

Immunoglobulin G(IgG)를 함유한 DOPE 리포솜의 제조와 담즙산염에 의한 용해 특성

이은옥 · 김진구 · 김종득†

한국과학기술원 화학공학과

(1990년 8월 30일 접수)

The Solubilization Behavior of DOPE-Immunoliposomes with Immunoglobulin G(IgG) by Added Bile Salts

Eun Ok Lee, Jin-Gu Kim and Jong-Duk Kim*

Department of Chemical Engineering and Bioprocess ERC,

KAIST P.O. Box 150, Cheongryang, Seoul 130-650, Korea

(Received August 30, 1990)

The effects of bile salts (BS) on the stability of dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) liposomes were investigated, observing apparent absorbance of vacant liposomes and calcein release from entrapped liposomes. Unilamellar liposomes were prepared by using a small quantity of palmitoyl-immunoglobulin G(IgG) (2.5×10^{-4} mol/lipid mol) to stabilize the bilayer phase of the unsaturated DOPE which by itself does not form stable liposomes. The destabilization of PE immunoliposomes by papain, clearly demonstrates that the IgG is essential for stabilization of PE bilayer. Approximately 4% of the entrapped calcein was released from the PE liposomes after 1 hr from liposome formation. Calcein release and absorbance of liposomes depended on the BS/lipid ratio because of the solubilization of lipid molecule in bilayer and the formation of mixed micelles. At very low BS concentrations, the incorporation of BS induced BS/lipid aggregates in the outer vesicles monolayer, while high BS concentrations, mixed micelles were formed. Cholate and its conjugates as 3 α , 7 α , 12 α -trihydroxy BS induce the concentration of the 3 α , 12 α -dihydroxy BS at half-maximal solubilization of immunoliposomes to approximately 2.5-, or 5-fold. Conjugation of BS with glycine or taurine slightly enhanced their capacities to perturb membranes.

Keywords—immunoliposome, bile salt, solubilization, IgG

phosphatidylcholine(PC), phosphatidylethanolamine(PE)과 같은 인지질은 수용액 분산상에서 배향이 잘된 판상의 micelle이나 리포솜을 형성하여, 친수성이나 소수성 약물을 포집할 수 있기 때문에 약물 전달체로서 이용하고자 하는 연구가 진행되고 있다.^{1,2)}

천연 또는 합성 인지질로 만들어진 리포솜은 신진대사에 참여하여 천연생체막의 분자와 상호교환이 가능하고, 독성이 거의 없고, 항체에 의한 부작용이

거의 관측되지 않는다. 화학적 결합없이 화학적으로 민감한 분자를 포집할 수 있고 선택투과성과 지연성이 우수하여 방출 속도 조절 시스템의 제조에 용이할 뿐만아니라, 지질의 성분, 크기, 전하투과성, 표면 리간드 등을 변화시킴으로써 유기체내에서의 분포와 성질을 상황에 따라 쉽게 조절할 수 있다.³⁾ 그러나 이러한 리포솜은 안정성이 낮고 전달 선택성이 적기때문에 이를 보완하기 위하여 탄수화물, 고분자, 단백질 등을 사용하여 리포솜의 막의 성질을

† 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

바꾸어 줄 수 있는데 적중화를 시키기 위하여 항체를 사용하는 것이 가장 널리 연구되고 있다.⁴⁻¹⁴⁾

항체를 리포솜에 부착하는 방법으로는 소수성, 혹은 이온결합으로 비결합성 결합(noncovalent bonding)을 이용하는데, 악성종양세포 표면에 대한 특별한 친화력을 갖는 분자탐침을 항종양제를 포집한 리포솜과 결합시키기도 한다. 세포에 의한 리포솜-IgG의 복합체에 대한 흡수력은 그 세포에 해당하는 IgG일 때 높아진다. 즉, anti-fibroblast IgG를 포집한 리포솜은 fibroblast와, anti-HeLa IgG를 포집한 리포솜은 HeLa cell과, anti AKR-A IgG를 포집한 리포솜은 AKR-A cell과 결합하기 쉽다.⁸⁾ 그러나 특성상 단일 입자당의 항체의 수, 노출항체의 활성, 크기분포, 항체의 투과도 등을 반복성있게 제조하기는 쉽지 않다. 또한 결합정도는 초음파분쇄 정도와 시간, IgG와 지질과의 비, 지질조성에 영향을 받는데 IgG를 리피드와 같이 초음파 처리하면 4~40%의 결합이 관측되었으나 리포솜을 제조한 후 IgG를 같이 침출시키면 결합이 일어나지 않는다.¹⁵⁾ 최근에는 리포솜의 표면에 관능기를 갖는 단백질을 부착하거나 단백질에 소수성 접합점을 붙이는 등의 방법으로 이중층에 비공유 결합성 상호작용으로 결합력을 갖게 하거나,⁹⁻¹¹⁾ 단백질에 소수성 지지대를 부가하여 개조한 후 리포솜에 주입하는 방법도 있다.^{13,14)}

리포솜은 그 자체로는 열역학적으로 안정하지는 않으나 제3의 성분이 첨가되면 안정도가 크게 증가하거나 열역학적으로 안정성을 갖는 microemulsion으로 전환되는 것으로 알려져 있다. 이러한 리포솜의 저장시의 열역학적 안정성과 실제 사용시의 in vivo 안정성은 직접 비교할 수는 없으나 최적조건 하에서 제조된 리포솜에 대한 pH, 염, 유기성분, ionomer, 생체막과의 상호작용을 이해하기 위하여 많은 연구가 진행되고 있다.

리포솜의 분리는 혼탁도를 관찰하여 쉽게 구별할 수 있으며 광산란법으로 그 안정성을 알 수 있다.^{16,17)} 일반적으로 리포솜은 이오노머나 염, pH, 계면활성 물질 등에 의하여 민감하게 반응하여 가용화하거나 분리가 촉진되는 것이 보통이다. 계면활성 물질들은 이러한 리포솜을 가용화시켜 포집된 약물을 방출하게 하므로 이에 대한 검토도 활발히 진행되고 있다.¹⁸⁾ 특히, 담즙산염은 인체 내에서 생성되어 간,

담낭, 십이지장에 분포하나 혈액 중에도 존재한다. 이들은 지질들과 혼합 micelle을 형성하며 bile salt와 막지질의 결합평형은 Large Unilamellar Vesicle(LUV)의 막소포체에서 혼합 micelle로의 구조 변화에 직접 관계가 있다. 담즙산염의 농도가 매우 낮을 때는 막소포체의 외부 지질층에서 담즙산염-지질의 결합체가 형성되고 담즙산염의 농도를 증가시키면 막에 구멍이 형성되고, 계속 증가시키면 리포솜의 가용화가 일어난다.^{19,20)}

본 연구에서는 자체만으로는 안정한 이중층을 만들 수 없는 원추 모양의 지질인 DOPE(dioleoyl-phosphatidylethanolamine)에 Immunoglobulin G(IgG)를 도입하여 안정한 이중층의 LUV를 만들고, 이 리포솜을 이용하여 자체의 안정성과 담즙산염이 리포솜의 안정성에 미치는 영향을 연구하고자 한다. 여기에 사용된 IgG는 PE 리포솜이 안정한 이중층을 만드는데 필요한 보조분자로서의 역할과 특정세포에 대한 선택성을 갖는 항체로서의 역할을 하게 된다. 즉, 생체조건에서 안정한 이중층을 형성하지 못하는 DOPE는 IgG에 의해 이중층이 만들어지나 IgG가 제거되면 안정한 이중층을 형성할 수 없게 된다. 이 성질을 이용하여, DOPE 리포솜이 IgG가 선택성을 갖는 특정세포에 접근하면 IgG가 항원과 반응하면서 IgG가 이중층에서 빠져나가게 되고 안에 포집되어 있던 물질은 자연히 리포솜 밖으로 방출되게 된다.

실험방법

시약

사용한 인지질은 1,2-dioleoyl-L-phosphatidylethanolamine(DOPE)(99%)과 egg yolk에서 추출한 L- α -phosphatidylcholine(99%)를 Sigma사에서 구입하여 사용하였다. 단백질로는 Immunoglobulin G(IgG)를 사용하였는데 이는 염소에서 추출한 Immunoglobulin으로 분자량은 약 160,000 정도이며, Sigma사에서, papain과 cystein도 Sigma에서 구입했다. 사용한 담즙산염은 cholic acid(CA), glycocholic acid(GC), taurocholic acid(TC), deoxycholic(DOC), taurodeoxycholic acid(TDC), chenodeoxycholic acid(CDC), glycochenodeoxycholic acid(GCDC), taurochenodeoxycholic acid(TCDC)의 Na 염으로, 담즙산염과 calcein을 Sigma사에서 구입하

여 사용하였다. palmitic acid, *N*-hydroxysuccinimide, dicyclohexylcarbodiimide, 1,4-dioxane은 Aldrich에서 구입했으며, buffer로는 PBS(phosphate buffered saline)로, NaCl 160 mM, KCl 3.2 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, Na₂HPO₄ 0.12 mM로 만들어 1 N NaOH로 pH 8.0으로 만들어 사용한다. Gel filtration에서 사용한 gel은 Sephadex G-75(Pharmacia fine chemical)과 Bio-Gel A-0.5 m(Bio Rad)이다.

기기 및 장치

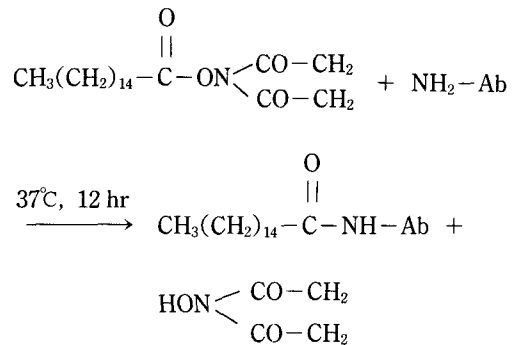
palmitoyl-IgG를 반응혼합물과 분리하기 위해 직경 1.5 cm, 높이 45 cm의 Sephadex G-75 칼럼을 사용하였고, palmitoyl-IgG를 농축하는데는 Amicon사의 centricon 30 microconcentrator를 사용하였다. 리포솜을 생성시키기 위해 ultrasonic processor 및 cuphorn system을 설치하였으며 Ultra power supplier는 Sonics & Material Inc.의 Model VC250 basic이고 여기에 연결된 cuphorn은 같은 회사 제품으로 horn radiating face가 51 mm인 것을 사용하였다. 흡광도는 cecil series 5000 double beam 분광광도계를 사용하였고 형광성 측정에도 Hitachi 분광광도계(model 204-s)를 사용하였다. 이 때 calcein이 포함된 리포솜과 외상의 calcein을 분리하기 위해 직경 1 cm, 높이 45 cm의 Bio-Gel A-0.5 m column을 사용하였다. 리포솜의 입자 크기와 분포를 측정하는데는 광산란 입도분석기(dynamic light scatteringparticle analyzer, Hiac/Royco, Nicomp 370)를 사용하였다.

Palmitoyl-IgG 제조

Palmitoyl-IgG는 *N*-Hydroxysuccinimide ester of palmitic(NHSP)와 IgG을 반응시켜 얻는다. 먼저 *N*-Hydroxysuccinimide(30 mmol)을 녹인 dry ethyl acetate(130 ml)에 palmitic산(30 mmol)을 첨가하고 여기에 dry ethyl acetate(10 mmol)에 녹인 dicyclohexylcarbodiimide(30 mmol)을 첨가하여 반응 혼합물을 상온에서 15시간 반응을 진행시키면 palmitic산의 *N*-hydroxysuccinimide ester(NHSP)와 dicyclohexylurea가 생성된다.²¹⁾ 침전된 dicyclohexylurea는 여과하여 제거하고 걸러진 용액을 감압하에서 농축시켜 흰결정을 얻는다. 얻어진 결정은 무수에 탄올에 녹여서 감압하에서 재결정시킨다. 재결정시킨 NHSP는 anhydrous dioxane에 저장한다.¹⁴⁾ NHSP의 생성여부는 TLC로 확인하는데 용매로는

디에칠에틸과 석유에틸을 3 : 1로 섞어서 사용하고 이때 R_f=0.53이다.²²⁾

IgG 2 mg을 NHSP 44 μg과 2 wt% dioxychololate (DOC)를 포함한 phosphate buffered saline(PBS) (pH 8.0)에 넣어 37°C에서 12시간 동안 항온시키면서 반응시킨다. 반응이 끝난 후 palmitoyl-IgG(p-IgG)와 *N*-hydroxysuccinimide가 생성된다. 반응혼합물과 p-IgG를 분리하기 위해서 Sephadex G-75 칼럼(1.5×45 cm)에서 DOC 0.15 wt%를 포함한 PBS(pH 8.0)를 사용하여 크로마토그래피를 행한다. p-IgG는 틸새부피(void volume)에서 나오므로 Gel filtration 유출물을 single path monitor UV-1(Pharmacia)을 통과시켜 280 nm에서 검출되게 한다. 받아들인 p-IgG 용액은 매우 희석되어 있으므로 유출물을 Centricon 30 microconcentrator(Amicon Co.)를 이용하여 2 mg IgG/ml로 농축한 후 0.15 wt% DOC를 포함한 PBS(pH 8.0)로 투석시킨다. 최종물질은 4°C에서 보관한다.¹⁴⁾ 이 때 주된 반응식은 아래와 같다.^{23,24)}



Immunoliposome 제조

초음파분쇄에 의해 LUV를 만드는데 bath 형의 cuphorn 시스템을 사용하였다. 먼저 DOPE(1-4 μmole)를 N₂ gas 하에서 용매를 증발시키고 flask 벽에 얇은 막으로 건조시킨다. 건조된 지질에 0.09 wt% DOC를 포함한 PBS(pH 8.0) 200 μl와 지질 1 mol에 대해 2.5×10⁻⁴ mol의 p-IgG로 지질을 수화시킨다. 이 때 지질의 농도는 1 wt%가 되게 하였다. 리포솜 분해실험을 하기 위해서는 수화시키는 과정에서 형광성 표시자로 calcein을 50 mM이 되도록 첨가한다. 상온에서 이 혼합물을 초음파 분쇄 기에서 30분 간격으로 10분씩 초음파분쇄시킨 후

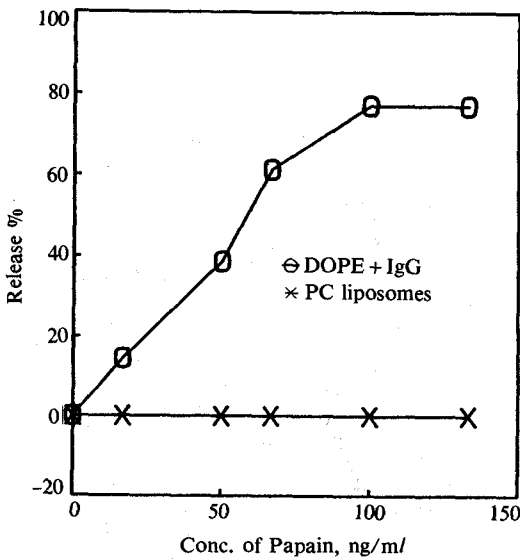


Figure 1—Papain-induced lysis of liposomes. Calcein release from Immunoliposomes, DEPE-IgG vesicles (symbol o) is depend on the concentration of papain, while calcein release of PC liposomes (symbol x) was not influenced by addition of papain at 37°C ($\lambda_{ex}=490$ nm, $\lambda_{em}=520$ nm).

포집되지 않은 calcein과 DOC를 제거하기 위해 Bio-Gel A-0.5 M column(1 cm×45 cm)에서 DOC가 함유되지 않은 pH8.0 PBS로 chromatograph시킨다. Gel filtration을 거쳐서 나온 리포솜에 포집된 calcein의 quenching %는 다음 식으로 계산한다. 총 calcein 형광성은 DOC의 최종농도가 0.12 wt%가 되도록 첨가한 후의 형광성이다.

$$\text{quenching \%} = (1 - F_0/F_1) \times 100$$

F_0 는 DOC를 첨가하기 전의 형광성이고 F_1 는 DOC를 첨가한 후의 형광성이다. 위의 식으로 계산해 본 결과, PE 리포솜의 경우 quenching %가 30% 정도이고 PC 리포솜의 경우는 quenching %가 80% 정도이다.

입자 크기와 흡광도 측정

초음파분쇄시킨 후 gel filtration시킨 immunoliposome을 형성된진 1시간 후에 Nicomp 370 particle analyzer를 이용하여 20°C에서 입자의 크기를 측정한다. Bio-Gel A-0.5 m column을 통과한 LUV 용액을 DOPE 농도가 250 μmol 이 되게 pH8.0 PBS로 희석하여 bile salt 용액을 종류별과 농도별로

첨가하여 30분 후에 Spectrophotometer로 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 사용하는 리포솜 용액이 Rayleigh 산란이론에 잘 맞는 지를 알아보기 위하여 350 nm~700 nm에 걸쳐 50 nm씩 증가시키며 light scanning하여 흡광도를 측정하였다.

calcein release 측정

리포솜에 calcein을 고농도로 포집시킨 후 외상에 존재하는 calcein을 Gel filtration으로 제거시킴으로써 리포솜으로부터 방출되는 calcein의 량을 측정할 수 있다.¹²⁾ 방출되는 형광성 %는 다음 식으로부터 구한다.

$$\text{Release \%} = [(F - F_0)/(F_1 - F_0)] \times 100$$

F 는 주어진 조건에서 측정된 형광성, F_0 는 초기의 형광성, F_1 는 총 형광성이다. calcein을 50 mM이 되도록 평량하여 사용하며 전술한 방법으로 분리된 시료를 취해 60분 동안 Fluorescence Spectrophotometer에서 시간에 따라 방출되는 형광성을 측정한다. 또한, 분리된 시료에 bile salt를 농도별로 첨가하면서 형광성을 측정한다. 이 때 excitation 파장은 최대값인 490 nm에서 측정했고 emission 파장도 최대값인 520 nm에 측정했다.

Papain으로 인한 형광성 방출

IgG로 인해서 PE 리포솜이 안정한 이중층을 형성하는지 여부를 알아보기 위해서 IgG인 Fab부분과 Fc부분을 자르는 단백질인 papain을 이용하여 calcein의 방출되는 량을 측정하였다.^{25,26)} calcein이 포집된 리포솜에 cystein 1 mM을 포함한 PBS(pH8.0)를 넣어 지질의 농도가 750 μM 이 되도록 희석시켜 온도가 37°C가 되도록 한 후에 papain의 농도를 변화시키면서 형광성을 측정한다. 같은 실험을 PC 리포솜에서도 행했다.

결과 및 검토

리포솜 특징

DOPE-Immunoliposome의 제조—불포화 PE는 생리적 조건에서는 안정한 이중층을 형성하지 못한다.²⁷⁾ papain으로 인한 calcein 방출 실험에서 PE 리포솜을 안정화시키는데 IgG가 필수적임을 알 수 있다.²⁸⁾ 그림 1은 papain의 농도가 증가할수록 calcein의 방출이 거의 80%까지 증가하다가 어느 농도

이상이되면 형광성이 일정해짐을 보여주고 있는데, 이는 PE 리포솜안에 끼워져 있는 IgG를 papain이 분해하기 때문에 안에 포집되어 있던 calcein이 밖으로 방출되기 때문이고 IgG가 모두 분해되면 형광성은 일정해지게 된다. 이는 IgG로 말미암아 안정한 DOPE 이중층이 형성됨을 나타내 준다. 같은 실험을 PC 리포솜에서도 행해 본 결과 PC 리포솜에서는 papain의 양이 증가함에도 불구하고 형광성에 아무런 변화가 없음을 알 수 있는데 이는 PC는 지질분자만으로도 안정한 이중층을 형성하므로 papain이 IgG를 분해하더라도 이중층의 안정성에는 별 차이가 없기 때문이다.

DOPE는 꼬리부분에 이중결합이 하나 있어 꼬리부분이 머리부분에 비해 더 커진 원추형의 분자 모양을 갖게 된다. 이러한 원추형의 분자가 모여서 형성하는 모양은 hexagonal II, 즉, 역 micelle을 형성하며 안정한 이중층을 형성하지는 못한다. 그래서 여러 가지 방법으로 안정한 이중층을 형성하도록 연구하고 있다. 여기에는 *N*-succinyldioleoyl-PE 같은 다른 형태의 지질을 도입하거나, 여러 혼합지질을 사용하거나, ganglioside, 지방산이나 oleic acid같은 유도체, cholesteryl hemisuccinate, palmitoylhomocystein, 단백질^{23,29)}을 사용하기도 한다.^{23,29)} 본 실험에서는 palmitoyl immunoglobulin G(p-IgG)을 지질 1몰당 2.5×10^{-4} 몰을 사용하여 안정한 이중층을 형성하였다.²³⁾ p-IgG가 PE 리포솜을 안정화시키는 것은 IgG의 Fc부분에 palmitic산이 연결되어 (70%) Fc 부분이 이중층으로 끼어들어가고 Fab부분이 이중층의 바깥으로 향하게 되는 것으로 생각된다. 수화이론에 따르면,^{30,31)} 상대적으로 낮은 머리부분의 전하밀도를 갖는 PE는 중성 pH에서 물 분자를 충분히 끌어 당길 수 없게 되어 있다. 이렇게 작은 머리부분으로 인해 원추형의 활동적 모양이 되는데 이중층 구조를 갖기 위해서는 썩기모양이나 역원추모양의 보조분자들이 필요하다. 본 실험에서 사용한 p-IgG는 역원추형모양의 분자로서 친수성을 띠는 Fab부분이 이중층의 표면에 나오게 되므로 높은 수화도를 나타내게 된다.

PE 리포솜의 크기분포—DLS(dynamic light scattering)를 이용한 Nicomp 370 particle analyzer로 20°C에서 리포솜의 크기를 측정한 결과, 그림 2에서와 같은 분포의 크기를 얻었다. 관측된 리포솜은

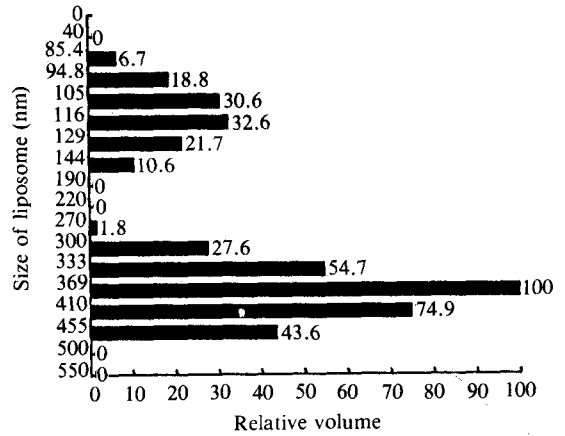


Figure 2—Particle size distribution of liposomes at 20°C.

LUV와 MLV로 생각되며, 앞부분에 나타난 것은 LUV로 크기는 1200 Å이고, 이 때 사용된 p-IgG와 PE의 비유를 보아 IgG 30분자로 리포솜이 형성되었음을 알 수 있다. 이는 500 Å 정도의 glycoporphin-PE 리포솜의 경우 안정한 이중층을 형성하는데 100개의 glycoporphin이 사용된 것²³⁾과 비교해 볼 때 p-IgG의 Fab부분이 glycoporphin보다 더 친수성이 강해서 이중층의 표면의 수화도를 높이는 것으로 생각된다.

Calcein 방출—앞에서 언급한대로 DOPE를 IgG, DCA(0.09 wt%)와 calcein(50 mM)을 포함한 PBS로 팽윤시켜 초음파분쇄한 시료를 Bio-Gel A-0.5 m 칼럼을 통과시킨 후 형광성 흡광광도계를 이용하여 시간에 따른 형광성 방출을 관측한 결과, 그림 3과 같이 PE 리포솜안에 포집된 calcein이 1시간이 지난 후에 형광성 방출이 4% 정도이고 같은 실험을 PC 리포솜에서 해본 결과 1시간 후의 형광성 방출이 2% 정도에 지나지 않는다. 이전의 연구에서 PC 리포솜만으로 실험했을 때 60%, cholesterol을 포함시켰을 때 50%, cholesterol과 cetyl alcohol을 같이 포함시켰을 때 49%이었던 것과 비교해 볼 때 상당히 안정한 계라고 할 수 있다.³²⁾ 두 가지 경우 모두 처음에만 조금 변하고 거의 변하지 않음을 알 수 있다. 이 때 PC 리포솜의 경우에서 PE 리포솜의 경우보다 더 낮은 형광성 방출을 볼 수 있는데 이는 PC 이중층이 PE 이중층보다 더 충진이 잘 되어 있으므로 안에 포집된 calcein이 밖으로 방출되기 어렵기 때문이다. 초기의 급격한 변화 이후에 형광성

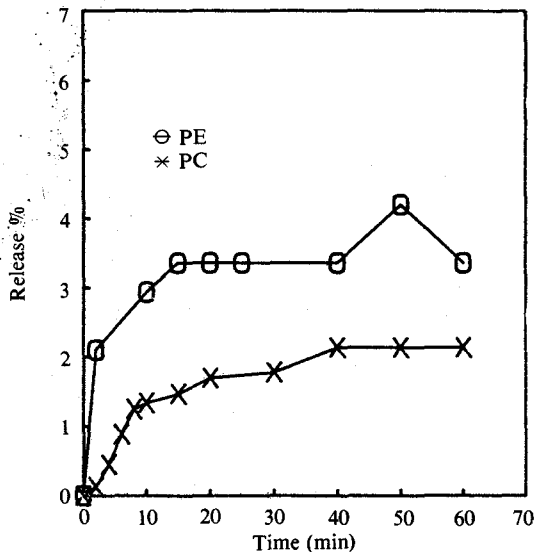


Figure 3—Percent release of calcein as a function of time at 20°C ($\lambda_{ex}=490$ nm, $\lambda_{em}=520$ nm). Percent release of calcein from DOPE liposomes stabilized with *p*-IgG (symbol o) is increased more rapidly than that from PC liposomes (symbol x).

방출이 매우 느린 것은 리포솜의 표면이 방출된 calcein으로 포화된 이후로 거의 방출이 일어나지 않는 것으로 생각된다.

담즙산염이 리포솜의 안정성에 미치는 영향

만들어진 리포솜이 흡광도가 파장의 4승에 역비례한다는 Rayleigh이론에 따르는지 여부를 알기 위하여^{16,17)} 각 파장에 따라 시료를 희석하면서 가시 영역에서 흡광도를 측정하였다. 파장은 350 nm에서 700 nm 사이로 50 nm씩 변화시키면서 실험한다. 고농도의 리포솜용액은 Rayleigh 이론에 따르지 않았으나 본 실험에서 사용되는 지질 농도인 250 $\mu\text{mol/l}$ 에는 Rayleigh이론을 잘 따름을 그림 4에서 보여주고 있다.

이미 형성된 리포솜에 미치는 담즙산염의 영향을 알아보기 위하여 리포솜용액에 담즙산염의 양과 종류를 변화시키면서 첨가하여 흡광도의 변화를 관측하였다. 흡광도의 관측에서 나타나듯이 담즙산염의 농도가 낮을 때에는 흡광도의 변화가 없는 것으로 보아 리포솜이 그대로 존재함을 알 수 있다. 즉, 리포솜의 바깥 층에 담즙산염이 흡착하여 있는 상태로 아직 리포솜이 가용화되지 않은 상태이다. 여기서 담즙산염이 더 첨가되면 담즙산염들이 2분자

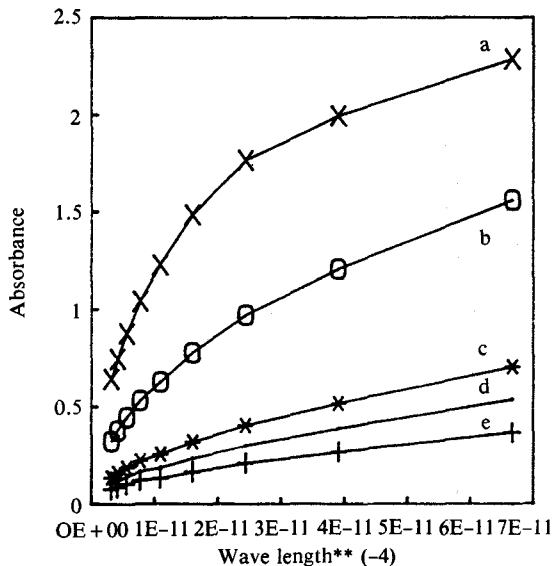


Figure 4—Diagram of absorbance vs. (wavelength)⁻⁴ after sonication, gel filtration at 20°C (a) b,c,d and e are data after dilution 1/2, 1/5, 1/6 and 1/10 of these to a each other.

Table 1—Half-Maximal Concentrations of Bile Salts

No. of OH Head group	Deoxycholate (2)	Chenodeoxycholate (2)	Cholate (3)
Acid	0.96	1.0	2.23
Taurine	0.55	1.02	2.25
Glycine		0.8	1.5

체를 형성하면 이중층 안으로 삽입된다. 담즙산염의 농도가 증가할수록 흡광도가 감소하게 되는 것으로 보아 리포솜의 지질이 담즙산염에 의해 가용화되어 담즙산염과 함께 micelle을 형성하는 것으로 보인다. 담즙산염의 농도가 낮을 경우는 담즙산염이 리포솜의 표면에 흡착하는 과정이 지배적이고 농도가 높아지면 micelle화하는 과정이 지배적으로 나타난다. 담즙산염의 농도가 계속 증가하여 어느 농도 이상이 되면 흡광도가 더 이상 변하지 않음을 알 수 있는데 이는 리포솜의 지질이 담즙산염에 의해 모두 가용화되어 혼합 micelle로 다 변했기 때문으로 보인다. 사용한 담즙산염의 경우 모두 같은 양상을 보인다. 담즙산염이 지질을 가용화할 때의 half maximal 농도를 Table 1에 나타냈다.

PC 리포솜의 경우 half-maximal 농도가 PE 리

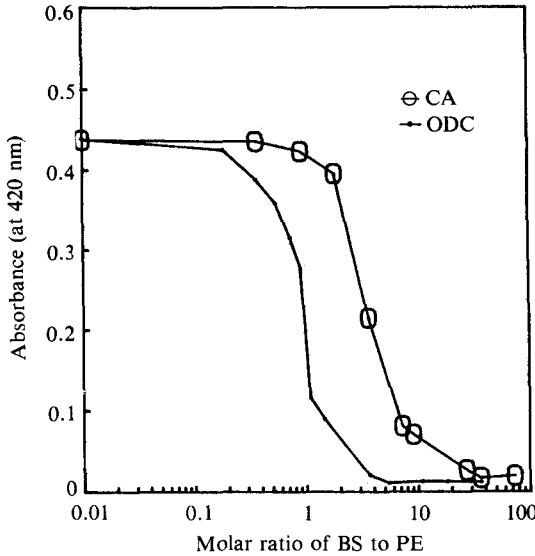


Figure 5—Effect of the number of hydroxy groups in the cholate of bile salts on the structural changes of DOPE liposomes at 20°C. Changes in turbidity ($\lambda=420$ nm, solid lines) was shown as a function of concentration of bile salts: cholic acid (symbol o); deoxycholic acid (symbol) sodium salt.

포솜의 경우보다 높게 나타나는데,²⁰⁾ 이는 PC 리포솜의 이중층이 PE 리포솜의 이중층보다 충진이 더 잘되어 있기 때문에 지질을 가용화하는데 더 많은 양의 담즙산염이 필요한 것으로 생각된다.

담즙산염에 붙은 수산기 수의 영향—그림 5에서는 담즙산염의 수산기를 변화시키면서 리포솜의 안정도에 미치는 영향을 관측하였는데 수산기가 2개 붙은 담즙산염이 수산기가 3개 붙은 담즙산염보다 half-maximal 가용화농도가 낮게 나타난다.^{19-20,33,34)} 이는 지질을 가용화시키는 능력이 수산기가 2개인 담즙산염이 수산기가 3개인 담즙산염보다 더 좋은 것으로 판단된다. 이러한 현상은 머리부분이 다른 경우에도 마찬가지로 경향을 나타냄을 그림 6에 보였다. 이들의 CMC를 비교해 보면 medium이 0.15 M Na⁺일 때 NaDC는 1 mmol/l이고 NaC의 경우 20 mmol/l이다. CMC의 경우는 수산기를 2개 가진 NaDC의 CMC보다 NaC의 CMC가 20배 크지만 지질을 가용화시키는 농도는 2.5배 정도인 것으로 보아 CMC와 지질을 가용화시키는 농도가 직접적으로 비례하지는 않음을 알 수 있다. 이와 같은 양상은 NaCDC와 NaC, NaTDC와 NaTC, NaTCDC와

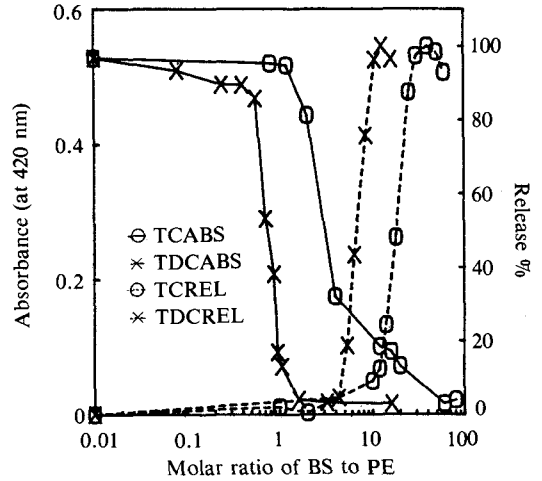


Figure 6—Effect of the number of hydroxy groups in the taurocholate of bile salts on the structural changes of DOPE liposomes at 20°C. Changes in turbidity ($\lambda=420$ nm, solid lines) and percent release of calcein ($\lambda_{ex}=490$ nm and $\lambda_{em}=520$ nm, dashed lines) from DOPE vesicles was shown as a function of concentration of bile salts: cholic acid (symbol o); deoxycholic acid (symbol x) sodium salt.

NaTC, NaGCDC와의 NaGC의 경우에서도 나타난다. 위의 경우 CMC는 수산기를 3개 가진 담즙산염이 수산기를 2개 가진 담즙산염보다 2, 6, 12, 3배 큰데 지질을 가용화시키는 농도는 2.5, 4.5, 5.5, 4배 정도로 나타났다.³⁴⁾ 위의 실험결과에서 보듯이 수산기가 2개인 담즙산염이 수산기가 3개인 담즙산염보다 더 소수성을 띄기 때문에 지질을 가용화하는 능력이 더 좋을 수 있다.

calcein의 방출 실험에서도 수산기가 2개 있는 담즙산염이 수산기가 3개 있는 담즙산염보다 리포솜을 가용화하는 능력이 더 좋은 것으로 나타났다. 또 담즙산염이 고농도일때 형광성 방출이 감소하는 것을 볼 수 있는데 이는 담즙산염이 calcein의 형광성을 감소시키기 때문이다. 흡광도와 형광성의 그림을 비교해보면 half-maximal 농도가 다름을 알 수 있는데, 이는 PE이중층의 유동성이 좋으므로 소량의 담즙산염에 의해 적은 양의 지질이 micelle 화하여도 리포솜이 전부 파괴되는 것이 아니라 리포솜의 크기는 작아지면서 빠져나간 부분을 다시 복구시키는 것으로 생각된다.

담즙산염에 붙은 수산기의 위치와 영향—수산기

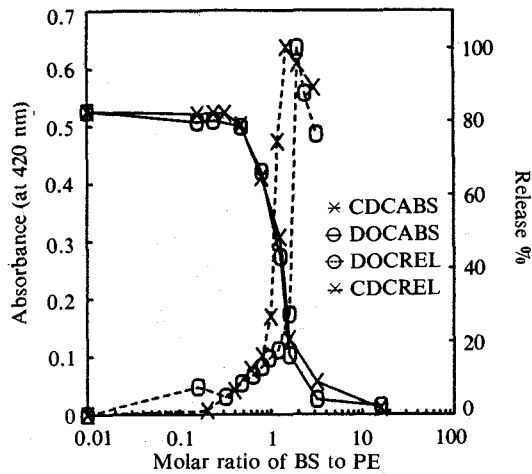


Figure 7—Effect of the position of hydroxy groups in the cholates of bile salts on the structural changes of DOPE liposomes at 20°C. Changes in turbidity ($\lambda=420$ nm, solid lines) and percent release of calcein ($\lambda_{ex}=490$ nm and $\lambda_{em}=520$ nm, dashed lines) from DOPE vesicles was shown as a function of concentration of bile salts: deoxycholic acid (symbol o); chenodeoxycholic acid (symbol x) sodium salt.

가 2개 있는 담즙산염은 수산기의 위치에 따라 수산기가 3- α , 12- α 위치에 수산기가 있는 NaDC와 3- α , 7- α 위치에 수산기가 있는 NaCDC로 나뉜다. 그림 7에서는 수산기의 위치는 지질의 가용화능력에 별 영향을 미치지 못한다는 것을 보여주고 있다. CMC는 medium이 물인 경우에 NaDC가 5 mmol/l이고 NaCDC가 6 mmol/l이며 지질 가용화농도도 거의 비슷하다.³⁵⁾ 머리부분이 같은 경우에는 수산기의 위치에 상관없이 지질의 가용화능력이 서로 비슷함을 알 수 있다.

형광성의 경우는 흡광도와는 약간의 차이가 있는데 CDC의 half-maximal 농도가 DC보다 1.5배 정도 높게 나타나는데 이를 흡광도에서와 비교해 볼 때 DC가 CDC보다 막에 형성하는 구멍의 전체 면적이 넓기 때문이다. DC는 15.2개로 응집체를 형성하는데 CDC는 11.3개로 응집체를 형성한다. 이들이 형성하는 구멍의 면적은 DC가 CDC보다 1.5배 정도 넓다. 이로써 형광성 방출에서 나타나는 DC와 CDC의 half-maximal 농도의 차이를 설명할 수 있다.

담즙산염의 머리부분의 영향—수산기의 수나 위치는 같게 하고 머리부분을 변화시키면서 지질을 가용화하는 담즙산염의 능력을 관측하였다. 머리부

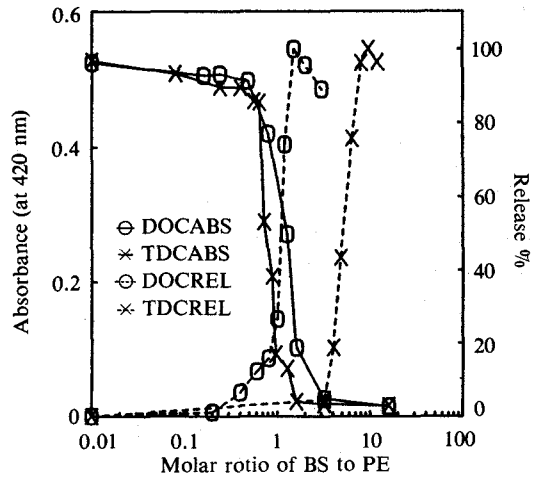


Figure 8—Effect of the head group in bile salt on the structural changes of DOPE liposomes at 20°C. Changes in turbidity ($\lambda=420$ nm, solid lines) and percent release of calcein ($\lambda_{ex}=490$ nm and $\lambda_{em}=520$ nm, dashed lines) from DOPE vesicles was shown as a function of concentration of bile salts: deoxycholic acid (symbol o); taurodeoxycholic acid (symbol 4) sodium salt.

분은 taurine과 glycine이 카르복실기자리에 위치한 복합체이다. 그림 8에서처럼 수산기를 3개 가진 담즙산염의 경우 머리부분을 변화시키지 않은 것보다 taurine이나 glycine과 결합한 담즙산염 복합체들의 half-maximal 가용화농도가 조금 낮음을 알 수 있다. 이는 담즙산염 복합체들의 지질을 가용화하는 능력이 더 좋음을 나타낸다. 수산기가 2개인 담즙산염의 경우도 담즙산염 복합체가 더 낮은 half-maximal 가용화농도를 나타냄을 알 수 있었다.³⁶⁾

결론

약전달계에 사용할 리포솜은 혈액속이나 위안의 여러조건에 대해서 안정해야하므로 리포솜의 담즙산염에 대한 안정성을 흡광도, 형광성 등을 측정하여 연구하였다.

자체만으로는 이중층을 형성하지 못하는 불포화 PE에 p-IgG를 2.5×10^{-4} mole/lipid mole 첨가함으로 안정한 리포솜을 만들 수 있었으며, particle analyzer로 측정된 리포솜의 크기는 LUV인 경우 120 nm 정도이다. IgG가 PE 리포솜을 형성하는데 필수적임을 알기 위해 papain으로 인한 리포솜의 분해 실험을 해 본 결과, papain으로 인한 리포솜의 분

해는 PE리포솜의 경우에만 나타난다. 따라서 IgG가 PE 리포솜 형성에 필수적임을 알 수 있다. calcein이 포집된 PE 리포솜이 1시간이 경과한 후 형광성 방출이 4% 정도로 안정한 리포솜이 형성되었다.

PE 리포솜의 안정성에 미치는 담즙산염이 영향을 본결과, 수산기가 2개인 담즙산염이 수산기가 3개인 담즙산염보다 리포솜을 가용화시키는 능력이 뛰어나다. 이는 수산기가 2개인 담즙산염이 수산기가 3개인 담즙산염보다 더 소수성을 띄므로 더 빨리 지질을 가용화시키기 때문이다. 수산기의 위치변화는 지질을 가용화시키는 데 큰 영향을 주지 않는다. glycine이나 taurine의 담즙산염 복합체가 머리부분을 변화시키지 않은 담즙산염보다 막을 교란시키는 능력이 크다.

문 헌

- 1) A.D. Bangham, in *Liposomes: From Physical Structure to Therapeutic Applications*, ed. by C.G. Knight, pp. 1-17, Elsevier/North-holland, 1981.
- 2) A.D. Bangham, in *Liposomes*, ed. by M.J. Ostro, pp. 1-21, Marcel Dekker, 1983.
- 3) E. Mayhew and D. Papahadjopoulos, in *Liposomes*, ed. by M.J. Ostro, pp. 289-292, Marcel Dekker, 1983.
- 4) R.L. Juliano and D. Stamp, Lectin-mediated attachment of glycoprotein-bearing liposomes to cells, *Nature*, **261**, 235-237, 1976.
- 5) A. Sulolia, B.K. Bachhawat and S.K. Podder, Interaction between lectin from ricinus communis and liposomes containing gangliosides, *Nature*, **257**, 802-804, 1975.
- 6) D. Schachter, Aggregation of liposomes by dextrans of high molecular weight, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **84**, 840-844, 1978.
- 7) G.G. Hammes and S.E. Schullery, Structure of macromolecular aggregates II. Construction of model membranes from phospholipids and polypeptides, *Biochemistry* **9**, 2555-2563, 1970.
- 8) G. Gregoriadis and E. D. Neerunjun, Homing of liposomes to target cells, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **65**, 537-544, 1975.
- 9) T.D. Heath, D. Robertson, M.S.C. Birberk and A.J.S. Davies, Covalent attachment of horseradish peroxidase to the outer surface of liposomes, *Biochim. Biophys. Acta*, **599**, 42-62, 1980.
- 10) T.D. Heath, R.T. Fraley and D. Papahadjopoulos, Antibody targeting of liposomes: cell specificity obtained by conjugation of F(ab')₂ to vesicle surface, *Science*, **210**, 539-541, 1980.
- 11) F.J. Martin, W.L. Hubbell and D. Papahadjopoulos, Immunospecific targeting of liposomes to cells: A novel and efficient method for covalent attachment of Fab' fragments via disulfide bond, *Biochemistry*, **20**, 4229-423, 1981.
- 12) Y. Hashimoto, H. Endoh and M. Sugawara, in *Liposome Technology*, vol. III, ed. by G. Gregoriadis, p. 41-49, CRC Press, 1984.
- 13) D. Shinha and F. Karush, Attachment to membranes of exogenous immunoglobulin conjugated to a hydrophobic anchor, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **90**, 554-560, 1979.
- 14) A. Huang, L. Huang and S., J. Kennel, Monoclonal antibody covalently coupled with fatty acid, *J. Biol. Chem.*, **255**, 8015-8018, 1980.
- 15) L. Huang and S.J. Kennel, Binding of immunoglobulin G to phospholipid vesicles by sonication, *Biochemistry*, **18**, 1702-1707, 1979.
- 16) D. Barrow and B.R. Lentz, Large vesicle contamination in small, unilamellar vesicles, *Biochim. Biophys. Acta.*, **597**, 92, 1980.
- 17) J.-G. Kim and J.-D. Kim, Turbidity and stability of sonicated lecithin liposomes, *Hwahak Konghak*, **26**, 171-177, 1988.
- 18) J.-G. Kim and J.-D. Kim, Solubilization behavior of egg yolk phosphatidylcholine by nonionic surfactant, poly oxyethylene alkyl ethers'', *Biochim. Biophys. Acta submitted*, 1990.
- 19) R. Schubert, K. Beyer, Hartwig, and K.-H. Schmidt, Structural changes in membranes of large unilamellar vesicles after binding of

- sodium cholate, *Biochemistry*, **25**, 5263-5269, 1986.
- 20) R. Schubert and K.-H. Schmidt, Structural changes in vesicle membranes and mixed micells of various lipid compositions after binding of different bile salts, *Biochemistry*, **27**, 8787-8794, 1988.
 - 21) Y. Lapidot, S. Rappoport and T. Woman, Use of esters of N-hydroxysuccinimide in the synthesis of N-acylamino acids, *J. Lipid Res.* **8**, 142-145, 1967.
 - 22) A. Huang, Y.S. Tsao, S.J. Kennel and L. Huang, Characterization of antibody covalently coupled to liposomes, *Biochim. Biophys. Acta*, **716**, 140-150, 1982.
 - 23) L. Huang, A. Huang and S.J. Kennel, in *Liposome Technology*, vol. III, ed. by G. Gregoriadis, pp. 51-61, CRC Press, 1984.
 - 24) R.J.Y. Ho, B.T. Rouse, and L. Huang, Target-sensitive immunoliposomes: Preparation and characterization, *Biochemistry*, **25**, 5500-5506, 1986.
 - 25) J. W. Goding, in *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 126-127, Academic Press, 1986.
 - 26) W.J. Herbert, P.C. Wilkinson and D.I. Stott, in *Dictionary of Immunology*, p. 108, Blackwell Scientific Pub., 1985.
 - 27) P.R. Cullis and B. de Kruijff, Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **559**, 399-420, 1979.
 - 28) J. W. Goding, in *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, p. 127-129, Academic Press, 1986.
 - 29) Theodore, F. Taraschi, Arnold T.M. van der Steen, B. de Kruijff, C. Tellier, and A.J. Verkleij, Lectin-receptor interactions in liposomes: Evidence that Binding of Wheat Germ agglutinin to glycoprotein-phosphatidylethanolamine vesicles induced nonbilayer structures, *Biochemistry*, **21**, 5756-5764, 1982.
 - 30) S. Marcelja and N. Radic, Repulsion of interfaces due to boundary water, *Chem. Phys. Letters*, **42**, 129-130, 1976.
 - 31) D.M. LeNeveu, R.P. Rand and V.A. Parsegian, Measurement of forces between lecithin bilayers, *Nature*, **259**, 601-603, 1976.
 - 32) H.H. Kang, J.-G. Kim, J.-D. Kim and O.S. Lee, Paper presented at 8th International Conference on Surfactant in Solution, held at Gainesville, Fla, June 10-15, 1990.
 - 33) J.B. Carye, JR., in *The Bile Acids*, vol. II, ed. by P.P. Nair and D. Kritchevsky, pp. 55-82, Plenum Press, 1971.
 - 34) C.J. O'Connor, R.G. Wallace, K. Iwamoto, T. Taguchi and J. Sunamoto, Bile salt damage of egg phosphatidylcholine liposomes, *Biochim. Biophys. Acta*, **817**, 95-102, 1985.
 - 35) D.M. Small, in *The Bile Acids: Chemistry, Physiology, and Metabolism*, vol. 1: Chemistry, ed. by P.P. Nair and D. Kritchevsky, pp. 249-355, Plenum press, 1971.
 - 36) E.O. Lee, The effects of Bile Salts on the Stabilities of DOPE-liposomes incorporated with Immunoglobulin G (IgG), M. S. Thesis, KAIST, 1990.