

행정간행물 등록번호

11-1471057-000187-01

가이드라인 관리번호

B1-2016-3-008

# 정제백일해 백신 품질관리 가이드라인

(Guideline on quality management of acellular pertussis vaccines)

2016. 9.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

바이오생약심사부 생물제제과

이 가이드라인은 정제 백신해 백신의 품질관리에 대한 식품의약품안전처의 입장을 기술한 것으로, 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아님

※ 가이드라인이란 대외적으로 특정한 사안 등에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술한 것임 [식품의약품안전처 지침 등의 관리에 관한 규정 (식약처 예규)]

※ 본 가이드라인에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전평가원 바이오생약심사부 생물제제과로 문의하시기 바랍니다.

전화번호: 043-719-3478

팩스번호: 043-719-3450

## <목 차>

1. 서론 .....	1
2. 적용 범위 .....	2
3. 일반사항 .....	3
4. 표준품 .....	5
4.1. 국제 표준품 .....	5
4.2. 국가표준품 .....	7
5. 용어 및 약어 .....	8
5.1 용어 .....	8
5.2 약어 .....	9
 A. 제조 관련 권고 사항 .....	 11
A.1 정의 .....	11
A.2 제조 관련 공통 권고 사항 .....	12
A.3 생산 관리 .....	12
A.4 충전 및 용기 .....	25
A.5 완제의약품의 관리 .....	26
A.6 기록서 .....	28
A.7 검체 .....	28
A.8 표시 기준 .....	28
A.9 유통 및 운송 .....	29
A.10 안정성, 보관, 유효일자 .....	29
 B. 정제 백일해 백신의 비임상 평가 .....	 32
B.1 백일해 항원 및 반제품의 비임상 특성 분석과 시험 .....	33
B.2 최종 백신 제제의 비임상 특성 분석 및 시험 .....	37

<b>C. 정제 백일해 백신의 임상 평가</b>	38
C.1 임상 시험을 위한 일반적인 고려 사항	41
C.2 면역 반응 평가	44
C.3 안전성 평가	51
C.4 의약품 위해성 관리계획	52
C.5 시판후 시험과 조사	52
<b>D. 정제 백일해 백신의 품질시험</b>	53
D.1 확인시험	53
D.2 무균시험	54
D.3 역가시험	54
D.4 엔도톡신시험	56
D.5 이상독성부정시험	57
D.6 정제백일해 무독화시험	58
D.7 면역보조제 함량시험	59
D.8 보존제 함량시험	60
D.9 잔류 무독화제 함량시험	61
D.10 pH 측정시험	61
D.11 실용량시험	62
<b>E. 정제백일해 백신에 대한 동물대체시험법</b>	62
E.1 백일해 역가시험 동물대체시험	62
E.2 백일해 히스타민 동물대체시험	63
<b>F. 정제백일해 백신 품질관리 통계처리방법</b>	67
F.1 평행선 검정법	68
F.2 회귀분석법	68
F.3 50% 유효량(CED50, LD50등) 의 추정	69
F.4 Bioassay Assist	70

참고문헌 .....	79
------------	----

## 첨 부

Appendix 1. 마우스 뇌내 공격법 (Modified intracerebral challenge assay) .....	88
Appendix 2. 체온 측정을 이용한 히스타민 민감성 시험 (Histamine sensitization test by temperature measurement) .....	89
Appendix 3. Lethal end-point (사망 종말점) 법을 이용한 히스타민 민감성 시험 (Histamine sensitization test by lethal end-point assay) .....	90
Appendix 4. 마우스 면역원성 시험 (Mouse immunogenicity test) .....	92
Appendix 5 호흡 챌린지 시험법 (Respiratory challenge) .....	96
Appendix 6 Enzyme-coupled HPLC 방법 .....	100
Appendix 7 Fetuin binding assay 방법 .....	111
Appendix 8 Modified CHO Cell-based Assay .....	116
Appendix 9. Bioassay Assist program(version.3.0.0)을 사용한 통계분석 방법 예시 ...	121
Appendix 10 정제백일해 백신의 제조 및 시험을 위한 Summary protocol .....	129
Appendix 11 정제백일해 백신 출하를 위한 국가규제기간의 보증서 모델 .....	152

## 1. 서론

백일해는 주로 영유아에게 발병하여 2주 이상 발작적 기침을 특징으로 하는 급성 호흡기 질환으로 백일해균(*Bordetellapertussis*)이 원인균이다. 그람음성의 짧은 호기성 간균으로 협막이 있고 아포를 형성하지 않는 특징을 지닌 백일해균은 1906년 Bordet 박사와 Gengou 박사에 의해 환자의 가래침에서 처음 분리되었다. 균이다. 백일해균은 주로 호흡기를 통하여 감염되며 호흡기관 점막에 서식하여 질환을 야기시킨다.

백일해로 인하여 2001년 전 세계적으로 285,000명이 사망하였다. 1930년대 전 세포 백일해 백신이 개발되어 백일해 예방 효과가 증명되었고, 1940년대 파상풍 및 디프테리아 독소이드 불활화 사백신과 혼합하여 전세계적으로 널리 사용되어 세계 각국의 백일해 질병 관리에 있어 토대 역할을 해왔다. 그러나 전세포 백일해 백신의 부작용(지속적인 발열, 발적 및 부종, 경련, 뇌증 등)이 보고되면서 안전성이 있으면서 효율적인 백신의 개발이 요구 되었다. 이에 1950년대 후반부터 백일해의 병인성 기전과 발현 항원에 관한 연구가 점진적으로 진행되었고 pertussis toxin (PT), filamentous hemagglutinin (FHA), pertactin (PRN; 69 kDa 단백질), fimbriae (FIM)등과 같은 구성 성분이 방어항원으로서 밝혀지면서 이들을 분리, 정제한 백일해 백신 개발이 촉진되었다. 최초의 정제 백일해 백신은 1980 년대에 일본에서 개발되어 사용되었다. 이 백신 제품을 예방 접종에 사용한 결과, 백일해가 효과적으로 통제되었음이 역학 조사에서 밝혀졌다.

백일해 예방 접종은 각 나라별 국가면역프로그램으로 관리되어 모든 유아와 소아의 백일해 예방접종이 권장되고 있으며, 일부 국가에서는 성인과 청소년도 백신접종이 권장된다. 전세포 백일해 백신(whole-cell pertussis vaccine)이 사용되어 백일해 예방 효과가 증명되었고, 세계 각국의 백일해 질병 관리에 있어서 토

대 역할을 해왔으나, 부작용 등의 이유로 1980년대 이후부터 정제 백일해 백신 (acellular pertussis vaccine)으로 대체하여 많은 국가에서 예방 접종 프로그램에 포함시켜 운영하고 있다. 국내에서는 1954년 디프테리아, 파상풍 및 백일해가 정기 예방접종 대상질환으로 지정되어 1958년 전세포 백일해백신의 접종이 시작되었고, 1984년 정제 백일해 백신이 허가 후 대체 사용되어 왔다.

정제 백일해 백신에 대한 수요 증가로 인해, 새로운 제조업체가 이 분야에 진출하고 있다. 정제 백일해 백신의 수가 늘어나고 사용이 증가하며, 새로운 백신이 개발되고 품질관리 방법의 표준화가 추진됨에 따라, 정제 백일해 백신에 대한 가이드라인 문서를 제정하게 되었다.

## 2. 적용 범위

이 문서는 정제 백일해 백신에 적용된다. 백일해균에 의해 생산된 항원만을 대상으로 한다.

본 문서는 정제 백일해 백신의 생산 및 품질관리에 적용되지만, 정제 백일해 성분은 흔히 디프테리아와 파상풍 독소이드, *Haemophilus influenzae* B형 접합 백신, 불활화 소아마비 백신 그리고 B형 간염 백신 등과 결합하여 사용한다. 그러므로, 정제 백일해 백신의 최종 원액이나 최종 제품에 대해 권장되는 시험을 정제 백일해 성분을 함유한 혼합 백신의 최종 원액이나 최종 제품을 상대로 실시한다.

본 문서는 정제 백일해 백신의 개발, 제조, 시험 분야의 기술 발전에 중점을 두고, 다음 사항에 대한 가이드라인 제공을 목적으로 한다.

- 새로운 정보와 경험을 기반으로 한 기존 백신의 품질관리 개선
- 제조 관리를 통한 새로운 제품 개발 및 품질 평가
- 비임상 및 임상 시험 시의 백신 평가

### 3. 일반사항

정제 백일해 백신이나 정제 백일해 성분을 함유한 혼합 백신의 생산 및 시험에 관한 세부 절차나 표준문서(SOP, Standard Operating Procedures) 그리고 각 생산 단계에서의 품질 관리 시험의 밸리데이션에 관한 증거 자료를 허가 신청 문서에 포함시켜 식약처에 제출하고 승인을 받아야 한다. 제조 또는 품질 관리 방법을 변경하고자 할 때에도 기준에 따라 변경 신청서를 식약처에 제출하고 승인을 받아야 한다.

현재까지는 정제 백일해 백신의 이상적인 항원 구성에 대해 합의가 이루어지지 않았다. 현재는 구성 성분의 수와 농도, 면역 보조제의 종류, 면역 보조제 흡착 정도, thiomersal 등의 방부제 사용여부 등이 각기 다른 다양한 정제 백일해 백신 제품이 나와 있으며, 각 제품은 다양한 백일해균주에서 유래한 항원을 서로 다른 방법으로 정제하고 서로 다른 물질을 사용해 무독화 처리하여 생산된다. 현재 시판되고 있는 모든 정제 백일해 백신 제품은 무독화 된 독소(톡소이드)를 함유하고 있으며, 백일해 독소이드만으로 만든 일부 백신 제품도 상당한 수준의 방어 효과가 있는 것으로 밝혀졌다. 그러나 임상시험 등에서 PT의 방어 효과가 다른 항원 성분에 의해 개선 될 수 있는 것으로 나타났다. 따라서 방어 메커니즘을 파악하고, 방어 효과의 면역학적 마커를 찾아내며, 관련 시험 모델을 개발하고 개선하기 위한 연구가 필요하다. 이와 더불어, 모든 정제 백일해 백신



이 다소 복잡한 혼합 백신 형태로 투여되므로, 여러 성분(예, 디프테리아와 파상풍 독소이드)을 함께 시험할 수 있는 모델에 대한 연구도 필요하다.

제조업체는 제조 및 조성의 일관성을 증명하고, 제품 허가를 받기 위한 임상 시험에 사용했던 백신 로트의 제조 방법을 엄격하게 준수해야 한다. 또한 임상 시험에서 평가했던 로트와 비교해, 새로운 백신 로트의 안전성, 역가, 이화학적/면역학적 특성이 일관됨을 시험을 통해 증명할 수 있어야 한다. 생산 로트의 일관성 확인을 위한 시험 절차의 밸리데이션(특이성, 민감성, 정확성 등)에도 특히 주의를 기울여야 하며, 적절한 안정성을 갖춘 표준품(참조 백신)을 충분히 확보하여, 자체 시험과 국가규제기관의 확증 시험에 활용할 수 있어야 한다.

자체 표준품을 사용하는 경우에는 값을 부여하여 경향을 분석하고 품질 관리 시험 기준을 규정한다. 국제 표준품이 있으면, 국제 표준품에 자체 표준품을 대조하여 자체 표준품을 교정한다.

새로 개발한 정제 백일해 백신이 적절한 안정성과 유효성을 갖추고 있는지 완벽하게 보증할 수 있는 시험방법, 동물 모델, 인체 면역 반응은 없다. 이와 같은 한계를 고려하여, 이 문서는 포괄적인 비임상 시험 프로그램으로 시작하여 임상 평가까지, 뒷받침 되는 정보 수집의 순차적인 방법을 설명한다.

이 문서에서 새로 개발한 백신이라 함은, 새로운 균주나 새로운 공정을 이용하여 생산하거나 새로운 제조업체가 생산한, 기 허가 제품의 항원 가운데 하나(즉, PTxd, FHA, PRN, FIM 2형, FIM 3형) 또는 새로운 항원을 함유하는 백신 제품을 의미한다. 실험실 상의 시험과 검사 만으로는 새로 개발한 정제 백일해 백신의 안전성과 유효성을 보증할 수 없으므로 비임상 시험을 실시 하여야 한다. 정제 백일해 백신의 비임상 평가에서 설명하는 바와 같이, 비임상 특성 분석 시험 시에는 순도, 잔류 독소 활성, 생물 활성, 특정 항체와의 반응성, 항체 결합

유도, 동물 모델에서 방어 활성 유도 등을 평가해야 한다. 또한 항원을 추가할 때마다, 다른 성분과의 상호 작용 가능성을 평가하는 시험을 실시하여야 하며, 추가된 항원이 새로운 항원이라면 보다 광범위한 특성 분석 시험이 필요하다. 이 문서에서는 이미 광범위한 비임상 시험을 거친 백신을 임상 평가에 사용하고 비임상 정보의 적절성을 평가하는 국가규제기관의 승인을 받아 임상 시험을 실시한다고 가정한다. 유효성 시험이 어려워 보이더라도, 적절한 디자인과 규모로 안전성과 면역원성 평가 시험을 실시하여야 한다. 정제 백일해 백신의 임상 평가에서는 임상 시험의 설계 및 평가와 관련된 가이드라인을 정리한다. 대부분의 임상시험은 비교 시험으로 진행되며 적절한 임상시험을 위해서는 대조 백신 선택이 특히 중요하며, 대조 백신은 새로운 정제 백일해 백신과 성분, 조성, 함량 등이 유사한 백신을 선택하여야 한다. 마지막으로 임상 평가 도구가 제한적이며, 허가 이전의 시험에서 확보되는 데이터가 제한 적이므로 적합한 수준의 임상 안전성 및 유효성을 달성하는지 확인하기 위해서는 시판 후 모니터링을 철저하게 추진할 필요가 있다.

서로 다른 백신의 유효성을 비교하는 것은 다소 어려움이 있다. 임상시험을 여러가지 디자인으로 실시 할 수 있고, 각 시험의 디자인에 따라 유효성의 결과가 다르게 나타날 수 있기 때문이다. 그러므로 이 문서에서 새로운 정제 백일해 백신의 승인 절차를 설명하고 있지만, 새로운 정제 백일해 백신의 승인을 위해서는 상당한 노력이 요구된다.

## **4. 표준품**

### **4.1. 국제 표준품**

다음의 WHO 국제표준품을 시험이나 임상 평가에 사용할 수 있다. 최신 WHO

국제 표준품에 대한 정보는 WHO 국제 생물학적 표준품 카탈로그를 참조한다  
(<http://www.who.int/bloodproducts/catalogue/en/index.html>).

주요 표준품은 다음과 같다.

- 정제 백일해 백신의 MICA(modified mouse intracerebral challenge assay)와 기타 보호 효과 분석 시험에 사용할 1차 WHO 국제 표준품(관리 번호 JN1H 3, 앰플 당 34 IU)
- 백일해 백신의 잔류 PT 활성 모니터를 위한 시험 방법의 표준화를 위한 백일해 독소의 1차 WHO 국제 표준품(예, 히스타민 감작 시험, CHO(Chinese hamster ovary) 세포 시험)(관리 번호 JN1H 5, 앰플 당 10,000 IU)
- 백일해 항혈청(사람)의 1차 WHO 국제 표준품(관리 번호 06/140, 앰플 당 335 IU anti-PT IgG와 65 IU IgA anti-PT, 130 IU IgG anti-FHA와 65 IU IgA anti-FHA, 65 IU IgG anti-69K와 42 IU IgA anti-69K)
- 임상 혈청학적 분석법 표준화를 위한 1차 WHO 국제 참조 시약(관리 번호 06/142, 앰플 당 106 IU anti-PT IgG와 18 IU IgA anti-PT, 122 IU IgG anti-FHA와 86 IU IgA anti-FHA, 39 IU IgG anti-69K와 38 IU IgA anti-69K)
- *B.pertussis*균주 혈청형 분석을 위한 *B. pertussis* fimbriae 2형 단클론 항체의 1차 WHO 국제 표준품(관리 번호 06/124)
- *B.pertussis*균주 혈청형 분석을 위한 *B. pertussis* fimbriae 3형 단클론 항체의 1차 WHO 국제 표준품(관리 번호 06/128)
- 백일해 항혈청(마우스)의 1차 WHO 국제 표준시약(관리 번호 97/642, 바이알 당 17 units anti-PT, 143 units anti-FHA, 30 units anti-PRN. 32 units anti-FIM 2 and 3)

WHO 국제 표준품 , 그리고 기타 시약은 영국 NIBSC(National Institute for Biological Standards and Control, Medicines and Healthcare products Regulatory

Agency , Potters Bar, England, <http://www.nibsc.ac.uk>)가 관리한다.

이와 같은 표준 물질을 지역, 국가, 자체 표준 물질 교정 및 확립에 이용할 수 있다.

## 4.2. 국가표준품

우리 처는 1998년에 소마트로핀 국가표준품을 최초로 확립한 후 2011년부터 매년 국가표준품을 확립해오고 있다. 현재 31종이 확립되어 연구소, 의약품 제조소 등에 분양되고 있다. 표준품에 대한 자세한 사항은 식품의약품안전처 홈페이지(<http://www.mfds.go.kr> > 정보자료 > 분야별 정보 > 의약품 > 표준품 > 생물의약품)을 참조하면 된다.

백일해 백신과 관련해서는 무독화시험, 확인시험(3종) 등 총 15년 현재 5종의 표준품이 확립되어 있다.

표. 백일해 백신관련 국가표준품 목록

코드 (code)	품명 (Name of Reference)	용도 (Purpose)	규격 (Specification)	보관온도 (Storage Temp.)
02/005	백일해백신 (Bordetella Pertussis Vaccine)	역가시험 (Potency assay)	112 units/vial	-70 ℃
06/016	백일해백신 (Bordetella Pertussis Vaccine)	무독화시험 (Specific toxicity test)	122.2 BWDU/mL 1.98 LPU/mL 3.20 HSU/mL	4 ℃
07/019	백일해 항원 항혈청 (Bordetella Pertussis FHA Aantiserum)	확인시험 (Identification test)	Bordetella Pertussis FHA Aantiserum	-20 ℃
07/020	백일해 항원 항혈청 (Bordetella Pertussis PT Antiserum)	확인시험 (Identification test)	Bordetella Pertussis PT Antiserum	-20 ℃
07/021	백일해 항원 항혈청 (Bordetella Pertussis Antiserum)	확인시험 (Identification test)	Anti-PT, Anti-FHA, Anti-PRN, Anti-FIM	-20 ℃

## 5. 용어 및 약어

### 5.1 용어

아래의 용어 정의를 이 문서에 적용한다. 다른 곳에서는 다른 의미로 사용될 수 있다.

**마스터 시드 로트(Master seed lot, MSL):** 단일 균주에서 유래하며 하나의 로트로 제조하여 균일한 조성을 갖는 세균 현탁액. 제조용 시드 로트 제조에 사용된다.

**제조용 시드 로트(Working seed lot, WSL):** MSL에서 유래한 단일 아균주(substrain)의 세균 현탁액으로, 미생물을 배양하고 소분하여 동결 상태나 동결 건조 상태로 만들어  $-20^{\circ}\text{C}$  이하에서 보관한다(액체 상태는  $-80^{\circ}\text{C}$  이하에서 보관). MSL을 최소의 계대 배양을 거쳐 WSL을 만든다. MSL과 동일한 특성을 갖춰야 하며, 배지에 접종하여 단가원액을 확보하는 용도로 사용된다.

**단가원액(Single harvest):** WSL(또는 WSL에서 유래한 접종물)을 접종하고 수득하여 처리한 것으로, 배양액 한 배치에서 확보한 배양 여과물 또는 세균 현탁액을 의미한다.

**정제 항원 원액(Purified antigen(s) bulk material):** 단일 작업으로 만들거나 여러 작업으로 만든 것을 혼합하여 확보한 백일해 항원으로 조제한 정제 물질. 정제 항원 원액을 면역 보조제에 흡착시키거나 면역 보조제와 혼합하기도 하며, 보존제를 추가하기도 한다. 최종 원액을 제조하는데 사용된다.

**최종 원액(Final bulk):** 단일 용기에 제조된 균질한 최종 백신으로, 하나 이상의 중간 용기를 통하거나 직접 최종 용기에 충전한다.

**완제의약품(Final lot or final product):** 밀봉 상태인 최종 용기 집단. 충전 시의 오염 리스크가 균질한 상태이다. 그러므로 최종 로트를 한 번의 연속적인 작업으로 단일 용기에서 충전해 만들어야 한다.

**개별 정제 항원(Individually purified antigen):** 백일해 항원 각각을 의미하며, 여러 가지 물리화학적 분리 방법을 조합하여 개별적으로 분리하고 정제한다.

**동시 정제 항원(Co-purified antigen):** 여러 가지 물리화학적 분리 방법(예, 황산암모늄 침전, 밀도 구배 원심분리)을 조합하여 분리하고 정제한 2개 이상의 백일해 항원.

**대조 백신(Comparator vaccine):** 유효성이 확립된 기허가 백신이나 유효성이 확립된 백신과 추적성이 확보된 백신으로 실험 백신과 병행하여 시험하고 비임상 또는 임상 시험에서 활성 대조로 사용된다.

## 5.2 약어

아데닐산 고리화효소	AC	Adenylate cyclase
집락형성단위	CFU	Colony-forming units
중국 햄스터 난소 세포	CHO cell	Chinese hamster ovary cell
세포 매개성 면역반응	CMI	Cell-mediated immune response
디프테리아, 파상풍, 정제 백일해 혼합백신	DTaP	Diphtheria, Tetanus, acellular pertussis vaccine
디프테리아, 파상풍, 전세포	DTwP	Diphtheria, Tetanus, whole cell pertussis

백일해 혼합백신		vaccine
50% 유효량	ED <sub>50</sub>	50% Effective dose
유럽의약품품질위원회	EDQM	The European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare
효소면역측정법	ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
섬유질 헤마글루티닌	FHA	Filamentous haemagglutinin
펄브리아	FIM	Fimbriae
임상시험관리기준	GCP	Good Clinical Practice
기하평균농도	GMC	Geometric Mean Concentration
의약품 제조 품질관리 기준	GMP	Good Manufacturing Practice
기하평균단위	GMU	Geometric mean ELISA units
히스타민 민감성 시험	HIST	Mouse Histamine Sensitisation Test
고성능-액체크로마토그래피	HPLC	High-performance liquid chromatography
호흡 챌린지 시험법	INCA	Intranasal challenge assay
불활화 폴리오 백신	IPV	Inactivated polio vaccine
투구게 변형세포 용해물	LAL	Limulus amoebocyte lysate
반수치사량	LD <sub>50</sub>	Dose lethal for 50% of the animals
리포올리고당류	LOS	Lipooligosaccharide
마우스 치사 기반 시험	MICA	Modified mouse intracerebral challenge assay
마우스뇌내공격법	MICA	Modified mouse intracerebral challenge assay
마우스 면역원성 시험	MIT	Mouse immunogenicity test
영국표준의약품연구소	NIBSC	National Institute for Biological Standards and Control
퍼탁틴	PRN	Pertactin
백일해 독소	PT	Pertussis toxin
백일해 독소이드	PTxd	Pertussis toxoid
누적분포	RCD	Reverse cumulative distribution
도데실황산나트륨 폴리아크릴아마이드겔 전기영동법	SDS-P AGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

표준문서	SOP	Standard Operating Procedure
단일방사면역확산	SRID	Single radial immunodiffusion
기관세포독소	TCT	Tracheal cytotoxin
전염성 해면양뇌증	TSE	Transmissible spongiform encephalopathies

## A. 제조 관련 권고 사항

### A.1 정의

#### A.1.1 국제 명칭 및 고유 명칭

국제 명칭은 정제 백일해 백신(acellular pertussis vaccine)이다. 고유 명칭은 원산지 국가의 언어로 국제 명칭과 동등하게 설정한다.

아래의 권고 사항을 만족하는 백신에만 국제 명칭을 사용할 수 있다.

#### A.1.2 서술적 정의

정제 백일해 백신은 *Bordetella pertussis*의 정제 또는 정제 항원 성분을 함유한 제제로, 화학적 수단으로 적절하게 처리하거나 유전적 조작으로 확보하여 독성을 최소화하고 역가를 유지할 수 있게 만든 것이다. 사람에게 투여하기 위한 제제는 아래의 권고 사항을 모두 충족해야 한다.

현재 허가 받은 백신은 PTxd만 함유하거나 하나 이상의 다른 항원(FHA, PRN, FIM(fimbriae)-2, FIM-3)과 PTxd를 같이 함유한다.



## A.2 제조 관련 공통 권고 사항

의약품 GMP와 생물학적제제 GMP에 규정된 제조 기준을 정제 백일해 백신 생산에 적용한다.

## A.3 생산 관리

이 문서는 *B. pertussis* 유래 항원의 생산과 정제에 관한 것이다.

### A.3.1 기원 물질 관리

#### A.3.1.1 *Bordetella pertussis* 균주

기원과 분리 시의 특성을 포함해 백신 제조에 사용되는 *B. pertussis* 균주의 이력에 대한 기록과 균주 특성 확인을 위해 주기적으로 실시하는 모든 시험에 관한 기록이 있어야 한다. 유전자 변형 *B. pertussis*를 사용한다면, 관련 변형 DNA 서열을 모두 명확히 규정하고 충분하게 특성 평가를 실시한다. 사용하는 *B. pertussis* 균주를 국가규제기관이 승인한다.

#### A.3.1.2 시드 로트 시스템

1가 백신이나 혼합 백신의 정제 백일해 성분 생산을 위해서는, 시드 로트 시스템을 적절하게 확립해야 한다. 제조용 시드 로트(WSL)의 배양액은 마스터 시드 로트(MSL)의 배양액과 동일한 특성을 구비해야 한다. 유전자 변형 *B. pertussis* 균주를 사용한다면, 신규 WSL 각각에 대하여 관련 변형 DNA 서열을 다시 확인한다. 국가규제기관이 승인한 방법으로 균주를 관리하며, 항원의 품질

측면에서 유효한 백신을 생산할 수 있게 시드를 보관한다.

동결 건조 상태로 보관하거나 액체 질소를 이용해 보관하는 방법이 바람직하며, 적합하게 밸리데이션을 실시한다. 일부 국가에서는 글리세롤을 이용한 보관 방법도 사용하는데, 이 방법을 채택한다면 밸리데이션을 철저하게 실시하고 국가규제기관의 승인을 받아야 할 것이다.

### A.3.1.3 배양 배지

배양 배지는 *B. pertussis*의 증식에 적합하고 관련 항원을 일정 수율로 생산할 수 있어야 한다. 배지에는 외래성 인자가 없어야 한다. 또한 알레르기 반응을 유발하는 것으로 알려진 배지 성분을 피한다. 사람 혈액이나 혈액 제품을 시드 로트나 백신 생산을 위한 배양 배지에 사용하지 않는다. 배양 배지에 사용하는 소, 양, 염소 유래 성분의 공급처가 적합함을 국가규제기관이 승인한다.

동물 유래 물질을 시드 제조나 보존, 또는 생산에 사용한다면, 이들 물질은 WHO의 “생물학적제제와 의약품 관련 TSE 가이드라인(guidelines on transmissible spongiform encephalopathies in relation to biological and pharmaceutical products)”과 국가 규제 기준에 부합해야 한다. 동물 혈액이나 혈액 제품을 사용한다면, 생산 과정에서 적절한 방법으로 제거한다.

배지 변경 시에는 국가규제기관의 승인을 받아야 한다.

## A.3.2 제조 공정 관리

### A.3.2.1 생산 배양액 관리

생산 배양액(Production culture)은 증식 속도, pH 변화 속도, 목표 항원 생산 속도, 그리고 국가규제기관과 합의하여 정한 기타 변수의 일관성을 보여야 한다. 허용 규격을 확립하며, 이에 대해 국가규제기관의 승인을 받는다.

### A.3.2.2 세균 순도 관리

배양액에서 검체를 채취하여 미생물 순도 시험을 실시한다. 검체를 도말하고 염색하여 현미경으로 관찰하거나 적절한 배양 배지에 접종하여 배양하거나 기타 적합한 방법으로 미생물 순도 시험을 실시한다. 현미경으로 검사할 때는 고배율로 여러 부분을 검사한다. 오염 미생물이 발견되면, 해당 배양액과 그 배양액에서 유래한 제품을 폐기한다.

2개의 승인 받은 적합한 방법으로 각 배양액의 미생물 순도 시험을 실시하기도 한다.

### A.3.2.3 항원 정제 관리

LOS(lipooligosaccharide), 피부 괴사성 독소, ACT(adenylate cyclase toxin), TCT(tracheal cytotoxin) 같은 바람직하지 않은 분자에 의한 오염을 최소화하는 방식으로, 항원을 정제한다. *B.pertussis* 세포를 여과나 원심 분리 방법으로 발효액에서 분리하고, 적합한 방법으로 불활화시킨 다음에 공정을 진행하거나 처리한다. 이 단계에서 국가규제기관이 승인한 방법을 이용해, 공정 반제품에 *B. pertussis* 세포가 없음을 확인한다.

백신 제조에 사용할 백일해 항원 정제 방법이 2가지 있다. 첫 번째 방법은 황산암모늄 침전과 밀도 구배 원심분리 방법을 반복하여 항원을 동시 정제해, 특정 단백질(주로 PT, FHA, PRN)이 많고 엔도톡신(LOS)이 없는 반제품을 생산하는 것이다. 이때 공정의 특성에 따라 항원의 수와 비율이 제품마다 다양할 수 있다. 하지만 제품마다 재현성이 있어야 한다. 두 번째 방법은 여러 가지 물리화학적 분리 방법을 조합하여 각 항원을 개별적으로 정제하는 것이다.

수율과 순도의 일관성을 확인하는 시험 방법과 이 시험 방법의 성능 특성을 국가규제기관이 승인한다.

멤브레인 여과 또는 다른 적합한 제균 여과 방법으로 정제 항원을 멸균 처리하

고 나서, 다음 공정을 진행하는 것이 바람직하다.

#### A.3.2.3.1 무독화/화학적 처리 이전의 시험

**항원 특성 평가:** 항원의 원래 특성을 변화시킬 수 있는 공정 단계를 진행하기 전에, 이화학적/면역학적/기능적(생물학적) 분석 방법으로 항원의 특성을 철저하게 평가하는 것이 중요하다. 서로 다른 원리의 다양한 분석 기법을 활용하도록 특히 주의를 기울인다. 특이적 단클론 또는 다클론 항체를 이용한 면역블로트 (immunoblot) 분석 방법을 이용하여 항원이나 항원 아단위(subunit)의 특성을 평가할 수 있다. 각 항원 성분의 특정 특성을 참조 물질과 비교하여 분석한다. 항원별로 규격을 설정한다. 적합한 분석 방법으로는 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis), SRID(single radial immunodiffusion), 면역블로팅, CHO 세포를 이용한 활성 PT 검출 시험, 혈구 응집 반응 시험, HPLC(high-performance liquid chromatography) 등이 있다. PT의 비활성(IU/ng)을 분석한다.

**항원 순도:** 백신의 유효성에 기여한다고 주장하는 개별 항원이나 동시 정제 항원의 순도를 SDS-PAGE, HPLC 또는 다른 적절한 방법으로 분석한 다음에 무독화를 진행한다. 가능하면 백신 성분의 다양한 특징을 감안하여 분석 기법을 선정한다. 검출된 모든 불순물에 대한 기준을 설정한다.

개별 항원 또는 동시 정제 항원의 순도는 임상 시험에서 안전성과 유효성이 입증된 백신 로트나 허가 신청과 관련된 다른 로트의 결과를 토대로 제품별로 설정한 기준 범위 이내여야 한다. 제품 개발 및 밸리데이션 과정에서 규격을 설정하고, 국가규제기관과 합의하여 확립한다.

**잔류 엔도톡신:** LAL(Limulus amoebocyte lysate) 시험법이나 기타 적절한 방법으로 잔류 엔도톡신 함량 시험을 실시한다. 이 시험을 뒷 단계에서 실시할 수도

있다. 엔도톡신 함량은 임상 시험에서 안전성과 유효성이 입증된 백신 로트나 허가 신청과 관련된 다른 로트의 결과와 일관성이 있어야 한다. 국가규제기관과 합의하여 규격을 설정한다.

**항원 함량:** 이 단계에서 필요하다면, 단백질 함량 시험 방법과 가능한 경우에는 적합한 정량적 면역분석 방법 등 충분한 민감성을 갖춘 밸리데이션된 정량 분석 방법으로 정제 항원 각각의 양을 추정한다. ELISA 방법으로 항원 함량 시험을 실시하고, CHO 세포 방법으로 활성 PT 함량 시험을 실시할 수 있다.

2개 이상의 항원이 동시에 정제되는 경우에는, 백신 유효성에 기여한다고 주장하는 각 항원의 비율을 적합한 방법(예, SDS-PAGE, HPLC, 비변성 젤을 이용한 전기영동, 밀도 검사 방법)으로 분석해야 하며, 그 결과는 임상 시험에서 안전성과 유효성이 입증된 백신 로트나 허가 신청과 관련된 다른 로트의 결과 범위 이내여야 한다. 밸리데이션 시에 규격을 정하고 국가규제기관과 합의하여 확립한다.

**무균 시험:** 개정 생물학적 성분 기준(General requirements for the sterility of biological substances) No. 6의 파트 A 섹션 5에 규정된 기준에 따라, 또는 국가 규제기관이 승인한 방법으로 각 항원 로트의 무균(세균 및 진균) 시험을 실시한다. 적절한 경우에는 이 시험을 뒷 단계에서 할 수도 있다.

보존제를 추가한다면, 무균 시험에서 간섭이 발생하지 않도록 적절한 조치를 취해야 한다.

#### A.3.2.4 무독화

정제 PT(유전적으로 무독화시키지 않은 경우) 또는 이 독소를 함유한 동시 정제 항원을 적절한 방법으로 무독화한다. 다른 항원도 잔류 PT의 무독화 처리가 필요할 수 있다. 잔류 무독화 처리 물질을 적절한 방법으로 제거한다. 포름알데

히드, 글루타르알데히드, 이 둘의 혼합물, 과산화수소 등 여러 가지 화학물질을 PT 무독화에 사용한다. 무독화 처리 공정의 산물도 그에 따라 다양하다.

무독화 방법/공정 생물학적 활성 PT의 수준이 기준에 부합하고 면역원성도 적합한 수준을 유지(최종 단계에서 분석)하는 항원을 일관되게 생산할 수 있음을 밸리데이션하여 증명되어야한다. 또한 보관 시에 생물학적 활성 PT로 되돌아가지 않는 무독화 PT 생산 방법임을 밸리데이션하여 증명한다. 무독화 이후에 항원 응집이 발생한다면, 초음파 처리 등 적절한 방법으로 응집물을 균질화하고 여과하여 큰 덩어리를 제거한다.

### A.3.3 백일해 항원 원액의 관리

단일 작업으로 확보한 항원이나 여러 작업으로 제조한 것을 혼합하여 원액을 만든다. 국가규제기관의 승인을 받아 원액을 면역보조제에 흡착시키거나 면역보조제와 혼합하고, 보존제를 첨가할 수 있다.

**항원 함량:** 단백질 함량 시험 방법과 가능한 경우에는 적합한 정량적 면역분석 방법 등 밸리데이션된 정량 분석 방법으로 정제 항원 각각의 양이나 동시 정제 항원의 양을 추정한다. 동시 정제 항원인 경우에는, 항원의 비율을 규정한다. 화학적 무독화 처리 이후에 각 항원을 평가하는 적절한 방법이 없다면, 무독화에 앞서 시험한 결과에 근거해 각 항원의 양을 밸리데이션된 적합한 절차로 추정할 수 있다. 항원 함량 기준을 제품 개발 및 밸리데이션 과정에서 정하고 국가규제기관의 승인을 받는다.

**백일해 독소 잔류 활성:** 각 항원 또는 동시 정제 항원에 존재하는 잔류 생물학적 활성 PT의 양을 무독화 이후에 HIST나 CHO 세포 분석 방법 등 충분한 민감성을 갖춘 방법으로 시험한다. 면역보조제와 기타 백신 성분이 CHO 세포 분석 방법의 적절한 성능을 저해할 수 있으므로 이와 같은 성분에 의한 간섭 영향

이 없도록 특별히 주의를 기울인다(예, 검액의 적절한 희석). 백신 최종 조제 농도 수준에서, 모든 백일해 항원의 잔류 생물 활성 PT의 총량은 임상 시험에서 안전성이 증명된 백신 로트나 허가 신청과 관련된 기타 로트의 결과를 초과해서는 안 된다. 국가규제기관과 합의하여 규격을 설정한다.

**잔류 엔도톡신:** LAL 시험 방법이나 다른 적절한 방법으로 원액 또는 항원의 잔류 엔도톡신 함량 시험을 실시한다. 백신 최종 조제 농도 수준에서 엔도톡신의 총량은 임상 시험에서 안전성이 증명된 백신 로트나 허가 신청과 관련된 기타 로트의 결과를 초과해서는 안 된다. 개별 성분의 백신 농도에 적용되는 기준을 국가규제기관과 합의하여 정한다.

**무균 시험:** 개정 생물학적 성분 기준(General requirements for the sterility of biological substances) No. 6의 파트 A 섹션 5에 규정된 기준에 따라, 또는 국가 규제기관이 승인한 방법으로 각 정제 항원 벌크의 무균(세균 및 진균) 시험을 실시한다. 보존제를 추가한다면, 무균 시험에서 간섭이 발생하지 않도록 적절한 조치를 취해야 한다.

#### **A.3.4 최종 원액의 관리**

독립적인 정제 백일해 백신이 없으므로, 아래의 시험은 혼합 백신의 최종 원액 단계에서 실시한다.

독립적인 정제 백일해 백신을 개발한다면, 아래의 절차를 조정해 채택할 수 있다.

##### **A.3.4.1 조제**

항원 원액을 혼합하여 백일해 벌크를 제조한다. PTxd만 함유하거나 FHA도 함께 함유하며, 이때 PRN과 FIM-2와 FIM-3이 있거나 없을 수도 있다. 이렇게 하여 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 성분의 정제 백일해 백신을 만든다. 다른 성분(예,

디프테리아 독소이드, 파상풍 독소이드, 불활화 폴리오 백신(inactivated polio vaccine, IPV))과 혼합하기 전이나 후에, 정제 백일해 백신 원액을 수산화알루미늄이나 인산 겔 또는 다른 적절한 면역 보조제에 흡착시키거나 같이 혼합하여 최종 원액을 제조한다. 적합한 항미생물 보존제를 첨가할 수 있다.

#### A.3.4.2 품질 관리 시험

최종 원액에 대한 다음과 같은 품질 관리 시험을 국가규제기관과 협의하여 완제의약품에서 실시할 수도 있다.

##### A.3.4.2.1 무독화제

잔류 무독화제 함량을 파악한다. 시험 방법과 기준은 국가규제기관의 승인을 받아야 한다.

포름알데히드를 사용한다면, 잔류물 함량은 0.2 g/L를 넘지 않아야 한다. 글루타르알데히드 잔류물 함량은 0.1 g/L를 넘지 않아야 한다.

##### A.3.4.2.2 보존제

보존제가 백신의 안전성에 미치는 영향과 백신 성분과 보존제 사이의 상호작용 가능성을 고려한다. 국가규제기관의 승인을 받은 방법으로 보존제 함량 시험을 실시한다. 백신 투여 용량 중의 보존제 양이 항원에 부정적인 영향을 주지 않는 것으로 증명되어야 하며, 제품의 안전성에도 영향이 없어야 한다. 보존제, 보존제를 사용하는 제조 공정 단계, 보존제 농도 또는 잔류량을 국가규제기관의 승인을 받아야 한다. 기허가 백신의 보존제 함량을 변경하고자 한다면, 백신 제품의 치메로살 제거, 감소 또는 대체와 관련된 규제 방침에 관한 WHO 가이드라인 문서(WHO guidelines on regulatory expectations related to the elimination, reduction or replacement of thiomersal in vaccines.)에 기술된 백신 평가 원칙을 적용한다.



페놀을 보존제로 사용해서는 안 된다.

#### A.3.4.2.3 면역보조제

백신에 첨가되는 면역보조제의 특성, 순도, 농도를 국가규제기관이 승인한 방법으로 시험한다. 알루미늄 화합물을 면역보조제로 사용한다면, 알루미늄 농도는 1회 인체 투여 용량 당 1.25 mg을 넘지 않아야 한다. 칼슘 면역보조제를 사용한다면, 칼슘 함량은 1회 인체 투여 용량 당 1.3 mg을 넘지 않아야 한다. 다른 성분을 면역보조제로 사용한다면, 국가규제기관과 협의하여 규격을 설정한다. 혼든 다음에 현탁액이 균질하게 보이고 그 상태를 일정 시간 유지해야 한다(예, 백신 투여에 필요한 시간 동안). 가능하면 어떤 항원이 얼마나 흡착되는지 파악할 수 있는 방법으로, 항원의 면역 보조제 흡착을 조사한다. 흡착의 일관성이 중요하며, 생산 로트의 항원 흡착 수준이 임상적으로 안전성과 유효성이 증명된 백신 로트나 허가 신청 관련 로트의 결과 범위 이내임을 증명한다.

#### A.3.4.2.4 무균

개정 생물학적 성분 기준 No. 6의 파트 A 섹션 5에 규정된 기준(생물학적 성분의 무균성에 대한 공통 기준에 따라, 또는 국가규제기관이 승인한 방법으로 각 최종 원액의 무균(세균 및 진균) 시험을 실시한다.

보존제를 추가한다면, 무균 시험 시험에서 간섭이 발생하지 않도록 적절한 조치를 취해야 한다.

#### A.3.4.2.5 백일해 독소의 잔류 활성

HIST 또는 국가규제기관의 승인을 받은 독소 활성 수준을 검출할 수 있는 충분한 민감성을 갖춘 또다른 시험 방법으로 각 최종원액의 활성PT 시험을 실시한다.

유전적으로 무독화시킨 PT를 함유한 제품인 경우에는, 국가규제기관의 승인을

받고 이 시험을 실시하지 않을 수 있다. 허가 받은 정제 백일해 백신 제품의 잔류 생물 활성 PT 분석에 사용되는 HIST 방법은, 시험 백신을 마우스에 주사하고 히스타민을 가하여 이에 대한 반응을 평가하는 식으로 진행된다. 2가지 변수를 평가하는 방법이 있는데, 하나는 히스타민 용량의 치사 효과를 평가하는 것(사망종말법)이고, 다른 하나는 히스타민 처리 시의 체온 증가를 평가하는 것(체온측정법)이다. 다른 방법을 사용하고자 한다면, 밸리데이션된 HIST 방법(앞서 설명한 2개 시험 방법 가운데 하나)과 동등 이상의 민감성과 특이성을 구비해야 하고 국가규제기관의 승인을 받아야 한다.

각 시험에 사용하는 마우스의 히스타민 감작에 대한 민감성을 적합한 PT 참조 물질 또는 대조 물질을 이용해 확립한다. 표준품이나 양성 대조의 특이 활성을 WHO 국제 표준품(현재 JN1H-5)에 대비하여 교정하고 IU 단위로 나타낸다. 독소의 명목 단백질 질량에 근거하여 HIST에서 생물학적 활성을 예측할 수 없기 때문이다. 시험 방법의 PT 검출 한계를 규정하고 국가규제기관의 승인을 받아야 한다.

잔류 생물 활성 PT의 함량에 대한 허용 기준은 임상 시험에서 안전성과 유효성이 증명된 로트나 허가 신청과 관련된 기타 로트의 결과와 일관성이 있어야 한다. 국가규제기관과 합의하여 규격을 설정한다.

현재는 정제 백일해 백신의 잔류 활성 PT 수준과 임상적 안전성 사이의 관계에 대한 정보가 충분하지 않다. 그러므로 면역원성을 부당하게 훼손시키지 않으면서, 가능하면 잔류 독성을 최대한 감소시킨다. 정제 백일해 백신의 활성 PT에 대하여 국제적으로 합의된 상한 기준은 없다. 일부 국가는 단일 백신 투여 용량당 PT의 상한 기준을 DTaP 백신에 적용한다. 최근 실시한 공동 연구에서 HIST 치사 변수 방법으로 DTaP-기반 혼합 백신 중의 생물 활성 PT 함량에 대한 예비 데이터를 확보했다.

HIST 사망종말법(첨부 3 참조)은 백신에 존재하는 잔류 PT의 감작화 때문에 히스타민에 의해 죽은 동물의 비율을 측정하는 것이다. PT 표준품(IU 단위로 교정)의 적정에 의해 분석 방법의 민감성을 확인한다. 반복 시험을 통해 직선성을 확립한 다음에는, 단일 투여 용량의 PT 표준품만 각 시험에 포함시켜 분석의 민감성을 확인하는 식으로 단순화시킬 수 있다.

허용 기준 수준의 농도로 독소 표준품을 사용해 분석법의 민감성을 확인하는 시험실도 있다.

히스타민 투여 시의 체온(직장 또는 피부) 감소를 측정하는 HIST 방법(체온측정법, 첨부 2참조)을 일부 국가에서 성공적으로 사용하고 있다. 또한 PT 표준품의 활성화에 대비하여 시험 백신의 활성을 정량적으로 측정할 수 있게 최적화되었다.

CHO 세포 분석 방법이 PT 활성 검출에 상당한 민감성을 갖추고 있으나, 이 시험 방법은 간섭 문제 때문에(예, 면역보조제나 불활화제의 존재로 인해) 최종 원액에는 적합하지 않을 수 있다.

HIST 방법을 대체할 수 있는 다른 방법의 개발을 권장한다. 효소 HPLC(E-HPLC) 분석법과 탄수화물 결합 분석 방법을 포함하는 체외 분석 시스템을 HIST의 대안으로 평가하고 있다. 잔류 PT 활성을 분석하는 HIST 방법의 대체 방법을 개발하는 경우에는, 밸리데이션을 실시하고 국가규제기관의 승인을 받아야 한다.

#### A.3.4.2.6 독성 회복

최종 원액이나 최종 로트 검체를 37°C에서 최소 4주 동안 배양해 HIST 성능을 평가하는 가속 독성 회복 시험을 실시해, 화학적으로 불활화된 PT가 백신 유효

일자 이전에 독성을 다시 회복할 가능성이 없음을 증명할 수 있다. 로트마다 이 시험을 요구하지 않고, 공정 밸리데이션의 일환으로 실시할 것을 요구하는 국가 규제기관도 있다. 유전적으로 무독화된 PT를 함유하는 제품인 경우에는, 국가 규제기관이 동의한 경우에 이 시험을 하지 않을 수 있다.

#### A.3.4.2.7 면역학적 활성

출하 승인 시험 시에 정제 백일해 백신 검체를 마우스에 투여하고 면역원성이 나 역가를 평가하는 방법에는 MIT(mouse immunogenicity test)와 MICA(modified mouse intracerebral challenge assay) 2가지 방법이 사용된다. 그런데 어떤 방법도 임상적 유효성의 지표로 생각되지 않는다. 어떤 방법을 사용하든 밸리데이션을 실시하고 국가규제기관의 승인을 확보해야 한다. 백신 제품에 활성 PT가 존재하는 경우에는, 백신의 역가가 증가할 수 있으며, 면역 항원, 마우스 종, 시험 방법, 시험 조건 등에 따라 그 정도가 달라진다.

MIT는 백신 유효성에 기여한다고 주장되는 모든 항원에 대하여 마우스를 면역시키고 항체 반응을 평가하는 비치사성 동물 시험 방법이다. 항원 각각에 대한 항체의 기능적 활성보다는 결합 활성을 ELISA 방법으로 측정한다. 5개 항원에 대한 항체를 함유하는 국제 마우스 참조 혈청을 이용해 ELISA 시험의 일관성을 모니터할 수 있다.

허가 이후 제조된 로트의 MIT 결과가 임상 시험 시에 적합한 성능을 나타낸 로트의 결과와 일치하는지 평가하여, 제조 일관성을 평가하도록 설계된 방법이 MIT이다. 다양한 백신 제품의 조성 차이 때문에 규격도 제품 특이적이다. 또한 적절한 성능을 보장하기 위해서는, 시험 백신과 조성이 유사한 제품 특이적 참조 또는 대조 백신을 MIT 시험에 사용해야 한다.

MIT 시험에 사용할 국제 참조 백신이 없는 경우에는, 지정 규격에 대비하여 시험 백신의 면역학적 활성을 유의미하게 평가할 수 있는 참조 백신을 개발할

책임이 각 제조업체에게 있다. 유효성이 확립된 임상 로트를 참조 백신으로 간주할 수 있지만, 임상 로트의 활용 가능성과 장기 안정성 같은 문제를 고려하면 현실적으로 어렵다. 하지만 참조 백신으로 선정된 백신 로트는 조성, 제조 공정, 면역원성, 보호 효과 측면에서 임상 로트와 충분히 유사해야 한다. 참조 백신의 안정화가 권장되지만, 안정화 절차가 백신의 활성화에 미칠 영향에도 주의를 기울여야 한다.

제조업체는 참조 표준품의 안정성을 모니터하고 필요하면 교체할 책임이 있다. 참조 표준품의 안정성을 모니터하거나 교체할 표준품 후보를 시험할 때, 정밀도가 큰 시험 방법(예, 더 많은 시험, 시험에 더 많은 동물 사용, 시험 시의 희석 농도 증가)을 사용해 활성 변화의 감지 능력을 높일 필요가 있다.

임상 시험 로트와 허가 신청 관련 로트의 시험 시에 관찰된 반응을 토대로 각 제품의 규격을 설정한다. 유효성에 기여한다고 주장하는 각 항원에 대한 항체 반응의 규격을 설정하고 국가규제기관의 승인을 받는다.

시험 제품이 참조 백신과 유의미하게 차이나지 않는다는 점만 보여 주는 시험은 권장되지 않는다. 규격의 타당성을 증명해야 하며, 이때 참조 백신 대비 최대 허용 편차와 시험의 정밀성을 고려해야 한다.

MICA: 백신에 의한 마우스 보호 활성을 검출하는 마우스 치사 기반 시험 방법이다. 각 최종 원액의 역가를 참조 백신 대비 상대 역가로 나타낸다. 참조 백신을 정제 백일해 백신의 WHO 국제 표준품(JNIH-3)에 대비하여 교정하고, 보호 활성을 IU로 나타낸다.

시험 방법과 규격에 대하여 국가규제기관이 승인한다. 시험 방법에 관한 추가 사항은 첨부 1을 참조한다.

통계적으로 유효한 시험을 통해 백신의 추정 역가가 단일 인체 투여 권장량 중 4.0 IU 이상이고 추정 역가의 신뢰 하한( $p=0.95$ )이 일차 예방 접종 백신인 경우에

2.0 IU 이상이면, 역가 시험에 적합하다는 것이 현재의 규격이다.

활성 PT는 이 시험으로 분석한 백신의 상대 역가를 증가시키는 것으로 나타났다, 그 정도는 마우스 종과 시험 조건 등에 따라 다르다(32).

## 기타 시험

MIT와 MICA 이외의 다른 시험 방법의 개발을 권장한다.

다른 시험 방법(기니픽 면역원성 시험)을 채택한 나라도 일부 있다(34, 35). 이 방법은 동일한 동물 집단을 이용해 정제 백일해 성분과 디프테리아와 파상풍 특소이드 성분의 면역원성을 시험할 수 있는 것이다. 이 방법이나 다른 방법을 채택해 출하 승인 시험에 사용하려면, 밸리데이션을 실시하고 국가규제기관의 승인을 받아야 한다.

마우스 INCA(intranasal challenge assay)(첨부 5 참조) 같은 호흡 챌린지 시험 방법도 WHO 국제 공동 연구를 통해 평가했다. 마우스에서 보호 효과의 규모가 차이나는 백신을 구분할 수 있는 방법이다. 현재의 호흡 챌린지 분석 방법은 정규 백신 역가 시험 방법으로 최적화되거나 설계되지 않았다. 그럼에도 불구하고 이 방법을 이용하여 제조 공정이나 조성 변경에 따른 영향이나 새로운 항원과 조성의 활성 및 안정성, 또는 새로운 혼합 조성에서 상호 작용 가능성을 평가하는데 이용할 수 있다. 파트 B에 기술한 바와 같이, 새로운 제품의 개발 시에 이 모델을 중요한 도구로 사용할 수 있다.

## A.4 충전 및 용기

생물학적제제 GMP 기준에 규정된 충전 및 용기 관련 기준을 최종 제형 상태로 충전된 백신 제품에 적용한다.

단일 용량 용기와 다회 용량 용기를 사용할 수 있다. 다회 용량 용기에 충전

한 제품인 경우에는 적합한 항미생물 보존제를 함유해야 한다.

## **A.5 완제의약품의 관리**

각 백신 항원 성분의 적절한 양이 최종 용기에 함유되어 있는지 확인하기 위한, 품질 관리 절차와 시험 방법을 밸리데이션하고 국가규제기관의 승인을 받아야 한다.

달리 타당성을 증명하여 허가 받은 경우가 아니라면, 국가규제기관이 승인한 밸리데이션된 시험 방법으로 완제의약품(라벨 작업이 완료된 용기)를 상대로 다음과 같은 시험을 실시한다.

### **A.5.1 확인시험**

국가규제기관의 승인을 받은 밸리데이션된 시험 방법으로, 각 최종 로트에서 최소 1개 용기를 채취해 확인 시험을 실시한다. 세부 시험방법은 D.1 확인시험을 따른다.

### **A.5.2 무균시험**

국가규제기관의 승인을 받은 방법으로 무균 시험을 실시한다. 세부 시험방법은 D.2 무균시험을 따른다.

### **A.5.3 역가시험**

국가규제기관의 승인을 받은 방법으로 역가 시험(마우스 뇌내공격법, 항체가측정법 또는 기타 승인 받은 방법)을 실시한다. 세부 시험방법은 D.3 역가시험을 따른다.

### **A.5.4 엔도톡신시험**

국가규제기관의 승인을 받은 방법으로 엔도톡신시험을 실시한다. 세부 시험방

법은 D.4 엔도톡신시험 을 따른다.

#### **A.5.5 이상독성부정시험**

예상치 못한 독성이 있는지 국가규제기관의 승인을 받은 방법으로 이상독성부정시험을 실시한다. 세부 시험방법은 D.5 이상독성부정시험 을 따른다.

#### **A.5.6 무독화시험**

국가규제기관의 승인을 받은 방법으로 무독화시험을 실시한다. 세부 시험방법은 D.6 무독화시험 을 따른다.

#### **A.5.7 면역보조제 함량시험**

국가규제기관의 승인을 받은 방법으로 면역보조제 함량시험을 실시한다. 세부 시험방법은 D.7 면역보조제 함량시험 을 따른다. 다른 성분을 면역보조제로 사용한다면 면역보조 효과가 있는 성분에 대하여 적절한 규격을 설정한다.

#### **A.5.8 보존제 함량시험**

국가규제기관의 승인을 받은 방법으로 보존제 함량시험을 실시한다. 세부 시험방법은 D.8 보존제 함량시험을 따른다. 투여 용량 당 보존제의 양은 항원에 부정적인 영향을 미치지 않거나 인체에서 이상 반응을 유발하지 않음이 증명된 수준이어야 한다. 보존제와 보존제 농도 또는 잔류량을 국가규제기관이 승인한다. 기허가 백신의 치메로살 함량을 변경하고자 한다면, 백신 제품의 치메로살 제거, 감소 또는 대체와 관련된 규제 방침에 관한 WHO 가이드라인 문서에 기술된 백신 평가 원칙을 적용한다.

#### **A.5.9 잔류 무독화제 함량시험**

국가규제기관의 승인을 받은 방법으로 잔류 무독화제 함량시험을 실시한다.



세부 시험방법은 D.9 잔류 무독화제 함량시험 을 따른다.

#### A.5.10 pH측정시험

국가규제기관의 승인을 받은 방법으로 pH측정시험을 실시한다. 세부 시험방법은 D.10 pH측정시험 을 따른다.

#### A.5.11 최종 용기 검사

완제의약품 용기 각각을 육안으로 검사하거나 기계로 검사하고, 불량 제품은 폐기한다.

### A.6 기록서

생물학적제제 GMP 기준을 적용한다.

백일해 백신에 적합한 요약 프로토콜 모델이 첨부 6에 있다.

### A.7 검체

생물학적제제 GMP 기준을 적용한다.

### A.8 표시 기준

생물학적제제 GMP 기준을 적용하고, 다음 사항을 추가로 적용한다.

- “정제 백일해 백신” 문구
- “흡착” 문구
- 제조업체 명칭 및 주소
- 권장 보관 온도와 그 온도에서 보관할 때의 유효일자
- 권장 1회 인체 투여 용량과 투여 경로

또한 용기에 인쇄하거나 부착하는 라벨이나 지함의 라벨, 또는 용기와 함께 제공하는 설명서에 다음 정보를 포함시킨다.

- 백신 제품이 이 문서의 권장 사항을 만족한다는 문구
- 백신에 함유된 보존제의 종류와 양(단회 투여 용량 용기에 보존제가 함유되어 있지 않다면, 그 사실을 명기한다.)
- 해당되는 경우에는 흡착제의 종류와 양
- 백신 제품에 첨가된 성분의 종류와 양
- 권장 보관 조건과 운반 조건
- 백신을 동결시켜서는 안 된다는 경고 문구
- 백신 제품을 사용하기 전에 흔들어야 한다는 문구
- 백신 사용 방법과 금기 사항, 백신 접종 이후 발생할 수 있는 반응에 대한 정보

## A.9 유통 및 운송

생물학적제제 GMP 기준을 적용한다.

## A.10 안정성, 보관, 유효일자

### A.10.1 안정성

품질 평가에서 중요한 부분이 안정성 평가이다. 안정성 시험의 목적은 유효기간, 보관 기간 또는 사용 기간 말기 시점에도 백신 제품이 품질, 안전성, 유효성 관련 필수 특성을 여전히 구비하는지 확인하는 것이다.

백신 개발의 필수적인 부분이 적절한 안정성 시험이다. 최종 용기에 포장한 상태로 권장 보관 온도에서 보관한 상태의 안정성을 증명하고 국가규제기관이 이를 인정해야 한다.

보호 유효성에 기여한다고 주장되는 항원 각각에 대하여 실시간 안정성 시험 (real-time stability studies)을 실시해 유효일자까지 면역학적 활성과 제품의 특정 독성 결여를 증명한다.

라벨 표시 조건에서 보관할 때 유효 기간 동안 불활화 PT의 독성 회복이 발생하지 않아야 한다.

시간 경과에 따라 면역보조제와 항원이 분리되는 현상을 조사하고, 가능하면 국가규제기관과 협의하여 기준을 설정한다.

가속 안정성 시험을 실시하여 제품 안정성에 대한 추가적인 증거를 확보할 수 있지만, 이 시험으로 실시간 안정성 시험을 대체할 수는 없다.

제품 안정성에 영향을 줄 수 있는 생산 절차 변경을 추진한다면, 새로운 방법으로 제조한 백신의 안정성을 증명해야 한다.

#### A.10.1.1 허가를 위한 안정성 시험

허가를 받기 위한 백신 제품의 안정성 시험을 예정 보관 조건에서 실시간 시험으로 실시한다. 안정성을 보여 주는 변수를 신중하게 선정한다. 면역학적 활성 시험은 항상 포함하되, 이 항목에만 국한해서는 안 된다. 적절한 주기로 시험을 실시해 면역학적 활성의 변화를 평가한다. 서로 다른 원액으로 만든 최소 3개 로트의 백신 제품을 유효 일자 시점에 시험하여 보관 시의 안정성을 증명한다.

안정성에 영향을 미칠 가능성이 있는 온도 조건에서 일정 기간 동안 제품을 보관하고 시험하여 확보한 가속 안정성 시험 데이터는, 지속적 실시간 안정성 시험 데이터를 보조하는데 도움이 되지만, 지속적 실시간 안정성 데이터를 대체할 수는 없다. 허가 받은 유효 기간을 변경하고자 할 때는, 변경 유효 기간을 뒷받침하는 안정성 데이터가 있어야 하며, 국가규제기관의 승인을 받아야 한다. 허가 이후에 예정 유효 기간 내내 안정성을 모니터한다.

#### A.10.1.2 제조 공정 단계별 안정성 시험

생산 단계별(예, 단가원액, 원액, 최종 원액, 최종 제품; 각기 최소 3개 로트)로 안정성 시험을 실시한다. 안정성을 파악할 수 있는 적합한 변수를 생산 단계별로 선정한다. 백신 생산 과정에서 생성되는 모든 물질, 특히 단가원액, 정제 항원 원액, 최종 원액 등 반제품에 유효기간을 부여한다.

#### A.10.1.3 임상 시험 승인을 위한 안정성 시험

개발 중인 백신의 임상 시험 승인을 받으려면, 앞서 설명한 것과 같은 안정성 데이터를 확보해야 할 것이다. 하지만 개발 중인 백신은 제한적인 기간에 대한 안정성 데이터만 있을 것이다. 앞서 언급한 모든 단계에서 백신의 안정성을 뒷받침하는 적절한 문서를 국가규제기관에 제출한다.

#### A.10.2 보관 조건

상기 A.10.1의 안정성 시험 결과를 바탕으로 권장 보관 조건과 최대 보관 기간을 설정하고 국가규제기관의 승인을 받는다. 정제 백일해 백신인 경우에 2-8℃가 일반적으로 적절하다고 인정된다. 백신을 라벨에 지정된 조건에서 보관할 때, 용기나 포장의 라벨에 규정된 최소 역가를 유효기간 말기까지 유지할 수 있어야 한다.

라벨에 표시된 유효일자까지 역가 기준을 만족시킬 수 있는 보관 조건과 운반 조건을 제조업체가 제시한다.

백신을 동결시켜서는 안 된다.

#### A.10.3 유효일자

상기 A.10.1의 안정성 시험 결과를 바탕으로 유효일자를 정하며 국가규제기관의 승인을 받아야 한다.

## B. 정제 백일해 백신의 비임상 평가

비임상 시험은 백신의 인체 임상 시험 시작을 위한 전제 조건이다. 시험실의 시험과 검사만으로는 새로 개발한 정제 백일해 백신이 적절한 안전성과 유효성을 구비할 것임을 확실하게 보증할 수 없다. 그러므로 이 문서에서는 종합적인 비임상 시험 프로그램에서 시작하여 임상 평가까지 근거 정보를 수집하는 순차적 방법을 설명한다. 권장 비임상 시험을 이 파트에서 설명한다. 비임상 시험이 필요한 정도는 다른 백신 성분의 임상 경험 수준에 따라 다르다. 백신이 기능적 면역 반응(예, PT 중화 항체 유도, 세균의 공격으로부터 보호)을 유도한다는 증거를 제공하기 위해 실시하는 동물 시험이, 백신 개발에서 중요한 부분을 구성한다. 과거에 임상 시험에서 유효성을 평가한 적이 없는 정제 백일해 성분을 함유한 백신인 경우, 비임상 시험 결과는 그 백신이 임상 상황에서 유효할 것인지 평가할 때 고려할 필요가 있는 전체 데이터 가운데 일부에 해당된다. 이외에도 제조 방법, 제조 공정 관리, 백신의 임상적 면역원성 등을 검토한다.

안전성 및 유효성 임상 시험을 통해 평가한 적이 없는 새로운 백신 제제는, 동물을 대상으로 한 안전성 시험과 예방 접종/공격 시험(개념 증명 시험)을 포함하여 광범위한 특성 평가가 필요하다. 하지만 안전성과 유효성에 근거하여 이미 승인 받은 백신에 함유된 것과 동일한(즉, 동일 제조업체, 동일 제조 방법) 백일해 항원을 함유한 백신인 경우에는 광범위한 비임상 시험이 필요하지 않을 수 있다.

새로운 백일해 항원을 함유한 백신이나 기존의 것과 다른 새로운 제조 방법으로 백일해 성분을 생산하여 만든 백신 제제인 경우, 1) 화학적 처리(예, 무독화) 이전의 정제 항원, 2) 조제 이전의 개별 항원, 3) 조제 제품을 상대로 구체적으로 평가하고 시험하여 특성 분석을 실시한다. 개별적으로 정제되는 항원보다 동시

에 정제되는 백일해 백신인 경우에 특성 분석이 더 어렵지만, 동시 정제 항원도 화학적 처리(예, 무독화) 이전과 이후, 그리고 최종 조제 제품 상태로 유사한 평가와 시험을 실시한다.

비임상 시험에 사용되는 개별 항원과 조제 백신 로트는 임상 시험에 사용될 로트를 적절하게 대표해야 하며, 임상 시험에 사용할 것과 같은 로트로 하는 방식이 가장 이상적이다. 그렇게 할 수 없다면, 제조 방법, 면역학적 활성, 안정성, 기타 품질 특성 측면에서 임상 시험 로트와 비임상 시험 로트가 동등해야 한다. 비임상 시험의 설계, 실시, 분석, 평가에 관한 세부 정보는 백신 비임상 평가에 관한 가이드라인을 참조한다.

## **B.1 백일해 항원 및 반제품의 비임상 특성 분석과 시험**

새로운 정제 백일해 항원을 함유한 백신(항원의 범위나 하나 이상 항원의 제조 공정 측면에서 새로운 것)인 경우에는 전임상 평가를 포괄적으로 실시해야 한다. 이때 화학적 처리 이전과 이후의 정제 항원과 관련 공정 반제품, 최종 제품의 철저한 특성 분석을 실시한다. 이화학적 평가, 생물학적 분석, 잔류 독성/독성 회복 평가, 활성 보호 모델을 포함하여 다양한 방법으로 순도, 완전성, 기능적 활성을 평가한다. 동시 정제 방법으로 생산한 정제 백일해 백신의 복잡성을 감안하면, 추가 시험을 실시해 조성을 충분히 규정하고 파악할 필요가 있다. 예를 들어 각 항원의 비율(예, PT:FHA 비율)을 평가해 임상 로트의 특성을 분석하고 제품 일관성을 모니터한다.

새로운 항원을 포함시킨다면(과거의 임상 유효성 평가에서 시험했던 항원(즉, PT, FHA, PRN, FIM)이 아닌 다른 항원), 더 고려해야 할 부분이 있을 것이다. 예를 들어 B. bronchiseptica에서 정제한 PRN 항원을 사용할 경우, 이 항원은 B.

pertussis 유래 PRN과 같은 항원이 아니기 때문이다. 가능하면 각 항원을 활성 보호 동물 모델로 평가한다. 백일해 독소이드(PTxd)는 대다수 활성 보호 모델로 평가할 수 있으므로, PTxd와 혼합한 항원인 경우에 추가적인 혜택이 있음을 증명하기가 어려울 것이다. 이러한 경우에는 PTxd가 없거나 PTxd의 양이 최적 수준 이하인 상태로, 보호 모델을 이용해 항원을 평가한다. 다른 항원(FHA, PRN, FIM)은 모든 보호 모델에서 활성을 나타내지 않으므로, 참고문헌을 참조하여 항원별로 적절한 모델을 파악하는 것이 중요하다(아래 표 A4.1 참조).

각 성분(PTxd, FHA, PRN, FIM2, FIM3)을 개별적으로 정제하거나 동시 정제 방법으로 생산하여 현재 승인 받은 정제 백일해 백신에 함유된 항원에 대하여 고려해 볼 수 있는 시험 전략을 아래에서 설명한다. 정제 백일해 백신에 함유된 FIM2와 FIM3는 일반적으로 동시에 정제하고 하나의 항원(FIM2/3)으로 처리된다.

PT: 화학적 처리 이전 단계 PT의 순도와 생물 활성, 화학적 처리 이후의 잔류 생물 활성, 독성 회복 결여, 동물 보호 모델에서의 활성, 동물에서 유도된 항체의 결합 및 기능적 활성, 단클론 항체를 이용한 기지 에피토프의 검출

FHA: 화학적 처리 이전 단계 FHA의 순도와 기능적 완전성(예, 혈구 응집 활성), 화학적 처리 이후의 잔류 활성, 동물 보호 모델에서의 활성, 동물에서 유도된 항체의 결합 활성, 단클론 항체를 이용한 기지 에피토프의 검출

PRN: PRN의 순도, 동물 보호 모델에서의 활성, 동물에서 유도된 항체의 결합 활성, 단클론 항체를 이용한 기지 에피토프의 검출

FIM2, FIM3, FIM2/3: FIM의 순도, FIM2:FIM3의 상대 함량, 동물 보호 모델에서의 활성, 동물에서 유도된 항체의 결합 및 전세포 응집 활성, 단클론 항체를 이

## 용한 기지 에피토프의 검출

유전적으로 불활화된 PT를 기반으로 한 백신에 특히 주의를 기울인다. 이와 같은 백신의 특성 분석 시험 시에 생산 균주의 유전적 안정성, 유전적 서열의 일관성, 독성 생물 활성의 감쇄를 평가한다.

표 A4.1은 관련 문헌의 결과를 정리한 것이다. 자세한 사항은 해당 참고문헌을 참조한다.

### 표 A4.1

#### 마우스 챌린지 모델에서 정제 백일해 항원의 보호 능력 평가 결과 요약

항원	동물 모델 보호 연구				
항원	호흡기 챌린지 모델		뇌내 챌린지 모델		
항원	정제 항원		정제 항원		정제 항원 + 소량의 비보호성 활성 PT
항원	능동 면역	수동 면역	능동 면역	수동 면역	능동 면역
PTxd	예 참고문헌: 18, 19, 41-47	예 참고문헌: 17, 43-51	예 참고문헌: 17, 19, 31, 42, 44, 45	예 참고문헌: 48, 49	예 참고문헌: 31
FHA	예 참고문헌: 18, 19, 44-46, 52-57	예 참고문헌: 17, 44, 45, 51, 55	아니오 참고문헌: 17, 19, 31, 44-46	아니오 참고문헌: 39	예 참고문헌: 31
PRN	예 참고문헌: 53, 58-61	예 참고문헌: 61			
FIM	예 참고문헌: 45, 62-65	예 참고문헌: 45	아니오 참고문헌: 31, 45, 65		예 참고문헌: 31, 65



PT = pertussis toxin; PTxd = pertussis toxoid; FHA = filamentous haemagglutinin; PRN = pertactin; FIM=.fimbriae; “예”= 보호 효과 증명; “아니오” = 보호 효과 관찰되지 않음; “?” = 관련 정보 없음.

PT와 *B. pertussis*가 생산하는 다른 반응성 성분의 독성 메커니즘에 관한 지식이 증가했음에도 불구하고, 이들 성분이 백일해 발병과 백신 반응에서 담당하는 역할에 대해서는 여전히 불확실한 부분이 있다. 이와 같은 정보의 부족 때문에 백일해 항원을 함유한 백신에 존재하는 이들 성분의 잔류 활성화에 대하여 과학적으로 타당한 기준을 설정하기가 어렵다. 하지만 화학적 또는 유전적으로 불활화된 PT를 함유하는 백신은, 철저한 특성 분석을 통해 잔류 PT 활성화와 적절한 경우에는 보관 시의 독성 회복 가능성을 평가해야 한다. 제조업체는 최종 원액에 존재하는 화학적 불활화 PT가 백신 유효일자 이전에 독성 형태로 되돌아가지 않음을 증명해야 한다. 또한 제조 공정 밸리데이션 시에 제조업체는 정제 단계를 거쳐 LOS 엔도톡신뿐만 아니라 열 민감성(피부 괴사성) 독소, TCT(tracheal cytotoxin), ACT(adenylate cyclase toxin)을 허용 수준까지 감소시킬 수 있다는 증거를 확보해야 한다.

일부 국가에서는 백신 개발 시에 공정 밸리데이션을 실시하여, 아래의 순도 기준에 부합하는 항원 분획이 일관되게 생산되는 공정임을 증명할 것을 요구한다. 일관성 증명 이후에는 로트마다 시험을 할 필요는 없다.

AC(Adenylate cyclase): 면역블로트 분석 방법이나 기타 적합한 방법으로 시험할 때, 최종 백신 제품 1회 투여 용량 해당량 중 500 ng 이하.

TCT(Tracheal cytotoxin): 생물학적 분석 방법이나 액체 크로마토그래피 같은 적합한 방법으로 시험할 때, 최종 백신 제품 1회 투여 용량 해당량 중 2 pmol 이하.

잔류 피부 괴사 독소 부정 시험: 최종 백신 제품 1회 투여 용량에 해당되는 항원 분획량을 함유하는 0.1 mL을 젖을 때지 않은 마우스 3마리 각각에 피내 투여하고 48시간 관찰할 때, 피부 괴사 반응이 없어야 한다.

현재 전세포 백일해 백신의 독성 시험 방법으로 사용되는 마우스 체중 증가 시험과 백혈구 증가 촉진 시험은 정제 백일해 백신의 잔류 PT 활성을 평가하는데 충분한 민감성을 갖추지 못한 것으로 생각된다. 특이적인 잔류 PT 활성 시험(A.3.3과 A.3.4.2.5 참조)이 바람직하다.

## B.2 최종 백신 제제의 비임상 특성 분석 및 시험

현재 독립적인 정제 백일해 백신이 없음을 생각하면, 최종 제제 상태로 다음과 같은 시험을 실시한다(디프테리아와 파상풍 독소이드와 기타 성분을 함유하는 제제). B.pertussis챌린지에 대하여 정제 백일해 백신이 마우스를 보호하는 능력을 바탕으로, 새로운 백신 제제의 비임상 증거를 확립할 수 있다. 정제 백일해 백신을 평가하는 방법으로 2가지(MICA(파트 A와 첨부 1)와 INCA(점적 또는 에어로졸)(파트 A와 첨부 5))가 개발되었다. 하지만 앞서 설명한 바와 같이(섹션 B.1), PTxd는 두 모델 모두에서 유효한 항원이며, 그러므로 PTxd를 함유한 백신인 경우에 PTxd 이외의 다른 항원의 기여도를 이 모델로 명확히 파악하기 어려울 수 있다. 또한 잔류 활성 PT가 MICA에 영향을 미칠 수 있으므로(32), MICA 시험 결과를 해석할 때는 주의할 필요가 있다. CHO 세포 분석 방법으로 평가하는 PT 중화 항체(항-PT) 또는 전세포 응집 항체(항-FIM) 등 기능성 항체 평가를 통해, 인체에서 백일해 보호 유효성에 대한 비임상 증거를 추가로 확보할 수 있다.

이외의 독성 시험과 기타 시험은 생물의약품 비임상 평가에 관한 가이드라인에 따라 실시한다.

## C. 정제 백일해 백신의 임상 평가

임상 시험 설계 및 평가와 관련된 가이드라인을 설명한다. 대다수 임상 시험은 비교 방식으로 진행할 것이므로, 대조 백신 선택을 상세하게 살펴본다. 비임상 시험을 적절하게 실시한 백신만 임상 평가를 진행하며, 국가규제기관은 비임상 정보의 적절성을 평가할 책임이 있다. 유효성 시험이 매우 어려워 보이므로, 안전성과 면역원성을 평가하는 임상 시험이 강조된다.

지난 30년 동안 실시된 임상 평가를 통해, 새로운 백신의 임상 평가 모델이 개발되었다. 더욱 중요하게는 1986년부터 1996년 사이에, 정제 항원으로 구성된 백신과 동시 정제 항원으로 구성된 백신 등 두 가지 백신 유형을 포함하여, 여러 가지 정제 백일해 백신을 일련의 유효성 임상 시험을 통해 평가했다. 스웨덴 (1986년-1987년)에서 실시되었던 첫 번째 정제 백일해 백신 유효성 임상 시험 시에, 동일한 일본 제조업체의 PTxd와 PTxd/FHA 백신을 평가했다. 일차 증례 정의(최소 하루 동안 기침을 하고 배양을 통해 백일해 확인)에 대한 유효성 평가 결과는 2개 성분 백신이 69%(95% CI 47-82)이고 PTxd로만 구성된 백신이 54%(95% CI 26-72)였다. 이 임상 시험 결과의 2차 분석에서 증례 정의의 중요성, 특히 시험실의 백신 유효성 추정 결과에 대한 뚜렷한 영향과 증례의 규정에 적용된 임상 기준의 중요성이 밝혀졌다. 예를 들어 가벼운 임상 증례의 포함 여부에 따라, 1개 성분 백신과 2개 성분 백신의 유효성 평가 결과가 뚜렷하게 다른 것으로 나타났다. 증례 정의와 관련된 문제를 해결하기 위해, WHO는 1991년에 전문가 회의를 소집하여 유효성 임상 시험에 적용할 증례 정의 기준을 제시했다. 권장 일차 증례 정의에 의하면, 21일 동안 발작성 기침이 있고 시험실에서 배양하거나 혈청학적 검사를 통해 확인하거나 증례가 확진된 자와 가정에서 접촉해야 한다. 하지만 이 일차 증례 정의는 정보가 충분하지 않으므로, 이차 변수의 평가가 강력하게 권장되었다. 경도 증상(예, 21일 이내의 발작성 기침)에 대한

유효성 평가가 특히 중요한 것으로 생각되었다.

1991년부터 1996년 사이에 임상 시험이 추가로 실시되었다. 이때 1-5개 백일해 성분을 함유한 DTaP 백신을 평가했다. 여러 가지 디자인으로 임상 시험을 실시했는데, 1) 무작위배정 위약 대조 코호트 임상 시험, 2) 가구 접촉 시험, 3) 증례-대조 시험 등의 방법을 적용했다. 백신 유효성 계산 결과가 달랐는데, 이는 시험 디자인과 증례 정의의 차이에 의한 것이었다. 예방 접종을 하지 않은 대조군을 두고 이중 맹검 방식으로 시험한 경우에 가장 신뢰성이 큰 절대 백신 유효성 평가 결과가 확보되었다. 증례-대조 임상 시험과 대다수 가구 접촉 시험에서는 맹검이 불가능했으므로, 이 경우의 유효성 평가 결과는 편향성이 더 컸다. 가구 접촉 시험은 예외였는데, 일부 무작위배정 대조 코호트 시험 결과 이내였다.

일련의 임상 시험에서 평가했던 모든 정제 백일해 백신은 적어도 어느 정도는 어린이를 백일해로부터 보호하는 것으로 밝혀졌다. 하지만 여러 백신을 동일 임상 시험에서 병행하여 시험하지 않았으므로, 서로 다른 정제 백신의 유효성을 비교할 때는 주의해야 한다. 시험 디자인, 증례 확인 방법, 증례의 정의 등이 각기 달랐기 때문이다. 예를 들어 위약 대조 코호트 시험 시에는 예방 접종 피험자보다 예방 접종을 하지 않은 피험자에서 배양을 통해 증례가 확인된 경우가 더 많았고, 그에 따라 백신의 유효성 평가 결과가 부풀려진 면이 있었다. 적절한 혈청학적 검사로 증례를 확인함으로써 이와 같은 편향을 상당 부분 극복했다. 마찬가지로 대조군보다는 백신 투여군에서 경도 증례가 더 많이 발생했고, 그에 따라 경도 증례를 배제하면 유효성 평가 결과가 과도하게 평가되고 경도 증례를 포함시키면 오히려 과소평가되었다. 무작위배정 위약 대조 코호트 임상 시험 가운데 일부는 서로 다른 2개 정제 백일해 백신을 시험했는데, 이를 통해 어느 정도 비교가 가능하게 되었다. 2개 임상 시험 시에 5개 성분을 함유한 정제 백일해 백신이 2개 성분 백신(허가 받은 적이 없는 것)보다 더 우수한 보호 효과를

나타냈다. 하지만 경도와 중증 질환에 대하여 최적의 보호 효과를 나타내는 백신 조성은 여전히 확실하지 않다. 역학 조사 결과에 의하면, 다양한 조성의 백신이 이 질병의 관리에 좋은 것으로 나타났다.

여러 임상 시험이 전세포 백신과 정제 백일해 백신을 모두 포함해 실시되었다. 일부 임상 시험에서는 전세포 백신이 정제 백신보다 보호 효과가 좋지 않게 나왔다. 하지만 다른 시험에서는 다른 전세포 백신이 대다수 정제 백신보다 유효성이 더 좋은 것으로 나타났다. 특히 경도 백일해에 대해 그러한 결과를 얻었다. 1950년대 이후로 전세포 백신의 이질성이 보고되었으며, 이에 따라 전세포 또는 정제 백일해 백신 접종 프로그램의 유효성 모니터링이 중요한 것으로 강조되었다.

2개 유효성 임상 시험은 노출 시점의 항체값을 평가하도록 설계되었는데, 그에 따라 특정 항체의 존재와 보호 효과 사이의 상관성을 평가할 수 있었다(13, 140). 두 임상 시험에서 PRN, PT, FIM 항체와 보호 효과 사이에 상관성이 있는 것으로 밝혀졌다. 하지만 FHA 항체와는 상관관계가 나타나지 않았다. 이 항원에 대해서는 혈청 항체보다 면역 메커니즘의 역할을 배제할 수 없다.

이와 같은 임상 시험을 완료한 다음에 많은 나라에서 정제 백일해 백신만 사용하기 시작했다. 보호 기간을 평가하기 위한 시험도 있었다. 현재까지 실시된 시험 결과를 종합하면, 정제 백일해 백신을 3회 또는 4회 투여한 경우에 최소 5년 동안 유효성이 유지된다고 볼 수 있다. 추가 평가를 실시해 보호 기간을 더 정확히 규정하여, 공중 보건 관계자에게 최적의 투여 시기에 관한 정보를 제공할 필요가 있다.

안전성을 평가하기 위한 시험도 많이 실시되었는데, DTWP 백신에 비해 DTaP

백신 접종 시에 국소 반응과 열이 더 적은 것으로 나타났다. 하지만 성분의 수가 서로 다른 여러 정제 백일해 백신 사이에는 임상적으로 유의미한 안전성 차이가 증명되지 않았다. 추가 접종을 평가한 임상 시험에서는, DTaP 백신을 여러 차례 투여 받은 피험자에서 발적과 부기의 유의미한 증가(예, 5 cm 이상 크기의 발적이나 부기, 또는 팔이나 다리 전체에서 부기 발생)가 나타났다. 중대한 이상 반응은 그리 많지 않았는데, 증례 보고서나 국가 이상 반응 보고서에 기술된 기타 중대한 이상 반응과 예방 접종 사이의 인과 관계에 대한 신뢰성 있는 근거는 없었다.

## C.1 임상 시험을 위한 일반적인 고려 사항

새로운 정제 백일해 백신의 임상 시험과 관련된 몇 가지 사항을 설명한다. 백신 임상 평가에 관한 가이드라인에 기술된 일반 원칙과 함께, 아래에서 설명하는 권고 사항을 고려하여 임상 시험을 실시한다.

안전성, 면역원성 및 유효성에 관한 추가 데이터나 앞으로 개발될 가능성이 있는 다른 종류의 정제 백일해 백신에 기타 관련 데이터를 종합적으로 고려하여, 이 문서의 권고 사항을 업무에 적용한다.

제조업체는 백신 조성(예, 백일해 성분)과 백신 평가를 위한 임상 개발 프로그램의 디자인(시험 규모와 평가 변수 포함)에 대하여 타당성을 증명해야 한다.

(동일 업체가 동일한 공정으로 제조한 동일 백일해 정제 항원으로 규정되고 임상 유효성 시험에서 평가했던 성분과 같은 방식으로 조제한) 기존 성분이 아닌 새로운 정제 백일해 백신 성분을 함유한 백신인 경우, 제조 정보와 비임상 데이터와 함께, 임상 시험에서 확보된 면역원성 데이터를 고려하여, 임상 상황에서 유효성이 증명될 가능성을 평가한다. 파트 B에서 기술한 비임상 평가를 거친

백신만 임상 시험을 추진한다. 임상 시험에 사용한 백신 로트의 제조 일관성을 증명하고 충분하게 문서화한다. 임상 시험의 뒷 단계에서는 추후 판매 예정인 조성분과 동일한 로트 다수를 사용해야 할 것이다.

### C.1.1 적용 범위

위약 대조 유효성 임상 시험은 윤리적인 이유에서 가능하지 않으므로, 유효성이 증명된 기허가 정제 백신에 대비하여 유효성을 평가하도록 임상 시험을 설계하고, 이때 상대 유효성 평가 시에 적절한 정밀성을 확보하기 위해서는 시험 규모가 매우 커야 할 것이다. 그러므로 새로운 정제 백신의 승인을 위해서는 적절한 규모와 디자인의 비교 면역원성/안전성 평가 시험을 통해 데이터를 확보해 임상적 혜택을 합리적으로 보증할 필요가 있다. 관련성이 있고 해당되는 경우에는, 일반적으로 다른 영유아 백신과 함께 투여할 때 임상 시험 백신의 효과를 평가하는 시험을 실시한다.

백일해에 걸려 입원하거나 사망할 위험이 가장 큰 집단은 생후 3개월 미만 유아이다. 이와 같이 매우 어린 유아의 보호 효과를 높일 수 있는 방법에 대한 관심이 커지고 있다. 예를 들어 임신 전후에 산모 예방 접종을 실시하거나 출생 시기에 투여하는 독립형 정제 백신을 개발하는 방법 등이 있다. 하지만 이와 같은 특수 집단을 대상으로 한 백신 임상 평가와 관련된 사항은 이 문서에서 다루고 있지 않다.

### C.1.2 대조 백신

백일해에 대한 보호 효과와 유도된 항체 농도 사이의 예측적 관계가 각 항원에 대해 확립되지 않았다. 그러므로 허가를 받기 위한 임상 시험 설계 시에 고려해야 할 중요한 요소 가운데 하나가 대조 백신의 선택이다. 이때 아래와 같은 사항을 고려해야 한다.

새로운 정제 백일해 백신의 특성에 따라 대조 백신의 선택이 달라질 수 있다. 하지만 정제 백일해 성분의 조성과 양이 새로운 백신과 가장 유사한 백신을 대조 백신으로 선택해야 한다. 새로운 백신 제제 평가와 관련하여 3가지 시나리오를 생각해볼 수 있다.

- 시나리오 1 - 새로운 정제 백일해 혼합 백신이 확립된 정제 백일해 성분을 함유하고(즉, 동일 업체가 동일 공정으로 제조한 동일 정제 백일해 항원이고 동일한 방식으로 조제), 이 항원은 임상 시험에서 유효성이 증명된 것이다. 이 경우에 가장 적절한 대조 백신은 동일 제조업체의 가장 유사한 기허가 제품일 것이다. 동일한 DTaP 성분(예, DTaP-IPV, DTaP-HepB, DTaP-HepB-Hib 등)이나 백일해 성분의 양이 다른 DTaP(예, 추가 접종 제제 Tdap)를 바탕으로 하는 다양한 혼합 백신 평가에 이 시나리오가 적용된다. 이때 별도로 투여하는 기허가 DTaP 또는 DTaP 기반 혼합 백신에 대비하여 면역 반응을 평가하고 비열등성을 증명하는 방식으로 혼합 백신을 평가한다.
- 시나리오 2 - 새로운 정제 백일해 백신의 조성이 임상 유효성 시험에서 적합한 것으로 증명된 기존 정제 백일해 성분과 동일하거나 매우 유사하다. 하지만 항원 전체 또는 일부를 다른 제조업체가 제조하거나 과거의 보호 유효성 임상 시험에서 평가했던 백신과 다른 공정으로 제조된다. 이 경우에 조성이 유사한(동일 정제 백일해 항원, 유사한 함유량) 기허가 제품(유효성이 증명된 것)이 가장 적절한 대조 백신이라 할 수 있다.

주: 유효성 임상 시험에서 평가했던 백신으로는 1개 성분(PTxd) 백신, 2개 성분(PTxd/FHA) 백신, 3개 성분(PTxd/FHA/PRN) 백신, 4개 성분(PTxd/FHA/PRN/FIM2) 백신, 5개 성분(PTxd/FHA/PRN/FIM2/FIM3) 백신이 있다.



- 시나리오 3 - 새로운 정제 백일해 백신은 임상 시험에서 유효성이 적합한 것으로 증명된 기허가 정제 백일해 백신과 같지 않은 정제 백일해 항원을 함유한다. 이와 같은 경우가 두 가지 있다. 1) 현재 사용하는 항원을 바탕으로 하지만, 조합(예, PTxd/PRN 또는 PTxd/PRN/FIM2/FIM3)을 다르게 하여 백신을 만드는 방법과 2) 현재 사용되는 항원 가운데 하나 이상과 새로운 항원을 결합하여 백신을 만드는 방법이 그것이다. 이 경우에 조성이 가장 유사한 기허가 제품(유효성이 증명된 것)이 가장 적절한 대조 백신이라 할 수 있다.

시나리오 2와 3인 경우에 제조업체는 대조 백신과 비열등성 마진의 타당성을 증명해야 한다. 정제 백일해 성분의 양과 조성에 차이가 있는 경우에 특히 그렇다.

## C.2 면역 반응 평가

### C.2.1 항체 반응 평가 방법

백신 허가를 받기 위한 임상 면역원성 시험에 사용되는 혈청학적 분석 방법을 밸리데이션해야 한다. 혈청학적 방법의 표준화를 위해 국제 참조 백일해 항혈청이 확립되었다. 그러므로 여러 임상 시험에서 확보된 혈청학적 데이터의 비교성과 수용성을 보장하기 위해서는, 면역원성 평가 결과를 이 백일해 항혈청 국제 표준품에 대비하여 IU 단위로 표현해야 한다. 밸리데이션을 시작하기 전에 분석 방법의 특이성을 철저히 평가하는 것이 중요하다. 공식 밸리데이션 시에는 모든 관련 성능 기준(정확성, 직선성, 정밀성, 범위 포함)을 평가하고, 완건성 시험도 권장된다. 범위(정량 하한 포함)가 임상 시험에 적합함을 증명할 수 있게 밸리데이션 시험을 설계하며, 백신을 서로 비교하는 방식도 고려한다(예, 일차 접종 이후 항체가가 기준 이상인 비율, 혈청 전환 비율 또는 기하 평균 항체가 등

평가 기준).

임상 시험 시에 밸리데이션된 분석 방법으로 면역 반응을 평가한다. 백신의 면역 반응 평가를 위한 분석 방법 선정의 타당성을 백신 개발자가 증명한다. 가능한 경우에는 기능적 면역 반응을 측정하는 분석 방법을 사용한다. 적합한 분석 방법을 구매할 수 없을 수도 있다.

서로 다른 백신 성분(예, PT, PRN, FIM 등)에 대한 특이적인 항체 반응은, 특정 항원에 결합하는 항체 농도를 측정하는 방법(예, ELISA); 적용가능할 경우, PT 중화 항체가(예, CHO 세포 분석 방법) 또는 *B. pertussis* 응집 역가를 측정하여 기능성 생물학적 활성을 측정하는 방법으로 평가한다.

세포 매개 면역 반응(cell-mediated immune; CMI)은 백일해 감염 보호에 중요한 역할을 한다. 하지만 투여 이후 CMI 반응을 평가하는 면역학적 분석 방법이 표준화되지 않았으며, 허가를 받는데 사용된 적도 없다. 그럼에도 불구하고 백일해 항원에 대한 면역 반응의 모든 측면에 대한 지식을 축적한다는 측면에서, CMI의 탐색적 평가를 권장한다.

#### C.2.1.1 정제 백일해 성분에 대한 항체 반응을 평가하는 ELISA

백신에 함유된 특정 백일해 성분에 대한 항체 반응 평가를 새로운 정제 백일해 백신에 대한 면역 반응 평가의 일차적인 수단으로 간주한다. 새로운 백일해 백신의 허가를 받기 위해서나 혈청역학 시험과 백일해 감염 진단을 위해, *B. pertussis*에 대한 혈청학적 방법의 표준화를 추진했다. 하지만 시중에서 판매되는 대다수 ELISA 키트 제품을 포함하여 진단과 역학 조사 목적으로 개발하여 최적화된 분석 방법은 백신 면역원성 시험에 필요한 성능 특성을 갖추지 못했을 가능성이 크다는 점을 생각할 필요가 있다. 예를 들어 백일해 성분 각각(예, PT,

FHA 등)을 평가하는데 필요한 특이성과 기하 평균 농도(GMC)를 구하기 위한 정확성을 갖추지 못했을 수 있다.

GCP(good clinical practice) 가이드라인(93)에 따라 데이터의 수집, 기록, 분석, 해석을 실시한다. 가이드라인에 기술된 방법/통계 관련 사항을 고려한다.

#### C.2.1.2 기능성 항체 역가 평가

백일해 성분에 대한 항체의 활성이 중요한 변수라 할 수 있다. 독소 중화와 세균 응집 등 기능적 활성을 지닌 항체를 유도하는 것으로 알려진 PTxd와 FIM을 함유하는 새로운 제제를 평가할 때 특히 그렇다. 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 것과 새로운 백신 제제를 전반적으로 비교하는데 중요한 변수라 할 수 있다.

가능한 경우에는 적어도 대조군과 시험군의 아집단에서 항체 분석을 실시한다.

#### C.2.2 면역 반응 평가 기준

새로운 백신을 평가하는데 바람직하는 방법은, 임상 유효성이 증명된 기허가 백신과 새로운 제품을 무작위배정 대조 임상 시험으로 직접 비교하는 것이다.

##### C.2.2.1 유아와 소아의 일차 예방 접종

투여 이후 일차 면역 반응 비교 시험 시에, 주로 시험 백신을 투여 받은 피험자의 반응이 대조 백신 투여군보다 열등하지 않음을 증명하는 식으로 진행된다. 비열등성 평가를 위한 일차 변수, 비열등성 마진, 비교 임상 시험을 위한 전체 피험자 수 등을 타당하게 선정할 필요가 있다. 기허가 정제 백일해 백신과 후보

백신의 면역 반응을 비교하는 시험이 필수적이지만, 유사한 분석 방법으로 과거에 보호 유효성 임상 시험 과정에서 생산된 데이터와 비교해 근거를 확보하는 방법도 있다. 새로운 후보 백신이 인체에서 면역 반응을 유발함을 증명하는 것이 중요하나, 데이터를 해석할 때는 주의가 요구된다. 특히 다른 제조업체가 생산한 백신이나 다른 방법으로 생산한 백신을 비교한 면역원성 데이터 평가 시에, 면역원성의 동등성이 유효성의 동등성을 직접적으로 의미하지는 않는다.

면역 반응 평가 주기를 정할 때는 시험 목적을 고려해야 한다. 대부분의 경우에 유아용 새로운 백신의 임상 시험은, 마지막 투여 이후 약 4주 시점에 정제 백일해 성분에 대한 항체 반응을 평가하는 식으로 설계된다. 적절한 허용 한도 수준을 적용해 비열등성 기준을 정하고, 이를 바탕으로 하고 아래에서 설명하는 변수를 이용해 시험 백신 투여 피험자와 기허가 대조 백신 투여 피험자에서 나타난 반응을 비교한다(C.1.2 참조).

다음과 같은 공동 일차 분석이 권장된다.

- 반응 피험자 비율 - 첫 번째 일차 분석 시에 정제 백일해 성분 각각에 대하여 투여 이전에 비해 유의미한 증가(예, 4배 증가)를 보인 반응 피험자 비율을 평가하고 시험 백신 투여군과 기허가 대조 백신 투여군을 비교한다. 충분한 타당성이 있을 때는 반응 피험자에 대하여 다른 정의를 적용할 수도 있다. 비열등성 기준을 적절하게 규정하여 시험군과 대조군을 비교한다. 일반적으로 관찰된 차이에 대한 양측 95% 신뢰구간의 하한이 NRA가 승인한 기준 이상이어야 한다(일반적으로 10% 포인트).
- 반응 규모 - 두 번째 일차 분석 시에 반응 규모를 비교하여 각 정제 백일해 성분에 대한 항체 반응(GMC 비율)을 평가한다. 새로운 백신이 유도한 GMC

와 기허가 대조 백신의 GMC를 비교하며, 이때 비열등성 마진을 미리 규정하여 적용한다. 대조 백신에 대비하여 새로운 백신의 GMC 비율에 대한 양측 95% 신뢰구간의 하한이 NRA가 승인한 기준 이상이어야 한다(일반적으로 0.50 또는 0.67).

지정 비열등성 기준을 충족하지 못하면, 면역 반응을 자세히 조사하고 기준을 충족하지 못한 이유를 파악한다. 특히 각 항원에 대한 항체 반응 결과와 시험 백신과 대조 백신 사이의 조성 차이, 그리고 보호 효과에서 항원(항체와 반응하는 항원)의 기여 정도에 대한 가용 정보를 국가규제기관이 종합적으로 고려할 수 있다.

#### C.2.2.1.1 이차 분석

**기능성 항체 반응.** 새로운 백신 제제를 평가할 때, 가능하면 많은 면역 변수를 평가하는 것이 중요하다. 그러므로 일부 또는 전체 임상 시험에서 예방 접종 피험자 가운데 무작위 아집단을 상대로 기능성 항체 반응(즉, PTxd 또는 FIM을 함유하는 제제인 경우에 PT 중화 역가 또는 B. pertussis 응집 역가)을 분석한다. 현재는 백일해 감염 예방 효과와 역가 사이의 상관관계를 명확히 알지 못하므로, 기능성 항체 데이터를 해석하기가 쉽지 않다. 그렇기 때문에 새로운 백신과 기허가 대조 백신 사이의 기능성 항체 역가 비교 시에 GMT 비율에 중점을 둘 필요가 있다.

#### C.2.2.1.2 추가 정보

RCD(Reverse cumulative distribution) 곡선. 항체 농도가 특정 수준 이상인 자의 누적 비율을 보여 주는 RCD 곡선을 이용하는 방법은, 시험 백신과 기허가 대조 백신에 대한 반응을 비교할 때 유용한 것으로 밝혀졌다. ELISA 데이터와 기능성 항체 반응 데이터로 RCD 곡선을 작성한다. 이와 같은 데이터의 검토는 탐색적

성격의 행위로 간주한다.

면역성 지속의 장기 추적 관리 대상 피험자 집단을 파악해 정리할 것을 권고한다. 이 데이터를 최초 승인 이후에 제공할 수도 있다. 시간 경과에 따른 항체 농도 감소는 어쩔 수 없으며, 그 자체를 추가 접종이 필요하다는 의미로 해석해서는 안 된다. 장기 항체 농도 데이터를 유효성 데이터와 함께 검토하여, 보호 효과 유지를 위하여 나중에 추가 접종이 필요한지 평가한다.

#### C.2.2.2 큰 소아, 청소년, 성인의 추가 접종

대부분의 경우에 유아의 일차 접종에 중점을 두어 평가한다. 하지만 정제 백일해 백신을 다음 연도나 취학전 소아, 청소년, 성인 등을 상대로 추가 접종하는데 사용할 수 있다. 현재 일차 접종과 추가 접종 방법이 나라마다 다르다. 어떤 방법을 채택하든 적절한 면역원성 시험을 통해 접종 일정을 뒷받침해야 한다. 과거의 경험에 의하면, 추가 접종만을 적응증으로 하는 백신은 하나 이상의 백일해 항원을 더 적게 함유할 필요가 있다.

큰 소아와 성인 등을 상대로 추가 접종하는데 사용하는 정제 백일해 성분의 면역원성 평가 시에는 활성 대조 백신이 필요하지 않을 것이다. 이러한 경우에는 해당 DTaP 백신으로 기초 접종한 유아의 면역 반응(과거 대조)과 단회 투여 이후 청소년과 성인의 면역 반응을 비교하는 방법도 가능하다. 또한 면역학적 기억을 유도할 수 있는 능력(예방 접종 이후 나타나는 면역 기억 반응으로 평가)을 정제 성분 각각에 대해 평가한다.

### C.2.3 혼합 백신, 그리고 다른 백신과 병행 투여

#### C.2.3.1 혼합 백신

정제 백일해 성분을 다른 항원과 혼합하는 경우에는, 백신의 임상 평가에 관한 가이드라인에 기술된 바에 따라, 백일해 성분과 다른 항원이나 첨가제 사이의 간섭 작용 가능성을 조사한다.

조제 이전 제품 상태로 투여하거나 백신을 주사 직전에 혼합하여 투여하는 경우에, 일부 정제 백일해 성분이 일부 다당류 접합 항원에 대한 면역 반응에 부정적인 영향을 미칠 수 있는 것으로 밝혀졌다(예, PRP-T와 일부 정제 백일해 성분을 함유하는 혼합 백신에서 b형 *Haemophilus influenzae* 접합 백신 반응). 그러므로 무작위 대조 임상 시험을 적절하게 설계하여 실시해, 최종 혼합 제제의 모든 항원에 대한 면역 반응이 적합함을 증명해야 한다. 혼합 대상 항원에 대한 면역 간섭 영향이 나타난다면, 임상 시험을 진행하기 전에 간섭 영향의 임상적 영향을 신중하게 검토한다.

#### C.2.3.2 다른 백신과 병행 투여

정제 백일해 성분을 다른 백신(접합 백신 포함)과 함께 투여하는 경우가 많은데, 임상적 의미를 명확히 파악하기 어렵지만 검출 가능한 수준의 면역 간섭 영향이 나타나기도 한다. 예를 들어 b형 *Haemophilus influenzae* 접합 백신과 수막구균 C 1가 백신에 대한 항체 반응이 감소될 수 있다. 그러므로 편리성이나 기준 준수 등의 이유에서 동일 의원 방문 시에 같이 투여할 가능성이 큰 다른 백신과 함께 투여할 때 정제 백일해 후보 백신에 대한 면역 반응을 평가하는 것이 중요하다. 다른 병행 투여 항원에 대한 반응을 평가한다. 이때 각 백신의 단독 투여와 비교하여 같이 병행 투여되는 항원에 대한 반응의 비열등성을 증명하는데 중점을 두어 평가한다. 비열등성 마진을 미리 규정하며 그 타당성을 증명할 수 있어야 한다.

병행 투여와 시차적 투여 방식을 비교할 수도 있다(예, 2, 4, 6개월에 일반적인

항원과 비교하고, 3, 5, 7개월에 새로운 백신과 비교).

### C.3 안전성 평가

C.1.1에서 설명한 바와 같이 위약 대조 유효성 임상 시험을 한다면 안전성 데이터베이스를 충분히 확보할 수 있겠지만, 현실적으로 가능하지 않다. 그럼에도 불구하고, 허가 이전의 백신 안전성 평가는 임상 프로그램에서 매우 중요한 부분이므로, 백신 임상 평가에 대한 가이드라인에 기술된 일반 원칙에 따라 실시한다(85). 일반적으로 시험 백신과 기허가 대조 백신 사이의 이상 반응 발생 비율 비교 방법을 임상 시험 계획서에 이차 변수로 규정한다. 승인 시점의 안전성 데이터베이스 최소 허용 규모는 백신 조성(모든 항원과 면역증강제 포함), 새로운 항원의 존재, 동일하거나 유사한 정제 백일해 성분을 함유한 백신의 과거 경험 등을 고려하여 정한다.

새로운 백신인 경우에는 약 3000-5000명 규모의 안전성 데이터베이스(동일 표적 연령 집단을 대상으로 한 모든 임상 시험의 결과)가 있어야 할 것이다. 이 정도는 되어야 100명 가운데 한 번과 1000명 가운데 한 번의 비율로 발생하는 일반적이지 않은 이상 반응을 평가할 수 있기 때문이다. 하지만 가용 데이터의 수준에 따라 NRA가 더 적은 수의 데이터, 아니면 더 많은 수의 데이터를 요구할 수 있다.

추가 접종의 안전성을 평가하는 시험 시에 이상 반응 정보(예, 사지의 광범위한 부기 증상)를 자세하게 모니터한다.



## C.4 의약품 위해성 관리계획

위해성 관리 계획의 목적은 의약품 품목허가 시 또는 시판 후 안전성 중점검토를 위해 해당 품목의 ‘중요한 규명된 위해성, 중요한 잠재적 위해성 및 중요한 부족 정보’를 확인하고, 시판 후 부작용 조사를 위한 의약품 감시방법 및 위해성 완화를 위해 첨부문서, 환자용 사용설명서 및 안전사용보장조치 등을 마련함으로써 의약품의 안전사용을 강화하고자 하는 것이다.

생물의약품의 경우, 신약, 희귀의약품, 시판후 중대한 부작용 발생으로 인해 위해성 관리계획의 제출이 필요하다고 식품의약품안전처장이 인정하는 의약품(줄기세포치료제 등) 및 신청인이 위해성 관리 계획의 제출이 필요하다고 인정하는 의약품이 이에 해당된다.

의약품 위해성 관리계획에 대한 자세한 내용 및 작성방법 등은 “의약품의 위해성 관리계획 작성 가이드라인”을 참고할 수 있다.

## C.5 시판후 시험과 조사

시판후 조사를 실시하고 데이터를 확보하여, 정제 백일해 백신의 보호 효과에 대한 과학적 증거를 축적하도록 노력한다. 가능한 경우에는 언제나 백신의 효과에 대한 정보를 보고한다. 또한 허가 이전 단계의 시험에서 확보되는 안전성 데이터가 제한적임을 고려하여, 시판후 조사 시에 모든 관련 안전성 변수를 모니터링한다. 특히 백신 성능에 대한 종합적인 시험을 통해, 백신 접종이 백일해 감염에 미치는 영향을 평가할 필요가 있다. 장기 보호 효과를 모니터링하고 백신 효과의 변화에 대한 증거를 찾기 위한 지속적 조사 프로그램을 구비해 운영한다.

현실적으로 제조업체만으로는 안전성과 유효성에 대한 타당하고 종합적인 데이터를 확보하기 어려울 것이다. 그러므로 제품의 시판을 책임지는 백신 제조업체와 국가/국제 보건 기관이 시판 이후 시기의 안전성과 유효성 평가 방안을 논의할 필요가 있다. 백신 접종 사업을 적절하게 시작하고 백일해 질병을 파악할 기반 시설

을 적합하게 구비한 곳에서만 신뢰성 있는 유효성 정보를 얻을 수 있다.

허가 이후 지속적 백신 감시에 대한 WHO 가이드라인을 준수한다. 모든 데이터를 주기적으로 NRA에 제출하여, 판매 허가 측면의 의미를 평가할 수 있게 한다. 질병을 파악할 기반 시설을 적합하게 구비한 곳에서만 신뢰성 있는 유효성 정보를 얻을 수 있다.

허가 이후 지속적 백신 감시에 대한 가이드라인을 준수한다. 모든 데이터를 주기적으로 국가규제기관에 제출하여, 판매 허가 측면의 의미를 평가할 수 있게 한다.

## D. 정제 백일해 백신의 품질시험

최종 로트에 대해 각 성분의 정보, 무균, 발열원성이나 엔도톡신 함량, 면역보조제 함량, 보존제 함량, 역가, 이상독성부정시험 등을 실시해야 한다. 일반적으로 생물학적제제 기준 및 시험방법 각조 및 일반시험법, 생물학적시험법 항에 기술된 시험방법이 적용된다.

### D.1 확인시험

정제 백일해 백신의 확인시험은 혈청학적 특성을 이용하여 정제 백일해 백신 내의 백일해 항원의 존재 유무를 확인하기 위하여 실시한다. 이 시험은 품목허가 받은 방법을 이용하여 각각의 최종 로트에서 한 개 이상의 용기에 대해 확인시험을 실시해야 하며 여기서 사용되는 방법은 백일해항원과 백일해항체간의 특별한 상호작용에 기초해야 한다.

적절한 검출법으로는 겔 확산법, ELISA 등 면역화학적 방법이 있으며, 알루미늄 운반체에 흡착된 독소이드에 대한 시험은 이 운반체를 구연산나트륨이나 EDTA를 통해 흡착된 독소이드를 용출한 뒤 시험을 실시한다.

만약 역가시험을 항체가측정법 (ELISA) 으로 실시한다면 역가시험으로 확인시험을 대체할 수도 있다.

겔 확산법에서는 백일해 항원과 항체의 응집으로 인한 침강선이 확인되어야 하고, ELISA를 통해 확인시험을 실시할 경우 접합체반응, 화학기질반응 및 정지반응의 단계를 거쳐 백일해 항원에 대한 특이 발색반응이 확인되어야 한다.

## D.2 무균시험

무균시험법은 배양법으로 증식할 수 있는 미생물 (세균 또는 진균) 의 유무를 시험하는 방법이다.

무균시험은 「대한민국약전」 및 「생물학적제제 기준 및 시험방법」 일반시험법이나 허가된 방법에 따라 무균 (세균 및 진균) 시험을 실시하며 보존제가 첨가되었다면, 무균시험에서 간섭이 발생하지 않도록 적절한 조치를 취해야 한다.

## D.3 역가시험

역가시험은 백신의 생물학적 활성을 표준품을 사용하여 정량적으로 측정하기 위하여 실시한다.

정제 백일해 역가시험은 「생물학적제제 기준 및 시험방법」 「생물학적 시험법」 중 정제 백일해 역가시험법 (마우스뇌내공격법 또는 항체가측정법) 이나 허가된 방법에 따라 실시한다.

「생물학적제제 기준 및 시험방법」에 따르는 경우, 아래의 절차를 참조한다.

### D.3.1 마우스 뇌내공격법

마우스 뇌내공격법은 공격용 백일해균주를 마우스 뇌내에 접종하게 되면 정제 백일해 백신을 통하여 면역이 된 마우스의 경우 사망률이 저하되는데, 이 현상을 이용하여 정제 백일해 백신을 백일해 역가표준품과 통계적으로 비교함으로써 정제 백일해 백신의 역가를 결정하는 방법이다.

정제 백일해 백신 (이하 “검체”라 한다.), 백일해역가시험용표준품(이하 “표준품”이라 한다.) 및 공격용 백일해균 18323주 (공격용 백일해균은 일정량의 균수를 포함하도록 냉동보관하여 사용할 수 있다.)를 사용한다. 검체 및 표준품을 4배 또는 다른 적당한 대수적 등간격으로 단계희석하여 3개 이상의 희석액을 만든다. 생후 4주된 마우스 16마리 이상을 1군으로 하고 각 희석액을 1군씩을 사용하여 마리당 0.5 mL씩을 복강내주사한다. 면역 후 21일 후 각각의 동물 마리당 공격용 균부유액 0.025 mL를 뇌내에 주사하고, 14일간 관찰한다. 공격용 균부유액 주사 후 3일 내에 죽은 것은 시험 결과에서 제외하며, 14일 후에 마비 또는 두개종대를 나타낸 것은 죽은 것으로 간주한다. 또한 따로 생후 7주된 마우스 10마리 이상을 1군으로 하고 3군 이상을 사용하여 공격용 균부유액 0.025 mL 중에 함유된 균의 LD<sub>50</sub>값을 측정할 때, 그 값은 50 ~ 400 균수이어야 한다.

시험 결과를 통계학적으로 처리하여 비교할 때, 검체의 역가는 8 units (또는 IU) /mL 이상이어야 한다.

### D.3.2 항체가측정법

항체가 측정법은 ELISA 기법을 사용, 표준혈청과 백일해 백신을 면역한 마우스의 혈청을 비교하여 정제 백일해 백신에 의하여 생성된 항체의 양을 직접적으로 측정할 수 있는 방법이다.

마우스 10 마리 이상을 1 군으로 하여 3 군을 준비하고, 검체 및 백신표준품을 각각 0.5 mL씩 접종하고, 음성대조군은 접종하지 않거나 또는 인산염완충액을 0.5 mL씩 접종한다. 주사 후 4 주 후에 채혈하여 혈청을 분리한다.

혈청을 분리하여 준비한 후 각각의 정제백일해항원표준품을 코팅시킨 플레이트에 분리한 혈청, 양성대조액(대조혈청), 항체표준품(혈청표준품)을 각각 단계희석하여 반응시킨다. 단계마다 세척액을 이용하여 세척하고 접합체반응, 화학기질반응, 정지반응의 단계를 거친다. 흡광도를 이용하여 항백일해 항원의 농도값을 구한다.

판정 기준 및 유효성 기준은 각 제제의 허가사항에 따른다.

#### D.4 엔도톡신시험

엔도톡신이란 일반적으로 그람음성세균의 세포벽 성분 중 lipopolysaccharide를 통칭하며 세균독소의 일종으로 용균 혹은 균체의 파괴에 의하여 유출되는 강력한 발열성물질로 내열성을 가진다.

엔도톡신시험법은 아메리카 투구게 (Limulus Polyphemus) 또는 아시아 투구게 (Tachypleus tridentatus) 의 혈구 추출성분으로 만든 라이세이트 (an amoebocyte lysate) 시약을 써서 그람음성균에서 유래되는 엔도톡신을 검출 또는 정량 하는 방법으로 「생물학적제제 기준 및 시험방법」 일반시험 항 엔도톡신시험에 따라

실시하거나, 허가 받은 방법에 따라 실시한다.

## D.5 이상독성부정시험

“이상독성부정시험”이라 함은 그 의약품의 제조공정 중 유입될 수 있는 외래성 물질에 의한 이상반응을 확인하기 위한 시험으로 비정상적인 독성시험이나 일반적인 안전성 시험으로 지칭되기도 한다.

이상독성부정시험은 완제의약품에 설정하는 것이 원칙이다. 다만, 해당 로트가 의약품 제조 및 품질관리기준과 생물학적제제등 제조 및 품질관리기준을 준수하여 제조되었고 제조공정의 일관성 유지 및 관리 등으로 외부로부터의 오염이 없을 것으로 인정되는 경우에 한하여, 제조원 품질부서 책임자의 확인 자료가 있는 경우 시험을 대체할 수 있다. 또한 시험 수행이 이론적으로 불가능하거나 (예: 제품 자체가 독소를 함유한 경우), 수행하는 것이 무의미하다고 인정되는 경우 (예: 경구투여 등) 에는 설정하지 않을 수 있다.

시험방법은 「생물학적제제 기준 및 시험방법」 일반시험 항 이상독성부정시험을 참조하며, 해당동물 투여량을 달리하는 경우, 품목허가 심사 시 승인 받아 허가된 방법에 따라 실시해야 한다.

## D.6 정제백일해 무독화시험

백일해 백신의 특이독성시험 혹은 무독화시험은 무독화된 백일해균 혹은 정제된 백일해 독소에 의한 잔류독성이 존재하는지를 측정하기 위한 시험이다.

정제백일해 무독화시험은 「생물학적제제 기준 및 시험방법」 「흡착 디프테리아, 파상풍 및 정제 백일해 혼합백신」 중 정제백일해무독화시험 방법이나 허가된 방법에 따라 실시하며, 완제의약품 단계에서 실시하면 최종원액에서의 무독화시험(특이독성시험)은 생략할 수 있다.

일본에서 수입/제조한 백신은 마우스체중감소시험과 히스타민증감시험(체온측정법)을, 유럽에서 수입되는 백신 경우에는 마우스히스타민민감성시험 (사망종말점법)을 주로 수행한다.

시험방법은 「생물학적제제 기준 및 시험방법」에 따르는 경우, 아래의 절차를 참조한다.

### D.6.1 무독화시험

#### D.6.1.1 마우스체중감소시험

백일해 무독화용 표준품을 적당한 대수적 등간격으로 단계희석 (보통 2배, 4배 간격으로 희석)한 표준액 (보통 3 구간) 과 희석하지 않은 검체를 사용한다. 생후 4 주 된 마우스 10 마리 이상을 1 군으로 하여 마리 당 0.5 mL를 복강 내에 주사하고 주사 전의 체중과 주사 후 16 시간에서의 체중의 차이를 산출한다. 이를 통계학적으로 처리하여 표준품과 비교할 때, 검체의 체중감소 활성은 10 BWDU/mL 이하이어야 한다.

#### *D.6.1.2 마우스 히스타민 증감 시험 (체온 측정법)*

검체를 4 °C 및 37 °C에서 4 주간 방치한다. 백일해 무독화용 표준품을 적당한 대수적 등간격으로 단계 희석 (보통 2배, 4배 간격으로 희석) 한 표준액 (보통 3 구간) 과 희석하지 않은 검체를 생후 4 주된 마우스 10 마리 이상을 1 군으로 하여 마리 당 0.5mL를 복강 내에 주사한다. 주사 후 4일째에 마리 당 히스타민 이염산염 4 mg을 복강내에 주사한다. 이때 주사량은 마리 당 0.5mL를 넘지 않도록 한다. 주사 후 30 분 후 피부 또는 직장 내 체온을 측정하고 통계학적으로 처리하여 비교할 때, 4 주간 37 °C로 가온한 검체와 4 °C에서 보관한 검체군 모두 마우스 히스타민 증감 활성은 0.4 HSU/mL 이하이어야 한다.

#### *D.6.1.3 히스타민 민감성 시험 (사망 종말점법)*

히스타민에 민감한 마우스 종을 사용하여 10 마리 이상을 1 군으로 하여 백일해 독소 표준품 희석액, 검체, 인산염 완충액을 복강 주사한 후 4 ~ 5일 후에 히스타민 이염산염 (히스타민으로서 2 mg) 시액을 각각 주사하고 24시간 이내에 사망한 동물수를 관찰한다. 이때 주사량은 0.5 mL를 넘지 않도록 한다. 관찰 기간 동안 인산염 완충액을 주사한 음성 대조군과 검체군 모두 생존하여야 한다. 다만, 표준품은 각 제조사의 유효성 기준을 따른다.

### **D.7 면역보조제 함량 시험**

면역보조제는 작용기전에 따라 크게 항원의 전달체, 면역증강제, 면역반응을 자극하는 동시에 항원에 대한 매트릭스로서 작용하는 것 등의 세 가지 종류로 구별된다. 면역보조제를 효과적으로 사용하면 재조합 항원의 면역원성을 증가시키고, 항원 투여량을 줄이거나 면역화 횟수를 줄일 수 있으며, 면역력이 약한 유아와 노인에게서 면역원성을 향상시키는 등의 다양한 효과를 얻을 수 있다.



현재 유럽 및 미국에서 승인을 받아 백신에 사용되고 있는 면역보조제로는 알루미늄염, MF59, AS03, AS04 등이 있다. 알루미늄염은 주로  $\text{Al}(\text{OH})_3$  또는  $\text{AlPO}_4$  형태로 사용되는데 일반적으로 단백질 항원을 흡착하여 천천히 방출 함으로서 면역증강효과를 나타내는 것으로 생각되었다. 그러나 최근에 알루미늄염이 수지상세포 (dendritic cell) 를 활성화시키고 interleukin(IL)- $1\beta$ 와 IL-18과 같은 사이토카인 분비를 촉진시키는 것으로 알려졌다. 알루미늄염은 여러 백신에 널리 사용되며 매우 안전한 것으로 생각되고 있지만 알러지 반응을 유발하고 신경독성도 있는 것으로 추정되고 있다. (백신 면역보조제의 개발 동향, 질병관리본부 감염병감시과, 2010.12.31.)

이러한 면역보조제의 함량은 품목허가 심사 시 승인 받은 방법으로 시험을 실시한다. 알루미늄 화합물을 면역보조제로 사용한다면, 알루미늄 농도는 1 회 인체 투여 용량 당 1.25 mg 을 넘지 않아야 하며, 시험방법은 「생물학적제제 기준 및 시험방법」 일반시험법 중 알루미늄정량법을 참조한다. 또한 칼슘 면역보조제를 사용한다면, 칼슘 함량은 1회 인체 투여 용량 당 1.3 mg 을 넘지 않아야 한다.

## D.8 보존제 함량시험

보존제는 의약품 제제를 오래 보존하기 위하여 첨가하는 물질로 인체에 해롭지 않아야 하고 치료효과를 변화시키지 않으며 제제의 품질을 평가하는 품질시험에 지장을 주어서는 안 된다.

이러한 보존제는 품목허가 심사 시 종류 및 함량을 승인 받는다.

보존제로서 치메로살을 사용한 경우에는 「생물학적제제 기준 및 시험방법」

일반시험법 중 치메로살정량법을 참조하고, 그 양은 0.012 w/v% 이하이며, 허가 받은 함량의 80 ~ 120 % 이어야 한다.

2-페녹시에탄올을 사용한 경우에는 「생물학적제제 기준 및 시험방법」 일반 시험법 중 2-페녹시에탄올정량법을 참조한다.

## D.9 잔류 무독화제 함량시험

백신은 화학물질이나 열 등을 이용하여 세균이나 바이러스를 불활화시켜 제조하게 된다. 이때 사용되는 화학약품의 잔류량은 확인되어야만 한다.

따라서 최종 로트에 들어있는 잔류 무독화제의 양을 결정해야만 하며, 그 방법과 기준에 대해서는 품목허가 심사 시 승인을 받아야 한다.

포름알데히드가 무독화제로 사용되었다면, 그 잔류량은 0.02 w/v%를 초과해서는 안 된다. 만약 다른 무독화제를 사용하였다면, 이를 정량화할 수 있는 적절한 시험을 실시해야 한다.

## D.10 pH 측정시험

최종 로트의 pH는 임상적으로 안전성과 유효성이 증명된 백신 로트의 pH 범위 이내에 있어야 한다. 일부 경우에는 삼투압 측정이 필요할 수도 있다.

## D.11 실용량시험

실용량시험은 『대한민국약전』 일반시험법 중 주사제의 실용량시험법에 따른다. 건조제제는 『대한민국약전』 일반시험법 중 제제균일성시험법 또는 『대한민국약전 외』 일반시험법 중 질량편차시험에 따르며, 일회용량 백신 및 다회용량 백신 모두, 실용량을 확인해야 하고, 이 양은 투여량 및 투여횟수에 충분해야 한다.

## E. 정제백일해 백신에 대한 동물대체시험법

### E.1 백일해 역가시험 동물대체시험

백일해백신의 효능 평가 지표인 역가시험은 실험동물에 면역 후 동물에서의 방어능을 나타내는 in vivo 시험방법을 보편적으로 사용하고 있다. 세계보건기구(WHO) 및 유럽약전 등 해외 공정서에서는 이 방법을 상세히 기술하고 있으나, 백신 품질관리 시험으로써 적용하기에는 소요되는 실험동물의 수가 많은 단점을 가지고 있다. 최근 동물윤리 문제의 대두와 더불어, 시설 및 관리, 수급 및 시험자의 실험숙련도 등 실험동물과 관련된 많은 제약이 따르는 in vivo 시험법을 새로운 기술을 활용한 다양한 in vitro 대체시험법을 개발하고 있다.

기본적으로 in vivo 시험방법과의 비교를 통하여 상관관계가 입증된 in vitro 시험방법을 사용토록 권고하고 있으며, 다른 한편으로는 시험방법의 통계분석기법의 개선을 통해 in vivo 시험방법에 사용되는 실험동물 수를 줄이고자 하는 노력도 이뤄지고 있다.

백일해 백신의 역가시험법은 크게 두 가지로 나뉘는데, 동물 면역 후 항혈청가를 확인하는 ELISA 방법과 동물면역 후 백일해 균주를 뇌에 주사하여 사망수를 표준품과 비교 확인하는 마우스뇌내공격법(MICA, modified mouse intracerebral challenge assay)이 있다. 마우스뇌내공격법은 항혈청가시험에 비해 실험동물이 많이 소요될 뿐만 아니라 동물의 고통 수준이 큰 시험법이다. 이에 반해 항혈청가시험은 면역된 마우스에서 백신의 유효성에 영향을 미치는 모든 항원에 대해 항체 반응을 평가하는 비-치사 동물 모델(non-lethal animal model)이다. 현재 국내 소아용 DTaP 백신은 3개 제품이 있으며, 이 3개 제품 모두 동물 소요가 많으며, 고통 수준이 높은 백일해 역가시험인 뇌내공격법을 국검 시험으로 사용하고 있는 반면, 국외 제조사의 DTaP 백신은 모두 항체가시험을 국검 시험으로 사용하고 있어 국내 제조의 DTaP 백신에 대한 백일해 역가시험으로 뇌내공격법에서 항체가시험법으로의 대체가 절실하다 할 수 있다. 최근 식약처에서 수행한 자체연구과제(정제 백일해 백신 역가시험법 동물대체시험 표준화에 관한 연구, 2014)에서는 백일해백신의 역가시험법인 뇌내공격법과 항체가시험법의 비교를 통하여 두 시험법간의 상관관계를 입증함으로써, 국내 정제백일해 백신의 뇌내공격법을 항체가시험법으로 대체하기 위한 근거를 마련 하였다. 향후 국내에서 개발될 정제 백일해 백신의 경우, 역가시험으로서 실험동물 수를 줄일 수 있고 동물의 고통 수준을 완화할 수 있는 항혈청가시험을 개발할 것으로 기대된다.

## E.2 백일해 히스타민 동물대체시험

정제 백일해 백신의 주요 방어항원의 하나인 백일해독소(PTx)는 적절한 면역 반응을 유도하면서 인체에 안전하기 위해 제형 이전에 무독화되어야 한다. 백일해 독소이드를생산하는 불활화과정은 백신의 효능(efficacy)을 유지하는 데 필요한 항원 구조를 보존하면서, 백일해 독소의 비활성화를 보장해야 하므로 신중하

게 제어가 되어야 한다. 현재, 마우스의 히스타민민감성시험(HIST)은 정제 백일해 백신의 백일해독소 잔류량을 검사하는 유일한 방법이다. 마우스 히스타민민감성시험은 마우스 체온(Temperature based HIST)을 측정하는 시험법과 사망 종말점을 측정하는 시험법(Lethal end point based HIST)이 있으며, 이 두가지 종류의 시험법은 마우스 종, 성별, 주령에 따라 그 결과의 변이가 매우크다 (reference : Improved protocols for histamine sensitization testing of acellular pertussis vaccines, Hokyung Oh et al. Vaccine 30(2012) 7246-7252).

최근 히스타민민감성 시험에 대한 동물대체시험법들이 개발되어 국제공동연구가 활발히 진행중에 있으며, 대표적 동물대체시험법으로는 Enzyme-coupled HPLC, Fetuin binding assay(Carbohydrate binding assay), cell-based assay가 있다. 2012년부터 유럽의약품품질위원회(EDQM) 후원으로 진행된 마우스 히스타민민감성시험에 대한 동물대체시험법 국제공동연구 및 국제워크숍은 식약처와 더불어 국내 제조사가 적극적으로 참여하고 있으며, 본 활동의 목적은 히스타민민감성시험을 대체하기 위해 상기 제안된 대체시험법의 프로토콜 및 그 결과를 검토하고, 대체시험법의 유용성과 한계 및 적용 가능성 평가하는 것이다.

## E.2.1 Enzyme-coupled HPLC

### E.2.1.1. 목적

이 시험방법의 목적은 fluorescent substrate(형광기질)와 HPLC를 이용하여 Acellular Pertussis based Vaccines 내의 ADP-Ribosyltransferase 활성을 정량하기 위함이다.

### E.2.1.2. 범위와 원리

백일해 독소는 ADP-ribose moiety를 NAD<sup>+</sup>로부터 guanine-nucleotide -binding proteins (G-proteins)의  $\alpha$ -subunits 신호전달로 전환시키는 것을 촉매 한다. 이러

한 ADP-ribosylation은 정상적인 receptor로부터 modified G-protein이 결합되지 않도록 하고, effector의 조절을 억제하여 반응을 저해한다. Gi3-protein  $\alpha$ -subunit의 carboxyl-terminal 20 amino acid sequence가 상동한 합성 펩타이드(Gai3C20 peptide)는 백일해 독소 ribosylation에서 좋은 기질로 알려져 있다. 여기에서 다루고 있는 enzymatic-HPLC coupled assay는 위에서 설명한 원리를 기초로 하고 있으며 Gai3C20 peptide가 결합되어 있는 fluorescein, for the PTx enzymatic transfer of ADP ribose from NAD to the cysteine moiety of the substrate의 기질로서 사용하는 F-VFDAVTDVHKNNLKEGGLY-COOH (HCAM-2)을 사용한다. 그리고 ribosylated product는 reverse-phase HPLC methodology에 의해 분리되고 정량화 된다. (Biologicals 2001, 29, 81-95) 실험실 환경에 따라서, modified HPLC assay system은 다음과 같이 수정되었다. 1) column heater를 필요로 하지 않는다. 2) test sample로서 pertussis toxin을 추가로 필요로 하지 않는다. (Vaccine 2002, 21, 44-52). 이 아래 쓰여져 있는 assay 절차는 modified assay system이다.

## E.2.2 Fetuin binding assay

### E.2.2.1. 목적

이 시험방법은 acellular pertussis(무세포 백일해) combination vaccine 내의 잔류 pertussis toxin(PT)을 확인하기 위한 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)을 설명하고 있다.

### E.2.2.2. 범위와 근거

다음 ELISA method는 PT를 감지하기 위해 ligand로서 fetuin을 사용한다. PT가 glycoprotein에 결합하는 것은 구조적인 영향을 미친다. fetuin은 완전하게 sialylated multiantennary N-glycan structure A3을 가지고 있으며, 이는 PT에 매우 높은 affinity를 가진다. 그리고 다른 vaccine components와 교차반응을 보이지 않는다. (Analytical Biochemistry 356 (2006) 244 - 253) sheep anti-PT polyclonal

antibody가 PT를 확인하기 위해 사용되어 왔으며 donkey-anti-sheep-HRP (Horse raddish peroxidase) conjugate antibody는 secondary antibody로 이용되어 왔다. 사용되는 substrate는 horse raddish peroxidase가 substrate component를 변환시키면서 reaction을 촉매 하도록 하는 역할을 한다. [Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS)] to a coloured compound. 발색되는 색을 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 정량 한다. PTx의 최종 농도는 standard curve에 의해서 결정되며 ng/ml 단위로 나타낸다.

### E.2.3 Modified CHO Cell-based Assay

#### E.2.3.1. 서론

National Regulatory Authorities(국제규제기관)에서는 현재 제조과정에서 잔류하고 있거나 화학적으로 얻어진 pertussis toxoid의 변환으로 인하여 acellular pertussis(aP) vaccines에 존재하는 pertussis toxin(PTx) activity의 test하는 것을 요구하고 있다.

batch를 출하하기 위해 vaccine에서 PTx를 감지하는 것은 현재 mouse Histamine Sensitisation Test (HIST)(히스타민 민감성 시험)를 통해 이루어지고 있으며, 여기서 동물은 PTx 내의 histamine에 민감하기는 하지만 치명적이지는 않다. 이 test는 굉장히 변수가 많고, 많은 수의 동물들을 사용하며, lethal end-point(사망종말점법)에 의해 불편한 점이 존재한다. 최근에 HIST는 과학적 목적으로 동물을 사용하는 시험 중 대체해야 하는 우선순위로 선정되어 있다.(in the light of Directive 2010/63/EC)

HIST 대체법을 찾기 위해 국제적으로 많은 노력이 이루어지고 있다.

The European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) monographs Pertussis vaccine (acellular, component, adsorbed) (1356) and Pertussis vaccine (acellular, co-purified, adsorbed) (1595)는 validation된 Chinese Hamster Ovary (CHO) cell assay를 사용할 수 있도록 했다. 이 assay는 non-adjuvanted bulks에서 잔류 PTx

와 toxoid의 toxicity 전환을 확인하기 위한 test로 PTx의 clustering effect(연관효과)에 기초한다.

"Direct Method"에서 vaccine은 직접적으로 cell에 적용되었다. 그러나 부작용을 줄이기 위해서 19번 희석을 해야 한다. "Indirect Method"에서는 semi permeable cell culture insert가 vaccine adjuvant와 cell 사이의 직접적인 접촉을 막기 위해 사용되었다. 기초자료는 두 modified CHO assay의 sensitivity가 적어도 측정된 LD5(dose lethal for 5% of the animals)이어야 한다.

## F. 정제백일해 백신 품질관리 통계처리방법

생물학적제제 및 시험기준에 역가시험, 독성시험 또는 미생물의 농도시험 등에 통계학적 처리가 필요할 때가 적지 않다. 위의 시험 중에서 역가, 독성 또는 농도 등을 정량하는 경우의 실험 계획이나 결과의 분석에 사용되는 통계학적 방법은 보통 회귀분석법, 특히 평행선검정법 (parallel line assay method)이다. 넓은 의미에서 생물학적제제라고 함은 그 역가나 독성에서 생물학적 방법을 사용하는 제제를 일컫는다고 하는 사고방식이다.

일반적으로 생물학적 방법을 사용하는 시험의 계획이나 결과의 분석의 이론과 방법체계의 중심은 평행선 검정법이다. 그러나 이 생물기준에서는 각조에 특히 최종벌크나 소분제품에 규정된 상기의 제시험의 대부분은 소위 최소요구량의 사고방식으로 세워져있고 보통 어떤 규정된 수준 이상 의 역가나 어떤 수준이하의 독성인가를 시험하도록 규정되어 있다.

이 수준이 예를 들면 동물의 반응의 크기등으로 표현되어 있는 경우와 표준품이나 참조품의 일정 량의 역가이상 또는 독성이하라고 표현되고 있는 경우도 있다. 결국 이 생물기준의 범위로 한정 한다면 그 판단을 위하여 통계학적 방법으



로 평균치의 비교를 위하여 주어진 방법으로 충족되는 경우가 많다.

## F.1 평행선 검정법

2개 이상의 검체나 독성에 틀림이 있는가 없는가를 검정하는 경우는 평균치의 차를 검정법으로 되지만 그 차이의 크기를 추정하는 경우에는 평행선검정법을 사용한다.

## F.2 회귀분석법

검체의 2단계 이상의량을 접종하고 각각의 접종량마다 동물의 반응을 구하여 그 측정치에서 검체의 어떤 특정한 반응을 일으키는 강도 또는 검체중에 함유되어 있는 어떤 특정한 물질 (유효 물질)의 농도를 추정하는 경우에 사용하는 방법이다.

이 방법은 영어로 Biological Assay 또는 Bioassay라고 하는 영역으로 취급됨으로 생물학적 정량법이라한다. 반응의 측정치를 그 성격에 따라 2종으로 나뉜다. 하나는 측정치가 항체가, 체중, 세포수(소수의 경우는 제외), 피부반응의 크기 등으로 표현되는 경우로 이것을 일괄하여 연속량이라고 한다. 또 하나는 동물의 생사 등과 같은 반응의 음양으로 표현되는 경우로 이것을 이산량이라고 한다. 이산량의 경우에는 주지하는 바와 같이 용량마다 출현율을 구하여 각각 통계학적 분석을 행하는 것이다. 이산량, 연속량에서도 분석의 기본적인 방법에는 차이가 없으나 이산량의 경우에는 독특한 절차를 밟지 않으면 안된다. 역시 회귀분석법에는 특별히 미리 알린 것이 없는 한 용량을 대수에 변환하고 나서 분석을 행한다. 이산량의 경우에 가장 많이 사용되고 있는 것이 Probit (Probability unit의 줄임말) 변환이다. 용량의 대수의 간격이 등차가 되어 있고 각 용량마다의 표본의 크기가 동일한 경우 계산이 간단하게 되기 때문에 실험계획의 실제에 이점을 고려한다.

### F.2.1 출현율의 회귀분석법

반응의 측정이 이산량으로 주어지는 경우에는 모수를 측정하기 위한 간편법이 고안되어 그 중 Reed Muench 법 등이 상당히 보급되어 있다. 이산량의 회귀 분석의 정통적인 방법인 Probit법이 상당히 번거로운 절차를 어떻게든지 하지 않으며 안되기 때문에 복잡한 절차에 간단 한 이것들의 간편법이 광범위하게 사용 되는 것은 무리가 없기때문이라고 본다.

그러나, 간편법에는 적지않은 약점이 있다. 예를 들면 Reed Muench법은 50% 유효량의 추정이 가능할 뿐, 직선성이나 평행선의 검정에서는 할 수 없다. 또 그 50% 유효량의 추정치를 사용하여 상대역가의 계산이 광범위하게 행하여지고 있으므로 통상 직선성도 평행성의 보증도 없이 적용되고 있는 경향이 있다. 2개의 평행선이 평행되지 않는 경우는 상대역가를 구할 수 없는 경우가 있기 때문에 사전에 그 실험계에서 평행선이나 직선성이 확실한 경우에 한하여 간편법을 이용한다고 하는 주의가 있어야 한다. 따라서 다소 번잡하더라도 사용하고 있는 실험계에 대하여 적시에 직선성이나 평행선을 Probit법으로 검정하여 두는 것을 권장한다.

### F.3 50% 유효량(CED50, LD50등) 의 추정

생물학적제제 기준 및 시험방법에서는 대부분의 역가시험에서 사용되는 공격 용의 미생물 부유액 의 LD50의 범위가 규정되어 있다. 따라서, 그 추정을 행하지 않으면 안된다. 그 추정에서는 정식으로 Probit법이 좋다고 생각되지만 규정된 LD50의 범위는 비교적 폭이 넓기 때문에 보통 Reed Muench법을 사용한다.

아래와 같은 시험항목에 대하여 Bioassay Assist program (version. 2.0.0)을 사용한 통계분석방법을 예시를 통해 설명하고자 한다.

- 백일해역가시험 : Probit assay
- 백일해무독화시험(마우스체중감소, 백혈구수증가시험, 히스타민증감시험)

: Parallel line assay.

## F.4 Bioassay Assist

생물학적제제(Biological Products) 품질관리를 위한 statistic analysis software

### F.4.1 분석을 위한 절차 방법

#### F4.1.1. Main menu

다음 software는 다음 기능들로 구성되어있다.

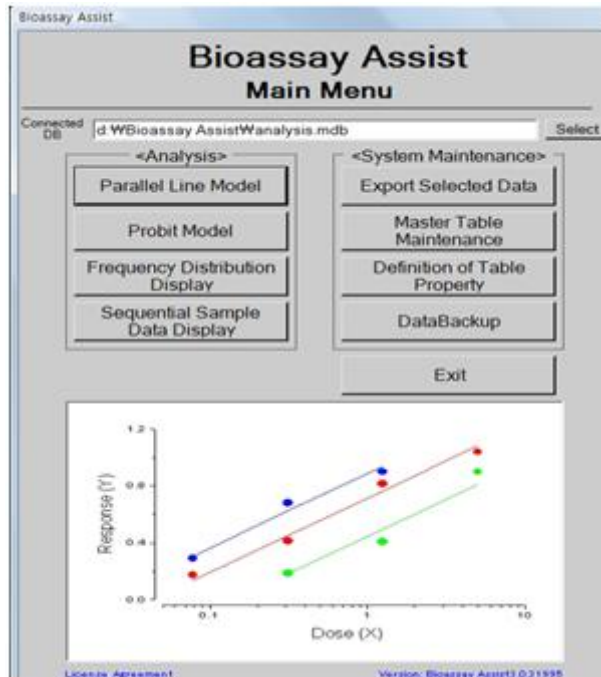
##### F4.1.1.1 Analysis

- Parallel line assay method

생물학적제제의 일반적인 품질관리 시험을 하는데 있어서 continuous variables(연속변수) 데이터를 분석하는 도구로 사용된다.

- Probit method

Parallel line assay method와 유사한 방법으로, 사망률에 따른 50% 치사량과 같은 일반적인 discrete variables(이산변수)를 분석하기 위한 도구로 사용된다.



#### F4.1.1.2 결과 분석을 활용하기 위한 기능

- Frequency distribution display

다음은 system에 저장되어 있는 계산 결과값을 사용한 일반적인 toxicity 또는 potency test 결과의 frequency distribution 분석을 돕는 기능을 한다.

- Sequential sample data display

다음은 system에 저장되어 있는 계산 결과값을 사용한 product의 potency or toxicity value의 graphical trend를 알아보는 기능을 한다.

- Export selected data

저장된 분석 결과값은 standard calibration 또는 reference 준비, variance(분산)와 regression coefficient(회귀계수)의 population value를 구하는 것과 같은 기능을 추가적으로 실시하는데 유용하다.

#### F4.1.1.3 system maintenance를 위한 기능

- Master table maintenance

다음 system은 사용자가 자신의 assay의 variance와 regression coefficient 대신에 미리 등록 되어진 population variance와 regression coefficient를 사용할 수 있게 한다. default setting에서 manufacturer과 product의 이름은 사용자의 편의에 따라서 변경할 수 있다. 필요한 편집 도구나 기능은 다음 목적을 위해 여기서 제공 되어진다.

- ID information registration

사용자는 sample 확인과 분석 결과를 위한 네개의 table subject items를 만들 수 있다. 미리 설정되어 있는 table subject item는 manufacturer, batch number, product name과 sample ID number이다. system을 사용하는데 있어서 이러한 정보와 환경은 사용자에게 따라서 다를 수 있다. 이 기능은 사용자들이 편의에 따라서 table subject item을 설정할 수 있도록 한다.

다음 설명서는 위에서 언급한 기능들을 위한 statistic technique을 설명하고 분석 결과값을 사용한 추가적인 계산 방법을 설명하고 있다.

다음 3가지 방법은 계산을 위해 데이터를 입력할 때 사용 가능하다.

- 1) Manual data input

- \* 다음 화면에서, "Number of samples"와 "Repeats of measurement"를 설정하고 "Add" 또는 "Delete" 버튼을 사용하여 cell의 개수를 설정함으로써 table format을 조정하여 데이터를 입력할 수 있다.

- \* 다른 data sheet로부터 복사, 붙이기

위에서 언급한 대로 number of samples, repeats of measurement 그리고 number of cells를 정의함으로써 data를 복사할 수 있는 data sheet format을

조정하여 table format을 구성한다. 그리고 Excel과 Lotus123과 같은 data sheet로부터 잘라내거나 복사한 data를 "CTL+V"를 눌러 해당 table에 붙여 넣는다.

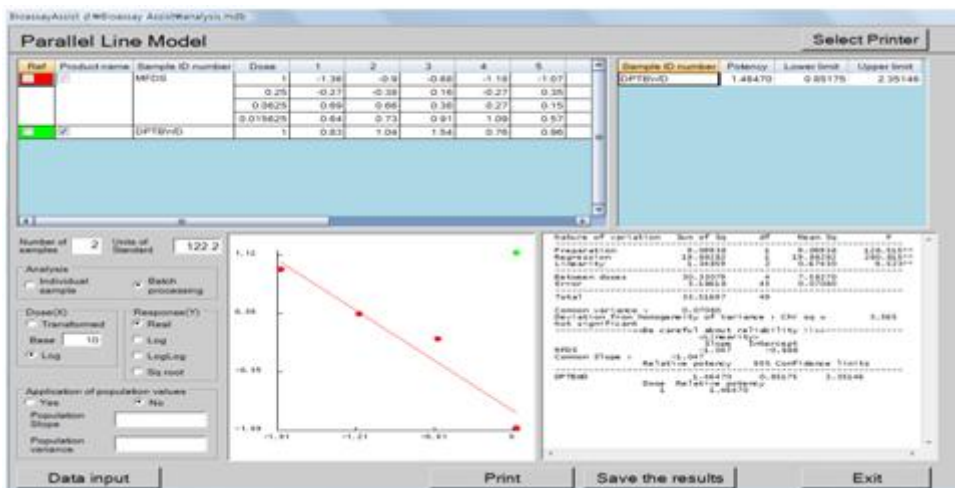
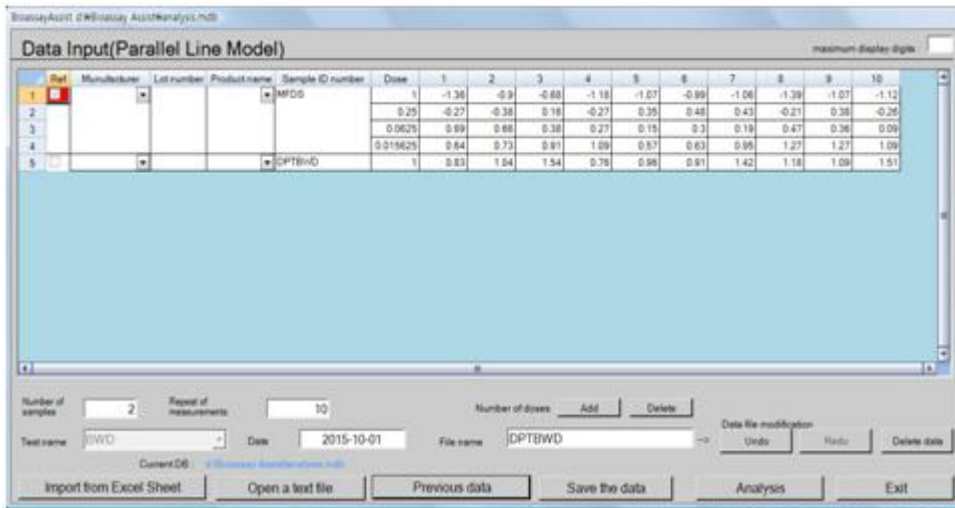
## 2) Import from an Excel work sheet

사용자는 data를 밖으로 내보내기 이전에 file로 저장하기 위해 "Bioassay Assist" format에 따라 입력 되어진 Excel data sheet를 만들어야 한다. data는 각 sample당 first dose의 left column의 row를 가져야 한다. 이 sample의 default definition은 "Sample ID number"로 이것들은 채워져야 하는데 그 이유는 이 정보가 test sample을 구분하고 data format을 확인하는데 반드시 필요하기 때문이다.

## 3) Selecting from existing data files

위에서 언급한 1)또는 2)의 방법으로 입력되고 "Test name", "Date" 그리고 "File name"이 설정된 file로 저장된 data는 이후에 data file list로부터 선택하여 분석을 위해 사용될 수 있다.

"Bioassay Assist"는 다양한 test data에 적용되기 때문에 "Test name"은 다른 test data와 구별하기 위해서 반드시 요구된다. "Test name"은 population variance와 population regression coefficient와 같이 미리 등록 되어진 population value를 사용할 수 수 있도록 한다. 더욱이 "Test name"은 결과값의 frequency distribution을 도표로 나타내거나 serial batch의 결과값의 경향을 알아보기 위해 data를 선택하는데 있어서 중요하다.



variance의 homogeneity에 significant deviation이 일어나는 가장 큰 이유는 다음 두 가지로 예측할 수 있다.

(1) 적절하지 않은 grouping으로 인한 편향된 결과

측정된 values가 random sample이 아닐 가능성이 있다. 따라서 population values의 편향되지 않은 결과값을 얻을 수 없어 신뢰도가 낮다. 이를 해결하기 위해 grouping 절차를 수정하는 것을 권장한다. 그러나, error variance에서 모든 possible variation factors를 포함하는 실험이 일반적인 범위를 벗어나 진행될 경우는 예외가 될 수 있다. 다음과 같은 상황에서는 error variance가 variation

factor를 따라야 하기 때문에 매우 작을 수 있다. 이 경우, 측정된 value를 사용하는 것 대신에 일반적인 계산 추정값을 사용하기 위해 특별한 실험방법으로 population value를 측정하는 것을 추천한다. 이 system은 미리 등록된 population variance와 slope의 추정값을 사용자가 사용하게 함으로써 confidence limit(신뢰한계)의 합리적인 추정값을 측정하도록 한다.

(2) response와 variance의 규모 사이의 상관관계와 같은 particular relationships (특정한 관계)

이 문제는 response의 distribution pattern에 따라서 측정된 value의 transformation 절차를 수정함으로써 해결할 수 있다.

#### \* Analysis of variance

variance의 distribution과 homogeneity normality가 확립되어 있다고 가정함으로써 다음 analysis를 구성할 수 있다.

$X_{pi}$ 와 같은 reference를 포함하는  $p$  th sample의  $i$  th dose와  $n_{pi}$ 와 같은 dose  $X_{pi}$ 에서의 number of repeats of measurement, 그리고  $Y_{pij}$ 로서  $j$  th measurement의 value를 가정한다.

squares와 slope의 합은 다음과 같이 계산된다.

Analysis of variance table				
Factor	Sum of Sq.	D.f.	Mean S.S.	F
Bet. Prep.	$pS_{yy}$	$q-1$	$pS_{yy}/(q-1)$	$(pS_{yy}/(q-1))/(eS_{yy}/(N-\sum \Sigma k))$
Regression	$S_{reg}$	1	$S_{reg}/1$	$(S_{reg}/1)/(eS_{yy}/(N-\sum \Sigma k))$
Parallelism	$S_{para}$	$q-1$	$S_{para}/(q-1)$	$(S_{para}/(q-1))/(eS_{yy}/(N-\sum \Sigma k))$
Linearity	$S_{lin}$	$\sum \Sigma k - 2q$	$S_{lin}/(\sum \Sigma k - 2q)$	$(S_{lin}/(\sum \Sigma k - 2q))/(eS_{yy}/(N-\sum \Sigma k))$
Betw. Doses	$dS_{yy}$	$\sum \Sigma k - 1$	$dS_{yy}/(\sum \Sigma k - 1)$	$(dS_{yy}/(\sum \Sigma k - 1))/(eS_{yy}/(N-\sum \Sigma k))$
Error	$eS_{yy}$	$N - \sum \Sigma k$	$eS_{yy}/(N - \sum \Sigma k)$	
Total	$\tau S_{yy}$	$N-1$		



다음 계산 결과값은 분석하기 위한 objective sample과 비정상적인 data를 제거하는 것과 같이 objective data를 변경하여 update할 수 있다. 만약 두 개보다 적은 data를 가지는 dose가 포함되어 있다면, test linearity는 얻을 수 없고, sum of square(제곱합)과 degrees of freedom(자유도)은 error variance와 degrees of freedom for error로 다루어진다.

비정상적인 big variance 또는 small degrees of freedom에 의해 data가 적절하지 않은 경우 이 system은 confidence interval(신뢰구간)을 계산할 수 없다. 이러한 경우, test protocol은 정확도를 높이기 위해서 더 넓은 범위의 dose 또는 repeats of measurement를 증가시켜 수정해야 한다.

relative potency와 이것의 신뢰구간은 dose의 transformation에 따라서 reverse-transformed value of M으로 나타난다. dose가 logarithm으로 변형될 때, 10M, 10ML, 10MU는 relative potency와 신뢰구간 최소, 최대 한계로 나타난다. 만약 reference 또는 standard preparation의 unit value가 U로 주어지면, U를 곱한 relative potency와 그것의 confidence limit이 나타난다. dose의 transformation이 없을 경우, reference preparation의 unit value를 곱한 M, ML, MU가 relative potency와 confidence limit으로 나타난다.

#### \* Printing out results of the analysis

"Print" 버튼을 이용하여 선택한 sample의 결과값을 dose response의 그래프와 함께 출력할 수 있다. 출력된 sheet에는 분석에서 제외된 data가 \*로 표시된다. 분석에서 transformation이 일어나지 않은 original data는 사용자가 data 입력을 확인하도록 하기 위해 data sheet에 출력된다.

#### \* Saving results of the analysis

위의 계산에서 얻어진 다양한 statistic index는 main menu에 있는 "Export Selected Data" 기능을 통해 file을 옮김으로써 이후의 분석에서 사용할 수 있다. 분석 결과를 저장하기 위해서 raw data는 "Data Input"에서 "Test name"과 "File name"을 지정하여 저장해야 한다. 이는 raw data와 분석 결과값의 일치도를 확인하기 위함이다.

Manufacturer, Lot number 그리고 Sample ID number와 같은 table subject item은 사용자의 편의에 따라서 변경할 수 있다.

Paralle Line Assay Method와 비슷하게 data를 입력하는 3가지 방법이 다음과 같이 있다.

#### 1) Manual input

- \* data를 수동으로 입력하기 위해 "Sample number"를 지정하고 cell을 선택하고 "Add" 또는 "Delete" 버튼을 이용하여 dose number를 변경함으로써 table format을 구성한다.

- \* 다른 data sheet로부터 복사: 위에서 언급한 방법과 비슷하게 subject data sheet를 조정하고, Excel와 Lotus123과 같은 data sheet를 복사 또는 잘라내기 하여 table에 "CTL+V"를 눌러 붙여 넣는다.

#### 2) Importing from an Excel work sheet

사용자는 data를 밖으로 내보내기 이전에 file로 저장하기 위해 "Bioassay Assist" format에 따라 입력되어진 Excel data sheet를 만들어야 한다. data는 각 sample당 first dose의 left column의 row를 가져야 한다. 이 sample의 default definition은 "Sample ID number"로 이것들은 채워져야 하는데 그 이유는 이 정보가 test sample을 구분하고 data format을 확인하는데 반드시 필요하기 때문이다.

### 3) Selecting from existing data files

위에서 언급한 1)또는 2)의 방법으로 입력되고 "Test name", "Date" 그리고 "File name"이 설정된 file로 저장된 data는 이후에 data file list로부터 선택하여 분석을 위해 사용될 수 있다.

"Bioassay Assist"는 다양한 test data에 적용되기 때문에 "Test name"은 다른 test data와 구별하기 위해서 반드시 요구된다. "Test name"은 population variance와 population regression coefficient와 같이 미리 등록되어진 population value를 사용할 수 수 있도록 한다. 더욱이 "Test name"은 결과값의 frequency distribution을 도표로 나타내거나 serial batch의 결과값의 경향을 알아보기 위해 data를 선택하는데 있어서 중요하다.

data 입력은 아래 그림과 같이 이루어진다.

Ref	Manufacturer	Lot number	Product name	Sample ID number	Dose	N	Y
1				MPCB	0.05	20	18
2					0.1	20	11
3					0.52	20	8
4				P Potency	0.5	20	17
5					0.1	20	11
6					0.52	20	7

"Test name"과 "File name"을 지정하고 "Save the data" 버튼을 이용하여 data를 저장한다. 그리고 "Analysis" 버튼을 누르면 analysis를 하기 위해 아래 그림과 같이 화면이 이동한다.

여기서, 사용자는 relative potency 계산과 dose X의 transformation 과정을 위해 reference sample(지정되지 않을 경우 data table의 첫 번째 sample)을 지정해야 한다. 사용자는 가능하다면 해당 column에 reference preparation의 unit value를 입력해야 한다. 만약 value가 주어지지 않는다면, 계산은 unit value 1.0으로 계산된다.

## 참고 문헌

1. Pertussis vaccines: WHO position paper. Weekly Epidemiological Record, 2010, 85(40):385–400.
2. Guidelines for the production and control of the acellular pertussis component of monovalent or combined vaccines. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-seventh report. Geneva, World Health Organization, 1998 (WHO Technical Report Series, No. 878), Annex 2.
3. Corbel MJ, Kreeftenberg JG, Knezevic I. WHO Working Group on the standardization and control of pertussis vaccines – report of a meeting held on 6–7 May 2003, Ferney Voltaire, France. Vaccine, 2004, 22(3–4):293–300.
4. Corbel MJ, Mastrantonio P, Kreeftenberg JG. Ad hoc Working Group on acellular pertussis vaccines, World Health Organization, Geneva, 27–28 July 2000. Vaccine 2001, 20(3–4):288–291.
5. Corbel MJ, Xing DK, Kreeftenberg JG. Informal consultation with manufacturers and WHO Ad hoc working group on mouse protection models for acellular pertussis vaccines, National Institute for Biological Standards, 12 November 1998. Biologicals, 1999, 27(2):189–193.
6. Xing DK et al. WHO working group on standardization and control of acellular pertussis vaccines – report of a meeting held on 16–17 March 2006, St. Albans, United Kingdom. Vaccine, 2007, 25(15):2749–2757.
7. Knezevic I et al. WHO Working Group meeting on standardization of acellular pertussis vaccines: potency assay, Beijing, China, 7–9 November 2007. Vaccine, 2008, 26(32):3960–3968.
8. Kato T. Pertussis vaccine in Japan. Journal of Infection and Chemotherapy, 1999, 5(4):185–189.
9. Kuno-Sakai H, Kimura M. Safety and efficacy of acellular pertussis vaccine in Japan, evaluated by 23 years of its use for routine immunization. Pediatrics International, 2004, 46(6):650–655.
10. Watanabe M, Nagai M. Acellular pertussis vaccines in Japan: past, present and future. Expert Review of Vaccines, 2005, 4(2):173–184.
11. Zhang L et al. Acellular vaccines for preventing whooping cough in children. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2011, (1):CD001478.

12. Ortqvist A et al. Protective effect of and adverse events following acellular pertussis vaccine. *Acta Pædiatrica*, 2010, 99(Suppl. 461):37–96.
13. Cherry JD et al. A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses. *Vaccine*, 1998, 16(20):1901–1906.
14. Storsaeter J et al. Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine*, 1998, 16(20):1907–1916.
15. Denoel P et al. Comparison of acellular pertussis vaccines–induced immunity against infection due to *Bordetella pertussis* variant isolates in a mouse model. *Vaccine*, 2005, 23(46–47):5333–5341.
16. Guiso N et al. Intranasal murine model of *Bordetella pertussis* infection. I. Prediction of protection in human infants by acellular vaccines. *Vaccine*, 1999, 17(19):2366–2376.
17. Sato H, Sato Y. Protective antigens of *Bordetella pertussis* mouse–protection test against intracerebral and aerosol challenge of *B. pertussis*. *Developments in Biological Standardization*, 1985, 61:461–467.
18. Syukuda Y et al. Aerosol infection test for evaluation of pertussis vaccine. *Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 1988, 13(Suppl.):71–77.
19. Watanabe M et al. Efficacy of pertussis components in an acellular vaccine, as assessed in a murine model of respiratory infection and a murine intracerebral challenge model. *Vaccine*, 2002, 20(9–10):1429–1434.
20. Stickings P et al. Collaborative study for the calibration of a replacement international standard for diphtheria toxoid adsorbed. *Biologicals*, 2010, 38(5):529–538.
21. WHO good manufacturing practices: main principles for pharmaceutical products. In: WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Forty-fifth report. Geneva, World Health Organization, 2011 (WHO Technical Report Series, No. 961), Annex 3.
22. Good manufacturing practices for biological products. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-second report. Geneva, World Health Organization, 1992 (WHO Technical Report Series, No. 822), Annex 1.
23. WHO guidelines on transmissible spongiform encephalopathies in relation to biological and pharmaceutical products. Geneva, World Health Organization,

2003 (WHO/BCT/QSD/03.01).

24. General requirements for the sterility of biological substances (Requirements for biological substances, No. 6, revised 1973, amendment 1995). In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-sixth report. Geneva, World Health Organization, 1995 (WHO Technical Report Series, No. 872), Annex 3.
25. Kataoka M et al. Chinese hamster ovary (CHO) cell clustering does not correlate with in vivo histamine-sensitization when measuring residual activity of aldehyde-treated pertussis toxin (PT). *Biologicals*, 2002, 30(4):297–302.
26. WHO guidelines on regulatory expectations related to the elimination, reduction or replacement of thiomersal in vaccines. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Fifty-third report. Geneva, World Health Organization, 2004 (WHO Technical Report Series, No. 926), Annex 4.
27. Adsorbed purified pertussis vaccines. In: Minimum requirements for biological products. Tokyo, National Institute of Infectious Diseases, 2006:150–153.
28. Chinese Pharmacopoeia Commission. Diphtheria, tetanus and acellular pertussis combined vaccine, adsorbed. In: Chinese pharmacopoeia. Vol. III. Beijing, Peoples' Medical Publishing House, 2005:67–71.
29. Xing D et al. Collaborative study for the standardisation of the histamine sensitizing test in mice and the CHO cell-based assay for the residual toxicity testing of acellular pertussis vaccines. *Pharmeuropa Bio and Scientific Notes*, 2010, 2010(1):51–63.
30. Yuen CT et al. An in vitro assay system as a potential replacement for the histamine sensitisation test for acellular pertussis based combination vaccines. *Vaccine*, 2010, 28(21):3714–3721.
31. Robinson A, Irons LI. Synergistic effect of Bordetella pertussis lymphocytosis-promoting factor on protective activities of isolated Bordetella antigens in mice. *Infection and Immunity*, 1983, 40(2):523–528.
32. Report. Working Group on the standardization and control of pertussis vaccines, 6–7 May 2003. Geneva, World Health Organization, 2003 (<http://www.who.int/biologicals/publications/meetings/areas/vaccines/apertussis/Pertussis%20WG%20May%202003.pdf>, accessed 15 March 2012).

33. Gaines–Das R et al. Modified intra–cerebral challenge assay for acellular pertussis vaccines: comparisons among whole cell and acellular vaccines. *Vaccine*, 2009, 27(49):6824–6832.
34. Assay of acellular vaccine. General chapter 2.7.16. European pharmacopoeia, Suppl. 7.5. Strasbourg, Council of Europe, 2011.
35. 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.
36. Guidelines for stability evaluation of vaccines. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Fifty–seventh report. Geneva, World Health Organization, 2011 (WHO Technical Report Series, No. 962), Annex 3.
37. WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Fifty–fourth report. Geneva, World Health Organization, 2005 (WHO Technical Report Series, No. 927), Annex 1.
38. Sato Y et al. Aerosol infection of mice with *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity*, 1980, 29(1):261–266.
39. Shahin RD, Cowell JL. Mouse respiratory infection models for pertussis. *Methods in Enzymology*, 1994, 235:47–58.
40. Guidelines for assuring the quality of pharmaceutical and biological products prepared by recombinant DNA technology. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty–first report. Geneva, World Health Organization, 1991 (WHO Technical Report Series, No. 814), Annex 3.
41. Arciniega JL et al. Contribution of the B oligomer to the protective activity of genetically attenuated pertussis toxin. *Infection and Immunity*, 1991, 59(10):3407–3410.
42. Brown DR et al. Construction and characterization of genetically inactivated pertussis toxin. *Developments in Biological Standardization*, 1991, 73:63–73.
43. Kimura A et al. Pertussis toxin analog with reduced enzymatic and biological activities is a protective immunogen. *Infection and Immunity*, 1990, 58(10):3337–3347.
44. Oda M et al. Protective activities of the filamentous hemagglutinin and the lymphocytosis-promoting factor of *Bordetella pertussis* in mice. *Journal of Infectious Diseases*, 1984, 150(6):823–833.

45. Robinson A et al. Protection against intranasal infection of mice with *Bordetella pertussis*. *Developments in Biological Standardization*, 1985, 61:165–172.
46. Sato H, Sato Y. *Bordetella pertussis* infection in mice: correlation of specific antibodies against two antigens, pertussis toxin, and filamentous hemagglutinin with mouse protectivity in an intracerebral or aerosol challenge system. *Infection and Immunity*, 1984, 46(2):415–421.
47. Shahin RD, Witvliet MH, Manclark CR. Mechanism of pertussis toxin B oligomer-mediated protection against *Bordetella pertussis* respiratory infection. *Infection and Immunity*, 1990, 58(12):4063–4068.
48. Sato H et al. Monoclonal antibody against pertussis toxin: effect on toxin activity and pertussis infections. *Infection and Immunity*, 1984, 46(2):422–428.
49. Sato H, Sato Y. Protective activities in mice of monoclonal antibodies against pertussis toxin. *Infection and Immunity*, 1990, 58(10):3369–3374.
50. Sato H, Sato Y. Relationship between structure and biological and protective activities of pertussis toxin. *Developments in Biological Standardization*, 1991, 73:121–132.
51. Sato Y et al. Role of antibody to leukocytosis-promoting factor hemagglutinin and to filamentous hemagglutinin in immunity to pertussis. *Infection and Immunity*, 1981, 31(3):1223–1231.
52. Shahin RD, Amsbaugh DF, Leef MF. Mucosal immunization with filamentous hemagglutinin protects against *Bordetella pertussis* respiratory infection. *Infection and Immunity*, 1992, 60(4):1482–1488.
53. Roberts M et al. Protection of mice against respiratory *Bordetella pertussis* infection by intranasal immunization with P.69 and FHA. *Vaccine*, 1993, 11(8):866–872.
54. Knight JB et al. Immunogenicity and protective efficacy of a recombinant filamentous haemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Clinical and Experimental Immunology*, 2006, 144(3):543–551.
55. Kimura A et al. *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin: evaluation as a protective antigen and colonization factor in a mouse respiratory infection model. *Infection and Immunity*, 1990, 58(1):7–16.
56. Cahill ES et al. Immune responses and protection against *Bordetella pertussis*



- infection after intranasal immunization of mice with filamentous haemagglutinin in solution or incorporated in biodegradable microparticles. *Vaccine*, 1995, 13(5):455–462.
57. Alonso S et al. Eighty-kilodalton N-terminal moiety of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin: adherence, immunogenicity, and protective role. *Infection and Immunity*, 2002, 70(8):4142–4147.
  58. Charles IG et al. Identification and characterization of a protective immunodominant B cell epitope of pertactin (P.69) from *Bordetella pertussis*. *European Journal of Immunology*, 1991, 21(5):1147–1153.
  59. Gotto JW et al. Biochemical and immunological properties of two forms of pertactin, the 69,000-molecular-weight outer membrane protein of *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity*, 1993, 61(5):2211–2215.
  60. Roberts M et al. Recombinant P.69/pertactin: immunogenicity and protection of mice against *Bordetella pertussis* infection. *Vaccine*, 1992, 10(1):43–48.
  61. Shahin RD et al. Characterization of the protective capacity and immunogenicity of the 69-kD outer membrane protein of *Bordetella pertussis*. *Journal of Experimental Medicine*, 1990, 171(1):63–73.
  62. Jones DH et al. Protection of mice from *Bordetella pertussis* respiratory infection using microencapsulated pertussis fimbriae. *Vaccine*, 1995, 13(7):675–681.
  63. Jones DH et al. Orally administered microencapsulated *Bordetella pertussis* fimbriae protect mice from *B. pertussis* respiratory infection. *Infection and Immunity*, 1996, 64(2):489–494.
  64. Robinson A et al. Serospecific protection of mice against intranasal infection with *Bordetella pertussis*. *Vaccine*, 1989, 7(4):321–324.
  65. Zhang JM et al. Purification of serotype 2 fimbriae of *Bordetella pertussis* and their identification as a mouse protective antigen. *Developments in Biological Standardization*, 1985, 61:173–185.
  66. Pertussis vaccine (acellular, component, adsorbed). European pharmacopoeia, 01/2008:1356, 820. Strasbourg, Council of Europe, 2008.
  67. Ad Hoc Group for the Study of Pertussis Vaccines. Placebo-controlled trial of two acellular pertussis vaccines in Sweden – protective efficacy and adverse events. *Lancet*, 1988, 1(8592):955–960.

68. Blackwelder WC et al. Acellular pertussis vaccines. Efficacy and evaluation of clinical case definitions. *American Journal of Diseases in Children*, 1991, 145(11):1285–1289.
69. WHO meeting on case definition of pertussis, Geneva, 10–11 January 1991. Geneva, World Health Organization, 1991 (MIM/EPI/PERT/91.1; [http://whqlibdoc.who.int/hq/1991/MIM\\_EPI\\_PERT\\_91.1.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/1991/MIM_EPI_PERT_91.1.pdf), accessed 13 March 2013).
70. Trollfors B et al. A placebo-controlled trial of a pertussis-toxoid vaccine. *New England Journal of Medicine*, 1995, 333(16):1045–1050.
71. Greco D et al. A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. Progetto Pertosse Working Group. *New England Journal of Medicine*, 1996, 334(6):341–348.
72. Gustafsson L et al. A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. *New England Journal of Medicine*, 1996, 334(6):349–355.
73. Schmitt HJ et al. Efficacy of acellular pertussis vaccine in early childhood after household exposure. *Journal of the American Medical Association*, 1996, 275(1):37–41.
74. Liese JG et al. Efficacy of a two-component acellular pertussis vaccine in infants. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 1997, 16(11):1038–1044.
75. Olin P et al. Ad Hoc Group for the Study of Pertussis Vaccines. Randomised controlled trial of two-component, three-component, and five-component acellular pertussis vaccines compared with whole-cell pertussis vaccine. *Lancet*, 1997, 350(9091):1569–1577.
76. Plotkin SA, Cadoz M. The acellular pertussis vaccine trials: an interpretation. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 1997, 16(5):508–517; discussion 517–519.
77. Simondon F et al. A randomized double-blind trial comparing a two-component acellular to a whole-cell pertussis vaccine in Senegal. *Vaccine*, 1997, 15(15):1606–1612.
78. Heininger U et al. Pertussis Vaccine Study Group. Comparative efficacy of the Lederle/Takeda acellular pertussis component DTP (DTaP) vaccine and Lederle whole-cell component DTP vaccine in German children after household exposure. *Pediatrics*, 1998, 102(3 Pt 1):546–553.

79. Stehr K et al. A comparative efficacy trial in Germany in infants who received either the Lederle/ Takeda acellular pertussis component DTP (DTaP) vaccine, the Lederle whole-cell component DTP vaccine, or DT vaccine. *Pediatrics*, 1998, 101(1 Pt 1):1–11.
80. Wassilak S, Fine PE. Vaccine efficacy. *Developments in Biological Standardization*, 1997, 89:121–193.
81. Hviid A et al. Impact of routine vaccination with a pertussis toxoid vaccine in Denmark. *Vaccine*, 2004, 22(27–28):3530–3534.
82. Carlsson RM, Trollfors B. Control of pertussis . lessons learnt from a 10-year surveillance programme in Sweden. *Vaccine*, 2009, 27(42):5709–5718.
83. Salmaso S et al. Sustained efficacy during the first 6 years of life of 3-component acellular pertussis vaccines administered in infancy: the Italian experience. *Pediatrics*, 2001, 108(5):E81.
84. Gustafsson L et al. Long-term follow-up of Swedish children vaccinated with acellular pertussis vaccines at 3, 5, and 12 months of age indicates the need for a booster dose at 5 to 7 years of age. *Pediatrics*, 2006, 118(3):978–984.
85. Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Fifty-second report. Geneva, World Health Organization, 2004 (WHO Technical Report Series, No. 924), Annex 1.
86. 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.
87. Gillenius P et al. The standardization of an assay for pertussis toxin and antitoxin in microplate culture of Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biological Standardization*, 1985, 13(1):61–66.
88. Meade BD et al. Description and evaluation of serologic assays used in a multicenter trial of acellular pertussis vaccines. *Pediatrics*, 1995, 96(3 Pt 2):570–575.
89. 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.Pt 2):595–600.
90. Manclark CR, Meade BD, Burstyn DG. Serological response to *Bordetella*

- pertussis. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. Manual of clinical laboratory immunology, 3rd ed. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1986:388–394.
91. Tondella ML et al. International Bordetella pertussis assay standardization and harmonization meeting report, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, United States, 19–20 July 2007. *Vaccine*, 2009, 27(6):803–814.
  92. Riffelmann M et al. Performance of commercial enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to Bordetella pertussis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48(12):4459– 4463.
  93. ICH harmonized tripartite guideline. Guideline for good clinical practice, E6(R1). Geneva, International Conference on Harmonisation, 1996.
  94. Reed GF, Meade BD, Steinhoff MC. The reverse cumulative distribution plot: a graphic method for exploratory analysis of antibody data. *Pediatrics*, 1995, 96(3 Pt 2):600–603.
  95. Guidelines for national authorities on quality assurance for biological products. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-second report. Geneva, World Health Organization, 1991 (WHO Technical Report Series, No. 822), Annex 2.
  96. Guidelines for independent lot release of vaccines by regulatory authorities. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Sixty-first report. Geneva, World Health Organization, 2013 (WHO Technical Report Series, No. 978), Annex 2.

## Appendix 1. 마우스 뇌내 공격법 (Modified intracerebral challenge assay)

### 1. 시험자재

백일해 18323 균주 (이하 내용에서는 공격 균주로 언급) 가 시험에 사용된다. 검체와 표준품의 희석액으로는 멸균된 생리식염수(0.85% NaCl) 를 사용한다.

공격 균주를 약 24시간동안 Bordet-Gengou medium 에 배양한 후에 0.6% w/v NaCl 을 포함하는 1% w/v Casamino acid 용액에 부유시켜 약 200 LD<sub>50</sub>/0.025ml (또는 약  $1 \times 10^5$  organism/challenge)농도의 현탁액으로 만든다.

대신, 안정하게 동결된 stock 은 알맞게 희석한 후에 바로 시험에 사용할 수 있다.

### 2. 시험방법

검체와 표준품을 4배씩 3단계 또는 그 밖의 로그 희석배수로 단계 희석한다. 군당 약 4주령 마우스 16수 이상을 사용하며, 희석액을 각각 0.5 ml씩 복강에 주사한다.

시험동물은 동일한 성별을 가지거나 군당 암수가 같은 수로 이루어져야 한다. 공격 균주액을 면역 21일 후에 0.025 ml씩 복강주사 한다. 14일 동안 시험동물을 관찰한다. 시험 시작 후 3일 이내에 사망한 동물은 시험에서 제외한다. 관찰기간 동안 두상이 부풀거나 마비가 발생하는 동물은 사망동물로 간주한다.

공격 균주의 독력을 적정하기 위해 공격 균주액을 적어도 3단계 이상 계단 희석하여 한 군당 적어도 10 수 이상으로 이루어진 마우스에 주사한다. 공격 균주액 0.025 ml 당 LD<sub>50</sub>의 균수가 300 CFU 이상이어서는 안 된다.

### 3. 판정기준

데이터는 마우스 반응 비율의 Probit transformation을 따라 Parallel line analysis 을 사용하여 분석한다. 검체와 표준품 백신의 용량 반응곡선에서 Parallelism 과

Linearity 에 심한 편차가 나타나는지 확인한다. 만약 log dose probit response 에서 significant regression ( $p < 0.05$ ) 이 나타나고 Parallelism 또는 Linearity 에서 no significant deviation 이라면 ( $p > 0.05$ ), 역가와 그 95% 신뢰한계가 계산된다. 첫 WHO 국제 표준품, 정제 백일해 백신 (JN1H-3) 이 설정되었고 이 시험에서 사용할 사내 표준품은 국제 표준품을 따라 보정되어야 한다. 기준은 국가규제기간 동의 하에 설정된다. 현재로서는 분석결과 검체의 역가가 8 IU/ml (4 IU/human dose) 이상이라면 적합으로 간주한다.

#### 4. 재시험

만약 검체 백신이 적합으로 판정되지 않았다면 동일하거나 그 이상의 마우스를 사용하여 시험을 반복한다. 통계적으로 유효한 모든 결과를 합산한다. 반복시험된 결과는 Weighted mean log potency 로 계산한다.

### Appendix 2. 체온 측정을 이용한 히스타민 민감성 시험 (Histamine sensitization test by temperature measurement)

적합한 종, 성별, 연령대의 마우스 군 (최소한 군당 10 마리 이상) 은 각기 다른 검체에 무작위적으로 배정한다. 샘플은 검액 및 표준품을 포함한다. 만약 국가규제기간에서 reversion to toxicity testing 이 요구하는 경우, 4주간 37°C 에서 배양된 시험 백신 샘플을 시험에 포함시켜야 한다. 감각된 모든 마우스들은 histamine dihydrochloride 으로 challenge 되어야 한다. 표준품과 histamine dihydrochloride 은 생리식염수로 희석한다. 만약 PT 가 표준품으로 사용될 경우에는 0.2% (w/v) 젤라틴을 함유한 생리식염수 혹은 PBS 을 희석액으로서 사용하여 용기 벽면 흡착에 의한 PT 활성 감소되는 것을 방지한다. 0.1°C 단위의 25°C

~ 40℃ 범위의 온도를 측정할 수 있는 적합한 체온측정기를 시험에 사용한다.

표준품은 적합한 용량-반응에 따라 희석한다. 검체 (대개 사람 1회 투여량) 및 각 표준품의 희석액은 각 마우스 군에게 0.5 mL 씩 복강 투여한다. 투여 4일 후, histamine dihydrochloride 는 각각의 마우스에게 복강 투여한다. 모든 마우스에게 히스타민이 투여한 후 30분 이후에 직장 또는 피부 체온을 측정한다. 체온은 관찰 중 30 분 이내에 사망하는 마우스를 포함, 투여한 모든 마우스에 대해서 기록한다.

표준품 대비 시험 백신내의 잔류 PT 반응 측정을 위하여, 마우스의 체온 반응을 적절한 통계적 방법을 활용하여 분석한다.

만약 측정된 검액군의 잔류 PT 반응값이 국가규제기간에서 규정해준 기준값보다 높지 않은 경우 해당 시험 Lot는 합격으로 판정한다. 정제 백일해 (acellular pertussis) 백신에 대하여 국제적으로 합의된 활성 PT의 상한 제한값은 현재 없으며, 몇몇 국가에서는 DTaP 백신의 요구 기준으로서 1회 백신 투여량 당 PT의 상한 제한값을 1.09 또는 2.18 IU (0.2 or 0.4 HSU) 로 지정해둔 상황이다.

### Appendix 3. Lethal end-point (사망 종말점) 법을 이용한 히스타민 민감성 시험 (Histamine sensitization test by lethal end-point assay)

적합한 종, 성별, 연령대의 마우스 군 (최소한 군당 10마리 이상) 은 각기 다른 검체에 무작위적으로 배정한다. 밸리데이션 또는 백신 허가 목적으로 수행되는 시험법의 경우, 양성 대조군, PT 표준품 (IU/ng)을 3 단계 혹은 그 이상 단계별로 희석하여 복강 내로 투여된 군을 포함해야 한다. 희석률은 단계별 반응을 확인할 수 있는 정도로 결정하되, 5배를 넘지 않도록 한다. 다른 마우스 군 (음성대조군) 은 희석액을 복강 투여한다. 한 그룹은 시험 백신을 복강내에 투여하고,

만약 reversion to toxicity testing 이 필요한 경우, 다른 그룹은 37℃에서 4주간 배양된 시험 검체를 투여해야 한다. 양쪽 군 모두 최종원액의 사람 1회 투여량 (사람 2회 투여량까지 허용하기도 함.) 을 투여한다. 위치적 요소에 의한 시험 결과의 영향을 최소화하기 위하여 시험 기간 중 사육 장치 상의 케이지 위치는 랜덤하게 지정한다. 감작, 투여 4 ~ 5 일 후, 지정량 (대개 1 ~ 2 mg 정도의 히스타민) 의 히스타민을 투여 한 후에 모든 마우스는 생존해야 한다. 히스타민은 대개 복강 또는 정맥 내로 투여한다. (투여방법은 실험실에서 지정한 것으로 동일하게 적요한다.) 히스타민 감작은 사육 장치 내 케이지 배치 순서대로 실시한다. 히스타민 투여 후 24시간 이내 마우스 사망에 대하여 기록한다.

시험법의 민감도와 유효 기준은 국가규제기간 동의 하에 정의되어야 한다. 유효한 시험의 경우, 희석액을 투여한 마우스 군 (음성대조군) 은 일반적으로 히스타민에 민감한 치사 반응을 나타나지 않는다. 그러나 여러 실험 결과에 따르면, 낮은 확률로 음성대조군 중 소수 (5% 이하) 에서도 히스타민 감작에 따른 사망이 나타나기도 한다. 따라서, 몇몇 실험실에서는 20 마리 혹은 그 이상의 음성대조군 중 1 마리 이하의 사망 마우스가 발생한 경우에도 해당 시험이 유효하다고 간주한다. 또한 각각의 시험은 민감도 확인 기준을 충족해야 한다. 특정 마우스 종 (모든 Swiss-Webster 계통) 은 히스타민 감작에 높은 민감성을 보이는 반면, 대부분 종은 낮은 민감성을 보인다. 시험을 위해 사용되는 종의 감작의 민감성은 시험법 밸리데이션 과정으로 확인하고 국가규제기간에 승인되어야 한다. 시험에 사용되는 마우스의 적절한 민감성은 시험법 밸리데이션 중 PT 표준품으로 확인하며 기준에 적합하여야 한다. 국가규제기간 기준에 대하여 적합한 양성 반응을 보이며, 용량-반응 곡선 상의 직선 부분에 해당되는 PT의 multiple doses (적합량의 표준 독소) 를 이용하여 반복 시험하여 직선성을 확인하며, 이때의 표준 독소의 적합한 용량을 시험법 민감도 규정을 위해 양성 대조군의 기준으로 반영하도록 한다.

몇몇 실험실의 경우, 제품 상의 상한 허용치의 PT의 1회 량을 투여하거나 또



는 의학적으로 안전성이 확인된 표준 백신을 투여하는 그룹을 시험에 포함시키기도 한다.

백신의 시험 투여량 감작 후 사망한 비율이 국가규제기간에서 지정된 최대치를 넘지 않을 경우 해당 Lot는 적합하다고 판정한다. 이 비율은 시험 Lot 에서 라이선스의 근거 자료로서 또는 임상시험으로서 효과와 안전성을 보여주는 기록과 관련이 있다. 표준품 군이 포함될 경우, 검액군의 사망률이 표준품 군의 사망률 보다 낮을 경우 해당 Lot를 적합하다고 판정한다.

만약 최초 시험시 백신 Lot가 부적합할 경우, 2회 연속의 독립적인 시험을 실시하여 두 시험의 결과가 모두 적합한 경우 적합하다고 판정한다.

#### Appendix 4. 마우스 면역원성 시험 (Mouse immunogenicity test)

정제백일해 백신을 대상으로 하는 마우스 면역원성 시험 (The mouse immunogenicity test : MIT) 은 백신 내 각각의 항원에 의해 유도된 마우스 항체를 바탕으로 생산된 백신 Lot 간의 일관성을 증명하기 위한 설계된 시험법이다. 이 시험법은 제품 특이적(product-specific)이고, 의미 있는 분석이 되려면 제품별로 적절한 표준백신이 사용되어야 한다. 면역원성은 지정된 시험 검체량 또는 마우스의 일정 비율로 특정되고 측정할 수 있는 항체 반응을 유도하는 항원량 (ex : 50% 유효량, ED50)으로 투여된 마우스에서 생성된 항체가로 측정할 수 있다.

각각의 항체에 대하여 용량-반응 곡선 (백신 투여량 - 항체 생산 곡선) 상의 linear-response 부분이 반드시 지정되어야 한다. 첫번째 방법은 마우스 1 군에 linear-response 부분 내에 있는 미리 지정된 백신의 투여량을 1회 투여한다. 여러 백일해 항원이 포함된 것은 마우스 내에서 각각 다른 면역원성을 보이기 때문에 백신의 한가지 시험용량 이상, Lot 당 1군 이상의 마우스의 준비가 필요하

다. 두번째 방법은 백신을 적당한 간격으로 희석하여 마우스에 투여 하고 각각의 dose 에 따라 반응하는 동물의 비율을 측정한다. 국가규제기간 에 의해 제조 및 시험의 일관성이 확인된 후, Serial-dose 투여방법은 적절한 Single-dose-투여 방법 (ex : 항원의 ED50)으로 간소화할 수 있다.

시험 혈청의 항체가는 밸리데이션된 ELISA 법으로 측정하며 안정화된 표준품 혈청 항체가 대비 상대 값으로 계산된다.

모든 항원에 대하여, 지정된 마우스 종의 항체 반응의 재현성은 동일한 표준품 (혹은 대조) 백신이 투여된 마우스 그룹이 포함된 모든 시험에서 확인되어야 한다. 표준품 (혹은 대조) 백신을 통해 마우스에서 이전 시험과 일관된 반응을 보임을 확인할 수 있다. 표준품 (혹은 대조) 백신의 안정성은 반드시 지속적으로 관리 (Monitoring) 되어야 한다. 따라서 동결 건조 등의 방식으로 안정성이 보장되는 표준품 (혹은 대조) 백신을 시험에 추천한다. 동결 건조 컨디션의 적절한 예는 다음과 같다. : 3.5% polygelin (1:1) under freeze-drying cycle at - 50°C load, -50°C freeze over 2.5 hours, then primary drying at 35°C (100μbar vacuum) and secondary drying at 30°C (30μbar vacuum). 표준품 백신은 허용 기준 자체가 임상 lot나 표준품 대비 혹은 완전하게 라이선스 근거로 사용되는 lot를 반영하고 있기 때문에 반드시 임상 lot이어야 할 필요는 없다. 그러나 표준품 백신은 시험에 적합하게 사용할 수 있을 만큼 임상 Lot 와 구성 성분과 제조적으로 충분히 유사해야 한다. 백신 검체의 반응은 표준품 백신과 대비하여 혹은 완전하게 라이선스 근거로서 보고할 수 있다. MIT를 위한 대체 표준품 백신의 Calibration은 시판중인 정제 백일해 백신의 유효성의 변화를 방지하기 위해서 적합한 통계적 원칙으로 관리해야 한다.

정제 백일해를 포함하는 백신 평가를 위한 specification은 제품 특이적이며 임상 백신 또는 라이선스 근거로 사용된 다른 lot의 MIT 반응 결과의 적절한 통계 분석을 바탕으로 시행한다. Specification은 국가규제기간 동의 하에 신중하게 규정 및 검증해야 한다. Specification은 각각의 항원이 백신 유효성에 기여하고 있

음을 규정해야 한다. 표준품 lot와 제조 lot 또는 2개의 연속된 제조 lot 간의 면역원성에 대한 동등성 판정으로 귀무가설(null hypothesis)을 기각하는 단순오류를 기초로 한 규격설정은 추천되지 않는다.

시험에서 2가지 요소를 특히 신중하게 준비해야 한다 :

1. **마우스** : 마우스 종 (필요시 1종 이상) 은 각각의 항원을 얻기 위해 충분한 항체 반응이 나타날 수 있는 종을 선정해야 한다. 마우스 면역을 위한 적절한 주령대 (ex : 5주령 이상), 적절한 사육 기간 (ex : 면역 후 4-6 주) 와 항체 반응의 항원특이성을 고려해야 한다. 시험 설계는 국가규제기간의 승인을 받아야 한다.
2. **항체 측정 시스템** : 항체 측정을 위한 ELISA법은 밸리데이션과 표준화 되어야 한다. 이러한 밸리데이션에는 플레이트 코팅에 사용되는 항원의 생화학적 완전성 및 면역학적 순도의 확인과 최적 항원 코팅 농도 확인이 포함되어야 한다. 이러한 목적을 위해, working-reference serum 의 조제와 표준화가 가장 중요하다. 국제 표준품 혈청으로서의 working-reference mouse serum 의 calibration은 적합한 대조군을 제공하고 실험실 간 비교를 가능하게 한다. 표준 혈청 표준화 검증은 표준품과 시험 혈청의 적정 곡선의 평행성 평가를 포함해야 한다. 항체 측정 시스템에 있어 신중한 평가가 필요한 다른 요소는 anti-mouse-immunoglobulin-enzyme conjugate 이다. 이 시약은 isotype specificity 와 subclass reactivity 가 특정되어야 하며, 적절한 희석방법이 결정되어야 한다.

다양한 양의 항체가 포함된 혈청 assay 의 재현성 (Reproducibility : intra-assay /inter-assay) 과 정량 한계 (LOD and LOQ, respectively)가 검증되어야 한다.

면역원성 시험과 관련하여 백신 Lot 허용 기준 개발은 다음의 ELISA 허용 기준을 고려해야 한다 :

- Normal 마우스 혈청의 흡광도값 평균은 historically defined upper limit 보다 낮아야 한다. Normal 마우스 혈청은 희석액이 투여되고 면역 기간 동안 백신 접종된 마우스와 함께 사육된 마우스로부터 채취해야 한다. Normal 마우스 혈청의 흡광도는 면역된 마우스와 동일한 ELISA로 측정해야 한다.
- 흡광도와 표준 혈청 희석 관련 곡선의 파라미터는 historically defined upper limit 와 lower limit 사이에 들어야 한다.
- 시험 혈청과 유사한 특성을 가진 대조군 혈청은 표준 혈청과 분리하여 보관하며 대조군 혈청은 매회 ELISA 플레이트에 포함시켜야 한다. 표준 혈청에 대한 대조군 혈청의 ELISA unit 비율은 historically defined upper limit 와 lower limit 사이에 들어야 한다.

만약 ELISA가 이러한 허용 기준을 충족한다면, 표준품 (혹은 대조) 백신과 시험 백신으로 면역된 마우스의 항체값 계산이 가능하다. LOQ 보다 낮은 ELISA unit의 혈청은 불응답 (non-responder) 마우스의 값으로 간주 한다. 항체가의 기하 평균 계산을 위해, 임의 (arbitrary) 값 (ex : 1/2 LOQ) 이 이러한 혈청에 주어진다. 항체가의 기하 평균은 LOQ 보다 높은 값으로만 계산되어야 하며 계산에 사용되는 최소 허용값의 수가 제한되어야 한다. 만약 면역원성이 백신 dose 에 대해 나타낸다고 본다면, 각각의 항원에 반응하는 마우스 수를 ED50계산에 사용할 수 있다. 만약 ELISA 허용 기준을 충족시키지 않을 경우, ELISA를 재실시해야 한다.

표준품 (혹은 대조) 백신에 대한 기하 평균 또는 ED50이 계산된 후, 해당 값은 시험 방법 밸리데이션시 설정한 충분한 항체 반응이 반영된 기준과 비교해야 한다. 만약 이 허용 기준을 충족한다면, 시험 백신의 결과는 아래에 서술된 바와 같이 평가한다. 만약 표준품 백신에 대한 허용 기준이 충족하지 않을 경우, 모든

혈청 (표준품 및 시험 백신이 접종된 마우스로부터 얻은 혈청) 에 대해서 ELISA 를 재 실시해야 한다.

면역원성 시험을 적합하다고 판정하기 위해선, 항체가의 기하 평균 또는 시험 백신이 면역된 마우스의 ED50이 시험법 밸리데이션시 설정된 허용 기준에 충족해야 한다. 시험 백신의 면역원성은 표준품 백신의 면역원성과 대비하여 상대적으로 표현할 수 있다. 허용 기준은 임상시험에서 적합한 (유효성, 면역원성 또는 둘다) 결과를 보인 여러 Lot (3개 이상 추천) 를 여러 차례의 시험하여 결정해야 한다. 만약 항체가의 기하 평균이 설정 한계값보다 낮거나, 또는 ED50 또는 ED50 비율이 설정한 한계값에 충족하지 않을 경우, 시험에 실패한 항원에 대하여 면역 또는 ELISA를 재 실시해야 한다. (유효한) 반복시험 이후, 적절한 통계적 방법을 활용하여 2번의 시험 결과값을 통합하여 항체 레벨의 기하 평균, 기하평균 비율, ED50 또는 ED50비율값을 계산한다. 두 번의 시험을 수행한 허용 기준은 통계적으로 조절되어야 한다. 만약 모든 항원에 대한 single 또는 double test 의 결과값이 기준 한계값을 충족한다면, 백신은 면역원성 시험 결과 적합하다고 판정할 수 있다. 만약 하나의 항원이라도 2번의 시험 후 적합하지 않을 경우에는 해당 백신은 시험 결과 부적합하다고 판정한다.

이 시험 (Specifications, 항체 반응 계산 방법, 백신 역가 계산을 위한 불응답 마우스의 처리를 포함해서) 은 반드시 국가규제기간 승인 후 실시한다.

## Appendix 5 호흡 챌린지 시험법 (Respiratory challenge)

호흡기관 공격 (Respiratory challenge) 모델은 정제백일해 백신 또는 candidate 항원으로 면역된 마우스의 방어하는 효과를 증명하도록 설계되었다. 그러나, 중요한 사실은 이 모델에서의 백신 또는 항원의 효과는 임상 효능 지침에는 포함

되어 있지 않다는 것이다. 일반적으로 적절한 용량에 대한 백일해 백신 또는 백일해에 대하여 적절한 면역 반응을 보이는, 면역 마우스가 관련된다. 이 마우스에 생 백일해균 현탁액을 투여한다. 비강내 투여법, 에어로졸 투여법 2가지 투여법이 알려져 있다. 투여에 따른 반응 관찰을 위하여, 적절한 시간이 지난 후 마우스의 폐를 적출하여 colony-forming units (CFU) 의 수를 확인한다. 시험 백신에 대한 마우스 면역 반응 수치는 임상 효능이 알려진 백신 또는 적합한 표준품 백신에 대한 반응과 비교함으로써 규정할 수 있다. 에어로졸 투여법은 특수한 에어로졸 장비가 필요하며, 대부분 실험실에는 준비되어 있지 않을 것이다. 비강내 투여법은 국제적 공동연구에서 실험실간 기술이전이 증명되어 조화된 protocol 을 사용한다. 그러나 현재 시험 방식은 백신 역가 확인을 위한 routine test 로 설계되지 않았다. 그럼에도 불구하고, 비강내 투여법은 표준품 백신과의 반응 비교를 통해 제조 공정 상의 변경 및 제품 성분 조성 변경에 따른 잠재적 영향을 평가, 제품의 새로운 성분 조성 평가, 성분 조합에 따른 잠재적 상호 작용 조사, 제품 안정성 모니터링, Lot 경향성 모니터링 등에 유용하다. 마우스 주령, 폭 변동 및 샘플링 횟수 등에 따라 다양한 시험 설계가 가능하다. 조화된 비강내 투여법은 다음과 같다.

## 1. 마우스

Balb/c 마우스, 3주령 ; 백신 군 당 15마리 준비 (즉, 샘플링 1회 당 마우스 5마리이며 샘플링 시간은 투여 후 2시간, 5일, 8일이 될 수 있다. ; 또는 밸리데이션 검증 후 다른 날짜로 지정 가능.)

## 2. 면역

### • 1차 면역 :

백신 투여량 준비 : 백신 1회 투여량 = 마우스 1마리 당 1회 면역시 사람 투여량의 1/4 (즉, 125  $\mu$ l) 마우스는 1 mL 주사기를 이용하여 면역한다. 시린지는

마커를 이용하여 125  $\mu$ l 마다 구분 표시해둔다. 백신은 피하 투여한다. 피하 면역이 제대로 되었다면, 피부가 볼록하게 부풀어 오른 것을 확인할 수 있다. 2차 면역은 1차 면역 후 2주 후에 실시하며, 방법은 1차 면역과 동일하다.

### 3. The Challenge

2차 면역 실시 후 2주 후에 모든 동물을 Challenge 시킨다.

- Challenge suspension 의 준비 :

공격용 B. pertussis 18323 의 박테리아 현탁액은 Bordet-Gengou medium (대신 charcoal agar plates containing blood 사용 가능.) 에서 18-24 시간 동안 배양하여 준비한다. 콜로니를 추출하여 신선한 Stainer-Scholte medium 또는 1% casamino acids solution 에 다시 재부유한다. 박테리아 현탁액의 불투명도는 OD<sub>650nm</sub>=1(10<sup>8</sup>CFU/mL를 포함하는 현탁액을 얻기 위한 추후 희석 및 3x10<sup>9</sup>CFU/mL와 상응하는 값 (이 값은 실험실에 따라 다를 수 있음.)) 로 조정한다. 이 현탁액의 50  $\mu$ l 는 각 마우스를 감염시키는 데 사용한다.

현탁 액의 부분 표본 중 하나를 10<sup>-4</sup>,10<sup>-5</sup>,10<sup>-6</sup>배로 연속 희석을 하고, 마지막 두 희석액의 100  $\mu$ l 은 마우스 공격시 사용하는 박테리아 현탁액의 CFU/mL 함량 파악을 위해 Bordet-Gengou plates 에 2개씩 나눠 배양한다.

- 비강내 Challenge :

시험 검체 백신으로 면역된 마우스는 challenge 전 까지 생존해야 하며, 각각의 마우스는 challenge 에 앞서 건강한 상태를 유지하여야 한다.

모든 마우스는 challenge 전에 마취시킨다. 50  $\mu$ l 자동화 피펫을 사용하여 박테리아 현탁액의 50  $\mu$ l 을 한 쪽 비강에 투여하거나 또는 25  $\mu$ l 을 양쪽 비강에 나눠 투여한다. (일부 실험실에서는 challenge 전에 페이퍼 타올을 사용하여 마우스 코를 말린다.)

#### 4. 샘플링 및 CFU count

각 군별 마우스에서 challenge 후 2시간, 5일, 8일 째에 마취 후 추출한 5개의 폐는 1 또는 2 mL saline 또는 1% casamino acids 가 담긴 튜브에 넣는다. 폐들은 각각 균질화하여 적절하게 희석 후 Bordet-Gengou plate 또는 charcoal agar plate 에 배양한다. 플레이트는 4-5일간 36-37 °C 에서 배양한다.

#### 5. 결과

각 동물마다 (1mL 의) 균질화된 폐를 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>배 희석하고, 대조군의 경우 추가적으로 10<sup>-6</sup>배까지의 희석이 필요하다.

각 포인트 마다 플레이트 상의 콜로니 수를 세야 한다.

Mean of CFU/lungs :

$$m = \frac{\sum \text{CFU on the 3 plates} \times \text{dilution factor}}{\sum \text{volumes used}}$$

\*메모 : dilution factor : 폐가 1mL 로 균질화 되었을 경우 10, 2mL 로 균질화 되었을 경우 20

예시 :

동물 1 마리의 폐가 1mL 로 균질화되어 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>배 희석한 경우 :

10<sup>-2</sup>배 희석 : 500 콜로니 확인

10<sup>-3</sup>배 희석 : 47 콜로니 확인

10<sup>-4</sup>배 희석 : 6 콜로니 확인

$$M = \frac{500 + 47 + 6}{0.01 + 0.001 + 0.0001} \times 10 = 5.53 \times 10^5 \text{CFU/mL}$$



Log<sub>10</sub>은 각각의 마우스를 위해, 산술평균은 각각의 백신 군을 위해 사용한다.  
곡선은 그 후 그린다. : Log<sub>10</sub>CFU/lungsversusdayafterinfection평균

## 6. 시험 유효 기준

해당 시험이 유효하기 위해선 몇 가지 중요 기준을 부합해야 한다.

- 프로토콜 준수 : 시험법 수행에 기술적 문제가 없음.
- 마우스에 투여하는 박테리아 수는 10<sup>5</sup>마리를 초과해야 한다.
- Challenge 2시간 후 음성 대조군의 CFU/lung 의 log<sub>10</sub>평균값은 5.4 이하여야 한다.
- Challenge 5일 후 양성 대조군의 CFU/lung 의 log<sub>10</sub>평균값은 3.75 이하여야 한다.
- Challenge 5일 후 표준품군과 음성 대조군 사이에 최소한 3.1 log CFU 정도의 명확한 차이가 있어야 한다.

표준품 백신과 검체 백신 둘다 반드시 시험에 포함되어야 한다. 표준품 및 검체 백신의log10CFU/lung값은 정량 분석시 사용되며, single dose 가 투여된 마우스 그룹의 결과값과 비교하거나 (만약 각각의 백신에 대하여 적절한 dose 가 사용된 경우) 평행선 분석법을 사용한 역가 해석에도 활용할 수 있다.

## Appendix 6 Enzyme-coupled HPLC 방법

### 1.Materials and Equipments

#### 1.1 Reference standards and vaccine samples

- PT reference standard stock 90/518 (NIBSC), 250 ng/vial in freeze-dried form (provided in this study and should be stored ≤ -20°C upon receipt).

Assay를 진행하는 날, 한 vial을 250  $\mu$ l ovalbumin solution (OVS, 2 mg/ml water)으로 reconstitution하여 1000 ng/ml의 PT solution을 만든다. 100  $\mu$ l의 working solution을 OVS로 serial dilution하여 500, 250 and 125 ng/ml을 만든다. 그리고 2-8°C에서 assay를 진행하기 전까지 보관한다. OVS는 0 ng/ml sample blank로 사용된다. 남은 PT solution은 반드시 버려야 한다.

- vaccine test에서 사용되는 PT enzyme activity는 PT standard curve에 대해 single point assay로 측정된다. 그리고 test vaccine preparation은 보통 OVS를 이용하여 미리 10배 희석한다.(e.g. 10  $\mu$ l neat vaccine solution을 90  $\mu$ l OVS에 넣는다.) if test enzyme activity가 standard curve 범위에 있지 않다면 dilution 정도를 바꿀 수 있다.

## 1.2 Reagents, Materials and Equipments

다른 명시사항이 없다면, 사용되는 모든 reagents는 analytical grade이고, 모든 stocks과 solutions들은 atmosphere of nitrogen at -20°C에서 보관되어야 한다.

- ELGA distilled and deionised water or equivalent
- Acetonitrile (Far UV HPLC grade), e.g., VWR-BDH 152516Q or equivalent
- Chloroform, e.g., Sigma-Aldrich 288306 or equivalent
- Methanol, e.g., VWR-BDH 101586B or equivalent
- Isopropyl Alcohol, e.g., VWR-BDH 102245K or equivalent
- Nitrogen (Oxygen free) gas, e.g., BOC or equivalent
- Tris Base, e.g. Sigma-Aldrich T1503 or equivalent
- Conc. Hydrochloric Acid, e.g. Sigma-Aldrich 320331 or equivalent
- Ammonium Hydroxide, 5 N, e.g. Sigma-Aldrich 318612 or equivalent
- Glacial acetic acid, e.g. Sigma-Aldrich 695092 or equivalent
- DL-Dithiothreitol (DTT), e.g., Sigma-Aldrich D5545 or equivalent

- L- $\alpha$  -Lysophosphatidylcholine (LPC) from egg yolk, Type I, e.g., Sigma-Aldrich L4129 or equivalent
- 4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride (AEBSF), e.g., Sigma-Aldrich A8456 or equivalent
- Ammonium hydroxide solution (NH<sub>4</sub>OH), 5N, Fluka 318612, or equivalent
- Dimethyl sulfoxide (DMSO), e.g. Sigma-Aldrich D8779 or equivalent
- Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate (ATP), e.g., Sigma-Aldrich A3377 or equivalent
- $\beta$ -Nicotinamide adenine dinucleotide hydrate ( $\beta$ -NAD), e.g., Sigma-Aldrich N1511 or equivalent
- Ovalbumin, Grade V: e.g. Sigma-Aldrich A5503 or equivalent
- Fluorescein Caproic Acid tagged Galactose-6-phosphate (G6P) substrate; AnaSpec Inc, San Jose CA 95131. Store at -20 °C.
- 4-ml Glass vials with Teflon seal
- Microvials
- Sonic water bath
- Vortex mixer

### 1.3 HPLC Equipment

- Gilson (Anachem, UK) titanium binary pump system with fluorescence detector or qualified equivalent
- Gilson Unipoint operation software, Version 5.0 or qualified equivalent
- Shodex Asahipak (ODP50-4E) polymeric column (5  $\mu$ , 4.6 x 250 mm; Phenomenex, UK). Please read 3.4.5 if participant uses an alternative column.

- Guard cartridge (C18; pH stability 1.5–12), Phenomenex, AJO-4287 or equivalent

## 2. Preparation of Reagents

모든 stocks과 working solutions은 atmosphere of nitrogen at  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관되어야 한다.

### 2.1 Preparation of 2 mg/ml Ovalbumin solution (OVS)

- cold storage에서 ovalbumin을 꺼내어 room temperature에서 30분간 안정화시킨다.
- 30-ml universal에 40 mg을 측정하여 20 ml ELGA water에 녹인다. 녹이기 위해 젓는다.
- solution을 소분한다.(e.g. 4-ml each, in 5-ml polypropylene screw capped vials and store at  $-20^{\circ}\text{C}$ )

### 2.2 Preparation of 1.0 M Tris/HCl Buffer, pH 7.6 stock

- 약 35 ml의 ELGA water가 들어있는 100 ml beaker에 Tris Base를 6.05 g 넣고 녹이기 위해 젓는다.
- 조심스럽게 conc. Hydrochloric Acid를  $\text{pH } 7.6 \pm 0.05$ 에 도달할 때까지 떨어트리며 섞는다.
- 50 ml volumetric flask에 solution을 옮겨 담고 ELGA water로 희석한다.
- solution을 소분한다.(e.g. 4-ml each, in 5-ml polypropylene screw capped vials and store at  $-20^{\circ}\text{C}$ )

### 2.3 Preparation of 2.5 M Ammonium acetate buffer, pH 8.5 stock

- 250 ml beaker에 100 ml 5 N  $\text{NH}_4\text{OH}$ 을 넣고 pH 8.6 + 0.05에 도달할 때까지 조심스럽게 glacial acetic acid를 넣는다.
- 200 ml volumetric flask에 solution을 옮겨 담고 ELGA water로 희석한다.
- 2 ~ 6 °C에서 보관한다. (Expiry Date: TBD; usually 1 year from date of preparation)

### 2.4 Preparation of 200 mM DTT Activation Buffer

- 10 ml 0.5 M Tris/HCl Buffer pH 7.6 (diluted from 1 M stock with ELGA water; v/v, 1/1)에 0.31 g of DL-Dithiothreitol을 녹이고 섞는다.
- DTT Activation Buffer를 100  $\mu\text{l}$ 씩 소분하고 screw-capped vials에 옮긴다.
- Blow a gentle stream of nitrogen gas over solution and cap the vial tightly. Store aliquots at -20°C. Expiry Date: TBD; usually 1 year from date of preparation.

### 2.5 Preparation of 10 mg/ml LPC Stock Solution

- 5ml glass screw-capped vial with Teflon seal 에 40 mg of L- $\alpha$ -Lysophosphatidylcholine을 칭량한다.
- 3.6 ml of Chloroform과 400  $\mu\text{l}$  of Methanol을 넣는다. 녹이기 위해 water-bath에서 sonication시키거나 vortex한다.
- solution을 -20 °C에서 저장한다. (Expiry Date: TBD; usually 1 year from date of preparation)

## 2.6 Preparation of 50 mM AEBSF Stock Solution

- 4ml glass screw-capped vial with Teflon seal에 48 mg of 4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride를 칭량한다.
- 4.0 ml of Isopropyl Alcohol을 넣고 완전히 녹을 때까지 vortexing 또는 sonication한다.
- solution을  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 저장한다. (Expiry Date: TBD; usually 1 year from date of preparation)

## 2.7 Preparation of 2 ml LPC (1.5 mg/ml)/AEBSB (20 mM) working reagent (in isopropyl alcohol/0.2 M Tris/HCl, pH 7.6 (v/v, 2/3))

- 4-ml glass vial에 stock LPC (sonicate and if necessary, warm at  $\sim 40^{\circ}\text{C}$  to re-dissolve LPC) 300  $\mu\text{l}$ 을 넣고 room temperature에서 blow dried with a stream of  $\text{N}_2$ .
- 건조된 LPC에 Stock AEBSF 0.8 ml를 넣는다. 1분간 vortexing, sonication한다.
- 0.2 M Tris/HCl, pH 7.6 (diluted from 1 M stock with water; v/v, 1/5) 1.2 ml를 넣는다. 1분간 LPC/AEBSF solution을 vortexing, sonication한다.
- 100  $\mu\text{l}$  씩 소분하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 저장한다. (Expiry Date: TBD; usually 1 year from date of preparation)

## 2.8 Preparation of 18 mM ATP Solution

- Adenosine 5'-triphosphate Disodium monohydrate 51 mg을 칭량하고 5 ml 0.1 M Tris-HCl Buffer pH 7.6 (diluted from 1 M stock with water; v/v, 1/10)

을 넣는다. 그리고 완전히 녹을 때까지 vortexing한다.

- \* containing bottle의 분자량을 체크한다. (e.g. water of crystallisation이 다를 수 있고 필요하다면 solution을 만들 때 무게를 조정한다)
- 200  $\mu$ l씩 소분하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 저장한다. (Expiry Date: TBD; usually 1 year from date of preparation)

## 2.9 Preparation of 3 mM $\beta$ NAD Solution

- $\beta$ -Nicotinamide Adenine Dinucleotide (anhydrous) 9.9 mg을 칭량하고 5.0 ml of 0.1 M Tris/HCl Buffer pH 7.6 (diluted from 1 M stock with water; v/v, 1/10)을 넣는다. 그리고 완전히 녹을 때까지 vortexing한다.
- \* containing bottle의 분자량을 체크한다. (e.g. water of crystallisation이 다를 수 있고 필요하다면 solution을 만들 때 무게를 조정한다)
- 200  $\mu$ l씩 소분하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 저장한다. (Expiry Date: TBD; usually 1 year from date of preparation)
- \* 주의: Reagents (1.2.8) and (1.2.9)는 각각 100 $\mu$ l씩 혼합되어 500  $\mu$ l micro vial에서 동결건조 되어야 한다. 이 동결건조된 reagent는  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 매우 안정하다. 1.2.10.에서 사용하기 이전에 200  $\mu$ l ELGA water로 녹여 사용한다.

## 2.10 Preparation of ADP ribosylation reagent

같은 volume의 18 mM ATP (1.2.8), 3 mM NAD (1.2.9) and LPC/AEBSF (1.2.7)을 혼합하고 사용하기 이전에 약 1분간 sonication한다. 사용하기 전에 만든다.

## 2.11 Preparation of Quenching Buffer

- 30-ml universal에 9.5 ml water, 5 N NH<sub>4</sub>OH 0.5ml를 넣고 10 ml DMSO를 넣는다.
- solution을 2 - 6 °C에 저장한다. 매우 안정한 상태이다.

## 2.12 Preparation of HCAM-2 enzyme substrate solution

- PT ADP-ribosylation enzyme substrate는 HCAM-2\*(400 $\mu$ M $\pm$ 10 $\mu$ M) or 1.09mg/ml) 이고 DMSO/0.2 M Tris/HCl, pH 7.6 (v/v, 1/1)에 녹는다. DMSO를 첫 번째로 넣는다. 이 working substrate solution은 collaborative study에서 제공된다.
- \* 주의: new batch of substrate에서 다음 사항들은 반드시 확인되어야 한다. 이 실험에서 사용된 substrate는 NIBSC에서 다음 아래 사항들을 확인하였다.

(a) 사용하기 이전에 substrate의 quality(>95%)는 C18 reverse-phase HPLC를 이용하여 확인되어야 하며 이는 no/ or minimum interfering impurity peaks를 확인하기 위함이다.

(b) substrate의 농도는 UV absorption measured at 495 nm in 10 mM NH<sub>4</sub>OAc, pH 8.5 (or in other HPLC solvents adopted in the analysis system)을 이용하여 확인되어야 한다. 동일한 buffer에서 농도 계산은  $\epsilon_{492}$ , 64,400 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>,  $\lambda_{\text{max}}$  492.3 nm 에서 5-carboxyfluorescein의 평균 몰 흡광계수 (Sigma-Aldrich C0537)를 사용하여 가능하다. (Applying Beer-Lambert's Law, a 25  $\mu$ M solution will give an absorbance value of 1.59 and a 5.0  $\mu$ M solution will give a value of 0.32)을 이용하여 가능하다.

strong stock substrate solution (e.g. 20 mg/ml DMSO)을 이용하여 농도를 다시 조정하거나 DMSO/0.2 M Tris/HCl buffer, pH 7.6 (v/v, 1/1)를 이용하여 희석한 뒤 농도를 확인하기 위해 다시 UV로 확인해야 한다.



stock과 working substrate solution을 N<sub>2</sub> at -20°C에서 저장한다. 이 condition에서 substrate가 가장 안정하다.

### 3. Enzymatic Reaction (in duplicates)

- 500-μl micro tube에 20 μl PT reference standards와 test samples을 넣는다.
  - 200 mM DTT activation buffer (3.2.4)을 5 μl 넣고 room temperature에서 20-30분간 놓는다.
  - ADP-ribosylation reagent (3.2.10)를 10 μl 넣고 섞은 후 냉장고(4 - 6 °C)에서 30분간 놓는다.
  - HCAM-2 cc(3.2.12)를 5 μl 넣은 후 섞고 ~22 °C 암실에서 6시간 incubation 한다.
  - Quenching Reagent (3.2.11)를 40 μl 넣어 반응을 중지시킨 뒤 HPLC analysis를 하기 전까지 reaction mixture를 -20°C에 놓는다.
- \* reaction mixture가 -20°C에서 안정하기는 하지만 일반적으로 HPLC analysis는 24-48시간 내에 진행한다.

## 4 HPLC Analysis

### 4.1 HPLC setup

- C18 reverse-phase HPLC using a Gilson HPLC system containing a titanium and PEEK lined binary pump system with a fluorescent detector model 122을 이용하여 HCAM-2와 ADP-ribosylated product를 분석한다. 두 작업과 데이터는 Gilson UniPoint software을 통해 진행된다. HPLC column은 Shodex Asahipak (ODP50-4E) polymeric column (5 μ, 4.6 x 250 mm; Phenomenex, UK)이다.

- HPLC mobile phase: (made from a 2.5 M stock buffer NH<sub>4</sub>OAc with water, pH 8.5; v/v, 1/250):
  - \* Solvent A: 10 mM NH<sub>4</sub>OAc, pH 8.5 solution containing also 80% acetonitrile (i.e. add 2 ml stock buffer (3.2.3) to 100 ml water and 400 ml acetonitrile)
  - \* Solvent B: 10 mM NH<sub>4</sub>OAc, pH 8.5 solution (i.e. add 2 ml stock buffer (3.2.3) to 500 ml water)
- HPLC Flow rate: 0.8 ml/min
- Fluorescence detection setting:  $\lambda_{ex}$ , 495 nm and  $\lambda_{em}$ , 515 nm;  
Sensitivity: depending on fluorimeter; e.g. Gain, 100; Attenuation, 2.
- Elution gradient:

Time, min	% Solvent A	% Solvent B	
0	25	75	
1	25	75	
2	30	70	
6	32	68	
8	100	0	
9	100	0	
11	25	75	
20	25	75	Run ends

- Sample injected: 10  $\mu$ l reaction mixture.
  - \* (주의. injection 이전에 sample을 반드시 centrifuge해야 한다. e.g. at 5,000 x g for 1 min. 이는 alum or other un-dissolved materials을 제거하여 HPLC column과 system에 이상이 일어나는 것을 방지하기 위함이다.)

## 4.2 System Suitability

ADP-ribosylated product를 포함하고 있는 reaction mixture와 starting substrate를 이용하여 system을 test한다. elution profile은 반드시 모든 test에서 비슷해야 하며 product peak는 통합되어 area가 측정되어야 한다.

### 4.3 Typical HPLC trace

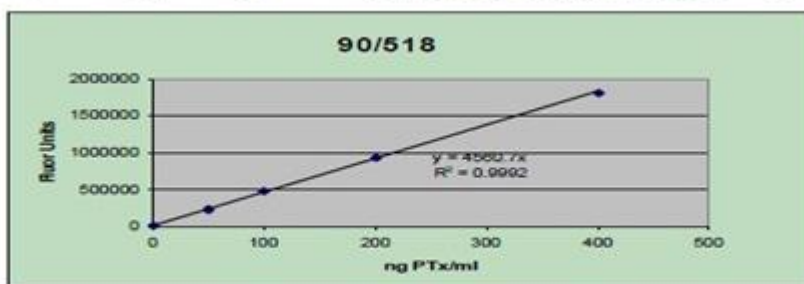
ADP-ribosylation product & HCAM-2 substrate는 각각 대략 8분, 11분간 분리된다. Traces (b) and (c)는 enzyme activity를 가지지 않는다.

다른 column은 product 분리 시간에 영향을 미칠 수 있으나 전반적인 profile은 같아야 한다는 것을 주의해야 한다. new batch of substrate는 impurity peaks에서 약간 다른 결과를 가져올 수 있다.

### 4.4 An Example of Calculation of Results

product peak의 peak area는 the Gilson Unipoint software에 의해 정리된다. 다양한 농도의 the Reference standard, 90/518에 의해 concentration curve가 만들어진다. test sample의 PT 농도는 the Reference standard curve에 의해 계산된다.

Inj. Number	Peak Name	R. Time	Area	Sample Descrip.	ng/ml
10	1	7.4	1804672.6	p99u, 10ul 90/518(400ng/ml)-2,	400
9	1	7.5	1817549.6	p99u, 10ul 90/518(400ng/ml)-1,	400
8	1	7.4	917029.4	p99u, 10ul 90/518(200ng/ml)-2,	200
7	1	7.4	937794.9	p99u, 10ul 90/518(200ng/ml)-1,	200
6	1	7.4	469984.0	p99u, 10ul 90/518(100ng/ml)-2,	100
5	1	7.4	487886.3	p99u, 10ul 90/518(100ng/ml)-1,	100
4	1	7.5	209500.0	p99u, 10ul 90/518(50ng/ml)-2,	50
3	1	7.5	243445.8	p99u, 10ul 90/518(50ng/ml)-1,	50
2	1	7.4	13493.8	p99u, 10ul 90/518(0ng/ml)-2,	0
1	1	7.4	0.0	p99u, 10ul 90/518(0ng/ml)-1, 100/2	0



4.5 the Shodex Asahipak (ODP50-4E) polymeric column (5  $\mu$ , 4.6 x 250 mm; Phenomenex, UK) 이외의 HPLC column을 사용할 경우 주의사항

- pH of Solvents

위의 HPLC analysis condition은 alkaline pH에서 안정한 polymeric

reverse-phase C18 column을 사용했다는 것을 실험자는 기억해야 한다. 이 경우에 사용한 solvent pH(pH 8.5)는 fluorescein이 결합한 substrate와 product로부터 최대의 형광을 발산시키기에 적합하다.

일반적인 silica로 구성된 C18 reverse-phase columns의 경우 이 높은 pH에서 사용하기에 적합하지 않다. 이 pH에서 column은 손상을 입을 수 있다. 그러나 silica based column중에서 높은 pH에서 안정한 경우도 있다.(e.g. Gemini columns by Phenomenex, Inc.)

만약 실험자가 일반적인 silica based column를 사용하기 원하는 경우에는 solvent의 pH를 중성으로 낮춰서 사용해야 한다. (e.g. pH 7.4) 그러나 이 pH에서는 detection sensitivity가 낮을 수 있다.

- Alternative HPLC columns and method development

만약 대체 가능한 다른 HPLC column을 사용한다면, pH를 고려하는 것 이외에 starting substrate로부터 product를 분석할 수 있는 elution gradient를 설정하는 것이 중요하다.

일반적으로, 대부분의 C18 reverse-phase columns은 비슷하게 진행되며 위에서 언급한 elution protocol을 이용한 시운전은 좋은 starting point이다. 그리고 필요하다면 PT (e.g. 1000 ng/ml)로 처리된 reaction mixture를 분석함으로써 elution gradient를 modify할 수 있다.

## Appendix 7 Fetuin binding assay 방법

### 1. Material(s) and Equipment(s) (시약과 기구)

#### 1.1 List Material(s) and Equipment(s)

- Coating Protein: Fetuin (Sigma catalogue no. : F3004)

- Coating Buffer: 0.05M Carbonate-Bicarbonate buffer pH 9.6
- Wash buffer: PBS/0.05% Tween 20 (PBST)
- Diluent/Blocking buffer: 3% BSA (Fraction V)/PBST (please see section 3.2.5)
- Detection antibody: Anti PT sheep polyclonal (NIBSC, 97/572)
- PT Reference: Freeze-dried PT 250ng/vial
- Conjugate/Secondary Antibody: Donkey anti sheep-HRP (Sigma, A3415)
- Substrate buffer: 0.05M Citric Acid, pH4.0
- Substrate: Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS)(Sigma, A9941)
- Hydrogen peroxide, 30% wt.% sol.in water (Sigma, H1009)
- NUNC F96 Maxisorp Microtiter plates product # 442404
- Microplate reader at 405nm
- Plate reader software

## 1.2 Storage and Handling of Critical Reagents

- pertussis toxin reference stock은 동결건조 상태로 250 ng /vial 제공되며 -20°C에서 저장해야 한다. 이는 90/518 (NIBSC)로 준비되었다. 동결건조된 vial은 1 ml PBS로 reconstitution 되어 최종 250ng/ml이다. reconstituted PT를 재사용하는 것은 피해야 하며 각 vial은 한 번에 사용에 적합하다.
- PBS로 5mg/ml Fetuin을 만들고 20ul (100μg)로 소분하여 -20°C에서 저장한다. 유효기한은 1년이다. 소분한 것은 한 번 사용을 위해 녹인다.
- 동결건조된 detection sheep antibody는 -20°C에서 저장한다. 각 vial은 0.5 ml PBS로 reconstitution하고 10μl로 소분하여 -20°C에서 저장한다. 각 10μl씩 소분한 것은 한 번만 사용한다. 최종 1/10,000 희석은 assay에서 사용한다.
- Anti-sheep conjugate antibody는 1/2,000로 assay에서 사용한다.
- BSA (Fraction V)는 assay 결과에 영향을 미칠 수 있다. BSA는 Sigma

(Sigma A7030) 것을 사용하기를 권장한다.

- Vaccine samples:

Vaccine sample 1

Vaccine sample 2

Vaccine sample 3

Vaccine sample 4

Vaccine sample 5

Vaccine sample 6

Vaccine sample 7

Vaccine sample 8

Vaccine sample 9

## 2. Procedure (방법)

### 2.1 Desorption of vaccine samples:

- 0.75 ml의 vaccine을 시험시 제조한 EDTA Buffer(Appendix 1) 0.75 ml와 혼합한다.
- 37°C에서 overnight한다.
- 2000 rpm에서 10분간 centrifuge하고 상층액을 얻는다. 이 vaccine sample 상층액은 assay에 이용된다.

### 2.2 Preparation of Coated Plates:

carbonate coating buffer를 이용하여 다음 방법에 따라 10 $\mu$ g/ml Fetuin coating solution을 준비한다. : 1 vial(20 $\mu$ l) fetuin stock(100 $\mu$ g/vial)을 10ml carbonate coating buffer에 희석한다. 각 plate에 한 well당 100 $\mu$ l coating solution을 분주한다. coated plates를 상온에서 overnight(16 to 24 hours)한다.

## 2.3 Performing the ELISA

- Blocking step

wash buffer를 이용하여 plate를 3회 세척한다. 세척 후, well에 남아있는 액체를 제거하기 위해 absorbent paper에 plate를 뒤집어 털어낸다. 3 % BSA를 포함하는 PBST를 100 $\mu$ l 분주하여 blocking한다. shaking하며 room temperature에서 1시간 동안 incubation 시킨다.

- Preparation of PT reference

동결 건조된 PT Reference (250ng /vial) vial을 1 ml PBS로 reconstitution하여 최종농도 250ng/ml로 한다.

- Sample loading and assay method

wash buffer를 이용하여 plate를 3회 세척한다. 세척 후, well에 남아있는 액체를 제거하기 위해 absorbent paper에 plate를 뒤집어 털어낸다. 준비된 PT를 200 $\mu$ l duplicate로 분주한다. (A2와 A7) column 2&7 다른 well에 100 $\mu$ l씩 diluent를 분주한다. 다음 방법에 따라 multi-channel pipette를 이용하여 100 $\mu$ l씩 dilution하여 row A부터 H까지 serial 2-fold dilutions of PT reference를 만든다.

row A에서 pipetting을 위아래 8번 실시하여 섞는다.

row A에서 row B로 material 100 $\mu$ l를 옮긴다.

row A에서 pipetting을 위아래 8번 실시하여 섞는다.

row C로 100 $\mu$ l를 옮기고 pipetting을 위아래 8번 실시하여 섞는다.

옮기고 섞는 과정을 모든 row에서 실시한다. 마지막은 row H이다.

row H에서 마지막 100 $\mu$ l solution을 버린다.

vaccine sample 상층액을 format에 따라 4 replicate로 100 $\mu$ l씩 loading한다.

100 $\mu$ l diluent를 모든 blank well에 넣는다.

Example of Plate format

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	PT	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	PT	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Blank
B	Blank		Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4		Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Blank
C	Blank		Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4		Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Blank
D	Blank		Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4		Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Blank
E	Blank		Sample 9									Blank
F	Blank	↓	Sample 9				↓					Blank
G	Blank		Sample 9									Blank
H	Blank		Sample 9									Blank

- Detection antibody

wash buffer를 이용하여 plate를 3회 세척한다. 세척 후, well에 남아있는 액체를 제거하기 위해 absorbent paper에 plate를 뒤집어 털어낸다.

PBST-3%BSA에 1/10,000배 희석하여 detection antibody를 준비한다.

한 plate 당

(i) 1/100 - 5 µl anti-PT sheep serum + 495 µl PBST-3%BSA

(ii) 1/100 - 120µl of (i) + 11, 880µl PBST-3%BSA

모든 well에 diluted detection antibody를 100µl씩 분주한다.

필름을 덮고 plate를 room temperature에서 2시간동안 shaking platform에서 incubation한다.

- Conjugate/secondary antibody

wash buffer를 이용하여 plate를 3회 세척한다. 세척 후, well에 남아있는 액체를 제거하기 위해 absorbent paper에 plate를 뒤집어 털어낸다.

PBST-3% BSA로 1/2000배 희석하여 conjugate antibody를 준비한다.



한 plate 당 6 $\mu$ l of conjugate antibody + 11, 994 $\mu$ l of PBST-3%BSA

모든 well에 diluted detection antibody를 100 $\mu$ l씩 분주한다.

필름을 덮고 plate를 room temperature에서 1시간 30분 동안 shaking platform에서 incubation한다.

- Substrate preparation

20ml substrate buffer에 1 ABTS tablet을 녹인다. 사용하기 바로 전에 strong hydrogen peroxide solution (30%w/v)을 5 $\mu$ l로 넣는다. 암실에 놓는다.

wash buffer를 이용하여 plate를 3회 세척한다. 세척 후, well에 남아있는 액체를 제거하기 위해 absorbent paper에 plate를 뒤집어 털어낸다.

모든 well에 substrate를 100 $\mu$ l 씩 분주한다.

필름을 덮고 plate를 상온 암실에서 15분 동안 shaking platform에서 incubation한다. plate를 즉시 405 nm에서 측정한다.

## Calculation

이 방법은 single point assay이다. test vaccine에서 PT binding activity의 relative potency는 statistic software를 사용한 PT reference standard curve를 이용하여 계산된다.

## Appendix 8 Modified CHO Cell-based Assay

### 1. Reagents Methods (시약 , 방법)

#### 1.1 Preparaion of reagents

- BRP stock solution

각 assay를 위해, BRP 1 vial을 1 mL aseptical water로 reconstitution시킨다. 최

중 농도는 7500 IU/mL이다. 일단 reconstitution되면, BRP는 짧은 시간동안 +4 °C에서 보관할 수 있으나 reconstitution된 BRP stock solution은 assay가 종료되면 폐기해야 한다. 이후 PBS, pH 7.0을 이용하여 BRP를 희석한다.

- Spiking of vaccine samples

vaccine sample은 reconstitution된 BRP를 이용하여 농도 1과 2 IU/mL로 spike한다.(for the Direct Method). 또는 1,2,4 IU/mL로 spike한다.(for the Indirect Method) vaccine에 첨가하기 이전에, BRP는 PBS로 50-fold desired concentration으로 희석하고, 10 µL를 500 µL vaccine에 첨가한다. vaccine을 가볍게 섞고, 1시간 동안 4 °C에서 반응시킨다. 이 후 과정은 4.2.1과 4.2.2에 언급되어 있다.

## 1.2 Method

vaccine sample을 test하기 이전에, 참여자는 purified PTx에 대한 CHO cell culture의 sensitivity를 검증해야 한다. pilot study를 기초로 하여, limit of detection(LoD)는  $\pm 1$  serial dilution of 0.0006 IU/mL 이다.(i.e. 0.0031 to 0.0125 IU/mL).

- Direct Method

다음 method는 96-well plate에서 진행한다. CHO-K1 cell은 바로 well에 loading 한다. well 내에 있는 sample은 시험을 위해 희석한다. assay는 plate 당 1 vaccine을 test하기로 설정하였고, 각 plate는 BRP standard curve와 1, 2 IU/mL BRP로 spike, unspike된 vaccine을 포함하고 있다. 모든 sample은 7 단계 농도로 연속적으로 희석되었고, sample, 각각 다른 농도의 BRP, spike된 vaccine은 triplicate wells(3 wells)로 시험한다.

- \* Preparation of BRP standard curve and vaccine dilutions

reconstitution된 BRP를 CHO cell culture medium을 사용해 0.1 IU/mL로 희석하고,

각 assay plate의 첫 3 well에 200  $\mu$ L씩 분주한다. spike, unspike된 vaccine sample을 CHO cell culture medium을 사용해 1:20으로 희석하고, Figure 1과 같이 200  $\mu$ L씩 assay plate의 첫 번째 row를 따라 3 well에 분주한다. 그리고 CHO cell culture medium(100  $\mu$ L)을 assay plate의 나머지 well에 분주한다. 첫 번째 row에 있는 BRP와 vaccine sample을 100  $\mu$ L씩 serial dilution을 실시한다. 첫 번째 row에서 두 번째 row로 실시하고 mixing한 다음, 다음 과정을 일곱 번째 row까지 실시한다. assay plate의 8번째 row에는 culture medium만이 남아있어야 한다.

Figure 1 - 96-well plate layout for the Direct Method.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	BRP (IU/mL)	Vaccine sample											Final vaccine dilution
		Spiked with 1 IU/mL			Spiked with 2 IU/mL			Unspiked					
A	0.05			0.025			0.05			0			1/40
B	0.025			0.0125			0.025			0			1/80
C	0.0125			0.0063			0.0125			0			1/160
D	0.0063			0.0031			0.0063			0			1/320
E	0.0031			0.0016			0.0031			0			1/640
F	0.0016			0.0008			0.0016			0			1/1280
G	0.0008			0.0004			0.0008			0			1/2560
H	Negative Control (Cells + media only)												
Values represent the final concentration of PTx within each well of the assay plate (in IU/mL). One assay plate is required per vaccine sample													

#### \* Preparation of CHO-K1 cells

CHO-K1 cell은 위에서 설명한 것과 같이 trypsin처리 된다. culture medium으로 resuspension하여  $2 \times 10^4$  cells/mL (cell viability > 95%) 농도로 조절한다. 그 다음, 최종 density가 2000 cells/well이 되도록 assay plate (100  $\mu$ L/well)에 분주한다. assay plate를 37 °C, 습도가 유지되는 (5 % CO<sub>2</sub>) incubator에서 48시간 동안 배양한다.

#### \* Washing and scoring of assay plates

더 명확한 cluster 결과를 얻기 위해 잔류하는 adjuvant를 scoring하기 이전에 assay plate에서 washing해야 한다. plate를 강하게 두드려 내용물을 섞고, plate를 뒤집어 medium을 버린다. 그 뒤 한 번 더 pre-warmed CHO cell culture medium으로 washing한 뒤, warmed medium을 well 당 200  $\mu$ L씩 분주한다.

cluster의 유무는 4X 또는 10X로 확대된 phase contrast optics(위상차현미경)을

이용하여 관찰할 수 있다. well에 10 또는 그 이상의 clear cluster가 존재하면 positive(+) score로 판정하고, 반면에 10보다 낮은 clear cluster가 존재하면 negative(-)로 판정한다. 각 assay plate의 모든 well은 CHO cell cluster를 확인하는데 능숙한 두 명의 실험자가 확인한다.

assay sensitivity는 positive response를 포함하는 BRP dilution series인한다. 의 마지막 well에 따라 결정된다. spike와 unspike된 vaccine의 assay endpoint는 positive score를 위한 각 dilution series의 마지막 well에 따라 결정된다.

- Indirect Method

24-well assay plate를 사용하는 다음 method는 정량적인 방법이 아니고, vaccine adjuvant와 존재하는 PTx의 유무를 확인한다. 0.4  $\mu\text{m}$  pore size를 가지는 24-well plate에 맞는 투과성의 polycarbonate tissue culture insert를(section 4.1.4 참고) adjuvant가 cell과 직접적으로 접촉하는 것을 막기 위해 사용한다. spiking과 adsorption을 한 후, vaccine을 centrifuge하고, 상층액을 제거한 후, adjuvant를 같은 volume의 CHO culture medium에 re-suspension한다. 그리고 resuspension된 adjuvant를 assay plate의 porous cell culture insert에 넣는다. 4개의 vaccine test는 각 plate에서 진행되어야 하며, unspike된 것과 1, 2, 4 IU/mL의 PTx로 spike된 것을 포함한다. BRP standard curve는 sensitivity를 확인하고, spike 회수율을 계산하기 위하여 assay plate에 포함한다. 참여자는 가능하다면 다른 날짜에, 각각의 vaccine에 대하여 독립적으로 3회 assay를 수행해야 한다.

- \* Preparation of CHO-K1 cells and assay plate

CHO-K1 cell은 위에서 설명한 것과 같이 trypsin처리 된다. culture medium으로 resuspension하여  $8 \times 10^4$  cells/mL (cell viability > 95%) 농도로 조절한다. 그 다음, 최종 density가  $2 \times 10^4$  cells/well이 되도록 24-well assay plate (100  $\mu\text{L}$ /well) 모든 well에 250  $\mu\text{L}$  분주한다. assay plate를 37 °C, 습도가 유지되는 incubator에서 3시간 동

안 배양한다.

sample을 분주하기 이전에, cell culture insert는 각 well에 무균적으로 옮겨져야 한다. BRP만을 가지는 assay well은 insert를 사용할 필요가 없다.

\* Preparation of BRP standard curve and vaccine dilutions

BRP를 cell culture medium을 이용하여 0.1 IU/mL로 희석하고 6개의 1:2 serial dilution을 culture medium을 사용하여 총 7 농도를 완성한다.

각 vaccine sample은 4.1.5dp 언급된 것과 같이 1, 2, 4 IU/mL의 BRP로 spike하고, 4 °C에서 1시간 동안 incubation 한다. 반응 후, adjuvant를 pellet화 시키기 위해 vaccine을 2000 xg로 10분간 centrifuge한다. 상층액을 조심스럽게 제거하고, 제거된 volume을 pipettor를 이용하여 측정한다. pellet은 같은 양의 cell culture medium으로 resuspension하면(일반적으로 450-480  $\mu$ L) 최종 volume(adjuvant+medium)은 500  $\mu$ L이다. suspension을 가볍게 섞어주고, 250  $\mu$ L를 해당cell culture insert로 옮긴다. 이 때, well에 넘치지 않도록 주의한다. assay plate당 1 well에서 각 dilution이 test된다.

희석된 BRP solution(250  $\mu$ L/well)은 standard curve를 만들기 위해 정해진 각 well에 분주한다. cell culture medium(250  $\mu$ L)은 negative control로써 1 well에 넣는다.(Figure 2) assay plate를 37 °C, 습도가 유지되는 incubator에서 48시간 동안 배양한다.

Figure 2 – 24-well plate layout for the Indirect Method

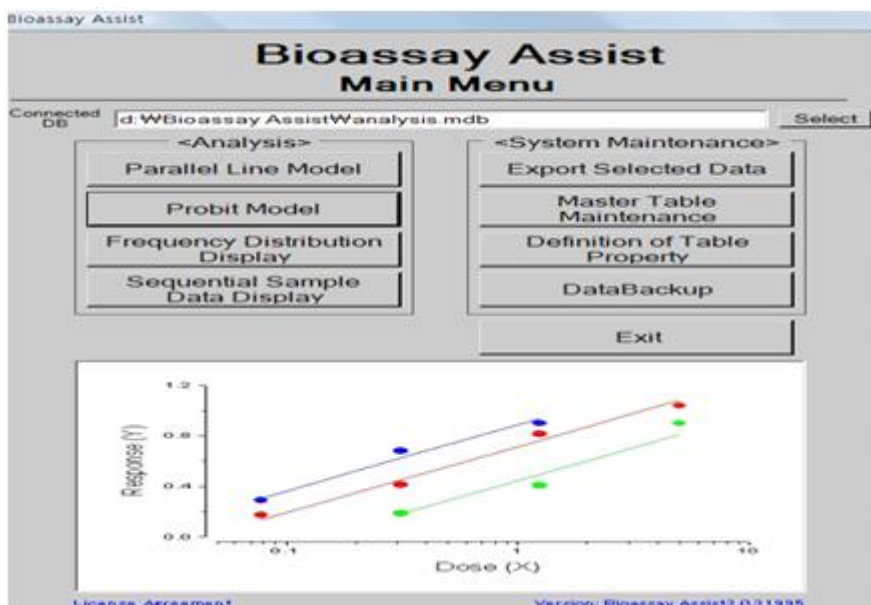
	1	2	3	4	5	6
	Vaccine A	Vaccine C	Vaccine D	Vaccine E	BRP (IU/mL)	
A	4	4	4	4	0.05	0.0031
B	2	2	2	2	0.025	0.0016
C	1	1	1	1	0.0125	0.0008
D	0	0	0	0	0.0063	0
Values represent the spiking concentration						

\* Scoring of assay plates

incubation 이후, well 바닥에 있는 cell에 영향을 미치지 않도록 주의를 기울이며 cell culture insert를 조심스럽게 제거한다. scoring은 Direct Method(section 4.2.1)와 같이 진행한다. 이 때, washing step은 진행하지 않는다. well에 10 또는 그 이상의 clear cluster가 존재하면 positive(+) score로 판정하고, 반면에 10보다 낮은 clear cluster가 존재하면 negative(-)로 판정한다.

cell culture medium control은 반드시 negative를 나타내야 하고, positive clustering response는 3 번째 높은 BRP 농도로 결과가 나와야 assay를 신뢰할 수 있다.

## Appendix 9. Bioassay Assist program (version. 3.0.0)을 사용한 통계분석 방법 예시



\* Bioassay Assist Program : 일본 NIID에서 개발한 생물의약품 품질관리 통계프로그램

## 1. 백일해 역가시험 - Probit assay

시험기준: Bioassay assist program (Probit analysis)으로 처리하였을 때 8 IU/mL 이상이어야 함.

### Bioassay assist program (probit analysis, version 2.0.0) 사용법

- Bioassay Assist main menu에서 Analysis 중에서 probit method를 선택한다.
- Data input (probit method)화면에서 number of sample의 수를 정하고, 해당 sample에서 number of dose 의 ADD버튼을 눌러 희석 배수만큼 칸을 선택한다.
- sample ID Number는 샘플번호를 넣어 사용하면 출력할 때 그래프에 기입된다. (한글사용가능)
- Dose(mL)란에는 0.5(8배), 0.1(40배), 0.02(200배)를 넣는다.  
(희석 배수는 시험시 사용한 희석배수를 넣는다.)

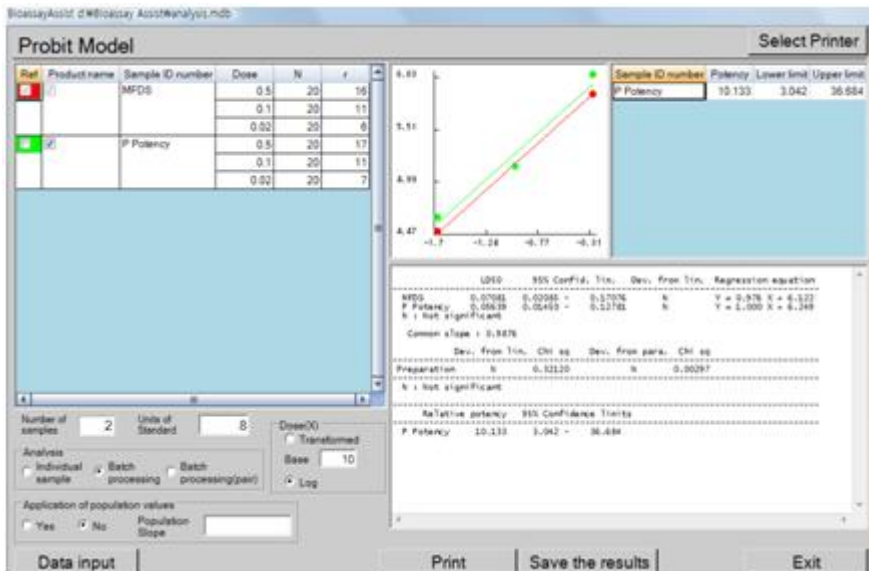
#### <계산방법>

표준품 8 IU/mL = 4 IU/dose,  $4 \text{ IU/dose} \times 1/8$  (희석배수) = 0.5 IU/dose

- N란에는 동물수/1군의 수를 넣는다. (20수)
- r란에는 죽은 동물수를 넣는다.
- Analysis를 눌러 새로운 창을 불러온다.
- U/mL of Standard에 표준값을 넣고, analysis는 Batch processing를 선택한다.
- Dose(X)값을 Log로 지정하면, sample에 대한 potency, lower limit, upper limit가 나온다.
- printer를 눌러 시험 결과를 출력한다.
- data 저장시 data input를 눌러 data input(probit method)로 돌아와서, test 명, 파일 명을 정한 후 save the data를 눌러 저장한다.

- 파일을 불러올 때는 open a data file를 눌러 test name, date, file name를 선택해서 불러온다.

## 백일해역가시험 Data 입력 및 분석





## 백일해역가시험결과 출력물

Test Name : P Potency  
Date : 2015-10-01  
File Name : DTPPPotency  
Standard Unit: 8  
Dose(X) : Log

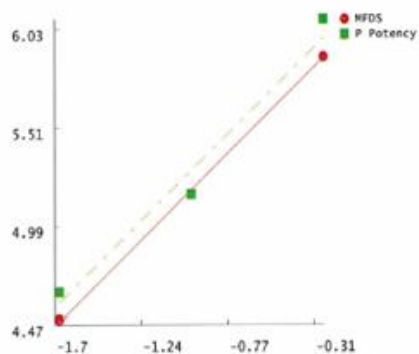
MFDS			P Potency		
Dose	N	r	Dose	N	r
0.5	20	16	0.5	20	17
0.1	20	11	0.1	20	11
0.02	20	6	0.02	20	7

	LD50	95% confid. lim.	Dev. from lin.	Regression equation
MFDS	0.07081	0.02085 - 0.17076	N	$Y = 0.976 X + 6.122$
P Potency	0.05639	0.01450 - 0.12781	N	$Y = 1.000 X + 6.249$
N : Not significant				

Common slope : 0.9876

	dev. from lin.	Chi sq	Dev. from para.	Chi sq
Preparation	N	0.32120	N	0.00297
N : Not significant				

	relative potency	95% Confidence limits
P Potency	10.133	3.042 - 36.684



## LD<sub>50</sub>수 계산

- 마우스의 증상에 관계없이 살아남은 마우스 수를 기록한다.
  - 공격용 균을 LD<sub>50</sub>수를 Reed Muench method로 측정하였을 때 그 값은 약 50 ~ 400이어야 한다.
- \* 공격량의 계산(공격LD<sub>50</sub>수) = 공격균수 ÷ LD<sub>50</sub>수

## LD<sub>50</sub>의 계산 (예)

Dose		Number Death	Number Surviving	Cumulative Death(A) ↑	Cumulative Surviving(B) ↓	Ratio of A/(A+B)	Percent Death
Cells	Dilution ratio						
7500	5 <sup>0</sup>	10	0	27	0	27/27	100
1500	5 <sup>-1</sup>	10	0	17	0	17/17	100
300	5 <sup>-2</sup>	5	5	7	5	7/12	58.33
60	5 <sup>-3</sup>	2	8	2	13	2/15	13.33

$$\text{Proportionate Distance (PD)} = \frac{(\% \text{position above } 50\%) - 50\%}{(\% \text{position above } 50\%) - (\% \text{position below } 50\%)}$$

$$\text{Proportionate Distance (PD)} = \frac{58.33\% - 50\%}{58.33\% - 13.33\%} = 0.185111 \approx 0.185$$

치사율 50%에 해당하는 것이 5<sup>-2</sup>와 5<sup>-3</sup>사이인 5<sup>-2.185</sup>이며, 비례식을 사용하여 계산한다.

$$7500 : 5^0 = X : 5^{-2.185}$$

$$X = 7500 \times 5^{-2.185}, \quad X = 244.92 \approx 245 \quad (X = \text{LD}_{50})$$

## 2. 백일해 무독화시험

(마우스체중감소, 마우스백혈구수증가, 마우스히스타민증감)

Bioassay assist program (parallel line analysis, version 2.0.0) 사용법

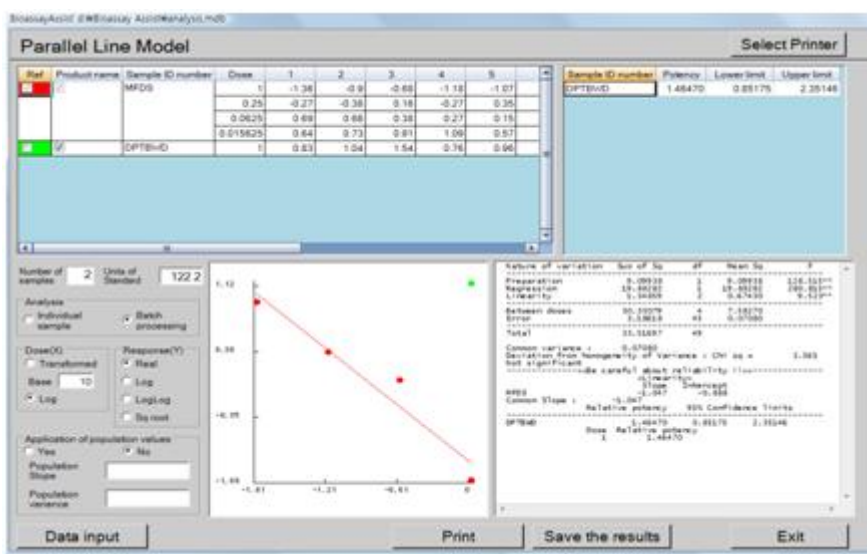
- Bioassay Assist main menu에서 Analysis 중에서 parallel line assay method를 선택한다.

- Data input (parallel line assay method)화면에서 number of sample의 수를 정하고, 해당 sample에서 number of dose 의 ADD버튼을 눌러 희석 배수만큼 칸을 선택한다.
- Repeat of Measurements 에 시험한 샘플의 수를 입력한다.
- Test 선택하여 마우스 체중감소시험에 BWDU(Body weight decreasing unit), 마우스 백혈구수증가시험에 LPU(Leukocytosis promoting unit), 히스타민 증감시험에는 HSU (Histamine sensitizing unit)를 선택하고, date는 시험일자, File name 에는 시험한 제조번호를 입력한다.
- Sample ID number에는 시험한 표준품이름과 샘플이름을 넣는다.
- Dose(mL)에서는 표준품 농도 1(1배), 0.25(4배), 0.0625(16배), 0.015625(64배)를 시험에 사용한 샘플농도 1(1배)를 정한다.
- 시험에서 나온 결과값을 넣는다.
- Analysis를 눌러 새로운 창을 불러온다.
- U/mL of Standard에 마우스체중 감소시험(122.2 IU), 백혈구수증가시험(1.98 IU), 히스타민 증감시험(3.20 IU)를 넣고, analysis는 Batch processing를 선택한다.
- Dose(X)값, Response(Y)값을 마우스체중감소시험(Log, Real), 백혈구수증가시험(Log, Log), 히스타민 증감시험(Log, Real) 로 선택을 하면 sample에 대한 potency, Lower limit, upper limit가 나온다.
- printer를 눌러 출력한다. (기본 프린터로 연결한 곳으로 출력된다)
- data 저장시 data input를 눌러 data input(parallel line assay method)로 돌아와서, test명, 파일명을 정한 후 save the data를 눌러 저장한다.
- 파일을 불러올 때는 open a data file를 눌러 test name, date, file name를 선택해서 불러온다.

## 백일해 무독화시험 (마우스체중감소시험) - Parallel line assay

시험기준: Bioassay assist (Parallel line analysis)로 처리하였을 때 10 BWDU/mL 이하이어야 함.

### 마우스체중감소시험 Data 입력 및 분석



- 1) Dose (X 축) : Log (희석배수)
- 2) Response (Y축) : Real (마우스체중변화)

## 마우스체중감소시험결과 출력물

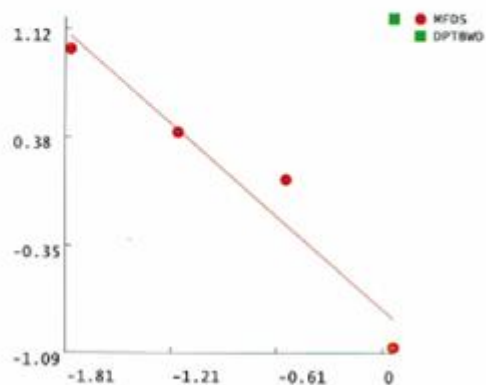
Test Name :BWd  
 Date :2015-10-01  
 File Name :DPTBWd  
 Standard unit:122.2  
 Dose(X) :Log  
 Response(Y) :Real

	MFDS				DPTBWd
Dose	1	0.25	0.0625	0.015625	1
1	-1.36	-0.27	0.69	0.64	0.83
2	-0.9	-0.38	0.66	0.73	1.04
3	-0.68	0.16	0.38	0.91	1.54
4	-1.18	-0.27	0.27	1.09	0.76
5	-1.07	0.35	0.15	0.57	0.96
6	-0.99	0.48	0.3	0.63	0.91
7	-1.06	0.43	0.19	0.95	1.42
8	-1.39	-0.21	0.47	1.27	1.18
9	-1.07	0.38	0.36	1.27	1.09
10	-1.12	-0.26	0.09	1.09	1.51
Mean	-1.082	0.041	0.356	0.915	1.124
Var.	0.043	0.121	0.041	0.069	0.079

Nature of variation	Sum of Sq	df	Mean Sq	F
Preparation	9.09938	1	9.09938	128.515**
Regression	19.88282	1	19.88282	280.815**
Linearity	1.34859	2	0.67430	9.523**
Between doses	30.33079	4	7.58270	
Error	3.18618	45	0.07080	
Total	33.51697	49		

Common variance : 0.07080  
 Deviation from homogeneity of variance : Chi sq = 3.565  
 Not significant

-----<Be careful about reliability !!>-----  
 <Linearity>  
 Slope Intercept  
 MFDS -1.047 -0.888  
 Common Slope : -1.047  
 Relative potency 95% Confidence limits  
 DPTBWd 1.46470 0.85175 2.35146  
 Dose 1 Relative potency  
 1 1.46470



## Appendix 10 정제백일해 백신의 제조 및 시험을 위한 Summary protocol

### 1. 최종 Lot 에 대한 요약 정보

제조사 이름 및 주소 :

---

Lot no. :

---

충전 일자 :

---

제조 일자 :

---

완제품 특성 (absorbed) :

---

성인 1회 적정 투여량 :

---

Final container 당 dose 수:

---

Final container 수 :

---

유효 일자 :

---

### 2. 제조 및 control strain의 세부 정보

- 품종

백신에 사용된 B. pertussis 종 :

---

품종의 혈청 타입 :

---

Seed Lot 의 Reference No. :

---

제조에 사용된 앰플의 reconstitution 날짜 :

---

- 제품에 사용한 배양 배지

배양 배지 종류 :

---

Bacterial purity 관리

결과 :

---

일자 :

---

- Antigen purification 관리

Purification of PT :

---

Purification of FHA :

---

Purification of Pertactin :

---

Purification of FIM 2/3 :

---

Identification :

---

Volume :

---

---

- 정제된 항원에 대한 시험

*For purified antigens*

방법 :

---

순도 :

---

일자 :

---

*For co-purified antigens*

Purity of claimed antigens :

---

Proportion of each antigen claimed :

---

방법 :

---

일자 :



---

*Residual level of endotoxin*

방법 :

---

성분 :

---

일자 :

---

*Antigen content*

방법 :

---

성분 :

---

일자 :

---

*Sterility test :*

박테리아와 곰팡이균에 대한 시험

방법 :

---

배지 :

---

시험에 사용한 container 수 :

---

container 당 접종량 (Volume of inoculum) : \_\_\_\_\_

container 당 배지량 : \_\_\_\_\_

---

배양 온도 : \_\_\_\_\_

---

시험 일자 (시작, 종료) : \_\_\_\_\_

---

결과 : \_\_\_\_\_

---

● 무독화

무독화 reagent: \_\_\_\_\_

---

무독화 실시 조건 : \_\_\_\_\_

---

● 원액 관리

Identification : \_\_\_\_\_

---

Volume : \_\_\_\_\_

---

*Test for antigen content*

방법 :

---

성분 :

---

일자 :

---

*Residual activity of pertussis toxin*

1. 온도 측정을 이용한 HIST

일자 :

---

마우스 종 및 성별 :

---

희석군 당 마우스 수 :

---

희석군 당 투여 마우스 수 :

---

면역 당일 주령 및 체중 범위 :

---

면역 방법 및 용량 :

---

Challenge 방법 및 용량 :

---

면역일과 challenge 일 간격 :

---

결과 (IU/SHD or HSU/SHD) :

---

계산식 :

---

직장 체온 또는 피부 체온 :

---

	체온	
	평균	편차
표준품 희석군 1		
표준품 희석군 2		
표준품 희석군 n		
백신 검체군		
음성 대조군		

• 희석액은 반드시 1.09 또는 2.18 IU (0.2 또는 0.4 HSU) / SHD 를 함유해야 한다.

## 2. 사망 종말점법을 이용한 HIST

일자 :

---

마우스 종 및 성별 :

---

희석군 당 마우스 수 :

---

희석군 당 투여 마우스 수 :

---

면역 당일 주령 및 체중 범위 :

---

면역 방법 및 용량 :

---

Challenge 방법 및 용량 :

---

면역일과 challenge 일 간격 :

결과 :

	사망 마리수 / 투여 마리수
표준품 희석군 1	/
표준품 희석군 2	/
표준품 희석군 n	/
백신 검체군	/
음성 대조군	/

*Residual level of endotoxin*

방법 :

성분 :

일자 :

*Sterility test :*

박테리아와 곰팡이균에 대한 시험

방법 :

배지 :

시험에 사용한 container 수 :

container 당 접종량 (Volume of inoculum) : \_\_\_\_\_

container 당 배지량 :

---

배양 온도 :

---

시험 일자 (시작, 종료) :

---

결과 :

---

● 최종 원액 관리

Identification :

---

Volume :

---

무독화 물질 (*Detoxifying agent*)

방법 :

---

성분 :

---

일자 :

---

보존제 성분 (*Preservative content*)

방법 :

성분 :

---

일자 :

---

*보조제 (Adjuvant)*

방법 :

---

성분 :

---

일자 :

---

*Sterility*

박테리아와 곰팡이균에 대한 시험

방법 :

---

배지 :

---

시험에 사용한 container 수 :

---

container 당 접종량 (Volume of inoculum) : \_\_\_\_\_

container 당 배지량 :

---

배양 온도 :

---

시험 일자 (시작, 종료) :

결과 :

*Residual activity of pertussis toxin*

1. 온도 측정을 이용한 HIST

일자 :

마우스 종 및 성별 :

희석군 당 마우스 수 :

희석군 당 투여 마우스 수 :

면역 당일 주령 및 체중 범위 :

면역 방법 및 용량 :

Challenge 방법 및 용량 :

면역일과 challenge 일 간격 :

결과 (IU/SHD or HSU/SHD) :

계산식 :



---

직장 체온 또는 피부 체온 :

---

	체온	
	평균	편차
표준품 희석군 1		
표준품 희석군 2		
표준품 희석군 n		
백신 검체군		
음성 대조군		

- 희석액은 반드시 1.09 또는 2.18 IU (0.2 또는 0.4 HSU) / SHD 를 함유해야 한다.

## 2. 사망 종말점법을 이용한 HIST

일자 :

---

마우스 종 및 성별 :

---

희석군 당 마우스 수 :

---

희석군 당 투여 마우스 수 :

---

면역 당일 주령 및 체중 범위 :

---

면역 방법 및 용량 :

---

Challenge 방법 및 용량 :

---

면역일과 challenge 일 간격 :

---

---

결과 :

---

	사망 마리수 / 투여 마리수
표준품 희석군 1	/
표준품 희석군 2	/
표준품 희석군 n	/
백신 검체군	/
음성 대조군	/

*Reversion to toxicity*

배양 기간 : 시작일 \_\_\_\_\_ 종료일 \_\_\_\_\_ 온도 \_\_\_\_\_

방법 :

---

#### 1. 온도 측정을 이용한 HIST

일자 :

---

마우스 종 및 성별 :

---

희석군 당 마우스 수 :

---

희석군 당 투여 마우스 수 :

---

면역 당일 주령 및 체중 범위 :

---

면역 방법 및 용량 :

Challenge 방법 및 용량 :

면역일과 challenge 일 간격 :

결과 (IU/SHD or HSU/SHD) :

계산식 :

직장 체온 또는 피부 체온 :

	체온	
	평균	편차
표준품 희석군 1		
표준품 희석군 2		
표준품 희석군 n		
백신 검체군		
음성 대조군		

• 희석액은 반드시 1.09 또는 2.18 IU (0.2 또는 0.4 HSU) / SHD 를 함유해야 한다.

## 2. 사망 종말점법을 이용한 HIST

일자 :

마우스 종 및 성별 :

희석군 당 마우스 수 :

희석군 당 투여 마우스 수 :

면역 당일 주령 및 체중 범위 :

면역 방법 및 용량 :

Challenge 방법 및 용량 :

면역일과 challenge 일 간격 :

결과 :

	사망 마리수 / 투여 마리수
표준품 희석군 1	/
표준품 희석군 2	/
표준품 희석군 n	/
백신 검체군	/
음성 대조군	/

### *Immunological activity*

#### 1. MIT

마우스 종 :

희석군 당 마우스 수 :

투여되는 희석군 수 :

투여 방법 및 투여량 :

---

표준품 정보 :

---

채혈 일자 :

---

항체 적정 :

---

백신 검체 결과값 :

---

GMT value of anti-PT :

---

GMT value of anti-FHA :

---

GMT value of anti-PRN :

---

GMT value of anti-Fims :

---

백신 표준품 결과값 :

---

GMT value of anti-PT :

---

GMT value of anti-FHA :

---

GMT value of anti-PRN :

---

GMT value of anti-Fims :

---

또는 백신 검체 / 백신 표준품 비율 :

---

Ratio for anti-PT :

---

Ratio for anti-FHA :

---

Ratio for anti-PRN :

---

Ratio for anti-Fims :

---

일자 :

---

## 2. MICA

마우스 종 :

---

희석군 당 마우스 수 :

---

투여되는 희석군 수 :

---

투여 방법 및 투여량 :

---

투여 일자 :

---

표준품 정보 :

LD<sub>50</sub> in challenge dose: \_\_\_\_\_

No. of colony-forming units in challenge dose : \_\_\_\_\_

Challenge 일자 : \_\_\_\_\_

관찰 종료 일자 : \_\_\_\_\_

결과 (IU/SHD) : \_\_\_\_\_

계산식 : \_\_\_\_\_

	희석	생존 마리수 / 투여 마리수	Median effective dose (ED <sub>50</sub> )
표준품 :	_____	_____	_____ mL
백신 :	_____	_____	
(IU/mL)	_____	_____	
	_____	_____	
	_____	_____	_____ mL
백신 검체	_____	_____	
	_____	_____	
	_____	_____	

백신 검체의 역가는 성인 1회 투여량 당 (per single human dose) \_\_\_\_\_ IU

이다. 95 % 신뢰구간의 신뢰 한계값 : \_\_\_\_\_ .

.

- **분병**

Identification : \_\_\_\_\_

Volume :

---

*Identity test*

시험 방법 :

---

결과 :

---

시험 일자 :

---

*Sterility test*

박테리아와 곰팡이균에 대한 시험

방법 :

---

배지 :

---

시험에 사용한 container 수 :

---

container 당 접종량 (Volume of inoculum) : \_\_\_\_\_

container 당 배지량 :

---

배양 온도 :

---

시험 일자 (시작, 종료) :

---



결과 :

---

*Test for adjuvant*

Adjuvant/SHD 의 특성 및 농도 :

---

시험 방법 :

---

Specification :

---

결과 :

---

—  
시험 일자 :

---

*Test for preservative*

Preservative 의 특성 및 농도 :

---

시험 방법 :

---

Specification :

---

결과 :

---

시험 일자 :

---

*pH*

시험 방법 :

---

Specification :

---

결과 :

---

시험 일자 :

---

*Endotoxin test*

시험 방법 :

---

Specification :

---

결과 :

---

시험 일자 :

---

*Immunological activity*

만약 최종 원액에 대하여 시험이 실시되지 않았을 경우, 이를 인지하여 “최종 원액” 단계에서 실시해야 되는 생물학적 활성 시험을 분병 제품에 대하여 실시한 후 관련 자료를 보고해야 한다.

*Innocuity test*

마우스 시험

시험 시작일 :

---

시험 종료일 :

---

사용 동물수 :

---

투여 방법 :

---

투여 부피 및 투여 방법 :

---

관찰 기간 :

---

결과 (동물 사망 관련하여 자세히 기술)

---

기니픽 시험

시험 시작일 :

---

시험 종료일 :

---

사용 동물수 :

---

투여 방법 :

---

투여 부피 및 투여 방법 :

---

관찰 기간 :

---

결과 (동물 사망 관련하여 자세히 기술) :

---

*Inspection of final containers*

검수 일자 :

---

제품 특성 (Organileptic characteristics) :

---

검수 제품 수량 :

---

부적합 제품 % :

---

### 3. 제조사 보증서

제조사책임자 이름 (타이핑)

---

이 보증서는 제품과 백신 관리에 대하여 전반적인 책임 및 권한을 갖는 제조사  
실험실 책임자가 작성한 보증서입니다.

책임자로서 해당 정제백일해 백신 Lot No. \_\_\_\_\_ (제품 부착 라벨에 표시) 은 정제백일해 백신의 품질, 안전성, 효능 (The quality, safety and efficacy of acellular pertussis vaccines) (2013)<sup>2</sup>를 보증하기 위한 WHO의 Part A<sup>1</sup>와 국검 요구사항을 모두 충족함을 보증합니다.

이름 (타이핑)

---

서명

---

일자

---

#### 4. 국가규제기간 보증서

만약 백신이 수출되는 경우, 부록 7에 기재된 바와 같이 국가규제기간 보증서를 제품 포장 라벨 및 사용자를 위한 제품 설명서에 부착해야 한다.

### Appendix 11 정제백일해 백신 출하를 위한 국가규제기간의 보증서 모델

이 보증서는 제조사 요청에 의해, 백신이 제조되는 국가의 국가규제기간 에서 발급하는 보증서이다.

Lot 출하 보증서

보증서 No. \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_<sup>2</sup>의 \_\_\_\_\_<sup>1</sup>에서 제조된 해당 정제백일해 백신 Lot (제품 포장 라벨에 기재) 는 관련된 marketing authorization, 생물학적 제제 출하 규정<sup>3</sup>, 정제백일해 백신의 품질, 안전성, 효능 (The quality, safety and efficacy of acellular pertussis vaccines) (2013)<sup>5</sup>를 보증하기 위한 WHO의 Part A<sup>4</sup>을 따랐으며, WHO good manufacturing practices for pharmaceutical products: main principles;<sup>6</sup>Good manufacturing practices for biological products;<sup>7</sup>Guidelines for independent laboratory release of vaccines by regulatory authorities<sup>8</sup>를 준수했음을 보증하는 바입니다.

출하 결정은 \_\_\_\_\_<sup>9</sup>를 근거로 합니다.

1 Name of manufacturer.

2 Country of origin.

3 If any national requirements are not met, specify which one(s) and indicate why release of the lot(s) has nevertheless been authorized by the 국가규제기관.

4 With the exception of provisions on distribution and shipping, which the 국가규제기관 may not be in a position to assess.

5 WHO Technical Report Series, No. 979, Annex 4.

6 WHO Technical Report Series, No. 961, Annex 3.

7 WHO Technical Report Series, No. 822, Annex 1.

8 WHO Technical Report Series, No. 978, Annex 2.

9 Evaluation of summary protocol, independent laboratory testing, and/or specific procedures laid down in defined document etc. as appropriate.

보증서는 다음과 같은 정보를 포함한다 :

- 제 조 사 이 름 및 주 소
- 제 조 장 소
- 제 품 의 판 매 명 과 일 반 명
- 판 매 허 가 번 호 (Marketing authorization number)
- Lot 번 호 (필요시 sub-Lot 번 호 및 packaging Lot 번 호 추가 기재)
- 보관 용 기 유 형
- 보관 용 기 별 dose 수
- Number of containers/lot size
- 제 조 일 자 및 유 효 일 자
- 보 관 조 건
- 제 품 보 증 확 인 을 위 한 서 명 및 보 증 서 발 급 을 위 한 기 능
- 보 증 서 발 급 일 자
- 보 증 서 번 호

국가규제기간 책임자 (또는 적절한 권위자) :

이름 (타이핑)

---

서명

---

일자

---

## 제·개정 이력

### 정제 백일해 백신 품질관리 가이드라인

제 · 개정 번호	승인 일자	주요 내용
B1-2016-3-008	2016. 9	정제 백일해 백신 품질관리 가이드라인 제정





## 정제 백일해 백신 품질관리 가이드라인

---

발 행 일 2016년 9월

발 행 인 바이오생약심사부장 김대철

편집위원장 정혜주

편 집 위 원 반상자, 김종원, 김병국, 이철현, 안준익, 김현국, 강소영,  
박은순, 오호경, 권은정, 손경희, 김도근, 지승완, 김연희,  
남주선, 오상연, 진미령, 권오석, 배창준, 서지숙, 김병철

도움주신분 사노피파스퇴르(김무수, 박혜경), 녹십자(최은아),  
SK케미칼(이양호), 보령바이오파마(이윤건),  
한국백신(이영진, 이병화), LG생명과학(최호성),  
메타바이오(신계명)

발 행 처 식품의약품안전평가원 바이오생약심사부 생물제제과

---



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원