

황산화 키토산 유도체의 합성과 항에이즈활성

한상문

서울보건대학 환경보건과

Novel Synthesis of Sulfated Chitosan Derivatives and its Anti-HIV-1 Activity

Sang-Mun Han

Dept. of Environmental Health, Seoul Health College, Sungnam 461-250, Korea

Abstract

To investigate anti-HIV-1 activity of water soluble chitosans, sulfated chitosan derivatives were prepared in mild condition. Various sulfated chitosan derivatives (*N*-3,6-*O*-S-chitosan, *N*-desulfated 3,6-*O*-S-chitosan, 3,6-*O*-S-chitin, and 3,6-*O*-sulfated-*N*-(*o*-carboxybenzoyl) chitosan) were synthesized with sulfurtrioxide-pyridene complex in pyridine solvent. Characterization of the sulfated chitosan derivatives was carried out by ¹³C NMR and IR spectroscopies. To observe ionic reaction properties, *pK_a*s of the sulfated chitosan derivatives and chitosan of low molecular weight were estimated by potentiometric titration. The sulfated chitosan derivatives had high water solubility, *pK_a*s (*pK_a* : 7.7) of *N*-3,6-*O*-S-chitosan and *N*-desulfated 3,6-*O*-S-chitosan were increased than *pK_a* of water insoluble chitosan (*pK_a* : 6.2). These results suggest the participation of electrostatic interaction of amino and sulfate groups on the sulfated chitosans. Anti-HIV-1 drugs, such as AZT, ddC, and ddI for anti-HIV activity had higher selective index compared with SCB-chitosan but *N*-3,6-*O*-S-chitosan has shown higher selective index compared with ddC and ddI as HIV drugs.. These results suggest that sulfated chitosan derivatives were expected as an anti-HIV drug with differential driving force mechanism against some nucleoside analogs drug in the future.

Keywords: water soluble chitosan, anti-HIV-1 activity, sulfated chitosan, gp120, NMR spectra

Corresponding author E-mail : chitosan@sh.ac.kr

I. 서론

인체 면역 결핍 바이러스 (Human immunodeficiency virus type 1, HIV-1)는 후천성 면역결핍 증후군 (Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS))을 일으키는 Retro virus로 인체에 많은 질병을 유발시켜 사망하게 만든다^{1, 2)}. 이를 치료하거나 환자의 생활의 질 개선을 위하여 뉴클레오시드와 유사한 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT), dideoxyinosine (ddI), and dideoxycytidine (ddC)가 사용되어 왔다. 하지만, 이 약물은 강한 독성과 부작용, HIV-1의 약물에 대한 내성으로 인하여 뉴클레오시드와 다른 메커니즘의 새로운 약물의 개발이 요구되고 있다³⁾.

최근 생체 세포표면에서 일어나는 많은 현상들이 glycosaminoglycans (GAGs)이 관여되어 일어나고 있다는 사실이 밝혀짐에 따라⁴⁾ GAGs나 화학적 유도체인 음이온성 다당류의 기능과 그 효과가 생명과학분야와 의약분야에 많은 관심이 집중되고 있다⁵⁾. 그리고 HIV-1이 T-cell에 침투할 때 이 GAGs나 음이온성 다당류가 HIV-1의 주 envelope glycoprotein (gp 120)과 상호작용 인자로 역할을 하고 있다고 보고되고 있다^{6, 7)}. 또한, Uryu 등은 GAGs와 같은 황산화 다당류(curdlan sulfate)가 in vitro에서 3.3 µg/mL의 낮은 농도에서 glycoproteins과 상호작용하여 HIV-1의 현저한 차단효과가 있으며 독성이 낮음을 보고하였다⁸⁾.

현재까지 이러한 Sulfated polysaccharide가 Anti-retrovirus 차단에 효과가 있다고 보고하고 있는 물질들은 N-Carboxymethyl N,O-sulfated chitosan⁹⁾이 있다. 하지만 이들이 항혈액응고활성^{12, 13, 14, 15)}이 있음

이 보고되어 부작용으로 분류되고 있다. 현재 항혈액응고활성이 낮으며 독성 또한 낮은 HIV-1의 차단 약물이 절실하게 요구되고 있다.

폐기물인 게 껍질에서 추출되는 키틴은 *N*-Acetylglucosamine이 β-1,4로 결합된 무코 다당으로서 생체내의 Lysozyme에 의하여 잘 분해되는 등 생체 친화성이 높은 천연 다당질로 항원성이 낮아 동식물의 생리 활성 물질로 주목 받고 있다¹⁰⁾. 그러나, 키틴은 C-3와 C-6 위치의 수산기와 Acetamide기에 의한 분자간과 분자내의 강한 수소결합 때문에 일반적인 유기 용매에는 용해성이 전혀 없어 그 적용의 범위가 극히 제한되어 왔고 많은 연구자들은 이 다당에 용해성을 부여하여 화학적 수식을 유리하게 하고 나아가 그 응용범위를 넓히고자 키틴의 Acetyl기를 제거하였다.

그러나, 키틴이 강알칼리성 용액중에서 탈아세틸화한 키토산 보다 더 천연에 가까운 물질임에는 틀림이 없다. Acetyl기를 제거한 키토산은 유기산 또는 산성의 수용액 중에서도 잘 용해되어 키틴에 비해 성형과 가공이 쉬워 그 응용의 범위가 대단히 넓다. 수불용성인 고분자 키토산은 C-2의 위치에 아미노기를 가지고 있고 *pKa*는 6.2로 알려져 있어¹⁰⁾ 용액의 pH 6.2이하에서부터 용해되기 시작하고 6.2이상에서는 석출하여 불용성으로 존재한다. 이 아미노기는 산성 수용액 중에서 Proton을 받아들여 양이온화 되고 키토산의 수 많은 특이적 기능성 유지에 큰 역할을 담당하고 있다. 하지만 키토산의 그 *pKa*가 변화한다면 반응특성이 달라져 그 기능성도 변화를 일으킬 것으로 사료된다. 즉 고분자와 저분자 키토산의 기능이 달라질 수 있다고 사료된다. 또한, 이러한 키틴 키토산의 용액화가 어려워 수용

화 시키기 위해 친수성 음이온성기인 Sulfate기, Carboxyl기, Phosphate기 등을 C-3, C-6 위치의 수산기에 도입하여 동식물에 대한 생리활성을 연구하여 왔다. 이러한 Sulfate기와 Carboxyl기를 도입한 Chitin 및 Chitosan은 항 AIDS활성¹¹⁾, 항 혈액 응고 활성^{12, 13, 14, 15)}, 암세포 전이억제¹⁶⁾등이 보고되어 의료용 실용화가 기대되어지고 있다. 그러나 이들 유도체들의 Active site를 결정할 수 있는 관능기의 화학적 반응특성은 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 키틴과 키토산에 Sulfate기와 Carboxyl기로 치환된 키토산 유도체들을 제조하고 항에이즈활성을 에이즈 치료약으로 널리 사용되고 있는 ddI, AZT, ddC와 비교하여 그 특성을 고찰하였다.

II. 재료 및 방법

1. 기기 및 재료

이 실험에 사용한 모든 시약은 Junsei Co. Ltd.(Japan)와 Wako Pure Chemical Industries Co. Ltd.(Japan)에서 구입하여 더 이상의 정제없이 사용하였다. 키토산의 탈아세틸화도는 적외선 분광 스펙트로(Bio-rad사의 FTS-7)를 사용하였고 분자량 측정에는 Gel permeation chromatography(GPC, standard material : pullulan)와 HPLC(Hitachi L-3300, Japan)를 사용하였다. HPLC분석은 Asahipak GFA-30F Column(Flow rate : 0.3ml/min, Solvent : acetic acid buffer)으로 하였다. 전위차 적정은 Hiranuma Co. Ltd.의 Auto titrator COM-500을 사용하였다.

¹³C NMR spectro는 Bruker Spectrometer (ASX-300, BRUKER Analytische Messtechnik GMBH, Germany)를 사용하였다. 원소분석은 P₂O₅과 함께 진공상태(50℃, 1Torr)하에서 건조시킨 후 분석하였다.

UV/VIS(HITACHI, U-2000A, Japan) spectrophotometer는 황산화 키토산 유도체의 Benzoyl group의 특징을 분석하는데 사용하였다.

키토산의 제조

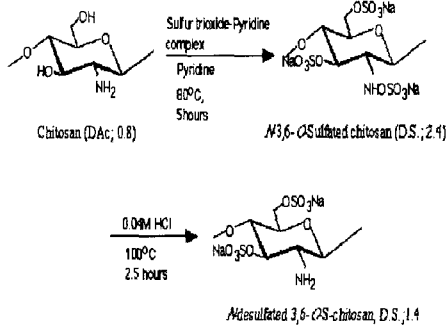
Hackman¹⁷⁾방법에 의하여 홍계 껍질로부터 키틴을 제조하고 이 키틴을 60Mesh이상으로 분쇄하여 수산화나트륨 용액 중에서 처리함으로써 탈아세틸화도^{18, 19)} 80%이상의 백색의 키토산을 제조하였다. 이 키토산을 합성을 위하여 분쇄 및 정제, 분리 하였다^{20, 21)}.

N-3,6-*O*-S-chitosan(S-chitosan)의 제조

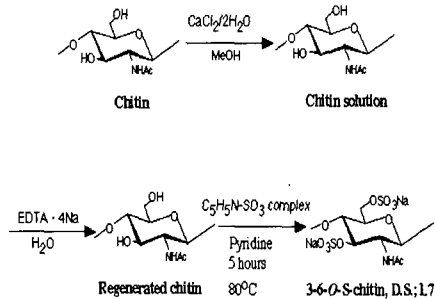
키토산(20g, DAc 80%)을 Pyridine용액 200ml에 첨가하고 플라스크 내부를 질소가스로 치환한 후 5시간이상 충분히 팽윤시켜 Sulfur trioxide-pyridine complex(75g)를 첨가하여 80℃에서 5시간동안 황산화시켜 Amino기와 C-3, C-6 위치의 수산기에 Sulfation된 S-chitosan을 제조하였다. 그 제조방법은 Scheme 1에 도시하였다.

N-desulfated 3,6-*O*-Sulfated chitosan (NDS-chitosan)의 제조

아미노기에 치환된 Sulfate group을 탈리하기 위하여 S-chitosan을 0.04M HCl 200ml에 용해시키고 2.5시간 동안 100℃에서 반응시켜 *N*-desulfation하였으며, 제조방법은 Scheme 1에 도시하였다.



Scheme 1. Synthetic route of *N*-3,6-O-sulfated-chitosan and *N*-desulfated 3,6-O-sulfated chitosan



Scheme 2. Synthetic route of 3,6-O-sulfated-chitin from regenerated chitin

Sulfated-chitin(S-chitin)의 제조

키틴을 CaCl₂·2H₂O 포화 Methanol에 용해^{22, 23)}하여 수중에서 재침전시켰다. 이 키틴겔을 정제수와 EDTA-4Na 용액으로 반복 세정하고 Pyridine 용액으로 4회 이상 치환하였다. 여기에 Sulfur trioxide-pyridine complex를 가하여 80°C에서 5시간 동안 반응시켜 S-chitin을 얻었다. 그 제조방법은 Scheme 2에 도시하였다.

3,6-O-sulfated-N-(*o*-carboxybenzoyl)chitosan(SCB-chitosan)의 제조

키틴에 Carboxyl기를 도입하며 Sulfate기를 도입한 유도체는 항 혈액 응고활성과 항혈전성이 있는 것으로 알려져 있다^{30, 34)}.

Carboxyl기가 있는 황산화 키토산 유도체를 제조하기 위해 한²⁹⁾ 등에 의하여 보고된 탈아세틸화도 99%의 키토산을 DMF용액에 무수프탈산을 첨가하여 130°C에서 1시간 반응시켜 *N*-phthaloylated chitosan을 제조하였다^{24, 25, 26)}. 이것을 여과하여 수중에서 재침전시켜 건조하였다.

이 *N*-phthaloyl chitosan을 Pyridine용액 중에서 용해하여 Sulfurtrioxide-pyridine complex를 첨가하고 80°C에서 0.5시간 반응시켜 C-3, C-6 위치의 수산기에 Sulfate기를 도입하여 3,6-O-sulfated-*N*-phthaloylated chitosan(SP-chitosan)을 제조하였다.

Carboxyl기의 도입을 위해 이 SP-chitosan을 0.5 N NaOH용액에 용해시켰고, Ice-bath에서 2hr동안 교반시켜 Phthaloyl기가 Ring opening되어 Carboxyl기가 도입된 SCB-chitosan을 제조하였다. 제조방법은 Scheme 3에 도시하였다. 그리고 첨가하는 Sulfur trioxide-pyridine량을 조절하여 다양한 치환도의 SCB-chitosan을 합성하였다(Table 1).

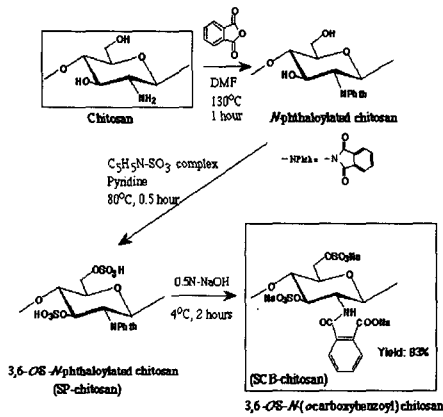
Table 1. Effect of applied sulfur-trioxide-pyridine complex amount on sulfur content of SCB-chitosan

| Molar ratio ^{a)} | Sulfur content(5) ^{b)} | Degree of sulfation |
|---------------------------|---------------------------------|---------------------|
| 9.5 | 10.29 | 1.80 |
| 8.2 | 9.36 | 1.71 |
| 6.0 | 9.00 | 1.40 |
| 5.3 | 8.92 | 1.20 |
| 1.2 | 5.23 | 0.67 |
| 0.6 | 3.75 | 0.44 |

^{a)} Sulfur trioxide-pyridine complex/phthal-chitosan

^{b)} Sulfur content by elemental analysis

^{c)} Reaction condition : Temperature; 80°C, Time; 30 min Solvent; pyridine



Scheme 3. Synthetic route of N-phthaloylated chitosan and 3,6-O-sulfated-N-(o-carboxybenzoyl) chitosan

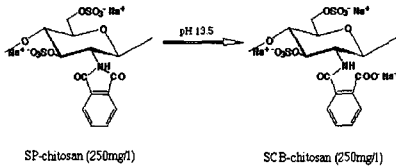
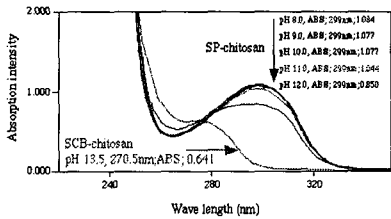


Fig. 1. Effect of pH on ring-opening reaction of phthalimide group

이 SCB-chitosan의 Ring opening반응의 평가는 UV/VIS spectroscopy에 의하여 조사하였다. Fig. 1 에서는 그 UV spectra를 나타내고 있으며 pH 13.5 이상에서는 대부분의 Phthaloyl기가 Carboxyl기를 소유하게 되는 것으로 나타났다.

Anti-HIV-1 활성실험(HIV 감염 여부 측정) 휴먼 T4-positive cell line HTLV-1(Human

T-lymphotropic virus type I) MT-4 세포(3×10^5 cell/mL) 에 HIV 감염 여부를 제조한 황산화 키토산 유도체와 대조군의 일반 시판 약물들과 비교하여 이 약물들의 여러 농도범위에서 세포를 배양하였다. 6일 후에 HIV 감염을 Immunofluorescence(IF) -positive 세포 %와 살아있는 세포의 수가 감소되는 것을 평가하였다(35).

III. 결과 및 고찰

저분자 키토산 및 황산화 키토산 유도체의 분자량 측정

GPC와 HPLC에 의하여 분자량을 측정하였다. 제조한 저분자 키토산의 분자량은 각각 10,000, 3,600으로 나타났으며 S-chitosan은 85,000, NDS-chitosan은 32,000, S-chitin은 30,000, SCB-chitosan은 51,000, 그리고 탈아세틸화도 99%의 키토산은 50,000으로 각각 나타났다.

이 결과 S-chitosan은 0.04M HCl용액으로 Desulfation함에 따라 키토산 분자의 Glycoside 결합이 HCl에 의하여 많이 절단되는 것으로 나타나며, 완전 분해되는 것은 아닌 것으로 나타났다. 또한 저분자 키토산 및 황산화 키토산 유도체는 높은 수용성을 나타내었다.

SCB-chitosan의 FT-IR spectra

Sulfate group의 FT-IR spectra 특징 흡수대로서 S=O 결합은 1240cm^{-1} , C-O-S 결합은 810cm^{-1} 에서 관찰되었다^{27, 30}.

1706cm^{-1} 와 1646cm^{-1} 의 흡수대는 carboxyl group의 O=C=O기와 C=O기로 나타났다³⁰.

그 FT-IR spectra는 Fig. 2 에 잘 나타내고

있다. 이 결과로부터 Carboxyl group과 Sulfate group이 잘 도입된 것을 알 수 있었다.

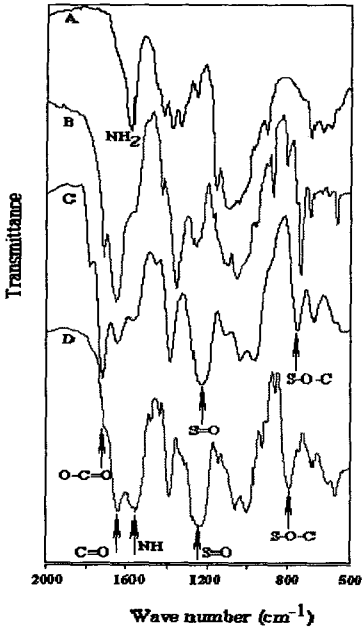


Fig. 2. IR spectra of chitosan and its derivatives

- A; chitosan,
- B; N-phthaloyl chitosan,
- C; 3,6-O-S-N-phthaloyl chitosan,
- D; 3,6-O-S-Mo-carboxy benzoyl) chitosan

¹³C NMR spectra

Sulfated chitin과 sulfated chitosan의 ¹³C NMR spectra는 Hirano et al.등에 의해 보고³¹⁾되어져 왔다. 그 실험적인 결과로부터 Sulfated-chitin은 C-3의 수산기보다 C-6의 수산기에서 더 높은 반응성을 가졌다고 평가되어져 왔다^{32, 34)}.

Fig. 3은 S-chitosan, NDS-chitosan과 S-chitin에 대한 ¹³C NMR spectra로 키토산에 있어서는 C-3, C-6 위치에서 각각 71ppm, 61ppm 부근인데, Sulfate group이 도입된 키토산 유도체의 C-3와 C-6에 있어서는 보다 낮은 자장으로 이동하였다. 이것으로부터 Sulfate기가 잘 치환되었음을 확인하였다. 또한 Fig. 4로부터 키토산의 C-3 (70.8ppm) 위치는 SCB-chitosan에서 C-3 (S)의 73.5, 74.9ppm로 완전히 Shift되는 반면에 C-6(60.9ppm)는 Sulfurtrioxide-pyridine 화합물에 의해 완전히 Sulfation 되지 않았다.

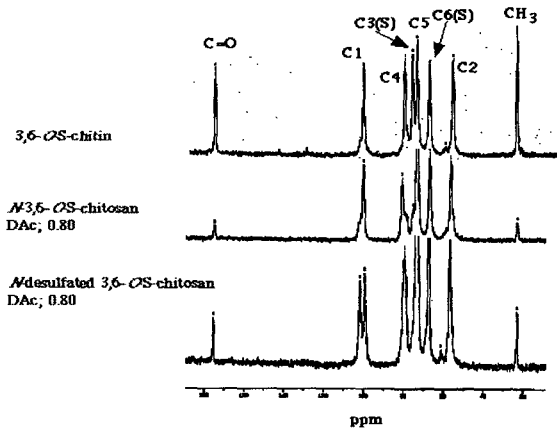


Fig. 3. ¹³C NMR spectra of sulfated chitosan derivatives in D₂O solution at 50°C

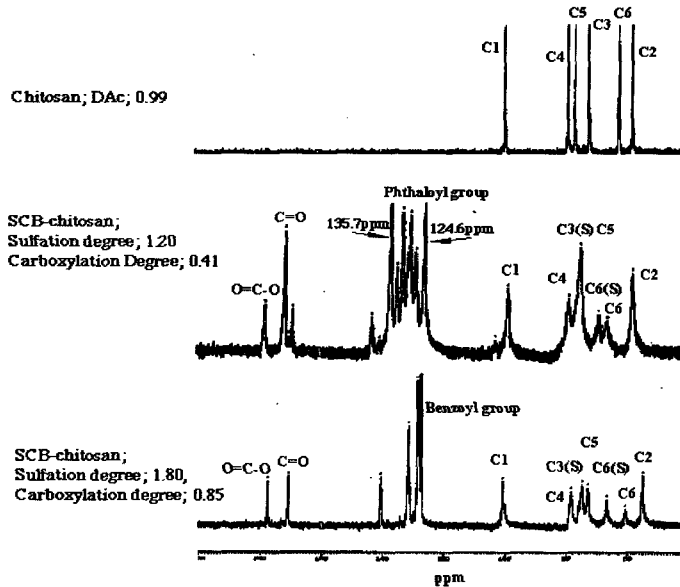


Fig. 4. ¹³C NMR spectra of chitosan hydrochloride salts, and SCB-chitosan in D₂O solution at 50°C

이러한 결과는 C-6에는 분자내와 분자간의 강한 수소결합때문인 것으로 사료된다. C-3 위치의 수산기의 분자내 수소결합은 Phthalic anhydride에 의한 아미노기의 보호때문에 사라지는 것으로 추정된다.

또한 SCB-chitosan에서 135.7ppm과 124.6ppm의 Signal은 0.5N NaOH용액에서 알칼리처리에 의해 사라졌다. 또한 177.6ppm과 171.1ppm의 신호는 각각 Benzoyl group의 O=C=O와 C=O에 의한 것이며 이것은 ¹³C NMR spectra에서 카르복실기의 치환도가 다른 경우 다른 피크 강도를 나타내는 것으로부터 알칼리 처리에 의해 Ring opening이 잘 일어나는 것으로 판명되었다. 이상의 결과들로부터 Sulfate group과 Carboxyl group이 도입된 SCB-chitosan이 성공적으로 얻어졌다는 것을 알 수 있었다.

수용성 키토산의 분자량에 따른 pKa

키토산의 아미노기 특성을 이해하기 위하여 pKa를 측정하였다. 0.1M NaCl을 함유한 0.1N HCl 50ml에 저분자 키토산을 용해하고 30분간 질소가스를 주입하면서 pH를 안정화시켰다. 다음 질소가스를 주입하면서 0.1M NaCl을 함유한 0.1N NaOH로 자동적정기를 이용하여 적정하였다. 키토산 유도체들의 적정곡선은 Fig. 5에 나타내었다^{27, 28)}. Fig. 5는 분자량별 키토산을 전위차적정에 의하여 pKa를 측정한 것으로 분자량 3,600, 10,000, 50,000별로 각각의 pKa는 6.8, 6.5, 6.2로 나타났다. 이 결과로부터 키토산의 pKa는 분자량에 의존하고 분자량이 낮아질수록 pKa값이 커지고 산성도가 감소되어 용해성이 증가한다는 것을 알 수 있었다. 키토산의 분자량이 낮을수록 아미노기가 보다 높은 pH에서도 Proton을

취하여 이온화되어 있고 금속이온들이 결합할 비공유전자쌍이 존재하지 않는다. 다만, 물에 대한 용해도는 증가되나 아미노기의 산성도가 감소하여 반응에 있어 그 Activity가 감소할 것으로 추정된다. 이 산성도의 감소로 이온 뿐만 아니라 생체 기질에 대하여 고분자의 키토산보다 저분자 키토산은 낮은 반응 특성을 나타낼 것으로 사료된다. 항에이즈 활성에서도 고분자 유리할 가능성이 높다.

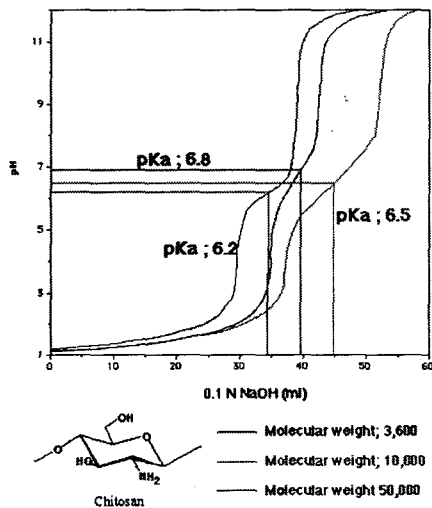


Fig. 5. *pKa* of chitosan dependent on molecular weight

S-chitosan과 NDS-chitosan의 *pKa*

일반적으로 키토산에 Sulfate 기와 아미노기가 동시에 존재하면 관능기의 수가 증가되므로 반응성도 증가될 것으로 생각되어져 왔다. Fig. 6은 전위차적정에 의해 S-chitosan, NDS-chitosan과 고분자 키토산의 *pKa*를 측정된 것으로 황산화 키토산 유도체는 7.7로 나타나 고분자 키토산의 6.2보다 증가하였다. 이것은 황산화 키토산의 아미노기가 양전하를 가짐으로서

Sulfate기의 음이온과 정전기적 결합을 함으로써 일어나는 것으로 사료된다. 또한, 이 결합이 이들 황산화 키토산 유도체에 산성도를 변화시켜 *pKa*가 증가된 것으로 생각된다. 그래서 S-chitosan의 주된 반응 Site는 C-2 위치의 아미노기와 C-3, C-6 위치의 수산기에 치환된 Sulfate기가 용액중에서 반응 Site로 이용될 것으로 생각된다. 또한 NDS-chitosan에서는 용액중에서 관능기가 해리되면서 키토산의 아미노기와 C-3 및 C-6 위치의 Sulfate기가 정전기적으로 결합하게 되어 Sulfate기의 반응 Site가 Amino기 존재량만큼 감소할 것으로 사료된다. 이 유도체는 음이온성과 양이온성을 동시에 나타낼 수 있는 특징이 있어 세포의 표면과 반응 시 특이성을 나타낼 것으로 추정된다.

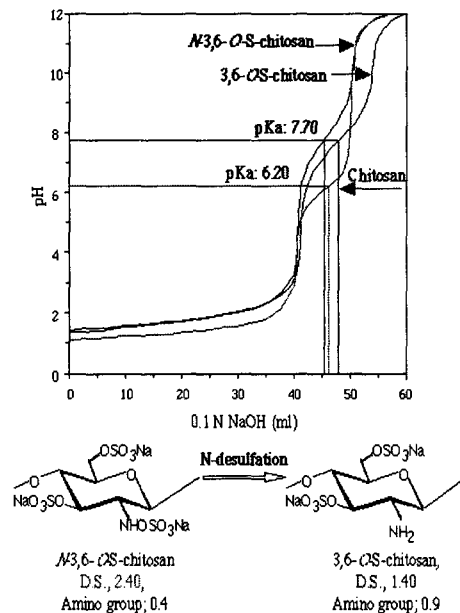


Fig. 6. Potentiometric titration of N-3,6-O-S-chitosan, and N-desulfated 3,6-O-S-chitosan, and chitosan in 0.1 N sodium hydroxide

S-chitin의 pKa

Fig. 7은 전위차 적정에 의해 Sulfated chitin의 pKa를 측정된 것으로서 pH 2~12에서의 pKa는 찾을 수 없었다. 이것으로부터 C-2위치에 있는 아미노기가 해리되지 않았음을 알 수 있었고 반응 Site로는 Sulfation된 C-3위치와 C-6위치라고 사료된다. 또한 제조된 키토신의 탈아세틸화는 거의 없는 것으로 사료된다. 이것으로 탈아세틸화가 되지 않은 것을 증명할 수 있다.

SCB-chitosan의 pKa

2개의 음이온 특성을 조사하고 HIV-1을 차단하기 위하여 바이러스의 표면에 상호작용도를 높이기 위하여 2개의 기능성기를 가지도록 카르복실기와 황산기를 도입하였다.

SCB-chitosan의 카르복실기의 pKa는 Sulfate groups의 치환도에 의존하여 4.28~4.77범위에 있었고 SCB-chitosan의 pKa는 Sulfation화도가 높을수록 높은 pKa치를 나타내었다. 또한 주된 반응 Site로는 Sulfate기와 Carboxybenzoylation된 부위의 Carboxyl

기라고 사료된다. Fig. 8은 SCB-chitosan의 치환도별 pKa를 측정된 것이다. 이것으로부터 Carboxyl기의 치환도가 높을수록 pKa가 커졌음을 알 수 있었다.

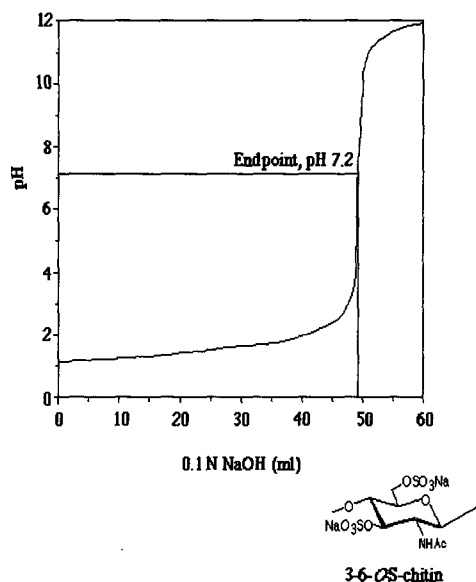


Fig. 7. Potentiometric titration curve of 3,6-O-S-chitin

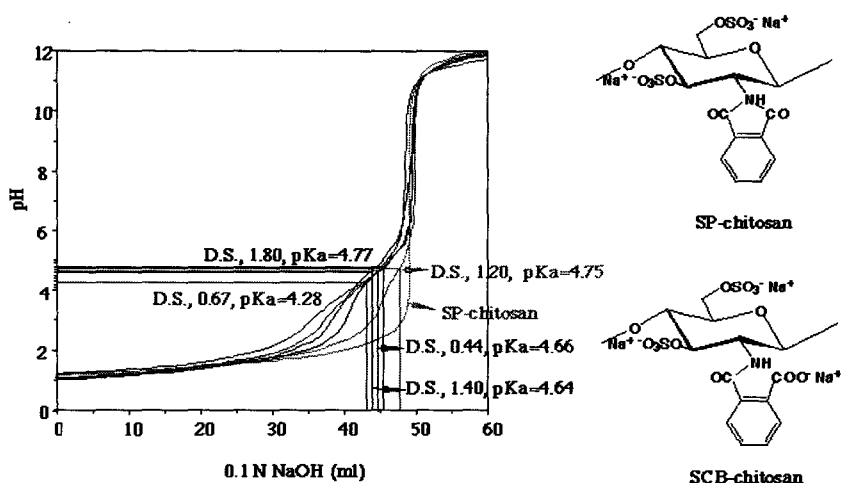


Fig. 8. Effect of sulfation degree on pKa of SCB-chitosan

Table 2. *pKas* of sulfated chitosan derivatives by potentiometric titration

| | D.S. (sulfate group) | D.S. (carboxyl group ^{a)}) | Applied amount | <i>pKas</i> |
|------------------------------------|-------------------------|---|----------------|--------------------|
| SCB-chitosan | 1.80 | 0.85 | 510.6 mg | 4.77 |
| SCB-chitosan | 1.40 | 0.88 | 503.7 mg | 4.64 |
| SCB-chitosan | 0.67 | 0.96 | 504.7 mg | 4.28 |
| SCB-chitosan | 0.44 | 0.88 | 501.2 mg | 4.66 |
| SCB-chitosan | 1.20 | 0.41 | 454.3 mg | 4.66 |
| N-3,6-O-S-chitosan | 2.40 | | 502.7mg | 7.70 ^{b)} |
| 3,6-O-S-chitosan | 1.40 | | 501.2 mg | 7.70 ^{b)} |
| 3,6-O-S-chitosan | 1.70 | | 476.6 mg | - |
| C ₆ H ₅ COOH | 4.21 | | | |

Table 1은 전위차적정에 의한 황산화 키토산 및 키틴-키토산 유도체의 *pKa*를 평가하였다. 이상의 결과로부터 Carboxyl 기의 치환도에 따라서 황산화 키토산의 용해도가 다르고 이것으로부터 *pKa*가 달라져 황산화 키토산의 반응 특성은 달라질 것으로 사료된다.

황산화 키토산 유도체의 항에이즈활성

이상과 같은 방법으로 황산화 키토산을 제조하고 여러 분석기기를 통하여 확인한 후 Carboxyl 화도, 황산화도, *pKa* 특성을 파악한 후 항에이즈활성을 에이즈 치료약으로 널리 사용되고 있는 ddI, AZT, ddC와 비교하여 그 특성을 고찰하였다.

Table 3. Anti-HIV-1 activity by sulfated chitosan derivatives

| Samples | Ds ^{a)} | CC ₅₀ ^{b)} (ug/ml) | EC ₅₀ ^{c)} (ug/ml) | SI ^{d)} |
|------------------|------------------|--|--|------------------|
| SCB-chitosan | 1.80 | 1000 | 0.691 | 1447 |
| N-3,6-S-chitosan | 2.40 | 1000 | 0.090 | 11062 |
| Dextran sulfate | | 1000 | 0.024 | 42204 |
| Curdans sulfate | 1.30 | 1000 | 0.10 | 10000 |
| AZI(uM) | | 305.8 | 0.007 | 43035 |
| ddC(uM) | | 3402 | 0.431 | 7897 |
| ddI(uM) | | 5000 | 3.427 | 1459 |

a) Degree of sulfation

b) 50% cytotoxic concentration

c) 50% effective concentration

d) Selectivity Index (CC₅₀ /EC₅₀)

실험에 사용된 SCB-chitosan 은 Anti-HIV 활성에 있어서 Selectivity Index가 Anti-HIV 약물인 AZT, ddC와 ddI보다 낮았지만 N-3,6-O-S-chitosan은 ddC와 ddI보다 높았다. 이는 황산화도가 에이즈 바이러스의 Blocking에 깊이 관여된 것으로 사료된다. 그리고 카르복실기보다는 황산기가 더 크게 작용하고 있는 것으로 추정된다. 이들 유도체들의 Binding Site는 Sulfated-chitosan 유도체의 황산기가 HIV-1의 gp120의 C 말단에 존재하는 양전하를 가진 아미노산들과 Sulfate 기와 결합함으로써 Blocking 되는 것으로 추정된다. 이상의 결과로부터 황산화 키토산 유도체는 Anti-AIDS 활성이 높은 물질로 사료되며 더욱이 키토산의 황산화 유도체는 항원성이 대단히 낮은 물질이기 때문에 임상적 실용화가 기대된다.

IV. 결론

키토산과 황산화 키토산의 특성을 파악하기 위하여 제조한 키토산과 그 유도체들의 pKa (평균분자량 : 3,600, pKa : 6.8, 평균분자량 : 10,000, pKa : 6.5) 를 평가하였다. 이는 분자량에 의존해서 고분자 키토산 (평균분자량 : 50,000, pKa : 6.2)보다 증가하였다. 또한, 키토산을 피리딘 용액중에서 Sulfurtrioxide-pyridine complex를 사용하여 몇 종류의 황산화 키토산 유도체들 (N-3,6-O-S-chitosan, N-desulfated 3,6-O-S-chitin and 3,6-O-sulfated-N-(*o*-carboxybenzoyl)chitosan)을 제조하였다. 제조한 황산화 키토산 유도체의 Sulfate기의 도입여부와 정제상태는 ^{13}C NMR과 IR spectroscopy를 사용하

여 평가하였다.

그리고 이 황산화 키토산 유도체들의 pKa 도 조사하였다. N-3,6-O-S-chitosan, N-desulfated 3,6-O-S-chitosan은 높은 수용성을 가지고 있었고, 그 $pKa(7.7)$ 는 고분자 키토산 (6.2)보다 증가하였다.

이 결과는 황산화 키토산 유도체의 용해도가 관여 되어 있는 것으로 추정되며 황산화 키토산 유도체에 존재하는 아미노기와 Sulfate기가 정전기적 결합되어 있어 pKa 가 증가된 것으로 사료된다.

SCB-chitosan 은 Anti-HIV 활성에 있어서 Selectivity Index가 Anti-HIV 약물인 AZT, ddC와 ddI보다 낮았지만 N-3,6-O-S-chitosan은 ddC와 ddI보다 높았다. 이들 유도체들의 Binding Site는 Sulfated-chitosan 유도체의 황산기가 HIV-1의 gp120의 C 말단에 존재하는 양전하를 가진 아미노산들과 Sulfate 기와 결합함으로써 Blocking 되는 것으로 추정된다.

참고 문헌

1. R.C. Gallo, P.S. Sarin, E.P. Gelman, M. Robert-Guroff, E. Richardson, V.S. Kalyanaraman, O. Mann, G.D. Sidha, R.E. Stahl, S. Zolla-Pazner, J. Leibowitch, and M. Popovic, Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS), Science, 220, 865-867, 1983.
2. F. Banie-Sinoussi, J.C. Cherman, F. Rey, M.T. Nugeyre, S. Chemaret, J. Gruest, C. Dauguest, C. Axler-Blin,

- F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier, *Science*, 220, 868-871, 1983.
3. H. Mitsuya, R. Yarchoan, and S. Broder, Molecular targets for AIDS therapy, *Science*, 249, 1533-1544, 1990.
 4. M. Bourin and U. Lindahl, Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation, *Biochem. J.*, 289, 313-330, 1993.
 5. H.D. Hay, *Cell Biology of Extracellular Matrix*, 2nd ed., Plenum Press, New York, 1991.
 6. E. Mbemba, V. Chams, J. Gluckman, D. Klatzmann, and L. Gattegno, Molecular interaction between HIV-1 major envelope glycoprotein and dextran sulfate, *Biochim. Biophys. Acta*, 1138, 62-67, 1992.
 7. C. Rider, D. Coombe, H. Harrop, E. Hounsell, C. Bauer, J. Feeny, B. Mulloy, N. Mahmood, A. Hay, and C. Parish, Anti-HIV-1 activity of chemically modified heparins: correlation between binding to the V3 loop of gp120 and inhibition of cellular HIV-1 infection in vitro, *Biochemistry*, 33, 6974-6980, 1994.
 8. T. Yoshida, K. Hatanaka, T. Uryu, Y. Kaneko, E. Suzuki, H. Miyano, T. Mimura, O. Yoshida, and N. Yamamoto, Synthesis and structural analysis of Curdlan sulfate with a potent inhibitory effect in vitro of AIDS virus infection, *Macromolecules*, 23, 3717-3722, 1990.
 9. R. Muzzarelli, F. Tanfani, and M. Emanuelli, Sulfated N-(carboxymethyl) chitosans: Novel blood anticoagulants, *Carbohydr. Res.*, 126, 225-231, 1984.
 10. Q. Li, E. T. Dunn, E. W. Grandmaison and M. F. A. Goosen: Applications and Properties of Chitosan. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 7, 370-397, 1992.
 11. Gama Sosa M., Fazely Fatemeh, Koch J., Vercellotti S. and Ruprecht R.: *N*-carboxymethylchitosan-*N,O*-sulfate as an ANTI-HIV-1 agent, *Biochem. and Biophys. Research Communications*, 174, 489-496, 1991.
 12. Cushing I. B., Davis R. V., Kratovil E. J., and MacCorquodale D. W.: The sulfation of chitin in chlorosulfonic acid and dechloroethane, *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 4590-4591, 1954.
 13. Wolform M. L., and Shen Han T. M., The Sulfonation of Chitosan, *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 1764-1767, 1959.
 14. Whistler Roy L., and Kosik M.: Anticoagulant Activity of Oxidized and *N*-and *O*-sulfated Chitosan, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 142, 106-110, 1971.
 15. Horton D. & Ernst K. Just, Preparation from chitin of (1→4)-2-Amino-2-deoxy-β-D- Glucopyranuronan and its 2-sulfoamino analog having blood-anticoagulant properties, *Car*

- bohydrate Research*, 29, 173-179, 1973.
16. Saiki I., Murata J, Nakajima M., Tokura S. and Azuma I.: Inhibition by Sulfated Chitin Derivatives of Invasion through Extracellular Matrix and Enzymatic Degradation by Metastatic Melanoma Cells, *Cancer Res.*, 50, 3631-3637, 1990.
 17. Hackman, R. H., and Goldberg. M.: Studies on Chitin. VI. The nature of α and β -chitins, *Austr. J. Bio. Sci.*, 18, 935-936, 1965.
 18. Miya, M., Iwamoto, R., Yoshikawa, S. and Mima S.: I.r. spectroscopic derermination of CONH content in highly deacetylated chitosan, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2, 323-324, 1980.
 19. Sannan, T., Kurita, K., Ogura, K. and Iwakura, Y.: Studies on chitin : 7. I. r. spectroscopic determination of degree of deacetylation, *Polymer*, 19, 458-459, 1978.
 20. Furusaki Etsuko, Yoshiharu Ueno, Nobuo Sakairi, Norio Nishi and Seiichi Tokura: Facile Preparation and Inclusion Ability of a Chitosan Derivatives Bearing Carboxymethyl- β -cycoldextrin, *Carbohydrate Polymer*, 29, 29-34, 1996.
 21. Tokura Seiichi, Keisuke Ueno, Satoshi Miyazaki and Norio Nishi: Molecular Weight Dependent Antimicrobial Activity by Chitosan, *Macromol. Symp.*, 120, 1-9, 1997.
 22. Tokura Seiichi and Norio Nishi, Kiyohisa Takahashi and Akihiro Shirai, Yasumitsu Uraki: Novel drug delivery system by chitin derivative, *Macromol. Symp.*, 99, 201-208, 1995.
 23. Tokura Seiichi, Shin-Ichiro Nishimura, Nobuo Sakairi and Norio Nishi: Biological Activities of Biodegradable Polysaccharide, *Macromol. Symp.*, 101, 389-396, 1996.
 24. Nishimura S., Kohgo, O. and Kurita, K., Vittavatvong, C., Kuzuhara, H.: Synthesis of Novel Chitosan Derivatives Soluble in Organic Solvents by Regioselective Chemical Modifications, *Chemistry Letter*, 243-246, 1990.
 25. Nishimura S., Kohgo osamu and Kurita K.: Chemospecific Manipulations of a Rigid Polysaccarides : Synthesis of Novel Chitosan Derivatives with Excellent Solubility in Common Organic Solvents by Regioselective Chemical Modifications, *Macromolecules*, 24, 4745-4748, 1991.
 26. Nishimura S., Miura Y., Ren L., Sato M., Yamagishi A., Nishi N., Tokura S., Kurita K., and Ishii S.: An Effecient Method for the Synthesis of Novel Amphiphilic Polysaccharides by Regio- and Thermosteective Modifications of Chitosan. *Chemistry Letter*, 1623-1626, 1993.
 27. Muzzarelli R. A. A., Tanfani, F., Emanuell M. and Mariotti, S.: *N*-(Carboxymethylidene)Chitosans and

- N*-(Carboxymethyl)-Chitosans : Novel Chelating Polyampholytes Obtained from Chitosan Glyoxylate, *Carbohydrate Research*, 107, 199~214, 1982.
28. Muzzarelli R. A. A., Tanfani F., and Emanuelli M.: Sulfated *N*-(carboxymethyl) chitosans : novel blood anticoagulants, *Carbohydrate Research*, 126, 225-231, 1984.
29. 한상문, 김용범: 가교 *N*-methylthiobenzyl-chitosan bead와 chitosan bead의 금속 이온의 선택적 흡착 능력. 한국키틴키토산 학회지, 4(1), pp. 39-44, 1999.
30. Nishimura S., Norio N. & Tokura S.: Inhibition of the hydrolytic activity of thrombin by chitin heparinods, *Carbohydrate Research*, 156, 286-292, 1986.
31. Hirano, S., Hasegawa, M., and Kinugawa, J.: ¹³C n.m.r. analysis of some sulphate derivatives of chitosan, *Int. J. Biol. Macromol.*, 13, 316-317, 1991.
32. Hirano, S., Tanaka Y., Hasegawa M., Tobetto K. and Nishioka A.: Effect of sulfated derivatives of chitosan on some blood coagulant factors, *Carbohydrate Research*, 137, 205-215, 1985.
33. Hirano, S., Kinugawa J., Nishioka, A. and Iino, H.: Transformation of triplet induced cotton effects of the methylene blue complexes of some sulphate derivatives of chitosan, *Int. J. Bio. Macromol.*, 9, 11-14, 1987.
34. Tokura S., Itoyama K., Nishi N., Nishimura S., Saiki I. and Azuma I.: Selective sulfation of chitin derivatives for biomedical functions, *Journal of Macromolecular science-Part A : Pure And Applied Chemistry*, A31(11), 1707-1718, 1994.
35. T. Yoshida, Y. Katayama, S. Inoue, and T. Uryu, *Macromolecules*, 25, 4051-4057, 1992.