

## Folate-PEG-DPPE를 포함하는 양이온성 지질 에멀전 시스템의 표적화 유전자 전달

권상규 · 정관호 · 김영진<sup>†</sup>

충남대학교 공과대학 바이오응용화학과

(2008년 11월 27일 접수, 2009년 1월 21일 수정, 2009년 1월 21일 채택)

### Targeted Gene Delivery of the Cationic Lipid Emulsion System Containing Folate-PEG-DPPE

Sang Kyoo Kwon, Kwan Ho Jeong, and Young Jin Kim<sup>†</sup>

Department of Applied Chemistry and Biological Engineering,

Chungnam National University, 220 Gung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea

(Received November 27, 2008; Revised January 21, 2009; Accepted January 21, 2009)

**초록:** 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP)와 Tween80, squalene을 포함하는 양이온성 지질 에멀전을 기반으로 효율적인 비바이러스성 유전자 전달체를 개발하였다. 유전자 전달체의 발현효율을 증가시키기 위해 암세포에 표적지향성을 가지는 folate를 수식한 PEG-DPPE를 사용하였다. Folate-PEG-DPPE를 포함하는 양이온성 지질 에멀전으로 HeLa 세포주와 293 세포주에 유전자 형질발현 실험을 하였다. HeLa 세포는 folate에 민감한 세포주이다. 양이온성 지질 에멀전의 입자크기와 DNA/lipid 복합체의 크기는 각각 206.6 nm와 150.5 nm로 측정되었다. 양이온성 지질 시스템/DNA (4:1 (w:w)) 복합체의 유전자 발현효율은 folate의 표적화 영향으로 인해 DOTAP만 있는 에멀전에 비하여 100배 이상 더 높은 것으로 나타났다.

**Abstract:** A cationic lipid emulsion containing 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP), Tween80, squalene has been prepared as a gene delivery system. In order to increase the transfection efficiency of gene carrier, folate was used as the tumor-targeting ligand that was attached on PEG-DPPE. HeLa and 293 cells were used for the *in vitro* transfection experiment. HeLa cell is a folate-positive cell line. The mean particle sizes of polymeric lipid system and DNA/lipid complex system were 206.6 nm and 150.5 nm, respectively. The transfection efficiencies of our carriers (4:1 (w:w) complex ratio) were 100 times higher than that of DOTAP only emulsion due to the targeting effect of folate.

**Keywords:** cationic lipid emulsion, folate, PEG, DOTAP, targeted gene delivery.

## 서 론

유전자 치료의 성공은 세포 안의 핵까지 유전자 물질을 효과적으로 전달하고 그 세포 안에서 얼마나 효율적인 발현을 하느냐에 달려있다. 이러한 치료의 목적은 단순히 증상 완화가 아닌 병의 근본 원인을 찾아 제거하여 치료하는 것이다.<sup>1</sup> Felgner와 Ringold에 의해 처음 보고된 이래로 양이온성 지질들은 *in vitro*와 *in vivo*에서 결합이 생긴 유전자를 치료하기 위한 비바이러스성 벡터로 널리 사용되고 있다.<sup>2</sup> 비바이러스성 벡터는 생체적합하며 양이온성을 갖는 고분자나 지질을 이용하여 만든 수송체로 유전자 또는 약물을 운송하며, 제조가 용이하고, 면역반응성이 없으며, 낮은 세포 독성을 가지는 장점이 있다.<sup>3</sup> 양이온성 지질을 이용해서 제조된 수송체들이 가지는 유전자 전달을 위한 가장 큰 이점 하나는 양전하를 가지기 때문에 DNA의 음전하를 띠는 phosphate 주시슬과 정전기적 상호작용으로 복합체를 형성하며, 선형의 DNA가 응축되게 만들고 안

정한 구조를 형성하는 것이다.<sup>4,5</sup> 그래서, 양이온성 지질은 외부유전자의 체외 전달 수단으로서 널리 이용되고 있다. 대표적인 물질은 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP)이며, oil/water 방법을 통하여 에멀전을 형성하게 된다.<sup>6</sup> 반면에 낮은 발현효율을 나타내는 단점이 있으며, 이 점을 보완하기 위한 많은 연구가 진행되고 있다.<sup>7,8</sup>

최근 발현효율 증가를 위한 방법으로 양이온성 지질 에멀전 시스템에 folate를 수식하여 종양이나 암세포와 같은 특이적인 부위에 표적지향 기능을 부가해주고 있다.<sup>9</sup> 일반적으로 암세포에는 folate 수용체가 다량으로 존재하므로 folate를 고분자 전달체에 수식하면 receptor-mediated endocytosis에 의해 치료 유전자가 암세포에 선택적으로 전달되어 비바이러스성 벡터의 전달효율을 높이고 다른 세포에 대한 독성을 낮추는 효과를 얻을 수 있다.<sup>10,11</sup>

본 연구에서는 전달체로서 안정성이 높은 양이온성 지질 DOTAP와 squalene (core oil), 계면활성제를 이용하여 양이온성 지질 에멀전 시스템을 제조하였다. 암세포와 같은 특이적 세포에 표적화를 하기 위한 표적리간드로는 folate-PEG-DPPE를 도입하였다. 이것

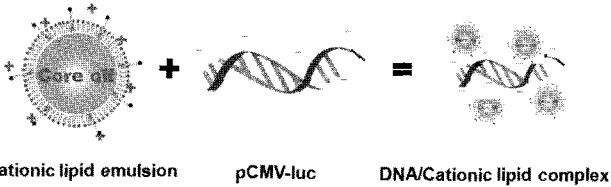
<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: kimyj@cnu.ac.kr

은 folate가 붙은 poly(ethylene glycol)에 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanol-amine-*N*-succinyl(DPPE)를 결합시켰다.<sup>12,13</sup>

양이온성 지질 에멀전 시스템을 이용하여 plasmid DNA를 정전기적인 상호작용으로 결합시키고 응집시켜 좀 더 작아진 양이온성 지질 에멀전/DNA 복합체를 형성하였다. 제조된 유전자 전달체는 적절한 나노 입자크기 및 분포를 가지는 것을 확인하고, 표적리간드를 도입하여 선택적으로 원하는 세포/장기를 치료할 수 있는 가능성을 부여하였다. 양이온성 지질 에멀전의 형태와 DNA와의 결합 모식도는 Figure 1과 같다. Folate-PEG-DPPE의 수식을 통한 표적지향 효과를 알아보기 위해서 일반세포주인 293 세포와 folate-receptor가 많은 자궁경부암 세포주인 HeLa 세포(folate positive)를 가지고 비교 실험하였으며, folate-PEG-DPPE의 양을 조절하여 ligand와 receptor의 작용에 어떤 변화가 있는지 알아보았다.

실 험

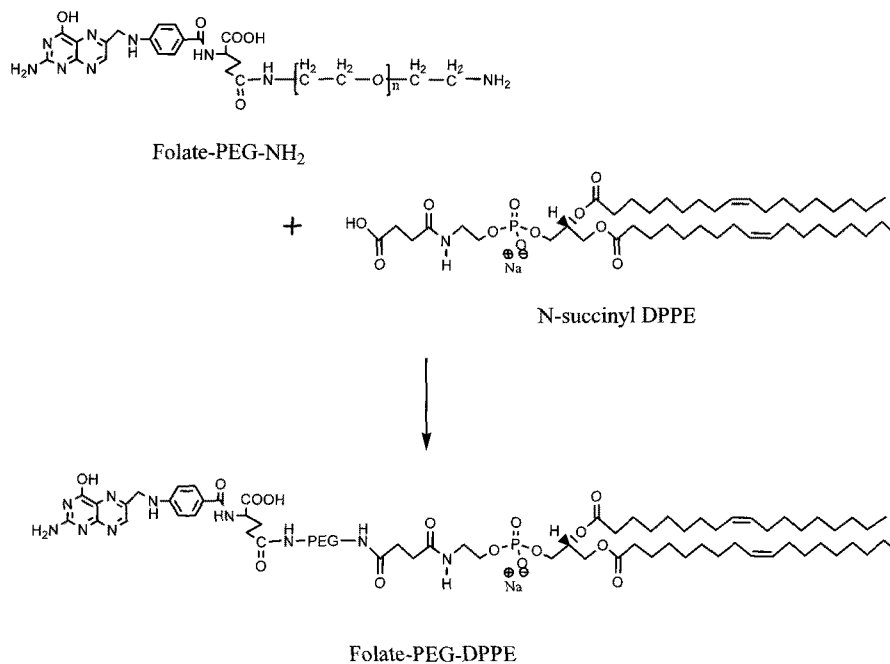
**재료.** 본 연구에서 사용된 양이온성 지질 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP)와 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanol-amine-*N*-succinyl(DPPE)는



**Figure 1.** Schematic illustration of the formation of the cationic lipid emulsion/DNA complex.

Avanti Polar Lipids에서 구입하였고, polyoxyethylene sorbitan monooleate(Tween80)과 squalene, folate(98%), 1,3-dicyclohexyl-carbodiimide(DCC(99%)), dimethyl sulfoxide(DMSO), 4-dimethylaminopyridine(DMAP), chloroform은 Aldrich chemical사의 제품을 사용하였다. Poly(ethylene glycol)-bis-amine(M.W.=3400)은 Sunbio(Korea)에서 구입하였다. *In vitro* 실험에 쓰인 DMEM과 fetal bovine serum(FBS)는 Gibco BRL/Life Technologies(NY)에서 구입하였다. pCMV-luc는 *E.coli*로부터 얻은 CMV를 프로모터로 하는 plasmid DNA에 luciferase gene을 인코딩시킨 것으로 충남대학교 생화학과의 최준식 교수님으로부터 제공받았다.

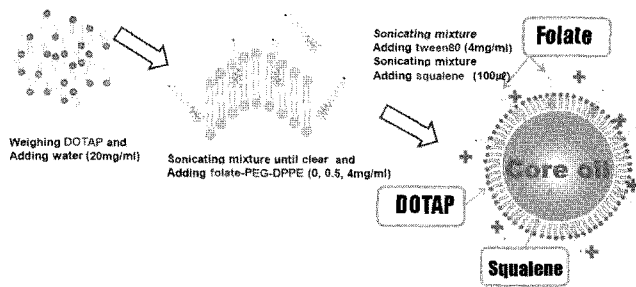
**Folate-PEG-DPPE의 제조.** Folate-PEG-DPPE는 두 단계의 반응을 통해 제조하였다. 첫 번째 단계에서 folate-PEG-amine은 PEG-bis-amine과 folate와 반응시켜 제조하였다. 이 때 PEG-bis-amine(1 g)은 DMSO(8 mL)에 녹였다. Folate(220 mg)는 DMSO(2 mL)에 녹인 후 PEG가 녹아있는 용액에 서서히 첨가하면서 교반하였다. Folate는 pyridine(40  $\mu$ L)을 촉매로 하여 반응에 첨가하였으며, 개시제로 DCC(100 mg)를 사용하였다. Folate-PEG-amine의 반응은 질소 분위기에서 30  $^{\circ}$ C, 6시간 동안 반응하였다. Folate-PEG-amine은 양이온의 선택적 흡착을 통해 얻었다.<sup>14</sup> 두 번째 반응에서는 얻어진 folate-PEG-amine에 *N*-succinyl DPPE를 반응시켜서 folate-PEG-DPPE를 제조하였다. 우선, Folate-PEG-amine(180 mg)은 TEA(80  $\mu$ g)와 함께 chloroform에 넣어 1시간 동안 교반하였다. 또한, DPPE(100 mg)는 DCC(23 mg)를 첨가하여 chloroform에서 4시간 동안 교반하였다. 각각 교반된 folate-PEG-amine과 DPPE 용액은 3구 등근 플라스크에 천천히 50 mL를 넣고 실온의 질소 분위기에서 6시간 동안 교반하였다. 부가 생성물은 0.45  $\mu$ L 필터를 통해 여과한 후 3차 증류수를 넣고 rotary



**Figure 2.** Reaction mechanism of folate-PEG-NH<sub>2</sub> and *N*-succinyl DPPE.

**Table 1. Various Kinds of Cationic Lipid Emulsion System**

Sample	Composition
1	DOTAP/Tween80/squalene
2	DOTAP/Folate-PEG-DPPE (0.5 mg)/Tween80/squalene
3	DOTAP/Folate-PEG-DPPE (4 mg)/Tween80/squalene



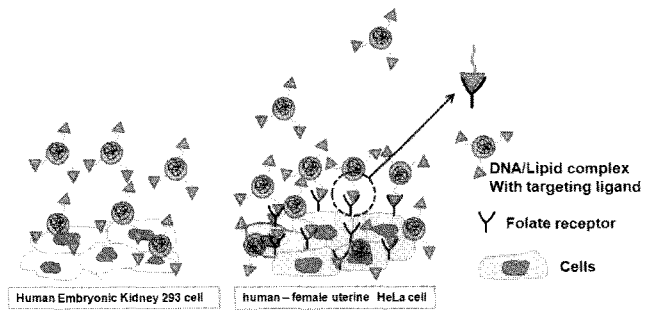
**Figure 3.** Schematic illustration of the formation of the cationic lipid emulsion system.

evaporator를 이용하여 용매를 제거한다. 미반응물을 제거하기 위해서 dialysis method를 사용하였다. Folate-PEG-DPPE를 co-solvent (THF : acetone)를 이용하여 녹인 후 투석막(molecular weight cut off : 2000 g/mol)을 사용하여 넣고 초순수 안에서 48시간 투석시켰다. Folate-PEG-DPPE의 반응 메커니즘은 Figure 2에서 나타내었다.

**양이온성 지질 에멀전 시스템의 제조.** 양이온성 지질 DOTAP를 20 mg 정량하여 3차 종류수에 분산시킨 후 probe type의 sonicator (Sonics and Materials, VCX750W model)를 사용하여 2~4분 동안 초음파 처리하여 20 mg/mL의 샘플용액을 만들었다. 이 과정에서 초음파 처리로 인해 생길 수 있는 열 발생을 막기 위해 ice/water bath에서 수행하였다. 다음 과정으로 folate-PEG-DPPE을 추가로 0, 0.5, 4 mg을 넣어주고 2~4분간 투명해질 때까지 초음파 처리하였다. 4 mg Tween 80와 100 µL squalene을 순차적으로 넣어준 후 3분간 2번 초음파 처리하였다. 만들어진 에멀전은 4 °C 상태에서 보관하였다. 에멀전 시스템의 각각의 조성은 Table 1과 같다. 에멀전 시스템 제조과정은 Figure 3와 같다.

**양이온성 지질 에멀전 시스템의 입자분석.** 양이온성 지질 에멀전 시스템과 DNA/지질 수송체 복합체의 평균 입자크기와 표면에너지는 ELS-Z(zeta-potential & particle size analyser, Otsuka Electronics) 장비를 사용하여 측정하였다. 지질 에멀전은 300배 희석하여 3번 측정하여 평균 입자크기와 표면에너지를 결정하였다. Particle의 모습은 TEM(energy-filtering transmission electron microscopy (EM 912 Omega, 한국기초과학연구원(KBSI)))을 이용하여 확인하였다.

**에멀전/DNA Complex형성 확인.** 유전자와 적절한 결합비를 알아보기 위해 DOTAP 에멀전/DNA를 다른 무게비로 준비하여(1:1, 4:1, 8:1 16:1) 실온에서 30분간 complex시켰다. 이 혼합물에 gel loading buffer(6X strength, 25% bromophenol blue가 포함된 blue dye)를 넣어준다. 0.7%의 agarose gel을 만들기 위해 1X TEA buffer 용액 20 mL에 LE agarose 파우더를 0.14 g 녹여준 후 EtBr (1 µg/µL ethidium bromide, red)을 넣어준 후 틀에 부어주었다. 틀이 완성되면 혼합물을 0.7% agarose gel에 넣어주고 전기영동을 실시하였다.<sup>15</sup>



**Figure 4.** Cell adsorption of the gene delivery carrier with or without the receptor-mediated endocytosis.

UV illuminator로 조사하여 결합여부를 확인하였다.

**시험관의 유전자 발현실험.** 양이온성 지질 에멀전 시스템의 종류에 따른 세포 내에서의 형질발현정도를 알아보기 위해서 세포실험을 실시하였다. 293 세포는 태아 신장 세포이며, HeLa 세포는 자궁경부암 세포이다. 각 세포들은 10% FBS를 공급해준 DMEM 배지에서 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator로 배양되었다. 세포들은 형질발현실험 전에 24시간 동안 96 well plate에 각각 2×10<sup>5</sup>개씩 넣어 배양하였다. 복합체는 무게비로 4:1, 8:1 (DNA/cationic lipid system)로 제조하였다. DNA는 0.5 µg/µL으로 희석된 pCMV-luc을 사용하였다. 양이온성 지질 에멀전/DNA 복합체를 넣어준 후 24시간 동안 배양하였다.<sup>16</sup> Luciferase assay와 protein assay를 하여 형질발현 효율을 측정하였다. 표적지향 리간드 folate를 수식한 양이온성 지질 에멀전 시스템과 DNA 복합체를 형성시킨 것을 293 세포와 HeLa 세포가 흡착되는 과정의 모습은 Figure 4와 같다. HeLa 세포의 경우 folate를 받아드릴 수 있는 수용체가 다량으로 존재하기 때문에 상호작용으로 인해 세포 내로 선택적으로 받아 드릴 수 있다.

**결과 및 토론**

효율적인 유전자 전달체로 양이온성 지질 에멀전 시스템을 제조하였다. 이 에멀전 시스템에 표적지향성을 부여하기 위하여 folate-PEG-DPPE를 첨가해 주었다. Folate-PEG-DPPE(M.W.=2900)는 PEG-bis-amine(M.W.=2000)을 이용하였다. 한쪽에 folic acid(M.W.=441)를 붙이는 단계를 거치고 folate-PEG-amine만을 얻어내기 위해서 양이온교환수지를 이용하였다. 여기에 다시 N-succinyl DPPE(M.W.=860)를 붙여주는 단계를 거쳐 합성을 완성하였다. 반응식은 Figure 2에서 볼 수 있다.

합성결과는 <sup>1</sup>H-NMR을 통하여 분석하였으며, Figure 5와 같다. Folate의 카르복실기와 PEG의 아민기가 만나 amide bond를 형성하고 NMR을 통해 7.8 ppm 피크에서 나타나는 것을 확인할 수 있다.

처음 PEG-bis-amine에 folate를 붙일 때 말단그룹의 반응정도를 조절하기 위해 반응시간과 반응비를 조절하는 것이 무엇보다 중요했다. Folate-PEG-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>만을 걸러내기 위한 작업으로 어느 정도의 손실을 확인할 수 있었다. 이렇게 제조된 양이온성 지질 시스템의 입자 크기는 평균 206.6 nm로 측정되었으며, Sample 1, 2, 3 모두 평균입자 크기에서 크게 벗어나지 않았다. 입자들은 4 °C 상태에서 보관하였을 때 크기변화가 적은 안정한 상태를 보여주었다. DNA의 평

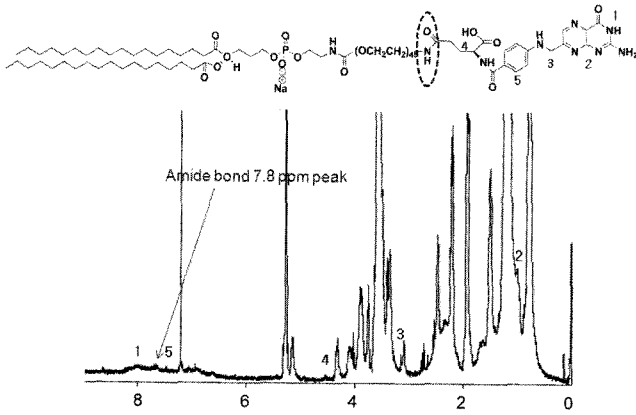


Figure 5. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of folate-PEG-DPPE.

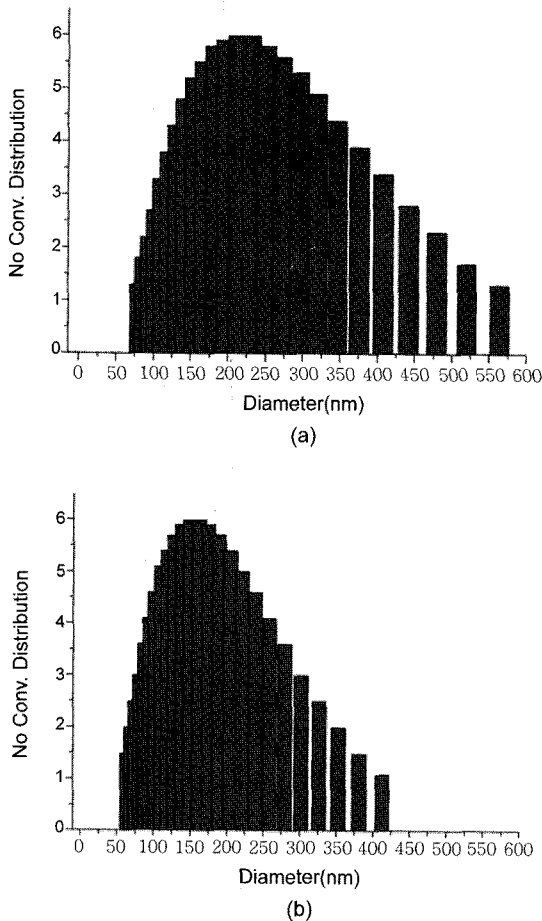


Figure 6. Particle size distribution of the cationic emulsion system measured by dynamic light scattering: (a) cationic lipid emulsion; (b) DNA/cationic lipid emulsion complex.

평균 크기는 2030 nm로 측정되었으며, DNA/양이온성 지질 복합체의 크기는 평균 150.5 nm로 측정되었다. 이것은 DNA와 정전기적 상호작용으로 인해 응축이 일어나 입자크기가 줄어든 것으로 확인되었다(Figure 6). 양이온성 지질 시스템의 제타 포텐셜 값은 평균 +54 mV로 측정되었으며, DNA/양이온성 지질 시스템의 복합체는 평균 +10 mV로 측정되었다. 세포막이 음전하를 띠기 때문에 유전자 복합체는 일정양의 양이온을 가져야 한다. 복합체의 제타 값은 음전하를

Table 2. Particle Size and Zeta Potential of Samples

Sample	Particle size(nm)		Zeta-potential(mV)	
	cationic lipid emulsion system	cationic lipid emulsion system/DNA	cationic lipid emulsion system	cationic lipid emulsion system/DNA
1	204.5	150.3	+54.2	+9.8
2	207.0	150.1	+54.1	+10.3
3	206.6	151.2	+54.1	+10.1

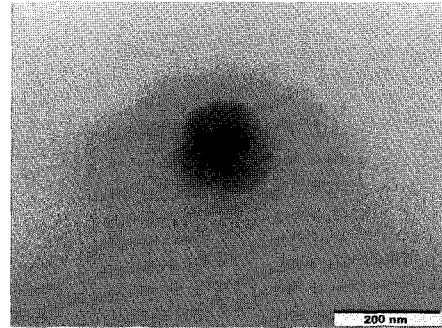


Figure 7. Transmission electron microscope(TEM) image of cationic lipid emulsion.

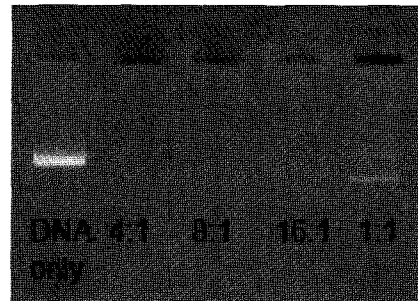


Figure 8. Agarose gel electrophoresis (0.7%) of plasmid DNA complexed with cationic lipid emulsion.

띠는 세포막과 붙을 만큼 충분한 전하를 가졌다고 판단된다. Sample 1, 2, 3 각각의 입자크기와 제타 포텐셜 값은 Table 2와 같다.

에멀전의 입자 형태와 크기를 알아보기 위해 TEM을 사용하여 측정하였다. 그 결과 원형 입자의 모습을 보이고, 지질층 안에 core oil이 차 있어서 검게 나타나는 것을 확인할 수 있었으며, 입자의 크기 역시 200 nm 정도의 크기를 가지는 것으로 확인할 수 있었다(Figure 7).

양이온성 지질 에멀전 시스템을 이용한 유전자 발현효율 실험에서 DNA와 결합되지 않으면 발현이 되지 않으므로 결합유무를 확인하였다. 양이온성 지질 에멀전/DNA 복합체 전기영동에서 이동되지 않는 원리를 이용하여 시행한 결과 1:1, 4:1, 8:1 16:1(DOTAP emulsion system/DNA weight ratio)의 비율로 혼합시켰을 경우 1:1 무게 비에서는 complex가 잘 이루어지지 않았으며, 4:1비율 이상에서는 완전한 complex가 이뤄지는 것을 확인하였다(Figure 8).

Folate는 암세포를 표적화하기 위한 ligand로서 사용되고 있으며, 인간의 암세포에는 folate receptor가 많이 존재하므로 이 특별한 ligand와 receptor의 작용으로 인해 암세포 내로 효율적으로 전달될 수 있게 된다.<sup>10,11</sup>

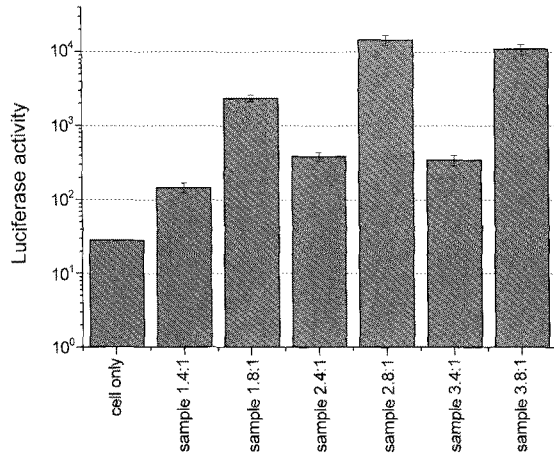


Figure 9. *In vitro* transfection activity of DNA/cationic lipid emulsion complexes on 293 cell lines.

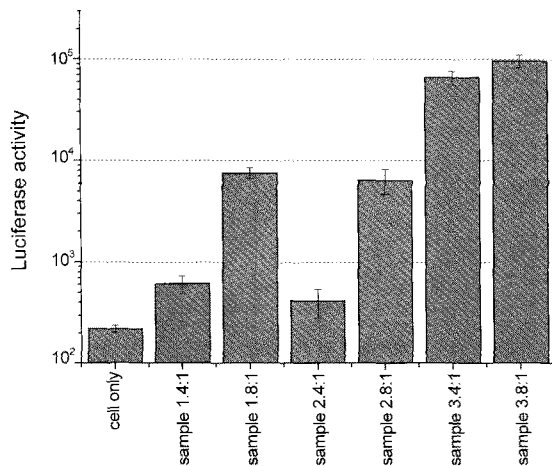


Figure 10. *In vitro* transfection activity of DNA/cationic lipid emulsion complexes on HeLa cell lines.

본 실험에서는 folate기를 암세포의 특이적 표적 리간드로 도입하였고, 면역반응을 피하고 안정성을 높여주기 위하여 PEG를 도입하여 제조하였다.<sup>17,18</sup>

또한, DPPE를 도입하여 소수성 꼬리를 가지게 하여 수용액상에서 자기조립을 통해 DOTAP와 섞여서 입자를 형성하도록 했다. Folate기가 표적 리간드로 이용될 수 있음을 확인하기 위하여 양이온성 지질 에멀전 시스템에 folate-PEG-DPPE의 양을 0, 0.5, 4 mg 넣어 주고 DNA 콤플렉스 비율 4:1, 8:1에 대해서 folate 수용체를 많이 가지고 있는 암세포주(HeLa)와<sup>10,11</sup> 일반세포주(293 세포)를 비교하여 각 세포주 별로 유전자 발현정도를 확인하였다(Figures 9, 10).

각 세포주(293 세포, HeLa 세포)에서의 샘플들에 따른 발현효율을 살펴보면 folate를 첨가하지 않은 양이온성 지질 시스템(sample 1)의 경우 어느 정도의 발현효율을 가지고 있다. 하지만, 비바이러스성 벡터가 가지는 단점 중에 하나인 낮은 발현효율을 보인다. 293세포의 경우에는 sample 2(0.5 mg), 3(4 mg)의 발현정도가 folate-PEG-DPPE의 양에 따른 차이는 거의 없었으며, 양이온성 지질과 유전자의 혼합비율에 따른 차이만 조금 나타났다. 4:1 보다는 8:1 비

율에서 발현효율이 조금 더 좋은 것으로 확인되었다. 각각의 8:1 비율에서도 folate 영향은 없었다.

이와 다르게 자궁경부암 세포주인 HeLa 세포에서는 folate receptor에 대한 영향을 확인할 수 있었다. 샘플 3은 folate-PEG-DPPE의 양을 4 mg 넣어준 것으로 folate양이 적은 샘플에 비하여 folate-receptor의 표적지향 효과로 인해 발현효율이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 4:1 비율에서 folate가 존재하지 않는 샘플 1과 비교하였을 때는 발현효율이 100배 정도 향상되는 것으로 나타났다. 8:1 비율에서는 folate를 넣지 않은 샘플에 비해 10배 정도의 차이를 보였다. 양이온성 지질 에멀전/DNA 복합체 비율을 4:1에 folate 양을 4 mg 넣을 때 더 효과적인 발현효율을 보였다.

## 결론

양이온성 지질인 DOTAP를 이용하여 나노입자 크기를 가지는 지질 에멀전을 형성하였다. 암세포에 표적지향성을 가지는 folate기를 수식한 folate-PEG-DPPE를 합성하여 새로운 유전자 전달체의 발현 효율을 증가시켰으며, folate에 민감한 자궁경부암(HeLa) 세포주를 통해 영향을 확인할 수 있었다. 이렇게 제조된 지질 에멀전의 평균 입자크기는 ELS와 TEM로 측정된 결과 평균 입자크기는 약 206.6 nm이며 입자상태는 4 °C 보관 상태에서 안정성을 보였다. DNA와 양이온성 지질 에멀전의 복합체의 크기는 평균 150.5 nm이며 DNA와의 응집효과로 크기가 줄어들었다. 일반세포주인 293 세포에 비해 암세포주인 HeLa는 folate 수용체를 많이 가지고 있어 folate-PEG-DPPE 함량에 따라 발현효율에 차이가 있었으며, 4:1비율의 양이온성 지질 에멀전/DNA 복합체에서는 첨가하지 않은 지질 시스템에 비해 100배 정도 발현효율이 향상되는 효과를 보였다. 반대로 일반 세포주인 293 세포는 단순히 DNA와 지질 에멀전의 혼합비율에 따른 차이만 나타났다. 양이온성 지질인 DOTAP는 유전자 전달이나 약물 전달에서 안전성이 검증되어 있는 물질이며, 표적리간드를 추가함으로써 특정 부위를 치료하기 위한 효과를 증대시켜 효율적인 유전자 전달체로 사용될 것으로 기대된다.

**감사의 글:** 본 연구는 교육과학기술부의 연구비 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사를 드립니다(과제번호: F104AA010001-06A0101-00110). 세포 실험에 도움을 주신 충남대학교 생화학과의 최준식 교수님, 최혜남께 감사를 드립니다.

## 참고 문헌

1. A. Mountain, *Trends in biotechnology*, **18**, 3 (2000).
2. P. L. Felgner and G. M. Ringold, *Nature*, **337**, 6205 (1989).
3. W. J. Kim and S. W. Kim, *Macromol. Res.*, **15**, 2 (2007).
4. A. Ziegler, G. H. Luedke, D. Fabbro, K. H. Altmann, and U. Zangemeister-Wittke, *J. Natl. Cancer Int.*, **89**, 14 (1997).
5. D. S. Friend, D. Papahadjopoulos, and R. J. Debs, *BBA - Biomembranes*, **1278**, 1 (1996).
6. S. W. Yi, T. Y. Yune, T. W. Kim, H. Chung, Y. W. Choi, I. C. Kwon, E. B. Lee, and S. Y. Jeong, *Pharmaceut. Res.*, **17**, 3 (2000).

7. H. Gershon, R. Ghrlando, S. B. Guttman, and A. Miinsky, *Biochemistry*, **32**, 28 (1993).
8. S. H. Kim, J. H. Jeong, H. J. Mok, S. H. Lee, S. W. Kim, and T. G. Park, *Biotechnol. Progr.*, **23**, 1 (2007).
9. T. Shinoda, A. Takagi, A. Maeda, S. Kagatani, Y. Konno, and M. Hashida, *J. Pharm. Sci.*, **87**, 12 (1998).
10. W. Zhou, X. Yuan, A. Wilson, L. Yang, M. Mokotoff, B. Pitt, and S. Li, *Bioconjugate Chem.*, **13**, 6 (2002).
11. H. Y. Lee, S. A. Yu, K. H. Jeong, and Y. J. Kim, *Macromol. Res.*, **15**, 6 (2007).
12. T. W. Kim, H. Chung, I. C. Kwon, H. C. Sung, and S. Y. Jeong, *Mol. Cells*, **10**, 2(2000).
13. J. M. Benns, A. Maheshwari, D. Y. Furgeson, R. I. Mahato, and S. W Kim, *J. Drug Target.*, **9**, 2(2001).
14. E. Chambers, M. Diane, D. Wagrowski, L. Ziling, R. Jeffrey, and Mazzeo, *J. Chromatogr. B*, **852**, 1 (2007).
15. M. B. Yun, H. R. Kim, H. Choi, and J. S. Choi, *Polymer (Korea)*, **15**, 3 (2007).
16. S. Y. Joo, J. S. Kim, H. J. Park, and E. K. Choi, *Polymer (Korea)*, **13**, 6 (2005).
17. M. A. Croyle, S. M. Callahan, A. Auricchio, G. Schumer, K. D. Linse, J. M. Wilson, L. J. Brunner, and G. P. Kobinger, *J. Virol.*, **78**, 2 (2004).
18. M. A. Croyle, H. T. Le, K. D. Linse, V. Cerullo, G. Toietta, A. Beaudet, and L. Pastore, *Gene Ther.*, **12**, 7 (2005).