

전하가 다른 PLGA 나노 입자의 생체 안정성 및 암세포에 미치는 영향

김인우 · 박승빈 · 지유현 · 박상효 · 기재홍

연세대학교 보건과학대학 의공학부

The Biostability and Cancer Effect of PLGA Nanoparticles with Different Charges

Inwoo Kim, Seungbin Park, Yuhyun Ji, Sanghyo Park and Jaehong Key

Department of Biomedical Engineering, College of Health Sciences, Yonsei University
(Manuscript received 12 January 2018 ; revised 2 March 2018 ; accepted 28 May 2018)

Abstract: Cancer is a major burden of human disease worldwide. Current chemotherapy has severe side effects because the drugs affect whole body nonspecifically. In addition, the drugs to reach cancer cells are very limited. Over the last two decades, Drug Delivery System (DDS) using nanoparticles has suggested promising results to improve current limitations. In this study, we prepared PLGA nanoparticles with different charge properties and observed their stability and internalization effect to cancer cells. Results using Dynamic Light Scattering (DLS) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) confirmed the size and chemical composition of the nanoparticles. The stability of the nanoparticles in pH buffers were variable depending on charge properties. The nanoparticles showed different cytotoxicity and internalization effects to MCF-7 human breast cancer cells. In conclusion, we demonstrated the importance of delicately engineered nanoparticles for better DDS in cancer.

Key words: Cancer therapy, Drug delivery, Nanoparticle, Zeta potential

1. 서 론

전세계적으로 2012년 약 1천 4백건의 암이 발병하였으며 8백만 명이 암으로 사망하였다[1]. 이처럼 현대 사회에서 암의 발병 수는 점점 증가하고 있으며 인류의 건강한 생활과 목숨을 위협하고 있다. 암의 치료에는 주로 수술 치료, 방사선 치료, 화학적 치료, 호르몬 치료, 면역 치료 등이 활용된다. 이중 화학적 치료 요법은 암세포를 죽이거나 억제하는 것을 목표로 하는 화학적 치료제를 사용하는 것을 말한다. 이러

한 치료법은 약물의 독성 때문에 높은 위험성을 지니고 있다[2]. 기존의 화학적 치료 요법은 비특이적으로 몸 전체에 약물을 분포하는 방식으로 암세포에 도달하는 약물의 양이 제한적이고 약물의 독성에 의해 부작용을 나타낸다는 문제점을 지니고 있다[3]. 효과적인 암 치료를 위해서는 약물이 건강한 세포에 최대한 영향을 미치지 않으면서 암세포에만 작용할 수 있어야 한다[4]. 이러한 문제점을 개선시키기 위해 나노 입자(Nanoparticle, NP)를 이용한 Drug Delivery System(DDS)이 활발히 연구 되고 있다[5]. 약물 전달에 나노 입자를 활용하면 특정 세포에 특이적으로 약물을 전달할 수 있으며, 지용성 약물의 전달을 향상시키고 상피와 내피 장벽을 통과하여 약물을 전달하거나 큰 약물도 세포 내로 전달할 수 있다[6,7]. 나노 입자에 항암제를 적재하여 투여하면 항암제만 단독으로 투여했을 때 보다 효과적으로 암 치료가 가능하며 부작용도 줄일 수 있다. 예를 들어, Stigliano et al. 의 연구에서 화학적 항암 물질인 Docetaxel을 기존의 방법대로 단독으로 투여하는 것 보다 나노 입자에 적재하여 투여

Corresponding Author : Jaehong Key
Department of Biomedical Engineering, Yonsei University,
1 Yonseidaegil, Wonju, Gangwon-do 220-710, South Korea
TEL: +82-33-760-2587
E-mail: jkey@yonsei.ac.kr

이 연구는 2017년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단(No. 2015R1C1A1A01052592), 바이오의료기술개발사업(2016-M3A9B4919711), 2017학년도 연세대학교 원주캠퍼스 미래선도연구사업(2018-62-0054)의 지원을 받아 수행된 연구임.

하는 것이 항암 효과가 더 높은 것으로 알려졌다[8].

나노 입자의 약물 수용력, 약물 방출 특성, 생체 내 활동은 합성 입자의 화학적 구성, 형상, 크기 등의 특성에 따라 매우 달라지므로 목적에 따라 각각의 특성을 고려하여 설계하여야 한다[9]. 여러 특성 중 나노 입자의 크기(Size), 표면 특성(Surface property), 모양(Shape)은 나노 입자 설계의 주요 변수가 될 수 있으며, 약물 전달 효율에 영향을 미친다[10]. 예를 들어, 양전하를 띠는 입자는 음전하를 띠는 세포막에 더 잘 부착하여 세포 내 흡수를 촉진하는 것으로 알려져 있는데[11], 이처럼 나노 입자의 표면 전하는 나노 입자의 효과를 결정하는 중요한 특성 중 하나이다. 이 연구에서는 화학적 조성을 다양하게 변화시켜 크기와 전하가 다른 나노 입자를 설계하고 제작하여 그 기능과 영향에서의 차이를 비교하였다.

이 연구에서는 생성한 입자의 암세포 치료제로의 활용 가능성을 보기 위해 여러 조건의 pH buffer에서의 안정성 변화 실험을 수행하였다. 나노 입자는 흡수와 반응을 위한 표면적 접근성을 유지하면서도 넓은 범위의 buffer 조건에서 안정성을 유지해야 한다[12]. 특히나 암 주변의 미세 환경은 정상 조직보다 산성인 것으로 알려져 있다[13]. 이러한 이유로 나노 입자의 여러 pH 환경에서의 안정성 변화는 DDS에 있어서 중요한 요소가 된다. 본 연구에서 나노 입자의 안정성은 나노 입자의 크기와 Polydispersity index (PDI)를 지표로 평가하였다. PDI는 입자의 안정한 정도와 입자가 얼마나 균일하게 형성되었는지를 나타내는 지표이다[14]. 이 외에도 생성한 나노 입자가 실제 암세포에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 MCF-7 인간 유방암 세포를 이용하여 나노 입자가 세포와 상호작용하는 형상을 관찰하고 세포 독성 실험을 수행하였다.

II. 연구방법

1. 나노 입자(PLGA-PEG NP, PLGA-PEG-PEI NP) 합성

나노 입자 합성에 사용된 재료는 Resomer RG 504 H, Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) (acid terminated, lactide:glycolide 50:50, Mw 38,000-54,000) (719900 ALDRICH, SIGMA-ALDRICH Co, Saint Louis, MO, USA), Poly (ethylene glycol) dimethacrylate (PEG) (average Mn 750) (437468 ALDRICH, SIGMA-ALDRICH Co, Saint Louis, MO, USA), Polyethylenimine branched (PEI) (average Mw ~25,000) (408727 ALDRICH, SIGMA-ALDRICH Co, Saint Louis, MO, USA)이다. 나노 입자를 염색하기 위해 18:1 Rhodamine B(RhB) (lissamine rhodamine B sulfonyl, ammonium salt, Mw 1301, Avanti)을 사용하였고, 세포 핵을 염색하기 위해 DAPI

(D9542 SIGMA, SIGMA-ALDRICH Co, Saint Louis, MO, USA)을 사용하였다. PLGA와 PEG로 음전하를 띠는 PLGA-PEG NP를 합성하였고 PLGA, PEG, PEI를 이용하여 양전하를 띠는 PLGA-PEG-PEI NP를 준비하였다. 나노 입자는 모두 Nanoprecipitation method을 활용하여 합성하였다[8].

PLGA-PEG NP는 PEG solution(1.48M, 증류수 용매)을 교반하면서 PLGA solution($1.85 \times 10^{-5} \sim 2.63 \times 10^{-5}$ M, Acetonitrile 용매)을 drop-let 방식으로 넣어 생성하였다. 나노 입자를 염색하기 위해 PLGA solution에 RhB를 추가하였다. 이 혼합물을 상온에서 교반하면서 용매를 증발시킨 후, 원심 분리시켜 상층액을 털어내는 방식으로 불순물을 제거하였다. PLGA-PEG-PEI NP는 PLGA-PEG NP에 PEI가 추가된 형태이다. PEG solution(1.48M, 증류수 용매)에 PEI solution (2.06×10^{-5} M, 증류수 용매)을 추가하고, 혼합물을 교반하면서 RhB가 추가된 PLGA solution($1.85 \times 10^{-5} \sim 2.63 \times 10^{-5}$ M, Acetonitrile 용매)을 drop-let 방식으로 넣었다. 마찬가지로 상온에서 혼합물을 교반하여 용매를 증발시킨 뒤 원심 분리하여 상층액을 제거하여 불순물과 나노 입자를 분리하였다.

이 연구에서는 DLS을 이용하는 기구인 Zetasizer(Nano zs90, Malvern Instruments, UK)를 이용하여 나노 입자의 평균 크기, 표면 전하(zeta potential), PDI를 측정하였다. 이러한 특성 외에도 FTIR을 이용하여 PLGA, PEG가 실제로 합성한 나노 입자에 존재하는지 알아보았다. 또한 PLGA-PEG NP와 PLGA-PEG-PEI NP를 비교하여 양전하를 띤 나노 입자에 PEI이 존재하는지 확인하였다.

2. 여러 pH buffer 조건에서 나노 입자의 안정성 추적

생성한 나노 입자가 여러 pH 조건에서 안정성이 어떻게 변하는지를 보기 위해 증류수와 pH 5, 7, 9의 TE buffer에서의 나노 입자의 평균 크기와 PDI의 변화를 34일동안 추적하였다. 평균 크기와 PDI는 Zetasizer로 측정하였다.

3. In vitro cell uptake 실험

생성한 나노 입자가 실제 암세포에 어떻게 작용하는지 확인하기 위해 in vitro cell uptake 실험을 수행하였다. 세포는 인간 유방암 세포인 MCF-7을 이용하였다. 실험에 이용하기 위해 MCF-7 세포 8×10^4 개를 각각의 confocal dish에 10% FBS (Fetal Bovine Serum)가 포함된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지와 함께 seeding하였다. 세포를 24시간 동안 배양한 후에 배지를 제거하고 FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지를 추가하였다. 그 후 세포에 농도가 18.5 mg/ml인 PLGA-PEG NP suspension과 PLGA-PEG-PEI NP suspension을

1 μ l, 3 μ l만큼 처리하고 6시간 동안 추가 배양하였다.

이렇게 처리한 세포를 DAPI로 염색하여 형광 현미경 (Nikon Eclipse Ti-U, Nikon Instruments, Kanagawa, Japan)을 이용하여 촬영하였다. 세포 핵의 DAPI 신호에 UV-2A filter (Excitation: 340 nm-380 nm, Emission: 420nm-), 나노 입자의 RhB 신호에 G-2A filter (Excitation: 510 nm-560 nm, Emission: 590 nm-)을 사용하였다.

4. 세포 독성 실험(CCK-8 test)

생성한 나노 입자가 실제 암세포에 미치는 영향을 파악하기 위해 세포 독성 실험의 일종인 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) test를 수행하였다. CCK-8 test를 위해 MCF-7 세포 5×10^3 개를 96 well plate에 10% FBS를 포함한 DMEM 배지와 함께 seeding하였다. 24시간 동안 배양한 후에 배지를 제거하고, DMEM 배지와 RhB을 적재한 나노 입자를 각각의 well에 첨가하였다. 나노 입자는 PLGA-PEG NP와 PLGA-PEG-PEI NP를 각각 0.07 mg/ml, 0.13 mg/ml, 0.25 mg/ml의 농도로 첨가하였다. 24시간 후 각각의 well에 CCK-8 용액 10 μ l를 추가하고 1시간 후 450 nm의 파장대에서 흡광도를 측정하였다. 나노 입자를 첨가하지 않은 대조군(control)의 흡광도를 기준(100%)으로

실험군의 흡광도 백분율을 계산하였다. 통계적 유의성을 위해 모든 경우에 대하여 실험은 3회 반복하였다.

III. 연구결과 및 고찰

그림 1에 합성한 나노 입자의 여러 특성들을 정리하였다. 그림 1A는 합성한 나노 입자가 어떤 구조로 결합 되어 있는지를 나타내는 모식도이다. 일반적으로 PLGA와 PEG는 자기 조립(self-assembly)형태로 중합체(copolymer)구조를 이루는데, 이 연구에서는 PLGA-PEG 나노 입자를 만드는 주요한 방법 중 하나인 ‘Nano-precipitation’ 방식을 이용하여 나노 입자를 생성하였다[8]. 이러한 방식으로 만들어진 나노 입자가 그림1A에 나타낸 PLGA-PEG NP로, PLGA와 PEG가 self-assembly를 통하여 입자를 형성하고, 그러한 입자는 PLGA polymer의 functional group인 카르복실기가 노출되어 있어 음전하를 띄게 된다. PLGA-PEG-PEI NP은 이와 유사한 방식으로 생성되었으나, PLGA에 PEI가 결합되어 있다는 점이 다르다. PEI는 세번 째 원자가 양성자를 받을 수 있는 아미노 질소(amino nitrogen)로 되어 있어 강력한 양전하를 띄는 분자로[15], 이러한 특성으로 음전하를 띄는 PLGA에 정전기적 인력에 의해 결합한

142

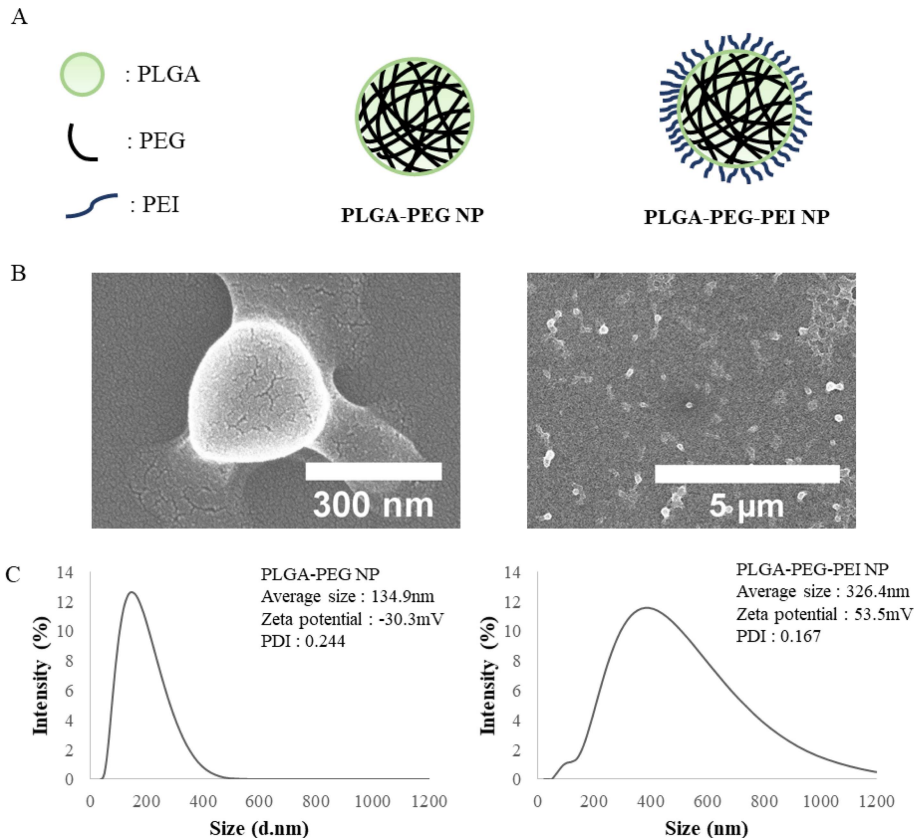


그림 1. 나노 입자의 크기 분석(a. 나노 입자 도식, b. SEM 결과, c. DLS 결과).

Fig. 1. Size analysis of PLGA-PEG NPs (a. scheme of NP, b. SEM results, c. DLS results).

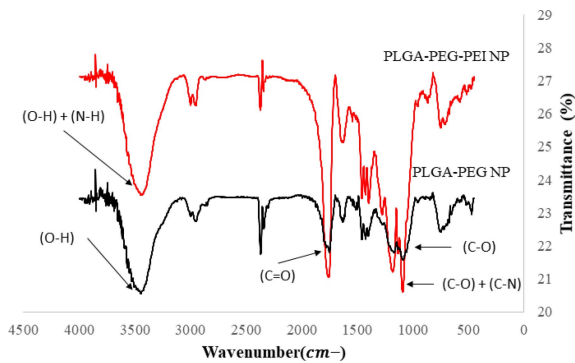


그림 2. PLGA-PEG NP와 PLGA-PEG-PEI NP의 FTIR spectrum.

Fig. 2. FTIR spectra of PLGA-PEG NP and PLGA-PEG-PEI NP.

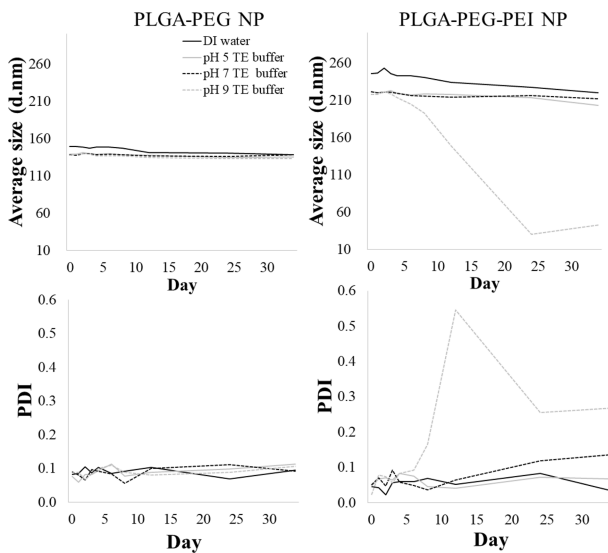


그림 3. 증류수와 pH 5, 7, 9 TE buffer에서 나노 입자의 평균 크기와 PDI.

Fig. 3. Average size and PDI of nanoparticles at distilled water, pH 5, 7 and 9 TE buffer.

다. 이와 유사한 원리로 PEI은 음전하를 띠는 DNA의 운반체 (carrier)로 사용되기도 한다[16].

그림 1B는 PLGA-PEG NP의 SEM 사진이다. 그림 1C에 나노 입자의 평균 크기 분포도와 평균 크기, zeta potential, PDI 값의 크기를 나타내었다. PLGA-PEG NP의 평균 크기는 134.9 nm, zeta potential은 -30.3 mV로 음전하를 띠고 PDI는 0.244이었다. PLGA-PEG-PEI NP의 평균 크기는 326.4 nm로 PLGA-PEG NP보다 크고 zeta potential은 53.5 mV로 양전하를 띤다. 이는 PEI가 결합하면서 생기는 결과로 보인다. PLGA-PEG-PEI NP의 PDI는 0.167이었다.

그림 2에는 PLGA-PEG NP와 PLGA-PEG-PEI NP의 FTIR spectrum을 나타내었다. 그래프에 C=O(1670 cm⁻¹-1780cm), C-O(1050 cm⁻¹-1150 cm), O-H(3200 cm⁻¹-3600 cm)을 나타내는 peak이 나오는 것을 보아 생성된 나노 입자가 재료로 사용한 PLGA를 바탕으로 합성되었음을 알 수 있다. PLGA-PEG-PEI NP는 PLGA-PEG NP에 비하여 약 3500 cm⁻¹ 부근과 1100 cm⁻¹ 부근의 영역에서 peak의 정도가 더 높았는데, 이는 PEI에만 존재하는 N-H(3400 cm⁻¹)와 C-N(1020 cm⁻¹-1230 cm⁻¹) peak가 추가된 것이다. 이를 통해 PLGA-PEG-PEI NP에 PEI가 결합되어 있다는 것을 확인할 수 있다.

그림 3에는 증류수와 pH 5, 7, 9의 TE buffer에서의 시간에 따른 나노 입자의 평균 크기와 PDI 변화를 나타내었다[17]. PDI가 0.1 이하에 대해서는 입자가 monodisperse 하다고 정의하고, 0.1 이상에서는 polydisperse하다고 알려져 있다. 예를 들어, Masarudin et al.의 연구에서 PDI가 작을 수록 균일하게 분포된 나노 입자를 Atomic Force Microscopy (AFM) 에서 관찰하였고, PDI값이 0.5이상이면 aggregated nanoparticles로 보고하였다[14]. PLGA-PEG NP는 시간에 따른 평균 크기와 PDI가 일정한 것으

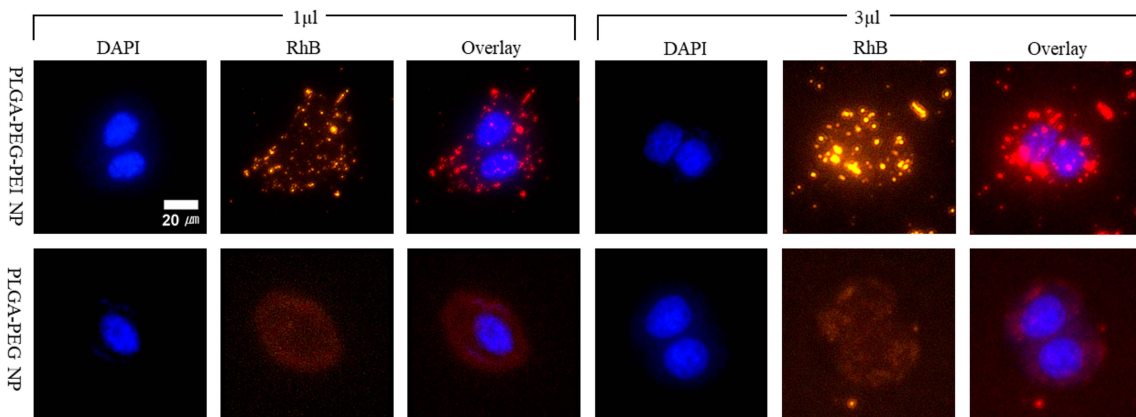


그림 4. PLGA-PEG NP와 PLGA-PEG-PEI NP가 MCF-7 세포에 uptake되는 형광 영상.

Fig. 4. Fluorescence images showing MCF-7 cell uptake of PLGA-PEG NPs and PLGA-PEG-PEI NP.

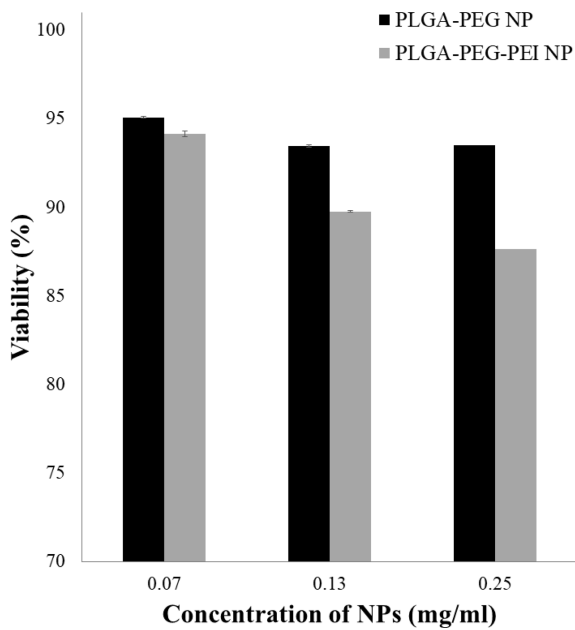


그림 5. MCF-7 세포를 이용한 PLGA-PEG-PEI NP와 PLGA-PEG NP의 세포독성 평가.
Fig. 5. Cytotoxicity of PLGA-PEG-PEI NP and PLGA-PEG NP using MCF-7 cell.

로 보아 여러 pH 조건에서 안정성이 크다고 볼 수 있다. PLGA-PEG-PEI NP는 pH 9의 TE buffer에서 평균 크기와 PDI가 변하였다. 이를 통해 PLGA-PEG-PEI NP는 pH 9 조건의 buffer에서 PLGA-PEG NP에 비해 안정성이 낮아지는 것을 알 수 있다. 이는 pH 조건에 따라 PLGA-PEG-PEI NP를 이루는 분자의 특성이 변하는 데서 기인한 것으로 보인다. PEI에 존재하는 아민기는 산성 조건에서 양성자가 결합한 NH_3^+ 형태로 존재하나 염기성 조건에서는 NH_2 형태로 존재한다[18]. 염기성인 pH 9 조건에서 PEI의 아민기가 양전하를 잃어 PLGA와 분리되는 과정에서 나노 입자의 안정성이 감소하였을 것으로 보인다.

그림 4는 MCF-7 세포에 나노 입자가 유입된 것을 보여주는 형광 이미지이다. Overlay 이미지를 통해 RhB로 염색된 나노 입자가 DAPI로 핵이 염색된 세포 안에 유입된 것을 확인할 수 있다. 음전하를 띠는 PLGA-PEG NP에 비해 양전하를 띠는 PLGA-PEG-PEI NP가 세포에 더 많이 유입되었다. 이는 세포막이 음전하를 띠기 때문에 나오는 결과로 보인다.

그림 5는 MCF-7 세포를 이용한 CCK-8 test 결과를 나타낸 것이다. 모든 경우에 대하여 3회 반복한 결과의 평균과 표준편차를 표시하였다. PLGA-PEG NP와 PLGA-PEG-PEI NP 모두 나노 입자의 농도가 증가함에 따라 대체적으로 세포의 수가 감소하였다. 이를 통해 나노 입자의 농도가 높을수록 세포 독성이 커진다는 것을 알 수 있다. 또

한 PLGA-PEG NP와 PLGA-PEG-PEI NP를 비교하였을 때, PLGA-PEG-PEI NP를 처리한 세포의 생존율이 낮아지는 것으로 보아 PLGA-PEG-PEI NP가 PLGA-PEG NP에 비해 세포 독성이 높다는 것을 알 수 있다. 이를 uptake 결과와 같이 고려하면, 양전하를 띠는 PLGA-PEG-PEI NP가 음전하를 띠는 PLGA-PEG NP에 비해 입자의 크기는 더 크지만 세포에 더 많이 유입되었으며, 또한 세포에 더 강한 독성을 나타낸다고 할 수 있다.

IV. 결 론

이 연구에서는 화학적 조성을 다르게 하여 크기와 전하 특성이 다른 PLGA-PEG NP와 PLGA-PEG-PEI NP를 생성하였다. 합성한 나노 입자의 기본적인 특성인 평균 크기, 표면 전하, 안정성 정도를 Zetasizer를 통해 측정한 결과 PLGA-PEG NP의 평균 크기는 134.9 nm, zeta potential은 -30.3 mV, PDI는 0.244이고 PLGA-PEG-PEI NP의 평균 크기는 326.4 nm, zeta potential은 53.5 mV, PDI는 0.167이었다. 또한 FTIR 분석을 통해 합성한 나노 입자가 PLGA와 PEG로 구성되었다는 것과 PLGA-PEG-PEI NP에서 PEI의 존재를 확인하였다.

생성한 나노 입자의 DDS를 위한 생체 내 안정성을 평가하기 위해 여러 pH 조건의 buffer(증류수, pH 5, 7, 9의 TE buffer)에서 시간에 따른 나노 입자의 안정성을 추적하였다. 나노 입자의 안정성은 입자의 평균 크기와 PDI로 평가하였다. PLGA-PEG NP는 모든 조건의 용액에서 34일 동안 안정성을 보였고 PLGA-PEG-PEI NP는 pH 9의 TE buffer에서 약 2주 후부터 불안정해짐을 보였다.

생성한 나노 입자의 암세포 치료제로서의 활용 가능성을 보기 위해 나노 입자가 실제 세포에 어떤 영향을 미치는지 알아보았다. 이를 확인하기 위해 MCF-7 세포에 나노 입자가 유입되는 것을 형광 현미경으로 확인하였다. 실험 결과 양전하를 띠는 PLGA-PEG-PEI NP가 음전하를 띠는 PLGA-PEG NP보다 더 많이 세포에 유입되는 것을 확인하였다. 또한 PLGA-PEG-PEI NP가 PLGA-PEG NP에 비해 그 세포 독성이 더 강하였다. 즉, 본 실험에서 양전하 입자의 경우, 크기는 음전하 입자보다 크지만, 암세포에 유입되는 효과가 음전하 입자보다 높았기 때문에 DDS 효과가 좋다고 예상할 수 있다. 하지만 생체 내 안정성에서는 음전하 입자가 더 좋기 때문에 실제적인 암세포에 도달하는 입자의 수는 양전하 입자가 더 높다고 예상하기는 힘들다. 한편 양전하 입자의 경우, 암세포 및 일반 세포에 비특이적 유입이 가능하므로 일반 세포에 대한 독성이 장기적인 관점에서 문제가 될 수 있을 것으로 사료된다.

결론적으로 본 연구에서는 나노 입자를 합성하는데 있어

서 표면의 특성 변화가 신체 내에서 DDS를 실현시키는데 있어 매우 큰 영향을 줄 수 있다는 것을 확인하였고, 나노 입자의 합성에 있어 이러한 요소들을 섬세하게 고려하여 평균 크기와 전하의 특징을 조절하고, 그러한 특징이 달라짐에 따라 나노 입자의 안정성이나 세포 독성의 영향이 크게 달라진다는 것을 확인하였다. 이러한 연구를 바탕으로 향후 항암 치료를 위한 개선된 나노 입자의 개발을 위해서는 나노 입자의 특성을 미세하게 조절하는 공학적 디자인과 그에 따른 분석이 필요하다는 것을 알 수 있다.

참고문헌

- [1] B. Stewart and C. P. Wild, "World cancer report 2014," *Health*, 2017.
- [2] S. S. Feng and S. Chien, "Chemotherapeutic engineering: Application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases," *Chemical Engineering Science*, vol. 58, pp. 4087-4114, 2003.
- [3] K. Cho, X. Wang, S. Nie, Z. G. Chen, and D. M. Shin, "Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer," *Clin Cancer Res*, vol. 14, pp. 1310-6, 2008.
- [4] L. Brannon-Peppas and J. O. Blanchette, "Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, pp. 206-212, 2012.
- [5] T. M. Allen and P. R. Cullis, "Drug delivery systems: entering the mainstream," *Science*, vol. 303, pp. 1818-22, 2004.
- [6] I. Brigger, C. Dubernet, and P. Couvreur, "Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, pp. 24-36, 2012.
- [7] O. C. Farokhzad and R. Langer, "Impact of nanotechnology on drug delivery," *ACS Nano*, vol. 3, pp. 16-20, 2009.
- [8] C. Stigliano, J. Key, M. Ramirez, S. Aryal, and P. Decuzzi, "Radiolabeled Polymeric Nanoconstructs Loaded with Docetaxel and Curcumin for Cancer Combinatorial Therapy and Nuclear Imaging," *Advanced Functional Materials*, vol. 25, pp. 3371-3379, 2015.
- [9] S. Moein Moghimi, "Recent developments in polymeric nanoparticle engineering and their applications in experimental and clinical oncology," *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, vol. 6, pp. 553-561, 2006.
- [10] T.-R. Lee, M. Choi, A. M. Kopacz, S.-H. Yun, W. K. Liu, and P. Decuzzi, "On the near-wall accumulation of injectable particles in the microcirculation: smaller is not better," *Scientific reports*, vol. 3, pp. 2079, 2013.
- [11] M. Bivas-Benita, S. Romeijn, H. E. Junginger, and G. Borchard, "PLGA-PEI nanoparticles for gene delivery to pulmonary epithelium," *Eur J Pharm Biopharm*, vol. 58, pp. 1-6, 2004.
- [12] X. Zhang, M. R. Servos, and J. Liu, "Ultrahigh nanoparticle stability against salt, pH, and solvent with retained surface accessibility via depletion stabilization," *J Am Chem Soc*, vol. 134, pp. 9910-3, 2012.
- [13] I. F. Tannock and D. Rotin, "Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation," *Cancer Res*, vol. 49, pp. 4373-84, 1989.
- [14] M. J. Masarudin, S. M. Cutts, B. J. Evison, D. R. Phillips, and P. J. Pigram, "Factors determining the stability, size distribution, and cellular accumulation of small, monodisperse chitosan nanoparticles as candidate vectors for anticancer drug delivery: application to the passive encapsulation of [14C]-doxorubicin," *Nanotechnology, science and applications*, vol. 8, pp. 67, 2015.
- [15] K. Zhang, X. Tang, J. Zhang, W. Lu, X. Lin, Y. Zhang, et al., "PEG-PLGA copolymers: Their structure and structure-influenced drug delivery applications," *Journal of Controlled release*, vol. 183, pp. 77-86, 2014.
- [16] O. Boussif, F. Lezoualch, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, et al., "A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer into Cells in Culture and in-Vivo-Polyethylenimine," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, pp. 7297-7301, 1995.
- [17] D. Cun, C. Foged, M. Yang, S. Frokjaer, and H. M. Nielsen, "Preparation and characterization of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles for siRNA delivery," *Int J Pharm*, vol. 390, pp. 70-5, 2010.
- [18] S. A. Agnihotri, N. N. Mallikarjuna, and T. M. Aminabhavi, "Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery," *J Control Release*, vol. 100, pp. 5-28, 2004.