

조직공학연구에 생리활성물질 전달시스템의 중요성

강길선 · 이일우 · 이종문 · 이해방

1. 서론

최근 조직공학은 환자 자신의 세포를 이용하여 고장나고 질병으로 손상된 본래조직의 복원이나 대체 조직을 체외에서 제조하는 것으로 차세대 인공장기 제조방법으로 각광받고 있다.¹⁻¹⁰ 이들의 이론적인 개념은 세포의 재생과 이들이 성장할 때 지지체가 되어주는 담체, 즉 인공기질이 근간이 된다. 최근에는 이러한 세포 및 담체와 더불어 성장인자들이 조직과 세포의 복원을 유도하고 성장을 촉진한다는 것이 알

려지면서 필수적 요소로 등장하게 되었다.¹¹⁻¹³ 예로써 혈관생성을 유도하는 성장인자가 조직대체물 내에 이식된 세포의 생존에 필수적 요소인 산소와 영양물질의 공급에 아주 유용한 것으로 알려지고 있다. 그러나 이러한 대부분의 성장인자들은 전통적인 투여방법에 의하면 짧은 반감기와 과량투여시 독성들의 잠재력에 의하여 체내 안정성이 열악하며 따라서 생리적 효과를 예견할 수 없다는 것에 있다. 이러한 문제점을 극복하고자 특정한 세포와 조직에 생리학적으로 활성인 단백질 구조와 원하는 농도로 지



강길선

1977~ 인하대학교 고분자공학과(학사)
1981
1981~ 인하대학교 고분자공학과(석사)
1985
1987~ 한국화학연구원 생체외료고분
1998 자팀 선임연구원
1991~ 아이오와 주립대학교 생체의료
1995 공학과(박사)
1998~ 전북대학교 고분자공학과, 유기
현재 신물질공학과 조교수



이종문

1972 전북대학교 섬유공학과(학사)
1976 전북대학교 섬유공학과(석사)
1985 경희대학교 섬유공학과(박사)
1977~ 전북대학교 섬유공학과 교수
1992
1993~ 전북대학교 고분자공학과, 유기
현재 신물질공학과 교수



이일우

1975~ 가톨릭대학교 외과대학(학사)
1981
1984~ 가톨릭대학교 대학원(석사)
1986
1987~ 가톨릭대학교 대학원 신경외과
1990 (박사)
1986~ 가톨릭대학교 신경외과 전문의
현재 부교수
1996~ 하바드외대 소아병원 교환교수
1998



이해방

1964 동국대학교 화학과(학사)
1966 동국대학교 화학과(석사)
1974 유타대학교 재료공학과(박사)
1974~ Univ. of North Carolina 치
1976 과대학 선임연구원
1976~ Milton Roy사, Lord사,
1984 Kendall사 책임연구원
1984~ 한국화학연구원 생체의료고분
현재 자팀 책임연구원

The Importance of Cytokine Delivery System for Tissue Engineering

전북대학교 유기신물질공학과(Gilson Khang and John M. Rhee, Department of New Organic Materials, Chonbuk Nat'l University)

가톨릭대학교 대전성모병원 신경외과(Ilwoo Lee, Department of Neurosurgery, Medical College, Catholic University)

한국화학연구원 생체의료고분자팀(Hai Bang Lee, Biomaterials Lab., KRICT)

속적인 전달방법인 즉, 단백질의 서방성화가 필요하게 되었다. 이러한 의약전달체계는 종래의 제약학 및 제제학에서 개발되었던 기술과 유사하여 현재 사람에 대한 임상적 결과는 미약하지만 동물실험들의 좋은 결과들이 많이 보고되어 짧은 시일 내에 좋은 결실들을 맺을 것으로 사료된다. 따라서 본고에서는 이러한 성장인자들의 특성, 고분자 재료를 이용한 지속·서방화된 단백질 전달의 기본 기술 등에 대하여 고찰해보고자 한다.

2. 조직내에 세포거동에 직접 영향을 미치는 단백질

세포 및 조직 발달학에 중요한 영향을 미치는 세포의 운동, 성장, 응집, 모양, 이동 및 유전자 발현 등은 신호 전달 단백질인 생리활성물질(사이토카인)에 의해서 영향을 받는다. 조직공학의 주된 목적은 병든 세포와 조직의 재생 또는 대체를 위한 근대 생물공학 기술의 적절한 사용이다. 이러한 병든 조직을 대체하기 위한 새로운 조직의 발달에 따라 기능을 담당할 조직의 재생에 있어서 세포 생존과 분화기능의 유지, 세포 성장의 진작, 세포 이동방향과 속도의 조절 및 세포 부착의 조절 등이 불요불급하다.¹⁴ 중앙으로 손상된 척수의 재생과 간경화 등으로 못쓰게된 간조직의 대체 등과 같은 조직공학의 대부분 응용에 있어서 수 종류 또는 수십 종류의 복잡한 세포거동의 동시조절도 또한 필수적이다. 완벽한 기능을 수행할 수 있는 조직으로써의 세포집합체를 조절하는 기본 원리는 현재로는 밝혀진 것은 없지만 신호전달 단백질인 성장인자가 세포조직형성과 관계되는 수많은 세포거동의 조절을 위한 유용한 도구임은 틀림없다.¹⁵ 표 1에는 조직공학에서 많이 쓰이는 성장인자들의 종류와 이들의 특성을 나타내었고, 표 2에는 고분자 전달체로 한 성장인자들의 서방화 연구사례를 나타내었다.¹¹

2.1 세포의 성장

세포의 생존과 기능은 신호전달 단백질들의 응용에 따라서 증진된다. 일례로 대부분의 신경세포의 초대배양에 있어서 신경성장인자(NGF)는 나노몰의 농도에 의해서도 극적으로 생존시킬 수 있으며 PC12세포의 배양에 있어서도 신경세포 특성의 형태도 유도한다.¹⁶ 대부분의 성장인자는 분열유발자와 같은 역할을 한다. 혈소판유래 성장인자(PDGF)는

표 1. 조직공학에서 사용되는 성장인자들¹¹

효 과	단백질 (성장인자)	혈장내 반감기 (분)	조직공학에 있어서 잠재적 사용처
세포성장	EGF ¹¹¹	2.32	상처치유 (세포성장 자극)
	bFGF ⁶⁶	1.5	
	TFG- β	11~160	
세포분화	NGF	2.4	세포기능 유지
	bFGF ¹¹²	1.5	
세포이동	포밀 펩타이드 NGF ¹¹³	변화가 큼 2.4	염증반응 신경재생
세포응집	항체 ¹¹⁴	변화가 큼	조직형성
	HHV-1 Tat ^{115,116} PEG-펩타이드 접합체		

EGF: 상피세포 성장인자, bFGF: 염기성 배아세포 성장인자, TGF- β : 변환성장인자-베타, NGF: 신경성장인자.

이질이량체 분자로써 맥관구조의 평활근에서 잠재적 분열유발을 일으키며¹⁷ 또한 상처회복 중에도 발현하는 것으로 나타나 있다.¹⁵ 배아세포 성장인자(FGF)는 배아세포 성장을 자극하며, 상피세포 성장인자(EGF)도 대부분의 많은 세포들의 증식과 성장에 잠재적 조절물질로 알려져 있다. EGF는 상피각막세포 상처의 회복에 연구 중이며¹⁸ 피부상처의 치유 증진에도 상당한 기여를 하는 것으로 알려져 있다.¹⁹ 최근에는 어른 동물의 뇌에 EGF를 직접 주입하였을 때 신경 전구세포의 증식을 유도하는 것으로 관찰되기도 하였다.²⁰

2.2 세포의 이동

조직재생에 있어서 세포의 운동성은 필수적 요건인데 펩타이드나 단백질 등의 화학주성 인자에 의하여 영향을 받는다. 가장 많이 알려진 것으로는 포밀-메티오닐-류실-페닐알라닌(fMLP)과 같은 포밀레이티드 박테리아성 펩타이드 등과 다음과 같은 단백질류도 포함된다. 변환성장인자-베타(TGF- β)는 배아세포의 화학주성 인자이며,²¹ PDGF는 단핵세포, 호중구, 배아세포 및 근육세포의 화학주성을 자극하는 것으로 알려져 있고¹⁵ NGF는 선조신경의 직접적인 운동성을 자극한다.²² 이때 이들의 투여 및 용액잔존량은 최대활동도와 세포 이동의 자극정도를 결정하게 된다.^{23,24} 대부분의 경우에는 화학주성활동도는 이러한 생리활성물질이 구배형태로 존재할 때 증진된다. 예를 들면 fMLP의 구배는 감염 중에 호중구의 상처부위로의 이동을 배향시킨다.²⁵

2.3 세포의 부착

조직은 세포의 집합체이기 때문에 조직재생에 있

표 2. 고분자를 전달체로한 성장인자들의 서방화 연구사례¹²

성장인자	고분자	사용된 동물	적용된 조직
BMP	PLA 다공성 PLA	개 토끼	대퇴골 두개골
rhBMP-2	다공성 PLA 콜라겐 스폰지 젤라틴 PLA-도포 젤라틴 스폰지 다공성 HA PLA-PEG 공중합체	개 쥐 토끼 토끼 개 원숭이 쥐	척추뼈 두개골 두개골 두개골 대퇴골 턱뼈 두개골 대퇴골
rhBMP-7	콜라겐	개 원숭이	척추뼈 대퇴골
EGF	아가로스 겔 PVA	햄스터 쥐	신생혈관화 피부
aFGF	PVA 알긴산 아가로스/헤파린 젤라틴 피브린 겔 콜라겐 펠렛 콜라겐 EVAc 공중합체	쥐 쥐 쥐, 돼지 쥐 토끼 원숭이 쥐 토끼 쥐 쥐	신생혈관화 신생혈관화 신생혈관화 신생혈관화 두개골 대퇴골 대퇴골 연골 신경
NGF	PLGA 콜라겐 펠렛	쥐 토끼	신경 신경
TGF- α	아가로스	햄스터	신생혈관화
TGF- β	젤라틴 PLGA 다공성 HA 콜라겐	토끼 쥐 개 쥐	두개골 두개골 대퇴골 피부
PDGF	다공성 HA 콜라겐	토끼 쥐	대퇴골 피부
VEGF	알긴산	쥐	신생혈관화
PDGF/IGF-I	티타늄 임플란트	개	턱뼈

BMP, 뼈형성인자; aFGF, 산성 배아세포 성장인자; HA, 수산화아파타이트; IGF-I, 유사인슐린 성장인자; PDGF, 혈소판유래 성장인자; rhBMP, 재조합 인간 뼈형성인자; TGF, 변환 성장인자; VEGF, 혈관내피세포 성장인자.

어서 세포-세포간의 상호작용의 조절은 필수적이다. 게다가 응집된 세포의 배열에 있어서 각각이 분리된 세포의 배열과 비교하여 볼 때 높은 세포 생존율, 증식률과 기능이 관찰된다. 혈청성분은 세포현탁액 내에서 응집형태를 증진시키나 이는 여러 형태의 활동성을 나타내기 때문에 대부분의 임상에 직접 응용

하기에는 부적합하다.²⁶⁻²⁸ 이러한 혈청의 단점을 방지하기 위하여 예측할 수 있는 세포부착에 영향을 줄 수 있도록 여러 가지의 세포체외 기질(ECM) 및 단백질로부터 얻어진 세포 접착 도메인들이 종종 사용된다.²⁹ 세포부착은 무혈청 환경에서도 유도될 수 있는데, 이는 동등한 펩타이드 도메인을 수용성 고분자에 공유결합시켜³⁰⁻³³ 세포 현탁 중에서 바로 이웃하는 세포의 리셉터를 결합시켜 놓으면 빠르고 재생산성이 있는 세포 응집이 유도된다.^{34,35} 또다른 예로써, 혈관내피세포의 상처부위에 혈소판의 부착이나 응집과 같이 세포-세포 상호작용을 원치 않을 경우에는 세포부착의 방지도 가능하다.³⁶

최근 생물공학의 가장 중요한 발전 중의 하나는 앞에서 거론이 되었던 여러 사이토카인류를 포함한 고순도의 폴리펩타이드 및 단백질들을 많은 양으로 생산할 수 있게 된 것이다. 그러나 대부분의 이러한 생리활성물질들은 체내에서의 반감기가 수분에서 수십분 정도로 짧다(표 1 참조).³⁷ 대부분의 조직 내에서 요구되는 시간은 이것보다도 장시간의 반감기가 요구되고 따라서 대부분의 치료에 적정량보다 과량으로 많이 사용되는 주사투여법은 용법상 제한이 많다. 게다가 대부분의 치료용 단백질은 분자자체가 크고 조직 내로의 침투가 아주 늦다. 따라서 극단적으로 많은 양의 그리고 자주되는 주사투여 횟수가 적절한 치료영역을 유지하기 위하여 필요하며 수반되는 부작용의 패해도 적지 않다.

그렇다면 정상적인 조직의 기능을 유지하기 위한 인체 시스템 내에 최적 단백질 투여 시스템은 무엇일까? 짧은 순환시간은 효과적인 지속전달 시스템으로 조절될 수 있으나 약물활동이 필요한 위치에서의 국부화는 상당히 중요하다. 대부분의 경우에는 적절한 리셉터를 갖는 세포는 이에 상응하는 신호전달 단백질에만 응답한다. 이러한 특정한 작용만이 세포의 하나의 증식에 관여하는 반면에 두 번째 증식에 대하여서는 작용을 못하거나 활성도를 방해한다.³⁸ 이러한 특정한 활성력은 단백질들이 체내 투여 후에 “타겟화하는 이른바 목표지향화”해야 한다는 필요성을 느끼게 한다. 반면에 단 한가지의 생리활성 물질이라고 하더라도 원하는 원치 않던 여러 다른 종류의 세포에 제각기 다른 작용을 하기 때문에 특정세포에 대한 원하는 특정 작용을 할 수 있는 전달체계가 아주 중요하게 되었다. 본고에서는 단백질 전달 체계에 있어 주 장애요소가 무엇인지, 그리고 향후에 조직공학 분야 및 세포·유전자 치료 분야의 차세

대 기술로 부상하게 될 재조합 단백질의 서방성 시스템에 대하여 간단히 논의될 것이다.

3. 단백질 전달 시스템

여러 가지 기술 중에서도 가장 널리 쓰이고 있는 시스템은 생체적합성 고분자를 이용한 단백질과 펩타이드의 미립구화와 물리적 고정화이며 이들은 암 질환의 화학요법과 다른 만성적이고 중증증상의 치료에 많이 쓰이고 있다.³⁹⁻⁴³

3.1 고분자 전달 시스템은 단백질과 펩타이드를 장기간 동안 서방화시킬 수 있다.

전달체는 여러 가지 외관과 저장형태, 매트릭스, 미립구, 미세캡슐 등의 형태로 고안되며 이들은 천연 또는 합성, 그리고 분해 또는 비분해 고분자의 여러 가지 형태로 제조된다. 약물의 방출기간은 여러 가지 기구로 조절이 되며 짧게는 하루부터 길게는 3~6개월 그 이상의 기간까지도 조절될 수 있다.

3.1.1 저장형태로부터의 서방화

초창기 연구분야의 대부분을 차지하고 있는 것으로서 약물을 타블렛화하여 그 위에 고분자 도포를 실시하여 서방화율을 조절한다. 대표적으로 쓰이는 고분자막은 실리콘탄성체 또는 에틸렌-초산비닐 공중합체(EVAc)인데 비교적 생체적합성이며 비분해성 고분자이다(그림 1A).^{44,45} 이 고분자들은 지난 30여년 동안 많은 응용연구가 진행되었고 이들로 제조되어진 튜브로부터 생리활성물질들의 분자들이 확산되어 나오도록 고안되었다. 이 기술의 상용화된 대표적인 것으로는 노플렌트® 피임약인데, 이식 후에 5년 동안 일정한 방출율로 레보노제스트렐을 분비하는 것으로 임상에 널리 쓰이고 있다. 이 방법에 의한 두 가지 큰 단점으로는, 성장인자 또는 단백질과 같이 크기가 큰 분자는 고분자 필름을 통한 확산이 매우 느리고, 종종 일어나는 예기치 않은 막의 파열 등에 의한 약물이 급격히 방출되는 것인데 특히 약물들이 매우 잠재력이 큰 경우에는 위험이 크다.

3.1.2 고분자 매트릭스에 의한 서방화

고분자 매트릭스계의 출현은 저장형태의 단점을 보완하기 위하여 고안되었다. 매트릭스 디바이스는 고분자의 매트릭스에 단백질을 분산시키는 것으로 제조하였다. 이때 단백질 등은 고체입자 형태로 존재하고 따라서 그림 1B에 나타내었듯이 불균일한 미세구조를 하고 있다. 고분자 표면 근처에 있는 단

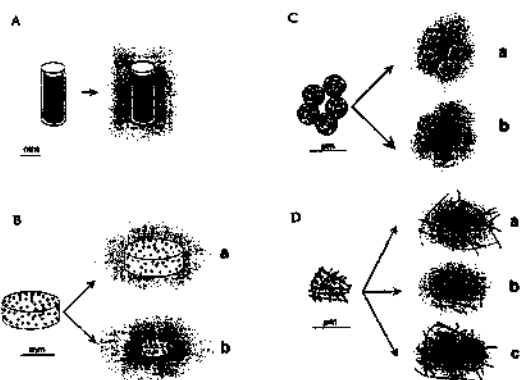


그림 1. 서방성 의약품제에 있어서 디바이스. (A) 저장 형태의 서방화 디바이스로서 중앙핵부분에는 약물이 들어 있고 이는 약물의 방출률을 조절하는 반투막으로 도포되어 있다. 약물분자들은 반투막을 통하여 주위의 조직으로 확산해나가고 중앙 약물층의 농도는 감소한다. (B) 단백질 입자들이 고분자 매트릭스에 분산되어 있다. 이러한 형태의 것은 슬랩, 펠렛, 디스크 등의 기하학적 형태로 제조할 수 있다. 비분해성 고분자 (B, a) 및 PLGA와 같은 생분해성 고분자 (B, b)로 제조될 수 있다. 비분해성 고분자 내에 분산되어 있는 단백질 입자 수분이 접촉되면 단백질은 붕해되며 이 자리는 공간으로 남는다. 따라서 이 공간에 물이 채워지고 매트릭스 내에 위치하고 있는 입자를 또 용해시킨다. 생분해성 고분자의 경우에는 단백질의 방출량은 고분자의 분해율에 의존된다. (C) 비분해성 (C, a) 및 분해성 (C, b) 고분자 미립구로부터 단백질의 방출. 이들의 방출기구는 B의 매트릭스형태와 유사하여 비분해성 미립구의 경우에는 용매의 침투율이, 분해성 고분자는 고분자의 분해율이 단백질의 방출을 조절한다. (D) 하이드로겔로부터의 단백질 방출 (D, a) 물리적인 포접 겔, (D, b) 생분해성 겔, (D, c) 팽윤 겔. a 형태의 겔은 고분자연쇄의 수용액 내에서 용해됨에 따라서, b 형태의 겔은 고분자쇄의 생분해도에 따라서, c 형태의 겔은 용매나 수용액이 팽윤되어 들어가면서 단백질의 방출이 일어난다.

백질 분자들은 매트릭스에서 용해되어 확산되어 방출되고, 방출된 공간에 용매나 기타 용출액이 침입하여 더욱 깊숙한 곳에 위치하고 있는 약물입자를 용해시켜내어 방출을 계속하는 것이다(그림 1B, a).⁴⁶ 물론, 약물의 크기, 포접량, 고분자의 분자량, 형태의 변형 및 부형체들의 조절 등에 의한 매트릭스내의 미세구조로 영향을 줄 수 있는 여러 인자들의 조절에 의하여 단백질 약물들의 방출량을 조절할 수 있다.⁴⁷⁻⁵¹

생분해성 고분자로는 폴리락타이드(PLA), 폴리글리콜라이드(PGA) 및 이들의 공중합체(PLGA)가 사용되는데(그림 1B, b) 이들 고분자는 물에 폭로

되면 가수분해에 의하여 서서히 분해되는 것으로 알려져 있다. 이들의 분해도 조절은 약물의 방출량에 크게 영향을 미치는데, 분자량과 PLGA의 경우 락타이드와 글리콜라이드의 분율 조절로서 가능하다.⁵² 또한 매트릭스 내에 산성 또는 알칼리성 화합물질의 첨가에 의해서도 조절 가능하여 약물의 특성과 환부의 특성에 따라서 조절하면 된다.^{39,42}

3.1.3 미립구

이 미립구의 가장 큰 특징(그림 1C)은 상기한 저장형태 및 매트릭스형태가 수술이 필요하다면 이는 주사에 의한 간단한 방법으로도 투여가 가능하다는 것이다. 또한 생분해성인 경우에는 약물의 방출이 소진되고 난 후에 제거수술이 불필요하다는 점이다. 대부분 1~100 μm 의 직경을 미립구, 1~100 nm의 직경은 나노미립구라고 불린다. 이 미립구에 의한 약물전달 시스템에 대한 좀더 자세한 사항은 전보의 총설을 참고하기 바란다.³⁹

3.1.4 하이드로겔 및 다른 형태의 전달 시스템

크게 대별하여 세 가지 형태의 하이드로겔을 기재로한 단백질 전달 시스템이 널리 연구 응용되고 있다(그림 1D). 물리적으로 얹혀진 고분자 시스템은 서서히 팽윤 또는 용해되고 내부에 있던 단백질은 동시에 서방화 된다(그림 1D, a). 화학적으로 가교화된 고분자 겔은 가수분해 또는 효소분해 반응에 의해 분해된다(그림 1D, b). 이 전달시스템 내에서는 단백질의 방출은 고분자 분해물에 의하여 결정된다. 하이드로겔은 물과 접촉 후에 팽윤되며 동시에 생성되는 다공구조를 통하여 단백질 등이 방출이 시작되며 매트릭스 전 영역으로 확산되면서 지속적인 방출로 이어진다(그림 1D, c). 이때 다공구조는 가교도 및 팽윤도의 가교구조에 의하여 단백질의 방출률이 결정된다. 방출률의 조절은 하이드로겔 삼차원 구조로 물리적인 얹힘의 빈도수, 고분자사이의 화학적 가교도 및 고분자 매트릭스와 사용되어야 할 생리활성분자간의 상호작용 등의 조절에 의한다. 고분자-단백질 상호작용은 사용되는 고분자의 이온화 관능기의 도입에 의해서 가능한데 반대전하의 경우에는 약물의 방출을 지연을, 같은 전하의 경우에는 약물 방출을 촉진시킴으로 알려져 있다.

상기에서 논의된 전달 시스템은 국부적 세포조직에 단백질과 펩타이드의 전달에 널리 쓰인다. 예로서 NGF가 포접된 매트릭스는 중추신경계통에,⁵³⁻⁵⁵ bFGF는 혈관⁵⁶ 및 눈에 신생혈관화의 방지에 쓰이고⁵⁷ 고분자 미립구로는 뇌로의 NGF 전달을^{58,59} 그

리고 사람 성장호르몬 전달에 사용된다.⁶⁰ 하이드로겔 시스템은 각막상피의 EGF 전달을,⁶¹ 절단된 척수회복을 위한 인슐린 유사 성장인자(IGF-I)와 PDGF의 전달을,⁶² 텐트의 재생에 뼈형성인자(BMPs)의 전달을,⁶³ 천연 고분자(콜라겐, 하이아루론산) 및 합성고분자(폴리아크릴산 및 폴리비닐알코올)의 블렌드물은 사람 성장호르몬(hGH)의 전달체로서 이용되고 있다.⁶⁴

3.2 고분자 전달체는 단백질을 안정화시킨다.

고분자 전달체 디바이스 내에 생리활성물질을 포접시키면 단백질 구조는 안정화되어 생물학적 활동도는 유지되고 따라서 활성화된 단백질의 활성도는 장시간 유지되어 원하는 곳에 전달된다. 대부분의 경우 단백질에 포접시키는 고분자에 다른 분자들이나 여러 가지 부형제들을 첨가하면 매트릭스 내에 존재하는 단백질의 안정화도는 증가되며, 이들 상의 조성변화로 방출량을 조절할 수 있고 결과적으로 생물학적 활동도도 조절할 수 있게 된다. 예로써 PLGA/NGF 미립구와 EVAc/NGF 매트릭스의 경우, 여러 다당류(덱스트린) 및 단백질(알부민 및 베타-락토글로불린)⁶⁵ 등의 분자량과 전하 등을 조절할 수 있는 부형제들로 NGF의 서방화를 연구하였다. 분자량의 변화와 부형제는 NGF 방출의 본질적인 효과에 대하여 영향은 미치지 않았으나 전하의 영향은 확실한 영향을 미치는 것으로 나타났다. 유사한 양전하 부형제의 경우에는 NGF의 방출은 감소시킨 반면, 반대전하인 음전하 부형제의 경우에는 NGF의 방출을 증진시켰다.

유사한 안정화는 여러 연구에서도 진행되었다. 알부민과 다당류로 안정화된 NGF,⁶⁶ 알부민으로 안정화된 EGF⁶⁶ 및 다른 성장인자들을 안정화시킨 해파린이다.⁶⁷ 종종 이러한 안정화는 성장인자들과 전하화된 분자들의 복합체 형성으로 나타나기도 하는데 이 단백질은 복합체화되면서 변성 및 분해로부터 피할 수 있다.⁶⁸ 스크랄페이트에 의한 bFGF의 안정화는 bFGF가 도포된 다공성 임플란트 주위에 혈관내피세포의 증식을 증진하는 것으로 밝혀졌는데⁶⁹ 이때 고분자로는 폴리하이드록시에틸메타아크릴레이트가 사용되었다. 이는 펠렛화되어 각막의 신생혈관화의 모델로도 제안되었다.⁶⁸

3.3 고분자 전달체는 국소전달도 가능하게 한다.

고분자 전달체를 조직에 이식하였을 때 방출된 단백질은 전달된 곳에서 축적된다. 따라서 이들 전달체의 적절한 크기, 기하학적 형태, 조성 및 미세구조

의 적절한 디자인에 의하여 원하는 량의 단백질 방출을 얻을 수 있고 따라서 조직 내에 단백질 축적양상을 조절할 수 있다. 이 디바이스가 피하에 임플란트 되었을 때 단백질은 피하조직 내로 방출되고 이를 통하여 체내순환으로 이어지게 된다(그림 3). 비록 순환에 있어서 단백질의 제거율은 전달체와 무관하지만 피하에 삽입된 고분자 디바이스는 순환하는데 있어 적절히 유지된 방출량으로 제공한다.

대부분 조직공학 분야의 응용에 있어서 전체순환계를 통한 단백질 투여가 필요없는 이유는 특정 단백질이 필요없는 부분에 독성 부반응을 나타내기 때문이다. 대신에 특별히 필요한 조직 주위에 국소적으로 지속적인 투여는 꼭 필요하다. 일례로 중추신경계 내에 이 전달체 시스템의 삽입 후 단백질의 국부투여가 많이 연구되고 있다.⁷⁰ 이러한 경우에 임플란트 주위의 조직 내에 단백질 분포의 패턴은 전달체의 효과면에 있어서 주요한 결정인자이다.

일반적으로 단백질 약물의 국부적 분포는 전달체 시스템과 관계되는 인자보다는 단백질의 조직으로의 이동 또는 제거율과 같은 조직생리학과 관계되는 인자에 더욱 영향을 받지만 어쨌든 두 가지 인자 모두 중요하다.⁷¹

3.3.1 고분자 주위에 단백질의 농도

조직 내에 단백질의 농도는 고분자 매트릭스 주위에 있는 조직에 단백질이 포화될 때까지 고분자로부터 약물의 방출률에 따라서 계속 변한다. 물론 단백질이 주위 조직에 포화되는 경우가 거의 일어나지 않는 이유는 대부분의 단백질은 아주 잠재력이 크고 물에 대하여 용해도가 높기 때문이다.

3.3.2 단백질의 방출기간

단백질 치료요법 기간은 단백질 방출률과 고분자 매트릭스 내에 함유된 단백질량에 의존된다. 일정한 고분자 매트릭스 내에 일정량의 단백질이 포접되었을 때 방출률이 증가하면 디바이스의 수명이 짧아진다. 대부분의 단백질 전달 시스템은 시간에 따라서 방출률이 감소하는 즉 완벽한 영차 방출이 일어나지 않아서 가용수명을 미리 예측하여야 한다.

3.3.3 조직 내로의 단백질 침투 실험

단백질 분자들의 국부조직 내로 침투되는 거리는 고분자 임플란트당 조직체적의 비로 나타내어진다.⁷² 침투거리는 단백질의 물리적 그리고 생리적 특징에 의존된다. 고분자 매트릭스로부터 방출되는 단백질은 조직간극 내로 수송되고 모세혈관이나 임파선 내의 침투로 제거되어지고 결국은 조직 내로 신진대사

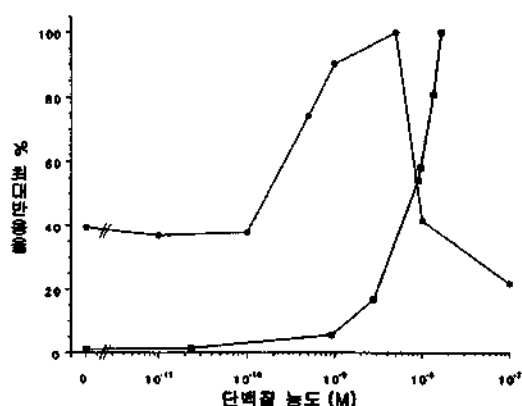


그림 2. 세포의 단백질 농도의 의존성. (A) 배아세포들 EGF (■)가 포함된 배양액 내에서 배양하면 EGF의 농도가 증가하면서 유사분열촉진성도 같이 증가한다. (B) 반면에 사람호중구들 fLNPLTL (●)의 존재 하에 배양하면 10⁻⁹~10⁻⁸M 사이에서 세포의 운동성이 최고에 이르며 10⁻¹⁰M 이하, 10⁻⁸ 이상의 농도에서는 세포의 운동성이 급격히 감소한다.

가 일어난다. 전달체 물성이 단백질에 폭로된 조직체적에 간접적인 영향을 미칠 때는 침투시키고자 하는 단백질의 변성으로 증가시킬 수 있고 따라서 이동속도는 상대적으로 제거율에 비해하게 된다. 이러한 조절은 전술한 바와 같이 여러 가지 부형제의 배합에 의하여 가능하다.^{58,71,73-77}

3.4 고분자 전달체는 조직 내에 확산제한 농도구배를 생성시킨다.

투여하고자 하는 단백질이나 펩타이드의 생물학적 활성도는 작용하고자 하는 장소의 농도에 의존한다.⁷⁸ 예를 들어 사람의 배아세포 증식은 주어진 배양액 내의 EGF 농도에 의존한다(그림 2A).⁶¹ 호중구에 대한 포밀레이트 펩타이드에 대한 화학적 속도론 효과는 최적농도가 10⁻⁸~10⁻⁹ M인 것으로 밝혀지고 있다(그림 2B), 따라서 최적의 단백질 활성도를 나타내기 위하여 국부농도의 조절은 제형설계에 있어서 대단히 중요하다. 대부분의 경우에는 생물학적 활성도는 단백질의 공간 구배형태에도 관계가 있다. 이의 좋은 예는 초파리의 개체발달 연구에서 볼 수 있다. 초파리 배아에서 비코이드 단백질의 구배가(그림 3A) 분극의 개체발달을 조절한다.^{79,80} 이때 화학주성 또는 화학적 신호에 대한 세포의 직접적 이동은 농도구배에 의존한다.

이렇게 자연적으로 일어나는 배아상태에서의 비코이드 단백질의 구배는 고분자 전달체의 삽입 후에 조직 내에서 측정되는 단백질 구배와 유사하다(그림 3B).

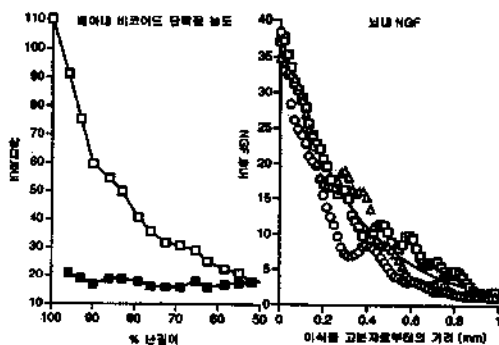


그림 3. 국부적 투여에 의하여 야기되는 단백질 구배현상. (A) 일반 초파리 배아 (□) 및 비코이드 결핍 배아 (■) 에서 발견되는 비코이드 구배현상, (B) 어른 쥐의 뇌에 NGF가 포함된 EVAc 고분자 이식체에서 서방화 되었을 때 뇌조직에서 검출되는 NGF의 농도구배.

NGF가 서방화되는 고분자 전달체를 뇌에 삽입하였을 때 삽입 후까지 단백질 구배가 상존한다.⁵⁴ 이러한 연구는 고분자 전달체가 조직 주위에 생리활성물질의 점진구배를 생성시키는데 유용하다고 생각되며 현존하는 기술로는 이 방법 이외의 것으로는 구배형태를 제조하기가 어렵다고 사료된다.

3.5 대부분 고분자 전달체는 환경에 적응시킬 수 있다.

때로는 인체의 생리학적 화학주기성에 따른 단백질 투여에 있어서 일정량의 지속성 투여보다는 펄스화된 투여가 필요한 질환치료가 있다. 결과적으로 주기적 투여방법이 필요하다. 이는 당뇨병에 있어서 인슐린 투여나 사람의 성장 호르몬 투여가 좋은 예이다. 인체 내에서는 이들을 아주 경제적인 방법으로 해결한다. 즉, 혈중의 글루코스의 양을 췌장세포가 인지하고 췌장 내에 인슐린을 생산하는 세포에 의해서 인슐린이 방출되는 이른바 피이드백 조절 자동 스위치 시스템을 가지고 있다.

이러한 주기적인 투여법을 대체하기 위하여 단백질 효과가 필요한 것을 감지하는 동시에 시간 변환 패턴에 따라서 정확히 계량된 단백질을 투여하기 위한 지능형 단백질 전달 시스템이 고안되기에 이르렀다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 자극 응답성 시스템을 이용한다. 예로써 세포막에 포접된 콘카나발린 A에 글루코스와 글리코실레이트와 인슐린을 경쟁적으로 공유결합시켜 변화하는 글루코스량에 응답하여 인슐린을 분비하게 하였으며^{81,82} 또한 pH 민감성 고분자 막에 글루코스옥시데이즈를 고정화하

여 pH 변화에 따라서 인슐린을 분비하게 고안하기도 하였다.⁸³ 그러나 이러한 방법이 실제적으로는 이러한 간단한 분자들의 응답만으로 복잡한 신체체계 이상을 완전히 해결한다는 것은 절음마 단계인 것만은 사실이다.

다른 방법으로는 면역 분리된 세포로 이루어진 하이브리드화 전달체제도 연구되고 있다. 합성 고분자 막에 캡슐화되어 면역적으로 격리되어 배양된 세포는 이중이식된 세포임에도 불구하고 장기간 동안 이 물세포로의 역할을 할 수 있다. 이렇게 생체하이브리드화된 인공췌장은 혈중의 혈당수치에 따라서 인슐린을 분비할 수 있는 췌장베타세포군으로 이식되고 자동적인 피이드백 조절이 되어 인슐린을 분비할 수 있고 이는 최근 인공장기 제조기법으로 각광받고 있는 조직공학의 대표적인 예이다.^{84,85} 이러한 것은 좀 부피가 크나 현재 이를 최소화하려는 연구가 한창 진행 중이다. 이들의 단점을 보완하는 다른 연구로는 이들 디바이스의 크기를 좀더 조직수준의 크기로 하여 주사할 수 있을 크기 정도의 고분자 막으로 세포를 보호하는 것이다. 미세캡슐은 천연고분자로는 알긴산이, 합성고분자로는 폴리알릴레이트가, 천연과 합성고분자의 블랜드물로는 폴리스티렌설포산/알긴산의 혼합 겔이 사용된다.⁸⁶ 또한, 폴리에틸렌옥사이드(PEO) 등의 고분자 필름을 계면광중합시켜 각각 광거한췌세포 표면에 처리하여 면역적으로 격리하는 방법도 개발되었는데 이런 부류의 연구는 특정부위의 조직재생을 위한 특정한 요소의 생리학적 요구에 단백질 계통의 생리활성물질을 최적조건으로 전달하기 위한 좋은 아이디어 중의 하나이다.⁸⁷

단백질 계통의 전달체를 위한 이식된 세포와 조직의 응용은 다음과 같은 단백질 전달체 응용에도 연구되고 있다. 배양된 PC12세포를 함유하는 고분자 중공사 및 미립구 등이 뇌에 이식되고 있는데^{88,89} 이의 가전은 캡슐화된 세포가 조직 내에서 도파민을 분비하여 파킨슨씨병을 치료하려 시도하였다.⁹⁰ 유전공학적으로 조작되어 NGF가 생성되는 세포를 PEO가 그래프트 반응된 고분자 막으로 캡슐화한 것을 뇌에 이식하였더니 망가진 콜린성 신경의 70% 이상이 생존됨을 확인하였다.⁹¹ 또한 NGF가 분비되는 세포를 함유한 미립구 및 중공사는 이식된 세포의 생존률을 증진시키고⁹² 전달 후에 콜린성신경의 생존률을 증가시켰다.⁹¹ 유사한 연구로 고분자 막과 NGF를 분비하는 세포의 하이브리드화로 서방성화

시켜서 이식된 태아조직의 생존률을 증진시키는 연구도 진행 중이다.⁵⁵ 이러한 뇌와 신경계통 재생의 일련의 연구들의 예는 세포들의 이식에 의하여 조직의 생존과 기능이 적절한 성장 또는 생존인자의 지속적이고 국부적 투여에 의하여 증진된다는 중요성을 증명해주는 좋은 본보기이다.

4. 차세대 단백질 전달체계로서의 가능성이 있는 연구

상기한 일련의 최근 연구들을 바탕으로 조직공학 내에서 단백질 전달 시스템의 몇몇 가능성을 던져주고 있다. 조직공학 분야의 연구는 아직 걸음마 단계라서 도전과 기회가 또 성공과 실패가 상존하는 것도 사실인 것은 타 분야의 신개척 분야와도 동일하다. 다음은 이러한 가능성이 있으면서도 한창 연구 중인 연구들을 소개한다.

4.1 고분자 표면에 단백질의 공유결합(고정화)

대부분의 성장인자 등은 생체막 단백질에 결합하여 세포 리셉터에 대한 리간드 역할을 한다. 이 결합은 세포의 거동 또는 기능을 변화시키는 생화학적 반응의 세포 내 단계반응을 촉발한다.⁹³ 세포는 또한 ECM 분자에도 결합하여 인테그린 리셉터를 통한 조절에 의하여 접착 상호작용을 생성시킨다. 이 인테그린은 공유결합과 관계되는 이질이량체 단백질로서 세포-매트릭스와 세포-세포간의 상호작용을 조절한다. 이때 리셉터는 국지적인 환경을 인지하고 이에 상응할 수 있는 적당한 방도를 세포에게 제공한다. 따라서 리간드의 유효성을 조절할 수 있는 위치에 세포를 위치하는 것으로도 세포의 거동을 조절할 수 있는 가능성도 있다.

그림 4는 장래의 단백질 전달 시스템에 대한 개요도를 나타내었다. 그림 4A에는 성장인자와 같은 가용성 단백질을 국부조직 사이트에 전달하는 방법을 나타내었고 그림 4B에는 이러한 인자들이 꼭 가용성이 아닐 때를 보여주고 있는데 예로써 폴리메틸렌테레프탈레이트에 인슐린을 고정화하였더니 중국 햄스터 난소세포의 밀도와 세포내부의 신호체계를 증진시킴을 보이고 있다.⁹⁴ 세 파로스에 인슐린을 그 래프트한 것의 생물학적 효과는 1960년말에 보여주었고⁹⁵ 몇 년 후에 NGF도 똑같은 활성도를 나타냄을 보였다.⁹⁶ 사실 고정화된 단백질은 때때로 같은 농도로 용액에 녹아있는 것보다 높은 레벨의 활성도

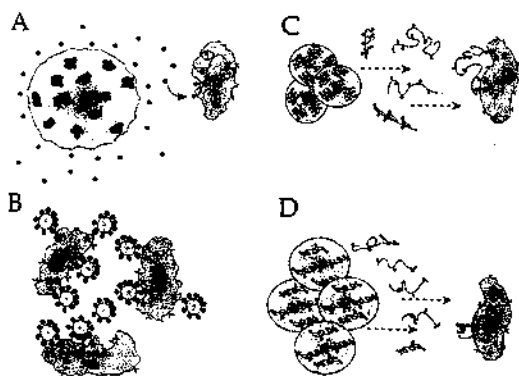


그림 4. 차세대에 가능성이 있는 단백질 전달체계. (A) 단백질 물질이 전달체로부터 세포를 향하여 확산되어나가고 있다. 리간드-리셉터 복합체가 세포내 신호체계를 촉발시키고 이는 내면화에 의해서 다른 레귤레이션되며 결국은 리셉터-리간드 복합체는 분해된다. (B) 미립구 표면에 고정화 등에 의한 리셉터-리간드 복합체의 내면화를 방지하는 단백질의 개질에 의하여 신호체계를 연장시킨다. (C) 단백질의 안정화를 위하여 분자량이 큰 수용성 고분자와 접합화시켜 조직내에서 단백질의 반감기를 증가시켜 조직내로의 침투를 증진시킨다. (D) 고분자-단백질 접합체는 목표지향화된 유전자 전달에도 사용된다. 유전자치료 전달체로의 동일한 고분자 전달체 분자로서 세포와 목표 단백질을 접합화하여 특정한 세포 또는 조직으로의 전달체의 전달에 있어서 시간과 공간 모두 연장시킬 수 있다.

를 나타낸다. 인슐린과 트랜스페린을 고정화시킨 폴리메틸테타아크릴레이트는 같은 농도와 용해된 또는 물리적으로 부착된 것보다 배아세포의 성장을 촉진시켰다.⁹⁷ 결합된 성장인자효과는 엔도사이토시스에 의해서 증폭되고 결과적으로 리셉터-리간드 복합체의 분해로 이어져 생물학적 활성도는 유지되나 리셉터 내부화가 방지되는 메커니즘으로 분자형태의 고정화된 리간드는 세포 내 신호전달체계에 있어서 좀더 장시간 동안 유지되는 것이다.

고정화된 인자의 형태는 세포간 메커니즘의 유도에 결정적으로 중요하다. 성장인자 활성도의 증진에 한가지 해결법으로는 PEO 분자를 표면과 인자 사이에 스페이서로 사용되었다(그림 4C). 인슐린과 표면간의 스페이서에 의한 고정화는 표면에 고정화된 인슐린에 비하여 세포성장이 증진되었다.⁹⁸ PEO를 통하여 표면에 결합된 속박(tethered) EGF는 물리적으로 흡착된 EGF에 비하여 좀더 생물학적 활동도가 증진되어 DNA 합성과 세포 접착이 큰 폭으로 촉진되었다.⁹⁹ 리간드의 돌연변이나 물리적 얽

힘으로 만들어진 성장인자 리셉터의 내부화 결핍이 발현된 세포는 유사한 증진이 관찰되었는데 이는 세포 신호전달체계의 중폭으로 기인된 것으로 해석되었다.¹⁰⁰

4.2 속박 분자의 서방화

조직 내에 단백질의 전달에 있어 주된 어려움은 이들의 반감기가 짧은 것에서 기인된다. 이러한 단백질의 순환 반감기는 불활성 운반 고분자의 접합에 의하여 연장시킬 수 있다. 대표적인 고분자로는 천연고분자로 알부민, 젤라틴 및 텍스트린, 합성고분자로는 PEG를 들 수 있다. 이들의 접합화에 의한 반감기 연장의 정확한 메커니즘은 불분명하나 분해율의 감소, 면역작용의 증진 및 콩팥에서의 제거 감소되는 등으로 설명되고 있다.^{42,101}

접합은 주사로 체내에 투여된 단백질의 순환시간을 연장시키는데 이와 같은 예로는 PEG-접합화된 아테노신 디아민나제 및 아스파라기나제가 있으며 미국 식품의약안전청에 의하여 임상사용이 허가되었다. 또한 이들은 조직공학에서 단백질의 국부투여를 증진시키기도 한다. 단백질의 국부투여에 있어서 접합화는 세포의 간 내에서 분해율, 세포의 간에서 체내순환체로의 투과도 및 리셉터 중재 반응에 의한 회수율을 감소시킬 수 있다. 이 단백질이 세포의 간에 머물러 있을 때, 단백질은 투여장소로부터 좀더 먼 거리까지도 투과할 수 있다.⁷¹ 예로써 NGF는 직접 주사투여 후에 뇌조직 내에서 30분이라는 비교적 짧은 반감기를 가진다.¹⁰² 이 조직 내에서의 이 짧은 시간 내에 NGF 분자들은 주사된 곳으로부터 약 1 mm 정도의 제한된 거리만이 침투할 수 있다. 그러나 분자량 70000 g/mole의 텍스트린과 접합된 NGF와 접합화가 되지 않은 NGF를 EVAc 디바이스를 이용하여 어른 쥐에 투여하여 비교하였을 때 접합화가 되지 않은 NGF에 비하여 뇌간질을 8배 이상이나 침투하는 것이 관찰되었다.⁶⁵ 이러한 접합 기술은 항암제나¹⁰³ 성장인자의¹⁰⁴ 서방화 물질을 안정화시키는데 사용된다.

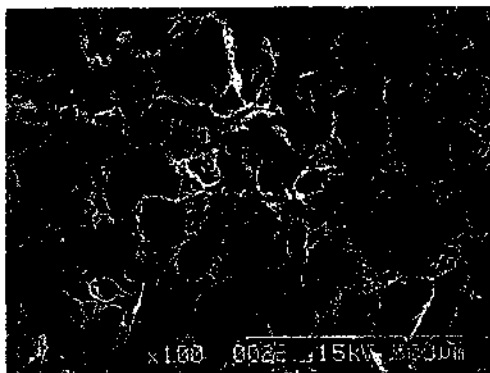
단백질이나 펩타이드의 기능은 접합을 통하여 변형될 수도 있다. 세포는 ECM 내에 단백질에 접촉된다. 세포의 기질에 대한 접착은 이러한 ECM 분자의 아미노산 잔기 서열로부터 얻어진 합성 펩타이드로 재 구축될 수도 있다.²⁹ 이러한 예로는 RGD (알라닌-글리신-아스파르트산의 순서로 이루어진 아미노산 잔기로 피브로넥틴으로부터 유래되어 현재까지는 대부분 ECM 단백질의 대부분이라고 여기고

있다) 및 YIGSR (타이로신-류신-글리신-세린-알라닌의 순서로 이루어진 아미노산 잔기로 라미닌에서 유래되었다)이 고정화된 표면 위에서는 세포부착을 촉진시킨다.¹⁰⁵ 또한 이들 펩타이드를 이관능성이며 수용성인 PEG 분자에 커플링시켜서 세포유착의 유도 및 증진시키는데 사용되곤 한다.³⁴ 이러한 고분자-펩타이드 접합체를 세포 현탁액에 투여하면 세포유착의 생성율과 평균 크기 등을 조절할 수 있다. 물론 세포의 생존율, 기능 및 단백질 생산 재조합 등은 용질들에 의존된다.³⁵

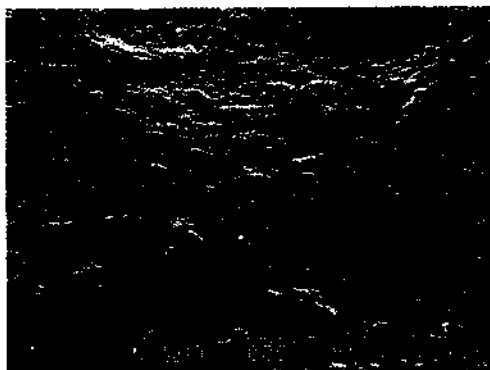
4.3 유전자 치료를 위한 단백질 전달체

조직세포 내에 목표지향화된 유전자 치료물질의 전달은 조직공학 응용에 있어서 강력한 무기이다. 이 기술은 특정조직이나 세포의 생존, 증식 및 기능의 증진을 위한 유전정보의 삽입을 가능케 한다. 그러나 목표화된 세포 내에 충분한 유전자 전달 기술은 아직도 개발 중이며 현존하는 기술로는 대부분 치료에서 필요한 기준 또는 기간 동안의 완벽한 형질전환 발현이 없는 상태이다. 현존 사용법의 대부분이 약물 또는 단백질의 전달체에서 사용하는 기법 그대로를 사용하는데 대표적으로는 조직 내에 유전자 총을 이용한 직접적인 투여¹⁰⁶ 또는 리포솜 내의 캡슐화 등이다.¹⁰⁷ 이러한 접근방법은 일반 약물 전달 체계와 비교하여 볼 때 유전자 치료물질은 기존의 약물보다 좀더 복잡한 약물로 생각하면 이해하기가 쉽다. 따라서 현존 약물 전달체계를 좀더 정교하게 또한 새로운 아이디어를 집어넣으면 유전자 교환을 증진시킬 수 있다.

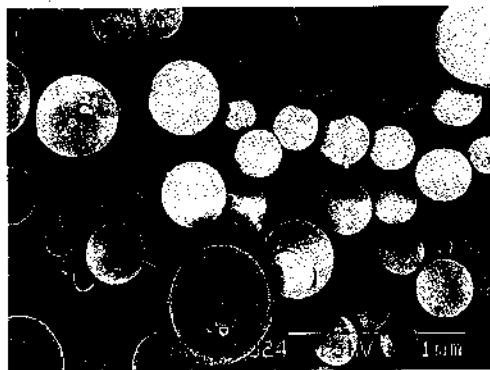
때때로 이러한 고분자는 세포막을 통과시키는 유전자 치료 매개체로 제조하여 전달체로 사용되기도 한다(그림 4D).⁴⁰ 유전자 전달은 수용성 고분자와 복합체화함으로써¹⁰⁸ 가능한데 이는 고분자 미립구¹⁰⁹ 및 고분자 겔 내로의 캡슐화¹¹⁰ 등이 대표적이다. 따라서 전술한 단백질의 국부투여화하기 위한 캡슐화 방법들이 그대로 사용된다. 유전자 치료법 매개체를 디자인하고 합성하는데 약물-고분자 접합체, 단백질-고분자 접합체, 펩타이드-고분자 접합체를 합성하는 것과 크게 다를 바 없다.¹⁰¹ 따라서 이런 것들은 기본으로 목표지향화, 내면화, 동화적 작용·활성화 및 조절활성도를 가지는 속박화 유전자 서열을 갖는 유전자 치료 매개체를 디자인해야 할 것이다.



(a)



(b)



(c)

그림 5. 본 연구팀에서 신경재생을 위하여 제조한 NGF가 포집된 PLGA의 조직공학용 담체 (a), 필름 (b) 및 미립구 (c)의 전자현미경 사진.¹¹⁷

5. 결 론

단백질 성장인자는 세포거동의 조절을 위한 강력한 수단을 제공하나 단백질의 연구개발에 있어서는 많은 도전과 실패가 필요하다. 일정기간 동안 적당한 약물농도로 특정 목표지형화된 세포에 활성력이

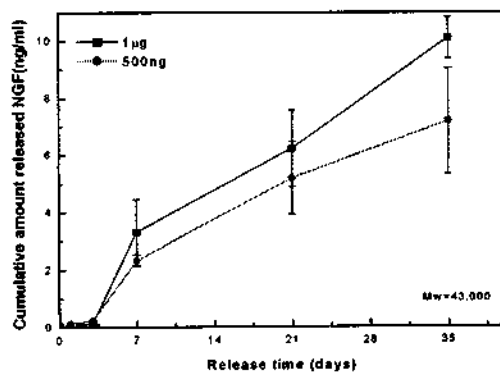
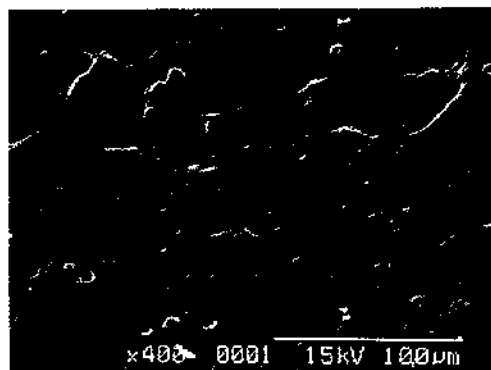
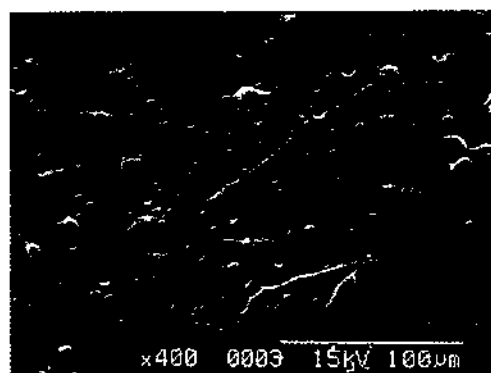


그림 6. 그림 5(a)의 담체에서 서방화된 NGF의 농도로써 거의 영차 방출을 이루고 있음을 보이고 있어서 세포의 분화·성장에 좋은 영향을 끼침을 예견할 수 있다.¹¹⁷



(a) 500 ng



(b) 1 µg

그림 7. 위의 조직공학용 담체, 필름, 미립구로부터 서방화된 NGF 내에서 배양된 PC-12세포에서 신경돌기가 생성된 것으로 보아 이상적으로 서방화된 것을 알 수 있어 이들로부터 제조된 신경재생유도관 등이 신경재생을 용이하게 할 수 있을 것으로 사료된다.¹¹⁷

있는 단백질 전달체의 제 1세대 기술은 조직공학 분야에 있어서 기초적인 분야에 쓰일 수 있게 되었다.

그림 5에는 본 연구팀에서 신경재생을 위하여 제조한 NGF가 포집된 유화동결건조 방법으로 제조된 조직공학용 담체, 조직공학용 필름 및 미립구들이다.¹¹⁷

그림 6에는 이들로부터 서방화된 NGF의 그림 및 그림 7에는 이들로부터 배양된 PC-12세포에서 신경돌기가 성장되는 것으로 보아 본 방법에 의하여 제조되어 단백질이 서방화된 조직공학용 담체가 세포의 성장, 분화 등에 유용할 것으로 사료된다.

고분자를 이용한 단백질, 펩타이드 등의 생리활성 물질의 지속 방출형 기술개발에 있어서 계속 연구되어야 할 분야는 성장인자의 안정화 및 유전자 전달체의 전달물질 및 전달방법 등이며, 이들은 고분자 공학에 기반을 두어 생물학, 단백질 공학, 약학 및 의학과 같이 다학제 간의 연구를 바탕으로 조직공학자들이 풀어야 할 과제임에 틀림없다.

감사의 글: 본 총설증 본 저자에 의하여 이루어진 연구는 보건복지부, 산업자원부 및 과학기술부의 지원에 의하여 이루어졌으므로 이에 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

- G. Khang and H. B. Lee, *Chem. World*, **37**, 46 (1997).
- G. Khang and J. H. Lee, in "Tissue Engineering: Concepts and Applications", eds. by J. J. Yoo and I. Lee, chap. 4, p. 61, Korea Med. Pub., Seoul, 1998.
- G. Khang and H. B. Lee, *J. Biomed. Eng. Res.*, **20**, 1 (1999).
- G. Khang, I. Jo, J. H. Lee, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer Sci. Tech.*, **10**, 640 (1999).
- G. Khang and H. B. Lee, *Bioindustry*, **22**, 32 (1999).
- G. Khang, J. H. Lee, and H. B. Lee, *Polymer Sci. Tech.*, **10**, 732 (1999); G. Khang, I. Lee, and H. B. Lee, *Polymer Sci. Tech.*, **10**, 782 (1999).
- G. Khang, J. H. Lee, and H. B. Lee, "Polymeric Biomaterials", in "CRC Biomedical Engineering Handbook", 2nd Ed., ed. by J. Bronzio, section IV, chap. 39, p. 1~23, CRC Press, Boca Raton, FL, 2000.
- G. Khang, in "Biomaterials and Tissue Engineering", eds. by K. S. Park, T. R. Yoon, M. C. Lee, and H. C. Lee, chap. 8, p. 127, Chonnam National Univ. Press, 2000.
- G. Khang, I. Lee, and H. B. Lee, *Fiber Tech. Ind.*, **4**, 1 (2000).
- G. Khang and H. B. Lee, "Cell-Synthetic Surface Interaction", in "Methods of Tissue Engineering", eds. by A. Atala and R. Lanza, chap. 20, Academic Press, in press, 2001.
- S. P. Baldwin and W. M. Saltzman, *Adv. Drug. Del. Rev.*, **33**, 71 (1998).
- Y. Tabata, *PSTT*, **3**, 80 (2000).
- R. Langer, *J. Control. Rel.*, **62**, 7 (1999).
- R. Langer, *Nature*, **392**(Suppl.), 5 (1998).
- T. F. Deuel, "Growth Factors", in "Principles of Tissue Engineering", eds. by R. Lanza, R. Langer, and W. Chick, R. G. Landes, Georgetown, TX, 1997.
- L. A. Greene and A. S. Tischler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2424 (1976).
- R. Ross, J. Glomset, B. Kariya, and L. Harker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 1207 (1974).
- H. Sheardown, C. Wedge, L. Chou, R. Apel, D. S. Rootman, and Y. L. Cheng, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **34**, 3593 (1993).
- N. Celebi, N. Erden, B. Gonul, and M. Koz, *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**, 386 (1994).
- C. G. Craig, V. Tropepe, C. M. Morshead, B. A. Reynolds, S. Weiss, and D. V. D. Kooy, *J. Neuro. Sci.*, **16**, 2649 (1996).
- A. Postlethwaite, J. Keski-Oja, H. Moses, and A. Kang, *J. Exp. Med.*, **165**, 251 (1987).
- J. H. Kordower, E. Y. Chen, E. J. Mufson, S. R. Winn, and D. F. Emerich, *Neuroscience*, **72**, 63 (1996).
- Y. Lee, L. V. McIntire, and K. Zygorakis, *Biotech. Bioeng.*, **43**, 622 (1993).
- D. A. Lauffenburger and J. J. Linderman, "Receptors: Models for Binding, Trafficking and Signaling", p. 365, Oxford University Press, NY, 1993.
- S. H. Zigmond, *J. Cell. Biol.*, **75**, 606 (1977).
- P. Parsons, "Wingert Cooperativity in Hepatocyte Culture from Cell-cell and Cell-substrate Interactions", Ph. D. thesis, The Johns Hopkins Univ., Chem. Eng., Baltimore MD, 1992.
- C. Yasua, Y. Tomita, M. Shono, K. Ishimura, and A. Ichihara, *J. Cell Phys.*, **156**, 522 (1993).
- G. Flouriot, C. Vaillant, G. Salbert, C. Pelissero, J. M. Guiraud, and Y. Valotaire, *J. Cell Sci.*, **105**, 407 (1993).
- M. D. Pierschbacher and E. Ruoslahti, *Nature*, **309**, 30 (1984).
- Y. Ito, M. Kajihara, and Y. Imanishi, *J. Biomed. Mater. Res.*, **25**, 1325 (1991).
- Y. Ito, "Biocomposite Materials for Cell Culture", in "Synthesis of Biocomposite Materials", ed. by Y. Imanishi, CRC Press, Boca Raton, FL, 1992.
- M. J. Moghaddam and T. Matsuda, *Trans Am. Soc. Art. Inter. Organs*, **37**, M437 (1991).
- S. P. Massia and J. A. Hubbell, *J. Biomed. Mater. Res.*, **25**, 223 (1991).
- W. Dai, J. Belt, and W. M. Saltzman, *Bio/Tech.*, **12**, 797 (1994).
- W. Pai and W. Saltzman, *Biotech. Bioeng.*, **50**, 349 (1996).
- J. L. Hill-West, S. M. Chowdhury, M. J. Slepian, and J. A. Hubbell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 5967

- (1994).
37. W. M. Saltzman, *MRS Bull.*, **21**, 62 (1996).
38. "Molecular Biology of the Cell", eds. by B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. D. Watson, 3rd Ed., p. 1294, Garland Pub., NY, 1994.
39. G. Khang, J. M. Rhee, J. S. Lee, and H. B. Lee, *Polymer Sci. Tech.*, **12**, 4 (2001).
40. P. Y. Kuo and W. M. Saltzman, *Crit. Rev. Eukaryotic Gene Exp.*, **6**, 59 (1996).
41. L. K. Fung and W. M. Saltzman, *Adv. Drug Del. Rev.*, **32**, 80 (1997).
42. W. R. Gombotz and P. K. Pettit, *Bioconj. Chem.*, **6**, 332 (1995).
43. R. Langer, *Science*, **249**, 1527 (1990).
44. J. Folkman and D. Long, *J. Surg. Res.*, **4**, 139 (1964).
45. J. Folkman, D. Long, and R. Rosenbaum, *Science*, **154**, 148 (1966).
46. W. M. Saltzman, S. H. Pasternak, and R. Langer, *Chem. Eng. Sci.*, **42**, 1989 (1987).
47. J. C. Cho, G. Khang, J. M. Rhee, Y. S. Kim, J. S. Lee, and H. B. Lee, *Korea Polymer J.*, **7**, 79 (1999).
48. G. Khang, J. C. Cho, J. W. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Bio-Med. Mater. Eng.*, **9**, 49 (1999).
49. H. B. Lee, G. Khang, J. C. Cho, J. M. Rhee, and J. S. Lee, *Polymer Preprints*, **40**, 288 (1999).
50. G. Khang, J. H. Lee, J. W. Lee, J. C. Cho, and H. B. Lee, *Korea Polymer J.*, **8**, 80 (2000).
51. J. C. Cho, G. Khang, H. S. Choi, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **24**, 728 (2000).
52. H. Okada and H. Toguchi, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **12**, 1 (1995).
53. C. E. Krewson, M. Klarman, and W. M. Saltzman, *Brain Res.*, **680**, 196 (1995).
54. C. E. Krewson and W. M. Saltzman, *Brain Res.*, **727**, 169 (1996).
55. C. E. Krewson and W. M. Saltzman, *Tissue Eng.*, **2**, 183 (1996).
56. E. R. Edelman, M. A. Nugent, and M. J. Karnorsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1513 (1993).
57. A. Lee and R. Langer, *Science*, **221**, 1185 (1983).
58. C. E. Krewson, R. B. Dause, M. W. Mak, and W. M. Saltzman, *J. Biomater. Sci.*, **8**, 103 (1996).
59. P. J. Camarata, R. Suryanarayanan, and D. A. Turner, *Neurosurgery*, **30**, 313 (1992).
60. J. Cleland, E. Duenas, J. Yang, H. Chu, V. Mukku, A. Mac, M. Roussakis, D. Yeung, D. Brooks, Y. F. Maa, C. Hsu, and J. Jones, *Proc. Int. Symp. Rel. Bioact. Mater.*, **22**, 149 (1995).
61. B. Gonul, D. Erdogan, C. Ozogul, M. Koz, A. Babul, and N. Celebi, *Burns*, **21**, 7 (1995).
62. M. Oudega, X. M. Xu, V. Guenard, N. Kleitman, and M. B. Bunge, *Glia*, **19**, 247 (1997).
63. M. F. Charette and R. B. Rutherford, "Regeneration of Dentin", in "Principles of Tissue Engineering", eds. by R. Lanz, R. Langer, and R. G. Landes, Georgetown, TX, 1997.
64. M. G. Cascone, B. Sim, and S. Downes, *Biomaterials*, **16**, 569 (1995).
65. C. Krewson, R. Dause, M. Mak, and W. Saltzman, *J. Biomater. Sci., Polymer Ed.*, **8**, 103 (1996).
66. J. B. Murray, L. Brown, R. Langer, and M. Klagsburn, *In Vitro*, **19**, 743 (1983).
67. D. Gospodarowicz and J. Cheng, *J. Cell Physiol.*, **128**, 475 (1986).
68. M. Loughman, K. Chatzistefanou, E. Gonzalez, E. Flynn, A. Adumis, Y. Shing, R. D. Amato, and J. Folkman, *Aust. New Zealand J. Ophthalmol.*, **24**, 289 (1996).
69. T. Nicaeus, M. Tolentino, A. Adamis, and P. Rubin, *Ophthalmic Plast. Reconstr. Surg.*, **12**, 235 (1996).
70. M. J. Mahoney and W. M. Saltzman, *J. Pharm. Sci.*, **85**, 1276 (1996).
71. W. M. Saltzman and M. L. Radomsky, *Chem. Eng. Sci.*, **46**, 2429 (1991).
72. M. F. Haller and W. M. Saltzman, *Pharm. Res.*, **15**, 377 (1998).
73. W. D. Dang and W. M. Saltzman, *Biotechnol. Prog.*, **8**, 527 (1992).
74. W. M. Saltzman, *Crit. Rev., Ther. Drug Carrier Syst.*, **10**, 111 (1993).
75. W. D. Dang, O. M. Colvin, H. Brem, and W. M. Saltzman, *Cancer Res.*, **54**, 1729 (1994).
76. J. F. Strasser, L. K. Fung, S. Eller, S. A. Grossman, and W. M. Saltzman, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **275**, 1647 (1995).
77. L. Fung, M. Shin, B. Tyler, H. Brem, and W. M. Saltzman, *Pharm. Res.*, **13**, 671 (1996).
78. D. Knauer, H. Wiley, and D. Cunningham, *J. Biol. Chem.*, **259**, 5623 (1984).
79. W. Driever and C. Nusslein-Volhard, *Cell*, **54**, 95 (1988).
80. D. S. Johnston and C. Nusslein-Volhard, *Cell*, **68**, 201 (1992).
81. C. M. Pai, Y. H. Bae, E. Mack, D. Wilson, and S. W. Kim, *J. Pharm. Sci.*, **81**, 532 (1992).
82. M. Brownlee and A. Cerami, *Science*, **206**, 1190 (1979).
83. J. Kost, T. Horbett, B. Ratner, and M. Singh, *J. Biomed. Mater. Res.*, **19**, 1117 (1985).
84. T. Maki, C. S. Ubhi, H. Sanchez-Farpon, S. J. Sullivan, K. Borland, T. E. Muller, B. A. Solomon, W. L. Chick, and A. P. Monaco, *Transplantation*, **51**, 43 (1991).
85. S. J. Sullivan, T. Maki, K. M. Borland, M. D. Mahoney, B. A. Solomon, T. E. Muller, A. P. Monaco, and W. L. Chick, *Science*, **255**, 718 (1991).
86. H. Iwata, T. Takagi, K. Kobayashi, T. Oka, T. Tsuji, and F. Ito, *J. Biomed. Mater. Res.*, **28**, 1201 (1994).
87. A. S. Sawhney, C. P. Pathak, and J. A. Hubbell, *Biotech. Bioeng.*, **44**, 383 (1994).
88. C. B. Jaeger, P. Aebischer, P. A. Tresco, S. R. Winn, and L. A. Greene, *J. Neurocytol.*, **21**, 469 (1992).

89. S. R. Winn, P. A. Tresco, B. Zielinski, L. A. Greene, C. B. Jaeger, and P. Aebischer, *Exp. Neurol.*, **113**, 322 (1991).
90. M. D. Lindner, S. R. Winn, E. E. Baetge, J. P. Hammang, F. T. Gentile, D. Poherty, P. E. McDermott, B. Frydel, M. D. Ullman, T. Schallert, and D. F. Emerich, *Exp. Neurol.*, **132**, 62 (1995).
91. M. Schinstine, D. M. Fiore, S. R. Winn, and D. F. Emerich, *Cell Transplant.*, **4**, 93 (1995).
92. I. Date, T. Ohomoto, T. Imaoka, and T. Shingo, *Neuroreport*, **7**, 1813 (1996).
93. J. J. Marler, J. Upton, R. Langer, and J. P. Vacanti, *Adv. Drug Del. Rev.*, **33**, 165 (1998).
94. Y. Ito, S. Kondo, G. Chen, and Y. Imanishi, *FEBS Lett.*, **403**, 159 (1997).
95. P. Cuatrecasas, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **63**, 450 (1969).
96. W. A. Frazier, L. F. Boyd, and R. A. Bradshaw, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2931 (1973).
97. Y. Ito, S. Q. Liu, and Y. Imanishi, *Biomaterials*, **12**, 449 (1991).
98. Y. Ito, M. Inoue, S. Q. Liu, and Y. Imanishi, *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**, 901 (1993).
99. P. R. Kuhl and L. G. Griffith-Cima, *Nat. Med.*, **2**, 1022 (1996).
100. C. C. Reddy, A. Wells, and D. A. Lauffenburger, *Biotechnol. Prog.*, **10**, 377 (1994).
101. R. Duncan and F. Spreafico, *Clin. Pharmacokinet.*, **27**, 290 (1994).
102. C. K. Krewson, M. L. Klarman, and W. M. Saltzman, *Brain Res.*, **680**, 196 (1995).
103. W. Dang, O. M. Colvin, H. Brem, and W. M. Saltzman, *Cancer Res.*, **54**, 1729 (1994).
104. A. M. Felix, Y. Lu, and R. M. Campbell, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **46**, 253 (1995).
105. S. P. Massia and J. A. Hubbell, *Anal. Biochem.*, **187**, 292 (1990).
106. J. Wolff, R. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani, and P. Felgner, *Science*, **247**, 1465 (1990).
107. P. Felgner, *Scientific American*, **276**, 102 (1997).
108. M. Tang, C. Redemann, and F. Szoka, Jr., *Bioconjugate*, **7**, 703 (1996).
109. E. Mathowitz, J. Jacob, Y. Jong, G. Carino, D. Chickering, P. Chaturvedi, C. Santos, K. Vijayaraghavan, S. Montgomery, M. Bassett, and C. Morrell, *Nature*, **386**, 410 (1997).
110. J. Isner, A. Pieczek, R. Schainfeld, R. Blair, L. Haley, T. Asahara, K. Rosenfield, S. Razvi, K. Walsh, and J. Symes, *Lancet*, **348**, 370 (1996).
111. S. J. Konturek, W. Pawlik, W. Mysh, P. Gustaw, R. Sendur, E. Mikos, and W. Bielanski, *Regul. Pept.*, **30**, 137 (1990).
112. V. Lindner, D. Lappi, A. Baird, R. Majack, and M. Reidy, *Circ. Res.*, **68**, 106 (1991).
113. J. H. Kordower, T. B. Freeman, B. J. Snow, F. J. G. Vingerhoets, and E. J. Mufson, *New Engl. J. Med.*, **332**, 1118 (1995).
114. D. Kolson, J. Buchhalter, R. Collman, B. Hellmig, C. Farrell, C. Debouck, and F. Gonzalez-Scarano, *AIDS Res. Hum. Retrovirus*, **9**, 677 (1993).
115. B. Axelsson, R. Youseffi-Etemad, S. Hammarstrom, and P. Perlmann, *J. Immunol.*, **141**, 2912 (1988).
116. M. J. Orsini, C. M. Debouck, C. L. Webb, and P. G. Lysko, *J. Neurosci.*, **16**, 2546 (1996).
117. G. Khang, I. W. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, unpublished data (2001).