

Liposome과 그 製劑에의 應用

具 永 順

梨花女子大學校 藥學大學

The Use of Liposome to Pharamaceutical Products

Young Soon Ku

(Received October 27, 1981)

최근의 人工膜에 관해서의 활발한 연구에 의해 많은 生體膜에 관계하는 現象을 磷脂質, cholesterol, 糖脂質을 포함하는 脂質人工膜上에서 再現할 수 있게 되었다.

生體膜을 構成하고 있는 主要成分은 磷脂質(phospholipids)으로써 이 脂質의 80%가 二重膜을 形成하고 있는 것과 동시에 이 脂質 二重膜構造는 barrier能을 가지고 있는 것 외에 膜의 流動性이나 機能蛋白의 配合性を 制御하여, 蛋白이 膜中에서 각각의 機能을 發現하기 위한 環境을 만드는¹⁾ 등 重要한 役割을 하고 있다.

生體膜 model으로써 現在 널리 알려져 있는 Danielli-Davson²⁾(Fig. 1)의 脂質二重膜model을 基반으로 발달한 Singer-Nicolson²⁾의 fluid mosaic model은 이 生體膜의 基本구조의 特

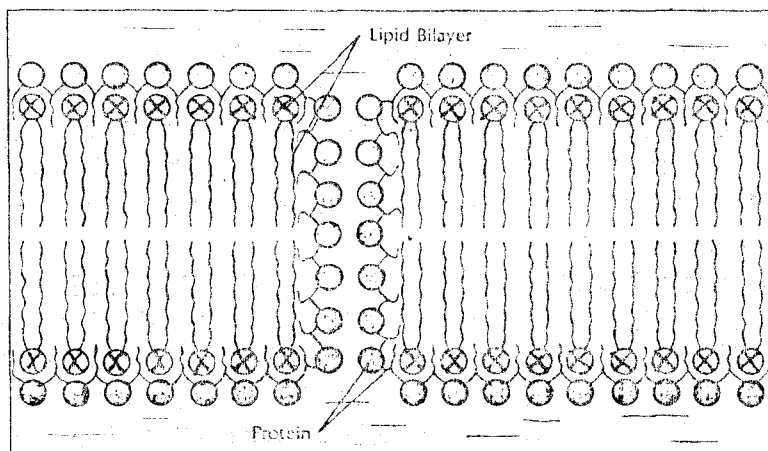


Figure 1—Early(Danielli) model of membrane structure visualized “unrolled” protein covering both sides of lipid bilayer, with hydrophobic amino acid residues interacting with similar lipid chains; hydrophilic residues were thought to form “pores” for molecular transport.

College of Pharmacy, Ewha Womens University

徵을 잘 나타내고 있다(Fig. 2). 이 Fig. 2에서 볼 수 있는 것같이 膜을 구성하고 있는 것은 大別하여 상당히 流動性을 갖는 脂質과 脂質이라고 하는 一種의 바다가운데 氷山처럼 떠 있거나 잠복해 있는 蛋白質이다.

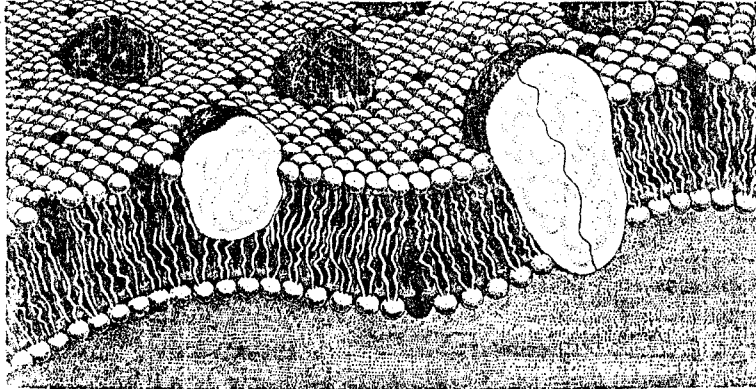


Figure 2—Current(Singer) membrane model sees proteins as predominantly globular and amphipathic, with their hydrophilic ends protruding from the membrane and their hydrophobic ends embedded in the bilayer of lipids and cholesterol(black). The proteins make up the membrane's "active sites"; some of them are simply embedded on one or the other side, while others pass entirely through the bilayer. Some of the latter presumably contain transport pores.

人工膜에는 크게 나누어서 單分子膜, 二分子膜, liposome의 三種類가 있다³⁾.

單分子膜은 非脂質性物質의 脂質膜에서 吸着, 侵入 혹은 gas性物質의 透過性을 검토하는데는 適當하지만, ion 및 水溶性物質의 透過性의 檢討가 不可能하다.

二分子膜은 水溶液—水溶液으로 되는 膜이므로, ion 등의 透過性을 電氣의 手法으로 쉽게 검토할 수 있으나, 얻어지는 膜面積이 매우 작고 게다가 溶媒로써 쓰여진 n-decane 등이 多量으로 膜內에 남는 등, 天然膜과의 相異가 큰 것과 동시에 安定性도 결여되고 있다.

이런 것들에 대해서 liposome은 透過性의 검토가 容易하고, 安定性이 높은 것과 동시에, 얻어지는 膜面積이 크고, 再現性이 풍부하고 特別한 調製設備을 필요로 하지 않는 등 利點을 가지고 있어서 그 발전이 기대되고 있다.

특히 drug carrying vehicles로써 이용되는 경우, 投與量이 적은 것, 透過性의 增大, 毒性이나 allergy性作用의 減少나 免疫反應의 改善 등 利點을 가지고 있어서 liposome 作成技術의 製劑에의 利用은 새로운 delivery system으로써 중요하다고 생각되며 또 注目되고 있다.

이 liposome에 대해서 그 調製法을 중심으로 種類나 in vivo에서의 liposome의 利用(특히 microcapsule로써의 利用), in vitro에 있어서 細胞—liposome 相互作用等を 再檢討하였다.

1. Liposome

1965年 英國의 Bangham⁴⁾에 의해, 磷脂質의 水懸濁物이 脂質二重膜層으로 되는 閉鎖小胞인 것이 발견되어, 1968年 Sessa 등⁵⁾에 의해 "liposome"라고 하는 말이 만들어져서 세상에 선을 보이게 된 것이다.

이 小胞(liposome, phospholipid bilayer vesicles, smectic mesophase, lipid spherules, 또는 發見者에 關連시켜 banghasomes 등으로 불려지고 있다.)는 生體膜에 있어서 膜model 로써 널리 연구되어 왔다.

한편 1973年~1974年頃부터는 microcapsule로써 利用되어 多方面에서 그 開發이 계속 진 전되고 있다.

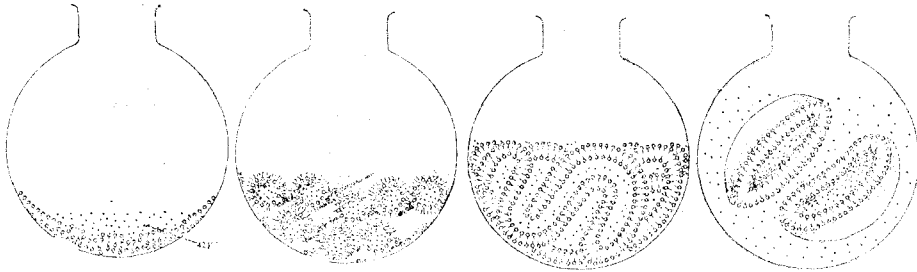


Figure 3—Formatin of liposomes containing labeled ions(black dots) begins with almost total separation of water from lipid(the first, left). As more water is added, it forms tubes within the lipid, which are lined with the molecules hydrophilic heads (second). With still more water, lipid first forms lamellar bilayers(third) then enclosed liposomes(fourth, right).

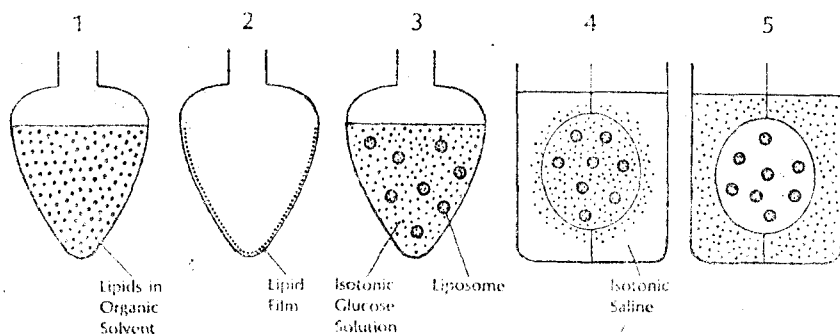


Figure 4—To prepare liposome with glucose marker so that glucose release can be measured following lysis, appropriate lipids are dissolved in organic solvent (1), which is evaporated to leave lipid film coating flask wall (2). When film is dispersed in isotonic glucose, some glucose is trapped within liposomes (3). Remainder is then removed by dialysis against isotonic saline (4,5).

Bangham에 의한 liposome形成膜式圖²⁾를 Fig. 3에 나타내고, 또 glucose marker를 갖는 liposome의 形成膜式圖²⁾를 Fig. 4에 圖示하였다.

2. Liposome膜 基劑

合成 磷脂質 및 天然의 磷脂質을 사용하나 각각 다른 特徵을 가지고 있다.

合成 磷脂質은 脂肪酸組成이 均一하기 때문에 二重膜의 流動性을 自由로 調節할 수 있다. 物性研究에는 脂肪酸殘基의 均一性은 필수조건이다.

天然膜에서 抽出한 脂質은 脂肪酸基가 不均一하기 때문에 均一하고 安定한 liposome을 作成할 때 問題가 있으나, 酸性 磷脂質(約 10%以上の 酸性 磷脂質이 있다)의 存在는 liposome 作成에 有利하고 동시에 marker 保持量이 많은 利點도 있다.

一般으로 사용되고 있는 磷脂質은 다음과 같다.

- 1) Egg phosphatidylcholine
- 2) Synthetic dipalmitoyl-DL- α -phosphatidylcholine
- 3) Sphingomyelin
- 4) Brain and Synthetic phosphatidylserine
- 5) Phosphatidylinositol
- 6) Ovolecithin 등이다.

이 중에도 특히 phosphatidylcholine(lecithin)을 사용하는 경우가 많다.

이것은 lecithin이 比較的 自然界에 많고 入手하기 쉬운 것과 物性等의 연구가 進展되고 있기 때문이다.

磷脂質은 물에 懸濁하는 것만으로 閉鎖小胞가 形成된다. 특히 卵黃 lecithin이 microcapsule의 材料로써 많이 사용되어 온 이유는 卵黃磷脂質의 主成分 및 構成脂肪酸의 主成分이 皮脂의 主成分에 類似한 것과 磷脂質의 主成分인 phosphatidyl choline(PC)이 脂質의 約 70~75%라는 高濃度로 存在하고 있는 것, 그 脂肪酸組成이 palmitine酸이다. mono不飽和酸인 olein酸으로 80% 이상 차지하고, 37°附近에서 流動性을 갖는 것 등을 들 수 있다.

高度不飽和酸이 적은 것은 過酸化를 일으키기 어렵다. 卵黃 lecithin 등에서는 cholesterol을 1:1로 포함할 때 지극히 安定한 liposome을 작성할 수 있다^{6,7)}. 또 이와 같은 liposome은 特別히 藥理活性物質, 抗生物質, 免疫反應^{8,9,10)} 등의 model에 흔히 利用되고 있다. 一枚膜 liposome으로 되는 것은 酸性磷脂質인 phosphatidylserine, phosphatidylglycerol^{11,12,13)}이다

이상의 것으로부터 安定한 liposome을 調製하기 위해서는 liposome膜 基劑의 構成成分이 均一하게 되도록 精製할 필요가 있다고 생각한다.

3. Liposome의 種類와 調製法

liposome은 構造上 3종류의 型이 있다. 즉

- 1) Multilamellar
- 2) Single compartment
- 3) Macrovesicle의 세가지 基本的인 type가 있다.

各型의 liposome調製法과 特徵은 다음과 같다^{14,15,16)}.

1) 多重層 liposome(multilamellar 혹은 multiple compartment liposome이라고 한다)은 물分子에 의해 서로 分離한 磷脂質의 多重層 liposome으로서 不均一 集合體이다. 精製한 磷脂質, cholesterol, 또는 다른 疎水性附加物을 chloroform에 溶解하여 丸底flask에 넣어

chloroform을 回轉蒸發하며 乾燥시키면 Fig. 4에서 볼 수 있는대로 round bottom flask의 glass壁에 脂質의 얇은 膜이 생긴다. 이것에 水溶液, 鹽類溶液을 加해 손으로 조용히 흔들어 脂質을 膨潤시키던가 아니면 vortex mixer 등을 사용하여 機械的(約 10分間)으로 水溶液을 攪拌하여, 脂質膜을 剝離하므로써 調製할 수 있다.

이 liposome은 直徑 $0.05 \sim 1.00 \mu\text{m}$ ^{18,19)}의 不均一한 크기로써 concentric bilayer(水層과 교차하는 同心圓二重層)로 되는 것이 特徵이다. 作成法이 간단하나 核酸 등의 高分子物質을 保持시키기 어렵고, 多重層이기 때문에 保持한 物質의 細胞內輸送이 곤란하다. 그러나 安定性인 것과 동시에 保持量이 좋은 點은 長點이다.

2) unilamellar liposomes(一枚膜 liposome)

1)에서 만들어진 多重層 liposome을 bath type sonicator中에서 超音波處理(約 20分)하면 直徑 $0.05 \sim 0.10 \mu\text{m}$ ^{18,19)}의 상당히 均一한 single compartment vesicle(一枚層小胞)로 된다. Size가 比較的 均一하고 安定性이나 保持하는 space가 적기 때문에 保持效率(一定量의 脂質當의 保持可能量)이 나쁘고 高分子物質의 保持에는 適當치 않다.

여기에서 mulilamellar liposome에서의 single compartment liposome을 分離하는 것은 Sephasose 6B에 의한 Gel여과 혹은 超遠心分離에 따른다.

3) macrovesicle(large unilamellar liposome)

Parahadjopoulos와 Watkins¹⁹⁾의 溶媒蒸發法(solvent evaporation)에 기반을 두고 Deamer와 Bangham^{18,20)}이 提案한 方法으로 만들어진다. 즉 ether에 溶解한 脂質을 따뜻한 水溶液中에 注入하면 多重層 liposome의 10배의 保持能을 갖는 一枚膜 liposome으로 된다. 直徑은 $0.13 \pm 0.06 \mu\text{m}$ ¹⁸⁾로 macrovesicle의 物理化學的 性質 등 상세한 것은 아직 分明하게 되어 있지 않으나, 이와 같은 큰 liposome은 生物學的 活性的 蛋白質이나 酵素 등을 保持하여 細胞에 보내는 등 膜model로써 醫藥品輸送擔體(drug carrying vehicles)로써 널리 利用된다고 생각된다.

4. Marker의 Liposome에의 保持 및 保持能

上記의 調製法으로 만들어진 liposome의 保持可能한 容積(entrapped capacity)은 1) 多重層 liposome(손으로 흔들어 만든 경우)에서는 $1.8 \pm 0.6 \mu\text{l}/\mu\text{mol lipid}$, 2) 超音波處理로 作成된 一枚膜 liposome에서는 $0.8 \pm 0.3 \mu\text{l}/\mu\text{mol lipid}$, 3) macrovesicle에서는 $14 \pm 6 \mu\text{l}/\mu\text{mol lipid}$ 임^{18,19)}으로 macrovesicle이 상당히 큰 것을 알 수 있다.

Liposome의 marker保持能은 liposome의 容積, marker의 種類, 膜脂質의 流動性에 따라서 支配된다. 또 liposome의 容積은 溶液의 ion強度나 膜의 荷電狀態에 의해 變한다.

一般的으로 stearylamine과 같은 長鎖 amine을 脂質에 添加하면 正荷電 liposome으로 되고, phosphatidylserine 또는 dicetyl phosphate의 添加로 負荷電 liposome으로 되며, 또 cholesterol 및 磷脂質만 포함하는 liposome은 中性으로 된다고 한다.

疎水性 醫藥品이나 極性 醫藥品은 liposome內에 保持할 수 있다.

(i) 疎水性 醫藥品은 脂質이나 cholesterol과 함께 chloroform에 溶解하여 溶媒를 蒸發시키므로써 round bottom flask壁에 沈着한 얇은 脂質膜內에 投入시킬 수 있다. 醫藥品을 간혀 넣는 保持能은 그 溶解度에 따라서 影響을 받는다. 즉 chloroform에 可溶인 醫藥品은 小胞의 疎水性層에 多量 쌓을 수 있다.

(ii) 極性 醫藥品은 flask壁에 沈着한 磷脂質의 얇은 膜으로부터 liposome形成에 사용한 緩

衝液에 溶解시켜 Fig. 4의 3번째 단계에서 投入시킬 수 있다. 이 때 liposome內的 水性space 容積이 클 수록 極性 醫藥品은 많이 갇히게 되므로 多重層 liposome쪽이 一枚膜 liposome보다 높은 比率(%)의 醫藥品을 집어 넣을 수 있다^{21, 22}.

마찬가지로 cholesterol量의 增加²⁴, 荷電한 補可溶化劑의 插入^{21, 23}, 超音波處理時間의 短縮²² 등은 liposome의 水層을 크게 하고, 醫藥品을 쌓아 넣을 수 있는 %도 높아진다. 保持되는 醫藥品의 %는 다음과 같다.

penicilline	2.2~2.8% ²¹⁾
methothrexate	18% ²⁴⁾
actinomycin D	2.3~11.6% ²¹⁾
horse radish peroxidase	2.5~5.0% ²⁵⁾
amyloglucosidase	4.0~6.5% ²⁶⁾
albumin	10.8% ²⁶⁾
polyuridylic acid	14~26% ²⁷⁾
8-aza uanine	0.7~5.4% ²⁸⁾
6-mercaptapurine	0.10~0.5% ²⁹⁾
bleomycin	60% 이상 ³⁰⁾
insulin	5% 이상 ³⁰⁾
cyclic-AMP	20% ³¹⁾
L-asparaginase	12% ³²⁾
glucose oxidase	5% 이상 ³⁰⁾

投入되지 못한 遊離醫藥品은 Sephadex G200 혹은 Sepharose 2B³³⁾를 사용해서 Gel여과에 의해 容易하게 分離된다.

5. In vivo에 있어서의 Liposome의 利用

生體膜과 類似한 膜으로 되는 liposome은 上記와 같이 小胞內的 水溶液相과 膜構造를 作成하는 脂質相에 각각 水溶性, 脂溶性物質을 집어 넣을 수 있으므로 生體에의 利用은 꽤 進진되고 있다. 特히 醫藥品을 目的組織까지 直接 運搬할 수 있는 擔體로써 이 liposome을 利用하는 일은 注目해야 할 일이다.

Liposome에 保持된 醫藥品은 二重膜을 透過하여 漏出한 것과 동시에 小胞의 破壞에 의해 遊離된다.

Kriss, Dunnick, McDougall^{34, 35, 36, 37)}에 의하면 liposome의 in vivo에서의 分布는 磷脂質 組成, size, 抗體 및 蛋白質과의 相互作用 및 投與經路 등에 따라서 影響받고, 醫藥品保持 liposome의 targeting에 影響을 준다.

醫藥品擔體로써 liposome의 有利한 効果는 投與量, allergy나 免疫反應의 減少, 細胞透透性的의 增大, 醫藥品消失의 遲延 등이다.

다음에 報告되어 있는 主要한 in vivo에의 利用例中 몇개를 소개한다.

1) penicillin은 効力있는 抗菌劑이나 經口投與한 경우, 消化管中에서 胃酸에 의해 破壞되어 酵素 penicillinase에 의해서 不活性化하여 不充分하고 不規則하게 吸收된다.

또 actinomycin-D는 成長抑制劑로써 惡性腫瘍治療에 사용되어지나, 正常인 細胞에 有害한 效果를 주어, 長期間 使用함으로써 細胞耐性으로 된다.

이와 같은 penicillin 또는 actinomycin-D를 保持한 liposome을 사용한 경우, 上記 障害의

大部分이 解消된 사실이 報告되고 있다³⁸⁾.

2) dipalmitoyl lecithin이나 dipalmitoyl phosphatidyl glycerol 등의 界面活性物質을 liposome內에 保持시켜서 肺에 投與하면³⁹⁾ 直接投與하는 것보다도 肺細胞로 藥劑를 집어 넣는 量이 增大하여 未熟兒의 呼吸困難症에 有効하다.

3) liposome의 保持能은 leukemia에 걸려있는 mouse의 生存率을 增加시켰다^{21,40)}.

4) 缺損酵素症에서 醫藥品의 長期間 治療에 의한 過感作反應 및 免疫反應을 克服할 수 있다⁴¹⁾.

5) 抗原의 diphtheria toxoid를 liposome에 保持하여 mouse에 투여하던 allergy 反應을 除去할 수 있다⁴²⁾.

6) 免疫의 adjuvant로써 liposome을 사용한 것도 報告되고 있다⁴³⁾.

7) liposome의 表面에 influenza virus를 附着하면(virosom이라고 부른다) 有害한 發熱을 하지 않고 免疫反應을 誘發한다⁴³⁾.

8) 糖尿病에 有効한 hormon인 insulin은 經口投與한 경우, 消化液中의 蛋白質分解酵素에 의해 分解를 받아서 無効로 되나, liposome에 保持시켜 rat에 經口投與할 때 血糖値는 分明히 低下한다고 한다^{44,45)}. 이 사실은 liposome에 保持시킨 insulin이 消化酵素와 接觸하는 일 없이 腸에서 吸收되어 効力を 發揮하는 것을 나타낸다.

6. In vitro에 있어서의 檢討

膜透過不能인 藥, 毒素, 制癌劑⁴⁶⁾나 virus⁴⁷⁾를 liposome에 保持시키므로써 耐性を 나타내는 細胞를 感受性으로 시키는 實驗이 試圖되고 있다.

Targeting의 문제도 in vitro에서의 model實驗으로 活發히 行해지고 있다^{16,48,49)}.

以上과 같이 microcapsule로써의 liposome의 利用은 藥劑學에 있어서 劑形開發, drug delivery system에의 利用이 크게 期待되어 매우 흥미있는 것으로 생각된다.

또 liposome을 利用하는 경우, 脂質成分의 毒性, 脂質 및 結合된 蛋白質의 免疫遺傳 등의 危險性, mouse의 腦內注射로 癲癇發作과 腦組織壞死 등의 위험도 일어나고, liposome의 分布가 그렇게 選擇의이 아닌 것과, 主로 肝과 脾臟에 輸送되는 등 缺點도 있으나, liposome基劑로써 사용하는 磷脂質(lecithin)을 精製하여 均一組成의 lecithin을 얻을 수 있으면 選擇的인 delivery가 可能한 機能 liposome 및 水層部의 容積이 크며 保持能率이 높고, 더우기 均一하고 安定한 liposome의 調製法, 또 投與時에 간단한 操作에 의해 liposome을 만드는 등 開發되지만 하면 그 應用範圍도 넓어지리라 생각된다.

文 獻

- 1) B. Solomon, and I.R. Miller, *Biochim. Biophys. Acta*, **M49**, 332 (1976)
- 2) G. Weissman and R. Claiborne, "Cell Membrances"
- 3) 井上奎三, 生化學實驗講座, 3, 608 (1975)
- 4) Bangham, A.D., M.M. Standish, and G. Weissmann, *J. Mol. Biol.*, **13**, 253 (1965)
- 5) G. Sessa and G. Weissmann, *J. Lipid Res.*, **9**, 310 (1968)
- 6) R. A. Demel, S.C. Kinsky, C.B. Kinsky, and L.L.M. Van Deenen, *Biochim. Biophys. Acta*, **150**, 655 (1968)

- 7) K. Inoue, *Ibid.*, **339**, 390(1974)
- 8) S.C. Kinsky, J.A. Haxby, D.A. Zopf, C.R. Alving, and C.B. Kinsky, *Biochemistry*, **8**, 4149 (1969)
- 9) K. Inoue, S.C. Kinsky, *Ibid.*, **9**, 4767 (1970)
- 10) T. Kataoka, K. Inoue, O. Lüderitz, and S.C. Kinsky, *Eur. J. Biochem.*, **21**, 80 (1971)
- 11) D. Papahadjopoulos, and J.C. Watkins, *Biochim. Biophys. Acta*, **135**, 639 (1967)
- 12) D. Papahadjopoulos, *Ibid.*, **241**, 254 (1971)
- 13) D. Papahadjopoulos, S. Nir, and S. Ohki, *Ibid.*, **266**, 561 (1971)
- 14) A.D. Bangham, *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **18**, 29 (1968)
- 15) G. Weissmann, D. Bloomgarden, R. Kaplan, and C. Cohen, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **72**, 88 (1975)
- 16) C.M. Cohen, G. Weissmann, S. Hoffstein, Y. Awasthi, and S.K. Srivastava, *Biochemistry* **15**, 452 (1976)
- 17) G. Weissmann, T. Collins, A. Evers, and P. Dunham, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **73**, 510, (1976)
- 18) D. Papahadjopoulos, and N. Miller, *Biochim. Biophys. Acta*, **135**, 624 (1967)
- 19) D. Papahadjopoulos, and J.C. Watkins, *Ibid.*, **135**, 1639 (1967)
- 20) W.R. Redwood, and B.C. Patel, *Ibid.*, **363**, 70 (1974)
- 21) G. Gregoriadis, *FEBS Lett.* **36**, 292 (1973)
- 22) K. Tsujii, J. Sunamoto, and J.H. Fendler, *Life Sciences*, **19**, 1743 (1976)
- 23) G. Sessa and G. Weissmann, *J. Biol. Chem.*, **245**, 3295 (1970)
- 24) C.M. Colley and B.R. Ryman, *Biochem. Soc. Transaction*, **3**, 157 (1975)
- 25) W.E. Magee, C.W. Goff, J. Schoknecht, M.D. Smith and K. Cherian, *J. Cell Biol.*, **63**, 492 (1974)
- 26) G. Gregoriadis, P.D. Leathwood and B.E. Ryman, *FBES Lett.*, **14**, 95 (1974)
- 27) C.F. Kulpa and T.J. Tinghitella, *Life Sciences*, **19**, 1879 (1976)
- 28) J.H. Fendler and A. Romero, *Life Sciences*, **18**, 1453 (1976)
- 29) K. Tsujii, J. Sunamoto, and J.H. Fendler, *Life Sciences*, **19**, 1743 (1976)
- 30) G. Gregoriadis, G. Dapergoals and E.D. Neerunjun, *Biochem. Soc. Transactions*, **4**, 256 (1976)
- 31) D. Papahadjopoulos, G. Poste and E. Mayhew, *Biochim. Biophys. Acta*, **363**, 404 (1974)
- 32) Y. Fishman and N. Citri, *FEBS Lett.*, **60**, 17, (1975)
- 33) Morris Finkelstein and G. Weissman, *J. Lipid Res.*, **19**, 290(1978)
- 34) I.R. McDougall, J.K. Dunnick, and M.G. McNamee, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **71**, 3487 (1974)
- 35) I.R. McDougall, J.K. Dunnick, M.L. Goris, and J.P. Kriss, *J. Nucl. Med.*, **16**, 488 (1975)
- 36) J.K. Dunnick, I.R. McDougall, S. Aragon, and M.L. Goris, *Ibid.*, **16**, 483 (1975)
- 37) J.K. Dunnick, R.S. Badger, and Y. Takeda, *Ibid.*, **17**, 1073 (1976)
- 38) G. Gregoriadis and D. Neerunjun, *Res. Commun. Chem. Pathology and Pharmacology*, **10**, 351 (1975)
- 39) J.L. Marx, *Science*, **199**, 1056 (1978)
- 40) D.E. Neerunjun and G. Gregoriadis, *Biochem. Soc. Transactions*, **2**, 868 (1974)
- 41) R.L. Capizzi, J.R. Bertino and R. Handschumacher, *Ann. Rev. Med.*, **21**, 433 (1970)

- 42) G. Gregoriadis and A.J. Allison, *FBES Lett.*, **45**, 71 (1974)
- 43) J.D. Almeida, C.M. Brand, D.C. Edwards and T.D. Heath, *The Lancet*, **899** (1975)
- 44) G. Gregoriadis, *N. Engl. J. Med.*, **295**, 704, (1976)
- 45) H.M. Patel and B.E. Ryman, *FEBS Lett.* **62**, 60, (1976)
- 46) D. Papahadjopoulos, G. Poste, and W.J. Vail, *Can. Res.*, **36**, 2988 (1976)
- 47) T. Wilson, D. Papahadjopoulos and R. Taben, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**, 3471 (1977)
- 48) G. Weissman, A. Brand and E.C. Franklin, *J. Clin. Invest.*, **53**, 536 (1974)
- 49) G. Gregoriadis, E.D. Neerunjun, *Biochim. Biophys. Res. Commu.*, **65**, 537 (1975)