

약물 전달시스템 개발에 있어서 나노기술의 응용

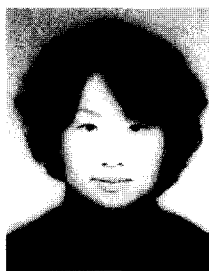
박윤정 · 민병무

1. 서론

나노기술 (nanotechnology)이란 10억분의 1의 정밀도를 바탕으로 원자나 분자 혹은 단분자든 고분자이든 1~100 nm 크기의 범위 내에서 어떤 현상을 설명하거나 그 크기 범위의 입자를 고안하고, 이러한 미세한 크기에 바탕을 둔 새로운 성질이나 기능을 창출하는 기술 및 이러한 기술의 바탕이 되는 연구를 총칭하는 말이다. 이러한 연구는 최근에 시작되었고 미국의 경우 1999년에 미국 국립 나노기술창의단 (National Nanotechnology Initiative, NNI)이 발족하였는데 당시 의약품 개발에 있어서 질병의 진단영상뿐만 아니라 바이오센서, biomarker, 약물전달시스템의 개발에 있어 나노기술의 중

요성이 부각되었으며, 현재 활발한 연구가 진행되고 있다.¹ 나노기술이 의미를 갖는 것은 나노 크기의 미세한 시스템이 물질의 최소단위로 알려진 분자의 세계로 진입하여 이를 조작하고 통제하며 활용할 수 있다는 점 때문이다. 또한 이러한 나노기술이 생명공학과 접합되어 파생된 나노생물공학 (nanobiotechnology) 기술의 개발은 신체의 최소 구성단위인 세포와의 상호작용 및 세포내에서 구성조직과도 상호작용이 가능케 함으로써 미세한 기능까지도 조절하여 최종적인 진단 및 치료효과를 극대화할 수 있게 해주는 가능성도 갖게 해준다.

의약품 개발에 있어서 특히 약물전달시스템 (drug delivery system, DDS)의 개발은 치료효과 및 안전성의 극대화에 있어서 중요한 역할을 한다. 이는



박윤정
 1989~ 이화여자대학교 약학대학 제약학과 (학사)
 1993 이화여자대학교 약학대학 대학원 (석사)
 1995 이화여자대학교 약학대학 대학원 (박사)
 1995~ 이화여자대학교 약학대학 대학원 (박사)
 1999 미국 미시간대학교 약학대학 연구원
 2002 미국 ISTN Inc. 연구책임자
 현재
 2002~ 미국 미시간대학교 약학대학 겸임 연구교수
 현재



민병무
 1974~ 서울대학교 문리과학대학 치의예과 및 치과대학 치의학과 (학사)
 1980 서울대학교 치의학과 (학사)
 1981~ 서울대학교 대학원 의학과 (석사, 박사)
 1989 UCLA 치과대학 Post Doc, 객원교수
 1991 서울대학교 치과대학 전임강사, 조교수, 부교수
 1999 서울대학교 치과대학 교수
 현재
 1991~ 서울대학교 치과대학 구강생화학 교실 주임교수
 현재
 2002~ 서울대학교 치과대학 대학원 두개악안면재건과학 전공주임
 현재

Application of Nanotechnology in the Development of Drug Delivery System

미국 미시간대학교 약학대학 (Yoon Jeong Park, College of Pharmacy, The University of Michigan, USA.) e-mail:yjpark@umich.edu

서울대학교 치과대학 (Byung-Moo Min, Dept. of Oral Biochemistry and Craniomaxillofacial Reconstruction Science Major, College of Dentistry, Seoul National Univ., Seoul 110-749, Korea) e-mail:bmmin@snu.ac.kr

단순히 약물전달체의 개발만을 포함하는 것이 아니고 질병의 진단, 약물전달체의 체내 거동을 포함한 최종 치료효과 산출에 필수적인 진단시약의 표적화 및 영상화 기법까지 포함한다는 사실을 감안하면 의약품 개발에 있어서의 나노기술의 활용분야는 무궁무진하다고 할 수 있다. 병소 표적용 진단시약 및 약물전달체의 개발은 각기 별개로 작용하는 것이 아니고 치료에 있어서 서로 정보를 교환할 수 있는 상호보완적인 요소이므로 약물전달시스템의 설계에 있어서 필수적인 구성성분이다.¹ 나노기술이 진단체의 개발에 있어서 유익한 것은 그것이 단순히 영상의 대비나 해상도를 높이기 때문만은 아니다. 그것이 특정질환의 발병기전의 핵심이 되는 미세분자나 미세한 발병과정을 표적화하여 미세 병리현상을 추적하여 초기질환 진단 및 이와 결부되는 약물 치료요법의 효과도 즉각적으로 파악할 수 있게 해주기 때문이다.^{1,2} 약물전달체 개발 역시 세포내 단위분자 및 체내거동에 활용되는 나노기술에 기반하고 있음은 더이상 재론의 여지가 없다고 하겠다. 본 총설에서는 약물전달시스템의 개발에 있어서 진단시약 및 치료약물 수송체의 고안에 활용되는 나노과학기술에 대한 고찰을 하기로 한다.

2. 진단시약 개발에서의 나노과학 기술

전통적인 방법에 의해 제조한 진단시약의 응용사례를 **표 1**에 표시하였다.³ 이러한 진단시약은 동위원소와 무기염으로 제조된 나노 및 마이크론 단위의 입자시스템을 바탕으로 한 것으로서 상용화되어

있다. 그러나 대표적인 한계점으로는 목적하는 장기로의 선택성이 부족하여 원하는 영상을 얻기가 어렵다는 점이다. 이에 따라 진단효율을 높이기 위해 이러한 진단시약에 표적화기법을 도입하는 시도가 시작되었다. 표적화는 항원-항체반응과 같이 특정 장기나 병소에 존재하는 분자를 추적하고 인식하여 특이하게 결합하는 현상에 기초한 것이다.

특정 장기나 병소에 대표적으로 존재하는 개개의 체내분자는 그 자체로는 크기가 매우 작아서 비침투적인 방법에 의한 직접적인 영상화는 불가능하다. 그 반면에 목적 체내분자에 대해 선택적이고 특이적으로 반응하거나 결합하는 물질을 도입하여 이에 의한 영상화가 이루어지도록 하는 기법이 나노기술에 기초하여 표적지향성 조영제로 개발되고 있다.¹ 표적지향성 진단체제는 나노입자 내에 동위원소나⁴ 혹은 철을 함유하는 물질⁵ 그리고 형광물질 등을 함유하여 영상화할 수 있게 하는 점에서 전통적으로 활용되어진 진단체제와 비슷하지만 나아가 병소 표면에서만 발현하는 물질 (항원, 기타 펩타이드 물질)과 특이적으로 결합할 수 있는 물질 (항체나 펩타이드의 수용체 등)로 나노입자 표면을 수식하여 병소표면에 대한 진단 특이성을 높이는 점에서 기존의 진단체제와는 크게 다르다고 할 수 있다.^{6,7}

2.1 진단용 나노수송체의 조건

최근에 진단용 나노입자들은 대부분 지질계열의 소재나 고분자 소재로 만들어지고 있는데, 고분자 소재 중에서도 천연의 고분자,⁸ 폴리락트산 계열의 고분자,⁹ 친수성 고분자 및 소수성 고분자의 공중합체를¹⁰ 포함하는 합성고분자로 이루어져 있다. 이러한 고분자는 이미 생체내에서 안전성이 확보되어 있으며,

표 1. 진단에 이용되는 방사성의약품의 예

방사성 의약품	에너지 전위	물리적 반감기	사용량	비고
⁵⁹ Fe citrate	1.1 meV (56%) 1.3 meV (44%)	45일	10-50 μCi	영상의 질이 낮고 표적장기에 도달하기 위해 고용량으로 조사해야 한다.
⁵² Fe citrate	165 keV (100%)	8.2시간	10-20 mCi	반감기가 짧아서 장기간 촬영 등에는 적합하지 않다.
¹¹¹ In chloride	173 keV (89%) 247 keV (94%)	2.8일	2-4 mCi	장기로의 분포가 일정치 않다.
⁶⁷ Ga citrate	93 keV (40%) 185 keV (24%) 296 keV (22%)	3.2일	2-5 mCi	감염과정이나 중앙발생과정 등을 추적하기에 좋으나 장기로의 분포가 일정치 않다.
⁵¹ Cr RBCs	320 keV (7%)	27.8일	100-300 μCi	표지된 적혈구가 열이나 혈액 내에서 변성할 수 있고 장기분포가 일정하지 않다.
^{99m} Tc- Phosphate	140 keV (90%)	6시간	10-20 mCi	중양이나 비장에 인산염이 특이적으로 집적하여 영상화가 이루어지나 집적도 및 비장으로의 분포가 일정치 않다.

다른 목적의 치료용으로 시판되고 있는 재료들이다. 이러한 재료로 나노수준의 입자를 제조하는 방법을 간단히 설명하자면, 고분자용액을 고분자에 대한 비용매에 미세하게 분산시켜 발생하는 상분리 현상을 통해서 나노입자를 형성하게 하는 기법이다.^{10,11} 또한 친수성 고분자와 소수성 고분자의 공중합체의 수계에서의 자발적인 회합 (self-assembly)에 의해 형성되는 미셀 (micelle) 역시 나노단위의 입자시스템의 한 예이다. **그림 1**은 폴리카프로락톤 (polycaprolactone)과 폴리에틸렌옥사이드 (polyethyleneoxide)의 공중합체에 동위원소를 함유하게 하여 제조한 미셀의 전자현미경 사진으로 50 nm 내외의 입자분포도를 나타내고 있다.⁴

진단 목적으로 나노입자들이 원하는 장기나 세포에 최적으로 도달하여 영상을 내게 하기 위해서는 다음의 조건을 충족시켜야 한다. 첫째로 생체내 순환기간 (순환 반감기)이 길어야 한다.¹² 생체내로 도입되어 순환되던 중 생체내 단백질에 의해 오폐소닌화 (opsonization)가 일어나고 간이나 비장의 세망내피계 (reticuloendothelial system, RES)에 인식되어 제거되면 목적하는 표적화를 이룰 수 없으므로, 체내 단백질에 의한 오폐소닌화 및 이에 따른 RES 제

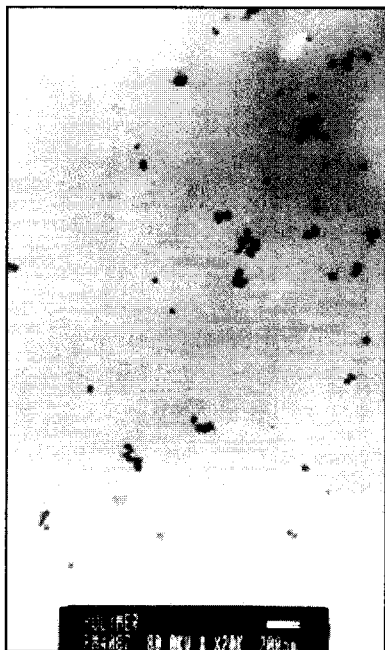


그림 1. 동위원소 함유 폴리카프로락톤과 폴리에틸렌옥사이드 공중합체로 이루어진 미셀 (micelle)의 전자현미경 사진.⁴

거를 최대한 억제하여야 한다.¹³ 이러한 시도는 나노입자의 표면에 친수성 고분자인 폴리에틸렌글리콜 (polyethylene glycol, PEG)을 피복시키거나 화학적으로 결합시켜 나노입자의 표면이 PEG층으로 덮이게 하여 RES 제거를 억제하도록 하는 것이다.^{13,14} PEG로 표면수식된 입자들이 간이나 비장의 제거가 억제되고 오랫동안 혈류에 존재하면서 원하는 장기로 이동한다는 사례가 보고된 바 있다.^{13,14} 특히, 골수를 진단하고자 하는 경우 PEG로 표면처리된 나노입자의 경우 간, 비장의 탐식 (uptake)이 제어되고 혈류에 존재하는 나노입자들이 대부분 골수로 이행하여 진단효율이 높아진다는 사례도 보고된 바 있다.^{4,15} 둘째로 표적장기나 세포표면에 존재하는 물질 즉, epitope에 선택적이고 특이적으로 결합하여야 한다.¹⁶ 특정 질병장소는 그 장기나 세포표면에 질병 특이적인 물질, 펩타이드 물질이거나 항원을 나타내는데 나노입자가 이러한 표면물질에 결합할 수 있는 펩타이드 리간드나 수용체 혹은 항체를 지니고 있다면 표적 장기에 대한 선택적인 영상효율이 증가된다고 할 수 있다. 이러한 나노입자에 수식된 표면 항체 및 수용체는 향후 나노입자를 표적장기로 이끌어 가는 homing sequence 물질이라고도 한다.¹⁶ 개발되고 있는 항체 및 homing sequence peptide의 종류가 많기 때문에 일일이 열거할 수는 없지만, **표 2**에 현재 시판되고 있는 표적지향성 항체의 종류, 표적질환 및 병소에 관하여 표시하였다. 상기의 항원이나 펩타이드성 수용체를 나노입자 표면에 붙이는 기법은 화학적방법에 기반을 두는데 나노입자 표면에 반응성을 띠는 아민기나 카르복실기 혹은 disulfide기를 형성하게 하고 가교제를 활용하여 대상 펩타이드, 펩타이드 수용체 및 항체를 결합시킬 수 있다.¹⁷ 표적화물질을 나노입자 표면에 수식하는 데 중요한 점은 화학적결합에 의해 항체나 펩타이드의 표적능에 지장을 미치지 않아야 한다는 점이다. 현재까지 개발된 가교제중 단백질의 생리활성에 영향을 최소화하도록 고안되어진 것들이 있으며, 그 예로 *N*-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP), succinimidyl 4-(*N*-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) 등이 있다. 이들은 반응조건이 생체내 조건과 유사하며 특히, 반응 후에도 항체의 항원특이성에 지장을 주지 않는 것으로 알려져 있다. 셋째로 진단용제체로서 영상에 적합하도록 적절한 신호를 나타낼 수 있어야 한다.

표 2. 시판되는 단클론항체 및 그 적용 예

일반명	상품명	표적물질	적응증	시판회사
Muromonab	OKT3	CD3	장기이식 거부 경감	Johnson & Johnson
Abciximab	ReoPro	platelet	항혈소판 작용	Eli Lilly
Rituzimab	Rituxan	CD20	비호치킨성 림프종	Genentech
Daclizumaab	Zenapax	CD25	장기이식 거부 경감	Roche
Basiliximab	Simulect	CD25	장기이식 거부 경감	Novartis
Infliximab	Remicade	TNF α	류마치성 관절염 및 크론(Crohn)병	Centocor/J&J
Trastuzumab	Herceptin	HER-2/neu	유방암	Genentech
Gemtuzumab	Mylotarg	CD33	급성백혈병	American Home Product
Alemtuzumab	Cpmpath	CD52	만성 림프성 백혈병	Millenium/ILEX
Ibritumomab tiuxetan	Y-90-Zevalin	CD20	비호치킨성 림프종	IDEC

넷째로 생체적합성이 우수하여야 한다. 다섯째로 제품생산과 임상응용이 용이하여야 한다. 마지막으로 진단과 동시에 치료가 이루어지는 것이 가장 이상적이므로 약물 및 치료용 유전자전달체로 활용하는데 무리가 없어야 한다.¹

진단목적으로 사용되는 나노수송체는 사용되는 조건에 따라서 진단효율이 달라지므로 질병의 특징과 어떠한 방법으로 진단영상을 얻을 것이냐에 따라 나노수송체의 종류를 선택할 수 있다. 나노수송체의 종류로는 리포솜 (liposome),¹⁸ 에멀전 (emulsion),¹⁹ 덴드리머 (dendrimer),²⁰ 바이러스 유래의 나노입자²¹ 그리고 앞서 기술한 생체적합성 고분자를 이용하여 제조한 나노스피어 (nanospheres)^{10,11} 등이 있고, 여기에 imaging agent를 함유시켜 체내에서 영상화하도록 한다. Imaging agent로는 para- 혹은 super-para magnetic 금속이나 동위원소, 형광물질이 자기공명영상촬영 (magnetic resonance imaging, MRI), 양전자방사단층촬영 (positron emission tomography, PET), 형광촬영 등의 목적으로 활용될 수 있다.²² 또한 초음파 촬영인 경우 비록 수송체 자체에 imaging agent가 함유되어 있지 않더라도 나노입자 자체의 고유한 성질 예를 들면 밀도나 압축도 (compressibility) 등을 활용하여 감지할 수도 있다.²³

2.2 진단용 나노수송체의 활용 사례

앞서 기술한 바와 같이 진단용 나노수송체의 중요한 조건중의 하나는 표적장소의 선택적이고 특이한 전달이다. 일반적으로 표적화에 이용되는 표적용 리간드 (targeting ligand)로는 모노클론항체와 항체를 구성하는 펩타이드, 세포부착성 arginine-glycine-aspartic acid (RGD) peptide와 같은 특정 펩타이드 및 aptamer 들이 있으며, 이들은 표적장소에 선택적으로 결합할 수 있다. 이들

리간드는 나노수송체에 화학적방법으로 결합되고 진단 영상화에 활용될 수 있다.

나노기술을 활용한 분자영상 (molecular imaging)은 실제 임상에서도 활용되고 있는데, 그 예로 somatostatin-receptor에 결합하는 나노입자를 활용하여 신경내분비종양 (neuroendocrine tumor)을 진단한 예이다.¹ 이 나노입자내에 동위원소를 함유시키고 표면에 somatostatin 수용체에 결합하는 물질을 부착시켜 양전자방사단층촬영을 실시하여 암의 확인과 더불어 암의 발병단계까지도 확인할 수 있게 되었다. 또한 암의 진단뿐만 아니라 항암제의 투여에 따른 암세포의 사멸도 진단할 수 있게 되었다. 그 예로 나노입자에 방사성동위원소인 테크네슘을 함유시키고 표면에 암세포 사멸 시 나타나는 특정물질에 결합하는 아넥신 (anexin)을 결합시켜 투여하면 암세포에서 아넥신이 세포사멸 시 세포표면에 나타나는 phosphatidylserine에 특이적으로 결합함으로써 동위원소가 함유된 나노입자가 그 자리에 집적됨으로써 암부위에서 암세포의 사멸을 확인할 수 있는 시스템이다.¹

MRI용 진단시약 (paramagnetic metal)을 함유하는 리포솜을 중앙 진단에 이용한 사례도 보고되었다. 종양을 진단하기 위해 암조직 내 신생혈관의 인테그린 (integrin) $\alpha_v\beta_3$ 에 특이적으로 결합하는 항체를 리포솜에 결합시켜 투여한 후 24시간 동안 나노수송체가 암병소에 머무르면서 진단에 충분한 영상을 제공하였다.²⁴ 유사한 사례로 사불화탄소 (perfluorocarbon)로 제조된 나노수송체에 비슷한 $\alpha_v\beta_3$ 를 표적화하는 리간드를 붙여 투여한 후 한시간 내에 영상을 얻는 기법도 보고된 바 있다.²⁵ 또한 심혈관수술 후 혈관내 혈전의 생성여부를 알아내기 위해 피브리 (fibrin)에 대한 항체 리간드를 나노입자

에 결합시켜 생체내에 적용하여 MRI로 진단하는 방법도 보고되었다.²⁶ 특정 질환부위를 표적용 리간드를 이용해서 표적화하여 영상화하는 방법 외에도 세포내로 진단제제를 도입시켜 영상화한 사례도 있는데, 그 예로 대식세포나 줄기세포 (stem cell)를 표지하여 관찰하는 것이다.⁴⁶ 초기질환 진단을 위해 (예, 동맥경화증의 진단) 산화철을 함유한 나노입자를 대식세포에 도입시켜 진단한 예도 있고, magneto-dendrimer를 이용하여 줄기세포를 표지시켜 MRI로 촬영하여 진단한 사례도 보고된 바 있다.²⁷

특히 조직이 아닌 단세포를 진단할 경우 예를 들면 백혈병, 림프종과 같은 단세포군 중앙인 경우, 줄기세포 내부를 진단하고자 하는 경우, 조직진단이더라도 조직을 효과적으로 투과하여 병리현상의 단계를 알아보고자 하는 경우에는 세포표면에 표적화하는 기법보다 세포내로의 투과를 촉진하는 기법이 요구된다. 이럴 경우 세포 및 조직내로의 수송효율을 증진하고자 할 때 특정 아미노산배열의 펩타이드를 나노물질 표면에 수식하는 방법이 있다. 표 3에 이러한 목적으로 사용되는 펩타이드의 예 및 그의 아미노산 배열을 표시하였다.²⁸⁻³⁰ 이러한 목적으로 활용되는 펩타이드를 세포막내 전달 신호 (membrane translocational signal, MTS) 혹은 단백질 수송도메인 (protein transduction domain, PTD)이라고 한다. 펩타이드의 기전을 중심으로 기술하는 경우에는 전자의 호칭을 주로 많이 사용하고, 펩타이드의 효과를 중심으로 기술하는 경우 후자를 많이 사용한다. 그러나 특별한 구분없이 어느 물질이든지 그들의 세포내로의 도입효율을 높이는 펩타이드라고 정의되며, 그들의 배열내에 arginine과 lysine의 함량이 높은 것이 이들 펩타이드의 공통점이다. 이들이 개발된 것은 초창기 단백질치료요법 (protein therapy)

표 3. 세포막내 전달 신호 (membrane translocational signal, MTS)의 예와 그의 아미노산 배열

명칭	아미노산 배열
TAT fragment (49-57)	RKKRRQRRR
Penetratin	RQIKIWFQNRRMKWKK
VP-22	DAATATRGRSAASRPTEPRAPARSASRP RPVD
Arginine peptide	RRRRRRR
Transportan	GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL
Loligomer	(TPPKKKRQVDPKPKKKK) ₆ -
Hydrophobic peptide	VTVLALGALAGVGVG AAVLLPVLLAAP

에서 단백질 자체로는 세포와 조직내로의 도입이 어려워 치료효과가 좋지 않았으나 상기 펩타이드와 화학적 혹은 생물학적인 방법에 의해 하이브리드 단백질을 형성한 다음 적용 시 치료효과가 현저히 증가되어 그 적용성이 확장되었다. MTS 혹은 PTD 펩타이드는 아미노산배열이 길지 않아 펩타이드 화학을 이용하여 합성할 수 있으므로 필요한 때 이들 펩타이드를 합성하여 목적하는 고분자물질이나 나노입자에 화학적수단으로 결합시켜 수식할 수 있다.²⁸⁻³⁰ 진단에 있어서는 텍스트란으로 이루어진 고분자 나노입자의 표면에 TAT 펩타이드를 결합시켜 림프종세포를 진단한 예가 있으며, 특히 치료용단백질이나 약물함유 고분자 나노시스템을 세포 및 조직내로 도입시키기 위해 사용되는 예는 다음 장에서 기술하기로 한다.

3. 치료용 약물전달체 개발에서 나노기술의 활용

표적지향성 나노시스템에 약물, 단백질약품, 치료용 유전자를 함유하는 기술 및 나아가 진단시약과 약물의 혼합 함유기법은 진단과 치료를 동시에 가능케 해주는 새로운 패러다임을 제공해 준다. 우선 치료용약물로는 저분자량의 활성물질, 단백질약품 및 유전자약품 등이 수송체의 소재가 되는 지질이나 고분자재료와 복합체를 이루고 이들이 나노시스템으로 적용되는 것이다. 약물의 함유기법에 있어서 약물은 수송체 표면에 코팅층을 형성시켜 코팅층에 용해되도록 할 수도 있고 수송체 내부에 분산시켜 함유되도록 할 수도 있다.¹ 표적인식능 없이 단순히 약물만을 함유하게 하여 조절 방출시키고자 하는 시도는 이미 고휘지질나노입자,³¹ 알부민,³² 합성고분자로 이루어진 나노입자^{10,11} 등을 통해 개발되어 널리 사용되고 있다. 그러나 이러한 약물전달체가 특정질환 예를 들면 혈전 (thrombosis)이나 종양 등의 특정부위의 질환을 치료하기 위함이면 이러한 질환부위를 특이적으로 인식하는 리간드가 필요하며, 이는 전신 순환혈에서의 비특이적인 약물방출에 의한 부작용을 피하는데 필수적이다. 표적인식용 리간드가 나노입자에 부착되면 이들은 약물을 함유한 나노입자를 표적장기나 세포로 수송하여 목적장소에서 고농도의 약물을 제공하는데 이러한 기법을 미사일요법이라 한다.³³ 표적인식용 리간드는

앞서 기술한 바와 같이 단클론항체 및 펩타이드 등이 될 수 있으며, 리간드와 나노입자의 결합 역시 앞서 기술한 화학적수단에 의한다. 이 장에서는 치료에 응용되는 단백질약품 및 유전자전달에 있어서 나노기술의 응용에 관하여 고찰하고자 한다.

3.1 나노수송체를 이용한 약물 전달

고분자 나노수송체로는 앞서 기술한 폴리락트산 계열의 합성고분자 및 키토산, 알부민, 덱스트란 등의 천연고분자를 재료로 하여 제조할 수도 있는데, 약물을 고분자 나노수송체에 도입하여 투여하게 되면 약물용액을 투여하는 것보다 목적장소에서 고농도의 약물농도를 얻을 수 있다.³⁴ 특히, 표면에 표적부위 인식이 가능한 리간드가 부착된 경우 리간드-나노수송체가 세포나 장기표면에 결합하고 함유된 약물이 방출될 수 있다. 이러한 나노시스템은 표적부위에서의 지속적인 방출 및 약효유지를 위한 약물저장고 역할을 하게 된다. Paclitaxol이나 doxorubicin 등의 항암제를 유방암 등의 고형암에 투여한 경우 고분자 나노수송체를 활용하여 높은 치료효과를 보인 사례도 보고된 바 있다.³⁵ 또한 심혈관수술 후 초래되는 합병증의 하나인 restenosis를 막기 위해 약물을 나노입자에 함유시키고 나노입자 표면에 tissue factor를 인식하는 리간드를 붙여 투여한 결과 restenosis가 현저히 감소함을 확인한 보고도 있다.³⁶

단백의약품을 투여하는 경우 단백질약품은 체내에서 효소공격 등에 의해 불안정해지므로 투여 시 많은 양의 단백질을 주사해왔으나 이에 따른 부작용이 문제점으로 제기되어 왔다.³⁷ 이에 고분자를 활용하여 소량의 약물을 안정한 상태로 고분자 수송체 내에 함유시킨 다음 적용시킴으로써 체내에서 서서히 유효농도의 약물을 방출시켜 치료효과를 극대화한 시도들이 보고되어 왔다.³⁸ 그러나 단백질약품을 폴리락트산과 같은 합성고분자에 함유시키는 기법은 다른 의약품을 함유하는 기법에 비해 까다로운데 합성고분자에 의한 나노수송체의 제조는 제조 시 고분자를 유기용매에 용해시키므로 제조과정에서 단백질약품과 유기용매와의 접촉으로 인한 약물의 활성저하가 야기되기 때문이다. 그러므로 단백질약품을 수계에 녹이고 이를 계면활성제와 함께 고분자가 용해되어 있는 유기상에 분산시키고 기존의 알려진 상분리법에 의해 제조하는 방법이 보고되었다.^{10,11} 또한 단백질약품을 함유하는 경우 상기의 방법 외에 천연고분자를 재료로 하여 나노입

자를 제조하여 적용하는 예도 보고된 바 있다.³⁹ 천연고분자로는 알긴산 (alginate), 키토산 (chitosan), 카라기난 (carrageenan), 콜라겐 (collagen) 등을 들 수 있는데, 이들은 특정 양이온 (예, 칼슘, 칼륨, 마그네슘)이나 음이온 (예, 트리폴리인산 등)과 이온결합으로 반응하여 겔을 형성하는 특징이 있어 나노입자를 형성할 수 있다. 특히 모든 제조과정에서 이루어지므로 단백질약품이 함유되는 경우 약물활성의 보존이라는 측면에서 잇점이 있다고 할 수 있다.³⁹

위와 같은 방법으로 고분자 나노입자에 단백질약품을 함유하는 방법 이외에도 화학적으로 수송체 물질과 결합시켜 조직이나 세포에 도입시켜 약효를 발현시킬 수도 있는데, 이 때 활용되는 수송체 물질이 앞에서 기술한 MTS 혹은 PTD 펩타이드이다. **그림 2**는 이러한 펩타이드들이 펩타이드에 연결된 단백질약품이나 나노입자 등의 물질을 세포내로 도입시키는 과정을 나타내고 있다.²⁸ 그림에서 물음표로 나타낸 것과 같이 MTS 펩타이드가 어떠한 기전으

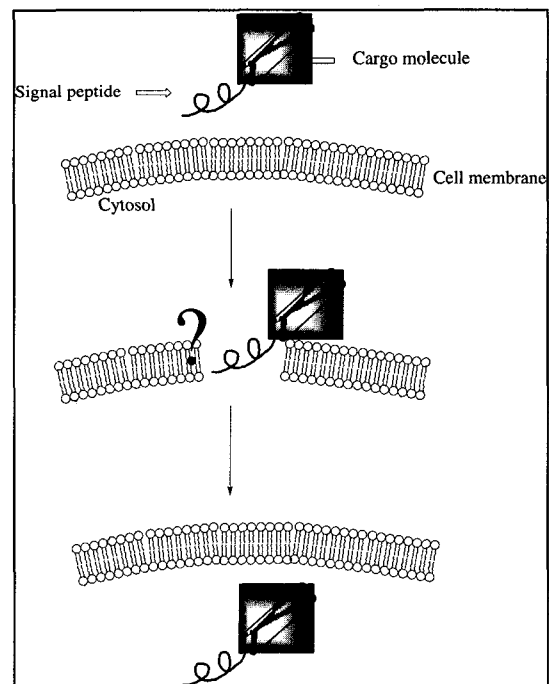


그림 2. 세포막내 전달 신호 (membrane translocational signal)와 결합된 물질이 세포막내로의 수송 모식도.²⁸ 정확한 세포막 투과기전은 확립되어 있지 않으나 엔도사이토시스 (endocytosis)와는 다른 기전으로 이루어진다고 알려져 있다.

로 세포내로 물질을 도입시키는가에 관하여 정확한 기전은 알려져 있지 않다. 그러나 일반화된 가설은 이들 펩타이드는 전통적인 세포내 수송과정을 따르지 않는다는 것이다. 즉, 세포의 수용체를 통하거나, 세포접착에 의한 세포내이입 (endocytosis)과는 다른 기전에 의해 이들 펩타이드, 펩타이드와 단백질 혹은 나노입자의 결합체가 세포내로 도입된다는 것이다. 가설에 따라 이들 펩타이드가 세포막과 접촉 시 바이러스와 유사한 방법으로 세포막에 가역적인 미세공 (pin-hole)을 형성하고 이를 통해 단백질이나 나노입자들을 세포내로 도입시킨 후 자연적으로 세포막이 원상태로 복원한다는 것이 가장 가능한 기전으로 제시되어져 왔다. 이들 펩타이드에 의해 세포내로 전달된 약물들은 앞서 기술한 진단용 제제 외에도 약리활성 펩타이드 및 단백질들이 생물학적 방법에 의한 fusion protein 기법이나 화학적결합에 의해 펩타이드에 연결되어 적용되어져 왔는데, 그 예를 표 4에 표시하였다.²⁸ 펩타이드 약물로서 p16은 망막종 (retinoblastoma)내 단백질의 인산화를 저해하여

세포성장을 완전히 억제하는 강력한 활성을 가지지만 그 자체로는 세포내로 도입이 안되어 작용을 못하는데, MTS 펩타이드의 일종인 TAT와 하이브리드를 형성하여 적용 시 세포내 도입효율이 증가되어 현저한 항암효과를 나타내었다.⁴⁰ 또한 항암효과를 나타내는 p53이나 caspase-3 단백질은 그 자체로는 세포내로의 도입이 어려워 항암효과를 나타내지 못하나 각각 VP22와 TAT에 결합시켜 적용할 때 항암효과 및 예정된 세포사 (apoptosis)에 의해 항바이러스효과를 보인다고 알려져 있다.^{41,42} 약물을 함유하는 나노수송체를 제조하기 위해서는 물리적 함유기법 이외에도 고분자의 반응성 관능기에 약리활성물질을 화학적으로 결합시키고 또한 병소의 이행을 도와주는 항체나 펩타이드를 결합시켜 응용한 사례도 보고된 바 있다. 일례로 수용성 고분자인 poly (hydroxypropyl methylacrylate)에 항암제인 doxorubicin을 특정 펩타이드 스페이서를 이용하여 화학적으로 결합시키고 여기에 암부위를 인식하는 항체를 부착시켜 투여한 경우 현저한 항암효과를 보였음은 물론 내성이 생겨 약물요법이 어려워진 multidrug resistance가 발생한 종양에서도 항암효과를 확인한 보고가 있다.⁴³

표 4. 세포막내 전달 신호 (Membrane translocational signal, MTS)를 활용한 약물 및 입자 전달 사례

MTS	전달물질 종류
HIV-TAT	형광물질 태그 (tag)-FITC 동위원소 리간드 펩타이드 약물 단백약품 올리고뉴클레오타이드 DNA 리포솜 (Liposome) 나노스피어 (Nanosphere)
Oligoarginine	형광물질 태그 (tag)-FITC 펩타이드 약물
Antennapedia	펩타이드 약물 단백약품 올리고 뉴클레오타이드 펩타이드-뉴클레오타이드 (PNA) 항종양약품 (독소루비신)
VP-22	단백약품
Transportan	펩타이드 약물 단백약품 PNA
Loligomer	형광물질 태그 (tag)-FITC Plasmid DNA 항종양약품
Hydrophobic signal	펩타이드 약물 단백약품 올리고 뉴클레오타이드

3.2 치료용유전자 전달수송체 개발에 나노기술 활용

유전자치료는 1990년에 미국 국립보건원 (National Institute of Health, NIH)에서 아데노신 탈아민효소 (adenosine deaminase)가 결핍된 여아에게 이 효소를 발현시키는 유전자를 전이시켜 효소결핍증이 치유된 것을 시작으로, 현재까지 활발한 연구가 진행되고 있는 분야이다.⁴⁴ 유전자치료는 분자생물학의 발달로 효소나 단백질 결핍, 종양, 심혈관계 및 중추신경계 질환의 주된 원인유전자가 밝혀짐에 따라 결핍된 유전자를 주입하거나 변환시켜 특정 단백질이나 효소를 발현시키거나 정상으로 되돌려 최종적인 치료효과를 도모하는 것이 목적이다. 유전자를 전이시키기 위해서는 벡터라는 수송체가 필요하다. 벡터는 수백-수천 나노미터 (대략 수 마이크로) 크기의 거대한 유전자를 200 nm 이하의 입자로 압축시키고 세포내로의 전달을 용이하게 해주는 역할을 한다. 전통적으로 바이러스에서 유래한 바이러스성 벡터가 유전자수송체로 사용되어져 왔는데, 그 예로는 retrovirus, adenovirus, adeno-associated virus, onyx virus, herpes simplex virus 등이 사용되어 왔다.⁴⁵ 이 벡터들은 유전자 발현효과는 우수하나 체내에 적용 시 벡터자체가 유발

하는 감염반응 및 부적절한 생체적합성이 문제점으로 지적되어 왔다. 이러한 바이러스성 벡터 이외에도 비바이러스성 벡터 (nonviral vector)의 개발도 이루어지고 있는데, 지질,⁴⁶ 리포솜,⁴⁷ 펩타이드⁴⁸ 및 고분자^{49,50} 등이 비바이러스성 벡터의 소재로 활용되고 있다. 고분자를 활용한 벡터 개발은 양이온성 고분자를 중심으로 이루어지고 있는데 양이온성 고분자가 음이온을 띠는 유전자와 이온결합으로 결합하여 나노미터 크기의 입자를 만들어 주기 때문이다. 유전자치료를 활용되는 양이온성 고분자의 예를 **그림 3**에 표시하였다.⁵⁰ 일반적으로 유전자와 벡터 결합체는 100~200 nm의 크기와 20~30 mV의 표면전하를 띠고 있을 때 용이하게 세포내로의 도입이 이루어진다고 알려져 있다.⁵¹ 이들 고분자와 유전자는 나노복합체를 형성할 때 위에서 요구되는 입자 크기와 표면 전하를 나타냄으로 적절한 소재라고 할 수 있다.

유전자전달 과정은 단순히 나노입자의 세포내로의 전달이 아니고 특정세포에 대한 표적화 및 세포내에서의 과정 즉, 엔도솜 (endosome)으로부터 세포질로의 이행, 세포질에서 최종 목적지인 핵으로의 이행이 연결되어 있는 일련의 복잡한 과정이므로 (**그림 4**), 각 과정의 이행을 용이하게 해주는 펩타이드나 관능기의 도입 역시 나노기술에 기반을 두고 있다고 할 수 있다.^{52,53} 예를 들면, 표적세포로의

표적화를 위해서 상기 기술한 단클론항체 또는 펩타이드를 고분자에 결합시킬 수도 있고,⁵⁴ 엔도솜에서 세포질로의 이행을 위해서는 이미다졸 (imidazol)을 함유한 펩타이드 (예, histidine)를 활용할 수 있다.⁵⁵ 세포질로의 직접적인 이행을 위해서는 TAT 펩타이드를 포함하는 transduction domain을 고분자에 결합시켜 엔도솜을 거치지 않고 직접 세포질내로 보낼 수 있다.⁵⁶

세포내에서 단백질약품의 작용부위가 일부를 제외하고는 세포질이 대부분이므로 단백질약품의 세포내 전달에 있어서 세포막이 주된 장벽이라면, 유전자전달에서는 세포막내 도입 후 세포질로부터 핵막을 통한 핵내로의 수송이 또 하나의 장벽이 된다. 고분자물질의 핵내로의 수송은 대부분 핵막에 존재하는 핵막공복합체 (nuclear pore complex, NPC)를 통한다고 알려져 있다.⁵⁷ NPC를 통한 투과는 9 nm 이하 입자이거나 50 kDa 이하의 단백질에서는 단순확산 (passive diffusion)에 의해, 이보다 큰 물질에서는 능동적수송 (active transport)에 의해 핵내로 도입된다고 알려져 있다.⁵⁷ 최근 최대 28 nm 입자크기의 물질도 NPC를 통해서 핵내로 도입됨이 알려져 있다. NPC를 통한 핵내 수송은 이 복합체와 결합하여 이루어지는 에너지 의존적 경로이며 담체에 의한 수송 (carrier-mediated pathway)으로 알려져 있다. Karyophilic protein이라는 물질은 세

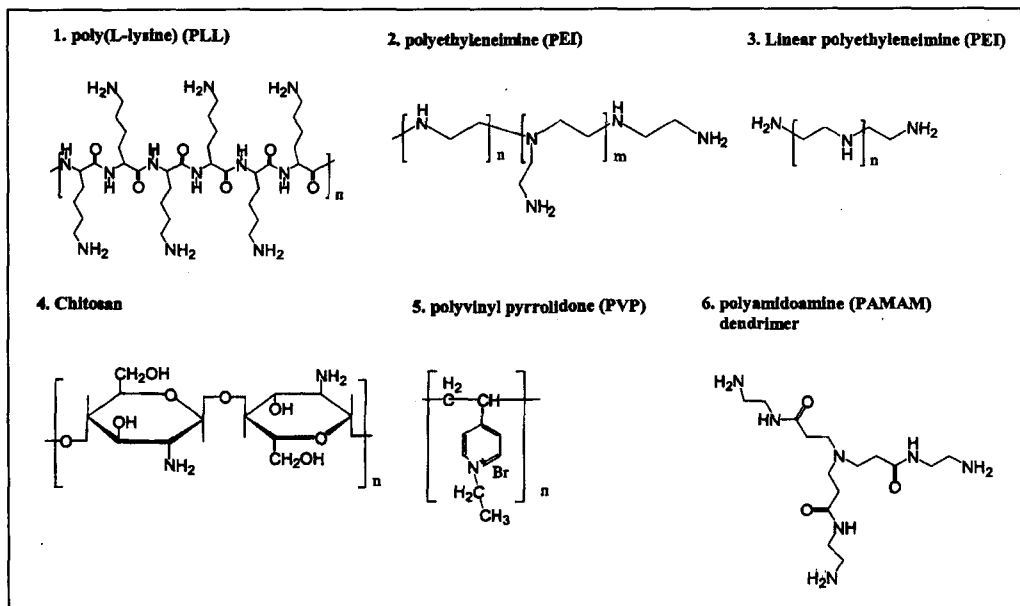


그림 3. 유전자 전달용 수송체에 활용되어지는 양이온성 고분자.⁵⁰

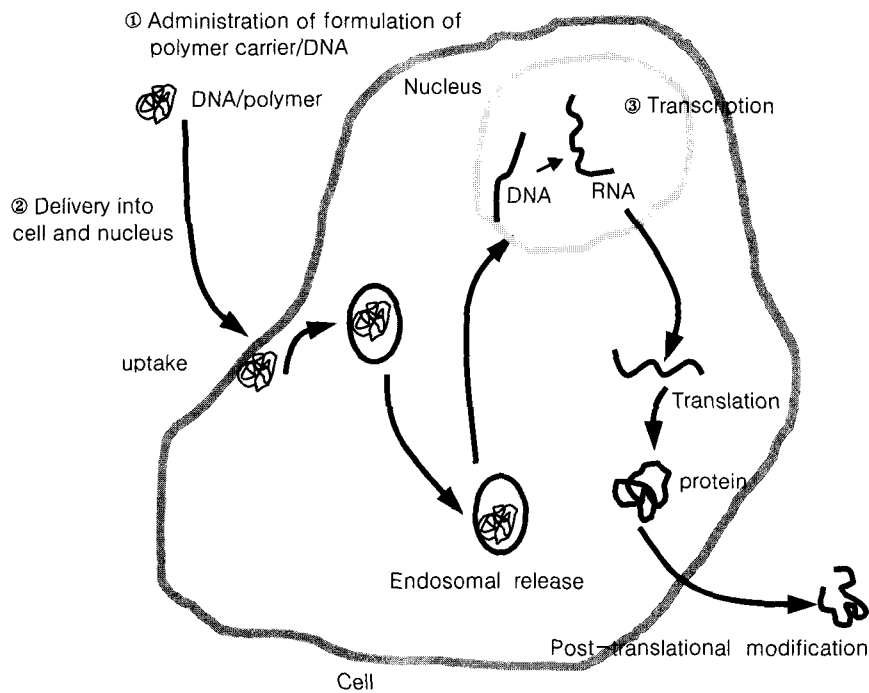


그림 4. 고분자-유전자 나노복합체의 세포내로의 전달 과정.

포내에서 하나 또는 둘 이상의 핵표적물질 (nuclear targeting signal peptide)을 지니고 있는데 이 특정 아미노산배열을 nuclear localiation sequence (NLS)라고 부른다.⁵⁷ 표 5에 NLS의 예와 그 아미노산 배열을 표시하였다. 핵내 수송을 위해서는 수송되는 단백질의 경우 karyopherin이라는 세포내 수송인자들이 NLS와 회합체를 이루어 핵공표적복합체 (nuclear pore targeting complex)를 이룬다. 이들이 NPC와 결합한 후 에너지 의존적 경로로 핵내로 도입된다. 그러나 NLS와 DNA를 결합시켰을 때 동일한 핵내 전달기전이 일어나는지에 관하여는 확실하지 않으나 이 경로 역시 최근연구의 중심이 되고 있다. DNA의 핵내 도입은 plasmid DNA와 NLS를 포함하는 핵단백질과의 이온결합이나 NLS를 포함하는 합성 펩타이드-핵산을 유전자에 이온결합 시키거나 또는 NLS를 유전자에 화학적 방법으로 직접 결합시켜 적용하였을 때 유전자 발현효율이 현저히 증가됨이 최근의 연구에서 보고된 바 있다.^{58,59} 따라서 치료용유전자 발현효율을 증가시키기 위하여 화학적방법이나 이온결합으로 NLS와 결합시키고 고분자 수송체에 도입한 후 적용할 수도 있다.

표 5. 핵내 수송 (Nuclear Transport)에 활용되는 물질과 그의 아미노산 배열

명칭	아미노산 배열
SV40 large T-antigen	PKKKRKV
Nucleoplasmin	KRPAAIKKAGQAKKKK
HIV-1 Rev	RQARRNRNRNRNRWR
hnRNP1 (M9)	NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPGGGGQYEAK-PRNQGGY

고분자 수송체를 활용하여 유전자전달을 시도한 예로는 polyethyleneimine과 항암유전자의 복합체에 암세포에 대한 항체를 표적지향성 리간드로 결합시켜 적용한 후 현저한 항암효과를 확인한 보고가 있다.⁶⁰ 또한 생체내 안전성을 향상시킨 지질-고분자 결합체에 표적지향성 리간드를 부착시키고 항암효과를 보이는 interleukin-10과 같은 cytokine 유전자와 나노복합체를 제작하여 실험동물에 투여한 결과 고분자를 사용하지 않은 경우와 비교할 때 현저한 항암효과를 보인다고 보고되었다.^{60,61} 이러한 비바이러스성 벡터는 바이러스성 벡터에 비교할 때 유전자 전달효율이 낮다는 한계는 있으나, 우수한 생체적합성이 확보되어 있고 전달효율을 높이기 위한 여러 기법들이 시도되어지고 또한 향상된 유전자전달

효과가 보고되고 있으므로 차기 약물전달체계에 있어서 전망이 밝은 분야라고 할 수 있다.

4. 결론

지금까지 약물 전달시스템의 개발에 있어서 나노 기술 활용분야를 진단제제와 약리활성물질의 전달체 개발로 나누어, 나노입자의 제조, 표면 수식, 기전 및 효과면에서 고찰하였다. 앞서 기술한 바와 같이 약물 전달시스템의 개발에 있어서 나노기술은 단순한 약학 및 화학적기반 뿐만 아니라 생물학적 연구기반 그리고 의학 연구기반 및 기술이 총체적으로 집결된 연구분야라고 할 수 있다. 이 총설에서는 나노미터 크기의 입자성 수송체 (particulate carrier)에 중점을 두고 고찰하였으나 나노기술은 입자성 전달체의 개발뿐만 아니라 나아가 나노크기의 다공성 구조체 (nanoporous matrix) 및 인공 이식체의 표면에서 나노층 (nanolayer)형성에도 활용될 수 있고 약물함유도 시도될 수 있다는 점에서 향후 활용분야가 더욱 커질 것으로 예상된다.

참고문헌

1. S. A. Wickline and G. M. Lanza, *Circulation*, **107**, 1092 (2003).
2. U. Westedt, L. Barbu-Tudoran, A. K. Schaper, M. Kalinowski, H. Alfke, and T. Kissel, *AAPS PharmSci.*, **4**(4), 41 (2002).
3. A. G. Desai and M. L. Thakur, *Semin. Nuclear Med.*, **15**(3), 229 (1985).
4. Y. J. Park, J. Y. Lee, Y. S. Chang, J. M. Jeong, J. K. Chung, M. C. Lee, K. B. Park, and S. J. Lee, *Biomaterials*, **23**, 873 (2002).
5. T. Allkemper, C. Bremer, L. Matuszewski, W. Ebert, and P. Reimer, *Radiology*, **223**(2), 432 (2002).
6. K. Arai, K. Takayama, Y. Nambu, N. Nambu, H. Ueda, Y. Machida, and T. Nagai, *Drug Des. Deliv.*, **2**(2), 109 (1987).
7. S. M. Moghimi, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1590**(1-3), 131 (2002).
8. Y. Nakagawa, K. Takayama, H. Ueda, Y. Machida, and T. Nagai, *Drug Des. Deliv.*, **2**(2), 99

- (1987).
9. K. Avgoustakis, A. Beletsi, Z. Panagi, P. Klw-petsanis, A. G. Karydas, and D. S. Ithakissios, *J. Control. Release*, **79**(1-3), 123 (2002).
10. J. S. Tan, D. E. Butterfield, C. L. Voycheck, K. D. Caldwell, and J. T. Li, *Biomaterials*, **14**(11), 823 (1993).
11. K. S. Soppimath, T. M. Aminabhavi, A. R. Kulkarni, and W. E. Rudzinski, *J. Control. Release*, **70**(1-2), 1 (2001).
12. G. Kaul and M. Amiji, *Pharm. Res.*, **19**(7), 1061 (2002).
13. J. Vandorpe, E. Schacht, S. Dunn, A. Hawley, S. Stolnik, S. S. Davis, M. C. Garnett, M. C. Davies and L. Illum, *Biomaterials*, **18**, 1147 (1997).
14. J. W. Bulte, M. Cuyper, D. Despres, and J. A. Frank, *J. Magn. Reson. Imaging*, **9**(2), 329 (1999).
15. C. J. H. Porter, S. M. Moghimi, L. Illum, and S. S. Davis, *FEBS 11191*, **305**(1), 62 (1992).
16. S. J. Kennel, M. W. Brechbiel, D. E. Milenic, J. Schlom, and S. Mirzadeh, *Cancer Biother. Radiopharm.*, **17**(2), 219 (2002).
17. C. Weber, S. Reiss, and K. Langer, *Int. J. Pharm.*, **211**, 67 (2000).
18. S. Demos, H. Alkan-Onyuksel, and B. Kane, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **33**, 867 (1999).
19. G. M. Lanza, K. D. Wallace, and M. J. Scott, *Circulation*, **95**, 3334 (1996).
20. C. Wiener, M. W. Brechbiel, and H. Brothers, *Magn. Reson. Med.*, **31**, 1 (1994).
21. J. W. Bulte, H. Zywicke, and J. A. Frank, *Molecular Imaging*, **2**, 225 (2001).
22. D. Hogenmann, L. Josephson, R. Weissleder, and J. P. Basilion, *Bioconj. Chem.*, **11**, 941 (2000).
23. G. M. Lanza, K. D. Wallace, and S. E. Fischer, *Ultrasound Med. Biol.*, **23**, 863 (1997).
24. D. A. Sipkins, D. A. Cheresch, and M. R. Kazemi, *Nat. Med.*, **4**, 623 (1998).
25. S. A. Anderson, R. K. Rader, and W. F. Westlin, *Magn. Reson. Med.*, **44**, 433 (2000).
26. S. Flacke, S. Fischer, and M. J. Scott, *Circulation*, **104**, 1280 (2001).
27. S. G. Ruehm, C. Corot, and P. Vogt, *Circulation*, **103**, 415 (2001).
28. C.-H. Tung and R. Weissleder, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **55**(2), 281 (2003).
29. P. Wunderbaldinger, L. Josephson, and R.

- Weissleder, *Bioconjug. Chem.*, **13**, 264 (2002).
30. S. Futaki, T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda, and Y. Sugiura, *J. Biol. Chem.*, **276** (8), 5836 (2001).
 31. R. H. Muller, M. Radtke, and S. A. Wissing, *Int. J. Pharm.*, **242**, 121 (2002).
 32. F. D. Kolodgie, M. John, and C. Khurana, *Circulation*, **106**, 1195 (2002).
 33. P. A. Trail, H. D. King, and G. M. Dubowchik, *Cancer Immunol. Immunother.*, **52** (5), 328 (2003).
 34. G. M. Lanza, X. Yu, and P. M. Winter, *Circulation*, **106**, 2842 (2002).
 35. I. Brigger, C. Dubernet, and P. Couvreur, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54** (5), 631 (2002).
 36. T. Uwatouku, H. Shimokawa, K. Abe, Y. Matsumoto, T. Hattori, K. Oi, T. Matsuda, K. Kataoka, and A. Takeshita, *Circ. Res.*, **92**(7), 62 (2003).
 37. W. Leobandung, H. Ichikawa, Y. Fukumori, and N. A. Peppas, *J. Control. Release*, **80**(1-3), 357 (2002).
 38. A. Prokop, E. Kozlov, G. W. Newman, and M. J. Newman, *Biotechnol. Bioeng.*, **78**(4), 459 (2002).
 39. A. Prokop, C. A. Holland, E. Kozlov, B. Moore, and R. D. Tanner, *Biotechnol. Bioeng.*, **75**, 228 (2001).
 40. D. R. Gius, S. A. Ezhevsky, M. Becker-Hapak, H. Nagahara, M. C. Wei, and S. F. Dowdy, *Cancer Res.*, **59**, 2577 (1999).
 41. A. Phelan, G. Elliott, and P. O'Hare, *Nat. Biotechnol.*, **16**, 440 (1998).
 42. A. M. Vocero-Akbani, N. V. Heyden, N. A. Lissy, L. Ratner, and S. F. Dowdy, *Nat. Med.*, **5**(1), 29 (1999).
 43. Y. Luo, N. J. Bernshaw, Z. R. Lu, J. Kopecek, and G. D. Prestwich, *Pharm. Res.*, **19**(4), 396 (2002).
 44. M. Onodera, D. M., Nelson, Y. Sakiyama, F. Candotti, and R. M. Blaese, *Acta Haematol.*, **101**(2), 89 (1999).
 45. K. Suzuki, K. Aoki, S. Ohnami, K. Yoshida, T. Kazui, N. Kato, K. Inoue, M. Kohara, and T. Yoshida, *Gene Ther.*, **10**(9), 765 (2003).
 46. D. Niculescu-Duvaz, J. Heyes, and C. J. Springer, *Curr. Med. Chem.*, **10**(14), 1233 (2003).
 47. M. R. Almofti, H. Harashima, Y. Shinohara, A. Almofti, Y. Baba, and H. Kiwada, *Arch. Biochem. Biophys.*, **410**(2), 246 (2003).
 48. C. Rudolph, C. Plank, J. Lausier, U. Schillinger, R. H. Muller, and J. Rosenecker, *J. Biol. Chem.*, **278**(13), 11411 (2003).
 49. W. Suh, S. O. Han, L. Yu, and S. W. Kim, *Mol. Ther.*, **6**(5), 664 (2002).
 50. R. I. Mahato, D. Y. Furgeson, A. Maheshwari, S. Han, and S. W. Kim, "Biomaterials and Drug Delivery toward New Melenium", eds. by K. D. Park, I. C. Kwon, N. Yui, S. Y. Jeong, and K. Park, pp. 249-280 (2000).
 51. W. Zauner, A. Kichler, W. Schmidt, A. Sinski, and E. Wagner, *Biotechniques*, **20**, 905 (1996).
 52. H. M. Moulton, M. C. Hase, K M. Smith, and P. L. Iversen, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **13**(1), 31 (2003).
 53. H. Lee, J. H. Jeong, and T. G. Park, *J. Control. Release*, **79**(1-3), 283 (2002).
 54. D. A. Heideman, V. W. van Beusechem, G. J. Offerhaus, T. J. Wickham, P. W. Roelvink, M. E. Craanen, H. M. Pinedo, C. J. Meijer, and W. R. Gerritsen, *Hum. Gene Ther.*, **13**(14), 1677 (2002).
 55. I. Fajac, J. C. Allo, E. Souil, M. Merten, C. Pichon, C. Figarella, M. Monsigny, P. Briand, and P. Midoux, *J. Gene Med.*, **2**(5), 368 (2000).
 56. Y. J. Park, J. F. Liang, K. S. Ko, S. W. Kim, and V. C. Yang, *J. Gene Medicine*, in press (2003).
 57. V. Escriou, M. Carriere, D. Scherman, and P. Wils, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **55**(2), 307 (2003).
 58. L. J. Branden, A. J. Mohamed, and C. I. E. Smith, *Nat. Biotechnol.*, **17**, 784 (1999).
 59. M. A. Zanta, P. Belguise-Valladier, and J. P. Behr, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**(1), 91 (1999).
 60. R. I. Mahato, M. Lee, S. Han, A. Maheshwari, and S. W. Kim, *Mol. Ther.*, **4**(2), 130 (2001).
 61. J. W. Yockman, A. Maheshwari, S. Han, and S. W. Kim, *J. Control. Release*, **87**(1-3), 177 (2003).