동결건조를 이용한 레트로바이러스의 저장 시 안정성에 미치는 인자에 관한 연구

조 수 형, 김 병 기

서울대학교 공과대학 생물화학공학 협동과정,

서울대학교 유전공학연구소 분자생물공학 및 생물신소재 실험실

전화 (02) 880-7528, FAX (02) 874-1206

Abstract

We studied to improve the stability of retrovirus during freeze-drying. Through selection of the additives, we chose the trehalose, trehalose-PVP colyophilized mixture which were most effective additive on retrovirus storage. Through thermal analysis by DSC, in case of adding trehalose, thermal change shift to 15°C from 10°C. As a result, we found it that Tg have important role to improve the stability of retrovirus. When retrovirus was storaged at the different temperature, the activity of freeze-dried retrovirus with trehalose sustained for 8 week below 4°C. But freeze-dried retrovirus without additives showed the activity less than 40% at all temperature.

서론

유전자 치료법의 전달체로 레트로바이러스를 사용하려는 요구가 증가하는 현실에 비추어 볼 때 [1] 레트로바이러스의 대량 생산연구와 더불어 생산된 레트로바이러스의 실활을 최소화할 수 있는 효율적이고 경제적인 보관기법이 요구되고 있다. 그러나 생산된 레트로바이러스를 액체 상등액 상태로 -80°C 에서 보관하는 종전의 방법 [2] 은 대량 보관이 힘들고 특히 상업적인 약품으로 이용하기 위해서 이를 취급하기 어렵기 때문에 동결 건조법을 이용하여 이들 단점을 극복 할 수 있겠다. 그러나 동결 건조시 물리화학적 스트레스가 발생하므로 [3] 레트로바이러스의 freezing 이나 dehydration 과정동안 발생하는 실활을 최소화하는 연구를 수행하게 되었다.

재료 및 방법

레트로바이러스의 생산을 위해서 유전자 재조합 된 ΨCRIP/MFG-LacZ 세포를 사용하였고, 바이러스 정량을 위한 감염세포로는 NIH-3T3 를 사용하였다. 세포의 계대 배양을 위하여 10%(v/v) calf serum 이 포함된 DMEM 을 사용하였다. 생산된 레트로바이러스의 동결 건조를 위해 -70°C 에서 12 시간 동안 동결시키고 4-6 Torr 의 압력의 동결 건조기에서 24 시간동안 건조시켰다. 동결건조한 레트로바이러스의 열적분석을 위해 자동액체질소냉각기를 가지고 있는 DSC 를 이용하였는데 우선 시료를 알류미늄 팬에 넣고 dry nitrogen purge 하에 열적분석을 하였다. 이때 heating rate 는 10°C/min 로 정하였다.

결과 및 고찰

동결건조시 레트로바이러스의 활성을 유지시켜주는 여러가지 첨가물 중 이탄당인 trehalose 의 첨가시 80%정도의 높은 활성도를 보였다. 이 현상으로 DSC 를 통해 첨가물을 넣어 준 경우를 열적분석을 해 보았다. Fig. 1(a)은 동결건조한 레트로바이러스의 열적 분석 데이터인데 5°C 정도부터 구조적인 변화가 시작된다. 레트로바이러스의 상등액은 혈청의 성분이 많기 때문에 저온에서도 급격한 구조적 변화가 있는 것을 알 수 있다. 반면 Fig. 1(b) 는 레트로바이러스를 동결건조시 Trehalose 를 넣어 준 경우인데 9°C 부터 열역학 적 변화가 시작되어 15°C 정도에서 전체적인 변화를 볼 수 있다. 이렇게 첨가물로 인한 열역학적 변화를 일으키는 온도의 상승은 trehalose 의 높은 Tg 의 영향인 것으로 보인다. 이런 Tg 의 상승이 레트로바이러스의 저장의 안정성을 높일 수 있다는 가정으로 Trehalose 에 190.28°C 의 높은 Tg 값을 가지는 고분자 물질, PVP 를 첨가하여 이것의 DSC 분석을 하였다. Fig. 1(c)에서 볼 수 있듯이 11°C 에서 열적 변화가 일어나 20°C 정도에서 전체적인 변화가 관찰되었다.

위의 실험을 바탕으로 여러가지 다른 온도에서 장기간 레트로바이러스를 저장 하므로써 첨가물의 영향을 알아 보았다. Fig. 2 에서 trehalose 를 넣어 준 경우 8 주 동안 4°C 에서 보관한 레트로바이러스는 60% 이상의 높은 활성도를 유지 하였는데 반하여 첨가하지 않은 레트로바이러스는 모든 온도에서 대부분 40% 미만의 활성

도를 유지하였다. 그러나 Trehalsoe & PVP 의 경우 trehalose 만을 넣어 준 경우와 별다른 차이가 없었다. 이것은 단지 Tg 만을 올리는 것이 활성을 유지하는 원인이 아님을 알 수 있었고 어느 정도 높은 Tg 를 가지며 또한 trehalose 와 같이 탈수 과정에서 물 대신 레트로바이러스의 표면과 수소결합을 대체할 수 있는 능력을 지니는 보호능력을 가져야지만 첨가물로써의 활성을 유지 할 수 있다는 것을 알 수 있었다. 이것으로 종전의 방법인 액체 배지 상태로의 초저온 보관 보다는 trehalose 를 첨가하여 동결건조 한 후 보관하는 것이 경제적으로 효율적일 뿐만 아니라 장기간 보관도 더욱 유지되며 오염의 위험성으로부터도 더욱 감소시킬 수 있는 효과적인 방법임을 증명할 수 있었다.

요약

동결건조로 레트로바이러스를 저장 시 활성유지에 가장 좋은 첨가물로 trehalose , trehalose&PVP 를 첨가해 주었고 DSC 를 통해 열적분석을 하여 온도에 따른 레트로바이러스의 열적변화를 살펴 본 결과 첨가물을 넣어 준 경우 더욱 높은 온도에서 열적 변화가 있었다. 이것을 바탕으로 저장 온도에 따른 레트로바이러스의 활성유지를 조사하기 위해 다양한 온도에서 장기간 보관 한 결과 trehalose 를 첨가한 경우 4°C 의 온도 까지 애서도 8 주동안 60% 이상의 높은 활성을 유지하였고 trehalose&PVP 의 경우에도 비슷한 활성을 보였으나 첨가물을 넣지 않은 경우에는 모든 온도에서 40%미만의 낮은 활성도를 보였다.

참고문헌

1. Crystal, R. G., Transfer of genes to humans : early lessons and obstacles to success. *Science*, 1995, 270; 404.
2. Morgan, j. R., LeDoux, J. M., Snow, R. G., Tompkins, R. G., Yarmush, M. L., retrovirus infection ; Effect of time and target cell number, *J. Virol.*, 1995, 69; 6994.
3. Carpenter, J. H., Pikal, M. J., Chang, B. S., Randolph, T. W., Rational design of stable lyophilized protein formulations : some practical advice, *Pharm. Res.*, 1997, 14; 969.