

# Liposomes의 면역학적 응용

정 홍 석 · 문 홍 모

(재) 목암생명공학연구소

리포솜은 1960년대 초 Bangham등에 의해 혈액응고시 인지질의 영향에 관한 연구중 우연히 발견하게 되었다<sup>1)</sup> 즉 인지질이 물에 분산되어 2 분자막 (Bilayer)을 형성함을 알았고, 이때 생긴 폐쇄소포체를 리포솜이라 하였다. 이러한 리포솜은 원형질 막이나 세포내의 소기관의 막과 유사한 구조를 갖고 있기 때문에 이것을 이용하여 생화학자나 생물리학자들은 생체막의 모델시스템으로 이용하여 생체막의 기능 연구에 널리 이용하여 왔다.<sup>2) 3)</sup>

1970년 초반부터 리포솜을 이용한 약물의 생체내 공급(Drug Delivery System, DDS)에 대하여 많은 연구가 이루어져 왔고, 지금까지도 의약품의 전달매체로 이용하려고 많은 시도를 하고 있는 실정이다. 최근에는 리포솜을 이용하여 항원을 전달하는 면역보조제 (Adjuvant System)로 이용하려는 시도를 하고 있다. 현재까지 리포솜을 이용한 상품들은 화장품과 임상용 진단시약, DNA transfection system (Lipopectin)으로 활용되고 있다.<sup>4)</sup>

본 심포지움에서는 리포솜의 응용분야인 DDS와 면역학적인 응용에 대해서 간략히 고찰하기로 한다.

## 1. 리포솜과 DDS

리포솜은 인산지방질 (인지질)로 구성되어 있으며, 인지질의 기본구조를 살펴보면 글

리세롤 (Glycerol) 골격을 이루고 있음을 알 수 있다. 이는 비극성 분자단 2개와 극성분자단 1개가 글리세롤 골격에 결합하여 극성 분자단과 비극성 분자단의 단면적이 거의 같아 인지질이 물에 분산되어 자발적으로 2 분자막을 형성 할 수 있도록 양친매성 성질을 갖는 분자구조를 이루고 있다.<sup>5)</sup> 인지질의 극성 분자단이 물쪽으로 향하고 비극성 분자단은 자기들끼리 Hydrophobic interaction에 의해 화합하여 2 분자막이 형성되는데 이 때, 소수성 부분이 물과 접촉하지 않기 위하여 구형의 소포체 (Vesicles)가 형성되는데 이를 리포솜이라 한다.

리포솜을 이용한 약물전달 매체의 개발은 1970년 대부터 지금까지 계속되고 있다. 특히 1980년대에 리포솜을 이용하여 특정세포에 표적(Targeting)하는 방법이 개발되고 Extruder, liposomat를 이용한 재현성 있는 리포솜의 대량생산이 가능해 지면서 의약품의 전달매체로 리포솜을 이용하려는 연구를 계속하고 있다.<sup>6) 7)</sup> 이들 liposomes은 다른 drug, carrier system과는 달리 다음과 같은 장점을 가지고 있다.<sup>8)</sup>

- 1) Liposomes은 인지질이라는 생체구성 성분으로 이루어져 있어 체내에서 분해가 가능하고 세포독성이 없다.
- 2) 친수성 부분과 소수성 부분이 동시에 존재하여 수용성 약물과 지용성 약물 모두를 포획할 수 있다.
- 3) Liposomes내로 약물을 포획하여 약물의 불활화를 막을 수 있고, 펩타이드성 약물의 생체이용율을 높일 수 있다.
- 4) 약물의 방출속도를 늦추어 약물의 약효를 장시간 유지할 수 있을 뿐 아니라 특정조직에 표적(Targeting)이 가능하여 약물의 치료효과를 높일 수 있다.
- 5) 리포솜의 체내분포 조절이 용이하여 이를 이용하여 면역원(Immunogen), 면역증강제 (Immunostimulator)등을 대식세포 (Macrophage, MO)에 집중화 시킬 수 있다.
- 6) 약물과 liposomes 사이에 화학적 결합이 필요없다.

7) 리포솜의 크기조절, 표면전하, 지질조성에 따라 다양하게 만들 수 있으며, 제조방법도 간단하다.

그 이외에도 liposomes은 약물을 거의 모든 투여경로 (경구, 피하, 정맥, 근육주사, 또는 경구부여)로 투여할 수 있는 장점을 가지고 있다. 이러한 장점으로 말미암아 외국의 여러 연구자들이 리포솜 제제에 많은 관심을 갖고 있다. 리포솜의 대표적인 경우는 합암제, 항감염제, 안구 건조증, 호흡기 질환, 생체내의 펩타이드 수송을 들 수 있다. 현재 여러개의 의약품이 리포솜 제제로 하여 임상중에 있으며, 진균치료제인 Amphotericin B라는 의약품의 리포솜 제제(AmBisome)가 유럽 17개국과 Canada, Australia등에서 시판하고 있는 실정이다.

## 2. 면역학적인 응용

위에서 언급한 바와 같이 리포솜은 약물학적인 응용 뿐만 아니라 면역학적인 응용에 대해서 최근에 많은 노력을 기울이고 있는 실정이다. 리포솜은 약물대신에 단백질항원이나 펩타이드 항원을 포획하여 체내에 투여할 수 있어 백신의 운반체 (Carrier)또는 면역보조제 (Adjuvant) 기능을 할 수 있다.<sup>9)</sup> 그 이외에도 리포솜은 항원의 안정성에도 크게 기여할 수 있는 장점이 있다.

### 1) 체액성 면역에의 리포솜의 이용

일반적으로 리포솜을 정맥주사하면 혈액내에 다량으로 존재하는 MO에 의해 쉽게 포획된다. 이러한 리포솜에 항원을 포획시키면 리포솜이 MO에 포획되어 항원의 processing이 일어난다. 항원의 processing이란 항원이 epitope peptide로 분해되는 과정을 말한다. 이러한 항원의 processing 과정에 MO가 필수적으로 작용하게 되는데, MO는 여러 항원의 면역학적 processing에 매우 중요할 뿐 아니라 liposomal 항원의 processing에도 매우 중요한 역할을 수행하고 있어 liposomes을 MO에 표적시키면 백신의 운반체

(Carrier) 또는 면역보조제 (Adjuvant) 역할을 하게 된다.<sup>10)</sup> 이러한 liposomes의 면역학적 응용과 장점을 살펴보면 Table I 과 같다.<sup>11)</sup>

<Table I> Strategies and Advantages in the use of Liposomes as Carrier of Vaccine.

- 
1. A nonimmunogenic substance may be converted to immunogenic one.
  2. Hydrophobic antigens may be reconstituted.
  3. Small amounts of antigen may be suitable as immunogens.
  4. Multiple antigens may be incorporated into a single liposomes.
  5. Adjuvants may be incorporated with antigens into the liposomes.
  6. Higher titer of functional antibody activity may be achieved.
  7. Longer duration of functional antibody activity may be achieved.
  8. Toxicity of antigens may be reduced or eliminated by inclusion in liposomes
  9. Soluble synthetic antigens may be presented as membrane-associated antigens in an insoluble liposomal matrix.
- 

이외에도, 리포솜은 리포솜내에 다른 면역증강제 (Lipid A, Muramyl dipeptide, Lipoidal amine (Aviridine))를 포획했을 때, 이들의 독성을 줄이는 효과도 있다. 그리고, 위에서 언급한 바와같이 리포솜은 단백질뿐만 아니라 펩타이드성 항원을 이용할 수 있으므로, 서로 다른 항원을 동시에 리포솜내에 포획할 수 있어 combined vaccine의 개발에 이용할 수 있다는 장점이 있다.

현재 리포솜을 이용한 백신개발에 많이 사용하고 있는 항원으로써는 infectious organism에 기인한 단백질들이 이용되고 있으며, 이 중에서 viral antigens, malarial antigens, bacterial toxin등에 많은 연구가 수행되었다.

## 2) 세포성 면역으로의 응용

체액성 면역은 혈청에 존재하는 항체에 의해서 이루어지는데 이러한 항체는 외부물질과 결합함으로써 그것을 제거하는데 중요한 역할을 한다. 한편, 세포성 면역은 임파계에 속하는 T 세포에 의해서 이루어지는데 이러한 세포는 침입해 온 세포나 조직에 직접 작용하여 파괴시키는 능력을 갖고 있다. 따라서 세포성 면역은 조직이나 세포내 감염, 암세포 등에 그 기능을 발휘한다. 이러한 T 세포중에 Cytotoxic T lymphocyte (CTL)는 감염된 세포를 직접 파괴하는 기능을 갖고 있다.

최근에 이러한 세포성 면역을 선택적으로 유도하는 방법들이 개발되어 이를 이용한 바이러스성 감염의 예방과 치료에 이용하려는 시도를 하고 있다. CTL을 유도할 수 있는 방법들이 많이 알려져 있지만 여기서는 liposomes을 이용한 방법을 소개하고자 한다.<sup>12) 13)</sup>

리포솜을 이용하여 CTL을 유도할 수 있는 이유는 리포솜 내부에 들어있는 항원을 완전한 (Intact) 상태로 세포질내로 전달이 가능하기 때문이다. 일반적으로 liposomal 항원을 정맥주사하면 MO에 의해서 쉽게 포획되어진다. 이러한 MO를 antigen presentation cell (APC)라고 부르는데 리포솜이 APC에 의해 endocytosis 또는 pinocytosis를 통해 내부로 들어가게 된다. APC내로 들어온 리포솜은 endosome과 융합이 일어나고 리포솜 내에 들어있던 펩타이드 항원은 세포질내로 보내지게 된다. 이때 사용된 리포솜은 일반적으로 낮은 pH에서 불안정화되는 pH-sensitive liposomes을 사용하게 된다. pH-insensitive liposomes을 사용하면 엔도솜과 융합이 일어나지 않고, 엔도솜과 라이소솜 (Lysosome)에 있는 단백분해효소에 의해 펩타이드 항원이 분해되어버려 세포질내로 intact한 상태로 도달시킬 수 없다. 따라서 pH-sensitive liposomes을 이용하는 것이 세포질내로 항원을 intact한 상태로 도달시킬 수 있어 항원의 presentation 과정중 class I 경로인 CTL 유도에 많이 이용되고 있다.

pH-Sensitive liposome을 가지고 CTL 유도에 사용할 경우 인지질의 조성뿐 아니라 리포솜의 투여경로가 중요하게 작용한다. Zhou와 Huang<sup>14)</sup>등은 ovalbumin을 이용해 CTL

유도에 필요한 조건 (투여경로, 면역증강제 사용)등을 확립하였다. 일반적인 pH-sensitive liposomes의 경우에는 정맥주사한 경우에만 펩타이드에 의한 CTL이 유도되고, 근육주사, 복강주사등으로는 CTL이 유도되지 않음을 알았고, 이러한 리포솜에 monophosphoryl lipid A등의 면역증강제를 함께 사용하면 거의 모든 투여경로에서 CTL을 유도할 수 있지만 정맥주사한 경우가 가장 좋은 효과를 거두었다.

pH-Sensitive liposomes을 이용한 CTL 유도에 영향을 미치는 그 외의 요소로는 인지질의 상전이온도와 면역스케줄이다. 상전이온도에 대해서는 체액성 면역과 같이 생체온도 근처의 값을 가지는 경우가 좋고, 면역스케줄의 경우 마지막 투여후 4-6주 사이의 동물을 사용하는 것이 좋은 결과를 얻을 수 있다.

현재 이러한 리포솜을 이용하여 HIV gp 160이나 gp 120, influenza virus, ovalbumin, malaria, HBV등에 관한 연구를 많이 수행하고 있으며, 본 연구진들도 리포솜을 이용하여 HIV-V3 peptides에 대한 humoral immunity와 cellular immunity를 유도할 수 있었다. HIV에 대한 humoral immunity는 ELISA와 syncytia forming inhibition으로 확인하였고, HIV-specific cellular immunity는 CTL induction으로 확인하였다. 또한 ovalbumin peptide와 같은 soluble protein에 기인한 peptide에 의해서도 cellular immunity를 유도할 수 있었다. 따라서 본 연구전에 의해 사용된 리포솜은 humoral immunity와 cellular immunity를 동시에 유도할 수 있는 adjuvant임을 확인하였다.

또한 리포솜은 위의 두가지 면역을 유도할 수 있을 뿐아니라 mucosal immunity도 유도할 수 있는 장점을 지니고 있다. 리포솜을 통해 mucosal immunity를 유도할 경우 리포솜 자체만으로는 좋은 결과를 얻지 못하는 결과와 만족스러운 결과가 양분되고 있는 실정이다. 리포솜을 가지고 점막면역을 유도할 경우 digestive tract에서의 불안정성을 해결해야하고 상피세포에서의 흡수를 증가시키는 방법을 강구해야 한다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 리포솜의 표면을 다당체로 코팅하는 방법과 인지질의 기본골격을 변화시키는 방법으로 mucosal immunity를 증가시키려 하고 있다. 또한 리포솜의 조성으로 lipid

A를 함께 사용할 경우 mucosal immunity를 유도할 수 있을 뿐 아니라 lipid A의 독성도 줄일 수 있는 결과를 얻을 수 있어 요즘에는 리포솜의 조성으로 면역증강물질 (Arviridine, muramyl dipeptide, Quil A)등을 함께 사용해 항원의 면역원성을 더욱 증가시키고 있다.

## 참 고 문 헌

1. Bangham, A.D., Standish, M.M., and Watkins, J.C. (1965) *J. Mol. Biol.* 13, 238-252.
2. Kim, J., and Kim, H. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 983, 1-8.
3. Lee, S., and Kim, H. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* 271, 188-199.
4. Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., and Danielsen, M. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 7413-7417.
5. Tanford, C. (1973) *The hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological membrane*, John Wiley & Sons, Inc.
6. Hope, M. J., Bally, M. B., Webb, G., and Cullis, P. R. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 812, 55-65
7. Mayer, L. D., Hope, M. J., and Cullis, P. R. (1986) *ibid* 858, 161-168.
8. Gregoriadis, G. (1984) *Liposome Technology*, CRC press.
9. Alving, C. R. (1991) *J. Immunol. Methods* 140, 1-8.
10. Van Rooijen, N. (1993) *Vaccine* 11, 1170.
11. Ostro, M. J. (1987) *Liposomes; From Biophysics to Therapeutics*. Marcel Dekker Inc.
12. Zhou, F., Rouse, B. T., and Huang, L. (1991) *J. Immunol, Methods* 145, 143-152.
13. Carbone, F. R., and Bevan, M. J. (1990) *J. Exp. Med.* 171, 377-387.
14. Zhou, F., and Huang, L. (1993) *Vaccine* 11, 1139-1144.