

저분자량 수용성 키토산이 분급화된 유전자 전달체의 제조 및 특성

장민자 · 김동곤 · 정영일 · 장미경[†] · 나재운[†]

순천대학교 나노고분자공학과

(2007년 9월 4일 접수, 2007년 10월 17일 채택)

Preparation and Characterization of Low Molecular Weight Water Soluble Chitosan Gene Carrier Fractioned according to Molecular Weight

Min-Ja Jang, Dong-Gon Kim, Young-Il Jeong, Mi-kyeong Jang[†], and Jae-Woon Nah[†]

Department of Nano Polymer Science and Engineering,

Sunchon National University, Suncheon, Jeonnam 540-742, Korea

(Received September 4, 2007; Accepted October 17, 2007)

초록 : 다양한 분자량을 가진 저분자량 수용성 키토산을 얻기 위해 젯산염이 결합되어 있는 키토산 올리고당을 한외 여과막 장치를 이용하여 분리하였고, 새로운 염 제거법으로 유리 아민기를 가진 LMWSC를 제조하였다. 젯산염이 제거된 LMWSC의 특성과 탈아세틸화도가 적외선 분광기(Infrared spectroscopy, IR) 및 핵자기공명장치(¹H-Nuclear Magnetic Resonance, ¹H-NMR)에 의해 확인되었다. 분자량을 나타내는 다분산지수(PDI)는 1.278~1.499로 비교적 좁은 분자량분포를 나타내었다. 유전자 전달체로서의 가능성을 확인하기 위하여, 성공적으로 분자량에 따라 분리된 키토산 올리고당과 염이 제거된 LMWSC의 유전자 전이효율이 293T cell을 이용하여 확인하였다. 또한 유전자 전이효율을 향상시키기 위해 제조된 LMWSC 유도체가 Balb/C mice를 이용하여 평가되었다.

Abstract : To obtain low molecular weight water soluble chitosan (LMWSC) with various molecular weights, chitosan oligosaccharides (COS) with lactic acid was separated by using ultrafiltration technique and LMWSC with a free amine group was prepared by the novel salts-removal method. The characterization of LMWSC removed the lactic acid and degree of deacetylation (DDA) were identified by FT-IR and ¹H-NMR spectra. Polydispersity index (PDI) was 1.278~1.499, which indicates a relatively molecular weight distribution. To identify the potential as a gene carrier, we confirmed the transfection efficiency of COS fractioned according to molecular weight successfully and the salt-removed LMWSC using 293T cell. Also, LMWSC derivatives prepared for improvement transfection efficiency were evaluated using Balb/C mice.

Keywords : low molecular-weight water soluble chitosan(LMWSC), chitosan oligosaccharides(COS), gene carrier, transfection.

서 론

최근 질병의 치료를 위한 유망한 치료전략으로써 유전자 치료가 많은 관심을 끌고 있다. 이것은 유전적인 결핍이나 조절되지 않는 세포 분화와 같은 비정상적인 세포의 기능을 멈추게 하거나 생물학적 활성 물질을 생산함으로써 다양한 종류의 질병을 치료하는 중요한 기회를 제공하기 때문이다.¹ 그러나 아직까지 유전자의 실제 응용에 있어서는 체액 내의 불안정성, 원하는 세포에 대한 비특이성, DNA 분해 효소에 의한 분해, 그리고 낮은 전이효율 등 여러 가지 문제에 의해 제한을 받고 있다. 이러한 문제들을 극복하기 위해서는 효과적이고 안전한 유전자 전달체계를 개발하는 것이다. 일반적으로 유전자 전달체는 바이러스성 벡터와 비바이러스성 벡터를 포함하고 있으며, 현재까지 바이러스성 벡터가 세포에 유전자를 전달하는 가장 효과적인 방

법이지만, 인체 내 안전성에 대한 문제점으로 인해 비바이러스성 벡터에 대한 연구로 대체되고 있는 실정에 있다. 비바이러스성 벡터는 세포내 독성이 없고, 비면역성, 그리고 재현성 같은 많은 장점을 가지고 있다.²

비바이러스성 벡터로 주로 사용되는 라이포솜 운반체³⁻⁵ 및 양이온성 고분자는^{6,7} 낮은 비용과 안전하다는 그들의 장점으로 인해 최근 10년간 폭넓게 연구되어져 왔다. *in vitro*에서 라이포솜 유전자 전달체가 높은 전이효율을 나타내는 것으로 알려져 있지만, 일부 라이포솜 유전자 전달체는 수용액상에서 불안정하고 혈액 내에서 응집이 된다는 문제점을 가지고 있다. 그리고 poly-L-lysine (PLL)과⁸⁻¹⁰ polyethylenimine(PEI)을 포함한 양이온성 고분자는 플라스미드 DNA와 복합체를 형성할 수 있고, 전이효율을 향상시키며 또한 DNA 분해효소로부터 DNA를 보호한다는 장점을 가지고 있으나, 인체 내 세포독성과 생체적합성 같은 문제점이 여전히 남아 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 많은 연구자들에 의해 사용되어지고 있는 키토

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: jmk8856@hanmail.net, jwnah@sunchon.ac.kr

산은 음전하를 띠는 DNA와 양전하를 띠는 키토산의 아민기가 이온 결합을 형성하므로 이를 유전자 전달체에 도입시킬 수 있다는 장점을 가지고 있다.^{11,12}

키토인의 탈아세틸화 반응을 통하여 얻어지는 키토산은 생체재료로서 가장 폭넓게 이용되는 천연 다당류 중의 하나이다. 키토산의 주사슬은 *D*-glucosamine과 *N*-acetyl-*D*-glucosamine의 두 가지 성분으로 이루어져 있으며, 이러한 두 요소는 b-1,4-linking에 의하여 결합되어 있다. 구조적으로 키토산은 셀룰로오스와 매우 유사하며 C-2 위치의 수산기(-OH)가 아민기(-NH₂)로 바뀐 형태를 하고 있다.¹³ 생체 고분자로서 키토산은 생분해성, 무독성, 생체적합성 등의 우수한 특성을 가지고 있으며,¹⁴⁻¹⁷ 이러한 우수한 특성으로 인하여 약물전달체 또는 생체의료용 재료로서 많은 응용이 시도되고 있다.

현재 시판되는 키토산은 생물학적 방법으로 제조한 것으로 분해과정에서 사용한 염이 제대로 제거되지 않기 때문에 대부분 염 형태의 키토산을 시판하고 있는 현실이다. 사용되어지는 염의 형태로는 염산, 질산, 초산 등 다양한 유·무기산 등이 사용되고 있으나 실질적으로 가장 많이 이용되는 것은 염산으로, 이는 키토산 제조에 있어서 가장 큰 기술적 과제로 남아 있었다. 소비자 연맹 등의 소비자 단체에서도 이러한 문제점을 파종산물인 키토산에 잔존 염산이 남아 있을 수 있는 여지가 있으나 이러한 염의 제거가 미약하여 2001년에는 언론을 통해 각 제조사의 키토산에 포함되어진 잔존염의 문제를 제기한 바 있다. 그러나 아직도 이러한 잔존염 제거에 관한 기술을 적용한 제품은 출시되지 않아 항상 문제점으로 남아있는 상황이다. 또한 유전자 전달체로서 키토산의 응용은 낮은 용해도로 인해 제한되어 왔으며, 이 문제를 해결하기 위해 염을 도입했으나 그 결과 아민기의 양전하가 감소함으로써 효과적인 유전자 전달체로서의 특성을 나타내지 못한 실정이었다. 이러한 키토산의 단점을 극복하기 위해 본 연구실에서는 유리 아민기를 가진 저분자량 수용성 키토산(LMWSC)을 제조했으며, 그 특성은 이미 분광학적 평가에 의해 확인되었다.¹⁸

따라서 본 연구에서는 증류수에 대한 높은 용해도를 위해 질산염이 결합되어 있는 키토산 올리고당(chitosan oligosaccharide, COS)을 한외여과막을 이용하여 분자량별로 분리한 다음 염 제거법을 통해 유리 아민기를 가진 LMWSC를 제조한 후, 유전자 전이 효율성에 영향을 주는 요소 중의 하나인 분자량에 따른 효과를 확인함으로써 LMWSC의 유전자 전달체로서의 우수성을 밝히고자 하였다. 또한 이전의 연구에서 유전자 전달체로서의 가능성을 확인한 LMWSC의 유도체로서 특정 조직을 표적할 수 있는 기능성기를 가진 유전자 전달체로서 LMWSC-AWBP¹⁹ 그리고 LMWSC-Ch(cholesterol)를²⁰ 이용하여 *in vivo*에서의 유전자 전이효율을 측정함으로써 독성이 없는 안전한 유전자 전달체로서의 가능성을 확인하였다.

실 험

재료. 질산염 키토산올리고당(COS)은 (주)키토라이프(서울, 한국)에서 제공받아 사용하였다. Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), 그리고 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)은 Sigma사(St. Louis, MO)에서 구입하였으며, Ethidium bromide(EtBr), 아가로즈는 Promega사(Madison, WI)

에서 구입하였다. Fetal bovine serum(FBS)은 Hyclone사에서 구입하였으며, 인간배아신장세포인 293T와 자궁암세포인 HeLa는 American Type Culture Collection(ATCC)에서 분양받아 배양하였다. 녹색형광단백질(green fluorescence protein, GFP)을 발현하는 pEGFP-N1과 pCMV-Luciferase 플라스미드 DNA는 BD Biosciences Clontech (Palo Alto, CA)에서 구입하였으며, 대장균을 통해 증폭시킨 플라스미드 DNA를 분리하기 위하여 Qiagen Maxi prep kit(Qiagen, Chatsworth, CA)를 사용하였다. *in vivo* 실험을 위하여 Balb/c mice(20 g, 5 weeks)는 Damul Science, Co.에서 구입하였으며, 기타 시약들은 1급 시약을 정제하지 않고 사용하였다.

다양한 분자량을 가진 LMWSC의 제조. 다양한 분자량의 COS를 1~3, 3~10, 10~30 KDa 범위의 한외여과막을 통해 각각 분리한 후, 인산염 완충용액에 용해시켜 적당량의 트리알킬아민으로 반응시킨 후 아세톤으로 처리한 다음 원심분리기를 이용하여 수회 세척 과정을 거친 후 감압 건조하였다. 건조된 1차 생성물을 묶은 염산으로 처리하여 다시 아세톤으로 세척하고 최종으로 건조된 생성물을 activated carbon과 이온교환수지를 이용하여 최종의 정제과정을 거친 후 동결 건조함으로써 다양한 분자량을 갖는 LMWSC를 제조하였다.

LMWSC의 특성 분석. 위의 과정을 통하여 제조된 LMWSC의 구조와 물리화학적 특성은 FT-IR(Shimadzu, FT-IR 8700, Japan) 및 NMR(¹H-NMR and ¹³C-NMR)(Bruker, Germany, Avance 400 FT-NMR, 400 MHz)을 이용하여 정성 및 정량적으로 분석하였다. 또한 광산란 검출계가 도입된 겔투과크로마토그래피(gel permeation chromatography, GPC-MALS, Wyatt, USA)를 이용하여 절대분자량 값과 분자량 분포 및 분포도(polydispersity index, PDI)를 구하였다.

DNA-LMWSC 복합체 형성 및 특성 분석. DNA와 LMWSC 복합체는 멸균수와 LMWSC를 넣은 뒤 DNA를 첨가해서 전체 부피를 20 μL로 맞추고, 30초 가량 교반한 후 30분간 4 °C에 방치해둠으로써 1 : 4에서 1 : 16의 무게비로 제조하였다. 복합체 형성을 위해 0.8% 아가로즈 겔을 이용한 전기영동 실험을 수행하였다. 복합체의 크기는 동적광산란 측정장치(dynamic light scattering, DLS, Otsuka Electronics Co. Japan)를 이용하여 측정하였으며 또한 복합체의 표면 형태는 투과전자현미경(transmission electron microscope, TEM, JEOLJEM-2000 FX-II)을 이용하여 측정하였다.

***in vitro*, 세포유전자 전이 실험.** 배양된 293T 세포를 24 well 세포 배양 plate에 한 well당 5×10⁴개의 세포를 pH 7.4 배지에 분주시킨 후 24시간 동안 인큐베이터에서 배양하여 세포를 안정되게 부착시켰다. 기존 배지를 제거하고 pH 6.2로 낮춘 배지 350 μL를 떨어뜨린 후 플라스미드 DNA인 pEGFP-N1과 다양한 분자량의 LMWSC를 무게비 1 : 10, 1 : 20, 1 : 30, 1 : 40에서 복합체를 형성시킨 후 plate에 떨어뜨리고 4시간 뒤에 배지를 제거했다. 다시 정상 pH 7.4의 배지를 넣고 주기적으로 형광현미경을 이용하여 관찰하였다.

***in vivo*, 유전자 전이실험.** 이전의 연구에서 제조된 LMWSC의 유도체로서 동맥벽 결합 펩타이드(AWBP)가 도입된 LMWSC-AWBP(200 ug)와 콜레스테롤이 도입된 LMWSC-Ch(Cholesterol)

(200 ug)가 pCMV-GFP 그리고 pCMV-luciferase 40 ug과 각각 혼합되어 복합체를 형성하였고, GFP와 luciferase 활성을 측정하기 위하여 Balb/c 마우스에 정맥 주사하였다. 복합체를 주사한 2일 후, GFP 활성은 항-GFP-항체를 이용하여 immunohistochemistry²¹ 방법으로 간, 폐, 비장, 그리고 신장의 각 조직에서 측정되었으며, 음성(negative)의 대조군(control)으로서 플라스미드로 처리한 것과 처리하지 않은 마우스를, 양성(positive)의 대조군으로 GFP-expressing transgenic Balb/c 마우스를 각각 사용하였다. Luciferase 활성은 복합체 형성 후 장기에 주입시킨 다음 각각 2일과 7일 후에 luciferase를 분리하여 기질과의 반응으로 나오는 발광 강도를 측정하였다. 대조군으로 플라스미드 DNA로 처리된 마우스를 사용하였다.

세포 독성 실험. DNA-LMWSC 복합체의 세포 독성은 HEK 293T와 HeLa cell을 사용하였고, MTT 분석을 통하여 수행하였다. 96 well 세포배양 plate의 한 well에 약 5×10^3 개의 세포를 분주한 후 24시간 동안 인큐베이터에서 배양하여 세포를 안정되게 부착시켰다. plate의 세포 배양액을 제거한 후 신선한 배지 90 μ L를 넣고, 다양한 비의 LMWSC로 형성된 플라스미드 복합체 용액(0.5 ~ 20 mg/mL in PBS pH 7.4) 10 μ L을 떨어뜨린 후 2일 동안 인큐베이터에서 배양하였다. LMWSC 용액을 제거하고 MTT 용액과 배지를 1 : 3의 비율로 섞어서 한 well당 40 μ L씩 떨어뜨리고 2시간 동안 배양한 후, MTT 용액을 제거하고 세포내의 미토콘드리아 활성에 의해 생성된 formazan 결정을 100 μ L의 DMSO를 이용하여

녹여내었다. 세포의 생존율은 DMSO로 녹여낸 용액을 570 nm에서의 흡광도를 측정하고 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{세포 생존율} = \frac{[(\text{OD}_{570, \text{sample}} - \text{OD}_{570, \text{blank}})]}{(\text{OD}_{570, \text{control}} - \text{OD}_{570, \text{blank}})} \times 100$$

결과 및 토론

효율적인 질병의 치료를 위한 약물전달체나 유전자 전달체로서 키토산은 인체 내에서 안전하고 생체 내에서 분해됨으로써 매우 가능성 있는 생체재료 중의 하나이다. 일반적으로 고분자량의 키토산을 저분자량으로 분해하기 위해 사용되는 효소분해법은 염을 포함한 산 수용액에 고분자량의 키토산을 용해하게 된다. 이의 결과로 키토산의 아민기에 강하게 염이 붙어 있게 되는데, 이 키토산은 생체재료로는 효율적이지 못하다는 문제점을 가지고 있다. 따라서 본 연구에서는 젖산염이 붙어있는 COS를 한외여과막을 이용하여 다양한 분자량으로 분급화한 다음 각각의 COS를 염 제거법을 통해 다양한 분자량의 LMWSC를 제조하였다. 또한 효율적인 유전자 전달을 위해 이전의 연구에서 제조된 유전자 전달체를 이용하여 in vitro와 in vivo에서의 유전자 전이효율을 측정하였다.

다양한 분자량을 가진 LMWSC 제조 및 특성분석. 한외여과막을 이용하여 분자량별로 분급화된 COS와 이를 이용하여 염이 제거

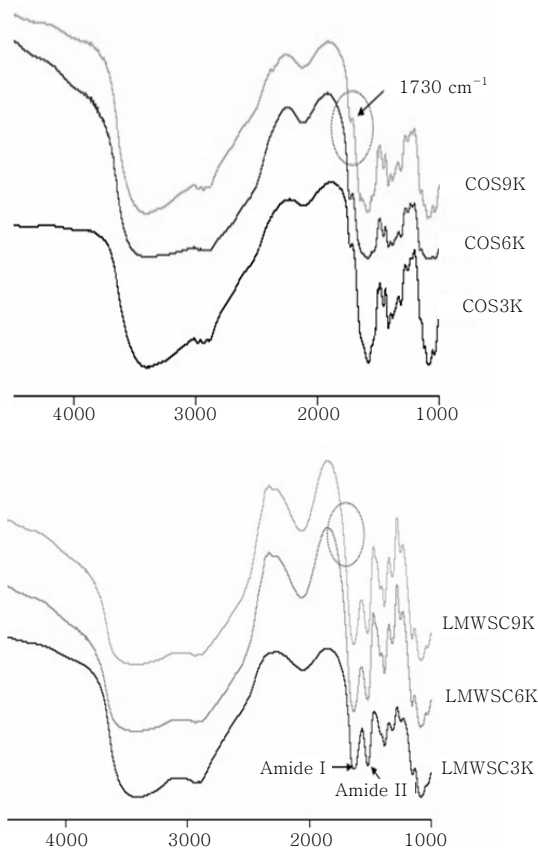


Figure 1. FT-IR spectra of COS and LMWSC.

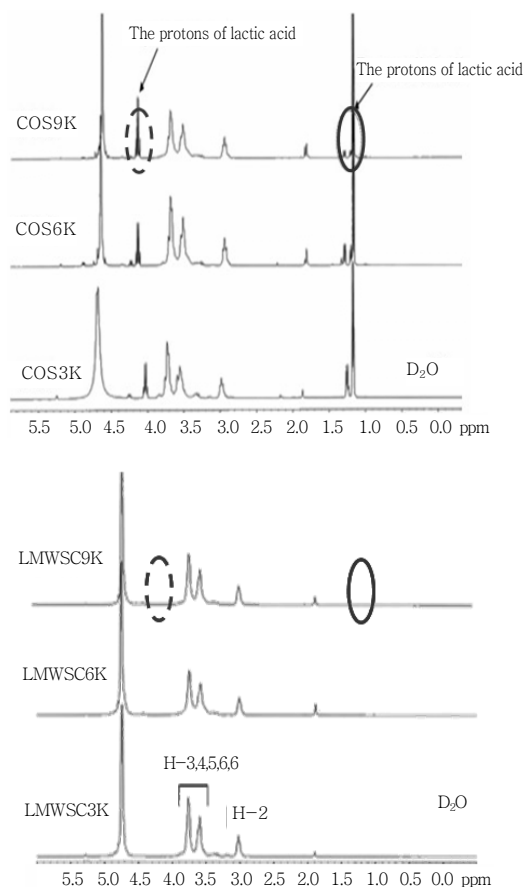


Figure 2. ¹H-NMR spectra of COS and LMWSC.

된 LMWSC의 구조적 확인을 위하여 FT-IR과 NMR을 측정하였다. Figure 1에 확인할 수 있듯이 염 제거 방법을 통해 얻어진 LMWSC는 1730 cm⁻¹ 부근에서 나타나는 젓산염 피크가 사라지고 1650과 1550 cm⁻¹ 부근에서 키토산의 특성 피크인 아마이드기와 아민기가 현저하게 분리되어 나타남으로써 유리 아민기를 가진 LMWSC가 제조되었음을 확인하였다. 또한 Figure 2와 Figure 3에 나타난 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR 스펙트럼에서도 알 수 있듯이 각각 1 ppm과 20 ppm에서 나타나는 젓산염 피크가 사라졌음을 확인함으로써 젓산염이 제거된 LMWSC가 성공적으로 제조되었음을 확인하였다. LMWSC의 분자량 및 분포를 확인하기 위하여 GPC를 측정하였으며, 결과는 Figure 4에 나타내었다. 젓산염이 제거됨으로 인해 COS에 비해 LMWSC의 머무름 시간(retention time)이 조금 느리게 나타남으로써 분자량이

낮아졌음을 알 수 있었으며, LMWSC의 분자량은 약 3, 6, 9 KDa로 나타났으며, 다분산도(PDI) 값은 1.279~1.499로 비교적 단일한 분자량 분포를 가짐을 확인하였다. ¹H-NMR 스펙트럼 및 GPC 데이터를 이용하여 측정된 분자량, 탈아세틸화도, 그리고 다분산도에 대한 결과를 Table 1에 나타내었다.

DNA-LMWSC 복합체 형성 및 특성 분석. COS 및 LMWSC와 DNA에 의해 형성된 복합체를 확인하기 위해 전기영동 실험을 수행하였으며 결과는 Figure 5에 나타내었다. COS는 DNA와의 무게비 1 : 8 이상에서 복합체가 형성되었으나, LMWSC의 경우 1 : 4에서 복합체가 형성되었다. 이는 LMWSC의 2번 탄소 위치에 유리 아민기가 존재하므로 염이 강하게 붙어있는 COS에 비해 훨씬 강한 양전하를 띠게 되고 따라서 LMWSC가 낮은 무게비에서도 복합체를 형성할 수 있기 때문으로 사료된다. 복합체의 입자 크기는 유전자를 체내에 효율적으로 전달하는데 있어 중요한 요인이 되며, 본 연구에서 제조된 유전자 전달체의 입자 크기 및 형태를 측정할 결과는 Figure 6에 나타내었다. 복합체의 크기는 130~190 nm

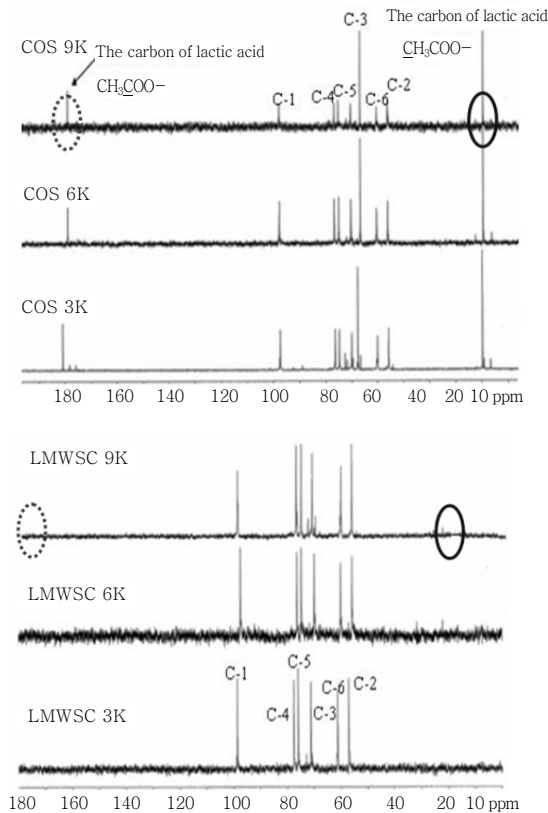


Figure 3. ¹³C-NMR spectra of COS and LMWSC.

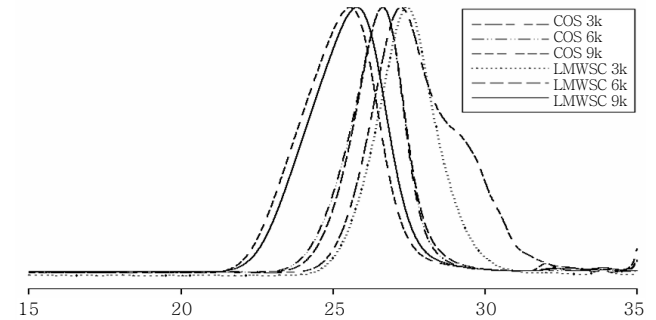


Figure 4. Gel permeation chromatograph of COS and LMWSC.

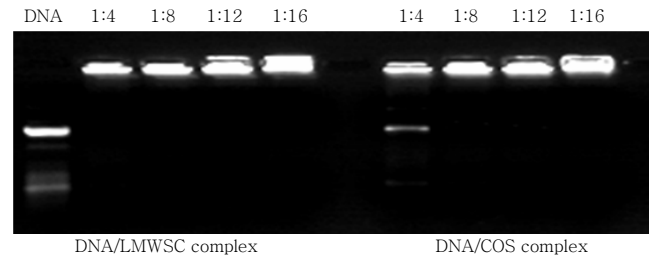


Figure 5. Gel retardation of LMWSC/DNA & COS/DNA complexes.

Table 1. Characterization Results of COS and LMWSC

	M_n^b	M_w^b	PDI ^b (Polydispersity (M_w/M_n))	DDA ^c (Degree of Deacetylation)
COS 3K ^a	3.0×10^3	4.5×10^3	1.4 ± 0.214	96%
COS 6K	6.0×10^3	7.0×10^3	1.1 ± 0.284	93%
COS 9K	8.7×10^3	13.7×10^3	1.5 ± 0.322	92%
LMWSC 3K	2.9×10^3	3.9×10^3	1.3 ± 0.232	96%
LMWSC 6K	5.8×10^3	7.4×10^3	1.2 ± 0.165	94%
LMWSC 9K	8.5×10^3	12.8×10^3	1.4 ± 0.199	94%

^afraction 1 ~ 3kDa. ^bcalculated from GPC. ^ccalculated from ¹H-NMR data.

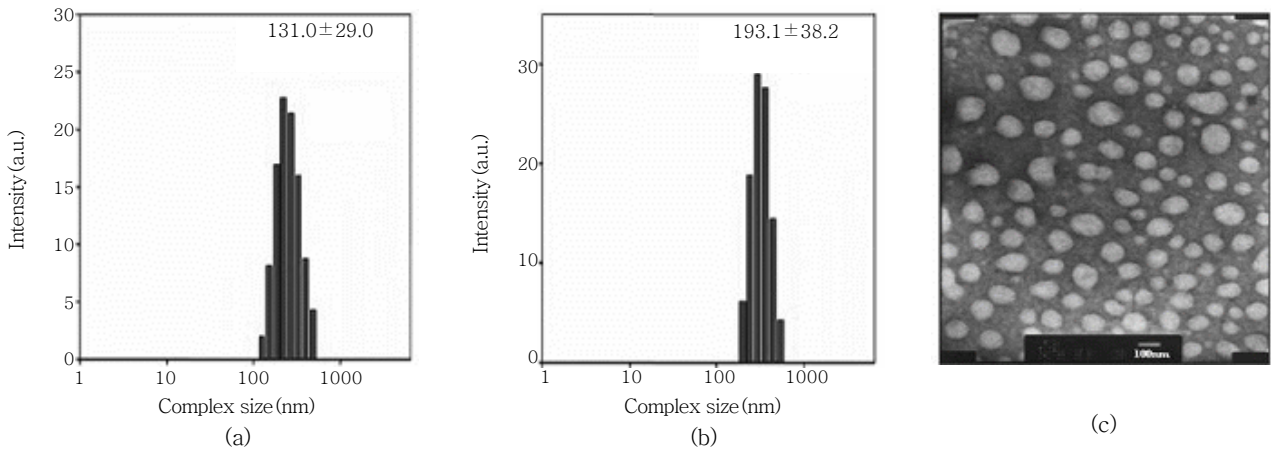


Figure 6. Particle size distribution of DNA/LMWSC(9 KDa) complex (a), DNA/COS(9 KDa) complex (b), and TEM image (c) of DNA/LMWSC complex.

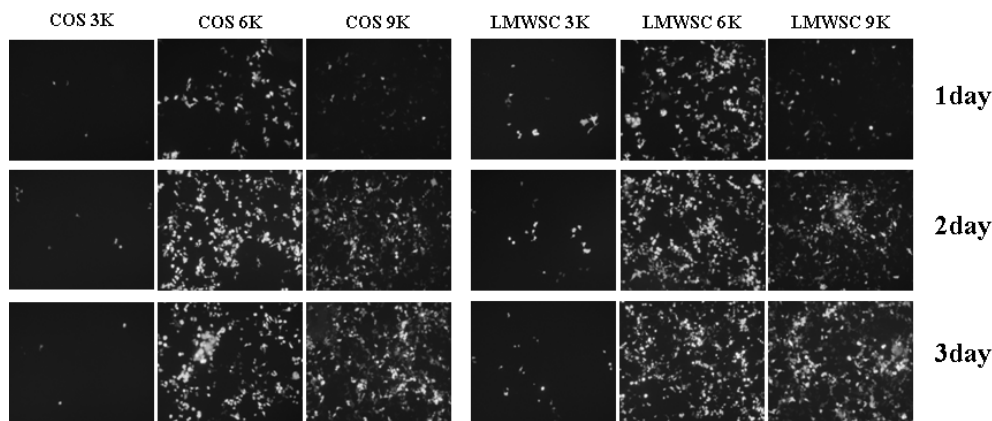


Figure 7. Transfection of COS/LMWSC–DNA complex to 293T cell.

로 단일한 형태의 입자 크기 분포를 나타내고 있음을 알 수 있으며, 또한 구형의 매끄러운 입자 형태를 투과전자현미경 이미지를 통해 확인하였다.

in vitro, 세포유전자 전이 실험. 제조되어진 COS 및 LMWSC가 유전자 전달체로서 응용가능성이 있는지를 확인하기 위하여 DNA와 각각 무게비 1 : 10부터 1 : 40까지 복합체를 형성시킨 후 유전자 전이 실험을 실시하였으며, 그 결과를 Figure 7에 나타내었다. 유전자 전이효율은 녹색형광단백질(GFP)을 발현하는 pEGFP-N1 플라스미드 DNA를 사용하였으며, 유전자 발현 정도는 형광현미경으로 관찰을 하였다. 그림에서 알 수 있듯이 이들이 지난 후 분자량 6K의 LMWSC와 DNA 복합체를 사용한 세포에서 많은 형광을 관찰할 수 있었다. 그렇지만 시간이 지날수록 분자량이 높은 9K에서 더 많은 형광을 관찰할 수 있었으나, 이는 인체 내에 주사했을 때 혈액 내에서 효소에 의해 분해가 되므로 장기간에 걸친 관찰은 의미가 없는 것으로서 3일 이후의 결과는 고려하지 않았다. 분자량이 낮은 3K의 경우 유전자 전이 효율이 매우 낮은 것으로 나타났으며 이는 분자량이 3K인 LMWSC의 경우 분자량이 작아서 빨리 분해가 일어나며, 이로써 DNA가 효소에 의해 분해가 일어났기 때문인 것으로 사료된다. 또한 분자량 9K의 경우는 분자량이 크기 때문에

LMWSC/DNA 복합체의 크기가 커지므로 세포내로의 흡수가 늦게 일어나고 따라서 DNA가 LMWSC로부터 방출되는데 시간이 오래 걸려 나타난 결과라고 할 수 있다. 이로써 유전자 전달체에서 분자량은 높은 전이 효율을 나타내는데 아주 중요한 요소가 됨을 확인할 수 있었으며, COS와 LMWSC의 전이효율을 비교했을 경우 결과적으로 유리아민기를 가진 LMWSC의 전이효율이 더 우수함을 확인할 수 있었다.

in vivo, 유전자 발현효율. 염이 제거된 유리아민기를 가진 LMWSC는 다른 기능성기로의 개질이 용이하다는 장점을 가지고 있다. 따라서 본 연구팀에 의해 이미 제조되어 유전자 전달체로서의 가능성을 높이 평가받은 LMWSC-AWBP(A)와 LMWSC-Ch(B)를 이용하여 *in vivo* 실험을 수행하여 유전자 발현효율을 측정하였다. LMWSC에 기능성기가 도입된 유도체는 특정 조직을 표적할 수 있는 유전자 전달체로서, LMWSC-AWBP의 경우 동맥벽과 특이적으로 결합할 수 있으며, 콜레스테롤(Ch)이 결합된 LMWSC-Ch의 경우 저밀도 지단백질 수용체에 의해 엔도사이토시스 메커니즘으로 세포내에 도입될 수 있는 특성을 가진 전달체이다. 본 실험에서는 LMWSC-AWBP 그리고 LMWSC-Ch와 pCMV-GFP, pCMV-luciferase로 각각 복합체를 형성한 다음 Balb/c 마우스에 주사하였다. 일정시

간이 지난 후 마우스의 각 장기로부터 GFP와 luciferase 활성을 측정하였다. Figure 8의 결과로부터 저밀도 지방단백질 수용체와 결합할 수 있는 기능성을 가진 유전자 전달체로서 LMWSC-Ch가 LMWSC-AWBP 또는 플라스미드와 비교했을때 특히 간과 신장에서 더욱 높은 GFP 발현효율을 나타냈음을 확인할 수 있었다. 이 결과를 바탕으로 효율이 높은 LMWSC-Ch의 luciferase 활성을 측정하기 위하여 위와 동일한 방법으로 마우스에 주사한 후 각 장기에 대한 발현효율을 측정한 결과(Figure 9) 대조군인 플라스미드를 주사한 마우스에 비해 간에서 훨씬 더 많은 효율을 나타내었다.

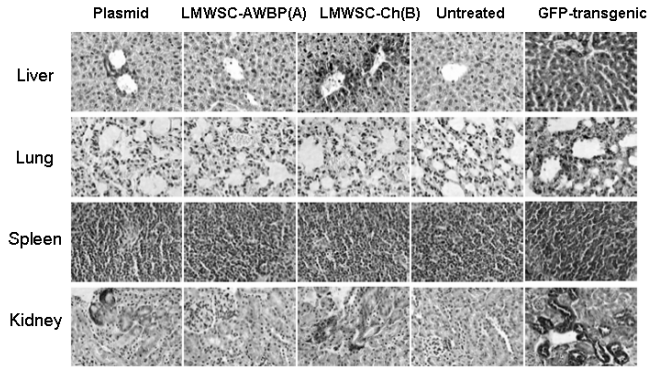


Figure 8. In vivo GFP expression by LMWSC-AWBP(A) and LMWSC-Ch(B) gene delivery.

이는 간세포 주변에 저밀도 지방단백질 수용체가 풍부하게 존재하여 엔도사이토시스 메커니즘에 의해 많은 양의 pCMV-luciferase/LMWSC-Ch 복합체가 흡수되었음을 알 수 있었다. 그러나 7일 후에는 어느 장기에서도 거의 luciferase 발현이 되지 않았음을 확인하였는데, 이것은 본 실험에서 제조한 유전자 전달체는 7일 이상이 경과된 후에는 모두 분해가 되어 체외로 빠져나가기 때문인 것으로 사료된다.

세포독성 실험. Figure 10에서는 다양한 분자량으로 제조되어진 LMWSC가 유전자 전달체로서 가능성이 있는지를 평가하기 위하여 MTT 분석을 실시하여 세포내 독성을 확인하였다. 293T 및 HeLa 세포주를 이용하여 세포독성 실험을 실시한 결과, DNA와의 무게비

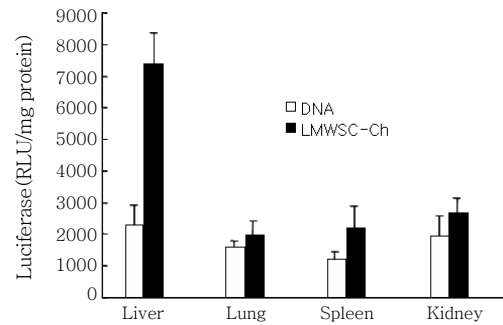
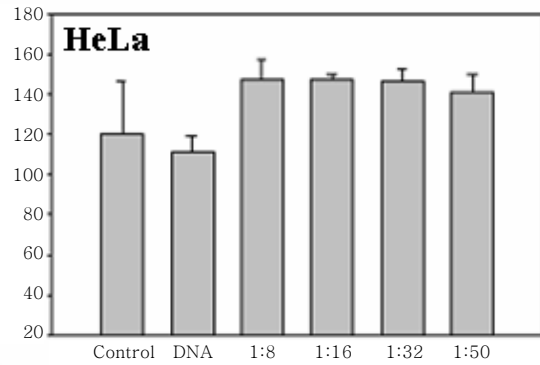
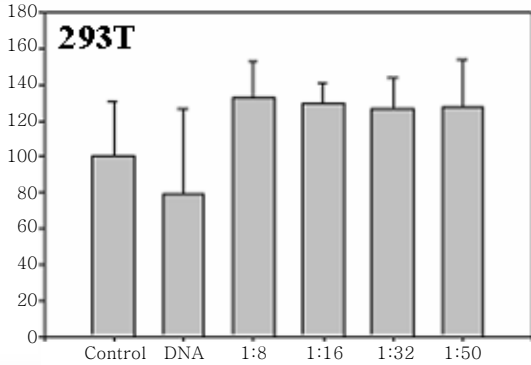
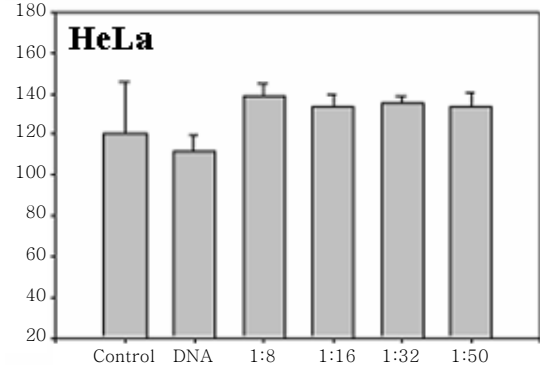
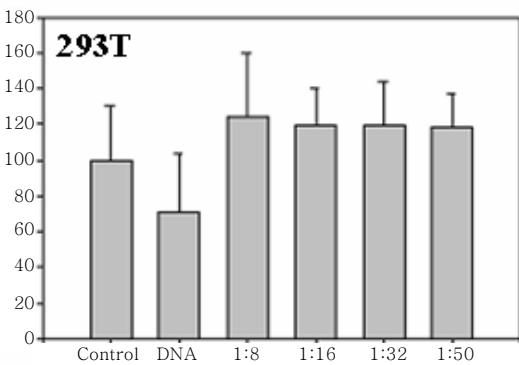


Figure 9. In vivo luciferase expression by LMWSC-Ch gene delivery.



(a)



(b)

Figure 10. Cytotoxicity of LMWSC/DNA complex (a) & COS/ DNA complex (b) by MTT assay.

1 : 8부터 1 : 50까지 모두 세포 생존율이 100%에 가까웠으며 이로써 어떠한 세포내 독성도 나타나지 않음을 확인할 수 있었다. 따라서 유전자 전달체로서의 응용가능성이 있음을 확인하였다.

결 론

본 연구에서는 한외여과막 장치를 이용하여 1~3, 3~10, 그리고 10~30 KDa의 다양한 분자량 범위를 가진 COS를 제조하였고 그 특성을 분석하였다. 이 COS를 새로운 염제거법을 사용하여 염을 제거함으로써 성공적으로 3, 6, 그리고 9 KDa의 분자량을 가진 LMWSC를 제조하였으며 특성을 분석하였다. 유전자 전달체에 도입하기 위해 먼저 DNA와의 응축능력을 전기영동 실험으로 확인한 결과 LMWSC의 경우 DNA와 무게비 1 : 4 이상에서 복합체가 형성됨을 확인할 수 있었다. 복합체의 입자 또한 200 nm 이하의 크기를 나타냄으로써 생체 의료용에 응용함에 있어 아주 적합하며, 구형의 형태를 지님을 확인하였다. 유전자 전이효율을 평가하기 위해 녹색형광단백질을 발현시키는 플라스미드 DNA를 사용한 결과, 분자량이 6 K인 LMWSC의 발현효율이 가장 높게 나타남을 확인함으로써 유전자 전달체에 효과적인 분자량을 확인할 수 있었다. 세포내 독성을 확인하기 위하여 MTT 분석을 수행하였으며 아무런 독성도 나타나지 않음을 확인하였다. 또한 특정 조직을 표적할 수 있는 기능성기를 가진 LMWSC 유도체의 *in vivo*에서의 발현효율을 측정된 결과 저밀도지방단백질 수용체와 결합할 수 있는 기능기를 가진 LMWSC-Ch가 가장 높은 효율을 나타내었으며, 이로써 LMWSC 및 그 유도체는 유전자 전달체로서의 가능성이 있는 비바이러스성 벡터로 고려되어 질 수 있음을 확인하였다.

감사의 글 : 본 연구는 한국 산학협동재단, 순천대학교 공대학술재단 및 한국여성공학기술인협회 2007 WATCH 21 프로그램의 지원을 받아 수행하였습니다.

참 고 문 헌

1. L. Huang, M. C. Hung, and E. Wagner, *Nonviral vectors for gene therapy*, Academic Press, New York, 1999.
2. M. Lee and S. W. Kim, *Pharmaceut. Res.*, **22**, 1 (2005).
3. M. Ruponen, Y. Herruala, and A. Urtili, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1415**, 331 (1999).
4. K. Y. Lee, I. C. Kwon, Y. H. Kim, W. H. Jo, and S. Y. Jeong, *J. Control. Release*, **51**, 213 (1998).
5. D. H. Seo, B. C. Shin, and M. S. Kim, *Polymer(Korea)*, **29**, 277 (2005).
6. J. H. Felgner, R. Kumar, and C. N. Sridhar, *J. Bio. Chem.*, **269**, 2550 (1994).
7. J. S. Kim, A. Maruyama, T. Akaike, and S. W. Kim, *J. Control. Release*, **47**, 51 (1997).
8. G. Y. Wu and C. H. Wu, *Biochemistry*, **27**, 887 (1988).
9. G. Y. Wu and C. H. Wu, *J. Bio. Chem.*, **262**, 4429 (1987).
10. G. Y. Wu, J. M. Wilson, F. Shalaby, M. Grossman, D. A. Shafritz, and C. H. Wu, *J. Bio. Chem.*, **266**, 14338 (1991).
11. K. Kunath, A. V. Harpe, D. Fisher, and T. Kissel, *J. Control. Release*, **88**, 159 (2003).
12. T. Reschel, C. Konak, D. Oupicky, L. W. Seymour, and K. Ulbrich, *J. Control. Release*, **81**, 201 (2002).
13. R. Hejazi and M. Amiji, *J. Control. Release*, **89**, 151 (2003).
14. M. Thanou, J. C. Verhoef, and H. E. Junginger, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **52**, 117 (2001).
15. K. Ogawa, T. Yui, and K. Okuyama, *Int. J. Bio. Macromol.*, **34**, 1 (2004).
16. W. G. Liu, X. Zhang, S. J. Sun, G. J. Sun, K. D. Yao, D. C. Liang, G. Guo, and J. Y. Zhang, *Bioconjugate Chem.*, **14**, 782 (2003).
17. Y. H. Kim, S. H. Gihm, C. R. Park, K. Y. Lee, T. W. Kim, I. C. Kwon, H. Chung, and S. Y. Jeong, *Bioconjugate Chem.*, **12**, 932 (2001).
18. J. W. Nah and M. K. Jang, *J. Polym. Sci.; Part A: Polym. Chem.*, **40**, 3796 (2002).
19. C. Choi, M. K. Jang, and J. W. Nah, *Polymer(Korea)*, **30**, 279 (2006).
20. C. Choi, D. G. Kim, M. J. Jang, T. H. Kim, M. K. Jang, and J. W. Nah, *J. Appl. Polym. Sci.*, **102**, 3545 (2006).
21. M. Huisinga, K. Failing, and M. Reinacher, *Vet. Immunol. Immunop.*, **118**, 210 (2007).