

음이온성 지질을 포함한 지질나노입자의 제조 및 물리적 특성

이정은 · 김은혜 · 임덕휘 · 정석현 · 정규성* · 신병철*

한국화학연구원 신약기반기술연구센터

*연세대학교 화학과

(2008. 2. 2 접수)

Preparation of Anionic Lipid Nanoparticles : Physical Properties and Stability

Jung Eun Lee, Eun Hye Kim, Deok Hwi Lim, Suk Hyun Jung,
Kyu-Sung Jeong[†], and Byung Cheol Shin*

Center for Drug discovery technologies, Korea Research Institute of Chemical Technology,
100 Jang Dong, Yuseong, Daejeon 305-343, Korea

[†]Yonsei University 134 Sinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-749, Korea

(Received February 2, 2008)

요 약. 지질나노입자는 난용성 물질을 봉입할 수 있는 지질로 이루어진 입자성 약물전달체이다. 나노입자는 인지질, 콜레스테롤, 다양한 음이온성 지질 그리고 PEG함유 인지질을 사용하여 자발 유화 용매확산법으로 제조하였으며, 모델 약물로는 난용성 약물인 파클리탁셀을 사용하였다. 이렇게 제조된 지질나노입자 수용액의 입자크기 및 표면전하는 전기영동 광산란측정기를 이용하여 물리적 특성을 측정하였고, 파클리탁셀의 봉입효율은 HPLC로 정량하였다. 입자의 크기는 약 110 nm였으며 약물의 봉입효율은 70% 이상이었다. 특히, 음이온성 지질인 DPPA를 사용한 경우 80% 이상의 높은 봉입효율을 보였으며, DPPA가 첨가됨으로써 입자간의 반발력을 유도하여 입자가 안정화되었다. 또한 콜레스테롤의 비율이 증가됨에 따라 입자크기는 비례하였고, 봉입효율은 반비례하였다. 그리고 세포독성 실험을 통하여 나노입자의 세포독성이 낮다는 것을 관찰할 수 있었다. 이와 같이 음이온성 지질로 구성된 지질나노입자는 난용성 약물을 가용화할 수 있는 시스템으로 응용이 가능하다.

주제어: 인지질, 나노입자, 약물전달, 난용성

ABSTRACT. Anionic lipid nanoparticles (LNPs) are a lipid-based encapsulation system for poorly water-soluble compounds. Paclitaxel-loaded lipid nanoparticles were prepared by spontaneous emulsification and solvent evaporation (SESE) method with phospholipid, cholesterol, anionic lipids and paclitaxel. The stability of anionic LNPs was enhanced after lyophilization. Mean particle size and zeta potential of anionic LNPs were measured by electrophoretic light scattering spectrophotometer and drug loading efficiency was evaluated by HPLC. The mean particle size was about 110 nm and loading efficiency was around 70%. DPPA was very efficient for increasing stability because it leads to coulombic repulsive forces of particles. According to cholesterol ratios increased of mean particle size and decreased of drug loading efficiency in the lipid compositions. Also, the low cytotoxicity was observed by MTT assay against B16F10 cells. Anionic LNPs may be a promising drug carrier for the poorly water-soluble drugs.

Keywords: Phospholipid, Nanoparticles, Drug Delivery System, Poorly Water-Soluble

서 론

입자성 약물전달체는 오일, 지질, 계면활성제 또는 천연 및 합성고분자를 사용하여 제조되는 에멀전, 리포솜, 마이크로 및 나노입자 형태의 구조체로서 지금까지 입자성 약물전달체의 제조, 특성 규명, 약물 봉입에 관한 수많은 연구가 이루어져 약물 전달체로서의 가능성이 충분히 입증되어왔다. 대표적인 예로서 리포솜(liposome)과 폴리머솜(polymerosome)이 가장 많이 사용되고 있다.¹ 리포솜은 양친매성 지질이 수상에 분산될 때 지질과 물의 비율에 따라 물속에서 다양한 구조의 이중막을 형성시키는 소포체를 말한다. 리포솜은 제법이 간편하며 수용성 및 지용성 약물을 운반할 수 있으므로 약물 수송체로서 활용이 가능하다. 그리고 폴리머솜은 생체막과 유사한 고분자 이중층을 가지는 polymer vesicle이다. 친수성과 소수성 블록이 특정 비율로 결합된 양친매성 고분자를 합성하여 수용액상에서 자가 조립하여 미셀을 형성한다. 미셀을 이룬 블록 공중합체들의 내부는 소수성의 성질을 가지고 있어 난용성 약물을 손쉽게 포획할 수 있고, 표면은 친수성의 성질을 가지므로 난용성 제제의 가용화, 약물 전달 운반체 등에 사용된다. 그 외에 나노에멀전, 고형지질 나노입자 그리고 초가변형 나노입자 등이 있다.² 최근 이러한 입자성 약물전달체 중 새로운 구조체로서 지질나노입자의 연구가 활발히 진행 중이다. 지질 나노입자는 상온에서 지질을 약물과 혼합하여 균일한 상을 제조하고 이를 수용액에 분산시켜 약물이 지질 결정사이에 고체 용액상으로 존재하는 구조체를 말한다.³ 지질나노입자는 생체 내에 존재하는 물질인 인지질, 지질 그리고 콜레스테롤 등을 사용하기 때문에 생체 이용률 및 친화도가 높으며, 약물의 방출 및 제어가 가능하며 효소 등에 의한 분해에 대해서 높은 안정성을 가지는 입자성 약물전달체이다. 그러나 지질나노입자는 혈류 내의 이온 흡착에 의해 구조적으로 불안정할 수 있으며, 대식세포의 식작용에 의한 손실 등의 단점을 가지고 있다.⁴ 이러한 문제를 해결하기 위하여 생체 친화성이 우수한 친수성 고분자인 폴리 에틸렌 글리콜(PEG)을 표면에 수식하여 이러한 단점을 극복할 수 있다. PEG는 생체에 부작용이 없으며 쉽게 지질나노입자 및 그 밖에 약물 전달체에 적용하기가 용이하여 가장 대표적으로 사용된다.⁵ 그리고

지질나노입자는 수용액상에서 봉입약물이 쉽게 가수분해 되는 경우가 있어서 이를 보완하기 위하여 동결 건조를 통하여 지질나노입자 내 약물의 안정성을 높이는 많은 연구가 진행되고 있다.

본 연구에서는 지질나노입자의 난용성 약물인 파클리탁셀을 가용화 하기 위하여 인지질, 콜레스테롤, 음이온성 지질 그리고 PEG함유 인지질을 사용하여 자발 유화 용매확산법에 의해 나노입자를 제조하였고, 파클리탁셀이 봉입된 나노입자의 입자크기를 안정화하기 위하여 동결 건조하였다. 다양한 음이온성 지질의 종류와 콜레스테롤 및 지질의 함량에 따른 봉입효율, 입자크기 그리고 표면전하 등의 물리적 특성을 고찰하였으며, 또한 이온성 지질의 유무에 따른 입자형성과의 관계를 고찰하였다. 그리고 세포독성 실험을 통하여 나노입자의 독성을 평가하였다.

실 험

시약

지질나노입자를 제조하기 위한 L- α -phosphatidylcholine (hydrogenated-Soy) (HSPC), 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphate (DPPA), 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphate (DMPA), 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-L-serine] (DSPS), 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)] (DSPG), 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy (polyethyleneglycol)-2000] (DSPE-mPEG2000) 그리고 cholesterol (CHOL)은 Avanti Polar Lipids사(Alabaster, AL, 미국)에서 구입하여 사용하였고, 파클리탁셀은 삼양사(한국)에서 구입하여 사용하였으며, 수클로오스는 Sigma Aldrich사(Milwaukee, 미국)에서 구매하였고, 그 밖에 실험에 사용한 모든 용매는 일급 및 특급시약을 그대로 사용하였다.

지질나노입자의 제조

지질나노입자는 자발 유화 용매확산법을 이용하여 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 인지질, 콜레스테롤 그리고 음이온성 지질을 질량비로 이용하여 제조하였다. 인지질은 HSPC를 사용하였고, 음이온성 지질인 DPPA, DMPA, DSPG 그리고 DSPS를 사용하였다. 파클리탁셀을 메탄올 7 ml에 10.0 mg/ml 농도가 되도록 용해하여 약물용액을 제조하고, HSPC는

3~7 (w/v), CHOL은 1~7 (w/v), DPPA는 1~7 (w/v) 그리고 DSPE-mPEG2000은 0.5~4 (w/v)의 조건에서 클로로포름 3 ml에 용해하여 지질용액을 제조하였다. 약물용액과 지질용액을 혼합한 10 ml의 약물-지질 혼합용액을 고강도 초음파발생기(Ultrasonicator, Model 500, Fisher scientific, 미국)를 사용하여 초음파를 조사하면서, 25 ml의 3차 증류수를 25 ml/min의 속도로 23게이지 주사기를 이용하여 약물-지질 혼합용액에 분산하였다. 이때 고강도 초음파발생기는 50와트의 출력조건에서 1분간 용액을 초음파 처리하고, 30초간 용액을 방치하는 작동을 7회 반복하여 약물-지질 혼합용액이 수용액 내에 고르게 분산된 분산용액을 제조하였다. 그리고 회전 증발 응축기(Rotary Evaporation, BUCHI, 스위스)를 이용하여 혼합용액의 유기용매를 제거함으로써 파클리탁셀이 그 구조 내에 봉입된 나노입자 수용액을 제조하였다. 상기 제조된 용액은 0.2 μ m의 기공 크기를 갖는 주사기 필터(Syringe filter, cellulose, 일본)로 여과하여 입자형성에 참여하지 않은 지질과 파클리탁셀을 제거하였다. 파클리탁셀이 봉입된 나노입자 수용액에 응집방지제로서 20(w/v)%의 수플로오스를 첨가하여 완전히 용해한 후, 입자의 동결을 위해 초저온 냉동기(deep-freezer, DF8514, Ilshin Lab, 한국)를 이용하여 -72 ~ -77°C의 온도에서 12 hr 동안 동결 후 동결 건조기(Freeze-drying, FD5505S, Ilshin Lab, 한국)에서 -40 ~ -45°C의 온도와 5 Pa의 압력을 유지하면서 48 hr 이상 건조하였다.^{8,10} 파클리탁셀이 봉입된 나노입자 분말은 3차 증류수에 재분산하였다.

입자 크기와 표면전하 측정

지질나노입자의 크기와 표면전하는 전기영동 광산란측정기(Electrophoretic light scattering spectrophotometer, model ELS-Z, Osuka Electronics, 일본)를 사용하여 나노입자 분산용액 0.2 ml를 3차 증류수로 15배 희석한 용액으로 입자의 크기를 관찰하였다. 또한 표면전하는 나노입자 용액 2 ml를 분취하여 25°C, pH 7에서 관찰하였다.

파클리탁셀의 봉입효율 측정

지질나노입자에 봉입된 파클리탁셀의 봉입효율은 HPLC system (NS-3000i Futecs Co. Ltd., 한국)로 측정하였다. Column은 reverse-phase column (μ bondapack™, 3.9

mm \times 300 mm, Waters, 아일랜드)을 사용하였으며, 이동상은 아세토나이트릴 : 탈이온수(55 : 45, v/v)를 사용하였고, 유속은 1.0 ml/min 조건하에 측정하였다. 외부표준물질법¹¹을 이용하여 파클리탁셀의 0.125, 0.25 그리고 0.5 mg/ml의 농도별로 검량선을 작성 후 제조된 나노입자는 클로로포름 : 메탄올을 1 : 4 비율로 혼합된 용액에 녹인 다음 최대흡수파장인 230 nm에서 측정하고 미리 작성한 검량선과 비교하여 파클리탁셀의 농도를 환산하였다. 파클리탁셀의 봉입효율은 다음 식에 의해 계산하였다.

봉입효율(%)

$$= \frac{\text{지질나노입자에 포함된 파클리탁셀의 양}}{\text{약물용액제조시 사용된 파클리탁셀의 양}} \times 100$$

지질나노입자의 세포독성 평가

제조된 지질나노입자의 세포독성 및 항암효과를 평가하기 위해 MTT assay를 하였다. Murine melanoma cells, B16F10을 5×10^3 cells/well로 24-well plates에서 37°C, 5%의 CO₂ 조건하에 배양하였다. 24시간 후, 약물이 봉입되지 않은 나노입자 수용액을 50 μ l로 각각의 well에 첨가하였고, 약물이 봉입된 나노입자 수용액은 약물농도가 각각 10, 100 μ g/ml의 농도를 50 μ l로 각각의 well에 첨가하여 24 그리고 48 시간 동안 배양한 후, 5 mg/ml의 MTT 시약 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]을 20 μ l/well씩 추가하였다. 그리고 4시간 동안 CO₂ 배양기에 배양하여 상층액 190 μ l 제거한 후 용액에 DMSO를 150 μ l씩 첨가하여 blue formazan 결정을 용해 한 후 microplate reader (SpectraMax 190, Molecular Device, 미국)로 590 nm에서 흡광도를 측정하였다.¹⁴

결과 및 고찰

지질의 종류에 따른 물리적 특성

음이온성 지질인 DPPA, DMPA, DSPS 그리고 DSPG를 사용하여 음이온성 지질나노입자를 제조하고 그 물리적 특성을 조사하였다. Table 1과 같이 음이온성 지질이 함유되지 않을 경우 입자 형성이 되지 않는 반면 이온성 지질이 함유된 경우 지질나노입자의 형성이 용이한 것을 관찰하였다. 이온성 지

Table 1. Physical properties of various anionic lipid nanoparticles

Lipid composition*	Anionic lipid	Mean particle size (nm)	Zeta potential (mV)	Loading efficiency (%)
HSPC : CHOL	**_	-	-	-
	DPPA	118.5 ± 0.8	-40.39 ± 1.9	88.2 ± 6.8
	DMPA	102.5 ± 5.5	-36.18 ± 3.2	56.5 ± 2.3
	DSPS	140.7 ± 12.5	-56.18 ± 3.5	45.5 ± 1.5
	DSPG	137.5 ± 2.5	-66.18 ± 7.2	21.5 ± 2.8

*The lipid composition was composed of HSPC : CHOL at a mass ratio of 7 : 3. The data is shown as mean ± S.D. (n=3)

**Physical properties could not be characterized because of formation of lipid aggregates.

지질을 이용한 나노입자의 형성은 입자간의 정전기적 반발력에 의하여 안정화된다고 보고되어져 왔다.^{12,13} 이온성 지질이 함유되지 않은 중성의 나노입자의 경우 입자형성 시 수십 마이크로의 거대 입자가 형성되거나 지질간의 반데르발스 인력 및 소수성 결합에 의하여 침전이 발생하는 것으로 보여 진다. 그리고 입자의 표면에 강한 전기적 전하를 띄게 될 경우 입자 간의 강한 정전기적반발력이 작용하여 입자형성 및 유지에 용이한 것으로 생각된다. 특히, 음이온성 지질 중 DPPA를 사용한 지질나노입자가 가장 높은 봉입효율을 보였다. 그리고 표면전하 값이 -66.18 ± 7.2 로 가장 큰 DSPG는 입자형성이 용이하나 약물의 봉입효율이 현저히 떨어지는 것으로 보아 입자표면의 강한 음전하적 특성이 약물의 봉입에 영향을 주는 것으로 생각된다. 따라서 HSPC, CHOL 그리고 DPPA를 사용한 나노입자의 경우, $88.2 \pm 6.8\%$ 의 파클리탁셀 봉입효율을 보여주며 입자크기도 118.5 ± 0.8 nm로 최적의 나노입자가 형성됨을 알 수 있었다.

음이온성 지질의 함량 변화

음이온성 지질의 함량에 따른 나노입자의 크기변화와 봉입효율을 Fig. 1(a)와 (b)에 나타내었다. 인지질과 콜레스테롤의 비율을 7 : 3으로 일정하게 유지한 후 음이온성 지질인 DPPA의 함량을 변화시켜 관찰하였다. (a)와 같이 DPPA의 함량이 증가함에 따라서 큰 입자크기의 변화는 관찰되지 않았다. 이는 이온성 지질의 함량이 증가하더라도 정전기적 반발력에 의한 입자간의 안정성을 유지 시켜 입자 크기 변화 및 형성에 영향을 주지 않기 때문이다. 그러나 (b)에서 봉입효율을 살펴보면 DPPA 함량이 질량비율 1 이하로 포함되거나 5이상 포함될 경우 낮은 봉입효율을 보였다. 음이온성 지질의 함량이 질량비율 1이하인 낮은 함량에서는 입자간 반발력에 의한 입자의

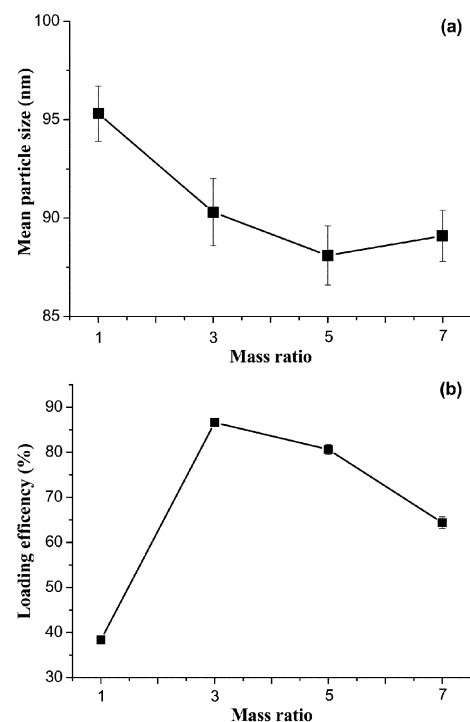


Fig. 1. Effect of DPPA ratios on the mean particle size (a) and drug loading efficiency (b) of paclitaxel loaded lipid nanoparticles. Lipid nanoparticles were composed of HSPC : CHOL. Mass ratio of HSPC : CHOL was set to 7 : 3. At 1 to 7 mass ratio of DPPA. The data is shown as mean ± S.D. (n = 3).

안정성을 유도하지 못하며, 질량비율 5이상의 함량에서는 음이온성 지질이 과량 포함되게 되어 입자 내 음이온성 지질간의 반발력이 증가하여 약물의 봉입을 저해하기 때문이다. 따라서 음이온성이 질량비율 3에서 5의 함량이 최적임을 알 수 있었다.

콜레스테롤의 함량 변화

콜레스테롤의 함량에 따른 나노입자의 크기변화와

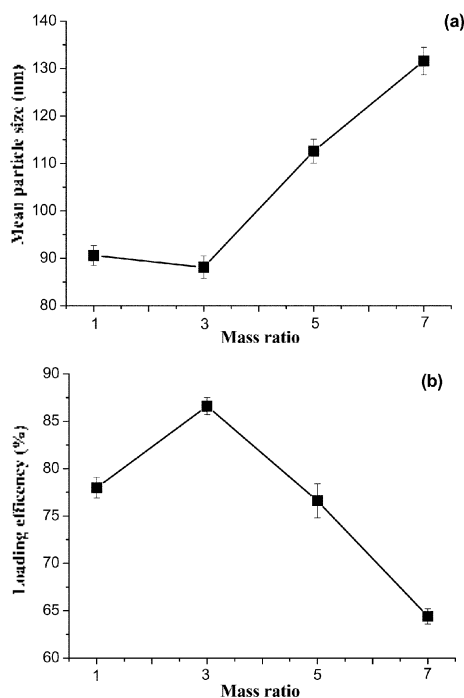


Fig. 2. Effect of cholesterol ratios on the mean particle size (a) and drug loading efficiency (b) of paclitaxel loaded lipid nanoparticles. Lipid nanoparticles were composed of HSPC : DPPA. Mass ratio of HSPC : DPPA was set to 7 : 3. At 1 to 7 mass ratio of cholesterol. The data is shown as mean \pm S.D. (n=3).

봉입효율을 Fig. 2(a)와 (b)에 나타내었다. 인지질과 음이온성 지질을 7 : 3으로 일정하게 유지한 후 콜레스테롤의 함량을 변화시켜서 관찰하였다. 콜레스테롤은 소수성물질로서 입자 형성시 지질간의 지방쇄 부분에 위치하여 입자내의 소수성결합을 더욱 강하게 유지시켜 주는 역할을 한다고 알려져 있다.¹⁵ (a)와 같이 콜레스테롤의 함량이 질량비율 3까지는 입자크기에 변화를 미치지 않으나 질량비율 5일 때 급격하게 입자크기가 증가하는 것을 알 수 있었다. 이는 콜레스테롤의 질량비율이 5 이상으로 증가함에 따라서 입자 내 지질의 지방쇄에 콜레스테롤이 고르게 분포하지 않음으로서 콜레스테롤의 증첩 및 봉침에 의한 소수성 영역의 밀도가 증가하여 지질의 자가 배열에 장애를 유발하여 입자형성 시 입자크기를 증가하게 만드는 요인으로 작용한 것으로 생각된다. (b)의 봉입효율에서 또한 콜레스테롤 비율이 3까지 증가할 때 비례적으로 봉입효율이 증가하나 3이상이

함유되면 약물의 봉입에 저해된다는 것을 관찰하였다. 이는 콜레스테롤이 입자크기에 미치는 영향과 같이 소수성영역의 급격한 밀도 증가 때문에 약물이 입자의 소수성 부분에 위치할 수 있는 공간이 작아짐으로서 파클리탁셀의 함유가 저해되며 또한, 파클리탁셀의 분자크기가 콜레스테롤의 분자크기 보다 크기 때문에 입체적으로도 파클리탁셀이 소수성 영역에 고농도로 봉입되기 어려울 수 있다고 생각된다.

DSPE-mPEG2000의 함량 변화

혈중에 존재하는 혈중단백질에 의한 흡수분해 및 혈중의 이온흡착에 의한 지질나노입자의 혈중 내에서 빠른 손실이 발생하는 것을 극복하고 혈중 내 안정성을 증가하기 위하여 대표적으로 사용되는 생체 적합성 고분자인 PEG^{16,17}를 함유한 인지질인 DSPE-mPEG2000을 지질나노입자 표면에 수식하여 Fig. 3과 같이 실험하였다. 나노입자 겉 표면에 수식되어

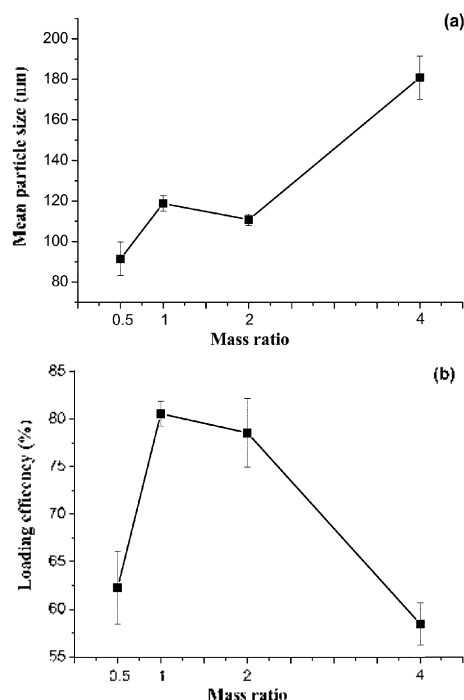


Fig. 3. Effect of DSPE-mPEG2000 ratios on the mean particle size (a) and drug loading efficiency (b) of paclitaxel loaded lipid nanoparticles. Lipid nanoparticles were composed of HSPC : CHOL : DPPA. Mass ratio of HSPC : CHOL : DPPA was set to 7 : 3 : 3. At 0.5 to 4 mass ratio of cholesterol. The data is shown as mean \pm S.D. (n=3).

있는 PEG 함유 인지질인 DSPE-mPEG2000을 함유한 입자의 평균 크기는 107.0 ± 4.9 nm이고 봉입효율은 $77.1 \pm 2.9\%$ 로서 Table 1과 같이 고분자를 포함하지 않는 지질나노입자와 유사한 결과를 얻었다. 이는 PEG를 함유한 인지질이 질량비율이 2이하로 첨가되어도 입자크기에는 영향을 미치지 않는다는 것을 나타낸다. 그러나 질량비율이 4이상 증가하면 입자의 크기가 약 180 nm로 증가하는 것을 알 수 있었다. 고분자인 PEG 함량이 과량 함유되면 친수성 막이 부껴워지며 DSPE의 함량의 증가로 총 지질함량이 증가하여 입자크기가 커진다고 알려져 있으며¹⁸ 또한, 낮은 함량의 PEG가 입자의 표면에 수식 될 때 mushroom 모양으로 입자 크기에 영향을 미치지 않으나, 높은 함량의 PEG가 수식 될 때에는 brush 모양으로 PEG 분자의 입체적인 기동이 변화¹⁹되므로 DSPE-mPEG의 질량비율이 2이상으로 증가하면 PEG의 함량의 증가로 입자크기가 증가되는 것을 알 수 있었다.

약물과 지질비율에 따른 입자크기 및 봉입효율

약물과 지질의 비율변화에 따른 봉입효율과 입자크기 변화를 Table 2에 나타내었다. 파클리탁셀과 지질의 비율이 10 : 1 일 때 봉입효율이 85% 이상으로 가장 높았으나, 입자크기 또한 봉입효율에 비례하여 커짐을 알 수 있었다. 이는 파클리탁셀의 함량비율이 높을 경우 난용성약물인 파클리탁셀이 위치할 수 있는 지질의 소수성영역의 공간적 한계 때문에 봉입효율이 감소하는 것으로 생각된다. 반면, 파클리탁셀의 함량비율이 적을 경우 난용성 약물인 파클리탁셀에 의한 입자내 소수성결합이 감소하게 되고 이로 인하여 입자 형성시 안정도가 감소하여 봉입효율이 상대적으로 감소된다고 생각된다. 그러므로 파클리탁셀에 인지질이 포화농도 이상으로 첨가될 경우 분산 용액 내에 다량의 침전이 발생하고 봉입이 되지 않음을 알 수 있었다.

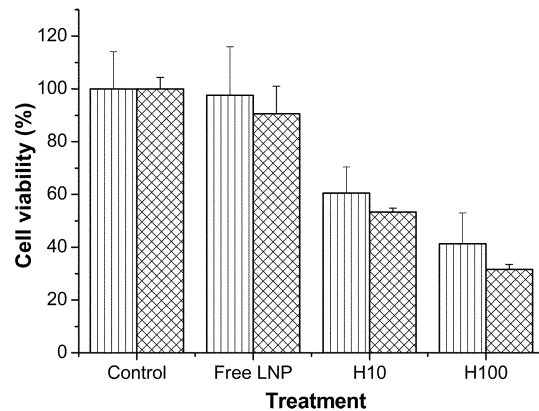


Fig. 4. Cytotoxicity study of lipid nanoparticles. Cell viability was determined by MTT assay after 24 and 48 hr, incubation at 37°C. Free LNP was composed of HSPC : CHOL : DPPA at a mass ratio of 7 : 3 : 3. H10 and H100 were composed of HSPC : CHOL : DPPA : Paclitaxel at a mass ratio of 7 : 3 : 3 : 1.3 and concentrations of paclitaxel are 10 and 100 µg/ml. Data are expressed as mean \pm S.D (n=3). () 24 hr, (▨) 48 hr.

지질나노입자의 세포독성

지질나노입자의 세포독성을 평가하기 위하여 B16F10세포를 이용하여 Fig. 4와 같이 MTT assay를 하였다. 약물이 봉입되지 않은 free LNP군의 경우 control군과 비교하여 큰 변화를 보이지 않았다. 이것은 HSPC, 콜레스테롤 그리고 DPPA로 구성된 지질나노입자가 낮은 세포독성을 가진다는 것을 나타낸다. 지질나노입자가 낮은 세포 독성을 갖는 이유는 생체 내 존재하는 인지질 및 콜레스테롤을 이용하여 제조되었기 때문이다. 한편, 100 µg/ml로 파클리탁셀이 봉입된 H100과 10 µg/ml로 파클리탁셀이 봉입된 H10의 경우 약물의 농도에 의존하여 세포독성 효과의 차이를 나타내었다. H100의 경우 24시간과 48시간 모두에서 50%이하의 낮은 세포 생존율을 보인 반면 H10의 경우 모두 50% 이상의 세포 생존율을 관찰함으로써 세포 생존율이 지질나노입자에 봉입된

Table 2. Physical properties of the lipid nanoparticles according to the ratio of lipid with drug

*Total lipid:Drug(mass ratio)	3 : 1	5 : 1	10 : 1	30 : 1	50 : 1
Mean particle size (nm)	83.95 \pm 5.5	88.55 \pm 6.9	101.6 \pm 7.8	102.5 \pm 8.3	86.2 \pm 10.5
Zeta potential (mV)	-43.39 \pm 2.3	-40.39 \pm 1.9	-47.39 \pm 4.5	-48.39 \pm 2.2	-53.39 \pm 6.2
Loading efficiency (%)	63.0 \pm 1.9	65.7 \pm 0.5	88.6 \pm 0.9	78.5 \pm 1.1	64.4 \pm 2.8

*Total lipid was composed of HSPC, CHOL and DPPA. Mass ratio of HSPC : CHOL : DPPA was set to 7 : 3 : 3. The data is shown as mean \pm S.D. (n=3)

파클리탁셀의 농도에 반비례함을 관찰 할 수 있었다. 이는 파클리탁셀이 봉입된 나노입자가 endocytosis에 의해 세포이입 후 세포내 대사 작용에 의해 약물이 세포 내로 방출되며 농도에 비례하여 세포독성을 유발시킨 것으로 생각된다. 이와 같이 제조된 음이온성 지질나노입자는 입자성 약물전달시스템으로써의 가능성을 제시한다.

결 론

자발 유화 용매화산법을 이용하여 인지질, 콜레스테롤, 다양한 음이온성 지질 그리고 PEG함유 인지질을 사용하여 지질나노입자를 제조하였고, 콜레스테롤의 함량 그리고 음이온성 지질의 종류 및 함량에 따라 나노입자의 특성과 봉입효율에 미치는 영향을 고찰하였다. 음이온성 지질 중 DPPA를 이용하여 제조 시 80% 이상의 높은 봉입효율을 보였으며, 콜레스테롤의 비율이 증가하면 콜레스테롤이 고르게 분포하지 못하여 입자 크기는 증가하고 봉입효율은 감소함을 알 수 있었다. 또한 사용된 총 지질의 양과 파클리탁셀의 비율을 달리하여 입자를 제조한 결과 지질의 양이 증가하면 약물의 봉입효율은 낮아지는 것을 알았다. 그리고 음이온성 지질나노입자의 세포독성 실험을 통하여 나노입자 자체의 독성은 낮으며, 봉입된 약물의 농도와 비례하여 세포독성을 나타내었다. 이렇게 제조되어진 음이온성 지질나노입자는 파클리탁셀과 같은 난용성 약물을 안정하게 가용화할 수 있는 시스템으로 응용이 가능하다.

인 용 문 헌

1. Wissing, S. A.; Kayser, O.; Muller, R. H. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2004**, *56*, 1257.
2. Schmitt-Sody, M.; Strieth, S.; Krasnici, S. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *6*, 23351.
3. Lundberg, B. B. *J. Control. Release.* **2001**, *72*, 191.
4. Kan, P.; Chen, Z. B.; Lee C. J.; Chu, I. M. *J. Control. Res.* **1999**, *58*, 271.
5. Junzo Seki; Satoru Sonoke; Akira Saheki; Hiroshi Fukui; Hideki Sasaki; Tadanori Mayumi, *Int. J. Pharm.* **2003**, *273*, 75.
6. Litzinger, D. C.; Buiting, J. N. *Biochim. Biophys. Acta.* **1994**, *1190*, 99.
7. Allen Zhang J.; Gopal Anyarambhatla.; Lan Ma.; Sydney Ugwu.; Tong Xuan.; Tommaso Sardone.; Inuran Ahmad. *Euro. J. Pharma. Biopharm.* **2005**, *59*, 177.
8. Tamilvanan, S. *Pro. Lipid. Res.* **2004**, *43*, 489.
9. Tetsuya Suzuki.; Hiroaki Komatsu.; Koichiro Miyajima.; *Biochim. Biophys. Acta.* **1996**, *1278*, 176.
10. Ozaki, K.; Hayashi, M. *Int. J. Pharm.* **1998**, *160*, 219.
11. Wei Guo.; Jenifer L.; Johnson.; Sumsullah Khan.; Ateeq Ahmad.; Inuran Ahmad, *Analyti. Biochem.* **2005**, *336*, 213.
12. Tharwat Tadros.; Izquierdo, P.; Esquena, J.; Solans, C.; *Advan. Colloid. Interface Sci.* **2004**, *303*, 108.
13. Monica Cristina De Oliveira.; Valerie Boutet.; Dlias Fattal, *Life. Sciences.* **2000**, *67*, 1625.
14. Wong-beringer.; Jacobs A.; Guglielmo, R. A and B. J. *Clin. Infect. Dis.* **1998**, *27*, 603.
15. Henna Ohvo-rekila.; Bodil Ramstedt.; Petra Leppimaki, J. *Pro. Lipid. Res.* **2002**, *41*, 66.
16. Litzinger, D. C.; Buiting, A. M. J.; Van Rooijen, N.; Huang, L. *Biochim. Biophys. Acta.* **1994**, *1190*, 99.
17. Tao Yang.; Fu-De Cui.; Min-Koo Choi.; Jei-Won Cho, *Int. J. Pharm.*, **2007**, *338*, 317.
18. Yong Hu.; Jingwei Xie.; Yen Wah Tong.; Chi-Hwa Wang, *J. Control. Res.* **2007**, *118*, 7.
19. Moghimi, S. M.; Szebeni, J. J. *Pro. Lipid. Res.* **2003**, *42*, 463.