

Ganglioside G_{M1}을 함유한 불포화 PE Immunoliposome의 제조와 특성

김창수 · 이은옥 · 김종득[†]

한국과학기술원 화학공학과
(1991년 8월 20일 접수)

Preparation and Characteristics of Unsaturated PE Immunoliposome Incorporated with Ganglioside G_{M1}

Chang-Soo Kim, Eun-Ok Lee, Jong-Duk Kim[†]

Department of Chemical Engineering and Bioprocess ERC, KAIST
373-1 Kusong-Dong, Yusong-Gu, Taejon 305-701, Korea
(Received August 20, 1991)

The storage stabilities of immunoliposomes incorporated with variable amounts of ganglioside G_{M1}, were investigated as a function of time, temperature, and composition by observing absorbance of visible light and calcein release. In the column chromatographe, the layer of unsaturated PE(dioleoylphosphatidylethanolamine : DOPE), unable to form stable liposomes at physiological temperature and pH, were formed when palmitoyl-immunoglobulin G(IgG) (2.5×10^{-4} mol/DOPE mol) added. The incorporation of ganglioside G_{M1} into immunoliposome, enhanced the stabilities of bilayers during the extended period of storage. The turbidities of immunoliposomes coated with ganglioside G_{M1} exhibited the maximum near 20 mol% G_{M1}/DOPE mol, probably because of the disturbance of the bilayer characteristics, i.e., layer transition or reorientation of interaction sites. At low temperature, the higher stability was achieved than at elevated temperatures. After one week of storage, the redispersed liposomal solutions at lower temperatures maintained the original elution patterns in chromatography but broader distribution at elevated temperatures. During the storage, it is suggested, the aggregation is the more dominant phenomena for liposomes kept at 5°C than the fusion, while the fusion is at elevated temperatures.

Keywords—PE immunoliposome, ganglioside-incorporated

인지질(phospholipid)이 수용액에 분산되면 스펙터상의 다층막을 형성하고, 그 내부에 수용성 공간을 갖는 밀폐형 겹분자의 지질판상 구조를 갖는 리포솜을 형성한다.^{1,2)} 이러한 리포솜은 세포막의 모형과 약물 전달매체로 사용할 경우 여러가지 장점이 있어 많이 연구되고 있다. 그러나 열역학적, 생물학적인 안정성이 낮고 전달 선택성이 적은 단점을 갖고 있어

이를 보완하기 위해 리포솜의 표면을 가공 수식하여 막의 성질을 바꾸어주는 연구가 계속되고 있다. 표면가공에 의해 리포솜의 안정도를 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라 약물의 적중화와 리포솜의 보호장치(masking)로서의 역할도 수행할 수 있다.³⁻⁶⁾

인지질로만 형성된 리포솜은 열역학적으로 안정하지 못하나 cholesterol이나 fatty alcohol 등의 제3

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

의 성분이 첨가될 경우 안정도가 크게 증가되거나 열역학적으로 안정성을 갖는 마이크로에멀전으로 전환되는 것으로 알려져 있다.⁷⁾ 이러한 리포솜의 생체내에서의 안정성과는 직접 비교할 수 없으나, 저장시의 열역학적 안정성 등을 고려한 pH, 염, 유기성분, 생체막과의 상호작용에 관한 연구가 진행되고 있다.⁸⁾

혈관에 주사된 리포솜은 보통 간상세포(reticuloendothelial system, RES)의 정화기능에 의하여 간이나 지라에서 분해하게 되어 목표지향성을 갖는 리포솜의 기능을 제한한다. 즉, 혈관으로 주사된 리포솜은 간상세포 혹은 인체내에서의 제반방어 시스템에 의해 목표부위에 도달하기 전에 혈관으로부터 제거된다. 이러한 정화시스템으로부터 리포솜이 인지되는 것을 막아주는 것이 리포솜 보호장치다.³⁾ 이러한 물질로는 적혈구에 존재하는 sialic acid 등이 보고되어 있다.³⁾

적중화를 시키기 위하여 항체를 사용하는 것이 널리 알려져 있다.^{5,6)} 항체를 리포솜에 결합시키면, 리포솜의 표면에 항체가 노출되어 치료학적 장점이 있고, 특정세포에 대한 적중화가 가능하게 된다.⁹⁾

Dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE)는 탄화수소 사슬부분에 이중결합을 가지고 있어서 원뿔모양(cone shape)을 이루기 때문에 생체조건에서 안정한 이중층을 형성하지 못한다. 이와 같은 불포화 PE를 안정화시키는 방법에는 여러가지 혼합지질을 사용하거나, ganglioside, 지방산이나 올레인산유도체, cholesteryl hemisuccinate,⁹⁾ palmitoyl homocysteine,¹⁰⁾ 단백질 등을 이용하는 방법이 있다.¹¹⁾ Dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC)에 ganglioside G_{M1}을 첨가시킬 경우 최대 0.25-0.3 mol/DPPC mol까지 DPPC 이중층 내에 삽입될 수 있고, 이때의 상전이 온도는 32.6-47.2°C 근처로 알려져 있다.¹²⁾ 그러나 이 DOPE에 immunoglobulin G(IgG)를 가하여 만든 리포솜에, 보호기구의 역할을 수행하는 것으로 알려진 sialic acid를 포함한 ganglioside (G_{M1})가 첨가된 경우의 안정성과 상전이 온도에 대해서는 연구된 바 없다. 이러한 immunoglobulin G(IgG)와 G_{M1}은 특정세포에 대한 선택성 뿐만 Fig. 1에서 예시한 바와 같이 안정한 이중층을 만드는 데 필요한 보조분자로서의 역할을 하게 된다.

본론에서는 IgG와 G_{M1}을 함유하는 리포솜을 표

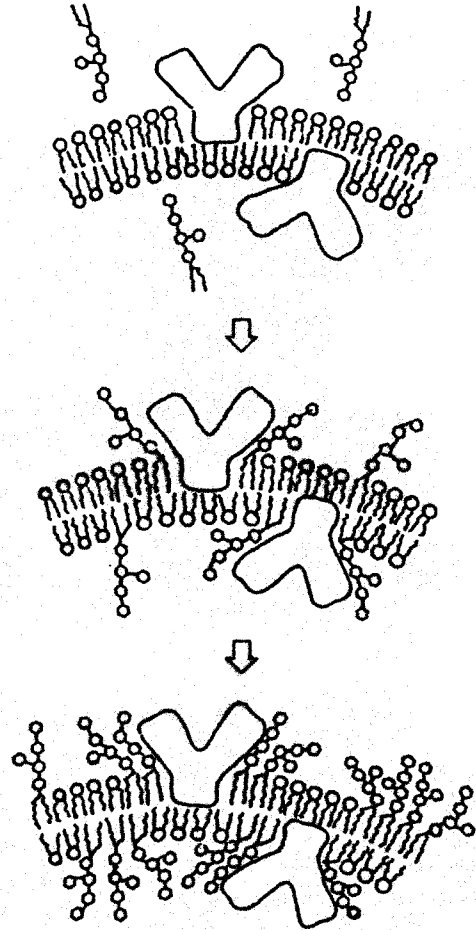


Figure 1—Schematic diagram of reconstituted membrane with protein and glycolipid.

적전달시스템으로서 사용하기 위한 저장, 온도, 조성 등에 따른 영향을 조사하였다. DOPE가 안정한 이중층을 형성할 수 있는 mole비로 IgG를 넣어 제조할 경우 시간에 따른 안정성을 조사하고 여러 농도의 ganglioside G_{M1}이 첨가되었을 경우 리포솜의 형성 과정에 미치는 영향과 제조된 리포솜의 시간에 대한 안정성을 조사하기 위하여 흡광도 측정과 형광성 측정실험을 수행하였다.

실험 방법

시약

사용한 인지질은 1,2-Dioleoyl-L-phosphatidylethanolamine(DOPE) (99%)를 Sigma Co.에서 구

입하여 정제하지 않고 사용하였다. DOPE 리포솜의 이중층을 안정화시킬뿐 아니라 항원-항체반응으로 인하여 자발적으로 내부에 포집된 물질을 방출시키기 위하여 단백질인 Immunoglobulin G(IgG)를 사용하였다. 이는 염소에서 추출한 immunoglobulin으로 분자량은 약 160,000 정도이며 Sigma Co.에서 구입했다. 담즙산염인 deoxycholic acid(DOC) Na염, 형광물질인 calcein도 Sigma Co.에서 구입하여 사용하였다. Palmitic acid, N-hydroxysuccinimide, dicyclohexylcarbodiimide, 1,4-dioxane은 순도 99% 제품을 Aldrich Co.에서 구입하여 정제하지 않고 사용하였다. 사용한 버퍼(buffer)는 PBS(phosphate buffered saline)로 NaCl 160 mM, KCl 3.2 mM, KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2HPO_4 0.12 mM를 넣어 만들고, 1 N NaOH로 pH 8.0을 맞추어 사용하였다. 겔 여과에서 사용한 겔은 Sephadex G-75(Pharmacia fine chemical)와 Bio-Gel A-0.5m(Bio Rad)이다. Ganglioside G_{M1} (95%)은 Sigma Co.에서 구입하여 정제하지 않고 사용하였다. 투석막(dialysis membrane)은 Spectra/pore(MWCO 12,000-14,000)를 Spectrum Co.에서 구입하여 사용하였다. Palmitoyl-IgG는 본 실험실에서 합성하여 사용하였다.^{13,14)}

기기 및 장치

palmitoyl-IgG(p-IgG)를 반응혼합물과 분리하기 위해 Sephadex G-75 column을 사용하였고, p-IgG를 농축하는 데는 Amion Co.의 centricon 30 microconcentrator를 사용하였다. 리포솜을 생성시키기 위해 Sonics & Material Inc.의 Model VC250 basic의 초음파 장치 및 probe를 설치하였으며, 흡광도는 Turner Co.(model 350) Spectrophotometer를 사용하였고 형광성 측정에는 Jasco Spectrophotometer(model FP-770)를 사용하였다. 이때 calcein이 포집된 리포솜과 외상의 calcein을 분리하기 위해 Bio-Gel A-0.5m column을 사용하였다.

Palmitoyl-IgG의 제조

IgG를 직접 DOPE에 첨가할 경우 소수성이 약하기 때문에 DOPE 이중층 속으로의 삽입효율이 떨어진다. 따라서 IgG의 소수성을 증가시키기 위하여 palmitic acid를 IgG에 붙여서 사용하였다. Palmitic acid의 N-hydroxysuccinimide ester(NHSP)는 Lapidot *et al.*의 방법으로 제조하였다.¹³⁾ N-hydroxysuccinimide(30 mmol)를 녹인 dry ethyl ace-

tate(130 ml)에 palmitic산(30 mmol)을 첨가한다. 여기에 dry ethyl acetate(10 mmol)에 녹인 dicyclohexylcarbodiimide(30 mmol)을 서서히 첨가하여 반응시키고 혼합물을 상온에서 12-15시간 둔다. 생성된 NHSP는 분리하여 재결정시켜서 무수 dioxane에 저장한다. NHSP의 생성여부는 TLC, GC, FT-IR 등을 사용하여 확인하였으며 98.7%의 순도를 얻었다.

IgG 2 mg을 NHSP 44 μg 과 2 wt% dioxycholate(DOC)를 포함한 PBS(phosphate buffered saline; pH 8.0)에 넣어 12시간 동안 37°C에서 반응시킨다. 반응생성물로 palmitoyl-IgG(p-IgG)와 N-hydroxysuccinimide가 생성된다.¹⁵⁾ p-IgG를 분리하기 위해 Sephadex G-75 column(1.5×45 cm)에서 DOC 0.15 wt%를 포함한 PBS(pH 8.0)를 사용하여 크로마토그래피시킨 후 농축시키고 Spectra/pore 2 membrane을 이용하여 54시간 동안 PBS(pH 8.0)를 세번 갈아주면서 투석시키고, 최종물질은 4°C에서 보관한다.¹⁴⁾

Ganglioside G_{M1} 이 함유된 Immunoliposome 제조

Probe type 초음파 시스템을 사용하여 LUV를 만드는데, 먼저 DOPE를 질소분위기에서 감압시키며 용매를 증발시켜 flask 내에 얇은 막으로 건조시킨 후 0.09 wt% DOC를 포함한 PBS(pH 8.0)로 수화시킨다. 지질 1 mol에 대해 2.5×10^{-4} mol의 p-IgG와 물비로 0, 10, 20, 30% G_{M1} 을 넣고 초음파 분쇄시킨다. 이때, 지질과 p-IgG의 물비는 안정한 리포솜을 형성하는 비율이다. 지질의 농도는 0.5 wt%가 되도록 고정하였다. 리포솜 분해실험을 하기 위해서는 수화시키는 과정에서 형광성 표시자로 calcein을 50 mM이 되도록 첨가하는데 calcein은 1 N NaOH에 녹여서 사용한다. 상온에서 이 혼합물을 초음파 분쇄시켜 리포솜을 형성시킨 후 포집되지 않은 calcein과 DOC를 제거하기 위해 Bio-Gel A-0.5m column(1×45 cm)에서 DOC가 함유되지 않은 PBS(pH 8.0)로 크로마토그래피시켜 분리한다.

리포솜의 흡광도 측정

Bio-Gel A column을 통하여 나온 리포솜 용액의 최종농도를 0.03 wt%로 맞추고 이것을 3 ml씩 spectrophotometer용 시험관에 넣어 5, 23, 37°C에 각각 보관하면서 시간에 따라 420 nm 파장의 흡광도를 측정하였다.⁷⁾ 밀폐된 시험관에는 질소를 넣어주어

리포솜의 산화를 방지하였다.

Calcein Release 측정

리포솜에 calcein을 고농도로 포집시킨 후 외부에 존재하는 calcein을 겔 여과로 제거시킴으로써 리포솜으로부터 방출되는 calcein의 정도를 측정할 수 있다. 리포솜 내부에 포집된 calcein은 형광성을 띄지 않고 외상으로 방출될 때 형광성을 나타낸다. 방출되는 형광성 %는 다음 식으로부터 구한다.

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

F는 주어진 조건에서 측정된 형광세기, F_0 는 초기의

형광세기, F_i 는 10 mM DOC 용액을 넣어 리포솜을 완전히 분해한 후의 총 형광세기이다. Calcein은 50 mM이 되도록 평량하여 1 N NaOH 용액에 녹인 후 PBS(phosphate buffered saline)를 첨가하여 최종 pH를 8.0으로 한다. 초음파 분쇄시킨 후 포집되지 않은 calcein은 Bio-Gel A column을 통과시켜 제거한다. 이렇게 얻어진 리포솜 용액을 상온에서 3시간 동안 방치한 후 3 ml씩 5, 23, 37°C에 각각 보관한다. 이것을 500배로 희석하여 시간에 따라 형광세기를 측정하였다.

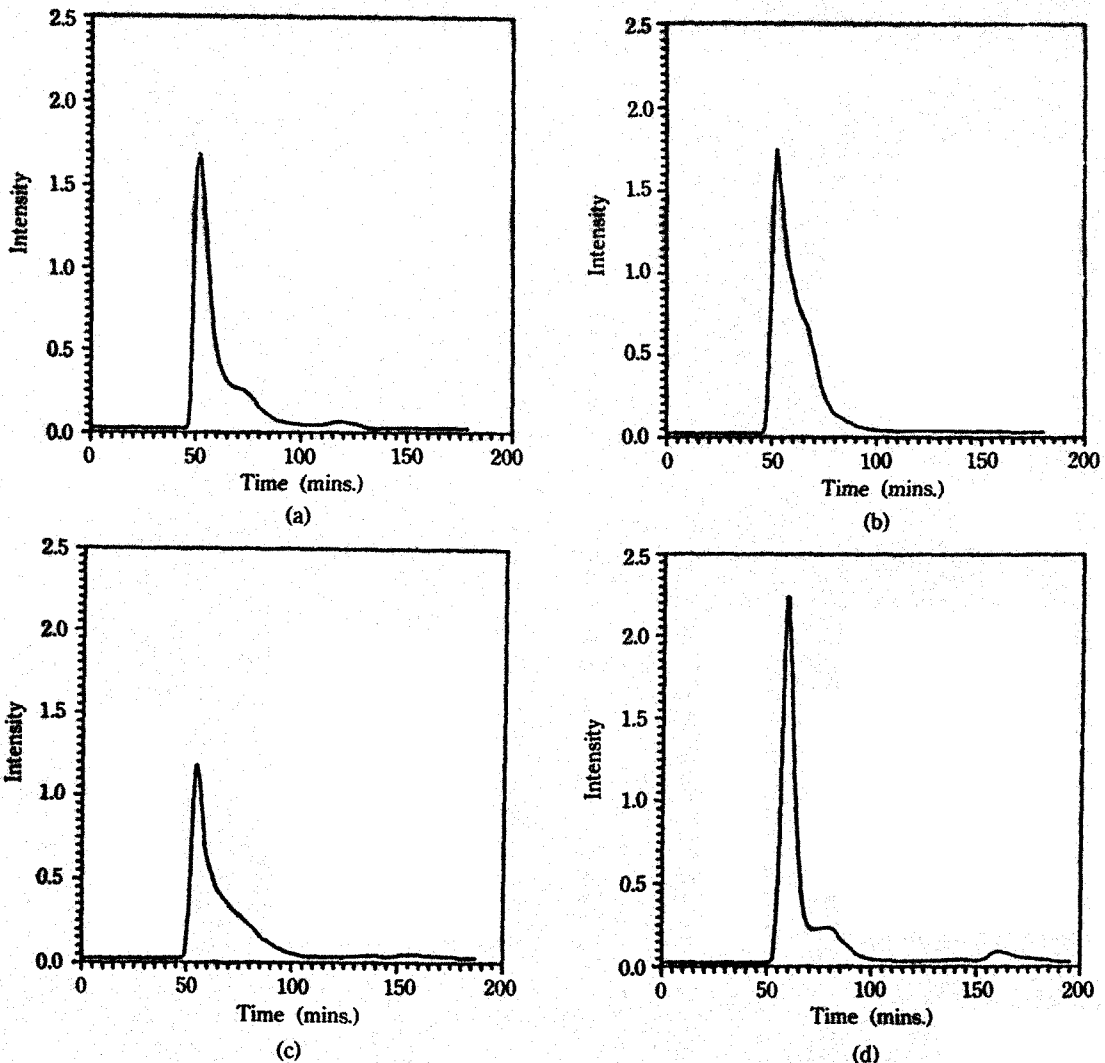


Figure 2—Elution profile of the immunoliposome solution on Bio-Gel A (2.5×10^{-4} p-IgG mole/DOPE mole, 25°C, 2.8 ml/10 min) containing 0 mol% (a), 10 mol% (b), 20 mol% (c), 30 mol% (d) ganglioside G_{M1} .

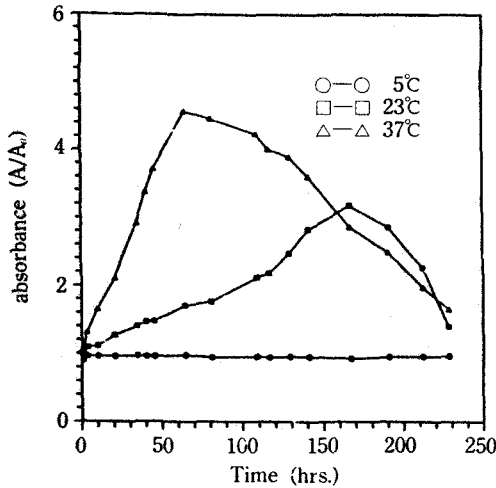


Figure 3a—Absorbance changes of immunoliposomes as time at 5, 3, 37°C. Amount of G_{M1} added to immunoliposome is 10 mol%.

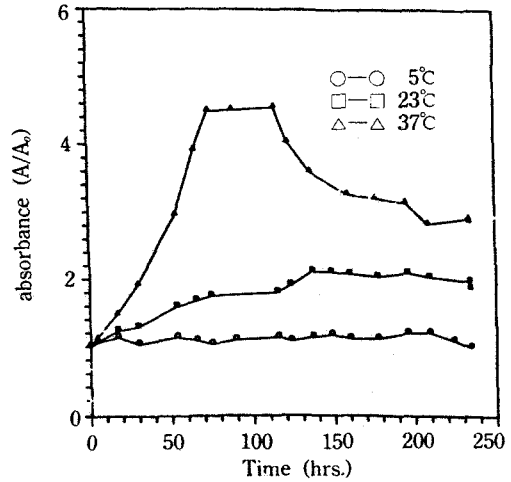


Figure 3b—Absorbance changes of immunoliposomes as time at 5, 23, 37°C. Amount of G_{M1} added to immunoliposome is 30 mol%.

결과 및 검토

리포솜의 제조

DOPE와 같이 분자구조상 안정한 이중층을 형성하지 못하는 불포화 PE로 리포솜을 제조하는 방법에는 여러 혼합지질을 사용하거나, ganglioside, 지방산이나 oleic acid 유도체, cholesteryl hemisuccinate, palmitoyl homocystein, 단백질 등을 첨가하여 안정한 이중층의 리포솜을 얻는 방법이 있다.^{11,16)} 본 연구에서는 DOPE에 p-IgG와 ganglioside G_{M1}을 첨가하여 Bio-Gel A column을 이용한 계면활성제 제거법으로 제조하였다. Fig. 2는 이때 만들어진 리포솜이 Bio-Gel A column을 통과되어 나오면서 UV monitor에 기록된 결과를 토대로 비교한 것이다.

30% G_{M1}이 첨가된 경우 유출농도곡선의 세기가 강하고 분산이 적어 비교적 크고 균일한 크기의 리포솜이 형성된다는 것을 의미한다. 0, 10, 20% G_{M1}의 경우 곡선이 넓고 비정규형 분산(tailing)으로 끝부분이 매우 넓게 나타나는데, 이것은 지질 이중층에 삽입되지 못한 p-IgG 혹은 리포솜 표면에 흡착되어 유동적인 p-IgG의 영향 때문이다. 이와 같은 현상은 30% G_{M1}이 첨가되면서 없어졌다.

10, 20, 30% G_{M1}의 경우 120-175분 근처에서 두 개의 작은 peak가 크기가 서로 변하면서 나타나는 것을 볼 수 있다. 이 중 앞의 peak는 계면활성제

제거법에 의해 제거되는 계면활성제인 DOC이고 뒤의 peak는 0% G_{M1}의 경우 나타나지 않고, 순수한 ganglioside G_{M1}을 초음파 분쇄시켜 Bio-Gel A column에 흘려본 결과 ganglioside G_{M1}에 기원이 된 불순물로 생각된다. 또, 30% G_{M1}의 경우에 나타나는 작은 peak는 지질 이중층에 삽입되지 못한 p-IgG가 sphingolipid의 일종인 ganglioside와의 강한 상호작용에 의해서 분리되는 것으로 추정된다. 즉, 리포솜을 제조할 때 G_{M1}이 첨가되면 첨가되지 않은 경우보다 균일한 크기의 리포솜을 형성하는데 이것은 G_{M1}의 amide 그룹이 단백질인 IgG과의 상호작용을 하기 때문이다.¹⁷⁾ 따라서, p-IgG를 DOPE 이중층에 삽입할 때 단백질과 수소결합에 의한 상호작용을 가지고 있는 sphingolipid의 일종인 ganglioside G_{M1}이 들어가면서 p-IgG를 DOPE 이중층에 쉽게 삽입시키고 리포솜 표면에 흡착되어 있거나 이중층에 삽입되지 못한 p-IgG를 제거하기도 하는 것으로 생각된다.

리포솜의 안정도

Fig. 3, 4는 시간에 따라 리포솜의 안정도를 알아보기 위하여 흡광도 측정실험을 한 결과이다. 흡광도는 입사광의 세기에 대한 투과광의 상대적 세기로 리포솜의 크기, 수, 그리고 형태의 함수이다.⁷⁾ 흡광도의 증가는 리포솜들이 서로 뭉쳐져 크기가 증가하면서 형태가 변하는 과정이고, 흡광도의 감소는

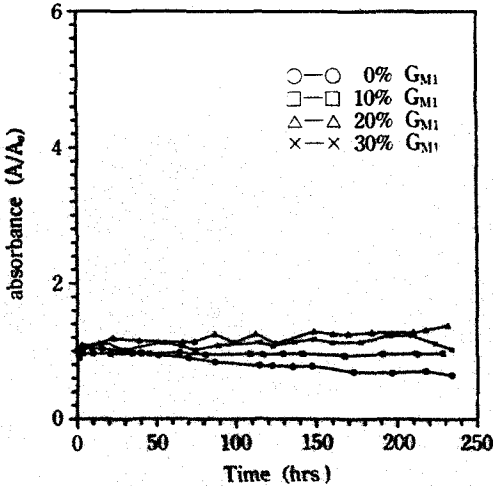


Figure 4a—Absorbance changes of immunoliposomes as time containing 0, 10, 20, 30 mol% G_{M1} . The immunoliposomes incubated at 5°C.

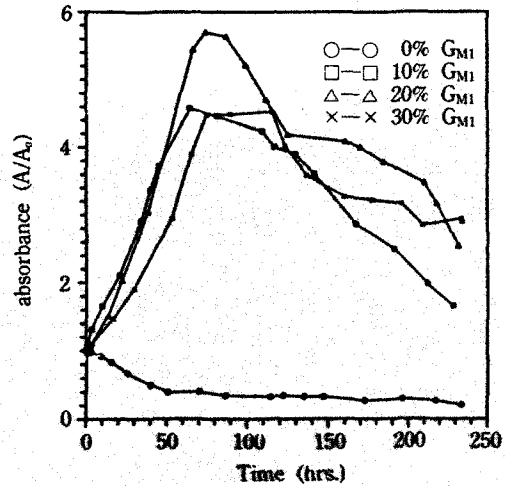


Figure 4b—Absorbance changes of immunoliposomes as time containing 0, 10, 20, 30 mol% G_{M1} . The immunoliposomes incubated at 37°C.

리포솜이 파괴되어 보다 작은 크기의 혼합 마이셀을 형성하는 과정을 포함하는 복합된 현상이다.

DOPE 1 mol에 p-IgG를 2.5×10^{-4} mol, G_{M1} 을 0, 10, 20, 30 mol%로 조정된 리포솜의 최종농도는 0.03 wt%로 맞추고 5, 23, 37°C에 보관하면서 시간에 따라 흡광도를 측정하였다.

p-IgG만을 넣어 만든 리포솜의 경우 흡광도는 일반적으로 감소하였다.¹⁸⁾ 5°C의 경우 시간에 대해 비교적 서서히 흡광도가 감소하나 23, 37°C의 경우는 100시간 이전에 흡광도가 크게 감소하였다. 즉, p-IgG만 들어간 리포솜의 경우는 짧은 시간에서는 비교적 안정한 상태라고 알려졌으나,^{15,19)} 시간이 지남에 따라 실온근처에서는 서서히 리포솜이 파괴됨을 알 수 있었다.

그림 3a는 p-IgG와 10% G_{M1} 이 함유된 리포솜을 3가지의 저장온도에서 시간에 따라 흡광도를 측정한 결과이다. 5°C에서는 오랜시간 동안 리포솜의 구조적 변화(리포솜의 크기, 형태) 없이 매우 안정한 상태를 유지하고 있는 것을 알 수 있었다. 이것은 이 온도가 이중층의 상전이 온도보다 아주 낮은 상태이므로 리포솜이 큰 형태 변화없이 만들어진 상태를 그대로 유지하고 있는 것이다. 즉, 지질의 탄화수소 사슬부분이나 머리부분이 매우 견고하여 리포솜간의 엉김 현상(aggregation, fusion)이 일어나지 않는 것이다. 23, 37°C의 경우는 초기에 크게 흡광도가 증가한다.

즉, 리포솜이 서로 뭉치지면서 크기가 증가하다가, 23°C의 경우 160-170시간 근처에서, 37°C의 경우 60-70시간 근처에서 흡광도가 감소하였다. 이것은 높은 온도에서 지질이나 단백질 유동적이므로 리포솜간의 상호작용이 크고, 또한 ganglioside와 단백질 사이의 혹은 ganglioside 사이의 상호작용에 의해서 초기에 급격히 리포솜의 크기가 증가하는 것이다. 이러한 현상은 G_{M1} 의 농도에 상관없이 유사한 결과를 얻을 수 있었다.¹⁸⁾

이때 일정시간 후 흡광도가 감소하는 것은 아주 큰 크기의 리포솜이나 지질이 침전되어 흡광도가 감소하는 경우와 23, 37°C에서 G_{M1} 의 농도에 상관없이 일정시간 후 흡광도가 감소하는 것으로 보아 오랜시간 보관된 p-IgG의 분해로 인하여 리포솜이 파괴되어서 흡광도가 감소하는 두 가지의 경우로 생각할 수 있다. 그러나 시간이 지남에 따라 침전물이 생기는 것으로 보아 큰 리포솜이 침전되어 상분리 현상이 일어나는 것으로 생각된다.

Fig. 3b는 30% G_{M1} 이 들어간 리포솜의 흡광도 실험결과이다. 5, 37°C에서는 다른 경우와 같은 흡광도 패턴을 보였다. 23°C의 경우는 최대 흡광도에서 일정시간 동안 변화없이 일정한 값을 유지하였다. 이것은 DOPE 보다 상전이 온도가 높은 많은 량의 ganglioside G_{M1} 이 리포솜에 삽입되면서 이중층 자체의 상전이 온도를 23°C 이상으로 증가시켜 리포

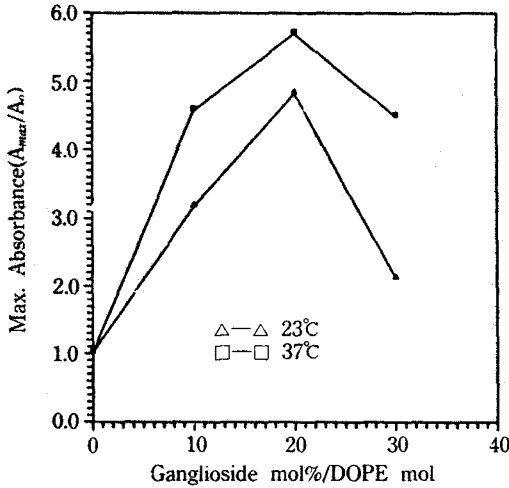


Figure 5—The aggregation of immunoliposomes at maximum point containing various G_{M1} mol%. Immunoliposomes incubated at 23, 37°C.

숨끼리의 영김이 감소한 것으로 생각된다.

Fig. 4a, b는 같은 온도에 대해 흡광도를 비교한 것이다. Fig. 4a에서 볼 수 있듯이 5°C의 경우 0, 10, 20, 30% G_{M1} 모두 비교적 안정한 상태를 보여, 지질의 탄화수소 사슬부분이 매우 견고한 상태를 알 수 있다. Fig. 4b에서, 37°C의 경우는 지질의 탄화수소 사슬부분이 매우 유동적이어서 리포솜간의 영김현상이 아주 빨리 일어나게 되어 리포솜의 크기 및 형태가 시간에 따라 크게 변화함을 알 수 있다. G_{M1}이 없는 경우 용액이 더욱 맑아지는데 이는 DOPE 리포솜의 용해가 증가하기 때문이며, G_{M1}이 증가하면 리포솜상으로의 전환이 일어나 상분리가 촉진되며 지질의 침적은 농도에 무관하게 약 7-80시간 후에 일어나고 있다.

Fig. 5는 23, 37°C에서 G_{M1}의 최대 흡광도를 그린 것이다. 23°C의 경우 20% G_{M1}까지 최대 흡광도가 증가하다 30% G_{M1}에서 크게 감소하였으나, 37°C의 경우는 20% G_{M1}까지는 23°C와 마찬가지로 크게 증가하였으나, 30% G_{M1}에서 감소하는 폭이 23°C보다 크게 줄어들었다. 따라서 앞의 상전이 온도에 대한 설명을 잘 뒷받침한다. 또한, 30 mol% G_{M1}에서 20 mol% G_{M1} 보다 최대 흡광도가 감소하는 것은 30 mol% G_{M1}의 경우 과량의 ganglioside로 인하여 리포솜의 마이셀화가 촉진되고 리포솜의 표면전하가 음의 전하를 띄므로 리포솜 간에 상호 반발력이

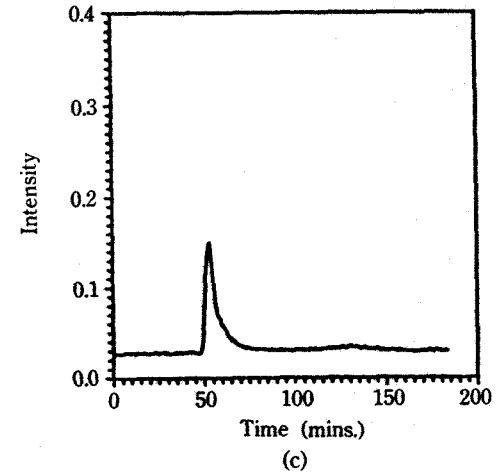
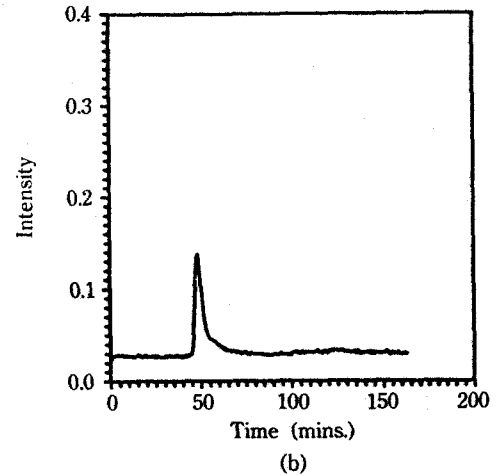
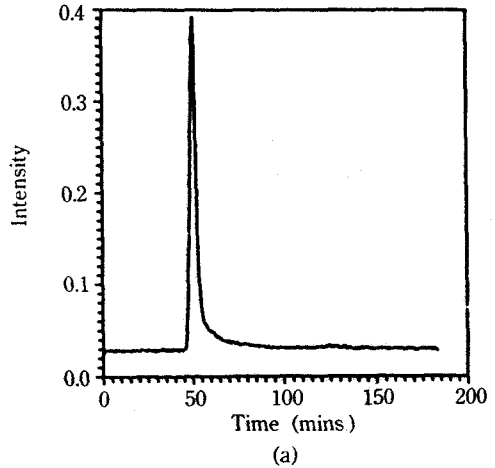


Figure 6—Elution profile of the immunoliposome solution on Bio-Gel A (2.5×10⁻⁴ p-IgG mole/DOPE mole, 25°C, 3.0 ml/10 min) containing 10 mol% ganglioside G_{M1}. The immunoliposome solution were eluted after incubating at 5°C (a), 23°C (b), 37°C (c) during 200 hr.

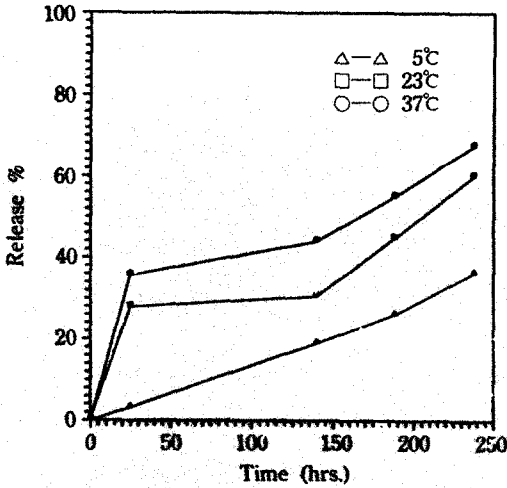


Figure 7—Calcein release of immunoliposome as time, incubated 5, 23, 37°C. Amount of G_{M1} added to immunoliposome is 0 mol%.

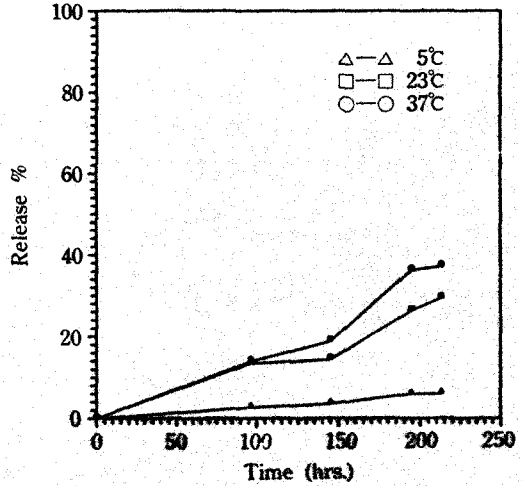


Figure 8—Calcein release of immunoliposome as time, incubated 5, 23, 37°C. Amount of G_{M1} added to immunoliposome is 30 mol%.

생기기 때문에 일어나는 현상으로 생각된다. 이와 유사한 현상이 PC 리포솜에서도 관찰되었다.¹²⁾

Fig. 6은 Bio-Gel A column을 통하여 나온 10 mol% G_{M1} 을 포함한 리포솜 용액을 5, 23, 37°C에서 200시간 동안 보관한 후 다시 Bio-Gel A column을 통과시키면서 UV monitor에 기록된 결과이다. Fig. 6 (a)에서 리포솜이 형성되는 큰 peak가 나타나는 것으로 보아 앞에서 예상한대로 리포솜간의 융합에 의한 크기 변화가 없었다고 생각된다. G_{M1} 이 20, 30 mol% 함유된 경우도 유사한 거동을 보였다.¹⁹⁾ 그러나 G_{M1} 이 포함되지 않은 경우에는 모든 온도에서 작은 피크만이 관찰되므로 리포솜이 모두 파괴되어 칼륨을 통과하지 못하거나 마이셀 상태로 존재하는 것으로 생각된다.

형광성 물질 방출

흡광도는 리포솜의 조막상태에 대한 정보를 제공하지 못하므로 DOPE를 p-IgG와 calcein(50 mM)을 포함한 PBS로 팽윤시키고, 여기에 0, 10, 30% G_{M1} 을 넣고 초음파 분쇄한 후, Bio-Gel A column을 통과시켜 시료를 채취하였다. 이를 5, 23, 37°C에 보관하면서 시간에 따라 형광성 물질 방출실험을 하였다.

G_{M1} 농도를 변화시키면서 온도별 형광성 방출 결과를 시간에 따라 살펴보면 Fig. 7에서 보여주듯이 0% G_{M1} 의 경우 23, 37°C에서 초기에 급격히 형광성 물질이 방출되고 계속 크게 증가함을 알 수 있다.

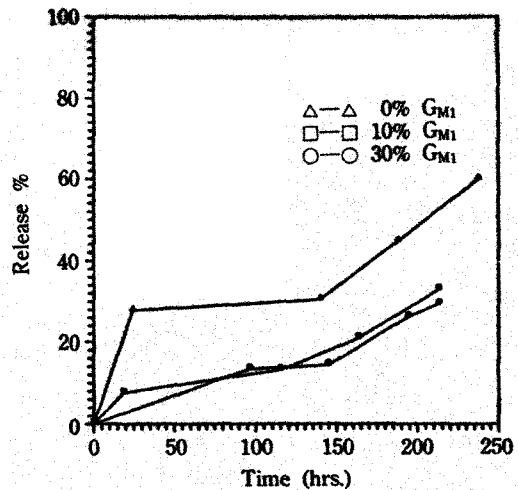


Figure 9—Calcein release of immunoliposome as time containing 0, 10, 30 mol% G_{M1} . The immunoliposome incubated at 23°C.

이는 리포솜의 막이 깨어져 리포솜 내부의 calcein을 방출하는 것으로 지질상이 분리되거나 입자가 작아지는 것을 나타내는데, 이것은 앞의 흡광도 측정실험 결과와 비교해 보면 지질의 분리 때문이라는 것을 알 수 있다. DOPE에 p-IgG만 첨가되어 형성된 리포솜의 경우 시간이 지나면서 매우 불안정한 상태를 보여 리포솜이 빠르게 파괴됨을 알 수 있다. 그러나 Fig. 8에서 볼 수 있듯이 30% G_{M1} 이 들어간 경우

약 200시간 후에도 형광성 물질 방출이 30-40% 정도이다. 특히 5°C에서 보관한 경우는 200시간 후에도 5% 정도 방출하여 매우 안정한 상태를 알 수 있다. 또한, Fig. 8에서 형광성 방출 %가 갑작스런 증가 부분이 없는 것으로 보아 Fig. 4b에서 일정시간 후 흡광도가 감소하는 것은 아주 큰 크기의 리포솜이 침전되어 일어나는 현상으로 생각된다.

Fig. 9는 형광성 물질 방출실험 결과를 온도별로 그린 것이다. 온도가 증가함에 따라 형광성 방출량이 증가하는 것을 볼 수 있는데, 이것은 높은 온도에서는 지질의 탄화수소 사슬부분이 낮은 온도에서 보다 훨씬 유동적이어서 이중층의 상변화가 쉽게 일어나기 때문이다. 5°C 정도의 낮은 온도에서는 지질의 탄화수소 사슬부분이 매우 견고한 상태이기 때문에 비교적 오랜시간 동안 리포솜이 안정한 상태를 유지하는 것으로 생각된다.

결 론

약물전달 매개체로 DOPE, IgG 그리고 G_{M1} 으로 만들어진 리포솜에 대하여 시간과 온도와 조성에 대한 안정성을 흡광도, 형광성 등을 측정하여 알아 보았다. 안정한 이중층을 형성하지 못하는 불포화 DOPE에 적중화 및 안정화 물질로 IgG를 사용하였을 경우 짧은 시간 동안은 안정한 리포솜 상태를 유지하였으나, 시간이 지나면서 서서히 리포솜이 파괴됨을 알았다.

리포솜 보호장치로서 ganglioside G_{M1} 이 immunoliposome에 첨가되었을 경우 리포솜 제조시 비교적 균일한 크기의 리포솜이 제조되었다. 또한, 시간이 지남에 따라 ganglioside G_{M1} 이 첨가되어 ganglioside G_{M1} 과 p-IgG 사이의 강한 상호작용에 의하여 리포솜의 응집현상이 크게 나타났다. 따라서, 리포솜의 크기가 급속히 증가하다가 일정한 시간 후 침전되어 상분리 현상이 일어났다. 그러나, 30 mol% ganglioside G_{M1} 이 첨가되었을 경우 마이셀화가 촉진되거나 리포솜의 표면전하(pH 8.0에서 G_{M1} 은 음의 전하를 띤다.)에 의한 상호반발력의 증가, 또는 단백질(IgG)과 상호작용하는 리포솜 표면 sites의 변화 때문에 응집현상이 20 mol% ganglioside G_{M1} 이 첨가된 경우보다 줄어들었다.

온도에 의한 영향은 5°C의 경우 모든 ganglioside

G_{M1} mol%에서 모두 리포솜의 형태 변화없이 안정한 상태를 유지하다가, 23, 37°C로 증가하면서 리포솜의 융합 혹은 응집현상에 의한 형태변화가 크게 나타났다. 그러나, 30 mol% ganglioside G_{M1} 이 첨가된 경우 ganglioside G_{M1} 에 의하여 이중층의 상전이 온도가 증가되어 형태변화가 크게 줄었다.

문 헌

- 1) A.D. Bangham, M.M. Standish and J.C. Watkins, Diffusion of Univalent Ions Across the Lamellae of Swollen Phospholipids, *J. Mol. Biol.* **13**, 238-252, 1965.
- 2) A.D. Bangham, M.M. Standish and G. Weissmann, The Action of Steroid and Streptolysin S on the Permeability of Phospholipid Structures to Cations, *J. Mol. Biol.* **13**, 253-259, 1965.
- 3) W.B. Geho and J.R. Lau, Masking of Liposomes from RES Recognition, U.S. Patent 450 1728, 1985.
- 4) H. Ellens, J. Bentz and F.C. Szoka, Fusion of Phosphatidylethanolamine Containing Liposomes and Mechanism of the La-H_{II} Phase Transition, *Biochemistry*, **25**, 4141-4147, 1986.
- 5) T.D. Heath, J.A. Montgomery, J.R. Piper and D. Papahadjopoulos, Antibody-Targeted Liposomes: Increase in Specific Toxicity of Methotrexateaspartate, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 1377, 1983.
- 6) L.D. Leserman, P. Machy and J. Barbet, Cell-specific Drug Transfer from Liposomes Bearing Monoclonal Antibodies, *Nature* **293**, 226, 1981.
- 7) J.-G., Kim and J.-D. Kim, Turbidity and Stability of Sonicated Lecithin Liposomes, *Hwahak-konghak* **26**(2), 171, 1988.
- 8) E. Mayhew and D. Papahadjopoulos, Therapeutic Applications of Liposomes in *Liposomes*, ed. by M.J. Ostro, pp.304-306, Marcel Dekker, 1983.
- 9) H. Ellen, J. Bentz, and F.C. Szoka, pH-Induced Destabilization of Phosphatidyl-ethanolamine-Containing Liposomes: Role of Bilayer Contact, *Biochemistry*, **23**, 1532-1538, 1984.

- 10) J. Connor, M.B. Yatvin, and L. Huang, pH-Sensitive Liposomes: Acid-Induced Liposome Fusion, *Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 1715-1718, 1984.
- 11) L. Huang, A. Huang and S.J. Kennel Coupling of Antibodies with Liposomes in *Liposomes Technology* Vol.III, ed. by G. Gregoriadis, pp. 51-61, CRC Press, 1984.
- 12) A.K. Choung, The Structures and Stabilities of Liposome Incorporated with Ganglioside G_{M1} , Master Thesis, KAIST, 1990.
- 13) Y. Lapidot, S. Rappoport and T. Wolman, Use of Ester of N-Hydroxysuccinimide in the Synthesis of N-Acylamino Acids, *J. Lipid Res.* **8**, 142-145, 1967.
- 14) A. Huang, L. Huang and S.T. Kennel, Monoclonal Antibody Covalently Coupled with Fatty Acid, *J. Biol. Chem.* **255**, 8015-8018, 1980.
- 15) A. Huang, Y.S. Tsao, S.J. Kennel and L. Huang, Characterization of Antibody Covalently Coupled to Liposomes, *Biochim. Biophys. Acta* **716**, 140-150, 1982.
- 16) Theodore F. Taraschi, Arnold T.M. van der Steen, Ben de Kruijff, C. Tellier, and Arie J. Verkleij, Lectin-Receptor Interactions in Liposomes: Evidence that Binding of Wheat Germ Agglutinin to Glycoprotein-phosphatidyl ethanolamine Vesicles Induces Nonbilayer Structures, *Biochemistry*, **21**, 5756-5764, 1982.
- 17) J. Sunamoto, K. Nagai, M. Goto and B. Lindman, Deuterium Nuclear Magnetic Resonance Studies on the Interaction of Glycophorin with 1,2-dimyristoylamide-1,2-deoxyphosphatidylcholine, *Biochim. Biophys. Acta* **1024**, 220-226, 1990.
- 18) C.S. Kim, Preparation and Characteristic of Unsaturated PE Immunoliposome Incorporated with Ganglioside G_{M1} , M.S. Thesis, KAIST, 1991.
- 19) 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**, 135-144, 1990.