

염기성 올리고펩티드 유도체를 가진 고분자 리피드의 합성 및 유전자 전달 효과 연구

배선주[#] · 최 혜[#] · 최준식[†]

충남대학교 자연과학대학 생화학과

(2012년 8월 29일 접수, 2012년 9월 25일 수정, 2012년 9월 28일 채택)

Synthesis of Polymerizable Amphiphiles with Basic Oligopeptides for Gene Delivery Application

Seon Joo Bae[#], Hye Choi[#], and Joon Sig Choi[†]

Department of Biochemistry, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

(Received August 29, 2012; Revised September 25, 2012; Accepted September 28, 2012)

초록: 폴리디아세틸렌(polydiacetylene, PDA)은 자기조립된 디아세틸렌(diacetylene) 단량체의 광중합에 의해 만들어진다. 디아세틸렌 단량체들이 조직적으로 배열되면 254 nm의 자외선 노광에 의해 1,4-첨가 중합이 일어나 고분자 주사슬에 이중결합과 삼중결합이 교대로 존재하는 폴리디아세틸렌이 만들어진다. 폴리디아세틸렌 수용액은 일반적으로 약 640 nm에서 최대흡수파장을 지니는 청색을 띠게 되며 여기에 온도나 pH의 변화, 다른 물질의 결합 등 외부 자극에 의해 약 550 nm의 최대 흡수 파장을 띠는 적색으로 색 전이가 일어나게 된다. 본 연구에서, 우리는 고체상 펩티드 합성을 이용하여 PCDA(10,12-pentacosadyinoic acid) 리포솜의 표면에 양이온성 올리고펩티드를 도입하였다. 또한 다양한 물 비율로 리포솜 수용액을 제조하여 동물 세포에 트랜스펙션한 결과, 향상된 유전자 전달 효율과 낮은 독성을 보이는 것을 확인하였고, PCDA의 특성을 이용하여 세포에 처리 후 세포 관련 비표지 형광을 관찰하였다.

Abstract: Polydiacetylene (PDA) is made by photopolymerization of self-assembled diacetylene monomers. If diacetylene monomers are arranged systematically and close enough with distance of atoms, 1,4-addition polymerization will occur by the irradiation of 254 nm ultraviolet rays and then PDA will have alternated ene-yne polymer chains at the main structure. Aqueous solutions of diffused PDA is tinged with blue which shows $\lambda_{\max}$ 640 nm. Visible color changes from blue to red occurs in response to a variety of environmental perturbations, such as temperature, pH, and ligand-receptor interactions. In this study, we synthesized cationic peptides - PCDA(10,12-pentacosadyinoic acid) liposome using a solid phase peptide synthesis (SPPS) method and prepared liposome solutions at various molar ratios using MPEG-PCDA. When mammalian cells were treated with the liposomes, high transfection efficiency and low toxicity were observed.

Keywords: polydiacetylene, cationic liposome, gene delivery, amino acid, polyethylene glycol.

서 론

폴리디아세틸렌은 널리 연구되고 있는 공액 고분자(conjugated polymer)이다. 폴리디아세틸렌을 이용한 유도체는 수용액에서 쉽게 합성할 수 있을 뿐만 아니라, 특별한 개시제나 촉매 없이 합성이 가능하다. 수용액 상에서 디아세틸렌(diacetylene) 단량체들이 나열되고 여기에 254 nm의 자외선 노광(UV irradiation)을 하면 디아세틸렌 사이에 중합이 일어나 고분자 주사슬에 이중결합과 삼중결합이 교대로 존재하는 폴리디아세틸렌이 형성된다.¹⁻⁶ 이들은 중합이 일어나기 전

에는 무색이나 자외선 노광 후에 중합이 일어나면 파란색을 띠어 육안으로 쉽게 확인이 가능하며 640 nm에서 최대흡수 파장을 나타내게 된다. 또한 중합이 일어난 폴리디아세틸렌 리포솜에 pH나 온도, 분자인식, 유기 용매 등의 외부 자극이 가해지게 되면 최대흡수파장이 540 nm로 붉은색 전이가 일어난다.⁷⁻¹⁰ 폴리디아세틸렌이 센서로서의 잠재력과 가능성을 보여주는 것은 붉은색으로 색 전이가 일어나면 이전에는 관찰되지 않았던 형광의 성질을 나타내는 매력적인 광학특성 때문이다.

한편, 유전자 치료(gene therapy)를 위해 널리 사용되고 있는 바이러스성 전달체는 높은 전달 효율에 비해 면역원성이나 독성, 비특이적 반응 등의 위험성을 가지고 있다.¹¹⁻¹⁴ 그래서 이에 비해 효율은 낮지만 안전하고 대량생산과 자유로운

[#]These authors contributed equally to this work.

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: joonsig@cnu.ac.kr

조작이 가능한 비바이러스성 전달체에 대한 연구와 관심이 높아지고 있는 실정이다. 비바이러스성 전달체로는 고분자, 덴드리머, 리피드, 리포솜 등을 들 수 있다.¹⁵⁻²⁰ 이들은 세포의 막이 대부분 음이온성 리피드와 당단백질들로 구성되어 있는 특징 때문에 세포막과 치료용 유전자 사이에 작용하는 척력을 보완하기 위해 주로 양이온성 성질을 띠게 된다.²¹

비바이러스성 유전자 전달체의 낮은 효율을 극복하기 위한 연구에 의해 단백질 전달 영역(protein transduction domain, PTD)이나 막 통과 신호(membrane translocation signals, MTS) 등이 알려져 있는데 이들은 유독 아르기닌이나 라이신 같은 양이온성 아미노산을 많이 함유하고 있다. 이전의 보고에서²² 아르기닌이나 라이신이 도입된 유전자 전달체의 효율을 비교하였는데 HepG2 세포주를 비롯한 다양한 세포주에서 아르기닌이 더 높은 효율을 보이는 것을 확인하였다. 뿐만 아니라 유전자 전달 효율은 엔도솜에서 라이소솜으로 진행되는 단계에서 엔도솜을 탈출하는데 기여하는 양성자 스폰지 효과에 의해 조절된다. 히스티딘은 pKa 값이 6인 이미다졸 작용기를 가지고 있어서 뛰어난 양성자 완충 효율을 보인다. 최근에는 폴리아미도아민(PAMAM) 덴드리머 표면에 히스티딘과 아르기닌을 순차적으로 합성하여 히스티딘의 개수에 따른 유전자 전달 효율의 상관관계가 보고되었다.²³

본 연구에서는 폴리디아세틸렌에 염기성 아미노산 중에서 히스티딘과 아르기닌으로 이뤄진 펩티드 유도체들을 도입하여 양이온성 표면 전하를 가지는 리피드를 합성하였고, 이를 이용하여 리포솜을 제작하고 이에 대한 색 전이 특징을 관찰하였으며, 세포에 적용하여 유전자 전달 효율 및 세포 독성, 그리고 비표지 전달체로서의 가능성을 확인하였다.

실 험

시약 및 재료. PDA 유도체인 PCDA(10,12-pentacosadynoic acid)는 Fluka에서 구매하였다. 고체상 합성을 위한 지지체로 Rink amide MBHA 수지(100-200 mesh, 0.56 mmole/g)는 Novabiochem(San Diego, CA)사에서 구입하였고, methoxy (polyethylene glycol)-amine(SUNBRIGHT MEPA-20H, MW 2000)은 NOF(Japan)에서 구입하였다. 폴리에틸렌이민(PEI 25 KD), 폴리아미도아민 덴드리머(PAMAM G4), *N,N*-diisopropylethylamine(DIPEA)와 반응 용매인 *N,N*-dimethylformamide(DMF, anhydrous 99.8%)는 시그마-알드리치(St. Louis, USA)에서 구입하였고 결합제로 *N*-hydroxybenzotriazole(HOBt)와 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate(HBTU) 그리고 아미노산 유도체로 Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH는 AnaSpec, Inc.(San Jose, USA)에서 구입하였다. 세포배양을 위한 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), antibiotic-antimycotic solution(100 unit/mL penicillin, and 100 µg/mL

streptomycin), Dulbecco's phosphate-buffered saline(DPBS), trypsin(0.25% trypsin with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)) 등은 Gibco(Gaithersburg, USA)에서 구입하였다. 루시페라아제 정량과 BCA 단백질 정량을 위해서 Promega(Madison, WI)의 루시페라아제 정량 키트와 Pierce(Rockford, IL)의 마이크로 BCA 단백질 정량 키트를 각각 구입하여 사용하였다. 세포독성을 측정하기 위해 EZ-Cytox 시약을 Daeil Lab Service(Seoul, South Korea)에서 구입하였다.

MPEG-PCDA Conjugate의 합성. MPEG-PCDA 고분자 리피드는 액체상 펩티드 합성방법을 통하여 anhydrous DMF를 용매로 하여 실온에서 합성하였다. MPEG-NH₂와 PCDA는 1:4의 몰비율로 하고, HOBt, HBTU와 DIPEA는 4:4:8의 몰비율로 혼합되었다. HOBt, HBTU는 결합제로 사용되었고, DIPEA는 촉매제로 사용되었다. 16시간 동안 반응을 보낸 후에 생성된 생성물은 과량의 차가운 에틸에테르로 3회 세척 과정을 거치고 질소가스를 이용하여 남아있는 에틸에테르를 없애준 후에 증류수에 녹여서 동결건조하여 최종적으로 가루 형태의 합성물을 얻었다. 합성물의 특징을 알아보기 위하여 400 MHz NMR 분광계(Bruker, AVANCE 400)로 ¹H NMR 스펙트럼을 측정하였다.

MPEG-PCDA(CDCl₃): 8.12(1H, -NH-CO-), 3.79(2H, -O-CH₂-CH₂-NH-), 3.65-3.55(-O-CH₂-CH₂-(OCH₂CH₂)_n-O-), 3.51-3.48(2H, -CH₂-CH₂-NH-), 3.38-3.30(3H, -CH₃-O-), 2.52-2.49(2H, -NH(C=O)CH₂-CH₂-), 2.25-2.23(4H, -CH₂-CH₂-C≡C-C≡C-CH₂-CH₂-), 1.85-1.71(2H, -(C=O)CH₂-CH₂-CH₂-), 1.50-1.46(4H, -CH₂-CH₂-CH₂-C≡C-C≡C-CH₂-CH₂-CH₂-), 1.45-1.26(26H, -(CH₂-(CH₂)₄-(CH₂)₂-C≡C-C≡C-(CH₂)₂-(CH₂)₉-CH₃), 0.89-0.87(3H, -CH₃-CH₃).

Oligopeptides-PCDA Conjugates 합성. Rink amide MBHA 수지(100 mg)이 합성에 사용되었다. Rink amide MBHA 수지와 아미노산 및 PCDA 리피드를 이용하여 무수 DMF상에서 고체상 펩티드 합성 방법을 통하여 합성되었다. DMF상에서 30% 피페리딘으로 수지의 Fmoc기를 제거한 후에 아르기닌이나 히스티딘을 결합제인 HOBt(4당량), HBTU(4당량)와 촉매제인 DIPEA(8당량) 존재 하에 각각 25 °C에서 16시간 동안 반응시켰다. 그런 후에 수지에 결합된 올리고펩티드에 PCDA를 몰 비율 4배로 처리한 후 DMF상에서 16시간 반응시켰다. 각각의 과정은 닌히드린 테스트를 통해 확인하였다. 반응이 끝난 후, 수지를 DMF로 세척하고 메탄올을 처리한 후에 수지상의 올리고펩티드 잔기의 보호기 제거와 올리고펩티드를 수지로부터 분리하기 위하여 TFA, TIS와 증류수(TFA:TIS:DW=95:2.5:2.5)의 혼합물을 처리해 주었다. 최종 생성물은 에틸에테르로 3회 세척하고 질소가스로 남은 에틸에테르를 제거한 후에 증류수에 녹여 동결 건조하여 얻었다(Figure 1). 이들 합성물은 ¹H NMR 스펙트럼을 통해 확인하였다(Figure 2).

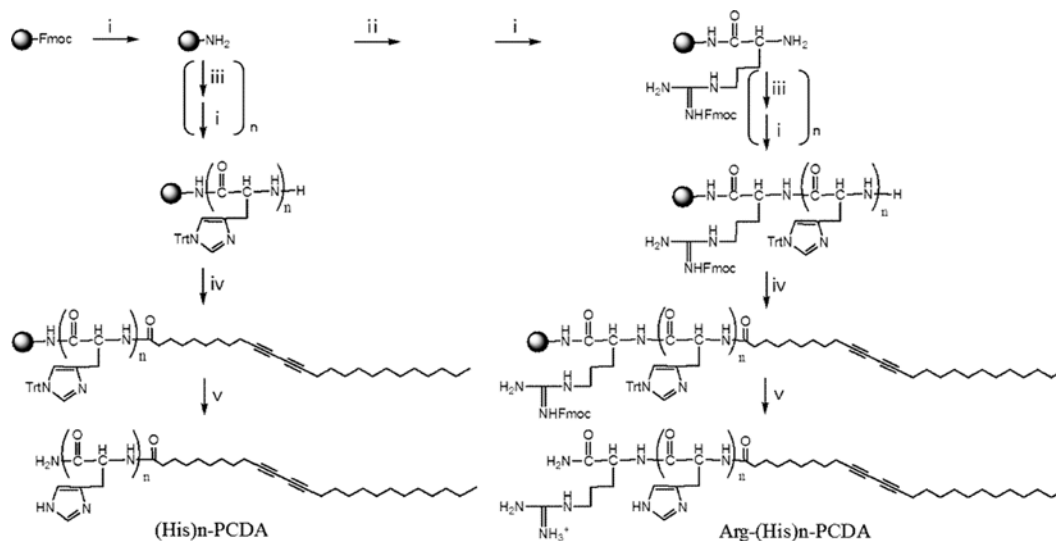


Figure 1. Synthesis scheme of oligopeptides-conjugated PCDA lipids: (i) 30% piperidine; (ii) Fmoc-Arg(Pbf)-OH, HOBT, HBTU, DIPEA; (iii) Fmoc-His(Trt)-OH, HOBT, HBTU, DIPEA; (iv) PCDA, HOBT, HBTU, DIPEA; (v) TFA/TIS/D.W (95:2.5:2.5).

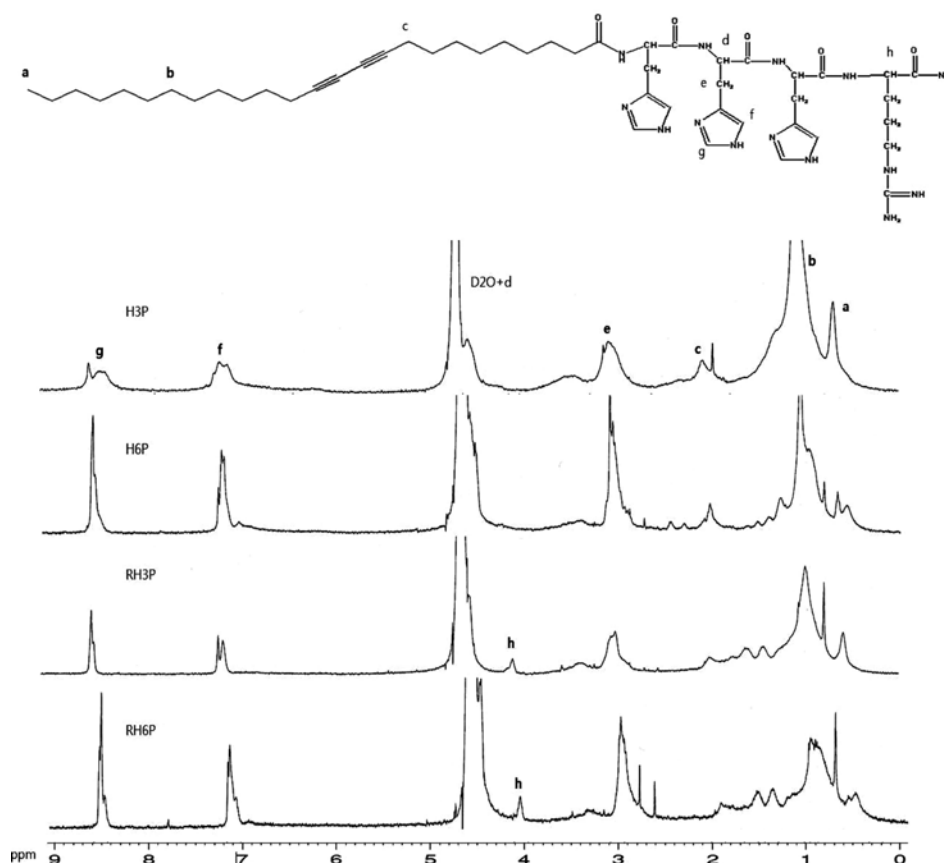


Figure 2. ^1H NMR spectra of oligopeptides-conjugated PCDA lipids.

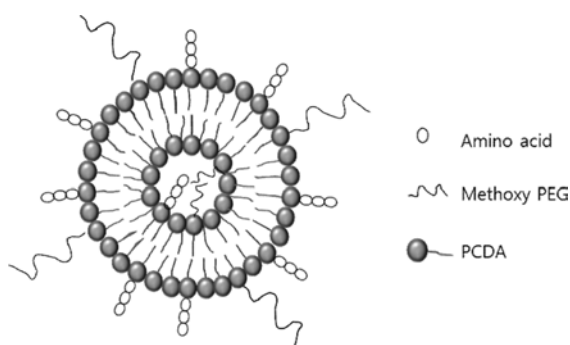
리포솜 제조. PCDA 리포솜의 물에 대한 용해성을 높이기 위하여 MPEG-PCDA를 섞어 리포솜을 제조하였다. 가루 형태의 MPEG-PCDA, 올리고펩티드-PCDA, 그리고 PCDA 리

피드를 다양한 물 비율(1:1:98, 1:5:94, 1:10:89, 1:50:49)로 유기용매인 클로로포름에 녹이고 질소가스로 유기용매를 날려 주었다. 1 mM에 맞추어 증류수를 더하고, 80 °C 항온조에서

Table 1. Preparation of Various Liposomes

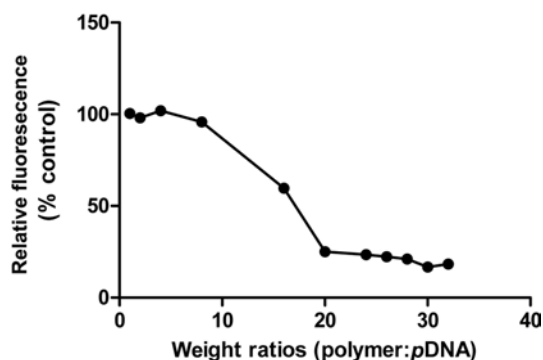
Sample preparation	Abbreviation
1 mol% His3-PCDA liposome	1H3P
5 mol% His3-PCDA liposome	5H3P
10 mol% His3-PCDA liposome	10H3P
50 mol% His3-PCDA liposome	50H3P
1 mol% Arg-His3-PCDA liposome	1RH3P
5 mol% Arg-His3-PCDA liposome	5RH3P
10 mol% Arg-His3-PCDA liposome	10RH3P
50 mol% Arg-His3-PCDA liposome	50RH3P
1 mol% His6-PCDA liposome	1H6P
5 mol% His6-PCDA liposome	5H6P
10 mol% His6-PCDA liposome	10H6P
50 mol% His6-PCDA liposome	50H6P
1 mol% Arg-His6-PCDA liposome	1RH6P
5 mol% Arg-His6-PCDA liposome	5RH6P
10 mol% Arg-His6-PCDA liposome	10RH6P
50 mol% Arg-His6-PCDA liposome	50RH6P

MPEG-PCDA:Oligopeptide-PCDA:PCDA=1:x:y, 1+x+y=100%.


Figure 3. Schematic presentation of oligopeptides-PCDA liposome.

15분 동안 열을 가한 후에 50 °C에서 15분간 음파처리 방법으로 리포솜을 제조하였다. 음파처리 직후 0.8 μ m 시린지 필터로 여과하고 4 °C에서 12시간 이상 보관한다. 리포솜 용액의 중합반응은 UV 반응기(RMR-600, 254 nm) 안에서 1분 동안 실온에서 UV를 조사함으로써 이루어진다. 제조된 각각의 다양한 성분의 리포솜의 약자는 Table 1에 제시하였으며, 제조된 리포솜의 예상되는 구조는 Figure 3에 나타내었다.

Lipoplex 형성 확인을 위한 Picogreen Assay. 플라스미드 DNA(1.0 μ g)와 리포솜의 결합 비율을 알아 보기 위하여 picogreen assay를 수행하였다. HEPES 완충용액(25 mM HEPES, pH 7.4)에 플라스미드 DNA(1.0 μ g)와 리포솜을 다양한 질량비별로 섞어서 실온에서 30분 동안 반응시켰다. 2분 동안 반응시키기 전, TE buffer(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5)로 희석된 picogreen 시약을 넣어 준 후에, 형광 분광계(JASCO FP-750)를 통하여 형광 감도를 측정하였다. Excitation(λ_{ex})과 emission(λ_{em})의 파장은 480 및 520 nm로 각각 고정시켜 측정하였다(Figure 4).


Figure 4. Picogreen reagent assay for 50RH3P liposomes with plasmid DNA.

리포솜 크기와 표면전하 측정. 플라스미드 DNA와의 결합 전후의 평균 리포솜 크기와 표면전하는 입자분석계(ELS-Z series, Otsuka, Japan)를 사용하여 측정하였다. 리포솜과 플라스미드 DNA는 20:1의 질량비로 섞어 30분 동안 반응시킨 후에 증류수로 최종 1 mL을 만든 후에 측정하였다. 측정은 각각 세 번씩 하였고 평균크기와 표준오차를 함께 표시하였다.

세포 배양. Human embryonic kidney 293(HEK 293) 세포는 10% FBS와 1% 항생제가 포함된 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM)으로 배양하였다. 배양환경은 37 °C, 5% 이산화탄소, 95% 습기로 유지하였다.

In Vitro Transfection. 제조된 리포솜의 유전자 전달 효율을 확인하기 위하여 lipoplex를 HEK 293 세포에 트랜스펙션하였다. 우선 96-well microplate(falcon)에 well당 1.5만 마리의 세포를 키워 16시간 후에 리포솜을 플라스미드 DNA와 질량비 20:1로 30분 동안 결합시킨 후 주입하였다. 대조군으로는 PEI 25 KD과 PAMAM G4를 사용하였다. PEI 25 KD은 질량비 2:1, PAMAM G4는 질량비 4:1로 플라스미드 DNA와 30분동안 결합시켰다. 그리고 24시간 후 reporter lysis buffer(promega)로 용해시키고 루시페라아제 정량과 단백질 정량을 수행하여 세포로의 외부 유전자의 전달 및 발현 효율을 측정하였다. 발현된 루시페라아제 효소의 활성도는 LB 9507 광도계(Berthold, Germany)를 사용하여 측정하였고, 단백질 정량은 마이크로 BCA 단백질 정량 키트(Pierce, Rockford, IL)와 함께 VERSAmax microplate 분광계(VERSAmax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 사용하여 측정하였다.

독성 확인 실험. 리포솜의 세포내 독성을 확인하기 위하여 WST-1 assay를 수행하였다. HEK 293 세포를 96-well microplate(Falcon)에 well당 1.5만 마리씩 키워 16시간이 지난 후에 리포솜과 대조군인 PEI 25 KD, PAMAM G4, 50H3P를 100 μ g/mL 농도로 제조한 후에 세포에 주입하였다. 24시간 후에 WST-1 시약(Daeil Lab Service, Seoul, South Korea)을 10 μ L씩 넣은 후 2시간 뒤에 VERSAmax microplate 분광계(VERSAmax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 이용하

여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

형광 현미경 이미지. 비표지 형광 리포솜으로서의 응용 가능성을 확인하기 위해 플라스미드 DNA와 아미노산이 도입된 50RH3P 리포솜의 복합체를 세포로 도입 후 형광 현미경을 통해 관찰하였다. 리포솜의 형광 성질을 나타내기 위해 복합체를 형성하기 전에 100 °C에서 1분간 열을 가하였다. 상온으로 식힌 후 DNA와 복합체를 형성한 후 세포에 처리하여 16시간 배양하고 TRICT 필터로 형광을 관찰하였다.

결과 및 토론

리포솜의 중합반응. 다양한 물비율로 제조된 양이온성 아미노산이 도입된 리포솜들에 254 nm 파장의 UV를 조사해주면 무색의 리포솜 용액이 푸른색으로 변하는 것을 확인할 수 있다. 용액의 색이 변하는 정도는 Figure 5에 나타난 것처럼 제조된 리포솜을 구성하는 리피드의 함유량에 따라 조금씩 차이를 확인하였다.

DLS를 통한 리포솜의 특징 확인 및 크기 측정. 올리고펩티드를 도입한 올리고펩티드-PCDA 리피드는 표면이 양전하를 띠기 때문에 음전하인 플라스미드 DNA와 정전기적으로 결합하게 된다. Picogreen assay 결과에서, 50RH3P는 플라스미드 DNA와 20:1 질량비 이상에서 효과적으로 결합하는 것을 확인하였다. 리포솜과 플라스미드 DNA와의 결합 전후에 입자의 평균 크기는 동적광산란법을 통해서 측정하였으며, 표면전하는 입자분석기를 통하여 측정되었다. Table 2에 나타난 것처럼 아미노산이 도입된 리포솜의 표면전하는 양전하를

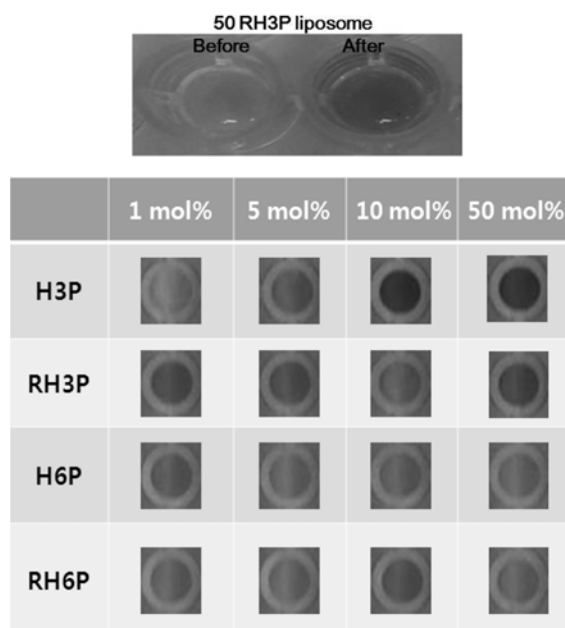


Figure 5. Visible color changes by UV irradiation.

Table 2. Dynamic Light Scattering and Zeta Potential Data of Liposomes

Zeta potential (mV)				
50H3P	50RH3P	50H6P	50RH6P	
46.13±0.09	48.26±2.58	45.87±1.94	46.49±1.25	
Zeta potential (mV) Mean diameter (nm)				
Before		After		
50RH3P	48.26±2.58	31.92±21.18	242.8±25.01	203±3.80
Liposome				

나타내며, 특히 50RH3P의 경우 UV 조사 후 플라스미드 DNA와의 결합 시에 200 nm 크기를 보여 세포내로 유전자 전달이 용이함을 보여주었다. 50 몰%의 리포솜만 비교를 하였을 때 모두 양전하를 띠는 것으로 확인되었다. 또한 대부분의 리포솜은 100~200 nm 정도의 입자 크기가 측정되었다.

유전자 전달 효율 평가. 리포솜과 플라스미드 DNA를 20:1의 질량비로 결합시켜 배양 중인 세포로 처리하였다. PEI 25 KD과 PAMAM G4를 양성 대조군으로 사용하였다. HEK 293 세포주에 트랜스펙션한 결과, 50RH3P의 유전자 발현 효율이 상당히 높은 것을 확인하였고, 양성대조군인 PEI 25 KD보다는 조금 낮지만 PAMAM G4덴드리머보다는 높은 수준의 유전자 발현 효과를 보이는 것을 확인하였다(Figure 6).

세포 독성. 세포에 처리된 고분자가 독성을 띠게 되면 유전자치료를 있어서 한계를 가지게 된다. 널리 알려진 트랜스펙션 물질인 PEI 25 KD은 유전자 전달효율은 높지만 독성이 강하다는 단점이 있다. 제조된 리포솜의 세포 독성 유무를 확인하기 위하여 WST-1 assay를 수행하였다. 그 결과, PEI 25 KD을 제외한 나머지 리포솜들은 실험이 수행된 농도에서 낮은 독성을 보임을 확인하였다(Figure 7).

리포솜의 형광 특성. *In vitro* 상에서 비표지 PCDA 리포솜의 형광 발색 효율을 확인하기 위하여, 100 °C에서 50RH3P

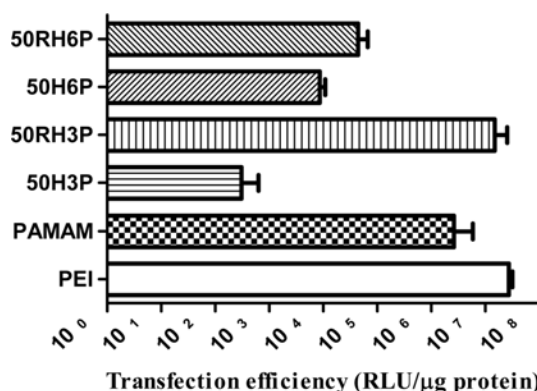


Figure 6. *In vitro* transfection efficiency data on HEK 293 cell line.

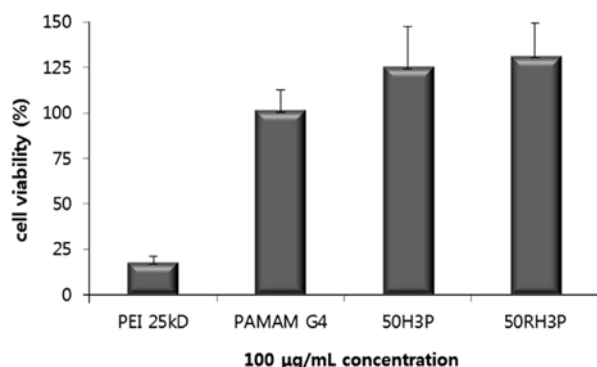


Figure 7. Cytotoxicity of amino acid-PCDA liposomes and control polymers complexed with the plasmid DNA on HEK 293 cell line.

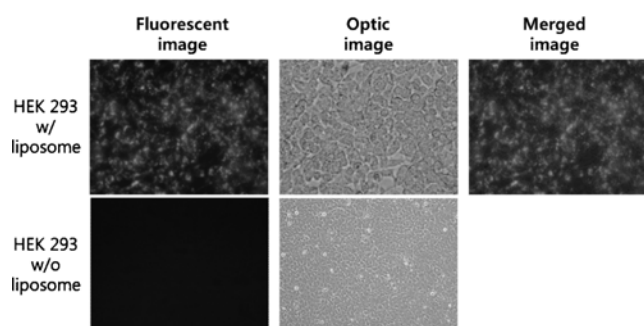


Figure 8. Fluorescence microscopic images of HEK 293 cells treated with the lipoplexes.

를 약 1분간 가열하여 붉은 색으로 전이시킨 다음 상온에서 열을 식힌 후, 플라스미드 DNA와 결합시켜 lipoplex를 제조하여 HEK 293 세포주에 주입시켰다. Figure 8에서 보여지는 결과와 같이 TRICT 필터를 통하여 리포솜의 세포 연관 효율을 관찰하였다. 결과로부터, 아미노산이 도입된 PCDA 리포솜의 세포안으로의 유전자 전달 효율을 확인하였고, 비표지 PCDA 리포솜이 유전자 전달 경로에서 비표지 전달체를 탐지하는데 사용될 수 있는 가능성을 보여주었다.

결 론

고체상 펩티드 합성 방법을 이용하여 폴리디아세틸렌 리피드의 소수성 작용기 부분에 아르기닌과 히스티딘을 도입하여 폴리디아세틸렌을 기초로 한 양이온성 리피드를 합성하였다. 음파처리 방법을 통하여 다양한 몰비율로 리포솜을 제조하였고 플라스미드 DNA와 반응시켜 HEK 293 세포주에 처리하여 유전자 전달 및 발현효율 정도를 규명하였다. 결과적으로, 50 몰% Arg-His3-PCDA(50RH3P) 리포솜이 매우 높은 수준의 유전자 전달 및 발현 효율을 보였다. 이러한 결과는 히스티딘에 의한 양성자 완충 효과의 증가에 의한 것으로 추측한다. 우리는 양이온성 리피드를 이용하여 제조된 리포솜을 UV

조사 후 가열하여 붉은색으로 전이시킨 후 동물세포주에 같이 처리하여 리포솜의 형광 발색을 관찰하였다. 이런 결과로써 제조된 리포솜을 이용하여 특별한 추가적인 외부 형광물질의 표지 없이 세포 안 내부로의 유전자 전달이나 약물 전달 연구에 응용될 수 있을 것으로 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글: 이 연구는 2011년도 충남대학교 학술연구비에 의해 지원되었음.

참 고 문 헌

1. D. H. Charych, J. O. Nagy, W. Spevak, and M. D. Bednarski, *Science*, **261**, 585 (1993).
2. Q. Huo, K. C. Russell, and R. M. Leblanc, *Langmuir*, **15**, 3972 (1999).
3. J. M. Kim, J. S. Lee, H. Choi, D. Sohn, and D. J. Ahn, *Macromolecules*, **38**, 9366 (2005).
4. S. Okada, S. Peng, W. Spevak, and D. Charych, *Acc. Chem. Res.*, **31**, 229 (1998).
5. H. Ringsdorf, B. Schlarb, and J. Venzmer, *Ang. Chem. Int. Ed.*, **27**, 113 (1988).
6. A. Sarkar, S. Okada, K. Komatsu, H. Nakanishi, and H. Matsuda, *Macromolecules*, **31**, 5624 (1998).
7. R. W. Carpick, D. Y. Sasaki, M. S. Marcus, M. A. Eriksson, and A. R. Burns, *J. Phys.-Condens. Mat.*, **16**, R679 (2004).
8. S. W. Lee, C. D. Kang, D. H. Yang, J. S. Lee, J. M. Kim, D. J. Ahn, and S. J. Sim, *Adv. Func. Mater.*, **17**, 2038 (2007).
9. J. Yoon, S. K. Chae, and J. M. Kim, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 3038 (2007).
10. Z. Z. Yuan, C. W. Lee, and S. H. Lee, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 4197 (2004).
11. R. G. Crystal, *Science*, **270**, 404 (1995).
12. T. Fujita, M. Furuhashi, Y. Hattori, H. Kawakami, K. Toma, and Y. Maitani, *J. Contr. Rel.*, **129**, 124 (2008).
13. M. Johnson-Saliba and D. A. Jans, *Curr. Drug Targets*, **2**, 371 (2001).
14. S. Y. Wong, J. M. Pelet, and D. Putnam, *Prog. Polym. Sci.*, **32**, 799 (2007).
15. J. S. Choi, E. J. Lee, H. S. Jang, and J. S. Park, *J. Biochem. Mol. Biol.*, **33**, 476 (2000).
16. M. Furuhashi, H. Kawakami, K. Toma, Y. Hattori, and Y. Maitani, *Int. J. Pharm.*, **316**, 109 (2006).
17. M. Morille, C. Passirani, A. Vonnarbourg, A. Clavreul, and J. P. Benoit, *Biomaterials*, **29**, 3477 (2008).
18. R. C. Mulligan, *Science*, **260**, 926 (1993).
19. D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, and R. Langer, *Nature Nanotech.*, **2**, 751 (2007).
20. S. K. Kwon, S. W. Kim, and Y. J. Kim, *Polymer(Korea)*, **34**, 501 (2010).
21. S. K. Kwon, K. H. Jeong, and Y. J. Kim, *Polymer(Korea)*, **33**, 213 (2009).
22. J. S. Choi, K. Nam, J. Y. Park, J. K. Lee, and J. S. Park, *J. Contr. Rel.*, **99**, 445 (2004).
23. G. S. Yu, Y. M. Bae, H. Choi, B. Kong, I. S. Choi, and J. S. Choi, *Bioconj. Chem.*, **22**, 1046 (2011).