

바이러스 불활화 공정에 대한 Hepatitis A Virus와 Murine Encephalomyocarditis Virus의 민감도 비교

김인섭*

한남대학교 이과대학 생명과학과

Murine encephalomyocarditis virus (EMCV)는 혈장유래의약품의 바이러스 안전성 검증을 위해 hepatitis A virus (HAV)의 모델 바이러스로 사용되어왔다. 근래에 혈액-용고인자제제에 의한 HAV 감염사례가 보고되면서 혈장유래의약품의 HAV 안전성 검증에 대한 국제적인 규제가 강화되어가고 있다. 본 연구에서는 HAV와 EMCV의 바이러스 불활화 공정에 대한 민감도를 평가하여, 혈장유래의약품 제조공정에서 HAV 불활화 공정의 검증법을 표준화하고자 하였다. HAV와 EMCV의 바이러스 불활화 공정에 대한 민감도를 평가한 결과 HAV가 60°C 열처리, low pH 처리(pH 3.9), 0.1 M NaOH 처리, 동결건조 공정 모두에서 EMCV보다 더 저항성이 큰 것을 확인할 수 있었다. EMCV는 특히 열처리와 0.1 M NaOH 처리에 민감하게 불활화 되었지만, HAV는 큰 저항성을 나타내었다. 열처리의 경우 2시간 안에 EMCV는 검출한계 이하로 감소하였지만, HAV는 5시간 후에 검출한계 이하로 감소하였다. 0.1 M NaOH 처리시 EMCV는 15분 안에 검출한계 이하로 감소하였지만, HAV는 120분 정도의 처리에도 감염성 바이러스가 검출되었다. pH 3.9에서 25°C로 14일 동안 항온하였을 때 HAV와 EMCV의 log 감소인수는 각각 1.63, 3.84이었다. 또한 혈액-용고 8인자 제조공정의 동결건조 과정에서 HAV와 EMCV의 log 감소인수는 각각 1.21, 4.57이었다. 이와 같은 결과는 혈장유래의약품 제조공정의 HAV 불활화 또는 제거 검증시 모델 바이러스로 사용된 EMCV의 검증 결과를 해석함에 있어 보다 신중함을 가져야 한다는 것을 보여준다. 또한 보다 정확한 HAV 검증 결과를 얻고자 한다면 모델 바이러스인 EMCV 보다 HAV를 사용하는 것이 보다 더 타당하다고 사료된다.

Key words □ hepatitis A virus, murine encephalomyocarditis virus, validation, virus inactivation

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 오래전부터 있어왔다(28). 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, 23). 혈액성분 중 혈장(plasma)을 이용하여 생산하는 혈장유래 의약품은 수백명에서 수천명의 공혈자 혈장을 pooling하여 한 제품단위(lot)로 만들기 때문에 다른 의약품에 비해 바이러스가 오염될 가능성이 높다(13, 26). 혈장유래의약품에 의한 감염성 질환 부작용은 1940년대부터 보고되었으며, 이러한 부작용을 극복하고 바이러스 안전성을 보증하기 위한 다양한 방법들이 개발되어 왔다(8, 25). 혈장유래의약품의 안정성 측면에서 강조되는 감염성 바이러스는 hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), human immunodeficiency virus (HIV) 등이다. 최근에 와서 hepatitis A virus (HAV)와 human parvovirus B19 (B19)에 대한 안전성이 중요시 되고 있다(30, 31).

일반적으로 혈장유래의약품의 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 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 위해바이러스를 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 위해바이러스에 대한 제거 및 불활화 공정이 포함된 분리 정제 방법으로 혈장유래의약품의 생산이 이루어져야 한다. 또한 이러한 의약품 생산 공정에 의한 바이러스 제거 및 불활화 정도가 과학적이고, 합리적으로 검증되어야만 한다(9, 34).

혈장유래의약품의 안전성을 확보하기 위한 제조공정의 바이러스 안전성 검증은 제조공정에 의해서 위해바이러스들이 재현성

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 042-629-8335, Fax: 042-629-7487
E-mail: inskim@hannam.ac.kr

있게 제거(removal) 또는 불활화(inactivation)된다는 것을 증명하는 실험결과를 문서화하는 것이라 할 수 있다. 혈장유래의약품의 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.

근래에 혈액응고인자제제에 의한 HAV 감염사례가 보고되면서 혈장유래의약품의 HAV 안전성 검증에 대한 국제적인 규제가 강화되어가고 있다(16, 29, 32). HAV는 크기가 25-30 nm 정도이며, single-stranded RNA를 가지고 있는 비-외피 바이러스(non-enveloped virus)이다. HAV는 murine encephalomyocarditis virus (EMCV)와 poliovirus 등이 속해 있는 Picornaviridae family에 속한다(3). 야생형 HAV는 감염시킨 증식 세포에서 매우 천천히 증식하며, 세포병변효과(cytopathic effect: CPE)를 잘 나타내지 않기 때문에 정량 분석이 어려워 바이러스 불활화 검증 연구에 사용하기가 매우 어려웠다. 따라서 HAV와 같이 Picornaviridae family에 속하는 EMCV를 HAV의 모델 바이러스로 사용하여 불활화 공정의 효율을 검증하여 왔다(10-12, 14, 17). 하지만 EMCV가 HAV에 대한 적절한 모델 바이러스인지에 대한 체계적 연구는 보고된 바 없다.

최근에 혈액응고인자제제에 의한 HAV 감염사례가 논란이 되면서 EMCV를 이용한 바이러스 안전성 검증보다는 HAV를 이용한 안전성 검증이 필요하게 되었다. 따라서 *in vitro*에서 증식 속도가 매우 빠르며, CPE를 나타내는 변이종이 개발되었고, 이를 이용한 정량분석법이 확립되면서 HAV를 이용한 검증 실험이 가능하게 되었다(4, 5, 21). 하지만 지금도 여러 제약회사에서 EMCV를 HAV의 모델로 바이러스 안전성 검증에 사용하고 있어 그 검증 결과를 해석하는데 신뢰성이 의문시되고 있다. 이러한 상황임에도 불구하고 여러 가지 불활화 공정에 대한 HAV와 EMCV의 비교검증 실험은 전무한 형편이다. 본 연구에서는 열처리 공정, low pH 처리 공정, 0.1 M NaOH 처리 공정, 동결건조 공정에서 HAV와 EMCV의 불활화 정도를 비교 검증하여, 혈장 유래의약품 및 사람체액, 세포, 조직, 기관 유래 의약품의 제조공정에서 HAV 불활화 공정의 효율성 검증방법을 표준화하고자 하였다.

재료 및 방법

HAV와 EMCV의 배양

HAV (ATCC VR 1402)의 배양과 정량을 위해 FRhK-4 (ATCC CRL 1688) 세포를 사용하였다. FRhK-4 세포를 10% fetal bovine serum (FBS: Gibco BRL, Gaithersburg, USA)을 첨가한 Dulbecco's

Minimum Essential Medium (DMEM: Gibco BRL)에 배양하였다. T-175 flask에 배양된 단층 세포에 HAV를 감염시킨 후 주기적으로 CPE를 관찰하였다. CPE가 명백하게 관찰될 때 배양액과 세포를 수거한 다음, 400×g에서 7분간 원심분리하여 상층액은 따로 모으고 pellet은 재현탁하였다. Pellet을 동결과 해빙 과정을 2회 반복하여 파쇄한 후 400×g에서 7분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 원심 상층액을 혼합한 후 0.45 μm filter로 여과한 다음 소분하여 -70°C에 보관하였다.

EMCV (ATCC VR 129B)의 배양과 정량을 위해 Vero 세포 (ATCC CCL 81)를 10% FBS를 첨가한 DMEM 배지에 배양하였다. T-175 flask에 배양된 단층 세포에 EMCV를 감염시킨 후 주기적으로 CPE를 관찰하였다. CPE가 명백하게 관찰 될 때 배양액과 세포를 수거한 다음, 400×g에서 7분간 원심분리하여 상층액은 따로 모으고 pellet은 재현탁하였다. Pellet을 동결과 해빙 과정을 2회 반복하여 파쇄한 후 400×g에서 7분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 원심 상층액을 혼합한 후 0.45 μm filter로 여과한 다음 소분하여 -70°C에 보관하였다.

국제적으로 통용될 수 있게 시험법을 표준화하기 위해, 국제적으로 통용되는 HAV와 EMCV, 바이러스 배양 및 정량 세포주를 사용하였다.

HAV와 EMCV의 정량

미국 FDA와 유럽연합의 CPMP에서는 의약품 제조공정에서 바이러스 불활화 및 제거 공정의 효율성 검증을 위해 감염성 바이러스의 titer를 세포배양법을 사용하여 정량하도록 권고하고 있다(9, 15, 34). PCR (Polymerase Chain Reaction) 방법은 적은 양의 DNA나 RNA를 증폭하여 바이러스를 검출할 수 있기 때문에 민감도가 더 높을 수 있으나 감염성이 있는 바이러스와 없는 바이러스의 구분이 불가능하기 때문에 일반적으로 바이러스 불활화 검증 연구에서는 사용되지 않는다. 본 연구에서는 감염성 있는 바이러스의 titer를 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀)로 나타내었다. 바이러스 spiking 실험시 바이러스 titer를 정확하게 측정하기 위해서 먼저 바이러스를 spiking하지 않은 음성대조 실험에서 취한 시료들이 바이러스의 정량 분석을 위해 사용되는 세포에 세포독성을 나타내는지, 바이러스 정량분석에 간섭을 일으키는지를 먼저 실험하였다. 바이러스 spiking 실험 중 취한 시료들을 세포독성과 간섭을 나타내지 않은 농도로 바이러스 배양 배지를 사용하여 희석하였다. 희석된 시료를 7배수로 희석하여 24 well plate에 배양된 세포에 0.25 ml씩 접종하였다. 양성 대조군으로 titer를 알고 있는 바이러스를 7배수로 희석하여 24 well plate에 배양된 세포에 0.25 ml씩 접종하였다. 음성대조군으로 바이러스가 spiking되지 않은 배양배지를 0.25 ml씩 접종하였다. 그 후 CO₂ 배양기에서 35°C로 배양하면서 계속적으로 현미경으로 CPE를 관찰하였다. 감염성 바이러스가 검출되지 않을 때, 즉 검출한계 이하로 관찰될 때에는 바이러스의 titer를 98% 신뢰도를 가지고 이론적 최소 검출량(a theoretical minimal detection level)을 사용하여 계산하였다.

열처리공정(pasteurization)

알부민 생산공정 중 바이러스를 불활화하기 위한 열처리 공정(60°C, 10시간)에서 HAV와 EMCV의 민감성을 비교하였다. 열처리 안정제로 알부민 1g 당 13.3 mg sodium caprylacid와 19.7 mg acetyl tryptophane을 포함하고 있는 20% 알부민 용액 18 ml에 HAV와 EMCV를 2 ml씩 첨가하였다. Load titer 측정을 위해 각기 2 ml씩의 시료를 취한 후 남은 시료를 항온 수조에서 60°C가 될 때까지 가온하였다. 시료의 온도가 60°C가 되었을 때를 0시간으로 하여 1시간, 2시간, 3시간, 5시간, 그리고 10시간이 되었을 때마다 2 ml의 시료를 취하였다. 각 시료들을 취하자마자 즉시 titration하였다.

Low pH incubation 공정

사람면역글로불린 또는 제조함 항체 등은 pH 4이하에서도 안정하다. 이러한 생물학적 의약품의 생산공정은 바이러스 안전성을 증진시키기 위해 pH를 4이하로 유지하는 공정을 포함한다. pH 4이하의 낮은 pH에서 HAV와 EMCV의 불활화 정도를 비교하였다. 아세트산 완충용액(pH 3.9, 50 mM) 54 ml에 HAV와 EMCV를 각각 6 ml씩 첨가하였다. pH를 3.9로 조정된 후 6 ml의 시료를 취하였다. 취한 시료의 pH를 즉시 6.8에서 7.2로 조정하고 바로 titration하였다. 남은 시료를 25°C로 항온하면서 4일, 7일, 11일 그리고 14일째 각각 6 ml의 시료를 취하였다. 각 시료들을 취하자마자 pH를 6.8에서 7.2로 조정하고 바로 titration하였다.

0.1 M NaOH 처리 공정

일반적으로 생물학적 의약품의 제조공정에 사용되는 용기 및 기기들은 바이러스 및 세균과 같은 감염성 위해인자를 불활화하기 위해 0.1 M NaOH 용액을 사용하여 세척한다. 이러한 세척 공정에서 HAV와 EMCV의 불활화 정도를 비교 검증하였다. 0.1 M NaOH를 포함한 생리식염수(0.9% NaCl) 54 ml에 HAV와 EMCV를 각각 6 ml씩 첨가하였다. 즉시 6 ml의 시료를 취하여 1.0 M HCl로 시료의 pH를 6.8에서 7.2로 조정된 후 바로 titration하였다. 남은 시료를 20°C로 항온하면서 15분, 30분, 60분, 그리고 120분 간격으로 각각 6 ml의 시료를 취하였다. 각 시료들을 취하자마자 pH를 6.8에서 7.2로 조정하고 바로 titration하였다.

동결건조공정

사람혈액응고 제8인자 제조공정에서 동결건조공정이 HAV와 EMCV의 불활화에 미치는 영향을 살펴보았다. Glycine 120 mM, NaCl 200 mM, CaCl₂ · 2H₂O 1 mM, Sodium citrate 10 mM을 안정제 및 부형제로 포함한 사람혈액응고 제8인자용액 126 ml에 바이러스를 각각 14 ml씩 첨가한 후 10 ml의 시료를 취하였다. 바이러스를 첨가한 용액을 30 ml 유리병에 10 ml씩 분주한 뒤 VirTis 동결건조기(Genesis 25XL, USA)를 이용하여 제조공정의 cycle에 따라 동결건조하였다.

바이러스 감소인수(virus reduction factor)의 계산

바이러스 정량 분석이 끝난 후 그 결과를 기초로 각 공정에서

바이러스 감소인수를 구하였다. 바이러스 감소인수는 바이러스가 spiking된 공정출발물질에 존재하는 바이러스 양의 log 값에서 공정진행 후에 존재하는 바이러스 양의 log 값을 뺀 log 감소인수(reduction factor)로 정의하였다(15). 모든 실험은 독립적으로 세 번 실시하여 평균값을 구하였다.

결과 및 고찰

열처리 공정 중 HAV와 EMCV 불활화

60°C에서 10시간 열처리하는 pasteurization 공정은 바이러스를 불활화시키기 위해 사용하고 있는 가장 일반적인 공정중의 하나이다. 열처리에 의한 바이러스 불활화 기작은 바이러스 구조 또는 바이러스 효소의 변성을 야기시켜 숙주세포에 대한 감염력을 떨어뜨리는 것이라 할 수 있다(17). 열처리 공정에서의 주요 공정 변수는 온도, 시간, 안정제의 농도, 단백질 농도, 열분포 등이다. 열처리에 대한 HAV와 EMCV의 민감도를 비교하기 위해, 알부민 제조과정중 pasteurization 공정에서 HAV와 EMCV의 불활화를 시간에 따라 비교 분석하였다. HAV의 경우 초기 바이러스 titer가 7.13 log₁₀ TCID₅₀에서 5시간이 지난 후에 검출한계 이하로 불활화 되었으며, log 바이러스 감소인수는 ≥4.83이었다. EMCV의 경우는 초기 바이러스 titer가 8.90 log₁₀ TCID₅₀에서 2시간 이내에 검출한계 이하로 급격히 불활화 되었으며, log 바이러스 감소인수는 ≥6.60이었다(Fig. 1). 열처리 공정은 HAV와 EMCV 모두를 효과적으로 불활화 하였지만, EMCV가 HAV보다 열처리에 민감하여 훨씬 빠르게 불활화 되었다. 이러한 결과를 통해 HAV가 EMCV보다 더 열처리에 저항성을 나타낸다는 것을 알 수 있었다.

Low pH incubation 공정 중 HAV와 EMCV 불활화

사람면역글로불린 또는 유전자 제조함 항체와 같은 생물학적 의약품은 pH 4이하에서도 안정하기 때문에, 이러한 의약품의 생산공정은 바이러스 안전성을 증진시키기 위해 pH를 4이하로 유

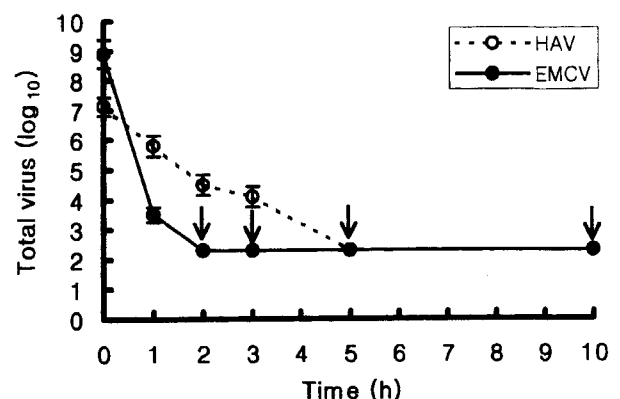


Fig. 1. Kinetics of inactivation of HAV and EMCV during pasteurization at 60°C for 10 hr. The arrows indicate the detection limits of the quantitative assay.

지하는 공정을 포함하기도 한다(19, 24, 27). Low pH 공정에서의 주요 공정 변수는 pH, 온도, 처리 시간이라 할 수 있다. Low pH incubation 공정에서 HAV와 EMCV의 불활화 정도를 비교 검증하기 위해 HAV와 EMCV를 pH 3.9의 아세트산 완충용액에 spiking하고 25°C 항온기에서 정치하면서 0, 4, 7, 11, 14일에 시료를 취하여 바이러스 titer를 측정하였다. 두 바이러스 모두 시간이 지나면서 서서히 불활화 되었다(Fig. 2). 14일간 처리 후 HAV titer가 7.43 log₁₀ TCID₅₀에서 5.80 log₁₀ TCID₅₀로 감소하여 log 바이러스 감소인수는 1.63이었다. EMCV titer는 8.06 log₁₀ TCID₅₀에서 4.22 log₁₀ TCID₅₀로 감소하여 log 바이러스 감소인수는 3.84이었다. 이와 같은 결과에서 낮은 pH에서 HAV가 EMCV보다 더 저항성을 나타낸다는 것을 알 수 있었다.

0.1 M NaOH 처리 공정 중 HAV와 EMCV 불활화

생물학적 의약품의 제조공정에 사용되는 용기 및 기기들은 바이러스 및 세균과 같은 감염성 위해인자를 불활화하기 위해 0.1 M NaOH 용액을 사용하여 세척한다. NaOH 용액을 사용한 세척 공정에서 주요 공정 변수는 NaOH의 농도, 온도, 처리 시간이라 할 수 있다. 0.1 M NaOH를 이용한 세척공정에서 HAV와 EMCV의 불활화 정도를 비교 검증하기 위해 HAV와 EMCV를 0.1 M NaOH 용액에 spiking한 후 20°C로 항온하면서 0, 15, 30, 60, 120분 후에 시료를 취하여 바이러스 titer를 측정하였다(Fig. 3). HAV는 반응 시간동안 점진적으로 불활화되었으며, 120분이 지난 후에도 HAV가 잔존하여 검출되었다. 120분 반응 후 HAV titer가 7.18 log₁₀ TCID₅₀에서 3.80 log₁₀ TCID₅₀로 감소하여 log 바이러스 감소인수는 3.38이었다. EMCV는 0.1 M NaOH 처리 15분만에 titer가 8.24 log₁₀ TCID₅₀에서 검출한계 이하로 불활화 되었다. EMCV의 log 바이러스 감소인수는 ≥5.94이었다. 이러한 결과는 HAV가 EMCV보다 훨씬 0.1 M NaOH 처리에 저항성이 크다는 것을 보여준다.

0.1 M NaOH 처리시 온도에 따른 HAV 불활화 효과를 비교하고자 60°C로 항온하였을 때, 5분안에 초기 바이러스 titer가 7.18 log₁₀ TCID₅₀에서 검출한계 이하로 급격히 불활화 되었다

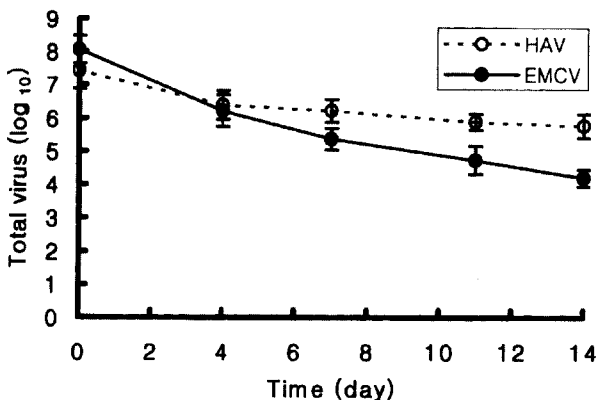


Fig. 2. Kinetics of inactivation of HAV and EMCV during incubation at pH 3.9 and 25°C for 14 days.

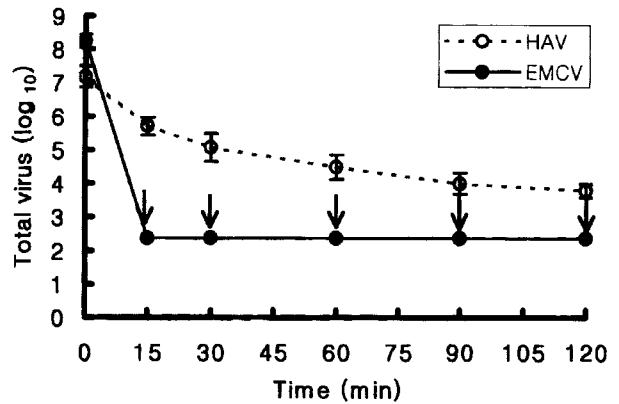


Fig. 3. Kinetics of inactivation of HAV and EMCV during 0.1 M NaOH treatment at 20°C for 120 min. The arrows indicate the detection limits of the quantitative assay.

(자료 미제시). 이러한 결과는 NaOH 처리에 의한 바이러스 불활화 시 고온으로 처리하면 훨씬 효과적으로 바이러스가 불활화됨을 의미한다. 열처리와 NaOH 처리에 의한 바이러스 불활화를 혈장유래 바이러스와 모델 바이러스를 사용하여 비교한 실험 결과에서도 NaOH 처리는 반응하는 온도와 상승효과를 발휘한다는 것이 밝혀져 있다(6).

동결건조공정 중 HAV와 EMCV 불활화

열에 불안정한 생물학적 의약품을 오랫동안 보관하기 위한 방법으로 동결건조를 이용한다. 동결건조는 시료를 냉동시킨 상태에서 진공을 가하여 얼음을 승화시켜서 건조하는 공정으로 단백질을 상하지 않고 건조할 수 있는 장점을 갖고 있다. 그리고, 일단 건조에 성공하면 대부분의 단백질은 변성이 일어나지 않기 때문에 열에 약한 단백질 제품을 오랫동안 보존할 수 있는 방법으로 사용되고 있다(7). 이러한 동결건조 과정 중 바이러스들의 불활화가 일어난다(20-22). 사람혈액응고 제8인자 제조공정에서 동결건조공정이 HAV와 EMCV의 불활화에 미치는 영향을 살펴 보았다(Table 1). 동결건조공정에서 HAV의 log 바이러스 감소인수는 1.21이었으며, EMCV의 log 바이러스 감소인수는 4.57이었다. 이러한 결과는 HAV가 EMCV에 비해 동결건조공정에서 안정성이 더 크다는 것을 보여준다. 50 mM histidine, 150 mM sodium chloride, 0.1%(w/v) polyethylene glycol 3350, 1.0% albumin을 안정제 및 부형제로 첨가한 고순도 사람혈액응고 제8인자 제조공정에서 동결건조공정이 HAV와 EMCV의 불활화에

Table 1. Inactivation of HAV and EMCV during lyophilization

Sample	Total virus titer (Log ₁₀ TCID ₅₀)	
	HAV	EMCV
Before lyophilization	7.44 ± 0.10	7.76 ± 0.11
After lyophilization	6.23 ± 0.21	3.19 ± 0.36
Log reduction factor	1.21	4.57

미치는 영향을 살펴본 다른 실험 결과에서도 HAV의 log 바이러스 감소인수는 2.3이었으며, EMCV의 log 바이러스 감소인수는 4.76이었다(20, 21). 또한 Urokinase 제조공정에서 동결건조 과정 중 HAV의 log 바이러스 감소인수는 1.48(22), EMCV의 log 바이러스 감소인수는 4.54이었다(unpublished result). 이와 같이 동결건조 cycle, 안정제와 부형제의 종류에 관계없이 EMCV가 HAV에 비해 동결건조과정에서 훨씬 민감하게 불활화되었다.

최근 생물산업의 급격한 발전에 따라 새로운 생물의약품의 개발이 급속도로 진전되고 있다. 사람의 혈액, 체액, 뇨, 세포, 조직, 기관 등을 이용한 새로운 생물의약품의 개발은 원료 자체에 감염성 병원 인자가 오염될 가능성이 크기 때문에 안전성이 가장 큰 문제로 대두되고 있다. 따라서 생물의약품이 인체에 유해한 바이러스로부터 오염되는 것을 방지하여 안전한 의약품이 제조되도록 하기 위해 오염바이러스의 검출 및 불활화 또는 제거 검증 관련 기술을 확립해야만 한다(2). 사람 세포 유래 생물의약품에 대한 바이러스 불활화 또는 제거 검증 연구를 수행하는데 있어서 중요한 고려사항은 적절한 바이러스를 선택하는 것과 그 바이러스의 정량 분석을 위한 용이하면서도 신뢰성 있는 시험법을 선정하는 것이다(15). 사람에게 치명적인 질병을 일으키는 HIV, HBV, HCV 등의 외피 바이러스(enveloped virus)는 열처리, 화학처리 등에 매우 민감하게 불활화되기 때문에 적절한 바이러스 불활화처리를 하면 다 사멸되며, 이러한 공정으로 생산된 제품의 경우 바이러스 감염 사례가 없다(18, 33). HAV는 사람의 혈액, 뇨, 분변 등을 통해 전파되는 바이러스로 여러 가지 바이러스 불활화 방법에 큰 저항성을 나타낸다. 본 연구에서 나타난 결과와 같이 열처리, low pH 처리, 0.1 M NaOH 처리, 동결건조 등에 큰 저항성을 나타내, 사람 혈장 또는 뇨 유래 의약품과 같은 생물학적 의약품 제조공정은 HAV를 제거 또는 불활화시키는 적절한 공정을 포함하여야만 한다. 또한 적절한 시험법에 따라 HAV 제거 또는 불활화 정도가 검증되어야만 한다.

본 연구에서는 열처리 공정, low pH 처리 공정, 0.1 M NaOH 처리 공정, 동결건조공정에서 HAV와 모델 바이러스인 EMCV의 불활화 정도를 비교 검증하여 혈장 유래 의약품의 HAV 안전성 검증법을 표준화하고자 하였다. 위와 같이 여러 가지 바이러스 불활화공정에서 HAV와 EMCV의 불활화 정도를 비교 검증한 결과, 실험을 한 모든 공정에서 HAV가 EMCV에 비해 훨씬 저항성이 크다는 것을 알 수 있었다. 또한 고순도 사람혈액응고 제 8인자 제조 공정 중 Q-Sepharose 컬럼 크로마토그래피에 의한 바이러스 제거 검증 결과 보고(20, 21)에 나타난 바와 같이 HAV와 EMCV가 Q-Sepharose ion-exchange resin에 결합하는 정도가 다르다는 것은 두 바이러스의 표면 단백질의 charge가 다르다는 것을 의미한다. 표면 단백질의 charge가 다를 때, 바이러스는 주위의 단백질 또는 다른 물질과 결합하는 정도가 달라져 여러 가지 바이러스 불활화 또는 제거 공정에 다른 효과를 나타내게 된다. 이러한 결과는 사람 혈장, 뇨, 또는 체액 등을 원료로 사용하여 생산되는 의약품의 HAV에 대한 안전성 검증시, 모델 바이러스인 EMCV보다는 HAV를 사용하는 것이 더 타당하다는 것을 보여 준다. 또한 HAV 정량 분석 방법이 개발되기 전에

EMCV를 HAV의 모델 바이러스로 사용하여 얻어진 검증 결과를 해석함에 있어 보다 신중해야 하며, HAV를 이용한 재검증이 필요함을 보여준다.

감사의 말

본 연구는 2002년도 식품의약품안전청 용역연구개발사업의 지원에 의하여 생물의약품평가부에서 주관한 용역사업 결과임. 본 연구를 위해 도움을 준 녹십자피디(주) 종합연구소에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. 김현욱. 2001. 수혈로 전파되는 바이러스 질환. *Med. Postgrad.* 29, 148-152.
2. 정혜성, 박영남, 최정운, 김영립, 김병국, 류승렬, 신진호, 백선영, 이석호, 박순희. 2002. 곤충세포유래 생명공학제품의 바이러스 제거 검증을 위한 모델바이러스로서의 일본뇌염 바이러스 정량. *J. Bac. Virol.* 32, 187-194.
3. Andrewes, C. 1989. *Andrewes Viruses of Vertebrates*, p. 120-145. Balliere Tindal, London.
4. Barrett, P.N., H. Meyer, I. Wachtel, J. Eibl, and F. Dörner. 1996. Determination of the inactivation kinetics of hepatitis A virus in human plasma products using a simple TCID₅₀ assay. *J. Med. Virol.* 49, 1-6.
5. Beales, L.P., D.J. Wood, P.D. Minor, and J.A. Saldanha. 1996. A novel cytopathic microtitre assay for hepatitis A virus and anti-hepatitis A neutralizing antibodies. *J. Virol. Methods* 59, 147-154.
6. Borovec, S., C. Broumis, W. Adcock, R. Fang, and E. Uren. 1998. Inactivation kinetics of model and relevant blood-borne viruses by treatment with sodium hydroxide and heat. *Biologicals* 26, 237-244.
7. Carpenter, J.F., M.J. Pikal, B.S. Chang, and T.W. Ranolph. 1997. Rational design of stable lyophilized protein formulation: some practical advice. *Pharm. Res.* 14, 969-975.
8. Cuthbertson, B., K.G. Reid, and P.R. Foster. 1991. Viral contamination of human plasma and procedures for preventing virus transmission by plasma products, p. 385-435. *In* J.R. Harris (ed.), *Blood separation and plasma fractionation*. Willey-Liss Inc., New York.
9. 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.
10. Highsmith F.A., H. Xue, X. Chen, L. Benade, J. Owens, E. Shanbrom, and W. Drohan. 1995. Iodine-mediated inactivation of lipid- and nonlipid-enveloped viruses in human antithrombin III concentrate. *Blood* 86, 791-796.
11. Highsmith, F.A., H. Xue, M. Caple, B. Walthall, W.N. Drohan, and E. Shanbrom. 1994. Inactivation of lipid-enveloped and non-lipid-enveloped model viruses in normal human plasma by crosslinked starch-iodine. *Transfusion* 34, 322-327.
12. Hollinger, F.B. and J. Ticehurst. 1990. Hepatitis A virus, p. 631-671. *In* B.N. Fields and D.M. Knipe (ed.), *Virology*, 2nd ed. Raven Press, New York..
13. Horowitz, B. 1990. Blood protein derivative viral safety: observations and analysis. *Yale J. Med.* 63, 361-369.
14. Horowitz, B., B. Williams, S. Rywkin, A.M. Prince, D. Pascual, N.

- Geacintov, and J. Valinsky. 1991. Inactivation of viruses in blood with aluminum phthalocyanine derivatives. *Transfusion* 31, 102-108.
15. International Conference on Harmonisation. 1998. Guidance on Viral safety Evaluation of Biotechnology Products Derived From Cell Lines of Human or Animal Origin; Availability. *Federal Register* 63, 51074-51084.
 16. Johnson, Z., L. Thornton, A. Tobin, E. Lawlor, J. Power, I. Hillary, and I. Temperley. 1995. An outbreak of hepatitis A among Irish haemophiliacs. *Int. J. Epidemiol.* 24, 821-828.
 17. 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.
 18. 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.
 19. 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.
 20. 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.
 21. 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.
 22. Kim, I.S., Y.W. Choi, S.R. Lee, Y. Kang, K.M. Lee, D.H. Park, H.S. Woo, and M.S. Lee. 2002. Removal and inactivation of hepatitis A virus during manufacture of urokinase from human urine. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 7, 340-346.
 23. 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.
 24. 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.
 25. Morgenthaler, J.J. 1989. Inactivation of viruses and safety of stable plasma products. *Beitr. Infusionsther.* 24, 33-39.
 26. Mosley, J.W. and J. Rakela. 1999. Foundling viruses and transfusion medicine. *Transfusion* 39, 1041-1044.
 27. 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.
 28. Parkman, P.D. 1996. Safety of biopharmaceuticals: a current perspective. *Dev. Biol. Stand.* 88, 5-7.
 29. Peerlinck, K. and J. Vermynen. 1993. Acute hepatitis A in patients with haemophilia A. *Lancet* 341, 179.
 30. Prowse, C., C.A. Ludlam, and P.L. Yap. 1997. Human parvovirus B19 and blood products. *Vox Sang.* 72, 1-10.
 31. Roberts, P. 1996. Virus safety of plasma products. *Rev. Med. Virol.* 6, 25-38.
 32. Robinson, S.M., H. Schwinn, and A. Smith. 1992. Clotting factors and hepatitis A. *Lancet* 340, 1465.
 33. 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.
 34. 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).

(Received September 16, 2003/Accepted December 4, 2003)

ABSTRACT: Comparative Inactivation of Hepatitis A Virus and Murine Encephalomyocarditis Virus to Various Inactivation Processes

In Seop Kim*(Department of Biological Sciences, Hannam University, Daejeon 306-791, Korea)

Murine encephalomyocarditis virus (EMCV) has been used as a surrogate for hepatitis A virus (HAV) for the validation of virus removal and/or inactivation during the manufacturing process of biopharmaceuticals. Recently international regulation for the validation of HAV safety has been reinforced because of the reported cases of HAV transmission to hemophilic patients who had received antihemophilic factors prepared from human plasma. The purpose of the present study was to compare the resistance of HAV and EMCV to various viral inactivation processes and then to standardize the HAV validation method. HAV was more resistant than EMCV to pasteurization (60°C heat treatment for 10 hr), low pH incubation (pH 3.9 at 25°C for 14 days), 0.1 M NaOH treatment, and lyophilization. EMCV was completely inactivated to undetectable levels within 2 hr of pasteurization, however, HAV was completely inactivated to undetectable levels after 5 hr treatment. EMCV was completely inactivated to undetectable levels within 15 min of 0.1 M NaOH treatment, however, residual infectivity of HAV still remained even after 120 min of treatment. The log reduction factors achieved during low pH incubation were 1.63 for HAV and 3.84 for EMCV. Also the log reduction factors achieved during a lyophilization process of antihemophilic factor VIII were 1.21 for HAV and 4.57 for EMCV. These results indicate that HAV rather than EMCV should be used for the virus validation study and the validation results obtained using EMCV should be precisely reviewed.