

리포솜계를 이용한 Amphotericin B의 세포막 독성 저하

박인철 · *양지원 · *김종득 · 최태부
건국대학교 공과대학 미생물공학과
*한국과학기술원 화학공학과

Reduction of Cell Membrane Toxicity of Amphotericin B Using Liposome System

Park In-Chul, *Ji-Won Yang, *Jong-Deuk Kim and Tae-Boo Choe

Department of Microbial Engineering, Kon-Kuk University, Seoul 133-701, Korea

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

ABSTRACT

Liposome system composed of egg phosphatidylcholine was employed to reduce the membrane toxicity of Amphotericin B(Amp. B). Liposomal Amp. B, which showed a free drug equivalent antibiotic effect on fungi, displayed a remarkable reduction of toxicity of the drug against the membrane of red blood cell than that of fungizone which has been used in clinical treatment, and it shows conspicuously lowered toxicity on red blood cells. However liposomal Amp. B which contains cholesterol as a component of liposome lowered the antibiotic effect and toxicity than that Phosphatidylcholine liposome. This due to the affinity between Amp. B and cholesterol. In addition to this, β -glucuronidase from snail juice crude enzyme reveals synergistic effect on liposomal Amp. B and free Amp. B. We also obtained positively raised antibiotic effect, when enzyme which is coupled with palmitic acid using NHSP inserted into liposome bilayer. From these results, we suppose that the use of liposomal system in the case of Amp. B shows increasing antibiotic effect and dramatically lowered toxicity, thus, we think that we can solve the problem of Amp. B toxicity which cause hesitate of clinical use.

서론

리포솜은 수용액 내에서 인지질에 의하여 자연스럽게 형성되는 이중층의 액포로서 수용성·지용성 약물을 포획하는데 용이할 뿐만 아니라 체내의 생체막과 비슷한 성분으로 되어 있어 생체조직 내에서 거부반응이 적다(1, 2). 따라서 이것을 약물전달체로 이용하여 antimicrobial chemotherapy에 응용하였을 경우에 다음과 같은 장점을 피할 수 있다.

첫째, 항생물질의 독성을 낮출 수 있다(3-5).

둘째, 항생물질에 대해서 저항성이 있는 미생물들(예를 들면 β -lactamase 생산균)까지도 저해시킬 수 있다(6).

셋째, macrophage 감염에 의해 유래된 질병일 경우에는 리포솜이 macrophage에 의해 phagocytosis 되는 현상을 이용하여 자연스럽게 항생물질을 세포 내로 전달할 수 있는 수동적 표적 지향을 피할 수 있다(7).

현재 AIDS의 이차 감염 또는 면역체계가 약화된 사람에게 있어서 직접적인 사망 원인균 중의 하나인

*Candida albicans*는 진균(fungi)으로서, 이 균의 감염에 의한 질병은 polyene계 항생물질 중의 하나인 Amphotericin B(Amp. B)를 사용하여 치료를 하고 있다. Amp. B는 *Candida albicans*와 같은 진균의 세포막에 존재하는 ergosterol과 결합하여 세포막에 pore를 형성함으로써 세포내의 K^+ , Mg^{2+} 혹은 아미노산과 같은 생리필수 저분자들의 유출을 유도하여 진균사멸(fungicidal)효과를 나타낸다(8). 이러한 Amp. B는 진균의 ergosterol뿐만 아니라 사람 체세포의 세포막에 존재하는 cholesterol과도 결합할 수 있기 때문에 세포막에 높은 독성을 나타낸다. Amp. B가 전신감염진균(systemicmycose)에 가장 강력한 항생제임에도 불구하고 상대적으로 사용이 제한되어 있는 것은 바로 이러한 독성때문이다. 약물전달체로서 리포솜을 이러한 독성이 있는 항생물질에 적용하였을 경우 높은 농도의 약을 목적세포 주위, 혹은 세포내에 전달함으로써 약물의 독성을 줄이고 치료 효과를 증가시킬 수 있을 것이다.

본 연구에서는 단백질을 리포솜에 삼입시키는 기술을 응용하여(9) 효소의 세포벽과 결합할 수 있는 β -glucuronidase를 리포솜의 외부에 삼입시킴으로써 효소의 특이성을 이용하여 진균에 대해서 표적지향을 가능하게 하고, 또 Amp. B를 리포솜 내에 포집시켜 약물의 독성을 낮춤으로써 진균에 의한 감염 치료에서 독성이 낮으면서도 치료효과가 향상될 수 있는 약물전달 system의 개발을 시도하였다.

재료 및 방법

효소와 인지질

표적세포와 결합할 수 있는 효소인 β -glucuronidase는 SIGMA(USA)사로부터 구입한 조정제된 시약을 실험에 사용하기 위하여 DEAE-cellulose ion exchange chromatography로 정제하였으며, 인지질은 순수한 egg yolk phosphatidylcholine(EPC)을 SIGMA사로부터 구입하였다.

리포솜의 제조

Chloroform에 녹인 0.03mM의 EPC를 N_2 gas하에서, 50°C, 15분 동안 증발시켜 round bottle에 인지질 필름을 만들었다. 이 필름의 잔류 유기용매를 제거하기 위하여 다시 1시간 동안 감압하에 방치한 후 2ml의 PBS를 첨가하여 3분 동안 bead와 함께 vortexing하여 인지질 필름을 수화시켰다. 수화된 인지질 용액을 3분 동안 sonication을 행한 후 0.22

μ m membrane filter로 제균하여 실험에 사용하였다. Sonication을 하기 전의 상태를 multilamellar vesicle(MLV)로 사용하였으며 sonication 후의 것을 small unilamellar vesicle(SUV)로 사용하였다(10).

Liposomal Amphotericin B(Amp. B)의 제조

Encapsulated liposomal Amp. B의 제조

Free 리포솜의 제조와 마찬가지로 인지질 필름을 제조한 후에 2ml의 PBS와 함께 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹아 있는 Amp. B(SIGMA) 2mg을 첨가하여 같은 방법으로 buffer에 수화시킨다. 수화시킨 후 sonication을 행하고 포집되지 않은 Amp. B와 잔여 DMSO를 제거하기 위하여 24시간 동안 투석을 행하였다. 투석된 리포솜 용액을 methanol에 넣어 리포솜을 갠 후 방출된 Amp. B의 양을 405nm에서 측정하여 리포솜 내의 Amp. B를 정량하였다.

Intercalatedn Amp. B 리포솜의 제조

empty 리포솜에 일정량의 Amp. B를 첨가하여 30°C에서 1시간 반응시켜 제조하였다(11). 즉 이것은 empty 리포솜의 표면에 Amp. B가 삼입되어 만들어진 liposomal Amp. B로 보아야 할 것이다.

β -Glucuronidase가 포함된 Amp. B 리포솜의 제조

β -Glucuronidase(β -GL)를 리포솜 표면에 삼입시키기 위해서는 효소분자에 소수성기를 만들어 줄 필요가 있다. 이것을 위해 β -GL에 palmitic acid를 결합시키기 위하여 N-hydroxysuccinimide ester of palmitic acid(NHSP)를 이용하였다(9). Deoxycholic acid(DOC) 2% PBS 용액에 NHSP/ β -GL molar ratio가 100이 되도록 NHSP를 첨가하여 37°C에서 10시간 동안 반응시켰다. 반응식은 아래와 같다.



반응 후에 0.15% DOC가 함유된 PBS에서 20시간 투석을 행함으로써 고농도의 DOC와 반응액에 남아있는 NHS, dioxane 등의 반응산물을 제거시켰다. 투석 후에 lipid가 단백질의 20(W/W)배가 되도록 유기 용매에 녹인 후 증발시키고 단백질 용액과 혼합하였다. 여기에 최종 DOC 농도가 DOC/lipid molar ratio가 1.5가 되도록 첨가하여 sonication을 행한 후 48시간 동안 다시 투석을 행하여 단백질이 삼입된 리포솜이 형성되도록 하였다. 이렇게 제조된 리포솜을 Sepharose 6B(0.8×40)에 gel filtration

을 행함으로써 삽입되지 않은 단백질을 제거하여 최종적으로 단백질이 삽입된 리포솜만을 얻었다. 여기에 일정한 Amp. B를 첨가하여 1시간 37°C에서 반응시킨 후 β -GL coupled Amp. B 리포솜을 제조하였다.

Candida albicans에 대한 Amp. B의 생육저지효과 측정

Fungi는 *Candida albicans* KCTC 1940을 사용하였으며, 각 농도의 liposomal 또는 free Amp. B를 1ml의 YM broth에 있는 일정수의 fungi(약 10^5)와 혼합하여 30°C에서 1시간 incubation한 후에 YM agar에 100, 또는 10,000배로 희석하여 도말한 후 생균수(colony forming unit)를 측정하였다.

Red Blood Cell(RBC)에 대한 Amp. B의 세포막 독성 측정

RBC를 1×10^8 /ml이 되게 PBS로 희석한 1ml에 측정하고자 하는 약물 system이 포함되어 있는 1ml을 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응을 시킨 후 2500rpm에서 원심분리하여 얻어진 상등액을 560nm에서 RBC로부터 방출된 hemoglobin의 양을 측정하여 Amp. B에 대한 세포막 독성을 측정하였다. Relative toxicity는 아래의 식에 의하여 구하였다.

$$\text{Relative toxicity} = \frac{\text{sample-con}_2}{\text{con}_2 - \text{con}_1} \times 100$$

con₁ : RBC 전체를 lysis시켰을 때 방출된 hemoglobin의 양

con₂ : 약물의 처리없이 1시간 incubation 후에 방출된 hemoglobin의 양

sample : 약물의 처리 후에 방출된 hemoglobin의 양

β -GL Activity의 측정

Phenolphthalein p-glucuronide 20mg을 10ml에 녹인 용액 100 μ l가 첨가된 PBS 1ml에 측정하고자 하는 enzyme solution을 적당량 첨가하여 30분 동안 37°C에서 반응시킨다. 반응 후 1N NaOH 용액을 첨가한 후 붉은색으로 발색되는 것을 540nm에서 측정하여 enzyme activity를 측정하였다.

결과 및 고찰

Amp. B Formulation에 따른 *Candida*의 증식저해효과 두 가지 방법으로 제조한 liposomal Amp. B와

free Amp. B를 각각 농도별로 *Candida* 배양액에 첨가하여 1시간 동안 접촉시킨 후 배양액을 agar plate에 도말하여 생성된 colony를 측정하여 Fig. 1과 같은 결과를 얻었다. Fig. 1에서 볼 수 있듯이 리포솜 내에 포획(encapsulation)된 Amp. B는 free Amp. B보다 각 농도에서 약간 낮은 항생효과를 나타낸 반면에 Amp. B가 리포솜 표면에 intercalation(free Amp. B+empty 리포솜)된 경우에는 *Candida*를 완전히 사멸시키기 위한 농도(minimal fungicidal concentration, MFC)가 12 μ g/ml에서 8 μ g/ml로 감소되어 향상된 항생효과를 나타내었다. 이러한 결과는 Amp. B가 리포솜의 내부보다는 표면에 농축된 형태로 존재하고 있을 때 *Candida*와 접촉할 경우 *Candida*의 세포막에 빠르게 전달됨으로써 결과적으로 항생효과의 증대를 가져오는 것으로 보여진다.

Liposome에 의한 Amp. B의 독성 저하

Fig. 2A는 여러 Amp. B농도에서 리포솜을 첨가하였을 때 RBC에 대한 세포막 독성의 감소 효과를 나타낸 것이다. 5×10^{-6} M의 Amp. B농도에서 독성을 90% 이상 낮추는데 300 μ g, 1×10^{-5} M에서는 500 μ g, 5×10^{-5} M에서는 1,000 μ g의 liposomal lipid 농도가 요구되었다. 이러한 결과로부터 리포솜을 이용할 경우 Amp. B의 적혈구에 대한 세포막 독성을 현저히 저하시킬 수 있음을 알 수 있었다. Fig. 2B는 각각의 Amp. B농도에서 50%의 독성 저하에 필요한 liposomal lipid의 농도를 Fig. 2A에서 구하여 다시 나타낸 것으로 Amp. B 1 μ M에 대하여 liposomal lipid 약 20 μ g이 필요한 것으로 보인다.

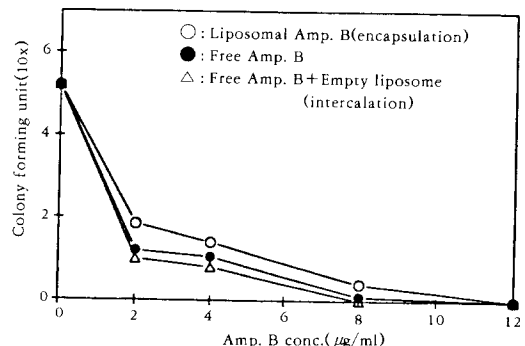


Fig. 1. The antibiotic effect of the various formulation of Amp. B on the growth of *Candida albicans*.

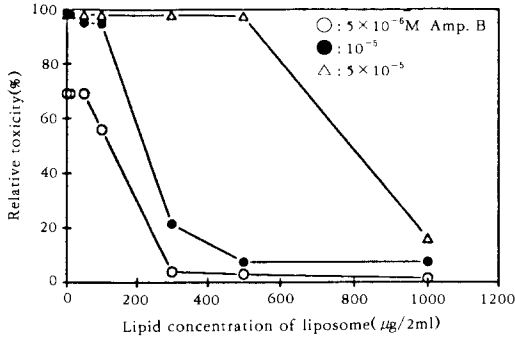


Fig. 2A. The effect of liposomal lipid concentration on the reduction of Amp. B toxicity at the various concentrations of amp. B the number of RBC is $1 \times 10^8/ml$.

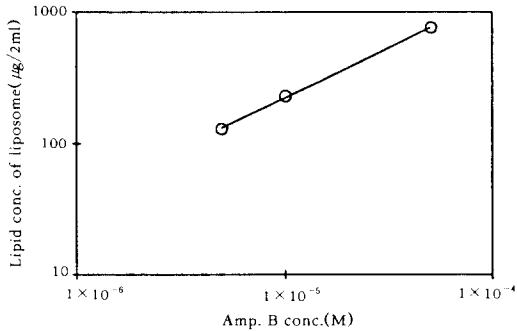


Fig. 2B. The liposomal lipid concentration required to reduce the Amp. B toxicity by 50%.

리포솜 종류에 따른 Amp. B의 독성 저하

Fig. 3은 서로 다른 방법에 의해서 제조된 리포솜이 Amp. B의 독성 저하에 미치는 영향을 측정함으로써 Amp. B 농도 $10^{-5}M$ 에서 SUV와 MLV를 이용하였을 때 독성 저하의 결과이다. SUV는 lipid 첨가량이 $100\mu g$ 이상일 때 독성이 현저히 낮아졌으며 MLV에서는 lipid 첨가량이 $500\mu g$ 일 때부터 독성이 현저히 감소하였다. 이는 SUV의 경우 lipid/Amp. B molar ratio가 6 정도에 해당하며 MLV의 경우에는 30 정도에 해당하는 값이다. 따라서 SUV의 경우 Amp. B 한 분자에 한하여 인지질 분자 6개가 또, MLV인 경우에는 인지질 분자 30개가 Amp. B의 독성을 90% 이상 낮추는데 요구됨을 알 수 있다. 일반적으로 MLV는 liposome의 제조시에 lipid film을 수용액에 단순 수화시켰을 때 형성되는 구조

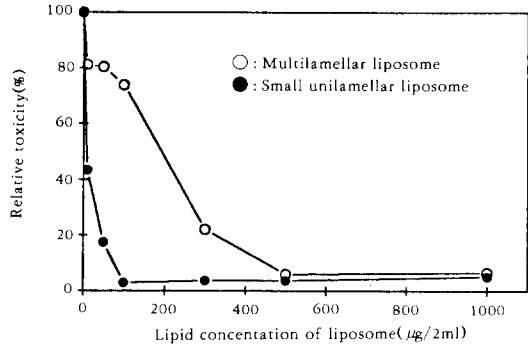


Fig. 3. The effect of liposomal lipid concentrations on the reduction of membrane toxicity of Amp. B. Two types of liposomes, MLV and SUV, were tested. The concentration of Amp. B is $10^{-5}M$.

로서 lipid의 이중막이 리포솜의 내부 수용액 부분을 중심으로 겹겹이 존재한다. 반대로 SUV는 MLV를 초음파 분쇄기를 이용해 파쇄한 형태로서 단일 이중막 형태를 이루고 있다. 따라서 같은 양의 lipid를 이용할 경우 Amp. B의 독성을 낮추는데 MLV에 비해 SUV가 상대적으로 더 넓은 표면적을 가지고 있기 때문에 Amp. B의 독성을 낮추는데 MLV보다 SUV가 효과적인 것으로 보여진다.

Fig. 4는 현재 임상적으로 사용되는 DOC와 Amp. B의 복합체인 Fungizone R과 liposomal Amp. B와의 세포독성을 비교한 것으로서 liposomal Amp. B는 고농도에서 독성이 월등히 적었으며 Amp. B의 농도가 $1 \times 10^{-4}M$ 까지 증가하여도 독성이 30% 이상 증가하지 않았다. Liposomal Amp. B가 항생효과를 같은 수준으로 유지하면서(Fig. 1 및 Fig. 6 참조) 독성을 낮추는 이유는 아직 확실하지는 않으나 다음과 같은 설명이 가능하다. 리포솜이 없을 경우 Amp. B는 Candida albicans의 ergosterol이나 적혈구의 cholesterol에 친화력에 따라 결합하게 되어 Candida에서는 항생효과로 나타나고 적혈구에서는 세포막 독성으로 나타나게 된다. 그러나 리포솜이라는 제3의 이중막이 존재할 경우 이들 사이에서 Amp. B가 재분배하게 되어 상대적으로 적혈구에 대한 독성은 줄어드나 리포솜보다는 ergosterol에 대한 친화력이 크므로 항생효과에 대해서는 큰 변화가 없는 것으로 보인다.

β -GL가 삽입된 리포솜의 제조

β -GL를 리포솜에 삽입시키기 위하여 β -GL에 소

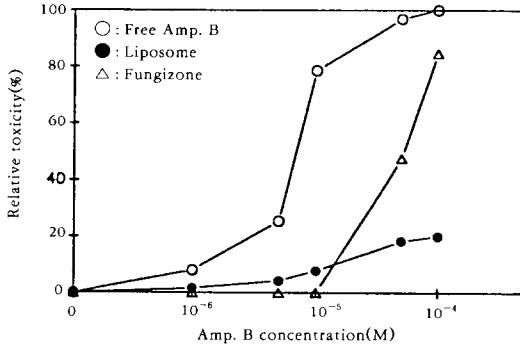


Fig. 4. The relative toxicity of the various Amp. B formulation on the membrane of red blood cell.

수성기인 palmitic acid를 부여하여야 하는데 이를 위하여 NHSP를 사용하였다. Table 1은 β -GL을 NHSP로 처리한 후 각 단계에서 효소의 잔존 활성도를 보여 주는 것으로 NHSP/ β -GL의 molar ratio를 100으로 하여 반응시켰을 때 반응 후 잔존활성은 75%였다. DOC를 제거하기 위하여 40시간 이상 투석한 결과 잔존활성은 71%였다. β -GL이 삽입된 리포솜을 만들기 위해서는 palmitoyl- β -GL과 lipid를 함께 gel filtration하면 되는데 Fig. 5는 Sepharose 6B를 이용하여 이들 두 혼합물을 gel filtration한 결과이다. P1이 590nm에서 측정된 리포솜 peak와 효소 활성이 일치하는 것으로 보아 enzyme coupled 리포솜이 만들어진 것으로 보이며 table 1에서 알 수 있듯이 리포솜 내에 삽입된 β -GL의 효소 활성은 초기 효소 활성도의 7.4% 정도였다.

β -Glucuronidase를 포함하는 Amp. B 리포솜의 항생효과

Amphotericin B를 갖고 있는 리포솜이 표적세포

Table 1. The change of β -Glucuronidase activity during the preparation of β -Glucuronidase coupled liposome.

	Remaining enzyme activity(%)
Original enzyme solution	100
After NHSP reaction	75.4
After dialysis	71.0
Peak 1*	7.4
Peak 2	9.8
Peak 3	15.6

* See Fig. 5

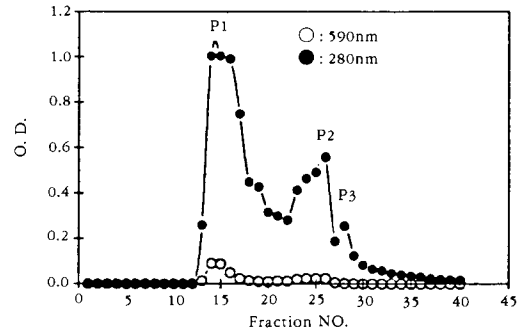


Fig. 5. The separation of enzyme coupled liposome from free enzyme and lipid mixture by gel chromatography using Sepharose 5B.

와 결합할 경우 상승된 약리작용을 갖는지의 여부를 조사하기 위하여 β -Glucuronidase로 표면이 수식된 Amp. B 리포솜이 *Candida albicans*에 대하여 갖는 성장저해효과에 대하여 조사하였다. Fig. 4에 의하면 Fungizone은 비교적 낮은 독성을 보여 주었으나 Fig. 6에서 알 수 있듯이 동시에 항생효과도 낮게 나타났다. Glucuronidase-Amp. B 리포솜은 효소가 없는 Amp. B 리포솜이나 free Amp. B에 비해 약간 향상된 저해효과를 나타냈으나 그 효과가 그리 크지는 않았다. 이는 PC 리포솜이 Glucuronidase에 의해 *Candida*와 결합하더라도 약물전달은 여전히 PC 리포솜의 이중막과 *Candida*의 세포막(Ergosterol) 사이의 분배계수에 의해 결정된다는 것을 나타내고 있다. 즉 Amp. B는 ergosterol > cholesterol > phospholipid의 순으로 선택성을 나타내므로 리포솜이 표적세포와 결합하면 리포솜 내의 Amp. B가 *Candida*의 세포벽으로 이동, 전달되기는 하겠지만 두 이중막 사이의 분배계수 이상으로 전달되지는 않는다는 것이다. 따라서 리포솜이 *Candida*와 결합하여 증가된 약물전달현상을 보이기 위해서는 결합후 내부의 약물을 모두 방출하는(PE로 만들어진) 표적 과민성 리포솜과 같은 것을 이용하는 편이 유리 할 것이고, 또 약물도 Amp. B와 같이 양 친매성을 가진 것보다는 리포솜이 변형된 후 수용액 내로 쉽게 방출될 수 있는 수용성 약물이 선택되어져야 소기의 목적을 달성할 수 있을 것으로 보여진다. 이상의 결과로 보아 리포솜을 이용할 경우 Amp. B의 세포막 독성을 현저히 감소시킬 수 있고 *Candida*에 대한 항생효과도 그대로 유지할 수 있으나

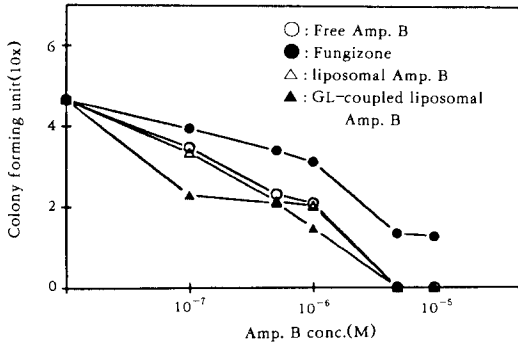


Fig. 6. The antibiotic effect of the GL-coupled liposomal Amp. B on the growth of *Candida albicans*.

*Candida*의 세포벽과 결합할 수 있는 효소를 리포솜 표면에 삽입하더라도 약물전달의 상승효과는 나타나지 않았다.

요 약

Amp. B의 세포막 독성을 낮추기 위하여 egg phosphatidylcholine를 사용한 리포솜체를 이용하였다. 리포솜에 포획된 Amp. B는 *Candida albicans*에 대해 free drug보다 향상되거나 동일한 항생효과를 가지면서도 동시에 적혈구에 대한 세포막 독성은 현저히 감소된 것으로 나타났다. 이러한 현상은 *Candida albicans*의 ergosterol이나 적혈구의 cholesterol 사이에 리포솜이라는 제3의 이중막이 존재할 경우 이들 사이에서 Amp. B가 재분배하게 되어 상대적으로 적혈구에 대한 독성은 줄어든다 리포솜보다는 ergosterol에 대한 친화력이 크므로 항생효과의 면에서는 큰 변화가 없는 것으로 보인다. *Candida*의 세포벽과 결합할 수 있는 효소를 리포솜 표면

에 삽입하기 위하여 β -glucuronidase를 이용하였으나 약물전달의 상승효과는 크게 나타나지 않았다.

감 사

본 연구는 한국과학재단의 1992년도 목적기초 연구비의 지원으로 수행된 것이며 지원에 대하여 감사드립니다.

참고문헌

1. Marsh(1984), *Biochem. J.*, **218**, 1.
2. H. Ringsdorf, B. Schlarb and J. Venzmer (1988), *Angewandte Chemie*, **27**, 113.
3. Wayne E. Magee(1985), *The Journal of Infectious Disease*, **145**, 748.
4. R. Juliano(1983), *The Journal of Infectious Disease*, **147**, 939.
5. R. Mehta and K. Mills(1984), *Biochemica et Biophysica Acta*, **770**, 230.
6. M. K. R. Chowdhry(1981), *J. Applied Bacteriology*, **51**, 223.
7. Christine E. Swenson(1990), *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **34**, 235.
8. E. F. Gale, Alison M. Johnson, D. Kerridge and T. Y. Koh(1975), *J. General of Microbiology*, **87**, 20.
9. Leaf Huang(1980), *The Journal of Biological Chemistry*, **255**, 8015.
10. Gregory Gregoriadis(1985), *Liposome Technique*, **1**, 29.
11. Soitic Jullien(1990), *Biochimica et Biophysica Acta*, **1021**, 39.