

기능성 Microspheres의 합성 및 생의학적 응용

김중현, 김우식

연세대학교 화학공학과

Synthesis of Functional Microspheres and Biomedical Applications

J. H. Kim and W. S. Kim

Dept. of Chem. Eng., Yonsei Univ.

ABSTRACT

Nowadays, microspheres are expected to be applied to biomedical areas and many studies are being performed.

For biomedical applications, many kinds of microspheres were synthesized by emulsion polymerization, emulsifier-free emulsion polymerization, and emulsifier-free emulsion polymerization with ionic surface-active comonomers. Further synthesis techniques about microencapsulation and magnetic microspheres are introduced.

Among the practical applications of microspheres, some interesting subjects are introduced. These include solid-phase immunoassays, labeling and identification of lymphocyte populations, extracorporeal and hemoperfusion systems, drug delivery systems, and immunomagnetic cell separation. In addition, basic theories, problems and research trends are also introduced.

Introduction

최근 고분자공학의 발전과 함께 생물공학의 발전이 빠른 속도로 이루어지고 있으며, 이와함께 기능성 microspheres의 생의학적 응용이 많은 주목을 받고 있다.

Microspheres는 Uniform Latex Particles(ULP)라고도 불리는 것으로, 입자 크기가 균일한 고분자 입자이다. 입자크기가 수 μm 에서 수십 μm 정도이기 때문에 microspheres라는 이름이 붙었다.

Microspheres는 1947년 처음 발견된 이래, 60년대까지 전자현미경 분야에서 전자현미경의 표준시료로 많이 이용되었다¹. 80년대에 들어와서, 생의학적 분야에서 많은 응용이 이루어져 왔으며 주요 응용분야는 다음과 같다^{2,3}.

- Solid phase immunoassays
- Labeling and identification of lymphocyte populations

- Extracorporeal and hemoperfusion systems
- Drug delivery systems
- Magnetic microspheres in cell separation
- Immobilized enzymes and catalysts

이 분야의 발전에는 biotechnology의 발전을 이용한 세포융합 기술로 동물이나 생물 반응기에서 균일한 항체를 생산할 수 있게 된 것이 큰 계기가 되었다. 이 기술은 앞으로 척추동물의 면역방어 작용제인 항체가 병이나 특별한 세포의 진단과 약물운반 그리고 생분리(bioseparation) 등에서 유용한 상품이 될 것을 예고하고 있다.

생물 공학에 응용하기 위한 여러 가지 종류의 Microspheres를 제조하기 위한 여러 기술이 개발되었다. 즉 일반적인 유화제를 사용한 유화중합^{4,5}, 시드 유화중합(seeded emulsion polymerization)⁶⁻⁸, 무유화제 유화중합(emulsifier-free emulsion polymerization)^{9,10}, 이온성 공단량체를 사용한 무유화제 유화중합(emulsifier-free emulsion polymerization with ionic and surface-active comonomers)¹¹⁻¹³ 등이 있다. 또한 최근에는 원하는 부위에 약물을 국지화할 수 있는 장점을 가진 자기적 성질을 띤 고분자 클로이드(magnetic microspheres)를 제조하는 여러 기술이 개발되었다. 그 예로 ⁶⁰Co gamma irradiation 을 사용하는 법¹⁴, 레독스 중합법(redox polymerization)¹⁵, 유화 중합법¹⁶ 등이 있다. 본 고에서는 이것에 대한 간략한 소개와 최근의 연구 동향에 대하여 다룰 것이다.

Synthesis of Microspheres

MICROCAPSULES AND MICROSPHERES

최근 약물 전달계(drug delivery system)의 속도(kinetics)를 제어하려는 연구와 활성물질(active ingredient)을 특정 기관이나 조직 또는 세포에 접근시켜 약물의 효능을 증가시키려는

연구가 진행되고 있으며 이를 위해 liposome¹⁷이나 nanosphere¹⁸ 등의 미세 시스템(submicroscopic system)이 개발되고 있으며 특히 microcapsule과 microspheres는 활성물질의 방출을 제어하고 목적 기관에 약물을 집중(vectorization)시킬 수 있는 오늘날 가장 주목받고 있는 시스템이다.

Microcapsule은 액체 혹은 고체 또는 가루 반죽 같은 물질을 함유한 고체(solid envelop)로 이루어진 물질이며 내용 물질은 고체 혹은 액체상으로 이루어진 활성 물질의 분자이다¹⁶. Microsphere는 크기가 microcapsule과 비슷하고 완전히 고체로 되어 있는 구형 물질로 내부상의 입자를 이루는 물질 안에서 분산되거나 용해되어 있는 활성 물질이다. 원료 물질로는 담체(support material)와 암색포를 제거하는 화학물질인 활성 성분으로 이루어져 있으며 Table 1 과 같은 요구 조건을 만족시켜야한다.

Table 1. Requirements of support materials.

- Ability to be shaped to the desired form.
- Release of the active substance by an appropriate mechanism.
- Stability of the form and adequate mechanical strength.
- Nontoxicity of the system itself and of any of its degradation products.
- Bionertia or biodegradation.
- Sterilizability.

흔히 비고분자로는 carnauba wax¹⁷와 cetyl alcohol¹⁸ 등이 있으며 고분자 물질로는 terephthaloyl dichloride로 가교 결합된 humane serum/albumin²², lactic acid와 glycolic acid에서 유도된 분해성 polyester²³ 등이 있다. 이를 제조하는 기술은 microencapsulation에 흔히 사용되는 방법에 속하며 (1) Hot melt of support material²⁴, (2) Solvent evaporation²⁵, (3) Stalagmopoesis²⁴ 등 3가지로 나눌 수 있다.

Hot melt 법은 4단계 공정으로 이루어져 있으며, 그 공정은 Fig.1와 같다.

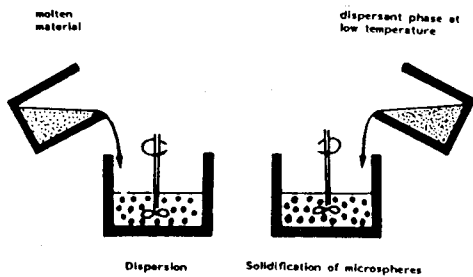


Figure 1. Microspheres, preparation by hot melt of the support material.

즉 담체가 녹는점이상으로 녹여지고 활성 물질이 분산된 후 담체/활성물질 성분이 합하여진 것이 적당한 분산상에서 유평된 후에 분산된 작은 방울은 또 얼마간의 분산상을 더함으로써 고화되고 후에 분리하여 얻는다.

용매 증발법은 먼저 활성분자(active molecule)와 microsphere wall 물질을 휘발성 유기 용매에 녹인 후 그것을 수용상에 유평시켜 o/w 에멀전을 만들고 용매를 증발시키 원하는 고체 microsphere를 얻으며 흔히 poly(D,L-lactic acid)의 제조에 많이 사용된다(Fig.2).

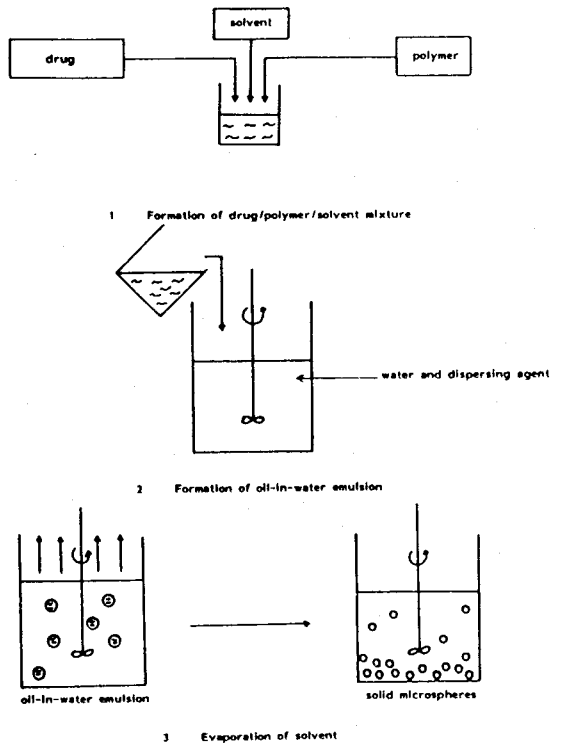


Figure 2. Microspheres, preparation by solvent evaporation.

이 방법은 간단해 보이지만 유기상의 성질, 유기상과 수상과의 비, 증발 온도, 담체의 양, 계면활성제의 종류 및 양 등 여러 가지 인자에 의하여 최종 물질의 성질에 영향을 준다.

Ross 등에 의하여 개발된 stalagmopoesis 법의 장치는 Fig.3과 같으며 녹은 물질을 노즐에서 떨어 뜨리고 고화시키는 방식이다. 그 특징으로는 상대적으로 입자 크기 분포가 균일한 많은 양의 microsphere를 얻을 수 있다.

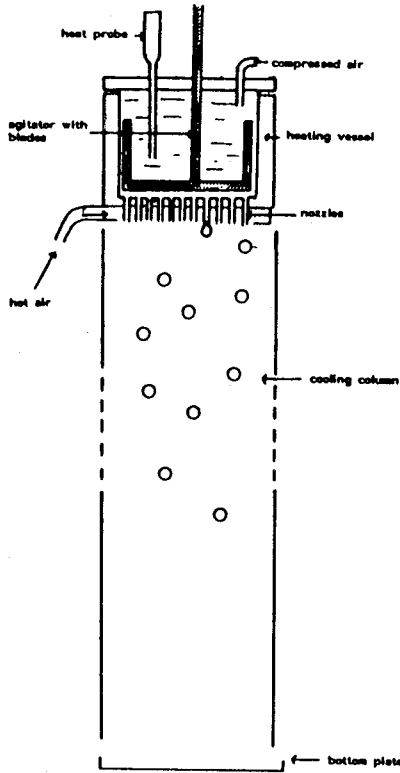


Figure 3. Microspheres, stalagmopoeisis.

Microcapsule을 제조하는 방법은 크게 coacervation법과 계면 중합법으로 나눌 수 있다. Fig.4과 Fig.5는 coacervation 법으로 ethylcellulose microcapsule을 제조하는 원리와 순서를 나타낸 것으로, A점에서의 고분자 용액의 온도를 내려 E점에 서 상분리가 일어나게 한다.

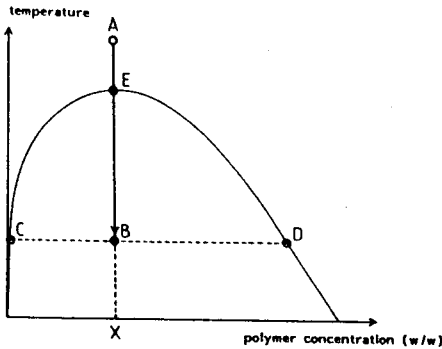


Figure 4. Microcapsules, coacervation by temperature lowering, principle.

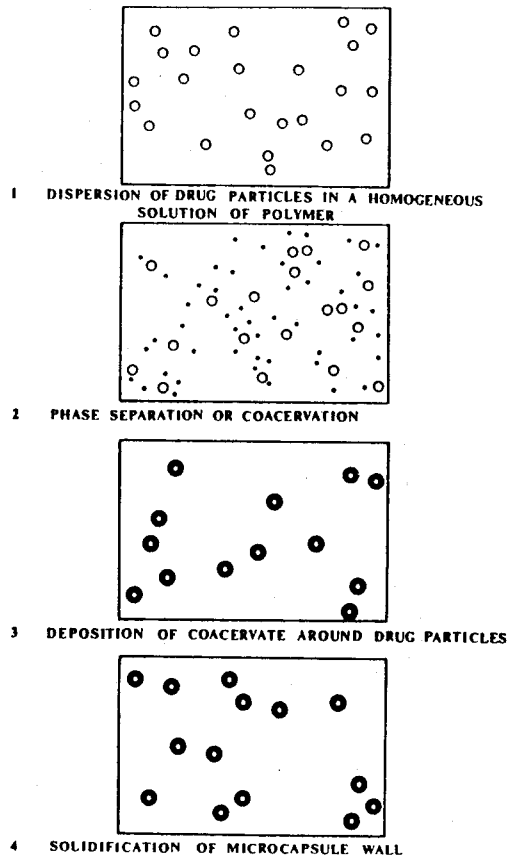


Figure 5. Ethylcellulose microcapsules, preparation by coacervation.

온도를 더 내림으로써 이것은 두개의 상으로 나뉘어지는데 그 조성은 C상에서는 용매가 D상에서는 고분자가 많은 상태이다. 계면 중합법은 생분해성 microcapsule을 만드는데 적용되고 Fig.6에서 보는 바와 같이 human serum albumin과 유기상과 계면활성제를 합하여 w/o 에멀전을 만든 후 difunctional acid chloride를 첨가하여 중합시킨 후 분리한다.

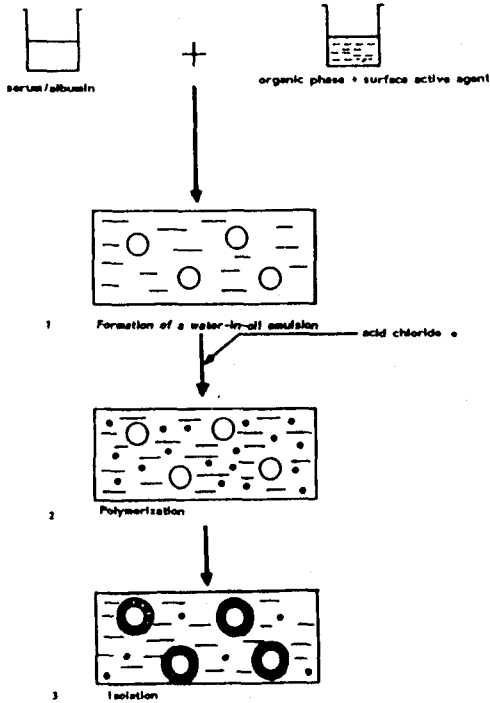


Figure 6. Cross-linked serum/albumin microcapsules, preparation by interfacial polymerization.

MAGNETIC MICROSPHERES AND MAGNETIC EMULSIONS

Chemotherapy는 수술이나 방사능 요법으로 치유할 수 없는 환자를 치료하기 위하여 개발된 중요하게 사용되는 치료 방법 중의 하나이다. 그 방법으로는 첫째, 특정 부분에 화학 치료 약물을 국지화(localization)시키는 것이고, 둘째, 약물을 중앙이 있는 자리 안으로 표적화(targeting)시키는 것이다. 가능한 약물 운반 시스템(DDS: drug delivery system)으로서의 약물 운반체로서는 liposome carrier system과 magnete and/or magnetic drug carrier가 있다. 앞으로는 주로 두번째 운반체 중에서도 magnetic albumine microspheres와 magnetic emulsion에 대하여 살펴 보겠다.

- Magnetic microspheres -

Fig.7은 정맥에 magnetic microsphere를 투여한 후에 목표조직에의 약물운반 매커니즘을 나타낸 것이다²⁶.

자기장은 목표물에 쓰여지고 자기에 반응하는 magnetic microsphere가 혈관계에 투여된후에 목표 지점에서 microsphere가 모여들고 내부에 포함하고 있는 약물을 내어 보낸다. Magnetic albumin microsphere는 혈청 단백질(serum albumin)과 자성 유체(magnetic fluid)로 제조되는데 자성 유체의 제조법은 Chart 1과 같다.

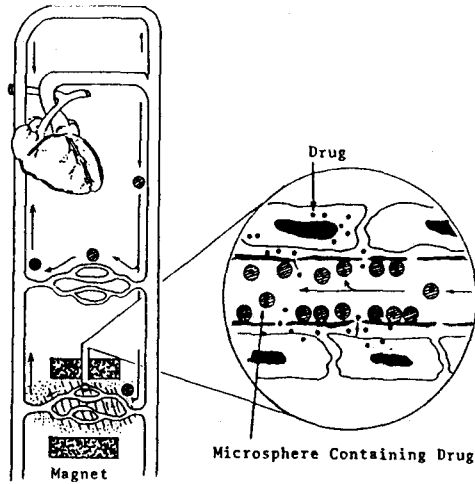


Figure 7. Schematic representation of possible mechanism for drug delivery to target tissues by magnetic albumin microspheres after i.v. administration.

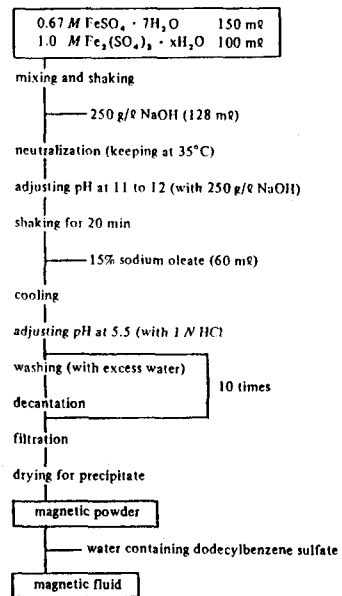


CHART 1. Schematic diagram of preparation of magnetic fluids.

Chart 1. Schematic diagram of preparation of magnetic fluids.

만들어진 자성 유체에 Fe₂O₃ 콜로이드 입자가 chloroform, kerosen 등의 용매에 균일하게 분산된다. 그후에 sodium oleate와 dodecylbenzene sulfate는 입자 표면에 흡착된다. (역시 효소와 항체도 이리 식으로 albumine microsphere에 흡착될 수 있다.) Fig. 8와 Chart 2에 상분리 유화 중합법(phase separation emulsion polymerization)²⁷으로 magnetic albumine microsphere를 제조하는 순서와 기구를 나타내었다.

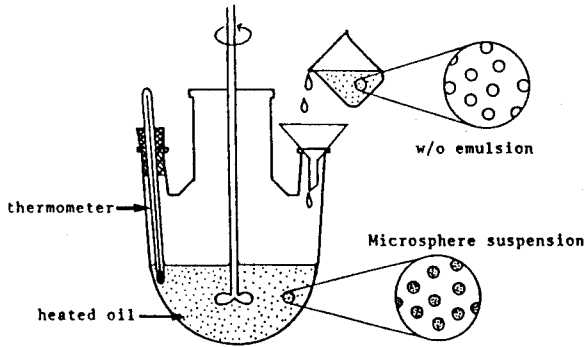


Figure 8. Apparatus for preparing albumin microspheres.

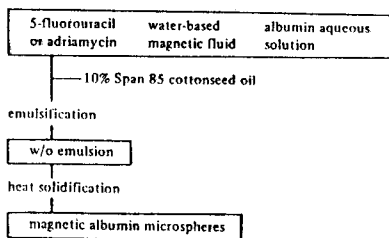


CHART 2. Schematic diagram of preparation of magnetic albumin microspheres containing 5-fluorouracil or adriamycin.

Chart 2. Schematic diagram of preparation of magnetic albumin microspheres containing 5-fluorouracil or adriamycin.

즉 serum albumin 과 fluorouracil 5 및 adriamycin 등의 항암제와 자성유체를 혼합한 용액을 유화제인 Span 85 를 포함한 cottonseed oil 또는 isootane/chloroform 에 유하시킨다. 그 후 생성된 w/o 에멀전을 화학약품이나 열로써 고화시킨후 ether 같은 유기 용매를 사용하여 microsphere를 추출해낸다.

- Magnetic emulsions -

에멀전 시스템은 제약, 향수, 식품 산업에 널리 이용되어왔다. 특히 지속적으로 약물을 방출할 수 있는 에멀전과 입과계 같은 조직내에 고르게 분산될 수 있는 여러 종류의 에멀전 합성이 연구되었다²⁸. 여기에서는 자기적인 방법으로 항암제를 특별한 목표지점에 국지화할 수 있는 oil-in-water (o/w) 에멀전에 대하여 다루겠다. Magnetic emulsion 은 분산상으로서 oleic acid 또는 ethyl oelate-based magnetic fluid와 연속상으로서 casein solution 그리고 기름 분산상안의 항암제인 methyl-CCNU 또는 ACNU 로 이루어져 있으며 대표적인 것을 Table 2 에 나타 내었다.

Table 2. Composition of magnetic emulsion formulations

Oleic acid-based magnetic emulsion	
Water phase	6.0 ml
Casein	60 mg
Water	q.s
Oil phase	1.5 ml
Magnetite	472 mg
Antitumor agent	45 mg
Oleic acid	q.s
Total volume	7.5 ml

Ethyl oleate-based magnetic emulsion	
Water phase	6.0 ml
Casein	60 mg
Water	q.s
Oil phase	1.5 ml
Magnetite	347 mg
Antitumor agent	45 mg
Ethyl oleate	q.s
Total volume	7.5 ml

Applications of Microspheres

SOLID-PHASE IMMUNOASSAYS(IA)

항체는 in vitro 진단법에 의해 단백질, 호르몬, 약물(drug), 기타물질 등의 존재여부를 알기위해 많이 사용되어 왔다. 최초의 정량적인 방법은 radioimmunoassay(RIA)이며, radioisotope를 이용하고 있다. 그러나 이 방법은 radioisotope의 반감기에 의한 소멸이 문제점이다. 최근 RIA도 microspheres를 이용한 방법으로 개선되어 아직 사용되고 있다.

Solid-phase immunoassay의 원리는 다음과 같다²⁹. Microspheres 입자표면에 결합되어 있는 항체는 단백질, 호르몬, 약물 등의 항원과 결합하게 되며, 그 결합정도를 여러가지 방법으로 측정하게 된다. 이때 microspheres 자체는 항원과 항체의 반응장소를 제공하며, 입자크기가 매우 작기 때문에 넓은 표면적을 제공한다는 장점도 동시에 가진다. 또 균일한 입자크기로 인해 항원-항체 반응의 정도를 정량적으로 알 수 있는 방법을 제공하게 된다. 반대의 경우로 microspheres 입자표면에 항원을 결합시킨 후 항체를 정량적으로 분석할 수도 있다.

Solid-phase immunoassay로 많이 사용되는 방법은 Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)²⁹와 Fluorescence Immunoassay (FIA)³⁰이다. 항원-항체 반응의 정도를 알아보기 위해 효소의 발색을 이용하는 것이 ELISA법, 형광물질을 이용하는 것이 FIA법이 된다.

최근 연구되고 있는 방법으로 latex agglutination test (LAT)²⁹가 있다. 항체는 항원 결합부위가 두 군데이므로 두 개의 항원과 결합을 하며, 또 microspheres 입자 하나에도 많은 수의 항체가 결합되어 있으므로, 결과적으로 항원-항체 반응은 microspheres의 응집(agglutination)을 유발시킨다. 이 응집 정도를 광산란(light scattering), 탁도(turbidity), angular dissymmetry 등으로 측정하여 정량적 분석을 행하는 것이다. 광산란의 경우에 대해 Fig.9에 도식적으로 나타내었다.

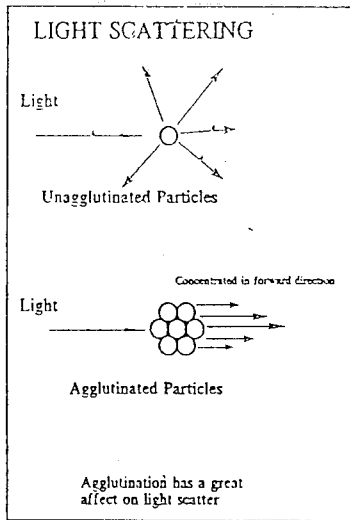


Figure 9. Light scattering detection of latex agglutination tests.

이 LAT 방법은 자동화된 분석기기로의 개발이 이루어지고 있다. 또 slide latex agglutination test라 하여 slide 상에서 간단한 정성분석으로도 이용되고 있다.

기타 방법으로 Particle Counting Immunoassay (PACIA)라 하여, 응집시 유입입자수가 감소하는 것을 이용하는 방법이 있고, 이 방법과 FIA를 결합한 PCFIA 등이 있다³⁰.

Solid-phase immunoassay에서는 microspheres 입자표면에 항원(또는 항체)를 결합시키는 기술이 중요하다. 처음에는 polystyrene 같이 소수성 표면을 제공하는 microspheres를 이용하여 항체(또는 항원)를 흡착시켜 사용했으나, 최근에는 표면이 기능성 기로 치환된 carboxylate modified latex (CML), amino modified latex (AML) 등이 사용되고 있다. 또 carbodiimide, n-hydroxy active ester, glutaraldehyde, polyacrolein based aldehyde 등에 의한 활성화(activation)도 이용된다.

그러나 표면에 직접 결합된 항체(또는 항원)는 거대분자인 항체(또는 항원)와 결합할 기회가 적기 때문에 spacer 또는 linker를 도입시키기도 한다. 이외에 표면에 불순물 존재여부, nonspecific agglutination 등도 주요변수이다.

LABELING AND IDENTIFICATION OF LYMPHOCYTE POPULATIONS (LILP)

LILP는 여러 질병의 진단을 위한 면역학적 연구에서 많이 이용되며, 이 분야에서도 microspheres의 응용이 기대되고 있다. Monodisperse microspheres를 이용한 림프세포(lymphocyte) 개체군의 확인 및 정량적 측정의 잇점은 무엇보다 간단하고 비용이 적다는 점이다. 현재 사용되고 있는 방법들은 매우 복잡하고 값비싼 기구(fluorescence activated cell sorter)를 사용해야 하며, 또 숙련된 인력이 요구되지만 이 방법은 모든 연구실에서 이용할 수 있는 값싼 기구의 사용만으로도 가능하다.

EXTRACORPOREAL AND HEMOPERFUSION SYSTEMS (EHS)

EHS 또한 microspheres의 응용 가능성이 높은 영역이다. Hemoperfusion이란 보통 저분자량인 분자(예: poison 등)들이 혈액순환으로부터 제거되는 절차로서, 맑게 된 plasma와 혈액세포는 다시 환자에게 주입된다. 현재 사용되고 있는 방법은 plasma를 목탄 column 혹은 이온교환 column에 통과시키는 것인데, 이 방법은 원하는 물질 뿐 아니라 다른 유용한 성분들까지 제거되는 단점이 있다.

그러나 킬레이트 시약 혹은 항체가 코팅된 기능성 microspheres를 이용할 경우 선택성을 부여할 수 있어 원하는 물질들만을 분리해 낼 수 있다. 특히 지나치게 과량의 약을 투여받은 환자나 중금속으로 오염된 환자에게 유용한 방법이다.

DRUG DELIVERY SYSTEMS (DDS)

Microspheres는 DDS에도 응용될 수 있다. 치료용 위약 약품을 함유한 microspheres는 자기장에 의해서 혹은 모노클론 항체에 의해 표적화가 가능하다. 자기장에 의한 방법은 magnetic microspheres를 이용하여 외부 자기장을 걸어주는 물리적 방법이며, 모노클론 항체에 의한 방법은 tumor cell에 대한 항체를 이용하여 표적화를 시키는 생물학적 방법이다. 두 가지 방법을 다 사용할 수도 있으며, 부수적인 연구가 많이 필요하다. 특히 이 방법으로 암의 치료에 뛰어난 효과가 예상된다.

DDS를 위한 microspheres는 다음과 같은 조건을 갖추어야 한다.

- 생물친화성 (bio-compatible)
- 생분해성 (bio-degradable)
- 무독성 (non-toxic)
- 주어진 상황에서 그 특성을 오랫동안 일정하게 유지할 수 있는 능력

- 모세관에도 침투할 수 있는 적당한 크기
- 약의 방출 속도를 제어 가능성
- 고도의 특이한 약물 표적화

MAGNETIC MICROSPHERES IN CELL SEPARATION

최근에 적당한 합체들로 코팅된 magnetic microspheres를 이용한 immunomagnetic cell separation (IMCS)이 세포분리에 있어서 기존의 여러가지 방법들을 대신하여 유용하게 사용되고 있는데^{31,32}, 그 이유는 IMCS가 한 번의 분리로 많은 세포들을 조작할 수 있고 그 조작이 간단하고 쉬우므로 시간적으로도 훨씬 효율적이기 때문이다. Immunomagnetic separation의 특이성은 microspheres의 물리적인 특성에 의존하는 것이 아니라 세포표면의 항원에 의한 항체의 친화력에 의존하므로 모든 immunomagnetic method는 세포분리의 생물학적 방법이라 하겠다. Magnetic microspheres에 의해 붙잡힌 세포는 자기장에 의해 유지된다.

세포분리에 사용되는 magnetic microspheres는 다음과 같은 조건을 가져야 한다. 세포분리에 사용되는 media나 isotonic buffer 안에서 안정성(stability)을 유지해야 하며, magnetic microspheres와 항체, 항체와 세포간에 강한 친화력을 가져야 한다. 또 그 microspheres는 특이성 없는 세포와 결합해서는 안된다.

또한 이 방법은 bone marrow transplantation (BMT)에도 유용하다. 이 방법은 체내의 bone marrow cell suspension에서 microspheres를 이용하여 T 세포를 제거하는데, 이 방법은 graft-vs-host 질병을 막게 해 준다. 특히 이 방법은 이식 제공된 조직이 적합하지 않은 환자들에게도 골수이식을 가능하게 하며, 적합한 이식 조직을 가진 환자들에게도 이식에 따른 질병 가능성을 줄일 수 있다. 또 이 방법으로 tumor cell을 제거하는 것은 암을 가지고 있는 환자의 이식수술에 매우 유용하다. 암을 가진 환자의 bone marrow는 전이하고 있는 암세포에 의해 종종 오염되어 있으며, 이들 암세포는 보통 매우 적은 비율로도 병의 초기제발을 일으키기에 충분하므로, 기능성 microspheres를 이용하여 암세포를 제거하는 것은 초기제발을 막아준다.

그러나 magnetic microspheres에 기초한 cell separation 방법은 아직 발전 초기단계에 있다. 원하는 세포를 모두 분리하기 위한 연속 흐름 장치의 설계에 많은 연구가 필요하다. Fig.10에 연속흐름 장치의 예를 나타내었다.

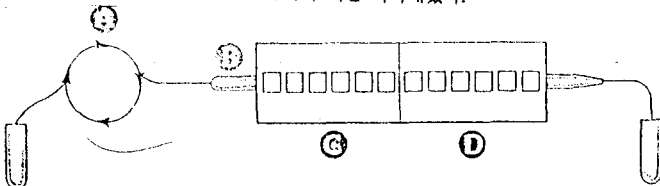


Figure 10. The apparatus for immunomagnetic separation.

또 이식조직에 남아있는 암세포의 수를 알아내는 방법이 필요한데, 이것은 매우 적은 양의 암세포에 의해서도 치료적 가치가 완전히 실패할 수 있기 때문이다.

IMMOBILIZED ENZYMES AND CATALYSTS

Microspheres에 고정화된 효소는 biotechnology, 식품공업, 제약공업 등에 광범위하게 응용될 수 있다. Microspheres의 이들 system에의 도입은 다음과 같은 잇점들을 가진다.

- 효소(촉매)는 공정이 끝난 후 재사용될 수 있어 비용을 줄일 수 있다.
- 효소(촉매)와 기질들 사이에 넓은 접촉면적을 제공하여 수율을 높일 수 있다.
- 효소(촉매)를 반응혼합물에서 제거하는 것이 용이하다.

OTHERS

기타 응용분야로 단백질의 chromatographic separation, flow cytometry standards, DNA probes, in vivo imaging applications 등에 사용될 수 있다.

참고문헌

1. L. B. Bangs, "Uniform Latex Particles", Seragen Diagnostics, Indianapolis, (1985).
2. M. S. El-Aasser and R. M. Fitch, "Future Directions in Polymer Colloids", Martinus Nijhoff, Netherlands (1987).
3. A. Rembaum and Z. A. Tokes, "Microspheres: Medical and Biological Applications", CRC Press, Florida (1988).
4. W. D. Harkins, J. Amer. Chem. Soc., 69, 1428 (1947).
5. W. D. Harkins, J. Polym. Sci., 2, 217 (1947).
6. E. A. Wilson et al., J. Phys. and Colloid Chem., 53, 357 (1949).
7. E. B. Bradford and J. W. Vanderhoff, J. Appl. Phys. 26, 864 (1955).
8. R. H. Ottewill and J. N. Shaw, Koll. z. z. Poly., 215, 161 (1966).
9. Y. Chung-Li et al., Colloid & Polym. Sci., 60, 163 (1976).
10. A. R. Goodall et al., Brit. Polym. J., 10, 141 (1978).
11. L. J. Liu and I. M. Krieger, J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed., 19, 3013 (1981).
12. B. W. Green et al., J. Colloid Interface Sci., 32, 90 (1970).

13. B. W. Green and D. P. Sheetz, *J. Colloid Interface Sci.*, 32, 96 (1970).
14. Molday et al., *Nature*, 2268, 437 (1977).
15. Kronick et al., *Science*, 200, 1074 (1978).
16. Ohman et al., *Hum. Immunol.* 14, 128 (1985).
17. D. Taylor et al., *Proc. Int. Symp. of the Brit. Pharm. Tech. Conference* (1980).
18. E. Duzman et al., *Int. Symp. on Glaucoma, Jerusalem*, Aug 15 (1983).
19. *Pharmacopée Française, Monographie Microcapsules*, J. O., 8233 (1978).
20. J. Bories et al., *Am. J. Roetgenol.*, 134, 404, (1980).
21. D. Terracol, *These Doctorat de 3eme Cycle, Paris XI*, (1979).
22. M. Beaufilet et al., "Microspheres and Drug Therapy", Elsevier, Amsterdam, (1983).
23. C. Thies et al., *J. Pharm. Sci.*, 73(12), 1721, (1984).
24. F. Puisieux and A. Raziell, *Sci. Technol. Pharm.*, 11(4), 149, (1982).
25. C. Thies, *CRC Crit. Rev., Biomed. Eng.* 8(4), 335, (1982).
26. P. Guiot and P. Couvreur, "Polymeric Nanoparticles and Microspheres", CRC Press, Florida (1986).
27. Y. Tamakawa et al., *J. Urol.*, 125, 19, (1981).
28. J. Y. Drouin and F. Puisieux, *APHIF*, 33, (1981).
29. "Microparticle Immunoassay Techniques", 2nd Ed., Seradyn Inc.
30. M. E. Jolley et al., *J. Immunological Methods*, 67, 21 (1984).
31. G. Kvalheim et al., *Bone Marrow Transplantation*, 4, 567 (1989).
31. J. T. Kemshead et al., *Br. J. Cancer*, 54, 771 (1986).