청렴韓세상

국민의 더 건강한 내일을 위한 정부혁신
보다 나은 식약처

생체시료 분석법 밸리데이션 및 시험검체 분석 가이드라인 [민원인 안내서]

2023. 10.

식품의약품안전처
식품의약품안전평가원

의약품심사부 약효동등성과

지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭	생체시료 분석법 밸리데이션 및 시험검체 분석 가이드라인

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

등록대상 여부	□ 이미 등록된 지침서·안내서 중 동일·유사한 내용의 지침서·안내서가 있습니까?	□ 예 ■ 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 기존의 지침서·안내서의 개정을 우선적으로 고려하시기 바랍니다. 그럼에도 불구하고 동 지침서·안내서의 제정이 필요한 경우 그 사유를 아래에 기재해 주시기 바랍니다. (사유 :)	
	□ 법령(법·시행령·시행규칙) 또는 행정규칙(고시·훈령·예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?	□ 예 ■ 아니오
	□ 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?	□ 예 ■ 아니오
	□ 일회성 지시·명령에 해당하는 내용입니까?	□ 예 ■ 아니오
	□ 외국 규정을 단순 번역하거나 설명하는 내용입니까?	□ 예 ■ 아니오
	□ 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까?	□ 예 ■ 아니오
	☞ 상기 사항 중 어느 하나라도 '예'에 해당되는 경우에 지침서·안내서 등록 대상이 아닙니다. 지침서·안내서 제·개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다.	
지침서·안내서 구분	□ 행정사무의 통일을 기하기 위하여 내부적으로 행정사무의 세부 기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	□ 예(☞지침서) ■ 아니오
	□ 민원인들의 이해를 돕기 위하여 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 설명하거나 특정 민원업무에 대한 행정기관의 대외적인 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)	■ 예(☞안내서) □ 아니오
기타 확인 사항	□ 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설·강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?	□ 예 ■ 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서·안내서 제·개정 절차를 진행하시기 바랍니다.	

상기 사항에 대하여 확인하였음.

2023 년 10 월 26 일

담당자 최 미 섭

확 인(부서장) 김 소 희

이 안내서는 생체시료 분석법 밸리데이션 및 시험검체 분석 시 고려사항에 대하여 알기 쉽게 설명하거나 식품의약품안전처의 입장을 기술한 것입니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식('~하여야 한다' 등)에도 불구하고 참고로만 활용하시기 바랍니다. 또한, 본 안내서는 2023년 10월 현재의 과학적·기술적 사실 및 유효한 법규를 토대로 작성되었으므로 이후 최신 개정 법규 내용 및 구체적인 사실관계 등에 따라 달리 적용될 수 있음을 알려드립니다.

※ "민원인 안내서"란 민원인들의 이해를 돕기 위하여 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 설명하거나 특정 민원업무에 대한 행정기관의 대외적인 입장을 기술하는 것(식품의약품안전처 지침서등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 의약품심사부 약효동등성과에 문의하시기 바랍니다.
전화번호: 043-719-3157
팩스번호: 043-719-3150

제·개정 이력

연번	제·개정번호	승인일자	주요내용
1	11-1470129-000073-01	2003.5	제정
2	B1-2010-2-016	2010.6	개정 (생체시료 분석법 밸리데이션 해설서 제정)
3	B1-2013-2-004	2013.3	개정 (검체검증 분석 가이드라인 제정)
4	B1-2013-2-007	2013.12	개정 (셍체시료 분석법 밸리데이션 가이드라인 및 검체검증 분석 가이드라인 통합)
5	안내서-0024-01	-	「식약처 지침서등의 관리에 관한 규정」 개정에 따른 등록번호 일괄 정비 (규제개혁담당관실-3761호, 2017.5.16)
6	안내서-0024-02	2023.10.26	전면개정 및 가이드라인 명칭 변경 (ICH M10 가이드라인 반영)

목 차

1. 서론 ····· 1

1.1 목적 ····· 1

1.2 배경 ····· 1

1.3 범위 ····· 1

2. 일반 원칙 ····· 2

2.1 분석법 개발 ····· 2

2.2 분석법 밸리데이션 ····· 3

2.2.1 전체 밸리데이션 ····· 3

2.2.2 부분 밸리데이션 ····· 4

2.2.3 교차 밸리데이션 ····· 4

3. 크로마토그래프법 ····· 4

3.1 표준품 ····· 4

3.2 밸리데이션 ····· 5

3.2.1 선택성(Selectivity) ····· 5

3.2.2 특이성(Specificity) ····· 6

3.2.3 생체시료효과(Matrix Effect) ····· 7

3.2.4 검량선 및 범위(Calibration Curve and Range) ····· 7

3.2.5 정확성 및 정밀성(Accuracy and Precision) ····· 8

3.2.5.1 품질관리시료 조제 ····· 8

3.2.5.2 정확성 및 정밀성 평가 ····· 9

3.2.6 캐리오버(Carry-over) ····· 10

3.2.7 희석의 타당성(Dilution Integrity) ····· 10

3.2.8 안정성(Stability) ····· 11

3.2.9 재주입 재현성(Reinjection Reproducibility) ····· 13

3.3 시험검체 분석(Study Sample Analysis) ····· 14

3.3.1 분석단위(Analytical Run) ····· 14

3.3.2 분석단위 판정기준 ····· 15

3.3.3 검량선 범위 ····· 16

3.3.4 시험검체 재분석 ····· 17

목 차

3.3.5 시험검체 재주입 ····· 18
3.3.6 크로마토그래프 적분 ····· 18
4. 리간드 결합 분석(Ligand Binding Assays, LBAs) ····· 19
4.1 핵심 시약(Key Reagents) ····· 19
4.1.1 표준품 ····· 19
4.1.2 필수 시약(Critical Reagents) ····· 19
4.2 밸리데이션 ····· 20
4.2.1 특이성(Specificity) ····· 21
4.2.2 선택성(Selectivity) ····· 21
4.2.3 검량선 및 범위(Calibration Curve and Range) ····· 21
4.2.4 정확성 및 정밀성(Accuracy and Precision) ····· 22
4.2.4.1 품질관리시료 조제 ····· 22
4.2.4.2 정확성 및 정밀성 평가 ····· 23
4.2.5 캐리오버(Carry-over) ····· 23
4.2.6 희석 선형성(Dilution Linearity) 및 후크 효과(Hook Effect) ····· 24
4.2.7 안정성(Stability) ····· 24
4.3 시험검체 분석(Study Sample Analysis) ····· 25
4.3.1 분석단위(Analytical Run) ····· 26
4.3.2 분석단위 판정기준 ····· 26
4.3.3 검량선 범위 ····· 27
4.3.4 시험시료 재분석 ····· 27
5. 검체검증분석(Incurred Sample Reanalysis, ISR) ····· 29
6. 부분 및 교차 밸리데이션 ····· 31
6.1 부분 밸리데이션 ····· 31
6.2 교차 밸리데이션 ····· 33
7. 추가 고려사항 ····· 33
7.1 내인성 물질인 분석물질 분석법 ····· 33
7.1.1 내인성 물질인 분석물질 분석법을 위한 품질관리시료 ····· 34

목 차

7.1.2 내인성물질인 분석물질 분석법을 위한 선택성, 회수율, 생체시료효과 ···· 35
7.1.3 내인성물질인 분석물질 분석법을 위한 평행성 ····· 36
7.1.4 내인성물질인 분석물질 분석법을 위한 정확성 및 정밀성 ····· 36
7.1.5 내인성물질인 분석물질 분석법을 위한 안정성 ····· 37
7.2 평행성 ····· 37
7.3 회수율 ····· 38
7.4 최소요구희석(Minimum Riquired Dilution, MRD) ····· 38
7.5 상업용 및 진단용 키트 ····· 38
7.6 신규 또는 대체기술 ····· 39
7.6.1 건조 생체시료 방법(Dried Matrix Methods, DMM) ····· 40
8. 문서화 ····· 40
8.1 요약정보 ····· 41
8.2 밸리데이션 및 생체시료 분석법 보고서 문서화 ····· 41
9. 용어 정의 ····· 49

생체시료 분석법 밸리데이션 및 시험검체 분석 가이드라인

1. 서론

1.1 목적

이 가이드라인은 화학의약품 및 생물의약품의 정량을 위한 생체시료 분석법 밸리데이션과 시험검체 분석에서의 적용을 위한 권고사항을 제공하는 것을 목적으로 한다. 이 가이드라인에 기술된 원칙 준수를 통해 화학의약품 및 생물의약품 둘 다 개발 및 시판 허가를 뒷받침하는 생체시료 분석 자료의 품질과 일관성을 보장할 것이다.

생체시료 분석법 밸리데이션의 목적은 생체시료 분석법이 의도한 목적에 적합하다는 것을 증명하고자 한다. 과학적 타당성이 증명될 경우 이 가이드라인의 권고사항 변경은 허용 가능하다. 허가 신청자는 대체 방식을 제안하거나 사용한 경우 유의미한 분석법 밸리데이션 변경 사항에 대해 규제당국과 협의할 것이 권고된다.

1.2 배경

생체시료 내에서 화학의약품 및 생물의약품, 그 대사체의 농도 측정은 의약품 개발에 중요하다. 이러한 방법들을 이용한 시험결과들은 의약품의 안전성과 유효성 관련 규제 결정을 하는데 기여한다. 그러므로 규제 결정을 뒷받침하기 위한 신뢰할 수 있는 자료 확보를 위해 사용하는 생체시료 분석법은 특성이 잘 규명되어야 하고 적절하게 밸리데이션 및 문서화하는 것이 중요하다.

이 가이드라인은 유효한 경우에는 동물시험을 위한 3R 원칙(감소, 개선, 대체)에 따른 의약품 개발을 촉진하고자 한다.

1.3 범위

이 가이드라인은 규제 결정을 뒷받침할 것으로 기대되는 생체시료 분석법 밸리데이션 및 시험검체 분석에 대해 기술한다. 이 가이드라인은 규제기관 제출자료에 있어 비임상시험관리기준(GLP) 원칙에 따라 수행된 비임상 독성동태(TK) 시험, 임상시험을 위한 대리표지자로서 수행된 비임상 약동학(PK) 연구, 및 비교 생체이용률/생동성(BA/BE)을 포함한 모든 임상시험 단계에서 얻은 생체시료(예, 혈액,

혈장, 혈청, 그 외 체액 또는 조직)에서 화학의약품 및 생물의약품의 농도, 그 대사체의 농도를 측정하기 위해 사용되는 생체시료 분석법에 적용할 수 있다. 규제기관 제출자료를 뒷받침하기 위해서는 주요 생체시료에 대해 전체 분석법 밸리데이션을 해야 한다. 추가 생체시료는 필요시 밸리데이션 되어야 한다.

규제기관 승인을 위해 제출되지 않은 연구나 안전성, 유효성 또는 허가사항(예, 탐색적 연구)과 관련된 규제 결정이 고려되지 않는 연구의 경우, 신청자는 자체 내부 의사결정을 뒷받침하기 위한 요건의 수준을 결정할 수 있다.

이 가이드라인의 정보는 일반적으로 질량 분석(MS) 검출기와 결합하여 사용되는 액체크로마토그래프(LC) 또는 기체크로마토그래프(GC)와 같은 크로마토그래프 분석법과 리간드 결합 분석(LBA)에 대한 정량 분석에 적용된다.

비임상시험관리기준(GLP) 또는 임상시험관리기준(GCP) 대상 시험의 경우 시험검체의 생체시료 분석도 각 기준의 요건을 준수해야 한다.

면역원성 평가에 사용되는 생체시료 분석법과 생체표지자(biomarker)의 시료분석은 이 가이드라인 범위에 포함되지 않는다.

2. 일반 원칙

2.1 분석법 개발

생체시료 분석법 개발 목적은 의도한 목적을 위한 분석법의 설계, 운영조건, 한계, 적절성을 정의하고 그 분석법이 밸리데이션을 위한 준비가 되었다는 것을 보장하는 것이다.

신청자는 가능하다면 생체시료 분석법 개발 전 또는 개발 중에 해당 분석물질(예, 의약품의 물리화학적 특성, in vitro/in vivo 대사, 적혈구 및 혈장 간 분포 경향성 및 단백결합)을 이해하고 모든 사전에 적용가능한 분석법 양상을 고려할 것을 권장한다.

분석법 개발에는 분석물질 정량과 관련된 절차 및 조건을 확인하는 것을 포함한다. 분석법 개발에는 다음의 생체시료 분석법 요소의 특성화를 포함할 수 있다: 표준품, 필수 시약, 검량선, 품질관리시료(QC), 선택성 및 특이성, 감도, 정확성, 정밀성, 회수율, 분석물질 안정성, 최소 요구 희석(MRD)

생체시료 분석법 개발에는 광범위한 기록 유지나 표기가 필요하지 않다. 한번 분석법이 개발되면, 생체시료 분석법 밸리데이션은 그 분석법이 시험검체 분석에 적합하다는 것을 입증한다.

분석을 필요로 하는 비임상 또는 임상시험검체 분석 중 분석법이 분석 중단이 필요한 문제에 직면했을 때, 모든 분석법의 변경 및 근거가 문서화되어야 한다.

2.2 분석법 밸리데이션

2.2.1 전체 밸리데이션

생체시료 분석법 밸리데이션은 분석능의 수용가능성과 분석 결과의 신뢰성을 가능하게 하는 데 필수적이다. 생체시료 분석법은 생체시료 내 분석물질의 농도를 측정하기 위해 사용된 일련의 절차들의 합으로 정의된다. 생체시료 분석법의 전체 밸리데이션은 임상 및 적용가능한 비임상시험에서 분석물질 정량을 위한 생체시료 분석법을 수립할 때 수행되어야 한다. 전체 밸리데이션은 또한 문헌에서 보고된 분석법 적용 및 상업용 키트(commercial kit)를 의약품 개발에서 생체시료분석을 위해 용도를 변경할 경우 실시해야 한다. 일반적으로 하나의 분석물질을 정해야 하지만, 경우에 따라 2개 이상의 분석물질을 측정하는 것이 적절할 수 있다. 이 경우에는 두 가지 다른 의약품, 그 대사체를 포함한 모체 약물 또는 약물의 광학이성질체 또는 이성체가 포함된다. 이 경우, 밸리데이션과 분석법의 원칙은 해당 모든 분석물질에 적용된다. 크로마토그래프 분석법의 경우, 달리 정당화되지 않았다면, 전체 밸리데이션에 선택성, 특이성, 생체시료효과, 검량선(반응함수), 범위(최저정량한계(LLOQ)부터 최고정량한계 (ULOQ)까지), 정확성, 정밀성, 캐리오버(carry-over), 희석의 타당성, 안정성, 재주입 재현성이 포함된다.

리간드 결합 분석(LBA)의 경우, 별도로 타당성이 제시되지 않는한, 특이성, 선택성, 검량선(반응함수), 범위(LLOQ부터 ULOQ까지), 정확성, 정밀성, 캐리오버(필요 시), 희석 선형성, 및 안정성이 포함된다. 필요하다면, 적절한 시험검체가 이용 가능할 때 평행성(parallelism)이 수행될 수 있다.

밸리데이션 중 수행되는 평가는 검체분석 작업흐름과 관련된다. 생체시료 분석법 밸리데이션에 사용되는 생체시료는 항응고제와 첨가하는 시료를 포함하여 시험검체 생체시료와 동일해야 한다. 경우에 따라서, 시험검체와 동일한 생체시료를 확보하기 어려울 수 있다.(예, 조직, 뇌척수액, 담즙과 같은 희귀 생체시료 또는 유리 약물을

측정하는 경우) 이 경우, 분석법 밸리데이션을 위해 대체 생체시료를 사용할 수 있다. 대체 생체시료의 선택은 과학적 타당성이 제시되어야 한다. 분석법을 밸리데이션 할 때 종(species) 내에서 생체시료의 차이(예, 연령, 민족성, 성별)는 일반적으로 다르다고 간주되지 않는다.

구체적으로 상세히 기술된 생체시료 분석법 및 밸리데이션 절차는 미리 확립되어야 한다. 이는 임상시험 계획서(protocol), 시험 계획, 결과보고서(report), 실험노트 또는 표준작업지침서(SOP) 형태로 기술될 수 있다.

2.2.2 부분 밸리데이션

전체 밸리데이션 분석법에 대한 변경은 부분 밸리데이션을 통해 평가할 수 있다. 부분 밸리데이션 범위는 한 번의 정확성 및 정밀성 확인부터 거의 전체 밸리데이션 수준까지 있을 수 있다(6.1항 참조). 부분 밸리데이션 대상은 분석법 변경 규모 및 특징에 따라 결정된다.

2.2.3 교차 밸리데이션

교차 밸리데이션은 여러 생체시료 분석법 및/또는 여러 생체시료 분석기관들이 포함될 때 보고된 자료가 어떻게 관련되는지 입증하는 데 필요하다. (6.2항 참조)

3. 크로마토그래프법

3.1 표준품

분석법 밸리데이션 및 시험검체 분석 시, 표준품 용액을 사용하여 대상 분석물질을 공생체시료에 스파이크하여 검량선용 표준시료, 품질관리시료를 조제한다. 검량선용 표준시료와 품질관리시료는 별도의 표준원액을 사용하여 조제한다. 그러나, 표준원액의 안정성이 검증되고 조제의 정확성이 제공되면 동일 표준원액으로부터 검량선용 표준시료와 품질관리시료를 조제할 수 있다.

시료 전처리 중 모든 검량선용 표준시료, 품질관리시료, 시험검체에 적절한 내부표준물질을 첨가해야 한다. 내부표준물질을 사용하지 않는 경우 타당성이 제시되어야 한다.

표준품의 품질이 분석 결과에 영향을 미치고 시험 자료까지 영향을 주기 때문에 표준품의 특성을 잘 분석하고 표준품 품질(예, 순도, 확인)과 내부표준물질의 적합성을 보증하는 것이 중요하다. 밸리데이션과 시험검체 분석에 사용하는 표준품은 인증받고 출처를 확인할 수 있는 공급원으로부터 구해야 한다. 표준품은 분석물질과 동일해야 한다. 이러한 사항이 불가능할 경우, 알려진 품질의 확립된 형태(예, 염 또는 수화물)을 사용해야 한다.

적절한 표준품은 공정서 수재 표준품, 상업적으로 판매되는 표준품 또는 충분히 특성분석된 내부 또는 외부기관에서 조제한 표준품을 포함한다. 표준품의 품질 보증을 보증하고 순도, 보관조건, 재시험/사용기간 자료, 표준품 배치번호 정보 제공을 위해 시험성적서 또는 이와 상응하는 자료가 요구된다.

해당 내부표준물질을 사용하는 적절성이 입증된다면 내부표준물질에 대한 시험성적서는 요구되지 않는다. 적절성에 대한 예시는 분석물질 자체 또는 그 외 불순물과의 간섭이 없다는 자료가 해당될 수 있다.

질량분석 검출기(MS)를 사용하는 경우, 내부표준물질은 가능하다면 안정한 동위원소로 표지된 분석물질을 사용하는 것이 권고된다. 그러나, 표지된 내부표준물질이 동위원소 순도가 높고 동위원소 교환반응이 일어나지 않는 것이 필수이다. 표지되지 않은 분석물질이 있는지 확인해야 하고 표지되지 않은 분석물질이 검출된 경우 분석법 밸리데이션 중 잠재적 영향을 평가해야 한다.

표준원액과 표준용액은 시험성적서에 기술된 안정성 기간(사용기간 또는 재시험 날짜) 내에 있는 표준품으로만 조제할 수 있다.

3.2 밸리데이션

3.2.1 선택성(Selectivity)

선택성은 공생체시료에 잠재적으로 존재하는 간섭물질 사이에서 분석물질을 구별하고 측정해낼 수 있는 분석 능력을 의미한다.

선택성은 (용혈되지 않고 및 지질혈증이 아닌) 최소 6개의 서로 다른 기원/로트에서 얻은 공시료(분석물질 또는 내부표준물질을 첨가하지 않고 전처리한 생체시료)를 사용하여 평가한다. 희귀 생체시료의 경우 더 적은 수의 기원을 사용하는 것이 허용될 수도 있다. 내부표준물질의 선택성 또한 평가해야 한다.

선택성 평가는 공시료에서 분석물질 또는 내부표준물질의 머무름시간에서 유의미한 반응에 기여할 수 있는 간섭성분이 없다는 것을 입증해야 한다. 반응에 기여할 수 있는 간섭성분은 각각의 생체시료의 최저정량한계(LLOQ)에서 분석물질 반응의 20% 이하 및 내부표준물질 반응의 5% 이하이어야 한다.

지질혈증 생체시료에 대한 선택성 평가는 최소 한 개 기원의 생체시료를 사용해야 한다. 과학적으로 의미가 있으려면, 이러한 시험에서 사용된 생체시료는 가능한 한 예상하는 시험검체를 대표해야 한다. 중성지방 수치가 비정상적으로 높은 자연적인 지질혈증 생체시료는 기증자를 통해 얻어야 한다. 기증자의 고지질 생체시료를 사용하는 것을 권고하지만 이를 확보하기가 어려울 경우, 시험검체를 대표할 수 없을 수 있지만 생체시료에 중성지방을 스파이크할 수 있다. 그러나 약물이 지질 대사에 영향을 주거나 대상 환자군이 고지질혈증인 경우, 스파이크된 시료 사용을 권장하지 않는다. 이러한 평가는 약물이 지질 대사에 영향을 주거나 고지질혈증이 있는 특정 동물 계통에 투여된 경우를 제외하고는 비임상시험에는 필요하지 않다.

용혈 생체시료의 선택성 조사를 위해 최소 한 개 기원의 시료를 사용해야 한다. 용혈 생체시료는 시각적으로 검출가능한 용혈 시료를 만들기 위해 용혈된 전혈(최소 2% V/V)을 생체시료에 스파이크하여 얻어야 한다.

3.2.2 특이성(Specificity)

특이성은 관련물질(예, 분석물질과 구조적으로 유사한 성분, 대사체, 이성체, 불순물, 시료 전처리 과정에서 생성된 분해산물 또는 대상 적응증의 환자를 치료하는데 사용될 것으로 기대되는 병용약물)을 포함한, 다른 성분으로부터 분석물질을 검출하고 구별하는 생체시료 분석 능력을 의미한다.

해당 생체시료에 관련물질이 존재할 것으로 예상되는 경우, 이러한 성분의 영향을 밸리데이션 동안이나 그렇지 않으면 약물투여전(predose) 시험검체에서 평가해야 한다. 액체크로마토그래프(LC)-질량분석기(MS) 기반 분석법의 경우, 이러한 성분의 영향을 평가하기 위해 잠재적인 간섭 관련물질의 분자량을 분석물질과 비교하고 분석물질에서 관련물질을 크로마토그래프로 분리하는 것을 포함할 수 있다.

검출 및 간섭성분에 기여할 수 있는 반응은 최저정량한계(LLOQ) 시료에서 분석물질 반응의 20% 이하 및 내부표준물질 반응의 5% 이하이어야 한다.

필요 시, 연속적인 분석단계(추출단계 또는 질량분석(MS) 검출기 내 포함) 중

대사체가 모체 분석물질로 역변환할 가능성 또한 평가해야 한다. (예, 에스터(ester) 분석물질에서 에스터/산성 대사체와 같이 잠재적으로 불안정한 대사체, 불안정한 N-oxide 또는 glucuronide 대사체, 락톤 고리구조). 대사에 대해 아직 평가되지 않은 화학의약품 신약 개발 초기 단계에서 이러한 평가가 가능하지 않을 것이 인정된다. 그러나, 이러한 문제는 평가되어야 하고, 필요하다면 부분 밸리데이션을 수행하는 것이 예상된다. 만약의 경우 역변환 정도가 확립되어야 하며, 생체시료 분석법 결과보고서에서 시험결과에 미치는 영향에 대해 논의되어야 한다.

3.2.3 생체시료효과(Matrix Effect)

생체시료효과는 생체시료 중에 미확인성분의 간섭으로 인해 종종 발생하는 분석물질 반응의 변화로 정의된다. 분석법 밸리데이션 중 다른 개별 기원/로트 간의 생체시료효과를 평가해야 한다.

생체시료효과는 최소 6개의 다른 기원/로트에서 얻은 생체시료를 사용해 각각 조제한 최소 3번 반복한 저농도 품질관리시료와 고농도 품질관리시료를 분석하여 평가해야 한다. 각각의 개별 생체시료 기원/로트의 평가를 위해, 정확성은 이론농도(nominal concentration)의 ±15% 이내 범위여야 하고 정밀성(변동계수 비율(%CV))은 15% 이내이어야 한다. 희귀 생체시료의 경우 더 적은 수의 기원/로트를 사용하는 것이 허용될 수 있다.

생체시료효과는 가능할 경우 관련 환자군 또는 특정 군(예, 간기능 장애 또는 신기능 장애)을 대상으로도 평가되어야 한다. 생체시료효과의 추가 평가는 분석법 밸리데이션 중 상황에 따라 특히 시험에서 해당 조건이 발생할 것으로 예상되는 경우 용혈 또는 지질혈증 생체시료를 사용할 것이 권고된다.

3.2.4 검량선 및 범위(Calibration Curve and Range)

검량선은 분석물질 이론농도와 분석물질의 분석 플랫폼 반응 간의 상관관계를 보여준다. 생체시료에 알려진 양의 분석물질을 스파이크하여 조제한 검량선용 표준시료는 검량선 범위를 포괄하여 검량선을 구성한다. 검량선용 표준시료는 시험검체와 동일한 생체시료로 조제해야 한다. 검량선 범위는 가장 낮은 검량선용 표준시료인 최저정량한계(LLOQ)와 가장 높은 검량선용 표준시료인 최고정량한계(ULOQ)로 정의된다. 시험법 밸리데이션 중 시험한 개별 분석물질과 각각의 분석단위 별로 한 개의 검량선이 있어야 한다.

검량선은 공시료(blank sample), 영시료(zero sample)(내부표준물질을 스파이크한 공시료), 최저정량한계(LLOQ) 및 최고정량한계(ULOQ) 등 최소 6개의 농도값의 검량선용 표준시료로 생성해야 한다.

농도-반응 관계를 적절히 기술하는 단순회귀모델을 사용해야 한다. 회귀모델 선정은 기록된 절차에 따라 진행되어야 한다. 회귀 모델, 가중치 부여방법, 수치의 변환은 분석법 밸리데이션 과정 중에 결정해야 한다. 공시료 및 영시료는 검량선의 회귀방정식 도출할 때 포함되지 않는다. 각각의 검량선은 반복분석될 수 있으며, 이 경우 허용가능한 모든 반복분석으로부터의 사례 자료들을 회귀분석에 사용해야 한다.

검량선에 대한 매개변수들이 보고서에 기술되어야 한다(예, 선형 모델의 경우 기울기와 절편). 검량선용 표준시료의 역산 농도는 산출된 정확성 및 정밀성의 평균값과 함께 제시해야 한다. 여러 날에 얻은 최소 3개의 독립적 분석단위를 기반으로 밸리데이션 중 얻은 모든 허용 가능 곡선이 보고되어야 한다. 각각의 검량선용 표준시료의 역산 농도 정확성은 최저정량한계(LLOQ)에서 이론농도의 ±20% 이내 그 외 모든 농도에서는 ±15% 이내이어야 한다. 최소 6개의 검량선용 표준시료에서 검량선용 표준시료의 최소 75%가 상기 기준을 만족해야 한다.

반복분석을 하는 경우 기준은 (±15% 이내 또는 최저정량한계(LLOQ)인 경우 ±20% 이내) 시험 농도 당 시험한 검량선용 표준시료의 최소 50%도 충족해야 한다. 검량선용 표준시료가 이 기준을 충족하지 않는 경우 검량선용 표준시료를 부적합 판정해야 하고, 해당 검량선용 표준시료를 제외하고 검량선을 재평가(회귀분석 포함)해야 한다. 정확성 및 정밀성 분석단위의 경우 분석단위 내에서 최저정량한계(LLOQ) 또는 최고정량한계(ULOQ) 검량선용 표준시료의 모든 반복분석이 부적합으로 판정되어 분석단위가 부적합으로 판정된 경우에는, 필요하다면 가능한 부적합 원인을 확인하고 분석법을 수정해야 한다. 다음 밸리데이션 분석단위도 부적합으로 판정될 경우 밸리데이션을 재시작하기 전에 분석법을 수정해야 한다.

검량선은 최소 한 개의 평가에서 새로 스파이크한 검량선용 표준시료를 사용하여 조제해야 한다. 이후 냉동 검량선용 표준시료를 정해진 안정성 기간 내에 사용할 수 있다.

3.2.5 정확성 및 정밀성(Accuracy and Precision)

3.2.5.1 품질관리시료 조제

품질관리시료는 시험검체 시료를 모방하기 위해 생체시료에 알려진 양의 분석물질을 스파이크하여 조제해야 하고, 시험검체의 예상되는 조건하에서 보관하고 분석법 밸리데이션을 평가하기 위해 분석해야 한다.

검량선용 표준시료와 품질관리시료는 분석법의 분석 성능과 관련이 없는 편향된 예측을 방지하기 위해 별도의 표준원액으로 조제해야 한다. 검량선용 표준시료 및 품질관리시료가 동일 표준원액에서 조제하는 경우, 표준원액의 정확성과 안정성을 검증해야 한다. 단일 기원의 공생체시료를 사용할 수 있으며, 3.2.3항에서 기술된 것과 같이 간섭물질 또는 생체시료효과가 없어야 한다.

분석법 밸리데이션 중 정확성 및 정밀성 분석단위에서 품질관리시료는 검량선 범위 내의 최소 4개 농도에서 조제되어야 한다: 최저정량한계(LLOQ), 최저정량한계(LLOQ)의 3배 농도 이내(저농도 품질관리시료), 검량선 범위의 약 30~50% 농도(중간농도 품질관리시료), 최고정량한계(ULOQ)의 최소 75% 농도(고농도 품질관리시료).

정확성 및 정밀성 평가 목적이 아닌 밸리데이션 분석단위에서, 저・중・고농도의 품질관리시료를 중복으로 분석할 수 있다. 이러한 품질관리시료는 검량선용 표준시료와 마찬가지로 분석단위의 적합 및 부적합을 위한 기초를 제공할 것이다.

3.2.5.2 정확성 및 정밀성 평가

정확성과 정밀성은 개별 분석단위(시험 내, within-run)와 다른 분석단위(시험 간, between-run) 간의 품질관리시료 분석을 통해 결정해야 한다. 정확성 및 정밀성은 동일한 분석단위 및 데이터를 사용해 평가해야 한다.

시험 내 정확성 및 정밀성은 개별 분석법 분석단위에서 품질관리시료 농도 별로 최소 5번 반복 분석을 통해 평가한다. 시험 간 정확성과 정밀성은 최소 2일 동안 최소 3개의 분석단위에서 개별 품질관리시료 농도값 별로 분석하여 평가한다. 하나의 분석단위 내에서 시간에 따른 어떠한 경향성을 평가하기 위해서, 예상되는 시험검체의 분석단위와 동등한 수의 품질관리시료의 정확성과 정밀성을 분석단위 중 적어도 한 개에서 입증하는 것을 권고한다. 분석법 밸리데이션 자료과 정확성 및 정밀성 판정결과는 오류가 명백하고 문서화된 사례를 제외하고 허용범위를 벗어난 개별 품질관리시료를 포함하여 얻은 모든 결과를 보고서에 기술해야 한다. 시험 내 정확성 및 정밀성 자료는 각각의 분석단위별로 보고되어야 한다. 모든 분석단위에서 시험 내 정확성 또는 정밀성 기준을 만족하지 않는 경우, 각각의 품질관리 농도에서의 시험 내 정확성 및 정밀성의 전체 예측치를 산출해야 한다. 시험 간(중간) 정밀성 및 정확성은

모든 분석단위로부터 자료를 합쳐서 산출해야 한다.

이러한 평가의 검량선은 최소 한 개 이상의 분석단위에서 새로 스파이크한 검량선용 표준시료를 사용하여 조제해야 한다. 새로 스파이크한 검량선용 표준시료를 그 외 다른 분석단위에서 사용하지 않은 경우 검량선용 표준시료의 냉동 안정성을 입증해야 한다.

개별 농도 수준의 정확성은 이론농도의 ±15% 이내이어야 하며, 최저정량한계(LLOQ)의 경우에는 예외적으로 ±20% 이내이어야 한다. 개별 농도에서 확인된 농도의 정밀도(%CV)는 15%를 초과하지 않아야 하며, 최저정량한계(LLOQ)의 경우에는 20%를 초과하지 않아야 한다. 정확성 및 정밀성이 아닌 밸리데이션 분석단위에서는 전체 품질관리시료의 적어도 2/3 및 각각의 농도값의 적어도 50%에서 이론값의 ±15% 이내이여야 한다.

3.2.6 캐리오버(Carry-over)

캐리오버는 분석기기 내 남아 있는 이전 시료의 잔류 분석물질로 인해 측정 농도가 변경되는 것이다.

분석법 개발 중 캐리오버를 평가하고 최소화해야 한다. 밸리데이션 중 최고정량한계(ULOQ) 검량선용 표준시료 분석 후 공시료를 분석하여 캐리오버를 평가해야 한다. 가장 높은 농도의 검량선용 표준시료 이후 공시료의 캐리오버는 최저정량한계(LLOQ)에서 분석물질 반응의 20%를 초과하지 않고 내부표준물질 반응의 5%를 초과하지 않아야 한다. 캐리오버가 불가피한 것으로 보이는 경우, 시험검체를 무작위로 분석해서는 안 된다. 특별한 조치를 고려해야 하고, 이를 시험검체 분석 중 캐리오버가 정확성과 정밀성에 영향을 미치지 않도록 밸리데이션되고 적용해야 한다. 여기에는 다음 시험검체 전 예측되는 고농도 시료 분석 후 공시료를 주입하는 것을 포함할 수 있다.

3.2.7 희석의 타당성(Dilution Integrity)

희석의 타당성은 요구되는 경우 수행하며, 시료 희석 절차가 분석물질 농도의 정확성과 정밀성에 영향을 미치지 않음을 평가한다. 품질관리시료 조제에 사용된 동일한 종(species)의 동일 생체시료를 희석할 때 사용해야 한다.

최고정량한계(ULOQ)를 초과하는 생체시료의 분석물질 농도로 희석 품질관리시료를 조제하고 공생체시료로 희석해야 한다. 농도가 검량선 범위 내에서 정확하고 정밀하게 측정된 것을 확인하기 위해서 하나의 분석단위 내에서 희석배율 당 최소 5번 반복하여

시험해야 한다. 시험검체 분석 중 적용된 희석배율 및 농도는 밸리데이션 중 평가된 희석배율 및 농도 범위 내여야 한다. 희석 품질관리시료의 평균 정확성은 이론농도의 ±15% 이내이어야 하고 정밀성(%CV)는 15%를 초과하지 않아야 한다.

희귀 생체시료의 경우 희석을 위해 대체 생체시료를 사용하는 것을 허용할 수 있다. 이러한 경우 정밀성 및 정확성에 영향을 주지 않음을 입증해야 한다.

3.2.8 안정성(Stability)

안정성 평가는 시료 조제, 전처리, 분석 과정에서 모든 단계 및 적용된 보관조건이 분석물질 농도에 영향을 미치지 않는다는 것을 확인하기 위해 수행되어야 한다.

시료 보관시간 및 온도, 검체의 생체시료, 항응고제, 보관용기 재질과 같은 안정성 시험에 적용하는 보관 및 분석 조건은 시험검체를 위해 사용된 조건들을 반영해야 한다. 문헌 참고자료는 충분하지 않은 것으로 고려된다. 보관기간 밸리데이션은 시험검체 보관기간과 동일하거나 더 긴 시간 동안 보관된 품질관리시료로 수행해야 한다.

생체시료 내 분석물질 안정성은 저농도 및 고농도의 품질관리시료를 사용하여 평가한다. 저농도 및 고농도 품질관리시료의 분취량(aliquots)를 0시간 및 평가할 보관 조건 적용 후에 분석한다. 각 농도값에 대한 한 개의 대용량(bulk) 품질관리시료를 조제해야 한다. 각 농도 별로 대용량 시료를 3개로 분주하여 보관, 가혹화 및 분석한다.

품질관리시료는 분석단위 내에서 새로 스파이크하여 조제한 검량선 표준시료로부터 얻은 검량선으로 그에 상응하는 새로 스파이크하여 조제한 품질관리시료 또는 안정성이 입증된 품질관리시료로 분석한다. 각 품질관리시료의 평균 농도는 이론농도의 ±15% 이내이어야 한다. 시험검체의 농도가 일관되게 검량선 범위의 최고정량한계(ULOQ) 보다 높은 경우 고농도 품질관리시료는 이러한 더 높은 농도를 반영하기 위해 변경되어야 한다. 이러한 적용은 비임상 시험에서는 용해도 한계로 인하여 가능하지 않을 수도 있다고 간주된다.

고정용량의 복합제 및 특별한 용법이 허가사항에 기재된 의약품의 경우, 생체시료 내 분석물질의 냉해동, 단기(bench-top) 및 장기안정성은 투여된 모든 성분을 스파이크한 생체시료로 수행해야 한다.

다음의 안정성 시험 항목을 평가해야 한다.

1) 생체시료 내 분석물질의 안정성

냉·해동 생체시료 안정성

냉동보관된 생체시료를 반복적으로 꺼내는 것에 대한 영향을 평가하기 위해 분석물질에 대한 여러 주기의 냉・해동 안정성을 평가해야 한다. 저농도 및 고농도 품질관리시료는 시험검체와 동일한 절차에 따라 해동 및 분석해야 한다. 품질관리시료는 해동 주기 사이에 최소 12시간 동안 냉동 보관해야 한다. 냉·해동 안정성을 위한 품질관리시료는 새로 조제된 검량선용 표준시료 및 품질관리시료 또는 안정성이 입증된 품질관리시료를 사용해 평가되어야 한다. 밸리데이션한 냉·해동 주기 횟수는 시험검체에서 수행된 냉·해동 주기와 동일하거나 이를 초과해야 하며, 다만 최소 3회 주기에 대해 수행해야 한다.

Bench top(단기) 생체시료 안정성

단기 생체시료 안정성 시험은 시험검체에 대한 실험실 취급 조건을 포괄하도록 설계하고 수행해야 한다.

저농도 및 고농도 품질관리시료는 시험검체와 동일한 방법으로 해동하고 동일 온도 및 시험검체와 최소한 동일 시간 동안 단기간 방치해야 한다.

단기 안정성의 총 시간은 동시에 이루어져야 한다; 단기안정성 조건에서 추가적인 노출은 허용되지 않는다. (즉, 각 냉・해동 평가 시간은 추가할 수 없다.)

장기 생체시료 안정성

냉동고에 보관된 생체시료 내 분석물질의 장기안정성이 확립되어야 한다. 저농도 및 고농도 품질관리시료는 동일 보관조건 및 시험검체과 최소한 동일 기간 동안 냉동고에 보관해야 한다.

화학의약품의 경우, 한 개 온도에서의 안정성(예, -20°C)은 더 낮은 온도로 외삽이 가능할 수 있다.(예, -70/80°C)

생물의약품의 경우, 예를 들면 -70/80°C 및 -20°C에서 안정성이 입증된 경우에는 브래케팅 접근법 적용이 가능하며, 시험검체가 보관될 2개의 온도 사이의 온도에서의 안정성을 실시할 필요는 없다.

2) 전처리한 시료의 안정성

분석 완료 기간(자동검체주입기/분석기기)을 포함한 전처리 시료의 안정성이 확인되어야 한다. 예를 들면,:

- 시험검체 분석 중 사용된 보관조건에서 전처리시료의 안정성(건조 추출 또는 주입단계)
- 주입기 또는 자동검체주입기 온도에서의 분석기기/자동검체주입기의 전처리시료 안정성

전처리 시료의 총 시간은 동시에 이루어져야 한다. (즉 자동검체주입기와 다른 보관시간은 서로 함께 합할 수 없다.)

3) 표준원액 및 표준용액 내 분석물질 및 내부표준물질의 안정성

분석물질과 내부표준물질의 표준원액 및 표준용액 안정성은 이러한 용액의 최저 및 최고농도를 사용하여 시험검체 분석 중 사용되는 보관조건에서 확인해야 한다. 이는 검출기 반응을 통해 평가한다. 표준원액과 표준용액의 안정성은 직선성과 검출기의 측정 범위를 고려해 적절히 희석하여 시험해야 한다. 농도에 따라 안정성이 다른 경우, 표준원액과 표준용액의 모든 농도에 대하여 평가할 필요가 있다. 분석물질에 대한 안정성이 입증된 경우, 분석물질과 동일한 보관조건에서 동위원소로 표지된 내부표준물질에서 동위원소 교환이 일어나지 않을 경우 내부표준물질을 위해 추가적인 안정성 입증은 필요하지 않다. 표준품 사용기간이 만료되거나 재시험 날짜가 경과한 경우, 이 표준품 로트로 이전에 제조한 표준원액의 안정성은 표준원액의 사용기간 또는 재시험 날짜에 따라 정해진다. 표준품 사용기간 연장만을 목적으로 표준품의 표준원액 및 표준용액을 제조하는 관행은 허용되지 않는다.

추가적으로, 해당하는 경우 다음의 시험을 수행해야 한다.

4) 전혈에서의 분석물질 안정성

분석법을 통해 얻은 농도가 검체 채취 시점에서 시험대상자의 혈액 내 농도를 반영하도록 하기 위해서 시험대상자로부터 직접 생체시료(혈액) 채취 후 및 보관 전 검체에서 분석물질의 안정성에 충분한 주의를 기울어야 한다.

사용하는 생체시료가 혈장인 경우 혈액 내 분석물질의 안정성은 분석법 개발 중 (예, 혈액 내 탐색적 방법 사용) 또는 분석법 밸리데이션 중 평가되어야 한다. 밸리데이션 보고서에 그 결과를 기술해야 한다.

3.2.9 재주입 재현성(Reinjection Reproducibility)

분석법 재현성은 품질관리시료를 반복측정하여 평가하고 일반적으로 정밀성 및 정확성 평가 내에 포함한다. 그러나, 시료를 재주입할 수 있는 경우 (예, 시험기기 중단

또는 시험기기 오류와 같은 다른 원인), 전처리 시료를 살릴 수 있는지 여부를 확립하고 재주입 전 보관을 뒷받침하기 위해 재주입 재현성을 평가해야 한다.

재주입 재현성은 검량선용 표준시료 및 보관 후 저・중・고농도 품질관리시료를 5회 반복한 것으로 구성된 분석단위를 재주입하여 평가한다. 재주입한 품질관리시료의 정밀성 및 정확성으로 전처리 시료를 살릴 수 있는지 여부를 평가한다.

밸리데이션 보고서 또는 수행된 시험의 생체시료 분석법 결과보고서에 그 결과를 포함해야 한다.

3.3 시험검체 분석(Study Sample Analysis)

시험검체 분석은 밸리데이션 완료 후 수행할 수 있지만, 몇 가지 항목은 이후 단계에서 완료될 수 있다고 간주된다(예, 장기 안정성). 규제당국에 자료를 제출하는 시점에는, 생체시료 분석법 밸리데이션을 완료해야 한다. 시험검체, 품질관리시료 및 검량선용 표준시료는 밸리데이션된 분석법에 따라 전처리해야 한다. 시스템적합성의 평가는 미리 정의된 세부 시험계획, 시험계획서 또는 SOP를 사용해야 한다. 시험장치 조건 및 시험기기 성능을 포함한 시스템적합성은 분석단위를 위한 검량선용 표준시료 및 품질관리시료와 독립적인 검체를 사용하여 결정해야 한다. 시험검체의 시료는 시스템적합성을 위해 사용하지 않아야 한다. 시험검체의 내부표준물질의 반응은 전반적인 내부표준물질 변동성 여부 확인을 위해 모니터링해야 한다. 문서화와 관련된 요구사항은 표 1을 참조한다.

3.3.1 분석단위(Analytical Run)

분석단위는 공시료(분석물질 및 내부표준물질 없이 전처리된 생체시료), 영시료(내부표준물질이 있는 전처리한 생체시료), 최소 6개 농도의 검량선용 표준시료, 최소 3개 농도의 품질관리시료(저, 중, 고) 한 쌍 (또는 시험검체의 최소 5%, 어느 쪽이든 더 높은 쪽) 및 분석할 시험검체로 구성된다. 전체 분석단위의 정확성과 정밀성을 보증할 수 있도록 품질관리시료를 분석단위 내에 분산시켜야 한다. 시험검체는 항상 품질관리시료 사이에 배치되어야 한다.

검량선용 표준시료 및 품질관리시료는 표준원액의 정확성 및 안정성이 검증되지 않은 한 각각 별도로 조제한 표준원액을 스파이크하여 조제해야 한다. 모든 시료(검량선용 표준시료, 품질관리시료, 시험검체)는 분석하고자 하는 순서대로 한 개 단일 배치에서 전처리하고 추출해야 한다. 단일 분석단위에서 몇몇의 분리된 배치로 전처리된 시료를 분석하는 것은 권장되지 않는다. 예를 들면 단기 안정성 한계 때문에 이러한 접근을 피할 수 없다면, 각 시료 배치는 저・중・고농도의 품질관리시료를

포함해야 한다.

비교 생체이용률/생동성 시험의 경우, 변동성을 줄이기 위해 한 개의 분석단위 내에서 시험대상자 한 명의 모든 시료를 분석하는 것이 권고된다.

시험검체 분석 중 발생하는 모든 캐리오버 영향을 평가하고 보고해야 한다.(3.2.6 항 참조) 캐리오버가 감지된 경우, 측정농도에 미치는 영향을 최소화시키거나(예, 시험검체의 비(非)-무작위배정, 예측되는 고농도 시료 후 공시료 주입) 생체시료 분석법 보고서 내에 기재된 농도의 타당성이 제시되어야 한다.

3.3.2 분석단위의 허용기준

분석단위의 적합 또는 부적합 기준은 시험계획서, 시험계획 또는 SOP 내에서 정의해야 한다. 한 개의 분석단위가 여러 배치를 포함하는 경우에 허용기준은 전체 분석단위 및 개별 배치에 적용해야 한다. 한 개의 분석단위 내 한 개의 배치가 배치 허용기준을 만족하지 못해 부적합 판정되더라도 분석단위가 허용기준을 만족할 수 있다. 분석단위 내 다른 배치의 허용을 뒷받침하기 위해 부적합처리된 배치 내 검량선용 표준시료를 사용할 수 없다.

검량선용 표준시료의 역산된 농도는 이론값의 ±15% 이내이어야 하고, 최저정량한계(LLOQ)는 ±20% 이내이어야 한다. 최소 6개의 농도를 포함한, 적어도 75%의 검량선용 표준시료 농도에서 이러한 기준을 충족해야 한다. 6개 농도를 초과하는 검량선용 표준시료를 사용하고 이 중 한 개가 기준을 만족하지 못한 경우, 이러한 검량선용 표준시료는 부적합 처리해야 하며 해당 시료를 제외한 검량선을 재평가하고 새로이 회귀분석을 수행해야 한다.

부적합된 검량선용 표준시료가 최저정량한계(LLOQ)인 경우, 이 분석단위의 새로운 정량한계는 검량선의 그다음 최저 허용가능 검량선용 표준시료가 된다. 이러한 새로운 검량선용 정량한계의 허용기준은 본래값(즉, ±15%)으로 유지된다. 최고 검량선용 표준시료가 부적합 판정된 경우, 이 분석단위를 위한 최고정량한계(ULOQ)는 검량선의 그다음 최고 허용가능 검량선용 표준시료가 된다. 수정된 검량선 범위는 최소 3개의 품질관리시료 농도(저, 중, 고)를 포함해야 한다. 수정된 범위를 벗어나는 시험검체는 재분석해야 한다. 만일, 반복 검량선용 표준시료를 사용하고 최저정량한계(LLOQ) 또는 최고정량한계(ULOQ) 표준시료 중 오직 한 개만 부적합 판정된 경우, 검량선 범위는 변경되지 않는다.

총 품질관리시료 중 최소한 2/3 및 각 농도값의 최소 50%는 이론값의 ±15%이내이어야 한다. 이 기준을 충족하지 못할 경우 분석단위는 부적합 처리해야

한다. 후속 분석을 위해 실패한 분석단위 내 모든 시험검체에 대한 새로운 분석단위를 전처리해야 한다. 허용 가능한 기술적 원인으로 인해 부적합처리된 경우에는 시료를 재주입할 수 있다.

재분석 시 희석시료를 포함한 분석단위는 시험검체 분석 중 희석법의 정확성 및 정밀성을 검증하기 위한 희석 품질관리시료를 포함시켜야 한다. 희석 품질관리시료 농도는 희석된 시험검체(또는 최고정량한계(ULOQ))의 농도를 초과해야 하고 동일 희석배율로 희석되어야 한다. 한 개의 분석단위 내에서 여러 희석배율을 사용한 경우, 희석 품질관리시료는 최고 및 최저 희석배율만으로도 희석할 수 있다. 희석 품질관리시료의 시험 내(within-run) 허용기준은 희석 시험검체의 적합성에만 영향을 미치고 해당 분석단위의 적부 판정에는 영향을 미치지 않는다.

여러 분석물질을 동시 분석할 때, 각 분석물질 별로 검량선이 있어야 한다. 한 개의 분석단위에서 한 개의 분석물질은 적합하나 다른 분석물질에서 부적합으로 판정된 경우, 적합판정된 분석물질 자료만을 사용해야 한다. 부적합 판정된 분석물질의 재추출 및 재분석의 결정은 해당 분석물질에 대해서만 수행되어야 합니다. 재분석된 해당 분석물질의 자료만 보고하면 됩니다.

기준통과 및 적합판정된 분석단위의 검량선용 표준시료 및 품질관리시료의 역산된 농도를 보고되어야 한다. 적합판정된 분석단위의 모든 품질관리시료의 전체 (시험 간, between-run) 정확성 및 정밀성은 각각의 농도 수준에서 산출하고 분석보고서 내에서 보고해야 한다.(8. 문서화 항 및 표 1 참조) 전체 평균 정확성 및/또는 정밀성이 15% 기준을 충족하지 못할 경우, 일탈 원인을 확인하기 위한 조사를 수행해야 한다. 비교 생체이용률/생동성 시험의 경우, 해당 시험결과가 부적합 처리될 수 있다.

3.3.3 검량선 범위

시험검체 분석 시작 전 시험검체의 분석물질 농도 범위가 좁은 것으로 알려져 있거나 예측되는 경우, 시험검체 농도를 적절히 반영하기 위해 검량선 범위를 좁히거나 품질관리시료 농도를 조절하거나, 적절한 다른 농도값의 새로운 품질관리시료를 추가하는 것이 권고된다.

목표 치료용량에서, 시료분석 시작 후 검량선의 말단 부분에서 시험검체의 예측하지 못한 쏠림 현상이 있는 경우 분석을 중단하고 시험검체 분석을 계속 진행하기 전에 표준 검량선 범위를 좁히고(즉, 부분 밸리데이션), 기존 품질관리시료 농도를 수정하거나 관찰된 범위 내 최초 검량선 내에 추가적인 농도의 품질관리시료를 추가해야 한다. 검량선 범위 또는 품질관리시료 농도를 최적화하기 전에 이미 분석한

시험검체를 재분석할 필요는 없다.

상당수의 시험검체의 분석물질 농도가 최고정량한계(ULOQ)를 초과하는 경우에도 동일하게 적용된다. 검량선 범위를 변경해야 하고, 가능하다면 품질관리시료를 추가하거나 품질관리시료 농도를 조정해야 한다. 검량선 범위를 변경할 수 없거나 최고정량한계(ULOQ)를 초과하는 농도의 수가 많지 않은 경우, 밸리데이션된 희석 방법에 따라 시료를 희석해야 한다.

최소 2개 농도의 품질관리시료가 시험검체에서 측정된 농도 범위 내에 포함되어야 한다. 검량선 범위가 변경된 경우, 검량선의 반응함수를 검증하고 정확성 및 정밀성을 보장하기 위해 생체시료 분석법을 재밸리데이션해야 한다. (부분 밸리데이션)

3.3.4 시험검체 재분석

시험검체의 가능한 재분석 사유, 반복횟수, 기재할 값을 선택하기 위한 판단기준은 시험검체의 실제 분석 시작 전에 시험계획서, 시험계획 또는 SOP에서 사전에 정의되어야 한다. 시험검체에서 여러 분석물질을 분석할 때, 하나의 분석물질이 허용기준을 만족하지 못한다면, 나머지 분석물질의 유효한 결과는 부적합 처리되지 않아야 한다.

재분석한 검체 수(및 총 검체 수 대비 백분율)은 생체시료 분석법 보고서 내에서 보고되고 고찰되어야 한다. 비교 생체이용률/생동성시험에서, 부적합처리된 분석단위의 수치를 별도 표로 보고해야 한다.

시험검체 재분석 사유에 대한 몇 가지 예시는 다음과 같다:

- 분석단위가 검량선용 표준시료의 정확성 및/또는 품질관리시료의 정밀성 및 정확성 관련 허용기준을 충족하지 못한 사유로 인한 분석 단위의 부적합 판정
- 내부표준물질 반응이 (SOP에 사전 정의된) 검량선용 표준시료 및 품질관리시료 반응과 유의미한 차이 발생
- 측정 농도가 최고정량한계(ULOQ)를 초과
- 검량선에서 최저 검량선용 표준시료가 부적합 처리된 후 다른 분석단위보다 최저정량한계(LLOQ)가 높은 분석단위에서 얻은 시험검체 농도가 수정된 최저정량한계(LLOQ)보다 미만인 경우
- 부적절한 시료 주입 또는 장비 오작동

- 희석된 시험검체가 최저정량한계(LLOQ) 미만인 경우
- 투약 전 시험검체, 대조군 또는 위약군의 시험검체에 대한 정량가능한 분석물질 농도 확인
- (SOP에 사전 정의된) 크로마토그래프 불량

비교 생체이용률/생동성시험의 경우 약동학적 원인(예, 시료 농도가 예상된 약동학적 프로파일에 맞지 않음)에 대한 시험검체의 재분석은 시험 결과에 대한 편향을 가져올 수 있기 때문에 허용되지 않는다.

모든 재분석 시료는 생체시료 분석법 보고서에 확인되어야 하며 초기값, 재분석 사유, 재분석값, 최종 선택값, 선택에 대한 타당성이 기술되어야 한다. 또한, 각각의 사유에 따라 재분석한 시료 전체 수에 대한 요약표가 제공되어야 한다. 최초 분석에서 보고를 할 수 없는 결과가 나온 경우 단회 재분석은 충분한 것으로 본다(예, 최고정량한계(ULOQ)를 초과하는 농도 또는 장비 오류). 값을 확정할 필요가 있는 경우(예, 투약 전 시료에서 측정 가능한 농도 검출)에는 시료량이 허용된다면 반복확인이 필요하다.

시험의 다른 어떤 것 보다 시험대상자 안전이 가장 중요하다. 그렇기 때문에 안전성 조사를 위해 특정 시험검체를 재분석할 필요가 있는 특수한 상황이 있을 수 있다.

3.3.5 시험검체 재주입

재주입 재현성이 밸리데이션 중 입증되었거나 수행된 생체시료 분석법 보고서에서 기술된 경우 장비 오류로 인한 전처리 시료의 재주입이 가능하다. 확인된 분석적 원인 없이 검량선용 표준시료 또는 품질관리시료 부적합으로 인한 전체 분석 단위 또는 개별 검량선용 표준시료 또는 품질관리시료의 단순 재주입은 허용되지 않는다.

3.3.6 크로마토그래프 적분

크로마토그래프 적분과 재적분을 시험계획, 시험계획서 또는 SOP에 기술해야 한다. 사전에 기술된 절차로부터 벗어나는 모든 일탈은 생체시료 분석법 보고서 내에서 논의되어야 한다. 모든 수동 적분 등 재적분이 필요한 크로마토그래프 목록과 재적분 사유를 생체시료 분석법 보고서에 기술해야 한다. 초회 및 재적분 크로마토그램과 각 결과를 향후 참조를 위해 보관해야 하고 비교 생체이용률/생동성시험을 위해 생체시료 분석법 보고서 안에서 제출해야 한다.

4. 리간드 결합 분석(Ligand Binding Assays, LBAs)

4.1 핵심 시약(Key Reagents)

4.1.1 표준품

표준품은 특성 규명 및 문서화가 잘 되어야 한다(예, 시험성적서 및 공급원(origin)). 생물의약품은 고도로 복잡한 구조를 가지고 있고 생체시료분석을 위한 결합시료와의 반응이 원료의약품의 제조공정 변경에 의해 영향을 받을 수 있다. 검량선용 표준시료와 품질관리시료 조제에 사용된 표준품 제조 배치는 가능하면 비임상과 임상시험에서 투여를 위해 사용된 것과 동일한 원료의약품 배치에서 유래할 것이 권고된다. 생물학적분석법에 사용된 표준품 배치가 변경된 경우, 분석법 성능 특성이 허용기준을 충족하도록 하기 위해 사용 전에 원래시료 및 신규시료에 대한 품질관리시료로 생체시료 분석법 평가를 수행해야 한다.

4.1.2 필수 시약(Critical Reagents)

결합 시약(예, 결합 단백질, 압타머(aptamers), 항체 또는 복합항체(conjugated antibodies), 효소 성분을 포함하고 있는 시약을 포함한 필수 시약은 정량 결과에 직접 영향을 미치기 때문에 품질이 보증되어야 한다. 필수 시약은 분석물질과 결합하고 상호작용하여 분석농도와 대응되는 기기신호로 이어진다. 필수 시약은 분석법에서 확인되고 정의되어야 한다.

자체 제조 또는 상업적 구매 여부에 상관없이 신뢰할 수 있는 필수 시약의 조달 방법을 분석법 개발 초기에 고려해야 한다. 필수 시약에 관한 자료 문서는 최소한의 확인, 공급원(source), 배치/로트 번호, 순도(가능할 경우), 농도(가능할 경우), 안정성/재시험 날짜/보관조건을 포함해야 한다 (표 1 참조). 추가적인 특성분석이 필요할 수 있다.

필수 시약의 전주기 관리 절차는 필수 시약의 원래 및 신규 배치 간의 일관성 확인을 위해 필요하다. 시약 성능은 생체시료 분석법을 사용하여 평가되어야 한다. 필수 시약의 경미한 변경이 분석 성능에 영향을 미칠 것으로 기대되지 않으나, 중요한 변경사항이 분석 성능에 유의미한 영향을 미칠 수 있다. 변경이 경미할 경우 (예, 한 개 시약의 공급원 변경), 특성분석을 위한 단회 비교 정확성 및 정밀성 평가로 충분하다. 중요한 변경일 경우 추가 밸리데이션 시험이 필요하다. 이상적으로, 변경 평가는 새로운 시약을 사용한 시험법과 예전 시약을 사용한 시험법을 직접 비교하는 것이다. 중요 변경사항은 항체 제조 방법 변경, 다클론 항체를 위해 동물에서 추가

혈액 채취, 단일클론 항체 생산을 위한 새로운 클론 또는 공급업자 등이 있으며 이에 국한되지 않는다.

필수 시약의 사용 연장 또는 대체를 뒷받침하기 위해 재시험 날짜 및 밸리데이션 매개변수를 문서화해야 한다. 시약의 안정성 시험은 생체시료 분석법 성능을 기초로 해야 하며 시약 보관조건의 일반적인 지침을 따라야 한다. 공급업자가 제시한 사용기간 이상으로 연장할 수 있다. 분석 성능 매개변수는 필수 시약의 사용 연장 또는 대체를 뒷받침하기 위해 문서화해야 한다.

4.2 밸리데이션

리간드 결합 분석을 위해 미량정량판(microtitre plates)가 가장 자주 사용되며, 시험검체는 시료 당 1개 또는 그 이상 웰(well)을 사용한 정량형식(assay format)으로 분석될 수 있다. 정량형식은 시험계획서, 시험계획 또는 SOP에서 정해야 한다. 분석법 개발 및 분석법 밸리데이션을 시료 당 1개 또는 그 이상 웰(well)을 사용하여 수행한 경우, 그 다음 시험검체 분석 또한 각각 시료 당 1개 또는 그 이상 웰(well)을 사용하여 수행해야 한다. 시료 당 여러 웰(well)을 사용하는 경우, 보고가능한 시료 농도는 반복 웰(well)로부터의 반응값의 평균으로 산출하거나 각각의 반응에서 계산된 농도의 평균을 통해 결정한다. 자료평가는 보고 가능한 농도로 평가되어야 한다.

4.2.1 특이성(Specificity)

특이성은 리간드 결합 분석에서 교차-반응 개념과 관련되어 있다. 결합시약은 목표 분석물질에 특이적으로 결합하지만, 함께 존재하는 구조적인 관련 분자 물질(예, 내인성 물질, 동형 단백질(isoform) 또는 구조적으로 관련된 병용약물)과는 교차-반응하지 않는 것이 중요하다. 특이성은 시험검체에서 예측되는 관련 분자 물질의 최대농도에서 관련 분자들을 공생체시료에 스파이크하여 평가한다.

최저정량한계(LLOQ) 및 최고정량한계(ULOQ)에서의 목표 분석물질의 정확성은 시험검체에서 예측되는 최대농도의 관련 분자 물질이 존재하는 상태에서 실시해야 한다. 관련 분자로 스파이크한 공시료의 반응은 최저정량한계(LLOQ) 미만이어야 한다. 관련 분자 물질의 존재 하에 목표 분석물질의 정확성은 이론값의 ±25%이내 이어야 한다.

만약 특이적이지 않은 경우, 분석법 영향은 공시료의 간섭 분자 물질 농도를 증가하여 스파이크하고 최저정량한계(LLOQ) 및 최고정량한계(ULOQ)에서 목표 분석물질의 정확성을 측정하여 평가해야 한다. 간섭이 일어날 경우, 관련 분자 물질의 최소농도를 결정하는 것이 필수적이다. 검체 분석 중 적절한 완화전략이 적용되어야

한다. 예를 들면, 정도에 따라 최저정량한계(LLOQ)/최고정량한계(ULOQ) 조절하거나 새로운 시험법을 고려하는 것이 필요할 수 있다.

분석법 개발 및 초기 분석법 밸리데이션 중, 이러한 "관련 분자 물질"을 사용할 수 없을 가능성이 높다. 최초 밸리데이션 완료 후 추가적인 특이성 평가를 수행할 수 있다.

4.2.2 선택성(Selectivity)

선택성은 비특이적 생체시료 구성성분 존재 하에 해당 분석물질을 검출하고 구별할 수 있는 분석능력이다. 시료 내에는 해당 분석물질을 간섭할 수 있는 분해 효소, 이염성 항체(heterophilic antibodies) 또는 류마토이드 인자(rheumatoid factor)와 같은 비특이적 생체시료 구성성분이 포함될 수 있다.

선택성은 대부분 문제가 발생하는 정량 범위 하한 말단(low end)에서 평가해야 하지만 더 높은 농도에서도 평가할 것이 권고된다. 그러므로, 선택성은 최소 10개의 개별 기원으로부터 얻은 공시료를 사용하고 최저정량한계(LLOQ) 및 고농도 품질관리시료에서 개별 공시료에 스파이크하여 평가한다. 희귀 시료를 사용하는 경우 더 적은 기원 사용은 허용가능하다. 공시료 반응은 개별 기원의 최소 80%에서 최저정량한계(LLOQ) 미만이어야 한다.

정확성은 평가된 개별 기원의 최소 80%에서 이론농도의 최저정량한계(LLOQ)에서 ±25% 이내, 고농도 품질관리시료에서 ±20% 이내이어야 한다.

선택성은 지질혈증시료 및 용혈시료에서도 평가해야 한다.(3.2.1항 참조) 지질혈증시료 및 용혈시료를 위한 시험은 단일 기원의 시료를 사용하여 평가할 수 있다. 선택성은 관련 환자군(예, 신장애 또는 간장애환자, 가능하다면 염증성 또는 면역성종양(immuno-oncology) 환자)의 시료에서도 평가해야 한다. 관련 환자군의 경우 최소 5명의 개별 환자가 있어야 한다.

4.2.3 검량선 및 범위(Calibration Curve and Range)

검량선은 분석물질 이론농도와 분석물질의 분석플랫폼 반응 간의 상관관계를 보여준다. 생체시료에 알려진 양의 분석물질을 스파이크하여 조제한 검량선용 표준시료는 검량선 범위를 포괄하며 검량선을 구성한다. 검량선용 표준시료는 시험검체와 동일한 생체시료로 조제해야 한다. 검량선 범위는 가장 낮은 검량선용 표준시료인 최저정량한계(LLOQ) 및 가장 높은 검량선용 표준시료인 최고정량한계(ULOQ)로 정의된다. 시험법 밸리데이션 중 시험한 개별 분석물질과

각각의 분석단위 별로 한 개의 검량선이 있어야 한다. 필요 시, 대체 생체시료 사용에 대한 과학적인 타당성이 제시되어야 한다.

검량선은 최저정량한계(LLOQ) 및 최고정량한계(ULOQ) 표준시료를 포함한 6개의 농도와 이에 더해 공시료로 구성되어야 한다. 공시료는 검량선 매개변수 산출에서 제외해야 한다. 검량선의 최저정량한계(LLOQ) 미만 농도 및 최고정량한계(ULOQ) 초과 농도에서의 고정점(anchor point)는 그래프 곡선을 적절히 들어맞게 하기위해 사용될 수도 있다. 자료의 점들이 점근선 하단 및 상단 근처에 있는 경우 검량선의 반응 및 농도의 상관관계는 4- 또는 5-매개변수 로지스틱 모델이 가장 적합하다. 그 외 모델들은 적절한 타당성이 제시되어야 한다.

시험 단위간 변동성에 기여할 수 있는 인자들을 고려하여 최소 6개의 독립적인 분석단위들을 며칠에 걸쳐 평가해야 한다.

개별 검량선용 표준시료의 역산농도에 대한 정확성 및 정밀성은 최저정량한계(LLOQ) 및 최고정량한계(ULOQ)에서 이론농도의 ±25% 이내, 그 외 농도에서 ±20% 이내이어야 한다. 고정점을 제외한 최소 75%의 검량선용 표준시료 및 최저정량한계(LLOQ)와 최고정량한계(ULOQ)를 포함한 최소 6개 농도의 검량선용 시료는 상기 기준을 만족해야 한다. 고정점은 정량가능한 곡선범위를 넘기 때문에 허용기준 적용이 필요하지 않다.

검량선은 새로 스파이크한 검량선용 표준시료를 사용하여 조제하는 것이 선호된다. 새로 스파이크한 검량선용 표준시료를 사용하지 않을 경우, 정해진 안정성 기간 내에에 있는 냉동 보관된 검량선용 표준시료를 사용할 수 있다.

4.2.4 정확성 및 정밀성(Accuracy and Precision)

4.2.4.1 품질관리시료 조제

품질관리시료는 시험검체 시료를 모방하기 위해 생체시료에 알려진 분석물질의 양을 스파이크하여 조제해야 하고, 시험검체의 예상되는 조건하에서 보관하고 분석법의 밸리데이션을 평가하기 위해 분석한다.

품질관리시료 조제를 위한 일련의 희석은 검량선용 표준시료 조제를 위한 일련의 희석과 완전히 독립적이어야 한다. 정확하게 조제되고 안정성이 검증된 동일한 표준원액(또는 표준용액)으로 조제할 수도 있다. 품질관리시료는 검량선 범위 내 최소 5개 농도값들로 조제되어야 한다. 분석물질은 최저정량한계(LLOQ), 최저정량한계의 3배 이내(저농도 품질관리시료), 검량선 범위의 기하평균 근처(중간농도 품질관리시료),

최고정량한계(ULOQ)의 최소 75%(고농도 품질관리시료) 및 최고정량한계(ULOQ) 농도로 스파이크되어야 한다.

정확성 및 정밀성이 아닌 밸리데이션 배치의 경우 저, 중, 고농도 품질관리시료는 이중으로 분석할 수 있다. 이러한 품질관리시료들은 검량선용 표준시료와 마찬가지로 배치의 적합 또는 부적합을 위한 기초를 제공할 것이다.

4.2.4.2 정확성 및 정밀성 평가

정확성 및 정밀성은 개별 분석단위(시험 내) 와 다른 분석단위(시험 간) 간의 품질관리시료 분석을 통해 결정해야 한다. 정확성 및 정밀성은 동일한 분석단위 및 데이터를 사용해 평가해야 한다.

정확성과 정밀성은 2일 이상 동안 최소 6개의 분석 단위에서 개별 품질관리시료 농도값 별로(최저정량한계(LLOQ), 저・중・고농도, 최고정량한계(ULOQ))에서 분석단위 당 최소 3번 반복분석을 통해 결정한다. 분석법 밸리데이션 자료과 정확성 및 정밀성 판정결과는 오류가 명백하고 문서화된 사례를 제외하고, 얻은 모든 결과를 보고서에 기술해야 한다. 시험 내 정확성 및 정밀성 자료는 각각의 분석단위별로 보고되어야 한다. 모든 분석단위에서 시험 내 정확성 또는 정밀성 기준을 만족하지 않는 경우, 각각의 품질관리 농도에서의 시험 내 정확성 및 정밀성의 전체 예측치를 산출해야 한다. 시험 간(중간) 정밀성 및 정확성은 모든 분석단위로부터 자료를 합쳐서 산출해야 한다.

개별 농도 수준의 정확성은 이론농도의 ±20% 이내이어야 하며, 최저정량한계(LLOQ)의 경우에는 예외적으로 ±25% 이내이어야 한다. 개별 농도에서 확인된 품질관리시료 농도의 시험 내 및 시험 간 정밀성은 20%를 초과하지 않아야 하고, 최저정량한계(LLOQ) 및 최고정량한계(ULOQ)의 경우에는 25%를 초과하지 않아야 한다.

정확성 및 정밀성이 아닌 밸리데이션 분석단위의 경우 전체 품질관리시료의 적어도 2/3 및 각각의 농도값의 적어도 50%가 이론값의 ±20% 이내이어야 한다.

또한 총 오차(즉, 정확성(%) 및 정밀성(%)의 오차에 대한 절대값의 합)을 평가해야 한다. 총 오차는 30%를 초과하지 않아야 한다.(최저정량한계(LLOQ) 및 최고정량한계(ULOQ)의 경우 40%)

4.2.5 캐리오버(Carry-over)

캐리오버는 리간드 결합 분석에서 일반적으로 문제가 되지 않는다. 그러나 만약

분석플랫폼이 캐리오버에 취약한 경우 검량선용 표준시료의 최고정량한계(ULOQ) 뒤에 공시료를 위치시켜 잠재적인 캐리오버를 조사해야 한다. 공시료 반응은 최저정량한계(LLOQ) 미만이어야 한다.

4.2.6 희석 선형성(Dilution Linearity) 및 후크 효과(Hook Effect)

많은 리간드 결합 분석에서 좁은 정량 범위 때문에 정량범위 내에서 분석물질의 농도를 얻기 위해 희석이 필요할 수 있다. 희석 선형성은 잘못된 결과를 얻지 않기 위해 다음 사항을 확인하여 평가하여야 한다; (i) 측정된 농도들이 검량선 범위 내로의 희석에도 의한 영향을 받지 않음 (ii) 최고정량한계(ULOQ)를 넘는 시료농도가 후크효과(즉, 고농도의 분석물질에서 나타나는 신호반응의 억제)에 영향을 받지 않음

희석을 위해 시험검체와 동일한 생체시료를 품질관리시료 조제를 위해 사용해야 한다.

희석 선형성은 희석 품질관리시료를 조제하여 입증해야 하며, 즉, 최고정량한계(ULOQ)를 초과한 분석물질 농도를 생체시료에 스파이크 후, 희석하지 않고 분석하고(후크 효과 평가 목적), 이 시료를 검량선 범위 내 농도로 공생체시료로 희석(최소 3개의 다른 희석 배율)하여 분석한다. 시험한 각각의 희석 배율의 경우 최소 3개의 독립적으로 조제한 일련의 희석시료로 시험검체에 적용되는 분석 반복 횟수와 동일한 횟수로 수행되어야 한다. 반응 감소 여부(후크 효과)는 희석 품질관리시료에서 확인하며, 만약 이러한 후크 효과가 관찰되고 타당한 방법으로 제거할 수 없다면, 시험검체 분석 중 이러한 효과를 최소화하기 위한 조치를 시행해야 한다.

개별 희석에서 산출된 평균농도는 희석 조정 후 이론농도의 ±20%이내이어야 하며, 정밀성은 20%를 초과하지 않아야 한다.

시험검체 분석 중 적용된 희석 배율은 밸리데이션 중 평가된 희석 배율 범위 내에 있어야 한다.

4.2.7 안정성(Stability)

안정성 평가는 시료 조제, 전처리, 분석 과정에서 모든 단계 및 적용된 보관조건이 분석물질 농도에 영향을 미치지 않는다는 것을 확인하기 위해 수행되어야 한다.

시료 보관시간 및 온도, 검체 생체시료, 항응고제, 보관용기 재질과 같은 안정성 시험에 적용하는 보관 및 분석조건은 시험검체를 위해 사용된 조건들을 반영해야 한다. 문헌 참고자료는 충분하지 않은 것으로 고려된다. 보관기간 밸리데이션은 시험검체 보관기간과 동일하거나 더 긴 시간 동안 보관된 품질관리시료로 수행해야

한다.

생체시료 내 분석물질 안정성은 저농도 및 고농도의 품질관리시료를 사용하여 평가한다. 저농도 및 고농도 품질관리시료의 분취량(aliquots)를 0시간 및 평가할 보관 조건 적용 후에 분석한다. 각 농도값에 대한 한 개의 대용량(bulk) 품질관리시료를 조제해야 한다. 각 농도 별로 대용량 시료를 3개로 분주하여 보관, 가혹화 및 분석한다.

품질관리시료는 분석단위 내에서 새로 스파이크하여 조제한 검량선 표준시료로부터 얻은 검량선으로 그에 상응하는 새로 스파이크하여 조제한 품질관리시료 또는 안정성이 입증된 품질관리시료로 분석한다. 검량선용 표준시료 및 품질관리시료를 새로 조제하여 사용하는 것이 선호되나, 몇몇 고분자의 경우 냉동보관 후 다음날 사용하는 것이 필요할 수도 있다. 이러한 경우 타당성 제시 및 냉해동 안정성이 입증되어야 한다. 품질관리시료는 해동주기 사이에 최소 12시간 동안 냉동을 유지해야 한다. 각각의 품질관리시료 농도값별 평균농도는 이론농도의 ±20% 이내이여야 한다.

많은 리간드 결합 분석에서 좁은 검량선 범위 때문에 시험검체 농도가 검량선의 최고정량한계(ULOQ)보다 일관적으로 높을 수 있다. 이러한 경우, 실제 검체 농도 범위를 대표하기 위해 적용된 검체희석을 고려하여 품질관리시료의 농도를 조정해야 한다.

고정용량의 복합제 및 특별한 용법이 허가사항에 기재된 의약품의 경우, 생체시료 내 분석물질의 냉해동, 단기(bench-top) 및 장기안정성은 사례별로 투여된 모든 성분을 스파이크한 생체시료로 수행해야 한다.

3.2.8 항에서 언급했듯이, 안정성 평가는 실온 및 검체 조제 온도에서의 bench top(단기) 안정성 및 냉해동 안정성을 포괄해야 한다. 또한 장기안정성시험을 수행해야 한다.

화학의약품의 경우, 한 개 온도에서의 안정성(예, -20°C)은 더 낮은 온도로 외삽이 가능할 수 있다.(예, -70/80°C)

생물의약품의 경우, 예를 들면 -70/80°C 및 -20°C에서 안정성이 입증된 경우에는 브래케팅 접근법 적용이 가능하며, 시험검체가 보관될 2개의 온도 사이의 온도에서의 안정성을 실시할 필요는 없다.

4.3 시험검체 분석(Study Sample Analysis)

시험검체 분석은 밸리데이션 완료 후 수행할 수 있지만, 몇 가지 항목은 이후

단계에서 완료될 수 있다고 간주된다(예, 장기 안정성). 규제당국에 자료를 제출하는 시점에는, 생체시료 분석법 밸리데이션을 완료해야 한다. 시험검체, 품질관리시료 및 검량선용 표준시료는 밸리데이션된 분석법에 따라 전처리해야 한다. 문서화와 관련된 요구사항은 표 1을 참조한다.

4.3.1 분석단위(Analytical Run)

분석단위는 공시료, 최소 6개 농도의 검량선용 표준시료, 최소 3개 농도의 품질관리시료 (저, 중, 고) 한 쌍 (또는 시험검체의 최소 5%, 어느 쪽이든 더 높은 쪽) 및 분석할 시험검체로 구성된다. 공시료는 검량선의 매개변수 도출할 때 포함되지 않는다. 시험검체는 항상 품질관리시료 사이에 배치하는 것을 고려하도록 하여, 전체 분석단위의 정확성과 정밀성을 보증할 수 있도록 품질관리시료를 배치한다.

리간드 결합 분석을 위해 미량정량판(microtitre plates)가 가장 자주 사용된다. 분석단위는 1개 이상의 판(plate)으로 구성될 수 있다. 일반적으로 각각의 판은 개별 검량선용 표준시료 및 품질관리시료 세트를 포함한다. 개별 판이 검량선용 표준시료 및 품질관리시료를 포함하는 경우 개별 판 단위로 평가해야 한다. 그러나 일부 플랫폼의 경우 검체 수용량이 제한적일 수 있다. 이러한 경우, 검량선용 표준시료 세트는 첫 번째와 마지막 판에 둘 수 있지만, 품질관리시료는 각각의 판마다 두어야 한다. 품질관리시료는 각각의 판의 시험검체의 최소 시작(전) 및 끝(후)에 두어야 한다. 각각의 판의 품질관리시료 및 검량선은 분석단위의 허용기준을 충족해야 한다.(4.3.2항 참조) 농도 계산을 위해, 검량선용 표준시료들은 한 개의 회귀분석 수행을 위해 합쳐야 한다. 합쳐진 검량선이 허용기준을 통과하지 못하는 경우 전체 분석단위는 부적합으로 판정된다.

4.3.2 분석단위 판정기준

분석단위의 적합 또는 부적합 기준은 시험계획서, 시험계획 또는 SOP 내에서 정의해야 한다. 한 개의 분석단위가 여러 배치를 포함하는 경우에 허용기준은 전체 분석단위 및 개별 배치에 적용해야 한다. 한 개의 분석단위 내 한 개의 배치가 배치 허용기준을 만족하기 못해 부적합 판정되더라도 분석단위가 허용기준을 만족할 수 있다. 분석단위 내 다른 배치의 허용을 뒷받침하기 위해 부적합처리된 배치 내 검량선용 표준시료를 사용할 수 없다.

검량선용 표준시료의 역산된 농도는 이론값의 ±20% 이내이어야 하고, 최저정량한계(LLOQ)는 ±25% 이내이어야 한다. 최소 6개의 농도를 포함한, 적어도 75%의 검량선용 표준시료 농도에서 이러한 기준을 충족해야 한다. 이러한 요구사항은

고정점에는 적용하지 않는다. 6개 농도를 초과하는 검량선용 표준시료를 사용하고 이 중 한 개가 기준을 만족하지 못한 경우, 이러한 검량선용 표준시료는 부적합 처리해야 하며 해당 시료를 제외한 검량선을 재평가하고 새로이 회귀분석을 수행해야 한다.

부적합된 검량선용 표준시료가 최저정량한계(LLOQ)인 경우 이 분석단위의 새로운 정량한계는 검량선의 그다음 최저 허용가능 검량선용 표준시료가 된다. 최고 검량선용 표준시료가 부적합 판정된 경우, 이 분석단위를 위한 최고정량한계(ULOQ)는 검량선의 그다음 최고 허용가능 검량선용 표준시료가 된다. 이러한 새로운 검량선용 최저 또는 최고 정량한계의 허용기준은 본래값(즉, ±20%)으로 유지된다. 수정된 검량선 범위는 모든 품질관리시료 농도(저, 중, 고)를 포함해야 한다. 수정된 정량 범위를 벗어나는 시험검체는 재분석해야 한다.

각각의 분석단위는 최소 3개 농도의 품질관리시료(저, 중 고)를 포함해야 한다. 시험검체 분석 중에는 검량선용 표준시료 및 품질관리시료는 시험검체 당 사용된 웰(well)의 수에 따라 시험검체 분석을 모방해야 한다. 품질관리시료의 최소 2/3 및 각 농도 별 50%는 각각의 농도의 이론값의 ±20% 이내이여야 한다. 이러한 기준 적용에 예외를 두는 경우 타당성이 제시되어야 하며 SOP 또는 시험계획서에 사전에 정의되어야 한다.

모든 적합판정된 분석단위의 품질관리시료에 대한 전체 평균 정확성 및 정밀성은 각 농도값 별로 산출되어야 하고 분석보고서 내에 기재되어야 한다. 전체 평균 정확성 및/또는 정밀성이 20%를 초과하는 경우에는, 이러한 일탈의 원인을 확인하기 위해 추가적인 조사를 수행해야 한다. 비교 생체이용률/생동성시험의 경우 해당 시험결과가 부적합 처리될 수 있다.

4.3.3 검량선 범위

목표 치료용량에서, 시료분석 시작 후 검량선의 말단 부분에서 시험검체의 예측하지 못한 쏠림 현상이 있는 경우 분석을 중단하고 시험검체 분석을 계속 진행하기 전에 표준 검량선 범위를 좁히고(즉, 부분 밸리데이션), 기존 품질관리시료 농도를 수정하거나 관찰된 범위 내 최초 검량선 내에 추가적인 농도의 품질관리시료를 추가해야 한다. 검량선 범위 또는 품질관리시료 농도를 최적화하기 전에 이미 분석한 시험검체를 재분석할 필요는 없다.

4.3.4 시험시료 재분석

시험검체의 가능한 재분석 사유, 재분석횟수, 기재할 값을 선택하기 위한 판단기준은 시험검체의 실제 분석 시작 전에 시험계획서, 시험계획 또는 SOP에서 사전에

정의되어야 한다.

재분석한 검체 수(및 총 검체 수 대비 백분율)은 생체시료 분석법 보고서 내에서 보고되고 고찰되어야 한다. 비교 생체이용률/생동성시험에서, 부적합 처리된 분석단위의 수치를 별도 표로 보고해야 한다.

시험검체 재분석 사유에 대한 몇 가지 예시는 다음과 같다:

- 분석단위가 검량선용 표준시료의 정확성 및/또는 표준관리 시료의 정밀성 및 정확성 관련 허용기준을 충족하지 못한 사유로 인한 분석단위의 부적합 판정
- 측정 농도가 최고정량한계(ULOQ)를 초과
- 검량선에서 최저 검량선용 표준시료가 부적합 처리된 후 다른 분석단위보다 최저정량한계(LLOQ)가 높은 분석단위에서 얻은 시험검체 농도가 수정된 최저정량한계(LLOQ)보다 미만인 경우
- 장비 오작동
- 희석된 시험검체가 최저정량한계(LLOQ) 미만인 경우
- 투약 전 시험검체, 대조군 또는 위약군의 시험검체에 대한 정량가능한 분석물질 농도 확인
- 시료를 2개 이상의 웰(well)로 분석한 경우, 반복 분석 결과 중 한 개가 미리 정의된 허용기준을 만족하지 못하여, 보고 할 수 없는 결과가 나온 경우 (예, 웰(well)간 현저한 변동성, 반복 분석 중 한 개에서 최고정량한계(ULOQ) 초과 또는 최저정량한계(LLOQ) 미만의 값)

비교 생체이용률/생동성시험의 경우 약동학적 원인(예, 시료 농도가 예상된 약동학적 프로파일에 맞지 않음)에 대한 시험검체의 재분석은 시험 결과에 대한 편향 영향을 가져올 수 있기 때문에 허용되지 않는다.

모든 재분석 시료는 생체시료 분석법 보고서에 확인되어야 하며 초기값, 재분석 사유, 재분석값, 최종 선택값, 선택에 대한 타당성이 기술되어야 한다. 또한, 각각의 사유에 따라 재분석한 시료 전체 수에 대한 요약표가 제공되어야 한다. 최초 분석에서 보고를 할 수 없는 결과가 나온 경우 단회 재분석은 충분한 것으로 본다(예, 최고정량한계(ULOQ)를 초과하는 농도 또는 장비 오류). 검체 분석은 초기 분석과 같이 시험검체 당 동일한 웰(well) 개수에 기초해야 한다. 값을 확정할 필요가 있는 경우(예, 투약 전 시료에서 측정 가능한 농도 검출)에는 시료 용량이 허용된다면

반복확인이 필요하다.

시험의 다른 어떤 것 보다 시험대상자 안전이 가장 중요하다. 그렇기 때문에 안전성 조사를 위해 특정 시험검체를 재분석할 필요가 있는 특수한 상황이 있을 수 있다.

5. 검체검증분석(Incurred Sample Reanalysis, ISR)

시험검체에 대한 분석능은 분석법 밸리데이션 중 공생체시료를 스파이크하여 사용한, 검량선용 표준시료 및 품질관리시료에 따라 다를 수 있다. 단백결합, 알려진 또는 알려지지 않은 대사체의 역변환, 시료 불균일성, 병용약물 또는 시험검체에 존재하는 고유한 생물학적 구성성분은 시험검체 내 분석물질의 측정된 농도에 영향을 줄 수 있다. 검체검증분석(ISR)은 보고된 시험검체 농도의 신뢰성을 확인하기 위한 것이다.

검체검증분석은 최소한 다음의 상황에서 실시되어야 한다.:

- 이 가이드라인 범위에 해당하는 비임상시험의 경우 일반적으로 검체검증분석은 종(species)마다 적어도 한번은 수행되어야 한다.
- 모든 핵심 비교 생체이용률/생동성시험
- 최초 인체 투여 임상시험
- 환자 대상 초기 핵심 임상시험의 경우, 환자 집단 당 1회 실시
- 간장애 및/또는 신장애 환자를 대상으로 하는 최초 또는 핵심 시험

검체검증분석은 동일한 생체시료 분석법을 사용하여 동일 시험의 검체 중 일부를 구별된 분석단위로 (즉, 최초 분석 날짜와 다른) 반복하여 수행한다.

검체검증분석 규모는 분석물질 및 시험검체에 따르며, 분석법 및 분석물질에 대한 심도깊은 이해를 기반으로 정한다. 그러나, 최소한 총 시험검체 수가 1,000개 이하이면, 시험검체의 10%를 재분석해야 한다.; 총 검체수가 1,000개 를 초과한다면, 처음 1000개 검체의 10%(100개)과 1,000개를 초과한 검체수의 5%를 더하여 평가한다. 검체검증분석을 위한 시험검체의 대상을 선정하기 위한 객관적 기준은 시험계획서, 시험계획 또는 SOP에서 사전에 정의되어야 한다. 약물을 복용하거나 투약한 시험대상자/동물 중에서 가능한 한 무작위로 선정해야 하지만, 농도 범위가 적절하게 분산되도록 선정하는 것이 중요하다. 그러므로, 검체검증분석을 위한 검체는

최대혈중농도(Cmax) 근처 및 일부는 소실기에서 선정할 것을 권고한다. 또한, 선정된 검체는 전체 시험을 대표해야 한다.

검체들을 합치는 것(pooling)은 비정상적인 결과의 관찰을 제한할 수 있으므로 합치지 않도록 한다. 검체검증분석 시료 및 품질관리시료는 본 분석과 동일한 방식으로 전처리 및 분석해야 한다. 검체검증분석은 분석물질의 안정성 기간 내에 수행해야 하지만 본 분석과 동일한 날짜에 수행해서는 안된다.

최초농도(최초값) 및 ISR로 측정된 농도(반복값) 간의 차이를 다음의 방정식을 사용하여 백분율 차이에 대한 평균값을 산출해야 한다.

$$\text{차이}(\%) = \frac{\text{반복값} - \text{최초값}}{\text{평균값}} \times 100$$

크로마토그래프 분석법을 위해 백분율 차이는 ISR의 최소 2/3의 검체가 ±20%이내이어야 한다. 리간드 결합 분석에서는 ISR의 최소 2/3의 검체가 ±30%이내이어야 한다.

전체 검체검증분석 결과가 허용기준을 만족하지 못할 경우 조사를 실시해야 하고 원인이 해결되어야 한다. 조사 실시 여부 및 수행에 대해 SOP에 지시사항이 기재되어야 한다. 조사 결과 허용기준 일탈에 대한 원인이 확인되지 않은 경우, 검체검증분석 실패가 시험의 타당성에 미치는 잠재적 영향에 대해 생체시료 분석법 보고서에서 기술되어야 한다. 만약 검체검증분석이 허용기준을 충족하나 다수의 시료에 대한 결과의 차이가 크게 또는 전반적으로 관찰되는 경우, 이는 분석에 문제가 있음을 시사하므로 추가적인 조사가 권장된다.

우려되는 사항에 대한 경향성은 다음 예시를 포함한다:

- 단일 시험대상자의 모든 검체검증분석 시료의 일탈
- 단일 분석단위의 모든 검체검증분석 시료의 일탈

검체검증분석 평가의 모든 측면은 시험과 조사를 재구성할 수 있도록 문서화되어야 한다. 최초값과 상당히 차이 있는 개별 시료(예, > 50%, “플라이어(flyers)”)는 초기 검체의 재분석으로 결론지어서는 안되며 조사가 필요하지 않다. 최초 시험검체 자료를 검체검증분석 자료로 교체해서는 안된다.

6. 부분 및 교차 밸리데이션

6.1 부분 밸리데이션

부분 밸리데이션은 이미 확립된 전체 밸리데이션된 생체시료 분석법에 대한 변경사항을 평가한다. 부분 밸리데이션 범위는 한 번의 시험 내 정확성 및 정밀성 수행과 같이 작은 것부터 거의 전체 밸리데이션 수준까지 포함한다. 안정성이 한 개의 기관에서 확립되었다면, 다른 기관에서 안정성 평가를 반복할 필요는 없다.

크로마토그래프 분석법의 경우, 부분 밸리데이션에 해당하는 일반적인 생체시료 분석법 수정 또는 변경은 다음 상황들이 포함되나, 이에 국한되지 않는다.:

- 동일 분석법을 사용한 분석기관 변경(즉, 실험실 간 생체시료 분석법 기술이전)
- 분석법 변경(예, 검출시스템, 플랫폼 변경)
- 검체 전처리 절차 변경
- 검체 용량 변경(예, 더 적은 양의 소아 검체)
- 검량선 농도 범위 변경
- 체액 내 항응고제(반대이온(counter-ion)의 변경이 없는) 변경(예, 헤파린에서 EDTA로 변경)
- 한 개의 종(species) 내에서 다른 생체시료로의 변경(예, 인체 혈장에서 혈청 또는 뇌척수액으로 변경) 또는 동일 생체시료 내에서 다른 종(species)으로의 변경(예, 랫드 혈장에서 마우스 혈장으로 교체)
- 보관조건 변경

리간드 결합 분석의 경우, 부분 밸리데이션에 속하는 일반적인 생체시료 분석법 수정 또는 변경은 다음 상황들이 포함되나, 이에 국한되지 않는다.:

- 리간드 결합 분석에서 필수 시약 변경(예, 로트 변경)
- 최소요구희석(MRD) 변경
- 보관조건 변경
- 검량선 농도 범위 변경

- 분석법 변경(검출시스템, 플랫폼 변경)
- 동일 분석법을 사용한 분석기관 변경(즉, 실험실 간 생체시료 분석법 기술이전)
- 검체 전처리 절차 변경 변경
- 체액 내 항응고제(반대이온(counter-ion)의 변경이 없는) 변경(예, 헤파린에서 EDTA로 변경)

부분 밸리데이션 평가항목은 전체 밸리데이션과 동일한 기준을 만족해야 한다. 이러한 기준을 만족하지 못한다면, 추가적인 조사 및 밸리데이션이 필요합니다.

6.2 교차 밸리데이션

교차 밸리데이션은 여러 생체시료 분석법 및/또는 여러 분석기관이 포함되었을 때 보고된 자료간의 관련성을 입증하는데 필요하다.

다음 경우에서 교차 밸리데이션이 필요하다.

- 한 시험에 대해 서로 다른 전체 밸리데이션 방법으로 얻은 자료
- 한 시험에 대해 동일한 생체시료 분석법을 서로 다른 실험실로부터 얻은 자료
- 다수의 시험에 대해 각 시험별로 다른 전체 밸리데이션으로부터 얻은 자료를 향후 합치거나, 특별한 투여요법의 근거를 위해 비교하거나, 안전성·유효성 및 허가사항에 대한 규제적 결정을 하는 경우

각기 다른 전체 밸리데이션 방법으로부터 얻은 자료를 합치기 위한 목적이 아니라면, 일반적으로 교차 밸리데이션은 필요하지 않다.

교차 밸리데이션은 가능하다면 시험검체 분석 이전에 수행해야 한다.

교차 밸리데이션은 두 시험법, 또는 두 실험실에서 시험검체 농도범위를 포괄하는 동일한 품질관리시료 세트(저, 중, 고) 최소 3개 및 시험검체(가능하다면)를 측정하여 평가해야 한다($n \geq 30$).

편향은 Bland-Altman 플롯 또는 Deming 회귀분석을 통해 평가할 수 있다. 두 개의 분석법 간 일치를 평가하기에 적합한 다른 방법(예, 일치 상관 계수(concordance correlation coefficient)) 또한 사용할 수 있다. 대안으로, 편향을 평가하기 위해 각각의 분석법으로 분석한 시험검체에 대해 농도 대 시간 곡선을 도표화할 수 있다.

하나의 비교 생체이용률/생동성시험 수행에서 동일 분석물질 측정을 위한 다수의 생체시료 분석법 사용은 강력하게 권장되지 않는다.

7. 추가 고려사항

7.1 내인성 물질인 분석물질 분석법

내인성 분자(예, 대체요법(replacement therapies))인 분석물질에 대해, 해당 분석법이 치료약물과 내인성 분자 간 구별을 할 수 없을 때 분석물질을 정확히 측정하기 어렵다. 아울러, 분석물질의 내인성 농도는 연령, 성별, 인종, 주행성 변동(diurnal variations), 질병 또는 약물치료의 부작용 때문에 다양할 수 있다. 이 항에서는 내인성 물질인 분석물질의 농도를 평가하기 위해 사용될 수 있는 몇 가지 접근법을 서술한다. 다만, 생체표지자는 이 가이드라인의 범위에서 다루지 않는다.

가능하다면, 검량선용 표준시료 및 품질관리시료를 조제하기 위한 생체시료는 시험검체와 동일해야 하며(즉, 실제 생체시료(authentic biological matrix)) 3항 및 4항에 서술되었듯이 생체시료효과 및 간섭이 없어야 한다. 선택된 생체시료 내 내인성 농도는 적절한 신호 대 잡음(signal-to-noise) 비율(예, 최저정량한계(LLOQ)의 <20%)을 얻기에 충분하게 낮아야 한다.

간섭물질이 없는 생체시료를 구할 수 없는 경우, 시험검체 내 분석물질의 농도를 산출하기 위해 사용할 수 있는 다음의 4가지 접근법이 있다.: 1) 대체 생체시료 접근법, 2) 대체 분석물질 접근법, 3) 기저치 차감 접근법, 4) 표준품 추가 접근법.

1) 대체 생체시료 접근법(Surrogate Matrix Approach):

검량선용 표준시료의 생체시료를 대체 생체시료로 사용한다. 대체 생체시료는 단순 완충액 또는 실제 생체시료를 모방하기 위한 인공시료부터 일부 성분을 제거한 생체시료(stripped matrices) 또는 다른 종(species)의 생체시료까지 복잡성에 따라 폭넓게 다양하다.

2) 대체 분석물질 접근법(Surrogate Analyte Approach):

내인성 분석물질 정량을 위한 검량선을 안정적인 동위원소 표지 분석물질을 사용하여 질량분석법으로 분석한다. 이 접근법에서 분자량을 제외하고 실제

분석물질과 대체 분석물질의 물리화학적 특성은 동일할 것으로 가정한다. 그러나, 동위원소 표준시료는 머무름시간 및 질량분석(MS) 감도가 다를 수 있기 때문에, 이러한 접근법을 적용하기 전에 표지된 분석물질에서 표지되지 않은 분석물질 질량분석(MS) 반응 비율(즉, 반응인자)가 거의 동일해야 하고 검량선 범위 전반에 걸쳐 일정해야 한다. 반응인자가 이러한 요구사항을 따르지 않는 경우, 검량선의 회귀방정식에 포함되어야 한다.

3) 기저치 차감 접근법(Background Subtraction Approach):

분석물질을 스파이크하여 구한 농도에서 합쳐진(pooling) 생체시료 또는 대표 생체시료에 구한 내인성 기저 농도로 차감한다. 이렇게 차감된 결과값으로 검량선을 작성한다.

그러나, 기저 농도가 표준품을 스파이크하기 전 공시료 희석으로 낮아졌다면(예, 더 낮은 최저정량한계(LLOQ)가 필요하다면) 시험검체 및 검량선용 표준시료에서 생체시료 구성이 달라지므로, 다른 회수율 및 생체시료효과를 야기할 수 있다. 이러한 차이는 분석법 밸리데이션 시 고려되어야 한다.

4) 표준품 추가 접근법(Standard Addition Approach):

표준품 추가 접근법은 반응이 선형적인 분석플랫폼에서만 적용가능하다. 일반적으로 표준품 추가 방법은 표준품과 품질관리시료 조제를 위해 사용되는 실제 생체시료 내 내인성 분석물질의 농도를 결정하기 위해 사용된다. 그러나 이러한 접근은 역시 시험검체의 농도 결정을 위해 사용할 수 있다. 이러한 접근에서, 모든 시험검체는 동일한 부피의 분취액(aliquot)로 나눈다. 1개를 제외한 모든 분취액에 분석물질 표준품을 알고 있는 다양한 양을 스파이크하여 실체 생체시료의 공시료와 모든 시험검체를 위한 검량선(예. 3~5 시점)을 작성한다. 내인성 기저 농도 또는 시험검체 농도는 해당 특정 시험검체에서 조제된 표준 검량선의 x-절편의 음수로 결정된다.

내인성 물질인 분석물질을 위한 분석법 밸리데이션은 3항 및 4항에서 보여진 밸리데이션과 더불어 다음 사항에 대한 고려가 필요하다.

7.1.1 내인성 물질인 분석물질 분석법을 위한 품질관리시료

생체시료 내 분석물질의 내인성 기저 농도는 품질관리시료 조제 전 평가해야 한다.

간섭하는 내인성 분석물질이 가능한한 가장 낮은 농도의 생체시료가 사용되어야 한다.

품질관리시료의 농도는 실제 생체시료 내 내인성 농도를 고려해야 하고 예상되는 시험검체 농도를 대표해야 한다.

품질관리시료는 시험검체와 비슷해야 하고 동일 생체시료로 조제해야 한다. 원칙적으로 밸리데이션에 사용되는 모든 품질관리시료 농도는 스파이크하지 않은 본래 생체시료의 분취액(가능하다면, 최저정량한계(LLOQ) 및 저농도 품질관리시료 사이 농도의 내인성 품질관리시료) 및 실제 분석물질의 알려진 양을 스파이크한 분취액(저・중・고농도 품질관리시료)이어야 한다. 스파이크한 시료는(예, 최저정량한계(LLOQ), 저농도 품질관리시료)의 경우, 첨가하는 양은 내인성 기저 농도로부터 3배 높거나 통계적으로 차이가 있는 농도를 제공하는데 충분한 양이어야 한다. 만약 여러 옵션들, 예를 들어 다수의 로트, 대체 공급원 및 특수 집단에서 얻게 되는 생체시료들이 지속적으로 내인성 농도가 너무 높아 본래 생체시료의 저농도 품질관리시료를 조제할 수 없을 경우 희석(대체) 생체시료를 사용할 수 있다.

7.1.2 내인성 물질인 분석물질 분석법을 위한 선택성, 회수율, 생체시료 효과

선택성 평가는 간섭물질이 없는 생체시료가 존재하지 않기 때문에 복잡하다. 크로마토그래프의 경우 식별력이 있는 검출시스템(예, tandem mass spectrometry(MS/MS))을 사용하여 다수 기증자로부터 얻은 생체시료 분석(최소 6개의 정상 공시료, 1개의 용혈 공시료, 1개의 지질혈증 공시료)을 통해 분석법 밸리데이션의 일부로서 피크 순도가 조사되어야 한다. 과학적 원칙에 따라 타당성이 제시된다면 다른 접근방법 또한 고려될 수 있다.

표준품 추가 및 기저치 차감 접근법의 경우, 시험검체 및 검량선용 표준시료에 대해 동일한 생체시료 및 분석물질이 사용되었을 때 시험검체 및 검량선용 표준시료에서 서로 동일한 회수율 및 생체시료효과가 발생한다. 그러나 내인성 성분이 완전히 동일하지 않다면(예, 재조합 단백질) 회수율의 잠재적 차이를 평행성시험을 통해 평가되어야 한다. 대체 생체시료 및 대체 분석물질 접근법에서는 생체시료효과 및 추출 회수율은 검량선용 표준시료와 시험검체 간 다를 수 있다. 정확성 및 정밀성에 영향을 주지 않는다는 것을 보장하기 위해 생체시료효과가, 주로 최저정량한계(LLOQ) 농도에서 평가되어야 한다.

- 대체 생체시료 접근법 적용 시, 대체 생체시료 및 실제 생체시료 둘 다 생체시료효과 및 회수율 차이의 영향이 평가되어야 한다. 이는 대체 검량선와

비교하여 생체시료 내 분석물질을 스파이크한 품질관리시료, 내인성 생체시료 단독 및 대체 생체시료 내 분석물질을 스파이크한 시료를 사용한 시험에서 조사해야 한다.

- 질량분석 크로마토그래프법에서 대체 분석물질 접근법 적용 시, 대체 및 실제 내인성 분석물질 간 생체시료효과 및 회수율 차이의 영향이 평가되어야 한다. 이는 대체 검량선과 비교하여 생체시료 내 분석물질을 스파이크한 품질관리시료, 내인성 생체시료 단독, 생체시료 내 대체 분석물질을 스파이크한 시료를 사용한 시험에서 조사해야 한다.

- 어떤 경우에는, 내인성 농도가 높고 최저정량한계(LLOQ)를 낮출 필요가 있을 때 대체 생체시료로 품질관리시료를 희석하는 것이 필요할 수 있다. (예, 기저치 차감 접근법). 이런 경우에는, 가능하다면 최저정량한계(LLOQ)와 저농도 품질관리시료 사이에 존재하는 내인성 농도의 실제 생체시료로 회수율과 생체시료효과 시험을 반복해야 한다.

각 허용기준은 크로마토그래프법 및 리간드 결합 분석, 각 3항 및 4항을 참조한다.

생체시료 구성 성분이 분석 성능에 영향을 줄 수 있으므로, 각 시료별로 별개의 검량선으로 분석되는 표준품 추가 접근법을 제외하고는 최소 6개(크로마토그래프법)/10개(리간드 결합 분석)의 서로 다른 기증자의 생체시료로 조사하는 것이 필요하다.

7.1.3 내인성 물질인 분석물질 분석법을 위한 평행성

평행성은 대체 생체시료 및 실제 생체시료 각 시험 방법 범위 내에서 관찰된 반응의 변화가 분석물질 농도에서 변화와 동등하다는 것을 보장한다. 평행성은 리간드 결합 분석 및 크로마토그래프법에서 다르게 평가된다는 것을 고려하여 대체 생체시료 및 대체 분석물질 접근법 적용 시 평가되어야 한다.

7.1.4 내인성 물질인 분석물질 분석법을 위한 정확성 및 정밀성

정확성 및 정밀성에 대한 허용기준은 크로마토그래프법 및 리간드 결합 분석, 각 3항 및 4항에서 정한 기준을 만족해야 한다.

대체 생체시료 또는 대체 분석물질 접근법을 사용한 경우, 정확성 및 정밀성 평가는 대체 검량선과 비교하여 품질관리시료를 분석하여 평가해야 한다.

공시료에서 내인성 분자의 기저농도는 스파이크한 시료에서 얻은 총 농도로부터

빼서 결정할 수 있다. 정확성은 품질관리시료를 분석물질의 내인성 기저농도를 포함한 생체시료에 실제 분석물질을 스파이크할 때 다음의 공식을 사용하여 계산하는 것을 권고한다.

$$\text{정확성}(\%) = 100 \times \frac{(\text{스파이크된 시료의 측정농도} - \text{내인성 기저농도})}{\text{스파이크된 농도}}$$

정밀성은 오직 각각의 스파이크하지 않은/내인성 품질관리시료로 결정할 수 있다.

7.1.5 내인성 물질인 분석물질 분석법을 위한 안정성

시험검체를 가능한 동일하게 모방하기 위해, 실제 생체시료에서의 본래 분석물질, 스파이크하지 않은/내인성 품질관리시료(내인성 분자물질이 있는 공시료) 뿐만 아니라 7.1.1. 항에서 정의한 스파이크한 저농도 품질관리시료 및 고농도 품질관리시료 시료에 대한 안정성시험을 실시해야 한다. 그러나, 검량선용 표준시료를 위해 대체 생체시료를 사용한다면, 실제 생체시료 내 안정성과 다를 수 있으므로, 대체 생체시료 내 분석물질에 대한 안정성 또한 입증되어야 한다.

7.2 평행성(Parallelism)

평행성은 분석물질 정량에 희석이 미치는 영향을 탐색하기 위해 검량선과 순차적으로 희석된 시험검체 간 평행 관계로 정의된다. 평행성의 미흡은 약동학 평가를 위한 생체시료 분석에서 드물게 나타나나, 리간드 결합 분석의 평행성은 사례별로 평가되어야 한다. 예를 들어 생체시료 성분(예, 내인성 결합단백질 존재)으로 인한 간섭이 시험검체 분석 중 의심되는 경우가 있다. 평행성 평가 또는 미실시에 대한 타당성 입증이 생체시료 분석법 보고서에 포함되어야 한다. 일부 방법에서 하나의 환자 집단에서 평행성을 입증하였으나, 그 외 다른 집단에서는 그렇지 않을 수 있다. 일반적으로 이러한 시험은 분석법 개발 및 분석법 밸리데이션 중에 시험검체를 이용할 수 없기 때문에 시험검체 분석 중에 수행되어야 한다. 고농도의 시험검체(Cmax에 근접할수록 좋음)는 공시료로 희석하여 3개 농도를 조제한다. 순차적 희석한 검체 별로 역산한 농도 간 정밀성은 30% CV를 넘지 않아야 한다. 그러나, 30% 기준을 적용할 때, 이 기준을 통과한 결과에서도 여전히 평행성 경향이 나타나지 않을 수 있으므로 결과를 면밀히 모니터링해야 한다. 시료가 순차적으로 희석되지 않은 경우(즉, 비(非)평행성 방법), 결과 보고절차가 사전에 정의되어야 한다.

7.3 회수율

시료 추출 방법을 통해 전처리하는 경우, 회수율(추출 효율성)을 평가해야 한다. 회수율은 시료 추출 및 시험법 전처리 단계를 통해 실시된 분석물질의 알려진 양의 비율로 보고한다. 회수율은 공생체시료를 전처리 후 분석물질을 스파이크한 반응과 분석물질을 스파이크한 후 전처리한 생체시료 내 분석물질 반응을 비교하여 결정한다. 분석물질 회수율은 100%일 필요는 없지만, 분석물질 회수율 및 내부표준물질(사용된 경우) 회수율 정도는 일정해야 한다. 회수율 평가는 여러 농도, 일반적으로 3개 농도(저, 중, 고)로 추출된 검체의 분석결과를 비교하여 실시하는 것을 권고한다.

7.4 최소 요구 희석(Minimum Required Dilution, MRD)

최소 요구 희석(MRD)은 리간드 결합 분석을 사용한 분석에서 배경신호 또는 생체시료 간섭을 감소시키기 위해 완충액으로 희석한 검체에 적용한 희석배율이다. 최소 요구 희석은 검량선용 표준시료 및 품질관리시료를 포함한 모든 검체에 동일해야 하며 시험법 개발 중 결정되어야 한다. 만약 최소 요구 희석을 시험법 확립 후 변경한다면, 부분 밸리데이션이 필요하다. 최소 요구 희석은 분석법 밸리데이션 보고서에서 정의되어야 한다.

7.5 상업용 및 진단용 키트

상업용 또는 진단용 키트(이하 키트)는 때때로 현장 의료 환자 진단을 위해 신약(화학의약품, 생물의약품) 개발과 동시에 개발되기도 한다. 이 가이드라인의 본 항에서는 현장 의료 환자 진단을 목적으로 한 키트 개발에 적용하지 않는다.(예, 동반 또는 무료 진단키트) 이러한 키트 개발에 대한 규제적 요구사항에 대한 적절한 가이드라인 문서를 참조한다.

신청자가 키트의 용도를 변경하거나(새로운 정량법 개발 대신), 신약 개발 중 화학의약품 또는 생물의약품 농도를 측정하기 위해 “연구용으로만 사용”하는 키트를 활용하는 경우, 신청자는 이 가이드라인에서 서술된 의약품 개발 기준을 준수하도록 키트 밸리데이션을 평가해야 한다.

키트 정량법을 위한 밸리데이션 고려사항은 다음의 사항을 포함하나 이에 국한되지 않는다.:

- 키트 내 표준품이 시험검체의 대상물질과 다른 경우, 시험은 키트 시약의 정량

성능차이를 평가해야 한다. 정량법의 특이성, 정확성, 정밀성, 안정성은 시료 분석을 수행하는 시설에서 실제 사용조건 하에 입증되어야 한다. 키트 전처리 방법의 수정은 완전히 밸리데이션 되어야 한다.

- 많지 않은 검량선용 표준시료를 사용하는 키트(예, 1개 또는 2개 시점의 검량선)는 검량선 범위를 충분한 수로 포함하는 검량선용 표준시료로 검량선을 작성하여 자체적으로 밸리데이션을 실시하여야 한다.

- 실제 품질관리시료 농도를 알고 있어야 한다. 범위로 표현된 품질관리시료 농도는 정량 목적으로 사용하기에 충분하지 않다. 이러한 경우 알려진 농도의 품질관리시료는 키트로 제공된 품질관리시료와 독립적으로 조제하고 사용되어야 한다.

- 검량선용 표준시료와 품질관리시료는 시험검체와 동일한 생체시료를 사용하여야 한다. 키트에 있는 검량선용 표준시료와 품질관리시료가 시험검체의 생체시료와 상이할 경우, 타당성이 제시되어야하고, 적절한 시험이 실시되어야 한다.

- 여러 키트 로트가 한 시험 내 사용된다면, 이 키트 내 포함된 모든 중요시약에 대해 로트 간 변동성 및 비교 평가가 이루어져야 한다.

- 여러 정량판을 사용하는 키트를 적용할 경우, 분석의 정확성을 모니터링하기 위해 각 판마다 충분한 반복 품질관리시료를 사용해야 한다. 허용기준은 개별 판 및 전체 분석단위에 대해 확립되어야 한다.

7.6 신규 또는 대체기술

의약품 개발 개시 시점부터 신규 또는 대체 기술을 적용한 생체시료 분석 기술이 오직 그 물질에 대해서만 사용되는 경우, 기존 분석방법과 교차 밸리데이션이 요구되지 않는다.

의약품 개발을 위한 2개의 다른 생체시료분석 기술 사용은 해석이 어려울 수 있는 동일 제품에 대한 자료를 생성할 수 있다. 이 결과는 한 플랫폼에서 생성된 의약품 농도가 다른 플랫폼에서 얻은 농도와 다를 때 발생할 수 있다. 따라서, 의약품 개발에 사용된 이전 플랫폼을 신규 또는 대체 분석법 플랫폼으로 대체할 때, 잠재적인 차이를 잘 이해하는 것이 중요하다. 이전 플랫폼/기술로 생성된 자료는 신규 또는 대체 플랫폼/기술로 생성된 자료와 교차 밸리데이션해야 한다. 의약품 개발 초기단계 부터 규제당국과 논의할 것을 권장된다. 비교 생체이용률/생동성시험 내에서 2개의 시험법

또는 기술을 사용하는 것은 강력하게 권장되지 않는다.

규제대상인 생체시료 분석 시 신규기술 사용은 사전에 수립된 분석법 개발 및 밸리데이션으로 검증된 허용기준 의해 뒷받침되어야 한다.

7.6.1 건조 생체시료 방법(Dried Matrix Methods, DMM)

건조 생체시료 방법은 의약품 분석을 위한 마이크로샘플링 기술로서 혈액검체의 부피를 감소시켜 시료 수집, 보관 및 수송 용이와 같은 이득을 제공하는 검체채취 방법이다. LC-MS 또는 리간드 결합 분석을 위한 일반적인 밸리데이션 방법과 더불어, 건조 생체시료 방법 사용은 규제신청을 뒷받침하는 시험에서 건조 생체시료 방법 사용 전에 이러한 검체채취 접근법에 대한 추가적인 밸리데이션이 필수적이다. 예를 들면:

- 헤마토크리트 (특히 검사지 카드 내로 전혈을 찍는 경우)
- 검체의 균질성(특히 검사지 카드/장치의 검체의 서브펀치(sub-punch)의 경우)
- 건조 생체시료로부터 검체 추출
- 검제검증분석을 위한 건조 생체시료 방법 검체 수집
    - 충분한 양의 검체 용량 또는 반복 시료 수가 검체검증분석을 위해 수집되도록 주의를 기울어야 한다.
    - 검체시료 채취 시 여러 펀치를 사용하거나, 반복하여 채취해서 평가도록 한다.

동일한 임상시험 또는 비임상시험 내에서 건조 생체시료 방법이 일반적인 액체 시료방식(예, 액상 혈장 검체)과 같이 사용될 경우, 이러한 두 개의 방법은 서술된 바와 같이 교차 밸리데이션 되어야 한다.(6.2항 참조) 비임상 독성동태 시험의 경우, ICH S3A Q&A의 4.1항을 참조한다. 의약품 개발 초기단계 부터 규제당국과 논의할 것을 권장된다.

8. 문서화

일반적이고 구체적인 표준작업지침서 및 우수한 기록 관리는 적절히 밸리데이션된 분석법에 필수요소이다. 생체시료 분석법 밸리데이션을 위해 생성된 자료는 문서화되어야 하고 자료 점검(audit) 및 실태조사를 위해 이용가능해야 한다. 표 1에는 규제당국 제출을 위해 권고되는 문서화 및 실태조사 때 분석기관에서 이용가능해야

하는 문서화에 대해 서술하고 있다. 이러한 기록문서는 분석기관 또는 다른 보안장소에 보관할 수 있다. 이러한 경우 기록문서는 요청 시 즉시 이용가능해야 한다.

실시 및 보고된 시험의 재구성에 필요한 모든 관련 기록문서는 보안환경에서 유지되어야 한다. 관련 기록문서는 기초자료, 계획서 및 보고서, 절차적, 운영적, 환경적 우려사항을 뒷받침하는 기록, 모든 관련된 구성원 간 소통기록이 포함되며, 이에 국한되지는 않는다.

문서화 방식에 관련없이(즉, 서면 또는 전자), 기록은 해당사항에 대해 현행화가 되어야 하고, 사후 대체한 기록들이 원자료를 모호하게 해서는 안된다. 자료의 변경 또는 재가공의 근거는 충분한 설명이 문서화되어야 하고, 원본 기록이 유지되어야 한다.

8.1 요약정보

요약정보는 의약품 국제공통기술문서(CTD 또는 eCTD)의 2.6.4/2.7.1 항 또는 보고서 내 다음의 항목을 포함해야 한다.

- 각각의 시험에 사용된 분석법의 요약설명이 포함되어야 한다. 각각의 요약은 분석법 제목, 분석법 식별코드, 분석 유형, 정량법 식별코드, 생체시료 분석법 보고서 코드, 시험법 유효일자, 관련 밸리데이션 보고서 코드를 제공해야 한다.
- 모든 관련 밸리데이션 보고서의 요약표는 부분 밸리데이션 및 교차 밸리데이션 보고서를 포함하여 각각의 분석물질에 대해 제공되어야 한다. 표는 분석법 식별코드, 분석 유형, 신규 시험법 또는 추가 밸리데이션 사유 (예, 정량한계를 더 낮추는 것)를 포함해야 하다. 시험법 변경은 명확히 확인되어야 한다.
- 분석법, 밸리데이션 보고서, 생체시료 분석법 보고서에 대해 다른 코드를 갖고 있는 경우, 여러 식별코드를 교차 참조하는 요약표가 제공되어야 한다.
- 분석법 변경 고찰(예, 분석법 개선, 개정 사유, 특이사항)
- 비교 생체이용률/생동성시험에 대한 각 분석기관의 최근 3년 및 시험 완료 후 1년간 규제기관 실태조사 실시일자 및 결과를 포함한 목록

8.2 밸리데이션 및 생체시료 분석법 보고서 문서화

표 1은 밸리데이션 및 생체시료 분석법 보고서를 위해 권고되는 문서화를 기술한다.

표 1. 문서화 및 보고

항목	분석기관에 보관되는 문서	밸리데이션 보고서*	생체시료 분석법 보고서*
크로마토그래프 시스템 적합성	• 시스템적합성 시험 날짜, 시간 및 사용된 검체	• 해당없음	• 해당없음
요약 분석법 발전 개요	• 이력/분석법 변경(예, 가능하다면 개정 설명, 근거자료 및 특이사항)	• 해당없음	• 해당없음
표준품	• 품질을 보증하기 위한(순도 포함) 시험성적서 또는 이와 동등한 수준의 대체 문서, 안정성/사용기간/재시험 날짜, 배치번호, 제조업체 또는 공급원 • 입고, 사용, 보관조건 기록 • 사용기간이 경과된 경우, 재발행된 시험성적서 또는 재시험 날짜로 품질 및 확인 재시험	• 배치/로트번호, 품질(순도 포함), 보관조건, 사용기간/재시험 날짜를 포함한 시험성적서 사본 또는 이와 동등한 수준의 대체 문서, 또는 이러한 정보를 포함한 표 • 사용기간이 경과된 경우, 사용시점에서 품질 및 안정성, 재시험 날짜, 재시험값	• 배치/로트번호, 품질(순도 포함), 보관조건, 사용기간/재시험 날짜를 포함한 시험성적서 사본 또는 이와 동등한 수준의 대체 문서, 또는 이러한 정보를 포함한 표 • 사용기간이 경과된 경우, 사용시점에서 품질 및 안정성, 재시험 날짜, 재시험값
내부표준물질	• 내부표준물질 품질 또는 적합성 입증 • 입고, 사용, 보관조건 기록	• 시약 및 표준품 명칭 • 기원	• 시약 및 표준품 명칭 • 기원

항목	분석기관에 보관되는 문서	밸리데이션 보고서*	생체시료 분석법 보고서*
필수 시약	• 시약 명칭 • 배치/로트번호 • 공급원/기원 • 가능하다면, 농도 • 재시험 날짜 (사용기간) • 보관조건	• 시약 명칭 • 배치/로트번호 • 공급원/기원 • 가능하다면, 농도 • 재시험 날짜 (사용기간) • 보관조건	• 시약 명칭 • 배치/로트번호 • 공급원/기원 • 가능하다면, 농도 • 재시험 날짜 (사용기간) • 보관조건
표준원액/표준용액	• 조제 기록 및 표준원액/표준용액 사용 기록 • 보관장소 및 보관조건	• 원액/용액이 안정성 기간내 사용되었다는 기록 • 표준원액/표준용액 용액 안정성 • 보관조건	• 원액/용액이 안정성 기간내 사용되었다는 기록 • 표준원액/표준용액 용액 안정성† • 보관조건†
공생체시료	• 생체시료 종류, 로트번호, 입고일자, 보관조건, 기원/공급원	• 종류, 로트번호, 입고일자	• 종류, 로트번호, 입고일자† †
검량선용 표준시료 및 품질관리시료	• 조제 기록 및 일자 • 보관 온도의 기록(입고/불출 기록, 분석자, 온도, 냉동고)	• 생체시료를 포함한 조제 성상 • 배치번호, 조제일자 및 안정성기간 • 보관조건(온도, 일자, 기간 등)	• 조제 성상† • 조제일자 및 안정성기간 • 보관조건†

항목	분석기관에 보관되는 문서	밸리데이션 보고서*	생체시료 분석법 보고서*
표준작업지침서(SOP; 절차)	다음과 같은 분석의 보든 측면을 위한 절차; • 방법/절차(밸리데이션/분석) • 허용기준(예, 분석단위, 검량선, 품질관리시료) • 기기 장치 • 재분석 • 검체검증분석 • SOP 변경기록(변경, 날짜, 사유 등)	• 분석법 절차 상세 서술	• 분석을 위해 사용된 절차/분석계획서 목록
검체 추적	• 시험검체 입고, 입고 조건 • 검체가 어떻게 운송되고 입고되었는지를 가리키는 기록. 검체 목록 및 상실된 시료 • 보관장소(예, 냉동고 단위) • 품질관리시료, 검량선용 표준시료, 시험검체를 위한 추적 일지 • 품질관리시료, 검량선용 표준시료, 시험검체의 입고 및 반출을 위한 냉동고 일지	• 해당없음	**모든 시험에 대한:** • 검체의 송장번호 입고일 • 검체의 입고조건 • 분석기관 보관조건 및 보관위치 • 보관 : 검체수집부터 분석까지 총 기간 • 계획된 보관조건으로부터 모든 일탈 목록 및 잠재적 영향 **추가적으로, 비교 생체이용률/생동성시험의 경우 다음도 포함:** • 시험대상자 ID

항목	분석기관에 보관되는 문서	밸리데이션 보고서*	생체시료 분석법 보고서*
분석	• 크로마토그래프에 대한 시스템적합성 확인을 위한 문서화 및 자료 • 각각의 분석단위에 대한 분석일자를 포함한 기기 사용일지 • 추출일자를 포함한, 각각의 분석단위에 대한 검량선용 표준시료, 품질관리시료, 시험검체의 전처리 문서화를 포함한 시료 추출 일지 • 각각의 분석단위에서 품질관리시료, 검량선용 표준시료 로트, 시험검체 확인 • 기기 설정 및 유지 기록 • 실험실정보관리시스템(Laboratory information management system, LIMS) • 다음을 위한 문서화 및 자료를 포함한, 밸리데이션 정보 - 선택성, 특이성, 민감성, 정밀성 및 정확성, 캐리오버, 희석, 회수율, 생체시료효과 - 단기안정성, 냉해동안정성, 장기안정성, 추출안정성, 표준원액 안정성 - 필요시, 교차/부분 밸리데이션	**모든 시험에 대한:** • 모든 분석단위에 대한 표(실패한 분석단위 포함) 및 분석일자 • 검량선용 표준시료 농도 표 및 정확성 및 정밀성에 대한 모든 적합한 분석단위의 반응함수 결과(검량선 매개변수) 표 • 품질관리시료 및 검량선용 표준시료의 시험 내 및 시험 간 분석단위 결과표(정확성 및 정밀성 분석단위로부터). 허용기준을 벗어난 값은 명확하게 표시해야 함. • 리간드 결합 분석의 경우 총 오차 포함 • 선택성, 특이성, 희석 선형, 민감성(LLOQ), 캐리오버, 회수율, 단기안정성, 냉해동안정성, 장기안정성, 추출안정성, 표준원액 안정성 • 필요시, 부분/교차 밸리데이션 • 존재할 경우, 추가 밸리데이션을 위한 별도 보고서 첨부 **추가적으로, 비교 생체이용률/생동성시험의 경우 다음도 포함:** • 비교 생체이용률/생동성시험에서 각각의 분석단위를 위한 기기 ID† • 적합 및 실패한 분석단위의 100% 요약표	**모든 시험에 대한:** • 모든 분석단위, 결과(적합 및 부적합), 부적합 사유, 분석일자 표 • 검량선용 표준시료 농도 표 및 정확성 및 정밀성에 대한 모든 적합한 분석단위의 반응함수 결과(검량선 매개변수) • 품질관리시료의 전체(시험 간) 정확성 및 정밀성 결과에 대한 모든 적합한 분석단위의 품질관리시료 결과표 및 적합한 분석단위로부터의 시험 간 정확성 및 정밀성 결과 • 재주입 분석단위의 결과와 함께 재주입 분석단위 표 및 재주입 사유 • 품질관리시료 그래프 경향 분석 권장 • 시험 농도 결과표 **추가적으로, 비교 생체이용률/생동성시험의 경우 다음도 포함:** • 비교 생체이용률/생동성시험에서 각각의 분석단위를 위한 기기 ID† • 부적합한 분석단위를 포함한 각각의 분석단위를 위한 내부표준물질 도표 • 적합 및 부적합한 분석단위의 100% 요약표

항목	분석기관에 보관되는 문서	밸리데이션 보고서*	생체시료 분석법 보고서*
크로마토그램 및 재적분	• 전자적 기록 점검 추적시스템 (audit trail) • 적합 또는 부적합한 분석단위의 최초 및 재적분 e-크로마토그램 100% • 재적분 사유 • 적합 및 부적합 분석단위의 재적분 유형에 대한 100% 요약표로 검량선, 회귀분석, 가중치 함수, 분석물질 및 내부표준물질 반응 및 머무름시간, 반응 비(ratio), 적분 유형을 포함	**모든 시험에 대한:** • 대표 크로마토그램(최초 및 재적분) • 재적분 사유 • 크로마토그램은 첨부로 제출될 수 있음 **추가적으로, 비교 생체이용률/생동성시험의 경우 다음도 포함:** • 적합 및 부적합 분석단위의 최초 및 재적분 100% 크로마토그램 • 적합 및 부적합 분석단위의 100% 요약표	**모든 시험에 대한:** • 크로마토그램은 첨부로 제출될 수 있음 • 비교 생체이용률/생동성 외 시험의 경우, 신청서류 내 제출된 검체의 5%에서 무작위적으로 선택 • 재적분 사유 • 수동 재적분한 크로마토그램 확인 및 고찰 • 해당되는 경우, 재적분 SOP **추가적으로, 비교 생체이용률/생동성시험의 경우 다음도 포함:** • 100% 크로마토그램 • 최초 및 재적분 크로마토그램과 초기 및 반복 적분 결과 • 적합 및 부적합 분석단위의 100% 요약표

항목	분석기관에 보관되는 문서	밸리데이션 보고서*	생체시료 분석법 보고서*
절차 일탈	• 일탈/예측하지 못한 상황 발생 시점에 기록된 문서 • 예측하지 못한 상황 조사 • 영향 평가	• 일탈 기술 • 시험 결과에 대한 영향 • 주요한 조사의 서술 및 근거자료	• 일탈 기술 • 시험 결과에 대한 영향 • 주요한 조사의 서술 및 근거자료
재분석/반복 분석	• 재분석/반복분석 수행 절차(재분석 사유 정의 등) • 100% 반복/재분석 자료 • 반복 분석 실시 당시 시점에 기록된 문서	• 해당없음	**모든 시험에 대한** • 검체 ID 표, 반복분석 사유, 최초 및 반복분석 값, 보고된 값에 대한 사유, 분석단위 ID **추가적으로, 비교 생체이용률/생동성시험의 경우 다음도 포함:** • 비교 생체이용률/생동성시험에서 부적합 분석단위의 값은 별도 표에 포함되어야 함.
검체검증분석	• 검체검증분석 절차 • 검체검증분석 자료 : 분석단위 ID, 분석단위 요약시트, 크로마토그램 또는 다른 전자기기 자료 파일 • 발생한 경우, 문서 검체검증분석 실패 조사	• 해당없음	• 검체검증분석 자료 표(최초 및 재분석값 및 분석단위 ID, 백분율 차이, 적합율) • 발생한 경우, 검체검증분석 실패 조사† †

항목	분석기관에 보관되는 문서	밸리데이션 보고서*	생체시료 분석법 보고서*
상호소통	• 시험/시험법에 참여한 당사자 간 소통 (신청자, 임상시험위탁기관(contract research organizations, CRO), 컨설턴트)	• 해당없음	• 해당없음
점검 및 실태조사	• 점검 및 실태조사 증거	• 해당없음/eCTD에 포함된 요약정보를 위해 8.1항 참조	• 해당없음/eCTD에 포함된 요약정보를 위해 8.1항 참조

* 신청자는 밸리데이션 및 생체시료 분석법 보고서 내 제출된 요약자료를 뒷받침하기 위해 분석기관에서 자료를 유지해야 할 것이다. 밸리데이션 및 생체시료 분석법 보고서는 신청 시 제출되어야 한다.

† 밸리데이션 보고서에 첨부하거나 연결할 수 있음.

† † 밸리데이션 보고서 또는 생체시료 분석법 보고서로 제출

9. 용어 정의

정확성(Accuracy) :

설정한 조건에서(또는 특정 방법으로 측정)에서 측정값이 이론값 또는 알려진 참값에서 근접한 정도. 본 가이드라인에서 정확성은 이론값의 백분율로 표현된다.
정확성(%) = (측정값/이론값) × 100

분석(Analysis) :

시료 전처리/희석에서부터 분석기기 측정까지의 일련의 분석 절차

분석물질(Analyte) :

생체시료 내 측정대상이 되는 특정 화학 성분으로, 모약물, 생물학적 분자물질 또는 그 유도체 또는 대사체들을 포함함

분석단위(Analytical Run, Run으로도 불림) :

밸리데이션을 위해 적절한 수의 검량선용 표준시료 및 품질관리시료로 구성된 분석시료 및 시험검체의 완전한 세트. 몇몇 분석단위들은 하루 만에 분석이 완료될 수 있거나 한 분석단위가 수일에 거쳐 분석이 완료될 수 있다.

고정 검량선용 표준시료(Anchor Calibration Standards)/고정점(Anchor Points) :

검량선의 최저정량한계(LLOQ) 또는 최고정량한계(ULOQ) 농도로 첨가된 시료 세트 및 리간드 결합 분석에서 곡선을 적절히 들어맞게 하기 위해 분석되는 시료 세트

배치(Batch) (생체시료분석용) :

한 배치는 균일한 조건 하에서 동일 시약으로 동일 분석자(군)에서 고정된 기간 동안 처리되며, 품질관리시료 및 검체시료로 구성되며, 공시료, 영시료 및 검량선용 표준시료가 포함될 수도 있다.

배치(Batch) (표준품 및 시약) :

하나의 공정 또는 일련의 공정들에서 생산된 특정 양의 물질로, 정해진 기준 범위 내에서 균질할 것으로 예상함. “로트(Lot)”라고도 불린다.

편향(Bias) :

모수의 값을 너무 많게 또는 적게 예측하는 측정 과정의 경향

생체시료 분석법(Bioanalytical Method) :

생체시료 내에서 분석물질을 정량적으로 측정하는 데 사용되는 분석 방법

생물의약품(Biological Drugs) :

살아있는 유기체 또는 세포로 만든 의약품 (예, 단백질 의약품)

생체시료(Biological Matrix) :

혈액, 혈청, 혈장 및 뇨 등을 포함하는 생체 물질로, 이외에도 있을 수 있음

결합시약(Binding Reagent) :

리간드 결합 분석에 기초한 생체시료 분석법에서 분석물질과 결합하는 시약

공시료(Blank Sample) :

분석물질, 내부표준물질 및 추가적인 대체 시료 또는 완충액이 첨가되지 않은 생체시료 검체

검량선(Calibration Curve) :

주어진 범위 내에서 검량선 표준시료들 내에서의 기기 반응(예, 피크면적, 높이 또는 신호)과 분석물질 농도(양)과의 관계. 표준곡선(Standard Curve)이라고도 불린다.

검량선 범위(Calibration Range) :

검량선용 표준시료들 내에의 분석물질의 상한 및 하한 농도(양) 간의 간격(해당 농도들 포함)

검량선용 표준시료(Calibration Standard) :

알려진 양의 분석물질을 첨가하여 스파이크한 시료. 검량선용 표준시료는 검량선을 작성하는 데 사용된다.

캐리오버(Carry-over) :

시료에 이전 시료의 분석물질 신호가 나타나는 것

화학의약품(Chemical Drugs) :

화학적으로 합성된 의약품

필수 시약(Critical Reagent) :

정량 결과에 직접 영향을 미치는 결합 시약들(예, 항체, 결합단백질, 펩타이드) 및 효소 성분들을 포함한 리간드 결합 분석(LBA)을 위한 필수 시약들

교차 벨리데이션(Cross validation) :

보고된 결과가 유사한지 여부를 결정하기 위해 다른 실험실에서 사용한 동일한 생체시료 분석법 또는 두 개의 생체시료 분석법 간 잠재적인 편향을 평가하는 것

희석의 타당성(Dilution integrity) :

시료 희석 절차가 분석물질 농도 측정에 영향을 미치지 않음을 평가하는 것

희석 선형성(Dilution Linearity) :

리간드 결합 분석(LBA)의 경우 프로존(prozone) 효과(후크 효과)의 영향 없이 검량선의 최고정량한계(ULOQ)를 초과하는 농도에서 시료를 적절히 분석할 수 있으며, 측정된 농도가 검량선 범위 내에서 희석에 영향을 받지 않음을 입증하는 매개변수

희석배율(Dilution Factor) :

시료가 희석되는 정도

전체 밸리데이션(Full Validation) :

시험검체 분석에 적용하는 분석법의 타당성을 보장하기 위해 모든 밸리데이션 항목을 평가하는 것

후크 효과(Hook Effect) :

특정 분석물질이 매우 고농도로 존재 시 반응이 억제되는 현상. 후크 효과는 결합 시약과 분석물질간의 반응이 액체상 반응단계가 이루어지는 리간드 결합 분석에서 발생할 수 있다. 프로존 효과(prozone effect)로도 불린다.

검체(Incurred Sample) :

시험대상자 또는 시험동물로부터 확보한 시료

검체검증분석(Incurred Sample Reanalysis, ISR) :

최초 분석 결과의 재현성 여부를 확인하기 위해 다른 날짜에 별도의 분석단위로 실시

하여 검체 중 일부를 재분석하는 것.

간섭물질(Interfering Substance) :

분석물질의 정량에 영향을 줄수 있는 생체시료 내 존재하는 물질

내부표준물질(Internal Standard, IS) :

목표 분석물질을 정량하기 위해 이미 알고 있는 일정 농도로 검량선용 표준시료, 품질관리시료, 시험검체에 첨가하는 구조적 유사체 또는 안정된 동위원소로 표지된 화합물

리간드 결합 분석(Ligand Binding Assay, LBA) :

분석물질에 특이적으로 결합하는 시약을 사용하여 해당 분석물질을 분석하는 방법. 분석물질은 예를 들어 효소, 방사선동위원소, 형광물질 또는 발색단으로 표지된 시약들을 사용하여 검출한다. 반응은 미량정량판(microtitre plate), 시험관, 디스크 등에서 수행한다.

최저정량한계(Lower Limit of Quantification, LLOQ) :

미리 정의된 정밀성 및 정확성을 갖춘 방법을 사용하여 정량적으로 확인할 수 있는 시료 내 분석물질의 최저량

생체시료효과(Matrix Effect) :

시료 내에서 의도되지 않은 분석물질 또는 다른 간섭물질 존재로 인해 반응 시 직접적 또는 간접적인 변화 또는 간섭이 발생하는 것.

최소요구희석(Minimum Required Dilution, MRD) :

리간드 결합 분석(LBA) 분석을 위해 완충액으로 희석되는 생체시료의 초기 희석배율. MRD는 최종 희석일 필요는 없으나 검량선용 표준시료 및 품질관리시료를 포함한 모든 검체에서 동일해야 한다. 그러나 시료들은 추가희석이 필요할 수 있다.

이론농도(Nominal Concentration) :

이론적 또는 예상 농도

평행성(Parallelism) :

평행성은 순차적으로 희석된 시험검체 반응 곡선이 검량선과 평행함을 증명한다. 평행성은 잠재적인 생체시료효과를 감지할 수 있는 수행 능력이다.

부분 밸리데이션(Partial Validation) :

선택한 밸리데이션 일부 항목 평가를 기반으로 실시하는 밸리데이션

이미 전체 밸리데이션된 분석법에서 변경된 분석법에 대해 적용한다.

정밀성(Precision) :

일련의 측정값 간의 근접 정도(즉, 분산정도). 정밀성은 변동계수(CV) 또는 상대표준편차(RSD)로 표시되며 백분율로 기재됩니다.

CV(%) = (표준편차/평균) x 100

전처리시료(Processed Sample) :

다양한 조작(예. 추출, 희석, 농축)을 거친 최종 시료

품질관리시료(Quality Control Sample, QC) :

알고있는 양의 분석물질을 생체시료에 스파이크한 시료로서, 생체시료 분석법의 분석능을 모니터링하고 각각의 배치 또는 분석단위에서 분석된 미지 농도의 생체시료에 대한 결과가 완전성 및 타당성이 있음을 평가하기 위하여 사용하는 시료

재분석(Reanalysis) :

이전에 정량분석한 검체의 추가 평가. 반복분석(Repeat Analysis)로도 불린다.

회수율(Recovery) :

분석 전처리 과정의 추출 효율을 의미하며, 분석방법의 시료 추출 및 전처리 단계를 통해 처리된 분석물질의 알려진 양의 백분율로 표시한다.

표준품(Reference Standard) :

검량선용 표준시료 및 품질관리시료 조제 시 사용하는 성분으로, 순도를 알고 확인되어 특성이 잘 분석된 성분

재적분(Reintegration) :

크로마토그램 피크의 원래 적분을 변경하는 것

반복(Replicate) :

한 시험검체, 검량선용 표준시료 또는 품질관리시료에 대한 여러번 확인 또는 측정한 것들 중의 하나

재현성(Reproducibility) :

시험을 반복할 때 얻은 일관된 결과의 정도

반응함수(Response Function) :

검량선용 표준시료 내 분석물질의 농도(양)과 기기반응(예, 피크면적 또는 높이비율 또는 신호) 간 상관관계에 대한 적절한 수학적 표현. 반응함수는 주어진 검량선 범위 내에서 결정된다. 검량선(Calibration Curve) 참조

분석단위 요약표(Run Summary Table) :

분석단위 내 개별 시험검체, 품질관리시료, 검량선용 표준시료로부터 얻은 모든 데이터의 결과표 (예, 크로마토그래피 머무름시간, 분석물질 및 내부표준물질 반응, 농도, 만약에 있다면 희석배율; 리간드 결합 분석의 경우 분석물질의 반응농도, 희석배율)

선택성(Selectivity) :

생체 시료 내 간섭물질이 존재(비특이적 간섭)하는 분석물질을 구분하고 측정하기 위한 분석능력

감도(Sensitivity) :

허용가능한 정확성 및 정밀성으로 측정할 수 있는 분석물질 최저농도(즉, 최저정량한계(LLOQ))

특이성(Specificity) :

관련물질(예, 분석물질과 구조적으로 유사한 성분, 대사체, 이성체, 불순물 또는 병용약물)들을 포함한 다른 물질들로부터 분석물질을 검출하고 구분하는 분석능력

안정성(Stability) :

주어진 시간 간격으로 출발물질을 기준으로 특정 보관 및 사용조건 하에서 주어진 생체시료 내 분석물질의 온전성(분해되지 않음)을 측정하는 것

표준곡선(Standard Curve) :

주어진 범위 내에서 검량선 표준시료들 내에서의 기기 반응(예, 피크면적, 높이 또는 신호)과 분석물질 농도(양)과의 관계. 검량선(Calibration Curve)라고도 불린다.

표준작업지침서(Standard Operating Procedure, SOP) :

특정 역할 수행의 통일성을 기하기 위해 상세히 기술된 지시서

표준원액(Stock Solution) :

알고 있는 농도로 분석물질이 있는 단일용매 또는 혼합용매로, 검량선용 표준시료 또는 품질관리시료 조제를 위해 사용함

시험검체(Study samples) :

비임상시험 또는 임상시험에 등록된 동물 또는 시험대상자의 검체

대체 생체시료(Surrogate Matrix) :

시험검체 시료를 구하기 어렵거나(예, 조직, 뇌척수액, 담즙), 내인성 간섭물질을 함유한 경우 대체하여 사용하는 시료

시스템 적합성(System Suitability) :

조제 및 스파이크한 검체의 분석을 통해 기기 성능(예, 신호 대 잡음(signal-to-noise) 비율, 피크형태, 머무름시간)을 확인하는 것으로 분석단위 측정 전에 실시하며, 검체 분석에 포함되지 않는다.

총 오차(Total Error) :

정확성(%) 및 정밀성(%) 오차에 대한 절대값의 합. 총 오차는 오차 백분율(%)로 보고된다.

최고정량한계(Upper Limit of Quantification, ULOQ) :

미리 정의된 정밀성 및 정확성으로 정량적으로 확인할 수 있는 시료 내 분석물질의 최대량

밸리데이션(Validation) :

생체시료 분석법이 의도한 목적에 적합한지 증명하는 것

표준용액(Working Solution) :

표준원액을 적절한 용매에 희석하여 조제된, 생체시료가 미포함된 용액

주로 검량선용 표준시료 및 품질관리시료를 조제하기 위해 생체시료에 첨가된다.

영시료(Zero Sample) :

공시료에 내부표준물질을 스파이크한 시료

본 가이드라인은 생체시료 분석법 밸리데이션 및 시험검체 분석에 대한 일반적인 사항을 제시한 것으로 의약품국제조화회의(ICH) 'Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis (M10)'을 참조하였고, 원 ICH 자료에서 변경된 사항이 있다는 사실 및 수정된 자료/번역본은 ICH 운영위원회가 승인하거나 지원하지 않았기 때문에 해당 자료는 공식적인 ICH 자료로 간주되지 않습니다.

생체시료 분석법 밸리데이션 및 시험검체 분석 가이드라인 [민원인 안내서]

발 행 일 2023년 10월 26일

발 행 인 박 윤 주

편 집 위 원 장 김 영 림

편 집 위 원 (의약품심사부 약효동등성과)
김소희, 이경신, 변정아, 안충열, 최미섭, 이은선, 김성민, 현양진, 하성진, 신보람, 김숙진, 윤은주, 정세희, 나금경, 백지영, 이하나, 한희선, 윤한나, 이주현, 강진아, 전민혜, 박인혜, 김지선, 이한나, 김산하, 정세영, 유정은, 한초연

발 행 처 식품의약품안전평가원 의약품심사부 약효동등성과