

방사성동위원소표지 Liposome의 분포에 대한 실험적 연구*

서울대학교 의과대학 내과학교실

이범우 · 정재민 · 김상은 · 이동수
정준기 · 이명철 · 고창순

치료방사선과학교실

하 성 환

= Abstract =

Distribution of Radionuclide Labeled Liposome in Experimental Study

Bum Woo Lee, M.D., Jae Min Jeong, Ph.D., Sang Eun Kim, M.D., Dong Soo Lee, M.D.
June-Key Chung, M.D., Myung Chul Lee, M.D. and Chang-Soon Koh, M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

Sung Whan Ha, M.D.

Department of Therapeutic Radiology

Liposome was labelled with ^{99m}Tc after negative charged liposome was formed with combination of a few lipid components. ^{99m}Tc liposome was injected through the tail vein of C3H mice bearing fibrosarcoma and biodistribution of ^{99m}Tc liposome was evaluated.

The results were as follows:

- 1) We confirmed formation of liposome which was small unilamellar and multilamellar vesicles.
- 2) In this experiment the optimal concentration of SnCl₂ was 156μg/ml to label liposome with ^{99m}Tc and labelling efficiency was 98%.
- 3) The labelled liposome was stable when it was incubated with human serum for 24 hours. Mean labelling efficiency was 94% at 24 hour.
- 4) The main uptake sites of Tc-99m liposome were liver and spleen. It showed significantly higher uptake than ^{99m}Tc HSA (p<0.001).
- 5) ^{99m}Tc liposome uptake in tumor tissue was not significantly higher than ^{99m}Tc HSA uptake.

In conclusion, ^{99m}Tc liposome disclosed high labelling efficiency and was highly stable. Liver and spleen were main uptake sites of ^{99m}Tc liposome. The uptake mechanism of ^{99m}Tc liposome also seemed to be different from that of ^{99m}Tc HSA. We conclude that ^{99m}Tc liposome would be a promising agents for the imaging of some tumor.

서 론

Liposome은 phospholipid가 수용성 용액에 노출되

는 경우 자연적으로 형성된다¹⁾. Liposome 소수포가 형성될때 수용성 또는 지용성 시약이나 약물이 liposome 내로 포획되고, 정맥주사한 경우에 liposome은 조직친화력이 있어 몇가지 조직에 축적될 수 있다^{2,3)}. Liposome을 정맥주사하는 경우에는 간과 비장등의 세망내피계에 주로 섭취되며, 방사성 추적자로 표지된

*본 논문은 1989년도 한국과학재단지원 일반기초연구비의 보조에 의하여 연구 되었음.

liposome도 종양에 섭취된다고 한다⁴⁾.

1978년 Richardson등은 ^{99m}Tc이 표지된 liposome이 종양조직에 친화력이 있으므로 이를 이용하여 종양을 동위원소로 영상화하여 그 위치를 알 수 있다(localization)고 하였다^{5,6)}. Morgan등은 1982년 ^{99m}Tc이 표지된 liposome을 이용하여 농양을 영상화하였다고 보고하였다⁷⁾. 이렇게 종양이나 농양에 동위원소가 표지된 liposome이 섭취되는 기전은 정확히 밝혀져 있지 않으나 세포내피체 기원의 세포나 종양세포 일부가 지니고 있는 endocytotic activity에 의해 섭취된다고 생각되어 왔다⁵⁻⁷⁾.

본 연구자들은 liposome에 ^{99m}Tc을 표지하고 종양에 이환된 마우스에서 ^{99m}Tc 표지된 liposome의 생체내 분포와 종양의 영상화 가능성에 대해 연구하였다.

재료 및 방법

1. Liposome의 제조

사용된 지질은 Sigma사의 phosphatidylcholine, cholesterol, diacetyl phosphate를 사용하였고 이를 7:2:1의 몰비(molar ratio)로 섞어 지질혼합체를 만들었다. Chloroform과 methanol을 1:1 부피비의 용매를 만들어 지질혼합체를 용해시켰고 이를 구형플라스크에 넣어 일정한도와 감압하에서 rotary evaporator를 이용하여 지질막을 형성하였다. 이 지질막에 0.1M의 Tris buffered saline (TBS) 6cc를 넣어 liposome의 현탁액을 만들어 다층구조의 소수포를 형성하였다.

이로부터 단층구조의 소수포를 많이 만들기 위하여 liposome 현탁액을 B Braun사의 Labsonic® 2000을 이용하여 160watt에서, 1cm titanium probe를 사용하여 30초 동안 초음파분쇄(sonication)하고 30초동안 ice bath에서 냉각시켰으며 이를 20회 반복 시행하였다. 초음파분쇄 후 20분동안 20,000g에서 원심분리하여 titanium fragment와 큰 liposome을 제거하였다. 분리된 liposome 현탁액을 potassium phosphate로 염색하여 일부 다층 구조와 다량의 단층구조의 소수포 liposome 현탁액을 형성하였다.

2. Liposome과 HSA의 ^{99m}Tc 표지

^{99m}Tc을 표지하기 위하여 만들어진 liposome 현탁액 6ml에 SnCl₂의 농도를 변화시키면서 3ml의 ^{99m}Tc

saline(30 mCi)을 첨가하였으며 이때 모든 용액은 oxygen free water를 이용하였다. 이렇게 만든 용액을 진탕한후 20분동안 실온에 방치하고 5분동안 1500g에서 원심분리하였다.

표지율을 보기 위하여 miniaturized ITLC에 점적한 후 전개용매인 acetone에 약 30분 상승전개 시킨뒤 방사능치를 측정하여 표지율을 구하였고 자가방사기록법(autoradiography)의 영상을 얻었다.

혈청에서의 안정성을 알아보기 위하여 36.5°C에서 사람 혈청에 ^{99m}Tc이 표지된 liposome 현탁액을 첨가하여 24시간까지 관찰하였다. ^{99m}Tc의 HSA에 대한 표지는 상품화된 Kit(NEN)을 사용하였다.

3. 동물 실험

우측 대퇴부에 섬유육종(fibrosarcoma)이 이식된 C3H 마우스 24마리를 대상으로 하였고 종양의 크기는 1cm³ 정도였으며 몸무게는 평균 25gm이었다. 이중 12마리는 ^{99m}Tc liposome 0.3ml(1mCi)을 나머지 12마리는 ^{99m}Tc HSA 0.3ml(1mCi)을 꼬리정맥을 통해 주사하였고, 각각에서 6마리는 4시간에 영상을 얻고 동물을 희생시켰고 나머지 6마리는 24시간에서 희생시켜 조직내 분포를 검사하였다.

영상은 동물을 ketamin으로 마취한후 Pho/Gamma Camera의 4mm pinhole collimator사용하여 12cm 높이에서 영상을 얻었다. 조직분포를 알아보기 위하여 4시간과 24시간에 동물을 희생시켜 각각 조직을 얻어 Packard사의 γ -counter를 이용하여 방사능을 측정하였다. 이때 ^{99m}Tc의 방사능값을 표준시료의 방사능 붕괴를 보정한 값을 사용하였고 투여전량을 100%로 할 때 조직의 단위 gm당 ^{99m}Tc의 방사능을 측정하여 비를 구하였다(%ID/gram).

결 과

Liposome 현탁액을 전자현미경으로 관찰한 결과 단층과 다층구조의 liposome 소수포가 형성되었다. 그 크기는 100 μ m 이하가 대부분이었다(Fig. 1). SnCl₂의 농도를 변화시키면서 liposome에 ^{99m}Tc을 표지한 결과 최적농도는 156 μ /ml로 이때의 표지율은 98%였고(Fig. 2), aceton으로 전개하여 얻은 자기방사기록법(autoradiography)에서도 같은 소견이 관찰되었다(Fig. 3).

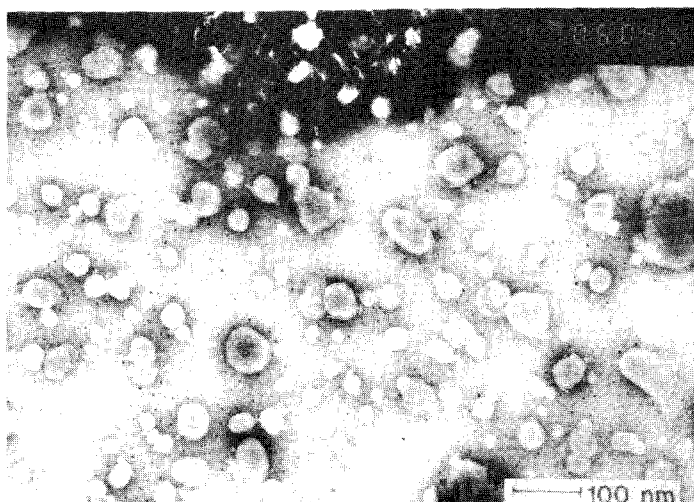


Fig. 1. Electron micrograph of liposome.

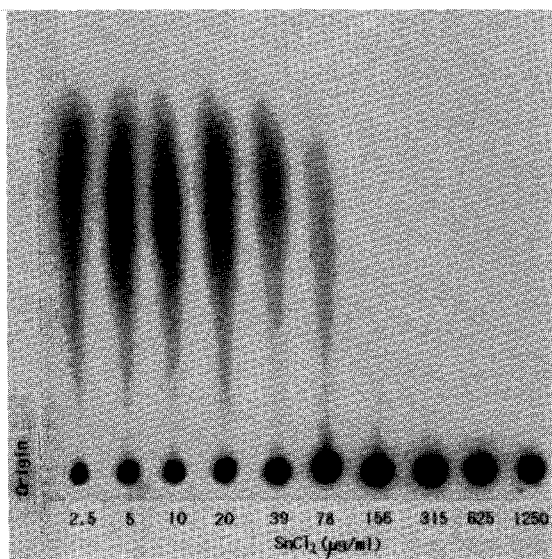


Fig. 2. Autoradiography of paper chromatography (acetone) of ^{99m}Tc liposome.

^{99m}Tc 으로 표지된 liposome을 사람 혈청과 30분, 1시간, 2시간, 4시간 그리고 24시간까지 반응시켰을때 24시간에서의 표지율은 94%로 안정하였다(Fig. 4).

^{99m}Tc , liposome과 ^{99m}Tc HSA를 투여한후 4시간에 영상을 얻은 결과 ^{99m}Tc liposome을 투여한 마우스에서는 간과 비장부위에 섭취가 많았고 종양에도 섭취되는 소견이 관찰되었다. 그러나 예비실험에서 TcO_4 를 투여한 경우에는 종양에 섭취되는지가 명확하지 않았으나, 99m

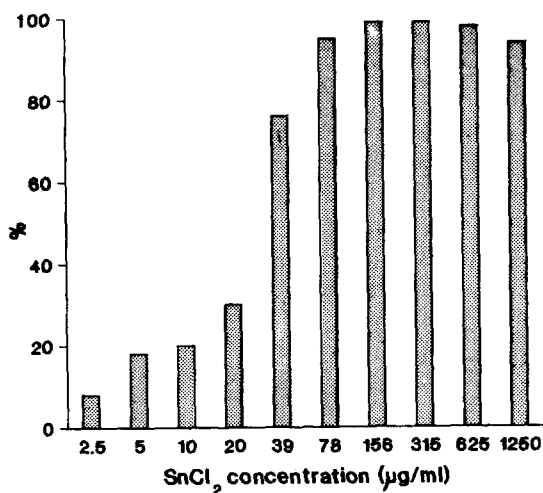


Fig. 3. ^{99m}Tc labelling efficiencies of liposome with graded concentrations of SnCl_2 .

Tc liposome을 투여한 경우와 ^{99m}Tc HSA를 투여한 경우에 거의 비슷하게 영상화가 되었다. 그리고 간과 비장 이외에 신장에서도 ^{99m}Tc liposome 이나 ^{99m}Tc HSA 모두에서 섭취되는 정도가 높았다(Fig. 5).

종양을 갖고 있는 마우스에서 ^{99m}Tc liposome과 ^{99m}Tc HSA를 투여한 후 4시간과 24시간에 조직분포를 살펴본 결과, 4시간에 관찰한 조직분포를 보면 ^{99m}Tc liposome을 투여한 경우가 ^{99m}Tc HSA를 투여한 경우에 비해 간과 비장의 방사능이 의미있게 높았고($p < 0.001$), 종양에 섭취된 방사능과 종양과 반대편 근육의

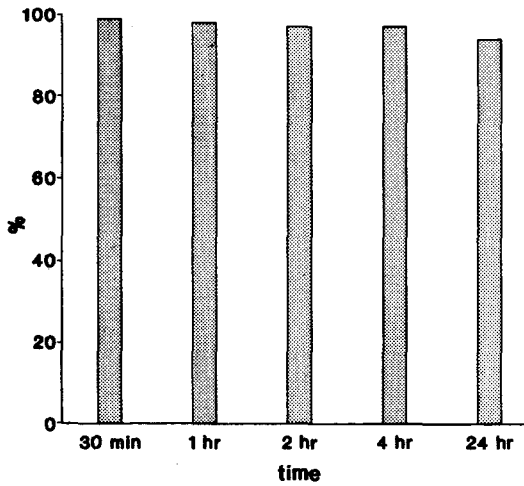


Fig. 4. ^{99m}Tc activity bound to liposome following incubation in human serum.

방사능과의 비는 ^{99m}Tc liposome을 투여한 경우에 다소 높았으나 통계적으로 의미있는 차이는 보이지 아니하였다. 또한 24시간에서의 조직 분포는 ^{99m}Tc HSA를 투여한 경우에 비해 ^{99m}Tc liposome을 투여한 경우에 종양의 방사능이 높았으나, 종양과 반대편 근육과의 비는 ^{99m}Tc liposome에 비해 ^{99m}Tc HSA를 투여한 경우와의 사이에 유의한 차이는 없었다. 그리고 혈액에 남아 있는 방사능의 투여량에 대한 퍼센트 섭취율이 4시간에 비해 24시간에 많이 낮은 결과를 보였다(Table 1, Fig. 6, 7).

고 안

Liposome은 lipid bilayer로 이루어진 소수포로서 bilayer의 수와 liposome의 크기에 따라 large multila-

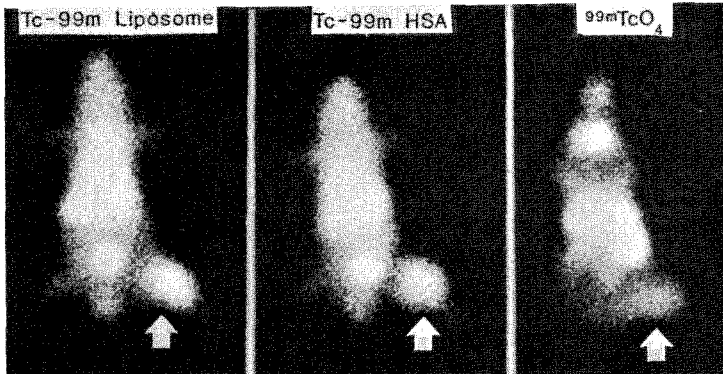


Fig. 5. Imaging of mice at 4 hour.

Table 1. Biodistribution of Radioactivity in MICE Bearing Fibrosarcoma, At 4HR and 24HR After Injection of Tc-99m Liposome and Tc-99m HSA

Organ	4hr		24hr	
	Tc-99m Liposome	Tc-99m HSA	Tc-99m Liposome	Tc-99m HSA
Blood	7.45 ± 1.28	7.36 ± 0.98	2.14 ± 0.40	2.83 ± 0.68
Liver	*14.35 ± 1.37	7.07 ± 1.11	*14.53 ± 2.72	4.25 ± 1.32
Spleen	*13.80 ± 2.77	3.25 ± 0.43	*11.10 ± 3.45	1.92 ± 0.51
Kidney	9.22 ± 1.56	7.22 ± 0.81	6.21 ± 0.58	5.86 ± 1.23
Lung	3.55 ± 0.60	3.31 ± 0.38	1.82 ± 0.33	1.52 ± 0.44
Muscle	0.88 ± 0.26	0.78 ± 0.6	0.58 ± 0.17	0.46 ± 0.23
Tumor	3.54 ± 0.69	2.57 ± 0.87	2.01 ± 0.50	1.71 ± 0.40
Tumor/Muscle	4.27 ± 1.20	3.52 ± 1.76	3.58 ± 0.97	4.17 ± 1.31

Unit : % injected dose per gram of tissue (Mean ± S.D.)

* P < 0.001

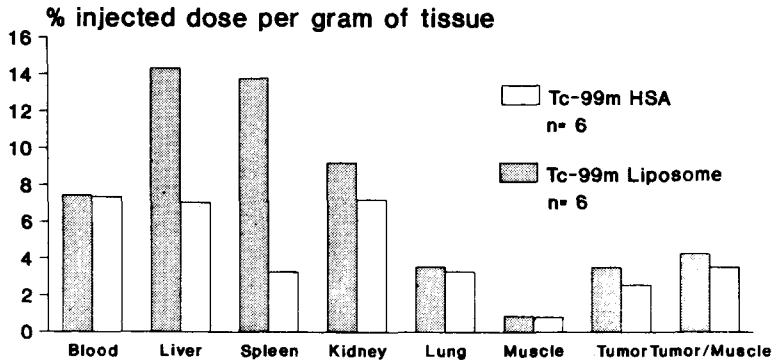


Fig. 6. Biodistribution of ^{99m}Tc liposome and ^{99m}Tc HSA at 4 hour.

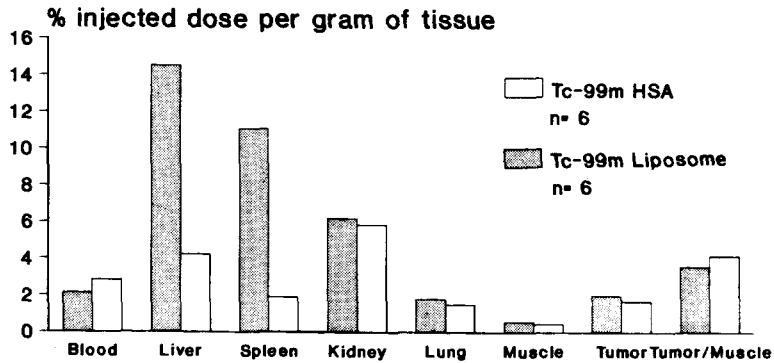


Fig. 7. Biodistribution of ^{99m}Tc liposome and ^{99m}Tc HSA at 24 hour.

mellar vesicle (LMV), large unilamellar vesicle (LUV), small unilamellar vesicle(SUV)등으로 나누어지며 전하에 따라서 양성 중성 음성 liposome으로 나눌 수 있다. Liposome은 특징적으로 수용성 또는 지용성 물질을 모두 포획할 수 있고 이렇게 포획된 물질을 목표기관에 비교적 파괴되지 않은 상태로 전달할 수 있다. Liposome은 처음에는 생체막의 모델로 연구에 이용되었으나 Gregoriadis가 1970년대에 임상 이용 가능성을 제안한 뒤에 활발한 in vivo 연구가 이루어졌다^{4,5,8)}.

1978년 Richardson 등이 liposome을 이용하여 종양을 영상화 한뒤 현재까지도 종양에 섭취가 잘되는 liposome이 어떤 종류인가에 대하여는 의견이 통일되지 않은 상태이다. 그러나 지금까지 연구를 종합하면 종양이나 농양의 영상화에는 음성 liposome이 좋은 성적을 보인다고 여러 자자들이 보고하였으므로^{5,7,9-11)} 본 연구에서도 음성 liposome을 이용하여 C3H mouse에서의 조직분포와 fibrosarcoma의 영상화를 시도하였다.

이와같은 배경에서 본 연구에서는 liposome이 종양에 섭취되는 양상과 생체에서의 분포를 알아보기 위하여 ^{99m}Tc HSA와 ^{99m}Tc 음성 liposome의 생체분포를 분석하였다.

연구자들은 liposome의 현탁액을 초음파 분쇄한 후 전자현미경으로 관찰한 결과 small unilamellar vesicle의 liposome이 형성되는 것을 관찰할 수 있었다^{1,5,6)} (Fig. 1). ^{99m}Tc 이 표지된 liposome은 in vitro와 in vivo에서 모두 안정한 것으로 보고되어 있으며^{5,12,13)} 이러한 안정성은 본 연구에서도 확인되었다.

Liposome의 생체분포 양상은 단백질, opsonin factors, 혈구, 그외 혈장요소 등에 따라서 달라지는데¹⁴⁻¹⁷⁾ 혈액에서의 제거율은 lipid vesicle의 안정성과 관계있다고 한다¹⁹⁾. Liposome의 크기도 혈액으로부터의 제거 시간에 영향을 주어 small unilamellar vesicle인 liposome은 큰 liposome에 비해 더 오랫동안 순환혈액내에서 관찰되며, 크기가 작을수록 안정하므로, 표적인 이상

조직에 더 많이 도달할 수 있는 특성을 가지게 된다^{20,21}). 정맥주사된 liposome은 세망내피계인 간 비장, 골수에 70% 이상 섭취되고, 특히 간에는 Kupffer cell과 간세포 모두에 섭취되는데 특히 small unilamellar vesicle은 간세포에만 섭취된다고 한다^{5-7,17,18}). 이와같이 신체 각 기관에 다양하게 섭취되는 것은 liposome의 조성과 크기, 주사된 양 등에 의해 많이 좌우된다^{8,22}). 본 연구에서도 ^{99m}Tc liposome이 주로 간과 비장에 많이 섭취되는 양상을 보였는데 이때 ^{99m}Tc HSA를 투여한 경우의 섭취분포와는 다소 다른 분포가 관찰되어 이 두가지 물질의 섭취 기전은 서로 다른 것으로 생각되었다.

본 연구에서 신장에 ^{99m}Tc liposome과 ^{99m}Tc HSA이 모두 많이 섭취된 것은 체내에서 liposome이나 HSA로 부터 분리된 free technetium이 신장을 통해 배설되기 때문으로 생각되며²³) 따라서 liposome이나 HSA 그 자체의 섭취와는 관계가 없는 것으로 생각된다. 이러한 것은 투여후 24시간이 지나면 방사능의 50% 이상이 표지된 liposome으로부터 유리되어 소실된다는 보고와 맞는 소견이다¹²). 종양이나 농양 등의 이상조직에 liposome이 섭취되는 기전은 아직 뚜렷이 밝혀져 있지 않다. Small unilamellar anionic liposome이 배양된 세포와 융합하는 현상을 조사한 결과로부터 종양에 liposome이 섭취되는 것이 phagocytosis보다는 pinocytosis에 의한 것이라 주장되었다^{12,24-26}). Liposome은 종양에 혈액내 unilamellar vesicle의 순환시간이 길수록 많이 섭취된다고 한다. 그러나 이때 종양에 liposome이 시간경과에 따라 점점 더 많이 섭취되는 것은 liposome이 종양세포에 특이적으로 섭취되는 것에 의하기 보다는, 종양내 혈류이상, 혈관 내피구조의 결손, 이상신생혈관 등에 의한 혈관누출에 기인한 것이라는 주장도 있다. 즉 이때 종양에 liposome이 섭취되는 것은 비특이적이고 종양의 혈류양에 의해 크게 제한되어, 순환시간이 길면 길수록 혈관누출이 될 기회가 많아지는 것이고 따라서 이것이 종양에 liposome이 섭취되는 주된 기전이라고 주장한 보고도 있다^{21,22}). 본 연구에서 vascular pool과 vascular integrity을 반영하는 ^{99m}Tc HSA의 섭취와 ^{99m}Tc liposome의 종양섭취를 비교하였을때, ^{99m}Tc liposome의 종양섭취와 ^{99m}Tc HSA의 종양섭취가 크게 차이가 없는 것은 위의 주장^{21,22})과 맞는 소견이다.

Presant 등은 사람에서 일차적 또는 전이성 종양을 찾

기 위하여 small vesicle(77 nm) liposome을 이용한 결과를 보았는데, 24명의 환자에서 성공적으로 종양을 발견하여 그 민감도가 85%였다고 보고하였다. 특히 재래적 종양 스캔물질로 잘 관찰되지 않던 유방, 신장, 췌장, 난소 종양에서도 In-III 표지 liposome의 섭취가 관찰되었다고 하였다²⁷).

본 연구의 결과와 여러 연구자들의 보고를 종합하면 결론적으로, liposome의 조직분포와 종양에서의 섭취 기전은 주로 세망내피계와 종양조직에서의 pinocytosis 또는 혈관누출에 의한 섭취에 의한 것이라고 설명할 수 있다. 따라서 앞으로도 계속적으로 liposome의 배합과 liposome에 표지할 적절한 동위원소의 개발로 종양에 보다 특이적으로 섭취되는 동위원소 표지 liposome을 개발하는 것이 바람직한 것으로 생각된다.

결 론

몇 가지 lipid를 조합하여 negative charged liposome을 형성한 뒤 ^{99m}Tc로 표지하였고, 섬유성 육종 (fibrosarcome)이 이식된 C3H 마우스에 꼬리정맥을 통하여 ^{99m}Tc liposome을 주사하여 조직 분포 양상을 조사하고 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 전자현미경으로 단층과 다층구조의 liposome 소수포의 형성을 확인하였다.

2) 본 실험에서 ^{99m}Tc를 liposome에 표지하는데 적절한 SnCl₂의 농도는 156 µg/ml이었다.

3) 표지된 liposome은 사람 혈청과 24시간까지 인큐베이트하였을때 표지율이 94%를 보여 표지의 혈액내 안정성을 확인하였다.

4) Liposome의 주된 섭취장소는 간과 비장이었으며 간과 비장에는 ^{99m}Tc HSA의 섭취에 비해 (p<0.001) 유의하게 높은 섭취를 보였다.

5) ^{99m}Tc liposome과 Tc-99m HSA의 종양섭취의 차이는 통계적 의미는 없었다.

결론적으로 ^{99m}Tc liposome은 표지율이 높고 안정하며 조직분포는 간과 비장에 주로 섭취되고 세망 내피계에 섭취될 것임을 시사하는 소견을 보였고 종양에서의 섭취도 관찰되었다. 앞으로 liposome의 성상을 적절히 변화시키면 종양의 영상화에 임상응용이 가능할 것으로 기대된다.

이 논문의 실험에 많은 도움을 주었던 서울대학교병원 핵의학과의 서일택, 정은주 선생님께 깊이 감사 드립니다.

REFERENCES

- 1) Bangham AD, Hill MW, Miller NG: *Preparation and use of liposome as models of biological membranes. In membrane biology, edited by E.D. Korn, Plenum Press. New York, Volume 1, P 1, 1974*
- 2) Juliano RL Stamp D: *The effect of particle size and charge on the clearance rates of liposome and liposome encapsulated drugs. Biochem Biophys Res Commun 63:65, 1975*
- 3) Gregoriadis G: *The carrier potential of liposomes in biology and medicine. N Engl J Med 295:704, 1976*
- 4) Gregoriadis G, Neerunjun DE: *Control of the rate of hepatic uptake and catabolism of liposome entrapped proteins injected into rats. Possible therapeutic applications. Eur J Biochem 47:179, 1974*
- 5) Richardson VJ, Jeyasingh K, Jewkes RF, Ryman BE, Tattersall MHN: *Possible tumor localization of ^{99m}Tc labelled liposome: Effects of lipid composition, charge and liposome size. J Nucl Med 19:1049, 1978*
- 6) Richardson VJ, Ryman BE, Jewkes RF, Jeyasingh K, Tattersall MNH, Newlands ES, Kaye SB: *Tissue distribution and tumor localization of ^{99m}Tc labelled liposome in cancer patients. Br J Cancer 40:35, 1979*
- 7) Morgan JR, Williams KE, Dabies RL, Leach K, Thomson M, Williams LAP: *Localization of experimental staphylococcal abscesses by ^{99m}Tc labelled liposome. J Med Microbiol 14:213, 1981*
- 8) Yatvin MB, Lelkes PI: *Clinical prospects for liposome. Med Phys 9:149, 1982*
- 9) Hnatowich DJ, Clancy B: *Investigation of a new highly negative liposome with improved biodistribution for imaging. J Nucl Med 21:662, 1980*
- 10) Lopez-Berestein G, Kasi L, Rosenblum MG, Haynie T, Jahns M, Glenn H, Mehta R, Mavligit GM, Hersh EM: *Clinical pharmacology of ^{99m}Tc labelled liposomes in patients with cancer. Cancer Research 44: 375, 1984*
- 11) Mjorgan JR, Williams LA, Howard B: *^{99m}Tc labelled liposome imaging for deep-seated infection. Br JR 58:35, 1985*
- 12) Richardson VJ, Jeyasingh K, Jewkes RF, Ryman BE, Tattersall MHN: *Properties of ^{99m}Tc labelled liposomes in normal and tumor bearing rats. Biochem Soc Trans 5:290, 1977*
- 13) Kasi LP, Lopez-Berestein G, Mehta K, Rosenblum M, Glenn HJ: *Haynie TP, Mavligit G Hersh EM: Distribution and pharmacology of intravenous ^{99m}Tc labelled multilamellar liposome in rats and mice. Int J Nucl Med Biol 11:35, 1984*
- 14) Black CD, Gregoriadis G: *Interaction of liposomes with plasma proteins. Biochem Soc Trans 4:253, 1976*
- 15) Scherphof G, Damen J, Hoekstra D: *Interactions of liposomes with plasma proteins and components of the immune system. In: Knight, C. G., editor. Liposome: from physical structure to Therapeutic applications. Am sterdam: Elsevier, North Holland; 1981:299-322*
- 16) Senior J, Gregoriadis G: *Stability of small unilamellar liposomes in serum and clearance from the circulation: the effect of the phospholipid and cholesterol components. Life Sci 30:2123, 1982*
- 17) Guo LSS, Hamilton RL, Goerke J, Weinstein JN, Havel KJ: *Interaction of unilamellar liposomes with serum lipoprotein and apolipoproteins. J.Lipid Res. 21:993, 1980*
- 18) 유용운, 김장휘, 강태용, 류주현 : *^{99m}Tc liposome과 킬레이트제 표지반응의 효과. 대한핵의학회지 19: 137, 1985*
- 19) Senior J, Gregoriadis G, Mitropoulos KA: *Stability of small unilamellar liposomes. Studies with normal and lipoprotein-deficient mice. Biochim Biophys Acta 760:11, 1983*
- 20) Wallingford RH, Williams LE: *Is stability a key parameter in the accumulation of phospholipid vesicles in tumor? J Nucl Med 26:1180, 1985*
- 21) Ogiwara-Umeda I, Kojima S: *Increased delivery of Ga-67 to tumors using serum-stable liposomes. J Nucl Med 29:516, 1988*
- 22) Caride VJ: *Technical and biological considerations on the use of radiolabelled liposomes for diagnostic imaging. Nucl Med Biol 17:35, 1990*
- 23) Dayton DA, Maher FT, Elveback LR: *Renal clearance of technetium as pertechnetate. Mayo Clin Proc 44:549, 1969*
- 24) Papahadjopoulos D, Poste G, Schaeffer BE: *Fusion of mammalian cells by unilamellar lipid surface charge, fluidity and cholesterol. Biophys Acta 323:23,*

- 1973
- 25) Neerunjun ED, Hunt R, Gregoriadis G: *Fate of a liposome-associated agent injected into normal and tumor bearing rodents: Attempts to improve localization in tumor tissue. Biochem Soc Trans* 5:1380, 1977
- 26) Ryman BE, Jewkes RF, Jeyasingh K, et al: *Potential application of liposomes to therapy. Ann NY Acad Sci* 308:281, 1978
- 27) Presant CA, Proffitt RT, Turner F, Williams LE, Winso D, Werner JL, Kennedy P, Wiseman C, Gala K, Mckenna RJ, Smith JD, Bouzaglon SA, Callahan RA, Baldeschwieler J, Crossley RJ: *Successful imaging of human cancer with In-III labeled phospholipid vesicles. Cancer* 46:951, 1989
-