

안내서 등록번호

안내서-1244-01



백일해 백신의 면역원성 평가를 위한 시험법 밸리데이션 사례집

[민원인 안내서]

2022. 10.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

바이오생약심사부 생물제제과

지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭

백일해 백신의 면역원성 평가를 위한 시험법 밸리데이션 사례집
[민원인 안내서]

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

등록대상 여부	<input type="checkbox"/> 이미 등록된 지침서·안내서 중 동일·유사한 내용의 지침서·안내서가 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 기존의 지침서·안내서의 개정을 우선적으로 고려하시기 바랍니다. 그럼에도 불구하고 동 지침서·안내서의 제정이 필요한 경우 그 사유를 아래에 기재해 주시기 바랍니다. (사유 : _____)	
	<input type="checkbox"/> 법령(법·시행령·시행규칙) 또는 행정규칙(고시·훈령·예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 일회성 지시·명령에 해당하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 외국 규정을 단순 번역하거나 설명하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
☞ 상기 사항 중 어느 하나라도 '예'에 해당되는 경우에 지침서·안내서 등록 대상이 아닙니다. 지침서·안내서 제·개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다.		
지침서·안내서 구분	<input type="checkbox"/> 행정사무의 통일을 기하기 위하여 내부적으로 행정사무의 세부 기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	<input type="checkbox"/> 예(☞지침서) <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 민원인들의 이해를 돕기 위하여 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 설명하거나 특정 민원업무에 대한 행정기관의 대외적인 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)	<input checked="" type="checkbox"/> 예(☞안내서) <input type="checkbox"/> 아니오
기타 확인 사항	<input type="checkbox"/> 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설·강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서·안내서 제·개정 절차를 진행하시기 바랍니다.	
상기 사항에 대하여 확인하였음. 2022년 10월 28일 <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> 담당자 확 인(부서장) 이 은 경 김 재 옥 </div>		

이 안내서는 백일해 백신의 면역원성 평가를 위한 시험법 밸리데이션에 대하여 알기 쉽게 사례에 기반하여 설명 및 식품의약품안전처의 입장을 기술한 것입니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술 방식('~하여야 한다' 등)에도 불구하고 민원인 여러분께서 반드시 준수하셔야 하는 사항이 아님을 알려드립니다. 또한, 본 안내서는 2022년 10월 현재의 과학적·기술적 사실 및 유효한 법규를 토대로 작성되었으므로 이후 최신 개정 법규 내용 및 구체적인 사실관계 등에 따라 달리 적용될 수 있음을 알려드립니다.

※ "민원인 안내서"란 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것(식품의약품안전처 지침서 등의 관리에 관한 규정 제2조)

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

전화번호 : 043-719-3451

팩스번호 : 043-719-3450

제·개정 이력

백일해 백신의 면역원성 평가를 위한 시험법 밸리데이션 사례집 [민원인 안내서]

연번	제·개정번호	승인일자	주요 내용
1	안내서-1244-01	2022.10.28	제정

목 차

1. 개 요	1
2. 적용범위	1
3. 면역원성 평가	1
4. 표준품	2
5. 밸리데이션	3
5.1. 특이성 및 선택성	3
5.2. 안정성	6
5.3. 검량선 및 범위	8
5.4. 정확성 및 정밀성	10
5.5. 희석 직선성 및 후크효과	15

1. 개요

백일해는 백일해균(*Bordetella pertussis*) 감염에 의한 급성 호흡기 질환으로 백일해균은 호흡기의 섬모상피세포(ciliated epithelium)에 강한 친화성을 보여 집락화하고 백일해 독소(pertussis toxin) 등을 포함한 다양한 활성물질을 생성하여 섬모상피세포 기능을 저하시키고 기도 내 염증을 유발한다. 백일해 감염 예방을 위한 백신은 1958년부터 디프테리아 독소이드, 파상풍 독소이드, 전세포 백일해 백신(whole cell pertussis vaccine, wP)이 혼합된 DTwP 백신의 사용이 시작되었고, 1980년대부터 정제 백일해 백신(acellular pertussis vaccine, aP)이 혼합된 DTaP 백신 사용이 일반화되었다. 백일해 백신은 pertussis toxin(PT), filamentous hemagglutinin(FHA), pertactin(PRN, 69kDa 단백질), fimbriae(FIM) 등과 같은 구성 성분이 방어항원으로서 밝혀지면서 이들을 분리, 정제한 백일해 백신으로 구성되어있다.

2. 적용범위

본 사례집은 국내 백일해 백신 개발업체에서 백일해 백신에 대한 임상시험의 면역원성 평가 시 도움을 주고자 ICH M10을 참고하여 PT, FHA, PRN으로 구성된 정제 백일해 백신의 ELISA 시험법에 대한 밸리데이션 연구보고서를 기반으로 작성되었다. 따라서 동 사례집의 내용만으로 백일해 백신 면역원성 밸리데이션 평가에 충분하지 않을 수 있어 규제기관과 사전 협의가 필요하다.

3. 면역원성 평가

백일해 백신에 대한 항체반응측정 분석법은 특정 항원에 결합하는 항체 농도를 측정하는 방법(예, ELISA), PT 중화 항체가(예, CHO 세포 분석 방법) 또는 *B. pertussis* 응집 역가를 측정하여 기능성 생물학적 활성을 측정하는 방법으로 평가한다. 다만, 시중에서 판매되는 대다수 ELISA 키트 제품을 포함하여 진단과 역학 조사 목적으로 개발하여 분석 방법은 백신의 면역원성 평가를 위한 최적의 시험법이 아닐 수도 있다. 예를 들어 백일해 성분 각각(예, PT, FHA 등)을

평가하는데 필요한 특이성과 기하 평균 농도(GMC, Geometric Mean Concentration)를 구하기 위한 정확성을 갖추지 못했을 수 있다.

ELISA가 결합항체를 측정하는 대표적인 분석방법이나 현재 전 세계적으로 표준화된 방법이 없으며 제조사별로 자체적으로 개발하고 있다. 초기 개발사는 수 년전에 실시한 백일해 백신에 대한 유효성 시험결과가 있고 자체적으로 개발한 ELISA 시험법을 이용한 면역원성 분석방법을 설정하였으나 새로운 백일해 백신을 개발하는 개발사의 경우 더 이상 유효성 시험을 수행할 수 없는 환경에서 자체적으로 면역원성시험법을 개발하고 기존에 허가된 백일해 백신과의 면역원성을 비교 분석하여야 한다. 이러한 분석 결과의 신뢰성 확보를 위한 밸리데이션은 필수 요소라고 할 수 있다.

기능적 시험법으로 PT 중화 항체와 전세포 *B. pertussis* 응집 항체를 분석하는 방법이 확립되었다. 백일해 백신의 보호 유효성과 직접적인 상관관계에 있는 기능적 한계치가 발견되지 않았지만, 안전성과 유효성이 증명된 백신과 새로운 백신 제제를 전반적으로 비교하는데 중요한 변수라 할 수 있다.

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

무세포 백일해 백신의 모든 백일해 항원에 대한 ELISA 측정법으로 권고되는 일차 유효성 평가변수는 기초접종 또는 추가접종에서 GMT/GMC 및 기저치 대비 GMT/GMC 4배 증가비율을 공동 평가변수로 설정할 것을 권장한다.

4. 표준품

분석물질은 생체시료(biological matrix)에 표준품으로 조제한 검량선용 시료(calibration standard)와 품질관리시료(quality control sample, QC sample)를 이용하여 분석한다. 생체시료에 첨가되는 표준품의 순도는 시험

결과에 영향을 미치므로 성분이 확인되고 순도가 인증된 WHO 국제 표준품 및 참조품(international standards and reference reagents)을 사용하여야 한다. 백일해 면역원성 분석을 위한 WHO 표준품은 아래와 같다.

- 표준 혈청 NIBSC code 06/140: 항-PT IgG 335IU/ml & IgA 65IU/ml, 항-FHA IgG 130IU/ml & IgA 65IU/ml, 항-pertactin IgG 65IU/ml & IgA 42IU/ml 함유
- Bordetella pertussis toxin PT NIBSC code 15/126, FHA JN1H-4, PRN 18/154

5. 밸리데이션

밸리데이션은 생체시료 중의 분석물질을 정량 분석하는 데에 사용되는 방법이 신뢰성과 재현성이 있다는 것을 증명하는 모든 과정을 포함한다. 분석법 밸리데이션은 특정 실험실에서 특정 분석법이 적합하고 신뢰할 수 있다는 것을 문서화하는 것을 포함하여야 한다. 일반적으로 밸리데이션에서 입증하여야 할 항목들은 선택성, 생체시료 효과, 안정성, 검량선, 범위(최저정량한계에서 최고정량한계까지), 정확성, 정밀성, 회석의 타당성 등이다.

5.1 특이성 및 선택성

(특이성)

특이성은 공생체시료에 시험 시료에서 예측되는 구조적으로 관련이 있는 성분의 최대 농도에서 관련 성분을 첨가해 평가한다.

최저정량한계와 최고정량한계의 표적 분석물질의 정확성은 시험 시료의 예측 최대 농도에서 관련 성분이 존재하는 상태에서 조사해야 한다. 관련 성분을 스파이크한 공시료 반응은 최저정량한계 미만이어야 한다. 관련 성분이 존재하는 표적 분석물질의 정확성은 표준값의 $\pm 25\%$ 범위여야 한다.

(선택성)

선택성(selectivity)이란 검체 생체시료(sample matrix) 중 관련성이 없는 혼합물이 존재하는 경우 관심 대상인 분석물질을 검출하고 구분해내는 분석 능력을 말한다.

선택성은 대부분의 경우 오류가 발생할 수 있는 저농도(low end)에서 평가해야 하지만 더 높은 농도에서도 평가할 것을 권고한다. 따라서, 최소 10 가지의 서로 다른 기원의 공시료(blank sample)를 사용하고 최저정량한계 및 품질관리 시료 고농도에서 각각의 공생체시료(blank matrix)를 첨가해 평가한다. 공시료 반응은 서로 다른 기원의 최소 80%에서 최저정량한계 미만이어야 한다.

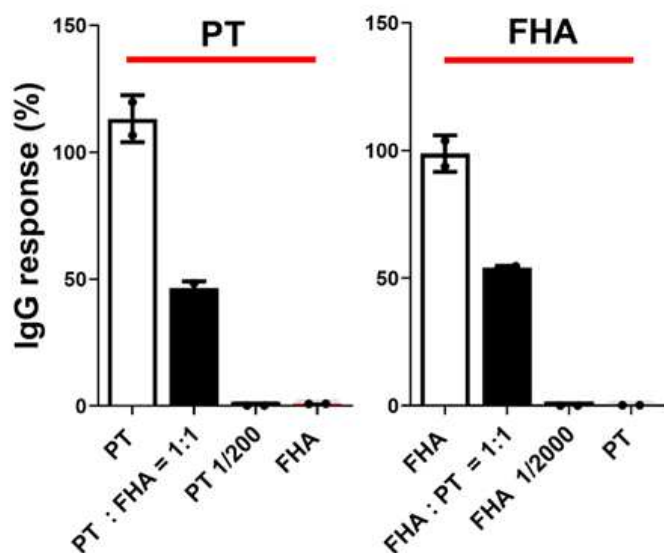
정확성은 최저정량한계에서 $\pm 25\%$ 범위, 평가한 개별 기원의 최소 80%에서 이론농도의 품질관리 고농도에서 $\pm 20\%$ 범위여야 한다.

선택성은 고지질 시료(lipaemic sample)와 용혈 시료(haemolysed sample)에서 평가해야 한다. 고지질 시료와 용혈 시료의 경우 단일 생체시료 기원을 사용하여 단회 평가할 수 있다.

특이성은 혼합백신에 함유된 다른 항원, pertussis 항원의 경우라면 FHA(filamentous haemagglutinin antigen), PRN(pertactin), 파상풍 독소이드, 디프테리아 독소이드 등을 이용하여 분석할 수 있다.

특이성 분석을 위해서는 각 항원에 반응하는 항혈청을 사용하며 필요 시 공혈청에 각 항원에 반응하는 시판 IgG를 섞은 검체를 사용한다. 마우스 혈청을 사용한 예를 들면 PT와 FHA에 각각 반응하는 마우스 혈청인 NIBSC JN1H-12, JN1H-11을 아래와 같이 희석하여 동종항원에 대하여 시험하였을 때 정해진 농도 대비 $\pm 25\%$ 이내에 들었고 이종항혈청은 최저정량한계 미만의 값을 나타내었다.

시험 혈청	기준
동종항혈청	정해진 농도 대비 $\pm 25\%$
동종항혈청 : 이종항혈청 (1:1)	정해진 농도 대비 $\pm 25\%$
이종항혈청	LLOQ 미만



상황에 따라 동물혈청을 이용한 혼합백신의 각기 다른 항원 성분에 대한 특이성 확인이 매우 어렵거나 불가능할 경우 임상 대상자의 혈청 내 존재할 수 있는 다른 IgG 항체(예, 인플루엔자 또는 covid-19 등)를 통해 특이성을 분석할 수도 있다.

5.2 안정성

안정성 평가를 수행해 시료 조제, 처리, 분석의 모든 단계 및 저장 조건이 분석물질의 농도에 영향을 미치지 않는다는 것을 확인해야 한다.

보관 조건뿐 아니라 생체시료의 준비 및 처리, 분석의 모든 단계가 분석물질의 농도에 영향을 주지 않음을 확인하기 위해 안정성을 평가하여야 한다. 검체의 저장 시간 및 온도, 검체 생체시료, 항응고제와 용기 재질 등 안정성 시험에서 보관 및 분석조건은 검체에 적용되는 조건을 반영해야 하며 문헌 자료만으로는 충분하지 않다.

시험한 생체시료의 안정성 분석물질은 저농도 및 고농도 안정성 품질관리 시료를 사용해 평가한다. 저농도 및 고농도 안정성 품질관리 시료 분취량은 0에서 분석하고 이후 평가할 저장 조건을 적용한다. 농도/저장 조건/시점 별로 최소 3개의 안정성 품질관리 시료를 조제하고 분석해야 한다.

검량선 범위가 협소해 시료 희석에서 여러 번의 리간드 결합 분석이 필요할 수 있기 때문에 시험 시료의 농도가 검량선의 최고정량한계 보다 일관적으로 높을 수 있다. 이 경우, 실제 시료 농도 범위를 나타내기 위해 적용 시료 희석을 고려해 안정성 표준관리 시료의 농도를 조정해야 한다.

생체시료 내 분석물질의 냉·해동 안정성, 생체시료 내 분석물질의 실온 또는 전처리 온도에서의 단기 안정성 등의 평가를 권고하며 냉·해동 안정성 평가에 대한 예시는 아래와 같다.

고농도, 저농도의 품질관리 시료를 사용하여 백일해 백신에 포함된 각 항원 PT, FHA, PRN에 대하여 냉동 해동과정을 1회, 2회, 3회 반복 후 시험하였다. 시험은 duplicate로 3회 반복하였으며 기준은 이론값(정밀성 결과 평균) 대비 측정값의 회수율이 80 ~ 120%로 설정하였으며 평가 결과 만족함을 확인하였다

항원	혈청	이론값	관찰값(IU/ml)			회수율(%)		
			1회	2회	3회	1회	2회	3회
PT	저농도	0.53	0.59	0.53	0.56	111.32	100.00	105.56
	고농도	118.67	128.06	116.48	108.81	107.91	98.15	91.69
FHA	저농도	5.12	5.24	4.19	4.17	102.34	81.84	81.45
	고농도	170.52	171.00	148.84	142.14	100.28	87.29	83.36
PRN	저농도	3.08	3.37	2.78	3.16	109.42	90.26	102.60
	고농도	54.65	45.17	51.29	51.43	82.65	93.85	94.11

추가적으로 장기 냉동 보관된 생체 시료를 사용할 경우 냉동 보관조건에서의 장기 안정성 평가를 할 수 있으며, 냉동 보관조건에서의 장기 안정성에 대한 예시는 다음과 같다.

고농도, 저농도의 품질관리 시료를 사용하여 백일해 백신에 포함된 각 항원 PT, FHA, PRN에 대하여 -60℃ 이하의 냉동고에서 1개월, 3개월, 6개월, 9개월, 12개월 주기로 보관된 검체의 농도를 확인하였다. 시험은 duplicate로 시험하였고 기준은 이론값(최초 보관 시험에서 정밀성 결과 평균) 대비 측정값의 회수율이 80 ~ 120%으로 설정하였으며 평가 결과 기준을 만족함을 확인하였다.

항원	검체	이론값	관찰값(IU/ml)					회수율(%)				
			1개월	3개월	6개월	9개월	12개월	1개월	3개월	6개월	9개월	12개월
PT	저농도	0.53	0.59	0.53	0.56	0.61	0.57	111.32	100.00	105.66	115.09	107.55
	고농도	118.67	128.06	116.48	108.81	115.98	121.52	107.91	90.96	93.42	106.59	104.78
FHA	저농도	5.12	5.24	4.19	4.17	4.95	5.06	102.34	79.96	99.52	118.71	102.22
	고농도	170.52	171	148.84	142.14	169.85	168.85	100.28	87.04	95.50	119.49	99.41
PRN	저농도	3.08	3.37	2.78	3.16	3.26	3.58	109.42	82.49	113.67	103.16	109.82
	고농도	54.65	45.17	51.29	51.43	55.43	56.81	82.65	93.85	94.11	101.43	103.95

5.3 검량선 및 범위

검량선이란, 이미 알고 있는 분석물질의 농도와 분석물질에 대한 분석 플랫폼(analytical platform)의 반응간의 관계를 말한다. 생체시료에 이미 알고 있는 농도의 분석물질을 첨가한 검량선용 표준시료는 검량선 범위 전체에 걸쳐 있어 검량선을 형성한다. 검량선용 표준시료는 검체와 동일한 생물학적 생체시료를 이용하여 준비해야 한다. 시험법 검증시 시험하는 각 분석물질 및 각 분석배치(analytical run)에 대하여 1개의 검량선이 있어야 한다.

검량선은 최저정량한계 및 최고정량한계를 포함한 최소 6개 농도의 검량선용 표준시료와 공시료를 가지고 생성해야 한다. 공시료는 검량선 파라미터 계산에 포함해서는 안된다. 검량선의 최저정량한계 미만 및 최고정량한계 초과하는 농도의 기준점 시료(anchor point sample)를 곡선 적합(curve fitting)을 개량하기 위해 사용할 수 있다. 검량선의 반응과 농도사이의 관계는 4- 또는 5-파라미터 로지스틱 모델이 가장 빈번하게 사용된다.

시험 간(between-run)의 변동성에 기여할 수 있는 요소들을 고려하여 수일에 걸쳐 최소 6개의 독립적인 분석배치를 평가해야 한다.

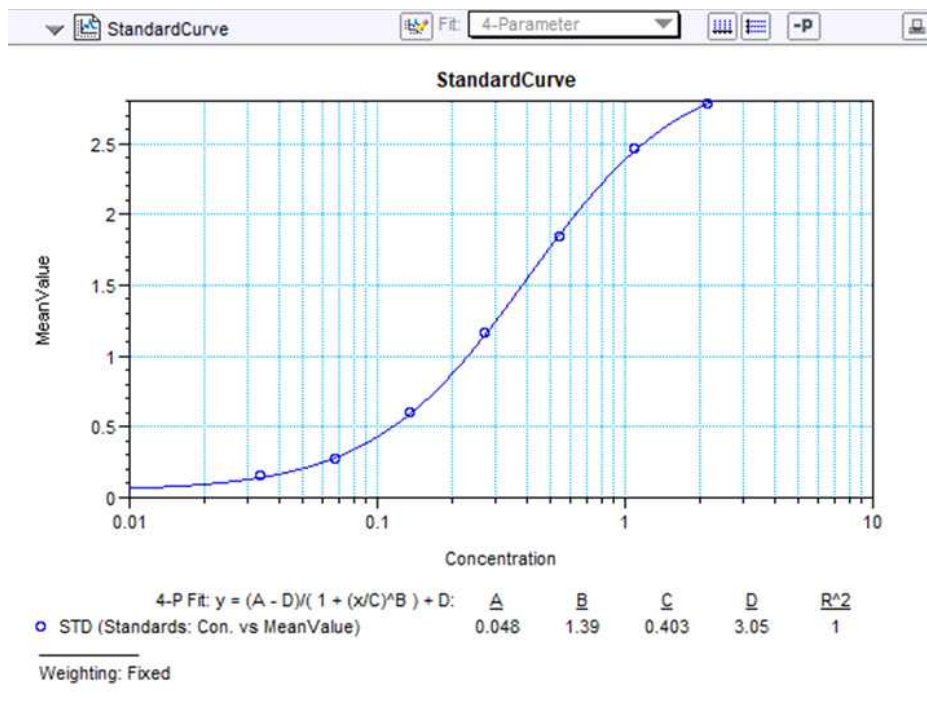
각 검량선용 표준시료의 역계산한 농도의 정확성 및 정밀성은 최저정량한계 및 최고정량한계는 이론값의 $\pm 25\%$ 이내이어야 하며 기타 다른 농도는 $\pm 20\%$ 이내이어야 한다. 기준점(anchor point)를 제외한 검량선용 표준시료의 최소 75%, 최저정량한계 및 최고정량한계를 포함한 검량선용 표준시료의 최소 6개 농도는 위의 기준을 충족해야 한다. 기준점은 검량선의 정량 가능 범위를 상회하기 때문에 허용기준이 필요하지 않다

검량선용 표준물질은 가급적이면 새로 혼합한 검량선용 표준시료를 사용해야 한다. 그렇지 않을 경우 검증된 안정성 기간 내에 동결된 검량선용 표준시료를 사용할 수 있다.

표준품을 이용하여 범위를 평가한 예시는 아래와 같다.

검량선은 표준혈청(NIBSC 06/140)을 사용하여 제조하고, 검량선 모델은 4-parameter logistic(4-PL) function을 이용하였다. 검량선은 blank와 최저정량한계를 포함한 최소 6개의 non-zero point를 포함하여야 하며, 기준점(anchor point)을 포함할 수도 있다. 검량선은 최소 2일 이상에 걸쳐 6회 이상 반복 측정하여 검량선의 Coefficient of determination($R^2 \geq 0.98$)을 평가하여 확인한다. 또한, 각 검량선용 표준시료의 역계산한 농도는 최저정량한계 및 최고정량한계는 이론값의 $\pm 25\%$ 이내 이어야 하며, 기타 다른 농도는 $\pm 20\%$ 이내 이어야 한다.

4-parameter logistic(4-PL) function 모델을 이용하여 검량선을 그린 예시는 아래와 같다.



5.4 정확성 및 정밀성

정확성은 분석물질의 이론값과 분석법에 의해 얻어진 측정값의 근접한 정도를 말하며 정밀성은 하나의 시료로부터 여러 번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 근접성을 말한다.

품질관리 시료로 평가할 수 있으며 품질관리 시료는 검량선용 표준시료와 독립적인 표준원액에서 준비하여야 한다. 품질관리 시료는 검량선 범위 내의 최소 5가지 농도에서 준비해야 한다. 분석물질은 최저정량한계, 최저정량한계의 3배 이내(저농도), 검량선 범위의 기하평균 부근(중간농도), 최고정량한계의 최소 75%(고농도), 최고정량한계 농도에 해당하도록 첨가한다.

정확성 및 정밀성은 각각의 시험 내에서(with-run) 그리고 서로 다른 시험들에서(between-run) 품질관리 시료를 분석하여 결정해야 한다. 정확성 및 정밀성은 동일한 분석배치 및 자료를 사용하여 평가해야 한다.

정확성 및 정밀성은 2일 이상에 걸쳐 최소 6회의 시험을 통해 각 품질관리 시료 농도(최저정량한계, 저농도, 중간농도, 고농도, 최고정량한계)에서 시험 당 최소 3개의 반복시료(replicate)를 분석해서 결정해야 한다. 시험 내 정확성 및 정밀성 자료는 개별 배치 별로 보고되어야 한다. 시험 내 정확성 및 정밀성 기준을 충족하지 못했다면 각 품질관리 시료 농도에 대하여 전체 시험 내 정확성 및 정밀성의 전반적인 추정치를 계산해야 한다. 시험 간 정확성 및 정밀성은 모든 분석에서 얻은 자료를 통합하여 산출해야 한다.

각 농도에서의 전반적인 시험 내 및 시험 간 정확성은 최저정량한계 및 최고정량한계는 이론값의 $\pm 25\%$ 이어야 하며 다른 농도는 이론값의 $\pm 20\%$ 이어야 한다. 각 농도에서 결정된 품질관리 시료 농도의 시험 내 및 시험 간 정밀성은 이론값의 $\pm 25\%$ 를 초과해서는 안되는 최저정량한계 및 최고정량한계를 제외하고는 이론값의 $\pm 20\%$ 을 초과해서는 안된다.

추가로, 총 오류(예, 정확성(%) 및 정밀성(%)에서 오류들의 절대값의 총합)를 평가해야 한다. 총 오류는 30%(최저정량한계 및 최고정량한계는 40%)를 초과해서는 안된다.

정확성 및 정밀도에 대한 PT 시험결과는 아래와 같은 예시로 결과를 작성할 수 있다

○ 정밀성은 반복성과 시험일간, 시험자간 반복시험을 통해서 평가한다.

WHO Reference Reagent Pertussis Antiserum(Human) 1st RR(NIBSC 06/142)를 이용하여 시험 내(with run) 반복성은 농도가 정해진 control 혈청을 5개 농도로 설정하여 시험일에 PT, FHA, PRN 각 항원별로 3회 반복 시험한 결과 이론값 대비 정확도가 20% 이내, 정량 한계 농도에서는 25% 이내로 측정되었고 CV(Coefficient of Variation)%는 20% 이내, 정량 한계 농도에서는 25% 이내 기준을 만족하였고 Total error%(CV% + Relative error%*)가 30% 이내, 정량 한계는 40% 이내로 기준을 만족하였다.

* Relative error(%) : (이론값 - Mean) / 이론값 * 100

PT	이론값 (IU/mL)	1 (IU/mL)	2 (IU/mL)	3 (IU/mL)	Mean (IU/mL)	CV(%)	Relative error(%)	Total error(%)
농도1	106	107.02	103.41	105.80	105.41	1.74	0.56	2.30
농도2	79	75.61	78.93	76.62	77.05	2.21	2.46	4.67
농도3	53	50.27	51.63	59.76	53.89	9.53	1.67	11.20
농도4	20	20.87	23.06	22.74	22.22	5.32	11.12	16.44
농도5	1	0.78	0.98	0.71	0.82	16.90	17.79	34.69

FHA	이론값 (IU/mL)	1 (IU/mL)	2 (IU/mL)	3 (IU/mL)	Mean (IU/mL)	CV(%)	Relative error(%)	Total error(%)
농도1	122	117.02	123.41	120.80	120.41	2.67	1.30	3.97
농도2	90	85.61	88.93	86.62	87.05	1.95	3.27	5.23
농도3	60	60.27	61.63	59.76	60.55	1.59	0.92	2.51
농도4	10	10.87	11.06	12.74	11.56	8.91	15.57	24.47
농도5	1	0.98	0.98	0.71	0.89	17.22	11.12	28.34

PRN	이론값 (IU/mL)	1 (IU/mL)	2 (IU/mL)	3 (IU/mL)	Mean (IU/mL)	CV(%)	Relative error(%)	Total error(%)
농도1	39	37.02	38.41	35.80	37.08	3.52	4.93	8.45
농도2	25	25.61	26.93	26.62	26.39	2.62	5.55	8.17
농도3	10	10.27	11.63	9.76	10.55	9.13	5.53	14.66
농도4	5	5.87	5.06	5.74	5.56	7.83	11.13	18.96
농도5	1.5	1.38	1.50	1.31	1.40	6.76	6.98	13.74

시험 간(between run)은 농도가 정해진 WHO Reference Reagent Pertussis Antiserum(Human) 1st RR(NIBSC 06/142)을 5개 농도로 설정하여 동일한 시험자가 3일 동안 총 9회 (3회/1일) PT, FHA, PRN 각 항원별로 시험한 결과 이론값 대비 정확도가 20% 이내, 정량 한계 농도에서는 25% 이내로 측정되어 기준을 만족하였다. CV (Coefficient of Variation) %는 20% 이내, 정량 한계 농도에서는 25% 이내 기준을 만족하였고 Total error% (CV% + Relative error %)가 30% 이내, 정량 한계는 40% 이내로 기준을 만족하였다.

PT	이론값 (IU/mL)	day 1 (IU/mL)	day 2 (IU/mL)	day3 (IU/mL)	Mean (IU/mL)	CV(%)	Relative error(%)	Total error(%)
농도1	106	105.41	101.42	100.65	102.49	2.49	3.31	5.80
농도2	79	77.05	79.06	81.00	79.04	2.50	0.05	2.54
농도3	53	53.89	49.16	50.23	51.09	4.85	3.60	8.45
농도4	20	22.22	23.14	23.25	22.87	2.47	14.36	16.83
농도5	1	0.82	0.70	0.80	0.77	8.74	22.67	31.41

FHA	이론값 (IU/mL)	day 1 (IU/mL)	day 2 (IU/mL)	day3 (IU/mL)	Mean (IU/mL)	CV(%)	Relative error(%)	Total error(%)
농도1	122	120.41	120.30	117.71	119.47	1.28	2.07	3.35
농도2	90	87.05	95.73	93.46	92.08	4.89	2.31	7.20
농도3	60	60.55	60.27	60.08	60.30	0.39	0.50	0.89
농도4	10	11.56	11.64	11.66	11.62	0.48	16.19	16.67
농도5	1	0.89	0.88	0.93	0.90	3.35	10.03	13.37

PRN	이론값 (IU/mL)	day 1 (IU/mL)	day 2 (IU/mL)	day3 (IU/mL)	Mean (IU/mL)	CV(%)	Relative error(%)	Total error(%)
농도1	39	37.08	41.73	39.01	39.27	5.95	0.69	6.64
농도2	25	26.39	26.75	26.98	26.71	1.13	6.83	7.96
농도3	10	10.55	12.46	11.10	11.37	8.64	13.72	22.35
농도4	5	5.56	5.14	4.56	5.09	9.81	1.73	11.54
농도5	1.5	1.40	1.10	1.24	1.25	11.65	16.78	28.44

시험자간은 WHO Reference Reagent Pertussis Antiserum(Human) 1st RR(NIBSC 06/142)을 5개 농도로 설정하여 2명의 시험자가 각각 3회(3회/1일) 시험한 결과 이론값 대비 정확도가 20% 이내, 정량 한계 농도에서는 25% 이내로 측정되어 기준을 만족하였다.

PT	이론값 (IU/mL)	시험자 1 (IU/mL)	시험자 2 (IU/mL)	Mean (IU/mL)	CV(%)	Relative error(%)	Total error(%)
농도1	106	105.41	101.48	103.74	3.08	2.13	5.21
농도2	79	77.05	75.38	77.19	3.32	2.29	5.61
농도3	53	53.89	49.51	51.25	4.82	3.30	8.12
농도4	20	22.22	22.62	21.31	8.68	6.54	15.22
농도5	1	0.82	0.88	0.94	8.76	5.83	14.59

FHA	이론값 (IU/mL)	시험자 1 (IU/mL)	시험자 2 (IU/mL)	Mean (IU/mL)	CV(%)	Relative error(%)	Total error(%)
농도1	122	120.41	131.30	126.65	5.19	3.81	9.00
농도2	90	87.05	92.73	91.36	2.11	1.52	3.63
농도3	60	60.55	60.27	60.13	0.31	0.22	0.54
농도4	10	11.56	11.64	10.82	10.70	8.19	18.89
농도5	1	0.89	0.98	0.99	1.43	1.00	2.43

PRN	이론값 (IU/mL)	시험자 1 (IU/mL)	시험자 2 (IU/mL)	Mean (IU/mL)	CV(%)	Relative error(%)	Total error(%)
농도1	39	37.08	36.63	37.82	4.43	3.03	7.46
농도2	25	26.39	26.75	25.88	4.78	3.50	8.29
농도3	10	10.55	11.13	10.56	7.55	5.64	13.18
농도4	5	5.56	4.93	4.97	0.95	0.67	1.62
농도5	1.5	1.40	1.39	1.44	5.52	3.75	9.27

○ 정확성

WHO Reference Reagent Pertussis Antiserum (Human) 1st RR(NIBSC 06/142)을 5개 농도로 설정하여 총 6회 시험하여 시험 평균값과 이론값 대비 회수율이 80 ~ 120% 이내, 정량 한계 농도의 경우 75 ~ 125% 이내를 만족하였다.

PT	이론값(IU/mL)	Mean(IU/mL)	Accuracy(%)
농도1	106	102.49	96.69
농도2	79	79.04	100.05
농도3	53	51.09	96.40
농도4	20	22.87	114.36
농도5	1	0.77	77.33

FHA	이론값(IU/mL)	Mean(IU/mL)	Accuracy(%)
농도1	122	119.47	97.93
농도2	90	92.08	102.31
농도3	60	60.30	100.50
농도4	10	11.62	116.19
농도5	1	0.90	89.97

PRN	이론값(IU/mL)	Mean(IU/mL)	Accuracy(%)
농도1	39	39.27	100.69
농도2	25	26.71	106.83
농도3	10	11.37	113.72
농도4	5	5.09	101.73
농도5	1.5	1.25	83.22

5.5 희석 직선성(dilution linearity) 및 후크 효과

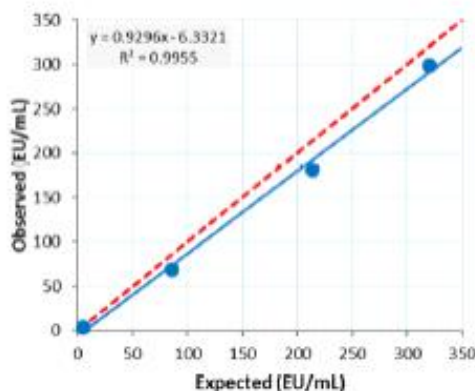
검정의 범위가 좁은 경우 검체 시료의 희석이 필요할 수 있는데 이러한 경우 희석이 분석에 영향을 미치지 않는다는 것을 입증하여야 한다. 희석 직선성은 측정된 농도가 검량선 범위 내에서 희석에 의해 영향을 받지 않으며, 검량선의 최고정량한계를 초과한 시료가 잘못된 결과를 가져오는 후크효과(예, 고농도의 분석물질로 인한 signal suppression에 영향을 받지 않음을 확인하기 위해서 실시한다.

품질관리 시료의 희석은 검체의 생체시료와 동일하게 수행하여야 하며 희석 직선성을 입증해야 한다. 예를 들면, 후크효과를 고려하여 희석하지 않은 최고정량한계를 초과한 농도의 분석물질을 생체시료에 첨가하고 최소한 3가지 다른 희석 배수로 검량선 범위 내의 농도로 공생체시료를 사용하여 희석한다. 각 희석배수마다 최소 3회 반복 분석하여야 한다.

각 희석에 의해 산출된 농도는 희석에 따른 보정 후 이론값의 $\pm 20\%$ 이내이어야 하며 모든 희석한 최종 농도의 정밀성은 20%를 초과해서는 안된다. 검체 분석에 적용한 희석 배수는 밸리데이션 중 평가한 희석 배수의 범위 내에 들어야 한다.

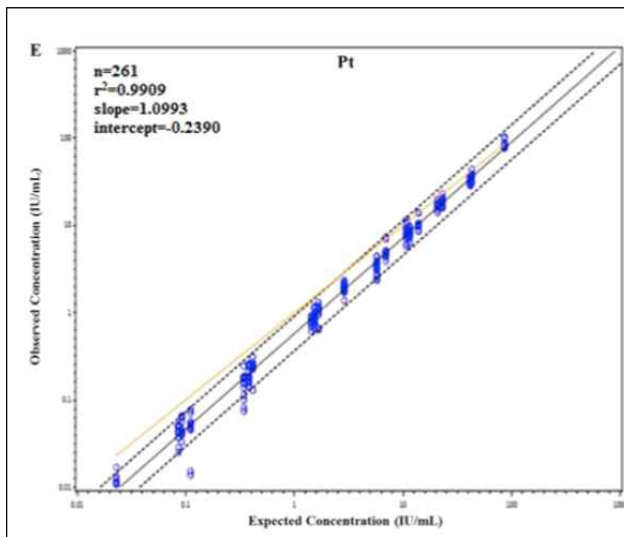
정해진 최고 농도를 기준으로 희석배수를 고려하여 각 검증용 시료의 이론값을 계산하고, 최소 2일 이상, 최소 6회 이상 반복 측정하여 이론값 대비 실제 측정값의 상관관계($R^2 \geq 0.95$)를 평가하여 직선성을 확인한다.

B ECL using NIBSC 06/140 (anti-PT)



참고 1. Kucku Varghese et al., A new electrochemiluminescence-based multiplex assay for the assessment of human antibody responses to *Bordetella Pertussis* Vaccines, Infect Dis Ther, (2021) 10: 2539-2561

표준혈청(NIBSC 06/140)이나 품질 관리 시료(예. NIBSC 06/142) 보다 더 높은 농도의 검체를 사용하여 직선성을 확인하고자 하는 경우에는 확보된 고농도의 검체를 사용할 수 있다. 희석하지 않은 고농도 검체를 최소 2일 이상에 걸쳐 최소 6회 이상 반복 측정하여 얻은 평균값을 이론값을 정한다. 이론값이 설정된 고농도 검체를 검량선 범위 내에 들도록 최소 3 point 이상 농도로 희석하여 검증용 시료를 조제(다만, 가장 높은 농도 검체는 검량선 범위를 벗어날 수 있다.)하고, 각 검증용 시료의 이론값은 고농도 검체의 이론값을 기준으로 희석배수를 적용하여 계산한다. 제작된 다양한 농도의 검증용 시료들을 최소 2일 이상, 최소 6회 이상 반복 측정하여 얻은 평균 실측값과 이론값의 상관관계($R^2 \geq 0.95$)를 평가하여 직선성을 확인한다.



참고 2. Gowrisankar Rajam et al., Development and validation of a robust multiplex serological assay to quantify antibodies specific to pertussis antigens, Biologicals (2019) 57: 9-20

※ (참고) 백일해 백신의 기능성 항체 분석법

정밀성 (precision) : 표준 혈청(NIBSC 06/140)을 1/2, 1/4, 1/8, 1/32 1/64로 희석하여 총 5개의 검체로 3회/1일로 3일간 총 9회 시험하고 시험자 2가 3회/1일 시험하였다. 반복성 (Reproducibility)과 시험일간 (Intermediate precision), 시험자 간 정밀성 (Inter person precision)을 확인한다. 시험 내 항목에서는 1일 3회의 시험의 median 값과 각 회 값 간의 차이가 4 fold 임을 확인하고 시험 간 항목에서는 전체 median 값 대비 각 시험일의 median 값 간의 차이가 4 fold 이하임을 확인한다. 시험자 1의 median 값 대비 시험자 2의 median 값 간의 차이가 4 fold 이하임을 확인한다. PTx 의 4 CPU(cytopathic unit)에 해당 되는 농도와 상응하는 희석배수를 혈청의 이론값으로 설정하여 이론값 대비 median 값은 모두 4 fold 이내에 들어야 한다.

직선성 (linearity) : 표준 혈청(NIBSC 06/140)을 원액, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32로 희석하여 총 6개의 농도에 대하여 총 6회 시험하여 직선성을 확인한다. Expected titre의 GMT와 6회 결과의 GMT값에 대하여 Log-Log 그래프를 그렸을 때 직선의 R square 값이 $R^2 > 0.95$ 를 만족해야 한다.

범위 (range) 및 민감도 (sensitivity) : 중화항체 시험에서 사용되는 PTx 의 4 CPU (cytopathic unit)에 해당되는 농도와 상응하는 희석배수를 혈청의 이론값으로 하여 표준 혈청을 이용하여 혈청 농도의 범위와 민감도를 IU/mL로 설정한다. CHO cell이 Clustering을 일으키는 농도 단위가 다양하게 될 수 있도록(예시표 참조) 다양한 농도로 표준 혈청(NIBSC 06/140)을 희석한 후 2배수 단계 희석하여 총 2일간 6회에 걸쳐 시험한다. 예를 들어 아래 예시 표에서처럼 9.6, 8, 6.4, 4.8, 3.2의 농도로 표준혈청을 희석하여 4 CPU에 해당하는 농도 0.27 과 근접하는 농도를 설정한다. 4 CPU에 해당되는 희석 농도를 이론값으로 설정하고 clustering을 확인한 결과 0.4 IU/mL 이하의 농도에서부터 clustering이 일어남을 확인하였고 혈청농도 0.4 IU/mL 이하는 모두 titre가 2이므로 중화항체 시험으로 확인 가능한 혈청의 범위 및 민감도는 0.4 IU/mL로 볼 수 있다.

범위 및 민감도 예시표 (4 CPU (cytopathic unit) = 0.27 IU/mL)									
검체	titre	2	4	8	16	32	64	128	256
농도1	64	9.6	4.8	2.4	1.2	0.6	0.3	0.15	0.075
농도2	64	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625
농도3	64	6.4	3.2	1.6	0.8	0.4	0.2	0.1	0.05
농도4	32	4.8	2.4	1.2	0.6	0.3	0.15	0.075	0.0375
농도5	16	3.2	1.6	0.8	0.4	0.2	0.1	0.05	0.025

참고문헌

1. ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis(EMA, 2022)
2. 생체시료 분석법 밸리데이션 가이드라인(식품의약품안전처, 2013)
3. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. (FDA, 2018)
4. Kucku Varghese et al., A new electrochemiluminescence-based multiplex assay for the assessment of human antibody responses to Bordetella Pertussis Vaccines, Infect Dis Ther, (2021) 10: 2539-2561
5. Gowrisankar Rajam et al., Development and validation of a robust multiplex serological assay to quantify antibodies specific to pertussis antigens, Biologicals (2019) 57: 9-20

“백일해 백신의 면역원성 평가를 위한 시험법 밸리데이션 사례집”

발행일 2022년 10월 28일

발행인 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원장 서경원

편집위원장 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 바이오생약심사부장 박인숙
식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 바이오생약심사부 생물제제과

편집위원 김재옥, 김영훈, 김연희, 배창준, 박상미, 양미숙, 송주경, 이은경, 박소영,
신진영, 이현, 박종식, 신숙진, 송민지, 이경윤, 권혜진, 천수정

발행부서 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 바이오생약심사부 생물제제과

연락처 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 바이오생약심사부 생물제제과

전화번호 043) 719-3451

팩스번호 043) 719-3450

공익신고자 보호법이 항상 당신의 양심을 지켜드립니다.

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

공익신고자 보호제도란?

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

※보호조치요구방법

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