

## 양이온성 지질이 포함된 PEG 리포솜의 세포내 이입 및 항암효력 평가

정순화<sup>1,2</sup> · 김성규<sup>1</sup> · 정석현<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

(2008년 4월 22일 접수 · 2008년 5월 29일 승인)

### Intracellular delivery and anti-tumor activity of polyethyleneglycol liposomes containing cationic lipid

Soon Hwa Jung<sup>1,2</sup>, Sung Kyu Kim<sup>1</sup>, Suk Hyun Jung<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 April 22, 2008 · Accepted May 29, 2008)

**ABSTRACT** – Liposomes are spherical vesicles composed of lipid bilayer membranes. However, the conventional liposomes have been found to be plagued by rapid opsonization and taken up by the reticuloendothelial system (RES), resulting in shortened circulation time and limited intracellular uptake to target cell. In this study, polyethyleneglycol-cationic liposomes (PCL) containing cationic lipid and DSPE-mPEG were prepared by thin film cast-hydration method. The PEG liposomes had approximately  $97.0 \pm 1.3$  nm of mean particle diameter and  $-21.7 \pm 1.2$  mV of zeta potential value. PCL had  $96.4 \pm 1.8$  nm of mean particle diameter and  $-8.7 \pm 1.1$  mV of zeta potential value with a decrease of about 10 mV compared to the PEG liposomes. Loading of model drug, doxorubicin (DOX), in liposomes were carried out by using remote loading method and the loading efficiency of DOX in liposomes was about  $95.0 \pm 1.9\%$ . Intracellular uptake and cytotoxicity of PCL were higher than that of PEG liposomes to murine B16F10 melanoma cells. In addition, anti-tumor activity of PCL was similar to that of PEG liposomes on growth of A549 human lung carcinoma in BALB/c mice. Consequently, PCL modified with cationic lipid may be applicable as anticancer drug carriers that can increase intracellular uptake and therapeutic efficacy.

**Key words** – Liposome, Polyethyleneglycol, Cationic, lipid, Intracellular, Anti-tumor

리포솜은 인지질로 형성된 이중막 소포체로서 리포솜의 내부에 친수성 약물을 봉입하거나 지질 이중막에 소수성 약물을 봉입할 수 있다.<sup>1-4)</sup> 이러한 리포솜은 생체 세포막과 유사한 구조를 가지므로 세포독성이 적고 생체 내 분해가 가능하며, 사용되는 지질의 구성에 따라 표면전하, 이중막의 유동성 그리고 크기 등을 쉽게 조절할 수 있다.<sup>5-7)</sup> 그러나 지질로만 구성된 리포솜은 체내 투여시 혈중 단백질과의 흡착과 리포솜의 응집 등으로 인한 구조적인 불안정성을 나타내고 간이나 비장의 세망내피계에 의해 쉽게 소실되어 병소세포로의 표적지향성이 감소할 수 있다.<sup>8-9)</sup> 이러한 단점을 보완하기 위하여 리포솜의 안정성과 혈류 순환시간을 증가시

키기 위하여 생체적합성과 유동성을 갖는 친수성 고분자를 이용하는 방법이 활발히 연구되고 있다. 예를 들어 생체 적합성 고분자인 폴리에틸렌글리콜을 이용하여 리포솜 표면을 수식함으로써 혈장 단백질이 리포솜 표면에 흡착되는 것을 방지하여 리포솜의 안정성을 향상시키는 연구 등이 보고되었다.<sup>10-14)</sup> 폴리에틸렌글리콜과 아민기를 갖는 인지질을 결합하여 1,2-디스테아로일-*sn*-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시-(폴리에틸렌글리콜)-2000] (DSPE-mPEG)와 같은 지질-PEG 복합체를 제조한 후 이를 리포솜의 이중층에 도입함으로써 혈장 단백질의 흡착을 방지하여 리포솜의 혈류내 안정성을 향상시키는 방법이 사용되어 왔다.<sup>15-17)</sup> 그러나 DSPE-mPEG를 이용한 리포솜은 PEG의 ether bond가 가지는 비공유 전자쌍에 의한 음이온성으로 인하여, 일반적으로 음이온성을 가지는 세포막의 표면과의 정적기적 반발력을 야기할 수 있어 표적세포로의 약물의 수송과 세포내 이입에 한

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

계가 있다.<sup>18)</sup> 한편, 양이온성 지질을 리포솜 이중층에 도입시킨 리포솜은 표면의 양이온성 전하에 의해 중앙 내피세포에 선택적으로 축적됨으로써 봉입된 약물의 효력을 증가시키는 약물전달체로 널리 연구되고 있다.<sup>19-20)</sup> 이에 본 연구에서는 PEG가 공유결합된 인지질인 DSPE-mPEG를 이용한 리포솜에 양이온성 지질을 리포솜 이중층에 도입시킴으로써 리포솜 표면의 음이온성이 감소된 양이온성 지질이 포함된 PEG 리포솜(PCL)을 제조하였다. 모델 약물로서 독소루비신(doxorubicin, DOX)을 리포솜에 봉입하고 리포솜의 입자 크기, 표면전하 및 봉입효율을 고찰하였다. B16F10 설치류 흑색종 세포주를 이용하여 제조된 리포솜의 세포이입성과 세포독성을 평가하기 위하여 유세포분석법과 MTT assay를 시행하였다. 또한 A549 폐암 세포주를 이용하여 봉입된 약물의 *in vivo* 항암효력을 평가하였다.

## 실험 방법

### 시약 및 재료

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. 모델 약물은 독소루비신(doxorubicin hydrochloride, DOX)을 보령제약(Seoul, South Korea)에서 구입하여 사용하였고, 투석막은 분획 분자량(molecular weight cut off, MWCO)이 12,000~14,000인 것을 Viskase Co. (Darien, IL, USA)에서 구입하여 사용하였다. 그 밖에 실험에 사용한 용매 및 시약은 일급시약 및 특급시약을 사용하였다.

### 기기

리포솜을 제조하기 위하여 회전응축증발기(Rotavapor R-200, Buchi, Switzerland)와 초음파 발생기(Ultrasonicator, 500, Fisher Scientific, USA)를 사용하였고, 리포솜의 입자 크기 조절을 위하여 가압압출기(Lipex extruders, Northern Lipid Inc., Canada)를 사용하였다. 제조된 리포솜의 입자 크기 및 표면전하는 입도분석 및 제타전위측정기(ELS-Z, Particle analyzer, Otuska Electronics Co., Japan)를 사용하여 측정하였다. 리포솜 내의 약물의 봉입효율은 자외선-가시광선 분광기(UV mini 1240, Shimadzu Scientific Inc., Japan)를 사용하여 측정하였고, 제조된 리포솜 용액의 삼투압은 삼투압 측정기(Osmomat 030, GONOTEC GmbH,

Germany)를 사용하였다. 리포솜의 세포내 이입을 평가하기 위한 세포이입성 분석은 유세포 분석기(FACS, Becton Dickinson, Sanjose, CA, USA)를 이용하여 측정하였고, 세포 독성을 조사하기 위한 세포생존율 측정은 Microplate reader (EL808, Bio-Tek, Winooski, VT, USA)를 이용하였다.

### 리포솜의 제조 및 약물봉입

각 리포솜 제조에 사용된 지질의 종류와 중량 비율은 conventional 리포솜의 경우 HSPC와 CHOL (9.58:3.19)을 사용하였고 양이온성 리포솜은 HSPC, CHOL 그리고 DSTAP (9.58:3.19:3.19)을 사용하였으며 PEG 리포솜은 HSPC, CHOL, 그리고 DSPE-mPEG (9.58:3.19:3.19)를 사용하였다. 각각의 PCL은 HSPC, CHOL, DSTAP, 그리고 DSPE-mPEG를 사용하여 PCL 0.1 (9.25:3.19:0.32:3.19), PCL 0.3 (8.62:3.19:0.96:3.19), 그리고 PCL 0.5 (7.98:3.19:1.60:3.19)를 제조하였다. 리포솜의 최종 지질 농도는 conventional 리포솜(12.77 mg/mL)을 제외한 모든 리포솜의 경우 15.96 mg/mL이 되도록 하였다. 리포솜의 제조는 각각의 지질을 클로로포름 5 mL에 용해시킨 후, 회전응축증발기를 사용하여 40°C에서 감압 증류하여 둥근바닥 플라스크 내벽에 얇은 지질막을 형성시켰다. 지질막이 형성된 둥근바닥 플라스크는 12시간 이상 진공 하에서 잔류 용매를 완전히 제거시킨 후 250 mM의 암모늄설페이트 용액으로 지질막이 완전히 분산될 때까지 수화하여 리포솜 용액을 제조하였다. 제조된 리포솜 용액의 리포솜 입자크기를 조절하기 위하여 가압압출기로 각각 200 nm, 100 nm, 그리고 80 nm의 공극을 갖는 폴리카보네이트 분리막(Whatman, USA)을 이용하여 각각 5회 이상 가압 압출 하였다. 리포솜 내부에 봉입되지 않은 암모늄설페이트는 리포솜 용액을 4°C에서 48시간 동안 막투석을 실시하여 제거하였다. 각 리포솜의 DOX의 봉입은 모두 리포솜 내부와 외부의 암모늄설페이트의 농도 편차를 이용한 리모트 로딩방법을 이용하였고 암모늄설페이트가 봉입된 리포솜 용액과 DOX 수용액을 1:1 (v/v)로 혼합하여 60°C에서 2시간 동안 교반하여 DOX를 리포솜 내부에 봉입시켰다.<sup>22-23)</sup> 이때 최종 DOX 농도는 2 mg/mL이 되도록 봉입하였으며 봉입되지 않은 DOX는 4°C에서 48시간 동안 막투석을 실시하여 제거하였다. 약물 봉입이 끝난 리포솜 용액에 20 mM L-histidine 완충용액(pH 6.5)과 수크로스를 가하여 pH 6.5와 삼투압 0.3~0.35 osmol/kg이 되도록 하였다.

### 리포솜의 물리적 특성분석

리포솜 입자의 크기와 표면전하 값을 입도분석 및 제타전위측정기를 사용하여 측정하였다. 리포솜 내부에 봉입된

DOX의 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.<sup>24)</sup>

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

여기서  $C_f$ 는 DOX가 봉입된 리포솜을 준비된 용매와 섞어 리포솜을 완전히 용해시킨 후 측정된 DOX의 농도이고,  $C_i$ 는 리포솜에 DOX를 봉입하기 위해 초기 첨가한 DOX의 농도이다.

**세포 및 동물 배양**

리포솜의 세포내 이입과 세포독성, 항암효력을 측정하기 위하여 설치류 흑색종 세포주인 B16F10 세포(Korean Cell Line Bank, Seoul, South Korea)와 폐암 세포주인 A549 세포(American type culture collection, Manassas, VA, USA)를 사용하였다. 세포는 10%의 소혈청 용액을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)과 RPMI medium 1640 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 37°C의 5%의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 실험에 이용한 누드마우스는 (BALB/c *nu/nu*, female) Charles River Japan, Inc.에서 구입하였으며 SPF (Specific pathogen free) 관리 하에서 사육, 실험하였다.

**리포솜의 세포내 이입**

제조된 리포솜의 세포내 이입효율을 알아보기 위해 B16F10 설치류 흑색종 세포주를 이용하여 유세포 분석법을 실시하였다.<sup>25-26)</sup> 먼저 24 웰 플레이트에 최종 세포 농도가  $1 \times 10^4$  cells/well이 되도록 가하여 24시간 이상 배양하여 세포를 부착시킨다. 배양액을 제거한 후 리포솜의 DOX 농도를 15 µg/mL로 하여 리포솜 용액을 첨가한 후 DMEM 배지에서 2시간동안 배양하였다. 배양액을 제거한 후 10 mM phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 2번씩 수세한 후, 5%의 paraformaldehyde 300 µL을 첨가하여 세포를 고정시킨 후 유세포 분석기를 이용하여 리포솜의 세포내 이입을 측정하였다.

**리포솜의 독성평가**

제조된 리포솜의 세포독성을 평가하기 위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay를 실시하였다.<sup>25)</sup> B16F10 설치류 흑색종 세포주를 이용하여 96 웰 플레이트에 최종 세포 농도가  $1 \times 10^4$  cells/well이

되도록 가한 후 24시간이상 배양하여 세포를 부착시켰다. 배양액을 제거한 후 10 mM PBS (pH 7.4)로 수세한 후, 각각의 리포솜을 DOX 농도에 따라 DMEM 배지와 희석하여 최종 부피가 200 µL가 되도록 배양액을 첨가하여 24시간 배양시켰다. 이때 DOX가 봉입되지 않은 리포솜을 DOX가 봉입된 리포솜을 처리할 때와 같이 희석하여 세포에 처리한 후 24시간 배양시킴으로써 리포솜 자체의 독성을 평가하였다. 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.

**리포솜의 항암효력**

제조된 리포솜의 항암효력을 평가하기 위해 A549 폐암 세포주를 이용하여 암 크기 변화를 측정하였다.<sup>23)</sup> A549 폐암 세포주를 누드마우스에 이종이식하고 일정한 크기로 자란 후 3×3×3 mm<sup>3</sup> 크기로 잘라 다시 누드마우스의 오른쪽 겨드랑이 피하에 이식하였다. 이식된 암의 크기가 약 200~210 mm<sup>3</sup>에 도달하였을 때 Free DOX와 PEG 리포솜, 그리고 PCL을 투여하였고, 투여 후 2~3일마다 암의 크기를 vernier calipers를 이용하여, 암의 직경(width, length)을 측정하고 다음의 식에 따라 암의 크기(Tumor volume)를 산출하였다.

$$\text{Tumor volume (mm}^3\text{)} = \text{width} \times \text{length}^2 / 2 \dots\dots\dots (2)$$

**결과 및 고찰**

**리포솜의 물리적 특성**

제조된 리포솜 각각의 입자크기, 표면전하 및 약물의 봉입효율을 Table I에 나타내었다. Conventional 리포솜과 양이온성 리포솜, PEG 리포솜의 입자크기는 95.0 nm 내외에서 관찰되었으며, 양이온성 지질이 포함된 PCL의 입자크기 역시 96.0 nm 내외로 입자크기의 변화는 관찰되지 않았다. 리포솜의 표면전하를 측정된 결과, HSPC와 CHOL로만 구성된 conventional 리포솜은  $-3.2 \pm 1.4$  mV로 전기적으로 중성을 나타내었고 이에 DSTAP이 첨가된 양이온성 리포솜은  $41.9 \pm 0.5$  mV의 강한 양이온성을 나타내었다. Conventional 리포솜에 DSPE-mPEG를 도입시킨 PEG 리포솜의 경우에는 DSPE-mPEG 지질의 영향으로  $-21.7 \pm 1.2$  mV의 음이온성을 나타내었다. PEG 리포솜 표면의 음이온성을 감소시키기 위하여 양이온성 지질인 DSTAP을 리포솜 이중층에 도입한

**Table I**—Physical Properties of DOX Loaded Liposomes

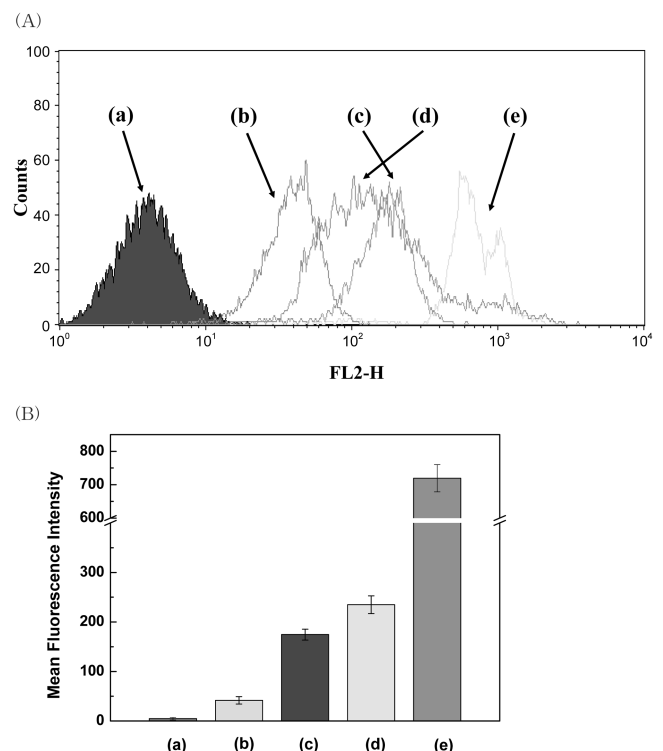
Liposomes	Composition (mass ratio)	Mean particle diameter (nm)	Zeta potential (mV)	DOX loading efficiency (%)
Conventional liposome	HSPC:CHOL (3 : 1)	95.6±1.9	-3.2±1.4	94.7±2.6
Cationic liposome	HSPC:CHOL:DSTAP (3 : 1 : 1)	93.7±2.1	41.9±0.5	95.3±1.7
PEG liposome	HSPC:CHOL:DSPE-mPEG (3 : 1 : 1)	97.0±1.3	-21.7±1.2	94.6±2.0
PCL 0.1	HSPC:CHOL:DSTAP: DSPE-mPEG (2.9 : 1 : 0.1 : 1)	96.4±1.8	-8.7±1.1	95.3±1.8
PCL 0.3	HSPC:CHOL:DSTAP: DSPE-mPEG (2.7 : 1 : 0.3 : 1)	97.5±1.2	6.43±0.9	93.5±1.6
PCL 0.5	HSPC:CHOL:DSTAP: DSPE-mPEG (2.5 : 1 : 0.5 : 1)	95.2±1.7	12.9±2.1	94.8±2.1

PCL 0.1, 0.3, 그리고 0.5의 표면전하는 각각  $-8.7\pm 1.1$  mV,  $6.43\pm 0.9$  mV, 그리고  $12.9\pm 2.1$  mV를 나타내었다. 제조된 PCL 0.1, 0.3, 그리고 0.5는 DSTAP 중량의 증가에 따라서 표면전하 값이 음이온성에서 점진적으로 양이온성으로 변화하였다. 이는 양이온성 지질이 리포솜 이중층에 도입됨에 따라 DSTAP에 의해 DSPE-mPEG에 의한 음이온성이 상쇄되었기 때문이다. 리포솜의 표면전하가 양이온성일 경우 혈류에서의 옉소닌화와 세망내피계에 의한 급격한 소실을 야기할 수 있으므로 전기적으로 약한 음이온성 또는 중성에 가까운 PCL 0.1을 이용하여 *in vitro*와 *in vivo* 실험을 시행하였다.<sup>19,21)</sup> 모델 약물인 DOX의 봉입은 리포트 봉입방법을 이용한 것으로 봉입효율은 95.0% 내외로 측정되었다. DSTAP이 도입된 PCL의 경우 각각의 표면전하 값의 변화와 관계없이 DOX의 봉입효율은 일정한 결과를 나타내었다.

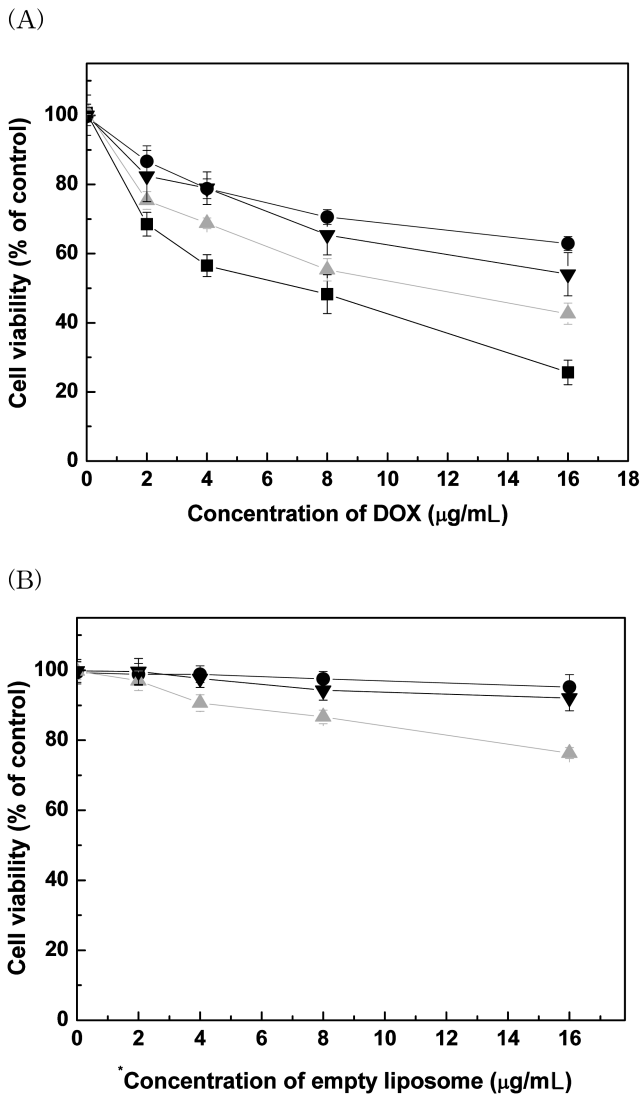
#### 리포솜의 세포내 이입

B16F10 설치류 흑색종 세포주를 이용하여 양이온성 리포솜, PEG 리포솜 그리고 PCL의 세포내 이입효율을 유세포 분석법으로 확인하였다. Figure 1에서와 같이, PBS (pH 7.4)를 처리한 세포, Free DOX 및 각각의 리포솜을 처리한 세포에서의 형광강도(A)와 평균형광강도(B)를 비교하였다. PCL은 PEG 리포솜과 비교하여 매우 증가된 형광강도를 나타내었다. PCL은 PEG 리포솜에 양이온성 지질인 DSTAP을 소량 첨가하여 리포솜 표면의 음이온성을 소폭 감소시킨 리포솜으로서, PEG 리포솜보다 세포이입효율이 4배 이상 증가하면서 매우 높은 이입효과를 나타내었다. 또한 표면에 강한 양전하를 가지는 양이온성 리포솜은 PEG 리포솜보다 월등

한 이입효율을 나타내었으며 PCL보다도 소폭 증가한 세포 이입효율을 나타내었다. 이는 리포솜 표면이 상대적으로 음전하성이 약하거나 또는 양전하를 가지게 될 경우 표적 세포막과의 정전기적 반발력이 감소하여, 세포막과의 상호작용



**Figure 1**—Flow cytometric analysis; fluorescence intensity (A) and mean fluorescence intensity (B) for intracellular uptake of DOX loaded liposomes to murine B16F10 melanoma cells; (a) untreated cells, (b) PEG liposome, (c) PCL, (d) cationic liposome, (e) Free DOX. Mean and S.D. are shown (n=3).



**Figure 2**—Cytotoxicity of DOX loaded liposomes (A) and DOX unloaded liposomes (B) to murine B16F10 melanoma cells assayed by using MTT assay method after 4 hrs incubation at 37°C. Mean and S.D. are shown (n=3). ; Free DOX (■), PEG liposome (●), cationic liposome (▲) and PCL (▼). \*Concentration of empty liposome : on the basis of concentration of DOX for DOX loaded liposomes.

이 유리하기 때문이라고 사료된다.<sup>27)</sup> 표면에 강한 양이온성을 가지는 양이온성 리포솜의 경우 이러한 세포막과의 정전기적 상호작용이 증가하게 되어 세포내 이입이 더욱 촉진될 수 있고 이로 인하여 세포막 내로의 내포작용(endocytosis)이 유도되어 리포솜의 세포내 이입이 증가하게 된다고 사료된다.<sup>28,29)</sup>

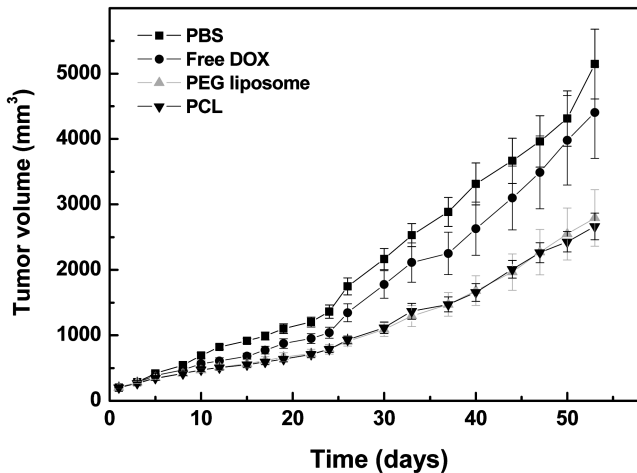
**리포솜의 독성평가**

양이온성 리포솜, PEG 리포솜 그리고 PCL의 세포독성을 평가하기위해 B16F10 설치류 흑색종 세포주를 이용하여

MTT assay를 실시하였다. 제조된 리포솜에 DOX를 봉입한 후 DOX 농도에 따라 각각의 리포솜을 세포에 처리하고 PBS (pH 7.4)를 처리한 대조군과 비교한 세포생존율을 Figure 2(A)에 나타내었다. 또한 DOX를 봉입하지 않은 리포솜을 위와 같은 농도로 희석하여 세포에 처리한 결과를 Figure 2(B)에 나타내었다. Figure 2(A)의 Free DOX의 경우 DOX의 농도가 증가할수록 세포생존율이 급격히 감소하여 8 mg/mL의 농도에서 48.3±5.6%의 세포생존율을 보였으며 16 mg/mL에서는 세포생존율이 더 감소하여 25.6±3.6%를 나타내면서 강한 세포독성을 나타내었다. DOX가 봉입된 리포솜의 세포생존율을 살펴보면 PEG 리포솜의 경우 16 mg/mL의 농도에서 62.9±2.0%의 생존율을 나타내며 Free DOX보다 2배 이상 증가된 생존율을 나타내었다. 한편, 양이온성 리포솜과 PCL의 경우 16 mg/mL의 농도에서 각각 42.6±3.1%, 54.0±6.3%의 세포생존율을 나타내었다. 이러한 결과는 PEG 리포솜보다 세포생존율이 크게 감소된 것으로 상대적으로 양전하성이 강한 리포솜일수록 세포독성이 증가함을 나타낸다. 이는 표면의 양전하성이 증가할수록 세포막과의 정전기적 인력이 증가하여 리포솜의 세포이입이 증가되어 결과적으로 봉입된 DOX의 농도가 세포내에 증가하게 됨으로써 세포에 강한 독성을 발휘할 수 있기 때문이다. 한편, Figure 2(B)에서 DOX를 봉입하지 않은 리포솜 자체의 세포독성을 살펴보면, PEG 리포솜의 경우에는 세포독성이 존재하지 않으나 양이온성 리포솜에서는 독성이 확인되었다. 이는 양이온성 지질에 의한 세포독성을 의미하며 DSTAP이 소량 포함된 PCL의 경우보다 과량의 DSTAP이 포함된 양이온성 리포솜에서 더 높은 세포독성을 나타내었다. 이처럼 양이온성 지질을 포함하는 리포솜의 경우 양이온성 지질 자체가 가지는 세포독성에 의해 세포생존율이 감소하고 이러한 독성효과는 봉입된 약물의 독성과 상승 작용하여 세포사멸을 더욱 증가시킬 수 있다.<sup>28,29)</sup>

**리포솜의 항암효력**

DOX가 봉입된 리포솜의 *in vivo* 항암효력을 평가하기 위해 A549 폐암 세포주를 누드마우스에 이식한 후, 제조된 각각의 리포솜을 마우스의 꼬리정맥을 통해 투여하여 암 크기 변화를 측정하였다. 항암효력 평가의 대조군으로써 PBS (pH 7.4)를 사용하였고 실험군은 DOX 수용액인 Free DOX와 DOX가 봉입된 PEG 리포솜, 그리고 PCL을 사용하였다. Figure 3에서 PBS와 Free DOX의 경우 암 크기가 지속적으로 증가하여 12일 경과 후에는 각각 822.86 mm<sup>3</sup>, 608.32 mm<sup>3</sup>를 나타내었고 26일 이후에는 암 크기가 급격히 증가하여 1748.89 mm<sup>3</sup>, 1343.85 mm<sup>3</sup>를 나타내었으며 최종 53일에



**Figure 3**—Anti-tumor activity of DOX loaded liposomes *in vivo* on growth of A549 human lung carcinoma in BALB/c mice. A549 cells were implanted subcutaneously at into the right flank of female nude mice. DOX loaded liposomes (200  $\mu$ L/mouse) were administered by intravenously at 1 day. The data are expressed as the mean tumor size  $\pm$  S.D. (n=8).

는 5145.46 mm<sup>3</sup>, 4407.05 mm<sup>3</sup>를 나타내었다. 한편 PEG 리포솜과 PCL을 투여한 실험군은 서서히 암 크기가 증가하여 12일 경과 후에는 각각 512.06 mm<sup>3</sup>, 504.53 mm<sup>3</sup>을 나타내면서 PBS보다 작은 암 크기를 확인하였다. 대조군의 암 크기가 급격히 증가하는 26일 경과 후에도 각각 909.00 mm<sup>3</sup>, 929.60 mm<sup>3</sup>를 나타내면서 높은 항암효력을 나타내었다. PEG 리포솜과 PCL은 최종 53일에 PBS의 절반정도의 암 크기를 나타내었으며 체형화 되지 않은 Free DOX보다도 훨씬 작은 암 크기를 나타내었다. 이는 리포솜에 봉입된 DOX의 효력에 의한 것으로 PEG 리포솜과 PCL은 유사한 항암효력을 나타내었다. PEG 리포솜은 세포내 이입과 세포독성 평가에서 PCL보다 비교적 낮은 결과를 나타낸 반면 항암효력은 유사하게 측정되었다. 이는 PEG 리포솜 표면의 높은 음이온성 전하로 인해 혈장 단백질과의 정전기적 반발력이 증가하여 리포솜이 혈장 단백질에 의해 흡수되지는 것과 체내의 세망내피계로 소실되는 것을 억제함으로써 리포솜의 혈류 내 순환시간이 증가된 결과라 사료된다.<sup>15)</sup> 반면, 표면의 음이온성이 감소된 PCL의 경우, PEG 리포솜보다 혈장 단백질과의 정전기적 반발력이 감소함으로써 혈류 내 안정성이 감소되어 EPR 효과를 통한 passive targeting 효과가 비교적 낮을 수 있다.<sup>19,21)</sup> 그러나 PCL은 EPR 효과에 의한 passive targeting 후 월등히 증가된 세포내 이입효과 때문에 고농도의 DOX를 세포내에 전달할 수 있어 높은 항암효력을 나타낼 수 있으며 이는 결국 PEG 리포솜과 대등한 항암효력을 갖게 하는 이유로 사료된다.

## 결론

리포솜의 표적 세포로의 이입을 증가시키고 봉입된 약물의 효력을 증가시키기 위하여 PEG가 공유결합된 인지질을 이용한 리포솜의 이중층에 양이온성 지질을 도입시킴으로써 리포솜 표면의 음이온성을 감소시켰다. 제조된 PCL은 PEG 리포솜과 비교하여 입자크기의 변화는 없었으나, 리포솜 이중층의 양이온성 지질의 도입으로 리포솜 표면전하 값은 약 10 mV 정도 음이온성이 감소되었다. 각각의 리포솜에 DOX를 봉입한 후 흑색종 세포주인 B16F10세포에 대하여 유세포분석법을 통한 세포이입성과 MTT assay를 이용한 세포독성을 평가한 결과, PCL이 PEG 리포솜에 비해 우수한 세포이입성과 세포독성을 나타냄을 확인하였다. 또한 누드마우스에 폐암 세포주인 A549 세포를 이중 이식하여 *in vivo* 항암효력을 평가한 결과, PCL의 항암효력이 PEG 리포솜과 대등함을 알 수 있었다. 양이온성 지질을 함유하는 PCL은 표적 세포로의 이입이 증가하고 봉입된 약물의 효력을 증가시킬 수 있는 효과적인 약물전달체로서 유용할 것이라 기대된다.

## 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. Watkis, 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 Deliv. 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- $\gamma$ : biopharmaceutical aspects, *Biochim. Biophys. Acta*, **1530**, 134-145 (2001).
- 8) Moghimi, S. M. and Szabeni, 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).
  - 9) Liu, D., Biological factors involved in blood clearance of liposomes by liver, *Adv. Drug Deli. Rev.*, **24**, 201-213 (1997).
  - 10) 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).
  - 11) B. Ceh, M. Winterhalter, P. M. Frederik, J. I. Vallner and D. D. Lasic, Stealth liposomes: From theory to product, *Adv. Drug Deli. Rev.*, **24**, 165-177 (1997).
  - 12) Klivanov, A. L., Maruyama, K., Torchilin, V. P. and Huang, L., Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes, *FEBS Lett.*, **268**, 235-237 (1990).
  - 13) Patel, H. M., Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **9**, 39-90 (1992).
  - 14) 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 Deli. Rev.*, **32**, 45-60 (1998).
  - 15) 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).
  - 16) Torchilin, V. P. and Trubetskoy, V. S., Which polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulating?, *Adv. Drug Deli. Rev.*, **16**, 141-155 (1995).
  - 17) 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).
  - 18) 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, *Prog. Lipid Res.*, **44**, 68-97 (2005).
  - 19) Wu, J., Lee, A., Lu, Y. and Lee, R. J., Vascular targeting of doxorubicin using cationic liposomes, *Int. J. Pharm.*, **337**, 329-335 (2007).
  - 20) C. R. Dass, Improving anti-angiogenic therapy via selective delivery of cationic liposomes to tumor vasculature, *Int. J. Pharm.*, **267**, 1-12 (2003).
  - 21) L. A. Carvalho and A. M. Carmona-Ribeiro, Interaction between cationic vesicles and serum proteins, *Langmuir*, **14**, 6077-6081 (1998).
  - 22) H. D. Han, A. Lee, C. K. Song, T. Hwang, H. Seong, C. O. Lee and B. C. Shin, *In vivo* distribution and anti-tumor activity of heparin-stabilized doxorubicin-loaded liposomes, *Int. J. Pharm.*, **313**, 181-188 (2006).
  - 23) H. D. Han, A. Lee, T. Hwang, C. K. Song, H. Seong, J. Hyun and B. C. Shin, Enhanced circulation time and anti-tumor activity of doxorubicin by comblike polymer-incorporated liposomes, *J. Control. Release*, **120**, 161-168 (2007).
  - 24) 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).
  - 25) 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).
  - 26) X. B. Xiong, Y. Huang, W. Lu, X. Zhang, H. Zhang, T. Nagai and Q. Zhang, Enhanced intracellular delivery and improved anti-tumor efficacy of doxorubicin by sterically stabilized liposomes modified with a synthetic RGD mimetic, *J. Control. Release*, **107**, 262-275 (2005).
  - 27) P. Chandaroy, A. Sen, P. Alexandridis and S. W. Hui, Utilizing temperature-sensitive association of Pluronic F-127 with lipid bilayers to control liposome-cell adhesion, *Bioch. Biophys. Acta*, **1559**, 32-42 (2002).
  - 28) C. R. Dass, Improving anti-angiogenic therapy via selective delivery of cationic liposomes to tumour vasculature, *Int. J. Pharm.*, **267**, 1-12 (2003).
  - 29) S. Krasnici, A. Werner, M. E. Eichhorn, M. Schmitt-Sody, S. A. Pahernik, B. Sauer, B. Schulze, M. Teifel, U. Michaelis, K. Naujoks and M. Dellian, Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels, *Int. J. Cancer*, **105**, 561-567 (2003).