

고분자 나노복합체를 이용한 유전자 전달시스템

김원종

1. 서론

최근 인간 게놈 프로젝트의 발전과 더불어 유전자를 기반으로 하는 새로운 치료기술들이 주목을 끌고 있다. 알츠하이머, 파킨슨씨 질병, 당뇨병, 류마티스 심장질환 그리고 암 등의 질병을 유발하는 주요 유전자들이 발견됨에 따라 머지않아 인간의 생명을 위협하는 주요 난치병들을 유전자 레벨에서 조절하여 치료하는 기술이 상용화 될 수 있을 것이다. 1950년대 처음으로 유전자 치료의 개념이 도입된 이래, 1980년대 유전자 전달 벡터이용 기술의 발전, 1990년 미국 국립보건원의 임상시험에 이르기까지 유전자 치료 분야는 새로운 질병 유발성 유전자의 발견 뿐만 아니라 다양한 유전자 전달 시스템의 진보로 괄목할 만한 발전을 거듭해 왔다. 유전자 치료는 질병의 결과인 증상을 치료하는 것이 아니라 질병의 원인인 유전자레벨에서 치료하는 근본적이고 획기적인 방법으로 인위적으로 유전자 전달 및 발현 조절이 가능하고 일회 투여로 체내에서 장시간 발현이 가능하며 유전자 재조합에 의해 환자의 변이된 유전정보도 교정할 수 있다. 하지만 최근 들어 유전자 치료가 암 유발 가능성을 내포하고 있다는 보고 및 전달효율이 낮다는 기술적인 제약으로 인해 한계에 부딪치고 있는 것도 현실이다. 그러나 이러한 제약에도 불구하고 유전자 치료는 인간의 질병을 치료할 수 있는 궁극적인 치료법으로 인식되고 있고 현재 존재하는 문제점을 극복하려는 많은 연구가 진행 중이다. 이에 본 특집에서는 유전자 치료에 사용되고 있는 전달시스템에 대해 간략히 논하고 생체적합성 고분자 나노복합체를 이용한 유전자 전달시스템에 대해서 집중적으로 논하여 앞으로 고분자를 이용한 유전자 전달 시스템의 나아갈 방향을 제시하고자 한다.

2. 본론

2.1 유전자 치료

유전자 치료란 질병을 유발하는 유전자를 대신할 수 있는 정상 유전자를 외부로부터 넣어 줌으로써 유전자가 본래의 기능을 발휘할 수 있도록 하는 것을 말한다. 여기에는 본래 결핍되어 있는 유전자를 외부로부터 넣어 줌으로써 목적하는 단백질의 발현을 유도하거나, 또는 돌연변이를 일으키는 유전자를 부분을 수정하거나, 발현 억제 유전자

(Antisense, siRNA, Oligonucleotide) 등을 이용해서 특정 단백질의 발현을 억제시키는 등의 다양한 전략이 구사되고 있다(그림 1). 최초의 유전자 치료는 1990년에 미국 국립보건원에서 아데노신 탈아민효소가 결핍된 여아에게 이 효소를 발현할 수 있는 유전자를 도입 시킴으로써 효소 결핍증을 치료한 것으로 보고되고 있다. 그 이후 유전자 치료는 유전적 질환뿐만 아니라 심장관계 질환, 대사성 질환, 중추 신경계 질환, 자가면역 질환, 감염증, 암 등의 난치병을 치유하기 위한 새로운 치료법으로 급부상하고 있다(그림 2). 유전자 치료법이 소기의 목적을 달성하기 위해서는 질병을 유발하는 유전자를 정확히 찾아내는 것과 동시에 목적하는 치료유전자를 원하는 곳까지 안전하게 전달하는 유전자 전달체의 개발이 필수적이다. 이를 위해 현재 많은 연구자들이 고효율의 세포특이적 유전자 전달체의 개발에 관하여 연구하고 있다.

2.2 유전자 전달 시스템

치료 유전자를 체내로 도입시키기 위한 방법으로는 바이러스를 이용하여 외부 유전자를 세포내로 전달하는 바이러스성 벡터와 고분자, 지질, 전가충격법 등을 이용하는 비바이러스성 벡터를 들 수 있다. 표 1에서 나타낸 바와 같이, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노수반바이러스 벡터 등을 이용하는 바이러스성 벡터는 높은 유전자 전달효율을 기대할 수 있지만 체내 적용시 벡터 자체가 유발하는 면역반응으로 인해 반복적으로 사용하기 어렵고, 암 유발의 위험성이 있으며 도입시킬 수 있는 유전자의 크기에도 제한이 있다는 단점이 있다. 반면 비바이러스성 벡터는 안전성면에서 우수하고, 벡터를 필요에 따라 자유자재로 변형가능하며 세포 특이적 물질을 부착하여 세포선택성을 높일 수 있고, 전달할 수 있는 유전자의 크기에도 비교적 제한이 없다는 장점을 지니고 있다.¹ 그러나 바이러스 벡터에 비



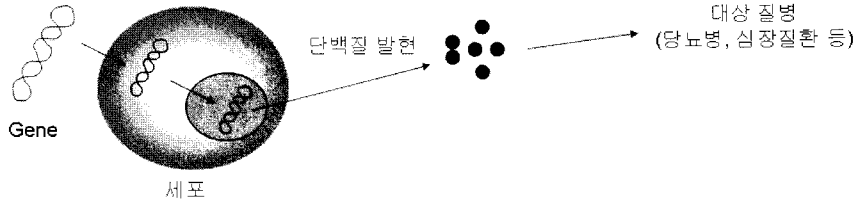
김원종

1998 한양대학교 섬유공학부(학사)
 2001 동경공대 생체분자공학과(석사)
 2004 동경공대 생체분자공학과(박사)
 2004~2007 University of Utah(Research Associate)
 2007~2009 포항공과대학교 화학과 조교수
 현재

Gene Delivery System by Polymeric Nanocomplexes

포항공과대학교 화학과 (Won Jong Kim, Department of Chemistry, Pohang University of Science and Technology (POSTECH), San31, Hyoja-dong, Nam-gu, Pohang, Gyeongbuk 790-784, Korea) e-mail: wjkim@postech.ac.kr

● 단백질의 발현 유도



● 단백질 발현 억제

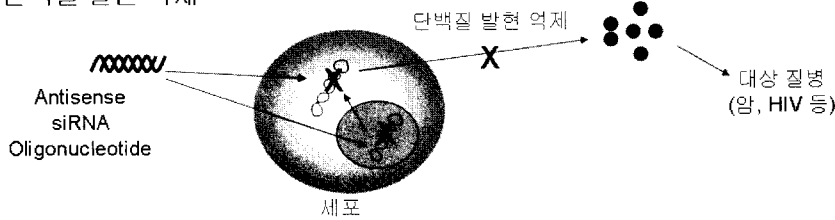


그림 1. 유전자 치료를 이용한 특정 단백질의 발현 유도 및 억제 모식도.

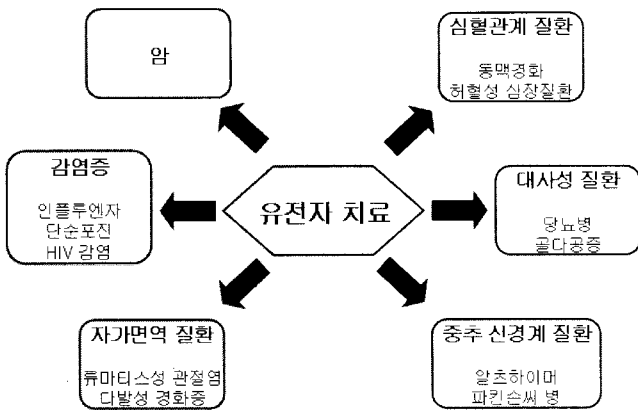


그림 2. 다양한 질병의 치료를 위한 유전자 치료의 응용.

표 1. 바이러스 벡터와 비바이러스 벡터의 비교

| 벡터의 종류 | 벡터 | 장점 | 단점 |
|--------|--|---|--|
| 바이러스 | 레트로바이러스 아데노바이러스 아데노수반바이러스 | 높은 발현효율 | 면역반응 탐재유전자 크기의 제한 암 유발 가능성 자기DNA삽입, 자기 복제 |
| 비바이러스 | 인산칼슘 DEAE-dextran 리포솜 고분자 전기충격 | 비면역반응 낮은 급성 독성 설계의 용이성 반복 주입 가능 저비용 | 낮은 전달효율 |

해서 현저히 낮은 유전자 전달효율은 비바이러스성 벡터의 해결해야 할 과제이다.

2.3 고분자를 이용한 유전자 전달의 기본 개념

DNA는 2-deoxyribose 분자가 생리 조건하에서 전기적으로 음성을 띤 phosphodiester 결합에 의해 연결되어 있는 거대한 생체고분자이며 각각의 2-deoxyribose의 1번 탄소에는 purine 또는 pyrimidine 염기가 결합되어 있다. 즉, 유전자는 음이온으로 대전된 거대한 고분자 사슬의 형태로 존재하므로 유전자 단독으로 존재할 때는 비교적 부피가 큰 랜덤코일의 형태를 띠고 있어 이러한 자연의

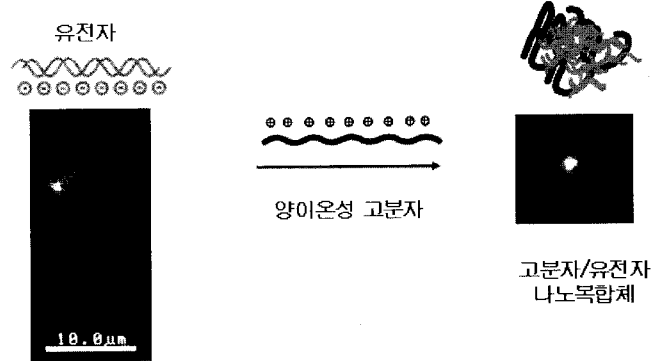


그림 3. 음이온성 유전자와 양이온성 고분자와의 정전상호작용에 의한 나노복합체의 형성.

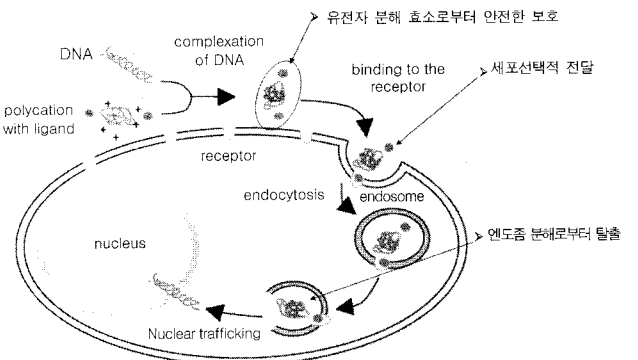


그림 4. 고분자/유전자 복합체에 의한 세포내 유입의 모식도. 출처: <http://www.nano-lifescience.com/research/genedelivery.html>.

형태로는 유전자의 세포내로의 전달이 어렵고, 크기가 작은 나노입자의 형태로 만들어 주어야 한다. 따라서 고분자를 이용한 여러 가지 유전자 전달체 중에서도 유전자와 정전상호작용을 하여 나노크기의 복합체를 형성할 수 있는 양이온성 고분자가 널리 쓰이고 있다(그림 3). 양이온성 고분자는 분자량에 따른 제조가 수월하고 여러 가지 형태로 변형시킬 수 있으며, 크기가 큰 유전자들과 나노크기의 고분자/유전자 복합체의 형성이 가능하다. 그림 4에 양이온성 고분자를 이용한 유전자 전달의 모식도를 나타내었다. 비바이러스성 벡터의 낮은

전달효율을 높이기 위하여, 고분자가 유전자와 안정한 나노복합체를 형성하여 외부 분해효소로부터 유전자를 안전하게 보호하도록 하며, 나노복합체를 세포 특이적 물질에 결합시켜 특정 세포에만 선택적으로 유전자를 전달하도록 하는 전략도 구사되고 있다. 또한, 세포내로 유입된 나노복합체는 엔도솜내에서 쉽게 분해되기 때문에 엔도솜으로부터 신속하게 탈출해야만 높은 전달효과를 기대할 수가 있다.²

2.4 다양한 유전자 전달용 고분자

2.4.1 폴리-L-라이신(PLL)

양이온성 고분자인 PLL은 최초로 사용된 유전자 전달용 고분자 중의 하나이며 다양한 크기의 분자량으로 자유자재로 합성할 수 있기 때문에 많은 연구가 진행되고 있다(그림 5(a)). PLL은 생분해성인 펩타이드 결합으로 연결되어 있기 때문에 *in vivo*에 활발히 응용되고 있으며 유전자와 나노복합체를 형성해서 세포내로 전달될 수 있다. 그러나 어느 정도의 독성도 나타내고 있으며 PLL은 단독으로는 높은 전달효율을 나타내는 데는 한계가 있다. 이를 극복하기 위해 엔도솜 파괴 물질이나 엔도솜 융합펩타이드 등을 부착시킴으로써 높은 전달효율을 보여주는 예가 보고되었다.³

2.4.2 폴리에틸렌이민(PEI)

PEI 고분자는 비바이러스 고분자 벡터 중 유전자 전달효율이 가장 높은 전달체 중의 하나이다(그림 5(b)). PEI는 그 모양에 따라 분지형과 직선형으로 나눌 수 있으며, 다양한 분자량으로 합성이 가능하고 분지형의 경우, 분지수에 따라 다양한 형태와 기능을 가진 전달체로 응용할 수 있다. 일반적으로 고분자 유전자 전달체는 분자량이 증가할수록, 양이온의 밀도가 높아질수록 유전자 전달효율이 높아지는데, 세포에 대한 독성 또한 증가하는 경향을 보인다.⁴ 따라서 양이온의 밀도가 높은 분지형 고분자가 밀도가 낮은 직선형보다 더 높은 유전자 전달효율을 보이지만, 높은 세포독성을 나타낸다. PEI의 다양한 분자량 중에서 높은 전달효율을 보이는 분지형의 25K(Mw : 25,000)가 표준으로 쓰이고 있는데, 유전자와 강력한 나노복합체를 형성함으로써 외부 분해효소로부터 유전자를 안전하게 보호할 수 있다. 또한 분지형의 PEI의 또 다른 특징으로 한 분자 안에 1차, 2

차, 3차 아민을 끌고루 가지고 있어 넓은 pH 범위 내에서 양이온으로 변할 수 있는 Proton sponge 효과를 가지고 있다. 일반적으로 양이온성 유전자 전달체가 유전자와 복합체를 형성하여서 세포내이입(endocytosis)을 통해 세포내로 유입이 되면 이 복합체는 엔도솜을 거쳐 라이소솜으로 이동하게 되는데 이때, 엔도솜내의 각종 분해효소로 인해 외부물질이 쉽게 분해되어진다. 엔도솜 내부는 ATPase 효소에 의해 다량의 proton이 세포질로부터 유입되어 각종 분해효소가 활성화되는데 이때 PEI는 protonation되면서 ATPase 효소에 의한 proton의 유입을 촉진시키고, 이와 함께 염화이온의 유입이 동반됨에 따라서 삼투압에 의한 팽윤현상이 일어나고 결과적으로 엔도솜의 물리적 파괴가 일어나게 되는데 이 현상을 PEI의 proton sponge 효과라고 한다.⁵ Proton sponge 효과는 PEI의 강력한 전달효율의 기전을 설명하는 하나의 유력한 가설로 여겨지고 있다. 앞에서 언급한 바와 같이 비분해성 고분자인 PEI에 의한 세포독성을 완화시키기 위하여 다양한 방법이 구사되고 있는데, 저분자량의 PEI를 생분해성 결합으로 연결시키거나, 저분자량의 PEI를 친수성 고분자인 폴리에틸렌글리콜(PEG) 등과 교차적으로 연결시킴으로써 높은 전달효율과 낮은 독성을 나타내도록 할 수 있다는 예가 보고되었다.^{6,7}

2.4.3 키토산(Chitosan)

키토산은 갑각류인 게나 새우의 껍질에 많이 존재하는 키틴을 탈아세틸화시킴으로써 생성되는 생분해성의 다당체이며 N-아세틸글루코사민과 글루코사민의 β-1,4-글라이코사이드 결합으로 이루어져 있다(그림 5(c)). 키토산은 아민기를 가지고 있고 PEI 보다 생체적합성이 뛰어나 유전자 전달체로 널리 쓰이고 있으며, 분자량과 탈아세틸화되는 정도에 따라서 다양한 유전자 나노복합체를 형성할 수 있다. 그러나 키토산은 PEI에 비해 생체적합성은 우수하나 전달효율이 낮은 단점을 지니고 있다. 이러한 낮은 전달효율을 극복하기 위해 pH-감응성 엔도솜 파괴 펩타이드 등을 결합시키거나 또는 세포선택성 물질을 컨쥬게이션시킨 키토산이 개발되어 높은 유전자 전달효율을 보이는 예도 있다.⁸

2.4.4 덴드리머(Dendrimer)

덴드리머란 중심분자로부터 가지모양의 단위구조가 반복적으로 뻗

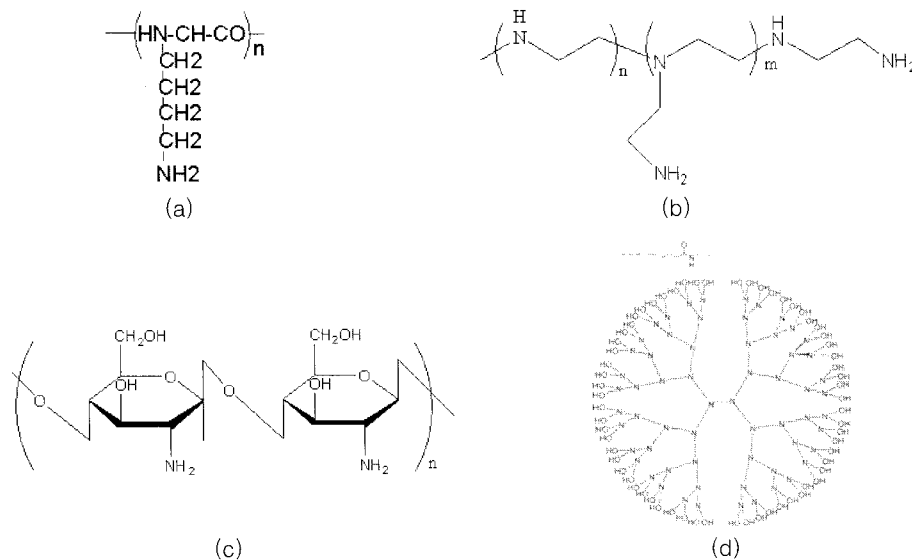


그림 5. 대표적 고분자 유전자 전달체. (a) 폴리-L-라이신(PLL), (b) 분지형 폴리에틸렌이민(BPEI), (c) 키토산(Chitosan), and (d) PAMAM 덴드리머.

어 나오는 거대분자 화합물을 말하며 입체적으로는 구형에 가까운 구조를 가지고 있다(그림 5(d)). 그 중심부는 상대적으로 낮은 밀도를 가지는 반면, 외곽으로 갈수록 밀도가 증가한다. 덴드리머는 일반적으로 divergent 합성법과 convergent 합성법으로 제조된다.⁹ Divergent 합성법은 한 개의 중심 분자로부터 단계적으로 외곽구조를 키워나가는 방법이며, convergent 합성법은 divergent 합성법과 반대로 덴드리머의 최외곽의 말단기로부터 중심 방향으로 합성해 나가는 방법이다. 덴드리머는 구조상 말단에 작용기가 많이 존재함으로써 세포 특이적 물질이나 핵막 통과를 돕는 펩타이드 또는 엔도솜 탈출을 돕는 물질의 부착이 용이하다. PEI와 마찬가지로 덴드리머는 고밀도의 양이온기로 대전되어 있어 유전자와 안정한 나노복합체를 형성하고 유전자를 보호함으로써 전달효율을 높일 수 있다. 여러 연구자들에 의해 덴드리머가 유전자 전달에 응용되어왔는데, 특히 Szoka 그룹에서는 선형고분자인 PLL 보다 독성이 적고 발현효율도 높은 poly(amido amine) PAMAM이라는 덴드리머를 보고하였다.¹⁰ 한편, Saltzman 그룹에서는 PAMAM 덴드리머의 중심부분에 PEG를 결합시켜 생체적합성을 향상시킴으로써 보다 낮은 독성을 갖는 덴드리머를 합성하였는데, PEG는 혈중에서의 음이온성 단백질의 흡착을 방지함으로써 유전자와의 나노복합체의 안정성을 향상시켰다.^{11,12}

2.5 특정 세포에 선택적으로 유전자를 전달하는 고분자

바이러스성 벡터에 비해 상대적으로 낮은 전달효율을 나타내는 비바이러스성 벡터의 단점을 극복하기 위해서는 치료유전자를 표적 세포 선택적으로 전달해야 한다. 예를 들어, 암을 치료하기 위한 고분자/유전자 나노복합체를 혈관을 통해 주입했을 때 체내의 다른 장기에 전달되는 나노복합체를 최소화시켜 대부분의 나노복합체가 암세포에 전달되도록 한다면 나노복합체에 의한 항암치료 효과를 극대화시킬 수 있을 것이다. 비바이러스성 고분자 벡터는, 바이러스 벡터에 비해, 화학결합을 이용하여 세포선택적 물질을 비교적 용이하게 도입할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 이에 다음에서는 다양한 세포 특이적 리간드를 이용한 세포 선택적 고분자 전달체에 대해 살펴보고자 한다.

2.5.1 암세포 표적 고분자 전달체

암세포는 정상세포와 달리 혈관의 생성을 촉진하는 여러 가지 인자들을 세포 주위로 분비한다. 이러한 혈관생성 촉진인자들은 주의

의 혈관을 자극하여 암세포를 향해 새로운 혈관들을 형성하게 하고, 암세포들은 형성된 혈관을 통해 여러 가지 영양분, 산소 등을 공급받아 지속적으로 증식하며 전이하는데, 이것을 암세포 주위의 혈관신생(Angiogenesis) 이라고 한다.¹³ 혈관생성 촉진인자들의 자극을 받은 암세포 주위의 혈관내피세포의 표면에는 인테그린(Integrin)이라는 수용체가 다량으로 발현되어 있는데, RGD 펩타이드와 특이작용을 하는 것으로 알려져 있다. 이를 바탕으로 RGD 펩타이드를 고분자 유전자 전달체에 부착시킴으로써 전달체의 암세포 선택성을 높이는 전략이 보고되었다(그림 6(a)).¹⁴ 또한 암세포에는 transferrin과 folate 수용체도 다량으로 존재하므로 transferrin과 folate를 고분자 유전자 전달체에 부착하여 치료유전자를 암세포에 선택적으로 전달함으로써 비바이러스성 벡터의 전달효율을 높이고 다른 세포에 대한 독성을 낮추는 전략이 이용되고 있다(그림 6(b), 6(c)).^{15,16}

2.5.2 심장혈관 표적 고분자 전달체

심장혈관에 특이적으로 치료유전자를 전달하기 위한 전략으로 LDL(low density lipoprotein)이라는 소수성의 지질단백질과 소수성으로 변형시킨 stearyl-PLL의 복합체를 만들어 유전자를 전달시킨 예가 보고되었다. LDL은 간암세포나 혈관세포의 표면에 다량으로 발현되어 있는 LDL 수용체와 특이적으로 작용하므로, 세포선택적인 유전자 전달을 위한 리간드로 사용되고 있으며, LDL의 주요부분을 이루고 있는 펩타이드만을 인공적으로 합성한 후 고분자 유전자 전달체와 결합시켜 심장혈관세포에서 발현효율을 향상시킨 예도 보고되었다. Kim 그룹은 PEG를 이용하여 LDL의 일부인 AWBP(Artery wall binding peptide)를 PLL에 결합시킨 후 평활근세포에서의 발현정도를 알아보았는데, AWBP 특이적으로 발현효율이 향상되었음을 보고하였다(그림 6(d)).¹⁷

2.6 자극감응형 유전자 전달 고분자

세포내의 특수한 환경조건 하에서만 특이적으로 반응하여 유전자를 전달하는 자극감응형 유전자 전달체가 지능형 전달체로 각광을 받고 있다. 예를 들어, 엔도사이토시스를 통해 세포내로 들어가 엔도솜 내부의 낮은 pH에 반응하여 엔도솜 막을 파괴시키는 지능적인 유전자 전달체들이 보고되었는데, 대표적으로 폴리히스티딘이 결합된 고분자를 들 수 있다. 폴리히스티딘은 이미디졸 그룹을 가지고 있고 그

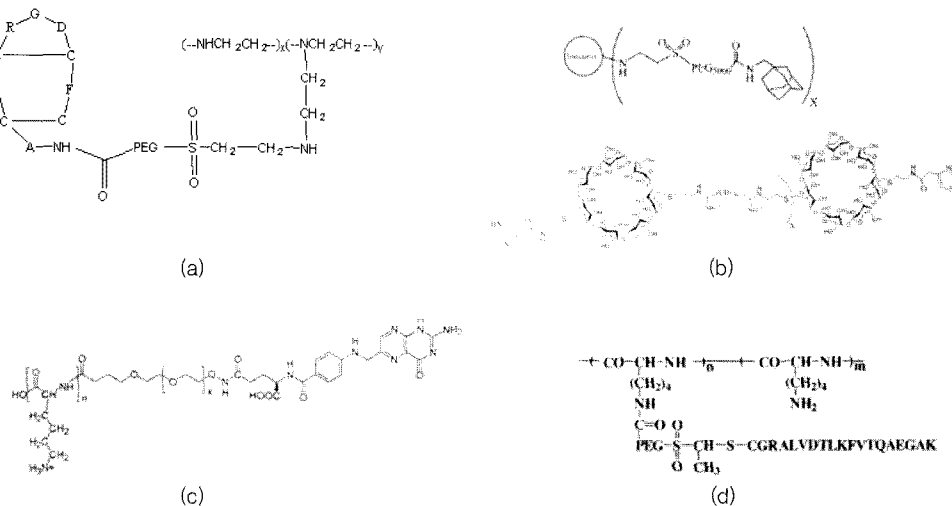


그림 6. 세포선택적 고분자 전달체. (a) PEI-g-PEG-RGD, (b) Transferrin-PEG-AD, (c) PLL-PEG-Folate, and (d) PLL-PEG-AWBP.

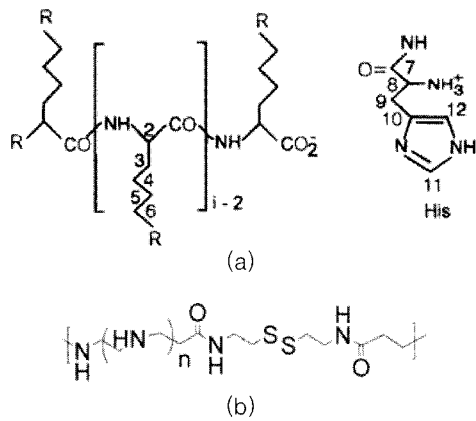


그림 7. (a) PLL-histidine pH 감응형 고분자 전달체와 (b) Polyamido amine 환원감응형 고분자 전달체.

룹 내 아민의 pKa가 6이기 때문에 중성의 pH에서는 이온화되지 않지만 낮은 pH를 갖는 엔도솜 내에서는 양이온화됨으로써 엔도솜 멤브레인을 파괴하는 특성을 가지고 있어 다양한 고분자 유전자 전달체에 응용되고 있다(그림 7(a)).¹⁸ 앞서서도 언급한 바와 같이 분자량이 큰 고분자는 발현효율은 높지만 또한 세포에 대한 독성도 높게 나타내는 단점을 지니고 있다. 그리고 유전자와의 정전상호작용이 강하기 때문에 강한 나노복합체를 형성한다. 복합체가 세포내로 유입이 된 후에 복합체의 결합력이 약해져 유전자가 고분자 전달체로부터 유리된다면 높은 발현효율을 기대할 수 있다. 다시 말해서 세포 밖에서는 강한 나노복합체를 형성하다가 세포내로 유입이 되면 복합체가 약해져 유전자를 유리하는 지능형 전달체가 이상적이다. 한편 세포질 내는 세포밖에 비해서 환원적 환경이 높기 때문에 이러한 환원적 환경을 인식하는 환원 감응형 고분자 유전자 전달체가 보고되고 있다. Kim 그룹과 Feijen 그룹은 disulfide bond로 결합되어 있는 고분자 유전자 전달체를 개발하여 세포내로 유입되면 저분자로 끊어져서 유전자를 유리시켜 높은 발현효율과 낮은 독성을 나타내는 지능형 고분자 유전자 전달체를 보고하였다(그림 7(b)).¹⁹

3. 결론

유전자 전달 시스템에 관한 연구는, 1950년대에 유전자 치료의 개념이 도입된 이후로 기술적인 면이나 학문적인 면에서 많은 발전이 있었음에도 불구하고 임상적인 면에서는 아직 넘어야 할 과제를 많이 남겨두고 있다. 유전자 치료 임상시험은 1989년 1건을 시작으로 약 10년간 꾸준히 증가세를 보이다 이후 5년간 하강 감소세를 보여왔다. 2005년 7월 현재 전 세계적으로 완료되었거나 진행 중인 유전자 치료 임상시험은 약 1,076건으로 보고되었는데, 유전자 치료 임상시험에 사용된 전달 벡터로는 높은 발현효율을 갖는 바이러스 벡터가 압도적이었고, 그 이유는 비바이러스 벡터에 비해 현저히 높은 발현효율을 들 수 있다.²⁰ 하지만 면역반응, 암유발 등의 여러 가지 위험성을 내포하고 있는 바이러스성 벡터는 궁극적으로는 사용하기 어렵기 때문에 비바이러스성 고분자 벡터의 잠재성이 주목되고 있다. 이제까지 우리는 고분자 벡터의 개념, 종류, 전략, 그리고 여러 가지 형태의

전달시스템에 대해 살펴보았으며, 고분자 벡터의 효율을 향상시키기 위해서는 전달체가 세포 내로 투입되는 메커니즘, 세포내 성분과의 상호작용, 유전자 발현의 조절, 체내 분포, 생체내 독성 등에 관한 사항이 명확하게 규명되어야 할 것이다. 앞으로 암, 유전병, 신경계 질환, 감염성 질환 등의 많은 선·후천적 난치병들을 치료하기 위한 대안으로 기대되고 있는 유전자 치료를 위해서는 낮은 독성과 고효율의 전달 능력을 지닌 차세대형 고분자 전달체가 개발되어야 할 것이다.

참고문헌

1. M. R. Dyer and P. L. Herrling, *Mol. Ther.*, **1**, 213 (2000).
2. T. Merdan, J. Kopeck, and T. Kissel, *Adv. Drug. Deliver. Rev.*, **54**, 715 (2002).
3. M. A. Wolfert, P. R. Dash, O. Nazarova, D. Oupicky, L. W. Seymour, S. Smart, J. Strohal, and K. Ulbrich, *Bioconjug. Chem.*, **10**, 993 (1999).
4. D. Fisher, T. Bieber, Y. Li, H. P. Elsasser, and T. Kissel, *Pharm. Res.*, **16**, 1273 (1999).
5. O. Boussif, F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, and J. P. Behr, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 7279 (1995).
6. C. H. Ahn, S. Y. Chae, Y. H. Bae, and S. W. Kim, *J. Control. Release*, **80**, 273 (2002).
7. M. R. Park, K. O. Han, I. K. Han, M. H. Cho, J. W. Nah, Y. J. Choi, and C. S. Cho, *J. Control. Release*, **105**, 367 (2005).
8. I. K. Park, T. H. Kim, S. I. Kim, Y. H. Park, W. J. Kim, T. Akaike, and C. S. Cho, *Int. J. Pharm.*, **257**, 103 (2003).
9. P. Hodge, *Nature*, **362**, 18 (1993).
10. J. Haensler and F. C. Szoka, Jr., *Bioconjug. Chem.*, **4**, 372 (1993).
11. D. Luo, K. Haverstick, N. Belcheva, E. Han, and W. M. Saltzman, *Macromolecules*, **35**, 3456 (2002).
12. J. H. Lee, Y. B. Lim, J. S. Choi, Y. Lee, T. I. Kim, H. J. Kim, J. K. Yoon, K. Kim, and J. S. Park, *Bioconjug. Chem.*, **14**, 1214 (2003).
13. J. Folkman and Y. Shing, *J. Biol. Chem.*, **267**, 10931 (1992).
14. W. J. Kim, J. W. Yockman, J. H. Jeong, L. V. Christen, M. Lee, Y.-H. Kim, and S. W. Kim, *J. Control. Release*, **114**, 381 (2006).
15. N. C. Bellocq, S. H. Pun, G. S. Jensen, and M. E. Davis, *Bioconjug. Chem.*, **14**, 1122 (2003).
16. S. H. Kim, J. H. Jeong, K. W. Chun, and T. G. Park, *Langmuir*, **21**, 8852 (2005).
17. J. W. Nah, L. Yu, S. O. Han, C. H. Ahn, and S. W. Kim, *J. Control. Release*, **78**, 273 (2002).
18. P. Midoux and M. Monsigny, *Bioconjug. Chem.*, **10**, 406 (1999).
19. L. V. Christensen, C. W. Chang, W. J. Kim, S. W. Kim, Z. Zhong, C. Lin, J. F. Engbersen, and J. Feijen, *Bioconjug. Chem.*, **17**, 1233 (2006).
20. J. Gene Medicine, <http://wiley.co.uk/genmed/clinical/>.