

생체조직공학용 수화젤

배민수 · 박홍현 · 이동욱 · 이근용

1. 서론

생체조직공학(tissue engineering)은 질병 또는 사고로 인하여 생체조직이나 장기의 손상을 입은 환자들에게 인공(man-made)의 생체조직이나 장기를 공급할 수 있는 흥미로운 치료방법이다.^{1,2} 이 방법에 따르면 생체조직과 장기들은 일반적으로 환자 자신의 세포와 고분자 지지체(scaffold)의 사용으로 재생 또는 대체될 수 있다. 간단하게 설명하자면 생체조직의 일부만 채워진 후 이 중 필요한 세포만 분리 및 배양을 통하여 필요한 수의 세포를 확보한다. 이 세포들은 3차원 구조의 다공성 고분자 지지체와 함께 bioreactor에서 생체조직으로 성장된 후 외과적 수술을 통한 이식 또는 주사기 등을 사용한 방법으로 환자에게 다시 이식된다(그림 1).³ 이 방법에서 사용되는 고분자 지지체는 체내 조직의 세포외기질(extracellular matrix)의 많은 역할을 모방하게 된다. 즉 고분자 지지체는 부착, 증식, 분화 등과 같은 세포의 역할과 기능, 재생될 생체조직의 구조 및 수용성 인자와 영양분 그리고 대사산물들의 확산 등의 조절을 가능하게 한다.^{4,5} 현재 생체조직공학 기법에 의하여 파

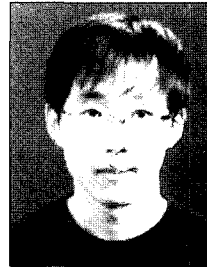
부와 연골은 상용화되어 있고, 그 외 동맥, 방광, 그리고 뼈를 포함하는 많은 생체조직들은 동물실험 또는 임상실험 단계에 있다.⁶

최근에 생체조직 재생용 지지체로 수화젤이 많은 관심을 받는 이유는 생체 내의 거대분자로 이루어진 구조물의 대부분이 수화되어 있고, 수화젤은 주사기 등을 사용하여 비교적 작은 상처만 남기고 생체에 주입될 수 있기 때문이다. 이러한 수화젤의 사용은 외과적 수술방법을 피할 수 있기 때문에 환자의 회복기간, 고통, 비용 등을 감소시킬 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 수화젤 단독으로는 하중이 많이 작용하는 곳에는 사용할 수 없는 단점이 있다.

생체조직 공학에 있어서 매우 중요한 요소 중의 하나는 세포와 고분자 지지체 사이의 상호작용을 조절하는 것이다. 그 상호작용은 생물학적인 상호작용(예: 수용체-리간드 상호작용), 고분자 지지체의 물리적인 특성(예: 기계적 물성과 분해속도), 그리고 지지체로부터의 수용성 인자(예: 성장인자, DNA)의 방출속도를 제어함으로써 조절될 수 있다. 이 모든 신호들을 적절하게 조절하여 세포의 유전자 발현을 제어함으로써, 필요한 기능을 갖추고 임상적으로 성공적인 생체조직을 생성시킬 수 있다(그림 2).



배민수
2004 대구대학교(공학사)
2005~ 한양대학교 공과대학 생명공학과
현재 (석사과정)



이동욱
2006 한양대학교(이학사)
2006~ 한양대학교 공과대학 생명공학과
현재 (석사과정)



박홍현
2006 한양대학교(공학사)
2006~ 한양대학교 공과대학 생명공학과
현재 (석사과정)



이근용
1992 서울대학교(공학사)
1994 서울대학교(공학석사)
1998 서울대학교(공학박사)
1998~ University of Michigan(박사후 연구원)
2001~ University of Michigan(연구교수)
2004 한양대학교 공과대학 생명공학과
현재 조교수

Hydrogels for Tissue Engineering

한양대학교 공과대학 생명공학과(Min Su Bae, Honghyun Park, Dong-wook Lee, and Kuen Yong Lee, Department of Bioengineering, Hanyang University, 17, Haengdang-dong, Seongdong-gu, Seoul 133-791, Korea) e-mail: leeky@hanyang.ac.kr

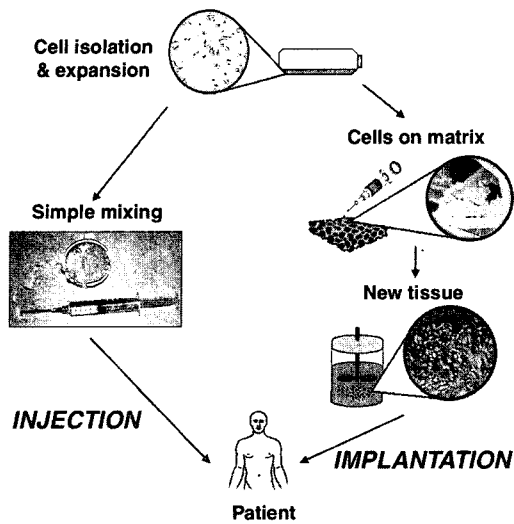


그림 1. 생체조직공학의 기본 개념.

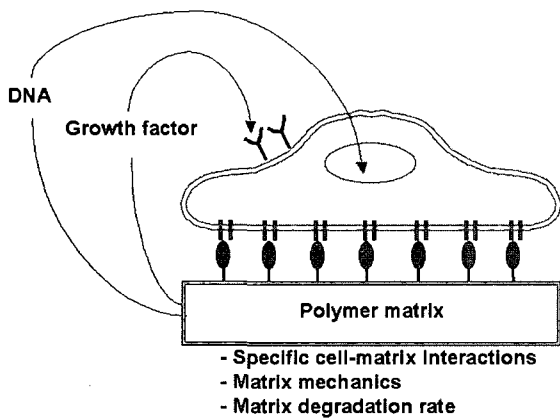


그림 2. 세포-고분자 지지체 상호작용 제어.

현재까지 많은 천연 및 합성 고분자들이 생체조직공학을 위하여 연구되어 왔으나, 어떤 고분자도 생체조직을 재생하는데 있어서 이상적으로 사용될 수 있다고 알려진 것은 없다. 따라서 이 특집에서는 생체조직공학을 위하여 사용될 수 있는 천연 및 합성 고분자 중에서 수화젤을 형성할 수 있는 고분자재료의 종류 및 생체조직재생을 위한 세포친화적인 수화젤의 설계요소에 대하여 설명한다.

2. 수화젤 생성 고분자

2.1 천연 고분자

2.1.1 콜라겐과 젤라틴

콜라겐(collagen)은 가장 널리 쓰이는 생체조직공학용 천연 고분자이며 동물의 피부, 뼈, 연골, 힘줄, 인대 등의 중요한 구성성분이다. 콜라겐은 생체조직을 재생시키는 지지체로서 많이 이용되고 있는데, 특히 인공피부를 만드는데 자주 사용되고 있다. 콜라겐은 기계적 물성이 매우 제한되어 있기 때문에 glutaraldehyde 또는 diphenylphosphoryl azide를 사용한 화학적 가교를 통하여 물리적 성질을 향상시킨다. 그러나 여전히 낮은 기계적 강도와 잠재적인 면역반응, 높은 가격이 단점이 되고 있다.⁷

젤라틴(gelatin)은 콜라겐의 삼중나선(triple-helix) 구조를 변형시킨 단일나선(single-helix) 형태의 천연 고분자이다. 젤라틴은 처리방법에 따라 젤라틴 A와 젤라틴 B의 두 가지 형태로 분류된다. 젤라틴 A는 산치리에 의하여 젤라틴 B는 염기치리에 의하여 제조된다. 젤라틴은 생체적합성과 가공의 용이성으로 인해 생체조직공학에 많이 이용되고 있다. 또한 젤라틴 수화젤은 성장인자의 전달이 용이해 생체조직재생에 많은 장점이 있다. 그러나 젤라틴 수화젤 역시 기계적 강도가 약하다는 문제점이 있다.^{8,9}

2.1.2 피브린

피브린(fibrin)은 주로 봉합제, 수술용 접착제 등으로 사용되어져 왔다. 피브린 젤은 환자 자신의 피에서 얻을 수 있고, 이를 이용한 자가치료(autologous) 용 생체조직공학용 지지체로 사용되고 있다. 피브린 젤은 체내에서 독성이 없고, 면역반응이 거의 없다고 알려져 왔다. 피브린은 상온에서 트롬빈(thrombin)의 존재 하에 피브리노겐(fibrinogen)의 효소적 중합반응에 의해 젤을 형성한다.¹⁰ 피브린은 생분해성과 세포 이동의 효소활성 등의 흥미로운 특성을 가지고 있다. 생분해 속도는 apronitin, 단백질 분해억제제 등의 사용으로 조절할 수 있다.¹¹ 피브린 젤은 골격근육세포(skeletal muscle cells), 평활근세포(smooth muscle cells), 그리고 연골세포(chondrocytes) 등과 함께 생체조직을 재생하는데 사용되고 있다. 그러나 피브린 젤 역시 제한된 범위의 기계적 강도를 가지고 있는 단점이 있다.

2.1.3 알긴산

알긴산(alginic acid)은 미역, 다시마와 같은 갈조류에서 추출되고, 생체조직공학과 약물전달에 널리 이용되는 천연 고분자이다(그림 3). 알긴산은 생체적합성이 뛰어나고 독성이 낮으며 가격이 싼 장점이 있다. 그리고 2가 양이온(예: Ca^{2+})과 결합하여 수화젤을 비교적 쉽게 생성한다.¹³ 알긴산은 세포전달용 운반체,¹⁴ 치과용 재료^{15,16} 및 연골세포,¹⁷ 간세포,¹⁸ 췌장세포¹⁹ 이식에도 사용되어 왔다. 한편 알긴산 수화젤로부터 2가 양이온이 방출되면 수화젤의 특성이 유지될 수 없기 때문에 다양한 형태의 공유결합을 통하여 수화젤의 기계적 강도와 팽윤도를 조절하려는 연구가 진행되어 왔다.¹⁹

생체조직공학에 있어서 알긴산 수화젤은 높은 친수성 및 낮은 세포친화성 때문에 세포와의 상호작용이 매우 제한적인 단점을 가지고 있다. 즉 알긴산 수화젤은 친수성이 높기 때문에 단백질의 흡착이 방해되고, 이로 인해 동물세포와의 직접적인 상호작용이 제한될 수밖에 없다.²⁰ 그러나 알긴산에 세포부착 리간드인 RGD (arginine-glycine-aspartic acid) 펩티드를 결합시켜 세포의 증식 및 분화를 향상시킬 수 있다(그림 4).²¹

2.1.4 키토산

키토산(chitosan)은 의료용으로 자주 사용되는 고분자로서, 생

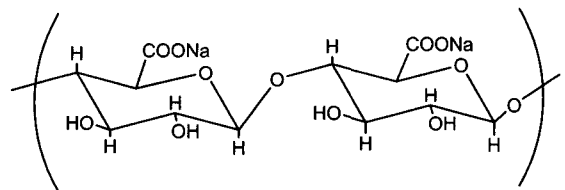


그림 3. 알긴산의 화학구조.

체적합성이 뛰어나고 독성이 낮으며 chitosanase나 lysozyme과 같은 효소에 의해 분해가 쉬운 특징이 있다(그림 5).²² 키토산은 일반적으로 유기용매에 잘 녹지 않고 결정화되는 성질이 있으므로 용해도를 높이는 다양한 방법이 보고되었다.^{23,24} 키토산은 이온²⁵ 또는 화학적 가교(예: glutaraldehyde)에²⁶ 의해 수화젤을 형성한다. 키토산의 azide 유도체는 UV에 의해 광가교(photo-cross-linking)가 되면서 수화젤을 형성한다.²⁷

2.1.5 히알루론산

히알루론산은 세포외기질에 있는 glycosaminoglycan의 구성 성분 중 하나이다(그림 6). 히알루론산은 세포와 혈청이 있는 상태에서 hyaluronidase에 의해 분해가 된다.²⁸ 히알루론산은 인공피부,²⁹ 안면 피하이식,³⁰ 연조직 대체물로³¹ 자주 사용되어 왔다.

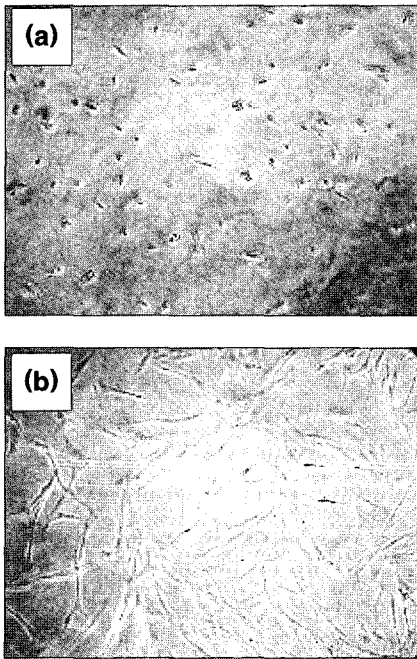


그림 4. (a) RGD 펩티드가 결합되지 않은 알긴산 수화젤 또는 (b) RGD 펩티드가 결합된 알긴산 수화젤 위에서 섬유모세포의 부착.

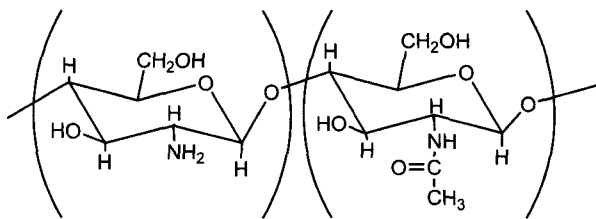


그림 5. 키토산의 화학구조.

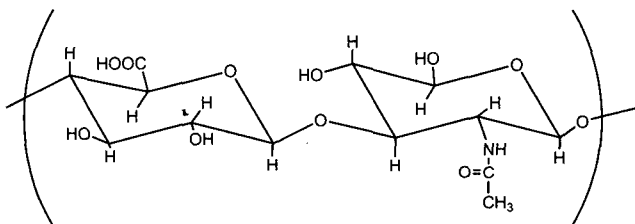


그림 6. 히알루론산의 화학구조.

그러나 체내에서의 면역반응과 기계적 강도가 약하다는 단점을 가지고 있어 제한적으로 사용되어지고 있다. 히알루론산은 공유결합을 통하여 다양한 물성을 가진 수화젤을 형성할 수 있다.^{32,33}

2.2. 합성 고분자

2.2.1. Poly(acrylic acid)와 그 유도체

현재까지 가장 많이 연구된 합성 수화젤 중 하나는 가수분해에 안정한 가교된 poly(2-hydroxyethylmethacrylate) (HEMA)이다.³⁴ Poly(HEMA)는 약물전달체³⁵ 뿐만 아니라 콘택트렌즈를³⁶ 포함하여 안과적으로 자주 사용되었다. 반복 동결/해동법 또는 미립자 침출 기술에 의하여 연골재생을 위한 미세 다공성 수화젤이 제조되기도 하였다.³⁷ 또한 다양한 유형의 분자와 세포를 함유하는 poly(HEMA) 캡슐도 제조가 가능하고, 이는 우리 인체 내부로의 인슐린 또는 다른 단백질 전달에 성공적인 것으로 보고되었다.³⁸ poly(HEMA) 수화젤은 생리적인 조건에서 분해가 되지 않는데 효소분해성이 있는 덱스트란 유도체의 합성도 보고되었다.³⁹ 한편 oligo(L-lactide)와 oligo(D-lactide) 이성질체를 poly(HEMA)에 가지중합 하였고, 그 결과 가교제 없이 입체착화합물(stereo-complex) 형성에 의하여 수화젤을 형성할 수 있었다.⁴⁰

Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm)은 저임계 용해온도(LCST)를 나타내며 그보다 높은 온도에서 상변화 거동을 보인다. 수용액에서 PNIPAAm의 LCST는 대략 32 °C이며 공중합을 통해 체온에 근접하게 조절할 수 있다.⁴¹ 실온 또는 더 낮은 온도에서 세포와 PNIPAAm 및 공중합체의 혼합용액을 준비하여 이를 생체의 일정 부분에 주사할 수 있고, 이것은 체온에서 수화젤을 형성하기 때문에 생체조직공학에 있어서 매우 유용할 수 있다. 한편 기존의 일반적인 세포회수는 세포배양 후 효소처리(예: 트립신)에 의하여 배양접시로부터 회수되었지만, PNIPAAm 위에서 배양된 세포 단일막은 간단하게 온도를 감소시키고 젤의 친수성을 변화시킴으로써 손상없이 완전하고 쉽게 회수될 수 있다.⁴² 또한 이러한 고분자 재료들은 연골과 뼈조직 재생용 지지체로도 연구되어 왔다.⁴³

2.2.2 Poly(ethylene oxide)와 공중합체

Poly(ethylene oxide) (PEO)는 생체적합성과 낮은 독성 때문에 여러 의료분야 응용에 있어서 미국 FDA의 승인을 받았다. PEO 수화젤은 α -hydroxy acid의 존재 하에서 각 acrylate 말단을 가진 PEO로 이루어진 물질의 UV 광중합에 의해 합성될 수 있다.⁴⁴ Cinnamylidene acetyl기를 펜던트로 가지는 PEO는 광중합에 의한 수화젤을 생성하고 이는 뛰어난 항혈전성이 있음이 보고되었다.⁴⁵ 별모양 PEO도 광조사에 의한 가교를 통하여 수화젤을 형성하며, 간세포와의 상호작용을 증가시키기 위해 galactose를 결합시키기도 하였다.⁴⁶

다양한 PEO 공중합체는 특히 약물전달에 광범위하게 응용되었다.⁴⁷⁻⁴⁹ 한 가지 흥미로운 공중합체는 Pluronic 또는 Poloxamers라는 상표명으로 잘 알려진 PEO와 poly(propylene oxide) (PPO)의 공중합체(예: PEO-*b*-PPO-*b*-PEO)인데, 다양한 길이와 조성으로 상업적으로 이용되고 있다. 이러한 고분자는 영구적인 가교없이 열가역적 젤을 형성한다. 현재 생체조직공학 분야에 이러한 수화젤의 이용이 많이 보고되지는 않았지만⁵⁰ 이 분야에 많은 응용을 기대할 수 있을 것이다.

PEO-PPO-PEO 블록 공중합체가 온도변화에 응답하여 수용액 상에서 수화젤을 형성하지만 의료용으로 사용되기 위해서는 생분

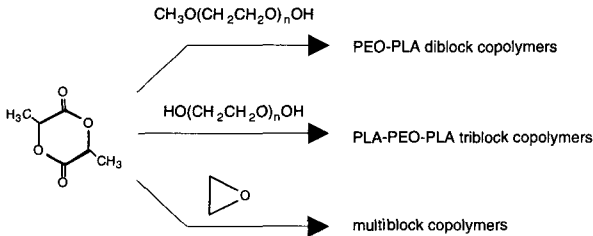


그림 7. Poly(ethylene oxide)-poly(lactic acid) (PEO-PLA) 블록 공중합체 합성.

해성의 문제가 수반된다. 따라서 생분해가 잘 알려지고 이미 많은 의료용 분야에서 안전하다고 입증된 poly(lactic acid) (PLA)와 PEO의 다양한 공중합체가 합성되었다(그림 7).⁵¹ 이 공중합체들은 체온 근처에서 열가역적 솔-젤 변화를 보였다.⁵² 이와 같은 수화젤은 상온 또는 그보다 더 낮은 온도에서 단백질 약물 또는 세포를 쉽게 포함시킬 수 있기 때문에 생체조직공학에 유용할 것으로 생각되어 많은 연구가 진행되어 왔다.

2.2.3 Poly(vinyl alcohol)

Poly(vinyl alcohol) (PVA)은 일반적으로 poly(vinyl acetate) (PVAc)의 가수분해로부터 얻을 수 있다.⁵³ PVA의 친수성과 용해성은 가수분해와 분자량의 정도에 의해 쉽게 조절될 수 있다. PVA는 glutaraldehyde 또는 epichlorohydrin을 사용한 화학적 가교를 통해 수화젤을 형성한다. 화학적 가교제의 독성과 유출문제를 피하기 위한 반복 동결/해동법⁵⁴ 또는 전자빔 조사법⁵⁵ PVA 수화젤 형성을 위해 사용되었다. 반복 동결/해동법에 의해 형성된 젤은 상온에서 안정하며 높은 탄성을 가진다.⁵⁴ 그러나 이 방법은 체내에서 수화젤을 형성하기에는 적합하지 않고 PVA는 대부분의 생리적 조건에서 분해되지 않는다. 그러므로 이러한 젤은 영구적 지지체로서 유용하고, 인공연골,⁵⁶ 인공혈장,⁵⁷ 뼈와 유사한 인회석 형성⁵⁸ 등의 생체조직 공학적인 응용에 이용되었다.

2.2.4 Polyphosphazene

Polyphosphazene은 생리적 조건에서 분해되기 때문에 의료용 재료로 많은 관심을 받아왔다. 생분해 속도는 지방족 polyester, polyanhydride 또는 poly(ortho ester)와는 다르게 고분자의 주사슬 보다는 결사슬의 변화에 의해 조절된다.⁵⁹ 유기 고분자인 polyphosphazene은 두 개의 부가그룹을 가진 인과 질소원소로 이루어져 있고, 합성을 위하여 poly(dichlorophosphazene)을 중간물질로 사용한다(그림 8).

Polyphosphazene은 비이온성 또는 이온성 두 가지 형태의 수화젤 제조가 가능하다. 비이온성 polyphosphazene 수화젤은 glucosyl 또는 glyceryl 양쪽 작용기를 포함하는 물에 녹는 polyphosphazene으로부터 제조된다.⁶⁰ 2가 이온 또는 ⁶⁰Co 감마 조사로 형성된 이온성 polyphosphazene 수화젤은 pH 또는 이온강도와 같은 환경변화에 반응하는 특성 때문에 단백질 약물의 전달에 널리 사용되었다.^{61,62} 한편 이러한 고분자는 뼈조직 재생이나⁶³ 잡종세포(hybrid cell)의 캡슐화⁶⁴ 등에 유용하게 사용되었다.

2.2.5 폴리펩티드

단백질은 생체조직의 천연 기질의 주된 구성성분이고, 이를 모방하기 위해 합성한 폴리펩티드(polypeptide)에 많은 관심이 집중되고 있다. 폴리펩티드는 개시 단량체로서 *N*-carboxyanhydride를 사용하여 합성하고, 아미노산의 다양한 조합이 가능하다. 그러나

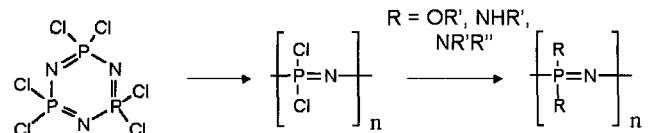


그림 8. Polyphosphazene의 합성.

원하는 아미노산의 배열을 정밀하게 조절하는 것이 매우 어려우며 제조원가가 상대적으로 비싸다. 게다가 대부분의 폴리펩티드는 유기용매에 잘 녹지 않는다. 이와 같은 문제를 해결하기 위하여 유전공학기법을 사용하여 폴리펩티드를 합성하는 방법이 보고되었다. 간단히 말하면, 박테리아의 유전자에 미리 설계된 배열의 DNA 주형을 끼워 넣고, 원하는 구조와 물성을 가진 폴리펩티드를 생산하는 것이다.^{65,66} 이 방법은 탄성, 강도, 생분해 속도, 그리고 세포 간 상호작용을 포함하여 다양한 기능을 가진 폴리펩티드를 설계하고 가공할 수 있다는 장점이 있다. Gly-Ala가 풍부한 배열의 폴리펩티드는 pH 또는 온도변화에 반응하는 가역적인 수화젤을 형성할 수 있고,⁶⁷ Gly-Val-Pro-Gly의 아미노산 배열은 탄력소(elastin)를 모방할 수 있는 폴리펩티드를 제공할 수 있음이 보고되었다.⁶⁸ 그러나 이 기술은 현재의 시점에서 대량생산이 불가능하고, 생산하고자 하는 폴리펩티드의 물성을 변화시키고자 하는 경우 전체의 시스템 구조를 바꾸어야 하는 단점이 있다.

3. 생체조직공학용 수화젤의 설계요소

생체조직공학에서 수화젤은 원하는 기능성과 새로운 생체조직형성을 위한 구조적 기준을 반드시 충족하여야 한다. 이러한 기준은 전통적인 물리적 요소(예: 기계적 물성과 생분해 속도) 뿐만 아니라 생물학적 요소(예: 특이적인 세포 수용체-리간드 상호작용)를 포함한다. 이 장에서는 생체조직재생용 수화젤을 설계 및 제조할 때 요구되는 각각의 요소에 대하여 정리하였다.

3.1 생체적합성

생체적합성(biocompatibility)은 수화젤의 설계 및 제조에 있어서 절대적으로 중요한 요소이다. 생체적합성은 인접 세포에 손상이나 피해를 주지 않고 재료가 체내에 존재하기 위한 능력, 그리고 생체 내에서 사용될 때 적절한 숙주반응(host response)을 수행하기 위한 재료의 능력과 관련이 있다. 물질에 있어 부적절한 생체적합성은 이식되거나 재생된 세포 주위에서 면역반응을 일으킬 수 있고, 고분자에 대한 염증반응과 같은 특이적인 문제를 일으킬 수 있다.^{69,70} 생체적합성은 고분자의 고유의 성질로부터 유래되나, 정제를 통해서도 일부 개선될 수 있다. 일반적으로 천연 고분자들은 적당한 생체적합성이 있는 반면, 합성 고분자는 체내에서 부정적인 반응을 유도한다. 한편 단백질유래 천연 고분자(예: 콜라겐)는 다른 천연 고분자들에 비하여 면역반응을 더욱 유발하는 것으로 알려져 있다.

3.2 젤화 방법

이온 또는 공유결합과 고유한 상변화 거동을 포함하는 다양한 젤화 방법(methods of gelation)을 이용하여 수화젤을 제조할 수 있다. 이온결합을 이용하는 방법은 수화젤을 형성하는 간단한 방법으로 알긴산 수화젤의 경우가 그 대표적인 예이다. 알긴산 수용액에

칼슘이온을 혼합하면 비교적 짧은 시간에 젤이 형성된다. 그러나 가교에 사용된 이온들은 생체 내에 존재하는 다른 이온(예: Na^+)들로 교환될 수도 있고, 그 결과 수화젤의 본래의 물성이 의도하지 않게 저하되는 경우가 발생한다. 공유결합에 의한 경우 이온결합에 의한 방법보다 물성이 더욱 뛰어난 수화젤을 제조할 수 있으나, 공유결합에 사용되는 가교분자의 독성은 반드시 고려되어야 한다. 한편 생분해가 되지 않는 가교형성은 대부분의 생체조직공학적인 응용에 불리할 것이다.

한편 알긴산과 히알루론산은 methacrylate와의 유도체를 형성한 후 광가교에 의하여 수화젤을 생성할 수 있다. 이렇게 만들어진 젤은 부드럽고 유동성이 뛰어난 점탄성의 수화젤을 형성한다. Methacrylate의 치환도에 따라 수화젤의 팽창, 압축 그리고 creep compliance와 같은 물성이 변하게 된다. 광가교에 의한 수화젤은 눈, 귀 그리고 폐와 같이 외과적 수술로 접근하기 어려운 부위에 적합하게 이용될 수 있다.⁷¹

젤화시키는 최근 연구 중의 하나는 특정 고분자용액의 상변화 거동을 이용한 것이다.⁷² 예를 들면 임계온도 근처에서의 매우 작은 온도변화는 특정 고분자 용액의 젤화를 일으키고, 이들은 세포 및 약물전달용 운반체로 관심을 받고 있다. 상업적으로 널리 알려진 PEO-PPO-PEO 블록 공중합체는 온도감응성 고분자의 아주 좋은 예이다. 일정한 농도에서의 PEO-PPO-PEO 블록 공중합체의 온도를 서서히 올리면 젤화가 일어난다.⁷³ 천연 고분자 중에서도 온도변화에 따라 수화젤을 형성시키는 경우가 보고 되어왔다. 젤라틴과 우무(agarose) 등이 대표적인 예이다.

3.3 세포친화성

수화젤과 세포의 친화성은 사용된 세포의 증식, 이동 그리고 분화에 매우 중요한 영향을 미친다. 수화젤에서의 세포의 부착(adhesion)은 세포유형 및 젤 표면에 존재하는 세포부착 분자(예: 리간드)를 인식하는 세포 수용체의 특이적인 상호작용에 의존한다.⁷⁴ 리간드 분자는 재료 고유의 성분이거나 화학적으로 재료에 결합시킬 수도 있다. RGD(arginine-glycine-aspartic acid)와 같은 작은 펩티드 서열은 다양한 세포의 부착에 중요한 역할을 하는 고유한 서열로 알려져 있는데, 이 서열은 세포외기질에 존재하는 단백질(예: 섬유결합소, 라미닌 등)에서 공통적으로 발견된다. 특히 RGD 서열은 세포의 인테그린 수용체와 특이적으로 상호작용을 하는 것이 잘 알려져 있다.⁷⁵ 알긴산 수화젤의 경우 세포친화성이 결여되어 있으므로 RGD 펩티드를 화학적으로 도입하는 방법이 시도되어 왔다. 간략하게 살펴보면, 알긴산 수용액(pH 6.0-7.5, 0.1 M MES buffer)에 수용성 carbodiimide(EDC)와 *N*-hydroxysulfosuccinimide(sulfo-NHS)의 존재 하에 공유결합을 통하여 RGD 펩티드를 결합시킬 수 있다. 이와 같이 RGD 펩티드가 도입된 알긴산 젤을 사용하면 근육세포 및 골모세포의 부착, 증식, 분화정도가 향상됨을 발견하였다(그림 9).^{76,77}

최근의 연구결과에 따르면 알긴산 수화젤에 도입된 리간드의 나노크기의 공간배열이 골모세포의 분화와 성장 속도를 조절하는데 결정적인 역할을 하였다. RGD 펩티드의 공간배열 거리를 78 nm로 부터 36 nm로 감소시켰을 때 골모세포의 성장속도는 $0.59 \pm 0.08 \text{ day}^{-1}$ 에서 $0.73 \pm 0.03 \text{ day}^{-1}$ 로 증가하였고(그림 10), 골모세포 분화의 전형적인 표지물로 쓰이는 오스테오칼신(osteocalcin)의 양이 약 4배 정도 증가하였다.⁷⁸

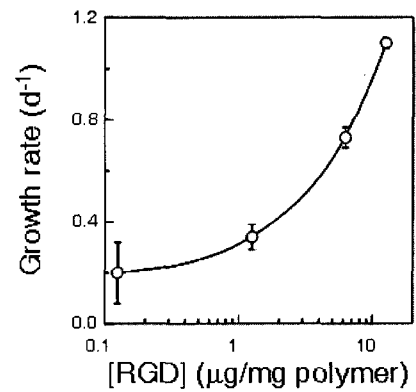


그림 9. RGD 농도에 따른 골모세포의 성장속도 변화.

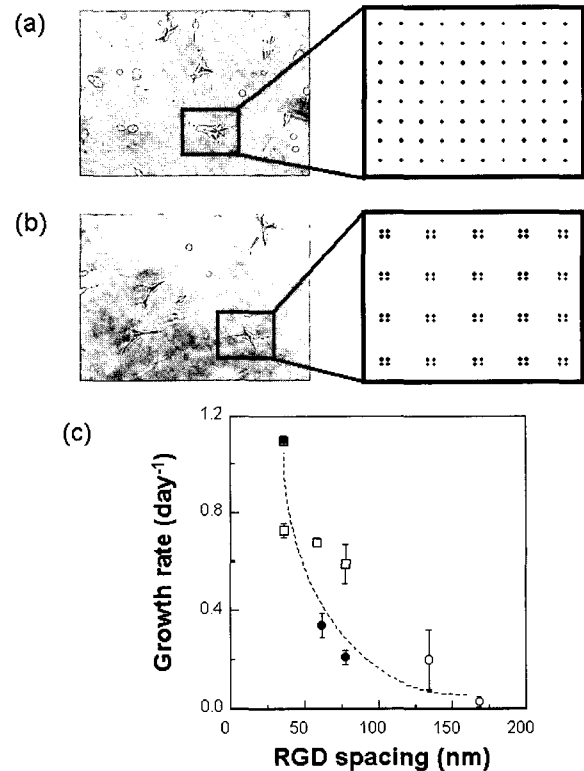


그림 10. 리간드 공간배열에 따른 세포의 성장속도 변화. 리간드 간의 거리가 (a) 62 nm 또는 (b) 78 nm인 알긴산 수화젤에서의 골모세포 부착 모습 및 (c) 성장속도 비교.

3.4 기계적 성질

수화젤은 생체조직이 재생되는 동안 일정한 공간을 제공하고 형태를 유지하는 역할을 하기 때문에 기계적 성질의 조절은 생체조직공학용 수화젤의 설계에 있어서 매우 중요하다. 또한 수화젤의 기계적 성질은 세포의 유전자 발현에도 중요한 영향을 미친다.⁷⁹ 수화젤의 기계적 성질은 젤화시키는 방법뿐만 아니라, 고분자 사슬의 고유의 물리적 특성에 주로 의존한다. 적절한 기계적 성질을 가지는 수화젤의 제조는 새로운 형태의 고분자 합성 또는 생체적합성이 이미 검증된 기존의 고분자의 변형을 통해 가능하다. 알긴산 수화젤의 기계적 성질을 조절하기 위해 adipic acid dihydrazide, *L*-lysine, 그리고 amino poly(ethylene glycol)의 다양한 가교분자

를 사용하여 수화젤을 제조할 수 있었다.⁸⁰ 알긴산 수화젤의 기계적 성질은 주로 가교 밀도에 의해 조절되지만, 가교분자의 유형에도 의존적이었다(그림 11).

3.5. 생분해성

생체조직공학에서 이상적인 고분자 지지체의 역할은 새로운 생체조직이 재생되는 동안 일정한 공간을 제공해주고 원하는 조직이 형성된 후에는 생체로부터 사라지는 것이다. 따라서 수화젤의 생분해 속도 조절은 생체조직공학적 응용에서 매우 중요하다. 일반적으로 생체조직의 유형에 따라 재생속도가 다르고, 따라서 이에 맞추어 지지체의 생분해 속도도 결정되어야 할 것이다. 수화젤의 분해는 가수분해 또는 효소작용에 의하여 진행된다. 수화젤의 생분해 속도를 조절하기 위한 전형적인 방법은 분해 가능한 고분자(예: PLGA)를 사용하거나⁸¹ 또는 생분해가 불가능한 고분자를 사용해야 되는 경우 분해 가능한 가교를 도입시킨다.⁸² 후자의 경우 고분자는 쉽게 용해될 수 있도록 충분히 낮은 분자량을 가져야 하고 신장을 통하여 인체로부터 완전하게 제거되어야 한다. 현재 상업적으로 이용 가능한 알긴산은 생리적 조건에서 분해되지 않고, 분자량은 신장 여과치(renal clearance)를 전형적으로 상회한다.⁸³ 이러한 점을 극복하기 위해 알긴산을 부분적으로 산화시켜 분자량을 낮추고 생분해가 되도록 변형시킬 수 있었다. 이는 연골조직 및 골조직을 성공적으로 재생하는데 사용되었고 생체로의 세포이식 수단으로 잠재력을 가진 것으로 판단되었다(그림 12).⁸⁴

가교된 젤의 생분해 속도와 기계적 물성은 일반적으로 반비례하는 것으로 알려져 있다. 하지만, 때때로 부드럽지만 생분해 속도가 느린 수화젤의 형성도 필요할 때가 있는데 이는 의도적으로 수화젤 내에 네트워크 결함(network defect)을 유도하여 이를 수가 있었다.⁸⁵

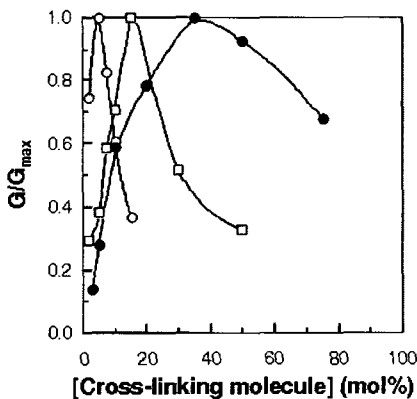


그림 11. 가교분자의 유형(●, adipic acid dihydrazide; □, PEG1000; ○, PEG3400) 및 가교 밀도에 따른 알긴산 수화젤의 전단탄성계수 변화.

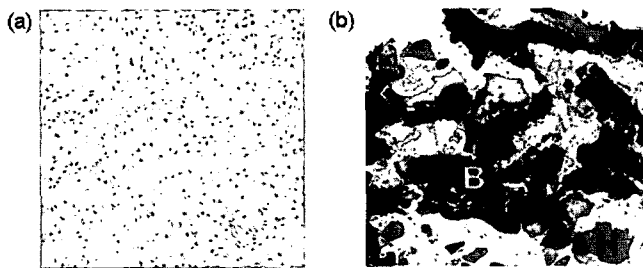


그림 12. 생분해성 하이드로젤을 사용한 (a) 연골 또는 (b) 골조직 재생.

3.6. 단백질/유전자 전달

생체조직의 재생이나 이식에 있어서 또 하나 중요한 요소는 세포에 충분한 산소 공급과 영양분의 전달을 위한 새로운 혈관 네트워크 형성이다. 이러한 혈관 네트워크는 자연발생적으로는 매우 천천히 형성된다. 따라서 이를 증진시키고자 혈관생성인자(angiogenic factor)나 혈관을 형성하는 세포(예: 혈관 내피 세포)를 생체조직에 전달하는 것을 고려해야 한다(그림 13).^{86,87} 수화젤을 사용한 혈관생성인자의 국소적이고 지속적인 방출은 체내에서 인자들의 빠른 분해를 막아주고, 혈관 생성을 최적화 시켜준다. Vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF) 등과 같은 다양한 성장인자들이 수화젤에 함유될 수 있고 지속적으로 방출될 수 있다(그림 14).^{88,89}

그러나 지금까지의 혈관생성인자의 전달방법은 정적인 상태에서 작동하도록 설계되었고, 인자들의 방출에 있어 기계적인 자극에 대한 효과는 고려되지 않았다. 단지 기계적인 자극으로 인해 수화젤로부터 혈관생성인자의 방출거동이 제어되고 이는 생체실험을 통해서도 유효함이 입증되었다(그림 15). 따라서 인체와 같이 수시로 기계적인 자극을 받는 환경에서 생체조직을 재생할 때 중요한 인자로 고려되어야 함을 잘 보여준다.^{90,91}

생체조직공학용 수화젤은 DNA 전달을 조절하기 위한 다양한 방법을 제공하였다. 예를 들면, 혈관생성 단백질을 암호화하는 플라스미드 DNA (plasmid DNA)의 전달은 재생된 생체조직에서 새로운 혈관 네트워크를 형성하는 대안법이다. 단백질 전달에 있어서 단

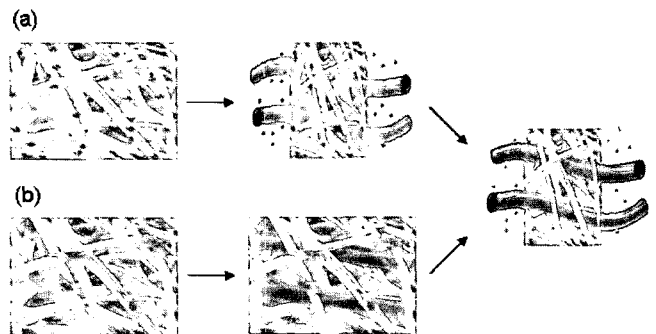


그림 13. (a) 혈관생성인자 또는 (b) 혈관내피세포 전달에 의한 미세혈관 생성.

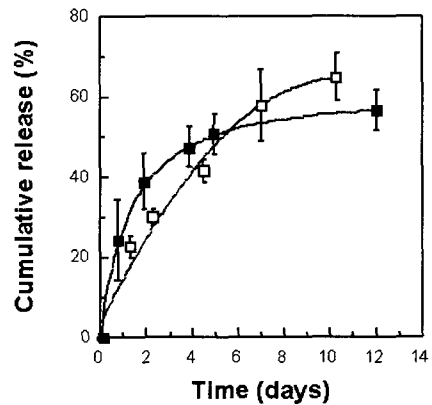


그림 14. 알긴산 수화젤로부터의 VEGF(□)와 bFGF(■)의 방출거동.

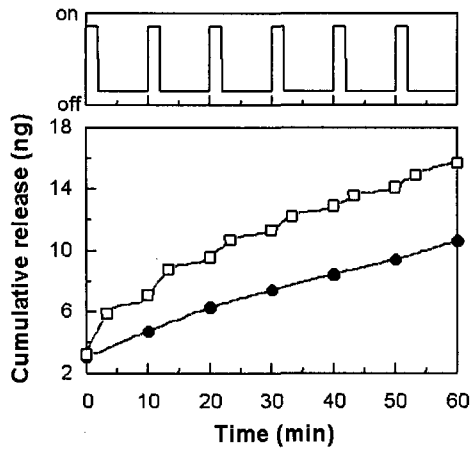


그림 15. 기계적 자극에 응답하여 방출되는 혈관생성인자.

백질의 안정성 문제가 DNA 전달을 위한 고분자 전달시스템 개발을 촉구했다. 혈관생성인자인 PDGF를 암호화하는 플라즈미드의 전달을 위하여 gas foaming/particulate leaching 방법으로 다공성 PLGA 지지체를 제조하였고, 이는 혈관을 형성하는데 유용하였다. 동물실험에서 이 전달체를 이용하여 형성된 혈관 수와 육아 조직의 증가에서 플라즈미드를 직접 주입한 것보다 더 좋은 효과를 보였다.⁹² 유전자 전달을 위해 우무, 히알루론산, 키토산 그리고 피브린과 같은 수화젤이 사용되기도 하였다. *In vitro* 상에서 근육세포의 형질전환을 위해 우무젤을 사용한 poly(L-lysine)/DNA 복합체의 전달은 DNA의 지속적인 방출을 보였고, 단지 DNA만 전달하는 것보다 좋은 효율을 보였다.⁹³ 피브린 젤은 혈관 재생을 증진시키기 위한 플라즈미드를 전달하기 위하여 사용되었다.⁹⁴ 피브린, 히알루론산, 우무 수화젤은 DNA 방출에 있어서 제한적이지만, 키토산은 DNA를 응축시켜 DNA의 안정성을 향상시킬 수 있다. 키토산/DNA 복합체는 세포독성을 최소화하고 DNA의 세포내 전달을 촉진시켜 *in vitro* 및 *in vivo* 상에서 형질전환의 높은 수준을 보였다.^{95,96}

4. 결론

본 특집은 생체조직공학에 현재 유용하게 사용되고 또는 사용될 잠재력이 있는 고분자 수화젤에 관하여 광범위하게 요약하였다. 수화젤이 자연으로부터 얻어졌든 합성으로 만들어졌든 간에 생체조직공학에 유용하게 사용되기 위해서 요구되는 설계요소가 존재한다. 천연 고분자 수화젤은 생체적합성, 세포와의 상호작용 제어, 생분해성 등의 장점을 가지고 있지만, 근원의 다양성, 일반적으로 제한된 범위의 기계적 강도 등의 단점이 있다. 대조적으로 합성 고분자 수화젤은 정밀하게 조절된 구조와 기능을 보유하도록 제조될 수 있다. 하지만 많은 합성 고분자는 생리적 조건에서 분해되지 않으며, 합성에 사용된 화학물질의 독성으로 인하여 철저한 정제 과정을 필요로 한다. 현재 사용되고 있는 수화젤 중에서 모든 응용분야에서 모든 설계요소를 만족시킬 물질은 존재하지 않지만, 다양한 고분자 재료의 특성을 제어하고 조합시켜 생체조직공학에 가장 적합한 수화젤을 제조할 수 있을 것이다.

참고문헌

1. R. Langer and J. P. Vacanti, *Science*, **260**, 920 (1993).
2. D. J. Mooney and A. G. Mikos, *Sci. Am.*, **280**, 60 (1999).
3. K. Y. Lee and D. J. Mooney, *Chem. Rev.*, **101**, 1869 (2001).
4. B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. D. Watson, in *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing, p 971, New York, 1994.
5. B. S. Kim and D. J. Mooney, *TIBTECH*, **16**, 224 (1998).
6. J. J. Marler, J. Upton, R. Langer, and J. P. Vacanti, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **33**, 165 (1998).
7. S. Pulapura, and J. J. Kohn, *Biomater. Appl.*, **6**, 216 (1992).
8. A. J. Kuijpers, G. H. M. Engbers, J. Feijen, S. C. De Smedt, T. K. L. Meyvis, J. Demeester, J. Krijgsveld, S. A. Zaat, and J. Dankert, *Macromolecules*, **32**, 3325 (1999).
9. Y. S. Choi, S. R. Hong, Y. M. Lee, K. W. Song, M. H. Park, and Y. S. Nam, *Biomaterials*, **20**, 409 (1999).
10. C. Perka, R.-S. Spitzer, K. Lindenhayn, M. Sittlinger, and O. Schultz, *J. Biomed. Mater. Res.*, **49**, 305 (2000).
11. Q. Ye, G. Zund, P. Benedikt, S. Jockenhoevel, S. P. Hoerstrup, S. Sakyama, J. A. Hubbell, and M. Turina, *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg.*, **17**, 587 (2000).
12. D. Sierra, R. Saltz, *Surgical Adhesives and Sealants, Current Technology and Application Technomic, Lancaster* (1996).
13. K. I. Draget, G. Skjæk-Braek, and O. Smidsrod, *TIBTECH*, **8**, 71 (1990).
14. A. Atala, W. Kim, K. T. Paige, C. A. Vacanti, and A. B. Retik, *J. Urol.*, **152**, 641 (1994).
15. G. Klock, A. Pfeffermann, C. Ryser, P. Grohn, B. Kuttler, H. J. Hahn, and Zimmermann, *U. Biomaterials*, **18**, 707 (1997).
16. W. R. Gombotz and S. F. Wee, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **31**, 267 (1998).
17. K. E. Gregory, M. E. Marsden, J. Anderson-MacKenzie, J. B. Bard, P. Bruckner, J. Farjanel, S. P. Robins, and D. J. Hulmes, *Exp. Cell Res.*, **246**, 98 (1998).
18. A. Joly, J. F. Desjardins, B. Fremond, M. Desille, J. P. Champion, Y. Malledant, Y. Lebreton, G. Semana, F. Edwards-Levy, M. C. Levy, and B. Clement, *Transplantation*, **63**, 795 (1997).
19. H. Uludag, P. De Vos, and P. A. Tresco, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **42**, 29 (2000).
20. J. A. Rowley, G. Madlambayan, and D. J. Mooney, *Biomaterials*, **20**, 45 (1999).
21. D. K. Singh and A. R. Ray, *J. Macromol. Sci.-Rev. Macromol. Chem. Phys.*, **C40**, 69 (2000).
22. R. A. A. Muzzarelli, *Carbohydr. Polym.*, **3**, 53 (1983).
23. K. Kurita, T. Kojima, Y. Nishiyama, and M. Shimojoh, *Macromolecules*, **33**, 4711 (2000).
24. A. Chenite, C. Chaput, D. Wang, C. Combes, M. D. Buschmann, C. D. Hoemann, J. C. Leroux, B. L. Atkinson, F. Binete, and A. Selmani, *Biomaterials*, **21**, 2155 (2000).

25. F. L. Mi, C. Y. Kuan, S. S. Shyu, S. T. Lee, and S. F. Chang, *Carbohydr. Polym.*, **41**, 389 (2000).
26. K. Ono, Y. Saito, H. Yura, K. Ishikawa, A. Kurita, T. Akaike, and M. Ishihara, *J. Biomed. Mater. Res.*, **49**, 289 (2000).
27. K. P. Vercruyssen, D. M. Marecek, J. F. Marecek, and G. D. Prestwich, *Bioconjugate Chem.*, **8**, 686 (1997).
28. A. M. Afify, M. Stern, M. Guntenhoner, and R. Stern, *Arch. Biochem. Biophys.*, **305**, 434 (1993).
29. Y. S. Choi, S. R. Hong, Y. M. Lee, K. W. Song, M. H. Park, and Y. S. Nam, *J. Biomed. Mater. Res.*, **48**, 631 (1999).
30. F. Duranti, G. Salti, B. Bovani, M. Calandra, and M. L. Rosati, *Dermatol. Surg.*, **24**, 1317 (1998).
31. F. Duranti, G. Salti, B. Bovani, M. Calandra, and M. L. Rosati, *Dermatol. Surg.*, **24**, 1317 (1998).
32. K. P. Vercruyssen, D. M. Marecek, J. F. Marecek, and G. D. Prestwich, *Bioconjugate Chem.*, **8**, 686 (1997).
33. T. Pouyani, G. S. Harbison, and G. D. Prestwich, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 7515 (1994).
34. J. Kost and R. Langer, In *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*, Vol. III (N. Peppas, Ed.), CRC Press, Boca Raton, p 95, 1987.
35. S. X. Lu and K. S. Anseth, *J. Controlled Release*, **57**, 291 (1999).
36. A. Kidane, J. M. Szabocsik, and K. Park, *Biomaterials*, **19**, 2051 (1998).
37. H. R. Oxley, P. H. Corkhill, J. H. Fitton, and B. J. Tighe, *Biomaterials*, **14**, 1064 (1993).
38. M. V. Sefton, M. H. May, S. Lahooti, and J. E. Babensee, *J. Controlled Release*, **65**, 173 (2000).
39. T. K. L. Meyvis, S. C. De Smedt, J. Demeester, and W. E. Hennink, *Macromolecules*, **33**, 4717 (2000).
40. D. W. Lim, S. H. Choi, and T. G. Park, *Macromol. Rapid Commun.*, **21**, 464 (2000).
41. M. Heskins, and J. E. Guillet, *J. Macromol. Sci. Chem. Ed.*, **A2**, 1441 (1968).
42. O. H. Kwon, A. Kikuchi, M. Yamato, Y. Sakurai, and T. Okano, *J. Biomed. Mater. Res.*, **50**, 82 (2000).
43. B. Vernon, A. Gutowska, S. W. Kim, and Y. H. Bae, *Macromol. Symp.*, **109**, 155 (1996).
44. J. L. West and J. A. Hubbell, *React. Polym.*, **25**, 139 (1995).
45. F. M. Andreopoulos, C. R. Deible, M. T. Stauffer, S. G. Weber, W. R. Wagner, E. J. Beckman, and A. J. J. Russell, *Am. Chem. Soc.*, **118**, 6235 (1996).
46. S. T. Lopina, G. Wu, E. W. Merrill, and L. Griffith-Cima, *Biomaterials*, **17**, 559 (1996).
47. W. R. Gombotz and D. K. Pettit, *Bioconjugate Chem.*, **6**, 332 (1995).
48. E. V. Batrakova, N. S. Meliknubarov, N. A. Fedoseev, T. Y. Dorodnich, V. Y. Alakhov, V. P. Chekhonin, I. R. Nazarova, and V. A. Kabanov, *J. Controlled Release*, **22**, 141 (1992).
49. A. Harada and K. Kataoka, *Science*, **283**, 65 (1999).
50. P. Alexandridis, D. Zhou, and A. Khan, *Langmuir*, **12**, 2690 (1996).
51. K. M. Huh and Y. H. Bae, *Polymer*, **40**, 6147 (1999).
52. B. Jeong, Y. K. Choi, Y. H. Bae, G. Zentner, and S. W. Kim, *J. Control. Release.*, **62**, 109 (1999).
53. C. A. Finch, *Poly(vinyl alcohol): Properties and Applications* Wiley: London, 1973.
54. N. A. Peppas and S. R. Stauffer, *J. Controlled Release*, **16**, 305 (1991).
55. F. Yoshii, Y. Zhanshan, K. Isobe, K. Shinozaki, and K. Makuuchi, *Radiat. Phys. Chem.*, **55**, 133 (1999).
56. G. Zheng-Qiu, X. Jiu-Mei, and Z. Xiang-Hong, *Biomed. Mater. Eng.*, **8**, 75 (1998).
57. K. Burczak, E. Gamian, and A. Kochman, *Biomaterials*, **17**, 2351 (1996).
58. T. Taguchi, A. Kishida, and M. Akashi, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **10**, 331 (1999).
59. K. E. Uhrich, S. M. Cannizzaro, R. Langer, and K. M. Shakesheff, *Chem. Rev.*, **99**, 3181 (1999).
60. H. R. Allcock, In *Hydrophilic Polymers: Performance with Environmental Acceptance* Glass, J. E. Ed., American Chemical Society, Washington, DC, p. 3, 1996.
61. S. Cohen, M. C. Bano, K. B. Visscher, M. how, H. R. Allcock, and R. Langer, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 7832 (1990).
62. A. K. Andrianov, and L. G. Payne, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **31**, 185 (1998).
63. C. T. Laurencin, S. F. El-Amin, S. E. Ibim, D. A. Wiloughby, M. Attawia, H. R. Allcock, and A. A. Ambrosio, *J. Biomed. Mater. Res.*, **30**, 133 (1996).
64. M. C. Bano, S. Cohen, K. B. Visscher, H. R. Allcock, and R. Langer, *Bio-technol.*, **9**, 468 (1991).
65. J. Cappello, J. Crissman, M. Dorman, M. Mikolajczak, G. Textor, M. Marquet, and F. Ferrari, *Biotechnol. Prog.*, **6**, 198 (1990).
66. J. P. O'Brien, *Trends. Polym. Sci.*, **8**, 228 (1993).
67. W. A. Petka, J. L. Harden, K. P. McGrath, D. Wirtz, and D. A. Tirrell, *Science*, **281**, 389 (1998).
68. D. W. Urry, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **32**, 819 (1993).
69. J. E. Babensee, J. M. Anderson, L. V. McIntire, and A. G. Mikos, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **33**, 111 (1998).
70. B. Rihova, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **42**, 65 (2000).
71. K. A. Smeds, A. Pfister-Serres, D. Miki, K. Dastgheib, M. Inoue, D. L. Hatchell, and M. W. Grinstaff, *J. Biomed. Mater. Res.*, **55**, 254 (2001).
72. B. Jeong, Y. H. Bae, D. S. Lee, and S. W. Kim, *Nature*, **388**, 860 (1997).
73. J. Rassing and D. Attwood, *Int. J. Pharm.*, **13**, 4755 (1983).
74. R. O. Hynes, *Cell*, **69**, 11 (1992).
75. K. Smentana, *Biomaterials*, **14**, 1046 (1993).
76. J. A. Rowley, G. M. Madlambayan, and D. J. Mooney, *Biomaterials*, **20**, 45 (1999).
77. E. Alsberg, K. W. Anderson, A. Albeiruti, R. T. Franceschi, and D. J. Mooney, *J. Dental Res.*, **80**, 2025 (2001).
78. K. Y. Lee, E. Alsberg, S. Hsiung, W. Comisar, J. Linderman, R. Ziff, and D. J. Mooney, *Nano Letters*, **4**, 1501 (2004).
79. S. Huang and D. E. Ingber, *Nature Cell. Biol.*, **1**, E131 (1999).
80. K. Y. Lee, J. Rowley, E. Moy, K. H. Bouhadir, and D. J.

- Mooney, *Macromolecules*, **33**, 4291 (2000).
81. L. D. Harris, B. S. Kim, and D. J. Mooney, *J. Biomed. Mater. Res.*, **42**, 396 (1998).
 82. K. Y. Lee, K. H. Bouhadir, and D. J. Mooney, *Macromolecules*, **33**, 97 (2000).
 83. A. Al-Shamkhani and R. Duncan, *J. Bioact. Compat. Polym.*, **10**, 4 (1995).
 84. K. H. Bouhadir, K. Y. Lee, E. Alsberg, K. L. Damm, K. W. Anderson, and D. J. Mooney, *Biotechnol. Prog.*, **17**, 945 (2001).
 85. K. Y. Lee, E. Alsberg, and D. J. Mooney, *J. Biomed. Mater. Res.*, **56**, 228 (2001).
 86. J. E. Nor, J. Christensen, D. J. Mooney, and P. J. Polverini, *Am. J. Pathology*, **154**, 375 (1999).
 87. J. Bonadio, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **44**, 185 (2000).
 88. M. E. Sheridan, L. D. Shea, M. C. Peters, and D. J. Mooney, *J. Control. Rel.*, **64**, 91 (2000).
 89. M. C. Peters, B. C. Isenberg, J. A. Rowley, and D. J. Mooney, *J. Biomat. Sci. Polym. Edn.*, **9**, 1267 (1999).
 90. K. Y. Lee, M. C. Peters, K. W. Anderson, and D. J. Mooney, *Nature*, **408**, 998 (2000).
 91. K. Y. Lee, M. C. Peters, and D. J. Mooney, *Adv. Mater.*, **13**, 837 (2001).
 92. L. D. Shea, E. Smiley, J. Bonadio, and D. J. Mooney, *Nature Biotechnol.*, **17**, 551 (1999).
 93. N. J. Meilander, M. K. Pasumathy, T. H. Kowalczyk, M. J. Cooper, and R. V. Bellamkonda, *J. Control. Release*, **88**, 321 (2003).
 94. A. Jozkowicz, A. Fugl, J. Nanobashvili, C. Neumayer, J. Dulak, D. Valentini, P. Funovics, P. Polterauer, H. Redl, and I. Huk, *Int. J. Artif. Org.*, **26**, 161 (2003).
 95. K. W. Leong, H. Q. Mao, V. L. Truong-Le, K. Roy, S. M. Walsh, and J. T. August, *J. Control. Release*, **53**, 183 (1998).
 96. H. Q. Mao, K. Roy, V. L. Truong-Le, K. A. Janes, K. Y. Lin, Y. Wang, T. August, and K. W. Leong, *J. Control. Release*, **70**, 399 (2001).