

Particle Replication In Non-Wetting Templates (PRINT) 방법을 이용한 약물 및 유전자 전달체의 제작

박지영[†] · Stephanie Gratton* · Maynor Benjamin* · 임종성** · Joseph Desimone*

노스캐롤라이나 대학교 약학대학

미국 노스캐롤라이나 채플린

*노스캐롤라이나 대학교 화학과

미국 노스캐롤라이나 채플린

**서강대학교 화공생명학과

121-742 서울시 마포구 신수동 1

(2007년 4월 1일 접수, 2007년 5월 18일 채택)

Fabrication of Non Viral Vector for Drug and Gene Delivery using Particle Replication In Non-Wetting Templates (PRINT) Technique

Ji-Young Park[†], Stephanie Gratton*, Maynor Benjamin*, Jomg Sung Lim** and Joseph Desimone*

School of Pharmacy, University of North Carolina at Chapel Hill, NC 27599, USA

**Department of Chemistry, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC 27599, USA*

***Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Sogang University, 1 Sinsu-dong, Mapo-gu, Seoul 121-742, Korea*

(Received 1 April 2007; accepted 18 May 2007)

요 약

본 연구에서는 UV photo-lithography 방식의 particle replication in non-wetting templates(PRINT) 법을 이용하여 약물 전달에 운반체로 사용되는 $3\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$ 사이즈의 균일한 고분자 하이드로젤 입자를 제조하였다. 몰드(mold)와 기재(substrate)는 PRINT 방식을 통하여 탄성을 지닌 perfluoropolyethers(PFPE)로 제작하였으며 이를 반복적으로 사용할 수 있도록 하였다. 제작된 입자는 점착성이 있는 수용성 고분자를 이용하여 회수하였다. 입자의 주요 성분은 생분해성 고분자인 poly(ethylene glycol) diacrylate(PEG-diA)이며, 세포 uptake에 적합하도록 aminoethylacrylate(AEM)와 2-acryloxyethyltrimethyl ammonium chloride(AETMAC)를 첨가하였다. 본 연구를 통해 균일하고 원하는 크기의 생분해성 고분자 입자를 제작하는 PRINT 기술이 약물 전달 및 유전자 전달에 필요한 수송체인 비바이러스 벡터를 제작하기 위한 효과적인 기술임을 제시하였다.

Abstract – Polymeric hydrogel particles were fabricated to demonstrate the scale-up possibilities with the Particle Replication In Non-wetting Templates (PRINT) process. A permanently etched, specifically designed master was made on a silicon wafer using conventional photolithography, then reactive ion etching. The master and substrate were used repeatedly to make a large number of identical elastomeric perfluoropolyethers (PFPE) replica molds. The PFPE replica molds were used to fabricate and harvest individual, monodisperse micron-sized particles using the PRINT process. A water-soluble polymer adhesive was used as a sacrificial layer for harvesting particles. Particles were composed of biodegradable poly (ethylene glycol) diacrylate (PEG-diA), and aminoethylacrylate (AEM) and 2-acryloxyethyltrimethyl ammonium chloride (AETMAC) were added to them for improving the uptake of the cells. This study suggested PRINT used to produce the uniformed and shape specific biodegradable polymer is the effective technique for the non viral vector for the drug and the gene delivery.

Key words: Polymeric Hydrogel Particles, Particle Replication In Non-wetting Templates (PRINT) Process, Photolithography, Perfluoropolyethers (PFPE)

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: jypark@unc.edu

1. 서 론

유전자 치료(gene therapy)는 유전적 문제를 발생시키는 장기에 유전자를 주입함으로써 치료하는 방법이다[1]. 바이올로지, 약제, 의학 등등의 분야에서 연구자들은 유전자 치료는 유전자 이상으로 기인한 암, 심장혈관질환, 신경퇴행성 질병 등을 치료할 수 있을 것을 기대한다. 체내에서의 유전자 이상은 체내 단백질의 결핍, 혹은 과대에 의해서 발생되며, 특정 유전자의 발현을 일으키는 단백질을 억제 혹은 성장시키는 방법을 얻기 위한 노력이 진행되고 있다[2]. 유전자를 치료하기 위한 방법은 크게 두 부류로 나눌 수 있다. 체내에 직접 단백질을 주입하는 '약제 전달(drug delivery)'과 유전적 정보를 가진 DNA/RNA를 직접 주입하는 '약제 전달(gene delivery)' 등의 방법이다. 약제를 직접 전달하는 약제 전달의 경우, 주입된 단백질은 지속적으로 체내에 주입해야 하고, 체내의 면역 시스템 내에서 문제를 일으킬 수 있다는 제한성이 있다. 그래서 유전자를 주입하여 체내에서 단백질을 지속적으로 생성할 수 있도록 하는 유전자 전달이 제안되었다[3].

유전자 전달은 운반체에 따라서 두 종류로 나눌 수 있는데 바이러스 벡터(viral vector)와 비바이러스 벡터(non viral vector)로서 이 두 가지는 각각의 장단점을 가지고 있다. 우선 바이러스 벡터는 바이러스를 바탕으로 한 전달체로서 DNA/RNA를 바이러스의 유전자에 재조합하여 사용하는 방법이다. 바이러스 벡터에 사용하는 바이러스는 adeno virus, adeno-associate virus, oncoretroviruses, lentiviruses, 그리고 herpes simplex virus-1(HSV-1) 등이 있으며, 이는 유전자 전달에 매우 효과적인 수송체로서 알려져 있다. 그러나 바이러스 벡터를 이용한 전달체는 특정 세포로의 수송에 제한적이고, 경제성, 특히 면역체계에 문제를 일으키거나 생체 내에 바이러스를 증식시킬 수 있는 가능성이 있기 때문에 안정성에 대한 문제가 지속적으로 지적되고 있다[4, 5]. 또한 이 운반체의 생산에 있어서 스케일 업(scale up)과 정제 과정 등의 실제적인 문제가 있다.

비바이러스 벡터는 organic 물질을 이용하여 제작한 수송체로서 주로 생분해성 고분자 입자, 마이셀(micelles), 리포솜(liposome), hollow sphere 등이 알려져 있는데 이 수송체와 유전자 혹은 약물을 수소결합, disulfide 결합, 혹은 그 외 다른 방식 등으로 결합시켜 입자를 목적하는 세포에 도달하게 한다. 비바이러스 벡터는 바이러스 벡터와는 달리 잠재적으로 안정한 유전자 전달방법이며 스케일 업이 간단하다는 장점을 가지고 있다. 이로 인해 많은 연구자들은 보다 안정한 유전자 전달을 위하여 비바이러스 벡터의 제작과 개발에 중점을 두고 있다. 그러나, 비바이러스 벡터는 목적하는 세포에 전달되는 효율이 바이러스 벡터에 비해서 상대적으로 낮은 단점을 가지고 있다. 현재 비바이러스 벡터에 관한 연구는 셀 표면의 receptor에 잘 결합될 수 있고, 원하는 특정 세포에 성공적으로 트랜스펙션(transfection)하여 그 효율을 증가시킬 수 있는 방향으로 진행되고 있다[6, 7].

비바이러스 벡터에 관한 연구가 진행되는데 있어서 중요한 요소 중의 하나가 비바이러스 벡터의 크기와 형태를 원하는 사이즈로 얼마나 균일하게 제작할 수 있는지에 대한 여부이다. 입자의 크기에 따라서 *in vitro*와 *in vivo* 트랜스펙션에 대한 효율이 증대하거나 감소하며 특히 원하는 목적하는 장기에 쉽게 도달할 수 있는가에 대한 여부도 입자의 크기와 중요한 관계가 있다. 그러므로 비바이러스 벡터가 약제와 유전자의 운반체로서 보다 효율적으로 작용하기 위한 입자 제작을 위한 기법 등이 개발되고 있다.

본 연구에서는 유전자와 약물 운반을 위한 비바이러스 벡터 구조물을 제작할 수 있는 기술로서 particle replication in non-wetting templates (PRINT)라는 소프트 리소그래피(soft lithography) 방식을 이용하였다[8-10]. 이 방법은 마이크로 및 나노 구조물을 제작할 수 있는 기술로서, 영구적으로 균일한 크기로 식각된 실리콘 웨이퍼 재질의 마스터를 이용하여 perfluoropolyethers(PFPE) 재질의 몰드(mold)를 만들어 입자 재료를 기재(substrate) 표면에 놓고 눌러서 입자 형태를 만드는 기법이다. $3\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$ 균일한 크기의 입자를 제조하였으며[11-13], 입자의 주요성분은 생체에 적합한 생분해성 고분자인 poly(ethylene glycol) diacrylate(PEG-diA)와 세포 내로의 uptake에 용이한 aminoethylacrylate(AEM)와 2-acryloxyethyltrimethyl ammonium chloride(AETMAC)를 이용하였다.

2. 실험

2-1. 재료 및 시약

Perfluoropolyethers(PFPE)를 curing 하기 위한 photo-initiator는 1-hydroxycyclohexyl phenyl ketone(HCPK)로서 Aldrich에서 구입하였고, poly(ethylene glycol) diacrylate(PEG)($n=9$)(PolySciences)는 inhibitor를 제거하기 전에 alumina column에 통과시킨다. 2-acryloxyethyltrimethylammonium chloride(80% solution in water), fluorescein-o-acrylate, 2-aminoethylmethacrylate hydrochloride, 1-hydroxycyclohexyl phenyl ketone은 Aldrich에서 구입하였고 정제없이 사용하였다. Silicon wafers($3\ \mu\text{m}$ thermal oxide layers)는 Silicon Question International에서 구입하였다.

2-2. 분석장비

Scanning electron microscopy(SEM, Hitachi S-4700 field emission instrument, 1-10 KV), 2개의 fluorescent와 1개의 transmitted 채널이 장착된 fluorescence microscopy(Zeiss LSM5 pascal confocal laser scanning microscope)이고, 모든 UV curing 실험은 Electro-lite UV curing chamber(model no. 81432-ELC-500, $\lambda=365\text{nm}$)를 이용한다.

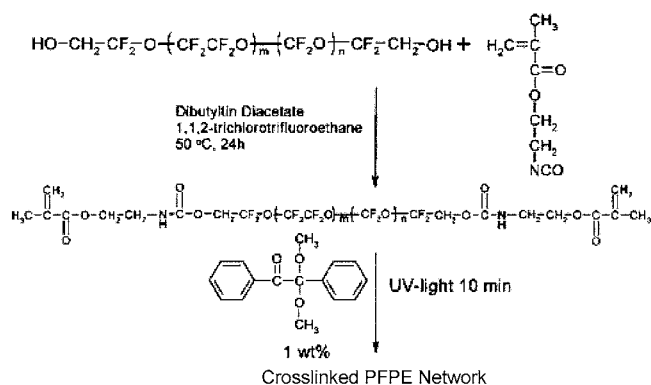
2-3. 실험과정

2-3-1. PFPE 합성과정

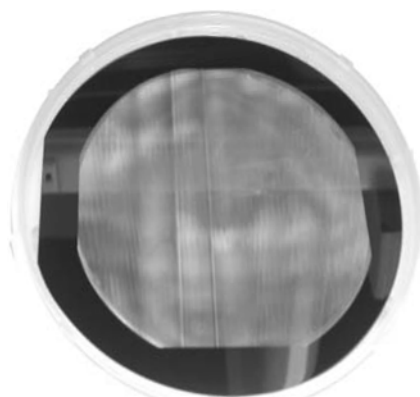
PRINT 방법으로 입자의 제작을 하기 위하여 사용되는 몰드와 기재의 재질은 photocurable perfluoropolyethers(PFPE)이며, Scheme 1에 이 물질을 합성하는 과정을 간략하게 나타내었으며 참고문헌에 자세히 설명되어 있다[13].

2-3-2. 몰드(mold)와 기재(substrate) 제작 과정

몰드와 기재는 UV-curing liquid PFPE에 의해서 만들어진다. Fig. 1에서 보여지는 것처럼 $3\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$ 모양의 육면체 형태가 새겨진 실리콘 재질로 만든 마스터 위에 PFPE를 부어 얇고 균일한 두께가 되도록 한다. 이것을 UV 기기 안에 넣고 약 5분 동안 질소 퍼지시킨 후 10분 동안 UV($\lambda=365\ \text{nm}$, $35\ \text{mWcm}^{-2}$)를 비추면 중합된다. 실리콘 마스터 위의 PFPE를 조심스럽게 떼어내면 탄성력을 지닌 약 1.5 mm 두께의 필름 형태의 몰드가 되며 실리콘 웨이퍼와 접촉된 면은 $3\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$ 로 오목하게 파인 균일한 정육면체 형태를 가지고 있게 된다. 기재는 실리콘 웨이퍼 마스터 대신 평평한 유리 위에 PFPE를 붓고 몰드를 만들었던 과정과 동일한



Scheme 1. Synthesis and curing of photocurable PFPEs [11].

Fig. 1. Silicon wafer master of $3\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$ cubes (aspect ratio = 0.7).

과정을 거치면 1.5 mm 두께의 탄성력을 지닌 필름 형태의 기재가 된다. Fig. 2는 몰드와 기재를 나타낸다.

2-3-3. 입자제작

{PEG-dA(97 mol%) + aminoethyl methacrylate(3 mol%)} 용액은 다음과 같은 과정으로 만들어진다. 4.622 g의 PEG-dA, 0.143 g의 aminoethylmethacrylate를 혼합한 후 aminoethyl methacrylate가 확실하게 용해되도록 에탄올을 3~4 방울을 넣어 혼합한다. PEG-dA에 있는 개시제는 알루미늄 파우더 통과한 후 $0.45\ \mu\text{m}$ filter로 걸러 제거한 후 1%의 photo-initiator(1-hydroxycyclohexyl phenyl ketone)를 용

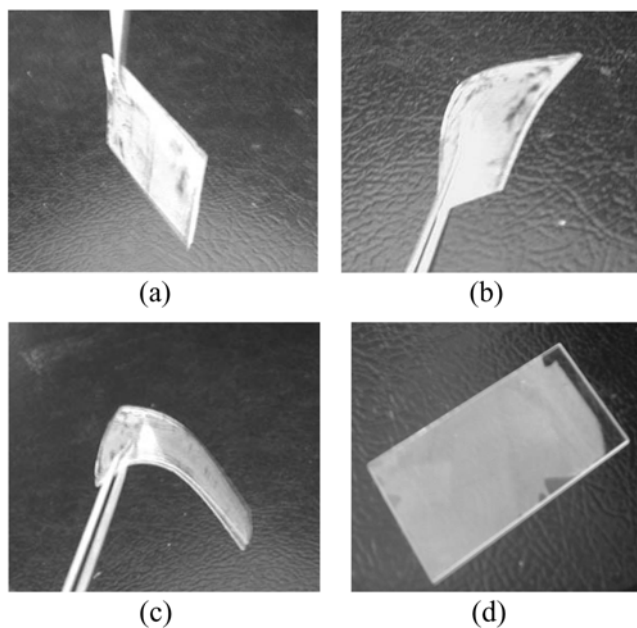
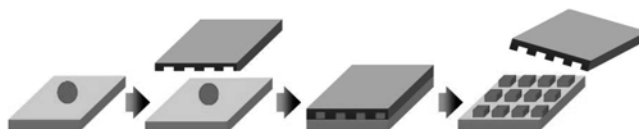
Fig. 2. Thin and uniform mold and substrate by the photocuring PFPE; (a)-(c) The molds made from $3\ \mu\text{m}^2$ master, (d) the substrate.

Fig. 3. Illustration of the PRINT process, where isolated particles are obtained from the confinement of a liquid precursor in between a PFPE mold and a PFPE substrate.

액에 넣는다. 그리고 제작한 기재 위에 이 용액을 1~2방울 떨어뜨린 후 몰드를 덮은 후 완전히 압착하여 UV 장치에 넣고 5분 동안 질소를 퍼지시킨 후 10분 동안 UV($\lambda=365\ \text{nm}$, $35\ \text{mWcm}^{-2}$)를 통하여 중합이 된다. PRINT 과정은 Fig. 3에 나타내었으며, 입자의 화학 구조식은 Fig. 4에 나타내었다.

2-3-4. 입자의 회수

합성된 입자는 다음과 과정에 의해서 회수한다. Poly(acrylic acid)를 슬라이드 글라스 위에 한 방울 떨어뜨려 얇은 층을 만든 후 입

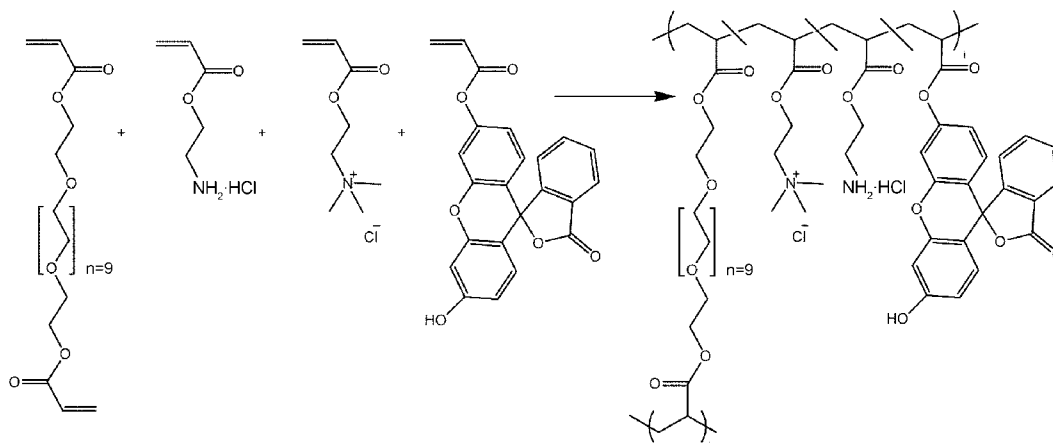


Fig. 4. Chemical structures of monomers inside the microparticles and the partial structure of the cationic hydrogel.

자가 붙어있는 몰드(다량의 입자가 존재) 및 기재(소량의 입자가 존재)를 덮어 건조시킨다. Poly(acrylic acid)의 점착성으로 인해 몰드 내 및 기재 위에 존재하는 입자들이 모두 슬라이드 글라스 위에 붙게 되고 몰드 및 기재를 벗겨내면 입자들을 모두 회수할 수 있게 된다. 그리고 슬라이드 글라스를 5 ml의 증류수에 떨어뜨리면 슬라이드 글라스 위의 입자들과 poly(acrylic acid)는 모두 증류수에 의해서 모아지며, 이를 정제하면 최종적으로 원하는 입자를 얻을 수 있다.

2-3-5. 몰드 및 기재의 재사용

입자를 제작한 후 한번 사용된 몰드와 기재를 재사용하기 위한 실험을 하였다. 한번 사용된 몰드와 기재는 증류수에 넣은 후 20분 정도 sonication 과정을 거친 후 깨끗이 세척하는 과정을 2회 반복하고 이 몰드와 기재를 이용하여 다시 입자를 제작하여 이들의 재사용이 가능한지를 확인하였다.

3. 실험 결과 및 고찰

본 연구에서는 photolithography의 한 방법인 PRINT 법을 이용하여 균일한 크기의 입자를 제조하였다. 우선 실리콘 웨이퍼 위에 reactive ion etching(RIE) 공정을 이용하여 균일한 크기의 매우 견고한 패턴의 마스터를 만들었고, 이 마스터를 이용하여 탄성력을 가진 PFPE 재질의 마스터와 동일한 패턴을 지닌 몰드를 제작하였다. 균일한 사이즈의 입자는 poly(ethylene glycol) diacrylate(PEG-diA), 2-acryloxyethyltrimethylammonium chloride(AETMAC), 2-aminoethyl-methacrylate hydrochloride(AEM), 그리고 fluorescein-o-acrylate으로 구성되었으며, PRINT 방법을 통해서 마스터 내에서 UV를 통하여 중합되었다. 실험에 사용된 poly(ethylene glycol) 유도체는 생체적합하고 안정하여 비바이럴 벡터의 원료로서 널리 사용되고 있으며, 2-aminoethyl-methacrylate hydrochloride(AEM)와 quaternary ammonium ion을 가지고 있는 모노머 AETMAC는 셀 표면과의 접촉할 때 결합력을 강화하기 위하여 사용하였다. 그리고 이렇게 제조된 입자를 세포실험에서 입자의 경로를 확인하기 위해서 형광을 띠는 물질인 fluorescein-o-acrylate로 라벨링하였다.

PRINT 공정에서 입자의 회수는 하이드로 젤 입자의 콜로이드 용액을 얻기 위하여 poly(acrylic acid) (PAA)의 수용성의 점착성이 있는 고분자를 이용하였으며, 이를 통하여 몰드에서 탈착 시키는 방식을 이용하였다. 슬라이드 글라스 위에 이 고분자용액을 얇은 층

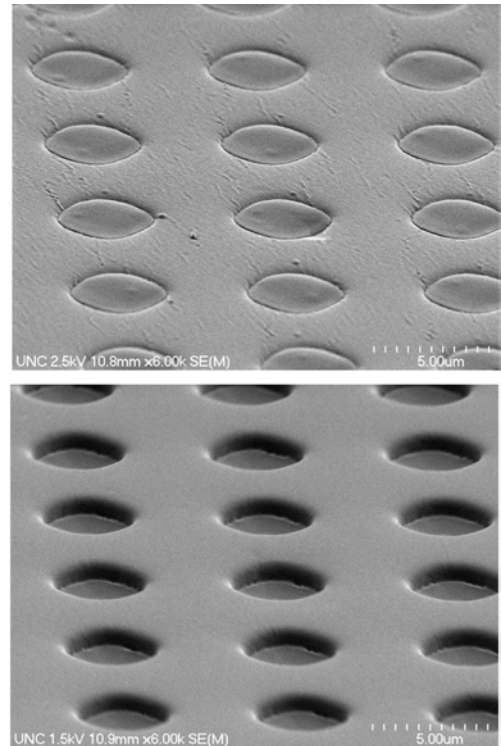


Fig. 5. (A) Scanning electron micrograph of the full mold (B) scanning electron micrograph of the full mold with one empty cell (photoresist).

으로 만든 후 PFPE 몰드를 그 위에 올려놓고 건조시키면 입자가 붙어있는 몰드의 면과 수용성 고분자의 면이 완전히 점착된다. 그리고 몰드를 제거하면 건조된 PAA 고분자 위에 입자가 붙어있게 되고 이를 증류수에 넣으면 PAA를 증류수에 용해되고 제조된 입자와 분리된다. 그리고 입자와 PAA 용액을 필터(0.22 μm filter, cellulose acetate)를 통하여 입자를 걸러내는 과정을 5회 정도 반복하면 poly(acrylic acid)가 제거되며, 이로써 입자들을 최종적으로 회수할 수 있다. Fig. 5는 입자를 회수하기 전과 후의 몰드 상태를 나타낸다. Fig. 5(a)에서 보는 것처럼 입자가 형성된 몰드는 입자를 회수한 후 완전히 비어 있음을 볼 수 있다(Fig. 5(b)). Poly(acrylic acid)가 슬라이드 글라스 위의 poly(acrylic acid)에 모두 붙어있는 입자(Fig. 6~7)는 물을 첨가하자마자 개별적으로 떼어가는 현상을 볼 수

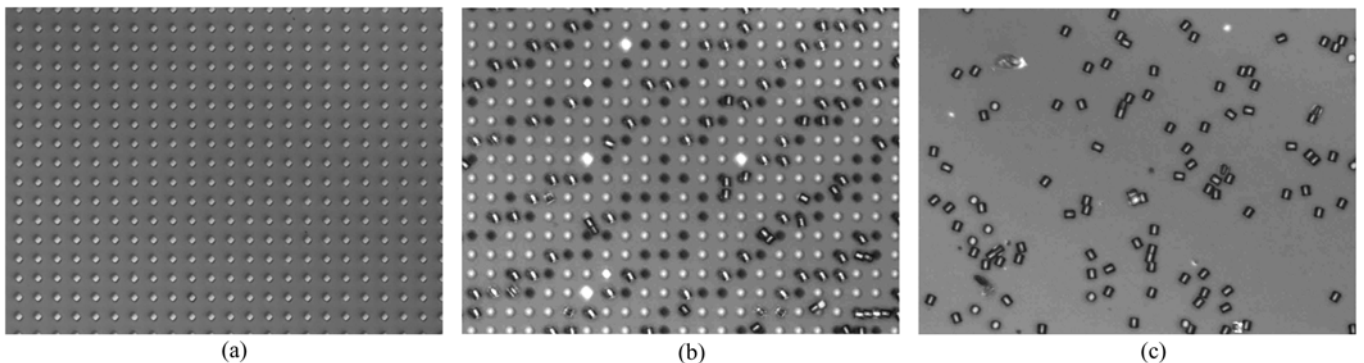


Fig. 6. PEG/AETMAC/AEM/fluorescein-o-acrylate particles formed by photo polymerization, (a) and (b) the particles into the mold, (c) the particles on the substrate.

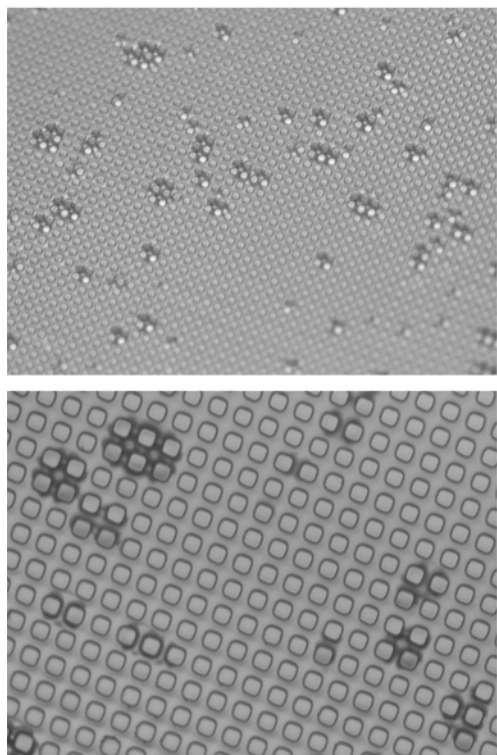


Fig. 7. The images of PEG/AETMAC/AEM/fluorescein-o-acrylate particles on the cured PAA film after peeling off the mold.

있었으며, 이를 Fig. 8에 나타내었다. 이 과정을 통해서 Fig. 9에서 보는 것처럼 성공적으로 입자를 회수할 수 있었다. Poly(acrylic acid) 용액 내에서 입자는 *centricon*을 이용하거나 *dialysis* 방법을 통하여도 정제할 수 있다. PRINT 제조법을 이용한 입자들은 DNA/RNA 등을 입자 내부에 넣고 *in vitro* 또는 *in vivo* 바이올로지 실험에 사용될 수 있다. 따라서 수용성 고분자를 이용하여 입자를 회수하는

방법보다는 입자 자체를 어떠한 제3의 물질을 이용하지 않고 회수하는 방법이 가장 바람직하므로 이에 관한 연구를 시도하고 있다.

상기의 방법으로 입자를 제작한 후 몰드와 기재를 재사용할 수 있는 가를 확인하기 위한 실험을 실시하였다. 우선 새로 제작된 몰드와 기재를 이용하여 1차 입자를 제작한 후 세척 과정을 거쳐서 2차 입자를 제작하고 다시 세척하여 3차 입자를 제작하였다. 몰드와 기재의 세척과정은 다음과 같다. 사용한 몰드와 기재를 증류수에 넣고 25 °C 에서 20분간 *sonication* 과정을 2회 반복한 후, 이를 35 °C 의 오븐에서 건조시킨다. 이렇게 세척된 몰드와 기재는 다시 입자를 만드는데 사용하였다. 우선 1차(새로운 몰드와 기재 사용)로 제작된 입자는 주변의 찌꺼기 없이 제작되었다. 그리고 2차(1차 사용 후 세척된 몰드와 기재 사용)로 제작된 입자는 Fig. 10(a)~(b)에서 보는 것처럼 1차 제작된 입자와 마찬가지로 잘 제작되었다. 이를 통해서 본 결과 몰드와 기재는 수 차례 반복적으로 사용해도 입자를 성공적으로 제작할 수 있음을 보여주었다. 그러나 5차(4차 사용 후

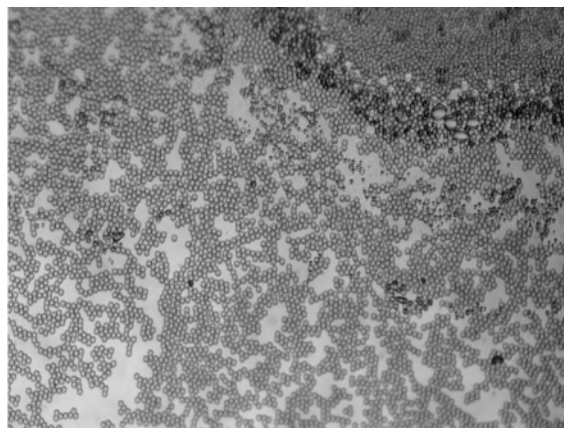


Fig. 9. The PEG/AETMAC/AEM/fluorescein-o-acrylate particles harvested from the mold.

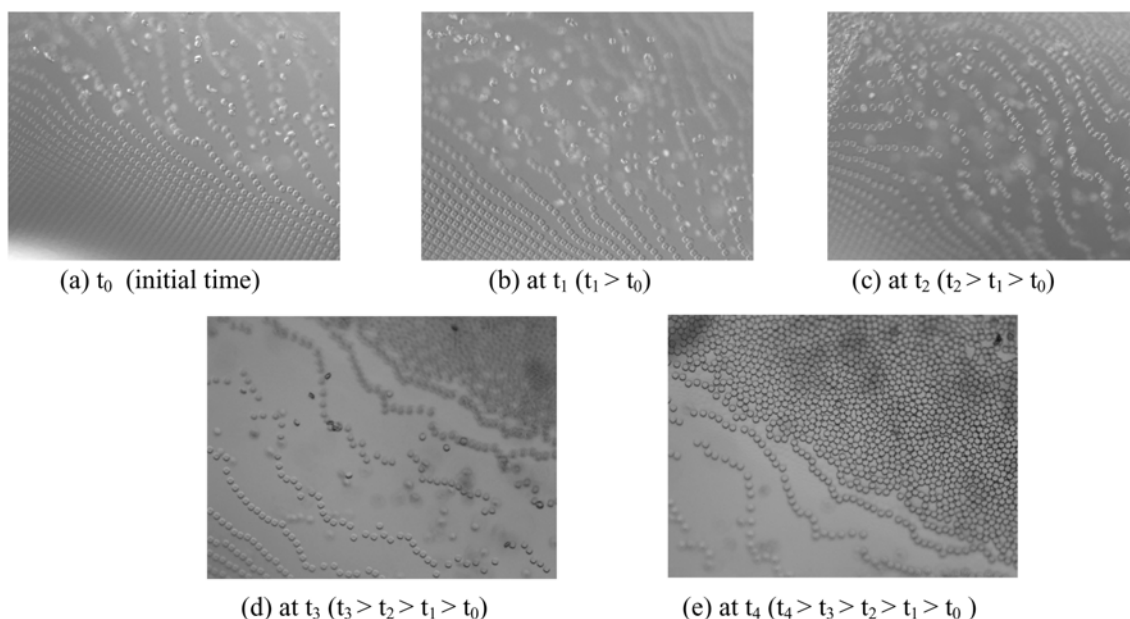
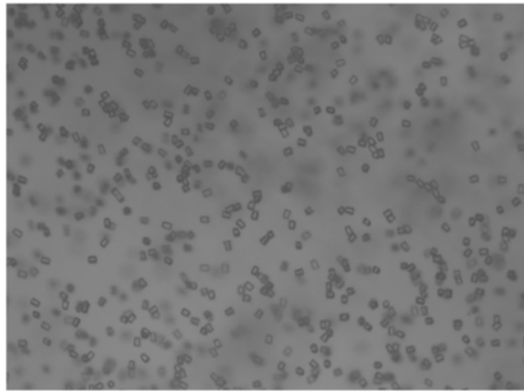
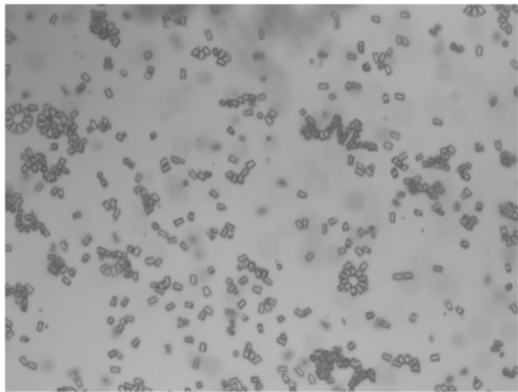


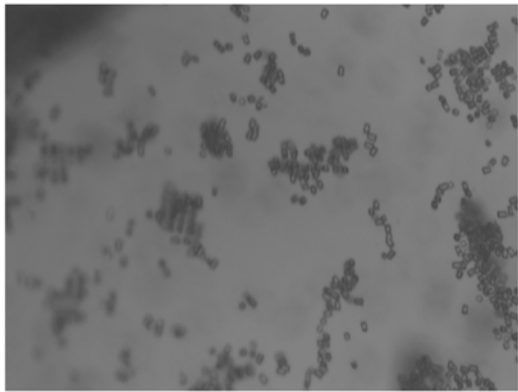
Fig. 8. The images of PEG/AETMAC/AEM/fluorescein-o-acrylate particles being removed from the PAA film into the water phase.



(a)



(b)



(c)

Fig. 10. The images of PEG/AETMAC/AEM/fluorescein-o-acrylate particles fabricated by the used mold and the used substrate. (a) the particles fabricated by the new mold and the substrate, (b) the particles fabricated by the mold and the substrate after 1st using, (c) the particles fabricated by the mold and the substrate after 5th using.

세척된 몰드와 기재 사용)까지 몰드와 기재를 재사용할 경우 Fig. 10(c)에서 보는 것처럼 입자가 개별적으로 형성되지 않고 서로 엉켜 붙어 제작되는 등 5회 이상 몰드와 기재를 이용할 경우 입자를 제작하는데 문제가 있음을 알 수 있었다. 또한 Fig. 11에서 보는 것처럼 5회 이상 사용할 경우 몰드의 형태가 찌그러지는 등 그 형태가 변하는 것으로 보아 몰드의 재사용에 한계가 있음을 보여주었다. 따라서 현재 몰드 및 기재를 지속적으로 재사용하기 위하여 PFPE의

화학공학 제45권 제5호 2007년 10월

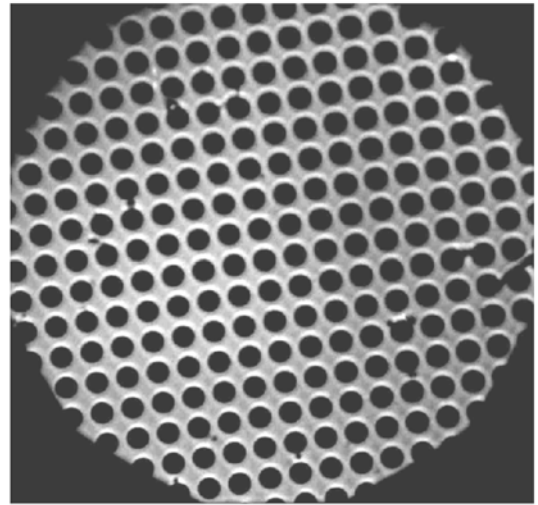


Fig. 11. The image of the mold surface shown after 5th using.

탄성력과 강도를 변화시키며, 최적 조건을 밝히는 연구가 중요함을 보여주고 있다.

4. 결 론

본 연구에서는 소프트 리소그래피(soft lithography) 기법의 RPINT 기술을 이용하여 유전자 및 약제 전달을 위하여 비바이러스 벡터로 사용될 수 있는 3 μm 의 고분자 하이드로 젤 입자를 제조하였다. 제작된 입자는 균일한 크기였으며 점착성이 있는 수용성 고분자를 이용하여 성공적으로 회수되었다. PFPE 재료의 몰드와 기재를 재사용할 수 있음을 보여주었으며 이를 통해 경제적으로도 효율적임을 보여주었다.

PRINT 기술을 통해 얻는 입자는 입자의 형태, 사이즈, 구성 성분 등을 조절할 수 있으며 입자내부에 DNA, proteins, chemotherapy drugs, biosensor dyes, radio-markers, contrast agents 등을 넣어서 약제의 수송체 역할을 하거나 antibodies나 cell targeting peptides 등의 리간드를 입자 표면에 결합시켜서 목적하는 세포나 장기에 도달하게 할 수 있다. 본 연구는 나노 및 마이크로 사이즈의 비바이러스 벡터를 제작하는 입자제조 기술로써 안전한 비바이러스 벡터 제작에 초점을 맞추고 있으며 유전자와 약제 전달에 유용한 기술로 기대된다.

감 사

이 논문은 STC program of the National Science Foundation과 2005년도 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구(KRF-2005-214-M01-2005-000-10201-0)이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Niidome, T. and Huang, L., "Gene Therapy Progress and Prospects: Nonviral vectors," *Gene Therapy*, **9**(24), 1647-1652(2002).
2. Herweijer, H. and Wolff, J. A., "Progress and Prospects: Naked DNA Gene Transfer and Therapy," *Gene Therapy*, **10**(6), 453-458 (2003).
3. Mulligan, R. C., "The Basic Science of Gene Therapy," *Science*,

- 260(5110), 926-932(1993).
4. Kay, M. A., Glorioso, J. C. and Naldini, L., "Viral Vectors for Gene Therapy: the Art of Turning Infectious Agents Into Vehicles of Therapeutics," *Nature Medicine*, **7**, 33-40(2001).
 5. Verma, I. M. and Somia, S. N., "Promises, Problems and Prospects," *Nature*, **389**(6648), 239-242(1997).
 6. Nishikawa, M. and Huang, L., "Nonviral Vectors in the New Millennium: Delivery Barriers in Gene Transfer," *Human Gene Therapy*, **12**(8), 861-870(2001).
 7. Lu, Q. L., Gharios, G. B. and Partridge, T. A., "Non-Viral Gene Delivery in Skeletal Muscle: a Protein Factory," *Gene Therapy*, **10**(2), 131-142(2003).
 8. Xia, Y. and Whitesides, G. M., "Soft Lithography," *Angew. Chem. Int. Ed.*, **37**(5), 550-575(1998).
 9. Whitesides, G. M., Ostuni, E., Takayama, S., Jiang, X. and Ingber, D. E., "Soft Lithography in Biology and Biochemistry," *Annual Review of Biomedical Engineering*, **3**, 335-373(2001).
 10. Schmid, H. and Michel, B., "Siloxane Polymers for High-Resolution, High-Accuracy Soft Lithography," *Macromolecules*, **33**(8), 3042-3049(2000).
 11. Rolland, J. P., Maynor, B. W., Euliss, L. E., Exner, A. E., Denison, G. M. and Desimone, J. M., "Direct Fabrication and Harvesting of Monodisperse, Shape-Specific Nanobiomaterials," *J. Amer. Chem. Soc.*, **127**(28), 10096-10100(2005).
 12. Rolland, J. P., Van Dam, R. M., Schorzman, D. A., Quake, S. R. and Desimone, J. M., "Solvent-Resistant Photocurable 'Liquid Teflon' for Microfluidic Device Fabrication," *J. Amer. Chem. Soc.*, **126**(8), 2322-2323(2004).
 13. Park, J. Y., Maynor, B. W., Pandya, A., Gratton, S. E. and Desimone, J. M., "Fabrication and Harvest of Polymeric Micro, and Nano Particles Using Particle Replication in Non-wetting Templates (PRINT)," NSF-STC fall meeting, UNC, 18-19(2005).
 14. Larken, E. E., Christopher, M. W., Maynor, B. W., Rolland, J. P., Denison, M. G., Gratton, S. E., Park, J. Y., Ashish, P. A., Elizabeth, E. L., Juliano, R. L., Hahn, K. M. and Desimone, J. M., "Monodisperse Nanocarriers: Novel Fabrication of Polymeric Nanoparticles for Bio-nanotechnology," SPIE-The International Society for Optical Engineering, Advances in Resist Technology and Processing, 32-34(2006).