

생물의약품 제조공정에서 Bovine Parainfluenza Virus Type 3 정량 검출을 위한 Real-Time RT-PCR

이 동 혁 · 김 찬 경 · 김 태 은 · † 김 인 섭
한남대학교 생명·나노과학대학 생명과학과
(접수 : 2008. 3. 3., 게재승인 : 2008. 8. 6.)

Real-Time RT-PCR for Quantitative Detection of Bovine Parainfluenza Virus Type 3 during the Manufacture of Biologics

Dong Hyuck Lee, Chan Kyong Kim, Tae Eun Kim, and In Seop Kim†

Department of Biological Sciences, College of Life Science and Nanotechnology, Hannam University, Daejeon 305-811, Korea
(Received : 2008. 3. 3., Accepted : 2008. 8. 6.)

Bovine blood, cell, tissue, and organ are used as raw materials for manufacturing biologics such as biopharmaceuticals, tissue-engineered products, and cell therapy. Manufacturing processes for the biologics have the risk of viral contamination. Therefore viral validation is essential in ensuring the safety of the products. Bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3) is one of the common bovine pathogens and has widely been known as a contaminant of biologics. In order to establish the validation system for the BPIV3 safety of biologics, a real-time RT-PCR method was developed for quantitative detection of BPIV3 contamination in raw materials, manufacturing processes, and final products. Specific primers for amplification of BPIV3 RNA was selected, and BPIV3 RNA was quantified by use of SYBR Green I. The sensitivity of the assay was calculated to be 2.8 TCID₅₀/mL. The real-time RT-PCR method was validated to be reproducible and very specific to BPIV3. The established real-time RT-PCR assay was successfully applied to the validation of Chinese hamster ovary (CHO) cell artificially infected with BPIV3. BPIV3 RNA could be quantified in CHO cell as well as culture supernatant. Also the real-time RT-PCR assay could detect 7.8 TCID₅₀/mL of BPIV3 artificially contaminated in bovine collagen. The overall results indicated that this rapid, specific, sensitive, and robust assay can be reliably used for quantitative detection of BPIV3 contamination during the manufacture of biologics.

Key Words : Bovine parainfluenza virus type 3, Chinese hamster ovary (CHO) cell, collagen, real-time RT-PCR, virus validation

서 론

소유래 혈액, 세포, 조직, 기관 등은 생물의약품과 조직공학 제제, 세포치료제의 원료로 널리 사용되고 있다(1, 2). 소유래 혈청은 치료용 단백질과 항체 등을 생산하기 위해 사용하는 Chinese hamster ovary (CHO) 세포, baby hamster kidney (BHK) 세포, hybridoma 세포와 백신을 생산하기 위한 세포주를 배양하기 위한 원료물질로 사용된다. 또한 소유래 혈청은 자가세포 치료제, 동종유래세포치료제 또는 이종세포치료제의 배양을

위한 원료물질로도 사용된다(3). 소 조직으로부터 추출하는 콜라겐은 낮은 항원성, 지혈효과, 세포부착 능력이 우수하기 때문에 의료용 생체재료로 널리 이용되고 있다(4, 5). 소 양막은 세포성장인자가 풍부하며, 염중유발 유전자발현 억제, 단백질분해 억제, 흉터생성 억제 등의 효능이 있는 조직적합성 의료용 소재로 창상파복제, 각막이식제 등의 원료로 사용된다(6, 7). 이러한 세포배양 유래 생물의약품과 조직공학제제, 세포치료제는 생체에서 유래한 복잡한 분자구조를 가진 물질로 최종제품에 대한 물리화학적 분석만으로는 제품의 효능을 평가하기 어렵다. 또한 원료 자체에 감염성 병원 인자가 오염될 가능성이 크기 때문에 안전성에 관한 논란이 오래 전부터 있어왔다(8-10). 따라서 최근 WHO (World Health Organization), 미국, 유럽 등을 중심으로 이러한 제제의 최종제품에 대한 안전성과 유효성 분석과 함께 원료부터 완제품에 이르는 전체

† Corresponding Author : Department of Biological Sciences, Hannam University, Daejeon 305-811, Korea
Tel : +82-42-629-8754, Fax : +82-42-629-8751
E-mail : inskim@hnu.kr

제조공정에 대한 철저한 품질관리의 중요성이 대두되고 있는 실정이다(11-13).

소유래 물질에 오염될 수 있는 감염성 병원 인자 중 바이러스는 종류의 다양성과 검출 방법의 제한성으로 인해 그 중요성이 더 강조되고 있다(14). 세계 각국의 규제기관에서는 생물 의약품과 조직공학체제, 세포치료제에서 내인성 또는 외래성 위해 바이러스의 오염을 방지하기 위하여 감도와 특이도가 우수한 검출시험방법 개발, 바이러스 제거 및 불활화 공정 확립과 검증, 바이러스 관련 기준 규격 제정 등에 관한 연구를 활발히 진행하고 있다(15).

생물의약품과 조직공학의약품, 세포치료제 제조 시 사용되는 원료물질의 기원과 특성에 따라 오염 바이러스의 검색대상이 매우 다양하나, 소유래 원료물질을 함유한 제제에 있어서 공통적인 검색대상이 되는 대표적인 오염 바이러스는 소 파라인플루엔자 감염증을 일으키는 Bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3)이다(16). BPIV3는 소에게 발열과 원기 및 식욕감퇴, 침흘림, 수양성 내지는 농양성 콧물, 기침, 폐포음의 이상 등 호흡기 증상을 유발하며, 유산을 유발하는 경우도 있다. 이 바이러스는 Paramyxoviridae과의 Respirivirus속에 속하며, 15,100개의 nucleotide를 갖는 negative-sense, single-stranded RNA로 구성되어 있고, HN, F, M, N, P, L과 같은 6개의 유전자를 갖고 있다(17). BPIV3는 치료용 단백질 의약품을 생산하는 CHO 세포 배양 공정에 오염된 사례가 있는데, 세포배양의 원료 물질인 우혈청에 의해 오염된 것으로 판단되고 있다(10, 18).

생물의약품과 조직공학체제, 세포치료제에서 내인성 또는 외래성 위해 바이러스의 검출을 위한 시험법으로 유전자 증폭기술이 활용되고 있다. RNA 바이러스 검출을 위한 유전자 증폭기술로는 RNA 주형으로부터 상보적인 cDNA를 만들고, cDNA를 이용하여 유전자의 일부를 증폭시킨 후, 증폭산물을 전기영동으로 분리한 다음 DNA를 염색하여 UV로 확인하는 RT-PCR이 일반적이다. RT-PCR은 바이러스 RNA의 존재 여부를 확인할 수 있는 훌륭한 시험법이지만, 정량분석이 어렵다는 단점이 있다. 최근에는 증폭되는 유전자 산물을 실시간으로 확인할 수 있고, 정량분석이 가능한 real-time RT-PCR 시험법이 개발되고 있다. Real-time RT-PCR은 RT-PCR에 비해 바이러스 RNA 존재 여부를 더 빨리 확인할 수 있다는 장점도 있다(13). BPIV3 검출시험법은 주로 소 질병의 진단을 위해 개발되어 왔다. BPIV3 검출시험법으로는 비침, 폐병변부, 유즙 등을 Madin-Derby bovine kidney(MDBK) 세포에 접종하여 바이러스를 배양한 후 형광색소를 부착시킨 항체를 이용하여 바이러스를 검출하는 형광항체법, 혈청에 존재하는 항체를 검출하는 혈청중화시험법, 효소결합 면역흡착 분석법 등이 있다(19). 이러한 시험법은 민감도와 특이도가 떨어지는 단점이 있다. 하지만 지금까지 PCR 방법을 이용하여 BPIV3를 정량적으로 검출하고자 하는 연구는 진행된 바가 거의 없다.

본 연구에서는 소유래 물질을 원료로 하는 생물의약품, 조직공학체제, 세포치료제 등에서 BPIV3 안전성을 확보하기 위해, 원료물질, 제조공정, 완제품에서 BPIV3를 정량적으로 검출하고, 제조공정에서 BPIV3 제거 검증을 위한 시험법으로 활용이 가능한 민감도와 특이도가 우수한 real-time RT-PCR 시험법을 확립하고자 하였다. 또한 확립된 real-time RT-PCR 시험법을 활용하여 인위적으로 BPIV3를 감염시킨 CHO 세포

와 소유래 플라겐에서 BPIV3를 정량적으로 검출하여 바이러스 안전성 검증 시험법으로의 활용 가능성을 평가하였다.

재료 및 방법

BPIV3의 배양 및 정량

BPIV3 (ATCC VR 281)의 배양과 정량을 위해 Vero 세포(ATCC CCL 81)를 사용하였다. Vero 세포를 10% 우혈청(Gibco BRL, USA)을 첨가한 Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM : Gibco BRL, USA) 배지에 배양하였다. T-150 flask에 배양된 단층 세포에 바이러스를 감염시킨 후 주기적으로 세포병변효과 (cytopathic effect : CPE)를 관찰하였다. CPE가 명백하게 관찰 될 때 배양액과 세포를 수거한 다음, 400 x g에서 5분간 원심 분리하여 상층액은 따로 모으고 pellet은 재현탁하였다. Pellet을 동결과 해빙과정을 2회 반복하여 파쇄한 후 400 x g에서 5분간 원심 분리하여 상등액을 얻었다. 원심상등액을 혼합한 후 0.45 μ m filter로 여과한 다음 소분하여 -70°C에 보관하였다.

BPIV3의 정량을 위해 감염성 있는 바이러스의 titer를 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀)로 나타내었다. BPIV3를 2% 우혈청을 첨가한 DMEM 배지로 7배수로 희석하여 24 well plate에 배양된 세포에 0.25 mL씩 접종하였다. 음성 대조군으로 세포배양배지를 0.25 mL씩 접종하였다. 그 후 CO₂ 배양기에서 5% CO₂, 35°C로 배양하면서 계속적으로 현미경으로 CPE를 관찰하였다.

바이러스 RNA 분리

-70°C에 보관한 바이러스 배양액을 얼음에서 녹인 후, RNA를 분리하였다. RNA 분리는 QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, German)를 사용하여 제조사에서 제공한 방법에 따라 실시하였다. 바이러스 배양액 140 μ L로부터 총 60 μ L의 RNA를 용출하였다.

Oligonucleotide primer

BPIV3 유전자를 증폭하기 위해 사용한 올리고핵산 primer 염기서열은 NCBI data base에 보고된 BPIV3 complete genome (NC 002161)을 기초로 Primer3 Software를 이용하여 디자인하였다(Table 1).

RT-PCR

분리한 RNA를 주형으로 Omniscript Reverse Transcription Kit (QIAGEN, German)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA를 합성하기 위해 template RNA 10 μ L, 10 pmol specific primer (reverse primer) 2 μ L, RNase inhibitor (10 U/ μ L) 1 μ L, 10x buffer RT 2 μ L, dNTP mix (5 mM) 2 μ L, Omniscript reverse transcriptase 1 μ L, RNase-free water 2 μ L를 혼합하고 37°C에서 60분 동안 반응시켰다. BPIV3의 reverse transcription 반응으로 얻어진 cDNA를 주형으로 PCR을 실행하였다. PCR 반응을 위해 BPIV3 cDNA 2 μ L, 10 pmol forward primer 1 μ L, 10 pmol reverse primer 1 μ L, MgCl₂ 용액 1 μ L, Go Taq® Green Master Mix (Promega) premix 12.5 μ L 혼합액에 멸균된

3차 증류수를 첨가하여 최종부피를 25 μ L로 맞추었다. Corbett Research사 (Australia)의 PALM-CYCLER를 이용한 핵산증폭은 pre-incubation은 95°C에서 2분, denaturation은 95°C에서 30초, annealing은 50°C, 52°C, 54°C, 56°C, 58°C 또는 60°C에서 30초, extension은 72°C에서 1분으로 하여 40 cycle을 수행하였다. 40 cycle PCR 후 72°C에서 5분 반응시킨 후 1.5% agarose gel 전기영동을 통해 PCR 반응물을 확인하였다. 최적화된 annealing 온도에서 MgCl₂ 농도를 변화시켜 PCR 조건을 최적화하였다. 또한 증폭된 DNA가 목적하는 산물인지를 확인하기 위하여 PCR product의 DNA sequencing을 실시하였다.

Real-time RT-PCR

BPIV3의 정량을 위해 RT-PCR을 통해 확립된 RT-PCR 조건을 기초로 AccuPower Greenstar PCR Premix Ex Taq (Bioneer, Korea)을 사용하여 Real-time RT-PCR 조건을 확립하였다. BPIV3 정량을 위해 Corbett Research사의 Rotor-Gene 3000 Real-time PCR 기계를 사용하였다. Real-time PCR 반응액은 AccuPower Greenstar PCR Premix Ex Taq 5 μ L, 10 pmol forward primer 0.5 μ L, 10 pmol reverse primer 0.5 μ L, template 2 μ L, MgCl₂ 용액 0.5 μ L에 멸균된 3차 증류수를 넣어 총 20 μ L가 되게 하였다. 핵산증폭은 pre-incubation은 95°C에서 15분, denaturation은 95°C에서 10초, annealing은 30초 (annealing 온도를 최적화를 위해 52°C, 54°C, 56°C, 58°C, 60°C에서 real-time PCR 수행), extension은 72°C에서 30초로 하여 45 cycle을 수행하였다. 마지막 cycle 후에는 모든 반응물에 대하여 72°C부터 95°C까지 영역에서 melting curve 분석을 실시하였다. 최적 MgCl₂ 농도를 설정하기 위해 최적화된 annealing 온도를 58°C에서 MgCl₂ 농도를 변화시켜 첨가해준 BPIV3 cDNA 농도에 따른 crossing point 값을 비교하였다.

Titer를 측정하고자 하는 시료들과 함께 titer가 2.8 x 10⁶ TCID₅₀/mL인 BPIV3를 순차적으로 2.8 x 10⁰ TCID₅₀/mL까지 10배씩 희석한 후 real-time RT-PCR을 수행하여 정량을 위한 표준곡선을 작성하였다. 시료 속에 들어있는 BPIV3의 양을 표준곡선에 대입하여 정량하였다. 표준곡선은 BPIV3의 농도에 따라 real-time PCR에 의해 검출되는 crossing point 값을 TCID₅₀ equivalent/mL로 전환하여 작성하였다(20). Crossing point는 PCR cycle이 exponential phase로 들어가는 cycle 수를 나타낸다.

Real-time RT-PCR의 신뢰성 검증

확립된 BPIV3 정량법의 신뢰성 (reliability)을 보증하기 위해 확립된 실험법의 민감도 (sensitivity), 재현성 (reproducibility) 등을 검증하였다. 민감도를 측정하기 위해 titer가 2.8 x 10⁶ TCID₅₀/mL인 BPIV3를 순차적으로 2.8 x 10⁰ TCID₅₀/mL 까지 10배씩 희석한 후 real-time RT-PCR을 수행하였다. 재현성 검증을 위해 titer가 2.8 x 10⁶ TCID₅₀/mL인 BPIV3를 순차적으로 2.8 x 10⁰ TCID₅₀/mL까지 10배씩 희석한 후 서로 다른 날에 3회 정량 분석하여 crossing point 값을 비교하였다. 특이성 검증을 위해 RNA 바이러스인 hepatitis A virus (ATCC VR 1402), bovine viral diarrhoea virus (ATCC VR 534), reovirus type 3 (ATCC VR-824), encephalomyocarditis virus (ATCC VR 129B)에 대한 cross-reactivity를 측정하였다. 시험에 사용

한 바이러스의 titer는 각각 10⁶ TCID₅₀/mL, 10⁶ TCID₅₀/mL, 10⁵ TCID₅₀/mL, 10⁷ TCID₅₀/mL이었다.

CHO 세포에서 real-time RT-PCR을 이용한 BPIV3 검출

확립된 real-time RT-PCR을 생물약품 제조공정 검증에 적용할 수 있는지 확인하기 위하여 인위적으로 BPIV3를 오염시킨 CHO 세포주에서 BPIV3 검출 시험을 실시하였다. CHO DG44 세포를 5% 우혈청을 첨가한 Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM: Gibco BRL, USA) 배지에 100X Hypoxanthine-Thymidine supplement (HT supplement; Gibco BRL, USA) 1%를 첨가하여 배양하였다. T-25 flask에 배양된 CHO DG44에 BPIV3를 감염시킨 후 4일 동안 배양하였다. 세포 배양액을 제거한 후 세포 배양액에 남아있을 수 있는 BPIV3를 완벽히 제거하기 위해 phosphate buffered saline으로 3번 세척한 다음 CHO DG44를 계대 배양하였다. 4일 동안 배양한 후 다시 계대 배양한 다음 4일 후에 현미경으로 CHO DG44의 모양을 관찰한 후 세포 배양액과 세포를 따로 수거하였다. 확립된 real-time RT-PCR 방법을 이용하여 세포 배양액과 세포에 BPIV3가 존재하는지 여부를 정량적으로 확인하였다. Real-time RT-PCR 양성 대조군으로는 titer가 2.8 x 10⁴ TCID₅₀/mL인 BPIV3를 사용하였으며, 음성 대조군으로는 CHO 세포주 배양 배지를 사용하였다.

소유래 콜라겐에서 real-time RT-PCR을 이용한 BPIV3 검출

확립된 real-time RT-PCR을 소유래 콜라겐 제조공정 검증에 적용할 수 있는지 확인하기 위하여 인위적으로 BPIV3를 오염시킨 콜라겐에서 BPIV3 검출 시험을 실시하였다. Titer가 7.8 x 10⁵ TCID₅₀/mL인 BPIV3를 순차적으로 10배씩 희석한 후 각 희석액 0.2 mL을 소유래 콜라겐 1.8 mL에 spiking한 다음 확립된 real-time PCR 방법을 사용하여 BPIV3를 검출하였다. Real-time RT-PCR 음성 대조군으로는 바이러스를 첨가하지 않은 콜라겐을 사용하였다.

결 과

Primer의 선별

PCR 방법을 사용하여 특정 바이러스 존재를 확인하고, 정량 분석하기 위해서는 바이러스 내에서 유전적인 변이가 심하지 않은 conserved sequence를 가진 부위를 선택하여야 한다. 선택된 sequence는 특정 바이러스에만 존재하여 특이성이 높아야 한다. 생물약품과 조직공학제제, 세포치료제의 원료물질, 공정 중간물질, 최종제품 등에 미량으로 오염될 수 있는 바이러스 검출을 위한 정량 PCR의 경우 높은 민감도가 요구된다(13, 20). 위와 같은 조건을 만족하는 PCR을 확립하기 위해 Primer3 Software를 이용하여 BPIV3 특이적인 primer 5쌍을 디자인하였다(Table 1). RT-PCR을 실행하여 각각의 primer 쌍들의 민감도를 확인하였다. Titer가 2.8 x 10⁶ TCID₅₀/mL, 2.8 x 10⁴ TCID₅₀/mL, 2.8 x 10² TCID₅₀/mL, 2.8 x 10⁰ TCID₅₀/mL 인 BPIV3를 시료로 RT-PCR을 수행한 결과 primer 쌍 BPIV3-F3, BPIV3-R3가 가장 민감도가 우수하였다(자료 미제시). RT-PCR

Table 1. Sequences of oligonucleotide primer sets used in the detection of BPIV3

Forward primer	Reverse Primer	Nucleotide position*	Amplicon size
BPIV3-F1 AACTAGGAAATGTAACACGAATTC	BPIV3-R1 AATTCACATATATAAACTCTCAC	14208 ~ 14320	113
BPIV3-F2 AACAGGTAATGATAACAGGATT	BPIV3-R2 AACTCACTTTTATACAACATCC	12646 ~ 12768	123
BPIV3-F3 ATGTTCAAAAATATATCCCCTAT	BPIV3-R3 CTATCATGAGTCATTCTCTGTA	7113 ~ 7236	124
BPIV3-F4 GTTCAAAAATATATCCCCTAT	BPIV3-R4 CTATCATGAGTCATTCTCTGTA	7115 ~ 7236	122
BPIV3-F5 AAGTACAATGATAGAAGAGGAT	BPIV3-R5 CTATAGCATTCTCTAATTCAGT	11744 ~ 11865	122

*NC 002161.

조건을 최적화 한 결과 annealing temperature와 MgCl₂ 농도는 각각 58°C와 3 mM이었다. 최적 조건에서 RT-PCR의 민감도를 측정하였다. Titer가 2.8 × 10⁶ TCID₅₀/mL인 BVDV를 순차적으로 희석하여 RT-PCR 한 결과 2.8 TCID₅₀/mL까지 PCR 산물을 확인할 수 있었다(Fig. 1). PCR 산물을 sequencing한 후 blast searching (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) 한 결과 PCR 산물이 BPIV3 유전자임을 확인할 수 있었다(자료 미제시).



Figure 1. Sensitivity of RT-PCR assay for detection of BPIV3. M, 100 bp DNA ladder; 1, 2.8 × 10⁶ TCID₅₀/mL; 2, 2.8 × 10⁵ TCID₅₀/mL; 3, 2.8 × 10⁴ TCID₅₀/mL; 4, 2.8 × 10³ TCID₅₀/mL; 5, 2.8 × 10² TCID₅₀/mL; 6, 2.8 × 10¹ TCID₅₀/mL; 7, 2.8 × 10⁰ TCID₅₀/mL; NC, Negative control.

Real-time RT-PCR 최적화

RT-PCR을 통해 확립된 PCR 조건을 기초로 AccuPower Greenstar PCR Premix Ex Tag을 사용하여 real-time RT-PCR 조건을 확립하였다. Forward primer로 BPIV3-F3를 reverse primer로 BPIV3-R3를 사용하여 PCR 반응의 annealing temperature를 최적화하였다(Fig. 2). Titer가 2.8 × 10⁶ TCID₅₀/mL, 2.8 × 10⁴ TCID₅₀/mL, 2.8 × 10² TCID₅₀/mL인 BPIV3를 시료로 annealing temperature를 52°C, 54°C, 56°C, 58°C, 60°C로 변화시키며 real-time RT-PCR을 수행하였을 때, 58°C에서 crossing point가 가장 낮게 나타나 58°C가 최적 온도임을 알 수 있었다.

최적 온도에서 MgCl₂ 농도를 변화시켜 PCR 조건을 최적화하였다(Table 2). Titer가 2.8 × 10⁶ TCID₅₀/mL, 2.8 × 10⁴ TCID₅₀/mL, 2.8 × 10² TCID₅₀/mL인 BPIV3를 시료로 MgCl₂ 농도를 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM로 변화시켜가며 real-time RT-PCR을 수행하였을 때 2 mM에서 crossing point가 가장 낮게 나타나 최적 MgCl₂ 농도는 2 mM임을 알 수 있었다.

Table 2. Optimization of MgCl₂ concentration in real-time RT-PCR assay

Virus titer (TCID ₅₀ /mL)	MgCl ₂ concentration (mM)			
	2	3	4	5
2.8 × 10 ⁶	^a 13.10	14.23	26.02	42.05
2.8 × 10 ⁴	19.96	21.63	35.84	43.52
2.8 × 10 ²	27.58	29.32	43.04	44.69
Negative control	45.31	45.43	45.87	45.64

^aValues indicate crossing point value.

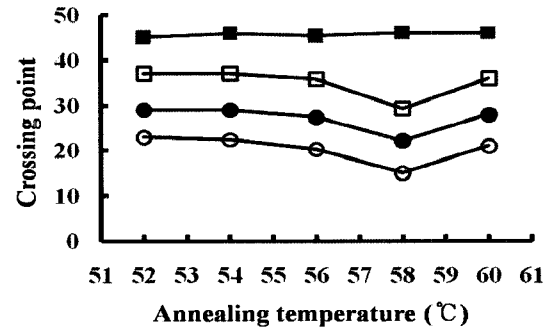


Figure 2. Optimization of annealing temperature. The crossing point value refers to the cycle number at which the fluorescence of the PCR reaction rises above a set threshold and is inversely proportional to the amount of starting target. ○, 2.8 × 10⁶ TCID₅₀/mL; ●, 2.8 × 10⁴ TCID₅₀/mL; □, 2.8 × 10² TCID₅₀/mL; ■, Negative control.

Real-time RT-PCR의 신뢰성 검증

BPIV3 정량을 위한 real-time RT-PCR 방법의 신뢰성 (reliability)을 보증하기 위해 확립된 실험법의 민감도 (sensitivity), 재현성 (reproducibility)등을 검증하였다.

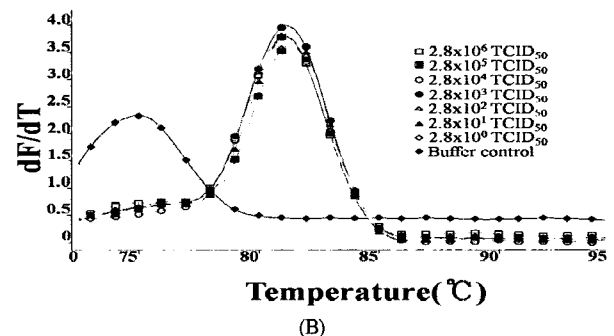
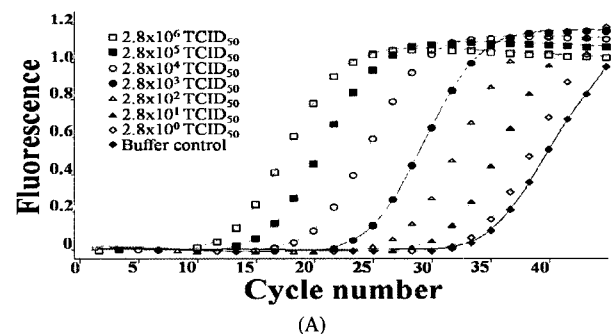


Figure 3. Sensitivity of real-time RT-PCR assay for quantification of BPIV3. (A) Amplification plots obtained with 10-fold serial dilutions of BPIV3 stock solution. (B) Melting curve analysis of the amplification plot. BPIV3 stock solution of 2.8 × 10⁶ TCID₅₀/mL was serially diluted and cycle-by-cycle detection of BPIV3 RNA was performed using the optimized real-time RT-PCR assay with SYBR Green I.

민감도를 측정하기 위해 2.8×10^6 TCID₅₀/mL BPIV3를 순차적으로 10배씩 희석한 후 Real-time RT-PCR을 수행하였다. 각 시료에 대해 Real-time RT-PCR cycle 수에 따른 fluorescence 값의 증가를 관찰한 결과 민감도는 2.8 TCID₅₀/mL임을 확인할 수 있었다(Fig. 3A). Melting curve 분석 결과 BPIV3에 특이적인 부분과 비특이적인 부분으로 나뉘었으며, 완충용액 대조군에서는 BPIV3에 특이적인 peak을 확인할 수 없었다(Fig. 3B). 증폭된 PCR 산물을 1.5% (w/v) agarose gel을 사용하여 전기 영동한 결과 각 BPIV3 양성시료에서 예상 크기의 밴드를 확인할 수 있었지만, 완충용액 대조군에서는 PCR 산물을 확인할 수 없었다(자료 미제시).

확립된 BPIV3 정량법의 재현성 검증을 위해 서로 다른 날에 BPIV3 표준시료에서 RNA를 추출하고 real-time RT-PCR을 수행한 후 crossing point 값을 비교하였다(Fig. 4). BPIV3 log titer (\log_{10} TCID₅₀/mL; x)에 대한 crossing point 값 (y) 간의 표준 회귀식은 첫째 날의 경우 $y = -3.62x + 38.40$ (결정계수 $r^2 = 0.996$), 둘째 날의 경우 $y = -3.50x + 37.93$ ($r^2 = 0.994$), 셋째 날의 경우 $y = -3.61x + 38.18$ ($r^2 = 0.991$)로 BPIV3 log titer와 crossing point 값 간의 회귀성이 매우 높았다.

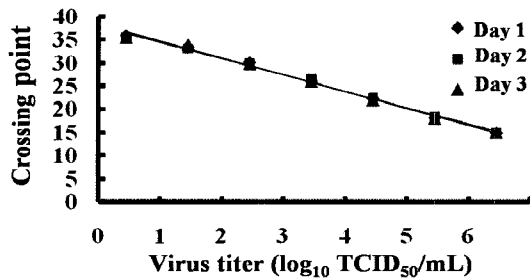


Figure 4. Reproducibility of real-time RT-PCR assay for quantitative detection of BPIV3. The standard curves were obtained by the regression analysis of crossing point values versus initial virus titer. These results were obtained from three independent assays performed at different days.

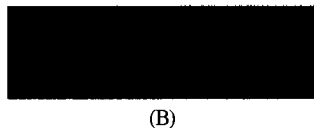
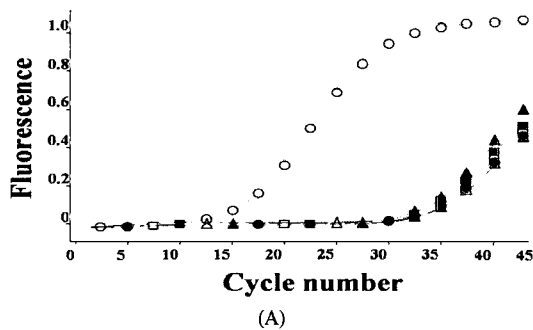


Figure 5. Specificity of real-time RT-PCR assay to potential cross-reactive viruses. (A) Amplification plots. ○, Bovine parainfluenza virus type 3; ●, Hepatitis A virus; △, Bovine viral diarrhoea virus; ▲, Reovirus type 3; □, Encephalomyocarditis virus; ■, Negative control. (B) Agarose gel electrophoresis of the PCR products. Specificity of the real-time RT-PCR assay was evaluated using the optimized protocol and then the PCR products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis. M, 100 bp DNA ladder; 1, Bovine parainfluenza virus type 3; 2, Hepatitis A virus; 3, Bovine viral diarrhoea virus; 4, Reovirus type 3; 5, Encephalomyocarditis virus; NC, Negative control.

다른 RNA virus들 (hepatitis A virus, bovine viral diarrhoea virus, reovirus type 3, encephalomyocarditis virus)을 대상으로 특이성을 실험할 결과 BPIV3의 경우에만 fluorescence값의 증가를 관찰할 수 있었고, 다른 바이러스에서는 완충용액 음성 대조군과 같이 fluorescence값의 증가를 관찰할 수 없었다(Fig. 5A). Real-time RT-PCR 산물을 1.5% agarose gel 상에서 분석한 결과 BPIV3 양성 대조군에서만 PCR 반응 산물이 생성되었고, 다른 바이러스와 완충용액 음성 대조군에서는 PCR 반응 산물이 생성되지 않았음을 알 수 있었다(Fig. 5B). 이와 같은 결과에서 확립된 real-time RT-PCR 방법은 BPIV3에 특이적인 실험법임을 확인하였다.

CHO 세포주에서 real-time RT-PCR을 이용한 BPIV3 검출

확립된 real-time RT-PCR을 생물 의약품 제조공정에 적용할 수 있는지 확인하기 위하여 인위적으로 BPIV3를 오염시킨 CHO 세포주에서 BPIV3 검출 시험을 실시하였다. T-25 flask에 배양된 CHO DG44 세포에 BPIV3를 인위적으로 오염시킨 후 T-25 flask에 3번 이상 계대 배양하면서 병변효과를 관찰하였다.

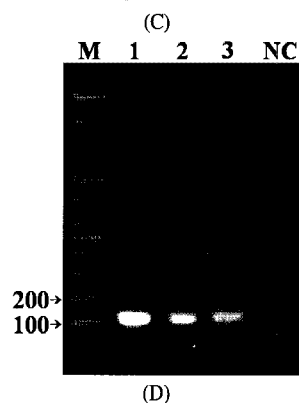
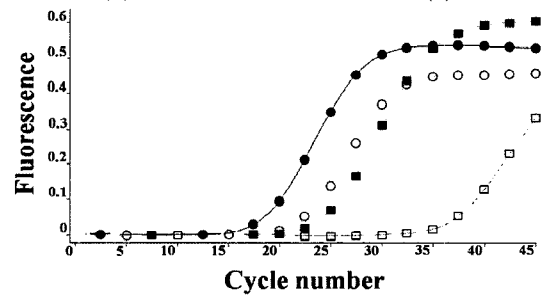
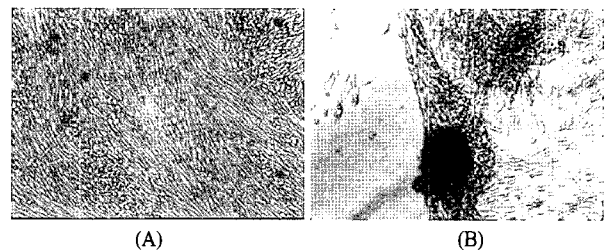


Figure 6. Quantitative detection of BPIV3 in artificially infected CHO DG44 cell line. (A) Morphology of CHO DG44 cell line not infected with BPIV3. (B) Morphology of CHO DG44 cell line infected with BPIV3. (C) Amplification plots of BPIV3 positive control(●), CHO DG44 cell line infected with BPIV3(○), cell culture supernatant(○), and negative control(□). (D) Agarose gel electrophoresis of the PCR products. M, 100 bp DNA ladder; 1, BPIV3 positive control; 2, CHO DG44 cell line infected with BPIV3; 3, cell culture supernatant; NC, negative control.

BPIV3는 CHO DG44 세포주에서 병변효과를 나타내었다(Fig. 6A & 6B). 세포배양 상청액 4 mL을 회수하고, CHO DG44 세포를 trypsin을 처리하여 4 mL 부피로 회수하였다. 세포배양 상청액과 CHO 세포에서 각각 RNA를 추출하고, 확립된 real-time RT-PCR을 활용하여 BPIV3를 정량 검출하였다(Fig. 6C). 세포배양액에서는 2.5×10^3 TCID₅₀ equivalent/mL BPIV3가 검출되었고, 세포에서는 6.1×10^2 TCID₅₀ equivalent/mL BPIV3가 검출되었다. 증폭된 PCR 산물을 1.5% (w/v) agarose gel을 사용하여 전기 영동한 결과 각 BPIV3 양성시료, 세포배양액, 세포에서 예상 크기의 밴드를 확인할 수 있었지만, 음성 대조구에서는 PCR 산물을 확인할 수 없었다(Fig. 6D).

소유래 콜라겐에서 real-time RT-PCR을 이용한 BPIV3 검출

확립된 real-time RT-PCR을 소유래 콜라겐 제조공정에 적용할 수 있는지 확인하기 위하여 인위적으로 BPIV3를 오염시킨 콜라겐에서 BPIV3 검출시험을 실시하였다. Titer가 7.8×10^5 TCID₅₀/mL인 BPIV3를 순차적으로 10배씩 희석한 후 각 희석액 0.2 mL을 소유래 콜라겐 1.8 mL에 spiking 한 다음 확립된 real-time PCR 방법을 사용하여 BPIV3를 검출하였다. 각 시료에 대해 real-time RT-PCR cycle 수에 따른 fluorescence값의 증가를 관찰한 결과 7.8×10^0 TCID₅₀/mL 까지 정량적으로 검출할 수 있었다(Fig. 7).

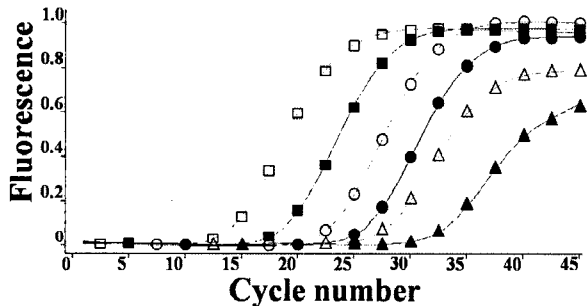


Figure 7. Quantitative detection of BPIV3 in artificially contaminated bovine collagen. BPIV3 stock solution of 7.8×10^5 TCID₅₀/mL was serially diluted with 10-fold and then 0.2 mL of each diluted solution was spiked in a 1.8 mL aliquot of 0.5% bovine collagen. Quantitative detection of BPIV3 in the artificially contaminated bovine collagen was performed using real-time RT-PCR. □, 7.8×10^4 TCID₅₀/mL; ■, 7.8×10^3 TCID₅₀/mL; ○, 7.8×10^2 TCID₅₀/mL; ●, 7.8×10^1 TCID₅₀/mL; △, 7.8×10^0 TCID₅₀/mL; ▲, Negative control.

고 찰

소유래 혈액, 세포, 조직, 기관 등을 이용하여 생산되는 생물 의약품, 조직공학체제, 세포치료제는 원료 자체에 감염성 병원 인자가 오염될 가능성이 있기 때문에 안전성 확보가 가장 큰 문제 중의 하나로 대두되고 있다. 인체에 유해한 바이러스가 오염되는 것을 방지하여 안전한 생물학적 제제가 제조되도록 하기 위해서는 오염 바이러스의 검출 및 불활화 또는 제거 검증 관련 기술을 확립해야만 한다(11, 20, 21). 또한 완제품은 물론 원료부터 완제품의 생산에 이르기까지 전체 제조공정에 대한 철저한 품질관리가 필수적이다. BPIV3는 생물 의약품 제조용 세포주인 CHO 세포와 세포주의 배양을 위해 첨가하는

우혈청에 오염된 사례가 있기 때문에, 인체에 직접적인 위해 여부는 알려져 있지 않지만, 잠재적인 위해요소의 하나이다. 따라서 우혈청을 세포배양 원료로 사용한 세포주의 경우 반드시 BPIV3의 오염 여부를 민감도와 특이도가 우수한 검증된 시험법으로 확인하여야만 한다(3, 22, 23). 세포치료제의 배양 원료로 우혈청을 사용할 경우에도, BPIV3의 오염 여부를 확인하여야만 한다. 또한 소의 조직을 이용하여 생산되는 콜라겐과 조직공학체제의 경우에도 BPIV3의 오염 여부를 확인하여야만 한다. 내인성 또는 외래성 위해 바이러스 오염을 방지하기 위한 ICH 가이드라인 (Q5A)은 원료의 오염 여부를 검사하고, 제조공정에서 바이러스 제거 능력을 평가하기 위하여 민감도와 특이도가 우수한 검증된 시험방법을 사용하도록 권장하고 있다(12).

BPIV3 검출시험법은 주로 소 질병의 진단을 위해 개발되어 왔다. BPIV3 검출시험법으로는 형광항체법, 혈청중화시험법, 효소결합 면역흡착 분석법 등이 있다(19). 이러한 시험법은 민감도와 특이도가 떨어지며, 정량분석이 어렵다는 단점이 있다. 생물의약품의 바이러스 안전성 검증을 위해서 더 높은 민감도와 특이도의 시험법이 요구되고 있는데, 최근에는 이러한 조건을 만족하는 PCR 시험법이 생물의약품 바이러스 안전성 검증에 활용되고 있다(13, 15, 20). 하지만 지금까지 PCR 방법을 이용하여 BPIV3를 정량적으로 검출하고자 하는 연구는 진행된 바가 없다.

본 연구에서는 소유래 원료를 사용하는 생물의약품과 조직공학체제, 세포치료제의 안전성을 보충하기 위해서 BPIV3를 정량적으로 신속하게 검출할 수 있는 민감도와 특이도가 우수한 real-time RT-PCR 시험법을 개발하고자 하였다. BPIV3 전체 유전자를 대상으로 BPIV3 특이적인 primer 5쌍을 디자인하였다. 5쌍의 primer 중 BPIV3의 HN (sialidase) 유전자를 대상으로 디자인 한 primer 쌍 BPIV3-F3, BPIV3-R3의 민감도가 가장 우수하였다. 선별된 primer를 활용하여 annealing temperature와 MgCl₂ 농도 등 real-time RT-PCR 조건을 최적화 한 결과 확립된 실험법의 민감도는 2.8 TCID₅₀/mL이었다. 확립된 BPIV3 정량법의 재현성 검증을 위해 서로 다른 날에 BPIV3 표준시료에서 RNA를 추출하고 real-time RT-PCR을 수행한 후 crossing point 값을 비교한 결과, BPIV3 log titer (log₁₀ TCID₅₀/mL; x)에 대한 crossing point 값 (y) 간의 표준 회귀식의 결정계수 (r²)는 모두 0.99 이상으로 재현성뿐만 아니라 회귀성이 매우 높음을 알 수 있었다. 생물의약품의 품질관리 평가에 있어 시험법의 민감도와 재현성은 분석의 정확성, 특이성, 검출한계 등과 함께 매우 중요한 요인으로 고려되는데, 본 연구에서 확립한 정량법은 BPIV3를 정량하는데 있어 민감도와 재현성이 우수함을 확인할 수 있었다.

WHO, EMEA (European Medicines Agency), FDA (Food and Drug Administration)와 같은 규제기관은 유전자 제조합 단백질 의약품을 생산하기 위해 사용하는 동물세포주의 마스터세포 (Master cell)와 제조용세포 (Working cell)에서 외인성 바이러스 검출에 대한 관리 규정을 정하고, 세포주에 의한 바이러스 오염 사고를 최소화하고 있지만, 비용과 시간이 많이 드는 생물학적 시험법 (In vitro 시험법, In vivo 시험법, 항체생산 시험법)을 대체할 수 있는 민감한 분자시험법이 상용화되지 않은 실정이다. 9CFR section 113.53은 원료물질 유래 생물의 세포주

(primary cells 또는 cell line)를 사용하여 생산용 원료물질, 생산용 세포주, 공정 시료 등에 오염될 수 있는 바이러스를 검출하도록 요구하고 있다(24). 소유래 물질을 원료로 사용한 경우 소유래 바이러스에 쉽게 감염되는 BT (bovine turbinate) 세포주를 사용하여 바이러스를 검출한다. BT 세포주 단층세포에 원료물질, 세포주 파쇄액, 공정 시료, 반제품, 완제품 등을 첨가한 후 7일 이상 배양을 하면서 병변효과를 관찰하여 오염여부를 판단하거나 haemadsorption test를 통해 바이러스 오염여부를 판단한다. 또한 BT 세포주 단층세포에 원료물질, 세포주 파쇄액, 공정 시료, 반제품, 완제품 등을 첨가한 후 7일 이상 배양 한 다음 소유래 바이러스에 대한 항혈청을 이용해 면역형광 방법으로 바이러스 오염 여부를 판단한다. 이러한 생물학적 실험법의 경우 시간이 많이 걸리고, 비용이 많이 드는 단점이 있다. 본 연구를 통해 확립된 BPIV3 검출 시험법을 CHO 세포주에서 BPIV3 검출 시험에 활용하였을 때, BPIV3가 오염된 CHO 세포주와 세포주 배양 상등액에서 BPIV3를 효과적으로 검출할 수 있었다. 따라서 BPIV3 real-time RT-PCR 시험법은 동물세포주 검증과 생산공정 검증에서 BPIV3 오염 여부를 정성적 또는 정량적 검출할 수 있는 우수한 시험법임을 확인할 수 있었다.

소유래 콜라겐은 의료용 생체재료로 널리 이용되고 있지만, 콜라겐의 바이러스 안전성 검증에 관한 구체적인 가이드라인이 현재까지 제시되지 않아 제조사에서 자체적으로 안전성 검증시스템을 구축하고 안전성 보증 시험을 실시하고 있다. 하지만 BPIV3를 효과적으로 검출할 수 있는 시험법이 확립되지 않아 real-time RT-PCR 시험법 같은 민감한 시험법이 요구되고 있다. 본 연구를 통해 확립된 BPIV3 검출 시험법을 0.5% 콜라겐에 적용하였을 때 7.8×10^0 TCID₅₀/mL 까지 정량적으로 검출할 수 있어 콜라겐의 품질보중에 활용할 수 있는 우수한 시험법임을 확인하였다.

Real-time PCR을 활용한 바이러스 정량 검출 방법은 크로마토그래피 공정과 같은 단백질 분리 정제 공정에서 미량의 바이러스를 실시간에 정량화 할 수 있기 때문에, 생물학적약품 제조공정에서 바이러스 제거 검증 실험 시 감염역가시험과 함께 적용할 수 있는 유용한 평가기술일 뿐만 아니라, 감염역가시험으로는 분석할 수 없는 크로마토그래피 세척공정에서의 바이러스 안전성 검증에 활용할 수 있는 적절한 방법이다(20). 본 연구를 통해 확립된 BPIV3 real-time RT-PCR 시험법도 세포배양 유래 생물학적약품 제조 공정에서 바이러스 제거 검증과 크로마토그래피 세척 검증에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

소의 혈액, 세포, 조직, 기관 등 소유래 물질을 원료로 사용한 생물학적약품, 조직공학체제, 세포치료제의 경우 소유래 원료물질에 다양한 바이러스가 오염된 사례가 있기 때문에 바이러스 안전성 검증이 필수적이다. BPIV3는 동물 세포주, 우혈청 등에 가장 흔하게 오염되는 바이러스이다. 소유래 물질을 원료로 하는 생물학적약품, 조직공학체제, 세포치료제 등에서 BPIV3 안전성을 확보하기 위해, 원료물질, 제조공정, 완제품에서 BPIV3를 정량적으로 검출하고, 제조공정에서 BPIV3 제거

검증을 위한 시험법으로 활용이 가능한 BPIV3 real-time RT-PCR 시험법을 확립하였다. BPIV3에 특이적인 primer를 선별하였으며, 형광염료 SYBR Green I을 사용하여 BPIV3 RNA 정량 검출 시험법을 최적화하였다. 세포배양법에 의한 감염역가와 비교한 결과 real-time RT-PCR 민감도는 2.8 TCID₅₀/mL이었다. 확립된 시험법의 신뢰성 (reliability)을 보증하기 위해 시험법 검증을 실시한 결과 특이성 (specificity)과 재현성 (reproducibility)이 우수함을 확인하였다. 확립된 real-time RT-PCR을 생물의약품 제조공정 검증에 적용할 수 있는지 확인하기 위하여 인위적으로 BPIV3를 오염시킨 CHO 세포주와 소유래 콜라겐에서 BPIV3 검출 시험을 실시하였다. BPIV3를 감염시킨 CHO 세포와 세포배양 상등액에서 BPIV3를 정량적으로 검출할 수 있었다. 소유래 콜라겐에서도 7.8 TCID₅₀/mL 까지 정량적으로 검출할 수 있었다. 위와 같은 결과에서 확립된 BPIV3 real-time RT-PCR 시험법은 생물의약품 안전성 보증을 위한 세포주 검증, 생물의약품 생산 공정 검증, 바이러스 제거 공정 검증 등에서 감염역가 시험법과 같은 생물학적 시험법을 대신할 수 있는 신속하고, 특이성과 민감성이 우수한 시험법임을 확인하였다.

감 사

본 논문은 교육과학기술부와 한국산업기술재단의 지역혁신인력양성사업과 식품의약품안전청 용역연구개발사업으로 수행된 연구결과임.

REFERENCES

1. Yarlagadda, P. K., M. Chandrasekharan, and J. Y. Shyan (2005), Recent advances and current developments in tissue scaffolding, *Biomed. Mater. Eng.* **15**, 159-177.
2. Schneider, G. (2003), Bioimplants-characteristics and use, *Laryngorhinootologie* **82**, 839-852.
3. Erickson, G. A., S. R. Bolin, and J. G. Landgraf (1991), Viral contamination of fetal bovine serum used for tissue culture: risks and concerns, *Dev. Biol. Stand.* **75**, 173-175.
4. Faraj, K. A., T. H. van Kuppevelt, and W. F. Daamen (2007), Construction of collagen scaffolds that mimic the three-dimensional architecture of specific tissues, *Tissue Eng.* **13**, 2387-2394.
5. Rudnick, A. (2006), Advances in tissue engineering and use of type 1 bovine collagen particles in wound bed preparation, *J. Wound Care* **15**, 402-404.
6. Choi, Y.-M., J.-K. Kim, J.-I. Park, and S.-W. Jeong (2006), Evaluation of bovine amniotic membrane for the treatment of superficial canine corneal ulcer, *J. Vet. Clinics* **23**, 334-336.
7. Gajiwala, K. and A. L. Gajiwala (2004), Evaluation of lyophilised, gamma-irradiated amnion as a biological dressing, *Cell Tissue Bank* **5**, 73-80.
8. Horaud, F. (1991), Introductory remark: viral safety of biologicals, *Dev. Biol. Stand.* **75**, 3-7.
9. Parkman, P. D. (1996), Safety of biopharmaceuticals: a current perspective, *Dev. Biol. Stand.* **88**, 5-7.
10. Merten, O.-W. (2002), Virus contamination of cell culture-a biotechnological view, *Cytotechnol.* **39**, 91-116.
11. Celis, P. and G. Silvester (2004), European regulatory guidance on virus safety of recombinant proteins, monoclonal antibodies and plasma derived medicinal products, *Dev. Biol. Stand.* **118**, 3-10.

12. International Conference on Harmonisation (1998), Guidance on viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin; availability, *Federal Register* **63**, 51074-51084.
13. Ryu, S.-R., J.-H. Shin, S.-Y. Baek, J.-O. Kim, K.-I. Min, B.-S. Min, B.-G. Kim, D.-K. Kim, M.-K. Park, M.-I. Ahn, K.-S. Chae, H.-S. Jeong, S.-H. Lee, and S.-N. Park (2003), Evaluation of limit of detection and range of quantitation for RT-PCR, real-time RT-PCR and RT-PCR-ELISA detection of bovine viral diarrhea virus contamination in biologics derived from cell cultures, *J. Bacteriol. Virol.* **33**, 161-168.
14. Jennings, A. (1999), Detecting viruses in sera: methods used and their merits, *Dev. Biol. Stand.* **99**, 51-59.
15. 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.
16. Minor, P. D. (1996), Mammalian cells and their contaminants, *Dev. Biol. Standard.* **88**, 25-29.
17. Collins, P. L., R. M. Chanock, and K. McIntosh (1996), Parainfluenza Viruses, In *Virology*, 3rd ed., Vol. 1, B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, and S. E. Straus, Eds., p1205, Fields Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
18. Eloit, M. (1999), Risks of virus transmission associated with animal sera or substitutes and methods of control, *Dev. Biol. Stand.* **99**, 9-16.
19. Assaf, R., C. Montpetit, and G. Marsolais (1983), Serology of bovine parainfluenza virus type 3: comparison of the enzyme linked immunosorbent assay and hemagglutination inhibition, *Can. J. Comp. Med.* **47**, 140-142.
20. Kil, T. G., W. J. Kim, D. H. Lee, Y. Kang, H. M. Sung, S. H. Yoo, S.-N. Park, and I. S. Kim (2005), Quantitative real-time PCR of porcine parvovirus as a model virus for cleaning validation of chromatography during manufacture of plasma derivatives, *Kor. J. Microbiol.* **41**, 216-224.
21. Darling, A. (2002), Validation of biopharmaceutical purification process for virus clearance evaluation, *Mol. Biotechnol.* **21**, 57-83.
22. Adamson, S. R. (1999), Experiences of virus, retrovirus and retrovirus-like particles in chinese hamster ovary (CHO) and hybridoma cells used for production of protein therapeutics, *Dev. Biol. Stand.* **93**, 89-96.
23. Garnick, R. L. (1998), Raw materials as a source of contamination in large-scale cell culture, *Dev. Biol. Stand.* **93**, 21-29.
24. Code of federal regulation 9 (9CFR), animal and animal products (1996), Part 113.53. Requirement for ingredients of animal origin used for production of biologics.