

동결 건조법을 이용한 레트로바이러스 저장의 안정화에 미치는 trehalose의 영향

조수현, 김병기

서울대학교 공과대학 생물화학공학 협동과정,
서울대학교 유전공학연구소 분자생물공학 및 생물신소재 실험실
전화 (02) 880-7528, FAX (02) 874-1206

Abstract

We investigated the effect of various additives on the freeze-drying efficiency of recombinant retrovirus. Trehalose was the more effective protectant compared with sucrose or glucose and the optimize trehalose concentration was 300 mM. To improve the effect of trehalose, trehalose-polymers mixtures were tested as protectants so that Poly(vinylpyrrolidone)(PVP) improved the recovery yield slightly, but dextran and Poly(ethyleneglycol)(PEG) showed a negative effect.

서론

유전자 치료법이란 DNA 재조합 방법을 이용하여 정상적인 기능을 갖는 유전자를 환자의 세포 내로 주입, 유전자 결함을 교정시켜 유전병이나 암 등의 병을 치료하는 기법이다. 유전자 치료에 가장 많이 사용되고 있는 유전자 전달체중 하나로 레트로바이러스를 들 수 있는데 이는 다른 전달체에 비해 동물세포에서 유전자가 안정하게 삽입, 발현되어 최근 치료용 목적으로 많이 사용되고 있다. 레트로바이러스를 유전자 치료법의 전달체로 사용하려는 요구가 증가하는 현실에 비추어 볼 때 레트로바이러스의 대량 생산연구와 더불어 생산된 레트로바이러스의 실활을 최소화할 수 있는 효율적이고 경제적인 보관기법이 요구되고 있다. 그러나 생산된 레트로바이러스를 액체 상등액 상태로 -70°C 에서 보관하는 종전의 방법은 대량의 보관이 힘들고 특히 상업적인 약품으로 이용하기 위해서 이를 운전하기 어려울 뿐만이 아니라 이를 필요로 하는 곳으로 운반하기도 매우 까다로운 면이 있는데 반해 동결 건조법의 경우 이들 단점을 극복 할 수 있겠다. 하지만 레트로바이러스가 동결 건조공정을 거치는 동안 안정성이 떨어져 이를 보관하는 방법이 필요하게 되었다. 따라서, 종전의 단백질 동결 건조에 이용되는 여러 가지 당을 비롯한 고분자 물질들을 사용하여 레트로바이러스의 freezing이나 dehydration 과정동안 발생하는 실활을 최소화하는 연구를 수행하게 되었다.

재료 및 방법

레트로바이러스의 생산을 위해서 CRIP/MFG-LacZ 세포를 사용하였고, 바이러스 정량을 위한 감염세포로는 NIH-3T3를 사용하였다. 세포의 계대 배양을 위하여 10%(v/v) calf serum이 포함된 DMEM을 사용하였고 5% CO₂와 37°C에서 배양하였다. 레트로바이러스를 생산하는 세포인 CRIP/MFG-LacZ 를 10% calf serum이 포함된 DMEM배지에서 confluence하게 배양하여 상등액을 얻기 24시간 전에 새로운 배지로 교환하고 상등액을 0.2 μ m pore sized cellulose acetate filter로 여과한 후, 즉시 -70°C에 보관하여 사용하였다.

레트로바이러스의 동결 건조시 레트로바이러스 20 μ l와 각각의 첨가물 20 μ l를 혼합해 준 후, -70°C에서 12시간 동안 동결시키고 4~6 Torr의 압력의 동결 건조기에서 24시간동안 건조시켰다.

동결 건조된 레트로바이러스의 활성을 측정하기 위하여 NIH-3T3를 24 well plate에 0.2-0.3 \times 10⁵ cell/mL의 농도로 접종하고 2일 후 PBS로 세척한 후, 10% calf serum이 포함된 DMEM배지로 rehydration시킨 동결건조 레트로바이러스와 polybrene 8g/ml이 포함된 새 배지 0.5 ml을 넣어주었다. 24시간 후, 0.5% glutaraldehyde용액으로 세포를 고정시키고 X-gal용액으로 염색한 후, 염색된 세포수를 측정하였다.

결과 및 고찰

동결 건조시 레트로바이러스의 활성을 유지시키기 위한 첨가물을 탐색하고자 효소나 단백질의 freeze-drying에 사용이 되고 있는 trehalose, sucrose, glucose를 동결 건조 과정동안 첨가하였다(Fig.1). 이 중 trehalose를 첨가한 경우 -70°C에 보관한 레트로바이러스와 비교하여 72%의 활성을 나타내었으며 첨가하지 않고 동결 건조시킨 경우와는 약 2배의 활성을 나타내었다. 첨가물들의 glass transition temperature(T_g)는 trehalose가 118°C로 가장 높은 값을 갖고 sucrose는 75°C, glucose는 32°C이다.¹ 일반적으로 분자량이 커질수록 T_g의 값이 커지는 경향이 있다. (T_g : glucose < sucrose < trehalose < PVP < dextran) Fig.1에서 보는 바와 같이 T_g의 값이 클수록 레트로바이러스의 활성도 높았다. 그러나 다른 연구에서 단백질이나 효소의 동결건조시 T_g값이 높은 고분자 물질인 PVP나 dextran같은 물질만을 첨가해 줄 경우 활성이 오히려 감소하는 경향을 보였다.² 고분자 물질은 비록 높은 T_g 값을 가졌지만 그들의 steric limitation 때문에 레트로바이러스와의 안정화에 큰 영향을 끼치지 못한다. 따라서 이 결과로 T_g와 더불어 건조 상태에서 당과 레트로바이러스간의 직접적인 상호작용이 레트로바이러스의 활성을 보존해 준

다는 것을 알 수 있었다. 따라서 trehalose와 높은 T_g 값을 갖는 분자량이 큰 protectant를 동시에 첨가하였을 경우¹, 레트로바이러스의 동결 건조 후 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 dextran, Poly (vinylpyrrolidone)(PVP), Poly(ethyleneglycol)(PEG)를 첨가해 보았다. (Fig. 2). Trehalose에 10% PVP를 첨가했을 때 trehalose만을 첨가하였을 경우와 비교하여 약 2%의 활성이 증가하였으나 그 이상의 농도에서는 오히려 활성이 감소하였다. PVP가 가장 좋은 활성도를 나타냈으나 trehalose에 비해 레트로바이러스의 활성에 큰 영향을 끼치지 못했고 다른 protectant의 경우 모두 trehalose보다 레트로바이러스의 활성에 저조함을 나타냈다. 이렇게 trehalose의 protectant로서 안정성을 확인한 후 레트로바이러스의 동결 건조시 이의 농도를 변화시켜 첨가해 주어 300mM일 때 가장 높은 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다 (Fig. 3). Trehalose가 동결 건조시 레트로바이러스의 안정성에 큰 역할을 하는 이유는 비슷한 분자량임에도 불구하고 sucrose보다 높은 T_g 를 가지고 있고 건조과정에서 물대신 단백질이나 인지질 막과 수소 결합을 대체하는 능력이 다른 당 보다 우수하기 때문이다.³ 레트로바이러스의 경우에서도 이탄당이 무정형 건조 상태의 레트로바이러스의 표면의 보호막 역할을 하여 안정한 수소결합을 함으로써 레트로바이러스의 표면의 envelope glycoproteins이나 phospholipid membrane envelope을 안정화시키는 역할을 하여 레트로바이러스의 활성을 보호하고 있는 것으로 보인다.⁴

전체적인 실험에서 -70°C 에서 저장한 경우 보다 동결건조법을 이용한 저장 방법이 활성도에 있어서 20% 정도 저조한 것을 볼 수 있다. 이는 저온에서의 냉동과 고압으로 탈수하는 과정에서 생기는 물리적, 화학적인 스트레스로 인한 실활 이라고 볼 수 있는데 이를 개선하기 위해 앞으로 freezing programming의 조절이나 건조 시 수분의 양의 최적화등 실험조건들을 보완한다면 이를 극복할 수 있을 것이다.

요약

레트로바이러스를 동결 건조과정에서 발생하는 물리적, 화학적인 스트레스로 인한 바이러스의 실활을 보완하기 위해 첨가하여 준 여러 가지 첨가물 중 trehalose가 가장 탁월한 protectant임을 알 수 있었고 최적 첨가농도는 300mM이었다. Trehalose의 역할을 보완하기 위하여 분자량이 큰 polymer들을 첨가 하였으나 trehalose만을 넣어 주었을 때 보다 poly(vinylpyrrolidone)(PVP)의 경우 큰 영향은 볼 수 없었고 dextran과 PEG를 첨가 하였을 경우엔 오히려 더욱 활성이 감소하였다.

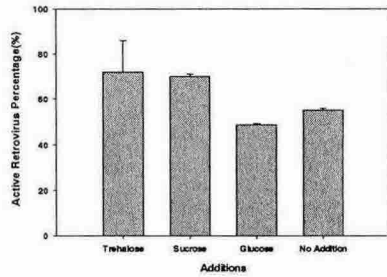


Fig.1 Percentage of active retrovirus obtained with diluted titer assay after lyophilization of retrovirus with 400mM trehalose, sucrose and glucose, and no addition. The control sample is a nondried retrovirus stored in -70°C .

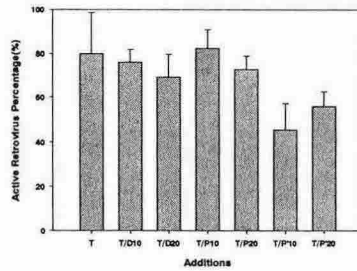


Fig. 2 Percentage of active retroviruses obtained with diluted titer assay after lyophilization of retrovirus containing variable additions with trehalose. The Control sample is nondried retrovirus stored in -70°C .
T: Trehalose 400mM, D10:10% dextran, D20:20% dextran, P10:10% PVP, P20:20% PVP, P'10:10% PEG, P'20: 20% PEG

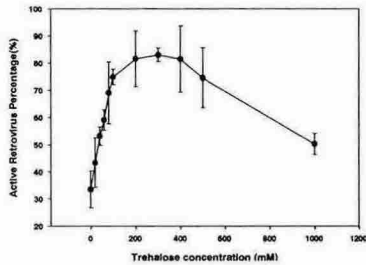


Fig 3. Percentage of active retroviruses obtained after lyophilization of retrovirus supernatant with variable trehalose concentration. The control sample is nondried retrovirus stored in -70°C .

참고문헌

- [1] Lynne S. Taylor and George Zografi, Sugar-Polymer Hydrogen Bond Interactions in Lyophilized Amorphous Mixtures, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1998, Vol. 87, No. 12, pp-1615-1621
- [2] Robert M. Bieganski, Alex Fowler, Jeffery R. Morgan, and Mehmet Toner, Stabilization of Active Recombinant Retroviruses in an Amorphous Dry State with Trehalose, *Biotechnol. Prog.*, 1998, Vol. 14, No 4, pp. 615-620
- [3] S. Dean Allison, Byeong Chang, Theodore W. Randolph, and John F. Carpenter, Hydrogen Bonding Between Sugar and Protein is Responsible for Inhibition of Dehydration-Induced Protein Unfolding, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1999, Vol. 365, No.2, pp.289-298
- [4] J.F. Carpenter, S.J.Prestrelski, T. J. Anchordoguy, and T. Arakawa, Interactions of stabilizers with proteins during freezing and drying, in *Formulation and Delivery of Protein and Peptides*, J.L. Cleland and R. Lauger, eds.) American Chemical Society Symposium Series, 1994, No. 567, pp. 134-147.