

Amphotericin B의 가용화 및 방출지속화를 위한 아르기닌 함유 폴록사머 하이드로젤의 제조 및 특성분석

신백기¹ · 백은정^{1,*} · 김예태 · 정지웅 · 노영창^{**} · 임윤묵^{**} · 박종석^{**} · 허강무^{*,†} · 박정숙[†]

충남대학교 약학대학, *충남대학교 고분자공학과, **한국원자력연구원 정읍방사선과학연구소 방사선공업환경연구부
(2010년 5월 14일 접수, 2010년 6월 9일 수정, 2010년 6월 15일 채택)

Preparation and Characterization of L-Arginine Containing Poloxamer Hydrogels for Solubilization and Sustained Release of Amphotericin B

Baek-Ki Shin¹, Eun Jung Baek^{1,*}, Ye-Tae Kim, Ji-Woong Jeong, Young-Chang Nho^{**},
Youn-Mook Lim^{**}, Jong-Seok Park^{**}, Kang Moo Huh^{*,†}, and Jeong-Sook Park[†]

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

*Department of Polymer Science and Engineering,

Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

**Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute,
1266 Sinjeong-dong, Jeongeup-si, Jeollabuk-do 580-185, Korea

(Received May 14, 2010; Revised June 9, 2010; Accepted June 15, 2010)

초록: 전신 진균감염 치료에 널리 사용되는 광범위 항진균제이며 대표적인 소수성 약물인 amphotericin B(AmB)의 효과적인 점막부착형 약물전달체로서 가용화제인 L-arginine, 점착성 고분자인 카보폴(carbopol), 온도감응성 고분자인 Poloxamer 407(P 407)로 구성된 하이드로젤 제형을 제조하였다. L-Arginine의 첨가로 AmB의 용해도가 2.6 mg/mL까지 향상되었으며, P 407 수용액은 20% w/v 이상의 농도에서 온도 변화에 따른 졸-겔-졸 상전이(phase transition)를 보였다. 이러한 상전이 온도는 약물 및 L-arginine의 존재에 의해 영향을 받았고, 점착성 고분자인 카보폴의 혼합에 의해 상전이 영역이 확장되었다. L-Arginine의 가용화 효과로 AmB의 약물방출특성이 향상되었고, 점착성 고분자인 카보폴의 첨가는 농도에 의존하여 약물방출을 지연시키는 효과가 있었다.

Abstract: Amphotericin B (AmB) is anti-fungal agent for the treatment of systemic fungal infections, but its poor solubility has limited clinical applications. In this study, a new gel formulation made up of L-arginine as solubilizer, thermosensitive Poloxamer 407 (P 407), and adhesive carbopol was designed for effective solubilization and delivery of AmB. The aqueous solubility of AmB was enhanced up to 2.6 mg/mL by addition of L-arginine. Aqueous P 407 solutions of more than 20% w/v showed thermo-induced sol-gel-sol phase transition. The phase transition behavior was affected by the presence of AmB and L-arginine, and the phase transition range was broadened by addition of carbopol. *In vitro* drug release was improved by the solubilizing effect of L-arginine, and the presence of mucoadhesive carbopol prolonged the release rate as a function of concentration.

Keywords: Poloxamer, amphotericin B, L-arginine, solubility, sustained release.

서 론

Amphotericin B(AmB)는 전신 진균감염 치료에 널리 사용되는 항진균제로 주로 생명을 위협하는 systemic fungal 감염의 치료에 사용된다.¹ Polyene macrolide계 항생제로 Figure 1(a)의 화학적 구조에서 보여지듯이 소수성 특징을 가진 일곱 개의 이중 결합과 친수성 특징을 가진 hydroxyl group 및 mycosamin residue로 구성된다.²

AmB의 주작용 기전은 진균의 세포막을 형성하고 있는 ergosterol에 결합하여 막의 과열을 초래하고 투과성을 증가시켜 전해질(K^+)과 세포질 내 성분이 누출되게 함으로써 세포를 사멸하게 하는 것이다.³ 결합 정도는 약하지만 사람의 cholesterol에도 부착하게 되어 부작용을 일으킨다. 자유 라디칼(free radical) 형성과 관련된 산화적 손상으로 살균작용을 일으킨다는 보고도 있다.⁴ 그러나 AmB는 수용액에서의 매우 낮은 용해도와 부작용 때문에 치료 효능이 제한적인 것으로 알려져 있다.⁵ AmB는 전신 진균증 치료에 1차 선택약으로 사용되지만, 수용액에서의 용해도가 1 μ g/mL로 매우 낮아 대표적인 소수성 약물로 분류된다.⁶

¹These authors equally contributed to this work.

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: eicosa@cnu.ac.kr, khuh@cnu.ac.kr

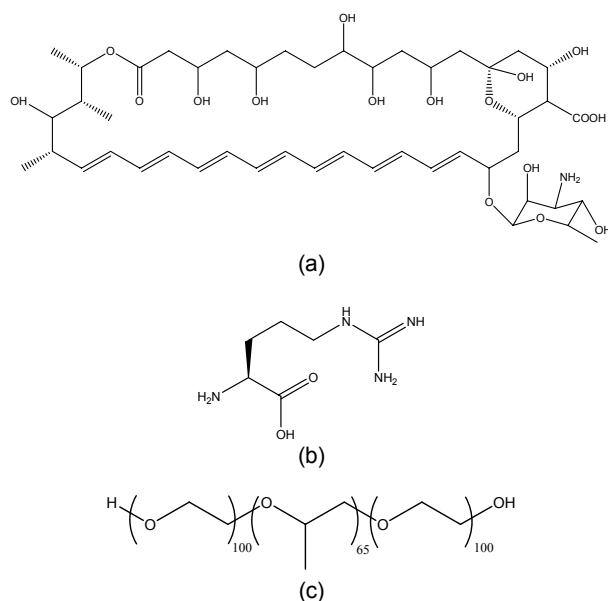


Figure 1. Chemical structures of (a) amphotericin B; (b) L-arginine; (c) Poloxamer 407.

α -아미노산의 일종인 arginine은 단백질 응집을 억제하고,⁷⁻¹¹ 고체 표면에 단백질 흡착을 억제하는 효과를 나타낸다.⁹⁻¹² 또한, arginine은 다양한 chromatographic column에서 결합된 단백질의 용리를 촉진시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{9-11,13} 이러한 결과는 arginine이 단백질-단백질 및 단백질-표면 사이의 상호작용을 분열시키는 작용을 한다는 것을 암시한다. 따라서, 본 연구에서는 이러한 arginine의 용리 및 해리 작용에 기인한 특성을 이용하여 소수성 약물인 AmB의 용해도를 향상시키고자 하였다.

Poloxamer는 친수성 고분자인 poly(ethylene oxide) (PEO)와 소수성 고분자인 poly(propylene oxide) (PPO)로 구성된 비이온성의 PEO-PPO-PEO 삼중블록공중합체(Figure 1(c))로서 대표적인 온도감응성 고분자이다.¹⁴ Poloxamer 수용액은 일정 농도 이상에서 온도증가에 따른 내부구조의 변화에 의해 졸(sol) 또는 겔(gel)의 형태로 가역적으로 변하는 독특한 특성을 가지고 있고, 친수성 및 소수성 블록의 길이 및 구성에 따라 전이온도의 범위를 조절할 수 있는 것으로 알려져 있다.¹⁵ 낮은 온도에서는 낮은 점도의 용액 상태(sol)를 나타내지만, 체온 정도의 높은 온도가 되면 PPO와 용매의 상대적으로 약한 수소결합이 깨지면서 micelle 구조를 형성하고, 이러한 micelle 구조의 회합 및 packing에 의해 겔화가 일어난다.¹⁶ 겔화가 일어나는 온도를 졸-겔 상전이온도라고 하고, 이러한 온도보다 더 높은 온도에서 겔이 용매에 다시 용해되며 졸이 되는 현상을 보이는데 이 때의 온도를 겔-졸 상전이온도라고 한다.¹⁴ P 407은 분자량이 약 12500인 것으로서 Poloxamer 중에서도 낮은 독성과 높은 용해력을 가지며 약물방출 특성이 뛰어나,¹⁷ 다양한 약물전달 제형의 조성물로 광범위하게 사용되고 있다.¹⁸⁻²⁰

본 연구에서는 Poloxamer의 온도감응성을 기초로 상전이가 가능한 하이드로겔 제형을 설계하고자 하였다. 또한, 궁극적으로 점막부착형 제형설계를 위해 제약분야에 대표적인 점착성 고분자로 많이 응용되고 있는 카보폴(carbopol)을 도입하였다.²¹ 카보폴 940은 poly-

acrylate를 가교시켜 제조된 것으로, 낮은 농도로도 높은 점도를 나타낼 수 있어 용액에 첨가하여 레올로지를 효과적으로 조절할 수 있다. 일반적으로 첨가하는 카보폴의 농도가 증가할수록 높은 점착력을 기대할 수 있으며,²¹ 본 연구에서는 arginine에 의한 가용화 효과와 더불어 카보폴의 이러한 점착성을 온도 감응성 하이드로겔 제형에 부여함과 동시에 약물의 방출특성 조절에 이용하고자 하였다.

실 험

시약 및 시료. AmB는 Duchefa Biochemical사(네덜란드)에서 구입하였고, Poloxamer 407(P 407, Pluronic® F127)은 BASF사(독일)에서 구입하였다. L-Arginine은 Sigma-Aldrich사(미국)로부터 구입하였고, 물은 3차 증류수를 사용하였으며, 그 외 시약은 시약급을 구입하여 별도의 정제과정 없이 사용하였다.

Amphotericin B (AmB)의 검량선 작성. AmB의 농도를 계산하기 위한 검량선은 UV-spectrophotometer로 측정된 흡광도를 기준으로 작성하였다. AmB를 완전히 용해시키기 위해 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 용매로 사용하여 표준액을 제조하였다. 이를 계열 희석하여 AmB의 농도가 1, 5, 10, 25 $\mu\text{g/mL}$ 인 표준액을 제조한 후, UV-VIS spectrophotometer(Mini 1240, Shimadzu, 일본)를 이용하여 파장 405 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

AmB의 용해도 평가. L-Arginine의 농도변화에 따른 AmB 용해도 향상 정도를 관찰하였다. 용매로는 증류수를 사용하였고, 각 시료에 대해 L-arginine이 각각 0.1, 0.2, 0.5, 1 M이 되도록 제조하였다. 제조한 L-arginine 용액에 AmB를 과량으로 넣어준 후, AmB와 L-arginine이 충분히 용해되도록 3일간 상온에서 교반하였다. 3일 후, AmB 포화용액을 3000 rpm으로 5분간 원심분리한 후, 가라앉은 침전물을 제외한 상등액 부분에서 0.8~0.9 mL를 syringe로 취하였다. 용해되지 않은 약물을 제거하기 위해 0.45 μm syringe filter를 이용하여 여과하였다. 얻어진 AmB 용액을 희석한 후, UV-spectrophotometer(Mini 1240, Shimadzu, 일본)를 이용하여 파장 405 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

졸-겔 상전이온도 측정. 다양한 농도의 P 407 수용액을 제조한 후 온도변화에 따른 졸-겔 상전이온도를 inverting법으로 측정하였다. P 407의 농도는 각각 20, 25, 30% w/v로 제조하였고, 약물을 첨가하는 경우에는 AmB가 1 mg/mL의 농도로 함유되도록 제조하였고, 카보폴의 경우 0.1, 0.2% w/v의 농도로 첨가되었다. P 407을 2일간 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하여 P 407을 완전히 용해시킨 후, 10 $^{\circ}\text{C}$ 의 항온수조에 시료를 넣고 온도를 서서히 높여 가면서 상전이온도를 측정하였다. 한 시료에 대해 3회 측정을 통해 평균값을 제시하였다.

In vitro 약물방출 특성평가. 약물방출 평가를 위해 P 407 20% w/v 수용액으로 제조된 하이드로겔 제형을 molecular porous membrane tube 내에 넣고 방출시험을 수행하였다. MWCO 6000~8000의 membrane에 AmB를 함유하는 2 mL의 고분자 수용액을 넣은 후 40 mL의 PBS가 든 conical tube에 준비한 membrane을 넣었다. 37 $^{\circ}\text{C}$ 항온조(SI-300, Lab Companion, 한국)에 넣고 방출시험을 수행하였다. 정해진 시간 간격에 따라 약물이 들어있는 membrane을 tube에서 빼내어 새로운 PBS 40 mL가 들어 있는 conical tube로 옮겨서 다음 측정 시간까지 방출 시험을 계속하였다.

이전 conical tube의 검액을 취하여 405 nm에서 흡광도를 측정하여 약물의 방출량을 산출하였다.

결과 및 토론

Amphotericin B(AmB)의 검량선. AmB를 DMSO에 용해하여 농도 1, 5, 10, 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 표준액을 제조한 후, UV spectrophotometer로 측정한 흡광도를 이용하여 검량선을 얻었으며 Figure 2의 검량선을 얻었다. 검량선의 직선회귀식은 $y=0.0489x+0.0265$ ($R^2=0.9991$)이었고, 이후의 농도 산출에 사용하였다.

아르기닌에 의한 AmB의 가용화. 증류수에 각각 0.1, 0.2, 0.5, 1 M의 L-arginine을 포함한 수용액에 과량의 AmB를 용해시켜 얻어진 샘플의 흡광도를 측정하였다. 흡광도를 AmB의 검량선 식(Figure 2)에 대입하여 농도를 산출하고, L-arginine의 농도에 대하여 AmB의 용해도를 Figure 3에 도시하였다. 피하조직 및 전신 진균증 치료제로 널리 사용되나 용해도가 낮아 응용이 제한적이었던 AmB의 용해도가 첨가된 L-arginine의 농도에 비례하여 크게 개선되었음을 확인할 수 있었다. AmB 자체의 수용액 내 용해도는 1 $\mu\text{g/mL}$ 로 매우 낮았으나,⁶ 본 가용화 실험 범위 내에서는 L-arginine의 농도가 증가함에 따라 AmB의 용해도가 직선적으로 증가하였다. 1 M L-arginine을 첨가한 경우 AmB의 용해도는 약 2.6 mg/mL로서 증류수에서의

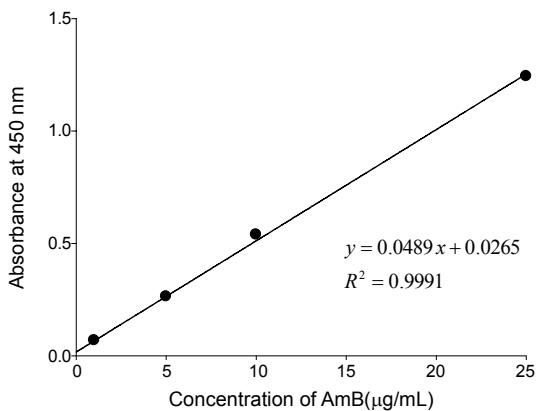


Figure 2. Standard curve of amphotericin B.

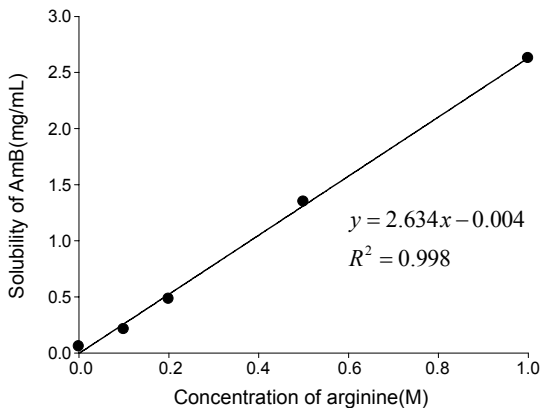


Figure 3. Solubility enhancement of amphotericin B by addition of L-arginine.

AmB의 용해도에 비해 약 2600배 증가하였다. Arginine은 단백질의 정제과정에서 단백질의 응집현상(aggregation)과 단백질-단백질 및 단백질-표면 간의 상호작용을 억제하는데 이용되었다. 이러한 arginine의 작용 메커니즘은 완전히 밝혀지지 않았으나, 물 분자구조에 대한 영향, 아미노산의 side chains 및 peptide bonds와의 상호작용, 그리고 단백질과의 우선적 상호작용 등에 의한 영향으로 제시되었다.⁹ AmB의 용해도 실험결과로서, L-arginine이 고분자량의 단백질 뿐 아니라, 저분자량 소수성 약물인 AmB의 가용화에도 탁월한 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

졸-젤 상전이 다이어그램. P 407의 농도를 20, 25, 30% w/v로 변화시켰을 때의 상전이온도, AmB(1 mg/mL)가 함유된 P 407의 상전이온도, 1 M의 L-arginine이 AmB와 함께 함유된 경우의 상전이온도를 inverting법으로 측정하였다. Inverting법으로 상전이온도를 측정할 때, 젤의 전체적인 흐름의 변화를 관찰해야 하므로 온도계를 젤에 직접 넣고 측정하여 국소적인 범위의 온도만을 측정할 때 보다 상전이온도의 오차를 줄이고자 하였다. Figure 4는 AmB와 L-arginine을 함유한 20% w/v 농도의 고분자 수용액을 각각 10, 37, 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 관찰한 그림이며, 온도증가에 따라 전형적인 졸-젤-졸 상전이 현상을 나타냄을 알 수 있었다.

Figure 5에서 알 수 있듯이 P 407의 상전이온도는 고분자의 농도와 소수성 약물인 AmB의 약물의 첨가 유무에 따라 각각 영향을 받은 것으로 나타났다. 가용화제인 L-arginine의 첨가는 상전이온도를 크게 변화시키지 않았다. 또한, 점착성 향상을 위한 부형제를 첨가하였을 경우 졸-젤 상전이온도가 각각 영향을 받는 것으로 나타났다. 약물이 함유되지 않은 P 407 수용액의 경우 온도증가에 따라 졸-젤 상전이온도가 약간 낮아졌고, 젤-졸 상전이온도는 반대로 증가하는 경향을 보였다. 이러한 상전이온도는 약물의 첨가에 의해 모든 농도에서 낮아지는 것을 관찰할 수 있었다. 예를 들면, 20% w/v 고분자

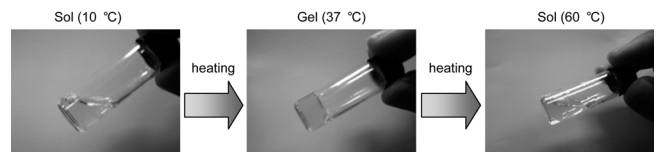


Figure 4. Thermo-induced sol-gel transition behavior of aqueous Poloxamer 407 solution.

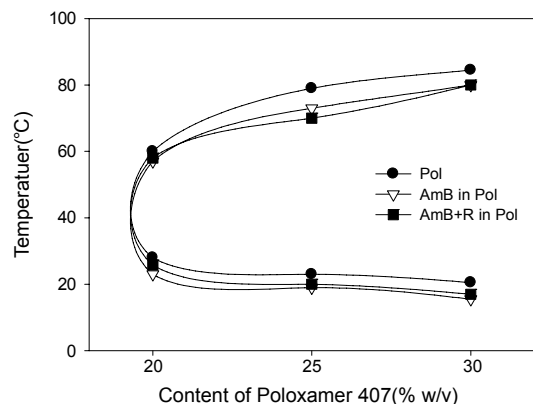


Figure 5. Sol-gel phase transition diagrams of Poloxamer 407 (Pol) solutions in the presence of absence of AmB and L-arginine (R).

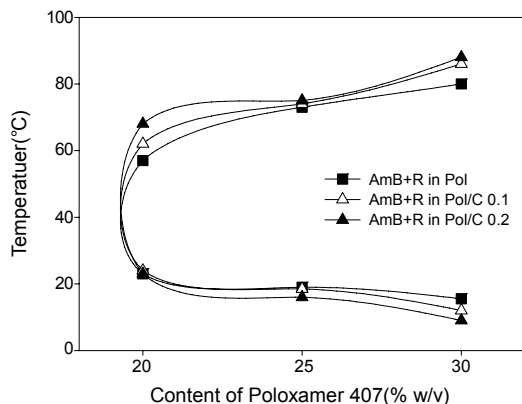


Figure 6. Sol-gel phase transition diagrams of Poloxamer 407 (Pol) solutions in the presence of Carbopol (C, 0.1 and 0.2% w/v).

수용액은 28 °C 에서 졸-젤 상전이를, 60 °C에서 젤-졸 상전이를 보였으나, AmB를 첨가한 경우 20% w/v는 23 °C에서 졸-젤 상전이, 57 °C에서 젤-졸 상전이를 나타내었다. 상전이온도가 다소 낮아지는 현상은 소수성 약물의 존재가 고분자 사슬들의 소수성 상호작용을 더욱 증진시킨 결과로 사료된다. Marchetti 등은 소수성 약물인 lidocaine을 첨가했을 때 졸-젤 상전이온도가 낮아진다는 유사한 결과를 보고하였다.²² 하지만, L-arginine이 추가로 함유된 경우에는 각각 25.8 °C에서 졸-젤, 58 °C에서 젤-졸의 상전이를 보여 주듯이 다시 이러한 상전이온도가 높아지는 것을 관찰하였다. AmB의 가용화제로 사용된 L-arginine이 고분자 수용액의 상전이온도 상승에도 기여하는 것으로 보여진다.

점착성 고분자인 카보폴을 첨가한 경우에도 상전이온도 변화에 대한 경향은 크게 변하지 않았으나, 첨가된 카보폴의 농도증가에 따라 상전이온도 영역이 다소 확장되었다(Figure 6). 카보폴의 높은 점성이 고분자 수용액의 졸-젤 상전이온도를 다소 낮추는 효과가 있는 반면 높은 온도에서는 젤 구조의 안정성을 높여 젤-졸 상전이온도를 높이는 것으로 사료된다. P 407은 상업적으로 사용 가능한 Poloxamer 중에서 가장 독성이 적다고 알려져 있다.²³ AmB와 L-arginine을 함유한 P 407 하이드로젤 제형은 20% w/v 농도 이상에서 실온(20 °C 이하)에서는 졸 상태이나 체온인 37 °C에서는 젤을 형성할 수 있으므로, *in-situ* forming 하이드로젤로서의 역할이 가능할 것이라 기대된다.

In vitro 약물방출 특성. 봉입되지 않은 free drug 상태의 AmB, 1 M의 L-arginine에 용해된 AmB, 그리고 1 M L-arginine과 20% w/v P 407에 용해된 AmB 제조한 후 L-arginine과 P 407이 AmB의 방출에 미치는 영향을 관찰하였다. Figure 7에서와 같이 free drug 상태의 AmB는 직선형의 약물방출을 나타내었으나, 2주간 7% 미만의 매우 적은 약물방출량을 나타내어 용해도가 개선되지 않은 상태에서는 약물의 방출이 용이하지 않음을 확인하였다. AmB의 용해도 개선 효과가 뛰어난 L-arginine을 첨가한 경우 용액상태에서 AmB의 방출은 1일 이내에 약 50%가 방출되는 burst effect를 나타내었고, 2주간 약 65%의 누적 방출량을 나타내어 약물의 용해도 개선을 통하여 방출이 향상됨을 보여주었다. 초기의 빠른 방출은 L-arginine으로 인한 가용화 효과에 기인하는 것으로 판단되며, 이후 2주간 관찰되는 느린 방출 거동은 가용화제 또한 약물과 함께 membrane에

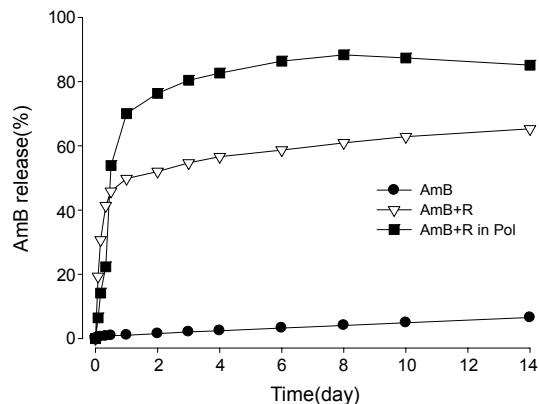


Figure 7. *In vitro* release profile of amphotericin B: AmB (free drug), AmB solubilized in L-arginine solution (1 mg/mL), and AmB in L-arginine containing P 407 (Pol) hydrogel (arginine 1 mg/mL, P 407 20% w/v).

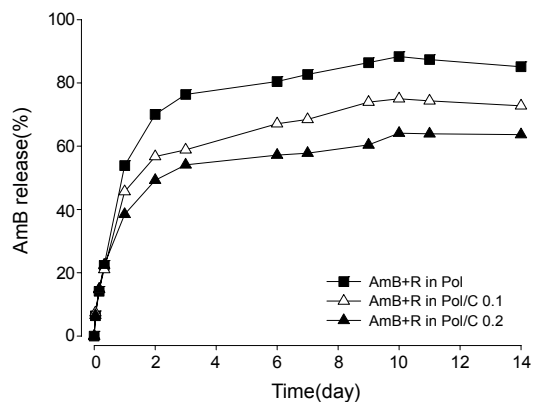


Figure 8. *In vitro* release profile of amphotericin B: AmB in L-arginine (R) containing P 407 (Pol) hydrogel, AmB in L-arginine containing P 407 hydrogel with 0.1% w/v Carbopol (C), and AmB in arginine containing P 407 hydrogel with 0.2% w/v Carbopol.

서 방출되어 점착적인 희석으로 인한 가용화 효과의 저하에 기인한다고 사료된다. 약물과 L-arginine이 모두 함유된 농도 20% w/v의 P 407 하이드로젤은 초기 12시간까지는 L-arginine 용액의 경우보다 초기 burst 방출현상 감소시키면서 지속적인 약물방출과 함께 2주간 약 85%의 약물이 방출됨을 관찰할 수 있었다. 이는 고분자 젤 형성에 의해 초기의 burst effect는 다소 감소하는 효과가 있었고, 이후 젤에서 분리되어 나온 고분자 분자들이 micelle을 형성하여 AmB의 용해도를 어느 정도 유지시킴으로써 지속적인 방출특성을 유지시킬 수 있는 것으로 사료된다. P 407 자체가 양친매성으로 인해 약물의 가용화제로도 일반적으로 알려져 있기 때문에 L-arginine의 가용화 효과를 보다 향상시켰을 것으로 생각된다.

Figure 8에서 비교된 바와 같이, 카보폴은 점착성으로 인해 농도에 비례하여 약물방출을 지연시키는 효과를 나타내었다. 카보폴을 첨가하지 않은 경우 2주간 약 85%의 약물이 방출되었으나, 카보폴 0.1% w/v와 0.2% w/v를 첨가한 경우 2주간의 약물방출은 각각 73%와 64%였다. 이러한 결과는 카보폴의 첨가로 젤 매트릭스의 밀도 및 가교구조의 강화로 인해 약물의 확산 속도가 저하되어 나타난 것으로 보

인다. 본 실험 결과로부터 약물의 방출을 용해도 개선을 통하여 증진시킨 후, 점착성 고분자를 가하여 약물방출속도를 제어함으로써 적절한 방출특성을 나타내는 젤 제형을 설계할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 P 407이 온도감응성 하이드로젤 특성 및 서방성 약물 제제로서의 역할이 가능하므로 카보폴의 사용과 함께 점막 국소 제형을 설계할 경우, 방출 지속형 제제를 가능하게 할 것으로 보인다. 향후 돼지 구강점막을 이용한 점착성 평가와 화학적 및 물리적 개질을 통한 하이드로젤 제형의 물성 향상에 대한 연구를 진행하고자 한다.

결 론

본 연구에서는 amphotericin B의 효과적인 점막부착형 약물전달체 개발을 위해 가용화제인 L-arginine, 점착성 고분자인 카보폴, 온도감응성 고분자인 Poloxamer 407로 구성된 하이드로젤 제형을 제조하고 가용화 및 기본특성을 평가하였다. L-Arginine의 첨가로 소수성 약물인 AmB의 가용화 및 약물방출 특성을 크게 향상시킬 수 있었으며, Poloxamer와 카보폴의 조성 변화로 약물방출 특성 제어가 가능함을 확인하였다. 이러한 L-arginine 함유 온도감응성 젤 제형은 난용성 약물인 AmB의 가용화 및 방출 제어능을 갖는 점막부착형 제형으로 유용할 것으로 기대된다.

감사의 글: 이 논문은 2009년 교육과학기술부의 재원으로 시험하는 한국연구재단의 방사선 기술 개발 사업으로 지원받았습니다.

참 고 문 헌

1. M. Kleinberg, *Int. J. Antimicrob. Ag.*, **27S**, S12 (2006).
2. J. Mazerski and E. Borowski, *Biophys. Chem.*, **57**, 205 (1996).
3. J. Bolard, *Biochim. Biophys. Acta*, **864**, 257 (1986).
4. J. Brajtburg, S. Elberg, D. R. Schwartz, A. Vertut-Croquin, D. Schlessinger, G. S. Kobayashi, and G. Medoff, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **27**, 172 (1985).
5. M. Nahar, D. Mishra, V. Dubey, and N. K. Jain, *Nanomedicine*, **4**, 252 (2008).
6. A. Lavasanifar, J. Samuel, and G. S. Kwon, *J. Control. Release*, **79**, 165 (2002).
7. T. Arakawa and K. Tsumoto, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **304**, 148 (2003).
8. T. Arakawa, Y. Kita, D. Ejima, K. Tsumoto, and H. Fukada, *Protein Peptide Lett.*, **13**, 921 (2006).
9. T. Arakawa, D. Ejima, K. Tsumoto, N. Obeyama, Y. Tanaka, Y. Kita, and S. N. Timasheff, *Biophys. Chem.*, **127**, 1 (2007).
10. T. Arakawa, K. Tsumoto, K. Nagase, and D. Ejima, *Protein Express. Purif.*, **54**, 110 (2007).
11. T. Arakawa, K. Tsumoto, Y. Kita, B. Chang, and D. Ejima, *Amino Acids*, **33**, 587 (2007).
12. D. Ejima, R. Yumioka, T. Arakawa, and K. Tsumoto, *J. Chromatogr. A*, **1094**, 49 (2005).
13. K. Tsumoto, D. Ejima, K. Nagase, and T. Arakawa, *J. Chromatogr. A*, **1154**, 81 (2007).
14. P. Wang and T. P. Johnston, *Int. J. Pharm.*, **113**, 73 (1995).
15. P. Alexandridis and T. A. Hatton, *Colloid Surface A*, **96**, 1 (1995).
16. Y. G. Han, J. W. Kwon, H. Y. Kim, J. S. Kim, J. S. Jo, W. L. Wi, and J. H. Lee, *J. Korean Ophthal. Soc.*, **44**, 2137 (2003).
17. M. Malmsten, *Soft Matter*, **2**, 760 (2006).
18. K. Morikawa, F. Okada, M. Hosokawa, and H. Kobayashi, *Cancer Res.*, **47**, 37 (1987).
19. R. Bhardwaj and J. Blanchard, *J. Pharm. Sci.*, **85**, 915 (1996).
20. S. D. Desai and J. Blanchard, *J. Pharm. Sci.*, **87**, 226 (1998).
21. S. C. Shin, J. Y. Kim, and I. J. Oh, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **26**, 307 (2000).
22. E. J. Ricci, M. V. L. B. Bentley, M. Farah, R. E. S. Bretas, and J. M. Marchetti, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **17**, 161 (2002).
23. R. G. Laughlin, *Aqueous Phase Behavior of Surfactants*, Academic Press, London, 1994.