

행정간행물 기록번호

디프테리아·파상풍 포함 혼합백신의 품질 및 안전성·유효성 평가 가이드라인

(Recommendations to assure the quality, safety
and efficacy of diphtheria–tetanus based
combined vaccines)

2014. 2.

식품의약품안전처

디프테리아 · 파상풍 포함 혼합백신의 품질 및 안전성 · 유효성 평가 가이드라인

(Recommendations to assure the quality, safety
and efficacy of diphtheria–tetanus based
combined vaccines)

2014. 2.

식품의약품안전처

이 가이드라인은 식품의약품안전처에서 관련 업계의 이해관계자 및 산·학·연 전문가의 의견을 반영하여 현재의 과학기술 수준에서 국내 백신 제조업체의 디프테리아·파상풍(DT) 포함 혼합백신의 개발 및 제품화를 위한 가이드라인을 제공하고자 작성되었습니다. 생물의약품에 대한 심사 경험과 전문가의 의견에 근거하여 식품의약품안전처의 최근 견해를 기술하였으며, 향후 국제적 동향, 과학기술의 발전 등에 따라 수정될 수 있습니다. 또한, 본 가이드라인은 법적 효력이 있는 사항이 아니며, 개별 사항에 따라 다르게 해석될 수 있음을 알려 드립니다.

※ 이 가이드라인에 대하여 의견이 있는 경우 아래로 문의하시기 바랍니다.

식품의약품안전처
바이오생약국 바이오의약품정책과

T.043-719-3318 F.043-719-3300

식품의약품안전평가원
바이오생약심사부 생물제제과

T.043-719-3478 F.043-719-3450

목 차

1. 서론	1
2. 용어 및 약어정리	2
3. 적용 범위	6
4. 일반 고려사항	7
5. 혼합백신의 제조 및 품질관리	10
5.1 일반적인 제조 권고사항	10
5.2 생산관리	10
5.2.1 생산 균주, 시드 로트 및 배양배지	10
5.2.2 단일 수득물	12
5.2.3 정제 톡소이드 원액	15
5.2.4 최종원액	16
5.3 충전 및 용기	22
5.4 최종제품 품질관리	22
5.4.1 확인	23
5.4.2 무균	23
5.4.3 역가	23
5.4.4 엔도톡신	25
5.4.5 잔류 무독화제 함량	25
5.4.6 특이독성(무독화)	26
5.4.7 이상독성부정	26
5.4.8 면역증강제 함량	26
5.4.9 보존제 함량	26
5.4.10 pH	26
5.4.11 실용량	26
5.4.12 완제의약품 용기 검사	27

5.5 기록	27
5.6 라벨링	27
5.7 보유검체	27
5.8 유통 및 수송	27
5.9 안정성, 보관, 유효기간	28
5.9.1 안정성	28
5.9.2 보관조건	29
5.9.3 유효기간	30
5.10 국제표준품 및 국내표준품	30
6. 혼합백신의 비임상 평가	34
6.1 서론	34
6.2 조제 전 개별백신성분의 특성분석	35
6.2.1 안전성 평가	36
6.2.2 안정성 평가	37
6.2.3 특성분석	37
6.3 혼합물에 들어있는 개별 백신성분의 특성분석	37
6.3.1 면역원성/역가	38
6.3.2 면역증강제	39
6.3.3 비임상 안전성 연구	39
6.3.4 독성 시험	40
6.3.5 안정성 연구	41
7. 혼합백신의 임상 평가	42
7.1 서론 및 범위	42
7.2 시나리오와 임상시험 설계	44
7.2.1 임상개발 계획 시 고려사항	44
7.2.2 새로운 혼합백신에서 나타날 가능성이 있는 시나리오 개요	45
7.2.3 일정과 투여군	47
7.2.4 병용투여 백신	48
7.2.5 특수한 환자를 대상으로 한 연구	48

7.3 면역반응 평가	49
7.3.1 면역원성 연구의 설계와 범위	49
7.3.2 항체반응 평가 분석	49
7.3.3 접종시험에 대한 면역원성 평가변수	52
7.3.4 1차 분석	54
7.3.5 2차 분석	56
7.3.6 기능적 항체반응의 평가	56
7.3.7 역 누적분포 곡선에서 나온 추가 정보	56
7.3.8 운반체 단백질에 대한 면역반응	57
7.3.9 면역기억	57
7.3.10 항체지속과 추가접종 시기	57
7.4 안전성 평가	58
7.5 시판 후 연구 및 감시	59
8. 참고문헌	61

1. 서론

혼합백신은 2개 이상의 항원으로 구성되는 백신으로 하나 이상의 감염증을 예방하거나 동일 미생물의 서로 다른 형태 또는 혈청형에 의해 유발되는 감염증을 예방하기 위한 것이다. 디프테리아(D) 및 파상풍(T) 독소이드와 다른 몇몇 항원들의 동시 투약을 허용하는 혼합백신은 20세기 중반 이후부터 사용되었다. 초기의 일부 디프테리아·파상풍(DT) 포함 혼합백신에는 개량불활화 폴리오백신(IPV) 및/또는 전세포 백일해 백신(DTwP)이 포함되어 있다. 이후에는 DTwP의 대체방법으로 다양한 정제백일해 항원(DTaP)이 개발되었으며(국내에는 1982년에 DTwP에서 DTaP로 전환), 여기에 b형 헤모필루스 인플루엔자 접합백신(Hib conj.)이나 B형 간염 표면 항원(HBsAg)이 하나 이상 결합되어 사용되고 있다.

최근에는 사용연령 범위(즉, 영아, 유아, 어린이, 청소년, 성인)에 따라 각 항원의 양과 항원의 총 범위는 다르지만, 전 세계적으로 DTwP-포함 및 DTaP-포함 혼합백신이 많이 이용되고 있다.

백일해 성분이 없거나 개량불활화 폴리오백신(IPV)과 같은 다른 항원을 포함한 디프테리아·파상풍(DT) 포함 백신도 있다. 디프테리아·파상풍(DT) 포함 혼합백신은 일반적으로 세균과 바이러스에서 유래된 항원을 포함하고 있다. 현재 일부 국가에서 승인된 혼합백신은 모두 흡착 디프테리아, 파상풍 및 정제 백일해 혼합백신(DTaP), 개량불활화 폴리오백신(IPV), B형간염표면항원(HBsAg) 및 헤모필루스 인플루엔자 비형 접합백신(Hib conj.)으로 구성되어 있지만, 향후에는 한층 광범위한 혼합백신이 개발될 가능성이 상당히 높다(예. 다당질 결합 수막구균 포함).

이 가이드라인은 백신 제조업체에 디프테리아·파상풍(DT) 포함 혼합백신의 생산, 품질 관리 및 안전성 유효성 평가에 관한 배경과 지침을 제공하기 위한 것이다. 이 문서의 5장은 디프테리아·파상풍(DT) 포함 혼합백신의 제조 및 품질평가에 관한 지침을 다루고 있으며 6장은 혼합백신의 비임상적 평가에 대한 지침을 다루고, 7장은 임상적 평가에 관한 지침을 포함하고 있다. 이 가이드라인과 함께 백신의 비임상 및 임상평가에 관한 가이드라인을 포함하여 관련된 단일백신의 WHO 가이드라인들과 같이 참조하는 것이 좋다.

2. 용어 및 약어정리

아래의 용어정의는 이 가이드라인에 한하여 적용한다.

기능적 항체(functional antibody) : 항원을 결속시키는 항체로, 실험실 시험으로 입증될 수 있는 생물학적 효능(예, 독소 중화, 바이러스 불활화, 옵소닌(opsonin) 또는 살균 활동, 전세포 응집)이 있다.

기초접종(primary vaccination) : 임상적 방어효과를 유도하기 위하여, 6개월 미만의 간격으로 미리 정한 기간 동안 처음으로 백신을 접종하거나 일련의 백신 접종을 수행하는 것을 말한다.

단일 수득물(single harvest) : 접종, 수득 및 공정 처리한 하나의 배양배지에서 얻은 독성 여과액 또는 독소이드를 말한다.

대조백신(comparator vaccine) : 기허가 백신 또는 유효성이 있는 백신으로 인정되는 것으로 실험 백신과 함께 시험하여 비임상 또는 임상시험에서 활성 대조군으로 사용한다. 혼합백신의 연구에 사용된 대조백신의 예는 7.2.2 표1에 나와 있다.

로트(lot) : 하나의 최종원액으로부터 제조기간 내에 일련의 제조공정에 의해 균질성을 갖도록 제조된 제품군을 말한다.

마스터 시드 로트(master seed lot) : 단일 균주에서 유래된 다량의 세균현탁액이 단일 로트로 처리되어 균일한 조성을 이루는 것. 제조용 시드 로트의 준비를 위한 접종배지로 사용된다. 마스터 시드 로트는 냉동품이나 안정성을 보장하는 것으로 알려진 온도에서 냉동건조품으로 보관해야 한다.

면역원성(immunogenicity) : 항체 매개 및/또는 세포 매개 면역 및/또는 면역학적 기억을 유도할 수 있는 백신의 능력을 말한다.

무독화시험(specific toxicity) : 의약품의 제조공정 중에 존재한 특정의 독성성분이 규정에 표시된 정도 이하로 독성이 소실되어 있는지 판정하는 시험이다.

반응원성(reactogenicity) : 백신접종과 인과관계에 있다고 생각되는 국소 또는 전신반응이다.

백신 유효성(vaccine efficacy) : 백신 미접종 경우와 비교하여, 백신접종 이후 임상적 질병에 걸릴 가능성 또는 확률의 감소. 직접적 방어(즉, 백신접종에 따라 유도된 방어)를 기준으로 백신 유효성을 평가한다.

백신 효과(vaccine effectiveness) : 지정 집단에서 백신접종에 따른 방어 비율. 백신 효과는 직접적인 방어와 간접적 방어(즉, 백신접종 집단에 의한 미접종자의 방어) 모두를 포함한다. 또한 백신접종 범위, 백신 균주와 병원 균주와의 상관관계, 그 집단의 백신 도입 이후 백신에 포함되지 않은 균주에 의한 질병 발생률에 의해 백신 효과를 결정한다.

비열등성 마진 또는 기준(non-inferiority margin or limit) : 적절한 신뢰구간에 기초하여 미리 정한 기준. 이 기준을 충족하면 면역반응에서 미리 정한 차이는 임상적으로 의미가 있는 것으로 간주되지 않을 수 있다.

비열등성시험(non-inferiority trial) : 연구 대상 제품에 대한 반응이 대조백신(활성 또는 위약)보다 임상적으로 열등하지 않음을 보여주는데 일차적인 목표를 두고 실시하는 임상시험을 말한다.

시드 로트(seed lot) : 단일 배양에서 얻은 특정 세균, 바이러스 등의 균일한 부유액을 소분하고 그 유전적 성질을 충분히 안정하게 하는 조건으로 보존된 것을 말한다.

안정성시험(stability) : 의약품의 성상, 성분 등이 일정 기간 동안 규정에 표시된 정도 이상으로는 변화하지 않는다는 것을 판정하는 시험이다.

약물유해반응/이상약물반응(adverse drug reaction, ADR): 의약품 등을 정상적으로 투여·사용한 이후 발생한 유해하고 의도하지 않은 반응으로서 해당 의약품 등과의 인과관계를 배제할 수 없는 경우를 말하며, 자발적으로 보고된 유해사례 중에서 의약품 등과의 인과관계가 알려지지 않은 경우에는 약물유해반응으로 간주한다.

유해사례(adverse event/adverse experience, AE) : 의약품 등의 투여·사용 중 발생한 바람직하지 않고 의도되지 않은 징후(sign, 예. 검사실 결과치의 이상 표기), 증상(symptom) 또는 질병을 말하며, 당해 의약품 등과 반드시 인과관계를

가져야 하는 것은 아니다.

이상독성부정시험(innocuity) : 의약품의 제조과정 중 유입될 수 있는 외래성 물질에 의한 이상반응을 확인하기 위한 시험이다.

이차변수(secondary endpoints) : 일차변수 외에 임상시험의 결과를 평가하는데 가장 적당할 것으로 생각되는 지정 변수.

일차변수(primary endpoints) : 임상시험의 결과를 평가하는데 가장 적당할 것으로 여겨지는 미리 정한 변수(예. 안전성, 유효성 또는 면역원성)를 말한다.

정제 특소이드원액(bulk purified toxoid) : 단일 수득물이나 다수의 단일 수득물의 플로부터 조제한 가공 정제물질. 최종원액이 만들어지는 모 물질이다.

제조용 시드 로트(working seed lot) : 마스터 시드 로트에서 유래된 단일 아균주로 구성되는 세균배양. 제조용 시드 로트는 마스터 시드 로트에 대해 기술한 것처럼 분액하여 보관한다. 제조용 시드 로트는 가능한 한 적은 배양계로 마스터 시드 로트를 통해 준비하며, 마스터 시드 로트와 동일한 특징을 가지며, 단일 수득물 제조용 접종배지를 위한 것이다.

최종 로트(final lot) : 모든 면에서 균일한 밀폐된 최종용기들의 모음. 원칙적으로, 최종 로트는 한 번의 지속적인 작업 단계에서 단일 최종원액 용기에서 채우거나 가공 처리(예. 냉동건조)를 거쳤다. 서로 다른 여러 최종 로트는 여러 작업 세션에서 동일한 최종원액으로 채우거나 추가 가공 처리를 거칠 수 있다. 이와 관련된 최종 로트(배치)는 서브 배치, 서브 로트, 충전 로트 혹은 냉동 건조 로트라고 하며, 명확한 최종 로트 번호로 확인이 이루어져야 한다.

최종원액(final bulk) : 한 용기 내에서 조제되어 바로 분주할 수 있는 상태로서 그 내용의 어느 부분을 취하여도 성상 및 품질에 있어서 균일하다고 인정되는 것을 말한다. 다만, 그 균일한 상태를 유지하기 위해 교반조작을 실시하는 것은 허용된다.

추가접종(booster vaccination) : 면역반응을 강화시키고 장기 방어효과를 유도하기 위하여 기초 접종 이후 특정 시기(최소 6개월)에 다시 접종하는 것을 말한다.

혈청전환(seroconversion) : 백신의 면역원성에 관한 정보를 제공하며, 혈청 음성에서 혈청 양성으로 전환되는 것과 관계가 있다고 간주되는, 미리 정해 놓은

항체농도 증가. 이미 항체가 존재한다면, 혈청전환은 지정 저농도에서 의미 있는 높은 지정 농도로의 전환을 의미한다.

혼합백신(combined vaccine) : 2개 이상의 항원으로 구성되며 이를 최종 조제 단계에서 제조업체가 결합하거나 투약 직전에 결합하는 백신. 이 백신은 하나 이상의 질병을 예방하거나 동일 미생물의 서로 다른 균주 또는 혈청형에 의해 유발되는 하나의 질병을 예방하기 위한 것이다.

※ 디프테리아·파상풍(DT) 포함 혼합백신 약어 정리

DTaP : 흡착 디프테리아, 파상풍 및 정제 백일해 혼합백신

DTaP-HepB : 흡착 디프테리아, 파상풍, 정제 백일해 및 B형 간염(유전자재조합) 혼합백신

DTaP-IPV : 흡착 디프테리아, 파상풍, 정제 백일해 및 개량 불활화 폴리오 혼합백신

DTwP : 흡착 디프테리아, 파상풍 및 백일해 혼합백신

DTwP-HepB : 흡착 디프테리아, 파상풍, 백일해 및 B형 간염(유전자재조합) 혼합백신

DTwP-HepB+fib 또는 **DTwP-HepB+fib** : 흡착 디프테리아, 파상풍, 백일해, B형 간염(유전자재조합) 및 헤모필루스 인플루엔자 비형 혼합백신

Td : 성인용 흡착 디프테리아 및 파상풍 혼합백신

Tdap : 성인용 흡착 디프테리아, 파상풍 및 정제 백일해 혼합백신

3. 적용 범위

이 가이드라인은 디프테리아·파상풍(DT) 포함 혼합백신의 품질 및 안전성·유효성 평가에 관한 지침을 제공하기 위한 것이다.

4. 일반 고려사항

「생물학적제제 등의 품목허가·심사규정」, 「생물학적제제 기준 및 시험방법」 등을 기초로 하여 작성하였으며, 그 외에도 ‘WHO 가이드라인’, ‘유럽약전’ 등에 기술된 혼합백신과 관련된 사항들을 고려하였다.

디프테리아·파상풍(DT) 포함 혼합백신의 품질에 대한 중요한 사항은 다음과 같다.

- 의도한 용도에 맞는 적합한 면역원성, 적절한 반응원성 및 안정성을 가지는 최적의 백신 조성의 조건(적합한 면역증강제의 선택 등)
- 단가 백신에서 확립된 시험법의 적용 가능성
- 혼합백신에 사용할 단가 백신 참조품의 적합성
- 출하 및 안정성 기준

디프테리아·파상풍(DT) 포함 혼합백신의 공급은 특성분석이 잘 이루어진 표준화된 제조공정에 좌우되며, 이와 함께 적절하고 검증된 방법을 통한 중간체에 대한 엄격한 제조공정관리 및 모니터링이 중요하다. 이를 위해 백신의 제조 및 시험에 사용되는 세부적인 표준운영절차를 서면으로 명확히 작성해야 하며, 핵심제조단계 및 시험 검사에 대한 적절한 밸리데이션을 실시하고 이에 대한 증거 자료를 품목허가(변경)심사 시 제출하여 승인을 받아야 한다. 또한 제조 및 관리 방법에 변경사항이 생기면, 품목허가 변경심사를 거쳐 승인을 받아야 한다.

안전성의 입증과 백신 역가의 확인은 백신 제조의 필수 요구사항이다. 사람을 대상으로 한 예방접종에서 이상약물반응을 최소화하기 위해서는 정제된 특소이드의 생산이 필요하며, 보통은 이상약물반응을 야기할 수 있는 성분을 제거하기 위해 포름알데히드로 무독화하기 전에 독소를 정제시킨다. 이때 무독화 공정을 검증함으로써 특소이드가 열에 노출되었을 때 다시 독성을 나타내지 않고 면역원성을 유지할 수 있도록 한다. 일부 제조업체는 독성회복 위험을 줄이기 위하여 독소를 정제하기 전에 무독화시키는 방법을 선호한다. 특히 독성회복 위험을 고려하여 독소를

정제 후 무독화하는 경우에 있어서는, 독성회복부정시험에서 상온에 보관한 희석된 정제 독소이드에 대해 6주의 배양기간을 유지하도록 권장한다.

뿐만 아니라 제조의 일관성이 있는지 모니터링하려면 독소의 순도와 수율(yield)을 확인하여야 한다. 응집단위로 나온 독소이드의 항원함량과 순도는 중요한 품질지표이며, 최소요구량은 디프테리아 독소이드는 단백질소 1 mg당 1,500 Lf, 파상풍은 단백질소 1 mg당 1000 Lf 이다.

제품 및 중간체의 특성을 분석하고 제조공정을 모니터링하기 위해선 독소이드의 순도를 정하는 기존의 라몬 응집법(Lamon flocculation) 외에도, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC), 원편광 이색성 분광법, SDS-PAGE와 같은 물리화학적 방법들을 추가로 고려할 수 있다. 최종원액 또는 완제의약품에서 항원함량 및 흡착정도를 측정하는 것은 중요한 품질시험이며 일관성을 나타내는 유용한 지표이다.

역가시험의 목적은 적절한 동물 모델을 사용하여, 인체에서 효과적인 것으로 나타난 독소이드의 반응과 유사한 면역 반응을 유도하기 위해 시험되는 제품의 능력을 입증하는 것이다. 역가는 체내 유발시험이나 검증된 대체방법을 사용하여 측정하며, 결과는 IU로 보정된 적절한 참조품과 비교하여 IU로 표시한다. 역가의 최소요구량은 사용한 동물모델과 시험 중인 백신의 구성에 좌우된다. 어떤 나라에서는 성인과 청소년의 면역증강을 위한 백신 역가의 최소요구량이 기초접종 백신보다 낮다. 기초접종용 백신과 대비하여 이 제품의 항원함량이 적기 때문이다.

새로운 디프테리아·파상풍(DT) 포함 혼합백신의 개발을 위한 비임상 프로그램은 일반적인 가이드라인을 따르되, 특별히 최종 제품의 임상 면역원성, 유효성 및 반응원성의 평가를 위한 동물 모델의 선택에 주의해야 한다.

임상개발 시 혼합백신의 특성상 반응원성의 증가와 면역원성의 축소가 문제가 될 수 있다. 따라서 다수 항원을 단일 주사 부위에 동시에 투약함으로 인한 반응원성 평가와 단가 백신의 접종이나 항원이 적은 백신의 접종과 비교하여 여러 항원으로 구성된 혼합백신을 주사할 때 하나 이상의 항원에 대한 면역반응이 임상적으로 유의할 만큼 축소되는지에 대한 평가가 이루어져야 한다. 예를 들어, 혼합백신에 접합 다당류를 포함하는 것은 동시 투약하거나 개별 접종하는 단가백신 주사와 비교하여 더 낮은 항체 수준을 보일 수 있다. 이외에도 접합 항원에 대하여 더 낮은 항원 반응을 초래하는 면역학적 간섭은 접합체에 의해서도 나타날 수 있다.

또한 정해진 백신 접종 스케줄은 몇몇 항원의 동시 투약에 맞게 조절될 수 있어야 하며, 다른 백신과 동시 접종으로 인한 잠재적 효과(예방접종프로그램 계획의 효과 포함)가 고려되어야 한다.

이 가이드라인을 만드는 과정에서는 최소한 정제된 원액 항원의 생산단계, 단일 성분과 혼합백신의 품질 측면까지 고려되었다. 또한 단일 성분백신과 비교 시 조제된 최종원액 및 최종 로트의 생산과 관련된 많은 사안들과 일부 비임상 및 임상 프로그램의 문제들이 혼합백신의 개발 시에도 매우 유사한 것으로 생각된다. 따라서 가능하고 해당되는 경우 디프테리아·파상풍(DT) 포함 혼합백신의 생산과 개발에 있어 개별 백신 성분에 대한 가이드라인과 함께 본 가이드라인을 참고하기 바란다.

5. 혼합백신의 제조 및 품질관리

5.1. 일반적인 제조 권고사항

혼합백신을 생산하는 제조시설 수립에는 「의약품 등의 안전에 관한 규칙 별표 1 의약품 제조 및 품질관리기준 및 별표 3 생물학적제제등 제조 및 품질관리기준」, 「생물학적제제등의 제조·판매관리규칙」을 따르며, ‘WHO 제조품질 관리기준 : 의약품의 주요원칙(*WHO good manufacturing practices : main principles for pharmaceutical products*)’의 일반 제조 요구사항을 적용할 수 있다.

서면으로 된 혼합백신의 조제 및 시험 절차서를 마련하여 각 생산단계를 검증했다는 적절한 증빙과 함께 이 증빙을 품목허가(변경)심사 시 제출하여 승인을 받아야 한다. 제조 및 관리 방법에 변경사항이 생기면, 이러한 변경내용이 이행되기 전에 품목허가(변경) 심사 시 제출하여 승인을 받아야 한다.

5.2 생산관리

모든 생산단계에서는 개별성분백신에 대한 「생물학적제제 기준 및 시험방법」에 따라 백신의 생산관리를 수행한다.

5.2.1 생산 균주, 시드 로트 및 배양배지(Production strain and seed lots)

5.2.1.1 생산 균주(Strains)

「생물학적제제 등의 품목허가·심사 규정」에 따라 원료의약품의 명칭 중 한글명은 식품의약품안전처장이 정하는 의약품 명명법 가이드라인에 따라 기재할 수 있으며, 영명은 국제일반명칭(INNPS: International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances) 및 식품의약품안전처장이 정하는 의약품 명명법 가이드라인에 따라 기재할 수 있다. 백신제제는 제조 시 사용된 균주, 바이러스주, 세포 등에 관한 유래, 특성, 배양, 보존방법 및 관리방법, 목적산물의 생산, 분리, 정제 등에 대하여 관련

규정에 따라 상세히 기재해야 하므로, 이를 준수한다.

또한, 각 독소이드를 조제할 때 사용되는 생산균주에 대한 그 이력과 균주 특성을 확인할 수 있는 모든 시험에 대한 기록을 제출해야 한다. 균주는 품목허가(변경)심사 시 승인을 받아야 하고, 배양 조건에 맞는 균주를 제출해야 한다.

유래와 이력이 잘 알려진 고독성 생성 생산균주(highly toxigenic strain)를 사용하여야 하며, 사용하는 균주는 품목허가(변경)심사 시 승인을 받아야 한다.

디프테리아 독소이드의 경우 *Corynebacterium diphtheriae*의 독소생성 가능성이 높은 균주가 사용되어야 하며, 유래와 이력이 잘 알려진 균주로서 만족할 만한 균주로 인정된 균주는 *Park Williams 8* 균주이다. 이 균주는 낮은 전염성과 체외(*in vitro*)에서의 높은 독소 생성 능력 때문에 디프테리아 독소이드의 제조를 위해 지금까지 사용되어왔고, 이 균주는 여전히 사용이 권장되고 있다.

파상풍 독소이드의 경우 *Clostridium tetani*의 독소생성 가능성이 높은 균주로 다수의 제조업체들이 만족스러운 것으로 입증한 균주는 *Harvard* 균주이나, 다른 균주도 사용된 적이 있다.

5.2.1.2 시드 로트 시스템(Seed lot system)

시드 로트 조제물은 「생물학적제제등 제조 및 품질관리기준」 GMP(Good Manufacturing Practice)의 시설 하에 제조되어야 한다. 각 독소의 생산은 독소생성능(toxigenicity)이 보존되는 정확히 규정된 시드 로트 시스템을 토대로 해야 한다.

제조용 시드 배양은 마스터 시드를 얻은 균주의 특성과 동일한 특성을 가져야 한다. 새로운 마스터 시드나 제조용 시드를 도입할 때는 출처, 계대이력(*passage history*), 정제 및 특성분석 절차 및 보관조건에 관한 세부기록을 제출해야 한다. 사용 중인 제조용 시드는 이전의 생산이력 및 경험을 토대로 정해진 간격으로 특성 분석이 이루어져야 한다. 생산을 위해 사용되는 각 시드 로트의 최대 계대 수는 안전하고 효과적인 제품을 생산하는 것으로 입증된 수를 토대로 명시해야 하며, 승인을 받아야 한다.

5.2.1.3 독소 생산용 배양배지(Culture medium for the production of toxin)

독소 생산용 배양배지는 세균의 성장을 돕고 각 독소의 수율을 보장해주는데 적합한 배양배지를 선택해야 한다. 배양배지는 외래성 오염인자(adventitious agents)가 없어야 하고, 인체에서 알레르기 반응을 일으키는 것으로 알려진 성분은 피해야 한다. 배지가 단백질 소화산물(예. 카제인 가수분해물이나 소화된 근육유래 등)에서 준비된다면 소화가 충분히 진행되었는지 주의하여 확인해야 한다. 동물 유래 물질이나 성분을 확인·승인을 받아야 한다. 또한 배지의 주요 변경사항이 있을 경우, 이 사실을 승인을 받아야 한다.

5.2.2 단일 수득물(Single harvests)

독소 생산의 일관성을 입증하여야 하는데, 여기에는 배양순도, 생장률, pH, 배양기간, 온도범위, 독소생산율 등이 포함될 수 있다. 생산의 일관성을 입증할 수 있도록 정해진 기준 및 경계기준(alert limits)의 허용규격을 설정하여 승인을 받아야 한다. 이례적인 생장특징을 보이는 경우가 있다면, 이를 조사하여 생산에 적합한지 여부를 조사한 후 사용한다. 오염된 배양은 폐기처분하여, 그 원인을 반드시 분석한다.

단일 수득물이 바로 생산에 사용되지 않을 경우, 보관 기간에 대해서는 적절한 안정성 시험을 통해 얻은 데이터로 뒷받침 되어야 하며, 승인을 받아야 한다.

5.2.2.1 세균의 순도 관리(Control of bacterial purity)

단일 수득물을 준비하기 위해 사용되는 배양 검체는 현미경 도말검사와 적절한 배양배지 접종을 통해 세균의 순도를 검사해야 한다. 어떤 단계에서든 생산 중에 오염이 발생했다면 해당 배치(batch)는 전량 폐기해야 한다. 독소가 함유된 배양배지는 무균으로, 혹은 오염을 최소화하는 방식으로 수집하여야 한다.

5.2.2.2 여과(Filtration)

순도 관리를 위해 검체를 채취한 후에, 무균여과방식으로 가능한 한 신속하게

균체에서 배양배지를 분리한다. 보존제를 넣어도 되지만 이러한 목적으로 페놀을 사용해선 안 된다.

여과를 촉진하기 위해 배양배지는 원심 분리할 수 있다. 단, 잠재적으로 위험한 에어로졸이 형성되지 않도록 적절한 예방책을 취해야 한다. 사전에 여과 보조제를 사용할 수 있으며, 섬유소가 제거되지 않는 필터를 사용해야 한다.

5.2.2.3 독소 생성능 측정(Determination of crude toxin concentration)

무독화 과정 전에 배양 상층액의 독소 함량을 승인된 방법을 이용하여 측정하여야 한다.

통상 면상반응시험(flocculation)은 독소함량 측정에 적합하며, WHO의 ‘디프테리아, 파상풍, 백일해 백신 품질관리 매뉴얼(*Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines*)’에 상세히 기술되어 있으니 참고하기 바란다. 면상반응 시험을 위해 디프테리아 독소이드 국제표준품 또는 파상풍 독소이드 국제표준품에 대한 Lf 보정 참조품을 포함하여야 하며, 결과는 Lf 단위로 표시한다.

독소함량의 측정은 생산의 일관성을 나타내는 지표이다. 그러므로 일관성을 모니터링하기 위해 허용한계를 규정해야 한다.

디프테리아의 경우 정제 독소이드를 준비하면서 사용된 배양 여과액은 최소 50 Lf/mL을, 파상풍의 경우는 40 Lf/mL을 초과하는 게 좋다. 물론 더 낮은 농도의 독소를 적용하여 만족스러운 결과를 얻은 제조업체들도 있다.

5.2.2.4 무독화 및 정제(Detoxification and purification)

각 독소의 무독화는 배양 여과액(culture filtrate)이나 정제독소(purified toxin)를 사용하여 실시한다. 무독화 과정은 독소로 복귀되지 않도록 각별한 주의를 기울여야 한다. 정제 독소를 사용하는 경우 순도가 더 높은 제제를 얻을 수 있는 장점이 있다. 다만, 독성회복 위험이 증가될 수 있으므로 무독화과정 중에는 더 많은 주의가 필요하다. 정제방법은 인체에 이상반응을 일으킬 수 있는 성분이 최종 제품에 포함되지 않도록 해야 한다.

정제 방법과 무독화공정에 사용되는 물질은 적절한 검증을 거친 뒤에 승인을 받아야 한다. 무독화율은 차이가 있을 수 있으며, 무독화공정에 대해 공정 중 모니터링을 실시해야 한다.

포름알데히드는 가장 흔히 사용하는 무독화제로, 무독화과정 중에 리신(lysine)이나 글리신(glycine) 같은 아미노산이 추가됨으로써 독소 분자의 교차 결합을 촉진하고 독소의 복귀를 방지할 수 있다. 무독화 조건은 명확히 규정되어야 하며 온도, 시간, 무독화제 농도, 독소 농도, 기타 중요한 변수들과 관련지어 관리해야 한다.

정제를 위해 사용되는 방법은 승인을 받아야 한다.

조독소이드(crude toxoid)는 황산암모늄을 이용한 분별법, 투석, 겔 여과, 이온교환 크로마토그래피 또는 이 모든 방법의 혼합에 의해 정제하기 전에 한외여과(ultrafiltration)에 의해 농축될 수 있다.

무독화 및 정제 후에 남아 있는 무독화제의 양은 최종원액 또는 완제의약품에서 측정했을 때 그 기준을 초과해선 안 된다. 「생물학적제제 기준 및 시험방법」에 따르면, 무독화시 일반시험법 중 포름알데히드정량법에 따르며, 포름알데히드 함량은 0.02 w/v% 이하이어야 한다.

디프테리아 독소의 무독화 여부는 기니픽에 피하 접종을 함으로써 또는 기니픽이나 토끼에 피내 주사를 놓음으로써 확인할 수 있으며, Vero 세포 분석(Vero cell assay)과 같은 세포 배양 분석도 적합하다. 파상풍 독소의 무독화 여부는 기니픽에 피하 접종을 함으로써 확인할 수 있다.

특이독성시험(무독화시험)이나 기타 적절한 체내 분석법을 사용하여 무독화공정이 종료될 때까지 수득물은 잠재적으로 독성이 있는 것으로 취급되어, 적절한 안전성 제약을 받는다.

5.2.3 정제 독소이드 원액(Bulk purified toxoid)

5.2.3.1 조제물(Preparation)

정제 독소이드 원액은 단일 사용 또는 여러 배치를 혼합하여 사용할 수 있으며, 무균상태이어야 한다. 보존제는 지금까지 독소이드의 안전성과 면역원성에 부작용을 주지 않았다면 승인에 따라 첨가될 수 있다. 일부 항균 보존제, 특히 페놀타입의 보존제는 항원 활성에 부정적 영향을 미친다.

5.2.3.2 무균(Sterility)

각각의 정제 독소이드 원액은 「생물학적제제 기준 및 시험방법」 일반시험법 중 무균시험에 따라 세균 및 진균 무균시험을 실시해야 한다. 무균시험은 최소한 각 정제 독소이드 원액을 10 mL 이용하여 실시한다. 보존제가 정제 원액에 첨가되었다면, 무균시험에서 간섭이 일어나지 않도록 적절한 조치를 취해야 한다.

5.2.3.3 항원 순도(Antigenic purity)

각 정제 독소이드 원액은 Lf 단위의 항원 농도와 단백질소 농도를 결정하여 항원의 순도를 검사해야 한다. 항원 농도는 면상반응 시험용 독소이드 국제표준품이나 승인된 이에 준하는 참조품을 기준으로 보정된 참조품과의 비교를 통해 결정하여야 한다. 시험 방법은 승인을 받아야 한다. 정제 독소이드 원액은 단백질소 mg 당 디프테리아는 1,500 Lf 이상을, 파상풍은 1,000 Lf 이상을 함유하면 시험을 통과한다.

면상반응(Ramon flocculation) 분석은 항원 함량의 측정에 적합하며, WHO의 ‘디프테리아, 파상풍, 백일해 백신 품질 관리 매뉴얼(*Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines*)’에 상세히 기술되어 있으니 참고하기 바란다.

SDS-PAGE와 HPLC 같은 방법을 이용하는 물리화학 분석법은 항원의 순도를 모니터하고 항원의 완전성(integrity), 응집 및 단백질 분해 정도에 대한 추가 정보를 제공하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 추가 특성 시험은 새로운 제조용 시드를

도입할 때마다 실시해야 한다.

5.2.3.4 특이독성(무독화)(Specific toxicity)

각 정제 특소이드 원액에 대해서 각 독소의 존재에 대하여 시험이 이루어져야 한다. 시험법은 「생물학적제제 기준 및 시험방법」에 따라 시험하며, 이에 적합하여야 한다.

5.2.3.5 독성회복 부정시험(Absence of toxin and irreversibility of toxoid)

각각의 정제 특소이드 원액을 시험할 때는 보관 중에 독소가 나타나지 않도록 해야 한다. 시험법은 「생물학적제제 기준 및 시험방법」에 따라 시험하며, 이에 적합하여야 한다.

5.2.3.6. 정제 특소이드 원액의 보관(Storage of bulk purified toxoid)

바로 생산에 사용되지 않을 경우, 정제 특소이드 원액의 보관기간은 설정되어야 하며, 적절한 안정성 시험을 통해 얻은 데이터로 뒷받침되어야 한다. 「의약품 등의 안정성시험 기준」에 따르며, WHO의 ‘백신 안정성 평가 가이드라인 (*Guidelines on stability evaluation of vaccines*)’을 참고하여 승인을 받아야 한다.

5.2.4 최종원액(Final bulk)

최종원액은 적정량의 수산화 인산알루미늄이나 수산화 알루미늄(또는 기타 적절한 면역증강제) 같은 적정량의 면역증강제(adjuvants)에 흡착시키거나 침전시켜 만든 정제 특소이드이다. 결과적으로 만들어진 혼합물은 혈액과 거의 등장성(isotonic)이다.

여기에 적절한 항균 보존제를 첨가할 수 있다. 백신의 최종 제형은 임상사용에서 안전하고 효과적인 것으로 나타난 제형으로 사용해야 한다.

이 외에도 다음과 같은 고려사항을 혼합백신에 적용한다.

경우에 따라 단가 백신에 최적으로 입증된 조제 조건이 일부 혼합백신에서는

그렇지 않을 수도 있다는 점을 염두에 두어야 한다. 여기서는 면역증강제에 들어가는 보존제의 선택과 농도, 항원에 대한 최적비, pH, 이온강도가 중요한 고려사항이다. 조제 조건은 최적의 임상 면역원성, 반응원성, 백신의 안정성을 보장할 수 있도록 검증한다.

Hib 성분이 들어있는 혼합백신의 경우, 2가지 유형의 조제법이 개발되었다. 동일용기에 모든 성분이 함께 들어있는 백신(100 % 액체나 일체형)과 별개의 용기에 Hib 성분이 든 백신(분산액체)이 바로 그것이다. 이 두 가지 유형의 특정한 시험 조건과 쟁점은 서로 차이가 있다.

5.2.4.1 조제물(Preparation)

최종원액은 혼합백신의 모든 성분을 혼합하여 조제하고, 여기에 적절한 항균 보존제를 첨가해도 된다. 허가된 내용에 따라 최종원액 단계 이전에 각 단가 백신을 면역증강제에 흡착시키거나 혼합하여도 된다(이러한 중간체를 흡착 전 원액(pre-adsorbed bulks)이라고 함).

이러한 중간체는 검증된 보관기간 동안 검증된 보관온도로 보관하면 된다. 중간체의 안정성 측면에 대해서는 식약처 고시 「의약품 등의 안정성시험 기준」에 따르며, WHO의 ‘백신 안정성 평가 가이드라인(*Guidelines on stability evaluation of vaccines*)’을 참고하기 바란다.

5.2.4.2. 보존제(Preservative)

백신을 다회투여용량 용기에 나누어 넣을 경우에는 여기에 적절한 항균 보존제를 첨가해야 한다. 최종원액에 들어가는 보존제의 양은 백신성분에 유해한 영향이 없으며, 인체에 예기치 못한 이상약물반응을 일으키지 않는 것으로 입증되어야 한다. 보존제의 농도는 품목허가 심사 시 승인받아야 한다. 특정한 항균 보존제, 특히 페놀 타입의 보존제는 파상풍과 디프테리아 성분의 항원활성에 부정적인 영향을 주는 것으로 나타났으므로, 사용하지 않도록 권고한다. 이와 마찬가지로, 치메로살은 불활화 소아마비 항원활성에 나쁜 영향을 주는 것으로 알려져 있다.

또한 백신에 함유된 치메로살의 사용은 관련된 ‘WHO 규제 가이드라인(*WHO*

guidelines on regulatory expectation related to the elimination, reduction or replacement of thimerosal in vaccines)’을 참고하여 기허가받은 품목의 치메로살 함량 저감화를 권고하고 있다. 2-페녹시에탄올은 백신의 적절한 보존제로 입증되어 왔으나, 혼합백신 항원과의 적합성은 사례별로 평가해야 한다.

5.2.4.3 면역증강제(Adjuvants)

제형에 사용되는 면역증강제는 혼합백신의 안전성 및 면역원성/유효성에 미치는 영향과 관련해 사용여부를 신중히 평가해야 한다. 면역증강제를 사용할 경우, 면역증강제의 순도 및 농도와 품질특성은 승인을 받아야 한다. 이 특성은 면역증강제로서의 적합성 및 혼합백신과 혼합 시, 그 적합성을 입증할 수 있어야 한다.

알루미늄은 혼합하는 동안 개별적인 사전흡착 성분원액으로 인해 단가백신보다는 혼합백신에서 농도가 더 높게 나올 수 있다는 점을 염두에 둔다. 또한, 최종원액에는 사전에 흡착된 개별성분 원액에서 유리된 면역증강제 혼합물이 들어있을 수도 있다. 면역증강제로 알루미늄 화합물이 쓰인다면 알루미늄의 농도가 1.25 mg/mL 이하이어야 한다.

새로운 면역증강제가 사용될 경우에는 해당 면역증강제의 품질규격과 항원과 혼합되었을 때의 품질규격을 확립하여 승인을 받아야 한다. 혼합백신의 경우에는 일관성, 출하, 안정성 변수로서 각 항원의 흡착정도를 결정하는 게 중요하다. 일부 국가에서는 권장하는 면역증강제 농도 기준을 매우 높은 것으로 간주하고, 더 낮은 기준을 안전하고 효과적인 것으로 고려하기도 한다.

5.2.4.4 일관성(Consistency)

혼합백신의 일관성은 여러 단계로 평가한다. 원액항원 단계에서는 각 성분의 연속배치가 3개 이상 있어야 한다.

예) 1) 새로운 DTaP-HepB 혼합물

- ① D1, D2, D3

② T1, T2, T3

③ aP1, aP2, aP3

④ HepB1, HepB2, HepB3

⑤ D1·T1·aP1·HepB1, D2·T2·aP2·HepB2, D3·T3·aP3·HepB3

2) 기허가 혼합백신(예. DTaP-HepB)에 새로운 성분(예, IPV)을 추가한 경우

D1·T1·aP1·IPV1, D1·T1·aP1·IPV2, D1·T1·aP1·IPV3

5.2.4.5 최종원액 품질관리(Control test of final bulk)

각 혼합백신 최종원액에 대해서는 「생물학적제제 기준 및 시험방법」 각 조에 따라 각 성분의 개별 권고사항을 참고하여 시험을 실시하여야 한다.

5.2.4.5.1 무균(Sterility)

무균 시험은 대한민국약전 및 「생물학적제제 기준 및 시험방법」 일반시험법이나 허가된 방법에 따라 세균 및 진균 무균에 대해 최소 각 최종원액의 10 mL을 사용하여 실시해야 한다. 보존제가 최종원액에 첨가되었다면, 무균시험에서 간섭이 발생이 발생하지 않도록 적절한 조치를 취해야 한다.

5.2.4.5.2 특이독성(Specific toxicity)

완제의약품 단계에서 실시하면 최종원액에서의 특이독성(무독화)시험은 생략할 수 있다. 시험은 「생물학적제제 기준 및 시험방법」에 기술된 무독화시험에 따른다.

5.2.4.5.3 역가(Potency)

5.2.4.5.3.1 디프테리아, 파상풍 역가시험 (Diphtheria potency testing & Tetanus potency testing)

시험은 「생물학제제제 기준 및 시험방법」 일반시험법에 기술된 시험법에 따르며, 완제의약품 단계에서 실시하면 최종원액에서의 역가시험은 생략할 수 있다.

5.2.4.5.3.2 aP/wP 역가시험(aP/wP potency testing)

시험은 「생물학제제제 기준 및 시험방법」 일반시험법에 기술된 시험법에 따르며, 완제의약품 단계에서 실시하면 최종원액에서의 역가시험은 생략할 수 있다.

5.2.4.5.3.3 B형 간염 역가시험(Hepatitis B potency testing)

WHO 가이드라인 ‘B형 간염백신 권고사항 (*Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of recombinant hepatitis B vaccines*)’을 참고한다. 원칙적으로 혼합백신에는 *in vitro* 분석법이 사용될 수 있다. 하지만 일부 *in vitro* 분석법은 wP 성분이 함유된 혼합백신에서는 효과가 떨어지는 것으로 입증되었다. 이런 경우 *in vivo* 분석법을 사용해야 할 수도 있다. *in vivo* 분석법의 경우에는 HepB 성분의 체내 역가 추정치는 HepB 성분만 함유된 백신과 비교해볼 때 일부 혼합백신(예. wP 함유 백신)에서 훨씬 더 높게 나오는 것으로 입증되었다. 이에 맞춰 규격을 수립해야 하며, 제조업체는 승인된 일관성 기준 상한치와 하한치를 설정해야 한다. 이 상한치와 하한치는 고려중인 혼합백신의 실제 역가 값을 반영하며, 임상에서 안전하고 효과적인 것으로 입증된 것이어야 한다. 여기서 특히 중요한 것은 제조업체가 이러한 일관성 기준과 핵심적인 모든 일관성 데이터의 트렌드를 긴밀히 모니터링하는 것이다.

5.2.4.5.3.4 IPV 역가시험(IPV potency testing)

시험은 「생물학제제제 기준 및 시험방법」 일반시험법에 기술된 시험법에 따른다.

5.2.4.5.3.5 Hib 성분이 함유된 혼합백신(전부 액체나 일체형 제제)이나 재구성 분산액체제제에 관한 역가 관련 시험(Potency-related tests on combined vaccines with a Hib component (full liquid or all-in-one formulations) or reconstituted

lyo-liquid formulations)

일부 백신의 경우에는 Hib 성분에 대한 역가시험과 안정성 표시 시험을 수행하는 게 어려운 것으로 입증되었다(총 단당류, 분자량 분포, 무 단당류, 무 운반체 단백질). 따라서 제조업체는 조제된 백신을 대상으로 이러한 시험이 이루어질 수 있도록 해당 방법을 개발해야 한다(최종 로트 단계 포함). 입증이 되었고 허가가 되었다면 원액 결함물 단계에서 이러한 시험을 수행하는 게 허용 가능한 것으로 간주될 수도 있다. 동물모델들(예. 생쥐, 일반 쥐, 토끼나 기니피그)은 일상적인 로트 출하에는 잘 쓰이지 않음에도 불구하고, 방어역가나 면역원성, 일관성을 분석하는데 유용하며, 필요하다면 안정성을 모니터하는 데에도 유용하게 쓰인다. 별도로 냉동건조 Hib 성분이 함유된 혼합백신의 경우에는 별개의 용기에 대해 시험을 실시할 수 있다.

5.2.4.5.4 aP 성분의 안전성 관련 시험(Safety-related testing of aP components (residual activity of pertussis toxin and reversion to toxicity))

완제의약품 단계에서 실시하면 최종원액에서의 aP 성분의 안전성 관련 시험(정제백일해무독화시험 및/또는 독성회복부정시험)은 생략할 수 있다.

알루미늄 기반의 면역증강제가 들어있다면, 조제된 제품의 시험과 화학적으로 무독화된 일부 정제백일해 항원에는 *in vitro* CHO 세포 기반 분석법을 적용하지 못할 수도 있다. 또한, *in vivo* 시험은 잔류 백일해 독소보다는 제제의 다른 성분들(예. 알루미늄 기반 면역증강제, 불활화 소아마비 바이러스 항원)에 더 민감하게 나타날 수도 있다. 따라서 *in vivo* 시험을 적절히 표준화하고, 대체 시험법을 개발하여 도입할 것을 적극 권장한다.

5.2.4.5.5 잔류 무독화제 함량(Amount of residual free detoxifying agent)

완제의약품 단계에서 실시하면 최종원액에서의 잔류 무독화제 함량시험은 생략할 수 있다.

각 최종원액에 들어있는 잔류 무독화제의 양을 결정해야 한다. 그 방법과 기준에 대해서는 승인을 받아야 한다.

포름알데히드가 사용되었다면, 잔류량은 0.2 g/L을 초과해선 안 된다. 다른

무독화제를 사용하였다면, 이를 정량화할 수 있는 적절한 시험을 실시해야 한다. 사용된 시험법과 상기 화학물질의 최대허용농도는 품목허가심사 시 승인을 받아야 한다.

5.2.4.5.6 pH

최종원액의 pH는 임상 사용에서 안전하고 효과적인 것으로 입증된 백신로트에서 측정된 값의 범위 내에 있어야 한다. 완제의약품 단계에서 실시하면 최종원액에서의 pH시험은 생략할 수 있다.

5.3 충전 및 용기(Filling and containers)

최종형태로 충전된 백신에는 ‘WHO의 GMP : 의약품 주요원칙(*Good manufacturing practices : main principles for pharmaceutical products*)’ 및 ‘생물의약품의 GMP(*Good manufacturing practices for biological products*)’ 이 적용된다.

5.4 최종제품 품질관리(Control of final product)

각각의 혼합백신 최종 로트에 대해 각 성분의 정보, 무균, 발열원성이나 엔도톡신 함량, 면역증강제 함량, 보존제 함량, 각 성분의 역가, 이상독성부정시험 등을 실시해야 한다. 일반적으로 「생물학적제제 기준 및 시험방법」 각조 및 일반시험법, 생물학적시험법 항에 기술된 시험방법이 혼합백신에도 적용된다. 투여 시, 혼합하여 사용하는 분산액체 제제(lyo-liquid formulations)의 경우, 각 조제물에 대해 각각 구별하여 시행된 출하시험을 제출하여도 된다. 개발단계 동안에 재구성 후 각 성분의 적합성을 입증해주는 검증된 연구가 수행 되었다면, 재구성 혼합백신에 대한 시험(특히 동물을 대상으로 한 역가시험 같은 것)을 반복할 필요가 없다.

이런 연구는 성분들과 최종 재구성 혼합물이 출하규격을 충족시키기에 충분한 품질, 면역원성 비교가능성을 가지고 있다는 것을 보여주며, 임상 안전성 및 유효성과 양립된다는 것을 보여주게 된다.

5.4.1 확인(Identity)

품목허가 받은 방법을 이용하여 각각의 최종 로트에서 한 개 이상의 용기에 대해 확인시험을 실시해야 한다.

여기서 사용되는 방법은 백신에 있는 디프테리아 항원과 디프테리아 항독소 간의 특별한 상호작용에 기초해야 한다. 적절한 검출법으로는 면상반응(flocculation), 면역침강법, ELISA가 있다. 알루미늄 운반체에 흡착된 독소이드에 대한 시험은 이 운반체가 용해되거나 흡착된 독소이드를 전체나 부분적으로 구연산나트륨이나 EDTA를 통해 용출한 뒤에 실시한다.

5.4.2 무균(Sterility)

허가된 방법으로 완제에 대해 세균 및 진균 무균시험을 실시한다. 대한민국약전 및 「생물학적제제 기준 및 시험방법」 일반시험 항 무균시험 요구사항을 적용한다. 백신에 보존제가 첨가되었다면 보존제가 무균시험에 간섭을 일으키지 않도록 적절한 조치를 취해야 한다.

5.4.3 역가(Potency)

5.4.3.1 디프테리아 역가시험(Diphtheria potency testing)

디프테리아 백신의 역가 시험법에 대한 세부사항은 「생물학적제제 기준 및 시험방법」의 생물학적 시험 중 디프테리아 역가시험항에 기술되어 있으니 참고하기 바란다.

디프테리아 역가에 대한 제품 특이적 최소 요구사항은 정당한 근거가 있고 해당 백신에 대해 실제로 얻은 역가 값을 토대로 했다는 전제 하에 허용된다. 역가에 대한 최소 요구사항을 규정하려면 적정 수의 로트를 검사해야 한다. 역가의 규격 확립에 사용된 백신 로트에는 임상시험에서 안전하고 효과적인 것으로 입증된 로트를 포함해야 한다. 제품 특이적 최소 요구사항은 품목허가 심사 시 승인을 받아야 한다.

일단 백신의 역가를 정하고 승인을 받은 뒤에는 이 역가가 최소 요구사항을 크게 초과하는 것으로 나타나야 한다.

5.4.3.2 파상풍 역가시험(Tetanus potency testing)

파상풍 백신의 역가 시험법에 대한 세부사항은 「생물학적제제 기준 및 시험방법」의 생물학적 시험 중 파상풍 역가시험항에 기술되어 있다.

파상풍 역가에 대한 제품 특이적 최소 요구사항은 정당한 근거가 있고 문제의 백신에 대해 실제로 얻은 역가 값을 토대로 했다는 전제 하에 허용된다. 역가에 대한 최소 요구사항을 규정하려면 적정 수의 로트를 검사해야 한다. 역가의 규격 확립에 사용된 백신 로트에는 임상시험에서 안전하고 효과적인 것으로 입증된 로트를 포함해야 한다. 제품 특이적 최소 요구사항은 품목허가 심사 시 승인을 받아야 한다. 일단 백신의 역가를 정하고 승인을 받은 뒤에는 이 역가가 최소 요구사항을 크게 초과하는 것으로 나타나야 한다.

5.4.3.3 aP/wP 역가시험(aP/wP potency testing)

「생물학적제제 기준 및 시험방법」 각조 및 생물학적 시험항에 따라 시험하며, 명시된 최소규격을 만족시켜야 한다.

5.4.3.4 B형 간염 역가시험(Hepatitis B potency testing)

시험은 「생물학적제제 기준 및 시험방법」 일반시험법에 기술된 시험법에 따른다. WHO 가이드라인 ‘B형 간염백신 권고사항 (*Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of recombinant hepatitis B vaccines*)’을 참고한다. 최종원액에서 *in vivo* 시험법을 적용하였다면, 완제의약품에서는 *in vitro* 시험법을 적용할 수 있다.

5.4.3.5 IPV 역가시험(IPV potency testing)

시험은 「생물학적제제 기준 및 시험방법」 일반시험법에 기술된 시험법에 따른다.

5.4.3.6 Hib 성분이 함유된 혼합백신(전부 액체나 일체형 제제)이나 재구성 분산액체 제제에 관한 역가 관련 시험

5.2.4.5.3.5의 내용과 동일하다.

5.4.4 엔도톡신(Endotoxin)

보통 혼합백신에 들어있는 각 성분의 경우, 세균 엔도톡신 함량이 특정 백신의 승인 기준보다 적어야 하고, wP 성분이 들어있지 않은 혼합백신의 경우에는 투여한 최종백신에 대한 함량이 1회 용법량당 100 IU 미만이어야 한다. 단가 wP 백신의 경우, WHO 가이드라인 ‘전세포 백일해 백신 권고사항 (*Recommendations for whole-cell pertussis vaccine*)’을 보면 “전세포 백일해 백신에서 허용할 만한 엔도톡신 수준을 이루는 게 무엇인지에 관한 합의가 없으므로, 생산 일관성의 감시 장치로서 로트별 엔도톡신 수치를 모니터링하는 게 좋다”고 기술되어 있다. 이 문구는 또한 wP 성분이 함유된 혼합백신에도 유효하다. 이런 백신에서 wP 성분은 최종 엔도톡신 함량에 훨씬 더 중요한 원인제공 역할을 한다. 일부 경우에는 엔도톡신 시험 대신 발열성물질 시험을 수행하기도 한다.

5.4.5 잔류 무독화제 함량(Amount of residual free detoxifying agent)

완제의약품에 들어있는 잔류 무독화제의 양을 결정해야 한다. 그 방법과 기준에 대해서는 품목허가(변경)심사 시 승인을 받아야 한다.

포름알데히드가 사용되었다면, 잔류량은 0.2 g/L을 초과해선 안 된다. 다른 무독화제를 사용하였다면, 이를 정량화할 수 있는 적절한 시험을 실시해야 한다. 사용된 시험법과 상기 화학물질의 최대허용농도는 품목허가(변경)심사 시 승인을 받아야 한다.

5.4.6 특이독성(무독화)(Specific toxicity)

완제의약품 단계에서 실시하면 최종원액에서의 특이독성(무독화)시험은 생략할 수 있다. 시험은 「생물학제제제 기준 및 시험방법」에 기술된 무독화시험에 따른다.

5.4.7 이상독성부정(abnormal toxicity or innocuity or general safety test)

각 최종 로트에 대해서는 이상독성부정시험을 실시해야 한다. 이 시험은 비정상적인 독성시험이나 일반적인 안전성 시험으로 지칭되기도 한다. 해당동물이 유의한 독성 증상을 보이지 않고 7일 이상 생존하면 최종제품은 이상독성이 없는 것으로 간주된다. 상세한 시험방법에 대해서는 「생물학적제제 기준 및 시험방법」 일반시험 항 이상독성부정시험을 참조하며, 해당동물 투여량을 달리하는 일부 백신의 경우에 대해서는 품목허가 심사 시 승인을 받아야 한다. 품목허가 심사 시 승인에 따라 생산의 일관성이 입증되었다면, 일상적인 로트출하에서 최종 로트에 대한 이상독성부정시험을 제조사 품질책임자의 GMP 확인서로 대체할 수 있다.

5.4.8 면역증강제 함량(Adjuvant content)

각 최종 로트의 면역증강제 함량은 품목허가 심사 시 승인받은 방법으로 정한다. 「생물학적제제 기준 및 시험방법」 일반시험항 항을 참조하기 바란다. 제제는 백신을 흔들 뒤에 일정한 시간 동안 용액이 균일하게 되도록 두어야 한다.

5.4.9 보존제 함량(Preservative content)

각 최종 로트의 보존제 함량은 품목허가 심사 시 승인한 적절한 화학방법을 사용하여 보존제의 양을 결정한다. 이 양은 시험 시에, 허가받은 기준범위 80% 이상, 120% 이하이어야 한다. 일부 경우에는 품목허가 심사 시 승인에 따라 최종원액에 이 시험을 실시한다.

5.4.10 pH

각 최종 로트의 pH는 임상사용에서 안전하고 효과적인 것으로 밝혀진 백신 로트의 측정값 범위 안에 있어야 한다. 일부 경우에는 삼투압 측정이 필요할 수도 있다.

5.4.11 실용량(Extractable volume)

단일용량 용기에 충전 된 백신의 경우, 실용량을 확인해야 하며 이 양은 예정된

투여량보다 큰 것으로 나타나야 한다. 다회용량 백신의 경우, 실용량을 확인해야 하며 이 양은 예정된 투여횟수에 충분하다는 것을 입증하여야 한다.

5.4.12 완제의약품 용기 검사(Inspection of final containers)

각각의 완제의약품 용기는 육안이나 기계로 검사해야 하며, 밀폐불량, 무결성 부족, 균집이나 입자 같은 이상이 있다면 해당 용기를 폐기한다.

5.5 기록(Records)

「의약품등의 안전에 관한 규칙 별표 1 의약품 제조 및 품질관리기준 및 별표 3 생물학적제제등 제조 및 품질관리기준」 및 「생물학적제제등의 제조·판매관리규칙」에 따라 기록을 관리한다.

5.6 라벨링(Labeling)

식약처 고시 「의약품 표시 등에 관한 규정」에 따르며, ‘WHO GMP : 의약품에 대한 주요 원칙(*WHO good manufacturing practices : main principles for pharmaceutical products*)’과 ‘생물의약품의 GMP(*Good manufacturing practices for biological products*)’의 권고사항을 참고한다.

5.7 보유검체(Samples)

「의약품등의 안전에 관한 규칙 별표 1 의약품 제조 및 품질관리기준 및 별표 3 생물학적제제등 제조 및 품질관리기준」에서 요구된 사항을 따르며, 백신 검체는 ‘WHO GMP : 의약품에 대한 주요 원칙(*WHO good manufacturing practices : main principles for pharmaceutical products*)’에 기술된 요구사항을 적용한다.

5.8 유통 및 수송(Distribution and transport)

「의약품등의 안전에 관한 규칙 별표 1 의약품 제조 및 품질관리기준 및 별표 3

생물학적제제등 제조 및 품질관리기준」, 「생물학적제제등의 제조·판매관리규칙」을 따르며, ‘WHO 제조품질관리기준 : 의약품의 주요 원칙(*WHO good manufacturing practices: main principles for pharmaceutical products*)’의 일반 제조 요구사항을 적용할 수 있다.

5.9 안정성, 보관, 유효기간(Stability, storage and expiry date)

안정성 시험은 식약처 고시 「의약품 등의 안정성시험 기준」과 WHO의 ‘백신 안정성 평가 가이드라인(*Guidelines on stability evaluation of vaccines*)’, 특히 혼합백신 가이드라인에 따라 수행해야 한다.

5.9.1 안정성(Stability)

안정성 평가는 품질평가에서 중요한 부분이다. 안정성 시험의 목적은 제품의 개발 단계에서 뿐 아니라, 허가 후에도 백신의 각 성분이 여전히 품질, 안전성 및 유효성을 뒷받침하는데 필요한 특성을 보유하도록 하는 것이다.

만약 해당사항이 있다면 시간이 지나면서 발생할 수 있는 항원과 면역증강제 간의 탈착을 조사하여야 한다.

권장 보관온도에서 보관중인 백신의 장기 안정성 (long-term stability or real-time stability)은 품목허가심사 시 만족시킬 만큼의 자료로 충분히 입증되어야 한다. 식약처 고시 「의약품 등의 안정성시험 기준」과 WHO의 ‘백신 안정성 평가 가이드라인(*Guidelines on stability evaluation of vaccines*)’에 따라, 제조업체는 완제의약품에 대한 안정성, 제조공정 단계별 안정성, 임상시험용 의약품 승인을 위한 안정성 평가를 수행하여야 한다.

특히 디프테리아·파상풍(DT) 포함 혼합백신은 정해진 유효기간 내의 보관기간 동안 독성회복이 발생하지 않도록 주의해야 한다. 대개 3개 이상의 연속된(서로 다른 독소이드 원액 중간물질에서 나온) 최종 로트 완제의약품을 검사하며, 이 용기들은 실시간 안정성 시험에 포함된다. 이때 유효기간까지, 역가에 대한 근거와 무독화에 대한 근거가 있어야 한다. 더불어 보관 중인 백신에서 독성이 회복되지 않았다는 것을 확인하기 위해 안정성 시험에 유효기간까지 독소회복부정시험을 평가할 수 있도록

설정되어야 한다. 이 외에도 가능하다면 백신은 유효기간까지, 무균, 역가, 면역증강제 함량, 흡착정도, 보존제 함량, pH, 실용량과 같은 완제의약품 품질관리 요구사항을 충족해야 한다. 식약처 고시 「의약품 등의 안정성시험 기준」과 WHO의 ‘백신 안정성 평가 가이드라인(*Guidelines on stability evaluation of vaccines*)’에 따라, 시험 횟수는 품목허가(변경)심사 시 승인을 받아야 한다(안정성 시험에 대한 계획서 평가). 또한 제품의 안정성에 영향을 줄 있는 변경사항이 생산절차에서 생긴다면, 변경된 방법으로 생산된 백신의 안정성 및 유효성을 재차 입증해야 한다.

백신 보관 권장온도 이외의 온도에서 안정성 시험을 수행한다면, 제한된 시간동안 다양한 온도에서 백신을 수송하는 것에 대한 정보를 제공하는데 도움이 될 수 있다. 가속 안정성 시험은 제품의 안정성에 대해 추가적인 근거를 제공할 수는 있으나, 장기 안정성 시험을 대체하진 못한다.

통상 품목허가·심사 신청에는 최종원액 조제 시 흡착공정에 대한 검증자료와 안정성 시험에서의 흡착 정도를 평가할 수 있는 자료가 요구된다(보관 중인 백신에서 항원과 면역증강제 간의 흡착률 변화를 안정성 시험의 일환으로 유효기간까지 이에 대한 시험을 평가 일정에 포함시켜야 한다).

5.9.2 보관조건(Storage conditions)

보관조건과 규정된 최대 보관기간은 안정성 시험을 기반으로 하며, 품목허가(변경)심사 시 승인을 받아야 한다. 디프테리아·파상풍(DT) 포함 혼합백신은 대개 2 ~ 8 °C의 온도에서 보관하고, 냉동해서는 안 되는 것이 일반적이다. 이를 통해, 용기나 포장 라벨에 명시된 최소 역가가 출하 이후나 제시된 유효기한이 끝날 때까지 유지될 수 있어야만 한다. 이는 백신 보관조건이 라벨의 문구에 부합한다는 전제 하에서이다. 따라서 제조업체는 백신이 라벨에 표시된 유효기간 만료일까지 역가 요구사항을 충족할 수 있도록 이에 맞는 보관 및 운송 조건을 권고해야 한다.

5.9.3 유효기간(Expiry date)

유효기간 만료일은 안정성 시험을 토대로 정해져야 하며, 품목허가(변경)심사 시 승인을 받아야 한다. 라벨에 기술되는 유효기간 관련 문구 또한 시험 결과를 토대로

하며, 안정성 시험의 데이터를 기반으로 품목허가(변경)심사 시 승인을 받아야 한다.

5.10 국제표준품 및 국내표준품

디프테리아·파상풍(DT) 포함 혼합백신을 위한 국제표준품이나 국제참조품은 존재하지 않는다. 혼합백신에 대한 품질 평가나 임상평가에서 사용될 수 있는 WHO 참조물질에 대해서는 WHO의 개별 백신성분에 대한 국제표준품을 사용하고 있다. 혼합백신의 역가를 분석하기 위해 국제표준품을 기준으로 보정시킨 안정적인 단가성분의 국제, 지역, 국가 참조물질을 사용하는 것은 우선적으로 권장된다.

혼합백신에 대해 이러한 접근방식이 적합한지 여부는 사례별로 신중히 평가해야 한다. 일부 경우에는 단가 참조품과 시험 중인 혼합백신의 비교 시험 시, 항원 및 첨가물의 양적 차이로 인해 타당하지 못한 시험결과가 나오거나(예, 용량반응선의 평행성 편차), 시험분석법의 차이 또는 실험실 간의 차이로 인해 시험의 결과에 영향을 미칠 수 있는 것으로 나타났기 때문이다.

특히 실험실간의 차이는 국가출하승인 시 충분히 고려되어야 한다. 따라서 일부 실험실에서는 국제표준품에 맞게 성분을 적절히 보정한 후, 시험 중인 혼합백신과 유사한 구성의 혼합백신을 내부 참조물질로 성공적으로 사용하여 왔다. 또, 일부 경우에는 쥐를 대상으로 한 정제백일해 백신의 특이독성 모니터링에서 제품 특유의 참조백신에 대한 필요성이 명확히 나타났다. 이러한 “내부” 또는 “이에 상응하는” 참조물질은 안정적이어야 하며, 가급적이면 임상시험에서 만족스러운 성과를 보이거나, 임상시험에서 이미 만족스러운 성과를 낸 것으로 입증된 백신 로트와 동일한 구성 및 생산 공정이어야 한다. 이러한 공정이나 제품 특유의 참조물질을 사용하기 위해서는 적절한 절차에 따라 허가를 받아야 한다. 이것은 제조업체와 국가출하승인기관이 공동연구를 통해 이러한 참조물질의 적합성과 작용을 평가함으로써 이루어질 수 있다. 이런 참조품을 국제단위(IU)로 보정하는 게 불가능하다면, 개별 제조업체들이 관련시험의 허용기준 및 타당성 조건이 명시된 규격을 결정하고 검증하여, 품목허가(변경) 심사 시 승인을 거쳐야 한다. 이에 대하여 ‘WHO 국가 및 기타 백신 2차 표준품 설정 매뉴얼(*WHO manual for the establishment of national and other secondary standards for vaccines*)’을 참고하기 바란다.

디프테리아 백신의 관리에 사용되는 핵심 표준품은 다음과 같다.

2차 디프테리아 독소이드 응집 반응 국제표준품(The 2nd International Standard of Diphtheria Toxoid for Flocculation)

코드가 04/150인 이 물질은 2007년에 확립된 것으로, 앰플 당 1100 Lf의 할당된 단위량을 가지며, 1차 면상반응 시험을 위한 디프테리아 독소이드 국제표준시약(DIFT)을 대체하였다. 이 표준품은 디프테리아 독소이드의 항원함량을 결정하기 위한 응집반응 시험에서 사용한다.

4차 디프테리아 독소이드(흡착) 국제표준품(The 4th International Standard for Diphtheria Toxoid (Adsorbed))

코드가 08/218인 이 물질은 2009년에 확립되었고, 3차 국제표준품을 기준으로 기니픽 시험을 토대로 한 교정에 기초하여 앰플 당 213 IU의 표시역가를 가진다. 3차 국제표준을 대체한다(98/560). 이 표준품은 디프테리아 백신 역가 분석에서 표준백신으로 사용한다.

디프테리아 항독소(DI) 국제표준품(The International Standard for Diphtheria Antitoxin (DI))

이 건조제형의 고도 면역 말 혈청은 1934년에 1차 디프테리아 항독소 국제표준품으로 확립되었다. 이 물질은 생리식염수 66% 글리세롤에서 mL당 10 IU를 함유한 액체 충전물을 조제하기 위해 사용된다. 현재의 충전물은 코드 번호가 11/200이다. 이 물질은 디프테리아 항독소의 역가를 결정하기 위해 체내(*in vivo*) 또는 체외(*in vitro*) 독소 중화시험에서 참조품으로 사용한다.

1차 디프테리아 항독소 인간 국제표준품(The 1st International Standard for Diphtheria Antitoxin Human)

코드가 10/262인 이 물질은 2012년에 확립되었으며, 앰플당 두 IU의 할당된 단위량을 가진다. 이 물질은 인간 혈청에서 디프테리아 항체 수준을 측정하기 위해 사용되는 분석에서 참조품으로 사용한다.

파상풍 백신 관리에 사용되는 핵심 표준품은 다음과 같다.

4차 흡착 파상풍 독소이드 국제표준품(The fourth International Standard for Tetanus Toxoid, Adsorbed)

코드가 08/218인 이 물질은 2010년에 확립되었고, WHO의 3차 국제표준품을 기준으로 기니픽 시험을 토대로 한 보정에 기초하여 앰플 당 490 IU의 표시역가를 가진다. 2012년에는 마우스 시험을 토대로 앰플 당 260 IU을 확정했다. 이 표준품은 파상풍 백신 역가시험에서 표준백신으로 사용된다.

2차 면상반응 시험을 위한 파상풍 독소이드 국제표준품(The second International Standard of Tetanus Toxoid for Flocculation)

코드가 04/150인 이 물질은 2007년에 확립된 것으로, 앰플 당 690 Lf의 할당된 단위량을 가지며, 1차 면상반응 시험을 위한 파상풍 독소이드 국제표준시약(DIFT)을 대체하였다. 이 표준품은 Lf로 된 파상풍 독소이드의 항원함량을 결정하기 위한 면상반응 시험에서 사용한다.

1차 파상풍 인간 면역글로불린 국제표준품(The first International Standard for Tetanus Immunoglobulin, Human)

코드가 TE-3인 이 물질은 할당된 단위량이 앰플 당 120 IU로서 1992년에 확립되었고, 1969년 이후 사용되어 왔던 두 번째 파상풍 항독소(말 유래) 국제표준품을 대체한다. 이 표준품은 체내 독소 중화시험을 통해 활성이 할당되었고, 체내 독소 중화시험에서 참조품으로 사용하기 위한 것이다. 또한 이 물질은 체외 분석법을 통해 사람 혈청에서 파상풍 항독소가를 측정하기 위한

참조품으로도 사용된다.

위에 열거한 국제표준품은 영국보건국의 국립생물표준통제연구소(Potters Bar, Hertfordshire)가 보유하고 있다. 이 자료의 참조품은 대체 표준품으로 대신할 수 있으며, 확립된 표준품 최신목록은 WHO 국제 생물표준품 및 참조품(International Biological Standards and Reference Materials) 카탈로그를 참고해야 한다. 국제 표준품은 디프테리아 백신의 제조 및 관리에 사용된 국가, 지역 또는 기타 2차 표준품 보정에 사용된다. 또한 일부 분석에서 1차 참조품으로 사용하는데 적합할 수도 있다.

식품의약품안전처에서는 현재 디프테리아 항독소(코드 KFDA 07/018), 파상풍 항독소(코드 KFDA 10/036), 디프테리아 독소(코드 KFDA 07/017) 및 파상풍 독소(코드 KFDA 01/001) 등을 제조, 확립하여 분양하고 있으니 참고하기 바란다.

6. 혼합백신의 비임상 평가

6.1 서론

비임상 시험은 사람을 대상으로 한 임상시험을 시작하고 허가를 받기 위한 필수조건이다. 이 문서의 적용범위 내에서 ‘비임상 평가’가 의미하는 것은 백신의 임상개발 전이나 임상개발 중에 수행하는 모든 체외/체내 시험이다. 시험의 목적은 후보백신의 체외/체내 특성을 규정하는 것이다. 동물을 대상으로 한 광범위한 제품특성분석, 면역원성 연구, 안전성 시험이 여기에 포함된다. 비임상 시험의 필요 정도는 항원의 유형, 제제의 복잡성, 단독 및 혼합물 형태로 여러 백신성분과 함께 기존의 임상경험에 따라 다르다. 혼합백신에 새로운 항원이나 면역증강제가 들어있다면 보다 광범위한 비임상 시험이 필요할 것으로 보인다. 비임상 시험의 설계, 진행, 분석, 평가에 대한 세부내용은 WHO의 ‘백신 비임상 평가 가이드라인 (*Guidelines on nonclinical evaluation of vaccines*)’에 나온다. 수행되는 비임상 시험은 (i) 개별 백신 항원과 최종 제품의 주성분의 조성이 특성분석을 통하여, 그 구성을 명확하고 철저하게 분석할 수 있으며, (ii) 사람에게 투여될 혼합백신이 새로운 안전성 문제가 일어나지 않을 것과 (iii) 동물의 면역원성 효과나 방어 효과 자료를 통하여 관련 질병에 대해 예방할 수 있다는 근거를 제공해야 한다. 이 사안들은 뒤에서 세부적으로 다룬다.

이 후에는 새로운 혼합백신의 개발 과정에서, 그리고 제조공정의 유의한 변화로 인해 백신의 재시험 및 특성분석이 필요할 때 고려해야 할 비임상 정보의 유형이 결정된다. 비임상 시험의 목적은 허가 신청 자료제출 시 적합한 근거의 기반을 마련하는데 있다. 자료제출 목적은 제품의 개발과정 단계에 따라 다르며, 경우에 따라서 특정한 임상연구의 시작을 뒷받침하기 위해 임상 데이터를 제출하기도 하며, 또 다른 경우에는 시판허가 신청서에 비임상 데이터가 포함되기도 한다. 임상시험을 시작하기 전에 실시하는 비임상 시험인 전임상 시험의 목적은 임상연구의 시행을 입증해주는 포괄적인 근거 데이터 및 제품 정보를 마련하기 위한 것이다.

필요한 비임상 시험의 규모를 결정하는 데에는 여러 가지 고려사항들이 있다. 이전에 안전성 및 유효성 평가를 받지 못한 새로운 백신 제제에는 광범위한 특성분석이 필요하며, 여기에는 면역원성 시험 동물모델을 대상으로 한

공격시험(challenge test)과 안전성 시험이 포함된다. 하지만, 이미 승인된 백신과 동일한 항원을 사용하는 백신(예, 동일한 제조업체, 동일한 방법으로 생산)에는 광범위한 비임상 시험이 필요하지 않을 수도 있다. 비임상 시험이 필요한 새로운 혼합백신은 다음과 같은 것을 통해 만들어질 수 있다.

- 2개 또는 그 이상의 기허가 제품들의 혼합
- 기존의 백신에 새로운 백신 항원(아직 허가되지 않은) 추가
- 혼합물에 있는 한 항원을 동일 지표의 다른 항원으로 대체
- 기허가된 결합물에서 항원 제거
- 하나 또는 그 이상의 개별 백신성분 제조에 변경사항이 생김
- 하나 또는 그 이상의 백신항원이나 첨가제의 양의 변화
- 면역증강제나 보존제, 첨가제에 변경사항이 생김

비임상 시험에서 다루는 특정한 문제들은 변경사항이 어떠한가에 따라 달라진다. 하지만 백신 성분의 적합성, 혼합 시 각각 항원의 물리화학적 또는 면역학적 결합, 개별적 항원의 안정성, 혼합 시 항원의 면역학적 상호작용 또는 항원의 면역원성 증대 등이 주 고려사항이다. 이러한 일부 평가에는 아래에서 논의하는 바와 같이 관련 동물모델을 대상으로 한 시험이 포함된다. 포괄적인 독성 시험(6.3.4)이 모든 새로운 혼합백신에 반드시 필요한 건 아니므로, 독성 시험을 시작하기 전에, 새로운 혼합백신의 독성 시험 필요성 및 설계와 관련해 식약처의 자문을 구하는 것이 좋다.

비임상 연구에 사용되는 백신로트는 임상시험용 제제를 충분히 대표할 수 있어야 하며 가급적이면 임상시험과 동일한 로트를 사용해야 한다. 이것이 가능하지 않다면, 제조, 면역 활성/역가, 순도, 안정성, 기타 품질특징과 관련해 임상적으로 사용되는 로트와 비임상 시험에 사용되는 로트를 비교해보아야 한다.

6.2 조제 전 개별백신성분의 특성분석

기존과는 다른 새로운 제조공정을 통해 한 가지나 그 이상의 성분이 생산되는 새로운 백신항원이나 제제를 토대로 한 백신의 경우, 비임상 시험에 조제 전 개별백신성분에 대한 세부적인 특성분석과 개별백신성분의 평가가 들어가야 한다. 해당 성분을 다루는 제품 특유의 WHO 문서와 WHO의 ‘백신의 비임상 평가 지침서(*Guidelines on nonclinical evaluation of vaccines*)’에 기술된 일반지침을 참고한다.

6.2.1 안전성 평가

디프테리아 독소가 완전히 무독화 되고 비가역적이라는 것을 확인하기 위해 생산공정을 검증한다. 특이독성 시험 및 독성회복부정 시험은 모두 벌크 정제 독소이드를 대상으로 실시한다. 가능하면, 백신의 비임상 평가 중에 체내 시험(*in vivo*) 방법을 실시해야 하는 것이 좋으나 밸리데이션 시험의 일환으로 체외 대체시험(*in vitro*)을 포함할 수 있다.

또한 파상풍 독소의 경우에도, 독소가 완전히 무독화 되었으며 특히 열에 노출되었을 때도 독소가 다시 생성되지 않는다는 것을 확인할 수 있도록 생산 공정을 검증한다. 5장에 기술된 특이독성 시험 및 독성회복부정 시험은 모두 정제 독소이드 원액을 대상으로 실시한다. 특이독성 및 독성회복이 없다는 것을 확인해주는 시험 말고도 별도의 독성 연구를 수행해야 할 수도 있다.

비임상의 독성 연구 결과는 임상을 진행하는데 백신이 안전하다는 것을 확실하게 뒷받침 할 수 있어야 한다. 신체의 중요기관의 조직병리학을 비롯해 한 가지 이상의 동물종을 대상으로 정제 불활화 독소이드의 잠재적인 독성 효과를 평가해야 한다. 이 연구에서는 국소염증반응, 전신독성, 면역체계에 대한 영향의 가능성을 조사한다. 사용하는 동물종은 백신의 생물학적 효과와 독성에 민감해야 한다. 실현 가능하면 동물모델을 대상으로 해당 임상시험에서 사용하는 최고용량을 평가한다. 특히 새로운 파상풍 항원에 대해서는 가임여성과 임신여성에게 사용될 수 있기 때문에 생식독성 연구를 고려할 수 있다.

엔도톡신 함량 정보는 생산 공정을 검증하는 동안에 비임상 평가 연구의 일환으로 얻을 수 있다. 무균상태에서 진행하지 않은 단계 중에 잠재적인 오염수치를 최소화하려면 바이오버든 시험을 할 수 있다.

6.2.2 안정성 평가

안정성 시험은 식약처 고시의 「의약품등의 안정성시험 기준」과 WHO의 ‘백신 안정성 평가 가이드라인(*Guidelines on stability evaluation of vaccines guidelines on stability evaluation of vaccines*)’을 참고할 수 있다. 단기간 내에 사용하지 않는 모든 단계별 중간체의 안정성은 적절한 방법을 사용하여 평가하고 입증해야 한다. 제조업체는 백신생산 공정 동안에 모든 물질, 특히 단일 수득물 및 정제 독소이드 원액과 같은 주요 중간체의 보존기간을 정해야 한다. 안정성-지표 변수 및 시험의 빈도를 선택할 때는 근거를 제시하고 승인을 받아야 한다. 제조공정 중 생산된 중간체의 보존기간은 안정성 시험에서 얻은 데이터를 기반으로 설정한다.

6.2.3 특성분석

디프테리아, 파상풍의 경우에는 불활화 독소의 순도는 총 단백질소의 농도에 대한 Lf 농도를 측정하여 결정한다. 면역증강제를 추가하여 제조하기 전에 파상풍 독소이드 백신 항원에 대해 전반적인 특성분석을 하고 완전성을 더하려면 HPLC, SDS-PAGE, Western blotting과 같은 다양한 순도표시법을 사용할 수 있다.

6.3 혼합물에 들어있는 개별 백신성분의 특성분석

새로운 혼합백신을 생산할 경우 각 백신 성분항원의 환경에 변화가 생긴다. 예를 들어, pH, 희석제 구성, 면역증강제 성질이나 농도, 단백질 농도에 변화가 생길 수 있다. 이 경우에는 면역증강제 흡착 정도나 물리화학적/면역화학적 결합성, 안정성에 변화가 생길 수 있다. 따라서 혼합물의 항원의 특성에 어떤 변화가 생길 수 있는지 평가하려면 적절한 방법으로 혼합한 항원을 검사해야 한다. 백신에 있는 모든 항원성분의 적합성은 비임상 시험을 통해 입증한다. 백신에 들어있는 모든 항원성분의 흡착은 로트별로 일관되게 나타나야 한다. 제품의 유효기간 동안 나타날 수 있는 항원의 흡착정도를 평가하여 보고해야 하며, 규격을 수립해야 한다. 백신조제용으로 새로운 면역증강제를 사용한다면 보다 폭넓은 연구가 필요할 것이다. 이를 위해 비임상 연구를 통해 임상용으로 제조된 면역증강제와 항원의 혼합물을 평가한다.

가능하다면 개별 항원의 특성을 평가할 때는 혼합되지 않은 기허가 백신에 들어있는 동일항원의 특성과 비교해본다. 어떤 경우에는 새로 개발하는 혼합백신보다 각각의 개별항원의 수가 더 적은 기허가 백신과 비교할 수도 있다(예. 새로운 DTP-B형 간염 혼합백신의 대조 백신으로 기허가 된 DTP와 비교).

6.3.1 면역원성/역가

사람을 대상으로 임상시험을 시작하기 전에, 혼합백신을 다른 방법으로 혼합하거나 재구성 하였을 때 이 혼합백신이 적절한 동물모델(가능하다면)에서 적절한 면역원성을 보이는지 시험해 보아야 한다. 적절한 동물 모델을 이용한 면역 연구는 백신의 비임상 개발 중에 중요한 정보를 제공할 수 있다. 이와 관련해, 백신에 들어있는 각 항원에 대한 면역반응을 평가해야 하며, 여기에는 반응의 질, 간섭 가능성, 혼합항원 적합성이 포함된다. 가능하다면 반응이 증가하는지, 감소하는지를 정할 때 동물의 개별항원(또는 개별항원의 수가 더 적은 기허가 백신)과 비교하여 새로운 혼합백신을 연구하는 것이 좋다. 이런 시험에는 한 가지 또는 그 이상의 백신성분을 평가할 수 있는 동물모델을 사용하도록 권장한다.

동물모델의 면역원성 시험은 면역증강제 혼합의 최적화 및 항원의 면역특성 평가와 관련해 중요한 정보를 제공해줄 수 있다. 이러한 면역원성 시험은 일부 항원에 대한 중화항체의 생성과 직접 항원을 투여하여 질환방어 효과도 알 수 있다. 하지만, 경험적으로 볼 때 동물모델의 데이터로 인간의 질병을 예측하는 외삽법은 신중하게 접근해야 한다. 다음 사항은 비임상 연구 중 면역원성 평가 시 고려해야 하는 요소들이다.

- 비임상 연구 시 임상연구에 사용된 백신과 동일한 방법으로 제조된 면역증강제와 항원으로 만든 백신을 사용해야한다.
- 개발하고자하는 백신의 각 항원에 대한 생성된 항체가와 이미 기허가된 대조 백신(가급적이면 많이 사용되어진 제품이나 유효성이 확실히 입증된 제품)의 항체를 직접 비교해 보아야한다. 주요 제조공정이 변하여 시험을 할 경우 개발백신과 기허가 백신과 비교해 보아야 한다. 기허가된 대조 백신의 경우

단가백신 또는 개별항원의 개수가 적은 백신도 가능하다. 일부 혼합백신의 경우 각성분을 비교하고자 할 때 한 개 이상의 대조백신을 사용할 수 있다.

- 면역반응에 대한 깊이 있는 분석이 필요한지 평가해 보아야하며, 가능하다면 중화항체 반응이나 세포성 면역에 대해 평가할 수 있다.
- 개발하고자 하는 백신에 면역 증강제를 혼합한다면, 면역 증강제 사용에 타당한 면역원성 근거자료가 있어야한다. 이 면역원성 자료에는 체액성 면역 또는 세포성 면역원성 평가 자료를 포함할 수 있다. 면역증강제를 사용한 개발백신은 적절한 대조백신과 서로 비교해 보아야한다. 이미 널리 사용되고 있는 알루미늄 흡착체를 대체하고자하는 새로운 면역증강제를 사용할 경우, 적절한 동물군을 신중하게 고려해야한다. 이 대조군에는 항원만 투여하는 군과 알루미늄 흡착체를 사용하는 항원을 투여하는 군을 설정할 수 있다.

6.3.2 면역증강제

해당하는 경우, 면역증강제는 화학적 조성, 물리적 형태, 흡착력, 순도, 엔도톡신 함량, 무균의 측면에서 특성 분석이 이루어져야 한다. 면역증강제와 항원 간의 상호작용에 대한 평가에서는 흡착정도에 대한 측정을 포함하여 실시해야 한다. 상호작용은 로트별로 일관성을 보여야하며, 충분한 수의 로트가 생산되었다면 이를 기반으로 규격을 설정해야한다. 개발단계 동안에는 면역증강제 자체의 안정성과 항체와 결합했을 때의 안정성이 모두 입증되어야 하며, 예정된 보존기간 동안 안정적인 것으로 나타나야 한다.

6.3.3 비임상 안전성 연구

면역증강제와 혼합백신의 항원간의 안전성 확인하는 비임상 동물연구도 수행해야 한다. 새로운 혼합백신의 안전성은 사례별로 동물모델을 대상으로 평가하며, 특히 항원이나 면역증강제를 혼합했을 때 독성문제가 생길 수 있다는 우려가 있다면(예. 새로운 면역증강제) 동물모델 평가가 더욱 더 필요하다. 화학적으로 불활화된 독소가 하나 이상 함유된 백신의 경우에는(예. 디프테리아, 파상풍, 무세포 백일해), 연구를 통해 특히 잔류 활성독소의 존재와 최종 혼합물에서 독성회복 가능성을 평가해야 한다.

보존제나 첨가물 같은 새로운 첨가제를 사용하고자 한다면, 그 안전성을 시험을 통해 확인해야한다. 새로운 보존제를 사용한다면, 제품 용도의 안전성과 유효성을 확인해야 한다. 새로운 첨가제를 사용할 경우, 개발하고자하는 백신의 항원을 제거한 상태에서 첨가제의 안전성도 평가해야한다. 새로운 첨가제가 모든 백신항원과 적합한지 확인하고, 동물모델에서 나타나는 특정한 항원과 첨가제 혼합물의 독성정보도 기록한다.

6.3.4 독성 시험

비임상의 독성시험은 임상시험을 진행하기 전 안전하다는 확증을 얻을 수 있도록 계획해야한다. 백신의 잠재적 독성을 평가하기 위해서는 1종 이상의 동물을 이용하여야하며, 주요 장기의 조직병리학적 평가를 수행하여야한다. 이 시험에서는 국소염증반응, 전신독성, 면역체계에 대한 영향의 가능성에 대해 조사가 이루어져야 한다. 사용된 동물 종은 백신의 생물학적 효과와 독성에 민감한 종이어야 한다. 가능하면, 예정된 임상시험에서 사용될 최고용량을 동물모델 대상으로 평가해야 한다. 최종제제(항원과 면역증강제 포함)에 관한 독성 연구는 WHO의 ‘백신 비임상 평가 지침서(*Guidelines on nonclinical evaluation of vaccines*)’에 따라 실시해야 한다. 독성 연구가 필요할 경우, 설계 시에 예정된 백신의 임상용도를 고려한다. 이것은 유아, 어린이, 임산부, 가임기 여성처럼 특정한 집단에서 사용되는 백신에서 특히 중요하다. 독성 연구를 시작하기 전에 식약처와 상의할 것을 권장한다.

새로운 면역증강제를 사용하여 제조할 경우, 면역증강제를 포함한 최종백신 제제에 맞게 비임상 독성연구를 실시한다. 반복투여 독성 연구를 이용해서 새로운 면역증강제와 기존 백신 제제의 안전성 정보를 비교해도 된다. 이때, 기존의 지침서를 고려한다. 새로운 면역증강제에 대한 독성 데이터가 없다면, 일부 상황에서는 면역증강제에 대해서만 별도로 독성시험을 실시함으로써 도움이 되는 정보를 제공할 수 있다.

성분항원 중 한 가지를 생산하는데 새로운 세포기질(즉, 이전에 허가되지 않았거나 사람에게 사용된 적이 없는 기질)이 사용될 경우, 숙주세포 유래 단백질에 의한 예상치 못한 면역반응에 대한 안전성을 고려한 적절한 동물모델을 대상으로 시험해 보아야 한다.

투여경로에 차이가 있다면 적절한 동물의 독성 시험과 함께 백신의 면역원성 평가가 필요할 수도 있으며, 이때 기존의 지침서를 참고한다.

6.3.5 안정성 연구

안정성 시험은 백신의 개발에서부터 허가 및 허가 후 모니터링에 이르기까지 하나의 연속과정으로 생각해야 한다. 안정성 시험은 WHO의 ‘백신 안정성 평가 가이드라인(*Guidelines on stability evaluation of vaccines guidelines on stability evaluation of vaccines*)’을 참고할 수 있다. 이 시험은 최종제품의 보관 조건에 따라 실시간으로 이루어져야 한다. 임상시험의 초기 단계에서, 실시간 안정성 데이터의 양이 제한되기도 하지만 계획된 시험기간 동안 백신의 안정성을 뒷받침하는 충분한 데이터가 생성되어야 한다. 허가 시, 예정된 보관조건에서 시험을 실시하되, 실시간으로 이루어져야 한다. 안정성에 영향을 줄 수 있는 온도에서 제한된 시간 동안 보관된 제품에 대해 실시하는 가속안정성 시험은 진행 중인 실시간 안정성 시험의 예비 데이터를 뒷받침 할 수는 있으나, 이것을 대체해서는 안 된다. 허가 시 유효기간 설정을 뒷받침 할 수 있도록 진행 중인 실시간 안정성 평가를 해야 한다. 최종 백신 제품의 유효기간 종료 시점에 항원의 실제 연령(actual age)에 대한 누적 특징(cumulative nature)이 고려되어야 하고, 항원의 누적 연령을 포괄하는 데이터를 수집하여 보고해야 한다.

안정성 시험에서는 생산 공정의 결과 최종 제품은 장기 보관 중에 독성이 회복되지 않는다는 것을 확인해야 한다. 결과적으로 안정성 시험(특이독성시험 및 이상독성부정시험)은 만료일에 실시해야 한다. 안정성 입증을 위한 추가 시험에는 역가 시험과 물리적, 화학적 특성분석이 포함되어야 하며, 적어도 역가, 무균, 면역증강제 함량, 흡착 정도, 보존제 함량 및 pH에 대한 시험이 실시되어야 한다. 유효기간을 설정하기 위해서는 최소 3 로트의 완제 의약품(각기 다른 원액에서 얻음)을 권장 온도에서 보관해야하며 안정성을 입증하기 위해서는 만료일에 안정성 시험을 해야 한다. 시험을 위해 선택한 시간은 백신을 평가하는데 적합해야 하고, 밸리데이션 데이터로 뒷받침되어야 하고, 승인을 얻어야 한다.

유효기간이 변경되었다면 관련 변경내용을 뒷받침할만한 안정성 데이터가 추가로 필요하며, 변경사항은 허가를 받아야 한다. 허가가 난 이후에는 제시된 유통기한 동안 안정성을 모니터해야 한다.

7. 혼합백신의 임상 평가

7.1 서론 및 범위

본 장에서는 새로운 혼합백신과, 제조공정에 유의한 변화가 있는 기존백신에 대한 임상시험 설계 및 평가에 대한 내용을 포함한다. WHO의 '백신 임상평가 가이드라인 : 규제기관 기대사항 (*Guidelines on clinical evaluation of vaccines : regulatory expectations*)' 및 '백신의 임상평가 시 고려사항(2007)'을 준수해야 한다. '6. 혼합백신의 비임상 평가'에서 논의된 바와 같이, 임상 프로그램을 시작하기 전에 적절한 비임상 연구가 선행되어야 하며, 임상 프로그램의 내용과 범위는 고려 중인 특정 혼합백신, 그리고 백신성분과 유사백신에 대한 사전 임상경험에 따라 달라진다. 임상시험에서 백신특유의 요구사항은 각 해당 제품의 특성에 따라 달라질 수 있다.

관련 내용은 특히 디프테리아와 파상풍 독소이드가 함유된 혼합백신의 임상평가를 기준으로 작성되었으며, 현재 기 승인된 디프테리아·파상풍(DT) 포함 혼합백신에는 백일해(전세포나 무세포), Hib 접합백신, 불활화 폴리오, B형 간염 등의 추가성분이 하나 또는 그 이상 포함되어 있다. 본 문서는 현재 사용 중인 혼합백신을 중점적으로 다루고 있으나, 개발될 새로운 디프테리아·파상풍(DT) 포함 혼합백신에 추가될 가능성이 있는 새로운 항원에는 일반원칙 및 절차가 적용된다.

디프테리아·파상풍(DT) 포함 혼합백신 임상개발 주된 목표는 혼합백신의 안전성과 백신에 함유된 각 성분의 면역원성을 평가하는 것이다. 일반적으로 임상개발 시 비교 임상을 포함해야 하는데 본 가이드라인의 7.2에서 이러한 비교임상에 대한 전반적인 설계와 대조백신의 선택에 대한 내용이 기술되어 있다. 새로운 혼합백신의 안전성과 면역원성의 평가는 무작위 대조군 시험을 통해 새로운 혼합물의 항원이 한 개 이상 포함된 기허가 백신의 안전성 및 면역원성과 비교해 보아야 한다. 무작위 대조군 시험에 너무 큰 비중을 둘 필요는 없다. 기허가 백신을 대조군에 포함시키면, 면역분석법을 비롯한 시험 절차와 방법의 적절성을 보장할 수 있고, 새로운 혼합백신으로 접종한 뒤에 예기치 못한 결과(예. 한 개 이상의 항원에 대해 낮은 면역반응이나 특정 이상반응의 비율 증가, 예기치 못한 이상반응)가 나오는 상황에서 해당 데이터를 쉽게 해석할 수 있다.

혼합백신의 임상시험의 경우, 그 평가는 새로운 혼합백신의 성분 및 특징에 의해 좌우되며, 면역학적 간섭 및 반응원성 증가가 일차적 고려 대상이다. 혼합백신의 경우 최종 혼합액에서의 면역학적 간섭 및 반응원성 증가를 평가해야한다. 안전성 연구를 할 때는 혼합백신의 투여가 개별로 투여되는 백신보다 반응원성이 우위인지를 평가해야 하며, 유익성-위해성 평가(risk-benefit considerations)에 필요한 적절한 안전성 데이터 베이스를 역시 구축해야한다.

혼합백신의 면역원성에 관련한 일차적인 고려사항은, 혼합백신의 항원 간에, 면역원성 반응에 영향을 주거나 또는 방해하는지 여부와 그 반응의 정도이다.

드물게 예외는 있으나, 현재 기허가된 디프테리아·파상풍(DT) 포함 혼합백신의 경우, 포함된 항원에 대해서는 임상 유효성을 직접 측정하는 건 비현실적이거나 불가능한 일이다. 따라서 임상의 유의성을 증명하기 위해, 디프테리아·파상풍(DT) 포함 혼합백신의 면역원성 평가가 적절한 평가방법으로 용인되어 왔다.

디프테리아·파상풍(DT) 포함 혼합백신의 일부 성분은 방어에 대해 혈청학적 지표가 설정되어 있으므로, 면역학적 평가변수를 선정하고 데이터를 해석함에 있어 용이하다. 면역원성을 평가하기 위해서는 분석법, 임상 설계, 그 검증에 있어, 적절성이 수반되어야 한다(세부 내용은 7.3 참고). 개발되는 혼합백신의 특성에 따라 임상시험을 위한 면역분석법의 선별 및 그 평가는 결정되어야 한다. 안전성과 면역원성 데이터는 혼합백신에만 국한된 특별한 사항이 아니며, 새로운 혼합백신이 기허가 백신과의 병용 투여를 판단할 수 있는 필수적인 평가 사항이다.

면역간섭 현상의 임상적 유의성이 항상 명확한 것은 아니지만, 병용투여를 하면 하나 이상의 병용투여 항원에 대해 면역반응이 낮아질 수도 있다(immune interference, 면역간섭).

병용투여 시, 접종된 단백접합백신의 운반체인 단백질이 혼합백신 항원의 하나와 연관되어 면역반응이 과장되어 나타나는 경우가 있다.

상호작용이 다양하게 나타날 수 있으므로, 백신의 병용 투여 시에 일차적 평가에 대해서는 임상 초기단계에 판단되어질 수 있다. 그러나 단순히 임상 초기단계에서만 아니라, 시작 및 시판 후 조사, 즉 모든 단계를 통해 그 데이터를 수집해야 한다.

7.2 시나리오와 임상시험 설계

7.2.1 임상개발 계획 시 고려사항

새로운 백신의 임상시험은 일반적으로, 소규모 안전성/면역원성 연구로 시작하여, 후에 대규모 연구를 수행한다.

새로운 항원이 포함된 소아백신의 경우에는 성인을 대상으로 안전성 및 면역원성 예비평가를 한 뒤에, 성인에서 연령대를 단계적으로 낮추어 진행하는 게 적절할 수 있다. 이런 연구를 평가할 때 염두에 두어야 할 점은 안전성과 면역원성은 연령, 감염 이력, 접종 이력에 좌우될 수 있다는 것이다.

임상시험을 시작하기 위해서는 제조업체는 혼합백신의 주성분 선별과 시험설계에 대한 타당한 근거를 제시해야 한다. 이전의 개별 백신성분 경험, 비임상 연구 경험, 용량범위 임상시험을 토대로 혼합백신의 각 성분에 대한 용량 설정의 과학적 근거가 제시되어야 한다. 모든 경우에 있어서, 개발되는 혼합백신의 비임상시험 및 제조에 관한 과학적 근거가 제시되어야만 임상시험을 시작할 수 있다.

1차 표적 집단을 대상으로 한 임상시험을 비롯하여 최소한 일부 임상시험은 시판용 백신과 동일한 공정을 사용하여 제조된 다양한 로트의 백신을 이용하여 실시해야 한다. 임상시험에서 사용되는 백신 로트에 대해서는 생산 시의 그 일관성을 입증하여야 한다. 임상시험에 사용되는 백신 로트는 비임상시험에서 평가된 로트와 동일한 것이 좋으며, 시판용 제제를 충분히 대표할 수 있어야 한다. 이것이 가능하지 않다면, 임상적으로 사용된 로트를 제조공정, 면역원성/역가, 안전성, 안정성, 기타 관련된 품질 특성과 관련하여 비임상시험에서 사용되는 로트와 비교해 보아야 한다. 로트의 일관성 평가를 위해 공식적인 임상시험이 항상 필요한 건 아닐 것이나, 일부 경우에는 생산 일관성을 뒷받침하는 근거를 제시하기 위해 임상 데이터가 필요할 수도 있다(예. 제품의 생산 일관성에 관해 특별한 우려가 있을 때). 여기서 염두에 둘 점은 생산 일관성의 증거를 제시하는데 사용하는 임상 데이터가 비임상 평가를 실시하는 동안 제조공정의 일관성을 입증할 필요성을 대체하지는 못한다는 점이다. 임상개발 프로그램 후기 단계에서는 각 면역원에 대한 여러 배치의 원액을 이용하여 제조한 여러 로트의 시판용 혼합백신을 사용해야 한다. 새로운 성분을 사용한 혼합백신은 기허가된 성분을 사용한 혼합백신 보다 더 많은 로트를 사용하여 시험하여야 한다.

임상개발 후기 단계에서 사용할 로트의 구성을 정할 때는 식약처의 자문을 받는 것이 좋다.

7.2.2 새로운 혼합백신에서 나타날 가능성이 있는 시나리오 개요

새로운 혼합백신은 많은 임상결과가 축적된 기허가 백신과 직접 비교해 보아야 한다. 후기 임상개발 단계에서 가장 적절한 시험 설계는 보통 표적 연령군을 대상으로 한 무작위 대조군 시험이다. 대조제품 선택은 식약처와 논의하여야 하며, 이때 시험군, 제안된 접종일정, 후보백신의 전체 항원 구성, 비교측정 백신에 대한 이전의 임상경험을 고려해야 한다. 일부 제품의 경우에는 모든 성분항원에 대한 적절한 임상평가에, 병용 투여된 비교측정 백신이 한 개 이상 필요할 수도 있다. 이 경우에는 이러한 기허가 백신을 동시투여(별개의 주입부위)에 권장하는지 여부, 혹은 투여 시 시차를 두어야 하는지 여부(다른 일수로)를 고려할 필요가 있다.

표1은 새로운 혼합백신 개발 시 가장 흔히 사용되는 임상평가 시나리오다. 새로운 혼합물은 새로운 항원의 추가, 동일 적응증에 대해 한 항원을 다른 항원으로 대체, 항원 제거, 제조나 조제에 유의한 변화 등 기존 혼합백신의 여러 변화유형에서 비롯될 수 있다. 게다가 새로운 제조업체는 기존에 이미 승인된 혼합물과 구성이 비슷한 백신의 생산을 시작하고 싶어 할 수도 있다. 여기서 특별히 다루지 않는 시나리오가 발생할 수 있음에도 불구하고, 이러한 새로운 상황에는 본 자료에 기술된 일반원칙이 적용될 수 있어야 한다. 각 시험에서 제조업체들은 비교측정 백신의 선택, 시험설계, 안전성과 면역원성 평가변수에 대한 근거를 제시해야 한다.

비교 임상시험은 안전성과 면역원성을 적절히 평가할 수 있도록 설계되어야 하며, 이상반응의 비율과 백신의 각 항원에 대한 면역반응과 관련해 적절한 평가변수를 사전에 명시해야 한다. 이런 평가변수 문제는 ‘7.3 면역원성’과 ‘7.4 안전성’에서 다룬다. 다음에 기술된 시험설계가 안전성과 면역원성 평가에 모두 적용됨에도 불구하고, 평가방식이 점점 복잡해지므로 표1에 면역반응평가에 대한 보다 세부적인 내용을 제시한다.

표 1. 새로운 혼합백신에서 나타날 가능성이 있는 시나리오 개요

카테고리	시나리오	사례	제안된 설계
항원 추가	2개 이상의 기허가 제품 혼합(예. AB+C→ABC)	기허가 IPV를 기허가 DTwP-HepB에 추가	ABC 면역반응을 별도로 투여한 기허가 백신 AB와 C에 대한 면역반응과 비교.
	기허가 제품(AB) 한 개와 새로운(미허가) 백신 항원 (C) 한 개를 혼합 (예. AB+C→ABC)	새로운 미허가 항원을 기허가 DTaP-HepB에 추가	ABC의 항원 A와 B에 대한 면역반응을 별도로 투여한 기허가 백신 AB에 대한 면역반응과 비교. 새로운 항원 C에 대한 반응은 C에 적절한 기준을 기반으로 함. C와 비교할만한 백신이 이미 허가가 났다면, C에 대한 반응을 기허가 제품과 비교해야 함. ^㉓
항원 교체	혼합물의 항원 한 개를 이미 허가된 항원으로 교체 (동일 백신성분에 대해) (예. ABC→ABC*)	기허가 DTwP의 wP성분을 기허가 aP성분으로 교체	ABC*의 A와 B 항원에 대한 면역반응을 A와 B가 함유된 별도 투여 기허가 백신에 대한 면역반응과 비교. 새로운 항원 C*에 대한 반응은 C*가 함유된 기허가 제품과의 비교를 기반으로 함.
	혼합물의 항원 한 개를 새로운 (미허가) 항원으로 교체(동일백신 성분에 대해) (예. ABC→ABC*)	기허가 DTaP의 aP 성분을 유전자 변경 aP 항원 (들)이 함유된 새로운 aP 성분으로 교체	ABC*의 A와 B 항원에 대한 면역반응을 별도로 투여한 기허가 백신 A나 ABC에 대한 면역반응과 비교. 새로운 항원 C*에 대한 반응은 C*에 적절한 기준을 기반으로 함. C*와 비교할만한 백신이 이미 허가가 났다면, C*에 대한 반응을 기허가 제품과 비교해야 함. ^㉔
제조 및 조제의 변화	한 개 이상의 백신 항원량의 증가나 감소 (예. ABC→AB _c)	디프테리아 독소이드 함량 감소	AB _c 에 대한 면역반응을 구성이 맞거나(가장 유사한) 기허가 제품에 대한 면역반응과 비교함. ^㉕
	면역증강제, 보존제, 기타 첨가제의 성질과/이나 함량 변화 ^㉖	새로운 면역증강제 도입 ^㉗	시험용 백신에 대한 면역반응을 승인된 공정으로 제조된 기허가 제품에 대한 면역반응과 비교.
	한 개 이상의 개별백신성분 생산에 유의한 변화 발생 (예. ABC→ABC*)	냉동건조된 Hib-결합성분의 사용을 100 % 액체 제제로 변경	시험용 백신에 대한 면역반응을 승인된 공정으로 제조된 기허가 제품에 대한 면역반응과 비교.
항원 제거	한 개 이상의 항원 제거 (예. ABC→AB)	DTwP-Hib-HepB에서 HepB 항원 제거	AB의 항원 A와 B에 대한 면역반응을 기허가 백신 ABC에 대한 면역반응과 비교.
새로운 제조업체	새로운 제조업체가 다른 기허가 제품과 유사한 혼합물 생산	DTwP-Hib-IPV 새로운 제조업체가 생산	ABC에 대한 면역반응을 유사한 구성의 기허가 제품 면역반응과 비교함. ^㉘

주 :

㉓ 표1에서는 제조업체가 다른 제조업체로부터 구입한 한 개 또는 그 이상의 성분을 이용하여 최종백신을 조제한 경우를 특별히 다루지 않는다. 하지만, 성분의 출처는 전반적인 임상평가의 설계에 영향을 주지 않을 것으로 보인다.

㉔ 대조 백신의 선택을 비롯해 제안된 설계 이외의 시험설계를 사용해도 된다. 단, 근거가 있어야 하며, 식약처의 승인이 필요하다.

㉕ 항원함량을 줄일 경우, 항원 감소로 인해 임상적으로 면역원성이 대폭 줄어들지 않도록 임상시험 설계를 해야 한다.

㉖ 면역증강제, 보존제, 기타 첨가제의 변경 이유를 제시한다. 특히, 면역증강제의 변경사항을 평가하는 임상시험에서는 안전성과 면역원성 매개변수를 추가로 고려해야 할 수도 있다.

㉗ 면역원성 평가의 한계로 인해, 새로운 혼합물의 성분 중 하나가 무세포 백일해 백신일 경우 적절한 대조제품을 선택하는 일이 특히 복잡하다. 추가 지침이 필요하다면 WHO의 ‘무세포 백일해 백신의 품질, 안전성, 유효성 권고사항 (*Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of acellular pertussis vaccines*)’을 참고한다.

7.2.3 일정과 투여군

대부분의 경우, 새로운 혼합백신은 유사 백신에 대해 이미 허가된 접종 일정에 따라 시험한다. 만일 프로그램상의 이유로 다른 일정이 필요하든지, 후보백신에 기허가 백신과는 상당히 다른 항원함량 및 면역증강제가 들어있을 경우 특정한 상황에서는 접종 일정에 대한 평가가 필요할 수 있다.

안전성과 면역원성은 해당 일정, 시험군, 항원구성, 병용투여된 백신의 성질에 따라 여러 백신에서 차이가 있는 것으로 보고되었다. 가능하다면, 혼합백신은 예정된 일정에 따라 표적군을 대상으로 평가해야 한다. 하지만, 현재 쓰이고 있는 모든 가능한 일정에 따라, 혹은 현실적으로 광범위한 지역에서 새로운 백신을 연구하는 것은 어렵다. 예를 들어, 특정 시험군 내에서 6주, 10주, 14주의 일정으로 백신접종을 받은 뒤 나타나는 면역반응 및 일부 이상반응 비율은 2개월, 4개월, 6개월 일정이나 3개월, 5개월, 12개월 일정으로 동일한 백신을 투여 받은 사람과는 차이가 있을 수 있다. 제조업체들은 제공된 임상데이터의 타당성을 입증해야 하며, 결과물의 외삽법 근거를 논의해야 한다. 다른 일정에 따라 백신을 사용할 예정이라면, WHO의 ‘백신 임상평가 가이드라인 : 규제기관 기대사항 (*Guidelines on clinical evaluation of*

vaccines : regulatory expectations)' 및 '백신의 임상평가 시 고려사항(2007)'에 의거하여 가장 제한적인 것으로 예상되는 일정을 사용하여 1차 평가를 진행해야 한다(즉, 최소면역반응이 예상되는 일정). 하지만 특정 이상반응은 연령에 따라 발생하기 때문에 백신과 관련된 국부 및 전신 반응원성은 특정 시험군 내에서 일정 따라 차이가 있을 지도 모르기 때문에 승인이 필요한 일정에 대해서는 여전히 안전성 데이터를 일부 수집할 필요가 있다. 모든 임상시험에서 시험군은 신중히 정해야 하며, 제조업체가 선정근거를 제시하고 승인을 받아야 한다.

7.2.4 병용투여 백신

위에 나온 유형의 비교연구에 등록된 백신은 특성에 따라 권장되는 다른 기허가 백신과도 함께 사용될 수 있으며, 백신을 병용투여하면 예기치 못한 상호작용이 발생할 수 있다. 이런 병용 투여되는 백신이 시험 및 대조 백신의 안전성과 면역원성에 영향을 줄 수 있고, 시험백신이 다른 백신에 영향을 미칠 수 있으므로, 제조업체들은 WHO 지침서에 나온 바와 같이 병용투여의 영향을 평가하는 연구를 실시해야 한다. 어떤 환경에서는 동일 질병에 대해 기허가 백신이 여러 개 있을 수 있으며, 이 백신들은 시험용 백신과 동일한 일정으로 투여된다. 병용 투여할 수 있는 특정유형의 기허가 백신이 하나 이상 있다면, 임상시험에서 사용되는 특정 백신(들)을 선택할 때 권장되는 접종일정과 병용투여 가능성을 고려해야 한다. 이때, 선택에 대한 근거가 있어야 하며, 이를 식약처와 함께 논의한다. 별도로 투여한 기허가 백신(들)에 비해 새로운 혼합백신과 병용 투여했을 때 한 가지나 그 이상의 항원에 대한 면역반응이 더 낮게 나온다면, 허가 시에 사례별로 가능한 임상결과를 고려해야 할 것이다. 병용투여 시에 유해사례 발현율이 증가한다면, 혼합백신이 아무리 편리하다 하더라도, 혼합백신 허가 및 사용에 대해 고려해보아야 한다.

7.2.5 특수한 환자를 대상으로 한 연구

개인이 특정질환(예. 조숙증, 면역결핍, 중증 폐질환, 점액점착증)에 의해 질병에 취약하거나, 특정백신에 대한 낮은 면역 반응과 관련이 있는 기저질환 및 조건이 있을 수 있다. 이처럼 위험성이 큰 시험군을 대상으로 특별히 새로운 혼합백신의 안전성과 면역원성을 평가하기 위해 임상시험을 실시해도 된다. 보통 허가 후에 특수한 환자를

대상으로 임상시험을 실시하고 있다.

7.3 면역반응 평가

7.3.1 면역원성 연구의 설계와 범위

면역원성 시험에서 고려해야 할 사항은 새로운 혼합백신의 성질에 좌우된다. 하지만, 주된 우려사항은 보통 항원 간의 면역학적 간섭 가능성과 관련이 있다. 이 가이드라인은 잠재적으로 면역원성 평가가 필요한 다수의 항원이 사용된 다양한 혼합백신을 대상으로 하였다. 아래에서는 분석법의 선정과 이러한 평가의 평가변수와 관련하여 지침을 제공한다. 하지만, 어떠한 질병은 그 특성에 따라, 어린이, 청소년, 성인에 대한 추가접종이 질병 관리의 중요한 부분을 차지한다. 일부 경우에는 기초접종용으로 개발된 백신이 추가접종으로도 사용되는 반면에, 다른 경우에는 추가접종용으로만 개발된 백신이 있다. 따라서 7.3에서는 추가접종 시 사용되는 백신에 대한 평가 정보를 포함하고 있다.

7.3.2 항체반응 평가 분석

기허가 디프테리아·파상풍(DT) 포함 혼합백신에 사용되는 여러 항원에 대해서는 WHO 지침서나 권고사항 및 ‘백신의 임상평가 시 고려사항(2007)’을 준수하여 작성되었으며, 이 자료들은 성분항원의 임상평가에 가장 적절한 분석법과 평가변수에 관한 지침을 제공한다. 하지만, 다수의 혼합백신에 사용되는 일부 개별항원에는 이러한 지침서가 없다. 참고용으로 표2에 항원의 목록, 흔히 사용하는 분석법, 제안된 평가변수가 나온다. 하지만 WHO 지침서가 있다면 이 지침서를 우선으로 참고하여야 한다.

일부 항원의 경우에는 기초접종 시험을 평가하는데 사용하는 평가변수가 추가접종 시험을 평가하는 할 때에 적절하지 않을 수 있다. 예를 들어, 상당한 비율의 시험군이 접종 전에 기본 방어항체가를 초과하는 항체 농도를 보이는 경우이다. 이 경우에는 항체농도가 유의하게 증가한 피험자 비율을 측정함으로써 예방접종 반응을 평가할 수 있다. 이러한 차이를 반영하기 위해 기초접종과 추가접종 시험에 제안되는 평가변수가

표2에 제시되어 있다.

면역반응은 검증되고 표준화된 분석법을 이용하여 혈청에 있는 각 성분항원에 대한 항체농도 측정을 기반으로 평가해야 한다. 국제 참조품이 있다면, 실험을 통한 혈청 데이터의 비교가능성과 수용성을 향상시키기 위해, 면역원성 결과를 혈청 1 mL당 IU로 표시해야 한다. 제조업체에 의해 선택된 면역반응 평가 분석법은 선택에 대한 과학적 근거를 제시해야 한다. 대부분의 백신은 적절한 유효성을 평가하는 것이 현실적으로 어렵다. 따라서 검증된 정량분석법을 선택하는 것이 중요하며, 적절한 실험을 수행하기 위한 실험실의 밸리데이션 역시 검증되어야 한다. 검증시험은 분석법이 임상시험에 적절하다는 것을 입증할 수 있도록 설계해야 하며, 이때 백신들을 서로 비교하는 방법을 고려해야 한다(예. 평가기준이 초기 이후 역가가 역치 이상인 비율측정, 혈청전환율, 항체의 기하평균농도). 검증 보고서에는 내부 참조품의 보정, 그리고 검체, 참조 표준품, 시약의 처리와 보관에 관한 세부적인 설명이 들어가야 한다. 분석법 검증 데이터는 검토 후 승인을 받아야 한다.

임상 프로그램을 개발할 때는 백신성분에 의해 유발된 항체의 기능적 활성(functional assay)을 측정하는 것이 중요하다. 백신항원의 경우에는 면역원성 평가를 위해 권장하는 방식이 기능적 분석법이다(표2). 다른 경우에는 비기능적 분석법(nonfunctional assay)이 1차 평가로 용인되어 왔다. 하지만 이 경우에는 가능하다면 기능적 분석법을 사용하여 비기능적 분석을 통해 면역반응을 의미 있게 평가할 수 있는지를 확인해야 한다. 여기서 염두에 둘 점은 일부 무세포 백일해 백신에 들어있는 일부 상용 항원에 대해서는 확인된 기능적 분석법이 아직 없다는 것이다.

세포 매개성 면역(CMI) 반응이 일부 감염에 대한 면역에서 하나의 역할을 수행할 수도 있다. 하지만, 접종 후 세포 매개성 면역(CMI) 반응을 평가하기 위해 면역분석법을 표준화하는 일은 힘든 일이라, 지금 현재 이러한 분석법은 허가를 뒷받침하는데 사용되지 않고 있다. 그럼에도 불구하고, 해당사항이 있다면 백신항원에 대한 면역반응의 모든 측면과 관련해 지식체계를 넓힐 수 있도록 세포 매개성 면역(CMI)에 대한 탐색적 평가를 권장해야 한다.

디프테리아 백신에 대한 항체반응을 측정하기 위한 분석법은 기능적 시험법(functional assay; 혈청 검체에서 디프테리아 독소의 독소 영향을 막는

디프테리아 항체의 능력을 입증하는 시험)과 비기능적 시험법(nonfunctional binding assay; 혈청 검체에서 디프테리아 독소나 독소이드에 결합하는 디프테리아 항체의 능력을 입증하는 시험)으로 구분된다.

Vero 세포 분석은 체외 독소중화(미세중화)검사로, 혈청에서 중화항체를 측정하는데 사용될 수 있으며, 디프테리아 백신에 대한 반응을 측정하는 표준정량법(gold standard method)으로 간주된다. 이 방법은 밸리데이션 시험의 일환으로 다른 체외 혈청 시험법의 타당성과 성능을 확인하는데 사용될 수 있다. 하지만 Vero 세포 분석은 세포배양설비와 다른 체외 혈청학적 시험법에 비해 상대적으로 많은 양의 혈청을 필요로 하므로 일반적으로 이용되지 않는다.

따라서 소량의 검체를 사용하는 체외 혈청시험법(*in vitro* serological assay)이 선호될 수 있으며, 자동화로 보다 신속하게 처리할 수 있어서 다량의 검체를 확인하는데 적합하다. 이러한 비기능적 시험법에는 ELISA, 이중항원 ELISA(DAE), 이중 이중항원 시간차 형광 면역 분석법(dDA-DELFI), 수동 적혈구 응집시험(PHA)와 독소 결합 억제시험(ToBI)을 포함한다. 비기능적 체외 혈청시험법은 Vero 세포 분석과 다양한 상관관계를 보여주므로 특히 기능적 항체 수준이 낮을 때 Vero세포 독소 중화 시험을 기준으로 적절히 검증되어야 한다. 선택된 방법은 승인이 있어야 하며, 가능하면, 백신의 임상평가 중 일부 단계에서 기능적 항체 반응을 측정하는 분석(예. 임상시험 검체의 일부를 분석)을 실시해야 한다.

디프테리아 항독소의 IU로 측정된 디프테리아 항독소(Diphtheria Antitoxin Human) 국제표준품은 독소중화검사 및 체외 면역분석법에 사용될 수 있다. ELISA와 다른 체외 혈청분석에 사용될 예정인 2차 참조물질은 모든 분석 결과를 ml 당 IU로 표시하는 독소중화검사를 사용하여 국제표준품과 비교하여 보정되어야 한다.

파상풍 백신에 대한 항체반응측정 분석법은 기능적 시험과 비기능적 시험법(혈청 검체에서 파상풍 항체가 파상풍 독소나 독소이드와 직접 경쟁하거나, 직접 결합하는 능력을 입증하는 시험)으로 구분된다. 기능적인 시험에는 기니피그나 쥐를 대상으로 한 체내 독성중화시험(*in vivo* TNT)이 있다. 이 체내 분석법은 독소/항독소 혼합물을 피하주사로 동물에게 주입하는 다소 까다로운 절차이다. 이 절차에는 전문시설이 필요하며, 비용이 많이 들고, 비교적 대량의 혈청을 요한다. 결과적으로 이 방법은 백신 임상시험에서 흔히 쓰이지 않는다.

그래서 검증된 체외 혈청시험을 선호하며, 이 방법은 속도, 적은 검체량, 손쉬운 사용법, 자동화 적응성으로 인해 대량의 혈청검체 시험에 더 적합하다. 현재 기능적인 파상풍 항체를 검출할 수 있는 적절히 검증된 체외분석법이 없으므로 상기 방법을 독소중화시험으로 사용하면 된다. 하지만 여러 체외혈청시험이 개발되어 검증되었으며 이 분석은 체내 독소중화시험(*in vivo* TNT)과 특히 항체수준이 높을 때 깊은 상관관계를 보인다. 이러한 분석법으로는 ELISA, ToBI 시험, KPA가 있다. 이중항원 ELISAs(DAE) 시험이나, 이중 이중항원 시간차 형광 면역 분석법(sDA-DELFI) 같은 방법들도 있으며, 이 방법들은 파상풍과 또 다른 하나 이상의 항원에 대한 항체반응을 동시에 평가하는 데에도 사용된다. 일부 실험실에서는 수동 적혈구 응집시험(PHA)를 이용하기도 하나, 이 방식은 더 가변적이라 체내 독소중화시험(*in vivo* TNT)과의 상관관계가 적은 것으로 나타난다.

항체 평가를 위해 선택된 방법은 계획한 목적에 따라 관련 검체를 이용하여 검증해야 하며, 승인이 있어야 한다. 가능하다면, 백신의 임상평가 중 일부 단계에서 기능적 항체 반응을 측정하는 분석(예. 임상시험 검체의 일부를 분석)을 실시해야 한다.

7.3.3 접종시험에 대한 면역원성 평가변수

기허가 디프테리아·파상풍(DT) 포함 혼합백신에 함유된 항원과 관련하여 표2를 보면 권장 분석법의 요약내용이 나오며, 기초접종 및 추가접종용 백신의 임상평가 1차 평가변수가 제시되어 있다. 이와 관련해서는 WHO 자료, 국가나 지역 지침서, 또는 참고문헌이 있으며, 보다 세부적인 정보를 원하면 이 자료들을 참고하면 된다.

표 2. 기초접종 및 추가접종 시험을 위한 면역원성 분석과 평가변수[®]

항원	분석법	참고 자료	제안하는 1차 평가변수		설명
			기초접종	추가접종	
디프테리아 독소이드	미세중화 분석법 (베로세포)	(2 , 3 1 , 38-41)	비율 ≥ 0.01 IU/ml 또는 ≥ 0.1 IU/ml (설명 참고)	유의성 있게 증가하는 피험 자의 비율 [®]	보통 독소중화분석법을 선호한다. 중화분석법과 상관관계가 있는 것으로 나타난 항원결합분석법도 허용된다. 기초접종에서는 독소중화분석을 사용하고, 2차 년도에 추가용량을 투여하는 경우 ml당 0.01IU의 역치를 허용할 수 있다. 그렇지 않으면 ml당 0.1IU의 역치를 사용해야 한다. 추

					가접종의 경우, 역치수준이나 대폭 증가한 비율을 이용하려고 하면, 접종 전에 역치를 초과할 것으로 예상되는 비율을 고려해야 한다.
파상풍 특소이드	ELISA	(3, 30)	비율 \geq ml당 0.1IU	유의성 있게 증가하는 피험자의 비율 ^㉒	마우스 중화분석법과 상관관계가 있는 것으로 나타난 항원결합분석법을 가장 흔히 사용한다.
전세포 백일해 ^㉑	1)응집분석법 2) P T 용 ELISA 3)다른 항원용 ELISA	(4, 42-45)	a)GMT/GMC b)4배 증가 비율	a)GMT/GMC b)4배 증가 비율 ^㉒	방어와 상관관계가 있는 값은 규정되어 있지 않다. 목표는 시험의 반응들과 각 분석법의 대조군들을 비교하는 것이다. a)와 b) 모두 공동 1차 평가변수로 권장한다.
무세포 백일해	백신에 든 모든 백일해 항원에 대한 ELISA ^㉑	(5, 42-45)	a)GMT/GMC b)4배 증가 비율	a)GMT/GMC b)4배 증가 비율 ^㉒	방어와 상관관계가 있는 값은 규정되어 있지 않다. 목표는 시험의 반응들과 각 분석법의 대조군들을 비교하는 것이다. a)와 b) 모두 공동 1차 평가변수로 권장한다.
비활성형 소아마비 백신	3개의 혈청형 각각에 대한 바이러스 중화 분석법	(46)	중화 역가가 1:8 이상인 비율	a)GMT/GMC b)중화 역가가 1:8 이상인 비율	중화항체가 있으면(역가 \geq 1:8) 소아마비 타입 1, 2, 3에 대해 방어적인 것으로 간주한다.
b형 헤모필루스 인플루엔자 접합백신	ELISA (b형 헤모필루스 헵막 다당류 ; PRP)	(8, 47-49)	a)ml당 0.15 μ g 이상 비율 b)ml당 1.0 μ g 이상 비율	ml당 1.0 μ g 이상 비율	접종 후 anti-PRT 수치가 ml당 0.15 μ g이면 이를 최소방어수치로 간주한다. ml당 1.0 μ g의 접종 후 수치는 이후 1년간의 방어상태를 가리킨다. 기초접종의 경우, a)와 b) 모두 공동 1차 평가변수로 권장한다.
B형 간염 백신	B형 간염 표면항원 항체용 ELISA	(6)	ml당 10mIU 이상 비율	ml당 10mIU 이상 비율	

주 :

㉑ 표에 기술된 약어 - ELISA : 효소결합면역분석법, GMT : 기하평균역가, GMC : 기하평균농도, PT : 백일해 독소, PRP : b형 헤모필루스 인플루엔자 헵막 다당류인 polyribosyl-ribitol-phosphate, IU : 국제단위

㉒ 고도로 효과적인 전세포 백일해 백신에 대한 항체반응에는 본질적인 이질성이 있다. 하지만, 목록에 나온 분석법은 비교 면역원성 실험을 평가할 때 사용해도 된다.

㉓ 백일해 독소중화 분석법과 전세포 응집 분석법을 이용한 추가 근거 데이터를 권장한다.

㉔ 접종 전에서 접종 후에 이르는 항체농도의 증가 규모(예. 4배)는 사전에 규정하여 입증해야 한다. 접종 전 항체농도가 특히 높은 사람에 대해서는 증가규모가 적을 수도 있다.

7.3.4 1차 분석

1차 분석은 규정된 접종 이후의 항체반응을 기반으로 해야 한다. 추가 접종용으로 사용되는 백신의 경우, 이것은 보통 단일접종으로 이루어진다. 새로운 백신과 기허가 대조백신 간에 공통된 항원과 새로운 백신에만 있는 항원에 대한 면역반응은 공동 1차 평가변수로 설정해야 한다.

면역반응 평가의 적절한 시간간격을 정의하려면 시험목적에 고려해야 한다. 대부분의 경우, 새로운 백신의 임상시험은 최종투여 후 약 4주에 백신성분에 대한 항체 반응을 결정하기 위한 것이다. 하지만 혈청검체의 채취 시기는 근거를 제시한 후에 승인을 받아야 한다. 추가접종을 평가하는 시험에서 혈액검체는 대개 추가투여 후 4주에 채취하나, 경우에 따라서는 추가투여 2주 이내처럼 더 짧은 기간 안에 면역반응이 정점에 이를 수 있다. 따라서 무작위 소규모 인원을 대상으로 추가접종을 투여한 후에 4주 미만의 시점에서 면역반응을 탐색해야 유용한 정보를 얻을 수 있으며, 항원유발 반응 속도에 대해서도 이해할 수 있다.

비열등성 평가의 1차 변수, 미리 정해진 비열등성 한계, 비교시험의 전체 피험자 수 선택의 타당한 이유를 신중히 밝혀야 한다. 비열등성 기준의 엄격성과 관련해 고려해야 할 요소는 평가변수의 임상적 적절성, 예방되고 있는 질병의 중증도, 표적군의 취약성이다. 특히 취약한 시험군을 대상으로 하거나, 혈청학적 평가변수가 질병 방어와 상관관계가 많은 것으로 알려져 있다면, 중증질환이나 쇠약성 질환에 대해 더 엄격한 한계(limit)를 입증할 수 있다. 새로운 백신이 안전성이나 접종률 개선 면에서 상당한 편익을 주는 것으로 알려져 있다면, 덜 보수적인 한계를 고려할 수 있다. 비열등성 기준은 시험의 검체크기에 영향을 줄 것이므로, 타당성을 고려해야 할 수도 있다. 그러므로 다른 환경에서는 동일항원에 대해 다른 기준을 두는 게 적절할 수도 있다. 비열등성 한계를 설정할 때에는 순차적인 비교시험과 함께 시간이 흐르면서 면역원성이 감소되는 가능성도 고려해야 한다. 이러한 경우, 그 결과는 새로운 백신이 원래 허가된 백신에 비해 면역원성이 상당히 떨어질 수 있다는 것이다. 하지만 공동체 내에서 병원체 순환이 줄어든 뒤 자연적인 면역력의 상승이 없듯이, 백신의 면역성이 실제보다 낮게 평가될 수 있음을 염두에 두어야 한다.

일반적으로는 후보백신과 기허가 백신 간의 면역반응을 비교하는 시험이 필요한데, 일부 경우에는 동일한 분석법을 이용하여 이전의 방어 유효성 시험 중에 생성된

과거의 데이터와 비교함으로써 근거를 제공할 수도 있다.

기허가된 디프테리아·파상풍(DT) 포함 혼합백신에 함유된 대부분의 항원의 경우, 1차 평가는 백신에 반응하는 피험자의 비율이 될 것이다(표2에 규정된 대로). 보통, 이것은 사전에 지정된 역치에 이르는 피험자의 비율이다. 하지만 일부 백신의 경우 반응이란 면역반응이 접종 전 수준 이상으로 유의성 있게 증가하는(예. 4배 이상) 접종자의 비율로 설정할 수 있다. 반응자에 대한 대체정의를 제대로 입증할 수 있다면, 이러한 정의를 고려해도 된다. 시험군들은 사전에 규정된 적절한 비열등성 기준을 사용하여 비교해보아야 한다. 대개, 관찰된 차이(대조제품 - 새로운 혼합백신)의 95% 양측 신뢰구간 상한치는 대부분은 0.05나 0.10 미만이어야 한다.

일부 항원과 적응증의 경우, 공동 1차 분석(co-primary analyses)에서는 새로운 백신과 기허가 대조 백신의 면역 반응의 크기를 비교해 보아야 한다. 전세포와 무세포 백일해 백신을 평가할 때와 같은 국제적으로 용인되는 방어항체가 없는 경우 혹은 시험군의 다수의 피험자가 접종 전에 방어항체를 초과하는 경우 추가접종에 대한 면역 반응을 평가할 때 1차 평가변수를 두 가지 이상 설정하는 것을 권장된다. 각 백신에 대한 면역반응의 크기는 사전에 명시된 비열등성 한계를 설정하고 기하평균농도(GMC)나 기하평균역가(GMT)를 비교한다. 특히, 새로운 백신 대비, 대조 백신의 기하평균농도(GMC)나 기하평균역가(GMT) 비율의 95% 양측 신뢰구간 상한치는 대부분은 1.5나 2.0 미만이어야 한다.

평가변수를 접종 전후의 항체가 증가한 피험자수의 비율을 기반으로 할 경우에는 접종 전후의 혈액 샘플이 필요하나, 평가변수가 특정 역치에 이르는 피험자 비율을 기반으로 한다면 모든 피험자의 접종 전 혈액샘플이 필요하지는 않다. 하지만 임상시험의 평가변수를 평가하는데 접종 전후의 항체가 필요하지 않더라도 접종후의 항체가 증가를 설명하는데 도움이 되므로 접종 전 항체에 대한 정보를 수집하는 것이 좋다.

항체 측정시험 중 우선순위를 정해서 여러 시험을 할 때나 추가적인 항체 측정시험을 할 때, 혈청의 양에 한계가 있어 일부 혈청을 선택하여 할 때는 샘플을 무작위로 배정하여 선택해야 한다.

혼합백신의 경우에는 면역원성 평가 시 많은 공동 1차 평가변수를 설정할 수 있다. 혼합된 항원에 대해 면역 간섭을 보일시 임상개발을 진행하거나 제품의 허가를

진행하기 전에 면역간섭에 의한 임상적 영향과 사전에 설정한 비열등성 기준을 충족하지 못하는 원인에 대하여 충분히 고려해 보아야한다.

7.3.5 2차 분석

대부분의 연구에서는 한 개 혹은 그 이상의 평가변수를 설정하여 보다 정확하게 면역반응에 대해 평가할 수 있어야한다. 새로운 백신과 기허가된 대조백신의 항체가의 크기가 1차 평가변수에 포함되지 않았다면, 2차 평가변수에서 고려해야한다. 면역반응 정도에 대한 측정은 미리 정해놓은 비열등성 한계를 이용하여 기하평균농도(GMC)나 기하평균역가(GMT)를 비교한다. 이때 비열등성 한계를 설정할 때는 근거가 있어야 한다.

7.3.6 기능적 항체반응의 평가

항원결합분석법(antigen-binding assay)을 이용하여 1차 평가변수를 설정하였어도 항체의 기능적 활성(functional activity)을 측정할 수 있다면 혼합백신을 평가하는데 중요한 역할을 할 것이다. 항원 또는 새로운 백신에 대한 사용 경험이 적을 경우에는 일부 시험군과 대조군을 대상으로 기능적 항체를 측정해도 좋을 것이다. 7.3.2에서 다룬바와 같이, 기능적 분석법은 밸리데이션 연구에서 중요한 역할을 하며, 그 덕분에 비기능적 분석법을 통해 의미 있는 면역반응 평가를 할 수 있음을 확인할 수 있다.

7.3.7 역 누적분포 곡선에서 나온 추가 정보

역 누적분포(RCD: reverse cumulative distribution curve) 곡선의 사용은 특정수치 이상의 항체농도를 가진 개개인의 누적비율을 보여주는 것이며, 시험백신과 기허가 대조 백신을 비교했을 때, 그리고 시간에 따른 항체량의 변화를 모니터할 때 특히 유용한 것으로 나타났다. 예를 들어, 역 누적분포는 방어임계값 미만의 시험군 비율을 보여주며, 추가접종 시기를 결정할 때 영향을 주는 데이터를 제공해준다. 역 누적분포를 사용할 때 각 시험군과 비교하는 것은 대개 정량적이며, 사실상 탐색적인 일이다. 이는 역 누적분포 곡선은 비교통계분석에 비교적 적합하지 않기 때문이다.

7.3.8 운반체 단백질에 대한 면역반응

현재까지, 기허가 다당류 접합백신에 사용되는 운반체 단백질에는 비독성 유전자변형 디프테리아 독소 분자(CRM197), 디프테리아 독소이드, 파상풍 독소이드, 헤모필루스 인플루엔자의 단백질 D, *Neisseria meningitidis* 혈청군 B의 외막단백 복합체(OMPC)가 포함되었다. 경우에 따라 이러한 운반체 단백질에 대한 면역반응을 모니터링하는 게 적절할 수도 있다. 운반체로서 디프테리아 독소이드, 파상풍 독소이드나 CRM197을 사용하는 접합백신을 투여하면 관련 항독소 항체량이 높아지는 것으로 나타났기 때문이다. 하지만, 이것은 지금까지 디프테리아 독소이드 및 파상풍 독소이드가 들어있는 백신을 사용하는 것이 일반접종을 대체하는 것으로 용인되지 않았다. 일반적인 영유아 백신(즉, 디프테리아 독소이드 및 파상풍 독소이드가 함유된 백신)과 함께 새로운 접합백신을 동시투여하면 항독소량이 많아질 수 있다. 일부 반응율의 증가는 높은 항독소량과 관련될 수 있으므로, 이러한 사용 환경에서 관찰되는 반응원성에는 세심한 주의를 기울여야 한다. 운반체 단백질에 결합된 혼합백신 항원의 반응은 동일한 운반체 단백질을 사용하는 다른 접합백신과 함께 투여했을 때 줄어든 수도 있다.

7.3.9 면역기억

혼합백신에 들어있는 일부 항원의 경우에는(예. 다당류 복합백신) 임상시험을 통해 영아 예방접종이 면역기억 반응을 보인다는 자료를 만들 필요가 있다. 이러한 자료는 새로운 백신의 추가접종에 대한 근거를 마련할 수 있다.

7.3.10 항체지속과 추가접종 시기

시간이 지남에 따른 항체농도의 감소는 불가피하므로, 기초접종 이후 다양한 시점에서 장기적인 면역지속력을 평가해야 한다. 일부 경우 임상 초기 단계에서 장기면역 지속력에 대한 자료를 제공할 수 있다. 시간이 경과함에 따른 항체가 감소를 그 자체의 면역손실이나 추가접종의 조짐으로 여겨서는 안 된다. 질병에 대한 방어 상태를 유지하기 위해 나중에 추가용량의 필요성을 평가하려면 유효성 평가와 함께 장기적으로 항체가를 고려해야한다. 추가용량의 필요성과 시기를 정할 때는 역학조사

및 장기 모니터링을 토대로 한다(7.5).

7.4 안전성 평가

백신 안전성의 허가 전 평가는 임상 프로그램에서 상당히 중요한 부분이며, WHO의 ‘백신의 임상평가 지침서: 규제기관 (*Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectation*)’의 일반원칙 및 ‘백신의 임상평가 시 고려사항 (2007)’에 부합하도록 개발되어야 한다. 앞에서 언급한 바와 같이 안전성 평가도 설정된 목표에 맞게 비교연구로 진행되어야 한다(7.2). 또한 흔히 발생하는 이상반응과 발생률이 낮은 이상반응에 대해서도 적극적으로 모니터하도록 설계해야 하며, 중증 이상반응과 성분이 유사한 백신과 관련된 특정이상반응(예. 과도한 사지 부종, 저긴장-저반응 에피소드(hypotonic-hyporesponsive episode), 열성발작)도 적극적으로 모니터링 해야 한다.

허가 시 안전성 데이터베이스의 최소허용크기를 정할 때는 백신의 구성(모든 항원과 면역증강제 포함), 새로운 항원의 존재, 동일하거나 유사한 구성의 백신에 대한 과거 경험, 예방 중인 질병의 중증도, 백신 접종대상군의 규모를 고려해야 한다. 새로운 백신의 안전성 데이터를 만들 경우 피험자는 약 3,000 ~ 5,000명 정도로 정하는 것이 정하는 것이 좋으며 이는 약 1:1,000의 비율로 발생하는 이상반응을 발견할 수 있기 때문이다.

임상시험 시 대규모의 유효성 평가 대신 소규모의 면역원성 평가만 이루어질 경우 안전성 평가를 해야 하는 피험자가 면역원성 평가 피험자 수보다 많게 설정해도 된다. 허가 전 안전성 데이터의 규모는 제조업체가 적합한 근거를 바탕으로 승인을 받아야 한다.

디프테리아 백신을 투여 받은 뒤에 나타나는 이상약물반응의 빈도는 백신의 제형(예. 디프테리아 항원용량) 및 피험자 특성(예. 접종 전 이력, 이전의 백신 투여 후 경과시간, 연령, 접종 전 디프테리아 항체 수준)에 따라 다를 수 있다. 기초접종과 비교하여 디프테리아 독소이드를 이용한 추가접종 후에 국소적인 이상반응이 관찰되는 비율이 높기 때문에 추가접종과 관련된 안전성 평가에 각별한 주의를 기울여야 한다. 운반체 단백질로서 CRM197이나 디프테리아 독소이드를 함유된 다당류 접합백신과 동시에(또는 직후에) 디프테리아 백신을 투여하면 반응원성이 증가할 가능성이

있으므로 그에 대해서도 고려해야 한다.

디프테리아 접종 후 흔히 발생할 것으로 예상되는 이상약물반응으로는 접종부위의 통증, 홍조, 부종과 같은 국소이상반응 및 접종 후 발열반응과 같은 전신반응이 일어날 수도 있다. 허가 전 임상시험에서 중증 이상반응을 모니터해야 하지만, 중증 이상반응을 모니터하기 위해 시판 후 감시를 실시해야 한다.

파상풍 백신을 투여 받은 뒤에 나타나는 이상약물반응의 빈도와 중증도는 백신의 제형(예. 파상풍 독소이드의 양), 피험자 특성(예. 접종 전 이력, 이전의 백신투여 후 경과시간, 연령, 접종 전 파상풍 항체수준), 부수적인 백신과의 동반 사용에 따라 다를 수 있다. 이론적으로는 운반체 단백질로서 파상풍 독소이드가 함유된 다당류 접합백신과 동시에(또는 직후에) 파상풍 독소이드 백신을 투여하면 반응원성이 증가할 가능성이 있다. 기초접종 대비 파상풍 백신을 추가 접종한 이후 국부적으로 일부 이상약물반응이 대거 관찰된 적이 있다. 따라서 파상풍 추가접종 연구를 설계할 때는 안전성 결과에 영향을 미칠 수 있는 요인(예. 이전 용량 이후 경과시간)과 관련해 적절한 등록기준을 마련해야 한다. 등록절차는 백신의 접종 연령대를 두루 적절히 대표할 수 있도록 설계해야 한다. 안전성 데이터는 임상개발 기간 동안에 수집한다. 허가 전 임상 안전성 평가에는 대개 비교 안전성 데이터가 포함되며, 여기서 시험용 백신과 기허가 대조 백신을 비교한다. 빈번하게 발생하는 이상반응과 발생빈도가 낮은 중증 이상반응이 있는지 피험자를 세심히 모니터한다. 파상풍 접종 후 흔히 발생할 것으로 예상되는 이상약물반응으로는 접종부위의 통증, 홍조, 부종과 같은 국소이상반응과 접종 후 발열반응과 같은 전신반응이 일어날 수도 있다. 허가 전 임상시험에서 중증 이상반응을 모니터해야 함에도 불구하고, 파상풍 독소이드와 연관된 중증 이상반응(예. 아더스 반응, Guillain-Barré syndrome)은 상당히 드물게 나타나므로 대부분의 임상시험에서 확실히 평가하기가 힘들다. 따라서 중증 이상반응을 모니터링하려면 시판 후 감시도 실시해야 한다.

이 외에도, 안전성 평가에는 예방접종을 통해 이득을 얻을 수 있는 고위험 피험자(예. 조산아, 만성질환자나 면역력이 약화된 피험자)가 포함되어야 한다. 이러한 시험군의 안전성은 대개 시판 후 연구를 통해 평가한다(7.5),

7.5 시판 후 연구 및 감시

기허가 백신의 유효성, 안전성, 품질 모니터링은 시판 후 감시와 시판 후 연구를 통해서도 이루어진다. 허가 후 모니터링의 목적은 일상적인 사용 조건 하에서 표적 집단을 대상으로 백신의 성능을 평가하고, 드물게 발생하는 이상반응을 모니터링하는 것이다. 항체 지속성 및 추가접종 용량의 필요성을 평가하는 데는 시판 후 연구도 유용하게 쓰일 수 있다. 시판허가권자는 허가 시에 시판 후 감시 프로그램을 제시해야 한다. 이 프로그램은 시판승인용 특정 백신에 관한 품질, 안전성, 유효성 기준을 토대로 해야 한다.

많은 경우에, 포괄적인 시판 후 안전성 및 유효성 데이터는 제조업체만 수집할 수 있는 게 아니므로 제조업체와 보건기관 간의 긴밀한 협력이 필요하다. 수집된 모든 데이터는 정기적으로 식약처에 제출하며, 시판허가에 영향이 있다면 적절한 조치를 취해야 한다.

시판 후 감시는 상당히 드물게 발생하여 임상시험 동안 검출하기에 다소 무리가 있는 희귀한 부작용을 파악해낼 수 있는 유일한 방법일 수 있다. 안전성 데이터를 수집하려면 능동적이거나 수동적인 과정을 통해 감시를 실시할 수 있다. 중증이상반응에 대한 자발적인 보고(수동적인 감시)가 가장 많이 사용된다. 적극적인 시판 후 조사를 할 경우 백신의 효과에 대한 과학적 근거를 마련할 수 있다. 그러나 신뢰할 수 있는 데이터를 만들기 위해서는 질병의 발생 등을 추적할 수 있는 보건시설이 있는 지역이 좋다.

8. 참고문헌

1. Requirements for diphtheria, tetanus, pertussis, and combined vaccines (revised 1989). Annex 2 in: *WHO Expert Committee on Biological Standardization. Fortieth report.* Geneva, World Health Organization, 1990 (WHO Technical Report Series, No.800).
2. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of diphtheria vaccines. In: WHO Expert committee on Biological Standardization. Sixty-third report. Geneva, World Health Organization (WHO Technical Report Series, in press).
3. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of tetanus vaccines. In: WHO Expert committee on Biological Standardization. Sixty-third report. Geneva, World Health Organization (WHO Technical Report Series, in press).
4. Recommendations for whole-cell pertussis vaccine. Annex 6 in: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Fifty-sixth report. Geneva, World Health Organization, 2007 (WHO Technical Report Series, No.941).
5. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of acellular pertussis vaccines. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Sixty-second report. Geneva, World Health Organization (WHO Technical Report Series, in press).
6. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of recombinant hepatitis B vaccines. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Sixty-second report. Geneva, World Health Organization (WHO Technical Report Series, in press).
7. Recommendations for the production and control of poliomyelitis vaccine (inactivated). Annex 2 in: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Fifty-first report. Geneva, World Health Organization, 2002 (WHO Technical Report Series, No.910).

8. Recommendations for the production and control of Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines, Annex 1 in: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-ninth report. Geneva, World Health Organization, 2000 (WHO Technical Report Series, No.897).
9. Recommendations for diphtheria, tetanus, pertussis and combined vaccines (Amendments 2003). Annex 5 in: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Fifty-fourth report. Geneva, World Health Organization, 2005 (WHO Technical Report Series, No.927).
10. WHO manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines (document WHO/IVB/11.11). Geneva, World Health Organization (in press).
11. WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines. Annex 1 in: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Fifty-fourth report. Geneva, World Health Organization, 2005 (WHO Technical Report Series, No.927).
12. Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations. Annex 1 in: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Fifty-second report. Geneva, World Health Organization, 2004 (WHO Technical Report Series, No.924).
13. Procedure for assessing the acceptability, in principle, of vaccines for purchase by United Nations agencies. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Sixty-first report. Geneva, World Health Organization (WHO Technical Report Series, in press). (http://www.who.int/immunization/sage/1_WHO_ECBS_22Oct_after_endorsement.pdf).
14. Immunization Practices Advisory Committee web site (http://www.who.int/immunization_delivery/systems_policy/ipac/en/, accessed 31 January 2013).
15. Dagan R et al. Reduced response to multiple vaccines sharing common protein epitopes that are administered simultaneously to infants. *Infection and Immunity*, 1998, 66(5):2093–2098.

16. FDA. Center for Biologics Evaluation and Research Clinical Review of Menactra([http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/Approved Products/UCM218550.pdf](http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/Approved%20Products/UCM218550.pdf)). 2005:page 27.
17. Stickings P et al. Collaborative study for the calibration of a replacement international standard for diphtheria toxoid adsorbed. *Biologicals*, 2010,38(5):529–538.
18. Stickings P et al. Animal refinement and reduction: alternative approaches for potency testing of diphtheria and tetanus vaccines. *Procedia in Vaccinology*, 2011,5:200–212.
19. Winsnes R, Hendricksen C. Collaborative study for the validation of serological methods for potency testing of tetanus toxoid vaccines for human use (Part 1). *Pharmeuropa Special Issue Biol*, 2000,1:82–124.
20. Winsnes R et al. Collaborative study for the validation of serological methods for potency testing of diphtheria toxoid vaccine (Part 2). *Pharmeuropa Bio*, 2006,1:73–88.
21. Winsnes R et al. Collaborative study on a guinea pig serological method for the assay of acellular pertussis vaccines. *Pharmeuropa Bio and Scientific Notes*, 2009,1:27–40.
22. WHO manual for the establishment of national and other secondary standards for vaccines (document WHO/IVB/11.03). Geneva, World Health Organization, 2011 (http://whqlibdoc.who.int/hq/2011/WHO_IVB_11.03_eng.pdf, accessed 31 January 2011).
23. WHO good manufacturing practices: main principles for pharmaceutical products. Annex 3 in: WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Products. Forty–fifth report. Geneva, World Health Organization 2011(WHO Technical Report Series, No.961).
24. Good manufacturing practices for biological products. Annex 1 in: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty–second report. Geneva, World Health Organization, 1992(WHO Technical Report Series, No.822).

25. Guidelines on stability evaluation of vaccines. Annex 3 in: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Fifty-seventh report. Geneva, World Health Organization, 2007(WHO Technical Report Series, No.962).
26. Sawyer LA et al. Deleterious effect of thimerosal on the potency of inactivated poliovirus vaccine. *Vaccine*, 1994,12(9):851-856.
27. WHO policy statement. The use of opened multi-dose vials of vaccine in subsequent immunization sessions (document WHO/V&B/00.09). Geneva, World Health Organization, 2000 (<http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF99/www9924.pdf>, accessed 31 January 2013).
28. Aluminum hydroxide, adsorbed. Monograph 01/2008;1664. European Pharmacopeia. Strasbourg, Council of Europe, 2008.
29. Note for guidance on pharmaceutical and biological aspects of combined vaccines (document CHMP/BWP/477/97). London, European Medicines Agency, 1998.
30. Borrow R, Balmer P, Roper MH. The immunological basis for immunization series. Module 3:Tetanus update 2006. Geneva, World Health Organization, 2007.
31. Scheifele DW, Ochnio JJ. The immunological basis for immunization series. Module 2 : Diphtheria update 2009. Geneva, World Health Organization, 2009.
32. Assay of tetanus vaccine (adsorbed). Monograph 2.7.8. European Pharmacopeia. Strasbourg, Council of Europe.
33. Assay of pertussis vaccine. Monograph 2.7.7. European Pharmacopeia. Strasbourg, Council of Europe.
34. Assay of diphtheria vaccine (adsorbed). Monograph 2.7.6. European Pharmacopeia. Strasbourg, Council of Europe.
35. Guidelines for independent lot release of vaccines by regulatory authorities. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Sixty-first report. Geneva, World Health Organization (WHO Technical Report Series, in press).

36. Guideline for good clinical practice. E6(R1). ICH Harmonized Tripartite Guideline 1996. Geneva, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1996.
37. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of pneumococcal conjugate vaccines. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Sixtieth report. Geneva, World Health Organization (WHO Technical Report Series, in press).
38. Di Giovine P et al. External quality assessment for the determination of diphtheria antitoxin in human serum. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2010,17(8):1282–1290.
39. Efstratiou A, Maple PAC. Diphtheria : manual for the laboratory diagnosis of diphtheria. Copenhagen, World Health Organization Regional Office for Europe, 1994. http://whqlibdoc.who.int/euro/1994-97/ICP_EPI_038_%28C%29.pdf, accessed 31 January 2013).
40. Miyamura K et al. Micro cell culture method for determination of diphtheria toxin and antitoxin titres using VERO cells. I. Studies on factors affecting the toxin and antitoxin titration. *Journal of Biological Standardization*, 1974,2(3):189–201.
41. Walory J, Grzesiowski P, Hryniewicz W. Comparison of four serological methods for the detection of diphtheria anti-toxin antibody. *Journal of Immunological Methods*, 2000,245(12):55–65.
42. Meade BD et al. Description and evaluation of serologic assays used in a multicenter trial of acellular pertussis vaccines. *Pediatrics*, 1995, 96(3):570–575.
43. Meade BD et al. Relationships between functional assays and enzyme immunoassays as measurements of responses to acellular and whole-cell pertussis vaccines. *Pediatrics*, 1995,96(3):595–600.
44. Tondella ML et al. International Bordetella pertussis assay standard-ization and harmonization meeting report. Centers for Disease Control

- and Prevention, Atlanta, Georgia, United States, 1920 July 2007. *Vaccine*, 2009,27(6):803–814.
45. Xing D et al. Characterization of reference materials for human antiserum to pertussis antigens by an international collaborative study. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2009,16(3):303–311.
 46. Sutter RW et al. Defining surrogate serologic tests with respect to predicting protective vaccine efficacy: poliovirus vaccination. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1995,754:289–299.
 47. Robbins JB et al. Quantitative measurement of "natural" and immunization-induced *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide antibodies. *Pediatric Research*, 1973,7(3):103–110.
 48. Anderson P. The protective level of serum antibodies to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *Journal of Infectious Diseases*, 1984,149(6):1034–1035.
 49. Peltola H et al. *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide vaccine in children: a double-blind field study of 100,000 vaccines 3 months to 5 years of age in Finland. *Pediatrics*, 1977,60(5):730–737.
 50. Horne AD et al. Analysis of studies to evaluate immune response to combination vaccines. *Clinical Infectious Diseases*, 2001, 33 (Supple 4) : S306–S311.
 51. Reed GF, Meade BD, Steinhoff MC. The reverse cumulative distribution plot: a graphic method for exploratory analysis of antibody data. *Pediatrics*, 1995,96(3):600–603.
 52. Granstrom M et al. Scientific panel on childhood immunisation schedule: diphtheria-tetanus-pertussis (DTP) vaccination. In: ECDC guidance. Stockholm, European Centre for Disease Prevention and Control, 2009 (www.ecdc.europa.eu, accessed 31 January 2013).
 53. Hanley JA, Lippman-Hand A. If nothing goes wrong, is everything all right? Interpreting zero numerators. *Journal of the American Medical Association*, 1983, 249(13):1743–1745.

54. Guidelines for national authorities on quality assurance for biological products. Annex 2 in: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-second report. Geneva, World Health Organization, 1992(WHO Technical Report Series, No.822).
55. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of DT-based combined vaccines. (revised 2012). Annex 2 in: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Sixty-third report. Geneva, World Health Organization, 2012 (WHO Technical Report Series, No.800).
56. 식품의약품안전청 생물약품본부, 백신의 임상평가 시 고려사항 2007, 2007.6.

생물의약품 평가가이드
디프테리아·파상풍 포함 혼합백신의 품질 및
안전성·유효성 평가 가이드라인

발행일	2014년 2월
발행인	바이오생약국장 홍순욱 바이오생약심사부장 손여원
발행위원	바이오의약품정책과 이승훈, 박영민, 김춘래, 김병국, 신경승, 김영주, 김판순, 한연해, 김지애, 여성구, 윤지상, 한희준, 김형진, 이하림, 한지혜 생물제제과 홍성화, 손경희, 안광수, 정기경, 이유경, 이연희, 권도연, 김연희, 오상연, 전형옥, 임재현, 남주선, 서지숙, 정기숙, 황지선, 이태형, 송민지
발행처	식품의약품안전처 바이오생약국 바이오의약품정책과 바이오생약심사부 생물제제과

식품의약품안전처 바이오생약국 바이오의약품정책과/바이오생약심사부 생물제제과
Tel : 043-719-3318, 3478 Fax : 043-719-3300, 3450

청렴한 세상