Antioxidant and Anticancer Properties of Metalloporphyrins Embedded in Liposomes

Makoto Yuasa^{1*,2}, Kenichi Oyaizu², Hidenori Murata¹, Yoshizumi Sahara¹, Tomomi Hatsugai¹ and Akihiko Ogata¹

¹ Department of Pure and Applied Chemistry, Faculty of Science and Technology, Tokyo University of Science (Noda 278-8510, JAPAN)

² Institute of Colloid and Interface Science, Tokyo University of Science (Tokyo 162-8601, JAPAN)

Abstract: Reactive oxygen species (ROS) are implicated in many disease such as inflammation, arteriosclerosis, cancer. Therefore, a water-soluble cationic metalloporphyrins with SOD activity are studied widely as antioxidant drugs. Further, liposomes are applied to drug delivery system (DDS) as drug carriers and investigated for example disposition and stability. We designed PEG modified liposomes for avoiding reticuloendothelial system (RES) and embedded cationic metalloporphyrins for DDS, evaluated antioxidant and anticancer property.

Preservation of these particle size measured DLS in an *in vitro* system, in order to simulate *in vivo* conditions of flow. Result of this measurement, we found Pluronic F-68/ liposomes have a long circulation property, and avoid fusion with plasma protein. SOD activity was determined by the stopped-flow analysis and cytochrome c assay, which allowed the evaluation of k_{cat} and IC_{50} for the reaction with a superoxide anion radical ($\cdot O_2^-$). Anti cancer property was measured by cell viability test. We found that F-68/ liposomes were the most effective catalyst as antioxidant and anticancer. These results revealed that porphyrin-embedded PEG-liposomes had the property of long circulation in blood and that this compound was effective as a SOD model compound with a drug carrier capacity.

Key words: superoxide anion radical, cationic metalloporphyrin, antioxidant, anticancer, PEG-Liposome

1 緒 言

呼吸によって取り込まれた酸素の一部は、反応性の高い活性酸素種（スーパーオキシドアニオンラジカル ($\cdot O_2^-$), 過酸化水素 (H_2O_2), ヒドロキシラジカル ($OH\cdot$)) へと変化する。 $\cdot O_2^-$ や H_2O_2 は、体内に細菌やウイルスが侵入した際、好中球やマクロファージなどの免疫細胞の生体防御（殺菌や解毒作用）、さらには紫外線や放射線、医薬、大気汚染によっても産出される。このようにして発生した活性酸素種はそのほとんどが生体内に存在する酵素（スーパーオキシドジスムターゼ (SOD), カタラーゼ, グルタチオンペルオキシターゼ (GPX) など）により消去される。しかし恒常性（活性酸素の消去と生成のバランス）が崩れて SOD などの酵素活性が低下すると、生体は酸化ストレス状態になり炎症疾患・神経疾患・動脈硬化・癌・糖尿病等

多くの病態に関与することが指摘されている¹⁻⁴⁾。

我々はこれまでに、生体内に存在する $\cdot O_2^-$ を迅速に消去する抗酸化剤として、カチオン性金属ポルフィリン錯体、特にマンガンポルフィリン錯体が $\cdot O_2^-$ の不均化反応を触媒 ($\cdot O_2^- + Mn^{3+} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + Mn^{2+}$) するという有効な SOD 活性を示す一方、中心金属を鉄に置き換えた同じカチオン性ポルフィリン錯体が、癌細胞内に過剰発生している $\cdot O_2^-$ から不均化によって発生する H_2O_2 をフェントン反応によって、より高い酸化力に基づいて強い殺細胞性を示す $OH\cdot$ へ変換する機構 ($\cdot O_2^- + Fe^{3+} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH\cdot + OH^- + Fe^{3+}$) により高い抗癌活性を示すということについて明らかにしてきた^{5,6)}。

そこでドラッグデリバリーシステム (DDS) 構築を目的として、丸山らの研究⁷⁾ を参考に、リポソーム表面にポリエチレングリコール (PEG) 鎖を導入するこ

* Correspondence to: Makoto Yuasa, Department of Pure and Applied Chemistry, Faculty of Science and Technology, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278-8501, JAPAN

E-mail: yuasa@rs.noda.tus.ac.jp

Accepted October 7, 2006 (received for review March 20, 2006)

Journal of Oleo Science ISSN 1345-8957 print / ISSN 1347-3352 online

http://jos.jstage.jst.go.jp/en/

とで細網内皮系 (Reticuloendothelial system: RES) への取り込みを回避し、血中安定性の向上が期待される PEG 修飾リポソームを設計し、これに高い SOD 活性を示すマンガンおよび鉄 5,10,15,20-テトラキス (*N*-メチルピリジニウム-2-イル) ポルフィリンを包埋したポルフィリン/PEG 修飾リポソーム系についての抗酸化・抗癌活性について詳細に検討したので報告する。また、この系はその癌細胞選択性から現在臨床的に用いられている抗癌剤をあわせて封入することにより、より効果的に癌治療ができる可能性がある。

2 実 験

2.1 試 料

マンガン 5,10,15,20-テトラキス (*N*-メチルピリジニウム-2-イル) ポルフィリン (MnT2MPyP) および鉄 5,10,15,20-テトラキス (*N*-メチルピリジニウム-2-イル) ポルフィリン (FeT2MPyP) は、既報⁸⁻¹³⁾により合成した。リポソームの構成成分である脂質には、DMPC (ジミリスチルホスファチジルコリン) (日本油脂) を使用した。PEG 修飾化合物として、疎水的なポリプロピレンオキシド鎖の両末端を親水性 PEG 鎖で修飾したトリブロックコポリマーである非イオン性界面活性剤のプルロニック F-68 (旭電化) を用いた。脂質および PEG 化合物の濃度は合計で 200 μmol になるように調節した。リポソームの調製は超音波処理法を用いた。

2.2 MT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 リポソームの調製

MnT2MPyP または FeT2MPyP (1.0×10^{-6} mol) を、ステアリン酸ナトリウム (SA-Na) 1.2 mg (4.0×10^{-6} mol) と、メタノール中で室温において攪拌 (3 時間) することにより、ポルフィリンイオンコンプレックス (MnT2MPyP or FeT2MPyP : SA-Na = 1 : 4) を得た。クロロホルムとメタノールの混合溶媒に溶解させた DMPC : プルロニック F-68 (=97 : 3, 95 : 5, 93 : 7) およびポルフィリンイオンコンプレックスを遠沈管に入れ、ロータリーエバポレーターにより溶媒を留去し

Fig. 1 Structure of MnT2MPyP and FeT2MPyP.

て遠沈管壁面に薄膜を形成した。次いで、水または生理食塩水を 10 mL 加え、プローブ型ソニケーターにより超音波照射 (氷浴中, 20 W, 30 min) を行い MT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 リポソームを得た。

2.3 測 定

2.3.1 リポソームの構造評価

得られた MnT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 系の形状および粒子径は、透過型電子顕微鏡 (TEM 観察) (H-7650, HITACHI), 動的光散乱法 (DLS 法) (NICOMP 380 ZLS) により評価した。リポソーム中の金属ポルフィリン錯体の包埋状態は、蛍光スペクトル測定 (SHIMADZU RF-5300PC) により調べた。測定は 25°C, ポルフィリン濃度 50 μM で行った。常磁性 Mn および Fe イオンは消光因子となるため、金属を導入してない H₂T2MPyP を別途に合成し、蛍光スペクトル測定に供した。リポソーム二分子膜の膜流動性は、標識分子に蛍光標識プローブに DPH (1,6-ジフェニル-1,3,5-ヘキサトリエン) を用いて、蛍光偏光解消法により評価した。

2.3.2 リポソームの安定性評価

2.3.2.1 擬似血中滞留試験

生体投与を考慮し、より血中に近い条件での安定性試験を行った。ペリスタポンプ (SJ1220 (ATTO 社製)) で流動させながら (流速 20 mL/min), MnT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 系溶液にシェアストレスをかけ、DLS による粒子径の経時測定によりその安定性を評価した。この際、血液成分との相互作用や凝集性を血清 (10% FBS), アルブミン (48 mg/mL), フィブリノゲン (3.8 mg/mL), を用いて検討した¹⁴⁻¹⁶⁾。アルブミン, フィブリノゲンは生体内濃度で調製した。また、測定前は系内の滅菌作業としてエタノール, イオン交換水, 生理食塩水をそれぞれ 5~10 分程度流した。

2.3.3 SOD 活性評価

2.3.3.1 チトクローム c 法

既報¹⁷⁾に基づく以下の方法により行った。SOD 活性

Fig. 2 Structure of Lipid and PEG Derivative Compound.

物質が存在しない条件下でのフェロチトクローム c ($\lambda_{\max}=550$ nm) の吸光度の経時変化を測定し、その傾きから阻害率 0% に相当する値 (a_0) を得た。次に各濃度のポルフィリン錯体存在下において、吸光度変化 (a_1) をそれぞれ求めた。SOD 活性物質の存在下では、 $\cdot\text{O}_2^-$ が消費されフェロチトクローム c の生成速度が減少することにより、[1] 式より阻害率 I (%) を求めた。

$$\text{阻害率 I (\%)} = (a_0 - a_1) / a_0 \times 100 \quad [1]$$

2.3.3.2 ストップフロー法

ストップフロー法による評価は、既報¹⁸⁾ に基づき以下の方法で行った。混合装置には UNISOKU 製自動コック付きミキシング装置を用いた。混合装置のシリンダー A に HEPES 緩衝溶液を用いて調製した SOD 活性物質溶液を入れ、シリンダー B に超酸化カリウム (1 g) を DMSO に分散させて調製した $\cdot\text{O}_2^-$ 飽和溶液を入れた。シリンダー A および B 内の溶液を体積比 20:1 で迅速に混合した後、270 nm における吸光度の経時変化を測定した。

2.3.4 抗癌活性評価

マウスの肺癌細胞 (Lewis Lung Carcinoma (LLC)) を DMEM + 10% FBS 培地により、5% CO_2 下で培養した。この LLC 細胞を 96 ウェルマイクロプレートに (1×10^4 cells/well) まき、抗癌剤として用いる、ポルフィリン/リポソーム (100 μL /well)、を加え、Alamar Blue Assay 法¹⁹⁾ により、評価した。吸光度は 570 nm および 600 nm の二波長で測定し、生存率を算出した。

3 結果および考察

3.1 リポソームの構造評価

3.1.1 動的光散乱測定

DLS ヒストグラム (Fig. 3) および Table 1 より、MnT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 リポソームは粒子径が約 40~50 nm であることがわかった。これらのような 40~50 nm 径のリポソームは小さな 1 枚膜リポソーム SUV (Small Unilamellar Vesicle) であると考えられる。

Fig. 3, Table 1 より、MnT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 はどの組成においても粒子径が約 30~50 nm であった。ドラッグデリバリーシステム (DDS) を構築するためにリポソーム粒子径を約 100 nm 以下にすることで細網内皮系 (RES) への取り込みを回避し、血中滞留性の向上が見込まれるという報告がある²⁰⁾。土田らによるリポソーム包埋ヘムの微小粒子 (粒径 40 nm) では、血液成分との相互作用が少なく血液適合性が良

好 (溶血、凝固、血小板凝集がない) で、物理化学的特性、酸素輸送能、生理特性に優れた性質が観測されており、ラットでの血中滞留時間も 14~20 時間と適当であると報告されている²¹⁾。また抗癌剤の機能として、癌組織付近に存在する新生血管の細孔を通過するためのサイズコントロールとしてリポソーム粒子径を約 100 nm 以下にすることが望まれている (EPR (Enhanced Permeability and Retention) 効果⁷⁾)。このことから MnT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 では薬剤として有効な粒子径であることが明らかとなった。

3.1.2 透過型電子顕微鏡測定

既報^{5,6)} に示されるように、DMPC のみで調製したポルフィリン/リポソームの粒子径はおよそ 20 nm~50 nm の SUV であることがわかっている。

Fig. 4 より、MnT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 系では Pluronic F-68 濃度が DMPC に対して 3%~7% の組成でおよそ 50 nm~100 nm 程度の球状粒子の形成が確認された。

3.1.3 蛍光スペクトル測定

Fig. 5 より、極性の高い環境である $\text{H}_2\text{T2MPyP}$ / water の $\lambda_{\text{em, max}}$ (638 nm) に比べ、低極性である $\text{H}_2\text{T2MPyP}$ / MeOH の $\lambda_{\text{em, max}}$ は 644 nm と長波長側にシフトしていることが分かる。MnT2MPyP / DMPC / Pluronic F-68 系では $\lambda_{\text{em, max}}$ は 640 nm~642 nm と水およびメタノール溶媒における $\lambda_{\text{em, max}}$ の間の値をとって

Fig. 3 DLS Histogram for the Particle Size of MnT2MPyP/DMPC/Pluronic F68 (97:3).

Table 1 Number-Averaged Particle Size of MnT2MPyP/DMPC/Pluronic F68.

MnT2MPyP/lipid/PEG compound (mole ratio)	Particle size (nm)
MnT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 (97 : 3)	53.6
MnT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 (95 : 5)	46.6
MnT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 (93 : 7)	50.8

Fig. 4 TEM Picture of MnT2MPyP/DMPC/Pluronic F68 (97 : 3).

いる。これらの結果より H₂T2MPyP はリポソームの外水相、または内水相に存在するのではなく二分子膜の親水、疎水境界付近に存在することが考えられる。

3.1.4 蛍光偏光解消測定

Fig. 6 からわかるように、MnT2MPyP / DMPC / Pluronic F-68 系におけるゲルー液晶転移は一段階で起きている。二分子膜中において、DMPC 成分と PEG 化合物成分が局在化し、相分離状態にあると仮定すると、相転移に伴う蛍光偏光度の挙動は二段階、もしくはそ

Fig. 5 Fluorescence Spectra.

Table 2 Phase Transition Temperature.

Substrates	T _c (°C)
MnT2MPyP/DMPC	23
MnT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 (97: 3)	25.5
MnT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 (95: 5)	27
MnT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 (93: 7)	28
Pluronic F-68	35

れ以上になることが予想される。したがってこの結果から DMPC と混合した Pluronic F-68 分子は相分離することなく均一系であることがわかる。また、Table 2 より、MnT2MPyP / DMPC / Pluronic F-68 系において DMPC に対する Pluronic F-68 の濃度が 3 – 7% と増加するに従い、T_c も増加する傾向にあることがわかった。これは、Pluronic F-68 分子が二分子膜中に導入されることにより、分子同士が密になりリポソーム膜がより硬くなったことが考えられる。

動的光散乱、蛍光スペクトル、蛍光偏光解消測定の結果と既報²²⁻²⁴⁾ に示される膜モデルと類似した構造であることから、MT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 系の膜構造モデルを Fig. 7 のようになっていると考えられる。

3.2 リポソームの安定性評価

3.2.1 擬似血中滞留試験

Fig. 8 に示すように、MnT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 系では、血清、アルブミン、フィブリノーゲンとの血液成分においても相互作用は見られず、血中での長期安定性が期待できる結果となった。

MnT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 系の安定性が顕著に高かった理由として、まず、ポルフィリン/リポソームの表面に存在する親水性高分子である PEG 鎖がリポ

Fig. 6 MnT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 (93: 7) by Fluorescence Depolarization Method.

Fig. 7 Membrane Structure Model of MT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68.

ソーム表面で水和層を形成し、アルブミンなどの疎水的なたんぱく質や血液成分との融合を回避したことが考えられる。また、長鎖 PEG によるリポソーム同士の融合が立体的に回避されたこと、血清成分の吸着が立体的に阻害されたことが考えられる。このことから MnT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 系は血中投与の際の有効なドラッグキャリアーとして期待できる。

3.3 SOD 活性評価

Table 3 に各種 SOD モデル化合物のチトクローム *c* 法およびストップフロー法による SOD 活性の測定結果を示す。MnT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 では、PEG 鎖の立体障害による活性低下が予想されたが、 IC_{50} , k_{cat} ともに MnT2MPyP, MnT2MPyP/DMPC と同様の活性が得られた。MnT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 系の SOD 活性が低下しない理由として、粒子径 25 nm のリポソーム表面に Pluronic F-68 を密に被覆したときの DMPC に対する Pluronic F-68 の含有率（約

Fig. 8 Influence of Blood Component for MnT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 (97: 3).

8.2%) に対して、今回設計したリポソームが Pluronic F-68 の含有率 3~7% とリポソーム表面を密に覆うことなく PEG 鎖が存在しているためであると考えられる。

さらに、MnT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 系では、MnT2MPyP がリポソーム表面近傍に存在することでカチオン基による静電的な $\cdot O_2^-$ の引き込みが因子となることから、高い SOD 活性を示したのと考えられ、血中滞留性有する優れた SOD 化合物になりうると期待される。

3.4 抗癌活性

Fig. 9 に FeT2MPyP, 各リポソーム系における LLC 細胞試験の結果を示す。DMPC 単独系, DMPC / Pluronic F-68 単独系の細胞毒性はなかった。FeT2MPyP/DMPC 系, FeT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 系の結果より、リポソームに包埋することによる殺細胞性の低下はみられなかった。細胞試験の結果から、臨床的に用いられているシスプラチン (CDDP) と比較して、FeT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 系は優れた抗癌活性を示すことが明らかとなった。FeT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 系が特に活性が高

Table 3 Result of Cytochrome *c* Assay (IC_{50}) and Stopped-Flow Analysis (k_{cat}).

Substrates	IC_{50} (μM)	k_{cat} ($M^{-1}s^{-1}$)	Ref.
MnT2MPyP	0.23	7.6×10^7	This work
MnT2MPyP/DMPC	0.20	6.2×10^7	〃
MnT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 (97: 3)	0.077	9.4×10^7	〃
MnT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 (95: 5)	0.096	8.2×10^7	〃
MnT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 (93: 7)	0.12	8.2×10^7	〃
Cu-Zn/SOD	-	2.3×10^9	25
SMA-MnMPyP	-	2.8×10^6	〃

Fig. 9 Cell Viability Test of LLC Tumor Cells by Evaluated Alamar Blue Assay.

かった理由として、リポソーム表面 PEG 鎖により培地との相互作用が少なく、安定性を保持し細胞内に取り込まれたこと、細胞との親和性が高かったことなどが考えられる。さらに FeT2MPyP は癌細胞内で特異的に多量に存在している $\cdot\text{O}_2^-$ をターゲットとした抗癌機構であるので、正常細胞への毒性（副作用）が少ない抗癌剤としてはたらくことが予想される⁶⁾。以上の結果より、FeT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 系は長期血中滞留型の抗癌剤として期待される。

4 結 論

抗酸化・抗癌活性化合物としてマンガンおよび鉄 5,10,15,20-テトラキス (*N*-メチルピリジニウム-2-イル) ポルフィリンを合成し、PEG 鎖を有するリポソームに包埋した結果、次の結論を得た。

FeT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 系は生体投与の際 RES への取り込みを回避し、長期血中安定性が期待できる約 40～50 nm であった。ポルフィリンはリポソーム二分子膜の親水・疎水界面に存在していることが確認された。

安定性試験結果より、MnT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 系はリポソーム表面 PEG 鎖の親水層の形成、およ

び立体効果による血液成分との相互作用、リポソーム同士の融合が顕著に抑制された。

SOD 活性評価より、MnT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 系においても MnT2MPyP 単独系と同様に高い活性を維持した。

細胞試験より、FeT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 系が有効な抗癌効果を示した。

以上より、MT2MPyP/DMPC/Pluronic F-68 系は長期血中滞留性が見込まれる抗酸化・抗癌剤となりうる。

References

1. Faulkner, K.M.; Liochev, S.I.; Fridovich, I. Stable Mn(III) porphyrins mimic superoxide dismutase *in vitro* and substitute for it *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **269**, 23471-23476 (1994).
2. H. KAWAKAMI, Control of reactive oxygen species by water-soluble cationic metalloporphyrin, *Oleoscience*. Vol. 1, 157-166 (2001).
3. Krishna, M.C.; Degraff, W.; Tamura, S.; Gonzalez, F.J.; Samuni, A.; Russo, A.; Mitchell, J.B. Mechanisms of hypoxic and aerobic cytotoxicity of mitomycin C in chinese hamster V79 Cells. *Cancer Res.* **51**, 6622-6628 (1991).
4. Tisdale, M.J.; Mahmoud, M.B. Activities of free radical metabolizing enzymes in tumours. *Br. J. Cancer.* **47**, 809-812 (1983).
5. Yuasa, M.; Oyaizu, K.; Ogata, A.; Matsukura, N.; Yamaguchi, A. Preparation of liposomes surface-loaded with cationic manganese porphyrins as SOD mimics. *J. Oleo Sci.* **54**, 233-239 (2005).
6. Yuasa, M.; Oyaizu, K.; Horiuchi, A.; Ogata, A.; Hatsugai, T.; Yamaguchi, A.; Kawakami, H. Liposomal surface-loading of water-soluble cationic iron(III) porphyrins as anticancer drugs. *Mol. Pharm.* **1**, 387-389 (2004).
7. Kasaoka, S.; Maruyama, K. Application of functionalized liposomal membrane to DDS development. *J. Oleo Sci.* **2**, 189-195 (2002).
8. Adler, A.D.; Longo, F.R.; Goldmacher, J.F.J.; Assour, J.; Kosakoff, L. A simplified synthesis for *meso*-tetraphenylporphine. *J. Org. Chem.* **32**, 476-476 (1967).
9. Kalyanasundaram, K. Photochemistry of water-soluble porphyrins: comparative study of isomeric tetrapyrrolyl- and tetrakis(*N*-methylpyridiniumyl)porphyrins. *Inorg. Chem.* **23**, 2453-2459 (1984).
10. Adler, A.D.; Longo, F.R.; Varadi, V. Preparation of metalloporphyrins. *Inorg. Synth.* **16**, 213-220 (1976).
11. Hambright, P.; Gore, T.; Burton, M. Synthesis and characterization of new isomeric water-soluble porphyrins. Tetra(2-*N*-methylpyridyl)porphine and tetra(3-*N*-methylpyridyl)porphine. *Inorg. Chem.* **15**, 2314-2315 (1976).
12. Harriman, A.; Porter, G. Photochemistry of manganese porphyrins. *J. Chem. Soc. Faraday. Trans. II.* **75**,

- 1532-1542 (1979).
13. Hunt, J.A.; Lee, J.; Groves, J.T. Amphiphilic peroxytrite decomposition catalysts in liposomal assemblies. *Chem. Biol.* **4**, 845-858 (1997).
14. Sudimack, J.J.; Guo, W.; Tjarks, W.; Lee, R.J. A novel pH-sensitive liposome formulation containing oleyl alcohol. *Biochim. Biophys. Acta.* **1564**, 31-37 (2002).
15. Nicolazzi, C.; Mignet, N.; Figuera, N.D.L.; Cadet, M.; Ibad, R.T.; Seguin, J.; Scherman, D.; Bessodes, M. Anionic polyethyleneglycol lipids added to cationic lipoplexes increase their plasmatic circulation time. *J. Cont. Rel.* **88**, 429-443 (2003).
16. Kim, J.-K.; Choi, S.-H.; Kim, C.-O.; Park, J.-S.; Ahn, W.-S.; Kim, C.-K. Enhancement of polyethylene glycol (PEG)-modified cationic liposome-mediated gene deliveries: Effects on serum stability and transfection efficiency. *J. Pham. Pharmacol.* **55**, 453-460 (2003).
17. Mccord, J.M.; Fridovich, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (Hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **244**, 6049-6055 (1969).
18. Riley, D.P.; Rivers, W.J.; Weiss, R.H. Stopped-flow kinetic analysis for monitoring superoxide decay in aqueous systems. *Biochemistry.* **196**, 344-349 (1991).
19. Nakayama, G.R.; Caton, M.C.; Nova, M.P.; Parandoosh, Z. Assessment of the alamar blue assay for cellular growth and viability *in vitro*. *J. Immunol. Methods.* **204**, 205-208 (1997).
20. Gregory, G.; Christopher, K.; Judith, S. Optimization of liposome behavior *in vivo*. *Biol. Cell.* **47**, 11-18 (1983).
21. Matsushita, Y.; Eshima, K.; Shindo, T.; Yamamoto, Y.; Hasegawa, E.; Nishide, H.; Tsuchida, E. Clearance and tissue distribution of functionalized polymeric liposomes from the blood stream of rats. *Biochim. Biophys. Acta.* **901**, 166-171 (1987).
22. Schillen, K.; Bryskhe, K.; Mel'ikova, Y.S. Vesicles formed from a poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymer in dilute aqueous Solution. *Macromolecules.* **32**, 6885-6888 (1999).
23. Varshney, M.; Morey, T.E.; Shah, D.O.; Filint, J.A.; Moudgil, B.M.; Seubert, C.N.; Dennis, D.M. Pluronic microemulsions as nanoreservoirs for extraction of bupivacaine from normal saline. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 5108-5112 (2004).
24. Napoli, A. Lyotropic behavior in water of amphiphilic ABA triblock copolymers based on poly(propylene sulfide) and poly(ethylene glycol). *Langmuir.* **18**, 8324-8329 (2002).
25. Kawakami, H.; Ohse, T.; Kawano, M.; Nagaoka, S. Superoxide dismutase activity of a novel macromolecular manganese porphyrin. *Polym. Adv. Tecnol.* **10**, 270-274 (1999).