

Evaluation of Internal Standard Responses During Chromatographic Bioanalysis: Questions and Answers

Guidance for Industry

크로마토그래피 바이오 분석 시의 내부 표준품 반응 평가:

Q&A

U.S. Department of Health and Human Services
Food and Drug Administration
Center for Drug Evaluation and Research (CDER)

September 2019
Biopharmaceutics

Evaluation of Internal Standard Responses During Chromatographic Bioanalysis: Questions and Answers

Guidance for Industry

크로마토그래피 바이오 분석 시의 내부 표준품 반응 평가:

Q&A

Additional copies are available from:

Office of Communications, Division of Drug Information

Center for Drug Evaluation and Research

Food and Drug Administration

10001 New Hampshire Ave., Hillandale Bldg., 4th Floor

Silver Spring, MD 20993-0002

Phone: 855-543-3784 or 301-796-3400; Fax: 301-431-6353

Email: druginfo@fda.hhs.gov

<https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>

**U.S. Department of Health and Human Services
Food and Drug Administration
Center for Drug Evaluation and Research (CDER)**

**September 2019
Biopharmaceutics**

[목차]

I. 서론(INTRODUCTION)

II. 질문/답변(QUESTIONS AND ANSWERS)

gmpeye

Evaluation of Internal Standard Responses During Chromatographic Bioanalysis: Questions and Answers Guidance for Industry¹

This guidance represents the current thinking of the Food and Drug Administration (FDA or Agency) on this topic. It does not establish any rights for any person and is not binding on FDA or the public. You can use an alternative approach if it satisfies the requirements of the applicable statutes and regulations. To discuss an alternative approach, contact the FDA office responsible for this guidance as listed on the title page.

이 가이드 문서는 이 주제에 대한 FDA의 방침을 제시한다. 이 문서는 어느 누구에게 일체의 권리를 부여하지 않으며 FDA 또는 일반 대중을 구속하지도 않는다. 관련 법규에 제시된 기준을 만족시킬 수 있는 다른 방법이 있다면, 그 방법을 활용할 수도 있다. 다른 방법을 협의하고자 한다면, 이 문서의 표지에 기재된 FDA 담당자에게 문의한다.

I. 서론(INTRODUCTION)

This guidance provides recommendations to sponsors, applicants, and contract research organizations regarding internal standard (IS) response² variability in

¹ This guidance has been prepared by the Office of Study Integrity and Surveillance, the Office of Generic Drugs, and the Office of Clinical Pharmacology in the Center for Drug Evaluation and Research at the Food and Drug Administration. You may submit comments on this guidance at any time. Submit comments to Docket No. FDA-2017-D-6821 (available at <https://www.regulations.gov/docket?D=FDA-2017-D-6821>). See the instructions in that docket for submitting comments on this and other Level 2 guidances.

FDA CDER의 OSIS, OGD, OCP가 이 가이드 문서를 만들었다. 이 가이드 문서에 대한 의견을 언제든지 제출할 수 있다. 의견 제출처: Docket No. FDA-2017-D-6821 (<https://www.regulations.gov/docket?D=FDA-2017-D-6821>). 이 문서와 다른 레벨 2 가이드 문서에 대한 의견 제출 방법은, 이 의견 제출처에 공개된 제출 절차를 참조한다.

² An IS response is a measurement of the signal from the IS, which is typically

chromatographic analytical data submitted in investigational new drug applications, new drug applications, abbreviated new drug applications, biologics license applications, and supplements. Chromatographic analytical methods are commonly used to quantitate analyte concentrations in samples from nonclinical and clinical studies to support regulatory submissions. Depending upon its source, IS response variability may impact the accuracy of analyte concentration measurements. This question and answer (Q&A) document provides the Agency's current thinking on IS response variability and its potential impact on the accuracy of analyte concentration measurements. This Q&A also suggests approaches to determine whether observed IS response variability is likely to impact the accuracy of the data such that further investigation into the root cause(s) is warranted.

이 가이드 문서는 IND, NDA, ANDA, BLA, 보정 문서에 포함시켜 제출하는 크로마토그래피 분석 데이터 가운데 내부 표준품(IS) 반응 변동성에 관한 권고 사항을 임상 시험 의뢰자, 신청 업체, CRO에게 제공하기 위한 것이다. 크로마토그래피 분석 방법은 규제 기관 제출 문서를 뒷받침하기 위해 실시하는 비임상 시험과 임상 시험 시에, 검체에 함유된 분석 대상 물질의 농도를 정량적으로 평가하는데 사용된다. 출처에 따라 IS 반응 변동성이 분석 대상 물질 농도 측정의 정확성에 영향을 미칠 수 있다. 이 Q&A 문서는 IS 반응 변동성과 이 변동성이 분석 대상 물질 농도 측정의 정확성에 미칠 영향에 대한 FDA의 현 방침을 제시한다. 또한 IS 반응 변동성이 데이터의 정확성에 영향을 미칠 수 있고 근본 원인에 대한 추가 조사가 필요한지 결정하는 방법도 설명한다.

In general, FDA's guidance documents do not establish legally enforceable responsibilities. Instead, guidances describe the Agency's current thinking on a topic and should be viewed only as recommendations, unless specific regulatory or statutory requirements are cited. The use of the word should in Agency guidances means that something is suggested or recommended, but not required.

FDA의 가이드 문서는 법적 강제성을 지니지 않는다. 다만 가이드 문서는 특정 주제에 대한 FDA의 생각을 기술하고 있으며, 구체적인 법적 기준이 제시되어 있지 않으면 일종의 권고 사항으로 간주한다. FDA 가이드 문서에서 "should"라는 표현은 어떤 것을 제안 또는 권고한다는 의미이지 반드시 그래야 한다는 의미는 아니다.

II. 질문/답변(QUESTIONS AND ANSWERS)

generated during liquid chromatography-mass spectrometry bioanalysis.

IS 반응은 LC-MS 바이오 분석 시에 생성되는 IS 시그널 측정 결과를 의미한다.

Q1: What are internal standards in analytical chemistry, and why are they used in bioanalysis?

분석 화학에서 내부 표준품이 무엇이고, 바이오 분석에 내부 표준품을 왜 사용하는가?

A1: In analytical chemistry, ISs are usually a structural analog or stable isotope of an analyte of interest and are commonly used in chromatographic analytical methods to correct for variability in sample processing and analysis. In chromatographic bioanalysis, an IS is added to all samples, including calibration standards (Cals), quality controls (QCs), and subject samples prior to extraction. The specific IS selected for a method should have similar physicochemical properties to the analyte of interest so that it behaves in a similar fashion to the analyte and reflects any changes to the analyte measurement that may occur during sample processing and analysis.

분석 화학에서 IS는 일반적으로 해당 분석 대상 물질의 구조적 유사체 또는 안정적인 동위체이며, 검체 처리와 분석 시의 변동성을 보정하기 위하여 크로마토그래피 분석 시에 주로 사용된다. 크로마토그래피 바이오 분석 시에 IS를 교정 표준품, QC 검체, 추출 이전의 시험 대상 검체를 포함해 모든 검체에 첨가한다. 특정 시험 용도로 선정된 IS는 해당 분석 대상 물질과 이화학적 특성이 유사하여, 분석 대상 물질과 유사한 동태를 나타내고 검체 처리와 분석 시에 발생할 가능성이 있는 분석 대상 물질 측정 과정의 변화를 반영할 수 있어야 한다.

Q2: What are sources of IS response variability?

IS 반응 변동성의 출처로는 어떤 것이 있는가?

A2: By design, the intention is to add the same amount of IS to all samples. However, variability in IS responses among samples is occasionally observed, even among samples analyzed in the same run. Potential sources of IS response variability include human errors made during sample preparation or processing, instrumental issues that may occur during analysis, and matrix effects.

모든 검체에 동일한 양의 IS를 첨가하는 것이 원래의 목적이다. 하지만 검체 사이의 IS 반응 차이가 나타나기도 한다. 동일한 조건에서 분석한 검체에서도 그러한 현상이 나타날 수 있다. IS 반응 변동성의 출처로는 검체 준비나 처리 과정의 시험자 오류, 분석 과정에서 발생하는 시험 장비 문제, 매트릭스 영향이 있다.

Q3: When is IS response variability not likely to impact the accuracy of the data?

IS 반응 변동성이 데이터의 정확성에 영향을 미치지 않는 경우는 언제인가?

A3: IS response variability is not likely to impact the accuracy of the data when the range of IS responses for subject samples is similar to the range of IS responses for Cals/QCs in the same analytical run. For example, variability in the IS responses for subject samples is not likely to impact the accuracy of the data under the following circumstances:

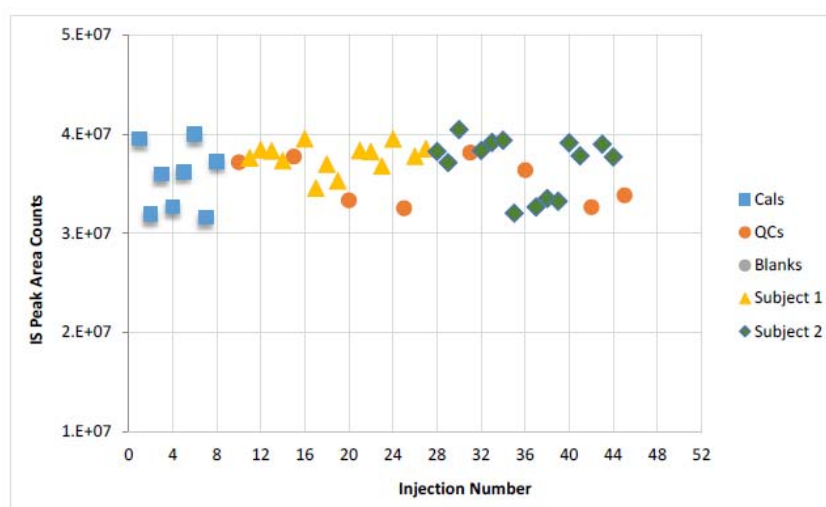
시험 대상 검체의 IS 반응 범위가 동일 분석 작업에 사용되는 Cal/QC의 IS 반응 범위와 유사한 경우에, IS 반응 변동성이 데이터의 정확성에 영향을 미치지 않을 것이다. 예를 들어 다음과 같은 경우에 시험 대상 검체의 IS 반응 변동성이 데이터의 정확성에 영향을 미치지 않을 수 있다.

Example 1: IS responses for subject samples are similar to IS responses observed for Cals/QCs in the same analytical run (see Figure 1).

예 1: 시험 대상 검체의 IS 반응이 동일 분석 작업에 사용된 Cal/QC의 IS 반응과 유사한 경우(그림 1).

Figure 1. Plot of IS responses in an analytical run, exemplifying IS responses for subject samples that are similar to IS responses observed for Cals/QCs

그림 1. 분석 작업 시의 IS 반응: Cal/QC의 IS 반응과 시험 대상 검체의 IS 반응이 유사한 경우.

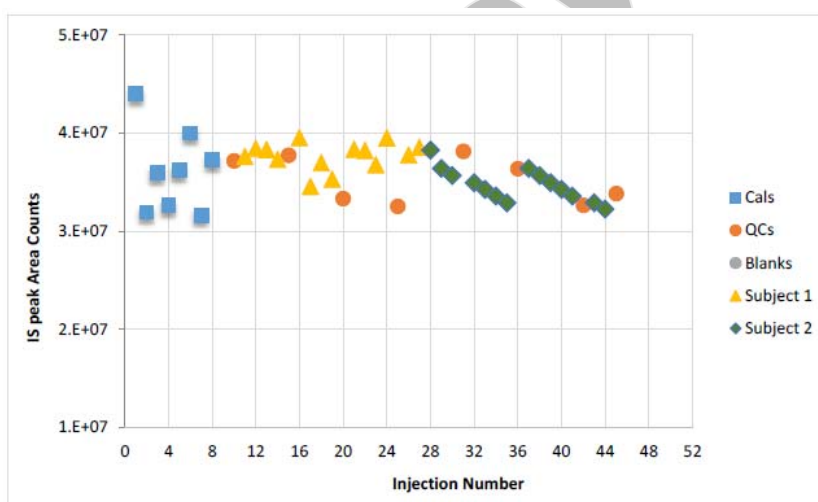


Example 2: IS responses for subject samples demonstrate a gradual drift or repeating pattern, but the range of IS responses for subject samples is similar to the range of IS responses for Cals/QCs in the same run (see Figure 2).

예 2: 시험 대상 검체의 IS 반응이 점진적인 드리프트나 반복 패턴을 나타내지만, 시험 대상 검체의 IS 반응 범위가 동일 분석 작업에 사용된 Cal/QC의 IS 반응과 유사한 경우(그림 2).

Figure 2. Plot of IS responses in an analytical run, exemplifying IS responses for subject samples demonstrating a gradual drift or repeating pattern similar to Cals/QCs

그림 2. 분석 작업 시의 IS 반응: 시험 대상 검체의 IS 반응이 Cal/QC와 유사하게 점진적인 드리프트나 반복 패턴을 나타내는 경우.



Q4:When can IS response variability impact the accuracy of the data?

IS 반응 변동성이 데이터의 정확성에 영향을 미칠 수 있는 경우는 언제인가?

A4: IS response variability may impact the accuracy of the data when the range of the IS responses for subject samples is different than the range of IS responses for Cals/QCs in the same run. For example, IS response variability for subject samples may impact the accuracy of the data under the following circumstances:

시험 대상 검체의 IS 반응이 동일 분석 작업에 사용된 Cal/QC의 IS 반응 범위와 다른 경우에 IS 반응 변동성이 데이터의 정확성에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어 시험 대상

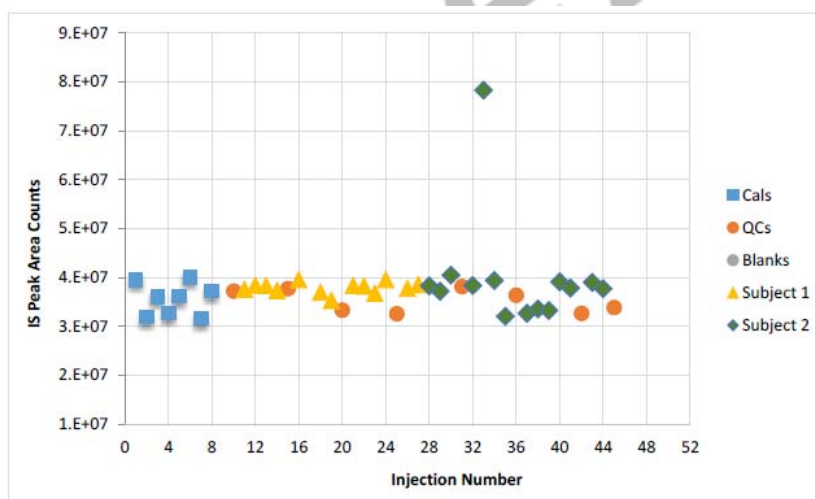
검체의 IS 반응 변동성은 다음과 같은 경우에 데이터의 정확성에 영향을 미칠 수 있다.

Example 1: IS responses for one or more subject samples are substantially different from the IS responses for the majority of the other subject samples, and the IS responses for Cals/QCs do not demonstrate a similar variability pattern (see Figure 3).

예 1: 하나 이상의 시험 대상 검체의 IS 반응이 다른 대다수 시험 대상 검체의 IS 반응과 큰 차이를 보이고, Cal/QC의 IS 반응이 유사한 변동성 패턴을 보이지 않는 경우(그림 3).

Figure 3. Plot of IS responses in an analytical run, exemplifying an IS response for a subject sample that is substantially different from the responses for the majority of the other subject samples and Cals/QCs

그림 3. 분석 작업 시의 IS 반응: 특정 시험 대상 검체의 IS 반응이 다른 대다수 시험 대상 검체와 Cal/QC의 IS 반응과 크게 다른 경우.

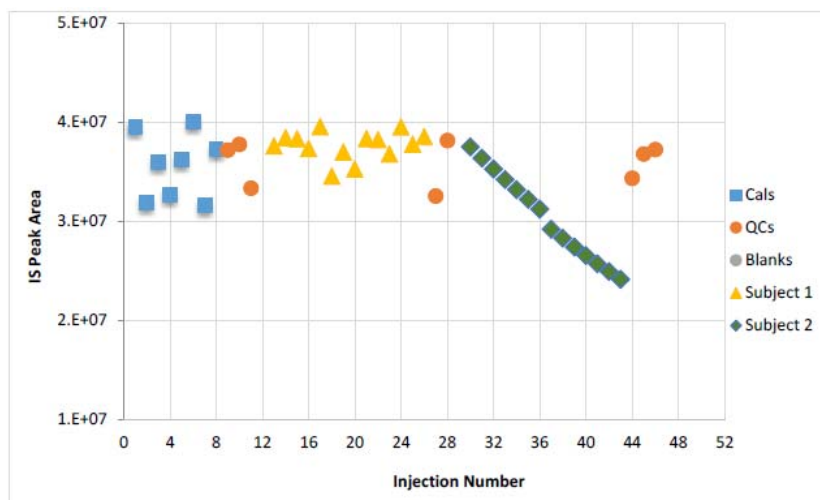


Example 2: There is a gradual increase or decrease extended beyond the range of the IS responses for subject samples, and there are no IS responses for QCs interspersed among the impacted segment of the run (see Figure 4).

예 2: 시험 대상 검체의 IS 반응 범위 이상으로 점진적인 증가 또는 감소가 나타나고, 이와 같은 경향을 보이는 부분에 QC 검체의 IS 반응이 없는 경우(그림 4).

Figure 4. Plot of IS responses in an analytical run, exemplifying a gradual decrease in IS responses for subject 2 samples without IS responses for QCs interspersed among the impacted segment of the run

그림 4. 분석 작업 시의 IS 반응: 시험 대상 검체 2의 IS 반응이 점차 감소하고, 이와 같은 경향을 보이는 부분에 QC 검체의 IS 반응이 없는 경우.

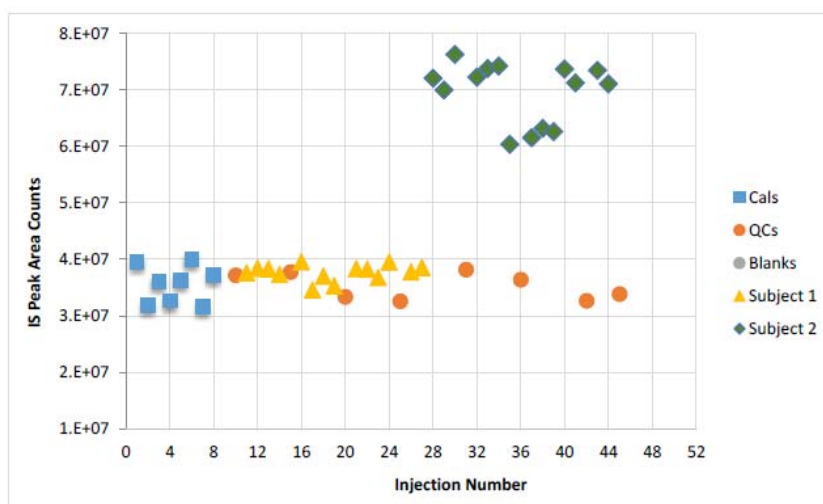


Example 3: IS responses for subject samples are consistently lower or higher than IS responses for Cals/QCs (see Figure 5).

예 3: 시험 대상 검체의 IS 반응이 Cal/QC의 IS 반응과 비교해 일관되게 더 적거나 큰 경우(그림 5).

Figure 5. Plot of IS responses in an analytical run, exemplifying IS responses for subject 2 samples that are consistently higher than IS responses for Cals/QCs

그림 5. 분석 작업 시의 IS 반응: 시험 대상 검체 2의 IS 반응이 Cal/QC의 IS 반응보다 일관되게 더 큰 경우.



Reviewing the scatter plot of IS responses for all samples in the run might help identify variability trends that may or may not impact the accuracy of the data.

모든 검체의 IS 반응을 산점도로 나타내면, 데이터의 정확성에 영향을 미치거나 미치지 않는 변동성 경향을 파악하는데 도움이 될 수 있다.

Q5: How can sponsors address concerns about IS response variability?

IS 반응 변동성에 관한 문제를 어떻게 대처할 수 있는가?

A5: When IS responses for subject samples are outside of the ranges observed for Cals/QCs that meet the run acceptance criteria, the subject sample concentration measurements might not be accurate. Therefore, sponsors should determine whether this observed difference impacts the accuracy of the data for subject samples.

시험 대상 검체의 IS 반응이 분석 허용 기준에 부합하는 Cal/QC의 범위를 벗어나면, 시험 대상 검체의 농도 측정 결과가 정확하지 않을 수 있다. 그러므로 이와 같은 차이가 검체 분석 데이터의 정확성에 영향을 미칠지 평가해야 한다.

For subject samples with IS responses significantly different from the responses for Cals/QCs (as pre-defined in a standard operating procedure (SOP)) in a run (see Figure 3), pre-established criteria for repeat analysis should be followed. The repeat analysis criteria should be justified and the protocol for the number of replicates reanalyzed for each sample and final values reported should be established in an SOP before initiation of the study.

시험 대상 검체의 IS 반응이 Cal/QC(SOP에 규정된 것)의 반응과 크게 차이나는 경우(그림 3 참조), 반복 분석에 대한 기준을 미리 설정하고 이 기준에 따라 처리한다. 반복 분석 기준의 타당성을 제시하고, 시험 개시에 앞서 검체별로 다시 분석하는 반복 횟수와 최종 보고값에 대한 프로토콜을 SOP에 규정한다.

For runs where a gradual drift or pattern in IS responses is observed between subject samples and there are no IS responses for Cals/QCs within the impacted segment of the run, subject samples displaying the aberrant IS responses (see Figure 4) should be reanalyzed. If the IS responses for subject samples in the repeat analysis are similar to those of Cals/QCs, and if the analyte concentrations in a repeat run are within 20% of the original assay results of the individual samples,

generally no further investigation into the cause of the initial variability is necessary. Sample values to be reported should follow a pre-established procedure. However, if the IS responses for subject samples in the repeat analysis are similar to those of Cals/QCs, but the analyte concentrations in the repeat analysis are not within 20% of the original assay results of the individual samples, then sponsors should report analyte concentrations from the repeat analysis.

시험 대상 검체 사이에서 IS 반응의 점진적 드리프트나 패턴이 관찰되고 해당 부분에 Cal/QC의 IS 반응이 위치하지 않으면, 이상 IS 반응을 나타내는 시험 대상 검체(그림 4 참조)를 다시 분석한다. 반복 분석 시에 시험 대상 검체의 IS 반응이 Cal/QC와 유사하다면, 그리고 반복 분석 시의 분석 대상 물질 농도가 개별 검체의 원래 분석 결과와 비교해 20% 이내라면, 초기에 나타난 변동성의 원인을 파악하기 위한 추가 조사는 일반적으로 필요하지 않다. 사전에 규정해 놓은 절차에 따라 검체 분석 결과를 보고한다. 하지만 반복 분석에서 시험 대상 검체의 IS 반응이 Cal/QC와 유사하지만, 반복 분석 시의 분석 대상 물질 농도가 개별 검체의 원래 분석 결과와 비교해 20% 이내가 아니라면, 반복 분석에서 확보한 분석 대상 물질 농도를 보고한다.

When IS responses for subject samples are consistently lower or higher than IS responses for Cals/QCs (see Figure 5), a subset of subject samples should be reanalyzed. If IS responses of subject samples in the repeat analysis are again not within the range for those of Cals/QCs (i.e., differences in IS responses in the original run are reproducible), and repeat analyte concentrations are still comparable to the original values, additional data might be needed to demonstrate that the differences in sample matrices (i.e., matrices for subject samples vs. matrices for Cals/QCs) do not impact the accuracy of the analyte concentration measurements. The approach(es) for investigation might include, but are not limited to, an analysis of QCs prepared in pre-dose matrix of individual impacted subjects, serial dilution of impacted subject samples using the matrices used to prepare Cals/QCs, or any other scientifically justified approach.

시험 대상 검체의 IS 반응이 Cal/QC의 IS 반응보다 일관되게 크거나 작다면(그림 5 참조), 시험 대상 검체 세트를 다시 분석한다. 반복 분석 시에도 시험 대상 검체의 IS 반응이 Cal/QC의 IS 반응 범위 이내가 아니라면(즉, 원래 분석 시의 IS 반응 차이가 재현된다면), 그리고 반복 분석 시의 분석 대상 물질 농도가 여전히 원래 값과 동등하다면, 검체 매트릭스의 차이(시험 대상 검체 매트릭스 vs. Cal/QC 매트릭스)가 분석 대상 물질 농도 측정 결과의 정확성에 영향을 미치지 않음을 증명하는 추가 데이터가 필요할 수 있다. 해당

대상자의 투여 이전 매트릭스로 조제한 QC 검체 분석, Cal/QC 조제에 사용되는 매트릭스를 이용한 해당 시험 대상 검체의 계단 희석, 기타 과학적으로 타당한 방법을 포함하되, 이에 국한하지 않고 조사할 수 있다.

gmpeye