

## Micelle, Liposome, Polyethylene Glycol을 이용한 Amphotericin B의 세포막 독성저하

박인철 · 이판종 · 양지원<sup>1</sup> · 김종득<sup>1</sup> · 최태부\*  
건국대학교 공과대학 미생물공학과, <sup>1</sup>한국과학기술원 화학공학과

## Reduction of Cell Membrane Toxicity of Amphotericin B Using Micelle, Liposome and Polyethylene Glycol

Park, In-Chul, Pan-Jong Lee, Ji-Won Yang<sup>1</sup>,  
Jong-Deuk Kim<sup>1</sup> and Tae-Boo Choe\*

Department of Microbial Engineering, Kon-Kuk University,  
Seongdong-gu 93-1 Seoul 133-701, Korea  
<sup>1</sup>Department of Chemical Engineering, KAIST

**Abstract** — Micelle, liposome and polyethylene glycol(PEG) were employed to reduce the cell membrane toxicity of Amphotericin B(Amp. B). Cholesterol-sulfate which can form a mixed micelle with Amp. B molecules was found very effective for the reduction of Amp. B toxicity. 0.01% of cholesterol-sulfate could reduce the toxicity of  $5 \times 10^{-6}$  M Amp. B by 90%. The required concentration of cholesterol-sulfate for the toxicity reduction was proportionally increased with increasing Amp. B concentration. PEG was also effective on the reduction of Amp. B toxicity. 2% PEG was required for the reduction of toxicity by 50%, regardless of Amp. B concentration. The liposome system showed an effective reduction of Amp. B toxicity on RBC, maintaining the antibiotic effect on *Candida albicans* as free drugs. This seems to be due to the fact that liposome bilayer plays a role of buffer system between ergosterol of fungi cell membrane and cholesterol of red blood cell membrane, which leads the redistribution of Amp. B between them, as the result, the reduction of drug toxicity on cell membrane.

진균에 의한 전신적 감염은 감염균에 따라 크게 두 종류로 나뉘지는데 그 하나는 지형학적으로 매우 다양하고 상대적으로 감염율이 적은 blastomycosis, histoplasmosis, coccidioidomycosis 등이 있으며, 다른 하나는 기회적으로 감염을 일으키는 candidiasis, aspergillosis, cryptococcosis, phycomycosis 등이 있다. 현재 AIDS의 이차 감염 또는 면역체계가 약화된 사람에 있어서 기회적·전신적으로 감염하여 사망을 일으키는 주 원인균으로는 *Candida albicans*가 있다. 이 진균에 의한 감염치료는 일반적으로 Amphotericin B (Amp. B)를 사용하고 있다. Amp. B는 구조적으로 한쪽에 이중결합을 4-7개 정도 가지는 소수성기와 다른 한쪽 부분에 친수성기인 hydroxyl기를 많이 가지는 양친성(amphiphilic) 물질로 polyene계에 속하는

항생물질이다(1). 이 항진균제는 진균의 세포막에 존재하는 ergosterol에 가역적으로 부착하여 양이온의 세포막에 대한 투과성을 증가시켜 궁극적으로 세포 내의 환경을 변화시킴으로써 진균에 대해 항생효과를 나타낸다(2,3). 따라서 Amp. B의 효과는 penicillin과 같은 항생물질과는 달리 세포의 성장을 요구하지 않을 뿐 아니라, protozoa, algae에서도 효과를 나타낸다. 그러나 박테리아에 대해서는 전혀 효과를 나타내지 않는다. 이는 박테리아 세포막에는 스테롤이 존재하지 않기 때문이다. 이러한 특징을 가지는 Amp. B는 물에 녹지 않으므로 임상적으로는 계면 활성제인 sodium deoxycholic acid(DOC)와 혼합하여 5% dextrose와 함께 colloid 상태로 사용하고 있다. 그러나 Amp. B는 진균에 존재하는 ergosterol 뿐만 아니라 사람 체세포의 세포막에 존재하는 cholesterol과도 결합할 수 있기 때문에 세포막에 높은 독성을 나타낸다(4,5). 따라서 Amp. B가 가장 유력한 항진균제임에도 불구하고

**Key words:** Liposome, polyethylene glycol, amphotericin B, toxicity  
\*Corresponding author

하고 사용이 제한되어 있는 것은 바로 이러한 이유에서이다. 현재 Amp. B의 독성을 줄이기 위하여 활발히 시도되고 있는 연구중 하나가 liposome의 사용이다(6-8). 그러나 liposome 자체가 아직까지는 불안정한 system으로 생체내 투여시 Reticuloendothelial system에 의한 과다한 축적작용 등으로 약물에 혼합하여 쓰기에는 몇가지 문제점을 지니고 있다.

본 연구에서는 Amp. B에 DOC를 혼합하여 시판하고 있는 Fungizone<sup>®</sup>과는 달리 약물의 항생효과를 그대로 유지한 채 독성을 감소시키는 방법을 연구하기 위하여 cholesterol-sulfate를 이용한 mixed micell, 인지질을 이용한 liposome system, 그리고 약물과 세포막 사이에 어떠한 경계를 만드는 것으로 보이는 polyethylene glycol(PEG)을 이용하여 Amp. B의 적혈구에 대한 독성감소 효과를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### Amp. B와 cholesterol-sulfate의 mixed micelle 제조

PBS 1 ml에 cholesterol-sulfate 혹은 DOC를 0.1% 되게 녹인 후 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹아 있는 Amp. B 2 mg을 첨가하여 이것을 stock solution으로 하여 실험에 사용하였다. Amp. B를 DMSO에 녹이지 않고 직접 첨가할 경우에는 녹지 않은 상태가 되며 이는 bead와 함께 vortexing 하여 colloid 상태로 만든 후 stock solution으로 사용하였다.

### PEG와 Amp. B의 혼합용액의 제조

PBS에 실험하고자 하는 양(%)의 PEG와 적당한 양의 Amp. B를 첨가하여 최종 volume이 1 ml이 되도록 조절하여 사용하였다.

### Liposomal Amp. B의 제조

Chloroform에 녹아 있는 0.03 mM의 egg yolk phospholipid를 N<sub>2</sub> gas의 감압하에 50°C에서 15분 동안 증발시켜 round bottle에 인지질 필름을 만들었다. 이 인지질 필름의 미세 유기용매를 제거하기 위하여 다시 1시간 동안 감압하에 방치한 후 2 ml의 PBS를 첨가하여 3분 동안 bead와 함께 vortexing 하여 인지질 필름을 수화시켰다. 이렇게 수화된 인지질 용액을 sonication을 한 후 일정량의 Amp. B를 첨가하여 30°C에서 1시간 반응시켜 liposomal Amp. B를 제조하였다(9, 10).

### Fungi에 대한 Amp. B의 효과 측정

Fungi는 *Candida albicans* KCTC 1940을 사용하였으며, 각 농도의 liposomal 또는 mixed micelle Amp. B를 1 ml의 YM broth에 있는 일정수의 fungi (약 10<sup>5</sup>)와 혼합하여 30°C에서 1시간 배양한 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<sup>8</sup>/ml이 되게 PBS로 희석한 1 ml에 측정하고자 하는 약물 system이 포함되어 있는 1 ml을 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응을 시킨 후 2500 rpm에서 원심분리하여 얻어진 상등액을 560 nm에서 RBC로부터 방출된 hemoglobin의 양을 측정하여 Amp. B에 대한 세포막 독성을 측정하였다.

Relative toxicity는 아래의 식에 의하여 구하였다.

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

con<sub>1</sub>: RBC 전체를 lysis 하여 방출된 hemoglobin의 양

con<sub>2</sub>: 약물의 처리 없이 1시간 incubation 후에 방출된 hemoglobin의 양

sample: 약물 처리 후에 방출된 hemoglobin의 양

## 결과 및 고찰

Cholesterol-sulfate를 이용한 Amp. B의 독성저하 Fig. 1은 Amp. B를 DOC나 cholesterol-sulfate와 함께 mixed micelle을 만들 때 여러 농도에서 측정한 Amp. B의 RBC에 대한 독성을 나타낸 것이다. 0.01%의 DOC와 mixed micell을 만들 경우가 가장 독성이

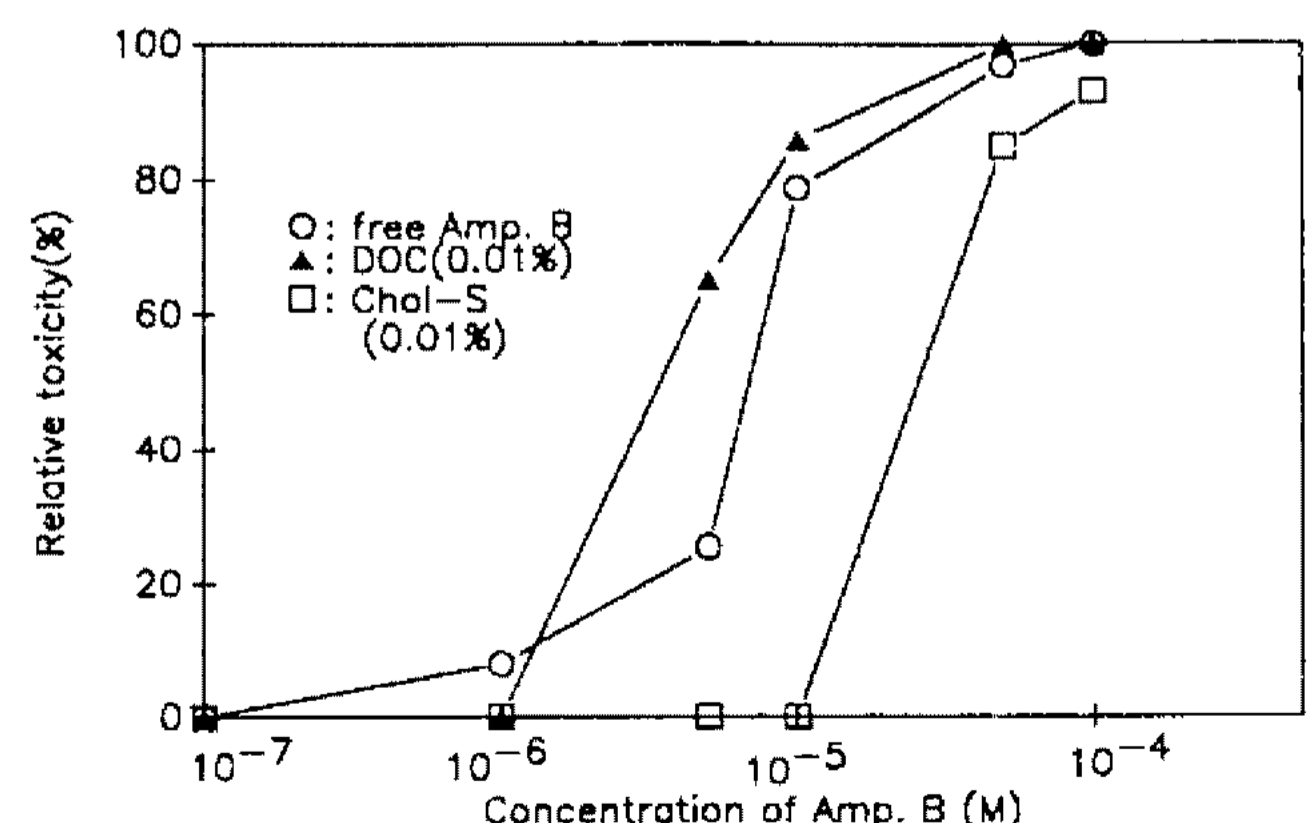


Fig. 1. The change of relative toxicity of Amp. B mixed with cholesterol-sulfate or deoxycholate.

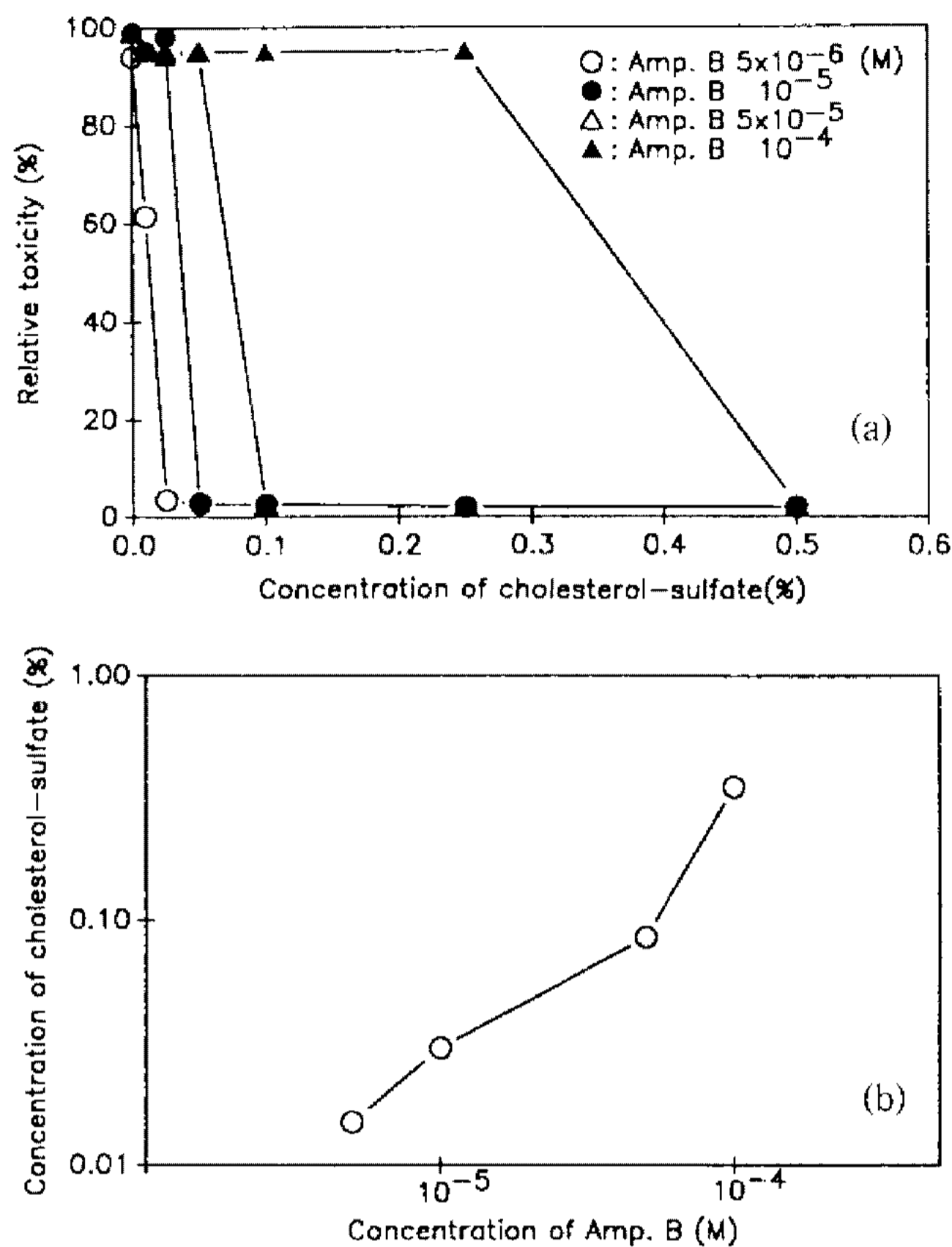


Fig. 2. (A) Reduction of Amp. B toxicity using cholesterol-sulfate at various Amp. B concentrations. (B) The concentration of cholesterol-sulfate required for the reduction of Amp. B toxicity by 50%.

높고 그 다음 free Amp. B(DMSO)이고, 0.01% cholesterol-sulfate와 mixed micelle을 만들 경우에는 Amp. B 농도가  $10^{-5}$  M이 될 때까지 전혀 독성이 나타나지 않았다. Amp. B를 수용액에 용해시키기 위하여 사용되는 DMSO는 그 농도가 2.5%(V/V) 이상에서부터 RBC에 대한 독성을 나타내기 시작하였으므로 이 농도 이하에서 사용할 경우 별 다른 문제점이 없었다. Fig. 2(A)는 여러 Amp. B 농도에서 cholesterol-sulfate의 농도를 증가시켰을 때 나타나는 독성의 감소 현상을 나타낸 것으로 *Candida*에 대한 Amp. B의 MIC 농도가 약  $10^{-5}$  M이므로 이 농도에서 약물의 독성을 거의 제거하는데 필요한 cholesterol-sulfate의 농도는 0.1% 이하임을 알 수 있다. Fig. 2(B)는 각 Amp. B 농도에서 독성을 50% 저하시키는데 요구되어지는 cholesterol-sulfate의 농도를 나타낸 그림으로 Amp. B의 농도가 증가할수록 cholesterol-sulfate의 농도도 비례적으로 요구되어짐을 알 수 있는데 이는 Amp. B의 독성을 낮추기 위해 cholesterol-sulfate와 Amp. B가 일종의 mixed micelle을 형성하여야 하기 때문일 것이다. 즉 Amp. B의 독성을 50%

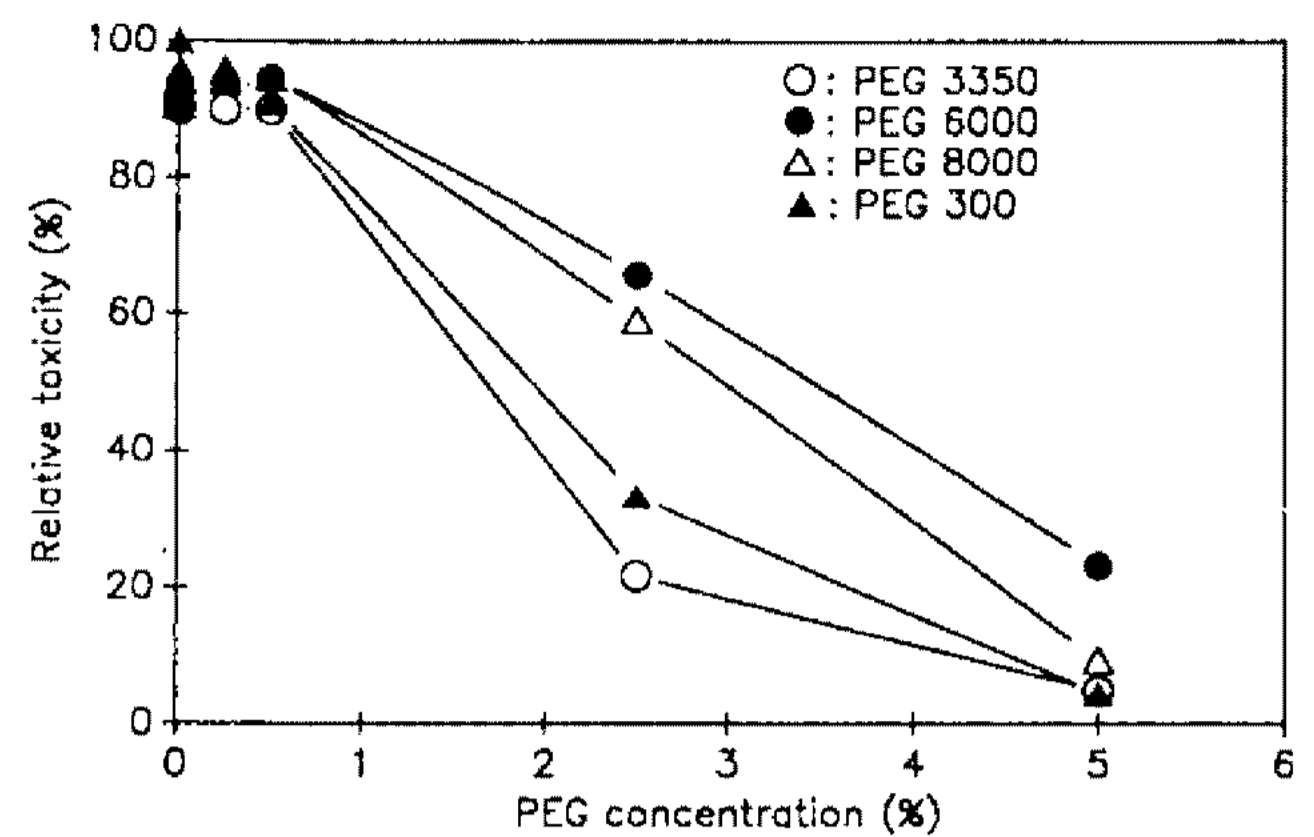


Fig. 3. Reduction of Amp. B toxicity using various molecular weight of PEG's. The concentration of Amp. B is  $1 \times 10^{-5}$  M.

낮추는 데에는 Amp. B  $1 \mu\text{M}$  당 약 0.002%의 cholesterol-sulfate가 요구되어지는 것으로 보여진다. 이는 Amp. B 분자 1개당 약 47개의 cholesterol-sulfate 분자가 필요한 양이다. 이상의 결과로 보아 cholesterol-sulfate가 Amp. B의 세포막 독성을 저하시키는데 매우 효과적임을 알 수 있었으며 여기에 나타나지 않았으나 cholesterol-sulfate 자체가 세포막에 미치는 독성은 0.2%까지는 미미한 결과를 얻었다.

#### PEG를 이용한 Amp. B의 독성 저하

Fig. 3은 여러 종류의 분자량을 가지는 PEG를 Amp. B와 함께 혼합시켰을 때 Amp. B의 적혈구에 대한 독성 감소현상을 나타낸 것이다. PEG는 고체상태로 존재하는 분자량이 큰 것(3000 이상)과 액체상태로 존재하는 분자량이 작은 것(1000 이하)을 이용하였을 때 분자량이 큰 것 중에서는 PEG 3,350이, 작은 것에는 PEG 300이 가장 효과적이었다. Amp. B 농도  $1 \times 10^{-5}$  M에서 PEG 300과 3,350의 농도가 1% 이상일 때부터 독성이 낮아지기 시작하여 2.5%에서는 약 50%, 5%에서는 거의 독성이 나타나지 않았다.

Fig. 4(A)는 Amp. B의 농도를  $5 \times 10^{-6}$  M에서  $1 \times 10^{-4}$ 까지 증가시키면서 PEG 3,350에 의한 독성감소 효과를 측정하여 Amp. B의 농도에 상관없이 모두 PEG 3350 농도 2% 정도에서 독성이 50% 감소하였으며 PEG 농도 5% 이상에서는 독성이 90% 이상 감소하였다. Fig. 4(B)는 여러 Amp. B 농도에서 독성이 50% 감소한 지점의 PEG의 농도를 나타낸 것으로 Amp. B 농도와 관계없이 모두 2%의 PEG에서 50%의 독성이 감소함을 보여주고 있다. 이러한 현상은 cholesterol-sulfate의 경우처럼 Amp. B가 mixed micelle을 형성하여 독성이 감소하는 것이 아니고 PEG 분자들이 일정한 농도가 되면 일종의 울타리를

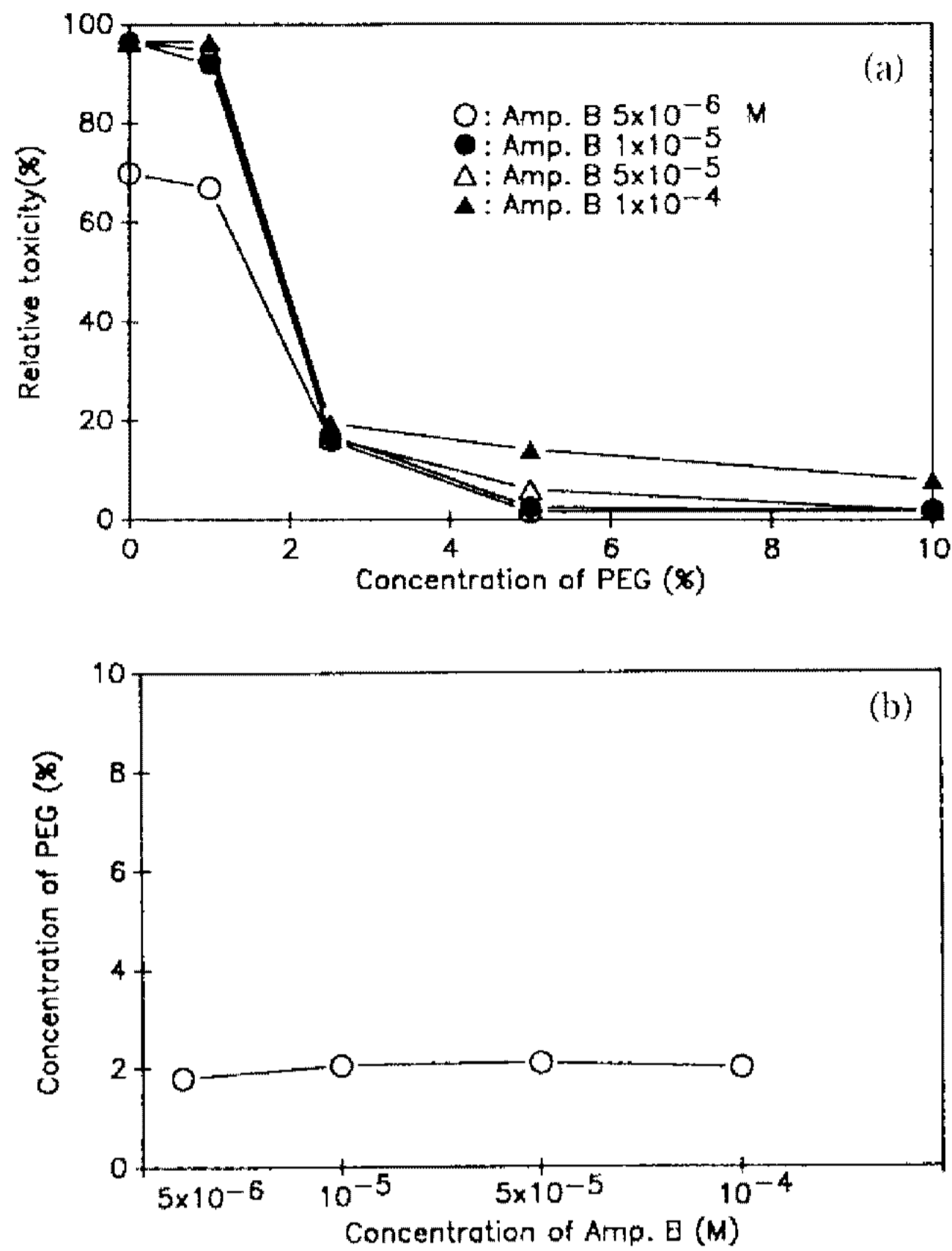


Fig. 4. (A) Reduction of Amp. B toxicity using PEG 3350 at various Amp. B concentrations. (B) The concentration of PEG 3350 required for the reduction of Amp. B toxicity by 50%.

만들어 물질 상호간에 확산을 제한시킴으로 독성을 감소시킨 것으로 보인다. 즉, Amp. B와 적혈구 사이에서 PEG라는 분자가 존재함으로써 Amp. B의 적혈구로의 확산을 저지함으로써 독성감소라는 효과가 나타날 수 있다는 것이다. 이러한 기작으로 볼 때, cholesterol-sulfate-Amp. B mixed micelle은 주사제로 사용하여도 혈액중에서 독성저하 효과를 얻을 수 있지만 PEG를 사용한 Amp. B를 주사제로 사용하면 혈액내에서 쉽게 PEG가 확산되어 Amp. B의 독성을 낮추기 위해 필요한 절대 농도 즉, 2.5% 이상을 유지하지 못하기 때문에 PEG의 사용은 무효화된다. 따라서 Amp. B에 PEG의 사용은 주사제보다는 체외용 치료제로서 적당하다고 생각된다.

**Liposome system을 이용한 Amp. B의 독성 저하**

Fig. 5(A)는 여러 Amp. B 농도에서 liposome을 첨가하였을 때 RBC에 대한 독성감소 현상을 나타낸 것이다. 독성을 90% 이상 감소시키기 위하여 5x10<sup>-6</sup> M의 Amp. B에서는 300 µg, 1x10<sup>-5</sup> M에서는 500 µg,

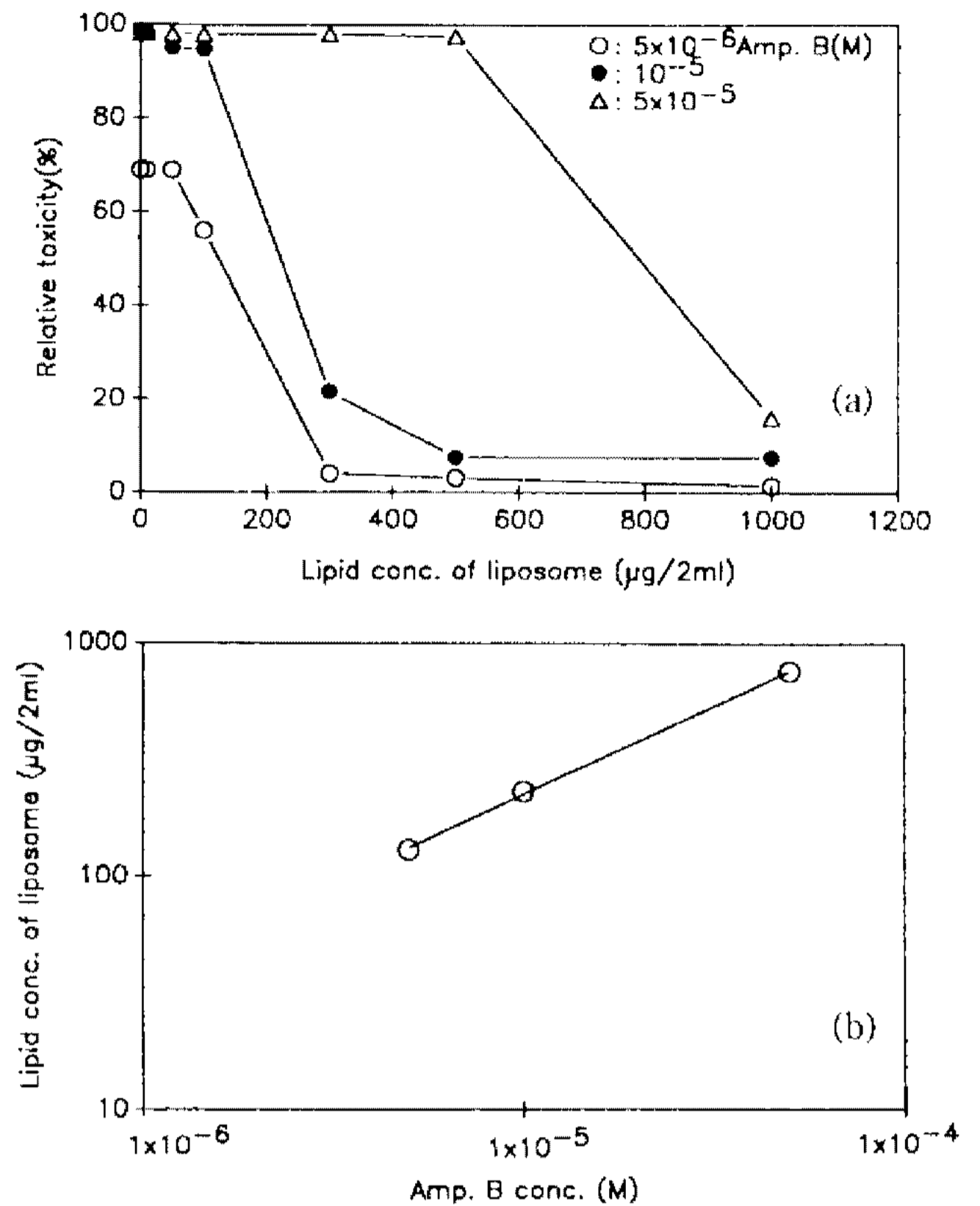


Fig. 5. (A) The effect of liposomal lipid concentration on the reduction of Amp. B toxicity at the various Amp. B concentrations. (B) The liposomal lipid concentration required to reduce the Amp. B toxicity by 50%.

5x10<sup>-5</sup> M에서는 1,000 µg의 liposomal lipid가 요구되었다. 이러한 결과로부터 리포솜을 이용할 경우 Amp. B의 적혈구에 대한 세포막 독성을 현저히 저하시킬 수 있고 필요한 리포솜의 농도는 약물 농도에 비례한다는 것을 알 수 있다. Fig. 5(B)는 각각의 Amp. B의 농도에서 50%의 독성 저하를 위해 필요로 하는 liposomal lipid의 농도를 다시 나타낸 것으로 Amp. B의 독성 저하에 필요한 liposomal lipid의 농도는 Amp. B의 농도에 따라 비례하며 Amp. B 1 µM 당 약 20 µg의 lipid가 필요한 것으로 보인다. Fig. 6은 Amp. B 농도 10<sup>-5</sup> M에서 SUV(small unilamellar vesicle)와 MLV(multilamellar vesicle) 형태의 리포솜을 이용하였을 때 Amp. B의 독성 저하에 미치는 영향을 측정된 결과이다. SUV는 lipid 첨가량이 100 µg 이상일 때 독성이 현저히 낮아졌으며 MLV에서는 lipid 첨가량이 500 µg일 때부터 독성이 현저히 감소하였다. 이는 SUV의 경우 lipid/Amp. B molar ratio가 6 정도에 해당하며 MLV의 경우에는 30 정도에 해당하는 값이다. 따라서 MLV의 경우 Amp. B 한 분자에 한하여 인지질 분자 6개가 또, MLV인 경우에는 인지질 분자 30개가 Amp. B의 독성을 낮추는데 요구됨을

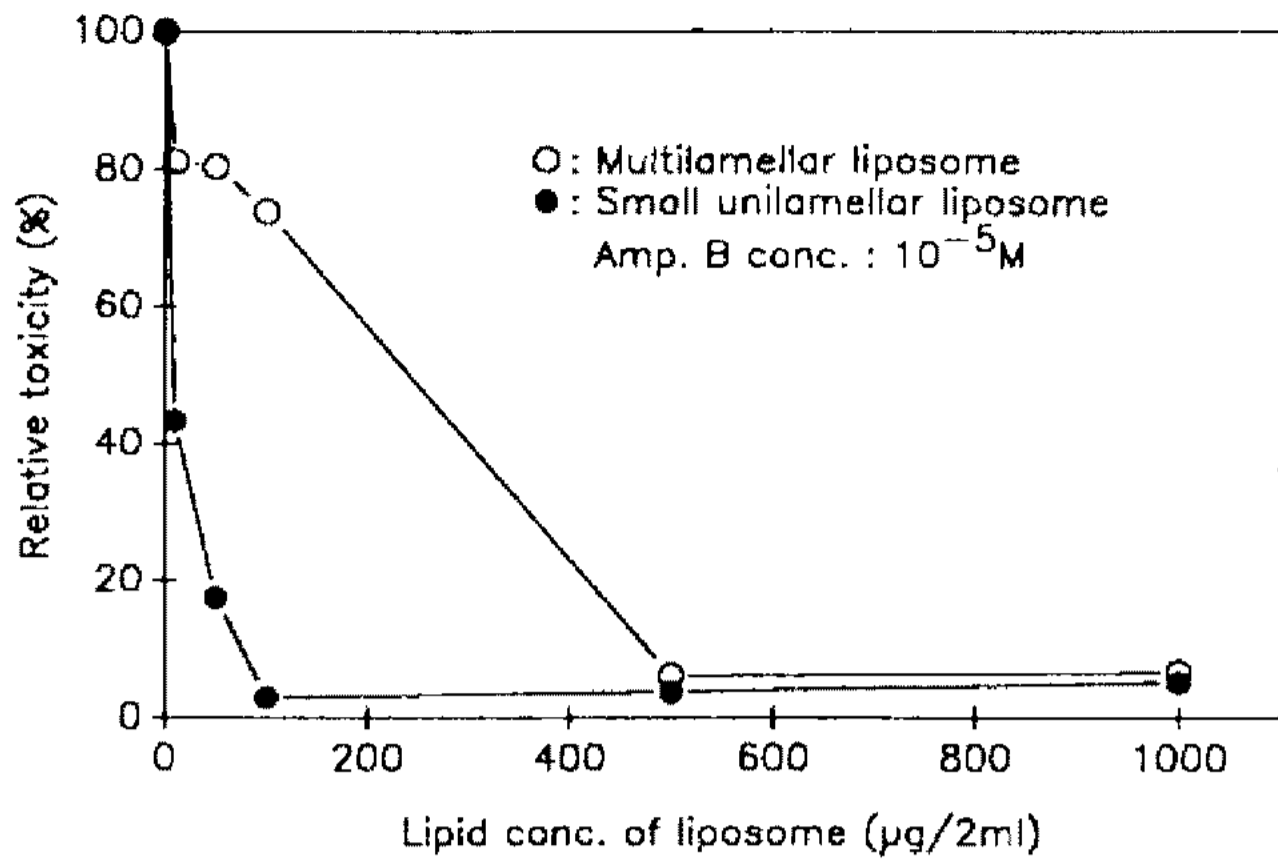


Fig. 6. The effect of liposomal lipid concentration on the reduction of Amp. B toxicity. Two types of liposome, MLV and SUV, were tested.

알 수 있다. 일반적으로 MLV는 liposome의 제조시에 인지질 필름을 수용액에 단순 수화시켰을 때 형성되는 구조로서 lipid 이중막이 liposome의 내부 수용액 부분을 중심으로 겹겹이 존재한다. 반대로 SUV는 MLV를 초음파 분쇄기를 이용해 파쇄한 형태로서 단일 이중막 형태를 취하고 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 효과적으로 보여진다.

**Amp. B에 의한 *Candida albicans*의 생육 저지효과 비교**

Amp. B를 여러가지 물질과 혼합하여 RBC에 대한 독성을 감소시킬 수 있음을 확인하였으므로 이제 이들에 대한 항생효과를 조사하였다. 왜냐하면 Amp. B의 독성저하와 함께 진균에 대한 항생효과도 같이 감소한다면 이들 혼합물이 보여주는 독성저하 효과가 별 의미를 갖지 못하기 때문이다.

Fig. 7은 여러가지 혼합물에서 Amp. B의 *Candida albicans*에 대한 항생 효과를 비교한 것이다. Liposome의 경우 DMSO에 녹인 free Amp. B보다 항생 효과가 약간 더 우수하거나 거의 같은 것으로 나타났으며 Fungizone<sup>R</sup>의 경우에 가장 효과가 낮은 것으로 나타났다. Liposomal Amp. B가 항생효과를 같은 수준으로 유지하면서 독성을 낮추는 이유는 아직 확실하지는 않으나 다음과 같은 설명이 가능하다. Liposome이 없을 경우 Amp. B는 *Candida albicans*의 ergosterol이나 적혈구의 cholesterol에 친화력에 따라 결합하게 되어 *Candida*.에서는 항생효과로 나타나고 적혈구에서는 세포막 독성으로 나타나게 된다. 그러나 liposome이라는 제 3의 이중막이 존재할 경우 이들

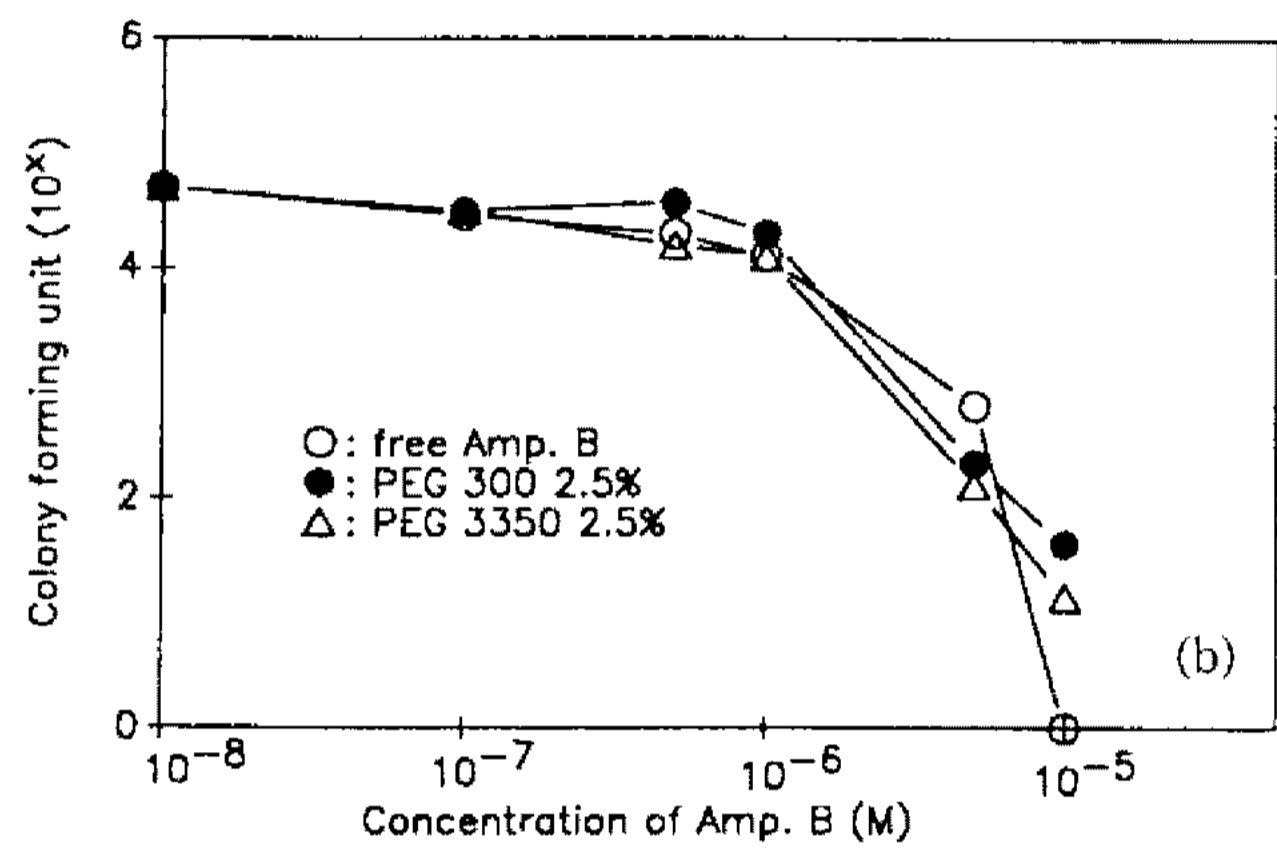
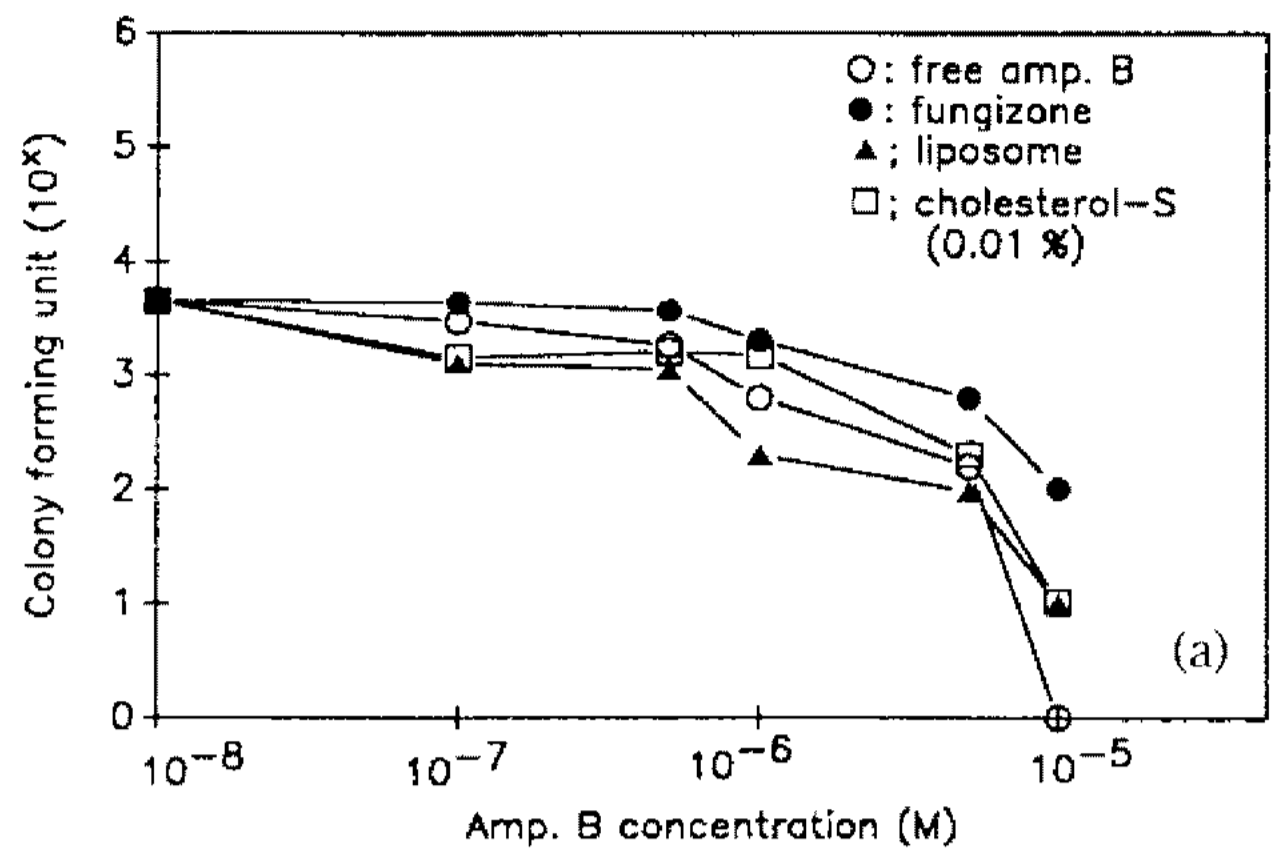


Fig. 7. (A) The antibiotic effect of various Amp. B mixture on the growth of *Candida albicans*. (B) The antibiotic effect of Amp. B mixed with PEG 3350 or 300 on the growth of *Candida albicans*.

사이에서 Amp. B가 재분배하게 되어 상대적으로 적혈구에 대한 독성은 줄어드나 liposome보다는 ergosterol에 대한 친화력이 크므로 항생효과에 대해서는 큰 변화가 없는 것으로 보인다. Cholesterol-sulfate나 PEG는 Amp. B의 농도가 낮을 경우 free Amp. B와 비슷한 항생 효과를 나타냈지만 높은 농도의 Amp. B에 있어서는 항생 효과가 약간 낮아지는 경향을 보였다.

결론적으로 liposome system을 사용하는 것이 Amp. B의 농도에 상관 없이 항생 효과의 유지뿐만 아니라 현저히 낮은 독성을 보였으므로 가장 좋은 혼합물인 것으로 생각되며 mixed micelle system이나 PEG의 사용은 Amp. B의 농도가 10<sup>-5</sup> M 이하에서 효과가 우수한 것으로 판단된다.

**요 약**

Amp. B의 세포막 독성을 낮추기 위하여 mixed micelle, PEG, liposome의 세 system을 이용하였다. Cholesterol-sulfate와 Amp. B의 mixed micelle은



Amp. B의 적혈구 세포막에 대한 독성을 낮추는데 매우 효과적이었다. 0.01%의 cholestrol-sulfate는  $5 \times 10^{-6}$ 의 Amp. B의 독성을 90%까지 낮추었으며 높은 농도의 Amp. B에서는 비례적으로 높은 농도의 cholestrol-sulfate가 요구되었다. 이에 반해 PEG는 Amp. B의 농도에는 상관 없이 50%의 독성을 낮추는데 2%의 PEG가 필요하였다. 이는 PEG가 Amp. B와 친화력이 존재하여 효과가 나타났다가 보다는 PEG가 Amp. B의 확산을 방해하여 나타난 결과로 판단된다. Liposome system에서는 Amp. B의 항생효과를 그대로 유지하면서도 적혈구에 대한 세포막 독성을 현저히 감소시켰다. 이는 liposome 이중막이 fungi(*Candida albicans*)의 세포막에 존재하는 ergosterol과 적혈구의 세포막에 존재하는 cholesterol 사이에서 약물의 재분배를 유도하였기 때문에 나타난 현상으로 판단된다.

### 감사의 말

본 연구는 한국과학재단의 1992년도 목적기초연구비의 지원으로 수행된 것이며 지원에 대해 감사드립니다.

### 참고문헌

1. Hamillton, J.H.T. and Miller. 1973. Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics.

- Bact. Rev.* **37**: 166-172.
2. Kinsky, S.C. 1970. Antibiotic interaction with model membrane. *Ann. Rev. Pharmacol.* **119**: 10-30.
3. Holtz, R.W. 1979. *Antibiotics*, Pp. 313-340. 2nd ed. Springer-Verlag, Berlin.
4. Seaberg, J.H. and H.E. Dascomb. 1960. Experience with amphotericin B. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **202**: 89-93.
5. Wilson, R. and S. Feldman. 1979. Toxicity of Amphotericin B in Children with Cancer. *Am. J. Dis. Child.* **731**: 133-137.
6. Keryn J.C., M.B. Edward, W.M.G. Jonathan, and A. Donard. 1985. Distribution and activity of amphotericin B in human. *The J. Infectious Disease* **152**: 1037-1043.
7. Hideo Y., S.K. George, and T. Hisashi. 1991. *Recent progress in antifungal chemotherapy*, Pp. 283-292. Marcel Dekker, Ins.
8. Claude T., B. Michael, F. Cynthia, and S. Francis. 1984. Efficacy of liposome-intercalated amphotericin B in the treatment of systemic candidiasis in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **26**: 170-173.
9. Gregory G. 1984. Liposome technique. *CRC Press. Inc.* **1**: 29-37.
10. Soitic J. 1990. The affinity of amphotericin B to lipid bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta* **1021**: 39-45.

(Received March 31, 1994)