

생물의약품 제조 공정에서 Porcine transmissible gastroenteritis virus 정량 검출을 위한 TaqMan Probe Real-Time RT-PCR 개발

이재일¹, 한상은², 김인섭^{2*}

¹(주)바이오피에스 바이오의약품안전성검증센터

²한남대학교 생명·나노과학대학 생명시스템과학과

Received: August 4, 2015 / Revised: September 2, 2015 / Accepted: September 2, 2015

Development of TaqMan Probe Real-Time RT-PCR for Quantitative Detection of Porcine Transmissible Gastroenteritis Virus During the Manufacture of Biopharmaceuticals

Jae Il Lee¹, Sang Eun Han², 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

Biopharmaceuticals and the cell substrates used for their manufacture are currently tested for porcine adventitious viruses due to the widespread use of porcine trypsin in cell culture. Porcine transmissible gastroenteritis virus (PTGV) is one of the major adventitious porcine viruses causing contamination during the manufacture of biopharmaceuticals. Therefore, rapid and sensitive detection of PTGV is essential in ensuring the safety of biopharmaceuticals. A TaqMan probe real-time RT-PCR method was developed for the quantitative detection of PTGV contamination in cell substrates, raw materials, manufacturing processes, and final products, as well as PTGV clearance validation. Specific primers for the amplification of PTGV RNA were selected, and PTGV RNA was quantified by use of a specific TaqMan probe. Specificity, limit of detection (LOD), and robustness of the method was validated according to international guidelines on the validation of nucleic acid amplification tests. The sensitivity of the assay was calculated to be 1.10×10^0 TCID₅₀/ml. The real-time RT-PCR method was validated to be reproducible, very specific to PTGV, and robust. The established real-time RT-PCR assay was successfully applied to the validation of Chinese Hamster Ovary (CHO)-K1 cells artificially infected with PTGV.

Keywords: Porcine transmissible gastroenteritis virus, contamination, TaqMan probe real-time RT-PCR, biopharmaceuticals, cell culture, validation

서 론

동물세포주를 숙주로 이용한 바이러스 백신이 개발된 이래로 동물세포주는 유전자 재조합 의약품과 항체의약품 등 치료 및 예방용 생물의약품 생산을 위한 숙주로 사용되어 왔다 [1, 10]. 세포배양 유래 생물의약품은 생체에서 유래한 복잡한 분자구조를 가진 물질로 최종제품에 대한 물리·화학적 분석만으로는 제품의 안전성과 유효성을 평가하기 어렵다. 또한 생물의약품 생산에 사용되는 동물세포주는 바이러스와 같은

내인성 및 외래성 오염물질에 오염될 가능성이 크기 때문에 안전성 보증을 위한 다양한 방법이 모색되고 있다 [3, 6, 7, 19, 22, 25]. 세포주를 이용하여 생산하는 생물의약품의 바이러스 오염을 방지하기 위해 생물의약품 생산을 위해 사용되는 세포주의 특성분석에 관한 미국 FDA의 가이드라인이 1993년에 발표된 이래로 세계 각국의 규제기관에서는 바이러스 안전성 평가 관련 가이드라인을 제정하고 안전성 관련 규제를 강화하여왔다 [8, 25]. 현재까지 세포배양 유래 생물의약품에 의한 바이러스 감염이 문제가 된 적은 없지만, 바이러스 오염은 심각한 임상결과를 가져올 가능성이 있기 때문이다.

세포주를 이용하여 생산되는 생물의약품의 잠재적인 바이러스 오염을 관리하기 위해 아래에 같은 상호 보완적인 세 가지 접근방법들이 필요하다. 첫째, 바이러스가 오염되지 않

*Corresponding author

Tel: +82-42-629-8754, Fax: +82-42-629-8891

E-mail: inskim@hnu.kr

© 2015, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

도록 세포주 및 배지 성분을 포함하는 원료들의 적절한 선택 및 검사. 둘째, 세포주 내재 또는 혼입 가능 외래성 바이러스에 대한 제거 및 불활화 공정이 포함된 검증된 분리 정제 방법으로 의약품의 생산. 셋째, 생산 공정 중 적절한 단계에서 오염 가능한 바이러스들의 검사.

외래성 바이러스 주요 오염원은 세포배양을 위해 사용하는 소 유래 혈청과 돼지 유래 trypsin이다[18]. 미국과 유럽의 가이드라인에서는 생물의약품 생산용 마스터 세포주(Master Cell Bank)에서 소 유래 혈청으로부터 오염이 가능한 Bovine viral diarrhoea virus (BVDV), Bovine adenovirus type 5 (BAV5), 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. 또한 Porcine parvovirus (PPV), Porcine adenovirus (PAV), Porcine transmissible gastroenteritis virus (PTGV), Porcine haemagglutinating encephalomyelitis virus (PHEV)와 같은 돼지 특이적인 바이러스 검출 시험을 수행하도록 하고 있다[18, 20].

PTGV는 *Coronaviridae* 과에 속하는 외피보유 바이러스(enveloped virus)로 positive-sense single-stranded RNA genome을 갖고 있다. PTGV는 모든 연령의 돼지에게 급성 장내 바이러스성 질병을 유발시킨다[24]. 형광항체법(Fluorescent antibody test), ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 시험법, PCR 시험법 등 PTGV 검출 시험법 확립에 대한 연구는 지금까지 주로 돼지의 바이러스성 장염의 원인이 되는 PTGV 진단 또는 Porcine epidemic diarrhoea virus와의 비교 진단을 위해 개발되었다[2, 5, 12, 23, 26-29]. 따라서 생물의약품 제조공정에서 바이러스 검출 시험법으로 사용하기에는 민감도가 떨어지는 단점이 있다. 본 연구에서는 동물세포 배양 유래 생물의약품에서 PTGV 안전성을 확보하기 위해, 세포주, 원료물질, 제조공정, 완제품에서 PTGV를 검출하고, 제조공정에서 PTGV 제거 검증을 위한 정량시험법으로 활용이 가능한 민감도와 특이도가 우수한 TaqMan probe real-time RT-PCR 시험법을 확립하고자 하였다. 확립된 real-time PCR 시험법을 활용하여 인위적으로 PTGV를 감염시킨 CHO (Chinese hamster ovary) 세포에서 PTGV를 정량적으로 검출하여 바이러스 안전성 검증 시험법으로의 활용 가능성을 평가하였다.

재료 및 방법

PTGV의 배양 및 정량

PTGV (ATCC VR-1740)의 배양과 정량을 위해 ST 세포

(ATCC CRL-1746)를 사용하였다. ST 세포를 10% Fetal Bovine Serum (FBS: Hyclone, USA)을 첨가한 Dulbecco's Minimum Eagle's Medium (DMEM: Hyclone, USA) 배지에 배양하였다. T-150 flask에 배양된 단층세포에 PTGV를 감염시킨 후 주기적으로 세포병변효과(cytopathic effect: CPE)를 관찰하였다. CPE가 명백하게 관찰될 때 동결과 해빙과정을 3회 반복하여 파쇄한 후 2,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 상층액을 얻은 후 0.45 µm filter로 여과한 다음 소분하여 -70°C 이하에서 보관하였다.

PTGV의 정량을 위해 감염성 있는 바이러스의 titer를 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀)로 나타내었다. PTGV를 2% FBS을 첨가한 DMEM 배지로 7배수로 희석하여 24 well plate에 배양된 세포에 0.25 ml씩 접종하였다. 음성대조군으로 세포배양배지를 0.25 ml씩 접종하였다. 그 후 35°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하면서 주기적으로 현미경으로 CPE를 관찰하였다.

Primer와 TaqMan probe의 디자인

PTGV 유전자를 증폭하기 위해 사용한 올리고핵산 primer 염기서열은 NCBI data base에 보고된 PTGV complete genome의 ORF 7 (Genbank no.: AJ271965.2)을 기초로 Primer Express 3.0 software (Applied biosystems)를 이용하여 디자인하였다. 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' 말단에는 quencher인 Blak Hole Quencher 1 (BHQ-1)이 오도록 하였다.

TaqMan probe real-time PCR 시험법 최적화

-70°C에 보관한 바이러스 배양액을 얼음에서 녹인 후, RNA를 분리하였다. RNA 분리는 NucleoSpin[®] RNA Virus (MACHEREY-NAGEL, Germany)를 사용하여 제조사에서 제공한 방법에 따라 실시하였다. 바이러스 배양액 150 µl로부터 총 50 µl의 RNA를 용출하였다. 분리한 RNA를 주형으로 TOPscript[™] cDNA Synthesis kit (Enzymomics, Korea)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 추출한 PTGV RNA 10 µl와 specific reverse primer (10 pmol) 2 µl를 혼합하였다. 혼합물을 70°C에서 5분간 처리한 후, 10× TOPscript[™] RT buffer 2 µl, TOPscript[™] Reverse Transcriptase (200 units/µl) 1 µl, dNTP mixture (2 mM) 2 µl, RNase Inhibitor (40 units/µl) 0.5 µl, RNase-free water 2.5 µl를 첨가하여 최종 부피를 20 µl로 맞추었다. 55°C에서 1시간 동안 반응시켜 cDNA를 합성한 후 95°C에서 5분간 반응시켰다. PTGV의 cDNA를 주형으로 Applied biosystems사 (USA)의 StepOnePlus Real-Time PCR system을 사용하여 real-time

PCR을 실행하였다.

TaqMan probe real-time PCR 시험법의 최적 조건을 확립하기 위해 annealing 온도와 $MgCl_2$ 농도에 따른 PCR 민감도 실험을 실시하였다. Real-time PCR 반응액은 TOPreal™ qPCR 2× PreMIX (TaqMan probe, Enzynomics, Korea) 10 μ l, 10 pmol forward primer 0.5 μ l, 10 pmol reverse primer 0.5 μ l, 10 pmol probe 1 μ l, PTGV cDNA 2 μ l에 멸균된 3차 증류수 6 μ l를 넣어 총 20 μ l가 되게 하였다. 핵산증폭은 pre-incubation은 95°C에서 2분, denaturation은 95°C에서 5초, annealing은 30초(annealing 온도 최적화를 위해 54°C, 56°C, 58°C, 60°C에서 real-time PCR 수행)로 하여 45 cycle을 수행하였다. 최적 $MgCl_2$ 농도를 결정하기 위해 최적화된 annealing 온도 60°C에서 $MgCl_2$ 를 3 mM에서 5 mM까지 변화시켜 첨가해준 PTGV cDNA 농도에 따른 threshold cycle 값을 비교하였다.

Titer를 측정하고자 하는 시료들과 함께 titer가 1.10×10^4 TCID₅₀/ml인 PTGV를 순차적으로 1.10×10^1 TCID₅₀/ml까지 10배씩 희석한 후 real-time RT-PCR을 수행하여 정량을 위한 표준곡선을 작성하였다. 시료 속에 들어있는 PTGV RNA의 양을 표준곡선에 대입하여 정량하였다. 표준곡선은 PTGV의 농도에 따라 real-time PCR에 의해 검출되는 threshold cycle (Ct) 값을 TCID₅₀ equivalent/ml로 전환하여 작성하였다[15]. Threshold cycle은 PCR cycle이 exponential phase로 들어가는 cycle 수를 나타낸다.

Real-time PCR의 신뢰성 검증

확립된 PTGV real-time PCR 검출시험법의 신뢰성(reliability)을 보증하기 위해 확립된 실험법의 특이성(specificity), 검출한계(detection limit), 완전성(robustness)을 검증하였다. Real-time PCR 검증은 식품의약품안전처의 ‘핵산증폭검사법 검증 가이드라인’에 따라 실시하였다[13].

특이성 검증을 위해 Bovine herpesvirus type 1 (BHV, ATCC VR-188), Bovine viral diarrhoea virus (BVDV, ATCC VR-534), Bovine parainfluenza 3 virus (BPIV-3, ATCC VR-281), Hepatitis A virus (HAV, ATCC VR-1402), Minute virus of mice (MVM, ATCC VR-1346), Porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV, KVCC-VR0000188), Porcine parvovirus (PPV, ATCC VR-742), Porcine rotavirus (PRoV, KVCC-VR0000176), Pseudorabies virus (PRV, ATCC VR-00129), Reovirus 3 (Reo-3, ATCC VR-824)에 대한 cross-reactivity를 측정하였다. 시험에 사용한 바이러스의 titer는 각각 7.76×10^8 TCID₅₀/ml, 7.44×10^8 TCID₅₀/ml, 6.07×10^7 TCID₅₀/ml, 7.44×10^8 TCID₅₀/ml, 7.34×10^8 TCID₅₀/ml, 8.08×10^8 TCID₅₀/ml, 8.08×10^8 TCID₅₀/ml, 1.33×10^9 TCID₅₀/ml, 5.33×10^6 TCID₅₀/ml, 6.60×10^7

TCID₅₀/ml이었다. 음성 대조군으로는 phosphate buffered saline (PBS)을 사용하였다.

검출한계 값 검증을 위해 Titer가 1.10×10^4 TCID₅₀/ml인 PTGV를 10배씩 순차적으로 1.10×10^0 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. 각 시험 결과를 토대로 정량을 위한 표준곡선을 작성하고 PTGV 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.

제조사를 달리한 primer에 따른 real-time PCR 방법의 완전성을 검증하기 위해 PTGV를 1.10×10^4 TCID₅₀/ml부터 1.10×10^0 TCID₅₀/ml까지 10배씩 순차적으로 희석한 후 3곳의 primer 제조회사가 제조한 primer로 3회의 real-time PCR을 실시한 후 평균 Ct 값을 비교하였다. $MgCl_2$ 의 농도에 따른 real-time PCR 시험법의 완전성 검증을 검증하기 위해 PTGV를 1.10×10^4 TCID₅₀/ml부터 1.10×10^0 TCID₅₀/ml까지 10배씩 순차적으로 희석한 후 $MgCl_2$ 의 농도를 3 mM, 4 mM, 5 mM로 변화시켜서 3회의 real-time PCR을 실시한 후 평균 Ct 값을 비교하였다.

CHO 세포주에서 real-time PCR을 이용한 PTGV 검출

확립된 real-time PCR을 생물약품 제조공정 검증에 적용할 수 있는지 확인하기 위하여 인위적으로 PTGV를 오염시킨 CHO-K1 (ATCC CCL-61) 세포주에서 PTGV 검출 시험을 실시하였다. CHO-K1 세포를 10% 우혈청을 첨가한 Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640; Gibco BRL, USA) 배지에 1X Antibiotic Antimycotic Solution (Hyclone, USA)을 첨가하여 배양하였다. T-25 flask에 배양된 CHO-K1에 PTGV를 감염시킨 후 2일 동안 배양하였다. 세포 배양액을 제거한 후 세포 배양액에 남아있을 수 있는 PTGV를 완벽히 제거하기 위해 phosphate buffered saline으로 2번 세척한 다음 CHO-K1을 2회 계대 배양하였다. 각 계대 배양 시 현미경으로 CHO-K1의 모양을 관찰한 후 세포가 포함된 세포 배양액을 수거하였다. 확립된 real-time PCR 방법을 이용하여 세포 배양액에 PTGV가 존재하는지 여부를 확인하였다. Real-time PCR 양성 대조군으로는 titer가 1.10×10^2 TCID₅₀/ml인 PTGV를 사용하였으며, 음성 대조군으로는 비 감염된 CHO 세포주 배양액을 사용하였다.

결과 및 고찰

Primer와 Probe 선별

세포 배양 중 혼입 가능한 외래성 바이러스인 PTGV는 세

Table 1. Primers and a TaqMan probe used in this study (5' to 3') based on 10 sets of conserved nucleotide sequences of different PTGV strains from the NCBI Genbank database.

TGEV Strain	Source*	Forward primer		Reverse primer		Probe	
		TAATGTAAGGCAACCCGATGTCT	AGCATTGCCAAATCAAATCTAAACT	FAM	CATCGCGCTGTCTACTCTTTGTACAGAATGG	BHQ1	
Purdue	AJ271965.2	TAATGTAAGGCAACCCGATGTCT	AGCATTGCCAAATCAAATCTAAACT		CATCGCGCTGTCTACTCTTTGTACAGAATGG		
SC-Y	DQ443743.1	TAATGTAAGGCAACCCGATGTCT	AGCATTGCCAAATCAAATCTAAACT		CATCGCGCTGTCTACTCTTTGTACAGAATGG		
TS	DQ201447.1	TAATGTAAGGCAACCCGATGTCT	AGCATTGCCAAATCAAATCTAAACT		CATCGCGCTGTCTACTCTTTGTACAGAATGG		
WH-1	HQ462571.1	TAATGTAAGGCAACCCGATGTCT	AGCATTGCCAAATCAAATCTAAACT		CATCGCGCTGTCTACTCTTTGTACAGAATGG		
H16	FJ755618.2	TAATGTAAGGCAACCCGATGTCT	AGCATTGCCAAATCAAATCTAAACT		CATCGCGCTGTCTACTCTTTGTACAGAATGG		
Attenuated H	EU074218.2	TAATGTAAGGCAACCCGATGTCT	AGCATTGCCAAATCAAATCTAAACT		CATCGCGCTGTCTACTCTTTGTACAGAATGG		
Virulent Purdue	DQ811789.2	TAATGTAAGGCAACCCGATGTCT	AGCATTGCCAAATCAAATCTAAACT		CATCGCGCTGTCTACTCTTTGTACAGAATGG		
P115	DQ8117788.1	TAATGTAAGGCAACCCGATGTCT	AGCATTGCCAAATCAAATCTAAACT		CATCGCGCTGTCTACTCTTTGTACAGAATGG		
M60	DQ811786.2	TAATGTAAGGCAACCCGATGTCT	AGCATTGCCAAATCAAATCTAAACT		CATCGCGCTGTCTACTCTTTGTACAGAATGG		
M6	DQ811785.1	TAATGTAAGGCAACCCGATGTCT	AGCATTGCCAAATCAAATCTAAACT		CATCGCGCTGTCTACTCTTTGTACAGAATGG		

Expected amplicon size is 154 bp.

*GenBank number

포 배양 유래 생물의약품의 잠재적인 위해요소중의 하나이므로 PTGV의 오염 여부를 민감도와 특이도가 우수한 검증된 시험법으로 확인하여야만 한다. 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[8]. Real-time PCR 방법을 사용하여 특정 바이러스 존재를 확인하고, 정량분석하기 위해서는 바이러스 내에서 유전적인 변이가 심하지 않은 conserved sequence를 가진 부위를 선택하여야 한다. 선택된 sequence는 특정 바이러스에만 존재하여 특이성이 높아야 한다. 또한 생물의약품의 원료물질, 공정 중간물질, 최종제품 등에 미량으로 오염될 수 있는 바이러스 검출을 위한 정량 PCR의 경우 높은 민감도가 요구된다[11, 15].

다양한 PTGV strain을 모두 검출하기 위해 NCBI database에 보고된 PTGV 유전자 염기서열 alignment를 통해 conserved sequence를 가진 부위인 ORF 7 유전자 부위를 기초로 primer를 디자인하였다(Table 1). Purdue strain (GenBank number AJ271965.2)의 sequence를 기초로 할 때 primer 쌍의 nucleotide position은 280,300-28,453으로 amplicon 크기는 154 bp이다. PTGV 유전자를 실시간으로 검출하기 위한 TaqMan probe도 PTGV 유전자 염기서열 alignment를 통해 mismatch가 없는 부분을 선별하여 디자인하였다(Table 1). PCR 산물을 sequencing한 후 blast searching (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) 한 결과 PCR 산물이 PTGV 유전자임을 확인할 수 있었다(자료 미제시).

TaqMan probe real-time RT-PCR 최적화

TOPreal™ qPCR 2× PreMIX를 사용하여 real-time PCR 조건을 확립하였다. Titer가 1.10×10^4 TCID₅₀/ml에서

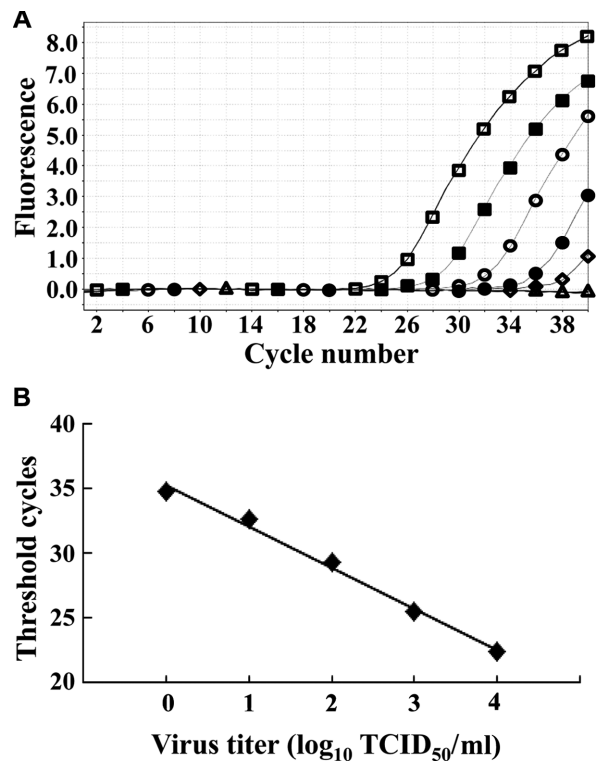


Fig. 1. Amplification plots obtained with 10-fold serial dilutions of PTGV (A) and the standard curves obtained by the regression analysis of crossing point values versus initial PTGV titer (B). □, 1.10×10^4 TCID₅₀/ml; ■, 1.10×10^3 TCID₅₀/ml; ○, 1.10×10^2 TCID₅₀/ml; ●, 1.10×10^1 TCID₅₀/ml; ◇, 1.10×10^0 TCID₅₀/ml; ◆, 1.10×10^0 TCID₅₀/ml; △, Negative control.

1.10×10^1 TCID₅₀/ml까지 10배씩 순차적으로 희석한 PTGV를 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 온도에서 MgCl₂ 농도를 변화시켜 PCR 조건을 최적화하였다. Titer가 1.10 × 10⁴ TCID₅₀/ml에서 1.10 × 10¹ TCID₅₀/ml까지 10배씩 순차적으로 희석한 PTGV를 시료로 하여 MgCl₂ 농도를 3 mM에서 7 mM로 변화시켜가며 real-time PCR을 수행하였을 MgCl₂ 농도에 따른 Ct 값 차이가 나타나지 않아 최적 MgCl₂ 농도를 3 mM로 결정하였다(자료 미제시).

최적화된 조건에서 Titer가 1.10 × 10⁴ TCID₅₀/ml인 PTGV를 1.10 × 10¹ TCID₅₀/ml까지 10배씩 순차적으로 희석한 후 real-time PCR을 수행하였다(Fig. 1A). PTGV log titer (Log₁₀ TCID₅₀/ml; x)에 대한 Ct 값(y) 간의 표준 회귀식을 구한 결과 y = -3.474x + 40.325 (R² = 0.995)로 나타나 PTGV log titer와 Ct 값 간의 회귀성이 매우 높아 정량 분석이 가능한 시험법임을 확인하였다(Fig. 1B).

TaqMan probe real-time PCR의 신뢰성 검증

확립된 real-time PCR 시험법을 세포주, 원료물질, 제조 공정, 완제품에서 PTGV 검출시험법으로 사용하기 위해 시험법의 특이성(specificity), 검출한계(detection limit), 완건성(robustness)을 검증하였다.

핵산증폭검사법의 특이성은 시험 대상물에서 특정 핵산을 정확하게 검출할 수 있는 능력이다. 특이성 검증을 위해 다른 RNA 바이러스(BVDV, BPIV-3, HAV, PEDV, Reo-3, PRoV)와 DNA 바이러스(BHV, MVM, PPV PRV)를 대상으로 cross-activity를 확인한 결과 PTGV에서만 fluorescence 값의 증가를 관찰할 수 있었고, 다른 바이러스에서는 음성대조군과 같이 fluorescence 값의 증가를 관찰할 수 없었다(Fig. 2). 이와 같은 결과에서 확립된 real-time PCR 방법은 PTGV에 특이적인 실험법임을 확인하였다.

검출한계 검증을 위해 Titer가 1.10 × 10⁴ TCID₅₀/ml인 PTGV를 10배씩 순차적으로 1.10 × 10⁰ TCID₅₀/ml까지 희석

한 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 검체량 당 PTGV titer를 의미하기 때문에 24회 시험 중 23회 이상 양성 값이 나온 농도인 1.10 × 10⁰ TCID₅₀/ml을 검출한계로 결정하였다(자료 미제시).

완건성은 시험방법 중 일부 조건이 소규모라도 의도적으로 변경되었을 때 측정값이 얼마나 영향을 받는지에 대한 척도를 나타내는 것으로 통상적으로 검사법의 신뢰도에 대한 지표이다. 제조회사를 달리한 primer에 따른 real-time PCR 방법의 완건성을 검증하기 위해 3곳의 primer 제조회사가 제조한 primer를 준비하였다. Titer가 1.10 × 10⁴ TCID₅₀/ml

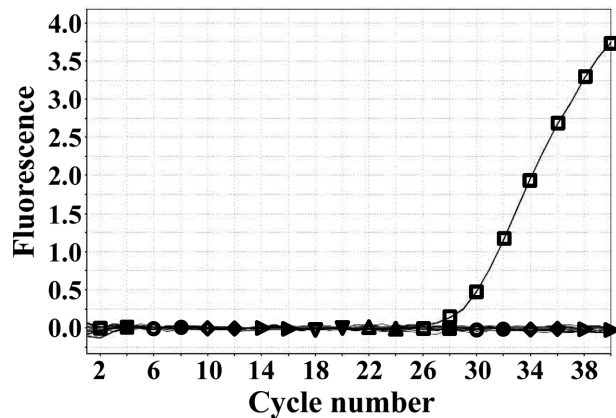


Fig. 2. Specificity of TaqMan probe real-time RT-PCR assay to potential cross-reactive viruses. Amplification plots were obtained with cross-reactive viruses using the real-time RT-PCR. □, Porcine transmissible gastroenteritis virus; ■, Bovine herpesvirus type 1; ○, Bovine viral diarrhea virus; ●, Bovine parainfluenza virus type 3; ◇, Hepatitis A virus; ◆, Minute virus of mice; ▷, Porcine epidemic diarrhea virus; ▸, Porcine parvovirus; ▽, Porcine rotavirus; ▾, Porcine pseudorabies virus; ▲, Reovirus type 3; △, Negative control.

Table 2. Robustness of real-time PCR (Effect of primer sets made by different vendors).

PTGV (TCID ₅₀ /ml)	Ct values									Mean of Ct	SD of Ct	CV (%)
	Vendor A			Vendor B			Vendor C					
1.10 × 10 ⁴	25.46	25.08	25.03	25.39	25.31	25.33	25.65	25.23	24.97	25.27	0.21	0.82
1.10 × 10 ³	28.71	28.58	28.60	28.76	28.79	28.77	27.76	27.78	27.70	28.38	0.46	1.61
1.10 × 10 ²	32.24	31.95	32.09	32.54	32.36	32.23	32.02	32.12	31.94	32.17	0.19	0.58
1.10 × 10 ¹	35.09	35.28	35.78	35.69	35.63	35.85	35.56	35.18	35.53	35.51	0.25	0.71
1.10 × 10 ⁰	37.27	37.87	39.22	39.11	37.91	38.11	38.27	37.64	38.05	38.16	0.60	1.58
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 PTGV 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 3. Robustness of real-time PCR (Effect of different MgCl₂ concentrations).

PTGV (TCID ₅₀ /ml)	Ct values									Mean of Ct	SD of Ct	CV (%)
	3 mM			4 mM			5 mM					
1.10 × 10 ⁴	24.76	24.50	24.62	24.55	24.74	24.66	24.56	25.05	24.76	24.69	0.16	0.63
1.10 × 10 ³	28.30	28.30	27.97	28.20	28.18	28.12	28.13	28.02	28.31	28.17	0.12	0.41
1.10 × 10 ²	31.71	31.94	31.54	31.89	31.67	31.87	31.46	31.61	31.29	31.66	0.20	0.64
1.10 × 10 ¹	35.89	35.50	35.73	35.76	35.57	35.99	35.38	36.05	35.67	35.73	0.21	0.59
1.10 × 10 ⁰	39.61	38.86	37.42	38.91	38.23	N/A	N/A	38.73	38.58	38.62	0.62	1.62
Negative Control	N/A	38.76	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A			

Three independent 10-fold dilution series of PTGV 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.

인 PTGV를 10배씩 순차적으로 1.10 × 10⁰ TCID₅₀/ml까지 희석한 후 primer 별로 3회의 real-time PCR을 실시한 후 평균 Ct 값을 비교하였다(Table 2). Ct 값에 대한 CV(%) 값은 0.82, 1.61, 0.58, 0.71, 1.58로 확인되었다. Real-time PCR의 완전성 검증에서 CV(%)가 3% 이하이면 완전성이 있다고 판단한다[9]. 서로 다른 제조회사의 primer에서 Ct 값의 CV(%)가 3% 이하로 나타나 완전성이 있음을 확인하였다.

MgCl₂ 농도 변화에 따른 완전성을 검증하기 위해 Titer가 1.10 × 10⁴ TCID₅₀/ml인 PTGV를 10배씩 순차적으로 1.10 × 10⁰ TCID₅₀/ml까지 희석한 후 MgCl₂ 농도를 3 mM, 4 mM, 5 mM로 변화시켜 real-time PCR을 실시한 후 평균 Ct 값을 비교하였다. Ct 값에 대한 CV(%) 값은 0.63, 0.41, 0.64, 0.59, 1.62로 확인되었다(Table 3). 실험조건의 농도에서 Ct 값의 변화가 거의 없고, CV(%)가 3% 이하로 나타나 MgCl₂ 농도의 변화에 대한 완전성이 있음을 확인하였다.

확립된 real-time PCR 시험법을 생물의약품 제조공정에서 PTGV 제거 검증을 위한 정량시험법으로 활용이 가능한지 확인하기 위해 PTGV 정량 검출시험법의 재현성 검증을 실시하였다. 서로 다른 날에 PTGV 표준시료에서 RNA를 추출하고 real-time RT-PCR을 수행한 후 Ct 값을 비교하였다(Fig. 3). PTGV log titer (Log₁₀ TCID₅₀/ml; x)에 대한 Ct 값(y) 간의 표준 회귀식은 첫째 날의 경우 $y = -3.551x + 40.385$ (결정계수 $R^2 = 0.994$), 둘째 날의 경우 $y = -3.425x + 39.540$ ($R^2 = 0.999$), 셋째 날의 경우 $y = -3.214x + 38.760$ ($R^2 = 0.995$), 넷째 날의 경우 $y = -3.511x + 40.540$ ($R^2 = 0.999$), 다섯째 날의 경우 $y = -3.497x + 41.470$ ($R^2 = 0.999$), 여섯째 날의 경우 $y = -3.377x + 39.410$ ($R^2 = 0.999$), 일곱째 날의 경우 $y = -3.214x + 38.760$ ($R^2 = 0.995$), 여덟째 날의 경우 $y = -3.257x + 39.115$ ($R^2 = 0.998$)로 표준 회귀식의 결정계수(r^2)는 모두 0.99 이상으로 나타나 재현성뿐만 아니라 회귀성이 매우 높음을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과에서 PTGV

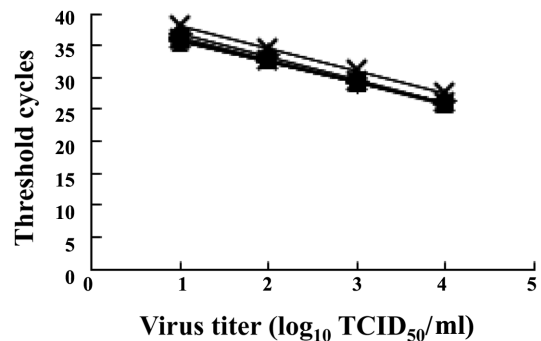


Fig. 3. Reproducibility and linearity of TaqMan probe real-time RT-PCR assay for quantitative detection of PTGV. 1 Day. $y = -3.551x + 40.385$, $R^2 = 0.994$; 2 Day. $y = -3.425x + 39.540$, $R^2 = 0.999$; 3 Day. $y = -3.214x + 38.760$, $R^2 = 0.995$; 4 Day. $y = -3.511x + 40.540$, $R^2 = 0.999$; 5 Day. $y = -3.497x + 41.470$, $R^2 = 0.999$; 6 Day. $y = -3.377x + 39.410$, $R^2 = 0.999$; 7 Day. $y = -3.214x + 38.760$, $R^2 = 0.995$; 8 Day. $y = -3.257x + 39.115$, $R^2 = 0.998$.

정량 검출시험법으로 활용이 가능함을 확인할 수 있었다.

PTGV가 오염된 CHO 세포주에서 TaqMan probe real-time PCR을 이용한 PTGV 검출

확립된 TaqMan probe real-time PCR을 생물의약품 제조공정에 적용할 수 있는지 확인하기 위하여 인위적으로 PTGV를 오염시킨 CHO-K1 세포주에서 PTGV 검출 시험을 실시하였다. T-25 flask에 배양된 CHO-K1 세포에 PTGV를 인위적으로 오염시킨 후 T-25 flask에 3번 이상 계대 배양하면서 병변효과를 관찰하였다. PTGV를 오염시키지 않은 CHO-K1 세포주의 모양(Fig. 4A)과 PTGV를 오염시킨 CHO-K1 세포주의 모양(Fig. 4B)을 현미경으로 관찰한 결과 차이점이 나타나지 않아 PTGV가 CHO-K1 세포주에서 병변효과를 나타내지 않음을 확인하였다. CHO-K1 세포가 포함된 세포배

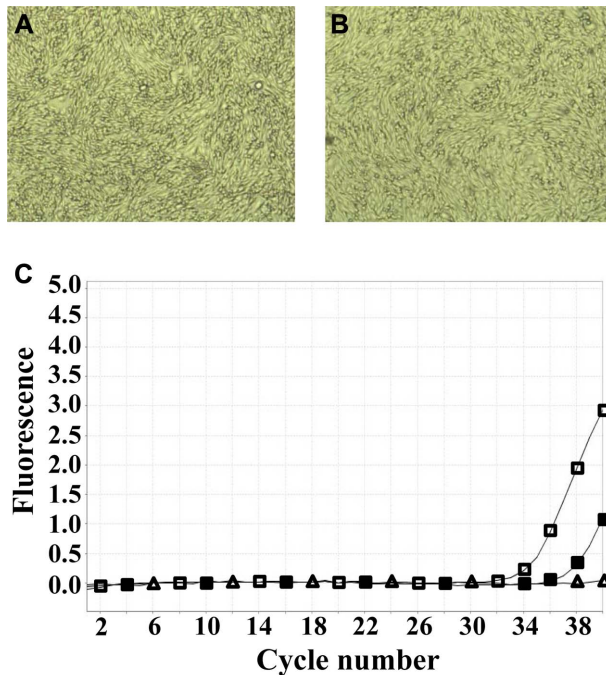


Fig. 4. Quantitative detection of PTGV in artificially infected CHO-K1 cell line. (A) Morphology of CHO-K1 cell line not infected with PTGV. (B) Morphology of CHO-K1 cell line infected with PTGV. (C) Amplification plots of PTGV positive control (\square ; 1.10×10^2 TCID₅₀/ml), CHO-K1 cell line infected with PTGV (\blacksquare), and negative control (\triangle).

양액 4 ml를 회수한 후 RNA를 추출하고, 확립된 real-time PCR을 활용하여 PTGV를 정량 검출하였다(Fig. 4C). 세포 배양액에서 1.1×10^1 TCID₅₀ equivalent/ml PTGV가 검출되었다.

본 연구를 통해 확립된 PTGV 검출을 위한 real-time RT-PCR 시험법을 CHO-K1 세포주에서 PTGV 검출시험에 활용하였을 때, PTGV에 오염된 CHO-K1 세포주가 병변현상을 일으키지는 않았지만, CHO-K1 세포배양액에서 PTGV를 효과적으로 검출할 수 있었다. 따라서 본 연구를 통해 확립된 real-time PCR 시험법은 동물세포주 검증과 생산공정 검증에서 PTGV 오염 여부를 정성적 또는 정량적 검출할 수 있는 우수한 시험법임을 확인할 수 있었다. 생물약품 생산 공정 중 CHO 세포주에 MVM, Reo-3, BPIV-3가 오염된 사례가 있는데[18-20], MVM, Reo-3, BPIV-3가 CHO 세포주에 병변효과를 나타내는지 확인하기 위하여 인위적으로 오염시킨 경우 세포병변효과를 나타내었다[15, 17, 21]. 하지만 소 혈청을 통해 오염 가능한 BVDV, BPV, BHV를 CHO 세포주에 인위적으로 오염시킨 경우 PTGV와 같이 CHO 세포주에 병변현상을 일으키지는 않았지만, CHO 세포주 배양액에서 real-time PCR로 검출되었다[4, 14, 16]. 이와 같은 결

과는 생물약품 생산용 세포주가 세포병변현상을 나타내지 않는다고 해서 바이러스 오염이 없다고 단정할 수 없다는 것을 의미한다. 따라서 생물약품의 바이러스 오염을 방지하기 위해서는 세포병변현상을 나타내지 않는 바이러스들의 검출 시험이 필요하다고 판단된다.

Real-time PCR을 활용한 바이러스 정량 검출 방법은 크로마토그래피 공정과 같은 단백질 분리 정제 공정에서 미량의 바이러스를 실시간에 정량화 할 수 있기 때문에, 생물약품 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[11]. 본 연구를 통해 확립된 PTGV real-time RT-PCR 시험법도 세포배양 유래 생물약품 제조 공정에서 PTGV 검출시험 뿐만 아니라 바이러스 제거 검증과 크로마토그래피 세척 검증에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

세포주를 이용하여 생산하는 생물약품과 생산용 세포주는 세포 배양 과정 중에 사용되는 돼지 유래 trypsin으로부터 외래성 돼지 유래 바이러스가 오염될 가능성이 있다. PTGV는 세포배양 유래 생물약품 제조공정에서 오염될 수 있는 외래성 바이러스 중의 하나이다. 본 연구에서는 생물약품 제조공정에서 PTGV 안전성을 확보하기 위해, 세포주, 원료물질, 제조공정, 완제품에서 PTGV를 정량적으로 검출하고, 제조공정에서 PTGV 제거 검증을 위한 시험법으로 활용이 가능한 TaqMan probe real-time RT-PCR 시험법을 확립하였다. PTGV에 특이적인 primer와 probe를 선별하여 PTGV 정량검출 시험법을 최적화하였다. 세포배양액에 의한 감염역가와 비교한 결과 real-time RT-PCR의 검출한계는 1.10×10^0 TCID₅₀/ml이었다. 확립된 시험법의 신뢰성을 보증하기 위해 시험법 검증을 실시한 결과 특이성과 재현성, 안전성이 우수함을 확인하였다. 확립된 real-time RT-PCR을 생물약품 제조공정 검증에 적용할 수 있는지 확인하기 위하여 인위적으로 PTGV를 오염시킨 CHO-K1 세포주에서 PTGV 검출 시험을 실시하였다. PTGV를 감염시킨 CHO-K1 세포에서 세포병변효과를 관찰할 수 없었지만, 세포배양액에서 PTGV를 정량적으로 검출할 수 있었다.

Acknowledgments

This research was financially supported by the Ministry of Education (MOE) and National Research Foundation of Korea (NRF) through the Human Resource Training Project for Regional Innovation (No. 2014H1C1A1066915).

References

- Butler M, Meneses-Acosta A. 2012. Recent advances in technology supporting biopharmaceutical production from mammalian cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **96**: 885–894.
- Carman S, Josephson G, McEwen B, Maxie G, Antochi M, Eernisse K, et al. 2002. Field validation of a commercial blocking ELISA to differentiate antibody to transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus and to identify TGEV-infected swine herds. *J. Vet. Diagn. Invest.* **14**: 94–105.
- Celis P, 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 HM, Lee DH, Kim HM, Kim IS. 2008. Real-time RT-PCR for quantitative detection of bovine viral diarrhoea virus during manufacture of biologics. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 34–42.
- Dulac GC, Ruckerbauer GM, Boulanger P. 1977. Transmissible gastroenteritis: demonstration of the virus from field specimens by means of cell culture and pig inoculation. *Can. J. Comp. Med.* **41**: 357–363.
- Horaud F. 1991. Introductory remark: viral safety of biologics. *Dev. Biol. Stand.* **75**: 3–7.
- Ill CR, Dehghani H. 2009. Risk reduction in biotherapeutic products. *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.* **12**: 296–304.
- 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.
- Jang J, Hing S-H, Kim I-H. 2011. Validation of a real-time RT-PCR method to quantify newcastle disease virus (NDV) titer and comparison with other quantitative methods. *J. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 100–108.
- Kantardjieff A, Zhou W. 2014. Mammalian cell cultures for biologics manufacturing. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **139**: 1–9.
- Kil TG, Kim WJ, Lee DH, Kang Y, Sung HM, Yoo SH, et al. 2005. Quantitative real-time PCR of porcine parvovirus as a model virus for cleaning validation of chromatography during manufacture of plasma derivatives. *Korean J. Microbiol.* **41**: 216–224.
- Kim SY, Song DS, Park BK. 2001. Differential detection of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhoea virus by duplex RT-PCR. *J. Vet. Diagn. Invest.* **13**: 516–520.
- Korea Food and Drug Administration. 2003. Guidance on the validation of nucleic acid amplification tests.
- Lee DH, Lee JH, Kim CK, Kim TE, Bae JE, Kim IS. 2008. Real-Time RT-PCR for quantitative detection of bovine parvovirus during manufacture of biologics. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 173–181.
- Lee DH, Cho HM, Kim HM, Lee J, Kim IS. 2008. Real-time PCR for validation of minute virus of mice safety during the manufacture of mammalian cell culture-derived biopharmaceuticals. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 12–20.
- Lee DH, Jeong HS, Lee JH, Kim TE, Lee J, Kim IS. 2008. Real-time PCR for quantitative detection of bovine herpesvirus type 1. *Korean J. Microbiol.* **44**: 14–21.
- Lee DH, Jeong HS, Kim TE, Oh SH, Lee JS, Kim IS. 2008. Real-Time RT-PCR for validation of reovirus type 3 safety during the manufacture of mammalian cell culture-derived biopharmaceuticals. *Korean J. Microbiol.* **44**: 228–236.
- Marcus-Sekura C, Richardson JC, Harston RK, Sane N, Sheets RL. 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.
- Nims RW. 2006. Detection of adventitious viruses in biologics—a rare occurrence. *Dev. Biol.* **123**: 153–164.
- Oh SH, Bae JE, Kim IS. 2012. Multiplex reverse transcription-PCR for simultaneous detection of reovirus, bovine viral diarrhoea virus, and bovine parainfluenza virus during the manufacture of cell culture-derived biopharmaceuticals. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 339–347.
- Parkman PD. 1996. Safety of biopharmaceuticals: a current perspective. *Dev. Biol. Stand.* **88**: 5–7.
- Paton D, Georgina I, Sands J, McGoldrick A. 1997. Detection of transmissible gastroenteritis virus by RT-PCR and differentiation from porcine respiratory coronavirus. *J. Virol. Methods* **66**: 303–309.
- Saif LJ, Wesley RD. 1999. Transmissible gastroenteritis and porcine respiratory coronavirus, pp. 295–325. In Straw BE, D’Allaire S, Mengeling WL, Taylor, DI (eds.), *Diseases of Swine*, 8th Ed. Iowa State University Press, Ames.
- Schiff LJ. 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.
- Sirinarmitr T, Paul PS, Halbur PG, Kluge JP. 1997. An overview of immunological and genetic methods for detection of swine coronaviruses, transmissible gastroenteritis virus, and porcine respiratory coronavirus in tissues. *Adv. Exp. Med. Biol.* **412**: 37–46.
- van Nieuwstad AP, Cornelissen JB, Vreeswijk J. 1988. Solid phase immune electron microscopy for diagnosis of transmissible gastroenteritis in pigs. *Res. Vet. Sci.* **44**: 286–294.
- van Nieuwstad AP, Cornelissen JB, Zetstra T. 1988. Comparison of two methods for detection of transmissible gastroenteritis virus in feces of pigs with experimentally induced infection. *Am. J. Vet. Res.* **49**: 1836–1843.
- Vemulapalli R, Gulani J, Santrich C. 2009. A real-time TaqMan® RT-PCR assay with an internal amplification control for rapid detection of transmissible gastroenteritis virus in swine fecal samples. *J. Virol. Methods* **162**: 231–235.