

## 중합성 Bolaamphiphile 분자의 합성과 특성에 관한 연구

진 지 영\* · 고 석 범\* · 정 명 희 · 최 경 희 · 이 연 식

전북대학교 화학공학부 심 · 혈관연구소, \*전북대학교 화학과  
(1996년 9월 9일 접수, 1996년 12월 19일 채택)

### A Study on the Synthesis and Characterization of Polymerizable Bolaamphiphiles

Ji Young Jin\*, Seuk-Beum Ko\*, Myung Hee Jeong, Kyoung Hee Choi, and Youn-Sik Lee

Faculty of Chemical Engineering Technology, Institute of Cardiovascular Research,  
Chonbuk Nat'l Univ., Chonju 561-756, Korea

\*Dept. of Chemistry, Chonbuk Nat'l Univ., Chonju 561-756, Korea

(Received September 9, 1996, Accepted December 19, 1996)

**요 약 :** Di(10-hemisuccinyloxy)decyl muconate(DDM)와 di(6-hemisuccinyloxy)hexyl muconate(DHM)가 합성되었으며, 수용액에 분산되어 각각 97°C와 79°C에서 상전이를 나타내었다. 이들은 자체적으로, 또는 콜레스테롤이나 dioleoylphosphatidylethanolamine(DOPE)을 혼합하여도 리포솜을 형성하지 않았지만, phosphatidylcholine(PC)과 혼합되면 리포솜을 형성하였다. 리포솜막에서 DHM이 254nm의 자외선에 노출될 때 1,2-중합반응이 쉽게 진행되었다. DOPE/dioleoylphosphatidylcholine(DOPC)/DHM(3/3/1)으로 구성된 리포솜은 중성 pH에서는 안정하지만 약산성 pH에서는 불안정하여 pH 4.8과 5.8의 phosphate-buffered saline(PBS, 37°C)에서 30분과 50분 이내에 각각 봉입된 calcein의 방출이 완료되었다. calcein의 방출은 pH가 감소됨에 따라서 증가하며 pH 5.5와 5.0 근처에서는 각각 봉입 calcein의 50%와 100%가 방출되었다.

**Abstract:** Di(10-hemisuccinyloxy)decyl muconate(DDM) and di(6-hemisuccinyloxy)hexyl muconate(DHM) were synthesized, and showed a phase transition in an aqueous solution at 97 and 79°C, respectively. They did not form liposomes by themselves or even in the presence of cholesterol or dioleoylphosphatidylethanolamine(DOPE), but did form liposomes when they were mixed with phosphatidylcholine(PC). DHM molecules in liposome membranes were readily polymerized via 1,2-polymerization process on exposure to 254nm. Liposomes composed of DOPE/dioleoylphosphatidylcholine(DOPC)/DHM(3/3/1) were stable at neutral pH, but leaky at weakly acidic pH. The leakage of entrapped calcein from liposomes in phosphate-buffered saline (PBS, 37°C) of pH 4.8 and 5.8 was complete within 30 and 50 min, respectively. The release of the entrapped calcein was increased with decreasing pH such that 50% and 100% of the calcein were released at pH near 5.5 and 5.0, respectively.

#### 1. 서 론

리포솜들은 콜로이드적 안정성이 높지 않기 때문에 장기간 저장시에 서로 엉겨붙거나 혹은 융합하는 과

정에서 봉입물이 흘러 나온다. 따라서 리포솜을 모델 막으로써 장기간 이용하기는 어렵다. 또한 리포솜은 화학적 안정성이 좋지 않기 때문에 유기용매나 계면활성제에 쉽게 녹아버린다. 이러한 리포솜의 안정성

을 향상시키거나 혹은 리포솜 이중막의 투과성을 제어하기 위하여 그동안 중합성 지질분자들에 대한 많은 연구가 있었다[1, 2]. 최근에는 중합성 phosphatidylethanolamine(PE)과 PC의 혼합물로부터 형성된 이중막을 일정한 온도 이상으로 가열하여 극성 부분(수용액)과 비극성 부분(지질)이 각각 모두 연결되어 있는 bicontinuous cubic phase( $Q_{II}$ )로 전환시켰으며, 중합반응으로 안정화시킴으로써 광범위한 온도에서 그 회합체의 특성을 연구할 수 있게 되었다[3].

중합반응은 주로 리포솜을 안정화시키기 위한 방법으로 이용되지만 다른 한편으로는 리포솜의 봉입물을 방출시키기 위하여 이용할 수도 있다. 중합성 지질과 비중합성 지질이 균일하게 혼합된 리포솜에서 중합반응이 진행되면 고분자 영역과 비중합성 지질 영역이 형성되어 상분리가 일어난다. 이때 비중합성 지질 영역이 실험 조건에서 이중막을 유지하지 못한다면 결국 리포솜은 파괴되고 말 것이다. 이때 비중합성 지질로서는 DOPE를 이용할 수 있는데 이는 자체만으로는 보통의 실험조건하에서 이중막이 아닌 inverted hexagonal phase( $H_{II}$ )를 형성하기 때문이다. 예를 들면 여러 겹으로 이루어진 DOPE/bisphosphatidylcholine(3/1)으로 구성된 리포솜(oligolamellar liposome)들은 광중합시에 봉입물질들을 방출하였다[4].

리포솜을 약물 송달체로 이용하기 위한 연구가 매우 활발히 진행되고 있다[5]. 이것은 리포솜을 이용하면 봉입된 약물이나 생체분자들이 효소에 의한 분해나 면역반응으로부터 보호될 수 있고, 지질의 독성이 낮으며, 리포솜 표면에 리간드를 접합시킴으로써 표적 지향성을 부여할 수 있는 장점이 있기 때문이다. 그러나 생체에서 리포솜은 안정하지 못하여 쉽게 제거되며 약물의 봉입량이 그다지 많지 않다는 점 등 여러 가지 문제점이 있다. 체내에서의 안정성 문제를 해결하기 위하여 리포솜의 표면을 ganglioside GM1[6]이나 poly(ethylene glycol)[7, 8] 등으로 코팅시킨 'stealth liposome'이 고안되었는데 이러한 리포솜들은 세망내피계조직의 세포에 잘 인식되지 않기 때문에 혈액에서의 잔류시간이 크게 증가하게 된다. 리포솜의 방출제어에 대한 연구도 활발하게 진행되어 온 바, 열[9], pH[10] 및 광중합[4]에 의하여 봉입물의 방출이 유도될 수 있는 리포솜들이 제조되었다. 특히 pH의 변화에 의하여 방출이 유도되는 리포솜을 pH-감응성 리포솜이라고 하는데 약산성(pH 5.0~

6.5)의 endosome에 포획된 리포솜이 lysosome으로 가서 분해되기 전에 봉입물이 세포질에 방출되도록 고안된 것이다. pH-감응성 리포솜은 일반적으로 DOPE와 같은 PE와 친수성 부분에 카르복실기가 있는 양쪽성분자(amphiphile)들을 혼합하여 만드는데, 최근에는 중합성 PE를 이용하여 안정성이 증대된 pH-감응성 리포솜도 제조되었다[11]. 따라서 약산성의 pH에서는 카르복실기가 중화되어 이중막 표면이 전하를 띄지 않기 때문에 리포솜막 사이의 접촉이 가능하게 된다. 이때 리포솜의 이중막들이 서로 접촉하여 융합을 일으키거나  $H_{II}$ 상으로 전환되는 과정에서 봉입물이 방출된다고 알려져 있다[12].

*Archaeobacteria*로부터 추출된 지질중에서 이중극성 지질(bipolar lipid)은 하나의 큰 고리화합물(macro-cyclic compound)로서 두 소수성 탄화수소 사슬이 양쪽으로 친수기에 연결되어 있는데[13, 14] 이와 같은 화학구조를 갖는 분자들을 bolaamphiphile 혹은 bolyte라고 한다[15]. 이미 하나의 고리로 이루어진 것 뿐만 아니라[15-18] 단일사슬로 되어 있는 bolaamphiphile들도 합성되었다[19-21]. 일반적으로 단일사슬 bolaamphiphile은 심한 곡률(curvature) 차이로 인하여 안쪽보다 바깥쪽의 단층에 더 많은 지질 분자가 있어야 하기 때문에 작은 리포솜은 만들지 못한다. 그러나 콜레스테롤이나 기존의 지질을 첨가하면 이들 대부분이 리포솜 바깥쪽에 위치하여 곡률문제를 해결하기 때문에 리포솜의 형성이 가능하게 된다. 단일사슬의 diacetylenic bolaamphiphile은 콜레스테롤을 첨가할 때 리포솜을 형성하였는데 0°C에서나 광중합이 가능하였다. 비대칭 bolaamphiphile은 예상한 대로 부피가 더 큰 친수기가 리포솜의 바깥쪽에 위치한다는 사실이 밝혀졌다[15, 19].

그러나 0°C 이상의 광범위한 온도에서 쉽게 중합반응을 일으킬 수 있는 중합성 bolaamphiphile의 합성과 이를 이용한 방출제어에 대한 연구가 아직까지 문헌에 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 실온이나 그 이상의 온도에서도 광중합이 가능할 뿐만 아니라, 리포솜막에서 U자형으로 굽어지지 않음으로써 혈장에서의 안정성을 증가시키기 위하여[18, 22] rigid segment 역할을 할 수 있는 muconyl group이 분자의 중간에 위치한 단일사슬의 bolaamphiphile을 합성하였다[23]. 합성된 이중극성 분자들의 상전이 거동(phase transition behavior), 광중합성 및 pH 변화에 따른 봉입물의 방출 등에 관한 특성을 조사하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 시약 및 기구

Tetrahydrofuran(THF)은 나트륨 금속의 존재하에서 증류하여 정제하였다. *Trans, trans*-muconic acid(98%), 피리딘(99%), 1,10-데칸디올(98%), 1,6-헥산디올(99+%), 무수 톨루엔(99.8%), oxalyl chloride(99+%) calcein(indicator grade), 콜레스테롤(99+%)은 Aldrich社, thionyl chloride는 Jin Chem.社, succinic anhydride는 Sigma社로부터 구입하여 정제하지 않고 사용하였다. DOPE(>99%), DOPC(>99%), DPPC(>99%)는 Avanti Polar Lipids社에서 구입하였다. Sepharose 4B는 Pharmacia Biotech社에서 구입하여 사용하였다. 박막 크로마토그래피(TLC)용 플레이트(알루미늄판, 실리카 겔 60, F-254, 층두께 0.2mm)와 속성 크로마토그래피용 실리카 겔(200-400 mesh ASTM)은 Merck社로부터 구입하였다. 상전이 온도는 Dupont Thermal Analyzer 2000에 DSC 910 module을 연결하여 이용하였다. 리포솜의 크기는 Brookhaven(USA) 5mW He-Ne laser를 이용하여 90°에서 빛 산란으로 측정하였다. Calcein의 형광은 FD-110 JASCO spectrofluorimeter를 이용하여 측정하였으며, 화합물의 흡광도는 Hewlett-Packard 8452A 다이오우드 UV-visible spectrophotometer를 이용하여 측정하였다. 합성된 화합물의 화학구조는 JEOL-JMN EX 400(400MHz)로부터 NMR 스펙트럼을 얻어 분석하였다.

### 2.2. 합성

#### 2.2.1. Di(10-hydroxy)decyl muconate(IIa)

Muconic acid(1.0g, 7mmol)에 thionyl chloride(20ml)를 실온에서 첨가하여 질소 분위기에서 4~5시간 가열하며 환류시킨 후 미반응 thionyl chloride를 감압하에 제거하여 muconyl dichloride(I)를 제조하였다. 화합물 I에 THF(15ml)를 첨가하여 1,10-데칸디올(3.7g, 21mmol)과 피리딘(1.4g, 17mmol)을 녹인 THF 용액에 질소분위기에서 한방울씩 가하고 실온에서 24시간 동안 저어준다. 침전물은 여과하여 제거하고 THF는 회전 증발기를 이용하여 증발시켰다. 잔여물은 클로로포름으로 녹인 후에 5% 염산 수용액으로 2회 씻어주고 무수 황산 나트륨을 첨가하여 건조시켰다. 클로로포름을 증발시키고 농축된 반응혼합물은 속성 크로마토그래피(클로로포름/메탄올

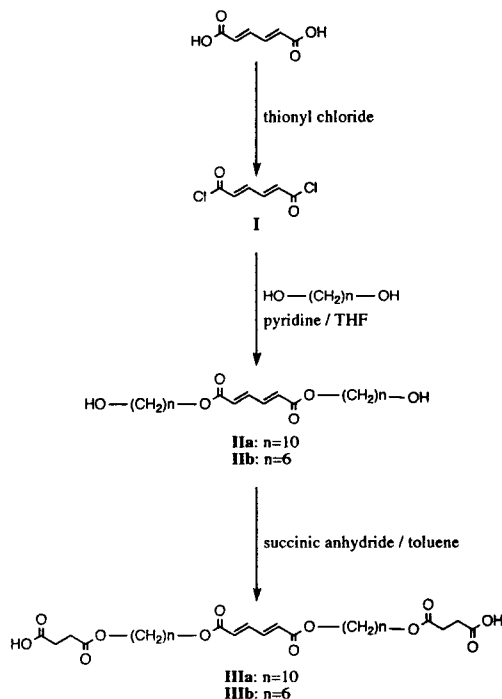


Fig. 1. Synthesis of DDM and DHM.

=97:3,  $R_f=0.3$ )로 분리하여 0.75g을 얻었다(24%). mp 120°C; IR(KBr) 3310(OH), 3071(=C-H), 1700(COO)cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ 1.2~1.6(m, 32H, HO-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>-), 3.6(t, 4H, CH<sub>2</sub>-OH), 4.1(t, 4H, CH<sub>2</sub>-O-C=O-), 6.1~7.3(4H, -CH=CH-CH=CH-)

#### 2.2.2. Di(10-hemisuccinyloxy)decyl muconate(DDM) (IIIa)

화합물 IIa(0.75g, 1.7mmol)와 succinic anhydride(0.66g, 6.6mmol)를 톨루엔(40ml)에 녹이고 질소 분위기에서 24시간 동안 열을 가하여 환류시켰다. 톨루엔은 회전 증발기를 이용하여 제거하고 헥산-에틸 아세테이트(1/1)로부터 재결정시켜서 0.83g을 얻었다(77%). mp 116°C; IR(KBr) 3500-3000(COOH), 3078(=C-H vinyl), 1700(C=O)cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ 1.2~1.8(m, 32H, HO-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>-), 2.6(t, 4H, CH<sub>2</sub>-COO-), 2.7(t, 4H, CH<sub>2</sub>-COO-), 4.1(t, 4H, CH<sub>2</sub>-OOC), 4.2(t, 4H, CH<sub>2</sub>-OOC-), 6.2~7.3(4H, -CH=CH-CH=CH-); Anal. Calcd for C<sub>34</sub>H<sub>54</sub>O<sub>12</sub>: C, 62.36; H, 8.31 Found C, 62.18; H,

8.32 ;  $\lambda_{\max}=264\text{nm}$ , 메탄올,  $\epsilon=31500$  ; DSC,  $T_m=97^\circ\text{C}$  ( $c=14.7\text{wt}\%$ , PBS/에틸렌글리콜=1/1).

### 2.2.3. Di(6-hydroxy)hexyl muconate(IIb)

1,6-헥산디올을 이용하여 2.2.1에서 기술한 방법에 따라 합성하였다.  $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$   $\delta$  1.2~1.8(m, 16H,  $\text{HO-CH}_2\text{-(CH}_2)_4$ ), 3.6(t, 4H,  $\text{CH}_2\text{-OH}$ ), 4.2(t, 4H,  $\text{CH}_2\text{-OOC}$ ), 6.2~7.4(4H,  $\text{-CH=CH-CH=CH-}$ ).

### 2.2.4. Di(6-hemisuccinyloxy)hexyl muconate(DHM) (IIIb)

화합물 IIb로부터 2.2.2에서 기술한 방법으로 합성하고 정제하였다. mp  $99\sim 100^\circ\text{C}$ .  $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$   $\delta$  1.4(m, 8H,  $\text{CH}_2$ ), 1.7(8H,  $\text{CH}_2$ ), 2.6(t, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 2.7(t, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 4.1(t, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 4.2(t, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 6.2~7.3(4H,  $\text{-CH=CH-CH=CH-}$ ) ; Anal. Calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_{12}$  : C, 57.5 ; H, 7.06 Found C, 56.7 ; H, 7.02 ;  $\lambda_{\max}=264\text{nm}$ , 메탄올,  $\epsilon=31100$  ; DSC,  $T_m=79^\circ\text{C}$  (PBS,  $c=0.08$  mg/ml PBS).

### 2.3. 리포솜의 제조 및 봉입물의 방출 측정

건조된 지질 박막에 적당량의 PBS나 50mM calcein 용액(pH=8.0)을 넣고 동결용해(freezethawing)법으로[24] 수화시킨 후  $80^\circ\text{C}$  이상에서 초음파 분쇄기로 10분간 처리하고 5분 정도 방치한 후 다시 10분간 초음파로 처리하였다. 리포솜에 봉입되지 않은 calcein은 sepharose 4B로 충전된 칼럼(용매 : PBS, pH=7.5)에 통과시켜서 분리하였다. calcein의 들뜨기과장과 방출과장은 각각 490nm와 520nm이었으며, 리포솜에 봉입된 calcein의 소광백분율을 아래의 식에 의하여 계산하였다. 여기에서  $F_0$ 는 리포솜용액의 형광세기이고,  $F_\infty$ 는 Triton X-100를 첨가함으로써 리포솜이 파괴되어 calcein이 모두 방출되었을 때 측정된 형광세기이다.

$$\text{소광 백분율}(\%) = (1 - F_0/F_\infty) \times 100$$

또한 시간의 함수에 따라서 리포솜으로부터 calcein의 방출 백분율은 다음의 식으로부터 계산하였다. 여기에서  $F_0$ 는 초기 리포솜의 형광세기이고,  $F_t$ 는 일정시간이 지난후에 측정된 형광이며,  $F_\infty$ 는 Triton X-100를 첨가한 후에 측정된 형광세기이다.

$$\text{방출 백분율}(\%) = \{(F_t - F_0)/(F_\infty - F_0)\} \times 100$$

### 2.4. 광중합 방법

DPPC/DHM(2:1)의 박막에 PBS를 첨가하고 위에서 설명한 방법으로 리포솜을 제조하였다. 리포솜 용액을 소량 취하여 메탄올에 녹인 후에 DHM의 흡광도( $\lambda_{\max}=264\text{nm}$ ,  $\epsilon=31100$ )를 이용하여 시료의 농도를 조절하였다. 시료를 수정용기에 넣은 후에 254nm(unfiltered) 램프(Fisher社)로부터 5cm 거리에서 일정 시간 동안 자외선에 노출시켰으며, 광중합으로 인한 DHM 흡광도의 감소 정도를 자외선 분광기를 이용하여 측정하였다.

### 2.5. pH 감응성 측정

DHM의 흡광도를 이용하여 calcein이 봉입된 리포솜의 농도를 조절하여 미리  $37^\circ\text{C}$ 로 유지되고 있는 각각의 PBS 용액에 첨가하였다(지질의 최종농도 0.40mM).  $37^\circ\text{C}$ 에서 1시간 동안 항온시킨 리포솜 용액을 0.08mM로 희석시키면서 묽은 NaOH 용액을 가하여 pH를 다시 7.5로 조정하고 calcein의 형광을 측정하였다. 따라서 pH의 변화에 따른 calcein의 방출 백분율은 위의 두번째 식으로부터 계산하였다. 여기에서  $F_0$ 는 pH=7.5일 때의 형광세기이고,  $F_t$ 는 각각 다른 pH에서  $37^\circ\text{C}$ 로 항온시킨 후에 pH를 다시 7.5로 환원시켜 측정된 형광이며,  $F_\infty$ 는 Triton X-100를 첨가한 후에 측정된 형광세기이다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 상전이

합성된 이중극성 분자들이 수용액에서 분산될 때 형성하는 회합체에서 소수성 사슬이 겔상으로부터 액정상태로 전환되는 상전이 온도(phase transition temperature 혹은 chain melting temperature,  $T_m$ )를 측정하기 위하여 DDM에는 PBS/에틸렌 글리콜(1/1) 용매를 첨가하고, DHM에는 PBS 용매만을 첨가하여 수화시킨 후에 DSC를 이용하여 상전이 온도를 측정하였다. 에틸렌 글리콜을 물에 혼합한 것은  $100^\circ\text{C}$ 를 약간 초과하여도 용매가 끓는 것을 방지하기 위해서이다. DDM과 DHM의 상전이 온도는 시료의 열처리 과정에 따라 조금씩 다르게 나타나는데 Fig. 2에서는 두번째 주사의 열분석도를 나타내었다.

$T_m$ 은 상전이가 일어날 때에 분자들의 현격한 재배열을 일으키기 위해서 파괴되어야 하는 반 데르 발스 접촉수(소수성 사슬 부분의 원자수)를 반영한

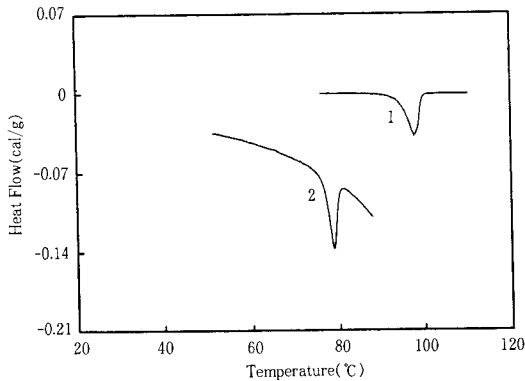


Fig. 2. DSC thermograms : curve 1, DDM(14.7wt %) in PBS/ethylene glycol(1/1, v/v) ; curve 2, DHM(7.7wt%) in PBS.

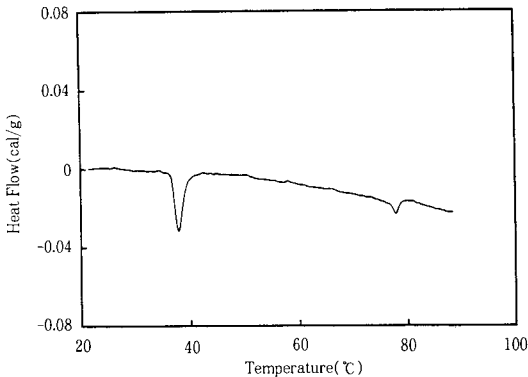


Fig. 3. DSC thermogram of DPPC/DHM(2/1, 12.4wt%) in PBS.

다[25]. 따라서 같은 종류의 지질분자들에 대해서는 소수성 사슬에 있는 탄소원자의 수가 증가함에 따라  $T_m$ 이 일반적으로 더 높아진다. DDM과 DHM의 상전이 온도는 열용량의 변화가 최대인 온도를 택할 때 각각 97°C와 79°C로 측정되었다. 이들의  $T_m$ 이 비교적 높은 것은 분자의 중간에 위치한 카르보닐기들이 겔상에서 분자들의 충진을 방해하지 않는다는 것을 의미한다. 또한 이들 분자의 중앙에 muconyl group이 위치하여 이중결합이 없을 때보다 gauche conformation의 형성이 어려울뿐만 아니라 이웃하는 분자의 muconyl group과의  $\pi-\pi$  중첩이 단층막의 겔상을 안정화시키기 때문에 높은 온도에서 상전이가 일어나는 것으로 생각되어진다[26].

리포솜의 제조방법 중에서 동결용해법을 이용할 때

에는 시료를 얼리고 서서히 용해시킨 후에 지질의  $T_m$  이상으로 가열하여 소용돌이 혼합이나 초음파처리를 하는데, DDM은  $T_m$ 이 너무 높기 때문에 이 방법으로는 리포솜을 제조하기가 쉽지 않다. 그러나 DDM에 비하여  $T_m$ 이 낮은 DHM을 사용하면 비교적 쉽게 리포솜을 제조할 수 있다.

만일 DPPC와 DHM이 균일하게 혼합된 리포솜막을 형성한다면 DPPC와 DHM의  $T_m$  사이의 어떤 온도에서 하나의 상전이가 나타날 것이지만[27], DPPC와 DHM이 균일하게 혼합되지 않고 각각 어떤 영역을 형성하여 상분리가 일어난다면 DPPC( $T_m \sim 41^\circ\text{C}$ )[28]와 DHM의 두 성분 각각에 대한  $T_m$ 이 관찰될 것으로 예측된다. DPPC/DHM(2/1) 리포솜에 대하여 DSC 실험을 수행한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 첫번째 주사에서 뿐만 아니라 세번째 주사에서도 DPPC와 DHM의 두  $T_m$  근처인 39°C와 79°C에서 각각에 해당하는 피크들이 나타났는데, 이것은 두 성분이 균일하게 혼합되지 않았음을 나타내는 것이다.

### 3.2. 리포솜의 제조

DHM 박막에 calcein 용액(pH 8.0)을 가하여 동결용해법으로 수화시키고 초음파 분쇄기를 이용하여 리포솜을 제조하고자 하였으나 calcein의 봉입이 전혀 이루어지지 않았다. DHM에 PBS를 첨가하고 초음파로 처리할 때에는 혼탁해지는데 이를 방지하면 곧 바로 작은 입자들이 침전하며 분산액의 윗부분이 맑아진다. 이는 DHM 자체만으로는 리포솜이 형성되지 않는다는 것을 의미한다. 이는 작은 리포솜의 외경과 내경의 큰 차이 때문에 대형적인 DHM에 대해서 예견된 결과이다. 지금까지 알려진 단일사슬의 이중극성 분자에다 콜레스테롤이나 PC를 첨가하면 리포솜이 형성된다는 사실은 이미 서론에서 언급하였다. 그러나 DHM에는 DOPE나 콜레스테롤을 1:3의 비율로 첨가하여도 calcein이 봉입되지 않았다. 이것은 DHM 분자의 친수성과 소수성의 균형이 충분히 이루어지지 않기 때문인 것으로 생각된다.

PC 중에서 DPPC를 택하여 DHM을 2:1의 비율로 혼합하고 50mM calcein 용액을 첨가하여 리포솜을 제조한 결과, calcein이 봉입되었으며 calcein 형광의 92%가 소광되었다( $F_o=33, F_\infty=430$ ). Calcein이 봉입된다는 것은 DPPC/DHM(2/1) 혼합물이 리포솜을 형성한다는 증거이다. Calcein의 형광이 70%

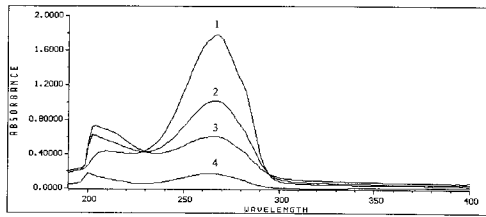


Fig. 4. UV absorption spectra of liposomes composed of DPPC/DHM(2/1,  $8.0 \times 10^{-5}$  M) in PBS. The spectra were recorded after exposure to 254nm light for the following times: curve 1, 0min; curve 2, 10min; curve 3, 15min; curve 4, 180min.

이상 소광되면 무난하다고 알려져 있으므로[29] DPPC/DHM(2/1) 리포솜의 봉입효율은 매우 우수하다고 할 수 있다. DOPE/DOPC/DHM(3/3/1) 혼합물에 대해서도 비슷한 실험방법으로 calcein 봉입을 측정하였는데 81%의 소광을 보였다( $F_0=110$ ,  $F_\infty=594$ ). 이는 DOPE/DOPC/DHM(3/3/1) 혼합물도 리포솜을 형성하며 calcein 용액을 거의 원액에 가까운 농도로 봉입한다는 것을 의미한다. DOPE/DOPC/DHM(3/3/1) 리포솜들은 transmission electron microscope(TEM) 사진에서 대략적인 구형으로 확인되었으며 직경이 약 100nm 정도로 관찰되었다. 빛 산란 실험으로부터 측정된 리포솜의 평균 직경은  $90 \pm 15$ nm로서 TEM 사진과 비슷한 결과를 나타내었다.

### 3.3. 광중합

본래 DOPE/DHM 리포솜의 DHM 분자들을 광중합시킴으로써 상분리를 유도하여 봉입물이 방출되는지를 알아보려고 하였으나 이미 언급한 바와 같이 DOPE/DHM 혼합물은 리포솜을 형성하지 않았다. DPPC/DHM(2/1) 리포솜(평균직경  $97 \pm 15$ nm)을 254nm의 자외선에 노출시킬 때 DHM의 흡광도 변화를 Fig. 4에 나타내었다. 자외선에 노출되는 시간이 길어짐에 따라 264nm에서의 흡광도가 감소하는데 이는 muconyl group에서 광반응이 일어남을 암시하는 것이다. 3시간의 노출 후에는 DHM의 발색단이 거의 없어졌는데, 이는 광중합이 거의 완료되었음을 나타낸다. 광중합 시간이 길어짐에 따라 204~206nm의 흡광도가 증가하다가 결국에는 감소하였다. 이 흡

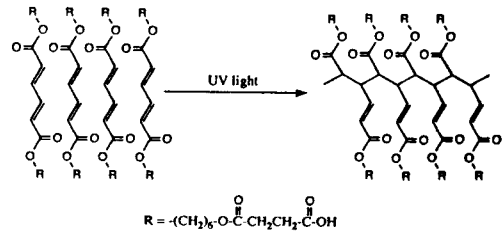


Fig. 5. Schematic representation of 1,2-polymerization of DHM in liposomes.

수도가 아크릴 유도체의 흡수띠에 해당된다는 사실은 dimethyl trans- $\beta$ -hydromuconate의 UV 스펙트럼( $\lambda_{max}$  204)으로 확인하였다. 따라서 DPPC와 DHM으로 이루어진 리포솜에서 DHM은 자외선에 노출될 때 1,2-중합반응을 일으키는 것으로 판단된다(Fig. 5). 중합시간이 충분히 길어지면 오히려 204nm의 흡수띠가 감소하는 것은 1,2-중합반응으로 생성된 아크릴 유도체들이 중합되고 있음을 의미한다[30]. 이미 언급한 바와 같이 DPPC와 DHM이 균일하게 혼합되지 않기 때문에 DPPC 이중막에서 DHM의 농도변화에 따른 광중합 동태는 고찰하지는 못하였다.

### 3.4. H<sup>+</sup>에 의한 DOPE/DOPC/DHM(3/3/1) 리포솜의 방출유도

DOPE/DOPC/DHM(3/3/1) 리포솜은 중성 pH에서는 안정하여  $-4^\circ\text{C}$ 에서 며칠 동안 저장하여도 봉입물의 방출이 거의 없었다. 그러나 약산성인 PBS에 혼합하면 리포솜이 불안정해져서 봉입물이 방출된다. 방출 시간을 측정하기 위하여 리포솜 용액을 pH가 각각 4.8과 5.8인 PBS( $37^\circ\text{C}$ )에 소량씩 첨가한 후에 시간에 따라 일정량씩 취하여 형광을 측정한 결과를 Fig. 6에 나타내었다[23]. 봉입된 calcein의 방출 속도는 pH에 의존하며 pH가 4.8과 5.8일 때 30분과 50분 이내에 방출이 완료되었다. 따라서 1시간 이후에는 calcein의 방출이 거의 없다고 가정하고, 리포솜 용액을 1시간 동안  $37^\circ\text{C}$ 로 항온시킨 후에 형광을 측정하였다.

약산성에서 봉입물의 상대적인 방출량을 측정하기 위하여 여러 pH의 PBS( $37^\circ\text{C}$ )에 리포솜용액을 첨가하고 1시간 동안 항온시킨 후에 pH를 7.5로 조정하여 각 시료의 형광을 측정하였다. Fig. 7에 나타난 바와 같이 pH가 감소함에 따라 방출량이 서서히 증가하여 pH 5.5 근처에서는 calcein의 방출량이 50%

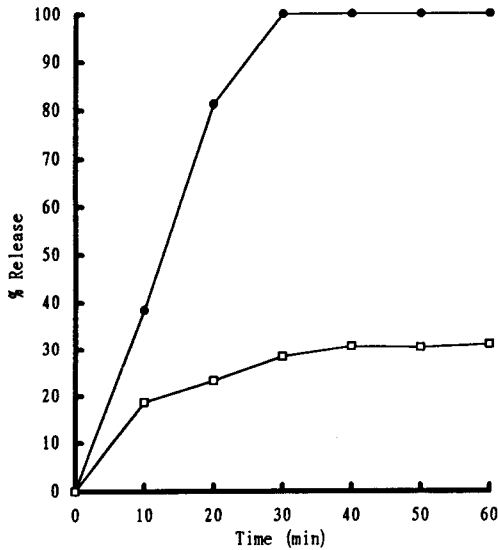


Fig. 6. Time courses of leakage of calcein from liposomes composed of DOPE/DOPC/DHM (3/3/1,  $4.8 \times 10^{-4} M$ ) in PBS of pH 4.8(●) and 5.8(□) at 37°C.

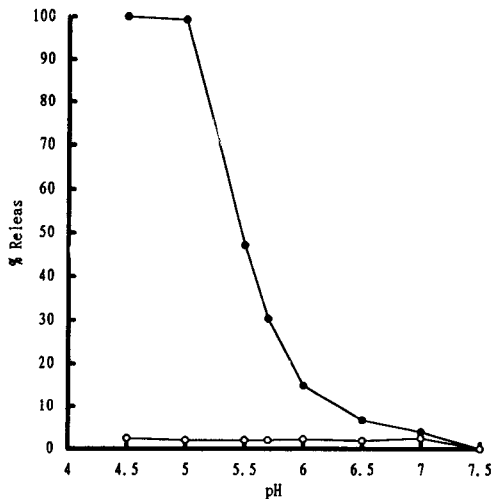


Fig. 7. pH-dependent calcein release from DOPE/DOPC/DHM(3/3/1)(●) and DOPE/DOPC(1/1)(○) liposomes in PBS at 37°C at a lipid concentration of  $4.8 \times 10^{-4} M$  for both experiments[23].

이며, pH 5.0 근처에서 100%의 방출을 나타냈다. 따라서 DOPE/DOPC/DHM(3/3/1) 리포솜의 pH

감응도는 pH 5.8~6.3에서 약 50%의 봉입물이 방출되는 DOPE/dioleoylsuccinylglycerol(DOSG)(4/1), DOPE/dipalmitoylsuccinylglycerol(4/1)[31] 및 단일 DOSG 리포솜[32]과 유사하다. 한편 DHM이 첨가되지 않은 DOPE/DOPC(1/1) 리포솜(평균 반경,  $110 \pm 15 nm$ )은 동일한 약산성의 영역에서 방출이 거의 일어나지 않았다. 이는 DHM이 리포솜에서 pH에 민감한 성분으로 작용하고 있음을 의미한다.

#### 4. 결 론

Muconic acid로부터 muconyl 중합기가 분자의 중앙에 위치하고 친수기로서 카르복실기가 분자의 양 끝에 공유결합으로 연결된 DDM과 DHM을 합성하였으며, 수용액에서 특성을 검토한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) DDM과 DHM은 수용액에 분산되어 비교적 높은 온도인 97°C와 79°C에서 상전이를 각각 일으켰다. DSC 실험 결과에 의하면 DHM은 DPPC와 균일하게 혼합되지 않았다.

2) DPPC/DHM(2/1) 리포솜이 254nm의 자외선에 노출될 때 DHM은 1,2-중합과정으로 쉽게 중합반응을 일으켰다.

3) DOPE/DOPC/DHM(3/3/1) 리포솜은 중성 pH에서는 안정하고 calcein의 봉입효율도 좋은 반면, 약산성에서는 리포솜이 불안정하여 봉입물이 방출된다. 37°C의 PBS에서 방출이 완료되는 시간은 pH가 4.8과 5.8일 때 30분과 50분 이내로써 pH에 의존하였다. 봉입된 calcein의 방출량도 역시 용액의 pH에 의존하여 pH가 감소함에 따라서 방출량이 증가하는데 pH 5.5 근처에서 50%의 방출이 일어나며 pH 5.0 근처에서 봉입물이 완전히 방출되었다.

#### 감 사

본 연구는 1995년도 한국과학재단 핵심전문연구비(과제번호 951-0305-010-1)의 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사료를 드린다.

#### 참 고 문 헌

1. D. F. O'Brien and V. Ramaswami, "Encyclopedia of Polymer Science and Engineering", 17, J.

- Wiley and Sons, 108(1989).
2. H. Ringsdorf, B. Schlarb, and J. Venzmer, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **27**, 113(1988).
  3. Y-S. Lee, J-Z Yang, T. M. Sisson, D. Frankel, J. T. Gleeson, E. Aksay, S. L. Keller, S. M. Gruner, and D. F. O'Brien, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 5573(1995).
  4. H. Lamparski, V. Liman, D. Frankel, J. A. Barry, V. Ramaswami, M. F. Brown, and D. F. O'Brien, *Biochemistry*, **31**, 685(1992).
  5. G. Gregoriadis, *TIBTECH DECEMBER*, **13**, 527(1995).
  6. T. M. Allen and A. Chonn, *FEBS Lett.*, **223**, 42 (1987).
  7. A. L. Klibano, K. Myuyama, V. P. Torchilin, and L. Huang, *FEBS Lett.*, **268**, 235(1990).
  8. G. Blume and G. Cevc, *Biochim. Biophys. Acta*, **1029**, 91(1990).
  9. M. B. Yatvin, J. N. Weinstein, W. H. Dennis, and R. Blumethal, *Science*, **202**, 1290(1978).
  10. M. Yatvin, W. Kreutz, B. Horwitz, and M. Shinitzky, *Science*, **210**, 1253(1980).
  11. M-J. Choi, H-S. Han, and H. Kim, *J. Biochem.*, **112**, 694(1992).
  12. N. Duzgunes, R. M. Straubinger, P. A. Baldwin, D. S. Friends, and D. Papahadjopoulos, *Biochemistry*, **32**, 1069(1985).
  13. K. Yamauchi, A. Moriya, and M. Kinoshita, *Biochim. Biophys. Acta*, **1003**, 151(1989).
  14. S. C. Kushwaha, M. Kates, G. D. Sprott, and I. C. P. Smith, *Science*, **211**, 1163(1981).
  15. J-H. Fuhrhop, H-H. David, J. Mathieu, U. Liman, H-J. Winter, and E. Boekema, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 1785(1986).
  16. N. Hebert, A. Beck, R. B. Lennox, and G. Just., *J. Org. Chem.*, **57**, 177(1992).
  17. K. Yamauchi, I. Yamamoto, and M. Kinoshita, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 445(1988).
  18. H. Bader and H. Ringsdorf, *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, **81**, 329(1986).
  19. J-H. Fuhrhop and D. Fritsch, *Acc. Chem. Res.*, **19**, 130(1986).
  20. H. Bader and H. Ringsdorf, *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **20**, 1623(1982).
  21. Y. Okahata and T. Kunitake, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 5231(1979).
  22. R. A. Mass, T. Fujita, and Y. Okumura, *Langmuir*, **7**, 2415(1991).
  23. M. H. Jeong, Y-S. Lee, J. Y. Jin, and S. B. Ko, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **17**, 875(1996).
  24. U. Pick, *Arch. Biochem. Biophys.*, **212**, 186 (1981).
  25. F. M. Menger, X. Y. Chen, S. Brocchini, H. P. Hopkins, and D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 6600(1993).
  26. H. Lamparski, Y-S. Lee, T. D. Sells, and D. F. O'Brien, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 8096(1993).
  27. J. R. Silvius and J. Gagne, *Biochemistry*, **23**, 3232(1984).
  28. D. Marsh, "Handbook of Lipids Bilayer", CRC Press Inc.(1990).
  29. R. J. Y. Ho, B. Rouse, and L. Huang, *Biochemistry*, **25**, 5500(1986).
  30. A. Laschewsky, H. Ringsdorf, and G. Schmidt, *Thin Solid Films*, **134**, 153(1985).
  31. D. Collins, D. C. Lintzinger, and L. Huang, *Biochim. Biophys. Acta*, **1025**, 234(1990).
  32. A. M. Tari, N. Fuller, L. T. Boni, D. Collins, P. Rand, and L. Huang, *Biochim. Biophys. Acta*, **1192**, 253(1994).