

Folate가 수식된 Poly((R)-3-hydroxy butyrate)-Poly(ethylene glycol) 나노입자를 이용한 표적지향형 약물전달체

권승호 · 김영진[†]

충남대학교 공과대학 바이오응용화학과

(2008년 9월 3일 접수, 2009년 9월 11일 수정, 2009년 9월 14일 채택)

Targeted Drug Delivery Carriers Using Folate Conjugated Poly((R)-3-hydroxy butyrate)-Poly(ethylene glycol) Nanoparticles

Seung Ho Kwon and Young Jin Kim[†]

Department of Applied Chemistry & Biological Engineering, Chungnam National University,

79, Daehangno, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea

(Received September 3, 2008; Revised September 11, 2009; Accepted September 14, 2009)

초록: 생분해성 고분자인 poly((R)-3-hydroxy butyrate)와 poly(ethylene glycol)을 결합시켜 양친성 이중 블록 공중합체를 형성하였고, 표적인자인 folate를 수식하여 특정 암세포에 표적화하도록 설계하였다. 이 공중합체는 수용액상에서 미셀을 이루며, DLS로 측정한 결과, 125~156 nm의 크기였고, 동결건조하여 SEM으로 관찰한 결과 구형임을 확인하였다. 여기에 소수성 약물인 griseofulvin을 사용하여, 35~56%의 봉입률을 나타내었다. 약물은 *in vitro* 상에서 24시간 동안 지속적으로 방출되었다. 세포생존율을 측정하여, folate가 수식된 입자가 그렇지 않은 입자보다 약 10% 더 낮은 세포생존율을 보임으로써 표적지향 효과가 있다는 것을 알 수 있었다.

Abstract: Biodegradable poly((R)-3-hydroxy butyrate) and poly(ethylene glycol) was conjugated to make amphiphilic di-block copolymer. Folate was conjugated at di-block copolymer to target the cancer cells. Copolymer was ready to form the self-assembled micelle whose size was 125~156 nm in aqueous solution. Griseofulvin as a hydrophobic drug was loaded in nanoparticles. Their loading efficiencies were 35~56%. Hydrophobic drug was continuously released for 24 h. Cell viability test showed that folate attached particles were 10% more efficient than the particles without targeting ligands.

Keywords: PHB, PEG, folate, targeting, drug delivery.

서 론

현재 암치료에 사용되는 항암제의 대부분은 강한 독성, 항암제 내성 등의 문제점을 가지고 있다. 항암제는 세포독성 약물로서 암세포뿐만 아니라, 정상세포에도 독성을 끼치는 부작용을 나타낸다. 세포의 증식이 활발히 일어나는 골수, 모낭, 위장관 내피세포 등은 항암제의 영향을 많이 받기 때문에 약물치료를 받는 환자들은 골수에서 만들어지는 면역에 관계되는 세포들에 대한 부작용이 크다. 면역에 관계된 백혈구의 감소, 혈액응고에 관련한 적혈구, 백혈구 및 혈소판의 감소 등으로, 세균감염, 자연출혈, 메스꺼움 및 구토 등의 부작용을 겪게 된다.^{1,2}

따라서, 기존 항암제의 부작용을 줄이고 효능을 극대화하기 위하여 암세포의 특정 receptor에 달라 붙는 targeting ligand를 수식하여 표적화가 가능한 약물전달체의 개발이 필요하다.^{3,4}

본 연구에서는 블록 공중합체 고분자 미셀을 이용한 약물전달체를 개발하려고 한다. 고분자 미셀은 수용액상에서 양친성 고분자에 의해 형

성되는 직경 200 nm 이하의 입자로서 양친성 공중합체가 수용액상에서 자기회합하여 내부의 소수성 영역과 외부의 친수성 영역으로 구성되는데, 이 소수성 내부 영역에 소수성 물질을 봉입하는 시스템이다. 고분자 미셀은 난용성 약물의 가용화 및 특정부위로의 약물수송 개선을 목적으로 하는 유용한 수단으로 많은 주목을 받고 있다.⁵

본 연구에서는 표적지향형 약물전달시스템을 개발하기 위하여 생분해성 고분자인 poly((R)-3-hydroxy butyrate) (PHB)와 양쪽 말단기가 -NH₂기로 치환된 poly(ethylene glycol) (PEG)을 결합시켰다. 이 이중블록 공중합체에 암세포의 표면에 많이 존재하는 folate receptor에 대한 표적인자인 folate(엽산: folic acid)를 수식하여, 미사일이 표적을 향해 곧바로 날아가듯이 약물이 체내에 들어갔을 때, 정상세포에는 영향을 미치지 않고, 암세포에만 영향을 미치는 약물전달시스템을 개발하고자 하였다.

실 험

재료. Poly((R)-3-hydroxy butyrate)를 Sigma-Aldrich에서

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: kimyj@cnu.ac.kr

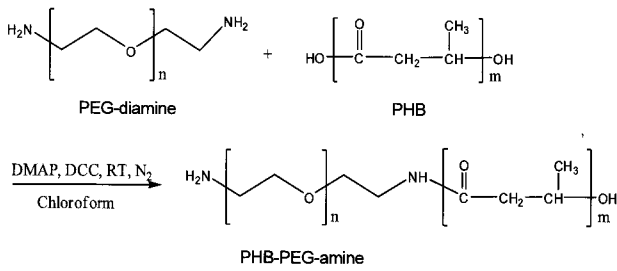


Figure 1. Reaction mechanism of PHB and PEG-diamine.

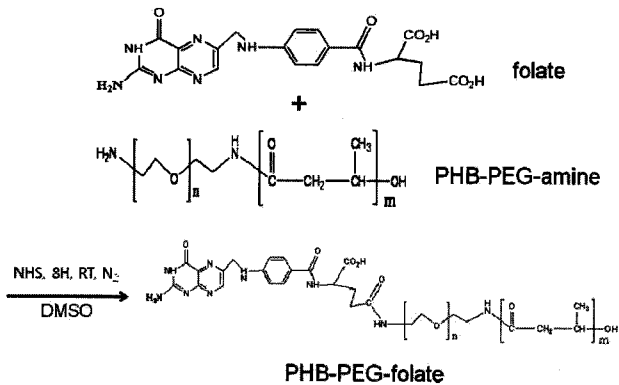


Figure 2. Reaction mechanism of PHB-PEG-NH₂ and folate.

구입 후, 가수분해하여 분자량을 조절하여 사용하였다.⁶ NH₂기로 치환된 poly(ethylene glycol) (M.W.=3.4 k)은 Sunbio(Korea)에서 구입하였다. Folate와 doxorubicin은 Sigma에서 구입하였다. 1,3-Dicyclohexyl carbodiimide(99%) (DCC), griseofulvin(95%, HPLC grade), 1-pyrene-carboxaldehyde(99%), 4-demethylamino-pyridine(99%) (DMAP), *N*-hydroxy-succinimide(98%) (NHS)은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.

PHB와 PEG-Diamine의 결합. 미생물에 의해 생산되는 PHB는 분자량이 매우 높기 때문에 그대로 사용하기에 적합하지 못하다.⁷ 그래서, 산촉매를 이용한 가수분해를 통하여 분자량을 조절하였다.⁶ 가수분해한 시간에 따라 분자량이 달라지며, PHB의 분자량이 1 k와 3.5 k, 그리고 5 k인 것을 사용하였다. PHB(500 mg)를 50 mL의 chloroform에 녹인 다음, DCC(125 mg)를 넣고, 질소 가스상태에서 하룻밤 동안 활성화시켰다. PEG-diamine(500 mg)을 50 mL의 chloroform이 담긴 플라스크에 넣고, DMAP(100 mg)를 넣어 주었다.^{8,9} 플라스크를 교반시키면서 활성화된 PHB를 천천히 넣어 준 다음, 상온에서 질소가스 상태에서 8시간 동안 반응시켰다. 이 반응물을 차가운 hexane에 침전시킨 다음, 진공건조하여 분말형태의 결과물을 얻었다.¹⁰⁻¹³ PHB-PEG-amine은 양이온의 흡착을 선택적 흡착을 통하여 제조하였다.¹⁴ Figure 1에 PHB와 PEG-diamine의 반응식을 나타내었다.

PHB-PEG-NH₂와 Folate의 결합. PHB-PEG-NH₂(50 mg)와 folate(7 mg)를 50 mL의 DMSO가 담긴 플라스크에 DCC(13 mg)와 NHS(4 mg)를 함께 넣어 주었다. 질소가스상태에서 상온에서 8시간 동안 반응시켰다. 이 반응물을 증류수에 넣고, 3000 rpm에서 원심분리하여 증류수로 다시 세척 후, 동결건조하였다. Figure 2

Table 1. Amount of Copolymer and GF for the Drug Loading Experiment

| Samples | Copolymer | GF |
|---------------------------------|-----------|------|
| 1) PHB(1 k)-PEG(3.4 k)-folate | 50 mg | 5 mg |
| 2) PHB(3.5 k)-PEG(3.4 k)-folate | 50 mg | 5 mg |
| 3) PHB(5 k)-PEG(3.4 k)-folate | 50 mg | 5 mg |

Table 2. CMC of PHB-PEG-Folate Nanoparticle(n=5)

| Samples | CMC Values(g/L) |
|---------|--------------------|
| 1 | 5×10^{-2} |
| 2 | 1×10^{-2} |
| 3 | 5×10^{-1} |

에 PHB-PEG-NH₂와 folate의 반응도를 나타내었다.

나노입자의 CMC 측정과 크기 관찰. 임계 미셀 농도(critical micelle concentration) (CMC)는 소수성 형광염료인 pyrene을 사용하여, 형광 분석기로 측정하였다. 형광분석기의 excitation 파장은 300~360 nm 이고, emission 파장은 390 nm이다.^{15,16}

투석방법(dialysis)을 사용하여 나노입자의 형성을 알아 보았다. 고분자를 CMC 이상의 농도(Table 2)에서 수용액에 녹인 다음, dynamic light scattering(Photal, ELS-Z) (DLS)로 수용액상에서 입자의 크기를 측정하였다.^{5,17} 이 입자들을 동결건조하여 scanning electron microscope(Hitachi, S-4300) (SEM)으로 형태와 크기를 측정하였다.

소수성 약물의 봉입. 약물 봉입률을 알아 보기 위하여 모델 약물로써 griseofulvin(GF)을 사용하였다. GF는 피부사상균 치료에 쓰이는 약물로 소수성 성질을 가지고 있다. 이 약물을 봉입하기 위하여 투석방법을 사용하였다. 5 mg의 GF를 물과 아세톤을 1:9비율로 섞은 10 mL의 용매에 용해시키고, 5분간 초음파 분쇄 후, 20분간 균질화시켰다. 50 mg의 PHB-PEG-folate 공중합체를 10 mL의 아세토니트릴에 용해시켰다. 두 용액을 섞어 준 다음, 투석막(M.W. cut off: 1000)에 넣고 2차 증류수에 24시간 동안 상온에서 투석시켰다.⁵

약물봉입률은 high performance liquid chromatography(Shimadzu, LC-6A) (HPLC)로 측정하였다. 4.6×150 mm의 크기에 내경 5 μm의 C18 컬럼(MU cleocil 100-5)을 사용하였다. 이동상(mobile phase)은 45 mM potassium을 넣고, 물과 아세토니트릴을 55:45의 비율로 섞어서 사용하였고, phosphoric acid를 사용하여 pH 3으로 맞추어 1 mL/min의 속도로 흘러 주었다. GF의 전형적인 체류시간은 5분이었고, 파장은 293 nm에서 측정하였다.¹⁸ Tabel 1에 약물 봉입 실험에 사용한 각각의 담체에 넣어 준 GF의 양을 정리하였다.

In vitro 상에서의 약물 방출 거동. 약물의 방출 거동을 알아보기 위하여 약물을 농도별로 HPLC로 측정한 다음, 방출되어 나오는 약물의 농도를 비교하였다. 약물을 넣은 고분자를 10 mL의 투석막(M.W. cut off: 1000)에 넣고, PBS 용액 100 mL에서 37 °C, 90 rpm에서 1 시간 간격으로 투석막 밖으로 빠져 나온 양을 측정하였다. 매번 PBS 용액을 갈아주면서 시간 별로 방출되는 양을 측정하였다.

Cell Viability 측정. 약물 전달체의 세포독성과 표적지향성을 알아보기 위하여 GF 대신 항암제인 독소루비신(doxorubicin) (dox)을 봉입하여 MTT assay를 사용하였다.

HeLa cell을 배지에서 24시간 동안 배양하여 0.25% trypsin-EDTA로 처리하여 세포를 플라스크에 수집하여 세포 수를 각각 20000 cells/mL 농도로 조절하여 96 well plate의 각 well에 100 μ L씩 접종하여 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 배양기 안에서 24시간 동안 배양하였다. 여기에 약물을 각각 1 g/L의 농도로 10 μ L씩 접종하여 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 배양기에서 시간 별로 배양 후, MTT assay을 이용하여 세포생존율을 측정하였다.

이때, 배양이 끝나기 4시간 전에 MTT 시약을 PBS 용액에 녹인 후, 여과 멸균하여 제조한 MTT 용액 26 μ L을 각각의 well에 첨가한 후, 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 배양기에서 4시간 추가 배양하여 formazan 형성 반응을 시키고 나서, 상층액을 제거하고 남은 자주색의 formazan침전에 PBS 완충액 50 μ L와 이것을 용해시키기 위하여 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 각 well당 100 μ L씩 첨가하여 반복적인 피펫팅으로 완전히 녹인 후, plate를 교반기에서 20분간 교반하였다.¹⁹⁻²¹ 이후, ELISA microplate 판독기를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 측정된 흡광도는 생존하는 세포의 미토콘드리아에 함유된 탈수소 효소에 의해 formazan이란 crystal로 전환된 양을 나타내며, 생존하는 세포의 수와 비례한다고 할 수 있다.²² 세포의 생존율은 다음과 같은 식으로 나타내었다.²³

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{Absorbance of treated cell}}{\text{Absorbance of untreated cell}} \times 100$$

결과 및 토론

PHB-PEG-Folate의 분석. PHB, PEG, folate의 구조분석을 위해 ¹H-NMR 분광법과 FT-IR 분광법을 사용하였다. PEG-diamine의 양쪽 말단에 있던 두 개의 -NH₂기 중에서 한 쪽은 PHB와 결합하고 다른 한 쪽은 folate와 결합하게 된다.

PHB 말단의 -COOH기와 folate의 -COOH기가 PEG-diamine의 -NH₂기와 반응하여 결합하고, H₂O가 떨어져 나간다. 그 결과, Figure 3의 ¹H-NMR 스펙트럼의 8.2 ppm 부근에서 5번 피크가 나타났음을 알 수 있었다.

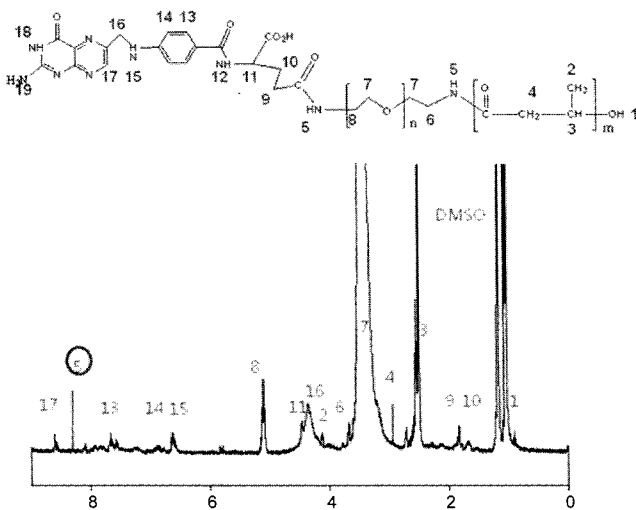


Figure 3. ¹H-NMR of PHB-PEG-folate block copolymer.

Figure 4의 FT-IR 분석 결과에서, PEG-diamine의 -NH₂ 피크가 1600 cm⁻¹ 부근에서 나타났는데, 합성 후, -NH₂기가 사라졌음을 확인하였다. ¹H-NMR 분광법과 FT-IR 분광법을 통하여 PHB가 PEG-diamine과 folate와 합성되었음을 알 수 있었다.

PHB-PEG-Folate 입자의 임계미셀농도. 합성된 PHB-PEG-

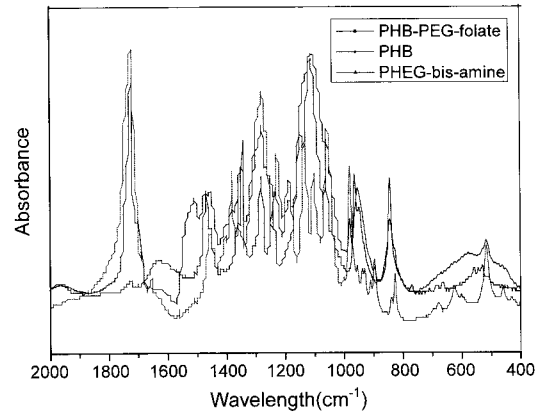


Figure 4. FT-IR spectra of PHB-PEG-folate block copolymer.

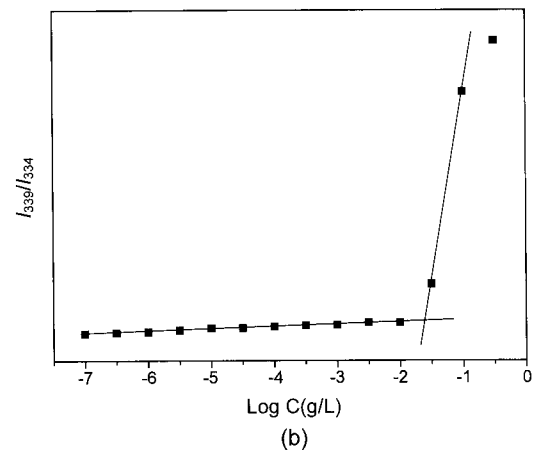
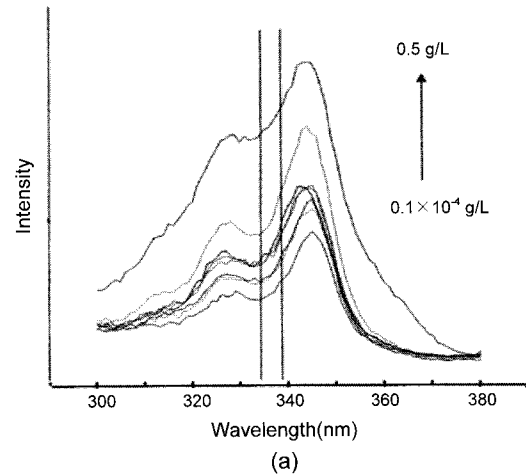


Figure 5. CMC measurement of PHB-PEG-folate (sample 3) at 24 $^{\circ}$ C. (a) Excitation spectra of pyrene with various concentration (0.1×10^{-4} ~0.5 g/L); (b) Plot of fluorescence intensity of pyrene vs logarithmic concentration in I_{339}/I_{334} .

folate 입자의 임계미셀농도(CMC)를 측정하였다. CMC란 양친성 공중합체가 수용액상에서 서로 자기조립(self-assembly)에 의하여 구형의 미셀을 이루기 시작하는 농도라고 할 수 있다.²⁴

Figure 5(a)는 농도별로 형광분석기의 파장을 나타낸 것이다. (b)는 intensity 값을 로그로 취한 값을 나타냈다. 그래프에서 갑자기 증가한 것을 볼 수가 있는데, 이 값이 CMC 값이라고 할 수 있다. Table 2에 각각의 입자에 따른 CMC 값을 나타내었다.

나노입자의 크기 및 모양 확인. 나노입자의 크기를 DLS로 측정 한 결과, 고분자 사슬의 길이에 따라 나노입자의 크기가 달라졌음을 확인할 수 있었으며, 약물 봉입 후 나노입자의 크기가 약간씩 증가한 것을 알 수 있었다. 분자량에 따른 샘플의 크기 변화를 Table 3에 정리하였다.

나노입자의 크기뿐만 아니라, 형태도 알아보기 위하여 동결건조 후 SEM으로 측정해 보았다. Figure 6에서 보이는 바와 같이 구형의 형태를 이루고 있었다. SEM의 측정결과가 DLS의 측정결과보다 약간 작게 나온 것을 알 수 있었다.

PHB-PEG-Folate 입자의 약물 봉입률. 소수성 약물인 GF은 물에 잘 녹지 않기 때문에 유기용매에 녹여 수용액 상태의 고분자 담체에 섞어 준 다음, 초음파 분쇄를 한 후, 다시 균질화시켰다. 그런 다음 투석막에 넣고, 하루 동안 투석시켰다. 용매를 교체해 주게 되면, 봉입되지 않은 약물은 삼투압 현상에 의해 밖으로 빠져 나오게 된다. 봉입된 약물은 투석막 속에 남게 되며, 시간이 지나면서 서서히 빠져 나오게 된다. 봉입률은 약물을 미셀에 넣은 양을 기준으로 실제적으로 미셀 속으로 들어간 양을 퍼센트로 나타내었다. 식은 다음과 같다.²⁵

$$\text{Drug loading efficiency (\%)} = \frac{\text{Amount of loaded in micelles}}{\text{Amount of drug added in micelles}} \times 100$$

봉입률을 측정 한 결과, 각 샘플마다 봉입률이 다음을 확인하였다. 그

Table 3. Sizes of PHB-PEG-Folate Nanoparticles (n=5)

| Samples | Blank (nm) | Drug loaded (nm) |
|---------|------------|------------------|
| 1 | 125 | 131 |
| 2 | 140 | 149 |
| 3 | 150 | 161 |

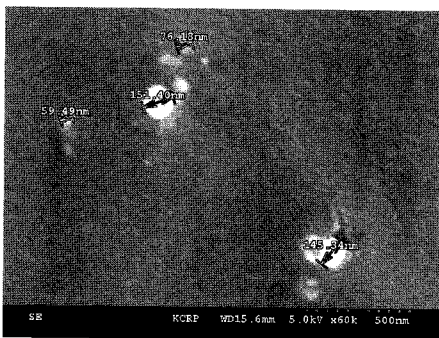


Figure 6. SEM image of PHB-PEG-folate nanoparticles (sample 3).

이유는 소수성 부분의 사슬에 따라 약물과 소수성 상호작용이 더 강하여 미셀 속으로 더 많은 양이 봉입되는 것이다. Table 4는 각각의 담체에 따른 봉입률을 나타내었다.

In vitro 상에서 PHB-PEG-Folate 입자의 방출 거동. 투석막을 이용하여 PBS 용액 속에서 약물의 방출 시간을 조사하였다. 각 샘플을 투석막에 CMC 이상의 농도로 10 mL씩 넣고, 100 mL의 PBS 용액이 들어 있는 비커에 넣고, 37 °C에서 90 rpm으로 교반하면서 매 시간마다 용액을 바꾸어 주면서 방출된 양을 HPLC로 측정하였다. 약물은 처음에는 미셀 안쪽에 있다가 삼투압현상에 의하여 시간이 지 나면 조금씩 밖으로 나온다. 실험 결과, 소수성 부분의 사슬이 길수록 소수성 상호작용이 강하여 약물이 밖으로 빠져 나오는 것을 방해하는 것을 알 수 있다. Figure 7과 같이 충분히 소수성 블록의 길이가 길 때, 약물이 지속적으로 24시간 동안 나오는 것을 확인하였다.

Table 4. Drug Loading Efficiency of GF with Various Block Ratios (n=5)

| Samples | Drug loading efficiency (%) |
|---------|-----------------------------|
| 1 | 35 |
| 2 | 48 |
| 3 | 56 |

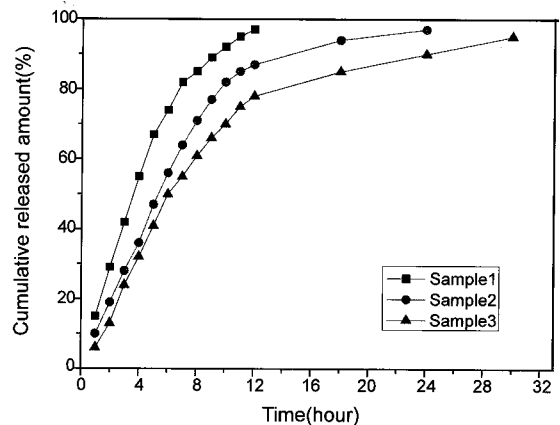


Figure 7. In vitro release behavior of PHB-PEG-folate nanoparticles (n=5, S.D.<5).

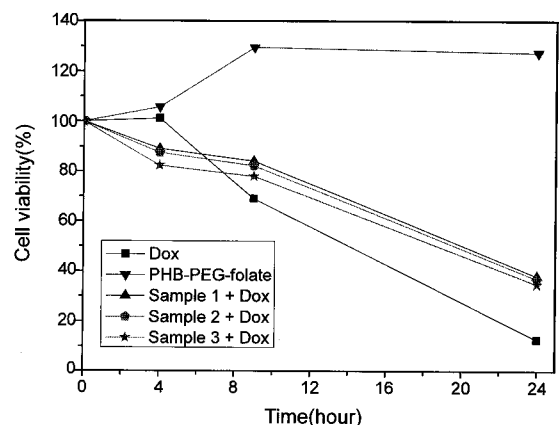


Figure 8. Cell viability of various samples on HeLa cell (n=5, S.D.<11).

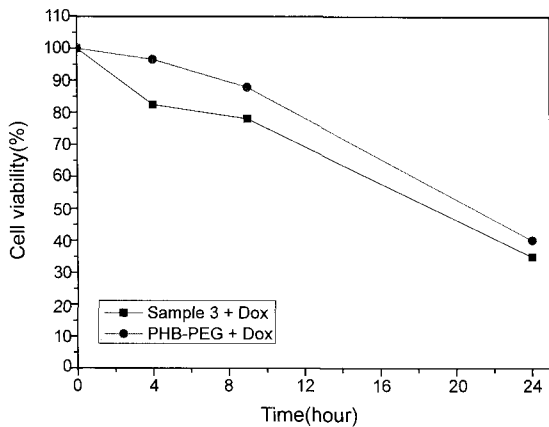


Figure 9. Comparison of cell viability to verify the targeting effect of folate(n=5, S.D.<8).

Folate의 표적지향성 확인. Figure 8에서 보는 바와 같이 항암제를 봉입하지 않은 PHB-PEG-folate 입자의 경우 세포가 죽지 않고 번식했음을 알 수 있다. 반면, 항암제를 봉입했을 경우, 각 샘플의 봉입률에 따라 세포생존율이 다르게 나타났음을 확인할 수 있었다.

항암제의 봉입양에 따라 세포가 더 많이 죽는 것을 확인할 수 있었다.

또한, Figure 9에서 같은 블록비를 가지는 PHB-PEG입자에 doxorubicin를 봉입하였을 때, 표적인자인 folate를 수식한 샘플 3가 표적화의 영향으로 더 많은 약물이 전달되어 세포생존율이 더 낮음을 확인할 수 있었다. Folate의 유무에 따라 표적 세포에 전달되는 정도가 달라져 약물의 항암효과가 높아지는 것을 확인할 수 있었다.

결론

표적지향형 약물전달체를 개발하기 위하여 생분해성 고분자인 PHB와 PEG-diamine을 이중블록 공중합체로 결합시켰다. 이중블록 공중합체에 암세포에 표적화(targeting)할 수 있도록 folate 리간드를 수식하였다. Folate가 리간드 수용체에 달라 붙는 성질을 이용하여 약물이 몸 속에 들어 갔을 때, 정상세포에는 영향을 주지 않고, 특정 부위에만 도달할 수 있도록 설계하였다. 이 공중합체는 수용액상에서 자기조립에 의해 미셀을 이루며, 나노입자를 형성하였다. 수용액상에서 DLS로 측정한 결과, 125~165 nm의 입자를 형성하였고, 동결건조하여 SEM를 측정한 결과, 구형의 나노입자가 형성되었음을 확인할 수 있었다.

이 나노입자의 약물봉입률과 방출거동을 알아보기 위하여 griseofulvin이라는 소수성 약물을 봉입하였다. 이 소수성 약물은 35~56%의 봉입률을 나타내었다. In vitro 상에서 방출거동을 확인한 결과, 고분자의 블록비에 따라 방출률이 달라졌으며, 소수성 블록이 가장 큰 샘플3에서 24시간 동안 약 80%의 약물이 지속적으로 빠져 나오는 것을 확인하였다.

이 나노입자의 folate의 표적지향성 효과를 알아보기 위하여 항암제인 doxorubicin을 봉입하여 HeLa cell에 세포생존율 실험을 하여 folate가 수식된 입자의 항암효과가 더 크다는 것을 확인할 수 있었다.

본 실험으로 제조된 folate가 수식된 PHB-PEG 나노입자는 표적

지향성 약물전달체로의 사용 가능성을 보여 주었다.

감사의 글: 이 논문은 2007년도 충남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. H. S. Kim, S. B. Hong, H. J. Sung, G. A. Moon, and Y. Yoon, *Korean Journal of Pharmacognosy*, **34**, 145 (2003).
2. N. J. Kim, S. B. Sim, J. K. Kim, D. H. Won, and N. D. Hong, *Korean Journal of Pharma*, **29**, 93 (1998).
3. A. C. Antony, *The Journal of The American Society of Hematology*, **79**, 2807 (1992).
4. C. J. Mathias, S. Wang, P. S. Low, D. J. Waters, and M. A. Green, *Nucl. Med. Biol.*, **26**, 23 (1999).
5. G. Gaucher, M. Dufresne, V. P. Sant, N. Kand, D. Maysinger, and J. Leroux, *J. Control. Release*, **109**, 169 (2005).
6. K. H. Jeong and Y. J. Kim, *Polymer(Korea)*, **30**, 512 (2006).
7. A. J. Anderson and E. A. Dawes, *Microbiol. Rev.*, **54**, 450 (1990).
8. O. Schiavon, G. Pasut, S. Moro, P. Orsolini, A. Guiotto, and F. M. Veronese, *Eur. J. Med. Chem.*, **39**, 123 (2004).
9. S. Zalipsky, M. Qazen, J. A. Walker II, N. Mullah, Y. P. Quinn, and S. K. Huang, *Bioconjugate Chem.*, **10**, 703 (1999).
10. Z. Jedliński, P. Kurcok, and R. W. Lenz, *Macromolecules*, **31**, 6718 (1998).
11. Q. Zhan, G. Cheng, H. Li, X. Ma, and L. Zhang, *Polymer*, **46**, 10561(2005).
12. J. Li, X. Li, X. Ni, and K. W. Leong, *Macromolecules*, **36**, 2661 (2003).
13. H. S. Yoo and T. G. Park, *J. Control. Release*, **96**, 273 (2004).
14. E. Chambers, M. Diane, D. Wagrowski, L. Ziling, R. Jeffery, and Mazzeo, *J. Chromatogr. B*, **852**, 1 (2007).
15. J. Li, X. Li, X. Ni, X. Wang, H. Li, and K. W. Leong, *Bio-materials*, **27**, 4132 (2006).
16. H. Hyun, M. S. Kim, G. Khang, and H. B. Lee, *Polymer (Korea)*, **30**, 146 (2006).
17. A. N. Lukyanov, Z. Gao, and V. P. Torchilin, *J. Control. Release*, **91**, 97 (2003).
18. H. Liu, S. Farrell, and K. Uhrich, *J. Control. Release*, **68**, 167 (2000).
19. B. P. Ram, and P. Tyle, *Pharmaceut. Res.*, **4**, 181 (1987).
20. E. S. Lee, K. Na, and Y. H. Bae, *J. Control. Release*, **91**, 103(2003).
21. Y. H. Bae, K. M. Huh, Y. Kim, and K.-H. Park, *J. Control. Release*, **64**, 3(2000).
22. Y. Lu and P. S. Low, *Cancer Immunol. Immun.*, **51**, 153 (2002).
23. E. K. Park, S. Y. Kim, S. B. Lee, and Y. M. Lee, *J. Control. Release*, **109**, 158 (2005).
24. C. Allen, D. Maysinger, and A. Eisenberg, *Colloid Surface B*, **16**, 3 (1999).
25. H. M. Aliabadi, S. Elhasi, A. Majmud, R. Gulamjusein, P. Mahdipoor, and A. Lavasanifar, *Int. J. Pharm.*, **329**, 158 (2007).