



의약품 국제 조화 회의 (INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF
TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE)

의약품 국제 조화 회의 가이드라인

인간 또는 동물 세포주 유래 생명공학의약품의 바이러스 안전성 평가
Q5A(R2)

초안
2022년 9월 29일 승인
현재 의견조회 단계

ICH 절차의 Step 2에서는 해당 ICH 전문가 실무단이 합의한 합의 초안 또는 가이드라인에 대해 국가 또는 지역 절차에 따라 내부 및 외부 협의를 거치기 위해 ICH 총회가 ICH 지역의 규제 당국으로 이 초안을 전달합니다.

Q5A(R2)
문서 연혁

Q5A

코드	연혁	일자
Q5A	ICH 운영위원회가 <i>Step 2</i> 문서를 승인하였으며 의견조회를 위해 공개.	1995년 12월 1일
Q5A	ICH 운영위원회가 <i>Step 4</i> 문서를 승인하였으며 ICH 세 규제당국에서 채택하도록 권고.	1997년 7월 5일

Q5A 개정

코드	연혁	일자
Q5A(R1)	ICH 운영위원회가 <i>Step 4</i> 이후 교정 편집을 승인.	1999년 9월 23일

Q5A(R1) 개정

코드	연혁	일자
Q5A(R2)	ICH 총회 회원국이 <i>Step 2</i> 문서를 승인하였으며 의견조회를 위해 공개.	2022년 9월 29일

법적 고지: 본 문서는 저작권의 보호를 받으며, 본 문서에 대한 ICH의 저작권이 항상 인정된다는 전제 하에, 공개 라이선스에 의거하여 ICH 로고를 제외한 본 문서의 사용, 복제, 다른 저작물에 통합, 개작, 수정, 번역 또는 배포를 허용합니다. 문서를 개작, 수정 또는 번역할 경우, 원본 문서를 변경하였거나 원본 문서를 기반으로 하였음을 명확하게 표시, 구분 또는 식별할 수 있는 합리적인 조치를 취해야 합니다. ICH가 원본 문서의 개작, 수정 또는 번역을 승인하였거나 후원한다는 인상을 주지 않아야 합니다.

이 문서는 어떠한 사항도 보증하지 않고 "있는 그대로" 제공됩니다. ICH 또는 원본 문서의 저자는 어떠한 경우에도 문서 사용으로 인해 발생하는 모든 청구, 손해 또는 기타 책임에 대해 책임이 없습니다.

위에서 언급한 권한은 제3자가 제공하는 콘텐츠에는 적용되지 않습니다. 따라서 제3자에게 저작권이 있는 문서의 경우 해당 저작권자로부터 문서 복제 허가를 받아야 합니다.

의약품 국제 조화회의 가이드라인

인간 또는 동물 세포주 유래 생명공학의약품의 바이러스 안전성 평가

Q5A(R2)

ICH 합의 가이드라인

목 차

1. 서론	4
2. 바이러스 오염원	7
2.1. 마스터 세포 은행(MCB)에서 발생할 수 있는 바이러스	7
2.2. 생산 중 유입될 수 있는 외래성 바이러스	7
3. 세포주 적격성 평가: 바이러스 시험	9
3.1. 마스터 세포 은행(MCB), 제조용 세포 은행(WCB), 생산용 체외 세포 한계 연령 세포를 위해 제안되 는 바이러스 시험	9
3.1.1. 마스터 세포 은행(MCB)	9
3.1.2. 제조용 세포 은행(WCB)	9
3.1.3. 생산용 체외 세포 한계 연령 세포	9
3.2. 권장 바이러스 검출 및 확인 분석	10
3.2.1. 레트로바이러스 시험	11
3.2.2. 체외 세포 배양 감염성 분석	12
3.2.3. 체내 분석	12
3.2.4. 항체 생산 시험	13
3.2.5. 분자적 방법	13
3.3. 세포주 유효성(Acceptability)	15
4. 미가공 벌크용 바이러스 시험	16
5. 정제 벌크 바이러스 시험 및 바이러스 클리어런스 시험을 위한 근거와 행동 계획	18
6. 바이러스 클리어런스 공정의 평가와 특성 분석	21
6.1. 바이러스 클리어런스의 평가 및 특성 분석을 위한 바이러스 선택	22
6.1.1. "관련" 바이러스와 "모델" 바이러스	22

6.1.2.	기타 고려사항.....	23
6.2.	바이러스 클리어런스 평가 및 특성 분석 시험의 설계 및 함의	24
6.2.1.	시설 및 근무자.....	24
6.2.2.	규모 축소 생산 시스템.....	24
6.2.3.	단계별 바이러스 제거 분석.....	24
6.2.4.	물리적 제거와 불활화 결정.....	25
6.2.5.	불활화 평가	25
6.2.6.	칼럼의 기능과 재생.....	26
6.2.7.	특이 주의사항.....	26
6.3.	바이러스 클리어런스 시험의 해석.....	27
6.4.	바이러스 클리어런스 시험의 한계.....	29
6.5.	통계	30
6.6.	바이러스 클리어런스 평가를 위한 사전 지식 적용	30
6.7.	바이러스 클리어런스의 재평가.....	32
7.	연속 생산 공정에서 고려할 사항.....	33
7.1.	CM 공정의 바이러스 안전성	33
7.2.	CM의 바이러스 클리어런스에 대해 일반적으로 고려할 사항.....	33
7.2.1.	세포 배양 생산 기간 연장과 관련된 잠재적 위해성.....	34
7.2.2.	바이러스 클리어런스 시험 접근법.....	34
8.	요약	36
9.	용어 정의	37
부록 1:	특성 분석된 세포 은행을 체내에서 증식시켜 유래한 제품.....	46
부록 2:	바이러스 클리어런스 시험을 위한 바이러스 선택.....	47
부록 3:	바이러스 및 바이러스 감소율 분석 평가를 위한 통계적 고려 사항.....	49
부록 4:	바이러스 클리어런스 결정을 위한 시험에서 감소율 계산.....	51
부록 5:	용량별 입자 추정치 계산	52
부록 6:	내부 경험 포함 제품별 밸리데이션 노력을 줄이기 위한 사전 지식의 예.....	53
부록 7:	유전자 조작 바이러스 벡터 및 바이러스 벡터 유래 제품.....	60

1. 서론

본 가이드라인은 생명공학의약품의 바이러스 안전성 시험 및 평가를 다룬다. 본 가이드라인에서는 허가 신청/등록을 위해 제출해야 하는 데이터를 기술한다. 생명공학의약품에는 특성이 규명된 인간 또는 동물 기원(예: 포유류, 조류, 곤충)의 세포 은행에서 시작한 세포 배양에서 유래한 바이오의약품 및 특정 생물학적 제품이 포함된다. 이 문서에서 "바이러스"라는 용어에서 포유동물의 프리온(예: 우해면양뇌증(BSE), 스크래피(Scrapie))과 같은 비전통적 전염원을 제외한다. 허가 신청자는 우해면양뇌증과 관련된 내용을 규제 당국과 논의할 것이 권고된다.

이 문서는 인터페론, 단일클론 항체 및 재조합 아단위 백신과 같은 DNA 재조합 기술을 통해 체외 세포 배양으로 생산된 제품을 대상으로 한다. 또한 체내 복수 증식 하이브리도마 세포 유래 제품도 포함된다. 이러한 제품은 특이 주의사항을 고려해야 하며, 부록 1에는 체내 증식 세포 시험에 대한 추가 정보를 제공한다. 제품에 부정적인 영향 없이 바이러스 클리어런스 과정을 거칠 수 있는 특정 유전자 조작 바이러스 벡터 및 바이러스 벡터 유래 제품도 이 문서에서 다룬다. 이런 제품에는 일시적 형질주입을 사용하거나 안정적인 세포주에서 생산되었거나, 재조합 바이러스를 감염시켜 생산된 바이러스 벡터가 포함될 수 있다. 또한 바이러스 벡터 유래 재조합 단백질(예: 배쿨로바이러스(baculovirus) 발현 바이러스 유사 입자(VLP)), 단백질 아단위 및 나노입자 기반 백신 및 치료제도 포함된다. 또한 그 범위에는 생산을 위해 배쿨로바이러스, 단순 헤르페스 바이러스 또는 아데노바이러스와 같은 보조바이러스에 의존하는 아데노 관련 바이러스(AAV) (아데노 부속 바이러스) 유전자 치료 벡터가 포함된다. 유전자 조작 바이러스 벡터 및 바이러스 벡터 유래 제품에 대한 구체적인 지침은 부록 7에서 제공한다. 자가 복제 인자를 포함한 불활화 바이러스 백신 및 약독화 바이러스 생백신은 이 가이드라인의 범위에서 제외된다.

바이러스 오염의 위험성은 모든 세포주 유래 생명공학제품에 공통적인 특징이다. 이런 오염은 심각한 임상적 결과를 불러오거나 세포주 자체(세포 기질)의 오염 또는 생산 중 유입된 외래성 바이러스에 의해 발생할 수 있다. 그러나 현재까지 세포주 유래 생명공학 제품이 바이러스 전파에 관련되었던 적은 없다. 하지만 이러한 제품의 바이러스 오염 관련 안전성은 포괄적인 바이러스 시험 프로그램을 적용하고 아래에 기술한 대로 생산 공정 중의 바이러스 제거와 비활성화 평가를 통해서만 적절히 보장될 수 있다. 생명공학 제품의 잠재적인 바이러스

오염을 통제하기 위해 세 가지 주요 보완 접근 원칙이 진화되어 왔다.

- 감염을 유발하는 바람직하지 않은 바이러스가 없는 배지 성분을 포함한 세포주 및 기타 원료 물질 선정 및 시험
- 생산 공정 중 감염성 바이러스 제거 능력 능력 평가
- 감염성 바이러스 오염 부재를 확인하기 위한 적절한 생산 단계의 제품 시험.

유전자 조작 바이러스 벡터 및 바이러스 벡터 유래 제품 생산 과정에 사용되는 일부 바이러스 클리어런스 단계는 재조합 단백질에 사용될 때만큼 효과가 없을 수 있다. 이런 경우 위해성을 더욱 감소하기 위해 여러 가지를 고려할 수 있다(예: 원료 물질 처리, 광범위한 바이러스 검출을 위한 광범위한 시험)(부록 7 참조).

낮은 바이러스 농도를 검출하는 정량적 바이러스 분석력은 통계적 이유에서 검체 크기에 따라 좌우된다. 그러므로 제품에 감염성 바이러스 오염 물질이 없다는 것을 확신하기 위해서는 오염 물질의 존재를 확인하기 위한 직접적인 시험뿐만 아니라 정제 기법이 바이러스를 제거하거나 비활성화하는 능력이 있다는 것을 밸리데이션하는 것을 통해 확보된다.

여러 생산 단계에서 요구되는 바이러스 검사 및 바이러스 클리어런스 시험의 유형과 강도는 다양한 요인의 영향을 받으며, 각각의 경우 별로 단계적으로 검토해야 한다. 고려해야 할 요소로는 세포 은행 특성 분석 및 적격성 평가 정도, 검출된 바이러스의 특성, 배양배지의 구성 성분, 배양 방법, 시설 및 설비 설계, 세포 배양 후 바이러스 시험 결과, 공정의 바이러스 클리어런스 능력, 임상시험 사용 제품 및 제품 사용 목적이 있다. 이 문서의 목적은 바이러스 시험, 바이러스 클리어런스 평가를 위한 바이러스 실험의 일반적인 프레임워크 제공과 바이러스 시험과 바이러스 클리어런스 시험 설계를 위한 접근법 권고이다.

제조업체는 본 가이드라인에 제시된 권고 사항을 해당 제품 및 생산 공정에 맞게 조정해 적용해야 한다. 바이러스 안전성을 보장하기 위해 제조업체가 사용하는 접근 방식을 설명하고 그 타당성을 제시해야 한다. 제공된 상세 데이터 외에도, 바이러스 안전성 평가를 전체적으로 요약한 정보는 규제 검토자에게 도움이 될 수 있다. 이 요약서에는 바이러스 오염을 방지하기 위한 바이러스 안전성 연구 및 전략의 모든 측면이 간략히 포함되어야 한다. (제공된 데이터 이외에도, 바이러스 안전성 평가 결과의 요약 정보는 규제 당국의 심사를 원활하게 하는데

도움이 될 수 있다. 이 문서와 관련하여 바이러스 오염 방지를 위한 바이러스 안전성 시험과 전략의 모든 측면이 요약 정보에 간단하게 기술되어야 한다.)

2. 바이러스 오염원

세포주 자체에서나 재조합 생산 세포주 및/또는 세포주은행 생산을 포함하여 생산 공정에 외래성 바이러스가 유입되어 생명공학 제품이 바이러스에 오염될 수 있다. MVS(마스터 바이러스 시드, Master Virus Seed) 또는 WVS(제조용 바이러스 시드, Working Virus Seed)에서 잠재적인 외래 바이러스의 유입은 부록 7에서 설명한다. 특성 분석이 잘 된 세포은행과 MVS 또는 WVS를 사용하여 바이러스 오염 위험성을 줄일 수 있다. 또한 재조합 단백질, VLP 또는 유전자 치료용 바이러스 벡터 제품 생산에 사용되는 보조바이러스도 공정 관련 바이러스 오염물질로 간주된다(부록 7 참조).

2.1. 마스터 세포 은행(MCB)에서 발생할 수 있는 바이러스

세포 안에는 잠복성 또는 영속성 바이러스(예: 헤르페스 바이러스)와 내인성 레트로바이러스가 있을 수 있으며, 이런 바이러스는 세포 세대에 걸쳐 수직으로 전파될 수 있다. 이런 바이러스는 구조적으로 발현되거나 예기치 않게 감염성 바이러스로 발현되기도 한다.

바이러스는 다양한 경로로 MCB에 유입될 수 있다. 1) 감염 동물의 세포주 유래, 2) 세포주 확립에 바이러스 사용 3) 오염된 생물학적 시약(예: 선별용 항체) 또는 세포 배양 원료 물질(예: 동물이나 인간 혈청 및 돼지 트립신) 사용, 4) 세포 취급 및 과정 및 세포은행 처리 과정 중 오염.

2.2. 생산 중 유입될 수 있는 외래성 바이러스

외래성 바이러스가 다음과 같은 (그러나 이에만 국한되지 않는) 다양한 경로로 제품에 유입될 수 있다. 1) 세포 배양 과정에 동물 혈청 성분과 같은 오염된 생물학적 원료나 시약 사용, 2) 원하는 단백질을 인코딩하는 특정 유전자의 발현을 유도하기 위해 바이러스나 바이러스 벡터(그 생산에 사용되는 보조바이러스 포함) 사용(부록 7 참조), 3) 제품 선택 또는 정제용으로 사용한 단일클론 항체 결합 친화성 수지 등의 다운스트림 정제 중에 오염된 원료 물질 또는 오염된 시약 사용, 4) 제형 중 오염된 첨가물 사용, 5) 비 생물학적 원료 물질 보관 과정이나 세포 배양 및 배지 취급 과정을 포함해 환경으로부터의 오염.

세포 배양 매개변수를 모니터링하여 잠재적 외래성 바이러스 오염 조기 검출에 도움이 될 수 있다. 제조업체는 가능하면 제조 공정에 인간 및 동물 유래 원료 물질(예: 인간 혈청, 소 혈청, 돼지 트립신) 사용을 피해야 한다. 동물 유래 원료 물질 사용이 불가피한 경우, 그 사용 위해성에 합당한 관련 문서나 원료 물질의 적격성 평가를 통해 사용 근거를 뒷받침해야 한다. 원산지 국가, 기원 조직, 원료 물질 제조 공정에 적용되는 바이러스 불활화 또는 바이러스 제거 단계, 원료물질에서 수행된 바이러스 시험 유형 등의 정보를 제공해야 한다.

가능한 경우, 세포 배양 배지 또는 배지에 감마선 조사, 바이러스 여과, 고온 단시간 처리 또는 UV-C 조사와 같은 처리를 추가적인 바이러스 위해성 경감 수단으로 사용할 수 있다.

3. 세포주 적격성 평가: 바이러스 시험

생명공학 제품 생산에 사용되는 세포주의 적격성 평가에서 중요한 부분은 바이러스 존재 여부를 확인하기 위한 적절한 시험이다.

3.1. 마스터 세포 은행(MCB), 제조용 세포 은행(WCB), 생산용 체외 세포 한계 연령 세포를 위해 제안되는 바이러스 시험

표 1은 MCB, WCB 및 생산용 체외 세포 연령 한계 세포(LIVCA)를 포함한 여러 세포 단계에서 한 번만 실시하는 바이러스 시험의 예를 보여준다.

3.1.1. 마스터 세포 은행(MCB)

내인성 및 외래성 바이러스 오염 모두에 대한 광범위한 스크리닝은 MCB에서 시행되어야 한다. 하나 이상의 파트너가 기원이 인간이거나 비사람 영장류인 헤테로하이브리드 세포주에서 발생하는 바이러스 오염이 특정 위험을 초래할 수 있으므로, 사람이나 비사람 영장류 유래 바이러스 검출 시험을 실시해야 한다.

외래성 바이러스 시험으로는 표 1에 설명한 것과 같은 광범위한 바이러스 검출 시험과 특정 바이러스 검출 시험이 있다. 광범위한 외래성 바이러스를 검출하는 새로운 방법론 도입을 권고한다. 오염원 바이러스를 확실하게 검출하기 위해 시험방법은 세포주의 기원과 이력, 세포주 생성 및 MCB 확장 과정에 인간이나 동물 기원 물질에 노출될 잠재적 가능성을 기반으로 한 것이어야 한다.

3.1.2. 제조용 세포 은행(WCB)

표 1에 설명된 대로 각 WCB는 외래성 바이러스 시험을 실시해야 한다. 적절한 외래성 바이러스 시험을 MCB에서 실시하였고, 체외 세포 연령 한계 시점까지 또는 그 이상까지 배양한 세포가 이 WCB에서 유래하였고 외래성 바이러스 확인 여부 시험에 사용되었다면 초기 WCB에서는 유사한 시험을 생략할 수 있다. 일반적으로 WCB에 항체 생산 시험이 꼭 필요한 것은 아니다. MCB가 아닌 각각의 WCB에서 전체 시험을 실시하는 대체 접근 방식도 허용된다.

3.1.3. 생산용 체외 세포 한계 연령 세포

생산용으로 체외 세포의 연령 한계 시점은 시험 생산 규모 또는 실제 생산 조건에서 신청 체외

세포 연령 또는 그 이상까지 확장된 생산 세포의 데이터에 근거해 정해야 한다. 일반적으로 생산 세포는 WCB를 확장하여 확보한다. MCB를 사용하여 생산 세포를 만들 수도 있다. 체외 세포 연령 한계 시점의 세포는 MCB에서 검출되지 않은 내인성 바이러스에 대해 추가 검사를 한 번 더 실시해야 한다. 체외 세포 연령 한계 시점에 도달한 세포를 생산 종료 세포라고도 한다. 생산용 체외 세포 연령 한계 시점의 세포에 최소 한 번 적합한 시험(표 1 참조)을 실시하는 것으로 생산 공정이 내인성 바이러스의 활성화나 성장이 느린 바이러스를 포함한 외인성 바이러스의 증폭에 취약하지 않다는 사실을 추가로 보장할 수 있다. 이 단계에서 외래성 바이러스가 검출되면 오염의 원인을 파악하기 위해 공정을 면밀히 점검해야 한다.

3.2. 권장 바이러스 검출 및 확인 분석

내인성 및 외래성 바이러스에 다양한 분석 방법이 있다. 표 2는 이런 분석 방법의 예를 정리한 것이다. 표의 분석 방법은 현재 권장되는 방법이지만, 이 목록에 모든 방법이 포함되거나 이 방법이 확정적인 것은 아니다. 과학적 진보에 따라 가장 적절한 기법은 바뀔 수 있으며, 대체 기술을 제안할 때는 적절한 근거 데이터가 뒷받침해야 한다. 제조업체는 관계 당국과 이런 대안에 대해 협의하도록 권장된다. 포괄적인 시험 전략으로 세포주의 기원과 계대 이력 및 세포주 생성, 세포 은행 준비, 생산용 원료 및 시약용 원료 물질과 시약을 고려해야 한다. 이 전략을 통해 사용된 세포 기질, 원료 물질 및 시약의 위해성 평가를 토대로 적절한 추가 분석이 이루어져야 한다. 예를 들어, 특정 바이러스가 존재할 가능성이 상대적으로 높다면 달리 타당한 사유가 있는 것이 아닌 한 해당 바이러스를 검출하는 특정 시험이나 기타 접근 방식이 전략에 포함되어야 한다. 분석 감도와 특이성이 적절하다는 것을 입증할 수 있는 적절한 대조군이 포함되어야 한다.

차세대 염기서열 분석법(NGS)과 중합효소연쇄반응(PCR)과 같은 핵산증폭기법(NAT)은 각각 광범위한 바이러스와 특이적인 바이러스 검출에 적절할 수 있다. 현재 권장되는 체외 및 체내 분석과의 체계적인 일대일 비교 없이 이런 시험을 도입할 수 있다. 체내 분석의 경우 특히 동물 사용을 대체, 철폐 및 개선하려는 글로벌 목표 의식을 충족하기 위해서 일대일 비교는 권장되지 않는다. 분석 감도와 바이러스 검출의 폭 때문에 NGS는 세포 기반 감염성 분석법을 대체하거나 잠재적인 분석 한계를 극복하거나, 분석시스템에서 가시적 표현형이 없는 바이러스를 검출하기 위해 세포 기반 감염성 분석법을 대체할 수 있다. 시험 결과가 양성일 경우, 검출된 핵산과 감염성 바이러스의 관련성을 확인해야 한다.

아래는 제조업체가 제품 및 제조 공정에 특이적(이거나 적절한) 포괄적인 바이러스 시험 체계를 개발할 때 사용해야 하는 일반적인 프레임워크에 대한 간략한 설명이다. 시험 계획이나 전략에는 접근 방식이 타당함을 적절히 입증해야 한다.

3.2.1. 레트로바이러스 시험

MCB 및 생산용 체외 세포 연령 한계 시점까지 또는 그 이상까지 배양된 세포에서 레트로바이러스 시험을 실시해야 한다. 이런 시험으로는 직접 접종 또는 동시 배양 감염성 분석, 역전사효소(RT) 활성 분석, 투과전자현미경(TEM) 입자 평가가 있다.

세포주에서 레트로바이러스 입자 생산 여부가 알려지지 않았다면, 세포에서 TEM을 실시하고 정제 상청액으로 PCR 기반 RT 분석(예: 제품 강화 RT 분석)을 실시해야 한다. PCR 기반 RT 분석으로 모든 레트로바이러스의 RT 활성을 검출할 수 있는 점은 특히 유용하지만, RT 활성은 감염성 레트로바이러스나 비감염성 레트로바이러스 어느 쪽과도 연관이 있을 수 있다. 세포의 DNA 중합효소 중에는 교차 반응을 하는 것도 있어 이로 인해 RT 결과가 양성으로 나올 수도 있으므로, RT 활성이 확인되거나(레트로바이러스 오염이 원인) 또는 TEM 결과가 양성으로 확인된 후에는 인간 세포주를 포함해 허용 가능한 세포에서 감염성 레트로바이러스 검출 여부를 분석하고 레트로바이러스 검출 민감도 판독 검사를 실시해야 한다.

세포주가 레트로바이러스 입자를 구조적으로 생산하는 세포주(설치류, 곤충 및 조류 중에서 유래된 일부 세포주)로 알려져 있다면, RT 활성이 예상되므로 PCR 기반 RT 분석은 필요 없을 수도 있다. 존재하는 레트로바이러스 입자의 유형(예: A형, C형)을 조사하기 위해 TEM을 실시해야 한다. 내인성 레트로바이러스 입자가 감염성이 있는지 확인하려면 관련 허용 세포(예를 들어, 설치류 레트로바이러스라면 *Mus dunni* 및 SC-1 세포)에서 레트로바이러스 검출 감도가 높은 판독 분석(예: 제품 강화 역전사효소(RT) 분석, 육종 양성, 백혈병 음성(S+L-) 분석 또는 XC 플라크 분석이나 광역 분자 분석)으로 감염성을 분석해야 한다.

입수할 수 있는 모든 데이터를 고려하여 레트로바이러스 시험 결과를 해석해야 한다. 3.3항 및 5위해성항에서 설명한 위해성 평가를 토대로, 내인성 레트로바이러스 입자를 발현하는

세포주를 제조용 세포주에서 제외하지 않는다.

유도 시험이 내인성 레트로바이러스(예: Chinese Hamster Ovary(CHO), NS0, Sp2/0)에 대한 특성분석이 잘 이루어진 세포주에 유용한 지는 밝혀지지 않았다. 그러나 이런 연구는 새로운 세포 기질에 알려지지 않은 내인성 레트로바이러스가 존재하는 지 여부를 평가하는 데는 도움이 될 수 있다. 또한 위해성 평가를 기반으로 한 잠복 DNA 바이러스(예: 사람 세포 내 헤르페스 바이러스) 및 잠복 RNA 바이러스(예: 곤충 세포의 노다바이러스)에 대한 유도 시험도 적절할 수 있다. 이런 시험은 새로운 세포 기질 유래 제품에 대한 바이러스 시험과 바이러스 클리어런스 전략을 알리는 데 도움이 될 수 있다.

3.2.2. 체외 세포 배양 감염성 분석

다양한 사람 및 관련 동물 바이러스를 검출할 수 있는 다양한 감수성 지표 세포 배양에 시험 물질(표 2 참조)을 접종하여 체외 시험을 실시한다. 시험에 사용할 세포는 시험할 세포 기질이 기원한 종을 감안하여 위해성 평가를 기반으로 선정해야 한다. 기원한 종의 세포주와 사람 바이러스에 민감한 사람 및 비사람 영장류 세포주를 세포주 패널에 포함시켜야 한다.

감염성 분석과 시험할 검체의 특성은 세포의 기원이나 그 취급을 기준으로 존재 가능성이 있는 바이러스 유형에 따라 결정한다. 처음 14일간 세포를 배양한 후 다시 14일 간 2차 계대 배양을 하면서 세포병원성 바이러스와 혈액흡착/혈구응집 바이러스를 모두 관찰하는 방식으로 세포주 적격성 평가 시험을 해야 한다.

아니면, 예를 들어 시험 물질 매개 간접 또는 독성 등의 특정한 한계를 해결해야 하는 경우라면 분자 바이러스 검출법으로 세포 배양 분석을 보완하거나 대체할 수 있다.

3.2.3. 체내 분석

검출하는 바이러스 범위 면에서나 동물 실험 사용을 대체, 철폐, 개선하려는 글로벌 목표를 촉진하다는 면에서 체내 분석을 대체하는 수단으로 NGS 사용이 권장된다. 체내 분석을 대체하여 NGS를 사용할 경우 타당성에 대한 근거로 밸리데이션 서류를 제출할 수 있다. 위해성 평가 및 전반적인 시험 전략을 기준으로 젓먹이 마우스, 성체 마우스 및 자충포장란에 시험 물질(표 2 참조)을 접종하는 방법을 체내 분석에 포함할 수 있다. 시험할 세포주의 특성과 기원에 따라 동물 종을 추가로 사용할 수 있다. 동물의 건강 상태를 모니터링하고

이상이 있으면 조사를 통해 원인을 규명해야 한다.

3.2.4. 항체 생산 시험

해당 동물 종이 바이러스에 노출될 가능성이 있는 경우에는 항체 생산 시험을 실시해야 한다. 예를 들어, 설치류 기원 세포주나 설치류에서 계대배양한 세포와 설치류 물질(표 2 참조)에서 유래했을 수도 있는 시약에 설치류 바이러스가 존재하는 지 여부는 마우스, 랫트, 햄스터와 같은 SPF(특이적 병원체 무함유) 동물에 시험 물질을 접종하고 특이적 인자에 대한 항체 시험을 할 수 있다. 이런 시험으로는 마우스 항체 생산(MAP) 시험, 랫트 항체 생산(RAP) 시험, 햄스터 항체 생산(HAP) 시험이 있다. 항체 생산 분석에서 현재 스크리닝되는 바이러스는 표 3에 나와 있다.

바이러스 특이적 PCR이나 표적 분자 방법은 표 3에 나온 동물 실험을 대체하는 분석법으로 사용할 수 있다.

3.2.5. 분자생물학적 방법

분자생물학적 방법은 체외 세포 배양 기반 분석 및 체내 동물 분석을 보완하거나 이를 대체하여 사용할 수 있다.

핵산증폭기법(NAT)

알려진 바이러스 또는 밀접한 관련이 있는 것으로 알려진 바이러스군의 염기서열을 검출하기 위해 PCR 기반 방법과 같은 핵산 증폭 기법(NAT)을 단독으로 또는 멀티플렉스 방식으로 사용한다. 알려진 바이러스를 고감도로 검출하는 데도 표적 NGS 방법을 사용할 수 있다. 분석 상의 간섭으로 결과에 한계가 있을 때 이런 분자생물학적 방법이 세포 배양 분석을 보완할 수 있으며, 감염성 분석 검출용 세포 배양에서 이런 바이러스가 쉽게 증식할 수 없는 경우 이런 바이러스를 검출하기에 효과적인 도구이다. 또한 NAT 방법은 보다 광범위한 바이러스를 검출하기 위해 조정할 수 있지만(예: 축퇴 PCR(degenerate PCR)) 특이성은 감소할 수 있다. 분석적 특이성 때문에, 보다 일반적인 생물학적 단일 분석법으로 검출되는 범위의 바이러스를 검출하려면 다중 바이러스에 특이성이 있는 PCR 분석법이 필요할 수 있다. NAT 분석이 사용 목적에 맞는 지 적절한 적격성 검사나 밸리데이션을 받아야 한다.

차세대 염기서열 분석법

광범위한 바이러스 검출력이 입증된 NGS(고처리량 시퀀싱, high-throughput sequencing)와

같은 새로운 고급 분자적 방법을 사용할 수 있다. NGS는 민감도와 바이러스 검출 범위가 규명되어 있어 동물 사용 및 시험 시간을 줄일 수 있다. NGS 방법을 사용할 경우, 용도를 뒷받침하는 밸리데이션 서류를 제공해야 한다. 밸리데이션 자료는 방법 밸리데이션 및 분석 또는 매트릭스 특이적 적격성 평가 중 적절한 것을 포함한다. 잠재적인 안전 문제를 기준으로 특정 바이러스를 대상으로 생물정보학적 분석을 하거나 광범위한 바이러스를 검출하기 위해 불가지론(agnostic) 방식으로 분석을 할 수 있다. 알 수 없거나 예상치 못한 바이러스 종을 광범위하게 검출하기 위해 NGS가 체내 시험을 대체할 수 있다. 또한 알려진 바이러스 및 알려지지 않았거나 예상하지 못한 바이러스 종을 검출하기 위해 NGS로 체외 세포 배양 분석을 보완하거나 대체할 수 있다. 이 분석은 알려진 바이러스를 검출하는 데도 사용할 수 있으며 HAP, MAP 및 RAP 시험 및 기타 바이러스 특이성 PCR 분석을 대체할 수 있다.

벡터 바이러스가 효과적으로 중화하지 못하거나(부록 7 참조) 제품이나 배지 성분 상 독성으로 인해 분석에 간섭이 발생한 바이러스 시드나 수득물이 있다면 특히 세포 기질 및 세포 은행의 특성 분석 또는 시험, 알려지거나 알려지지 않은 바이러스 검출 시 NGS 사용을 고려해야 한다. 이런 응용 분야에서는 NGS로 세포 DNA에 존재하는 바이러스 서열(유전체, genomics)이나 세포에서 RNA로 발현되는 바이러스 서열(전사체, transcriptomics)을 검출하거나 입자에 존재하는 바이러스 유전체(바이러스체, viromics)를 검출할 수 있다. 이런 다양한 전략을 선택한 근거를 제공해야 한다.

알려진 바이러스의 고감도 검출 및/또는 새로운 바이러스의 광범위한 검출에 NGS를 사용하려면 허가 신청자는 NGS 작업 흐름에서 몇 가지 중요한 단계에 유의해야 한다. 그 단계는 다음과 같다. 1) 검체 처리(실시할 때) 및 검체 물질 유형별 처리, 2) 효율적인 바이러스 핵산 추출(외피 및 외피 외 입자 포함) 및 라이브러리 준비, 3) 적합한 서열분석 플랫폼 선택, 4) 이중 바이러스계에 속하는 다양한 바이러스 서열이 등록된 데이터베이스에서 포괄적인 생물 정보학 분석 수행. 바이러스 검출을 극대화하기 위해 검체를 처리하고 가공할 수 있다.

분석 적격성 평가 및 밸리데이션에 적합한 표준이나 참고 자료를 사용해 방법론에 포함된 여러 단계의 성능을 평가하고 바이러스 검출의 민감도, 특이성 및 검출 범위를 입증해야 한다. 그 과정에 전체 NGS 작업 흐름 또는 특정 단계의 성능을 평가하기에 물리적(크기, 외피 및 비외피), 화학적(저, 중, 고저항성) 및 유전체(DNA, RNA, 이중 가닥 및 단일 가닥, 선형,

원형)적 특성이 뚜렷하면서 현재 사용 가능한 참조 바이러스 시약을 사용하고, 여러 바이러스 서열과 함께 포괄적인 바이러스 데이터베이스를 사용해 광범위한 바이러스를 검출해야 한다. 또한 특정 기술 및 생물 정보 단계 평가에 다른 표준 유형을 사용할 수 있다. NGS는 작업 흐름이 복잡하므로 제조업체는 방법 밸리데이션 및 데이터 제출 기대치가 어느 정도인지 해당 규제 당국과 논의하도록 한다.

3.3. 세포주 유효성(Acceptability)

일부 제품 생산용 세포주는 감염성 바이러스로 재활성화될 수 있는 내인성 레트로바이러스, 기타 바이러스 또는 바이러스 서열을 포함한다. 이런 제조 환경에 권장되는 실행 계획은 5항에 나와있다. 내인성 레트로바이러스 이외의 바이러스가 존재하는 세포주 유효성은 제품의 유익성과 의도하는 임상 용도, 오염 바이러스의 특성, 사람 감염성 또는 사람에서의 질병 유발 가능성, 제품 정제 공정(예: 바이러스 클리어런스 평가 데이터), 정제 벌크 바이러스 시험 정도를 근거로 한 위해성/유익성 평가 결과를 고려해 해당 규제 당국 별로 검토해야 한다.

4. 미가공 벌크용 바이러스 시험

제조업체는 생산 배치의 외래성 바이러스 여부를 지속적으로 평가하는 프로그램을 개발하도록 권장된다. 미가공 벌크용 바이러스 시험의 범위와 정도는 원하는 제품 생산용 세포주의 특성, 세포주의 적격성 평가를 위해 시행한 바이러스 시험 결과와 정도, 배양 기간, 배양 방법, 원료 물질 및 시약 공급원, 바이러스 클리어런스 평가 결과 등 여러 사항을 고려해 결정해야 한다.

미가공 벌크는 하나 또는 그 이상의 세포 수득물과 배양 배지를 혼합한 풀로 구성된다. 추가 가공 전에 생산 반응기에서 채취한 미가공 벌크 대표 검체는 외래성 바이러스 오염 가능성을 높은 검출 확률로 파악할 수 있는 가장 적합한 대표적 단계 중 하나이다. 미가공 벌크를 대상으로 적절한 바이러스 시험을 실시해야 한다. 관류 또는 연속 생산 공정은 중공 섬유나 이와 유사한 미세 여과 시스템을 사용하므로 세포에 쉽게 접근할 수 없다. 이런 경우 미가공 벌크는 생물 반응기에서 채취한 유체로 구성된다. 세포 분리 기술과 점진적 필터 오염이 이런 미가공 벌크 시험 검체의 대표성에 미칠 잠재적 영향을 고려해야 한다. 미가공 벌크가 시험 세포 배양에 독성이 있다면 초기 부분 처리(예: 최소 검체 희석 또는 대체 시험 분석)를 고려할 수 있다(3.2항 참조). 일부 추가 가공 전 생산 반응기에서 확보한 완전한 세포와 파쇄 세포 및 세포 배양 상청액으로 구성된 혼합물을 시험하는 것이 더 적절한 경우도 있다. 공정에 연속 수득이 포함되어 있다면, 세포 배양 기간에 따라 외래성 바이러스와 내인성 바이러스 입자가 변할 수 있으므로 검체 채취 전략(검체 채취 주기 및 구성 포함)에 대한 타당성이 있어야 한다(7항 참조).

각 미가공 벌크마다 일상적 절차로 외래성 바이러스 시험을 실시해야 한다. 여기에는 세포주를 여러 가지 사용하거나 NGS와 같은 광범위한 분자 바이러스 검출 방법을 사용하는 체외 스크리닝 분석이 포함될 수 있다(3.2항 참조). 세포 기질, 동물 유래 원료 물질 또는 시약의 사용, 공정의 바이러스 클리어런스 수준을 고려한 위해성 평가 결과를 기준으로 최소 2주 동안 지표 세포 배양 관찰을 수행해야 한다. 특정 바이러스 또는 바이러스 계통 검출도 위해성 평가에 포함시키는 것이 적절할 수 있다(예를 들어, 쥐의 미세바이러스). 신속한 시험 방법을 사용하면 실시간 의사 결정이 용이하므로 적절하다면 PCR이나 기타 분자 방법을 선택할 수도 있다.

미가공 벌크에서 외래성 바이러스가 검출되었을 때 타당한 사유가 있는 경우가 아니고는 제품 제조에 수득 물질을 사용해서는 안 된다. (수득 물질에서 외래성 바이러스가 검출된 물질 사용에 대한 지침은 5항 참조.) 오염의 근본 원인과 정도를 파악하기 위해 공정을 면밀히 확인하고 적절한 조치를 취해야 한다. 연속 생산 공정에서 최종 서브로트를 출하하려면 해당 서브로트 생산용 배양액 수득 기간 동안 바이러스에 오염되지 않았다는 사실이 문서상 증거로 남아있어야 한다. 외래성 바이러스가 검출되면 생산에 미칠 광범위한 영향을 완화하기 위한 잠재 오염 물질 분리 절차를 검토해야 한다.

5. 정제 벌크 바이러스 시험 및 바이러스 클리어런스 시험을 위한 근거와 행동 계획

MCB부터 여러 의약품 생산 단계를 거쳐 최종 제품까지 미가공 벌크의 바이러스 클리어런스 평가와 특성 분석을 포함하여 가장 적절하고 합리적인 바이러스 시험 프로토콜을 설계하는 것이 중요하다. 여기에서 바이러스 클리어런스 평가와 특성 분석이 핵심적인 역할을 한다. 제품이 바이러스에 오염되지 않았다는 사실을 가장 합리적으로 확인하는 것을 목표로 해야 한다.

클리어런스 시험용 바이러스를 선정할 때는, 존재할 것으로 알려진 바이러스의 클리어런스 능력을 평가할 필요성과 비특이적 “모델” 바이러스(뒤에서 설명) 클리어런스의 특성을 분석하여 해당 공정의 견고성 추정을 구분해야 한다. 관련, 특이적, 비특이적 “모델” 바이러스의 정의는 용어정의 부분에 설명이 되어 있다. 공정 평가를 위해서는 제품 안전성을 평가하기 위해 공정(예를 들어 미가공 벌크)에 바이러스가 어느 정도 존재할 수 있는 지 그리고 제거할 수 있는 양은 어느 정도인지에 대한 지식이 요구된다. 불활화 절차의 시간 의존성에 대한 지식은 불활화 절차의 효과성 확보에 유용하다. 이미 알고 있는 오염 물질의 클리어런스 평가에서는 시간에 따른 심층적 시간 의존성 불활화 시험, 불활화 또는 제거 공정의 재현성 입증, 공정 변수를 평가해야 한다. 비특이적 “모델” 바이러스를 사용하여 제조 공정의 클리어런스 견고성의 특성 분석 시, 시험 설계에서 비외피성 바이러스에 각별히 주의를 기울여야 한다. 특성 분석 시험에서 바이러스 클리어런스 정도는 세포주와 미가공 벌크 시험 결과의 영향을 받을 수 있다. 이런 시험은 아래에 기술한 내용대로 수행해야 한다(6항 참조).

표 4는 세포 또는 미가공 벌크 바이러스 시험 결과에 따라 사용되는 행동 계획의 예시이다. 이 계획에는 정제 벌크 바이러스 클리어런스 및 바이러스 시험 공정 평가 및 특성 분석이 포함된다. 표에는 다양한 사례를 제시하였으며, 여기에 대해서는 아래에서 설명한다. 모든 경우에 비특이적 “모델” 바이러스를 사용해 클리어런스 특성을 규명해야 한다. 가장 일반적인 상황은 Case A와 B이다. 설치류 레트로바이러스 이외의 바이러스에 오염된 생산 시스템은 일반적으로 사용하지 않는다. Case C, D 또는 E의 세포주를 사용한 의약품 생산에 타당한 이유가 있다면 해당 규제 당국과 논의해야 한다. Case C, D 및 E의 경우 제조 공정에서 해당 바이러스를 불활화하거나 제거하는 효과적이고 밸리데이션된 단계를 갖추는 것이 중요하다.

Case A: 세포 또는 미가공 벌크에서 바이러스, 바이러스성 입자 또는 레트로바이러스성 입자가 확인되지 않은 경우 앞서 언급한 바와 같이 비특이적 "모델" 바이러스로 바이러스 클리어런스 및 불활화 시험을 실시해야 한다.

Case B: 설치류 세포주에 설치류 레트로바이러스(또는 설치류 A- 및 R형 입자와 같이 비병원성으로 여겨지는 레트로바이러스성 입자)만 존재하는 경우, 특이적 "모델" 바이러스(예: murine leukemia virus)를 사용하는 공정 평가를 수행해야 한다. 정제 벌크는 문제의 바이러스를 검출할 수 있는 높은 특이도와 민감도를 지닌 적합한 방법으로 시험해야 한다. 시판 허가 서류 제출 시, 시험 생산 규모나 실제 생산 규모의 정제 벌크 로트 최소 3개 이상에서 얻은 데이터를 제공해야 한다. 차이니즈 햄스터 난소(CHO), C127, BHK 및 설치류 하이브리도마 세포주와 같은 세포주는 제품의 바이러스 오염과 관련해 안전성 문제가 보고된 바 없는 약물 생산용 기질로 빈번히 사용되었다. 내인성 입자의 특성이 광범위하게 분석되고 클리어런스가 입증된 이런 세포주에서 정제 벌크 또는 원료 의약품 내에 존재하는 비감염성 입자 확인 시험은 일반적으로 권장되지 않는다. Case A와 같은 비특이적 "모델" 바이러스를 사용한 시험이 적절하다. 특성이 광범위하게 규명된 내인성 레트로바이러스성 입자를 만드는 곤충 세포주(예: Sf9)에서도 유사한 접근법이 관련될 수 있다.

Case C: 세포 또는 미가공 벌크에 사람 감염 증거가 없는 바이러스(설치류 레트로바이러스 제외)가 있는 것으로 알려졌다면(예: Sf9 랫도바이러스(설치류 레트로바이러스를 제외한 표 3의 각주 2에서 제시된 바이러스(Case B))), 바이러스 클리어런스 및 불활화 평가 시험에는 확인된 바이러스를 사용해야 한다. 확인된 바이러스를 사용할 수 없다면, 수용 가능한 클리어런스 증명을 위해 "관련" 바이러스 또는 특이적 "모델" 바이러스를 사용하여야 한다. 핵심 불활화 단계에서 확인된(또는 "관련" 또는 특이적 "모델") 바이러스가 시간 종속적으로 불활화된다는 사실이 이런 바이러스에 대한 공정 평가의 일부로 확보되어야 한다. 해당 바이러스를 검출할 수 있는 특이성과 민감도가 높은 적절한 방법으로 정제 벌크를 시험해야 한다. 시판 허가를 받으려면 시험 생산 규모 또는 실제 생산 규모로 생산된 정제 벌크 중 최소 3개 로트에서 입수한 데이터를 제공해야 한다.

Case D: 바이러스가 사람에게 전염성이 있는 것으로 알려진 경우(예: 표 3, 각주 1에 제시된

바이러스), 해당 제품은 예외적인 상황에서만 허용된다. 이 경우 바이러스 클리어런스 및 불활화 평가 시험에는 확인된 그 바이러스를 사용해야 하며, 문제의 바이러스를 검출할 수 있도록 특이성과 민감도가 높은 방법을 사용해야 한다. 확인된 바이러스를 사용할 수 없는 경우라면 관련 및/또는 해당 "모델" 바이러스(뒤에서 설명함)를 사용해야 한다. 정제 및 불활화 공정을 거치며 선택된 바이러스가 제거되고 불활화된 것이 확인되어야 한다. 핵심 불활화 단계가 시간 종속적 불활화된다는 것을 보이는 데이터가 공정 평가의 일부로 확보되어야 한다. 정제 벌크는 문제의 바이러스를 검출할 수 있는 높은 특이도와 민감도를 지닌 적합한 방법으로 시험해야 한다. 시판 허가를 받기 위해서는 시험 생산 규모 또는 실제 생산 규모로 생산된 정제 벌크 중 최소 3개 로트에서 입수한 데이터를 제공해야 한다.

Case E: 현행 방법론으로는 분류할 수 없는 바이러스가 세포나 미가공 벌크에서 검출될 경우, 바이러스가 병원성 바이러스일 가능성이 있으므로 그런 제품은 일반적으로 허용되지 않는다. 드문 경우이긴 하나 그러한 세포주로 의약품 생산할 타당한 사유가 있다면, 공정을 더 진행하기 전에 이에 대해 관련 규제 당국과 논의해야 한다.

Case F: 보조바이러스를 생산에 사용하는 경우, 보조바이러스 자체 또는 특이적 모델 바이러스(예: 배콜로바이러스, 아데노바이러스, 헤르페스 바이러스)의 바이러스 클리어런스를 입증해야 한다.

6. 바이러스 클리어런스 공정의 평가와 특성 분석

바이러스 클리어런스 또는 불활화 공정의 평가 및 특성 분석은 생명공학 제품의 안전성 확립에 중요하다. 과거에는 존재 자체가 알려지지 않았거나 의심하지도 않았던 인자에 의한 오염 사례가 많았다. 비록 이런 일이 특성 분석이 철저히 이루어진 세포주가 아닌 그 외의 여러 원료 물질에서 유래한 생물학적 제품에서 발생하긴 했지만, 바이러스 클리어런스 평가는 알려지지 않고 예상치 못한 모든 유해 바이러스가 제거된다는 신뢰를 제공할 것이다. 이런 시험은 제대로 문서화하여 통제된 방식으로 진행해야 한다.

바이러스 클리어런스 시험의 목표는 1) 바이러스 불활화나 제거 효과가 있다고 여겨지는 공정 단계를 평가하고 2) 공정에서 확보한 전체적인 바이러스 감소 수준을 정량적으로 추정하는데 있다. 원재료 또는 여러 공정 단계에서 얻은 다른 분획물에 유의미한 양의 바이러스를 의도적으로 투입(즉, "스파이킹")하고 후속 단계에서 제거 또는 불활화된다는 것을 입증해야 한다. 더 적은 단계로도 적절한 클리어런스가 입증된다면 제조 공정 전 단계를 평가하거나 특성 분석을 할 필요는 없다. 공정 중의 다른 단계가 바이러스 불활화 또는 제거에 간접적인 영향을 미칠 수 있다는 점을 감안해야 한다. 제조업체는 바이러스 클리어런스 평가 시험에 사용된 접근 방식을 설명하고 그 타당성을 제시해야 한다. 일반적으로는 정제 공정에 들어가는 내인성 바이러스 입자의 양을 확인하기 위해 세 가지 세포 배양 캠페인, 로트 또는 배치 정량을 해야 한다. 이 데이터는 시판허가신청 또는 등록 패키지의 일부로 제출해야 한다.

바이러스 입자를 제거하거나 바이러스 감염성을 불활화하여 바이러스 감염성을 감소시킬 수 있다. 평가한 각 생산 단계마다 바이러스 감염성 손실 가능 기전이 불활화로 인한 것인지 아니면 제거로 인한 것인지 여부를 설명해야 한다. 불활화 단계라면, 시간대를 달리하여 검체를 채취하여 불활화 곡선을 그리도록 시험 계획을 수립해야 한다(6.2.5항 참조).

바이러스 클리어런스 평가 시험으로 1) MCB에 존재하는 것으로 알려진 바이러스가 제거되었다는 사실을 증명하거나, 2) 검출되지 않거나 생산 공정에서 접근할 수 있는 외래성 바이러스의 클리어런스를 보증하는 시험을 실시한다. 감소율은 일반적으로 로그 단위로 표시되며, 잔류 바이러스 감염성이 0으로 감소할 리는 없으나 수학적으로 크게 감소할 수 있다는 것을 나타낸다.

존재하는 것으로 알려진 바이러스 클리어런스 시험 외에도 다른 바이러스 제거 또는 불활화 능력의 특성을 분석하는 시험을 실시해야 한다. 생화학 및 생물리학적 특성이 알려지지 않았거나 이러한 특성을 예상할 수 없는 바이러스 시험은 특이적 불활화 또는 제거 목표를 달성하는 것이 아닌 절차의 견고성에 대한 특성 분석하는데 목표를 두어야 한다. 생산 공정에서 바이러스 불활화 또는 제거 능력을 입증하는 것이 바람직하다(6.3항 참조). 특이적인 안전성 위해성을 평가할 목적으로 이런 시험을 실시하지는 않는다. 따라서 특이적인 클리어런스 값을 달성할 필요가 없다.

6.1. 바이러스 클리어런스의 평가 및 특성 분석을 위한 바이러스 선택

바이러스 클리어런스 평가 및 공정 특성 분석 시험을 위한 바이러스는 제품을 오염시킬 가능성이 있는 바이러스와 유사하면서, 일반적으로 시스템의 바이러스 제거 능력을 시험할 수 있는 광범위한 물리화학적 특성을 대표하는 바이러스를 선택해야 한다. 제조업체는 바이러스 선택이 이 가이드라인에서 제공한 평가 및 특성 분석 시험의 목표에 따르고 있다는 타당성을 증명해야 한다.

6.1.1. "관련" 바이러스와 "모델" 바이러스

바이러스 클리어런스 시험을 수행할 때 중요한 문제는 어떤 바이러스를 사용해야 하는지 결정하는 것이다. 이런 바이러스는 세 가지 범주로 나뉜다. 1) "관련" 바이러스, 2) 특이적 "모델" 바이러스, 3) 비특이적 "모델" 바이러스.

"관련" 바이러스는 바이러스 클리어런스 시험의 공정 평가에 사용되며, 확인된 바이러스, 생산 공정에 사용되는 세포 기질 또는 기타 시약이나 물질 오염 가능성이 있는 바이러스로 확인되었거나, 그럴 가능성이 있는 바이러스와 동종으로 확인된 바이러스이다. 정제 및/또는 불활화 공정은 이런 바이러스를 제거 및/또는 불활화하는 능력을 입증해야 한다. "관련" 바이러스를 사용할 수 없거나 바이러스 클리어런스 시험 공정 평가용으로 잘 적응되지 않는 경우(예를 들어, 충분히 고역가의 체외 증식 바이러스를 확보할 수 없는 경우)에는 특이적 "모델" 바이러스를 대신 사용한다. 적절한 특이적 "모델" 바이러스는 관찰되거나 의심되는 바이러스와 유사한 물리 화학적 특성을 가진 것으로 알려졌거나 가졌을 것으로 의심되는 바이러스(같은 속 또는 족)와 밀접한 관련이 있는 바이러스가 여기에 해당할 수 있다.

설치류 유래 세포주는 대개 감염성(C형 입자) 또는 비감염성(세포질 A- 및 R-형 입자) 내인성

레트로바이러스 입자 또는 레트로바이러스성 입자를 갖고 있다. 이런 세포에서 확보된 제품에서 설치류 레트로바이러스를 제거 및/또는 불활화하는 능력이 있는 지 확인해야 한다. 설치류 기원 세포의 경우 특이적 "모델" 바이러스인 쥐 백혈병 바이러스를 사용하여 확인할 수 있다.

CHO 세포 유래 제품의 경우 CHO 유래 내인성 바이러스 입자를 바이러스 클리어런스 실험에 사용할 수도 있다. 이런 입자는 감염성을 분석할 방법이 없으며 검출 분석법(분자적 분석법이나 생화학적 분석법)은 용도에 적합해야 한다. Epstein-Barr 바이러스로 B 림프구를 불멸화하여 단일클론 항체를 분비하는 사람 세포주를 확보한 경우, 제조 공정에서 헤르페스 바이러스를 제거 및/또는 불활화할 수 있는 지 확인해야 한다. 가성광견병 바이러스도 특이적 "모델" 바이러스로 사용할 수 있다.

일반적으로 바이러스를 제거 및/또는 불활화하는 제조 공정의 능력을 특성 분석하는 것이 목적인 경우(즉, 제거 공정의 견고성의 특성 분석), 다른 속성을 지닌 비특이적 "모델" 바이러스로 바이러스 클리어런스 특성 분석 시험은 실시해야 한다. "관련" 및/또는 특이적 "모델" 바이러스 시험에서 확보한 데이터도 이 평가에 사용할 수 있다. 모든 유형의 바이러스를 시험할 필요는 없다. 물리적 및/또는 화학적 처리에 유의한 저항성이 있는 바이러스를 우선적으로 고려 한다. 이런 바이러스에 대해 확보한 결과는 일반적으로 바이러스를 제거 및/또는 불활화하는 생산 공정의 능력에 대한 유용한 정보를 제공한다. 세포주와 생산 공정의 품질 및 특성 분석 결과에 따라 사용할 바이러스를 선택하고 그 수를 결정한다.

다양한 물리화학적 구조를 나타내는 유용한 "모델" 바이러스의 예와 바이러스 클리어런스 시험에 사용된 바이러스의 예를 부록 2 및 표 A-1에 정리하였다.

6.1.2. 기타 고려사항

추가로 다음과 같은 사항을 고려한다.

- 항상 가능한 것은 아니지만 고역가로 증식할 수 있는 바이러스를 선호한다.
- 시험하는 모든 제조 단계에서 각 바이러스 검출에 효율적이고 신뢰할 수 있는 검사 방법이 있어야 한다.

- 특정 바이러스가 클리어런스 시험 수행자에게 미칠 수 있는 건강 유해요소를 고려해야 한다.

6.2. 바이러스 클리어런스 평가 및 특성 분석 시험의 설계 및 함의

6.2.1. 시설 및 근무자

우수 의약품제조 및 품질관리기준(GMP) 상의 제약 조건으로 인해 의도하지 않은 바이러스를 생산 시설에 도입하는 것은 적절치 못하다. 그러므로 바이러스 클리어런스 시험은 바이러스 작업을 시설을 갖춘 별도의 실험실에서, 바이러스 전문 지식을 갖춘 근무자가 규모 축소 정제 공정 설계 및 준비에 관여하는 생산 담당자와 함께 실시해야 한다.

6.2.2. 규모 축소 생산 시스템

규모 축소의 유효성을 입증해야 한다. 규모 축소 정제 공정은 생산 공정을 최대한 대표해야 한다. 크로마토그래피 설비인 경우, 컬럼 베드 높이, 선형 유속, 유속 대 베드 용적 비율(즉, 접촉 시간), 완충액 및 겔 유형, pH, 온도, 단백질, 염, 제품의 농도 등 모든 부분이 실제 생산 규모를 대표하는 것으로 확인되어야 한다. 용리 프로파일도 유사해야 한다. 다른 공정도 고려해야 할 사항은 유사하다. 불가피한 이탈점이 있다면 결과에 미치는 영향과 관련하여 논의가 이루어져야 한다.

6.2.3. 단계별 바이러스 제거 분석

바이러스 클리어런스 시험을 수행할 때 하나 이상의 생산 단계에서 바이러스 클리어런스에 기여하는 정도를 평가하는 것이 바람직하다. 바이러스 제거 가능성이 있는 단계는 바이러스 제거 및 불활화 능력을 개별적으로 평가해야 하며, 개별 단계가 정확히 어떻게 정의되어 있는지 고려해야 한다. 각 단계의 유효성을 적절히 평가할 수 있으려면 시험 단계 별로 물질에 바이러스가 충분히 존재해야 한다. 일반적으로 바이러스는 시험할 각 단계마다 공정 중 사용 물질에 추가해야 한다. 경우에 따라서는 미정제 벌크에 고역가 바이러스를 추가하고 단계 간 바이러스 농도를 시험하는 것으로도 충분하다. 분리 절차 결과 바이러스가 제거되었다면, 적절하면서 가능하다면 다양한 분획물에서 바이러스 부하 분포를 조사할 필요가 있다. 항바이러스성 완충액을 제조 공정 중 여러 단계에 사용한다면, 전체 공정 평가의 일부로 항바이러스성이 적은 완충액에 병행 스파이킹과 같은 대체 전략을 채택해 실시할 수 있다. 평가 각 단계 전후 바이러스 역가를 확인해야 한다. 정량적 감염성 분석은 적절한 민감도와 재현성을 확보해야 하며, 결과가 유의한 통계적 타당성을 갖도록 충분히 반복 실시해야 한다.

타당하다면 감염성과 관련이 없는 정량 분석을 채택할 수 있다. 분석 방법의 민감도를 보장하기 위해 모든 감염성 분석에 적절한 바이러스 관리 과정이 포함되어야 한다. 또한 농도가 낮을 때 바이러스 검체의 통계적 측면도 고려해야 한다(부록 3 참조).

6.2.4. 물리적 제거와 불활화 결정

바이러스의 감염성은 바이러스의 제거 또는 불활화로 감소시킬 수 있다. 평가 대상 생산 단계 별로 바이러스 감염성이 소실될 수 있는 기전을 불활화 또는 제거와 관련하여 기술해야 한다. 생산 공정에서 감염성이 거의 제거되지 않고 바이러스 클리어런스가 제품 안전의 중요한 요소로 간주된다면 특이적 또는 추가적 불활화/제거 단계를 도입해야 한다. 특정 단계에서 바이러스 제거와 불활화를 구분해야 할 수도 있다. 예를 들어 하나 이상의 클리어런스 단계에 사용된 완충액이 각각의 단계마다 불활화에 기여할 가능성이 있다면(즉, 크로마토그래피의 여러 단계에서 공유되는 완충액이 불활화 기여), 이 각 단계에서 달성된 클리어런스를 크로마토그래피 단계마다 구분해야 한다.

6.2.5. 불활화 평가

바이러스 불활화 평가에는 미가공 원료 또는 중간 물질에 감염성 바이러스를 스파이크하고 감소율을 계산해야 한다. 바이러스 불활화는 단순한 1차 반응이 아니며 일반적으로 보다 복잡하고 대개는 빠른 "1단계"와 느린 "2단계"로 구성된다. 따라서 여러 시점에 걸쳐 검체를 채취하고 불활화 곡선을 그리는 방식으로 시험을 계획해야 한다. 불활화 시험은 최소 노출 시간 외에도 최소 노출 시간보다는 작고 0보다 큰 시점을 적어도 하나 포함시켜야 한다. 사람 병원성이 있는 것으로 알려진 "관련" 바이러스이고 효과적인 불활화 공정을 설계 중이라면 특히 추가 데이터 확보가 중요하다. 그러나 비특이적 "모델" 바이러스를 사용하는 불활화 시험의 경우이거나, CHO 세포질 내 레트로바이러스성 입자와 같은 바이러스 입자의 대용물로 특이적 "모델" 바이러스를 사용하는 경우에는, 적어도 두 개의 독립적인 시험으로 클리어런스의 재현성을 입증해야 한다. 가능한 모든 경우에, 출발 물질 스파이크로 검출될 수 있는 바이러스 양을 토대로 초기 바이러스 부하를 결정해야 한다. 이렇게 하는 것이 불가능하다면 스파이크 바이러스 제제의 역가에서 초기 바이러스 부하를 계산할 수 있다. 불활화가 매우 빠르게 진행되어 공정 조건에 따른 불활화 곡선을 그릴 수 없는 경우라면, 적절한 관리 대책을 실시하여 불활화로 실제 감염성이 상실되었음을 입증해야 한다.

6.2.6. 칼럼의 기능과 재생

시간이 지나고 반복적으로 사용하면 크로마토그래피 칼럼과 기타 정제 장치의 바이러스 클리어런스 능력이 변할 수 있다. 크로마토그래피 배지/수지 수명 사용 기간을 표시해야 하며 바이러스 클리어런스에 영향을 미치는 핵심 공정 변수를 정의해야 한다.

단백질 A 친화 포획 크로마토그래피에 대한 사전 지식을 토대로, 바이러스 클리어런스가 사용한(예: 수명 종료) 크로마토그래피 배지/수지의 영향을 받지 않거나 약간 증가한다. 그러므로 제품 별로 사용 수지에 대한 시험은 기대하지 않는다. 바이러스 클리어런스 관련 다른 유형의 크로마토그래피(예: 음이온 교환 또는 양이온 교환)에도 이런 사전 지식을 적용할 수 있다. 따라서 다른 크로마토그래피 유형에서도 수지 반복 사용의 근거를 제시하려면, 수명이 다 된 수지로 제품별 바이러스 클리어런스 시험을 하는 대신 자체 경험과 타당성에 대한 상세한 근거를 포함해 이에 상응하는 사전 지식을 제공해야 한다.

시스템을 재사용하기 전에 생산 시스템에 잔류할 가능성이 있는 모든 바이러스가 적절히 파괴 또는 제거된다는 것이 보증되어야 한다. 예를 들어 세척 및 재생 절차가 바이러스를 불활화하거나 제거하는 것을 증명하여 그러한 증거를 확보할 수 있다.

6.2.7. 특이 주의사항

다음과 같은 특이 예방 조치를 고려해야 한다.

- 고역가 바이러스를 준비할 때는 물리적 제거는 높이고 불활화를 감소시켜 실제 생산과의 상관관계를 왜곡시킬 수 있는 응집을 피하도록 주의해야 한다.
- 분석을 신뢰할 수 있는 바이러스의 최소량을 고려해야 한다.
- 적정 이전 시료의 희석, 농도, 여과 또는 검체 보관과 같은 사유로 인한 바이러스 감염성 손실을 평가하는 병행 대조 분석을 실시해야 한다.
- 제품의 특성을 희석 또는 변경하지 않도록 바이러스 "스파이크"는 소량으로 제품에 투입해야 한다. 희석된 시험 단백질 검체는 더 이상은 실제 생산 규모로 생산된 제품과 동일하지 않다.
- 완충액, 배지 또는 시약(예)의 작은 차이가 바이러스 클리어런스에 실질적인 영향을 미칠 수 있다.

- 바이러스 불활화는 시간 의존적이므로, 스파이크 제품을 특정 완충액 또는 특정 크로마토그래피 칼럼으로 처리하는 시간이 실제 생산 공정의 조건을 반영해야 한다.
- 완충액과 제품이 지표 세포에 부정적인 영향을 미칠 수 있으므로, 바이러스 역가 결정 분석 시 완충액과 제품의 세포 독성 또는 간섭을 별도로 평가해야 한다. 용액이 지표 세포에 독성이 있는 경우 스파이크 바이러스를 함유한 완충액을 희석, pH 조정 또는 투석을 해야 할 수도 있다. 만일 제품 자체에 항바이러스 활성이 있는 경우, 제품을 생략하거나 항바이러스 활성이 없는 유사한 단백질로 대체하면 일부 생산 단계에서 바이러스의 행동에 영향을 미칠 수 있지만 클리어런스 시험은 "모의" 실행에서 사용한 제품 없이 실시해야 할 수 있다. 스파이크 바이러스의 제거/불활화 분석(예, 투석, 보관)을 위한 검체 준비만을 위한 효과적인 절차를 증명하는 충분한 관리가 포함되어야 한다.
- 많은 정제 공정이 동일하거나 유사한 완충액 또는 칼럼을 반복적으로 사용한다. 데이터를 분석할 때는 이런 접근 방식이 미치는 영향을 고려해야 한다. 특정 공정의 바이러스 클리어런스 효과는 사용되는 제조 단계에 따라 달라질 수 있다.
- 생산 조건이나 완충액의 세포 독성이나 바이러스 살균성이 너무 크면 전반적인 감소율이 과소평가될 수 있으며, 이런 부분은 사례 별로 검토해야 한다. 바이러스 클리어런스 시험의 내재적 한계 또는 부적절한 설계로 인해 전체 감소율이 과대 평가될 수도 있다.

6.3. 바이러스 클리어런스 시험의 해석

바이러스 불활화/제거 평가의 목적은 바이러스 불활화/제거에 효과적인 것으로 간주되는 공정 단계를 평가하고 특성을 분석하며 제조 공정의 전체 바이러스 감소 수준을 정량적으로 추정하는데 있다. Case B~E에 해당하는 바이러스 오염물질의 경우 정제 공정을 거치면서 바이러스가 제거되거나 불활화되고, 최종 제품에서 적절한 수준의 안전성을 보장하기에 충분한 수준으로 바이러스 클리어런스 능력이 구현되었음을 보여주는 것이 중요하다. 생산 공정에서 제거되거나 불활화된 바이러스의 양을 미가공 벌크에 존재할 수 있는 바이러스의 양과 비교해야 한다.

이러한 비교를 수행하기 위해서는 미가공 벌크의 바이러스 양을 추정하는 것이 중요하다.

감염성 분석이나 투과전자현미경(TEM) 기법 또는 정량적 핵산증폭기법(NAT)과 같은 다른 방법을 사용하여 이 추정치를 입수해야 한다. 전체 정제 공정은 미가공 벌크 중 일회 용량에 상응하는 것으로 추정되는 양보다 실질적으로 더 많은 양의 바이러스를 제거할 수 있어야 한다. 바이러스 감소율 계산은 부록 4를 참조하고, 용량별 바이러스 입자 계산은 부록 5를 참조한다. 제조업체는 바이러스 클래스 간에 클리어런스 기전에 차이가 있을 수 있다는 점을 인식해야 한다. 바이러스 불활화/제거 공정의 효과를 뒷받침하는 데이터를 평가할 때는 다음을 포함해 여러 요소를 조합해 고려해야 한다. 여기에는 다음이 포함된다.

- 시험에 사용된 바이러스의 적절성
- 클리어런스 시험의 디자인
- 로그 감소 결과
- 불활화의 시간 의존성
- 공정 변수 변동이 바이러스 불활화/제거에 미칠 수 있는 영향
- 분석 민감도의 한계
- 특정 바이러스 클래스를 불활화/제거할 수 있는 절차 선택.

광범위한 잠재 바이러스 오염 물질을 제거하는 다운스트림 공정을 설계하는 것이 권장된다. 이런 맥락에서 실현성이 있고 제품에 부정적인 영향을 미치지 않는다면, 작동 모드에서 상호 보완적이며 효과적인 두 가지 단계를 구현하는 것이 좋다. 제조 단계 중 하나는 외피가 없는 바이러스를 효과적으로 제거해야 한다. 효과적인 바이러스 제거 단계는 일반적으로 적어도 두 개의 독립적인 시험에서 4로그 이상의 차수로 바이러스 부하의 감소를 재현성 있게 증명해야 한다. 그러나 감소율이 1~3 로그 정도로 재현되는 단계는 바이러스 안전성에 기여하며, 전체 바이러스 감소 평가 시에 고려할 수 있는 것으로 받아들여야 한다. 용매/계면활성제 처리, 계면활성제 단독 처리, 바이러스 여과(나노여과) 또는 낮은 pH 배양과 같은 바이러스 불활화/제거 전용 공정 단계는 광범위한 바이러스를 제거하는 데 매우 효과가 있었다. 작은 바이러스 제거 목적으로 설계된 바이러스 필터를 사용하는 것도 보다 작은 파보바이러스나 폴리오마바이러스에 효과적인 바이러스 클리어런스 단계이다. 마지막으로, 단일클론 항체 정제를 위한 단백질 A 포획 단계 후에 낮은 pH에서 배양하여 친이종

쥐백혈병관련 바이러스(Xenotropic Murine Leukemia Virus, XMuLV) 및 가성광견병 바이러스를 효율적으로 불활화한 경험에 있다.

다중 불활화 단계, 다중 보완 분리 단계 또는 불활화 및 분리 단계의 조합 중 한 가지 방법으로 허용 가능한 수준에서 전체 클리어런스를 달성할 수 있다. 분리 방법은 크로마토그래피 고정상(예: 수지 또는 크로마토그래피 멤브레인)과의 상호 작용에 영향을 미치는 바이러스의 지극히 특이적인 물리화학적 특성에 따라 달라질 수 있으며, "모델" 바이러스는 표적 바이러스와 다른 방식으로 분리할 수 있다. 분리에 영향을 미치는 제조 변수를 적절히 정의하고 관리해야 한다. 당화와 같은 표면 특성의 변화에서 차이가 생길 수 있다. 그러나 이런 잠재 변수에도 불구하고 상보적 분리 단계나 불활화 및 분리 단계의 조합을 통해 바이러스를 효과적으로 제거할 수 있다. 따라서 크로마토그래피 공정, 여과 단계 및 추출과 같이 분리 단계를 잘 설계하고 적절하게 통제된 조건에서 실시한다면 효과적인 바이러스 클리어런스 단계가 될 수 있다.

전체 감소율은 일반적으로 개별 감소율의 합으로 표현된다. 그러나 $1 \log_{10}$ 이하 정도의 바이러스 역가 감소는 무시할 수 있는 것으로 간주되며 타당성을 제시할 수 없는 경우에는 무시할 수 있다.

생산 공정에서는 감염성 감소가 거의 없고 바이러스 클리어런스가 제품 안전성 보장에 매우 중요한 요인으로 간주된다면 특이적인 추가 불활화/제거 단계를 도입해야 한다. 모든 바이러스에 대해 제조업체는 획득한 감소율의 유효성이 타당하다는 것을 입증해야 한다. 상기의 요소를 고려하여 결과를 평가한다.

6.4. 바이러스 클리어런스 시험의 한계

바이러스 클리어런스 시험은 최종 제품의 적정 안전성 수준 달성을 보증하는 데는 유용하지만 그 자체로 안전성이 확립되지는 않는다. 하지만 바이러스 클리어런스 시험의 디자인과 실행에 있어서 공정의 바이러스 감염성 제거 능력을 부정확하게 추정하는데 기여하는 요소가 많이 있다. 요인은 다음과 같다.

- 생산 공정의 클리어런스 시험에 사용되는 바이러스 조제물은 일반적으로 특정

세포를 배양해 생산된다. 생산 단계에서 보이는 이런 바이러스 스파이크의 행동은 세포 배양 배지의 생물학적 원료 물질 또는 제조 세포에서 복제되는 네이티브 바이러스 오염물의 행동과는 다를 수 있다. 예를 들어, 스파이킹용 바이러스 입자와 각 생산 중간 물질의 자연 바이러스는 의 순도나 응집도가 다를 수 있다.

- 바이러스 감염성 불활화는 초기 단계 급속한 불활화에 이어 느린 불활화로 이상성 곡선을 보이는 경향이 있다. 첫 번째 불활화 단계에서 벗어난 바이러스는 후속 단계에서는 더 큰 내성을 보일 수 있다. 예를 들어, 저항성 분획물이 바이러스 응집물의 형태를 띠다면, 여러 화학적 처리 및 가열에도 감염성이 내성을 가질 수 있다.
- 전체 공정의 바이러스 제거 또는 불활화 능력은 각 단계에서 로그 감소율의 합으로 표현된다. 여러 단계, 특히 감소율이 매우 작은 단계(예: $1 \log_{10}$ 미만)의 감소율 합침으로써 실제 바이러스 클리어런스 잠재력이 과대평가될 수도 있다. 제조 공정 중에 유사한 불활화 기전으로 인한 개별 바이러스 감소율을 추가하면 전체 바이러스 클리어런스가 과대 평가될 수 있다. 또한 동일하거나 거의 동일한 공정을 반복하여 달성한 감소치를 포함시킨 경우에는 타당성을 제시해야 한다.
- 로그 역가 감소로 감소율을 표현하는 것은 잔류 바이러스의 감염성이 크게 감소할 수는 있지만 절대로 0으로는 감소하지 않는다는 것을 의미한다. 예를 들어 분석 검출 한계를 고려하면 ml당 $8 \log_{10}$ 감염 단위를 함유하는 조제물의 감염성이 $8 \log_{10}$ 감소된다 해도 분석방법의 검출 한계를 고려하면 ml당 $0 \log_{10}$ 또는 ml당 1 감염 단위는 남는다.
- 규모 축소 공정 설계에 철저히 주의를 기울여도 시험 생산 규모 공정은 실제 생산 규모의 공정과 다를 수 있다.

6.5. 통계

바이러스 클리어런스 시험에는 결과를 평가하기 위한 데이터의 통계 분석이 포함되어야 한다. 도출된 결론을 뒷받침할 수 있도록 시험 결과가 통계적으로 유효해야 한다(부록 3 참조).

6.6. 바이러스 클리어런스 평가를 위한 사전 지식 적용

일반적으로 바이러스 클리어런스는 조사하려는 제품별 각 단계의 공정 중 물질에 바이러스를

첨가하는 실험으로 평가한다. 제조업체가 잘 확립되고 특성 분석이 잘 된 공정으로 유사한 제품을 개발하는 경우(즉, 동일한 플랫폼 기술 사용), 다른 제품을 위해 입수한 바이러스 클리어런스 데이터를 동일한 처리 단계를 거치는 신제품에 적용할 수 있다. 그러나 이런 단계의 데이터를 활용하려면 공정 단계를 잘 이해할 필요가 있다. 특정 공정 단계에 대한 사전 지식의 대표성에 대한 타당성이 명확해야 한다. 아래에서 설명된 측면에서 외부 및 내부 경험이 반영된 사전 지식을 다뤄야 한다.

- 바이러스 클리어런스의 기저 기전을 이해해야 한다.
- 바이러스 클리어런스에 영향을 미칠 수 있는 모든 공정 변수를 이해해야 한다.
- 바이러스와 제품 간의 상호 작용이 바이러스 클리어런스에 영향을 미치지 않는다는 것이 분명히 확인되어야 한다.
- 해당 공정 중간 물질의 조성이 바이러스 클리어런스에 영향을 미칠 수 있다. 일부 공정 단계의 경우 완충액, 배지, 시약, 수준 및 불순물 프로파일(예)에 사소한 차이가 있어도 바이러스 클리어런스에 상당한 영향을 미칠 수 있다. 그러므로 공정 중간 물질 조성의 대표성을 다른 제품에서 입증해야 한다. 또한, 공정 중간 물질의 구성과 관련하여 바이러스 클리어런스의 견고성이 사전 지식에 나타나지 않는 한, 해당 단계 이전의 신규 제품과 기존 제품 공정은 유사한 전략을 따라야 한다.
- 특정 제품에 사전 지식을 활용할 때는 6.4항에 설명한 바이러스 클리어런스 시험의 일반적인 한계를 참작해야 한다.

외부에서 입수한 사전 지식(문헌 데이터 포함)은 바이러스 불활화/제거 단계의 가능성을 보이는데 유용할 수 있으며 관련 기전을 통찰할 수 있다. 핵심 공정 변수를 정의하고 특정 바이러스 클리어런스 단계 시험에서 최악의 경우에 대한 한계를 설정할 때도 이런 데이터를 사용할 수 있다. 최악의 조건에서 바이러스 클리어런스 시험을 시행하면 제품별 시험 횟수를 줄이는 데도 유용하다. 그러나 특정 제품에 공개 감소율을 적용할 때는 여러 관련 제품 제조 전반에 걸친 공정의 동등성, 제품 중간 물질의 동등성, 제품 특이적 속성이 바이러스 감소에 영향을 미치지 않는다는 보증이 있어야 한다. 그러므로 주어진 플랫폼 기술에 대한 내부 경험(내부 사전 지식)을 토대로 문헌 데이터를 신중하게 평가하고 보완해야 한다.

제품별 실험을 하지 않을 경우에는 세포 기질과 원료 물질의 성질과 특성, 전반적인 바이러스 클리어런스 전략을 포함하여 의약품에 대한 전체 바이러스 안전성 개념을 고려해 사례별로 바이러스 클리어런스 데이터의 유효성을 결정해야 한다. 데이터 패키지가 사전 지식을 사용하기에 충분한 근거를 주지 못한다면 제품별로 바이러스 클리어런스 시험을 실시해야 한다.

사전 지식을 활용하여 LRV 주장을 도출할 때 관련 플랫폼 데이터의 모든 LRV를 고려하여 해당 주장의 타당성을 입증해야 한다. 공정 단계의 감소량을 과대평가하는 위해성을 방지하기 위해 보수적인 LRV 주장으로 판단해야 한다.

부록 6에 다른 제품에서 얻은 바이러스 감소 데이터와 자체 경험을 포함해 현재 이해 수준에 맞는 사전 지식을 활용하여 동일한 제조 플랫폼에서 신제품의 바이러스 감소율을 주장할 수 있는 경우를 기술했다.

6.7. 바이러스 클리어런스의 재평가

생산 또는 정제 공정에 중대한 변경이 발생할 때마다 바이러스 클리어런스에 직접적으로나 간접적인 미치는 영향을 검토하고 필요한 경우 시스템을 재평가해야 한다. 예를 들어 생산 공정 변경은 세포주에서 생산되는 바이러스의 양에 상당한 변화를 유발할 수 있다. 공정 단계의 변경으로 바이러스 클리어런스 정도를 변화 시킬 수 있다.

수명주기 관리(Life cycle management) 중 바이러스 클리어런스의 유효성에 영향을 줄 수 있는 제조 공정 상의 변경은 내부 지식과 플랫폼 개념을 활용해 평가할 수 있다. 다른 제품의 내부 지식(내부 경험)을 특정 제품에 외삽할 수 없거나 플랫폼 개념을 더 이상 적용할 수 없다면 제품별 바이러스 클리어런스 시험을 실시해야 한다.

7. 연속 생산 공정에서 고려할 사항

연속 생산(continuous manufacturing: CM) 공정은 원료물질, 공정 중간 물질, 출발 물질이 제조 공정에 지속적으로 투입되고 제조 공정 전반에 걸쳐 제품이 배출되는 복수 단위의 작업이 통합되어 구성된 동적 시스템이다. CM은 일부 단위 작업 또는 전체 단위 작업에 적용할 수 있다. 바이러스 안전을 해치는 위해성을 식별하고 이를 완화하기 위해서는 각 단위 작업 외에도 통합 공정과 그 역학에 대한 이해가 필수적으로 수반되어야 한다. 치료용 단백질 제조를 위한 CM 공정 유형은 ICH Q13(부록 3)에서 설명한다.

바이러스 안전성 면에서 볼 때 CM의 기술적 측면은 바이러스 검출 및 제거 개념, 물질 추적성, 시스템 역학, 모니터링 시작/종료 빈도, 고급 공정 제어, 공정 밸리데이션, 공정 모델, 연속 공정 검증(verification)을 포함하여 배치 공정에서 발생하는 것과 다를 수 있다.

그러나 공정에 이해를 바탕으로 하는 기본 원칙과 기대(예: 과학 및 위해성 기반 접근 방식 및 바이러스 위해성을 관리하기 위한 이러한 접근방식 구현)는 배치 제조와 동일하다. 여기에는 오염 방지 전략도 포함된다(2.2항 참조). 예를 들어 바이러스 클리어런스와 관련이 있는 공정 변수 목표 관리 상태가 동적 공정에서도 보장되는 경우에는 배치 생산 경험이나 사전 지식에 기반한 물리적 화학적 바이러스 불활화 또는 제거 조건을 적용할 수 있다(6.6항 참조).

7.1. CM 공정의 바이러스 안전성

CM 공정에서는 잠재적인 오염원(예: 출발 및 원료 물질, 연장된 세포 배양 기간)에 대한 위해성 평가, 공정의 바이러스 제거 능력, 바이러스 부재를 보장하는 시험 능력을 기반으로 바이러스를 관리해야 한다. 3항과 4항에서 설명한 시험에 대한 지침도 CM에 적용을 고려할 수 있다. 이 평가를 토대로 세포 배양 및 기타 후속 단계 공정이 오염되지 않았다는 것을 증명하는 외래성 바이러스 시험의 유형과 빈도를 포함하는 전략을 개발해야 한다.

7.2. CM의 바이러스 클리어런스에 대해 일반적으로 고려할 사항

제조 공정 및 바이러스 클리어런스 시험은 다음 사항을 고려해 설계해야 한다.

- 제조 공정 상 연속되거나 연결된 작업 모드를 부분적으로 실행할 수 있으며, 적절하다면 배치 공정을 기반으로 하는 바이러스 클리어런스 시험 설계에서 나온

지식/경험을 단위 작업 평가에 사용할 수 있다.

- 각 단위 작업에 잠재된 위해성과 설비 간의 연결(예: 질량 유속 차이 또는 투입 물질의 불균일성을 완화하기 위해 단위 작업 사이에 서지 또는 혼합 탱크 사용)을 평가하여 바이러스 감소 능력에 영향을 주는 모든 부분을 포괄하여야 한다.
- 의도치 않은 교란 또는 외래성 바이러스 오염을 감지하는 적절한 공정 모니터링 및 검체 채취 전략이 있어야 한다. 실시간으로 의사 결정이 이루어진다면, 여기에는 산출 물질의 품질과 제품에 교란 또는 오염이 미치는 영향을 확인할 수 있는 공정이 포함되어야 한다. 어떤 영향을 받는 지에 따라 제품 스트림에 잠재된 부적합 물질의 전환이나 생산된 물질의 처분도 고려해야 한다.
- 다음과 같은 잠재적 영향을 감안하여 바이러스 클리어런스 시험을 설계해야 한다.
 - 투입 물질의 속성(예: 바이러스 부하, 단백질 또는 불순물의 농도 및 균질성, 응집 수준)의 변동
 - 유량, 일시적 장애 또는 정지
 - 운영 부하용량
 - 다중칼럼 순환(multicolumn cycling)

또한, CM은 바이러스 안전에서 고려해야 할 고유한 측면도 보여준다.

7.2.1. 세포 배양 생산 기간 연장과 관련된 잠재적 위해성

생산 배양 시간이 경과함에 따라 내인성 레트로바이러스 수준이 변동할 수 있으므로 의약품의 용량 위해성 요소 계산에 영향을 미치지 않도록 적절한 검체 채취 지점을 평가해야 한다(세포주 적격성 평가는 4항, 3항의 고려사항 참조).

7.2.2. 바이러스 클리어런스 시험 접근법

CM의 관리 상태가 유지될 것으로 예상은 되나, 제조 공정의 산출에 변동이 생길 수 있는 공정 시작, 종료, 일시적 공정 교란(예: 바이러스 오염시 짧은 시간동안 바이러스 고부하 가능) 기간이 포함된다. 이런 기간 중 생기는 위해성은 이 가이드라인의 다른 부분에서 다루는 클리어런스 시험 모범 사례를 활용해 해결할 수 있다. CM에서 특히 다음을 고려해야 한다.

- 크로마토그래피

- 하위 배치(예: 다중 칼럼) 반복 공정의 경우, 배치 공정이 타당한 목표 공정 조건(예: 유속, 수지 부하 대 칼럼 과부하, 수지 세척성)에 대한 타당성이 잘 확립된 규모 축소 모델 역할을 할 수 있다.
- 설비 설계 및 시스템 통합(예: 양이온 교환 크로마토그래피(CIEX)의 결합 및 용출 모드 후 음이온 교환 크로마토그래피(AEX)의 흐름 통과 모드)에 따라서는 2개 또는 그 이상의 연결 단위 작병의 동시 밸리데이션이 하나의 선택지가 될 수는 있지만, 되도록 모든 유닛 단위 작업의 바이러스 클리어런스를 밸리데이션해야 한다. 연결된 단위 작업의 경우 시험물질을 배치 작업과 다르게 로딩하지 않았다면 통상적인 규모 축소 모델로 평가할 수 있다.
- 낮은 pH/용매 계면활성제 불활화
 - 목표 공정 조건에 타당성이 있다면 배치 공정으로 밸리데이션하는 것이 적절할 수 있다.
 - 바이러스 불활화(예: pH 및 용매/계면활성제)의 경우 관련된 동적 공정 변수(예: pH, 용매/계면활성제 농도, 균질성 및 혼합, 온도, 체류 시간)가 관리된다는 것을 입증해야 한다.
 - 동적 공정에서 불활화에 규모 축소 모델을 적용할 경우 규모의 영향(예: 체류 시간 분포)를 평가하고 타당성을 제시하는 데 주의를 기울여야 한다.
- 바이러스 여과
 - 바이러스 클리어런스에 영향을 미치는 변수 설정이 바이러스 클리어런스 시험에서 시험한 범위를 벗어나지 않는 경우(예: 최악의 경우의 설정값)라면 배치 공정으로 밸리데이션하는 것이 적절할 수 있다.
 - 바이러스 클리어런스 능력(capacity)을 유지하면서 필터 교환 및 사용 후 무결성 시험을 할 수 있도록 공정 제어를 정의해야 한다. 여기에는 필터 고장 시 연속 공정 중단 없이 재료 우회(material diversion)을 허용하는 제어 과정이 포함되어야 한다.

8. 요약

이 본 가이드라인은 바이러스 오염 리스크 평가와 제품에서 바이러스를 제거하기 위한 접근 방식을 제시하여 동물 또는 사람 세포주 유래의 안전한 생명공학 제품 생산에 기여하고 다음과 같은 여러 전략의 가치를 강조하고 있다.

- 바이러스 오염 물질의 존재 여부를 파악하기 위한 세포 기질 출발 물질의 철저한 특성 분석/스크리닝
- 사람 세포 친화성을 결정하거나 사람 감염에 대한 지식으로 잠재적 위해성 평가
- 미가공 벌크 중의 외래성 바이러스를 검사하기 위한 적절한 시험 프로그램 구축
- 최대 바이러스 클리어런스를 달성하기 위해 동일 생산 공정에서 서로 다른 바이러스를 불활화 또는 제거하는 방법을 활용한 바이러스 클리어런스 시험의 면밀한 설계
- 바이러스 불활화 및 제거를 평가하는 시험 수행.

9. 용어 정의

외래성 바이러스 (Adventitious Virus)

바이러스 항목 참조.

세포 기질 (Cell Substrate)

제품 제조에 사용하는 세포.

생산 종료 세포 (End of Production Cells, EOPC)

(생산 조건과 유사한 조건에서) 계대 수준 또는 생산에서 도달한 최대 수준 또는 그 이상의 배증 수준으로 배양하여 MCB 또는 WCB에서 수득한 세포. 생산 종료 세포는 체외 세포 연령 한계 시점이거나 그 이상인 세포이다.

내인성 바이러스 (Endogenous Virus)

바이러스 항목 참조.

체외 세포 연령 (In Vitro Cell Age)

MCB 바이알의 해동부터 생산 용기에서의 수득까지 걸린 시간을 배양 경과 시간, 세포 집단 배증 수준 또는 배양물의 희석을 위한 지정 절차로 계대 배양한 경우 세포의 계대 횟수를 표시하는 시간 단위.

불활화 (Inactivation)

화학적 또는 물리적 처리로 인한 바이러스 감염성 감소.

마스터 세포 은행 (Master Cell Bank, MCB)

일반적으로 선정 세포 클론을 활용해 지정 조건에서 제조하여 여러 용기에 분주하고 지정 조건에서 보관하는 단일 세포 풀의 분주물. 모든 WCB는 MCB에서 유래된다.

마스터 바이러스 시드 (Master Virus Seed, MVS)

마스터 바이러스 시드(원액, 로트 또는 은행)는 백신 바이러스, 보조바이러스 또는 향후에 모든 생산물이 유래될 바이러스 벡터 조제물을 말한다.

최소 노출 시간 (Minimum Exposure Time)

처리 단계가 지속되는 가장 짧은 기간.

차세대 염기서열 분석법 (Next Generation Sequencing, NGS)

HTS(고처리량 시퀀싱, High Throughput Sequencing) 또는 MPS(대량 병렬 시퀀싱, Massive Parallel Sequencing) 또는 딥 시퀀싱(Deep sequencing) 이라고도 하는 다단계 핵산 기반 기술을 말하며, 알려졌거나 알려지지 않은 외래성 인자를 불가지론적으로 검출할 수 있는 광범위한 기능을 갖추고 있다. 경우에 따라 알려진 바이러스의 표적 검출에 NGS를 사용할 수 있다.

플랫폼 제조 (Platform Manufacturing)(ICH Q11에 따름)

동일 허가 신청자가 동일 유형의 다른 의약품 제조에 사용하는 것과 유사한 제조 공정에서 시작하여 신약 생산 전략을 개발하는 접근 방식(예: 사전 정의된 숙주세포, 세포 배양 및 상당한 경험이 축적된 정제 공정을 사용한 단일클론 항체의 제조).

플랫폼 밸리데이션 (Platform Validation)

이 가이드라인 전체에서 이 용어는 바이러스 클리어런스의에 대한 플랫폼 밸리데이션만을 의미한다.

이러한 맥락에서 플랫폼 밸리데이션은 최근 경향에 따라 새로운 유사 제품에 대한 감소율을 주장하기 위해 다른 제품에서 얻은 바이러스 감소 데이터와 자체 경험을 포함한 사전 지식을 사용하는 것으로 정의한다.

사전 지식 (Prior Knowledge)

사전 지식은 기존의 지식을 말하며 내부 지식(예: 개발 및 제조 경험), 외부 지식(예: 공급업체의 데이터, 문헌 및 동료 검토 간행물을 포함한 과학 기술 간행물) 또는 확립된 과학적 원리(예: 화학, 물리학 및 공학 원리) 응용을 포함한다.

바이러스 클리어런스의 공정 특성 분석 (Process Characterisation of Viral Clearance)

비특이적 "모델" 바이러스를 활용하여 제조 공정의 바이러스 제거 및/또는 불활화 견고성을 평가하는 바이러스 클리어런스 시험.

바이러스 클리어런스의 공정 평가 시험 (Process Evaluation Studies of Viral Clearance)

"관련" 및/또는 특이적 "모델" 바이러스를 활용하여 제조 공정의 바이러스를 제거 및/또는 불활화하는 능력을 결정하는 바이러스 클리어런스 시험.

바이러스 클리어런스의 공정 견고성 (Process Robustness of Viral Clearance)

견고성이라는 용어는 두 가지 다른 특성 중 하나를 설명할 때 사용한다. 하나는, 바이러스 클리어런스에 부정적인 영향을 주지 않으면서 물질의 변동성과 공정 변경을 허용하는 공정 또는 공정 단계의 능력을 말할 때 사용한다. 다른 하나는, 광범위한 특이적 및 비특이적 모델

바이러스를 제거하는 능력을 말한다.

생산 세포 (Production Cells)

제품 제조에 사용되는 세포 기질.

보충 시험 방법 (Supplementary Test Method)

기존의 시험을 개선하는 데이터를 도출하는데 사용되는 시험 방법. 시험물질 간섭이나 독성 등 기존 시험 방법의 한계를 극복하기 위해 사용하는 시험.

미가공 벌크 (Unprocessed Bulk)

하나 이상의 세포 및 배양 배지 수득물 풀. 세포에 용이하게 접근할 수 없는 경우에는 발효기에서 수득한 액체가 미가공 벌크를 구성한다.

바이러스 (Virus)

잠재적으로 병원성이 있고, 한 종류의 핵산(RNA 또는 DNA)만 보유하며, 증식하거나 이분법으로 분열하지 않고 유전 물질 형태로 늘어나는 세포 내 복제되는 감염성 인자.

외래성 바이러스 (Adventitious Virus)

의도치 않게 도입된 오염 바이러스.

내인성 바이러스 (Endogenous Virus)

유전체가 세포주 유래 종 생식 계열 일부이며 모 세포주가 유래한 동물 유전체에 통합되어 있는 바이러스 개체. 이 가이드라인에서는 세포 기질 불멸화에 사용된 Epstein-Barr 바이러스 또는 Bovine Papilloma Virus와 같이 의도적으로 도입된 비통합 바이러스를 의미한다.

보조바이러스 (Helper Virus)

이 가이드라인에서 말하는 보조바이러스란 제품의 발현 또는 복제가 가능하도록 보조하는 바이러스 또는 바이러스 벡터를 말한다.

비특이적 모델 바이러스 (Non-Specific Model Virus)

일반적으로 바이러스를 제거 및/또는 불활화하는 제조공정의 능력을 특성화(예, 정제공정의 견고성 특성분석)하기 위해 바이러스 제거 공정의 특성분석에 사용되는 바이러스

관련 바이러스 (Relevant Virus)

동정된 바이러스이거나 생산 공정에 사용되는 세포 기질 또는 기타 시약 또는 물질을 오염시키는 것으로 알려져 있거나 그럴 가능성이 있는 바이러스와 동종인 바이러스로 공정

평가 연구에 사용되는 바이러스.

특이적 모델 바이러스 (Specific Model Virus)

관찰 또는 의심되는 바이러스와 유사한 물리적/화학적 특징을 지닌 알려졌거나 의심되는 바이러스와 밀접한 관계(동일 속 또는 과)에 있는 바이러스.

바이러스 클리어런스 (Viral Clearance)

바이러스 입자를 제거하거나 바이러스 감염성을 불활화하여 목표 바이러스를 제거.

바이러스성 입자 (Virus-Like Particles)

알려진 바이러스와 형태학적으로 관련이 있으며 전자현미경으로 관찰 가능한 구조물

바이러스 제거 (Virus Removal)

목적하는 제품에서 바이러스 입자를 물리적으로 분리하는 것.

바이러스 벡터 (Viral Vector)

의료용 제품으로 *in vivo*에 사용하거나 다른 고급 치료적인 용도로 *ex vivo*에서 사용할 수 있는 재조합 바이러스. 유전자 조작 바이러스 벡터 생산에는 보조바이러스가 필요할 수 있다.

바이러스 벡터 유래 제품 (Viral Vector-Derived Product)

재조합 바이러스에 의해 인코딩되고 발현되는 제품. 유전자 조작 바이러스 벡터 생산에는 보조바이러스가 필요할 수 있다.

제조용 세포 은행 (Working Cell Bank, WCB)

WCB는 확립된 배양 조건에서 MCB를 배양하여 얻은 균질한 세포 현탁액의 분주물로 만든다.

제조용 바이러스 시드 (Working Virus Seed, WVS)

제조용 바이러스 시드(원액, 로트 또는 은행)는 MVS에서 생성된다.

표 1. 다양한 세포 수준에서 실시가 권고되는 바이러스 시험

	MCB	WCB ^a	체외 세포 연결 한계 시점 세포 ^b
레트로바이러스 및 기타 내인성 바이러스 시험			
감염성	+	-	+
전자현미경	+ ^c	-	+ ^c
역전사효소 ^d	+ ^d	-	+ ^d
기타 바이러스 특이성 시험 ^e	적절히	-	적절히
비 내인성 또는 외래성 바이러스 시험			

ICH Q5A(R2) 가이드 라인

<i>In vitro</i> 분석 또는 NGS ^f	+	+	+
<i>In vivo</i> 분석 또는 NGS ^g	+	-	+
항체 생산 시험 또는 특이적 분자 분석 ^{h,j}	+	-	-
기타 바이러스 특이성 시험 ⁱ	+	-	-

a. 3.1.2.항 참조

b. 한계 세포: 생산용 체외 세포 연령 한계 시점의 세포(3.1.3항 참조).

c. 다른 인자도 검출 가능.

d. 세포주가 레트로바이러스 입자를 구조적으로 생성하는 것으로 알려진 경우 분석이 필요하지 않을 수 있음.

e. 이런 인자에 의해 감염된 것으로 알려진 세포주에 적합함.

f. *In vitro* 바이러스 시험은 WCB 또는 이 WCB에서 직접 유래한 LIVCA(체외 세포 연령 한계 시점) 세포에 직접 실시함. 광범위 분자법(NGS)을 이용한 바이러스 시험은 위해성 평가를 기반으로 한 *in vitro* 시험(세포 배양 및 PCR)을 보완 또는 대체하는 분석법으로 사용할 수 있음.

g. *In vivo* 시험은 위해성 평가를 기반으로 실시할 수 있음. 단, 세포주 이력, 사전 지식 및 기타 위해성 기반 고려 사항을 기준으로 CHO, NS0 및 SP2/0처럼 특성이 잘 규명된 세포주에서는 *in vivo* 시험이 필요하지 않음. 여기에는 형질주입을 하지 않은 모세포주에 대한 이전의 *in vivo* 바이러스 시험 또는 NGS 시험과 모세포 은행으로부터 MCB 유도 관리도 포함된다. MCB 구축에 사용한 방법을 포함하여 동일한 모세포 은행에서 유래한 다른 MCB의 바이러스 안전성 시험에 대한 사전 지식도 고려해야 한다. 승인된 관리 조건에서 첫 번째 WCB 또는 후속 WCB를 준비하는 경우에는 일반적으로 시험이 불필요함. LIVCA세포의 경우 사전 지식 및 기타 위해성 기반 고려 사항에 따라 시험이 필요하지 않을 수 있음.

잔류 위해성이 잔존하는 경우, MCB 구축 중 또는 체외 세포 연령 한계 시점인 세포 배양 중에 도입되었을 수 있는 바이러스를 검출하기 위해 다양한 바이러스 검출을 위한 분자적 방법(예: NGS 또는 PCR)으로 시험을 지속하거나 대체하는 것을 고려할 수 있음.

h. 예: 설치류 세포주에 일반적으로 적용할 수 있는 MAP, RAP, HAP. 바이러스 특이적 PCR 또는 표적 분자 방법은 예를 들어 관련 원료 물질 및 시약을 포함한 세포주의 기원 및 이력을 기반으로 하^{ms} 동물 실험을 대체하는 분석법으로 사용할 수 있음.

i. 예: 관련 원료 물질 및 시약을 포함한 세포주의 기원 및 이력 기반

j. 해당되는 경우 NGS는 *in vivo* 시험 대체 시험으로 간주해야 하며, 분석 적합성 및 위해성 평가에 따라 *in vitro* 및 기타 바이러스 특이적 시험을 보완하거나 대체하는 시험으로 사용할 수 있음.

표 2. 바이러스 시험에 사용할 수 있는 분석 및 한계 예시

시 험	시 험 물 질	검 출 능 력	검 출 한 계
항체 생산	세포 용해물 및 이의 배양 배지	특이적 바이러스 항원	동물 시험 시스템에 감염성이 없는 항원
<i>In vivo</i> 바이러스 스크린	세포 용해물 및 이의 배양 배지	다양한 바이러스	시험 시스템에서 복제 또는 질병을 유발하지 않는 바이러스
<i>In vitro</i> 바이러스 스크린(용도):		다양한 바이러스	시험 시스템에서 복제 또는 질병을 유발하지 않는 바이러스
1. 세포 은행 특성분석	1. 세포 용해물 및 이의 배양 배지(동시 배양인 경우 시험 물질에 완전한 세포가 있어야 함)		
2. 생산 스크린	2. 미가공 벌크 수득물 또는 세포 용해물 및 생산 반응기에서 확보한 이의 배양 배지		
TEM on:		바이러스 및 바이러스성 입자	정성적 분석 및 확인 평가
1. 세포 기질	1. 살아있는 세포		
2. 세포 배양 상청액	2. 세포가 없는 배양 상청액		
역전사효소(RT)	세포가 없는 배양 상청액	레트로바이러스 및 발현 레트로바이러스 RT	바람직한 조건의 최적 활성 효소만 검출. 일부 농축 검체의 백그라운드가 되는 세포 효소의 존재로 인해 해석이 어려울 수 있음.
레트로바이러스(RV) 감염성	세포가 없는 배양 상청액	감염성 레트로바이러스	선택된 시험 시스템에서 복제 또는 뚜렷한 병소나 플라크를 형성하지 못하는 RV
동시 배양	살아있는 세포	감염성 레트로바이러스	복제 불가 RV
1. 감염성 변수			1. 상기 RV 감염성 참고
2. TEM 변수			2. 상기 TEM ^a 참고
3. RT 변수			3. 상기 RT 참고
PCR(중합효소 연쇄반응)	세포, 배양액, 기타 물품	특이적 바이러스 서열	프라이머 서열이 있어야 함. 바이러스 감염성은 알 수 없음

NGS	세포, 배양액, 기타 물품 다양한 바이러스	결과가 양성이어도 바이러스의 전염성 여부를 나타내는 것은 아니며 추가 조사가 필요할 수 있음
-----	----------------------------	--

- a. 또한 시험 물질과 지표 세포 구별이 어려울 수 있음

표 3. 항체 생산 시험 내 검출 바이러스

<i>MAP^d</i>	<i>HAP^d</i>	<i>RAP^d</i>
Ectromelia Virus ^{2,3}	Lymphocytic Choriomeningitis Virus(LCM) ^{1,3-}	Hantaan Virus ^{1,3}
Hantaan Virus ^{1,3}	Pneumonia Virus of Mice (PVM) ^{2,3}	Kilham Rat Virus (KRV) ^{2,3}
K Virus ²	Reovirus Type 3 (Reo3) ^{1,3}	Mouse Encephalomyelitis Virus (Theilers, GDVII) ²
Lactic Dehydrogenase Virus (LDM) ^{1,3}	Sendai Virus (SV) ^{1,3}	Pneumonia Virus of Mice (PVM) ^{2,3}
Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCM) ^{1,3}	SV5	Rat Coronavirus (RCV) ²
Minute Virus of Mice ^{2,3}		Reovirus Type 3 (Reo3) ^{1,3} Sendai Virus ^{1,3}
Mouse Adenovirus (MAV) ^{2,3}		Sialodacryoadenitis Virus (SDAV) ²
Mouse Cytomegalovirus (MCMV) ^{2,3}		
Mouse Encephalomyelitis Virus (Theilers, GDVII) ²		Toolan's H-1 Virus ^{2,3}
Mouse Hepatitis Virus (MHV) ²		
Mouse Rotavirus (EDIM) ^{2,3}		
Pneumonia Virus of Mice (PVM) ^{2,3}		
Polyoma Virus ²		
Reovirus Type 3 (Reo3) ^{1,3}		
Sendai Virus ^{1,3}		
Thymic Virus ²		

1. 사람 또는 영장류 감염성 증거가 있는 바이러스.
2. 사람 감염 증거가 없는 바이러스.
3. 사람 또는 영장류 유래 세포에서 *in vitro* 복제 능력이 있는 바이러스.
4. PCR 분석 또는 기타 표적 분자 방법과 같은 NAT는 해당 설치류 바이러스 시험을 대체하여 사용할 수 있음.

표 4. 정제 벌크의 바이러스 클리어런스 및 바이러스 시험의 공정 평가를 위해 권고되는 행동 계획

	Case A	Case B	Case C ²	Case D ²	Case E ²	Case F
상태						
바이러스 존재 ¹	-	-	+	+	(+) ³	-
바이러스성 입자 ¹	-	-	-	-	(+) ³	-
레트로바이러스성 입자 ¹	-	+	-	-	(+) ³	-
바이러스 확인	적용 불가	+	+	+	-	+
사람 바이러스 병원균	적용 불가	- ⁴	- ⁴	+	모름	(+) ⁹
보조바이러스 유무	-	-	-	-	-	+
행동						
비특이성 “모델” 바이러스	yes ⁵	yes ⁵	yes ⁵	yes ⁵	yes ⁷	yes ⁵
사용 바이러스 클리어런스의 공정 특성 분석						
“관련” 또는 특이성 “모델” 바이러스 사용 바이러스 클리어런스의 공정 평가	no	yes ⁶	yes ⁶	yes ⁶	yes ⁷	yes ⁹
정제 벌크 바이러스 시험	적용 불가	no	yes ⁸	yes ⁸	yes ⁸	yes ⁹

1. 세포 기질 및/또는 미가공 벌크 수준의 바이러스 시험 결과. 일반적으로 바이러스에 오염된 생산용 세포 배양물은 특이적 바이러스 클리어런스 및 위해성 평가로 그 타당성을 입증하지 않는 한 사용해서는 안 된다. 내인성 바이러스(예: 레트로바이러스) 또는 MCB의 필수 부분을 구성하는 바이러스의 경우 적절한 바이러스 클리어런스 평가 공정을 따른다면 적합하다.
2. 바이러스에 오염된 원료 물질은 사람에게 감염성 및/또는 병원성이 있는 것으로 알려진 바와 관계없이 특이적 바이러스 클리어런스 및 위해성 평가를 통해 예외적인 상황에서만 사용해야 한다.
3. 바이러스가 직접 또는 간접 적인 방법으로 관찰되었음.
4. 비병원성으로 생각됨.
5. 비특이적 “모델” 바이러스를 사용하여 클리어런스의 특성 분석을 실시해야 함.
6. “관련” 바이러스 또는 특이적 “모델” 바이러스 공정 평가를 실시해야 함.
7. Case E 본문 참조.
8. 문제의 바이러스 검출에 높은 특이성과 민감도를 보이는 적합한 방법으로 정제 벌크를 검증하여 검출 가능한 바이러스가 없다는 것을 확인해야 한다. 시판 허가를 위해 시험 생산 규모 또는 실제 생산 규모로 제조된 최소 3개의 정제 벌크 로트 또는 배치의 데이터를 제공해야 한다.
9. 바이러스는 인간에게 전염성이 있을 수도 있고 없을 수도 있다. 보조바이러스(재조합 또는 야생형) 공정 평가를 실시해야 한다. 이것이 불가능할 경우 특이적 모델 바이러스를 사용해야 한다. 생산에 사용될 때 보조바이러스는 바이러스 클리어런스 목표를 결정하기 위해 미가공 벌크 단계에서 최소 세 번의 세포 배양 캠페인으로 정량한다. 정제 후, 민감한 바이러스 검출 관련 허용 세포주를 사용한 감염성 분석을 사용하여 검출 가능한 보조바이러스가 없는 지 확인한다. 또는 분자적 방법을 사용할 수도 있다. 각각의 정제 벌크에서 잔류 보조바이러스가 없는 것이 확인되어야 한다.

부록 1: 특성 분석된 세포 은행을 *IN VIVO* 에서 증식시켜 유래한 제품

특성 분석된 은행의 세포를 동물에 접종해 해당 동물에서 수득한 체액으로 제품을 제조한 경우 이 동물과 관련한 추가 정보를 제공해야 한다.

가능한 경우 생명 공학/생물학적 제품 제조에 사용되는 동물은 잘 규명되고 특정 병원체가 없는 개체군에서 확보해야 한다. 표 3에 나열한 것과 같이 적절한 바이러스 시험을 실시해야 한다. 새로 입고된 동물과 질병에 걸린 동물의 격리 절차를 기술하고 해당 시설 내의 모든 봉쇄, 세척 및 정화 방법이 외래성 인자의 전파를 봉쇄하는 데 적합하다는 것을 보장해야 한다. 이는 센티넬 프로그램을 활용하여 달성할 수 있다. 시험 대상인 인자의 목록 또한 포함해야 한다.

수의학적 지원 서비스가 현장 또는 손쉽게 접근 가능한 곳에서 제공될 수 있어야 한다. 동물 사육장을 제조 시설의 다른 구역과 분리하는 정도도 기술해야 한다. 작업자의 업무 절차는 안전성 확보에 적절해야 한다.

동물 유지관리 절차를 충분히 기술한다. 사료, 세척 및 사료를 주는 기간, 해당되는 경우 정기적인 수의학적 관리 대책, 접종 후 동물에 필요할 수 있는 특별 취급 세부 사항을 포함해 기술한다. 동물 프라이밍 요법, 접종물 준비, 접종 장소 및 접종 경로에 대한 설명도 포함되어야 한다.

동물에서 확보한 일차 수득 물질은 생물 반응기에서 수득한 미가공 벌크와 동등한 제조 단계로 간주할 수 있다. 그러므로 앞서 이 문서의 4항에서 설명한 시험과 관련해 고려해야 할 모든 사항을 적용해야 한다. 또한 제조업체는 미가공 벌크의 바이오버튼을 평가하고, 마이코플라스마 존재 여부를 확인하며, 종 특이적 분석 및 성체 마우스와 젖먹이 마우스를 대상으로 *in vivo* 시험을 실시해야 한다.

부록 2: 바이러스 클리어런스 시험을 위한 바이러스 선택

A. 유용한 "모델" 바이러스의 예

- a. 다양한 물리화학적 구조를 대표하는 비특이적 "모델" 바이러스:
 - SV40(*Macaca mulatta polyomavirus*), 동물 파보바이러스 또는 기타 작은 비외피성 바이러스
 - 파라인플루엔자 바이러스 또는 인플루엔자 바이러스, 신드비스 바이러스 또는 일부 기타 중형 내지 대형 외피 RNA 바이러스
 - 헤르페스 바이러스(예: HSV-1 또는 가성광견병 바이러스) 또는 기타 중형 내지 대형 DNA 바이러스.

이런 바이러스는 예시일 뿐이며 반드시 사용해야 하는 것은 아니다.

- b. 레트로바이러스성 입자를 생성하는 세포 기질의 경우 일반적으로 설치류 레트로바이러스를 특이적 "모델" 바이러스로 사용한다. 내인성 쥐과 또는 기타 설치류 레트로바이러스 입자도 사용할 수 있다.

B. 바이러스 클리어런스 시험에 사용된 바이러스의 예

바이러스 클리어런스 시험에 사용된 여러 바이러스가 표 A-1에 정리되어 있다. 그러나 이런 바이러스는 단지 예에 불과하며, 표에 있는 바이러스를 반드시 사용해야 하는 것은 아니다. 제조업체는 특히 개별 생산 공정에 더 적합한 다른 바이러스를 고려해야 한다. 일반적으로 공정은 서로 다른 특성을 가진 최소 세가지 다른 바이러스로 클리어런스 능력을 평가해야 한다.

표 A-1: 바이러스 클리어런스 시험에 사용된 바이러스 예시

<i>Virus</i>	<i>Family</i>	<i>Genus</i>	<i>Natural host</i>	<i>Genome</i>	<i>Env</i>	<i>Size (nm)</i>	<i>Shape</i>	<i>Resistance^a</i>
Vesicular Stomatitis Virus ^b	Rhabdo	Vesiculovirus	Equine Bovine	RNA	yes	70x150	Bullet	Low
Parainfluenza Virus	Paramyxo	Paramyxovirus	Various	RNA	yes	100-200+	Pleo/Sphere	Low
MuLV	Retro	gammaretrovirus	Mouse	RNA	yes	80-110	Spherical	Low
Sindbis Virus	Toga	Alphavirus	Human	RNA	yes	60-70	Spherical	Low
BVDV	Flavi	Pestivirus	Bovine	RNA	yes	50-70	Pleo-Sphere	Low
Pseudorabies Virus ^{b,c}	Herpes	Varicellovirus	Swine	DNA	yes	120-200	Spherical	Med
Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus ^c	Baculo	Alphabaculovirus	Insect	DNA	yes	250-300	Polyhedral	Med
Adenovirus Type 2 or Type 5 ^c	Adeno	Adenovirus	Human	DNA	no	70-90	Icosahedral	Med
Vesivirus 2711	Calici	Vesivirus		RNA	no	27-40	Icosahedral	Med
Encephalomyocarditis Virus (EMCV)	Picornia	Cardiovirus	Mouse	RNA	no	25-30	Icosahedral	Med
Reovirus 3	Reo	Orthoreovirus	Various	RNA	no	60-80	Spherical	Med
SV40	Papova	Polyomavirus	Monkey	DNA	no	40-50	Icosahedral	Very high
Parvoviruses (canine, murine, porcine) ^d	Parvo	Parvovirus	Canine Mouse Porcine	DNA	no	18-24	Icosahedral	Very high

a. 생산 공정 시험에 근거한 물리 화학적 처리에 대한 저항성. 저항성은 특정 처리와 관련이 있으며 이러한 처리는 바이러스에 대한 생물학적 이해와 제조 공정의 환경을 바탕으로 사용한다. 실제 결과는 처리 방법에 따라 달라진다.

b. 곤충 세포에서 발견된 랩도바이러스 관련 모델

c. 특이적 모델 또는 바이러스 벡터 생산용 보조바이러스 관련 바이러스

d. 바이러스 여과 밸리데이션 시 더 큰 구형/20면체 바이러스 및 외피 바이러스의 단일 최악의 모델 바이러스로 사용할 수 있다.

이런 바이러스는 예시일 뿐이며 반드시 사용해야 하는 것은 아니다.

부록 3: 바이러스 및 바이러스 감소율 분석 평가를 위한 통계적 고려 사항

모든 생물학적 분석 시스템에 공통적인 편차 문제 때문에 바이러스 역가 검사도 어려움이 있다. 바이러스 역가 검사의 정확성과 여기에 근거한 감소율 및 분석법의 유효성을 평가하여 시험의 신뢰성을 파악해야 한다. 통계적 평가의 목표는 바이러스학적 역량 면에서 적합한 수준으로 시험이 실시되도록 하는 것이다.

1. 분석 방법은 가부 반응 분석법이거나 정량적 분석법이 될 수 있다. 가부 반응법에는 동물의 감염성 분석, 또는 동물 또는 세포 배양의 감염 여부에 따라 점수를 매기는 TCID(Tissue-Culture-Infectious-Dose) 분석이 포함된다. 감염 역가는 감염된 동물 또는 배양물의 비율로 계산한다. 정량적 방법에서는 측정 감염성이 바이러스 투입에 따라 계속 달라진다. 정량적 방법에는 분자 기반 방법 또는 각 플라크가 단일 감염 단위에 해당하는 플라크 분석법이 포함된다. 가부 반응과 정량적 분석법 모두 통계적 평가가 가능하다.
2. 알려지지 않거나 제어하기 어려운 회색 오류, 통계적 효과 및 분석 시스템 내에서 발생하는 차이로 인해 분석 편차가 발생할 수 있다. 단일 분석 작업 내 결과를 비교할 때 보다(분석 내 편차) 서로 다른 분석 작업 결과를 비교할 때(분석 간 편차) 이런 영향이 더 커질 수 있다.
3. 분석 내 편차 결과에 대한 95% 신뢰 한계는 일반적으로 평균의 약 $\pm 0.5 \log_{10}$ 이어야 한다. 분석 내 편차는 표준적인 방법으로 평가할 수 있다. 분석 간 편차는 참조 조제물을 포함해 모니터링할 수 있으며, 그 역가 추정치는 실험실에서 해당 분석에 대해 확립한 평균 추정치의 약 $0.5 \log_{10}$ 이내여야 한다. 적절한 타당성이 있다면 정밀도가 낮은 분석도 허용될 수 있다.
4. "관련" 및 특이적 "모델" 바이러스 클리어런스 시험 시 가능하다면 관찰된 감소율에 대한 95% 신뢰한계를 계산해야 한다. 출발 물질의 바이러스 분석에 대한 95% 신뢰한계가 $+s$ 이고 해당 단계 이후 물질의 바이러스 분석에 대한 신뢰한계가 $+a$ 라면, 감소율에 대한 95% 신뢰한계는 다음과 같다

$$\sqrt{S^2 + a^2}$$

저농도 바이러스의 검출 확률

바이러스 농도가 낮으면(예: 리터당 10~1,000개의 범위의 감염성 입자), 몇 밀리리터의 검체에 감염성 입자가 포함되었을 수도 포함되지 않았을 수도 있다. 이 검체에 감염성 바이러스가 포함되어 있지 않을 확률 p 는 다음과 같다.

$$p = ((V-v)/V)^n$$

V (리터)는 시험 대상 물질의 총 용량이며, v (리터)는 검체의 용량, n 은 V 중에 통계적으로 분포하는 감염성 입자의 절대 값을 나타낸다.

$V \gg v$ 라면, 이 방정식은 푸아송 분포로 근사값으로 구할 수 있다.

$$p = e^{-cv}$$

여기에서 c 는 리터당 감염성 입자의 농도이다.

또는, $c = \ln p / -v$

예를 들어, 검체량 1ml를 시험한다면, 리터당 10~1,000개 범위로 감염성 입자가 있는 바이러스 농도에서 확률 p 는 다음과 같다.

c	10	100	1000
p	0.99	0.90	0.37

이는 리터당 1,000개의 바이러스 농도인 경우, 검체의 37%가 1ml 중 바이러스 입자를 포함하지 않았다는 의미이다.

검체 중 일부만 바이러스 시험을 하고 그 시험 결과가 음성이라면 양성 결과를 얻기 위해서는 전체 검체에 존재해야 하는 바이러스의 양을 계산해야 한다. 감소율을 계산할 때는 이 값을 고려해야 한다. 95%의 신뢰한계가 바람직하다. 그러나 경우에 따라 물질 자체의 한계때문에 가능하지 않을 수도 있다.

부록 4: 바이러스 클리어런스 결정을 위한 시험에서 감소율 계산

개별 정제 또는 불활화 단계의 바이러스 감소율은 정제 이전 물질의 바이러스 부하와 다음 단계에서 사용할 준비가 된 정제 이후 물질의 바이러스 부하 비율의 \log_{10} 으로 정의한다. 약어로 표현하면 다음과 같다.

출발 물질:

vol v' ; titer $10^{a'}$;
virus load: $(v')(10^{a'})$,

최종 물질:

vol v'' ; titer $10^{a''}$;
virus load: $(v'')(10^{a''})$,

개별 감소율 R_i 는 다음과 같이 계산된다

$$10R_i = (v')(10^{a'}) / (v'')(10^{a''})$$

이 공식에서는 정제 단계 전후 물질의 역가와 용량을 모두 고려했다.

일부 바이러스 역가는 내재된 고유한 비정밀성으로 인해 전체 감소율 계산에 적용되는 개별 감소율이 1보다 커야 한다.

전체 생산 공정에 대한 전체 감소율은 개별 단계의 감소율의 로그합이다. 첫 번째 공정 클리어런스 단계 시작 시의 바이러스 부하와 마지막 공정 제거 단계의 끝에서 바이러스 부하 비율의 로그이다. 감소율은 일반적으로 로그 단위로 표현하며, 이는 잔여 바이러스 감염성이 절대로 0으로 감소하지는 않지만 수학적으로는 크게 감소할 수 있다는 의미이다.

부록 5: 용량별 입자 추정치 계산

이 부록의 내용은 내인성 레트로바이러스와 같이 출발 수치를 추정할 수 있는 바이러스에 적용할 수 있다.

예시:

I. 추정

세포 배양 수득물의 측정 또는 추정 바이러스 농도 = $10^6/\text{ml}$

계산한 바이러스 클리어런스 비율 = $>10^{15}$

제품 1용량 제조에 필요한 배양 수득물의 양 = 1 litre (10^3ml)

II. 추정 입자/용량의 계산

$(10^6 \text{ virus units/ml}) \times (10^3 \text{ ml/dose})$

Clearance factor $>10^{15}$

= $10^9 \text{ particles/dose}$

Clearance factor $>10^{15}$

= $<10^{-6} \text{ particles/dose}$

그러므로 100만 용량 당 1개 이하의 입자가 예상된다.

위의 경우는 설치류 세포에서 단일클론 항체를 제조하는 과정의 내인성 레트로바이러스 감소를 나타내는 대표적인 사례이다(Case B). 특이적 바이러스에 대한 종합 위해성 평가에서 바이러스의 숙주 범위, 바이러스의 병원성, 오염 방지 조치, 시험 조치, 투여 경로 및 인체 감염 용량과 같은 추가 요소를 고려해야 한다.

중국 햄스터 난소(CHO) 세포에 대한 Case B 시나리오에서, 체외 시험에서 감염성 물질의 존재를 확인하지 못했다면 재조합 단백질에 대한 레트로바이러스성 입자(RVLP)에 대해 $<10^{-4}$ 입자/용량의 안전 마진이 허용되는 것으로 간주한다.

부록 6: 내부 경험 포함 제품별 밸리데이션 노력을 줄이기 위한 사전 지식의 예

플랫폼 밸리데이션 접근법의 일반 원칙에 따라, 동일 플랫폼에서 생산되는 제품 전체에서 강력한 바이러스 클리어런스 성능이 입증되어야 하며 이런 바이러스 클리어런스 공정은 확립되고 특성이 잘 규명된 조건을 따라야 한다. 또한 제품 중간 물질 구성 관련 사전 지식이 바이러스 클리어런스의 견고성을 시사하지 않는 한 제품 중간 물질 조성이 바이러스 클리어런스 시험에 사용되는 중간 물질과 유사하다는 점을 보여야 한다.

이러한 맥락에서 플랫폼 밸리데이션은 새로운 유사 제품에 대한 감소율을 주장하기 위해 다른 제품에서 얻은 바이러스 감소 데이터와 내부(허가 신청자 소유 데이터) 경험을 포함한 사전 지식을 사용하는 것으로 정의한다. 일반적으로 사전 지식(내부 경험 포함)을 기반으로 한 신제품의 바이러스 클리어런스 주장에는 모든 가용 데이터에 대한 논의와 플랫폼 밸리데이션 접근법을 뒷받침하는 근거가 포함되어야 한다(6.6항 참조). 제품별 밸리데이션을 줄이는 데 사용되는 사전 지식 및 내부 데이터 중 일부는 신제품 및 그 제조 공정을 다른 내부 제품, 관련 공정 조건 및 제품 중간 물질과 비교하는 용도로 제공할 수 있다.

바이러스 클리어런스 전담 공정 단계(예: 계면활성제에 의한 불활화, 낮은 pH 및 바이러스 여과에 의한 제거)는 플랫폼 밸리데이션 접근법에 적합하다.

따라서 계면활성제, 낮은 pH 배양, 바이러스 여과에 의한 XMuLV 불활화/제거에 대한 사전 지식 적용 사례를 아래에 설명했다.

이런 모의 사례는 설명 목적으로 제공한 것으로 플랫폼 밸리데이션 접근 방식을 적용할 수 있는 방법을 제안한 것에 불과하며, 규제 제출용 템플릿이나 유일한 근거로 사용해서는 안 된다.

표 A-2~A-4에 산업 전반에 적용되는 광범위한 공정 조건에 대한 현 시점의 이해를 기반으로 개별 공정 단계의 공정 변수와 잠재적 중요도를 요약해 제시했다. 공정 변수 및 중간 물질이 XMuLV 클리어런스에 실제 미치는 영향은 사전 지식과 내부 경험을 통해 평가해야 한다.

진화하는 공정에 대한 이해를 바탕으로 향후 플랫폼 밸리데이션에 추가적인 공정 단계를

권고하게 될 수도 있다.

용매/계면활성제 (SD) 또는 계면활성제 단독으로 불활화

작용 기전에 따라 SD 시약 또는 계면활성제 단독의 계면활성제 농도가 중요한 공정 매개변수가 된다.

또한 지질, 세포 잔해 또는 소포제와 같은 세포 배양 배지의 성분과 같은 소수성 불순물은 바이러스 지질 외피를 용해시키는 계면활성제 또는 SD 혼합물에 저항하여 바이러스 불활화에 영향을 미칠 수 있으므로 이를 평가해야 한다.

지금까지는 바이러스와 특이적 치료 단백질 간의 상호 작용이 계면활성제에 의한 불활화에 영향을 미친다는 결과는 없었다. 응집물(예: 세포 잔해 또는 응집된 바이러스 입자)은 바이러스 입자를 포획하고 보호해 계면활성제가 접근하지 못하도록 할 수 있다. 따라서 제조 시에는 계면활성제 불활성화 전에 공칭공경이 $\leq 0.2\mu\text{m}$ 인 여과 단계를 포함하여 제품 중간 물질(예: 수득 세포 배양액(HCCF))로부터 세포/세포 잔해에서 제거해야 한다.

다음 단락은 SD 또는 Triton X-100을 예로 들어 플랫폼 밸리데이션 검사 접근 방식을 XMuLV 불활화에 적용하는 방법을 기술한다. 이 접근 방식은 강력하고 효율적인 XMuLV 불활화 활성을 보이는 다른 대체 계면활성제에도 적용할 수 있다.

Triton X-100은 멤브레인 연구에서 지질 이중층을 용해하기 위해 일반적으로 사용되는 비이온성 계면활성제이다. 이 물질은 바이러스 지질 외피를 용해시켜 바이러스를 비감염성으로 만들어 외피 바이러스를 불활화한다. Triton X-100은 단일클론 항체(MAb)의 플랫폼 정제 공정(HCCF에 첨가) 외에도 수년간 혈장 유래 제품 제조 공정에서 바이러스 불활화에 널리 사용되었다.

유럽화학물질관리청(European Chemical Agency)은 이 물질의 분해 화합물이 호르몬 유사 활동을 하므로 Triton X-100을 허가물질 목록(부록 14)에 포함시켰다. 따라서 널리 사용되고는 있지만 제약 업계는 대체 계면활성제를 찾고있다. 물리화학적 특성이 유사한 다른 계면활성제가 상용화 되어 있으며 XMuLV 불활화에 효율적이다.

Triton X-100의 비이온성 때문에 그 효과는 pH, 이온 강도 또는 HCCF의 반대 이온 특성에 민감하지 않다. 사전 경험에 따르면 HCCF 내 다양한 종류의 일반적인 지질 및 총 단백질 함량을 포함하는 플랫폼 공정, 0.2% Triton X-100 농도, 15°C, 60분 배양 조건에서 여러 제품에 걸쳐 HCCF에서 XMuLV를 효과적으로 불활화시킨 것으로 나타났다. 그러나 아래에 표시된 대로 제품별 실험을 생략할 때 효과적이면서도 신뢰할 수 있는 불활화를 보장하려면 0.5%의 Triton 농도를 권장한다.

표 A-2에는 지질 외피 바이러스의 계면활성제 기반 불활화 공정 매개변수와 그 잠재적 중요도를 요약 제시하였다.

표 A-2: 공정 변수 및 계면활성제 불활화에 대한 잠재적 영향 요약

공정 변수	잠재적 영향	근거
SD 또는 Triton X-100 농도	High	불활화제
배양 시간	High	불활화 기전은 시간 의존적
온도	High	불활화 동역학에 미치는 영향
0.2 μ m 여과 전 처리	High	잠재적으로 바이러스 입자를 포획하고 계면활성제 접근으로부터 보호할 가능성이 있는 응집물을 출발 중간 물질에서 제거
HCCF 내 총 지질 함량 또는 대용 변수	Low	최악의 경우인 HCCF에서 관찰된 낮은 영향
제품 유형	Low	MAB, 반 항체 (half antibody), 융합 단백질 또는 재조합 단백질에는 불활화에 대한 영향이 관찰되지 않음
HCCF의 총 단백질 함량	Low	최악의 경우인 HCCF에서 관찰된 낮은 영향
pH	Low	Triton X-100은 비이온성 계면활성제
이온 강도	Low	위 참조
HCCF 내 완충염	Low	위 참조
바이러스 입자와 제품 간의 잠재적인 상호작용	Low	불활화에 영향을 미치는 것으로 관찰되지 않았고 지질 외피가 파괴되어 제품과의 상호작용 가능성이 낮아짐

따라서 현재 공정에 대한 이해와 일치하게 $\geq 15^{\circ}\text{C}$ 에서 ≥ 60 분 동안 정제된 HCCF를 $\geq 0.5\%$ Triton X-100 처리하는 조건에서 여러 세포 배양 유래 제품에 대해 효과적으로 XMuLV를 불활화한다. ≥ 30 분 동안 1% Triton X-100 및 0.3% TNPB(Tri-N-Butylphosphate)로 처리하거나 $\geq 23^{\circ}\text{C}$ 에서 ≥ 6 시간 동안 1% 폴리소르베이트 80와 0.3% TNBP로 처리하면 레트로바이러스가 효과적으로 불활화된다. 현재 공정에 대해 이해한 바에 따르면 SD 처리 또는 Triton X-100 단독 처리를 통한 XMuLV 불활화에 플랫폼 밸리데이션 접근 방식을 적용할 수 있다.

낮은 pH에서 배양

낮은 pH 조건은 바이러스 외피 단백질을 변성시켜 지질 외피를 파괴함으로써 외피 바이러스를 불활화한다. 낮은 pH 조건의 포획 크로마토그래피 제품 풀 처리법은 단일클론 항체(MAb)와 같은 세포 배양 유래 제품의 제조 공정에서 레트로바이러스를 불활화하는 데

널리 사용되었다.

불활화 효율은 pH로 측정되는 수소 이온(불활화제) 농도, 배양 시간 및 온도, 완충액 매트릭스에 따라 달라진다. 매우 높은 이온 강도는 불활화 효율에도 영향을 미칠 수 있다.

표 A-3에는 낮은 pH 조건의 XMuLV 불활화 공정 변수와 잠재적 영향을 요약 제시했다.

표 A-3: 낮은 pH 불활화 및 XMuLV에 미치는 영향에 대한 공정 변수와 그 잠재적 영향 요약

공정 변수	잠재적 영향	근거
pH	high	불활화제
배양 시간	high	불활화 기전은 시간 의존적
온도	high	불활화 동역학에 미치는 영향
완충액 매트릭스	high	입수한 데이터에 따르면 불활화의 견고성은 완충액 매트릭스에 의존적임
제품 농도	low	불활화에 대한 영향이 관찰되지 않음
제품 유형	low	MAB, 반항체 (half antibody), 이중 특이적 항체, 융합 단백질 또는 재조합 단백질에는 불활화에 대한 영향이 관찰되지 않음
NaCl 농도 (a)	low	염화나트륨 $\leq 500\text{mmol/L}$ 인 경우에는 영향 없음
바이러스 입자와 제품 간의 잠재적인 상호작용	low	불활화에 대한 영향이 관찰되지 않음.

(a): 현재까지 다른 완충액이 이온 강도에 미치는 영향에 대한 데이터는 제한적임.

현재 공정에 대한 이해와 일치하게 염화나트륨 농도 $\leq 500\text{mmol/L}$ 에서 ≥ 30 분, $\leq \text{pH } 3.6$, $\geq 15^\circ\text{C}$ 에서 낮은 pH 처리를 하면 XMuLV를 효과적으로 불활화함. 아세테이트 및 구연산 완충액이 가장 일반적으로 사용되며 강력한 XMuLV 불활화 작용을 함.

현재 공정에 대해 이해한 바에 따르면 낮은 pH 처리에 의한 XMuLV 불활화에 플랫폼 밸리데이션 접근 방식을 적용할 수 있다.

바이러스 여과

바이러스 여과는 크기 기반으로 입자를 제거한다. 일반적으로 제품 중간 물질의 체적 처리량과 필터 세정 완충액의 체적 처리량 및 압력 차단을 포함한 압력이 바이러스 여과에서 잠재적으로 중요한 변수이다.

바이러스 입자 크기가 필터의 공극 크기 분포보다 훨씬 큰 경우에는 제품과 바이러스 입자 간 상호 작용 가능성은 중요하지 않다. 그러나 바이러스 입자 크기와 공극 크기가 비슷할 때 잠재적인 상호 작용이 유체 역학과 바이러스 체류에 미치는 영향에 대해서는 아직 완전히 이해하지 못했다.

이 항에서는 다른 제품의 바이러스 여과에 대한 사전 지식과 자체 경험을 활용하여 소형 및 대형 바이러스 보유 필터의 레트로바이러스 클리어런스를 입증하는 방법에 초점을 맞춘다.

소형 바이러스 필터의 효율적인 레트로바이러스 클리어런스에 영향을 미치는 요인은 멤브레인 종류, 흐름 또는 압력 제어 여과 방식, 압력 중단과 같은 공정 변수 변화와 관련해 잘 알려져 있다. 바이러스 클리어런스의 예측성과 견고성을 근거로 이 공정 단계는 플랫폼 밸리데이션 접근 방식에 적합한 것으로 간주된다.

소형 바이러스 필터를 사용하여 바이러스를 제거하는 한 가지 옵션은 더 큰 구형/20면체 바이러스 및 외피 바이러스에 파보바이러스 로그 감소 값을 적용하는 방식이다. 그러나 이 방법은 때때로 파보바이러스가 필터를 통과하여 바이러스 클리어런스 능력(예: 레트로바이러스 클리어런스 능력)을 과소 평가하게 될 수 있다. 크기 기반 작용 기전과 소형 바이러스 필터를 사용한 강력한 레트로바이러스 완전 클리어런스 경험을 토대로 기업은 파보바이러스 및 레트로바이러스 클리어런스에 대한 자체 데이터를 활용해 일반적으로 사용되는 소형 바이러스 필터에서 플랫폼 레트로바이러스 클리어런스 검증 체제를 구축할 수 있다.

크기 기반 제거 기전에 따르면 이론상 바이러스가 소형 바이러스 보유 필터를 통과할 위험성은 레트로바이러스보다 소형 바이러스에서 더 높다.

우수 의약품 제조 및 품질관리 기준(GMP) 조건을 반영한 용적 처리량 및 필터 플러시 용적 외에도 압력 중단이 미치는 영향을 철저히 이해할 필요가 있다.

파보바이러스 클리어런스를 주장하기 위해 다른 제품의 사전 지식과 내부 경험을 사용하는 경우 파보바이러스를 사용하여 최소 한 번은 제품별 확인 밸리데이션 시험을 실시해야 한다.

바이러스 필터 유형은 바이러스 감소 및 공정 변수에 미치는 영향과 관련해 그 견고성에서 중요한 부분이며 플랫폼 데이터를 설계할 때도 이를 고려해야 한다.

표 A-4. 소형 바이러스 보유 필터의 파보바이러스 클리어런스 공정 변수와 그 잠재적 영향 요약

공정 변수	잠재적 영향	근거
바이러스 필터에 로드된 제품 중간 물질의 체적 처리량	High	특정 필터 유형에 따라 파보바이러스가 낮은 수준으로 통과하는 것이 관찰되었다
필터 플러시 완충액의 체적 처리량	High	파보바이러스가 낮은 수준으로 통과한 것이 관찰
압력	high	압력은 필터 작동 상한을 초과하지 않아야 함. 특이적 멤브레인 유형에서는 저압이 더 나쁜 사례가 될 수 가능성이 있다. 압력 중단(여과 중 또는 제품 중간 여과에서 필터 플러시로 전환 시 발생)을 고려해야 한다.
제품 유형	low	MAb, 반항체 (half antibody), 이중 특이적 항체, 융합 단백질 또는 재조합 단백질에는 바이러스 클리어런스에 대한 영향이 관찰되지 않았다
제품 농도	low	바이러스 클리어런스에 부정적인 영향이 관찰되지 않음
pH	low	크기 기반 제거로 바이러스 클리어런스에 부정적인 영향을 미치지 않음
이온 강도	low	바이러스 클리어런스에 제한적 영향이 관찰됨
완충액 매트릭스	low	바이러스 클리어런스에 제한적 영향이 관찰됨
바이러스 입자와 제품 간의 잠재적인 상호작용	low	바이러스와 항체 간의 특이적 상호작용으로 바이러스 체류시간이 늘어날 수 있다

부록 7: 유전자 조작 바이러스 벡터 및 바이러스 벡터 유래 제품

7.1 서론

생명공학의 진보로 특성 분석된 사람 또는 동물 기원(즉, 조류, 포유류 또는 곤충)의 세포 은행으로 제조한 새로운 유형의 제품을 발현하는 새롭고 진보된 생산 플랫폼이 등장했다. 부록 7에는 제품의 물리화학적 특성에 착안해 바이러스 클리어런스가 가능한 보조바이러스 의존성 및 보조바이러스 독립적 유전자 조작 바이러스 벡터와 바이러스 벡터 유래 제품을 다룬다. 이런 제품에는 배쿨로바이러스/곤충 세포, 나노입자 기반 백신 및 AAV와 같은 바이러스 벡터 제품으로 생산되는 바이러스성 입자(VLP) 및 단백질 아단위가 포함된다. 이런 의약품은 체내 또는 체외에 적용할 수 있다.

보조바이러스 독립형 제품은 안정적 형질전환 또는 일시적 형질주입 세포주를 사용하거나 단백질 발현 바이러스 벡터(예: 재조합 배쿨로바이러스)를 감염시켜 생산한다. 보조바이러스 의존 제품은 제품의 발현 또는 바이러스 벡터를 복제하기 위해 보조바이러스가 필요하다(예: 헤르페스 심플렉스 바이러스 또는 아데노바이러스와 같은 보조바이러스를 사용하여 발현되는 아데노 관련 바이러스 또는 재조합 단백질).

바이오 의약품의 잠재적 바이러스 오염원은 주 가이드라인의 2항에서 설명한다. 발현 시스템에서 도입된 것과 같은 추가적인 오염 위해성 및 복제 가능 바이러스로 인한 오염 가능성을 염두에 두어야 한다. 제품 제조 과정의 외부 오염 가능성을 평가할 때는 세포 기질의 외래성 바이러스 감수성을 고려해야 한다. 특성이 잘 분석된 세포 은행과 바이러스 시드 사용으로 바이러스 오염 위해성을 줄일 수 있다. 또한 생산에 사용되는 보조바이러스는 공정 관련 바이러스 오염 물질로 간주된다.

물질의 근원, 적절한 제조 단계에서의 바이러스 시험, 제조 공정에 의한 외래성 바이러스 및 보조바이러스의 제거 및/또는 불활화에 대한 포괄적인 프로그램을 적용하여 새로운 제품 유형의 바이러스 안전 및 오염 관리를 확보해야 한다. 바이러스 클리어런스에 한계가 있다면, 원료 물질 및 시약에 대한 시험과 관리 및 제조 공정에 중점을 두고 바이러스의 안전을 관리해야 한다.

따라서 제품의 바이러스 안전성을 입증하는 위해성 기반 접근법을 적용해야 한다.

7.2 바이러스 시험

제품의 전반적인 안전을 뒷받침하기 위해 적절한 제조 단계에서 내인성 및 외래성 바이러스 오염에 대한 광범위한 시험 및 특성 분석은 실시해야 한다. 제품 수명 주기 전반에 걸쳐 제품 유형 및 관련 위해성 요소에 따라 시험 계획을 적용해야 한다. 아래의 표 A-5에는 생산 중 여러 단계에서 실시하는 시험을 요약하여 정리하였다. 바이러스 시드, 벡터 수득, 원료 의약품에 적용되는 시험이 기술되어 있다. 바이러스 벡터 생산용 세포 기질에 제안된 시험 및 특성 규명 계획은 주 가이드라인 문서의 표 1과 많은 부분이 일치하지만 이런 제품 유형에는 추가로 고려할 부분이 있을 수 있으므로 완전성을 위해 이러한 사항을 아래 표 A-5에 정리하였다.

세포 기질 및 제조 공정과 관련된 특이적 위해성 요소를 고려한 위해성 평가에 따라 시험 유형과 정도에 차이가 생긴다. 그런 요소로 세포 기질 및 바이러스 벡터의 기원, 계대 이력 및 특성, 사용된 원료 물질 및 시약 및 배양 방법, 보조바이러스 의존도, 생산 공정의 바이러스 불활화 및 /또는 제거 능력을 고려해야 한다.

표 A-5: 해당 제조 단계에서 실시해야 하는 시험

시험	MCB, WCB, 체외 세포 연령 한계 시점 세포	바이러스 시드 ^k	미가공 벌크(수득물)	원료 의약품
외래성 또는 내인성 바이러스 시험				
a, b, <i>in vitro</i> 분석 또는 NGS	ⁱ 주 가이드라인의 표 1 참조	+ ^h	+ ^h	-
b, <i>in vivo</i> 분석 또는 NGS		+ ^h	- ^{h, j}	-
^{c, g} 외 바이러스 특이성 시험		1	1	-
^e 항체 생산 분석 또는 특이적 분자 분석		+ ^{j, l}	-	-
해당 시, 내인성, 보조, 복제 가능 바이러스 시험				
^a 레트로바이러스	ⁱ 주 가이드라인의 표 1 참조	+	+ ¹	-
잔류 보조바이러스	NA	-	+	+ 1

복제 바이러스	가능	+	+	(+)	(+)
------------	----	---	---	-----	-----

- a. 위해성 평가를 기반으로 허용 가능한 세포주에서 시험을 실시해야 한다. 지표 세포 배양은 최소 2주 동안 관찰해야 하며 추가로 2차 계대 배양을 하면서 2주 더 관찰해야 한다. 혈구흡착 및 혈구응집 바이러스 시험을 포함한다. 곤충 세포주에서 생산된 제품의 경우, 아르보바이러스 허용 세포주(예: BHK 세포)에 대한 시험이 포함되어야 한다. 바이러스 벡터 및 바이러스 벡터 유래 제품을 중화할 수 없는 경우에는 밸리데이션된 대체 분석법을 사용할 수 있다. 후속 처리 전에 바이러스 시드 및 미가공 벌크 수득물 시험을 실시해야 한다. 경우에 따라서는 미가공 벌크 수득물이 원료의약품과 동일할 수 있다.
- b. 해당되는 경우 광범위한 NGS가 체내 외래성 바이러스 시험을 대체하는 것으로 간주해야 하며, 분석 적합성 및 위해성 평가에 따라 *in vivo* 시험을 보완하거나 대체하는 시험으로 사용할 수 있다.
- c. 세포 기질, 원료 물질 또는 시약 및 제조 공정 위해성 평가를 기반으로 종 특이적 바이러스 검출(예: NAT 및 세포 배양 또는 표적 NGS)을 확인한다. 여기에는 사람 또는 설치류 종 특이적 바이러스, 곤충 세포의 아르보바이러스, 혈청 성분 또는 트립신이 사용되는 경우 소 또는 돼지 바이러스가 포함될 수 있다.
- d. 세포 기질, 원료 물질 또는 시약 및 제조 공정의 위해성 평가를 기반으로 항체 생산 시험(MAP, HAP, RAP) 또는 바이러스 특이적 NAT 또는 표적 NGS를 실시할 수 있다.
- e. MCB 및 바이러스 시드 단계에서 역전사효소 분석법을 사용해 레트로바이러스의 존재를 확인하는 것을 고려해야 한다. MCB 또는 바이러스 시드가 역전사효소 활성에 양성인 경우, 바이러스 클리어런스 목표 수준을 결정하기 위해 최소 3개의 세포 배양 캠페인에서 얻은 미가공 벌크 수득물에서 잠재적인 레트로바이러스 입자를 정량하는 과정이 후속 조치에 포함되어야 한다. 또한 위해성 평가를 근거로 미가공 벌크(수득)에서 PCR 기반 RT 분석(PBRT)(예: 제품 강화 역전사 분석, PERT)을 실시해야 한다.
- f. 생산에 활용될 때 보조바이러스는 바이러스 클리어런스 목표를 결정하기 위해 미가공 벌크 단계에서 최소 세 번의 세포 배양 캠페인으로 정량해야 한다. 정제 후, 민감한 바이러스 검출 관련 허용 세포주를 사용한 감염성 분석을 사용하여 검출 가능한 보조바이러스가 없는 것을 확인해야 한다. 또는 분자적 방법을 사용할 수도 있다. 각각의 정제 벌크에서 잔류 보조바이러스가 없는 것이 확인되어야 한다(Case F, 표 4).
- g. 제조 중 모든 단계에서 복제 가능 바이러스(RCV, Replication Competent Virus)가 나타날 수 있다(예: 초기 형질주입 또는 형질도입 단계 및 생산 단계). 현재는 재조합 또는 벡터 바이러스의 부모형 또는 야생형 표현형으로 복귀하는 것을 탐지하기 위해 제조 중 여러 단계에 RCV 시험을 포함시키도록 권고하고 있다. 제조 단계 및 시험 방법은 적용 가능 시점과 제품에 따라 달라진다. 예를 들어, RCV 시험은 안정적으로 형질주입된 벡터 생산자 또는 패키징 MCB 및 체외 세포 연령 한계 시점에서 유래된 세포와 상청액, 바이러스 시드 또는 세포 은행 적격성 평가 중에 실시한다. RCV 시험은 생산 과정에 적용하며, 벡터 생산 세포와 각각의 미가공 벌크 수득물의 상청액 또는 해당 시 각 원료 의약품/최종 로트에서 시험을 실시한다. 예를 들어, 복제 가능 바이러스 시험은 일반적으로 검출 가능성을 보장하기 위해 미가공 벌크 수득물에서 실시하거나 표에서 (+)로 표시된 AAV(Adeno-Associated Virus) 기반 제품에 대한 원료 의약품 단계에서 실시한다.
- h. 분석 간섭이 발생할 가능성이 있다면 바이러스 시드 및 미가공 벌크 수득 단계에서 병행 배양한 대조 세포를 시험한다.
- i. 곤충 기원 세포주의 경우 종 특이적 바이러스 및 아르보바이러스에 대한 시험을 실시해야 한다. 생산용 세포 기질에서 바이러스 검사를 위해 취해야 할 조치 단계는 표 4(Case B, C 및 E)를 참조한다.
- j. 세포 기질/세포 은행을 시험하지 않았다면 시험을 실시해야 한다
- k. 제품 유형에 따라 바이러스 시드로 백신 바이러스, 바이러스 벡터 또는 보조바이러스를 제조할 수 있다. 바이러스 시드는 확립된 세포주에서 만든다. 위해성 기반 접근법에 어긋나지 않도록, 외래성 바이러스가 세포 기질에서 유래하지 않고 RCV가 없다는 것을 증명하기 위해 세포주의 기원 물질과 바이러스 시드 준비용 원료 물질 및 시약에서 바이러스 시험을

실시하는 것도 고려해야 한다. 가공 전 바이러스 시드에서 시험을 해야 한다. 제조용 바이러스 시드(Working Virus Seed, WVS)는 MVS에서 직접 파생된 것이므로, 위해성 평가를 기반으로 외래성 인자 하위 집단 시험을 적용한다. MVS가 아닌 각각의 WVS에서 전체 시험을 실시하는 대체 접근 방식도 허용된다.

I 위해성 평가에 기반한 시험

(+) 대체 시험 단계

NA 해당 없음

7.3 바이러스 클리어런스

가능하다면 본 가이드라인의 일반 원칙에 따라 보조바이러스와 단백질 발현 벡터와 같이 생산 과정에 사용되는 외래성 바이러스와 바이러스 잔류물 오염 위해성을 완화해야 한다.

대표성이 있고 적절한 규모 축소 시스템을 사용해 바이러스 클리어런스를 밸리데이션해야 한다.

바이러스 벡터 및 바이러스 벡터 유래 제품의 물리화학적 특성에 따라 제품 정제 계획 범위에서 바이러스 클리어런스 적용 방식을 결정한다. 바이러스 클리어런스 밸리데이션에는 외래성, 내인성 및 가능한 경우 관련 보조바이러스를 대표하는 모델 바이러스를 포함해야 한다. 5항 및 6항(사전 지식 적용 포함)은 표 4에 설명된 특이적 및 비특이적 모델 바이러스 선택을 위한 행동 계획을 사용하여 적용한다. 외피가 없는 바이러스 벡터 등과 양립되는 제품이라면, 계면활성제 또는 용매/계면활성제로 처리하는 등의 일반적인 바이러스 불활화 단계가 적합할 수 있다. 아니면, 크기 배제를 기반으로 바이러스를 제거할 수 있는 AAV 또는 나노 입자 기반 백신과 같은 소형 바이러스 벡터는 바이러스 여과가 더 적합한 방법일 수 있다. 적절한 경우 생산 공정의 관련 단계에서 바이러스 감소율을 확인하는 바이러스 클리어런스 시험을 실시해야 한다.

예를 들면 다음과 같다.

- 배쿨로바이러스/곤충 세포를 사용해 생산된 아단위 단백질과 VLP는 정제할 수 있으며, 제조 공정을 통해 높은 수준의 바이러스 로그 감소율을 달성할 수 있다. 이는 바이러스 클리어런스 시험으로 밸리데이션된다.
- AAV와 같은 일부 바이러스 벡터 제품은 강력한 바이러스 클리어런스 단계를 통해 외래성 및 보조바이러스를 불활화 또는 제거하는 클리어런스 단계를 보장한다.

보조바이러스는 공정 관련 바이러스 오염 물질로 간주된다. 제조 공정은 충분한 보조바이러스 클리어런스를 보장해야 한다. 위해성 평가를 기반으로 적합한 로그 감소율을 결정할 수 있다.

생산 중에는 바이러스 클리어런스 단계가 재조합 단백질과 동일한 견고성을 달성하지 못할 수 있으므로, 이런 제품은 폐쇄 가공, 시험 및 기타 예방적 관리에도 바이러스 안전성이 좌우된다(2.2, 3, 4항 참조).