



힘내라
대한민국

불활화 폴리오 백신 평가 가이드라인(안)

Guideline on Evaluation of Inactivated Poliomyelitis Vaccines

2020. 10. OO



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

바이오생약심사부 생물제제과

지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭

불활화 폴리오 백신 평가 가이드라인(민원인 안내서)(안)

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"/> 1년 이내 한시적 적용 또는 일회성 지시·명령에 해당하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 외국 규정을 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"/> 내부적으로 행정사무의 통일을 기하기 위하여 반복적으로 행정사무의 세부기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	<input type="checkbox"/> 예(☞지침서) <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 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.	
<p>상기 사항에 대하여 확인하였음.</p> <p style="font-size: 1.2em;">2020년 10월 00일</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="text-align: center;"> <p>담당자 확 인(부서장)</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>배창준 김재욱</p> </div> </div>		

이 안내서는 불활화 폴리오 백신 평가 시 고려사항에 대하여 알기 쉽게 설명하거나 식품의약품안전처의 입장을 기술한 것으로 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아닙니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술 방식('~하여야 한다' 등)에도 불구하고 민원인 여러분께서 반드시 준수하셔야 하는 사항이 아님을 알려드립니다. 또한, 본 안내서는 2020년 10월 〇〇일 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 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것(식품의약품안전처 지침서등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전평가원 바이오생약심사부 생물제제과에 문의하시기 바랍니다.

전화번호 : 043-719-3451

팩스번호 : 043-719-3450

제·개정 이력서

불활화 폴리오 백신 평가 가이드라인(민원인 안내서)(안)

연번	제·개정번호	발행일자	주요내용
1	안내서-0000-00	2020.10.00	제정

목 차

용어설명	7
1. 서론	11
1.1. 목적 및 배경	11
1.2. 범위	12
2. 품질 평가	13
2.1. 정의	13
2.2. 제조 관련 고려사항	15
2.3. 기원물질의 관리	16
2.4. 백신 생산 관리	22
2.5. 충전 및 용기	36
2.6. 완제의약품 관리	36
3. 비임상 평가	42
3.1. 약독화된 바이러스주로부터 유래한 시드로트의 특성분석	42
3.2. 항원성 프로파일	42
3.4. 약독화 바이러스주에서 유래한 IPV에서 D-항원 함량	42
3.5. 면역원성 시험	43
3.6. 안전성 시험	43

4. 임상 평가	44
4.1. 일반적인 고려사항	44
4.2. 면역원성 시험	44
4.3. 다른 백신과 동시접종	47
4.4. 허가 전 안전성 자료	47
4.5. 시판 후 감시활동	48
[부록 1] IPV 생산에 사용되는 바이러스 시드에 대한 개요	49
[부록 2] IPV <i>In vivo</i> 역가시험	55
[참고문헌]	57

용어설명

- **경구용 폴리오 백신(Oral Poliomyelitis Vaccine, OPV)** : 사빈주를 경구 투여하는 제형의 폴리오 백신
- **개체별 바이러스 부유액(Single harvest)** : 동일 WCB의 세포 배양액에서 수확하여 단일 생산 작업으로 조제된 하나의 바이러스 타입의 현탁액.
- **기하평균항체가(GMT, Geometric Mean Titre)** : 모든 값을 곱하고 이 수치의 n차 루트 값을 취해(여기서 n은 가용한 자료가 있는 시험대상자의 수), 시험대상자 집단에 대한 평균 항체 역가를 계산하는 방법.
- **단가원액(Monovalent pool)** : 동시에 처리된 같은 유형의 바이러스의 개체별 바이러스 부유액을 모아 놓은 풀.
- **마스터 세포 은행(Master Cell Bank, MCB)** : 특성 분석을 충분히 실시한 사람 또는 동물에서 유래한 일정량의 세포로, 특정 PDL(Population Doubling Level) 또는 특정 계대 수준의 세포 시드로 만들어 여러 용기에 소분하고 동결 보존하는 균일한 조성의 분액으로서, 액체질소의 가스층 또는 액체층과 같은 지정된 조건에서 냉동 보관한다. MCB는 세포들을 균질하게 혼합한 단일 풀에서 제조되며, 모든 WCB의 제조에 사용된다. 대체(동일한 클론이나 기존의 MCB 또는 WCB로 제조한) MCB에 대해 수행하는 시험은 정당한 예외 사유가 없는 한 원래의 MCB에 대해 수행하는 시험과 동일하다.
- **면역증강제(Adjuvant)** : 백신의 임상적 효과와 백신 항원의 특이적 면역반응을 증진(증강, 가속화, 장기화 및/또는 표적화)시키기 위해, 백신 항원과 연계하여 사용하는 성분 또는 성분의 조합.
- **바이러스 마스터 시드 로트(Virus Master Seed Lot, MSL)** : 균일한 조성을 보장하기 위해 동시에 처리하고, 식약처가 승인한 최대횡수를 초과하지 않은 범위 내에서 일정 횡수로 계대한 바이러스 현탁액. 바이러스 제조용 시드 로트(WSL)를 구축하는 데 필요한 범위 내에서 특성 분석이 실시된다.

- **바이러스 제조용 시드 로트(Virus Working Seed Lot, WSL)** : 적절한 시간 내에 세포변형 효과가 확인된 MOI(multiplicity of infection)에서 만들어진 마스터 바이러스 시드 로트 (MSL)로부터 만들어진 다량의 균일한 바이러스로, 백신의 제조를 위해 식약처가 승인한 계대 수준에서 구축한다.
- **불활화 정제 단가원액(Inactivated purified monovalent pool)** : 검증된 방법을 사용하여 불활화하고 여과와 정제를 거친 단가 원액.
- **불활화 폴리오 백신(Inactivated Poliomyelitis Vaccine, IPV)** : 폴리오 바이러스를 불활화 하여 제조한 폴리오 백신
- **사빈주 불활화 폴리오 백신(Sabin poliovirus strain Inactivated Poliomyelitis Vaccine, sIPV)** : 야생주(Wild poliovirus strain)를 약독화 시켜 neurovirulence와 transmissibility를 낮춘 사빈주(Sabin poliovirus strain)로 제조된 IPV
- **삼가원액(Trivalent bulk)** : 3 종류의 바이러스 타입을 모두 포함하여, 각 타입 별로 정해진 D-항원 함량을 충족하도록, 여러 불활화 정제 단가원액들이 동시에 투입되어 제조된 풀.
- **생산 세포 배양액(production cell cultures)** : IPV의 생산에 사용되는 하나 이상의 WCB의 용기로 이용하여 제조한 세포 배양액.
- **세포 은행(Cell bank)** : 지정된 조건에서 보관되는 균일한 조성의 내용물을 포함한 적절한 용기들의 집합체. 각 용기는 단일 세포 풀을 소분한 것이다. 각 용기(예, 앰플, 바이알)는 세포를 채취한 세포 풀을 대표해야 하고, 동일 절차에 따라 동일 장비와 시약을 사용하여 동일한 일자에 냉동시켜야 한다.
- **세포 시드(Cell seed)** : 사람 또는 동물 유래의 단일 조직이나 세포에서 유래되고, 특성 분석이 충분히 실시된 일정량의 세포를 의미하며, 균일한 조성의 소분 상태로 액체 질소를 이용해 냉동 보관한다. 이 가운데 하나 이상을 마스터 세포 은행(MCB)의 생산에 사용할 수 있다.
- **야생주 불활화 폴리오 백신(Wild poliovirus strain Inactivated Poliomyelitis Vaccine, wIPV)** : 야생주 폴리오 바이러스주를 사용하여 제조한 IPV

- **완제의약품(Final lot)** : 충전 과정 중의 오염 위험성을 고려하여 제조된 균질한 상태인 최종 백신의 밀봉된 최종 용기들의 집합체. 따라서 모든 최종 용기는 최종 원액의 단일 용기로부터 1회 작업으로 충전되어야 한다.
- **외래성 인자(Adventitious agents)** : 세포배양액의 오염미생물 또는 그 배양에 사용된 기원물질의 오염미생물로 제조공정에 의도치 않게 유입된 세균, 진균, 마이코플라스마, 내인성/외인성 바이러스 등이 해당된다.
- **정제 바이러스 부유액(Purified monovalent pool)** : 동시에 처리된 같은 유형의 바이러스 개체별 바이러스 부유액들로 구성되고 농축과 정제를 거친 풀.
- **제조용 세포 은행(Working Cell Bank, WCB)** : 정해진 계대 횟수를 거친 하나 이상의 MCB 앰플로 만들어 균일한 조성의 세포로, 소분하여 -70°C 또는 그 밑의 온도에서 냉동 보관한다. 이중 하나 이상이 백신의 생산에 사용될 수 있다. 모든 용기는 동일하게 취급해야 하고, 보관 장소에서 일단 꺼내면 다시 집어넣지 않는다.
- **최종원액(Final bulk)** : 최종 제품 용기에 충전되는 최종 백신. 하나 이상의 삼가 원액으로 조제될 수 있다.
- **폴리오(Polio)** : 소아마비
- **항체양전(Seroconversion)** : 사전에 정한 혈청 항체 농도 또는 역가의 증가. 백신접종 전에 검출 가능한 항체가 없는(최저 검출한계 이하인[LLOD]) 또는 정량 가능한 항체가 없는(최저 정량한계 이하인[LLOQ]) 시험대상자들에서 항체양전은 주로 백신 접종 후 정량 가능한 항체 수준에 도달하는 것으로 정의된다. 백신 접종 전에 정량 가능한 항체 수준을 가진 시험대상자들의 항체양전은 흔히 백신 접종 전후에 미리 정한 배수로 증가하는 것으로 정의된다.
- **항체양전률(Seroconversion rate, SCR)** : 전체 시험대상자 중 항체양전된 시험대상자의 비율
- **CCID50(Cell-culture infective dose 50%)** : 세포배양액의 50%를 감염시킬 수 있는 바이러스 현탁액의 양.

- **D-항원(D-antigen)** : 수크로오스 구배(Sucrose gradient) 분획물에 존재하는 항원으로서, 중화항체의 표적인 토종(Native) 바이러스 입자에서 발견되는 항원이다. 초기 D-항원 단위는 D-항원 특이적 다클론 혈청(D-antigen-specific polyclonal sera)을 이용하여 수행된 한천 침강소 시험(Agar precipitin test)을 기초로 하여 정의되었다. 중심에서 25mm의 거리에 있는 침강소라인(Precipitation line)을 나타내는 백신제제는 특정 농도에서 특정 항체를 사용하여 600 D-항원 단위의 값으로 임의로 지정되었다. 이 시험은 표준품의 최초 교정 시 사용되었다. IPV의 D-항원 함량은 현재 ELISA로 측정된다.
- **ICP(Immunological correlate of protection)** : 흔히 임상적으로 명백한 감염성 질환에 대해 백신에서 유도된 예방과 상관관계가 있는 면역반응의 유형(Type) 및 양(amount)이라고 정의되며, 임상 유효성을 예측하는 것으로 간주된다. 일부 백신 유형의 경우, ICP는 감염에 대한 백신 유도 방어와 상관관계가 있는 면역반응의 유형 및 양이 될 수 있다(예, A형 및 B형 간염 백신). ICP는 기전적(Mechanistic)일 수도 있고(즉, 바이러스를 중화시키는 항체 또는 혈청 살균 항체와 같이 방어와 인과관계가 있는 경우) 비기전적(non-mechanistic)일 수도 있다(즉, 백신접종으로 예방된 사람들에게서 인과 관계가 없는(non-causative) 면역반응이 발생하는 경우, 예를 들면 대상포진의 방어 상황에서 수두 대상포진 바이러스(VZV)에 대한 혈청 면역글로불린 G(IgG)가 방어의 척도가 되지 않는다).

불활화 폴리오 백신 평가 가이드라인(안)

1. 서론

1.1. 목적 및 배경

이 가이드라인은 IPV 개발사 또는 제조사에게 IPV의 품질 및 안전성·유효성 평가 시 권고 사항을 제공하기 위해 마련되었다.

폴리오는 세 가지 폴리오 바이러스 혈청형(1형, 2형, 3형)에 의해 발생하는 급성 전염병이다. 폴리오 바이러스는 피코르나바이러스과의 C종 엔테로바이러스로 분류되며, 외가닥의 양성 RNA 유전체와 단백질 캡시드로 구성된다.

위생관리가 취약한 경우에는 대변 대 구강 전염이, 위생기준이 높은 경우에는 구강 대 구강 전염이 더 흔하게 발생한다. 대부분의 환경에서는 이 두 가지가 혼재된 전염이 발생한다. 주로 5세 미만의 소아에서 발생하며, 소아마비 감염 사례의 약 0.5%에서 불가역적인 마비 증상을 일으킨다. 또한, 마비 환자 중 5%에서 10%는 호흡근 마비 발생으로 사망에 이르기도 한다. 현재까지 소아마비의 치료법은 알려져 있지 않으므로, 백신 접종이 유일한 소아마비 예방법이다.

1988년 이후 폴리오 박멸에서 진척을 보인 것은 대부분 백신을 널리 사용한 덕분이었다. 최초의 폴리오 백신은 1955년 Salk에 의해 야생주를 불활화하여 근육 또는 피하 투여하는 wIPV가 개발되었으며, 그 후 Sabin에 의해 폴리오 바이러스를 약독화한 바이러스주를 이용한 OPV가 개발되어 미국에서 1961년에 단가에 대하여 그리고 1963년 삼가에 대하여 허가 받았다.

1988년 5월, WHO 총회에서는 2000년까지 전 세계의 소아마비를 박멸하기로 결의하였고, 글로벌 폴리오 박멸 이니셔티브(Global Polio Eradication Initiative, GPEI)를 세웠다. 1988년 이후에는 전 세계적으로 폴리오 백신이 지속적으로 사용되어, 전 세계의 소아마비의 발생률이 99%이상 급격히 줄어들었다.

한편 약독화된 생바이러스를 사용하는 OPV의 접종은 마비성 폴리오 (Vaccine-Associated Paralytic Poliomyelitis, VAPP)가 발생시킬 우려가 있어서, 완전한 폴리오 바이러스 박멸을 위해 정기 예방접종사업에서 점차적으로 OPV를 wIPV로 바뀌 사용하기 시작하였다.

wIPV의 제조에 사용된 병원성이 강한 야생주 폴리오 바이러스와 관련된 생물안전 및 생물보안 우려를 완화시키기 위해, IPV의 생산에 약독화 바이러스주를 사용하자는 제안이 있었다. 현재 여러 국가의 제조업체들이 사빈주나 유전자재조합 기술로 얻은 약독화 바이러스주를 사용한 IPV를 개발하고 있고 일부는 허가되어 사용되고 있다.

1.2. 범위

본 가이드라인의 적용 범위에는 wIPV 및 sIPV가 포함된다. 유전자재조합 기술 유래의 바이러스주를 비롯하여 바이러스 유사 입자(Virus-Like Particles, VLPs)와 레플리콘 (Replicons)을 기반으로 하는 폴리오 백신은 포함되지 않는다.

디프테리아독소이드-파상풍독소이드와 같은 다른 백신과 혼합한 불활화 폴리오 백신 사용 증가로 인해 불활화 폴리오 백신 독립형 제품으로 사용될 때 논의 되지 않던 사항들(예, 폴리오 바이러스 항원과 다른 항원 및/또는 면역증강제와의 상호작용)에 대한 고려사항들은 '디프테리아·파상풍 포함 혼합백신의 품질 및 안전성·유효성 평가 가이드라인(식약처, 2014)'을 참고하며, 이 가이드라인에서는 다루지 않는다.

본 가이드라인의 내용은 현재의 과학적 수준에 기반해 작성되었고 새로운 과학적 정보에 따라 변경될 수 있으며, 본 가이드라인 및 참고문헌에서 언급되지 않은 부분에 대해 추가적인 기준이 필요한 경우 반드시 식약처와 사전에 논의를 거쳐 적절한 평가자료가 마련되어야 한다.

2. 품질 평가

2.1. 정의

2.1.1. 서술적 정의

IPV는 세포배양으로 증식, 농축, 정제, 불활화 한 폴리오바이러스 1형, 2형, 3형의 무균 액상제제로 구성되어야 한다. 본 제제는 다음에 나오는 모든 권고사항을 충족해야 한다.

2.1.2. 국제 표준품

wIPV의 D-항원 함량을 측정하는 *in vitro* 시험에는 WHO 국제표준품을 사용할 수 있다. 그러나 몇몇 연구에서 제조사 및 관리 연구실이 채택한 다양한 ELISA 시험법 시행 시 wIPV 및 sIPV 제품에 대하여 항체 시약의 반응성에 차이가 있음을 밝혀졌다. 이는 이중 참조품(Heterologous reference, 즉 sIPV에 야생형 참조품 또는 wIPV에 사빈 참조품) 사용 시 IPV 제품의 역가 결과에 시험실간 많은 차이(Variability)을 보였던 것이다. 이러한 이유로, sIPV 제품 특이적인 새로운 국제표준품을 2018년 확립하였으며, 새로운 항원단위인 사빈 D-항원 단위(Sabin D-Antigen Unit(SDU))에 대하여 정의하였다(1). 이렇게 결정된 새로운 단위는 wIPV의 역가에 표현되어 사용되는 D-Ag unit(DU)와 상관성이 없다. wIPV 및 sIPV 국제표준품은 각각 wIPV의 D-항원 함량과 sIPV의 D-항원 함량을 계산하는데 사용되는 역가시험에 이용되는 2차 표준물질의 함량 보정에 사용된다. 현재는 표준화된 ELISA 시험법이 없어서 표준화된 시약 및 프로토콜을 개발하는데 노력하고 있다. 랫드를 이용한 *in vivo* 역가시험 관리를 위한 국제표준품 및 참조시약에 대한 검토 역시 진행 중이다.

IPV의 국제참조품(International Reference Preparation, IRP)은 1962년 WHO ECBS에서 확립하였다(2). 이 참조품은 1959년 폴리오 1형(Mahoney), 2형(MEF), 3형(Saukett) 바이러스주로부터 원숭이 신장 초대 세포(Primary monkey kidney cells)를 사용하여 제조한 삼가 혼합액이다.

국제참조품 제조 이후, IPV 생산 및 관리 부문의 상당한 진보가 진행되어 역가 및 순도가 향상된 백신이 개발되었다. 네덜란드 국립환경공중보건연구소(RIVM)에서 개발된 개량(enhanced) 역가의 IPV(PU78-02)가 품질관리 시험용 참조품으로 널리 사용되었다. 이 시약 비축분이 거의 소진되었을 때, 1994년 WHO ECBS에서 IPV의 *in vivo* 및 *in vitro* 시험을 위한 새로운 2차 WHO 국제참조시약(91/574)을 확립하였다(3). 이 국제참조시약은 폴리오 바이러스 1형, 2형 및 3형에 대하여 mL당 각 430, 95, 285 D-항원 단위의 역가가 설정되었다. 유럽약전위원회(European Pharmacopoeia Commission)에서 생물학적 참조품 배치 1(Biological Reference Preparation(BRP) batch 1)로 확립한 별도의 분주(Separate aliquot)는 위에서 설정한 것과 동일한 역가(titre)를 지닌다(4). 2003년에는 상업용 IPV 백신의 농축 삼가 원액에서 수득한 물질을 BRP 배치 2로 확립하면서, 1형, 2형 및 3형에 대하여 mL당 320, 67, 282 D-항원단위의 역가를 설정하였다(5). 91/574의 일부 바이알에서 성능의 일관성 문제가 발견되어, 2010년 이 참조시약 사용이 중단되었다. 2013년, WHO ECBS는 BRP 배치 2를 참조품으로 사용하는 연구를 진행하여 불활화 폴리오 백신을 위한 3차 WHO 국제표준품(the Third WHO International Standards)(12/104)을 확립하였다. 폴리오바이러스 1형, 2형 및 3형에 대하여 mL당 277, 65, 248 D-항원단위의 역가가 설정 되었다(6).

2015/2016년에 진행한 공동연구에서는, 전통적인 IPV에 대한 국제표준품(12/104)이 sIPV 제품의 역가 측정을 위하여 적합하지 않음이 밝혀졌다. 유효하지 못한 시험(invalid assay)의 비중이 비교적 높았으며 실험실간 역가 결과에 큰 차이를 보였다. sIPV 검체를 sIPV 연구 검체에 대한 역가를 결정할 때 참조품으로 사용하는 경우 실험 편차 및 실험실간 차이가 개선되었다. 따라서 sIPV 제품에 특이적인 WHO 국제표준품을 새롭게 확립하기로 하였다. Sabin 불활화 폴리오 백신에 대한 제1차 WHO 국제표준품(17/160)은 2018년 WHO ECBS에서 확립되었다. 역가 단위는 각 폴리오바이러스 혈청형별로 모두 100 SDU/mL로 설정하였다(1). 여기서 100이란 숫자는 인위적인 단위이다.

IPV의 표준화에 관한 과학적 견해에 차이가 여전히 존재하며, IPV 제품 사이에 차이가 발견되어 왔으므로, 미래 IPV 백신, 특히 sIPV 평가에는 현재의 국제표준품에 대한 제품 특이적인 평가가 중요하다(7-11).

항(抗)폴리오 제1형 및 2, 3형 항체(인간)에 대한 국제표준품이 폴리오 바이러스에 관한 중화항체 시험 표준화를 위하여 사용이 가능하다(12).

1963년 WHO ECBS는 생바이러스 부유액을 리서스 원숭이에 고(高)접종(hyper-immunization)하여 혈청형에 특이적 다클론 항혈청(polyclonal antisera)을 생산하고, 이를 사용하여 항폴리오 혈청 1형, 2형, 3형에 대한 1차 국제표준품(International Standards, IS)을 확립하였다(13). 각 표준품은 1개의 혈청에만 특이적이다. 공동연구를 통해 확립하였고(6), 각 폴리오 혈청형에 대하여 단위량 10 IU/vial을 설정하였다.

1989년 경, 이 국제표준품의 재고가 매우 줄어들자(특히 3형), 대체를 위한 공동연구가 수행되었다(14). 1형, 2형, 3형에 대한 항 폴리오 혈청의 2차 국제표준품(66/202)은 1991년 WHO ECBS에서 확립되었다. 기존 표준품과는 대조적으로, 대체 표준품은 3가지 폴리오바이러스 혈청형에 활성을 보이는 단일 혈청이었다. 다음 단위량이 설정되었다: 항폴리오바이러스 혈청(1형)/인간, 25 IU; 항폴리오바이러스 혈청(2형)/인간, 50 IU; 항폴리오바이러스 혈청(3형)/인간, 5 IU. 66/202의 비축분 고갈에 따라, 2006년 WHO ECBS는 항폴리오바이러스(인간) 혈청형 1형, 2형, 3형에 대한 3차 국제표준품(82/585)을 확립하였고, 이들에 대하여 각각 단위량 11, 32, 3 IU/vial의 중화항체가를 각각 설정하였다(15).

위에 열거한 국제표준품은 NIBSC(Potters Bar, UK)에서 제공 가능하다. WHO 국제표준품 및 참조물질에 대한 최신정보는 WHO 카달로그(16)를 참조한다.

2.2. 제조관련 권고사항

「의약품 등의 안전에 관한 규칙」 별표 1 의약품 제조 및 품질관리기준 및 별표 3 생물학적제제등 제조 및 품질관리기준, 「의약품 제조 및 품질관리에 관한 규정」을 따른다.

IPV의 생산 및 품질 관리에 관여하는 자는 세 가지 유형의 폴리오바이러스에 면역력이 있는 것이 입증되어야 하며, 제조업체는 생바이러스를 포함한 미완성된 의약품이 부주의하게 유출되지 않도록 적절한 대응관리 방안을 마련하여야한다

2.3. 기원 물질의 관리

2.3.1. 바이러스주 및 시드로트 시스템

다음에 나오는 모든 권고사항을 충족하는 백신에 한하여 국제 명칭을 사용한다.

2.3.1.1. 바이러스주

IPV의 생산에 사용되는 폴리오 바이러스주는 그 유래 및 관련 정보 등을 포함하여 이력기록이 확인되어야 하며 감염성 시험(Infectivity test)과 면역학적 방법을 통해 바이러스주는 확인되어야 한다. 또한 사빈주는 염기서열분석으로 확인되어야 한다. 백신생산에 사용되는 바이러스주는 식약처와 협의하여야 한다.

2.3.1.2. 바이러스 시드로트 시스템

백신 생산은 바이러스 시드 로트 시스템을 토대로 이루어진다. 달리 타당한 근거가 제시되거나 허가된 것이 아니라면, 최종 백신의 바이러스는 백신을 제조할 당시의 안전성 및 유효성, 생물봉쇄기준을 충족한다고 입증된 계대보다 더 많이 계대를 해서는 안 된다. 바이러스 MSL 및 WSL는 보관안정성이 입증된 온도(예, -60°C 이하)에서 온도가 모니터링 되는 전용 냉동고에 보관한다.

2.3.1.3. 바이러스 MSL 및 WSL 시험

백신 배치의 생산을 위해 사용되는 각 바이러스 MSL과 WSL는 이 항에 소개된 시험과 개체별 바이러스 부유액(2.4.3.1~2.4.3.3)에 적용되는 특정 시험을 거쳐야 한다. 또한 세포주(2.3.2)와 세포배양배지(2.3.3)의 권고사항을 준수하여야 하며, 식약처와 협의하여야 한다.

2.3.1.3.1. 토끼 신장 세포 배양액 시험

원숭이 신장 초대 세포(primary cell)에서 사전에 계대된 바이러스주로부터 얻은 마스터 시드의 경우만 해당됨.

원숭이 신장 초대 세포에서 사전에 계대된 바이러스 마스터 시드는 헤르페스 B 바이러스(Herpes B virus)와 그 외 다른 바이러스의 존재에 대해 토끼 신장 세포 배양액으로 시험을 실시한다. 이때 바이러스 시드 최소 10mL를 검체로 사용한다. 배양배지에 사용되는 혈청은 지표 바이러스로 단순성 헤르페스 바이러스(Herpes simplex virus)를 사용하여 B 바이러스 억제제가 없음을 입증한다. 혼합액을 세포 배양액이 담긴 배양 용기에 접종하며, 이때 혼합액이 배양배지에서 희석되는 정도는 1/4를 넘지 않게 한다. 세포 시트의 부분은 혼합액의 최소 3cm²/mL는 되어야 한다. 세포 배양의 각 종류마다 최소 1개의 세포 배양 용기를 미접종 상태로 유지하여 대조군으로 사용한다.

접종 배양과 대조 배양은 37°C에서 배양하고, 최소 2주간 적절한 간격을 두고 관찰한다.

시험이 유효하기 위해서는, 특별한 사유 없이 시험 기간의 종료 시까지 배양 용기의 20%를 초과하여 사멸해서는 안 된다. 토끼 신장 세포의 각 배치의 민감도는 유효성이 확인된 양만큼 단순성 헤르페스 바이러스를 챌린지하여 입증한다. 챌린지 시험은 식약처와 협의하여야 한다.

2.3.1.3.2. 외래성 바이러스 및 검출 가능한 SV40 서열 부정시험

2.3.1.3.2.1. 세포배양에서 외래성 바이러스 시험

백신 배치의 생산을 위해 사용되는 바이러스 MSL와 WSL는 세포배양 분석에서 외래성 바이러스가 없어야 한다.

외래성 인자 확인을 위해서 최소 40mL의 MSL와 WSL 검체를 사용하여 시험한다. 검체는 고농도의 Type 특이적인 항혈청으로 중화되어야 한다.

단클론 항체가 이 시험에서 유용할 수 있다.

다클론 항혈청이 사용되는 경우 Sabin주는 항혈청의 제조를 위해 면역항원으로 사용될 수 있다. 그러나 항혈청의 제조를 위해 사용되는 면역항원은 생산 시드와 같아서는 안 된다.

면역항원은 외래성 인자가 없음이 증명되어야 하고, 외래성 미생물성 인자가 없는 세포 배양 환경에서 증식되어야 한다. 외래성 미생물성 인자는 개체별 바이러스 부유액에 존재하는 외래성 인자들의 증식을 억제할 수 있는 항체를 유도하기 때문이다.

검체는 원숭이(*Cercopithecus* sp.) 신장 초대 세포 배양 또는 SV40 바이러스에 대해 동일한 민감성이 입증된 세포와 사람 이배체세포를 이용하여 증명한다. 세포는 37°C에서 배양하고 2주간 관찰한다. 이 관찰 기간이 끝나면 상등액의 계대배양(subculture)이 최소 하나 이상 동일한 세포 배양시스템에서 이루어져야 한다. 검체를 접종하며, 이때 상등액이 배양배지에서 희석되는 정도는 1/4를 넘지 않게 한다. 세포 시트의 면적은 혼합액의 최소 3cm²/mL는 되어야 한다. 세포 배양의 각 종류마다 최소 1개의 세포배양용기를 미접종 상태로 유지하여 대조군으로 사용한다. 접종 세포와 대조 배양액은 37°C에서 배양하여, 추가로 2주간 적절한 간격을 두고 관찰한다.

필요할 경우, 혈청을 이 단계의 일차 배양에 추가할 수 있다. 단, 혈청이 SV40 항체나 다른 억제제를 포함하지 않아야 한다.

외래성 인자가 존재한다는 증거가 없으면 바이러스 MSL와 WSL는 적합하다. 시험이 유효하기 위해서는, 특별한 사유 없이 시험 기간 종료 시까지 배양 용기의 20%를 초과하여 사멸해서는 안 된다.

외래성 인자의 검출을 위해 다음과 같은 새로운 분자시험법이 개발 중이며, 기존의 방법을 보완하거나 적절한 밸리데이션 후에 식약처와 협의하여 *in vivo* 및 *in vitro* 시험에서 대체 방법으로 사용될 수 있다(17) (a) 혼성화(hybridization), 염기서열 분석법, 또는 질량분석법에 의한 증폭산물(amplicon)의 분석과 전체 바이러스 계통에 대한 축퇴성 핵산증폭기술(degenerate NAT), (b) 무작위 프라이머(random primers)를 이용한 NAT 이후에 보존되는 바이러스 염기서열 분석법에 대한 대형 올리고뉴클레오티드 마이크로어레이(oligonucleotide microarrays) 또는 발현된 유전자배열의 디지털 감산(digital subtraction)에 대한 증폭산물의 분석, (c)HTS(high-throughput sequencing). 소의 혈청이나 돼지 트립신을 사용하여 얻을 수 있는 시드 로트에서 사람, 원숭이, 소 또는 돼지의 외래성 인자의 존재 가능성에 대한 이론상의 위험성이 평가되어야 한다. 필요하다면 소 폴리오마바이러스(bovine polyomavirus), 돼지 파보바이러스(porcine parvovirus), 돼지 썬코바이러스(porcine circovirus, PCV)와 같은 바이러스에 대해 특이 분석(예, 분자 NAT 기반 분석법 등)을 이용하여 검사해야 한다(17).

2.3.1.3.2.2. 검출 가능한 SV40 서열 부정시험

바이러스 MSL는 식약처처와 협의된 분자 NAT 기반 분석법과 같은 밸리데이션 된 특정 분석법을 통해 검출 가능한 SV40 서열이 없음이 입증되어야 한다.

SV40의 DNA는 분자 생물시약으로 널리 사용되고 있으며, PCR 분석법의 오염은 중요한 문제가 될 수 있다. 한 가지 방법은 SV40의 별도의 유전체 영역의 증폭을 확인하고 스크리닝 목적으로 한 영역을 사용하고, 반복 양성검체의 확인을 위해 다른 영역을 사용하는 것이다. 두 번째 유전체 영역이 고유의 서열을 가지고 있고 그 양성의 결과가 시험기관의 SV40의 오염으로 인한 것이 아닐 경우 다른 분리균간의 차이를 확인하는데 사용가능(유용)하다. 사용된 유전체 영역에 대해서는 PCR 분석법의 민감도를 확인한다.

2.3.1.3.3. 사빈주를 이용한 약독화 균주의 시드에 대한 추가시험

약독화 생바이러스 사빈주를 백신 생산에 사용한다면, OPV 생산을 위한 밸리데이션하여 확립된 마스터 시드를 출발물질로 사용해야 한다. 약독화 표현형을 유지하기 위해서 온도, 배양기간, MOI(multiplicity of infection) 등을 포함한 생산 시드 배양 조건은 잘 정의되고 조절되어야 한다. OPV 생산을 위한 조건이 sIPV 생산에도 적합하다. 또한, 세포배양으로 증식한 바이러스가 바이러스 시드의 약독화 마커를 유지하고 있음을 확인하는 시험을 시행해야 한다. 일반적 고려사항에서 기술한 바와 같이 IPV 제조에 사용한 마스터 시드 사빈 바이러스와 제조용 시드의 전체 공통 염기서열을 확인하여 동일함을 증명해야 한다. 대체 방안으로는 약독화 표현형 확증을 위하여 다른 *in vitro* 시험(MAPREC 혹은 deep sequencing) 혹은 *in vivo* 시험(원숭이 혹은 형질전환 마우스 신경 병원성 시험)을 시행할 수 있다. 이러한 시험에 관한 기준은 반드시 식약처와 협의하여야 한다.

사빈주를 이용한 약독화 균주를 포함해서 확립된 마스터 시드로부터 유도된 새로운 제조용 시드는 적어도 연속 3배치의 정제 단가 원액풀에 대해서 바이러스의 분자적 특성(예, 전체 염기 서열 분석)에 대해서 모니터하여 분석해야 한다.

2.3.2. 세포주

「의약품 등의 안전에 관한 규칙」 별표 1 의약품 제조 및 품질관리기준 및 별표 3 생물학적제제등 제조 및 품질관리기준, 「의약품 제조 및 품질관리에 관한 규정」을 따르며, 추가적으로 생산 시 한 번에 한 가지 유형의 세포만 생산구역으로 반입하거나 취급한다. 백신은 사람 이배체 세포주 또는 무한증식 세포주로 생산될 수 있다.

2.3.2.1. MCB 및 WCB

IPV의 제조를 위해 세포주를 사용할 경우에는 세포 은행 시스템을 토대로 한다. 세포 시드와 세포 은행은 '생물의약품생산에 사용되는 세포기질가이드라인'(식약처, 2011)'를 준수해야 한다.

MCB에 대해서는 식약처와 협의하여야 한다. 최대 계대 한도(또는 집단배가)내에서 MCB로부터 WCB를 얻고, 생산 배양의 최대 계대 한도를 확립하여야 한다.

2.3.2.2. 확인시험

MCB 및 WCB에 대한 확인시험은 '생물의약품생산에 사용되는 세포기질가이드라인(식약처, 2011)'에 따라 수행 하고 식약처와 협의하여야 한다. WCB는 생화학 검사(biochemical test)(예, 동위효소분석), 면역학적 검사(immunological test), 세포 유전 표지자 검사(cytogenetic marker test), DNA 지문 감식(fingerprinting) 또는 염기서열 분석법(sequencing)과 같은 검사법으로 확인되어야 하며 시험법은 식약처와 협의하여야 한다.

2.3.3. 세포 배양 배지

세포 증식을 위해 사용되는 혈청은 감염성 바이러스와 세균, 진균, 마이크로플라즈마가 없음을 입증해야 한다. 소 혈청에서 바이러스를 검출하는데 적합한 시험은 '생물의약품생산에 사용되는 세포기질가이드라인' (식약처, 2011)'을 참고한다.

소 혈청에 대한 세포 배양 시험을 소 바이러스에 대한 검증된 분자 검사로 대체하고자 할 경우, 식약처와 협의하여야 한다. 품질에 대한 추가 모니터를 위해, 혈청에 박테리오파지(bacteriophage)가 없는지와 엔도톡신을 검사할 수 있다. 일부 바이러스는 감마방사선에 비교적 내성이 있다는 점을 인정하더라도, 오염 가능성이 있는 바이러스의 불활화를 위해 감마 방사선이 사용될 수 있다.

배양배지에 사용되는 동물 성분의 출처는 식약처와 협의하여야 한다. 혈청 단백질 농도는 무혈청 배지로 세포배양액을 행구거나 바이러스 수확물을 정제함으로써 감소시킨다.

세포배양 준비를 위해 사용되는 소 또는 돼지의 트립신을 검사하여, 배양 가능한 세균, 진균, 마이크로플라즈마와 해당될 경우 감염성 바이러스가 없는지 밝혀야 하고(17), 이를 확인하는데 사용되는 방법은 식약처와 협의하여야 한다.

사람 혈청이 사용되어서는 안 된다. 제품 제조의 어느 단계에서든지 사람혈청

알부민이 사용되면, 식약처와 협의하여야 한다.

페니실린과 베타-락탐은 그 특성상 사람에게 매우 민감한 성분이므로 제조의 어느 단계에서든지 사용되어서는 안 된다.

기타 항생제 및 페놀레드(phenol red)와 같은 비독성 pH지표를 추가하고자 할 경우, 식약처와 협의하여야 한다.

소 기원의 트립신이 사용되면 그 출처에 대해 식약처와 협의한다.

2.4. 백신 생산 관리

2.4.1. 대조 세포 배양액

사람 이배체 또는 무한증식 세포주가 백신 생산을 위한 배양에 사용하는 경우, 백신 생산 단계(본배양)의 배양에 접종되는 세포농도와 계대 단계에서 적어도 총량의 5%, 또는 세포 현탁액 500mL, 또는 1억 개의 세포에 해당하는 분획을 취하여 대조 배양에 사용한다.

세포배양기 기술(bioreactor technology)이 사용되는 경우에는 식약처와 세포 검체의 양과 처리방법을 상의하여야 한다.

2.4.1.1. 대조 세포 배양에 대한 시험

대조 물질로 따로 준비하는 세포의 배양 방법은 생산에 사용되는 세포 배양과 유사하다. 다만, 외래성 인자 검출을 위한 대조 세포 배양은 바이러스를 접종하지 않은 채 그대로 두어야 한다.

이러한 대조 세포 배양은 최소 2주간 바이러스가 접종된 배양과 가능한 한 유사한 조건에서 배양하고, 아래에 설명된 바에 따라, 외래성 인자에 대해 검사한다. 시험이 유효하기 위해서는 사고에 의한 특별한 사유 없이 대조 세포 배양의 20%를 초과하여 사멸해서는 안 된다.

관찰기간 종료 시점에, 대조세포배양에 외래성 인자로 인한 퇴행증거가 없는지 시험한다. 본 시험이나 이 섹션에 명시된 다른 어떤 시험으로 대조 배양액에 외래

성 인자가 존재한다는 증거가 나타나면, 해당 접종 배양액으로 증식된 폴리오바이러스를 백신 생산에 사용해서는 안 된다.

검사를 즉시 실시할 수 없으면, 검체를 60°C 이하에서 보관한다.

2.4.1.2. 혈구 흡착 바이러스 시험

관찰기간이 끝나면 기니피그 적혈구를 사용하여 대조 세포의 최소 25%에 대해 혈구흡착바이러스(haemadsorbing virus)의 존재를 검사한다. 기니피그 적혈구 세포가 보관해둔 것이라면, 보관기간이 7일을 넘지 않아야 하며, 보관온도는 2-8°C의 범위 이내여야 한다. 혈구흡착바이러스 시험에서 칼슘 및 마그네슘 이온은 배지에 없어야 한다.

2.4.1.3. 세포 상층액의 외래성 인자 부정시험

관찰기간 종료 시점에, 각 대조배양의 그룹에서 수집된 상층액의 검체를 대상으로 외래성 인자를 검사한다. 이를 위해 각 폴의 10mL를 동일 세포에서 검사하되, 이는 백신 생산용으로 사용된 것과 같은 세포 배치는 아니어야 한다. 두 번째 지표 세포주(indicator cell line)가 각 폴의 추가 10mL 검체를 시험하기 위해서 사용되어야 한다. 사람 이배체 세포주가 생산용으로 사용될 때, 원숭이 신장 세포주는 두 번째 지표 세포주로 사용한다. 원숭이 신장 세포주를 생산용으로 사용할 때는 사람 이배체 세포주를 두 번째 지표 세포주로 사용한다(17).

혼합한 세포 상층액 검체를 세포 배양액이 담긴 배양 용기에 접종하며, 이때 상층액 검체가 배양배지에서 희석되는 정도는 1/4를 넘지 않게 한다. 세포 시트의 면적은 상층액 검체의 최소 3cm²/mL는 되어야 한다. 세포 배양의 각 종류마다 최소 1개 세포배양용기를 미 접종 상태로 유지하여 대조군으로 사용한다.

접종 배양과 대조 배양은 35~37°C에서 진행하고, 최소 14일간 적절한 간격을 두고 관찰한다.

시험이 유효하기 위해서는 사고에 의한 특별한 사유 없이 대조 세포 배양의 20%를 초과하여 사멸해서는 안 된다.

일부 배양액에서 외래성 인자로 인해 세포병변이 발생하면, 대조세포를 채취한 세포 배치로부터 생산된 바이러스 수확물은 폐기해야 한다.

대조 물질로 따로 준비하는 세포의 배양 방법은 생산에 사용되는 세포 배양과 유사하다. 다만, 외래성 인자 검출을 위한 대조 세포 배양은 바이러스를 접종하지 않은 채 그대로 두어야 한다.

선택된 바이러스에 대한 선별검사를 위해 분자 NAT 기반 분석법과 같은 특별한 시험방법이 사용될 수 있으며, 식약처와 협의하여야 한다. 검사를 즉시 실시할 수 없으면 검체를 -60°C 이하에서 보관한다.

2.4.1.4. 확인시험

생산수준에서 대조세포 확인을 위해 생화학 검사(예, 동위효소 분석), 면역학적 시험, 면역학적 시험, (염색체 표지자에 대한) 세포유전검사, 유전 표지자에 대한 검사(예, DNA 지문 감식 또는 염기서열 분석법)등 적합한 방법을 사용하여 하며 식약처와 협의하여야 한다.

2.4.2. 백신 생산을 위한 세포배양

2.4.2.1. 외인성 인자 확인을 위한 배양 관찰

바이러스 제조용 시드 로트 접종일에 각 세포 배양 또는 각 배양용기의 검체를 육안으로 검사하여 감염체로 인한 변성이 발생하지 않았는지 검사한다. 만일 이 검사로 세포 배양에 어떤 외래성 인자가 확인되면, 이 배양세포는 백신 생산용으로 사용해서는 안 된다.

동물 혈청이 바이러스의 접종 전 세포배양을 위해 사용된다면, 배지를 제거하고, 무혈청 배지로 세포를 세척한 다음 무혈청 배지로 대체한다.

2.4.3. 개체별 바이러스 부유액의 관리

바이러스를 생산세포에 접종한 후에 접종 세포배양과 대조 세포배양의 배양 조건을 표준화하고, 식약처와 협의한 기준 내에서 유지한다.

개체별 바이러스 부유액의 시험용으로 필요한 검체는 회수 시 즉시 채취한다.

2.4.3.1. 무균시험

각 바이러스 MSL, WSL 및 개체별 바이러스 부유액에 대해서 세균 및 진균 오염검사 최소 10mL, 마이코플라스마 오염검사 최소 10mL을 사용하여 검사한다. 식약처와 협의된 시험방법을 사용한다.

2.4.3.2. 바이러스 함량시험

각 바이러스 MSL 및 WSL와 개체별 바이러스 부유액의 바이러스 농도는 조직 배양법을 사용하여 감염 바이러스의 함량(titration)을 측정한다. 이 함량시험은 희석 배수 당 10개의 배양액을 사용하여 10배 이하의 희석 단계로, 또는 동일한 정밀도를 제공하는 다른 배열로 수행한다.

이를 위해서는 Microtitre plate에서 Hep-2C 또는 Vero 세포를 사용하는 것이 적합하다. 생산 공정 동안에 단가 원액에서 바이러스 함량 시험을 위해서도 같은 세포를 사용한다.

바이러스 함량(virus titre)에 대한 정보는 불활화 후 역가 기준을 충족시킬 것으로 예상되는 개체별 바이러스 부유액을 선택하는데 도움이 된다.

2.4.3.3. 확인시험

각 바이러스 MSL 및 WSL와 개체별 바이러스 부유액에서 특이적인 항혈청을 사용한 중화법이나 식약처와 협의된 분자 시험법에 의해 폴리오바이러스를 검사하여 혈청형과 종 유사성을 확인한다.

사용되는 혈청은 바이러스 함량이 알려진 동형 및 이형 바이러스에 대한 함량시험을 통해, 특이성(Monospecific)을 가지는 것을 확인하여야 한다. 이 시험에서는 단일클론항체가 유용할 수 있다.

3개의 혈청형 각각에 대한 종 유사성 표준 또는 심층 뉴클레오티드 서열 분석(Deep nucleotide sequence analysis)이나 적합한 분자기술에 의해 측정하여 확인할 수 있다.

2.4.4. 정제 바이러스 부유액의 관리

2.4.4.1. 개체별 바이러스 부유액의 정제

동일한 혈청형의 개체별 바이러스 부유액은 불활화 이전에 정제한다. 숙주 세포 단백질의 제거는 공정 밸리데이션 중에 평가한다.

허용되는 방법은 여과에 의해 바이러스 현탁액을 정제하고, 한외여과(UF)에 의해 바이러스를 농축하고, 그 이후에 겔 여과 칼럼을 통과시킨 후 바이러스 피크(Virus peak)를 수집하는 방법이다. 이온 교환 칼럼(Ion-exchange column)을 통해 바이러스를 통과시킴으로써 추가 정제할 수 있다. 제조물을 고정화된 DNA-ase 칼럼을 통과시키는 것 같이 다른 정제 절차(허용 가능한 출하기준이 될 수 있음)를 사용할 수 있다.

2.4.4.2. 정제 바이러스 부유액에 대한 시험

2.4.4.2.1. 잔류 세포 DNA

무한증식세포(Continuous cells)에서 증식한 바이러스의 경우, 잔류 세포 DNA에 대해 정제 바이러스 단가 원액을 시험한다. 정제 공정은 세포 DNA의 수준이 1회 인체 접종량 대비 10ng 이하로 일관되게 감소하는 것을 계산을 통하여 입증한다.

제조공정이 이 기준을 충족할만큼 밸리데이션 된 경우, 식약처와 협의 후 규격 시험에서 생략할 수 있다.

2.4.4.2.2. 바이러스 함량시험

각각의 정제 바이러스 단가 원액의 바이러스 농도는 조직 배양법을 사용하여 감염 바이러스의 함량을 측정한다. 이 함량시험은 희석배수 당 10개의 배양액을 사용하여 10배 이하의 희석 단계로, 또는 동일한 정밀도를 제공하는 다른 배열로 수행한다.

이를 위해서는 Microtitre plate에서 Hep-2C 또는 Vero 세포를 사용하는 것이 적합하다.

2.4.4.2.3. 확인시험

각각의 정제 바이러스 단가 원액에서 특이적인 항혈청을 사용한 중화법이나 식약처와 협의된 분자 시험법에 의해 폴리오바이러스를 검사하여 혈청형과 종 유사성을 확인한다.

사용되는 혈청은 바이러스 함량이 알려진 동형 및 이형 바이러스에 대한 함량시험을 통해, 특이성(Monospecific)을 가지는 것을 확인하여야 한다. 이 시험에서는 단일클론항체가 유용할 수 있다.

3개의 혈청형 각각에 대한 계통은 표준 또는 심층 뉴클레오티드 서열 분석(Deep nucleotide sequence analysis)이나 적합한 분자기술에 의해 측정하여 확인할 수 있다.

2.4.4.2.4. D-항원 함량시험

각각의 정제 바이러스 단가 원액의 D-항원 함량은 밸리데이션된 면역화학적 방법을 사용하여 측정하고, WHO 국제표준품을 기준으로 교정된 표준품을 사용하여 계산한다(2.1.3 참조).

2.4.4.2.5. 단백질 함량시험

정제 단가 바이러스 단가 원액은 폴리오바이러스의 D-항원단위 당 0.1 μ g 이하의 단백질을 포함하거나 식약처와 협의된 기준 범위를 만족하여야 한다.

2.4.4.2.6. 불활화 전 여과

각각의 정제 바이러스 단가 원액은 불활화 전에 여과한다.

여러 종류의 필터로 만족스러운 결과가 보고되었더라도 최종 여과 시에는 0.22 μ m 필터를 사용하며, 석면 함유 필터는 사용하지 않는다.

불활화는 가능한 한 신속하게 시작하고, 어떠한 경우에도 여과 후 72 시간 이내에 이루어져야 한다.

여과 후 24시간 이내에 불활화를 시작하는 것이 추천된다. 여과 단계의 목적은 불활화 과정의 효과를 감소시킬 수 있는 미립자와 다른 간섭물질을 제거하기 위한 것이고 여과 후 세워놓았을 때 응집물이 증가하는 경향이 있으므로, 이 시간을 지키려는 노력을 기울여야 한다.

여과된 정제 바이러스 단가 원액의 검체를 보존하고, 그 바이러스 함량(2.4.4.2.2에 따라)을 측정한다. 불활화 예정인 여과된 정제 바이러스 단가 원액의 역가를 측정하는 주된 목적은 시작시점의 함량(Starting titre)을 제공하여 불활화 동력학(Kinetics of inactivation)을 모니터하기 위한 것이다.

2.4.4.2.7. 사빈 시드로부터 생산된 정제바이러스 부유액에 대한 추가 시험

생산 조건, 특히 사빈 바이러스 성장 조건(예, 온도 및 배양기간, MOI 등)은 잘 정의되어 있고 관리되어 약독화 표현형을 유지해야 한다. 생산 조건은 충분한 수의 연속 배치의 정제 바이러스 단가 원액에 대해 적절한 시험법(식약처에서 협의된 시험법과 풀에 대한 숫자)으로 생산의 일관성을 유지하는 것을 확인함으로써 밸리데이션하여야 한다. 생산 일관성 확보를 위하여, 매년 생산 배치의 원액의 일정 비율에 대하여 이러한 시험을 실시할 수 있다. 매년 시험하는 각 유형의 원액의 수에 대한 근거를 제시하고 식약처와 협의하여야 한다.

사빈주에 대한 적절한 시험에는 시드 바이러스와 정제 바이러스 단가 원액의 전체 공통 뉴클레오티드 염기서열에 대해 비교하고 차이가 없음을 확인한다. 대체 방법으로는, WHO 가이드라인(TRS980 annex 2, A.3.2.4)에서 기술하고 있는 시험을 통해, 바이러스의 약독화된 특성의 안정성을 확인하고 바이러스의 분자적 특성의 일관성을 모니터할 수 있을 것이다. 이러한 시험에는 이 문서의 2.4.4.2.7.1 및 2.4.4.2.7.2에서 기술하는 *in vitro* 및 *in vivo* 시험을 포함한다.

rct40 시험법은 민감도가 불충분하므로 약독화 표현형을 확인하는 시험으로는 채택하지 않는 것이 좋다.

2.4.4.2.7.1. 바이러스 분자 특성(일관성) 모니터를 위한 시험

IPV 생산을 위해 배양한 사빈 바이러스주의 분자적 특성분석은 제조의 일관성 모니터링에 대하여 추가적인 수단이 될 수 있다. IPV 제조사가 이러한 접근법을 선택한다면, WHO 가이드라인(TRS980 Annex 2)을 참고하여 Deep sequencing 혹은 MAPREC을 통해 특정 Nucleotide 위치에 존재하는 변이의 비율(돌연변이 특성)을 확인함으로써 사빈 바이러스주의 분자적 특성의 일관성을 모니터할 수 있을 것이다. 이 시험의 해석에 관한 기준은 확립되어야 하며, 식약처와 협의하여야 한다.

2.4.4.2.7.2. 신경 병원성 시험

사빈주로 생산된 정제 바이러스 단가 원액에서 바이러스의 표현형을 평가하는데 사용될 수 있는 적절한 *in vivo* 시험은 WHO 가이드라인(TRS 980 annex 2)을 참고한다. 본 시험은 GAPⅢ를 준수하는 시설에서 수행되어야 하므로, 시험 수행의 제한이 있을 경우 수행 여부를 식약처와 협의한다.

2.4.5. 불활화 정제 단가 원액의 관리

2.4.5.1. 불활화 공정

여과된 정제 바이러스 부유액은 식약처에서 협의된 방법으로 불활화한다. 불활화에 앞서 바이러스 함량 또는 D-항원 함량을 토대로 여과된 정제 바이러스 단가 원액의 농도를 공정 밸리데이션 중에 확정된 허용 범위에 맞게 조정한다. 허용범위는 밸리데이션 시험 중에 확립한다.

적합한 백신 제조를 위해서는 불활화 방법이 일관된 불활화 결과를 보임을 입증하여야 한다. 적절한 간격을 두고 바이러스 함량을 측정하여 불활화의 진행상황을 모니터한다. 불활화 기간은 생바이러스 함량이 검출되지 않는데 소요되는 시간보다 최소 2배를 초과하여야 한다.

이차 여과는 불활화 과정 중에 이루어져야 한다.

이 단계는 바이러스 함량이 검출 수준 미만으로 떨어지고, 안전성 시험을 위한 1회차 검체를 채취하기 전에 실시한다.

바이러스 불활화 속도(Kinetics)는 각 제조업체가 확립하고, 식약처와 협의되어야 한다. 바이러스 불활화 동력학에 대한 적절한 자료를 확보하고, 불활화 공정의 일관성을 모니터한다. 이를 위해, 불활화 전/중/후 단계의 각각의 여과된 정제 바이러스 단가 원액에 대한 바이러스 함량과 D-항원 함량을 측정하여야 한다(2.4.4.2.2 와 2.4.4.2.4 참고).

일관성 기록(효과적인 불활화와 불활화 동력학)은 최소 5개의 연속 로트의 생산을 통해 확립하고, 만일 그 기록이 깨지면 근본 원인에 대한 분석을 실시하고 추가 연속 5배치의 여과된 정제 바이러스 단가 원액을 준비하고 확립된 동력학 기록을 만족함을 입증하여야 한다.

2.4.5.2. 효과적인 불활화 시험

각 불활화 정제 단가 원액으로부터 최소 1,500회 인간 투여량에 해당하는 용량으로 2개의 검체를 추출해야 한다. 검체 1개는 불활화 공정 종료 시, 그리고 다른 1

개 검체는 불활화 기간의 3/4을 넘지 않는 시점에 채취해야 한다. 불활화제의 제거 혹은 중화 후, 검체를 세포 배양에 접종하여 감염성 폴리오바이러스 부재에 대하여 시험해야 한다. 사람 폴리오바이러스 수용체를 발현하는 마우스 L20B 세포, HEp-2c 세포 뿐 아니라 마카크 및 긴꼬리, 개코 원숭이속(屬)(genera *Macaca*, *Cercopithecus* and *Papio* sps.)의 신장 세포와 같은 원숭이종의 신장세포가 적합한 민감도를 갖는 것으로 보인다. 다른 만약 다른 세포배양 시스템을 사용한다면, 부분적으로만 포르말린 불활화된 바이러스를 접종 후 위에서 설명한 세포와 비교할 때 폴리오바이러스에 대한 민감도가 최소한 동일함을 증명하여야 한다. 원숭이 신장 초대세포를 이 시험에 사용하는 경우, 서로 다른 배치로부터 유래된 세포배양 접시에 2개의 검체를 접종해야 한다.

검체가 배양배지에서 희석되는 정도는 1/4를 넘지 않게 한다. 세포 시트의 면적은 검체의 최소 3cm²/mL는 되어야 한다. 세포 배양액마다 최소 1개의 용기를 미접종 상태로 유지하여 대조군으로 사용한다.

조직 배양시험용 백신의 검체에서 포르말데히드는 일반적으로 검체 채취 시 Bisulfite를 추가하여 중화하고, 보통 검체는 그 뒤에 투석한다.

투석을 실시하지 않은 검체에 대해서도 조직 배양시험을 수행할 수 있다. 그러나 1/4로 희석하더라도 세포에 독성이 있는 것으로 밝혀지는 경우가 종종 있다. 이러한 시험에서 비특이적 세포 퇴행(Degeneration)이 발생하거나 조직 배양 시스템의 민감도가 감소한다면, 투석한 물질에서 시험을 반복 실시해야 한다. 투석 후 바이러스 D-항원 함량을 측정하여, 투석 중에 어떤 D-항원이 손실되었는지를 확인한다.

조직 배양은 최소 3주간은 관찰한다. 배양용기마다 적어도 2번의 계대배양을 실시한다. 1차 계대배양은 첫 번째 배지 교환 이전에 실시하고, 2차 계대배양은 관찰기간이 끝나면 실시한다. 계대배양은 적어도 2주간은 관찰한다.

불활화 종료 시 채취된 검체나 불활화 공정이 4분의 3정도일 때 채취한 검체에서 전염성 폴리오바이러스가 검출되면, 해당 불활화 단가 원액은 이후 공정에 사용되어서는 안 된다. 불활화 정제 단가 원액에서 생바이러스가 검출된 것은 제조 일관성이 결여된 것으로 간주되어, 생산 공정 검토 및 재발리데이션을 실시해야 한다.

원숭이 신장 초대 세포를 이 시험에서 사용할 경우, 시험 결과를 방해할 수 있

는 외래성 인자가 포함될 수 있다. 시험마다 부분적으로 불활화된 폴리오바이러스 검출에 민감도를 유지하고 있음을 입증하는 것이 중요하다. 관찰기간이 끝나면, 잔류하는 생 바이러스의 검출을 위해 사용되는 세포 배양액은 불활화 정제 단가 원액의 것과 같은 종류의 검증된 양의 생 Sabin 바이러스를 사용하여 챌린지 시험을 실시한다. 챌린지 시험 절차의 세부사항은 식약처와 협의하여야 한다.

이 시험에 무한증식 세포주(Continuous cell lines)가 사용되면, 각 시험의 시작 시 양성 대조군을 도입하여 시험마다 감염 바이러스를 검출할 수 있는 능력을 동시에 검사한다. 양성 대조 플라스크는 시험법의 검출한계에 가까운 소량의 바이러스로 접종한다. 양성 대조군을 사용하지 않는 경우에는 원숭이 신장 초대 세포에 대해 위에서 설명한대로 챌린지 시험을 실시한다.

불활화 백신에 잔류하는 활성 폴리오바이러스의 검출 문제는 비처리된 현탁액에서 감염 바이러스를 평가하는 것과 같은 것이 아니다. 포름알데히드에 노출되었으나 불활화가 되지 않은 바이러스의 경우, 비처리 바이러스보다 세포병변이 발생하는 데 기간이 더 오래 걸린다. 이러한 이유로 잔류 활성 바이러스 부정시험에 사용하는 조직 배양액은 기술적으로 가능한 정도까지 오래 관찰하는 것이 바람직하다. 따라서 이 목적을 위한 만족할 만한 조직 배양 시스템은 배양액의 제조에 사용된 세포의 민감도뿐만 아니라 배양 배지에 의해서도 좌우된다.

배양 배지에 추가되는 혈청은 50%의 농도까지 억제효과를 나타내지 않는지 확인되어야 한다. 3가지 type의 폴리오바이러스를 억제하는 물질이 없는 혈청만 사용한다.

우수한 조건에서 배양을 유지하려면 배양 배지를 자주 교환하는 것이 필요할 수 있다. 그러나 배양 배지를 너무 빨리 교환하는 경우, 비흡착바이러스(Unadsorbed virus)를 제거하는 결과를 초래할 수 있고, 그로 인해 시험의 타당성이 손상될 수 있다는 점을 염두에 두어야 한다. 따라서 배양 배지 또는 배양 상등액은 5-7일 이후에 변경한다.

2.4.5.3. 무균시험

각각의 불활화 정제 단가 원액에 대해서 무균시험을 실시한다.

2.4.5.4. D-항원 함량시험

각각의 불활화 정제 단가 원액의 D-항원 함량은 밸리데이션된 면역화학적 방법을 사용하여 측정하고, WHO 국제표준품을 기준으로 교정된 표준품을 사용하여 계산한다(5.1.3 참조). 결과는 식약처와 협의된 기준 범위 이내이어야 한다.

2.4.6. 삼가 원액의 관리

적합한 것으로 확인된 불활화 정제 단가 원액만 삼가 원액 제조에 사용한다.

2.4.6.1. 감염성 폴리오 바이러스 부정시험

최소 1,500mL의 검체, 또는 정제된 농축 백신을 준비할 경우 각 삼가 원액의 최소 1,500명의 인체 접종량에 해당하는 양을 5.4.5.2에 설명된 절차에 의해 세포배양액에서 감염성 폴리오바이러스의 부정시험을 실시한다. 감염성 폴리오바이러스가 검출되면, 이 삼가 원액이나 이로부터 생산한 제품은 사용해서는 안 된다.

2.4.6.2. 무균시험

삼가 원액에 대해서 무균시험을 실시한다.

2.4.6.3. 포름알데히드 함량시험

삼가 원액에 잔류하는 유리 포름알데히드의 함량은 식약처와 협의된 방법 및 기준에 적합하여야 한다.

2.4.6.4. D-항원 함량시험

삼가 원액의 D-항원 함량은 밸리데이션된 면역화학적 방법을 사용하여 측정하고, WHO 국제표준품을 기준으로 교정된 표준품을 사용하여 계산한다(5.1.3 참조). 결과는 식약처와 협의된 기준에 적합하여야 한다.

2.4.7. 최종원액의 관리

최종원액을 만들기 위해 삼가 원액에 추가하거나 혼합할 수 있는 보존제, 첨가제 또는 다른 물질은 폴리오바이러스 면역 효능과 항원의 안전성 프로파일에 유해한 영향을 미치지 않는다는 사실이 입증되어야 한다. 보존제의 효능은 제품 개발 중에 식약처와 협의된 방법을 사용하여 입증한다.

삼가 원액으로부터 최종원액을 준비하는데 필요한 작업은 제품을 오염시키지 않는 방식으로 수행해야 한다. 최종 원액을 준비하면서 제품에 추가되는 희석액, 안정화제 또는 면역증강제와 같은 어떤 물질도 사용된 농도에서 백신의 안전성과 유효성을 손상시키지 않는다는 것이 입증되어야 한다. 완제의약품 제조 전까지, 최종 원액은 생물학적 활성이 보존되는 것으로 제조업체가 입증한 조건에서 보관한다.

2.4.7.1. 무균시험

최종 원액에 대해서 무균시험을 실시한다.

2.4.7.2. 역가시험

각각의 최종원액은 식약처와 협의된 시험에 의해 면역원성에 대한 *in vivo* 분석으로 검사한다. 랫트를 이용한 *in vivo* 역가 시험법이 표준화되어, IPV에 대한 적합한 시험으로 입증되었다. 이 시험에서는 제품 특이적 표준품을 사용할 수 있다 (부록 2 참조).

최종원액의 각 혈청형에 대한 D-항원 함량은 밸리데이션된 면역화학적 방법을 사용하여 측정하고, WHO 국제표준품을 기준으로 교정된 백신 표준품을 사용하여 계산한다(5.1.3 참조). 결과는 협의된 기준 범위 내에 있어야 한다.

이 시험이 완제 의약품에 대해 수행된다면 최종원액에서는 생략할 수 있다. 적절한 수의 연속된 최 원액에 대해 생산의 일관성이 확립되었다면, 식약처와 협의하여 *in vivo* 시험을 생략할 수 있다. 그러나 D-항원 측정 판정 기준이 배치의 합격 혹은 불합격 측면에서 *in vitro* 시험이 *in vivo* 시험과 동등한 결과를 낳는다는 것이 입증되었을 때만 가능하다. 이를 입증하기 위해서, 열처리나 다른 방법을 이

용하여 실험적으로 면역원성 활성을 감소시킨 저역가(Subpotent)배치를 이용한 시험이 포함되어야 한다.

백신의 품질과 면역원성에 영향을 미칠 수 있는 항원이나 그 제형의 제조공정에 변경이 있는 경우, *in vivo* 시험을 실시하여 새로운 제조공정과 기 확립된 공정의 동등성을 입증해야 한다. 공정 변경이 *in vivo* 시험에 영향을 미친다면 재밸리데이션을 고려하고, 허가를 얻으려면 임상자료가 요구될 수 있다.

항원 함량의 측정에 가장 적합한 것으로 밝혀진 *in vitro* 시험법은 D-항원 ELISA이다. 이 시험법이 널리 사용되고 있기는 하지만, 이것의 표준화를 위해서는 각별한 주의가 요망된다. 사용하는 항체가 다르면 결과도 달라질 수 있다. 항체의 D-항원 특이성(Specificity)도 입증되어야 한다. 어떤 종류의 항혈청을 사용하든 간에, 밸리데이션 시험을 통해 해당 시험으로 생산의 일관성을 확인할 수 있음을 보여줘야 한다. D-항원 ELISA 시험이 유효하려면, 직선성(Linearity)과 평행성(Parallelism)에 대해 정해진 기준을 준수해야 한다. 등록된 품질규격상의 기준에서 D-항원 함량의 계산법 변경의 영향도 고려해야 한다.

면역증강제를 사용하는 것이 시험에 간섭을 일으킬 경우, D-항원 ELISA를 수행하기 전에 탈착 또는 전처리 단계가 필요할 수 있다.

최종원액이 폴리오 바이러스 삼가 원액 및 다른 항원과 함께 혼합백신 제조에 사용될 경우, 최종 원액에 대해 D-항원 ELISA를 수행하는 것이 적합한지 결정한다. D-항원 ELISA가 특정 혼합백신에 적합하지 않으면 *in vivo* 시험을 사용한다.

각 바이러스 유형에 대한 최종 원액의 역가는 식약처와 협의하여야 한다.

2.4.7.3. 보존제 함량시험

보존제가 추가되면 최종 원액 중 그 함량은 식약처와 협의된 방법 및 기준에 적합하여야 한다.

Thiomersal의 사용으로 D-항원 함량이 감소될 수 있다는 이유로, 지난 50년간 유일하게 2-Phenoxyethanol만이 IPV제조에 사용되어 왔다.

2.4.7.4. 면역증강제 함량시험(해당될 경우)

매 배치의 최종원액마다 면역증강제의 함량을 분석한다. 이 시험을 완제의약품에서 수행한다면 최종원액에서는 생략할 수 있다. 알루미늄 화합물을 사용하는 경우, 알루미늄 함량은 1회 인체 접종량 당 1.25mg를 초과해서는 안 된다.

2.5. 충전 및 용기

「의약품 등의 안전에 관한 규칙」 별표 1 의약품 제조 및 품질관리기준 및 별표 3 생물학적제제등 제조 및 품질관리기준, 「의약품 제조 및 품질관리에 관한 규정」의 충전 및 용기에 관한 기준을 최종 제형 상태로 충전된 백신에 적용한다. 단일 용기 및 다회 용량 용기를 사용할 수 있다.

2.6. 완제의약품 관리

완제의약품 매 배치마다 검체를 채취하여 아래에 기술된 시험을 백신의 완제 의약품(즉, 최종 용기)의 매 배치마다 수행해야 한다. 달리 타당성을 증명하여 허가 받은 경우가 아니라면, 라벨작업이 완료된 완제 의약품의 매 배치에 대하여, 식약처와 협의된 밸리데이션된 시험 방법으로 시험을 수행한다. 이 섹션에 나와 있는 다양한 변수들에 대한 허용 기준은 달리 명시하지 않는 한 식약처와 협의하여야 한다.

2.6.1. 최종 용기 검사

완제의약품 매 배치의 모든 용기는 육안이나 기계로 검사하여, 불량 제품은 폐기하고, 해당 불량사항을 기록한다. 불합격 비율에 대한 한도를 설정해야 한다.

2.6.1.1. 성상

백신의 성상은 그 형태 및 색상과 관련하여 기술한다.

2.6.2. 확인시험

확인 시험은 완제 의약품 배치 중에서 라벨 작업이 완료된 최소 1개의 용기를 취하여 적절한 방법으로 수행한다. 2.6.5에 설명된 역가 시험이 확인시험으로 사용될 수 있다.

2.6.3. 확인시험

완제의약품에 대해서 무균시험을 실시한다.

2.6.4. 이상독성부정시험

완제의약품에 대해서 이상독성부정시험을 실시한다.

2.6.5. 역가시험

완제 의약품 매 배치마다 D-항원 함량을 밸리데이션 된 면역화학적 방법으로 측정하고(2.4.5.4 및 2.4.7.2 참조), WHO 국제표준품을 기준으로 교정된 참조 백신을 사용하여 계산한다(2.1.3 참조).

최종 원액에 면역증강제를 사용하는 것이 시험법에 영향을 준다면, D-항원 ELISA를 수행하기 전에 탈착 또는 전처리 단계가 필요할 수 있다. 전처리/탈착이 불가능하면, 면역증강제의 간섭을 문서화하고, *in vivo* 시험을 실시한다(2.4.7.2 및 부록 2 참조).

일반적으로 1형, 2형, 3형 각각에 대해 사람 투여 용량 당 40, 8, 32 D-항원 단위 또는 그 이상을 함유하도록 조제된 wIPV가 효과가 있다(18).

D-항원 함량이 이보다 낮은 백신의 경우 임상 자료로 보완된다면 허용될 수 있다. 면역증강제가 사용되는 백신이나 다른 시드 바이러스(예, Sabin 바이러스)로 생산된 백신은 임상자료로 보완된다면 다른 항원 조성으로도 허가될 수 있다.

최종 원액이 삼가 원액 및 다른 항원과 함께 혼합백신 제조에 사용될 경우, 완제의약품에 대해 D-항원 ELISA를 수행하는 것이 적합한지 결정한다. D-항원 ELISA가 특정 혼합백신에 적합하지 않으면 부록 2에 설명되어 있는 *in vivo* 시험을 이용한다.

각 바이러스 유형에 대한 백신의 역가는 식약처와 협의하여야 한다.

2.6.6. 단백질 함량시험

단백질 함량은 1회 인체 접종량 당 10 μ g이하여야 한다. 생산의 일관성이 식약처가 만족할 정도로 확립되어 있다면, 출하 승인 시험 시에 이 시험을 생략할 수도 있다.

동물 혈청이 세포 배양의 증식을 위해 사용된다면, 완제 의약품에서 혈청 단백질 농도(소 혈청 알부민)는 1회 인체 접종량 당 50ng이하로 한다. 삼가 또는 최종 원액에 대해 시험이 수행되었다면, 소 혈청 알부민에 대한 시험을 식약처와 협의하여 생략할 수 있다.

2.6.7. 보존제 함량시험

보존제 함량은 식약처와 협의된 방법 및 기준에 적합하여야 한다.

2.6.8. 엔도톡신시험

엔도톡신 함량은 식약처와 협의된 방법 및 기준에 적합하여야 한다. 함량 수준은 허가 전 임상시험에서 사용된 백신 로트에서 허용된 수준과 일치시키고, 식약처와 협의하여야 한다.

2.6.9. 포름알데히드 함량시험

유리 포름알데히드의 함량은 식약처와 협의된 방법 및 기준에 적합하여야 한다.

2.6.10. pH 측정시험

완제 의약품의 매 배치마다 pH를 측정하고, 식약처와 협의된 방법 및 기준에 적합하여야 한다.

2.6.11. 면역증강제 함량시험 및 흡착률 시험(해당될 경우)

면역증강제가 제형에 사용되는 경우, 완제 의약품 매 배치마다 면역증강제의 함량을 검사한다. 알루미늄 화합물을 사용하는 경우, 알루미늄 함량은 1회 인체 접종량 당 1.25mg를 초과해서는 안 된다.

완제 의약품의 매 배치마다 알루미늄 화합물(aluminium hydroxide 또는 hydrated aluminium phosphate)에 대한 항원의 흡착률을 평가한다.

2.6.12. 잔류항생제 함량시험(해당될 경우)

항생제가 백신 생산 중에 추가되면, 잔류 항생제의 함량을 측정하고 식약처와 협의된 기준 범위 내에 있어야 한다. 생산의 일관성이 확립되어 있다면, 정기 로트 출하승인 시에 이 시험을 생략할 수 있다.

2.7. 기록

「의약품 등의 안전에 관한 규칙」 별표 1 의약품 제조 및 품질관리기준 및 별표 3 생물학적제제등 제조 및 품질관리기준, 「의약품 제조 및 품질관리에 관한 규정」의 요구사항을 적용한다.

2.8. 보관검체

「의약품 등의 안전에 관한 규칙」 별표 1 의약품 제조 및 품질관리기준 및 별표 3 생물학적제제등 제조 및 품질관리기준, 「의약품 제조 및 품질관리에 관한 규정」의 요구사항을 적용한다.

2.9. 표시기준

「의약품 등의 안전에 관한 규칙」 별표 1 의약품 제조 및 품질관리기준 및 별표 3 생물학적제제등 제조 및 품질관리기준, 「의약품 제조 및 품질관리에 관한 규정」의 요구사항을 적용하고, 용기 라벨이나 포장에 아래의 정보를 추가적으로 포함한다.

- 백신에 포함된 폴리오바이러스 주 명칭(strain designation)
- 백신 제조에 사용된 세포기질
- 각 폴리오바이러스 유형별 D-항원 함량
- 바이러스 불활화에 사용되는 방법 및 불활화제
- 백신에 들어 있는 모든 안정화제와 보존제의 특성 및 양
- 해당하는 경우, 면역증강제의 특징 및 양

완제의약품의 생산자가 백신을 제조한 것이 아니라면, 라벨에 생산자 이름과 원액 물질의 출처를 밝히는 것이 바람직하다. 백신에 항생제가 들어 있다면 그 특성과 양에 관한 사항을 포함할 수 있다.

2.10. 유통 및 운송

「의약품 등의 안전에 관한 규칙」 별표 1 의약품 제조 및 품질관리기준 및 별표 3 생물학적제제등 제조 및 품질관리기준, 「의약품 제조 및 품질관리에 관한 규정」의 요구사항을 적용한다.

2.11. 안정성 시험, 보관, 유효기간

2.11.1. 안정성 시험

백신 개발에서 중요한 부분은 적절한 안정성 시험이다. 백신의 안정성 평가에 대한 지침은 「의약품등의 안정성시험기준」을 참고한다. 안정성 시험은 중간 제품을 보관하는 여러 생산단계 즉, 개체별 바이러스 부유액, 불활화 정제 단가 원액, 삼가 원액, 최종 원액, 완제 의약품 단계에서 수행할 수 있다. 생산 단계에 따라 안정성의 지표가 되는 항목을 정하거나 선택한다. 백신 생산 중에 모든 공정 중 물

질, 특히 개체별 바이러스 부유액, 불활화 정제 단가원액, 삼가원액, 최종원액 등의 중간제품에 대해 유효기간을 설정한다.

권장 보관 온도에서 유효기한까지 최종 용기 내 백신의 안정성을 입증하여 식약처의 인정을 받아야 한다. 서로 다른 불활화 정제 단가원액 및 삼가원액에서 유래한 최소 연속 3배치의 완제의약품에 대한 안정성 시험을 실시할 수 있다.

다른 제조시설에서 공급한 삼가 원액으로 최종 원액 및 완제의약품 제조만 수행하는 경우, 보관 용기나 보관 조건에 변경이 있으면 완제의약품 제조사가 삼가 원액에 대한 안정성 자료를 생성하여 사용 시까지의 유효기간을 설정한다.

백신 제형은 유통기간 동안 안정적이어야 한다. 안정성 허용기준은 식약처의 동의를 받아야 한다. 허가 이후에도 유효기간 기준을 뒷받침하고, 안정성 프로파일을 개선하기 위해 백신 안정성을 지속적으로 모니터링하는 것을 권고한다.

최종 안정성 시험 프로그램은 식약처와 협의하고 안정성 지표 변수들, 안정성 자료의 지속적인 수집 및 공유 절차, 백신 부적합 처리기준 등에 대해 합의한 사항을 포함한다.

2.11.2. 보관조건

IPV는 항상 2~8°C에서 보관한다.

2.11.3. 유효기간

사용기한(Expiry date)은 유효기간을 바탕으로 정하고, 안정성 시험을 실시하여 뒷받침하고 식약처의 승인을 받는다. 사용기한은 최종원액의 혼합일자, 충전일자, 완제의약품 해당 배치의 최초의 유효한 역가시험 일자를 근거로 정한다. 역가시험은 부록 2에 설명된 시험법으로 수행한다.

3. 비임상 평가

IPV의 비임상 평가는 '생물의약품 비임상시험 가이드라인(식약처, 2014년)에 따라 실시되어야 한다. 다음의 사항은 새로운 IPV 제품 및 기 허가 제품에서 제조공정 또는 원료약품 및 그 분량에서 상당한 변경이 있는 경우 고려되어야 한다.

3.1. 약독화 바이러스주로부터 유래한 시드로트의 특성분석

IPV 제품의 제조에 사용하는 약독화 바이러스주(사빈주)에서 유래한 MSL 및 WSL은 광범위하게 특성분석이 되어야 한다('2.3 기원물질의 관리' 참고). 특성분석은 전임상 및 임상 연구에서 사용하는 제품 로트 생산에 사용된 시드로트를 대상으로 수행하는 것이 이상적이다.

3.2. 항원성 프로파일

독립적으로 개발되고 있는 여러 IPV 제품들 사이에서(특히 sIPV와 wIPV 비교시) 항원성 프로파일이 상당한 차이가 있다는 것을 나타내는 여러 증거들이 있다(19, 20). IPV의 항원성 프로파일은 바이러스주, 세포 기질, 제조 공정 매개 변수에 의해 영향을 받는다. IPV 개발 초기 단계에서 특이성이 있는 단클론 항체로 IPV의 항원성 구조를 확립하는 것이 이상적이며(20, 21), 개발 과정 중에 백신 안정성과 제조 일관성을 확인할 수 있는 특성화 기술이 사용되어야 한다.

3.3. 약독화 바이러스주에서 유래한 IPV에서 D-항원 함량

현재 허가된 wIPV의 타입 별 항원 함량은 여러 ELISA법을 사용하여 측정하고 있고(20), 국제 표준품에서 유래된 제조 표준품에 대한 상대적 D-함량으로 산출된다. IPV 개발 시 약독화 바이러스주(예, 사빈주)를 사용할 경우, 자사 ELISA 시험법을 개발하여 타입 별 D-항원 함량을 측정해야 한다. 제품 개발 초기에 자사 표준품을 확립해야 하며 국제 표준품으로 보정해야 한다. 자사 표준품은 안정성과 새로운 로트 제조 시 비교동등성을 확보하기 위한 모니터링 프로그램을 실시해야 한다. 또한, 개발 단계에서 불활화 전에 정제된 monovalent pool의 mL 당 바이러스 역가와 D-항원 함량의 비율을 각 폴리오

바이러스 타입 별로 확립하여야 하며 상업적 생산에서 모니터링되어야 한다. 이것은 제품수명주기에 걸쳐 상업용 로트의 D-항원 함량은 임상시험에서 안전성 및 면역원성을 보여주었던 로트와 비교동등하다는 것을 입증해 준다. 대부분의 허가 받은 wIPV는 1회 접종 당 40, 8, 32 D-항원 단위가 포함되도록 제조한다. 하지만 공정에 사용되는 다양한 폴리오 바이러스주에 대해 D-항원 단위가 정의되어 있지는 않고 ELISA 에서 사용되는 항체의 특이도에 의해 영향을 받는다. 따라서 다른 단클론 및 다클론 항체 기반의 ELISA로 측정된 다양한 IPV의 D-항원 함량을 직접적으로 비교하는 것은 불가능하다 (예, sIPV와 wIPV의 비교)(22). 약독화 바이러스주에서 유래하거나 면역증강제가 들어간 IPV는 사람에서 적절한 면역반응을 유도하기 위해 다른 D-항원 함량이 요구된다.

3.4. 면역원성 시험

임상 시험 진입 전에 개발하는 IPV의 면역원성 특성이 적합한 동물 모델(예, 랫드)에서 연구해야한다. 효력시험에서는 개발하고자 하는 IPV와 허가 받은 IPV 간의 면역원성(사빈주 및 야생주에서 각 타입 별 중화항체가)을 비교해야 한다. 이 시험은 임상에서 D-항원 함량의 용량 선정 시 도움을 줄 수 있다. 그러나 동물에서의 면역원성 결과는 완제의약품에 포함되어야 할 적절한 항원함량을 확실히 예측하지는 못한다는 사실은 인지할 필요가 있다. 형질전환 마우스를 이용해서 개발하는 IPV와 허가 받은 IPV에서의 면역반응시험을 비교하거나 공격시험을 실시할 수 있다(23, 24). *In vivo* 시험은 공정 중 주요 변경이 발생하였을 때 비교동등성 자료로 중요하다. 면역증강제가 포함될 경우 제조사는 백신에서의 면역증강제 사용을 뒷받침할 수 있는 근거와 면역원성 결과를 제시하여야 한다.

3.5. 안전성 시험

비임상 안전성 시험의 필요성, 시험유형 및 시험설계에 대한 일반적인 사항은 '생물의약품 비임상시험 가이드라인(식약처, 2014)'에 따른다(예, 접종기구의 사용 혹은 피내접종과 같은 다른 투여경로). 만일 개발되는 IPV에 새로운 면역증강제나 첨가제(예, 안정화제)가 포함된다면, '생물의약품 비임상시험 가이드라인(식약처, 2014)'에 따른 독성시험이 수행되어야 한다.

4. 임상 평가

임상시험은 '의약품 등의 안전에 관한 규칙(총리령), [별표 4] 의약품 임상시험 관리기준' 및 '백신 임상평가 가이드라인(식약처, 2017)'에 따라 수행한다. 야생주 및 약독화주(예, 사빈주) IPV의 임상 평가와 관련된 여러 고려사항은 아래 항에 기술한다.

4.1. 일반적인 고려사항

1998년 세계 보건 총회의 결의에 따라 설립된 GPEI의 노력으로 전 세계 폴리오 발병률은 급격히 감소하였다(25). 결과적으로, 개발되는 IPV의 허가를 뒷받침하는 유효성 임상시험은 더 이상 가능하지 않으며 임상시험은 기 허가된 제품(대조약)과 개발하는 IPV 간의 안전성 및 면역원성을 평가한다. ICP가 확립된 혈청 중화항체가에 대한 항체양전률을 평가한다(26). 개발하는 IPV의 허가를 위해 대조 백신과 면역원성에서 비열등성을 증명해야 한다.

4.2. 면역원성

4.2.1. 면역반응의 평가

폴리오에 대한 임상적 예방 지표로 '혈청 중화항체가 ≥ 8 '이 간주된다(27). IPV 접종 전후의 중화항체가를 측정하여 면역반응을 제시해야 한다. 폴리오 항원에 대한 항체양전의 정의는 다음과 같다.

- 접종 전 항체음성에서 접종 후 중화항체가가 8 이상인 시험대상자
- 접종 전 항체양성에서 접종 후 접종 전 대비 중화항체가가 4배 이상인 시험대상자

모체 항체에 의해 접종 전 항체가가 영향을 받을 수 있기 때문에 항체의 반감기가 28일인 것을 감안하여 상기의 접종 후 접종 전 대비 4배 이상 증가나 접종 후 8 이상(어느쪽이든 높은 것)은 항체양전을 의미한다. 혈청 중화항체를 분석하는 시험법은 세포주, 국제 표준 혈청, 다른 중요한 시약 등이 표준화되어야 한다. 혈청

시료에 있는 중화 항체의 수준은 역가로 표현되며, 이는 배양 세포에서 50% Viral cytopathic effect를 나타내는 가장 높은 혈청 희석 배수이다. 약독주(사빈주)에서 유래한 IPV의 임상 평가에서 사빈주 및 야생주 모두에 대해 적용이 가능하다는 것을 혈청 중화항체가 결과로 증명하여야 한다. 야생주 간의 항원 차이를 고려할 때, 최근 분리된 야생주와 임상 시험대상자 하위군에서의 종래의 바이러스주를 사용하여 중화항체를 평가하는 것이 유용할 수 있다. 폴리오 바이러스에 대한 중화항체 생성은 폴리오 예방에 대한 확실한 ICP로 간주된다. 그러나 하나의 혈청형에 대한 면역이 다른 2개의 혈청형에 대한 예방을 보장해 주지는 않는다.

4.2.2. 면역원성의 비교

개발하는 IPV는 전향적 대조군 시험에서 적어도 하나 이상의 확립이 잘된 허가 받은 IPV와 직접 비교해야한다. 개발하는 IPV의 허가를 위해서는 시험대상자(예, 백신 접종 경험이 없는 영아)에서 기초접종 후 면역원성을 평가하는 비열등성 시험이 요구된다. 추가접종 여부와 시기를 결정하기 위해 기초접종 후 혈청 중화항체가의 지속성도 평가해야 한다. 하지만, 허가 이전까지 장기적인 항체가 지속성에 관한 자료가 구비되지 못할 수 있다. 시간이 지남에 따라 항체가가 약해지는 것은 불가피한 현상이며, 지속성이 있는 면역 기억으로도 폴리오에 대해 충분히 예방이 가능하다는 결과도 있기때문에 이러한 현상때문에 반드시 추가접종이 필요한 것은 아니다(28, 29).

4.2.3. 시험대상자 및 지역

일반적으로 1상 임상시험에서는 건강한 성인에서 개발하는 IPV의 안전성을 평가한다. 광범위하게 IPV과 OPV를 사용하고 있기 때문에 개발하는 IPV의 면역원성은 영아 같은 접종 경험이 없는 집단에서만 평가될 수 있다. 시험대상자가 유행하는 야생주 또는 OPV 유래 폴리오 바이러스에 노출될 경우 IPV에 의해 유도되는 면역반응을 증가시키며 이는 결국 시험 결과에 영향을 줄 수 있다. 따라서 개발하는 IPV의 면역원성을 평가하는 임상시험은 IPV만을 사용하는 지역에서 수행하는

것이 이상적이다. OPV를 일상적으로 접종하는 지역에서 수행하는 임상시험의 경우 시험대상자가 폴리오 바이러스에 대한 잠재적 노출 가능성을 최소화할 수 있는 특별한 장치가 마련되어야 한다(예, OPV를 캠페인 기반으로 접종 받는 지역에서 새로운 IPV에 대한 임상시험 수행).

4.2.4. 평가변수 및 분석

1차적으로 대략 기초접종 4주 후 사빈주 및 야생주에 대한 항체양전율을 분석해야 한다. 1차 목적은 개발하는 IPV와 대조 백신의 항체양전률에서 비열등성을 증명해야 한다. 사전 설정된 비열등성 마진 근거 및 시험대상자수 산출 근거는 임상시험계획서 상에 명확히 제시하여야 한다. 비열등성 임상시험에 대한 추가적인 사항은 ‘백신 임상평가 가이드라인(식약처, 2017)’을 참고한다. 2차 분석으로 기초접종 4주 후 사빈주 및 야생주 모두에 대한 기하평균역가와 역누적분포를 분석해야 한다. 개발하는 IPV가 약독화주에서 유래한 경우 하나 이상의 폴리오 바이러스 타입에 대한 기하평균항체가 대조 백신보다 낮을 수 있으나 기초접종 4주 후 낮은 기하평균항체가 항체가 장기 지속성에 영향을 미치는지에 대해서는 확실하지 않다. 결과적으로 기하평균항체에서 유의미한 차이가 관찰된다면(예, 미리 지정된 기준을 충족하지 않은 경우) 식약처에 의해 주의깊게 다뤄져야 하며 항체가 지속성에 대한 추가적인 연구(4.2 참고)와 시판 후 연구(4.5 참고)가 결정되어야 한다. 개발하는 백신에서 유효기간까지 요구되는 최소 D-항원 함량기준은 임상시험 시 허용 가능한 면역반응을 유도하였던 임상 로트(예, 용량 설정 임상시험 시 사용한 로트)의 D-항원 함량에 근거해야 한다.

4.2.5. 예방접종 일정

다양한 지역이나 국가에서 다른 예방접종일정에 따라 wIPV가 사용된다. 순응도를 높이기 위해 IPV의 접종 일정을 DTaP 백신의 접종일정과 맞추는 것은 일반적이다. 임상시험 자료를 보면 접종 일정에 따라 허가된 wIPV의 면역반응이 다르게 나타난다. 일반적으로 기초접종 간격이 길수록(예, 2, 4, 6개월) 중화항체와 항체

양전률이 높아진다. 가능하다면 개발하는 백신에 대한 용량 선정 및 비열등성 임상시험에서 접종 일정은 대상 국가 또는 지역에 맞춰야한다. 그러나 개발하는 백신에 대한 임상시험을 모든 대상 지역에 맞는 각각의 접종 일정에 따라 수행하는 것은 가능하지 않다. 개발사는 허가 받고자 하는 각각의 국가에 임상시험 자료의 타당성을 제공해야 하며 외삽의 근거에 대해 논의해야 한다. 예를들어 짧은 접종 간격(예, 2, 3, 4개월)에서 만족스러운 면역반응이 나온다면 보다 긴 접종 간격(예, 2, 4, 6개월)에서도 마찬가지로 만족스러운 면역반응이 기대될 것이다. 그러나 개발하는 IPV와 관련된 국소 및 전신 반응은 특정 집단 내에서 접종 일정에 따라 달라질 수 있으며 허가 전에 제안된 접종 일정(예, 2, 4, 6개월)에서 안전성 자료를 수집할 필요가 여전히 있다. 순차적 IPV-OPV 접종 일정에서 약독화되거나 분획 항원 함량을 포함하는 IPV를 사용하기 위해서는 야생주 및 사빈주 폴리오 바이러스에 대해 적정 수준의 중화항체가 나오는 지를 확인하여야 한다.

4.3. 다른 백신과 동시접종

IPV는 일반적으로 다른 유아 및 유아 백신과 동시 접종된다. 결과적으로 개발하는 IPV뿐만 아니라 동시 접종하는 모든 다른 항원에 대한 면역반응을 필수적으로 평가하여야 한다. 여러 접종 일정에 따라 영유아기때 IPV와 동시 접종하는 수많은 허가된 백신이 있기때문에 이 모든 가능한 조합에 대해 연구하는 것은 불가능하다. 최초 허가 시점에서 동시 접종 자료는 제한적일 수 있으므로 허가 후 추가 연구에서 확인되어야 한다. 만일 다른 백신과의 동시 접종 결과 면역반응이 낮아진다면 식약처는 사례별로 잠재적 임상 결과를 고려할 필요가 있다.

4.4. 허가 전 안전성 자료

개발하는 백신의 허가 전 임상시험에서 안전성 자료 평가는 '백신 임상평가 가이드라인(식약처, 2017)'을 참고한다. 개발하는 IPV가 약독화주에서 유래한 경우 안전성 프로파일은 현재 허가되어 있는 내약성이 매우 우수한 wIPV와 매우 유사할 것으로 예상된다. 식약처는 대규모 안전성 임상시험이 필요하지 않다고 결정할 수 있다. 그러나 만일 개발하는 IPV가 새로운 면역증강제 및/또는 첨가제가 포함

되어 있거나 투여경로 그리고/또는 접종 기구가 다른 경우 새로운 백신에서 요구되는 크기와 유사한 안전성 데이터베이스가 필요할 수도 있다. 이것은 사례별로 식약처에 의해 논의되고 승인되어야 한다. 또한 개발하는 IPV에 면역증강제가 포함되어 있다면 접종 부위에서 이상사례 빈도는 높아질 것이다. 만일 이상사례 발생률이 다른 허가된 면역증강제가 포함된 백신제제와 유사하고 위해성보다 유익성이 높다면 이러한 점은 허용될 수 있다. 적절한 약물감시계획이 설정되어야 하고 허가 전에 식약처에 의해 승인을 받아야 한다.

4.5. 시판 후 감시활동

시판 후 감시활동은 '신약 등의 재심사 기준(식약처 고시)' 및/또는 '의약품 등의 안전에 관한 규칙(총리령)' 제4조제1항제11호의 '위해성 관리 계획'에 따른다. 특히 새로운 면역증강제 및/또는 첨가제가 포함된 백신일 경우 안전성 감시활동을 강화하는 것이 특히 중요하다. sIPV는 하나 이상의 폴리오 바이러스 타입에 대해 낮은 기하평균항체가와 항체 지속성을 보일 수 있으므로 시판 후 추가접종의 필요성에 대한 연구를 수행해야 한다. 강화된 감시활동은 식약처에 의해 주기적으로 검토되어야 한다. 만일 허가 전 임상시험 또는 허가 후 안전성 감시활동에서 특이사항이 있었다면 별도의 허가 후 안전성 연구가 필요할 수도 있다.

[부록 1] IPV 생산에 사용되는 바이러스 시드에 대한 개요

이 부록에서는 현재 생산에 사용되고 있거나 미래에 사용될 수 있는 바이러스 시드의 이력을 개괄적으로 설명한다. 바이러스 시드에는 현재 IPV 생산에 사용되는 야생 주(wild strains)와 위험성이 더 낮은 것으로 알려져 대체 시드로 개발 중인 약독화 Sabin주가 포함된다. 생산에 보다 안전하게 사용할 수 있는 새로운 바이러스 주도 개발 중이다.

1. 병원성 균주(virulent strains)로 만든 IPV

Jonas Salk 등에 의해 개발되어 1955년에 허가된 대표적인 IPV와 1980년 대 후반에 도입된 역가가 향상된 IPV는 둘 다 3가지 혈청형의 야생형(병원성) 폴리오바이러스로 제조된다. Salk가 선택한 주는 Mahoney, MEF-1, Saukett로 각각 1형, 2형, 3형을 나타낸다. Mahoney주는 1941년 Drs Thomas Francis와 Walter Mack에 의해 미국 오하이오주 클리브랜드에 사는 건강한 3명의 어린이의 대변에서 수집되어 분리되었다(30). 이후 Salk에 의해 계대 배양되었는데, 여기에는 살아 있는 원숭이에서 14회, 원숭이 정소 배양에서 2회의 계대 배양을 포함한다(31). MEF-1주는 지중해 원정연합군들 사이에서 폴리오가 발병했던 1940년 이집트 원숭이의 접촉에 의해 분리되었다(32). 이 주는 Schlesinger와 Olitsky에 의해 마우스에서의 증식을 위해 조작되었고(33), 이후 Salk에 의해 마비된 마우스의 척수에서 조직 배양으로 옮겨졌다(31). 최초의 Saukett주는 Salk에 의해 1950년에 마비 환자의 대변 검체를 이용한 조직 배양의 직접 접종에 의해 분리되었다(31). Salk는 바이러스의 시드 스톡(seed stock)을 대부분의 제조업체에 제공하여, 바이러스 마스터 시드를 확립하는데 사용하도록 하였다.

제1형 폴리오바이러스의 대체 균주(Brunhilde)는 덴마크에서 Statens Serum Institute(SSI)에 의해 사용되었다. 이 주는 1939년에 David Bodian에 의해 메릴랜드의 환자 7명의 대변 검체 수집물에서 분리되었다(34). 이 균주는 하버드 의과대학(Harvard Medical School in Boston, MA, USA)의 Dr. John Enders의 실험실에 제공되었고, 이곳으로부터 스웨덴 스톡홀름의 Dr. Arne Svedmyr의 실험실에도 제

공되었다. Dr Svedmyr는 SSI에 바이러스를 제공하였다. 표 1은 이들 바이러스의 분리 이력 및 초기 계대를 요약한 것이다.

표 1. IPV생산에 사용된 야생형 바이러스주

주 명칭	분리 출처	위치	연도	참조
Mahoney	건강한 어린이 3명의 대변	미국 오하이오주 클리브랜드	1941	(30)
MEF-1	마비성 환자의 CNS	이집트	1941	(32)
Saukett	마비성 환자의 대변	미국	1950	(31)
Brunhilde	환자 7명의 대변	미국 메사추세츠주	1939	(34)

이후의 연구에서는 이들 주에 대한 의문이 제기되었다. MEF-1의 염기서열이 또 다른 2형 균주(Lansing, 1937년 미국 미시간 주에서 분리)의 염기서열과 17개의 뉴클레오티드와 2개의 아미노산 차이가 있을 뿐 매우 유사한 것으로 밝혀졌다(35). 이 균주는 중동과 미국에서 4년 간격으로 분리되었기 때문에, 이 유사성이 자연에서의 연관성을 나타낼 가능성은 낮다. 1943년 원숭이의 척수에서 확보한 MEF-1는 마우스에서의 증식을 위해 조작되었는데(33), Lansing의 균주와 병원성과 면역학적 특성 측면에서 구별하기가 어려운 것으로 밝혀졌다. Lansing의 균주 역시 마우스에서의 증식을 위해 조작되었던 것이다.

이에 대한 그럴듯한 해명은 Schlesinger와 Olitsky의 실험실에서 참조 균주로 사용된 Lansing의 균주가 실수로 MEF-1로 바뀌었고, 이후의 모든 MEF-1의 스톡(stock)은 Lansing주의 유도체라는 것이다. 또한 뉴클레오티드 몇 개만 다른 2가지 MEF-1 변이가 다른 실험실과 생산시설에서 사용되고 있다는 것이다.

다른 실험실과 제조업체에서 얻은 Saukett주는 다양성의 정도(~10% 뉴클레오티드 치환)가 크게 달라(36, 37), 그것들이 다른 균주임을 증명한다. 일부 차이가 항원 부위에서 관찰되었고 면역원성에도 영향을 미칠 수 있었는데, 이는 향후에 보다 철저한 백신의 특성 분석에 제조업체들이 사용하는 바이러스 마스터 시드 로트에 대한 정확한 염기서열의 결정을 포함하는 것이 필요할 수 있음을 나타낸다.

아래의 흐름도(그림 1-3)는 IPV 제조업체에 따라 1형, 2형, 3형 IPV를 각각 생산하는데 필요한 마스터 시드 로트를 제조하는데 사용되는 각 시드 바이러스의 이력

을 나타낸 것이다. 이 흐름도에서는 백신 제조업체를 대상으로 WHO가 2012년에 실시한 설문조사와 후속 협의를 통해 얻은 정보를 바탕으로 다른 시드의 사용에 대한 개요만을 제공한다. 따라서 이것을 주 또는 백신에 대한 WHO의 적격성 심사 또는 승인을 나타내는 것이라고 간주해서는 안 된다.

그림 1. 제1형 IPV 생산에 사용되는 시드 바이러스의 이력

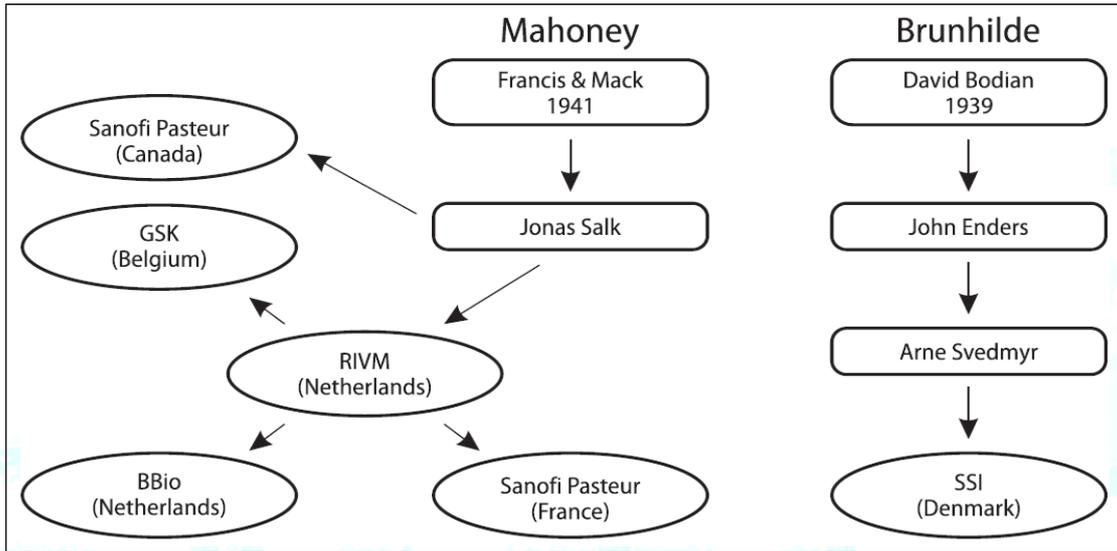


그림 2. 제2형 IPV 생산에 사용되는 시드 바이러스의 이력

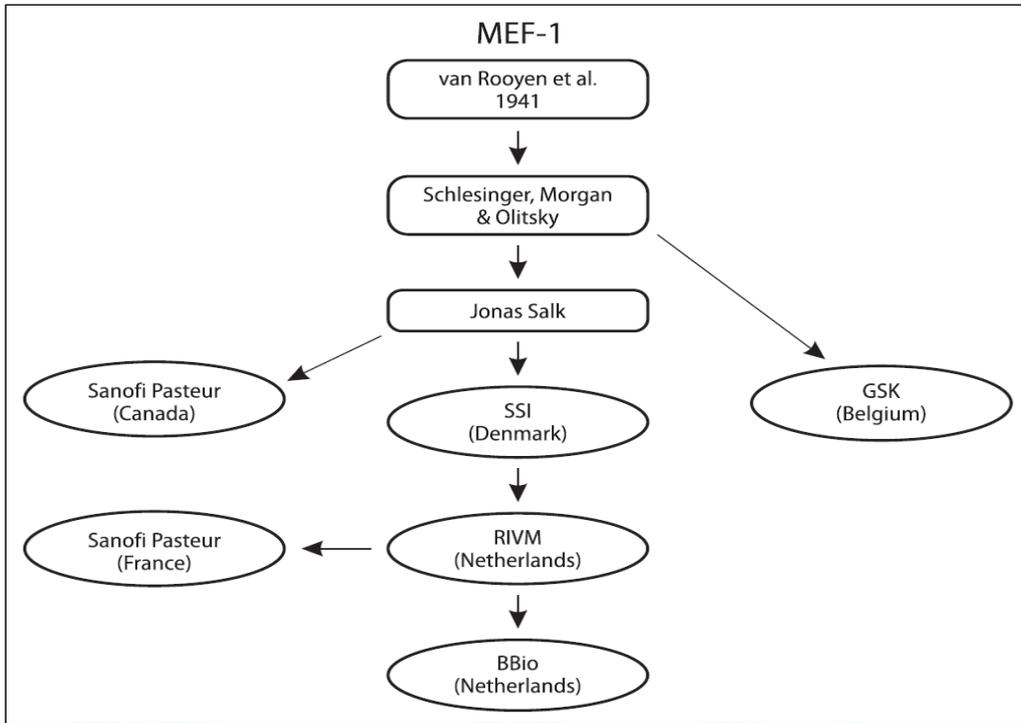
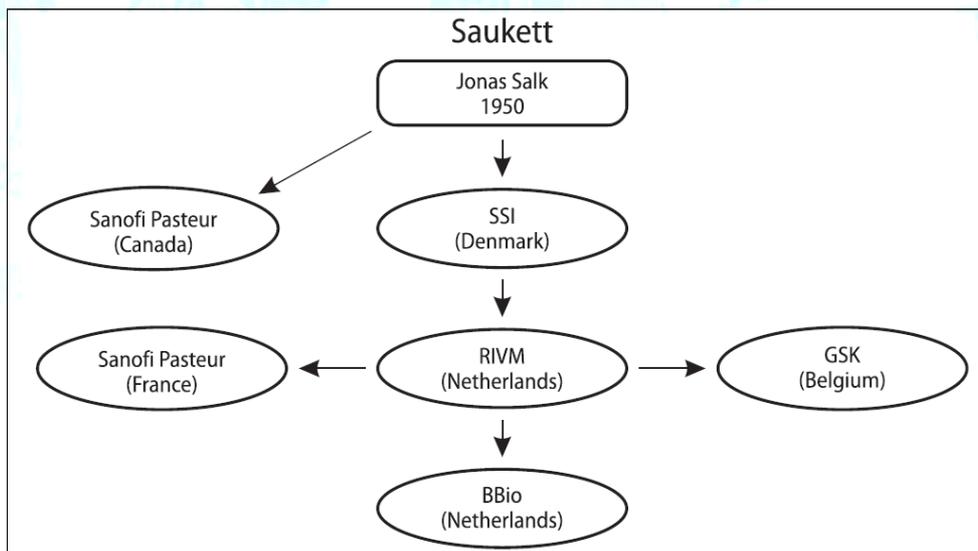


그림 3. 제3형 IPV 생산에 사용되는 시드 바이러스의 이력



흐름도에 나와 있는 제조업체명 및 기관명은 아래 표 2에 정리되어 있다.

표 2. 그림 1-3의 제조업체 및 기관의 명칭

BBio	Bilthoven Biologicals B.V.(구 NVI), Bilthoven, Netherlands
GSK	GlaxoSmithKline Vaccines, Wavre, Belgium
RIVM	Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu(National Institute for Public Health and the Environment), Bilthoven, Netherlands
Sanofi Pasteur(캐나다)	Sanofi Pasteur, Canada
Sanofi Pasteur(프랑스)	Sanofi Pasteur, Marcy L'Etoile, France
SSI	Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark

2. 약독화 균주(사빈주)로 만든 IPV

야생형 폴리오 바이러스가 박멸될 경우, IPV 제조시설이 병원성 바이러스의 잠재적인 출처가 될 가능성이 크다. 따라서 이런 바이러스는 환경으로 재 유입되지 않도록 철저한 방지대책을 세워야 한다. OPV 제조에 사용된 사빈주는 야생형 주에 비해 병원성이 약해, 생산시설에서 부주의로 인한 유출 위험성을 줄이는데도 용이하여 위험성이 적은 IPV 생산용 시드로 제안되었다. 사빈주는 감염된 사람에서, 그리고 일부는 생산에서 유전적으로 불안정하다고 알려졌다. 약독화 표현형을 보존하려면 사빈주를 관리가 잘 되는 지정된 조건에서 증식시켜야 한다. 또한 OPV 제조 중에 분자의 일관성을 - 예를 들어, MAPREC에 의해 - 모니터링하기 위해 각 수확물을 검사하고, 각 단가 원액에 대해 신경 독력 시험을 실시하여 약독화 표현형이 보존되는지 확인한다. IPV 제품이 불활화 될 때, 모든 배치에 대한 전반적인 특성분석이 필요한 것은 아니지만, 일관된 생산을 보증할 필요는 있다. 사빈주는 야생형에 비해 전파성이 약한 것으로 간주되며, 생산시설에서 유출되어 지역사회에 퍼지기 시작하더라도 위험성이 덜할 것이다. 그러나 원상태로 되돌아가 전염성과 발병을 야기할 수 있는 백신 유래 주를 유행시킬 수 있다. 따라서 IPV의 제조에 사빈주를 사용하면 독성의 야생형 주를 제조에 사용하는 것보다는 생물보안의 우려를 줄일 수는 있으나, 완전히 없애지는 못한다. 사용된 봉쇄 수준

을 정당화하기 위해서, 제품이 일관성이 있고 약독화된 표현형이 보존됨을 입증하는 시험이나 공정 밸리데이션이 필요하다(이 문서의 공통 사항과 파트 5 참조). 사빈주의 유래는 참고문헌 1에 설명되어 있으며, 이들 주로 만든 시드 바이러스의 자세한 기원은 WHO 가이드라인(TRS980 annex 2, 9)에서 참조할 수 있다.

[부록 2] IPV *in vivo* 역가시험

IPV의 역가 평가를 위한 시험에는 면역반응에 대한 *in vivo* 시험이 포함된다. 시험 밸리데이션을 위해서는 적절한 WHO 국제표준품(International Standard)을 사용한다. 그러나 백신마다 반응이 다양하므로 모든 제조업체의 백신에 대한 *in vivo* 시험을 표준화하기에 국제표준품(International Standard)이 적합하지 않을 수 있다. 그럴 경우에는 제조업체가 임상시험에서 효능이 입증된 백신 로트로 제품 특이적인 표준품을 확립한다.

최근 연구에서는 랫트를 대상으로 한 *in vivo* 역가 시험이 표준화되었고(38), 앞서 기술된 IPV의 *in vivo* 시험 보다 장점이 있는 것으로 나타났다(18).

적절한 *in vivo* 시험법은 평가 하고자 하는 백신과 표준품의 4가지 희석군을 랫트 대퇴부에 근육주사하며, 희석군 당 10마리 이상의 특이 병원체가 없는 적절한 종의 랫트를 사용한다. 동물마리 수는 95% 신뢰한계에서 25~400%로 역가를 계산이 가능하도록 충분해야 한다. 시험에서 최소한의 동일한 민감도를 보이는 대안이 있다면, 희석군의 수와 희석군 당 동물의 마리 수는 이 문서에서 명시한 것과 다를 수 있다. 각 희석군 당 개별 동물의 체중은 군 평균의 20% 이상을 벗어나지 않아야 한다. 랫트 당 0.5mL씩 접종한다. 용량 범위는 3가지 폴리오바이러스 유형에 대한 용량 반응을 얻을 수 있도록 정한다. 동물 채혈은 20-22일 이후에 한다. 3가지 폴리오바이러스 유형 모두에 대한 중화항체는 챌린지 바이러스(Challenge viruses)로 각 사빈주의 100 CCID₅₀ 처리하고, 지표 세포는 Vero 또는 Hep-2C를, 그리고 35-37°C에서 3시간에 이어 2-8°C에서 18시간 동안의 중화 조건을 이용하여 측정한다. 결과는 35-37°C에서 5~7일간 배양한 후 고정 및 염색(Fixation and staining) 후 판독한다. 중화항체가 시험이 유효하려면, 각 챌린지 바이러스함량은 30-300 CCID₅₀ 범위 내에 있고, 대조혈청의 중화항체는 기하평균항체의 2배 희석군 안에 있어야 한다. 역가는 프로빗 방법(Probit method)을 이용하여 백신검체와 백신표준품에 대한 반응자(Responder)로 지정된 동물의 비율을 비교하여 계산된다. 동물을 반응자(Responder)로 규정하기 위해서는 각각의 폴리오바이러스 유형에 대한 중화항체의 기준치(Cut-off)를 정하는 것이 필요하다. 실험실 간 편

차가 있기 때문에 모든 실험실에 적용할 수 있는 기준치를 정하는 것이 불가능할 수 있다. 이 경우 백신표준품을 이용한 최소 3번의 시험을 토대로 기준치를 정한다. 3회 이상의 시험에 대한 최소 및 최대 기하평균항체가의 \log_2 스케일의 중간값을 기준으로 사용한다. 각각의 세 가지 폴리오바이러스 유형에 대해, 백신의 역가는 표준품보다 통계상으로 유의하게 낮아서는 안 된다. 다음을 만족하지 않으면 시험은 유효하지 않다.

- 백신 검체와 표준품 모두 중간유효용량(ED_{50})은 동물에 투여한 최소 용량과 최대 용량 사이이다.
- 통계분석 결과, 직선성(Linearity)이나 평행성(Parallelism)에서 유의한 편차가 나타나지 않는다.
- 추정되는 상대 역가의 신뢰한계는 추정 역가의 25%와 400% 사이이다.

랫트 시험에 대한 항체 분석을 평행선 방법(Parallel line method)으로 확립한 실험실은, 역가를 반응자의 비율로 변환하는 프로빗 방법 대신에 이 방법을 사용할 수 있다.

실험실은 폴리오 생바이러스 사용을 줄이기 위해 대체 방법을 고안하였다면 이를 밸리데이션하는 것을 권고한다. IPV를 포함하는 혼합백신의 경우, 랫트의 면역원성 시험 수행의 적합성이 평가되어야 한다. 면역원성 시험을 수행하면, 각 바이러스 유형에 대한 최종 원액의 역가에 대해 식약처와 협의하여야 한다.

[참고문헌]

1. Report on the WHO collaborative study to establish the 1st International Standard for Sabin inactivated polio vaccine (sIPV), WHO/BS/2018.2338.
2. WHO Expert Committee on Biological Standardization: fifteenth report. Geneva: World Health Organization; 1963 (WHO Technical Report Series, No. 259).
3. Wood *et al.*, 1997. A new WHO International Reference Reagent for use in potency assays of inactivated poliomyelitis vaccine. *Biologicals*. 25:59-64.
4. Tummers, 1996. Collaborative study for establishment of a biological reference preparation for inactivated poliomyelitis vaccine. *Pharmeuropa Bio* 96:81-91.
5. Fuchs *et al.*, 2003. Establishment of European Pharmacopoeia BRP batch 2 for inactivated poliomyelitis vaccine for *in vitro* D antigen assay. *Pharmeuropa Bio* 1:23-50.
6. WHO Expert Committee on Biological Standardization: sixty-fourth report. Geneva: World Health Organization; 2014(WHO Technical Report Series, No. 987)
7. Shirato *et al.*, 2014. A national reference for inactivated polio vaccine derived from Sabin strains in Japan. *Vaccine* 232:5163-5169.
8. Ferguson *et al.*, 1993 Antigenic structure of poliovirus in inactivated vaccines. *J Gen Virol*. 74:685-690.
9. Rezapkin *et al.*, 2005. Analysis of antigenic profiles of inactivated poliovirus vaccine and vaccine-derived polioviruses by block-ELISA method. *Biologicals*. 33:29-39.
10. Sawyer *et al.* 1997. Potency of wild-type or sabin trivalent inactivated poliovirus vaccine, by enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies specific for each antigenic site. *Biologicals*. 25:299-306.
11. Tano *et al.*, 2007. Antigenic characterization of a formalin-inactivated poliovirus vaccine derived from live- attenuated Sabin strains. *Vaccine* 25:7041-7046.
12. Wood *et al.*, 1992. The second International Standard for anti-poliovirus sera types 1, 2 and 3. *Biologicals*. 20:203-211.
13. Lyng *et al.*, 1963. International Standards for anti-poliovirus sera types 1, 2 and 3. *Bull World Health Organization*. 29:711-720.
14. Wood *et al.*, 1991. WHO Collaborative Study to establish a replacement International Standard for anti-poliovirus sera. Geneva, World Health Organization. BS/91.1660.

15. Cooper *et al.*, 2006. Report of a WHO collaborative study to assess the suitability of a replacement 3rd International Standard for anti-poliovirus sera. Geneva, World Health Organization. WHO/BS/06.2038.
16. WHO Catalogue of International Reference Preparations. Blood products and related biologicals [website]. Geneva: World Health Organization. (<http://www.who.int/bloodproducts/catalogue/en/>, accessed 24 July 2018).
17. Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks. Replacement of Annex 1 of WHO Technical Report Series, No. 878. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization: sixty-first report. Geneva: World Health Organization; 2013: Annex 3(WHO Technical Report Series, No. 978)
18. van Steenis *et al.*, 1981. Potency testing of killed polio vaccine in rats. *Dev Biol Stand* 47:119-128.
19. Ferguson *et al.*, 1993. Antigenic structure of poliovirus in inactivated vaccines. *J Gen Virol*. 74:685-690
20. Rezapkin *et al.*, 2005. Analysis of antigenic profiles of inactivated poliovirus vaccine and vaccine-derived polioviruses by block-ELISA method. *Biologicals*. 33:29-39.
21. Sawyer *et al.*, 1997. Potency of wild-type or Sabin trivalent inactivated poliovirus vaccine, by enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies specific for each antigenic site. *Biologicals*. 25:299-306.
22. Martin *et al.*, 2013. Report on the WHO collaborative study to establish the 3rd International Standard (replacement) for inactivated polio vaccine. Geneva: World Health Organization;(Document WHO/BS/2013.2217; http://www.who.int/biologicals/expert_committee/BS_2217_IPV_3rd_IS.pdf, accessed 9 March 2015).
23. Ren *et al.*, 1990. Transgenic mice expressing a human poliovirus receptor: a new model for poliomyelitis. *Cell*. 63:353-362.
24. Koike *et al.*, 1991. Transgenic mice susceptible to polioviruses. *Proc Natl Acad Sci*. 88:951-955(<http://www.pnas.org/content/88/3/951.full.pdf>, accessed 3 December 2014).
25. Polio vaccines: WHO position paper, January 2014. *Wkly Epidemiol Rec*. 89:73-92 (<http://www.who.int/wer/2014/wer8909.pdf>, accessed 3 December 2014).

26. Brown et al., 1955. The effect of gamma globulin on subclinical infection in familial associates of poliomyelitis cases: II. Serological studies and virus isolations from pharyngeal secretions. *J Immunol.* 74:71-80.
27. Nathanson., 2005. David Bodian's contribution to the development of poliovirus vaccine. *Am J Epidemiol.* 161:207-212(<http://aje.oxfordjournals.org/content/161/3/207.full.pdf+html>, accessed 3 December 2014).
28. Salk et al., 1977 Control of influenza and poliomyelitis with killed virus vaccines. *Science* 195:834-847.
29. Salk., 1982. Immune response and minimum requirement for immunity to disease. *Scand J Infect Dis(Suppl).* 36:65-67.
30. Sabin et al., 1973. History of Sabin attenuated poliovirus oral live vaccine strains. *J Biol Stand* 1:115-118.
31. Salk., 1953. Studies in human subjects on active immunization against poliomyelitis. I. A preliminary report of experiments in progress. *JAMA.* 151:1081-1098.
32. van Rooyen et al., 1943. Poliomyelitis. Experimental work in Egypt. *Edinb Med J.* 50:705-720.
33. Schlesinger et al., 1943. Transmission to rodents of Lansing type poliomyelitis virus originating in the Middle East. *Science* 98:452-454.
34. Howe et al., 1941. Poliomyelitis in the chimpanzee: a clinical pathological study. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 69:149-181.
35. Dragunsky et al., 2004. Evaluation of immunogenicity and protective properties of inactivated poliovirus vaccines: a new surrogate method for predicting vaccine efficacy. *J Infect Dis.* 190:1404-1412.
36. Minor et al., 1982. Genetic and antigenic variation in type 3 polioviruses: characterization of strains by monoclonal antibodies and T1 oligonucleotide mapping. *J Gen Virol.* 61:167-176.
37. Huovilainen et al., 1994. Poliovirus type 3/Saukett: antigenic and structural correlates of sequence variation in the capsid proteins. *Virology.* 199:228-232.

불활화 폴리오 백신 평가 가이드라인(안)

발행일	2020년 10월 00일
발행인	식품의약품안전처 식품의약품안전평가원장 이동희
편집위원장	식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 바이오생약심사부장 박인숙
편집위원	식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 바이오생약심사부 생물제제과 김재욱, 김도근, 지승완, 임재현, 임종미, 진미령, 배창준, 김병철, 김현국, 이유림, 송주경, 이은경, 신진영, 박애란, 윤희성, 배현아, 박나원, 천수정
발행부서	식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 바이오생약심사부 생물제제과

연락처	식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 바이오생약심사부 생물제제과
전화번호	043) 719-3451
팩스번호	043) 719-3450

공익신고자 보호법이 항상 당신의 양심을 지켜드립니다.

식약처의 공무원이나 관계자가 부조리한 행위를 하거나 부당하게 처리한 경우가 있을 때는 다음으로 신고하여 주시기 바랍니다. 신고자의 신원은 절대 보장하겠으며 향후 민원처리에 있어 추호의 불편함이 없도록 최선을 다하여 도와드릴 것을 약속드립니다.

공익신고자 보호제도란?

공익신고자등(친족 또는 동거인 포함)이 공익신고 등으로 인하여 피해를 받지 않도록 **비밀보장, 불이익 보호조치, 신변보호조치** 등을 통하여 보호하는 제도

※보호조치요구방법

식약처 홈페이지(www.mfds.go.kr) > 국민소통 > 국민신문고 > 공직자 부조리신고