

## 폴리에틸렌글리콜이 도입된 양이온성 리포솜의 물리적 특성 및 세포이입효과

정순화<sup>1,2</sup> · 정석현<sup>1</sup> · 김성규<sup>1</sup> · 성하수<sup>1</sup> · 조선행<sup>1</sup> · 신병철<sup>1,2†</sup>

<sup>1</sup>한국화학연구원 신약기반기술연구센터, <sup>2</sup>과학기술연합대학원대학교 의약 및 약품화학

(2007년 11월 19일 접수 · 2008년 1월 29일 승인)

### Physical properties and intracellular uptake of polyethyleneglycol-incorporated cationic liposomes

Soon Hwa Jung<sup>1,2</sup>, Suk Hyun Jung<sup>1</sup>, Sung Kyu Kim<sup>1</sup>, Hasoo Seong<sup>1</sup>, Sun Hang Cho<sup>1</sup> and Byung Cheol Shin<sup>1,2†</sup>

<sup>1</sup>Center for drug discovery technologies, Korea Research Institute of Chemical Technology, 100, Jang-dong, Yuseong, Daejeon 305-343, Korea.

<sup>2</sup>Medical and Pharmaceutical Chemistry, Korea University of Science and Technology, 52, Eoeun-dong, Yuseong, Daejeon, 305-333, Korea

(Received November 19, 2007 · Accepted January 29, 2008)

**ABSTRACT** – Liposomes as one of the efficient drug carriers have some shortcomings such as their short circulation time, fast clearance from human body by reticuloendothelial system (RES) and limited intracellular uptake to target cell. In this study, polyethyleneglycol (PEG)-incorporated cationic liposomes were prepared by ionic complexation of positively charged liposomes with carboxylated polyethyleneglycol (mPEG-COOH). The cationic liposomes had approximately 98.6±1.0 nm of mean particle diameter and 42.8±0.8 mV of zeta potential value. The PEG-incorporated cationic liposomes had 110.1±1.2 nm of mean particle diameter with an increase of about 10 nm compared to the cationic liposomes. Zeta potential value of them was 12.9±0.6 mV indicating 30 mV decrease of cationic charge compared to the cationic liposomes. The amount of PEG which was incorporated onto the cationic liposomes was assayed by using picrate assay method and the incorporation efficiency was 58.4±1.1%. Loading efficiency of model drug, doxorubicin, into cationic liposomes or PEG-incorporated cationic liposomes was about 96.0±0.7%. Results of intracellular uptake which were evaluated by flow cytometry analysis of doxorubicin loaded liposomes showed that intracellular uptake of PEG-incorporated cationic liposomes was higher than the cationic liposomes or DSPE-mPEG liposomes. In addition, cytotoxicity of PEG-incorporated cationic liposomes was comparable to cationic liposomes. Consequently, the PEG-incorporated cationic liposomes of which surface was incorporated with PEG by ionic complex may be applicable as anticancer drug carriers that can increase therapeutic efficacy.

**Key words** – Liposome, Polyethyleneglycol, Intracellular uptake

리포솜은 지질 이중막으로 구성되는 소포체로서 리포솜 내부에 친수성 약물을 봉입하거나 지질 이중막 사이에 소수성 약물을 봉입할 수 있는 유용한 약물 전달체로서 연구되고 있다.<sup>1-4</sup> 또한 리포솜의 구조는 세포막 구조와 비슷하여 세포독성이 적고 세포와의 융합이나 세포내 이입을 통해 손쉽게 약물을 전달할 수 있는 장점이 있다.<sup>5-8</sup> 하지만 리포솜은 체내 투여 시간이나 비장의 세망내피계와 대식세포에 의하여 쉽게 흡수되어 혈류 내 반감기가 급격히 떨어지며 혈중 단백질의 흡착 및 리포솜간의 응집현상에 의하여 구조적으로 불안정하게 되어 봉입된 약물이 누출되고 정상세포에 독성을 끼치는 문제를 가지고 있다.<sup>9-10</sup> 이러한 단점을 극복

하기 위하여 리포솜 표면에 친수성 고분자인 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 도입시키는 방법이 연구되어 왔다. PEG는 생체적합성 고분자로서 리포솜과 혈장 단백질과의 흡착을 감소시켜 리포솜의 안정성을 증가시키고 결과적으로 혈류 내 순환시간을 증가시킬 수 있다.<sup>11-12</sup> PEG를 이용하여 리포솜의 구조를 안정화시키는 방법에는 지질과 고분자를 공유결합한 후 리포솜을 제조하는 방법, 리포솜을 제조한 후 지질과 고분자의 인력을 이용하여 리포솜의 표면을 코팅하는 방법 그리고 제조된 리포솜에 직접 공유 결합하여 리포솜의 표면을 수식하는 방법 등이 있다.<sup>13-18</sup> 예를 들어, 아민기를 갖는 인지질과 PEG를 공유 결합하여 1,2-디스테로일-*sn*-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시-(폴리에틸렌글리콜)-2000](DSPE-mPEG)와 같은 지질-PEG 복합체를 제조한 후 이를 리포솜의 이중층에 도입함으로써 혈중 단백질의 흡착

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
Tel : 042)860-7223, E-mail : bcshin@kricr.re.kr

과 세망내피계로부터 안정한 리포솜을 제조하는 연구 등이 보고되었다.<sup>19-21)</sup> 하지만 DSPE-mPEG와 같은 공유결합으로 이뤄진 복합체는 생체 내 분해 기구가 없고 경제적 비용이 많이 들며 중앙세포로의 이입에 한계가 있다.<sup>22)</sup> 본 연구에서는 이러한 단점들을 극복하기 위해 양전하를 갖는 리포솜의 표면에 음전하를 갖는 PEG 유도체를 이온결합 시킴으로써 리포솜의 표면에 PEG가 도입된 양이온성 리포솜을 제조하였다. 모델 약물로써 독소루비신을 리포솜에 봉입하고 리포솜 표면에 존재하는 PEG는 피크레이트(picrate) 정량법을 이용하여 정량함으로써 PEG 도입효율을 확인하였다. 또한 B16F10 설치류 흑색종 세포주에 대하여 제조된 리포솜의 세포이입성과 세포독성을 관찰함으로써 PEG 도입 양이온성 리포솜의 약물전달체로서의 응용가능성을 살펴보았다.

## 실험 방법

### 시약

리포솜 제조에 사용된 지질인 L- $\alpha$ -phosphatidylcholine (soy hydrogenated) (HSPC), cholesterol (CHOL), 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy (polyethyleneglycol)-2000] (DSPE-mPEG) 및 1,2-distearoyl-3-trimethylammonium-propane (DSTAP)은 Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, USA)에서 구입하여 사용하였다. 리포솜 표면에 이온결합 시킨 PEG 유도체인 [methoxy (polyethyleneglycol)-2000-COOH] (mPEG-COOH)는 Nanocs Inc. (New York, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다. 모델 약물은 독소루비신(doxorubicin hydrochloride, DOX)을 보령제약(Seoul, South Korea)에서 구입하여 사용하였고, 그 밖에 실험에 사용한 클로로포름과 메탄올 등은 일급 및 특급시약을 그대로 사용하였다.

### 기기

리포솜 제조 시 인지질 필름 형성을 위하여 회전증발기(Buchi Rotavapor R-200, Switzerland)를 사용하였고, 리포솜의 입자 크기 조절과 단일 이중막 제조를 위하여 가압압출기(Lipex extruders, Northern Lipid Ins, Canada)를 사용하였다. 리포솜의 크기 및 표면전하는 입도분석기 및 제타전위측정기(ELS-Z, Particle analyzer, Otuska, Japan)를 사용하여 측정하였다. 리포솜 내의 약물 봉입률은 자외선-가시광선 분광기(UV mini 1240, Shimadzu Scientific Inc, Japan)를 사용하여 측정하였다. 리포솜의 세포내 이입을 평가하기 위한 세포이입성 분석은 유세포 분석기(FACS, Becton Dickinson, Sanjose, CA, USA)를 이용하여 측정하고, 세포

독성을 조사하기 위한 세포생존율 측정은 Microplate reader (EL808, Bio-Tek, Winooski, VT, USA)를 이용하였다.

### 세포 및 세포 배양

리포솜의 세포내 이입과 세포독성을 측정하기 위하여 설치류 흑색종 세포주인 B16F10 세포(Korean Cell Line Bank, Seoul, South Korea)를 사용하였다. 세포는 5%의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 10%의 소혈청 용액을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, USA)에서 37°C로 배양하였다.

### 리포솜의 제조 및 약물봉입

각 리포솜 제조에 사용된 지질의 종류와 몰 비율은 양이온성 리포솜의 경우 HSPC, CHOL 그리고 DSTAP (49.5:32.6:17.9)을 사용하였고 DSPE-mPEG liposome은 HSPC, CHOL 그리고 DSPE-mPEG (57.2:37.6:5.2)를 사용하여 리포솜을 제조하였다. 리포솜의 최종 지질 농도는 모두 15.95 mg/mL이 되도록 하였다. 리포솜의 제조는 각각의 지질을 클로로포름과 메탄올을 1:1 (v/v)로 혼합한 용매 5 mL에 용해시킨 후, 회전증발기를 사용하여 40°C에서 감압 증류하여 등근바닥 플라스크 벽에 얇은 지질막을 형성시켰다. 지질막이 형성된 등근바닥 플라스크는 12시간 이상 진공 하에서 잔류 용매를 완전히 제거시킨 후 형성된 지질막을 160 mM의 암모늄설페이트 용액으로 지질막이 완전히 분산될 때까지 수화하여 리포솜 용액을 제조하였다. 이렇게 제조된 리포솜 용액의 리포솜 입자 크기를 조절하기 위하여 가압압출기로 200 nm, 100 nm 그리고 80 nm의 공극을 갖는 폴리카보네이트 분리막(Whatman, USA)을 이용하여 각각 5회 이상 가압 및 압출 하였다. 리포솜 내부에 봉입되지 않은 암모늄설페이트는 리포솜 용액을 4°C에서 48시간 동안 막투석(MWCO 12000~14000, Viskase Sales Inc, Chicago, IL, USA)을 실시하여 제거하였다. 각 리포솜에 독소루비신의 봉입은 리포솜 표면의 이온성과 관계없이 모두 리포솜 내부와 외부의 암모늄설페이트의 농도편차를 이용한 리모트 로딩방법을 사용하였고 최종 독소루비신 농도는 2 mg/mL이 되도록 봉입하였다. 자외선-가시광선 분광기를 이용하여 497 nm에서 독소루비신의 봉입효율을 측정하였다.<sup>23)</sup>

### 양이온성 리포솜 표면의 PEG 도입

제조된 양이온성 리포솜 표면에 mPEG-COOH를 이온결합 시키기 위하여 양이온성 리포솜 용액에 mPEG-COOH를 혼합하였다. PEG 도입효율이 가장 우수한 최적의 몰 비율을 알아보기 위하여 리포솜 제조 시 사용된 양이온성 지질

과 대비하여 1:0.1, 1:0.5, 1:1, 1:2 그리고 1:4의 각각의 물 비율로 mPEG-COOH를 혼합한다. 이러한 혼합용액에 1 M 농도의 수산화나트륨 수용액을 이용하여 pH를 12.5로 조절함으로써 mPEG-COOH의 음전하성을 더욱 활성화시킨 후에 25°C에서 1시간동안 교반시켰다. 리포솜 표면에 도입되지 않은 mPEG-COOH는 Centricon® (MWCO 100,000, Millipore Corporate, MA, USA)을 이용하여 4000×g에서 2시간 동안 2회 이상 원심 분리하여 제거하였다.

### 리포솜의 물리적 특성분석

리포솜 입자의 크기와 표면전하 값을 입도분석기 및 제타 전위측정기를 사용하여 측정하였고, 리포솜내부에 봉입된 독소루비신의 농도는 클로로포름, 메탄올 그리고 증류수를 혼합한 용매에 리포솜 용액을 가하여 리포솜을 완전히 용해시킨 후 용액의 흡광도를 자외선-가시광선 분광기를 사용하여 측정하였으며 다음 식(1)에 의하여 봉입효율을 계산하였다.

$$\text{약물봉입효율(\%)} = \frac{C_f}{C_i} \times 100 \quad (1)$$

여기서  $C_f$ 는 독소루비신이 봉입된 리포솜을 준비된 용매와 섞여 리포솜을 완전히 용해시킨 후 측정된 약물의 농도이고,  $C_i$ 는 리포솜에 독소루비신을 봉입하기 위해 초기 첨가한 독소루비신의 농도이다.

### 리포솜 표면에 도입된 PEG 정량 및 PEG 도입효율 측정

PEG 도입 양이온성 리포솜의 표면에 PEG가 결합되어 있음을 확인하기 위하여 피크레이트 정량법을 이용하여 PEG 정량과 리포솜에 도입된 PEG의 도입효율을 평가하였다.<sup>24-25)</sup> 먼저 검량선 작성은 일정농도의 PEG 용액 5 mL을 sodium nitrate-picrate 용액 10 mL과 혼합한 후 5분 동안 vortexing 한다. 이 혼합용액에 dichloroethane 5 mL을 첨가하고 10분 이상 강하게 vortexing한 후, 1500×g 10분간 원심분리한 후 유기층을 채취하여 자외선-가시광선 분광기를 사용하여 380 nm에서 용액의 흡광도를 측정하여 검량선을 작성하였다. 리포솜에 도입된 PEG의 양은 검량선 작성시 동일한 방법으로 리포솜 용액 5 mL과 sodium nitrate-picrate 용액 10 mL을 혼합한 후 5분 동안 vortexing 한다. 이 혼합용액에 dichloroethane 5 mL을 첨가한 후 10분 이상 강하게 vortexing하고 원심분리한 후 유기층을 채취하여 흡광도를 측정하고 미리 작성한 검량선과 비교하여 PEG의 농도로 환산하였다. 측정된 PEG 농도를 이용하여 양이온성 지질과 mPEG-COOH의 몰 비율에 따른 PEG 도입효율을 다음 식(2)에 의해 계산하였다.

$$\text{PEG 도입효율(\%)} = \frac{P_m}{P_i} \times 100 \quad (2)$$

여기서  $P_m$ 은 리포솜에 PEG를 도입시킨 후 PEG를 측정 한 농도이고,  $P_i$ 는 리포솜에 PEG를 도입하기 위해 초기 첨가한 PEG의 농도이다.

### 리포솜의 세포내 이입

제조된 리포솜의 세포내 이입효율을 알아보기 위해 B16F10 설치류 흑색종 세포주를 이용하여 유세포 분석법을 실시하였다. 먼저 24 웰 플레이트에 최종 세포 농도가  $1 \times 10^4$  cells/well이 되도록 가하여 12시간이상 배양하여 세포를 부착시킨다. 배양액을 제거한 후 리포솜의 독소루비신 농도를 15 µg/mL로 하여 리포솜 용액을 첨가한 후 DMEM 배지에서 2시간동안 배양하였다. 배양액을 제거한 후 10 mM Phosphate buffered saline (PBS)으로 2번씩 수세한 후, 5%의 paraformaldehyde 300 µL을 첨가하여 세포를 고정시킨 후 유세포 분석기를 이용하여 리포솜의 세포내 이입을 측정한다.

### 리포솜의 독성평가

제조된 리포솜의 세포독성을 평가하기 위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay를 실시하였다. B16F10 설치류 흑색종 세포주를 이용하여 96 웰 플레이트에 최종 세포 농도가  $1 \times 10^4$  cells/well이 되도록 가한 후 24시간이상 배양하여 세포를 부착시킨다. 배양액을 제거한 후 10 mM PBS로 수세한 후, 각각의 리포솜을 약물 농도에 따라 DMEM 배지와 희석하여 최종 부피가 200 µL가 되도록 배양액을 첨가하여 24시간 배양시킨다. 5 mg/mL 농도의 MTT 용액 20 µL를 첨가하고, 4시간동안 5%의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 숙성하였다. 배양액을 제거한 후 dimethylsulfoxide (DMSO)를 첨가하여 formazan crystal을 용해시킨 후 Microplate reader를 이용하여 590 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 리포솜의 물리적 특성

제조된 리포솜의 입자크기, 표면전하 및 약물의 봉입효율을 Table I에 나타내었다. 양이온성 리포솜과 DSPE-mPEG 리포솜의 입자크기는  $98.9 \pm 0.9$  nm 내외에서 관찰되었으며, PEG가 도입된 양이온성 리포솜의 입자크기는  $110.1 \pm 1.2$  nm로 양이온성 리포솜보다 10 nm 정도 증가하였다. 이는 리포솜 표면에 PEG가 도입되어 PEG 코팅층이 형성되면서 입자

Table I—Physical Properties of Various DOX Loaded Liposomes

Liposomes	Composition	Mean particle diameter (nm)	Zeta potential (mV)	DOX loading efficiency (%)
Cationic liposome	HSPC : CHOL : DSTAP	98.6±1.0	42.8±0.8	96.8±0.5
DSPE-mPEG liposome	HSPC : CHOL : DSPE-mPEG	99.2±0.8	-21.2±0.7	95.7±0.4
PEG-incorporated cationic liposome	HSPC : CHOL : DSTAP-PEG	110.1±1.2	12.9±0.6	95.2±0.8

크기가 증가한 것으로 생각된다.<sup>26)</sup> 리포솜의 표면전하를 측정 한 결과, 양이온성 리포솜은  $42.8 \pm 0.8$  mV의 강한 양이온성을 나타낸 반면, PEG를 도입시킨 양이온성 리포솜의 경우에는  $12.9 \pm 0.6$  mV의 값을 나타내었다. 이는 mPEG-COOH의 음전하와 양이온성 리포솜을 형성하는 지질인 DSTAP이 가지는 양전하와의 이온결합이 형성되어 리포솜 표면의 양이온성을 감소시킨 것으로 생각된다.<sup>27)</sup> 한편, DSPE-mPEG 리포솜은 DSPE-mPEG 지질의 영향으로  $-21.2 \pm 0.7$  mV의 음이온성을 나타내었다. 모델 약물인 독소루비신의 봉입은 리포트 봉입방법을 이용한 것으로 봉입효율은  $95.9 \pm 0.6\%$  내외로 측정되었다. PEG가 도입된 양이온성 리포솜의 경우 mPEG-COOH의 이온결합에 의해 표면전하 값이 약한 양이온으로 변화하였으나, 독소루비신의 봉입효율에는 영향을 보이지 않았다.

#### 리포솜에 도입된 PEG 정량 및 PEG 도입효율 측정

PEG 도입 양이온성 리포솜의 표면에 mPEG-COOH가 결합되어 있음을 확인하기 위하여 피크레이트 정량법을 이용하여 PEG 정량을 실시하였다.<sup>24-25)</sup> 그리고 정량한 PEG를 이용하여 리포솜 표면에 도입된 PEG의 도입효율을 확인하였다. 양이온성 리포솜에 mPEG-COOH를 도입시킬 때 초기

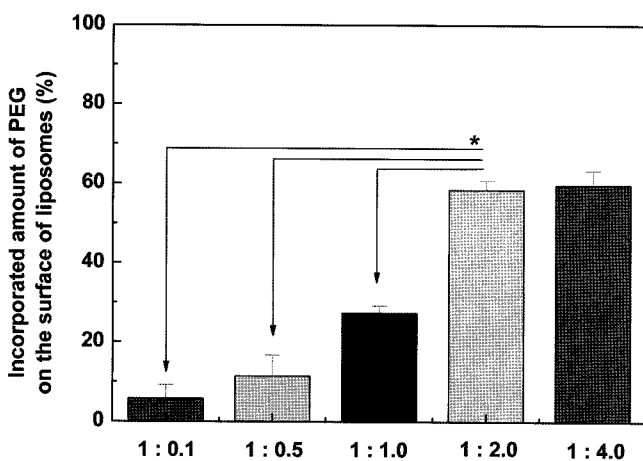
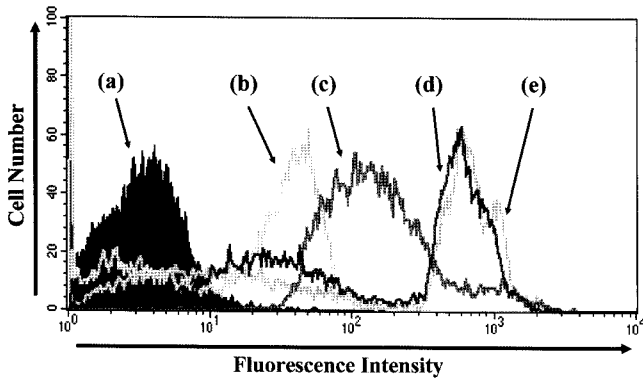


Figure 1—Quantitative estimation of the PEG incorporated on the surface of various PEG-incorporated cationic liposomes according to the molar ratio of DSTAP to mPEG-COOH (\* $P < 0.001$ ).

첨가한 PEG의 양과 PEG 도입이 끝나고 도입되지 않은 PEG를 제거한 후 최종적으로 결합되어 있는 PEG양을 측정하여 PEG 도입효율을 확인하였다. Fig. 1에서와 같이 양이온성 지질과 mPEG-COOH의 몰 비율에 따른 PEG 도입효율을 확인한 결과, 1:0.1, 1:0.5 그리고 1:1의 몰 비율일 때 각각  $5.81 \pm 3.3\%$ ,  $11.4 \pm 5.3\%$  그리고  $27.3 \pm 1.8\%$ 의 도입효율을 나타내었다. 또한 1:2와 1:4일 경우  $58.4 \pm 2.3\%$ 와  $59.6 \pm 3.6\%$ 의 도입효율을 나타내었다. DSTAP과 mPEG-COOH의 몰 비율이 1:1 이하일 경우 30% 이하의 낮은 도입효율을 보였으나, mPEG-COOH를 1:2 이상 첨가했을 경우 50% 이상의 증가된 도입효율을 나타내었다. DSTAP과 mPEG-COOH의 몰 비율을 1:4로 mPEG-COOH의 비율을 증가시켰음에도 PEG 도입효율이 더 이상 증가하지 않음을 확인하였다. 이와 같이 피크레이트 정량법을 통해서 PEG가 양이온성 리포솜에 이온결합 되어있음을 확인하였고, PEG 도입효율은 양이온성 지질인 DSTAP 대비 mPEG-COOH의 몰 비율이 1:2일 때 가장 효율적임을 확인하였다. 이러한 PEG 도입 양이온성 리포솜은 리포솜 표면에 PEG를 결합시킴으로써 리포솜과 혈장단백질과의 흡착을 감소시켜 리포솜의 안정성을 유지하고 혈류 내 순환시간을 증가시킬 수 있다.<sup>11-12)</sup> 한편 양이온성 리포솜 표면에 mPEG-COOH 도입 시 pH를 12.5로 조절한 것은 mPEG-COOH를 mPEG-COO<sup>-</sup>로 deprotonation하여 mPEG-COOH의 음전하성을 더욱 활성화하는 단계이며 도입 후에는 다시 생체 내 pH인 7.4로 조절해준다. pH 7.4로 보정하는 과정에서 양이온성 리포솜에 도입된 mPEG-COOH의 헤리가 실험상 관찰되지 않은 것으로 보아 pH 12.5에서 pH 7.4로의 보정이 가능하다.

#### 리포솜의 세포내 이입

양이온성 리포솜, DSPE-mPEG 리포솜 그리고 PEG 도입 양이온성 리포솜의 세포내 이입효과를 알아보기 위해 B16F10 설치류 흑색종 세포주를 이용하여 유세포 분석법을 실시하였다. Figure 2에서 양이온성 리포솜과 PEG 도입 양이온성 리포솜의 세포이입성이 음전하의 표면전하를 갖는 DSPE-mPEG 리포솜보다 뛰어난 것을 알 수 있다. 이는 양전하의 리포솜 표면과 세포막과의 정전기적 인력이 작용하고, 내

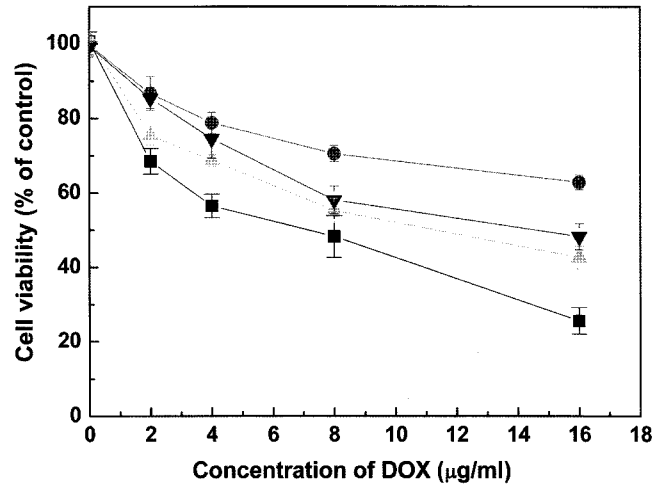


**Figure 2**—Flow cytometric analysis for intracellular uptake of various DOX loaded liposomes against murine B16F10 melanoma cells ; (a) normal cells, (b) DSPE-mPEG liposome, (c) Cationic liposome, (d) PEG-incorporated cationic liposome, (e) Free DOX.

포작용(endocytosis)에 의해 세포내 이입이 유도되어 이입성이 증가하였다고 생각된다.<sup>28)</sup> 또한 PEG 도입 양이온성 리포솜은 양이온성 리포솜보다 양전하성이 낮음에도 불구하고 우수한 세포이입효과를 나타내었다. 양이온성 리포솜의 경우 세포독성을 나타내는 양이온성 지질이 표면에 노출되어 세포사멸이 증가하지만 PEG 도입 양이온성 리포솜의 경우에는 리포솜 표면에 도입된 PEG층에 의해서 양이온성 지질과 세포와의 상호작용이 억제될 수 있으므로 상대적으로 세포사멸이 감소하였다. 유세포 분석법의 경우 살아있는 세포를 분석하기 때문에 세포사멸이 증가한 양이온성 리포솜이 PEG 도입 양이온성 리포솜보다 낮은 세포이입효과를 나타내었다.<sup>29)</sup>

**리포솜의 독성평가**

양이온성 리포솜, DSPE-mPEG 리포솜 그리고 PEG 도입 양이온성 리포솜의 세포독성을 평가하기 위해 B16F10 설치류 흑색종 세포주를 이용하여 MTT assay를 실시하였다. 약물이 봉입된 각각의 리포솜을 약물 농도에 따라 세포에 처리한 후 약물을 처리하지 않은 대조군과 비교한 세포생존율을 Figure 3에 나타내었다. 먼저 Free DOX의 경우 약물의 농도가 증가할수록 세포생존율이 급격히 감소하여 독소루비신 16 mg/mL의 농도에서 25.6±3.6%의 세포생존율을 보이며 강한 세포독성을 나타내었다. 이는 독소루비신을 리포솜으로 제형화하지 않았기 때문에 세포독성을 감소시킬 수 있는 리포솜의 이중막이 존재하지 않아서 높은 독성을 나타낸 것이라 생각된다.<sup>30)</sup> 제조된 리포솜의 세포생존율을 살펴보면 DSPE-mPEG 리포솜의 경우 독소루비신 16 mg/mL의 농도에서 63.0±2.0%의 생존율을 나타냈으며 PEG 도입 양이온성 리포솜은 이보다 세포생존율이 감소하여 48.3±3.5%의 생존율을 나타내었다. 양이온성 리포솜 또한 DSPE-mPEG



**Figure 3**—Cytotoxicity of various DOX loaded liposomes against murine B16F10 melanoma cells ; Free DOX (■), DSPE-mPEG liposome (●), Cationic liposome (▲) and PEG-incorporated cationic liposome (▼).

리포솜보다 세포생존율이 크게 감소하여 42.6±3.0%의 생존율을 나타냄으로써 상대적으로 양전하성을 띄는 리포솜일수록 세포독성이 증가함을 확인하였다. 이는 양이온성 리포솜의 양전하와 세포막과의 정전기적 인력에 의해 세포이입성이 증진된 결과로써, 세포내로 이입된 독소루비신의 방출이 증가함으로써 세포에 강한 독성을 나타낸 것으로 생각된다. 또한 DSTAP과 같은 양이온성 지질을 포함하는 리포솜의 경우 양이온성 지질 자체가 가지는 세포독성에 의해 독성이 증가될 수 있으며 이러한 양이온성 지질의 독성효과는 봉입약물의 독성과 상승 작용하여 리포솜의 세포생존율을 감소시킬 수 있다.<sup>28)</sup>

**결론**

리포솜의 세포내 이입을 증가시키기 위하여 리포솜 표면의 양이온에 PEG 유도체를 이온결합하여 리포솜을 제조하였다. PEG가 도입된 양이온성 리포솜은 양이온성 리포솜과 비교하여 입자크기가 10 nm 정도 증가하였고 표면전하 값은 약한 양이온으로 양이온성이 소량 감소한 것으로 보아 양이온성 리포솜에 PEG가 결합되었음을 확인하였다. 또한 피크레이트 정량법을 통해 리포솜 표면의 PEG 도입효율을 측정 한 결과, 양이온성 지질 대비 mPEG-COOH의 몰 비율이 1:2일 경우 58.4±1.1%의 PEG 도입효율을 나타내었다. PEG 도입 양이온성 리포솜은 양이온성 리포솜과 DSPE-mPEG 리포솜과 비교하여 월등한 세포이입율을 나타내었으며 세포독성 평가에 있어서도 DSPE-mPEG 리포솜에 비해 우수한 독성효과를 보였다. 이는 PEG 도입 양이온성 리포

솜 표면의 양전하에 의해 상대적으로 음전하를 띠는 종양세포와 정전기적 인력에 의해 세포내 이입이 증가하고 세포 내에서 약물이 방출되어 효과적인 세포독성을 발휘할 수 있음을 말해준다. 따라서 PEG가 도입된 리포솜은 PEG에 의해 혈류 내에서 구조적인 안정성을 유지하고 종양세포로의 높은 이입효과를 기대할 수 있다. 이러한 리포솜은 리포솜의 세포내 이입을 증가시킴으로써 봉입된 약물의 효력을 증가시킬 수 있는 효율적인 약물전달체로서의 응용이 가능하리라 기대한다.

### 감사의 말씀

본 연구는 산업자원부 차세대 성장 동력 개발 사업(10016573)으로 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

- 1) A. D. Bangham, M. M. Standish and J. C. Watkins, Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *J. Mol. Bio.*, **13**, 238-252 (1965).
- 2) Gregoriadis, G. and Florence, A. T., Liposomes in drug delivery: Clinical, diagnostic and ophthalmic potential, *Drugs.*, **45**, 15-28 (1993).
- 3) H. D. Han, B. C. Shin and H. S. Choi, Doxorubicin-encapsulated thermosensitive liposomes modified with poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylamide): drug release behavior and stability in the presence of serum, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **62**, 110-116 (2006).
- 4) Torchilin, V. P., Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **4**, 145-160 (2005).
- 5) Allen, T. M. and Moase, E. H., Therapeutic opportunities for targeted liposomal drug delivery, *Adv. Drug Delivery. Rev.*, **21**, 117-133 (1996).
- 6) Sharma, A. and Sharma, U. S., Liposomes in drug delivery: progress and limitations, *Int. J. Pharm. Biopharm.*, **154**, 123-140 (1997).
- 7) M. L. Van Slooten, O. Boerman, K. RomÖren, E. Kedar, D. J. A. Crommelin and G. Storm, Liposomes as sustained release system for human interferon- $\beta$ : biopharmaceutical aspects, *Biochim. Biophys. Acta*, **1530**, 134-145 (2001).
- 8) Lasic, D. D. and Papahadjopoulos, D., Liposomes revisited, *Science*, **267**, 1275-1276 (1995).
- 9) Moghimi, S. M. and Szebeni, J., Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: circulation profiles, protein-binding properties and activation of complement in blood, *Prog. Lipid Res.*, **42**, 463-478 (2003).
- 10) Liu, D., Biological factors involved in blood clearance of liposomes by liver, *Adv. Drug Delivery. Rev.*, **24**, 201-213 (1997).
- 11) Vertut-Doř, A., Ishiwata, H. and Miyajima, K., Binding and uptake of liposomes containing a poly (ethylene glycol) derivative of cholesterol (stealth liposomes) by the macrophage cell line J774: influence of PEG content and its molecular weight, *Biochim. Biophys. Acta*, **1278**, 19-28 (1996).
- 12) Lasic, D. D., Martin, F. J., Gabizon, A., Huang, S. K. and Papahadjopoulos, D., Sterically stabilized liposomes: a hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times, *Biochim. Biophys. Acta*, **1070**, 187-192 (1991).
- 13) Gabizon, A. and Papahadjopoulos, D., Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**, 6949-6953 (1988).
- 14) B. Ceh, M. Winterhalter, P. M. Frederik, J. I. Vallner and D. D. Lasic, Stealth liposomes: From theory to product, *Adv. Drug. Delivery Rev.*, **24**, 165-177 (1997).
- 15) Moghimi, S. M. and Szebeni, J., Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein binding properties, *Prog. Lipid Res.*, **42**, 463-478 (2003).
- 16) Klibanov, A. L., Maruyama, K., Torchilin, V. P. and Huang, L., Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes, *FEBS Lett.*, **268**(1), 235-237 (1990).
- 17) Patel, H. M., Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **9**, 39-90 (1992).
- 18) Moghimi, S. M. and Patel, H. M., Serum-mediated recognition of liposomes by phagocytic cells of the reticuloendothelial system: the concept of tissue specificity, *Adv. Drug Delivery. Rev.*, **32**, 45-60 (1998).
- 19) Huang, S. K., Mayhew, E., Gilani, S., Lasic, D. D., Martin, F. J. and Papahadjopoulos, D., Pharmacokinetics and therapeutics of sterically stabilized liposomes in mice bearing C-26 colon carcinoma, *Cancer Res.*, **52**, 6774-6781 (1992).
- 20) Torchilin, V. P. and Trubetsky, V. S., Which polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulating?, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **16**, 141-155 (1995).
- 21) Slepishkin, V. A., Simoes, S. and Dazin, P., Sterically stabilized pH-sensitive liposomes: Intracellular delivery of aqueous contents and prolonged circulation longevity in vivo, *J. Biol. Chem.*, **272**, 2382-2388 (1997).
- 22) Thomas, L. A., Simon, S. J. and Kent, J., Advanced strategies in liposomal cancer therapy: Problems and prospects of active and tumor specific drug release, *Progress in Lipid Research*, **44**, 68-97 (2005).
- 23) Haran, G., Cohen, R., Bar, L. K. and Barenholz, Y., Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak bases, *Biochim. Biophys. Acta*, **1151**, 201-215 (1993).
- 24) K. Shimada, S. Matsuo, Y. Sadzuka, A. Miyagishima, Y. Nozawa, S. Hirota and T. Sonobe, Determination of

- incorporated amounts of poly(ethylene glycol)-derivatized lipids in liposomes for the physicochemical characterization of stealth liposomes, *Int. J. Pharm.*, **203**, 255-263 (2000).
- 25) Y. Sadzuka, A. Nakade, R. Hiram, A. Miyagishima, Y. Nozawa, S. Hirota and T. Sonobe, Effects of mixed polyethyleneglycol modification on fixed aqueous layer thickness and antitumor activity of doxorubicin containing liposome, *Int. J. Pharm.*, **238**, 171-180 (2002).
- 26) Takeuchi, H., Kojima, H., Toyoda, T., Yamamoto, H., Hino, T. and Kawashima, Y., Prolonged circulation time of doxorubicin-loaded liposomes coated with a modified polyvinyl alcohol after intravenous injection in rats, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **48**, 123-129 (1999).
- 27) Yoshida, A., Hashizaki, K., Yamauchi, H., Sakai, H., Yokoyama, S. and Abe, M., Effect of lipid with covalently attached poly(ethylene glycol) on the surface properties of liposomal bilayer membranes, *Langmuir*, **15**, 2333-2337 (1999).
- 28) Wu, J., Lee, A., Lu, Y. and Lee, R. J., Vascular targeting of doxorubicin using cationic liposomes, *Int. J. Pharm.*, **337**, 329-335 (2007).
- 29) C. R. Dass, Improving anti-angiogenic therapy via selective delivery of cationic liposomes to tumor vasculature, *Int. J. Pharm.*, **267**, 1-12 (2003).
- 30) T. Hwang, H. D. Han, D. H. Seo, H. Seong, J. H. Kim and B. C. Shin., Enhanced Intracellular Uptake of Anticancer Agent by Liposomes Modified with Folate-poly(ethylene imine)-phospholipid Conjugates, *J. Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **3**, 114-119 (2006).