

항-보호항원 항체의 역가 측정을 위한 효소면역측정법 밸리데이션

ELISA Validation for anti-PA Antibody Titer Measurements

김 유 진*

Yugene Kim

Abstract

The vaccine is biological pretreatment that improves immunity to a particular disease. We can get immunity from producing antibody with injection antigen which has ability to defense against the disease. The ELISA is the most widely used method to measure antibody titer. We have developed and performed validation of ELISA according to the guideline of KFDA and ICH. In this paper, we have verified ELISA method is an excellent method to measure the titer of anti-PA antibody. We have constructed recombinant protective antigen among anthrax toxins and used as antigen of ELISA. In this validation, we have evaluated precision(repeatability, inter-laboratory precision), specificity, linearity(range) and LOD, which are validation articles suggested by guideline. Inter-person precision was replaced with inter-laboratory precision. From the results, we have confirmed high precision in all experiments with CV under 20%.

Keywords : Validation(밸리데이션, 검증), ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, 효소면역검사법), PA(Protective Antigen, 보호항원), Kfda(Korea Food And Drug Administration, 한국식약청), Ich(International Conference of Harmonization, 국제의약품조화회의), LOD(Limit of Detection, 검출한계), CV(Coefficient of Variation, 변동계수)

1. 서론

밸리데이션은 사용하고자 하는 분석법이 사용목적에 적합한 지를 증명하는 과정이다. 원료 의약품과 완제 의약품의 품질을 보증하고, 품질의 변화를 평가하

기 위해서는 검증된 분석법을 사용하여야 한다. 이유는 분석 데이터의 질이 의약품의 품질에 중대한 영향을 미치기 때문이다.

제약업계에 종사하는 분석자들은 여러 상황에서 분석법 검증의 필요성을 느끼게 된다. 분석의 신뢰성을 확보하기 위해서 뿐만 아니라 의약품 허가 시, 규제기관에서 분석법 검증자료를 요구하기 때문이다. 각국의 규제당국은 GMP(Good Manufacturing Practice) 체제하에서는 의약품의 제조 뿐만 아니라 이를 뒷받침할 수

† 2010년 3월 19일 접수~2010년 5월 20일 게재승인

* 국방과학연구소(ADD)

책임저자 : 김유진(yugene@add.re.kr)

있는 검증된 분석법을 사용할 것을 요구하고 있다.

본 실험에서 검증하고자 하는 분석법은 항-보호항원(PA)의 역가를 측정하는 효소면역검사법(ELISA)으로, 시료 내에 존재하는 항-보호항원 항체의 양을 측정하는 방법이다. 한국식약청(KFDA)^[1]과 국제의약품조화회의(ICH)^[2]의 지침서(가이드라인)에 따라 효소면역검사법의 검증방법을 수행하였으며 본 효소면역검사법이 항-보호항원의 PA 항체가 측정법으로서 매우 우수함을 검증하고자 하였다.

2. 본 론

가. 실험재료 및 방법

1) 항원(Antigens)

본 실험실에서 클로닝방법을 이용하여 자체 제작한 PA 재조합 단백질을 항원으로 사용하였다.

2) 시료(Samples)

전 검증 과정에서 동일한 분석시료를 사용하여야 하며, 본 검증 실험방법은 항-보호항원 항체 역가를 측정하기 위한 것이기 때문에 항-보호항원 표준다가 클론(polyclone)항체를 제작하여 사용하였다.

기니피그(guinea pig) 다기관항체 제작은 rPA 항원의 농도가 200 μ g/ml이 되도록 PBS(Phosphate Buffered Saline)로 희석하고, 여기에 FCA(Freund Complete Adjuvant)와 FIA(Freund Incomplete Adjuvant)를 동량으로 넣어 에멀전 상태가 될 때까지 섞어주었으며 기니피그 마리당 2ml을 사용하였다. 투여는 기니피그의 등배부 털을 깎아 70% 에탄올로 소독한 후 여러부위에 나누어 피하로 투여하였다. 투여는 2주 간격으로 4회를 투여하였으며, 마지막 투여후 소량 채혈하여 역가를 측정하였으며 2주 후에 전혈 채혈을 실시하였다. 채혈한 혈청은 ProteinA column을 사용하여 순수 항-보호항원 항체만을 분리 정제하여 사용하였다.

정제한 항체의 최종농도는 2.5mg/ml이며, 이 원액을 PBS로 1/2씩 순차적 희석(serial dilution)을 한 뒤 1:100부터 1:204800까지 12개의 희석시료를 제조하였다. 이 중에서 일정한 희석 간격을 둔 1:100(S1), 1:800(S2), 1:12800(S3), 1:204800(S4)의 4가지 희석시료를 사용하였다.

3) 효소면역검사법(ELISA)

실험전날 보호항원(rPA)을 코팅 완충용액인 pH9.6, 0.05M carbonate-bicarbonate(Sigma C3041)에 3 μ g/ml의 농도로 희석한 후 평평한 바닥의 96-well plate(Nunc-Immuno plate, 439454)의 각 well에 50 μ l(150ng/well)씩 분주하여 코팅하였다. 뚜껑을 덮고 4 $^{\circ}$ C에서 16~18시간 처리하였다.

코팅이 끝나면, 마이크로플레이트 세척용액 pH7.4, PBS with 0.05% Tween20(Sigma, P3563)로 3회 세척하였다. 플레이트의 물기를 완전히 제거한 뒤, 각 well에 세척버퍼에 5% 탈지분유(aldrich)를 녹인 블로킹 버퍼 100 μ l씩 분주한 뒤, 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 블로킹 처리하였다.

블로킹이 끝나면, 이전과 같은 방법으로 마이크로플레이트를 3회 세척한 뒤, 마이크로플레이트의 가로 1번열을 제외한 나머지 well에 블로킹 버퍼 50 μ l씩 Fig. 1에서 보인 것처럼 분주하였다. 원하는 희석배수에 맞게 1.5ml 마이크로튜브에 시험액을 블로킹 버퍼로 희석하였다. 희석한 시험액 100 μ l를 마이크로플레이트의 1번열에 분주하고 1번열의 시험액을 횡방향으로 50 μ l씩 옮겨가면서 1/2씩 희석하였다. 골고루 섞일수 있도록 일정하게 7번씩 파이펫팅 한뒤, 희석이 완료된 마이크로플레이트는 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 항온처리하였다.

시험액처리가 끝나면, 이전과 같은 방법으로 마이크로플레이트를 5회 세척하였다. 항-기니피그 2차항체(anti-guinea pig IgG[whole molecule] peroxidase conjugate, Sigma A2789)를 블로킹 버퍼를 사용하여 1:8000의 농도로 희석하였다. 2차항체 희석액을 각 well에 50 μ l씩 분주한 뒤, 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 항온처리하였다. 2차항체 처리가 끝나면, 이전과 같은 방법으로 마이크로플레이트를 5회 세척하였다.

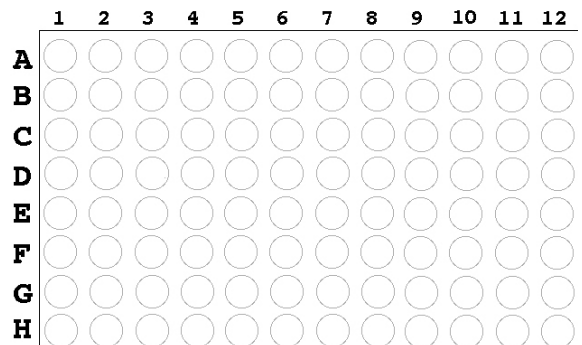


Fig. 1. 96-well microplate

세척이 끝나는 즉시 발색용액인 o-Phenylenediamine dihydrochloride(Sigma, P9187)을 만들어 각 well에 100 μ 씩 분주한뒤, 빛이 들어가지 않도록 호일로 마이크로플레이트를 싸서 빛이 없는 실온에서 30분간 발색시켰다.

발색용액 처리가 끝나면, 각 well에 정지용액인 3M sulfuric acid(Aldrich, 258105) 50 μ 를 분주하여 발색을 정지시켰다. 그리고 마이크로플레이트 분광광도기(Thermo)를 이용하여 492nm, 620nm 각각의 파장에서 흡광도를 측정하고, 흡광도 값을 이용하여 항체의 농도를 계산하였다.

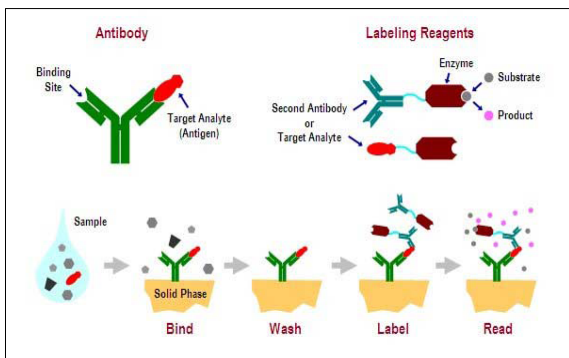


Fig. 2. Sigm of ELISA

나. ELISA 검증 요소

1) 검증 허용기준의 설정

검증을 위한 허용기준은 Pombo 등의 연구 논문^[3]과 Hering 등의 연구 논문^[4]을 참조하여 설정하였다.

2) 특이성(Specificity)

항-보호항원의 ELISA에서 항-보호항원 항체가 보호항원 이외의 항원과 결합하지 않는다는 것을 검증하기 위해서, 치사요소(LF : Lethal Factor) 항원을 코팅하여 특이성을 검증하였다.

3) 정확도(Accuracy)

정확도는 별도실험을 실시하지 않고, 시험간 반복성 측정 실험결과를 사용하여 평가하였다. 특정 희석배율을 정해놓고 시험하는 스파이킹(spiking) ELISA와는 달리 순차적 희석(serial dilution) ELISA의 경우에는 참값이 없으므로, 분석시료의 최고농도인 S1의 역가와 이로부터의 희석비율(S2, S3, S4)을 계산하여 나머지 분석시료의 예측 역가를 구하고, 이 예측값과 실제 측

정값을 비교하여 회수율을 구하였다.

4) 정밀성(Precision)

가) 반복성(Repeatability)

플레이트내 반복성과 플레이트간, 시험간 반복성은 모두 동일한 시험결과를 바탕으로 분석하였다. 동일한 시험자가 S1, S2, S3, S4 분석시료를 한 시험내에서 동일시료로 3번 반복 측정하였다. 이 시험세트를 3일간 3회 반복하여 변동계수를 측정하였다.

나) 실험실간 정밀성(Inter-lab precision)

실험실간 정밀성을 측정하는 경우, 실험자간 정밀성은 생각할 수 있다. 서로 다른 실험실에서 위 반복성과 동일한 방법으로 3일간 3회 반복하여 두 실험실간의 정밀성을 측정하였다.

다) 직선성(Linearity)

직선성은 별도의 실험을 실시하지 않고 시험간 반복성의 측정 결과를 사용하여 평가하였다. S2부터 S4까지의 시료는 원액시료(S1)를 정확한 비율로 희석한 것이므로, 이 희석에 따른 항체역가의 감소가 정확한 1차식의 직선성을 보이는지를 마이크로소프트 엑셀을 사용하여 결정계수(R²)를 구하여 평가하였다.

라) 동적범위(Dynamic Range)

범위는 별도의 실험을 실시하지 않고 반복성, 실험실내 정밀성, 정확성, 직선성의 결과를 종합하여 충분한 신뢰성을 입증할 수 있는 구간을 구하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 항체역가 계산법

순차적 희석(serial dilution) ELISA에서 사용하는 항체농도 계산법은 역가계산법이다. 양성기준치(Cut-off)를 설정하고, 시료를 몇 배 희석하였을 때 그 흡광도가 양성기준치에 도달하는지를 계산하는 방법이다. 역가가 높으면 높을수록 희석배수는 높아지고, 시료내 항체의 농도는 높은 것으로 해석할 수 있다.

492nm 파장에서 측정한 흡광도 값에서 620nm에서 측정한 흡광도 값을 빼준다. 희석배수에 로그를 취한 값과 흡광도 사이의 상관관계 그래프를 Fig. 3으로 나타낼 수 있다. 이 그래프에서 직선을 나타내는 구간의

점들을 이용하여 선형회귀직선(linear regression line)을 구하고 추세선의 방정식을 얻는다. 이 방정식을 이용하여 y값이 양성기준치(0.3)일 때 시료의 희석배수를 구할 수 있고, 이것이 항체의 역가(희석배수)가 된다.

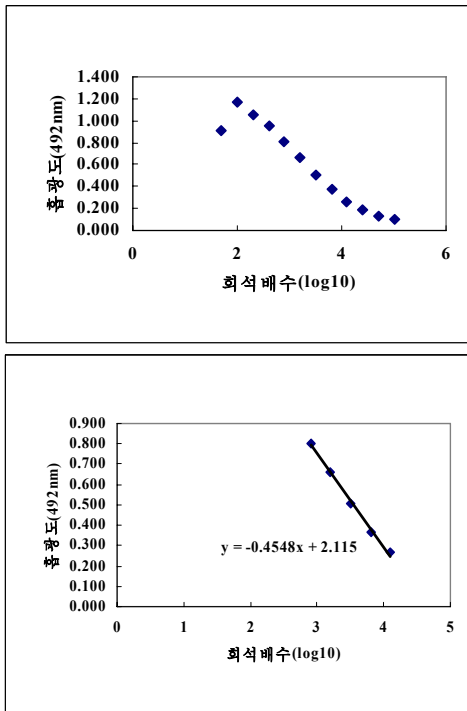


Fig. 3. Regression analysis and curve fitting

나. 양성기준치(Cut-off) 측정실험

양성기준치(Cut-off)란 에너지, 농도 및 길이 등과 같이 정도를 나타내는 단위에서 최소값이라는 의미를 가지고 있다. 어떤 값이 양성기준치를 넘어서면 의미있는 값으로 인정하고, 양성기준치 이하면 무시해도 되는 값으로 인정한다. 순차적 희석(serial dilution) ELISA에서는 예비실험을 통해 양성기준치를 측정하고, 양성기준치에 해당하는 시료의 희석배수(역가)를 이용하여 시료 내 항체농도를 예측한다.

양성기준치는 시험방법의 특성과 시험결과의 의미에 따라 다르게 결정할 수 있다. 예를 들면, 양성반응을 보이는 시료들의 흡광도 평균의 몇 혹은 몇십 %로 정하는 경우도 있다. 일반적인 ELISA 시험결과에서는 정상대조군(음성대조군, 건강한 기니피그의 혈청)의 평균값 + 3시그마(표준편차)를 양성기준치로 정한다. 본 실험에서는 23개의 정상대조군 시료를 사용하

였다. 양성기준치 0.3을 사용하여 분석한 결과는 Table 1과 같다. 추가적으로 다른 항원(치사요소)을 사용하여 양성기준치를 비교분석하였다.

Table 1. Definition of cut-off value(10-fold dilution, cut-off = 0.3)

	평균	표준편차	양성기준치 정의
anti-PA	0.053	0.023	평균+10.7SD
anti-LF	0.034	0.02	평균+13.3SD

다. 허용기준의 설정

허용기준 설정은 Table 2와 같이 설정하였다. 국내 뿐 아니라, 분석법에 대한 검증요구가 까다로운 미국에서도 지침서만 있을 뿐, 구체적인 허용기준은 마련되어 있지 않다. 밸리데이션을 수행하는 기관에서 자

Table 2. Establishment of permissible criteria

항목	탄저균백신 ELISA 검증연구 (Pombo위, 2004)	탄저균백신 TNA 검증연구 (Hering위, 2003)	본연구의 설정기준
특이성	-	희석혈청의 예상 역가가 25%이내	희석혈청의 역가가 50이하는 비특이적
정밀성 플레이트내 플레이트간 시험간	%CV < 20 %CV < 20 %CV < 25	%CV < 25 %CV < 25 %CV < 25	%CV < 20 %CV < 20 %CV < 20
실험실간 정밀성 t-test	%CV < 30 -	%CV < 25 -	%CV < 20 p > 0.05
정확성	회수율 80~120%	희석혈청의 예상 흡광도가 25%이내	회수율 50~150%
직선성	-	희석혈청의 예상역가가 25% 이내	R ² > 0.99

협요소들을 제어하는 것이다. Table 2에서 볼 수 있듯이, 앞서 밸리데이션을 수행한 논문에서 설정한 허용치의 허용기준을 설정하고 그 기준을 유지하도록 실험기준보다 본 실험에서 설정한 허용기준이 더 엄격하며, 모든 항목에서 변동계수 20%를 넘기지 않는 결과는 아주 높은 신뢰도를 보이는 것으로 사료된다.

라. 특이성

치사요소를 플레이트에 코팅하고, 보호항원에 대한 항체역가가 충분히 높다고 생각되는 시료(S1, S2)를 이용하여 시험하였을 때, 모두 항체역가 50배를 넘지 않아 치사요소 항원과 항-보호항원 항체는 결합하지 않는다는 결과가 나왔다. 보호항원을 코팅한 플레이트를 사용하여 시험한 결과 예상대로 높은 역가를 확인할 수 있었다. 이 결과를 토대로 항-보호항원 ELISA는 보호항원에만 특이성을 나타내는 것을 알 수 있다.

마. 정확성

S1부터 S4까지 4개의 시료를 사용하여 3일간 3회 반복 측정된 결과는 Table 3과 같으며 회수율은 100.47~147.80%였으며, 허용기준 50~150%를 충족하였다. 그러므로 정확성은 우수하다고 판단 하였다.

Table 3. Results of accuracy

시료	희석배수 (배)	시험일	측정 역가	예상 역가	회수율
S1	100	1일	132108	-	-
		2일	130252	-	-
		3일	109528	-	-
S2	800	1일	16727	16514	101.23
		2일	17079	16282	104.89
		3일	14622	13691	106.80
S3	12800	1일	1037	1032	100.47
		2일	1197	1018	117.63
		3일	991	856	115.81
S4	204800	1일	77	65	119.36
		2일	94	64	147.80
		3일	77	53	143.98

바. 정밀성

1) 반복성

반복성은 플레이트내, 플레이트간, 시험간 정밀성 세 항목에 대하여 실시하였다. S1, S2, S3, S4 시료를 사용하여 3장의 플레이트에서 반복 실험한 결과를 Table 4와 Table 5에 나타 내었다. 플레이트 내 변동계수는 1.6~6.8%를 얻었고, 플레이트간 변동계수는 6.8~13.8%를 얻었으며, 모두 허용기준 20% 미만을 충족하였다. S1, S2, S3, S4 시료를 사용하여 3일간 3회 반복 측정하여 Table 6에 나타내었으며 시험간 변동계수 8.2~11.8%를 얻었고, 허용기준 20%미만을 충족하였다. 그러므로 플레이트내, 플레이트간, 및 시험간에서는 정밀성을 보여 주었다.

2) 실험실간 정밀성

동일한 시스템을 구축하고 있는 서로 다른 실험실에서 서로 다른 시험자가 S1부터 S4까지 4개의 시료를 사용하여 3일간 3회 반복시험 한 결과, 허용기준을 넘는 결과가 나왔다. 마이크로 플레이트 세척기의 세척정도의 차이에서 유래한 결과로 분석되어, 다른 실험실의 양성기준치를 0.25로 조정하여 비교분석한 결과 변동계수 0.1~10.9%를 얻어 Table 7에 나타난 것처럼 허용기준 20% 미만을 충족하였다. 그러므로 실험실간 정밀성은 우수하다고 판단되었다.

Table 4. Results of repeatability(Intra-plate)

Plate	시료	평균값	표준편차	CV(%)
1	S1	136811	7169.2	5.2
	S2	16792	499	3.0
	S3	1186	22.4	1.9
	S4	89	2.8	3.2
2	S1	137513	9368.4	6.8
	S2	18398	663.8	3.6
	S3	962	34.6	3.6
	S4	73	2.1	2.9
3	S1	121526	7172.1	5.9
	S2	14974	398.6	2.7
	S3	961	15.9	1.6
	S4	69	2.5	3.6

Table 5. Results of repeatability(Inter-plate)

시료	Plate1	Plate2	Plate3	평균	표준 편차	CV (%)
S1	136811	137513	121526	131950	9034.1	6.8
S2	16792	18398	14974	16721	1713.5	10.2
S3	1186	962	961	1036	129.8	12.5
S4	89	73	69	77	10.7	13.8

Table 6. Results of repeatability(Inter-assay)

시료	1일	2일	3일	평균	표준 편차	CV (%)
S1	131950	130167	109454	123857	12505.2	10.1
S2	16721	17076	14621	16139	1327.0	8.2
S3	1036	1195	990	1074	107.3	10.0
S4	77	94	77	83	9.8	11.8

Table 7. Results of precision(Inter-lab)

날짜	시료	Lab1	Lab2	평균	표준 편차	CV (%)
1일	S1	131950	119835	125892	8566.7	6.8
	S2	16721	15904	16313	577.4	3.5
	S3	1036	1090	1063	38.2	3.6
	S4	77	82	80	3.8	4.7
2일	S1	130167	115007	122587	10719.4	8.7
	S2	17076	15321	16198	1241.1	7.7
	S3	1195	1024	1110	120.6	10.9
	S4	94	81	87	9.3	10.7
3일	S1	109454	122979	116216	9563.4	8.2
	S2	14621	16751	15686	1505.9	9.6
	S3	990	1040	1015	35.4	3.5
	S4	77	77	77	0.1	0.1

실험실간 정밀성을 위한 분석법은 두 집단 평균을 비교하여 차이에 의미를 부여하는 분석으로 z-test와 t-test가 있다. 이 두 분석방법을 선택하는 기준은 모집

단 분산을 알 수 있는가의 여부와 표본크기에 의해 결정된다.

이 분석방법 중 z-test의 경우, 모집단의 분산을 알 수 있는 경우에 사용되지만, 일반적으로 모집단의 분산을 알 수 있는 경우는 극히 드물다.

그러나, 표본크기의 수에 따라 분석법을 선택하는 경우 표본크기가 30개 이상이면 모집단의 분산을 알 수 없더라도 z-test를 사용할 수 있으며, 사실상 이 경우에 t-test의 결과치도 z-test의 결과치에 접근한다. 표본크기가 30이하일 경우에는 표본집단의 정규분포를 가정하기가 어려워 t-test를 사용하여야만 한다.

한편 t-test는 독립된 두 개의 표본집단 간의 평균의 차이를 검증하는 분석방법이다. 비교집단이 3개이상이면 t-test를 사용할 수 없고 분산분석(ANOVA)을 사용하여야 한다. 본 시험에서 t-test 결과 S1에서 S4까지의 정밀성 결과 Table 8과 같으며 유의확률(p)은 모두 0.05이상 나와 각 집단의 95% 분포이내에서 두 집단 간 차이가 없음을 알 수 있다.

Table 8. T-test results of precision(Inter-lab)

시료	p(>0.05)
S1	0.148
S2	0.793
S3	0.578
S4	0.386

사. 직선성

S1부터 S4까지 4개의 시료를 사용하여 3일간 3회 반복 측정하였고, 각각의 시험에 대하여 1차곡선 회귀 분석을 실시하여 결정계수(R^2)>0.998을 얻어(Fig. 4), ELISA의 직선성은 1차 회귀모델로 설명하는 것이 적합함을 알 수 있었으며, 허용기준을 충족하였다.

아. 재밸리데이션(Revalidation)

의약품 제조방법, 분석절차 또는 시험자가 변경되었을 경우 분석법의 재밸리데이션을 수행하여야 한다. 재밸리데이션은 분석법의 특이성이 이전과 동일하게 유지되는지, 분석법이 품질특성인 확인, 강도, 순도, 역가) 보증할 수 있는지 확인하기 위하여 수행하여야 한다. 재밸리데이션은 변화정도에 따라 완전 또는 부분 밸리데이션을 수행할 수 있다.

지금까지 ELISA의 시험담당자가 한번 교체되어 규정에 따라 재 밸리데이션을 수행하였다. 한 가지 농도(1:1000)에서 재밸리데이션을 수행한 결과, 본 실험에서 정한 허용기준(<20%)을 넘지 않았기 때문에 분석법의 타당성을 증명할 수 있었다.

4. 결론

분석법 밸리데이션은 규제당국의 요청에 따른 GMP 절차로서의 중요성도 있지만, 의약품의 품질관리의 측면에서도 반드시 수행되어야 하는 절차이다.

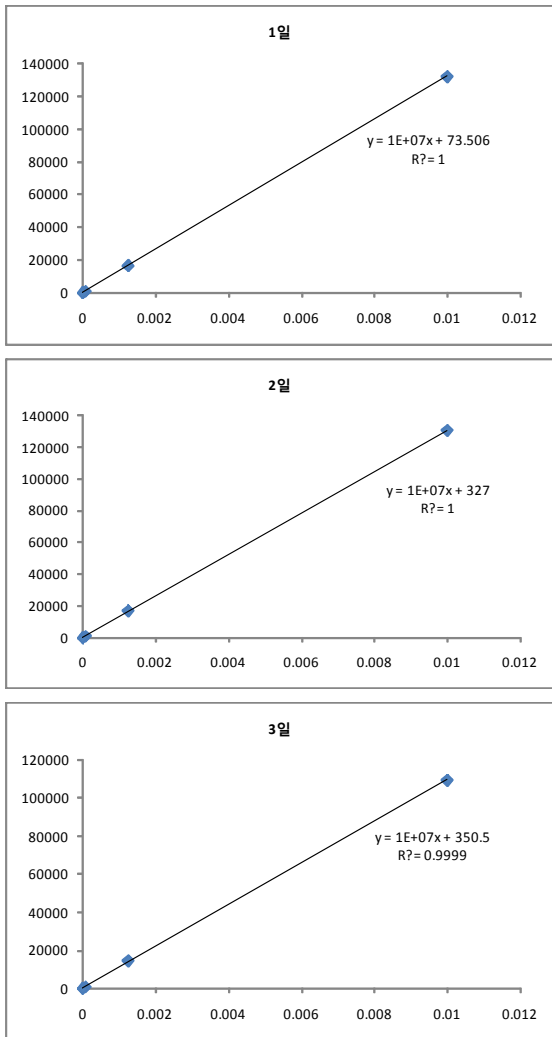


Fig. 4. Results of linearity

본 실험에서 검증한 분석법은 항-보호항원(PA) 효소면역검사법(ELISA)으로, 시료 내에 존재하는 항-보호항원 항체의 양을 측정하는 방법이다. 분석법 밸리데이션의 항목으로는 정밀도(반복성, 실험실간 정밀도), 특이성, 직선성, 검출한계(범위) 등이 있다. 정밀도 항목 중, 시험자간 정밀도는 실험실간 정밀도로 대체하였다.

생물분석법 밸리데이션은 화학분석법 밸리데이션과는 달리 정확한 가이드라인이 없는 실정이다. 밸리데이션을 수행하는 기관에서 한국식약청(KFDA)과 국제의약품조화회의(ICH)의 가이드라인에 따라 자체적으로 기준을 정하고 그 기준을 유지하도록 해야한다. 기준을 설정할 때, 분석법의 특성을 고려하여 기준 항목의 수와 각 기준의 척도를 정하는 것이다. 본 시험에서 검증한 분석법은 ELISA 중에서도 데이터의 변동정도가 큰 순차적 희석방법(Serial dilution)이다. 특정 농도를 계산하여 일정한 양을 희석하는 방법(Spiking)과는 달리 1/2씩 순차적으로 희석하기 때문에 그 정확도는 떨어질 수 밖에 없다. 이러한 이유로, 이번 밸리데이션 시험결과에서 높은 농도(S1~S3)에서는 회수율이 좋았으나(120%이내), 가장 낮은 농도(S4)에서는 회수율이 떨어지는 것(150%이내)으로 보인다. 또한, 항체와 항원 사이의 결합을 정의하는 정량적인 척도가 없기 때문에, 분석시료 원액을 기준으로 모든 결과값을 정의해야만 한다.

Table 9. Summary of validation

항목	허용기준	결과
특이성	희석혈청역가 <50는 비특이성	LF 역가<50 PA 역가>50
정밀성(반복성)		
Intra-plate	CV(%) < 20	CV(%) 1.6~8.8
Inter-plate	CV(%) < 20	CV(%) 6.8~13.8
Inter-assay	CV(%) < 20	CV(%) 8.2~11.8
실험실간 정밀성		
Inter-lab	CV(%) < 20	CV(%) 0.1~10.9
정확성	회수율 50~150%	회수율 100.47~147.8%
직선성	R ² > 0.99	R ² > 0.99
검출한계(범위)	항체역가 50 ~ 102400	

항-보호항원 효소면역검사법은 밸리데이션을 수행하기에 어려움이 많은 분석법이지만, 본시험에서 밸리데이션을 수행한 결과를 종합하여 Table 9와 같이 나타 내었으며 모든 항목에서 CV20% 이내의 높은 정밀도를 나타내어 시료 내 항-보호항원 항체가를 측정하는데 우수한 시험법임을 입증하였다. 그래서 생물평가실에서 항체역가를 측정하기위한 가이드라인으로 효소면역법을 사용하여도 문제가 없을 것으로 사료된다.

Reference

- [1] “의약품등 분석법의 밸리데이션에 대한 가이드라인”, 식품의약품안전청 의약품평가부, 2004.
- [2] ICH Guidance for Industry; Validation of Analytical Procedures: Methodology. Nov., 1996.
- [3] Hering, D., Thompson, W., Hewetson, J., Little, S., Norris, S. and Pace-Tempeton, J. “Validation of the Anthrax Lethal Toxin Neutralization Assay”, Biologicals., Vol. 32, pp. 17~27, 2004.
- [4] Pombo, M., Berthold, I., Gingrich, E., Jaramillo, M., Leef, M., Sirota., L, Hsu, H. and Arciniega, J. “Validation of an anti-PA ELISA for the Potency Testing of Anthrax Vaccine in Mice”, Biologicals, Vol. 32, pp. 157~163, 2001.
- [5] 경천수, “Method Validation Methodology and Case Study for Biologics”, 생물산업기술실용화센터 보고서, 한국생산기술연구원 생물산업기술실용화센터, 2005.