

## 경구용 약물수송체로서의 팔미토일 치환 다당체로 코팅된 리포솜

한양희\* · 이정우 · 최영욱<sup>†</sup>

\*(주)보령제약 중앙연구소, 중앙대학교 약학대학

(1994년 2월 31일 접수)

### Palmitoylpolysaccharide-coated Liposomes As A Potential Oral Drug Carrier

Yang Hee Hahn\*, Jung Woo Yi, and Young Wook Choi<sup>†</sup>

\*Boryung Pharm. Co., Ltd., Central Research Institute  
College of Pharmacy, Chung-Ang University

(Received February 31, 1994)

Applications of liposomes as a drug carrier for the oral delivery of poorly-absorbable macromolecular drugs have been limited, because of their instability in gastrointestinal environments including pH, bile salts, and digestive enzymes. Two polysaccharides, dextran(DX) and pullulan(PL), were introduced to the preformed liposomes in order to enhance the stability. Palmitoyl derivatives of polysaccharides, palmitoyldextran(PalDX) and palmitoylpullulan(PalPL), were synthesized and introduced to the liposomes during preparation for the same purpose of stability. The effects of these polysaccharides coating were evaluated basically by physical properties of particle size distribution and optical microscopy, then compared with uncoated liposomes by the observations of both in vitro stability and in vivo absorption characteristics. The geometric mean diameters of polysaccharide-coated liposomes were greater than that of uncoated liposome, showing the outermost polysaccharide-coated layer under the optical microscopy. In vitro stabilities of uncoated or polysaccharides-coated liposomes were measured by turbidity changes in various pH buffer solutions containing sodium choleate as bile salts. While uncoated liposome was very sensitive to bile salts, polysaccharides-coated liposomes were stable in relatively higher concentrations of sodium choleate, giving the results of better stability of PalDX- and PalPL-coated liposomes than that of DX- and PL-coated liposomes. After liposomal encapsulation of acyclovir(ACV), an antiviral agent as a model drug, it has been administered orally to rats as dose of ACV 40 mg/kg. Plasma concentrations of ACV were assayed by HPLC and analyzed by model-independent pharmacokinetics. Pharmacokinetic parameters of Cmax, tmax, and [AUC] have been compared.

**Keywords** - Liposomes, Oral carrier, Palmitoylpolysaccharides, Bile salts, Stability, Absorption.

리포솜은 구조적으로 지질 이중층을 가진다는 점<sup>1,2)</sup>에서 생체막 모델로서 뿐만 아니라, 지용성 약물의 분배계수<sup>3,4)</sup> 및 세포내로의 물질이동 현상<sup>5,6)</sup>을 연구하는 생체막 모델로서 뿐만 아니라, 지용성 약물이나 수용성 약물을 모두 리포솜 소포체내에 동시에 봉입할 수 있는 장점과 생체적 합성을 가지는 효과적인

약물수송체로서 잘 알려져 있다. 경구용 약물수송체로서의 리포솜의 응용을 살펴보면 1979년 Hashimoto와 Kawada<sup>7)</sup>는 음으로 하전된 리포솜내에 인슐린을 봉입시킨 후 alloxan으로 당뇨를 유발한 랫트에 경구투여하여 혈중 포도당량을 감소시키는 등, 경구투여시 위장관내의 pH, 소화 효소, 소화액

<sup>†</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

등에 의해 분해 및 변성되거나, 잘 흡수되지 않는 항암제, 호르몬제, 펩타이드 약물을 리포솜내에 봉입시켜 투여함으로써<sup>8-11)</sup> 생체이용율을 높이고자 하는 연구가 그 동안 활발히 진행되어 왔다. 그러나 리포솜 역시 위장관내의 생리환경에 불안정하여 봉입된 약물을 충분히 보호해 주지 못하여 경구용 약물수송체로서의 응용에 많은 어려움이 있었고, 따라서 위장관내에서의 물리적 안정성에 대한 개선책이 문제점으로 지적되어 왔다. 위장관내에서 리포솜의 안정성에 영향을 미치는 인자로는 pH, 소화액에 관여하는 효소 및 소화액 등을 들 수 있으며 이 중에서도 담즙액과 pancreatic lipase에 의한 영향이 가장 큰 것으로 보고<sup>12-14)</sup>되어 왔다. Pancreatic lipase는 인지질을 유리지방산으로 분해시켜 리포솜의 소포체 형성을 파괴하는 것으로 알려져 있으며, 담즙액의 경우 담즙산의 주성분인 cholic acid를 비롯하여 taurocholic acid, glycocholic acid 및 deoxycholic acid등과 그의 염들이 복합적으로 작용하여 인지질을 유화시키므로써 리포솜의 구조적 완전성 (structural integrity)을 파괴하는 것으로 알려져 있다.

리포솜의 물리적 안정성을 증가시키는 방법은 여러가지가 제시되는데,<sup>15-20)</sup> 리포솜의 구조적 완전성을 높이기 위해 콜레스테롤과 같은 membrane-spanning lipids를 가하는 등의 인지질의 조성을 조절하는 방법, 인지질의 친수부에 전하를 띠도록 하여 그 외곽을 반대전하의 고분자 물질 등으로 둘러싸는 방법, 인지질의 소수성 부위들이 서로 결합되도록 유도하는 방법, 고분자를 이용하여 인지질과 network를 형성하도록 하는 방법 등 많은 연구가 활발히 진행되어 오고 있다. 이 중 고분자를 이용하는 방법중에서 수용성 고분자, 특히 경구로 투여할 때 인체에 해를 미치지 않는 다당체를 선택하여 리포솜 표면에 흡착코팅시키는 방법이 있다. 또한 흡착코팅방법외에 리포솜의 성질을 변화시키지 않으면서 외부 환경으로부터 리포솜을 충분히 보호하기 위한 새로운 방향의 코팅방법이 모색되는데, 한 예로서 다당체에 소수성기를 화학적으로 결합시켜<sup>21)</sup> 이 소수성기가 리포솜의 지질 이중층 사이에 삽입되어 마치 말뚝과 같은 고정기(anchor group) 역할을 하게 하므로써, 리포솜 표면을 더욱 견고히 코팅하는

방법이 있다.

본 연구에서는 리포솜을 경구용 약물수송체로서 응용할 목적으로 위장관내의 안정성을 개선하고자 수용성 다당체인 pulluland (PL)과 dextran (DX)을 선택하여 리포솜의 표면에 흡착시켰고, 별도로 palmitoyldextran (PalDX)과 palmitoylpullulan (PalPL)을 합성하여 이를 리포솜의 코팅물질로 사용하였다. 담즙산염에 의해 리포솜 소포체가 파괴될 때 가시부에서의 흡광도(탁도)가 감소되는 점에 착안하여, 리포솜을 sodium choleate용액과 *in vitro*상에서 혼합하여 시간의 경과에 따른 탁도의 변화를 측정하므로써 위장관내에서의 안정성을 상대적으로 평가하였다. 한편 리포솜내에 약물을 봉입하여 비코팅 및 코팅 리포솜이 약물의 흡수에 미치는 영향을 살펴보고자, acyclovir (ACV)를 랫트에 경구투여한 뒤 혈중농도를 관찰하였다. ACV는 헤르페스 바이러스 DNA polymerase의 특이적 억제제로 작용하므로써 항바이러스 효과를 가지는 것으로<sup>22-25)</sup> 알려져 있고, 경구로서는 초기 및 재발성 생식기 포진에 유효하며 경구적으로 투여될 때에 생체이용율이 15~30%로 보고되고 있는데, 이는 위장관내에서의 저조한 흡수에 기인하는 것으로 해석되고 있다.

이상의 연구로부터 위장관내에서 비교적 안정하며 약물의 흡수를 높여주는 고분자 코팅리포솜을 얻을 수 있었으며, 향후 경구용 약물수송체로서 응용할 수 있으리라 사료되어 이를 보고하고자 한다.

## 실험방법

### 재료 및 기기

Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC)과 sodium choleate, DX는 Sigma사 (St. Louis, MO)로부터 palmitoyl chloride는 Fluka사, PL은 Haya-shibara사 (Tokyo, Japan)로부터, ACV분말은 (주) 삼천리제약제품 (Lot No. 9256)을 사용하였으며 이외의 일반시약은 일급을 사용하였다. 기기로는 HPLC (Gilson 305 system, France), UV/Vis spectrophotometer (Model UV 240, Shimadzu, Japan), FT-IR spectrometer (Model Magna-750, Nicolet, U.S.A.), <sup>1</sup>H-NMR spectrometer (Model AC-200F, Bruker, Germany, 200 MHz), 입도분석기 (Master

Sizer/E, Malvern Instr., U.K.), 광학현미경 (Model BH-2, Olympus, Japan) 등을 사용하였다.

#### 리포솜의 제조

비코팅 리포솜-인지질로서 DMPC를 사용하여 제조방법은 Bangham 등의 방법<sup>1)</sup>에 따라 다중층의 리포솜을 제조하였다. 간략히 기술하면, DMPC 6.8 mg을 정밀히 달아 클로로포름에 녹이고 이를 회전감압농축기로 감압증류하여 둥근 플라스크 기벽에 얇은 인지질 피막을 제조하고, 질소가스를 통과시켜 잔류하는 클로로포름을 완전히 제거한다. 건조된 인지질 피막을 incubator에서 하룻밤 방치한 후, 40°C 수욕상에서 인지질 피막에 pH완충액 20 ml를 가하고 5분간 vortex 혼합하여 리포솜(비코팅 리포솜으로 약함)을 제조하였다. 실험에 사용된 완충액은 pH 5.6 및 pH 6.8로서 MacIlvaine의 방법<sup>2)</sup>에 따라 구연산염/인산염 완충액을 만들어 사용하였다.

PL 또는 DX으로 코팅된 리포솜-DMPC의 양을 2배로 하여 앞에서와 같은 방법으로 먼저 비코팅 리포솜을 제조하고, 이것을 수용성 다당체 고분자인 PL의 1%용액 또는 DX 1%용액과 각각 동량 혼합하고 1분간 vortex 혼합한 후 실온에서 24시간 방치하여 흡착코팅의 원리에 의해 PL 또는 DX코팅 리포솜을 제조하였다. 이때 리포솜 제조에 사용된 완충액과 다당체용액의 완충액은 동일한 pH완충액을 사용하여 비코팅 리포솜과 pH의 차이가 없게 하였다.

PalDX 및 PalPL으로 코팅된 리포솜-Schotten-Baumann 반응원리<sup>27)</sup>에 따라 DX 또는 PL의 hydroxy기에 palmitoyl기를 ester 결합시켜<sup>17,20)</sup> PalDX 및 PalPL을 합성하였다. 무수 formamide를 용매로 하여 DX 또는 PL을 현탁시키고 70~80°C로 가온하여 완전히 녹인다. 따로 formamide, palmitoyl chloride, pyridine (10 : 4 : 30)을 혼합한 후 반응액에서 서서히 추가한다. 온도를 2시간 이상 계속 70~80°C로 유지시킨 후 상온까지 식힌다. 반응액을 반투막 안에 넣고 48시간 이상 투석시키고 반투막 안의 물질을 여과, 세척 및 건조하여 합성물을 얻는다.

PalDX-<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>, δ = ppm) : 0.85 (t, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.27 (s, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CH<sub>3</sub>), 2.41 (t, -CH<sub>2</sub>-COO), 3.1~5.5 (m, dextran), IR

(KBr, cm<sup>-1</sup>) : 3406.8 (aro, C-OH), 2927.2, 2855.2 (ali, C-H), 1753.6 (ali, C-H), 1753.6 (ester-C=O), 724.8, 1580.8, 1552.0, 1471.3, 1268.3, 1050.

PalPL-<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>, δ = ppm) : 0.88 (t, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.25 (s, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 2.33 (t, -CH<sub>2</sub>-COO), 4.4~5.7 (m, pullulan), IR(KBr, cm<sup>-1</sup>) 3400.3 (aro, C-OH), 2923.5, 2855.2 (ali, C-H), 1748.6 (ester-C=O), 1724.8, 1580.0, 1471.3, 1260.3, 1050.

다음에 DMPC 6.8 mg과 PalDX 또는 PalPL을 각각 6.8 mg을 둥근 플라스크에 넣고 클로로포름에 녹인 후 비코팅 리포솜의 제조방법과 동일하게 제조하여, 소수성 고정기를 가진 PalDX 또는 PalPL 코팅 리포솜을 만들었다.

#### 물리적 특성 관찰

입도분석-제조한 비코팅 리포솜, DX코팅 리포솜, PL코팅 리포솜, PalDX코팅 리포솜 및 PalPL코팅 리포솜 각각 20 ml씩을 동일 완충액으로 희석하여 50 ml로 하고, 상온에서 약 200 rpm의 속도로 교반하면서 focal length 100 mm, beam length 2.4 mm 조건하에서 레이저 입도분석기를 사용하여 입도분포 및 입자경을 측정하였다.

광학현미경-비코팅 리포솜 및 PL코팅 리포솜을 각각 제조한 후, 이를 1,750 g로 원심분리하여 상정액을 제거하고 얻어진 침전물을 1,000배율의 광학현미경으로 관찰하였다.

#### 담즙산염에 대한 *in vitro* 안정성

리포솜 제조시 가한 완충액과 동일 pH완충액에 sodium choleate를 녹여 각각의 농도가 0.05, 0.07, 0.10, 0.15, 0.20%가 되도록 한 후, 동량의 미리 제조한 리포솜과 혼합하고 정해진 시간마다 UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 가시부 400 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 측정된 흡광도는 식 (1)에 의하여 상대적 탁도 (relative turbidity)를 구하였다. 이때 sodium choleate용액은 용해된 상태에서 미황색의 색을 띠며 그 자체가 흡광도를 나타내므로, 초기 및 각 측정시간에서의 sodium choleate의 흡광도를 각각 보정하였다.

$$\text{Relative Turbidity} = T_t - B_t / T_0 - B_0 \dots (1)$$

여기서 T<sub>t</sub>는 담즙산염 용액과 리포솜용액의 혼합적

후의 흡광도를,  $T_t$ 는 혼합후  $t$ 시간후의 흡광도를,  $B_0$ 는 초기의 담즙산염 용액의 흡광도를,  $B_t$ 는 혼합후  $t$ 시간 후의 담즙산염 용액의 흡광도를 나타낸다.

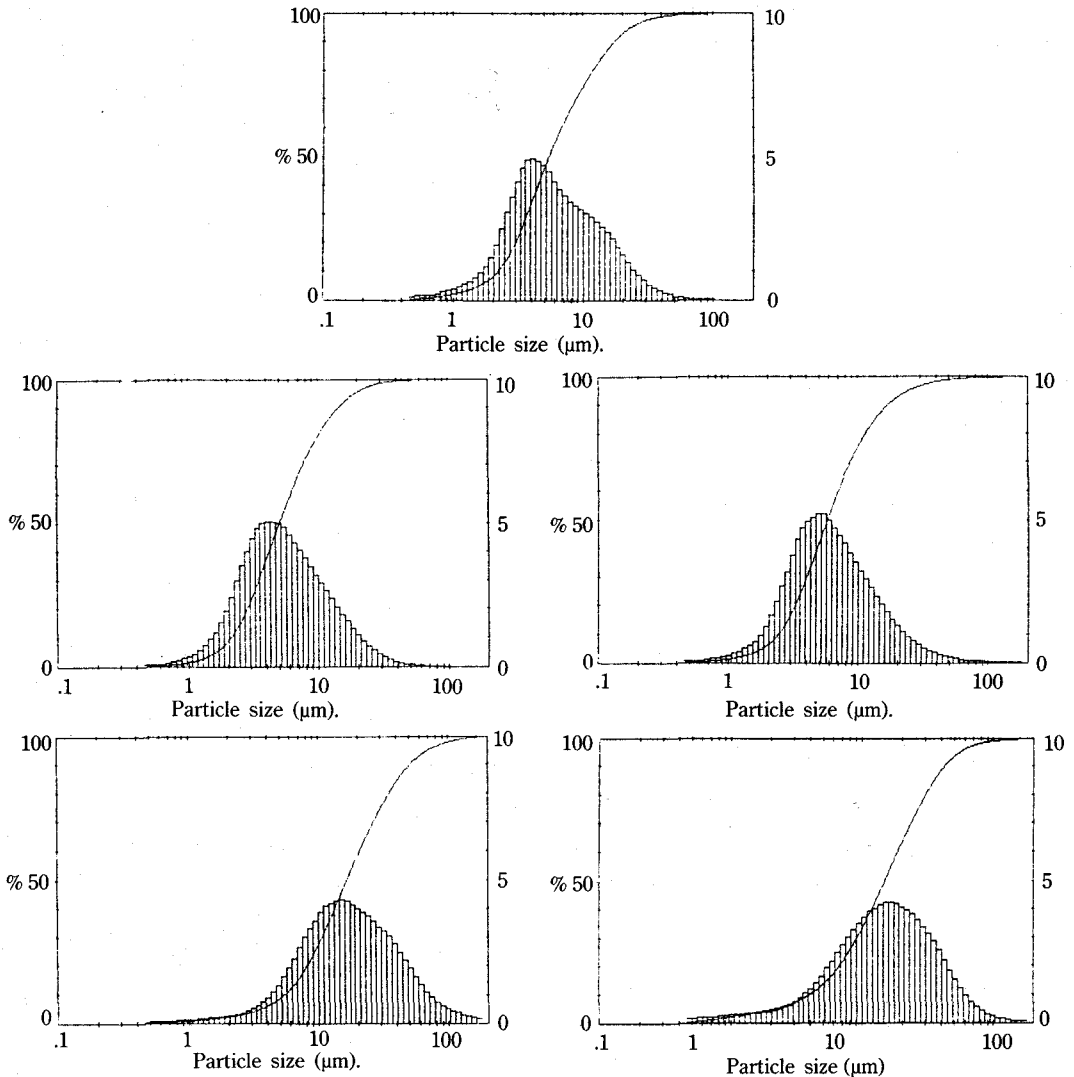
**In Vivo 흡수특성**

**실험동물**— 생후 6주령의 Sprague Dawley계 음성 랫트를 물과 사료를 자유로이 공급하며 3일 이상 실험실조건에서 사육한 후 외견상 건강한 체중 180~220 g 범위의 것을 선별하여 실험에 사용하였다.

**약물투여**— 랫트를 1군당 3마리로 하여 24시간

절식시킨 후 체중 100 g당 ACV 4 mg/ml 용액을 1 ml씩 경구투여하였으며 비코팅리포솜 및 코팅리포솜을 제조할 때 ACV를 4 mg/ml 농도로 함유하는 완충액을 사용하여 ACV를 리포솜내에 봉입하였고, 봉입되지 않은 ACV를 더 이상 정제분리하지 않고 그대로 동량의 약물량을 각각 경구투여하였다.

**채혈 및 분석**— 약물 투여후 정해진 시간마다 heparin처리한 주사기를 사용하여 랫트의 경정맥에 미리 삽입시켜 놓은 silicon catheter (Silastic<sup>®</sup> tubing : 0.02 inch i.d., 0.037 inch o.d.)로 부터 혈액



**Figure 1**—Size distribution of various liposomes. Key: A; Uncoated, B; DX-coated, C; PL-coated, D; PalDX-coated, E; PalPL-coated

0.2 ml씩을 채취하여 10분간 원심분리하여 혈장을 얻었다. 여기에 10% HClO<sub>4</sub> 용액을 동량 가하여 단백질을 응고시키고 5분간 vortex 혼합한 뒤, 원심분리하고 상정액을 0.45 μm 밀리포아 필터로 여과하여, 혈장중의 ACV를 HPLC로 정량하였다. HPLC 분석에 사용된 조건으로 컬럼은 Microsorb-MV<sup>tm</sup> (C<sub>18</sub>, 5 μm), 이동상은 메탄올/물 (5 : 95 v/v %), 유속은 0.8 ml/min, 감도는 0.005 AUFS, UV 검출파장은 250 nm, 주입량은 20 μl 이었다.

## 결과 및 고찰

### 물리적 특성

입도분포-비코팅리포솜 및 각 고분자 코팅된 리포솜의 입도분석결과는 Fig. 1 및 Table I과 같다. Parameter중 volume-surface mean diameter ( $d_{vs}$ ) 및 weight-moment diameter ( $d_{wm}$ )는 Edmundson의 평균 입자크기를 나타내는 일반식<sup>28)</sup>으로부터  $p=1$ ,  $f=2$  또는 3을 대입하므로써 산출하였다. 각 리포솜들의 입자경에 따른 빈도분포곡선은 대수정규분포를 보였으며, 이것을 누적확률대수 plot했을 때 직선성이 성립됨을 확인하여 그로부터 50% 확률에 해당하는 입자경을 얻으므로써 geometric mean diameter ( $d_{geo}$ )를 구할 수 있었다. 또한 geometric standard deviation ( $\sigma_g$ )은 Hatch-Choate식<sup>29)</sup> ( $\log d_{vs} = \log d_{geo} - 1.151 \log^2 \sigma_g$ )으로 부터 구하였다.

각각의 입자경을 비교하여 보면 비코팅 리포솜의 입자경과 DX코팅 리포솜 및 PL코팅 리포솜의 입자경은 다소의 차이를 보였으며, 이는 교반속도 및 제조상의 차이에 기인하리라 생각된다. 반면에 PalDX 및 PalPL코팅 리포솜은  $d_{vs}$ ,  $d_{geo}$ ,  $d_{wm}$  모두 비코팅 리포솜에 비해 1.8배에서 3.0배까지 증가하였다. 이

는 DX 또는 PL코팅 리포솜에서의 코팅층은 단순한 흡착코팅층인데 반하여, PalDX 및 PalPL코팅 리포솜은 리포솜 소포체 형성단계에서 부터 다당체가 관여되어 소수성 고정기가 지질이 중층내로 끼어 들어 가면서 소포체가 더욱 커진 것으로 사료된다.

광학현미경적 관찰-각 리포솜을 1000배 배율의 광학현미경으로 관찰하였을 때, 그결과는 Fig. 2와 같다. 우선 비코팅 리포솜은 매우 둥근 구의 형태임을 알 수 있었으며 크기 또한 입도 분포결과와 같이 매우 작게 관찰되었다. 이때 현미경 시야에선 지질이중층이 동심원을 그리며 중복되어 있는 것을 관찰할 수 있었으나, 이들이 고정되어 있지 않고 계속 유동적이어서 현미경 사진으로 찍었을 때 그 초점이 불분명하게 나타났다. 또한 DX 및 PL코팅 리포솜은 그의 외곽에 얇은 코팅층을 관측할 수 있었고, PalDX 및 PalPL코팅 리포솜은 비코팅 리포솜 만큼 매우 둥근 구의 모습은 나타내지 않았고 표면에는 비코팅 리포솜의 lamellae와는 달리 코팅물질에 의한 불규칙한 주름을 볼 수 있었다.

### 리포솜의 In Vitro 안정성

Sodium choleate 용액에서의 안정성-담즙산염들의 혼합체인 sodium choleate 용액에서의 비코팅 리포솜 및 고분자코팅 리포솜의 경시적 탁도변화를 보면 전반적으로 고분자 코팅 리포솜이 비코팅 리포솜보다 항상 안정된 결과를 보였다 (Fig. 3, 4). pH 5.6 완충액에서 고분자 코팅 리포솜의 경우 담즙산염용액 0.05~0.1%농도에서 5시간까지 초기의 탁도를 거의 그대로 유지하여 대부분의 소포체가 파괴되지 않음을 알 수 있었으나, 비코팅 리포솜의 경우에는 90분 이후 계속적인 탁도 감소를 나타내어 리포솜 소포체가 상대적으로 불안정하여 서서히 파괴됨을 알 수 있었다. 0.15 및 0.2%농도에서는 비

Table I- Particle Size Parameters for Uncoated Liposome and Polysaccharide-coated liposomes

Parameter	Uncoated	DX-coated	PL-coated	PalDX-coated	PalPL-coated
geometric mean diameter ( $d_{geo}$ , μm)	5.37	5.00	5.72	16.43	14.79
volume-surface mean diameter ( $d_{vs}$ , μm)	3.95	3.87	4.37	9.49	6.95
weight moment mean diameter ( $d_{wm}$ , μm)	8.23	7.02	8.73	23.91	20.10
specific surface area <sup>a)</sup> (m <sup>2</sup> /cc)	1.52	1.55	1.37	0.63	0.86
span <sup>b)</sup>	2.81	2.43	2.55	2.74	2.56
geometric standard deviation ( $\sigma_g$ )	1.41	1.37	1.38	1.58	1.71

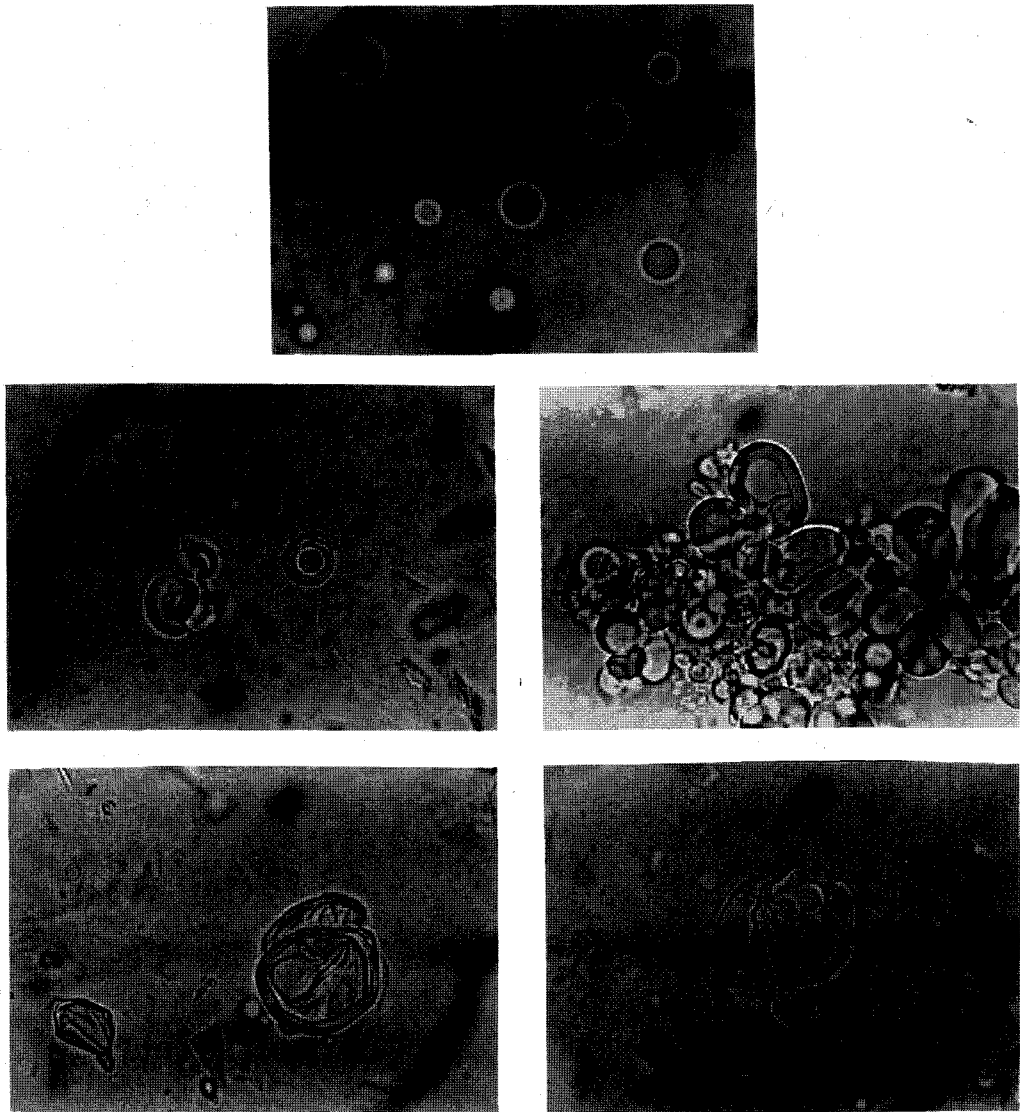
<sup>a)</sup>specific surface area was calculated as  $6.0/d_{vs}$ .

<sup>b)</sup>span was calculated as  $(d_{90} - d_{10})/d_{geo}$ .

코팅 리포솜은 혼합 즉시 리포솜의 소포체가 파괴되면서 투명한 용액으로 변하였으나, 고분자코팅 리포솜은 0.15%에서는 계속 안정된 결과를 보였고 0.2%에서는 DX 및 PL코팅 리포솜 역시 비코팅 리포솜의 경우와 마찬가지로 10분 이내에 급격히 탁도를 소실했다가 이후 소포체의 재형성에 의한 탁도상승을 보였으나, 초기의 급격한 탁도 감소로 이미 약물수송체로서의 기능을 상실하였다고 사료된다. 반면에 소수성 고정기를 가진 다당체로 코팅한 리

포솜은 담즙산염 용액 0.2%에서 최기에 약간의 탁도감소만 보일 뿐 0.8이상의 상대적 탁도를 계속 유지하였다.

pH 6.8 완충액에서의 리포솜의 안정성을 비교하여 보면, 비코팅 리포솜은 담즙산염 0.07%에서 초기에 약간의 탁도 감소를 보였고, 0.1% 이상의 농도범위에서는 담즙산염용액과 혼합 즉시 대부분의 소포체가 파괴되어 탁도가 완전히 소실됨을 알 수 있었다. DX코팅 리포솜은 0.07~0.1% sodium cho-



**Figure 2**—Optical photomicrographs of various liposomes. Key : A ; Uncoated, B ; DX-coated, C ; PL-coated, D ; PalDX-coated, E ; PalPL-coated

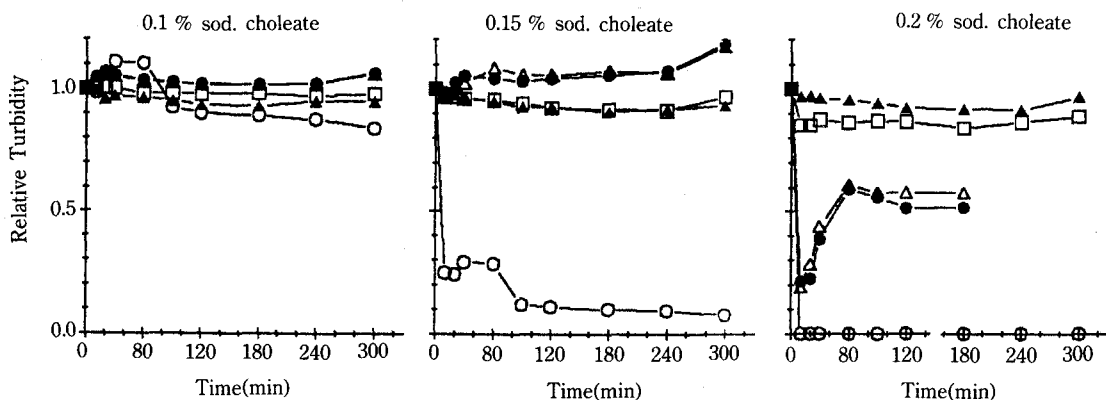


Figure 3—Relative turbidities of liposomes against different sodium choleate concentrations in pH 5.6 buffer solution. Key : ○ ; Uncoated, ● ; DX-coated, △ ; PL-coated, ▲ ; PalDX-coated, □ ; PalPL-coated

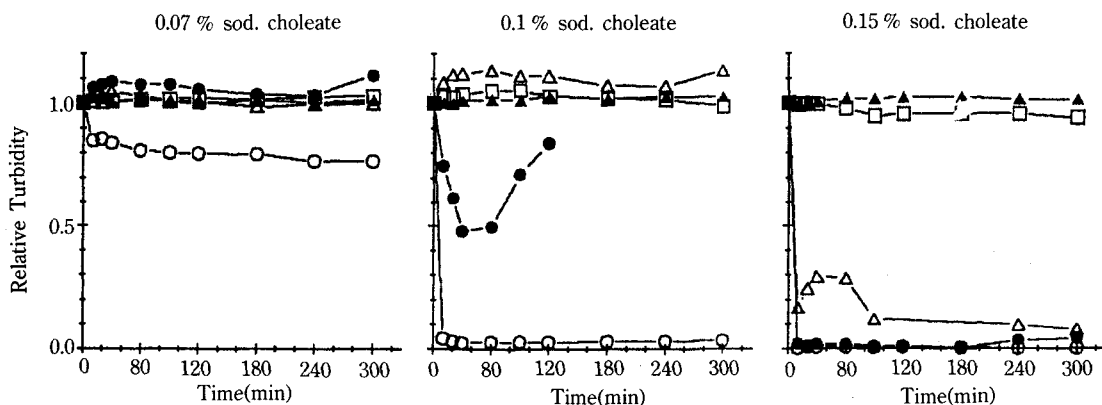


Figure 4—Relative turbidities of liposomes against different sodium choleate concentrations in pH 6.8 buffer solution. Key : ○ ; Uncoated, ● ; DX-coated, △ ; PL-coated, ▲ ; PalDX-coated, □ ; PalPL-coated

leate 용액에서 초기의 탁도를 그대로 유지하였으나, 0.15% 이상에서는 초기 10분 이내에 빠른 속도로 탁도가 감소되었다. PL코팅 리포솜은 0.07%에서 계속 탁도를 유지하였고, 0.1%에서는 초기 30분까지 급속한 탁도의 감소를 나타냈고, 0.15% 이상에서는 혼합직후 완전히 탁도를 소실하였다. 반면에 PalDX 및 PalPL코팅 리포솜은 0.05%에서 0.2%까지의 전 농도범위에 걸쳐 초기의 탁도를 거의 그대로 유지하였다.

이상의 결과로 부터 다당체로 코팅한 리포솜이 비코팅 리포솜에 비해 담즙산염에 대해 보다 안정함을 알 수 있었으나, 흡착코팅방법에 의한 DX 및 PL코팅 리포솜은 담즙산염이 고농도로 갈수록 충분히 안정화시켜 주지 못한 반면에 소수성 고정기

를 가진 다당체로 코팅한 리포솜은 전 농도범위에 걸쳐 안정한 결과를 나타냈다.

담즙산염 농도에 따른 상대적 안정성—DX 및 PL코팅 리포솜은 0.15%까지 비교적 안정된 탁도를 계속 유지하였으나, 비코팅 리포솜은 0.05%부터 상대적 탁도가 약간 감소하기 시작하여 담즙산염용액의 농도가 증가함에 따라 계속적인 탁도의 감소를 보였으며, 특히 0.15% 용액에서는 완전히 탁도가 소실되었다. 한편 pH 6.8 완충액에서 DX 및 PL코팅 리포솜은 0.11%까지는 안정하였으나, 그 이후 농도에 비례하여 탁도가 감소하였다. 비코팅리포솜은 0.05~0.11% 담즙산염 용액 농도범위에서 비례적인 상대적 탁도 감소를 보이다가, 0.12% 이상에서는 거의 완전한 탁도 소실을 볼 수 있었다. 그러나, 소수성

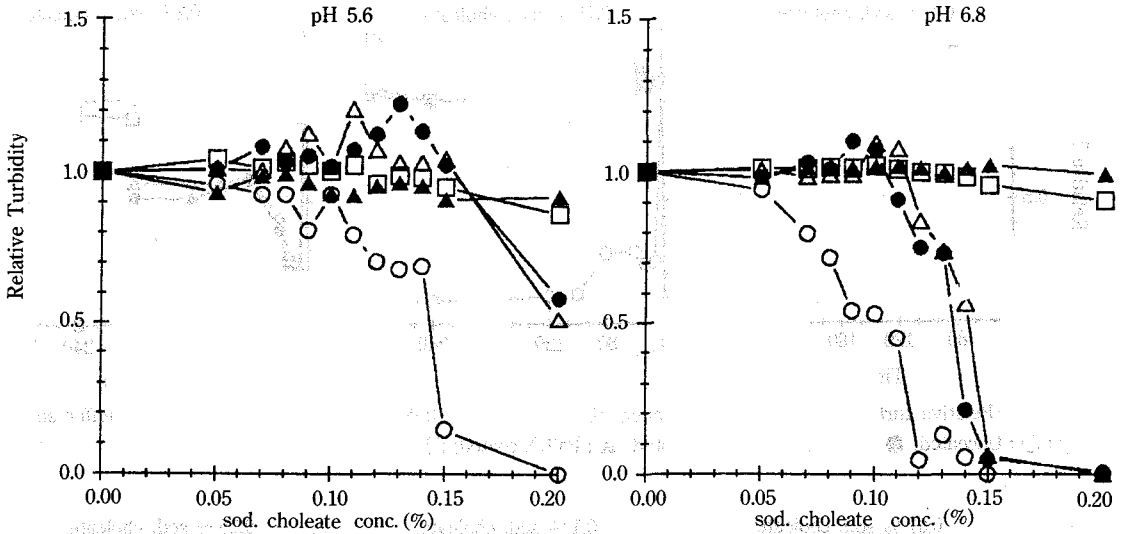


Figure 5—Turbidity changes of liposomes against sodium choleate concentrations after 3 hours in pH 5.6 and 6.8 buffer solutions. Key : ○ ; Uncoated, ● ; DX-coated, △ ; PL-coated, ▲ ; PalDX-coated, □ ; PalPL-coated

고정기를 가진 다당체로 코팅한 리포솜은 두 종류 모두 pH 5.6 및 6.8 담즙산염 용액에서 0.2%농도에서도 안정함을 알 수 있었다.

**In Vivo 흡수특성**

**랫트 혈장중의 ACV농도변화**—Acyclovir를 봉입시킨 비코팅 리포솜과 고분자코팅 리포솜 각각을 랫트에 경구투여한 후의 혈장중 ACV농도변화는 Fig. 6과 같으며, 전반적으로 용액에 비해 비코팅 리포솜 및 고분자코팅 리포솜에 봉입된 ACV의 혈장중의 농도가 높게 나타났다. 각각 얻어진 data를 모델 비의존적방법으로  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ 를 구하고 사다리꼴 공식에 따라 AUC를 산출한 결과는 Table II와 같다. 이때  $\lambda_{last}$ 는 평균혈장농도의 terminal phase의 직선적으로 감소하는 3개 이상의 점들을 연결하는 회귀 방정식으로부터 구하였다. AUC를 비교하여 보면, 모든 리포솜시스템들이 용액에 비하여 약 1.2~1.4 배의 유의성 있는 ( $p < 0.05$ ) 증가를 보였으며,  $C_{max}$  역시 리포솜 시스템들이 용액에 비하여 높게 나타나 리포솜에 의한 흡수촉진 작용을 예측할 수 있었다. **다당체 코팅이 ACV의 흡수에 미치는 영향**—다당체로 코팅한 리포솜의 흡수를 살펴보면 DX 및 PL 코팅 리포솜은 비코팅 리포솜에 비해 1.4배의  $C_{max}$ 의 증가를 나타냈으나 AUC를 비교하면 95% 유의수준에서 유의성있는 차이를 나타내지 않았다.

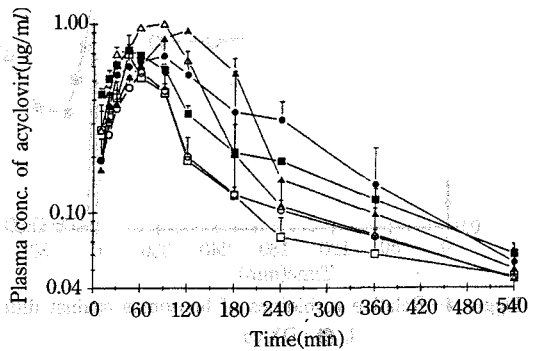


Figure 6—Plasma concentrations of acyclovir after an oral administration to rats as dose of 10 mg/kg in six formulations. Key : ○ ; solution, ● ; uncoated liposome, △ ; DX-coated liposome, ▲ ; PL-coated liposome, □ ; PalDX-coated liposome, ■ ; PalPL-coated liposome

PalDX 및 PalPL코팅 리포솜 역시 비코팅 리포솜과 유의성있는 차이를 ( $p < 0.05$ ) 나타내지 않았으나, 비코팅 리포솜에 비하여 AUC는 약 10% 정도의 감소를,  $C_{max}$ 는 비슷한 결과를 나타냈다. 따라서 소수성 고정기를 가진 다당체로 코팅한 리포솜들은 palmitoyl기가 지질이중층 사이로 삽입되므로서 리포솜의 형태와 표면이 변화함에 따라 리포솜의 기본성질은 유지하고 있으나 비코팅 리포솜에 비해 충분한 흡수촉진 작용은 갖지 못하는 것으로 사료된다. 그러나 *in vitro* 안정성실험과 관련지어 살펴볼



**Table II**—Pharmacokinetic Parameters of Acyclovir after an Oral Administration to Rats as Dose of 10 mg/kg in Different Formulations of Solution, Uncoated Liposome, and Polysaccharide-coated Liposomes

Parameter	Solution	Uncoated	DX-coated	PL-coated	PalDX-coated	PalPL-coated
$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	0.551	0.675	1.004	0.921	0.689	0.723
$t_{max}$ (min)	60	90	90	120	45	45
[AUC] <sub>0-12h</sub> (mg·min/ml)	127.85 ± 4.46	175.92 ± 19.52*	180.06 ± 7.92**	194.58 ± 5.97**	149.82 ± 5.84*	175.49 ± 7.21**
$\lambda_{1/2}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0.00119	0.00252	0.00126	0.00160	0.00068	0.00126

AUC is expressed as mean ± S.E. (n=3-4).

\*significant compared to solution (p<0.05).

\*\*significant compared to solution (p<0.01).

때 다소 흡수율은 떨어지지만 담즙액 및 각 소화효소 등 위장관내의 환경으로부터 충분히 약물을 보호할 수 있는 PalDX 및 PalPL코팅 리포솜이 경구 약물수송체로 사용하기에 보다 적합하리라 사료된다. 이상의 흡수실험을 토대로 앞으로 위장관내에서 불안정한 약물이나 흡수되지 않는 펩타이드 약물을 선택할 때, 약물을 충분히 보호하기도 하고 리포솜 자체의 안정성도 보장할 수 있으면서, 동시에 리포솜 자체의 흡수특이성을 유지할 수 있는 고분자 코팅 리포솜의 응용이 가능하리라 기대되며 앞으로 이에 대한 보다 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

## 결 론

Bangham 등의 방법에 따라 multilamellar vesicles를 얻을 수 있었고 DX, PL 및 PalDX, PalPL을 이용하여 고분자 코팅된 리포솜을 얻을 수 있었다. 제조된 리포솜을 광학현미경으로 관찰했을 때 리포솜은 매우 둥근 구의 형태를, DX 및 PL 코팅 리포솜의 외곽에는 얇은 다당체 코팅층을 볼 수 있었으며, PalDX, PalPL 코팅 리포솜은 외곽의 코팅층에 불규칙한 주름과 함께 전체적으로 구형을 나타내지 않았다. 또한 레이저 입도분석기를 통해 리포솜의 입도를 조사한 결과, 평균입자의 크기는 소수성고정기를 가진 다당체로 코팅한 리포솜이 2배 이상 증가하여 흡착코팅에 의해 제조된 리포솜과는 다른 양상의 리포솜임을 확인할 수 있었다. 담즙산염의 혼합체인 sodium choleate용액에 대해서 고분자 코팅 리포솜이 비코팅 리포솜에 비해 상대적으로 안정하였으며, 이 중 흡착코팅 리포솜은 고농도의 담즙산염 용액에서는 충분히 안정하지 못한 반면

소수성고정기를 가진 다당체로 코팅한 리포솜은 보다 더 안정함을 관찰할 수 있었다. ACV를 봉입한 리포솜들을 랫트에 경구투여했을 때, 각 리포솜시 스템 용액에 비하여 유의성 있는 생체이용율의 증가를 나타냈는데 이는 리포솜이 생체막과 유사한 구조를 가져 흡수촉진작용에 기인하는 것으로 사료되며, 고분자 코팅리포솜들 역시 다소 형태적으로 변화되긴했으나 리포솜의 기본성질을 가지는 것으로 판단된다. 결론적으로 다당체와 소수성 고정기로 분자수식된 다당체로 리포솜을 코팅하여, 리포솜의 기본성질을 그대로 유지하면서 동시에 위장관내의 주된 분해요인인 담즙산염에 대하여 리포솜을 더욱 안정화 시킬 수 있었으며, 향후 위장관내에서 불안정한 호르몬이나 펩타이드 약물등의 경구투여시 약물수송체로 응용할 수 있으리라 기대된다.

## 감사의 말씀

본 연구는 1993년도 한국과학재단 핵심전문연구비(과제번호: 931-0700-037-2)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다. 원료를 제공해주신 (주)삼천리제약 개발부와 입도분석에 협조해주신 (주)일양약품 중앙연구소 제제연구실에도 감사드리며, 본 논문은 한양회의 약학석사학위(1994년 2월) 논문의 일부로 제출되었음을 밝힌다.

## 문 헌

- 1) A.D. Bangham, M.M. Standish and J.C. Watkins, Diffusion of univalent ion across the la-

- mellae of swollen phospholipids, *J. Mol. Biol.*, **13**, 238-252 (1965).
- 2) N. Weiner, F. Martin and M. Riaz, Liposome as a drug delivery system, *Drug Devel. Ind. Pharm.*, **15**, 1523-1554 (1989).
  - 3) D. Champman, Physicochemical properties of phospholipids and lipid-water systems. In G. Gregoriadis(ed.), *Liposome Technology*, Vol. I, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1984.
  - 4) Y.W. Choi and J.A. Rogers, Characterization of behavior of 2-imidazolines into multilamellar liposomes, *J. Pharm. Sci.*, **80**, 757-760 (1991).
  - 5) Y.W. Choi and J.A. Rogers, The liposome as a model membrane in correlation of partitioning with  $\alpha$ -adrenoceptor against activities, *Pharm. Res.*, **7**, 508-512 (1990).
  - 6) J.A. Rogers, G.V. Betageri, and Y.W. Choi, Solubilization of liposome by weak electrolyte drugs. I. propranolol, *Pharm. Res.*, **7**, 957 (1990).
  - 7) A. Hashimoto and J. Kawada, Effects of oral administration of positively charged insulin liposomes on alloxan diabetic rats, *Endocrinol. Japan*, **26**, 337-344 (1979).
  - 8) E. Mayhew and Y. Rustru, Effect of liposome-entrapped chemotherapeutic agents on mouse primary and metastatic tumors, *Biol. Cell.*, **47**, 81-85 (1983).
  - 9) G. Weismann, H. Korchak, M. Finkelstein, J. Smolen and S. Hoffstein, Uptake of enzyme laden liposomes by animal cells in vitro and in vivo, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **38**, 235-249 (1978).
  - 10) B. Ryman, G.M. Baratt and H.J. Begent, Possible localization of tumors and metastases by liposomes, *Biol. Cell.*, **47**, 71-80 (1983).
  - 11) B.E. Ryman, R.F. Jewkes, K. Jeyashingh, M.P. Osborne, H.M. Patel, V.J. Richardson, M.H.N. Tattersall and D.A. Tyrell, Potential applications of liposomes to therapy, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **308**, 281-307 (1978).
  - 12) R.N. Rowland and J.F. Woodley, The stability of liposomes in vitro to pH, bile salts and pancreatic lipase, *Biochim. Biophys. Acta*, **620**, 400-409 (1980).
  - 13) M.H. Richards and C.R. Grardneer, Effects of bile salts on the structural integrity of liposomes, *Biochim. Biophys. Acta*, **543**, 508-522 (1978).
  - 14) J.A.F. Op Dem Kamp, J.De Gier, and L.L.M. Deenen, Hydrolysis of phosphatidylcholine liposomes by pancreatic phospholipase A<sub>2</sub> at the transition temperature, *Biochim. Biophys. Acta*, **345**, 253-256 (1974).
  - 15) A.E. Gad, G. Elyashiv and N. Rosenberg, The induction of large unilamellar vesicle fusion by cationic polypeptides: the effects of fmannitol, size, charge density and hydrophobicity of the cationic polypeptides, *Biochim. Biophys. Acta*, **860**, 314-324 (1986).
  - 16) M. Takada, T. Yuzuriha, K. Katayame, K. Iwamoto and J. Sunamoto, Increased lung uptake of liposomes coated with polysaccharides, *Biochim. Biophys. Acta*, **802**, 237-244 (1984).
  - 17) J. Moellerfeld, W. Prass, H. Ringsdorf, H. Hamazaki and J. Sunamoto, Improved stability of black lipid membranes by coating with polysaccharide derivatives bearing hydrophobic anchor groups, *Biochim. Biophys. Acta*, **857**, 265-270 (1986).
  - 18) H. Izawa, M. Arakawa, and T. kondo, Disintegration by surfactants of egg yolk phosphatylcholine vesicles stabilized with carbonylmethylchitin, *Biochim. Biophys. Acta*, **855**, 243-249 (1986).
  - 19) A. Walter, C.J. Steer and R. Blumenthal, Polylysine induces pH-dependent fusion of acidic phospholipid vesicles: a model for polycation-induced fusion, *Biochim. Biophys. Acta*, **861**, 319(1986).
  - 20) W. Hartmann and H.J. Galla, Binding of polylysine to charged bilayer membranes molecular organization of a lipid-peptide complex, *Biochim. Biophys. Acta*, **509**, 474-490 (1978).
  - 21) M. Suzuki, T. Mikami, T. Matsumoto, and S. Suzuki, Preparation and antitumor activity of o-palmitoyldextran phosphates, o-palmitoyldextrans, and dextran phosphate, *Carbohydrate Research*, **53**, 223-229 (1977).

- 22) K.K. Birpon, J.E. Noblin, P.D. Miranda and G.B. Elion, Uptake, distribution, and anabolism of acyclovir in herpes simplex virus-infected mice, *Antimicrob. Agent Chemother.*, **21**, 44 (1982).
- 23) G.B. Elion, Mechanism of Action and Selectivity of Acyclovir, *Am. J. Med.*, **73**, 7-13(1982).
- 24) M.D. Trousdale and A.B. Nesbrun, Evaluation of the antiherpetic activity of acyclovir in rabbits, *Am. J. Med.*, **73**, 155-160 (1982).
- 25) P.V. McGuirt and P.A. Furman, Acyclovir inhibition of viral DNA chain elongation in herpes simplex virus-infected cells, *Am. J. Med.*, **73**, 67-71 (1982).
- 26) J.P. How and J.W. Poole, Kinetics and mechanism of degradation of ampicillin in solution, *J. Pharm. Sci.*, **58**, 447(1969).
- 27) R.T. Morrison and R.N. Boyd, Functional derivatives of carboxylic acids, In *Organic Chemistry*, 6th Ed., Prentice Hall, New York, pp. 762-764 (1993).
- 28) I.C. Edmundson, *Advances in Pharmaceutical Sciences*, Vol. 2, H.S. Bean, J.E. Carless and A.H. Beckett(Ed.), Academic Press, London, p.95 (1967).
- 29) A. Martin, J. Swarbrick, and A. Carmarata, Micromeritics, In *Physical Pharmacy*, 3rd edition, Lea & Febiger, Philadelphia, U.S.A., pp 501-521 (1983).