

세포배양 유래 생물약품 생산 공정에서 Reovirus Type 3 안전성 검증을 위한 Real-Time RT-PCR

이동혁¹ · 정효선² · 김태은¹ · 오선환¹ · 이정숙² · 김인섭^{1*}

¹한남대학교 생명·나노과학대학 생명과학과, ²한스바이오메드(주) 한스대덕연구소

세포배양 유래 생물약품 생산 공정에서 다양한 바이러스가 오염된 사례가 있기 때문에 바이러스 안전성 검증이 필수적이다. Reovirus type 3 (Reo-3)는 동물 세포주와 동물 세포 배양 공정에 오염되는 대표적인 바이러스이다. 세포배양 유래 생물약품의 Reo-3 안전성을 확보하기 위해, 세포주, 원료물질, 제조공정, 완제품에서 Reo-3를 정량적으로 검출하고, 제조공정에서 Reo-3 제거 검증을 위한 시험법으로 활용이 가능한 real-time RT-PCR 시험법을 확립하였다. Reo-3에 특이적인 primer를 선별하였으며, 형광염료 SYBR Green I을 사용하여 Reo-3 RNA 정량 검출 시험법을 최적화하였다. 세포배양법에 의한 감염역가와 비교한 결과 real-time RT-PCR 민감도는 3.2×10^0 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 생물약품 제조공정 검증에 적용할 수 있는지 확인하기 위하여 인위적으로 Reo-3를 오염시킨 CHO 세포에서 Reo-3 검출 시험을 실시한 결과 Reo-3를 감염시킨 CHO 세포와 세포배양 상청액에서 Reo-3를 정량적으로 검출할 수 있었다. 또한 바이러스 필터 공정에서 Reo-3 제거 효과를 감염역가 시험법과 비교 검증한 결과 더 빠른 시간에 동일한 결과를 얻을 수 있었다. 위와 같은 결과에서 확립된 Reo-3 real-time RT-PCR 시험법은 생물약품 안전성 보증을 위한 세포주 검증, 생물약품 생산 공정 검증, 바이러스 제거 공정 검증 등에서 감염역가 시험법을 대신할 수 있는 신속하고, 특이성과 민감성이 우수한 시험법임을 확인하였다.

Key words □ Chinese hamster ovary (CHO) cell, real-time RT-PCR, reovirus type 3, virus validation

동물세포를 이용한 바이러스 백신이 개발된 이래로 동물세포는 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 물리·화학적 분석만으로는 제품의 효능을 평가하기 어렵다. 또한 생물약품 생산에 사용되는 동물세포주는 내인성 및 외래성 바이러스에 오염될 가능성이 크기 때문에 안전성에 관한 논란이 오래 전부터 있어왔다(7, 12, 23, 26). 최근에 World Health Organization (WHO), Food and Drug Administration (FDA), European Medicines Agency (EMA)는 이러한 제제의 최종제품에 대한 안전성과 유효성 분석과 함께 원료부터 완제품에 이르는 전체 제조공정에 대한 철저한 품질관리의 중요성을 강조하고 있다(2, 13). 따라서 세계 각국의 규제기관에서는 생물약품에서 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(14).

생물약품 생산을 위해 설치류 유래 세포주인 Chinese hamster ovary (CHO) 세포와 baby hamster kidney (BHK) 세포

가 주로 사용되고 있다(5, 19). 이러한 세포들은 설치류 동물을 쉽게 감염시키는 Reovirus type 3 (Reo-3)에 감염될 수 있다(10, 24). Reo-3는 Reoviridae 과에 속하며, double-stranded RNA로 구성된 24 kb 유전체를 갖고 있는 외피비보유 바이러스(non-enveloped virus)이다(25). Reo-3는 두겹의 icosahedral capsid 단백질을 갖고 있기 때문에 물리·화학적 처리에 큰 저항성을 나타낸다. 또한 세포배양 유래 생물약품 생산공정에서 동물 세포주들이 오염된 사례가 보고되고 있기 때문에 생물약품의 안전성 검증을 위한 모델 바이러스로 이용되고 있다(27). Reo-3는 염소 처리에 매우 큰 저항성을 나타내기 때문에, 물에서 오랫동안 생존할 수 있어 오염된 물을 통한 감염이 주요 감염경로이다. Reo-3는 사람을 포함하는 거의 모든 동물의 호흡기나 장관에 감염한다. 보통의 경우 무증상을 나타내지만 면역력이 약해진 환자나 소아, 노인들에게는 세균에 의한 이차감염에 의해 심각한 호흡기 질병을 야기할 수 있다(18).

Reo-3를 검출하기 위한 시험법으로 혈구응집반응 시험(haemagglutination assay), 감염성 세포를 이용한 감염성 시험(infectivity assay), 면역형광염색법(immunofluorescent staining), 효소결합면역흡수법(enzyme immunosorbent assay) 등이 사용되어 왔다(6, 21, 22, 30). 이러한 시험법은 시간과 비용이 많이 들고, 민감도와 특이도가 떨어지는 단점이 있어, 생물약품 생산 공정에서 Reo-3 검출 시험법으로 적용하는데 어려움이 있다. 최근에는 민

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-42-629-8754, Fax: 82-42-629-8751
E-mail: inskim@hnu.kr

감도와 특이도가 우수한 역전사-중합효소 연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)을 활용하여 환경시료와 폐수처리 공정에서 Reo-3를 검출하려는 시험법이 개발되었다(9, 16). 또한 RT-PCR을 이용하여 동물세포 배양 공정에서 바이러스 검출실험에 활용하고자 하는 연구가 시도되었다(20). RT-PCR은 바이러스 RNA의 존재 유무를 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. Reo-3의 경우에는 동물사육실에서 동물들의 Reo-3 감염여부를 신속하게 진단하기 위해 형광 프로브를 이용한 real-time RT-PCR 시험법이 개발되었다(28).

본 연구에서는 동물세포 배양 유래 생물약품에서 Reo-3 안전성을 확보하기 위해, 세포주, 원료물질, 제조공정, 완제품에서 Reo-3를 정량적으로 검출하고, 제조공정에서 Reo-3 제거 검증을 위한 시험법으로 활용이 가능한 민감도와 특이도가 우수한 real-time RT-PCR 시험법을 확립하고자 하였다. 확립된 real-time RT-PCR 시험법을 활용하여 인위적으로 Reo-3를 감염시킨 CHO 세포에서 Reo-3를 정량적으로 검출하여 바이러스 안전성 검증 시험법으로의 활용 가능성을 평가하였다. 또한 단백질 의약품 제조 공정에서 바이러스 필터를 이용한 바이러스 제거 공정의 효율을 감염역가 시험법과 비교 검증하여 바이러스 제거 검증 시험법으로의 활용 가능성을 평가하였다.

재료 및 방법

Reo-3의 배양 및 정량

Reo-3 (ATCC VR 824)의 배양과 정량을 위해 Vero C1008 (ATCC CRL-1586) 세포를 사용하였다. Vero C1008 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 관찰될 때 배양액과 세포를 수거한 다음, 400×g에서 5분간 원심 분리하여 상층액은 따로 모으고 pellet은 재현탁하였다. Pellet을 동결과 해빙과정을 2회 반복하여 과쇄한 후 400×g에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 얻었다. 원심 상층액을 혼합한 후 0.45 μm filter로 여과한 다음 소분하여 -70°C에 보관하였다.

Reo-3의 정량을 위해 감염성 있는 바이러스의 titer를 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀)로 나타내었다. Reo-3를 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.

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 μl로부터 총 60 μl의 RNA를 용출하였다.

Oligonucleotide primer

Reo-3 유전자를 증폭하기 위해 사용한 올리고핵산 primer 염기서열은 NCBI data base에 보고된 Reo-3 segment L1 (NC 004282)과 S1 genome (NC 004277)을 기초로 Primer3 Software를 이용하여 디자인하였다(Table 1). 이들 유전자는 바이러스 내에서 유전적인 변이가 심하지 않은 conserved sequence로 다른 종류의 바이러스들과는 차이점을 나타낸다.

RT-PCR

분리한 RNA를 주형으로 Omniscript Reverse Transcription Kit (QIAGEN, German)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA를 합성하기 위해 template RNA 7 μl, 10 pmol specific primer

Table 1. Sequences of oligonucleotide primer sets used in the detection of Reo-3

Forward primer	Reverse primer	Nucleotide position	Amplicon size
REO-F1 GTAAAGCGITTTGGGTCAGA	REO-R1 TTAGCCACCATCCATCTTGF	2650-2768 ^a	119
REO-F2 CGGAGAITAAGGTTCCCAT	REO-R2 ATATAAGTAACGCGCGATGG	1196-1296 ^a	101
REO-F3 GTAAAGCGITTTGGGTCAGA	REO-R3 CGTAAACATTAGCCACCATC	2650-2776 ^a	127
REO-F4 TGTCAAACACCACGTCAAG	REO-R4 GTCGCAGTCATTACCATTC	3593-3719 ^a	127
REO-F5 GATGGTGGCTAATGGTTACG	REO-R5 CGCTCGTCCAGACTTCTTACG	2757-2901 ^a	145
REO-F6 ATCCATAACAAGAGGATTTTCG	REO-R6 TGGCGAGATTATTCCTGAC	468-613 ^b	146
REO-F7 GGGAGCTCCCTCTCAATCC	REO-R7 CTGAAGTCCACCATTTTGAA	531-663 ^b	133
REO-F8 GGCAGGATGGAGTACTTC	REO-R8 GATGAAATGCCCCAGTGC	1274-1416 ^b	143

^aNC 004282

^bNC 004277

(reverse primer) 1 μ l, RNase inhibitor (10 U/ μ l) 1 μ l, 10 \times buffer RT 2 μ l, dNTP mix (5 mM) 2 μ l, Omniscript reverse transcriptase 2 μ l, RNase-free water 5 μ l를 혼합하고 37°C에서 60분 동안 반응시켰다. Reo-3의 reverse transcription 반응으로 얻어진 cDNA를 주형으로 PCR을 실행하였다. PCR 반응을 위해 Reo-3 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 Research 사(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 산물 인지를 확인하기 위하여 PCR product의 DNA sequencing을 실시하였다. PCR 산물을 PCR SV PCR purification kit (GENE ALL, Korea)를 사용하여 정제한 후, 솔젠트(주)에 의뢰하여 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, USA)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 BLAST program을 이용하여(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) 확인하였다.

Real-time RT-PCR

Reo-3의 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. Reo-3 정량을 위해 Corbett Research 사(Australia)의 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 온도 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 온도 52°C에서 MgCl₂ 농도를 변화시켜 첨가해준 Reo-3 cDNA 농도에 따른 crossing point 값을 비교하였다.

Titer를 측정하고자 하는 시료들과 함께 titer가 3.2 \times 10⁵ TCID₅₀/ml인 Reo-3를 순차적으로 3.2 \times 10⁰ TCID₅₀/ml까지 10배씩 희석한 후 real-time RT-PCR을 수행하여 정량을 위한 표준곡선을 작성하였다. 시료 속에 들어있는 Reo-3의 양을 표준곡선에 대입하여 정량하였다. 표준곡선은 Reo-3의 농도에 따라 real-time RT-PCR에 의해 검출되는 crossing point 값을 TCID₅₀ equivalent/

ml로 전환하여 작성하였다(1). Crossing point는 PCR cycle이 exponential phase로 들어가는 cycle 수를 나타낸다.

Real-time RT-PCR의 신뢰성 검증

확립된 Reo-3 정량법의 신뢰성(reliability)을 보충하기 위해 확립된 실험법의 민감도(sensitivity), 재현성(reproducibility) 등을 검증하였다. 민감도를 측정하기 위해 titer가 3.2 \times 10⁵ TCID₅₀/ml인 Reo-3를 순차적으로 3.2 \times 10⁰ TCID₅₀/ml 까지 10배씩 희석한 후 real-time RT-PCR을 수행하였다. 재현성 검증을 위해 titer가 3.2 \times 10⁵ TCID₅₀/ml인 Reo-3를 순차적으로 3.2 \times 10⁰ TCID₅₀/ml까지 10배씩 희석한 후 서로 다른 날에 3회 정량 분석하여 crossing point 값을 비교하였다. 특이성 검증을 위해 RNA 바이러스인 hepatitis A virus (HAV, ATCC VR 1402), bovine viral diarrhoea virus (BVDV, ATCC VR 534), bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV-3, ATCC VR 281), murine encephalomyocarditis virus (EMCV, ATCC VR 129B)에 대한 cross-reactivity를 측정하였다. 시험에 사용한 바이러스의 titer는 각각 10⁶ TCID₅₀/ml, 10⁶ TCID₅₀/ml, 10⁵ TCID₅₀/ml, 10⁷ TCID₅₀/ml이었다.

CHO 세포에서 real-time RT-PCR을 이용한 Reo-3 검출

확립된 real-time RT-PCR을 생물의약품 제조공정 검증에 적용할 수 있는지 확인하기 위하여 인위적으로 Reo-3를 오염시킨 CHO 세포주에서 Reo-3 검출 시험을 실시하였다. CHO DG44 세포를 5% 우혈청을 첨가한 Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM: Gibco BRL, USA) 배지에 100 \times Hypoxanthine-Thymidine supplement (HT supplement; Gibco BRL, USA) 1%를 첨가하여 배양하였다. T-25 flask에 배양된 CHO DG44에 Reo-3를 감염시킨 후 4일 동안 배양하였다. 세포 배양액을 제거한 후 세포 배양액에 남아있을 수 있는 Reo-3를 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 Reo-3가 존재하는지 여부를 정량적으로 확인하였다. Real-time RT-PCR 양성 대조군으로는 titer가 3.2 \times 10² TCID₅₀/ml인 Reo-3를 사용하였으며, 음성 대조군으로는 CHO 세포주 배양배지 또는 비감염된 CHO 세포주를 사용하였다.

Real-time PCR을 이용한 바이러스 제거 검증

확립된 real-time RT-PCR을 생물의약품 분리정제과정에서 바이러스 제거 효율 검증에 적용할 수 있는지 확인하기 위하여 B 혈우병 치료제 factor IX 생산을 위한 Viresolve NFP 바이러스 필터 공정을 모델 시스템으로 선정하였다(3, 17). Reo-3 stock 용액 3 ml을 0.1 μ m membrane (Millex-VV, Millipore, Cork, Ireland)으로 여과하여 바이러스 aggregate와 세포 debris를 제거한 후 factor IX 용액(0.8 mg/ml) 27 ml에 첨가하였다. 바이러스가 첨가된 factor IX 용액 16 ml을 Viresolve NFP 47 mm 디스크 여

과막(Millipore, Jaffrey, USA)에 2 bar의 압력으로 여과하였다. 여과가 끝난 후 다시 인산완충용액 16 ml를 첨가하여 2 bar의 압력으로 여과하였다. 바이러스가 첨가된 factor IX 용액, 바이러스 필터 여과액, 인산완충용액 여과액에 존재하는 바이러스 양을 감염역가시험법과 real-time RT-PCR 시험법으로 정량하였다. 감염역가 시험시 Reo-3 titer를 정확하게 측정하기 위해서 먼저 factor IX 용액이 Reo-3의 정량 분석을 위해 사용되는 Vero C1008 세포에 cytotoxicity (세포독성)를 나타내는지와 Reo-3 정량분석에 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(17). 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(1, 2). 위와 같은 조건을 만족하는 PCR을 확립하기 위해 Primer3 Software를 이용하여 Reo-3 특이적인 primer 8쌍을 디자인하였다(Table 1). RT-PCR을 실행하여 각각의 primer쌍들의 민감도를 확인하였다. Titer가 3.2×10^3 TCID₅₀/ml과 3.2×10^1 TCID₅₀/ml인 Reo-3를 시료로 RT-PCR을 수행한 결과 primer 쌍 REO-F7, REO-R7이 가장 민감도가 우수하였다(자료 미제시). RT-PCR 조건을 최적화 한 결과 annealing temperature와 MgCl₂ 농도는 각각 58°C와 2 mM이었다. 최적 조건에서 RT-PCR의 민감도를 측정하였다. Titer가 3.2×10^5 TCID₅₀/ml인 Reo-3를 순차적으로 희석하여 RT-PCR 한 결과 3.2×10^0 TCID₅₀/ml까지 PCR 산물을 확인할 수 있었다(Fig. 1). PCR 산물을 sequencing 한 후 blast searching (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) 한 결과

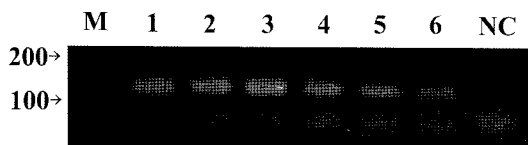


Fig. 1. Sensitivity of RT-PCR assay for detection of Reo-3. M, 100 bp DNA ladder; 1, 3.2×10^5 TCID₅₀/ml; 2, 3.2×10^4 TCID₅₀/ml; 3, 3.2×10^3 TCID₅₀/ml; 4, 3.2×10^2 TCID₅₀/ml; 5, 3.2×10^1 TCID₅₀/ml; 6, 3.2×10^0 TCID₅₀/ml; NC, Negative control.

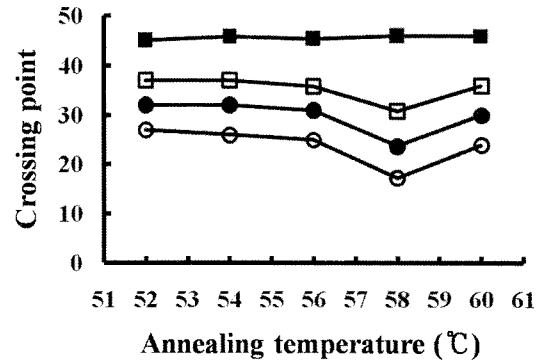


Fig. 2. Optimization of annealing temperature. The crossing point value refers to the cycle number at which the fluorescence of the PCR reaction rises above a set threshold and is inversely proportional to the amount of starting target. ○, 3.2×10^5 TCID₅₀/ml; ●, 3.2×10^3 TCID₅₀/ml; □, 3.2×10^1 TCID₅₀/ml; ■, Negative control.

PCR 산물이 Reo-3 유전자임을 확인할 수 있었다(자료 미제시).

Real-time RT-PCR 최적화

RT-PCR을 통해 확립된 PCR 조건을 기초로 real-time RT-PCR 조건을 확립하였다. Forward primer로 REO-F7을 reverse primer로 REO-R7을 사용하여 PCR 반응의 annealing temperature를 최적화하였다(Fig. 2). Titer가 3.2×10^5 TCID₅₀/ml, 3.2×10^3 TCID₅₀/ml, 3.2×10^1 TCID₅₀/ml인 Reo-3를 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 3.2×10^5 TCID₅₀/ml, 3.2×10^3 TCID₅₀/ml, 3.2×10^1 TCID₅₀/ml인 Reo-3를 시료로 MgCl₂ 농도를 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM로 변화시키며 real-time RT-PCR을 수행하였을 때 2 mM에서 crossing point가 가장 낮게 나타나 최적 MgCl₂ 농도는 2 mM임을 알 수 있었다.

Real-time PCR의 신뢰성 검증

Reo-3 정량을 위한 real-time RT-PCR 방법의 신뢰성(reliability)을 보증하기 위해 확립된 실험법의 민감도(sensitivity), 재현성(reproducibility), 특이성(specificity) 등을 검증하였다. 민감도를

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
3.2×10^5	17.34 ^a	24.41	32.38	43.27
3.2×10^3	23.71	31.45	37.99	43.54
3.2×10^1	30.79	35.79	39.21	44.74
Buffer control	45.32	45.29	45.54	45.41

^a Values indicate crossing point value

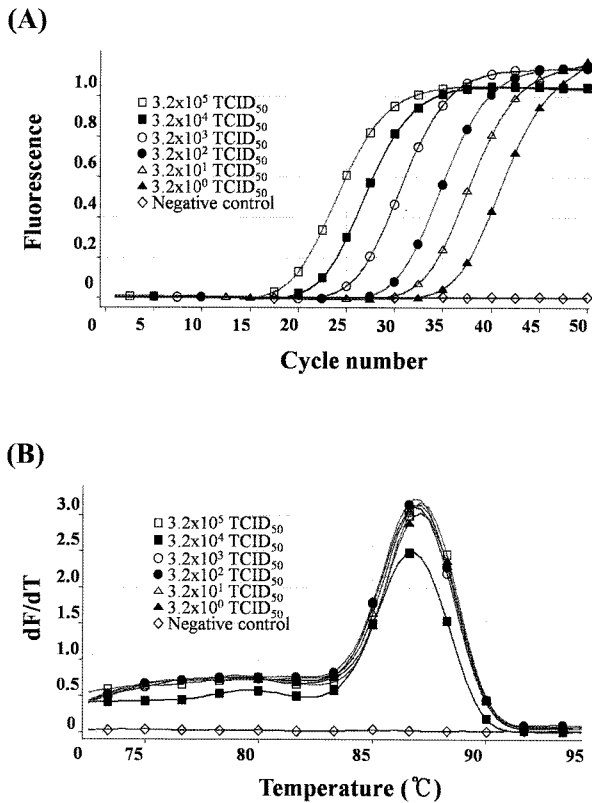


Fig. 3. Sensitivity of real-time RT-PCR assay for quantification of Reo-3. (A) Amplification plots obtained with 10-fold serial dilutions of Reo-3 stock solution. (B) Melting curve analysis of the amplification plot. Reo-3 stock solution of 3.2×10^5 TCID₅₀/ml was serially diluted and cycle-by-cycle detection of Reo-3 RNA was performed with SYBR Green I.

측정하기 위해 titer가 3.2×10^5 TCID₅₀/ml인 Reo-3를 순차적으로 10배씩 희석한 후 real-time RT-PCR을 수행하였다. 각 시료에 대해 real-time RT-PCR cycle 수에 따른 fluorescence값의 증가를 관찰한 결과 민감도는 3.2×10^0 TCID₅₀/ml임을 확인할 수 있었다 (Fig. 3A). Melting curve 분석 결과 Reo-3에 특이적인 부분과 비특이적인 부분으로 나뉘었으며, 완충용액 대조군에서는 Reo-3에 특이적인 peak를 확인할 수 없었다 (Fig. 3B). 증폭된 PCR 산물을 1.5% (w/v) agarose gel을 사용하여 전기 영동한 결과 각 Reo-3 양성시료에서 예상 크기의 밴드를 확인할 수 있었지만, 완충용액 대조군에서는 PCR 산물을 확인할 수 없었다 (자료 미제시).

확립된 Reo-3 정량법의 재현성 검증을 위해 서로 다른 날에 Reo-3 표준시료에서 RNA를 추출하고 real-time RT-PCR을 수행한 후 crossing point 값을 비교하였다 (Fig. 4). Reo-3 log titer (\log_{10} TCID₅₀/ml; x)에 대한 crossing point 값(y) 간의 표준 회귀식은 첫째 날의 경우 $y = -3.437x + 36.05$ (결정계수 $r^2 = 0.995$), 둘째 날의 경우 $y = -3.429x + 36.03$ ($r^2 = 0.998$), 셋째 날의 경우 $y = -3.294x + 35.42$ ($r^2 = 0.991$)로 Reo-3 log titer와 crossing point값 간의 회귀성이 매우 높았다.

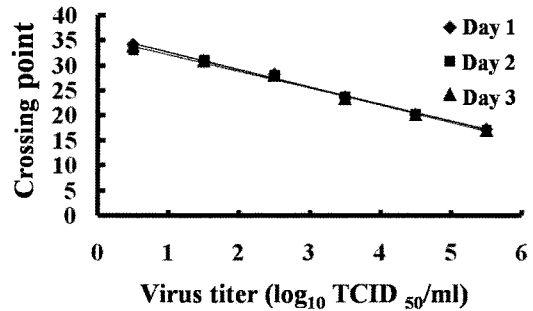


Fig. 4. Reproducibility of real-time RT-PCR assay for quantitative detection of Reo-3. The standard curves were obtained by the regression analysis of crossing point values versus initial virus titer. These results were obtained from three independent assays performed at different days.

다른 RNA virus들(HAV, BVDV, BPIV-3, EMCV)을 대상으로 특이성을 실험할 결과 Reo-3의 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 Reo-3 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 Reo-3에 특이적인 실험법임을 확인하였다.

CHO 세포주에서 real-time RT-PCR을 이용한 Reo-3 검출

확립된 real-time RT-PCR을 생물약품 제조공정에 적용할 수 있는지 확인하기 위하여 인위적으로 Reo-3를 오염시킨 CHO 세포주에서 Reo-3 검출 시험을 실시하였다. T-25 flask에 배양된 CHO DG44 세포에 Reo-3를 인위적으로 오염시킨 후 T-25 flask에 3번 이상 계대 배양하면서 병변효과를 관찰하였다. Reo-3는 CHO DG44 세포주에서 병변효과를 나타내었다 (Fig. 6A and B). 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 Reo-3를 정량 검출하였다 (Fig. 6C). 세포배양액에서는 3.4×10^2 TCID₅₀ equivalent/ml Reo-3가 검출되었고, 세포에서는 3.5×10^2 TCID₅₀ equivalent/ml Reo-3가 검출되었다. 증폭된 PCR 산물을 1.5% (w/v) agarose gel을 사용하여 전기 영동한 결과 각 Reo-3 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 RT-PCR을 생물약품 분리정제공정에서 바이러스 제거 효율 검증에 적용할 수 있는지 확인하기 위하여, B혈우병 치료제 factor IX 생산을 위한 Viresolve NFP 바이러스

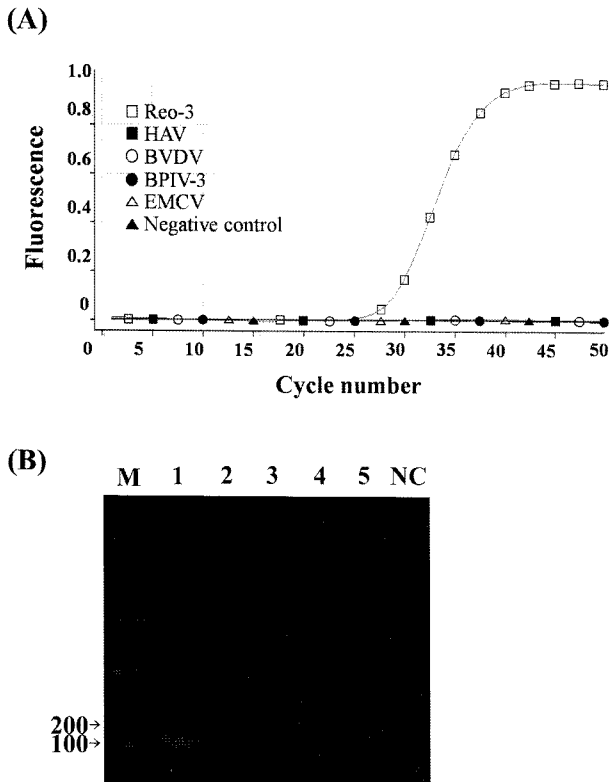


Fig. 5. Specificity of real-time RT-PCR assay to potential cross-reactive viruses. (A) Amplification plots. (B) Agarose gel electrophoresis of the PCR products. Specificity of the real-time RT-PCR assay was evaluated using the optimized protocol and then the PCR products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis. M, 100 bp DNA ladder; 1, reovirus type 3 (Reo-3); 2, hepatitis A virus (HAV); 3, bovine viral diarrhoea virus (BVDV); 4, bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV-3); 5, murine encephalomyocarditis virus (EMCV); NC, Negative control.

필터 공정에서 Reo-3 제거 효율을 감염역가 시험법과 비교 검증하였다. 감염역가시험법으로 바이러스를 정량 분석했을 때, 바이러스가 첨가된 factor IX 용액의 Reo-3 총 역가는 5.71 log₁₀ TCID₅₀ 이었으나, 바이러스 필터 여과액과 인산완충용액 여과액에서는 Reo-3가 전혀 검출되지 않았다. Real-time RT-PCR로 바이러스를 정량 분석하였을 때에도 바이러스가 첨가된 factor IX 용액의 Reo-3 총 역가는 5.74 log₁₀ TCID₅₀ equivalents이었으나, 바이러스 필터 여과액과 인산완충용액 여과액에서는 Reo-3가 전혀 검출되지 않았다. 감염역가시험법으로 검증한 Reo-3 감소인수는 ≥4.57이었다. Real-time RT-PCR로 검증한 Reo-3 감소인수는 ≥4.03으로 계산되었다. 감염역가시험법은 10일 이상의 시험기간이 소요되었는데, real-time RT-PCR 시험법은 1일안에 시험결과를 얻을 수 있어 시험시간이 10배정도 단축되었다.

고 찰

동물세포를 배양하여 생산되는 생물의약품은 특성상 숙주 유

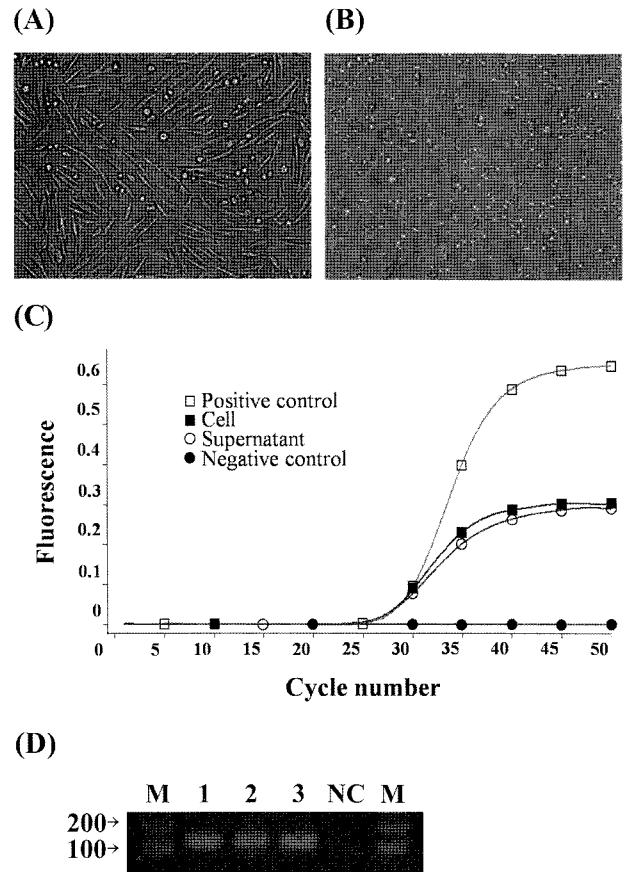


Fig. 6. Quantitative detection of Reo-3 in artificially infected CHO DG44 cell line. (A) Morphology of CHO DG44 cell line not infected with Reo-3. (B) Morphology of CHO DG44 cell line infected with Reo-3. (C) Amplification plots of Reo-3 positive control, CHO DG44 cell line infected with Reo-3, cell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

래 DNA, 세포기질 유래 바이러스, 원료물질 유래 바이러스와 같은 공정관련 불순물의 올바른 이해와 관리가 제품의 안전성 보증을 위해 매우 중요하다(29). 미국, 유럽, 일본 등과 같은 선진국에서는 안전하고 우수한 생물의약품을 생산하기 위해 공정 관련 불순물의 정성적 검출과 정량적 분석을 위해 최신의 과학 기술방법을 개발·도입하고 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(13, 23). 또한 규제기관은 동물세포유래 생물의약품의 안전성 보증을 위해 바이러스 불활화 공정과 제거 공정이 단백질 분리 정제 공정에 반드시 포함되도록 요구하고 있다. 따라서

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

Sample	Total Reo-3 titer	
	Infectivity titration (Log ₁₀ TCID ₅₀)	Real-time RT-PCR (Log ₁₀ TCID ₅₀ equivalents)
Factor IX solution spiked with virus	5.71	5.74
Filtrate after Viresolve NFP filtration	ND ^a (≤1.38) ^b	ND (≤1.71) ^c
Post-washed solution with phosphate buffer	ND (≤1.38) ^b	ND (≤1.71) ^c
Reduction factor (log ₁₀)	≥4.57	≥4.03

^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 RT-PCR method (3.2×10⁰ TCID₅₀ equivalents/ml) as a minimum detectable level.

생물의약품의 허가등록을 위해 바이러스 불활화와 제거 효율 검증이 필수적이다(8, 13, 23).

인체에 유해한 바이러스가 오염되는 것을 방지하여 안전한 생물학적 제제가 제조되도록 하기 위해서는 오염 바이러스의 검출 및 불활화 또는 제거 검증 관련 기술을 확립해야만 한다(3, 4, 7, 8). 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(13).

Reo-3는 크기가 80 nm 정도이며, 사람을 포함하는 거의 모든 동물의 호흡관이나 장관에 감염할 수 있다. 또한 Reo-3는 CHO 세포를 이용한 단백질 의약품 생산공정에서 오염된 사례가 있기 때문에, CHO 세포 배양 공정에서 Reo-3 안전성 확보가 가장 큰 문제 중의 하나로 대두되고 있다(10~12, 15, 24). Reo-3는 두겹의 icosahedral capsid 단백질을 갖고 있는 외피비모유 바이러스이기 때문에 여러 가지 물리·화학적 바이러스 불활화 처리에 큰 저항성을 나타낸다. 따라서 CHO 세포를 이용한 단백질 의약품 생산 공정은 Reo-3를 적절하게 불활화하거나 제거하는 공정을 포함하여야만 한다. 또한 Reo-3 불활화 및 제거 효율이 적합한 방법으로 검증되어야만 한다. 본 연구에서는 동물세포 배양 유래 생물의약품에서 Reo-3 안전성을 확보하기 위해, 세포주, 원료물질, 제조공정, 완제품에서 Reo-3를 정량적으로 검출하고, 제조공정에서 Reo-3 제거 검증을 위한 시험법으로 활용이 가능한 민감도와 특이도가 우수한 real-time RT-PCR 시험법을 확립하고자 하였다. Reo-3 전체 유전자를 대상으로 Reo-3에만 특이적인 primer 8쌍을 디자인하였다. 8쌍의 primer 중 Segment S1 (Sigma-1 protein) 유전자를 대상으로 디자인 한 primer 쌍 REO-F7, REO-R7의 민감도가 가장 우수하였다. 선별된 primer를 활용하여 annealing temperature와 MgCl₂ 농도 등 PCR 조건을 최적화 한 결과 확립된 실험법의 민감도는 3.2×10⁰ TCID₅₀/ml이었다. 본 연구를 통해 확립된 real-time RT-PCR은 다른 연구자들이 확립한 real-time RT-PCR 시험법 민감도인 10 TCID₅₀/ml 보다 더 낮은 농도의 Reo-3를 검출할 수 있었다(28). 확립된 Reo-3 RNA 정량법의 재현성 검증을 위해 서로 다른 날에 Reo-3 표준시료에

서 RNA를 추출하고 real-time RT-PCR을 수행한 후 crossing point 값을 비교한 결과, Reo-3 log titer (log₁₀ TCID₅₀/ml; x)에 대한 crossing point 값(y) 간의 표준 회귀식의 결정계수(r²)는 모두 0.99 이상으로 재현성 뿐만 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 Reo-3를 정량하는데 있어 민감도와 재현성이 우수함을 확인할 수 있었다.

본 연구를 통해 확립된 Reo-3 검출 시험법을 CHO 세포주에서 Reo-3 검출 시험에 활용하였을 때, Reo-3에 오염된 CHO 세포주와 세포주 배양 상등액에서 Reo-3를 효과적으로 검출할 수 있었다. 따라서 Reo-3 real-time RT-PCR 시험법은 동물세포주 검증과 생산공정 검증에서 Reo-3 오염 여부를 정성적 또는 정량적 검출할 수 있는 우수한 시험방법을 확인할 수 있었다. 동물세포주 검증에서 real-time RT-PCR을 활용한 Reo-3 검출시험은 지금까지 보고된 바 없다.

Real-time RT-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 평가기술일 뿐만 아니라, 감염역가 시험으로는 분석할 수 없는 크로마토그래피 세척공정에서의 바이러스 안전성 검증에 활용할 수 있는 적절한 방법이다(1, 3, 31). 본 연구를 통해 확립된 Reo-3 real-time RT-PCR 시험법을 Viresolve NFP 바이러스 필터 공정에 적용하여 감염역가 시험법과 비교하였을 때, 바이러스가 첨가된 factor IX 용액에서의 총 역가는 각각 5.71 log₁₀ TCID₅₀와 5.74 log₁₀ TCID₅₀ equivalents로 동일한 결과를 나타내었다. 또한 바이러스 필터 여과액과 인산완충용액 여과액에서는 두 시험법 모두 Reo-3를 검출할 수 없었다. 이러한 결과는 Viresolve NFP에 의해 Reo-3가 완벽하게 제거됨을 보여준다. 계산된 바이러스 감소인수도 각각 ≥4.57과 ≥4.03으로 거의 동일한 결과를 나타내었다. 감염역가시험법은 10 일 이상의 시험기간이 소요되는데 반해, real-time RT-PCR 시험법은 1일만에 시험결과를 얻을 수 있어 시험시간이 10배 정도 단축되었다. 따라서 Reo-3 real-time RT-PCR 시험법은 동물세포 배양 유래 생물의약품 제조 공정에서 바이러스 제거 검증에 유

용하게 사용될 수 있는 시험법으로 판단된다.

감사의 말

본 논문은 2008년도 한남대학교 학술연구조성비와 교육과학기술부와 한국산업기술재단의 지역혁신인력양성사업 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. 길태건, 김원중, 이동혁, 강용, 성학모, 유시형, 박순희, 김인섭. 2005. 혈장분획제제 제조공정에서 크로마토그래피 세척 검증을 위한 모델바이러스로서의 porcine parvovirus 정량. *미생물학회지* 41, 216-224.
2. 류승렬, 신진호, 백선영, 김재욱, 민경일, 민복순, 김병국, 김도근, 박미경, 안미진, 채경숙, 정혜성, 이석호, 박순희. 2003. 세포배양 유래 생물약품 중 bovine viral diarrhoea virus 검출을 위한 RT-PCR, real-time RT-PCR 및 RT-PCR-ELISA 기법의 검출한계와 정량범위 평가. *J. Bacteriol. Virol.* 33, 161-168.
3. 이동혁, 조항미, 김현미, 이정숙, 김인섭. 2008. 세포배양 유래 생물약품 생산 공정에서 minute virus of mice 안전성 검증을 위한 real-time PCR. *한국미생물·생명공학회지* 36, 12-20.
4. 이동혁, 정효선, 이정희, 김태은, 이정숙, 김인섭. 2008. Bovine herpesvirus type 1 정량 검출을 위한 real-time PCR. *미생물학회지* 44, 14-21.
5. Arden, N. and M.J. Betenbaugh. 2004. Life and death in mammalian cell culture: strategies for apoptosis inhibition. *Trends Biotechnol.* 22, 174-180.
6. Barthold, S.W. 1993. Infectivity, disease patterns, and serologic profiles of reovirus serotype 1, 2, and 3 in infant and weanling mice. *Lab. Animal Sci.* 43, 425-430.
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. Stand.* 118, 3-10.
8. Darling, A. 2002. Validation of biopharmaceutical purification process for virus clearance evaluation. *Mol. Biotechnol.* 21, 57-83.
9. Gallagher, E.M. and A.B. Margolin. 2007. Development of an integrated cell culture-real-time RT-PCR assay for detection of reovirus in biosolids. *J. Virol. Methods* 139, 195-202.
10. Garnick, R.L. 1996. Experience with viral contamination in cell culture. *Dev. Biol. Stand.* 88, 49-56.
11. Garnick, R.L. 1998. Raw materials as a source of contamination in large-scale cell culture. *Dev. Biol. Stand.* 93, 21-29.
12. Horaud, F. 1991. Introductory remark: viral safety of biologicals. *Dev. Biol. Stand.* 75, 3-7.
13. 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.
14. 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.
15. Karpas, A., J. Cawley, and J. Nagington. 1977. Serum-born reovirus type 1 infection of cultured haemic cell lines. *J. Gen. Virol.* 35, 191-195.
16. Kim, H.J., Y.O. Shin, and S.H. Kim. 2006. Detection of enteroviruses and mammalian reoviruses in Korean environmental waters. *Microbiol. Immunol.* 50, 781-786.
17. Kim, I.S., Y.W. Choi, Y. Kang, H.M. Sung, K.W. Sohn, and Y.S. Kim. 2008. Improvement of virus safety of an antihemophilic factor IX by virus filtration process. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 1317-1325.
18. Kim, M., Y.H. Chung, and R.N. Johnston. 2007. Reovirus and tumor oncolysis. *J. Microbiol.* 45, 187-192.
19. 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.
20. Leary, T.P., J.C. Erker, M.L. Chalmers, J.D. Wetzel, S.M. Desai, I.K. Mushahwar, and T.S. Dermody. 2002. Detection of reovirus by reverse transcription-polymerase chain reaction using primers corresponding to conserved regions of the viral L1 genome segment. *J. Virol. Methods* 104, 161-165.
21. Liu, H.J., L.C. Kuo, Y.C. Hu, M.H. Liao, and Y.Y. Lien. 2002. Development of an ELISA for detection of antibodies to avian reovirus in chickens. *J. Virol. Methods* 102, 129-138.
22. London, B.A., J. Kern, and W.D. Gehle. 1983. Detection of murine virus antibody by ELISA. *Lab. Animals* 12, 40-47.
23. Merten, O.W. 2002. Virus contamination of cell cultures-a biotechnological view. *Cytotechnol.* 39, 91-116.
24. Nicklas, W., V. Kraft, and B. Meyer. 1993. Contamination of transplantable tumors, cell lines, and monoclonal antibodies with rodent viruses. *Lab. Animal Sci.* 43, 296-300.
25. Niebert, M.L. and I.A. Schiff. 2001. Reoviruses and their replication, pp. 1679-1728. In B.N. Fields, D.M. Knipe, and P.M. Howley (eds.), *Fields Virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, USA.
26. Parkman, P.D. 1996. Safety of biopharmaceuticals: a current perspective. *Dev. Biol. Stand.* 88, 5-7.
27. Schimidt, S., J. Mora, S. Dolan, and J. Kauling. 2005. An integrated concept for robust and efficient virus clearance and contaminant removal in biotech processes. *BioProcess Int.* 3, 26-31.
28. Uchiyama, A. and D.G. Besselsen. 2003. Detection of reovirus type 3 by use of fluorogenic nuclease reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Lab. Animals* 37, 352-359.
29. Walsh, G. 2002. *Proteins: Biochemistry and Biotechnology*, pp. 196-209. John Wiley & Sons Ltd, Baffins Lane, Chichester, West Sussex, England.
30. Wright, M.H., L.M. Cera, N.A. Sarich, and J.A. Lednicky. 2004. Reverse transcription-polymerase chain reaction detection and nucleic acid sequence confirmation of reovirus infection in laboratory mice with discordant serologic indirect immunofluorescence assay and enzyme-linked immunosorbent assay results. *Comp. Med.* 54, 410-417.
31. 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.

ABSTRACT: Real-Time RT-PCR for Validation of Reovirus Type 3 Safety During the Manufacture of Mammalian Cell Culture-Derived Biopharmaceuticals

Dong Hyuck Lee¹, Hyo Sun Jeong², Tae Eun Kim¹, Seon Hwan Oh¹, Jungsuk Lee², and In Seop Kim^{1*} (¹Department of Biological Sciences, Hannam University, Daejeon 305-811, Republic of Korea, ²Tissue Engineering Division, Research and Development Dept., Hans Daedeok R&D Center, Hans Biomed Corp., Daejeon 305-811, Republic of 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 Reovirus type 3 (Reo-3), and there are several reports of Reo-3 contamination during the manufacture of biopharmaceuticals. In order to establish the validation system for the Reo-3 safety, a real-time RT-PCR method was developed for quantitative detection of Reo-3 in cell lines, raw materials, manufacturing processes, and final products as well as Reo-3 clearance validation. Specific primers for amplification of Reo-3 RNA was selected, and Reo-3 RNA was quantified by use of SYBR Green I. The sensitivity of the assay was calculated to be 3.2×10^0 TCID₅₀/ml. The real-time RT-PCR method was proven to be reproducible and very specific to Reo-3. The established real-time RT-PCR assay was successfully applied to the validation of Chinese hamster ovary (CHO) cell artificially infected with Reo-3. Reo-3 RNA could be quantified in CHO cell as well as culture supernatant. When the real-time RT-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 Reo-3.