

보 문

소유래 성분 원재료 사용 생물 의약품과 의료기기 제조 공정에서 bovine adenovirus type 1 정량 검출을 위한 TaqMan probe real-time PCR

고윤영¹ · 노나경² · 김인섭^{2*}

¹(주)바이오피에스 바이오 의약품 안전성 검증센터, ²한남대학교 생명·나노과학대학 생명시스템학과

TaqMan probe real-time PCR for quantitative detection of bovine adenovirus type 1 during the manufacture of biologics and medical devices using bovine-derived raw materials

Woon Young Ko¹, Na Gyeong Noh², and In Seop Kim^{2*}

¹Center for Biopharmaceuticals Safety Validation, BioPS Co., Ltd. Daedeuk Valley Campus, Hannam University, Daejeon 34054, Republic of Korea

²Department of Biological Sciences and Biotechnology, Hannam University, Daejeon 34054, Republic of Korea

(Received August 19, 2015; Accepted September 11, 2015)

ABSTRACT: Biologics and medical devices manufactured with bovine-derived raw materials have the risk of viral contamination. Therefore, viral validation study is essential to ensure the safety of the products. Bovine adenovirus type-1 (BAdV-1) is one of the common bovine viral pathogens. For quantitative detection of BAdV-1 during the manufacture of biologics and medical devices, a TaqMan probe real-time PCR method was developed. Specific primers and TaqMan probe for amplifying and detecting BAdV-1 DNA were designed. Specificity, limit of detection (LOD), and robustness of the method was validated according to international guideline on the validation of nucleic acid amplification tests for the pathogen detection. The sensitivity of the assay was found to be 7.44×10^1 TCID₅₀/ml. The real-time PCR method was reproducible, very specific to BAdV-1, and robust. Moreover, the method was successfully applied to the validation of Chinese Hamster Ovary (CHO)-K1 cells artificially infected with BAdV-1, a commercial CHO master bank, and bovine type 1 collagen. The overall results indicate that this rapid, specific, sensitive, and robust assay can be reliably used for quantitative detection of BAdV-1 contamination during the manufacture of biologics and medical devices using bovine-derived raw materials.

Key words: biologics, bovine adenovirus, medical device, TaqMan probe real-time PCR, virus detection

소유래 혈액, 세포, 조직, 기관 등은 생물 의약품과 조직공학 제제, 세포치료제, 의료기기의 원재료로 널리 사용되고 있다. 소유래 혈청은 유전자 재조합 의약품, 항체의약품, 백신 등 치료 및 예방용 생물 의약품 생산을 위한 동물세포주를 배양하기 위한 원료물질로 사용된다. 또한 자가세포치료제, 동종유래 세포치료제 또는 이종세포치료제의 배양을 위한 원료물질로도 사용된다(Erickson *et al.*, 1991). 소유래 콜라겐, 뼈, 양막 등은 창상피복제, 조직수복용 생체재료, 이식용 뼈, 인공혈관, 봉

합사, 지혈제 등과 같은 의료기기의 원재료로 사용되고 있다(Delgado *et al.*, 2015; Moon *et al.*, 2015; Vaegler *et al.*, 2015). 세포배양 유래 생물 의약품과 조직공학제제, 세포치료제, 의료기기는 생체에서 유래한 복잡한 분자구조를 가진 물질로 최종제품에 대한 물리·화학적 분석만으로는 제품의 안전성과 유효성을 평가하기 어렵다. 또한 원료 자체에 감염성 병원 인자가 오염될 가능성이 크기 때문에 안전성 보증을 위한 다양한 방법이 모색되고 있다(Horaud, 1991; Parkman, 1996; Merten, 2002; Celis and Silvester, 2004; Schiff, 2005; Ill and Dehghani, 2009; Hawkes, 2015).

소유래 물질에 오염될 수 있는 감염성 병원 인자 중 바이러

*For correspondence. E-mail: inskim@hnu.kr;
Tel.: +82-42-629-8754; Fax: +82-42-629-8891

스는 종류의 다양성과 검출 방법의 제한성으로 인해 그 중요성이 더 강조되고 있다(Marcus-Sekura et al., 2011; Hawkes, 2015). 세계 각국의 규제기관에서는 생물의약품과 조직공학 제제, 세포치료제, 의료기기에서 내인성 또는 외래성 위해 바이러스의 오염을 방지하기 위하여 민감도와 특이성이 우수한 검출시험방법 개발, 바이러스 제거 및 불활화 공정 확립과 검증, 바이러스 관련 기준 규격 제정 등에 관한 연구를 활발히 진행하고 있으며, 바이러스 안전성 평가 관련 가이드라인을 제정하고 안전성 관련 규제를 강화하여왔다(ICH Expert Working Group, 1998; Schiff, 2005; Brennan et al., 2015; Lim, 2015).

소유래 성분을 원재료로 사용하여 생산되는 생물의약품과 조직공학제제, 세포치료제, 의료기기의 잠재적인 바이러스 오염을 관리하기 위해 아래와 같은 상호 보완적인 세 가지 접근 방법들이 필요하다. 첫째, 바이러스가 오염되지 않도록 원재료들을 적절하게 선택하고, 바이러스 오염 여부를 검사하여야 한다. 둘째, 소유래 바이러스에 대한 제거 및 불활화 공정이 포함된 검증된 생산 공정으로 제품을 생산하여야 한다. 셋째, 생산 공정 중 적절한 단계에서 오염 가능한 바이러스들을 검증된 방법으로 검사하여야 한다.

미국과 유럽의 가이드라인에서는 생물의약품 생산용 마스터 세포주(Master Cell Bank)에서 소유래 혈청으로부터 오염이 가능한 Bovine adenovirus (BAdV), Bovine viral diarrhoea virus (BVDV), Bovine parvovirus (BPV), Bluetongue virus (BTV), Bovine respiratory syncytial virus (BRSV), Bovine rabies virus (BRV), Reovirus type 3 (REO-3), Bovine Parainfluenza type 3 virus (BPIV-3)와 같은 소 특이적 바이러스 검출 시험을 수행하도록 하고 있다. 소 특이적 바이러스는 PCR 시험법과 세가지 세포주를 이용한 *in vitro* 바이러스 부정시험과 같은 방법으로 검출한다. PCR 시험법은 종 특이적이지만, *in vitro* 바이러스 부정시험법은 소 세포주에서 증식할 수 있는 다양한 바이러스를 검출할 수 있다(Nims, 2006; Marcus-Sekura et al., 2011; Hawkes, 2015).

BAdV는 *Adenoviridae* family에 속하는 비-외피(non-enveloped) 바이러스로 double-stranded DNA를 포함하는 icosahedral nucleocapsid를 갖고 있다(Benko et al., 2000). BAdV는 열, 유기용매, 계면활성제, 산과 알칼리, 건조 등 물리·화학적 처리에 매우 큰 저항성을 나타내어 세포배양 유래 생물의약품 생산공정의 안전성 보증을 위해 철저한 관리가 요구되는 바이러스이다. 본 연구에서는 소유래 물질을 원재료로 사용하는 생물의약품, 조직공학제제, 세포치료제, 의료기기 등에서 BAdV type 1 (BAdV-1) 안전성을 확보하기 위해, 세포주, 원료물질, 제조공정, 완제품에서 BAdV-1을 정량적으로

검출하고, 제조공정에서 BAdV-1 제거 검증을 위한 시험법으로 활용이 가능한 민감도와 특이도가 우수한 TaqMan probe real-time PCR 시험법을 확립하고자 하였다. 확립된 real-time PCR 시험법을 활용하여 인위적으로 BAdV-1을 감염시킨 CHO (Chinese hamster ovary) 세포에서 BAdV-1을 정량적으로 검출하여 바이러스 안전성 검증 시험법으로의 활용 가능성을 평가하였다. 또한 확립된 시험법을 항체의약품 생산용 CHO 마스터 세포주와 소유래 type 1 collagen에서 BAdV-1 검출 시험에 산업적으로 적용하였다.

재료 및 방법

BAdV-1의 배양 및 정량

BAdV-1 (ATCC VR 313)의 배양과 정량을 위해 Madin-Darby bovine kidney (MDBK; ATCC CCL-22) 세포를 사용하였다. MDBK 세포를 10% 우혈청(HyClon)을 첨가한 Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM; HyClon) 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 수거한다. 400 × g에서 5분간 원심 분리하여 상층액은 따로 모으고 pellet은 재현탁하였다. Pellet을 동결과 해빙과정을 2회 반복하여 파쇄한 후, 400 × g에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 얻었다. 원심 상층액을 혼합한 후, 0.45 μm filter로 여과한 다음 소분하여 -70°C에 보관하였다.

BAdV-1의 정량을 위해 감염성 있는 바이러스의 titer를 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀)로 나타내었다. BAdV-1를 2% 우혈청을 첨가한 DMEM 배지로 7배수로 희석하여 24 well plate에 배양된 세포에 0.25 ml씩 접종하였다. 음성대조군으로 세포배양배지를 0.25 ml씩 접종하였다. 그 후 CO₂ 배양기에서 5% CO₂, 35°C로 배양하면서 계속적으로 현미경으로 CPE를 관찰하였다.

Primer와 TaqMan probe의 디자인

BAdV-1 유전자를 증폭하기 위해 사용한 올리고핵산 primer 염기서열은 NCBI data base에 보고된 BAdV-1 complete genome (AC 000191)에서 hexon 유전자 부위를 기초로 Primer3 Software를 이용하여 디자인하였다(Table 1). TaqMan probe는 primer보다 Tm (melting 온도) 값이 8~10°C 정도 높게 디자인하였다. TaqMan probe sequence 5' 말단에는 fluorescent reporter dye인 6-carboxy-fluorescein (FAM)을 3' 말단

Table 1. Sequences of oligonucleotide primer set and probe used in the detection of BAdV-1

Oligonucleotide	Sequence (5' → 3')	Nucleotide position*	Amplicon size (bp)
Forward primer	GTA CAT GCA CAT CGC CGG GC	17541-17690	150
Reverse primer	GAC CGC TCT GTG GTG ACG TC		
Probe	(FAM)GAGTACCTGTCTCCCGCCTGGTG(BHQ1)	17572-17595	-

* AC 000191

에는 quencher인 black hole quencher 1 (BHQ-1)이 오도록 하였다.

TaqMan probe real-time PCR 시험법 최적화

BAdV-1 배양액 200 μ l로부터 Exgene™ Blood SV kit (GeneALL®)를 사용하여 200 μ l의 DNA를 분리하였다. TaqMan probe real-time PCR을 이용한 BAdV-1 DNA 정량 시험법을 최적화하기 위해 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems)을 사용하여 annealing 온도와 MgCl₂ 농도에 따른 PCR 민감도 실험을 실시하였다. Real-time PCR 반응액은 Real-time PCR Master Mix (TaqMan probe, TOYOBO) 10 μ l, 10 pM forward primer 1 μ l, 10 pM reverse primer 1 μ l, 10 pM probe 0.5 μ l, BAdV-1 DNA 2 μ l에 Nuclease-Free water (Promega) 5.5 μ l를 넣어 총 20 μ l가 되게 하였다. 핵산 증폭은 pre-incubation은 95°C에서 5분, denaturation은 95°C에서 15초, annealing & elongation은 1분(온도 최적화를 위해 54°C, 56°C, 58°C, 60°C에서 real-time PCR 수행)으로 하여 40 cycle을 수행하였다. 최적 MgCl₂ 농도를 결정하기 위해 최적화된 annealing & elongation 온도 60°C에서 real-time PCR 반응액에 MgCl₂를 1 mM에서 3 mM까지 더 첨가하여 BAdV-1 농도에 따른 threshold cycle (Ct)값을 비교하였다. Ct 값은 PCR cycle이 exponential phase로 들어가는 cycle 수를 나타낸다 (Lee *et al.*, 2008a).

Real-time PCR의 신뢰성 검증

확립된 TGEV real-time PCR 검출시험법의 신뢰성(reliability)을 보증하기 위해 확립된 실험법의 특이성(specificity), 검출한계(limit of detection), 완전성(robustness), 직선성(linearity)을 검증하였다. Real-time PCR 검증은 식품의약품안전처의 '핵산증폭검사법 검증 가이드라인'에 따라 실시하였다 (Korea Food and Drug Administration, 2003).

핵산증폭검사법의 특이성은 다른 이물질이 존재하는 조건에서 특정 핵산을 정확하게 검출해 낼 수 있는 능력이다. 특이성 검증을 위해 BHV type-1 (BHV-1, ATCC VR-188), BVDV

(ATCC VR-534), BPIV-3 (ATCC VR-281), Hepatitis A virus (HAV, ATCC VR-1402), Minute virus of mice (MVM, ATCC VR-1346), Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV, KVCC-VR00127), Porcine parvovirus (PPV, ATCC VR-742), Porcine rotavirus (PRoV, KVCC-VR00128), Pseudorabies virus (PRV, KVCC-VR00129), REO-3 (ATCC VR-824)에 대한 cross-reactivity를 측정하였다. 시험에 사용한 각 바이러스의 titer는 BHV-1은 7.76×10^8 TCID₅₀/ml, BVDV는 7.44×10^8 TCID₅₀/ml, BPIV-3는 6.07×10^7 TCID₅₀/ml, HAV는 7.44×10^8 TCID₅₀/ml, MVM은 7.34×10^8 TCID₅₀/ml, PEDV는 8.08×10^8 TCID₅₀/ml, PPV는 8.08×10^8 TCID₅₀/ml, PRoV는 1.33×10^9 TCID₅₀/ml, PRV는 5.33×10^6 TCID₅₀/ml, REO-3는 6.60×10^7 TCID₅₀/ml이었다. 음성 대조군으로는 phosphate buffered saline (PBS)을 사용하였다.

검출한계는 각 검체에서 검출 가능한 핵산의 최소량을 의미하여 총 시험 건수 중 95%가 양성으로 검출될 수 있는 검체당 당 최소 목표 핵산의 양을 의미한다. Titer가 7.44×10^4 TCID₅₀/ml인 BAdV-1를 10배씩 순차적으로 7.44×10^1 TCID₅₀/ml까지 희석한 샘플을 독립적으로 준비하여 각 희석 배수 당 8회에 걸쳐 총 24회 검출시험을 실시하였다. 총 24회 시험 중 23회 이상 양성 값이 나온 농도를 검출한계로 결정하였다.

완전성은 시험방법 중 일부 조건이 소규모라도 의도적으로 변경되었을 때 측정값이 얼마나 영향을 받는지에 대한 척도를 나타내는 것으로 통상적으로 검사법의 신뢰도에 대한 지표이다. 제조사를 달리한 primer에 따른 real-time PCR 방법의 견고성을 검증하기 위해 BAdV-1를 7.44×10^4 TCID₅₀/ml부터 7.44×10^1 TCID₅₀/ml까지 10배씩 순차적으로 희석한 후 3곳의 primer 제조사가 제조한 primer로 3회의 real-time PCR을 실시한 후 평균 Ct 값을 비교하였다. MgCl₂의 농도에 따른 real-time PCR 시험법의 견고성을 검증하기 위해 BAdV-1를 7.44×10^4 TCID₅₀/ml부터 7.44×10^1 TCID₅₀/ml까지 10배씩 순차적으로 희석한 후 최적화된 real-time PCR 반응액에 MgCl₂를 1 mM, 2 mM 더 첨가하여 3회의 real-time PCR을 실시한 후 평균 Ct 값을 비교하였다.

직선성 검증을 위해 서로 다른 날에 8회 BAdV-1를 $7.44 \times$

10^4 TCID₅₀/ml부터 7.44×10^1 TCID₅₀/ml까지 10배씩 순차적으로 희석한 후 DNA를 추출하고 real-time RT-PCR을 수행하였다. 각 시험 결과를 토대로 정량을 위한 표준곡선을 작성하고 BAdV-1 log titer (\log_{10} TCID₅₀/ml; x)에 대한 Ct 값(y) 간의 표준 회귀식과 결정계수를 구하였다. 결정계수 값이 0.99 이상인 경우 직선성이 있다고 판단하였다.

CHO 세포에서 real-time PCR을 이용한 BAdV-1 검출

확립된 real-time PCR을 생물약품 제조공정 검증에 적용할 수 있는지 확인하기 위하여 인위적으로 BAdV-1를 오염시킨 CHO 세포주에서 BAdV-1 검출 시험을 실시하였다. CHO-K1 (ATCC CCL-61) 세포를 10% 우혈청을 첨가한 Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640; HyClon) 배지에 1X Antibiotic Antimycotic Solution (HyClon)을 첨가하여 배양하였다. T-25 flask에 배양된 CHO-K1 세포에 BAdV-1를 감염시킨 후 2일 동안 배양하였다. 세포배양액을 제거한 후, 세포배양액에 남아있을 수 있는 BAdV-1를 완벽히 제거하기 위해 phosphate buffered saline으로 3번 세척한 다음 CHO-K1 세포를 3회 계대배양하였다. 현미경으로 CHO-K1 세포의 모양을 관찰한 후, 세포배양 상등액과 세포를 따로 수거하였다. 확립된 real-time PCR 방법을 이용하여 세포배양 상등액과 세포에 BAdV-1이 존재하는지 여부를 정량적으로 확인하였다. 정량을 위한 표준시료로 titer가 7.44×10^4 TCID₅₀/ml인 BAdV-1를 10배씩 순차적으로 7.44×10^1 TCID₅₀/ml까지 10단계 희석한 후 real-time PCR을 수행하여 정량을 위한 표준곡선을 작성하였다. 시료 속에 들어있는 BAdV-1 DNA의 양을 표준곡선에 대입하여 정량하였다. 표준곡선은 BAdV-1의 농도에 따라 real-time PCR에 의해 검출되는 Ct 값을 TCID₅₀ equivalent/ml로 전환하여 작성하였다(Lee et al., 2008a). 음성 대조군으로는 비 감염된 CHO-K1 세포 배양액을 사용하였다.

BAdV-1 검출 시험의 산업적 적용

확립된 real-time PCR 시험을 생물약품 제조공정에 적용하기 위해 항체약품 생산용 CHO 마스터 세포주와 세포치료제 및 의료기기의 원료물질로 사용되는 소유래 type 1 collagen에서 BAdV-1 검출 시험을 실시하였다. 멸균된 1.5 ml tube A와 B에 시험시료를 각각 200 μ l 분주하였다. 각 시료 분주 후, B 튜브에는 BAdV-1 표준품(2.50×10^4 TCID₅₀/ml) 2 μ l를 첨가하여 spiking control로 사용하였다. 음성대조군으로는 멸균된 증류수를 사용하였다. 음성대조군, 시험시료, spiking control, 양성대조군(2.50×10^2 TCID₅₀/ml)으로부터 추출한

DNA 중 2 μ l를 주형으로 real-time PCR 시험을 수행하였다. 이때 시험시료로부터 추출한 DNA 2 μ l에 BAdV-1 표준품(2.50×10^3 TCID₅₀/ml)으로부터 추출한 DNA 중 0.2 μ l를 첨가하여 inhibition control로 사용하였다. Spiking control은 시험시료로부터 BAdV-1 DNA 추출 시 시험시료의 성분이 저해물질로 작용하는지 확인하기 위한 대조군이며, inhibition control은 시험시료로부터 추출한 DNA 성분 중 PCR 저해물질이 있는지 확인하기 위한 대조군이다(Buckwalter et al., 2014). BAdV-1 검출 시험은 2회 실시하였으며, 평균 Ct 값을 계산하였다.

결 과

Primer와 probe 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 조직공학체제, 세포치료제, 의료기기의 원료물질, 공정 중간물질, 최종제품 등에 미량으로 오염될 수 있는 바이러스 검출을 위한 정량 PCR의 경우 높은 민감도가 요구된다(Lee et al., 2008b; Motitschke et al., 2010). 위와 같은 조건을 만족하는 PCR을 확립하기 위해 BAdV-1 hexon 단백질 유전자 부위를 대상으로 BAdV-1 특이적인 primer와 TaqMan probe를 디자인하였다(Table 1). PCR 산물을 sequencing한 후, blast searching (www.ncbi.nlm.gov/BLAST/) 한 결과 PCR 산물이 BAdV-1 hexon 단백질 유전자임을 확인할 수 있었다(자료 미제시).

TaqMan probe real-time PCR 최적화

Real-time PCR Master Mix를 사용하여 real-time PCR 조건을 확립하였다. Titer가 7.44×10^4 TCID₅₀/ml에서 7.44×10^1 TCID₅₀/ml까지 10배씩 순차적으로 희석한 BAdV-1를 시료로 하여 annealing temperature를 54°C, 56°C, 58°C, 60°C로 변화시키며 real-time PCR을 수행하였을 때 60°C에서 Ct 값이 가장 낮게 나타나 60°C가 최적 온도임을 알 수 있었다(자료 미제시).

최적 온도 60°C에서 real-time PCR 반응액에 MgCl₂를 1 mM, 2 mM, 3 mM 더 첨가하여 BAdV-1 농도에 따른 Ct 값을 비교하였을 때 MgCl₂ 농도에 따른 Ct 값의 변화가 크지 않았다(자료 미제시).

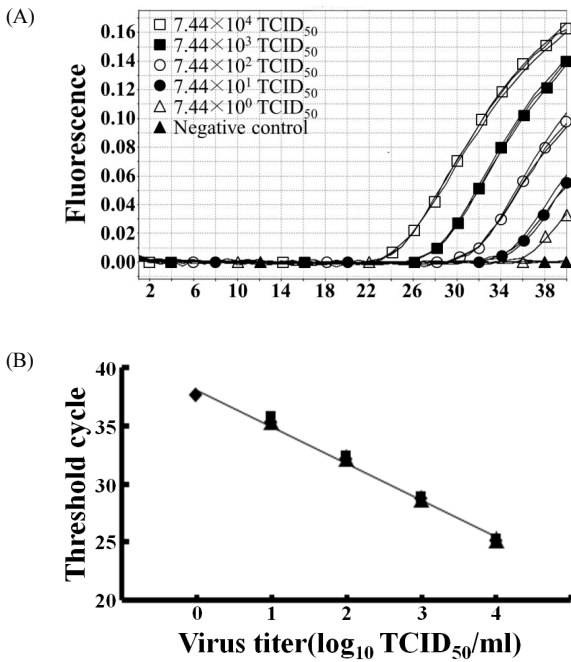


Fig. 1. Quantitative detection of BAdV-1 using optimized TaqMan probe real-time PCR. (A) Amplification plots obtained with 10-fold serial dilutions of BAdV-1. (B) Standard curve obtained by the regression analysis of Ct values versus initial BAdV-1 titer.

최적화된 조건에서 Titer가 7.44×10^4 TCID₅₀/ml에서 7.44×10^0 TCID₅₀/ml까지 10배씩 순차적으로 희석한 BAdV-1를 시료로 하여 real-time PCR을 수행하였다(Fig. 1A). BAdV-1 log titer (\log_{10} TCID₅₀/ml; x)에 대한 Ct 값(y) 간의 표준 회귀식을 구한 결과, $y = -3.267x + 38.514$ ($R^2=0.993$)로 나타나 BAdV-1 log titer와 Ct 값 간의 회귀성이 매우 높아 정량 분석이 가능한 시험법임을 확인하였다(Fig. 1B).

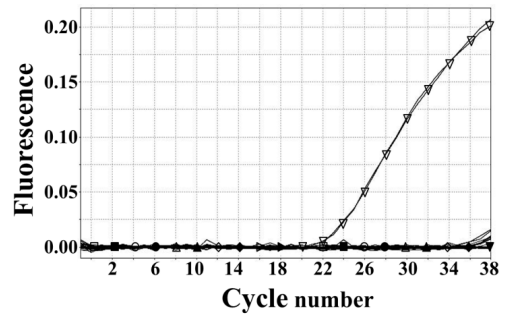


Fig. 2. Specificity of TaqMan probe real-time PCR assay to potential cross-reactive viruses. Amplification plots were obtained with cross-reactive viruses using the real-time PCR. ▽, BAdV-1; □, BHV-1; ■, BVDV; ○, HAV; ●, MVM; △, PEDV; ▲, PPV; ◇, PRoV; ◆, REO-3; ►, BPIV-3; ▼, Negative control.

TaqMan probe real-time PCR의 신뢰성 검증

특이성 검증을 위해 다른 DNA 바이러스(BHV-1, MVM, PPV, PRV)와 RNA 바이러스(BVDV, BPIV-3, HAV, PEDV, PRoV, REO-3)를 대상으로 cross-reactivity를 확인한 결과, BAdV-1에서만 fluorescence값의 증가를 관찰할 수 있었고, 다른 바이러스에서는 완충용액 음성대조군과 같이 fluorescence값의 증가를 관찰할 수 없었다(Fig. 2). 이와 같은 결과에서 확립된 real-time PCR 방법은 BAdV-1에 특이적인 실험법임을 확인하였다.

검출한계 검증을 위해 Titer가 7.44×10^3 TCID₅₀/ml인 BAdV-1를 10배씩 순차적으로 7.44×10^1 TCID₅₀/ml까지 희석한 샘플을 독립적으로 준비하여 각 희석 배수 당 8회에 걸쳐 총 24회 검출시험을 실시하였다. 검출한계 값은 총 시험 건수 중 95%가 양성으로 검출될 수 있는 검체량당 BAdV-1 titer를 의미하기 때문에 24회 시험 중 23회 이상 양성 값이 나온 농도인 7.44×10^1 TCID₅₀/ml을 검출한계로 결정하였다(Table 2).

Table 2. Determination of LOD (Limit of Detection) of BAdV-1

Run	TCID ₅₀ /ml															Limit of detection
	7.44×10^3			7.44×10^2			7.44×10^1			7.44×10^0			7.44×10^{-1}			
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	7.44×10^0
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	7.44×10^0
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	7.44×10^0
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	7.44×10^1
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	7.44×10^0
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	7.44×10^1
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	7.44×10^1
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	7.44×10^0
Decision																7.44×10^1

Three independent 10-fold dilution series of BAdV-1 were tested on different days with 8 replicates for each dilution. LOD for the individual run was determined as the lowest TCID₅₀/ml of detectable. “+” represented the positive signal while “-” represented the negative signal for each replicate.

Table 3. Robustness of real-time PCR assay (effect of primer sets made by different vendors)

BAdV-1 (TCID ₅₀ /ml)	Ct values											
	Vendor A		Vendor B		Vendor C		Mean of Ct		SD of Ct		CV (%)	
7.44×10^4	25.81	25.73	25.81	25.87	25.71	25.82	25.54	25.87	26.52	25.85	0.270	1.04
7.44×10^3	28.89	29.10	29.05	29.08	29.15	29.12	28.74	28.89	28.82	28.99	0.146	0.50
7.44×10^2	32.33	32.25	32.15	32.37	32.42	32.39	32.20	32.03	31.87	32.22	0.183	0.57
7.44×10^1	35.17	35.86	35.84	35.41	33.62	35.59	35.00	34.86	34.33	35.07	0.733	2.09
Negative control	N/A*	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-

Three independent 10-fold dilution series of BAdV-1 were tested using different primer sets made by different vendors for real-time PCR. Mean and standard deviation (SD) of Ct were calculated.

CV (%): coefficient of variance % = (SD of Ct/Mean of Ct) × 100

*N/A, not applicable; real-time PCR signals were not detected.

Table 4. Robustness of real-time PCR assay (effect of different MgCl₂ concentrations)

BAdV-1 (TCID ₅₀ /ml)	Ct values											
	Optimal condition	Addition of 1 mM MgCl ₂		Addition of 2 mM MgCl ₂		Mean of Ct		SD of Ct		CV (%)		
7.44×10^4	24.99	24.68	24.92	23.99	24.42	24.60	25.87	25.84	26.01	25.04	0.715	2.86
7.44×10^3	27.95	28.49	27.99	27.75	27.97	27.77	29.47	29.44	28.94	28.42	0.697	2.45
7.44×10^2	32.85	31.55	31.80	31.59	32.10	31.58	33.78	33.19	32.72	32.35	0.814	2.52
7.44×10^1	35.44	35.94	35.06	34.95	35.40	35.70	36.92	35.61	35.36	35.60	0.582	1.63
Negative control	N/A*	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-	-

Three independent 10-fold dilution series of BAdV-1 were tested using different concentrations of MgCl₂ for real-time PCR. Mean and standard deviation (SD) of Ct were calculated.

CV (%): coefficient of variance % = (SD of Ct/Mean of Ct) × 100

*N/A, not applicable; real-time PCR signals were not detected.

제조회사를 달리한 primer에 따른 real-time PCR 방법의 완전성을 검증하기 위해 3곳의 primer 제조회사가 제조한 primer를 준비하였다. Titer가 7.44×10^4 TCID₅₀/ml인 BAdV-1을 10배씩 순차적으로 7.44×10^1 TCID₅₀/ml까지 희석한 후 primer 별로 3회의 real-time PCR을 실시한 후 평균 Ct 값을 비교하였다 (Table 3). Ct 값에 대한 CV%는 1.04, 0.50, 0.57, 2.09로 확인되었다. 서로 다른 제조회사의 primer에서 Ct 값의 변화가 거의 없어 완전성이 있음을 확인하였다.

MgCl₂ 농도 변화에 따른 완전성을 검증하기 위해 Titer가 7.44×10^4 TCID₅₀/ml인 BAdV-1을 10배씩 순차적으로 7.44×10^1 TCID₅₀/ml까지 희석한 후 최적화된 real-time PCR 반응액에 MgCl₂를 1 mM, 2 mM 더 첨가하여 3회의 real-time PCR을 실시한 후 평균 Ct 값을 비교하였다 (Table 4). Ct 값에 대한 CV%는 2.86, 2.45, 2.52, 1.63으로 확인되었다. 실험조건의 농도에서 Ct 값의 변화가 거의 없어 MgCl₂ 농도 변화에 대한 완전성이 있음을 확인할 수 있었다.

확립된 real-time PCR 시험법을 생물의약품 제조공정에서 BAdV-1 제거 검증을 위한 정량시험법으로 활용이 가능한지 확인하기 위해 BAdV-1 정량 검출시험법의 직선성 검증을 실

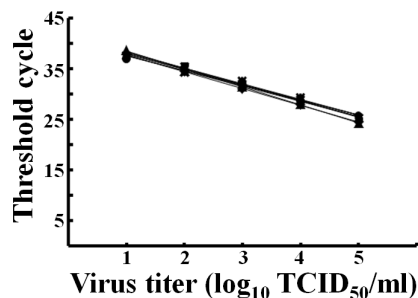


Fig. 3. Linearity and reproducibility of TaqMan probe real-time PCR assay for quantitative detection of BAdV-1. The standard curves were obtained by the regression analysis of Ct values versus initial virus titer. These results were obtained from 8 independent assays performed at different days. □, day 1; ■, day 2; ○, day 3; ●, day 4; △, day 5; ▲, day 6; ◇, day 7; ◆, day 8.

시하였다. 서로 다른 날에 BAdV-1 표준시료에서 DNA를 추출하고 real-time RT-PCR을 수행한 후 Ct 값을 비교하였다 (Fig. 3). BAdV-1 log titer (Log₁₀ TCID₅₀/ml; x)에 대한 Ct 값 (y) 간의 표준 회귀식은 첫째 날의 경우 $y = -3.220x + 37.375$ ($R^2=0.992$), 둘째 날의 경우 $y = -3.525x + 38.473$ ($R^2=0.992$), 셋째 날의 경우 $y = -3.134x + 37.952$ ($R^2=0.997$), 넷째 날의 경

우 $y = -3.506x + 39.500$ ($R^2=0.994$), 다섯째 날의 경우 $y = -3.205x + 38.262$ ($R^2=0.995$), 여섯째 날의 경우 $y = -3.362x + 38.731$ ($R^2=0.992$), 일곱째 날의 경우 $y = -3.205x + 38.262$ ($R^2=0.993$), 여덟째 날의 경우 $y = -3.361x + 38.557$ ($R^2=0.997$) 로 BAdV-1 log titer와 Ct 값 간의 회귀성이 매우 높았다. 이와 같은 결과에서 BAdV-1 정량 검출시험법으로 활용이 가능함을 확인할 수 있었다.

BAdV-1이 오염된 CHO 세포주에서 TaqMan probe real-time PCR을 이용한 BAdV-1 검출

확립된 TaqMan probe real-time PCR을 생물의약품 제조공정에 적용할 수 있는지 확인하기 위하여 인위적으로 BAdV-1을 오염시킨 CHO-K1 세포주에서 BAdV-1 검출 시험을 실시하였다. T-25 flask에 배양된 CHO-K1 세포에 BAdV-1을 인위적으로 오염시킨 후 T-25 flask에 3번 계대배양하면서 병변효과를 관찰하였다. BAdV-1은 CHO-K1 세포주에서 병변효과를 나타내지 않았다(Fig. 4A and B). 세포배양 상등액 4 ml을 회수하고, CHO-K1 세포를 trypsin을 처리하여 4 ml 부피로 회수하였다. 세포배양 상등액과 CHO 세포에서 각각 DNA를 추출하고, 확립된 real-time PCR을 활용하여 BAdV-1을 정량 검출하였다(Fig. 4C). 세포배양 상등액에서는 2.33×10^2 TCID₅₀ equivalent/ml BAdV-1이 검출었고, 세포에서는 1.12×10^1 TCID₅₀ equivalent/ml BAdV-1이 검출되었다.

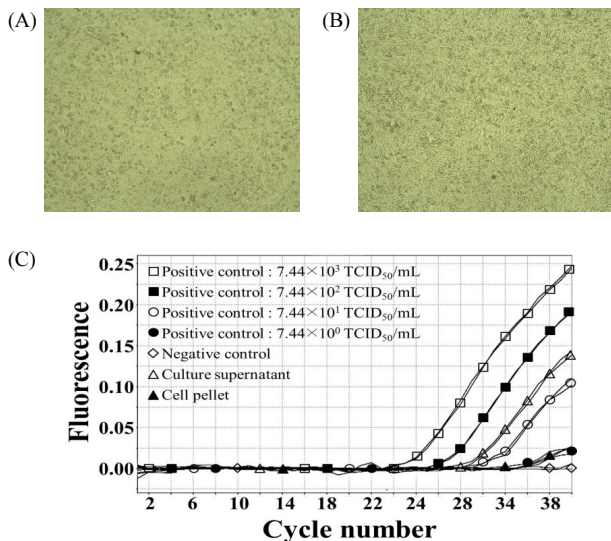


Fig. 4. Quantitative detection of BAdV-1 in artificially infected CHO-K1 cell line. (A) Morphology of CHO-K1 cell line not infected with BAdV-1. (B) Morphology of CHO-K1 cell line infected with BAdV-1. (C) Amplification plots of BAdV-1 positive controls, CHO-K1 cell pellet and culture supernatant infected with BAdV-1 and negative control.

Table 5. Application of real-time PCR assay to detect BAdV-1 from a commercial CHO master cell bank and bovine-derived type 1 collagen

Sample	Mean of Ct values	
	CHO master cell bank	Type 1 collagen
Negative control	N/A	N/A
Test article	N/A	N/A
Spiking control	30.74	29.38
Inhibition control	30.14	29.58
Positive control	30.03	30.05
Decision	Not contaminated	Not contaminated

N/A, not applicable; real-time PCR signals were not detected.

BAdV-1 검출 TaqMan probe real-time PCR 시험의 산업적 적용

확립된 real-time PCR 시험을 활용하여 항체의약품 생산용 CHO 마스터 세포주와 조직수복용 세포치료제 원료물질로 사용되는 소유래 type 1 collagen에서 BAdV-1 검출 시험을 실시하였다(Table 5). 두 시험에서 모두 음성대조군에서는 fluorescence 값의 증가를 관찰할 수 없었고, spiking control과 inhibition control의 Ct 값이 양성대조군의 Ct 값과 비슷하게 나와 시험시료의 성분이 BAdV-1 DNA 추출의 저해물질로 작용하지 않았고, 시험시료로부터 추출한 DNA 성분이 PCR 저해물질로 작용하지 않았음을 확인하였다. 두 시료 모두 음성대조군과 같이 fluorescence 값의 증가를 관찰할 수 없어 BAdV-1이 오염되지 않았다고 판정하였다.

고 찰

BAdV는 소에 호흡기 질환 및 장 관계 질환을 일으키는 바이러스이다. BAdV 감염이 소에게 항상 질병을 일으키는 것이 아니라서, 건강한 소에서도 BAdV가 분리되는 경우도 있다 (Benko *et al.*, 2000). 따라서 소유래 원료 물질에 BAdV가 오염될 가능성이 크다. 소 혈청을 배양 배지 성분으로 사용하는 생물의약품과 조직공학제제, 세포치료제의 경우 BAdV에 오염될 가능성이 있다. 또한 소유래 콜라겐, 뼈, 양막 등을 원료 물질로 사용하는 의료기기의 경우에도 BAdV가 오염될 가능성이 있다. 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(ICH Expert Working Group, 1998).

BAdV는 비-외피 바이러스로 물리·화학적 처리에 매우 큰

저항성을 나타내며 자연 환경에서 오랫동안 생존할 수 있기 때문에 물과 식품 등에서 소 분변 오염의 지표(indicator) 바이러스로 사용되어 왔다(de Motes et al., 2004). BAdV 검출을 위한 직접배양법, 형광항체법, ELISA 시험법은 시간과 비용이 많이 들고, 민감도와 특이도가 떨어지는 단점이 있어 상대적으로 민감도와 특이도가 우수한 real-time PCR 시험법이 개발되었다(Wong and Xagorarakis, 2010). PCR 시험법을 생물의약품 제조공정에 사용하기 위해서는 PCR 시험법 검증 가이드라인에 따라 검증을 하여야 하는데, 지금까지 개발된 PCR 시험법은 민감도, 특이도, 완전성 등을 검증한 사례가 없다. 또한 진단 목적의 PCR 시험법은 생물의약품 제조공정에서 BAdV 검출 시험법으로 사용하기에는 민감도가 떨어지는 단점이 있다.

본 연구에서는 동물세포 배양 유래 생물의약품에서 BAdV-1 안전성을 확보하기 위해, 세포주, 원료물질, 제조공정, 완제품에서 BAdV-1을 검출하고, 제조공정에서 BAdV-1 제거 검증을 위한 정량시험법으로 활용이 가능한 민감도와 특이도가 우수한 TaqMan probe real-time PCR 시험법을 확립하였다. 확립된 BAdV-1 real-time PCR 검출시험법의 신뢰성을 검증한 결과, 검출한계는 7.44×10^1 TCID₅₀/ml로 매우 민감하게 BAdV-1을 검출할 수 있었다(Table 2). 확립된 BAdV-1 real-time PCR 검출시험법의 직선성 검증을 위해 서로 다른 날에 BAdV-1 표준시료에서 DNA를 추출하고 real-time PCR을 수행한 후 Ct 값을 비교한 결과, BAdV-1 log titer (\log_{10} TCID₅₀/ml; x)에 대한 Ct 값(y) 간의 표준 회귀식의 결정계수 (r^2)는 모두 0.99 이상으로 직선성뿐만 아니라 재현성이 매우 높았다(Fig. 3). Real-time PCR의 효율을 표준 회귀식의 기울기 값으로 판단할 수 있다. 100% 증폭 효율을 나타내는 기울기 값은 -3.32이며, 일반적으로 -3.60에서 -3.10의 기울기 값을 나타내면 증폭 효율이 90~110%로서 정량시험에 적합한 real-time PCR 시험방법으로 판단한다(Lee and Kim, 2014). 본 연구를 통해 확립된 real-time PCR의 표준 회귀식에서 기울기 값은 -3.134에서 -3.525 값 사이에 존재하였다. 이와 같은 결과에서 확립된 real-time PCR은 정량시험법으로 적합한 시험법임을 확인하였다.

본 연구를 통해 확립된 BAdV-1 검출을 위한 real-time PCR 시험법을 CHO-K1 세포주에서 BAdV-1 검출시험에 활용하였을 때, BAdV-1에 오염된 CHO-K1 세포주가 병변현상을 일으키지는 않았지만, CHO-K1 세포배양액과 세포에서 BAdV-1를 효과적으로 검출할 수 있었다(Fig. 4). 따라서 본 연구를 통해 확립된 real-time PCR 시험법은 동물세포주 검증과 생산공정 검증에서 BAdV-1 오염 여부를 정성적 또는 정량적 검출할

수 있는 시험법임을 확인할 수 있었다. 생물의약품 생산 공정 중 CHO 세포주에 MVM, Reo-3, BPIV-3가 오염된 사례가 있다(Merten, 2002; Nims, 2006; Marcus-Sekura et al., 2011). 이들의 경우 CHO 세포주에 세포병변효과를 나타내기 때문에 쉽게 바이러스 오염 여부를 판별할 수 있다(Lee et al., 2008a, 2008b; Oh et al., 2012). 하지만 소 혈청을 통해 오염 가능한 BVDV, BHV, BPV의 경우에는 BAdV-1와 같이 CHO 세포주에 병변현상을 일으키지는 않았지만, CHO 세포주 배양액에서 real-time PCR로 검출되었다(Cho et al., 2008; Lee et al., 2008c, 2008d). 이와 같은 결과는 생물의약품 생산용 세포주가 세포병변현상을 나타내지 않는다고 해서 바이러스 오염이 없다고 단정할 수 없다는 것을 의미한다. 따라서 생물의약품의 바이러스 오염을 방지하기 위해서는 세포병변현상을 나타내지는 않지만 오염 가능한 바이러스들의 검출 시험이 필요하다고 판단된다.

소유래 물질을 원료로 하는 생물의약품, 조직공학제제, 세포치료제, 의료기기 등에서 바이러스 검출을 위해 real-time PCR 시험법을 활용하기 위해서는 시험의 정도 관리가 필수적으로 요구된다. PCR 시험은 시험시료에 존재하는 저해물질로 인해 위음성(false negative)의 결과를 나타낼 수 있다. 따라서 음성대조군과 양성대조군 뿐만 아니라 spiking control과 inhibition control이 시험의 정도 관리를 위해 사용된다(Buckwalter et al., 2014). 이러한 정도 관리 조건하에서 확립된 real-time PCR 시험법을 CHO 마스터 세포주와 소유래 type 1 collagen에서 BAdV-1 검출 시험에 적절하게 적용할 수 있었다(Table 5).

위와 같은 결과 본 연구를 통해 확립된 BAdV-1 real-time PCR 시험법은 소유래 물질을 원료로 하는 생물의약품, 조직공학제제, 세포치료제, 의료기기 제조 공정에서 BAdV-1 검출 시험과 제거 검증에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

적 요

소의 혈액, 세포, 조직, 기관 등이 생물의약품, 조직공학제제, 세포치료제, 의료기기의 원재료로 널리 사용되고 있다. 소유래 성분 원재료에 다양한 바이러스가 오염된 사례가 있기 때문에 소유래 물질을 원재료로 사용한 제제의 바이러스 안전성 검증이 필수적으로 요구된다. Bovine adenovirus type 1 (BAdV-1)은 소에게 가장 흔하게 감염되는 바이러스 중의 하나이다. 소유래 물질을 원재료로 하는 생물의약품, 조직공학

제제, 세포치료제, 의료기기 등에서 BAdV-1 안전성을 확보하기 위해, 세포주, 원재료, 제조공정, 완제품에서 BAdV-1을 정량적으로 검출하고, 제조공정에서 BAdV-1 제거 검증을 위한 시험법으로 활용이 가능한 TaqMan probe real-time PCR 시험법을 확립하였다. 세포배양법에 의한 감염역가와 비교한 결과, real-time PCR 검출한계는 7.44×10^1 TCID₅₀/ml이었다. 확립된 시험법의 신뢰성(reliability)을 보증하기 위해 시험법 검증을 실시한 결과, 특이성(specificity)과 재현성(reproducibility), 완전성(robustness)이 우수함을 확인하였다. 확립된 real-time PCR을 생물약품 제조공정 검증에 적용할 수 있는지 확인한 결과, 인위적으로 BAdV-1을 오염시킨 Chinese Hamster Ovary (CHO) 세포주에서 BAdV-1을 정량적으로 검출할 수 있었다. 확립된 시험법을 항체약품 생산용 CHO 마스터 세포주와 소유래 type 1 collagen에서 BAdV-1 검출 시험에 산업적으로 적용하였다. 위와 같은 결과에서 확립된 BAdV-1 real-time PCR 시험법은 감염역가 시험법과 같은 생물학적 시험법을 대신할 수 있는 신속하고, 특이성과 민감성이 우수한 시험법임을 확인하였다.

감사의 말

본 연구는 교육부와 한국연구재단의 지역혁신인력양성사업(No. 2014H1C1A1066915)과 한국산업기술평가관리원의 산업융합원천기술개발사업(과제번호: 10040197, 항체바이오베터 개발을 위한 항체특성분석 기반기술 개발)으로 수행된 연구결과임.

References

- Benko, M., Harrach, B., and Russell, W.C.** 2000. Family Adenoviridae, pp. 227-238. In Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., and Wickner, R.B. (eds.), *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, New York, San Diego, USA.
- Brennan, F.R., Baumann, A., Blai, G., de Haan, L., Fagg, H., Kiessing, A., Kronenberg, S., Locher, M., Milton, M., Tibbitts, J., et al.** 2015. Nonclinical safety testing of biopharmaceuticals – Addressing current challenges of these novel and emerging therapies. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **73**, 265-275.
- Buckwalter, S.P., Sloan, L.M., Cunningham, S.A., Espy, M.J., Uhl, J.R., Jones, M.F., Vetter, E.A., Mandrekar, J., Cockerill III, F.R., Pritt, B.S., et al.** 2014. Inhibition controls for qualitative real-time PCR assays: are they necessary for all specimen matrices?. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 2139-2143.
- Celis, P. and Silvester, G.** 2004. European regulatory guidance on virus safety of recombinant proteins, monoclonal antibodies and plasma derived medicinal products. *Dev. Biol. Stand.* **118**, 3-10.
- Cho, H.M., Lee, D.H., Kim, H.M., and Kim, I.S.** 2008. Real-time RT-PCR for quantitative detection of bovine viral diarrhoea virus during manufacture of biologics. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 34-42.
- de Motes, C.M., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Martín, M., and Girones, R.** 2004. Detection of bovine and porcine adenoviruses for tracing the source of fecal contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 1448-1454.
- Delgado, L.M., Bayon, Y., Pandit, A., and Zeugolis, D.I.** 2015. To cross-link or not to cross-link? Cross-linking associated foreign body response of collagen-based devices. *Tissue Engin. Part B Rev.* **21**, 298-313.
- Erickson, G.A., Bolin, S.R., and Landgraf, J.G.** 1991. Viral contamination of fetal bovine serum used for tissue culture: risks and concerns. *Dev. Biol. Stand.* **75**, 173-175.
- Hawkes, P.W.** 2015. Fetal bovine serum: geographic origin and regulatory relevance of viral contamination. *Bioresour. Bio-process.* **2**, 34.
- Horad, F.** 1991. Introductory remark: viral safety of biologicals. *Dev. Biol. Stand.* **75**, 3-7.
- ICH Expert Working Group.** 1998. International conference on harmonization; guidance on viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin; availability. *Fed. Resist.* **63**, 51074-51084.
- Ill, C.R. and Dehghani, H.** 2009. Risk reduction in biotherapeutic products. *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.* **12**, 296-304.
- Korea Food and Drug Administration.** 2003. Guidance on the validation of nucleic acid amplification tests.
- Lee, D.H., Cho, H.M., Kim, H.M., Lee, J., and Kim, I.S.** 2008a. Real-time PCR for validation of minute virus of mice safety during the manufacture of mammalian cell culture-derived biopharmaceuticals. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 12-20.
- Lee, D.H., Jeong, H.S., Kim, T.E., Oh, S.H., Lee, J.S., and Kim, I.S.** 2008b. Real-Time RT-PCR for validation of reovirus type 3 safety during the manufacture of mammalian cell culture-derived biopharmaceuticals. *Kor. J. Microbiol.* **44**, 228-236.
- Lee, D.H., Jeong, H.S., Lee, J.H., Kim, T.E., Lee, J., and Kim, I.S.** 2008c. Real-time PCR for quantitative detection of bovine herpesvirus type 1. *Kor. J. Microbiol.* **44**, 14-21.
- Lee, D.H., Lee, J.H., Kim, C.K., Kim, T.E., Bae, J.E., and Kim, I.S.** 2008d. Real-time RT-PCR for quantitative detection of bovine parvovirus during manufacture of biologics. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 173-181.
- Lee, J.I. and Kim, I.S.** 2014. TaqMan probe real-time PCR for quantitative detection of mycoplasma during manufacture of biologics. *Kor. Soc. Biotechnol. Bioeng.* **29**, 361-371.

- Lim, J.O.** 2015. Regulation policy on cell- and tissue-based therapy products in Korea. *Tissue Eng. Part A* (Article in press)
- Marcus-Sekura, C., Richardson, J.C., Harston, R.K., Sane, N., and Sheets, R.L.** 2011. Evaluation of the human host range of bovine and porcine viruses that may contaminate bovine serum and porcine trypsin used in the manufacture of biological products. *Biologicals* **39**, 359–369.
- Merten, O.W.** 2002. Virus contamination of cell cultures—a biotechnological view. *Cytotechnol.* **39**, 91–116.
- Moon, J.W., Sohn, D.S., Heo, J.U., and Kim, J.S.** 2015. Comparison of two kinds of bovine bone in maxillary sinus augmentation: a histomorphometric study. *Implant Dent.* **24**, 19–24.
- Motitschke, A., Ottiger, H.P., and Jungback, C.** 2010. Evaluation of the sensitivity of PCR methods for the detection of extraneous agents and comparison with *in vivo* testing. *Biologicals* **38**, 389–392.
- Nims, R.W.** 2006. Detection of adventitious viruses in biologicals—a rare occurrence. *Dev. Biol.* **123**, 153–164.
- Oh, S.H., Bae, J.E., and Kim, I.S.** 2012. Multiplex reverse transcription-PCR for simultaneous detection of reovirus, bovine viral diarrhea virus, and bovine parainfluenza virus during the manufacture of cell culture-derived biopharmaceuticals. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 339–347.
- Parkman, P.D.** 1996. Safety of biopharmaceuticals: a current perspective. *Dev. Biol. Stand.* **88**, 5–7.
- Schiff, L.J.** 2005. Review: production, characterization, and testing of banked mammalian cell substrates used to produce biological products. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **41**, 65–70.
- Vaegler, M., Daum, L., Maurer, S., Stenzl, A., Busch, S., and Sievert, K.D.** 2015. A bovine collagen type I-based biodegradable matrix as a carrier for tissue-engineered urothelium. *J. Stem Cell Res. Ther.* **5**, 275.
- Wong, K. and Xagorarakis, I.** 2010. Quantitative PCR assays to survey the bovine adenovirus levels in environmental samples. *J. Appl. Microbiol.* **109**, 605–612.