

# 허가사항 중 시험방법 작성 시 고려사항

(‘21.09.29(수), 유전자재조합의약품과, 바이오의약품연구과)

## □ 목 적

- 유전자재조합의약품, 세포배양의약품의 품목허가(변경)를 위한 기준및 시험방법에 있어, 시험방법 작성 시 고려사항 등을 주요 시험법별로 사례와 함께 제시하여 기준및시험방법 심사 및 허가후 변경관리의 효율성·투명성을 제고하고자 함

### < 다빈도 주요 시험법 >

- |               |                   |
|---------------|-------------------|
| • 펩티드 지도작성법   | • 크기배제 액체크로마토그래프법 |
| • 모세관 전기영동법   | • 자외가시부흡광도측정법     |
| • 효소결합면역흡착분석법 | • 세포기반 역가시험법      |

## □ 적용범위

- 유전자재조합의약품, 세포배양의약품의 원료의약품 규격, 완제의약품 기준및시험방법

## □ 시험방법 작성 시 고려사항

- 시험방법은 「생물학적제제 등의 품목허가·심사 규정」 제26조제1항 및 제29조제4호에 따라 품질관리에 적정을 기할 수 있는 방법으로 작성하고, [별표 10] 및 [별표 12] 작성 예를 따른다.
- 시험자가 시험방법에 기술된 분석 조건 및 절차에 따라 시험하여 결과를 도출할 수 있도록 자세하게 작성하되, 분석법 성능 보증을 위한 중요도를 고려하도록 하며, 특별한 주의가 필요한 경우 해당 사항도 기재한다.

- 시험방법은 다음의 ‘시험방법 주요 항목’에 따라 각 항목을 자세하게 기술하되, 항목은 품목 및 시험방법 특성에 따라 다를 수 있다.
- 항목별 기재 범위와 상세 수준은 항목의 각 변수와 분석 성능 관계에 대한 이해도, 분석법의 복잡성, 품질관리 전략 등에 따라 달라질 수 있다.
  - \* 항체, 세포 등을 이용한 생물학적시험법, 신기술 시험법[예: 차세대 염기서열 분석(NGS)] 등의 경우 더욱 상세하게 기재될 수 있음
- 시험방법에서 각 변수의 변경이 분석 성능에 미치는 영향을 이해하기 위하여 시험방법의 완전성(robustness) 평가가 필요하며, 주로 시험방법 개발 연구, 시험방법 밸리데이션 등을 통해 수행되고, 위험평가 및 다변량시험 등 체계적 접근법을 사용할 수 있다.

## **시험방법 주요 항목**

- 검액, 표준액 등 조제
  - 희석·혼합 등 조제 방법을 구체적 기술 또는 용매 및 최종 농도 기재, 반복 조제 횟수 등
- 분석 절차
  - 단계별로 수행 절차 등을 상세히 기재
  - 필요한 장비·기기 구성 요소별 유형, 설정 조건 등 조작조건
    - \* 검출기 유형 및 설정조건, 칼럼 유형 및 규격, 칼럼 온도, 이동상, 유량 등
  - 결과 측정 및 분석 절차
- 시스템적합성
  - 시스템의 성능, 시스템의 재현성, 검출의 확인(순도시험), 판정기준 등을 품목 특성 및 시험목적 등에 따라 설정

## ○ 계산식, 분석 결과

- 표시량 또는 기준 대비 계산식, 측정값·관측값 처리 방법
- 단위, 유효숫자 명확히 기재

## ○ 시약·시액, 표준품

- 시험에 직접 사용되는 주요 시약·시액, 완충액 등의 조제 방법을 구체적 기술 또는 최종 농도, 조성, pH 등 기재
- 항체, 세포 등 생물학적 시약의 경우, 보다 상세한 정보가 필요할 수 있음(제품명, 제조사 등)
- 표준품 정보

## ○ 기타 정보

- 대표 크로마토그램(전체 및 확대한 크로마토그램)
  - \* 전체 크로마토그램 양상에 따라 확대한 크로마토그램 미제출 가능
- 플레이트 layout 등 분석에 필요한 정보

## **붙임 : 시험방법 작성 예시**

1. 펩티드 지도작성법 (Peptide mapping)
2. 크기배제 액체크로마토그래프법 (Size exclusion liquid chromatography)
3. 모세관 전기영동법 (Capillary electrophoresis)
4. 자외가시부흡광도측정법 (Ultraviolet-visible spectrophotometry)
5. 효소결합면역흡착분석법 (Enzyme-linked immunosorbent assay)
6. 세포기반 역가시험법 (Cell culture-based bioassay)

## [붙임] 시험방법 작성 예시

※ 본 예시의 목적은 시험방법 작성 수준·범위에 대한 일반 정보를 제공하고자 함이며, 실제 허가(변경)신청 품목 및 시험방법의 특성, 시험목적, 품질관리 전략 등에 따라 항목 및 작성수준·범위, 내용 등은 상이할 수 있습니다.

### 1

## 펩티드 지도작성법 Peptide Mapping

### 검액, 표준액 등 조제

원료의약품 또는 완제의약품에 포함되어 분석을 방해하는 부형제, 안정제 등으로부터 단백질 분리 및 정제, 희석 등의 절차와 단백질의 전처리 방법(변성, 환원 및 알킬화 등)을 기술한다.

절단제를 사용한 단백질 펩티드 결합의 선택적 절단 절차와 분해조건(반응 pH, 반응 온도, 반응시간, 절단제 양 등)을 기술한다.

분석 중 간섭현상을 일으킬 수 있는 인위적 분해 요소를 확인하기 위한 분해 대조액(시험 단백질을 제외한 모든 성분이 포함된 공시험액 또는 정제수 등)을 사용하는 경우, 해당 조제 방법을 기술한다.

(예시)

- 1) 검액 : 희석완충액을 사용하여 00 mg/mL가 되도록 한다. 이 액 00  $\mu$ L에 변성완충액 00  $\mu$ L와 환원완충액 00  $\mu$ L를 넣고 가볍게 섞은 다음 ○○ °C에서 ○○ 분 동안 환원시킨다. 알킬화완충액 00  $\mu$ L를 넣고 혼합한 다음 실온에서 차광하여 ○○ 분 동안 반응시킨다. 이 액 00  $\mu$ L를 취하여 절단완충액 00  $\mu$ L와 혼합하고, □□□ 00  $\mu$ L를 넣고 가볍게 섞은 다음 △△ °C에서 ○○ 시간 반응시킨다. △△△ 00  $\mu$ L를 넣어 반응을 중단한다.
- 2) 표준액 : ○○ 표준품을 검액과 동시에 동일한 방법으로 준비한다.

### 분석 절차

장비, 칼럼, 이동상, 농도 구매 조건, 유량 등 조작조건을 기술한다.

칼럼은 분석에 쓰인 칼럼의 안지름, 길이, 관의 재질과 충전제의 입자경 및 종류를 기재한다. 필요한 경우 상품명 등 구체적으로 기재할 수 있다.

(예시)

1) 분석장비

2) 검출기 : 유형, 설정 조건 기재 (예) 자외부흡광광도계(측정파장 220 nm)

3) 칼럼 : 안지름 약 4.6 mm, 길이 약 25 cm인 스테인레스강관에 5  $\mu$ m의  
액체크로마토그래프용 옥타데실실릴실리카겔이 충전된 칼럼

(또는) 상품명(칼럼 길이, 내경, 충전제 종류) 또는 이와 동등한 것

4) 칼럼온도 : 「○○℃ 부근의 일정온도」 또는 필요한 경우 범위를 명확하게  
기재하고 「실온」인 경우는 기재하지 않음

5) 자동주입기 온도 : ○℃

6) 이동상 : 이동상 A 및 이동상 B의 혼합비를 다음과 같이 농도기울기적으로 제어한다.

이동상 A : XX □□ g을 YY △△ mL에 녹인다.

이동상 B : 물·아세트니트릴혼합액(1 : 1)

시간(분)	이동상 A (vol%)	이동상 B (vol%)
0~30	70 → 40	30 → 60
30~35	40 → 70	60 → 30
35~65	70	30

7) 유량

(예 1) □□의 유지시간이 약 ×× 분이 되도록 조정한다

(예 2) ○○ mL/분

8) 주입순서 : 희석액(○회), 표준액(○회), 검액(○회, 검액 △개 이상인 경우 표준액  
1회 추가), 표준액(○회), 희석액(○회)

## 시스템 적합성

품목 특성 및 시험 목적에 따라 시스템의 성능, 시스템의 재현성, 검출의 확인 (순도시험) 및 판정기준 등을 기재한다.
---

(예시)

시스템의 성능 : 표준액 00  $\mu$ L를 가지고 위의 조건으로 조작할 때 △△, □□□의  
순서로 유출하고 분리도는 ×× 이상이며, □□□의 피크의 대칭계수는 ×× 이하  
이다.

시스템의 재현성 : 표준액 00  $\mu$ L씩을 가지고 위의 조건으로 시험을 6회 반복할 때  
□□□의 피크면적의 상대표준편차는 ×× % 이하이다.

## 계산식, 분석결과

측정 결과의 분석, 세부적인 판정 기준 등을 기재한다.

(예시)

검액에서 얻은 크로마토그램 양상은 표준액에서 얻은 크로마토그램과 일치하며, X개의 특징적 펩티드 피크가 모두 식별된다.

## 시약·시액, 표준품

시험에 사용되는 주요 시약·시액의 조제 방법 또는 조성, 농도, pH 등을 기재한다.

표준품의 규격(등급 또는 출처)을 기재한다.

(예시)

- 1) 희석완충액 : ○○ 00 g, △△ 00 g, □□ 00 g을 물 00 mL에 녹이고 pH 00로 조정하고 물을 넣어 000 mL로 한다.  
(또는) 00 mol/L ○○, 00 mmol/L △△, 00 mmol/L □□, pH 00
- 2) 변성완충액 : ○○ 00 g, △△ 00 g, □□ 00 g을 물 00 mL에 녹이고 pH 00로 조정하고 물을 넣어 000 mL로 한다.  
(또는) 00 mol/L ○○, 00 mmol/L △△, 00 mmol/L □□, pH 00
- 3) 환원완충액 : 00 mg/mL ○○
- 4) 알킬화완충액 : 00 mg/mL △△
- 5) 트립신 용액 : 00 mol/L ○○ 완충액(pH 7.5)으로 트립신을 희석하여 00 mg/mL로 한다.
- 6) 표준품 : 자사표준품

## 기타 정보

- 1) 대표 크로마토그램(전체 및 확대한 크로마토그램)  
\* 전체 크로마토그램 양상에 따라 확대한 크로마토그램 미제출 가능
- 2) 피크 확인 정보 또는 기준 피크 정보

### 검액, 표준액 등 조제

검액 및 표준액 등의 구체적인 조제 방법 또는 용매 및 최종 농도 등을 기술한다.

(예시)

검액 : 이 약 00 mL을 정확하게 취하여 희석액으로 희석하여 00 mg/mL이 되도록 한다.

표준액 : ○○ 표준품을 희석액으로 희석하여 00 mg/mL이 되도록 한다.

### 분석 절차

장비, 칼럼, 이동상, 유량, 측정범위 등 조작조건을 기술한다.

칼럼은 분석에 쓰인 칼럼의 안지름, 길이, 관의 재질과 충전제의 입자경 및 종류를 기재한다. 필요한 경우 상품명 등 구체적으로 기재할 수 있다.

(예시)

1) 분석장비

2) 검 출 기 : 유형, 설정 조건 기재 (예) 자외부흡광광도계(측정파장 220 nm)

3) 칼 럼 : 안지름 약 8 mm, 길이 약 30 cm인 스테인레스강관에 5  $\mu$ m의 액체크로마토그래프용 친수성실리카겔이 충전된 칼럼

(또는) 상품명(칼럼 길이, 내경, 충전제 종류) 또는 이와 동등한 것

4) 이동상 : 00 mol/L ○○, 00 mmol/L △△, pH 00

5) 유 량 : 00 mL/분

6) 칼럼온도 : ○○℃ 부근의 일정온도

7) 자동주입기 온도 : ○○℃ 부근의 일정온도

8) 분석시간 : 00 분

9) 주입순서 : 희석액(○회), 표준액(○회), 검액(○회), 검액 △개 이상인 경우 표준액 1회 추가), 표준액(○회), 희석액(○회)

## 시스템 적합성

품목 특성 및 시험 목적에 따라 시스템의 성능, 시스템의 재현성, 검출의 확인(순도시험) 및 판정기준 등을 기재한다.

(예시)

시스템의 성능 : 표준액을 가지고 위의 조건으로 조작할 때 표준액의 ○○ 단량체 피크 유지시간 대비 고분자량 유연물질 피크의 상대유지시간은 약 ××이고, 분리도는 ×× 이상이다.

시스템의 재현성 : 표준액을 가지고 위의 조건으로 시험을 ×회 반복할 때 주피크면적의 상대표준편차는 ○○ % 이하이다.

## 계산식, 분석결과

주성분, 고분자량 유연물질, 저분자량 유연물질 등 필요한 계산 및 판정방법 등을 기술한다. 필요한 경우 계산에 포함 또는 제외하는 피크 기준 등을 포함한다.

(예시)

$$\text{고분자량 유연물질의 양(\%)} = \frac{\text{검액 주피크 앞에 검출된 모든 피크면적의 합}}{\text{검액의 모든 피크면적의 합}} \times 100$$

$$\text{저분자량 유연물질의 양(\%)} = \frac{\text{검액 주피크 뒤에 검출된 모든 피크 면적의 합}}{\text{검액의 모든 피크면적의 합}} \times 100$$

$$\text{단량체의 양(\%)} = \frac{\text{검액의 주피크 면적}}{\text{검액의 모든 피크면적의 합}} \times 100$$

## 시약·시액, 표준품

시험에 사용되는 주요 시약·시액의 조제 방법 또는 조성, 농도, pH 등을 기재한다.

표준품의 규격(등급 또는 출처)을 기재한다.

(예시)

1) 희석액 : 00 mol/L ○○, 00 mmol/L △△, pH 00

2) 표준품 : 자사표준품

## 기타 정보

대표 크로마토그램(전체 및 확대한 크로마토그램)

\* 전체 크로마토그램 양상에 따라 확대한 크로마토그램 미제출 가능

### 검액, 표준액 등 조제

검액 및 표준액의 조제 방법을 구체적으로 기술하거나, 최종 농도 등을 기재한다. 비환원, 환원 조건에서 분석하는 경우, 사용 시약과 처리 조건(온도, 시간 등)을 기재한다.

(예시 : CE-SDS)

#### 1) 검액

- (비환원조건) 이 약 00 mL을 정확하게 취하여 물로 희석하여 단백질로서 00 mg/mL이 되도록 하고, 검액조제용 완충액으로 희석하여 00 mg/mL로 한다. 250 mM Iodoacetamide 00  $\mu$ L를 넣은 다음 원심분리하고, 혼합액을  $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 가온한 뒤 실온으로 냉각하고 원심분리한다. 이 액 00  $\mu$ L를 취하여 바이알에 옮긴다
- (환원조건) 이 약 00 mL을 정확하게 취하여 물로 희석하여 단백질로서 00 mg/mL이 되도록 하고, 검액조제용 완충액으로 희석하여 00 mg/mL로 한다. 2-mercaptoethanol 00  $\mu$ L를 넣은 다음 원심분리하고, 혼합액을  $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 가온한 뒤 실온으로 냉각하고 원심분리한다. 이 액 00  $\mu$ L를 취하여 바이알에 옮긴다.

2) 표준액 : ○○ 표준품을 가지고 비환원조건 및 환원조건에서 검액과 동시에 동일한 방법으로 준비한다.

#### 3) 공시험액 :

- (비환원 조건) 검액조제용 완충액과 250 mM Iodoacetamide의 혼합액을 가지고 검액과 동시에 동일한 방법으로 준비한다.
- (환원 조건) 검액조제용 완충액과 2-mercaptoethanol의 혼합액을 검액과 동시에 동일한 방법으로 준비한다.

## 분석 절차

장비, 검출기, 모세관, 모세관온도, 주입 및 분리 조건 등 조작조건을 기술한다.  
필요한 경우 분석 소프트웨어, 시료 주입 순서 등을 기재한다.

(예시 : CE-SDS)

- 1) 분석장비 : 모세관 전기영동법 분석시스템 모델명, 분석 소프트웨어 모델명을 기재할 수 있음 (예 : ○○○○ 또는 이와 동등한 것)
- 2) 검출기 : PDA, UV, LIF 등 검출기 유형, 설정 조건 기재  
(예) 자외부흡광광도계 (측정파장 200 nm)
- 3) 모세관 : 분석에 쓰인 모세관의 안지름, 유효길이 및 조성 기재  
(또는) 상품명 또는 이와 동등한 것  
(예) 안지름 약 50  $\mu\text{m}$ , 유효길이 약 70 m의 코팅되지 않은 실리카
- 4) 모세관온도 : 「○○ °C 부근의 일정온도」 또는 필요한 경우 범위를 명확하게 기재하고 「실온」인 경우는 기재하지 않음
- 5) 전압
- 6) 극성
- 7) 검액보관온도 : 「○○ °C 부근의 일정온도」 또는 필요한 경우 범위를 명확하게 기재함
- 8) 주입조건 : ○○ kV에서 00초
- 9) 분리조건 : ○○ kV에서 00초
- 10) 주입 순서 : 공시험액(○회), 표준액(○회), 검액(○회, 최대 00개), 표준액(○회), 공시험액(○회)

## 시스템 적합성

품목 특성 및 시험 목적에 따라 시스템의 성능, 시스템의 재현성, 검출의 확인 (순도시험) 및 판정기준 등을 기재한다.

(예시 : CE-SDS)

- 1) 비환원 조건  
(예) 공시험액에 방해 피크가 나타나지 않는다.  
표준액의 전기영동도는 대표 전기영동도와 유사해야 한다.

검액의 전기영동도는 표준액 전기영동도와 동일한 양상을 나타낸다.

표준액 주피크 보정피크면적%의 상대표준편차가 X.X% 이하이어야 한다.

## 2) 환원조건

(예) 공시험액에 방해 피크가 나타나지 않는다.

표준액의 전기영동도는 대표 전기영동도와 유사해야 한다.

검액의 전기영동도는 표준액 전기영동도와 동일한 양상을 나타낸다.

표준액 주피크 보정피크면적%의 상대표준편차가 X.X% 이하이어야 한다.

## 계산식, 분석결과

검액에서 식별된 각 피크의 면적 백분율 등을 통한 결과값 등 필요한 계산식 및 판정방법 등을 기술한다.

필요한 경우, 계산에 적용하는 피크 기준을 기재한다.(예 : LOQ 1 % IgG 피크면적보다 면적이 큰 피크만 사용한다.)

(예시 : CE-SDS)

### 1) 비환원 조건

주성분(모노머) 순도(%) = 주피크의 보정피크면적 백분율

총 전하변이체의 양(%) = 주피크 이외의 보정피크면적의 합

### 2) 환원 조건

주성분(모노머) 순도(%) = 경사슬, 중사슬 관련 피크를 포함한 중사슬 피크의  
보정피크면적 백분율의 총합

총 전하변이체의 양(%) = 주피크 이외의 보정피크면적 백분율의 총합

## 시약·시액, 표준품

시험에 사용되는 주요 시약·시액의 조제방법 또는 조성, 농도, pH 등을 기재한다.

표준품의 규격(등급 또는 출처)을 기재한다.

(예시 : CE-SDS)

1) 검액조제용완충액 : 00 mol/L ○○ pH 00

2) 모세관 전기영동 완충액 : 00 g/L pH 00

- 3) 산성 세척액 : 00 M □□용액
- 4) 염기성 세척액 : 00 M ◇◇용액
- 5) ○○ % 도데실황산나트륨 용액
- 6) 염색 시액 등
- 7) 표준품 : 자사표준품

## 기타 정보

대표 전기영동도(비환원, 환원 조건)(전체 및 확대한 전기영동도)

\* 전체 전기영동도 양상에 따라 확대한 전기영동도 미기재 가능

## 4

# 자외가시부흡광도측정법 Ultraviolet-visible Spectrophotometry

### 검액, 표준액 등 조제

검액, 표준액, 공시험액 등 조제 방법을 구체적으로 기술하거나, 최종 농도를 기재하고, 반복 조제 횟수 등을 기재한다.

(예시)

- 1) 검액 : 이 약 00 mL을 정확하게 취하여 희석완충액으로 희석하여 단백질로서 00 mg/mL이 되도록 한다. 동일한 검액을 독립적으로 X개 조제한다.
- 2) 공시험액 : 희석완충액을 사용한다.

### 분석 절차

자외가시부흡광도측정법에 따른 분석, 확인 절차 등을 단계적으로 기술하고, 구체적인 조작 조건 등을 기재한다.  
필요한 경우, 반복 측정 횟수, 검액 적합성 기준 등을 기재한다.

(예시)

검액을 분광광도계용 셀에 넣고 자외가시부흡광도측정법에 따라 280 nm 및 320 nm에서 측정한다.

### 시스템 적합성

품목 특성 및 시험 목적에 따라 시스템의 성능, 시스템의 재현성, 검출의 확인 (순도시험) 및 판정기준 등을 기재한다.

(예시)

시스템의 성능 : 검액을 가지고 위의 조건으로 조작할 때 보정된 280 nm에서의 흡광도 측정값은 00~00 AU 에 있어야 한다.

공시험액의 흡광도 측정값은 약 00 AU 이어야 한다.

시스템의 재현성 : 검액을 가지고 위의 조건으로 조작할 때 검액의 Y회 분석 결과값의 상대표준편차는  $\times\times\%$  이하이다.

## 계산식, 분석결과

측정값을 통한 결과값 계산 등 필요한 계산식 및 판정방법 등을 기술한다.

(예시)

각 검액당 Y회씩 흡광도를 측정하여 평균을 구하고 다음의 계산식에 따라 총 단백질 함량(mg/mL)을 계산한다. 총단백질 함량(mg/mL)은 Y회 분석한 결과의 평균으로 한다.

$$\text{총 단백질 함량(mg/mL)} = ([A_{280} - A_{320}] \times (1/\epsilon) \times D \times F$$

$A_{280}$  : 280 nm에서의 흡광도

$A_{320}$  : 320 nm에서의 흡광도

$\epsilon$  : 흡광도계수 ( $0.00 \text{ mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

D : 희석계수 (중량비로 계산)

F : 밀도보정계수 (검액의 밀도/공시험액의 밀도)

## 시약·시액, 표준품

시험에 사용되는 주요 시약·시액의 조성, 농도, pH 등 조제방법을 기재한다.  
표준품의 규격(등급 또는 출처)을 기재한다.

(예시)

1) 희석완충액 : 00 mol/L ○○, 00 mmol/L △△, pH 00

## 기타 정보

분석에 필요한 추가 정보를 기재한다.

### 검액, 표준액 등 조제

검액 및 표준액 등의 조제 방법을 구체적으로 기술하거나, 최종 농도를 기재하고, 반복 조제 횟수 등을 기재한다.

(예시)

- 1) 검액 : 이 약 00 mL을 정확하게 취하여 희석완충액으로 희석하여 농도 범위 00~00 ng/mL로 준비한다. × 회 반복 분석이 가능하도록 준비한다.
- 2) 표준액 : ○○ 표준품을 희석완충액으로 희석하여 × 개 농도로 준비한다(00, 00, 00, 00, 00, 00 ng/mL). × 회 반복 분석이 가능하도록 준비한다.

### 분석 절차

플레이트 준비 및 측정 절차, 구체적인 조작조건 등을 단계별로 기술한다. 통계분석방법 등을 기재한다. 필요한 경우 데이터분석 프로그램, 통계분석 프로그램의 모델명 등을 포함한다.

[예시 : 역가시험(결합 활성)]

- 1) 분석용 플레이트 준비
  - 코팅 : ××(코팅 단백질)을 코팅 완충액을 이용하여 00 µg/mL로 희석한 다음, 마이크로플레이트 각 웰마다 00 µL 씩 분주한다. ○○ °C에서 움직이지 않게 하고, ○○ 시간 반응시킨다.
  - 블로킹 : 상온에서 플레이트를 3회 세척한다. 블로킹 버퍼로 희석 완충액을 사용하며, 각 웰에 00 µL를 넣어서 마이크로 플레이트를 블로킹한다. ○○ °C에서 움직이지 않게 하고, ○○시간 동안 반응시킨다.
- 2) 표준액과 검액을 00 µL씩 희석용 플레이트의 2열로 옮긴다. 플레이트 설계도에 따라 희석용 플레이트에서 표준액과 검액을 희석액으로 순차적으로 × 배 희석한다. 1열에서 00 µL를 취하여, 2열 00 µL의 희석액과 희석한다. 11열까지 연속 희석하고, 11열에서 희석 완료 후 00 µL를 버린다.
- 3) 세척 완충액으로 분석용 플레이트를 3회 세척한다.
- 4) 희석용 플레이트에서 순차적으로 희석한 표준액과 검액을 00 µL씩 분석용

플레이트에 옮긴다. 플레이트를 밀봉하고, ○○ °C에서 움직이지 않게 하고, ○○ 시간 동안 반응시킨다.

- 5) 분석용 플레이트의 A12 및 B12 웰에 음성대조군으로 희석액을 00  $\mu\text{L}$ 씩 넣는다.
- 6) 세척 완충액으로 플레이트를 3회 세척한다.
- 7) 희석된 검출 항체를 12열부터 2열까지 플레이트의 각 웰에 00  $\mu\text{L}$ 씩 옮긴다. 플레이트를 밀봉하고, ○○ °C에서 움직이지 않게 하고, ○○ 시간 동안 반응시킨다.
- 8) 세척 완충액으로 플레이트를 6회 세척한다.
- 9) 12열부터 2열까지 ○○ °C로 평형화시킨 기질(명칭)을 각 웰에 00  $\mu\text{L}$ 씩 넣고 상온에서 00 분 동안 반응시킨다. 중지 완충액을 12열부터 2열까지 플레이트의 각 웰에 00  $\mu\text{L}$  씩 넣어 반응을 중단한다.
- 10) ○○ nm 및 □□ nm 파장에서 플레이트를 판독한다. 00 nm 판독값에서 □□ nm 판독값을 보정한다.
- 11) Constrained 4-Parameter parallel curve fit를 사용하여 표준액, 대조액, 검액의 곡선을 구하고, 평행선 모델 분석을 통해 상대 역가를 계산한다.
  - 4-parameter 로지스틱 곡선 분석 소프트웨어 : 명칭 또는 이와 동등
  - 평행선 모델 분석 소프트웨어 : 명칭 또는 이와 동등

## 시스템 적합성

품목 특성 및 시험 목적에 따라 시스템의 성능, 시스템의 재현성 및 판정기준 등을 기재한다.

[예시 : 역가시험(결합 활성)]

- 1) 회귀 곡선의 적합성 : 표준액 및/또는 대조액, 검액의 곡선의 모양, 변곡점(C값), 기울기(B값), 상한 점근선(A값) 및 하한 점근선(D값),  $R^2$ , signal to noise(A/D) 값을 포함하여 곡선 적합성 기준을 기술한다.
- 2) 대조액 곡선의 유사성 : 표준액 곡선 대비 대조액 곡선의 기울기 비율, 하한 점근선 차이, 상한 점근선 차이, 분석된 역가 결과의 기준을 기술한다.
- 3) 검액 곡선의 유사성 및 재현성 : 표준액 곡선 대비 검액 곡선의 기울기 비율, 하한 점근선 차이, 상한 점근선 차이, 반복 분석 결과값의 상대표준편차 기준 등을 기술한다.

## 계산식, 분석결과

결과값 계산 및 반복 분석 결과값 처리 방법 등 최종 보고되는 결과값이 계산되는 과정을 기재한다.

[예시 : 역가시험(결합 활성)]

- 1) 개별 플레이트는 검액 X 반복에 대한 평균값이 독립적으로 분석된다.
- 2) 총 Y개의 플레이트 전체에 대해 최종적으로  $\times$  회 반복 분석 역가(상대활성) 결과값의 평균을 계산한다.

## 시약·시액, 표준품

시험에 사용되는 주요 시약·시액, 배지의 조제 방법을 기술하거나, 조성, 농도, pH 등을 기술한다. 필요한 경우 상품명 등을 기재한다.

코팅단백질, 포획항체, 검출항체 등 생물학적 시약의 경우 제품명, 로트번호, 제조사 등의 변경 및 추가 시 광범위한 평가가 필요할 수 있다. 필요한 경우 제조사, 카탈로그 번호 등을 기재한다.

표준품의 규격(등급 또는 출처)을 기재한다.

(예시)

- 1) 코팅 단백질 : 유전자재조합 ○○ 단백질 (제조사, 카탈로그 번호)
- 2) 검출 항체 : Biotinylated anti-△△ 항체(제조사, 카탈로그 번호)
  - 초순수 xx mL에 녹여 최종 농도 00 mg/mL로 조제하여 분석에 사용한다.
- 3) 기질 : 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine (TMB)
- 4) 희석 완충액 : 조제 방법 기술 또는 상업용 제품명, 조성 등 기재
- 5) 코팅 완충액 : 조제 방법 기술 또는 상업용 제품명, 조성 등 기재
- 6) 세척 완충액 : 조제 방법 기술 또는 상업용 제품명, 조성 등 기재
- 7) 중지 완충액 : 조제 방법 기술 또는 상업용 제품명, 조성 등 기재
- 8) 표준품 : 자사표준품
- 9) 양성 대조군 : ○○을 약 00  $\mu\text{g/mL}$  농도로 준비한다.
- 10) 음성 대조군 : 희석 완충액을 사용한다.

## 기타 정보

플레이트 layout

### 검액, 표준액 등 조제

검액 및 표준액 등의 조제 방법을 구체적으로 기술하거나, 최종 농도를 기재하고, 반복 조제 횟수 등을 기재한다.

(예시)

- 1) 검액 : 이 약 00 mL를 정확하게 취하여 분석용 배지를 사용하여 Y개 농도 (00, 00, 00, 00, 00, 00, 00 ng/mL)로 희석한다. ×회 반복 분석하도록 독립적으로 조제한다.
- 2) 표준액: ○○ 표준품을 검액과 동일하게 분석용 배지를 사용하여 Y개 농도 (00, 00, 00, 00, 00, 00, 00 ng/mL)로 준비한다. × 회 반복 분석하도록 독립적으로 조제한다.
- 3) 대조액 : 표준품을 가지고 00 mg/mL로 만들어 표준액과 동일한 절차로 조제한다.

### 분석 절차

세포 준비(세포 배양 및 유지) 과정을 기술한다.  
 사용되는 플레이트 수 및 플레이트 설계 등 플레이트 준비 과정을 상세히 기술한다. 필요한 경우 플레이트 layout을 포함한다.  
 측정 절차 및 조작조건 등을 구체적으로 기술한다.  
 통계분석방법 등을 기재한다. 필요한 경우 데이터분석 프로그램, 통계분석프로그램의 모델명 등을 포함한다.

(예시)

- 1) 세포 준비 : 배양한 세포로부터, 증식용 배지를 사용하여 00 cells/mL의 세포 현탁액을 준비한다.
- 2) 플레이트 준비 : 96-웰 마이크로플레이트에서 '세포 전용 대조군'(1-6열, H행) 및 공시험액(2-12열, A행)을 위한 지정된 웰에 분석용 배지 150  $\mu$ L를 넣는다. 리간드 고농도 용액 A를 00  $\mu$ L 추가하고(1열, A행), △배 연속 희석으로

(2-12열, A행) 추가하여 '리간드 대조군 곡선'을 생성한다. '세포 + 리간드 대조군'(7-12열, H행)으로 지정된 웰에 분석용 배지와 00  $\mu\text{L}$ 의 리간드 작업 용액 B를 추가한다. 샘플 웰 (2-12열, B-G행)에 분석용 배지 00  $\mu\text{L}$ 를 추가하고, 검액 및 표준액 00  $\mu\text{L}$ 를 추가한다(1열, B-G행). 일련의  $\Delta$ 배 희석을 준비하고(2-12열, B-G행), 리간드 저농도 용액 B 00  $\mu\text{L}$ 를 추가한다(1-12열, B-G행).  $5\pm 2\%$   $\text{CO}_2$  농도가 유지되는 배양기에서  $37^\circ\text{C}$ 에서 1 시간 동안 배양한다.

- 3) 플레이트 각 웰에 준비된 세포 현탁액 00  $\mu\text{L}$ 씩을 넣은 후,  $5\pm 2\%$   $\text{CO}_2$  농도가 유지되는 배양기에서  $37^\circ\text{C}$ 에서 00-00시간 동안 배양한다.
- 4) 각 웰에서 배지 00  $\mu\text{L}$ 를 제거하고 기질용액 10  $\mu\text{L}$ 를 넣은 후, 세포 활성 측정 시약(제품명) 00  $\mu\text{L}$ 를 넣는다.  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\pm 2\%$   $\text{CO}_2$  농도가 유지되는 배양기에서 00 시간 동안 배양한다.
- 5)  $\bigcirc\bigcirc$  nm 및  $\square\square$  nm 파장에서 플레이트를 판독한다.  $\bigcirc\bigcirc$  nm 판독값에서  $\square\square$  nm 판독값을 보정한다.
- 6) Constrained 4-Parameter parallel curve fit를 사용하여 표준액, 대조액, 검액의 곡선을 구하고, 평행선 모델 분석을 통해 상대 역가를 계산한다.
  - 4-parameter 로지스틱 곡선 분석 소프트웨어 : 명칭 또는 이와 동등
  - 평행선 모델 분석 소프트웨어 : 명칭 또는 이와 동등

## 시스템 적합성

품목 특성 및 시험 목적에 따라 시스템의 성능, 시스템의 재현성 및 판정기준 등을 기재한다.

(예시)

- 1) 회귀 곡선의 적합성 : 표준액 및/또는 대조액, 검액의 곡선의 모양, 변곡점(C값), 기울기(B값), 상한 점근선(A값) 및 하한 점근선(D값),  $R^2$ , signal to noise(A/D) 값을 포함하여 곡선 적합성 기준을 기술한다.
- 2) 대조액 곡선의 유사성 : 표준액 곡선 대비 대조액 곡선의 기울기 비율, 하한 점근선 차이, 상한 점근선 차이, 분석된 역가 결과의 기준을 기술한다.
- 3) 검액 곡선의 유사성 및 재현성 : 표준액 곡선 대비 검액 곡선의 기울기 비율, 하한 점근선 차이, 상한 점근선 차이, 반복 분석 결과값의 상대표준편차 기준 등을 기술한다.

## 계산식, 분석결과

결과값 계산 및 반복 분석 결과값 처리 방법 등 최종 보고되는 결과값이 계산되는 과정을 기재한다.

(예시)

- 1) 개별 플레이트는 검액 X 반복에 대한 평균값이 독립적으로 분석된다.
- 2) 총 Y개의 플레이트 전체에 대해 최종적으로  $\times$  회 반복 분석 역가(상대활성) 결과값의 평균을 계산한다.

## 시약·시액, 표준품

시험에 사용되는 주요 시약·시액, 배지의 조제 방법을 기술하거나, 조성(농도, pH 등)을 기술한다. 필요한 경우 상품명 등을 기재한다.

세포주는 명칭 및 분석 목적과 관련된 세포주 특성에 대한 개요를 기술한다.

세포활성시스템이 시판품인 경우 상품명 또는 분석 원리 및 시스템을 기술한다.

생물학적 시약의 경우 제품명, 로트번호, 제조사 등의 변경 및 추가 시 광범위한 평가가 필요할 수 있다. 필요한 경우 제조사, 카탈로그 번호 등을 기재한다.

표준품(등급 또는 출처)을 기재한다.

(예시)

- 1) WEHI-164 세포(ATCC No. CRL-1751) TNF- $\alpha$ 에 민감한 설치류 유래 섬유육종세포주
- 2) 증식용 배지 : 10% 열불활화-소태아혈청(FBS) 00 mL, ○○(농도) 00 mL 및 ○○(농도) 00 mL을 □□ 00 mL에 넣은 다음 0.2  $\mu$ m 필터로 여과한다.
- 3) 분석용 배지 : 10% 열불활화-소태아혈청(FBS) XX mL, ○○(농도) 00 mL 및 ○○(농도) 00 mL을 □□ 00 mL에 넣은 다음 0.2  $\mu$ m 필터로 여과한다.
- 4) 항원(리간드) : 명칭 (제조사, 카탈로그 번호)
- 5) 세포활성 분석시스템 : Steady-Glo™ 루시페라제 분석 시스템
- 6) 표준품 : 자사표준품

## 기타 정보

플레이트 layout