

표적 민감성 리포솜의 제조와 약물 방출

양진모 · 양지원 · 김종득 · 최태부
건국대학교 미생물 공학과, *한국과학기술원 화학공학과

Preparation and Destabilization of Target-Sensitive Liposomes

Jin-Mo Yang, Ji-Won Yang*, Jong-Duk Kim* and Tae-Boo Choe[†]

Department of Microbial Engineering, Konkuk University, 93-1 Mojin-dong, Seoul 133-701, Korea

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

ABSTRACT

Target-sensitive(TG-S) liposomes, which have the antibodies coupled on the surface of liposome and can release their entrapped contents by the binding of antibodies with the specific target cells, were prepared and employed to study the release of calcein and the selective delivery of an anticancer agent, doxorubicin(DOX). The monoclonal antibody, Y3, used for the preparation of the TG-S liposome was one against major histocompatibility complex class 1 of mouse(MHC1, H-2K^b type) and the target cells were EL-4 and RMA, which have the MHC1, H-2K^b type on their membrane surfacem. The release of calcein from TG-S liposome occurred when the target cells were contacted with liposomes and it was proportionally increased with the rise of binding capacity of antibody coupled on the surface of liposome to the target cells. The experimental results of drug delivery were similar to the cases of calcein release. The viability of specific target cell, EL-4 with liposomal DOX was not so different from that with the free DOX, while for the non-specific target cell, Yac1(H-2Kⁱ), the cell viability with liposomal DOX was much higher than that with free DOX. This shows the fact that the liposomal DOX can be efficiently delivered to the specific target cells, while it was not the case for the non-specific target cells. And the drug delivery was inhibited when the free antibody of Y3 was added in the contact process between EL-4 and TG-S liposomes, which means the drug delivery occurred mainly by the destabilization of TG-S liposomes. From these results, we could conclude that the selective drug delivery to specific target cell using the TG-S liposome would be feasible.

서론

리포솜의 표면에 항체를 부착한 면역 리포솜(immunoliposome)은 특정한 표적세포에만 약물을 전달할 수 있는 선택적 약물전달 시스템으로 개발되어져 왔다. 그러나 리포솜이 표적세포와 결합한 후

에도 리포솜으로부터 약물 방출이 원활하지 않아 면역 리포솜을 이용한 약물 전달은 그 효율이 기대에 미치지 못하는 결과를 가져왔다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 L. Huang 그룹(1-5)은 리포솜이 특정 표적세포와 결합한 후 스스로 와해되면서 내부에 포집된 약물이 방출되는 표적 민감성 리포솜을 제조하였다. 이러한 리포솜을 제조하기 위해서는 인

[†] Corresponding Author

재료 및 방법

인지질 및 시약

Di-oleoylphosphatidylethanolamine (DOPE), dioleoylphosphatidic acid(DOPA), dipalmitoyl-phosphatidylcholine(PC), calcein, sodium deoxycholic acid(DOC), N-hydroxysuccinimide ester of palmitic acid (NHSP), 7-chloro-4-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazole(NBD chloride), 2, 3-bis [2-methoxy-4-nitro-5-sulfohyphenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt(XTT), 등은 Sigma사에서 구입하였고 항암제 doxorubicin(DOX) hydrochloride는 Pharmachemie B. V. (Holland)에서 구입하여 사용하였다.

항체

실험에 사용된 항체는 단일클론 항체 Y3 (IgG_{2b}, anti-major histocompatibility complex class 1 of mouse, anti-H-2K^b)를 생산하는 하이브리도마(ATCC HB176)를 생명공학연구소로부터 분양받아 무혈청 배지에서 배양한 뒤 정제하여 실험에 사용하였다. 즉 무혈청 배지(IMDM/F12 : 1/1 supplemented with insulin 10 µg/ml, transferrin 100 µg/ml, ethanolamine 100 µM and selenium 100nM) 1L로 1주간 유가식 배양한 후 hollow fiber(Microgon, U.S.A., M.W.C.O. 50,000)를 이용하여 diafiltration하고 약 10배 농축한 후, protein purification system(Millipore, U.S.A., ConSep LC100)에서 DEAE-ion exchange prepacked column (Millipore, 1010) chromatography를 이용하여 정제하였다. 항체의 농도는 single radial immunodiffusion(SRID) 법으로 측정하였으며 농도를 1.5mg/ml로 조절한 뒤 냉동보관하여 사용하였다. 항체를 인지질 막 사이에 끼워 넣기 위해서는 먼저 항체에 소수성기를 만들어 주어야 하는데 본 실험에서는 NHSP를 이용하여 항체에 palmitic acid를 연결시키는 방법을 이용하였다(6). 간단히 설명하면 정제된 항체 1mg에 dioxane에 용해한 NHSP 50µg과 2% DOC를 첨가하여 37°C에서 overnight reaction시킨 후 미반응의 NHSP를 제거하기 위해 0.18% DOC가 포함된 phosphate buffered saline(PBS)으로 cold chamber에서 투석한다. 형광성 물질인 NBD를 항체에 결합시키기 위해서는 항체 1mg당 NBD chloride 0.15mg을 첨가한 후 overnight 시키고 충분히 투석한 후 사용하였다.

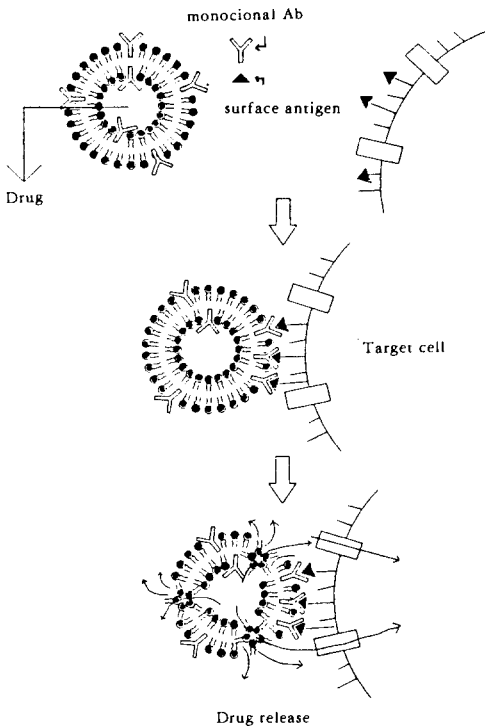


Fig. 1. Schematic representation of the preferred mechanism of site-specific cytosolic delivery of transportable drugs mediated by target-sensitive immunoliposomes.

지질만으로는 리포솜이 형성되지 않는 불포화 PE (phosphatidylethanolamine)를 이용하는데, 예를 들면 dioleoyl-phosphatidylethanolamine (DOPE)는 상온에서 이중 층이 아닌 hexagonal II phase를 형성하고 있어 여기에 palmitic acid 같은 소수성기를 부착한 항체를 삽입시키면 비교적 안정된 이중 층 구조의 리포솜이 만들어진다(1). 따라서 이 항체가 표적세포와 결합할 경우 리포솜 표면에 골고루 분산되어 있던 항체가 한쪽으로 몰리게 되고 이에 따라 리포솜이 와해되면서 약물방출이 일어나게 된다(2, 3, Fig. 1 참조). 본 연구에서는 형광성 물질인 calcein이 봉입된 표적 민감성 리포솜을 제조하고 이것을 여러 가지 표적세포와 결합시켜 세포에 따른 calcein의 선택적 방출성을 확인한 다음, 다시 항암제인 doxorubicin이 봉입된 표적 민감성 리포솜을 이용하여 특정 표적세포에 약물전달이 선택적으로 이루어질 수 있음을 확인하였다.

항체가 삽입된 DOPE Liposome (Immunoliposome)의 제조

먼저 DOPE(10mg/ml) 1.5ml과 DOPA 10% (w/w)를 flask에 담아 N_2 gas하에서 증발시키고(3~5min), 이어 vacuum chamber속에 1~2시간 동안 방치하여 flask 벽에 얇은 막을 형성하도록 건조시킨다. 이렇게 건조된 지질막에 앞서 제조한 p-Ab (palmitoyl antibody) solution (1.5mg/ml with 0.18% DOC) 0.5ml과 수용성 마커인 calcein 100mM 0.5ml을 넣고 수화시킨다. Calcein대신 항암제를 봉입할 경우에는 doxorubicin 2mg/ml, 0.5ml을 넣고 수화시킨다. 엉겨붙어지 지질층이 충분히 수화되고 나면 이어 sonication을 한다. Bath type(Branson 2210)의 경우 20분씩 3~4회 반복하고 probe type의 sonicator(ultrasonic homogenizer 4710 series, Cole Parmer Instrument, U. S. A.)를 사용할시에는 1회 1분 정도 행한다. 이렇게 sonication된 용액을 Sephadex G-50 gel-column (2.5×8cm)을 이용하여 chromatography를 행하면 틱새 부피로부터 SUV(small unilamellar vesicles) 리포좀이 만들어져 나오게 된다. Fraction별로 받아내어 형광성과 흡광도를 측정하여 항체가 삽입된 리포좀이 완성되었음을 확인한다. 받아낸 리포좀 용액은 0.2 μ m membrane(Millipore)를 이용하여 수차례 통과시킨 후 사용한다.

표적세포의 준비와 Calcein 방출실험

본 실험에 사용한 특정 표적세포들로는 세포막에 H-2K^b 항원을 가지고 있는 EL-4 및 RMA를 이용하였고, 비특정 표적세포들로는 L929(H-2K^b), Yac1(H-2K^b), P815(H-2K^d) 등과 RMA 세포중 H-2K^b 항원이 결손된 RMA-S(H-2K^b deficient)를 이용하였다. Calcein 방출실험은 먼저 특정 및 비특정 표적 세포를 무혈청 배지로 3회 세척하고 농도를 1×10^3 /ml에서 1×10^7 /ml까지 조절한 후, 세포 배양액 1ml당 준비된 리포좀 50 μ l를 첨가하여 37°C에서 30분간 접촉시킨다. Calcein 방출량은 30분 후 형광성을 측정하여 다음 식에 따라 계산하였다.

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

여기서 F_0 와 F 는 각각 세포 접촉 전과 접촉 후에 측정된 sample의 형광성 세기이고 F_t 는 DOC 0.12%를 첨가하여 리포좀을 완전히 깬 후 측정된 형광성 세기이다. 형광성은 excitation 파장 490nm와 emission 파장 520nm에서 측정하였다.

표적세포에 대한 항체 결합력 측정

Y3 항체의 특정 및 비특정 표적세포에 대한 결합력을 측정하기 위하여 먼저 세포들을 3회 세척하고 세포농도를 1×10^3 /ml에서 1×10^7 /ml로 조절된 뒤 위에서 제조한 NBD-Ab를 세포와 1시간 동안 접촉시키고 세포를 다시 3회 세척한 후 형광성을 excitation 파장 460nm와 emission 파장 554nm에서 측정하였다.

표적세포에 대한 약물전달실험

표적세포에 대한 약물전달 실험은 다음과 같이 수행하였다. 먼저 리포좀에 포집된 DOX의 양을 측정하기 위하여 0.12% DOC를 넣어 리포좀을 완전히 깬 후 Sephadex G-50 column을 이용하여 인지질 층을 제거하고 수용액에 남아 있는 DOX의 농도를 excitation 파장 468nm와 emission 파장 585nm에서 형광성을 측정하여 결정하였다. 그 다음 특정 혹은 비특정 표적세포를 96well에 2-3000 cells/well이 되게 접종한 뒤 48시간 동안 배양하고 여기에 free DOX 혹은 리포좀에 봉입된 DOX(liposomal DOX)를 농도별로 첨가한 다음 30분이 경과하면 약물이 든 배지를 모두 제거한 뒤 새 배지를 첨가하고 다시 48시간 배양한다. 배양이 끝나면 배양액을 제거하고 XTT를 첨가하여 살아있는 세포의 농도를 측정한다(7). 세포의 상대적 생존도(relative viability)는 약물이 첨가되지 않은 배지의 세포 생존도를 100으로 하고 계산한 값이다.

결과 및 고찰

P-Ab가 삽입된 Immunoliposome의 제조

Ho 등(1)에 의하면 p-Ab 제조에서 항체 한 분자당 결합된 palmitic acid의 숫자는 2~5개로써, 그 70%가 항체의 F₁ fraction에 결합되어 표적세포에 대한 항체 결합력이 본래의 항체에 비해 크게 떨어지지 않는다고 했으며 본 실험에서도 이와 유사한 결과를 얻었다(Data not shown). 준비된 p-Ab를 이용하여 면역 리포좀을 제조하기 위하여 재료 및 방법에서 진술한대로 지질막에 p-Ab와 calcein을 첨가하여 수화한다. 이어서 sonication을 행한 후 Sephadex G-50 gel에 loading하여 리포좀을 fraction별로 받아내었다. 실험 결과 Fig. 2에서처럼 fraction tube 6, 7, 8번에서 calcein의 형광성과 인지질 및 단백질의 농도가 모두 최대치를 나타내었으므로 이 부분에서 받아낸 리포좀이 항체와 결합되었

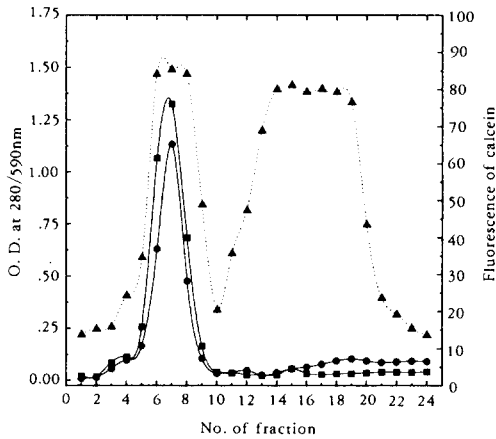


Fig. 2. Sephadex G-50 gel chromatography of PE-immunoliposome containing calcein. (2.5×8cm, 1.5ml/min, 1ml/tube)
 ● 280nm ■ 590nm ▲ fluorescence of calcein

음을 알 수 있었다(quenching%는 50% 이상). 회수한 리포솜 fraction은 0.2μm membrane을 이용하여 수차례 통과시킨다. 이렇게 제조된 리포솜의 크기는 Ho등(1)에 따르면 약 50nm라고 보고하고 있으나 본 실험실에서 HPLC를 이용하여 간단히 측정할 바에 의하면 대체로 200~500nm 정도로 분포하였다.

표적세포와의 결합에 의한 Calcein 방출

항체가 삽입되어 만들어진 면역 리포솜은 표적세포와 결합하면 리포솜 표면에 고르게 퍼져 있던 항체가 한쪽으로 몰리게 되고 이로 인해 리포솜이瓦解(destabilization)되면서 calcein이 방출된다. 본 실험에서는 destabilization시 일어나는 calcein의 방출율을 측정하여 표적 민감성 리포솜과 표적세포와의 상호작용을 조사하였다. 실험 결과 Fig. 3에서처럼 여러 가지 특정 및 비특정 표적세포와의 접촉에서 생긴 calcein 방출율은 H-2K^b type 항원을 가진 EL-4와 RMA에서 가장 높았고 다른 세포들은 비교적 낮았다. L929 세포의 표면항원인 H-2K^a는 항체 Y3와 약한 cross-reactivity를 가지고 있어 calcein 방출율이 다른 비특정 표적세포들보다 약간 높은 것으로 보인다(8). 이것을 확인하기 위하여 형광성 물질인 NBD를 항체에 결합시킨 후 이 항체와 세포들간의 결합력을 형광성을 이용하여 측정해보았다. Fig. 4에 의하면 역시 H-2K^b type 항원을 가진 EL-4와 RMA에서 항체 결합력이 가장 강하였고

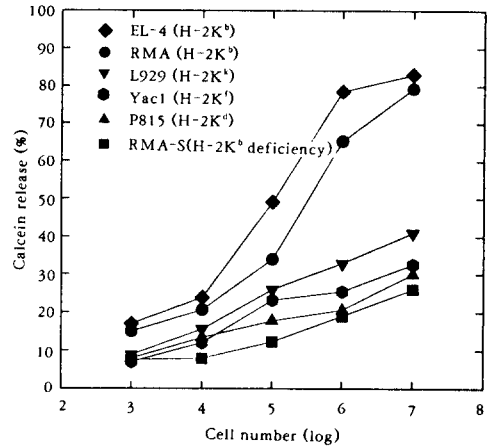


Fig. 3. The change of calcein release with the target cell concentration(log). Specific or non-specific target cells were contacted with 50μl of PE-immunoliposome (anit-H-2K^b) for 30minutes.

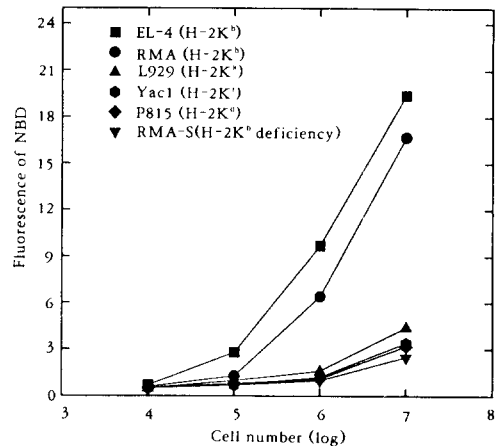


Fig. 4. Antibody(anit-H-2K^b) binding capacity to the various specific or non-specific target cells. Target cells were contacted with 50μl of NBD-Ab for 1hour and the fluorescence of NBD-Ab bound to the target cells was measured.

L929, Yac1, P815, RMA-S 순으로 결합력이 떨어졌다. 항체의 세포 결합력과 리포솜의 calcein 방출율과의 관계를 다시 그림으로 나타내면 Fig. 5와 같이 된다. 이 그림에서 알 수 있듯이 calcein 방출율

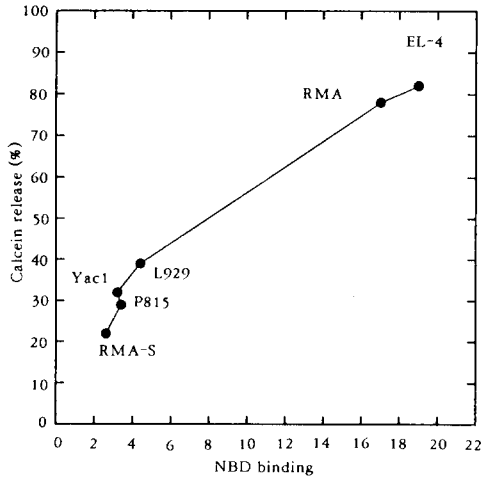


Fig. 5. The relationship between the antibody binding capacity and the calcein release from PE-immunoliposome.

은 표적세포에 대한 항체의 결합력에 비례하여 증가하는 것으로 나타났다. 즉 표적 민감성 리포솜 표면에 연결된 항체는 표적 세포와의 결합력에 따라 리포솜을 와해시키는 정도를 결정짓게 되고 따라서 표적 세포에 대한 항체의 결합력이 리포솜 내부에 봉입된 약물의 방출 정도를 결정하게 될 것이다.

표적세포에 대한 약물전달

Fig. 6은 특정 표적세포인 EL-4와 비특정 표적세포인 Yac1에 대한 약물 전달율, 즉 상대적 세포 생존도를 나타내는 그림이다. 인지질 PC만으로 제조된 리포솜은 상온에서 매우 안정하므로 표적 세포와의 접촉 후에도 리포솜의 변형이 일어나지 않는다. 따라서 항체가 없는 비 민감성 리포솜인 PC 리포솜을 EL-4와 접촉시켰을 때는 free DOX에 비해 월등히 높은 생존율을 보이는데 반해, 민감성 리포솜인 Y3-PE 리포솜에서는 free DOX와 유사한 생존도 곡선을 보이고 있어 PE리포솜을 이용한 약물전달이 잘 일어나고 있음을 알 수 있다. 그러나 약물농도가 증가함에 따라 PC 리포솜에서의 세포 생존율도 감소하는데 이는 항암제인 DOX가 리포솜의 인지질층을 통과해 약물전달이 리포솜 와해 없이도 일어날 수 있기 때문이다(9). 또다른 이유로 리포솜이 표적 세포와 접촉후 세포막에 융합(fusion)되거나 세포의 endocytosis 기능에 의해 약물이 세포내로 전달될 가능성도 배제할 수 없는데 여기에 대한 설명은

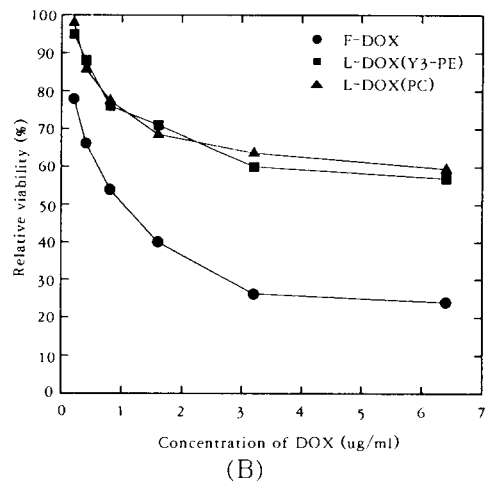
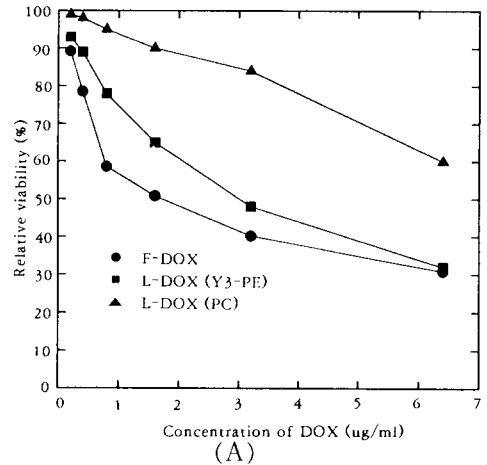


Fig. 6. The relative viability of target cells with free DOX(F-DOX) or liposomal DOX(L-DOX) at various concentrations. A) specific target cell; EL-4(H-2K^b) B) non-specific target cell; Yac1(H-2K).

현재 수행중인 인지질 막을 통과할 수 없는 항암제인 metotrexate를 이용한 실험이 끝난 후에는 가능할 것으로 보인다. 한편 비특정 표적세포인 Yac1에서는 free DOX에 비해 PC 리포솜과 Y3-PE 리포솜에서의 세포 생존율이 현저히 높아 민감성 리포솜인 PE 리포솜에서도 약물 방출이 거의 일어나지 않고 다만 PC 리포솜에서 일어날 수 있는 비특이적 약물 전달만 약간 일어나고 있음을 확인할 수 있다. 이러한 약물 방출이 항체의 특이적 반응에 의한

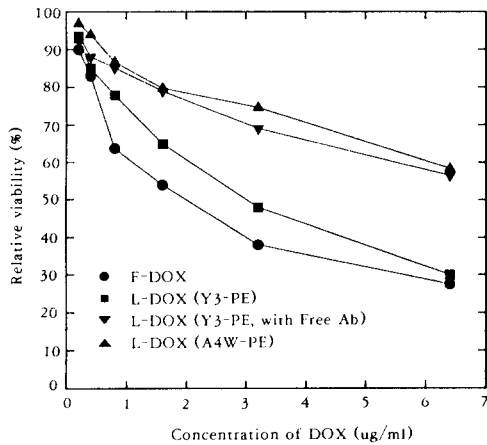


Fig. 7. The relative viability of specific target cell, EL-4 with liposomal DOX in the absence or presence of free Ab, Y3. A non-specific target-sensitive liposome coupled with antibody A4W was also tested.

것임을 보이기 위해 항체 Y3 대신 비 특이적 항체인 A4W (anti-human chorionic gonadotropin-antibody)를 가진 PE 리포솜이나, Y3 항체를 가진 PE 리포솜 용액에 결합되지 않은 free Y3 항체를 1mg/ml로 첨가하였을때 특정 표적세포 EL-4에 대한 약물전달율을 Fig. 7에 나타내었다. 이 그림에서 볼 수 있듯이 비 특이적 항체인 A4W를 가진 리포솜이나, 용액 내에 free Y3 항체를 첨가하여 Y3-PE 리포솜과 표적세포와의 결합을 저해하면 민감성 리포솜의 세포 생존율이 증가하였다. 이러한 결과는 약물 방출이 주로 리포솜에 결합된 항체와 표적세포의 항원이 결합하고 이에 따라 리포솜이 와해되면서 일어나는 결과라고 볼 수 있다(Calcein방출 실험결과를 볼 때).

여러 가지 비특정 표적세포에 대한 약물전달율을 측정하여 세포 생존도 곡선을 구한 뒤 IC₅₀ (drug concentration for 50% of relative cell viability) 값을 결정하여 Table 1에 나타내었다. 특정 표적세포인 EL-4와 RMA에서는 free DOX와 liposomal DOX간의 IC₅₀값이 2배 정도의 차이를 보이고 있는 반면, 비특정 표적세포들에서는 liposomal DOX의 IC₅₀값이 free DOX에 비해 적어도 5배 이상 증가하고 있어 표적 민감성 리포솜을 이용할 경우 원하는 특정 세포에만 선택적으로 약물 전달이 가능 할 것

Table 1. IC₅₀ values of Doxorubicin for various tumor cell lines.

Target cell	IC ₅₀ value	
	Free-DOX	Liposomal-DOX
EL-4	1.8	2.9
RMA	0.7	1.9
Yac1	1.2	>8
P815	1.7	>4
RMA-S	0.6	>4
L929	16	>25

으로 보인다. 본 실험에서는 특정 표적세포와 비특정 표적세포를 따로 배양하여 약물전달의 차이를 조사하였으나 앞으로의 실험에서는 같은 배양액 내에서 특정 및 비특정 표적세포를 혼합 배양하면서 표적 민감성 리포솜에 의한 선택적인 약물전달이 가능한지를 실험해 볼 예정이다. In vitro에서 특정 표적세포만을 선택적으로 제거할 수 있는 기술은 현재 백혈병 환자에서 골수를 분리하여 leukemia 세포만을 선택적으로 제거한 후 정상적인 골수를 다시 환자에게 되돌려 주는 bone marrow purging 기술에서 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

감 사

본 연구는 1991년도 한국과학재단 목적기초연구비에 의하여 이루어진 것이며 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. R. J. Y. Ho, B. T. Rouse and L. Huang (1986), *Biochem.*, **25**, 5500.
2. R. J. Y. Ho, B. T. Rouse and L. Huang (1986), *Biochem. Biophy. Res. Commun.*, **138**, 931.
3. R. J. Y. Ho, B. T. Rouse and L. Huang (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 13973.
4. R. J. Y. Ho, B. T. Rouse and L. Huang (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 13979.
5. R. J. Y. Ho, H. P. Ting-Beall, B. T. Rouse and L. Huang (1988), *Biochem.*, **27**, 500.
6. A. Huang, L. Huang and S. J. Kennel (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 8015.
7. T. Mosmann (1983), *J. Immunol. Method*, **65**, 55.

8. ATCC catalog of cell lines and hybridomas 7th ed. (1992), 370.
9. T. Skovsgaard and N. I. Nissen (1986), Membrane transport of antineoplastic agents, I. D. Goldman ed. p. 195 Pergamon Press, Oxford.