

# 키토산 나노 입자를 이용한 약물전달시스템

권익찬 · 김광명 · 김성원 · 정혜선 · 정서영

## 1. 서론

약물전달시스템 (DDS, drug delivery system)이란 기존 약물의 부작용을 최소화하고 약물이 가지고 있는 효능 및 효과를 최적화시켜 질병치유에 필요한 최소의 약물을 효과적으로 전달하기 위한 제형으로 정의될 수 있다. DDS 분야는 저비용과 짧은 개

발기간으로 기존 약물의 새로운 제형개발을 가능하게 함으로써 차세대 바이오산업의 핵심으로 인식되고 있다. 최근의 지노믹스 (Genomics), 프로테오믹스 (Proteomics), 및 생물정보학 (Bioinformatics) 등 관련 기술의 급격한 발달에 의해서 DDS 세계 시장은 1999년 기준의 220억 달러에서 2007년에는 1200억 달러의 거대 시장을 형성할 것이라고 예측

### 권익찬

1982 서울대학교 섬유공학과 (학사)  
1984 서울대학교 섬유공학과 (석사)  
1984 ~ 한국과학기술연구원 고분자연구부  
1987 연구원  
1993 Dept. Pharmaceutics, Univ. of Utah (박사)  
1994 ~ 한국과학기술연구원 의과학연구  
현재 센터 선임, 책임연구원

### 김광명

1997 성균관대학교 화학공학과 (학사)  
1999 광주과학기술원 신소재공학과 (석사)  
2003 광주과학기술원 신소재공학과 (박사)  
2003~ 한국과학기술연구원 의과학연구  
현재 센터, Postdoctoral Fellow

### 김성원

1997 서울대학교 분자생물학과 (학사)  
1999 광주과학기술원 신소재공학과 (석사)  
2004 광주과학기술원 신소재공학과 (박사)  
2004~ 한국과학기술연구원 의과학연구  
현재 센터, Postdoctoral Fellow

### 정혜선

1984 이화여자대학교 화학과 (학사)  
1986 이화여자대학교 화학과 (석사)  
1994 Ohio State Univ. 화학과 (박사)  
1994 ~ Ohio State Univ., Postdoctoral  
1996 Fellow  
1996 ~ 한국과학기술연구원 의과학연구  
현재 센터 선임, 책임연구원

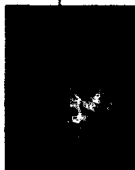
### 정서영

1979 서울대학교 약학대학 (학사)  
1984 Dept. Pharmaceutics, Univ. of Utah (박사)  
1984~ Dept. Pharmaceutics, Univ. of  
1986 Utah, Research Associate (박사)  
1986~ 한국과학기술연구원 의과학연구  
현재 센터, 책임연구원

권익찬



김광명



김성원



정혜선



정서영



## Drug Delivery Systems Using Chitosan Nanoparticles

한국과학기술연구원 의과학연구센터 (Ick Chan Kwon, Kwangmeyong Kim, Sungwon Kim, Hesson Chung, and Seo Young Jeong, Biomedical Research Center, Korea Institute of Science and Technology, 39-1 Hawolgok-dong, Seongbuk-gu, Seoul 136-791, Korea) e-mail : ikwon@kist.re.kr

되고 있다.

DDS 분야에서 다양한 기능과 성능을 가진 생체고분자 및 합성고분자를 이용한 새로운 약물전달체 (drug carrier)를 개발하는 연구가 매우 활발하게 이루어지고 있다. 이러한 연구의 목적은 기존 약물 또는 신약물의 부작용을 최소화하고, 인체 내에서 약물의 유효 혈중농도를 질병에 따라 최적화함으로써 치료효과를 극대화시키려는 것이다. DDS용 재료로서 요구되는 고분자의 특성은 생체적합성, 생분해성, 화학적·생물학적 무독성 등이 필수 조건이다. 그러므로 다양한 천연고분자 및 합성고분자들이 DDS용 재료로서 연구되고 있으며 DDS의 방법 및 목적에 따라 적합한 고분자를 선택하는 것이 중요하다.

최근에는 DDS 분야에 nanotechnology (NT)를 이용한 나노입자가 개발되어 나노약물전달체, 나노진단시약, 나노의료용물질, 나노바이오물질 등이 다양하게 활용되고 있다. 특히 나노약물전달체의 경우는 나노 수준의 제어가 가능한 지속성 약물전달 체제, 제어방출 시스템, 표적지향성 약물전달체제 등의 연구가 활발하게 진행되고 있다.<sup>1</sup> 이러한 나노입자를 이용한 DDS는 조만간 상업화가 가능한 차세대 기술로서 주목받고 있고, 인슐린 같은 펩타이드 약물, 항암제, 유전자 치료에 응용이 되며 난용성 약물의 가용화 등에 응용되는 기술로 그 응용분야는 더욱 넓어지리라 예상된다.

키토산 (chitosan)은 다당체의 일종으로 키토인의 탈아세틸화 (deacetylation)에 의해 제조된다. 최근 키토산의 생체적합성, 항미생물성, 생분해성 및 금속이온 흡착능 등의 기능성이 밝혀짐에 따라서 섬유고분자 산업이나 의공학을 비롯한 최첨단 기술 분야에서 응용되기 시작하였고 이에 대한 연구도 국내외적으로 활발하게 진행되고 있다.<sup>2-5</sup> 특히 키토산 나노입자를 이용한 항암제 및 유전자 치료를 위한 새로운 DDS 방법이 보고되고 있고, 본 연구팀에서도 지난 10년간 키토산 나노입자를 이용한 다양한 DDS 방법을 연구하고 있다.<sup>6-12</sup>

본고에서 키토산 나노입자의 제조 방법, 특성, 약물전달체로서의 우수성 등을 간단히 소개하고 키토산을 이용한 DDS 응용에 관한 최근의 연구동향과 앞으로의 전망 등을 언급하고자 한다.

## 2. 키토산 나노입자의 제조

키토산의 기본 구조는 *N*-acetylglucosamine과

glucosamine이  $\beta$ -1,4-glycosidic 결합으로 된 반복단위로 구성되어 있으며 양이온성인 아민 그룹의 존재로 다양한 물리적·화학적 개질이 가능하다. 키토산을 이용한 나노입자 제조 방법은 크게 두 가지 방법으로 나눌 수 있다 (그림 1).

첫 번째 방법은 키토산의 양이온성 아민 그룹과 음이온을 갖는 생체 고분자 및 DNA 등이 서로 정전기적 복합체 (polyion complex)를 형성하여 나노입자로 제조되는 방법이다. Maitra 등은 dextran-doxorubicin 복합체에 키토산을 정전기적 인력에 의해서 코팅하였다.<sup>13</sup> 이렇게 키토산으로 코팅된 나노입자는 100 nm의 균일한 크기를 나타내었으며 혈액 내에서 항암제의 잔류시간을 크게 증가시켜 암치료 효율을 증가시켰다. 또 키토산-DNA 복합체는 키토산 및 DNA의 농도, pH, 온도, 키토산 및 DNA의 분자량 등의 조건에 의해서 다양한 크기의 나노입자가 생성된다. 최적화된 조건에서 키토산-DNA 복합체는 100~500 nm의 균일한 나노입자를 형성하며, 유전자 치료를 위한 제제로서 다양한 방법으로 연구되고 있다.<sup>14-16</sup>

두 번째 방법은 친수성 키토산의 아민 그룹에 소수성 물질인 알킬 사슬, 담즙산 (bile acid) 및 소수성 항암제 (doxorubicin)를 화학적으로 결합하여 양친성 키토산을 제조하고, 이를 이용하여 자기 조립 (self-aggregate) 방법으로 입자를 형성시키는 것이다.<sup>6,7,11</sup> 소수성 물질로 개질된 양친성 키토산은 수용액 상에서 자기 조립형 나노입자를 형성하는데, 소수성 물질의 특성과 화학적으로 개질된 소수성기의 수

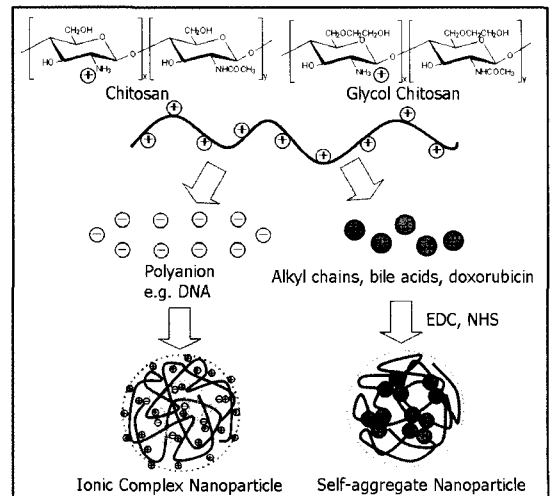


그림 1. 키토산을 이용한 나노입자 제조방법.

에 따라서 다양한 나노입자의 크기 및 물성을 나타낸다. 또 소수성 항암제인 doxorubicin을 직접 키토산 주쇄에 화학적으로 결합함으로써, 항암제를 포함하는 키토산 나노입자를 제조할 수도 있다.<sup>9</sup>

### 3. 키토산 나노입자의 특성

양이온을 가진 키토산과 음이온을 가진 고분자 및 DNA 등은 이온 결합에 의하여 키토산-고분자 또는 키토산-DNA 이온 복합체를 형성한다.<sup>17,18</sup> 키토산-DNA 복합체는 100~500 nm의 나노입자를 형성하며, 수용액 상에서 매우 안정된 형태를 가진다. 이렇게 키토산을 이용한 이온 복합체는 약물, 단백질 및 DNA를 물리적으로 봉입하여 다양한 DDS 방법에 사용되고 있다. 소수성 물질로서 개질된 양친성 키토산은 수용액 상에서 어느 정도 용해도를 가지고 있다는 점에서 키토산과 유사한 성질을 나타내지만, 또한 특별한 점탄성을 가지는 등 수용액 내에서의 거동이 본래의 키토산과는 상이한 특성을 나타낸다. 이런 독특한 성질은 양친성 키토산이 수용액 내에서 자기 집합체 (self-aggregate)를 이루기 때문이다 (그림 2).<sup>6,7,11</sup> 양친성 키토산이 자기 집합체를 이루는 원동력은 주쇄에 붙어있는 소수성 측쇄의 분자 간 소수성 결합에 의한 것이라고 알려져 있다. 양친성 키토산의 자기 집합체는 낮은 분자량의 계면활성제가 가지고 있는 micelle의 자기 집합 형태와는 상이한 구조를 나타내는데, 현재까지 알려진 바에 의하면 고분자 집합체는 한 개 이상의 소수성 물질의 microdomain을 가지고 있으며, 이러한 microdomain은 소수성 약물을 나노입자에 봉입하는데 유용하게 사용된다 (그림 2).

양친성 키토산 나노입자의 가장 큰 특징은 critical

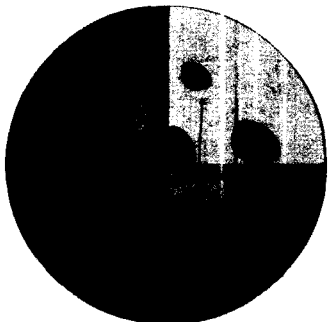


그림 2. 양친성 키토산으로 제조된 나노입자의 구조.

aggregation concentration (CAC) 이상의 농도에 이르면 수용액 상에서 나노입자를 형성하게 된다는 것이다. 이러한 나노입자의 구조는 형광분광법 (fluorescence spectroscopy)과 광산란 (light scattering)을 이용하여 측정될 수 있다 (그림 3). 양친성 키토산은 수용액 상에서 매우 균일한 나노입자를 형성하며, 입자의 크기는 약 100~800 nm 정도로 조절이 가능하다. 또 나노입자 내의 소수성을 조절하기 위하여 소수성이 서로 상이한 알킬 사슬과 담즙산을 화학적으로 개질한다면 소수성 약물 방출의 제어 가능성이 가능하며, 암, 경색 또는 염증부 등에 발생하는 enhanced permeability and retention (EPR)에 최적화된 나노입자 제조도 가능하다.<sup>19</sup>

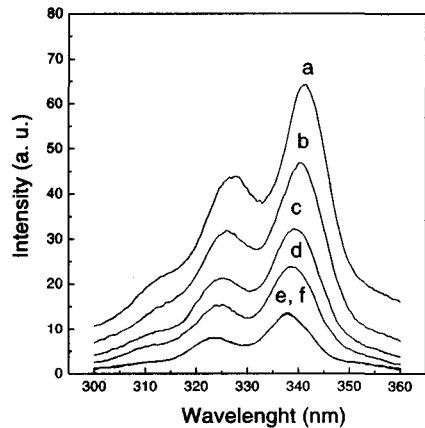


그림 3. Chitosan-deoxycholic acid 나노입자의 형광특성과 크기. (a) Excitation spectra of pyrene in PBS solution (pH 7.4) in the presence of chitosan-deoxycholic acid conjugates; a. 1, b. 0.5, c. 0.2, d. 0.1, e. 0.01, f. 0.001 mg/mL, (b) TEM image of chitosan-deoxycholic acid nanoparticles in PBS.

## 4. 키토산 나노입자를 이용한 DDS 분야

### 4.1 키토산 나노입자를 이용한 암치료

암치료에 있어서 약물을 이용한 화학요법의 가장 큰 문제는 항암제의 부작용에 의한 정상 세포 및 조직의 손상이다. 이러한 부작용을 해결하기 위하여 DDS 분야에서는 site-specific drug delivery 방법이 사용되고 있다. 이 방법은 인체 내의 약물이 필요한 부분에만 약물을 전달하는 방법으로, 암과 같은 질병이 있는 부위로만 약물이 전달되게 되면 투여한 약물의 효율도 높일 수 있을 뿐만 아니라 질병이 없는 다른 부위로 약물이 이행되는 것을 막을 수 있어 부작용을 줄일 수 있는 장점이 있다.

나노입자를 이용한 대표적인 site-specific drug delivery는 암 조직 주변의 느슨한 혈관의 높은 투과성 때문에 나타나는 EPR을 이용한 방법이 사용된다 (그림 4).<sup>20</sup> 인체 내의 나노입자는 혈액을 따라 계속적으로 이동하다가 암 조직 주변의 느슨한 혈관의 높은 투과성에 의해서 암 조직에 축적되고, 나노입자에 봉입된 항암제가 서서히 방출되어 최종적으로 암 조직만 선택적으로 치료될 수 있다. 이러한 나노입자의 조절방출개념과 EPR을 이용한 암치료 방법은 현재 가장 많이 연구되는 방법이며, 다양한 나노입자들이 개발되어 사용되고 있다. 그러나 대부분의 나노입자는 인체 내에 투여된 후, non-specific elimination으로 인하여 제거되기 때문에 원하는 암조직에 효율적으로 도달할 수 없다는 단점이 있다. 이를 해결하기 위하여 빠른 시간 내에 제거되지 않는 방법을 모색하게 되었고 이러한 방법을 long circulating system 또는 stealth system이라고 부른다. 체내에서 나노입자는 대부분 신장과 간에서 빠른 시간 내에 제거가 된다. 신장을 통한 제거는 주로 분자량의 크기에 의해서 결정되고 일반적으로 분자량 50000

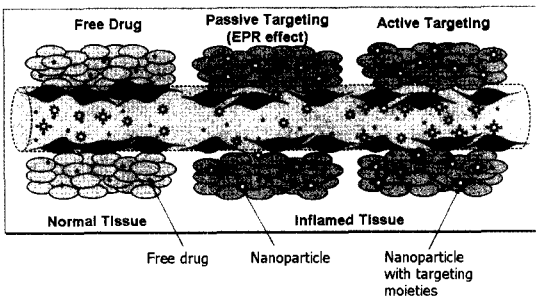


그림 4. 암조직에서 발생하는 EPR 효과를 이용한 약물전달 시스템.

Da 보다 낮은 물질은 수 분 내에 제거되어지며, 간을 통한 제거는 주로 reticuloendothelial system (RES) 또는 mononuclear phagocyte system (MPS)라는 체내의 방어기전에 의해서 제거된다. 따라서 이상적인 long circulating system은 분자량이 높고 체내의 방어기전에 탐색되지 않은 것이 가장 이상적이라 할 수 있겠다.

이러한 관점에서 키토산 나노입자는 뛰어난 생체적 합성 때문에 RES/MPS를 통한 방어기전에 의해서 쉽게 제거가 되지 않고, 나노입자의 크기를 조절함으로써 신장에서 제거되는 것을 최소화 할 수 있다고 보고되고 있다.<sup>21</sup> 즉, 키토산 고유의 뛰어난 생체적합성 및 저독성 때문에 혈액 내에 주입 시, 혈액에서 일어나는 면역 반응을 최소화하고, 나노입자의 안정성 때문에 신장에서 제거되는 것을 방지할 수 있다는 것이다. 현재까지 보고된 결과로서는 Kato 등에 의해서 제조된 키토산 나노입자는 쥐의 혈액 내에서 무려 10일 동안 제거가 되지 않는 biodistribution을 나타내었다.<sup>22</sup> 일반적인 지질 및 고분자 나노입자의 bio-distribution이 하루 이하인 결과와 비교할 때 매우 우수한 결과임을 알 수 있다.

키토산 나노입자를 이용한 항암제 전달체계는 Maitra group에서 활발히 연구가 진행되었는데, 소수성 항암제인 doxorubicin을 dextran에 화학적으로 결합시킨 다음, 키토산 용액에 떨어뜨려 키토산 나노입자를 제조하였다. 항암제를 봉입한 나노입자는 동물 실험에서 암 조직의 성장을 억제하였고, 항암제 투여 시 발생하는 부작용을 최소화하였다.<sup>13</sup> 본 연구그룹에서도 암 치료제를 위한 새로운 약물전달체제로서 키토산-항암제 나노입자는 개발하였다. 소수성 doxorubicin에 의해서 화학 개질된 키토산-항암제는 소수성 doxorubicin에 의해서 자기 조립체를 형성하였고, 최적화된 조건에서 250 nm의 균일한 입자를 형성하였다 (그림 5). 이러한 키토산-항암제 나노입자는 혈액 내에서 매우 안정한 나노입자를 형성하였고, 약 10일 동안 잔존하며 시간이 흐름에 따라서 암 조직 주변에 선택적으로 축적이 되었다. 또 doxorubicin 약물을 물리적으로 봉입함으로써, 약물의 봉입 효율을 97%까지 향상시켜, 기존의 doxorubicin 약물에서 발생하는 부작용을 최소화하고 암 치료 효율을 극대화시켰다 (그림 6).<sup>9</sup> 이러한 키토산 나노입자를 이용한 암치료법은 새로운 DDS 방법으로서 다양한 단백질 및 항암제 전달체로서 사용될 것이다.

최근에는 다양한 약물 봉입기술을 이용한 인슐린

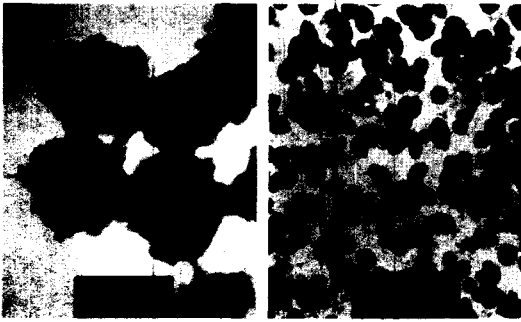


그림 5. 키토산-doxorubicin 나노입자의 TEM 형상.

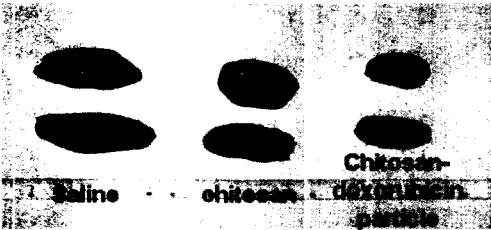
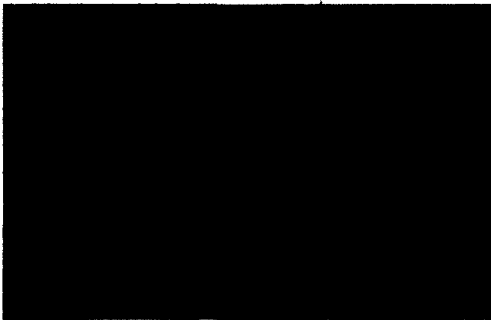


그림 6. Chitosan-doxorubicin 나노입자를 이용한 암치료 효과.

과 같은 단백질을 키토산 나노입자에 봉입하여 경구 및 경피 흡수가 가능한 새로운 약물전달체계를 만들기도 하고,<sup>23-25</sup> 키토산 나노입자의 세포 흡수 및 위장 흡수와 같은 기초적인 연구가 활발하게 진행됨에 따라서 암 및 유전자 치료뿐만 아니라, 다양한 단백질, 백신, 생약물질에 대한 새로운 전달기전을 제시할 것으로 기대된다.

#### 4.2 키토산 나노입자를 이용한 유전자 치료

유전자 치료법이란 유전자를 세포에 전달하여 질병을 치료하는 방법을 이르는 것으로 유전자를 전달하는 방법은 크게 두 가지의 형태로 나눌 수 있는데, 하나는 바이러스 전달체 (viral vector)를 이용하는 것이고 또 다른 하나는 비바이러스성 전달체 (non-viral vector)를 이용하는 것이다. Viral vector는 주로 retrovirus, adenovirus 등을 이용하여 높은 효

율로 유전자를 전달할 수 있지만 면역반응 및 염증반응 등의 안정성에 있어서 문제점을 가지고 있다. Non-viral vector는 유전자 전달 효율이 낮은 반면, 상대적으로 독성이 적고 안전한 전달체계로 각광받고 있다. Non-viral vector로 사용되는 전달체로는 micro-emulsion, cationic liposome 및 고분자를 이용한 micro-encapsulation 및 cationic polymer 등이 연구되고 있다.

특히 양이온을 가진 고분자를 이용하는 방법은 음이온을 띠고 있는 DNA를 양이온과 이온 결합에 의해서 고분자 이온 복합체를 제조하고 이를 이용하여 유전자 전달체로 이용하는 방법이다. 현재까지 poly-L-lysine, DEAE-dextran, poly(ethyleneimine) 등과 같은 양이온을 갖는 고분자를 이용한 DNA 복합체 전달체에 관한 많은 연구가 보고되었다.<sup>26-30</sup> 그러나 이러한 고분자 복합체로는 유전자 전달의 효율이 바이러스 전달체와 비교하여 현저하게 낮은 뿐만 아니라, 체내에 투여하였을 경우 양이온 고분자의 독성이 높아 체내의 방어기전에 의해서 모두 제거되는 단점을 가지고 있다.

이러한 문제점을 해결하기 위하여 뛰어난 생체적 합성, 낮은 독성, 생분해성을 가진 키토산을 이용한 유전자 전달체에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 특히 키토산은 다른 양이온성 고분자에서 발생하는 세포독성 및 면역반응 등의 부작용이 현저하게 줄여주기 때문에 새로운 유전자 전달체로서 많은 연구가 진행되고 있다. 이러한 양이온을 가진 키토산은 DNA와 이온결합을 통하여 균일한 나노입자 전달체를 형성하고, DNase에 의한 DNA 분해를 억제해 주며, *in vitro* 및 *in vivo* 결과에서 높은 DNA 전달 효율을 나타내었다.<sup>16</sup> 그러나 유전자 전달의 효율에 있어서 세포 형태에 의존하는 경향이 있는데 이러한 문제를 해결하기 위하여 키토산 이온 복합체 표면을 transferrin 및 viral fusion protein으로 개질하여 유전자 전달 효율을 향상시키는 방법이 보고되고 있다.<sup>16</sup> 최근 Leong 등은 키토산-DNA 나노입자를 이용하여 경구 흡수가 가능한 유전자 치료제를 개발하였다. 이러한 방법은 바이러스 전달체에 비교하여 낮은 전달 효율을 나타내는 고분자-DNA 복합체의 단점을 극복할 수 있는 새로운 가능성을 제시하였다.<sup>14</sup> 또 높은 경구 흡수율을 나타내는 키토산 미립구를 계속적으로 경구 복용함으로써, 필요한 DNA를 계속적으로 인체 내로 주입하는 방법들이 연구가 진행 중이다.

## 5. 결론

키토산 나노입자를 이용한 약물전달체계 분야는 그 역사가 짧음에도 불구하고 새로운 암 및 유전자 치료법을 개발하는데 많은 연구가 이루어지고 있는 분야이다. 키토산의 물리적·화학적 개질을 통하여 단백질, 항암제, 백신, 유전자 등의 다양한 약물이 봉입된 나노입자 제조가 가능함에 따라 특정 질병에 적합한 새로운 약물전달체계의 개발이 가능할 것이다. 본고에서 고찰한 다양한 키토산 나노입자는 기존 약물의 부작용을 최소화하고 약물이 가지고 있는 효능을 극대화하여 환자들에게 최소의 약물로서 효과적인 치료법을 제공할 것으로 기대된다. 키토산 나노입자를 이용한 약물전달체계는 차세대의 약물전달체계 개발 및 이를 이용한 새로운 치료법의 개발에 있어서 중요한 역할을 담당할 수 있는 연구 분야로 기대된다.

## 참고문헌

1. H. Ringsdorf, B. Schlarb, and J. Venzmer, *Angew. Chem.*, **110**, 117 (1998).
2. K. Kifune, "Advances in Chitin and Chitosan", eds. by C. J. Brine, P. A. Sandford and J. P. Zikakis, p. 9, Elsevier Applied Science, London (1992).
3. J. L. Leuba and P. Stossel, "Chitin in Nature and Technology", eds. by R. Muzzarelli, C. Jeuniaux, and G. W. Gooday, p. 215, Plenum Press, New York (1986).
4. J. Xu, S. P. McCarthy, and R. A. Cross, *Macromolecules*, **29**, 3436 (1996).
5. R. Maruca, B. T. Suder, and J. P. Wightman, *J. Appl. Polym. Sci.*, **27**, 4827 (1992).
6. K. Y. Lee, W. H. Jo, I. C. Kwon, Y. H. Kim, and S. Y. Jeong, *Langmuir*, **14**, 2329 (1998).
7. K. Y. Lee, W. H. Jo, I. C. Kwon, Y. Kim, and S. Y. Jeong, *Macromolecules*, **31**, 378 (1998).
8. K. Y. Lee, I. C. Kwon, Y. Kim, W. H. Jo, and S. Y. Jeong, *J. Control. Rel.*, **51**, 213 (1998).
9. Y. J. Son, J. Jang, Y. W. Cho, H. Chung, R. Park, I. C. Kwon, I. Kim, J. Y. Park, S. B. Seo, C. R. Park, and S. Y. Jeong, *J. Control. Rel.*, **91**, 135 (2003).
10. J. H. Park, Y. W. Cho, H. Chung, I. C. Kwon, and S. Y. Jeong, *Biomacromolecules*, **4**, 1087 (2003).
11. S. Kwon, J. H. Park, H. Chung, I. C. Kwon, S. Y. Jeong, and I. Kim, *Langmuir*, **19**, 10188 (2003).
12. J. H. Park, S. Kwon, J. Nam, R. Park, H. Chung, S. B. Seo, I. Kim, I. C. Kwon, and S. Y. Jeong, *J. Control. Rel.*, **95**, 579 (2004).
13. S. Mitra, U. Gaur, P. C. Ghosh, and A. N. Maitra, *J. Control. Rel.*, **74**, 317 (2001).
14. K. Roy, H. Mao, S. Huang, and K. W. Leong, *Nat. Med.*, **5**, 387 (1999).
15. E. Kai and T. Ochiya, *Pharm. Res.*, **21**, 838 (2004).
16. H. Mao, K. Roy, V. L. Troung-Le, K. A. Janes, K. Y. Lin, Y. Wang, J. T. August, and K. W. Leong, *J. Control. Rel.*, **70**, 399 (2001).
17. F. C. MacLaughlin, R. J. Mumper, and J. J. Wang, *J. Control. Rel.*, **56**, 259 (1998).
18. S. C. W. Richardson, H. J. V. Kolbe, and R. Duncan, *Int. J. Pharm.*, **178**, 231 (1999).
19. Y. Matsumura and H. Maeda, *Cancer Res.*, **46**, 6387 (1986).
20. H. Maeda, L. W. Seymour, and Y. Miyamoto, *Bioconjug. Chem.*, **3**, 351 (1992).
21. S. Hirano, H. Seino, Y. Akiyama, and I. Nonaka, "Chitosan: a biocompatible materials for oral and intravenous administration", eds. by C. G. Gebelin and R. L. Dunn, in "Progress in Biomedical Polymers", Plenum Press, p. 283-290, New York (1990).
22. Y. Kao, H. Onishi, and Y. Machida, *Biomaterials*, **25**, 907 (2004).
23. K. A. Janes, M. P. Fresneau, A. Marazuela, A. Fabra, and M. J. Alonso, *J. Control. Rel.*, **73**, 255 (2001).
24. R. Fernandez-Urrusuna, D. Romani, P. Calvo, J. L. Vila-Jato, and M. J. Alonso, *S. T. P. Pharm. Sci.*, **5**, 429 (1999).
25. A. M. Dyer, M. Hinchcliffe, P. Watts, J. Castile, I. Jabbal-Gill, R. Nankervis, A. Smith, and L. Illum, *Pharm. Res.*, **19**, 998 (2002).
26. G. Y. Wu and C. H. Wu, *J. Biol. Chem.*, **262**, 4429 (1987).
27. G. Y. Wu and C. H. Wu, *J. Biol. Chem.*, **263**, 14621 (1987).
28. E. Wagner, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **87**, 3410 (1990).
29. Y. H. Choi, F. Liu, J. S. Kim, Y. K. Choi, J. S. Park, and S. W. Kim, *J. Control. Res.*, **54**, 39 (1998).
30. O. Boussif, M. A. Zantaamd, and J. P. Behr, *Gene Ther.*, **3**, 1074 (1996).