

## PLGA ナノスフェアを用いた遺伝子デリバリーシステムの開発

田原耕平,<sup>\*,a</sup> 山本浩充,<sup>a</sup> 竹内洋文,<sup>b</sup> 川島嘉明<sup>a</sup>

### Development of Gene Delivery System Using PLGA Nanospheres

Kohei TAHARA,<sup>\*,a</sup> Hiromitsu YAMAMOTO,<sup>a</sup> Hirofumi TAKEUCHI,<sup>b</sup> and Yoshiaki KAWASHIMA<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Pharmaceutical Engineering, School of Pharmacy, Aichi Gakuin University, 1-100 Kusumoto-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8650, Japan, and <sup>b</sup>Laboratory of Pharmaceutical Engineering, Gifu Pharmaceutical University, 5-6-1 Mitahora-higashi, Gifu City 502-0004, Japan

(Received June 14, 2007)

The development of nonviral vectors for the efficient and safe delivery to cells has long been awaited to facilitate gene therapy. Recently, many nonviral vectors modified with cationic lipids, cationic polymers, *etc.* have been reported. However, those nonviral vectors with cationic materials require improved stability, longer duration of gene expression, and reduced cytotoxicity. We successfully prepared mucoadhesive poly (lactide-co-glycolide) nanospheres (PLGA NS) by modifying the nanoparticulate surface with chitosan to improve mucosal peptide absorption after oral and pulmonary administration. Furthermore, we found that nucleic acid, which was not dispersed in the organic solvent, could be dispersed by forming a complex with cationic lipid. Using this phenomenon, polynucleic acids for gene therapy (plasmid DNA, antisense oligonucleotide, small interfering RNA, *etc.*) can be encapsulated into the matrix of the polymer particles with the emulsion solvent diffusion method. The advantages of this preparation method are its simple process and avoidance of an ultrasonication process for submicronization of particles. The resultant nanospheres show better cellular uptake and different gene therapeutic effects compared with conventional vectors due to their improved adherence to cells and sustained release of polynucleic acid in the cells. In conclusion, chitosan-coated PLGA NS can possibly be applied in nonviral vectors for gene therapy.

**Key words**—nanosphere; emulsion solvent diffusion method; chitosan

#### 1. はじめに

近年、疾病治療の高度化に伴い、薬物治療に関して薬物の放出制御、標的組織送達性など、製剤の機能化、精密化が求められている。これらを達成するための手法の1つとして、ナノスフェア(NS)やリポソームなどのサブミクロンサイズの微粒子キャリアの応用が注目されている。微粒子の基剤には、生分解性、生体適合性の材質を用いることが必須であり、薬物の担持能、放出制御は、その材質に大きく依存する。<sup>1,2)</sup> ポリ乳酸・グリコール酸(PLGA)は、古くは、手術用縫合糸等に利用される生分解性、生体適合性に優れたポリマーである。また武田

薬品工業で開発された長期徐放性製剤に使用されるなどの実績もある。PLGAを用いたマトリックスタイプの微粒子(ナノスフェア)は、様々な方法により調製可能である。遺伝子のような水溶性薬物を封入する際にはW/O/Wエマルジョンを水中乾燥することにより調製するW/O/Wエマルジョン溶媒留去法を利用することが多く、ペプチド医薬品などを封入した微粒子キャリアに関する研究が数多く行われている。<sup>3-6)</sup>

しかし、これらの方法は調製プロセスが複雑で、ナノ粒子を得るには、強力な乳化装置を用いる必要があるため、せん断力によるストレスや、発生する熱による遺伝子の失活が危惧される。

われわれが独自に開発したエマルジョン溶媒拡散法は、乳化装置を必要とせず、マイルドな条件で高分子ナノスフェアを調製することができる。またこの調製方法は、粒子表面を機能性物質で簡単に修飾

<sup>a</sup>愛知学院大学薬学部製剤学講座(〒464-8650 名古屋市千種区楠元町1-100), <sup>b</sup>岐阜薬科大学製剤学教室(〒502-8585 岐阜市三田洞東5-6-1)

\*e-mail: tahara@dpc.agu.ac.jp

本総説は、日本薬学会第127年会シンポジウムSD1で発表したものを中心に記述したものである。

することも可能である。<sup>7,8)</sup>

本稿では、エマルジョン溶媒拡散法による、遺伝子封入 PLGA ナノスフェア及び、その粒子表面を生分解性カチオン性ポリマーであるキトサン (CS) で修飾した粒子の開発について紹介する。

## 2. W/O/W エマルジョン溶媒留去法による遺伝子封入 PLGA ナノスフェアの調製

われわれはまず、これまでに報告されている調製法のうち、Wang らの W/O/W エマルジョン溶媒留去法 (ダブルエマルジョン溶媒留去法) により、プラスミド DNA (pDNA) を封入した PLGA ナノスフェアの調製を試みた。<sup>9)</sup> その基本的な調製機構を Fig. 1 に示す。pDNA を溶解させた水相とポリマーを溶解した有機溶媒相を混和し、超音波により一次乳化して、W/O エマルジョンを得る。続いて、PVA 水溶液を加えて二次乳化を行い、W/O/W の複合エマルジョンを形成させる。その後、有機溶媒相を減圧留去すると、エマルジョン内のポリマーの溶解度が低下し、エマルジョンの形状を保持したまま、エマルジョン表面から内部に向かって、高分子及び pDNA が沈積、固化し、ナノスフェアが得られる。今回、pDNA 封入 PLGA ナノスフェアの調製では、pDNA を溶解する水相にトリス-EDTA 緩衝液 (TE buffer; pH 8.0) を、PLGA を溶解する有機溶媒相にクロロホルムを用いた。

W/O/W エマルジョン溶媒留去法による粒子調製において、より微細なエマルジョンを形成させるためには強いせん断力を加えることのできる乳化装置が使用される。特にサブミクロンサイズのエマルジョン滴の形成には、超音波照射による乳化が一般的である。<sup>11)</sup> 超音波の照射時間及び出力の強度に応じて、調製される粒子は微細で均一なものとなる。しかしながら、超音波照射時間が長くなるほど、内水相の外水相への漏出が起こる。さらに、pDNA は長時間の超音波照射により、切断、分解が生じ

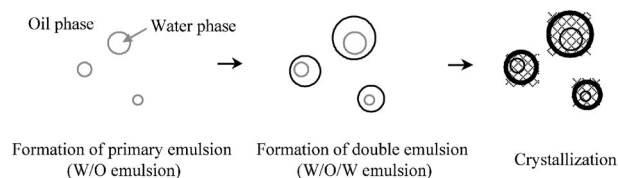


Fig. 1. Preparation Mechanism of pDNA Loaded PLGA Nanosphere by W/O/W Emulsion Solvent Evaporation Method

る。そこで超音波の照射時間が粒子物性に及ぼす影響について検討した。

W/O 型の初期エマルジョン形成時の超音波照射時間を 10 秒間に固定して一次乳化を行い、二次乳化時の超音波照射時間を 0, 5, 20, 60 秒と変化させて粒子を調製した。得られた粒子の粒子径、pDNA 封入率を Fig. 2 に示す。

超音波照射を行わずに調製した粒子の粒子径は約 2.5  $\mu\text{m}$  であったが、超音波照射時間の延長に伴い粒子径は減少し、60 秒の超音波照射で約 200 nm の粒子が得られた。その一方で、封入率は、超音波照射を行わなかった場合、約 50% と高い値を示したのに対し、超音波照射時間の延長に伴い封入率は減少し、60 秒の超音波照射での封入率は約 5% と低くなった。これは、エマルジョンの微細化に伴い pDNA が外水相中へ漏出したためと考えられた。また、超音波照射 20 秒より延長しても、粒子径変化は小さかったのに対し、封入率が減少していることから、超音波照射により内相中の pDNA の分解が生じており、これが封入率の低下の一要因であることが示唆された。

以上の検討より、PLGA ナノスフェア内に、外部刺激に対して敏感な遺伝子を封入するためには、粒子調製プロセスにおいて、超音波照射などのストレスを与えないことが必要である。

## 3. エマルジョン溶媒拡散法による遺伝子封入 PLGA ナノスフェアの調製

W/O/W エマルジョン溶媒留去法を用いて、遺

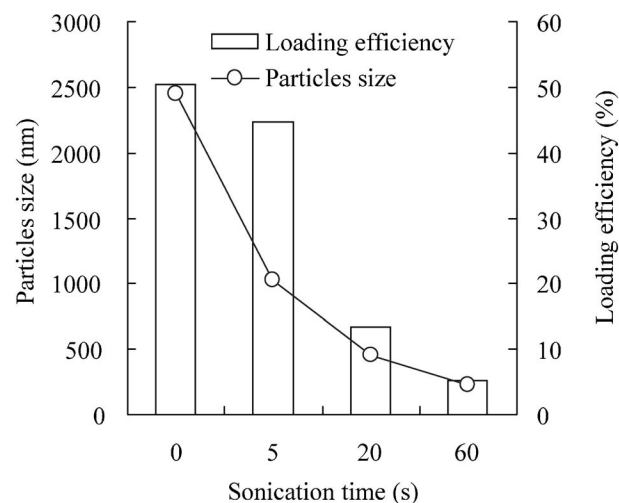


Fig. 2. Effect of Sonication Time on Particle Size and Loading Efficiency of pDNA Loaded PLGA NS

伝子封入ナノスフェアを調製すると、遺伝子が一部失活するため、遺伝子キャリアの調製には、よりマイルドな条件で調製する必要がある。

当研究室ではこれまで、マイクロスフェア、ナノスフェアの調製法であるエマルジョン溶媒拡散法を開発し、高い生体適合性、生体内分解性を有するポリ乳酸・グリコール酸共重合体 (PLGA) を用いてナノ粒子を調製し、低分子の薬物を始め、ペプチドやタンパク等の高分子量の薬物も封入可能であることを報告してきた。<sup>8,9)</sup> エマルジョン溶媒拡散法とは、液中造粒技術である球形晶析法の一つであり、薬物を含むポリマー溶液を貧溶媒に滴下、瞬時に析出、造粒する方法である。また、形成されるエマルジョンは自己乳化的にサブミクロンサイズとなるため、乳化装置を必要とせず、マイルドな条件でナノスフェアを調製することができ、遺伝子キャリアの調製にも適用できると考えられる。そこで、われわれは、水中エマルジョン溶媒拡散法による、PLGAを基剤とした遺伝子送達用ナノ粒子の調製法の確立及びその物性について検討した。

水中エマルジョン溶媒拡散法による PLGA ナノスフェアの基本的調製機構を Fig. 3 に示す。薬物及び PLGA を良溶媒に溶解させたのち、貧溶媒にかく拌下滴下する。滴下直後、急速に良溶媒が貧溶媒に、貧溶媒は良溶媒に相互拡散するため、有機溶媒相と水相の界面が乱れ、ポリマー溶液が自己乳化し、サブミクロンサイズの O/W 型エマルジョンが形成される。このとき、PVA や高分子がエマルジョン滴表面に吸着し、エマルジョンの安定性を高めていると考えられる。その後、溶媒の相互拡散がさらに進み、溶解度の低下とともに PLGA 及び薬物が析出し、ナノスフェアとなる。ナノスフェアの形成はエマルジョン滴の形状を保持したまま、液滴表面から内部に向かってポリマー及び薬物が析出、成

長する。

水中エマルジョン溶媒拡散法では、ポリマー・薬物溶液として、それぞれの物質の良溶媒を、適当な比率に混合して用いる。PLGA はジクロロメタンやクロロホルム、アセトンなどに溶解するが、エタノールや水などへの溶解度は極めて低い。通常、エマルジョン溶媒拡散法による PLGA ナノスフェアの調製には、水への拡散性などの観点から、アセトンが用いられる。一方、本研究において封入を試みる核酸は、緩衝液には溶解するが、有機溶媒中には溶解できない。すなわち、PLGA の良溶媒であるアセトンは核酸に対しては貧溶媒として、また、核酸の良溶媒である緩衝液は PLGA に対しては貧溶媒として働く。PLGA 溶液を核酸溶液に加えたところ、脱水和によるものと思われる核酸の析出が認められた。

PLGA は溶解し、pDNA が析出している状態で、ナノスフェアの調製を試みたところ、粒子径 208.8 nm の粒子が得られた。しかしながら、本粒子内に内封されている pDNA 量を定量したところ、pDNA 封入率は 0.3% と極めて低く、ほとんどの pDNA が PVA 水溶液中に漏出してしまふことが明らかになった。

pDNA は、カチオン性物質と容易にイオンコンプレックスを形成し、不溶性複合体を形成することが知られている。<sup>10-12)</sup> 複合体の形成に伴い、電荷の中和、立体的構造の変化などにより溶媒への親和性なども変化するものと考えられる。<sup>13-15)</sup> そこで、pDNA の析出抑制、ナノスフェア内への封入率向上を目的として、pDNA とカチオン性脂質である DOTAP との複合体を形成させ、粒子調製時の内相中へ添加し、粒子調製を試みた。

複合体を形成させることにより、pDNA の析出は認められなくなり、得られた PLGA ナノスフェア

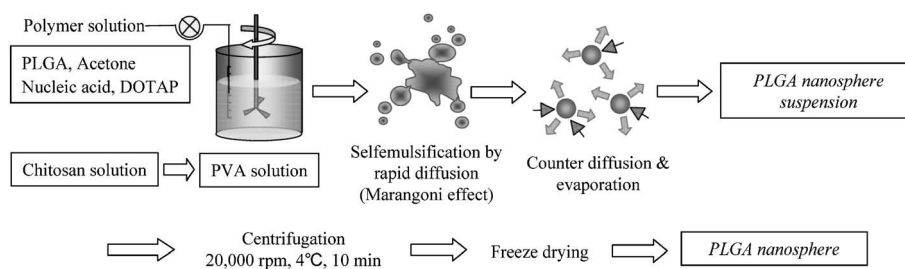


Fig. 3. Schematic Representation of PLGA Nanospheres Preparation Process

アの封入率も向上した (Fig. 4, Table 1). これは、複合体を粒子調製に用いることにより、pDNA の強い負電荷が中和され、有機溶媒への親和性、分散性が向上したこと、さらに、脂質の疎水性アルキル鎖が PLGA と疎水的に相互作用し効率よくポリマーマトリックス内に封入できたためと考えられた。また、得られた粒子のゼータ電位は負の値を示し、DOTAP 複合体は粒子表面にはなく、ナノスフェア内部に封入されていることが確認された。また、pDNA だけでなく、アンチセンス DNA や siRNA においても上述の方法により、PLGA ナノスフェア内部への封入率が高まることが確認された。

#### 4. 遺伝子封入 PLGA ナノスフェアのキトサンによる表面修飾

薬物担体として用いるナノ粒子の表面を、機能性物質で修飾することにより、ナノ粒子に新たな機能

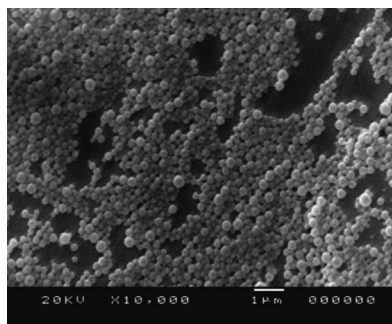


Fig. 4. The Scanning Electron Microphotograph of siRNA Loaded PLGA NS

Table 1. Physicochemical Properties of PLGA Nanospheres a)

Nucleic acid	Particle size (nm)	Zeta potential (mV)	Loading efficiency (%)
pDNA	284.3	-24.3	22.2
siRNA	329.8	-33.3	47.1
Antisense DNA	308.3	-34.0	55.5

b)

Nucleic acid	Particle size (nm)	Zeta potential (mV)	Loading efficiency (%)
pDNA	325.5	2.5	24.5
siRNA	355.9	11.0	50.8
Antisense DNA	382.1	8.2	69.4

a): Non coated PLGA nanospheres, b): Chitosan coated PLGA nanospheres.

性を賦与することができる。エマルジョン溶媒拡散法を用いれば、容易に粒子表面に機能性物質を修飾することができる。われわれはこれまでに、生分解性カチオン性ポリマーであるキトサンで粒子表面を修飾した場合、粘膜付着性といった、新たな機能を賦与できることを明らかにしてきた。

そこで、遺伝子封入 PLGA ナノスフェアにキトサンを表面修飾することを試みた。粒子調製時の外水相中に、キトサンを添加し、得られた粒子のゼータ電位を測定したところ、未修飾のものと比較し、正の値にシフトし、粒子表面がキトサンで修飾されていることが確認された (Table 1)。

また粒子表面をキトサンで修飾することにより、遺伝子 (pDNA, アンチセンス DNA, siRNA) の封入率が上昇した。これは、エマルジョン滴表面にキトサンが吸着し、キトサンと各種核酸が相互作用したため、核酸の外水相への漏出を抑制できたためと考えられた。

#### 5. ナノスフェアからの遺伝子放出挙動

薬物キャリアがナノサイズ化されると生体との相互作用が顕著になったり、ミクロンオーダーでは現れなかった粒子径依存性の機能が現れたりする。しかし、薬物を封入したナノ粒子の欠点として、その比表面積の増大により、内封物質の初期バーストが起こってしまい、薬物の徐放化が難しい。

エマルジョン溶媒拡散法によって調製した、遺伝子封入 PLGA ナノスフェアの内封遺伝子放出挙動を調べたところ、PLGA ナノスフェアにおいても初期バーストが観察された (Fig. 5)。これは、粒子表面近傍に存在する核酸が、初期バーストとして放出され、内部に存在する核酸が時間の経過とともに拡散し放出されたと考えられた。

粒子表面をキトサンで修飾したところ、遺伝子の初期バーストは抑制された。これは粒子表面のキトサンが、粒子表面に吸着あるいは粒子表面近傍に内封されている核酸と相互作用することでバーストが抑制できたと考えられた。

このことから、粒子表面を機能性物質で修飾することにより、放出制御機能の賦与が可能であることが分かった。

#### 6. 遺伝子封入キトサン修飾 PLGA ナノスフェアの細胞内導入、安全性試験

これまでに調製した PLGA ナノスフェアの、培

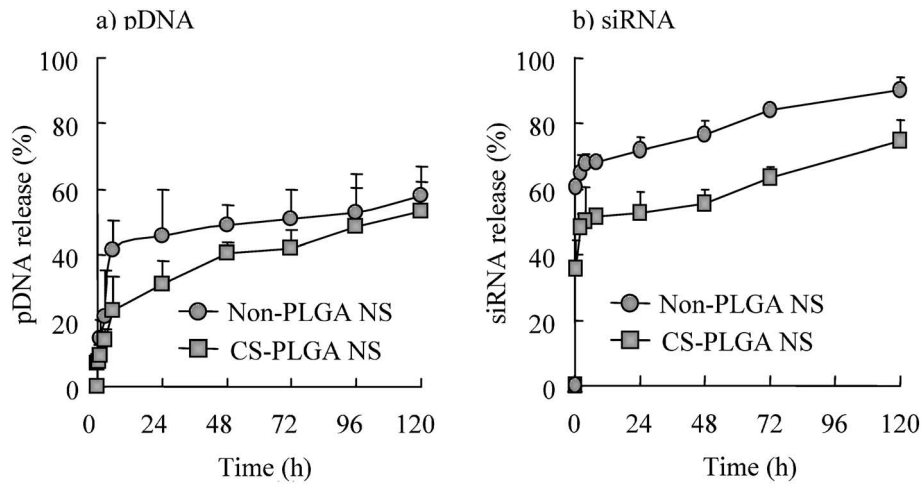


Fig. 5. Effect of Chitosan-coating on siRNA or pDNA Release Profile from PLGA Nanospheres  
a: pDNA release, b: siRNA release.

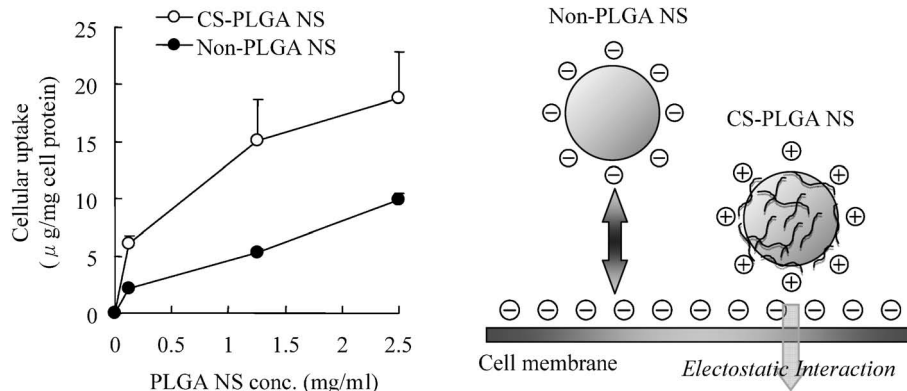


Fig. 6. Effect of Chitosan Coating on Cellular Uptake with A549 Cells

養細胞による評価を行った。培養細胞はヒト肺上皮がん細胞 (A549) を用いた。

粒子の蛍光マーカーである 6-クマリンを封入したナノスフェアを、培養細胞へ投与し、一定時間後、細胞内の 6-クマリンを抽出することで、粒子の細胞内への取り込み量評価を行った。<sup>16)</sup> 細胞内への取り込み量は、未修飾の粒子と比べ、キトサンで表面修飾することにより、増加した。これはキトサンで修飾することにより、粒子表面が正電荷を持ち、負に帯電している細胞表面と相互作用したためと考えられた (Fig. 6)。

次に、siRNA 封入 PLGA ナノスフェアの細胞内取り込みの視覚的評価を共焦点レーザー顕微鏡観察により行った (Fig. 7)。Cy3 で標識された siRNA と 6-クマリンを同時に封入したナノスフェアを A549 細胞へ投与した。いずれの粒子においても、

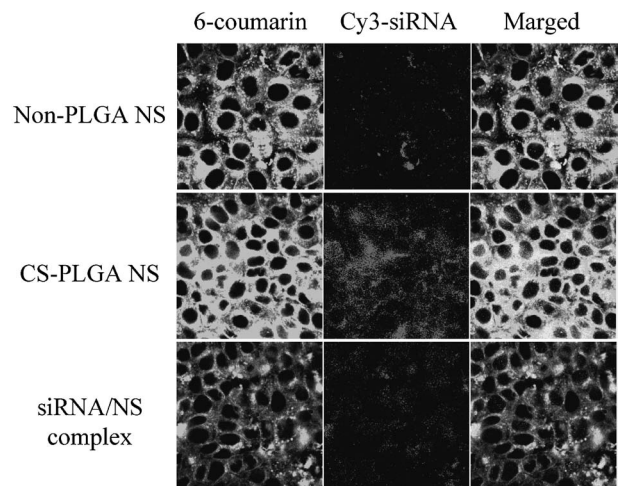


Fig. 7. CLSM Images of A549 Cells (magnification 100×) following 4 h Uptake of 50 μM siRNA Preparations (Green fluorescence; 6-coumarin, Red fluorescence; Cy3 labeled siRNA)

細胞内に蛍光が観察されるとともに、siRNAに由来する赤とナノスフェアに由来する緑の両蛍光が、同じ場所に観察されることからsiRNAはナノ粒子に封入された状態で細胞内に取り込まれていることが明らかとなった。また前に示した、核酸未封入のナノスフェアのときと同様にまたキトサン修飾NSにおける蛍光は、未修飾の場合より強く、キトサン修飾を施すことにより細胞内への取り込みが促進されることが観察された。

生体へ薬物担体ナノ粒子を投与する場合には、安全性が高くなければならない。PLGA ナノスフェアの安全性試験を、MTS アッセイを用いて評価した (Fig. 8)。PLGA ナノスフェアを細胞に投与した場合細胞生存率はほぼ 100% となり毒性がないことが確認された。また DOTAP のみを投与した場合、細胞生存率が低下し毒性が確認された。

#### 7. 遺伝子封入 PLGA ナノスフェアの細胞内挙動、培養細胞における実際の効果

機能性遺伝子の作用点は細胞内であるため、粒子の細胞内における挙動を把握することは、遺伝子キャリアを設計する上で重要となる。そこで A549 細胞における PLGA NS の細胞内動態を、細胞表面に吸着している粒子を除去したのち、細胞分画法により、細胞質ゾル、膜・オルガネラ、核、細胞骨格

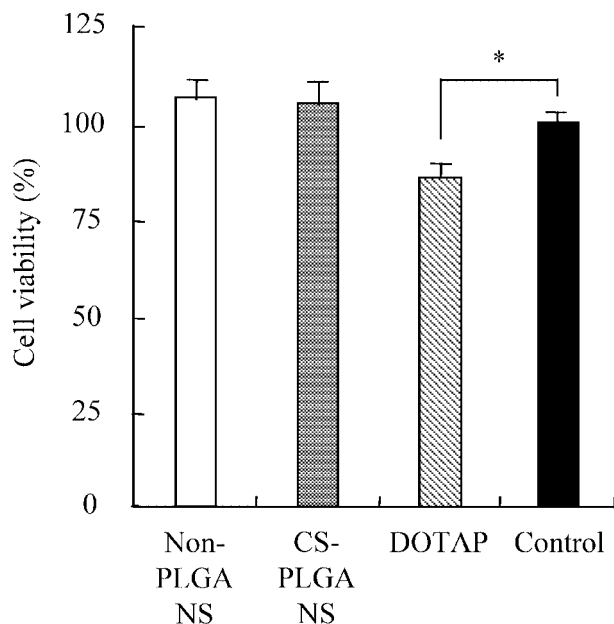


Fig. 8. Cytotoxicity of PLGA; Nanospheres with A549 Cells Control; Incubation without samples, \* $p < 0.05$ , significantly different from control.

の 4 画分に分け、PLGA NS の細胞内分布割合を経時的に評価した。<sup>17-19)</sup>

未修飾 PLGA NS は細胞骨格に局在し、また正に帯電しているキトサン修飾 PLGA NS は膜・オルガネラ画分に局在していることが分かった (Fig. 9)。このことから、粒子の表面状態を変えることにより、粒子の細胞内における挙動も制御できることが示唆された。

ルシフェラーゼを発現する pDNA を封入した PLGA ナノスフェアを A549 細胞へ投与し、経時的にルシフェラーゼ活性を測定した。また、プロテインキナーゼ C- $\alpha$  を標的とする siRNA のタンパク質産生抑制評価を、ウエスタンブロット法により行った。今回評価に用いたサンプルは、未処理の pDNA 及び siRNA、DOTAP/pDNA 及び siRNA 複合体、未修飾 PLGA ナノスフェア、キトサン修飾 PLGA ナノスフェア、pDNA 及び siRNA を粒子表面に吸着させたキトサン修飾 PLGA ナノスフェア複合体の 5 種類を用いた。これらのサンプルを細胞培養液に懸濁させ、細胞に投与し、一定時間後、培養液を除去し、評価を行った。

Figure 10 に pDNA 封入 PLGA ナノスフェアの遺伝子発現量評価の結果を示す。DOTAP/pDNA 複合体や pDNA/キトサン修飾 PLGA NS 複合体では、初期に高いルシフェラーゼ活性を示したが、時間の経過とともに活性が低下してしまったのに対し、キトサン修飾ナノスフェアでは 2 日後に活性のピークが現れ、発現が維持されていることが明らかとなった。これは、キトサン修飾ナノスフェアが細胞内へ取り込まれ、pDNA を徐放化することによって、維持できたと考えられる。

Figure 11 に siRNA のタンパク質産生抑制効果をウエスタンブロット法を用いて評価した結果を示す。DOTAP/siRNA 複合体では、初期にタンパク質発現抑制を示したが、時間の経過とともに効果が低下する傾向がみられた。これに対し、キトサン修飾ナノスフェアでは他の系とは異なったパターンを示し、5 日後にピークが現れ、抑制が維持されていることが明らかとなった。これは、キトサン修飾ナノスフェアが細胞内へ取り込まれ、siRNA を徐放化することによって、長時間 mRNA を分解したためと考えられた。また siRNA を表面に吸着させた NS では持続的な効果は観察されなかった。このことから

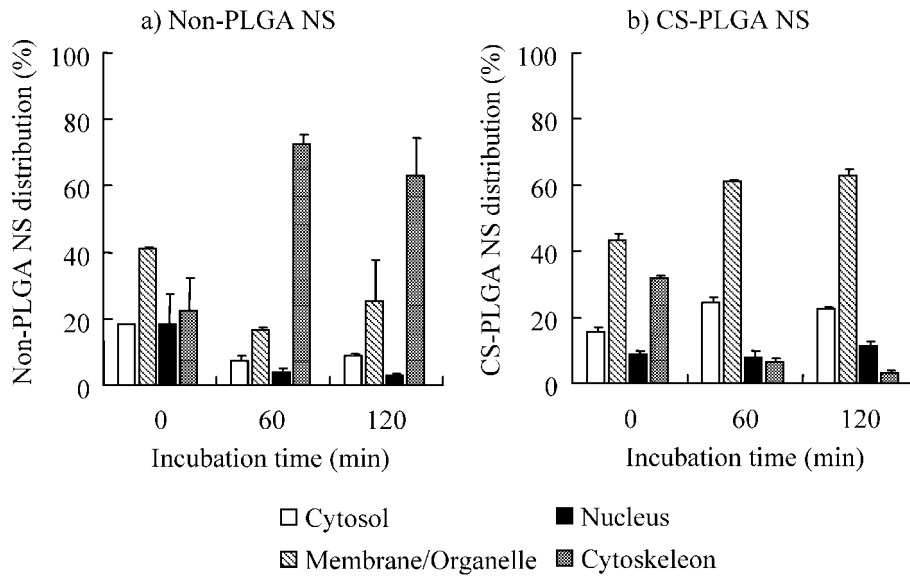


Fig. 9. Intracellular Distribution of PLGA Nanospheres on A549 Cells

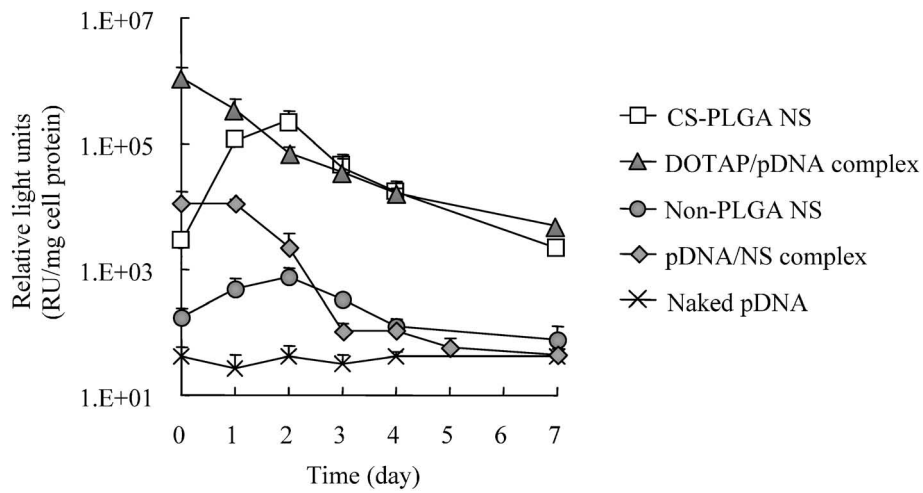


Fig. 10. Effect of Incubation Time on Transfection Efficiency of pDNA Loaded PLGA NS with A549 Cells

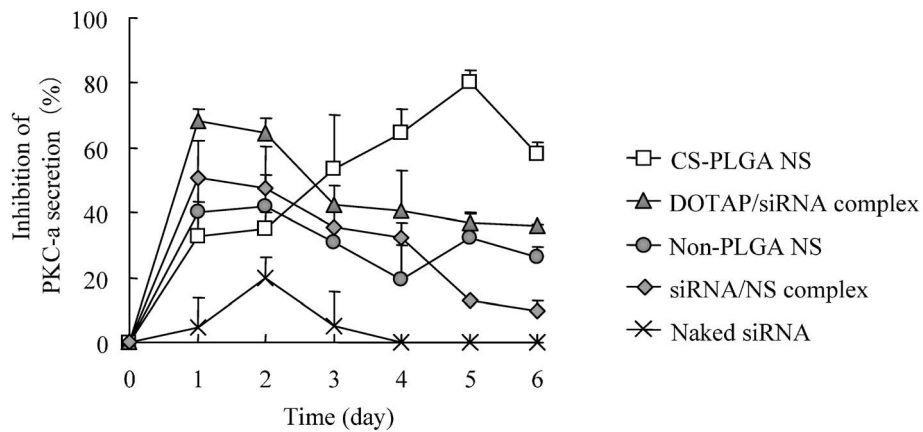


Fig. 11. Effect of the Different siRNA Preparations on the Expression of PKC-α in A549 Cells

PLGA ナノスフェアを遺伝子キャリアとして用いる場合、遺伝子を粒子内部に封入する必要性が示唆された。

遺伝子を PLGA ナノスフェアに封入して用いることで、DOTAP 複合体と比較し、効果のピークが遅れて現れ、これまでの非ウイルスベクターとは異なるパターンの作用を示すことが明らかとなった。これら初期に抑制する処方と、持続性を示すキトサン修飾ナノスフェアを組み合わせることにより、細胞に多様なパターンで遺伝子を存在させることも可能であると思われる。

#### 8. おわりに

本稿では、PLGA ナノスフェアを応用した、遺伝子デリバリーシステム開発について紹介した。エマルジョン溶媒拡散法により調製された PLGA ナノスフェアは機能性化粧品や育毛剤として実用化されており、生体において使用実績があるという観点からすると、他の遺伝子キャリアよりも実用化し易い生体内分解性高分子材料といえる。

また遺伝子を封入した PLGA ナノスフェアは、機能性物質を表面修飾することにより、細胞内動態制御、細胞内における遺伝子放出制御機能が備わることが分かった。これらの特徴は、核酸医薬の新たな展開を開くことができるものと期待される。

#### REFERENCES

- 1) Anderson, J. M. Shive, M. S. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **28**, 5–24 (1997).
- 2) Sahoo, S. K. Panyam, J. Prabha, S. Labhasetwar, V. *J. Control. Release*, **82**, 105–114, (2002).
- 3) Pistel, K. F. Kessel, T. *J. Microencapsul.*, **17** (4), 467–483 (2000).
- 4) Zambaux, M. F. Bonneaux, F. Gref, R. Maincent, P. Dellacherie, E. Alonso, M. J. Labrude, P. Vigneron, C. *J. Control. Release*, **50**, 31–40 (1998).
- 5) Perez, C. Sanchez, A. Putnam, D. Ting, D. Langer, R. Alonso, M. J. *J. Control. Release*, **75**, 211–224 (2001).
- 6) Lamprecht, A. Ubrich, N. Perez, M. H. Lehr, C. M. Hoffman, M. Maincent, P. *Int. J. Pharm.*, **196**, 177–182 (2000).
- 7) Kawashima, Y. Yamamoto, H. Takeuchi, H. Hino, T. Niwa, T. *Euro. J. Pharm. Biopharm.*, **45**, 41–48 (1998).
- 8) Kawashima, Y. Yamamoto, H. Takeuchi, H. Kuno, Y. *Pharm. Devel. Tech.*, **5**(1), 77–85 (2000).
- 9) Wang, D. Robinson, D. R. Kwon, G. S. Samuel, J. *J. Control. Release*, **57**, 9–18 (1999).
- 10) Mansouri, S. Lavigne, P. Corsi, K. Benderdour, M. Beaumont, E. Fernandes, J. C. *Euro. J. Pharm. Biopharm.*, **57**, 1–8 (2004).
- 11) Kleemann, E. Dailey, L. A. Abdelhady, H. G. Gessler, T. Schmehl, T. Roberts, C. J. Davies, M. C. Seeger, W. Kissel, R. *J. Control. Release*, **100**, 437–450 (2004).
- 12) Ziady, A. G. Gerdeon, C. R. Miller, T. Quan, W. Payne, J. M. Hyatt, S. L. Fink, T. L. Muhammad, O. Oette, S. Kowalczyk, T. Pasumathy, M. K. Moen, R. C. Cooper, M. J. Davis, P. B. *Mol. Ther.*, **8**(6), 936–947 (2003).
- 13) Rosa, G. Quaglia, F. Rotonda, M. I. Appel, M. Alphandary, H. Fattal, E. *J. Pharm. Sci.*, **91**(3), 790–799 (2002).
- 14) Dunne, M. Bibby, D. C. Jones, J. C. Cudmore, S. *J. Control. Release*, **92**, 209–219 (2003).
- 15) Capan, Y. Woo, B. H. Gebrekidan, S. Ahmed, S. DeLuca, P. P. *J. Control. Release*, **60**, 279–286 (1999).
- 16) Panyam, J. Zhou, W. Prabha, S. Sahoo, S. K. Labhasetwar, V. *FASEB J.*, **16**, 1217–1226 (2002).
- 17) Toub, N. Angiari, C. Eboue, D. Fattal, E. Tenu, J.-P. Le Doan, T. Couvreur, P. *J. Control. Release*, **106**, 209–213 (2005).
- 18) Eboue, D. Auger, R. Angiari, C. Le Doan, T. Tenu, J. P. *Arch. Physiol. Biochem.*, **111**, 265–272 (2003).
- 19) Garcia-Garcia E., Andrieux K., Gil S., Kim H. R., Le Doan T., Desmaele D., d'Angelo J., Taran F., Georgin D., Couvreur P., *Int. J. Pharm.*, **298**(2), 310–314 (2005).