

Amphotericin B가 함유된 Egg PC 리포솜의 용혈 특성

김진철 · 이은옥 · 김종득[†]

한국과학기술원 화학공학과, 생물공정연구센터
(1993년 6월 12일 접수)

The Hemolytic Characteristics of Amphotericin B-Containing Egg PC Liposomes

J.-C. Kim, E.-O. Lee and J.-D. Kim[†]

Department of Chemical Engineering and Bioprocess ERC, KAIST
373-1 Kusung-Dong, Yusong-Gu, Taejon 305-701, Korea
(Received June 12, 1993)

The hemolytic characteristics of amphotericin B-containing liposomes have been investigated *in vitro*. From the hemolysis of human erythrocytes against free and liposomal amphotericin B, the marked reduction in the toxicity of amphotericin B was observed by incorporating the drug in egg PC liposomes. For 45 min, free amphotericin B at 9.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ could completely lyse 2 wt% human erythrocytes. However, liposomal amphotericin B had essentially no lytic effect even in the range over 9.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$. In the 66 hr-hemolysis experiment, liposomal amphotericin B showed the slowly hemolysing characteristics during the experimental period regardless of the concentration of amphotericin B but rapid hemolysis only for 12 hr was observed in the case of free amphotericin B and the degree of hemolysis for 12 hr was maintained after that time. Also the hemolysing ability of liposomal amphotericin B at 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ was lower than that of free amphotericin B at the same concentration for 66 hr. On the other hand, the dependence of hemolysis on amphotericin B contents in egg PC liposomes was significant between 1.64 mole% amphotericin B-containing liposomes and 15.79 or 27.27 mole% amphotericin B-containing liposomes. But no marked difference in hemolysis was observed between 15.79 and 27.27 mole% amphotericin B-containing liposomes. Especially, cholesterol as an excipient in amphotericin B-containing liposomes significantly reduced the hemolysis of human erythrocyte. The degree of hemolysis in 5 mole% amphotericin B-containing liposomes was reduced to approximately 50% of value in the cholesterol-free liposomes by adding 50% cholesterol.

Keywords—Liposomes, Amphotericin B, Toxicity, Hemolysis, Erythrocyte

전신 진균 중에 가장 널리 사용되는 항진균제는 amphotericin B이다. Amphotericin B는 스테롤을 함유하는 막과 상호작용하는 특성이 있으며 막을 가로지르는 이온통로 역할을 하는 친수성 채널을 형성시키기 때문에 항진균활성과 동물세포에 대한 독성이 동시에 나타난다.¹⁻⁴⁾ 따라서 amphotericin B를 정맥주사하면 여러가지 부작용이 생기게 되고, 투여된 amphotericin B는 hemodialysis에 의해서

쉽게 제거될 수 없고 신장에 의해서 매우 천천히 방출되므로 신장에 대한 독성을 나타내는 것이 가장 일반적이고 심각한 부작용이다.⁵⁾ Amphotericin B를 투여받은 환자중 80% 이상이 신장기능저하를 겪고 투여를 멈추면 일반적으로 신장기능은 회복되지만 투여받은 amphotericin B의 전체 양에 따라 신장 구체 여과에 손상을 입게 된다. 빈도는 낮지만 간 기능 손상을 입을 수도 있고 빈혈증세를 나타낼 수

[†] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

있다. 주사과정중 자주 열병, 오한 그리고 두통증세를 나타내고 다섯명중 1명은 구토증세를 나타낸다.^{6,7)}

독성이 강한 약물을 리포솜에 봉입시켜 약물의 작용이 특정부위에만 국한되게 하여 약물의 독성을 감소시키고 약효를 증대시키고자 하는 노력이 근래 약물전달체(DDS) 분야에서 큰 관심사로 떠오르고 있고 또한 그러한 노력이 본 역누실에서 진행되고 있다.^{8,9)} New와 Chance는 리포솜이 amphotericin B를 운반하는 담체로 사용될 수 있다는 것을 시사했고¹⁰⁾ 리포솜에 amphotericin B를 포집시키면 자유 amphotericin B보다 독성이 낮고 진균중에 더 효과적이라고 보고되어 있다.¹⁰⁻¹²⁾ 단일과 다중 투여양생법(single- and multiple-dose regimens)으로 리포솜에 포집된 amphotericin B를 쥐에 정맥주사할 경우 자유 amphotericin B의 MTD(maximal tolerated dose)는 0.8 mg amphotericin B/kg 체중인 반면 리포솜에 포집된 amphotericin B의 MTD는 12 mg amphotericin B/kg 체중이다.⁷⁾ Mehta 등에 의하면 *in vitro*에서 얻은 적혈구의 용혈 실험결과는 *in vivo*에서 얻은 결과를 모사할 수 있고 amphotericin B를 리포솜에 삽입시키면 약의 항진균활성은 유지되면서 독성은 감소된다고 한다.¹³⁾ Lopez-Berestein과 Juliano는 FDA로부터 IND(investigational New Drug) 허가를 받고 전신·심진균증을 치료하기 위하여 리포솜에 포집된 amphotericin B를 이용하였다.⁶⁾ 전신진균 중에 감염된 20명 이상의 환자가 리포솜에 포집된 amphotericin B로 치료받았고 그중에서 반 이상이 완전 치유되었다. 자유 amphotericin B와 같은 기존의 치료방법으로는 치유되지 않았음을 고려하면 이 사실은 아주 획기적인 것이다.

본 연구는 적혈구 용혈정도를 관찰함으로써 자유 amphotericin B와 egg PC 리포솜에 포집된 amphotericin B의 용혈능력을 amphotericin B의 농도와 시간에 따라 비교하였고, 리포솜의 조성이 amphotericin B의 용혈특성에 미치는 영향을 살펴봄으로써 *in vitro*에서 amphotericin B의 독성을 감소시키는 방안을 모색하고자 하였다.

실험 방법

시약 및 기기

사용한 인지질은 egg yolk에서 추출한 L- α -phos-

phatidylcholine(99%)이며 리포솜에 포집시키는 약물은 항진균 항생제인 amphotericin B를 사용하였고 모두 Sigma Chemical Co.에서 구입하였다. Amphotericin B를 포집한 리포솜을 제조할 때 일반적으로 메탄올에 녹아 있는 amphotericin B의 용액을 사용하는데 Merck Co.에서 구입한 HPLC용 메탄올을 사용하였다. 리포솜의 첨가제로서 콜레스테롤(98%)을 사용하였는데 Aldrich에서 구입하였고 사람의 적혈구는 충남적십자혈액원에서 구입하였고 완충액은 PBS(phosphate buffered saline)를 사용했으며, NaCl 160 mM, KCl 3.2 mM, KHPO₄ 1.8 mM, NaHPO₄ 0.12 mM로 만들어 1 N NaOH로 pH 8.0으로 만들어 사용하였다. 인지질의 건조막을 얻기 위해서 Heidolph사의 회전증발기를 사용하였고 리포솜을 생성시키기 위하여 초음파 분쇄장치(ultrasonic processor system)를 사용하였다. Ultra power supplier는 Sonics & Material Inc.의 Model VC250 basic이다. 흡광도는 Hewlett Packard 8452A diode array spectrophotometer로 측정하였고 리포솜의 입자분포를 측정하는 데는 light scattering spectrophotometer(Brook Haven)를 사용하였다.

리포솜의 제조

과량의 amphotericin B를 메탄올에 넣고 교반시킨 후 녹지 않은 침전물을 glass filter로 제거하고 걸러진 용액을 용기에 담아 4°C에서 보관한다. 메탄올에 녹아있는 amphotericin B를 정량하기 위하여 405 nm에서 흡광도를 측정하여 검량선과 비교하였다. Amphotericin B를 함유하는 리포솜을 만들기 위해서 필요한 부피의 amphotericin B 용액을 클로로포름에 녹아 있는 egg PC 20 mg에 첨가한 다음 50 ml 둥근 플라스크에 넣고 유기용매를 증발시키기 위해서 40°C 중탕으로 감압회전증발기에서 최소한 5시간 동안 건조시켰다.⁷⁾ 그 다음 1 ml PBS(pH 8.0)로 팽윤시키고 5분간 tip type으로 초음파 분쇄하였다. 콜레스테롤이 amphotericin B를 함유하는 리포솜의 용혈특성에 미치는 영향을 알아보기 위해서 콜레스테롤을 amphotericin B와 함께 인지질 이중층막에 삽입시키고자 할 때는 클로로포름에 콜레스테롤을 녹여 이것을 amphotericin B 용액, 인지질 용액과 함께 섞어 건조시켰다.

크기분포 측정

광산란(DLS)을 이용해서 0, 10, 20, 30 mole%

amphotericin B를 함유한 egg PC 리포솜의 크기 분포를 측정하였다. 먼저 리포솜 현탁액의 농도를 PBS(pH 8.0)로 0.005 wt%가 되게 맞추었다. 그 다음 먼지를 제거하기 위해서 1.2 μm polycarbonate막 (Millipore)을 통과시킨 후 입자의 크기분포를 측정하였다.

자유, 리포솜에 포집된 amphotericin B의 용혈

단량체 상태의 자유 amphotericin B와 리포솜에 포집된 amphotericin B의 동물세포에 대한 독성을 조사하기 위해서 PBS(pH 8.0)에 amphotericin B의 최종농도가 0, 2.4, 4.0, 5.6, 8.0, 9.6, 11.2, 12.8, 14.4, 19.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되게 자유 amphotericin B 또는 2.43, 4.86, 7.3, 9.73, 12.16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되게 리포솜에 포집된 amphotericin B를 첨가하였다. 그 다음 적혈구의 최종농도가 2 wt%가 되게 적혈구를 가하고 37°C에서 45분간 항온시켰다. 그 다음 적혈구와 적혈구 조각을 제거하기 위해서 4000 rpm에서 30분간 원심분리한 다음 상정액을 취해 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 용혈에 의해서 빠져나오는 헤모글로빈의 특성파장은 550 nm이다. 이때 사용한 리포솜 조성은 2 mole% amphotericin B를 함유하도록 하였다.

리포솜에 포집된 amphotericin B와 amphotericin B의 시간에 따른 용혈거동을 관찰하기 위해서 amphotericin B의 최종농도가 4, 14.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되게 리포솜에 포집된 amphotericin B 또는 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되게 자유 amphotericin B를 적혈구와 PBS(pH 8.0)와 함께 37°C에서 13, 26 그리고 41시간 동안 항온시켰다. 그 다음 4000 rpm에서 30분간 원심분리한 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 리포솜에 포집된 amphotericin B의 용혈능력을 같은 농도(4 μg amphotericin B/ml)의 자유 amphotericin B의 용혈 능력과 비교하였고 완충액에서 적혈구 자체의 용혈 현상을 알아보기 위하여 순수한 완충액에서 적혈구의 용혈현상을 관찰하였다. 이때 사용한 리포솜의 조성은 3 mole% amphotericin B를 함유하도록 하였고 적혈구의 최종농도를 2 wt%로 하였다.

Amphotericin B 함량이 용혈에 미치는 영향

리포솜에 포집된 amphotericin B의 농도를 일정하게 했을 때 지질에 대한 amphotericin B의 상대적인 양이 적혈구의 용혈현상에 미치는 영향을 알아보기 위하여 1.84, 15.79, 27.27 mole%의 amphotericin B를 함유하는 리포솜 시료를 모두 완충액에서 amphotericin B의 최종농도가 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되게 하였다. 그 다음 적혈구를 가한 후 37°C에서 정해진 시간동안 항온시키고 4,000 rpm으로 30분간 원심분리한 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 적혈구의 최종농도를 2 wt%로 하였다.

리포솜에 포집된 amphotericin B의 농도를 일정하게 했을 때 지질에 대한 amphotericin B의 상대적인 양이 적혈구의 용혈현상에 미치는 영향을 알아보기 위하여 0, 10, 30, 50 mole% 콜레스테롤을 함유하는 리포솜을 제조하였는데 각각의 리포솜은 모두 5 mole% amphotericin B를 함유하게 하였다. 각각의 리포솜을 모두 완충액에서 amphotericin B의 최종농도가 18 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도가 되게 하였다. 그 다음 적혈구를 가한 후 37°C에서 18시간 항온시킨 뒤 원심분리한 다음 550 nm에서 상정액의 흡광도를 측정하였다. 적혈구의 최종농도를 2 wt%로 하였다.

콜레스테롤 함량이 용혈에 미치는 영향

콜레스테롤의 함량이 용혈현상에 미치는 영향을 알아보기 위하여 0, 10, 30, 50 mole% 콜레스테롤을 함유하는 리포솜을 제조하였는데 각각의 리포솜은 모두 5 mole% amphotericin B를 함유하게 하였다. 각각의 리포솜을 모두 완충액에서 amphotericin B의 최종농도가 18 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도가 되게 하였다. 그 다음 적혈구를 가한 후 37°C에서 18시간 항온시킨 뒤 원심분리한 다음 550 nm에서 상정액의 흡광도를 측정하였다. 적혈구의 최종농도를 2 wt%로 하였다.

결과 및 고찰

평균크기 및 분포

Egg-PC 리포솜에서 amphotericin B의 함량이 리포솜 입자의 직경에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험방법에서 기술한 대로 0, 10, 20 그리고 30 mole% amphotericin B를 함유한 리포솜을 제조하였다. Fig. 1에서와 같이 amphotericin B의 함량이 증가하면 리포솜의 평균직경은 450 nm에서 220 nm로 감소하였고 모두 bimodal distribution을 나타내었다. 수상에서 인지질과 amphotericin B가 함께 분산되어 있으면 Fig. 2와 같이 amphotericin B의 함량이 3 mole% 이하의 리포솜계와 amphotericin B 함량이 높은 amphotericin B-인지질 복합체가 공존하였다. 이때 계 전체의 amphotericin B 함량이 증가하면 증가분의 amphotericin B는 기존의 리포솜구조를 파괴하여 amphotericin B의 함량이 높은 amphotericin B-지질복합체로 된다.¹⁴⁾ 결과적으로 주어진 인지질 양에 대해서 amphotericin B의 함량이 증가하면 리포솜의 구조를 가진 입자의 수는 감소한다. Amphotericin B에 의해서 파괴된 리포솜, 즉 amphotericin B-지질 복합체는 리포솜보다 크기가 작다. 따라서 egg PC 리포솜에서 amphotericin B의 함량이 증가하면 일부 리포솜 구조가 파괴되어 전체 평균크기가 감소된다고 생각된다. 순수한 egg

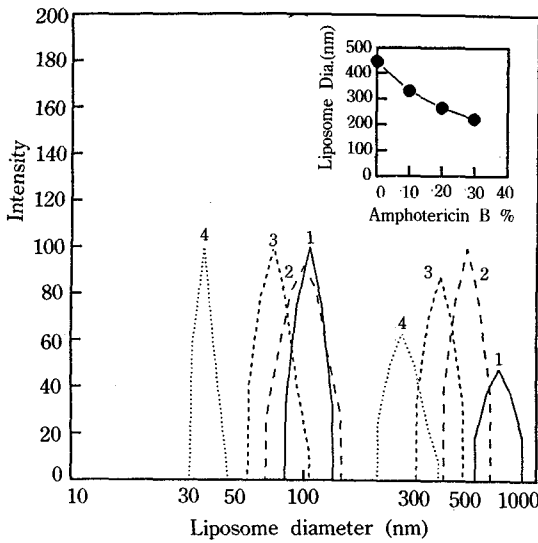


Figure 1—Effects of amphotericin B contents in egg PC liposomes on the size distribution of liposomes. Key: 1; 0 mole%, 2; 10 mole%, 3; 20 mole%, 4; 30 mole%.

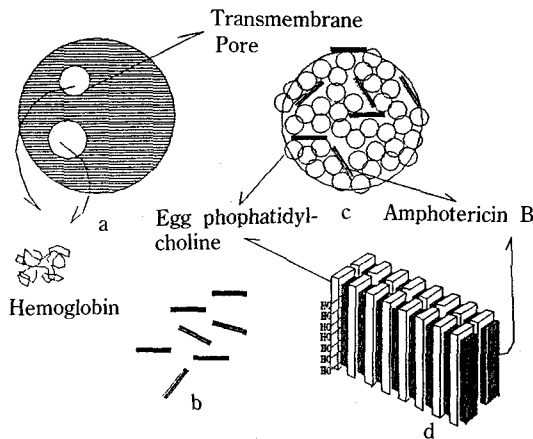


Figure 2—Schematic representation of hemolysis of human erythrocytes (a) by amphotericin B (b). A possible arrangement of amphotericin B-containing liposomes and of amphotericin B-phospholipid complex is shown in (c) and (d), respectively.

PC 리포솜의 크기분포도 amphotericin B를 함유한 리포솜의 크기분포와 같이 bimodal한 형태를 취하기 때문에 amphotericin B를 함유한 리포솜의 bimodal 분포는 리포솜계와 amphotericin B-복합체계로 분리된 현상에서 비롯된 것이 아니라 초음파 분쇄과정 중 에너지의 국부화에서 비롯되었다고 추측된다.

자유, 리포솜에 포집된 amphotericin B의 용혈

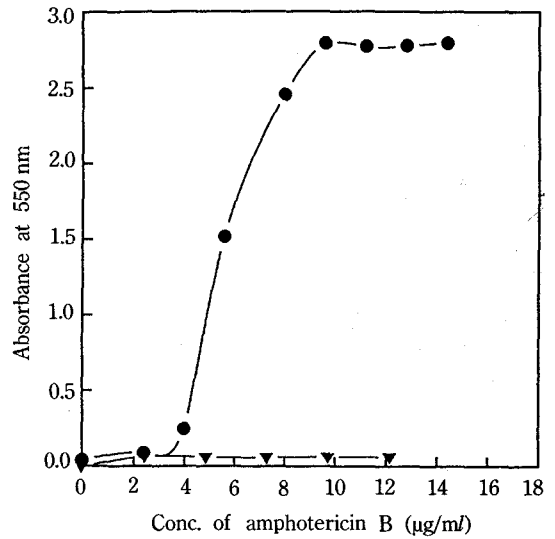


Figure 3—Hemolysis of human erythrocytes by free and liposomal amphotericin B at 37°C for 45 min in PBS (pH 8.0) containing 2 wt% human red cell and liposomal or free amphotericin B. Liposomes contain 2 mole% amphotericin B. Key: ●; Free amphotericin B, ▼; Liposomal amphotericin B.

37°C 에서 46분간 항온시키면서 적혈구의 용혈현상을 관찰해 보면 Fig. 3에서와 같이 자유 amphotericin B의 경우 4 µg/ml에서 적혈구가 용혈되기 시작해서 9.6 µg/ml에서 완전히 용혈되었다. 그러나 리포솜에 포집된 amphotericin B의 경우는 12.16 µg/ml에서도 거의 용혈되지 못했다. 이것은 Fig. 2에서와 같이 amphotericin B 분자가 egg PC 분자와 함께 아주 안정한 amphotericin B-인지질 복합체를 형성하거나 리포솜을 형성하여 amphotericin B가 인지질에 의해 고정화되기 때문에¹⁴⁾ 자유 amphotericin B보다 적혈구에 쉽게 작용될 수 없기 때문인 것으로 생각된다. 자유 amphotericin B가 4 µg amphotericin B/ml 이상의 농도에서 550 nm에서의 흡광도가 급격히 증가하는 것은 amphotericin B 농도가 증가함에 따라 적혈구 막에서 amphotericin B-콜레스테롤 복합체의 채널형성이 촉진되어 적혈구의 내부에 있던 헤모글로빈이 외부로 급격히 빠져나오기 때문이다. Amphotericin B의 농도가 더욱 높아지면 이러한 복합체 채널에 의해서 적혈구막이 완전히 파괴되기 때문에 9.6 µg amphotericin B/ml 농도 이상에서는 흡광도가 일정해진다고 생각된다.

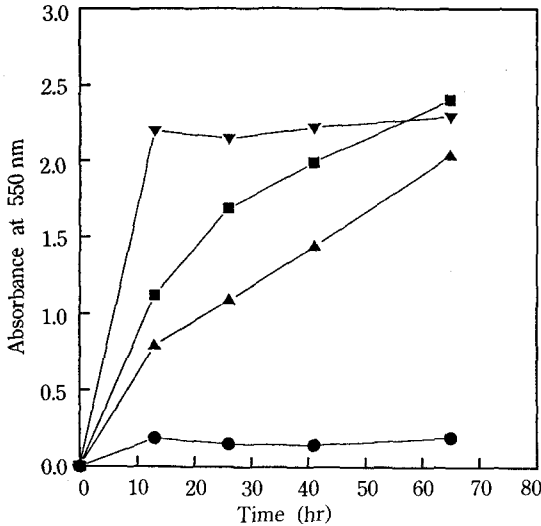


Figure 4—Hemolysis of liposomal amphotericin B and of free amphotericin B at 37°C for predetermined time intervals in PBS (pH 8.0) containing 2 wt% human and free or 3 mole% amphotericin B-containing liposomes. Key: ▽; 4 µg Free amphotericin B/ml, ▲; 4 µg Liposomal amphotericin B/ml, ■; 14.4 µg Liposomal amphotericin B/ml, ●; 0 µg amphotericin B/ml.

리포솜에 포집된 amphotericin B와 자유 amphotericin B의 장기간에 걸친 용혈특성을 관찰하기 위하여 37°C에서 2 wt% 적혈구와 항온시킨 결과는 Fig. 4와 같았다. 리포솜에 포집된 amphotericin B의 경우 항온 초기부터 66시간까지 서서히 흡광도가 증가하는 것으로 보아 적혈구를 서서히 용혈시킨다고 여겨진다. 그러나 자유 amphotericin B 경우는 처음 12시간 항온시키는 동안 흡광도가 한꺼번에 증가하고 그 이후 일정한 것으로 보아 약의 독성을 한꺼번에 나타낸다고 생각될 수 있다. Fig. 2d와 같은 amphotericin B-인지질 복합체에서 시간에 따라 복합체가 해체됨으로써 인지질이 amphotericin B를 고정화시키지 못하여 방출시키기 때문에 리포솜에 포집된 amphotericin B가 시간에 따라 서서히 독성을 나타내는 것으로 생각된다. 적혈구의 용혈현상이 amphotericin B-인지질 복합체내에서 인지질에 의해서 고정화된 amphotericin B에 의한 것이 아니라 단지 자유 amphotericin B에 의한 것이라면 각각 4 µg amphotericin B/ml로 2 wt% 적혈구와 항온시킨 자유 amphotericin B 경우와 리포솜에 포집된 amphotericin B 경우의 비교로부터 66시간이

지나면 적혈구와 항온시킨 리포솜시료에서 약 89%의 amphotericin B가 자유단량체와 같은 상태로 존재한다는 것을 알 수 있다(Fig. 4 참조). 4 µg amphotericin B/ml 그리고 14.4 µg amphotericin B/ml로 적혈구와 항온된 리포솜시료의 경우(Fig. 4 참조) 처음 13시간 동안 비교적 급격하게 적혈구를 용혈시키는 것은 Fig. 2c와 같은 리포솜에 흡착되어 있는 그리고 비교적 자유로운 amphotericin B 때문인 것으로 생각된다. 그 이후는 amphotericin B-인지질 복합체의 해체로 인해서 방출되는 amphotericin B의 영향 때문인 것으로 생각된다.

Amphotericin B 함량이 용혈에 미치는 영향

리포솜 계에서 지질에 대한 amphotericin B의 함량이 용혈에 미치는 영향을 알아보기로 1.84, 15.79, 27.27 mole% amphotericin B를 함유하는 리포솜 시료들을 amphotericin B의 최종농도가 16 µg/ml이 되게 적혈구와 함께 37°C에서 주어진 시간간격으로 용혈현상을 측정된 결과 Fig. 5와 같이 15.79와 27.27 mole% amphotericin B를 함유한 리포솜시료는 거의 같은 용혈특성을 보였다. 그러나 1.64 mole% amphotericin B를 함유한 리포솜은 약 41시간 동안 전자의 리포솜 시료들의 용혈작용의 75%에 해당하는 용혈정도를 보였다. 즉 25% 용혈감소효과를 얻을 수 있었다. 일반적으로 지질에 대한 amphotericin B의 함량이 증가하면 Fig. 2c에서와 같은 리포솜의 구조보다는 Fig. 2d와 같은 amphotericin B-인지질 복합체가 많이 형성됨으로 상대적으로 자유롭게 존재하는 amphotericin B의 양은 적어지기 때문에 amphotericin B의 함량이 많은 리포솜계는 독성이 적을 것이라고 생각될 수 있다. 하지만 Fig. 5에서 1.84 mole% amphotericin B를 함유하는 지질계가 15.79와 27.27 mole% amphotericin B를 함유하는 지질계보다 독성이 적게 나타났다. 이것은 1.84 mole% amphotericin B를 함유하는 지질계가 15.79와 27.27 mole% amphotericin B를 함유하는 지질계보다 amphotericin B 한 분자당 동물세포에 노출되지 않도록 숨겨줄 수 있는 지질이 많기 때문인 것으로 생각된다. 즉 리포솜 표면에 자유롭게 존재하는 amphotericin B의 용혈효과보다 지질에 의해서 감추어지는 효과가 더 크기 때문인 것으로 생각된다. Amphotericin B의 함량이 15.79와 27.27 mole%인 경우 거의 같은 용혈효과를 보이는 것으로 보아 이와

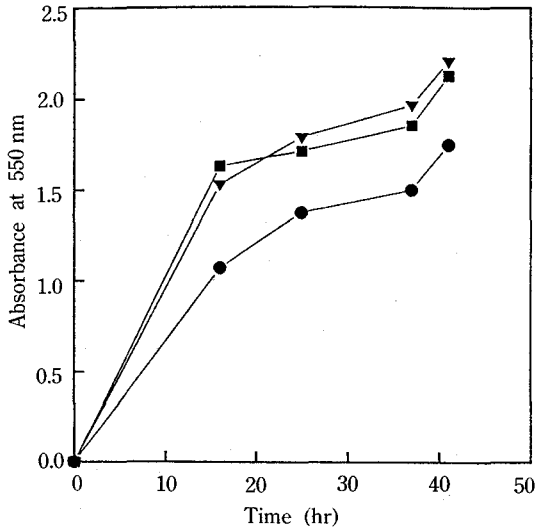


Figure 5—Effects of amphotericin B contents in egg PC liposomes on hemolysis at 37°C for predetermined time intervals in PBS (pH 8.0) containing 2 wt% human red cells and 1.64, 15.79 and 27.27 mole% amphotericin B-containing liposomes. Concentration of liposomal amphotericin B was adjusted to 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in all incubated samples. Key: ●; 1.64 mole% amphotericin B-Containing Liposomes, ▼; 15.79 mole% amphotericin B-Containing Liposomes, ■; 27.27 mole% amphotericin B-Containing Liposomes.

같이 amphotericin B 조성이 높은 시료에서 amphotericin B가 지질에 의해서 숨겨지는 효과가 적음을 알 수 있었다.

콜레스테롤 함량이 용혈에 미치는 영향

5 mole% amphotericin B를 함유하는 인지질계에서 콜레스테롤의 함량이 0, 10, 30 그리고 50 mole%로 증가하면 Fig. 6에서와 같이 용혈현상이 현저하게 감소한다. 콜레스테롤 함량이 0 mole% 일 때 흡광도가 1.75이고 콜레스테롤 함량이 50 mole% 일 때 흡광도가 0.85이므로 50 mole% 콜레스테롤이 amphotericin B의 용혈작용을 감소시키는 효과는 약 51이다. 콜레스테롤이 증가함에 따라 용혈이 감소되는 것은 다음과 같은 두 가지 이유로 설명될 수 있다고 여겨진다. 첫째, 콜레스테롤 함량이 증가 되면 자유롭게 존재하는 amphotericin B와 함께 리포솜의 인지질 이중층에서 안정한 amphotericin B-콜레스테롤 복합체를 형성하여 자유 amphotericin B의 양을 감소시키고 둘째, amphotericin B와 인

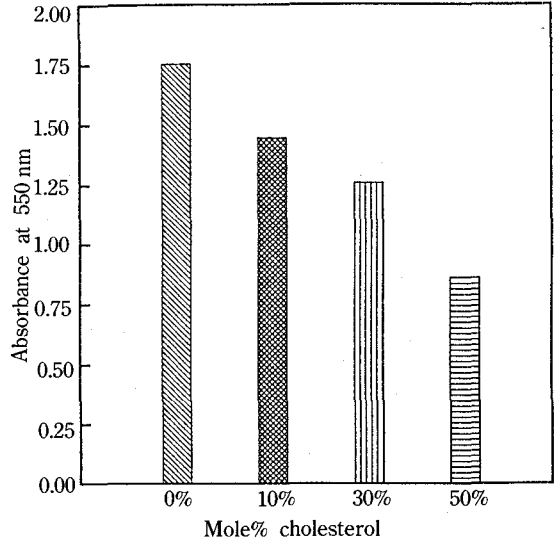


Figure 6—Effects of cholesterol contents in 5 mole% amphotericin B-containing liposomes on hemolysis at 37°C for 18 hr in PBS (pH 8.0) containing 2 wt% human red cell and various composite liposomes. Concentration of liposomal amphotericin B was adjusted to 18 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in all incubated samples.

지질계에서 콜레스테롤이 증가하면 콜레스테롤-amphotericin B 친화력에 의해서 amphotericin B의 적혈구에 대한 친화력이 감소되기 때문이다. Brajbarg 등은 콜레스테롤을 함유한 serum lipoprotein을 이용하여 콜레스테롤이 amphotericin B의 용혈작용에 미치는 영향을 보고하였는데, lipoprotein의 양이 증가할수록, 즉 콜레스테롤의 함량이 증가할수록 amphotericin B의 용혈작용 현저히 감소함을 보였다.¹⁵⁾ 콜레스테롤이나 에르고스테롤과 같은 스테롤을 함유한 리포솜이 순수한 인지질 리포솜보다 동물세포에 대한 독성이 적다는 보고도 있다.^{16,17)}

결 론

리포솜에 봉입된 amphotericin B의 용혈특성과 제조된 리포솜 입자의 크기를 검토한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 리포솜에서 amphotericin B의 함량을 증가시켜 광산란(DLS)을 이용해 리포솜 입자의 평균직경을 측정된 결과 amphotericin B의 함량이 0에서 30 mole%로 증가하면 평균직경은 450

nm에서 220 nm로 감소하였다. 45분 동안 37°C 에서 2 wt% 적혈구와 함께 자유 amphotericin B와 리포솜에 봉입된 amphotericin B의 용혈특성을 비교한 결과 자유 amphotericin B가 적혈구를 완전히 용혈시키는 이상의 농도에서 리포솜에 봉입된 amphotericin B는 용혈현상을 나타내지 않았다. 따라서 amphotericin B를 리포솜에 봉입시키면 동물세포에 대한 독성이 감소함을 알 수 있었다. 66시간 동안 37°C 에서 2 wt% 적혈구와 함께 자유 amphotericin B와 리포솜에 봉입된 amphotericin B를 항온시키면서 용혈 특성을 비교한 결과 리포솜에 포집된 amphotericin B는 적혈구를 서서히 용혈시키는 제어된 용혈거동을 보였다. 그러나 자유 amphotericin B는 한꺼번에 용혈시키는 제어되지 않은 용혈거동을 보였다. 그리고 66시간 동안 리포솜에 봉입된 amphotericin B는 같은 농도의 자유 amphotericin B보다 낮은 용혈을 보였다. 41시간 동안 37°C 에서 2 wt% 적혈구와 함께 amphotericin B 농도를 일정하게 유지하면서 리포솜의 amphotericin B 함량에 따른 용혈현상을 관찰한 결과 리포솜에서 amphotericin B의 함량이 감소하면 용혈은 감소되었다. 5 mole% amphotericin B를 함유한 리포솜에서의 콜레스테롤 함량에 따른 용혈현상을 관찰한 결과 콜레스테롤 함량이 증가하면 용혈현상이 감소되었다. 이상의 결론에서 amphotericin B를 리포솜에 봉입시키면 약의 독성이 현저히 감소될 수 있고, 이때 amphotericin B를 함유한 리포솜에서 콜레스테롤함량과 지질에 대한 amphotericin B의 조성이 amphotericin B를 함유하는 리포솜의 용혈특성에 중요한 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다.

감사의 말씀

본 연구는 과학재단 목적기초 연구비 지원에 의하여 이루어 졌습니다. 아울러 광산관실험에 도움을 주신 이현국 박사님께 감사드립니다.

문 헌

1) B. De Kruijff and R.A. Demel, Polyene antibiotics-sterol interaction of acholeplasma laidlawii cells and lecithin liposomes, *Biochim.*

Biophys. Acta., **339**, 57-70 (1974).

- 2) R. Bittman, W.C. Chen and O.R. Anderson, Interaction of filipin III and amphotericin B with lecithin-sterol vesicle and cellular membranes, *Biochemistry*, **13**, 1364-1373 (1974).
- 3) P. Van Hoogevest and B. De Kruijff, Effect of amphotericin B on cholesterol-containing liposomes of egg phosphatidylcholine and didocosenoil phosphatidylcholine, *Biochim. Biophys. Acta*, **511**, 397-407 (1978).
- 4) V.E. Khutorsky, Structure of amphotericin B-cholesterol complex, *Biochim. Biophys. Acta*, **1108**, 123-127 (1992).
- 5) V. Joly, M. Saint-Pierre-Chazalet, L. Saint-Julien, J. Bolard, C. Carbon and P. Yeni, Inhibiting cholesterol synthesis reduces the binding and toxicity of amphotericin B against rabbit renal tubular cells in primary culture, *J. Infect. Dis.*, **165**, 337-343 (1992).
- 6) G. Lopez-Berestein and R.L. Juliano, *Liposomes*, Marcel Dekker, New York, U.S.A. pp.253-276 (1987).
- 7) G. Lopez-Berestein, R. Mehta, R.L. Hoper, K. Mills, L. Kasi, K. Mehta, V. Fainstein, M. Luna, E.M. Hersh and R. Juliano, Treatment and prophylaxis of disseminated infection due to *candia albicans* in mice with liposome-encapsulated amphotericin B, *J. Infect. Dis.*, **147**, 939-944 (1983).
- 8) E.-O. Lee, J.-G. Kim and J.-D. Kim, Induction of vesicle-to-micelle transition by bile salts for DOPE vesicles incorporating immunoglobulin G¹, *J. Biochem.*, **112**, 671-676 (1992).
- 9) J.-H. Park, E.-O. Lee and J.-D. Kim, Preparation and characteristics of phosphatidylcholine liposomes covalently coupled with immunoglobulin fragments, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **22**, 115-124 (1992).
- 10) R.R.C. New and M.L. Chance, Treatment of experimental cutaneous leishmaniasis by liposome-entrapped pentostam, *Acta Trop.*, **37**, 253-256 (1980).
- 11) J.R. Graybill, P.C. Craven, R.L. Taylor and W. E. Magge. Treatment of murine Cryptococcosis with Liposome-associate amphotericin B, *J. Infect. Dis.*, **145**, 748-752 (1980).

- 12) G. Lopez-Berestein, V. Fainstein and R.M. Hopfer, Liposomal amphotericin B for the treatment of systemic fungal infections in patient with cancer: A preliminary study, *J. Infect. Dis.*, **151**, 704-710 (1985).
- 13) R. Mehta, G. Lopez-Berestein, R. Hopfer, K. Mill and R. Juliano, Liposomal amphotericin is toxic to fungal cells but not to mammalian cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **770**, 230-234 (1984).
- 14) W.R. Perkins, S.R. Minchey, L.T. Boni, C.E. Swenson, M.C. Popescu, R.F. Pasternack and A.S. Janoff, Amphotericin B-phospholipid interaction responsible for reduced mammalian cell toxicity, *Biochim. Biophys. Acta*, **1107**, 271-282 (1992).
- 15) J. Brajtburg, S. Elberg, G.S. Kobayashi and G. Medoff, Effect of serum lipoproteins on damage to erythrocytes and *candida albicans* cells by polyene antibiotics, *J. Infect Dis.*, **153**, 623-626 (1986).
- 16) F.C. Szoka, Jr, D. Milholl and M. Barza, Effect of lipid composition and liposome size on toxicity and *in vitro* fungicidal activity of liposome-intercalated amphotericin B, *Antimicrob. Agent. Chemother.*, **31**, 421-429 (1987).
- 17) N.I. Payne, R.F. Cosgrove, A.P. Green and L. Liu, In-vivo studies of amphotericin B liposomes derived from proliposomes: Effect of formulation on toxicity and tissue disposition of the drug in mice, *J. Pharm. Pharmacol.*, **39**, 24-28 (1987).