Polymer(Korea), Vol. 31, No. 5, pp 454-459, 2007

효과적인 유전자전달을 위한 표적성 리간드가 도입된 저분자량 수용성 키토산 나노입자의 제조 및 특성

허선행 · 장민자 · 김동곤 · 정영일 · 장미경† · 나재운†
순천대학교 공과대학 나노고분자공학과
(2007년 6월 11일 접수, 2007년 8월 28일 채택)

Characterization and Preparation of Low Molecular Weight Water Soluble Chitosan Nanoparticle Modified with Cell Targeting Ligand for Efficient Gene Delivery

Sun-Heang Heo, 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, Jeonnam 540-742, Korea
(Received June 11, 2007; Accepted August 28, 2007)

초록 : 본 연구에서는 folic acid(FA)가 복합화된 저분자량 수용성 키토산(LMWSC) 나노입자(water soluble chitosan-folic acid nanoparticle, WSCFA)를 제조하고, 또한 DNA와 나노복합체 합성 및 특성을 분석함으로써 *in vitro*에서 세포내 독성을 평가하였다. WSCFA 합성을 확인하기 위하여 분광학적 분석 방법을 사용하여 분석하였으며, WSCFA 나노입자는 110 nm 이하의 입자 크기인 구형의 형태를 가지고 있음을 알 수 있었다. *In vitro* 세포내 독성 실험에서, WSCFA-DNA 복합체는 세포내 독성을 전혀 나타내지 않음으로 높은 세포 생존율을 보여주었다. 전기영동 실험을 통해 WSCFA의 DNA 응축능력을 확인하였고, *in vitro*에서의 전이효율은 형광 광도계에 의해 평가하였다.

Abstract : Gene therapy using low molecular weight water soluble chitosan (LMWSC) as polycationic polymer shows good biocompatibility, but low transfection efficiency. The mechanism of folic acid (FA) uptake in the cells to promote targeting and internalization could improve transfection rates. The objective of this study was to synthesize and characterize the WSCFA-DNA complex and evaluate their cytotoxicity, *in vitro*. In ^{1}H-NMR spectra, specific peaks appeared both of FA and LMWSC in D_2O. WSCFA nanoparticles have spherical shapes with particle size show below 110 nm. In the cell cytotoxicity test, the WSCFA-DNA complex showed high cell viability, in vitro. Gel electrophoresis showed condensed DNA within the carriers. *In vitro* transfection efficiency was assayed by fluorescence spectroscopy. WSCFA nanoparticles have less cytotoxicity, good DNA condensation and particle size around 110 nm, which makes them a promising candidate as a non-viral gene vector.

Keywords : LMWSC, folic acid, nanoparticle, gene therapy.

서 론

유전자 치료법이란 유전자를 이용하여 필수 단백질의 생성을 유도하거나 불필요한 단백질의 생성을 억제함으로써 인간의 질병 치료를 목적으로 하는 의료 수단이다. 이를 위해 단백질을 발현하는 유전자를 효율적으로 전달할 수 있는 유전자 전달체계(gene delivery system, GDS)의 개발이 절실히 요구되고 있으며, 현재 양이온성 고분자를 이용한 비바이러스성 벡터(non viral vector)에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 유전자 전달체계는 크게 바이러스성 벡터(viral vector)와 비바이러스성 벡터를 이용하는 방법의 두 종류로 나눌 수 있다. 바이러스성 벡터는 유전자 발현 효율성이 높고 장기적으로 발현이 일어난다는 장점이 있는 반면 면역반응과 독성이 일어날 수 있으며, 바이러스를 이용한다는 점에서 체내축적이 일어날 수 있는 위험성을 가지고 있다.[1,2] 반면 비바이러스성 벡터의 경우, 유전자를 조직에 축적되도록 조절할 수 있고 유전자 전달체의 물리화학적 인자인 입자 크기, 표면 전하, 특이적 리간드(ligand)의 결합을 쉽게 조절할 수 있고 면역반응이 적게 일어나는 장점을 가진 반면 유전자 발현 효율이 바이러스성 벡터에 비해 낮고 유전자 발현이 단기적으로 일어난다는 단점을 가지고 있다.[3] 비바이러스성 전달체는 리포솜을 이용한 리포플렉스(lipoplex)와 양이온성 고분

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

자를 이용한 폴리플렉스(polyplex) 운반체로 분류할 수 있다.[4,5]

본 연구에 사용한 물질은 비바이러스성 전달체의 유전자 발현 효율을 높이고 발현성을 지속시키며 체내에 전혀 독성을 일으키지 않는 양이온성 천연고분자인 키토산을 사용하였다. 키틴은 *N*-아세틸-*D*-글루코사민이 β-(1,4)결합한 천연고분자이며 게나 새우 등의 갑각류, 오징어 등의 연체류, 곤충류 및 세균의 세포벽 등에 광범위하게 분포되어 있다. 키틴은 지구상에 존재하는 천연다당류 중에서 셀룰로오스 다음으로 많은 양이 존재하지만 물과 유기용매에 잘 용해되지 않기 때문에 그 용도가 한정되어 있다.[6] 키토산은 키틴을 농축 알칼리로 처리하여 얻어지는 물질로서 *D*-글루코사민이 β-(1,4) 결합을 하고 있으며 2번 탄소 위치에 아민기를 가지고 있는 천연고분자이다. 키토산은 독성이 없어서 생체적합하며, 생체분해가 잘 된다는 특징이 있으며 또한 면역거부 반응이 없다는 장점을 가지고 있어 생체 재료로 사용하기에 매우 적합한 조건을 나타낸다. 그러나 키토산은 아세트산 염산 등의 묽은 산을 포함한 수용액에 잘 용해되기 때문에 지금까지는 주로 공업용으로 이용하려는 연구가 대부분이었으나,[7-9] 키토산은 생리 활성물질로 면역활성,[10] 콜레스테롤 저하작용,[11] 및 상처치유작용 등과[12] 같은 생체 기능성이 있기 때문에 건강식품, 식품보존제, 식물의 생장촉진제 및 인공피부 등으로 이용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 따라서 기존의 키토산을 수용액에 가용화하는 기술을 개발하는 것이 키토산을 생체재료로 이용하기 위한 가장 중요한 문제라고 할 수 있다.

본 연구에서는 이러한 목적으로 제조된 유리 아민기(free-amine group)를 가진 저분자량 수용성 키토산(low molecular water soluble chitosan, LMWSC)을[13,14] 이용하여 생체 적합하고 체내 독성이 전혀 없는 유전자 전달체로서의 가능성을 확인하고자 하였다. 본 실험을 위하여 수용성 비타민으로서 폴레이트(folate) 수용체(receptor)에 의해 엔도사이토시스(endocytosis) 과정으로 세포내에 흡수될 수 있는 folic acid(FA)를 LMWSC에 복합화함으로써 특정 조직을 표적할 수 있는 유전자 전달체를 제조하고자 하였다. FA는 엔도사이토시스를 매개해주는 폴레이트 리셉트(folate receptor)을 거쳐서 종양을 표적하기 위해 주로 사용되어지는 리간드로서, 인간 종양 조직의 표면에 풍부하게 발현되어지는 것으로 알려져 있으나, 정상 조직에는 아주 작게 분포하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 FR은 선택적으로 종양 조직에만 특이적인 수용체일 뿐만 아니라 가장 적합한 종양 마커(marker)로서의 역할을 제공한다.[15-17] 이러한 FA의 장점을 이용해서 FA가 복합화된 LMWSC 나노입자(water soluble chitosan-folic acid nanoparticle, WSCFA)를 제조하였고 또한 LMWSC의 양전하와 DNA의 음전하에 의해 형성된 복합체(complex)를 이용하여 유전자를 세포내로 안전하게 전달시켜 유전자 발현 효율을 높인 유전자 전달체를 개발함으로써 효율적인 항암 치료를 위한 유전자 치료의 계기를 마련하고자 하였다.

실 험

시약 및 재료. 본 연구에 사용된 시약 LMWSC(분자량 10 kDa, 탈아세틸화도 97%)는 (주)키토라이프에서 제공받았다. Folic acid (FA)는 Sigma-Aldrich(approx.98%)를 사용하였고, EDC(Sigma chemical co. FW : 191.7)를 사용하였다. 그리고 용매는 DMSO (Junsei chemical co. 99%)를 사용하였다. Agarose와 Ethidium bromide는 Promega 사에서 구입하였고, 이 실험에 사용된 DNA는 pEGFP-N1이며, 세포주는 293T 세포로 American Type Culture Collection(Rockville, MD)에서 분양받아 사용하였다. Fetal bovine serum(FBS)은 Hyclone 사에서 구입하였고, Penicillin-streptomycin, 0.25%(w/v) Trypsin EDTA 용액, Dulbecco's modified 3-4[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT), Eagle's medium(DMEM)은 Sigma (St. Louis, MO)를 사용했다. 나머지 기타 용매 및 시약은 정제된 1급 시약을 사용하였다.

WSCFA의 합성. 먼저 LMWSC(10K) 50 mg을 증류수(1 mL)에 녹인 후 DMSO(10 mL)를 첨가하여 실온에서 교반하였다. LMWSC(10K) 50 mg에 대한 FA를 몰비 3, 5, 10, 15%와 각 FA에 대한 몰비 1.2배의 EDC를 상온의 암실에서 1시간 동안 DMSO(2 mL)에 넣어 용해하였다. LMWSC 용액에 FA-EDC 용액을 천천히 첨가한 후 상온의 암실에서 하루정도 교반해준다. 그 후에 햇빛을 차단한 상태에서 증류수로 4일간 투석해주고 용액을 3일 동안 동결건조함으로써 WSCFA를 얻었다.

적외선 분광학 측정. WSCFA의 합성여부를 확인하기 위하여 FT-IR spectroscopy(Shimadzu, FT-IR 8700, Japan)로 분석하였다. 상온의 암실에서 3일정도 동결건조를 시킨 혼합물질을 KBr과 WSCFA 혼합비 100 : 1로 약 10분간 혼합하여 투명한 펠렛을 제조한 후, 60 ℃에서 12시간 동안 감압하여 수분을 제거하고 FT-IR spectroscopy로 측정하였다.

핵자기공명 측정. WSCFA의 합성여부를 확인하기 위해 ^{1}H-NMR (Bruker AVANCE 400, Germany)로 측정하였다. FA와 LMWSC는 NMR 용매인 D_2O를 사용하여 측정하였다.

WSCFA의 나노입자 크기와 투과전자현미경 측정. WSCFA의 나노입자 크기는 동적 광산란(dynamic light scattering, DLS)을 이용해서 측정하였고 DLS는 ELS-8,000 electro phoretic LS Spectrophotometer(Otsuka Electronics Co., Japan)를 사용했다. 그리고 WSCFA 나노입자의 표면형태는 전자투과현미경(transmission electron microscope, TEM, JEOLJEM-2000 FX-II)을 이용하여 측정하였다. 나노입자 용액에 phosphotungstic acid 0.01%를 첨가하여 카본 필름으로 코팅된 TEM grid 위에 적하하여 건조시킨 후 측정하였다.

WSCFA-DNA 복합체 제조 및 전기 영동. DNA와 WSCFA가 복합체를 형성하기 위하여 DNA와 WSCFA의 무게비를 각각 1 : 1, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 12로 혼합한 다음 e-tube에 증류수와 함께 넣고 60초 동안 vortexing 하였고, 복합체 형성 유무를 확인하기 위하여 전기영동장치(gel electrophoresis)를 이용하여 gel retardation assay를 수행하였다. 사용된 gel은 1% Agarose이며 30분간 100 V 전압으로 측정하였다.

WSCFA-DNA 복합체의 독성 확인. 먼저 제조된 DNA/WSCFA 복합체의 세포 독성 유무를 확인하기 위해 293T 세포를 사용하였고, 293T cell은 FBS 10% 함유된 DMEM medium 상태에서 CO_2 농도가 5%이며 온도가 37 ℃인 incubator에서 배양하였다. 96 well plate에 1×10^4 cells/well 농도로 세포를 seeding한 후, 하루 동안 incubator에서 배양하였으며, 이미 제조된 복합체를 최종

농도 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 mg/mL로 첨가한 후, 2, 3, 5일 간격으로 MTT assay를 수행하였다.

유전자 발현효율. 5% CO_2에 37 ℃로 유지된 incubator에서 10% FBS와 항생제가 들어있는 DMEM 배양액에 인간 배아신장 세포(HEK-293)를 배양시킨 후 24 well plate에 세포를 4×10^4 cells/well로 seeding후 24시간 배양하였다. pH 6.2와 7.0 분류하여 DMEM(+) 배양액으로 갈아준 후, 각 무게비로 계산된 복합체 용액을 각 well에 첨가하고 4시간 동안 배양한 다음 pH 6.2 well의 배양액을 pH 7.0 DMEM(+)으로 갈아주었다. 그 후 3일간 세포의 전이를 관찰하였다.

결과 및 토론

WSCFA의 합성 및 분석. 본 연구에서는 Figure 1에서와 같이 LMWSC의 아민기와 FA의 카복실기를 EDC 반응을 이용하여 FA가 3, 5, 10, 및 15% 치환된 WSCFA를 각각 제조하였고, 유전자 전달체로서의 가능성을 확인하고자 하였다. Figure 2는 제조된 WSCFA 3, 5, 10, 및 15%의 FT-IR 스펙트럼 결과를 나타낸 것이다. Figure 2에서 보는 바와 같이 LMWSC의 아민기와 FA의 카복실기가 아미드 결합을 함으로써 1650 cm^{-1} 부근에서 아미드 I의 특성 피크가 증가하고 아미드 II 피크가 감소함을 알 수 있다. Figure 3은 제조된 WSCFA 3, 5, 10, 및 15%의 ^{1}H-NMR 스펙트럼을 나타낸 결과이다. ^{1}H-NMR 스펙트럼에서 LMWSC의 1번 탄소에 결합되어 있는 수소가 4.3 ppm에서, 2번-C의 수소가 2.6 ppm, 그리고 3.4~3.1 ppm에서 3~6번-C의 수소가 나타남을 확인하였으며, FA의 특성 피크로써 7.3 ppm에서 7번-C의 수소, 3.6 ppm에서 8번-C의 수소, 6.1 ppm에서 9~10번-C의 수소, 6.4 ppm에서 11~12번-C의 수소, 그리고 3.1 ppm에서 13번-C의 수소가 확인됨으로써 WSCFA의 합성을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로부터 FT-IR과 ^{1}H-NMR을 측정하여 LMWSC의 특

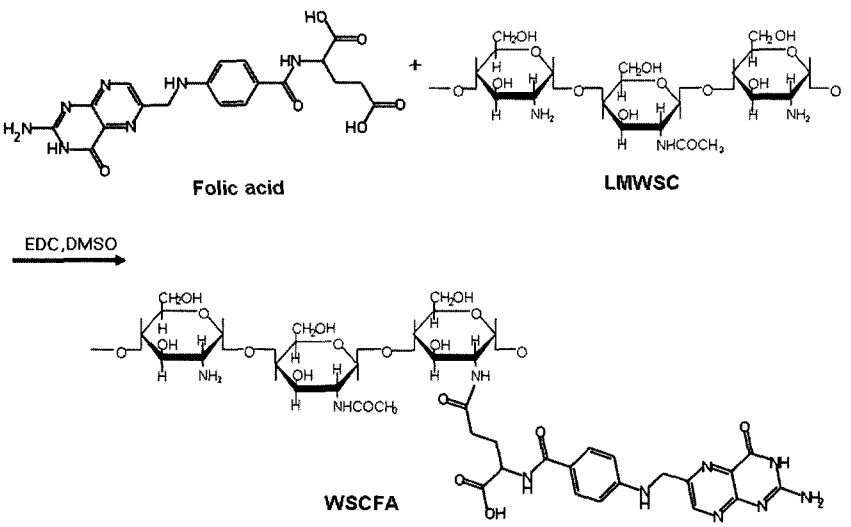


Figure 1. Scheme of nanoparticle for formation based on WSCFA.

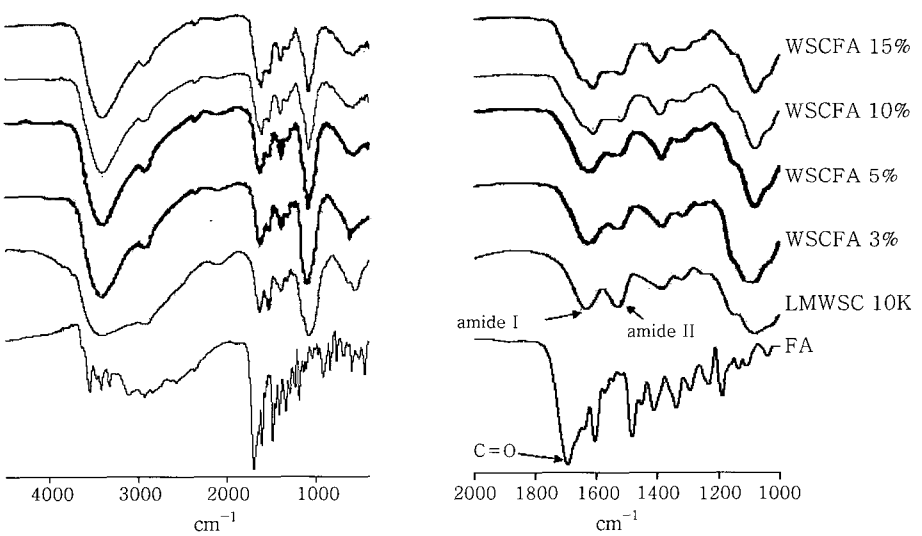


Figure 2. FT-IR spectroscopy of WSCFA nanoparticles.

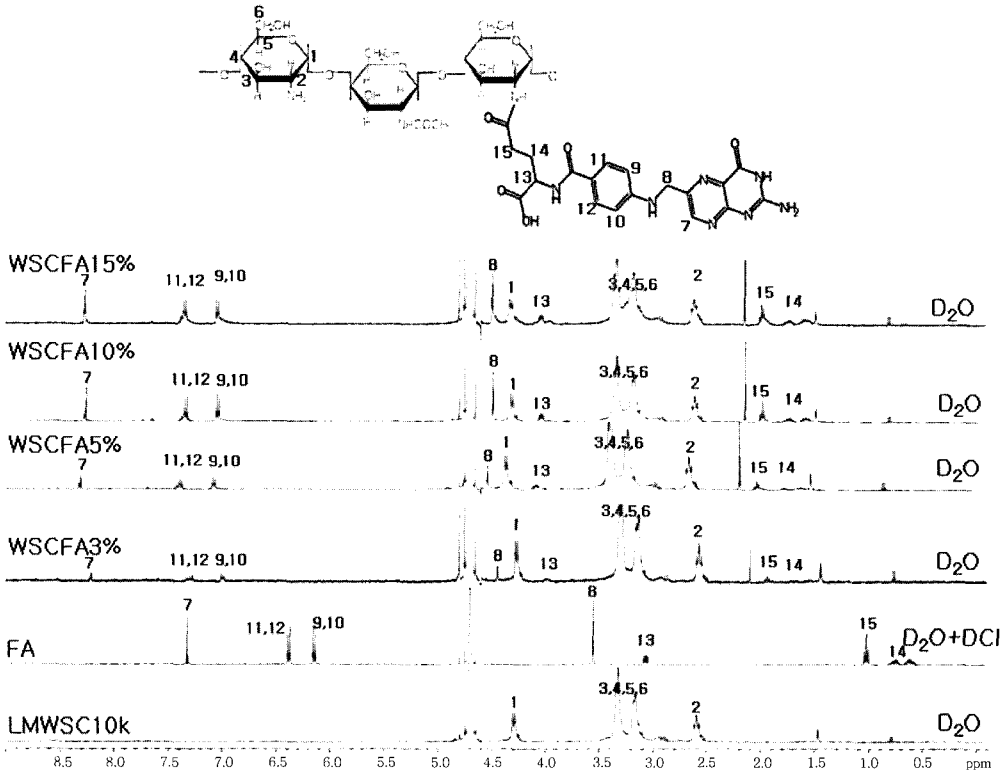


Figure 3. ^{1}H-NMR spectra of WSCFA nanoparticles.

성 피크를 확인하였고, FA의 치환정도가 증가할수록 1550 cm^{-1}에 나타나는 아민기의 특성 피크가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 FA가 LMWSC의 아민기에 치환됨으로써 유리아민(free-amine)기가 전체적으로 줄어들기 때문에 나타나는 현상으로 사료된다. 그러므로 FA의 카복실기와 LMWSC의 아민기가 결합함으로써 새로운 아미드 I이 형성되었다는 것을 확인하였다. ^{1}H-NMR 측정결과 WSCFA에서 2.5 ppm에 있는 수소의 면적비와 1.5 ppm에 있는 키틴의 아세틸기 수소의 면적비를 이용하여 본 연구에서 사용한 LMWSC의 탈아세틸화도(degree of deacetylation, DDA (%))가 96%임을 확인하였고, 2.5 ppm과 1.5 ppm에 있는 LMWSC의 수소에 대한 면적비와 8.4 ppm에 있는 FA의 수소 면적비를 이용하여 치환도(degree of substitution, DS(%))를 계산하였고, 결과로써 각각 2, 4, 9, 및 13%임을 확인하였으며, 결과는 Table 1에 나타내었다.

WSCFA-DNA 복합체의 특성. WSCFA의 경우 분자 내에 친수성을 나타내는 LMWSC와 소수성을 나타내는 FA가 함께 공존하는 양친성(amphiphilic) 물질의 특성을 나타내게 된다. 소수성기와 친수성기를 모두 갖는 양친성 물질은 수용액 상에서 미셀이나, 입자를 형성할 수 있다는 독특한 특성 때문에 생명공학이나 의학 분야에 다양하게 응용이 되어 진다. 소수성 그룹은 물에 대한 낮은 용해도와 물에 용해되지 않는 부분의 소수성 결합을 형성하기 때문에 양친성 물질은 수용액에서 소수성 core와 친수성 shell의 형태를 갖는 자기회합체를 형성하게 된다. 특히 양친성 고분자 미셀은 소수성 core에 유전자 치료제를 담지할 수 있음으로 생체 내에서 유전자 전달체로 활용가치가 매우 높은 물질이다. 본 연구에서 제조한

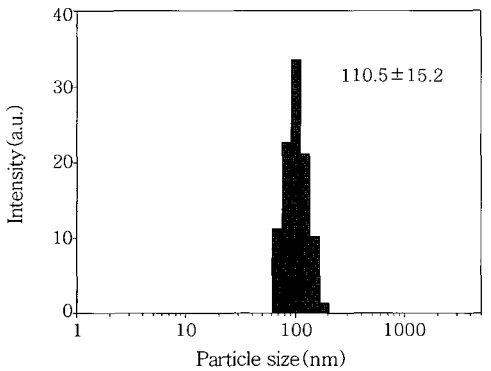
Table 1. Characterization of WSCFA

Samples	DDA[b]	DS[c]
WSCFA 3%[a]	96.38%	2.48%
WSCFA 5%	96.29%	4.20%
WSCFA 10%	96.33%	9.22%
WSCFA 15%	96.12%	13.74%

[a]LMWSC conjugated FA 3%. [b]Degree of deacetylation, calculated from ^{1}H-NMR data of WSCFA. [c]Degree of substitution, calculated from ^{1}H-NMR data of WSCFA.

WSCFA도 수용액 하에서 소수성 결합을 통하여 자가응집의 형태로 나노입자를 형성하였으며, 이 나노입자의 크기 및 분포는 동적광산란(DLS)으로 측정하였고 입자의 이미지를 투과전자현미경(TEM)으로 관찰하였다. Figure 4(a)에서 DLS로 측정한 나노입자의 크기는 110 nm 정도이고 입자의 크기가 고르게 분포되었음을 알 수 있는 좁은 분포도를 확인하였다. 그리고 Figure 4(b)에서 TEM으로 WSCFA의 표면형태를 확인한 결과 100 nm 정도의 표면이 매우 매끄러운 구형의 나노입자를 확인함으로써 DLS 측정결과와 거의 일치함을 알 수 있었다. 이러한 결과로 WSCFA가 100 nm 정도의 나노입자를 형성함으로써 유전자 전달체로서의 높은 응용 가능성을 확인하였다.

전기영동 분석. WSCFA와 DNA의 복합체 형성 유무를 확인하기 위하여 전기영동 분석을 수행하였다. Figure 5에서 복합체가 형성되지 않은 naked plasmid DNA는 정상적인 이동성을 나타내었으나, WSCFA-pDNA 복합체의 무게비 1 : 1를 제외한 그 이상인 1 : 4, 1 : 8, 1 : 12의 무게 비에서는 복합체가 완전히 형성됨으로



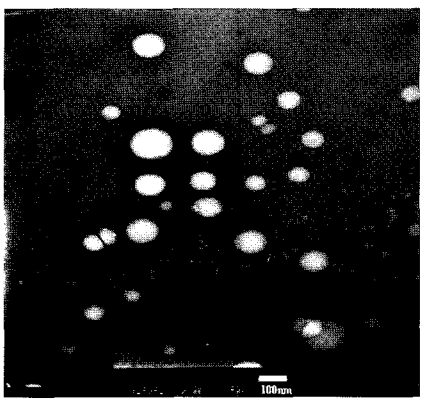


Figure 4. Particlesize & TEM photograph of WSCFA(10%).

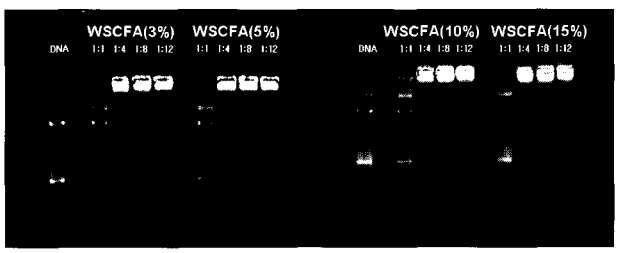


Figure 5. Gel Retardation Assay(WSCFA-DNA complex).

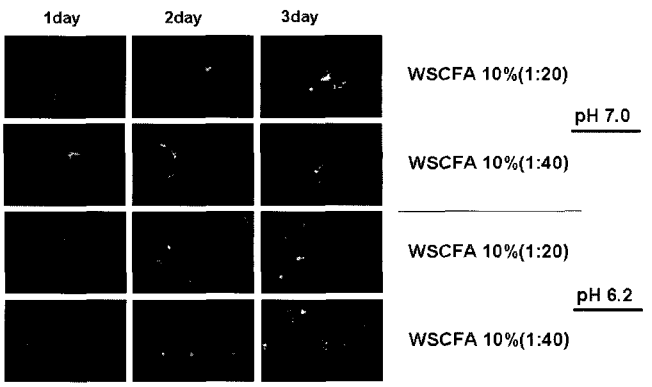


Figure 6. Transfection of WSCFA-pEGFP plasmid DNA complex.

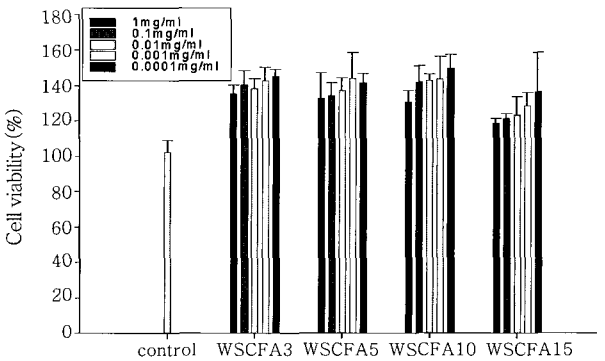


Figure 7. Cell viability of HEK 293T cell with WSCFA nanoparticles.

써 DNA의 이동성이 완전히 지연되어 나타나는 것을 확인함으로써 낮은 무게비에서 WSCFA에 의해 DNA가 복합체를 형성할 수 있음을 확인하였다. 음이온성의 pDNA와 복합체를 형성하기 위해서는 양이온성의 WSCFA와 DNA의 무게비가 1 : 4 이상임을 알 수 있었다.

WSCFA-pEGFP Plasmid DNA 복합체의 전이효율. Figure 6은 293T 세포에 대한 세포전이 효율을 평가하기 위하여 pH 6.2와 7.0 DMEM(+) 배양액에 인간 배아신장세포(HEK-293)를 배양 후 WSCFA와 pDNA 무게비(1 : 20, 1 : 40)로 복합체를 형성하여 실험한 결과 시간이 지날수록 유전자 발현효율이 높아지며 pH 6.2에서 1 : 40일때 유전자 발현효율이 가장 높게 나타남을 알 수 있었다. 먼저 무게비가 1 : 20 보다 1 : 40이 더 높은 발현효율을 나타낸 것은 양이온의 전하를 가진 LMWSC의 양이 많을수록 세포 표면의 음전하와의 강한 상호작용에 의해 세포내로 훨씬 더 많은 양의 복합체가 흡수될 수 있기 때문인 것으로 사료된다. 또한 pH 6.2에서 배양했을 때 pH 7.0보다 유전자 발현효율이 더 높게 나타난 것을 확인할 수 있었는데 이것은 일반적으로 키토산의 pKa 값이 6.3 정도임을 감안할 때 낮은 pH에서 LMWSC가 강한 산성을 나타내며 따라서 훨씬 더 안정한 복합체를 형성할 수 있기 때문이다.

세포 생존율. Figure 7은 양이온성 비바이러스성 벡터인 WSCFA의 세포 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT 실험을 하였다. WSCFA 3, 5, 10, 15% 모두 세포 생존율이 대조군보다 높은 결과를 나타냈으며, 최종농도가 낮을수록 세포 생존율이 높다는 것을 알 수 있다. 이 결과로부터 본 연구에서 제조한 유전자 전달체로서 WSCFA는 인체 내에 독성을 나타내지 않는 안전한 유전자 전달체로서의 가능성을 확인하였다.

결 론

본 연구에서는 특정 세포의 표적성을 높이고 유전자 발현효율을 향상시키기 위한 유전자 전달체로서 FA의 카복실기와 LMWSC의 아민기를 결합하여 WSCFA를 제조하였다. WSCFA의 입자크기를 측정한 결과 110 nm 정도이고, 입자형태는 구형의 나노입자를 DLS와 TEM으로 확인하였으며, 이러한 결과로 인체 내의 유전자 전달체로 사용할 수 있는 크기에 대한 적합성을 확인할 수 있었다. FT-IR 스펙트럼에서는 FA의 카복실기와 LMWSC의 아민기를

합성하여 1550 cm^{-1}에 나타나는 아미드 I 피크가 증가하는 반면, 아민기의 특성 피크가 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과로부터 FA의 카복실기와 LMWSC의 아민기가 결합함으로써 새로운 아미드 I 결합이 생성되었음을 확인하였다. ^{1}H-NMR 스펙트럼에서는 FA와 LMWSC 각각의 특성 피크를 확인하였고 WSCFA의 탈아세틸화도(DDA)는 96%이고, 치환도(DS)는 각각 2, 4, 9, 및 13%임을 확인하였다. 그리고 전기영동을 측정한 결과 WSCFA-pDNA 복합체의 무게비 1 : 4 이상에서 복합체가 완전히 형성됨을 확인할 수 있었다. 유전자 발현효율을 알아보기 위해 WSCFA와 pDNA 무게비(1 : 20 및 1 : 40)로 복합체를 형성하여 실험한 결과, pH 6.2에서 1 : 40일 때 유전자 발현효율이 가장 높게 나타났다. 그리고 무게비가 1 : 20보다 1 : 40이 더 높은 발현효율을 나타냈으며, pH 7.0 보다 6.2에서 유전자 발현효율이 더 높게 나타난 것을 확인할 수 있었다. WSCFA의 독성실험 결과 독성이 없음을 확인하였다. 이상의 결과로부터 WSCFA는 유전자 전달체로서의 가능성을 입증하였다.

감사의 글 : 본 연구는 산학협동재단(2007)과 중소기업청(2007)의 재정적 지원으로 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. R. S. Kevin, *Gene Ther.*, **34**, 247 (2003).
2. E. Marshall, *Science*, **269**, 1050 (1995).
3. K. Morimoto, M. Nishikawa, S. Kawakami, T. Nakano, Y. Hattori, S. Fumoto, F. Yamashita, and M. Hashida, *Mol. Therpy*, **7**, 254 (2003).
4. M. D. Brown, A. G. Schatzlein, and I. F. Uchegbu, *Int. J. Pharm.*, **229**, 1 (2001).
5. C. Y. Choi, M. K. Jang, and J. W. Nah, *Polymer(Korea)*, **30**, 279 (2006).
6. R. A. A. Muzzarelli, *Natural chelating polymers*, Pergamon Press, Oxford, p 83 (1973).
7. C. J. Brine, P. A. Sanford, and J. P. Zikakis, *Advances in Chitin and Chitosan*, Elsevier Applied Science, London, p 30 (1992).
8. G. Skjak-Braek, T. Anthonsen, and P. Sanford, *Chitin and Chitosan*, Elsevier Applied Science, London, p 30 (1989).
9. C. H. Kim, H. S. Park, Y. J. Gin, Y. Son, S. H. Lim, Y. J. Choi, K. S. Park, and C. W. Park, *Macromol. Res.*, **12**, 367 (2004).
10. Y. Shigemasa, H. Sashimoto, and I. Azuma, *Chitin Derivatives in Life Science*, Japanese Society for Chitin/Chitosan, p 86 (1992).
11. I. Ikeda, M. Sugano, K. Yoshida, E. Sasaki, Y. Iwamoto, and K. Hatano, *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 431 (1993).
12. R. A. A. Muzzarelli, C. Lough, and M. Emanuelli, *Cabohydr. Res.*, **8**, 433 (1987).
13. M. K. Jang, Y. I. Jeong, C. S. Cho, S. H. Yang, Y. E. Kang, and J. W. Nah, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **23**, 914 (2002).
14. J. W. Nah and M. K. Jang, *J. Polym. Sci.; Part A: Polym. Chem.*, **40**, 3796 (2002)
15. P. Caliceti, S. Salmaso, A. Semenzato, T. Carofiglio, R. Fornasier, M. Fermeglia, M. Ferrone, and S. Pricl, *Bioconjugate Chem.*, **14**, 899 (2003).
16. S. Wang, R. J. Lee, C. J. Mathias, M. A. Green, and P. S. Low, *Bioconjugate Chem.*, **7**, 56 (1996).
17. K. M. Kamruzzaman Selim, J. H. Lee, S. J. Kim, Z. Xing, and I. K. Kang, *Macromol. Res.*, **14**, 646 (2006).