

키토산-리포산 빗살형 공중합체를 이용한 유전자 전달체 개발

권상규 · 김성완* · 김영진†

충남대학교 공과대학 바이오응용화학과, *유타대학교 약학대학 CCCD
(2010년 4월 23일 접수, 2010년 5월 27일 수정, 2010년 6월 26일 채택)

Novel Gene Delivery Carrier Using Chitosan-Lipoic Acid Comb-Type Copolymer

Sang Kyoo Kwon, Sung Wan Kim*, and Young Jin Kim†

Department of Applied Chemistry and Biological Engineering,

Chungnam National University, 220, Gung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea

*Center for Controlled Chemical Delivery, University of Utah, Salt Lake City, Utah 84112, USA

(Received April 23, 2010; Revised May 27, 2010; Accepted June 26, 2010)

초록: 물에 잘 녹지 않는 고분자량의 키토산을 가수분해하여 수용성을 갖는 저분자량 키토산을 제조하였다. 키토산을 효율적인 유전자 전달체로 개발하기 위하여 항산화제의 일종인 리포산과 결합하여 빗살 형태의 공중합체를 제조하였다. 양친성을 가지는 공중합체는 수용액 상에서 자기조립을 하여 나노입자를 형성하였다. 나노입자의 평균크기는 217.6 nm이었고 유전자와 복합체를 이루었을 때의 평균크기는 170 nm로 나타났다. 새롭게 만들어진 키토산-리포산 공중합체는 낮은 세포독성을 나타내었고 순수한 키토산에 비하여 10배 정도 높은 형질 발현효율을 보여주었다.

Abstract: Natural chitosan has high molecular weight and the poor solubility in water. Water-soluble chitosan with low molecular weight was prepared by the hydrolysis method. In order to develop an efficient gene delivery carrier, chitosan was conjugated with lipoic acid to form the comb-type copolymer. The copolymer with the amphiphilic property formed the self-assembled nanoparticles in the aqueous solution. The average size of nanoparticles was 217.6 nm and the average size of nanoparticles/DNA complex was 170 nm. New chitosan-lipoic acid copolymer showed the low cytotoxicity and 10 times higher transfection efficiency than that of the pure chitosan.

Keywords: chitosan, lipoic acid, gene delivery, comb-type copolymer.

서 론

유전자치료는 세포 내로 해당 질환의 유전자를 전달하여 치료 단백질을 발현하는 것을 목적으로 하는 방법으로 세포의 생물학적 결함을 제거하거나, 유전적인 결핍이나 조절되지 않은 세포분화와 같은 비정상적인 세포의 기능을 멈추게 하며, 생물학적 활성물질을 생산함으로써 다양한 종류의 질병을 치료하는 것을 목적으로 한다.¹⁻⁵

그러나 아직까지 유전자의 이용 및 응용은 낮은 발현효율이나 원하는 세포에 대한 비특이성, DNA 분해 효소에 의한 분해, 체내에서의 불안정성 등 여러 가지 문제에 의해 제한을 받고 있다.⁶

1970년에 유전자 치료가 제안되어진 이래로 Felgner와 Ringold에 의해 세포 내 독성이 없고, 비면역성, 안정성을 가지는 비바이러스성 벡터로 처음 보고된 양이온성 고분자들이 현재 유전자 치료에 폭넓게 이용되어지고 있다.^{7,8} 양이온성 고분자의 가장 큰 이점 중 하나는 양전하를 가지기 때문에 DNA와 정전기적 상호 작용으로 복합체를 쉽게 형성하고 선형의 DNA를 응축하게 만들어 안정한 구조를 만

들 수 있다는 것이다.⁹

키토산(chitosan)은 자연에 존재하는 다당류 고분자 물질로서 최근에 의료용 소재로 많이 응용되고 있다. 분자량이 조절되거나 개질된 키토산은 일반 키토산과 다르게 물에 녹는 수용성 키토산으로 제조가 가능하다. 분자구조 중에 포함된 아민기가 쉽게 양이온화(NH_3^+)하며, 수소결합을 일으킬 수 있는 다량의 수산기를 동시에 가지고 있으므로 비교적 타고분자와의 상용성도 큰 것으로 알려져 있다.^{10,11}

α -리포산(lipoic acid)은 만능 항산화제(universal antioxidant)라 불리며 막과 수용액에서 모두 항산화 성질을 가진다. 즉, 여러 반응성 산소종을 직접 억제시키거나 반응성 산소의 생성원을 억제한다. 또한, 관상동맥 경화증과 암을 방호하는데도 좋은 항산화제임이 증명되고 있다. 이러한 리포산은 물질대사의 보조인자로서도 매우 중요한 역할을 한다.^{12,13}

본 연구에서는 양이온성 고분자를 이용하여 효율적으로 유전자를 전달하기 위한 비바이러스성 유전자 전달체를 개발하는 것을 목적으로 하였다. 천연물질에서 유래된 키토산은 양이온성 고분자로서 아민기에 의해 양전하를 띠기 때문에 음전하를 띠는 DNA와 상호작용할 수 있지만, 낮은 용해도로 인해 실제 사용에 있어서 문제점이 있다. 그

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: kimyj@cnu.ac.kr

래서 고분자량의 키토산을 가수분해를 통해 분자량을 조절하여 수용성을 가지도록 제조하였다.¹⁴ 수용성 키토산을 제조한 후 키토산이 가지는 아민 그룹에 항산화 물질로 알려진 리포산을 합성하여 양친성 블록 공중합체를 형성시켰다. 블록 공중합체는 수용액 상에서 자가응집에 의하여 나노입자를 형성하였고 나노입자로 만들어진 후 유전자와 결합시켰을 때 선행의 키토산-리포산 공중합체가 유전자와 결합한 경우보다 더 높은 형질발현효율을 나타내었다(자료 비공개). 세포 시험을 통해 양이온성 키토산, 키토산-리포산 공중합체들의 세포 내에서의 독성을 확인하였고 DNA복합체의 형질발현 정도를 측정하였다. 키토산과 리포산의 결합 비율을 조절하여 친수성-소수성 결합비가 유전자 전달체에 미치는 영향을 확인하였다.

실 험

재료. 본 연구에 사용된 저분자량 수용성 키토산(LMWSC)은 Aldrich Chemical사의 고분자량 키토산을 구매하여 가수분해하여 제조하였고, 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide(EDC)와 α -리포산 역시 Sigma-Aldrich사의 제품을 구입하여 사용하였다. 투석에 사용된 막은 Spelco사의 분자량한계 2000 g/mol인 제품을 사용하였다. *In vitro* 실험에 쓰인 DMEM과 fetal bovine serum(FBS), 모델유전자로 쓰인 pCMV-luc은 충남대학교 생화학과 최준식교수님으로부터 제공받아 실험하였다. pCMV-luc은 *E.coli*로부터 얻은 CMV를 프로모터로 하는 plasmid DNA에 luciferase gene을 인코딩시킨 것이다. 293 세포의 기본 배지는 10% FBS를 공급해준 DMEM에 1%의 항생제를 첨가하여 사용하였고, 5% CO₂, 95% 습도, 37 °C incubator에서 배양하였다.

저분자량 수용성 키토산의 제조. 불용성인 고분자량 키토산($M_w = 1.90 \times 10^6$, 디아세틸화도 89%)을 250 mL 둥근 삼구 플라스크에 넣고 4 N 염산(HCl) 100 mL를 첨가하여 50, 70 °C에서 24시간 동안 질소 분위기 하에서 반응시켰다. 반응 종료 후 반응물은 투석막을 사용하여 24시간 동안 투석하여 반응 시 사용된 염산을 제거하였다. 그 뒤 동결 건조를 통하여 백색 분말의 저분자량 수용성 키토산을 얻는다. 이렇게 얻어진 저분자량 수용성 키토산의 분자량은 Ostwald viscometer를 이용하여 아래에 주어진 Mark-Houwink 식 (1)에 의해 분석하였다.

$$[\eta] = 1.81 \times 10^{-5} \bar{M}^{0.93} (\text{dL/g}) \quad (1)$$

키토산-리포산 Comb-Type Copolymer의 합성. 100 mL 둥근 삼구 플라스크에 이렇게 얻어진 저분자량 수용성 키토산 420 mg과 250 mg(1.5 mmol)의 EDC, 150 mg(1.3 mmol)의 NHS를 넣고 증류수 50 mL에 녹여준다. 그 후 이 용액에 103 mg(0.5 mmol), 206 mg(1.0 mmol), 412 mg(2 mmol)의 리포산을 각각 20 mL의 아세톤에 녹여 가해준 뒤 기계적인 교반을 가하며 20시간 동안 50 °C에서 반응시킨다.

반응물을 tetrahydrofuran(THF)에 침전시켜 침전물을 얻고 이렇게 얻어진 침전물을 투석막을 사용하여 24시간 동안 투석하여 반응 시 사용된 용매를 제거하였다. 이렇게 얻어진 결과물을 동결건조시켜 흰색의 키토산-리포산 공중합체를 얻는다. 키토산 주사슬에 결

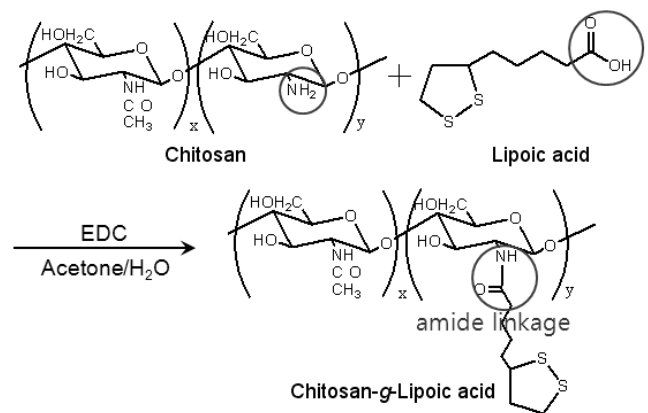
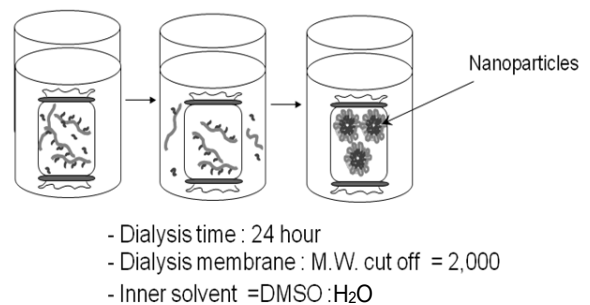


Figure 1. Reaction mechanism of chitosan-lipoic acid comb-type copolymer.



Hydrophilic segment : chitosan
Hydrophobic segment : lipoic acid → **core-shell structure**

Figure 2. The formation of nanoparticles using dialysis method.

합된 리포산의 degree of substitution(DS)를 조절하면서 합성한 수용성 키토산-리포산 공중합체의 구조 분석은 ¹H NMR, FTIR을 사용하여 확인하였다. 저분자량 수용성 키토산-리포산의 반응 메커니즘은 Figure 1에 나타내었다.

키토산-리포산 공중합체의 나노입자 제조 및 특성 분석. 세 가지 조건의 키토산-리포산 공중합체를 증류수와 DMSO의 혼합용액에 넣어 교반시켜 녹인다. 이를 투석막을 사용하여 24시간 동안 투석하여 나노입자를 형성함과 동시에 사용된 유기 용매인 DMSO를 제거하였다. 나노입자의 크기 및 표면전하 측정은 dynamic light scattering(Zeta potential & Particle size Analyzer, ELS-Z)와 transmission electron microscope(TEM, CM20, Philips)를 통해 확인하였다. 제조 과정은 Figure 2에 나타내었다.

임계응집농도(CAC) 측정. 합성된 양친매성 공중합체의 수용액 상에서 나노입자가 형성되는 농도를 확인하기 위하여 형광 측정기 spectrofluoro-photometer(RF-5301 PC, Shimadzu)를 이용하여 분석하였다. 각각의 저분자량 수용성 키토산-리포산 공중합체의 critical aggregation concentration(CAC) 값을 측정하기 위하여 소수성 형광 염료인 pyrene을 사용하였다. 다양한 농도의 고분자 용액을 준비하고 각 용액에 일정한 양의 pyrene을 넣어 가용화된 pyrene의 형광 정도를 측정하였다. 측정은 pyrene의 여기파장(400 nm)과 발산파장(480 nm)에서 측정하였다.

Polyplex 형성 확인. 형성된 키토산-리포산 나노입자에 표시 유전자인 pCMV-luc을 결합하여 polyplex(복합체)를 형성시켰다.

유전자와 나노입자의 적절한 결합비를 알아보기 위해 나노입자/DNA를 각각 다른 무게비로 준비하여(1:1, 1:2, 1:3, 1:4(W/W)) 분산시킨 후 실온에서 30분간 결합시켰다. 각각의 복합체 시료를 0.7% agarose gel에 넣어주고 전기영동을 실시하였다. 10분간의 전기영동 후에 UV illuminator로 조사하여 결합 여부를 확인하였다.

세포 내 독성실험. 키토산 및 리포산 결합비가 조절된 공중합체의 세포 내독성을 알아보기 위해서 293세포를 이용하여 MTT assay를 실시하였다. 키토산, 합성된 고분자와 독성이 강한 물질로 알려진 PEI를 사용하여 비교 실험하였다. 96 well plate에 well 당 2×10^4 개의 세포를 분배하여 넣어 주었다. 26 μ L의 MTT시약을 각 well에 넣어 준 후 4시간 더 배양한다. 미디어를 제거해주고 150 μ L의 DMSO를 넣어 formazan crystals이 형성되게 한다. 용매를 제거한 후 ELISA reader를 통해 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

유전자 형질발현실험. 양이온성 키토산과 각각의 키토산-리포산 공중합체의 *in vitro*에서의 형질발현 효율을 알아보기 위해서 세포 실험을 실시하였다. 293 세포를 사용하였고, 세포들은 형질발현 실험 전에 24시간 동안 24 well plate에 각각 2×10^5 개씩 넣어 배양하였다. 복합체는 무게비(w/w)로 1:4(DNA/chitosan-lipoic acid)로 제조하였다. DNA는 0.5 μ g/ μ L로 희석된 pCMV-luc을 사용하였다. 30분 동안 숙성하여 얻은 복합체를 각각의 well에 넣어준 후 24시간 동안 배양하였다. 미디어를 제거한 후 DPBS로 세척하고, 150 μ L의 lysis buffer로 처리해준다. 세포를 모은 후 원심분리기로 13000 rpm, 10분간 돌려 상층액(lysate)을 100 μ L 담아 각각의 튜브에 담아준다. 10 μ L의 lysate와 luciferase assay buffer를 섞어 lumino-

meter를 사용해 형질발현 효율을 측정하였다.

결과 및 토론

저분자량 수용성 키토산의 특성 분석. 본 연구에서는 불용성 키토산에 수용성을 부여하기 위해 산성 용액에 의한 가수 분해법(hydrolysis)을 이용하여 반응 온도에 따라 저분자량 수용성 키토산을 제조하였다.¹⁴ 수용성 키토산의 평균분자량은 Ostwald viscometer를 이용하여 고유점도를 얻은 뒤 이 값을 Mark-Houwink식에 대입함으로써 구하였다. 반응온도 50 $^{\circ}$ C에서 제조된 키토산의 분자량은 평균 3.5×10^5 이었고 70 $^{\circ}$ C에서 제조된 키토산의 분자량은 평균 9.5×10^4 임을 확인하였다. 분자량이 조절된 키토산은 물에 쉽게 녹는 것을 확인할 수 있었다.

키토산의 탈아세틸화도 측정은 toluidine blue-O를 이용한 콜로이드 적정법으로 다음과 같이 구하였다.¹⁴ 반응 온도가 50 $^{\circ}$ C인 경우의 탈아세틸화도는 86.45%이고 70 $^{\circ}$ C일 경우는 87.12%로 나타났다. 분자량이 작고 탈아세틸화도가 높은 키토산을 선택하여(70 $^{\circ}$ C, 4 N 염산처리) 리포산과 합성하기로 결정하였다.

키토산-리포산 공중합체의 구조 분석. 친수성 키토산(CH, M.W. = 9.5×10^4)과 소수성 리포산(LA) 그룹의 반응액 내 당량비를 조절하여 다양한 조성의 그래프트 공중합체((a) chitosan, (b) chitosan-lipoic acid (0.5 mmol), (c) chitosan-lipoic acid (1 mmol), (d) chitosan-lipoic acid (2 mmol))를 합성하였다 이렇게 제조된 양친성 고분자는 1 H NMR, FTIR 분석을 통하여 중합된 그래프트 공중합체의 특정 관능기에 해당하는 분자 구조를 분석하였다.

NMR 분석은 Figure 3에 나타내었다. 수용성 키토산의 1번 탄소

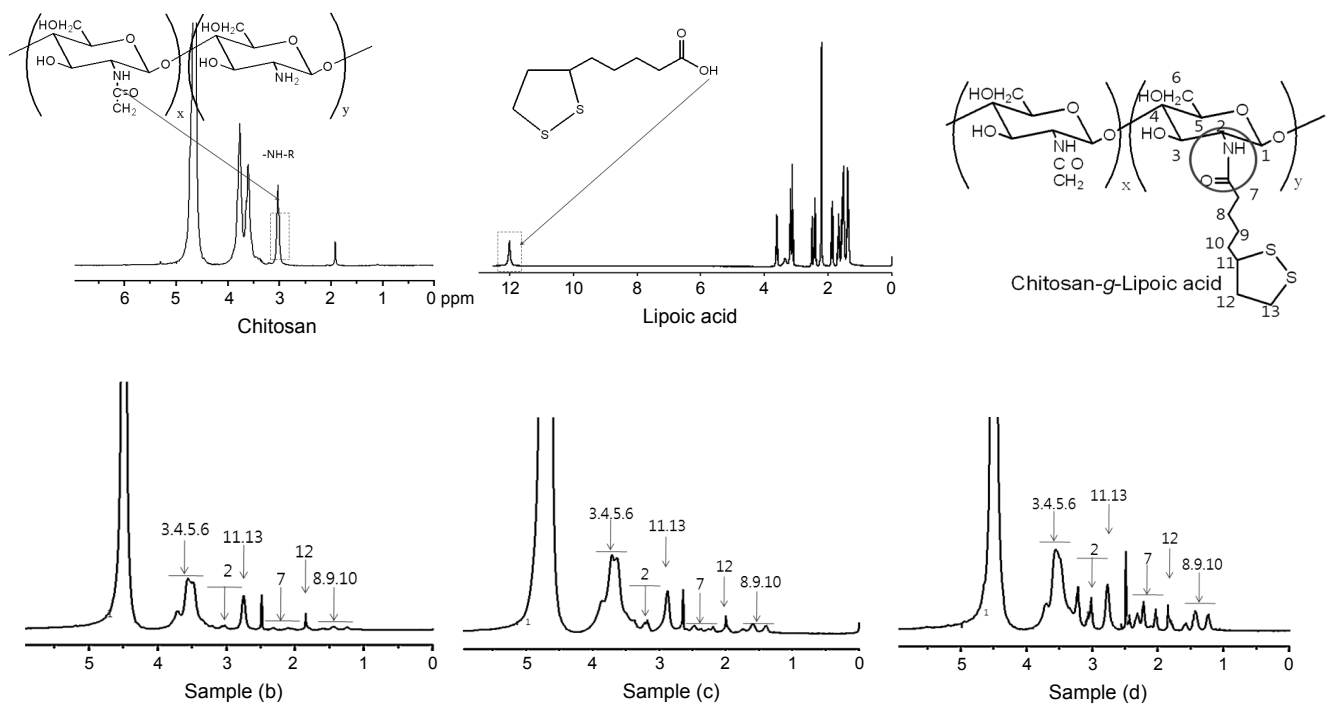


Figure 3. 1 H NMR spectra of chitosan, lipoic acid, chitosan-lipoic acid (sample b); chitosan-lipoic acid (sample c); chitosan-lipoic acid (sample d).

에 결합되어 있는 수소가 4.3 ppm에서, 2번 탄소의 수소피크가 2.5 ppm에서, 그리고 3~6번 탄소의 수소피크가 3.6~3.4 ppm에서 나타남을 확인하였다. 리포산의 특성 피크로써 8~10번 탄소의 수소피크가 1.3~1.5 ppm에서 확인됨으로써 키토산-리포산의 결합을 확인할 수 있었다. 수용성 키토산에 해당하는 3 ppm에 있는 피크의 면적

Table 1. Characteristics of Chitosan-Lipoic Acid Graft Copolymer

Sample	Mole rate (mmol)	Degree of substitution (DS)
(a) Chitosan	—	—
(b) CH-LA	1 : 0.5	1 : 0.01
(c) CH-LA	1 : 1	1 : 0.10
(d) CH-LA	1 : 2	1 : 0.21

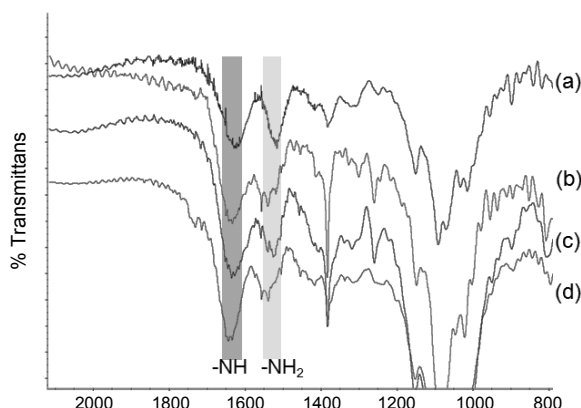


Figure 4. FTIR spectra of chitosan(a); chitosan-lipoic acid (sample b); chitosan-lipoic acid (sample c); chitosan-lipoic acid (sample d).

비와 리포산에 해당하는 1.5 ppm에 있는 피크의 면적비를 이용하여 치환도(degree of substitution, DS)를 계산하였다. 결과는 Table 1에 나타내었다.

Figure 4의 FTIR의 결과로부터 리포산의 치환 정도가 증가할수록 1585 cm^{-1} 에 나타나는 아민기의 특성 피크가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 리포산이 수용성 키토산의 아민기에 치환됨으로써 아민기가 전체적으로 줄어들기 때문에 나타나는 현상으로 사료된다. 그러므로, 리포산의 카르복실기와 수용성 키토산의 아민기가 결합함으로써 새로운 아마이드(NH-)가 형성되었다는 것을 확인하였다.

임계응집농도(CAC). 합성된 키토산-리포산 양친성 공중합체는 pyrene을 이용한 형광 분석을 통하여 임계입자형성 농도를 측정하였다. 고분자 용액의 다양한 농도에서 I_{445}/I_{452} 의 값을 구한 뒤 농도에 따른 그래프를 그리면 Figure 5처럼 특정 농도 값 이상에서 기울기가 갑자기 증가하는 것을 확인할 수 있다. 이때, 그래프의 기울기가 달라지는 지점의 농도가 바로 임계응집농도 값이 된다. 샘플 (b)는 $1 \times 10^{-2}\text{ mg/mol}$ 이고, 샘플 (c)는 $5 \times 10^{-2}\text{ mg/mol}$ 이고, 샘플 (d)는 $1 \times 10^{-3}\text{ mg/mol}$ 이었다. 이는 키토산에 소수성을 가지는 리포산이 많이 결합할수록 응집체가 더 낮은 농도에서 형성하는 것을 나타낸다.

키토산-리포산 공중합체의 나노입자 분석. 수용액 상에서 형성된 나노입자와 polyplex의 크기는 zeta potential & particle size analyzer (ELS-Z)에 의해 측정되었다. 키토산-리포산 공중합체는 리포산의 치환 정도에 따라 입자 크기의 차이를 보이며, 샘플(b)의 경우 평균입자 크기가 224.2 nm 이었고, 샘플(c)는 217.4 nm 이었고, 샘플(d)는 205.1 nm 로 나타났다. 이것은 키토산에 리포산이 많이 치환될수록 소수성 부분이 증가해서 응집이 잘 일어나는 것으로 생각된다. 입자 모양도 역시 소수성 부분이 많이 치환된 것이 더 원형에 가까운 모습을 나타내었다(Figure 6).

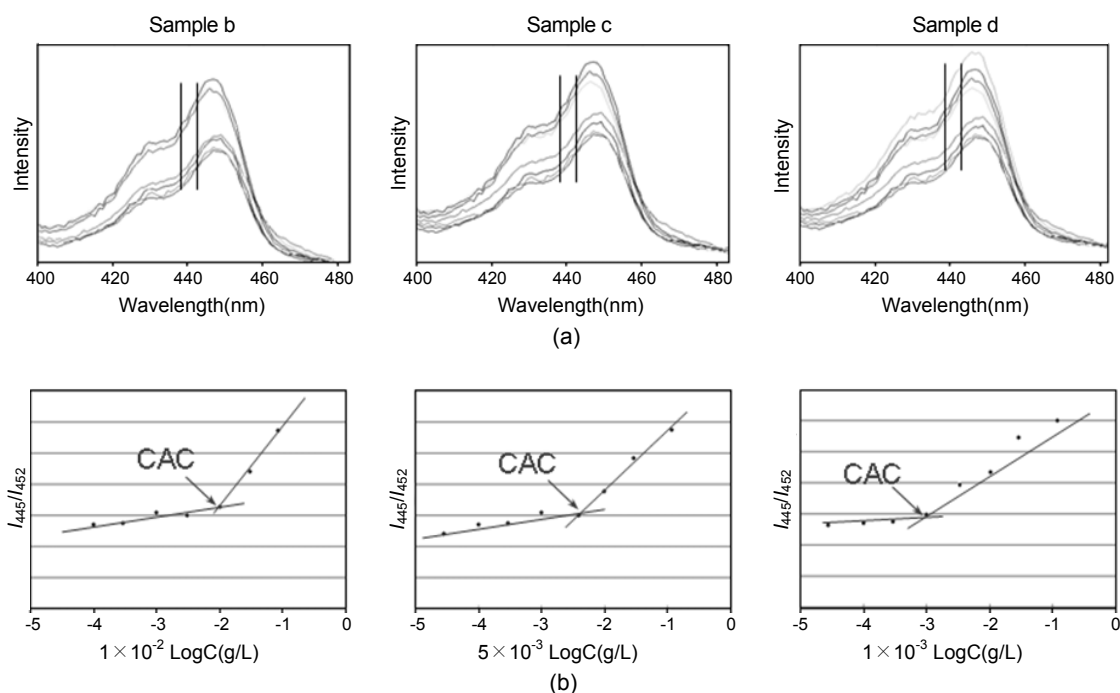


Figure 5. (a) Excitation spectra of pyrene with various concentration of chitosan-lipoic acid conjugates; (b) plots of I_{445}/I_{452} .

DNA와 결합한 polyplex의 경우 DNA의 정전기적 인력으로 인해 응축되는 현상을 발견할 수 있었으며, 크기는 결합전과 비교하여 샘플 (b)는 180.3 nm, 샘플(c)는 170 nm, 샘플(d)는 174.6 nm로 각각 30~40 nm씩 줄어든 것을 확인할 수 있었다. 입자크기에 대한 실험결과는 Table 2에 정리하였다.

표면전하 값의 경우에도 리포산의 치환 정도에 따라 그 값이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 키토산의 주사슬의 아민기($-NH_3^+$)가 리포산의 카르복실기($-COOH$) 그룹과 반응하여 양이온성이 감소한 것으로 생각된다. 또한, 나노입자가 DNA와 결합 후에도 복합체가 계속 양이온성을 가지는 것으로 나타나 음이온성을 띠는 세포와 잘 결합할 것으로 생각된다. 또한, 투과전자현미경(TEM)을 통해 측정된 결과 나노입자가 약 200 nm 정도의 크기를 가지며 구형의 모양을 가지고 있음을 확인하였다.

키토산-리포산 나노입자/DNA Complex 확인. 고분자 나노입자와 DNA의 적절한 결합 비율을 알아보기 위해 전기영동법을 사용하여

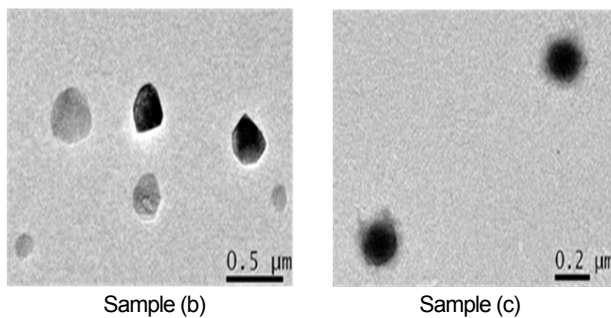


Figure 6. TEM images of chitosan-lipoic acid nanoparticles.

Table 2. Particle Sizes and Zeta Potentials of Chitosan-Lipoic Acid and Polyplex Nanoparticles (CH-LA/DNA, w/w, 4:1) (ELS-Z)(n=3)

Sample	Size (nm)	Zeta potential (mV)
(a) Chitosan	—	+57.6
(b) CH-LA	224.1±7.6	+50.3
(c) CH-LA	217.4±4.7	+37.1
(d) CH-LA	205.2±5.2	+33.2
(b) CH-LA/DNA	180.3±3.2	+19.8
(c) CH-LA/DNA	170±7.2	+18.5
(d) CH-LA/DNA	174.6±3.9	+13.0
DNA (pCMV-luc)	2180±12.3	-20.0

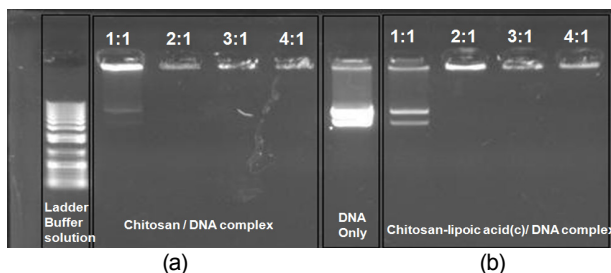


Figure 7. Electrophoresis using agarose gel retardation assay. (a) chitosan/DNA polyplex with the charge ratio of 1:1, 2:1, 3:1, 4:1; (b) chitosan-lipoic acid/DNA polyplex with the same charge ratio (sample c).

확인하였다. Figure 7에서 키토산과 DNA의 결합은 1:1 이상에서 모두 잘 이루어지는 것으로 확인되었다. 키토산-리포산과 DNA는 2:1 비율 이상에서 결합되는 것을 확인하였다. 이것은 키토산의 아민 그룹에 리포산이 결합하면서 양이온성을 띠는 아민기가 적어졌다고 판단된다. 표면전하 측정결과에서도 역시 전하가 57.6 mV에서 치환 정도에 따라 33.2 mV까지 줄어든 것을 확인할 수 있었다.

세포독성 실험. 나노입자의 세포 독성평가를 위하여 사람의 신장세포인 293 세포주를 이용하여 생체외 세포 독성평가를 실시하였다. 키토산(a), 키토산-리포산(샘플 b~d) 공중합체의 독성평가 결과는 UV 측정기를 통하여 흡광도를 측정하여 Figure 8에 나타내었다. 24시간 동안 293 세포주의 세포 생존율을 측정한 결과 세포 생존도는 97%로 나타났으며, 거의 모든 시료에서 독성이 낮은 것을 확인할 수 있었다.

유전자 형질발현 시험. 키토산과 리포산의 결합비율의 변화에 따른 유전자 형질발현효율의 변화를 알아보고자 293세포에 형질발현 실험한 결과를 Figure 9에 나타내었다. 리포산과 결합되지 않은 순수한 키토산에 비해 리포산과 결합된 키토산이 결합비율에 따라 형질 발현효율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

형질발현효율이 아주 우수한 반면 세포 독성이 큰 PEI(25 kD, 가지형)와 비교하면 그 효율이 높지는 않지만 리포산과의 결합비율이 높아질수록 순수한 키토산에 비하여 발현 효율이 10배 이상 높아진 것을 알 수 있다. 이것으로 리포산의 결합이 세포내에서 형질발현효율을 높

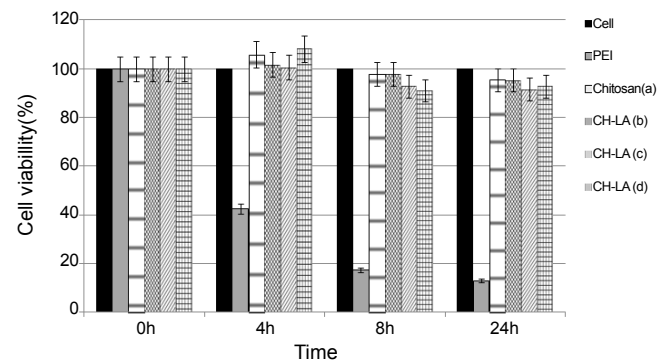


Figure 8. Cytotoxicity of chitosan-lipoic acid copolymer on human embryonic kidney 293 cells.

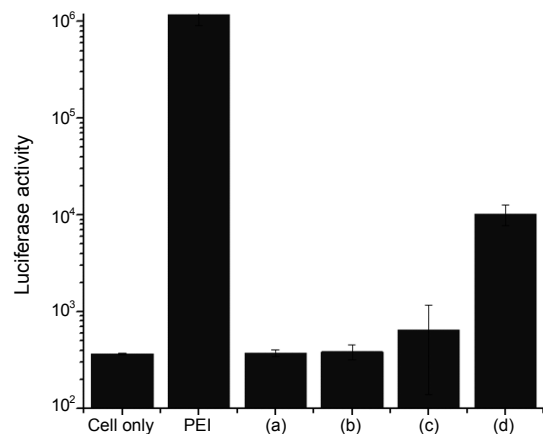


Figure 9. Transfection efficiency of chitosan(a); chitosan-lipoic acid (b)~(d) polyplexes for 293 cells.

이는 인자로 작용함을 알 수 있다.

결 론

생체적합성이 좋은 천연고분자인 키토산의 분자량을 조절하여 수용성 키토산을 제조하였다. 70 °C에서 가수 분해시킨 키토산은 분자량이 9.5×10^4 이고 탈아세틸화도는 87.12%를 가진다. 이 키토산을 항산화제로 알려진 리포산과 결합시켜 양친성 그래프트 공중합체를 합성하였다. 합성된 고분자는 소수성기와 친수성기를 모두 가지고 있어 수용액 상에서 나노 크기의 자기응집체를 형성할 수 있었다. 양이온성 키토산의 아민기에 리포산을 치환시켰으며, 결합몰비가 1:0.5, 1:1, 1:2일 때 치환 정도는 0.01, 0.1, 0.21로 나타났다. 고분자 나노입자의 크기는 평균 210 nm이었고 DNA와의 결합은 순수한 키토산은 1:1(CH/DNA, w/w)이상에서 복합체를 이루었고, 리포산이 결합된 키토산(CH-LA/DNA, w/w)은 2:1 비율 이상에서 복합체를 형성함을 확인하였다. 293 세포주에서 유전자 형질발현 시험을 한 결과 발현효율이 순수한 키토산에 비하여 10배 이상 높게 나타나 비바이러스성 유전자 전달체로서의 응용 가능성이 있음을 확인하였다.

감사의 글: 이 논문은 지식경제부 화학소재정보은행 구축사업의 지원을 받아 연구하였습니다. 세포 실험에 도움을 주신 충남대학교 생화학과의 최혜, 최준식 교수님께 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. M. Ogris and E. Wagner, *Somat. Cell Mol. Genet.*, **27**, 85 (2002).
2. R. Kircheis, T. Blessing, S. Brunner, L. Wightman, and E. Wagner, *J. Control. Release*, **72**, 165 (2001).
3. I. J. Chung, *J. Appl. Pharm.*, **15**, 274 (2007).
4. D. W. Emery, *Clini. Appl. Immunol.*, **4**, 411 (2004).
5. Y. K. Choi, J. G. Park, Y. S. Kim, and S. G. Paik, *Bulletin of Biotechnology CNU*, **8**, 10 (2002).
6. J. Johnston and F. Baylis, *A Review of Recent Events Clinical Researcher*, **4**, 11 (2004).
7. P. L. Felgner and G. M. Ringold, *Nature*, **337**, 387 (1989).
8. W. J. Kim and S. W. Kim, *Macromol. Res.*, **15**, 100 (2007).
9. A. Ziegler, G. H. Luedke, D. Fabbro, K. H. Altmann, R. A. Stahel, and U. Zangemeister-Wittke, *J. Natl. Cancer Inst.*, **89**, 1027 (1997).
10. V. M. Ramosa, N. M. Rodríguez, M. S. Rodríguez, A. Herasc, and E. Agulló, *Carbohydr. Polym.*, **51**, 425 (2003).
11. M. G. Jeong, D. S. Kim, Y. H. Choi, and H. S. Lim, *Polymer (Korea)*, **28**, 253 (2004).
12. S. W. Kang, S. J. Lee, and D. S. Kim, *Korean Diabetes*, **32**, 21 (2008).
13. M. A. Croyle, H. T. Le, K. D. Linse, V. Cerullo, G. Toietta, A. Beaudet, and L. Pastore, *Gene Therapy*, **12**, 579 (2005).
14. E. J. Park and Y. J. Kim, *Polymer (Korea)*, **32**, 544 (2008).