

복제가능 레트로바이러스 평가 가이드라인[민원인 안내서]

2022. 9.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭

복제가능 레트로바이러스 평가 가이드라인

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

등록대상 여부	<input type="checkbox"/> 이미 등록된 지침서·안내서 중 동일·유사한 내용의 지침서·안내서가 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 기존의 지침서·안내서의 개정을 우선적으로 고려하시기 바랍니다. 그럼에도 불구하고 동 지침서·안내서의 제정이 필요한 경우 그 사유를 아래에 기재해 주시기 바랍니다. (사유 :)	
	<input type="checkbox"/> 법령(법·시행령·시행규칙) 또는 행정규칙(고시·훈령·예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 일회성 지시·명령에 해당하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 외국 규정을 단순 번역하거나 설명하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
☞ 상기 사항 중 어느 하나라도 '예'에 해당되는 경우에 지침서·안내서 등록 대상이 아닙니다. 지침서·안내서 제·개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다.		
지침서·안내서 구분	<input type="checkbox"/> 행정사무의 통일을 기하기 위하여 내부적으로 행정사무의 세부 기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	<input type="checkbox"/> 예(☞ 지침서) <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 민원인들의 이해를 돕기 위하여 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 설명하거나 특정 민원업무에 대한 행정기관의 대외적인 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)	<input checked="" type="checkbox"/> 예(☞ 안내서) <input type="checkbox"/> 아니오
기타 확인 사항	<input type="checkbox"/> 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설·강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서·안내서 제·개정 절차를 진행하시기 바랍니다.	
상기 사항에 대하여 확인하였음.		
2022 년 9 월 22 일		
담당자 확 인(부서장)		류 정 임 오 일 응

이 안내서는 복제가능 레트로바이러스 평가방법에 대하여 알기 쉽게 설명하거나 식품의약품안전처의 입장을 기술한 것입니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술 방식('~하여야 한다' 등)에도 불구하고 참고로만 활용하시기 바랍니다. 또한, 본 안내서는 2022년 9월 현재의 과학적·기술적 사실 및 유효한 법규를 토대로 작성되었으므로 이후 최신 개정 법규 내용 및 구체적인 사실관계 등에 따라 달리 적용될 수 있음을 알려드립니다.

※ '민원인 안내서'란 민원인들의 이해를 돕기 위하여 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 설명하거나 특정 민원업무에 대한 식품의약품안전처의 대외적인 입장을 기술하는 것(식품의약품안전처 지침서등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 가이드라인에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전평가원

바이오생약심사부 세포유전자치료제과로 문의하시기 바랍니다.

전화번호: 043-719-3539

팩스번호: 043-719-3530

목 차

1. 서론	1
2. 시험에 대한 권장사항	1
2.1. 시험용 물질	1
2.1.1. 벡터생산세포 마스터세포은행(VPC MCB)	2
2.1.2. 벡터생산세포 제조용세포은행(VPC WCB)	3
2.1.3. 레트로바이러스 벡터 상층액과 생산종결세포	3
2.1.4. 레트로바이러스 형질도입 세포	3
2.2. 검체량	4
2.2.1. 세포 시험	4
2.2.2. 상층액 시험	4
2.3. 분석방법	5
3. 환자 모니터링을 위한 권장 사항	6
3.1. RCR 시험 일정	6
3.2. 권장하는 분석시험	7
4. RCR 시험 결과의 문서화	7
5. 허가 후 고려사항	8
6. 참고문헌	9
붙임 1. RCR 검출을 위한 시험 부피 권장량 계산	11
붙임 2. 상대 민감도 결정	13
붙임 3. 반복시험 검체의 수와 부피를 결정하는 수식	14

1. 서론

복제가능 레트로바이러스(RCR, replication competent retrovirus)의 잠재적 병원성으로 인해 레트로바이러스 벡터 기반 유전자치료제에서 철저한 시험을 통해 RCR이 없음을 확인해야 한다(1). 이 가이드라인은 레트로바이러스 벡터 기반 유전자치료제 제조 시 및 레트로바이러스 벡터 기반 유전자치료제로 치료를 받은 환자의 추적조사 모니터링 시 RCR 시험에 대해 권장 사항을 제공한다. 또한 본 권장 사항은 레트로바이러스 벡터-기반 유전자치료제의 투여 후 레트로바이러스 감염 증거에 대해 환자를 모니터링하기 위해 제공된다.

Retroviridae과(family)는 두 개의 아과(subfamily)로 구성된다. *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus* 및 *Lentivirus* 6개의 바이러스 속(genera)으로 구성된 *Orthoretrovirinae* (아과)와 *Bovispumavirus*, *Equispumavirus*, *Felispumavirus*, *Prosimiispumavirus* 및 *Simiispumavirus* 5개의 바이러스 속으로 구성된 *Spumaretrovirinae* (foamy viruses) (아과)이다(2, 3). RCR은 이들 모든 바이러스 속으로부터 레트로바이러스를 제조하는 경우 잠재적으로 생성될 수 있다.

2. 시험에 대한 권장 사항

2.1. 시험용 물질

일반적으로 레트로바이러스 벡터는 벡터 생산세포에 일시적(transient) 또는 안정적(stable)으로 벡터를 도입하고 배양한 후, 상층액(supernatant)을 수집하여 제조한다.

RCR은 초기 형질주입(transfection) 또는 형질도입(transduction)에서부터 레트로바이러스 벡터 상층액 생산까지, 벡터 제조 시 모든 단계에서 발생할 수 있다. 또한 레트로바이러스 벡터가 세포의 ex vivo 유전자 변형을 위해 사용된 경우, 레트로바이러스 벡터 상층액에서는 검출한계 미만이었던 RCR이 ex vivo 형질도입 세포의 증식 배양 동안 증폭될 수 있다. 그러므로 본 권고사항은 제품 제조의 여러 단계에서 사용되는 원료에 대한 시험을 포함한다(표-1).

벡터가 일시적인 형질주입에 의해 생산될 때 모든 세포은행을 적격성 평가해야 하며,

이때 「생물의약품 생산에 사용되는 세포기질 관리 가이드라인(식약처, 2010)」을 참고할 수 있다. 본 가이드라인에는 벡터 상층액, 생산종결세포 및 세포기반 유전자치료제에 대한 레트로바이러스 벡터 RCR 특이적 시험이 요약되어 있다.

적절하고 일관적인 레트로바이러스 벡터 공급을 보증하기 위해서는 가능한 한 안정적으로 형질주입된(stably-transfected) 벡터생산세포(VPC, Vector Producer Cell) 은행 시스템을 사용해야 한다. 단일 세포 클론으로부터 유래된 단일한 구성의 세포로 마스터세포은행(MCB, Master Cell Bank)을 구축한다. 제조용세포은행(WCB, Working Cell Bank)은 MCB로부터 유래하며, 특정 계대수까지 순차적 계대배양에 의해 증식된다. VPC 은행을 이용하여 벡터를 생산하는 경우에는 벡터 상층액, 생산종결세포 및 ex vivo 형질도입 세포 뿐만 아니라 VPC MCB에서도 RCR에 특이적인 시험이 권장된다.

2.1.1. 벡터생산세포 마스터세포은행(VPC MCB)

벡터 생성에 사용된 바이러스의 친화성(tropism)을 참고로 세포주를 선택하여 VPC MCB로부터 얻은 세포와 상층액 모두 RCR에 대해 시험해야 한다. 예를 들어 gibbon ape leukemia virus (GALV) 외피 또는 vesicular stomatitis virus glycoprotein (VSV-G) 외피를 함유하는 VPC는 일반적으로 사람 세포주에서 시험한다. 다른 레트로바이러스 외피들은 관련된 RCR의 감염을 허용하는 세포주에서 시험해야 한다.

임상용 벡터와 다른 외피를 가지는 위형(pseudotyped)의 레트로바이러스 벡터, 예를 들어 동종지향성(ecotropic) Murine Leukemia Virus (MLV)를 이용하여 VPC MCB가 생산되는 경우에는 다른 외피를 가지는 RCR이 도입될 가능성이 존재한다. 동종지향성 MLV RCR은 사람에게 대해 직접적 위험이 적을 수 있다. 그러나 동종지향성 MLV RCR은 VPC 내의 요소를 이용한 재조합을 통해 사람에게 감염성이 있는 RCR이 될 수 있으므로 문제가 될 수 있다.

그러므로 동종지향성 레트로바이러스 벡터 형질도입에 의해 VPC가 생산된 경우 양쪽 지향성(amphotropic) RCR 시험에 추가로 동종지향성 RCR 시험을 수행할 것을 권장한다. 예를 들어 동종지향성 MLV 외피를 함유할 가능성이 있는 VPC는 동종지향성 MLV-like RCR에 의한 감염을 허용하는 적절한 세포주에서 RCR 시험을 하여야 한다.

2.1.2. 벡터생산세포 제조용세포은행(VPC WCB)

적절하게 검증된 VPC MCB로부터 유래된 VPC WCB로 벡터를 생산 시 RCR 위험은 지금까지 축적된 경험을 바탕으로 할 때 비교적 낮다. 따라서 VPC MCB의 RCR 시험이 본 가이드라인에 따라 충분히 수행된 경우 VPC WCB에 대한 RCR 시험은 생략할 수 있다.

2.1.3. 레트로바이러스 벡터 상층액과 생산종결세포

레트로바이러스 벡터 상층액과 생산종결세포(EOP, end of production)에 대해 모두 RCR 시험을 수행하여야 한다. EOP 세포는 제품생산을 위해 배양되는 수준 이상으로 배양된 세포로 정의된다. 벡터 생산 로트의 RCR 시험은 벡터 상층액과 EOP 세포 모두에서 반드시 동일한 결과를 나타내지는 않는 것으로 알려져 있다. 따라서 벡터 상층액과 EOP 세포에서 RCR 시험은 상호보완적이며 모두 음성이어야 한다.

2.1.4. 레트로바이러스 형질도입 세포

레트로바이러스 벡터가 세포의 ex vivo 유전자 도입에 사용되는 경우 RCR이 검출 불가능한 수준으로 벡터 내에 있을 수 있으며 세포기반 유전자치료제의 제조 중 증폭될 가능성이 있다. 그러므로 세포기반 유전자치료제 각 로트 마다 RCR 시험 수행을 권장한다. 배양기간(예, 4일 이상)과 RCR 발생 가능성 간에 상관관계는 없는 것으로 알려져 있으므로, 이 시험은 형질 도입 후 세포의 배양 기간에 상관없이 적용한다.

그러나 의도적으로 RCR 재조합 가능성을 최소화하도록 설계된 벡터는 형질도입 세포에서 RCR이 발생할 가능성이 낮은 것으로 알려져 있다. 이러한 벡터를 사용하는 경우 일관되게 RCR 음성을 입증하는 축적된 자료가 RCR 시험을 축소 또는 미수행하는 근거가 될 수 있다. 세포기반 유전자치료제 완제품의 출하 시험으로 RCR 시험을 설정하지 않더라도 제품 유효기간 만료 후 최소 6개월 동안 검체를 보관하도록 권장한다. 향후 필요한 경우 RCR 시험을 수행할 수 있도록 충분한 양의 세포를 보유하도록 권장한다. 장기 보관할 수 있는 적절한 안전장치(예, 모니터링되는 냉동고 알람 보관 시스템)에

검체를 보관하여야 하며, 보관 검체가 투여환자의 진료기록 및 생산로트 기록과 신속하게 연결되고 검색될 수 있는 효율적 시스템을 확립하여야 한다. 세포기반 유전자치료제 제품 출하 시 RCR에 대해 시험하는 경우 보관하지 않아도 된다.

표-1. 시험에 대한 권장 사항

시험대상 물질	시험 빈도	예상되는 RCR에 대한 시험* (세포 및 상층액)	동종지향성 RCR에 대한 시험 (세포 및 상층액)
MCB - 동종지향성 벡터를 이용한 형질 도입에서 유래시 - 레트로바이러스 벡터 플라스미드를 이용한 형질주입에서 유래시	1회	예 예	예 해당 없음
벡터 수확 물질 - EOP 세포 - 상층액 (또는 제형화된 벡터)	제품 출하	예 예	해당 없음
세포기반 유전자치료제	제품 출하	예, 세포만 또는 보관	해당 없음

*RCR 시험은 사용된 벡터 외피 종류를 기반으로 해야 한다.

2.2. 검체량

2.2.1. 세포 시험

취합된(pooled) 벡터생산세포 또는 세포기반 유전자치료제의 1% 또는 10^8 개의 세포 (둘 중 적은 쪽)를 허용 세포주와 공동 배양하여 시험할 것을 권장한다.

2.2.2. 상층액 시험

최종 배양 상층액 또는 제형화된 벡터의 5% 이상을 취해 시험할 것을 권장한다. 현재 과학수준에서 임상용 레트로바이러스 벡터의 검출한계는 1 RCR/투여당량(dose

equivalent) 미만이다. 그러므로 최종 배양 상층액 또는 제형화된 벡터의 5% 이상을 취해 시험하는 것이 불가능한 경우, RCR이 1 RCR/투여당량의 농도로 존재할 때 RCR 검출 확률이 95% 이상이 되도록 최종 배양 상층액 또는 제형화된 벡터를 취하여 시험할 수 있다. 이러한 시험 신뢰 수준을 달성하기 위해 적용되는 근거와 계산식에 대한 보다 상세한 설명은 [붙임 1]의 예시에서 확인할 수 있다. 검체량을 기술하고, 검체량 설정 근거에 대한 타당성을 설명하여야 한다.

하나의 레트로바이러스가 검출될 수 있음을 입증하기 위하여 개별 RCR 분석에서 하나의 RCR을 검출할 수 있는 검체량을 결정해야 한다. 또한 결정된 검체량에 근거하여 전체 시험 부피는 단일 RCR 검출이 가능한 각각의 부피를 포함하는 여러 개의 반복 검체들로 나뉘어야 한다. 검체량이 많거나 높은 역가의 바이러스를 사용할 때에는 RCR 검출에 대한 간섭이 발생할 수 있다. 대체 시험법을 사용하기 위해서는 높은 역가의 레트로바이러스 벡터에 의한 간섭을 극복할 수 있는 보다 민감한 검출 방법을 개발하여야 한다.

2.3. 분석방법

벡터 상층액에 대한 시험은 상층액에 존재하는 잠재적인 RCR을 증폭시키기 위해 상층액을 허용 세포주(a permissive cell line)에서 배양해야 한다. 마찬가지로 세포에 대한 시험도 존재하는 잠재적인 RCR을 증폭시키기 위해 허용 세포주와 공동 배양해야 한다. 일반적으로 배양 기반 RCR 시험은 최소 5 계대 배양을 포함한다. 동등한 민감도를 입증한다면 분석법을 최적화하여 더 적은 계대수에서 시험하는 것을 고려할 수 있다. 하나 이상의 증폭세포주가 필요할 수 있음을 고려하여 벡터 디자인에 특이적인 바이러스 도입, 증폭 및 바이러스 입자 생산을 지원하는 RCR 분석시험을 개발할 것을 권장한다 (예, 동종지향성 MLV에 대한 *Mus dunni* (4), VSV-G pseudotyped HIV-1에 대한 C8166 세포(5) 또는 E1001 enveloped HIV-1에 대한 293F-DCSIGN 세포(6)). 그 후 증폭된 검체는 적절한 지표 세포 분석시험(indicator cell assay, 예, PG-4 S+L-(7), XC(8)), 또는 PERT(9), 또는 psi-gag 아니면 VSV-G 중합효소연쇄반응(PCR, polymerase chain reaction)(10), 또는 상업적으로 이용 가능한 p24 ELISA에 의해 검출될 수 있다. 모든 분석시험은 특이성, 민감도, 재현성을 평가하기 위해 양성 및 음성 대조군을 포함해야 한다. 각 레트로바이러스 벡터 상층액의 로트는 벡터 상층액에 양성대조군을 추가(spiking)하여 RCR 검출에 대한 간섭 효과를 평가하여야 한다.

제품개발전략에 따라 세포기반 유전자치료제에서 배양기반 시험법 대신 PCR 등 대체시험법을 적용할 수 있다. 이 경우 출발물질과 원료물질에서 복제가능 레트로바이러스에 대한 안전성을 확인하여야 한다.

복제가능 레트로바이러스 존재는 시험대상자에게 치명적이다. 따라서, 출하시험으로 대체시험법을 설정하려면 임상시험단계부터 민감도, 특이성, 재현성 등 해당시험의 밸리데이션을 통해 시험대상자의 안전을 확보하여야 한다.

분석시험 개발을 위해, 시험법 밸리데이션 및 양성대조군으로 사용하기 위한 표준 바이러스 스톱을 개발해야 한다. 표준 바이러스 스톱은 단일 RCR이 검출될 수 있는 검체량을 결정하기 위해 사용할 수 있다. 감마레트로바이러스 RCR는 표준 바이러스 스톱이 개발되어, 감염 역가(TCID₅₀)가 결정된 ATCC (American Type Culture Collection)의 4070A 바이러스 또는 NGVB (National Gene Vector Biorepository)의 GALV SEATO 바이러스를 이용할 수 있다. 감마레트로바이러스 RCR 표준품에 대한 보다 상세한 정보와 RCR 검출을 위한 반복시험 검체의 수와 검체량을 결정하는 방법에 대해서는 [붙임 2]와 [붙임 3]을 참조한다. 다른 레트로바이러스 벡터에 대한 표준 바이러스 스톱은 아직 개발되지 않았다. 임상용 벡터의 특징(유전적 배경, 외피 단백질, 보조 단백질 제거 등을 포함)을 대표하는 내부 표준 바이러스 스톱을 개발할 것을 권장한다. 해당 바이러스 스톱은 허용 세포주에서 성장 속도(growth kinetics)에 대한 특성분석 및 안정성을 평가하여야 한다.

3. 환자 모니터링을 위한 권장 사항

3.1. RCR 시험 일정

환자 검체 분석에 대하여 다음의 시점을 모니터링 일정에 포함할 것을 권장한다: 치료 전, 치료 후 3, 6, 12 개월, 이후 15 년까지 1 년에 한 번. 만약 어떤 치료 후 검체 분석결과가 양성이라면 식약처와 상의하여 보다 상세한 RCR의 분석과 더 광범위한 환자 추적조사가 이루어져야 한다. 그러나 개인 환자에 대한 모든 치료 후 분석 결과가 처음 일 년 동안 음성이라면 해당 환자에 대한 연 1 회 추적조사 검체의 수집을 중단할 수 있으며 일반적으로 해당 환자에 대해 연 1 회 병력검토로 충분할 수 있다.

해당 제품에 대한 환자 모니터링 데이터를 축적한 후 임상시험계획서의 안전성 모니

터링 섹션에 RCR 환자 검체에 대한 모든 능동적 검사를 중단하는 근거로 제공할 수 있다. 해당 근거 자료는 이전의 임상적 시험 경험의 결과 외에 RCR 생성 가능성을 줄일 수 있는 벡터 설계에 대한 안전성 특징의 고찰을 포함할 수 있다.

데이터가 환자 검체에 대한 능동적 검사의 중단을 충분하게 뒷받침하는 경우 장기추적 조사의 일부로서 환자 검체 대신에 연 1 회 병력검토를 수집할 것을 권장한다. 해당 병력은 암, 신경학적 질병 또는 혈액학적 질병 등 레트로바이러스가 유발할 수 있는 질병을 암시하는 임상 결과 판정을 목적으로 한다. 수집한 정보는 연 1 회 장기추적조사 이행·평가 결과 보고서에 포함하여 규제기관에 제출해야 한다.

관련된 임상 검체를 수집하고 레트로바이러스 관련 질병을 암시하는 부작용 발생 시 RCR 시험을 해야 한다. 유전자치료제 임상시험 시 환자가 의심되는 레트로바이러스 관련 질병으로 사망하거나 15 년 이내에 암이 발생한 경우 종양 조직 또는 적절한 조직의 검체에서 RCR 시험을 해야 한다. 검체 수집과 보관은 기대하는 시험 전략에 대해 상호보완적이어야 한다.

3.2. 권장하는 분석시험

환자에서 RCR을 검출하기 위해 현재 두 가지 시험방법을 권장한다: 1) RCR 특이적 항체의 혈청학적 검출, 2) 환자 말초혈액 단핵세포에서 RCR 특이적 DNA 서열에 대한 PCR 분석. 분석시험의 선택은 벡터, 벡터 투여 방식 및 임상 징후에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 벡터생산세포를 직접 투여하거나 벡터를 반복하여 직접 주입하는 경우, RCR의 존재 여부와 관련 없는 벡터 특이적인 항체가 발생할 수 있는 것으로 나타났다 (11, 12). 따라서 벡터 또는 벡터생산세포를 직접 투여하는 경우 혈청 모니터링보다 PCR 분석시험이 선호될 수 있다. 또한 환자가 항체 생산이 미미하거나 전혀 안 될 정도로 면역력이 훼손된 경우 PCR에 의한 환자 검체 모니터링이 선호될 수 있다. 어느 경우든 확인된 모든 양성 결과에 대해 감염성 바이러스를 분리하고 특성을 밝히기 위한 직접적인 세포 배양 분석이 수행되어야 한다.

4. RCR 시험 결과의 문서화

생산 로트와 환자 모니터링으로부터 얻은 RCR 시험 결과는 적절하게 문서화해야 한다. 환자 모니터링으로부터 얻은 양성 결과는 부작용 경험으로서 의약품 이상사례 보고 절차 등에 따라 신속히 보고해야 하며 음성 결과는 RCR 환자 검체에 대한 모든 능동적 검사를 중단하는 근거로서 장기추적조사 이행·평가 결과 보고서 등에 포함하여 제출해야 한다.

5. 허가 후 고려사항

레트로바이러스 벡터 기반 유전자치료제의 허가사항이 RCR과 관련된 즉각적 및 장기적 위험을 제시할 수 있도록 관련된 데이터와 정보를 통합할 것을 권장한다. 허가 후에도 벡터의 제조 및 출하 시 RCR 시험을 지속해야 한다.

품목허가 신청 시 해당 제품에 중대한 RCR 발생 위험이 있는지 결정하기 위한 충분한 제조 및 임상 안전성 데이터를 축적해야 한다. 레트로바이러스 관련 질병을 암시하는 이상 사례 발생 시 품목허가 신청서에 RCR 시험을 위해 환자로부터 해당 임상 검체를 수집하는 조항을 포함해야 한다. 환자가 레트로바이러스 관련 가능성이 있는 질병으로 사망하거나 제품 투여 후 15 년 이내에 암이 발생한 경우 암 조직 또는 적절한 조직 검체에서 RCR을 분석하기 위해 노력해야 한다.

이들 허가 후 고려사항은 「첨단바이오의약품의 장기추적조사 가이드라인」에 따라 투여 후 15 년까지 지속된 환자 장기추적조사도 포함해야 한다. 보다 상세한 정보는 「첨단바이오의약품의 장기추적조사 가이드라인」의 ‘5. 유전자치료제를 포함한 제품의 장기추적조사’를 참조한다.

6. 참고문헌

1. Donahue, RE, et al., Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer, J Exp Med, 1992; 176(4):1125-1135.
2. Fields Virology. In: BN Fields, DM Knipe, PM Howley, editors, 2013, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 1424-1473.
3. Khan, et al., Spumaretroviruses: Updated taxonomy and nomenclature, Virology, 2018; 516C:158-164.
4. Lander, MR and SK Chattopadhyay, A Mus dunni cell line that lacks sequences closely related to endogenous murine leukemia viruses and can be infected by ectropic, amphotropic, xenotropic, and mink cell focus-forming viruses, J Virol, 1984; 52(2):695-698.
5. Escarpe, P, et al., Development of a sensitive assay for detection of replication-competent recombinant lentivirus in large-scale HIV-based vector preparations, Mol Ther, 2003; 8(2):332-341.
6. Farley, DC, et al., Development of a replication-competent lentivirus assay for dendritic cell-targeting lentiviral vectors, Mol Ther Methods Clin Dev, 2015; 2:15017.
7. Bassin, RH, N Tuttle, and PJ Fischinger, Rapid cell culture assay technic for murine leukaemia viruses, Nature, 1971; 229(5286):564-566.
8. Rowe, WP, WE Pugh, and JW Hartley, Plaque assay techniques for murine leukemia viruses, Virology, 1970; 42(4):1136-1139.
9. Sastry, L, et al., Product-enhanced reverse transcriptase assay for replication-competent retrovirus and lentivirus detection, Hum Gene Ther, 2005; 16(10):1227-1236.
10. Sastry, L, et al., Certification assays for HIV-1-based vectors: frequent passage of gag sequences without evidence of replication-competent viruses, Mol Ther,

2003; 8(5):830-839.

11. Long, Z, et al., Biosafety monitoring of patients receiving intracerebral injections of murine retroviral vector producer cells, *Hum Gene Ther*, 1998; 9(8):1165-1172.
12. Martineau, D, et al., Evaluation of PCR and ELISA assays for screening clinical trial subjects for replication-competent retrovirus, *Hum Gene Ther*, 1997; 8(10):1231-1241.
13. Miller, AD, MF Law, and IM Verma, Generation of helper-free amphotropic retroviruses that transduce a dominant-acting, methotrexate-resistant dihydrofolate reductase gene, *Mol Cell Biol*, 1985; 5(3):431-437.

붙임 1. RCR 검출을 위한 시험 부피 권장량 계산

RCR이 특정 농도(c)로 생산 로트에 존재하고 분석시험이 검체 내에서 단일 레트로바이러스를 검출한다고 가정하면 특정 부피(V_t) 내에서 레트로바이러스를 검출할 확률(p)은 다음 식에 의해 계산된다: $p = 1 - \exp(-cV_t)$, V_t 내의 RCR의 수는 cV_t 를 변수로 한 포아송 분포를 따른다. 이를 V_t 에 따라 풀면 다음의 등식을 얻게 된다:

$$V_t = -(1/c)\ln(1-p)$$

여기서 \ln 은 자연로그를 나타낸다.

p 값

이 식에는 p 값은 0.95로 설정할 것을 권장한다. [붙임 3]에서 정의된 권장 반복시험 검체 수와 부피에 따라 p는 생산 로트에서 RCR 검출 가능성이 된다.

c 값

c 값을 1 RCR/투여당량(dose equivalent)보다 높지 않게 설정할 것을 권장한다. 생산 로트에서 RCR 농도가 1 RCR/투여당량 이상인 경우 검출 가능성은 최소 0.95 이상이다. 생산 로트가 1 RCR/투여당량 미만의 RCR을 함유하는 경우 RCR이 검출되지 않고 환자에게 투여될 수 있다. 투여당량은 한 번에 투여되는 최대량으로 설정할 것을 권장한다. 세포기반 유전자치료제에 대한 투여당량은 각 생산 로트에 대해 가장 많은 수의 표적 세포에 형질도입하기 위해 투입되는 벡터의 양이다.

V_t 값

p와 c의 권장되는 값을 이용하여 로트 크기와는 독립적으로 시험할 레트로바이러스 상층액의 총 부피는 다음과 같이 계산한다.

$$V_t = -(1/(1 \text{ RCR/투여당량}))\ln(1-0.95)$$

레트로바이러스 벡터 직접 투여 사례

해당 제품이 1×10^{10} TU (transducing unit)으로 투여되는 경우

$$V_t = -(1/(1/1 \times 10^{10} \text{ TU})) \ln(1-0.95) = 3 \times 10^{10} \text{ TU}$$

세포기반 유전자치료제 사례

1×10^7 TU/mL의 역가로 MOI(multiplicity of infection) 0.5에서 최대 1×10^8 세포를 형질도입하고자 하는 경우:

$$\text{투여당량} = (1 \times 10^8 \text{ cells})(0.5 \text{ TU/cell}) / (1 \times 10^7 \text{ TU/mL}) = 5 \text{ mL}$$

$$V_t = -(1/(1/5 \text{ mL}))(\ln(1-0.95)) = 15 \text{ mL}$$

더 작은 부피에 대한 제안은 식약처와 상담하여 개발하고 검토해야 한다.

붙임 2. 상대 민감도 결정

양쪽성(amphotropic) 외피를 가지는 VPC로부터 생산되는 RCR을 검출하기 위해 사용하는 분석시험의 민감도 결정과 밸리데이션을 위한 표준 감마레트로바이러스 스톡(ATCC # VR-1450)이 확립되었다. 해당 스톡을 RCR 시험의 상대 민감도를 결정하는 데 사용할 수 있다. 이 정보는 단일 레트로바이러스 검출이 가능한 레트로바이러스 상층액의 반복시험 검체량과 [붙임 3]에 제시된 적절한 총 부피(Vt)를 보증하기 위한 반복시험 검체 수를 결정하는 데 사용할 수 있다. 이 바이러스 스톡은 amphotropic murine leukemia virus (A-MLV) 4070A 균주의 외피 암호화 부위를 치환한 MoMLV를 암호화하는 분자 클론(molecular clone)으로 형질전환된 세포주로부터 유래한다(13). 그러므로 해당 바이러스 스톡은 MLV 외피에 대한 암호화 서열을 포함하는 레트로바이러스 패키징 세포주에서 생성될 수 있는 일반적인 재조합 바이러스를 대표한다.

이 표준 바이러스 스톡과 스톡의 감염 역가는 레트로바이러스 벡터의 RCR을 검출하는데 사용하는 분석시험의 상대 민감도를 결정하는데 양성대조군으로 사용할 수 있다. 특히 해당 스톡으로 연구자는 단일 RCR을 검출하기 위한 최대 검체량을 결정할 수 있다. 이러한 결정 과정은 RCR의 검출에 대한 레트로바이러스 벡터 입자들의 간섭 효과를 조절하기 위해 일반적인 생산 로트의 레트로바이러스 벡터 상층액의 존재 하에서 수행되어야 한다. 이런 표준품을 이용하여 RCR 검출 대체 시험법을 개발할 수 있다.

붙임 3. 반복시험 검체의 수와 부피를 결정하는 수식

[붙임 2]의 RCR 표준품을 이용하여 결정된 바와 같이 개별 RCR 분석시험으로 단일 RCR을 검출할 수 있는 검체량에 따라, 검체에서 RCR의 검출을 보장하기 위해 전체 시험 부피를 여러 반복시험 검체로 나누어야 할 수 있다. 반복시험 검체의 수(r)는 다음 식을 이용하여 결정할 수 있다.

$$r = V_t/V_s$$

여기서 V_s 는 한 개의 RCR을 일관되게 검출할 수 있는 부피이다. V_t 결정에 대해서는 [붙임 1]을 참조한다.

복제가능 레트로바이러스 평가 가이드라인[민원인 안내서]

발 행 일 2022월 9월

발 행 인 서경원

편집위원장 박인숙

편 집 위 원 오일웅 양성준 강진욱 최경숙 박정연

박송희 백정희 전설희 박지원 유혜선 이재린 한덕희 안난영

홍영기 류정임 유지수

발 행 처 식품의약품안전평가원 바이오생약심사부 세포유전자치료제과

식품의약품안전처 식품의약품안전평가원

세포유전자치료제과 전화: 043-719-3531~3549 팩스: 043-719-3530



【공직자 부조리 및 공익신고안내】 ** 신고자 및 신고내용은 보호됩니다.
▶ 부조리 신고 : 식약처 홈페이지 "국민신문고 > 공직자 부조리 신고" 코너
▶ 공익 신고 : 식약처 홈페이지 "국민소통 > 신고센터 > 부패.공익신고 상담" 코너