

유전자 전달체로서 폴리(에틸렌 글리콜) 및 폴레이트로 수식된 폴리(에틸렌 이민)의 합성

서동환* · 김선화** · 강길선** · 지상철* · 신병철 · 김문석†

*성균관대학교 제약학과, **전북대학교 유기신물질공학과,

한국화학연구원 화학소재부

(2004년 9월 9일 접수, 2005년 3월 5일 채택)

Preparation of PEG-Folate-graft-Polyethylenimine as a Gene Carrier

Dong Hoan Seo*, Seon Hwa Kim**, GilSon Khang**,
Sang Cheol Chi*, Byung Cheol Shin, and Moon Suk Kim†

*College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-476, Korea

**Department of Advanced Organic Materials Engineering, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

Nanobiomaterials Laboratory, Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 305-606, Korea

(Received September 9, 2004; accepted March 5, 2005)

초록 : 본 연구에서는 세포 독성을 감소시키고 *in vivo*에서 표적화를 향상시키기 위하여 methoxypoly(ethylene glycol) (mPEG) 및 folate가 도입된 poly(ethylene imine)(PEI)를 합성하였다. mPEG 말단에 카복실 그룹을 도입하여 EDC/NHS에 의해 활성화시킨 후 PEI의 아민기와 반응으로 mPEG-PEI를 합성하였다. Folate의 카복실 그룹을 EDC/NHS로 활성화시킨 후 mPEG-PEI의 아민기와 반응으로 PEG-folate-graft-PEI를 합성하였다. 합성된 고분자의 화학적 구조는 ¹H-NMR과 FT-IR을 이용하여 확인하였다. 합성된 고분자와 DNA가 정전기적 인력에 의해 완전한 복합체의 형성을 확인하기 위해 여러 가지 N/P charge 비율로 agarose gel 전기영동 및 형광을 측정하였고, 2 이상의 N/P charge 비율에서 완전한 복합체를 형성함을 확인하였다. 복합체의 크기는 광산란장치 및 AFM으로부터 100~300 nm임을 관찰하였다. 이러한 결과들로부터 합성된 양이온성 고분자와 DNA가 복합체를 잘 이루어진 것을 관찰하였고 유전자 전달체로서의 가능성을 평가하고자 하였다.

Abstract: In this study, poly(ethylene imine) (PEI) modified by methoxypoly(ethylene glycol) (mPEG) and folate as a gene carrier was synthesized to decrease cytotoxicity and to improve *in vivo* targeting. mPEG was modified by glutaric anhydride (GA) to endow carboxylic end group, followed by the activation reaction with EDC (*N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide) and NHS (*N*-hydroxysuccinimide). The activated carboxylic end group of mPEG was reacted with the amines of PEI to give mPEG graft PEI. The mPEG-folate-graft-PEI was synthesized by the reaction of mPEG-PEI with folate pre-activated by EDC/NHS. The obtained copolymers were characterized by ¹H-NMR and FT-IR. Gel retardation assay and fluorescence measurement indicated that DNA formed the complexes with the synthesized copolymers above N/P charge ratio 2. The size of complexes was ranging from 100 nm to 300 nm. In conclusion, we confirmed that the synthesized copolymer have the possibility as a DNA carrier.

Keywords: gene carrier, MPEG, PEI, folate.

1. 서론

1970~80년대 암, 유전질환 등의 질병 원인이 유전학적 이상에 기인함이 알려졌고 또한 최근 인간게놈프로젝트에 의해 많은 유전자들의 기능이 밝혀지고 있다. 그러므로 이들을 이용하여 근원적으로 질병을 치료하고자하는 많은 연구들 중 유전자 치료(Gene therapy) 연구는 많은 집중 조명을 받고 있다.^{1,2} 유전자 치료란 DNA 재조합 방법 등의 유전자조작을 이용하여 정상유전자 및 치료유전자를 병소로 이입시켜 결손유전자를 교정하거나 또는 세포에 새로운 기능을 추가하여 인체 세포의 유전적 변형에 의한 암, 감염성 질환, 자가면역질환 등과 같은 유전자 결함을 치료하거나 예방하는 방법을 말한다. 유전자 치료는 치료방식이 근본적인 차원에서 이루어지며,

한 번의 투여로서 치료용 물질이 체내에서 장기간 발현될 수 있고, 유전자 전달 및 발현을 인위적으로 조절함으로써 치료제 작용의 선택성을 추구할 수 있다.^{3,4}

유전자를 생체 내로 전달하는 물질을 벡터라고 하며, 벡터는 원하는 유전자를 세포에 효율적으로 전달할 수 있어야 하며, 독성이 낮거나 없어야 하며, 충분한 양의 유전자 산물을 지속적으로 발현할 수 있으면서 목적 세포에 유전자발현을 조절할 수 있어야 한다. 벡터는 크게 바이러스성 벡터와 비바이러스성 벡터로 구분된다. 레트로바이러스(Retro virus),^{5,6} 아데노바이러스(Adeno virus)^{7,8} 및 아데노 부속 바이러스(Adeno-associated virus)들로^{9,10} 구성되는 바이러스성 벡터는 유전자 전달 효율 및 지속성 면에서 매우 우수하나 안전성의 문제와 벡터에 삽입할 수 있는 유전자의 크기에 제한이 있다. 바이러스성 벡터의 이러한 문제점을 해결하기 위하여 개발되기 시작한 비바이러스성 벡터는 주로 양이온성 리포좀¹¹⁻¹³ 및 양이온

†To whom correspondence should be addressed. E-mail: mskim@pado.kRICT.re.kr

성 고분자 등을^{14,16} 이용하며, 이들 벡터는 음이온성인 DNA와 정전기적 결합에 의해 복합체를 형성하고 그리고 세포내로 전달시키는 역할을 한다. 비바이러스성 벡터는 비록 아직 전달 효율이 바이러스성 벡터보다는 낮지만 바이러스가 인체 세포 안으로 유입될 소지가 없을 뿐만 아니라 도입할 유전자 크기에 제한이 없고 사용상의 간편한 장점을 갖고 있다.

양이온성 고분자 벡터 중에서도 폴리(에틸렌 이민)(PEI)은 높은 양이온성을 나타낼 수 있는 고분자로서 쉽게 DNA와 복합체를 형성하며, DNA와 complex 된 후 *in vitro* 또는 *in vivo*에서 우수한 세포내 이입을 통해 비교적 높은 전달 효율을 나타낸다.¹⁷⁻²¹ 한편 바이러스성 벡터에 비해 낮은 전달효율을 나타내는 원인으로 PEI와 DNA 복합체에 대해 인체 내 음이온성 단백질이 흡착되어 복합체 안정성이 줄어들고, 그러므로 유전자의 세포내 이입효율이 감소되어 낮은 전달 효율을 나타내게 된다. 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG)은 생체적합성으로 음이온 단백질 흡착 억제효과가 뛰어나며 이미 FDA로부터 승인되어져 있으며, PEI의 유전자 전달 효율을 높이기 위한 관점에서 PEI에 PEG를 도입시킨 연구가 활발히 진행되고 있다.²²⁻²⁴ 또한 PEI의 유전자 전달 효율을 높이기 위한 또 다른 방법으로 특정세포를 표적화할 수 있는 폴레이트(folate),²⁵⁻²⁸ 아시아로그리코프로테인(asialoglycoprotein),^{29,30} 트랜스페린(transferrin)^{31,32} 및 표피 성장인자(epidermal growth factor)^{33,34} 등의 화합물을 도입함으로써 유전자 전달 효율을 높이기 위한 연구가 진행되고 있으며 특히 Benms에 의해 PEG의 양 말단에 폴레이트(folate-PEG-folate)를 합성하였고 여기에 PEI를 그래프트시켜(folate-PEG-folate-PEI) 유전자 전달체를 제조한바 있다.^{35,36}

본 실험에서는 양이온성 고분자인 PEI 주사슬에 생체적합성 및 단백질 흡착 억제기능을 갖는 PEG를 몰 비율에 따라 그래프트(mPEG-PEI) 시켰으며, 정상조직에는 적게 분포되어 있으나 암 조직에는 넓게 분포되어 있는 폴레이트 수용체를 표적화하고자 폴레이트를 mPEG-PEI에 그래프트시킨(mPEG-folate-graft-PEI) 양이온성 고분자 유전자 전달체를 제조하고자 하였다.

2. 실험

2.1 시약

폴리(에틸렌 이민)(PEI, M.W. 10000 g/mol), 메톡시폴리(에틸렌 글리콜)(mPEG, M.W. 550 g/mol), glutaric anhydride(GA), 1-[3-(dimethyl-amino)propyl]-3-ethylcarbodiimide hydrochloride(EDC), N-hydroxy-succinimide(NHS), 그리고 이티뎀 브로마이드(EtBr)는 Aldrich Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 투석 막(Viskase Co., USA)은 MWCO 3,500을 사용하였다. 톨루엔 그리고 메틸렌 클로라이드(MC) 등의 용매는 특급시약을 사용하였다.

2.2 mPEG-GA의 합성(mPEG-Co)

mPEG 말단에 활성그룹으로 카복시 그룹을 도입하기 위하여 다음과 같은 과정을 실시하였다. mPEG(0.55 g, 1 mmol)와 톨루엔 60 mL를 완전히 건조된 둥근바닥 플라스크에 넣고 딘 스타크 트랩(Dean Stark trap)을 사용하여 130 °C에서 5시간 동안 교반하면서 공비 증류를 실시하여 수분을 제거하였다. 증류 후 40 mL 톨루엔을 포함한 둥근 바닥 플라스크를 상온(25 °C)까지 냉각시킨 후 중합 촉매로서 초산(1 mL, 0.01 mmol)과 GA(0.1198 g, 1.05 mmol)를 넣고 120 °C에서 10시간 교반하면서 반응시켜 주었다. 반응 후 20 °C에서 회전 증발기를 사용하여 톨루엔을 제거하고 감압하에서 건조시켜 95% 수

율로 말단에 카복시 그룹을 갖는 mPEG를 합성하였다.

2.3 PEI에 mPEG-Co의 그래프트(mPEG-PEI)

PEI에 mPEG-Co의 10대 1의 몰비로 그래프트된 P10은 다음과 같은 과정으로 진행하였다. mPEG-Co(0.0199 g, 0.03 mmol)를 EDC(0.006 g, 0.0315 mmol)와 NHS(0.0036 g, 0.0315 mmol) 그리고 MC 10 mL를 잘 건조된 둥근바닥 플라스크에 넣고 상온에서 30분 동안 교반시키며 반응을 진행하였다. PEI(3 g, 0.3 mmol)를 MC 20 mL로 용해시켰고, 반응 후 mPEG-Co가 용해되어 있는 둥근바닥 플라스크에 PEI 용액을 첨가하였고 3시간 동안 교반하며 반응시켰다. 반응 후 20 °C에서 회전증발기를 사용하여 MC를 모두 제거시켰고, 둥근바닥 플라스크에 남아있는 mPEG-PEI 합성 물질을 증류수로 용해시킨 후 투석 막에 담아 2 °C에서 72시간 동안 막 투석을 실시하여 반응 후 미반응물질을 제거하였다. 막 투석을 통해 정제된 용액을 동결건조기로 건조하여 92% 수율로 mPEG가 그래프트된 PEI를 합성하였다.

2.4 mPEG-PEI에 폴레이트의 그래프트(mPEG-folate-graft-PEI)

mPEG-PEI에 폴레이트를 그래프트하기 위해 다음과 같은 과정을 진행하였다. Folate(0.0047 g, 0.01 mmol)와 EDC(0.0019 g, 0.01 mmol) 그리고 NHS(0.0011 g, 0.01 mmol)를 증류수 10 mL를 둥근바닥 플라스크에 넣고 상온에서 30분 동안 교반하며 반응하였다. mPEG-PEI(0.3199 g, 0.03 mmol)를 증류수 20 mL로 용해시켰고, 반응 후 활성화된 폴레이트가 용해되어 있는 둥근바닥 플라스크에 mPEG-PEI 수용액을 넣고, 3시간 동안 교반하며 반응시켰다. 반응이 끝난 mPEG-PEI-folate 수용액을 투석 막에 담아 2 °C에서 72시간 동안 막 투석을 실시하여 미반응물질을 제거하였고, 막 투석 후 정제되어진 용액을 동결건조기로 건조하여 89% 수율로 폴레이트가 mPEG-PEI에 그래프트된 고분자를 형성하였다.

2.5 합성된 고분자의 특성 분석

고분자의 구조 분석은 내부 기준시료인 0.05 wt%의 tetramethyl silane(TMS)를 포함한 CDCl₃(Aldrich Chemical Co., USA)를 용매로 하여 ¹H-NMR(Bruker DRX-300 FT-NMR Spectrometer, USA)을 사용하여 합성결과를 확인하였고, 또한 Fourier transform infrared spectrophotometer(FT-IR)(Digilab FTS-165 FT-IR Spectrometer)를 사용하여 확인하였다. 합성된 고분자와 DNA 복합체 형성은 다양한 N/P charge 비율을 통해 RAGE(rapid agarose gel electrophoresis)(RGX-60, Cascade biologics, Inc.)를 사용하여 확인하였고, 복합체의 크기는 electrophoretic light scattering spectrophotometer(ELS-8000, OTUSKA Electronics Co., Japan)를 이용하여 측정하였다. 또한 복합체의 크기 및 형태는 atomic force microscopy(AFM, Nanoscope IV, Digital Instrument Co., USA)를 이용하여 측정하였다.

2.6 합성된 고분자와 DNA 복합체의 Agarose Gel 전기영동 측정 및 입자크기 측정

DNA는 pEGFP(4.5 kb, Clontech)를 사용하였고, 고분자는 PEI(MW 10000)와 본 실험에서 합성한 고분자를 사용하여, 합성된 고분자의 nitrogen과 DNA의 phosphate의 charge 비율(N/P charge)을 0.5, 1, 2, 4, 8, 및 16이 되도록 DNA와 고분자를 혼합하였고, 3차 증류수를 이용하여 최종부피가 200 μL가 되도록 모두 맞추어 주었으며, 복합체를 이루도록 혼합 용액을 상온에서 30분간 인큐베이션 시간을 가졌다. 1.2% agarose gel에 복합체 용액을 10 μL씩 취해서 120 V에서 30분간 전기영동시켰고, 전기영동을 거친 agarose gel은 UV를 조사하여 젤의 흐름을 사진 찍었다. 또한 150 μL의 복합체용액을 광산란장치를 이용하여 입자크기를 측정하였다.

2.7 합성된 고분자와 DNA 복합체의 형광강도 측정

고분자와 DNA 복합체의 N/P charge 비율을 0.5, 1, 2, 4, 8 및 16으로 200 μ L씩 제조한 각각의 용액에 10 μ L의 EtBr을 첨가해주었고 30분간 상온에서 인큐베이션 시간 후, fluorescence spectrophotometer (F-4500, HITACHI, Japan)를 사용하였으며 510 nm에서 excitation하고 590 nm에서 emission을 측정하였다.

2.8 Atomic Force Microscopy

mPEG-folate-graft-PEI(P10F)와 DNA의 복합체 중 N/P charge 비율이 1과 16인 용액을 각각 5 μ L를 취한 후 silicon wafer에 떨어뜨리고 액체질소로 급랭시킨 후 동결건조기를 이용하여 72시간 동안 감압 하에 건조하였고, RTESP Tip을 이용하여 Tapping Mode로 AFM을 측정하여 크기 및 형태를 관찰하였다.

3. 결과 및 토론

3.1 mPEG와 폴레이트가 도입된 PEI의 합성 및 특성 분석

양이온성 고분자 유전자 전달체의 제조는 Figure 1에 나타난 바와 같이 3단계로 합성하였다. 첫 번째 합성 단계에서는 mPEG 말단에 활성그룹으로 카복시 그룹을 도입하기 위하여 초산을 이용하여 GA의 개환을 통해 합성하였으며, 두 번째 단계로 mPEG-Co의 카복시 그룹을 EDC로 활성화시킨 후 PEI의 아민 그룹과의 반응으로 아미드 결합을 이루었다. PEI에 대한 mPEG의 함량을 몰비로 조절하여 두 가지 P10, P100을 Table 1과 같이 설계하였다. 세 번째 단계에서는 EDC를 이용하여 폴레이트의 카복시 그룹을 활성화시킨 후 mPEG-

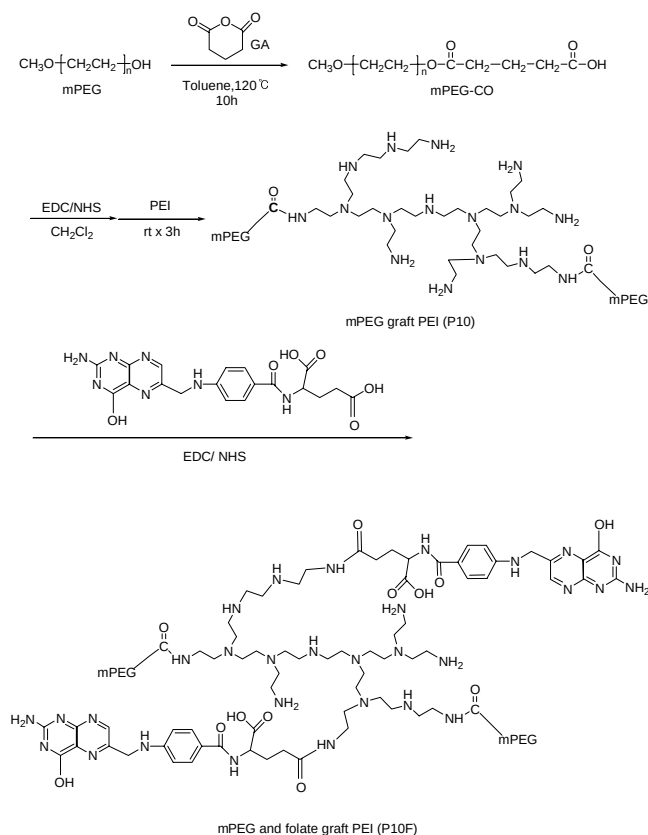


Figure 1. Scheme for the synthesis of mPEG and folate-graft-PEI.

PEI의 아민 그룹과의 반응으로 합성하였고, 각각의 합성단계는 반응 전후의 무게 변화를 통하여 95, 92 및 89%의 매우 높은 수율로 공중합체를 얻을 수 있었다.

Figure 2는 합성된 mPEG-Co와 mPEG-PEI의 $^1\text{H-NMR}$ 측정 결과를 나타내고 있다. mPEG-Co의 피크에서 mPEG에 기인한 특정피크인 메틸 피크와 말단의 메톡시 피크를 3.65와 3.38 ppm에서 각각 확인하였으며, GA에 기인한 메틸렌 피크를 1.95, 2.42 ppm에서 확인하였다. 그리고 그 면적비로부터 카복시 그룹이 정량적으로 도입된 것을 알 수 있었으며, mPEG-PEI의 피크에서는 mPEG의 특정피크들과 함께 PEI에 기인한 메틸렌 피크를 2.4~2.9 ppm에서 확인함으로써 PEI에 mPEG가 그래프트되었음을 확인하였다. 면적비로부터 mPEG가 PEI에 정량적으로 도입된 P10 및 P100이 합성되었음을 알 수 있었다.

Figure 3에서는 폴레이트가 도입된 P10F의 D_2O 에서의 $^1\text{H-NMR}$ 측정 결과를 나타내고 있다. P10의 특정피크들과 함께 폴레이트에 기인한 특정피크들이 6.75, 7.75, 8.65 ppm에서 각각 확인됨으로써 P10에 폴레이트가 그래프트되었음을 확인하였다. 또한 그 면적비로부터 정량적으로 folate가 도입되었음을 확인할 수 있었다. 또한 FT-IR에서 mPEG-Co의 말단 카복시 그룹이 1730 cm^{-1} 에서 그리고 PEI 반응 후 PEI 유래 피크가 1557 cm^{-1} , folate 반응 후에는 folate 유래 피크를 $1051, 881\text{ cm}^{-1}$ 에서 각기 확인할 수 있었다.

3.2 합성된 고분자와 DNA의 복합체 형성

Figure 4는 양이온성 고분자와 음이온성 DNA와의 N/P charge에 따른 복합체 형성을 알아보기 위한 agarose gel 전기영동 사진을 나타내고 있다. (a)는 PEI(P0)와 DNA와의 복합체의 전기영동 사진으로 N/P charge 비율이 2이상에서 복합체를 형성하였음을 알 수 있었다. (b)는 P10과 DNA와의 복합체를 나타내며, 16 이상의 비율에서 복합체를 형성하였다. P10이 높은 N/P charge 비율에서 복합체를 형

Table 1. Synthesis of mPEG and PEI

	Feed ratio PEI/mPEG	Obtained ratio ^a PEI/mPEG
P10	10/1	9.3/1
P100	100/1	94.5/1

^aMeasured with $^1\text{H-NMR}$.

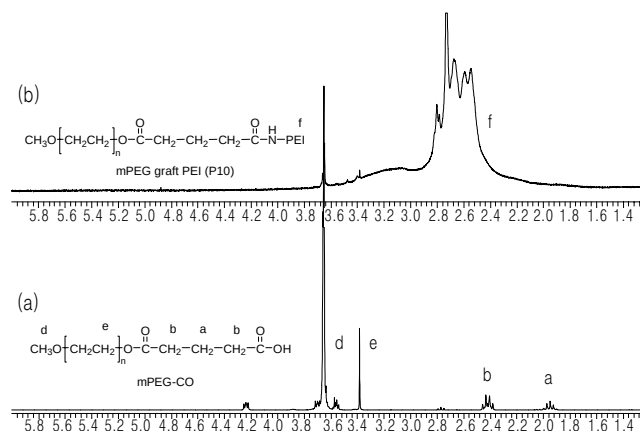


Figure 2. $^1\text{H-NMR}$ spectra of (a) mPEG-Co and (b) mPEG graft PEI (P10) copolymer in CDCl_3 .

성하는 이유는 PEI가 가지고 있는 양이온성의 아민기와 mPEG가 결합됨으로써 양이온성의 감소로 인해 보다 높은 비율에서 복합체를 형성하였기 때문으로 사료된다. (c)는 P10F와 DNA와의 복합체

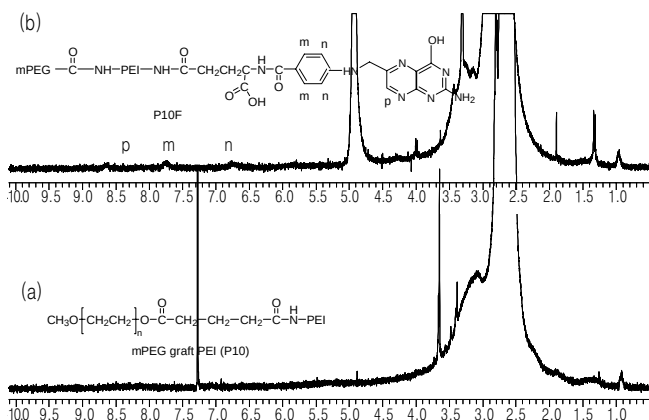


Figure 3. ^1H -NMR spectra of (a) P10 and (b) P10F in D_2O .

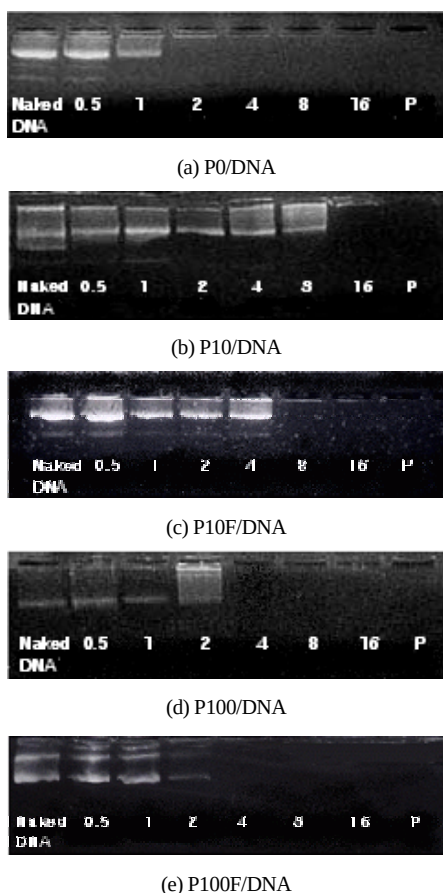


Figure 4. Gel retardation assay of copolymer/ DNA complexes. Lane 1 indicates naked DNA as control. Lanes 2~7 indicate the complexes at N/P charge ratio of 0.5, 1, 2, 4, 8, and 16, respectively. Lane 8 indicates the used copolymer without DNA. (a) P0/DNA complexes, (b) P10/DNA complexes, (c) P10F/DNA complexes, (d) P100/DNA complexes, and (e) P100F/DNA complexes.

이며, P10보다 낮은 비율인 4이상에서 복합체를 형성함을 알 수 있었다. P10F가 P10보다 낮은 비율에서 복합체를 형성하는 이유는 P10에 아민기를 가지고 있는 폴레이트가 도입됨으로 인해 양이온성이 증가하였기 때문으로 사료된다. (d)는 P10과 비교하여 상대적으로 PEI 함량이 증가된 P100과 DNA와의 복합체를 나타내고 있으며 8이상에서 복합체를 형성함을 관찰할 수 있었다. (e)는 P100F과 DNA와의 복합체이며 2이상에서 복합체를 형성함을 관찰할 수 있었다. 결과적으로 사용된 고분자의 상대적 양이온성이 높을수록 낮은 N/P charge 비율에서 복합체를 형성함을 알 수 있었다.

EtBr은 DNA의 intercalating reagent로서 DNA에 첨가시 590 nm에서 높은 형광강도를 나타내는데 DNA가 유전자 전달체로서 양이온성 고분자와 복합체를 형성함에 따라 그 형광강도의 감소가 예상된다. 그러므로 합성된 양이온성 고분자와 DNA의 각기 다른 N/P charge 비율에서 복합체형성을 확인하기 위하여 P0, P10, P10F, P100 및 P100F와의 DNA 복합체에 EtBr을 각각 첨가하여 형광강도를 측정하여 그 변화를 Figure 5에 나타내고 있다. P0, P10, P10F, P100 및 P100F의 복합체에서 사용된 고분자의 상대적 양이온성이 증가할수록 DNA와 고분자가 복합체를 잘 이루어 형광강도 발현이 감소함을 관찰하였다. 한편 P10은 높은 N/P charge 비율에서도 비교적 높은 형광강도를 나타냄이 관찰되어졌다. 이는 P10이 상대적으로 높은 mPEG 함량에 의해 DNA와의 복합체 형성이 방해되기 때문으로 전기영동 결과와 일치함을 알 수 있었다. 결과적으로 N/P charge 비율이 높아질수록 형광강도가 감소하는 것을 확인함으로써 고분자의 상대적 양이온성이 증가할수록 DNA와 복합체를 잘 형성하는 것을 확인할 수 있었다.

Figure 6은 P10F와 DNA의 N/P charge 비율이 1과 16인 복합체의 AFM 사진을 나타낸 것이다. N/P charge 비율이 1인 경우 완전한 복합체를 형성하지 못한 DNA를 관찰할 수 있었으며, DNA와 합성된 고분자가 부분적으로 복합체를 형성한 전체적인 크기는 420 nm임을 관찰할 수 있었다. 16인 경우는 완전한 복합체를 형성하여 117 nm 정도의 복합체를 형성하였음을 관찰할 수 있었다. 또한 합성된 고분자와 DNA 복합체의 크기는 광산란 장치(ELS-8000, OTUSKA Electronics Co., Japan)를 통해 100~300 nm의 크기임이 관찰되어졌다.

4. 결론

본 연구에서는 DNA와의 복합체 형성 후 DNA의 안정성을 높여

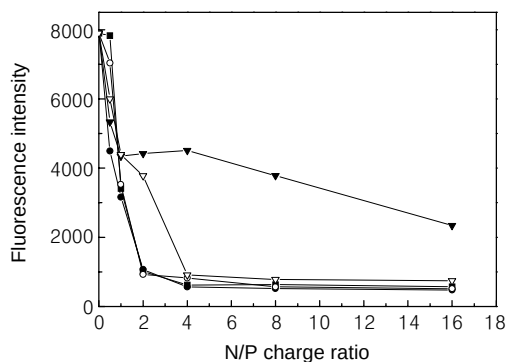


Figure 5. Plot of fluorescence intensity versus N/P charge ratio for copolymer/DNA complexes (—■—P0/DNA, —▼—P10/DNA, —▽—P10F/DNA, —●—P100/DNA, —○—P100F/DNA).

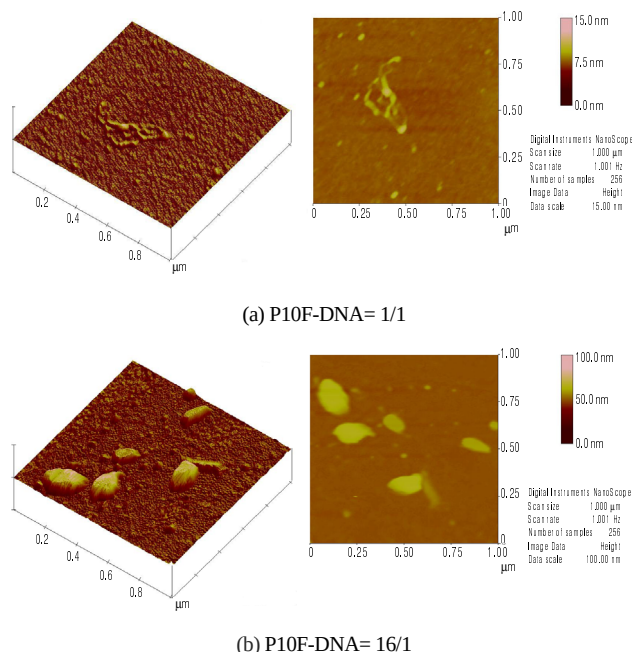


Figure 6. AFM images of (a) N/P charge ratio 1 and (b) N/P charge ratio 16.

주기 위한 mPEG와 특정세포를 표적화할 수 있는 폴레이트를 도입한 PEI를 합성하였고, $^1\text{H-NMR}$ 과 FT-IR 측정으로 합성된 고분자들을 확인하였다. 합성된 고분자와 DNA를 여러 가지 N/P charge 비율로 복합체를 형성하여 agarose gel 전기영동 및 형광강도를 측정한 결과 고분자의 상대적 양이온성이 증가할수록 DNA와의 복합체 형성이 잘 됨을 확인하였다. 복합체의 크기는 광산란장치 및 AFM으로부터 100~300 nm임을 관찰하였다. 결과적으로 합성된 P10F가 양이온성을 띠고 있어 유전자와 복합체를 잘 형성함을 확인함으로써 양이온성 고분자 유전자 전달체로서의 가능성을 확인하였다. 현재 합성된 양이온성 고분자를 이용한 암세포에 대한 유전자 전달 효율에 관한 실험이 진행 중에 있다.

감사의 글 : 본 연구는 한국화학연구원 기관 고유사업으로 이루어진 것으로 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

- D. M. F. Prazeres and G. N. M. Ferreira, *Chem. Eng. and Process.*, **43**, 615 (2004).
- P. M. Kraan, F. A. J. Loo, and W. B. Berg, *Biomaterials*, **25**, 1497 (2004).
- C. Chastel, J. Jiricny, and R. Jaussi, *DNA Repair*, **3**, 201 (2004).
- P. R. Lowenstein and M. G. Castro, *Curr. Opin. Pharmacol.*, **4**, 91 (2004).
- H. M. Kankkonen, M. P. Turunen, M. O. Hiltunen, P. Lehtolainen, J. Koponen, P. Leppänen, A. M. Turunen, and S. Y. Herttuala, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **36**, 333 (2004).
- C. M. Liu, D. P. Liu, W. J. Dong, and C. C. Liang, *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **313**, 716 (2004).
- L. Xing and S. K. Tikoo, *Virology*, **321**, 372 (2004).
- R. Meulenbroke, K. Sargent, J. Lunde, B. Jasmin, and R. Parks, *Mol. Ther.*, **9**, 617 (2004).
- M. A. F. V. Goncalves, I. Velde, K. S. Shoshan, D. Valerio, and A. A. F. Vries, *Virology*, **321**, 287 (2004).
- D. Boden, O. Pusck, F. Lee, L. Tucker, and B. Ramratnam, *Mol. Ther.*, **9**, 396 (2004).
- D. Lesage, A. Cao, D. Briane, N. Lievre, R. Coudert, M. Raphael, J. L. Salzmman, and E. Taillandier, *Biochi. Bio. Acta*, **1564**, 393 (2004).
- A. Kim, E. H. Lee, S. H. Choi, and C. K. Kim, *Biomaterials*, **25**, 305 (2004).
- M. Singh and M. Ariatti, *J. Control. Release*, **92**, 383 (2003).
- X. Liu, D. Erickson, D. Li, and U. J. Krull, *Analy. Chim. Acta*, **507**, 55 (2004).
- T. Segura, M. J. Volk, and L. D. Shea, *J. Control. Release*, **93**, 69 (2003).
- J. H. Steven Kuo, Y. L. Lo, M. D. Shau, and J. Y. Chemg, *J. Control. Release*, **81**, 321 (2002).
- C. H. Ahn, S. Y. Chae, Y. H. Bae, and S. W. Kim, *J. Control. Release*, **80**, 273 (2002).
- W. T. Godbey, M. A. Barry, P. Saggau, K. K. Wu, and A. G. Mikos, *J. Biomed. Mater. Res.*, **51**, 321 (2000).
- W. T. Godbey, K. K. Wu, and A. G. Mikos, *J. Control. Release*, **60**, 149 (1999).
- W. T. Godbey, K. K. Wu, and A. G. Mikos, *J. Biomed. Mater. Res.*, **45**, 268 (1999).
- D. Fischer, T. Bieber, Y. Li, H. P. Elsässer, and T. Kissel, *Pharmaceut. Res.*, **16**, 1273 (1999).
- S. J. Sung, S. H. Min, K. Y. Cho, S. N. Lee, Y. J. Min, Y. I. Yeom, and J. K. Park, *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 492 (2003).
- J. H. Chio, J. S. Chio, H. Suh, and J. S. Park, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **22**, 46 (2001).
- K. Sagara and S. W. Kim, *J. Control. Release*, **79**, 271 (2002).
- Y. Lu and P. S. Low, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **54**, 675 (2002).
- H. E. J. Hofland, C. Masson, S. Iginla, I. Osetinsky, J. A. Reddy, C. P. Leamon, D. Scherman, M. Bessodes, and P. Wils, *Mol. Ther.*, **5**, 739 (2002).
- W. Guo and R. J. Lee, *J. Control. Release*, **77**, 131 (2001).
- J. Sudimack and R. J. Lee, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **41**, 147 (2000).
- J. Z. Mu, R. J. Fallon, P. E. Swanson, S. B. Carroll, M. Danaher, and D. H. Alpers, *Biochi. Bio. Acta*, **1222**, 483 (1994).
- N. Kokudo, D. R. Vera, K. Tada, M. Koizumi, M. Seki, T. Matsubara, T. Yamaguchi, T. Takahashi, T. Nakajima, and T. Muto, *World J Surg*, **26**, 1342 (2002).
- M. Kursa, G. F. Walker, V. Roessler, M. Ogris, W. Roedel, R. Kircheis, and E. Wagner, *Bioconjugate Chem.*, **14**, 222 (2003).
- C. Rudolph, U. Schillinger, C. Plank, A. Gessner, P. Nicklaus, R. H. Muller, and J. Rosenacker, *Biochi. Bioph. Acta*, **1573**, 75 (2002).
- T. Blessing, M. Kursa, R. Holzhauser, R. Kircheis, and E. Wagner, *Bioconjugate Chem.*, **12**, 529 (2001).
- R. Kircheis, T. Blessing, S. Brunner, L. Wightman, and E. Wagner, *J. Control. Release*, **72**, 165 (2001).
- J. M. Bennis, A. Maheshwari, D. Y. Furgeson, R. I. Mahato, and S. W. Kim, *J. Drug Targeting*, **9**, 123 (2001).
- J. M. Bennis, R. I. Mahato, and S. W. Kim, *J. Control. Release*, **79**, 255 (2002).