

C1q-coated ELISA 법을 이용한 정맥용 면역글로불린제제의 항보체성 측정

강혜나[#] · 김순남 · 신광훈* · 허숙진**

식품의약품안전청 생물학평가부, *국립보건원 세균질환부,

**경인지방청 식품의약품안전청 시험분석실

(Received September 19, 2001; Revised October 22, 2001)

C1q-Coated Microtitre Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Measuring the Anticomplementary Activity of Intravenous Immunoglobulin Preparations

Hye Na Kang[#], Soon Nam Kim, Kwang Hoon Shin* and Sook Jin Hur**

*Biologics Evaluation Department, Korea Food and Drug Administration 5 Nokbun-dong,
Eunpyung-gu, Seoul, 122-704, Korea*

**Microbiology, Ministry of Health and Welfare 5 Nokbun-dong,
Eunpyung-gu, Seoul, 122-701, Korea*

***Test & Analytical Laboratory, Kyung-in Regional KFDA 7-241 3Ga Shinhung-dong,
Chung-gu, Incheon, 400-712, Korea*

Abstract — The quality of an intravenous immunoglobulin preparation (IVIG) is reflected by the degree of nonspecific activation of complements, the so-called anticomplementary activity (ACA). ACA of aggregates in IVIG was investigated using method by the European Pharmacopoeia and C1q-coated microtiter enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Both the EP method and the ELISA method showed a dose response curve with the amount of complements bound increasing with the percentage content of aggregates in immunoglobulin standard. The correlation between the two tests was good ($r=0.96$, $r=0.99$). However, the correlation was not found when the ACA (EP method) of IVIG product was compared with its aggregate percentage. These results emphasize that the method of aggregate formation affects ACA and that estimation of the percentage distribution of aggregates by HPLC may not reflect ACA. In analysing IVIG product for C1q binding activity test with the ELISA, the result by using Protein A-HRP correlated with aggregate percentage ($r=0.84$). But the correlation decreased ($r=0.48$) when the result used Protein A-AP(having poorer sensitivity than HRP) was compared with aggregate percentage. As a result, some variation between the two methods, due to differences in assay principles, is to be expected. However, ELISA technique has the advantage in that it is easier to perform, more precise and less subject to reagent variability, and is the more suitable screening method than HPLC analysis.

Keywords □ Anticomplementary activity, aggregate, C1q-coated microtiter enzyme-linked immunosorbent assay

정맥용 면역글로불린 제제가 임상에 사용된 이후 안전성에 관한 가장 큰 이슈중 하나는 항원과는 독립적

으로 일어나는 보체의 활성화 감소나 부재에 관한 것이었는데 이는 제제내 중합물이 항원-항체 반응없이 보체를 활성화시켜 심한 전신적 부작용을 일으킬 수 있기 때문이다.¹⁾ 제제의 부작용은 다양한 원인에서 비롯되나 제조공정중 일종의 변성결과로서 증가된 중합

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-380-1765 (팩스) 02-383-8322

물의 보체 결합능이 그 원인이 되는 것으로 추정되고 있다. 그리고 이는 중합물의 heavy chain과 light chain의 flexibility변화로 항원결합없이 보체 결합부위가 노출되어 비특이적 보체활성이 용이해졌기 때문으로 알려져있다.²⁾

그러므로 글로불린을 분리, 생산공정 및 보관 과정 시 제제내 항체활성에는 영향없이 중합물의 생성을 막거나 제거해야만 하는 문제에 직면하게되어 여러 방법들이 연구, 사용되어져왔다. 원심분리로 중합물을 제거하거나 pH를 낮추는 등의 물리적 처리는 저장되는 동안 보체결합물이 다시 생길 수 있으나 즉각적인 효과는 볼 수 있다.²⁾ 펄스, 플라즈마 등의 처리로 면역글로불린의 Fc부분을 제거함으로써 중합물에 의한 보체활성을 막는 효소처리법은 면역글로불린의 구조를 변형시키고 사용된 효소가 사람기원이 아닐 경우 항원성 반응을 일으킬 가능성이 있고 half life가 짧다.^{2,3)} 그 외 환원작용과 알킬화 작용으로 제제를 화학적으로 변형시키거나 PEG(polyethylene glycol)처리로 중합물을 제거하는 등의 방법이 이용되어져왔는데 특히 PEG처리 사람면역글로불린은 PEG처리과정으로 면역글로불린내 중합물을 거의 제거할 수 있고 제제의 half life와 보체결합능력을 잘 보유하고 있어 정맥주사용으로 높이 평가되고 있다.^{3,4)}

면역글로불린 제제의 항보체성 측정의 필요성은 근래 안전성문제의 아기로 인한 바이러스 불활화 공정의 도입으로 더욱 중요해지고 있다. 이들 과정은 60°C에서 열처리하는 과정이 포함되어 있어 이 과정은 제제내 중합물함량을 더욱 증가시키는 동시에 항보체성을 발생시킬 수 있기 때문이다.⁵⁾ 제조업체들은 소비자와 정부의 바이러스 불활화 과정도입에 대한 압력을 받기 때문에 각 제조과정에 대한 모니터링과 각각의 제제에 대한 항보체활성 모니터링이 시급하다.⁶⁾

항보체성이 매우 낮은 제제의 경우는 감수성이 높은 환자에서도 임상적 증후를 유발하지 않으므로, 임상적 부작용이 없는 정맥 주사제를 선정하기 위해서는 항보체성이 특정한 저수준에 달한 제제의 선정이 필요하다.³⁾ 그러므로 정맥용 면역글로불린의 질은 보체의 비특이적 활성정도에 의해 결정되어 이러한 제제의 항보체활성(anticomplementary activity)은, 비록 그것이 제제의 부작용을 얼마나 반영할 수 있는지 명백하지는 않아도 제제의 quality screen의 중요한 측면이 되어 왔다.¹⁾ 또한 임상적으로 안전하고 효과적인

제제를 만들기 위해서는 생리적 항체 활성과 특이성이 보존되어 체내에서 항원과 결합시 보체를 활성화(complement fixation)시킬 수 있는 능력이 있어야 하고, 중합물이 없어 시험관내 방법으로도 항보체성이 거의 없다는 사실이 입증되어야 한다.³⁾ 이와같이 면역글로불린 제제에서 중합물의 항보체활성 측정은 제제의 정도관리(quality control)에 있어 매우 중요한 측면이라 할 수 있다.

가장 일반화된 항보체활성 측정법은 일정량의 검체와 보체를 반응시킨 후, 용혈소로 감작된 면역적혈구를 넣어 용혈정도로써 잔존 보체량을 측정하여 검체의 항보체활성을 측정하는 방법으로, 유럽약전이나 생물학적제제 기준 및 시험방법(생기법) 등에 게재되어 있다.⁷⁻⁹⁾ 그러나 이 방법은 사용하는 면역적혈구에 따라 결과차가 나타날 수 있어 시험전 용혈소와 보체를 적정해야 하고 여러 buffer를 제조해야하는 등 시험상 어려운 점들이 있으며, 많은 검체를 한번에 screening할 수 없다는 단점이 있었다.²⁾ 한편 C1q를 이용한 "ELISA법"은 항원-항체복합체나 면역글로불린 중합물의 Fc 부위의 결합 위치로서 C1q가 작용하여 고전적 경로를 통한 보체계 활성화에 착안한 것으로 방법이 단순, 신속하며 소량의 여러 검체를 쉽게 조작하여 처리하므로써 비용을 절약하고 아울러 검정업무를 좀 더 신속하고 정확하게 처리할 수 있다.^{6,10)} 따라서 본 연구는 면역글로불린제제의 항보체활성을 생기법에 명시된 방법과 ELISA법으로 비교 측정하고, 제제내 항보체성의 원인으로 알려진 중합물함량과도 비교하여 생기법에 규정된 항보체부정시험법을 ELISA법으로 대체 가능한지의 기초자료를 얻고자 한다.

실험방법

시약

European Pharmacopoeia Ig(50 g/L)을 European Pharmacopoeia Commission(EPC)으로부터 구입하여 표준품으로 사용하였고 정맥용 면역글로불린으로는 건조PEG처리 사람면역글로불린(IV-globulin 50 g/L, Green Cross Co.)제제를 사용하였다.

중합물의 준비는 기본 실험을 통해 필요한 중합물을 얻기 위한 열처리 시간을 정하고 정해진 다양한 시간 동안 61°C 수조에서 면역글로불린 표준액을 열처리하고 4°C의 ice-bath에서 반응을 정치시킨 후 0.6m×

7.5 mm TSK gel G 3000SW column(Tosoh, Japan)을 이용한 HPLC(High Performance Liquid Chromatograph, Waters Co.)분석으로 각각의 얻어진 중합물 함량을 측정하였다. 크로마토그램의 대부분을 차지하는 분자량 160 Kd정도의 면역글로불린 단량체(monomer) peak와 2개의 peak가 더 나타나는데 각각 이량체(dimer)와 중합물(polymer 혹은 aggregate)이다. 이때 저분자량의 degradation 물질이 관찰되어서는 안된다.

시험에 사용한 모든 완충액과 시약은 Sigma Chem. Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

생물학적제제 기준 시험법(생기법)^{7,8,9)}

완충액의 제조 - 완충액으로는 modified barbital buffer(5,5-diethyl barbituric acid 2.875 g, sodium 5,5-diethyl barbiturate 1.875 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1103 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.5083 g, NaCl 42.50 g/DW 1L, pH 7.3±0.1)를 사용하였다.

감작면양적혈구의 준비 - 면양 적혈구를 채취하여 동량의 alsever solution에서 1주일간 평형을 시킨 후 완충액으로 3회 세척하여 1×10^9 cell/mL의 농도로 준비하였다. 항면양적혈구 토끼혈청인 용혈소(일본생연)를 2MHU(minimal hemolytic unit)/mL로 적정하여 면양 적혈구와 1:1로 혼합하여 37°C 항온수조에서 30분간 반응시키고 반응이 끝나면 ice-bath에서 정치시켜 감작면양적혈구를 만들어 사용하였다.

항보체성부정시험 - 검체 1 mL에 적정된 기니픽 보체 100단위를 함유한 액 1 mL를 넣고 다시 완충액 3 mL를 가한 후, 37°C에서 1시간 항온하였다. 이 반응액을 동일한 완충액으로 적당하게 몇 단계로 희석하여, 일정량의 감작면양적혈구를 가하고, 37°C 항온수조에서 1시간 방치한 후 원심분리($\times 3000$ g, 5분)하였다. 파장 541 nm에서 상등액의 흡광도를 구하였다. 100% 용혈(complete hemolysis)을 1로 하였을 때, 각각의 흡광도를 y로 하여 용혈정도 y/1-y를 가로축으로, 첨가한 보체량(mL)을 세로축으로 log-log 그래프를 그린 후 50% 용혈을 보이는 y/1-y=1일 때의 보체량을 구해 검체의 잔존보체량(a)을 구하였다. 따로 대조로서 같은 완충액으로 똑같이 조작하여 측정된 보체량(b)을 구하였다. 불활화한 보체량은 b-a로 구하고 그 단위는 CH_{50} 으로 표시하는데, 이는 감작된 면양적혈구 5×10^8 개중 50%인 2.5×10^8 개의 세포를 용혈시키는데 필요한 보체량을 가리킨다.

ELISA 시험법^{6,10-12)}

Protein A-HRP 이용 - 0.05M bicarbonate/carbonate buffer(pH9.6)로 희석된 사람 C1q 100 μL 로 flat bottomed microtitre plate를 4°C에서 overnight하여 coating하였다. PBS-Tween(phosphate buffered saline +0.05% Tween)으로 3회 세척하고 5% BSA(bovine serum albumin)/PBS로 1시간 동안 blocking하였다. 검체나 표준품을 3% BSA/PBS로 희석하여 100 μL 씩 well에 넣고 37°C에서 3시간 반응시켰다. PBS-Tween으로 3회 세척하고 Protein A-HRP(horseradish peroxidase-conjugated protein A)를 3% BSA/PBS로 희석하여 역시 100 μL 씩 well에 넣고 37°C에서 1.5시간 반응시켰다. Plate를 3회 세척하고 0.05M phosphate-citrate buffer(pH5.0) 50 mL에 20 mg OPD(o-phenylenediamine)와 20 μL 의 30% hydrogen peroxide를 포함하는 기질용액 100 μL 를 가해 37°C에서 30분 반응시킨 후 2.5M 황산용액 50 μL 로 반응을 정지시켰다. 발색정도를 490 nm 파장에서 ELISA reader로 읽었다.

Protein A-AP 이용 - 0.05M bicarbonate/carbonate buffer(pH9.6)로 희석된 사람 C1q 100 μL 로 flat bottomed microtitre plate를 4°C에서 overnight하여 coating하였다. TBS-Tween(Tris buffered saline + 0.05% Tween)으로 3회 세척하고 5% BSA/TBS로 1시간 동안 blocking하였다. 검체나 표준품을 3% BSA/TBS로 희석하여 100 μL 씩 well에 넣고 37°C에서 3시간 반응시켰다. TBS-Tween으로 3회 세척하고 Protein A-AP(alkaline phosphate-conjugated protein A)를 3% BSA/TBS로 희석하여 100 μL 씩 well에 넣고 37°C에서 1.5시간 반응시켰다. Plate를 3회 세척하고 0.2M Tris buffer tablet을 5 mL DW에 녹이고 pNPP(p-nitrophenyl phosphate) tablet(1.0 mg/mL)을 녹인 기질용액 200 μL 를 가해 실온에서 30분 반응시킨 후 3N 수산화나트륨용액 50 mL로 반응을 정지시켰다. 발색정도를 405 nm 파장에서 ELISA reader로 읽었다.

실험결과

열처리시간에 따른 중합물 함량변화

면역글로불린 표준액내 다양한 농도의 중합물을 얻기 위해 0, 1.5, 2, 3, 4, 6분으로 열처리시간을 정하여 표준곡선에 이용할 중합물 표준액 0.479, 0.757,

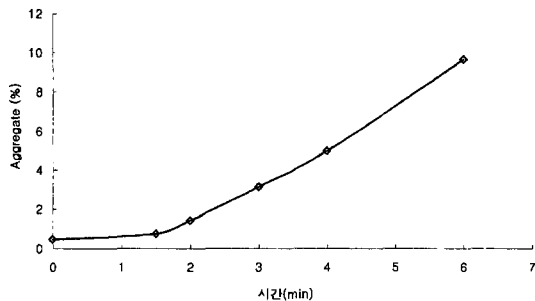


Fig. 1 - Percentage aggregates formed from heating for 0, 1.5, 2, 3, 4, 6 minutes

1.435, 3.135, 4.972, 9.662%를 얻었다(Fig. 1). 이 중 열처리 시간 6분으로 얻은 중합물 표준액 9.662%는 정맥용 면역글로불린 제제내 중합물 존재 허용치(생기 : 1%이하, 유럽약전 : 3%이하)에 비해 너무 많은 양이므로 실험에서 제외하였다.^{7,9)} 초기 약 2분간의 열처리 시에는 중합물이 서서히 증가하다가 2분 이후에는 시간에 비례하여 $y=2.0709x-2.9647(r^2=0.9936)$ 의 직선을 나타내며 증가했다.

중합물농도와 항보체가 변화(생기법)

표준액내 각각의 중합물에 대한 항보체가를 3회 실험하여 10.3, 15.0, 21.2, 49.8, 70.1 CH₅₀ 으로 구하였을 때, 보체결합능은 중합물농도에 비례하여 증가 ($y=13.588x+3.9823, r^2=0.9929$)했다(Fig. 2).

중합물농도와 O.D값 변화(ELISA시험법)

시험조건 - 초기 cross titration assay를 통해 C1q coating 농도는 0.5 µg/well로, Protein A-HRP 1 mg/

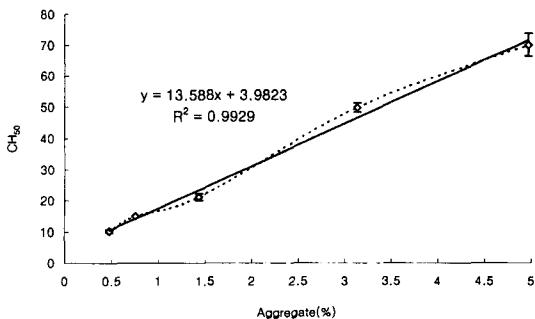


Fig. 2 - EP Method : ACA-response curve for Ig aggregates. The relationship between aggregate concentration and complement binding was observed a linear relationship at 5 aggregate level.

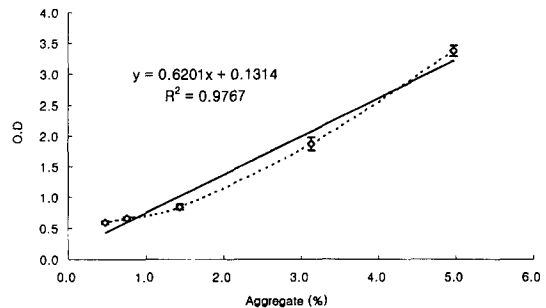


Fig. 3 - ELISA Method using Protein A-HRP. The binding of Protein A-HRP to microtiter wells coated C1q, after incubation with increasing amounts of aggregates in standard immunoglobulin, is represented on the ordinate.

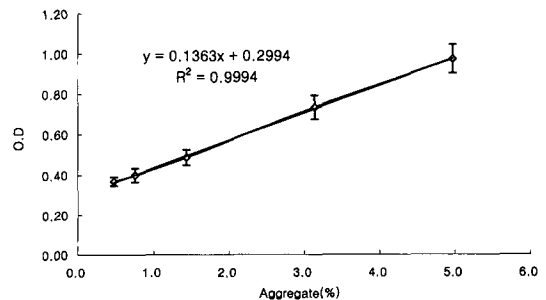


Fig. 4 - ELISA Method using Protein A-AP. The binding of Protein A-AP to microtiter wells coated C1q, after incubation with increasing amounts of aggregates in standard immunoglobulin, is represented on the ordinate.

mL는 1:10000, Protein A-AP 1 mg/mL는 1:3000 으로 희석하여 사용하였다.

표준곡선 - ELISA시험에 사용할 최적 항원(면역글로불린 표준액과 검체)농도를 Protein A-HRP 는 1:5000, Protein A-AP 는 1:500으로 정하고, C1q에 결합하는 중합물에 의해서만 O.D값이 변하게 하였을 때 두 시험에서 모두 중합물농도와 비례하여 증가하였다(Fig. 3, 4). 그러나 각 농도변화에 대한 O.D값 변화정도는 Protein A-HRP(slope=0.6201)가 Protein A-AP(slope=0.1363)에 비해 높은 것으로 나타났다.

두 시험법간의 상관관계

Fig. 5, 6에서 보는 바와 같이 ELISA시험법으로 측정된 보체 결합을 생기법의 결합율과 비교할 때 좋은 상관관계수가 얻어졌다($r=0.96, r=0.9958$).

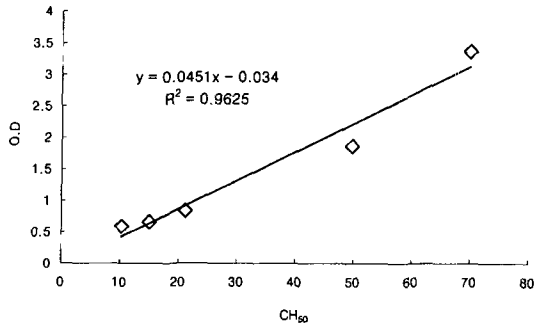


Fig. 5 – Correlation of ELISA (using Protein A-HRP) with EP method in 5 aggregates formed from heating.

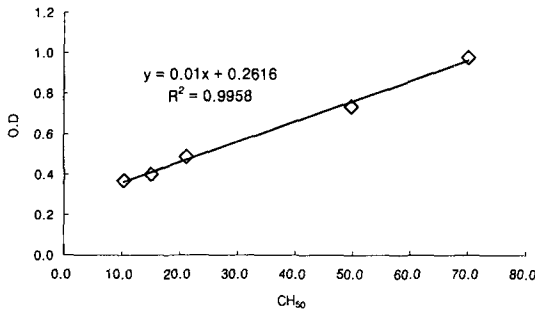


Fig. 6 – Correlation of ELISA (using Protein A-AP) with EP method in 5 aggregates formed from heating.

검체분석

검체인 건조PEG처리 사람면역글로불린(IV-globulin, 50 g/L)제제에서의 중합물 함량을 HPLC로 분석하고 항보체가를 생기법으로, C1q결합능을 ELISA시험법으로 측정하였다. ELISA시험에서 Protein A-HRP와 Protein A-AP의 경우 각각의 결과 C.V.(coefficients of variation; 0.7~6.1%, 1.3~14.0%)는 작았으나 두 결과가 항상 일치하지는 않았다(Fig. 7, 상관계수 = 0.4446). 또 HPLC로 분석한 각 검체의 중합물 함

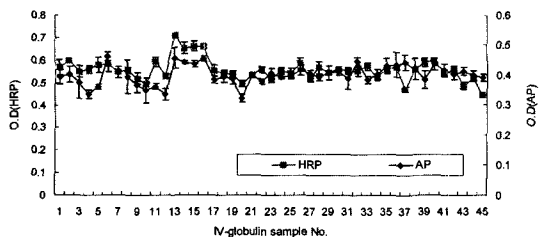


Fig. 7 – The ability of the Protein A-HRP and Protein A-AP in ELISA method to detect aggregates in IV-globulins is shown. Each point represented the mean of triplicate sample.

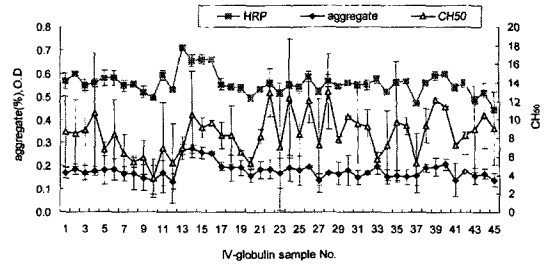


Fig. 8 – Results of aggregate percentage, ACA and C1q binding ability in IV-globulin samples.

량 변화에 따른 항보체가와 C1q결합능 측정결과를 Fig. 8에 정리하였는데 각 시험결과간의 상관계수는 중합물함량과 Protein A-HRP는 0.8409, 중합물함량과 Protein A-AP는 0.4802, 중합물함량과 항보체가는 0.3242, 항보체가와 Protein A-HRP는 0.3080, 항보체가와 Protein A-AP는 0.2688로 나타났다. 또 HPLC 분석에 의한 중합물함량과 생기법에 의한 항보체가 측정시의 C.V.는 각각 0.4~39.7%와 0.8~77.0%로 나타났다.

고 찰

항원-항체 복합체에 의한 보체결합은 체내 면역글로불린의 체액성 효능에 필수적이다. 그러나 면역글로불린이 항원없이 보체에 결합한다면 정맥투여시 심각한 부작용을 야기하게 될 것이다. 인체내에서의 이러한 항보체 활성측정은 불가능하므로 실험을 통해 높은 항보체성을 가진 제제는 사용하지 않도록 하고 있다. 항보체활성은 제제중의 중합물의 양과 분자의 Fc부분 손상과 관련되며 그러한 제제는 심각한 부작용, 종종 아나필라틱 반응과도 관련된다.¹⁾

제제내의 보체결합능을 측정하기위해 시도된 두 방법, 즉 생기법과 ELISA시험법은 모두 면역글로불린 표준품내의 중합물 함량에 비례하여 보체결합율이 증가하는 표준곡선을 보였으며(Fig. 2와 Fig. 3,4), 두 시험법간의 상관관계도 높았다(Fig. 5, 6).

그러나 측정 원리차이에 의한 약간의 변이가 예상된다. 즉, 첫째, 보체의 활성화 과정은 고전적 경로(classical pathway)와 대체적 경로(alternative pathway)의 두가지 경로가 있는데, ELISA시험법은 보체계 활성화 과정의 첫 단계인 중합물의 수용체에 해당하는 C1q 결합능을 측정하므로써 중합물의 고전적 경로를

통한 보체의 활성을 측정하는 방법으로¹³⁾ 생기법에 의해 검출 가능한 대체적 경로를 통한 약간의 중합물에 의한 보체의 활성은 측정할 수 없다.⁶⁾ 1982년 조민기 등은 칼슘 chelator인 EGTA(ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether) N,N,N',N'-tetraacetic acid)포함 완충액 사용으로 Ca^{+2} 를 제거하여 고전적 경로의 활성화 과정 차단시에도 제제가 항보체성을 나타냄을 생기법으로 보여 대체적 경로를 통한 보체활성기전을 규명하였다.³⁾ 둘째, 면역글로불린 제제는 대부분이 IgG이며 약간의 IgA와 IgM을 포함한다. IgG의 경우에도 4가지의 subclass(IgG1 70%, IgG2 25%, IgG3 3%, IgG4 2%)⁴⁾가 있는데 일반적으로 ELISA시험법에 사용된 C1q는 IgG4 subclass를, protein A는 IgG3 subclass를 인식하지 못하는 것으로 알려져 있고 생기법으로는 IgG4 subclass를 검출하지 못하는 것으로 알려져 있다.^{10,18)}

제제의 경우 HPLC에 의한 중합물함량 측정시 측정시마다 결과차를 나타냈는데(Fig. 8), 이것은 온도증가에 의한 이량체의 함량의 변화에 의한 것으로 HPEC(high performance exclusion chromatography) 분석시 희석과 column injection전 제제의 보관온도가 유지되어야 그 분석결과차를 최소화할 수 있음을 보인 Tankersley등의 보고로 설명이 가능하다.¹⁴⁾ 즉, Fig. 8에서 보여주는 중합물함량 결과차나, 중합물 함량과 C1q결합능 사이의 차이는 제제를 보관 후 시험 전까지의 온도변화와 column injection시의 온도에 원인이 있을 것으로 사료된다.

또 각 제제의 보체결합능 측정을위한 생기법과 중합물함량과는 연관성이 보이지 않았는데 이런 결과들은 중합물의 생성방법이 항보체 활성화에 영향을 주고 HPLC에 의한 중합물의 분포가 정확히 항보체 활성화와 일치하지 않는다는 것을 의미한다.⁶⁾ 표준물의 경우 열처리에 의해서만 중합물이 생성되었고 면역글로불린의 다른 물질은 포함하고 있지않으나, 제제의 경우 열처리의 다른 원인에 의해서도 중합물이 생성되었을 수 있고 면역글로불린의 알부민과 아세틸트립토판등을 포함하고 있다. 특히 알부민은 면역글로불린의 항보체성질을 다소 억제할 수 있는 안정제로 알려져있어 공기 중에 노출시나 반복되는 피펫조작에 항보체가가 영향을 받지않는다.³⁾

ELISA시험에서 2차항체 대신 사용하는 Protein A를 두 가지 enzyme conjugate형태로 사용했는데 일

반적으로 HRP가 AP보다 민감도가 높은 것으로 알려져 있다. 제제의 경우 중합물함량과 C1q결합능이 Protein A-AP에서는 낮은 상관관계를 나타냈고 ($r=0.48$) Protein A-HRP에서는 상관관계 $r=0.84$ 를 나타냈다. 또 면역글로불린의 표준품에서 Protein A-HRP(slope=0.6201)와 Protein A-AP(slope=0.1363)를 각각 사용한 ELISA시험에서 Protein A-HRP가 민감도가 높아 제제 중의 미량의 항보체성 물질을 부정하는 시험에서는 감도 높게 측정할 수 있는 방법인 Protein A-HRP가 더 적합함을 보였다. 또 두 시험 모두 각 제제내의 결과차는 적어 중합물 양을 HPLC 분석보다는 변이계수가 작았으며 이는 위에서 설명했듯이 HPLC분석시는 온도변화에 의해 결과차가 나타났으나 ELISA시험의 경우 각 단계별 정확한 온도가 유지되었기 때문인 것으로 사료된다. 또 중합물의 크기에 따라서도 C1q 결합능이 달라지므로^{15,18)} 제제내 존재하는 중합물의 크기가 결과에 영향을 준 것으로 사료된다. 중합물은 C1q에 결합 후 반드시 그것을 활성화시키는 것은 아니지만 C1q결합과 활성화의 효과는 면역글로불린 분자의 polymerization정도에 크게 의존하게된다.¹⁵⁾

현재 국가검정에 적용되고 있는 중합물과 항보체가의 기준은 각각 1%이하와 20단위이하이고 유럽약전에서는 3%이하와 50단위 이하로 규정하고 있다. 본 표준물 실험결과(Fig. 2) 1%이하의 중합물은 20단위 이하의 항보체가를 나타냈고 3%이하의 중합물 역시 50단위 이하의 항보체가를 나타내 모두 기준내의 값을 보였다. 그러나 1997년 Ramasamy등은 3%이하의 중합물이 기준을 초과하는 양의 보체와 결합할 수 있고, 중합물의 생성조건에 따라서 보체결합능이 달라질 수 있음을 보여주었다.⁶⁾ 이것은 면역글로불린의 polymerization을 위해 사용된 source와 방법차이로 단량체 면역글로불린과 삼량체 면역글로불린의 C1q 결합능 비교 실험 결과가 Doekes등의 경우 10배,¹⁵⁾ Tschoop 등의 경우 60배로¹⁶⁾ 차이를 보인 것으로 설명될 수 있다. 또 중합물은 항보체활성외에 다른 부작용에 작용할 수 있으므로 최종산물의 완전한 특성을 규명하기 위해서는 중합물 시험과 항보체성시험 모두 수행해야할 것으로 사료된다. 항보체성은 제제중 중합물의 물리적특성과 그 농도에 의존하므로 정밀하게 항보체 활성을 정량할 수 있는 방법이 검증되어야 한다.⁶⁾

Ramasamy등에 따르면 생기법은 두 개의 주요 변수

가 있어, 표준품과 반응시키는 보체 농도와 중합물 농도에 따라 항보체가가 달라지게 되는데 현재 50 mg 표준품을 100단위 보체와 반응시키는 것 대신 보체 농도를 더 높일 경우 표준품내 중합물 농도에 따른 보체 결합능이 2배에서 3배로 더욱 증가하고, 표준품농도와 중합물 농도가 같아도 반응 시키는 보체 단위수가 증가하면 항보체가가 증가된다.⁶⁾ 측정법의 민감도와 정확도는 보체와 용혈소, 그리고 각각의 농도에 영향을 받고 양적혈구의 기원(개개의 양사이에서 오는 변이가 존재)에도 영향을 받는다.¹⁾ 또 생기법은 적혈구 농도와 상태, 반응계의 이온강도, 칼슘 및 마그네슘 이가이온의 농도, pH, 반응시간과 온도에 따라서도 그 결과가 달라지고,⁸⁾ 복잡한 수학적 기술적 조작, 객관성 부족, 민감도가 떨어진다는 문제점이 있다. 그리고 제제의 국가 검정시에는 제제를 몇 단계로 희석하게 되는데 이러한 희석은 낮은 농도에서의 면역글로불린의 입체적 구조변화로 보체 소모를 증가시키게 된다.¹⁷⁾ 본 시험이나 Törmä 등¹⁾의 시험에서도 항보체가는 $SD \pm 0.07 \sim \pm 6.93$ 과 $SD \pm 2.2 \sim \pm 22.9$ 로 변이를 보여 결과차를 나타내게 하는 등 위와 같은 많은 변수들 때문에 동일 제제를 시험한 결과가 실험실내 혹은 실험실간에 따라 달라지게 된다.¹⁾ 따라서 생기법은 단위수를 정하는 보체적정 calibration을 통해 항상 정확한 양의 보체단위를 사용하여 정의된 조건에서 시험이 수행되고 있는지를 확인해야 제제간 비교가 정확해 질 수 있음을 알 수 있다.

시험결과 두 시험법은 면역글로불린 표준품에서 좋은 상관관계($r=0.96$, $r=0.9958$)를 보여주나 제제에서는 그렇지 못했다. 더욱이 검체수급에 어려움이 있어 많은 검체에 대한 반복 실험이 어려워 PEG처리 사람 면역글로불린제제로 점차 대체되고 있는 말토즈첨가 사람면역글로불린 제제에서의 연구가 앞으로 진행되어야 할 것으로 사료된다. 그러나 여러가지 차이에도 불구하고 ELISA법은 기술은 수행이 간편하고 보다 정밀하며 시약에 덜 의존적이다. 또 중합물은 면역복합체와 유사한 많은 생물학적 활성을 가지고 있어 C1q를 이용한 면역복합체 측정시의 표준물질로서 이미 사용되고 있으므로,^{12,19)} HPLC에 의해 측정된 중합물 함량과 ELISA법은 연관성이 있고 또한 상업적으로 구입 가능한 시약을 사용할 수 있어 ELISA시험법은 스크리닝 방법으로서 현재 사용되고 있는 HPLC분석 대신 일상적인 실험업무에 좀 더 유용하게 사용될 수 있

으리라 사료된다.⁵⁾

결 론

면역글로불린 표준품의 경우 생기법과 ELISA시험법에서 중합물 함량에 비례하여 보체결합율이 증가하는 표준곡선을 보였으며, 두 시험법간의 상관관계가 높았다($r=0.96$, 0.99).

제제의 경우 중합물함량과 생기법으로 측정된 보체 결합능이 연관성을 보이지 않았는데 이는 중합물의 생성방법이 항보체 활성에 영향을 주고 HPLC에 의한 중합물의 분포가 정확히 항보체 활성과 일치하지 않기 때문인 것으로 사료된다.

ELISA시험법의 경우 AP에 비해 민감도가 높은 Protein A-HRP 사용시 상관관계($r=0.84$)를 나타냈다. 또 시험간의 변이(C.V.=0.7~6.1%, 1.3~14.0%)가 HPLC분석(C.V.=0.4~39.7%)과 생기법(C.V.=0.8~77.0%)에 의한 항보체성 측정시에 비해 적게 나타났다. 이는 HPLC분석은 온도변화에 의해 결과차가 생길 수 있고 생기법에 의한 항보체성 측정은 제제의 희석이나 보체, 용혈소농도, 양적혈구에 영향을 받기 때문이다. 또한 두 방법간의 원리차이에서 오는 약간의 변이도 예상된다.

중합물은 면역복합체와 유사한 많은 생물학적 활성을 가지고 있어 C1q를 이용한 면역복합체 측정시의 표준물질로서 이미 사용되고 있고, 본 시험 결과 HPLC에 의해 측정된 중합물 함량과 ELISA시험법에 의해 측정된 C1q결합능 상관관계가 있어 변이가 적은 ELISA시험법 역시 스크리닝 방법으로 적합하리라 사료된다.

문 헌

- 1) Törmä, E. Suomela, H. and Hämäläinen, E. : Microtiter plate assay for measuring the anticomplementary activity of immunoglobulins. *J. of Immunological Method* **164**, 101 (1993).
- 2) Fernandes, P. M. and Lundblad, J. L. : Preparation of a stable intravenous gamma-globulin : process design and scale-up. *Vox Sang* **39**, 101 (1980).
- 3) Cho, M. K., Lee, Y. W. and Park, M. Y. : A study on anticomplementary activity of immunoglobulin products. *The Annual Report of Ministry of Health*

- and Welfare* **19**, 61 (1982).
- 4) Hässig, A. : Intravenous immunoglobulins : Pharmacological aspects and therapeutic use. *Vox Sang* **51**, 10 (1986).
 - 5) Uemura, Y., Uriyu, K., Hirao, Y., Takechi, K., Ishikawa, H., Nakajima, T., Kagitani, Y., Yokoyama, K., Funakoshi, S., Nishida, M., Yabushita, S., Furuta, K., Hamamoto, Y., Tochikura, T. S. and Yamamoto, N. : Inactivation and elimination of virus during the fractionation of an intravenous immunoglobulin preparation : Liquid heat treatment and polyethylene glycol fraction. *Vox Sang* **56**, 155 (1989).
 - 6) Ramasamy, I., Tran E. and Farrugia, A. : Measurement of anticomplementary activity in therapeutic intravenous immunoglobulin preparations. *Biologicals* **25**, 87 (1997).
 - 7) Tests for anticomplementary activity of immunoglobulins. *European Pharmacopoeia*, p97 (1997).
 - 8) Kabat, E. A. and Meyer, M. M. : *Experimental immunochemistry*. 2nd Ed. 133 (1971).
 - 9) 생물학적제제기준 및 시험방법, p534 (1999).
 - 10) Füst, G., Medgyesi, G. A., Rajnavölgyk, Eva, Csécsi-Nagy, Maria, Czíkora, Klára and Gergely, J. : Possible mechanisms of the first step of the classical complement activation pathway : binding and activations of C1. *Immunology* **35**, 873 (1978).
 - 11) Joy Yang, Y. H., Ngo, C., Ng Yeh, I. and Uemura, Y. : Antibody Fc functional activity of intravenous immunoglobulin preparations treated with solvent-detergent for virus inactivation. *Vox Sang* **67**, 337 (1994).
 - 12) Jordan, S. C., Gautier, E., Sakai, R. and Bahn, L. : Quantitation of circulating immune complexes in human serum by the Raji cell and F(ab')₂ anti-C3 micro enzyme immunoassays. *Journal of Immunological Methods* **83**, 36 (1985).
 - 13) Winkelhake, J. L., Kunicki, T. J., Elcombe, B. M. and Aster, R. H. : Effects of pH treatments and deglycosylation of rabbit immunoglobulin G on the binding of C1q. *The Journal of Biological Chemistry* **255**, 2822 (1980).
 - 14) Tankersley, D. L., Sue Preston, M. and Finlayson, J. S. : Immunoglobulin G dimer : An idiotype-anti-idiotype complex. *Molecular Immunology* **25**, 41 (1988).
 - 15) Doekes, G., Vanes, L. A. and Daha, M. R. : Influence of aggregate size on the binding and activation of the first component of human complement by soluble IgG aggregates. *Immunology* **45**, 705 (1982).
 - 16) Tschopp, J., Schulthess, T., Engel, J. and Jaton, J.-C. : Antigen-independent activation of the first component of complement C1 by chemically crosslinked rabbit IgG-oligomers. *FEBS Letters* **112**, 152 (1980).
 - 17) Blann, A. D., Lewin, I. and Bacon, P. A. : Development and evaluation of a rapid, semi-automatic micro-method for CH₅₀ estimation using a computer program. *Immunological Investigations* **19**, 109 (1990).
 - 18) Augener, W., Grey, H. M., Cooper, N. R. and Muller-Eberhard, H. J. : The reaction of monomeric and aggregated immunoglobulins with C1. *Immunochemistry* **8**, 1011 (1971).
 - 19) Kauffmann, R. H., Van Es, L. A. and Daha, M. R. : Aggregated human immunoglobulin G stabilized by albumin : A standard for immune complex detection. *Journal of Immunologic Methods* **31**, 11 (1979).