

표면수식된 프로리포솜에 의한 표적부위 지향성 약물수송체의 개발 I 갈락토스 당쇄로 표면수식된 리포솜의 간세포 렉틴 결합성

심창구[†] · 이창용 · 김종국

서울대학교 약학대학
(1992년 6월 5일 접수)

Development of Target-Specific Drug Delivery Systems Using Glycosylated Proliposome I-Binding of Asialofetuin-Labeled Liposomes to Lectin RCA

Chang-Koo Shim[†], Chang-Yong Lee and Chong-Kook Kim
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
(Received June 5, 1992)

Although glycosylated liposomes have attracted much attention as targeting delivery systems (DDS) of drugs to specific organs which have glycoside receptors, physical instability of liposomes greatly limits their practical application. In this case, proliposomes might be a potential answer to solve this problem. Utilizing the proliposomes as targeting DDS has been a goal of our series of works; we have tried to develop DDS which form liposomes upon adding water and can deliver drugs to specific target organs/cells such as hepatocytes. In this paper, preparation of glycosylated liposomes and binding of the liposomes with lectin (agglutinin RCA 120) was studied. Asialofetuin (AF) was selected as a model compound which has galactose terminal and is favorable for binding with galactose receptor on the surface of hepatocytes. AF was obtained by splitting the terminal N-acetylneuraminic acid (NANA) of fetuin. Small unilamellar AF-liposomes were prepared by mixing aqueous solution of AF-palmitate with thin film of phosphatidyl choline and cholesterol (30:10 w/w) formed on the innersurface of the round bottomed flask. They were successively extruded through polycarbonate membranes (0.45 mm). Palmitoyl-AF not incorporated into the liposomal bilayer was separated from liposomes by a Sepharose 4B column equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffered saline. Lectin (agglutinin RCA 120) was added to the suspension of AF-liposomes and incubated at 37°C for 2 hr. After centrifugation, the unbound lectin in the supernatant was assayed for protein. The binding of the lectin to AF-liposomes (AF content 2.8 nmole) at 37°C was linear at least upto 35 mg of lectin indicating high affinity association of the lectin to AF molecules of the liposomes.

Keywords—proliposome, asialofetuin (AF), AF-liposome, galactose, targeting, lectin binding.

리포솜을 약물의 수송담체로 이용하고자 하는 시도는 오래 전부터 많은 사람들에 의해 연구되어 왔다.¹⁾ 예컨대 리포솜의 표면을 항체²⁻⁵⁾나 당지질 또는 당단백⁶⁻⁸⁾으로 수식함으로써 체내의 특정부위에 약물을 집중적으로 수송하고자 하는 연구들이 있다.

본 연구에서는 간실질세포로 약물을 집중시킬 수

있는 약물수송체로 리포솜의 전구체인 프로리포솜을 개발하는 것을 목표로 하였다. 간장의 모세혈관에 있는 내피세포는 불연속성⁹⁾이기 때문에 입자성 약물을 간실질세포로 집중시키는 데에 편리하다. 또 간실질세포 표면에는 갈락토스간기를 갖고 있는 당을 인식할 수 있는 asialoglycoprotein(AGP) 수용체가 있다.¹⁰⁻¹³⁾ 이 수용체의 생체내에서의 역할은

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

혈중에 존재하는 갈락토스 잔기를 갖고 있는 당단백을 인식하여 간내로 uptake 시켜 제거하는 것으로 알려져 있다.¹¹ AGP 중에서 가장 연구가 많이 되어 있는 것은 asialofetuin(AF)이다. AF는 당사슬 끝에 세계짜리 갈락토스 안테나를 수개 갖고 있는 당단백이다.¹²⁾

Hara 등¹⁴⁻¹⁶⁾은 이러한 리포솜의 특성과 AF의 특성 두 가지를 동시에 이용하여 약물의 간 타겟팅을 시도하였다. 그 결과, 리포솜 표면을 AF로 수식하면 간실질세포 표면에 있는 AF 수용체와 리포솜 표면에 있는 AF간의 고친화성 상호작용에 의해 AF가 수식된 리포솜이 간실질세포내로 선택적으로 잘 들어간다는 사실을 보고한 바 있다. 이와 같은 사실은 당단백으로 수식한 리포솜을 타겟팅용 약물수송체(DDS)로 활용할 수 있으리라는 기대를 낳게 하는 매우 고무적인 연구결과라고 생각된다.

그러나 리포솜은 수용액 상태이기 때문에 보관중에 응집, 침강, 융합, 인지질의 가수분해, 산화, 봉입약물의 분해가 일어나기 쉬운 뿐더러, 멸균처리가 불가능하고, 대규모 생산이 곤란하며, 품질의 재현성이 낮다는 결정적인 결점¹⁷⁾ 때문에, 실제로 리포솜을 이용한 타겟팅 DDS의 개발은 불가능하다고 생각된다. 이러한 리포솜의 물리화학적 불안정성과 멸균문제 등을 해결하고자 Payne 등^{18,19)}은 1986년 건조상태의 리포솜 제제를 고안하여 프로리포솜이라고 명명하였다. 프로리포솜은 건조상태의 분말로서 사용시에 물을 가하고 가볍게 진탕해 주면 리포솜으로 바뀌는 리포솜의 전구체로서, 소르비톨같은 다공성 분말에 인지질과 약물을 침투시키고 건조함으로써 만들 수 있다. 프로리포솜은 분말상태이기 때문에 용액과는 달리 보존 중에 안정하고, 멸균 및 대량생산이 용이하다는 장점을 가지고 있다.

본 연구실에서는 이와 같은 프로리포솜의 장점에 착안하여 이것을 새로운 DDS로 활용하는 연구들²⁰⁻²²⁾을 계속하여 왔다. 이와 같은 경험을 바탕으로 표면수식된 리포솜의 타겟팅 특성은 그대로 살리고, 리포솜의 물리적 불안정성은 프로리포솜화함으로써 개선하고자 하는 것이 본 연구의 총괄적인 목표이다. 이러한 타겟팅용 프로리포솜에 관한 연구는 세계적으로도 유례가 보고된 바 없는 분야로서, 리포솜의 실용화에 크게 기여할 수 있으리라 기대된다. 따라서 본 연구에서는 이러한 목표를 달성하기

위한 기초적인 연구로 우선 AF로 표면 수식된 리포솜을 조제하고, 이 리포솜과 간세포 표면의 갈락토스 인식 렉틴과의 결합성 여부를 조사하고자 하였으며, 그 결과를 제 1보로 이하 보고하고자 한다.

실험 방법

Fetuin의 Sialic Acid 제거법에 따른 Asialofetuin (AF)의 제조 및 확인

Spiro의 방법²³⁾에 따라 fetuin의 말단 N-acetylneuraminic acid(NANA)를 잘라내는 방법을 써서 AF를 제조하였다. 즉, fetuin (type III) 200 mg을 0.1 N 황산 100 ml에 녹인 후 수용상에서 80°C로 60분간 가열하였다. 이 액을 실온에 방치하여 식힌 후 황산과 NANA를 제거하기 위하여 cellulose membrane tube(Spectra/por 2, Mol. Cut off 12,000-14,000)에 넣고 2일에 걸쳐 1리터의 증류수를 3번 갈아주면서 투석하였다. 투석 중간 중간에 pH paper를 써서 투석액의 pH를 읽음으로써 황산이 완전히 제거되었음을 확인하였다. 이때 튜브안에 남아 있는 액을 동결건조함으로써 sialic acid의 일종인 NANA가 제거되어 AF가 되어 있으리라고 기대되는 흰색 해면상의 물질 약 70 mg을 얻었다.

AF의 순도 측정 : AF 중에 남아 있는 Sialic Acid (NANA)의 정량

Fetuin으로부터 AF가 얼마나 고순도로 만들어졌는지를 확인하기 위하여 AF 중에 남아 있는 NANA를 Warren의 방법²⁴⁾에 따라 다음과 같이 정량하였다. 위에서 제조한 AF 일정량(여기서는 5 mg)을 시험관에 넣고 증류수 0.2 ml에 녹인 다음 0.2 M sodium periodate액(용매 : 9 M 인산용액) 0.1 ml를 가하여 흔들었다. 20분간 방치 후 10%(w/v) sodium arsenite 용액 1 ml(용매 : 0.5 M 황산나트륨 + 0.1 M 황산)를 가하여 황갈색이 없어질 때까지 흔들어 주었다. 이 때 여기에 0.6%(w/v) thiobarbituric acid액(용매 : 0.1 M 황산나트륨) 3 ml를 가하여 15분 동안 가열하여 적색으로 변색한 액을 5분간 찬물로 식혔다. 거의 무색인 반투명한 이 액 2 ml를 다른 시험관에 옮긴 후 cyclohexanone 2 ml를 가하여 5분간 진탕한 다음 원심분리하여 얻어진 윗쪽 유기용매층(담홍색)의 흡광도를 549 nm에서 측정하였다. 이 흡광도로부터 다음 식에 따라 NANA의

양을 구하였다.

$$\text{NANA의 함량 \% (w/w)} = \frac{(\text{시험액의 최종부피, ml}) (\text{흡광도}) / 57}{\text{AF의 양} (\mu\text{mole})} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{NANA 제거 정도} (\%) = \frac{\{\text{Fetuin 중의 NANA 함량} (8.7\%) - \text{시료중의 NANA 함량} (\%)\}}{8.7\%} \times 100 \quad (2)$$

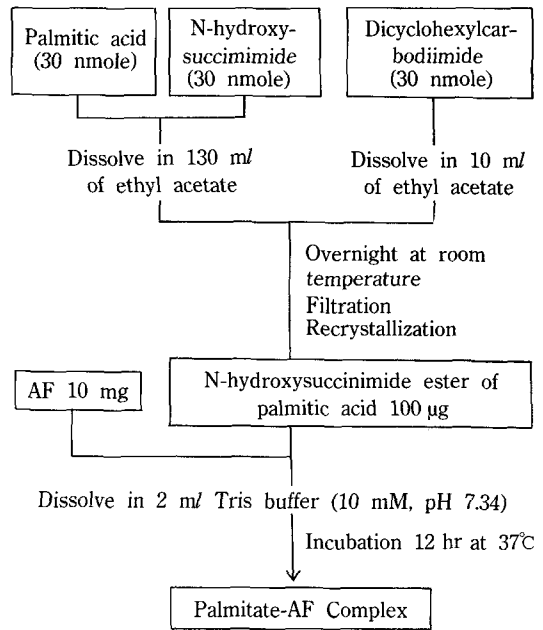
(1)식에서 57이란 숫자는 NANA의 mmole 분자흡광계수²⁴⁾이고, (2)식에서 8.7은 fetuin 중에 함유되어 있는 NANA 함량(%)의 문헌치²³⁾이다. 그 결과, 당쇄의 sialic acid 말단 중 약 90%가 제거된 AF를 얻을 수 있었다. 이 AF 중의 갈락토스 잔기의 농도는 이론상 약 8%(w/w) [8.7×0.9]이었다.

AF로 표면 수식된 리포솜(AF-liposome)의 제조

AF는 지불용성이기 때문에 그대로는 인지질로 된 리포솜 막 중에 끼어들어 표면수식에 간여할 수 없다. 따라서 인지질에 녹아들어 갈 수 있도록 AF에 지용성 뿌리를 붙여주어야 한다. 이를 위해 우선 palmitic acid의 N-hydroxysuccinimide 에스테를 만든 후 이 에스테를 AF를 반응시켜 AF-palmitate 복합체를 만들고, 이 복합체와 인지질을 써서 리포솜을 만들고 정제하였다. 각 과정의 내용은 다음과 같다.

팔미틴산의 N-Hydroxysuccinimide Ester의 제조²⁵⁾ - 팔미틴산(grade II, 95%, Sigma) 7.68g(30 mmol)과 N-hydroxysuccinimide(Sigma) 3.45g(30 mmol)를 초산에칠 130 ml에 녹였다. 이를 3 M dicyclohexylcarbodiimide 용액(용매: 초산에칠) 10 ml와 섞은 후 실온에서 하룻밤 방치하였다. 반응액을 감압여과하여 반응 부산물인 dicyclohexyl urea를 제거하고 여과액을 감압하여 은색 결정을 얻었다. 이 결정을 에탄올로 재결정하여 순수한 화합물을 얻고 IR 스펙트럼상에 새로운 피크(1750 cm⁻¹와 1200 cm⁻¹)가 나타나는 것으로 확인하였다(Scheme I).

AF-Palmitate 복합체의 합성²⁶⁾ - AF 10 mg과 위에서 얻은 에스테를 100 mg을 10 mM Tris buffer(pH 7.34, 염화나트륨 0.9%, sodium deoxycholate 2% 함유) 2 ml에 용해시킨 다음 37°C에서 12시간 동안 인큐베이션하여 AF-palmitate 복합체가 들어 있는 무색투명한 액체를 얻었다(Scheme I).



Scheme I—Preparation of palmitate-AF complex.

AF-리포솜의 제조—Phosphatidyl choline 30 mg과 cholesterol 10 mg을 클로로포름 약 10 ml에 용해시킨 후 환저플라스크 내에서 감압건조하여 인지질의 얇은 막을 얻었다. 여기에 위에서 제조한 AF-palmitate 복합체 액을 가하고 vortexing 하여 거의 투명한 액을 얻었다. 이 액을 10 mM Tris buffer로 투석하여 AF-리포솜 이외의 물질을 제거하였다. 이렇게 얻은 리포솜을 얼음욕 중에서 probe형 초음파 발생장치로 약 30분간 간헐적으로 분쇄한 후 공경 0.45 µm의 멤브레인 필터를 통과시켜 small unilamellar vesicles(SUV)를 얻었다.

유리 AF의 제거²⁷⁾ - 제조한 AF-liposome 중에 혼입되어 있는 미결합 AF의 양을 알아보기 위하여 45,000 rpm으로 2시간 원심분리하여 리포솜을 가라앉히고 상청에 존재하는 AF를 단백질량 키트(Bio-Rad)를 써서 정량한 결과 첨가한 AF 총량 중 20% 정도가 리포솜에 결합되어 있고 나머지는 유리상태로 공존함을 알게 되었다. 따라서 다음 방법으로 유리 AF를 제거하였다. 5 ml 주사기에 10 mM Tris buffer로 수화시켜 놓은 Sepharose 4B를 충전시킨 후 지면과 수직이 되도록 스탠드에 걸어 놓고 하룻밤 방치한 다음 2000 rpm으로 3분간 원심분리하여 겔 중에 들어 있는 액을 제거하였다. 이 겔에

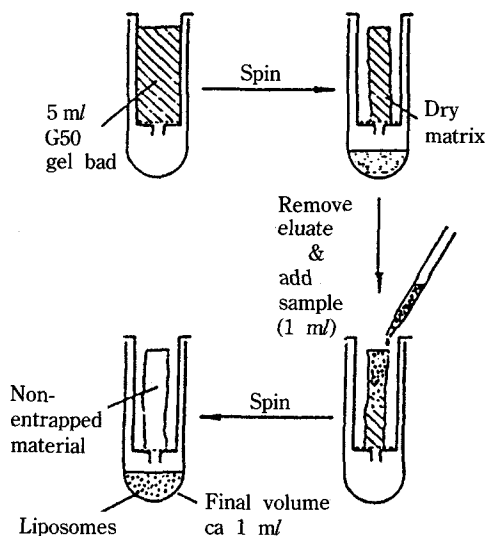


Figure 1—Removal of untrapped material by minicolumn centrifugation.

(Reproduced from literature 27)

위에서 제조한 AF-liposome액 1 ml를 적가하고 다시 2000 rpm으로 3분간 원심분리하여 미결합 AF와 AF-liposome을 분리하였다(Fig. 1).

AF-liposome의 평가

입도분포시험—AF-liposome의 입도분포는 일본 전자과학사제의 레이저 입자분석기(Photal Otsuka Electronics, LPA-3100)와 photon correlator(LPA-3000)를 사용하여 측정하였다.

Transmission Electron Microscope(TEM) 관찰—제조한 AF-liposome 1방울을 그리드 위에 떨어뜨린 후 정착액 1방울을 떨어뜨린 뒤 TEM으로 관찰하였다. 정착액으로는 폴리브덴산암모늄과 초산암모늄완충액을 사용하였다. 구리재질의 그리드에 얇은 수지막을 도포시킨 후 도전률을 높이기 위하여 탄소코팅을 시켰다.

렉틴 결합 시험—Surolia 등²⁸⁾의 실험방법에 준하였다. 10 mM Tris buffer(pH 7.34)에 현탁되어 있는 AF-liposome액에 agglutinin RCA 120(Sigma)을 가한 후 37°C 항온조에서 흔들며 주면서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후 2시간 동안 45,000 rpm에서 원심분리시켜 상청에 남아 있는 미결합 렉틴을 정량하였다. 총 가한 양에서 상청에 남아 있는 양을 빼서 결합된 양으로 하였다.

렉틴의 정량—미결합 렉틴을 Lowry법²⁹⁾에 따라

단백질로서 다음과 같이 정량하였다. 소혈청알부민(BSA, fraction V powder, Sigma)의 농도가 50, 100, 150, 200 mg/ml가 되게 표준액을 조제하였다. 대조액으로는 탈이온수를 사용하였다. 시험액, 표준액 및 대조액 각 0.1 ml에 염색시약(Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate)을 5배 희석한 액 5 ml를 가하고 30분간 진탕한 후 5분-1시간 사이에서 흡광도(595 nm)를 측정하였다.

결과 및 고찰

AF-liposome의 입도분포 및 TEM 사진

본 실험에서 모든 AF-리포솜의 입도분포를 측정된 결과, 대부분이 평균입자경 약 0.12 μm 인 SUV로 존재하고, 나머지는 LUV로 존재함을 알았다. 그러나 0.45 μm 필터를 통과시켰기 때문에 0.45 μm 보다 큰 리포솜은 없었다(Fig. 2). 이와 같은 크기는 간의 모세혈관 내피세포 간극(평균 0.1 μm , 최대 0.2-0.3 μm)⁹⁾과 비교해 볼 때, 간세포 타겟팅이 가능한 크기라고 생각된다. 그러나 실제로 이 AF-리포솜을 간타겟팅용으로 생체에 투여하고자 할 경우에는 초원심분리 등의 방법을 써서 입자경이 더 작고 분포가 고르게 조제하는 것이 바람직하리라고 생각되었다.

한편 TEM 사진에서는 리포솜의 지질막이 더러 깨져 있거나, 지질 이외의 물질로 생각되는 물질들이 지질층에 끼어 있는 것으로 보였다(Fig. 3). 이는 단백질인 AF가 지질과 섞일 때 리포솜의 생성을 방해하거나 지질층 사이에 끼어들기 때문으로 추측되었다.

AF-liposome의 정제

Sepharose 4B 칼람을 이용하여 리포솜에 결합되어 있지 않는 유리 AF를 제거한 AF-liposome 액을 45,000 rpm에서 원심분리하여 얻어진 상청층의 유리 AF 농도는 리포솜에 결합되어 있는 AF 양에 비하여 무시할 수 있을 만큼 낮았다. 이 칼람을 통과시켜 주는 과정에 의해 리포솜의 양은 원래 부피의 70%를 얻을 수 있었다.

AF-liposome의 렉틴 결합능

Fig. 4는 RCA 렉틴의 검량선이다. AF-liposome의 양을 일정하게 하고(이때 이 리포솜 중 AF 농도는 2.8 nmole) 렉틴의 양을 변화시키면서 배양한 후 595 nm에서 상청액의 흡광도를 측정하고 Fig. 4에

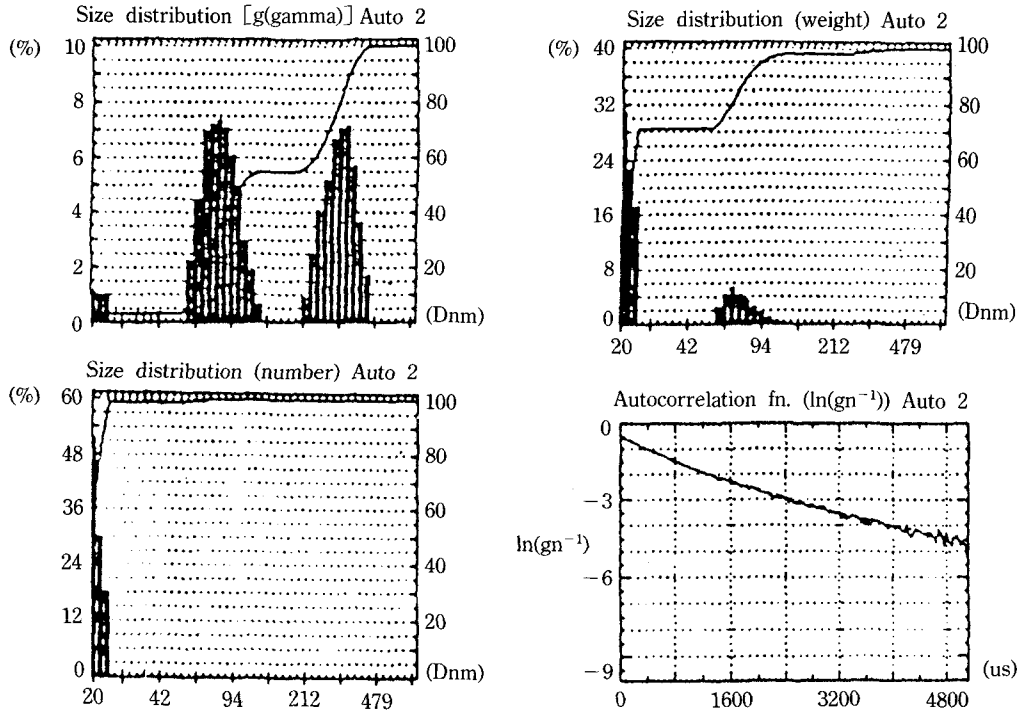


Figure 2—Size distribution of AF-liposome (Mean diameter: 122.8 nm).

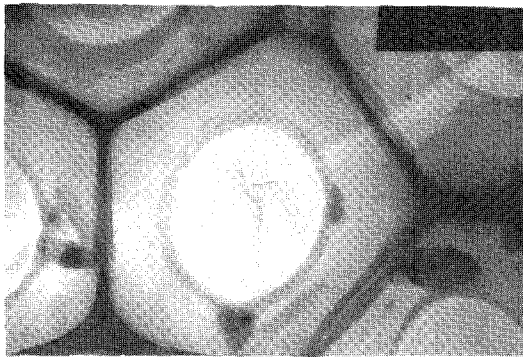


Figure 3—Transmission electron micrograph of AF-liposome (magnification: 40,000).

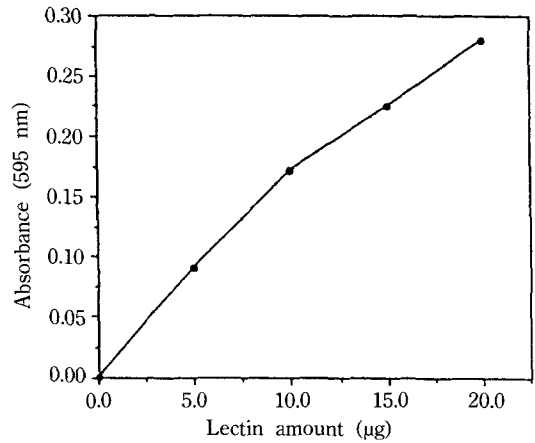


Figure 4—Calibration curve of RCA lectin.

나타낸 검량선을 이용하여 상청에 남아 있는 미결합 렉틴을 정량하였으며, 그 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 이 그림은 가한 렉틴의 양과 배양 후 결합된 렉틴의 양과의 관계를 플롯한 것으로, 가한 렉틴의 양에 비례하여 결합량이 계속 증가함을 알 수 있었다. 그러나 렉틴의 양을 계속 증가시키면 결합량이 더 이상 증가하지 않는 포화점에 도달할 것으로 생각된다. AF-liposome과 렉틴과의 이러한 특이적

결합은 RCA 렉틴이 AF에 있는 갈락토스 잔기를 인식하기 때문¹⁵⁾이라고 한다. 따라서 이 AF-liposome은 RCA 렉틴과 마찬가지로 갈락토스 잔기 인식능이 있는 간질질세포와도 특이적으로 결합할 것으로 기대되었다. 즉, AF-liposome을 이용한 간질질세포로의 약물의 타겟팅이 가능할 것으로 기대되었다.

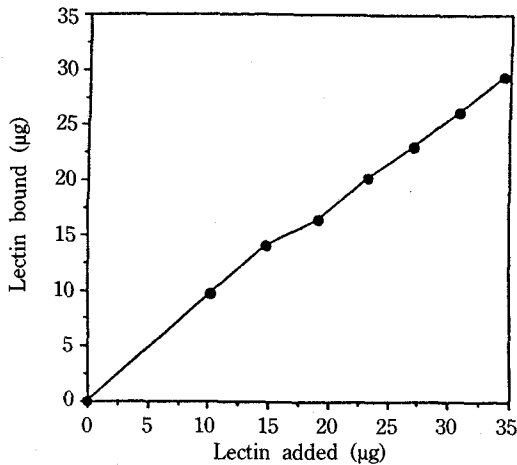


Figure 5—Binding of RCA lectin to AF-liposome at 37 °C. Lectin was added to a 0.1 ml aliquot of the AF-liposome suspension (AF content: 2.8 nmole) in 10 mM Tris buffer (pH 7.4).

이 가능성은 간싯질세포와 AF-liposome간의 *in vitro* 및 *in vivo* 결합실험을 통해 검증되어야 하며 만약 이 가능성이 확인된다면 AF-liposome계를 간세포로의 타겟팅용 DDS로 실용화하기 위한 안정성있는 AF-liposome, 즉 AF로 표면수식된 프로리포솜(AF-proliposome)을 개발하는 것은 큰 의미를 띠는 것으로 기대된다. 이에 관한 연구는 현재 당 연구팀에 의해 계속 추진되고 있다.

결 론

간싯질세포 타겟팅용 DDS인 AF로 표면 수식된 프로리포솜계(AF-proliposome)를 개발하고자 하는 목표를 가지고, 우선 AF-liposome을 제조하여 RCA 렉틴 결합시험을 한 결과, 렉틴과 높은 결합능을 갖는 AF-liposome을 제조할 수 있었다. 이 결과를 바탕으로 하여 AF-proliposome을 제조하는 방법을 확립하고, 이 프로리포솜이 리포솜과 동일한 렉틴 결합특성을 갖게 할 수 있다면, AF-proliposome은 광범위한 약물들을 간싯질세포로 타겟팅해 줄 수 있는 약물수송체로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 말씀

이 연구는 한국과학재단의 목적기초연구 지원비에

의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) M.J. Ostro, In *Liposomes from Biophysics to Therapeutics*, Marcel Dekker, New York, 1987.
- 2) J. Barbet, P. Machy and L.D. Leserman, *J. Supramolec. Struct. Cell. Biochem.*, **16**, 243 (1981).
- 3) L.D. Leserman, P. Machy and J. Barbet, *Nature*, **293**, 226 (1981).
- 4) G.J. Kennel, T. Lankford and K.M. Flynn, *Cancer Res.*, **43**, 2843 (1983).
- 5) J. Conner and L. Huang, *Cancer Res.*, **46**, 3431 (1986).
- 6) G. Gregoriadis and J. Senior, *Biochem. Soc. Trans.*, **12**, 337 (1987).
- 7) P.K. Das, G.J. Murray, G.C. Zirzow, R.O. Brady and J.A. Baranger, *Biochem. Med.*, **33**, 124 (1985).
- 8) T. Hara, H. Ishihara, Y. Aramaki and S. Tsuchiya, *Int. J. Pharm.*, **67**, 123 (1991).
- 9) A. Taylor and D. Granger, *Fed. Proc.*, **42**, 2440 (1983).
- 10) T. Tanabe, W.E. Pricer and G. Ashwell, *J. Biol. Chem.*, **254**, 1038 (1976).
- 11) J.U. Baenziger and Y. Maynard, *J. Biol. Chem.*, **255**, 4607 (1980).
- 12) R.G. Spiro, *Adv. Protein Chem.*, **27**, 350 (1973).
- 13) L. Van Lenten and G. Ashwell, *J. Biol. Chem.*, **247**, 4633 (1972).
- 14) T. Hara, Y. Aramaki, S. Tsuchiya, K. Hosoi and A. Okada, *Biopharm. Drug Dispos.*, **8**, 327 (1987).
- 15) T. Hara, H. Ishihara, Y. Aramaki and S. Tsuchiya, *Int. J. Pharm.*, **42**, 69 (1988).
- 16) T. Hara, H. Ishihara, Y. Aramaki and S. Tsuchiya, *Int. J. Pharm.*, **67**, 123 (1991).
- 17) B.R. Lentz, T.J. Carpenter and D.R. Alford, *Biochemistry*, **26**, 5389 (1987).
- 18) N.I. Payne, P. Timmins, C.V. Ambrose, M.D. Ward and F. Ridgway, *J. Pharm. Sci.*, **75**, 325 (1986).
- 19) N.I. Payne, I. Browning and C.A. Hynes, *J. Pharm. Sci.*, **75**, 330 (1986).
- 20) D.S. Chung, C.K. Shim, M.H. Lee and S.K. Kim, *Yakhak Hoeji*, **32**, 234 (1988).

- 21) E.J. Jang, Studies on drug solubilization using proliposome system, MS thesis, College of Pharmacy, Seoul National University (1991).
- 22) Y.C. Roh, Proliposome as a delivery system for poorly water-soluble drug, MS thesis, College of Pharmacy, Seoul National University (1992).
- 23) R.G. Spiro, *J. Biol. Chem.*, **235**, 2860 (1960).
- 24) L. Warren, *J. Biol. Chem.*, **234**, 1971 (1959).
- 25) I.E. Liener, N. Sharon and I.J. Goldstein, The lectins: Properties, functions and applications in biology and medicine, Academic Press, 1986, pp.1-600.
- 26) S. Tsuchiya, Y. Aramaki, T. Hara, K. Hosoi and A. Okada, *Biopharm. Drug Dispos.*, **7**, 549 (1986).
- 27) D.W. Fry, C. White and D.J. Goldman, *Anal. Biochem.*, **90**, 809 (1978).
- 28) A. Surolia, B.K. Bachhawat and S.K. Podder, *Nature*, **257**, 802 (1975).
- 29) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).