

항체를 포함하는 Phosphatidylethanolamine 리포솜의 제조와 그 특성

박 성 호 · *신 현 재 · *양 지 원 · †최 태 부
건국대학교 미생물공학과
*한국과학기술원 화학공학과

Preparation and Characterization of PE Liposomes Containing Antibody

Sung-Ho Park, Hyun-Jae Shin,* Ji-Won Yang* and Tae-Boo Choe[†]

Department of Microbial Engineering, Konkuk University, Seoul 133-701, Korea

*Department of Chemical Engineering, KAIST, Taejon 305-701, Korea

ABSTRACT

A target-sensitive liposome was prepared by using a dioleoyl-phosphatidylethanolamine(DOPE) and a palmitic acid coupled antibody(p-IgG). For the preparation of stable PE-liposomes, the key factors such as antibody modification method with palmitic acid, molar ratio of p-IgG to lipid and the amount of various additives, were examined. The optimum molar ratio of p-IgG to lipid was found to be 2.5×10^{-4} and the final concentration of deoxycholate for the stable liposome formation was about 0.09%. Two kinds of target-sensitive liposomes, containing polyclonal anti-SRBC(Sheep Red Blood Cell)-antibody and monoclonal anti- β -HCG(Human Chorionic Gonadotropin)-antibody, were successfully prepared. The destabilization of liposomes was examined by measuring the release of calcein entrapped in the liposome vesicles. Calcein was released only when the liposomes were contacted with the specific target cells. The calcein release with non-specific target cells was negligible. From this result, it is clear that p-IgG is indispensable for the maintenance of stable PE-liposome and the calcein release is mainly due to the specific interactions between the liposomes containing antibody and the target cells containing antigen.

서 론

리포솜이란 phosphatidylcholine(PC), phosphatidylethanolamine(PE), serine, sphingomyelins, cardiolipins, plasmalogens, phosphatidic acid, cerebroside 등과 같은 지질성분이 수용액 분산상에서 배향이 잘된 판상의 micelle이나 폐쇄막을 형성하여 물과 평형상태에 있는 분자단을 말한다(1, 2). 리포솜은 세포막의 model system이나 약리적인 전달매

체로 매우 유용한데 약물 전달체로의 리포솜은 천연 또는 합성 인지질로 만들어지므로 신진대사에 참여하여 천연생체막의 분자와 상호교환이 가능하고, 생분해 후 독성이 거의 없고, 항체로 인한 부작용이 거의 관찰되지 않으며, 직접적인 결합없이 화학적으로 민감한 분자를 포집할 수 있기 때문에 약물을 보호할 수 있고, 선택투과성과 지연성이 우수하여 방출 속도 조절 시스템의 제조에 용이하며, 지질의 성분, 크기, 표면 리간드 등을 변화시킴으로써 유기체 내에서의 분포와 성질을 상황에 따라 쉽게 조절할 수 있고, 친수성이나 친유성 양쪽 모두를 전달하는데

† Corresponding Author

선택적으로 사용이 가능하다는 등의 장점이 있다 (3). 그러나 아직까지는 해결해야 할 문제점 또한 많이 남아 있어 실제로 상용화된 예는 매우 적은 편이다. 현재 표적세포나 조직에 대한 약 전달성을 향상시키기 위하여 여러 가지 방법으로 리포솜의 표면을 가공하는 연구가 진행 중이다.

한편 불포화 PE만으로는 상온에서 리포솜이 만들어지지 않으나 여기에 소수성기를 부착한 항체를 삽입시킬 경우 비교적 안정된 리포솜을 만들 수 있다 (4). 따라서 이 항체가 특정한 표적 세포와 결합할 경우 리포솜 표면에 분산되어 있던 항체가 한쪽으로 물리개(capping)되고 이에 따라 리포솜이 와해(destabilization)되면서 리포솜 내부에 포집되어 있던 약물이 방출될 수 있는데 이것을 표적 민감성 리포솜(target-sensitive liposome)이라고 부른다. 본 실험에서는 이러한 표적 민감성 리포솜의 제조 및 그 특성에 관한 연구를 수행하였다. 항체가 지질층에 삽입되기 위해서는 미리 적절하게 가공이 되어야 하는데 이러한 과정에 대한 조건과 지질 및 항체의 몰 비율 등에 대한 최적화, 그리고 안정한 리포솜을 제조하는데 필요한 몇 가지 첨가제들의 특성과 영향에 대해서도 조사하였다. 또한 항체가 삽입된 immunoliposome이 표적 세포와 결합했을 때 이 리포솜이 약물전달 면에서 어느 정도의 특이성을 갖고 있는지를 포집된 calcein의 방출 정도를 이용하여 알아 보았다.

재료 및 방법

인지질 및 시약

리포솜 제조를 위해 사용한 인지질은 L-β-dioleoyl-phosphatidylethanolamine(DOPE)로 Sigma사에서 구입하였으며 chloroform에 용해하여 10mg/ml의 농도로 냉동보관하여 사용하였다. 리포솜 제조 시 사용하는 계면활성제로는 DOC(deoxycholic acid)가, 그리고 안정성을 증가시켜주는 첨가제로 DOPA(dioleoylphosphatidic acid; 10mg/ml)가 사용되었으며 수용성 마커로는 형광성 물질인 calcein (50mM)을 Sigma사에서 구입하여 사용했다. 그 밖의 시약으로 tannic acid, SRBC, HCG, NBD(7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole) 등도 모두 Sigma사 제품을 이용하였다.

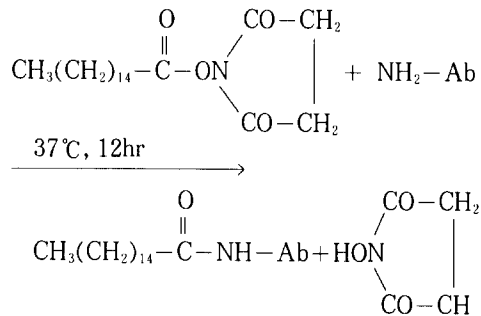
항체

실험에 사용된 항체는 모두 2가지로, 1가지의 다

중클론 항체(polyclonal antibody)와 1가지의 단일 클론 항체(monoclonal antibody)이다. 다중클론항체는 anti-SRBC(sheep red blood cell)-antiserum (IgG fraction)으로 Sigma사에서부터 구입하였고, 단일클론항체인 anti-β-HCG(human chorionic gonadotropin)-antibody(IgG_{2a} type)는 유전공학연구소로부터 하이브리도마 A4W를 분양받아 무혈청 배지에서 배양하여 정제한 후 실험에 사용하였다. 즉 무혈청 배지 1ℓ로 1주간 유가식 배양한 후 DEAE-ion exchange chromatography column과 protein-A column을 연속 통과시켜 항체를 분리·정제하였다. 항체의 농도는 single radial immunodiffusion (SRID) 법으로 측정하였으며, 농도를 1.5mg/ml로 조절한 뒤 냉동보관하여 사용하였다.

Palmitoyl IgG(p-IgG)의 제조

항체를 인지질 막 사이에 끼워 넣기 위해서는 먼저 항체에 소수성기를 만들어 주어야 한다. 따라서 본 실험에서는 N-(palmitoyloxy)-succinimide(NHSP, Sigma)를 이용하여 항체에 palmitic acid를 연결시키는 방법을 이용하였다(5). 반응식은 다음과 같다 (6, 7).



정제한 항체 1mg에 dioxane에 용해한 NHSP 47μg과 2% DOC를 첨가하여 37°C에서 overnight reaction시킨 후 미반응의 NHSP를 제거하기 위해 0.18% DOC가 포함된 PBS로 cold chamber에서 투석한다.

항체가 삽입된 DOPE Liposome(ImmunoLiposome)의 제조

먼저 DOPE(10mg/ml) 1.5ml을 flask에 담아 N₂ gas 하에서 증발시키고(3~5min), 이어 vacuum chamber속에 1~2시간 동안 방치하여 flask 벽에 얇은 막을 형성하도록 건조시킨다. 이렇게 건조된

지질막에 앞서 제조한 p-IgG solution(1.5mg/ml with 0.18% DOC) 0.5ml과 수용성 마커인 calcein 100mM 0.5ml을 넣고 수화시킨다. 엉겨 붙어있는 지질층이 충분히 수화되고 나면 이어 sonication을 한다. Bath type(Branson 2210)의 경우 5분씩 3~4회 반복하고 probe type의 sonicator(ultrasonic homogenizer 4710 series, Cole Parmer Instrument, U. S. A.)를 사용할시에는 1회 1분 정도 행한다. 이렇게 sonication된 용액을 Sephadex G-50 gel-column(2.5×8cm)을 이용하여 chromatography를 행하면 틸새 부피로부터 SUV(small unilamellar vesicles) 리포솜이 만들어져 나오게 된다. Fraction별로 받아내어 형광성과 흡광도를 측정하여 항체가 삽입되었음을 확인한다. DOPA(dioleoylphosphatidic acid)는 negative-charge를 띤 인지질로 DOPE 리포솜의 안정제로 첨가할 수 있다. DOPA를 첨가할 경우 5-20w/w%로 지질에 첨가하여 제조하였다.

HCG-coated-SRBC의 제조

HCG는 수용성 항원(soluble antigen)이기 때문에 그 자체로는 anti-βHCG-Ab와 결합하더라도 리포솜을 와해시킬 능력이 없다. 따라서 항원을 불용성의 표면 항원으로 만들기 위해 HCG를 SRBC와 같은 고체 표면에 결합시켜야 한다. 이를 위해 tannic acid를 이용하였다. 즉 SRBC(1.0×10^7 cells/ml) 3ml에 tannic acid solution(1mg/ml) 0.45ml, 그리고 HCG solution(100μg/ml) 0.1ml을 첨가하여 37℃에서 30분간 preincubation 한다. 이때 2~3분간격으로 mild-mixing해야 하는데 이는 tannic acids끼리의 반응을 방지하기 위해서이다. SRBC는 실험 전에 미리 10분간 prewarming 해둔다. 반응이 끝난 후 원심을 3~4회 하여 free tannic acid나 HCG를 제거한다. SRBC에 HCG가 결합되었는지의 여부는 형광성 물질인 NBD가 결합된 HCG를 이용하여 확인하였다.

형광물질의 방출

Immunoliposome에 포집된 calcein은 0.12%의 DOC가 포함된 PBS에 노출시키면 immunoliposome의 지질층이 깨지면서 밖으로 방출되어 형광성을 띠게 된다. 이 형광성의 차이로 calcein의 포집률을 계산할 수 있다(8). 즉,

$$\text{Quenching}(\%) = \left(1 - \frac{F_0}{F_t}\right) \times 100$$

여기서 F_0 는 DOC를 첨가하기 전의 형광성이고 F_t 는 0.12%의 DOC가 첨가된 후의 형광성이다.

형광성의 측정은 Fluorometer(KONTRON Co., SFM-25)를 이용했으며 Calcein의 excitation 파장은 490nm에서, emission 파장은 520nm에서 측정하였다.

한편, SUV에 항체가 삽입되어 만들어진 immunoliposome은 항원과 반응하면 특유의 항원-항체 반응에 의해 lysis가 일어난다. 이때 immunoliposome 안에 포집된 형광성 물질도 밖으로 방출된다. 이렇게 항원과 반응으로 방출되는 정도를 방출률이라 하며 아래의 식으로 나타낼 수 있다.

$$\text{Releasing ratio}(\%) = \left(\frac{F - F_0}{F_t - F_0}\right) \times 100$$

여기서 F는 주어진 조건(시간, 온도, pH 등)에서 측정된 형광성, F_0 는 초기의 형광성, 그리고 F_t 는 총 형광성이다. 반응시간은 항체의 종류에 관계없이 일반적으로 30분 정도로 하였고 온도는 37℃로 고정하여 실험하였다.

결과 및 고찰

P-IgG가 삽입된 Immunoliposome의 제조

리포솜에 항체가 제대로 삽입되어지는지를 확인하기 위하여 형광성 물질인 NBD(7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole)를 항체에 결합시켜 이를 리포솜에 삽입시켰다. 재료 및 방법에서 기술한대로 지질막에 NBD-P-IgG를 첨가하여 수화한다. 이어서 sonication을 행한 후 Sephadex G-50 gel에 loading하여 리포솜을 fraction별로 받아내었다.

실험결과 Fig. 1에서처럼 fraction tube 7, 8, 9번에서 NBD의 형광성과 인지질 및 단백질의 농도가 모두 이 부분에서 최대치를 나타내었으므로 이 부분에서 받아들인 리포솜이 항체와 결합되었음을 알 수 있었다.

IgG와 NHSP의 몰비율에 의한 Calcein 포집률의 영향

항체를 리포솜에 삽입시키기 위해서는 항체에 결합된 palmitic acid의 양을 적절하게 조절해야 하는데(7) 여기서는 polyclonal IgG와 NHSP와의 몰비율이 리포솜 형성에 어떤 영향을 미치는지를 알아 보았다. 실험은 [NHSP]/[IgG]의 몰비율을 각각 5, 10, 20, 40, 100으로 달리하여 리포솜을 만든 후

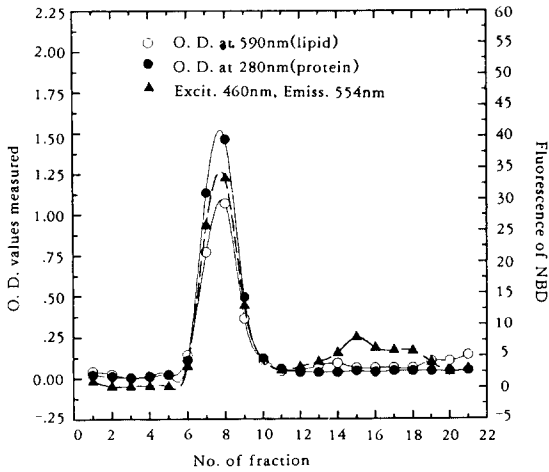


Fig. 1. Sephadex G-50 gel column(2.5×8cm) chromatography of PE liposome containing NBD labelled antibody. Flow rate; 3ml/min 7, 8, 9 fractions were retrieved.

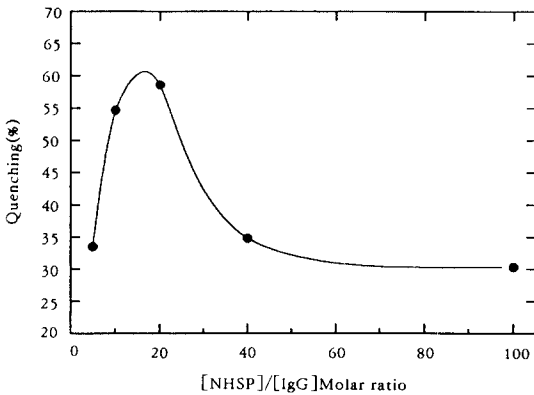


Fig. 2. Fluorescence quenching of calcein containing immunoliposomes prepared with various molar ratios of [NHSP]/[IgG], pH 8.5.

측정은 수용성 마커인 calcein(50mM)의 형광성에 의한 리포솜의 포집률로 나타내었다. 왜냐하면 calcein 포집률이 높을수록 안정된 리포솜이 만들어졌다고 볼 수 있기 때문이다. 실험 결과 Fig. 2에서 처럼 [NHSP]/[IgG]의 몰비율이 10, 20 두 가지에서 quenching%가 거의 비슷하게 최대치를 나타내었다. 이것으로부터 항체에 palmitic acid를 결합시키기 위해 사용하는 NHSP와 항체의 몰비율은 10

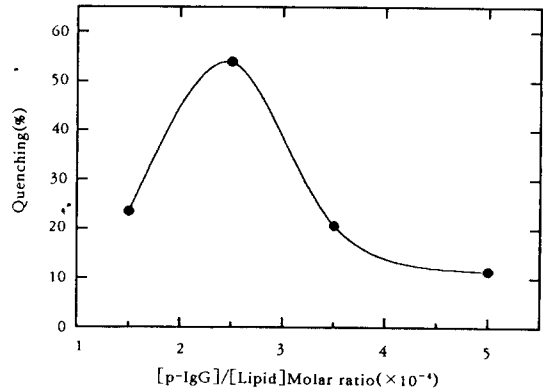


Fig. 3. Fluorescence quenching of calcein containing immunoliposomes prepared with various molar ratios of [p-IgG]/[lipid], pH 8.5.

~20 정도가 가장 적절한 것임을 알 수 있었다. 같은 방법으로 p-IgG를 만든 Ho 등(7)에 따르면 이 조건에서 항체 1분자당 결합된 palmitic acid의 수는 약 2~5개였고 항체의 항원에 대한 결합력은 거의 변하지 않았다. 본 실험에서도 이 조건에서 palmitic acid가 결합된 항체의 항원 결합력은 크게 변화하지 않았는데 여기에 대한 결과는 다른 곳에 발표할 예정이다(10).

p-IgG와 지질의 몰비율에 의한 Calcein 포집률의 영향

항체가 적절히 가공되어 p-IgG가 되면 이어 지질층에 삽입되어야 하는데 이때 지질과 항체의 몰비율이 안정된 리포솜을 형성하는데 중요한 역할을 한다(7). 본 실험에서는 [p-IgG]/[PE]의 몰비율을 1.5, 2.5, 3.5, 5.0($\times 10^{-4}$)의 4가지로 나누어 수행하였다. 항체는 anti-SRBC-IgG를 사용하였고 실험결과 Fig. 3에서처럼 [p-IgG]/[PE]의 몰비율이 2.5×10^{-4} 일 때 가장 포집률이 높게 나타났으며(54%), 나머지 3가지의 몰 비에서는 확실하게 차이가 날 정도로 낮게 나타났다. 삽입된 항체의 양이 많아져도 calcein의 포집률은 낮아지는데 그 이유는 확실하지 않으나 단위 면적당 삽입된 항체의 개수가 리포솜의 크기를 결정하고 따라서 포집된 calcein의 양도 달라질 수 있을 것으로 보인다(7).

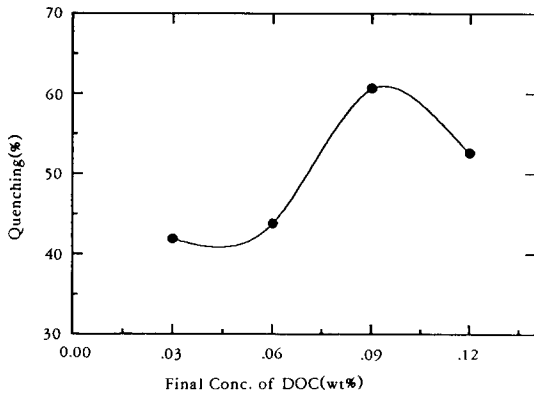


Fig. 4. Fluorescence quenching of calcein containing immunoliposomes prepared with various final concentrations of DOC.

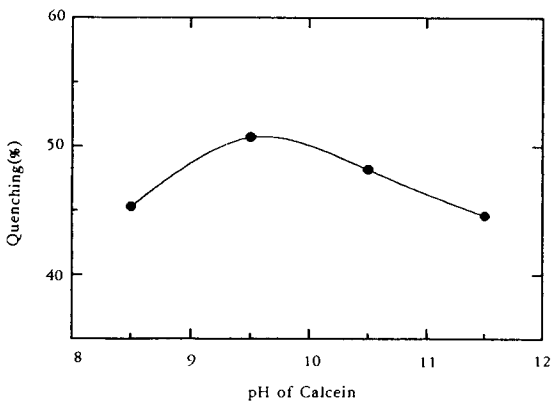


Fig. 5. Effect of final pH of calcein solutions on the fluorescence quenching of immunoliposomes.

Final DOC의 농도에 의한 Calcein 포집률의 영향 리포솜을 만들 때 들어가는 첨가제 중 하나인 DOC(deoxycholic acid)의 농도도 안정된 리포솜을 얻기 위하여 최적화해야 할 변수 중 하나이다. DOC의 역할은 지질분자 사이에 위치해 있다가 palmitic acid가 결합된 항체가 리포솜 속으로 삽입될 수 있도록 한다. 그 뒤 gel chromatography에 의해 삽입되지 않은 항체와 DOC가 빠져나가면서 immunoliposome이 형성되는 것이다. 만약 DOC의 농도가 낮으면 항체가 잘 삽입되지 않고, 반대로 DOC의 농도가 지나치게 높으면 리포솜이 제대로 형성되지 않는다. 본 실험에서는 DOC의 final 농도를 각각

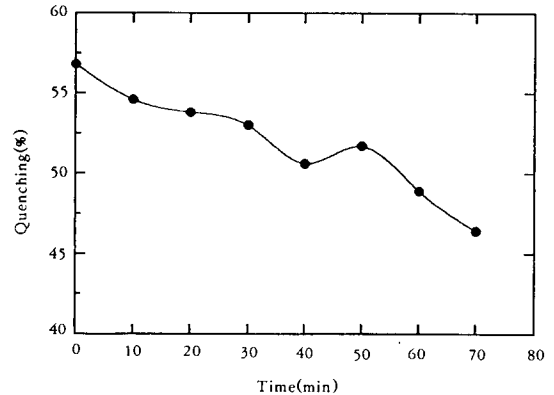


Fig. 6. Time dependent change of fluorescence quenching of immunoliposome.

0.03, 0.06, 0.09, 0.12wt%로 구분하여 수행하였다. 실험 결과 Fig. 4에서처럼 final DOC의 농도가 0.09wt%일 때가 가장 리포솜의 포집률이 높은 것으로 나타났다.

수용성 마커인 Calcein의 pH에 의한 Calcein 포집률의 영향

리포솜의 포집률을 확인하기 위해서 수용성 마커인 형광성 물질이 첨가되는데 본 실험에서는 50mM의 calcein을 사용하였다. Calcein은 1N NaOH에 녹여서 사용하는데 제조된 calcein의 최종 pH에 의해 리포솜의 포집률이 달라진다. 본 실험에서는 calcein의 최종 pH를 각각 8.5, 9.5, 10.5, 11.5의 4가지로 하여 수행하였다. 실험결과 Fig. 5에서처럼 최종 pH는 8.5~10.5에서 리포솜의 포집률이 비교적 높게 나타났다. 한 가지 특이할 점은 calcein의 pH가 12 이상에서는 지질의 응결(aggregation)이 일어나 리포솜이 만들어지지 않음을 확인할 수 있었다. pH 8.5에서 가장 깨끗한 리포솜이 형성되었으므로 이후의 실험은 모두 pH 8.5에서 수행하였다.

시간별 Calcein 포집률의 변화

리포솜의 안정성을 알아 보기 위하여 시간에 따른 calcein 포집률의 변화를 측정하였다. 리포솜을 만든 후 10분 간격으로 70분까지 각각의 F_0 와 F_t 를 측정하였다. 실험결과 Fig. 6에서처럼 quenching%가 57에서 45까지 약 10% 정도 감소하여 DOPE 리포솜이 비교적 불안정하다는 사실을 알 수 있었다. 리포솜의 안정성을 증가시키기 위하여 앞서 기술한대

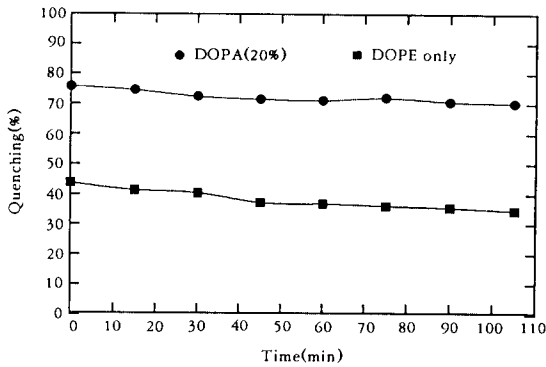


Fig. 7. Effect of DOPA addition on the stability of immunoliposomes.

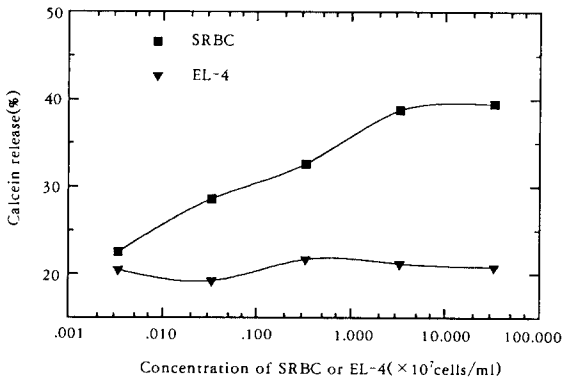


Fig. 8. Cell induced release of calcein. To SRBC or EL-4 cells in suspension was added 20 μ l of anti-SRBC-Ab containing immunoliposome and the amount of released calcein was measured after 30 minutes.

로 인지질에 20%의 DOPA를 첨가해 보았다. 실험 결과 Fig. 7에서처럼 100분 후까지도 초기값인 70~75%의 포집률을 거의 유지하였고 DOPA가 첨가되지 않은 경우(40%)보다 약 35% 이상 포집률이 증가되어 DOPA가 PE 리포솜의 안정성에 기여할 수 있음을 확인하였다.

표적세포에 의한 Calcein 방출

Anti-SRBC-Ab가 삽입되어 만들어진 immunoliposome(quenching% = 50.6)은 표적세포인 SRBC와 결합할 경우 리포솜 표면에 고르게 퍼져 있던 항체가 한쪽으로 몰리게 되고 이로 인해 리포솜이瓦解되면서 calcein 방출을 유발하게 된다. 본 실험에

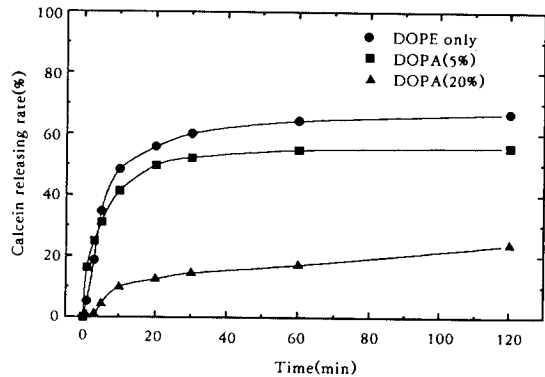


Fig. 9. Effect of DOPA concentration on the calcein release rate of immunoliposomes.

서는 destabilization시 일어나는 calcein의 방출률을 측정하여 항원-항체간의 specific binding에 의한 표적 민감성 리포솜이 만들어졌음을 확인하였다. 실험 결과 Fig. 8에서처럼 anti-SRBC-Ab가 삽입된 immunoliposome을 표적세포인 SRBC와 결합시켰을 때에는 calcein의 방출률이 세포농도에 따라 고른 증가를 보이고 있는 반면 대조구로 사용한 EL-4 cell line의 경우는 세포농도가 증가하더라도 calcein 방출이 일어나지 않아 이것으로부터 calcein의 방출이 SRBC의 표면항원과 항체간의 특이적 결합에 의한 리포솜의 destabilization에 의한 것임을 확인할 수 있었다.

DOPA농도에 의한 Calcein 포집률의 영향

DOPA의 첨가가 calcein 방출에 미치는 영향을 알아 보기 위하여(9) polyclonal 항체와 5% 및 20%의 DOPA를 첨가한 리포솜을 이용하여 방출 실험을 수행하였다. 실험결과 Fig. 9에서처럼 DOPA가 첨가되지 않은 DOPE-liposome의 방출률이 가장 높았으며(65%), 그 다음이 5%의 DOPA가 첨가된 것이었고(55%) 20%의 DOPA가 첨가된 리포솜은 방출률이 가장 낮게 나타났다(23%). 이는 포집률의 결과와는 정 반대의 현상인데 각각의 calcein 포집률은 55%, 75%, 85%의 순이었다. 이것으로부터 DOPA는 리포솜을 안정화시켜 포집률은 증가시켜 주지만 실제 표면항원과 반응에서는 원활한 리포솜의 destabilization을 유도하기가 어렵다는 것을 추정할 수 있었다. 따라서 첨가하는 DOPA의 농도는 필요에 따라 그때그때 결정하여야 할 것으로 보이는데 예를 들어 항암제인 doxorubicin을 포집시킬

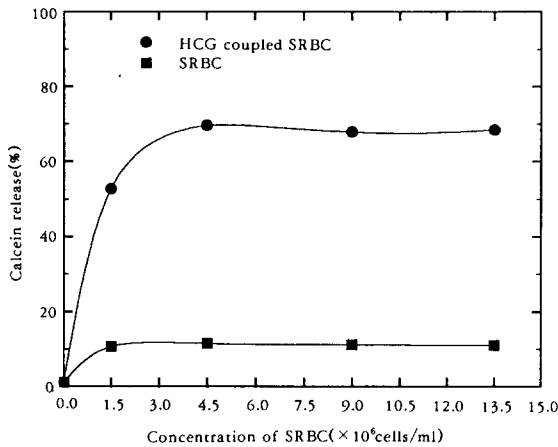


Fig. 10. Cell induced release of calcein. To HCG-coupled SRBC or simple SRBC suspension was added $20\mu\text{l}$ of anti- β -HCG-Ab containing immunoliposomes and the amount of released calcein was measured after 30 minutes.

경우에는 약물의 포집률을 높이기 위하여 약 10%의 DOPA를 첨가하는 것이 적당한 것으로 나타났고, 포집률이 실험수행에 그다지 중요하지 않는 calcein의 경우에는 방출되는 속도를 높이기 위해 5%의 DOPA가 적당하였으므로 이후의 실험에서는 모두 5%의 DOPA를 첨가하여 리포솜을 제조하였다.

Anti- β -HCG-Ab가 삽입된 리포솜에 의한 Calcein 방출

단일클론 항체, anti- β -HCG-Ab가 삽입된 immunoliposome의 destabilization을 위해 soluble antigen인 HCG molecule과 HCG-coated-SRBC를 이용하여 실험하였다. 실험 결과 Fig. 10에서처럼 SRBC와 liposome간의 lysis 반응은 SRBC 표면에 HCG로 coating된 경우에만 일어났으며 HCG가 없는 경우에는 calcein 방출이 되지 않았다. 또 Fig. 11은 리포솜이 표적세포의 표면에 coating된 HCG 농도(구체적인 HCG의 농도는 알 수 없었고 NBD의 형광성을 이용하여 HCG가 SRBC 표면에 결합되었다는 것만 확인할 수 있었다. Fig. 11의 단위 세포당 HCG 농도는 SRBC 표면에 결합시키기 위해 첨가한 HCG의 농도임)에 따라 calcein의 방출량이 변하는 것을 보여주는 것으로 HCG-coated-SRBC

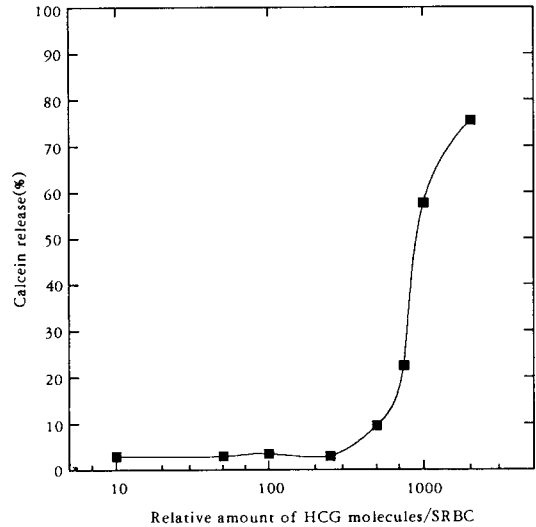


Fig. 11. Effect of antigen(HCG) concentration at the surface of SRBC on the release of calcein. Anti-SRBC-Ab containing immunoliposome was added to the HCG-coupled SRBC suspension and the amount of released calcein was measured after 30 minutes.

와 결합해서 리포솜이 lysis되기 위해서는 SRBC 표면에 HCG의 농도가 일정한 값 이상이 되어야 한다는 것을 실험을 통하여 알 수 있었다. 이상의 결과로부터 본 실험에서 제조된 PE 리포솜은 palmitic acid가 결합된 항체에 의해서만 안정성이 확보될 수 있으며 이 항체가 특정 표면항원과 결합할 때에는 리포솜이瓦解되면서 포집된 약물이 방출되는 표적 민감성 리포솜이 만들어졌음을 확인할 수 있었다. 본 리포솜에 항암제를 포집시켜 특정 암세포에게 약물을 전달하는 실험의 결과는 다른 논문으로 발표할 예정이다(10).

요 약

인지질 그 자체만으로는 안정한 이중층 리포솜을 형성하지 못하는 불포화 PE(DOPE)에 palmitoyl기가 결합된 항체(p-IgG)를 지질층에 삽입시켜 immunoliposome을 제조하고 그 특성에 관하여 살펴 보았다. 우선 안정된 리포솜을 제조하기 위해서 고려해야 할 인자들로 항체 가공방법, 지질과 항체와의

물 비, 그리고 각종 첨가제들에 대한 최적 조건을 조사하였다. 예를 들면 p-IgG와 lipid의 물비를 2.5×10^{-4} 으로 했을 때 안정한 리포솜을 만들 수 있었으며, 첨가제로 들어가는 DOC의 경우 최종 농도가 0.09wt%일 때 calcein의 포집률이 최대가 되었고 calcein의 최종 pH는 8.5~9.5 정도에서 안정한 리포솜이 제조될 수 있었다. 다중 및 단일클론의 항체를 삽입한 리포솜을 표면항원을 가진 표적세포와 결합시켰을 때 리포솜이 와해되면서 포집된 calcein이 방출되는 것으로 보아 삽입된 p-IgG가 PE 리포솜을 형성하는데 필수적임을 알 수 있었다. 또 같은 리포솜을 비특이적인 세포와 접촉시켰을 때에는 아무런 변화를 보이지 않아 calcein 방출이 항원-항체 반응에 의한 것임을 알 수 있었고 이로부터 표적 민감성 PE 리포솜이 만들어졌음을 확인하였다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단의 1991년도 목적기초연구비의 지원으로 수행된 것이며 지원에 대해 감사드립니다.

참고문헌

1. A. D. Bangham(1981), *Liposomes : From Phy-*

- sical Structure to Therapeutic Applications*, (C. G. Knight, eds) p. 1, Elsevier/Northholland.
2. A. D. Bangham(1983), *Liposomes*, ed. by M. J. Ostro, p. 1, Marcel Dekker.
3. E. Mayhew and D. Papahadjopoulos(1983), *Liposomes*, ed. by M. J. Ostro, p. 289, Marcel Dekker.
4. D. Sinha and F. Karush(1970), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **90**, 554.
5. A. Huang, L. Huang and S. J. Kennel(1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 8015.
6. L. Huang, A. Huang and S. J. Kennel(1984), *Liposome Technology*(G. Gregoriadis, eds), **3**, 51, CRC Press.
7. R. J. Y. Ho, B. T. Rouse and L. Huang (1986), *Biochemistry*, **25**, 5500.
8. Y. Hashimoto, H. Endoh and M. Sugawara (1984), *Liposome Technology* (G. Gregoriadis, eds), **3**, 41, CRC Press.
9. P. Pinnaduwege and L. Huang(1993), *Liposome Technology* (G. Gregoriadis, eds), 2nd Ed., **3**, 283, CRC Press.
10. T. B. Choe and J. K. Ku, Selective Delivery of Anticancer Drugs Using Target-sensitive Liposomes.