV/VIS spectrophotometer (Varian carry 3, Varian INC., Australia)를 사용하였다.

입체 구조적으로 안정화된 리포솜의 제조 및 동결건조

CL은 DSPC만을 사용하여 제조하였고, SSL은 DSPC에 DSPE-PEG 2000를 5% 첨가하여 제조하였으며, CL 및 SSL 모두 지질의 총량은 30 $\mu\text{mol/ml}$ 로 하였다. 둥근바닥 플라스크에 지질을 넣고 클로로포름으로 녹인 후, 회전 증발 농축기에서 상전이 온도가상을 유지하면서 감압증류하여 유기용매를 제거하였다. 약물 3 mg/ml과 cryoprotectant로서 sucrose를 함유한 액을 넣어 상전이 온도 이상에서 수화시켜 multilamella vesicle(MLV)을 만든 후, extrusion을 실시하여 입자 100 nm 정도의 unilamellar vesicle을 제조하였고³⁾ 동결 건조시 lipid:sucrose=1:3(W/W)의 비율로 충분한 sucrose를 가하였으며, 동결 건조후에는 3차 증류수에 재분산하였다.

입자도 측정

동결 건조에 따른 입자도의 변화를 통해 동결건조가 리포솜의 물리적 안정성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 리포솜 현탁액 일정량을 취해 count per second(cps)가 8,000-12,000의 범위가 되도록 희석한 뒤 laser particle analyzer로 측정하였다.

봉입률 측정

Sephadex G-25 컬럼을 이용한 gel filtration에 의해 리포솜에 봉입되지 않은 약물을 분리하였다. 분리된 유리약물과 리포솜에 봉입된 약물은 다음과 같은 방법을 이용하여 HPLC로 정량하였다. 분석조건은 역상 컬럼 Capcell PAK (C₁₈, 4.6×250 mm, 5 μm)을 사용하여 검출과장 230 nm에서 측정하였고, 이동상은 100% 인산완충액(pH 4.0), 유속은 1.0 ml/min, 주입량은 20 μl 로 하였다. 리포솜에 봉입된 약물의 경우 Triton-X 100 5% 용액으로 처리하여 분석한 뒤

리포솜내의 봉입률을 산출하였다.

탁도 측정

혈장 단백질에 의한 리포솜의 aggregation을 평가하기 위하여 탁도변화를 관찰하였다. 제조된 리포솜을 30배 희석한 후 흰쥐 혈장의 농도가 20%가 되도록 리포솜 희석액에 흰쥐 혈장을 가하고 UV/VIS spectrophotometer를 사용하여 파장 540 nm에서 시간에 따른 흡광도의 변화를 측정하였다.

흰쥐 혈장에서의 *in vitro* 약물 방출 평가

동결 건조 전후 흰쥐 혈장에서 SSL로부터의 약물 방출 특성을 관찰하기 위해 방출 실험을 실시하였다. 미리 활성화시킨 투석막(MWCO 12,000)의 한쪽 끝을 집게로 고정시킨 후 흰쥐 혈장 0.5 ml를 넣고 약물을 함유하는 리포솜 현탁액 0.5 ml를 가한 뒤 기포를 제거하였다. 투석막 주머니의 다른 한쪽 끝을 집게로 고정하고 잘 섞이도록 흔들어준 후 투석막 주머니를 방출 매질인 37°C 인산완충액 29 ml에 넣고 100 rpm으로 교반하면서 각 시간별로 방출 매질 200 μl 를 취해 HPLC로 분석하여 정량하였다. 100% 방출량은 Triton X-100 5T 용액으로 처리한 스트렙토조신의 양으로 하였다.

결과 및 고찰

입자의 응집

Litzinger 등⁴⁾은 SSL로 제조한 리포솜의 입자가 50 nm이하일 경우 간으로 분포되고, 200 nm 이상의 경우에는 비장으로 포획되며, 50~200 nm의 입자는 혈중에서 장시간 체류할 수 있다고 하였으며, 특히 50 nm 이하의 작은 리포솜은 fenestrated liver endothelium을 통과하여 parenchymal cell에 축적되는 것으로 보고하였다. 이러한 사실에 근거하여 SSL이 혈중에 장시간 체류하도록 하기 위하여 extrusion의 방법을 사용하여 약 114 nm로 입자도를 조절하였다.

그러나, 이렇게 입자도를 조절한 SSL일지라도 제제의 안정성을 확보하기 위하여 동결건조를 하면 재분산시 입자의 응집이 일어나면서 입자도가 커지게 되어 혈중에서 빨리 소실되게 된다. 따라서 입자의 응집을 막기 위하여 cryoprotectant로서 sucrose를 첨가하여 동결건조한 결과 동결 건조 후 재분산시 SSL의 입자는 약 134 nm로써 50~200 nm의 범위를 유지하였기에(Table I) 동결건조한 SSL은 재분산후에도 혈중에 장시간 머무를 것으로 기대되었다.

한편 CL은 extrusion에 의해 입자도를 조절하였을 때 약 174 nm였으며, 동결 건조후 재분산시 입자의 크기는 약 211 nm였다. 그러나 CL은 혈중에서 단백질을 흡착함으로써 입

Table I—Changes in Particle Size and Encapsulation Efficiency of Conventional Liposomes (CL) and Sterically Stabilized liposomes (SSL)

Liposomes	Particle size (nm)		Encapsulation efficiency (%)	
	Fresh ^{a)}	Rehydrated ^{b)}	Fresh	Rehydrated
CL	174.1 ± 3.2 nm	210.9 ± 7.5 nm	6.3 ± 0.6%	6.3 ± 2.2%
SSL	113.6 ± 7.8 nm	133.5 ± 8.6 nm	4.6 ± 0.5%	6.5 ± 0.4%

^{a)} represents liposomal vesicle before lyophilization
^{b)} represents liposomal vesicle after lyophilization

자도의 증가가 예상되며, 실제로 MPS uptake에 의해서 혈중에서 빨리 소실되는 것으로 잘 알려져 있다.

봉입률

동결건조시 약물의 유출은 dehydration과 rehydration 과정에서 인지질이 상전이온도(Tm)를 지나면서 일어나는데,^{5,6)} cryoprotectant는 liposome 내부 및 외부에서 인지질의 Tm을 낮추어 주며, 유리질화된 cryoprotectant가 분자의 운동을 억제하여 건조된 membrane을 안정화시켜서 약물의 유출을 억제하는 것으로 알려져 있다.⁷⁻¹⁰⁾ 수용성 모델 약물인 스트렙토미신의 봉입률은 CL과 SSL의 경우 각각 6.3%, 4.6%였고 동결건조 후 재분산시 봉입률은 각각 6.3%, 6.5%로써(Table I) SSL의 경우 봉입률이 약간 증가했으나 모두 큰 변화는 없었다. 이것은 cryoprotectant로 쓰인 sucrose가 위와 같은 작용기전에 의해서 리포솜을 안정화시켰기 때문인 것으로 사료된다. 또한 일반적으로 50~100 nm의 리포솜이 다른 입도범위에 있는 리포솜에 비하여 상대적으로 안정하여 동결건조시 약물의 유출이 비교적 적은 것으로 보고되고 있기 때문에⁵⁾ extrusion에 의해 입자도를 약 100 nm로 조절한 것이 약물의 봉입률 유지에 유리하였을 것으로 사료된다.

탁도

리포솜 입자의 응집이 일어날 경우 리포솜 현탁액은 혼탁하게 된다. 따라서 혈액내에서 리포솜 입자들의 거동을 해석하기 위해서 혈장을 가하여 탁도의 변화를 관찰함으로써 혈장내 안정성을 상대적으로 평가할 수 있다.

Figure 1에서 볼 수 있듯이, CL은 혈장 단백질과의 흡착에 의해서 쉽게 응집이 일어나기 때문에 흰쥐 혈장을 가하자마자 흡광도가 크게 증가함을 알 수 있다. 그러나, SSL은 초기에 약간의 탁도의 증가가 나타났을 뿐 탁도의 큰 변화는 없었다. 이것은 SSL의 표면이 친수성 고분자인 PEG로 수식되어 있어서, PEG에 의한 물리적인 반발력에 의해서 단백질 흡착이 억제되고 리포솜 입자간의 응집이 잘 일어나지 않았기 때문이다.

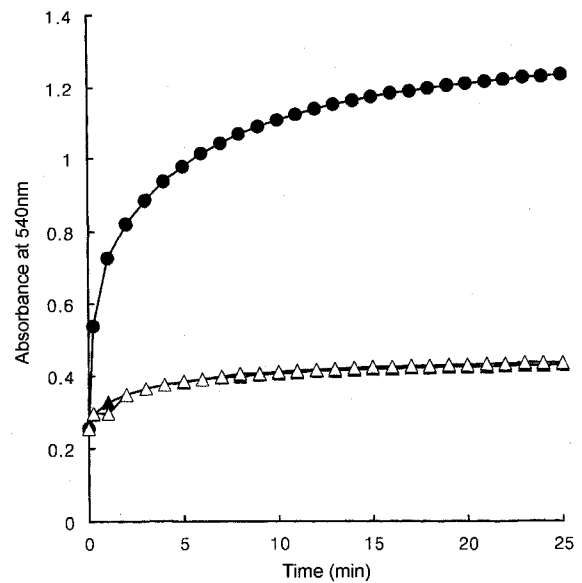


Figure 1—Turbidity change of liposomes in rat plasma. ●, Fresh CL; ▲, Fresh SSL; △, Rehydrated SSL.

동결 건조에 의해서 SSL이 입체 구조적인 안정성을 유지하지 못한다면, 흡광도의 변화가 동결 건조 전에 비하여 커야 한다. 그러나, 동결 건조 후의 SSL의 흡광도의 변화는 동결건조 전과 매우 유사하게 나타나 동결 건조 후에도 SSL은 입체 구조적으로 안정한 상태를 유지하고 있음을 알 수 있었다.

흰쥐 혈장에서의 in vitro 약물 방출

혈장은 리포솜을 불안정화시켜 약물의 방출을 증가시킨다. 이는 리포솜을 구성하는 인지질이 HDL과 교환되면서 봉입된 약물이 유출되기 때문이며, HDL에 의한 인지질의 제거는 주로 리포솜 이중층의 outer layer에서 일어나는 것으로 보고되었다.¹¹⁾ 이러한 HDL에 의한 리포솜의 불안정화는 cholesterol(CH)을 첨가함으로써 억제시킬 수 있으나, CH는 동결 건조시에 오히려 약물을 유출시켜 봉입률을 떨어뜨리는 것으로 보고되어 있어⁵⁾ 본 실험에서는 CH를 첨가하지 않았다.

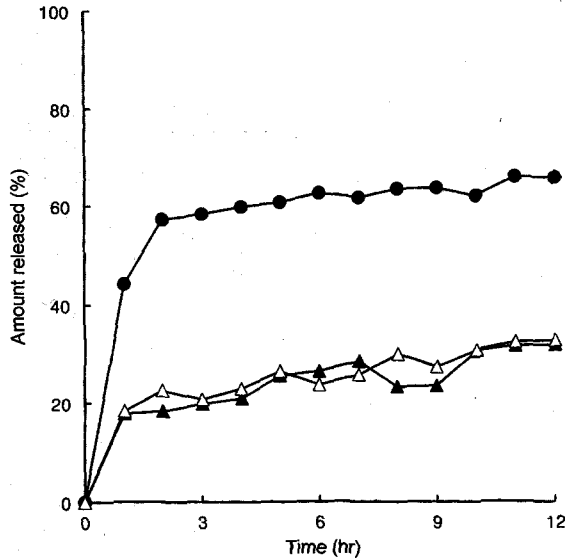


Figure 2—Drug release from liposomes in rat plasma. ●, Fresh CL; ▲, Fresh SSL; △, Rehydrated SSL.

12시간 이후의 약물의 방출률은 CL이 65.8%, SSL이 31.8%이었다(Fig. 2). 이처럼 SSL로부터의 약물 방출이 CL보다 낮은 이유는 SSL의 친수성 고분자가 입체 구조적으로 리포솜을 안정화시켜 HDL과의 상호작용을 억제함으로써 약물의 방출을 제어한 반면, CL은 HDL에 의해서 쉽게 불안정화되어 약물의 유출이 컸던 것으로 해석된다. 그러나 CL과 SSL 모두 초기 1시간까지의 방출률이 비교적 높았는데 이는 HDL등의 혈장단백질과의 흡착에 의한 리포솜의 불안정화와 gel filtration시 미처 제거되지 못한 유리약물때문인 것으로 사료된다.

한편 SSL이 동결 건조를 거치면서 입체 구조적으로 안정한 상태를 유지하지 못한다면, 혈장 단백질과의 상호작용으로 인하여 약물의 방출이 더 증가하여야 한다. 그러나 동결 건조후 SSL은 12시간 후의 약물의 방출이 32.9%로서 동결 건조전 31.8%와 거의 동일하였고 약물의 방출양상 또한 비슷하였기 때문에, 동결건조가 SSL의 약물 방출에 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

결 론

입체구조적으로 안정한 리포솜(SSL)의 혈장내 안정성을 확보하고 수용액중에서 불안정한 약물을 봉입할 수 있는 리포솜 제제를 개발하기 위해 동결건조의 방법을 도입하였으며, 그에 따른 물리적 특성을 관찰하였다. 동결 건조에 의해서 SSL의 입자도가 약간 증가하긴 하였으나, 혈중에서 장시간 체류할 수 있는 크기인 50~200 nm를 유지하였으며 봉

입률의 변화도 거의 없었다. 또한 SSL은 혈장 단백질에 흡착되지 않아 혈장중에서 약물의 방출을 제어할 수 있었을 뿐만 아니라, 동결 건조 후에도 SSL은 입체 구조적으로 안정한 상태를 유지하여 동결 건조 전과 동일한 방출양상을 나타낼 수 있었다.

이상의 결과로부터, 동결건조가 SSL의 입체구조적인 안정성에는 영향을 끼치지 않으면서 수용액상에서 불안정한 약물의 안정성을 향상시킬 수 있고, 인지질의 분해를 억제하여 결과적으로 리포솜 제제의 안정성을 증가시킬 수 있는 유용한 방법임을 알 수 있었다.

감사의 말씀

본 논문은 보건과학기술연구개발사업(HMP-98-D-1-0016)에 의해서 수행된 연구 결과 중 일부를 정리한 것으로서 본 연구의 지원에 감사드립니다.

문 헌

- 1) D. Papahadjopoulos, T. M. Allen, A. Gabizon, E. Mayhew, K. Matthey, S. K. Huang, K. D. Lee, M. C. Woodle, D. D. Lasic, C. Redemann and F. J. Martin, Sterically stabilized liposomes: Improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **88**, 11460-11464 (1991).
- 2) D. Needham, T. J. McIntosh and D. D. Lasic, Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1108**, 40-48 (1992).
- 3) B. L. S. Mui, P. R. Cullis, E. A. Evan and T. D. Madden, Osmotic properties of large unilamellar vesicles prepared by extrusion, *Biophys. J.*, **64**, 443-453 (1993).
- 4) D. C. Litzinger, A. M. J. Buiting, N. van Rooijen and L. Huang, Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphipatic poly (ethylene glycol)-containing liposomes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1190**, 99-107 (1994).
- 5) K. Tanaka, T. Takeda, K. Fujii and K. Miyajima, Freeze-drying of liposomes prepared by sonication and extrusion techniques, *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 2653-2656 (1991).
- 6) J. H. Crowe, L. M. Crowe, J. F. Carpenter and C. A. Wistrom, Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars, *Biochem J.*, **242**, 1-10 (1987).
- 7) K. L. Koster, M. S. Webb, G. Bryant and D. V. Lynch, Interactions between soluble sugars and POPC (1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine) during dehydration: vitrification of sugars alters the phase behavior of phospholipid, *Biochim. Biophys. Acta*, **1193**, 143-150 (1994).
- 8) K. Ozaki and M. Hayashi, Effect of cyclodextrin with additives on the freeze-drying of liposome, *Int. J. Pharm.*,

- 160, 219-227 (1998).
- 9) K. Tanaka, T. Takeda, K. Fujii and K. Miyajima, Cryoprotective mechanism of saccharides on freeze-drying of liposome, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 1-5 (1992).
- 10) L. M. Crowe, C. Womersley, J. H. Crowe, D. Reid, L. Appel and Rudolph, Prevention of fasion and leakage in freeze-dried liposomes by carbohydrates, *Biochim. Biophys. Acta*, **861**, 131-140 (1986).
- 11) G. Scherphof, B. V. Leeuwen, J. Wilschut and J. Damen, Exchange of phosphatidylcholine between small unilamellar liposomes and human plasma high-density lipoprotein involves exclusively the phospholipid in the outer monolayer of the liposomal membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **732**, 595-599 (1983).