

카테콜기가 도입된 헤파린의 표면고정화에 의한 아데노연관바이러스의 발현 억제에 관한 연구

도민재¹ · 이슬기림² · 장재형^{2†} · 이해신^{1†}

¹한국과학기술원 화학과, ²연세대학교 생명화학공학과
(2016년 12월 6일 접수, 2016년 12월 15일 수정, 2016년 12월 15일 채택)

Significant Attenuation of Adeno-associated Virus Gene Expression by Catechol-conjugated Heparin Surface Coating

Minjae Do¹, Slgirim Lee², Jae-Hyung Jang^{2†}, and Haeshin Lee^{1†}

¹Department of Chemistry, Korea Advanced Institute of Science and Technology (KAIST) 291 Daehak-ro,
Yuseong-gu, Daejeon 34141, Korea

²Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Yonsei University 50 Yonsei-Ro, Seodaemun-Gu, Seoul 03722, Korea
(Received December 6, 2016; Revised December 15, 2016; Accepted December 15, 2016)

요약: 일반적으로, 화학 물리적 변성이 수반되는 멸균방법을 적용하지 못하는 경우 필터여과에 의한 멸균 방법을 주로 사용한다. 하지만 바이러스의 경우 100 nm의 작은 크기로 인해 박테리아 제거에 사용되는 필터여과에 의한 멸균 방법을 적용하기가 어렵다. 본 논문에서는 화학 물리적 변성 없이 바이러스를 비활성화하는 물질 개발을 위하여, 카테콜기가 도입된 헤파린 고분자(Hep-C)를 합성하였다. Hep-C의 바이러스 비활성화 효과를 알아보기 위해서 표면이 노르에피네프린으로 코팅된 조직배양접시에 아데노연관바이러스(Adeno-associated virus; AAV)를 고정화하였으며, 그 위에 다시 Hep-C를 코팅하여 녹색형광단백질(GFP) 유전자를 전달할 수 있는 AAV의 비활성화 정도를 유세포분석기(FACS)를 이용하여 분석하였다. 그 결과 AAV에 Hep-C를 도포하면 99%에 달하는 비활성화 효과를 보였으며, 헤파린 고분자를 도포한 결과에 비해 강한 염 저항성을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 미루어 보아 제조된 Hep-C는 AAV 바이러스 제거의 효과적인 방법으로 충분한 가능성을 가짐을 증명하였다.

Abstract: In this study, natural polymer-based virus neutralizing agent was developed in an attempt to replace the conventional sterilization method for mammalian cell culture. A catechol conjugated heparin was synthesized by using EDC chemistry, and it show unique binding ability to virus which has heparin affinity (adenovirus, adeno-associated virus). To evaluate neutralization ability of catechol conjugated heparin, adeno-associated virus was used for test model, instead of using a pathogenic virus. The catechol conjugated heparin exhibited resistance to high concentration of salt and complete inactivation of adeno-associated virus. The result suggests that the catechol conjugated heparin, which is biocompatible and efficiency, may replace conventional sterilization method for mammalian cell culture.

Keywords: neutralization, adeno-associated virus, heparin, catechol

1. 서 론

최근 발발한 SARS, 조류독감 등과 같은 바이러스성 전염병의 전 세계적 유행으로 인하여 바이러스성 질환의 치료 및 멸균법에 대한 관심이 높아졌다[1-2]. 이러한 감염성 질환의 주요 원인 중 하나인 바이러스를

제거하기 위한 방법으로는 고온고압[3] 혹은 방사선을 이용한 물리적 멸균방법[4]과 가스[5] 혹은 화학물질 [6]에 의한 화학적 멸균방법이 존재한다.

이러한 멸균방법은 대상의 화학적 혹은 물리적 변성 및 손상이 필수적으로 동반되기 때문에 사용에 제한적이라는 단점이 존재한다. 특히 동물세포 배양 등에 있어서 이러한 변성을 피하기 위한 최선의 방법인 필터여과에 의한 멸균방법은 바이러스의 작은 사이즈에 의해서 효과가 없으며 특별한 형태의 멤브레인을

[†]Corresponding author: Haeshin Lee (haeshin@kaist.ac.kr)
Jae-Hyung Jang (j-jang@yonsei.ac.kr)

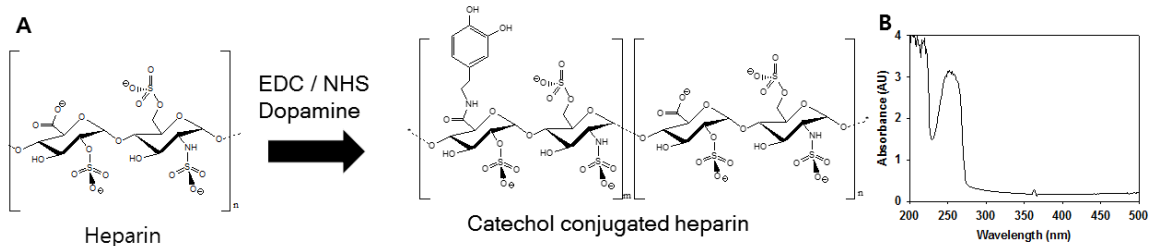


Figure 1. Synthesis of Hep-C and its UV-Vis absorbance spectrum. A. EDC/NHS reaction and molecular structure of Hep-C, B. UV-Vis absorbance spectrum of Hep-C.

제한적으로 사용할 수 있다[7]. 따라서 물리적 화학적 변성을 피해야 하는 물질, 장소 또는 동물세포배양액과 같은 외부환경 변화에 민감한 시스템 등에 적용할 수 있는 특정 바이러스에만 영향을 미치는 바이러스 비활성화 물질의 개발이 필요하다.

인체 주요 감염성 바이러스 중 한 종류인 아데노바이러스(adenovirus)와 병원성이 없는 바이러스인 AAV는 바이러스 표면에 헤파린 수용체가 존재하여 인체 내 세포막에 표지되어있는 헤파린과 결합하여 세포를 감염시킨다고 알려져 왔다[8-9]. 따라서 만약 일정 농도 이상의 헤파린이 adenovirus 및 AAV가 있는 용액에 존재하게 된다면, 바이러스 표면의 헤파린 수용체와 경쟁적으로 결합하여 바이러스의 세포감염 능력을 저하시킬 수 있다. 하지만 헤파린 친화 바이러스와 헤파린의 결합은 바이러스 표면에 양 전하를 가진 아민기와 헤파린의 설페이트기(sulfate)가 가진 음 전하의 정전기적 인력에 의한 가역적 결합으로, 공유결합과는 달리 그 효과가 영구적이지 못하며, 용액 내의 이온에 의해 그 결합이 분리되기도 한다[10]. 이러한 점 때문에 헤파린의 특성을 이용한 헤파린 친화 바이러스의 중화제(neutralization)의 개발은 아직까지 없었다.

헤파린과 헤파린 친화 바이러스 간에 추가적인 결합력을 높이기 위해서는 헤파린과 바이러스 간에 공유결합을 형성할 수 있는 가교제가 필요하다. 생체적 합성이라는 헤파린의 장점을 유지하고 바이러스에 대한 결합력을 높이기 위해서는 마찬가지로 생체적합성을 가지고 있는 또한 바이러스와 공유결합이 가능한 화학적 기능기를 헤파린에 도입하여야 한다. 여기에 홍합 접착 단백질의 접착에 관련된 카테콜기는 생체적합한 물질임과 동시에 알칼리 환경에서 아민기를 가지고 있는 펩타이드, 단백질 등과 공유결합을 형성하므로[11-12] 헤파린의 바이러스에 대한 결합력을 높이는데 적합한 특성을 가지고 있다. 특히, 최근 카테콜과 단백질의 아민그룹과의 반응을 체계적으로 본 연구에서는 카테콜이 단백질의 N-말단 아민그룹에 좀더 선택적으로 반응한다는 내용이 보고되었다[13]. 본 연구에서는 헤파린 친화 바이러스의 병원성을 연구하

제거하기 위해서 헤파린 고분자에 바이러스에 결합할 수 있는 홍합 유래 물질인 Hep-C를 합성하였다. 또한 Hep-C의 바이러스의 중화효과를 확인하기 위해서 병원성이 없으나 헤파린과 친화성이 있는 바이러스 종류 중 하나인 AAV를 실험 모델로 선정하였다. 이를 이용해서 Hep-C용액을 표면에 고정화된 AAV에 도포하여 바이러스의 활성을 측정하였다.

2. 실험

2.1. 시약

헤파린(Heparin sodium, 녹십자, 한국)은 사용하기 전 정제 후 사용하였다. 에틸다이메틸아미노프로필카보디이미드; EDC, 시그마알드리치, 미국), 하이드록시숙신아마이드(N-Hydroxysuccinimide; NHS, 시그마알드리치, 미국), 노르에피네프린(DL-Norepinephrine hydrochloride, 시그마알드리치, 미국), 도파민(Dopamine hydrochloride, 시그마알드리치, 미국), 염화칼슘(Calcium chloride, 시그마알드리치, 미국)은 추가 처리 없이 사용하였다. 세포실험 및 배양을 위해서 HEK293 (Stratagene, 미국) 및 AAV293 (Stratagene, 미국) 세포를 분양받았다. 돌벡코 변형 이글 미디어(Dulbecco's modified Eagle's medium; DMEM, Invitrogen, 미국), 소태아시럼(10% fetal bovine serum; FBS, Invitrogen, 미국), 페니실린(Penicillin, Invitrogen, 미국)을 세포 배양을 위해 구입하여 사용하였다.

2.2. Hep-C 합성

Hep-C를 합성하기 위해서 EDC/NHS 반응을 이용하였다(Figure 1A). 먼저 500 mg의 헤파린 고분자를 0.1 M의 pH 4.5의 MES 버퍼 50 mL에 용해하였다. 용해된 헤파린 고분자 용액에 헤파린 단위체 1몰당 1몰에 해당하는 도파민을 헤파린 용액에 넣고 1 h 동안 교반하였다. 그 후 헤파린 단위체 1몰당 1몰에 해당하는 EDC, NHS를 각각 10 mL의 DDW에 녹인 후 교반하였다. 상온에서 약 16 h 동안 교반한 후, 멤브레인 투석방법(MW cutoff = 4,000 Da)을 통해 반응하지 않은

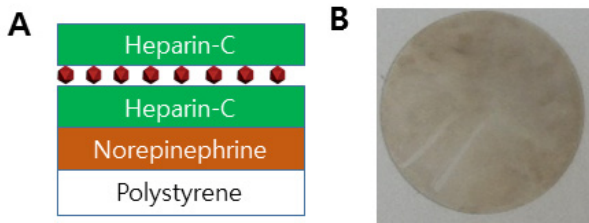


Figure 2. Illustration and photograph of modified surface. A. Illustration of norepinephrine, AAV, and Hep-C coated surface for AAV inactivation test (Red dot indicate AAV), B. Photograph of as-prepared surface.

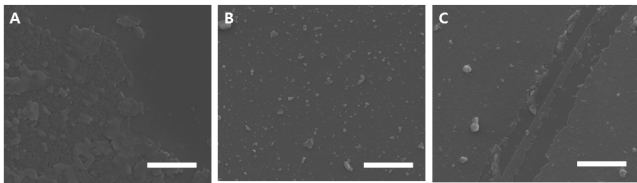


Figure 3. SEM image of surface coating. A. Norepinephrine coating B. Hep-C coating, C. AAV absorbed surface (Scale bar = 3 μm).

도파민, EDC, 그리고 NHS를 제거해 주었으며 동결건조를 통해 Hep-C만을 획득하였다. 획득한 Hep-C의 카테콜기 도입 비율은 15% 내외임을 UV-Vis 흡광도를 통해 측정하였다(Figure 1B).

2.3. AAV 비활성화 테스트

AAV 비활성화 효과를 측정하기 위한 테스트 표면을 준비하였다(Figure 2A). 세포 배양을 위해서 96 well cell culture plate를 기본 표면으로 선택하였으며, 우선 표면에 AAV를 흡착할 수 있도록 세포배양 접시에 pH 8.3의 15 mM Tris 버퍼에 녹아있는 노르에피네프린 0.2% (w/v)농도의 용액 100 μL를 넣은 후 37°C에서 12 h incubation 하였다. 노르에피네프린 코팅이 완료된 후 증류수로 표면을 washing 해주고, pH 8.3의 15 mM Tris 버퍼에 녹아있는 Hep-C 0.2% (w/v)농도의 용액을 100 μL 부어준 후 36°C에서 12 h 동안 incubation 하였다. 코팅이 완료된 후, DDW로 표면을 washing 해주고 이번에는 녹색형광 유전자를 발현하는 AAV를 $10 \times 10^8/\mu\text{L}$ 농도로 녹아있는 PBS 용액 100 μL를 부어준 후 12 h 동안 incubation 하였다. 그리고 incubation 후 표면을 증류수로 washing 해주고 각 조건에 따라서 PBS에 녹아있는 Hep-C 용액(0.2% (w/v))을 100 μL씩 부어주었으며 1 h 동안 상온에서 incubation하였으며 이러한 과정을 거쳐 준비된 표면은 카테콜기의 산화작용으로 인해 갈색의 색을 띤다 (Figure 2B). 준비된 표면의 코팅 정도는 각 단계마다 SEM이미지를 찍어서 확인하였으며(Figure 3) 코팅에

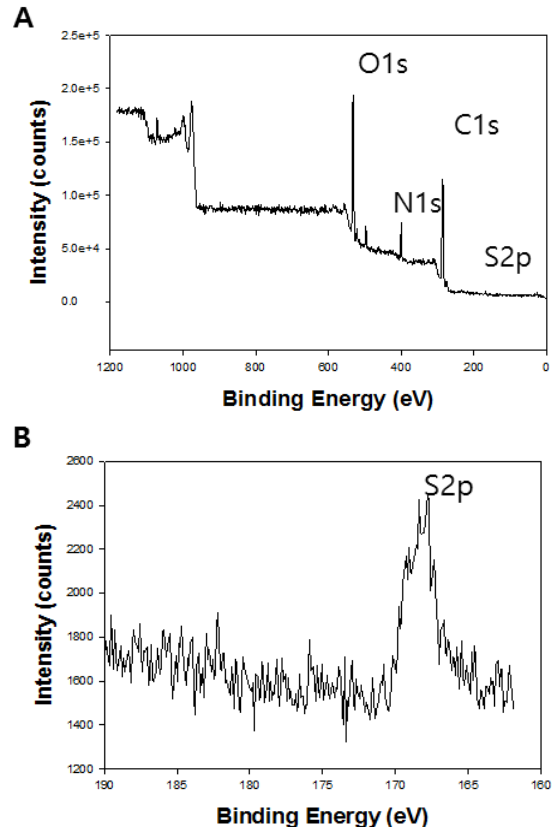


Figure 4. XPS data of Hep-C coating. A. Survey scanned XPS spectra of Hep-C coated surface, B. S 2p scan spectra of Hep-C coated surface.

따라 표면에 적층되는 것을 각 단계의 SEM 이미지에서 확인할 수 있었다. 그리고 코팅이 완료 후 XPS를 찍어보아서 glass에 없던 황원소가 코팅 후 검출되는 것으로 미루어 보아 코팅이 성공적으로 이루어졌음을 확인할 수 있었다(Figure 4).

3. 결과 및 토의

3.1. Hep-C의 AAV 비활성화 실험

Hep-C의 AAV 비활성화 정도를 측정하기 위해서 각각 노르에피네프린과 노르에피네프린 및 Hep-C로 표면 개질 처리된 세포배양접시에 AAV를 흡착된 군과 노르에피네프린 및 Hep-C로 표면 개질 처리된 세포배양접시에 AAV를 흡착 시킨 후, 다시 그 위를 0.2% (w/v) 농도의 Hep-C용액을 1 h 도포한 실험군에 HEK293 세포를 표면 위에 seeding하였으며, 대조군으로 아무런 처리를 하지 않은 배양접시에 HEK293세포 및 동량의 AAV를 함께 배양한 후 2일 및 6일 뒤 유세포분석기(Fluorescence activated cell sorter; FACS)를 통해 AAV에 의한 형광발현을 관찰하였다(Figure 5).

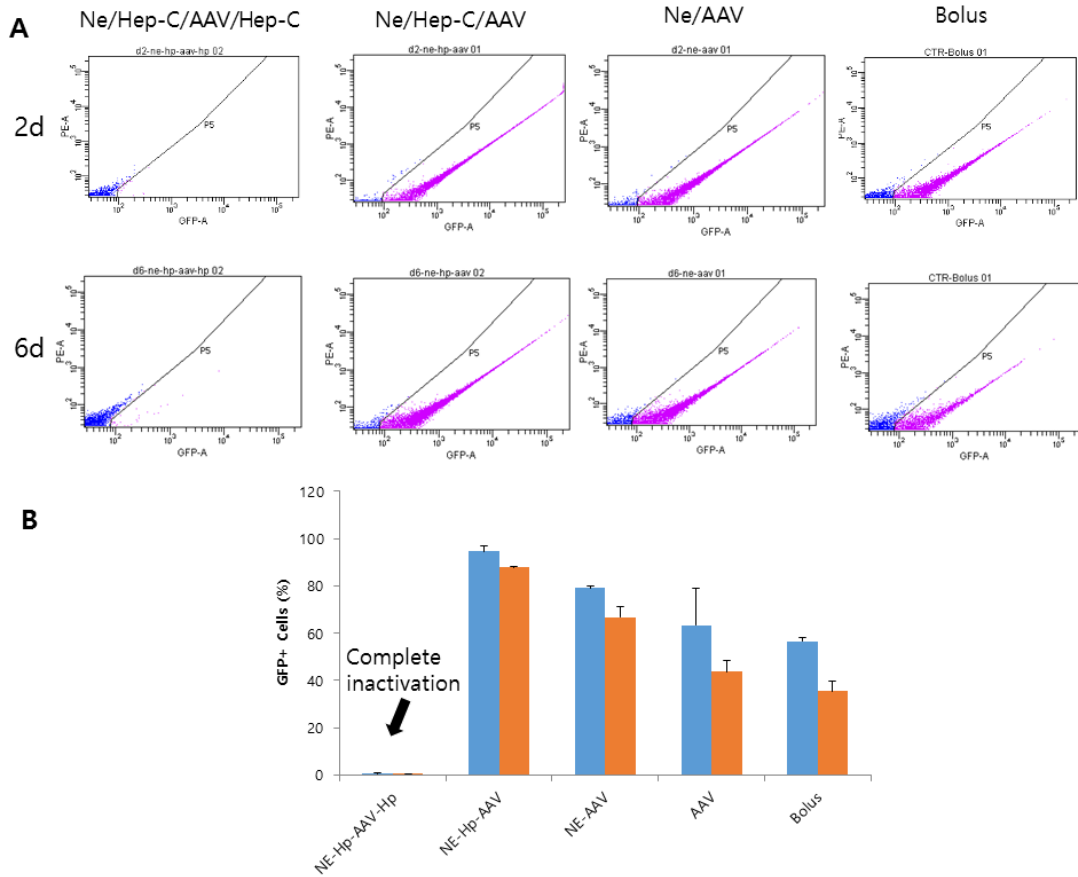


Figure 5. FACS analysis of transduction efficiency of AAV/Hep-C coated surface. A. Population graph of GFP positive cells (Blue : negative cells, Pink : GFP positive cells), B. Graph of GFP positive cells seeded onto AAV and Hep-C coated surface (Blue : 2 days after incubation, Orange : 6 days after incubation).

AAV가 HEK293 세포 내에 감염되어 표지인자인 GFP를 발현하는 세포들은 형광이 안 보이는 그룹 군에서 떨어져 나와 높은 녹색 형광을 보이는 그룹으로 분리되었다(Figure 5A). 이러한 녹색형광 발현은 AAV의 비활성화 효과가 클수록 떨어지게 되는데 흡착된 AAV에 따로 표면처리를 해주지 않은 군에서는 모두 30% 이상의 높은 발현을 보였으며, Hep-C를 처리해준 군에서는 1% 미만의 발현을 보여 급격하게 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 이를 그래프로 표현한 (Figure 5B)를 보면 좀 더 극명하게 알 수 있는데 Hep-C처리로 인해 표면에 흡착된 AAV가 Hep-C에 의해 encapsulation 되면서 HEK293 cell에 대한 활성을 잃어버렸기 때문으로 판단된다. 한 가지 흥미로운 사실은 일반적으로 AAV를 세포에 전달할 때 사용하는 방법인 주입 혼합(Bolus) 방법에 비해서 표면에 AAV를 고정시킨 2가지의 방법에서 높은 AAV 전달 효율을 보였는데, 이는 기존에 리포트되었던 표면 고정에 의한 AAV전달의 효율성 증대 효과로 보이며[14-15], 이는 적은 양의

유전자 전달체를 이용하여 균일한 수준의 유전자 전달 모델을 만들 수 있어 이러한 유전자 전달체 비활성화 실험에 적합한 실험 모델로 판단내릴 수 있다.

3.2. Hep-C 농도별 AAV 비활성화 정도 측정 실험

AAV의 활성화 정도를 저해하는 Hep-C의 최적 농도 조건을 찾기 위해서 표면 흡착된 AAV에 각 농도 조건별 Hep-C를 처리하는 실험을 수행하였다.

실험에서 노르에피네프린과 Hep-C로 개질된 표면에 AAV를 흡착시킨 후, 0 mg/mL (1st), 0.03 mg/mL (2nd), 0.125 mg/mL (3rd), 0.5 mg/mL (4th), and 2 mg/mL (5th)의 농도 조건의 Hep-C를 1 h 동안 가한 후, HEK293 cell을 표면 위에 seeding 한 후 48 h이 지난 후 GFP 유전자 발현 양상을 FACS를 통해 분석하였다(Figure 6). 그 결과 0.5 mg/mL 농도 이하로 표면 처리한 조건에서는 10% 내외의 HEK293 cell에서 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 Hep-C가 낮은 농도에서 AAV와 충분히 결합하지 못하여서 Hep-C의

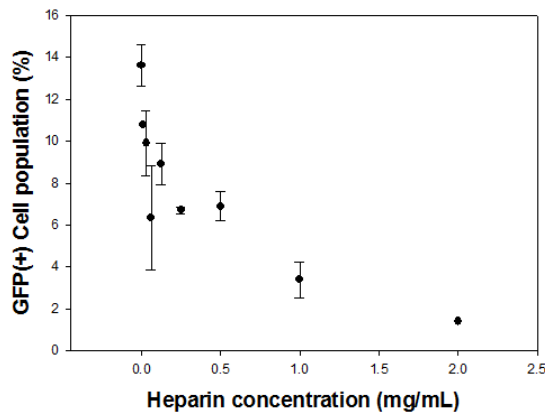


Figure 6. AAV inactivation rate with Hep-C concentration (Hep-C concentration 0.0, 0.1, 0.3, 0.6, 1.02, 0.25, 0.5, 1.0 mg/mL and 2.0 mg/mL).

영향을 받지 않은 AAV들이 HEK293 cell에 감염되어 형광이 발현되는 것으로 판단되며, 2 mg/mL 이상의 농도 조건에서 AAV에 감염되는 세포의 수가 1% 이내로 줄어드는 것을 확인하였다.

이 결과로 미루어 볼 때 유의미한 수준의 AAV의 비활성화를 달성하기 위해서는 최소 2 mg/mL 농도의 Hep-C 용액을 1 h 이상 가해주어야 한다는 사실을 확인할 수 있다.

3.3. 헤파린과 Hep-C가 처리된 AAV의 염처리 후 비활성화 정도 측정 실험

헤파린과 AAV 간의 상호결합은 이온과 경쟁적작용에 의해서 분리(dissociation)될 수 있다. 따라서 지속적인 비활성화 효과를 유지하기 위해서 헤파린과 AAV 간의 정전기적 인력 뿐만 아니라 추가적인 결합이 필요하다. 헤파린에 화학적으로 결합된 카테콜 기는 서론에서 언급한 바와 같이 단백질의 아민그룹과 공유결합을 형성하는 바, 비가역적으로 AAV 표면 단백질과 반응할 것으로 생각된다[12].

앞서 실험과정과 동일하게 노르에피네프린과 Hep-C로 개질된 표면에 AAV를 흡착시켰다. 이렇게 흡착된 AAV에 헤파린과 Hep-C 0.2% (w/v)농도의 용액을 1 h 동안 처리한 후 Heparin과 AAV 간의 인력을 끊을 수 있는 1 M 농도의 NaCl 용액을 처리해주었다. 그 후 HEK293 Cell을 표면 위에 seeding하고 48 h이 지난 후 유전자 발현 양상을 형광 현미경을 통해 관찰하였다 (Figure 7). 그 결과 비록 헤파린과 Hep-C 모두에서 AAV에 의해 형광이 발현된 세포들이 적었으나, 1 M 농도의 NaCl을 처리한 결과에서 헤파린을 처리해준 표면에서 HEK293세포의 녹색형광 발현을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 표면에 처리해준 NaCl에 의해

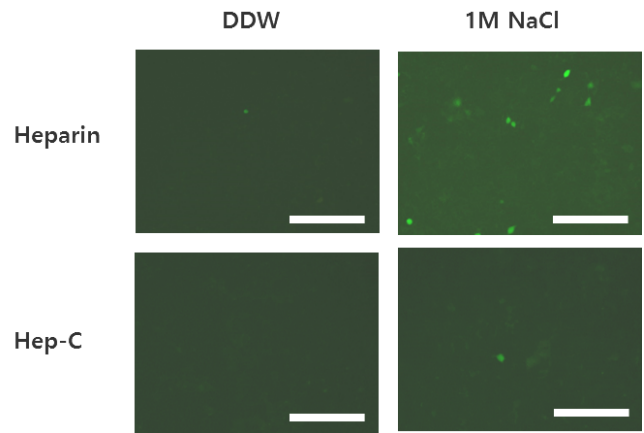


Figure 7. Dissociation test of heparin and Hep-C coated surface (Scale bar = 100 μ m).

서 헤파린 코팅이 떨어져 나가면서 표면에 고정되어 있던 AAV가 노출이 되었고 그 AAV가 세포에 감염됨으로써 녹색 형광이 발현하게 된 것으로 판단된다. 반면에 Hep-C코팅의 경우 AAV와 Hep-C 간에 공유결합을 형성함으로써, NaCl처리에 더 강한 염 저항성을 보일 수 있었다. 따라서 헤파린보다 Hep-C를 이용한 코팅이 보다 지속적인 AAV 비활성화 효과를 보일 수 있다고 판단할 수 있다.

4. 결 론

본 연구에서는 EDC/NHS 반응을 통해 헤파린 고분자에 도파민을 15%의 비율로 도입하였다. 표면에 흡착된 AAV 모델을 이용하여 적정 농도(2 mg/mL) 이상의 Hep-C용액을 AAV에 도포하면 대부분의 세포(30% 이상)들이 GFP 발현을 보였던 대조군과는 달리 소수의 세포들만이 GFP (1% 이내) 발현을 보임을 확인하였으며 이를 통해 Hep-C를 이용하여 AAV를 비활성화할 수 있음을 확인하였다. 또한 Hep-C는 헤파린고분자와는 달리 AAV에 카테콜기를 이용하여 공유결합형성이 가능하므로 외부의 이온을 가해주는 실험을 통해 외부의 이온에 의해서도 그 결합이 끊어지지 않음을 확인할 수 있었다.

향후 추가적인 헤파린 친화 바이러스를 이용한 실험으로 좀 더 범용성 있는 바이러스에 효과가 있음을 확인한다면, 기존의 필터에 의한 여과 방식을 보완, 대체할 수 있는 소재로 활용하기 충분하다고 판단된다.

감 사

이 논문은 한국 연구 재단 Mid-career Scientist Grant

(No. 2015021564, H.L.)(No. NRF-2015R1A2A2A03003553, J.-H.J)의 지원을 받아 연구하였습니다.

References

1. S. M. Ng, T. H. Y. Chan, C. L. W. Chan, A. M. Lee, J. K. Y. Yau, and J. Lau, *Community Mental Health Journal*, **42**, 53 (2006).
2. F. S. Dawood, S. Jain, L. Finelli, M. W. Shaw, S. Lindstrom, R. J. Garten, L. V. Gubareva, X. Xu, C. B. Bridges, and T. M. Uyeki, *The New England Journal of Medicine*, **360**, 25 (2016).
3. P. J. Vezeau, G. F. Koorbusch, R. A. Draughn, and J. C. Keller, *Journal of Oral Maxillofac Surg.*, **54**, 738 (1996).
4. R. S. Pascaud, W. T. Evans, P. J. J. McCullagh, and D. P. FitzPatrick, *Biomaterials*, **18**(10), 727 (1997).
5. M. Goldman and L. Pruitt, *Journal of Biomedical Material Res.*, **40**(3), 378 (1998).
6. H. Mohr, B. Bachmann, A. Klein-Struckmeier, and B. Lambrecht, *Photochemical Photobiology*, **65**(3), 441 (2009).
7. S. Y. Yang, J. Park, J. Yoon, M. Ree, S. K. Jang, and J. K. Kim, *Advanced Functional Materials*, **18**, 1371 (2008).
8. M. C. Dehecchi, A. Tamanini, A. Bonizzato, and G. Cabrini, *Virology*, **268**(2), 382 (2000).
9. G. G. Lin and J. G. Scott, *Biochemistry*, **100**(2), 130 (2012).
10. M. A. Liebert, A. Auricchio, M. Hildinger, E. O. Connor, G. Gao, and J. M. Wilson, *Human Gene Therapy*, **76**, 71 (2001).
11. H. Lee, J. Rho, and P. B. Messersmith, *Advanced materials*, **21**(4), 431 (2009).
12. J. P. Park, M. Do, H.-E. Jin, S.-W. Lee, and H. Lee, *ACS Applied Materials Interfaces*, **6**(21), 18653 (2014).
13. I. T. Song, M. Lee, H. Lee, et al., *Acta Biomater*, **43**, 50 (2016).
14. E. Kim, S. Lee, S. Hong, et al., *ACS Applied Mater Interfaces*, **6**(11), 8288 (2014).
15. E. Kim, I. T. Song, S. Lee, J.-S. Kim, H. Lee, and J.-H. Jang, *Angewandte Communications*, **51**(23), 5598 (2012).