

폴리에틸렌이민으로 수식된 양이온 리포솜의 제조 및 유전자 전달체로서의 응용

서동환 · 신병철 · 김문석[†]

한국화학연구원 화학소재부

(2005년 1월 27일 접수, 2005년 4월 21일 채택)

Preparation of Cationic Liposomes Modified by Polyethylenimine and Their Application as Gene Carrier

Dong Hoan Seo, Byung Cheol Shin, and Moon Suk Kim[†]

Nanobiomaterials Laboratory, Korea Research Institute of Chemical Technology,

100 Jang Dong, Yuseong, Daejeon 305-606, Korea

(Received January 27, 2005; accepted April 21, 2005)

초록 : 비바이러스성 DNA 전달체 중에서 최근 양이온성 고분자와 양이온성 리피드들은 많이 연구되어 왔다. 본 연구에서는 비바이러스성 유전자 전달체로서 양이온성 고분자인 폴리에틸렌이민(PEI)을 리피드에 수식하여 더 효과적인 전달체를 제조하고자 하였다. 새로운 양이온성 리피드(PEI-DSPE)는 1,2-디아실-*sn*-글리세로-3-포스포에탄올아민(DSPE)과 PEI를 이용하여 고수율로 합성하였다. 1,2-디스테아로일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린(DSPC), *L*- α -포스파티딜콜린(소이하이드로제네티드) (HSPC), 콜레스테롤(CHOL) 및 합성된 PEI-DSPE를 이용하여 리포솜을 제조하였다. 리포솜 제조는 리피드 함량에 대해 양이온성이 도입된 PEI-DSPE의 양을 증가시키며 수행하였다. 제조된 리포솜의 크기는 PEI-DSPE의 첨가량이 증가할수록 감소하였으며 리포솜의 표면전하 또한 양의 값으로 증가됨을 관찰할 수 있었다. PEI-DSPE 양적 변화에 따라 제조된 리포솜을 이용하여 DNA의 복합체 형성에 관한 결과 사용된 리포솜의 함량이 증가할수록 DNA와의 복합체 형성이 용이함을 전기영동 및 형광 측정을 통해 관찰할 수 있었으며 형성된 복합체가 사용된 리포솜 함량이 증가할수록 양이온적 성질이 증대됨을 관찰할 수 있었다. 그러므로 본 연구에서 합성한 PEI-DSPE를 사용하여 제조된 리포솜이 유전자 전달체로서의 가능성을 갖고 있음을 확인할 수 있었다.

Abstract: Recently, various carriers prepared by the modification both cationic polymers and liposomes have been examined. In this work, we prepared the lipid with polyethylenimine (PEI) to investigate the possibility as effective DNA carrier. Cationic lipid (PEI-DSPE) was synthesized by the reaction of PEI and 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DSPE). The liposomes were prepared by the concentration changes of PEI-DSPE for a mixture of 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DSPC), *L*- α -phosphatidylcholine, hydrogenated (HSPC) and cholesterol (CHOL). Particle size decreased as PEI-DSPE concentration increased. In addition, the charge of liposome surface increased to positive value according to increasing the relative of PEI-DSPE concentration. The complexation of DNA was confirmed by gel retardation assay and fluorescence measurement. The surface charge of liposome/DNA complexes increased as the liposome concentration or surface charge of liposome increased. In conclusion, we confirmed that the prepared liposomes have the possibility as a DNA carrier.

Keywords: PEI-DSPE, liposome, gene carrier.

1. 서론

유전자 치료란 유전자 전달에 의해서 질병을 치료하거나 예방하는 것을 의미하며 전통적인 질병치료와는 상이한 치료법으로써 지금까지의 대부분의 질병치료는 질환의 증상을 억제하거나 감소시키기 위해서 약물 투여를 주로 시도했으나 유전자 치료는 질병의 원인을 처음부터 제거하므로 질병을 근본적으로 완치할 수 있는 치료법이다.^{1,4}

치료 유전자를 최적 조건으로 신체의 필요부위에 전달하는 물질을 벡터라 하며, 이상적인 벡터로서의 기능을 위해서는 표적이 되는 세포에 높은 효율로서 전달이 될 것과, 전달된 유전인자의 효율적인 통합이 이루어져야 하며, 유전자 발현의 효율이 높고, 발현된 산물의 생리적 조절이 가능해야 한다. 벡터는 크게 바이러스성 벡터와 비바이러스성 벡터로 구분된다. 레트로바이러스(retro virus),^{5,6} 아데노바이러스(adeno virus)^{7,8} 및 아데노 관련 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 양이온

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

성 리포솜¹¹⁻¹³ 및 양이온성 고분자 등을¹⁴⁻¹⁶ 이용하며, 이들 벡터는 음이온성인 DNA와 정전기적 결합에 의해 복합체를 형성하고 그리고 세포내로 전달시키는 역할을 한다.

비바이러스성 유전자 전달방법 중 리포솜을 전달벡터로 이용하는 방법이 가장 많이 시도되고 있다. 리포솜은 유전자와 결합되어 지질-DNA 복합체를 형성하는데, 복합체가 쉽게 형성되는 장점 때문에 중앙 유전자치료에 많이 쓰이고 있다.¹⁷ 리포솜을 이용한 유전자 전달은 도입된 유전자의 발현이 바이러스성 벡터에 비해 현저히 낮으며, 발현이 일시적이라는 단점이 있으나, DNA를 직접 주사하는 방법에 비해 발현정도가 높고, 바이러스의 유전물질이 세포 안으로 도입될 소지가 없어 안전하며, 효소에 의한 DNA의 분해를 막을 수 있고, 유전자의 크기에 제한이 없다는 큰 장점을 지니고 있어 효용 가치가 크다고 할 수 있다.^{18,21} 또한 양이온성 고분자 벡터 중에서도 폴리에틸렌아민(PEI)은 높은 양이온성을 나타낼 수 있는 고분자로서 쉽게 DNA와 복합체를 형성하며, 세포 내로 들어간 DNA의 대부분은 endocytic vesicle에 머무르고 있으며 적당한 조건하에서 세포질로 방출된 후 핵으로 이동하게 된다. 이 과정에서 PEI의 proton-sponge 효과에 의해 DNA의 방출이 용이해지기 때문에 우수한 세포내 이입을 통해 *in vitro* 또는 *in vivo*에서 비교적 높은 전달 효율을 나타낸다.²²⁻²⁷ 최근에는 리포솜의 단점인 유전자 발현효율이 낮고 특정 세포에만 발현이 된다는 점을 해결하고 안전하면서도 발현효율이 높은 양이온성 고분자의 장점과 리포솜의 장점들을 결합한 리포폴리플렉스에 대한 연구가 활발히 진행 중이며^{28,29} 특히 Yamazaki는 리포솜 제조시 양이온성 고분자인 세틸폴리에틸렌아민을 단순히 첨가하여 세틸 그룹이 리포솜 표면에 박히게 하는 방법으로 양이온성을 수식하였으나³⁰⁻³³ 본 실험에서는 높은 양이온성을 가지고 있고 세포내 이입효율이 좋은 양이온성 고분자인 PEI 및 리피드를 이용하여 PEI를 직접 갖는 리피드를 합성하였고³⁴ 이를 이용한 양이온성 리포솜을 제조하여 유전자 전달체로서의 가능성을 확인하고자 하였다.

2. 실험

2.1 시약

폴리에틸렌아민(PEI, Mw; 600 g/mol), 글루타릭안하이드라이드(GA), 1-[3-(디메틸아미노)프로필]-3-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드(EDC), 그리고 *N*-하이드록시-숙신이미드(NHS)는 Aldrich Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 리포솜을 제조하기 위한 지질로서 1,2-디스테아로일-*sn*-글리세로-3-포스포에탄올아민(DSPE), 1,2-디스테아로일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린(DSPC), *L*- α -포스포타일콜린(소이-하이드로제네이트) (HSPC), 그리고 콜레스테롤(CHOL)은 Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, USA)에서 구입하여 사용하였다. DNA는 pEGFP(4.5 kb, Clontech, USA)를 사용하였고, 투석막은 MWCO 1000(Viskase Co., USA)을 사용하였다. 메틸렌 클로라이드(MC) 및 클로로포름은 특급시약을 사용하였다.

2.2 기기

PEI와 DSPE의 합성결과 및 구조 분석은 내부 기준시료인 0.05 wt%의 테트라메틸실란(TMS)을 포함한 CDCl₃(Aldrich Chemical Co., USA)를 용매로 하여 ¹H-NMR(Bruker DRX-300 FT-NMR Spectrometer, USA)을 사용하여 합성결과를 확인하였고, 리포솜 제조시에는 회전응축증발기(Buchi Rotavapor R-200, Switzerland), 초음파 발생기(Ultrasonicator,

500, Fisher Scientific, USA), 가압압출기(Northern Lipids Inc. Canada)를 사용하였다. 제조된 리포솜의 입자크기와 제타전위 측정은 광산란장치(ELS-8000, OTUSKA Electronics Co., Japan)를 사용하였으며, 제조된 리포솜과 DNA 복합체 형성은 RAGE(Rapid Agarose Gel Electrophoresis, RGX-60, Cascade biologics, Inc.)를 사용하여 확인하였다. 또한 형광 측정은 형광분광분석기(F-4500, Hitachi, Japan)를 이용하여 측정하였다.

2.3 카복시그룹이 도입된 PEI의 합성(PEI-Co)

PEI 말단에 활성그룹으로 카복시그룹을 도입하기 위하여 다음과 같은 과정을 실시하였다. PEI(0.6 g, 1 mmol)를 완전히 건조된 둥근 바닥 플라스크에 넣고 MC 60 mL로 용해시킨 후 10 mL MC로 용해시킨 GA(0.0011 g, 0.01 mmol) 용액을 1 mL/min의 속도로 첨가하였으며, 상온에서 10시간 동안 교반하면서 반응시켜 주었다. 반응 후 20 °C에서 회전증발기를 사용하여 MC를 제거하였고, 96% 수율로 카복시 그룹이 도입된 PEI-Co를 합성하였다.

2.4 PEI-Co에 DSPE의 그래프트(PEI-DSPE)

PEI-Co에 DSPE의 그래프트는 다음과 같은 과정으로 진행하였다. PEI-Co(0.5 g, 0.83 mmol)를 EDC(0.1591 g, 0.83 mmol)와 NHS(0.0955 g, 0.83 mmol) 그리고 클로로포름 50 mL를 잘 건조된 둥근 바닥 플라스크에 넣고 상온에서 30분 동안 교반시키며 반응을 진행하였다. DSPE(0.6208 g, 0.83 mmol)를 클로로포름 20 mL로 용해시켰고, 반응 후 PEI-Co가 용해되어 있는 둥근바닥 플라스크에 DSPE 용액을 첨가하였고 10시간 동안 교반하며 반응시켰다. 반응 후 20 °C에서 회전증발기를 사용하여 클로로포름을 모두 제거시켰고, 둥근바닥 플라스크에 남아있는 PEI-DSPE 합성 물질을 증류수로 용해시킨 후 투석막에 담아 2 °C에서 72시간 동안 막 투석을 실시하여 반응 후 불순물을 제거하였다. 막 투석을 통해 정제된 용액을 동결건조기로 건조하여 93% 수율로 DSPE가 그래프트된 PEI를 합성하였다.

2.5 PEI-DSPE가 첨가된 리포솜 제조

리포솜을 구성하는 지질의 전체량을 10 mmol로 고정하였으며, DSPC, HSPC 및 CHOL을 100:50:30의 몰 비율로 고정을 하였고, DSPE 10 mmol과 합성된 PEI-DSPE를 10, 20, 30 및 40의 몰 비율로 변화시키며 리포솜을 제조하였다(Table 1). DP10의 제조 방법은 아래와 같다. 완전히 건조된 둥근 플라스크에 DSPC 0.0415 g, HSPC 0.0240 g, CHOL 0.0061 g, PEI-DSPE 0.0071 g 및 클로로포름 50 mL를 첨가하여 완전히 용해시킨 후 회전 증발기를 이용하여 클로로포름을 완전히 제거하고 둥근 플라스크 바닥에 지질로 이루어진 얇은 층을 얻었으며, 10 mmol PBS(phosphate buffered saline) 20 mL를 초음파를 5분간 조사하였으며, 60 °C에서 수화를 하였다. 동결-해동 과정을 5회 실시하였으며 동결과 해동과정은 -70 °C와 60 °C에서 각각 5분 간격으로 시행하였다. 압출(polycarbonate membrane pore size: 100 nm)을 40 °C에서 실시하여 리포솜의 입자크기를 조절하였다.

Table 1. The Composition and the Formulation of Liposomes Modified with PEI

Name	Composition	Molar ratio of formulation
DP0	DSPC:HSPC:CHOL:DSPE	100:50:30:10
DP10	DSPC:HSPC:CHOL:DSPE-PEI	100:50:30:10
DP20	DSPC:HSPC:CHOL:DSPE-PEI	100:50:30:20
DP30	DSPC:HSPC:CHOL:DSPE-PEI	100:50:30:30
DP40	DSPC:HSPC:CHOL:DSPE-PEI	100:50:30:40

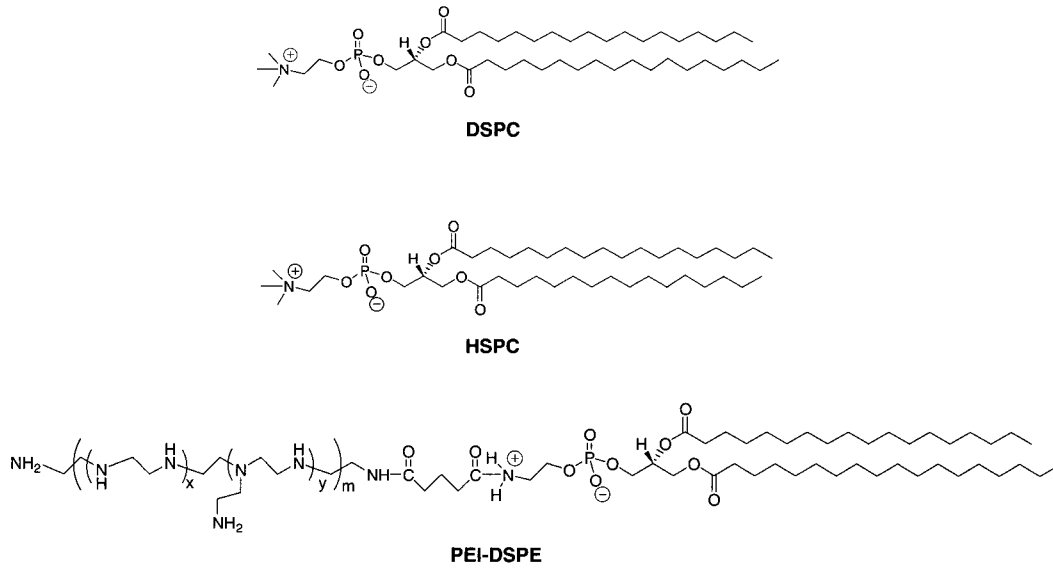


Figure 1. Structures of DSPC, HSPC and PEI- DSPE.

2.6 리포솜의 입자크기 및 표면전하 측정

제조된 리포솜의 입자크기와 표면전하는 광산란 장치를 사용하여 측정하였다. 리포솜 용액 1 ml를 취해서 증류수 2 mL로 희석한 후, 25 °C에서 입자크기와 표면전하를 확인하였다.

2.7 리포솜과 DNA 복합체의 아가로스젤 전기영동 측정과 입자 크기 및 표면전하 측정

1 µg의 DNA에 대해 제조된 리포솜의 양을 0.25, 0.5, 1, 3, 5 및 10 µL씩 첨가하여 DNA와 리포솜 용액을 혼합 후, 3차 증류수를 이용하여 최종부피가 200 µL가 되도록 하였으며, 복합체를 이루도록 혼합용액을 상온에서 30분간 인큐베이션시간을 가졌다. 0.8% 아가로스 젤에 복합체 용액을 30 µL씩 취해서 100V에서 20분간 전기영동을 시켰고, 전기영동을 거친 아가로스젤은 UV를 조사하여 젤의 흐름을 사진 찍었다. 또한 각각의 복합체용액을 150 µL씩 취해서 광산란장치를 이용하여 복합체의 크기 및 표면전하를 측정하였다.

2.8 리포솜과 DNA 복합체의 형광강도 측정

상기에 설명하여 형성된 각각의 복합체 용액에 10 µL의 EtBr를 첨가해주었으며, 형광분광분석계를 사용하여 흡수파장은 510 nm, 방출 파장은 590 nm에서 측정하였다.

3. 결과 및 토론

3.1 PEI가 도입된 DSPE의 합성 및 특성분석

양이온성 리포솜 유전자 전달체의 제조는 2단계로 합성하였으며, 첫 번째 합성 단계에서는 GA의 개환을 통해 PEI 말단에 활성그룹으로 카복시그룹을 도입하였으며(PEI-Co), 두 번째 단계로 PEI-Co의 카복시그룹을 EDC, NHS로 활성화시킨 후 DSPE의 아민그룹과의 반응으로 PEI-DSPE를 93%의 매우 높은 수율로 합성하였다.³⁴

3.2 리포솜의 입자크기 및 표면전하

Table 1은 리포솜 제조를 위한 지질혼합 비율을 나타내고 있다. 리포솜은 전체 지질의 양을 10 mmol로 고정하였고 DSPC, HSPC, CHOL, DSPE의 혼합물과 PEI-DSPE의 몰 비율을 조절하여 제조하였다. 또한 Figure 1은 리포솜 제조에 사용된 DSPC, HSPC 및 PEI-DSPE 지질의

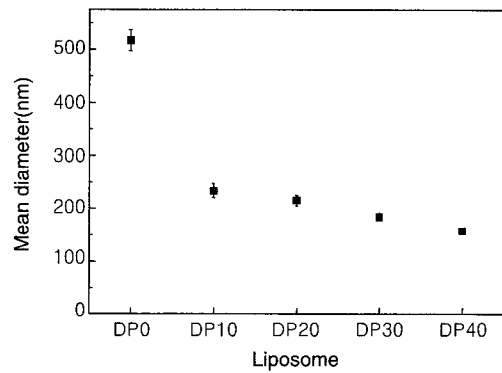


Figure 2. Particle size of liposomes(DP0, DP10, DP20, DP30 and DP40) prepared by using different ratio of PEI-DSPE for a mixture of DSPC, HSPC and CHOL.

구조식을 나타내고 있다.

Figure 2에서는 PEI-DSPE의 첨가 양에 따라 제조된 리포솜 DP0, DP10, DP20, DP30 및 DP40의 평균 입자크기를 나타내고 있다. PEI-DSPE가 사용되지 않은 DP0는 517 nm이었으나 PEI-DSPE가 사용된 DP10은 234 nm, DP20은 215 nm, DP30은 184 nm 그리고 DP40은 157 nm임을 확인할 수 있었다. 결과적으로 리포솜 제조 시 PEI-DSPE의 양이 증가할수록 입자가 작아지는 것을 확인할 수 있었으며 이것은 리포솜 표면에 수식된 PEI가 입자간 응집현상을 막아주기 때문에 PEI 함량이 증가함에 따라 리포솜의 크기가 작아지는 것으로 사료된다.³⁵⁻³⁷

Figure 3에서는 PEI-DSPE의 양적 변화에 따른 리포솜의 표면전하 측정결과를 나타내고 있다. DP0의 경우 표면전하 값이 -6.4 mV의 값을 갖으나 DP10은 8.4 mV, DP20은 14.3 mV, DP30은 19.9 mV 그리고 DP40은 27.2 mV의 값을 갖는 것을 확인할 수 있었으며, 표면전하 값이 증가하는 이유는 리포솜 표면에 양이온성의 아민기를 가지고 있는 PEI양의 증가에 기인한 것으로 판단된다. 그러므로 PEI-DSPE의 양조절을 통해 리포솜 표면에 양이온을 도입할 수 있으며 또한

그 양이온 양도 조절할 수 있음을 확인하였다.

3.3 리포솜과 DNA의 복합체 형성

Figure 4는 각각의 리포솜과 DNA와의 복합체 형성에 따른 입자 크기 변화를 나타낸 결과이다. DP0를 사용한 경우 복합체 입자의 크기에 큰 영향을 미치지 않았다. 그러나 DP10과 DP20의 경우 DNA 대비 리포솜 양의 증가에 따라 복합체 입자의 크기가 1300~1400 nm로 최고 5배까지 커짐이 관찰되었으나 DP30과 DP40을 사용한

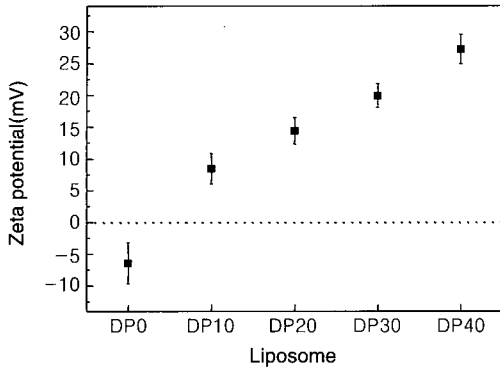


Figure 3. Zeta potential of DP0, DP10, DP20, DP30 and DP40 liposomes.

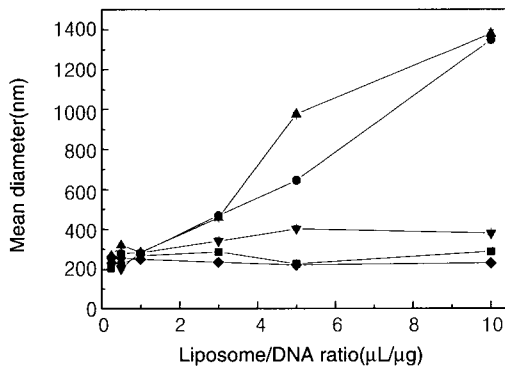


Figure 4. Particle size for the DNA/liposome complexes formed with concentration changes of various liposomes(DP0, DP10, DP20, DP30 and DP40). (■-DP0/DNA, ●-DP10/DNA, ▲-DP20 /DNA, ▽-DP30/DNA and ◆-DP40/DNA).

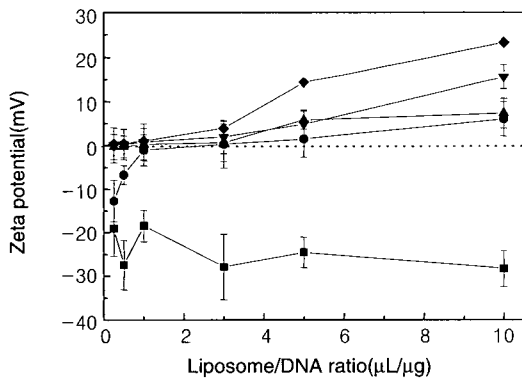


Figure 5. Zeta potential for the DNA/liposome complexes formed with concentration changes of various liposomes (DP0, DP10, DP20, DP30 and DP40). (■-DP0/DNA, ●-DP10/DNA, ▲-DP20 /DNA, ▽-DP30/DNA and ◆-DP40/DNA).

복합체의 경우 229~379 nm 정도의 입자크기를 갖고 있음이 관찰되었다. 이것은 DP10과 20의 경우 DP30과 DP40보다 상대적으로 작은 표면전하 값을 가지고 있어서 복합체 형성 시 DNA에 많은 리포솜이 결합을 했기 때문으로 사료된다. 상대적으로 리포솜 표면에 양이온성이 많이 도입된 DP30, DP40의 경우 형성된 복합체는 비교적 균일한 입자크기를 형성함을 관찰할 수 있었다.

Figure 5은 각각의 리포솜과 DNA와의 복합체 형성 후 측정된 표면전하를 나타내고 있다. DP0의 경우 그 양을 증가시키도 음전하 값을 나타내고 있으나, DP10, DP20, DP30 및 DP40의 경우 DNA 1 μg에 대해 리포솜 양을 증가시키기에 따라 형성된 복합체의 표면전하가 증가됨을 관찰할 수 있었다.

Figure 6은 양이온성 리포솜과 음이온성 DNA와의 복합체 형성을 알아보기 위한 아가로스젤 전기영동 사진을 나타내고 있다. (a)는 DP0과 DNA 복합체의 전기영동사진으로 DP0의 양을 DNA에 대해 10 배 사용하여도 복합체가 형성되지 않음을 확인하였다. (b)는 DP10과 DNA와의 복합체를 나타내며, 10의 비율에서 복합체를 형성하였으며 (c) DP20은 5이상, (d) DP30은 3이상, 그리고 (e) DP40은 1이상에서 복합체를 형성함을 확인할 수 있었다. 이러한 것은 리포솜 제조

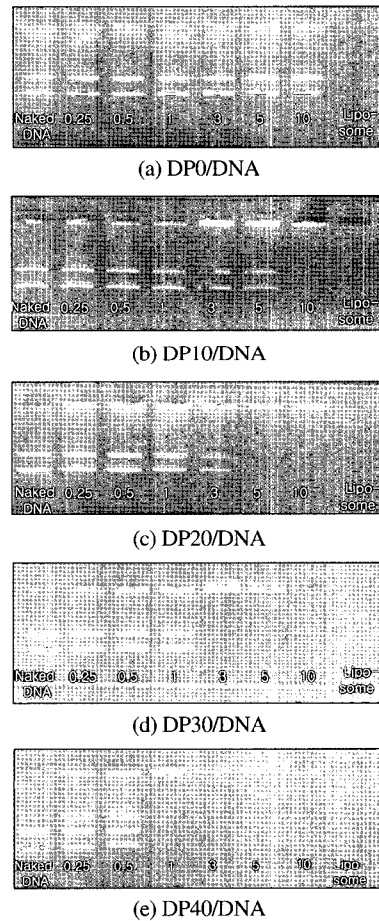


Figure 6. Gel retardation assay of DNA/liposome complexes. Lane 1 indicates naked DNA as control. Lane 2~6 indicate the complexes at μL/μg ratios of 0.25, 0.5, 1, 3, 5 and 10, respectively. Lane 7 indicates each liposomes without DNA. (a) DP0/DNA complexes, (b) DP10/DNA complexes, (c) DP20/DNA complexes, (d) DP30/DNA complexes, and (e) DP40/DNA complexes.

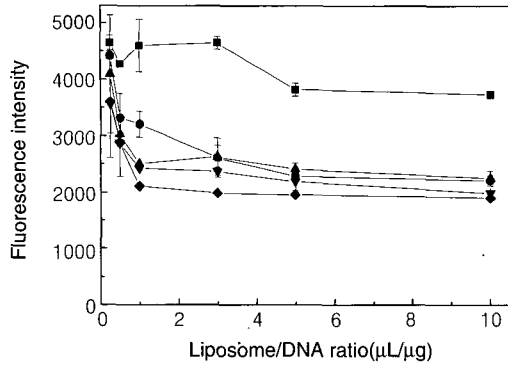


Figure 7. Plot of fluorescence intensity versus DNA/liposome ratios (■-DP0/DNA, ●-DP10/ DNA, ▲-DP20/DNA, ▼-DP30/DNA and ◆-DP40 /DNA). The resulted fluorescence intensity was measured at 510 nm excitation and 590 nm emission.

시 사용된 PEI-DSPE 함량이 많아질수록 높은 양이온성이 리포솜 표면에 도입됨으로 인한 것으로, 상대적으로 양이온성이 커질수록 DNA와의 복합체 형성이 용이해짐을 알 수 있었다. EtBr은 DNA의 intercalating reagent로서 DNA에 첨가 시 590 nm에서 높은 형광강도를 나타낸다. DNA가 유전자 전달체로서 양이온성 리포솜과 복합체를 형성함에 따라 그 형광강도의 감소가 예상된다. 그러므로 DNA에 대해 제조된 양이온성 리포솜의 복합체 형성을 확인하기 위하여 DP0, DP10, DP20, DP30 그리고 DP40을 사용하여 형성된 DNA 복합체에 EtBr을 각각 첨가하여 형광강도를 측정하여 그 변화를 Figure 7에 나타내고 있다. DP0 리포솜을 사용한 경우 리포솜 양을 증가시키도 형광강도가 그다지 변화되지 않았다. 복합체 형성을 위하여 사용한 DP10, DP20, DP30 및 DP40의 경우 리포솜 양이 증가할수록 형광강도의 발현이 감소됨을 관찰할 수 있었다. 한편 표면에 도입된 양이온성 양에 따라서는 형광발현 차이가 크지는 않으나, 도입된 양이 많아질수록 형광 발현이 감소됨을 관찰할 수 있었다.

4. 결론

본 실험에서는 비바이러스성 벡터로서 많이 사용되고 있는 리포솜과 PEI, 각각의 특징을 활용하고자 PEI를 갖는 리피드인 PEI-DSPE를 합성하였다. PEI-DSPE를 이용하여 리포솜을 제조하여, 그 첨가량에 따라 234~157 nm의 리포솜을 제조할 수 있었고, PEI-DSPE 함량이 증가할수록 표면에 많은 양이온성 그룹의 도입으로 표면전하 값이 -6.4에서 27.2 mV로 증가함을 관찰하였다. PEI-DSPE의 농도변화를 통해 제조된 리포솜을 사용하여 DNA와의 복합체 형성을 검토한 결과, 복합체는 229~1347 nm의 입자 형성을 보였으며, 사용된 리포솜 및 그 양적 변화에 따라 형성된 복합체의 표면전하의 변화를 관찰할 수 있었다. 또한 전기영동 및 형광 측정을 통해 제조된 리포솜이 DNA와 복합체를 형성함을 관찰할 수 있었으며 리포솜의 양적 증가 또는 표면에 도입된 양이온의 증가에 따라 DNA와의 복합체 형성이 용이해짐을 알 수가 있었다. 그러므로 본 연구에서는 새로운 유전자 전달체로서 양이온이 도입된 리포솜 제조에 성공하였고, 현재 세포를 이용한 실제 유전자 전달 효율에 대한 평가를 검토 중에 있다.

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

참고문헌

1. A. E. Aneed, *Eur. J. Pharmacol.*, **498**, 1 (2004).
2. P. M. Kraan, F. A. J. Loo, and W. B. Berg, *Biomaterials*, **25**, 1497 (2004).
3. C. Chastel, J. Jiricny, and R. Jaussi, *DNA Repair*, **3**, 201 (2004).
4. P. R. Lowenstein and M. G. Castro, *Curr. Opin. Pharmacol.*, **4**, 91 (2004).
5. 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).
6. C. M. Liu, D. P. Liu, W. J. Dong, and C. C. Liang, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **313**, 716 (2004).
7. L. Xing and S. K. Tikoo, *Virology*, **321**, 372 (2004).
8. R. Meulenbroke, K. Sargent, J. Lunde, B. Jasmin, and R. Parks, *Mol. Ther.*, **9**, 617 (2004).
9. M. A. F. V. Goncalves, I. Velde, K. S. Shoshan, D. Valerio, and A. A. F. Vries, *Virology*, **321**, 287 (2004).
10. D. Boden, O. Pusch, F. Lee, L. Tucker, and B. Ramratnam, *Mol. Ther.*, **9**, 396 (2004).
11. D. Lesage, A. Cao, D. Briane, N. Lievre, R. Coudert, M. Raphael, J. L. Salzmann, and E. Taillandier, *Biochi. Bio. Acta*, **1564**, 393 (2004).
12. A. Kim, E. H. Lee, S. H. Choi, and C. K. Kim, *Biomaterials*, **25**, 305 (2004).
13. M. Singh and M. Ariatti, *J. Control. Release*, **92**, 383 (2003).
14. X. Liu, D. Erickson, D. Li, and U. J. Krull, *Analy. Chim. Acta*, **507**, 55 (2004).
15. T. Segura, M. J. Volk, and L. D. Shea, *J. Control. Release*, **93**, 69 (2003).
16. J. H. Steven Kuo, Y. L. Lo, M. D. Shau, and J. Y. Cherng, *J. Control. Release*, **81**, 321 (2002).
17. C. R. Dass, *Int. J. Pharma.*, **267**, 1 (2003).
18. 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).
19. J. H. Chio, J. S. Chio, H. Suh, and J. S. Park, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **22**, 46 (2001).
20. K. Sagara and S. W. Kim, *J. Control. Release*, **79**, 271 (2002).
21. Y. Lu and P. S. Low, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **54**, 675 (2002).
22. C. H. Ahn, S. Y. Chae, Y. H. Bae, and S. W. Kim, *J. Control. Release*, **80**, 273 (2002).
23. W. T. Godbey, M. A. Barry, P. Saggau, K. K. Wu, and A. G. Mikos, *J. Biomed. Mater. Res.*, **51**, 321 (2000).
24. W. T. Godbey, K. K. Wu, and A. G. Mikos, *J. Control. Release*, **60**, 149 (1999).
25. W. T. Godbey, K. K. Wu, and A. G. Mikos, *J. Biomed. Mater. Res.*, **45**, 268 (1999).
26. D. Fischer, T. Bieber, Y. Li, H. P. Elsässer, and T. Kissel, *Pharmaceut. Res.*, **16**, 1273 (1999).
27. D. H. Seo, S. H. Kim, G. Khang, S. C. Chi, B. C. Shin, and M. S. Kim, *Polymer(Korea)*, **29**, 135 (2005).
28. W. Guo, M. A. Gosselin, and R. J. Lee, *J. Control. Release*, **83**, 121 (2002).
29. C. H. Lee, Y. H. Ni, C. C. Chen, C. K. Chou, and F. H. Chang, *Biochi. Bio. Acta*, **1611**, 55 (2003).
30. N. Oku, Y. Yamazaki, M. Matsuura, M. Sugiyama, M. Hasegawa, and M. Nango, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **52**, 209 (2001).
31. M. Matsuura, Y. Yamazaki, M. Sugiyama, M. Kondo, H. Ori, M. Nango, and N. Oku, *Biochi. Bio. Acta*, **1612**, 136 (2003).
32. M. Sugiyama, M. Matsuura, Y. Takeuchi, J. Kosaka, M. Nango, and N. Oku, *Biochi. Bio. Acta*, **1660**, 24 (2004).
33. Y. Yamazaki, M. Nango, M. Matsuura, Y. Hasegawa, M. Hasegawa, and N. Oku, *Gene therapy*, **7**, 1148 (2000).
34. Y. J. Park, D. E. Nam, D. H. Seo, H. D. Han, T. W. Kim, M. S. Kim, and B. C. Shin, *Polymer(Korea)*, **28**, 502 (2004).
35. J. D. Castile and K. M. G. Taylor, *Int. J. Pharma.*, **221**, 197 (2001).
36. V. P. Torchilin, T. S. Levchenko, K. R. Whiteman, A. A. Yaroslavov, A. M. Tsatsakis, A. K. Rizos, E. V. Michailova, and M. I. Shtilman, *Biomaterials*, **22**, 3035 (2001).
37. K. K. Son, D. H. Patel, D. Tkach, and A. Park, *Biochi. Bio. Acta*, **1466**, 11 (2000).