

# 에멀전 기술과 계면활성제

-리포솜기술 - 전달매체로서의 이용-

한국과학기술원 화학공학과

김 종 득 교수

## 목 차

1. 서론
2. 인지질과 분자결합체의 구조
3. 인지질막의 상전이
4. 리보솜의 분류
5. 리보솜의 제조방법
6. 외부자극 응답성 리보솜
7. 리보솜의 표면 수식
8. 리보솜의 응용
9. 참고문헌

# 리포솜기술 - 전달매체로서의 이용

## 1. 서론

리포솜이란 phosphatidylcholine(PC), ethanolamine (PE), serine, sphingomyelins, cardiolipins, plasmalogens, phosphatidic acid, cerebroside같은 인지질로 구성되어 있는 이중층 폐쇄막을 형성하여 물과 평형상태에 있는 분자단을 말한다[1,2].

리포솜은 인지질 이중층의 matrix형태를 갖추고 있는 생체막과 구조상으로 유사하여 생체막 모델 시스템으로 이용되는 연구가 활발하다[3]. 천연 또는 합성 인지질로서 신진대사에 참여하여 생체막 분자와 상호교환이 가능하고, 생분해성이고, 신체에 대한 독성이 거의 없으며, 화학적 결합 없이 활성물질을 포집할 수 있다. 또한, 화학적으로 민감한 분자를 보호할 수 있고, 선택적 투과성과 지연성이 우수하여 방출속도 조절 시스템의 제조에 적합하며, 리포솜을 구성하고 있는 지질의 성분, 크기, 전하 투과성, 표면 리간드등의 변화시킴으로써 유기체내에서의 리포솜의 분포와 특성을 상황에 따라 조절할 수 있다. 그리고, 친수성이나 친유성 약의 양쪽 모두를 전달하는데 선택적으로 사용이 가능하다는 장점이 있어 약전달체로서 응용될 수 있는 잠재성이 매우 크다[4].

## 2. 인지질과 분자결합체의 구조

리포솜을 구성하는 주요 성분인 인지질로서 인지질의 대표적인 구조들을 그림. 1에 나타내었다.

인지질은 음이온성, 또는 극성머리부분과 비극성인 2개의 탄화수소 사슬로 되어있다. 탄화수소사슬은 길이가 다양한데, 천연 인지질의 경우 탄화수소의 길이는 16개 이상이며, 1쌍 정도의 불포화도를 갖는다. 리포솜 제조시 가장 일반적으로 사용되는 것은 phosphatidylcholine(PC)인데, 친수성 극성 머리부(head group)을 가진 glycerol bridge가 한 쌍의 소수성 탄화수소 사슬을 연결하는 양친성 분자이고 분자모양은 관형(tubular)이다. PC와 같이 머리부와 꼬리부가 횡방향으로 차지하는 면적이 비슷한 인지질이 수용상에 존재하면 수용상과 긴 탄화수소 지방산 사슬과의 불리한 상호작용을 최소화하기 위해서 분자들의 결집상태가 마이셀구조보다는 이중층 판상 (bilayer sheet)이 되도록 배열된다. 판상형태에서 불리한 상호작용판상의 가장자리에서 물과 탄화수소사슬과의 상호작용--은 판상이 굽혀져 폐쇄된 소포체를 형성함으로써 완전히 없어진다. 한편, DOPE와 같이 머리부

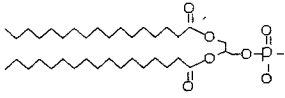
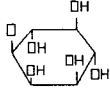
Phosphatidyl moiety	Headgroup	Common name	abbreviation
	$\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_3$	choline	PC
	$\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3$	ethanolamine	PE
	$\text{O}-\text{CH}(\text{NH}_3)\text{COO}^-$	serine	PS
	$\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2(\text{OH})$	glycerol	PG
	$\text{O}-\text{H}$	acid	PA
		inositol	PI

그림 1 인지질들의 구조

가 꼬리부보다 작을 때 수용상에서 이 들 분자는 육각형상(H<sub>h</sub>)을 형성하고 반대로 머리부가 꼬리부보다 클 때 분자의 모양이 원추형(conical)이기 때문에 구형의 마이셀 구조를 나타낸다. 이와 같은 분자 결집체의 모양을 그림. 2에 나타내었다.

### 3. 인지질막의 상전이

일정온도에서 인지질막은 특정한 상(phase)을 갖는다. 그림 2와 같이 온도가 증가함에 따라 리포솜막은 겔상(gel phase)에서 분자운동의 자유도가 높은 액정상(liquid-crystal phase)으로 전환되는데, 이때 인지질 분자는 trans형태에서 gauche형태로 전환된다[5]. 탄화수소의 사슬길이, 머리부, 불포화도가 이와 같은 상전이 온도에 미치는 영향은 크다. 그림. 3에서와 같이 일반적으로 탄화수소의 길이가 길어질 수록, 포화도가 증가할 수록 상전이 온도는 증가한다. Egg yolk PC로 만들어진 막의 경우, 상전이 온도는 -15°C에서 -7°C사이에 있다. 리포솜막의 상거동은 막의 투과도, 막의 융합, 그리고 리포솜 입자의 뭉침(agggregation)과 같은 성질을 결정하기 때문에 인지질막의 성질을 이해하는 것은 리포솜을 제조하고 이용하는데 중요하다. 일반적으로 온도가 증가하면 막의 투과도는 증가하는데, 온도가 증가하면 인지질의 탄화수소 부분이 trans/gauche transition이 유리하게 되어 packing defect가 증가하게 되어 막의 투과도는 증가하게 된다.

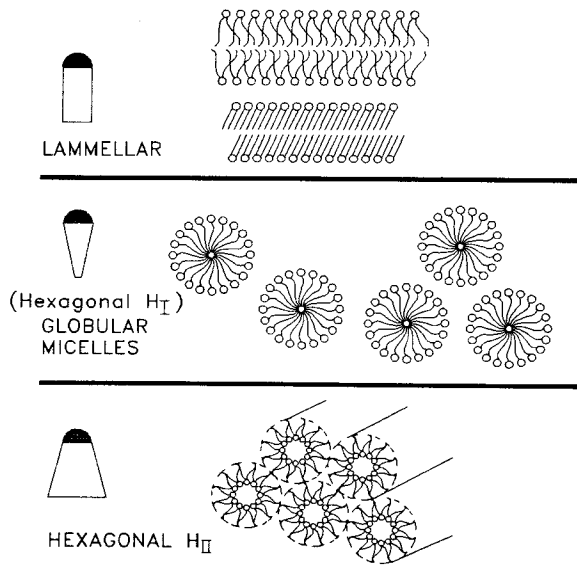


그림 2 수용상에서 지질분자 결집체의 구조

#### 4. 리포솜의 분류

리포솜은 제조방법에 따라 크기가 달라지고, 응용분야에 따라 다른 크기가 요구되기 때문에 리포솜을 크기에 따라 분류하는 것이 가장 일반적이다. 리포솜을 크기와 형태에 따라 분류하면 다음과 같다. 직경이 200-1000nm 정도의 넓은 범위에 걸쳐 있고 보통 5개 이상의 동심원으로 구성되어 있는 리포솜을 multilamellar vesicle (MLV)이라 한다. 인지질의 머리부가 곡률을 극복하면서 배열할 수 있는 가장 작은 크기의 리포솜을 small unilamellar vesicle (SUV)이라 하는데, 이 극한은 수용액의 이온강도나 막의 지질조성에 따라 약간 변하지만 생리수에서 계란 노른자로 부터 추출한 레시딘 리포솜은 약 15nm이고 DPPC리포솜의 경우는 약 25nm이다. 일반적으로 SUV의 직경은 20-50nm이다. 직경이 100-1000nm이고 단층으로 된 리포솜을 large unilamellar vesicle(LUV)이라 하고, 직경이 약 100nm이고 단층으로 구성된 리포솜을 intermediate-sized unilamellar vesicle(IUV)이라 한다[6].

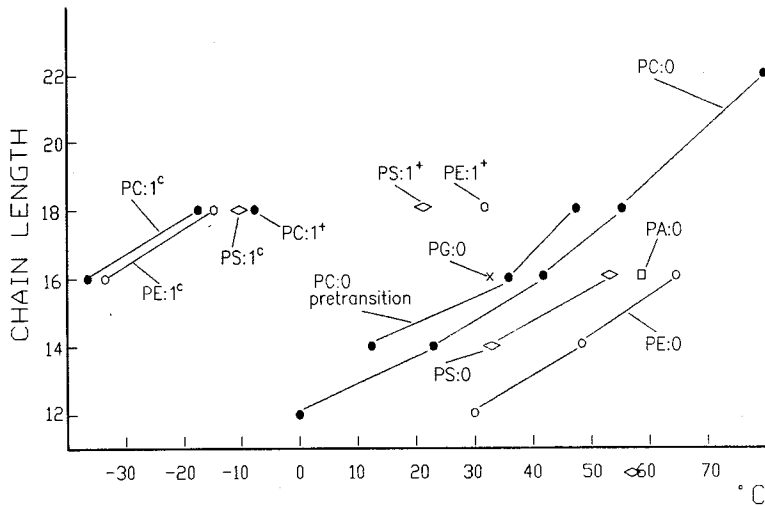


그림 3 인지질의 상전이 온도

## 5. 리포솜의 제조방법

리포솜은 수용상에서 인지질과 물과의 상호작용에 의하여 저절로 형성되기 때문에 리포솜을 만들 때 막을 assembling하는 것보다 사용목적에 알맞은 크기, 구조 그리고 일단 형성된 리포솜으로부터 포집된 물질이 누출되지 않게 효율적으로 물질을 포집하는 것에 역점을 두어야 한다. 리포솜을 제조하는 일반적인 순서는 다음과 같다.

- a. 유기용매로부터 인지질을 건조시킨다. 일반적으로 사용되는 유기용매는 부피비 2:1인 클로로포름과 메탄올의 혼합용매이다.
- b. 수용상으로 건조 인지질막을 분산시킨다.
- c. 형성된 리포솜을 정제( purification ) 한다.
- d. 최종적으로 얻은 리포솜을 분석한다.

각 단계별로 살펴보면 살펴보면 다음과 같다.

### a. 건조

증발표면적을 증가시키기 위하여 회전증발기에서 건조시키는데 감압(400-700 mmHg)에서 20-40 °C에서 용매를 증발시킨다. 진공이 충분하지 않거나 지질의 농도가 높으면 건

조된 지질막에서 잔여분을 제거하기 어렵다. 잔여분을 없애기 위해서 다양한 lyophilizer 와 건조막을 담고있는 플라스크를 연결하여 고 진공에서 여러시간동안 방치한다.

## b. 분산

### b-1. 기계적 분산

가장 간단한 분산 방법으로 고체 지지체(solid support, 보통 유리 용기벽)위에 건조되어있는 지질막에 수용액을 첨가한 다음 요동(shaking)에 의해서 분산된다. 수화(hydration)에 의해서 지질은 팽윤(swelling)되어 이중판상(bilayer sheet)형태로 수용상으로 분산되는데 일반적으로 MLV이 형성된다. 이 방법으로 리포솜을 만들면 건조 지질막을 수화시키기 위해서 사용되는 전체 용액의 5 - 10% 만이 포집되기 때문에, 비록 지질의 단위 질량당 포집되는 부피가 실제 목적에 만족스럽다 해도 포집되는 물질이 많이 손실된다는 단점이 있다.

기계적 분산중에서 가장 단순하고 일반적으로 사용하는 방법은 hand shaking인데 손으로 플라스크를 흔들어 주어 수용상으로 지질을 분산시킨다[7]. 이 방법으로 MLV을 제조할 수 있다. MLV에 초음파를 가해주면 SUV를 제조할 수 있는데 이 방법을 초음파 분쇄법 (sonication method)라 한다. 초음파 에너지를 전달하는 방법에 따라 probe sonication과 bath sonication으로 구분하는데 전자는 리포솜 현탁액의 부피가 적고 지질의 농도가 높은 경우에 사용되고 후자는 현탁액의 부피가 크고 지질의 농도가 낮은 경우에 사용된다. Probe sonicator를 사용하면 무균상태를 유지하기 힘들기 때문에 약전달체로 이용될 리포솜을 제조할 때는 적당하지 않다[8]. 또 다른 기계적 분산으로 proliposomes을 이용한 분산을 들 수 있다. 지질의 단위질량당 건조되는 면적을 증가시키기 위해서 미세분말위에 지질을 건조시키면 건조된 지질로 피복된 분말이 형성되는데 이것을 proliposomes이라 한다 [9]. 여기에 물을 첨가하여 회전교반시켜 주면 지질은 팽윤하고 분말은 빠르게 용해되면서 MLV이 형성된다. 이 방법에 의해서 만든 MLV는 hand shaking에 의해서 만든 것보다 작고 균일성이 좋다. 미세분말에는 염화나트륨, 소비톨(sorbitol), polysaccharide등이 사용된다. 이 중에서 미세 다공구조를 가지는 sorbitol은 비표면적이 크기 때문에( $33.1 \text{ m}^2/\text{g}$ ) 특히 많은 관심을 받고 있다. proliposomes은 제조하여 사용하기 전에 밀봉하여 보관할 수 있기 때문에 상업적인 응용에 매우 유용하다. 한편, 수용액을 첨가하기 전에 유기용매에 녹아있는 지질을 냉동건조(freeze-dry)면 팽창된 거품구조를 가진 건조상태의 지질을 얻을 수 고 여기에 물이나 염수를 상 전이 온도이상에서 첨가하여 빠르게 혼합하면 MLV를 제조할 수 있다. 그 외 이미 형성된 리포솜의 크기를 조절하기 위한 기계적 분산법으로

micro-emulsification[10], french pressure cell extrusion[11,12], membrane extrusion[13] 등을 들 수 있다.

## b-2. 용매분산

지질이 녹아있는 유기용매를 리포솜에 포집될 물질이 녹아있는 수용액과 접촉시켜 리포솜을 제조하는 방법이다. 이때 유기용매와 수용액은 서로 섞일 수 있거나 섞이지 않을 수 있다. 용매분산을 이용하여 리포솜을 제조하는 방법은 다음과 같다.

### b-2-1. Ethanol injection을 이용한 분산

지질이 녹아있는 에탄올 용액을 섬세한 바늘 구멍을 통하여 과량의 수용액에 빠르게 분사시키면 분사시키는 힘은 두 용액이 완전히 혼합될 수 있을 만큼 충분하기 때문에 에탄올은 물에 순간적으로 희석되고 인지질 분자는 수용액상으로 골고루 분산된다[14]. 혼합이 잘되지 않은 경우에는 지질이 모여서 SUV보다 더 큰 소포체를 형성할 수 있지만 대부분 ethanol injection에 의해서 SUV를 높은 수율로 얻을 수 있다. 방법이 아주 단순하다는 것과 인지질의 분해(degradation)를 피할 수 있다는 것이 이방법의 장점이다. 한편, 에탄올에서의 지질의 용해도의 제한(PC의 경우 40mM)과 리포솜이 형성되기 위해서 도입되는 에탄올의 양이 적어야한다는 제한(7.5% v/v) 때문에 분산되는 지질의 양이 적어서 생성되는 리포솜 현탁액이 다소 묽다. 따라서 포집효율이 아주 낮다는 단점이 있다. 또 다른 단점은 인지질 막에서 유기용매인 에탄올을 제거하기 어렵다는 것이다.

### b-2-2. Ether Injection을 이용한 분산

개념상으로 앞에서 언급한 방법과 매우 유사하지만 ether injection은 ethanol injection과 여러 가지 면에서 대조된다. 섬세한 바늘 구멍을 통해서 수용액과 섞이지 않는 유기용매를 아주 천천히 수용액으로 분사하는데 이 과정은 기화에 의해서 유기용매가 제거될 수 있는 온도에서 수행된다[15,16]. 이 방법에서 ether의 순도가 높으면 지질의 산화를 방지할 수 있고 ether가 도입되는 속도와 같은 속도로 기화되고 사출 과정이 오랫동안 진행될 수 있기 때문에 얻을 수 있는 지질의 농도에 제한이 없고 따라서 리포솜의 포집효율이 아주 높다. 이방법의 단점은 일 회분의 리포솜을 얻기 위해서 많은 시간이 소비되고 지질용액을 조심스럽게 도입해야 하기 때문에 기계적으로 작동되는 펌프가 필요하다.



### b-2-3. Water in oil emulsion을 이용한 분산

이 방법에 의해서 리포솜은 두 단계를 거쳐 만들어지는데 처음에 이중층의 내부층이 만들어지고 다음 외부층이 만들어진다(그림. 4).

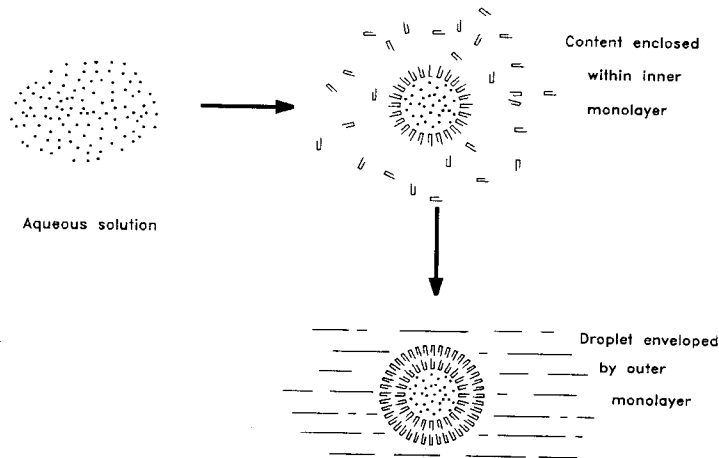


그림 4 수용상과 유기상을 이용한 리포솜 제조

이러한 부류의 방법들에는 몇 가지 다른 점이 있지만 적은 양의 수용액을 섞이지 않는 과량의 지질 유기용액에 도입한 다음 W/O 에멀전을 제조하는 것이 공통점이다. W/O 에멀전에서 물액적은 상경계에서 형성된 인지질 단분자층에 의해서 안정화된다. 액적의 크기는 에멀전을 형성시키기 위해서 가해주는 기계적 에너지의 강도와 수용액 부피에 대한 지질의 양에 의해서 결정되는데 이유는 각 액적이 다른 액적과 합체(coalescence)되지 않기 위해서는 액적표면을 완전히 덮을 수 있는 인지질의 단분자층을 필요로 하기 때문이다, 이러한 수용액의 액적은 최종적으로 형성되는 리포솜의 수용상 코아(core)를 형성한다. 이러한 부류의 방법 중에서 대표적인 방법은 역상증발법(reverse phase evaporation method)이다. 포집될 물질이 녹아 있는 수용액을 인지질이 녹아 있는 유기용매에 가한 다음 초음파 분쇄시키면 인지질로 안정화된 water in oil 에멀전이 만들어진다. 그 다음 유기상을 감압하에서 서서히 증발시키면 gel이 형성되고 gel에 기계적인 에너지를 가해주면 일부의 에멀전은 깨어져 깨어지지 않고 남아있는 에멀전을 둘러싸 리포솜의 외부층을 이루어 결과적으로 리포솜이 형성된다[17].

## b-2. Detergent solubilization and removal을 이용한 분산

이 방법은 계면활성제를 이용하여 인지질과 물의 접촉을 친밀하게 하고 물로부터 인지질의 소수성 부분이 차폐된 구조를 가진 혼합 마이셀을 제조한 다음 마이셀로부터 계면활성제를 제거하여 리포솜을 제조하는 방법이다. 이와 같이 계면활성제 이외의 성분을 포함하는 또는 2종류 이상의 계면활성제를 포함하는 마이셀을 혼합 마이셀(mixed micelle)이라 한다. 마이셀의 모양과 크기는 계면활성제의 화학적 성질, 농도 그리고 지질에 의존한다. 계면활성제의 농도가 높으면 지질이 존재하지 않아도 계면활성제는 마이셀을 형성할 수 있는데 마이셀이 생기기 시작하는 계면활성제의 농도를 임계 마이셀 농도라고 한다. 이 농도 이하에서 계면활성제 분자는 물에 완전히 용해되어 분자수준으로 용액에 존재한다. 이 농도 이상에서는 계면활성제가 물에 녹음에 따라 마이셀로 존재하는 계면활성제의 농도는 증가하지만 분자수준으로 자유롭게 존재하는 계면활성제의 농도는 변하지 않는다. 인지질과는 달리 계면활성제는 수용상과 유기상에 잘 녹기 때문에 수용상과 마이셀 지질사이에 평형이 존재한다. 따라서 투석에 의해서 수용상에 존재하는 계면활성제를 제거함으로써 혼합 마이셀에서 계면활성제를 제거할 수 있다. 리포솜을 제조하는데 계면활성제를 사용하는 모든 방법에서 기본적인 특징은 인지질을 포함하는 혼합 마이셀로부터 계면활성제를 제거하여 자발적으로 ULV 을 형성시킨다는 것이다. 혼합 마이셀로부터 계면활성제를 제거하여 리포솜을 제조하는 방법은 리포솜의 이중층 막에 친유성 단백질을 삽입하는데 효과적이다. 왜냐하면, 계면활성제를 이용하여 단백질의 성질을 변형시키지 않고 단백질을 혼합 마이셀로 100% 도입시킬 수 있기 때문이다. 또 다른 장점은 계면활성제를 제거하는 조건을 조절하여 리포솜의 크기를 변화시킬 수 있고 크기가 균일한 리포솜을 얻을 수 있다는 것이다.

## 6. 외부자극 응답성 리포솜

리포솜 막의 조성을 적절히 변화시키면 리포솜의 in vivo 분배(distribution)를 변화시킬 수 있고 또한 리포솜에 포집된 물질이 특정 외부조건에 의해서만 방출되도록 할 수 있다. 특히 외부 조건에 대응하여 특정 부위에서 포집된 물질이 방출되는 리포솜을 site specific 리포솜이라 한다. 이와 같은 특성을 지니고 있는 리포솜은 다음과 같다.

### 6-1. 열 민감성 리포솜 (Temperature-sensitive liposomes)

열 민감성 리포솜은 리포솜이 그 막을 형성하는 지질의 상전이 온도에서 매우

용이하게 내용물을 방출시킨다는 사실을 이용하여 설계된 리포솜이다. In vivo 또는 in vitro에서 특정 세포질 단백질(plasma protein)을 리포솜 막에 결합시켜주면 상전이 온도에서 리포솜의 불안정도를 증대시켜주어, 결과적으로 상전이 온도에서 리포솜에 포집된 물질의 방출을 증대시킨다[18]. In vivo 약전달에서, DSPC와 DPPC로 구성된 리포솜은 37 °C에서 안정하고 온도가 40 °C인 신체부위 ( 종양 또는 외부에서 국부적으로 가열되는 신체 부위)를 통과하면 완전히 파괴되도록 설계될 수 있다.

High density lipoprotein(HDL)과 같은 단백질에 의해서 유도된 상전이 방출(phase transition release, PTR)은 여러 가지 면에서 단백질이 없는 경우에 관찰되는 상전이 방출과 다르다. 단백질이 없는 경우는 상전이 온도에서 막은 파괴되지 않고 단지 투과도만 증가하게되어 결과적으로 저 분자량의 물질 일부분만이 방출하게 된다. 그러나 HDL이 존재하면 그림. 5에서와 같이 상전이 온도에서 어떤 리포솜은 완전히 파괴되어 포집되어 있는 내용물을 완전히 방출하는 반면 다른 리포솜은 안정한 상태로 남게 되어 어떠한 내용물도 방출시키지 않는다. 이와 같은 현상을 all-or-nothing이라 한다. 이와 같은 유형의 방출은 온도가 상전이온도 이하에서 상전이온도로 근접할 때 그 반대보다 더욱 뚜렷한데 왜냐하면, 단백질이 막에 결합하는데 필요한 에너지는 막이 유동상(fluid phase)에 있을 때보다 겔상에 있을 때가 더 낮기 때문이다. 일단 결합된 단백질은 비가역적으로 결합되어있기 때문에 단백질이 없는 다른 리포솜에서의 방출을 유도할 수 없다.

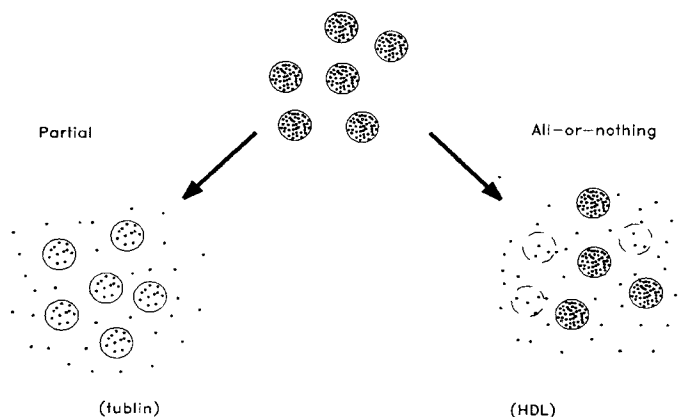


그림 5 상전이 온도에서 두 가지 유형의 방출

## 6-2. 목표민감성 리포솜

목표 민감성 리포솜은 그 자체만으로는 이중판상(bilayer sheet)을 형성하지 못하는 포화 phosphatidylethanolamine(PE)와 PE이중층을 안정화시켜주는 보조분자로 구성되어 있다. 지방산 사슬이나 지질분자를 공유결합시킨 단백질을 막의 이중층에 삽입시킴으로써 PE막을 안정화시킬 수 있다.

주로 사용되는 단백질은 특정 항체이다. 만약 항체를 함유한 리포솜이 polyvalent 리간드 또는 세포와 같은 목적세포를 만나면 그림 6에서와 같이 항체는 목적세포와 결합하게 되고 항원에 의해서 뭉치게 된다. 이 같은 과정에서 보조분자인 항체가 없는 PE막이 형성되어 결국 PE리포솜은 파괴된다. 따라서, 목적세포들에 의해서 리포솜이 섭취(ingestion)되지 않아도 포집된 물질이 목적세포 부위에서 방출되어 세포에 가해진다. 목표민감성 리포솜의 형성 여부는 단백질:지방산 결합비율과 단백질:지질 비율에 크게 좌우되며 효능적인 목표민감성 리포솜을 제조하기 위해서는 이 같은 비율들이 최적화 되어야 한다[19, 56].

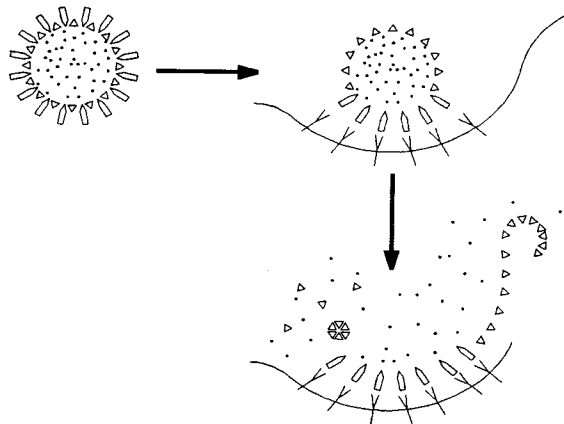


그림 6 적중화에 의한 목표민감성 리포솜의 불안정화

## 6-3. pH 민감성 리포솜

목표민감성 리포솜과 같이 pH 민감성 리포솜은 PE와 보조분자로 구성되어 있다. 보조분자는 중성에서 전하를 띠지만 낮은 pH에서는 전하가 없어져 PE이중층 막을 불안정화

시킨다. 지방산 ,palmitoyl homocysteine, cholesterol hemisuccinate(CHEMS) 그리고 N-succinyl PE등이 이와 같은 성질을 가지는 보조분자이다. 이와 같은 보조분자를 10-30%로 PE 또는 trans-PE와 섞어주면 pH7에서 안정하고 pH5에서 융합(fusion)하는 리포솜을 제조할 수 있다. 보조분자가 CHEMS일 경우 칼슘이나 마그네슘이 있어야 융합이 일어난다. 어떤 경우는 막에서의 pH 구배가 융합에 중요한 역할을 한다[20].

이와 같은 유형의 리포솜은 리포솜에 포집된 물질이 리소조솜(lysosome)을 피할 수 있기 때문에 생활성(bioactive) 물질을 세포에 전달하는데 응용될 수 있다. 리포솜이 세포로 들어가는 처음단계는 내부 pH가 5-5.5인 엔도소솜(endosome)에 의한 흡수이다. 만약 리포솜이 이러한 pH에 노출되어 융합될 수 있는 성질(fusogenic)을 가질 수 있다면 리포솜이 리소조솜(lysosome)에서 파괴되고 분해되기 전에 엔도소솜의 벽과 융합하여 세포질로 포집된 물질을 방출할 것이다. 이와 같은 방법은 유전자를 발현시키기 위해서 유전자를 함유한 플라스미드(plasmid)를 세포질을 통해서 핵으로 전달하는데 사용될 수 있다[21].

## 7. 리포솜의 표면 수식

리포솜의 표면에 단백질을 부착하거나 탄수화물이나 다른 리간드를 이중층에 삽입시켜 표면성질을 바꿀 수 있다. 즉, 탄수화물을 포함한 리포솜에 lectin이 결합되고, 항체를 함유한 리포솜에 세포가 부착되는 경우 등이며 따라서 특수조직이나 세포에 적중화가 가능하다[22]. 여기서는 단백질을 이용한 리포솜의 표면수식에만 그 내용을 국한한다.

### 7-1. 비공유결합을 이용한 단백질의 표면수식

리포솜의 표면에 단백질, 특히 항체를 부착하여 리포솜을 적중화하려는 시도가 시작된 이후 적중화를 위한 여러 가지 방법이 고안되었다. 초창기에는 항체와 함께 건조지질막을 수화시켜 항체를 리포솜의 이중막에 삽입시켰다[23]. 이 방법은 항체를 소수성 결합과 이온 결합으로 리포솜에 부착시키는 비공유 결합을 이용한 것이었다. 악성종양세포 표면에 대해 특별한 친화력을 갖는 분자탐침을 항종양제를 포함한 리포솜에 결합시키면 악성종양 세포에 특정적으로 작용하는 리포솜을 제조할 수 있다. 이때 분자 탐침으로 immunoglobulinG(IgG)가 사용된다. 세포에 의한 IgG의 흡수력은 그 세포에 해당하는 IgG일 때 높아진다. 즉, anti-fibroblast IgG를 포함한 리포솜은 fibroblast와 결합하고 anti-HeLa IgG를 포함하는 리포솜은 HeLa cell과, anti AKA-A IgG를 포함한 리포솜은 AKR-A cell과 결합한다. 이상에서와 같이 항체를 이용한 리포솜의 적중화는 성공적으로

수행된다[24]. 그러나 비공유결합이라는 결합성질 때문에 단위 소포체당 항체의 수, 노출된 항체의 활성, 리포솜의 크기분포 그리고 리포솜의 투과도 측면에서 항체를 함유한 리포솜을 재현성 있게 제조하는 것과 특성화하는 것이 어렵다. 항체와 리포솜을 함께 sonication 시키면 가해준 항체의 4-40%가 리포솜에 결합되지만 이미 형성된 리포솜을 항체와 함께 항은 시키면 결합되지 않는다고 보고되었다.[25]. 항체의 결합율은 리포솜이 음이온성 PC로 구성되어 있을 때가 그렇지 않을 때보다 높아질 수 있고 또한 sonication되는 시간과 강도, 지질에 대한 IgG비 그리고 지질조성에 의존한다. 일반적으로 phosphatidylglycerol (PG) 그리고 phosphatidylserine(PS)와 같은 음이온성 인지질은 전기적으로 중성인 phosphatidylcholine의 경우보다 결합이 50% 높다.

또 다른 방법으로 단백질의 소수성을 증가시키기 위해서 단백질에 소수성 지지대를 부가하여 개조한 후 리포솜막에 삽입하는 방법도 있다. 그 예로 immunoglobulin G에 palmitic산을 붙여서 리포솜의 지질사이에 끼워 넣는 방법을 들 수 있다[26,27].

## 7-1. 공유결합을 이용한 단백질의 표면수식

단백질이 결합된 리포솜은 약물의 적중화[28,29]나 진단용[30-32]으로서 그 잠재성이 높기 때문에 매우 높은 관심을 끌고 있다. 항체가 가장 일반적으로 사용되는 결합 단백질이다. 물론, Staphylococcus aureus protein A[29], plant lectins[33] 그리고 효소[34]와 같은 다른 단백질들도 쉽게 리포솜에 결합될 수 있다, 단백질을 리포솜에 결합시키기 위해서 초창기에는 glutaraldehyde와 dimethylsuberimidate와 같이 amino기와 반응하는 homobifunctional reagents를 사용하였다.[35]. 수용성 carbodiimide도 리포솜막에 있는 PE의 amino기와 단백질의 carboxyl기 사이에 형성되는 amide결합을 촉진시키는데 사용되었다 [36]. 그러나 이 방법은 일반적으로 비효율적이고 단백질이 중합되기 쉽다[37]. 단백질이 단지 리포솜 표면과만 반응할 수 있도록 하는 좀 더 진보된 방법이 고안되었다. 그 예로 horseradish peroxidase를 리포솜 표면에 결합시키는 것을 들 수 있다[38]. 이 효소의 자유 amino기를 fluorodinitrobenzene으로 blocking한 다음 효소에 있는 탄수화물을 sodium periodate로 산화시키면 반응성 aldehyde로 된다. 이와 같이 처리된 효소는 리포솜막에 낮은 농도로 존재하는 PE의 일차 amino기와 산화반응에 의해서 생성된 aldehyde 기와의 반응에 의해서 리포솜에 결합된다. 여기서 생성된 결합은 sodium borohydride와의 환원 아민반응에 의해서 형성된다. 이 반응에 의해서 horseradish peroxidase가 외부표면에 결합된 리포솜을 얻을 수 있다. PI 또는 cerebroside와 같은 glycolipid를 함유한 리포솜에 단백질을 결합시킬 경우에도 비슷한 방법이 사용될 수 있다. 이 경우에는 리포솜막에 삽입되어있

는 glycolipid의 수산기가 온화한 조건에서 sodium periodate에 의해서 aldehyde로 산화되고 그 다음 수정되지 않은 단백질에 있는 일차 아미노기와 반응한다. 리포솜에 있는 amino기와 단백질의 aldehyde기 사이에서 Schiff base는 중성 pH에서 형성이 잘되고 그 결합은 immine 결합을 이차 아민의 immine 결합으로 전환시키는 cyanoborohydride를 첨가함으로써 안정화될 수 있다.

수용상에서 진행될 수 있는 세 가지 효율적이고 선택적인 반응을 개발함으로써 단백질은 리포솜에 결합시키는 방법을 혁신시켰다. 이 중에서 첫 번째 반응은 N-hydroxy succinimide로 활성화된 carboxyl기가 amino기와 반응하여 amide결합을 형성하는 것이다. 두 번째 반응에서는 pyridyldithiol이 thiol과 반응하여 disulfide 결합을 형성한다. 세 번째 반응에서는 maleimide유도체가 thiol과 반응하여 thioether bonds를 형성한다. 세 가지 모든 반응 중성 pH에서 매우 빠르게 진행되며 단백질의 변성을 피할 수 있다. 이러한 반응에 근거를 둔 일련의 heterobifunctional reagent들이 개발되었으며[39-41] 단백질을 리포솜에 결합시키는데 가장 효과적이다[42-44].

단백질을 리포솜에 공유결합시키는 가장 효율적인 방법은 리포솜막에 있는 thiol기와 반응할 수 있는 인지질 유도체와 리포솜에 결합될 단백질의 thio기와 반응을 이용한다. Thiol기와 반응할 수 있는 지질은 N-succinimide pyridyl dithio propanate(SPDP)와 N-succinimidyl(-4-[p-maleimidophenyl]) butyrate(SMPB)를 이용하여 합성된다. 전자의 방법으로 결합시키면 disulfide bond에 의해서 단백질이 가역적으로 결합되고 후자의 방법을 사용하면 비가역 thioether결합이 형성된다.

## 8. 리포솜의 응용

### 8-1. 약전달체로서의 리포솜

리포솜은 생체적합성이 높기 때문에 약전달체로서 그 잠재성이 매우 높다. 약물은 리포솜 내부의 수용성공간에 포집되거나 막의 이중층에 삽입될 수 있기 때문에 수용성 약물이나 지용성 약물을 전달하는데 적합하다. 최근에는 리포솜에 포집된 약의 몇 가지 임상시도가 이미 시작되었다. 특히, 리포솜에 포집된 항암제인 doxorubicin은 미국, 캐나다, 그리고 이스라엘 등에서 임상에 들어간 상태이고 muramyltripeptide 리포솜은 면역 조절자 (immune modulator)로서 현재 미국에서 시험중이다. 가장 진보된 경우는 전신진균증을 처방하기 위하여 리포솜에 포집된 amphotericin B를 이용하는 것인데, 이 연구는 Gabriel

Lopez-Berestein팀에 의해서 FDA로 부터 승인을 받고 현재 진행중이다[45]. 지금까지 전 신진균증에 감염된 20명 이상의 환자가 리포솜에 포집된 amphotericin B로 처방 받았는데, 반이상이 완전히 치유되었다. 자유 amphotericin B로 처방하는 기존의 치료요법으로 치유 되지 않았음을 고려하면 이런 사실은 아주 획기적인 것이다.

## 8-2. 면역반응 보조체로서의 리포솜

짧은 펩타이드는 면역반응 보조체 없이는 약한 면역반응을 나타내기 때문에 강한 면역 반응을 얻기 위해서는 펩타이드를 보조체에 결합시켜야한다[46]. 이러한 보조체에는 여러 가지가 있지만 독성 때문에 alum만이 인체에 사용될 수 있게 허가되어 있다. 그러나 alum은 항상 효과적이지 못하고 .lyophilization시킬 수 없기 때문에 냉동보관 시켜야 한다. 이상적인 보조체는 가격이 저렴하고 제조하기 용이해야하며 보관시 안정도가 우수해야한다. 또한 생분해성이어야 하고 독성이 없고 비 면역적이어야 하며 여러 가지 경로를 통해서 투여되는 항원에 대한 cell-mediated immunity(CMI)와 humoral immunity(HI)를 유도할 수 있는 능력 등을 가지고 있어야 한다.

리포솜은 항원의 면역반응을 향상시킬 수 있고 또한 비면역적이고 독성이 없으며 생분해성인 합성물질로부터 제조될 수 있기 때문에 면역반응보조체로서 그 잠재성이 인정되었다. 예를 들면, 단백질을 리포솜에 포집시키면 단백질에 대한 면역반응이 매우 향상된다[47]. 이것은 리포솜이 대식세포와 상호작용하여 결과적으로 대식세포로의 단백질 전달이 향상되었기 때문이다. 리포솜 막에 lipid A와 muramyl dipeptide(MDP)같은 보조체를 삽입시키면 면역반응은 더욱 증가한다[48]. 이상적인 면역반응보조체의 특성을 지니고 있고 또한 특정 기관에 적중화될 수 있기 때문에 면역반응 보조체로서 리포솜의 연구가 활발히 진행되고 있다[49, 50].

## 8-3. 광에너지 전환 - 광반도체와 리포솜

물 광분해용 광반도체 입자를 리포솜 막에서 성장시켜 제조하면 안정하고 작고 균일한 입자를 얻을 수 있다[51,52]. 그림 7.에서와 같이 반도체를 band gap에 해당되는 빛의 파장으로 광여기시키면 valence band에서 conduction band로 전자가 전이되어 전하가 분리된다. 분리된 전자와 홀은 서로 충돌하거나 반도체 표면과 충돌하면서 반도체 내에서 빠르게 움직인다. 이러한 광여기를 quenching시키지 못하면 전자와 홀은 재결합하여 열이나 빛을 방출한다. 광여기에 의해서 분리된 전하들이 재결합되지 않지 위해서는 전자와 홀이



반도체 표면으로 나와 반도체 표면에 있는 전자주계로 전자를 주거나 전자받계로부터 전자를 받아야한다.

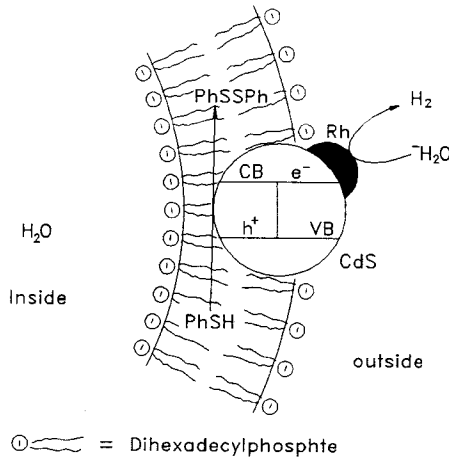


그림 7 리포솜에서 CdS 입자에의한 물의 광환원에대한 이상화된 모델

이러한 반도체 계면에서의 전자전이는 촉매에 의해서 감광된 물의 환원을 가능하게 해준다. 전자전이는 반도체의 크기가 작을수록 유리한데 이것은 반도체의 크기가 작을수록 반도체 단위질량당 표면적, 즉 비표면적이 크기 때문에 계면에서의 전자전이 효율이 높아지고 따라서 물의 광분해 효율이 높아진다. 리포솜은 콜로이드 반도체 입자 작고 균일하게 성장할 수 있는 구획을 제공해주고 형성된 반도체 입자는 리포솜막을 형성하는 인지질분자에 의해서 서로 분리되어있기 때문에 장기간동안 안정하다.

## 8-2. 수소화 반응 - 촉매와 리포솜

벌크 수용상에 금속촉매의 전구체를 녹인 다음 photolysis시키면 콜로이드 금속촉매를 얻을 수 있다. 그러나 이 방법으로 제조된 콜로이드 금속촉매는 안정성이 매우 낮아 안정화제 없이는 수일 내로 침전하게되어 촉매로서 그 가치를 잃는다. 이러한 단점을 극복하고 작고 균일한 촉매입자를 제조하기 위해서 그림 8.에서 보는 바와 같이 리포솜의 내부공간에 촉매의 전구체를 포집시킨 다음 photolysis시켜 리포솜의 수용성공간에 촉매입자를 형성시키는 방법이 연구되고 있다[53,54]. 대표적인 금속촉매로서 백금촉매를 들 수 있는데.

리포솜의 이중층에 존재하는 전자전달자 또는 수소전달자와 함께 작용하여 리포솜 외부에 존재하는 분자를 수소화시킨다. 이때 수소는 bubbling에 의해서 외부에서 공급된다.

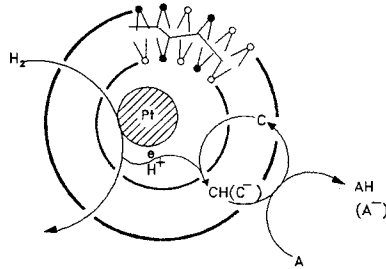


그림 8 리포솜에 colloidal platinum을 도입한 촉매반응의 예

### 8-3. 광화학 - 자성입자와 리포솜

자성입자(예를 들면,  $\text{Fe}_3\text{SO}_4$ )를 리포솜 이중층막에 삽입시키면 이중층막에 삽입되어 있는 물질의 광분해에 의해서 생성되는 생산물의 비율을 변화시킬 수 있다. 예를 들면 자성입자를 DODAC리포솜에 삽입시키면 리포솜막에 삽입되어 있는 benzophenone의 광분해에 영향을 주는데 이 영향은 2000G의 외부자장효과와 같다. 이와 같은 광분해에서 생성되는 escaped radical의 비율은 56%에서 87%로 증가한다.[55]. (Hydrogen donor의 존재하에서 benzophenone 광분해시키면 삼중상태의 benzophenone을 거쳐 삼중상태의 라디칼 쌍이 생성된 다음 이 라디칼 쌍으로부터 intersystem crossing에 의한 단일상태의 라디칼 쌍과 escaped radical이 경쟁적으로 형성된다.) 이와 같은 benzophenone 광화학의 급격한 변화는 소포체 이중층 막에 잠금되어있는 단일 영역을 형성하고 있는 자성입자들의 영향권에 benzophenone이 집중화되어있기 때문이다. 서로 근접해 있는 자성입자들은 삼중상태에 있는 라디칼 쌍을 효과적으로 분리하여 escaped radical이 많아 생성되게 한다.

## 9. 참고문헌

1. A. D. Bangham, in *Liposomes*, ed. by C. G. Knight, p.1-17, Elsevier/Northholland, 1981
2. A. D. Bangham, in *Liposomes*, ed. by M. J. Ostro, p.1-21, Marcel Dekker, 1983
3. J. H. Fendler, in *Membrane Mimetic Chemistry*, p.114, John Wiley & sons, 1982
4. E. Mayhew and D. Papahadjopoulos, in *Liposomes*, ed. by M. J. Ostro, p. 304-306, Marcel Dekker, 1983
5. R. R. C. New, in *Liposomes*, ed. by R. R. C. New, p. 1-32, IRL Press, 1990
6. D. W. Deamer and P. S. Uster, in *Liposomes*, ed. by M. J. Ostro, p.27-51. Marcel Dekker, New York, 1983
7. A. D. Bangham, M. M. Standish and J. C. Watkins, *J. Mol. Biol.*, 13, 238, 1965
8. C. Huang, *Biochemistry*, 3, 344, 1969
9. N. I. Payne, P. Timmins, C. V. Ambrose, M. D. Ward and F. Ridgeway, *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 970, 1988
10. E. mayhew, R. Lazo, W. J. Vail, J. King and A. M. Green, *Biochim. Biophys Acta*, 775, 169, 1984
11. Y. Barenholtz, S. Amselem and D. Lichtenberg, *FEBS Lett.*, 99, 210, 1979
12. R. L. Hamilton, J. Goerke, L. S. S. Guo, M. C. Williams and R. J. Havel, *J. Lipid Res.*, 21, 981, 1980
13. F. Olson, C. A. Hunt, F. C. Szoka, W. Vail, E. Mayhew and D. Paphadjopoulos, *Biochim. Biophys. Acta*, 601, 559, 1980
14. S. Batzri and E. D. Korn, *Biochim. Biophys. Acta*, 298, 1015, 1973
15. D. W. Deamer and A. D. Bangham, *Biochim. Biophys. Acta*, 443, 629, 1976
16. D. W. Deamer, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 308, 250, 1978
17. F. Szoka and D. Papahadjopoulos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 4194, 1978
18. J. N. Weinstein, R. L. Magin, R. L. Cysyk and D. S. Zaharko, *Cancer Res.*, 40, 1388, 1980
19. R. J. Ho, B. T. Rouse and L. Huang, *Biochem.*, 25, 5500, 1986
20. J. Bentz, H. Ellens and F. C. Szoka, *Biochem.*, 26, 2105, 1987.
21. C. Y. Wang and L. Huang, *Proc. Natl. Aca. Sci. USA*, 84, 7851, 1987
22. F. Szoka and D. Papahadjopoulos, in *Liposomes*, ed. by C. G. Knight, p. 71-77, Elsevier/North-holland, 1981
23. W. E. Magee and O. V. Miller, *Nature*, 235, 339-341, 1972
24. G. Gregoriadis and E.D. Neerunjun, *Eur. J. Biochem.*, 47, 179-185, 1974
25. L. Huang and S. J. Kennel, *Biochemistry*, 18, 1702-1707, 1979
26. Deepari Sinha and Fred Karush, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 90, 554-560, 1979
27. A. Huang, L. Huang and S. J. Kennel, *J. Biol. Chem.*, 225, 8015-8018, 1980
28. T. D. Health, J. A. Montgomery, J. R. Piper and D. Papahadjopoulos, *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. USA, 80, 1377, 1983
29. L. D. Leserman, P. Machy and J. Barbet, *Nature*, 293, 226, 1981
  30. J. O'Connell, R. Campbell, B. Fleming, T. Mercolino, M. Johnson and D. McLaurin, *Clin. Chem.*, 31, 1424, 1985
  31. V. T. Kung, P. Maxim, R. Veltri and F. Martin, *Biochim. Biophys. Acta*, 839, 105, 1985
  32. V. T. Kung, Y. Vollmer and F. Martin, *J. Immunol. Methods*, 90, 189, 1986
  33. F. Martin and V. T. Kung Unpublished results
  34. P. S. Shek and T. D. Health, *Immunology*, 50, 101, 1983
  35. V. T. Torchilin, V. S. Goldmacher and M. V. Smirnov, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 85, 983, 1978
  36. J. K. Dunnick, R. McDougall, S. Aragon, M. Goris and J. Kriss, *J. Nucl. Med.*, 16,, 483, 1975
  37. T. D. Health and F. J. Martin, *Chem. Phys. Lipids*, 40, 347, 1986
  38. T. D. Health, D. Robertson, M. S. C. Birbeck and A. J. S. Davies, *Biochim. Biophys. Acta*, 640, 66, 1981
  39. J. Carlsson, H. Drevin and R. Axen, *J. Biochem.*, 173, 723, 1978
  40. T. Kitagawa and T. Aikawa, *J. Biochem.*, 79, 233, 1976
  41. E. S. Rector, R. J. Schwenck, K. S. Tse and A. H. Schon, *J. Immunol. Methods.*, 24, 321, 1978
  42. F. J. Martin, W. L. Hubbell and D. Papahadjopoulos, *Cancer Res.*, 44, 1880, 1984
  43. F. J. Martin and D. Papahadjopoulos, *J. Biol. Chem.*, 257, 286, 1982
  44. L. D. Leserman, J. Barbet, F. Kouriisky and J. N. Weinstein, *Nature*, 288, 602, 1980
  45. G. Lopez-Berestein and R. L. Juliano, ed. by M. J. Ostro, p.262-263, Marcel Dekker, 1987
  46. R. L. Richards, M. D. Hayre, W. T. Hockmeyer and C. R. Alving, *Infect. Immun.* 56, 682, 1988
  47. A. C. Allison and G. Greoriadis, *Nature*, 269, 407-411, 1977
  48. R. L. Richards, G. M. Jr. Swartz, M. D. Hatre, G. S. Ward, W. R. Ballou, J. D. Chulay, W. T. Hockmeyer, S. L. Berman and C. R. Alving, *Vaccine*, 7, 506, 1989
  49. C. R. Alving, *J. Immunol. Methods*, 140, 1, 1993
  50. D. Davis and G. Gregoriadis, *Immunology*, 61, 229, 1987
  51. Y. -M. Tricot and J. H. Fendler, *J. Phys. Chem.*, 90, 3369, 1986
  52. Y. -M. Tricot and J. H. Fendler, *J. Am. Chem. Soc.*, 106, 7359, 1984
  53. K. Kurihara and J. H. Fendler, *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 6152, 1983
  54. K. Kurihara, J. H. Fendler, I. Ravet and J. B. Nagy, *J. Mol. Catal.*, 34, 325, 1986
  55. P. Herve, F. Nome and J. H. Fendler, *J. Am. Chem. Soc.*, 106, 8291, 1984
  56. E. O. Lee, J. K. Kim and J. D. Kim, *J. Biochem.*, 112, 671-676, 1992