The Korean Journal of Microbiology, Vol. 41, No. 3, September 2005, p. 216-224
Copyright©2005, The Microbiological Society of Korea

혈장분획제제 제조공정에서 크로마토그래피 세척 검증을 위한 모델바이러스로서의 Porcine Parvovirus 정량

길태건 · 김원중 · 이동혁 · 강용[1] · 성학모[1] · 유시형[2] · 박순희[2] · 김인섭*

한남대학교 이과대학 생명과학과, [1](주)녹십자 종합연구소, [2]식품의약품안전청 혈액제제과

혈장분획제제 중 혈액응고인자제제와 일부 면역글로불린제제는 혈장에 존재하는 다양한 단백질로부터 유효한 단백성분만을 선택적으로 분리 정제하기 위해 크로마토그래피 방법을 사용하여 생산된다. 효율적인 세척(cleaning) 공정이 이루어지지 않는다면 크로마토그래피는 다양한 종류의 불순물뿐만 아니라 혈액 중 내재 또는 오염 가능성이 있는 위해인자가 오염될 가능성이 있다. 본 연구에서는 혈장분획제제 제조공정에 사용되는 크로마토그래피의 세척 공정에서 혈장유래 바이러스의 제거 및 불활화 공정의 검토 강화로 혈장분획제제의 안전성을 확보하기 위해 크로마토그래피 세척 검증 시스템을 구축하고자 하였다. 크로마토그래피 세척 공정 중 바이러스 제거 검증을 위해 혈장유래 바이러스 중 물리·화학적 처리에 가장 큰 저항성을 갖는 human parvovirus B19의 모델 바이러스인 porcine parvovirus(PPV)를 대상으로 real-time PCR 정량법을 확립하였다. PPV에 특이적인 primer를 선별하였으며 형광염료 SYBR Green I을 사용하여 PPV DNA를 정량하였다. 세포배양법에 의한 감염역가와 비교한 결과 PCR 민감도는 1.5 $TCID_{50}$/ml이었다. 확립된 검증법의 신뢰성(reliability)을 보증하기 위해 실험법의 특이성(specificity), 재현성(reproducibility) 등을 검증하였다. 구축된 검증시스템을 thrombin 분리·정제를 위한 SP-Sepharose 양이온 크로마토그래피 공정과 factor VIII 분리·정제를 위한 Q-Sepharose 음이온 크로마토그래피 공정에 적용하여 크로마토그래피 세척 검증을 실시하고, 세척 검증 시스템의 적합성을 확인하였다.

Key words □ **cleaning validation, plasma derivatives, porcine parvovirus, real-time PCR, virus inactivation**

인간 또는 동물의 혈액, 체액, 세포, 조직, 기관 등을 이용하여 생산되는 생물학적 의약품은 제품의 원료 자체에 감염성 병원인자가 오염될 가능성이 크기 때문에 안전성에 관한 논란이 오래 전부터 있어왔다(7, 12, 25). 특히 인간의 혈액을 이용하여 만드는 의약품의 경우 혈액 자체에 사람에게 위해한 바이러스가 오염될 가능성이 매우 높기 때문에, 바이러스 감염질환 예방을 위한 검사를 시행하고 있다 할지라도 안전성을 100% 신뢰할 수 없다(22, 27, 29, 30). 혈액성분 중 혈장(plasma)을 이용하여 생산하는 혈장유래의약품은 수백명에서 수천명의 공혈자 혈장을 pooling하여 한 제품단위(Lot)로 만들기 때문에 다른 의약품에 비해 바이러스가 오염될 가능성이 높다(13, 24). 혈장유래의약품에 의한 감염성 질환 부작용은 1940년대부터 보고되었으며, 이러한 부작용을 극복하고 바이러스 안전성을 보증하기 위한 다양한 방법들이 개발되어 왔다(4, 8). 혈장유래의약품의 안정성 측면에서 강조되는 감염성 바이러스는 hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), human immunodeficiency virus (HIV) 등이다. 최근에 와서 hepatitis A virus (HAV)와 human parvovirus B19 (B19)에 대한 안전성이 중요시 되고 있다(26, 27).

최근에 혈장유래 의약품의 안전성 보증을 위해 효과적인 세척공정의 확립과 검증에 대한 관심이 증대하고 있다. 세척공정 검증은 제조공정 중 행해지는 세척공정이 일관성 있게 교차오염, carryover-contamination, 세척액, 미생물과 기타 불순물들을 제품의 안전성, 효력, 순도 등의 quality에 영향을 미치지 않을 규정된 수준 이하로 제거하는 것을 체계적으로 검토하는 문서화된 일련의 검증행위라 할 수 있다(2, 11). 혈장분획제제 중 혈액응고인자제제와 일부 면역글로불린제제는 혈장에 존재하는 다양한 단백질로부터 유효한 단백성분만을 선택적으로 분리 정제하기 위해 친화 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 소수성 크로마토그래피 등 다양한 크로마토그래피 방법을 사용하여 생산된다. 크로마토그래피 공정은 크로마토그래피 resin에 원하는 단백질을 선택적으로 흡착하거나 원하지 않는 단백질을 선택적으로 흡착하여, 유효한 단백성분을 선택적으로 분리·정제하는 공정으로 이러한 크로마토그래피 과정 중 바이러스가 원하는 단백질과 partitioning이 일어 날 수 있다(17-19, 23). 하지만 혈장에 오염될 수 있는 바이러스들이 크로마토그래피 resin에 오염되어 batch-to-batch 오염이 일어날 수 있어 효과적인 세척 공정이 필요하다. 또한 혈장분획제제의 안전성 보증을 위해서 크로마토그래피의 세척 공정에서 감염성 위해인자의 제거 및 불활화 공정의 검토 강화가 필요하다.

일반적으로 생물학적 의약품 제조공정에서 바이러스 불활화 및 제거 공정의 효율성 검증을 위해 감염성 바이러스의 titer를 세포배양법을 사용한 감염역가로 정량한다(15, 32). 하지만 크로마토그래피 세척 검증의 경우에는 크로마토그래피 resin에 바이

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 042-629-8335, Fax: 042-629-7487
E-mail: inskim@hannam.ac.kr

러스가 흡착을 하기 때문에 세포배양법을 사용하여 크로마토그래피 resin에 존재하는 바이러스의 titer를 정량할 수 없다(31). 본 연구에서는 혈장분획제제 제조공정에 사용되는 크로마토그래피의 세척 공정에서 감염성 위해인자의 제거 및 불활화 공정의 검토 강화로 혈장분획제제의 안전성을 확보하기 위해 크로마토그래피 세척 검증 시스템을 구축하였다. 이를 위해 물리·화학적 처리에 큰 저항성을 갖는 B19의 모델 바이러스인 Porcine parvovirus (PPV)를 대상으로 real-time PCR을 이용한 크로마토그래피 세척 검증 시스템을 구축하고, 크로마토그래피 공정에 적용한 후 검증 시스템의 적합성을 평가하였다.

재료 및 방법

PPV의 배양 및 정량

PPV (ATCC VR 742)의 배양과 정량을 위해 Minipig Kidney (MPK) 세포(ATCC CCL 166)를 사용하였다(17). MPK 세포를 10% fetal bovine serum (FBS: Gibco BRL, USA)을 첨가한 Dulbecco's Minimun Essential Medium (DMEM: Gibco BRL, USA)에 배양하였다. T-150 flask에 배양된 단층 세포에 PPV를 감염시킨 후 주기적으로 세포병변효과(cytopathic effect: CPE)를 관찰하였다. CPE가 명백하게 관찰 될 때 배양액과 세포를 수거한 다음, 400 × g에서 7분간 원심분리하여 상층액은 따로 모으고 pellet은 재현탁하였다. Pellet을 동결과 해빙과정을 2회 반복하여 파쇄한 후 400 × g에서 7분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 원심 상등액을 혼합한 후 0.45 μm filter로 여과한 다음 소분하여 -70°C에 보관하였다.

PPV의 정량을 위해 감염성 있는 바이러스의 titer를 50% tissue culture infectious dose ($TCID_{50}$)로 나타내었다. 바이러스 spiking 실험시 바이러스 titer를 정확하게 측정하기 위해서 바이러스를 spiking하지 않은 음성대조 실험에서 취한 시료들이 바이러스의 정량 분석을 위해 사용되는 세포에 cytotoxicity를 나타내는지, 바이러스 정량분석에 interference를 일으키는지를 먼저 실험하였다. 바이러스 spiking 실험 중 취한 시료들을 cytotoxicity와 interference를 나타내지 않은 농도로 바이러스 배양 배지를 사용하여 희석하였다. 희석된 시료를 7배수로 희석하여 24 well plate에 배양된 세포에 0.25 ml씩 접종하였다. 양성 대조구로 titer를 알고 있는 바이러스를 7배수로 희석하여 24 well plate에 배양된 세포에 0.25 ml씩 접종하였다. 음성대조구로 바이러스가 spiking되지 않은 배양배지를 0.25 ml씩 접종하였다. 그 후 CO_2 배양기에서 5% CO_2, 35°C로 배양하면서 계속적으로 현미경으로 CPE를 관찰하였다.

Primer의 선별

PPV 유전자를 증폭하기 위해 사용한 올리고핵산 primer 염기서열은 NCBI data base에 보고된 PPV complete genome(NC 001718)을 기초로 Primer3 Software를 이용하여 디자인하였다 (Table 1). Corbett Research사(Australia)의 PALM-CYCLER를 이용한 일반 PCR 반응을 통해 디자인 한 primer 5쌍들의 특이성을 확인하고, annealing temperature와 $MgCl_2$ 농도를 변화시켜 PCR 조건을 최적화하였다. 또한 증폭된 DNA가 목적하는 산물인지를 확인하기 위하여 PCR product의 DNA sequencing을 실시하였다.

PPV DNA는 QIAamp® DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, German)을 사용하여 분리하였다. PCR 반응을 위해 바이러스 genomic DNA 2 μl, 5 pmol forward primer 1 μl, 5 pmol reverse primer 1 μl, 10X Quick PCR Premix (Genenmed, Korea) 25 μl 혼합액에 멸균된 3차 증류수 21 μl를 첨가하여 최종부피를 50 μl로 맞추었다. 핵산증폭은 pre-incubation은 95°C에서 5분, denaturation은 95°C에서 30초, annealing은 52°C, 54°C, 56°C, 또는 58°C에서 30초, extention은 72°C에서 1분으로 하여 40 cycle을 수행하였다. 40 cycle PCR 후 72°C에서 5분 반응시킨 후 2% agarose gel 전기영동을 통해 PCR 반응물을 확인하였다.

Real-time PCR을 이용한 PPV DNA 정량

PPV의 정량을 위해 일반 PCR을 통해 확립된 PCR 조건을 기초로 SYBR® Premix Ex Taq™ (TaKaRa, Korea)을 사용하여 real-time PCR 조건을 확립하였다. PPV 정량을 위해 Corbett Research사의 Rotor-Gene 3000 real-time PCR 기계를 사용하였다. PCR 반응액은 SYBR® Premix Ex Taq™ 12.5 μl, 10 pmol forward primer 0.5 μl, 10 pmol reverse primer 0.5 μl, template 2 μl, $MgCl_2$ 3 μl(최종 5 mM)에 멸균된 3차 증류수를 넣어 총 25 μl가 되게 하였다. 핵산증폭은 pre-incubation은 95°C에서 10초, denaturation은 95°C에서 5초, annealing은 20초(annealing 온도 최적화를 위해 52°C, 54°C, 56°C, 58°C에서 real-time PCR 수행), extention은 72°C에서 15초로 하여 45 cycle을 수행하였다. 마지막 cycle 후에는 모든 반응물에 대하여 72°C부터 95°C까지 영역에서 melting curve 분석을 실시하였다. 최적 $MgCl_2$ 농도를 설정하기 위해 최적화된 온도 56°C에서 $MgCl_2$를 2~8 mM까지 변화시켜 첨가해준 PPV 농도에 따른 Crossing point 값을 비교하였다.

Titer를 측정하고자 하는 시료들과 함께 Titer가 1.5×10^6 $TCID_{50}$/ml인 PPV를 순차적으로 1.5×10^5 $TCID_{50}$/ml, 1.5×10^4 $TCID_{50}$/ml, 1.5×10^3 $TCID_{50}$/ml, 1.5×10^2 $TCID_{50}$/ml, 1.5×10^1 $TCID_{50}$/ml, 1.5×10^0 $TCID_{50}$/ml로 희석한 후 real-time PCR을 수행하여 정량을 위한 표준곡선을 작성하였다. 시료속에 들어있는 PPV DNA의 양을 표준곡선에 대입하여 정량하였다. 표준곡선은 PPV의 농도에 따라 real-time PCR에 의해 검출되는 Crossing point 값을 $TCID_{50}$ equivalent/ml로 전환하여 작성하였다. Crossing point는 PCR cycle이 exponential phase로 들어가는 cycle 수를 나타낸다. 시료속에 들어 있는 PPV양을 환산하기 위해 아래와 같은 식을 사용하였다.

Virus titer ($TCID_{50}$ equivalent/ml) =

Result ($TCID_{50}$ equivalent/μl) × Elution volume (μl) ÷ Sample volume (ml)

Real-time PCR의 신뢰성 검증

확립된 PPV DNA 정량법의 신뢰성(reliability)을 보증하기 위해 확립된 실험법의 민감도(sensitivity), 재현성(reproducibility), 특이성(specificity) 등을 검증하였다(16, 28). 민감도를 측정하기 위해 Titer가 1.5×10^6 $TCID_{50}$/ml인 PPV를 순차적으로 1.5×10^5 $TCID_{50}$/ml, 1.5×10^4 $TCID_{50}$/ml, 1.5×10^3 $TCID_{50}$/ml, 1.5×10^2 $TCID_{50}$/ml, 1.5×10^1 $TCID_{50}$/ml, 1.5×10^0 $TCID_{50}$/ml희석한 후 real-time PCR을 수행하였다. 특이성 검증을 위해 DNA 바이러스인 human parvovirus B19, bovine herpes virus, minute virus of mice에 대한 cross-reactivity를 측정하였다. 재현성 검증을 위해 서로 다른 날에 1.5×10^6 $TCID_{50}$/ml, 1.5×10^5 $TCID_{50}$/ml, 1.5×10^4 $TCID_{50}$/ml, 1.5×10^3 TCID50/ml, 1.5×10^2 $TCID_{50}$/ml, 1.5×10^1 $TCID_{50}$/ml, 1.5×10^0 $TCID_{50}$/ml 농도의 시료를 정량분석하여 Crossing point 값을 비교하였다.

Real-time PCR을 이용한 크로마토그래피 세척 검증

Real-time PCR을 이용한 크로마토그래피 세척 검증의 적격성과 응용 가능성을 확인하기 위해 모델 시스템으로 혈장으로부터 thrombin 분리·정제를 위한 SP-Sepharose 양이온 크로마토그래피 공정과 factor VIII 분리·정제를 위한 Q-Sepharose 음이온 크로마토그래피 공정을 선정하였다. SP-Sepharose와 Q-Sepharose 크로마토그래피공정은 원하는 단백질을 컬럼으로부터 분획한 후 컬럼에 부착되어 있는 타단백질을 제거하기 위해 NaCl로 세척하는 공정과, 타단백질 제거 및 멸균을 위해 NaOH로 세척하는 공정을 포함하고 있다. SP-Sepharose 크로마토그래피 세척공정에서 바이러스 제거 효율을 검증하기 위해 scale-down된 크로마토그래피 공정에 바이러스를 spiking 한 후 공정에 따라 비흡착액, 완충용액 세척액, 활성분획, 1 M NaCl 세척액, 1 M NaOH 세척액으로 분취하였다. 또한 세척 공정 중에 제거되지 않고 SP-Sepharose resin에 부착되어 있을 수 있는 바이러스 핵산을 정량하기 위해 크로마토그래피 컬럼의 상단, 중단, 하단에서 SP-Sepharose resin을 취하였다. 각 분획과 SP-Sepharose resin에 존재하는 바이러스 핵산 양을 확립된 real-time PCR을 이용하여 정량분석하였다. Real-time PCR 결과를 감염역가의 결과와 비교 검증하기 위해 감염성 있는 바이러스의 titer를 세포배양법으로 정량하였다. Q-Sepharose 크로마토그래피 세척공정에서 바이러스 제거 효율을 검증하기 위해 scale-down된 크로마토그래피 공정에 바이러스를 spiking 한 후 공정에 따라 비흡착액, 완충용액 세척액, 활성분획, 2 M NaCl 세척액, 1 M NaOH 세척액으로 분취하였다. 또한 세척 공정 중에 제거되지 않고 Q-Sepharose resin에 부착되어 있을 수 있는 바이러스 핵산을 정량하기 위해 크로마토그래피 컬럼의 상단, 중단, 하단에서 Q-Sepharose resin을 취하였다. 각 분획과 Q-Sepharose resin에 존재하는 바이러스 핵산 양을 확립된 real-time PCR을 이용하여 정량분석하였다. Real-time PCR 결과를 감염역가의 결과와 비교 검증하기 위해 감염성 있는 바이러스의 titer를 세포배양법으로 정량하였다.

바이러스 감소인수(Virus reduction factor)의 계산

바이러스 정량 분석이 끝난 후 그 결과를 기초로 각 공정에서 바이러스 감소인수를 구하였다. 바이러스 감소인수는 바이러스가 spiking된 공정출발물질에 존재하는 바이러스 양의 log 값에서 공정진행 후에 존재하는 바이러스 양의 log 값을 뺀 log 감소인수(reduction factor)로 정의하였다(15). 모든 실험은 독립적으로 세 번 실시하여 평균값을 구하였다.

결 과

Primer의 선별

PCR 방법을 사용하여 특정 바이러스 존재를 확인하고, 정량분석하기 위해서는 바이러스 내에서 유전적인 변이가 심하지 않은 conserved sequence를 가진 부위를 선택하여야 한다. 선택된 sequence는 특정 바이러스에만 존재하여 특이성이 높아야 한다. 또한 크로마토그래피 세척공정에서 바이러스 제거 검증을 위한 정량 PCR의 경우 높은 민감도가 요구된다. 위와 같은 조건을 만족하는 PCR을 확립하기 위해 Primer3 Software를 이용하여 PPV 특이적인 primer 5쌍을 디자인하였다(Table 1). PCR을 통해 디자인 한 primer쌍들의 민감도를 확인하였다. Titer가 1.5×10^5 $TCID_{50}$/ml, 1.5×10^4 $TCID_{50}$/ml인 PPV를 시료로 PCR을 수행한 결과 forward primer로 PPV-F1을 reverse primer로 PPV-R2를 사용했을 때 가장 민감도가 우수하였다(자료 미제시). PCR 조건을 최적화 한 결과 annealing temperature와 $MgCl_2$ 농도는 각각 56°C와 5 mM이었다. 최적 조건에서 PCR의 민감도를 측정하였다. Titer가 1.5×10^6 $TCID_{50}$/ml인 PPV를 순차적으로 희석하여 PCR 한 결과 1.5 $TCID_{50}$/ml까지 PCR 산물을 확인할 수 있었다 (Fig. 1). PCR 산물을 sequencing한 후 blast searching (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) 한 결과 PCR 산물이 PPV 유전자임을 확인할 수 있었다(자료 미제시).

Table 1. Sequences of oligonucleotide primer sets used in the detection of PPV

Forward primer	Reverse Primer	Nucleotide position*	Amplicon size
PPV-F1 ATGCATCATTGGGGAAATGT	PPV-R1 TTGGAGTTGCTGCGTAGTTG	1939-2083	145
PPV-F1 ATGCATCATTGGGGAAATGT	PPV-R2 TCCAGGTCCTCCTGTATTGG	1939-2099	161
PPV-F1 ATGCATCATTGGGGAAATGT	PPV-R3 TTGCTGCGTAGTTGTTGTCC	1939-2077	139
PPV-F4 CAACTACGCAGCAACTCCAA	PPV-R4 CGGTTTCTATTTCCGACCAA	2064-2227	164
PPV-F5 ACCGCCAGATTCAGCAATAC	PPV-R5 AGGCGCCATCCTACCTTATT	2172-2295	124

*NC 001718

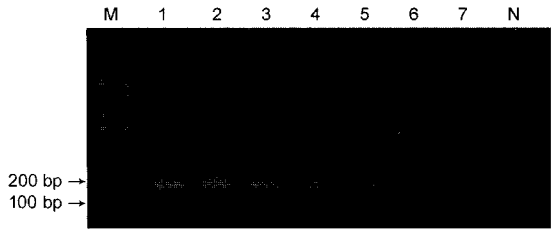

Fig. 1. Sensitivity of PCR assay for detection of PPV. M, 100 bp DNA ladder; 1, 1.5×10^6 $TCID_{50}$/ml; 2, 1.5×10^5 $TCID_{50}$/ml; 3, 1.5×10^4 $TCID_{50}$/ml; 4, 1.5×10^3 $TCID_{50}$/ml; 5, 1.5×10^2 $TCID_{50}$/ml; 6, 1.5×10^1 $TCID_{50}$/ml; 7, 1.5×10^0 $TCID_{50}$/ml; N, Negative control.

PPV DNA 정량을 위한 Real-time PCR 최적화

일반 PCR을 통해 확립된 PCR 조건을 기초로 SYBR® Premix Ex Tag™ (TaKaRa, Korea)을 사용하여 real-time PCR (Rotor-Gene 3000, Corbett Research) 조건을 확립하였다. Forward primer로 PPV-F1을 reverse primer로 PPV-R2를 사용하여 PCR 반응의 annealing temperature를 최적화하였다(Fig. 2). Titer가 1.5×10^4 $TCID_{50}$/ml, 1.5×10^3 $TCID_{50}$/ml, 1.5×10^2 $TCID_{50}$/ml인 PPV를 시료로 annealing temperature를 52°C, 54°C, 56°C, 58°C로 변화시키며 real-time PCR을 수행하였을 때 56°C에서 Crossing point가 가장 낮게 나타나 56°C가 최적 온도임을 알 수 있었다.

최적 온도에서 $MgCl_2$ 농도를 변화시켜 PCR 조건을 최적화하였다(Table 2). Titer가 1.5×10^4 $TCID_{50}$/ml, 1.5×10^3 $TCID_{50}$/ml, 1.5×10^2 $TCID_{50}$/ml인 PPV를 시료로 $MgCl_2$ 농도를 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM로 변화시켜가며 real-time PCR을 수행하였을 때 5 mM에서 Crossing point가 가장 낮게 나타나 최적 $MgCl_2$ 농도는 5 mM임을 알 수 있었다.

Real-time PCR의 신뢰성 검증

PPV DNA 정량을 위한 real-time PCR 방법의 신뢰성(reliability)을 보증하기 위해 확립된 실험법의 민감도(sensitivity), 재현성(reproducibility), 특이성(specificity) 등을 검증하였다. 민감도를 측정하기 위해 Titer가 1.5×10^6 $TCID_{50}$/ml인 PPV를 순차적으로 10배씩 희석한 후 real-time PCR을 수행하였다. 각 시료에 대해 real-time PCR cycle 수에 따른 fluorescence값의 증가를 관찰한 결과 민감도는 1.5 $TCID_{50}$/ml임을 확인할 수 있었다(Fig. 3A). Melting curve 분석 결과 PPV DNA에 특이적인 부분과 primer dimer 등 비특이적인 부분으로 나뉘었으며, 완충용액 대조구에서는 PPV DNA에 특이적인 peak을 확인할 수 없었다

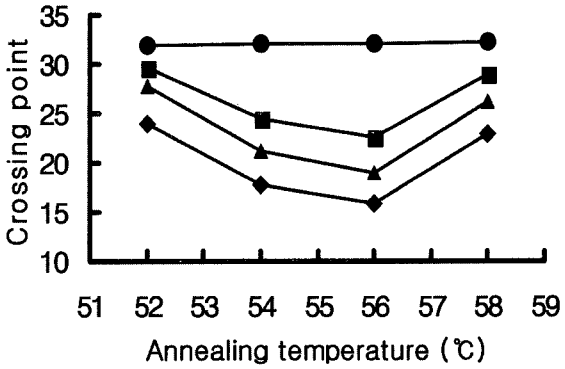

Fig. 2. Optimization of annealing temperature. The crossing point value refers to the cycle number at which the fluorescence of the PCR reaction rises above a set threshold and is inversely proportional to the amount of starting target. ◆, 1.5×10^4 $TCID_{50}$/ml; ▲, 1.5×10^3 $TCID_{50}$/ml; ■, 1.5×10^2 $TCID_{50}$/ml; ●, Negative control.

(Fig. 3B). 증폭된 PCR 산물을 2% (w/v) agarose gel을 사용하여 전기영동한 결과 각 PPV 양성시료에서 예상 크기의 밴드를 확인할 수 있었지만, 완충용액 대조구에서는 PCR 산물을 확인할 수 없었다(자료 미제시).

확립된 PPV DNA 정량법의 재현성 검증을 위해 서로 다른 날에 PPV stock solution에서 DNA를 추출하고 real-time PCR을 수행한 후 Crossing point 값을 비교하였다(Fig. 4). PPV log titer (log_{10} $TCID_{50}$/ml; x)에 대한 Crossing point 값(y) 간의 표준 회귀식은 첫째 날의 경우 y=-3.277x+29.488 (결정계수 r^2=0.999), 둘째 날의 경우 y=-3.265x+29.657 (r^2=0.998), 셋째 날의 경우 y=-3.289x+30.243 (r^2=0.999)로 PPV log titer와 Crossing point 값 간의 회귀성이 매우 높았다. 3개 표준곡선 기울기의 평균, 표준편차 및 변동계수 백분율은 각각 -3.260, 0.031, -0.95%이었으며, y축 교점의 평균, 표준편차 및 변동계수 백분율은 각각 29.796, 0.396, 1.33%로 표준곡선의 재현성이 매우 우수함을 확인할 수 있었다.

다른 DNA virus들(human parvovirus B19, bovine herpes virus, minute virus of mice)을 대상으로 특이성을 실험한 결과 PPV의 경우에만 fluorescence값의 증가를 관찰할 수 있었고, 다른 바이러스에서는 완충용액 음성 대조군과 같이 fluorescence값의 증가를 관찰할 수 없었다(Fig. 5A). Real-time PCR 산물을 2% agarose gel 상에서 분석한 결과 PPV 양성 대조구에서만 PCR 반응 산물이 생성되었고, 다른 바이러스와 완충용액 음성

Table 2. Optimization of $MgCl_2$ concentration in real-time PCR assay

$TCID_{50}$/ml[a]	$MgCl_2$ concentration (mM)						
	2	3	4	5	6	7	8
1.5×10^4	16.53[b]	16.08	15.93	15.79	15.83	17.12	17.20
1.5×10^3	19.93	19.51	19.27	19.00	18.51	20.15	20.18
1.5×10^2	23.29	22.93	22.55	22.55	23.32	23.35	23.39
Buffer control	32.14	32.23	32.26	32.01	32.42	32.41	32.45

[a]$TCID_{50}$:median tissue culture infectious dose
[b]Values indicate crossing point value

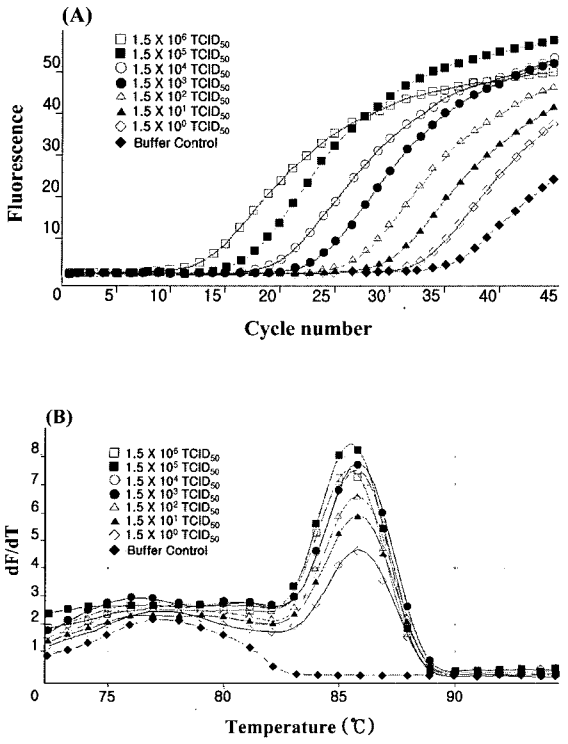

Fig. 3. Sensitivity of real-time PCR assay for quantification of PPV. (A) Amplification plots obtained with 10-fold serial dilutions of PPV stock solution. (B) Melting curve analysis of the amplification plot. PPV stock solution of 1.5×10^6 $TCID_{50}$/ml was serially diluted and cycle-by-cycle detection of PPV DNA was performed with SYBR Green I.

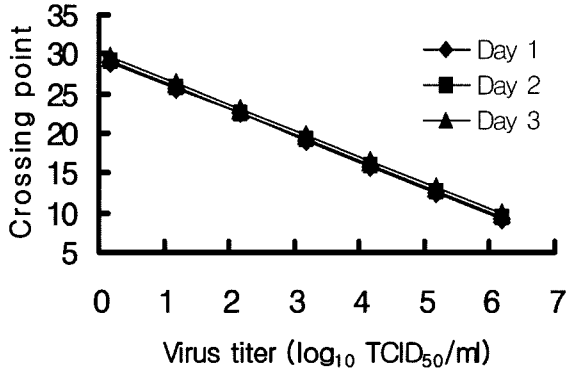

Fig. 4. Reproducibility of real-time PCR assay for quantitative detection of PPV. The standard curves were obtained by the regression analysis of crossing point values versus initial virus titer. These results were obtained from three independent assays performed at different days.

대조구에서는 PCR 반응 산물이 생성되지 않았음을 알 수 있었다(Fig. 5B). 이와 같은 결과에서 확립된 real-time PCR 방법은 PPV에 특이적인 실험법임을 확인하였다.

Real-time PCR을 이용한 크로마토그래피 세척 검증

Scale-down된 SP-Sepharose 크로마토그래피 공정에 바이러스를

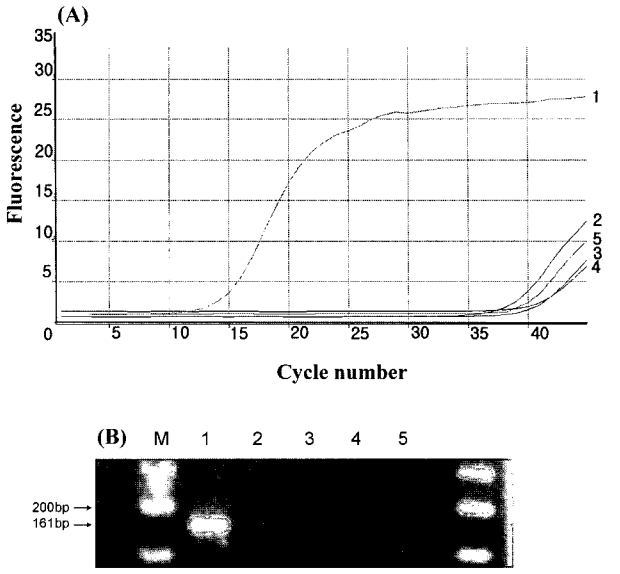

Fig. 5. Specificity of real-time PCR assay to potential cross-reactive viruses. (A) Amplification plots. (B) Agarose gel electrophoresis of the PCR products. Specificity of the real-time PCR assay was evaluated using the optimized protocol and then the PCR products were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis. M, 100 bp DNA ladder; 1, Porcine parvovirus; 2, Human parvovirus B19; 3, Bovine herpes virus; 4, Minute virus of mice; 5, Negative control.

spiking 한 후 공정에 따라 비흡착액, 완충용액 세척액, 활성분획, NaCl 세척액, NaOH 세척액으로 분취하였다. 또한 세척 공정 중에 제거되지 않고 크로마토그래피 gel에 부착되어 있을 수 있는 바이러스 핵산을 정량하기 위해 크로마토그래피 컬럼의 상단, 중단, 하단에서 resin을 취하였다(Table 3). 각 분획에 존재하는 PPV의 titer를 감염역가시험법으로 살펴본 결과 비흡착액에 가장 많이 존재하였고, 완충용액 세척액, 활성분획, NaCl 세척액에서도 감염성 PPV가 검출되었다. 하지만 1 M NaOH 세척액에서는

Table 3. Application of real-time PCR assay to validation of PPV clearance during the SP-Sepharose chromatography process for thrombin purification

Sample	Total PPV titer	
	Infectivity titration (Log_{10} $TCID_{50}$)	Real-time PCR (Log_{10} $TCID_{50}$ equivalents)
Thrombin solution spiked with PPV	7.31±0.25	7.65±0.05
Unbound fraction	7.02±0.37	7.32±0.12
Washed fraction with buffer	4.92±0.48	5.08±0.18
Eluate fraction	4.94±0.32	5.19±0.14
Washed fraction with 1 M NaCl	5.40±0.43	7.29±0.14
Cleaning fraction with 1 M NaOH	ND	4.58±0.22
SP-Sepharose resin (upper fraction)	-[a]	ND[b]
SP-Sepharose resin (middle fraction)	-	ND
SP-Sepharose resin (lower fraction)	-	ND

[a]- : assay was not possible.
[b]ND : not detected

감염성 PPV가 검출되지 않았다. Real-time PCR로 PPV를 정량 분석한 결과 비흡착액, 완충용액 세척액, 활성분획에서는 감염역가시험법으로 정량한 결과와 거의 일치하였다. 하지만 1 M NaCl 세척액과 1 M NaOH 세척액에서는 real-time PCR로 PPV를 정량 분석한 결과가 감염역가시험법으로 측정한 결과보다 훨씬 높게 나타났다. 1 M NaOH 세척액의 경우 감염역가시험법으로 측정했을 때는 감염성 PPV가 검출되지 않았지만, real-time PCR로 측정했을 때는 4.58 $\log_{10}$ $TCID_{50}$ equivalents로 측정이 되었다. 감염역가시험의 경우 PPV를 spiking한 초기시료에서 PPV의 총역가가 7.31 $\log_{10}$ $TCID_{50}$였으며, 활성분획에서는 4.94 $\log_{10}$ $TCID_{50}$로 나타나 바이러스 감소인수는 2.37이었다. Real-time PCR로 측정한 초기시료에서 PPV의 총역가는 7.65 $\log_{10}$ $TCID_{50}$ equivalents였으며, 활성분획에서는 5.19 $\log_{10}$ $TCID_{50}$ equivalents로 나타나 바이러스 감소인수는 2.46이었다.

Q-Sepharose 크로마토그래피의 경우에 각 분획에 존재하는 PPV의 titer를 감염역가시험법으로 살펴본 결과 활성분획에 가장 많이 존재하였고, 비흡착액, 완충용액 세척액, NaCl 세척액에서도 감염성 PPV가 검출되었다. 하지만 1 M NaOH 세척액에서는 감염성 PPV가 검출되지 않았다(Table 4). Real-time PCR로 PPV를 정량 분석한 결과 비흡착액, 완충용액 세척액, 활성분획에서는 감염역가시험법으로 정량한 결과와 거의 일치하였다. 하지만 2 M NaCl 세척액에서는 real-time PCR로 PPV를 정량 분석한 결과가 감염역가시험법으로 측정한 결과보다 훨씬 높게 나타났으며, 1 M NaOH 세척액의 경우 감염역가시험법으로 측정했을 때는 감염성 PPV가 검출되지 않았지만, real-time PCR로 측정했을 때는 4.98 $\log_{10}$ $TCID_{50}$ equivalents로 측정이 되었다. 감염역가시험의 경우 PPV를 spiking한 초기시료에서 PPV의 총역가가 7.85 $\log_{10}$ $TCID_{50}$였으며, 활성분획에서는 6.45 $\log_{10}$ $TCID_{50}$로 나타나 바이러스 감소인수는 1.40이었다. Real-time PCR로 측정한 초기시료에서 PPV의 총역가는 7.95 $\log_{10}$ $TCID_{50}$ equivalents였으며, 활성분획에서는 6.48 $\log_{10}$ $TCID_{50}$ equivalents로 나타나 바이러스 감소인수는 1.47이었다.

Table 4. Application of real-time PCR assay to validation of PPV clearance during the Q-Sepharose chromatography process for factor VIII purification

Sample	Total PPV titer	
	Infectivity titration (Log_{10} $TCID_{50}$)	Real-time PCR (Log_{10} $TCID_{50}$ equivalents)
Factor VIII solution spiked with PPV	7.85±0.35	7.95±0.15
Unbound fraction	5.20±0.32	5.40±0.16
Washed fraction with buffer	4.12±0.26	4.36±0.14
Eluate fraction	6.45±0.18	6.48±0.18
Washed fraction with 2 M NaCl	5.58±0.36	7.32±0.36
Cleaning fraction with 1 M NaOH	ND	4.98±0.28
Q-Sepharose resin (upper fraction)	-[a]	ND[b]
Q-Sepharose resin (middle fraction)	-	ND
Q-Sepharose resin (lower fraction)	-	ND

[a]- : assay was not possible.
[b]ND : not detected

고 찰

최근 생물산업의 급격한 발전에 따라 새로운 생물의약품의 개발이 급속도로 진전되고 있다. 사람이나 동물의 혈액, 체액, 뇨, 세포, 조직, 기관 등을 이용한 새로운 생물의약품의 개발은 원료 자체에 감염성 병원 인자가 오염될 가능성이 크기 때문에 안전성 확보가 가장 큰 문제 중의 하나로 대두되고 있다. 인체에 유해한 바이러스가 오염되는 것을 방지하여 안전한 생물의약품이 제조되도록 하기 위해서는 오염 바이러스의 검출 및 불활화 또는 제거 검증 관련 기술을 확립해야만 한다(1, 7, 9, 10). 혈장분획제제와 같은 단백질 의약품의 경우 제조공정에서 약액과 직접 접촉하는 크로마토그래피 시스템, 교반탱크 등 모든 공정 관련 장비에 혈장유래 감염성 병원 인자가 오염될 수 있어 효과적인 세척공정의 확립과 검증이 필요하다. 일반적으로 교반탱크는 습윤멸균 또는 건조멸균과 같은 열처리 멸균공정을 통해 감염성 병원 인자를 불활화할 수 있지만, 크로마토그래피의 경우에는 resin의 특성상 열처리가 어려운 경우가 많다. 일반적으로 크로마토그래피 컬럼에 resin을 충진하고 재사용하기 때문에, 컬럼의 세척 및 재생에 각별한 주의가 요구되며, resin에 남아있는 잔존물, 특히 감염성 위해 인자의 효과적인 제거 및 불활화가 필수적으로 요구되어진다(6, 31). 크로마토그래피 시스템의 세척과 감염성 병원 인자의 불활화를 위해 일반적으로 NaCl과 NaOH 처리를 한다(1, 5, 17-19). 혈장분획제제의 안전성 보증을 위해 크로마토그래피의 세척 공정에서 감염성 위해인자의 제거 및 불활화 공정의 검증이 요구되고 있지만, 지금까지 확립된 검증법이 보고된 바 없다. 본 연구에서는 혈장분획제제 제조공정에 사용되는 크로마토그래피의 세척 공정에서 바이러스의 제거 및 불활화 공정의 검토 강화로 혈장분획제제의 안전성을 확보하기 위한 크로마토그래피 세척 검증 시스템을 구축하고자 하였다.

바이러스 제거 검증 연구를 수행하는데 있어서 중요한 고려사항은 적절한 바이러스를 선택하는 것과 그 바이러스의 검출을 위한 용이하면서도 신뢰성있는 시험법을 확립하는 것이다(10, 15). 일반적으로 생물의약품 제조공정에서 바이러스 불활화 및 제거 공정의 효율성 검증을 위해 감염성 바이러스의 titer를 세포배양법을 사용하여 정량한다. 하지만 크로마토그래피 세척 검증의 경우에는 크로마토그래피 resin에 바이러스가 흡착을 하기 때문에 세포배양법을 사용하여 바이러스의 titer를 정량할 수 없다. PCR 같은 핵산증폭법은 바이러스 유전자를 검출하거나 정량하는데 있어 높은 민감도를 가진 방법으로 세포배양방법을 이용한 바이러스 정량이 용이하지 않은 경우 매우 유용하게 사용될 수 있다(16, 28, 33). 혈장분획제제에 오염된 사례가 있어 혈장유래 의약품의 안정성 측면에서 강조되는 감염성 바이러스인 HBV, HCV, HIV, HAV, B19 중 B19은 지질성막을 갖고 있지 않는 단선형 DNA 바이러스로 NaOH 처리, 열처리, Solvent/detergent 처리 등 여러 가지 물리 · 화학적 처리에 가장 큰 저항성을 나타낸다(26). 현재까지 B19을 바이러스 안전성 검증 목적으로 사용할

만큼 충분한 양으로 증식시키고 정량분석할 수 있는 적당한 방법이 개발되지 않았기 때문에, B19의 검증을 위해서 모델바이러스인 PPV를 주로 사용하여 오고 있다. 또한 PPV는 다양한 물리·화학적 처리에 큰 저항성을 나타내는 것으로 보고되고 있기 때문에 일반적으로 바이러스를 제거하거나 불활화하는 제조공정의 견고성(robustness)을 평가할 때 사용되는 바이러스이다(4, 15, 17). 본 연구에서는 크로마토그래피 세척 검증 시스템을 구축을 위해 모델바이러스로 PPV를 선정하여 Real-time PCR을 활용한 정량분석법을 확립하였다.

최근에 PCR을 이용하여 PPV를 검출하려는 연구가 활발히 진행되어 왔는데, 주로 conventional PCR 또는 nested PCR 방법을 이용하여 돼지에서 PPV 감염여부를 빠른 시간에 진단하고자 하는 연구였다(3, 14, 20, 21). 본 연구에서는 PPV의 정량적 분석방법으로 real-time PCR을 활용하였으며, 확립된 PPV 정량법을 혈장분획제제 제조공정에서 크로마토그래피 세척 검증에 최초로 적용하여 혈장분획제제 안전성 평가 기술의 확립에 공헌하였다. 확립된 실험법의 민감도는 1.5 $TCID_{50}$/ml이었다. 생물의약품의 품질관리 평가에 있어 민감도와 재현성은 분석의 정확성, 특이성, 검출한계 등과 함께 매우 중요한 요인으로 고려되는데, 본 연구에서 확립한 정량법은 PPV를 정량하는데 있어 민감도와 재현성이 우수함을 확인할 수 있었다.

SP-Sepharose 크로마토그래피와 Q-Sepharose 크로마토그래피 공정에서 PPV의 분포를 감염역가시험법과 real-time PCR로 분석한 결과 PPV를 spiking한 초기시료, 비흡착액, 완충용액 세척액, 활성분획에서는 정량 결과가 거의 일치하였다. 하지만 NaCl 세척액과 NaOH 세척액에서는 real-time PCR로 PPV를 정량 분석한 결과가 세포배양법으로 측정한 결과보다 훨씬 높게 나타났다. NaOH 세척액의 경우 세포배양법으로 측정했을 때는 감염성 PPV가 검출되지 않았지만, real-time PCR로 측정했을 때는 각각 4.58 $\log_{10}$ $TCID_{50}$ equivalents와 4.98 $\log_{10}$ $TCID_{50}$ equivalents로 측정이 되었다. Real-time PCR에 의한 PPV 유전자 정량방법은 크로마토그래피 세척과정 중 바이러스 감염력이 떨어지는 경우에도 검출할 수 있으므로 세포배양법으로 측정했을 경우보다 titer가 훨씬 높게 나타난 것으로 보인다. 실제로 1 M NaOH로 PPV를 처리하였을 경우에 처리 온도에 관계없이 5분안에 첨가한 모든 PPV가 완벽하게 사멸되었다(미발표 자료). 비록 PPV는 NaOH 처리에 의해 사멸되었다 할지라도 PPV DNA는 파괴되지 않은 상태로 존재하기 때문에 real-time PCR로 측정한 경우 PPV DNA가 정량된 것으로 판단된다. NaOH로 크로마토그래피 시스템을 세척한 후 크로마토그래피 resin에 존재하는 PPV를 정량분석한 결과 잔존하는 PPV가 전혀 검출되지 않았다. 이러한 결과는 SP-Sepharose resin과 Q-Sepharose resin에 흡착되었던 PPV가 NaOH 세척공정에 의해 완벽하게 세척되었음을 보여준다. 이와 같은 결과에서 SP-Sepharose 크로마토그래피와 Q-Sepharose 크로마토그래피의 경우 NaOH 세척공정이 바이러스 불활화 및 세척에 매우 효과적인 공정임을 확인할 수 있었다.

바이러스가 spiking된 공정출발물질에 존재하는 바이러스 양의 log 값에서 공정진행 후에 활성분획에 존재하는 바이러스 양의 log 값을 뺀 log 바이러스 감소인수의 경우에 real-time PCR로 분석한 결과가 감염역가시험법으로 분석한 결과와 거의 일치하였다. 이러한 결과는 본 연구를 통해 확립된 PPV real-time PCR 시험법이 크로마토그래피나 필터를 이용한 바이러스 제거와 관련된 공정의 검증 연구에 매우 유용하게 쓰일 수 있음을 시사한다.

혈장분획제제 안전성 평가의 모델에서 real-time PCR을 활용한 PPV 정량 검출 방법은 크로마토그래피 공정에서 미량의 바이러스를 실시간에 정량화 할 수 있음으로써 혈장분획제제 제조공정에서 바이러스 제거 검증 실험시 감염역가시험과 함께 적용할 수 있는 유용한 평가기술일 뿐만 아니라, 감염역가시험으로는 분석할 수 없는 크로마토그래피 세척공정에서의 바이러스 안전성 검증에 활용할 수 있는 적절한 방법임이 확인되었다. 본 연구의 결과는 정부의 의약품 관리정책의 일환으로 혈장분획제제 생산공정의 세척 검증에 대한 지침안을 작성하는데 기초 근거자료로 활용할 수 있을 것이다. 또한 확립된 크로마토그래피 검증 시스템을 생산 공정에 적용하여 혈장분획제제의 위해 바이러스로부터의 안전성 증진에 공헌 할 수 있을 것이다.

감사의 말

본 연구는 2004년도 식품의약품안전청 용역연구개발사업(생물의약품안전관리) 결과임. 본 연구를 위해 도움을 준 (주)녹십자 종합연구소에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. 김인섭. 2003. 바이러스 불활화 공정에 대한 hepatitis A virus와 murine encephalomyocarditis virus의 민감도 비교. 미생물학회지 39, 242-247.
2. Active Pharmaceutical Ingredients Committee. 1999. Cleaning validation in active pharmaceutical ingredient manufacturing plants.
3. Arnauld, C., O. Legecy, Y. Laurian, R. Thiery, M. Denis, P. Blanchard, and A. Jestin. 1998. Development of a PCR-based method coupled with a microplate colorimetric assay for the detection of porcine parvovirus and application to diagnosis in piglet tissues and human plasma. *Mol. Cell. Probes* 12, 407-416.
4. Boschetti, N. and A. Johnston. 2005. Virus elimination and validation. *Methods Mol. Biol.* 308, 209-220.
5. Bronrson, K., J. Brown, E. Hamilton, and K.E. Stein. 2003. Identification of protein A media performance attributes that can be monitored as surrogates for retrovirus clearance during extended re-use. *J. Chromatogr. A.* 989, 155-163.
6. Burgoyne, R.F., M.C. Priest, K.L. Roche, and G. Vella. 1993. Systematic development and validation of sanitization protocols for a chromatography system designed for biotherapeutics purification. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 11, 1317-1325.
7. Celis, P. and G. Silvester. 2004. European regulatory guidance on virus safety of recombinant proteins, monoclonal antibodies and plasma derived medicinal products. *Dev. Biol.* 118, 3-10
8. Cuthbertson, B., K.G. Reid, and P.R. Foster. 1991. Viral contamination of human plasma and procedures for preventing virus trans-

mission by plasma products, p. 385-435. *In* J.R. Harris (ed.), Blood separation and plasma fractionation. Willey-Liss Inc., New York.
9. Darling, A. 2002. Validation of biopharmaceutical purification process for virus clearance evaluation. *Mol. Biotechnol.* 21, 57-83.
10. Farshid, M. 2004. Viral safety evaluation of plasma-derived therapeutic products. *Dev. Biol.* 118, 11-15.
11. Food and Drug Administration. 1993. Guide to inspection for validation of cleaning processes.
12. Horaud, F. 1991. Introductory remark: viral safety of biologicals. *Dev. Biol. Stand.* 75, 3-7.
13. Horowitz, B. 1990. Blood protein derivative viral safety: observations and analysis. *Yale J. Med.* 63, 361-369.
14. Huang, C., J.-J. Hung, C.-Y. Wu, and M.-S. Chien. 2004. Multiplex PCR for rapid detection of pseudorabies virus, porcine parvovirus and porcine circoviruses. *Vet. Microbiol.* 101, 209-214.
15. International Conference on Harmonisation. 1998. Guidance on viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin; availability. *Federal Resister* 63, 51074-51084.
16. Jeong, H.-S., J,-H. Shin, Y.-N. Park, J.-Y. Choi, Y.-L. Kim, B.-G. Kim, S.-R. Ryu, S.-Y. Baek, S.-H. Lee, and S.-N. Park. 2003. Development of real-time RT-PCR for evaluation of JEV clearance during purification of HPV type 16 L1 virus-like particles. *Biologicals* 31, 223-229.
17. Kim, I.S., Y.W. Choi, S.R. Lee, H.S. Woo, and S. Lee. 2001. Removal and inactivation of viruses during manufacture of a high purity antihemophilic factor VIII concentrate from human plasma. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11, 497-503.
18. Kim, I.S., Y.W. Choi, S.R. Lee, M.S. Lee, K.H. Huh, and S. Lee. 2001. Removal and inactivation of hepatitis A virus during manufacture of a high purity antihemophilic factor VIII concentrate from human plasma. *J. Microbiol.* 39, 67-73.
19. Kim, I.S., Y.W. Choi, S.R. Lee, Y. Kang, K.M. Lee, D.H. Park, H.S. Woo, and S. Lee. 2002. Removal and inactivation of hepatitis A virus during manufacture of urokinase from human urine. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 7, 340-346.
20. Kim, J. and C. Chae. 2003. Multiplex nested PCR compared with in situ hybridization for the differentiation of porcine circoviruses and porcine parvovirus from pigs with postweaning multisystematic wasting syndrome. *Can. J. Vet. Res.* 67, 133-137.
21. Kim, J., D.U. Han, C. Choi, and C. Chae. 2003. Simultaneous detection and differentiation between porcine circovirus and porcine parvovirus in boar semen by multiplex seminested polymerase chain reaction. *J. Vet. Med. Sci.* 65, 741-744.
22. Kleinman, S. 1999. Residual risk of transfusion transmitted viral infections among seronegative donors: application of the incidence/window period model. *Dev. Biol. Stand.* 102, 61-65.
23. Morrica, A., C. Nardini, A. Falbo, A. C. Bailey, and E. Bucci. 2003. Manufacturing process of Anti-thrombin III concentrate: viral safety validation studies and effect of column re-use on viral clearance. *Biologicals* 31, 1-9.
24. Mosley, J.W. and J. Rakela. 1999. Foundling viruses and transfusion medicine. *Transfusion* 39, 1041-1044.
25. Parkman, P.D. 1996. Safety of biopharmaceuticals: a current perspective. *Dev. Biol. Stand.* 88, 5-7.
26. Prowse, C., C.A. Ludlam, and P.L. Yap. 1997. Human parvovirus B19 and blood products. *Vox Sang.* 72, 1-10.
27. Roberts, P. 1996. Virus safety of plasma products. *Rev. Med. Virol.* 6, 25-38.
28. Saldanha, J. 2001. Validation and standardisation of nucleic acid amplification technology (NAT) assays for the detection of viral contamination of blood and blood products. *J. Clin. Virol.* 20, 7-13.
29. Schilt, U. 1989. Overview of viruses relevant to blood transfusion. *Curr. Stud. Hematol. Blood Transf.* 56, 1-8.
30. Sherwood, W.C. 1993. The significance of the blood-borne viruses: blood banking and transfusion medicine. *Dev. Biol. Stand.* 81, 25-33.
31. Sofer, G. 2003. Current issues in validation of chromatography. *Dev. Biol.* 113, 61-64.
32. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: Human Medicines Evaluation Unit. Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). Note for guidance on plasma derived medicinal products (CPMP/BWP/269/95 rev2).
33. Willkommen, H., I. Schmidt, and J. Lower. 1999. Safety issues for plasma derivatives and benefit from NAT testing. *Biologicals* 27, 325-331.

(Received August 12, 2005/Accepted September 6, 2005)

ABSTRACT: Quantitative Real-Time PCR of Porcine Parvovirus as a Model Virus for Cleaning Validation of Chromatography during Manufacture of Plasma Derivatives

Tae Gun Kil, Won Jung Kim, Dong Hyuk Lee, Yong Kang[1], Hark Mo Sung[1], Si Hyung Yoo[2], Sue-Nie Park[2], and In Seop Kim* (Department of Biological Sciences, Hannam University, Daejeon 306-791, Korea, [1]Central Research Center, Green Cross Co., Yongin City, Kyunggi-Do 449-900, Korea, [2]Blood Products Division, Biologics Evaluation Department, Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea)

Chromatography has now been used successfully to provide the requisite purity for human plasma-derived biopharmaceuticals such as coagulation factors and immunoglobulins. Recently, increasing attention has been focused on establishing efficient cleaning procedures to prevent potential contamination by microorganisms as well as carry-over contamination from batch to batch. The purpose of present study was to develop a cleaning

validation system for the assurance of virus removal and/or inactivation during chromatography process. In order to establish an assay system for the validation of virus clearance during chromatography cleaning process, a quantitative real-time PCR method for porcine parvovirus(PPV) was developed, since PPV, a model virus for human parvovirus B19, has a high resistance to a range of physico-chemical treatment. Specific primers for amplification of PPV DNA was selected, and PPV DNA was quantified by use of SYBR Green I. The sensitivity of the assay was calculated to be 1.5 $TCID_{50}$/ml. The established real-time PCR assay was successfully applied to the validation of PPV removal and cleaning during SP-Sepharose cation chromatography for thrombin purification and Q-Sepharose anion chromatography for factor VIII purification. The comparative results obtained by real-time PCR assay and infectivity titrations suggested that the real-time PCR assay could be a useful method for chromatography cleaning validation and that it could have an additive effect on the interpretation and evaluation of virus clearance during the virus removal process.