

하이드록시아파타이트 코팅 리포솜의 초음파에 의한 약물방출

조성근 · 위태인 · 하 정 · 조선행 · 한 건[†] · 한희동^{‡,*} · 신병철^{*}

한국화학연구원 의약화학센터

[†]충북대학교 약학대학

[‡]건국대학교 의과대학

(접수 2013. 5. 10; 게재확정 2013. 6. 26)

Ultrasound-Triggered Drug Release of Hydroxyapatite Coated Liposomes

Sung Keun Cho, Tae In Wee, Jeung Ha, Sun Hang Cho, Kun Han[†],

Hee Dong Han^{‡,*}, and Byung Cheol Shin^{*}

Research Center for Medicinal Chemistry, Division of Drug Discovery Research,
Korea Research Institute of Chemical Technology, 100, Jang-dong, Yuseong-gu, Daejeon, Korea.

*E-mail: bcsin@kriect.re.kr

[†]College of Pharmacy, Chungbuk National University, 52, Naesudong-ro, Heungdeok-gu, Cheongju, Korea

[‡]Department of Immunology, School of Medicine, Konkuk University, Chungju 380-701, Korea. *E-mail: hanhd@kku.ac.kr

(Received May 10, 2013; Accepted June 26, 2013)

요 약. 리포솜은 표적 약물을 봉입하여 병소에 안전하게 전달할 수 있는 약물전달체로서 연구되고 있다. 그러나 일반적인 리포솜은 표적부위에서 약물방출이 제한적인 문제점이 있다. 따라서 본 연구에서는 리포솜의 안정성을 향상시키고 표적부위에서 외부 초음파로부터 약물의 방출을 극대화시키기 위하여 하이드록시아파타이트(hydroxyapatite, HA)가 코팅된 리포솜을 개발하였다. 대조군 리포솜은 인지질과 콜레스테롤을 이용하여 제조하였고, 대조군 리포솜의 표면에 칼슘 아세테이트, 포스포릭에시드, 그리고 25% 암모니아용액을 이용하여 HA를 코팅하였다. 모델 약물로는 독소루비신을 사용하였다. HA코팅 리포솜의 크기는 120 nm 이었고, 약물봉입효율은 95% 이상이었다. 30% 혈장용액 내에서 HA코팅 리포솜의 입자크기는 일정한 상태를 유지하였으며, 대조군 리포솜은 크기가 1.4배 증가하였다. 외부 초음파 자극에 의한 리포솜으로부터 약물 방출을 유도한 후, 방출된 약물의 세포 이입율은 HA 코팅된 리포솜이 3배 이상 대조군 리포솜에 비하여 증가하였다. 본 연구에서는 외부 초음파 자극에 의하여 리포솜으로부터 약물의 방출을 극대화시키기 위한 초음파 민감형 리포솜을 개발하였고, 본 제형은 표적부위에서 약물의 방출을 효과적으로 제어하기 위한 분야에 활용이 가능할 것이다.

주제어: 하이드록시아파타이트, 리포솜, 초음파, 약물방출, 안정성

ABSTRACT. Liposomes, which can deliver payload at target site, have been studied as drug carrier. However, conventional liposomes have limitation for drug release at target site. Therefore, we developed hydroxyapatite (HA) coated ultrasound sensitive liposomes to increase drug release at target site and to enhance stability in blood stream. Control liposome was prepared using hydrogenated soy phosphatidylcholine (HSPC) and cholesterol, and then we assessed HA coating on the surface of control liposomes using calcium acetate, phosphoric acid, and 25% ammonium solution. Doxorubicin was used as a model drug. Size of HA coated liposomes was 120 nm and encapsulation efficiency of doxorubicin in liposomes was up to 95%. Size of HA coated liposomes are not changed in 30% serum solution, however, the control liposomes was 1.4 fold increased. After ultrasound triggered drug release from liposomes, intracellular efficiency of drug released from HA coated liposomes was 3 fold increased compared to control liposomes. In this study, we developed ultrasound sensitive liposomes to enhance drug release, which will be applied in controlled drug release at disease site.

Key words: Hydroxyapatite, Liposome, Ultrasound, Drug release, Stability

서 론

리포솜은 지질 이중 막으로 이루어진 소포체로써 내부에 약물을 봉입할 수 있는 특징이 있기 때문에 표적약물을

병소에 효율적으로 전달하기 위한 약물전달체로서 활발히 연구되고 있다.¹⁻³ 그러나 일반적인 리포솜은 정맥주사 후 혈류 내에서 순환되는 동안 혈장에 있는 단백질과 흡착하여 세망내피계에 의하여 소실되기 때문에 체내 순

환시간이 짧으며, 물리 화학적으로 안정성이 감소되는 문제가 있다.^{4,5} 또한 표적부위에 도달한 리포솜으로부터 효과적인 약물의 방출이 지연되므로 약효가 감소되는 문제가 있다. 따라서, 리포솜의 혈류 내 순환 안정성을 향상시키는 한편 리포솜으로부터 표적 부위에서 약물의 방출을 극대화시키기 위한 연구들이 진행되고 있다.⁶ 표적부위에서 리포솜으로부터 약물의 방출을 극대화시키기 위한 연구로는 외부자극에 의해 약물 방출을 제어하는 방법으로써 온도민감형,^{7,8} pH 민감형,⁹ 이온전위차,¹⁰ 외부의 빛,¹¹ 전기장,¹² 자기장,¹³ 초음파¹⁴ 의한 방법들이 연구되고 있다. 이들 외부자극에 의한 약물방출 제어방법 중, 초음파를 이용하는 방법은 낮은 전기적 상호작용, 조직내 부로의 침투성, 용이한 표적화, 그리고 국부적인 조사가 가능한 장점이 있다. 또한, 초음파자극은 세포 내로 약물이 이입될 때 엔토사이트시스 작용을 증가시키기 위한 세포막의 약물 침투성을 향상시킬 뿐만 아니라 세포간의 간극을 파괴하여 세포내부로 약물의 이입을 증가시키는 특징이 있다.^{15,16}

따라서, 본 연구에서는 외부 초음파 자극에 의하여 리포솜 내부의 약물 방출을 극대화시키기 위한 방법으로 리포솜의 표면에 하이드록시아파타이트(hydroxyapatite, HA)를 코팅하고자 하였다. HA는 인체 뼈의 무기성분과 결정학적, 화학적으로 동일한 세라믹 소재로써 독성이 없으며, 생체친화적이고 인체의 뼈나 치아의 주성분과 구조가 동일한 특징이 있다. 특히 의료분야에서는 분말형태, 치밀제, 또는 금속에 코팅을 하여 활용되고 있다.^{17,18} 특히, HA는 초음파에 의해 결정화가 가속화되어 합성이 단시간에 일어나기 때문에 리포솜의 표면에 HA를 코팅함으로써 외부 초음파 자극에 의하여 리포솜의 구조를 빠르게 파괴시켜 리포솜 내부에 봉입된 약물의 방출을 극대화시킬 수 있는 특징이 있다.^{19,20}

한편, 리포솜을 정맥주사하였을 경우 리포솜은 혈류를 통해 체내 순환을 하다가 Enhanced permeability and retention (EPR) 효과에 의하여 종양조직으로 전달이 된다. 그러나 종양조직으로 전달이 된 리포솜은 종양세포 뿐만 아니라 백혈구, 면역세포 등에도 이입이 되는 한편, 여전히 종양조직의 혈관에 체류하고 있을 확률이 높다. 결과적으로 리포솜이 내부에 약물을 봉입한 채 세포에 이입되지 않거나 또는 여전히 종양조직에 체류할 수 있는 문제가 있다. 그렇기 때문에 본 연구에서는 리포솜을 암 조직까지 부작용이 없이 전달을 한 후, 암 조직에 초음파를 조사하여 혈관에 잔류하거나 세포에 이입이 되지 않는 리포솜 또는 이미 암세포에 이입이 된 리포솜으로부터 약물의 방출을 극대화함으로써 치료효과를 상승시키고자 하였다.

실험방법

시약 및 기기

리포솜 제조에 사용된 지질인 포스파티딜콜린(L- α -phosphatidylcholine soy-hydrogenated, HSPC)과 콜레스테롤(cholesterol, CHOL)은 Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, USA)에서 구입하여 사용하였고, 모델 약물로 사용한 독소루비신은 Boruynng Inc. (Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 기기로서 투석막은 분획 분자량(molecular weight cut off, MWCO)이 12,000–14,000인 것을 (Viskase Co. Illinois, USA) 사용하였고, 리포솜을 제조하기 위하여 회전응축증발기(Rotavapor R-200, Buchi, Switzerland)와 초음파 발생기(Ultrasonicator, 500, Fisher Scientific, USA)를 사용하였다. 제조된 리포솜의 입자크기 및 표면전하는 입도분석 및 제타전위측정기(ELS-Z, Particle analyzer, Otuska Electronics Co., Japan)를 사용하여 측정하였다. 리포솜 내의 독소루비신 봉입은 자외선가시광선 분광기(UV mini 1240, Shimadzu Scientific Inc., Japan)를 사용하여 측정하였고, 리포솜의 세포 내 이입효율은 유세포 분석기(FACS, Becton Dickinson, Sanjose, CA, USA) 및 공초점 현미경(CLSM, LSM5 LIVE, Carl Zeiss, Germany)으로 측정하였다. 독소루비신의 정량은 형광분광광도계(Fluorescence spectrophotometer, Hitachi, Japan)를 사용하였다. 또한 동물실험에서도 초음파 발생기(HF Ultrasonic Amplifier, MIRAE Ultrasonic Co., Korea)를 사용하였다. 그밖에 실험에 사용한 클로로포름과 메탄올 등은 일급 및 특급시약을 그대로 사용하였다.

리포솜의 제조

대조군 리포솜은 포스파티딜콜린과 콜레스테롤을 3:1 (w/w)의 질량 비율로 제조하였다. 리포솜의 제조는 지질을 클로로포름에 용해시킨 후, 회전응축증발기를 사용하여 40 °C에서 감압 증류하며 둥근 바닥 플라스크 내벽에 얇은 지질 막을 형성시킨 후, 형성된 지질 막을 250 mM 농도의 암모늄설페이트 용액을 가하여 지질막이 완전히 분산될 때까지 60 °C에서 수화하여 제조하였다. 제조된 리포솜은 입자의 크기를 조절하기 위하여 가압압출기로 각각 400, 200, 100, 그리고 80 nm의 풀리카보네이트 분리막(Whatman, USA)을 이용하여 각각 4–5회 이상 가압 압출하였다. 최종 리포솜 수용액은 투석막(MWCO 12,000–14,000)을 이용하여 4 °C에서 24시간 동안 막 투석을 진행하여 획득하였다. 독소루비신의 봉입은 리포솜 내부와 외부의 암모늄설페이트 농도 구배를 이용한 리모트 로딩법을 사용하였고,²¹ 암모늄설페이트가 봉입된 리포솜 용액과 독소루비신 수용액의 최종 농도가 2 mg/ml이 되도록

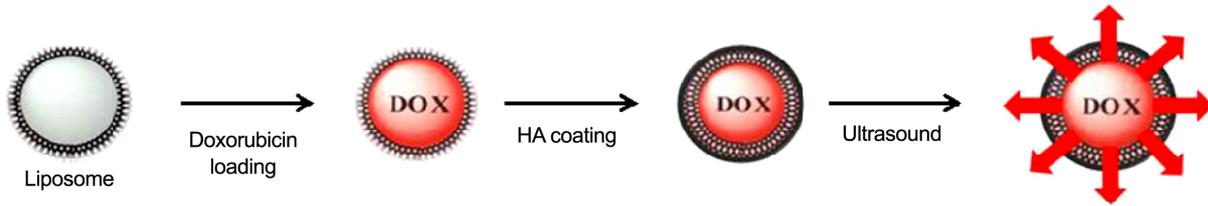


Figure 1. Schematic representation of HA coated liposome.

1:1 (v/v)로 혼합하여 60 °C에서 2시간 동안 숙성하여 독소루비신을 리포솜 내부에 봉입시켰다. 봉입되지 않은 독소루비신은 4 °C에서 24시간 동안 막투석을 진행하여 제거하였으며, 봉입효율은 UV-vis 분광광도계를 이용하여 최대 흡수파장 497 nm에서 농도를 측정하였다.

리포솜 표면에 HA 코팅

HA코팅은 리포솜의 표면에 칼슘아세테이트와 포스포릭에시드의 정전기적 반응을 이용하여 결합시키는 것으로서, 리포솜 용액에 칼슘 아세테이트 용액(2.5×10^{-2} M)과 포스포릭에시드 용액(1.5×10^{-2} M)을 1:1:1 (v/v) 비율로 천천히 첨가한 후, 25% (v/v) 암모니아 용액으로 pH 11로 맞추고 일정한 시간 동안 반응시켜 코팅이 되게 하였다. 코팅이 완료되면 sephadex-50 컬럼을 이용하여 리포솜을 정제한 후, 리포솜의 입자크기 및 표면전하를 측정하였으며, 리포솜 표면에 코팅된 HA의 결합은 inductively coupled plasma (ICP)를 이용하여 칼슘의 함량을 분석하여 확인하였다.

초음파 자극에 의한 HA코팅 리포솜으로부터 독소루비신의 방출

초음파에 의한 HA코팅 리포솜으로부터 독소루비신의 방출을 확인하기 위하여 ultrasonicator를 사용하여 초음파를 HA코팅 리포솜과 대조군 리포솜에 가해줌으로써 봉입된 독소루비신의 방출을 확인하였고, UV-vis 분광광도계로 방출량을 측정하여, HA코팅 리포솜의 초음파 민감도를 측정하였다.

HA 코팅 리포솜의 안정성

HA코팅 리포솜의 안정성을 확인하기 위하여 30% FBS 용액에서 리포솜의 입자크기를 확인하였다. 대조군 리포솜과 HA코팅 리포솜을 37 °C에서 배양시키며 단백질 흡착으로 인한 리포솜의 크기 변화를 측정하였다.

초음파 자극에 의한 리포솜으로부터 방출된 독소루비신의 세포 내 이입

초음파 민감성을 확인하기 위하여 HA코팅 리포솜으로

부터 방출된 독소루비신의 세포 내 이입효율을 유세포분석기(flow cytometry)를 통하여 확인하였다. 흑색종 세포주 B16F10은 10% FBS가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, USA) 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 먼저 HA코팅 리포솜에 초음파를 가하여 독소루비신의 방출을 유도하였다. 세포는 6 well 플레이트에 1×10^4 cells/well이 되도록 하였고, 2 mg/ml 독소루비신이 봉입되어 있는 HA코팅 리포솜을 혼합하여 CO₂ 인큐베이터에서 2시간 숙성 후에 공초점 현미경으로 세포 내 이입을 확인하였다. 한편, 동일한 세포배양 조건 하에서, 독소루비신 용액과 독소루비신이 로딩된 HA코팅 리포솜을 처리한 후, 파라포름알데하이드(4%, v/v)를 첨가하여 세포를 고정시키고 유세포 분석기를 이용하여 독소루비신의 세포 내 이입율을 확인하였다.

외부 초음파에 의한 종양조직 내에서 리포솜으로부터 방출된 독소루비신

종양조직 내에서 초음파 민감성 HA코팅 리포솜으로부터 독소루비신의 방출 효과를 확인하기 위하여 종양이 형성되어 있는 쥐를 이용하여 리포솜으로부터 방출된 독소루비신의 양을 측정하였다. 암 세포는 1×10^6 을 누드마우스의 오른쪽 대퇴부에 이식하여 사용하였다. 이식된 암의 크기가 5 mm³ 일 때 리포솜을 정맥주사하였고, 이후, 쥐를 마취시킨 상태에서 종양조직에 1 MHz 20%의 초음파를 30분 조사하여 리포솜으로부터 독소루비신의 방출을 유도하였다. 초음파 처리 후, 30분 동안 37 °C 항온조에서 마취상태의 쥐를 숙성한 후, 종양조직을 쥐로부터 적출하였다. 조직내의 독소루비신 농도는 종양조직을 균질기(homogenizer)를 사용하여 분쇄한 후에 원심분리를 하여 상등액을 채취하여 농도를 형광분광광도계 최대 파장인 497 nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

리포솜의 특성

리포솜의 표면에 HA결합을 확인하기 위해서 원소분석

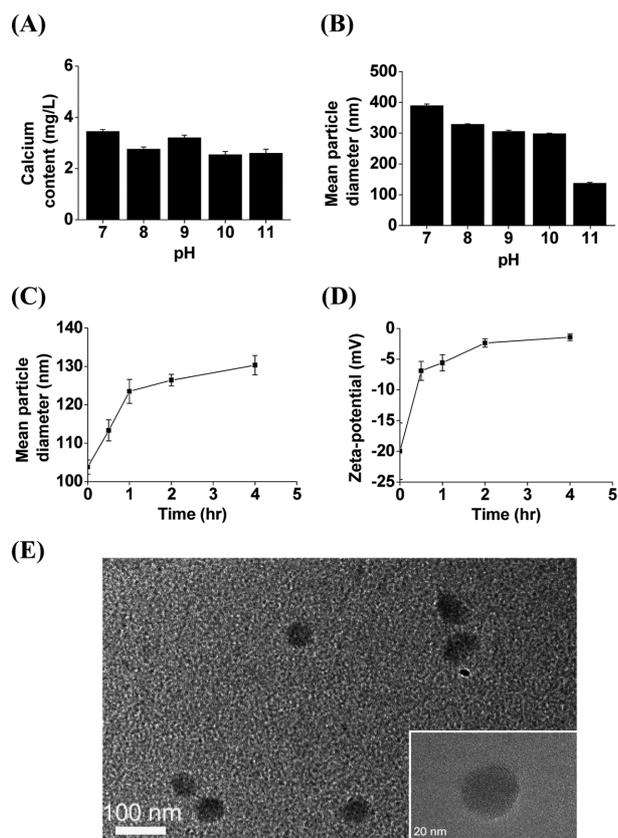


Figure 2. Physical properties of HA coated liposomes. (A) Calcium content on HA coated liposomal with different pH, (B) Mean particles diameter with different pH, (C) Mean particles diameter with different HA coating time, (D) Zeta potential with different HA coating time, (E) Morphology of HA coated liposomes by TEM. Mean and S.D. are shown ($n=3$).

(ICP)을 진행하여 칼슘의 함량을 측정하였다(Fig. 2). HA가 코팅된 리포솜의 칼슘함량은 평균 3 mg/L로 pH변화에는 일정하나(Fig. 2A), 리포솜의 크기는 pH 7에서부터 pH 12까지 pH가 높아질수록 작아지는 것을 확인 하였다(Fig. 2B). 한편, 대조군 리포솜의 크기는 103.7 ± 1.3 nm인 것에 비하여 HA의 코팅시간을 증가시킬수록 리포솜의 크기가 증가하였으며, 1시간 이상 코팅이 지속될 경우 입자의 크기가 미비하게 증가하였다(Fig. 2C). 결과로써, 리포솜 표면에 HA가 결합되면서 코팅 층이 형성되어 입자의 크기가 증가된 것으로 사료된다. 리포솜의 표면전하를 측정한 결과, 코팅 전에는 -18.5 ± 5.2 mV이었으며, HA가 코팅될수록 양이온성 전하를 나타냈다(Fig. 2D). 이는 HA의 결합으로 인한 양전하가 리포솜의 음전하와 이온결합이 형성되어 리포솜 표면의 표면전하를 상쇄시킨 것으로 판단된다. 이때, 리포솜 내부의 독소루비신 봉입효율은 95% 이상이었다.

상기의 결과로부터, 리포솜의 크기를 고려하여 HA코팅의

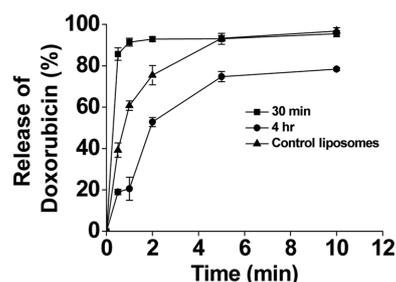


Figure 3. Ultrasound triggered doxorubicin release from HA coated liposomes with different coating time. Release of doxorubicin was measured by UV-vis at 497 nm. Mean and S.D. are shown ($n=3$).

최적 상태는 pH 11에서 코팅시간 30분이 적합하다고 판단을 하였고, 본 실험조건으로 이후 실험을 진행하였다. 한편, 리포솜의 형태를 TEM을 이용하여 확인하였으며 리포솜은 구형으로서 100 nm의 크기를 나타내었다(Fig. 2E).

초음파 자극에 의한 HA 결합 리포솜으로부터 독소루비신의 방출

HA 코팅시간에 따른 초음파의 민감성을 확인하기 위하여 30분, 4시간 HA코팅을 한 리포솜을 이용하여 독소루비신의 방출을 확인하였다(Fig. 3). 30분 동안 HA를 코팅한 리포솜에서는 초음파에 의하여 약물의 방출이 30초 이내에 80% 이상 증가하였으나 4시간 동안 HA를 코팅한 리포솜에서는 약 5분 후에 70%정도의 방출을 나타냈다. 이것은 리포솜의 HA결합 코팅시간이 지속될수록 리포솜의 표면에 HA의 결합이 증가하여 리포솜 표면이 두꺼워짐에 따라 초음파 민감도가 감소된 것으로 사료된다(Fig. 3). 또한 30분 코팅한 리포솜으로부터 약물의 방출은 대조군 리포솜에 비하여 30초내에 20% 향상되었으며, 본 결과로부터 리포솜의 표면에 HA를 코팅함으로써 초음파에 대한 민감도가 증가한다는 것을 확인하였다.

HA 코팅 리포솜의 안정성 평가

HA가 코팅된 리포솜의 혈류 내 안정성을 예측하기 위하여 37°C , 30% 혈장용액에서 리포솜의 크기변화를 측정하였다(Fig. 4). 24시간 이내에는 대조군 리포솜과 HA코팅 리포솜의 크기변화가 일정하였지만 24시간 후, 대조군 리포솜의 크기는 급격히 증가하는 반면, HA코팅 리포솜은 변화가 미비하였다. 따라서 HA를 리포솜의 표면에 코팅함으로써 혈장내의 단백질 결합이 억제되었고, 체내 주사 후, 혈류 내에서 리포솜이 안정한 상태를 유지할 수 있을 것으로 판단된다.

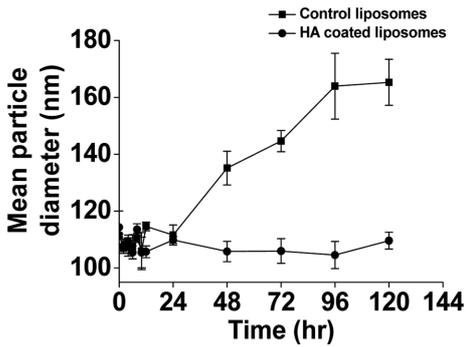


Figure 4. Size variation of liposomes with 30% serum at 37 °C. Mean and S.D. are shown (n=3).

초음파 자극에 의해 리포솜으로부터 방출된 독소루비신의 세포 이입

HA는 초음파에 의해서 빠른 결정화 반응으로 리포솜의 구조를 파괴하여 리포솜으로부터 약물의 방출을 증가시킨다.²² 초음파조사에 대한 리포솜으로부터 방출된 독소루비신의 세포 내 이입을 공초점 현미경과 유세포 분석

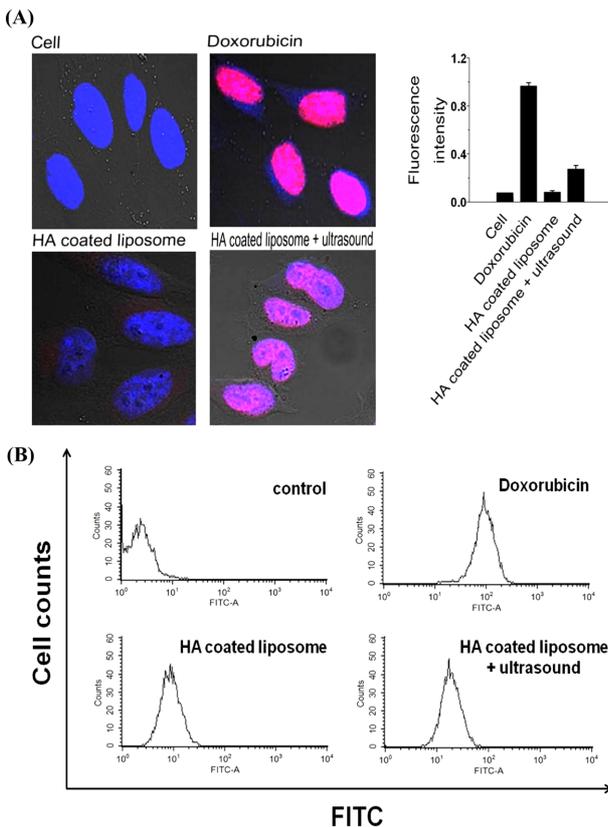


Figure 5. Intracellular uptake of DOX released from ultrasound-triggered HA coated liposomes. (A) Confocal microscopy images. (B) Flow cytometry images. HA coated liposomes were irradiated by high intensity focused ultrasound at 60 Hz (20%) for 2 min by ultrasonicator. Red; doxorubicin, Blue; DAPI staining. Mean and S.D. are shown (n=3).

기를 통하여 확인하였다(Fig. 5). 초음파를 조사하지 않은 HA코팅 리포솜은 자발적으로 독소루비신의 방출이 일어나지 않아 세포에 이입되지 않은 반면, 초음파(60 Hz, 2분)를 조사하여 준 HA코팅 리포솜은 독소루비신의 방출량이 증가하여 세포에 이입율이 증가하였다(Fig. 5A).

이와 동일한 방법으로 초음파 자극에 의하여 리포솜으로부터 방출되는 독소루비신의 세포 이입을 유세포분석기로 확인하였다(Fig. 5B). 세포에 이입된 독소루비신은 Fig. 5A와 동일한 경향을 나타냈으며 초음파로 처리한 HA 코팅 리포솜으로부터 방출된 독소루비신의 세포이입율이 증가한 것을 확인하였다.

외부초음파에 의한 종양조직 내에서 리포솜으로부터 독소루비신의 방출

초음파에 대한 HA코팅 리포솜의 독소루비신 방출을 확인하기 위하여 종양이 이식되어 형성된 쥐에 HA코팅 리포솜과 독소루비신 수용액을 각각 정맥주사 후, 1 MHz 20%의 초음파를 종양조직에 30분 조사하고 쥐에게서 종양조직을 적출하였다. 종양조직에서 독소루비신의 농도를 측정한 결과, 독소루비신 수용액만 투여한 그룹과 초음파를 조사하지 않은 HA 코팅 리포솜 그룹이 유사한 농도를 나타냈다(Fig. 6). 그러나 초음파를 조사하여 준 경우, 초음파를 조사하지 않은 경우보다 종양조직 내에서 독소루비신의 방출이 2배 증가하였다($P < 0.05$).

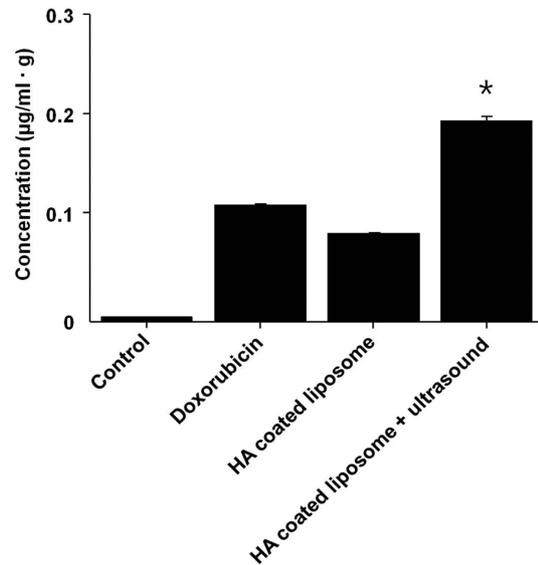


Figure 6. Doxorubicin concentration in tumor tissue after i.v. injection of HA coated liposomes with or without ultrasound. HA coated liposomes were irradiated by high intensity focused ultrasound at 1 MHz (20%) for 30 min by ultrasonicator. Mean and S.E. are shown (n=3). * $P < 0.05$ compared to HA coated liposomes without ultrasound.

따라서, 본 연구에서 개발된 HA 코팅 리포솜을 약물운반체로 사용할 경우 외부 초음파 자극에 의하여 리포솜으로부터 약물의 방출을 극대화시킬 수 있다는 것을 확인하였다.

결 론

리포솜이 체내에서 순환하는 동안 혈장 내 단백질의 흡착을 억제시키는 동시에, 외부 초음파 자극으로부터 리포솜 내부의 약물 방출을 극대화하기 위하여 HA를 리포솜의 표면에 코팅하였다. HA코팅은 리포솜의 안정성을 향상시켰고 초음파 자극에 의해 봉입된 독소루비신의 방출을 극대화시킬 수 있었다. 본 연구는 리포솜의 표면에 HA를 코팅함으로써 리포솜의 안정성과 초음파 민감성을 동시에 증가시킬 수 있다는 것을 확인하였고, 이러한 초음파 민감형 리포솜 제형은 주사한 약물의 최대 치료효과를 얻기 위한 유사한 병종에 대해 광범위하게 응용이 가능하리라 사료되며, 외부자극에 의하여 약물 방출을 효율적으로 제어할 수 있는 약물전달 방법을 제시하였다.

Acknowledgments. 이 연구는 교육과학기술부 도약과제(NRF-2009-0078434)의 연구비 지원으로 연구되었음.

REFERENCES

1. Torchilin, V. P. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 145.
2. Han, H. D.; Shin, B. C.; Choi, H. S. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2006**, *62*, 110.
3. XueMing, Li.; LiYan, Ding.; Yuanlong, Xu.; Yonglu, Wang.; QiNeng, Ping. *Int. J. Pharm.* **2009**, *373*, 116.
4. Moghimi, S. M.; Szebeni, J. *Prog. Lipid Res.* **2003**, *42*, 463.
5. Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K. *J. Control. Release* **2000**, *65*, 271.
6. Mühlen, A. Z.; Schwarz, C.; Mehnert, W. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1998**, *45*, 149.
7. Paoli, E. E.; Kruse, D. E.; Seo, J. W.; Zhang, H.; Kheirloomoom, A.; Watson, K. D.; Chiu, P.; Stahlberg, H.; Ferrara, K. W. *J. Control. Release* **2010**, *143*, 13.
8. Gopal, R.; Anyarambhatla.; David, Needham. *J. Liposome Res.* **1999**, *9*, 491.
9. Simões, S.; Moreira, J. N.; Fonseca, C.; Düzgüneş, N.; de Lima, M. C. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 947.
10. Zhang R. S.; Tang, M. G.; Bowyer, A.; Eienthal, R.; Hubble, J. *Biomaterials* **2005**, *26*, 4677.
11. Angelatos, A. S.; Radt, B.; Caruso, F. *J. Phys. Chem B* **2005**, *109*, 3071.
12. Kulkarni, R. V.; Biswanath, S. *J. Appl. Biomater. Biomech.* **2007**, *5*, 125.
13. Liu, C. Y.; Guo, J.; Yang, W. L.; Hu, J. H.; Wang, C. C.; Fu, S. K. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 4764.
14. Huang, S. L. *Adv. Drug. Delivery Rev.* **2008**, *60*, 1167.
15. Liu, Y. Y.; Miyoshi, H.; Nakamura, M. *J. Control. Release* **2006**, *114*, 89.
16. Liu, Y.; Yang, H.; Sakanishi, A. *Biotechnol. Adv.* **2006**, *24*, 1.
17. Xu, Q.; Tanaka, Y.; Czernuszka, J. T. *Biomaterials* **2007**, *28*, 2687.
18. Rose, F.; Hou, Q. P.; Oreffo, R. O. C. *J. Pharm. Pharmacol.* **2004**, *56*, 415.
19. Bohmer, M. R.; Klivanov, A. L.; Tiemann, K.; Hall, C. S.; Gruell, H.; Steinbach, O. C. *Eur. J. Radiol.* **2009**, *70*, 242.
20. Schroeder, A.; Honen, R.; Turjeman, K.; Gabizon, A.; Kost, J.; Barenholz Y. *J. Control. Release* **2009**, *137*, 63.
21. Fritze, A.; Hens, F.; Kimpfler, A.; Schubert, R.; PeschkaStüss, R. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758*, 1633.
22. Liu, T. Y.; Huang, T. C. *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 3927.