



Targetting에 의해 항암 물질을 투입할 수 있는 Polymeric Lipid Vesicles에 관한 연구

A Study on the Polymeric Lipid Vesicles Carrying
Anticancer Drug by Targetting

연구기관
한국과학기술원



과 학 기 술 처

제 출 문

과 학 기 술 처 장 관 귀 하

본 보고서를 "Targetting에 의해 항암 물질을 투입할 수 있는 polymeric lipid vesicle에 관한 연구" 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

1987년 7월 일

주관연구기관명 : 한국과학기술원
연구기관명 : 한국과학기술원
총괄연구책임자 : 김형만 (한국과학기술원 교수)
연구원 : 배운수 (한국과학기술원 학생)
한현숙 (한국과학기술원 학생)

여 백

요 약 문

I. 제 목

Targetting 에 의해 항암물질을 투입할 수 있는 polymeric lipid vesicle에 대한 연구

II. 연구 개발의 목적 및 중요성

Monomeric phospholipid vesicle은 drug delivery 수단으로 현재 외국에서 활발히 진행되고 있으나 pH에 sensitive한 연구는 별로 없는 것으로 안다. 특히 pH에 sensitive한 polymeric vesicle에 대한 연구는 전무하다고 본다. 국내에서는 liposome을 화장품 성분으로 이용하려는 연구는 진행 중이지만 drug delivery 방법은 없는 것으로 안다. 이 연구는 새로운 개념을 drug delivery system으로 이용하려는 것이기 때문에 장기적인 연구 개발이 필요 하다.

III. 연구 개발의 내용 및 범위

1차 년도는 pH에 대해 제일 sensitive한 monomeric vesicle의 성분을 찾는 것이다. 중성에서 vesicle이 형성되지 않는 phosphatidly ethanolamine 과 지방산을 혼합하여 첫째는 안정한 vesicle을 형성 하느냐를 보고 둘째로 pH와 온도에 따르는 이들 막의 permeability 의

변화를 형광 probe를 이용하여 측정한다. 특히 중요한 점은 체온인 37 °C에서 pH 7.4에서는 안정하고 pH 6.5 부근 이하에서 permeability가 많이 증가하는 system을 찾는 것이다.

VI. 연구 개발 결과 및 활용에 대한 건의

pH에 sensitive 한 liposome을 찾는 데 있어서 phosphatidyl ethanolamine 70% 와 palmitic acid 30%를 함유한 혼합 지방질 vesicle이 제일 좋다는 것이 판명되었다. 37 °C에서 pH 7.4에서는 15 %의 내용물이 방출되나 pH 6.5에서는 50% 이상이 방출된다. Palmitic acid 대신에 stearic acid가 존재할 때는 palmitic acid 때와 유사한 유사한 결과가 나왔으나 이중 결합을 가진 지방산의 존재하에서는 vesicle이 낮은 pH에서도 비교적 안정한 것을 발견 하였다. 이러한 계통적인 screening 연구의 결과로 목적에 최적 인 혼합 지방질 성분을 발견하였다.

SUMMARY

The pH of malignant tumor cell is about 6.5 as compared to the value of 7.4 for the normal cells. For targetting cancer drugs entrapped in liposomes as a means of the drug delivery systems we have investigated liposomes which are stable at physiological pH but unstable below pH 6.5 so that the drugs inside of the vesicles leak out at low pH. Of various compositions studied the greatest sensitivity was found with the vesicles composed of phosphatidylethanolamine and palmitic acid. We are currently working on the synthesis of polymerizable phosphatidylethanolamine with an ultimate objective of preparing stable polymeric liposome composed of phosphatidylethanolamine and palmitic acid which may be used as a cancer drug delivery system targetted to malignant tumor cells.

여 백

CONTENTS

Chapter 1.	Introduction	11
Chapter 2.	Experiment	13
Section 1.	Materials and Instruments	13
Section 2.	Pareparation of vesicles	13
Section 3.	Permeability test	14
Chapter 3.	Results and Discussion	15
Section 1.	Effect of pH on the fluorescence intensity of ANTS	15
Section 2.	Effect of pH on the stability of PE : unsaturated fatty acid liposome	15
Section 3.	Effect of pH on the stability of PE : saturated fatty acid liposome	20
Section 4.	Comparison between three different PE : fatty acid liposomes	28
Chapter 4.	Conclusion	30
REFERENCES	31

여 백

목 차

제 1 장 서 본	11
제 2 장 실험	13
제 1 절 시약 및 기기	13
제 2 절 리포좀의 제조	13
제 3 절 리포좀의 불안정화 실험	14
제 3 장 결과 및 고찰	15
제 1 절 ANTS의 형광에 대한 pH의 영향	15
제 2 절 PE : 불포화 지방산 리포좀의 pH에 따른 stability .	15
제 3 절 PE : 포화 지방산 리포좀의 pH에 따른 stability ..	20
제 4 절 각각의 PE : 지방산 리포좀에 대한 비교	28
제 4 장 결 론	30
참고문헌	31

여 백

제 1 장 서 론

의약품을 인체내에서 targetting에 의해서 필요한 부분으로만 보내고 거기서 controlled release를 시키면 그의 효율적인 인체 투입 뿐 아니라 부작용의 감소도 가능하기 때문에 이에, 대한 연구는 현재 세계적인 관심사가 되고 있다. 이 중 controlled drug release 의 방법으로는 hydrogel이나 다른 matrix에 약을 entrap시켜 서서히 방출 시키거나 polymer에 약품을 화학적으로 결합시킨 후 서서히 해리되므로서 방출시키는 것이 가장 많이 연구가 되고 있다. 최근에 와서는 phospholipid 를 물에 넣었을 때 얻어지는 liposome이나 vesicle들을 의약품의 carrier 로서 이용하려는 연구가 많이 진행되고 있다. Liposome은 다른 약품 carrier와는 달리 그 성분인 phospholipid가 생체에 원래 존재하는 것과 또 vesicle 내부에 의약품이 들어가 있기 때문에 보호가 되고 carrier 무게당 deliver되는 약품의 양이 크다는 이점이 있다. 또 하나는 controlled release 뿐만 아니라 약물이 필요한 조직에만 배달되도록 targetting을 하는 것이 중요한 데 vesicle 표면에 antibody등을 부착시켜 이 목적에 쓰일 가능성이 많다. 그러나 이 targetting문제는 아직도 잘 해결이 되고 있지 않다. 본 연구는 암 조직의 특수성을 이용하여 항암물질을 targetting 에 의해 암조직에 공급하는 drug delivery system을 연구 개발하려는 데 그 목적이 있다. 정상적인 조직은 그 pH가 7 이상인데 비해 암 조직은 pH가 6.5 정도로 떨어진다. 어떠한 drug delivery system이 낮은 pH 에서만 약품을 방출하면 암세포에의 targetting에 이상적이 될 것인데 phospholipid vesicle이 pH 6.5 근처에서 파괴되면 대단히 좋은 항암물질 의 delivery system이 될 것이다. Phospholipid가 bilayer를 형성하는 원인은 극성인 머리 부분과 소수성인 꼬리 부분이 한 분자내에 연결되어 있어 amphiphile을 이루기 때문인데 만일 머리 부분의 극성이 감소되면 bilayer가 파괴된다. 지금까지 이러한 amphiphile을

포함하여 pH에 sensitive한 vesicle이 형성된 예는 N-palmitoyl homocystein을 함유한 phosphatidylcholine vesicle과 oleic acid를 함유한 phosphatidyl ethanolamine vesicle 이다. 이들은 pH 6 - 6.5사이에서 vesicle이 파괴되어 그 내용물을 release 할 수 있는 것이 증명되었으나 vesicle이 파괴되는 조건은 그 구성 성분비와 phospholipid의 acyl chain의 길이에 따라 다르기 때문에 이에 대한 계통적인 연구를 진행하였다.

제 2 장 실험

제 1 절 시약 및 기기

Bovine brain phosphatidylethanolamine (PE)과 stearic acid, palmitic acid, oleic acid 는 Sigma 에서 구입하였으며 Thin layer chromatography 로 one spot 임을 확인하였다. 8-Aminonaphthalene - 1,3,6 - trisulfonic acid disodium salt (ANTS) 와 p-xylylene bis(pyridinium)bromide (DPX) 는 Molecular Probes, Inc. 에서 구입하였다. Vesicle의 turbidity 측정에는 Gilford 260 UV-Visible Spectrophotometer 를 사용하였다. 각 시료의 pH는 ALTEX Model 4500 Digital pH Meter (BECKMAN) 을 사용하여 측정하였다. Liposome에 entrap 되었던 물질의 liposome으로부터의 release는 JASCO FP-770 Spectrofluorometer를 사용하여 측정하였다.

제 2 절 리포솜의 제조

Liposome 은 Bangham 의 방법에 의해 만들었다. Chloroform 용액에 녹인 PE 와 지방산 (7:3 몰 비율) 을 유리 vial 에 넣고 질소 가스하에서 chloroform 을 완전히 날려 보내 얇은 lipid film 을 만들었다. 여기에 encapsulation 시킬 수용액을 넣고 40 °C 에서 incubation 해 주며 hydration 시킨 후 강렬하게 vortex 로 mixing 을 해 주어 lipid 를 재현탁시켰다. Lipid 농도는 Vaskowsky 등의 방법에 의한 lipid phosphate assay 에 의해서 결정하였다.

제 3 절 리포솜의 불안정화 실험 (Permeability test)

주위 medium 의 pH 에 따른 liposome 의 stability 의 측정은 liposome 에 ANTS 와 DPX 를 entrap 시켜 DPX 의 quenching 에 의해 형광을 발하지 못하던 ANTS 가 liposome 의 이중막이 불안정해지면서 liposome 밖으로 새어 나와 희석효과로 인해 형광을 발하게 되는 것을 측정하므로써 수행하였다. 12.5 mM ANTS / 45 mM DPX / 68 mM NaCl / 10 mM TES, pH 7.5 를 lipid film에 넣고 40 °C 에서 incubation 하면서 vortex mixer 로 현탁시킨 뒤 Sephadex G-50 column (1 * 30 cm) 으로 gel filtration 하여 entrap 되지 않은 marker 를 제거하였다. 이 때 elution buffer 로는 150 mM NaCl / 0.1mM EDTA / 10 mM TES, pH 7.4 를 사용하였다. 형광의 측정은 Spectrofluorometer (JASCO) 를 사용하였다. Fluorometer cell 에 0.1 ml 의 liposome 을 isotonic buffer (pH 7.4) 로 전체가 2 ml 가 되도록 현탁시키고 time 0 에 각 농도의 acetic acid 수용액을 10 씩 넣어 medium 의 pH 를 적절하게 맞추었다. 각 시료의 pH 값은 형광측정이 끝난 후 pH meter 를 사용하여 측정하였다. Fluorescence emission 은 545 nm 에서 연속적으로 측정하였으며 (excitation 360 nm) Corning 3-69 cut off filter 를 사용하였다. Cuvette 의 용액은 magnetic stirrer 를 써서 형광을 측정하는 동안 계속해서 mixing 해 주었다. Vesicle의 aggregation 이나 크기 증가는 spectrophotometer 를 사용해서 450 nm 에서의 turbidity 증가로 측정하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 ANTS의 형광에 대한 pH의 영향

그림 1 은 각 pH에서의 ANTS의 fluorescence intensity인 데 pH 7.5 에서 5.5 사이에서 상대적인 값이 3% 정도 밖에 떨어지지 않아 이 범위에서는 pH에 거의 무관함을 보여주고 있다. 이 pH 범위에서 형광의 세기가 75 % 이상이 변하는 carboxyfluorescein과 비교하여 볼 때 이 실험에는 ANTS를 사용하는 것이 적당하다고 하겠다. ANTS는 carboxyfluorescein 이나 calcein과는 달리 자신의 excitation spectrum 과 emission spectrum이 겹치지 않기 때문에 self-quenching을 나타내지 않는다. 그러나 DPX에 의해서 심한 quenching이 일어나는데 이 현상은 DPX의 농도 즉 ANTS와 DPX의 거리에 의존하고 있다. 이것은 quenching이 complex 형성에 의한 것이 아니라 nonradiative energy transfer에 의한 것임을 시사해 준다. 그러므로 dequenching 되는 속도는 ANTS 와 DPX가 medium으로 희석되는 속도에 좌우된다. 위의 여러가지 점들을 고려하여 liposome의 이중막의 불안정화로 오는 leakage 현상을 측정 하는데 ANTS와 DPX를 사용하였다.

제 2 절 PE:불포화 지방산 liposome의 pH에 따른 stability

그림 2,3 은 medium의 각 pH에서 PE:oleic acid liposome (7:3 몰 비율) 으로부터 새어나오는 ANTS의 시간에 따른 패턴을 보여준다. 약산성에서도 PE:oleic acid liposome이 불안정화 되어 안에 entrap 되었던 물질이 새어 나옴을 볼 수 있으며 pH가 낮아질 수록 그 정도가 커지고

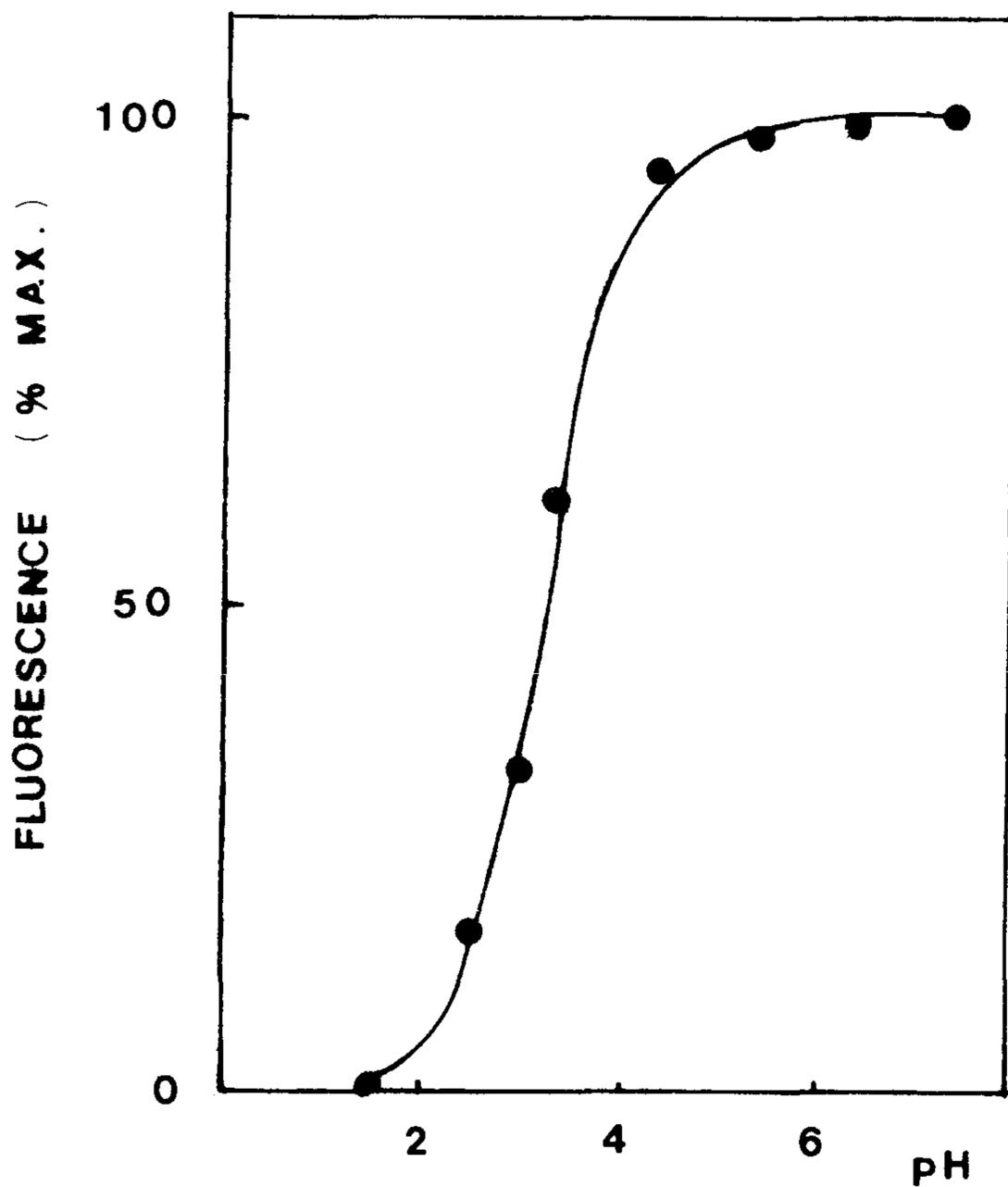


Figure 1. Effect of pH on ANTS fluorescence. The fluorescence of 0.01 mM ANTS was measured at various pH values. 100% fluorescence was set with 0.01 mM ANTS in Tris, pH 7.5; 0% fluorescence was set with buffer.

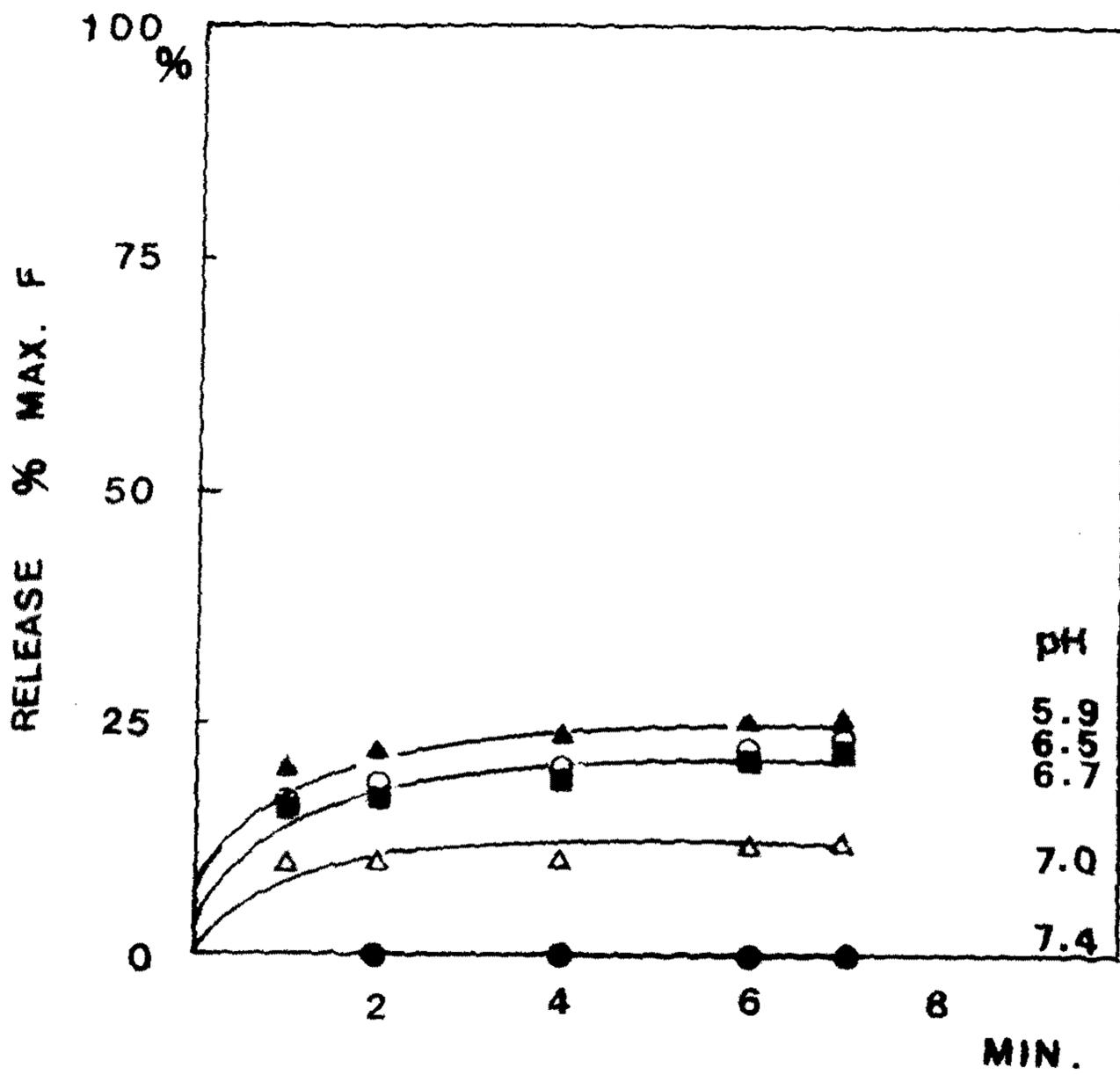


Figure 2. Time course of release of oleic acid / PB liposomes in media of various pH at 23°C.

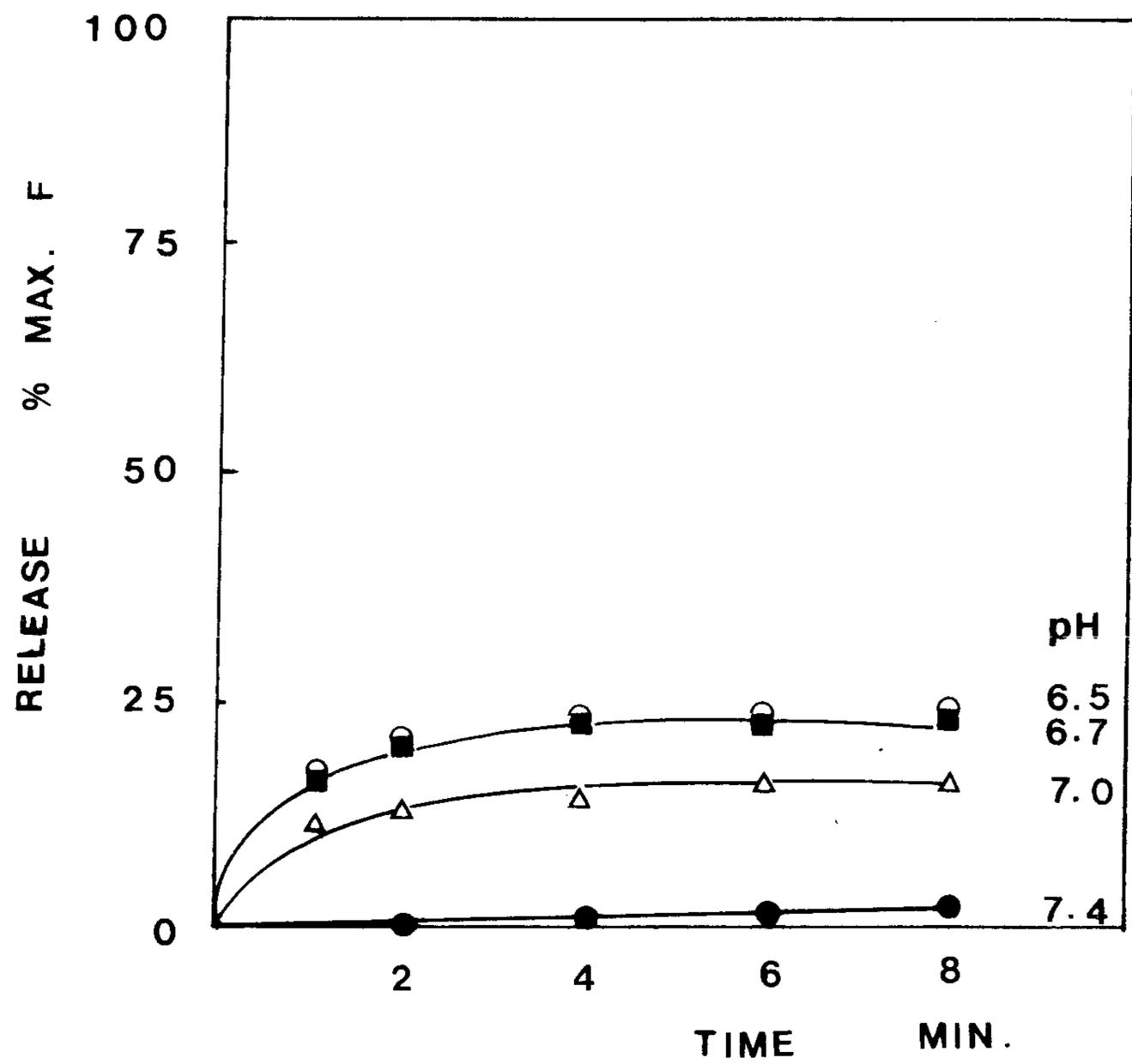


Figure 3. Time course of release of oleic acid / PE liposomes in media of various pH at 37°C.

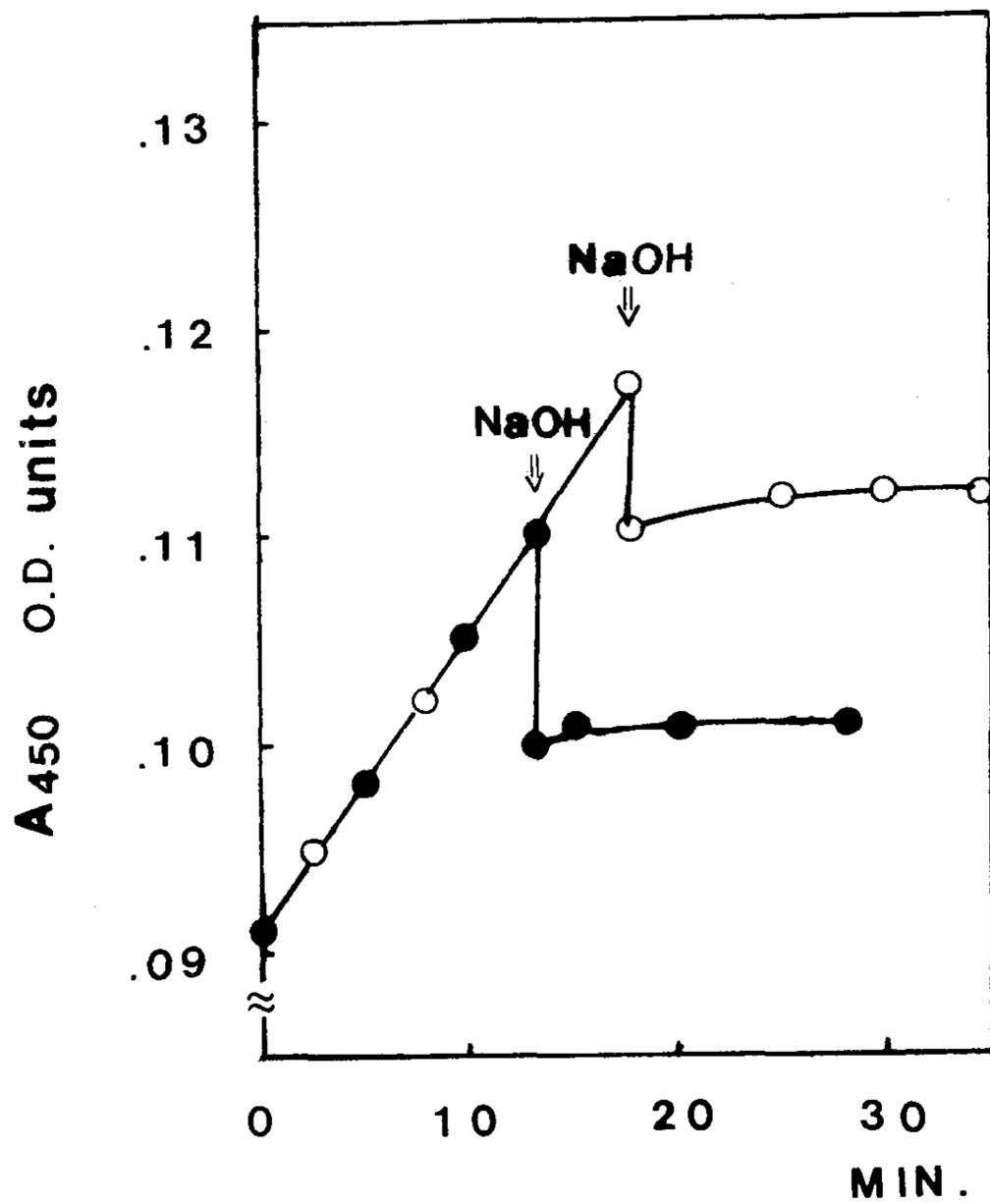


Figure 4. Time course of aggregation as measured by the change in turbidity at 450 nm of oleic acid / PE (3:7) liposomes upon acidification of the medium from pH 7.4 to 6.0 by the addition of acetic acid at time $t=0$.

있다. 또한 여기에 수반하여 vesicle의 aggregation 현상을 관찰할 수 있었다 (그림 4). pH에따라 ANTS가 새어 나오는 정도는 23 C 에서나 37 C 에서나 비슷한 결과를 보였다. 그림 4 는 pH를 7.4 에서 6.0 으로 낮추어 줄 때 나타나는 turbidity의 변화를 측정하므로써 vesicle의 aggregation과 크기 증가를 시간에 따라 관찰한 것이다. 만약 vesicle의 aggregation이 가역적으로 일어난다면 pH를 중성으로 만들어 줄 때 vesicle 용액의 turbidity가 원래의 값으로 돌아가야 할 것이다. 그러나 그림 4 에서 보는 것과 같이 NaOH 용액을 처리해서 medium의 pH를 중성으로 해 준 결과 처음의 값보다 더 높은 turbidity를 나타냈으며 이것은 liposome에 비가역적인 변화, 예를 들어 fusion, 가 일어 났음을 시사하고 있다. Ca^{++} 이나 Mg^{++} 에 의해서도 leakage가 유발되는 현상이 관찰되었다. 그림 5,6 은 각각 Ca^{++} , Mg^{++} 를 처리해 주었을 때 entrap되었던 ANTS의 release를 시간에 따라 연속적으로 측정한 것이다. 이 때 medium의 pH는 7.4였으며 온도는 20°C 였다.

제 3 절 PE: 포화 지방산 liposome의 pH에 따른 stability

그림 7,8 은 PE:palmitic acid (7:3 몰 비율) liposome의 각 pH에서 시간에 따른 ANTS release pattern이다. 약산성에서 이중막이 크게 불안정화되어 pH 6.5 면 entrap되었던 내용물의 50 % 이상이 새어나오는 것을 볼 수 있다. PE:oleic acid 에서와는 달리 온도에 의한 영향이 중성 pH 쪽에서 크게 나타났다. 그림 9,10 은 PE:stearic acid (7:3 몰 비율) liposome에서 pH에따른 이중막의 stability를 추적한 것이다. 이 system에서도 약산성에서도 entrap되었던 물질의 release가 증가함을 볼 수 있다.

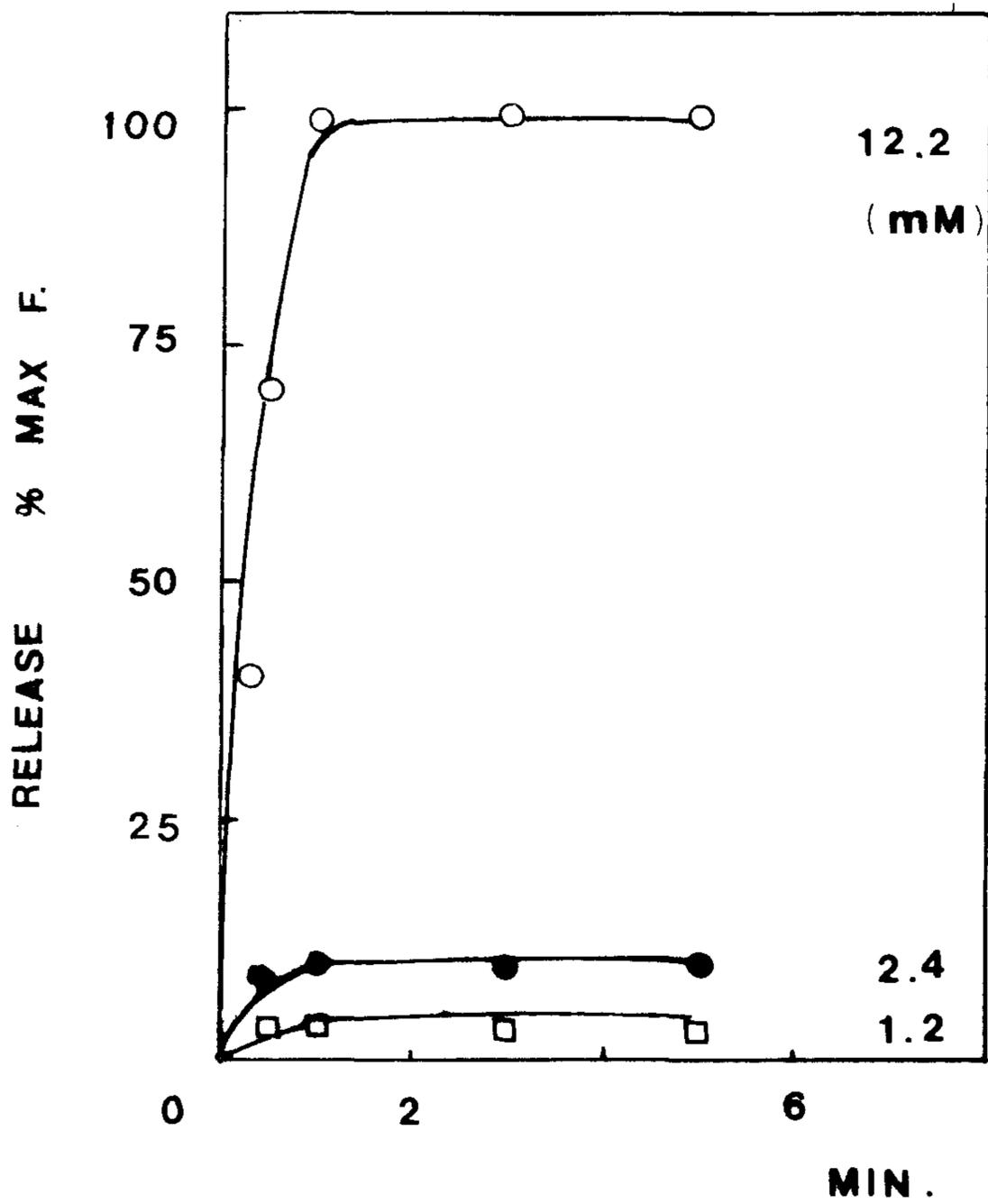


Figure 5. Time course of release of oleic acid / PE liposomes in media of various Mg^{++} concentration at pH 7.4.

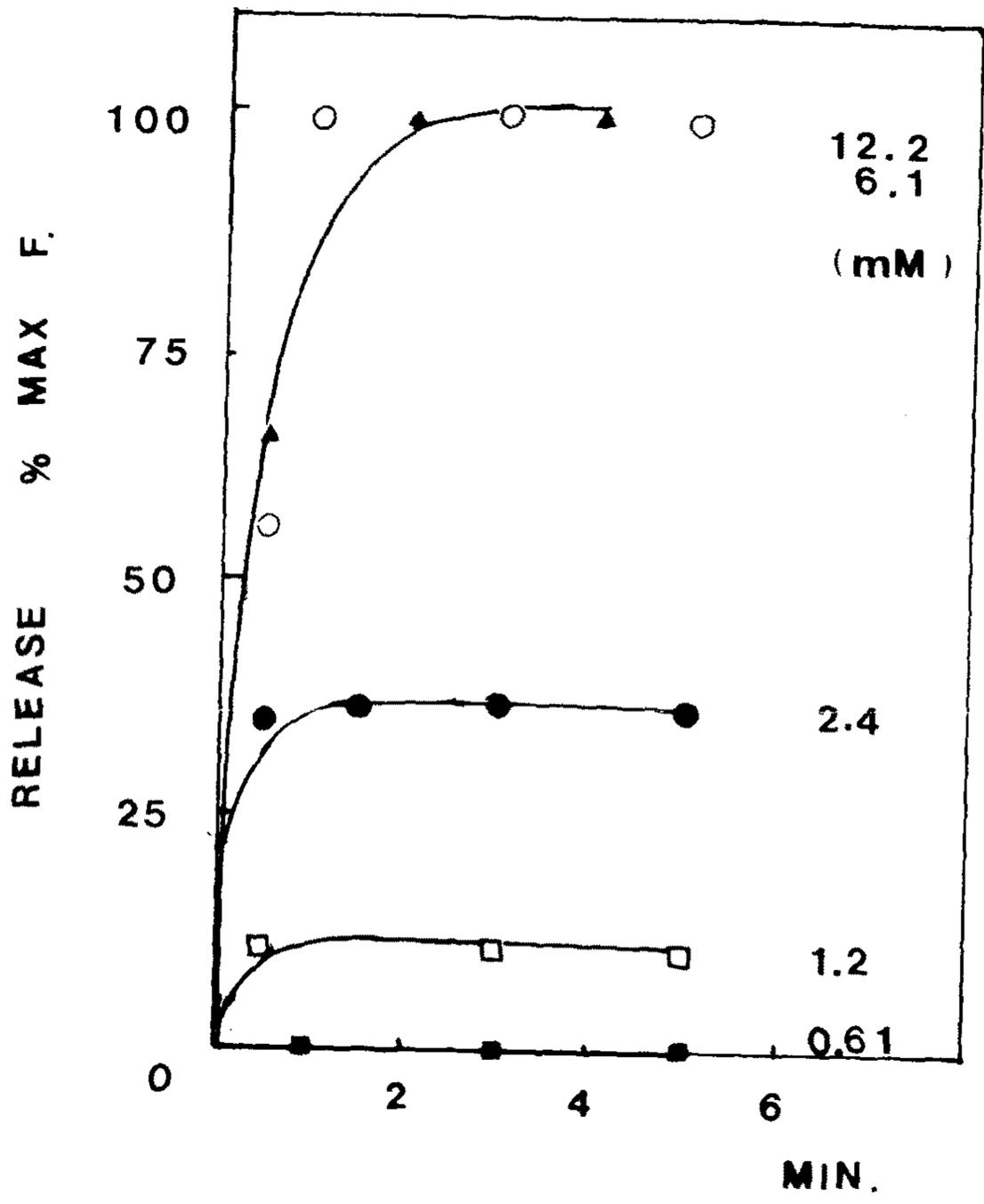


Figure 6. Time course of release of oleic acid / PE liposomes in media of various Ca⁺⁺ concentration at pH 7.4.

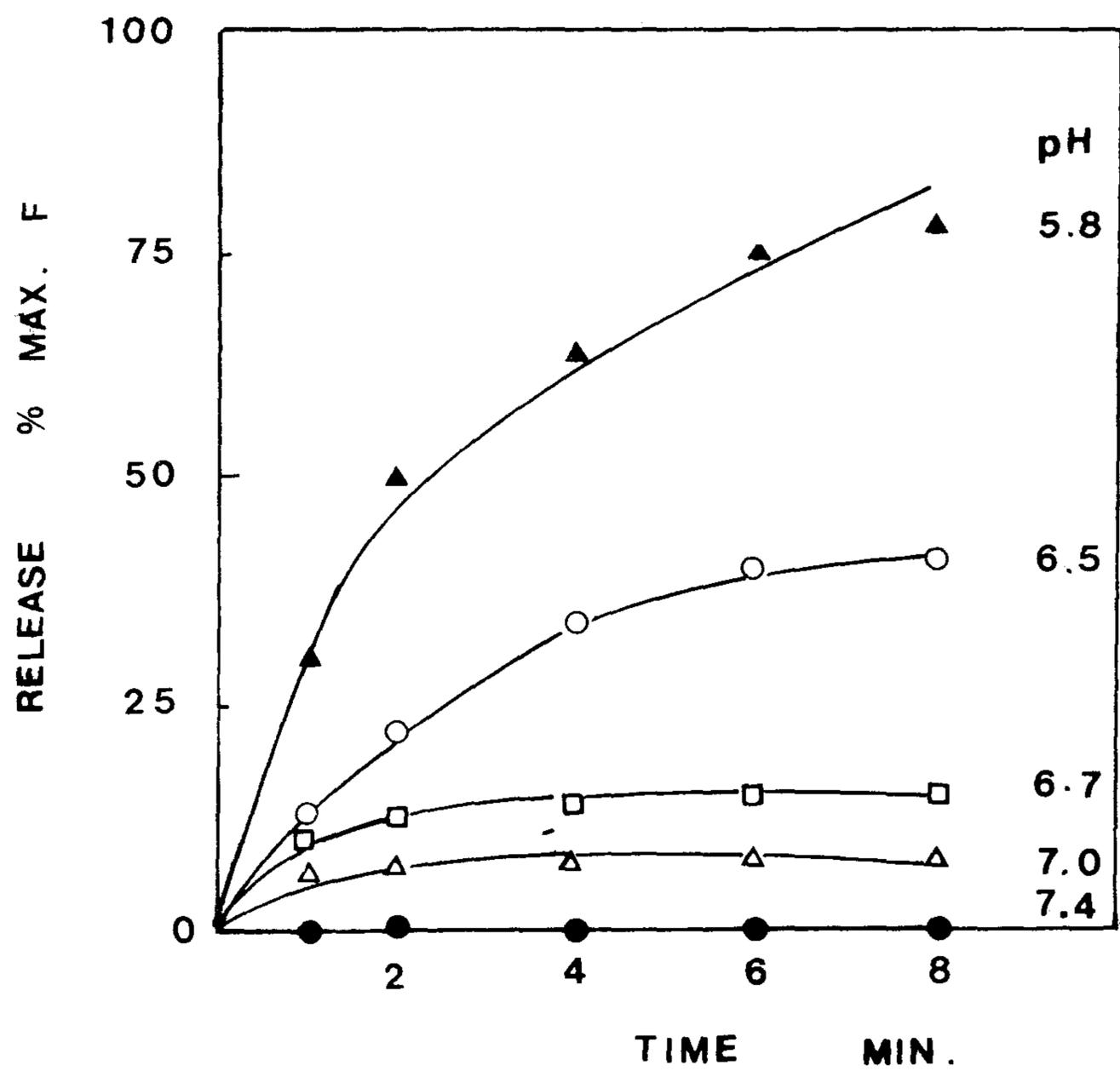


Figure 7. Time course of release of palmitic acid / PE liposomes in media of various pH at 23°C.

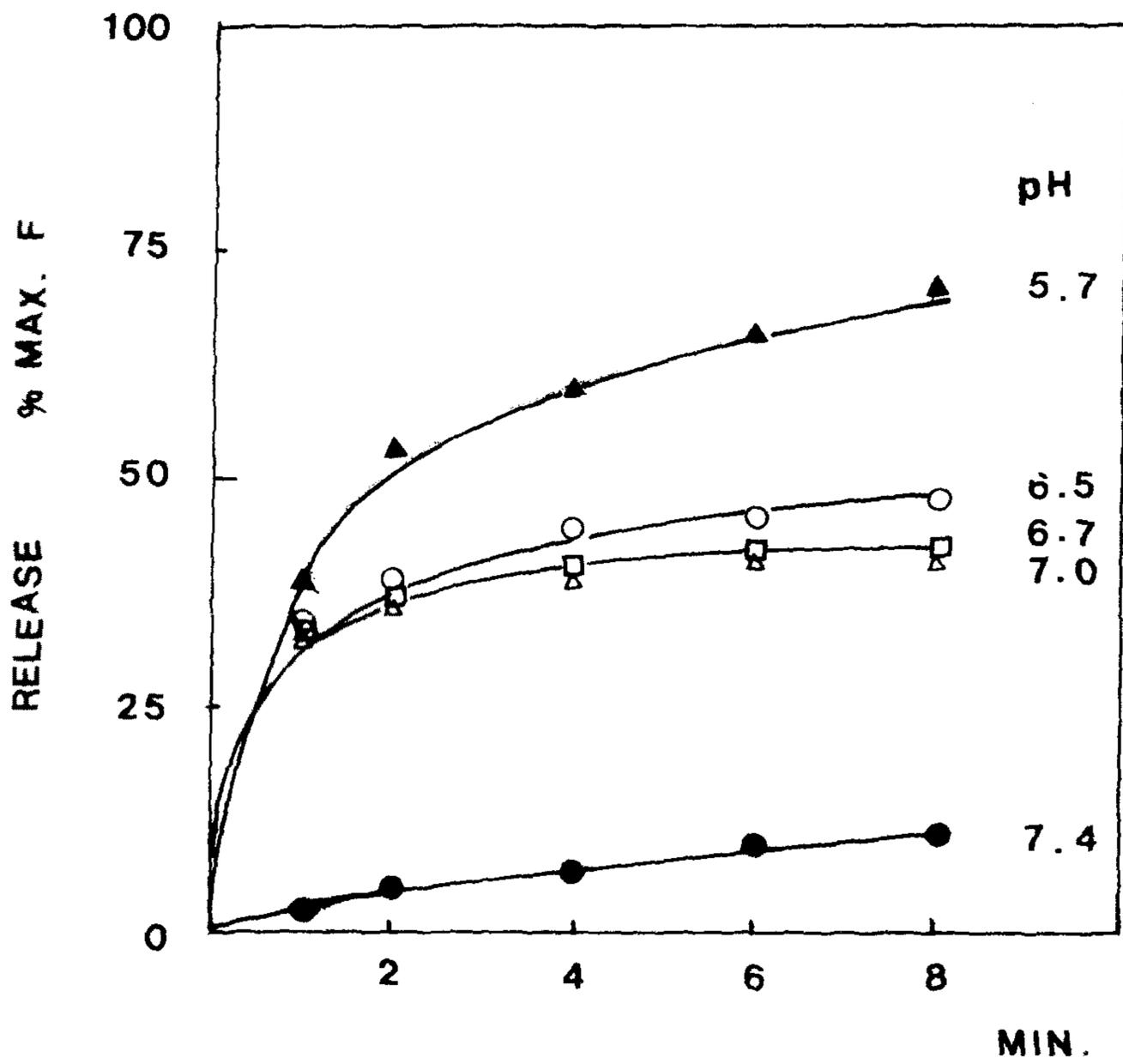


Figure 8. Time course of release of palmitic acid / PE liposomes in media of various pH at 37°C.

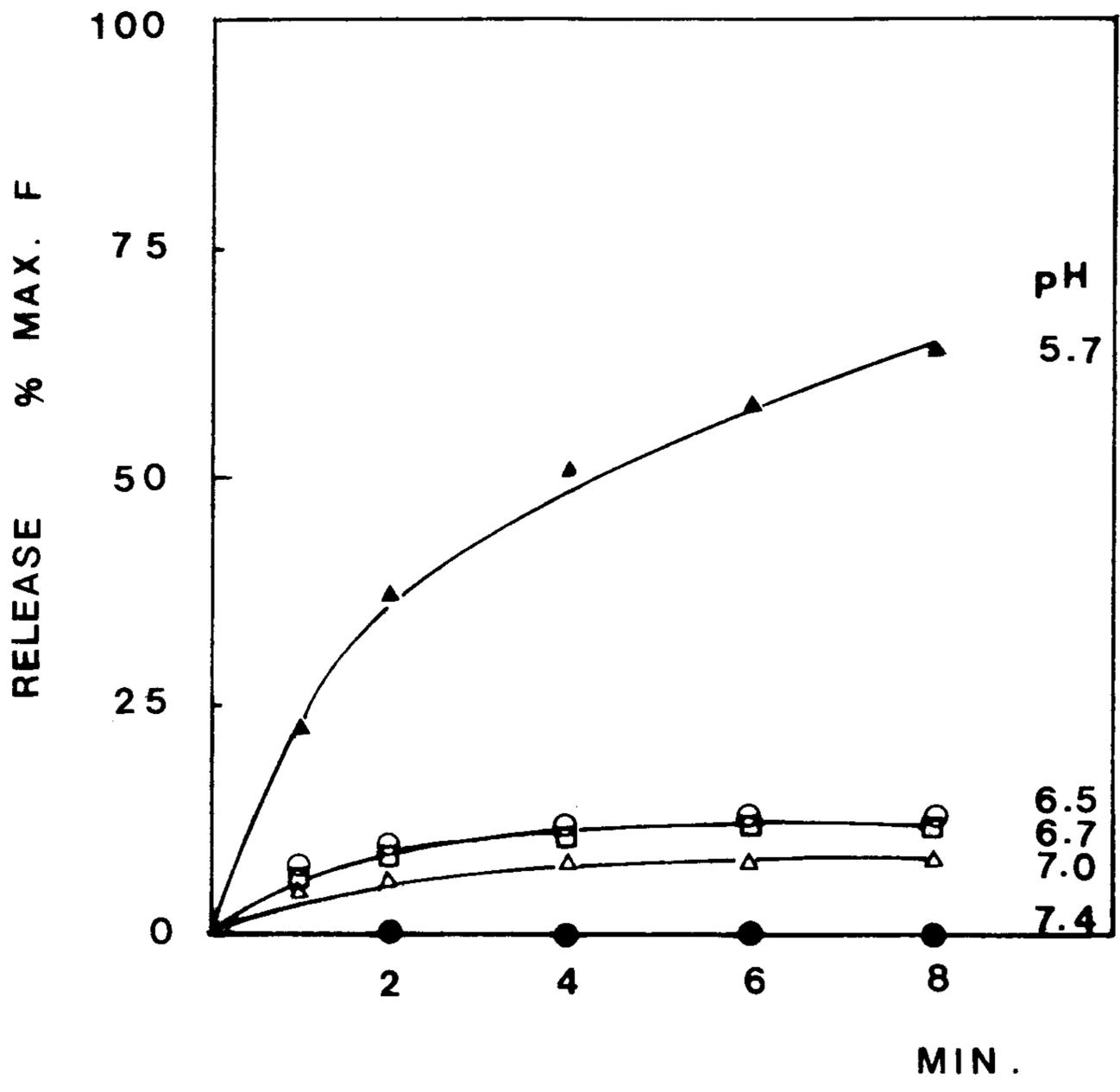


Figure 9. Time course of release of stearic acid / PE liposomes in media of various pH at 23°C.

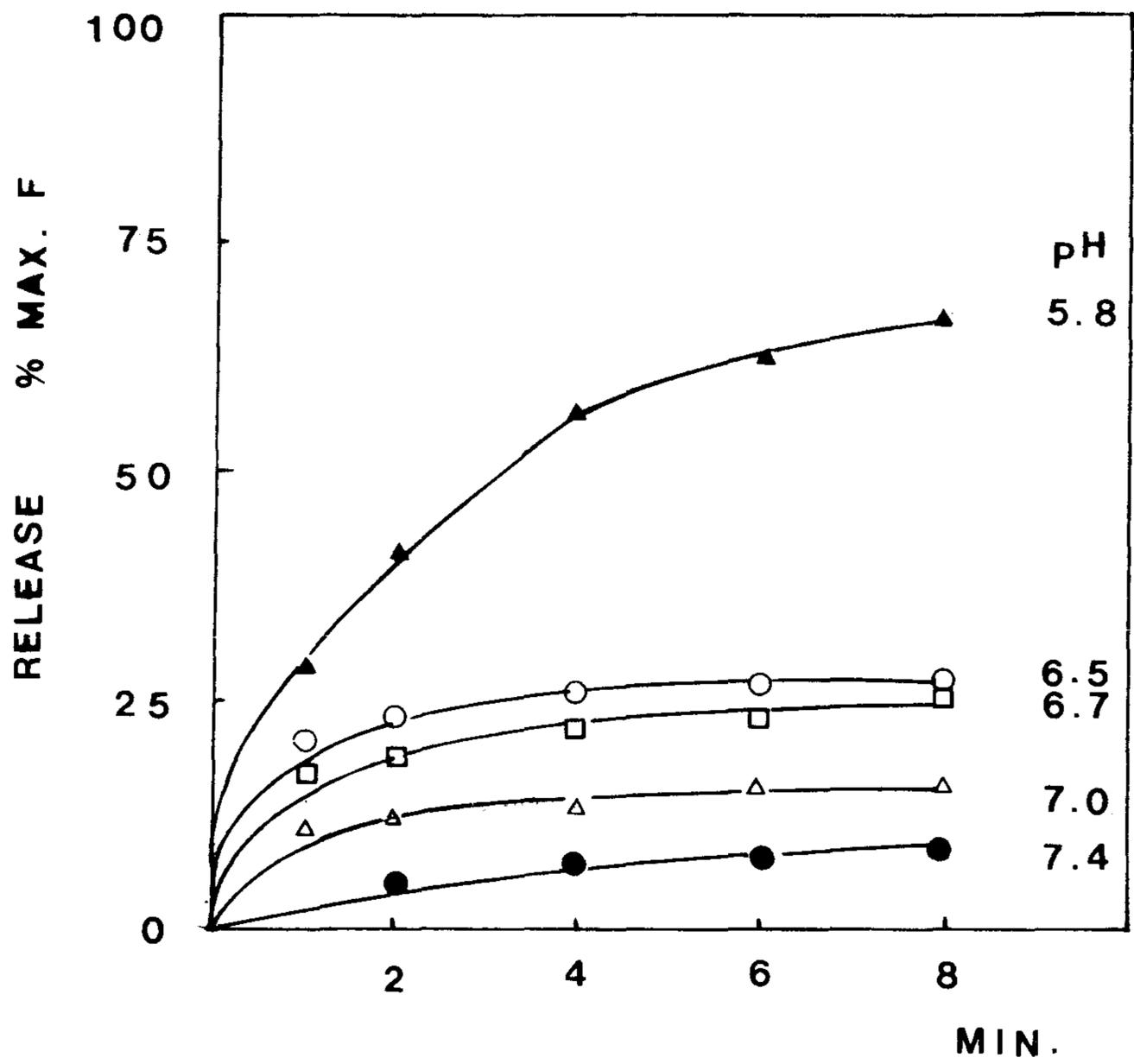


Figure 10. Time course of release of stearic acid / PE liposomes in media of various pH at 37°C.

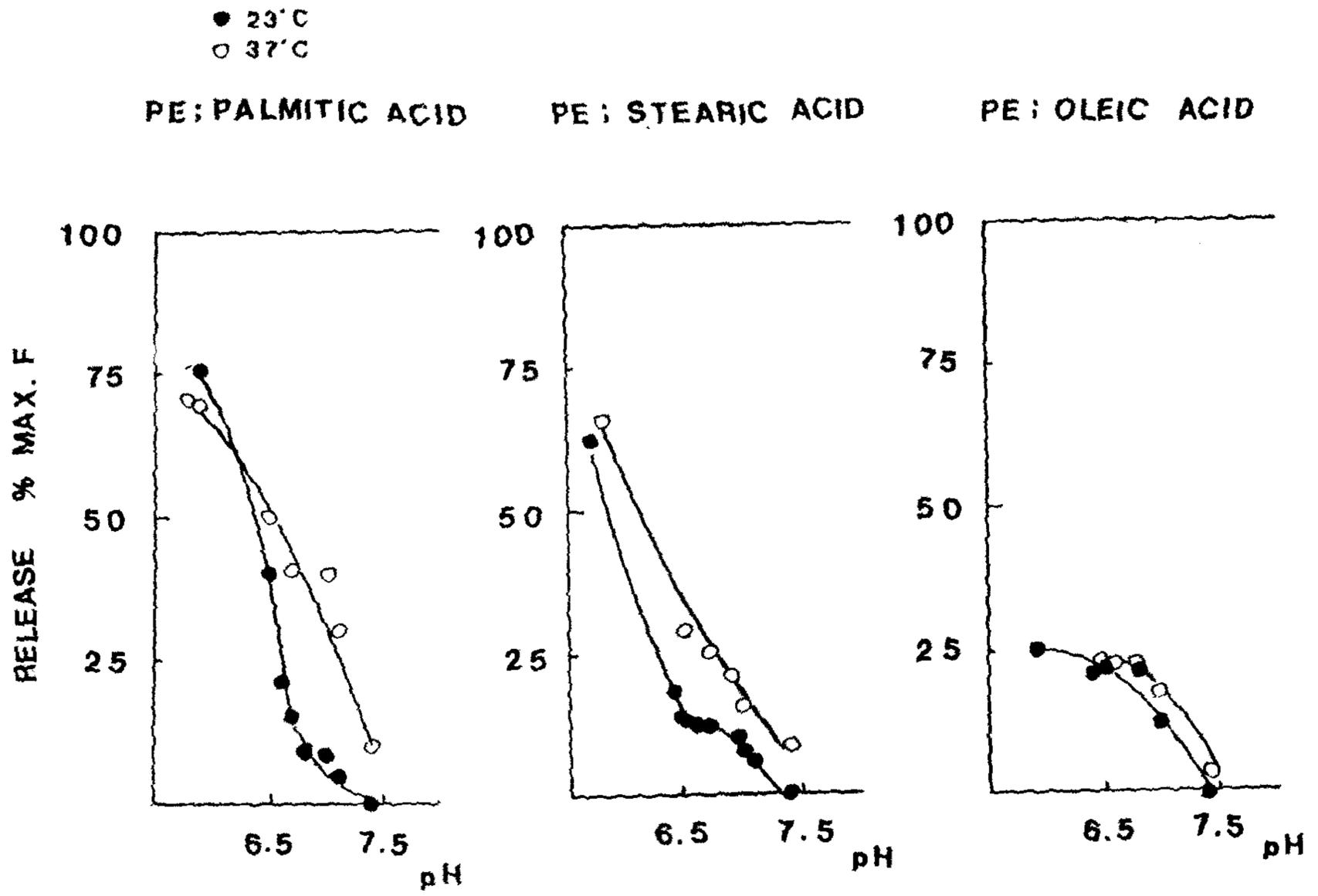


Figure 11. Comparison of pH course of release between three different liposome.

제 4 절 각각의 PE:지방산 liposome에 대한 연구

그림 11 은 pH를 낮추어 준 후 7 분 경과 후의 release 정도를 각 pH에 따라 plot한 것이다. PE:fatty acid (7:3 몰 비율) liposome은 정도의 차이는 있으나 fatty acid로 oleic acid, stearic acid, palmitic acid를 썼을 경우 모두 pH를 낮추어 줌에 따라 leakage가 증가함을 보였으며 PE:palmitic acid liposome의 경우가 가장 pH에 따라 sensitive 하여 암치료에 drug delivery system으로 사용하기에 적당하다고 생각되어 진다. 이와 같이 지방산을 함유하는 PE liposome이 낮은 pH에서 leakage가 증가되는 것은 PE의 물리 화학적 성질로 인한 것으로 생각된다. PE는 head group의 hydration 정도가 낮고 nonbilayer 구조를 형성하는 경향이 높아 중성 pH에서는 안정한 이중막을 이루지 못한다. 이러한 PE에 fatty acid를 첨가해 주면 중성 pH에서 음전하를 제공하게 되어 vesicle을 형성할 수 있게 해준다. 지방산은 수용액 중의 pK는 매우 낮으나 liposome에 incorporation되었을 때는 주위의 hydrophobic한 성질때문에 pK가 높아져 7 - 8 정도가 되는 것으로 알려져 있다. medium의 pH를 낮추어 주게 되면 음전하를 제공하던 지방산이 protonation되어 전하를 잃게 되고 이렇게 되면 더 이상 정전기적 반발력을 제공할 수 없게 되어 vesicle끼리 아주 가까이 접근하게 된다. PE는 repulsive hydration force도 작으므로 vesicle들은 aggregation이 일어나게 되고 이 때문에 bilayer가 불안정하게 되어 entrap되었던 ANTS가 새어 나오게 되는 것으로 생각된다. 그리고 turbidity를 측정한 결과를 보면 NaOH를 넣어 주어 pH를 다시 중성으로 해주어도 그 값이 비가역적인 것을 보아 이 system에서 fusion도 일어날 가능성이 높음을 보여주고 있다. Ca^{++} 나 Mg^{++} 같은 이가 이온에 의해서도 leakage가 크게 증가되는 것을 볼 수 있었다. 이것은 이들 이가 이온이 fatty acid의 head에 결합을 하여 fatty acid가 띄고 있는 음전하를 중화시키기 때문이라 생각되며 또한 이들은 phospholipid vesicle의

fusion에도 관여하는 것으로 알려져 있으므로 이 system에서도 fusion을 증가시켜 그중간 단계로 생기는 이중막의 불안정화에서 오는 leakage로 생각할 수 있겠다. 포화 지방산(palmitic acid, stearic acid)과 불포화 지방산(oleic acid)이 각각 incorporation된 liposome들에 있어서 pH에 따른 leakage의 양상이 온도에 따라 다른 것은 지방산의 melting point 차이에서 오는 것이라고 생각된다. Oleic acid는 이미 상온에서 액체로 존재하므로 23°C 에서나 37°C에서나 PE:oleic acid liposome의 bilayer 전체가 liquid-crystalline phase transition temperature 이상의 온도에서의 상태여서 온도에 따른 leakage 양상에 별로 차이가 나지 않았다. 포화 지방산인 경우 melting point가 60°C 이상으로 이러한 포화 지방산을 함유한 PE liposome의 T_m이 실험을 수행한 온도 범위에 있어 온도에 의한 효과가 크게 나타나지 않았나 생각된다.

제 4 장 결 론

pH에 sensitive 한 liposome을 찾는 데 있어서 phosphatidylethanolamine 70%와 palmitic acid 30%를 함유하는 혼합 지방질 vesicle이 제일 좋다는 것이 판명되었다. 37°C에서 pH 7.4에서는 7분 동안 15%의 내용물이 방출 되나 pH 6.5에서는 50%가 방출된다. Palmitic acid 대신에 stearic acid 가 존재할 때는 palmitic acid 때와 유사한 결과가 나왔으나 이중결합을 가진 지방산의 존재 하에서는 vesicle이 낮은 pH에서도 비교적 안정하였다. 이러한 계통적인 screening 연구의 결과로 목적에 최적인 혼합 지방질 성분을 발견하였다.

참 고 문 헌

- (1) M. B. Yatvin et al. (1980) Science, 210, 1253 -1255
- (2) F. Szoka, Jr. and D. Papahadjopoulos (1978) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 75, 4984 - 4198
- (3) S. Kim and G. M. Martin (1981) Biochim. Biophys. Acta 646, 1-9
- (4) J. Leaver, et al. (1983) Biochim. Biophys. Acta. 732, 210-218
- (5) D. S. Johnston, et al. (1980) Biochim. Biophys. Acta 602, 57-69
- (6) O. Albrecht, et al. (1982) Biochim. Biophys. Acta. 687, 165-169
- (7) D. S. Johnston, et al. (1983) Biochemistry, 22, 3194 -3202
- (8) R. M. Straubinger, et al. (1985) FEBS LETTERS, 179 148 -178
- (9) N. Duzgunes, et al. (1985) Biochemistry, 24 3091 -3098
- (10) Harma Ellens, et al. (1984) Biochemistry, 23 1532 - 1538