총 설(Ⅱ)

혈장 유래 의약품의 바이러스 안전성 검증

김 인 섭
녹십자피디(주) 종합연구소

인간 또는 동물의 혈액, 체액, 세포, 조직, 기관 등을 이용하여 생산되는 생물학적 의약품은 제품의 원료 자체에 감염성 병원 인자가 오염될 가능성이 크기 때문에 안전성에 관한 논란이 오래 전부터 있어왔다[14, 37]. 특히 인간의 혈액을 이용하여 만드는 의약품의 경우 혈액 자체에 사람에게 위해한 바이러스가 오염될 가능성이 매우 높기 때문에, 바이러스 감염질환 예방을 위한 검사를 시행하고 있다 할지라도 안전성을 100% 신뢰할 수 없다[1, 4, 26]. 혈액성분 중 혈장(plasma)을 이용하여 생산하는 혈장 유래 의약품은 수 백명에서 수 천명의 공혈자 혈장을 pooling하여 한 제품단위(Lot)로 만들기 때문에 다른 의약품에 비해 바이러스가 오염될 가능성이 높다[15, 33]. 혈장 유래 의약품에 의한 감염성 질환 부작용은 1940년대부터 보고되었으며, 이러한 부작용을 극복하고 바이러스 안전성을 보증하기 위한 다양한 방법들이 개발되어 왔다[7, 9, 11, 30, 32]. 혈장 유래 의약품의 안전성을 보증하기 위해서는 생산공정관리 및 품질관리를 강화하는 것이 필요하다. 이를 위해 오염될지도 모를 바이러스에 대한 제거 및 불활화 공정이 포함된 제조 공정으로 의약품을 생산하는 것이 무엇보다도 중요하다[10, 18]. 본 총설에서는 혈장 유래 의약품의 바이러스 안전성 보증을 위한 생산공정의 바이러스 제거 및 불활화 검증에 관한 이론적 배경과 국제적 regulation 등을 소개하고, 저자와 다른 연구자의 연구 결과를 토대로 검증 과정의 실제를 제시하였다. 이러한 총설을 통해서 생물학적 의약품의 안전성 검증을 위한 논의가 국내에서도 활발해지기를 기대한다.

혈장 유래 의약품

혈액은 혈구를 중심으로 한 세포성분과 혈장(Plasma)이라는 액체성분으로 나눌 수 있다. 혈장의 91~92%는 수분이고 그 다음 주성분은 단백질로 7~8%를 차지한다. 그 외 당질, 지질, 비타민류, 전해질과 미량의 무기질로 구성되어 있다. 대부분 간장에서 합성되는 혈장 단백질은 알부민, 글로불린 및 섬유소원으로 구성된다. 그 외 특수한 단백질로 혈액응고인자, 철과 결합하는 트랜스페린, 혈색소와 결합하는 합토글로빈, 적혈구 생성촉진 호르몬인 erythropoietin 등이 있다. 이러한 혈장의 각 구성성분들은 수 십년 동안 중요한 의약품으로 사용되어 왔다. 혈장으로부터 분리되어 의약품으로 사용되고 있는 주요 혈장 유래 의약품은 알부민, 면역글로불린제제, 혈액응고제제와 기타 제제로 나누어 볼 수 있다[2].

알부민은 가장 오랜 역사를 갖는 혈장 유래 의약품으로 출혈에 따른 혈장증량제로 사용되며 쇼크의 치료와 화상 등과 같은 소모성 질환에 사용된다. 면역글로불린제제는 알부민과 함께 분획 초기에 근육주사제로 등장한 제제로서 처음에는 홍역, A형간염 등 질병의 예방목적에 주로 사용되었으나, 치료목적으로 정맥주사제가 1970년대부터 개발되어 혈소판자반증[ITP], 가와사끼병 등의 치료에 사용되고 있다. 1980년대에 들어 서는 AIDS 등 면역결핍질환에 사용되면서 사용량이 급증되었다. 또한, 특정 질병에 대한 항체가를 다량 함유한 고면역글로불린(hyperimmune globulin)이 속속 개발되어 B형간염면역글로불린, 파상풍면역글로부린, 수두면역글로불린 등 10여 종의 고면역글로불린이 사용 중에 있다. 혈액응고제제는 A형 혈우병과 B형혈우병 치료제와 이들 제제에 대한 항체를 갖는 환자에게 사용되는 제제가 개발되어 사용되고 있으며, 외과적 수술후에 사용하는 지혈제로 피브리노겐, 트롬빈과 국소지혈제로 봉합제로 사용하는 fibrin sealant도 이용되고 있다. 또한, 항트롬빈 III는 혈전생성을 억제하여 선천적 또는 후천적 혈전색전증의 예방 및 치료에 사용되고 있으며, Alpha 1 proteinase inhibitor 농축제제는 이 성분의 선천적인 결핍환자의 악성폐기종의 예방과 치료에 사용되고 있다. 이러한 혈장 유래 의약품들은 혈장의 pH, 에탄올 농도, 이온 강도, 단백농도와 온도 등을 순차적으로 변화시켜 주요 혈장성분을 분리하는 냉에탄올 분획법(cold ethanol fractionation)과 순차적인 크로마토그래피 공정을 통하여 생산된다[2, 6].

혈장 유래 의약품의 바이러스 안전성

혈장으로 만드는 의약품은 pooling된 수 많은 공혈자 혈장을 원료로 하여 생산되기 때문에 전혈 또는 성분 수혈의 경우보다 바이러스등의 전염성 질환에 노출될 확률이 크다. 예를 들면 특정 혈장 유래 의약품의 생산을 위해서 보통 한 batch당 1,000L 이상의 혈장을 사용하기 때문에, 제조공정 중 바이러스를 불활화 또는 제거할 수 있는 공정이 존재하지 않는다면,

그 제품은 바이러스 전염병을 전파할 가능성이 있다. 혈액 또는 혈액 유래 의약품을 통해 전파될 가능성이 있는 바이러스들의 종류와 특성은 Table 1과 같다. 혈장 유래 의약품의 안정성 측면에서 강조되는 감염성 바이러스는 hepatitis B virus(HBV), hepatitis C virus(HCV), human immunodeficiency virus(HIV) 등이다. 또한 hepatitis A virus(HAV)와 human parvovirus B19(B19)도 혈장에서 발견되는 감염 가능성이 있는 바이러스이다[39-42]. Human T cell leukaemia virus (HTLV) I과 II, Cytomegalovirus 등은 cell-associated 바이러스로 수혈을 통한 감염의 위험성은 있지만, cell-free한 혈장으로 만드는 의약품을 통해 감염될 가능성은 거의 없다[27].

병원성 바이러스에 대한 면역학적 진단법과 PCR(Polymerase Chain Reaction) 진단법의 발달에 따라 혈액의 바이러스 오염 여부 조사의 정확도와 민감도가 높아지면서 수혈 또는 혈장 유래 의약품의 투여에 의한 전염성 바이러스 감염율은 급속하게 감소하여 왔다[44]. HBV의 경우 1975년에 hepatitis B surface antigen(HBsAg)을 진단할 수 있는 3세대 진단법이 상용화 되었고, HCV의 경우 1990년에 anti-HCV 항체 진단법이

Table 1. Viruses transmissible via blood and plasma-derived pharmaceuticals and their model viruses for virus validation studies.

Family	Contaminating virus	Size(nm)	Envelope	Genome	Specific properties	Model(s)
Retro	Human immunodeficiency virus type I & II(HIV)	~100	Yes	ss-RNA	Persistent viraemia in infected patients	**HIV-1**
	Human T cell leukaemia virus I & II(HTLV)				Adult T cell leukaemia. Cell Associated	
Picorna	Hepatitis A(HAV)	25-32	No	ss-RNA	HAV rarely infective via blood due to transient viraemia	**HAV** EMC Polio
Hepadna	Hepatitis B(HBV)	42	Yes	ds-DNA	Core protein p22, Reverse transcriptase (RT) activity. No culture system. Relatively stable against heat, human titre up to 10^8/ml.	
Hepatitis	Hepatitis Delta(HDV)	28-39	Yes	ss-RNA (circular)	Co-infection with HBV. Viral-like agent. Needs HBV for replication. Shell made of HbsAg. HBV antibodies protect against HDV	
Flavi	Hepatitis C(HCV)	30-60	Yes	ss-RNA(+)	Proteins closely related to Flavivirus (Yellow Fever Virus)	BVDV Sindbis*
	Hepatitis G(HGV)				Causal link to viral hepatitis not yet established. Closely related to HCV.	
	Tick-borne encephalitis				Causes tick-borne virus encephalitis	
Calici	Hepatitis E(HEV)	35-40	No	RNA	Endemic in parts of Asia, Africa and Middle East. Subclinical form of HEV identified in non-endemic areas.	Feline Calici
Herpes	Cytomegalovirus(CMV)	100-200 variable	Yes	ds-RNA	Several serotypes. Cell-associated	**HSV-1** PRV BHV-1
	Epstein-Barr virus(EBV)				Cell-associated	
	Herpesvirus-6(HHV-6)				Co-factor of HIV? Lymphoma? Common, latent Exanthema subitum? Post-transfusion seroconversion is rare	
	Herpervirus-7(HHV-7)				?	
	Herpes simplex type I & II(HSV)				Distributed worldwide. Usually latent. Rarely reactivation results in CNS infections	
Parvo	Parvovirus(B19)	18-26	No	ss-DNA	Causes aplastic crisis in haemolytic anaemias. Transient viraemia. Cause for concern in immunosuppressed individuals, AIDS patients.	PPV CPV BPV
Papova	JC virus(JCV) and BK	45	No	ds-DNA	Polyomavirus infections common, reactivated in immunocompromised hosts, AIDS patients.	SV-40

This table was cited and modified from a technical bulletin No. 13 of Q-One Biotech Ltd.(www.q-one.com).
Viruses in bold represent relevant viruses. Viruses in normal type represent model viruses.
* Sindbis belongs to Togaviridae family.

상용화되어, 이를 이용한 감염 여부 진단은 이러한 질병의 예방에 큰 공헌을 하였다. 1982년 처음으로 혈액 또는 혈액 유래 의약품을 통해 후천성 면역 결핍증(AIDS)이 전염될 수 있다는 보고가 있은 후에, 1984년에 AIDS의 원인이 HIV임이 판명되었고, 1985년에 anti-HIV 항체 진단법이 상용화 되었다.

혈장 유래 의약품은 바이러스 감염 가능성의 위험도에 따라 세가지 범주로 나누어 볼 수 있다. 첫째, 알부민과 같이 임상적으로 바이러스 안전성이 검증된 제품; 냉에탄올 분획과 열처리 공정을 이용하여 생산된 알부민의 경우 1948년 이래로 HBV, HCV, HIV등의 바이러스에 의한 감염 사례가 보고된 바가 없다[29, 44]. 둘째, 혈우병치료제와 혈액응고 관련 의약품들과 같이 바이러스 감염 위험성이 매우 높았으나 최근에 바이러스 불활화 공정이 추가된 제품[8, 17, 22]. 셋째, 임상적으로 바이러스 안전성이 검증되었지만, 최근에 바이러스 불활화 공정이 추가된 제품; 근육주사용 면역글로불린의 경우 바이러스에 의한 감염 사례가 보고 된 바 없지만, 투여 경로를 바꾼 정맥주사용 면역글로불린의 경우 HCV 감염 사례가 1993년 미국과 유럽에서 발생하였다[45]. 이후 바이러스 안전성을 증진시키기 위해 1994년부터 열처리 또는 화학처리, 바이러스 필터와 같은 불활화 공정이 생산공정에 도입되었다. 이러한 불활화 방법의 도입 이후 정맥주사용 면역글로불린에서도 HCV를 비롯한 바이러스의 감염 사례가 현재까지 보고된 바 없다[44].

바이러스 안전성 검증의 필요성

일반적으로 혈장 유래 의약품의 안전성은 다음과 같은 다섯가지 원칙에 의해 보증된다. 첫째, 공혈자의 관리. 둘째, 공혈된 원료 혈장의 바이러스 감염 여부 조사. 셋째, 혈장 내재 또는 혼입 가능 위해 바이러스에 대한 제거 및 불활화 공정이 포함된 검증된 분리 정제 방법으로 혈장 유래 의약품의 생산. 넷째, 반제품과 완제품의 바이러스 존재 여부 조사. 다섯째, 임상적 감시(clinical surveillance).

공혈된 원료 혈장과 반제품과 완제품의 위해 바이러스 존재 여부 조사는 혈장에 존재할지도 모를 위해 바이러스를 모두 검사하기 보다는 marker 바이러스들(HIV, HAV, HBV, HCV 등)을 대상으로 수행된다. 이러한 marker 바이러스 조사만으로는 현재 수행하고 있는 분석 방법으로는 검색되지 않는 변이주 또는 미동정 바이러스를 검색할 수가 없어 혈장 유래 의약품의 안전성을 보증할 수가 없다. 또한, 바이러스 검사를 위해 원료 혈장, 반제품 또는 완제품의 일부만 sampling하기 때문에 검사의 한계가 있고, 만약 바이러스가 너무 낮은 농도로 존재하여 검출한계 이하라면 검사의 오류를 범할 수 있다. 이러한 이유로 혈장 내재 또는 혼입 가능 위해 바이러스에 대한 제거 및 불활화 공정이 포함된 분리 정제 방법으로 혈장 유래 의약품의 생산이 이루어져야 한다. 또한, 이러한 의약품 생산 공정에 의한 바이러스 제거 및 불활화 정도가 과학적이고, 합리적으로 검증되어야만 한다[10, 13, 18, 47].

혈장 유래 의약품의 안전성을 확보하기 위한 제조공정의 바이러스 안전성 검증은 제조공정에 의해서 위해 바이러스들이 재현성 있게 제거(removal) 또는 불활화(inactivation)된다는 것을 증명하는 실험결과를 문서화 하는 것이라 할 수 있다. 혈장 유래 의약품의 바이러스 안전성 검증에 관한 관리 지침 제정은 미국 FDA와 유럽연합의 CPMP(Committee for Proprietary Medicinal Products)가 주도하고 있으며, FDA의 경우 CBER(Center for Biologics Evaluation and Research)에서 관장하고 있다. 또한, 미국, 유럽연합, 일본 등 선진국에서는 각 국가간의 규제 차이를 극복하고 전 세계적으로 통용될 수 있는 표준화를 실현하기 위해 ICH(International Conference on Harmonization)를 설립하고 이를 통해 관리 지침을 제정하고 있다. 이러한 미국, 유럽연합 등 선진국 및 국제기구의 관리 지침은 새로 제정되거나 개정되면서, 안전하고 유효한 의약품의 품질 관리 기준을 강화해 나가고 있다.

CPMP가 혈장 유래 의약품의 제조공정에서 바이러스 안전성 보증을 위해 제정한 관리 지침은 아래와 같다.

- Note for guidance on virus validation studies: the design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses(CPMP/BWP/268/95).
- Note for guidance on plasma derived medicinal products (CPMP/BWP/269/95 rev2).
- Note for guidance on quality of biotechnology products : viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell Lines of human or animal origin(CPMP/ICH/295/95).

이러한 CPMP 관리 지침은 미국, 일본, 유럽 등의 국가에서 채택되어 통용되고 있으며, 미국 FDA에서도 ICH와 공동으로 바이러스 제거 공정 검증을 위한 아래와 같은 지침들을 제정하였다.

- Guide to inspections of viral clearance processes for plasma derivatives.
- International Conference on Harmonization(ICH) Q5A Guidance on viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin. EMEA 1997.

바이러스의 제거 또는 불활화 방법

바이러스로부터 안전한 혈장 유래 의약품의 생산을 위해 생

Table 2. Methods used for improving the safety of plasma derivatives with respect to transmission of viruses.

Removal methods	Inactivation methods	Method under development
• Ethanol fractionation	• Heat treatment	• Photochemical inactivation
• Precipitation by e.g. PEG, Octanoic Acid	• Sovent/detergent	• Sodium chlorite
• Chromatography	• Beta-propiolactone/UV	• Caprylate
• Filtration	• Low/High pH	• Iodine treatment
	• Irradiation	• Microwave heating
	• Lyophilizationl	

산 공정은 혈장 내재 또는 혼입 가능 위해 바이러스에 대한 clearance 공정(제거 및 불활화 공정)이 포함되어야 한다. 바이러스 제거방법은 바이러스를 원하는 단백질과 partitioning하는 것으로 침전, 크로마토그래피, 여과(filtration) 등의 공정을 통해서 이루어진다. 바이러스 불활화방법은 열처리, solvent/detergent 처리, low/high pH처리, irradiation 등과 같은 물리·화학적 처리를 통해 바이러스의 감염성(infectivity)을 감소시키는 방법이다(Table 2).

바이러스 제거 공정

냉에탄올 분획공정(Cold Ethanol Fractionation) :

냉에탄올 분획공정은 혈장의 pH, 에탄올 농도, 이온 강도, 단백농도와 온도등을 순차적으로 변화시켜 주요 혈장 성분을 분리하는 방법으로 혈장 유래 의약품의 분리정제를 위해 1940년대부터 사용되어온 방법이다[6]. 이때 알부민의 경우 40%, 글로불린의 경우 25%까지 에탄올이 첨가되며, 분획공정에 걸리는 시간은 알부민의 경우 3일정도 소요된다. 냉에탄올 분획공정중에 바이러스가 타단백과 함께 침전되어 공정 중에 제거될 수 있다. 또한, 첨가된 에탄올에 의해 혈장에 존재할 수도 있는 바이러스가 불활화될 수 있다[20, 21, 23].

크로마토그래피(Chromatography) :

혈장으로부터 다양한 단백질을 선택적으로 분리 정제하기 위해 면역친화 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 소수성 크로마토그래피 등 다양한 크로마토그래피 방법이 사용된다. 이러한 크로마토그래피 과정 중 바이러스가 원하는 단백질과 partitioning이 일어 날 수 있다[11, 22, 24, 25].

여과(filtration) :

Membrane technology의 발달로 최근에 15nm에서 75nm pore size를 갖는 바이러스 필터들이 개발 되었다. 바이러스 필터는 원하는 단백질에 변성을 일으키지 않으면서, 효율적으로 size exclusion에 의해 다양한 종류의 바이러스를 제거시킬 수 있다. 특히 바이러스 필터 공정은 물리·화학적 처리에 매우 큰 저항성을 갖는 HAV, parvovirus B19같은 외피비보유 바이러스(Non-enveloped virus)를 효과적으로 제거할 수 있어 혈장 유래 의약품의 안전성을 증진시킬 수 있는 매우 우수한 공정이다[19, 36].

바이러스 불활화 공정

열처리(Pasteurization) :

60℃에서 10시간 동안 항온하는 열처리는 바이러스의 단백질구조를 파괴하여 바이러스를 불활화 시키는 방법으로 혈장 유래 의약품의 안전성을 보증하는 가장 일반적인 방법이다. 이러한 열처리 방법은 알부민 생산을 위해 1948년부터 사용하여 오고 있지만, 열처리에 약한 단백질들의 경우 단백질의 변성이 일어 날 수 있어 사용이 제한 적이다. 열처리 공정 중 단백질의 변성을 막기 위해 아미노산, 당, citrate 등의 안정제가 첨가되는데, 첨가 되는 안정제의 농도가 높을 경우 바이러스의 안정제로도 작용을 하여 바이러스 불활화 효율이 떨어질 수 있다[12, 20, 21, 34].

건조열처리(Dry heat) :

일반적으로 열에 의해서 변성되기 쉬운 혈액응고관련 단백질들은 동결건조를 하여 단백질의 안정성을 증진시킨다. 동결건조된 단백질들은 상대적으로 열처리에 안정하기 때문에 100℃에서 30분, 80℃에서 72시간, 60℃에서 144시간 정도 열처리를 하여 바이러스를 불활화 시킬 수 있다. 건조열처리시 바이러스의 불활화 정도는 제품의 안정제 및 부형제 조성과 동결건조 후의 함습도 등에 의해 영향을 받는다. 또한, 동결건조 과정 중에도 바이러스가 불활화 된다[3, 8, 24].

Solvent/Detergent(S/D) :

1985년 New York Blood Center에서 개발하여 상용화된 Solvent/Detergent를 이용한 화학적 바이러스 불활화 방법은 혈장 유래 단백질의 활성에 영향을 미치지 않고, HIV, HBV, HCV등 외피보유바이러스(enveloped virus)를 효과적으로 사멸시키는 방법이다. 주로 사용되는 solvent는 tri(n-butyl) phosphate(TNBP)이며, detergent로는 Tween 80, Triton X-100, 또는 sodium cholate가 사용된다. S/D는 enveloped virus의 지질막을 파괴함으로 해서 바이러스를 불활성화 시키며, 그 불활화 효과는 처리 시간과 온도에 따라 달라진다[16, 17, 22, 24, 38].

Low/High pH :

대부분의 바이러스는 low pH(pH 5 이하) 또는 high pH(pH 10 이상)의 환경에 오랫동안 노출될 경우 활성을 잃게 된다. 특정 단백질이 low pH 또는 high pH에서 안정하다면, 제조 공정 중 pH를 조절하여 바이러스를 불활화 시킬 수 있다. 면역글로불린의 경우 pH 4에서 매우 안정한데, 최종 제품의 pH를 4로 조정하여 장기간 보관함으로 해서 바이러스 안전성을 증진시킬 수 있다[5, 23, 28, 35].

바이러스 제거 및 불활화 검증

혈장 유래 의약품의 안전성을 확보하기 위한 제조공정의 바이러스 clearance 검증은 ① 제조 공정에서 바이러스 제거 및 불활화 단계 선정, ② 제조 공정의 scale-down 및 scale-down 공정의 검증, ③ 검증에 적절한 바이러스 선정, ④ 공정 시료의 cytotoxicity와 interference test, ⑤ Scale-down 제조공정에 바이러스 spiking, ⑥ 공정 시료의 바이러스 정량 분석, ⑦ 실험 결과의 해석 단계로 진행된다.

제조 공정에서 바이러스 제거 및 불활화 단계 선정

일반적으로 혈장 유래 의약품 생산 공정은 바이러스 제거 또는 불활화를 위해 열처리, S/D 처리, 바이러스 필터공정 등과 같은 의도적인(Intentional) 바이러스 clearance공정을 포함한다. 또한 단백질의 분리 정제를 위해 사용하는 크로마토그래피 또는 침전공정등에 의해 바이러스의 partitioning이 일어날 수 있다. 따라서 바이러스 안전성 보증을 위해 생산 공정 중 바이러스의 제거 및 불활화가 일어날 수 있는 전 과정을 검증하는 것이 중요하다. 하지만 같은 기작에 의해서 바이러스 제거 또는 불활화가 일어나는 공정을 다 검증할 필요는 없다. 예를 들면 생산 공정 중 열처리를 독립적으로 두번 한다거나 같은 또는 기작이 같은 크로마토그래피를 두번 한다고 했을 때 각 공정을 다 검증할 필요는 없다. 서로 다른 기작에 의해서 바이러스의 제거 또는 불활화가 일어 나는 공정들의 결과만이 결과의 해석을 위해 합산될 수 있기 때문이다[46-48].

제조 공정의 scale-down 및 scale-down 공정의 검증

우수의약품제조기준[GMP, Good Manufacturing Practice]은 어떤 바이러스라도 생산공정에 투입되는 것을 금하고 있다. 또한, 생산 규모로 바이러스 clearance 검증 실험을 하는 것은 불가능하다. 따라서 바이러스 clearance 검증 연구는 따로 분리된 바이러스 연구 시설에서 scale-down된 공정을 사용하여 생산기술자와 바이러스 연구에 능숙한 연구원이 협동으로 수행하여야 한다. 또한, 실험은 비임상시험기준[GLP, Good Laboratory Practice]에 따라야 한다[46-48].

생산 공정의 scale-down 및 scale-down 공정의 검증은 바이러스 clearance 검증 실험을 위해 필수적이다[13, 49]. Scale-down factor에 대한 규정된 지침은 없지만 일반적으로 1/100 ~1/1000배로 scale-down한다. 무엇보다도 중요한 것은 scale-down 공정이 가능한 한 생산 공정과 유사하도록 고안되어야 한다는 것이다. 따라서 scale-down 공정의 검증이 필요하며 이를 위해서 공정상의 parameter들, pH, 온도, 단백질과 다른 성분들의 농도, 반응시간, column bed의 높이, 세척 및 용출액의 linear flow rate, 용출 양상과 각 단계별 효율(yield, specific activity, 단백질의 조성 등) 등을 비교 검증하여야 한다. 연속적인 3회 이상의 scale-down 공정의 검증 결과가 생산공정의 검증 결과와 일치하여야만 바이러스 clearance 검증 결과가 의미를 갖는다.

컬럼 크로마토그래피의 scale-down 배율은 컬럼의 단면적 비율이 결정하며, resin bed의 높이는 일정하여야 한다. 따라서 scale-down 컬럼상에서 용액의 linear velocity와 residence time은 생산 공정상의 값들과 일치하여야만 한다.

검증에 적절한 바이러스 선정

검증 바이러스 선정 시 고려하여야만 할 사항은 아래와 같다[31, 48].

첫째, 검증을 위해 사용될 바이러스는 제품에 오염 가능성이 있는 바이러스 그 자체 또는 가장 유사한 바이러스이어야 한다. 또한, 다양한 물리·화학적 성질의 바이러스를 선택하여 검증을 함으로 해서 일반적으로 모든 종류의 바이러스를 제거 또는 불활화할 수 있다는 것을 보여 주어야 한다.

둘째, 선택된 바이러스는 되도록 물리·화학적 처리에 큰 저항성을 나타내는 것이어서 다른 미지의 또는 동정되지 않은 바이러스의 clearance를 보장할 수 있어야 한다.

셋째, 검증용 바이러스는 되도록 쉽게 분석 가능하며 고농도로 배양할 수 있어야 한다.

넷째, 선택된 바이러스는 검증하는 실험 기간 동안 실험자에게 감염의 위험이 적어야 한다.

대부분의 검증 연구는 쉽게 배양 가능하고 분석 가능한 실험실용 바이러스들을 사용한다. 그렇기 때문에 실험실용 바이러스들은 많은 경우 자연 상태에 존재하는 바이러스들과 물리·화학적 성질들이 다를 수 있다. 따라서 검증 실험을 위해서 선택한 바이러스는 모델(model) 바이러스일 수 밖에 없으며, 제품 생산 공정의 검증에 맞게 선택되었다는 것이 실험자에 의해서 문서적으로 증명되어야 한다.

혈장 유래 의약품의 검증연구를 위해서 사용되는 바이러스는 혈장에 오염 가능성이 있는 바이러스에 대한 relevant 바이러스 및 모델 바이러스로 구분할 수 있으며, 검증용 바이러스는 CPMP guideline에 따라 선택되어져야 한다(Table 1)[47, 48].

HIV-1은 retrovirus의 lentivirus family에 속하는 enveloped, medium-sized, single-stranded RNA 바이러스로 사람의 혈액

또는 혈장으로부터 유래된 어떤 의약품의 검증에도 꼭 사용되어져야만 한다[27, 47]. HCV는 Flaviviridae family에 속하는 enveloped, medium-sized, single-stranded RNA 바이러스로 현재까지는 이 바이러스를 증식시킬 수 있는 적당한 방법이 발견되고 있지 않다[27]. HCV clearance검증을 위해 사용될 수 있는 모델 바이러스로는 togaviruses(eg., Sindbis), flavivirus(eg., Yellow Fever virus), pestiviruses(eg., Bovine viral diarrhoea virus) 등이 있다. 이러한 바이러스들은 HCV와 유사한 생화학적 특성을 갖고 있지만, 작은 물리·화학적 특성의 상이점이 바이러스 clearance 검증에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들면 pestiviruses는 냉에탄올분획과정 중 togavirus와는 다르게 반응하며, HCV는 이러한 점에서는 pestviruses를 더 닮았다. 현재까지 어떤 바이러스가 HCV에 더 적합한 model virus인지 충분한 연구 결과가 없지만, 일반적으로 Bovine viral diarrhoea virus(BVDV)가 널리 쓰이고 있다[5, 13, 23, 47].

Murine encephalomyocarditis virus(EMCV)는 non-enveloped, small, single-stranded RNA virus로 HAV와 같이 Picornaviridae family에 속하여 그 모델 바이러스로 사용되어 왔다[27]. HAV의 세포배양기술이 개발되기 전에는 EMCV를 모델 바이러스로 사용하여 검증 실험을 하였지만, HAV의 세포배양이 가능해졌기 때문에 바이러스 clearance 검증을 위해 HAV를 직접 사용하는 것이 좋다[11, 25]. 하지만 혈장에 HAV에 대한 항체가 다량 존재하므로 HAV의 중화가 일어날 수 있어 실험의 계획과 결과의 해석에 유의하여야 한다. 다른 혈장 유래 non-enveloped virus로 검증하여야만 하는 것은 parvovirus B19이다[47]. B19은 small, single-strandes DNA 바이러스이며, B19의 모델 바이러스로 사용되어온 것들은 canine parvovirus, porcine parvovirus, murine parvovirus, bovine parvovirus들이 있다[43]. 그 중 porcine parvovirus는 여러 종류의 물리·화학적 처리에 강한 저항성을 나타내어 검증 실험에 유용한 것으로 알려져 있다. 면역글로불린 제조 공정의 검증과 같이 생산 제품에 충분한 양의 항체가 존재한다고 판단되면 HAV와 B19의 검증은 생략될 수 있다.

Herpes virus는 lymphoid안에 존재하는 enveloped, large, double-stranded virus로 지금까지 non-cellular blood products의 사용으로 herpesvirus가 전염되었다는 보고는 없다[47]. 하지만 새로운 종류의 herpes virus들이 계속적으로 발견되고 있어 그 검증이 필요하다. HSV-1, HSV-2, HCMV, HHV-6, HHV-7, HHV-8 등과 같은 Herpes virus는 전염 가능한 바이러스들이다[27]. Bovine herpes virus(BHV)가 herpes virus의 검증을 위해 사용되어져 왔는데, 이 virus는 검증에 필요한 만큼 충분히 증식 시킬 수 있고 혈장에 존재하는 항체들에 의해 중화가 일어나지 않으므로 herpes virus의 검증을 위해서 좋은 모델 바이러스이다.

공정 시료의 cytotoxicity와 interference test

바이러스 clearance 검증은 검증 공정의 출발 물질에 바이러스를 spiking한 후 공정을 진행하면서 단계별로 시료를 분획하고, 분획된 시료를 배양세포에 접종하여 감염성 바이러스 입자의 수를 확률적으로 산출하는 과정을 통해 진행된다. 이때 공정 시료가 배양세포에 cytotoxic하다면 바이러스의 정량 분석이 어렵게 된다. 따라서 spiking 실험 전에 미리 생산 공정 또는 scale-down 공정에서 취한 공정 시료를 일정한 배수로 희석하여 배양세포에 접종한 후 배양하면서 cytotoxicity를 나타내지 않는 범위의 희석배수를 구한다. 공정 시료가 cytotoxicity를 나타내지 않는 범위로 희석되어 배양세포에 접종된다 할지라도 공정 시료에 존재하는 성분이 바이러스의 증식을 억제할 수도 있다. 이러한 interference를 검사하기 위해 배양세포에 non-cytotoxic한 범위로 희석된 공정시료를 배양세포에 접종한 후 바이러스를 일정한 희석배수로 희석하여 접종한다. 대조구로 공정시료를 첨가하지 않은 배양세포에 바이러스를 접종하여 감염 정도를 비교하여 interference를 측정한다. 즉 cytotoxicity와 interference 검사는 정확한 바이러스의 정량 분석을 위해 공정 시료를 얼마나 희석해야 하는지를 결정하는 과정이라 할 수 있다.

Scale-down 제조공정에 바이러스 spiking

검증 실험을 위해 spiking되는 바이러스의 양은 생산 공정 중 바이러스가 제거 또는 불활화되는 능력을 정량화 하기 위해서 가능하면 많을수록 좋다. 하지만 투입되는 바이러스로 인해 생산 원료의 조성이 변화되어 공정상의 변화가 야기되지 않아야만 한다. 일반적으로 투입하는 바이러스시료의 부피는 공정 출발물질의 10% 이내여야 한다[46].

바이러스 제거 공정의 검증에서는 바이러스가 partitioning이 일어나는 정도를 바이러스 mass balance 관점에서 분석하여야 한다. 또한, 바이러스 불활화 공정의 검증에서는 바이러스가 불활화되는 정도를 시간에 따른 kinetics로 분석하여야 한다.

공정 시료의 바이러스 정량 분석

바이러스 clearance 검증을 위한 바이러스 정량 분석은 시료를 배양세포에 접종하여 감염성 바이러스 입자의 수를 확률적으로 계산하는 것이 바람직하다. 감염성 바이러스는 50% tissue culture infectious dose($TCID_{50}$) 또는 plaque formation unit로 정량 분석 되며, 그 결과는 적당한 민감도와 재현성이 있어야 한다. 또한, 그 결과는 통계적으로 정확하게 표현되어야 한다[46].

PCR을 이용한 바이러스의 분석은 민감도가 높으며, HBV 또는 HCV와 같이 배양 시스템이 불완전한 바이러스에 이용할 수 있다. 하지만 불활화된 바이러스도 그 결과가 양성으로 나올 수 있으며, 정량분석, 표준화, 결과의 해석 등에 어려움이

있을 수 있다. 이러한 PCR방법은 바이러스 불활화 공정에는 사용할 수 없고 바이러스 제거 공정의 분석에 유용하게 이용될 수 있다.

바이러스 spiking 실험시 시료를 분획하자마자 곧바로 한외여과나 투석, 냉동보존 등과 같은 전처리 과정을 거치지 않고 정량 분석하는 것이 좋다. 세포 배양의 저해 물질들을 제거하기 위해 전처리가 꼭 필요하거나 모든 시료를 같이 분석하기 위해 냉동 보관이 필요하다면 이러한 처리가 결과에 어떠한 영향을 미칠지를 먼저 검증하여야 한다.

검증 실험 결과의 해석

바이러스 정량 분석이 끝나면 그 결과를 기초로 각 공정에서 바이러스가 얼마나 제거 또는 불활화되었는지 바이러스 감소값(virus reduction factor)을 구하게 된다[46-48, 50]. Virus reduction factor는 바이러스가 spiking된 공정출발물질에 존재하는 바이러스 양의 $\log_{10}$값에서 공정진행 후 활성분획에 존재하는 바이러스 양의 $\log_{10}$값을 뺀 log reduction factor로 정의 된다. 또한, spiking하는 stock 바이러스의 양을 기준으로 계산된 값을 log clearance factor라고 정의 한다. 예를 들면 크로마토그래피 공정에서 95ml의 공정 초기 물질에 5ml의 바이러스를 spiking한 후 바이러스를 정량 분석하였더니 5×10^8 $TCID_{50}$/ml이었고, 공정 진행 후 활성분획을 10ml 분획하여 바이러스를 정량 분석하였더니 $5\times10^4 TCID_{50}$/ml이었다면 log reduction factor는 다음과 같이 계산된다.

$\log_{10}(5\times10^8\times100)-\log_{10}(5\times10^4\times10) = 5$

일반적으로 생산공정의 바이러스 clearance 효율은 개별 공정들의 log reduction factor를 합한 cumulative log reduction factor로 표현된다. 1 log 이하의 값을 나타내는 공정은 바이러스 정량 분석의 확률적 오류 범위에 속하므로 cumulative log reduction factor 계산시 무시하여야만 한다.

검증 결과의 해석을 위한 고려 사항

혈장으로부터 의약품을 생산하는 공정 중 바이러스 제거와 불활화 검증은 실험의 계획과 그 결과의 해석에 있어서 여러 가지 이유로 어려울 수 있다. 검증 바이러스들은 특성에 따라 생산 공정 중 제거 또는 불활화 기작이 서로 다를 수 있기 때문이다. 예를 들면 enveloped virus의 경우 S/D 처리에 매우 민감하게 불활화되지만, non-enveloped virus의 경우에는 불활화되지 않는다. 검증에 사용되는 바이러스에 대한 항체가 혈장에 존재한다면, 그 항체에 의한 중화 효과 때문에 바이러스 clearance 검증의 해석을 어렵게 할 수 있다. 또한, 제품 그 자체 또는 제품을 만들기 위해 가해지는 화학 약품들이 바이러스의 화학적 성질을 변화시키거나 응집이 일어나도록 하여 virus의 감염능력을 떨어뜨려 그 결과의 해석을 어렵게 할 수도 있다. 따라서 검증 실험 결과가 신뢰성을 갖기 위해서는 검증 결과의 정확한 해석이 필요하며, 이를 위해서 다음과 같은 요소들을 모두 고려하여 검증 결과를 해석하여야만 한다[46].

첫째, 실험에 사용된 바이러스들의 적합성; 검증 실험을 위해 선택한 바이러스는 특정 세포주와 특정 영양배지를 이용한 세포배양으로 배양되기 때문에 native 바이러스와 성질이 다를 수 있다. 또한, 같은 바이러스라 할지라도 strain들에 따라 또는 배양 방법에 따라 똑같은 처리에 서로 다르게 반응할 수 있다. 따라서 검증에 사용된 바이러스의 strain이름, 배양 방법, 분석 방법, 샘플링과 보관 방법 등을 자세하게 기록하여야만 한다.

둘째, 검증 실험 design의 유의성; 검증된 scale-down 공정이라 할지라도 실제적인 생산 공정과는 다를 수 있다. 또한, 어떤 공정 시료에 바이러스를 spiking하는가도 그 공정의 바이러스 clearance 효과에 영향을 미칠 수 있다.

셋째, 측정된 log reduction factor; 검증한 공정 단계에서 2~4 log reduction 값 또는 그 이상의 값이 나오면 그 단계가 효과적이라고 볼 수 있다. 하지만 특정 공정에서 바이러스 감소 효율의 해석은 spiking하는 바이러스의 양에 따라 달라질 수 있다. 예를 들면 최대 10^4 감염 단위(infectious units)를 흡착할 수 있는 matrix 가 있다고 할 때 투입되는 바이러스의 양이 10^4 이하라면 모든 virus를 제거하는 것으로 결과가 나오겠지만 10^6을 투입하게 되면 1%의 바이러스만 제거되는 결과가 나온다.

넷째, 불활화의 동력학(the kinetics of inactivation); 불활화 검증시 log reduction 값만이 그 단계의 효과를 나타내는 유일한 절대적 값으로 사용될 수는 없다. 일반적으로 바이러스 불활화는 일차 함수 반응을 따르는 것은 아니며, 종종 불활화 공정 초기의 빠른 불활화 속도 후에 느린 불활화 반응이 일어난다. 만약에 시간의 경과에 따라 불활화 속도가 급격하게 감소한다면 불활화 처리방법의 효과가 시간에 따라 감소 할 수 있다고 볼 수 있으며, 또한 생존한 바이러스가 그 불활화 공정에 매우 큰 저항성을 나타낸다고 볼 수도 있다.

다섯째, 바이러스 불활화 또는 제거 공정의 성격; 어떤 공정은 특정 바이러스 clearance에 매우 효과적일 수 있지만 다른 종류의 바이러스에는 효과를 나타내지 않을 수 있다. 또한 공정의 효율이 공정상의 parameter들의 변화에 매우 민감하다면 그 결과의 해석에 매우 주의하여야 한다. 단백질 농도나 온도와 같은 생산 요인의 작은 차이가 바이러스 clearance에 큰 차이를 야기할 수 있기 때문이다.

여섯째, 분석 감도의 제한성(the limits of assay sensitivities); 바이러스 정량 분석 시 공정 시료 자체 또는 첨가되는 화학물질들에 의해서 야기되는 cytotoxicity와 interference로 인해 시료를 고배율로 희석할 필요도 있다. 시료가 희석될수록 분석 감도는 떨어지게 된다. 즉, detection

limit의 범위에 따라 특정 공정의 바이러스 clearance 결과 해석이 달라질 수 있다.

일곱째, 바이러스 clearance 재검증; 제조공정에 변화가 있다면 변화된 공정이 바이러스 안전성에 영향을 줄 수 있으므로 재검증(Revalidation)을 하여야 만 한다. 또한, 크로마토그래피 공정의 경우 사용한 resin의 횟수에 따라 단백질의 분리능 뿐만 아니라 바이러스 partition 정도도 달라 질 수 있다. 따라서 크로마토그래피 공정의 바이러스 검증은 사용된 resin의 재생 횟수에 따라 따로 검증하여야 한다.

맺는 말

생물학적 의약품의 제조공정에서 바이러스 안전성 검증은 제조 공정이 오염 가능한 위해 바이러스를 일정 수준 이상 제거 또는 불활화할 수 있다는 것을 보증하는 과정이라 할 수 있다. 검증 결과 제조 공정이 특정 위해 바이러스를 제거 또는 불활화하는데 효과적이지 못하다면, 추가적인 바이러스 clearance 공정을 개발하여야만 한다. 추가적인 바이러스 clearance 공정은 기존의 바이러스 clearance 공정과는 서로 다른 기작에 의해서 바이러스를 제거 또는 불활화하는 것이 좋다. 또한, 제조 공정 중 적어도 한 공정은 non-enveloped virus를 효율적으로 제거 또는 불활화할 수 있어야 한다.

국내에서 백신, 혈장 유래 의약품을 비롯한 생물학적 의약품의 안전사고에 대한 국민적 관심이 높아짐에 따라 식품의약품안정청 등 제약 관련 정부기관에서 생물학적제제 안전성 강화사업을 2001년부터 시작하였다. 때늦은 감이 있지만 국민에게 공급되는 생물학적 의약품의 안전성 강화사업을 산·학·연 공동 연구로 시작하였다는 것은 매우 뜻깊은 일이다. 이에 본 총설이 국내 생물학적 의약품의 안전성보증을 위한 제조공정의 바이러스 검증 연구에 도움이 되기를 기대한다.

참고 문헌

1. 김현옥. 2001. 수혈로 전파되는 바이러스 질환. *Med. Postgrad.* **29**: 148-152.
2. 이성민, 김인섭. 2001. 혈장으로 만드는 의약품. *Med. Postgrad.* **29**: 153-159.
3. Bennett, P. S., R. Z. Maigetter, M. G. Olson, P. J. Provost, E. M. Scattergood, and T. L. Schfield. 1991. The effect of freeze-drying on the potency and stability of live varicella virus vaccine. *Dev. Biol. Stand.* **74**: 215-221.
4. Berkman, S. A. 1988. Infectious complications of blood transfusion. *Blood Rev.* **2**: 206-210.
5. Bos, O. J. M., D. G. J. Sunye, C. E. F. Nieuweboer, F. A. C. van Engelenburg, H. Schuitemaker, and J. Over. 1998. Virus validation of pH 4-treated human immunoglobulin products produced by the Cohn fractionation process. *Biologicals.* **26**: 267-276.
6. Cohn, E. J., L. E. Strong, W. L. Hughes Jr, D. J. Mulford, J. N. Ashworth, M. Melin, and H. L. Taylor. 1946. Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of the proteins and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J. Am. Chem. Soc.* **68**: 459-475.
7. Cuthbertson, B., K. G. Reid, and P. R. Foster. 1991. Viral contamination of human plasma and procedures for preventing virus transmission by plasma products, pp. 385-435. *In* J. R. Harris(ed.), *Blood separation and plasma fractionation.* Willey-Liss Inc., New York, U.S.A.
8. Dichtelmuller, H., D. Rudnick, B. Breuer, R. Kotitschke, M. Kloft, A. Darling, E. Watson, B. Flehmig, S. Lawson, and G. Frosner. 1996. Improvement of virus safety of a S/D-treated factor VIII concentrate by additional dry heat treatment at 100℃. *Biologicals.* **24**: 125-130.
9. Erstad, B. L. 1996. Viral infectivity of albumin and plasma protein fraction. *Pharmacotherapy.* **16**: 996-1001.
10. Federal Health Office and Paul Ehrlich Institute Federal Office for Sera and Vaccines(1994) Notice on the registration of drugs: requirements for validation studies to demonstrate the virus safety of drugs derived from human blood or plasma. *Bundesanzeiger.* **84**: 4742-4744.
11. Hamman, J., J. Zou, and B. Horowitz. 1994. Removal and inactivation of hepatitis A virus(HAV) during processing of factor VIII concentrates. *Vox Sang.* **67(Suppl. 1)**: 72-77.
12. Heimburger, N. and H. E. Karges. 1989. Strategies to produce virus-safe blood derivatives. *Curr. Stud. Hematol. Blood Transfus.* **56**: 23-33.
13. Hilfenhause, J., M. Niedrig, and T. Nowak. 1993. Theroretical and technical concerns in inactivation/elimination of viruses in plasma derivatives. *Dev. Bio. Stand.* **81**: 117-123.
14. Horaud, F. 1991. Introductory remark: viral safety of biologicals. *Dev. Biol. Stand.* **75**: 3-7.
15. Horowitz, B. 1990. Blood protein derivative viral safety: observations and analysis. *Yale J. Med.* **63**: 361-369.
16. Horowitz, B., A. Lazo, H. Grossberg, G. Page, A. Lippin, and G. Swan. 1998. Virus inactivation by solvent/detergent treatment and the manufacture of SD-plasma. *Vox Sang.* **74(Suppl. 1)**: 203-206.
17. Horowitz, M. S., C. Rooks, B. Horowitz, and M. W. Hilgartner. 1986. Virus safety of solvent/detergent treated antihaemophiliac factor concentrates. *Lancet.* **2**: 186-189.
18. International Conference on Harmonisation. 1998. Guidance on viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin; Availability. *Federal Resister.* **63(185)**: 51074-51084.
19. Johnston, A., A. MacGregor, S. Borovec, M. Hattarki, K. Stuckly, D. Anderson, N. H. Goss, A. Oates, and E.

Uren. 2000. Inactivation and clearance of viruses during the manufacturing of high purity factor IX. *Biologicals.* **28**: 129-136.
20. Kim, I. S., H. G. Eo, C. E. Chang, and S. Lee. 2000. Partitioning and inactivation of viruses by cold ethanol fractionation and pasteurization during manufacture of albumin from human plasma. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 858-864.
21. Kim, I. S., H. G. Eo, C. W. Park, C. E. Chang, and S. Lee. 2001. Removal and inactivation of human immunodeficiency virus(HIV-1) by cold ethanol fractionation and pasteurization during the manufacturing of albumin and immunoglobulins from human plasma. *Biotechnol. Bioprocess Eng,* **6**: 25-30.
22. Kim, I. S., Y. W. Choi, H. S. Woo, C. E. Chang, and S. Lee. 2000. Solvent/detergent inactivation and chromatographic removal of human immunodeficiency virus during the manufacturing of a high purity antihemophilic factor VIII concentrate. *J. Microbiol.* **38**: 187-191.
23. Kim, I. S., Y. W. Choi, S. R. Lee, H. B. Cho, H. G. Eo, H. S. Woo, C. E. Chang, and S. Lee. 2001. Improvement of virus safety of a human intravenous immunoglobulin by low pH incubation. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 619-627
24. Kim, I. S., Y. W. Choi, S. R. Lee, H. S. Woo, and S. Lee. 2001. Removal and inactivation of viruses during manufacture of a high purity antihemophilic factor VIII concentrate from human plasma. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 497-503.
25. Kim, I. S., Y. W. Choi, S. R. Lee, M. S. Lee, K. H. Huh, and S. Lee. 2001. Removal and inactivation of hepatitis A virus during manufacture of a high purity antihemophilic factor VIII concentrate from human plasma. *J. Microbiol.* **39**: 67-73.
26. Kleinman, S. 1999. Residual risk of transfusion transmitted viral infections among seronegative donors: application of the incidence/window period model. *Dev. Biol. Stand.* **102**: 61-65.
27. Levy, J. A., H. Fraenkel-Conrat, and R. A. Owens. 1994. Virology, 3rd ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, U.S.A.
28. Louie, R. E., C. J. Galloway, M. L. Dumas, M. F. Wong, and G. Mitra. 1994. Inactivation of hepatitis C virus in low pH intravenous immunoglobulin. *Biologicals.* **22**: 13-19.
29. McClelland, D. B. L. 1998. Safety of human albumin as a constituent of biologic therapeutic products. *Transfusion.* **38**: 690-697.
30. Menache, D. and D. L. Aronson. 1985. Measures to inactivate viral contaminants of pooled plasma products. *Prog. Clin. Biol. Res.* **182**: 407-423.
31. Minor, P. D. 1993. Criteria for the choice of viruses in validation studies. *Dev. Biol. Stand.* **81**: 215-219.
32. Morgenthaler, J. J. 1989. Inactivation of viruses and safety of stable plasma products. *Beitr. Infusionsther.* **24**: 33-39.
33. Mosley, J. W. and J. Rakela. 1999. Foundling viruses and transfusion medicine. *Transfusion.* **39**: 1041-1044.
34. Nowak, T., M. Niedrig, D. Bernhardt, and J. Hilfenhaus. 1993. Inactivation of HIV, HBV, HCV related viruses and other viruses in human plasma derivatives by pasteurization. *Dev. Biol. Stand.* **81**: 169-176.
35. Omar, A., C. Kempf, A. Immelmann, M. Rentsch, and J.-J. Morgenthaler. 1996. Virus inactivation by pepsin treatment at pH 4 of IgG solutions: factors affecting the rate of virus inactivation. *Transfusion.* **36**: 866-872.
36. Oshima, K. H., T. T. Evans-strickfaden, A. K. Highsmith, and E. W. Ades. 1996. The use of a microporous polyvinylidene fluoride(PVDF) membrane filter to separate contaminating viral particles from biologically important proteins. *Biologicals.* **24**: 137-145.
37. Parkman, P. D. 1996. Safety of biopharmaceuticals: a current perspective. *Dev. Biol. Stand.* **88**: 5-7.
38. Prince, A. M., B. Horowitz, and B. Brotman. 1986. Sterilization of hepatitis and HTLV III viruses by exposure to Tri-n-Butyl phosphate and sodium cholate. *Lancet.* **1**: 706-710.
39. Prowse, C., C. A. Ludlam, and P. L. Yap. 1997. Human parvovirus B19 and blood products. *Vox Sang.* **72**: 1-10.
40. Roberts, P. 1996. Virus safety of plasma products. *Rev. Med. Virol.* **6**: 25-38.
41. Schilt, U. 1989. Overview of viruses relevant to blood transfusion. *Curr. Stud. Hematol. Blood Transf.* **56**: 1-8.
42. Sherwood, W. C. 1993. The significance of the blood-borne viruses: blood banking and transfusion medicine. *Dev. Biol. Stand.* **81**: 25-33.
43. Siegl, G., R. C. Bates, K. I. Berns, B. J. Carter, D. C. Kelly, E. Kurstak, and P. Tattersall. 1985. Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. *Intervirology.* **23**: 61-69.
44. Tabor, E. 1999. The epidemiology of virus transmission by plasma derivatives: clinical studies verifying the lack of transmission of hepatitis B and C viruses and HIV type 1. *Transfusion.* **39**: 1160-1168.
45. Taliani, G., E. Guerra, R. Rosso, M. C. Badolato, G. Luzi, G. Sacco, R. Lecce, C. De Bac, and F. Aiuti. 1995. Hepatitis C virus infection in hypogammaglobulinemic patients receiving long-term replacement therapy with intravenous immunoglobulin. *Transfusion.* **35**: 103-107.
46. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: Human Medicines Evaluation Unit. Committee for Proprietary Medicinal Products(CPMP). Note for guidance on virus validation studies: the design, contribution and interpretation of studies validating the

inactivation and removal of viruses(CPMP/BWP/268/95).
47. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: Human Medicines Evaluation Unit. Committee for Proprietary Medicinal Products(CPMP). Note for guidance on plasma derived medicinal products (CPMP/BWP/269/95 rev2).
48. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: Human Medicines Evaluation Unit. Committee for Proprietary Medicinal Products(CPMP). Note for guidance on quality of biotechnology products: viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell Lines of human or animal origin(CPMP/ICH/295/95).
49. Walter, J. K., W. Werz, and W. Berthold. 1996. Process scale considerations in evaluation studies and scale-up. *Dev. Biol. Stand.* **88**: 99-108.
50. Willkommen, H. and J. Lower. 1993. Theoretical considerations on viral inactivation or elimination. *Dev. Biol. Stand.* **81**: 109-116.