

세포배양 유래 생물약품 생산 공정에서 Minute Virus of Mice 안전성 검증을 위한 Real-Time PCR

이동혁 · 조항미 · 김현미 · 이정숙¹ · 김인섭*
한남대학교 생명·나노과학대학 생명과학과, ¹한스바이오메드(주) 한스대덕연구소

Real-Time PCR for Validation of Minute Virus of Mice Safety during the Manufacture of Mammalian Cell Culture-Derived Biopharmaceuticals. Lee, Dong Hyuck, Hang Mee Cho, Hyun Mi Kim, Jungsuk Lee¹, and In Seop Kim*. *Department of Biological Sciences, Hannam University, Daejeon 305-811, Korea, ¹Tissue Engineering Division, Research and Development Dept., Hans Daedeok R&D Center, Hans Biomed Corp., Daejeon 305-811, Korea* - Validation of viral safety is essential in ensuring the safety of mammalian cell culture-derived biopharmaceuticals, because numerous adventitious viruses have been contaminated during the manufacture of the products. Mammalian cells are highly susceptible to minute virus of mice(MVM), and there are several reports of MVM contamination during the manufacture of biopharmaceuticals. In order to establish the validation system for the MVM safety, a real-time PCR method was developed for quantitative detection of MVM in cell lines, raw materials, manufacturing processes, and final products as well as MVM clearance validation. Specific primers for amplification of MVM DNA was selected, and MVM DNA was quantified by use of SYBR Green I. The sensitivity of the assay was calculated to be 6×10^{-2} TCID₅₀/mL. The real-time PCR method was proven to be reproducible and very specific to MVM. The established real-time PCR assay was successfully applied to the validation of Chinese hamster ovary (CHO) cell artificially infected with MVM. MVM DNA could be quantified in CHO cell as well as culture supernatant. When the real-time PCR assay was applied to the validation of virus removal during a virus filtration process, the result was similar to that of virus infectivity assay. Therefore, it was concluded that this rapid, specific, sensitive, and robust assay could replace infectivity assay for detection and clearance validation of MVM.

Key words: Chinese hamster ovary (CHO) cell, minute virus of mice, real-time PCR, virus validation

서 론

동물세포를 이용한 바이러스 백신이 개발된 이래로 동물 세포는 단백질 의약품과 단일클론 항체 등 치료 및 예방용 생물약품 생산을 위한 숙주로 사용되고 있다. 세포배양 유래 생물약품은 생체에서 유래한 복잡한 분자구조를 가진 물질로 최종제품에 대한 물리화학적 분석만으로는 제품의 효능을 평가하기 어렵다. 또한 생물약품 생산에 사용되는 동물세포주는 내인성 및 외래성 바이러스에 오염될 가능성이 크기 때문에 안전성에 관한 논란이 오래 전부터 있어왔다 [4, 10, 20, 24]. 최근에 WHO(World Health Organization), FDA(Food and Drug Administration), EMEA(European Medicines Agency)는 이러한 제제의 최종제품 대한 안전성과 유효성 분석과 함께 원료부터 완제품에 이르는 전체 제조공정에 대한 철저한 품질관리의 중요성을 강조하고 있다 [11, 25]. 따라서 세계 각국의 규제기관에서는 생물약품에

서 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[12].

생물약품 생산을 위해 설치류 유래 세포주인 Chinese hamster ovary(CHO) 세포와 baby hamster kidney(BHK) 세포가 주로 사용되고 있다[2, 18, 22]. 이러한 세포들은 Minute Virus of Mice(MVM)에 쉽게 감염될 수 있으며, 생물 의약품 생산공정에서 이러한 세포주들이 오염된 사례가 보고되고 있다[1, 8, 9, 21]. MVM은 parvovirus 과에 속하며, single-stranded DNA로 구성된 5 kb 유전체를 갖고 있는 외피비보유 바이러스(non-enveloped virus)이다[6]. MVM은 열, 유기용매, 계면활성제, 산과 알칼리, 건조 등 물리화학적 처리에 매우 큰 저항성을 나타내어 세포배양 유래 생물 의약품 생산공정의 안전성 검증을 위한 모델 바이러스로 이용되고 있다[3]. MVM의 자연계상의 숙주는 집쥐(*Mus musculus*)이며, 성체 쥐가 감염되었을 경우 무증상을 나타내나, 신생아쥐나 햄스터가 감염되었을 경우 기형이 되거나 사망할 수 있다[5]. MVM은 세포분화, 세포증식, 면역억제를 포함하는 생물학적 과정에 관여하며, 바이러스의 비구조적

*Corresponding author

Tel: 82-42-629-8754, Fax: 82-42-629-8751

E-mail: inskim@hnu.kr

단백질이 세포독성이 있다는 연구도 보고되었다[16, 17].

MVM을 검출하기 위한 시험법으로 기니픽의 적혈구를 사용한 혈구응집반응 시험(haemagglutination assay), 감염성 세포를 이용한 감염성 시험(infectivity assay), 면역형광염색법(immunofluorescent staining), 효소결합면역흡수법(enzyme immunosorbent assay) 등이 사용되어 왔다[14, 19, 23]. 이러한 시험법은 시간과 비용이 많이 들고, 민감도와 특이도가 떨어지는 단점이 있어, 생물약품 생산 공정에서 MVM 검출 시험법으로 적용하는데 어려움이 있다. 최근에는 민감도와 특이도가 우수한 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)을 활용하여 동물세포 배양액에서 MVM을 검출하려는 시험법이 개발되었다[5, 13]. 또한 real-time PCR을 이용하여 동물세포 배양 유래 단백질 의약품 제조공정에서 바이러스 제거 검증 실험에 활용하고자 하는 연구가 시도되었다[28]. 이러한 시험법의 민감도는 1 TCID₅₀/mL로 기존의 전통적인 시험법보다 민감도와 특이도 우수하였고, 시험시간도 감염성 시험에 비해 10배 정도 단축되었다. 하지만 동물세포 배양액에는 감염력이 없는 MVM 입자와 MVM DNA 절편들이 감염력이 있는 MVM과 함께 존재할 수 있으므로, 배양액에 존재하는 모든 MVM DNA를 검출하기 위해서는 더 민감도가 높은 시험법이 요구되고 있다.

본 연구에서는 동물세포 배양 유래 생물약품에서 MVM 안전성을 확보하기 위해, 세포주, 원료물질, 제조공정, 완제품에서 MVM을 정량적으로 검출하고, 제조공정에서 MVM 제거 검증을 위한 시험법으로 활용이 가능한 민감도와 특이도가 우수한 real-time PCR 시험법을 확립하고자 하였다. 확립된 real-time PCR 시험법을 활용하여 인위적으로 MVM을 감염시킨 CHO 세포에서 MVM을 정량적으로 검출하여 바이러스 안전성 검증 시험법으로의 활용 가능성을 평가하였다. 또한 단백질 의약품 제조공정에서 바이러스 필터를 이용한 바이러스 제거 공정의 효율을 감염력 시험법과 비교 검증하여 바이러스 제거 검증 시험법으로의 활용 가능성을 평가하였다.

재료 및 방법

MVM의 배양 및 정량

MVM(ATCC VR 1346)의 배양과 정량을 위해 A9 세포

(ATCC CRL 6319)를 사용하였다. A9 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×g에서 5분간 원심 분리하여 상층액은 따로 모으고 pellet은 재현탁하였다. Pellet을 동결과 해빙과정을 2회 반복하여 파쇄한 후 400×g에서 5분간 원심 분리하여 상등액을 얻었다. 원심 상등액을 혼합한 후 0.45 μm filter로 여과한 다음 소분하여 -70°C에 보관하였다.

MVM의 정량을 위해 감염성 있는 바이러스의 titer를 50% tissue culture infectious dose(TCID₅₀)로 나타내었다. MVM을 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.

Primer의 선별

MVM 유전자를 증폭하기 위해 사용한 올리고핵산 primer 염기서열은 NCBI data base에 보고된 MVM complete genome(NC 001510)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 MgCl₂ 농도를 변화시켜 PCR 조건을 최적화하였다. 또한 증폭된 DNA가 목적하는 산물인지를 확인하기 위하여 PCR product의 DNA sequencing을 실시하였다.

MVM DNA는 GENE ALL™ Blood SV mini Kit(General Biosystem, Korea)을 사용하여 분리하였다. PCR 반응을 위해 바이러스 Genomic DNA 2 μL, 10 pmol forward primer 1 μL, 10 pmol reverse primer 1 μL, 2X GoTaq®Green Master Mix(Promega, USA) 12.5 μL 혼합액에 Nuclease-free water 8.5 μL를 첨가하여 최종부피를 25 μL로 맞추었다. 핵산증폭은 pre-incubation은 95°C에서 2분, denaturation은 95°C에서 30초, annealing은 30초(annealing 온도 최적화를 위해 48°C, 50°C, 52°C, 54°C, 56°C, 58°C에서 PCR

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

Forward primer	Reverse Primer	Nucleotide position*	Amplicon size
MVM-F1 AGTAAACCAGTTTAAAGCCATTTG	MVM-R1 TTCTGACCACTGTAATGTTCTCAT	1613~1740	128
MVM-F2 CAAGTAAACCAGTTTAAAGCCATT	MVM-R2 TTCTGACCACTGTAATGTTCTCAT	1611~1740	130
MVM-F3 AGTAAACCAGTTTAAAGCCATTTG	MVM-R3 CACTGTAATGTTCTCATTGTGGT	1613~1733	121
MVM-F4 CAAGTAAACCAGTTTAAAGCCATT	MVM-R4 CACTGTAATGTTCTCATTGTGGT	1611~1733	123
MVM-F5 GTTGGTGTCTACTGGGTCTTAT	MVM-R5 ATTGTGAACTCTGATTCTGCAATA	2911~3057	147

*NC 001510

수행), extension은 72°C에서 1분으로 하여 40 cycle을 수행하였다. 40 cycle PCR 후 72°C에서 5분 반응시킨 후 1.5% agarose gel(Sigma Co., USA)을 사용하여 100V 전압으로 30분정도 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 PCR 반응산물을 확인하였다.

Real-time PCR을 이용한 MVM DNA 정량

MVM의 정량을 위해 일반 PCR을 통해 확립된 PCR 조건을 기초로 SYBR Premix Ex Taq™(TaKaRa, Korea)을 사용하여 real-time PCR 조건을 확립하였다. MVM 정량을 위해 Corbett Research사(Australia)의 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 µL에 멸균된 3차 증류수를 넣어 총 25 µL가 되게 하였다. 핵산중폭은 pre-incubation은 95°C에서 15초, denaturation은 95°C에서 15초, annealing은 20초(annealing 온도 최적화를 위해 48°C, 50°C, 52°C, 54°C, 56°C, 58°C에서 real-time PCR 수행), extension은 72°C에서 15초로 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 온도 52°C에서 MgCl₂를 2 mM에서 6 mM까지 변화시켜 첨가해준 MVM DNA 농도에 따른 crossing point 값을 비교하였다.

Titer를 측정하고자 하는 시료들과 함께 Titer가 6×10^4 TCID₅₀/mL인 MVM을 순차적으로 6×10^{-2} TCID₅₀/mL까지 10단계 희석한 후 real-time PCR을 수행하여 정량을 위한 표준곡선을 작성하였다. 시료 속에 들어있는 MVM DNA의 양을 표준곡선에 대입하여 정량하였다. 표준곡선은 MVM의 농도에 따라 real-time PCR에 의해 검출되는 crossing point 값을 TCID₅₀ equivalent/mL로 전환하여 작성하였다[15]. Crossing point는 PCR cycle이 exponential phase로 들어가는 cycle 수를 나타낸다.

Real-time PCR의 신뢰성 검증

확립된 MVM DNA 정량법의 신뢰성(reliability)을 보증하기 위해 확립된 실험법의 민감도(sensitivity), 재현성(reproducibility) 등을 검증하였다. 민감도를 측정하기 위해 titer가 6×10^4 TCID₅₀/mL인 MVM을 순차적으로 6×10^{-2} TCID₅₀/mL까지 10단계 희석한 후 real-time PCR을 수행하였다. 재현성 검증을 위해 titer가 6×10^4 TCID₅₀/mL인 MVM을 순차적으로 6×10^{-2} TCID₅₀/mL까지 10단계 희석한 표준시료를 서로 다른 날에 3회 정량 분석하여 crossing point 값을 비교하였다. 특이성 검증을 위해 human parvovirus B19(BBI Diagnostics, USA), bovine parvovirus(ATCC VR 767), porcine parvovirus(ATCC VR 742),

bovine herpesvirus type 1(ATCC VR-188)에 대한 cross-reactivity를 측정하였다. 시험에 사용한 바이러스의 titer는 각각 9.4×10^5 IU/mL, 10^6 TCID₅₀/mL, 10^6 TCID₅₀/mL, 10^6 TCID₅₀/mL이었다.

CHO 세포에서 real-time PCR을 이용한 MVM 검출

확립된 real-time PCR을 생물약품 제조공정 검증에 적용할 수 있는지 확인하기 위하여 인위적으로 MVM을 오염시킨 CHO 세포주에서 MVM 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 MVM을 감염시킨 후 4일 동안 배양하였다. 세포 배양액을 제거한 후 세포 배양액에 남아있을 수 있는 MVM을 완벽히 제거하기 위해 phosphate buffered saline(PBS)으로 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 PCR 방법을 이용하여 세포 배양액과 세포에 MVM이 존재하는지 여부를 확인하였다. Real-time PCR 양성 대조군으로는 titer가 6×10^4 TCID₅₀/mL인 MVM을 사용하였으며, 음성 대조군으로는 CHO 세포주 배양배지를 사용하였다.

Real-time PCR을 이용한 바이러스 제거 검증

확립된 real-time PCR을 생물약품 분리정제공정에서 바이러스 제거 효율 검증에 적용할 수 있는지 확인하기 위하여 B형혈병 치료제 factor IX 생산을 위한 Viresolve NFP 바이러스 필터 공정을 모델 시스템으로 선정하였다. MVM stock 용액 3 mL을 0.1 µm membrane(Millex-VV, Millipore, Cork, Ireland)으로 여과하여 바이러스 aggregate와 세포 debris를 제거한 후 factor IX 용액(0.8 mg/mL) 27 mL을 첨가하였다. 바이러스가 첨가된 factor IX 용액 16 mL을 Viresolve NFP 47 mm 디스크 여과막(Millipore, Jaffrey, USA)에 2 bar의 압력으로 여과하였다. 여과가 끝난 후 다시 인산완충용액 16 mL을 첨가하여 2 bar의 압력으로 여과하였다. 바이러스가 첨가된 factor IX 용액, 바이러스 필터 여과액, 인산완충용액 여과액에 존재하는 바이러스 양을 감염 역가시험법과 real-time PCR 시험법으로 정량하였다. 감염 역가 시험시 MVM titer를 정확하게 측정하기 위해서 먼저 factor IX 용액이 MVM의 정량 분석을 위해 사용되는 A9 세포에 cytotoxicity(세포독성)를 나타내는지와 MVM 정량 분석에 interference(간섭)를 일으키는지를 조사하고, cytotoxicity와 interference를 나타내지 않는 농도까지 희석하여 감염역가를 측정하였다. 바이러스 정량 분석이 끝난 후 그 결과를 기초로 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[26]. 바이러스 제거 검증 실험은 독립적으로 세 번 실시하였고, 그 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. 생물의약품의 원료물질, 공정 중간물질, 최종제품 등에 미량으로 오염될 수 있는 바이러스 검출을 위한 정량 PCR의 경우 높은 민감도가 요구된다[15, 25]. 위와 같은 조건을 만족하는 PCR을 확립하기 위해 Primer3 Software를 이용하여 MVM 특이적인 primer 5쌍을 디자인하였다(Table 1). 일반 PCR을 실행하여 각각의 primer쌍들의 민감도를 확인하였다. Titer가 6×10^3 TCID₅₀/mL과 6×10^1 TCID₅₀/mL인 MVM을 시료로 PCR을 수행한 결과 primer 쌍 MVM-F5, MVM-R5가 가장 민감도가 우수하였다(자료 미제시). PCR 조건을 최적화 한 결과 annealing temperature와 MgCl₂ 농도는 각각 52°C와 4 mM이었다. 최적 조건에서 PCR의 민감도를 측정하였다. Titer가 6×10^4 TCID₅₀/mL인 MVM을 순차적으로 희석하여 PCR 한 결과 6×10^{-2} 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 MVM 유전자임을 확인할 수 있었다(자료 미제시).

MVM DNA 정량을 위한 real-time PCR 최적화

일반 PCR을 통해 확립된 PCR 조건을 기초로 SYBR® Premix Ex Taq™(TaKaRa)을 사용하여 real-time PCR 조건을 확립하였다. Forward primer로 MVM-F5를 reverse primer로 MVM-R5를 사용하여 PCR 반응의 annealing temperature를 최적화하였다(Fig. 2). Titer가 6×10^4 TCID₅₀/mL, 6×10^2 TCID₅₀/mL, 6×10^0 TCID₅₀/mL인 MVM을



Fig. 1. Sensitivity of PCR assay for detection of MVM. M, 100 bp DNA ladder; 1, 6×10^4 TCID₅₀/mL; 2, 6×10^3 TCID₅₀/mL; 3, 6×10^2 TCID₅₀/mL; 4, 6×10^1 TCID₅₀/mL; 5, 6×10^0 TCID₅₀/mL; 6, 6×10^{-1} TCID₅₀/mL; 7, 6×10^{-2} TCID₅₀/mL; NC, Negative control.

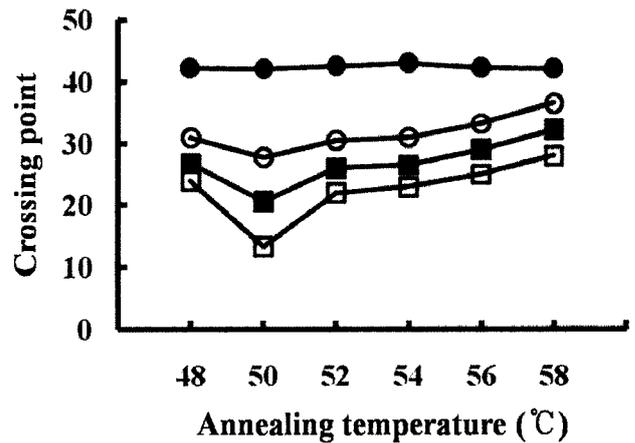


Fig. 2. Optimization of annealing temperature. The crossing point value refers to the cycle number at which the fluorescence of the PCR reaction rises above a set threshold and is inversely proportional to the amount of starting target. □, 6×10^4 TCID₅₀/mL; ■, 6×10^2 TCID₅₀/mL; ○, 6×10^0 TCID₅₀/mL; ●, Negative control.

시료로 annealing temperature를 48°C, 50°C, 52°C, 54°C, 56°C, 58°C로 변화시키며 real-time PCR을 수행하였을 때 50°C에서 crossing point가 가장 낮게 나타나 50°C가 최적 온도임을 알 수 있었다.

최적 온도에서 MgCl₂ 농도를 변화시켜 PCR 조건을 최적화하였다(Table 2). titer가 6×10^4 TCID₅₀/mL, 6×10^2 TCID₅₀/mL, 6×10^0 TCID₅₀/mL인 MVM을 시료로 MgCl₂ 농도를 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM로 변화시켜 가며 real-time PCR을 수행하였을 때 2 mM에서 crossing point가 가장 낮게 나타나 최적 MgCl₂ 농도는 2 mM임을 알 수 있었다.

Real-time PCR의 신뢰성 검증

MVM 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 6×10^4 TCID₅₀/mL인 MVM을 순차적으로 10배씩 희석한 후 real-time PCR을 수행하였다. 각 시료에 대해 real-time PCR cycle 수에

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

TCID ₅₀ /mL	MgCl ₂ concentration				
	2 mM	3 mM	4 mM	5 mM	6 mM
6×10^4	13.23 ^a	14.14	14.33	14.54	15.11
6×10^2	20.62	21.83	22.84	23.28	23.67
6×10^0	26.91	27.78	29.22	29.42	30.49
Buffer control	42.50	42.42	42.20	42.54	42.64

^aValues indicate crossing point value

따른 fluorescence값의 증가를 관찰한 결과 민감도는 6×10^2 TCID₅₀/mL임을 확인할 수 있었다(Fig. 3A). Melting curve 분석 결과 MVM DNA에 특이적인 부분과 primer dimer 등 비특이적인 부분으로 나뉘었으며, 완충용액 대조군에서는 MVM DNA에 특이적인 peak를 확인할 수 없었다(Fig. 3B). 증폭된 PCR 산물을 1.5%(w/v) agarose gel을 사용하여 전기 영동한 결과 각 MVM 양성시료에서 예상 크기의 밴드를 확인할 수 있었지만, 완충용액 대조군에서는 PCR 산물을 확인할 수 없었다(자료 미제시).

확립된 MVM DNA 정량법의 재현성 검증을 위해 서로 다른 날에 MVM 표준시료에서 DNA를 추출하고 real-time PCR을 수행한 후 crossing point 값을 비교하였다(Fig. 4). MVM log titer(\log_{10} TCID₅₀/mL; x)에 대한 crossing point 값(y) 간의 표준 회귀식은 첫째 날의 경우 $y = -3.077x + 28.75$ (결정계수 $r^2=0.984$), 둘째 날의 경우 $y = -2.927x + 28.10$ ($r^2=0.976$), 셋째 날의 경우 $y = -2.974x + 28.42$ ($r^2=0.977$)로 MVM log titer와 crossing point 값 간의 회귀성이 매우 높았다.

다른 parvovirus과 바이러스들(human parvovirus B19, bovine parvovirus, porcine parvovirus)과 DNA 바이러스인 bovine herpesvirus를 대상으로 특이성을 실험할 결과 MVM

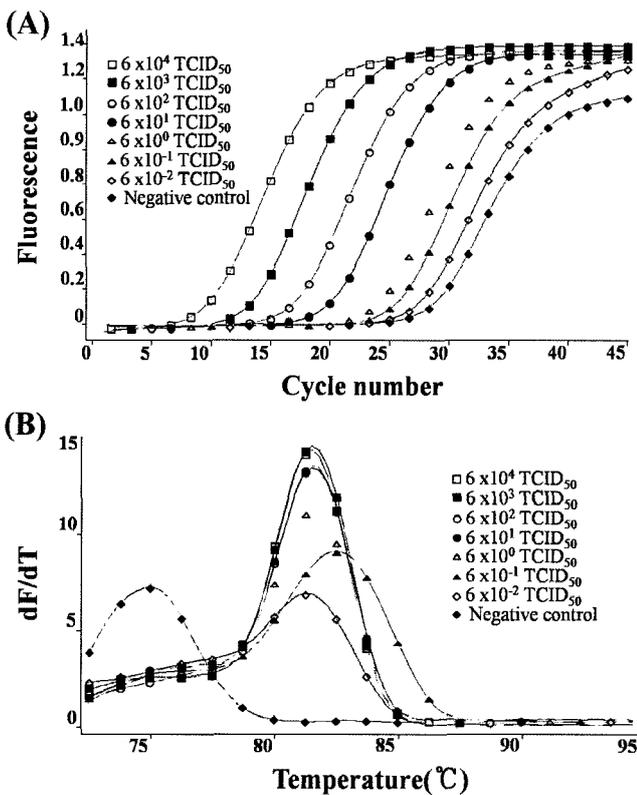


Fig. 3. Sensitivity of real-time PCR assay for quantification of MVM. (A) Amplification plots obtained with 10-fold serial dilutions of MVM stock solution. (B) Melting curve analysis of the amplification plot. MVM stock solution of 6×10^4 TCID₅₀/mL was serially diluted and cycle-by-cycle detection of MVM DNA was performed with SYBR Green I.

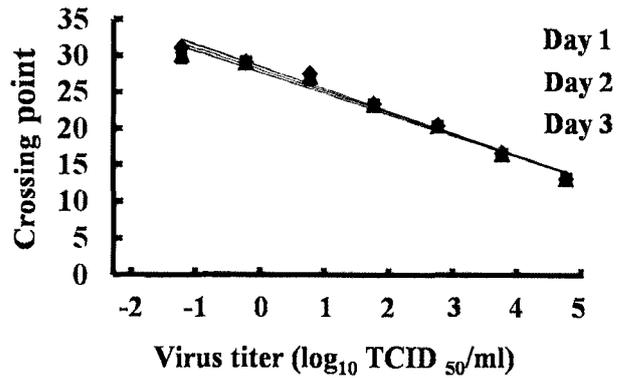


Fig. 4. Reproducibility of real-time PCR assay for quantitative detection of MVM. The standard curves were obtained by the regression analysis of crossing point values versus initial virus titer. These results were obtained from three independent assays performed at different days.

의 경우에만 fluorescence값의 증가를 관찰할 수 있었고, 다른 바이러스에서는 완충용액 음성 대조군과 같이 fluorescence값의 증가를 관찰할 수 없었다(Fig. 5A). Real-time

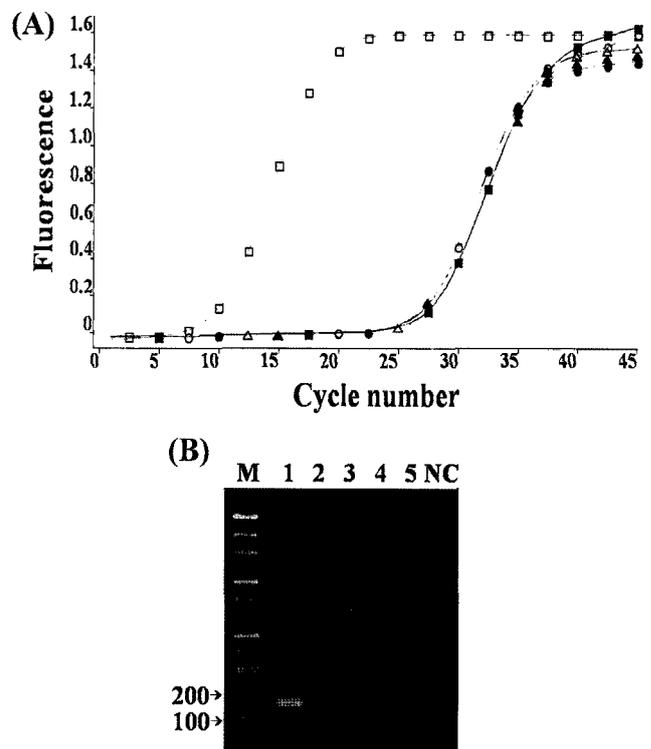


Fig. 5. Specificity of real-time PCR assay to potential cross-reactive viruses. (A) Amplification plots. □, minute virus of mice; ■, human parvovirus B19; ○, porcine parvovirus; ●, bovine parvovirus; △, bovine herpesvirus type 1; ▲, Negative control. (B) Agarose gel electrophoresis of the PCR products. Specificity of the real-time PCR assay was evaluated using the optimized protocol and then the PCR products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis. M, 100 bp DNA ladder; 1, minute virus of mice; 2, human parvovirus B19; 3, porcine parvovirus; 4, bovine parvovirus; 5, bovine herpesvirus type 1; NC, Negative control.

PCR 산물을 1.5% agarose gel 상에서 분석한 결과 MVM 양성 대조군에서만 PCR 반응 산물이 생성되었고, 다른 바이러스와 완충용액 음성 대조군에서는 PCR 반응 산물이 생성되지 않았다(Fig. 5B). 이와 같은 결과에서 확립된 real-time PCR 방법은 MVM에 특이적인 실험법임을 확인하였다.

CHO 세포주에서 real-time PCR을 이용한 MVM 검출
 확립된 real-time PCR을 생물의약품 제조공정에 적용할 수 있는지 확인하기 위하여 인위적으로 MVM을 오염시킨 CHO 세포주에서 MVM 검출 시험을 실시하였다. T-25 flask에 배양된 CHO DG44 세포에 MVM을 인위적으로 오염시킨 후 T-25 flask에 3번 이상 계대 배양하면서 병변효과를 관찰하였다. MVM은 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 DNA를 추출하고, 확립된 real-time PCR을 활용하여 MVM을 정량 검출하였다(Fig. 6C). 세포배양액에서는 6.1×10^1 TCID₅₀ equivalent/mL MVM이 검출되었고, 세포에서는 5.9×10^2 TCID₅₀ equivalent/mL MVM이 검출되었다. 증폭된 PCR 산물을 1.5%(w/v) agarose gel을 사용하여 전기 영동한 결과 각 MVM 양성시료, 세포배양액, 세포에서 예상 크기의 밴드를 확인할 수 있었지만, 음성 대조군에서는 PCR 산물을 확인할 수 없었다(Fig. 6D).

Real-time PCR을 이용한 바이러스 제거 검증
 확립된 real-time PCR을 생물의약품 분리정제공정에서 바이러스 제거 효율 검증에 적용할 수 있는지 확인하기 위하여 B혈우병 치료제 factor IX 생산을 위한 Viresolve NFP 바이러스 필터 공정에서 MVM 제거 효율을 감염역가 시험법과 비교 검증하였다. 감염역가시험법으로 바이러스를 정량 분석했을 때, 바이러스가 첨가된 factor IX 용액의 MVM 총 역가는 $5.34 \log_{10}$ TCID₅₀ 이었으나, 바이러스 필터 여과액과 인산완충용액 여과액에서는 MVM이 전혀 검출되지 않았다. Real-time PCR로 바이러스를 정량 분석하였을 때에도 바이러스가 첨가된 factor IX 용액의 MVM 총 역가는 $5.32 \log_{10}$ TCID₅₀ equivalents이었으나, 바이러스 필터 여과액과

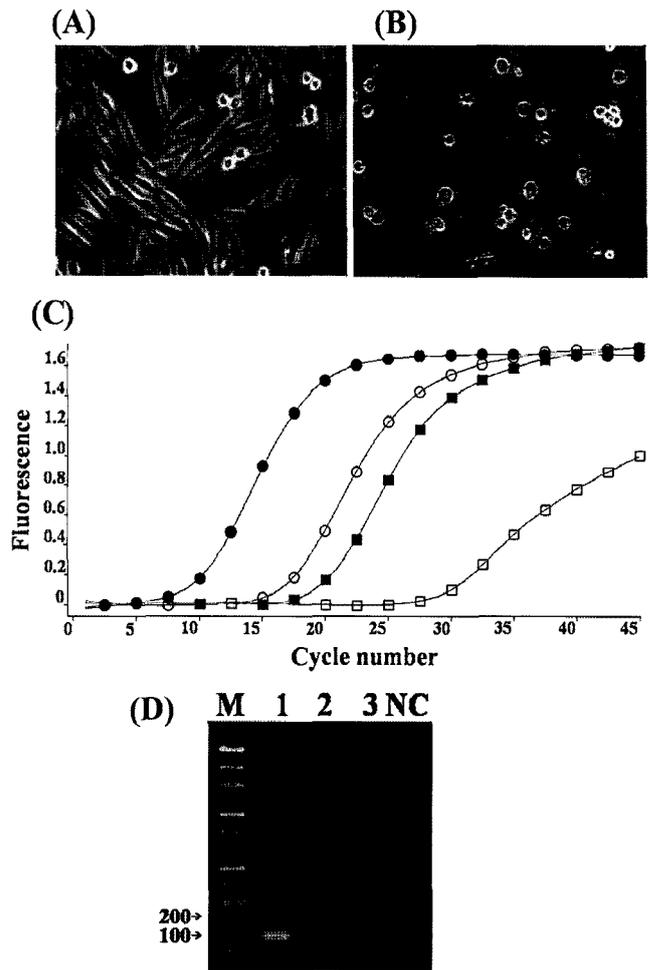


Fig. 6. Quantitative detection of MVM in artificially infected CHO DG44 cell line. (A) Morphology of CHO DG44 cell line not infected with MVM. (B) Morphology of CHO DG44 cell line infected with MVM. (C) Amplification plots of MVM positive control (●), CHO DG44 cell line infected with MVM (○), cell culture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

인산완충용액 여과액에서는 MVM이 전혀 검출되지 않았다. 감염역가시험법으로 검증한 MVM 감소인수는 ≥ 3.96 이었다. Real-time PCR로 검증한 MVM 감소인수는 6.54로 계산되었다.

Table 3. Application of real-time PCR assay to validation of MVM clearance during Viresolve NFP filtration.

Sample	Total MVM titer	
	Infectivity titration (\log_{10} TCID ₅₀)	Real-time PCR (\log_{10} TCID ₅₀ equivalents)
Factor IX solution spiked with virus	5.34	5.32
Filtrate after Viresolve NFP filtration	ND ^a (≤ 1.38) ^b	ND(-1.22) ^c
Post-washed solution with phosphate buffer	ND(≤ 1.38) ^b	ND(-1.22) ^c
Reduction factor (\log_{10})	≥ 3.96	6.54

^aNo infectious virus was detected.

^bThese values were calculated using a theoretical minimum detectable level of infectious virus with a 95% confidence level.

^cThese values were calculated using the sensitivity of real-time PCR method (6×10^{-2} TCID₅₀ equivalents/mL) as a minimum detectable level.

고 찰

동물세포를 배양하여 생산되는 생물의약품은 특성상 숙주 유래 DNA, 세포기질 유래 바이러스, 원료물질 유래 바이러스와 같은 공정관련 불순물의 올바른 이해와 관리가 제품의 안전성 보증을 위해 매우 중요하다[27]. 미국, 유럽, 일본 등과 같은 선진국에서는 안전하고 우수한 생물의약품을 생산하기 위해 공정관련 불순물의 정성적 검출과 정량적 분석을 위해 최신의 과학기술방법을 개발도입하고 있다. WHO, EMEA, FDA와 같은 규제기관은 생물의약품을 생산하기 위해 사용하는 동물세포주의 마스터세포(Master cell)와 제조용세포(Working cell)에서 비내인성 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[11, 20]. 또한 규제기관은 동물세포유래 생물의약품의 안전성 보증을 위해 바이러스 불활화 공정과 제거 공정이 단백질 분리 정제 공정에 반드시 포함되도록 요구하고 있다. 따라서 생물의약품의 허가등록을 위해 바이러스 불활화와 제거 효율 검증이 필수적이다[7, 11, 20].

인체에 유해한 바이러스가 오염되는 것을 방지하여 안전한 생물학적 제제가 제조되도록 하기 위해서는 오염 바이러스의 검출 및 불활화 또는 제거 검증 관련 기술을 확립해야 한다[4, 7, 15]. 또한 완제품은 물론 원료부터 완제품의 생산에 이르기까지 전체 제조공정에 대한 철저한 품질관리가 필수적이다. 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[11].

CHO cell 배양시 가장 오염 빈도가 높은 비내인성 바이러스는 MVM이다. MVM은 사람을 포함한 척추동물에서부터 곤충에 이르기까지 다양한 숙주 범위를 갖는 바이러스이기 때문에 CHO 세포 배양 공정에서 MVM 안전성 확보가 가장 큰 문제 중의 하나로 대두되고 있다[8, 9, 13, 21]. MVM은 크기가 18에서 24 nm 정도로 동물세포배양 유래 생물의약품에 오염될 수 있는 바이러스 중 가장 작은 크기의 바이러스에 속한다[6]. 본 연구에서는 동물세포 배양 유래 생물의약품에서 MVM 안전성을 확보하기 위해, 세포주, 원료물질, 제조공정, 완제품에서 MVM을 정량적으로 검출하고, 제조공정에서 MVM 제거 검증을 위한 시험법으로 활용이 가능한 민감도와 특이도가 우수한 real-time PCR 시험법을 확립하고자 하였다. MVM 전체 유전자를 대상으로 MVM에만 특이적인 primer 5쌍을 디자인하였다. 5쌍의 primer 중 VP1(capsid protein) 유전자를 대상으로 디자인 한 primer 쌍 MVM-F5, MVM-R5의 민감도가 가장 우수하였

다. 선별된 primer를 활용하여 annealing temperature와 MgCl₂ 농도 등 PCR 조건을 최적화 한 결과 확립된 실험법의 민감도는 6×10^2 TCID₅₀/mL이었다. 본 연구를 통해 확립된 real-time PCR의 민감도는 다른 연구자들이 확립한 PCR 시험법 민감도인 1 TCID₅₀/mL 보다 더 낮은 농도의 MVM을 검출할 수 있었다[5, 13, 28]. 확립된 MVM DNA 정량법의 재현성 검증을 위해 서로 다른 날에 MVM 표준시료에서 DNA를 추출하고 real-time PCR을 수행한 후 crossing point 값을 비교한 결과, MVM log titer(log₁₀ TCID₅₀/mL; x)에 대한 crossing point 값(y) 간의 표준 회귀식의 결정계수(r²)는 모두 0.97 이상으로 재현성뿐만 아니라 회귀성이 매우 높았다. 생물의약품의 품질관리 평가에 있어 시험법의 민감도와 재현성은 분석의 정확성, 특이성, 검출한계 등과 함께 매우 중요한 요인으로 고려되는데, 본 연구에서 확립한 정량법은 MVM을 정량하는데 있어 민감도와 재현성이 우수함을 확인할 수 있었다.

본 연구를 통해 확립된 MVM 검출 시험법을 CHO 세포주에서 MVM 검출 시험에 활용하였을 때, MVM에 오염된 CHO 세포주와 세포주 배양 상등액에서 MVM을 효과적으로 검출할 수 있었다. 따라서 MVM real-time PCR 시험법은 동물세포주 검증과 생산공정 검증에서 MVM 오염 여부를 정성적 또는 정량적 검출할 수 있는 우수한 시험법임을 확인할 수 있었다.

Real-time PCR을 활용한 바이러스 정량 검출 방법은 크로마토그래피 공정과 필터 공정 같은 단백질 분리 정제 공정에서 미량의 바이러스를 실시간에 정량화 할 수 있기 때문에, 생물의약품 제조공정에서 바이러스 제거 검증 실험 시 감염역가시험과 함께 적용할 수 있는 유용한 평가기술이다[15, 28]. 본 연구를 통해 확립된 MVM real-time PCR 시험법을 Viresolve NFP 바이러스 필터 공정에 적용하여 감염역가 시험법과 비교하였을 때, 바이러스가 첨가된 factor IX 용액에서의 총역가는 각각 5.32 log₁₀ TCID₅₀ equivalents와 5.34 log₁₀ TCID₅₀로 동일한 결과를 나타내었다. 또한 바이러스 필터 여과액과 인산완충용액 여과액에서는 두 시험법 모두 MVM을 검출할 수 없었다. 이러한 결과는 Viresolve NFP에 의해 MVM이 완벽하게 제거됨을 보여준다. 하지만 계산된 바이러스 감소인수는 real-time PCR 시험법으로 검증한 결과가 더 높게 나타났다. 감염역가시험에서는 MVM이 첨가된 factor IX 용액이 MVM 감염성 세포인 A9 세포에 나타내는 cytotoxicity와 interference를 나타내지 않는 범위까지 희석을 해야 하므로 검출한계가 희석배수만큼 높아진다. 또한 real-time PCR 시험법이 감염역가 시험법보다 17배 정도 민감도가 좋기 때문에 real-time PCR 시험법으로 검증한 바이러스 감소인수가 감염역가시험법으로 검증한 값보다 훨씬 더 높게 나타났다. 감염역가시험법은 10일 이상의 시험기간이 소요되는데 반해, real-time PCR 시험법은 1 일안에 시험결과를 얻을 수 있어 시험기간이 10배정도 단축

되었다. 따라서 MVM real-time PCR 시험법은 동물세포배양 유래 생물학적약품 제조 공정에서 바이러스 제거 검증에 유용하게 사용될 수 있는 시험법으로 판단된다.

요 약

세포배양 유래 생물학적약품 생산 공정에서 다양한 바이러스가 오염된 사례가 있기 때문에 바이러스 안전성 검증이 필수적이다. MVM은 동물 세포주와 동물 세포 배양 공정에 오염되는 대표적인 바이러스이다. 세포배양 유래 생물학적약품의 MVM 안전성을 확보하기 위해, 세포주, 원료물질, 제조공정, 완제품에서 MVM을 정량적으로 검출하고, 제조공정에서 MVM 제거 검증을 위한 시험법으로 활용이 가능한 real-time PCR 시험법을 확립하였다. MVM에 특이적인 primer를 선별하였으며, 형광염료 SYBR Green I을 사용하여 MVM DNA 정량 검출 시험법을 최적화하였다. 세포배양법에 의한 감염여가와 비교한 결과 real-time PCR 민감도는 6×10^{-2} TCID₅₀/mL이었다. 확립된 시험법의 신뢰성(reliability)을 보증하기 위해 시험법 검증을 실시한 결과 특이성(specificity)과 재현성(reproducibility)이 우수함을 확인하였다. 확립된 real-time PCR을 생물학적약품 제조공정 검증에 적용할 수 있는지 확인하기 위하여 인위적으로 MVM을 오염시킨 CHO 세포에서 MVM 검출 시험을 실시한 결과 MVM을 감염시킨 CHO 세포와 세포배양 상청액에서 MVM을 정량적으로 검출할 수 있었다. 또한 바이러스 필터 공정에서 MVM 제거 효과를 감염여가 시험법과 비교 검증한 결과 더 높은 민감도로 빠른 시간에 동일한 결과를 얻을 수 있었다. 위와 같은 결과에서 확립된 MVM real-time PCR 시험법은 생물학적약품 안전성 보증을 위한 세포주 검증, 생물학적약품 생산 공정 검증, 바이러스 제거 공정 검증 등에서 감염여가 시험법을 대신할 수 있는 신속하고, 특이성과 민감성이 우수한 시험법임을 확인하였다.

감사의 글

본 논문은 산업자원부와 한국산업기술재단의 지역혁신인력양성사업과 식품의약품안전청 용역연구개발사업(2006년도)으로 수행된 연구결과임.

REFERENCES

- 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.
- Arden, N. and M. J. Betenbaugh. 2004. Life and death in mammalian cell culture: strategies for apoptosis inhibition. *Trends Biotechnol.* **22**: 174-180.
- Boschetti, N., K. Wyss, A. Mischler, T. Hostettler, and C. Kempf. 2003. Stability of minute virus of mice against temperature and sodium hydroxide. *Biologicals* **31**: 181-185.
- 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.
- Chang, A., S. Havas, F. Borellini, J. M. Ostrove, and R. E. Bird. 1997. A rapid and simple procedure to detect the presence of MVM in conditioned cell fluids or culture media. *Biologicals* **25**: 415-419.
- Cotmore, S. F. and P. Tattersall. 1987. The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv. Virus Res.* **33**: 91-174.
- Darling, A. 2002. Validation of biopharmaceutical purification process for virus clearance evaluation. *Mol. Biotechnol.* **21**: 57-83.
- Garnick, R. L. 1996. Experience with viral contamination in cell culture. *Dev. Biol. Stand.* **88**: 49-56.
- Garnick, R. L. 1998. Raw materials as a source of contamination in large-scale cell culture. *Dev. Biol. Stand.* **93**: 21-29.
- Horaud, F. 1991. Introductory remark: viral safety of biologicals. *Dev. Biol. Stand.* **75**: 3-7.
- 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.
- 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.
- Joung, J., S. Lee, S. Chang, J. Jeong, and Y. Sohn. Study for detection of adventitious minute virus of mice from cell culture. *Lab. Ani. Res.* **21**: 74-79.
- Kajioka, J., R. Taguchi, and D. Nagaki. 1974. Plaque formation and replication of minute virus of mice. *Kitasato Arch. Exp. Med.* **47**: 101-105.
- 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.
- Kilham, L. and G. Margolis. 1971. Fetal infections of hamsters, rats, and mice induced with the minute virus of mice (MVM). *Teratology* **4**: 43-61.
- Kilham, L. and G. Margolis. 1970. Pathogenicity of minute virus of mice (MVM) for rats, mice, and hamsters. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **133**: 1447-1452.
- Kim, S. H. and G. M. Lee. 2007. Differences in optimal pH and temperature for cell growth and antibody production between two Chinese hamster ovary clones derived from the same parental clone. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 712-720.
- Kraft, V. and B. Meyer. 1986. Diagnosis of murine infections

- in relation to test methods employed. *Lab. Anim. Sci.* **36**: 271-276.
20. Merten, O.-W. 2002. Virus contamination of cell cultures-a biotechnological view. *Cytotechnol.* **39**: 91-116.
 21. Nicklas, W., V. Kraft, and B. Meyer. 1993. Contamination of transplantable tumors, cell lines, and monoclonal antibodies with rodent viruses. *Lab. Anim. Sci.* **43**: 296-300.
 22. Park, S., J. Lee, B. Lee, and H. Kang. 2006. Production of humanised anti-hepatitis B antibody in butyrate-treated chinese hamster ovary cells. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 47-51
 23. Parker, J. C., S. S. Cross, M. J. Collins Jr, and W. P. Rowe. 1970. Minute virus of mice : procedures for quantification and detection. *J. Natl. Cancer Inst.* **45**: 2973-303.
 24. Parkman, P. D. 1996. Safety of biopharmaceuticals: a current perspective. *Dev. Biol. Stand.* **88**: 5-7.
 25. 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.-J. 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 diarrhoea virus contamination in biologics derived from cell cultures. *J. Bacteriol. Virol.* **33**: 161-168.
 26. Shin, J. S., Y. W. Choi, H. M. Sung, Y.-W. Ryu, and I. S. Kim. 2006. Enhanced virus safety of a solvent/detergent-treated antihemophilic factor IX concentrate by dry-heat treatment. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **11**: 19-25.
 27. Walsh, G. 2002. Proteins: Biochemistry and Biotechnology, pp. 196-209. John Wiley & Sons Ltd, Baffins Lane, Chichester, West Sussex, England.
 28. Zhan, D., M. R. Roy, C. Valera, J. Cardenas, J. C. Vennari, J. W. Che, and S. Liu. 2002. Detection of minute virus of mice using real time Quantitative PCR in assessment of virus clearance during the purification of mammalian cell substrate derived biotherapeutics. *Biologicals* **30**: 259-270.

(Received Feb. 2, 2008/Accepted Mar. 1, 2008)