

항바이러스 활성을 갖는 Trifluoroacetyl Chitosan 유도체의 제조

김 천 호* · 신 차 균 · 신 계 숙 · 손 태 일†

중앙대학교 생물공학과, *한국과학기술연구원 생체재료연구센터
(1999년 3월 22일 접수, 1999년 4월 26일 채택)

Preparation of Trifluoroacetyl Chitosan Derivatives with Antiviral Activity

Chun-Ho Kim*, Cha-Gyun Shin, Kye-Sook Shin, and Tae-il Son†

Department of Biotechnology, Chung-Ang University, Ansong 456-756, Korea

*Biomaterials Research Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul 136-791, Korea

(Received March 22, 1999; accepted April 26, 1999)

요약: Chitosan을 아질산분해법을 이용하여 저분자화시킨 다음, 저분자량 chitosan의 유리 아민기와 trifluoroacetic anhydride를 반응시켜 새로운 합불소 chitosan 올리고머 유도체(FCO)를 합성하였다. 이들 반응의 진행은 FT-IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR 및 ^{19}F (^1H)NMR 등을 통해 확인하였다. FCO의 항바이러스 효과는 바이러스 감염용액에 다양한 농도의 FCO를 첨가하고 세포를 감염시킨 후, 36시간 후에 복제되고 있는 바이러스 DNA 양을 측정하여 조사하였다. 바이러스의 복제는 FCO를 첨가하여 바이러스를 감염시킨 세포들에서, FCO를 첨가하지 않은 대조군에 비하여 첨가한 FCO의 농도에 비례하여 감소하여, FCO가 바이러스 감염을 효과적으로 억제함을 제시한다. 특히, 1% FCO의 감염용액으로 처리된 세포에서는 바이러스의 복제가 대조군에 비하여 40%로 감소하였다.

Abstract: Chitosan was depolymerized by using nitrous acid. In order to synthesize new fluorinated chitosan oligomer(FCO) derivative, free amine groups of resulting low molecular weight chitosan oligomers were reacted with trifluoroacetic anhydride. The structure changes in the samples were confirmed by using FT-IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR and ^{19}F (^1H)NMR. Antiviral activity of FCO was studied by measuring DAN amounts of the replicating viruses at 36 hr after the cells were infected with the viral solution containing FCO of various concentrations. The viral replications in the cells infected with the viral solution containing FCO were proportionally decreased with the FCO does, compared to those of the control groups, indicating that FCO efficiently inhibits viral infection. In particular, viral replication was decreased to 40% in the 1% FCO-treated cells.

Key words: Chitosan derivatives, Antiviral activity

1. 서 론

합불소 유기화합물과 생리활성에 관한 연구는 1940년대 후반 Peters 등에 의해서 분자 레벨에서 그 작용 발현기구의 해명[1]이 이루어진 이래, 1953년에 Fried 등에 의해서 코르티솔에 불소를 도입함으로써 항염증작용이 현저하게 증가하는 것이 발견되었다[2]. 그 당시 항염증제로서 스테로이드 호르몬의 화학수식에 관한 연구에서는 활성의 증강과 작용 선택성의 향상을 목적으로 활발히 행해졌다. 이것을 발단으로 하여 불소에 대한 관심이 높아져, 스테로이드계 의약품뿐만 아니라 많은 의약품 개발에 있어서 불소 도입이 시도되게 되었다. 그 관련 연구로서는 5-fluoro-uracil의 제암작용의 작용기구가 uracil의 티미딘으로의 정상적인 대사경로가 불소 도입으로 인하여 지체된다는 것이 해명되면서[3] 이를 화학적으로 치환하여 제암제 및 항암성 종양제가 개발되었다. 현재 이러한 생리활성과 약리효과의 발현을 목적으로 불소 도입의 분자설계가 수 많이 이루어지고 있다[4,5].

Chitin은 N-acetyl-D-glucosamine 잔기가 다수(1-4) 결합한 직쇄 다당[6]으로, 동식물의 구성 성분이고, 또 그 탈아세틸화합물인

chitosan은 균류 등의 구성성분으로서 자연계에 널리 분포하고 있는 생체고분자지만, 특별한 경우 외에는 이들 천연고분자가 거의 모든 용매에 대해서 용해성이 열악하기 때문에 그 사용에는 많은 제약이 따른다. 그러나 이들을 화학적인 변성[7-10]을 통해, 혹은 가수분해에 의한 저분자화[11-13]시킴으로서 그 용해성이 증가되고, 특히 물에 용해될 수 있기 때문에, 동물의 정맥내 투여가 가능해 의료용으로서의 그 사용 용도를 넓힐 수 있게 되어 천연자원 재활용의 견지로부터 chitin질과 그 유도체의 특성 및 생리활성의 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히, 고분자인 chitin 및 chitin 올리고머가 우수한 생리활성을 나타낸다는 것이 보고되고[14-16], 그 중에서도 분리된 2당으로부터 6당까지의 NACOS-6, COS-6가 mouse 이식종양에 대해서 항종양성을 발휘할 뿐 아니라, 그람양성균의 감염을 나타낸다는 것이 최근 알려졌다[17]. NACOS-6 및 COS-6 양쪽 모두 분자량 1000 전후의 저분자 물질이고 이들 올리고당이 Lentinan[18]과 Schizophyllan[19] 등의 고분자 β -glucan류와 거의 필적하는 생리활성을 나타낸다는 결과로부터 면역부활 작용은 저분자형으로 이행할 가능성이 높다고 추정된다.

그러나, chitin, chitosan의 불소화 반응을 통한 유도체의 제조는 지금까지 보고된 예가 거의 없으며, 더욱이 합불소 chitin 및 chitosan을 화학적으로 가수분해하여 올리고당을 제조함으로써 새로운 생리활성을 밝히려는 연구 또한 아직까지 보고된 예가 없다.

† 주 저자 (e-mail: tisohn@cau.ac.kr)

따라서, 본 연구에서는 chitosan 을 출발물질로 하여, 아질산염을 이용한 산 가수분해법으로 특정 분자량을 가지는 chitosan 분해물질을 얻은 다음, 이를 trifluoroacetic anhydride와 반응시켜서 합불소 키토산 올리고머 유도체를 제조하였다. 합성된 합불소 chitosan 올리고당 유도체의 항종양성에 대한 감염, 방어효과를 검토하기 위해, 방사능으로 표식된 바이러스 DNA의 양을 검토하여 감염억제 효과를 조사하였다.

2. 실험

2.1. 저분자량의 chitosan 제조

Chitosan(共和 테크노스사, Flonac C: 탈아세틸화도 85%)을 4% 초산용액에 완전히 용해시킨 후, 얼음중탕 하에서 교반하면서 10%의 아질산나트륨 수용액을 첨가하고 반응시킨 후 진한 암모니아수로 중화시키고 계속해서 NaBH₄(아질산나트륨에 대해서 2몰당량)을 첨가하여 말단기를 환원시켰다[20].

2.2. UF(ultra filtration)법에 의해서 분자량에 따른 키토산 올리고 유도체의 분리

아질산 분해법에 의해서 얻어진 chitosan 분해 생성액은 불용물을 여과한 다음 혼합 생성물을 한외여과막(Amicon사, cut-off size: 500, 1000, 3000 및 10000)을 통과시켜 분자량 별로 분리한 후 메탄올로 침전시켜 분리하였다. 각각의 침전물을 아세톤, 에테르로 충분히 세척 후 진공 건조시켜 저분자량의 chitosan(LMC)을 제조하였다.

2.3. Fluorinated Chitosan Oligomer의 제조

Chitosan 2 g을 10% 초산 수용액 40 mL에 완전히 용해시킨 다음, 150~160 mL의 메탄올로 희석하였다. 이 용액에 chitosan의 아민기에 대해 2~3배 몰당량의 trifluoroacetic anhydride를 가하였다. 실온에서 하룻밤 방치한 후, 진공증류기로 농축한 다음 메탄올을 가하여 침전시킨다. 생성된 침전을 아세톤, 에테르로 충분히 세척한 다음, 실온에서 감압 건조하여 황색의 분말인 저분자량의 chitosan 불소화유도체(이하 FCO)를 얻었다(Found: C, 40.27; H, 5.87; O, 39.86; N, 4.49; F, 9.51).

2.4. 기기 및 분석

2.4.1. 기기

IR스펙트럼은 KBr Pellet법에 의해서 JASCO IR-810형 적외선 분광광도를 이용하였고, 원소분석(Foss Heraeus Analysentechnik GmbH)은 복해도대학 지구환경연구과에 의뢰하였다. ¹H NMR 스펙트럼은 JEOL GX-270을, ¹³C-NMR(Bruker AM 300)은 내부기준을 TMS 로, ¹⁹F(¹H)NMR(Varian VXR-500S)은 hexafluorobenzene을 외부기준으로 하였으며, 용매로는 CDCl₃를 사용하였다.

2.4.2. 분자량 측정

생성물의 분자량은 HPLC로 측정했다. Column은 Asahi Pack GFA-30F 를 이용했다. 이동상은 0.5%의 초산완충용액(pH 4.0), 온도(50 °C), 유속을 0.5 mL/min의 조건하에서 행했으며, 유출 올리고당은 시차결절계에 의해서 검출했다. 표준시료로서 Pullulan과 N-acetylchitooligo 혼합물을 이용했다.

2.4.3. 탈아세틸화도의 측정

Chitosan 분말 0.5 g을 평량하여, 이것을 5% 초산(v/v)에 용해시켜 100 g으로 하였다. 이 chitosan 초산용액을 1.0 g 취해서 200 mL의 삼각플라스크에 옮겨 넣고, 증류수 30 mL를 첨가한 다음 총

분히 교반하고, 지시약으로 toluidine blue 용액을 2~3방울 가한 후 N/400 폴리비닐황산칼륨(PVSK) 용액으로 적정하여 다음 식으로 탈아세틸화도를 구하였다(24).

$$\text{탈아세틸화도} = \frac{X/161}{X/161 + Y/203} \times 100(\%)$$

$$X = \frac{1}{400} \times \frac{1}{1000} \times f \times 161 \times v$$

$$Y = 0.5 \times \frac{1}{1000} - X$$

v : n/400 PVSK 용액으로 적정했을 때의 소모량(mL)

f : n/400 PVSK 용액의 factor

2.5. 바이러스감염 억제효과 조사

제조된 FCO 유도체의 바이러스감염 억제효과는 바이러스 용액에 FCO 용액을 함께 섞어서 배양세포에 감염시키고 36시간 후에 복제되고 있는 바이러스 DNA양을 측정[21]하여 조사하였다. SV 40 바이러스 용액과 FCO 용액을 섞어 전체부피 200 mL에 FCO의 최종 농도가 0.05, 0.1, 0.5 및 1.0%가 되며, 바이러스 농도는 10 m.o.i가 되게 하여 30 mm plate에 monolayer로 성장한 배양세포(CV-1; African green monkey kidney cell)에 투여하였다. 1시간 동안 37 °C에서 배양하여 감염이 되게 한 후, 감염용액을 제거하고 인산완충용액으로 감염세포를 2번씩 세척하여 감염되지 않은 바이러스를 완전히 제거하고 1.5 mL의 배양배지(10% CS-MEM)을 넣고 36시간 배양하였다. 36시간 후에 배양용액을 제거하고 50 Ci/mL의 [3H]-thymidine를 함유하는 200 mL의 MEM 용액에서 30 분간 배양하여 바이러스 DNA를 표식하였다. 방사능표식용액을 제거하고 300 mL의 Hirt lysis 용액을 투여하여 세포를 파괴하고 cell 분해물을 모았다[22]. 75 mL의 5 M NaCl를 첨가하고 잘 섞은 후 4 °C에서 5시간 방치한 다음, 원심분리하여 Hirt 상등액을 얻고, Hirt 상등액속에 존재하는 바이러스 DNA양을 filter assay로 정량하였다. 20 mL의 Hirt 상등액을 1 mL의 4 M GuHCl(guanidine hydrochloride) 용액에 넣고 이를 glass filter(GFC, whatman)에 통과시킨 다음, 4 °C 메탄올로 세척한 후 filter를 건조하였다. 건조한 filter는 액체섬광계측기(liquid scintillation counter, LSC) cocktail (4 g ppo, 0.1 g popop, 1 L toluene 혼합액)에 넣고 방사능 양을 액체섬광계측기로 측정하였다[23].

3. 결과 및 고찰

3.1. 아질산에 의한 chitosan 분해생성물의 제조 및 분리

아질산분해법에 의해서 얻어진 분해생성물을 분자레벨에 가까운 생리활성에 대한 상세한 정보를 얻기 위해 Amicon사의 UF막을 이용하여 분자량분포가 좁은 저분자량의 chitosan을 얻을 수 있었다. 분획된 각 아질산분해생성물의 탈아세틸화도와 분자량과의 결과를 Table 1에 나타내었다. 제조된 chitosan 올리고머의 탈아세틸화도 및 분자량분포는 용해도차를 이용한 재침전법[20]에 의한 것과 비교해 볼 때 대체적으로 비교적 낮은 값을 보이고 있는데, 이는 chitosan에 아질산을 첨가하면 글루코사민 잔기상의 아미노기가 탈아미노화 반응에 의해서 암모니아로 분해되고, 또한 분획된 chitosan 분해생성물의 다분산도가 1.2~1.5로 분자량분포가 우수한 분해생성물이기 때문으로 생각된다.

3.2. Fluorinated Chitosan Oligomer(FCO)의 합성

Chitosan 분해물질 중 분자량이 5,300인 fraction 부분(LMC)과 trifluoroacetic anhydride의 반응으로 불소화된 저분자량의 chitosan

Table 1. The Deacetylation Degree and Molecular Weights of Each Fractions of Partially Hydrolyzed Chitosan Separated by UF Membrane

Used Membrane Filters (Mw)	Deacetylation degree(%)	Mn*	Mw/Mn
YC05 (500)	18	1200	1.18
YM1 (1000)	25	1800	1.20
YM3 (3000)	32	3100	1.25
YM10 (10000)	47	5300	1.52

* Measured by GPC (column: Asahi Pack GFA-30F, eluent: 2.5% Acetic acid and 50 mL LiCl)

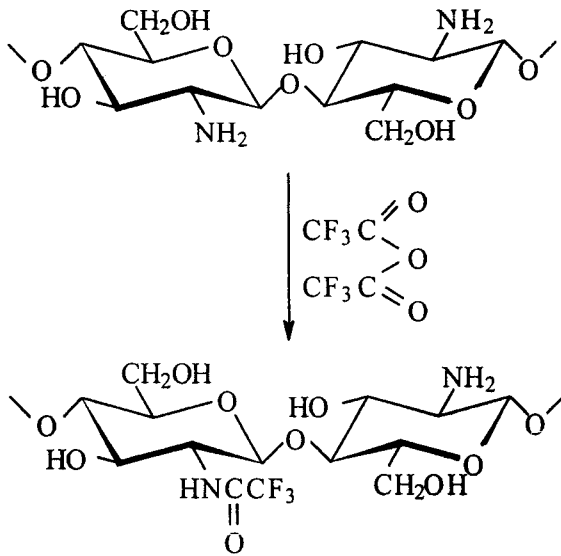


Figure 1. Schematic structure of fluorinated chitosan oligomer derivative.

유도체(FCO)의 제조과정은 Figure 1에 나타내었다. Chitosan 분해 물질 중 FCO의 합성에 사용된 저분자량의 chitosan(LMC)과 FCO의 IR 스펙트럼을 Figure 2에 나타내었다. LMC의 IR 스펙트럼(Figure 2 (a))으로부터 1600 cm⁻¹ 부근에 탈아세틸화되지 않은 amide기에 기인하는 흡수띠가 보이며, 3400 cm⁻¹ 부근에서는 수산기에 기인하는 신축진동을 확인할 수 있다. 또한 이를 chitosan의 스펙트럼과 비교해 보면, 2차 알코올의 C-O 신축진동에 기인하는 흡수가 1060 cm⁻¹ 부근에서 관측되는데, 이는 chitosan 자체의 glycoside 결합이 깨지면서 생성되는 2차 알코올 때문으로 추정된다. 또한 FCO의 IR 스펙트럼(Figure 2 (b))으로부터는 카르보닐기의 신축진동에 기인하는 강한 흡수가 1678 cm⁻¹에서 관측되고, 1000 cm⁻¹ 부근의 C-F 신축에 기인한 흡수가 새로이 관측되는 것으로 반응이 진행되었음을 확인할 수 있었다.

한편 ¹³C{¹H}NMR 스펙트럼(Figure 3)을 보면, 이로써 manithol과 pyranose 골격의 각각의 탄소에 기인하는 signal에 대한 정확한 고찰은 할 수 없지만 170 ppm 부근에서 amide의 카르보닐에 기인하는 흡수띠를 확인할 수 있으며, chitosan 분해물질인 LMC와 trifluoroacetic anhydride와의 반응에 의해서 얻어진 생성물(FCO)의 ¹³C{¹H}NMR 스펙트럼을 Figure 4에 나타내었다. 여기에서 보면, aminoacetyl기의 카르보닐에 기인하는 흡수피크가 175 ppm에서 관측되었으며, trifluoroacetyl기의 카르보닐에 기인하는 흡수피크는 218 ppm 부근에서 관측되었다. 이는 카르보닐에 붙어 있

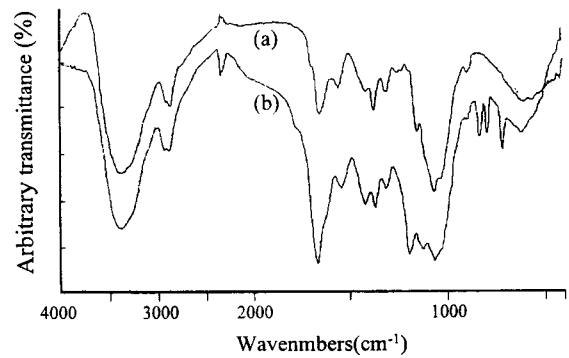


Figure 2. IR spectra of (A) partially hydrolyzed chitosan and (B) its fluorinated derivative.

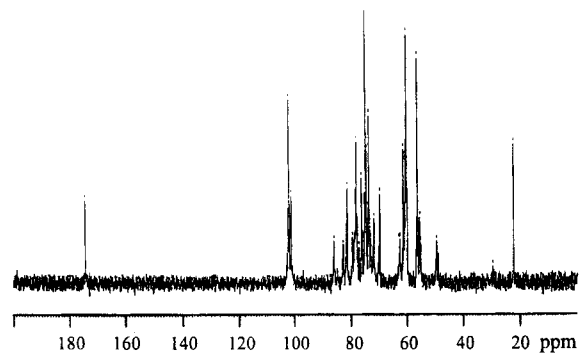


Figure 3. ¹³C{¹H}NMR spectrum of partially hydrolyzed chitosan.

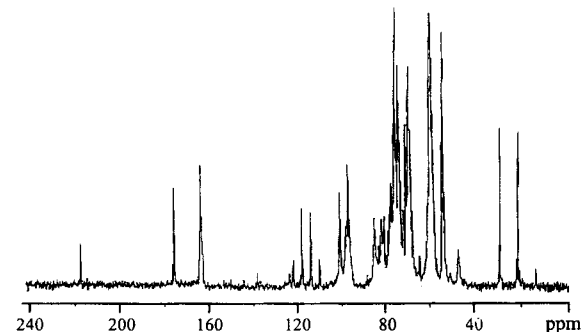


Figure 4. ¹³C{¹H}NMR spectrum of fluorinated chitosan derivative(FCO).

는 electron withdrawing group을 가지는 CF₃로 인해서 전자차폐 효과가 감소하여 낮은 자기장에서 공명흡수가 일어나는 것으로 추측할 수 있다. Figure 5는 FCO의 ¹⁹F{¹H}NMR 스펙트럼으로, trifluoroacetyl의 signal이 88.9 ppm에서 singlet로서 관측되는 것으로 저분자량 chitosan의 유리 아민기에 trifluoroacetyl기가 도입되었음을 확인할 수 있었다.

3.3. 바이러스감염 억제효과

FCO의 바이러스감염 억제효과의 측정, 바이러스 복제가 최고조로 일어나는 감염 후 36시간에서 30분 동안 [3H]-thymidine으로 처리하여 복제주기가 15분인 SV40 바이러스 DNA를 표식하고 방사능으로 표식된 바이러스 DNA의 양을 대조군과 비교하여 감염

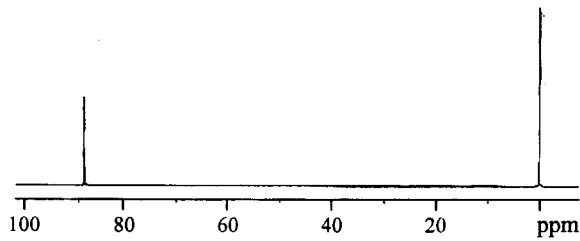


Figure 5. $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ NMR spectrum of fluorinated chitosan derivatives(FCO).

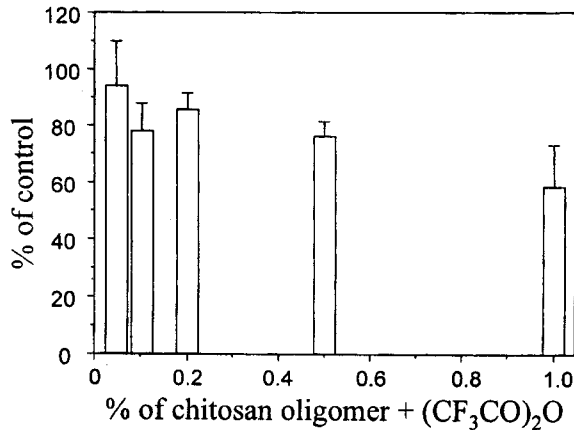


Figure 6. Antiviral activity of fluorinated chitosan derivative (FCO).

억제효과를 조사할 수 있다[21]. 즉, 방사능으로 표식된 바이러스 DNA를 함유하고 있는 Hirt lysis 용액을 4 M GuHCl(guanidine hydrochloride)에 넣고 glass filter를 통과시킬 때 방사능으로 표식된 모든 바이러스 DNA가 필터에 부착하는 성질을 이용한 것으로, 동등한 바이러스양에 FCO의 농도를 증가시켜가면서 감염시켰을 때 36시간 후에 복제되고 있는 바이러스 DNA 양의 결과를 Figure 6에 나타내었다.

이 때, 감염효과는 FCO를 주입하지 않은 대조군에서 복제하는 바이러스의 양을 100%로 하여 나타내었으며, 0.05%를 함유하고 있는 FCO 용액에서는 바이러스감염 억제효과가 거의 나타나지 않았지만 FCO가 0.1%, 0.5% 농도일 때는 바이러스 DNA 양이 70~80%로 나타내었으며, 특히 FCO가 1% 농도일 때는 바이러스 DNA 양이 약 60%로 바이러스감염 억제효과는 약 40% 감소됨을 확인할 수 있다. 이것은 바이러스용액에 FCO 용액을 혼합함으로써 FCO의 흡착작용에 의하여 바이러스가 FCO 중합체와 결합되면서 세포 안으로 진입하는 것을 차단하기 때문으로 추정된다.

4. 결 론

생리활성이 높은 chitosan을 아질산염으로 산 가수분해하여 chitosan 분해물질을 제조하였다. UF막으로 분획된 저분자량의 chitosan 탈아세틸화도는 모두 50% 이하로 분자량의 감소와 함께 줄었지만, 다분산도는 모두 1.5 이하로 분별침전에 의한 방법에 비해 상대적으로 분자량분포가 좁은 분해물을 얻을 수 있었다. Chitosan 분해물질과 trifluoroacetic anhydride를 반응시켜서 새로운 합분소 키토

산 올리고머 유도체를 제조하였으며, FT-IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ NMR 등을 이용하여 반응을 확인하였다. 이 유도체를 이용한 바이러스 감염 억제는 1%의 주입농도에서 대조군에 비하여 약 40%의 감염억제 효과를 갖고 있는 것을 알 수 있었다.

감 사

이 논문은 1996년도 한국학술진흥재단 자유 공모과제 연구비 지원에 의하여 연구되었습니다. 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. R. Peters, *Proc. Roy. Soc. Ser. B*, **139**, 143(1952).
2. J. Fried, E. F. Sabo, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 2273(1953).
3. C. Heidelberger and R. Dushinsky, *Nature*, **179**, 663(1957).
4. R. H. Abeles and A. L. Maycock, *Acc. Chem. Res.*, **9**, 313 (1976).
5. J. Kollonisch, A. A. Patchett, S. Marburg, A. L. Maycock, L. M. Perkins, G. A. Doldouras, D. E. Duggan, and S. D. Aster, *Nature*, **274**, 906 (1978).
6. R. A. A. Muzzarelli, Chitin, Pergamon Press, New York (1977).
7. R. A. A. Muzzarelli and E. R. Pariser eds., *Proc. 1st. Conf. Chitin/chitosan*, MIT, Cambridge (1987).
8. S. Hirano, S. Tokura eds., *Proc. 2nd. Conf. Chitin/Chitosan*, The Japanese Society of Chitin and Chitosan (1982).
9. J. P. Zikakis, Chitin, Chitosan and Related Enzyme, Academic Press, New York (1984).
10. R. A. A. Muzzarelli, C. Jeuniaux and G. W. Gooday, eds., *Chitin in Nature and Technology*, Plenum Press, New York (1986).
11. J. A. Rupley, *Biochim. Biophys. Acta*, **83**, 245(1964).
12. S. T. Horowitz, S. Roseman, and H. J. Blumenthal, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 5046(1957).
13. C. Bosso, J. Defaye, A. Domard, and A. Gabelle, *Carbohydr. Res.*, **156**, 57(1986).
14. 戸倉清一, 最後のバイオマスキチン, キトサン, キチン, キトサン 研究会編, 技報堂出版, p. 51 (1988).
15. 東市郎, キチン, キトサンの應用, キチン, キトサン研究会編, 技報堂出版, p. 195 (1990).
16. 内田 泰, キチン, キトサンの應用, 키チン, 키토산研究会編, 技報堂出版, p. 71 (1990).
17. S. Suzuki, Y. Okawa, Y. Okura, K. Hashimoto, and M. Suzuki, *Proc. of the 2nd Int. Conf. on Chitin and Chitosan* (1989).
18. 田口鐵男, 金子有太郎, 千原吳郎, *Biotherapy*, **2**, 509(1988).
19. 古江 尙外, *Biotherapy*, **2**, 543(1988).
20. C. H. Kim, E. S. Lee, Y. T. Hahn, B. Y. Kim, and T. I. Sohn, *Korean Ind. and Eng. Chem., in press* (1999).
21. R. M. Snapka, *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 4221(1986).
22. B. Hirt, *J. Mol. Biol.*, **26**, 365(1967).
23. C. G. Shin, J. M. Strayer, M. A. Wani, and R. H. Snapka, *Ter. Car. Mutagen*, **10**, 41(1990).
24. K. Toei and T. Kohata, *Anal. Chem. Acta*, **83**, 59(1976).