

## 동결 건조된 리포솜의 안정화에 있어서 말토스의 영향

김윤아 · 한희동 · 신병철\*  
한국화학연구원 나노생체재료연구팀  
(2004. 9. 18 접수)

### Effects of Maltose on the Stability of Freeze-Dried Liposomes

Yun A Kim, Hee Dong Han and Byung Cheol Shin\*

Nanobiomaterials Laboratory, Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 305-606, Korea  
(Received September 18, 2004)

**요 약.** 약물 수송체로 사용되는 리포솜은 동결 건조를 통하여 분말화 시키는 방법이 사용되어지고 있다. 리포솜 안정제로서 말토스는 동결건조된 리포솜 분말의 안정성을 향상시키고 약물 봉입률에 영향을 주는 것으로 알려져 왔다. 동결건조 전과 후의 리포솜 입자의 크기를 측정함으로써 리포솜의 안정성을 평가하였고 또한, 약물 봉입률은 모델 약물인 칼세인을 사용하여 조건에 따른 봉입양을 측정하였다. 리포솜 제조 후에 말토스를 첨가한 리포솜은 수화하는 과정에서 말토스를 첨가하여 제조한 리포솜보다 훨씬 더 안정한 것으로 확인되었다. 말토스를 첨가하지 않은 리포솜은 시간이 지남에 따라 입자의 크기가 커지는 반면, 리포솜 제조 후에 말토스를 첨가한 리포솜은 4~37°C에서 30일 동안 안정하다. 또한, 말토스/지질의 몰농도 비가 3과 6일때 상대적으로 가장 높은 안정성을 보였다.

**주제어:** 리포솜, 분말, 동결건조, 안정성, 칼세인, 말토스

**ABSTRACT.** Liposome powders were prepared by a freeze-drying method for the application to the field of drug carrier. The effect of maltose as a liposome stabilizer was studied on the stability and the drug-loading efficiency of the freeze-dried liposome powders. The particle size of liposomes before and after freeze-drying was determined to evaluate the liposome stability. The drug-loading efficiency was measured by Fluorescence spectrophotometer using calcein as a model drug. When maltose was added after the preparation of the liposomes, the liposomes was stable, compared to the case of maltose addition at the hydration procedure. By the addition of maltose, the liposome was stable for 30 days at 4~37°C, while the particle size of the liposome without maltose increased with time. The liposome showed relatively high stability when the maltose/lipids molar ratio was 3 and 6.

**Keywords:** Liposome, Powder, Freeze-dry, Stability, Calcein, Maltose

### 서 론

리포솜은 제조가 쉽고 생체막과 상용성이 있으며 생분해성과 안정성이 우수한 장점 때문에 생체막 연구의 모델로 사용되고 있다. 또한, 리포솜에 약물을 봉입함으로써 약물의 독성을 줄일 수 있고 치료 효과를 향상시킬 수 있는 약물 수송체로 널리 알려져 있

다.<sup>1,2</sup> 의학 분야에서 진단, 화학 치료법, 암 치료법, 면역학적 치료법 및 유전자 치료법 등 다양한 분야에서 리포솜 활용 및 응용 시도에 관한 많은 예를 찾아볼 수 있으며,<sup>3</sup> 화장품 연구 분야로는 리포솜 내에 미용 활성 성분들을 봉입하여 보습 및 피부보호 효과를 지속시키고 필요한 미용성분을 피부에 도포함으로써 건강한 피부유지 등에 대한 연구가 이루어지고 있다.<sup>4,5</sup>

리포솜은 생체막 성분인 인지질이 주요성분이기 때문에 인체에 대한 안전성에 대해서는 큰 문제가 없으나 제형으로서의 안정성에 대해 물리적, 화학적으로 많은 문제점이 있다. 물리적인 측면에서 살펴보면, 리포솜이 물리적으로 불안정하면 리포솜 내부에 봉입된 친수성 약물의 누출이 생기게 된다. 막 이중층의 물리적 안정성에 영향을 미치는 요인으로 막을 구성하는 지질의 종류, 성분 및 조성, 삽입된 약물의 종류 등이 있으며, 제조방법, 저장온도, 수용액의 pH에 따라 막의 안정성이 변하게 된다<sup>6</sup>. 화학적인 요인으로는, 리포솜 막을 구성하는 불포화 지질의 산화 및 가수분해 그리고 봉입된 약물의 누출 등으로 안정성의 문제가 생긴다. 특히, 불포화된 대두 포스파티딜 콜린 (Phosphatidyl Choline, PC)으로 제조된 리포솜은 저장 기간 동안에 화학적 변화, 특히 자동산화과정을 일으킬 수 있는 화학적 불안정성 문제점을 가지고 있다. 그리고, 인지질은 정제가 까다롭고 자연산으로 공급이 부족하다. 또한, 저장 및 제조 과정 중 변질될 수도 있다.

리포솜의 물리 및 화학적 불안정성은 리포솜의 제조 및 저장과정에 변질을 일으킬 수 있으므로 리포솜을 분말화하여 저장 안정성을 향상시키는 연구가 활발히 진행되어 왔다. Crowe *et al.*은 트레할로스 같은 이당류를 리포솜 용액에 첨가하여 동결 건조 하였을 때, 건조된 지질의 상전이온도를 저하시켜 리포솜의 융합, 응집 및 상분리를 억제하여 리포솜이 안정화하는 것으로 발표하였다<sup>7</sup>.

본 연구에서는 리포솜 안정제로서 말토스를 사용하여 이의 첨가 방법 및 농도에 따른 입자크기의 변화를 관찰하여 동결건조에 의한 안정성을 평가하였다. 또한 보관 온도 및 시간에 따른 입자크기의 변화를 조사하였고 모델 약물로서 칼세인을 사용하여 리포솜 안정제가 약물의 봉입률에 미치는 영향을 조사하였다.

### 실험방법

#### 시약 및 기기

시약. 리포솜을 제조하기 위해 사용된 시약으로서 지질의 주성분인 1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine(DPPC), L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine(soy-Hydrogenated)(HSPC), Cholesterol(CHOL)은 Avanti Polar

Lipids Inc.(Alabaster, AL, USA)에서 구입하여 사용하였다. 모델 약물은 형광물질인 칼세인과 동결건조 전과 후에 리포솜 입자의 안정성을 향상시키기 위하여 사용된 말토스는 Sigma-Aldrich 사(Louis, MO, USA)에서 각각 구입하여 사용하였고, 에탄올과 클로로포름 등의 용매는 모두 일급 또는 특급 시약을 사용하였다.

기기. 리포솜 제조시에 사용된 기기로는 가압 압출기(Extruder, Northern Lipids Inc.), 회전증발농축기(Rotary evaporator, Buchi Rotavapor R-200, Switzerland), 초음파 발생기(Ultrasonicator, Model 500, Fisher Scientific, Hampton, Kentucky, USA)를 사용하였고, 제조되어진 리포솜의 크기, 약물정제 및 약물 방출 농도는 광산란 장치(Electrophoretic light scattering spectrophotometer ELS-8000, OTUSKA Electronics Inc, Osaka, Japan), 투석 막 장치(Dialysis, MWCO 1,000, Viskase Inc. Chicago, Illinois, USA), 밀리카보네이트 막(Millipore Inc, County Cork, Ireland), 형광 분광 광도계(Fluorescence spectrophotometer, Tvon-Spex, Instruments. S.A, Inc)를 사용하여 측정하였다. 리포솜 입자의 동결을 위해 냉동고(deep-freezer, DF8514, Ilshin Lab, Korea)를 사용하였고 리포솜 분말화는 동결 건조기(Freeze-drying, FD5505S, Ilshin Lab, Korea)를 사용하였다.

#### 리포솜 입자의 제조

말토스가 첨가되지 않은 대조군 리포솜과 말토스가 첨가된 리포솜은 자발적인 자기조립법에 의하여 다음과 같은 과정을 통하여 제조하였다<sup>8</sup>. 대조군 리포솜과 말토스가 첨가된 리포솜은 지질의 양을 10 mM로 고정하여 DPPC:HSPC:CHOL을 100:50:30의 조성비로 제조하였고 30 mM 농도의 말토스를 사용하였다(Fig. 1). 대조군 리포솜의 경우, 인지질 68.5 mg을 정밀히 달아 클로로포름 5 ml에 용해시킨 후 회전증발농축기를 사용하여 상전이온도(41°C) 이상을 유지하면서 감압증류하여 둥근 플라스크벽에 얇은 지질막을 만들고, 진공상태에서 24h 건조시켜 둥근 플라스크내에 잔류하는 클로로포름을 완전히 제거한다. 그 후 10 mM 칼세인 10 ml로 지질막이 완전히 분산될 때까지 수화시킨 다음, 2분 간격으로 10분간 교반하여 리포솜을 제조하였다. 수화를 마친 후, freeze-thaw 과정을 각각 -16°C와 55°C에서 7번 반복하여 실시하였다. 이 용액을 초음파 발생기의 팁 부분이 1/2정도 잠기게 고정된 다음 4°C 이하를 유지하면서

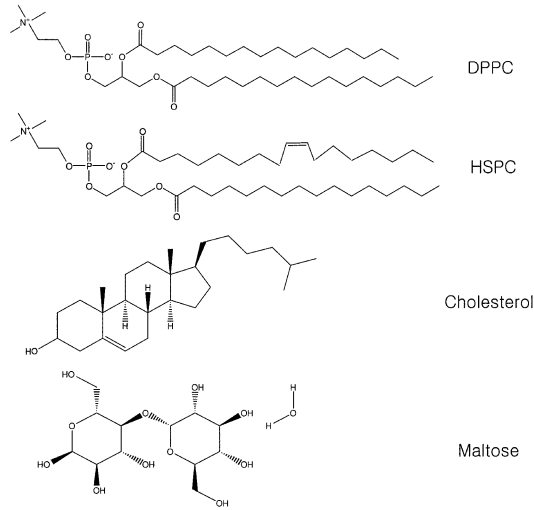


Fig. 1. Molecular structures of the lipid and additive used in this study.

5분간 초음파를 실시하였다. 리포솜 입자는 가압 압출기를 사용하여 100 nm 폴리카보네이트 막을 통과시킨 후 획득하였다. 리포솜 내부에 칼세인이 함유된 리포솜 용액은 4°C에서 2주 동안 막 부식을 실시하여 획득하였다. 이렇게 획득된 리포솜 용액에 말토스를 첨가하여 말토스가 첨가된 리포솜 용액을 제조하였다.

#### 동결건조에 따른 입자크기 측정

동결건조에 따른 리포솜 입자의 크기 변화를 알아보기 위해 대조군 리포솜 용액 (1 ml)과 리포솜 용액 (1 ml)을 30 mM의 말토스 (1 ml)와 혼합한 혼합용액을 각각 냉동 창고에서 -77°C의 온도에서 12시간 동안 동결 후 동결건조기에서 -45°C의 온도와 5 Pa의 압력을 유지하면서 24시간 동안 건조하였다. 건조된 시료에 처음의 2 ml의 3차 증류수를 첨가하여 재분산하여 25°C에서 각각의 동결건조 전과 후의 입자크기 변화를 광산란 장치를 이용하여 측정하였다.

#### 리포솜의 안정성 측정

동결건조 전에 첨가한 말토스 대한 리포솜 분말의 안정성은 10 mM 리포솜 용액 1 ml에 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 mM의 말토스를 각각 1 ml씩 첨가하여 25°C에서 리포솜의 동결건조 전과 후의 입자의 크기 변화를 관찰하여 평가하였다. 또한 대조군 리포솜에 30 mM의 말토스를 첨가하여 30일 동안 4, 25, 37°C의 온도에서 보관하면서 말토스가 첨가되지 않은 리

포솜과 말토스가 첨가된 리포솜의 동결건조 전과 후의 입자크기 변화를 측정하여 리포솜 입자의 안정성을 평가하였다.

#### 리포솜 입자에 함유된 약물의 봉입률 측정

리포솜 입자에 함유된 칼세인의 봉입률은 형광분광광도계를 이용하여 측정하였다. 동결건조 전과 후의 리포솜 입자의 형광강도는 25°C에서 약물의 방출파장 520 nm, 흡수파장 490 nm에서 측정하였으며 다음의 식 (1)에 의하여 약물의 봉입률을 계산하였다. 이때,  $M_{drug}^b$ 와  $M_{drug}^a$ 는 각각 동결건조 전과 후의 약물과 말토스가 들어있는 리포솜 용액의 약물의 양이고,  $M_{DPPC}^b$ 와  $M_{DPPC}^a$ 는 각각 동결건조 전과 후의 리포솜 안에 들어있는 DPPC의 양으로 4°C에서 2주 동안 막 부식을 실시하여 획득한 리포솜 내부에 칼세인이 함유된 리포솜 용액으로 여기에 2% Triton X-100의 용액을 첨가하여 리포솜을 완전히 파괴한 후의 형광강도 값이다<sup>9,11</sup>.

$$Loading\ Efficiency(\%) = \frac{M_{drug}^b M_{DPPC}^a}{M_{DPPC}^b M_{drug}^a} \times 100 \quad (1)$$

## 결과 및 고찰

#### 동결 건조에 따른 입자크기의 변화

동결 건조 후 재분산시 리포솜 입자간의 응집이 일어나면서 입자의 크기가 커지게 된다<sup>14</sup>. 동결 건조시 응집 방지제로 알려져 있는 사카라이드 계열의 일종인 말토스를 첨가하여 동결 건조 전과 후의 리포솜 입자크기에 미치는 말토스의 영향에 대해서 알아보았다.

Fig. 2는 대조시료로서 말토스를 첨가하지 않은 리포솜수용액 (A), 수화과정에서 말토스를 첨가하여 만든 리포솜 수용액(B) 그리고 리포솜 제조 후 말토스를 첨가한 리포솜 수용액 (C)의 동결 건조 전과 후의 입자크기 변화를 나타낸 것이다. 말토스를 첨가하지 않은 리포솜 (A) 입자의 크기는 약 121 nm이었으며, 동결 건조 후 재분산시 입자의 크기는 약 490 nm였다. 또한 리포솜을 제조하는 수화과정에서 말토스를 첨가한 경우 (B)에는 약 107 nm로 동결 건조 후 입자의 크기보다 2.071 nm로 약 19배 정도 증가하였다. 그러나 리포솜 제조 후 말토스를 첨가한 경우 (C)에는 약 101 nm, 동결 건조 후 재분산시 입자의 크기는 103 nm로 거의 변화가 없는 것으로 확인되었다. 결과적으

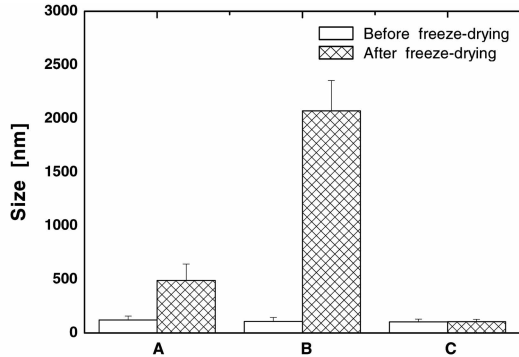


Fig. 2. The changes of particle size of liposomes by the addition of maltose before/after freeze-drying. A, control liposomes; B, liposomes prepared by the addition of maltose at the hydration procedure; C, liposomes prepared by the addition of maltose after the liposome formation.

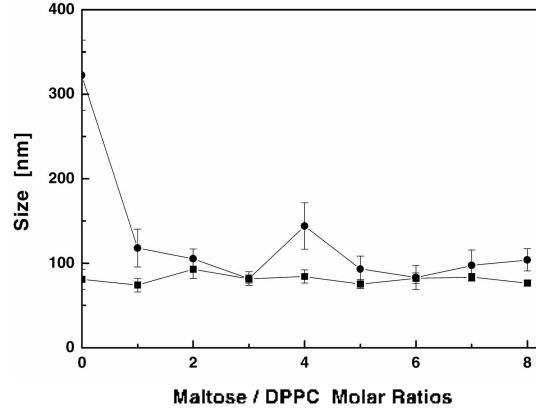


Fig. 3. The effect of maltose/DPPC molar ratio on the changes of particle size of liposomes before (-■-) and after (-●-) freeze-drying.

로 리포솜 제조 후 말토스를 첨가한 경우 (C)는 리포솜을 제조하는 과정에서 말토스를 첨가하여 제조한 리포솜 (B)이나 대조군 리포솜 (A)보다 동결 건조 후 재분산시 입자의 크기가 거의 변화가 없었다. 말토스를 첨가하여 리포솜 (B)을 제조하였을 경우, 동결 건조 후 입자의 크기가 약 19배정도 증가하는 이유는 말토스의 -C(H)-, -C(H)- 그룹들이 약한 소수성을 나타내면서 물의 친수성 부분과 반발작용을 하고, 인지질의 소수성기가 친수성기보다 결합력이 강하기 때문에 말토스와 소수성 결합을 하여 리포솜 형성시 인지질 막이 두껍게 형성되어 리포솜 입자간의 응집이나 유착 등이 발생한다<sup>12</sup>. 그러나, 리포솜 제조 후에 말토스를 첨가한 경우 (C), 동결 건조 전과 후에 리포솜 입자 크기의 변화가 없는 이유는 리포솜의 입자 형성이 이미 이루어진 상태에서 말토스를 첨가하는 경우로 인지질의 소수성기보다는 친수성의 결합이 강화된다. 동결 건조 전에는 말토스의 -OH-그룹들과 물간의 수소 결합으로, 불과 리포솜 입자들 사이에서 수화되어 있는 상태로 존재하게 된다. 또한, 동결 건조 후 재분산할 경우에는 리포솜의 분산 속도보다 말토스의 용해 속도가 더 빨라 동결 건조 전의 상태로 빠르게 돌아감으로써 입자의 크기를 안정하게 유지시켜 주는 역할을 수행한다. 결과적으로 리포솜 제조 후 말토스를 첨가하여 (C) 동결 건조 후 재분산 하였을 경우, 리포솜 입자의 크기 변화가 없다는 것을 확인하였다.

**말토스 농도에 따른 리포솜의 안정성**

Fig. 3에는 동결 건조 전과 후의 말토스 / 리포솜의

농도 비에 따른 리포솜 입자의 크기 변화를 나타내었다. 리포솜 제조 후 말토스의 농도를 10~80 mM로 첨가하여 동결 건조 전과 후의 입자크기의 변화를 나타내었다. 대조군 리포솜의 경우 80 nm에서 330 nm로 약 4배 증가한 반면, 리포솜에 말토스를 첨가하였을 경우에는 말토스의 농도가 증가할수록 80~150 nm사이로 거의 일정하였으며 말토스의 농도가 30 mM과 60 mM일때 동결 건조 전과 후의 값이 거의 비슷하게 나온 것으로 보아 가장 안정하다고 사료된다. 동결 건조하는 동안 응집방지제로 말토스, 글루코오스 및 말토트리오스를 첨가하여 리포솜 입자의 안정성을 향상시킨 Suzuki *et al.*<sup>13</sup>의 보고에 의하면, 응집방지제를 인지질 농도의 120배 정도 첨가하여 리포솜을 제조하여 동결 건조 하였을 경우 리포솜 입자의 크기가 거의 변화가 없었다. 그러나 응집방지제를 과량으로 첨가하게 되면 약물의 봉입률 유지에 유리하지만, 동결 건조 후 재분산시 리포솜을 과도하게 안정화 시켜 일정시간 후의 방출을 유도하기에는 무리가 있고 고농도의 리포솜을 얻을수 없는 문제가 있다. Fig. 3에서 볼 수 있듯이, 리포솜 용액에 말토스의 양을 리포솜의 약 3 배와 6 배로 소량으로 첨가하였을 경우, 동결 건조 전과 후의 입자의 크기가 약 80 nm 이내로 거의 변화가 없었다. 결과적으로, 소량의 응집방지제를 사용하더라도 동결 건조 후 재분산시 안정한 상태를 유지할수 있었으며 이 방법은 Suzuki *et al.*에서 사용한 방법보다 20배정도의 고농축 리포솜을 얻을 수 있다고 사료된다.

### 온도에 따른 리포솜의 안정성

Fig. 4는 온도 변화에 대한 리포솜의 안정성을 관찰하기 위하여 온도를 4°C, 25°C 및 37°C에서 각각 30일 동안 항온 보관 후 입자크기의 변화를 나타내었다. 말토스의 농도를 30 mM로 고정하여 리포솜 용액에 첨가하고 동결 건조 전과 후의 입자크기를 비교하였다. 4°C, 25°C 및 37°C에서 동결 건조 전에는 말토스를 첨가한 리포솜의 경우에는 입자크기의 변화가 관찰되지 않았다 (b). 그러나, 대조군 리포솜의 경우 동결 건조 전과 후의 입자크기 변화를 볼 때 4°C와 25°C의 경우, 입자의 크기가 80 nm에서 600 nm로 약 7~8 배 증가할 반면, 37°C의 경우에는 약 10 배 정도 증가한 것을 관찰할 수 있었다 (a). 37°C의 경우에 4°C와 25°C와는 다르게 입자의 크기가 증가하는 이유는 높은 온도에서 리포솜의 불안정한 구조상의 특성

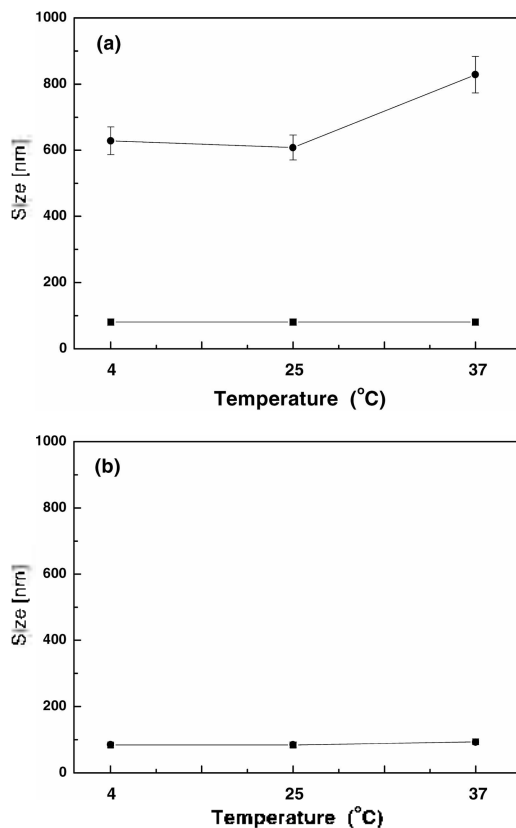


Fig. 4. The changes of particle size of the liposome before (-■-) and after (-●-) freeze-drying when incubated for 30 days at different temperatures. (a), without maltose; (b), with 30 mM maltose.

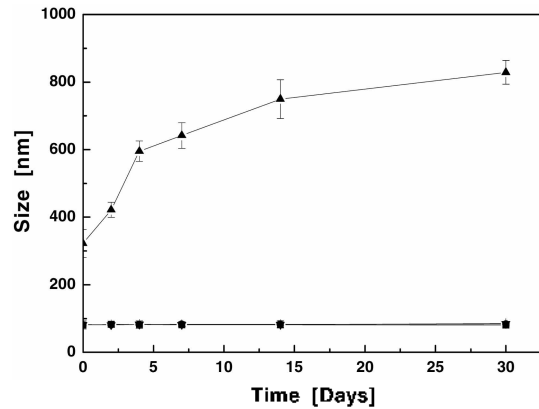


Fig. 5. The changes of particle size of the liposomes before freeze-drying (-■-, without maltose; -●-, with 30 mM maltose) and after freeze-drying (-▲-, without maltose; -▼-, with 30 mM maltose) as a function of time at 37°C.

으로 리포솜 입자간의 유착과 응집 그리고 오스트왈드 리페닝(Ostwald ripening) 현상에 의해 입자의 크기가 증가한 것으로 사료된다<sup>11</sup>. 결과적으로 대조군 리포솜의 경우에는 온도가 증가함에 따라 입자의 크기가 지속적으로 증가하는 반면, 말토스를 첨가한 리포솜의 경우에는 온도에 관계없이 동결 건조 전과 후에 거의 입자크기의 변화가 없는 것을 확인함으로써 비교적 안정하다고 예측 할 수 있다.

### 시간에 따른 리포솜의 안정성

동결 건조 전과 후의 말토스의 첨가 유무에 따른 리포솜의 시간에 따른 입자의 안정성은 Fig. 5에 나타내었다. 상대적으로 비교하기 위하여 말토스의 농도를 30 mM로 고정하고 리포솜에 첨가하여 37°C에서 보관하면서 동결 건조 전과 후의 입자크기를 비교하였다. 그 결과, 대조군 리포솜의 경우에는 시간에 따라 지속적으로 증가하여 30일 후에는 초기의 약 2.5배 정도 커지는 반면, 말토스를 첨가한 리포솜의 경우에는 30일 후 동결 건조 전과 후에 거의 변화가 없는 것을 확인하였다. 또한 리포솜 자체의 응집이나 융합 등의 변화가 관찰되지 않았다. 따라서, 말토스를 첨가한 리포솜은 동결 건조 전과 후에 37°C에서 최소 30일 동안 비교적 안정하다고 예측 할 수 있다.

### 리포솜 입자의 봉입률

Fig. 6은 동결 건조 시 말토스의 농도에 따른 리포솜 입자 내부의 약물의 봉입률을 나타낸 것이다. 농

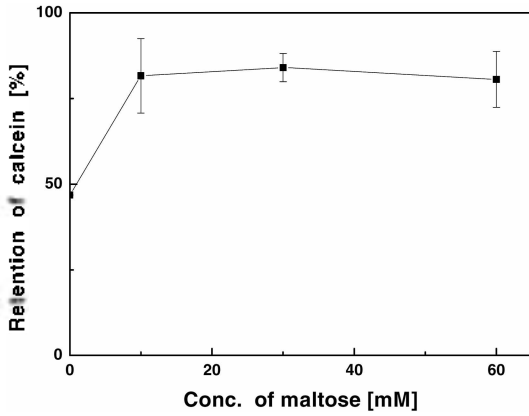


Fig. 6. The retention of calcein from liposome solution after rehydration of liposomal powders with different concentration of maltose.

결건조 후 재분산시 수용성 모델 약물이 칼세인의 봉입률은 동결 건조 전 말토스를 첨가하지 않은 경우와 말토스를 10 mM 첨가한 리포솜의 경우는 각각 46%와 85%였다. 또한 최대의 봉입률을 가지는 말토스의 양은 30 mM 일때 89%로 가장 높은 것으로 나타났다. 말토스를 첨가한 리포솜의 경우는 85~89%로 46%를 가지는 대조군 리포솜의 경우보다 약물의 유출이 적은 것을 관찰할 수 있었다. 동결 건조시 약물의 유출은 탈수와 재분산하는 과정에서 인지질의 상전이온도 ( $T_m$ )를 지나면서 일어난다<sup>15</sup>. 이때 동결 건조시 리포솜의 탈수과정은 리포솜 밖의 수분이 리포솜 내용물보다 먼저 동결될 때 일어나는 삼투압 현상으로 동결 건조시 리포솜으로부터의 수분과 약물의 유출이 일어나는 것으로 알려져 있다. 그러나 말토스와 같은 응집방지제는 리포솜 내부 및 외부에서 인지질의  $T_m$ 을 낮추어 주며, 유리질화 된 응집방지제가 분자의 운동을 억제하여 건조된 인지질 막을 안정화시켜서 약물의 유출을 억제하는 것으로 리포솜 입자의 안정성을 향상시킨 것으로 사료되었다<sup>16</sup>.

### 결 론

본 연구에서는 리포솜 나노 분말의 안정성을 확보하기 위한 것으로 동결 건조의 방법을 도입하여 그에 따른 물리적 특성을 관찰하였다. 또한, 말토스의 첨가 방법, 말토스의 농도, 보관 온도 및 시간을 달리하여 대조군 리포솜과 말토스가 첨가된 리포솜의 입자크

기 변화와 봉입률을 측정하여 안정성을 평가하였다. 대조군 리포솜의 경우 동결 건조 후 리포솜 입자의 크기가 동결 건조 전보다 약 4배 정도 증가하였다. 그러나, 리포솜 용액을 제조한 후에 말토스를 기존 첨가량의 20배 감소시켜 첨가하여 동결 건조 후 재분산 하였을 경우 리포솜 입자간의 응집과 융합이 억제되어 4, 25 및 37°C 에서 최소 30일 동안 안정한 상태를 유지하여 동결 건조 전과 동일한 입자크기를 나타낼 수 있었다. 또한 약물 봉입률의 측정 결과, 동결 건조에 의해서 말토스의 농도가 증가할수록 약물의 유출이 다소 있었지만, 말토스의 농도가 30 mM일때 89%의 가장 높은 봉입률을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

이상의 결과는, 동결 건조의 방법을 도입하여 리포솜 나노 분말의 안정성을 향상시키는 방법에 관한 것으로 말토스의 양을 조절하여 온도와 시간에 따른 안정성을 제어할 수 있다. 리포솜 용액을 제조한 후에 말토스를 첨가하여 동결 건조 하였을 경우, 말토스가 리포솜 입자간의 응집과 융합을 억제하여 결과적으로 리포솜 나노 분말의 안정성을 증가시킬 수 있는 유용한 방법임을 알 수 있었다.

### 인 용 문 헌

1. Bangham, A.; Standish, D.; Watkins, M. J. C. *J. M. Biol.* **1965**, *13*, 238.
2. Papahadjopoulos, D.; Allen, T. M.; Gabizon, A.; Mayhew, E.; Matthey, K.; Huang, S. K.; Lee, K. D.; Woodle, M. C.; Lasie, D. D.; Redemann, C.; Martin, F. J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, *88*, 11460.
3. Engin, K.; Leeper, D. B.; Tupchong, L.; Waterm, F. M. *Cancer Res.* **1995**, *1*, 1139.
4. Barry, B. W. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *14*, 101.
5. Nakajima, H. *Fragrance Journal* **1993**, *4*, 52.
6. Kulkarni, S. B.; Betageri, G. V.; Singh, M. *J. Microencapsulation* **1995**, *12*, 229.
7. Crowe, J. H.; Crowe, L. M.; Carpenter, J. F.; Rudolph, A. S.; Wistrom, C. A.; Spargo, B. J.; Anchordoguy, T. *J. Biochim. Biophys. Acta* **1988**, 947, 367.
8. Akiyoshi, K.; Sunamoto, J. *Supramolecular Science* **1996**, *3*, 157.
9. Crowe, J. H.; Crowe, L. M. *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, 939, 327.
10. Wilschut, J.; Düzgünes, N.; Hong, K.; Hoekstra, D.; Papahadjopoulos, D. *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, 734, 309.

11. Majumdar, S.; Flasher, D.; Friend, D.; Nassos, P.; Yajko, D.; Hadley, W. K.; Düzgünes, N. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **1992**, *36*, 2808.
  12. Kwon, H. Y.; Lee, J. Y.; Chio, S. W.; Jang, Y. S.; Kim, J. H. *Colloids and surfaces* **2001**, *182*, 123.
  13. Suzuki, T.; Komatsu, H.; Miyajima, K. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1278*, 176.
  14. Ng, J. D.; Lober, B.; Witz, J.; Dietrich, A. T.; Kem, D.; Giege, R. *J. Cryst. Growth* **1996**, *168*, 50.
  15. Tanaka, K.; Takeda, T.; Fujil, K.; Miyajima, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 2653.
  16. Koster, K. L.; Webb, M. S.; Bryant, G.; Lynch, D. V. *Biochem. Biophys. Acta* **1994**, *1193*, 143.
-