

## N-스테아릴락토비온아미드의 합성과 이를 이용한 리포솜의 제조

김중국# · 민미홍 · 민경희 · 나운용 · 이봉진 · 김양배

서울대학교 약학대학 물리약학연구소

(Received March 12, 1992)

## Synthesis of N-Stearyl lactobionamide(N-SLBA) and Preparation of Neo-galactosylated Liposome

Chong-Kook Kim#, Mi-Hong Min, Kyoung-Hee Min, Woon-Ryong Lah,  
Bong-Jin Lee and Yang-Bae Kim

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

**Abstract**—A neoglycolipid, N-stearyl lactobionamide(N-SLBA) was synthesized and the incorporation of the neoglycolipid into liposomes was achieved in order to prepare neo-galactosylated liposome as potential drug carrier for active targeting to galactose receptor existing cell and tissue.

N-SLBA was synthesized by the covalent linkage between carboxyl group of lactobionic acid and amino group of stearylamine(SA). The yield of N-SLBA was about 52.3%. It was identified with  $1650\text{ cm}^{-1}$  in IR chart, 7.5 ppm in NMR spectra,  $61^\circ\text{C}$  endothermic peak in DSC heating curve.

Surface-modified large unilamellar vesicle with galactose(N-SLBA-LUV) could be prepared with N-SLBA by reverse evaporation method. N-SLBA-LUV was identified by TEM and measuring of membrane function. The maximum amount of N-SLBA incorporated into liposome is up to about 15 mol%. Compared with control liposome (SA-LUV), N-SLBA-LUV showed lower encapsulation efficiency of MTX. It might due to the loss of positive surface charge of stearylamine. N-SLBA-LUV was similar to SA-LUV in aspect of osmotic behavior. N-SLBA-LUV prepared with N-SLBA would be expected to be a good carrier for active targeting to galactose receptor existing cell and tissue.

**Keywords** □ Active targeting, galactose receptor, N-SLBA, liposome, membrane function, MTX.

약물수송에 대한 주된 연구과제는 약물을 특정 표적부위로 수송하여 부작용을 줄이고 최대한의 치료 효과를 얻고자 하는 것이다. 리포솜은 생체내 적합성 및 생체내 분해성 물질이라는 점에서 여러 약물의 수송체로서 주목을 받아왔다.<sup>1)</sup> 리포솜을 이용한 표적화 연구에서는 표적 지향성의 잔기의 종류와 표적 잔기를 도입하는 합성방법이 중요한 연구 과제로 되어있다. 일반적으로 사용하는 잔기로는 항원, 항체와 같은 단백질, 당을 포함하고 있는 glycoprotein, glycolipid 등이 있다.<sup>2)</sup> 천연에 존재하는 glycolipid는 분

리가 어려우며 비록 분리된다 하더라도 단지 소량만을 얻을 수 있으므로 수득률이 높은 방법으로 neoglycolipid를 합성할 필요가 있다. 1974년, Ashwell과 Morrell 등<sup>3)</sup>이 말단부위에 galactose잔기가 붙어있는 asialoglycoprotein의 체내 수용체가 hepatocyte에 존재한다고 밝힌 바 있고, hepatocyte<sup>4-10)</sup> 이외에도 kupffer cell<sup>11,12)</sup>과 peritoneal macrophage<sup>13,14)</sup> 등에 galactose에 대한 수용체가 존재한다는 보고가 있다. 따라서, 본 연구에서는 약물을 특정부위로 표적화시키려는 연구의 일환으로서, galactose가 결합된 새로운 glycolipid인 N-stearyl lactobionamide(N-SLBA)를 합성하고 이를 사용하여 galactose로 표면이 수식된

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

리포솜을 제조하고자 하였다.

리포솜의 표면을 당으로 수식하는데 사용하는 neoglycolipid의 일반적인 형태는 다음과 같다.<sup>2)</sup>

### S-R-L

S는 생체내 여러장기나 세포에 특이적으로 작용할 수 있는 saccharide부분이고 R은 당과 리포솜의 구성성분간을 연결시키는 연결고리로서 neoglycolipid의 대사적 안정성 및 당수용체와의 상호작용에 영향을 준다. L은 리포솜막에 삽입되는 지용성부분으로서 리포솜표면에 S를 도입하는데 관능기를 제공한다. S로서 사용하는 당의 종류에 따라 생체내 표적화 부위가 결정되며, 연결고리 R의 탄소사슬길이와 친수성의 정도<sup>15)</sup>에 따라 리포솜 표면으로 당이 노출되는 정도가 달라진다.

본 실험에서는 S로서 galactose를, L로서 stearylamine을 선택하였고, 이들을 연결시키는 R로서 개환된 glucose를 사용하여 사슬의 길이 및 친수성을 조절하고자 하였다. 리포솜 표면으로 당의 노출을 증가시키기 위하여 리포솜에 삽입되는 stearylamine(C<sub>18</sub>)보다 탄소 사슬이 4개 짧은 dimyristoyl phosphatidylcholine(C<sub>14</sub>)이 주성분인 리포솜의 제조방법을 확립하였다. 제조한 리포솜의 형태, 막기능을 측정하여 리포솜을 확인하였으며 항암제인 methotrexate(MTX)를 봉입하여 봉입 효율을 측정하였다.

### 실험방법

**시약**—Dimyristoyl phosphatidylcholine(DMPC), cholesterol(Chol),  $\alpha$ -tocopherol( $\alpha$ -T), stearylamine(SA), lactobionic acid hemicalcium salt는 Sigma Co. LTD. (St. Louis, U.S.A.)에서, amberlite IR-120(plus) ion exchange resin은 Aldrich chemical Co. Inc.(Milwaukee, U.S.A.)에서 구입하였다. methotrexate(MTX)는 중의 제약(Suwon, Korea)에서 공급받은 것으로 실험하였고 그 외 일반시약은 1급 또는 특급 시약을 사용하였다.

**기기**—회전식 감압증류기(EYELA, Tokyo Rikakikai Co. LTD., JAPAN), Vortex type 혼화기(Thermolyne Maxi Mix II type 37600, U.S.A.), 초원심분리기(Beckman L-80, U.S.A.), pH/mV 측정기(Corning Model-7, U.K.), 자외부/가시부 분광광도계(Shi-

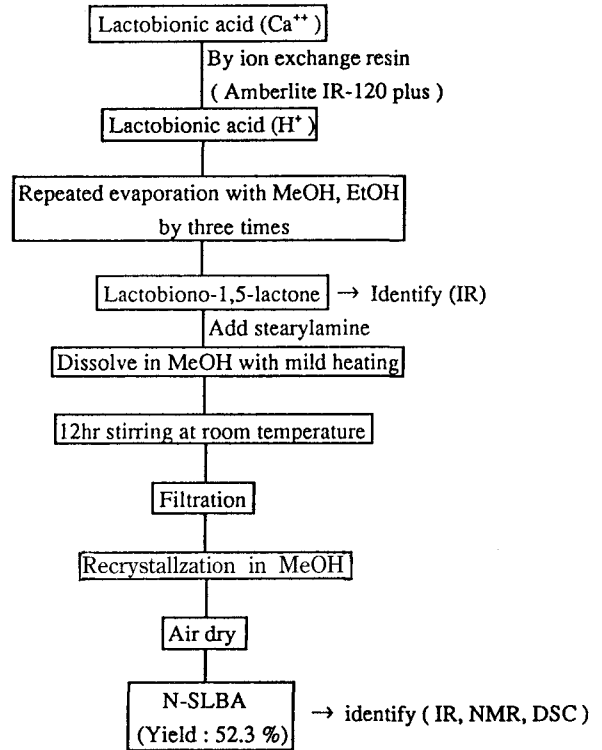


Fig. 1—The schematic diagram of the synthesis of N-SLBA.

madzu, UV-visible recording spectrophotometer UV-2100, JAPAN), DSC(DSC V4, OB DuPont 2000, U.S.A.), 400 MHz <sup>1</sup>H-NMR(JEOL JNM-GSX, JAPAN), FT-IR(Perkin-Elmer Model 1710, U.K.), 투과전자현미경(JEOL JEM-200CX, JAPAN) 등을 사용하여 실험하였다.

### N-stearyl lactobionamide의 합성 및 확인

말단에 galactose잔기를 갖는 N-stearyl lactobionamide(N-SLBA)를 William 등<sup>16,17)</sup>이 보고한 aldonic acid와 fatty acylamine을 공유결합시키는 방법을 변형하여 다음과 같이 합성하였다(Fig. 1).

Lactobionic acid hemicalcium salt는 양이온성 이온교환수지(Amberlite IR-120)를 사용하여 유리산기로 전환시킨 후 pH를 측정하여 유리산 형태임을 확인하였다. 얻은 유리산은 감압증발하여 건조시켰으며 MeOH과 EtOH로 반복 증류하여 겔상태의 lactobiono-1,5-lactone으로 전환시켰다. 중간체로 얻은 lactobionolactone은 IR로 확인하였다.

동일 몰수의 lactobiono-1,5-lactone과 SA를 무수

MeOH에 가온하여 용해시킨 후 상온에서 12시간 교반하면서 반응시켰다. 반응 완료후 생성된 N-SLBA의 침전을 여과하고 MeOH상에서 재결정 하였다. 혹시 남아 있을지도 모르는 SA를 제거하기 위하여 차가운  $\text{CHCl}_3$ 으로 세척한 후 공기중에서 건조시켰다. 합성한 N-SLBA는 DSC(1분당  $10^\circ\text{C}$ 의 가열속도로 출발물질인 SA와 lactobionolactone의 혼합물, 그리고 반응생성물인 N-SLBA의 thermogram을 얻었다.), IR(반응물과 중간체인 lactobionolactone, 생성물인 N-SLBA를 KBr법을 이용하여 IR 스펙트럼을 얻었다.), NMR(N-SLBA를 DMSO- $d_6$ 에 가온 용해시킨후 내부 표준물질로서 tetramethylsilane을 사용하여 chemical shift를 측정)로 확인하였다.

**N-SLBA-LUV의 제조**—Szoka와 Papahadjopoulos가 고안한 Reverse Phase Evaporation Vesicle(REV)<sup>18)</sup>법에 의해 DMPC, Chol, N-SLBA,  $\alpha$ -T의 조성이 8 : 4 : 1 : 0.1인 Large Unilamellar Vesicle(LUV)을 아래와 같이 제조하였다.

50 ml tear-drop-shaped rotary evaporator에 DMPC, Chol,  $\alpha$ -T는  $\text{CHCl}_3$ 에 용해시키고, 이에 MeOH에 가온 용해한 N-SLBA를 가한 후 감압증류하여 얇은 필름막을 형성하였다. 이를  $\text{CHCl}_3$  및 isopropylether가 1 : 2로 혼합한 용액 3 ml에 다시 용해시킨뒤 수상 1 ml를 가하여 vortex하였다. 수상과 유상의 혼합액은  $30^\circ\text{C}$  수욕상에서 30초간 방치하고 1분간 vortex하는 과정을 3번 이상 반복하여 균일한 유탁액으로 만들었다. 유기용매를 증발되어 점액성의 겔상태가 되면 2 ml Tris-HCl 완충액(pH 7.4)을 가한 후 유기용매를 완전히 제거하기 위해 15분간 더 증발하였다. 리포솜의 이중층이 완전히 형성되도록 질소기류중에서 30분간 방치하고나서, 봉입물질의 방출을 막기위해 얼음욕중에서 즉시 냉각하였다. 리포솜 현탁액은 45,000 rpm에서 15분간 여러번 초원심분리하여 비봉입물질과 리포솜을 분리하였고, N-SLBA-LUV pellet을 얻었다. 리포솜 표면에 당이 존재하지 않는 대조 리포솜으로, N-SLBA대신 SA를 사용하여 위와 동일한 방법에 의해 SA-LUV를 제조하였다.

**N-SLBA-LUV의 생성 및 막기능 확인**—N-SLBA-LUV의 형태를 negative stain법<sup>19)</sup>에 의해 투과전자현미경 사진으로 확인하였다. N-SLBA-LUV의 막기능은 Yoshikawa등이 제안한 식<sup>20)</sup>에 근거하여 리포솜 막내외에 glucose 농도의 차이를 주었을때, 삼투압차

에 따른 리포솜의 상태변화로써 측정하였다. 리포솜 막내외의 삼투압차에 따른 리포솜의 부피변화를 450 nm에서의 흡광도를 측정하여  $(1/A)^{3/2}$ 과  $C_{in}/C_{out}$ 을 축으로 그래프를 그렸다. 또한 리포솜에 최대로 삼입시킬 수 있는 N-SLBA의 함량을 결정하기 위하여 N-SLBA의 함량을 7.6 mol%에서 20 mol%까지 변화시키면서 N-SLBA-LUV를 제조하였고 위와 동일한 방법으로하여 리포솜의 막기능을 측정하였다.

**N-SLBA-LUV의 MTX봉입효율 측정**—MTX를 모델약물로하여 N-SLBA-LUV의 봉입효율을 대조리포솜인 SA-LUV와 비교하였다. 수상용액으로 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  MTX 용액을 사용하여 N-SLBA-LUV, SA-LUV (7.6 mol%)를 제조하고, 초원심분리 (45,000 rpm에서 15분)하여 미봉입 MTX를 분리하였다. 원심분리하여 얻은 pellet을 tris-HCl완충액에 재현탁하고 다시 원심분리하는 과정을 반복하여 리포솜 pellet중에 끼인 미봉입 MTX를 분리하였다. 상등액을 취하여 MTX의  $\lambda_{max}$ 인 370 nm에서 흡광도를 측정하여 미봉입 MTX의 양을 결정하였다. 봉입된 MTX의 양은 리포솜 제조시 수상으로 가한 MTX (total drug) 양과 미봉입된 MTX (supernatant drug) 양과의 차이로 봉입효율(%)을 다음과 같이 계산하였다.

Encapsulation efficiency(%)

$$= \frac{\text{Total drug} - \text{Supernatant drug}}{\text{Total drug}} \times 100$$

## 결과 및 고찰

**N-SLBA의 합성**—N-SLBA는 SA의  $\text{NH}_2$ 기와 lactobionic acid의 CO기간의 amide결합에 의해 생성되었다. Lactobionic acid의 COOH기는 반응성이 낮으므로 고반응성의 lactobionolactone을 매개로 반응시켰다. Lactone의 생성은 IR 상에서  $1750\text{ cm}^{-1}$  위치(Fig. 2)로 확인하였으며 COOH의 특징적인 peak인  $1600\text{ cm}^{-1}$ 에서 peak가 나타나지 않는 것으로 보아 거의 대부분이 lactone form으로 존재한다고 생각된다. Lactone form과 SA를 MeOH에 가온 용해시킨후 12시간 반응시켜 여과한 결과 백색의 결정이 얻어졌으며 이를 MeOH상에서 재결정 하였다. 합성된 N-SLBA( $\text{C}_{30}\text{H}_{59}\text{O}_{11}\text{N}$ )의 분자량은 609이고 수득률은 약 52.3%이었다.

합성된 N-SLBA의 DSC가열곡선에서 SA의 endo-

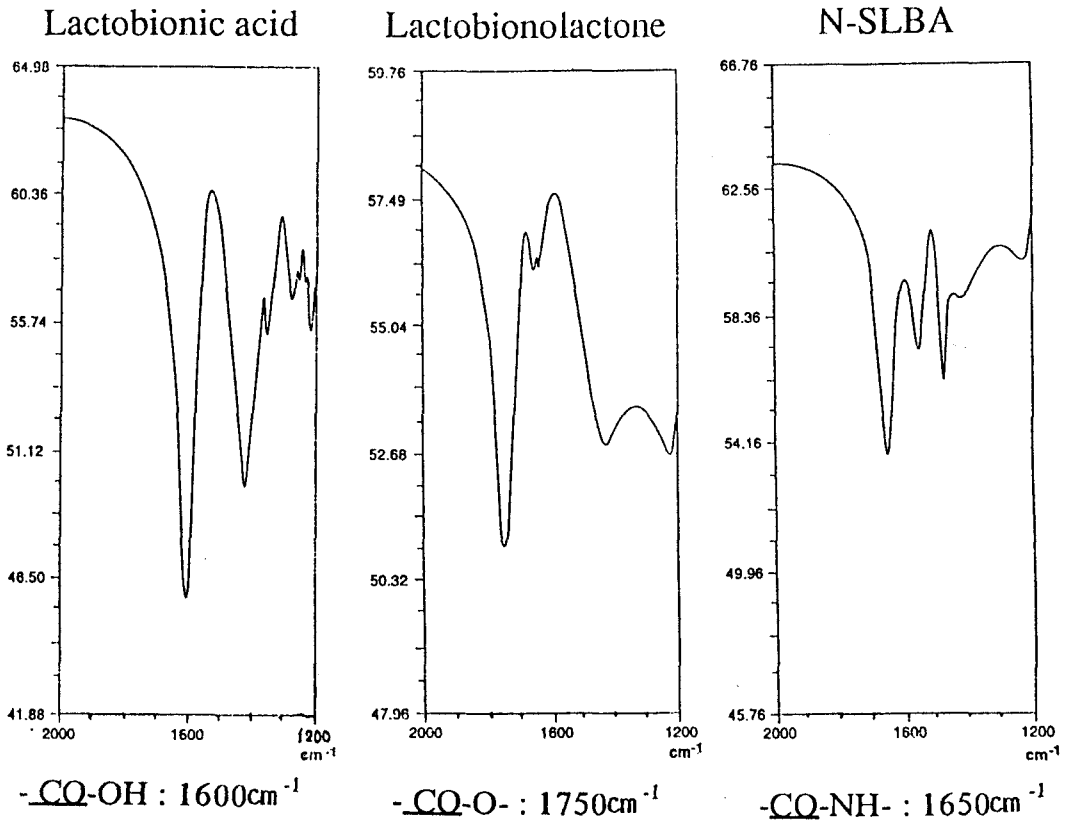
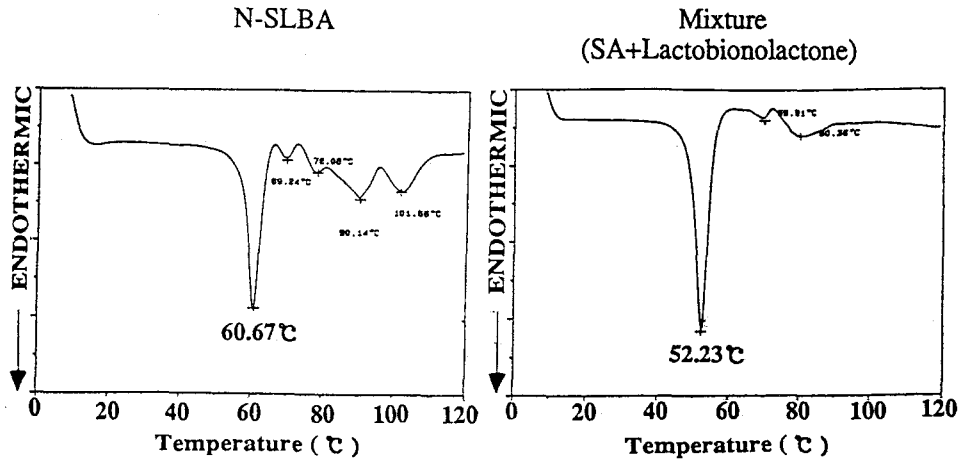


Fig. 2—The identification of N-SLBA by IR (KBr method).



Reference : blank pan  
 Heating rate : 10°C / min

Fig. 3—The identification of N-SLBA by DSC.

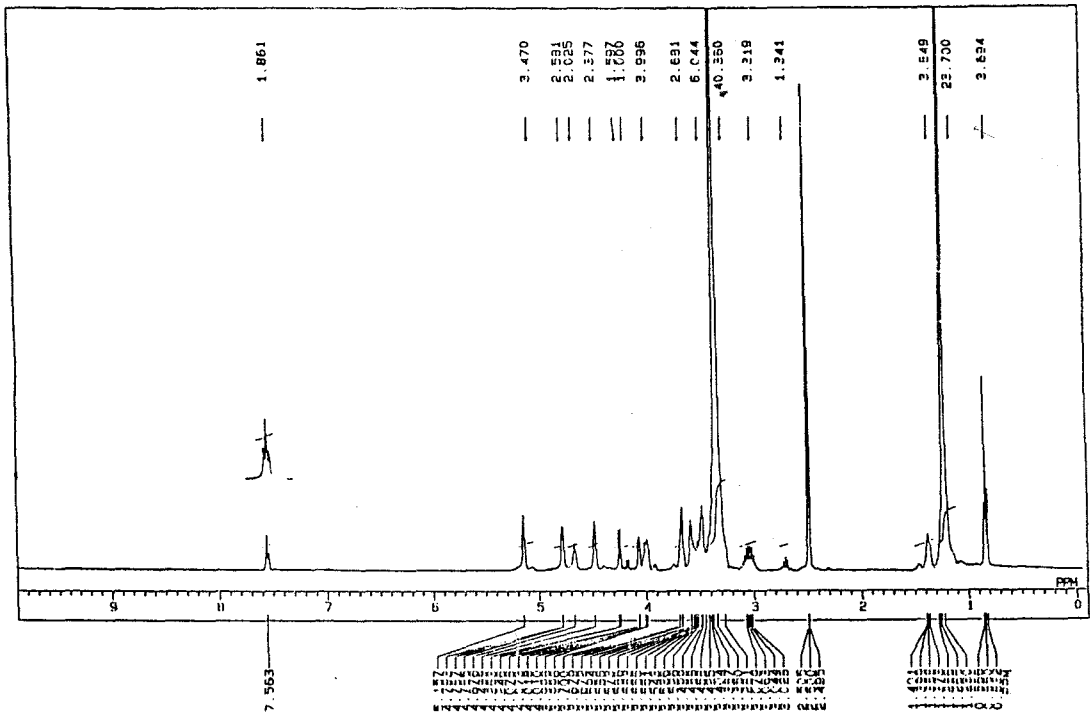


Fig. 4—The identification of N-SLBA by <sup>1</sup>H-NMR.

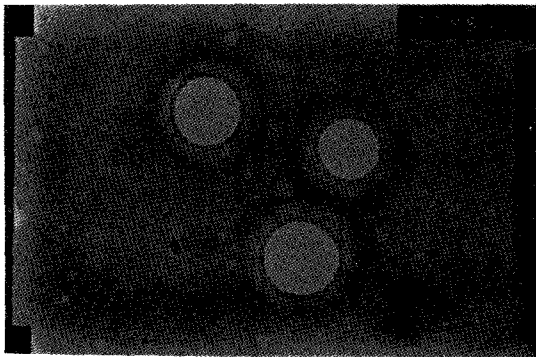


Fig. 5—Transmittance electron micrograph of N-SLBA-LUV by negative staining method. (Magnification 20×1000).

therm peak의 위치가 52°C→61°C로 이동(Fig. 3)하였으며 52°C에서는 특정 peak가 보이지 않는 것으로 보아 SA와는 다른 새로운 물질이 생성되었음을 알 수 있었다. N-SLBA는 amide 결합에 의해 생성되므로, IR과 NMR을 찍어 amide 결합을 확인하였다. IR에서는 1650 cm<sup>-1</sup>에서 나타난 특징적인 C=O peak로서, NMR에서는 7.5 ppm에서 나타난 weak triplet

(Fig. 4)으로 확인하였으며 이들은 문헌과 일치하는 결과를 나타내었다.

N-SLBA-LUV의 생성 및 막기능 확인—제조된 N-SLBA-LUV를 negative stain법에 의해 TEM사진을 찍어본 결과 약 0.8 μm, 0.85 μm, 0.9 μm의 크기의 정형화된 리포솜을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 또한 리포솜 막내외에 glucose농도에 따른 삼투압차를 주면 리포솜 내수상이 팽창 혹은 수축하게 되어 리포솜의 부피변화가 일어나게 된다. 리포솜의 부피변화는 Yoshikawa등이 유도한 식<sup>20)</sup>에 따라 자외부 영역에서의 흡광도로 쉽게 측정할 수 있다.

$$(1/A)^{3/2} = 1/k[V_{act}(C_{in}/C_{out}) + V_{dead}]$$

이 식에서 A는 흡광도를 표시하며 V<sub>act</sub>와 V<sub>dead</sub>는 각각 리포솜에서 삼투압에 영향을 받을 수 있는 부분의 용적과 삼투압에 전혀 영향을 받지 않는 부분의 용적, C<sub>in</sub>/C<sub>out</sub>은 리포솜의 내부와 외부에 존재하는 용질의 농도비이고, k는 비례상수이다.

본 실험의 경우 LUV이지만 400 Å 이상의 크기를 갖는 single lamellar vesicle도 삼투압에 민감히 반

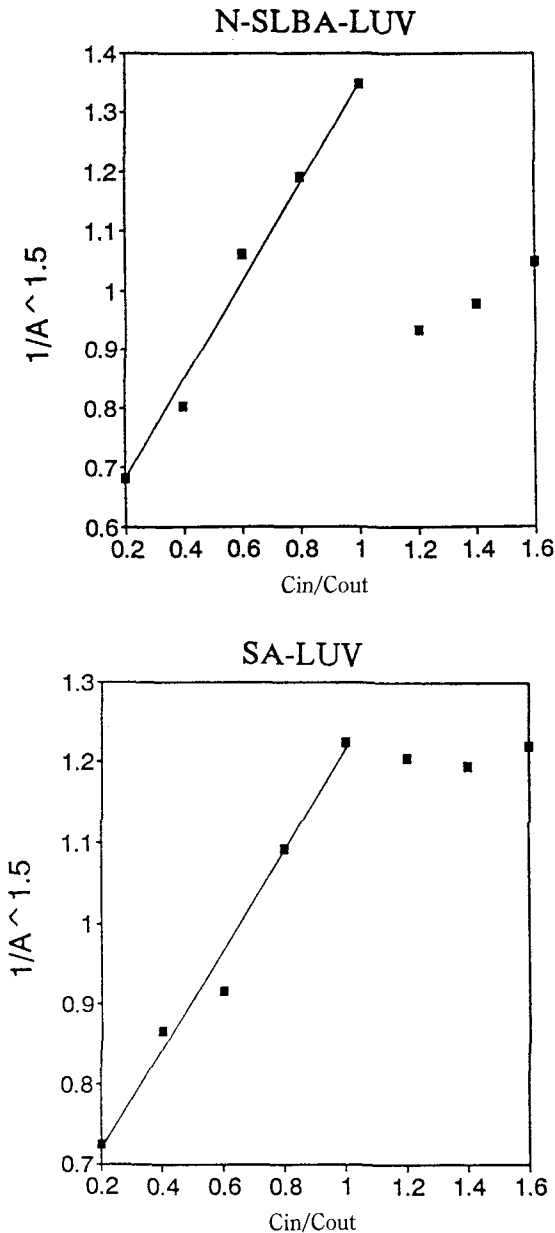


Fig. 6—The comparison of N-SLBA-LUV with SA-LUV: Membrane function of liposome with 7.6 mol% N-SLBA or SA.

응할 수 있다는 보고<sup>21)</sup>에 따라, Yoshikawa의 산란식에 근거하여 UV로 혼탁도를 측정함으로써 막기능 여부를 살펴보았다.  $(1/A)^{3/2}$ 과  $C_{in}/C_{out}$ 을 축으로 하여 그래프를 그렸을 때 1차직선을 나타낸다면 윗식에 따라 리포솜이 막기능을 수행하고 있음을 알 수 있다.

N-SLBA-LUV, SA-LUV 모두  $C_{in}/C_{out}$ 이 1.0까지 직선성을 나타내며 1.0 이후에 막기능이 상실되는 것으로 보아(Fig. 6), 고장액에서는 막기능을 가지는 리포솜으로 존재하는 반면 저장액에서는 당의 존재에 무관하게 팽창에 의한 내압을 이기지 못하고 리포솜이 깨져버리는 것을 알 수 있다. 이는 단일막인 LUV가 삼투압에 대해 민감하게 작용하기 때문인 것으로 생각된다.

N-SLBA의 함량을 달리하여 리포솜을 제조한뒤 이에 Yoshikawa의 산란식을 적용함으로써 막기능의 존재여부를 확인하였다. N-SLBA-LUV의 막기능이 존재할 수 있는 N-SLBA의 최고함량을 리포솜에 최대로 삼입시킬 수 있는 N-SLBA 양으로 가정하였다. 7.6 mol%, 10 mol%, 15 mol%의 N-SLBA를 함유하는 LUV에서는  $C_{in}/C_{out}=1.0$ 까지 거의 직선성을 나타내며 20 mol%의 N-SLBA를 함유하는 LUV에서는 직선성이 깨어지는 것으로보아(Fig. 7) 약 15 mol%까지의 N-SLBA를 리포솜에 삼입하여 당으로 표면이 수식된 리포솜을 제조할 수 있는 것으로 생각되었다.

**N-SLBA-LUV의 MTX붕입효율 측정**—N-SLBA-LUV와 SA-LUV에 붕입물질로서 methotrexate(MTX)를 사용하여 붕입효율을 비교하여 보았을때 SA-LUV의 경우가 N-SLBA-LUV보다 붕입효율이 약 2.4 배 높았다. 이의 원인으로는 pKa가 4.8, 5.5인 MTX가 사용한 완충액의 pH 7.4에서 음전하를 띠게되므로 표면이 양전하를 띠는 SA-LUV의 표면에 정전기력에 의해 결합될 수 있기 때문이라고 생각하였다. 반면에 N-SLBA-LUV의 경우 SA에 당이 결합되어 표면에 존재하는 SA의 양성전하가 상실하게되므로 SA-LUV보다 MTX의 붕입효율이 낮아질 수 있다.

## 결 론

본 연구에서는 약물의 능동적인 표적화 연구의 일환으로 galactose로 표면이 수식된 리포솜을 제조하고자, neoglycolipid로서 galactose잔기를 갖는 N-SLBA를 합성하였고 이를 이용하여 REV법에 의하여 N-SLBA-LUV를 제조하였다.

1. SA의 amine기와 lactobionic acid의 carboxyl기 간의 공유결합에 의해 N-SLBA를 합성하였으며 그 수득률은 약 52.3%이었다. 합성된 N-SLBA의 amide 결합은 DSC상에서는 61°C의 특유한 흡열 peak로,

IR에서는  $1650\text{ cm}^{-1}$ 에서, NMR에서는 7.5 ppm의 weak triplet으로 각각 확인하였다.

2. N-SLBA를 이용하여 표면이 당으로 수식된 DMPC리포솜을 제조할 수 있었다. 제조된 리포솜의 생성여부는 TEM사진과 막기능 여부를 측정하여 확인하였다. 투과전자현미경에 의해 약  $0.8\sim 0.9\ \mu\text{m}$  크기의 구형형태를 가지는 리포솜을 확인하였으며, Yoshikawa의 산란식을 적용한 결과,  $1/A^{1.5}$ 와  $C_{in}/C_{out}$  사이에 직선관계가 성립하는 것으로 보아 N-SLBA-LUV에 막기능이 존재함을 알 수 있었다. 또한 막기능을 유지한 상태에서 리포솜에 최대도 삽입할 수 있는 N-SLBA의 양은 리포솜 구성성분의 약 15 mol %까지인 것으로 밝혀졌다.

3. 제조된 N-SLBA-LUV를 대조리포솜과 비교한 결과 유사한 막기능을 나타내었으나, MTX를 모델약물로서 봉입하였을 때 약 2.4배 봉입효율이 낮아졌다. 이는 N-SLBA-LUV의 표면의 양성전하가 SA에 당이 결합됨에 의해 상실되었기 때문이라 생각되었다.

본 연구에서 제조한 galactose로 표면이 수식된 N-SLBA-LUV는 galactose에 대한 수용체가 존재한다고 알려진 hepatocyte, kupffer cell, peritoneal macrophage 등으로의 표적화에 유용한 약물수송체로 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 이는 galactose 수용체가 존재하는 세포 및 조직에 대한 표적성 연구를 통하여 확인할 필요가 있으므로 본 연구실에서는 이에 대한 연구를 현재 진행중에 있다.

### 감사의 말씀

이 논문은 한국과학재단의 목적기초연구비(KOSEF 90-0300-06)로 수행된 것으로 동 재단에 감사드립니다.

### 문 헌

- 1) Gregoriadis, G.: Review Article: Targeting of drugs. *Nature*, **265**, 407-411 (1977).
- 2) Gregoriadis, G.(Ed): Targeted drug delivery and biological interaction. *Liposome Technology Vol. III*, CRC Press, Inc., pp.95-126 (1984).
- 3) Ashwell, G. and Morrel, A.G.: The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. *Adv. Enzymol.*, **41**, 99-128 (1974).
- 4) Hara, T., Ishihara, H., Aramaki, Y. and Tsushiya, S.: Specific uptake of asialofetuin-labeled liposomes by isolated hepatocytes. *Int. J. Pharm.*, **42**, 69-75 (1988).
- 5) Ghosh, P. and Bachhawat, B.K.: Grafting of different glycosides on the surface of liposomes and its effect on the tissue distribution of  $^{125}\text{I}$ -labelled  $\gamma$ -globulin encapsulated in liposomes. *B.B.A.*, **632**, 562-572 (1980).
- 6) Ishihara, H., Hara, T., Aramaki, Y., Tsuchiya, S. and Hosoi, K.: Preparation of asialofetuin-labeled liposomes with encapsulated human interferon- $\gamma$  and their uptake by isolated rat hepatocytes. *Pharm. Res.*, **7**(5), 542-546 (1990).
- 7) Kiwada, H., Nimura, H., Fujisaki, Y., Yamada, S. and Kato, Y.: Tissue distribution and pharmacokinetic evaluation of the targeting efficiency of synthetic alkyl glycoside vesicles. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**(6), 2475-2482 (1985).
- 8) Roerdink, F., Regts, J., van Leeuwen, B. and Scherphof, G.: Intrahepatic uptake and processing of intravenously injected small unilamellar phospholipid vesicles in rats. *B.B.A.*, **770**, 195-202 (1984).
- 9) Spanjer, H.H. and Scherphof, G.L.: Targeting of lactosylceramide-containing liposomes to hepatocytes *in vivo*. *B.B.A.*, **734**, 40-47 (1983).
- 10) Fallon, R.J. and Schwartz, A.L.: Receptor-mediated delivery of drugs to hepatocytes. *Advanced Drug Delivery Reviews* **4**, 49-63 (1989).
- 11) Dijkstra, J., Van Galen, M., Regts, D. and Scherphof, G.: Uptake and processing of liposomal phospholipids by kupffer cells *in vitro*. *Eur. J. Biochem.*, **148**, 391-397 (1985).
- 12) Teradaira, R., Kolob-Bachlofen, V., Schlepper-Schafer, J. and Kolb, H.: Galactose-particle receptor on liver macrophages. *B.B.A.*, **759**, 306-310 (1983).
- 13) Kelm, S. and Schauer, R.: The galactose-recognizing system of rat peritoneal macrophages. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **367**, 989-998 (1986).
- 14) Kawasaki, T., Ii, M., Kozutsumi, Y. and Yamashina, I.: Isolation and characterization of a receptor lec-

- tin specific for galactose/ N-acetylgalactosamine from macrophages. *Carbohydrate Research*, **151**, 197-206 (1986).
- 15) Slama, J. S. and Rando, R.R.: Lectin-mediated aggregation of liposomes containing glycolipids with variable hydrophilic spacer arms. *Biochemistry*, **19**, 4594-4600 (1980).
- 16) Williams, T.J., Rlessas, N.R. and Goldstein, I.J.: A new class of model glycolipids: synthesis, characterization and interaction with lectins. *Arch. Biochem. Biophysic.*, **195**(1), 145-151 (1979).
- 17) Williams, T.J., Rlessas, N.R. and Goldstein, I.J.: Synthesis of a new class of model glycolipids. *Carbohydrate Research*, **67**, C1-C3 (1978).
- 18) Szoka Jr., F. and Papahadjopoulos, D.: Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse phase evaporation. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **75**(9), 4194-4198 (1978).
- 19) Makoto, H., Shinya, S. and Hiroshi, I.: Drug Sensor: Liposome immunosensor for theophylline. *Anal. Biochem.*, **118**, 286-293 (1985).
- 20) Yoshikawa, W., Akutsu, H. and Kyokoku, Y.: Light-scattering properties of osmotically active liposomes. *B.B.A.*, **735**, 397-406 (1983).
- 21) Lichtenberg, D., Freire, E., Schmidt, C.F., Barenholz, Y., Felgner, P.L. and Thompson, T.E.: Effect of dipalmitoyl phosphatidylcholine single lamellar vesicles. *Biochemistry*, **21**, 3462-3467 (1981).