

## 열변성 단백질이 결합된 음이온성 리포솜의 혈장 내 안정성 및 세포 내 이입 평가

이미정<sup>1,2</sup> · 황인영<sup>1,2</sup> · 김성규<sup>1</sup> · 정석현<sup>1</sup> · 정서영<sup>2</sup> · 성하수<sup>1</sup> · 조선행<sup>1</sup> · 신병철<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>한국화학연구원 바이오소재연구센터, <sup>2</sup>경희대학교 약학대학  
(2009년 10월 18일 접수 · 2009년 11월 24일 수정 · 2009년 11월 27일 승인)

### Stability in Plasma and Intracellular Uptake of Thermally Denatured Protein-coated anionic Liposomes

Mi Jung Lee<sup>1,2</sup>, In Young Hwang<sup>1,2</sup>, Sung Kyu Kim<sup>1</sup>, Suk Hyun Jung<sup>1</sup>, Seo Young Jeong<sup>2</sup>, Ha soo Seong<sup>1</sup>, Sun Hang Cho<sup>1</sup> and Byung Cheol Shin<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Biomaterials Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology, 100, Jang-dong, Yuseong, Daejeon 305-343, Korea.

<sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Science, College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea  
(Received October 18, 2009 · Revised November 24, 2009 · Accepted November 27, 2009)

**ABSTRACT** – Liposomes have been used as one of the efficient carriers for drug delivery. In this study, anionic liposomes of which surface was modified by using both electrostatic interaction between anionic liposomes and cationically charged BSA molecules at lower pH than isoelectric point (pI) of BSA and denaturation of the BSA-coated liposomes by thermal treatment. The thermally denatured BSA-coated liposomes (DBAL) had mean particle diameter of  $125.2 \pm 1.7$  nm and zeta potential value of  $-22.4 \pm 4.5$  mV. Loading efficiency of model drug, doxorubicin (DOX), into liposomes was  $83.0 \pm 2.6\%$ . Results of *in vitro* stability study of DBAL in blood plasma showed that the mean particle diameter of DBAL 400 did not increase in blood plasma and adsorption of plasma protein was much less than plain or anionic liposomes. Intracellular uptake of DBAL 400 evaluated by confocal microscopy observation was higher than that of PEG liposomes.

**Key words** – Liposome, Denaturation, Plasma protein adsorption, Doxorubicin, Albumin

리포솜은 1960년대 A.D. Bangham 교수에 의해 그 구조가 소포체 형태로 밝혀졌으며, 내부에 소수성 또는 친수성 약물의 봉입이 가능한 약물전달체이다.<sup>1)</sup> 이러한 리포솜은 대부분 생체 물질인 지질 및 인지질로 구성되기 때문에 생체 적합성이고 생분해성이며 독성이 없고 면역반응이 거의 없다고 알려져 있다.<sup>2-4)</sup> 그러나 리포솜을 체내 주입 시 혈장 단백질의 흡착과 효소들의 지질 분해로 인한 구조적인 불안정성 때문에 내부에 봉입된 약물이 누출되어 표적부위에서의 효율적인 약물방출이 이뤄지지 않으며 세망내피계(reticuloendothelial system, RES)에 의한 리포솜의 소실로 장시간 순환이 불가능하다는 단점을 가진다.<sup>5-7)</sup> 이러한 단점의 극복을 위해 생체 적합성이고 친수성고분자인 폴리에틸렌 글리콜(polyethyletheglycol, PEG) 리포솜의 표면에 도입함으로써 리포솜 표면에 친수성막의 형성으로 옹소닌작용(opsonization)을 억제하여 혈류 내 순환시간이 증가되고 항

암치료 전달체로 사용시 EPR (enhanced permeability and retention)효과에 의해 표적부위로 리포솜이 축적되어 효율적인 약물 전달이 가능하게 되었다.<sup>8,9)</sup> 그러나 리포솜 표면에 친수성 막을 도입하기 위해 사용되는 PEG와 공유결합으로 만들어진 지질 복합체는 생체 내에 분해 효소가 없어 완전 분해가 일어나지 않기 때문에 체내에 미량이나마 축적될 가능성을 완전히 배제할 수 없고, 세포내 이입에 한계가 있다고 보고되었다.<sup>10-12)</sup> 이러한 PEG의 단점을 극복하기 위해 생체 내 분해가 가능한 단백질 분자를 리포솜 표면에 결합시켜 신장과 혈관에서의 흡수를 억제시키고, 혈중 체류시간을 연장하여 혈류 내 안정성을 증가시킬 수 있는 약물전달체를 개발하고자 하였다.<sup>13,14)</sup> 단백질은 등전점(isoelectric point, pI)보다 높은 pH에서는 음전하를 띠고, 낮은 pH에서는 양전하를 띠는 쯔비터(zwitter) 이온으로 열, 압력, 자외선, X선, 음파, 진동, 동결 등의 물리적 요인과 산, 염기, 유기용매, 계면활성제 등의 화학적 요인에 의해 단백질 변성이 일어나는 특징을 가진다. 변성된 단백질은 수소결합과 소수성 결합이 끊어져 단백질의 가장 안정한 구조인 3차 구조에서 1차

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
Tel : 042)860-7221, E-mail : bcshin@kriict.re.kr  
DOI : 10.4333/KPS.2009.39.6.423

구조로 풀리면서 3차 구조 내부의 소수성 부분이 외부로 노출되고, 아미노산의 아미드기와 카르보닐기의 펩티드결합으로 인해 새로운 수소결합과 소수성 결합의 형성으로 자유에너지가 최소화 되면서 단백질 고유의 활성을 잃어버린 상태가 된다. 이러한 열변성 단백질은 외관은 견고해지나 구형을 이루고 있던 폴리펩타이드 체인이 열에 의해 풀어져 효소가 작용할 수 있는 활성부위가 증가하여 단백질 내부는 가수분해 효소에 의해 분해되기 쉽게 된다.<sup>15,16</sup> 이러한 단백질의 특성을 이용하여 단백질 약물전달을 위한 고형나노지질입자와 단백질을 리포솜과 같은 지질나노입자에 적용하는 연구가 보고되었다.<sup>17</sup> 본 연구에서는 체내 존재하는 단백질 중 약 50~55%를 차지하고 5.82의 등전점을 가지는 알부민을 선택하여 열변성이 된 단백질을 리포솜 표면에 결합시킨 음이온성 리포솜(thermally denatured BSA-coated anionic liposome, DBAL)을 제조하였다.<sup>18</sup> 변성된 단백질의 표면 결합으로 인한 물리적 특성, 혈장 단백질의 흡착 정도 및 혈류 내에서 안정성을 평가하였고, 공초점 현미경을 사용하여 세포 내 이입을 관찰하였다.

## 실험 방법

### 시약 및 기기

리포솜 제조에는 L- $\alpha$ -phosphatidylcholine (soy-hydrogenated) (HSPC), cholesterol (CHOL), 1,2-Distearoyl-*sn*-Glycero-3-[Phospho-rac-1-glycerol] (Sodium Salt) (DSPG) 및 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy (polyethylene glycol) 2000] (DSPE-mPEG2000) (DSPE-mPEG 2000)을 사용했고, Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, USA)에서 구입 했다. 리포솜 표면 결합에 사용한 소 혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA)은 Sigma Aldrich Inc. (MI, USA)에서 구입하였고, 모델 약물은 독소루비신(doxorubicin, DOX)을 사용했으며, Boruyn Inc. (Seoul, Korea)에서 구입했다. 투석막은 분획 분자량(MWCO)이 12,000~14,000인 것을 Viskase Co. (IL, USA)에서 구입하여 사용하였고, 정제에 이용한 한외여과기(Bedford, MWCO 300,000)는 Millipore Co. (MA, USA)에서 구입했다. 그 밖의 실험에 사용한 용매 및 시약은 일급시약 및 특급시약을 그대로 사용하였다. 리포솜의 필름형성과 입자 크기 조절에는 회전용축증발기(Buchi, Switzerland)와 초음파 발생기(Fisher Scientific, USA) 및 가압압출기(Notherm Lipids Inc. Canada)를 사용했고, 입자 크기와 표면전위의 확인을 위해 입도측정기와 제타전위측정기(OTUSKA Electronics Co., Japan)를 사용했으며, 리포솜

내의 약물 봉입률은 분광광도계(UV mini 1240, Shimadzu, Japan)를 사용하여 측정했다. 제조된 리포솜 용액의 삼투압은 삼투압 측정기(Osmomat 030, GONOTEC GmbH., Germany)를 사용했고, 리포솜의 표면에 결합된 단백질의 정량분석을 위해 ELISA (EL808, Bio-Tek Ins, USA)를 사용하여 측정하였다. 세포 내 이입을 관찰하기 위해 공초점 현미경(CLSM, LSM5 LIVE, Carl Zeiss, Germany)을 사용하였다.

### 리포솜의 제조

대조 리포솜은 HSPC와 CHOL를 12.6 : 8.3 mM의 비율로 제조하였고, 음이온성 리포솜은 HSPC, CHOL 그리고 DSPG를 12.4 : 8.2 : 0.1 mM 비율로 제조하였으며, 두 지질의 농도는 12.8 mg/mL이 되도록 하였다. 또한, PEG를 도입한 리포솜(PEG 리포솜)은 HSPC, CHOL 그리고 DSPE-mPEG 2000을 12.6 : 8.3 : 1.1 mM 비율로 제조하였으며, 최종 지질의 농도는 16.0 mg/mL이 되도록 하였다. 각각의 지질들을 클로로포름으로 용해하였고, 감압 증류하여 등근플라스틱 내부에 지질막을 형성시킨 후, 24시간 동안 4°C 온도로 보관하여 형성된 지질막에 존재할 수 있는 잔류 용매를 완전히 제거하였다. 500 mM의 암모늄설페이트 용액을 첨가하여 등근플라스틱 내부에 형성된 지질막이 완전히 분산될 때까지 60°C의 온도에서 2시간 이상 수화시켜 리포솜 용액을 제조하였다. 수화가 끝난 리포솜 용액 중의 리포솜 입자크기를 80~100 nm로 조절하기 위하여 각각 200, 100 그리고 80 nm 공극의 폴리카보네이트 분리막(Whatman, USA)을 사용하여 각각 5회 이상 가압압출을 실시하였다. 리포솜 내에 봉입되지 않은 암모늄설페이트 용액을 제거하기 위해 4°C에서 24시간 동안 막투석(MWCO 12,000~14,000)을 실시하였다.

### 리포솜 표면의 알부민 결합 및 열변성

음이온성 리포솜 용액의 표면에 단백질을 결합시키기 위하여 구연산-인산 완충용액으로 소혈청 알부민을 100, 200, 400  $\mu$ g/mL의 농도로 각각 용해시켜 BSA 수용액들을 제조하였다. 제조한 BSA 수용액을 37°C에서 20  $\mu$ g/min 속도로 pH 3인 음이온성 리포솜 용액에 적가하면서 1시간 동안 교반시켰다. 이후 음이온성 리포솜 표면에 결합되지 않은 BSA를 제거하기 위해 한외여과법(MWCO 300,000)을 5회 이상 실시하여 BSA 표면 결합된 음이온성 리포솜을 제조한 후, 항온수조 100에서 30분간 단백질 변성을 실시하였다. 열변성이 된 리포솜은 pH 7.4인 HEPES buffer saline (HBS)로 막투석(MWCO 12,000~14,000)을 실시하여, 리포솜 용액

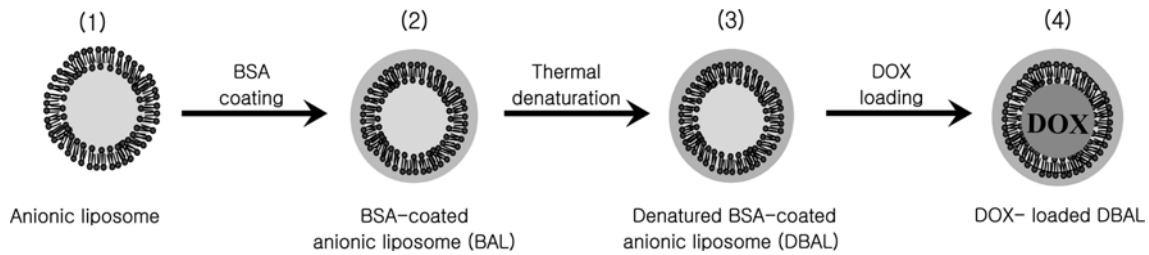


Figure 1—Schematic representation of denatured BSA-coated anionic liposome ; DOX is doxorubicin.

의 pH가 7.4까지 도달하면 투석을 완료하여 열변성 된 단백질이 결합된 음이온성 리포솜(DBAL)을 완성하였다. DBAL의 구조는 Fig 1에 나타내었다.

#### 리포솜의 약물봉입

제조된 리포솜과 DOX 수용액을 1 : 1 (v/v)로 혼합하였고, 60°C에서 2시간동안 교반하면서 DOX을 리포솜 내부로 봉입시켰다. DOX의 봉입에는 리포솜의 내부와 외부의 암모늄염의 이온농도 구배를 이용한 리모트 로딩법의 원리를 사용한 것으로 봉입이 되지 않은 DOX은 4°C에서 48시간 동안 실시한 막투석(MWCO 12,000~14,000)으로 제거하였다. 봉입이 끝난 리포솜 용액은 수크로스를 가하여 삼투압이 0.3~0.35 osmol/kg이 되도록 하였다.<sup>19)</sup>

#### 리포솜의 물리적 특성

리포솜의 입자크기 및 표면전위는 입도측정기와 제타전위기를 사용하였고, DOX의 봉입효율은 분광광도계를 사용하여 DOX의 농도를 측정하였다. 리포솜 표면에 결합된 단백질의 정량을 위해 브래드포드 분석법을 실시하여 다음과 같이 정량하였다. 96 well plate의 각각의 well에 알부민과 결합된 리포솜 용액 0.1mL과 Bio-Red protein assay시약 0.1 mL을 가한 후 ELISA를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였고, BSA 검량선은 각각의 대조 리포솜과 음이온성 리포솜 용액에 BSA를 1 mg/mL의 농도가 되도록 용해시켜 100°C에서 30분간 열처리한 시료를 사용하여 작성하였다.<sup>20,21)</sup>

#### 리포솜의 혈장 내 안정성 평가

DBAL의 혈장 내 입자크기 변화를 평가하기 위해 SD 랫트에서 채혈한 혈액을 헤파린 용액과 1 : 9 (v/v)로 혼합 후 원심분리하여 혈장을 취하여 혈장액을 준비하였다. BSA 100, 200, 400 µg/mL 농도의 수용액을 각각 결합시킨 DBAL 용액과 혈장액을 1 : 1 (v/v)의 비율로 혼합하여 37°C에서 교반시켰다. 일정한 시간에 따라 샘플을 채취하였

고, 입도측정기를 사용하여 입자크기를 측정하였다. 또한, DBAL과 대조 리포솜 및 PEG 리포솜의 혈장 내 단백질 흡착정도를 비교하기 위해 SD 랫트에서 채혈한 혈액을 헤파린 용액과 1 : 9 (v/v)로 혼합하여 원심분리 후 혈장을 취하였다. 채취한 혈장을 DBAL과 대조 리포솜 및 PEG 리포솜 용액들과 1 : 1 (v/v)의 비율로 혼합하여 37°C에서 교반시켰다. 일정 시간마다 1 씩 채취한 샘플을 한외여과기(MWCO 300,000)를 사용하여 단백질이 흡착된 리포솜만을 취해 브래드포드 분석법을 실시하여 흡착 단백질을 정량하였다.

#### 세포 내 이입 평가

DBAL의 세포 내 이입을 평가하기 위해 흑색종 세포주인 B16F10 세포(Korean Cell Line Blank, Seoul, Korea)를 사용하였다. 세포는 10%의 소 혈청 용액을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 5%, CO<sub>2</sub> 배양기에서 37°C로 배양하였다. B16F10을 커버슬립에 최종 세포 농도가  $1 \times 10^4$  cells/well이 되도록 가하여 24시간 이상 배양하여 부착시킨다. 배양액을 제거한 후 리포솜의 DOX의 농도를 16 µg/mL로 하여 리포솜 용액에 첨가한 후 배양액에서 2시간 동안 37°C의 5%, CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양시켰다. 배양액을 제거하고, 세포를 PBS로 세 번 수세한 후, 5% (v/v)의 paraformaldehyde 300 µL를 첨가하여 고정시켰고 세포핵 염색을 위해 15분 동안 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI, excitation/emission: 345/661)를 처리한 후 PBS로 세 번 수세하였다. 공초점 현미경을 이용하여 세포 내 이입을 평가하기 위해 세포의 형광 이미지(DOX excitation/emission: 480/540)를 관찰하였다.<sup>22-24)</sup>

## 결과 및 고찰

#### 리포솜의 물리적 특성

제조된 리포솜의 물리적 특성을 Table I에 나타내었다. 대

Table I—Physical properties of liposomes

Liposomes	Mean particle diameter (nm)	Zeta potential (mV)	DOX loading efficiency (%)
Plain liposome	109.5±1.6	0.33±0.2	90.5±1.2
Anionic liposome	106.0±1.8	-33.4±3.8	94.8±1.4
PEG liposome	99.2±0.8	-21.2±0.7	95.7±0.4
DBAL 100	123.2±2.5	-17.5±0.4	86.3±3.2
DBAL 200	117.9±1.1	-23.6±0.3	84.6±2.3
DBAL 400	125.2±1.7	-22.4±4.5	83.0±2.6

조 리포솜과 PEG 리포솜의 입자크기는 각각 109.5±1.6, 99.2±0.8 nm였고, 이온성 리포솜의 입자크기는 106.0±1.8 nm로 열변성 단백질이 결합된 DBAL 400의 입자크기인 125.2±1.7 nm 보다 약 20 nm 정도 작은 것을 확인할 수 있었다. 이는 리포솜 표면에 정전기적 결합으로 열변성 단백질 층이 형성된 것이기 때문이라 생각된다.<sup>13)</sup> 제조된 음이온성 리포솜의 표면전하는 -33.4±3.8 mV를 나타내었고, DBAL 100, 200 및 DBAL 400의 표면전하 값은 각각 -17.5±0.4 mV, -23.6±0.3 mV 및 -22.4±4.5 mV로 나타났다. 음이온성 리포솜의 경우 구성 지질인 DSPG가 음이온성 지질로 그 영향 때문에 표면전위가 음전하를 나타내는 것으로 생각된다. 반면, DBAL은 pH 3.0에서 음이온성 리포솜과 열변성 단백질을 이온결합 시켰기 때문에 초기에 중성을 띠나 혈중 pH인 7.4로 조정하기 위하여 HBS로 투석하는 과정에서는 DBAL 표면에 결합시킨 열변성이 된 단백질이 등전점 이상의 pH 조건에 존재하게 되므로 DBAL 표면전하는 음전하를 띠는 것으로 생각된다.<sup>15,16,18,25)</sup> DBAL의 입자크기와 BSA 수용액을 100, 200, 400 µg/mL의 농도로 결합시켜 열변성한 DBAL의 표면에 결합되어진 단백질을 브래드포드 분석법에 의하여 정량한 결과를 나타낸 Fig 2에 비교하였을 때, DBAL 100, 200 및 400의 표면에 결합된 단백질의 양이 각각 26.4±8.4, 87.1±5.2 및 154.5±13.3 µg/mL로 정량되어 표면에 결합한 단백질의 양은 BSA 수용액의 농도가 높을수록 증가한다는 것을 확인할 수 있었으나, Table I에 제시된 DBAL의 입자크기는 표면 결합된 단백질의 양에 따라 일정하게 증가되지 않는 것으로 관찰되었다. DBAL의 경우, 표면에 결합시킨 BSA 수용액의 농도가 200 µg/mL과 400 µg/mL일 때의 표면전위는 약 -20 mV로 비슷한 수치를 나타내었으나, 리포솜 표면에 결합된 단백질의 양은 농도에 따라 증가함을 알 수 있었다. 이는 BSA 수용액의 농도가 400 µg/mL일 경우 리포솜 표면에 결합된 단백질간의 수소 결합 및 소수성 결합에 의해서 DBAL 200에 비해 표면 수식된 단백

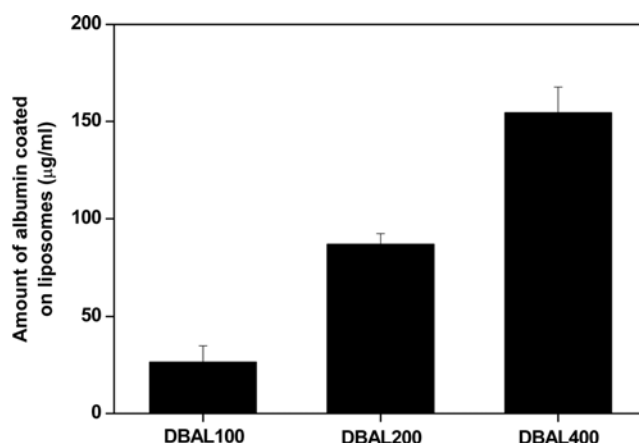
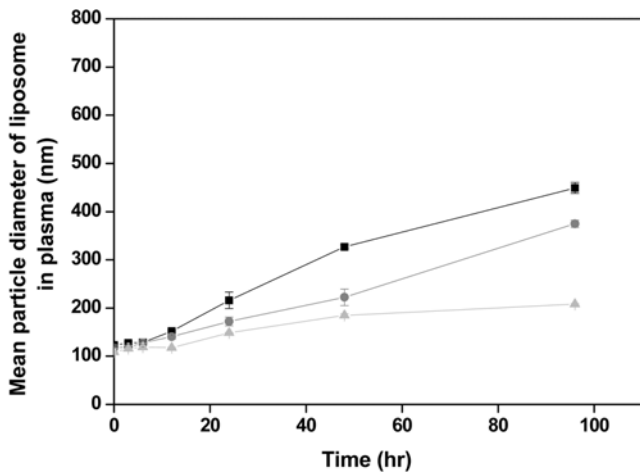


Figure 2—Amount of BSA coated on the surface of various DBAL ; DBAL is thermally denatured BSA-coated liposome.

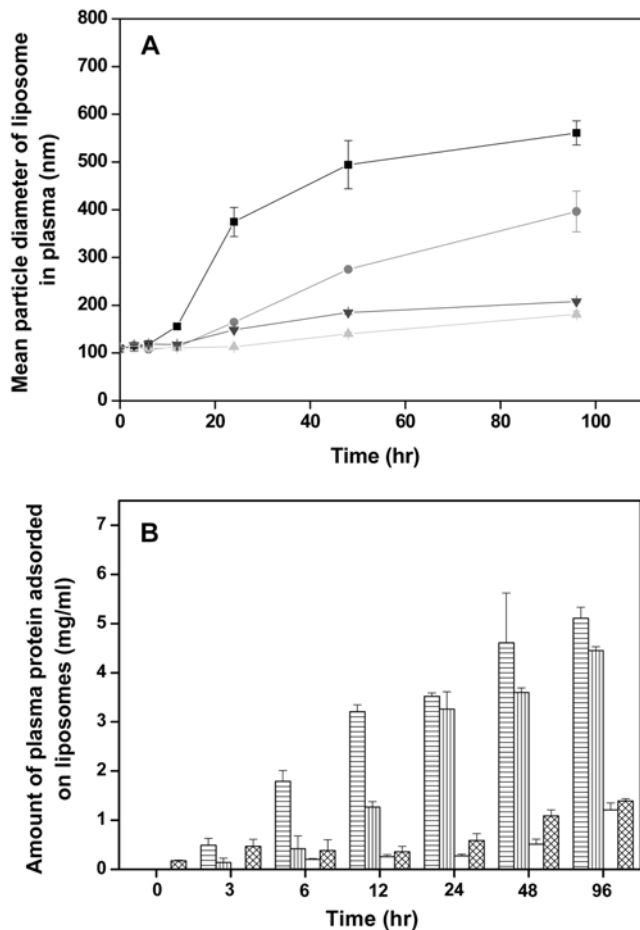
질의 밀도가 높고, 또한 등전점 이상의 pH에 존재하므로 비슷한 표면전위를 나타내며, 표면에 결합된 단백질의 양이 증가된 것이라고 생각된다.<sup>18)</sup> DOX를 대조 리포솜, 음이온성 리포솜 및 PEG 리포솜에 봉입한 결과, 봉입효율이 90% 이상인 것에 비해 DBAL의 봉입효율은 약 80%로 약 10%정도 낮게 나타났으며, 이는 DBAL 표면에 결합된 단백질이 DOX의 봉입을 저해하여 상대적으로 낮은 봉입효율을 보인 것으로 생각된다.

#### 혈장 내 리포솜의 안정성 평가

DBAL의 시간에 따른 혈장 내 입자크기 변화를 Fig 3에 나타내었다. 96시간 동안 DBAL 100과 DBAL 200의 입자크기는 각각 449.2±1.4 과 374.9±7.6 nm로 큰 변화를 보였으나, DBAL 400은 DBAL 100과 DBAL 200에 비해 약 1/2배 정도 되는 크기인 207.7±1.4 nm로 비교적 작은 입자크기를 나타내었다. 이와 같은 입자크기의 변화는 DBAL 100과 DBAL 200의 표면에 결합시킨 열변성 단백질의 양이 적었기 때문에 리포솜 표면에 혈장 단백질이 흡착되었거나, 구조적으로 불안정한 리포솜간의 반데르발스 힘에 의한 응집으로 입자크기가 커진 것이라 생각된다. 결과적으로 혈장 내 가장 안정한 상태는 DBAL 400이라고 판단하여 차후 실험에 사용하였다. Fig 4 (A)는 대조 리포솜, 음이온성 리포솜, DBAL 400 및 PEG 리포솜의 시간에 따른 입자크기의 변화를 관찰한 것이다. 96시간 동안 대조 리포솜과 음이온성 리포솜은 혈장 단백질과의 흡착이 진행되면서 입자크기가 급격히 커지는 것을 확인하였다. 반면에, DBAL 400과 PEG 리포솜의 혈장 내에서 입자크기는 96시간 동안에 크게 증가하지 않았고, 유사한 변화를 보여 안정함을 알 수 있었다. 이러한 DBAL 400의 혈장 내 적은 입자크기의 변화는



**Figure 3**—Mean particle diameter of liposomes in blood plasma : (■) DBAL 100, (●) DBAL 200, (▲) DBAL 400. Mean and S.D. are shown (n=3).

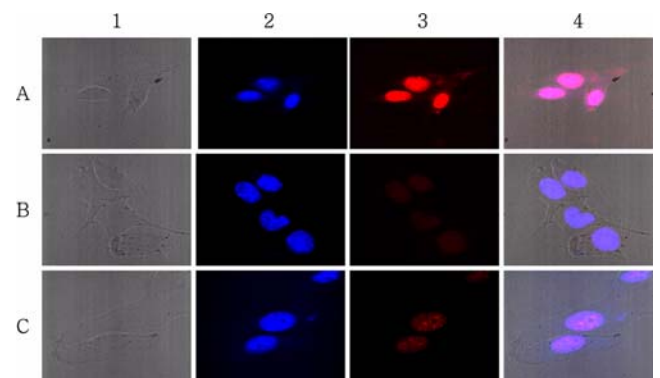


**Figure 4**—A. Mean particle diameter of liposomes ; (■) plain liposomes, (●) anionic liposomes, (▼) DBAL 400, (▲) PEG-liposomes. Mean and S.D. are shown (n=3). B. Amount of adsorbed plasma protein on the liposomes ; (▨) plain liposomes, (▤) anionic liposomes, (□) DBAL 400, (▩) PEG-liposomes. Mean and S.D. are shown (n=3).

열변성 단백질에 의한 것으로 단백질에 열을 가하여 변성되면 효소에 의한 활성을 잃고, 독성 및 면역성, 항체와 항원의 결합 능력도 상실하기 때문에 혈장 단백질과의 흡착이 억제되었기 때문이라 생각된다. Fig 4 (B)는 리포솜 표면에 흡착된 혈장 단백질을 평가하기 위하여 브래드포드 분석법으로 단백질을 정량한 것이다. 96시간 동안 대조 리포솜이나 음이온성 리포솜에 비해 DBAL 400과 PEG 리포솜은 혈장 단백질의 흡착량이 적은 것으로 관찰되어 리포솜과 혈장 단백질의 흡착을 억제함을 확인할 수 있었고, DBAL 400이 PEG 리포솜과 유사한 효과를 나타낼 수 있었다. 즉, PEG 리포솜은 PEG 고분자에 의해 구성된 친수성막에 의한 구조적 반발력으로 리포솜 표면의 혈장 단백질을 억제하고,<sup>25)</sup> DBAL은 표면에 결합된 열변성 단백질로 리포솜 표면의 자유에너지가 최소화되고, 혈장 단백질과의 결합이 억제되어 혈류 내 안정성이 증가된 것이라 사료된다.

**리포솜의 세포 내 이입**

DBAL 400, PEG 리포솜 및 free DOX의 세포 내 이입을 비교하기 위해 설치류 흑색종인 B16F10를 사용하여 공초점현미경으로 관찰한 형광 이미지를 Fig 5에 나타내었다. 가장 높은 형광을 나타낸 free DOX는 엔도사이토시스(endocytosis)로 세포핵 전달 및 세포 이입이 매우 우수한 것으로 알려져 있으나,<sup>26)</sup> 혈류 내 주입 시 음식료작용과 세망내피계(reticuloendothelial system, RES)에 의한 소실로 종양 부위로의 도달이 어렵다는 단점을 가진다. PEG 리포솜은 표면전하가 약 -21 mV로 세포막과 같은 음이온성이기 때문에 세포막에 부착하지 못하고, semi-contact에 의한 세포 내 이입이 이루어지지만, 친수성 고분자인 PEG로 형성된 친수성막의 영향으로 세포 내 이입이 저해될 수 있다고 보고



**Figure 5**—Confocal microscopy images of murine melanoma cells B16F10 cells incubated for 2 hr at 37 ; Row (A) free DOX, (B) PEG liposomes, (C) DBAL. Column (1) phase contrast image, (2) DAPI image, (3) DOX image, (4) merged image.

된 바 있다.<sup>27)</sup> DBAL의 경우 PEG 리포솜과 표면전하가 -22 mV로 같은 음이온성을 가지나, 암세포의 신생혈관에 존재하는 알부민 수용체(gp60)와 암조직 표면에 다량으로 발현되어 알부민과 결합이 가능한 secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARK)의 영향으로 DBAL의 세포 내 이입이 증가되어<sup>28)</sup> PEG 리포솜에 비해 상대적으로 강한 형광을 나타내는 것으로 사료된다.

## 결 론

리포솜의 혈장 단백질의 흡착을 억제시키고 구조적으로 안정한 리포솜을 제조하기 위해 단백질을 정전기적 인력으로 음이온성 리포솜 표면에 결합시켜 열변성시킨 DBAL을 제조하였다. 음이온성 리포솜과 DBAL의 입자크기는 표면에 형성된 열변성 단백질층의 형성으로 인하여 약 20 nm 정도의 증가를 보였고, 혈장 내 안정성 시험에서 표면에 흡착된 혈장 단백질 함량과 입자크기는 표면에 가장 많은 열변성 단백질이 결합된 DBAL 400이 가장 적은 것으로 나타났다. 대조리포솜, 음이온성 리포솜, DBAL 400 및 PEG 리포솜으로 혈장 단백질 흡착 시험을 실시하였고, DBAL과 PEG 리포솜의 표면에 흡착된 단백질이 가장 적게 측정되어 열변성된 단백질이 혈장 단백질에 의한 흡착을 억제하는 PEG와 비슷한 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 공초점 현미경을 이용하여 DBAL과 PEG 리포솜의 세포 내 이입을 관찰한 결과, DBAL은 PEG 리포솜에 비해 상대적으로 강한 형광을 나타내는 것으로 관찰되어 세포이입에 있어서 PEG 리포솜보다 DBAL이 우수함을 알 수 있었다.

표면에 결합된 열변성 단백질에 의해 혈장 단백질의 흡착을 억제함으로써 혈류 내에서 구조적으로 안정하며, 생체 내 분해가 가능한 DBAL은 약물전달 물질로써 적용이 가능하리라 생각한다.

## 참고문헌

- 1) A.D. Bangham, Liposomes: the Babraham connection, *Chem. Phys. Lipids.*, **64**, 275-285 (1993).
- 2) A.D. Bangham, M. M. Standish and J. C. Watkis, Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *J. Mol. Bio.*, **13**, 238-252 (1965).
- 3) G Blume and G Cevc, Liposomes for the sustained drug release *in vivo*, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1209**, 91-97 (1990).
- 4) R. Fraley and D. Papahadjopoulos, New generation of liposomes: the engineering of an efficient vesicle for the delivery of nucleic acid, *Trends in Biochem. Sci.*, **6**, 77-80 (1981).
- 5) M.C. Woodle and D.D. Lasic, Sterically stabilized liposomes, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1113**, 171-199 (1992).
- 6) T.M. Allen and C. Hansen, Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: effect of dose, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1068**, 133-141 (1991).
- 7) S.M. Moghimi and J. Szebeni, Stealth liposomes and long circulating nanoparticle: critical issues in pharmacokinetics. opsonization and protein-binding properties, *Prog. Lipid. Res.*, **42**, 463-478 (2003).
- 8) J.I. Yokoe, S. Sakuragi, K. Yamamoto, T. Teragaki, K.I. Ogawara, K. Higaki, N. Katayama, T. Kai, M. Sato and T. Kimura, Albumin-conjugated PEG liposome enhances tumor distribution of liposomal doxorubicin in rats, *Int. J. Pharm.*, **353**, 28-34 (2008).
- 9) J.H. Senior, Fate and behavior of liposome *in vivo*: a review of controlling factors, *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.*, **3**, 123-193 (1987).
- 10) J.A. Boomer, H.D. Inerowicz, Z. Zhang, N. Bergstrand, K. Edwards, J.M. Kim and D.H. Thompson, Acid-triggered release from sterically stabilized fusogenic liposomes via a hydrolytic dePEGylation strategy, *Langmuir*, **19**, 6408-6415 (2003).
- 11) L.A. Thomas, S.J. Simon and J. Kent, Advanced strategies in liposomal cancer therapy: Problems and prospects of active and tumor specific drug release, *Prog. Lipid. Res.*, **44**, 68-97 (2005).
- 12) P. Caliceti and F. M. Veronese, Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **55**, 1261-77 (2003).
- 13) S.K. Kim, S.H. Jung, H. Seong and B.C. Shin, Preparation of protein-coated cationic liposomes containing doxorubicin and their binding property of blood plasma protein, *Kor. Chem. Soc.*, **52**, 57-65 (2008).
- 14) H.E. Youn, K.W. Kang, J.K. Chung and D.S. Lee, Nanomedicine: drug delivery systems and nanoparticle targeting, *Nucl. Med. Mol. Imaging.*, **42**, 337-346 (2008).
- 15) H. Pelham, Heat shock proteins: coming in from the cold, *Nature.*, **332**, 776-777 (1988).
- 16) J.K. Myers, C.N. Pace and J.M. Scholtz, Denaturant m values and heat capacity change: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding, *Protein Sci.*, **4**, 2138-2148 (1995).
- 17) I.A.S. Drummond and R.A. Steinhardt, The role of oxidative stress in the induction of drosophila heat-shock proteins. *Exp. Cell Res.*, **173**, 439-449 (1987).
- 18) J.H. Lee, S.I. Ahn, J.H. Park, Y.T. Kim, G. Khang, J.M. Rhee and H. B. Lee, Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins, *Regenerative Med.*, **5**, 215-228 (2008).
- 19) Y. Barenholz, Liposome application: problems and prospects, *Curr. Opin. Colloid. Interface. Sci.*, **6**, 66-77 (2001).
- 20) G Haran, R. Cohen, L.K. Bar and Y. Barenholz, Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposomes produce efficient

- and stable entrapment of amphipathic weak bases, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1151**, 201-215 (1993).
- 21) H. Baumgarten, A simple microplate assay for the determination of cellular protein, *J. Immunol. Methods.*, **82**, 25-37 (1985).
- 22) S.H. Jung, S.K. Kim, S.H. Jung, H. Seong, S.H. Cho and B. C. Shin, Intracellular delivery and anti-tumor activity of polyethyleneglycol liposomes containing cationic lipid, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **3**, 163-169 (2008).
- 23) X.B. Xiong, Y. Huang, W.I. Lu, X. Zhang, T. Nagai, and Q. Zhang, Enhanced intracellular delivery and improved antitumor efficacy of doxorubicin by sterically stabilized liposomes modified with a synthetic RGD mimetic, *J. Control Release.*, **107**, 262-275 (2005).
- 24) R. Gorodetsky, L. Leviansky, A. Vexler, I. Shimeliovich, I. Kassis, M. B. Moshe, S. Magdassi and G Marx, Liposome transduction into cells enhanced by haptotactic peptides (Haptides) homologous to fibrinogen C-termini, *Gene Ther. Mol. Biol.*, **11**, 477-488 (2004).
- 25) K. Na, pH-sensitive polymeric micelles for the effective delivery of anti-cancer drug, *Kor. Soc. Gastrointest Cancer.*, **49**, 314-319 (2007).
- 26) N. Dan, Effect of liposome charge and PEG polymer layer thickness on cell-liposome electrostatic interactions, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1564**, 343-348 (2002).
- 27) T. Hwang, H.D. Han, C.K. Song, H. Seong, J.H. Kim, X. Chen and B.C. Shin, Anticancer drug-phospholipid conjugate for enhance for enhintracellular drug delivery, *Macromol. Symp.*, **249**, 109-115 (2007).
- 28) B. Haley and E. Frenkel, Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment, *Urol Oncol.*, **26**, 57-64 (2008).