

스트렙토키나제를 함유하는 스텔스® 리포솜의 제조 및 평가

최현순 · 이계원 · 백명기 · 조인숙 · 김동출 · 지웅길†

충남대학교 약학대학
(1999년 4월 12일 접수)

The Preparation and Evaluation of Streptokinase-entrapped Stealth® Liposome

Hyun-soon Choi, Gye-Won Lee, Myung-Gee Baek, In-Sook Cho, Dong-Chool Kim and Ung-Kil Jee†

College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea

(Received April 4, 1999)

ABSTRACT—Stealth® liposomes entrapped with streptokinase were prepared to improve the physical stability of conventional liposomes. The particle size distribution, dissolution rate and entrapping efficiency of the Stealth® liposomes were studied. The entrapping efficiency of streptokinase into conventional liposomes was proportional to the total lipid and cholesterol amounts. In Stealth® liposomes, the entrapping efficiency of streptokinase was increased with the increase of DPPE-PEG(5,000) amount. The particle size of Stealth® liposomes decreased with the increase of DPPE-PEG(5,000) amount. The dissolution rate of streptokinase from conventional liposomes was decreased by addition of cholesterol. The dissolution rate of streptokinase from the Stealth® liposomes was also decreased by addition of DPPE-PEG(5,000).

Keywords—Streptokinase, Stealth® liposomes, DPPE-PEG(5,000)

혈전 용해제로 가장 오랫동안 임상에서 이용되어 온¹⁾ streptokinase(이하 SK)는 *Streptococcus haemolyticus* group C에 의해서 생성되며 약 414 여개의 아미노산이 펩타이드 결합으로 구성되어 있는 분자량 약 47,000정도의 단백질로²⁾ 물에 잘 녹고 pH 6~8 용액에서 가장 안정하다. SK는 정맥 주사 후 순환계로부터 신속히 소실되는데 특정 항체에 의한 제 1단계의 반감기는 18분이며 비항체성 순환계로부터의 제거 반감기는 83분으로 반감기가 매우 짧은 약물이다.³⁾ 또한 extracellular protein이므로 항원성이 강하고 출혈 및 allergy 반응과 같은 부작용의 발생 빈도가 높으며⁴⁾ 특히 오랫동안 반복 투여시 인체가 그에 대한 항체를 생성하므로 투여량을 증가시켜야 하며 그에 따라 전신 출혈 및 plasma fibrinolytic state가 유발될 수 있다.⁵⁾ 이러한 SK등의 혈전 용해제를 비롯한 많은 단백질 치료제에서 나타나는 짧은 혈중 반감기, 항원성 같은 문제점은 화학적 수식화 방법을 이용한 단백질 구조 변형체의 개발⁶⁻⁸⁾과 안정성이 높은 수송체의 개발⁹⁾을 통하여 극복될 수 있는데 특히 제어 방출성 미립구 즉 리포솜과 같은 수송체는 열, pH에 의한 불활성화, 그리고 순환계의 내분비 저해제들과 단백질 가수분해 효소에 의한 불활성화를 방지하여 단백질의 인체내 안정성을 향

상시키기 위한 수단으로 활용할 수 있다.¹⁰⁾

리포솜은 한 층 혹은 여러 층의 인지질 이중막으로 이루어진 소포체로서 약물의 표적 부위 도달을 목적으로 하는 연구나 체내에서 지속적으로 약물을 방출하도록 하는 연구에 적용이 되는데¹¹⁻¹⁴⁾ 면역 리포솜,¹²⁾ 열 감수성 리포솜,¹³⁾ pH 감수성 리포솜,¹⁴⁾ stealth 리포솜¹⁵⁻²⁰⁾(SL) 등을 예로 들 수 있다. 약물 수송체로 리포솜을 적용할 때 단점은 정맥 투여시 간의 세망내피계에 의해 포획되어 빠르게 순환혈에서 제거되는 현상과 현탁액 상태로 보관시 응집, 침강, 융합, 인지질의 가수분해, 산화 및 봉입 약물의 누출 등의 물리화학적 불안정성이라 할 수 있는데 이런 단점을 보완하는 SL이 최근 부각되고 있다.¹⁵⁻²⁰⁾ 일반적으로 리포솜의 입자 크기를 작게 하거나 막 표면의 음전하 density나 막 유동성을 증가시키므로써 리포솜의 혈중 반감기를 길게 할 수 있음이 연구되었는데^{15,18)} 초기에는 GM1 ganglioside, cerebroside sulfate, phosphatidylinositol을 사용하여 리포솜 표면에 음전하를 띠게 하는 방법을 사용하였으며 현재는 1차 아민기가 있는 지질 (예; nitrogen-linked phosphatidylethanolamine(PE), N-alkyl-PE, 1,3,5 triazynyl PE)이나 epoxy기 또는 diacylglycol methyl ether(이하 PEG, M.W. 1000~5000)를 공유 결합시킨¹⁹⁾ 지질로 입자 크기가 작은 리포솜을 제조하는 방법을 사용한다. PE-PEG가 리포솜의 지질 이중층에 촘촘하게

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 042)821-5934, E-mail : ukjee@hanbat.chungnam.ac.kr

끼여 들어 가며 리포솜 입자 크기가 작아지고 PEG에 의해 막 표면에는 친수성이 부여되므로 opsonin에 의한 리포솜의 혈중 소실이 느려지게 된다. 또한 polymer의 사슬 길이, chemical linkage의 성질, 소수성 anchor의 acyl chain 조성 과 지질 이중층의 조성을 변경시키면서 실험한 결과 가장 느린 혈중 소실을 보이는 리포솜은 긴 사슬의 포화 disteroyl 지질에 PEG 2,000이 carbamate 공유 결합되어 있는 지질을 5 mol% 사용하고 콜레스테롤의 함량을 높게 하여 제조된 SL이었다.¹⁷⁾ 또한 Vaage²⁰⁾ 등의 실험에 따르면 doxorubicin을 봉입한 입자 크기가 작은(100 nm 이하) SL이 쥐에 이식한 암세포에서 축적됨이 밝혀졌는데 이는 SL의 표적 친화성의 가능성을 말해 주고 있다.

따라서 본 연구에서는 SK의 혈중에서의 짧은 반감기, 용액 내에서의 불안정성, 투약의 번거로움 및 투여시 부작용의 단점을 개선할 목적으로 phosphatidylcholin(PC)과 콜레스테롤을 기본 지질로 하여 수용성 약물을 봉입시킨 일반 리포솜을 제조하였으며 이들의 물리적 불안정성을 개선하고 지속성 제제화를 위해 dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPE)에 PEG를 공유결합 시킨 지질(이하 DPPE-PEG(5,000))을 첨가시킨 SL을 제조하였다. 이러한 리포솜들의 봉입률, 입자 크기 분포를 측정하였고 *in vitro*에서의 리포솜으로부터의 약물의 방출 실험을 실시하여 일반 리포솜의 물리적 안정성을 개선하며 짧은 혈중 반감기를 가진 SK의 지속성 제제로써 SL의 응용 가능성을 검토하고자 하였다.

실험방법

시약 및 기기

이 실험에 사용한 시약은 streptokinase (Dongkook Pharm. Co., Korea), plasminogen (10 I.U., Sigma Chem. Co., U.S.A.), chromozyme-PL (Tosyl-glycyl-prolyl-lysine 4-nitro-anilide acetate, C₂₆H₃₅N₆O₇SCOOCH₃, BMS Ltd., U.S.A.), soybean trypsin inhibitor (SBTI, Sigma Chem. Co., U.S.A.), soybean phosphatidylcholine (PC, Epikuron 200, PC 95%, Pacific Pharmaceuticals GmBH), cholesterol (5-cholestan-3 β -ol, purity 96%, Sigma Chem. Co., U.S.A.), dipalmitoylphosphatidylcholine(DPPE, Sigma Chem. Co., U.S.A.), polyethylene glycol methyl ether 5,000 (이하 PEG, Aldrich Chem. Co., U.S.A.), ultrafiltration membrane (Diaflo, molecular weight cut off 300,000, 62 mm, Amicon Inc., U.S.A.), diethylene glycol monoethyl ether (Transcutol, Gattefosse Co., France), HPLC filter (Acrodisc LC PVDF, 0.45 μ m, Waters Co., U.S.A.), dialysis sack (Spectra/Por CE,

molecular weight cut off 100,000, Spectrum Inc., U.S.A.), methanol (Merck, Germany), chlorform (Merck, Germany) 등을 사용하였으며 기타 시약 및 용매는 일급 또는 특급을 사용하였다.

사용된 기기는 microplate reader (Molecular Device, Thermo Max), HPLC (Waters 510 Pump, WatersTM 486 UV/VIS Detector, U.S.A.), column (TSKgelTM SW guard column (7.5 cm \times 7.5 cm), TSKgelTM column G3000 SW (30 cm \times 7.5 cm), Supelco Inc., U.S.A.), UV-spectrophotometer (Jasco V-550, Japan), laser light scattering (He-Ne laser model 127, Lixel Laser Inc., Analysis software : BI-8000AT Digital Correlator), ultrafiltration apparatus (Vision Scientific Co., Korea), rotary evaporator (B chi RotavaporR 110, Switzerland), high vacuum pump (Vacuum pump DD-40, Precision Scientific, U.S.A.), vortex mixer (Model 1801, Dong Yang Scientific Co., Korea) 등이었다.

SK의 수상에서의 안정성 실험

수용성 약물인 SK의 리포솜으로의 제제화를 위해서는 SK의 분해가 일어나지 않는 가장 안정한 수상의 선택이 필요하므로 여러 pH의 완충액에서 SK의 안정성 실험을 실시하였다. 사용된 용액은 인산염 완충액(pH 4.0, 9.0)과 isotonic PBS(pH 7.4), 0.9% NaCl 용액(생리 식염수) 및 3차 증류수였으며 7일 동안 4°C에서 보관하면서 1일 간격으로 HPLC로 분석하였다. 각 시험액을 컬럼에 주입한 후 0.05M PBS(pH6.9)/0.3M NaCl을 1.0 ml/min의 유속으로 흘려 주어 220 nm에서 피크 면적을 측정하였으며 같은 조건에서 얻은 초기액의 피크와 비교하여 분해되지 않고 남아 있는 SK의 양을 구하였다.

리포솜의 제조

가장 일반적인 지질막 수화법으로 제조하였으며 SK가 가장 안정했던 isotonic PBS(pH 7.4)를 선택하여 SK를 0.5 mg/ml의 농도로 용해시켜 리포솜 제조시 수상으로 사용하였다. 총 지질 양을 100과 200 μ mol/ml로 변화시켜 봉입률의 변화를 관찰하였으며 지질을 200 μ mol/ml로 고정시키고 Table I에 보이는 것처럼 PC와 콜레스테롤의 양을 몰비로 4:1, 2:1, 1:1로 변화시켜 제조한 리포솜(Table I의 처방 A~C)의 봉입률을 측정하여 콜레스테롤의 첨가가 봉입률에 미치는 영향을 검토하였다. 또한 PC와 콜레스테롤을 2:1 몰비로 고정시킨 뒤 DPPE-PEG(5,000)를 2.5, 5, 7.5 mol%가 되도록 첨가하여 SL을 제조하여 앞의 일반 리포솜과 봉입률을 비교하였다(Table I의 처방 D~F).

Table I—The Lipid Composition of Liposomes

Formulation	PC (%)	CH ¹⁾ (%)	DPPE-PEG 5,000 (%)
A	80	20	-
B	66.7	33.3	-
C	50	50	-
D	65	32.5	2.5
E	63.3	31.7	5
F	61.7	30.8	7.5

* Total lipid concentration was 200 μ mol/ml.* CH¹⁾ represents cholesterol.**SL 제조를 위한 지질 DPPE-PEG(5,000)의 합성**

1차 아민기가 있는 지질(예; nitrogen linked PE, N-alkyl-PE, 1,3,5-triazinyl PE)이나 epoxy 기 또는 diacylglycol 기가 있는 지질에 PEG methyl ether를 carbamate화한 물질로 수식하여 친수성 지질을 합성하는 단계를 거치는데 보통 PEG-linked PE의 합성시 수율이 가장 좋으므로 많이 사용되고 있다.¹⁹⁾ 본 실험에서도 DPPE 지질의 아민기에 PEG 5,000을 수식하는 방법을 사용하여 DPPE-PEG(5,000)을 합성하였다.

봉입되지 않은 SK의 분리²¹⁾

한외 여과막(molecular weight cut off 300,000)을 장착한 여과 장치에 적당량의 isotonic PBS(pH 7.4)를 가한 리포솜 현탁액을 넣고 질소 가스압하에서 한외 여과시켜 가해준 PBS와 동일한 양의 여액을 수집하고 이를 HPLC로 분석하여 여액에서 SK가 검출되지 않을 때까지 위의 조작을 반복하여 봉입되지 않은 SK를 분리시켰다. 리포솜으로부터 봉입된 SK의 방출을 최소화하기 위해 여과의 신속성을 도모하고자 비교적 molecular weight cut off가 큰 한외 여과막을 사용하였으며 여과후 막 위에 잔존하는 리포솜 현탁액을 바이알에 넣고 질소로 충전시켜 냉장 보관하면서 여러 가지 리포솜 제제의 평가 실험에 사용하였다.

리포솜의 평가

봉입률 측정 - SK를 isotonic PBS(pH 7.4)로 희석하여 200, 100, 50, 25, 12.5 및 6.25 μ g/ml의 농도로 만든 표준 용액 100 μ 에 Transcutol(400 μ l)를 가한 후 vortex mixer로 1분간 혼합하고 0.45 μ m의 막 여과기로 여과시킨 여액을 HPLC로 분석하여 검량선을 작성하였으며 리포솜액 100 μ 에 Transcutol(400 μ l)를 가한 후 검량선 작성시와 동일하게 HPLC로 분석하여 SK의 봉입률을 구하였다.

입자 크기 및 분포 측정 - 동적 광산란 기법(dynamic light scattering)을 이용하여 리포솜 현탁액을 100배 희석한 후 검

체로 사용하였으며 Ne-He laser 광원의 632.8 nm 측정 파장에서 25°C의 온도 조건으로 측정하였다.

탁도측정 - 리포솜의 보관 중 입자 크기의 변화를 비교적 단시간에 간접적으로 예측하기 위해 각 리포솜을 isotonic PBS (pH 7.4)로 30배 희석하여 잘 혼합 후 37°C에서 일주일간 보관하면서 540 nm에서 광선이 투과된 양(% T)을 측정하므로써 탁도의 변화를 관찰하였다.

리포솜으로부터 SK 방출 실험 - 각 리포솜의 약물방출 실험은 미리 물에 팽윤시켜 한 쪽 끝을 묶은 셀룰로오스 반투막(molecular weight cut off 100,000) sack안에 리포솜 현탁액 2 ml를 넣고 이를 용출액인 isotonic PBS(pH 7.4) 5 ml에 넣어 36°C, 100 rpm의 조건으로 진탕 배양시키면서 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 및 24 시간마다 용출액 200 μ l씩을 취해 HPLC로 분석하여 리포솜으로부터 약물의 방출률을 계산하였다. 이때의 표준액은 SK를 등장인 인산완충액으로 용해 희석하여 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0.78125 (g/ml)의 농도로 만든 후 100 (1 μ l씩 HPLC에 주입하여 SK의 양을 계산하였다. 또한 amidolysis assay로도 분석하여 약물의 방출률을 비교·검토하였는데 이 분석법은 SK에 의해 활성화된 plasmin이 chromozyme-PL을 분해시켜 나타나는 4-nitroaniline의 정색 반응 속도를 405 nm에서 측정하므로써 단위 시간당 흡광도의 증가분을 SK정량의 지표로 사용하는 방법이다.²²⁻²⁶⁾

결과 및 고찰**SK의 수상에서의 안정성**

Figure. 1에 나타난 바와 같이 여러 용액에서 안정성 실험을 실시한 결과 특히 isotonic PBS (pH 7.4)용액과 순수한 물에서 SK는 매우 안정한 상태로 유지되었다. 그러나, pH 4.0인 산성 완충액에서 SK는 매우 불안정하였다. SK의 시간에 따른 잔존율을 semilogarithmic plot하였을 때 얻어지는 그래프는 1차 속도식에 의한 것으로 반응속도 상수 및 반감기($t_{1/2}$)를 Table II에 나타내었다. SK는 isotonic PBS(pH 7.4)에서 가장 안정하여 반감기가 18일이었으며 pH 4.0 PBS에서 가장 불안정하여 반감기는 3일 정도밖에 되지 않았다.

리포솜의 봉입 효율

SK 표준 용액 100 μ 에 Transcutol(400 μ l)를 가해 잘 혼합 후 여과시킨 여액을 HPLC로 분석하여 리포솜에 봉입된 SK의 양을 구하였다.

지질을 PC 단독으로 사용한 리포솜에서 지질의 농도를 100 μ mol/ml로 했을 경우 봉입률은 5.35%였으며 지질의

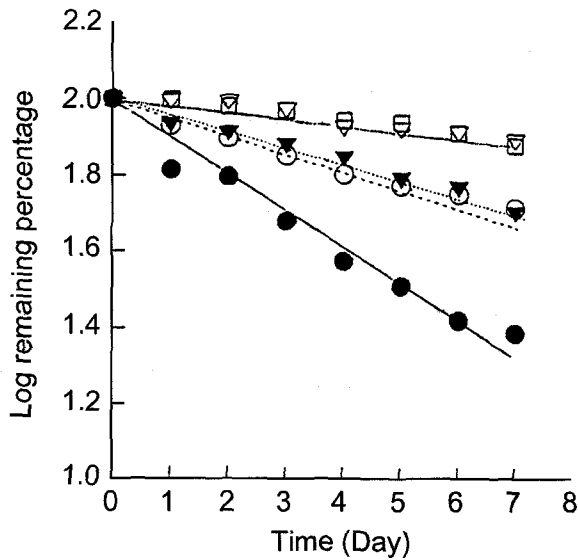


Figure 1—The first order degradation profiles of streptokinase in various aqueous solutions at 4°C.
Key : -▽- ; isotonic PBS (pH 7.4), -□- ; pure water, -▼- ; PBS (pH 9.0), -○- ; 0.9% NaCl, -●- ; PBS (pH 4.0).

Table II—The Pseudo-first Order Rate Constant of Streptokinase Degradation in Various Buffer Solutions at 4°C

Solutions	K_{obs} (Day ⁻¹ , × 10 ⁻²)	$t_{1/2}$ (Day)
pH 4.0 PBS	19.8 ± 1.5	3.50 ± 0.27
pH 7.4 PBS	3.82 ± 0.23	18.1 ± 1.1
pH 9.0 PBS	8.98 ± 0.85	7.72 ± 0.73
Distilled Water	3.87 ± 1.56	17.9 ± 7.2
0.9 % NaCl	9.05 ± 0.41	7.65 ± 0.35

(n=3, mean ± S.D.)

농도를 200 μmol/m²로 증가시켰을 경우에는 8.67%로 증가하였으나 모두 10% 미만의 낮은 봉입률을 나타내었다. 따라서 총 지질 농도를 200 μmol/m²로 고정시킨 후 콜레스테롤을 증가시키면서 제조한 리포솜 A~C의 봉입률은 14.57, 17.45, 17.87%로 증가함이 관찰되었다. 또한 PC와 콜레스테롤을 몰비로 2:1 이상 첨가시 봉입률의 증가가 관찰되지 않았으므로 SL의 제조시에 PC와 콜레스테롤의 몰비를 2:1로 고정하고(Table I의 B) DPPE-PEG(5,000)을 각각 2.5, 5, 7.5 mol%의 비율로 첨가하여 SL을 제조하였다. 각각의 봉입률은 18.25, 20.46, 21.84%로 위의 일반 리포솜보다 봉입률은 증가했으며 첨가된 DPPE-PEG(5,000)의 양이 증가할수록 증가되었다.

첨가제에 따른 입자 크기 및 분포

Table IV에서와 같이 콜레스테롤의 양을 증가시켰을 경우

Table III—The Entrapment Efficiency of Streptokinase into Liposomes Containing Phosphatidylcholine and Various Additives

Formulation of liposomes	Entrapment efficiency (%)
only PC	8.67 ± 1.19
A	14.57 ± 2.32
B	17.45 ± 2.12
C	17.87 ± 3.21
D	18.25 ± 2.92
E	20.46 ± 4.22
F	21.84 ± 2.31

(n=3, mean ± S.D.)

Table IV—The Size Distribution and Mean Size of Streptokinase-Entrapping Liposomes with Various Lipid Composition

Formulation of liposomes	Size (nm)	
	Mean	Range
only PC	692	585 ~ 799
A	847	703 ~ 953
B	1314	1137 ~ 1657
C	1707	1099 ~ 2274
D	536	481 ~ 570
E	413	400 ~ 433
F	383	358 ~ 428

입자의 크기가 증가했으며 입자 크기의 분포도 넓어지는 경향을 나타내고 있다. 특히 DPPE-PEG(5,000)를 첨가한 SL (Table I의 처방 D~F)의 경우에는 입자 크기가 1314 nm인 일반 리포솜에 비해 300~500 nm로 현저히 작은 입자 크기를 보여 주고 있다. DPPE-PEG(5,000)의 첨가량이 증가함에 따라 리포솜의 크기가 작아지고 입자 크기의 분포도 좁아짐을 알 수 있었다.

탁도 측정에 의한 리포솜의 안정성 평가

일반 리포솜의 경우보다 SL의 경우에서 탁도의 변화가 현저히 줄었으며 DPPE-PEG(5,000)의 함량이 증가할수록 탁도의 변화가 감소하였다(Table V). 특히 DPPE-PEG(5,000)를 7.5 mol%로 함유한 SL은 탁도의 변화가 최소인 결과로 미루어 보아 일반 리포솜 현탁액의 응집, 침강, 융합 등의 물리·화학적 불안정성의 단점이 SL에 의해 극복되었으며 입자 크기의 감소에 따라 리포솜의 물리적 안정성이 확보되었다고 사료된다.

리포솜으로부터 SK 방출

일반적으로 지질에 콜레스테롤을 첨가하면 지질막을 이루

Table V—The Change of Turbidity(%T) of Liposomes at 540 nm During 7 days (37°C)

Time (day)	only PC	A	B	C	D	E	F
0	0.15	0.28	0.23	0.27	0.37	0.25	0.26
0.5	0.34	1.39	2.67	5.17	0.43	0.26	0.28
1	0.46	0.87	18.14	42.88	0.47	0.28	0.30
3	1.03	58.22	68.65	72.70	0.48	0.28	0.31
5	76.64	81.24	83.08	86.31	0.50	0.33	0.39
7	82.26	93.07	81.24	92.40	27.31	29.96	17.32

는 인지질의 탄화수소 사슬의 회전 자유도를 감소시켜 지질 막을 견고하게 만들고 상전이 온도 억제되어 방출 속도가 지연됨이 알려져 있는데²⁷⁾ SK와 같은 수용성이 큰 약물의 경우에는 지질 성분이나 첨가된 콜레스테롤의 양에 따라 서로 다른 방출 양상을 나타내게 할 수 있다.

총 지질 농도를 200 µmol/ml로 고정시킨 후 콜레스테롤의 양을 증가시킨 처방 A~C의 리포솜으로부터 방출된 SK를 HPLC로 분석한 결과 PC만으로 구성된 리포솜의 24시간 후의 방출률이 88%정도였으며 콜레스테롤이 증가함에 따라 방출률은 80, 72, 65%로 감소됨을 Figure 2 (a)에서 관찰할 수 있었다. 이는 콜레스테롤 첨가에 의한 방출 지연 현상이며 또한 amidolysis assay로 분석한 결과 리포솜의 콜레스테롤의 함량이 증가시(Table I의 처방 A~C) 리포솜으로부터 SK의 방출률은 각각 72, 66, 58%로 감소하였으며 HPLC 분석법에 의한 방출률보다 약간씩 감소되었다(Figure 3(a)). 이는 방출된 SK가 36°C 용출 매질에서 24시간의 용출 기

간 중 효소 활성이 저하된 현상이라 사료된다.

SL의 경우 방출 실험 24시간 후 DPPE-PEG(5,000)를 각각 2.5, 5, 7.5 mol%로 첨가시킨 SL로부터 SK의 방출률은 64, 58, 50%로 현저히 감소되었는데(Figure 2 (b)), 이는 친수성 고분자로 수식된 SL의 지질 이중막이 공간적으로 안정화되어 방출 실험 중 리포솜 막의 파괴로 인한 SK의 유출 현상이 감소되었기 때문이다. 또한 amidolytic assay로 분석한 결과 DPPE-PEG(5,000)의 함량이 2.5, 5, 7.5 mol%로 증가시 SK의 방출률은 각각 58, 52, 48%로 감소하였으며 HPLC 분석법에 의한 방출률보다 약간씩 감소되었다.(Figure 3(b)).

결론

SK의 리포솜 제제화를 위하여 여러 수상에서 안정성 실험을 실시한 결과를 바탕으로 일반 리포솜과 SL을 제조하여 이들의 지질 조성에 따른 봉입률의 변화 및 입자 크기 분포 실험을 실시하였으며 보관 중의 탁도 변화와 *in vitro*에서 SK의 방출 실험을 하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. SK는 용액 상태일때 pH 7.4인 PBS에서 가장 안정하였으며 산성 용액(pH 4.0)에서 불안정하였다.
2. 일반 리포솜의 경우 지질의 농도가 100에서 200 µmol/ml로 증가함에 따라 SK의 봉입률이 증가되었으며 콜레스테롤의 함량이 커질수록 봉입률이 향상되었다. 또한 SL의 경우 일반 리포솜보다 봉입률이 증가하였으며 DPPE-PEG

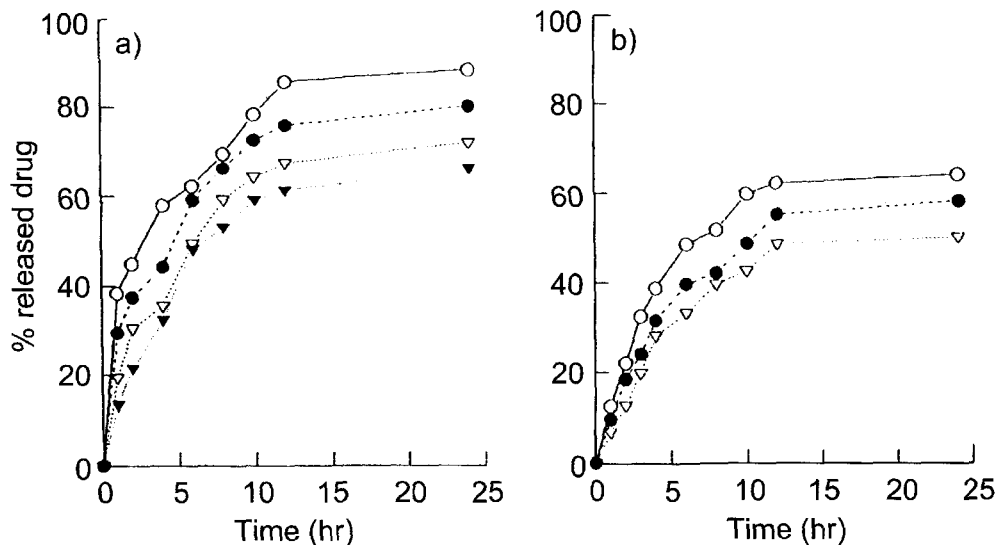


Figure 2—The release profiles of streptokinase entrapped into conventional liposomes (a) and Stealth® liposomes (b) by HPLC.

*Total lipid concentration was 200 µmol/ml.

*The molar ratio of PC and cholesterol for (b) was fixed to 2 : 1.

Keys : (a) -○- : only PC, -●- : A, -▽- : B, -▼- : C, (b) -○- : D, -●- : E, -▽- : F.

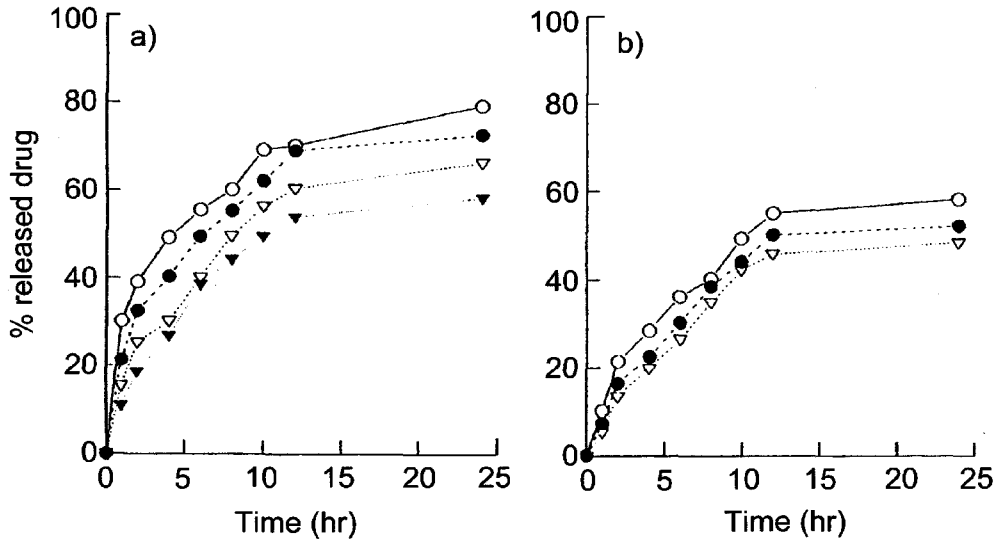


Figure 3—The release profiles of streptokinase entrapped into conventional liposomes (a) and Stealth[®] liposomes (b) by HPLC.

*Total lipid concentration was 200 μmol/ml.

*The molar ratio of PC and cholesterol for (b) was fixed to 2 : 1.

Keys : (a) - ○ - : only PC, - ● - : A, - ▽ - : B, - ▼ - : C, (b) - ○ - : D, - ● - : E, - ▽ - : F.

(5,000)의 첨가량이 증가할수록 봉입률이 증가하였다.

3. 리포솜의 입자 크기 분포는 콜레스테롤의 함량이 많을수록 증가하였으며 평균 입자도 커졌다. SL의 경우에는 DPPE-PEG(5,000)의 함량이 증가할수록 입자의 크기가 감소하였고 그 분포 범위도 균일하였다.

4. 리포솜으로부터의 약물 방출률은 PC 단독의 리포솜의 경우보다 콜레스테롤이 첨가되었을 경우 방출률이 감소하였으며 콜레스테롤의 함량이 많아질수록 감소하였다.

5. SL의 경우 일반 리포솜 보다 SK의 방출이 더 지연되었으며 DPPE-PEG(5,000)의 첨가량이 증가할수록 SK의 방출률은 감소하였다.

이상의 결과로 보아 SK를 봉입시킨 SL을 제조하여 리포솜의 물리적 안정성의 개선 및 생체내 약물을 지속적으로 방출하는 약물 수송체로서 SK에 대한 SL의 응용 가능성을 평가하였다.

문헌

- 1) S.A. Lew and W. Ganz, Streptokinase thrombolytic therapy in acutemyocardial infarction, *Haemostasis*, **16**, Supple. 3, 113-121 (1986).
- 2) S. Karger AG and Basel, Streptokinase-biochemistry and clinical application, *Enzyme*, **10**, 79-89 (1988).
- 3) G. Koren, M.H. Luria, A. J. Weiss, M. Kriwisky, M. Mosseri and C. Cotan, Early treatment of acute myocardial infarction with intravenous streptokinase. A High risk syndrome, *Archs. Intern. Med.*, **147**, 237-240 (1987).

- 4) V.D. Laarse, F. Vermeer, W.T. Hermens and G. M. Willens, Effect of early intracoronary streptokinase on infarct size estimated from cumulative enzyme release and on enzyme release rate. A randomized trial of 533 patients with acute myocardial infarction, *Am. Heart J.* **112**, 672-681 (1986).
- 5) J.P. Bassand, R. Faivre, O. Becque and C. Herbert, Effect of early high-dose streptokinase intravenously on left ventricular function in acute myocardial infarction, *Am. J. Cardiol.*, **60**, 435-439 (1987).
- 6) C.S. Yong and Y.T. Sohn, Conjugation of protein and peptide drugs with hydrophilic polymers and their application, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **23**, 187-206 (1993).
- 7) R. Shrin, L.G. Stoven and S. Pizzo, A nonantigenic covalent streptokinase-polyethylene glycol complex with plasminogen activator function, *J. Cli. Invest.*, **75**, 413-419 (1985).
- 8) N. Tomiya, K. Watanabe, J. Awaya, M. Kurono and S. Fujii, Modification of acyl-plasmin-streptokinase complex with polyethylene glycol, *FEBS Lett.*, **193**, 44-48 (1985).
- 9) P. Goldbach, S. Dumont, R. Kessler, P. Poindron and A. Stmm, Preparation and characterization of interferon-γ-containing liposome, *Int. J. Pharm.*, **123**, 33-39 (1995).
- 10) L.D. Mayer, M.B. Bally, K.J. Hope and P.R. Cullis, Techniques for encapsulating bioactive agent into liposomes, *Chem. Phys. Lipids*, **40**, 335-345 (1986).
- 11) R.L. Juliano and D. Stamp, Pharmacokinetics of liposome-encapsulated anti-tumor drugs, *Biochim. Pharmacol.*, **27**, 21-27 (1978).
- 12) F.J. Martin and D. Papahadjopulos, Irreversible coupling of immunoglobulin fragments to performed vesicles, *J. Bio. Chem.*, **257**, 286-288 (1982).
- 13) J.N. Weistein and R.L. Magin, Liposomes and hyperthermia :

- Selective delivery of methotrexate to heated tumors, *Science*, **204**, 188-191 (1979).
- 14) K. Kono, K.I. Zenitani and T. Takagishi, Novel pH-sensitive liposomes : Liposomes bearing a poly(ethyleneglycol) derivative with carboxyl groups, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1193**, 1-9 (1994).
 - 15) D.D. Lasic, F.J. Martin, A. Gabizon, S.K. Huang and D. Papahadjopoulos, Sterically stabilized liposome : a hypothesis on the molecular origin of extended circulation times, *Biochim. Biophys. Acta*, **1070**, 187-192 (1991).
 - 16) M.C. Woodle and D.D. Lasic, Sterically stabilized liposomes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1113**, 171-199 (1992).
 - 17) D. Lasic and F. Martin, *Stealth liposome*, CRC press, Boca Raton, Fla., U.S.A. (1995).
 - 18) K.L. Hwang, K.S. Luk and P.L. Beaumierm, Hepatic uptake and degradation of unilamellar sphingomyelin/cholesterol liposome : a kinetic study, *Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 4040 (1980).
 - 19) T.M. Allen, C. Hansen, F. Martin, C. Redemann and A.Y. Young, Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethyleneglycol) show prolonged circulation half-lives *in vivo*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1066**, 29-36 (1991).
 - 20) G. Vaage, D. Donovan, E. Mayhew, P. Uster and M. Woodle, Therapy of mouse mammary carcinoma with vincristine and doxorubicin encapsulated in sterically stabilized liposomes with relatively prolonged residence in circulation, *Biochim. Biophys. Acta*, **348**, 1022 (1990).
 - 21) F. Olson, C.A. Hunt, F.C. Szoka, W.J. Vail and D. Papahadjopoulos, Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **557**, 9-23 (1979).
 - 22) O. Matsuo, T. Sakai, Y. Takakura and H. Mihara, Substrate specificity of tissue plasminogen activator and urokinase as determined with synthetic chromogenic substrates, *Japanese J. Physiology*, **33**, 1031-1037 (1983).
 - 23) T. Radek, J.D. Donald and J.C. Francis, Streptokinase-plasmin (ogen) activator assay, *Methods in Enzymology*, **223**, 145-155 (1990).
 - 24) C.W. Robert, S. Louis and C.R. Kenneth, Kinetics of activation of human plasminogen by different activator species at pH 7.4 and 37°C, *J. Biol. Chem.*, **255**, 2005-2013 (1980).
 - 25) C.W. Robert, S. Louis and A. Leonida, and C.R. Kenneth, Steady state Kinetics of activation of human and bovine plasminogens by streptokinase and its equimolar complexes with various activated forms of human plasminogen, *J. Biol. Chem.*, **253**, 1402-1407 (1978).
 - 26) S. David, M.D. Grierson and T.D. Bjornsson, Pharmacokinetics of streptokinase in patients based on amidolytic activator complex activity, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **41**, 304-313 (1987).
 - 27) R. Ganapathi and A. Krishnan, Effect of cholesterol content of liposomes on encapsulation, efflux and toxicity of adriamycin, *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 698-700 (1984).