

캄프토테신 유도체의 리포솜 제형 개발

심진영 · 김진석[†]

숙명여자대학교 약학대학
(2001년 5월 14일 접수)

Development of Liposomal Formulation of A Camptothecin Derivative

Jin-Young Shim and Jin-Seok Kim[†]

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea
(Received May 14, 2001)

ABSTRACT—CKD602, a camptothecin derivative, is a synthetic and water-soluble anticancer agent possessing of topoisomerase I inhibiting activity. DPPC and DSPE-PEG liposomal formulations entrapped with CKD602 were developed. DSPE-PEG liposome, or PEGylated liposome, encapsulating CKD602 composed of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), cholesterol and distearoyl-N-monoethoxy poly (ethyleneglycol) succinylphosphatidylethanolamine (DSPE-PEG₂₀₀₀) (22:11:2) was prepared by reverse-phase evaporation method. Formed liposomes were characterized in terms of the morphology, size and encapsulation efficiency. To elucidate the *in vitro* stability, PEGylated liposome was incubated in human plasma, and the adsorbed proteins onto the surface of liposomes were applied to the SDS-PAGE. *In vitro* cytotoxicity of CKD602 encapsulated in PEGylated liposome was studied in human cervical cancer cell line (HeLa). CKD602 in PEGylated liposome was found to be 40-fold more effective (IC₅₀ = 1 nM) than free CKD602 (IC₅₀ = 40 nM) in inhibiting the growth of HeLa cells *in vitro*.

Keywords—PEGylated liposome, Camptothecin derivative, CKD602

Camptothecin은 중국의 *Camptotheca acuminata*에서 처음 분리된 pentacyclic alkaloid로써 몇 가지의 동물 암 모델에서 항암 작용을 가지고 있는 것으로 알려져 있다.¹⁾ 그 항암 기전은 camptothecin이 topoisomerase I과 DNA 복합체에 안정적으로 결합하여 DNA 합성이 활성화되는 세포의 S-phase에 영향을 미쳐 DNA 합성을 저해함으로써 암세포의 성장 및 증식을 억제하는 것이다.²⁾ 그러나 camptothecin은 매우 낮은 수용성을 갖기 때문에 수용성을 높이기 위한 유도체 연구가 활발히 진행되고 있다.³⁾ CKD602는 (주)종근당이 개발한 수용이 개선된 camptothecin계 항암제로써 Figure 1과 같은 화학구조를 가지고 있다.

리포솜은 여러 겹의 인지질 이중층 막으로 이루어진 약물 수송체로서 많은 약물의 표적 지향적 전달에^{4,7)} 적용되고 있으며 최근에는 유전물질의 전달에 관한 연구도 활발히 진행되고 있다.⁸⁻¹⁰⁾ 약물 수송체로 리포솜을 사용할 때의 장점으로서는 난용성 약물의 가용화나 특정 장기에서 독성을 줄여주는 것을 들 수 있고, 단점으로 혈장 단백질과 결합하여 혈

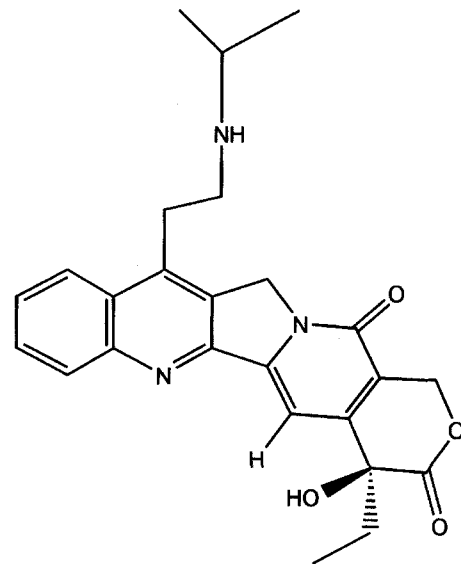


Figure 1—Chemical structure of camptothecin derivative, CKD602

중 반감기가 짧아진다는 것과 리포솜 현탁액의 보관시의 불안정성이라 할 수 있다.^{11,12)} 이러한 단점을 보완하기 위하여 리포솜의 크기를 작게 하고 막의 유동성을 증가시키거나 리

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02)710-9574, E-mail : jskim@sdic.sookmyung.ac.kr

리포솜 표면에 친수성을 부여하거나 음전하를 띠도록 하는 연구가 되어지고 있다.¹²⁾

본 연구에서는 혈장에서 안정하여 혈중 반감기를 높일 수 있는 리포솜에 CKD602를 봉입하여 리포솜의 일반적인 성질을 관찰하였고 free drug과 비교하여 그 항암 효과를 *in vitro* 상에서 평가하였다.

실험방법

시약 및 기기

Camptothecin 유도체인 CKD602는 (주)중근당으로부터 제공받았으며, dipalmitoylphosphatidylcholine(DPPC), cholesterol(Chol), distearoyl-N-monoethoxy poly(ethyleneglycol) succinylphosphatidylethanolamine(DSPE-PEG₂₀₀₀)과 3-[4,5-dimethyl thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)는 Sigma Chemical Co., Ltd.(St. Louis, U.S.A.)에서 구입하였다. SDS-PAGE를 하기위해 사용된 시약들 중 glycine과 ammonium persulfate(Bio-Rad, hercules, CA, U.S.A.)를 제외하고 모두 Sigma Chemical Co., Ltd.(St. Louis, U.S.A.)에서 구입하였다. 세포배양에 사용된 minimum essential medium(MEM), fetal bovine serum(FBS), trypsin-EDTA는 Gibco BRL(Grand Island, NY)에서 구입하였다. 리포솜의 혈장 단백질 흡착 정도를 알기 위한 실험에서 사용된 혈장은 중앙 적십자 혈액원에서 구입하여 사용하였다. 기타 시약 및 용매는 특급 또는 cell culture grade를 사용하였다.

리포솜의 봉입률은 UV/Visible spectrophotometer(Ultra-spec 3000, Amersham Pharmacia Biotech, UK)로 측정하였다.

리포솜의 형태학적 성질을 관찰하기 위해 scanning electron microscope(JSM-5410, JEOL, voltage:20 kV), transmission electron microscope(CM 20, Philips, voltage:200 kV), dynamic laser-light scattering(Malvern Zetasizer(r)[®], Malvern Instruments Ltd., England)등이 사용되었다.

리포솜의 제조

리포솜의 제조는 봉입 효율이 좋은 Szoka등이 개발한 reverse-phase evaporation 방법을 이용하였다.¹³⁾ 지질의 조성은 DPPC:Chol(2:1) 또는 DPPC:Chol:DSPE-PEG₂₀₀₀(22:11:2)의 몰 비로 하였다. 비교적 CKD602의 용해도가 높은 5% dextrose 용액에 CKD602를 8 mM 농도로 용해시켜 수상으로 하였으며 이 때의 삼투압은 290 mOsm/kg이었고 pH는 5.5~6.0 이었다. 리포솜으로부터 봉입되지 않은 CKD602를 분리하기 위하여 1×12 cm의 Shephadex G-75 column을

사용하였다. 리포솜 제조에 사용된 모든 기구와 시약은 멸균 하였으며 clean bench에서 작업하였다. 봉입 효율 측정을 위해 리포솜 현탁액을 5% dextrose 용액에 희석하고 Bligh and Dyer방법¹⁴⁾을 이용하여 CKD602를 리포솜으로부터 추출 분리한 후 254 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 봉입률을 구하였다.

리포솜의 평가

리포솜 입자의 크기 및 분포 - 리포솜 현탁액을 300배 희석하여 dynamic laser-light scattering을 이용하여 리포솜 입자의 평균 크기와 분포를 24°C에서 He-Ne laser광원의 670 nm의 파장을 이용하여 측정하였다.

리포솜의 morphology - 냉동 건조한 리포솜을 gold coating한 후 scanning electron microscopy(SEM)을 이용하여 관찰하였고 리포솜을 negative staining 하기 위해 2% ammonium molybdate(pH 7.4) 용액으로 처리한 후 transmission electron microscopy(TEM)으로 관찰하였다(data를 나타내지는 않았음).

리포솜의 혈장 단백질 흡착 실험 - 리포솜 입자의 혈장 단백질과의 상호작용을 관찰하기 위하여 일반 리포솜과 PEG-ylated 리포솜을 신선한 혈장과 37°C, 50 rpm의 shaking incubator(Vision scientific co. Ltd., Korea)에서 5, 10, 30, 60 min 동안 반응시켜 리포솜 표면에 흡착된 혈장단백질을 SDS-PAGE kit(Mini-PROTEAN 3, Bio-Rad, hercules, CA, U.S.A.)를 사용하여 분리하였다. 사용한 acrylamide gel의 농도는 10%로 하였다.

In vitro 세포 성장 억제 효과 - 실험에 사용된 세포는 사람의 자궁 경부암 세포인 HeLa cell을 사용하였으며, HeLa cell은 37°C, 5% CO₂의 incubator(Sanyo Electric co. Ltd., Japan)에서 10% FBS가 포함된 MEM에서 배양하였다. 약물 처리를 위해서는 같은 배지에 1.2×10⁵ cells/ml 농도의 세포를 96-well plate(Nunc, Denmark)의 각 well당 90 μl씩 seeding 하여 6시간 배양한 후, CKD602의 리포솜 현탁액과 5% dextrose 용액에 녹인 CKD602 용액 10 μl를 triplicate로 하여 처리한 후 72시간 배양하였다. 그 후 배양액 속에 5 μg/ml 농도의 MTT 용액 15 μl씩 가하여 3시간 배양한 후 상등액을 제거하고 DMSO 150 μl을 가하여 생성된 formazane을 용해 시킨 다음 ELISA reader(Dynatech MR5000, Dynatech Laboratories, U.S.A.)로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 평균 percent growth 값을 아래의 식에 의해 구하여 semi-logarithmic scale그래프를 그렸다.^{16,17)}

이 그래프로부터 각 formulation에서의 CKD602의 IC₅₀ 값을 구하였다.

$$\% \text{ Growth} = \frac{[\text{sample count} - \text{original count}]}{[\text{control count} - \text{original count}]} \times 100$$

In vitro wash experiment - 시간에 따른 약물 및 리포솜의 세포 안으로의 uptake와 cytotoxicity 및 *in vitro* 환경에서의 두 리포솜 제형의 안정성을 비교하기 위하여 HeLa cell을 위와 같은 방법으로 seeding 하여 6시간 배양한 후 각각 10 nM과 1 nM 농도의 CKD602 및 CKD602 리포솜 제형을 포함하는 배지로 바꾸어주고 4시간을 더 배양한 후 150 µl PBS 용액으로 세척한 후에 약물이 포함되지 않은 배지에서 68시간을 더 배양하여 약물을 포함한 채 72시간 배양한 것과 세포의 평균 percent growth 값을 구하여 비교하였다.

결과 및 고찰

리포솜의 평가 - DPPC:Chol(2:1)의 몰 비율로 제조한 리포솜의 경우 CKD602의 평균 봉입률은 19%이었고 DSPE-PEG₂₀₀₀ 약 6 mol%를 가하여 DPPC:Chol:DSPE-PEG₂₀₀₀ (22:11:2)의 몰 비율로 제조한 PEGylated 리포솜의 경우 CKD602의 봉입률은 18%로 DPPC 리포솜과 봉입 효율이 비슷했다. Dynamic laser-light scattering을 이용하여 관찰한 리포솜 입자의 평균 크기는 DPPC 리포솜이 389 nm였고 PEGylated 리포솜이 402 nm로 두 formulation간에 큰 차이가 없었다(Table I).

리포솜의 혈장 단백질 흡착실험 - 리포솜을 신선한 사람 혈장과 5, 10, 30, 60 min 반응시킨 후 흡착된 혈장 단백질을 SDS-PAGE 전기영동하여 분리한 결과 Figure 2에 나타난 바와 같이 PEGylated 리포솜은 일반 리포솜에 비하여 혈장 단백질 흡착 정도가 현저히 적었으며 특별히 혈장 단백질의 55%가량을 차지하고 있는 알부민(66 kD)과 heavy chain IgG(54 kD)의 흡착 감소 정도가 두드러졌다. 또한 DPPC 리포솜은 혈장과의 반응시간이 길수록 혈장 단백질의 흡착량이 증가하는데 비하여 PEGylated 리포솜은 반응시간이 길어져도 단백질 흡착량이 증가하지 않았다.

In vitro 항암 효과 - MTT assay 방법¹⁴⁾ 의한 HeLa cell에

Table I-Encapsulation Efficiency and Size of Different Liposome Formulations

Liposome composition	Encapsulation efficiency (%)	Size (nm)
DPPC:Chol (2:1)	19 ± 4.3	389.3 ± 196.2
DPPC:Chol:DSPE-PEG (22:11:2)	18 ± 4.4	402.4 ± 182.4

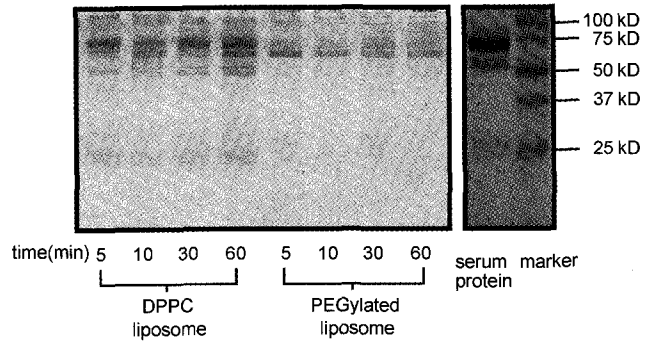


Figure 2-SDS-PAGE analysis of pattern of adsorbed plasma proteins to the liposome.

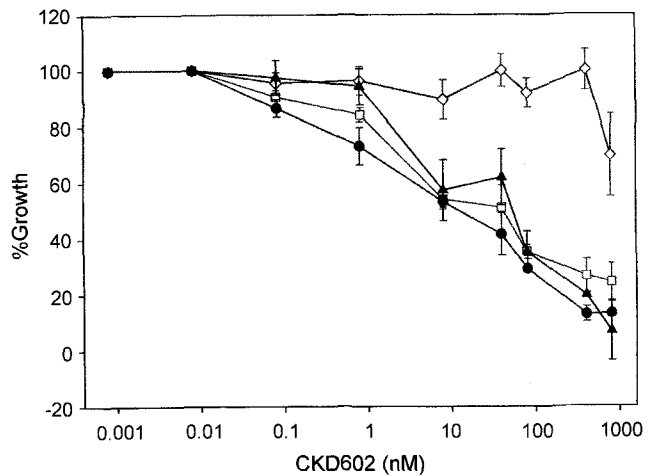


Figure 3-Growth inhibition of HeLa cells by CKD602 in DPPC liposome and free CKD602
 Keys : -◇- empty DPPC liposome; -□- free CKD602; -▲- empty DPPC liposome+free CKD602; -●- CKD602 in DPPC liposome.

대한 liposomal CKD602의 세포 성장 억제효과는 Figure 3, 4와 같았다. DPPC 리포솜에 봉입된 CKD602와 PEGylated 리포솜에 봉입된 CKD602의 50% 세포 성장 억제농도(IC₅₀)는 각각 10 nM과 1 nM로서 free CKD602의 40 nM에 비하여 각각 4배 및 40배 뛰어날 정도로 높은 세포 성장 억제를 보였다(Table II). 약물을 봉입하지 않은 리포솜(empty liposome)과 CKD602를 단순 혼합하여 세포에 처리하였을 때에

Table II-Potency of CKD602 in Different Liposome Formulation in HeLa Cells

Liposome composition	IC ₅₀ ^a (nM)	Potency Increase Factor (PIF) ^b
Free CKD602	40	-
DPPC: Chol(2:1)	10	4
DPPC: Chol:DSPE-PEG (22:11:2)	1	40

^a 50% growth inhibitory concentration of CKD602

^b PIF = (IC₅₀ of free drug)/(IC₅₀ of encapsulated drug)

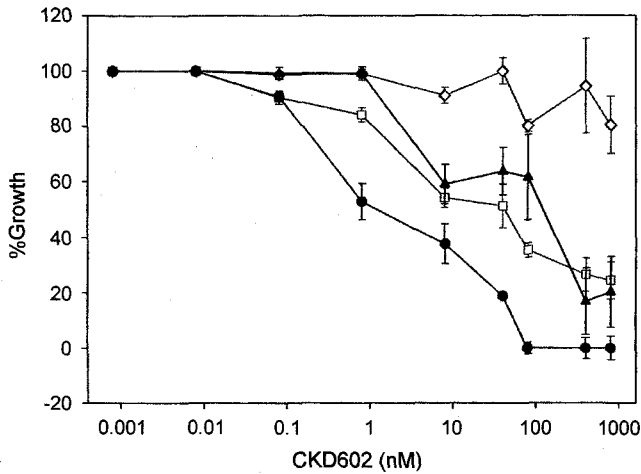


Figure 4—Growth inhibition of HeLa cells by CKD602 in PEGylated liposome and free CKD602.
 Keys : -◇- empty PEGylated liposome; -□- free CKD602; -▲- empty PEGylated liposome+free CKD602; -●- CKD602 in PEGylated liposome.

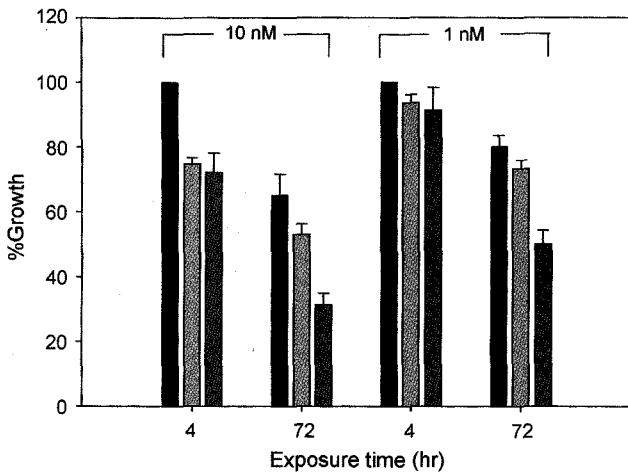


Figure 5—Relationship between incubation time (4 and 72 hr) and growth inhibition of HeLa cells by free CKD602 (black), CKD602 in DPPC liposome (light gray) and CKD602 in PEGylated liposome (dark gray).

는 이러한 효과가 없는 것으로 보아 리포솜의 delivery system으로서의 효율이 확인되었다. 또한 CKD602를 함유하지 않는 empty liposome은 비교적 세포의 성장 억제에 영향을 미치지 않았다.

In vitro wash experiment - 약물과 함께 4시간동안 배양한 경우에는 두 리포솜 제형 간에 세포 성장 억제 효과의 차이가 없었으나 72시간을 배양한 경우에 PEGylated 리포솜이 DPPC 리포솜에 비하여 약 20%가량 세포 성장 억제 효과가 뛰어났다. 이러한 효과는 약물의 농도가 10 nM과 1 nM일 때에 모두 동일하였다.

결론

이상에서 관찰한 바와 같이 CKD602를 봉입한 DPPC 리포솜과 PEGylated 리포솜을 제조하여 형태학적 및 물리적 성질을 관찰하고 세포 성장 억제 실험을 하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. CKD602를 봉입한 PEGylated 리포솜 및 DPPC 리포솜의 크기와 봉입률에서는 유의한 차이가 없었다.

2. PEGylated 리포솜은 혈장 단백질과 반응하였을 때 DPPC 리포솜에 비하여 혈장 단백질의 흡착정도가 현저히 낮아 혈중에서 안정할 것으로 기대된다.

3. PEGylated 리포솜에 봉입된 CKD602는 free drug보다 HeLa 세포에서 약 40배 높은 세포 성장 억제 효과를 나타냈으며 DPPC 리포솜 보다는 약 10배 높은 세포 성장 억제 효과를 나타냈다.

4. *In vitro* 환경에서도 PEGylated 리포솜은 오랜 시간동안 안정하여 세포 안으로의 uptake가 꾸준히 일어나 cytotoxicity를 나타낸다.

결론적으로, 본 연구는 CKD602를 봉입한 PEGylated 리포솜을 이용한 새로운 formulation의 개발 가능성을 제시하였고, 향후 다양한 PEGylated 리포솜의 조성을 이용하여 혈액 중에서 보다 안정하고 혈중 반감기를 증가시킬 수 있는 formulation의 개발이 기대된다.

감사의 글

본 연구는 숙명여자 대학교 1999년도 교비연구비 지원에 의해 수행되었으며, 사용된 CKD602는 (주)종근당으로부터 공급 받았기에 이에 감사 하는 바이다.

문헌

- 1) L. P. Rivory and J. Robert, Molecular, cellular, and clinical aspects of the pharmacology of 20(s)camptothecin and its derivatives, *Pharm. Ther.* **68**, 2, 269-296 (1995).
- 2) S. B. Horwitz and M. S. Horwitz, Effect of camptothecin on the break-age and repair of DNA during the cell cycle, *Cancer Res.*, **33**, 2834-2836 (1973).
- 3) S. Sawada, T. Yokokura and T. Miyasaka, Synthesis of CPT-11(irino-tecan hydrochloric trihydrate), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **803**, 12-28 (1996).
- 4) E. Mayhew, M.Cimino, J. Klemperer, R. Lazo, J. Wiemkowski and S. Arbusk, Free and liposomal doxorubicin treatment of intraperitoneal colon 26 tumor: Therapeutic and pharmacologic studies, *Sel. Cancer Ther.*, **6**, 193-209 (1990).
- 5) J. Vaage, D. Donovan, E. Mayhew, P. Uster and M. Woodle,

- Therapy of mouse mammary carcinomas with vincristine and doxorubicin encapsulated in sterically stabilized liposome, *Int. J. Cancer*, **54**, 959-964 (1993).
- 6) Y. Rustum, C. Dave, E. Mayhew, D. Papahadjopoulos, Role of liposome type and route of administration in the antitumor activity of liposome-entrapped 1-β-D-arabinofuranosylcytosine against mouse L 1210 leukemia, *Cancer Res.*, **39**, 1390-1396 (1979).
 - 7) S. S. Daoud, M. I. Fetouh and B. C. Giovanella, Antitumor effect of liposome-incorporated camptothecin in human malignant xenografts, *Anticancer Drugs*, **6**, 83-93 (1995).
 - 8) X. Gao and L. Huang, A novel cationic liposome reagent for efficient gene transfection in mammalian cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **179**, 280-285 (1991).
 - 9) S. Afion, C. K. Conrad and T. R. Flotte, Gene therapy vectors as drug delivery systems, *Clin. Pharmacokinet.*, **28**, 181-189 (1995).
 - 10) X. Gao and L. Huang, Cationic liposome-mediated gene transfer, *Gene Therapy*, **2**, 710-722 (1995).
 - 11) D. Papahadjopoulos, T. Allen, A. Garbizon, E. Mayhew, et al., Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 11460-11464 (1991).
 - 12) T. M. Allen, C. Hansen, F. Martin, C. Redemann and A. Y. Young, Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly (ethyleneglycol) show prolonged circulation half-lives *in vivo*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1066**, 29-36 (1991).
 - 13) F. Szoka and D. Papadopoulos, Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 4194-4198 (1978).
 - 14) E. G. Bligh and W. J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917 (1959).
 - 15) A. D. Bangham, R.W. Horn, Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface active agents as observed in the electron microscope, *J. Mol. Biol.*, **8**, 660-668 (1964).
 - 16) T. D. Heath, N. G. Lopez and D. Papahadjopoulos, The effect of liposome size and surface charge on liposome-mediated delivery of methotrexate-aspartate to cells *in vitro*, *Biochim. Biophys. Acta*, **820**, 74-84 (1985).
 - 17) T. Mosman, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; Application to proliferation and cytotoxicity assays *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63 (1983).