

리포솜 제제 중 렉틴-엘라지탄닌 포합체의 분석법 확립

전현주 · 최영욱[†]

중앙대학교 약학대학
(2001년 4월 25일 접수)

Assay Method for Lectin-conjugated Ellagitannin Encapsulated in Liposomal Formulations

Hyun-Joo Jeon and Young Wook Choi[†]

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

(Received April 25, 2001)

ABSTRACT—Lectin-conjugated ellagitannin (LET), a newly introduced melanoma-specific antitumor agent which has been synthesized by conjugation of wheat germ agglutinin as a lectin with praecoxin A as an ellagitannin, was encapsulated into sterically stabilized liposomes (SSL). Modified Folin phenol method was established for the quantitation of LET contents in liposomal formulations protein employing the standard calibration curve with bovine serum albumin. After removal of phospholipid by organic solvent extraction, which interferes the specific selectivity of the Folin-Ciocalteu reagent with the protein, recovery of LET was $94.5 \pm 2.3\%$ and the encapsulation efficiency was revealed as $37.8 \pm 5.9\%$ for 2.5 mg/ml LET solution.

Keywords—Lectin-conjugated ellagitannin, Sterically stabilized liposome, Organic solvent extraction, Folin phenol method, Encapsulation efficiency

최근 인체내 특정 부위로의 targeting을 시도하여 암세포에만 특이적으로 약물을 전달함으로써 약물의 약효를 증진 시킴과 동시에 부작용을 감소시키는 미사일형 항암제 연구가 활발히 진행되고 있다. 암세포는 정상세포와 비교시 세포 표면에 당의 구조적 차이를 나타내며, 이를 특이적으로 인식하여 결합하는 렉틴과 같은 물질이 미사일형 항암제 개발에 도입되고 있다. Wheat germ agglutinin(WGA)은 *Triticum vulgare*에서 추출된 렉틴으로서 N-acetyl-D-glucose 및 N-acetylneuraminic acid에 특이적으로 결합하고, 바이러스와 화학 발암제로 암화된 세포에 정상세포보다 강하게 응집하는 단백질로 알려져있다.^{1,2)}

가수분해성 탄닌 중 하나인 praecoxin A는 *Alnus hirsuta* var. *micophylla*에서 분리된 ellagitannin(ET)으로서 수년 전부터 항암 및 면역부활작용에 관한 연구가 진행된 바 있다.^{3,4)} 본 연구에서는 WGA 렉틴과 식물유래 항암약물인 praecoxin A의 분자화합물인 lectin-conjugated ellagitannin(LET)을 주사제형으로 만들기 위해 리포솜을 이용하여 LET를 봉입하

고, 더 나아가 수용성 약물 및 지질의 안정성 확보를 위해 동결 건조하여 분말 제제화 하였다. 이 때 리포솜 제제중 LET의 함량은 ET를 직접적으로 정량할 수 없기 때문에 praecoxin A와 1:18의 일정한 비율로 결합⁵⁾되어 있는 렉틴을 정량함으로써 간접적으로 평가할 수 있다. 그러나 일반적인 단백질 정량법에 의해 렉틴을 정량하는 경우 공존하는 지질에 의한 간섭효과가 커서 정량이 곤란하기 때문에 본 연구에서는 유기 용매를 이용하여 먼저 리포솜에 공존하는 인지질을 추출 제거한 후 modified Folin phenol method를 이용하여⁶⁻⁸⁾ 렉틴 단백질을 정량할 수 있는 방법을 확립하였으며, 결과적으로 LET의 리포솜 내 봉입률을 구할 수 있었기에 간략히 소개하고자 한다.

실험방법

시약 및 기기

시약으로는 Dimyristoylphosphatidylcholine(DMPC), cholesterol(CH)과 sucrose는 Sigma(U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다. Distearylphosphatidylethanolamine-N-poly(ethylene glycol) 2000(DSPE-PEG)은 Avanti polar lipids사(U.S.A.)에서

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

구입하여 사용하였다. Protein assay kit는 Sigma Diagnosis (U.S.A.)에서 구입하여 사용하였고, Ethyl ether(GR grade, Duksan pharmaceutical Co., Ltd.)를 사용하였으며, 그 외의 일반 시약은 특급 및 1급 시약을 그대로 사용하였다. 그리고 LET는 이미 보고⁹⁾된 바 있는 물질을 사용하였다.

기기로는 회전감압 농축기(Eyela, Tokyo Rikakikai Co., Japan), Extruder(LiposoFast, Avestin Inc., Canada), 등속 주입 펌프(Masterflex, Cole-Parmer Instrument Co., U.S.A.), 원심분리형 농축기(Ecospin 314, Hanil Research and Development, Korea), 분광광도계(Varian Carry3, Varian Inc., Australia), 동결건조기(Martin Christ Co., Germany) 등을 사용하였다.

리포솜의 제조

지질의 총량을 30 μmol/ml로 하였고, 통상적인 리포솜 (conventional liposome: CL)은 DMPC:CH을 70:30의 몰비로 혼합하고, 입체구조적으로 안정화된 리포솜(Sterically stabilized liposome: SSL)은 DMPC:CH:DSPE-PEG을 65:30:5의 몰비로 혼합하여 제조하였다. 각 조성의 지질을 클로로포름에 녹인 후, 회전 증발 농축기에서 상전이 온도 이상을 유지하면서 감압 증류하여 유기용매를 제거하여 둥근 바닥 플라스크 표면에 지질 피막이 형성하였다. 여기에 약물을 함유한 수용액을 넣어 상전이 온도 이상에서 수화시켜 multilamellar vesicle을 만든 후 extrusion을 실시하여 입자경 100 nm 정도의 unilamellar vesicle을 제조하였으며⁹⁾ cryoprotectant로서 sucrose를 lipid와 3:1의 몰비로 약물 수용액에 첨가한 후 동결건조하였다.¹⁰⁾

추출에 의한 인지질 제거

LET의 정량에 방해물로 알려진 리포솜으로부터 유래하는 인지질을 제거하기 위해 ethyl ether를 이용한 유기 용매 추출법을 도입하였다. 이 때 인지질이 얼마나 효과적으로 제거되는지를 확인하기 위해서 리포솜 현탁액의 탁도와 유기 용매 추출 후의 수층의 탁도를 파장 540 nm에서의 흡광도로서 비교 평가하였다.

추출시 LET의 회수율 측정

추출에 의한 인지질 제거시 LET도 함께 제거되는지의 여부를 관찰하기 위해 추출조작 전후의 LET 함량을 정량함으로써 회수율을 측정하였다. 즉 일정농도의 LET 용액 0.9 ml을 대조용 공 리포솜 0.1 ml과 혼합하고 동량의 메탄올을 넣어 vortexing하여 리포솜의 구조를 파괴시킨다. 이를 ethyl ether로 추출하여 원심분리한 후 수층을 취해 질소가스를 이

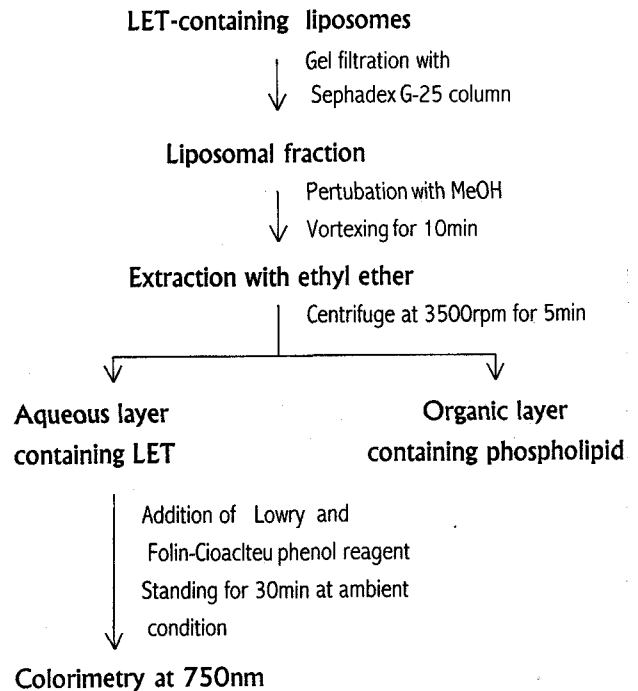
용하여 용매를 모두 제거한 다음 1 ml의 물로 재분산하여 LET 정량법에 따라 정량하여 회수율을 측정하였다.

LET 정량법

Folin phenol method에 따라 protein assay kit(Sigma)을 사용하여 bovine serum albumin(BSA)을 표준 단백질로 하여 검량선을 작성하고 validation 하였으며, 검액 중의 LET를 정량하였다. 검액 0.4 ml에 Lowry 시약 0.4 ml을 가하고 잘 혼합한 후 20분간 실온에서 방치한 뒤 이 액에 Folin-Ciocalteu phenol 시약을 0.2 ml 가한 다음 30분간 실온에 방치하고 750 nm에서 비색정량하였다.

붕입률 측정

제조된 리포솜의 붕입률 측정시 리포솜 분획만을 얻기 위해 붕입되지 않은 유리약물은 고정상으로 Sephadex G-25 컬럼과 이동상으로 pH 3.0 인산완충액을 이용하여 겔 여과법으로 분리하였다. 유리된 약물을 제거한 리포솜 분획만을 취한 다음, 리포솜의 구조를 깨기 위해 동량의 메탄올을 가하여 10분간 vortexing하고, 시료 일정량을 취해 시험관에 옮겼다. 여기에 유기용매인 ethyl ether를 가하여 20분간 추출하였다. 추출이 끝난 다음 3500 rpm으로 10분간 원심 분리한 후 유기용매 층을 제거하고 수층만을 취하여 검액으로 하고, 이를 LET 정량법에 의하여 정량하였다(Scheme I).



Scheme I—Assay procedures for Lectin-conjugated ellagitannin (LET) in liposomal formulations.

결과 및 고찰

LET의 리포솜 제제화

CL 제조시 인지질 피막을 LET 용액으로 수화시킬 때 육안으로 확인되는 응집이 관찰되어 LET의 리포솜 제제를 제조할 수 없었는데, 이는 인지질과 LET의 상호작용에 의한 것으로 생각된다. 그러나 SSL의 경우에는 응집이 일어나지 않고 리포솜이 정상적으로 형성되었는데 이는 리포솜의 표면을 수용성 고분자인 PEG 2000이 둘러싸 입체적인 방어막을 구성하여 인지질과 LET의 상호작용을 막을 수 있었기 때문인 것으로 사료되었다. 따라서 LET의 리포솜 제제는 SSL로 제제화하였으며, 이는 향후 이 제제를 정맥 주사할 때 오히려 LET의 혈중 체류성을 개선시킬 수 있는 이점이 있을 것으로 기대된다.

인지질의 제거 및 LET의 회수율

유기 용매 추출이 리포솜으로부터 유래하는 인지질을 얼마나 효율적으로 제거하는지를 확인하기 위해 탁도를 비교하였을 때(Table I), 추출 전의 리포솜 제제가 추출 후에 비하여 5배 이상 흡광도가 크게 나타났다. LET 용액의 탁도를 기준으로 하여 상대 탁도를 구하였을 때 용매 추출 후의 상대 탁도가 1.16으로서 LET 용액의 탁도와 거의 비슷하게 관찰되어, 수층에 존재하던 인지질의 대부분이 유기용매 층으로 이동함으로써 정량에 방해가 주는 인지질이 효율적으로

로 제거되었음을 확인할 수 있다.

한편 유기용매 추출시 단백질의 손실 정도를 평가하기 위해 회수율을 측정된 결과 원래의 단백질 양의 약 95% 이상이 회수됨으로써 유기 용매를 이용한 인지질의 추출제거 방법이 LET 정량에 영향을 미치지 않는 것으로 판단되었다.

리포솜내 봉입된 LET의 정량 및 봉입률

일반적으로 단백질을 정량하는 방법은 여러 가지가 알려져 있으나, 본 연구에서 이용한 modified Folin phenol method는 *o*-phthalaldehyde (OPA) fluorescence assay나 Coomassie blue dye binding method에 비해 단백질간의 측정값의 변화가 적으며, 280/260 nm ultraviolet absorption method에 비하여 감도가 좋고, 매우 간편하고 정확한 방법으로 알려져 있다.⁸⁾ 그리고 단백질의 정량법은 단백질의 종류에 따라 정량치에 변화가 있으므로, 경제적이면서도 정제가 용이하고 순품을 확보하기 쉬우며 실험의 재현성이 우수한 표준 단백질을 써서 검량선을 작성해야 할 필요성이 있다. 따라서 본 연구에서는 LET의 흡광을 농도로 환산하기 위해 표준 단백질로서 BSA를 이용하고 modified Folin phenol method로 정량하여 검량선을 작성한 결과 상관관계수가 0.9994로서 높은 직선성을 나타내었다. 일간 및 일내 변동계수를 고려하여 LET 정량법의 정밀성과 정확성을 validation한 결과 coefficients of variations(CV)(%) 및 relative errors(RE)(%)가 모두 10% 이내(최소 분석치에 대해서는 15%이내)로 나타나(Table II), 분석조건이 매우 정량성 있는 양호한 방법임을 알 수 있었다. 이 조건에서 LET의 리포솜내 봉입률(%)을 측정된 결과 0.5 mg/ml 및 2.5 mg/ml의 LET 수용액에서 각각 47.6±2.9 및 37.8±5.9였다.

Table I—Turbidity of Liposomal Formulations before and after Extraction by Organic Solvent

	Turbidity ^{a)}	Relative turbidity ^{b)}
Before extraction	0.162 ± 0.002	6.48
After extraction	0.029 ± 0.004	1.16

^{a)} Expressed as mean ± S.E.(n=3)

^{b)} Calculated as the turbidity ratio of liposomal formulations to LET solution without liposomes, which was observed as 0.025 in average turbidity.

결 론

LET를 주사제형으로 만들기 위해 SSL을 이용하여 제제

Table II—Precision and Accuracy in LET Assay by Modified Folin Phenol Method

Nominal conc. (µg/ml)	Intraday (n=3)			Interday (n=3)		
	Measured conc. (µg/ml, mean ± S.D)	CV ^{a)} (%)	RE ^{b)} (%)	Measured conc. (µg/ml, mean ± S.D)	CV (%)	RE (%)
5	4.54 ± 0.21	4.62	9.12	4.45 ± 0.12	2.67	11.02
7	7.18 ± 0.72	9.97	-2.63	7.29 ± 0.59	8.04	-4.14
10	9.29 ± 0.59	6.36	7.02	9.57 ± 0.35	3.71	4.27
15	15.60 ± 0.96	6.17	-4.06	15.57 ± 0.15	0.95	-3.81
20	20.53 ± 0.01	0.06	-2.70	20.43 ± 0.17	0.82	-2.15
50	49.68 ± 0.69	1.39	-0.63	48.93 ± 0.67	1.37	2.14

^{a)} Coefficient of variation, ^{b)} Relative error

화 할 수 있었으며, 리포솜 제제 중의 LET 정량시 먼저 유기 용매 추출에 의해 인지질을 효율적으로 제거한 뒤 modified Folin phenol 법을 이용한 분석법을 확립할 수 있었다. 이 방법은 추후 단백질과 conjugation하여 리포솜으로 제제화한 약물군에 대해서도 정량성 있는 분석방법으로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 말씀

본 연구는 보건복지부의 보건의료기술연구개발사업(HMP-98-D-1-0016)의 내용을 일부 정리 한 것으로 연구비 지원에 감사드립니다.

문 헌

- 1) H.K. Kim, K.S Han, D.I Lee, Effects of Letin-conjugated Ellagitannin on inhibition of melanoma metastasis, *Yakhak Hoeji*, **44**, 601-606 (2000).
- 2) H.K. Kim, K.S Han, D.I Lee, Effects of Letin-conjugated Ellagitannin on antitumor activity, *Yakhak Hoeji*, **44**, 607-

- 612 (2000).
- 3) 천연물화학 교재연구위원회, 천연물 화학, 서울, 영림사, pp. 229 (1995).
- 4) Y. Kachiwada, I. Nonak, K. Nishida, J. Lee, Y. Bori, K. Fukushima, F. Bastow and K. H. Lee, Tannin as potent inhibitors of DNA topoisomerase II *in vitro*, *J. Pharm. Sci.*, **82**, 487-492 (1993).
- 5) W.S. Kim, M.S. Kim, B.S. Kim, M.W. Lee, D.I. Lee, Y.W. Choi, E.J. Kim, H.H. Kim, Preparation and characterization of Wheat germ agglutinin-conjugated praecoxin A, *Yakhak Hoeji*, **45**, 302-309 (2001).
- 6) G. L. Peterson, Determination of total protein, *Meth. Enzymol.*, **90**, 95-121 (1983).
- 7) D. M. Bollag, S. J. Edelman and M.D. Rozycki, *Protein methods*, Wiley- Liss, New York, pp. 57-79 (1996).
- 8) G. L. Peterson, Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, *Anal. Biochem.*, **100**, 201-220 (1979).
- 9) A. Sharma and U. S. Sharma, Liposome in drug delivery : progress and limitations, *Int. J. Pharm.*, **154**, 123-140 (1997).
- 10) K. Tanaka, T. Tanaka, K. Fuji and K. Miyajima, Freeze-drying of liposomes prepared by sonication and extrusion techniques, *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 2653-2656 (1991).