

## 음이온성 리포솜의 방출 거동과 안정성

남다은\* · 한희동 · 박윤정 · 김윤아 · 신병철†

\*충북대학교 화학공학과, 한국화학연구원 나노생체재료연구팀

(2004년 7월 19일 접수 · 2004년 8월 10일 승인)

## Release Profile and Stability of Anionic Liposomes

Da Eun Nam\*, Hee Dong Han, Yun Jung Park, Yun A Kim and Byung Cheol Shin†

\*Department of Chemical Engineering, Chungbuk National University, 48 Gaesin Dong, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea  
Nanobiomaterials Lab. Korea Research Institute of Chemical Technology, P.O. Box 107 Yuseong, Daejeon 305-606, Korea

(Received July 19, 2004 · Accepted August 10, 2004)

**ABSTRACT**—This study was to prepare the anionic liposomes which were to release anticancer drug (doxorubicin) at the hyperthermia temperature ( $-42^{\circ}\text{C}$ ) and to stabilize in bovine serum solution at  $37^{\circ}\text{C}$ . The vesicle size and zeta potential of liposomes in Tris-HCl buffered solution (pH 7.4) were measured by an electrophoretic light scattering spectrophotometer. To estimate the stability of liposomes, liposome size was measured in bovine serum solution at  $37^{\circ}\text{C}$  for 72 h. The release of doxorubicin from liposome was determined by measuring the fluorescence intensity using fluorescence spectrophotometry with temperature and time. The size of liposomes was from 120 to 160 nm and zeta potential was from  $-33.3 \pm 2.4$  to  $-75.6 \pm 6.9$  mV. Anionic liposome was stabilized in bovine serum solution at  $37^{\circ}\text{C}$  within 72 h. Additionally, the release transition temperature of doxorubicin from liposomes was increased by increasing mole % of anionic phospholipid.

**Key words**—Anionic liposome, Doxorubicin, Bovine serum

리포솜을 이용한 약물 전달은 인체에 부작용이 적고 효과적이며 표적 지향적 치료를 위한 수단으로서 최근 활발히 연구되어지고 있다. 이러한 리포솜은 생체 적합성이 매우 우수하며 제법이 간편하고, 수용성 및 지용성 약물을 운반 할 수 있는 장점을 지니고 있다.<sup>1-3)</sup> 또한 리포솜은 막 조성과 막 표면을 수식하는 물질을 변화시켜 열,<sup>4,6)</sup> 빛<sup>7)</sup> 및 pH<sup>8)</sup> 등의 외부 자극에 의하여 선택적으로 약물의 방출을 제어 할 수 있다. 특히 열에 의하여 약물을 방출하는 온도 민감성 리포솜은 외부 온열에 의하여 리포솜 막을 구성하는 인지질의 상전이 온도에서 막의 안정성이 급격히 변화하는 현상에 의하여 약물의 방출을 제어할 수 있다. 또한, 온도 민감성 리포솜은 생체 내에 투여 후 외부 온열을 가하여 표적 부위의 온도를 상승시키면 표적 부위에서만 온도에 의하여 약물의 방출을 효과적으로 제어할 수 있기 때문에 국부적인 약물 전달 시스템에 많이 응용되어지고 있다.<sup>9-12)</sup>

하지만 기존의 리포솜은 계 자체가 물리화학적으로 불안정하기 때문에 수용액 내에 분산시켜 보관할 때 응집, 융합, 인지질의 가수분해, 산화 및 봉입 약물의 누출 등을 야기 할 수 있는 단점을 지니고 있다. 또한 정맥 주사 시 혈액에 의

하여 빠르게 소실되고 간이나 비장의 세망내피계에 축적되거나 쉽게 분해 되어지고, 혈장 내에 존재하는 단백질과 흡착하여 응집을 야기 시킬 수 있다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 리포솜의 표면을 고분자로 수식하는 연구가 진행되어지고 있다.<sup>13-16)</sup> 리포솜이 고분자의 수식을 받게 되면 이중 막이 견고해지고 혈중에서도 고분자 사슬이 유동성을 부여하여 안정성을 높여준다. 한편, Lin 등<sup>13)</sup>은 리포솜 표면에 결합되는 혈장 단백질은 리포솜을 구성하는 지질 성분에 의존하고 리포솜의 안정성에 영향을 준다고 보고하였다. 수용성 고분자인 polyethyleneglycol(PEG) 유도체를 리포솜 표면에 수식하면 혈류 내에서의 체류 시간이 증가되며 리포솜 표면에 유동성을 부여하여 단백질 및 혈소판의 부착을 억제하여 리포솜의 안정성을 향상시킬 수 있다는 연구 결과가 보고 되어지고 있다.<sup>13-16)</sup> 또한, 일반적인 리포솜을 주사제로 사용하였을 경우 리포솜의 표면에 혈장 단백질이 흡착되어 리포솜의 크기가 증가됨으로서 리포솜의 성질을 저하시키게 된다. 리포솜의 안정성을 향상시키기 위하여 고분자로 수식하는 방법 이외에 리포솜의 표면을 비이온성이나 음이온성으로 만들어주는 기술도 발전되고 있다. 리포솜이 음이온성을 띄게 될 경우 리포솜 표면의 전기적인 반발력에 의하여 혈장 내에서 입자가 응집되어지는 것을 감소시킴으로서 입자의 안정성을 증가시키게 된다.<sup>17)</sup> 따라서 리포솜 주사제로써

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
Tel : 042)860-7223, E-mail : bcshin@pado.kriict.re.kr

혈장 내에서 안정성을 향상시키기 위해서는 리포솜의 표면을 고분자로 수식하거나 표면 전하가 비이온이거나 음이온을 나타내어야 한다.

본 연구에서는 주사제로 응용할 수 있고 혈장 내에서 안정하고 외부 온열에 의하여 약물의 방출을 증가시킬 수 있는 음이온성 리포솜을 제조하였다. 음이온성 리포솜은 인지질의 구성 성분을 미세하게 변화시켜 제조하였고, 표면 전하는 제타 전위 값으로 평가하였으며 Tris-HCl 완충용액(pH 7.4) 내에서 독소루비신의 방출 거동을 관찰하였다. 또한 37°C의 우혈청 용액 내에서 72시간 동안 숙성하면서 리포솜 입자 크기 변화를 통하여 리포솜과 혈장 단백질 흡착을 관찰하였다.

## 실험 방법

### 시약 및 기기

리포솜을 제조하기 위하여 사용된 지질의 주요 성분으로는 온도 민감성을 지닌 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DPPC)와 phosphatidylcholine(soy-pyrogenated)(HSPC), cholesterol(CHOL), 1-a-phosphatidylcholine-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-n-[methoxy(polyethyleneglycol)-2000](DSPE-mPEG)과 음이온성 지질의 주요 성분인 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphate acid(DPPA)를 Avanti Polar Lipids Inc.(Alabaster, AL, 미국)에서 구입하여 사용하였다. 리포솜의 모델 약물로 사용된 독소루비신과 GPC의 충진물로 사용되어진 sephacryl S-400-HR는 Sigma-Aldrich사(Louis, MO, 미국)에서 구입하여 사용하였다. Fetal bovine serum은 GIBCO(Grand Island, NY, 미국)에서 구입하여 사용하였다. 폴리카보네이트 막은 Millipore(County Cork, 아일랜드)에서 구입하여 사용하였다. 그 밖의 클로로포름과 메탄올 등은 일급 시약을 사용하였다.

기기로는 회전 증발 응축기(Buchi Rotavapor R-200, Flawil, 스위스), 사출 성형기(Extruder, Northern Lipids Ins., vancouver, BC, 캐나다), gel permeation chromatography (GPC, Retriever 500, Isco Inc., Hercules, CA., 미국), 광산란 장치(Electrophoretic light scattering spectrophotometer, ELS-8000, OTUSKA Electronics사, 일본)와 형광분광계(Fluorescence spectrophotometry, Tvon-Spex, S.A, Inc., Dubuque, IA., 미국)를 사용하였다.

### 리포솜 제조

본 실험에서 사용되어진 리포솜과 대조 리포솜은 다음과 같은 과정에 의하여 제조하였다. 우혈청 용액 내에서 리포솜

**Table I-Particle Size and Zeta Potential of Liposomes. Total Amount of Lipids was 10 mM. Liposome Formulation was Composed of DPPC:DPPA:DSPE-mPEG:HSPC:CHOL in the Constant Molar Ratio of HSPC:CHOL=50:30. The Data are Shown as Mean  $\pm$  S.D. (n=3)**

| Lipid composition<br>DPPC:DPPA:DSPE-mPEG | Size<br>(nm $\pm$ S.D.) | Zeta potential<br>(mV $\pm$ S.) |
|--|-------------------------|---------------------------------|
| 90:10:0                                  | 125.6 $\pm$ 8.5         | -31.33 $\pm$ 2.1                |
| 100:0:0                                  | 154.4 $\pm$ 13.5        | -2.67 $\pm$ 0.7                 |
| 100:0:6                                  | 123.8 $\pm$ 13.7        | -0.04 $\pm$ 0.8                 |
| 90:10:6                                  | 154.7 $\pm$ 12.6        | -33.3 $\pm$ 2.4                 |
| 80:20:6                                  | 123.7 $\pm$ 14.3        | -36.0 $\pm$ 3.1                 |
| 70:30:6                                  | 135.3 $\pm$ 18.4        | -40.6 $\pm$ 5.2                 |
| 0:100:6                                  | 128.5 $\pm$ 11.9        | -75.6 $\pm$ 6.9                 |

의 안정성에 관한 대조 리포솜은 DPPC:HSPC:CHOL을 100:50:30의 molar 비율로 제조하였으며 리포솜으로부터의 독소루비신의 방출에 관한 대조 리포솜은 DPPC:HSPC:CHOL:DSPE-mPEG를 100:50:30:6의 molar 비율로 제조하였다. 모든 리포솜은 인지질을 10 mM로 고정하여 Table I을 기준으로 정량된 인지질 성분을 등근 플라스크에 넣고 2:1(v/v)의 클로로포름-메탄을 혼합 용매에 녹인 후 회전 증발 응축기를 이용하여 55°C에서 혼합 용매를 제거하여 얇은 인지질 막을 제조하였다. 모델 약물인 독소루비신은 1.73 M의 농도로 10 mM의 Tris-HCl 완충용액(pH 7.4, 400 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl)에 용해하였다. 독소루비신 용액은 등근 플라스크의 인지질 막과 혼합한 후 30분간 수화 과정을 시행하여 리포솜을 제조하였다. 수화 과정을 마친 후 freeze-thaw 과정을 5회 반복 실시하였다.<sup>18)</sup> Freeze 과정은 -16°C에서 thaw 과정은 70°C에서 실시하였다. Freeze-thaw과정 이후 사출 성형기를 이용하여 100 nm 크기의 폴리 카보네이트 막으로 50°C에서 리포솜의 입자 크기를 성형하였다. 사출 성형 과정 이후 리포솜 내에 봉입되지 못한 독소루비신과 잔류 인지질을 제거하기 위하여 GPC를 사용하여 리포솜을 정제하였다. 이때 정제 조건은 4°C에서 10 mM의 Tris-HCl 완충용액(pH 7.4)을 사용하였으며, GPC내의 충진물로는 sephacryl S-400-HR를 사용하였다.

### 리포솜 입자 크기와 표면 전하 측정

리포솜의 입자 크기와 표면 전하는 광산란 장치를 사용하여 측정하였다. 리포솜의 입자 크기는 GPC를 통하여 정제된 리포솜 용액을 2 ml 취해서 Tris-HCl 완충용액(pH 7.4)으로 2배 희석한 다음 석영 셀에 담아 4°C에서 측정하였다. 리포솜의 표면 전하는 GPC를 통하여 정제된 각각의 리포솜 용액을 100  $\mu$ l를 취해서 2 ml의 3차 증류수와 함께 흘려주며 제타 전위 값을 측정하여 비교하였다.

### 리포솜의 단백질 흡착

우혈청 용액 내에서 리포솜의 입자의 크기 변화를 통하여 리포솜의 단백질 흡착을 관찰하였다. 우혈청 용액 내에서의 리포솜의 단백질 흡착은 리포솜 용액(2 ml)과 우혈청 용액(2 ml)을 혼합한 다음 37°C의 항온조에서 교반을 하면서 숙성시켰다. 우혈청 용액과 리포솜 혼합 용액을 2 ml 취해서 석영 셀에 담아 광산란 장치를 통하여 72시간 동안 리포솜의 입자 크기 변화를 측정하였다.

### 리포솜으로부터 독소루비신의 방출

리포솜으로부터 독소루비신의 방출은 온도와 시간에 따라서 형광분광계를 사용하여 독소루비신의 형광강도를 측정하여 계산하였다. 독소루비신의 형광강도는 방출파장 595 nm와 흡수파장 487 nm에서 측정하였으며, 다음의 식 (1)을 통하여 계산하였다.

$$\text{방출농도}(\%) = (F_t - F_0)/(F_t - F_0) \times 100 \quad (1)$$

이때,  $F_t$ 는 리포솜의 형광강도이고  $F_0$ 는 약물의 방출이 일어나지 않는 범위(4°C)에서의 형광강도이며,  $F_t$ 는 Triton X-100(10%, v/v)을 첨가하여 리포솜의 인지질 막을 파괴한 후의 형광강도이다.<sup>19,20)</sup>

## 결과 및 고찰

### 리포솜의 입자 크기와 표면 전하 측정

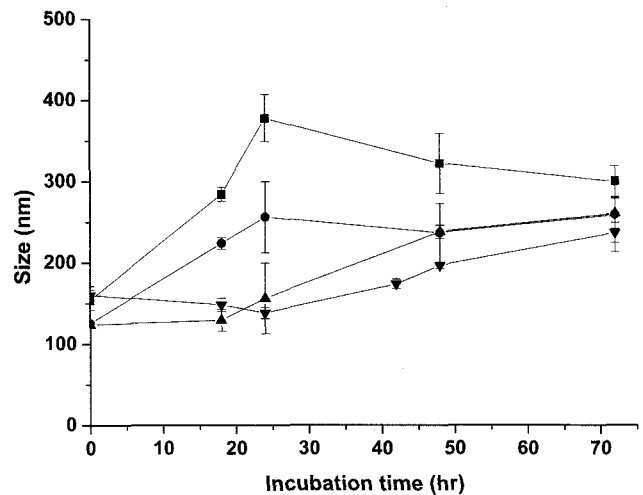
제조되어진 리포솜의 입자 크기와 표면 전하에 대한 결과는 Table I에 나타내었다. 리포솜 입자 크기는 HSPC:CHOL:DSPE-mPEG=50:30:6의 molar 비율로 인지질을 포함하고 있는 리포솜에서 DPPC와 DPPA의 첨가 비율이 100:0, 90:10, 80:20 그리고 70:30에 따라  $123.8 \pm 13.7$ ,  $154.7 \pm 12.6$ ,  $123.7 \pm 14.3$  그리고  $135.3 \pm 18.4$  nm로 각각 측정되었다. DPPA가 100 mole %가 첨가된 리포솜의 입자의 크기는  $128.5 \pm 11.9$  nm로 측정되었다. 결과적으로 제조된 리포솜 모두 100에서 200 nm 사이의 크기를 나타냈다. 리포솜의 입자의 크기는 사출 성형기의 폴리카보네이트 막의 pore 크기에 의하여 결정되어진다.<sup>21)</sup> 제조된 리포솜들은 100 nm의 폴리카보네이트 막을 통과하면서 100 nm에서 200 nm 사이의 입자를 제조 할 수 있었다. 일반적으로 리포솜의 입자의 크기가 50 nm 이하일 경우에는 간으로 분포되고, 200 nm 이상의 경우에는 비장으로 포획되며, 50에서 200 nm의 크기가 혈중에서 안정한 크기라고 알려져 있다.<sup>22,23)</sup> 그러므로 본 실험에서 제조된 리포솜의 입자의 크기는 120에서 160 nm 범위 내에 존재하므로 혈중에서 안정한 범위에 든다고 예상할

수 있다.

한편, 리포솜의 표면 전하는 DPPC와 DPPA가 100:0, 90:10, 80:20 그리고 70:30으로 첨가되어질수록  $-0.04 \pm 0.8$ ,  $-33.3 \pm 2.4$ ,  $-36.0 \pm 3.1$ 과  $-40.6 \pm 5.2$  mV의 값을 각각 나타내었다. DPPA가 100 mole %가 첨가되어진 경우에는  $-75.6 \pm 6.9$  mV의 제타 전위 값을 나타내었다. 결과적으로 DPPA의 mole %의 값이 증가할수록 음전하의 값이 증가하는 것을 관찰 할 수 있었다. 일반적으로 리포솜은 친수성 성질의 머리 부분이 바깥부분으로 향하며 원형으로 제조되어진다.<sup>24)</sup> 제조되어진 리포솜은 DPPA의 mole %가 증가하면서 음이온성을 띠고 있는 DPPA 머리부분인 인산 그룹의 양이 증가하게 되어 리포솜의 표면 전하의 값이 음전하를 띄게 된다. 제조된 리포솜의 경우 DPPA의 양이 증가하면서 리포솜의 표면 음전하 값도 증가되어지는 것으로 보여진다. 따라서 리포솜의 표면은 리포솜을 구성하는 인지질의 비율을 미세하게 조절하여 음이온을 부여할 수 있었고, 이러한 음전하를 띠고 있는 리포솜은 혈장 내에서 단백질 흡착성을 감소시켜 안정할 것으로 예상되어진다.

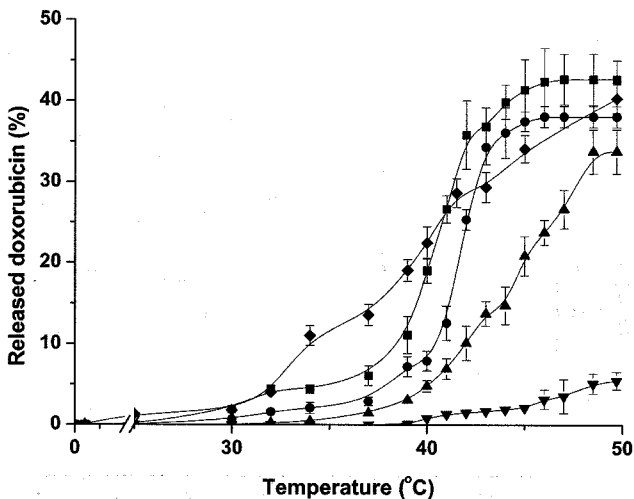
### 리포솜의 단백질 흡착

Figure 1은 37°C의 우혈청 용액에서 리포솜의 입자 크기를 변화를 나타내고 있다. 대조 리포솜(DPPC:HSPC:CHOL=100:50:30)의 입자 크기는 37°C의 우혈청 용액 내에서 숙성하는 동안에  $154.4 \pm 13.5$  nm에서 24시간 후  $377.93 \pm 29.2$  nm으로 증가하였으나, 72시간 후에는  $300 \pm 19$  nm로 감소하



**Figure 1**—The liposome size in bovine serum solution at 37°C for 72 h. The data are shown as mean  $\pm$  S.D. (n=3). (-■- DPPC:HSPC:CHOL=100:50:30, -●- DPPC:DPPA:HSPC:CHOL=90:10:50:30, -▲- DPPC:HSPC:CHOL:DSPE-mPEG=100:50:30:6 and -▼- DPPC:DPPA:HSPC:CHOL:DSPE-mPEG=90:10:50:30:6).

였다. 한편 대조 리포솜에 10 mole %의 DPPA가 첨가되었던 경우 입자 크기변화는  $125.6 \pm 8.5$ 에서 72시간 후  $259.2 \pm 46$  nm로 증가하였다. 대조 리포솜에 6 mole %의 DSPE-mPEG가 첨가되었던 리포솜은  $123.8 \pm 13.7$ 에서 72시간 후  $260.4 \pm 19$  nm로 증가하였다. 반면 DPPA와 DSPE-mPEG가 함께 첨가되었던 리포솜의 입자 크기는  $154.7 \pm 12.6$ 에서  $230 \pm 12.2$  nm로 미세하게 증가하였다. 결과적으로 대조 리포솜과 비교했을 시 DPPA와 DSPE-mPEG가 첨가되었기 때문에 우혈청 용액 내의 안정성이 증가됨을 관찰하였다. 일반적인 리포솜의 표면은 인지질이 주된 성분으로 구성되어지기 때문에 혈장 내에서 혈장 단백질과 결합, 흡착 그리고 융합 등이 발생한다. 그렇기 때문에 혈장 단백질과 흡착이 일어난 리포솜은 입자의 크기가 상승하게 된다. 대조 리포솜의 경우 리포솜의 외부 표면과 혈장 단백질의 흡착 및 결합으로 인하여 입자의 크기가 증가된 것으로 사료 되어진다. 일반적으로 PEG와 음이온성 지질로 이루어진 리포솜은 혈액 내에서 혈장 단백질에 대한 결합작용을 방해하고, 수용액상에서 높은 유연성과 친수성 또는 이온적 척력이 작용하기 때문에 우혈청 용액 내에서 안정성이 향상 된다고 알려져 있다.<sup>13-16)</sup> 또한 리포솜 표면에 PEG를 수식하면 리포솜 표면에 유동성을 부여하여 단백질 및 혈소판의 부착을 억제 할 수 있다.<sup>13-16)</sup> 이러한 장점을 지니는 PEG와 음이온성이 첨가되었기 때문에 우혈청 용액 내에서 음이온성 리포솜의 안정성을 향상시킬 수 있었다.



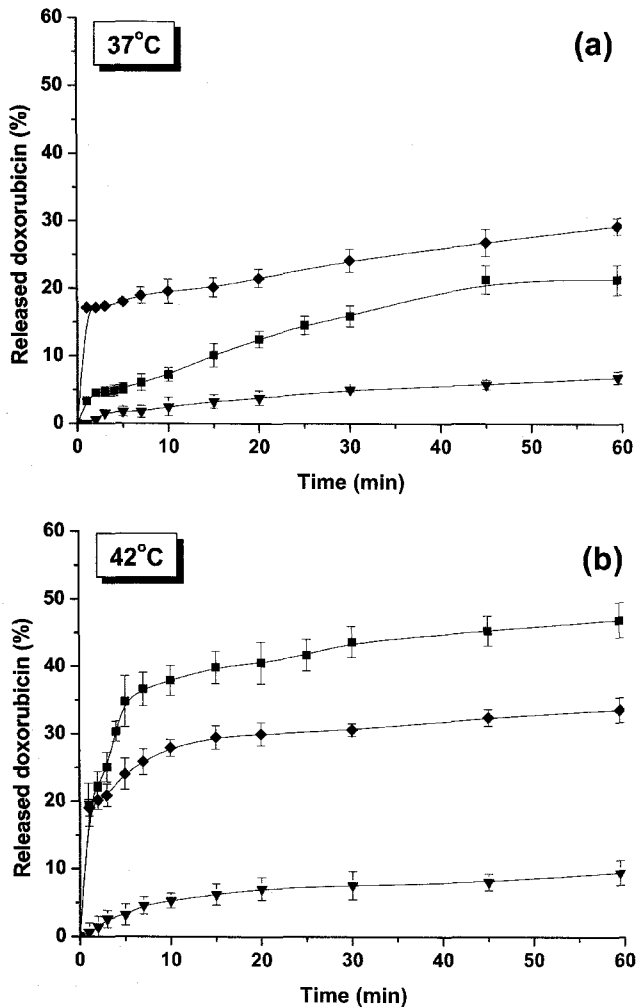
**Figure 2**—Doxorubicin release from liposomes at various temperatures. All liposomes were prepared by changing the mole % of DPPA and DPPC in presence of constant phospholipids composition (HSPC:CHOL:DSPE-mPEG=50:30:6). The data are shown as mean  $\pm$  S.D. (n=3). (◆- DPPA:DPPC=0:100, ■- DPPA:DPPC=10:90, ●- DPPA:DPPC=20:80, ▲- DPPA:DPPC=30:70 and ▼- DPPA:DPPC=100:0).

### 리포솜으로부터 독소루비신의 방출

Figure 2는 리포솜으로부터 온도의 변화에 따른 독소루비신의 방출 나타내고 있다. HSPC:CHOL:DSPE-mPEG=50:30:6의 인지질에 DPPA 10 mole %와 DPPC 90 mole %가 첨가되어 제조된 리포솜의 경우 독소루비신이 37°C에서 42°C 사이에서 방출되는 것을 관찰할 수 있었으나, DPPA가 100 mole %가 첨가되었던 리포솜의 경우 독소루비신 방출은 50°C까지 온도를 올려도 5%정도의 미비한 방출을 보였다. 한편, 100 mole %의 DPPC가 첨가되었던 리포솜의 경우 32°C부터 선형적으로 독소루비신이 방출되는 것을 관찰할 수 있었다. 결과적으로 DPPA의 mole %가 증가되어질수록 독소루비신의 방출 전이 온도가 증가하고 선형적으로 약물이 방출되었다. 일반적으로 리포솜으로부터 봉입된 약물의 방출은 리포솜 막을 구성하는 인지질의 상전이 온도를 경계로 막의 안정성이 급격히 감소하게 되면서 나타나게 된다.<sup>12)</sup> 따라서 리포솜 막을 구성하고 있는 인지질의 상전이 온도가 증가하게 되면 인지질 층이 불안정해지는 온도 범위도 증가하게 됨으로서 봉입된 약물의 방출 온도도 증가하게 되어진다. 따라서 상전이 온도가 67°C인 DPPA가 첨가됨으로서 외부온열에 의하여 지질층이 불안정해지는 온도범위도 증가되어 독소루비신의 방출 온도도 증가된 것으로 사료되어진다.

### 시간에 따른 독소루비신의 방출

Figure 3은 37°C (a)와 42°C (b)의 일정한 온도에서 리포솜으로부터 독소루비신의 방출을 나타내고 있다. 37°C (a)는 HSPC:CHOL:DSPE-mPEG=50:30:6의 molar 비율로 구성되어 인지질에 100 mole %의 DPPC가 첨가되었던 리포솜의 경우 2분 이내에 20%의 방출을 보이며 서서히 방출이 시작되었으나 10 mole %의 DPPA와 90 mole %의 DPPC가 첨가되었던 리포솜의 경우 초기 10분간 10% 미만의 방출을 보였으며 시간이 증가할수록 서서히 방출이 일어남을 관찰하였다. DPPA가 100 mole %가 첨가되었던 경우에는 방출량이 5% 미만으로 미비하게 나타났다. 42°C (b)의 경우 100 mole %의 DPPC가 첨가되었던 리포솜의 경우 초기 5분 이내에 독소루비신 방출이 20%로 최대가 되었으며, DPPA 10 mole %와 90 mole %의 DPPC가 첨가되었던 리포솜의 경우 6분 이내에 독소루비신의 방출이 35%로 최대가 되었다. 반면 DPPA가 100 mole %가 첨가되었던 경우 60분이 지나도 약물의 방출은 10%에 그쳤다. 결과적으로 DPPA 10 mole %와 DPPC 90 mole %가 첨가되었던 리포솜은 100 mole %의 DPPC가 첨가되었던 리포솜보다 외부 온열에 의해 약물 방출이 최대가 되어지는 것을 관찰



**Figure 3**—Release profiles of doxorubicin from liposomes at (a) 37°C and (b) 42°C in presence of constant phospholipids composition (HSPC:CHOL:DSPE-mPEG=50:30:6). The data are shown as mean  $\pm$  S.D. (n=3). (-◆- DPPA:DPPC=0:100, -■- DPPA:DPPC=10:90 and -▼- DPPA:DPPC=100:0).

할 수 있었다. 또한, DPPA 100 mole %가 첨가되어진 리포솜은 외부 온열에 의해 약물이 방출되지 않으며 온도 민감성이 없음을 관찰하였다. 리포솜의 구성 인지질 중 DPPC 90 mole %와 상전이 온도가 67°C인 DPPA가 10 mole % 첨가되어진 리포솜은 DPPA에 의하여 리포솜의 이중막이 불안정해지는 온도도 증가되어짐으로서 DPPC 100 mole %가 첨가된 리포솜보다 온도 민감성을 지니는 것으로 사료 되어진다. 결과적으로 DPPA 10 mole %와 DPPC 90 mole %가 첨가되어 제조된 리포솜은 37°C에서 약물 방출량이 적고 비교적 안정한 상태로 유지될 수 있으며 외부 온열(42°C)에 의해 약물의 방출을 제어할 수 있음을 관찰하였다.

## 결 론

본 연구에서는 외부온열(42°C)에 의하여 독소루비신의 방출을 증가시키며 37°C의 우혈청 용액에서 안정한 음이온성 리포솜을 제조하였다. 제조된 리포솜의 입자의 크기는 120에서 160 nm 사이의 크기를 나타냈으며, 표면전하는 DPPA의 mole %가 증가할수록 표면 음전하 값이 증가하였다. 또한 음이온성 리포솜은 37°C의 우혈청에서 72시간 동안 안정하였으며, 리포솜으로부터의 독소루비신의 방출은 DPPA의 mole %가 증가할수록 방출 온도가 증가함을 관찰하였다. 특히, DPPA 10 mole %와 DPPC 90 mole %가 첨가되어진 리포솜은 37°C에서 42°C 범위 내에서 독소루비신이 방출되고 37°C의 우혈청에서 가장 안정하였다. 결과적으로 인지질의 비율을 조절하여 외부 온열에서 약물의 방출을 제어할 수 있으며 37°C의 우혈청 용액 내에서 안정한 음이온성 리포솜을 제조하였다.

## 감사의 글

본 연구는 과학기술부 기능성 화합물질 개발사업과 정보통신 연구진흥원 IMT-2000 출연금 기술 개발 지원 사업으로 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) A. Sharma and U.S. Sharma, Liposomes in drug delivery: progress and limitations, *Int. J. Pharm.*, **154**, 123-140 (1997).
- 2) Y. Barenholz, Document title liposome application: problems and prospects, *Current Opinion in Colloid & Interface Sci.*, **6**, 66-77 (2001).
- 3) Lian, H. Tianshun and J.Y. Rodney, Trends and developments in liposome drug delivery systems, *J. Pharm. Sci.*, **90**, 667-680 (2001).
- 4) K. Maruyama, S. Unezaki, N. Takahashi and M. Iwatsuru, Enhanced delivery of doxorubicin to tumor by long-circulating thermosensitive liposomes and local hyperthermia, *Bioch. Biophys. Acta*, **1149**, 209-216 (1993).
- 5) G.R. Anyarambhatla and D. Needham, Enhancement of the phase transition permeability of DPPC liposomes by incorporation of MPPC: A new temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia, *J Liposome Res.*, **9**, 491-506 (1999).
- 6) O. Ishida, K. Maruyama, H. Yanagie, M. Eriguchi and M. Iwatsuru, Targeting chemotherapy to solid tumors with long-circulating thermosensitive liposomes and local hyperthermia, *Japan. Can. Assoc.*, **91**, 118-126 (2000).

- 7) A.S.L. Derycke and P.A.M. de Witte, Liposomes for photodynamic therapy, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, 17-30 (2004).
- 8) S. Simoes, J.N. Moreira, C. Fonseca, N. Duzgunes and M.C. Pedroso de Lima, On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, 947-965 (2004).
- 9) M.H. Gaber, N.Z. Wu, K. Hong, K.H. Shi, M.W. Dewhirst, and D. Papahadjopoulos, Thermosensitive liposomes: extravasation and release of contents in tumor microvascular networks, *Int. J. Radiat. Oncology, Biology, Physics*, **36**, 1177-1187 (1996).
- 10) G. Kong, G. Anyarambhatla, W.P. Petros, R.D. Braun, O.M. Colvin, D. Needham and M.W. Dewhirst, Efficacy of liposomes and hyperthermia in a human tumor xenograft model: importance of triggered drug release, *Cancer Res.*, **60**, 6950-6957 (2000).
- 11) A. Hillery, Heat-sensitive liposomes for tumour targeting, *Drug Discov. Today*, **6**, 224-225 (2001).
- 12) A. Ono, K. Takeuchi, A. Sukenari, T. Suzuki, I. Adachi and M. Ueno, Reconsideration of drug release from temperature-sensitive liposomes, *Bio. Pharm. Bull.*, **25**, 97-133 (2002).
- 13) W. Lin, M.C. Garnett, M.C. Davies, F. Bignotti, P. Ferruti, S.S. Davis and L. Illum, Preparation of surface-modified albumin nanospheres, *Biomaterials*, **18**, 559-565 (1997).
- 14) S.A. Johnstone, D. Masin, L. Mayer and M.B. Bally, Surface-associated serum proteins inhibit the uptake of phosphatidylserine and poly(ethylene glycol) liposomes by mouse macrophages, *Bioch. Biophys. Acta*, **1513**, 25-37 (2001).
- 15) M.C. Woodle, Controlling liposome blood clearance by surfacegrafted polymers, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **32**, 139-152 (1998).
- 16) P. Vermette and L. Meagher, Interactions of phospholipid- and poly(ethylene glycol)-modified surfaces with biological systems: relation to physico-chemical properties and mechanisms, *Colloids and Surfaces*, **28**, 153-198 (2003).
- 17) J.L. Rigaud, M.T. Paternostre and A. Bluzat, Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 2. Incorporation of the light-driven proton pump bacteriorhodopsin, *Biochemistry*, **27**, 2677-2688 (1988).
- 18) D.C. Jonathan and M.G.T. Kevin, Factors affecting the size distribution of liposomes produced by freeze-thaw extrusion, *Int. J. Pharm.*, **188**, 87-95 (1999).
- 19) K. Kono, R. Nakai, K. Morimoto and T. Takagishi, Thermosensitive polymer-modified liposomes that release contents around physiological temperature, *Bioch. Biophys. Acta*, **1416**, 239-250 (1999).
- 20) J.C. Kim, S.K. Bae and J.D. Kim, Temperature-sensitivity of liposomal lipid bilayers mixed with poly (n-isopropylacrylamide-co-acrylic acid), *J. Biochem.*, **121**, 15-19 (1997).
- 21) G. Gregoriadis, Liposome technology 2nd edition: Liposome preparation and related techniques, vol. I, CRS press, london, England, pp.123-139 (1993).
- 22) 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 amphipathic poly(ethylene glycol)-containing liposomes, *Bioch. Biophys. Acta*, **1190**, 99-107 (1994).
- 23) H.S. Jeon, S.K. Lee and Y.W.J. Choi, Physical characteristics of sterically stabilized liposomes after lyophilization and rehydration, *Kor. Pharm. Sci.*, **31**, 4-473 (2001).
- 24) P. Walde and S. Ichikawa, Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications, *Biom. Eng.*, **18**, 143-177 (2001).