

일반 논문

저분자량 수용성 키토산을 이용한 동맥 벽 표적성 유전자 전달체의 합성

최창용 · 장미경 · 나재운[†]

순천대학교 공과대학 신소재응용공학부 고분자공학전공
(2005년 12월 29일 접수, 2006년 7월 4일 채택)

The Synthesis of Artery Wall Targeted Gene Carrier Using Low Molecular Water-Soluble Chitosan

Changyong Choi, Mi-Kyeong Jang, and Jae-Woon Nah[†]

Department of Polymer Science and Engineering, College of Engineering,
Sunchon National University, Jeonnam 540-742, Korea
(Received December 29, 2005; accepted July 4, 2006)

초록 : 유전자 치료에 있어서 안전성의 장점을 지니고 있는 비바이러스성 전달체에 대한 관심이 높아져가고 있다. 비바이러스성 전달체 중, 양이온성 리포솜이나 합성 유전자 전달체는 *in vitro*계에서 효율적인 DNA 전달체이지만, 낮은 생체적합성으로 인하여 *in vivo*계에서의 응용성은 크게 뒤떨어지고 있다. 한편, 천연 양이온성 다당류인 키토산은 낮은 독성과 강한 양전하를 띠고 있어 유전자 전달 시스템(gene delivery system)에 있어 아주 기대되는 전달체이다. 본 연구에서는 저분자량 수용성 키토산(low molecular water-soluble chitosan ; LMWSC)을 이용하여 동맥 벽 세포를 표적할 수 있는 표적성 유전자 전달체를 합성하였다. 상대 점도와 Kina 적정법을 이용하여 LMWSC의 점도 평균 분자량(M_w)과 탈아세틸화도(degree of deacetylation ; DDA)를 측정하였고 구조는 FTIR, ^1H -NMR, 그리고 ^{13}C -NMR을 통하여 분석하였다. 동맥 벽을 표적하기 위한 유전자 전달체로서 pegylated LMWSC의 말단에 특이성 세포 표적 펩타이드인 artery wall binding peptide(AWBP)를 결합시킴으로써 AWBP-PEG-*g*-LMWSC를 합성하였고 FTIR, ^1H -NMR, zeta potentiometer, 그리고 atomic force microscopy (AFM)을 이용하여 분석하였다.

Abstract : Non-viral gene carriers continue to attract a great deal of interest due to advantageous safety profile. Among the non-viral gene carriers, cationic liposomes or synthetic gene carriers are efficient DNA carriers *in vitro*, but their *in vivo* applications are greatly hampered because of low biocompatibility. On the other hand, chitosan, a natural cationic polysaccharide, is a candidate non-viral vector for gene delivery because of its low cytotoxicity and high positive charges. In this work, targeted gene carrier was synthesized to target artery wall cells using low molecular water-soluble chitosan (LMWSC). The molecular weight(M_w) and degree of deacetylation(DDA) of LMWSC were measured by relative viscometer and Kina titration, respectively. The structure of LMWSC was analyzed by measuring FTIR, ^1H -NMR, and ^{13}C -NMR. AWBP-PEG-*g*-LMWSC was synthesized by conjugation of the artery wall binding peptide(AWBP), a specific targeting peptide, to the end of pegylated LMWSC as a gene carrier to target artery wall cells. The synthesized AWBP-PEG-*g*-LMWSC were analyzed by measuring FTIR, ^1H -NMR, zeta-potentiometer, and atomic force microscopy (AFM).

Keywords : low molecular water-soluble chitosan(LMWSC), artery wall binding peptide(AWBP), *N*-hydroxysuccinimide polyethylene glycol vinylsulfone(NHS-PEG-VS), non-viral vector.

서론

치료 단백질(therapeutic protein)의 생성을 유도할 수 있는 유전자 물질을 특정 조직이나 세포에 직접 주입함으로써 인간의 질병

을 치료하는 방법을 유전자 치료법(gene therapy)이라고 한다. 이에 안전하고 효율적인 유전자 운반 기술을 개발함이 유전자 치료법에 한 중요한 장으로 등장했으며, 지금까지 여러 가지 유전자 전달체(gene carrier)의 개발이 이루어지고 있다. 현재까지는 유전자를 전달하는데 있어 레트로 바이러스, 아데노 바이러스, 그리고 아데노 조합 바이러스 등의 바이러스성 전달체(viral vector)가 유전

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: jwnah@sunchon.ac.kr

자 치료에 많이 이용되었다. 그 이유는 전이 효율성이 뛰어나기 때문이다.^{1,2} 하지만 바이러스성 전달체는 면역성, 종양성 그리고 내인성 바이러스의 재조합과 같은 안전성이나 독성, 생산적인 측면에 있어서 치명적인 문제점을 가지고 있는 것으로 알려져 있다.³ 이러한 바이러스성 전달체의 문제점으로 인해 비바이러스성 전달체(non-viral vector)에 관한 관심이 높아져 가고 있다. 비바이러스성 전달체는 크기에 상관없이 DNA를 수송할 수 있으며 특이성 세포에 표적화하기 위해 리간드를 쉽게 결합할 수 있고, 바이러스성 전달체에 비해 면역반응을 덜 야기하고, 낮은 독성을 나타내며, 제조하기 쉽다는 장점을 가지고 있다.^{3,4} 비바이러스성 전달체는 일반적으로 양이온성 지질과 양이온성 고분자 물질 그리고 이들의 개질 화합물들로 구성될 수 있다. 양이온성 지질이나 poly(L-lysine) (PLL), polyethylenimine (PEI) 과 같은 합성 고분자는 *in vitro*계에서 바이러스성 전달체에 의해 야기되는 면역성을 극복할 수 있으나, 낮은 생체 적합성과 빠른 분해로 인해 *in vivo*계에서의 응용은 크게 저하되고 있다.⁵ 이러한 합성 고분자의 문제점은 *in vivo*계에서 높은 유전자 발현율을 나타내고 무독성 polyplex를 형성할 수 있는 생체 적합적 양이온성 고분자의 개발을 자극하게 되었다. 그러한 고분자 물질은 DNA와 잘 응축할 수 있어야 하고 생체 적합적이며 대량 생산이 가능하고 표적 리간드와 결합할 수 있는 반응 그룹을 가지고 있는 화학적 특성과 조건을 지녀야 한다.⁶⁻⁸ 그러한 점에서 천연 고분자인 키토산이 새로운 유전자 전달체로서 우수한 가능성을 나타내고 있다. 키토산은 D-glucosamine과 N-acetyl-D-glucosamine이 $\beta(1,4)$ -glycosidic 결합으로 된 단위로 구성된 생체 분해성 다당류이고 무독성이며 강한 양전하를 띠고 있어 DNA와 쉽게 결합할 수 있기 때문이다.⁹ 키토산은 Mumper 등에 의해 처음으로 plasmid의 운반체로 기록되었으며,¹⁰ 지금까지 유전자 전달을 위한 많은 연구가 시도되었다. 1999년 K. Roy 등에 의해 경구용 투여를 위한 chitosan-DNA nanoparticle의 제조가 시도되었으나, 여기서 사용된 키토산은 분자량이 70000 Da 이상인 고분자량 키토산(high molecular weight chitosan; HMWC)을 사용함으로써 산성 용매에 녹여 사용했다는 문제점을 가지고 있었다.¹¹ 반면에 저분자량 키토산(low molecular weight chitosan; LMWC, <10000 Da)이 생체 적합성과 생체 내 분포 그리고 DNA와 복합체를 형성할 수 있는 능력이 뛰어난 것으로 평가되었고 최근 저분자량 수용성 키토산(low molecular water soluble chitosan; LMWSC)을 이용하여 유전자 전달체로서의 가능성을 조사한 결과 LMWSC는 무독성이며 PLL보다 높은 전이 효율을 나타냈다는 특성을 밝힌 바 있다.¹² 따라서 무독성, 생체 분해성, 생체 적합성의 특징을 지닌 LMWSC의 효율적이고 안전한 유전자 전달체로서의 역할이 기대되어진다.

Low density lipoprotein(LDL)이 수용체가 매개된 세포내 유입(receptor-mediated endocytosis)과정을 통해 다른 형태의 세포(혈관의 내피 조직 세포, 혈관의 평활근 세포, 간 세포와 대식 세포)에 의해 유입될 수 있다는 것은 잘 알려져 있다. Kim 등은 LDL 수용체가 매개된 세포내 유입과정을 거쳐서 유전자 전달을 향상시키기 위해 pDNA, LDL, 소수성화된 poly(L-lysine) (H-PLL)로 구성된 TerplexDNA 유전자 전달 시스템을 개발하였으며,¹³ 이

시스템은 *in vitro*계에서의 동맥 벽 세포와¹⁴ *in vivo*계에서의 심근(myocardium) 세포에서¹⁵ 더 높은 전이 효율을 나타내었음을 보고하였다. LDL의 주요 단백질 성분인 Apolipoprotein B-100(apo B-100)은 LDL 수용체-결합 영역, 동맥 벽 세포 결합 영역, 그리고 헤파린-결합 영역과 같은 많은 수용체 결합 영역을 포함한다. Shih 등은 apo B-100(Arg-Ala-Leu-Val-Asp-Thr-Leu-Lys-Phe-Val-Thr-Gln-Ala-Glu-Gly-Ala-Lys)의 1000-1016 아미노산 잔유기를 포함하는 합성 펩타이드는 apo B-100의 동맥 벽 결합 영역임을 설명하였다.¹⁶ 따라서 본 연구에서는 사용된 LMWSC의 물리화학적 특성을 조사하였으며, 이를 이용하여 유전자 전달 시스템을 합성하고자 동맥 벽 세포에 표적 수단을 제공할 수 있는 apo B-100에 기초한 합성 펩타이드인 artery wall binding peptide(AWBP)를 사용하여 pegylated LMWSC에 결합시킴으로써 AWBP-PEG-g-LMWSC를 합성하여 FTIR, ¹H-NMR, zeta-potentiometer, 그리고 atomic force microscopy (AFM)을 통해 특성을 분석하였다. 본 연구의 결과는 앞으로 *in vitro*계, *in vivo*계에서의 동맥 벽 세포의 유전자 전달 연구에 있어서 AWBP-PEG-g-LMWSC 유전자 전달 시스템의 응용에 대해서 유용하고 중요한 정보를 제공할 것이다.

실 험

재료. 본 연구에 사용된 저분자량 수용성 키토산(LMWSC, M_w = 22 kDa, 탈아세틸화도(DDA) = 84%)은 (주)키토라이프(서울, 한국)로부터 공급받았다. N-Hydroxysuccinimide polyethylene glycol vinylsulfone(NHS-PEG-VS, M_w = 3400 Da)은 Shearwater Polymers(Huntsville, AL, USA)로부터 구입하였다. Artery wall binding peptide(AWBP) (Sequence 'N'-CGRA-LVDTLKFVTQAEGAK-'C', M_w = 2008 Da)은 ANYGEN Co., Ltd.(Korea)로부터 구입했다. 투석 튜브(molecular weight cutoff(MWCO) : 8000, 12000)는 Spectrum(Spectrum Medical Industries, Inc., CAL, USA)으로부터 구입하였다. 기타 시약들은 일급시약을 정제하지 않고 사용하였으며 phosphate buffered saline (PBS) 용액은 제조하여 사용하였다.

LMWSC의 상대 점도와 탈아세틸화도(DDA) 측정. M_w 를 측정하기 위해, 점도계(Viscotek, Y501C, USA)를 사용하여 상대 점도를 측정하였다. LMWSC의 분자량(M_w)은 상대 점도 결과로부터 다음 Mark-Houwink-Sakurada¹⁷ 식 (1)에 의해 계산하였다.

$$[\eta] = KM_w^a$$

$$M_w = ([\eta]/K)^{1/a} \quad (1)$$

여기에서 $[\eta]$, M_w 는 각각 고유 점도와 분자량을 나타낸다. 그리고 K와 a는 키토산의 용매의 상수 값으로 각각 0.0000181 dL/g, 0.93이다.

LMWSC의 DDA는 Kina 적정법을¹⁸ 이용하여 식 (2)에 의해 계산하였다.

$$DDA = \frac{(X/161)}{(X/161) + (Y/203)} \times 100 \quad (2)$$

여기에서 X 는 $(1/400) \times (1/1000) \times f \times 161 \times v$, Y 는 $0.5 \times (1/100) + X$, v 는 $1/400$ (2.5 mN) PVSK 용액의 소모량(mL), 그리고 f 는 $1/400$ (2.5 mN) PVSK의 용액 상수를 각각 나타낸다.

LMWSC의 분광학적 분석. LMWSC의 구조를 규명하기 위해 FTIR(Shimadzu, FTIR S700), ^1H -NMR, 그리고 ^{13}C -NMR(Bruker, DRX-500 MHz)을 사용하였다. FTIR은 LMWSC 3 mg을 KBr 300 mg과 10분 동안 물리적으로 섞은 후, 이것의 200 mg을 취하여 만든 KBr disc를 12시간 동안 60°C 에서 진공 건조한 후 측정하였다. 또한 ^1H -NMR과 ^{13}C -NMR을 이용하여 LMWSC의 구조적 특성을 확인하였다. ^1H -NMR 용매로서는 deuterium oxide(D_2O)를 사용하였다. 화학적 이동은 ppm 단위로 기록하였고 기준 물질로서 tetramethylsilane(TMS)을 사용하였다.

AWBP-PEG-*g*-LMWSC의 합성. LMWSC 1.1 g을 PBS(pH 7.0) 300 mL에 녹여 실온에서 3시간 동안 교반하였다. DMSO 20 mL에 0.68 g의 NHS-PEG-VS를 녹인 용액을 LMWSC 용액에 서서히 첨가시켜 저온(4°C)에서 반응시켰다. MWCO 8000 Da인 투석 튜브를 이용하여 증류수로 24시간 투석 후, 동결 건조하여 VS-PEG-*g*-LMWSC를 합성하였다. VS-PEG-*g*-LMWSC 0.18 g을 PBS(pH 8.0) 150 mL에 용해시켰다. 그리고 48 mg의 AWBP를 DMSO 15 mL에 용해시킨 후, VS-PEG-*g*-LMWSC 용액에 서서히 첨가시킨 후, 저온(4°C)에서 24시간 반응시켰다. 혼합물을 MWCO 12000 Da인 투석 튜브를 이용하여 실온에서 증류수로 24시간 투석한 후 동결 건조하였다. 사용 전에는 -20°C 에서 보관하였다.

구조 분석. VS-PEG-*g*-LMWSC와 AWBP-PEG-*g*-LMWSC의 구조적 특성을 분석하기 위해 FTIR과 ^1H -NMR를 사용하여 측정하였다. FTIR은 각각의 샘플 3 mg을 KBr 300 mg과 10분 동안 물리적으로 섞은 후, 이것의 200 mg을 취하여 만든 KBr disc를 12시간 동안 60°C 에서 진공 건조한 후 측정하였다. 또한 ^1H -NMR에 의해서도 구조적 특성을 밝혔다. 이때 VS-PEG-*g*-LMWSC를 분석은 trifluoroacetic acid(TFA)를 용매로 사용하여 측정하였으며, AWBP-PEG-*g*-LMWSC 측정은 deuterium oxide(D_2O)에 용해시켜 수행하였다. 단위는 ppm으로 기록하였으며 기준 물질로서 tetramethylsilane(TMS)을 사용하였다.

입자 크기 측정. AWBP-PEG-*g*-LMWSC의 입자 크기를 측정하기 위해서 zeta potentiometer와 AFM(PARK's Science, Autoprobe CP)을 사용하였다. Zeta potentiometer 측정은 동결 건조한 후의 각 단계의 최종 물질을 증류수에 분산시킨 후, 632 nm 와 23°C 에서 Part 370+770(Altamira instruments, USA)에 의해 분석하였다. AFM을 측정하기 위해서 각 단계의 최종 물질을 증류수에 분산시킨 후, 실리카웨이퍼에 떨어뜨려 건조시킨 후, 실온에서 측정하였다. 실리카웨이퍼는 표면을 1 N-HCl 과 증류수로 세척하여 24시간 완전히 건조시킨 후 사용하였다.

결과 및 토론

LMWSC의 상대 점도 측정과 탈아세틸화도(DDA). LMWSC의 분자량(M_w)을 측정하기 위해, 상대 점도를 측정하였다. LMWSC의 농

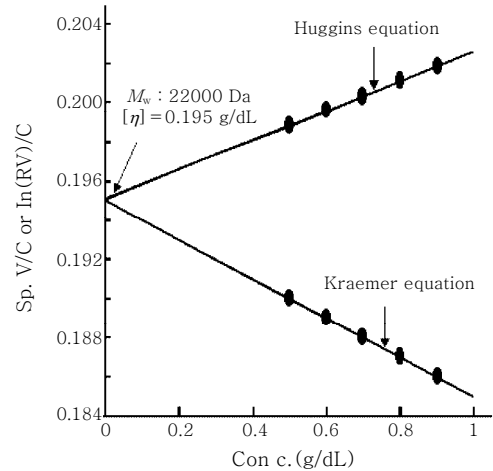


Figure 1. Intrinsic viscosity of low molecular weight soluble chitosan in $0.1\text{ M AcOH}/0.2\text{ M NaCl}$ $25.0 \pm 0.01^\circ\text{C}$ as a function of concentration.

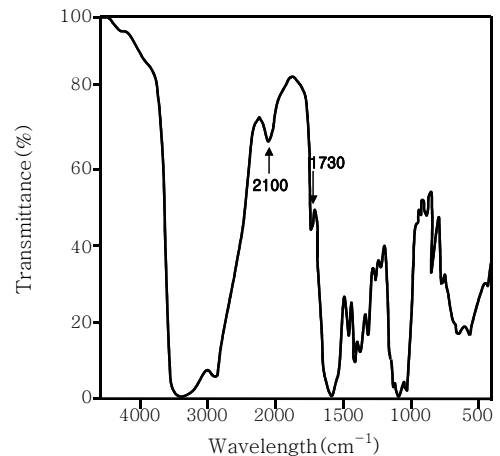


Figure 2. FTIR spectrum of a general chitosan as a control.

도에 대한 고유 점도의 관계를 Figure 1에 나타내었으며, LMWSC의 고유 점도는 Huggins 식¹⁹ ($\eta_{sp} = [\eta]c + k_H[\eta]^2c^2$)과 Kraemer 식²⁰ ($\ln(\eta/\eta_0) = [\eta]c - k_K[\eta]^2c^2$)에 의해 구했다. 이 결과, LMWSC의 분자량(M_w)은 약 22 kDa임을 확인하였다. 그리고 Kina 적정법에 의해 구해진 LMWSC의 DDA는 약 84%가 됨을 확인하였다.

LMWSC의 FTIR 스펙트럼 분석. 염에 의한 수용성 키토산의 FTIR 스펙트럼과 LMWSC의 FTIR 스펙트럼을 비교하여 Figure 2와 Figure 3에 나타내었다. 수용성 키토산의 스펙트럼을 보면 젖산염에 의한 카복실 그룹의 흡수 피크가 1730 cm^{-1} 에서 나타났고 효소 분해 과정에 의해 형성된 불순물 피크가 2100 cm^{-1} 에서 나타났다. 그러나 LMWSC의 스펙트럼에서는 1730 cm^{-1} 에서의 흡수 피크가 사라졌으며 2100 cm^{-1} 에서의 불순물의 강한 피크가 현저하게 감소하였다. 따라서 FTIR 스펙트럼 분석을 통해 LMWSC이 불순물과 염이 제거된 순수한 LMWSC임을 확인하였다.

LMWSC의 ^1H -NMR과 ^{13}C -NMR 스펙트럼 분석. Figure 4는 염에 의한 수용성 키토산의 ^1H -NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

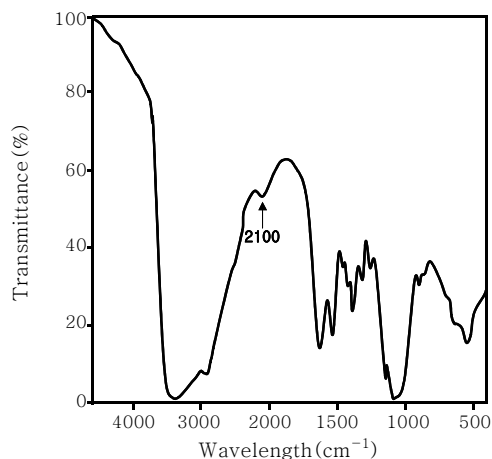


Figure 3. FTIR spectrum of low molecular water-soluble chitosan.

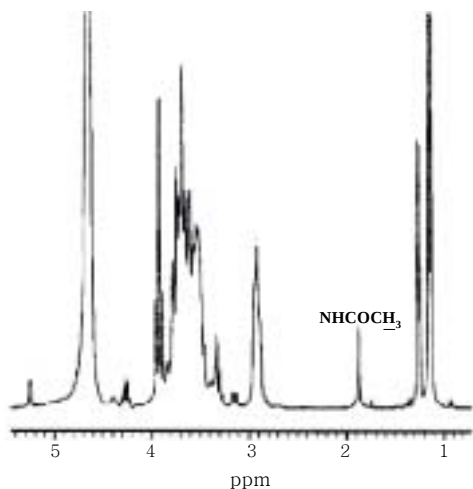


Figure 4. ¹H-NMR spectrum of a general chitosan as a control.

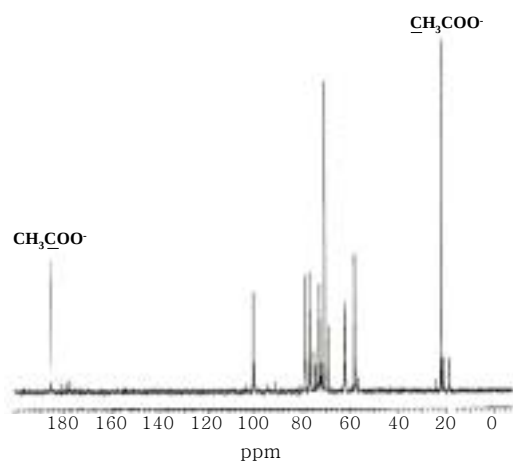


Figure 5. ¹³C-NMR spectrum of a general chitosan as a control.

젖산염에 의한 강한 불순물 피크가 1.1~1.5 ppm에서 확인되었다. 또한 Figure 5의 ¹³C-NMR 스펙트럼에서도 불순물 피크가 20~26 ppm에서 나타났고 20 ppm에서 아세트아미드 그룹의 탄

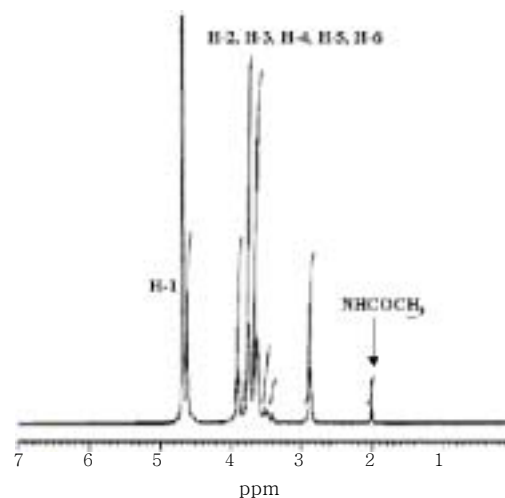


Figure 6. ¹H-NMR spectrum of low molecular water-soluble chitosan.

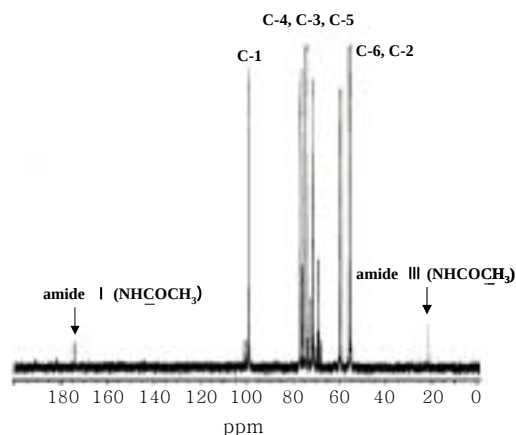


Figure 7. ¹³C-NMR spectrum of low molecular water-soluble chitosan.

소를 확인할 수가 없었다. 그러나 LMWSC는 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR 스펙트럼에서 아주 명백한 피크의 분포를 나타내었다. Figure 6은 LMWSC의 ¹H-NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다. 이 스펙트럼에서, 젖산염에 의한 피크가 사라졌으며 여러 가지 불순물에 의한 피크가 현저하게 감소하였다. 그리고 C-1 위치의 수소가 이웃하는 산소 원자에 의한 전기 음성도의 영향으로 저자장쪽에서 나타났다. C-1 위치의 1개의 수소가 4.5 ppm에서 나타났으며 C-2, -3, -4, -5, 그리고 -6위치의 6개의 수소가 2.8~3.9 ppm에서 나타났다. 그리고 2.0 ppm에서 아세트아미드 그룹에 있는 세 개의 수소가 정량적으로 확인되었다. 또한, ¹³C-NMR 스펙트럼(Figure 7)에서 젖산염에 의한 카복실 그룹의 피크가 사라졌으며 아세트아미드 그룹의 탄소의 피크를 확인할 수 있었다. C-1 위치의 탄소가 전기 음성도의 영향으로 저자장쪽의 99 ppm에서 나타났으며 C-3, -4, 그리고 -5위치의 탄소가 79~70 ppm에서 나타났다. 그리고 55와 60 ppm에서 각각 C-2와 -6위치의 탄소가 명백하게 확인되었다. 따라서, 본 실험에 사용된 LMWSC 이 순수한 수용성 키토산임을 확인하였다.

AWBP-PEG-*g*-LMWSC의 합성. Figure 8은 두 단계의 반응으로 구성된 AWBP-PEG-*g*-LMWSC의 합성을 나타낸 것이다. 첫 번째 반응에서, NHS-PEG-VS의 *N*-hydroxysuccinimide(NHS)기는 LMWSC의 아미노 그룹과 결합함으로써 VS-PEG-*g*-LMWSC가 74%의 수율로 합성되었다. 두 번째 반응에서, pegylated LMWSC의 vinyl sulfone 그룹에 AWBP의 thiol 그룹이 결합함으로써 68%의 수율로 AWBP-PEG-*g*-LMWSC를 얻었다.

분광학적 분석. 생성물의 구조와 컨쥬게이트 반응이 FTIR과 $^1\text{H-NMR}$ 에 의해 분석되었다. 첫 번째 반응에서 합성된 VS-PEG-*g*-LMWSC의 FTIR 스펙트럼(Figure 9)을 보면, NHS-PEG-VS의 NHS기의 $-\text{C}=\text{O}$ (1782 cm^{-1}) 피크가 사라졌음을 확인하였다. 이것은 LMWSC의 아민 그룹이 PEG와 완전히 결합하였음을 의미한다. 또한 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼(Figure 10)에서도 분석 규명하였는데, NHS의 수소 피크(2.60 ppm)가 스펙트럼에서 나타나지 않은 것으로 보아 투석 과정을 통해 완전 제거되었음을 확인할 수 있었다. 그리고 PEG의 비닐 그룹에 있는 각각의 수소가 6.849, 6.561, 그리고 6.331 ppm에서 나타났고 LMWSC의 아세틸 그룹이 2.280 ppm에서 나타났다. 두 번째 반응에서 합성되어진 AWBP-PEG-*g*-LMWSC의 FTIR 스펙트럼(Figure 11)을 보면, pegylated LMWSC의 vinyl sulfone 그룹에 합성 펩타이드 AWBP의 thiol 그룹이 결합함으로써 AWBP의 thiol

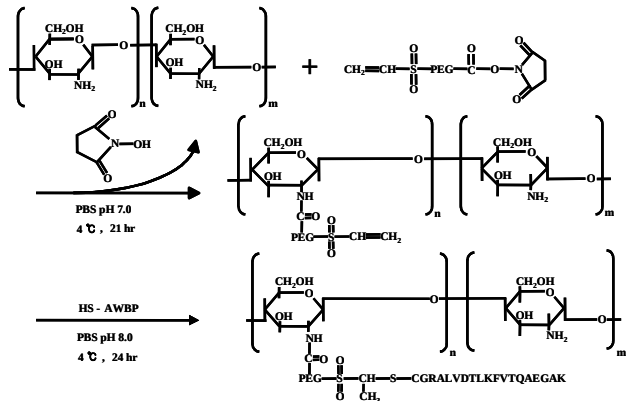


Figure 8. Synthetic scheme of AWBP-PEG-*g*-LMWSC.

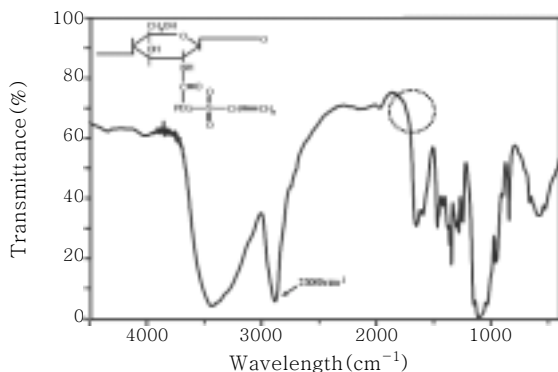


Figure 9. FTIR spectrum of VS-PEG-*g*-LMWSC.

그룹의 특성 피크(2550 cm^{-1})가 사라졌음을 확인하였다. 물론 $^1\text{H-NMR}$ (Figure 12) 스펙트럼에서도 AWBP의 thiol 특성 피크(11.85~12.61 ppm)가 AWBP-PEG-*g*-LMWSC의 스펙트럼에서 전체적으로 사라졌음을 확인함으로써 AWBP의 thiol 그룹이

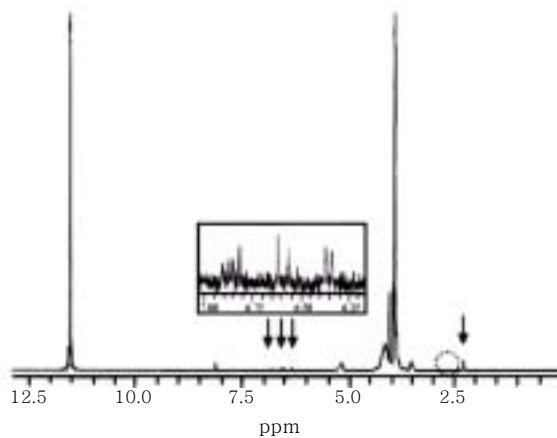


Figure 10. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of VS-PEG-*g*-LMWSC.

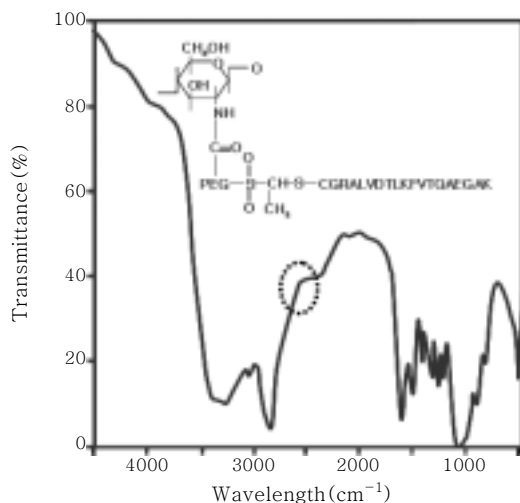


Figure 11. FTIR spectrum of AWBP-PEG-*g*-LMWSC.

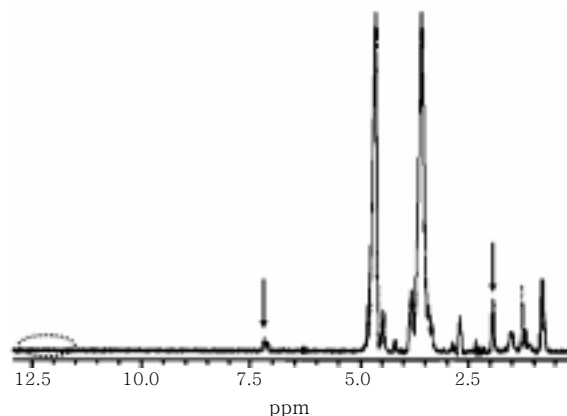


Figure 12. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of AWBP-PEG-*g*-LMWSC.

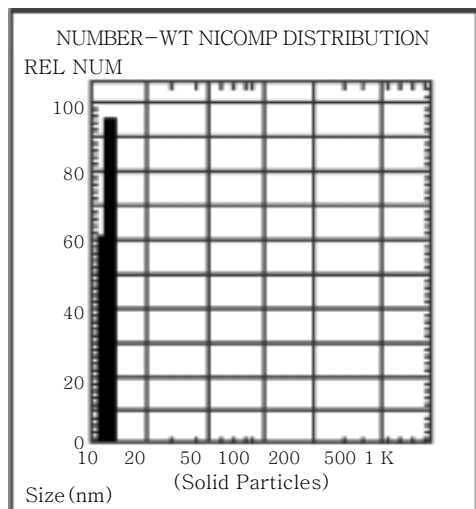


Figure 13. Particle size distribution of AWBP-PEG-*g*-LMWSC measured by zeta potentiometer.

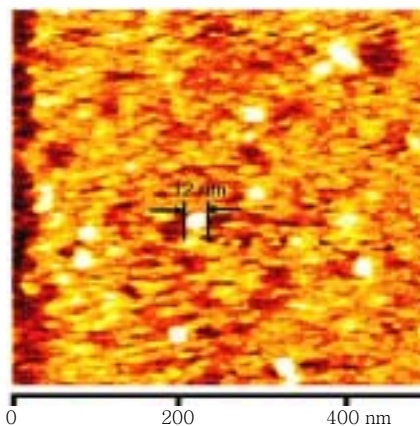


Figure 14. Particle size of AWBP-PEG-*g*-LMWSC measured by AFM.

VS-PEG-*g*-LMWSC의 vinyl sulfone 그룹에 완전히 결합되었음을 다시 한 번 확인하였다. 그리고 phenylalanine의 aromatic 그룹(7.111 ppm)과 LMWSC의 아세틸 그룹(1.929 ppm)에서의 피크를 비교함으로써 4몰의 AWBP가 1몰의 VS-PEG-*g*-LMWSC와 반응하였음을 확인하였다.

입자 크기. Zeta potentiometer에 의해 측정된 AWBP-PEG-*g*-LMWSC의 입자 크기는 12.0 nm(Figure 13)였으며, 입자 크기 분포가 상당히 좁고 단일 형태로 나타났다. 이 결과는 AFM(Figure 14)에 의해 측정된 결과와 일치함을 확인하였다.

결 론

특이성 세포 표적을 위한 유전자 전달 시스템은 유전자 물질을 원하는 특정 조직이나 세포에 직접 주입함으로써 인간의 질병을 치료할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 본 연구에서는 이러한 천연 양이온성 다당류인 LMWSC를 가지고 동맥 벽 세포를 표적할 수 있는 유전자 전달 시스템으로서 AWBP-PEG-*g*-LMWSC를 합성

하였다. 동맥 벽은 심장혈관 질병을 유전자 치료로서 *ex vivo*, *in vivo*로 접근할 수 있는 아주 중요한 표적 기관이다.²¹ 유전자 전달과 치료를 위한 동맥 벽을 사용한 시스템은 아주 흥미있는 접근이라 할 수 있다. 왜냐하면 인체의 모든 조직과 기관에 분포되어 있기 때문이다. Apolipoprotein B-100에 기초하여 합성한 펩타이드인 AWBP가 동맥벽 세포를 표적할 수 있는 수단을 제공하고 유전적인 질병을 치료하기 위해 충분한 시간동안 표적 위치에 머물게 할 것이다.²²

본 실험에서는 유전자 전달체로서 가능성이 보고된 바 있는 LMWSC의 물리화학적 특성을 분석하였으며 각각의 두 단계를 거쳐 합성된 AWBP-PEG-*g*-LMWSC의 특성 및 구조를 분석하여 유전자 전달체를 합성하였다. LMWSC의 M_w 와 DDA는 상대 점도와 Kina 적정법에 의해 M_w 22 kDa, DDA 84%로 측정되었다. LMWSC의 구조적 특성은 FTIR, ^1H -NMR, 그리고 ^{13}C -NMR에 의해 측정하였다. FTIR 스펙트럼에서, 젖산염에 의한 카복실 그룹의 흡수 피크가 사라졌으며 효소 분해 과정에 의해 형성된 불순물 피크가 현저하게 감소하였다. ^1H -NMR 스펙트럼과 ^{13}C -NMR 스펙트럼에서, 젖산염에 의한 피크가 사라졌으며 여러 가지 불순물에 의한 피크가 눈에 띄게 감소하였다. 또한 수소와 탄소의 면적비에 대한 ^1H -NMR과 ^{13}C -NMR의 실험값이 이론값과 거의 일치하였다. 결론적으로, 본 실험에 사용한 LMWSC는 C-2 위치의 아민 그룹에 어떠한 수용성 유도체도 도입하지 않은 순수한 수용성 키토산임을 확인하였다. LMWSC를 이용하여 합성한 유전자 전달체 AWBP-PEG-*g*-LMWSC의 특성은 FTIR, ^1H -NMR, zeta potentiometer, 그리고 AFM에 의해 확인하였다. FTIR 스펙트럼에서, VS-PEG-*g*-LMWSC의 vinyl sulfone 그룹에 AWBP의 thiol 그룹이 결합됨으로써 AWBP의 thiol 그룹의 특성 피크가 사라졌음을 확인하였다. ^1H -NMR 스펙트럼에서도 AWBP의 thiol 그룹의 특성 피크가 전체적으로 사라졌음을 확인하였다. 이것은 AWBP의 thiol 그룹이 VS-PEG-*g*-LMWSC의 vinyl sulfone 그룹에 완전히 결합되었음을 의미한다. Zeta potentiometer와 AFM에 의해 측정된 입자 크기는 12 nm의 아주 작은 크기로 DNA와 복합체를 형성했을 때 동맥 벽 세포를 표적하기 위한 적절한 크기로 평가된다. 지금까지 보고된 여러 문헌의 결과를 미루어 보아 최종 생성물인 AWBP-PEG-*g*-LMWSC는 동맥 벽을 표적할 수 있는 훌륭한 유전자 전달체로서 많은 가능성을 보이고 있다고 사료되어진다. 동맥 벽 세포를 표적한 유전자 전달 시스템은 더 나아가 동맥경화와 심장 동맥 재협착증과 같은 심장혈관 질병의 치료를 위해서도 크게 이바지할 것이라고 기대한다.

감사의 글 : 본 연구는 과학기술부 국가지정연구실사업(National Research Laboratory, NRL)의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. E. Gilboa, M. A. Eglitis, P. W. Kantoff, and F. W. Anderson, *Biotechniques*, **4**, 504 (1986).
2. M. A. Rosenfeld, W. Siegfried, K. Yoshimura, K. Yoneyama, M. Fukayama, L. E. Stier, P. K. Paakko, P. Gilardi, L. D.

- Stratford-Perricaudet, M. Perricaudet, S. Jallat, A. Pavirani, J. P. Lecocq, and R. G. Crystal, *Science*, **252**, 431 (1991).
3. J. Smith, Y. Zhang, and R. Niven, *Adv. Drug. Deliver. Rev.*, **26**, 135 (1997).
4. K. W. Peng, *Mol. Med. Today*, **5**, 448 (1999).
5. N. J. Caplen, E. W. F. W. Alton, P. G. Middleton, J. R. Dorin, B. J. Stevenson, X. Gao, S. R. Durham, P. K. Jeffery, M. E. Hodson, C. Coutelle, L. Huang, D. J. Porteous, R. Williamson, and D. M. Geddes, *Nat. Med.*, **1**, 39 (1995).
6. I. Fajac, P. Briand, M. Monsigny, and P. Midoux, *Hum Gene Ther.*, **10**, 395 (1999).
7. S. S. Diebold, M. Kursa, E. Wagner, M. Cotten, and M. Zenke, *J. Biol. Chem.*, **274**, 19087 (1999).
8. K. W. Leong, H. O. Mao, V. L. Truong-Le, K. Roy, S. M. Walsh, and J. T. August, *J. Control. Release*, **53**, 183 (1998).
9. S. Hirano, H. Seino, Y. Akiyama, and I. Nonaka, *Progress in Biomedical Polymer*, C.G. Gebelein and R.L. Dunn, Editors, Plenum Press, New York, pp 283-290 (1990).
10. R. J. Munper, J. J. Wang, J. M. Claspell, and A. P. Rolland, *Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, **22**, 178 (1995).
11. K. Roy, H. Q. Mao, S. K. Huang, and K. W. Leong, *Nat. Med.*, **5**, 387 (1999).
12. M. Lee, J.-W. Nah, Y. Kwon, J. I. Koh, K. S. Ko, and S. W. Kim, *Pharm. Res.*, **18**, 427 (2001).
13. J. -S. Kim, A. Maruyama, T. Akaike, and S. W. Kim, *Pharm. Res.*, **15**, 116 (1998).
14. L. Yu, M. Nielsen, S. O. Han, and S. W. Kim, *J. Control. Release*, **72**, 179 (2001).
15. D. G. Affleck, L. Yu, D. A. Bull, S. H. Bailey, and S. W. Kim, *Gene Ther.*, **8**, 349 (2001).
16. I. L. Shih, R. S. Lees, M. Y. Chang, and A. M. Lees, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87**, 1436 (1990).
17. J. Z. Knaul, M. R. Kasaai, V. T. Bui, and A. M. Creber, *Can. J. Chem.*, **76**, 1699 (1998).
18. K. Kina, K. Tamura, and N. Ishibashi, *Jpn. Anal.*, **23**, 1082 (1974).
19. M. L. Huggins, *J. Am. Chem. Soc.*, **64**, 2716 (1942).
20. E. O. Kraemer, *Ind. Eng. Chem.*, **30**, 1200 (1938).
21. R. D. Simari and E. G. Nabel Semin, *Genetic therapy, Interv. Cardiol.*, **1**, 77 (1996).
22. J.-W. Nah, L. Yu, S. O. Han, C. -H. Ahn, and S. W. Kim, *J. Control. Release*, **78**, 273 (2002).