

이뮤노글로부린 토막과 결합된 포스파티딜콜린 리포솜의 제조와 특성

박정환* · 이은옥 · 김종득†

한국과학기술원 화학공학과

(1992년 4월 28일 접수)

Preparation and Characteristics of Phosphatidylcholine Liposomes Covalently Coupled with Immunoglobulin Fragments

Jung Hwan Park*, Eun Ok Lee and Jong-Duk Kim**

Department of Chemical Engineering and Bioprocess ERC, KAIST

373-1 Kusung-Dong, Yusong-Gu, Taejon 305-701, Korea

(Received April 28, 1992)

The characteristics and stabilities of phosphatidylcholine liposomes covalently coupled with immunoglobulin fragments prepared by the REV method were investigated by the dynamic light scattering, absorbance and calcein release. Using a sulfhydryl-reactive phospholipid derivative of N-[4-(*p*-maleimido-phenyl) butyl] phosphatidylethanolamine (MPB-PE), Fab' antibody fragments were covalently combined with preformed large unilamellar vesicles (LUV). Coupling ratio was 250 μ g of Fab'/ μ mol of phospholipid in vesicles. From dynamic light scattering, it was found that the size of the vesicles increases as the ratio of cholesterol to lipid increases, but that apparently, the size of liposomes was not sensitive to the existence of Fab' fragments. Regardless of inserting Fab' fragments, the absorbance of liposomes decreased as the amounts of bile salt (BS) added. At very low BS concentrations, BS/lipid aggregates would be formed in the outer vesicles monolayer, while, at the high BS concentrations, mixed micelles would be preferred. The vesicles incorporated with Fab' fragments, however, are more resistant to the bile salts than the MPB-PE vesicle are. The absorbance of vacant liposomes and calcein release resulted in that the Fab' vesicles and MPB-PE vesicles by the REV method are very stable, but that those by the sonication method suffered the significant change of turbidities.

Keywords—Immunoliposome, Fab', REV method, covalent coupling

수용액상에 분산된 지질의 이중층 소포체인 리포솜은^{1,2)} 일반 세포막과 유사하여 세포막의 모사연구에 이용될 뿐만 아니라 최근에는 약전달체로서 연구되고 있다. 이러한 리포솜은 열역학적으로 안정하지 못하나 콜레스테롤이나 알카놀과 같은 제 3의 성분이 첨가되면, 안정도가 크게 증가되거나 열역학적으로 안정한 마이크로에멀전으로 전환되는 것으로 알려져 있다.³⁾ 이러한 리포솜이 생체내에 적용되기 이전에 저장시의 열역학적 안정성 등을 고려한 pH, 염, 유기성분, 생체막과의 상호작용에 관한

연구가 진행되고 있다.⁴⁾

그리고 리포솜은 선택성이 없기 때문에 여러가지 방법으로 리포솜의 표면을 수식하기도 한다. 이러한 표면수식은 리포솜의 안정도를 증가시킬 수 있으며 약물의 적중화와 보호장치로서의 역할도 수행할 수 있다.⁴⁻⁷⁾ 이러한 전달장치를 적중화시키기 위하여 항체를 사용한다.^{4,7)} 항체를 리포솜에 결합시키면, 리포솜의 표면에 항체가 노출되어 치료학적 장점이 있고, 특정세포에 대한 적중화가 가능하게 된다.⁸⁾ 항체를 리포솜에 결합시키는 방법에는 비공유결합과

*현주소: 럭키중앙연구소, 대전

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

공유결합이 있다. 비공유결합 방법⁹⁻¹¹⁾으로는 소수성 상호작용을 이용하여 단백질에 소수기를 결합시켜 리포솜 이중층 안으로 삽입시키는 방법^{12,13)}과, 전하를 갖는 인지질을 이용하여 이온성 결합을 이용하는 방법이 있다. 공유결합 방법은 양단 기능을 이용하여 리포솜 표면에 단백질을 결합시키는 것인데, 이 방법은 크게 세가지로 나누어 볼 수 있다. 첫째는 N-hydroxysuccinimide로 활성화시킨 카르복실기를 아미노기와 반응시켜 아마이드결합을 형성하는 방법,¹⁴⁾ 둘째는 pyridyldithiol을 치올과 반응시켜 disulfide 결합을 형성하는 방법,¹⁵⁾ 그리고 마지막으로 maleimide 유도체를 치올과 반응시켜 thioether 결합을 형성하는 방법이다.^{16,17)}

위에서 언급한 공유결합 방법중 많이 연구되고 있는 것은 리포솜과 변형된 단백질의 치올기 간의 반응이다. 치올과 반응성인 지질(thiol-reactive lipid) 유도체로는 phosphatidylethanolamine(PE)을 사용하는데 N-succinimidyl-pyridyl dithiopropionate (SPDP) 또는 N-succinimidyl(-4-[*p*-maleimidophenyl]) butyrate(SMPB)를 이용하여 만든다. SPDP는 disulfide 결합을 통해 가역적으로 단백질과 결합하고 SMPB는 비가역 thioether 결합을 형성한다. 후자는 각 단백질내의 sulfhydryl기와 MPB-PE의 maleimide기 사이의 강한 반응을 이용하여 단백질-소포체 결합을 만든다. 이 반응은 소포체 중에서 MPB-PE의 구성비율이 낮은 값일 때도 효과적이다. 이렇게 결합된 단백질은 혈청이나 혹은 dithiothreitol (DTT)과 같은 강한 환원제에 의해서도 분리되지 않는다.

본 실험에서는 역상증발법으로 제조한 리포솜과 단백질 사이에 thioether 결합을 형성하는 공유결합 방법을 사용하였다. SMPB를 이용하여 DOPE를 치올과 반응성인 지질로 만들고 치올기를 가진 단백질과 반응시켜 단백질이 결합된 리포솜을 제조하였다. 그리고 이 리포솜을 구성하는 지질들의 조성, 저장온도, 저장시간에 의한 영향을 연구하였으며, 또한 리포솜의 제조방법의 차이에서 발생하는 리포솜 특성의 차이점을 규명하기 위하여 광산란, 흡광도 측정, 형광성 방출실험을 수행하였다.

실험 방법

시약

사용한 인지질은 계란에서 추출한 L- α -phosphatidylcholine(PC) (99%)과 1,2-dioleoyl-L-phosphatidylethanolamine(DOPE) (99%)이며 Sigma Chem. Co.에서 구입하여 사용하였다. 단백질로는 immunoglobulin G(IgG)의 항원 결합 부위인 Fab' 부분을 사용하였는데 분자량은 약 50,000 dalton 정도이다. 본 실험에서 이 단백질을 사용한 이유는 항원과 결합하기 위해서는 항체 전체 분자 중에서 항원과 결합부위인 Fab' 부분만 있어도 가능하고, IgG 전체 분자와 반응시키는 것보다 Fab' 부분과 결합시킬 때 결합효율이 높다는 보고에 따라 Fab' 부분을 선택하였다.¹⁶⁾ 또한 Fab' 부분에 존재하는 SH기는 변형한 지질인 MPB-PE와 결합시킬 경우 다른 시약을 필요로 하지 않는 이점도 있다. 사용한 Fab' 부분은 쥐에서 추출한 것으로 Sigma Chem. Co.에서 구입하였다. 사용한 담즙산염으로 deoxycholic acid (DOC)와 taurodeoxycholic acid(TDC), 형광물질로 calcein을 Sigma Chem. Co.에서 구입하여 사용하였다. SMPB는 Sigma Chem. Co.에서, triethylamine과 무수메탄올은 Aldrich에서 구입하였다. 완충용액은 citric buffer로 20 mM citric acid, 35 mM disodium phosphate, 108 mM NaCl, 그리고 1 mM의 EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid)로 만들어 사용하였으며 시약들은 Aldrich로부터 구입하였다. 겔여과에서 사용한 겔은 Bio-Gel A-0.5m(Bio Rad)이다.

기기 및 장치

Fab'이 결합된 리포솜과 결합하지 않은 Fab' 부분을 분리하기 위하여 직경 1.1 cm, 높이 70 cm의 Bio-Gel A-0.5m 칼럼을 사용하였다. 분석을 위한 TLC로는 Merck사의 실리카 겔 60 HF₂₅₄ 0.25 mm 판을 사용하였다. 정제하는 데는 Merck PLC 실리카 겔 60 HF₂₅₄ 1 mm 판을, 농축하는 데는 농축기(Amicon Co.의 centricon 30)를 사용하였다. 리포솜을 만들기 위해서 초음파장치(Sonics & Material Inc.의 model VC250 basic)을 사용하였다. 흡광도는 분광계(Hewlett Packard 8452A Diode array)를, 형광성 측정에는 크세논 램프(Amino xenon lamp)를 사용하였다. 이때 형광물질(calcein)이 포집된 리포솜과 외상의 형광물질을 분리하기 위해 직경 1.1 cm, 높이

70 cm의 Bio-Gel A-0.5m 칼럼을 설치하여 사용하였다. 리포솜의 입자크기와 분포를 측정하는 데는 광산란 분광계(Brook Haven, model BI-8000 AT)를 사용하였다.

MBP-PE(N-[4-(p-Maleimido-phenyl)butyl] phosphatidylethanolamine)의 합성

MPB-PE는 DOPE와 SMPB를 반응시켜서 얻는다.¹⁶⁾ 먼저 27 μmol (20 mg)의 DOPE를 건조시키고 다른 플라스크에 42 μmol (15 mg)의 SMPB를 넣어 마개로 막고 질소가스를 불어넣어 공기와의 접촉을 없앤다. 여기에 1.5 ml의 무수메탄올과 4.2 μl (30 μmol)의 triethylamine을 넣는다. SMPB를 메탄올에 녹인 후 이 용액을 PE가 있는 플라스크에 질소가스를 이용해 넣는다. 25°C 에서 5시간 동안 반응시키는데, 이 때의 주반응식은 Fig. 1과 같다. 그 다음 혼합물을 TLC로 분리하여 MPB-PE가 합성되었는지 확인하였는데 용매로는 혼합용매(클로로포름 : 메탄올 : 물 = 65 : 25 : 4)를 사용하였다. 이 때 MPB-PE의 이동점을 확인하는 방법으로는 다음 네가지 방법을 이용하였다. 254 nm UV, I₂ 증기, ninhydrin, molybdenum blue에 의한 염색법을 이용하여 MPB-PE 합성여부를 확인하였다.¹⁶⁾

정제공정은 용매로서 TLC용 혼합용매를 사용하여 실리카 겔 60 HF₂₅₄ PLC에서 합성된 MPB-PE를 정제하였다. 이때 PLC에 의한 정제에는 질소가스 하에서 수행한다. 위의 확인법을 다시 이용하여 MPB-PE의 띠를 확인하고, MPB-PE로 확인되는 띠를 긁어 내어 혼합용매(클로로포름:메탄올=4 : 1)의 용액을 이용하여 실리카 겔로부터 용리해 낸다. 이 MPB-PE 용액은 질소가스 하에 -40°C 에서 보관한다.

MPB-PE의 농도분석

위에서 얻어진 MPB-PE의 농도를 측정하기 위해 지질에 있는 인산염을 분석하는 Bartlett 분석법을 사용하였다.¹⁸⁾ Bartlett 방법은 인산염을 인산몰리브데늄염(phosphomolybdate)이라는 복합체를 만든 다음 Fiske & Subbarow reducer와 반응시켜 발색 정도를 측정하여 인산염의 농도를 측정하는 방법이다. 우선 각 표준시료의 인산염의 농도에 대해 발색되는 정도를 800 nm에서 흡광도를 측정하여 만든다.

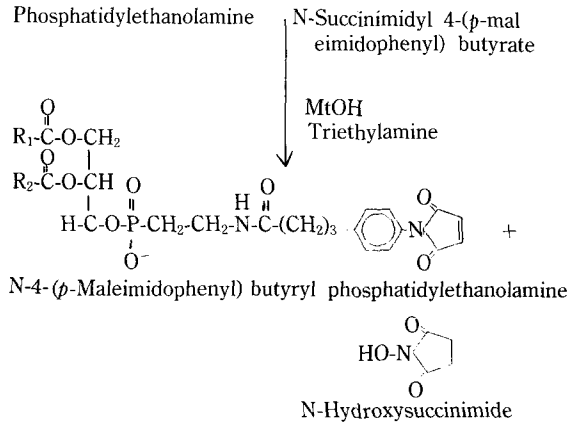
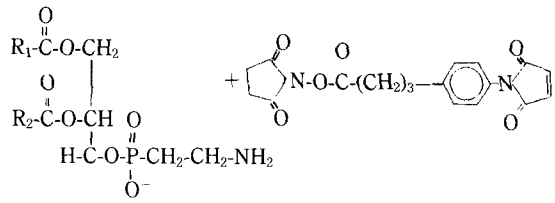


Figure 1—Synthesis of maleimidophenylbutyrylphosphatidylethanolamine (MPB-PE).

리포솜의 제조

과잉의 유기상에 녹아 있는 인지질과 수성 완충 용액으로 만들어진 유탁액(water-in-oil emulsion)로부터 감압 하에서 유기상을 제거함으로써 LUV를 만들 수 있는데 이를 REV 소포체라고 한다.

지질의 혼합물(PC : MPB-PE : cholesterol=9.5 : 0.5 : 10)을 감압 하에서 용매를 증발시켜 지질의 박막을 형성시킨다. 질소 기체 하에서 지질막을 3 ml의 디에칠에테르에 다시 녹인 후 1 ml의 수용액상을 첨가하면 상이 둘로 나뉘는데 이 혼합액을 팁형 초음파장치에서 1분 내지 2분 동안 초음파로 처리하면 깨끗한 단일 분산상이 된다. 혹은 최소한 30 분간 분리가 일어나지 않는 균일한 흐린 분산상이 된다. 혼합액을 회전 증발건조기에 넣고 20-25°C, 감압 하에서 200 rpm으로 회전시키며 유기용매를 증발시킨다. 대부분의 유기용매가 증발함에 따라 분산상은 처음에는 점도가 높은 겔을 형성하고, 5-10분 후에 액상 분산상이 된다.

Fab'와 액포와의 결합

4 μmol의 인지질로 형성된 소포체를 완충액(108 mM NaCl, 20 mM citric acid, 35 mM disodium

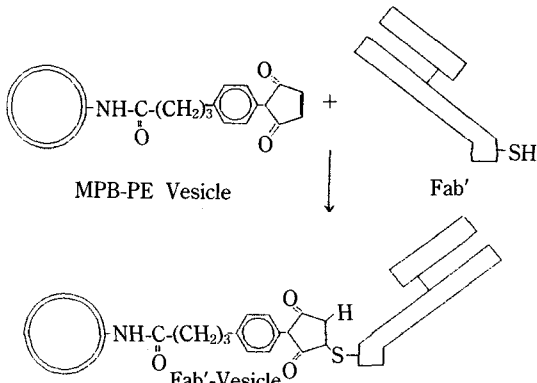


Figure 2—Covalent coupling of Fab' fragments to MPB-PE vesicles.

phosphate, 1 mM EDTA, pH 6.5)에 희석시킨 후 1.3 mg/ml의 Fab' 부분을 섞는다. pH는 6.5로 맞추고 질소가스 하의 실온에서 12시간 동안 반응시킨다. 이 때 일어나는 반응은 Fig. 2와 같다. 결합되지 않는 단백질은 Bio-Gel(1.1×70 cm)을 통과시켜 분리한다. 단백질의 결합정도는 Lowry 방법으로 확인하였다.¹⁸⁾ 표준단백질로는 알부민(bovine serum albumine)을 사용하였으며 750 nm에서 흡광도를 읽는다.

입자크기의 측정

리포솜의 크기는 리포솜의 제조방법, 리포솜과 단백질의 결합여부, MPB-PE의 리포솜 구성 지질로서의 존재 유무, 그리고 콜레스테롤의 조성비율에 따라 영향을 받기 때문에 리포솜의 크기와의 관계를 조사하였다. 이러한 리포솜을 광산란 장치를 이용하여 25°C에서 입자의 크기를 측정하였다.

흡광도의 측정

Bio-Gel A-0.5m column을 통과한 LUV 용액을 지질농도가 0.2 μmol/l가 되게 pH 6.5 buffer I(108 mM NaCl, 20 mM citric acid, 35 mM disodium phosphate, 1 mM EDTA)로 희석하여 담즙산염용액을 농도별로 첨가하고 30분 후에 흡광광도계로 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 시간에 따라 리포솜의 안정도를 알아보기 위하여 리포솜 용액의 최종농도를 0.03 wt%로 맞추고 이것을 3 ml씩 흡광광도계용 1 cm cell에 넣어 흡광도를 측정하였다. 흡광도의 측정파장은 420 nm이다.

형광물질 방출 측정

리포솜에 형광물질(calcein)을 고농도로 포집시킨 후 외상에 존재하는 잔여분을 겔 여과로 제거시킨다.

Table 1—Brief Identifications of PE and MPB-PE on Thin Layer Chromatography

Developer	PE	MPB-PE
UV (254 nm)	-	+
I ₂	+	+
Ninhydrin	+	-
Molybdenum blue	+	+

+: positive test, -: negative test

방출되는 형광성 %는 다음 식으로부터 구한다.

$$\text{Release \%} = [(F - F_0)/(F_t - F_0)] \times 100$$

F는 주어진 조건에서 측정된 형광강도, F₀는 초기의 형광강도, F_t는 총 형광강도이다. 형광체를 50×10⁻³ mol/l가 되도록 1 N NaOH 용액에 녹인 후 pH 6.5 buffer I를 첨가한 후 최종 pH는 6.5으로 한다. 리포솜안에 포집되지 않은 잔여분을 제거하기 위해 Bio-Gel A-0.5m 칼럼을 통과시켜 분리한다. 이 칼럼에 완충용액을 총상부피의 2배 정도를 흘려서 칼럼이 평형에 도달한 후에 시료를 넣어 분리한다. 분리된 시료를 취해 5, 20 및 37°C에 보관하면서 형광 흡광계에서 시간에 따라 방출되는 형광강도를 측정하였다. 이때 여기 파장과 형광 파장은 최대값인 490 nm와 520 nm이었다.

결과 및 고찰

항체가 결합된 리포솜의 제조

MPB-PE의 합성—항체를 리포솜에 결합하기 위하여 sulfhydryl기를 가진 항체와 sulfhydryl기와 강한 반응성을 가진 maleimide기를 갖도록 변형시킨 지질을 사용하였다. 우선 maleimide기를 갖도록 PE를 변형시켰으며 MPB-PE가 만들어졌는지는 TLC를 사용하여 합성시킨 물질을 분리한 후 R_f값과 염색에 의한 차이를 이용하였다. 우선 염색법에 의한 확인은 Table I과 같다.

한편 상대적인 R_f값에서 MPB-PE는 PE보다 높은 값을 나타낸다. 이로부터 MPB-PE가 합성되었음을 알 수 있다. 이렇게 합성된 MPB-PE는 PLC를 이용하여 분리한 후 다시 TLC로 확인하였을 때 닐히드린에 의해 반응이 일어나지 않았으며 molybdenum blue에는 푸른색을 띠었다. 따라서 정제가 잘

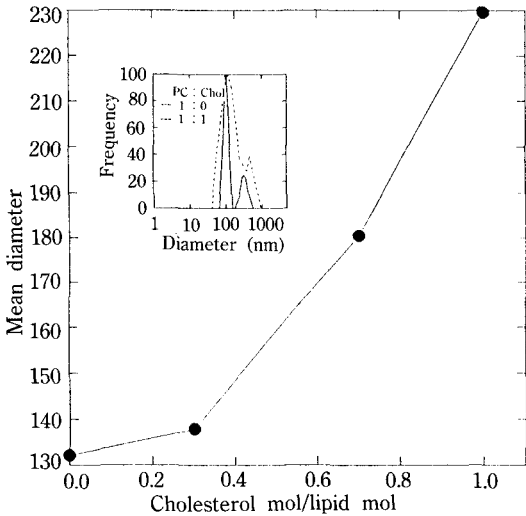


Figure 3—Change of mean diameter with ratio of cholesterol to lipid.

되었음을 알 수 있었다.

MPB-PE의 농도를 Bartlett 분석법으로 정제된 MPB-PE용액 7 ml/중 0.2 ml를 취해 측정된 결과 0.8 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ 임을 알 수 있었다. 따라서 정제후 얻어진 MPB-PE의 양은 5 μmol 이었다. 이로써 처음 PE의 양이 10 μmol 이므로 절반의 양이 MPB-PE로 전환되었음을 알 수 있었다.

리포솜과 단백질의 결합

지질과 Fab' 부분을 12시간 동안 반응시킨 후 BioGel A 칼럼을 통해 결합되지 않은 Fab' 부분을 분리시켜 결합하지 않은 단백질을 Lowry 측정법으로 측정하였다. 유출액 1.2 ml/중 0.4 ml를 취해 흡광도를 측정된 결과 0.278이었다. 이는 표준곡선에 의하면 78 μg 으로 전체적으로는 240 μg 의 Fab' 부분이 결합하지 못하고 유출된 것이다. 따라서 1.3 mg의 Fab' 부분 중에서 약 1mg이 결합하였으며 사용된 지질에 대하여 비율로 나타내면 250 $\mu\text{g}/\text{lipid}$ μmol 이다. 이 값은 리포솜의 크기가 0.1-0.3 μm 이므로 리포솜 1개에 약 2000개의 Fab' 부분이 붙어 있을 것으로 추정된다.

광산란(DLS)을 이용한 리포솜의 크기 측정

콜레스테롤의 영향—Fig. 3은 지질과 콜레스테롤의 양에 대한 입자크기를 측정된 것이다. 보통 콜레스테롤과 지질의 비율을 1대 1로 하여 리포솜을 만들었는데 이는 MPB-PE를 갖는 리포솜의 콜레스

Table II—Size Distribution of Liposome(PC/MPB-PE/Cholesterol=9.5/0.5/10) Prepared by REV and Sonication Methods

REV method		Sonication method	
Particle size (nm)	Frequency	Particle size (nm)	Frequency
50	0	32	0
74	40	37	28
90	67	42	73
108	90	46	100
130	100	52	73
157	90	65	0
189	67	75	30
227	40	87	0
274	20	100	0
330	8	115	0
346	16	140	36
381	27	157	72
462	35	177	91
533	40	200	72
759	56	225	36
851	20	254	11
955	16	316	0
1072	9	365	0
1265	0		

테롤의 비율에 따라 단백질과의 결합효율이 달라질 뿐만 아니라 최대의 결합효율을 나타내기 때문이다.¹⁹⁾ 콜레스테롤이 증가함에 따라 평균 입자크기는 증가하였으며 결합효율도 증가하였는데 이는 콜레스테롤이 지질 사이에 끼어 보다 큰 역미셀을 만들어 리포솜의 크기를 크게 한 결과라고 생각된다. 또한 지질의 친수기간의 상호 작용을 콜레스테롤의 입체 효과를 감소시키고 항체와 보다 잘 결합할 수 있는 환경을 만들기 때문이다.

제조 방법에 의한 영향—REV 방법과 초음파분쇄방법에 의한 리포솜의 차이를 알아보기 위해서 지질의 조성을 같게 하여 리포솜을 제조하였다. 이때 초음파분쇄 방법에서 초음파분쇄 시간은 30분이었다. Table II에서 보여 주는 이 두 방법에 의한 크기 차이는 초음파분쇄 방법이 평균입자 직경이 130 nm로 276 nm인 REV 방법보다 작았으며 분포 폭도 역시 좁았다. 하지만 초음파분쇄 방법으로 만든

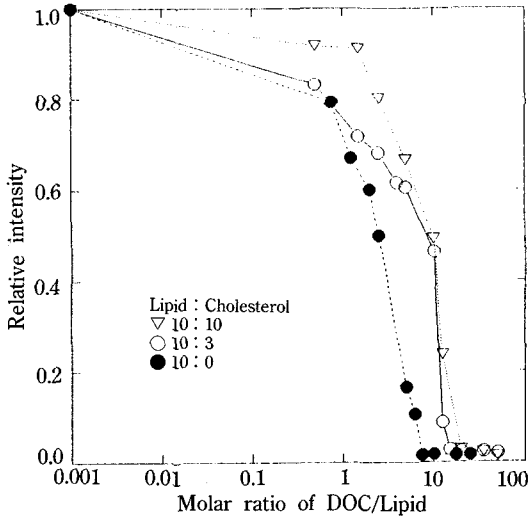


Figure 4—Effect of cholesterol on the solubilization of liposome by DOC in pH 6.5 buffer solution at 20°C, detected at 420 nm.

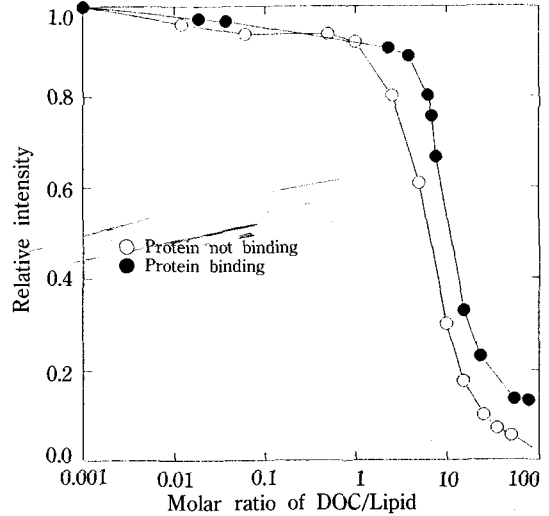


Figure 6—Effect of Fab' on the solubilization of liposomes by DOC in pH 6.5 buffer solution at 20°C, detected at 420 nm.

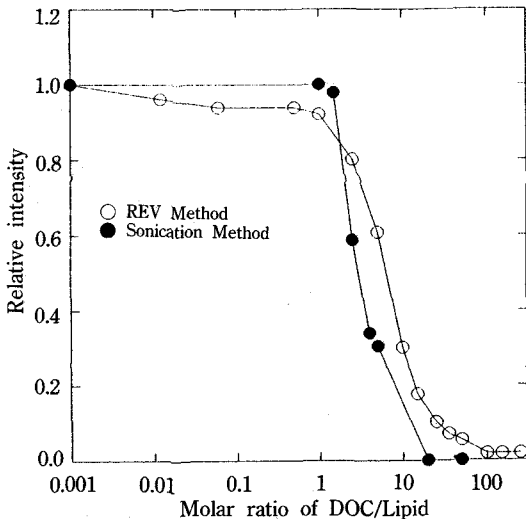


Figure 5—Effect of the preparation methods of liposomes on the solubilization of liposome by DOC in pH 6.5 buffer solution at 20°C, detected at 420 nm.

SUV은 내포할 수 있는 양이 적고, 이에 반해 REV 방법으로 만든 LUV는 크기가 큰 약물이라도 포집할 수 있는 장점이 있다.

리포솜 조성에 의한 영향—MPB-PE가 들어간 경우와 들어가지 않은 경우를 비교하였을 때 MPB-PE가 들어간 경우 평균 입자 직경은 276 nm이고 들어가지 않은 경우가 230 nm으로 입자 부피로는

약 65% 증가하였다. 사다리꼴 형태의 DOPE가 곡률반경을 증가시켰을 것으로 추정된다. 그러나, 항체가 결합된 경우와 MPB-PE만을 가지고 항체와 결합하지 못한 경우를 비교해 보면, 평균입자 크기는 각각 275 nm과 276 nm으로 차이가 없었으며 분포 역시 비슷하다. 따라서 MPB-PE의 영향에 비하여 항체의 결합은 리포솜의 크기에는 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

담즙산염이 리포솜의 안정성에 미치는 영향

단백질이 함유된 리포솜의 안정성에 미치는 담즙산염의 영향은 이전에 보고한 바 있다.²⁰⁾ 여기서는 리포솜의 조성과 제조방법에 따른 리포솜의 안정성을 담즙산염을 이용하여 알아보려고 한다.

콜레스테롤의 영향—Fig. 4는 콜레스테롤의 양이 증가할수록 리포솜을 용해하는 데는 더 많은 담즙산염이 필요함을 나타내고 있다. 이것은 지질의 탄화수소사슬에서 발생하는 trans-gauche 이성화 때문에 투과도가 변화한 것으로 추정되는데, 콜레스테롤을 첨가하면 이러한 격임을 감소시켜서 투과도를 감소시키기 때문이다.²¹⁾

제조방법에 의한 영향—Fig. 5는 제조방법을 달리한 것인데, 초음파분쇄에 의한 것이 REV에 의한 것보다 쉽게 가용화되었다. 이는 Table II에서처럼 크기의 분포가 좁으며 구조상 REV 방법의 LUV보다

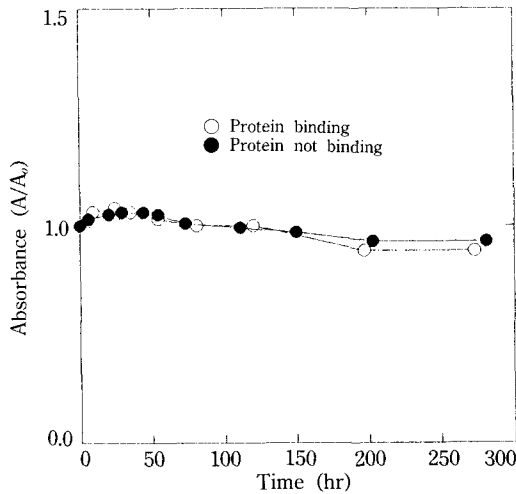


Figure 7—Absorbance changes of Fab' vesicles (liposomes coupled with Fab') and MPB-PE vesicles (not coupled), with time at 20°C.

높은 곡률을 갖으므로 구조가 불안정하기 때문이다. 이처럼 둘다 단층 액포이긴 하지만 곡률에서 발생하는 열역학적 안정성 때문에 REV 방법으로 만든 LUV가 더 안정하다.

Fab' 부분의 영향—리포솜의 안정성에 대한 담즙산염의 영향은 PB-PE가 포함된 리포솜이나 아니거나 거의 차이가 없다. MPB-PE가 포함된 리포솜과 그렇지 않은 리포솜 사이에는 크기에는 차이가 있었지만 표면 성질에는 별다른 영향을 미치지 않는다. 그러나 Fig. 6에서 Fab' 부분이 결합된 경우에는 Fab' 부분이 결합되지 않은 경우와 다른 결과를 나타낸다. 이는 광산란에 의한 크기 측정에서 같은 크기가 나왔다는 것을 생각해 볼 때 표면의 성질, 즉 단백질의 결합 때문에 발생한 것이다. Fab' 부분이 붙은 경우 가용화되는 정도가 감소하는데 이것은 담즙산염이 리포솜에 접근하기 전에 단백질에 의해 저해 받거나 혹은 단백질과 결합하여 리포솜을 가용화하는 데에 더 많은 담즙산염이 필요하기 때문이다.

보관온도에 따른 리포솜의 안정성

흡광도 측정—PC/MPB-PE/cholesterol을 9.5/0.5/10의 비율로 혼합하여 REV방법으로 리포솜을 제조하여 흡광도 측정실험을 하였다. Bio-Gel A column을 통과시켜 얻은 유출액중 4 μ mol을 Fab'와 결합시켜 단백질이 결합된 리포솜과 결합되지 않은

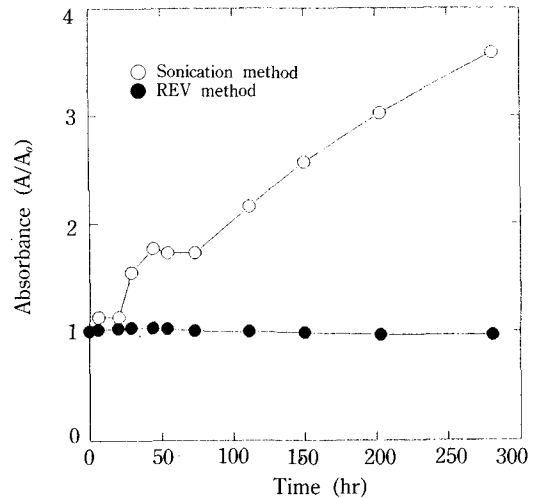


Figure 8—Absorbance changes of MPB-PE vesicles (Pc/MPB-PE/cholesterol=9.5/0.5/10) prepared by sonication and REV with time at 20°C.

리포솜을 제조하였다. REV 방법과 초음파분쇄방법으로 리포솜을 제조하였으며 이때 지질의 최종 농도는 모두 0.03 wt%로 맞추었다. 이 세 종류의 리포솜 용액을 각각 4, 20, 37°C에 보관하면서 흡광도를 측정하였다. Fig. 7은 REV 방법으로 제조한 리포솜의 경우에는 Fab' 부분의 결합여부가 리포솜의 시간에 따른 흡광도에 영향을 미치지 못하였다. Fig. 8에 나타낸 바와 같이 초음파분쇄 방법으로 만든 SUV의 경우에는 흡광도의 변화가 매우 큰 것을 볼 수 있는데, 이는 열역학적으로 불안정한 상태의 SUV들이 서로 응결함으로써 안정성을 높이려는 경향이 있기 때문이다. Fig. 9는 단백질이 결합된 REV 리포솜의 경우 보관온도에 따른 흡광도의 변화를 나타낸 것이다. 보관 온도에 관계없이 시간에 따른 리포솜의 흡광도에는 거의 변화가 없음을 나타내고 있다. 이와 같은 현상은 단백질이 결합되지 않은 REV 리포솜의 경우에서도 나타나는데 이로부터 REV 방법에 의해 제조된 리포솜이 매우 안정함을 알 수 있다. 단백질이 삽입된 PE 리포솜의 경우 상온 이상에서 보관할 경우에는 단백질의 변화로 인해 리포솜이 불안정해지는 현상을 보였는데²²⁾ 반해, 단백질이 공유결합한 본 실험의 경우에는 상온 이상에서 보관할 경우에도 리포솜이 안정함을 알 수 있다.

형광체 방출 측정—리포솜의 조막상태와 리포솜

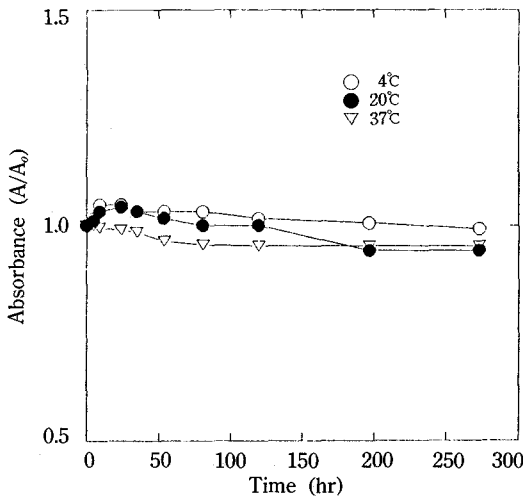


Figure 9—Absorbance change of Fab' vesicles with time at 4, 20 and 37°C.

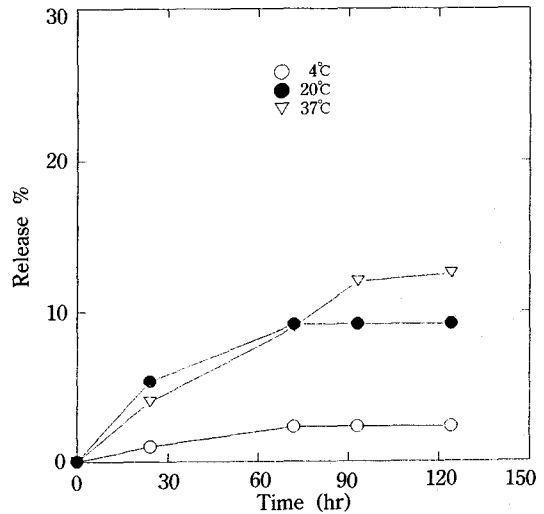


Figure 10—Calcein release from MPB-PE vesicles with time, incubated 4, 20 and 37°C.

의 내부에 포집된 물질의 방출특성을 알아 보기 위해서 형광성 방출 실험을 하였다. REV 방법에서는 50 mM의 형광체가 녹아 있는 완충용액을 수용상으로 사용하였으며, 초음파분쇄방법에서는 calcein (50 mM)을 포함한 완충용액으로 팽윤시킨 후 초음파분쇄하였다. 이 시료를 Bio-Gel A 칼럼을 통과시킨 후 4, 20, 37°C에 보관하면서 시간에 따른 형광성 물질 방출실험을 하였다. 리포솜 용액의 조성은 흡광도 측정에 사용한 것과 같고 제조하는 방법도 같은 방법을 사용하였다. Fig. 10에서는 시간이 지남에 따라 형광성 방출이 약간 증가하는 것을 볼 수 있다. 이는 리포솜의 막을 통해 안에 포집된 물질들이 확산되어 나오기 때문이다. 또한 온도가 증가함에 따라 형광성 방출이 약간 증가함을 볼 수 있는데, 막을 이루고 있는 지질들의 상전이 온도와 관계가 있다. 즉, 온도가 증가함에 따라 막의 유동성이 증가하여 안에 포집된 형광물질의 확산이 용이해지기 때문이다. Fab' 부분의 결합여부에 의한 형광체 방출은 흡광도 측정에서의 마찬가지로 영향을 미치지 않는 것으로 나타났는데, 공유결합에 의해 결합되어 있는 단백질 간의 상호작용에 의해서는 리포솜간의 영집현상이나 막의 유동성에 영향을 미치지 않는다는 것을 나타낸다.

초음파분쇄 방법으로 만든 SUV는 REV로 만든 LUV과의 형광체 방출에는 차이가 있었다. SUV나 REV 리포솜 모두 리포솜의 대부분을 이루고 있는

PC가 리포솜을 안정하게 형성하고 있어서 둘다 안정한 편이지만 시간이 지날수록 SUV의 형광체 방출이 REV 리포솜의 것보다 약간 증가하는 것을 관측하였다. 이로부터 리포솜을 제조하는 방법이 형성된 리포솜의 크기뿐만 아니라 안정성에도 영향을 미칠 수 있음을 간접적으로 알 수 있다. 이를 흡광도 실험에서 얻어진 결과와 비교해 보면 앞에서 나타난 SUV의 흡광도의 증가는 리포솜이 깨어지고 더 큰 형태로 뭉치는 것임을 알 수 있다.

결 론

단백질을 공유결합시킨 리포솜의 제조방법, 조성, 단백질 결합 여부에 따른 특성화와 저장 안정성, 담즙산염으로 인한 가용화에 의한 안정성에 대해서 광산란, 흡광도와 형광성 방출실험등을 통해서 연구하였다.

항체의 항원결합부위인 Fab' 부분은 MPB-PE가 함유된 LUV와 thioether 결합을 통해 강하게 공유결합시켜 제조하였는데 단백질의 결합은 250 µg Fab'/µmol lipid로서 결합효율은 약 80% 정도이다.

REV 방법으로 지질의 농도, 지질의 성분, 수용액과 유기용액 간의 부피비 등에 따라 만들어지는 입자의 평균크기를 광산란법으로 측정하였다. 지질의 성분중 콜레스테롤의 함량이 증가할수록 리포솜

의 평균 입자경이 증가하고 안정성 또한 좋아지는데 이는 콜레스테롤이 리포솜 막의 충전상태를 향상시켜 막의 유동성을 감소시키기 때문이다. 여기서는 10 μmol 의 지질과 10 μmol 의 콜레스테롤의 혼합물에서 water/oil=1/3의 비율로 만든 것이 크기가 작은 리포솜을 얻었다.

PC 리포솜의 안정성에 미치는 담즙산염의 영향은 지질의 조성중 콜레스테롤의 함량이 증가할수록 담즙산염에 대한 안정성이 증가하였는데 콜레스테롤로 인한 막의 투과성 감소로 인한 현상이다. 또한 Fab' 부분이 결합된 리포솜을 가용화하는데 사용되는 담즙산염의 양이 Fab' 부분이 결합되지 않은 리포솜을 가용화시키는데 사용되는 양보다 높게 나타났다. 이러한 현상은 리포솜을 가용화시키는데 사용되는 담즙산염이 지질뿐 아니라 단백질과도 결합하여 혼합 미셀을 형성하기 때문이라고 여겨진다.

마지막으로 시간에 따른 리포솜의 안정성을 관측한 결과 초음파분쇄에 의해 제조된 리포솜의 막상태는 REV 방법으로 제조한 리포솜과 유사하였다. 흡광도 실험에서는 시간이 지남에 따라 영김현상이 일어나는데 반해, REV 방법으로 제조한 리포솜은 단백질의 결합여부에 상관없이 흡광도 측정이나, 형광성 방출실험에서 매우 안정한 계를 유지하고 있었다.

약 어

DOC	: deoxycholic acid
DOPE	: 1,2-dioleoyl-L-phosphatidylethanolamine
DTT	: dithiothreitol
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid
LUV	: large unilamellar vesicle
MBP-PE	: N-[4-(p-maleimido-phenyl) butyl] phosphatidylethanolamine
PC	: L- α -phosphatidylcholine
PE	: phosphatidylethanolamine
PLC	: preparative layer chromatography
REV	: reverse-phase evaporation vesicle
SMPB	: N-succinimidyl(4-[p-maleimidophenyl]) butyrate
SPDP	: N-succinimidyl-pyridyl dithioproprionate

SUV	: small unilamellar vesicle
TDC	: taurodeoxycholic acid
TLC	: thin layer chromatography

문 헌

- 1) A.D. Bangham, *Liposomes: From physical structure to therapeutic applications*, Elsevier/North-holland (1981).
- 2) A.D. Bangham, *Liposomes*, Marcel Dekker (1983).
- 3) J.-G., Kim and J.-D. Kim, Turbidity and stability of sonicated lecithin liposomes, *Hwahak-konghak* **26**(2), 171 (1988).
- 4) L.D. Leserman, P. Machy and J. Barbet, Cell-specific drug transfer from liposomes bearing monoclonal antibodies, *Nature*, **293**, 226 (1981).
- 5) W.B. Geho and J.R. Lau, Masking of liposomes from RES recognition, U.S. PATENT 4501728 (1985).
- 6) H. Ellens, J. Bentz and F.C. Szoka, Fusion of phosphatidylethanolamine containing liposomes and mechanism of the L_{α} - H_{II} phase transition, *Biochemistry*, **25**, 4141 (1986).
- 7) T.D. Heath, J.A. Montgomery, J.R. Piper and D. Papahadjopoulos, Antibody-targeted liposomes: Increase in specific toxicity of methotrexate-aspartate, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 1377 (1983).
- 8) E. Mayhew and D. Papahadjopoulos, *Liposomes*, Marcel Dekker, 1983.
- 9) T.D. Heath, David Robertson, Michael S.C. Birberk and Anthony J.S. Davies, Covalent attachment of horseradish peroxidase to the outer surface of liposomes, *Biochim. Biophys. Acta*, **599**, 42 (1980).
- 10) T.D. Heath, R.T. Fraley and D. Papahadjopoulos, Antibody targeting of liposomes: Cell specificity obtained by conjugation of F(ab') to vesicle surface, *Science*, **210**, 539 (1980).
- 11) F.J. Martin, W.L. Hubbell, and D. Papahadjopoulos, Immunospecific targeting of liposomes to cells: A novel and efficient method for covalent attachment of Fab' fragments via disul-

- fide bonds, *Biochemistry*, **20**, 4229 (1981).
- 12) Y. Hashimoto, H. Endoh, and M. Sugawara, *Liposome Technology*, Vol. III, CRC Press, 1984.
 - 13) D. Sinha and F. Karush, Attachment to membranes of exogenous immunoglobulin conjugated to a hydrophobic anchor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**, 554 (1979).
 - 14) A. Huang, L. Huang and S.J. Kennel, Monoclonal antibody covalently coupled with fatty acid, *J. Biol. Chem.*, **255**, 8015 (1980).
 - 15) F.J. Martin, W.L. Hubbell, and D. Papahadjopoulos, Immunospecific targeting of liposomes to cells: A novel and efficient method for covalent attachment of Fab' Fragments via disulfide bonds, *Biochemistry*, **20**, 4229 (1981).
 - 16) F.J. Martin and D. Papahadjopoulos, Irreversible coupling of immunoglobulin fragments to preformed vesicles, *J. Biol. Chem.*, **257**, 286 (1982).
 - 17) J.T.P. Derksen and G.L. Scherphof, An improved method for the covalent coupling of proteins to liposomes, *Biochim. Biophys. Acta*, **814**, 151 (1985).
 - 18) C.M. Stoscheck, Quantitation of protein, *Methods of Enzymology*, **182**, 50 (1990).
 - 19) R.R.C. New, *Liposomes : A Practical Approach*, IRL Press, 1990.
 - 20) E.O. Lee, J.G. Kim, and J.D. Kim, The Solubilization behavior of DOPE-immunoliposomes with immunoglobulin G(IgG) by added bile salts, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **20**, 135 (1990).
 - 21) P. Yeagle, *The membranes of cells*, Academic Press, 1987.
 - 22) C.S. Kim, E.O. Lee, and J.D. Kim, Preparation and characteristics of unsaturated PE immunoliposome incorporated with ganglioside G_{M1}, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **21**, 161 (1991).