

리포솜을 이용한 플라스미드 DNA의 봉입

송미향 · 이만형 · 용철순* · 오두만†

대구호성가톨릭대학교 약학대학, *영남대학교 약학대학

(1996년 9월 13일 접수)

Entrapment of Plasmid DNA in Liposomes

Mi Hyang Song, Mann Hyung Lee, Chul Soon Yong* and Doo-Man Oh†

College of Pharmacy, Catholic University of Taegu-Hyosung, Kyongsan, 712-702, Korea

*College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan, 712-749, Koera

(Received September 13, 1996)

Liposomes of pSV- β -Galactosidase vector plasmid DNA with various lipid composition were prepared by the thin-film method. Size distribution, shape and the efficiency of plasmid DNA encapsulation were investigated. Effect of sonication time on the plasmid DNA entrapment in liposomes and stability at 4°C were also examined. Sizes of neutral liposomes were about 100-200 nm and above 1 μ m, and those of cationic liposomes were about 400-600 nm and above 1 μ m. Shapes of liposomes entrapped plasmid DNA were spherical. Proper sonication time for better entrapment was below 15 minutes and stability at 4°C was decreased rapidly after 1 day. Plasmid DNA entrapments of complex liposomes of various lipids were higher than those of liposomes made from one sort of lipid. Plasmid DNA entrapments of cationic liposomes were higher than those of neutral liposomes.

Keywords—Liposome, pSV- β -Galactosidase vector plasmid DNA, Sonication time, Stability, Entrapment

리포솜의 자기폐쇄적 이중지질막의 구조는 생물학적인 막의 기능과 매우 흡사하다. 예를 들면 세포나 조직의 크기와 모양을 결정하며, 투과장벽으로서 기능을 하며, 막단백질이 포함되어 고정될 수 있도록 지지대를 형성시켜 준다. 또한 리포솜은 여러가지 극성 또는 비극성 물질을 함유하고 여러가지 다른 소수성 장벽을 통과할 수 있으며, 소수성 환경내에 봉입된 물질을 운반할 수 있다. 리포솜과 다른 분자간에 일어나는 상호작용에는 수용성 물질의 경우 봉입되거나, 리포솜 표면에 소수성으로 혹은 정전기적으로 결합되는 경우가 대부분이다.¹⁾ 리포솜은 대부분 천연물질로 부터 만들어지므로, 생체적합성이고, 생체분해성이며 독성이 없고 면역반응이 거의 없다. 따라서 이러한 리포솜의 특성 때문에 그 용도는 다양하여 세포의 모양이나 막의 단백질의 기능에 대한 메카니즘에 대한 기초 연구에 사용되고 있을 뿐만 아니라 약물송달,¹⁻⁴⁾ 진단시약,

⁵⁾ 면역보조제, 연고나 화장품, 식품공학 또는 의료산업에 까지 응용되고 있다.⁶⁻¹²⁾

여러가지 리포솜의 특성 중에서 리포솜은 수용성 고분자물질 특히 DNA, RNA, 또는 oligonucleotide가 세포내로 수송되는 것을 촉진하는데 이것을 이용한 유전자 송달에 대한 연구가 활발하다.¹³⁻¹⁸⁾ 즉 유전자를 세포배양에 도입하여 재조합 폴리펩티드와 단백질을 생산할 수 있을 뿐 아니라 세포기능을 연구하고 유전결합을 치료(gene therapy)하기 위한 강력한 도구로서 사용될 가능성이 많다. 즉, 단백질이나 효소들을 세포에 전달하는 것은 일시적인 해결책이기 때문에, 유전자를 효소결합된 세포에 직접전달하여 결손된 물질을 양산함으로써 세포내에서 유전물질을 치료할 수 있도록 하는 연구가 진행되고 있다.¹³⁻¹⁷⁾ 이러한 유전자 전달에 사용되는 방법에는 투과도 증진제, fusogen, 삼투압 shock, 직접적인 주사와 같은 단순한 물리 혹은 화학적 방법 이외에도 electroporation과 같은 전기적인 방법이 있다. 그 중에서 가장 많이 사용되고 있는

† 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

방법은 인산칼슘, DEAE-dextran, 다양이온과의 상호작용을 이용한 유전자침전법인데, 이것은 결과적으로 생성된 고분자 복합체가 세포내로 서서히 endocytosis를 일으켜 유전자를 전달하도록 하는 방법이다.

새로운 유전자전달법으로서 리포솜을 이용하는 방법에는 크게 두 가지로 나누는데, 단순히 유전자를 봉입시켜 그것을 세포내에 전달하는 방법과 다양이온 축합 방법이다. 후자는 음이온으로 이루어진 핵산과 양이온성 리포솜이 복합체를 형성한 후, 정전기적으로 세포막과 결합된 후 생긴 세포표면부착 복합체가 endocytosis에 의해 세포내로 들어가는 방법이다.

봉입하려는 유전자의 일반적인 분자량은 보통 백만에서 천만달톤 정도이므로, 커다란 LUV(large unilamellar vesicle)형의 리포솜이 필요하다. 더욱이 핵산은 음전기를 띠기 때문에, 리포솜은 양전기를 띤 표면을 가져야만 수용성 핵산으로 봉입될 수 있다. cochleate/calcium depletion method를 사용하여 phosphatidylserine으로 부터 제조된 양이온성 리포솜을 주로 사용한다.^{1,2)} 그러나 이러한 방법으로 제조된 리포솜의 봉입율은 2-10% 정도이며, 리포솜의 leakage와 불안정성은 매우 높았다. 레시친으로 제조된 리포솜에 calf thymus DNA를 봉입한 경우, MLV(multilamellar vesicle)로서 2-3%, LUV로서는 5.4-6.6%의 낮은 봉입율이 보고되었다.¹²⁾ 봉입후 안정성을 높이기 위해서 콜레스테롤을 추가하여 기계적인 지질 이중층의 강도를 높여주기도 하고, 유전자 전달효율을 높이기 위해 항체, glycolipid와 leictin 등을 첨가하는 방법도 있다.

그러나 endocytosis에 의해 세포내로 들어가서 endosome-lysosome fusion이 일어나면 봉입된 물질은 대부분 파괴될 수 있다. 이러한 핵산의 lysosomal damage를 막기 위한 방법 중의 하나가 pH-sensitive 리포솜이다.^{14,28)} 이것은 유전자가 세포내에 들어가면 lysosome과 fusion되기 전에 endosome에서 파괴가 되기 때문이다. 척추동물 세포에 유전자를 전달하는 효율은 매우 낮았는데, 예를 들자면 pBR322 plasmid를 리포솜에 봉입하여 전달한 효율은 10^{-6} 정도였으며,¹⁹⁾ 다양이온성 리포솜을 사용한 경우는 수백배가 더 높았다. 이러한 양이온성 리포솜을 이용한 유전자 전달(gene transfection)은 봉입보다는 오히려 양이온성 리포솜과 음이온성 핵산 복합체의 형성에 의해 이루어지는 메카니즘이기 때문에 보통 50%이상의

양이온성 리포솜을 함유한 SUV (small unilamellar vesicle)가 이용된다. 최초로 사용된 양이온성 리포솜은 DOTMA (N-[1-(2, 3-dioleoyloxy) propyl]-N, N, N-trimethylammonium)이며,⁸⁾ 이후 DDAB (dimethyldioctadecylammonium bromide),²⁷⁾ DC-Chol (3 β -[N-(n',N'- dimethylaminoethane) carbamoyl] cholesterol),²⁰⁾ TMAG (N-(α -trimethyl ammonioacetyl)-didodecyl-D-glutamate choride)²¹⁾ 등이 사용되고 있다. 최근에는 상품화된 양이온성 리포솜으로서 Lipofectin (DOTMA : DOPE=1:1),^{22,25)} LipofectAmine, CellFectin, LipofectAce, Transfectam²³⁾ 등이 있다.

양이온성 리포솜과 핵산간의 상호작용에 의해 생성되는 복합체의 형태는 핵산이 양이온을 띤 지질 이중층내에 완전하게 봉입이 되며 핵산 주위로 응결된 입자들의 덩어리를 형성한다.¹⁵⁾ 따라서 봉입된 DNA는 비교적 안정하며, 외부에서 DNase를 가해도 파괴되지 않고 활성을 유지한다.^{24,25)}

위에서 언급한 낮은 봉입효율때문에 치료제로서 개발될 DNA나 oligonucleotides같은 값비싼 약물을 효과적으로 봉입할 수 없고, DNA를 리포솜에 봉입하여 세포배양 또는 생체내로의 전달 효율은 아직도 낮지만, 생체적합성 등이 우수하여 다른 유전자 치료방법 보다는 우수한 점이 많다. 따라서 음이온성, 양이온성, 또는 여러가지 혼합 인지질을 사용하여 다양한 리포솜들을 만들고, 그 제조과정 중에 리포솜의 봉입효율이나 안정성에 미치는 요인들을 확인하여 그 특성을 더욱 개선해야 된다. 또한 유전자의 세포내 전달에 대한 메카니즘을 이해하고, 좀더 유효한 리포솜을 개발하여, 차세대에 곧 이루어 질 유전자 치료제체의 체제설계에 필요한 기본지식을 축적할 필요가 있다.

따라서 본 연구에서는 양이온성 리포솜을 포함한 여러가지 리포솜을 만들어 그 안에 plasmid DNA를 봉입하고, 그 안정성 및 효율을 측정하여 이미 보고된 방법보다 더 우수한 리포솜을 만들어 보고자 하였다.

실험방법

시약 및 기기

phosphatidylcholine (PC), dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), dilaurylphosphatidylcholine (DLPC) 등은 Sigma Chem. Co., dimethyldioctadecylammonium bromide (DDAB)는 Flu-

ka, pSV- β -Galactosidase plasmid DNA와 RNase free DNase는 Promega Co.에서 구입하고 이외 일반시약은 일급을 사용하였다.

사용된 기기로는 회전식감압농축기 (RE-111, Büchi, Switzerland), 감압건조기(VOC-300SD, Eyela, Japan), sonicator (RK-1028, Bandeline, Germany), centrifuge (Model VS 15-CF, Vision Scientific Co., LTD), UV/Visible spectrophotometer (Ultrospec[®] 2000, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), 입도 분석기 (Model BI-9000AT Digital Correlator, Brook Haven), 전자현미경 (H-600, Hitachi, Japan) 등이다.

리포솜의 제조

PC, DMPC, DLPC 같은 인지질을 단독 혹은 혼합물로, 또는 양이온성 리포솜이 되도록 일정량의 DDAB를 가한 뒤, 클로로포름에 녹여서 등근 플라스크에 넣은 다음, 40°C 중탕으로 회전식감압농축기 (RE-111, Büchi, Switzerland)상에서 감압증발시켜 얇은 지질막을 만들었다.²¹⁾ 이를 진공하에서 하룻밤동안 방치하여 남아있는 클로로포름을 완전히 제거시키고 pSV- β -Galactosidase plasmid DNA가 용해되어 있는 Tris-EDTA(pH 7.6)를 가하여 혼합하고 bath형 초음파분쇄기(RK-1028, Bandeline, Germany)에서 수화시켰다. 현탁액 중의 지질의 농도는 10 mM로 조절하였다.

크기분포측정

제조한 여러조성의 리포솜을 광산란(Model BI-9000AT Digital Correlator, Brook Haven)을 이용하여 25°C에서 입자크기 분포를 측정하여 비교하였다.

Transmission Electron Microscope (TEM) 관찰

구리재질의 그리드를 제조한 리포솜 현탁액으로 적시고 건조한 후 0.2% 우라닐아세테이트액에 2초간 염색하고 건조 후 TEM (H-600, Hitachi, Japan)을 사용하여 리포솜형태를 관찰하였다.

초음파분쇄시간이 봉입에 미치는 영향

초음파분쇄시간이 봉입에 미치는 영향을 알아보기 위하여 5, 15, 30분간 초음파분쇄 (High Frequency = 35 kHz, Heating capacity = 600 W)시켰다. 그 다음 봉입율을 측정하여 그 영향을 알아보았다.

리포솜의 안정성

plasmid DNA가 봉입된 리포솜을 4°C에서 방치하고 0, 1, 2, 3, 4, 5 일후에 봉입된 plasmid DNA량을 측정하여 시간의 경과에 따른 안정성을 알아보았다.

plasmid DNA 봉입을 측정

리포솜 현탁액을 5,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 침전을 위하여 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4) 500 μ l로 다시 현탁화시킨 뒤 37°C에서 RNase-free DNase로 봉입되지 않은 plasmid DNA를 완전히 제거하였다.¹⁵⁾ 이때 완충액 (40 mM Tris-HCl pH 7.9, 10 mM NaCl, 6 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂)을 동량 가하였다. EDTA를 2 mM로 가하여 DNase의 활성을 중단시킨 뒤, 페놀:클로로포름 (1:1)을 동량 가하여 봉입된 plasmid DNA를 추출하기 위해 12,000 \times g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취했다. 초산암모늄을 2 M로 가하고 2배량의 100% 에탄올을 가하여 plasmid DNA를 침전시켰다. 침전을 Tris-EDTA (pH 7.6)에 용해시킨 뒤 260 nm에서 흡광도를 측정하여 봉입된 plasmid DNA량을 구했다(흡광도 1은 DNA 50 μ g/ml를 나타낸다).

봉입율은 다음과 같이 계산했다.

$$\text{봉입율(\%)} = \frac{\text{봉입된 plasmid DNA량}}{\text{사용한 총 plasmid DNA량}} \times 100$$

결과 및 고찰

입자크기 및 TEM 사진

plasmid DNA가 봉입된 여러가지 리포솜의 크기를 측정한 결과 크기분포가 넓어서 평균크기값은 높았다 (Figure 1). 분포곡선을 보면 중성지질로 만든 PC, DMPC, DMPC:DLPC (1:1, 2:3)은 직경이 약 100-200 nm 정도에서 1 μ m 정도까지 넓게 분포하였고, 양이온성지질로 만든 DMPC:DDAB (1:1), DLPC:DDAB (1:1), DMPC:DLPC:DDAB (1:1:1, 2:3:1)는 보다 큰 약 400-600 nm에서 1 μ m 이상의 크기로 중성지질들보다는 분포가 균일하였으나 역시 넓은 분포를 보였다(Figure 1, Table I). 다만 DMPC:DLPC:DDAB (2:3:1) 리포솜은 평균입자크기가 809.72 nm로서 비교적 크지만 균일한 입자크기를 보였다. 이렇듯 양이온성지질들의 크기가 큰 것은 DDAB가 다른 중성지질들의 결합을 강하게 하였기 때문이라고 생각된다.

TEM 사진(Figure 2)에서 보면, 중성지질로 만든 리포솜의 평균입자크기가 약 100 nm이며 plasmid DNA를 둘러싼 구형의 리포솜이었다. DMPC:DMPC (2:3)로 제조된 리포솜의 경우, 1 μ m이상의

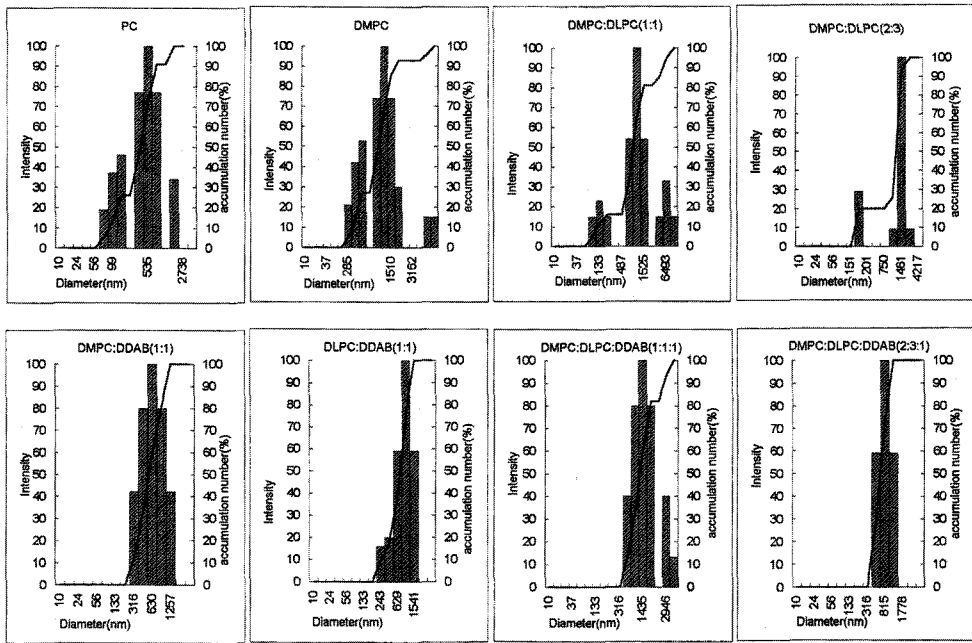


Figure 1—Size distribution of various liposomes. PC : phosphatidylcholine, DMPC : dimyristoylphosphatidylcholine, DLPC : dilaurylphosphatidylcholine, DDAB : dimethyldioctadecylammonium bromide.

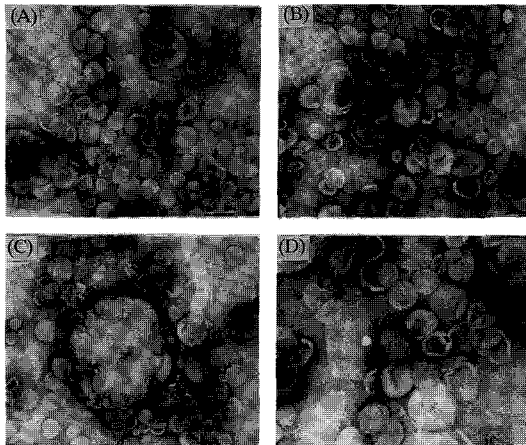


Figure 2—Transmission electron microscopy of liposomes of PC(A) and DMPC : DLPC=2:3(B-D). (magnification A-C : $\times 50,000$, D : $\times 80,000$)

크기를 가진 뭉쳐진 입자를 확인할 수 있었는데 이는 입자도 측정의 결과와 일치하였다(Figure 2 중 (C), (D)). 이러한 입자들의 뭉침의 방지가 앞으로 해결해야 할 문제점이라고 사료된다.

초음파분쇄시간의 영향

봉입율을 높이기 위해 초음파분쇄시간을 변화시켜 본 결과(Figure 3), 5분보다는 15분이 1% 정도 더 봉

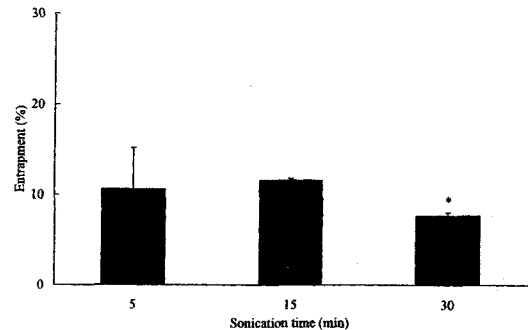


Figure 3—Effect of the sonication time on DNA entrapment(%) in liposomes made of phosphatidylcholine. Each value represents the mean \pm SE (n=3 to 5. *p < 0.05).

입이 되었으나 유의성은 없었고, 30분의 초음파분쇄는 5분보다 plasmid DNA의 봉입이 3% 정도 유의성있게 작아졌다(p=0.002). 이는 초음파분쇄가 리포솜의 크기를 작게 만들고 시간이 길수록 발생하는 열이 리포솜을 파괴하기 때문에 봉입율이 떨어졌다고 생각된다. 본 실험에서 plasmid DNA의 봉입율이 우수한 리포솜을 만들기 위해서는 초음파분쇄시간은 5-15분이 적당하다고 사료된다.

리포솜의 안정성

4°C에서 보관하면서 시간별로 봉입율을 측정할 결

과, 시간이 지나면서 안정성이 떨어져 봉입율도 떨어짐을 보였다(Figure 4). 1일이 지났을 때 가장 급격히 안정성이 떨어져 봉입되었던 plasmid DNA량이 1/3 정도 방출되었으며, 그 이후엔 서서히 안정성이 떨어짐을 보였다(반감기는 3.8일). 이는 시간이 지남에 따라 리포솜이 파괴되거나 뭉쳐진 상태로 봉입되었던 plasmid DNA가 유실되었기 때문이라고 생각된다. 그런데 1일이 경과되었을 때 안정성이 많이 떨어지는 것은 in vitro나 in vivo 실험에서 모두 문제가 되므로 건조된 지질피막과 약물이 용해된 용액을 따로 보관하였다가 필요시에 혼합하여 사용하는 것이 안정성 면에서는 좋다고 생각된다. 따라서 본 실험에서는 리포솜을 제조한 후 1일 내에 모든 실험조작을 마쳤다.

여러가지 리포솜들의 봉입

DMPC의 경우, 유의성은 없었으나 DMPC 하나만으로 이루어진 리포솜보다는 DLPC와 동일비율로 혼합한 리포솜이 약 1%, 2:3인 경우가 약 1.6% 정도 plasmid DNA를 더 많이 봉입하였으며, 이 보다는 양이온성을 띤 DMPC:DDAB (1:1), DMPC: DLPC: DDAB (1:1:1), DMPC:DLPC: DDAB (2:3:1)이

각각 4, 4, 2% 정도씩 더 많이 봉입되었으나 유의성은 없었다(Figure 5, Table I). DLPC의 경우도 유의성은 없었으나 단독보다는 DMPC:DLPC 비가 1:1, 2:3으로 혼합지질을 이룬것이 각각 0.4, 1.2% 정도 더 봉입하였고 이 보다는 양이온을 띤 DLPC:DDAB (1:1), DMPC:DLPC:DDAB (1:1:1), DMPC:DLPC: DDAB (2:3:1)들이 각각 6, 3, 1.4% 더 봉입하였다(Figure 5, Table I). DMPC:DLPC가 1:1인 경우, 여기에 DDAB를 동일비율로 혼합한 경우가 유의성은 없었지만 약 3%정도 더 봉입하였다. DMPC:DLPC (2:3)인 경우는 DMPC:DLPC:DDAB (2:3:1)와 비슷한 봉입율을 보였다(Figure 5, Table I). 그러나 전체적으로, 단독지질보다는 중성혼합지질이, 그리고 이 보다는 양이온성지질이 plasmid DNA에 대한 봉입율이 높음을 알 수 있었다 (Figure 5).

이와 같은 결과는, 일반적으로 지질들의 크기가 클수록 봉입이 잘 된다고 알려진 것처럼,¹²⁾ 크기측정에서의

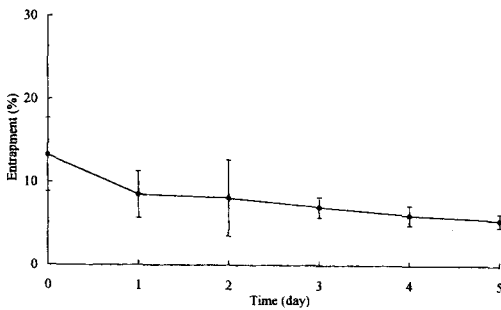


Figure 4—Stability of liposomes made of phosphatidylcholine during storage at 4°C. Each value represents the mean±SE (n=3 to 5).

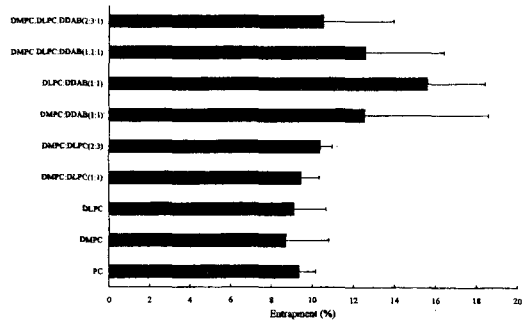


Figure 5—Efficiency of DNA entrapment in liposomes made of different lipids. PC : phosphatidylcholine, DMPC : dimyristoylphosphatidylcholine, DLPC : dilaurylphosphatidylcholine, DDAB : dimethyldioctadecylammonium bromide. Each value represents the mean±SE (n=3 to 5).

Table I—Characteristics of Liposomes Made of Various Compositions. PC : phosphatidylcholine, DMPC : dimyristoylphosphatidylcholine, DLPC : dilaurylphosphatidylcholine, DDAB : dimethyldioctadecylammonium bromide. Each Value Represents the Mean±SE (n=3 to 5).

Lipids	Composition	Entrapment(%)	Particle size(nm)
PC	-	9.35±0.81	514.83± 35.78
DMPC	-	8.71±2.11	1392.97±155.16
DLPC	-	9.11±1.57	-
DMPC : DLPC	1:1	9.46±0.88	2057.87±236.80
DMPC : DLPC	2:3	10.39±0.58	1205.7 ± 52.10
DMPC : DDAB	1:1	12.55±6.03	725.04± 30.81
DLPC : DDAB	1:1	15.61±2.81	915.78± 42.14
DMPC : DLPC : DDAB	1:1:1	12.59±3.83	1753.46± 93.96
DMPC : DLPC : DDA	2:3:1	10.56±3.40	809.72± 14.69

중성지질들의 크기보다는 양이온성 지질들의 크기가 크다는 결과(Figure 1)와 일치한다. 또 양이온성 지질이 음이온을 띤 plasmid DNA를 정전기적으로 더 잘 결합하기 때문이라고 생각된다. 단독지질보다 혼합지질들의 봉입율이 높은 것은 void가 적은 interdigitated bilayer 구조를 만들어 그 기계적 강도가 barrier로써 기능이 향상되기 때문이라고 생각된다.^{11,26)}

실험결과, 가장 봉입율이 우수한 것은 DLPC: DDAB의 몰비율이 1:1인 것 (15.61%)이었다.

결 론

봉입율이 우수한 리포솜을 제조하고자 하는 목적으로 실험한 결과, 리포솜의 형태는 구형으로 plasmid DNA를 둘러싸고 있으며 크기는 중성지질들보다는 양이온성지질들의 크기가 컸다. 제조방법 확립을 위한 방법 중의 하나로 행한 초음파분쇄(35 kHz, 600 W)는 15분일 때까지는 봉입정도가 어느 정도 일정하였으나 30분일 때는 크기도 작아지고 열의 영향으로 인해 봉입율이 떨어짐을 보였다. 그러나 4°C에 보관하면서 시간별 안정성 실험에서는 반감기가 약 3.8일이면서 하루가 경과되었을 때 급격히 안정성이 떨어졌다. 혼합지질들이 단독지질들보다는 봉입율이 높았고, 중성지질들보다 양이온성 지질들이 입자크기가 크고 음이온을 띤 plasmid DNA와 정전기적으로 결합하기 때문에 봉입율이 더 우수했다. 이를 바탕으로 plasmid DNA는 양이온성 지질로 약 5-15분간 초음파 분쇄시킬 때 리포솜내로의 봉입이 가장 우수함을 알았다.

추후에는 plasmid DNA의 초음파분쇄에 의한 파괴정도, plasmid DNA가 봉입되지 않은 리포솜의 분리, 그리고 리포솜의 뭉침 방지 등을 연구하고 이를 바탕으로 cultured mammalian cell line을 사용하여 양이온성 리포솜이 plasmid DNA를 세포내까지 잘 수송하여 그 기능이 발현되는지를 계속 검토하고자 한다.

감사의 말씀

본 연구는 대구효성가톨릭대학교의 연구비에 의하여 연구되었기에 이에 감사드립니다. 그리고 입도분석에 협조해 주신 대전화학연구소 이재홍박사님, 오승열박사님과 본교 미생물학교실 이지현양에게도 감사드립니다.

문 헌

- 1) D.D. Lasic, *Liposomes: from physics to applications*, Elsevier, 1993.
- 2) G.V. Betageri, S.A. Jenkins, D.L. Parsons, *Liposome Drug Delivery System*, Technomic, Lancaster and Basel, 1993.
- 3) R.T. Fraley, S. Subramani, P. Berg, D. Papahadjopoulos, Introduction of liposome-encapsulated SV 40 DNA into cells, *J. Biol. Chem.*, **255**, 10431-10435 (1980).
- 4) R. Fraley and D. Papahadjopoulos, New generation of liposomes. The engineering of an efficient vesicle for the delivery of nucleic acid, *Trends in Biochem. Sci.*, **6**, 77-80 (1981).
- 5) Chong-Kook Kim and Kyung-Mi Park, Liposome immunoassay for bioactive substances, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **24**, 201-217 (1994).
- 6) R. Fraley, R.M. Straubinger, G. Rule, E.L. Springer, D. Papahadjopoulos, Liposome-mediated delivery of deoxyribonucleic acid to cells: Enhanced efficiency of delivery related to lipid composition and incubation conditions, *Biochemistry*, **20**, 6978-6987 (1981).
- 7) G.Y. Wu and C.H. Wu, Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo, *J. Biochem. Chem.*, **263**(29), 14621-14624 (1988).
- 8) P.L. Felgner, T.R. Gadek, Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**, 7413-7417 (1987).
- 9) M. Zenke, P. Steinlein, E. Wagner, M. cotten, H. Beug and ML Brinstiel, Receptor-mediated and cytosol of transferrin-polycation conjugates: Unefficient way to introduce DNA into hematopoietic cells, *Proc. Natl. Acad. USA.*, **87**, 3655-3659 (1990).
- 10) Eun-Ock Lee, Effect of phospholipase D on the L- α -Dimyristoyl-phosphatidyl Choline liposome containing cholesterol, L- α -Phosphatidylinositol and L- α -phosphatidylserine, *Yakhak Hoeji*, **27**, 249-256 (1983).
- 11) Min Kim, Suk Kyu Han and Chong-Kook Kim, Effect of lipid composition on the properties of phospholipid liposomal membranes, *Yakhak Hoeji*, **38**, 131-139 (1994).
- 12) Bum Jin Lee, Studies on the Entrapment of DNA in Liposomes, M.S. Thesis for Pharmacy, Seoul National University (1986).
- 13) K. Konopka, L. Stamatatos, CE Larse, BR Davis, N. Duzgunes, Enhancement of human immunodeficiency virus type I infection by cationic liposomes: the role of CD4, serum and liposome-cell interactions, *J. Gen.*

- Viol.*, **72**(11), 2685-2696 (1991).
- 14) JY Legendre, FC Szoka Jr, Delivery of plasmid DNA into mammalian cell lines using pH-sensitive liposomes: comparison with cationic liposomes, *Pharm. Res.*, **9**(10), 1235-1242 (1992).
 - 15) H. Gershon, R. Ghirlando, SB Guttman, A. Minsky, Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection., *Biochemistry.*, **32**(28), 7143-7151 (1993).
 - 16) VJ Dwarki, RW Malone, IM Verma, Cationic-mediated RNA transfection, *Methods. Enzymol.*, **217**, 644-654 (1993).
 - 17) T. Takehara, N. Hayashi, Y. Miyamoto, M. Yamamoto, E. Mita, H. Fusamoto, T. Kamada, Expression of the hepatitis C virus genome in rat liver after cationic liposome-mediated in vivo gene transfer, *Hepatology.*, **21**(3), 746-751 (1995).
 - 18) H. Kojima, N. Ohishi, M. Takamori, K. Yagi, Cationic multilamellar liposome-mediated gene transfer into primary myoblasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **207**(1), 8-12 (1995).
 - 19) C. Nicolau, A. Cudd, Liposomes as carriers of DNA, *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Syst.*, **6**, 239-271 (1989).
 - 20) J.K. Rose, L. Buoncore, M.A. Whitt, A new cationic liposome reagent mediating nearly quantitative transfection of animal cells, *Biotechniques.*, **10**, 520-525 (1991).
 - 21) J.C. Kim, E.O. Lee and J.D. Kim, The Hemolytic characteristics of amphotericin B-containing egg PC liposomes, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **23**(2), 111-118 (1993).
 - 22) X. Gao, L. Huang, A novel cationic liposomes reagent for efficient transfection of mammalian cells, *Biophys. Biochem. Res. Commun.*, **179**, 280-285 (1991).
 - 23) B. Delaplace, *Biotech. Forum Europe*, **8**, 360 (1991).
 - 24) G.J. Dimitriadis, Entrapment of plasmid DNA in liposomes, *Nucleic Acids Research*, **6**(8), 2697-2705 (1979).
 - 25) R.T. Fraley, C.S. Fornari and S. Kaplan, Entrapment of a bacterial plasmid in phospholipid vesicles: Potential for gene transfer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3348-3352 (1979).
 - 26) N. Darthasarathy, S.R. Elizabeth and J.M. Thomas, Studies of the ethanol-induced interdigitated gel phase in phosphatidylcholine using the fluorophore 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene, *Biochemistry*, **27**, 9175 (1988).
 - 27) N. D z g nes, J.A. Goldstein, D.S. friend and P.L. Felgner, Fusion of liposomes containing a novel cationic lipid, N-[2,3-(Dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethyl- ammonium: Induction by multivalent anions and asymmetric fusion with acidic phospholipid vesicles, *Biochemistry*, **28**, 9171-9184 (1989).
 - 28) C.-J. Chu, J. Dijkstra, M.-Z. Lai, K. Hong and F.C. Czoka, Efficiency of cytoplasmic delivery by pH-sensitive liposomes to cells in culture, *Pharm. Res.*, **7**(8), 824-834 (1990).