

등록번호
안내서-1167-01



치료용 단백질의 항-약물 항체 검출시험법 가이드라인 [민원인 안내서]

Guideline on Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein
Products

2021. 10. 25.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

바이오생약심사부 유전자재조합의약품과

지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭

치료용 단백질의 항·약물 항체 검출시험법 가이드라인

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

등록대상 여부	<input type="checkbox"/> 이미 등록된 지침서·안내서 중 동일·유사한 내용의 지침서·안내서가 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 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 :)	
	<input type="checkbox"/> 법령(법·시행령·시행규칙) 또는 행정규칙(고시·훈령·예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 1년 이내 한시적 적용 또는 일회성 지시·명령에 해당하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 외국 규정을 번역하거나 설명하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 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	<input type="checkbox"/> 내부적으로 행정사무의 통일을 기하기 위하여 반복적으로 행정사무의 세부기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	<input type="checkbox"/> 예(☞지침서) <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)	<input checked="" type="checkbox"/> 예(☞안내서) <input type="checkbox"/> 아니오
기타 확인 사항	<input type="checkbox"/> 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설·강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서·안내서 제·개정 절차를 진행하시기 바랍니다.	
상기 사항에 대하여 확인하였음.		
2021 년 10 월 25 일		
담당자 확 인(부서장)		최경민 정지원

이 안내서는 치료용 단백질의 항-약물 항체 검출시험법 개발 및 검증과 관련한 사항에 대하여 알기 쉽게 설명하거나 식품의약품안전처의 입장을 기술한 것입니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식('~하여야 한다' 등)에도 불구하고 민원인 여러분께서 반드시 준수하셔야 하는 사항이 아님을 알려드립니다. 또한, 본 안내서는 2021년 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 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것(식품의약품안전처 지침서등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전평가원 바이오생약심사부 유전자재조합의약품과에 문의하시기 바랍니다.

전화번호 : 043-719-3503

팩스번호 : 043-719-3500

목 차

1. 서론	1
2. 배경	1
3. 일반원칙	1
3.1. 항-약물 항체 검출 시험법	1
3.2. 제품 간 항-약물 항체 발생률 비교의 한계	2
4. 시험법 디자인	3
4.1. 시험 전략	3
4.1.1 다단계 시험 전략	3
4.1.2 면역글로불린 동형 또는 아형	4
4.1.3 도메인 특이성	4
4.2 시험법 기준값	5
4.3 민감도	6
4.3.1 시험법 민감도	6
4.3.2 약물 내성, 민감도 및 시험법 적합성	7
4.4 특이성	8
4.5 선택성	8
4.5.1 기질에 의한 영향	9
4.5.2 최소 요구 희석	9
4.6 정밀성	10
4.7 재현성	10
4.8 완건성 및 시료 안정성	11
4.9 형식의 선택	11
4.10 시약의 선택	11

4.10.1 양성 대조 항체의 개발	12
4.10.2 음성 대조품 개발	13
4.10.3 비특이적 결합 관리	13
4.11 정량적 및 반-정량적 시험 결과 보고	14
4.12 시험법 개발에 대한 기타 고려사항	15
4.12.1 이미 존재하는 항체	15
4.12.2 류마티스 인자	15
4.12.3 단클론항체	16
4.12.4 결합 단백질	16
5. 시험법 개발	16
5.1 스크리닝 시험법 개발	16
5.2 확진 시험법 개발	17
5.2.1 확진 시험법의 형식 선택	17
5.2.2 확진 시험의 기준값	17
5.3 적정 시험법 개발	18
5.4 중화능 시험법 개발	18
5.4.1 중화능 시험 형식의 선택	18
5.4.2 중화능 시험법의 활성 곡선	19
5.4.3 중화능 시험에서 기질 저해 고려	19
5.4.4 중화능 시험의 기준값	20
5.4.5 중화능 시험의 추가적인 고려사항	20
6. 시험법 밸리데이션	21
6.1 시험법 밸리데이션에 대한 일반적 고려사항	21
6.2 스크리닝 시험의 밸리데이션	23
6.2.1 스크리닝 시험법의 민감도	23

6.2.2 스크리닝 시험법의 기준값	23
6.3 확증 시험법의 밸리데이션	24
6.4 적정 시험법의 밸리데이션	25
6.5 중화능 시험법의 밸리데이션	25
7. 시험법의 이행	26
7.1 시료의 확보	26
7.2 동시 양성 및 음성 품질 관리	27
7.3 대상 환자에서 기준값 확정	28
8. 문서화	28
참고문헌	31
부록 : 항-약물 항체 시험법 개발을 위한 단계적인 접근방법	32

1. 서론

이 가이드라인은 임상시험 중 치료용 단백질의 면역원성 평가 시험법의 개발 및 검증(validation)에 대한 권고사항을 담고 있으며 특히 스크리닝 시험법, 확증(confirmatory) 시험법, 적정(titration) 시험법 및 중화능 시험법의 개발 및 검증에 대한 권고사항을 포함한다. 이 가이드라인에서 면역원성은 치료용 단백질 제품 자체 또는 제품 관련 단백질(product-related protein)에 대해 면역반응을 유발하거나 면역학적 이상 반응을 유발하는 경향성으로 정의된다. 이 가이드라인에서 시험법 개발 및 검증에 대한 권고사항은 하나 이상의 항-약물 항체 검출을 위한 시험법에 적용될 수 있고 경우에 따라 몇몇 펩타이드, 올리고뉴클레오타이드 및 복합품목에도 적용될 수 있다.

이 가이드라인은 항-약물 항체 시험 실시 사유 또는 면역원성에 영향을 줄 수 있는 환자 및 제품 특이적 위해 요소에 대해서는 다루지 않는다. 또한 이 가이드라인은 체외 진단 제제에는 적용되지 않는다.

2. 배경

치료용 단백질에 의한 면역 반응은 제품의 약동학, 약력학, 안전성 및 유효성에 영향을 준다. 환자에서 면역반응의 임상적 영향은 미미한 수준에서 상당한 위해에 이르기까지 매우 다양하다. 임상 시험 중 관찰된 면역반응에 대한 정보, 특히 항-약물 항체 발생 빈도 또는 약동학, 약력학, 안전성 또는 유효성에 미치는 항-약물 항체 반응의 영향에 대한 정보는 의약품 특성을 파악하는 데 필수적이며, 가능하다면 이러한 정보는 허가사항 중 이상반응 항에 포함되어야 한다. 그러므로 항-약물 항체 반응을 측정하기 위한 검증되고, 민감하고, 특이적이고, 선택적인 시험법 개발이 치료용 단백질 개발에 있어서 핵심 요소이다.

3. 일반 원칙

치료용 단백질에 대한 항-약물 항체 생성 면역반응이 환자에게 미치는 위험성은 제품마다 다르므로 약동학, 약력학, 안전성 및 유효성에 영향을 미치는 치료용 단백질에 대한 면역 반응을 평가하기 위해서 위해 기반 접근법을 사용할 것이 권고된다.

3.1 항-약물 항체 검출 시험법

스크리닝 시험법(혹은 결합 항체 시험법)은 치료용 단백질 제제에 결합하는 항체를 검출하

는 데 사용된다. 치료용 단백질 제제에 대한 항-약물 항체의 특이성은 보통 확증 시험법에서 치료용 단백질과 경쟁을 통해 밝혀낼 수 있다. 항-약물 항체는 적정 및 중화능 시험법을 이용하여 평가된다. 적정 시험법은 항-약물 항체 반응의 크기를 평가하는 시험법이다. 항-약물 항체가 약동학, 약력학, 안전성 및 유효성에 미치는 영향은 항-약물 항체 발생빈도 보다는 역가 및 지속성과 관련되어 있으므로 중화능 시험법으로 이러한 반응의 크기를 측정하는 것이 중요하다. 중화항체(neutralizing antibodies)는 치료용 단백질과 그 결합 타겟의 상호작용을 방해하는 능력을 가진 항-약물 항체이다. 항-약물 항체가 약동학, 약력학, 안전성 및 유효성에 미치는 영향이 중화항체의 활성과 관련이 있으므로 항-약물 항체 발생빈도 보다는 항-약물 항체의 중화능을 평가하는 것이 중요하다. 어떤 경우에는 면역원성에 대한 위해성 평가 결과에 따라 중화항체에 대한 정성적 결과(예를 들어 양성 또는 음성)와 더불어 중화항체 역가를 확립하는 것이 유용할 수 있다.

제품 개발 중 적절한 항-약물 항체 시험법을 디자인, 개발 및 검증할 적절한 시점은 제품의 위해성 평가 결과에 따라 결정된다. 개발자는 임상 1상부터 적절한 스크리닝, 확증 및 필요 시 중화능 시험법을 개발하고, 이를 이용하여 시험하는 것이 권고된다. 3상 임상시험시에는 완전히 검증된 시험법으로 평가해야 한다. 면역원성으로 인한 위험성이 으로 환자에 대한 실시간 데이터가 필요한 경우(예를 들어, 고유의 기능을 수행하는 내인성 결합대상이 존재하는 경우), 임상시험 시작 전에 목적에 맞는 시험법을 개발하고 실시간으로 시험을 수행해야 할 수 있다. 다른 경우에는, 개발자가 적절한 시험법 사용이 가능할 때를 대비하여 시료를 보관해야 할 수도 있다. 품목허가 신청 시점에서 개발자는 시험법 전체 밸리데이션 데이터를 제출해야 한다. 항-약물 항체 시료 채취 시점에 대한 권고사항은 7.1에 제시되어있다.

3.2 제품 간 항-약물 항체 발생률 비교의 한계

항-약물 항체 검출은 민감도와 특이도 같은 시험법의 핵심 요소들에 의해 영향을 받는다. 일례로 염기서열 또는 구조적 동일성(homology)을 보이는 제품 간에도 항-약물 항체 발생 비교가 타당하지 않을 수 있는데 왜냐하면 항-약물 항체의 검출은 시험법의 민감도, 특이도 및 약물 내성(tolerance) 수준에 의존하기 때문이다. 추가적으로, 항-약물 항체의 발생률은 방법, 시료 처리, 시료 채취 시점, 병용 약물, 질병 상태를 포함한 여러 가지 요소들에 영향을 받는다. 그러므로 동일한 적응증에 대해 구조적 동일성을 가진 치료용 단백질들 간의 면역원성 비교는 완전히 검증된 시험법을 사용하더라도 바람직하지 않다. 만약 유사한 치료용

단백질 제제들 간의 직접적인 면역원성 비교가 요구되는 경우, 두 제제에 대해 동일한 민감도 및 특이도를 입증한 시험법을 이용하여 직접 비교 임상시험 수행을 통한 비교 데이터가 필요하다.

본 가이드라인에서 제시되는 시험법 개발 및 밸리데이션에 대한 권고사항은 면역원성 평가 시 자주 접하게 되는 문제들에 기반하고 있다. 개발자들은 특히 고유의 기능을 가진 내인성 결합대상을 포함한 제제와 같이 특히 위해도가 높은 제제에 대한 시험법 개발 시, 동형 확인(isotyping), 항원결정기 맵핑(mapping), 내인성 단백질과의 교차반응을 위한 시험법 디자인과 관련하여 과학적으로 충분히 타당한 접근방식이 요구된다. 일반적으로 민감도, 특이도, 선택성, 약물 내성, 정확성, 반복성 및 완전성을 가진 시험법 개발이 권고된다.

4. 시험법 디자인

개발자는 최신의 과학기술에 기반하여 시험법 디자인에 필요한 요인들의 적용가능성을 평가해야 한다.

4.1 시험 전략

4.1.1 다단계 시험 전략

항-약물 항체 시험법의 개발 전략으로서 다단계 접근법이 권고된다. 초기에는 민감한 스크리닝 시험법이 사용된다. 항-약물 항체 반응의 전반적인 양상을 정확하게 파악하기 위해 스크리닝 시험법은 민감해야 하고, 낮은 농도에서도 저- 및 고-친화도 항-약물 항체를 검출할 수 있도록 설계되어야 한다(예, 세척 단계 최소화). 그러나 대부분의 경우 초기 스크리닝 시험을 통해 항체의 친화도를 실험적으로 결정할 필요는 없다. 다음 단계로 스크리닝 시험법에서 양성으로 확인된 검체는 항-약물 항체가 치료용 단백질 제제에 특이적인지 여부를 확인하기 위해 확증 시험을 거쳐야 한다. 예를 들어, 경쟁적 시험법(competition assay)을 통해 항체가 치료용 단백질에 특이적으로 결합하며, 스크리닝 시험에서의 양성 결과가 임상 검체 혈청의 비-특이적 반응, 검출 시약과 시험 관련 물질(예를 들어 플라스틱 또는 다른 단백질) 등과의 반응에 의한 것이 아님을 확인할 수 있다.

확증 시험에서 양성으로 확인된 시료는 적정시험 및 중화능 시험과 같은 다음 단계 시험으로 추가 평가되어야 한다. 때때로 내인성 단백질과 같은 타 단백질들과의 교차 반응을 검출하기 위한 시험이 요구된다. 예를 들어, 교차 반응 평가는 치료용 단백질 제제가 높은

상동성을 가진 단백질 그룹에 속해있고 해당 그룹의 다른 단백질이 항-약물 항체에 의해 영향을 받는지 여부를 확인하는 것이 중요한 경우에 필요하게 된다. 또한 항체를 포함한 검체가 양성인 경우 항체의 동형(isotype) 또는 그 항원 결정기에 대한 특이성을 평가해야 한다. 항-약물 항체 반응의 항원 결정기 특이성 확인은 자주 수행되지는 않으나, 폐길화 단백질, 항체-약물 복합체, 이중 특이성 항체와 같이 다중 도메인제제의 경우 도메인 특이성에 대해 전반적인 평가가 수행된다.

4.1.2 면역글로불린 동형(isotypes) 또는 아형(subtypes)

스크리닝 시험은 모든 관련 면역글로불린 동형을 검출할 수 있어야 한다. 비점막 경로로 투여되고 아나필락시스 위험이 없는 경우, 관련 항-약물 항체의 동형은 IgM 및 IgG 이다. 점막 투여 경로의 경우 IgA 항-약물 항체도 관련된다. 모든 관련 동형이 스크리닝 시험에서 검출될 것으로 기대되나, 스크리닝 시험법으로 어떤 동형이 검출되는지 확인할 필요는 없다. 예를 들어 가교 시험(bridging assay format)은 이론적으로 모든 동형을 검출할 수 있으나, 어떤 동형이 검출되는지에 대한 정보는 제공하지 못한다.¹⁾

어떤 경우 개발자는 항체 동형을 구분할 수 있는 시험법을 개발해야 한다. 예를 들어, 치료용 단백질 제제에 대한 아나필락시스 발생 위험이 높거나 아나필락시스가 관찰된 경우, 항체 특이적 IgE 시험이 필요할 수 있다.

상황에 따라서는 항-약물 항체 아형 평가가 유용한 정보를 제공할 수 있다. 예를 들어 IgG4 항체의 생성은 8인자 치료와 같은 만성적인 항원 노출 조건하에서나 적혈구 무형성증 환자에 대한 에리스로포이에틴 치료 환자에서 발생하는 면역반응과 관련이 있다. 결론적으로 임상적 고려를 통해 특정 동형 또는 아형 평가가 요구될 수 있다.

4.1.3 도메인 특이성

어떤 단백질은 임상적 효과를 나타내는 데 있어서 서로 다른 방법으로 작용하는 다중 도메인을 가지고 있다. 한 가지 도메인에 대한 면역반응은 다른 기능들에는 영향을 주지 않으면서 특별한 기능을 억제할 수 있다. 개발자는 전체 치료용 단백질 제제에 대한 스크리닝 및 확증 시험을 실시할 것이 권고된다. 다중도메인 치료용 단백질 제제의 경우는 항-약물 항체가 임상적으로 관련 있는 도메인에 결합하는지 조사할 필요가 있다. 예를 들어, 폐길화와

1) 가교 시험은 IgG4 검출 시 항체 수준을 과소평가할 수 있으므로 적절한 완전성이 확보되지 않을 수 있다.

같이 변형이 가해진 치료용 단백질에 대한 항-약물 항체가 환자에 미치는 위험을 적절히 이해하기 위해 개발자들은 단백질 구성요소 뿐만 아니라 가해진 변형에 대한 항-약물 항체의 특이성을 확인할 수 있는 시험법을 개발해야 한다.

도메인 특이성은 일반적으로 전체 분자를 이용하여 양성으로 확인된 항-약물 항체 시료에 대해 평가된다.

이중 특이성 항체와 같이 다수의 기능적 도메인을 가진 치료용 단백질 제제에 대한 면역 반응 평가를 위해서는 서로 다른 도메인에 대한 면역반응을 평가할 수 있는 다수의 시험법 개발이 요구된다.

4.2 시험법 기준값(cut-point)

시험법 기준값은 시료 반응을 양성 또는 음성으로 결정하는 반응 수준이다. 시험법의 종류에 따른 기준값 설정에 대한 정보는 5, 6절에 제시되어 있다. 적절한 기준값을 정하는 것은 위음성 결과의 위험성을 최소화하는 데 필수적이다.

시험법의 기준값은 무수한 제제 또는 기질(matrix) 성분들에 의해 영향을 받는다.²⁾ 기준값을 정의할 때 이러한 요소들이 시험법 개발 초기에 고려되어야 한다. 서로 다른 대상 집단 및 질병 상태에 따라 시험법의 배경 신호가 달라질 수 있으므로 대상 집단별로 별도의 기준값이 필요할 수 있다.

가능한 경우 기준값은 치료를 받지 않은 환자로부터 얻은 시료를 이용하여 통계적으로 결정되어야 한다.³⁾ 이러한 시료들에 대해 반복시험을 수행함으로써 시험법의 변동성이 평가될 수 있다. 기준값을 결정하기 위한 통계적 접근방법은 분석 시 통계적 이상치의 제거나 이미 존재하는 항체를 설명하는 방법을 이용하는 것과 같은 다양한 과정을 포함할 수 있다. 시험법 개발 중에는 적은 수의 시료가 기준값 예측에 사용될 수 있다.

개발자는 기준값을 설정할 때 통계적으로 결정된 이상치(outlier)와 참 양성 시료의 영향을 고려해야 한다. 개발자는 이상치 결정에 사용된 방법과 함께 데이터 값 삭제에 대한 타당성을 제시해야 한다.

양성 결과 및 양성 시료는 환자 시료에 이미 존재하는 항체 또는 기타 혈청 인자들로부터 유래할 수 있다. 비록 다양한 내인성 단백질에 대한 항체가 건강인에서 이미 존재하는 것

2) 본 가이드라인에서 '기질'이란 혈청, 혈장, 타액 등을 포함한다.

3) '치료를 받지 않은 환자'는 시험법 개발 또는 밸리데이션 단계 및 시료의 가용성에 따라 건강인 또는 치료용 단백질 제제에 노출되지 않은 환자가 될 수 있다. 개발자는 사용되는 시료의 적절성에 대한 근거를 제시해야 한다.

으로 확인되지만 몇몇 질병에서는 이러한 항체 수준이 더 높을 수 있다. 개발자는 항체가 이미 존재하는 시료들을 확인하고(예를 들어 약물과의 경쟁을 통해) 기준값 분석 시 이를 제거해야 한다. 만일 시험대상자가 이미 항체를 가지고 있다면 치료 증가(treatment-boosted) 항-약물 항체라고 알려진 치료 후 증가된 항-약물 항체를 확인하기 위해 개별 시험대상자에 대한 투여 전·후 결과의 차이에 기반하여 양성 반응을 평가하는 것이 필요하다. 치료 유래 항-약물 항체 반응 평가에 있어서 일반적인 접근방법은 항체 역가 변화를 측정하는 것이다. 이상 언급된 기준값 설정 방법 사용이 가능하지 않다면 개발자들은 식약처와 대체 방법에 대해 논의해야 한다.

4.3 민감도

4.3.1 시험법 민감도

시험법 민감도는 항체가 일관되게 양성 또는 해당 시험법의 기준값과 동일한 결과를 나타내는 가장 낮은 농도이다. 시험법은 항-약물 항체가 약동학, 약력학, 안전성 또는 유효성 양상에 변화를 줄 수준에 이르기 전에 항-약물 항체를 검출할 수 있을 정도로 충분한 민감도를 가져야 한다. 시험법 민감도는 특정 환자에 대해서는 항-약물 항체 반응을 반영하지 않을 수도 있는 양성 대조 항체를 사용하여 평가된다. 예를 들어, 양성 대조는 주로 고-결합력 항체(high affinity antibodies)가 많게 되도록 하는 조건에서 개발된다. 그러한 고-결합력 양성 대조를 사용하면 시험법의 민감도를 과대평가 할 수 있다. 이러한 이유로 시험법 민감도 결정은 임의의 대상자에 대해 검출된 항-약물 항체의 절대량을 결정하기 보다는 시험법이 어떻게 작동하는지 전반적으로 이해하는 데 도움이 된다. 시험법의 민감도 측정은 체내 존재하는(on-board) 약물에 의해 영향을 받으므로, 예상 농도의 체내 약물이 존재하는 상황에서 민감도를 결정하는 것이 중요하다. 스크리닝 및 확진 IgG 및 IgM 항-약물 항체 시험법에 있어서, 위해성 및 기존 지식에 따라 더 클 수는 있으나 최소 100 ng/mL의 민감도를 가질 것이 권고된다. 중화항체 시험법은 그 정도의 민감도에 이르지 못할 것이다. IgE 항-약물 항체 평가를 위해 개발된 시험법은 높은 pg/mL에서 낮은 ng/mL 수준의 민감도를 가져야 한다.

민감도는 희석되지 않은 기질(예, 혈장, 혈청, 타액) 중 검출가능한 항체의 질량으로 표현된다. 시험법 민감도는 최소 요구 희석(MRD)을 적용한 후에 제시되어야 한다. 예를 들어 시험법이 50 ng/mL의 민감도를 나타내고, MRD가 20인 경우 1000 ng/mL로 보고된다. 시험법의 민감도는 임상시험 시료를 시험할 때 사용된 것과 동일한 생물학적 기질로 희석하여

평가되어야 한다. 예를 들어 민감도는 임상 시료에서 사용된 희석제로서 동일한 항응고제를 사용하여 결정되어야 한다.

민감도는 약물을 투여받지 않은 사람으로부터 획득한 개별 또는 합쳐진 기질을 이용하여 알려진 농도의 양성대조 항체를 연속적으로 희석한 것으로 평가될 수 있다. 희석 배수는 2 또는 3을 넘지 않아야 하며, 최소 5개의 희석물이 사용되어야 한다. 민감도는 희석 곡선의 선형 부분을 시험법 기준값으로 내삽함(interpolating)으로써 계산될 수 있다.

시험법의 민감도가 질량 units / 기질 mL로 보고될 수 있도록 결정하기 위해서는 치료용 단백질 제제에 특이적으로 결합하는 정제된 항체가 양성 대조로 사용되어야 한다. 민감도 분석에 사용하는 양성 대조 항체는 치료용 단백질 제제에 결합하는 정제된 다클론항체 또는 단클론항체 형태를 사용할 수 있다.

시험을 일상적으로 수행하는 동안 시험법 민감도를 보증하기 위해 저-양성의 시스템 적합성 대조군이 사용되어야 한다. 추가적으로, 저-양성 대조약은 스크리닝 및 확증 단계에서 일관되게 양성으로 확인되어야 한다. 양성 및 음성 대조약은 4.10.1 및 4.10.2 절에 언급되어 있다.

4.3.2 약물 내성, 민감도 및 시험법 적합성

치료용 단백질 제제 또는 혈청에 존재하는 그 내인성 단백질은 시험법의 민감도에 영향을 줄 수 있다. 치료용 단백질이 영향을 줄 것으로 예상되는 수준으로 존재하는 상황에서 시험법의 민감도를 평가하는 것(시험법의 약물 내성)은 투여받은 환자에서 항-약물 항체를 검출하는 시험법의 민감도와 적합성을 이해하는 데 중요하다. 시험법 개발 초기에 약물 내성을 평가할 것이 권고된다. 개발자는 치료용 단백질 제제가 항-약물 항체 검출을 방해하는지 여부를 확인하기 위해서 서로 다른 양의 치료용 단백질 제제가 존재하거나 존재하지 않는 항-약물 항체 음성 대조 시료에 이미 알고 있는 서로 다른 분량의 양성 대조 항체를 추가하여 약물 내성을 평가해야 한다. 서로 다른 양의 치료용 단백질이 있을 때와 없을 때 얻은 결과가 비교되어야 한다. 약물 내성은 혈중 순환하는 항-약물 항체-약물(ADA-drug) 복합체를 분해하는 산 분해와 같은 방법을 이용하여 개선될 수 있다. 시험법의 특이성, 타겟의 특성 및 양성 대조의 종류와 같은 요인들은 약물 내성 평가에 영향을 주기 때문에 시험법 개발 시 고려되어야 한다. 예를 들어 산 분해는 항체가 산에 약하거나 약물 타겟이 수용성인 경우 적절하지 않을 것이다. 치료용 단백질 제제에 의한 영향은 약물 농도가 낮은 시료를 채취함으로써 최소화될 수 있다. 항-약물 항체 시료 채취 시점과 관련한 권고사항은

7.1을 참고한다.

4.4 특이성

특이성은 대상 분석물, 즉 항-약물 항체를 특이적으로 검출하는 시험법의 성능을 말한다. 시험법 특이성이 없으면 위-양성 결과를 유발하여 항-약물 항체 생성 면역반응, 약동학, 약력학, 임상적 안전성 및 유효성 결과 간의 상관관계를 모호하게 만들 수 있다. 단클론항체, Fc-융합단백질 및 Ig-융합단백질에 대한 항체반응의 특이성 입증은 사람 혈청중의 높은 Ig 농도 때문에 어려울 수 있다. 시험법은 항-단클론항체를 특이적으로 검출하여야 하며, 단클론항체 자체, 수용성 약물 타겟, 비특이적 내인성 항체 또는 시험법에 사용된 항체 시료는 검출하지 않아야 한다. 이와 유사하게, 류마티스양 인자(Rheumatoid Factor) 발생률이 높은 환자 집단에 대해서는 개발자가 류마티스양 인자가 검출 방법에 영향을 주지 않거나 시험법이 류마티스양 인자와 특이적 항체를 구분할 수 있음을 입증해야 한다. 류마티스양 인자는 4.12.2에 자세히 언급된다. 항-약물 항체와 숙주 세포 단백질 및 기타 제제 관련 불순물과의 교차 반응이 입증되는 경우, 이러한 반응의 특이성에 대한 추가 평가가 필요할 수 있다.

특이성을 입증하는 직접적인 방법은 결합이 수용성 또는 비표지 정제 치료용 단백질 제제에 의해 차단됨을 보이는 것이다. 한 가지 접근방법은 양성 및 음성 대조 항체 시료를 정제 치료용 단백질 제제 또는 그 성분과 반응시키는 것이다. 관련 치료용 단백질 제제 또는 그 성분에 의해 신호가 차단되면 반응이 특이적임을 나타낸다. IgM과 같은 다중 결합 항체의 경우 경쟁적 억제를 통한 특이성 확립은 어려울 수 있다. 따라서 이러한 경우에는 시험법의 성능을 평가하기 위해 신중한 개발 또는 추가적인 접근이 필요하다. 단클론항체 제제에 대한 항-약물 항체에 대해서는, 동일한 Fc를 가지고 있으나 서로 다른 가변 부위(variable region)를 가진 항체를 포함하는 것이 도움이 된다. 만일 시험법이 개발 중인 치료용 단백질 제제에 대한 항-약물 항체에 특이적이고 선택적인 경우, 일반적으로 그 치료용 단백질 제제 또는 그 성분을 시험 용액에 추가하면 시험의 신호가 감소하며 반대로 다른 특이성을 가진 항체에 미치는 영향은 거의 없어야 한다.

4.5 선택성

항-약물 항체 시험법의 선택성은 시료에 다른 성분이 존재하는 상황에서 치료용 단백질

제제에 특이적인 항-약물 항체를 확인하는 능력이다. 시험 결과는 기질 또는 체내 치료용 단백질 제제에 의해 영향을 받을 수 있다. 대부분의 시험 기질은 다양한 크기와 전하를 가진 많은 양의 단백질을 포함하고 있음을 유의하는 것이 중요하다. 선택성 확립의 실패는 비-특이적 신호를 유발하여 양성 결과를 불분명하게 할 수 있다.

4.5.1 기질에 의한 영향

시료 기질(예, 혈장, 혈청, 타액)이 시험법에 미치는 영향은 중요한 고려사항이다. 희석액으로 시험을 수행하는 경우 기질에 비해 어느 정도 신호 감소가 예상된다. 기질에 포함된 내인성 및 외인성 인자들이 시험 결과에 영향을 미칠 수 있으며 이러한 영향을 최소화하기 위해 시료를 희석하는 것이 필요할 수 있다. 개발자는 이러한 기질이 시험 결과에 미칠 수 있는 영향을 평가하는 밸리데이션 시험을 수행하기 전에 시료 준비에 사용될 기질 및 희석 배수를 결정해야 한다.

기질에 있는 여러 가지 물질, 예를 들어 유리 헤모글로빈(용혈), 지질(지질혈증), 빌리루빈(황달) 및 병용 약물은 시험 결과에 영향을 줄 수 있다. 예를 들어, 시료 채취에 사용되는 항응고제는 시험 종류에 따라 서로 다른 영향을 주어 시험 민감도에 영향을 줄 수 있다. 개발자는 기질이 있거나 없는 조건에서 알고 있는 서로 다른 양의 양성 대조 항체를 접종함으로써 기질에 의한 영향을 평가할 수 있다. 완충액 단독과 기질이 포함된 완충액에서 항-약물 항체의 회수율을 비교하여 기질 성분에 의한 영향의 정도를 평가할 수 있다. 그러한 분석은 시료 분석 시 권장되는 최소 요구 희석(MRD) 결정에 도움을 줄 수 있다. 이러한 정보는 시험법 민감도를 이해하는데 유용할 수 있다.

임상적으로 치료용 단백질 제제와 관련된 완충액 성분들은 시험법에 영향을 줄 수 있다. 예를 들어, 폴리소르베이트는 화학적으로 폴리에틸렌글리콜(PEG)과 유사하므로 항-PEG 항체의 검출에 영향을 줄 수 있다. 완충액의 화학적 조성은 시험법 개발 시 신중하게 고려되어야 한다.

4.5.2 최소 요구 희석(Minimal Required Dilution, MRD)

기질 성분들은 비-특이적 신호를 발생시켜 양성 결과를 불명확하게 만들 수 있다. 그러므로, 항-약물 항체 검출 능력을 유지할 수 있도록 시료를 희석하는 것이 필요하게 된다. 신호 대 잡음 비가 가장 높은 시료 희석, 시험법의 희석액과 가장 근접한 신호를 나타내는 시료 희

석, 신호 대 변이성(variability) 비가 가장 높은 시료 희석을 포함하여 여러 가지 MRD 정의가 제시되어왔다. 개발자들은 이러한 정의를 사용할 수 있으나 시험법 민감도 및 역가 계산을 위해 MRD는 시료의 최종 희석을 보통 1:5에서 1:100 범위(즉, 1/5 ~ 1/100)로 하는 것을 고려하여야 한다.

치료를 받지 않은 사람에서 얻은 적절한 수의 시료 패넬로부터 MRD를 결정하는 것이 권고된다. MRD의 결정은 치료제를 투여하지 않은 항-약물 항체 음성 시료를 연속적으로 희석한 다음, 연속적으로 희석된 기질에 포함된 고, 중, 저농도의 항체 시료를 희석액으로 희석한 동일한 양의 양성 대조 항체와 비교함으로써 이루어진다. 이는 시험법의 검출 범위에 걸쳐서 적절한 신호-대-잡음 비를 보증한다. MRD는 적절한 수의 개별 혈청 시료로부터 계산되어야 한다. 시료의 적절한 수는 개별 시료의 다양성을 포함하여 여러 가지 요인들에 의해 결정되며 보통 최소 10개의 시료가 권고된다.

비록 개발자가 선택하는 MRD는 시험법 디자인 및 시험대상자 군에 따라 달라지나, MRD가 1:100을 넘지 않을 것이 권고된다. MRD 값이 높을수록 위-음성 결과를 유발할 가능성이 높아진다. 그러나 몇몇 경우에는 높은 MRD가 요구될 수 있고 그러한 MRD가 전반적인 시험법 민감도 및 면역원성 위해도 평가에 미치는 영향에 대해 고려되어야 한다.

4.6 정밀성

정밀성은 한 가지 방법으로 동일한 물질에 대한 연속적인 측정치에서 관찰되는 변동성을 측정하는 것이다. 시험 결과는 적절한 정밀성을 보증하기 위해 시험 내 및 시험 간 재현 가능해야 한다. 시험법 변동성은 시험법 기준값 결정 및 낮은 양성 시료를 양성으로 검출함을 보증하는데 있어 근거가 되므로 시험법의 정밀성 입증은 항-약물 항체 평가에 필수적이다. 신뢰할 만한 예상값을 제공하기 위해 개발자는 시험 반응의 시험 내(반복성) 및 시험 간(실험실내 정밀성) 변동성을 모두 평가해야 한다. 유동적 기준값(floating cut-point)이 필요한 경우 표준화된 값을 이용하여 시험 간 정밀성이 계산될 수 있다.

4.7 재현성

재현성은 시험법이 둘 또는 그 이상의 독립적인 실험실에서 수행되는 경우 중요한 고려사항이며, 개발자는 각 실험실에서 생성된 데이터의 비교동등성을 확립해야 한다. 민감도, 약물 내성, 정밀성을 포함한 비교동등한 시험 성능이 실험실 간에 확립되어야 한다.

4.8 완전성(robustness) 및 시료 안정성

시험법 완전성은 일반적인 시험 중 시험결과와 신뢰성을 나타내는 지표이다. 이는 일반적인 실험 수행의 실제 환경하에서 발생할 만한 작지만 의도적인 시험법 및 장비 성능 변경에 대해 영향을 받지 않는 시험법의 능력으로 평가된다. 예를 들어 온도, 배양 시간, 또는 pH 및 염 농도와 같은 완충액 특성의 변경은 모두 시험 결과에 영향을 미칠 수 있다. 시험법이 복잡하면 시험 조건의 변화에 특별히 민감하게 영향을 받는다. 따라서 계대 수, 배양 시간, 배양 배지 조성과 같은 인자들을 평가하고 최적화하는 것이 필수적이다. 개발자들은 개발 과정동안 완전성을 평가해야 하고 시험법의 특정 단계에서의 작은 변경이 결과에 영향을 미치는 경우 해당 단계를 관리하기 위한 예방조치를 취해야 한다. 완전성과 관련된 일부 특성들은 시험법 밸리데이션에 포함되어 평가될 수 있다. 환자 시료의 안정성을 확보하기 어려우므로 시험 시점에 환자 시료의 항체 활성도가 보존될 수 있는 방법으로 시료를 보존할 것을 권고한다. 시료의 해동 및 용해는 시험 결과에 영향을 줄 수 있으므로 개발자가 환자의 시료를 적절히 분주함으로써 냉동-해동 반복을 최소화 할 것이 권고된다. 그러나 양성 대조 항체의 냉동-해동 반복 및 냉장 및 상온 안정성 평가를 포함하는 단기 안정성 평가 시험도 유용할 수 있다.

4.9 형식(format)의 선택

항-약물 항체 검출에 다양한 형식 및 기기가 사용될 수 있다. 여기에는 이에 국한되지는 않으나 직접적인 결합 시험, 가교 시험 및 용해-상 결합시험(예, 방사성면역침강 시험법)이 포함된다. 각각의 시험 형식은 처리량(throughput), 민감도, 특이도, 활성 범위, 다양한 Ig 동형의 검출능력, 신속히 분리되는 항체 검출 능력 및 시약의 이용가능성에 있어서 장단점을 가지고 있다. 가교시험 형식은 항원(예, PEG)이 반복적인 모티프를 가지고 있을 경우 위-음성 결과를 유발할 수 있다. 이러한 시험 형식들 간의 가장 큰 차이점은 시험법 민감도에 영향을 미치는 세척의 횟수와 강도이다. 항원결정기 노출은 플라스틱 또는 다른 성분과 결합하는 경우 항원의 구조적인 변화를 유발하여 해당 단백질 제제의 항체 결합 부위를 가리거나, 노출시키거나, 변화시키거나, 훼손할 수 있으므로 중요하게 고려되어야 한다.

4.10 시약의 선택

항-약물 항체 검출 시험법의 많은 요소들은 표준품 또는 상업용(예, 마이크로 플레이트) 제품들로 부터 이용할 수 있다. 그러나 양성 대조 항체, 음성 대조 및 시스템 적합성 대조를 포함한 다른 요소들은 시험법 특이적으로 확립될 필요가 있다. 핵심 시약의 품질 및 안정성은 시험법 성능의 일관성 유지에 중요하다.

4.10.1 양성 대조 항체의 개발

개발자들은 시스템 적합성의 확립, 검증 및 모니터링을 위해 동일한 또는 서로 다른 양성 대조 항체를 이용할 수 있다. 시스템 적합성 대조의 경우, 시험법의 민감도를 평가하고 후크 효과를 검출하기 위해 조정되었던 농도로 단클론 또는 다클론 양성 대조 항체가 포함되어야 한다.⁴⁾

양성 대조항체를 제조하기 위해 여러 가지 방법이 이용될 수 있다. 가장 흔한 방법으로 양성 대조 항체는 면역 증강제(adjuvants)가 없거나 있는 상태에서 동물을 면역시킴으로써 생성된 항체를 치료용 단백질 제제를 이용하여 흡착 분리(affinity purified)함으로써 제조할 것이 권고된다. 이러한 접근방법은 항-약물 항체 중 다클론항체를 높여서 민감도 평가 결과의 해석을 돕는다. 양성 대조 항체 제조 시 동물종 선택은 신중하게 고려되어야 한다. 예를 들어, 항-사람 면역글로불린 시료가 환자에서의 항체를 검출하는 이차 시약으로 사용될 경우 양성 대조 항체 및 품질 관리 시료는 동일한 시약에 의해 검출될 수 있어야 한다. 양성 대조 항체가 동일한 시약에 의해 검출되지 않는 경우(예, 양성 대조항체가 토끼에서 생성되고 다른 이차 시약이 양성 대조 항체를 검출하는 데 필요한 경우) 환자 시료에서 사람 항체를 검출하기 위해 사용된 이차 시약이 예상대로 기능함을 보증하기 위해 이차 시약에 대한 양성 대조 항체가 포함되어야 한다. 몇몇 경우, 개발자는 환자의 시료로부터 양성 대조 항체를 생성할 수 있을 것이다.⁵⁾ 그러한 환자 유래 양성 대조는 매우 유용하지만 일반적으로 임상 초기에는 가용하지 않다. 대체 방법으로서 양성 대조 항체에 대한 개별 단클론 항체 또는 단클론항체 패널이 사용될 수 있다. 치료용 단클론항체에 대해, 개발자는 치료용 항체의 다양한 부위에 결합하는 양성 대조 항체를 선택하여야 한다. 드물기는 하지만 양성 대조 항체를 생성할 수 없는 경우, 시험법 개발 및 밸리데이션을 위한 대체 접근방법을 고려해야 한다.

4) 후크 효과는 고농도의 특정 분석물 또는 항체의 존재로 인해 발생할 수 있는 신호의 감소이며 위-음성 결과를 유발할 수 있다.

5) 적절한 환자 동의가 필요하며 미리 계획되어야 한다.

일단 양성 대조 항체의 기원이 확인되면 개발자는 해당 기원을 민감도, 선택성, 특이도, 약물내성 및 재현성과 같은 시험법 성능 특성을 평가하기 위해 사용해야 한다. 품질 대조 또는 시험 수행 시 시스템 적합성 대조로 양성 대조 항체를 생성 및 보존할 것이 권고된다. 시험법 개발 및 밸리데이션을 위해서 고, 중, 저 시험 결과값(signal values)을 생성하도록 양성 대조를 희석해야 한다. 이는 넓은 범위의 항체 농도에 대해 시험 수행이 적합한지 여부를 이해하기 위해 정성적인 시험법을 개발하는 경우에도 권고된다. 항-약물 항체를 검출하기 위한 중간 값의 품질관리(QC) 시료는 정기적인 시험 수행을 위한 시스템 적합성 모니터링에는 필요하지 않다.

4.10.2 음성 대조품 개발

밸리데이션 시험 및 환자 시료에 대한 시험을 위한 음성 대조품을 확립할 것이 권고된다. 이와 관련하여 치료받지 않은 적절한 수의 사람 혈청을 음성 대조로 이용할 수 있다. 음성 대조로부터 얻어진 수치는 시험 대상 환자군에 대한 시험법에서 결정된 기준값(cut-point)에 가까워야 한다. 기준값을 설정하기 위해 이용된 개별 혈청 시료로부터 얻은 평균값보다 훨씬 낮은 수치를 나타내는 음성 대조는 적절한 시험법 성능을 보증하는데 적절하지 않을 것이다.

가능한 경우 음성 대조 시료는 치료를 받지 않은 환자로부터 수집되어야 하고 시료 기질이 시험 대상 환자를 대표하기 위해 성, 연령, 동반질환이 유사한 환자를 포함해야 한다. 분석 전(pre-analytical) 변수들이 시험에 있어서 대조 시료의 성능에 영향을 줄 수 있으므로, 대조 시료는 시험 시료와 (예를 들어 항응고제의 종류, 부피, 시료 준비 및 저장에 있어서) 동일한 방법으로 수집 및 처리되어야 한다.

그러한 대조 시료는 종종 개발 또는 시험 전(pre-study) 밸리데이션 동안 가용하지 않다. 이러한 상황에서 상용 시료 또는 건강한 공여자로부터의 시료를 이용하는 것이 가능하나, 적절한 대상군으로부터 치료를 받지 않은 환자의 시료를 이용할 수 있을 때 기준값, 민감도 및 특이도와 같은 시험법 성능과 관련된 중요한 매개변수들이 결정되어야 한다.

만일 서로 다른 환자군에서 기인한 음성 대조의 기준값 및 선택성이 서로 다르면, 다른 시험법 매개변수들(예, 민감도)의 재평가가 필요하다.

4.10.3 비특이적 결합 관리

마이크로 플레이트의 플라스틱부터 발색 시약에 이르는 모든 시험 성분이 시험법의 민감

도와 비-특이적 결합에 영향을 미칠 수 있다. 가장 중요한 요소들 중 하나는 적절한 시험법 완충액과 비-특이적 결합을 막기 위한 블로킹 시약(blocking reagents)이다. 개발자는 시험법 완충액(예, 차단 또는 세척 시약)에 포함되는 계면활성제 및 세척 단계의 횟수 및 시점을 신중히 고려해야 한다. 여러 가지 단백질이 신호-대-잡음 비를 줄이기 위한 차단 시약으로 사용될 수 있다. 그러나 이러한 단백질은 특정 면역시험에서는 동일하게 작용하지 않을 수 있다. 예를 들어 모든 종류의 고정상에 잘 결합하지 않을 수도 있고 검출 시약과 예상하지 못한 교차반응을 보일 수도 있다. 그러므로 개발자는 시험법을 최적화하기 위해 여러 가지 차단 시약을 시험해야 할 수도 있다. 게다가 코팅되지 않은 웰(wells)을 포함하는 것만으로는 비-특이적 결합을 평가하는데 충분하지 않다. 그보다는 시료에 포함되어 있을 수 있는 유사한 크기 및 전하를 가진 무관한 단백질에 대한 결합능을 확인하는 것이 결합 특이성 입증에 있어서 더 나은 시험법이 될 것이다.

4.11 정량적 및 반-정량적 시험 결과 보고

양성 항체 반응을 보고하는 데 여러 가지 방법이 이용될 수 있으며, 사용된 방법의 적절성은 개별적으로 검토되어야 한다. 가장 흔한 방법은 환자에 대해 양성 또는 음성 항체 반응을 가진 것으로 보고하는 정성적인 접근방법이다.

항-약물 항체 양성인 환자에 대해서 항체 수준과 그것이 안전성 및 유효성에 미치는 영향을 결정하는 것이 유용하다. 양성 항체 수준은 역가를 이용하여 평가될 수 있다. 역가의 결정은 보통 시험의 기준값 또는 바로 그 위의 값을 나타내는 가장 높은 희석배수의 역수로 결정된다. 다른 방법으로, 용량 반응 곡선의 선형 부분을 이용하여 시험법 기준값에 희석배수를 외삽함으로써 결정될 수도 있다. MRD 및 산 분해와 같은 모든 시료 희석은 역가 계산 시 인자로 포함되어야 하며 역가 보고 시 제시되어야 한다.

중화능 시험법에 대한 결과 보고 시, 시험값은 단위 혈청 부피 당 중화되는 치료용 단백질 제제의 질량(mass amount)으로 표현될 수 있으나, 이는 임의의 시험관 내 시험법 단위이고 치료용 단백질의 체내 이용 정도를 예측하는 데 사용될 수 없다.

사용된 시험법을 통해 희석되지 않은 기질 부피 당 질량을 독립적으로 결정할 수 없다면 질량 단위로 보고된 항체 수준은 일반적으로 적절하지 않다. 이는 질량 단위 예측이 양성 대조 항체로 생성된 표준 곡선으로부터의 데이터 내삽에 기반하고 있고, 양성대조와 시험약

간에 평행성이 가정될 수 없기 때문이다. 게다가 양성 대조와 시험약 간의 평행성이 입증된 경우에도 시료가 서로 다른 종류의 항체를 포함하고 있을 수 있으므로 절대 질량 단위는 정확히 계산될 수 없다. 그래서 다음 경우를 제외하고 개발자가 질량 단위로 환자 항체 결과를 보고하는 것은 바람직하지 않다. (1) 정량적 방법으로 결과를 얻는 경우 (2) 보편적으로 인정되고 이용가능한 밸리데이션된 항체를 대조약으로 이용 가능하고, 대조 항체와 시험대상자 시료 간 희석 곡선의 평행성이 입증된 경우

4.12 시험법 개발에 대한 기타 고려사항

시료 다양성(variability), 세포 기반 중화능 시험법에서 대조 곡선 생성에 사용된 세포의 치료용 단백질 제제-용량 반응, 항-약물 항체의 친화도 및 결합력(avidity), 확증 시험에서 경쟁하는 제제의 농도 등 많은 요인들이 항-약물 항체 수준에 영향을 미칠 수 있다. 시험법의 다양성을 이해 및 분석하고 오류를 피하기 위해 이러한 요인들을 설명하는 것이 중요하다. 고려해야 할 공통 요소들은 다음과 같다.

4.12.1 이미 존재하는 항체

이미 존재하는 항체는 시험 중인 치료용 단백질 제제의 유효성에 영향을 줄 수 있다. 이미 항체가 존재하는 경우 정성적 스크리닝 시험법에 대한 대체 방법이 항-약물 항체의 양과 질을 평가하는데 필요할 수 있다. 예를 들어, 적정 시험과 같이 반-정량적인 시험법을 사용하여 항-약물 항체의 증가를 평가하는 경우, 치료용 단백질 제제가 면역원성에 대해 미치는 영향에 대해 정성적 시험으로 제공되지 않는 정보를 제공할 수 있다. 이미 항체가 존재하는 상황에서 치료용 단백질 제제 노출 이후 항체 역가가 증가하는 경우, 이를 치료-유발(treatment-induced) 항체 역가와 구분하여 치료-증가(treatment-booster) 항체로 보고할 수 있다. 예를 들어, 역가를 결정하기 위해 두 배 희석이 사용될 경우, 증가된 항-약물 항체 반응은 치료 전 역가에 비해 두 희석 단계 더 큰 역가로 정의될 수 있다.

4.12.2 류마티스 인자(Rheumatoid Factor; RF)

단클론항체와 Fc 융합단백질과 같이 Fc 부위가 존재하는 치료용 단백질 제제에 대한 면역 반응 측정은 기질 내에 RF가 존재하는 경우 특히 어려울 수 있다. 보통 RF는 IgG를 인식하는 IgM이다. RF는 항체의 Fc 부위에 결합하여 치료용 단백질 제제에 대한 특정 항체가 존

제하도록 만든다. 아스파탐 처리 및 배경 결합을 감소시키기 위해 시료의 농도를 신중하게 최적화하는 것을 포함하여 RF에 의한 방해를 최소화하는 여러 가지 방법이 유용한 것으로 확인되었다. 임상 개발 도중 RF가 위-양성 결과를 유발하는 Fc 융합 단백질에 대한 면역반응이 관찰되는 경우, 온전한 제제보다는 단백질의 비-Fc 부위에 특이적인 시험법 개발이 권고된다.

4.12.3 단클론항체

키메라화(chimeric) 및 인간화(humanized)와 같이 단클론항체에서 비-인간 서열을 감소시키고자 하는 기술은 항-약물 항체를 감소시켰으나 완전히 없애지는 못했다. 이러한 경우 면역 반응은 대부분 항체의 가변 영역들에 대해 발생한다. 가변 영역에 대한 반응성을 검출할 수 있는 시험법은 환자에서 단클론항체 기반 치료제에 대한 항체의 영향을 평가하는데 더 적절하다고 고려된다. 만일 Fc 부위가 변형되었거나 다른 분자에 결합하는 경우 이러한 반응을 고려한 시험법이 필요할 것이다.

4.12.4 결합 단백질(Conjugated Proteins)

항체-약물 결합체(Antibody Drug Conjugate; ADC)는 저분자 약물이 결합된 항체이며 전통적인 헵텐-전달체 분자를 대표한다. 그러므로 면역원성 시험은 항체, 링커-약물 및 결합에 의해 생긴 새로운 항원결정기를 포함하여 ADC의 모든 구성요소에 대한 반응을 측정해야 한다. ADC가 면역원성 시험을 위해 표지될 필요가 있는 경우, 표지된 분자들이 응집하여 소수성이 증가될 가능성을 고려해야 한다. 이러한 검출 시약들의 안정성 및 용해도는 적절히 평가되어야 한다.

5. 시험법 개발

시험법 종류별 개발에 대한 정보는 5.1~5.4에 제공된다. 이 단락들은 4장에서 제공된 모든 시험법 종류와 관련된 정보들을 보완한다.

5.1 스크리닝 시험법 개발

4.1절에서 언급된 다단계 접근법에 기반하여, 항-약물 항체를 검출하는 첫 번째 시험은 저

- 및 고-친화도 항-약물 항체를 검출하는 매우 민감한 스크리닝 시험법이어야 한다. 초기 시험법 개발 시 대략 5~10명 환자의 시료가 기준값 예측에 사용될 수 있다. 그러나 이는 치료를 받지 않은 환자 시료를 이용할 수 있는 경우 조정이 될 수 있다. 참양성 검출을 최대화하기 위해 낮고 제한된 위-양성 비율(약 5%)이 초기 스크리닝 시험법에 적절하다. 후속 시험은 실제 면역반응 발생률을 확인할 때 위-양성 결과를 배제하기 위해 이용될 수 있다.

5.2 확증 시험법 개발

스크리닝 시험법은 약 5%의 위-양성 비율로 혈청 시료에 존재하는 약물에 결합하는 항체의 존재를 대략적으로 확인하기 위해 설계되므로, 개발자가 치료용 단백질 제제에 특이적인 항체의 결합을 확증하는 시험법을 개발할 것이 권고된다. 적절한 확증 시험을 도입하는 것은 항-약물 항체가 안전성 및 유효성에 미치는 영향을 분석하는데 있어서 항-약물 항체 위-양성 데이터의 교란을 막기 위해 중요하다.

5.2.1 확증 시험법의 형식 선택

선택된 확증 시험은 스크리닝 시험법과 위-양성 비율은 서로 다르나 유사한 민감도를 가지고, 더 높은 특이성 및 최소 위-양성 시료를 확인할 수 있을 정도의 좋은 선택성을 가질 것으로 기대된다. 시험방법 및 기기의 형식은 스크리닝 시험법에 사용된 것과 유사하거나 서로 다를 수 있다. 보통 스크리닝 및 확증 시험법은 동일한 방법 및 기기 플랫폼을 이용한다. 그러한 경우 각 시험법의 민감도는 질량 단위로 결정되어야 하며 시험법이 결합 항체의 존재를 민감하게 검출함을 보증하기 위해 시스템 적합성 대조약을 이용하여 확증되어야 한다. 결합 경쟁 시험법을 이용하는 경우 경쟁 제제의 농도는 시험법 범위 전반 및 그 이상 범위의 항체 존재를 확인할 수 있도록 최적화 되어야 한다.

5.2.2 확증 시험의 기준값

경쟁적 억제 형식이 선택된 경우 기준값을 결정하는데 권장되는 접근방법은 보통 치료용 단백질 제제인 경쟁 약물의 존재 하에서 항체 음성인 치료를 받지 않은 환자 시료로부터 얻은 데이터를 이용하여 결정하는 방법이다. 이 경우 기준값을 설정하는 데 사용되는 치료용 단백질 제제의 양은 경쟁적 억제제로 사용될 치료용 단백질 제제의 양과 같아야 한다. 그러

나 이 접근방법은 치료를 받지 않은 환자군에서 얻은 시료에 항체가 이미 존재하는 경우에는 적절하지 않을 수 있다. 이러한 경우 개발자는 기준값 평가 시 참양성을 제외해야 한다. 드물기는 하나 기준 음성 시료를 사용할 수 없는 경우 개발자는 시료가 양성으로 스크리닝됨을 입증하기 위해 역가의 변화를 평가하거나 다른 방법을 사용해야 할 수도 있다.

5.3 적정 시험법 개발

항-약물 항체가 이미 존재하는 환자에서 치료-증가(treatment-boosted) 항-약물 항체 반응은 치료 후 역가의 증가에 의해 확인될 수 있다. 예를 들어 증가된 항-약물 항체 반응은 역가 결정을 위해 두 배 희석이 사용된 경우, 치료 전 역가 보다 두 희석 단계 더 큰 역가로 정의될 수 있다. 역가가 희석 곡선을 시험법 기준값으로 외삽하여 결정되는 경우, 치료 유도 반응은 시험법 변동성에 대한 추정값을 이용하여 결정될 수 있다.

5.4 중화능 시험법 개발

생체 외 중화능 시험은 항-약물 항체가 약물의 치료적 활성을 억제하는 능력을 나타낸다. 그러한 중화항체는 약물이 그 타겟에 도달하는 것을 막거나 수용체-리간드 상호작용과 같은 약리학적 활성을 방해함으로써 치료용 단백질 제제의 임상적 활성에 영향을 줄 수 있다. 항-약물 항체 양성 시료의 중화능을 평가하기 위한 시험방법의 선택은 치료용 단백질 제제의 작용기전에 근거해야 한다. 임상적 활성을 나타내는 데이터를 생성하는 높은 민감도의 약력학 표지자 또는 적절히 디자인된 약동학 시험 또는 그 모두를 이용 가능한 경우와 같이 중화 항체 시험법 대신 이러한 방법을 이용하는 것이 가능할 수도 있다.

5.4.1 중화능 시험 형식의 선택

중화항체 활성을 측정하기 위해 세포 기반 시험법 및 비-세포 기반 경쟁적 리간드 결합 시험법의 두 가지 접근 방법이 사용되어 왔다. 적절한 시험법 형식의 선택은 여러 가지 요인에 따라 결정된다. 이러한 요인들은 치료용 단백질 제제의 작용기전, 선택성, 민감도, 정확성 및 시험법의 완전성 등을 포함한다. 일반적으로 중화능 시험법으로 세포 기반 시험법을 이용할 것이 권고된다. 치료용 단백질 제제의 작용 기전에 따라 중화능을 평가할 다른 전략이 있을 수 있다. 예를 들어 항체 결합 시험법은 길항적 단클론항체 또는 타겟에

결합하여 억제하는 수용체 Fc 융합단백질에 적합할 수 있다.

세포내 기질의 인산화, 칼슘 가동화, 증식 및 세포 사멸과 같은 서로 다른 세포 반응이 이러한 시험법으로 측정될 수 있다. 몇몇 경우 개발자들은 관련 수용체 및 수용체 구조를 발현하는 세포주를 개발하였다. 치료용 단백질이 직접적으로 세포 반응을 유도하는 경우 중화항체가 생물활성을 감소시키는 직접적인 효과를 시험법에서 측정할 수 있다. 치료용 단백질이 간접적으로 세포 반응을 유도하는 경우(예, 수용체-리간드 작용 차단을 통해) 중화항체가 생물학적 활성을 회복시키는 간접적인 효과를 시험법에서 측정할 수 있다. 몇몇 생물학적 시험법들은 다양성이 크고 활성 곡선에 대한 동적 범위가 제한된다. 그러한 문제들은 중화 시험법의 개발 및 밸리데이션을 어렵게 만들 수 있다.

리간드 결합 시험법 또는 효소 활성 시험법과 같이 비-세포 시험법이 사용되는 경우가 있다. 한 가지 경우는 민감하거나 특이적인 세포 기반 시험법이 개발될 수 없는 경우이다. 또 다른 경우는 세포 섭취를 필요로 하지 않는 효소 치료용 단백질 제제의 경우와 같이 치료용 단백질 제제가 세포기반 작용기전을 가지고 있지 않은 경우이다. 이러한 경우 개발자들은 리간드 결합 시험법 이용을 고려할 수 있다.

5.4.2 중화능 시험법의 활성 곡선

일반적으로 중화능 시험법은 단일 희석 항체와 단일 농도의 치료용 단백질 제제를 이용한다. 결론적으로 개발자는 억제에 민감한 활성 결과를 나타내는 치료용 단백질 제제 농도를 선택해야 한다. 용량 반응 곡선의 아래 부분에서의 용량은 중화 역치를 만족할 수 있는 충분한 범위의 반응을 나타내지 못할 수 있다. 만일 시험이 용량-반응 곡선의 평탄역(plateau) 근처에서 수행되면 적은 양의 중화항체로 중화항체 양성 시료를 구분하지 못할 수 있다. 따라서 중화능 시험이 치료용 단백질 제제 용량-반응 곡선의 선형 부분의 농도에서 평가되는 것이 권고된다.

5.4.3 중화능 시험에서 기질 저해 고려

기질은 특히 기질 성분들이 시험법에서 치료용 단백질 제제의 활성을 증가 또는 감소시킬 수 있는 경우 중화 시험에 영향을 줄 수 있다. 예를 들어 특정 질환을 가진 환자의 혈청은 시험에서 세포를 활성화시킬 수 있는 하나 또는 그 이상의 사이토카인이 상승되었을 수 있다. 이는 기존의 활성 인자 또는 치료용 단백질 제제에 대한 반응을 증가시킴으로써 중화항체

의 존재를 확인하기 어렵게 만들 수 있다. 반대로 간접 인자가 특정 항체 사용 또는 약물 치료에 특이적으로 반응하는 세포주 사용에 의해 억제되거나 제거될 수 있다. 기질 시료에서 유래한 항-약물 항체를 높이는 것이 이러한 종류의 상황에 적합할 수 있다. 그러나 이러한 접근방법은 중화항체의 손실을 유발하여 결과적으로 개발자의 신중한 관찰 및 밸리데이션이 요구될 수 있다.

5.4.4 중화능 시험의 기준값

모든 시험에 있어서 기준값은 치료를 받지 않은 환자 시료를 이용하여 확립된 시험법 변동성에 근거하여 설정되어야 한다. 만일 중화능 시험이 스크리닝 및 확증 시험에서 양성으로 확인된 시료에 대해 수행되는 경우 일반적으로 1%의 위-양성 비율이 적절하다. 드물기는 하지만 중화능 시험이 스크리닝에 사용되는 경우에는 5%의 위-양성 비율이 사용된다. 만일 시료의 변동성 때문에 중화항체 활성을 평가하기 어려운 경우 다른 방법이 고려될 수 있다. 변동성을 줄이고 더 정확한 기준값을 제공하는 다른 시험법 형식을 탐색하는 것이 필요할 수 있다. 일반적으로 중화능 시험에 대해서는 약물의 작용 기전에 따라 신호의 억제 또는 활성화 비율 역치로 설정되는 고정된 기준값이 사용되는데, 유동적인 기준값이 사용될 수도 있다. 기준값에 대한 일반적인 정보에 대해서는 4.2절을 참고한다.

5.4.5 중화능 시험의 추가적인 고려사항

중화능 시험은 주로 항원 특이적 항-약물 항체를 가진 시료에 대해서 수행되는 시험이므로 확증적 접근은 필요하지 않다. 그러나 몇몇 경우에는 시험법의 복잡성 때문에 환자가 실제 중화항체 반응을 보였는지 확인하는데 시험법의 특이성 확증이 유용할 수 있다. 개발자는 다음의 접근법을 고려해야 한다.

- a. 관련 없는 억제성 분자가 중화 반응을 유발할 수 있으며, 관찰된 중화 활성이 중화항체에 의한 것인지 다른 억제성 분자에 의한 것인지 때때로 불명확할 수 있다. 노출 전 기저값에 대한 시험결과가 유용할 수 있다. 비특이적 억제가 우려되는 경우 중화 활성이 실제로 항-약물 항체에 의해서 유발되고 다른 억제성 분자에 의해 유발되지 않음을 평가하기 위해 항체 고갈(depletion) 시험이 수행되어야 한다.

- b. 세포주는 시험 중인 치료용 단백질 제제 이외의 여러 가지 자극에 반응을 나타낼 수 있다. 그러한 경우 중화항체의 존재는 특정 중화항체 반응에 의해 차단되지 않는 다른 자극과 대비하여 특정 중화항체 반응에 의해 차단되는 치료용 단백질 제제의 존재 하에서 관찰될 수 있다.
- c. 기질은 중화능 시험에서 잘못된 결과를 유발할 수 있는 용해성 수용체 또는 내인성 제제 대응물과 같은 성분들을 포함하고 있다. 그러한 경우 치료용 단백질 제제가 없는 상태에서 시험 기질 시료를 직접 시험에 추가하거나, 혹시 알려져 있는 경우, 기질 요소를 차단하면 시험 결과를 이해하는 데 유용하다.
- d. 중화능 시험을 디자인할 때, 특히 반감기가 긴 약물이 사용될 때, 시료 내(on-board) 약물의 존재가 고려되어야 한다.

6. 시험법 밸리데이션

시험법 밸리데이션은 특정 실험적 조사를 통해 대상이 되는 항-약물 항체 시험법의 성능 특성이 의도하는 목적에 부합하는지 입증하는 과정이다. 밸리데이션 정도는 제품 개발 단계 및 치료용 단백질 제제와 관련된 환자의 면역원성 결과의 위해도에 따라 결정된다. 대부분의 제제의 경우 시험법 민감도, 특이도, 정확도, 기준값 및 약물 내성을 포함하는 (상대적으로 완전성, 재현성 및 안정성에 대한 강조는 약한) 부분 밸리데이션이 임상 1, 2상과 같은 임상 개발 초기 단계에서 적절할 수 있다. 위해도가 높은 제제는 임상시험 이전에 완전한 밸리데이션이 요구될 수 있다. 그러나 6.1절에 언급된 것과 같이 완전한 밸리데이션 시험은 핵심 또는 시판 후 임상시험용 시료에 대해 수행되어야 한다.

시험 종류에 따른 밸리데이션 정보는 6.2절부터 6.5절에서 제공된다. 이 단락들은 4장 및 6.1절에서 제공되는 모든 종류의 시험과 관련된 정보를 보완한다.

6.1 시험법 밸리데이션에 대한 일반적 고려사항

핵심 시험으로부터 획득한 시료는 완전히 밸리데이션된 시험으로 평가되어야 한다. 허가신청 시점에서 개발자는 시험법이 완전히 밸리데이션 되었음을 입증하는 데이터를 제출해야 한다.

밸리데이션은 항-약물 항체 측정에 사용되는 시험법이 의도한 목적에 부합하는지 입증하는 평가를 포함한다. 밸리데이션을 위한 기본적인 파라미터들에는 (1) 기준값 (2) 민감도 및 약물내성 (3) 특이성 및 선택성 (4) 정확성 (5) 재현성⁶⁾ (6) 몇몇 시험 특성에 대한 완전성 (7) 주요 시약에 대한 사용중 안정성이 포함된다.

기준값의 결정은 시험법 밸리데이션에서 기본적인 부분이다. 기준값 결정을 위해 균형 잡힌 시험 디자인이 사용되어야 한다. 만일 반응의 플레이트 균일성(plate homogeneity)이 입증되지 않은 경우, 기준값을 결정하는 동안 변경된 플레이트 배열을 사용해야 한다. 만일 치료받지 않은 적절한 환자군으로부터 획득한 시료를 전-밸리데이션 시험에 사용할 수 없으면 대체 시료를 이용할 수 있으며 종종 상용 시료가 이용된다.⁷⁾ 밸리데이션 시험에서 기준값 결정에 대체 시료가 사용되는 경우 기준값은, 예를 들어 시험 조건에서 수집, 관리 및 보관된 치료를 받지 않은 환자 시료와 같이 적절한 환자군으로부터 획득한 시료를 이용하여 확증되어야 한다. 만일 치료를 받지 않은 환자의 기질 시료를 이용하여 확립된 기준값이 시험법 밸리데이션을 통해 얻은 값과 차이가 큰 경우 기준값이 조정되어야 한다. 시험 대상 시료가 항-약물 항체에 양성인지 여부를 결정하기 위해서는 적절한 시료를 이용하여 확립된 기준값이 사용되어야 한다.

기본적인 시험법 파라미터의 밸리데이션을 위해서는 비록 모든 종류의 변동성을 포함하기 위해 서로 다른 기기가 사용되어야 하지만, 시험 간 정확성을 서로 다른 날에 서로 다른 분석자가 동일한 기기 플랫폼과 모델을 이용하여 평가할 것을 권고한다. 이러한 디자인은 각 시료에 대해 최소 6개의 독립적인 결과값을 산출한다. 시험 내 정확성은 동일한 분석자에 의해 독립적으로 준비된 플레이트 당 최소 6개의 동일시료 유래의 독립적인 조제물(preparation)에 대해 평가되어야 한다. 다른 방법으로, 동일 시료 유래의 최소 6개 독립적인 조제물에 대해 하나의 플레이트에서 시험하는 것이 불가능하여 결과 산출 효율이 낮은 경우(예, 적정 시험법), 플레이트 당 동일 시료에서 유래한 최소 3개의 독립적인 조제물 및 동일 시료 유래 최소 총 9개의 독립적인 조제물에 대해 시험-내 정밀성이 평가되어야 한다. 시료는 음성 대조 및 시험 동적 범위에서 저, 중, 고 수치를 나타내는 양성 시료를 포함해야 한다. 일반적으로 변동계수 비율(%CV)로 표현된 시험-내 및 시험-간 정밀성은 20% 미만이어야 한다. 그러나 세포 기반 시험과 같은 몇몇 시험 형식에서는 더 높을 수 있다. 시험-내 및 시험-간 정밀성이 20%보다 큰 %CV값을 갖는 경우 개발자는 시험법

6) 재현성(교차-밸리데이션)은 시료 평가 시 하나 이상의 실험실이 참여하는 경우 요구된다.

7) ‘치료를 받지 않은 환자’는 시험법 개발 또는 밸리데이션 단계 및 시료의 가용성에 따라 건강인 또는 치료용 단백질 제제에 노출되지 않은 환자가 될 수 있다. 개발자는 사용되는 시료의 적절성에 대한 근거를 제시해야 한다.

정밀성을 최적화하기 위해 시험법 변수들을 조정하거나 더 높은 %CV가 왜 적합한지 타당하게 설명할 수 있어야 한다. 음성 대조군에 대해서는 더 큰 %CV가 인정된다. 개발자는 가능한 경우 장비 간 및 시험자 간 정밀성을 평가해야 한다.

시험법에 적용되는 방법, 기술 또는 기기 플랫폼에 따라 특정 변수들에 대한 밸리데이션이 필요할 수 있다. 예를 들어, 표면 플라즈몬 공명 시험은 재생 시 표면 안정성에 대해 밸리데이션 되어야 하며, 칩(chip)의 기저 성능에 대한 기준이 설정되어야 한다. 개발자는 개발 단계에서 완전성을 확인해야 하며 검증되어야 할 시험법 완전성 양상에 대한 밸리데이션 여부를 결정해야 한다. 예를 들어 표지된 시약의 효율과 안정성, 반응 시간 및 온도가 결정되어야 한다.⁸⁾

기 검증된 방법을 변경하는 경우 개발자는 어느 정도의 추가 밸리데이션이 필요한지 결정해야 한다. 일반적으로 제품 개발이 진행되면서 항-약물 항체 시험이 변경될 수 있다. 때때로 시료들은 최적화된 검증 시험법을 이용하여 재시험될 필요가 있다. 그러므로 완전히 밸리데이션 되고 규제기관에 의해 평가되기 전까지는 재시험이 가능하도록 충분한 양의 시료가 보관되어야 한다.

6.2 스크리닝 시험의 밸리데이션

6.2.1 스크리닝 시험법의 민감도

앞에서 언급된 시험법 밸리데이션에 대한 모든 일반적인 고려사항은 스크리닝 시험의 밸리데이션에 적용된다. 이전에 언급된 바와 같이, 스크리닝 시험 결과에 따라 시료의 후속 분석을 실시하게 되므로 초기 스크리닝 시험에서 민감도는 특히 중요하다.

6.2.2 스크리닝 시험법의 기준값

기준값은 적절한 수의 투여하지 않은 환자 시료를 이용하여 통계적으로 결정되어야 하며 일반적으로 약 50개의 시료가 이용된다. 각각의 시료는 최소 서로 다른 3일간 2개의 분석물에 대해 시험하여 전체 최소 6번의 개별 측정이 이루어져야 한다. 5%의 위-양성 비율을 확실하게 보증하는 한 가지 접근방법은 음성 대조 환자에 대한 95번째 백분위에 대한 90% 신뢰구간 단측 하한을 적용하는 것이다. 이는 최소 5% 위-양성 비율을 90% 신뢰수준

8) 시약은 검출 또는 시각화를 돕는 부분(moiety)과 결합 또는 융합된 경우 '표지' 되었다고 본다. biotin, streptavidin 또는 fluorochrome과의 결합이 그 예이다. 비표지된(unlabeled) 시약은 표지되지 않은 시약이다.

으로 보증할 것이다(Shen 등, 2015). 이러한 접근방법은 항체가 발생할 수 있는 모든 환자를 시험법으로 확인할 수 있는 확률을 높인다. Shen 등이 발표한 접근방법을 이용하면 각 시료에 대한 보고 가능한 수치는 6회 측정값의 평균이 되어야 한다. 기준값을 결정하는 데 사용되는 통계적 방법은 데이터의 통계적 분포에 기반해야 한다. 예를 들어 정규분포의 95 번째 백분위는 평균 더하기 표준편차의 1.645배로 예측된다. 95 번째 백분위를 예측하는 데 사용되는 다른 방법에는 평균과 표준편차 대신 중앙값과 중앙값 절대 편차를 이용하는 것이 포함된다.

음성 대조 시료에 대한 평균 반응은 일정하거나 시험, 플레이트 또는 분석자에 따라 달라질 수 있다. 시험, 플레이트 또는 분석자 간 평균은 다르나 편차는 일정한 경우 정규화 인자가 통계적으로 결정되어 시험에 적용될 수 있다. 이것은 유동적 기준값(floating cut-point)으로 알려져 있으며 가장 흔하게 사용되는 기준값이다. 정규분포를 따르는 데이터의 경우 평균이 일정하면 기준값은 시험법 밸리데이션 도중에 확립될 수 있다. 이것은 고정된 기준값(fixed cut-point)으로 알려져 있다. 고정된 기준값 사용은 음성 대조 평균값이 시험마다 다를 수 있는 가능성을 허용하지 않으므로 권장되지 않는다. 평균과 분산에 모두 변동이 있는 경우 기준값이 각각의 시험, 플레이트 및 분석자에 대해 확립될 필요가 있다. 이는 동적 기준값(dynamic cut-point)으로 알려져 있다. 그러나 이러한 접근방법은 음성대조에 대한 더 많은 반복평가(replicates)가 필요하기 때문에 실용적이지 않다. 동적 기준값을 사용하는 대신 추가적인 시험법 개발이 고려되어야 한다.

6.3 확증 시험법의 밸리데이션

확증 시험법은 스크리닝 및 중화능 시험법과 유사한 방식으로 충분히 밸리데이션 되어야 한다. 과학적인 방식으로 시험법 밸리데이션 연구는 시험법 형식과 선택한 기기에 따라 결정된다. 이러한 시험법이 항원 결합에 대한 항체의 경쟁⁹⁾에 기반하고 측정값이 반응의 감소라면, 시료에 대해 양성으로 판정할 억제 또는 고갈의 정도를 확인하는 것이 필수적이다. 과거에는 결합 감소에 대한 고정된 백분율이 사용되었으나, 이러한 수치들이 종종 임의적이고 모든 시험법에 적용될 수 없다. 경쟁 항원을 추가했을 때 항체가 없는 것으로 알려진 음성 대조 시료에서 관찰된 결합 변화에 대한 평가를 기반으로 기준값을 설정할 것이 권고된다. 또한 확증 시험의 민감도는 낮은 농도의 양성 대조 항체를 이용하여 입증할 것이 권고된다.

9) '항원 결합에 대한 경쟁'이란 항원-특이적 항체가 표지된 또는 플레이트에 결합된 항원에 결합하는 능력이 비표지된 또는 용해성 항원에 의해 억제되는 경쟁적 시험법을 의미한다.

확증 시험 기준값을 예측하는 하나의 접근방법은 99 백분위에 대한 80 내지 90% 신뢰구간 단측 하한을 적용하는 것이다. 이 시험법의 목적은 비-특이적 결합 결과로부터 유래하는 위-양성 시료를 제거하는 것이므로 확증 기준값 계산 시 1% 위-양성율을 사용하는 것이 적절하다. 0.1%와 같이 더 작은 위-양성율을 사용하는 것은 권고되지 않으나 더 규모가 큰 시험법들에는 적용될 수 있다.

확증 시험 형식은 항-약물 항체가 포획 시료(capture reagent)에 결합하는 것을 억제하기 위해 주로 비표지 치료용 단백질 제제인 경쟁 물질을 반응 혼합물에 추가하는 경쟁 시험법(competition assay)을 종종 사용한다. 이러한 시험 형식에서는 확증 시험 기준값을 결정할 때 동일한 농도의 비표지 단백질 제제가 음성 대조 시료에 추가되어야 한다.

6.4 적정 시험법의 밸리데이션

6.1에 기술된 시험법 밸리데이션의 원칙은 일반적으로 적정 시험법 밸리데이션에 적용된다. 적정 시험법의 기준값은 스크리닝 시험법의 기준값과 같거나 다를 수 있다. 예를 들어 미국 약전에서는 혈청의 차단 효과 때문에 시험 희석액 또는 기질에서의 신호가 스크리닝 시험 결과보다 높은 경우나, 주로 스크리닝 기준값이 양성 대조 희석 곡선의 낮은 고원 부분의 값을 나타내는 경우에서와 같이, MRD 보다 높은 희석 시료가 음성 결과를 일관성있게 생성하지 않는 경우 적정 시험법 기준값을 확립하기를 권고한다. 적정 시험법 특이적인 기준값이 사용되는 경우 밸리데이션 되어야 한다. 적정 시험법이 스크리닝에 사용되지 않는 경우 기준값은 0.1% 위-양성율을 사용하여 확립될 수 있다. 적정 시험법이 스크리닝에 사용될 경우(예, 환자 집단이 기-존재하는 항-약물 항체의 발현율이 높은 경우), 기준값은 5% 위-양성율을 이용하여 확립되어야 한다.

6.5 중화능 시험법의 밸리데이션

기준값을 결정하기 위해서는 최소 서로 다른 3일 동안 최소 두 사람의 분석자에 의해 최소 30개의 시료가 적절한 통계적 방법을 이용하여 분석되어야 한다.(5.4.4절 참고)

시험법 민감도 평가는 사용되는 양성대조의 종류(예, 단클론항체 또는 다클론항체), 시험법의 변동성 및 시험법의 기준값 결정 방법에 의해 영향을 받을 수 있다. 그럼에도 불구하고 밸리데이션 수행 중 시험법 민감도 평가는 중요하다.

중화 시험에 대한 양성 대조로 단클론항체 또는 정제된 다클론항체가 사용될 수 있다. 정제된 다클론 양성 대조 항체가 사용되는 경우 항체 중 일부만 중화능을 가져서 시험법을 덜 민감하게 만들 수 있다.

개발자는 세포 기반 중화능 시험법의 시험법 특이성을 밸리데이션해야 한다. 언급된 바와 같이 특정 치료용 단백질 제제 이외의 자극에 반응성이 있는 세포에 대해서는 중화항체가 치료용 단백질 제제에 대한 반응만을 억제하며 다른 자극에 대한 반응은 억제하지 않음을 입증하는 능력이 시험법 특이성을 나타내는 좋은 지표이다. 그러한 연구에 대해 다른 자극물이 치료용 단백질 제제와 유사한 결과를 나타내는 농도로 사용되기를 권고한다. 개발자는 환자 혈청에 다른 자극물이 없음을 입증해야 한다.(4.3~4.5절 참고)

세포 기반 중화능 시험법은 생물학적 반응이 잘 조절된 결합 시험법에 비해 내재적 변동성이 더 크므로 리간드 결합 시험법에 비해 종종 정밀성이 낮다. 시험법 정밀성이 낮은 경우 개발자는 정밀성 평가와 개별 반응 평가를 위한 더 많은 수의 시료에 대한 시험 수행을 고려해야 한다.(4.6절 참고)

허용된 세포 배양 계대 수 및 세포 밀도 및 생존에 대한 저, 중, 고 범위의 세포가 사용되는 경우 추가적인 시험법 성능 매개변수들(performance parameters)이 확립되어야 한다. 이는 시험법 개발 도중 종종 수행되며 밸리데이션 시험의 일부로 포함되지 않을 수 있다.

7. 시험법의 이행

7.1 시료의 확보

개발자들이 모든 환자들로부터 치료 전 시료를 확보할 것이 권고된다. 기질 내에 항체가 이미 존재하거나 교란 성분이 존재할 가능성이 있으므로 투여 전 반응성 정도를 확인하는 것이 필수적이다. 개발자는 투여 빈도에 기반하여 일련의 시료를 확보해야 한다. 적절하게는 최초 노출 후 7~14일 동안 확보한 시료는 초기 IgM 반응을 확인하는 데 도움을 줄 수 있다. 최초 노출 후 3~6주 기간에 확보한 시료는 보통 IgG 반응을 결정하는 데 적절하다. IgA 반응은 IgG 반응보다 일찍, 항원 노출 후 약 2~3주 시점에 최고에 도달한다. 치료용 단백질 제제를 단회로 투여받는 환자들의 경우에는 이러한 시간 범위가 적절하다. 그러나 시험 도중 여러 번 투여받는 환자에 대해서는 개발자가 시험 전반에 걸쳐 일정한 간격으로 그리고 최종 투여 약 30일 후 시료를 확보해야 한다. 반감기가 긴 제제에 대해서는 최종 투여 후 약 5

반감기 후의 시료를 확보해야 한다. 항-약물 항체로 인해 중대한 이상반응이 발생할 위험이 높은 경우, 개발자들은 항-약물 항체가 기저수준으로 회복될 때까지 시료를 채취할 계획을 수립해야 한다. 기질 속의 치료용 단백질 제제로부터 간섭이 최소화되는 시점에서 시료를 채취하는 것이 필수적이다. 개발자는 적절한 시료 채취 시점 결정을 돕기 위해 치료용 단백질 제제의 반감기 및 용법용량을 고려해야 한다. 이는 특히 단클론항체의 경우 반감기가 수 주일 이상 될 수 있으며, 용법용량에 따라서는 치료용 항체 그 자체가 혈중에 수 개월 동안 남아있을 수 있으므로 중요하다. IgE를 시험하는 경우에는 시료 채취의 시점에 대해 규제기관과 논의해야 한다.

임상 단계에서 치료용 단백질이 없는 시료가 확보될 수 없다면, 개발자는 시험법이 약물 존재하에도 민감함을 입증하기 위한 추가적인 조치를 취해야 하며 시료는 적절한 세척(washout) 기간(일반적으로 5 반감기) 이후에 획득해야 한다. 의미있는 항체 반응을 시험하기 위한 시료 채취는 치료용 단백질 제제 그 자체가 면역 억제제인 경우 어려울 수 있다. 그러한 경우 시료 채취 일정은 가능한 한 면역억제제 용법용량에 따라서 조정되어야 한다.

치료용 단백질 제제의 혈중 농도를 확인하기 위한 시료는 면역원성 시료와 같은 시점에 획득되어야 한다. 그러한 시료에 대한 시험은 시료에 존재하는 치료용 단백질 제제가 항-약물 항체 시험을 방해하는지, 항-약물 항체가 치료용 단백질 제제의 약동학에 영향을 주는지 여부에 대한 정보를 줄 수 있다. 항-약물 항체가 기저치에 도달할 때까지 시험을 지속하고 필요시 시험을 재 실시 또는 재검증하기 위한 시료를 이용할 수 있도록 하기 위해 시험 참여자들로부터 동의를 받는 것이 중요하다. 시험법 개발 및 관리에 시료를 이용할 수 있도록 시험 참여자들의 동의를 받는 것도 필요하다.

7.2 동시 양성 및 음성 품질 관리

개발자가 적절한 밸리데이션 작업을 완료하고 기준값을 결정한다면 환자의 면역원성 상태는 직접적으로 결정될 것이다. 그러나 양성 대조 및 품질 관리 시료는 필수적이며 환자 시료와 동시에 시험되어야 한다. 이러한 시료는 음성, 저, 고 수준의 신호를 가진 품질 관리 시료의 양성 범위에 걸쳐있어야 한다. 더 중요한 것은 품질 관리 시료는 시험 대상 환자 시료의 기질로 희석되어야 한다. 예를 들어 품질 관리 시료는 환자 시료와 동일한 항응고제로 희석되어야 한다. 저 양성 품질 관리 시료의 경우 통계적인 분석을 통해 시험의 1% 배제를 유도하는 농도로 설정할 것이 권고된다. 이러한 방법으로 개발자는 시험법이 예상한 성능을 나타내고 시료가 정확히 평가되었음을 보증할 수 있다. 만일 시험법이 희석역

(prozone) 효과¹⁰⁾를 나타낸다면, 고 양성 품질 관리 시료의 농도는 희석역 효과를 확인할 수 있도록 설정되어야 한다.

또한 이러한 품질 관리 시료들은, 음성 결과가 이차 시약의 검출 실패에 의해 발생하는 것이 아니라 실제 항원 반응성이 없기 때문임을 보증하기 위해 이차 검출 시약에 의해 검출되는 항체를 가진 사람 또는 동물로부터 획득해야 한다. 이러한 문제는 표지된 항원을 검출에 사용하는 가교(bridging) 시험의 경우에는 문제가 되지 않는다.

7.3 대상 환자에서 기준값 확정

서로 다른 환자군에서 획득한 시료들은 항-약물 항체 시험에서 서로 다른 배경 활성을 나타낼 수 있다. 이와 유사하게, 시험법 밸리데이션 동안 기준값을 결정하는 데 사용된 시료 확보 방법이 실제 시험에서 시료를 확보·처리하는 방법을 대표하지 못하는 경우 배경 활성이 변할 수 있다. 그러므로 시험법 밸리데이션 도중 결정된 기준값이 대상 환자군에 적절함을 확인하는 것이 필요하다. 대상 환자군으로부터 획득한 충분한 수의 시료가 사용되어야 하며 시료 수에 대한 타당성이 입증되어야 한다.

8. 문서화

개발자가 치료용 단백질 제제 개발 초기부터 면역원성 데이터를 수집하고, 개별 제제 임상 프로그램이 임상시험 승인신청 단계에서 허가신청 및 허가 후 단계에 이르기까지 진행됨에 따라 일정한 간격으로 업데이트되는 개인별 종합 면역원성 요약 보고서 생성을 통한 전주기 관리 접근방법이 권고된다. 문서의 별도 부분에 (1) 면역원성 위해도 평가 (2) 단계적 생물분석 전략 및 시험법 밸리데이션 요약 (3) 임상 시험 디자인 및 세부 면역원성 시료 채취 계획 (4) 임상 면역원성 데이터 분석 및 (5) 결론 및 위해성 평가·완화 전략을 포함하여 확보 가능할 때마다 개발단계에 적합한 정보가 포함되도록 할 것이 권고된다.

허가신청 자료로서 개발자가 면역원성 결과의 간단한 요약을 CTD section 2.7 임상 요약 및 section 5.3.5.3 하나 이상의 시험 데이터 분석 보고서의 적절한 위치에 제공하는 것이 권고된다. 면역원성에 대한 종합 요약은 다음 내용을 포함해야 한다.:

10) 희석역 효과는 후크 효과라고도 하며 고 농도의 특정 분석물 또는 항체의 존재로 인해 발생할 수 있는 신호의 감소로서 위-음성 결과를 유발할 수 있다.

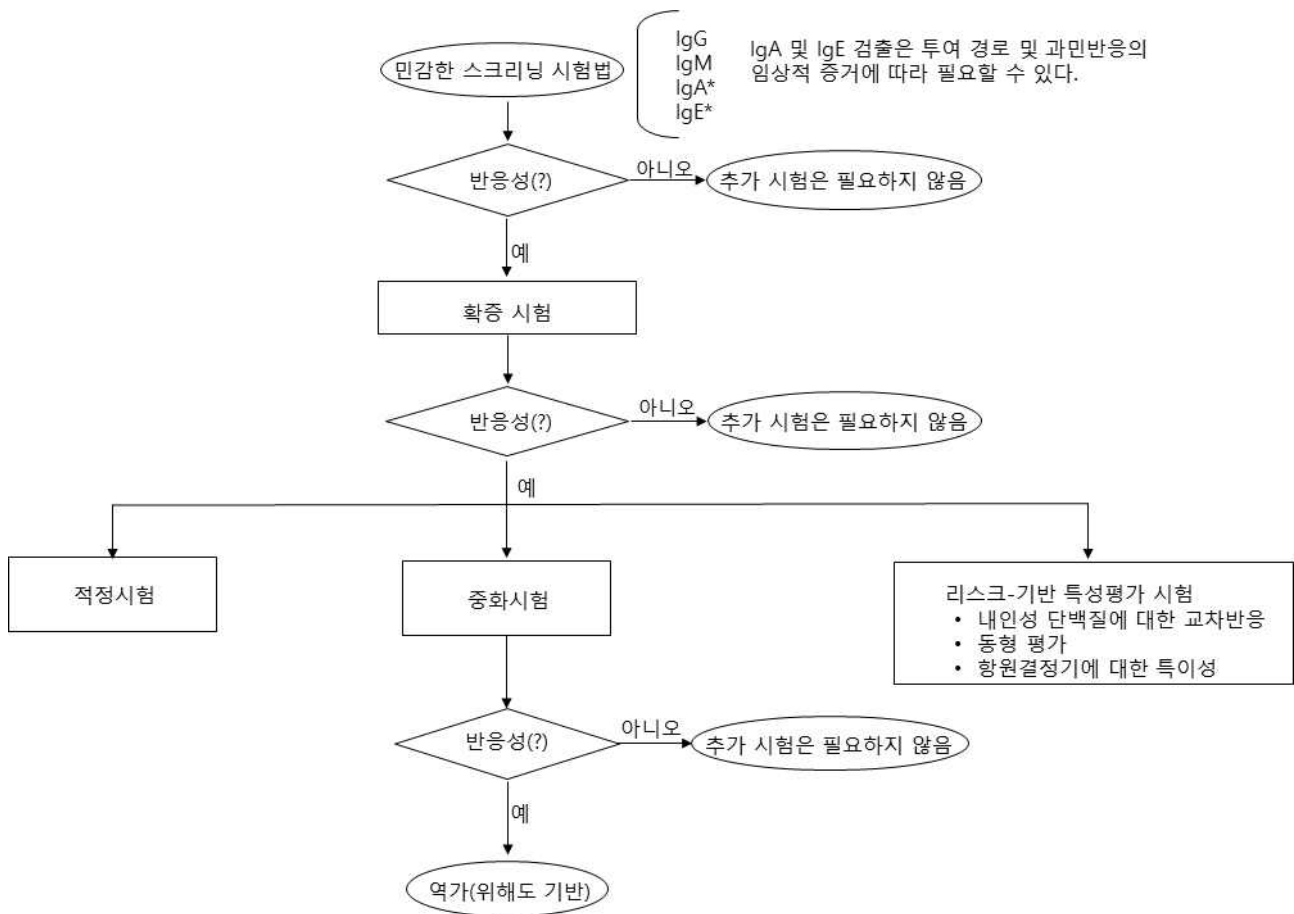
- a. 면역원성 위해성 평가: 치료용 단백질 제제에 특이적인 간략한 면역원성 위해성 평가를 포함해야 한다. 이 부분은 치료용 단백질 제제의 품질-관련 요인들에 대한 논의와 이러한 요인들이 치료용 단백질 제제의 면역원성에 어떻게 영향을 미치는지, 환자군 및 임상 적응증 관련 면역반응 유발 가능성에 대한 논의를 포함한 환자 관련 요인들, 그리고 면역원성 반응을 관리하기 위해 도입된 모든 전략 및 임상시험 조건을 포함한 임상시험 디자인 관련 요인들을 포함해야 한다.
- b. 단계적 전략 및 단계별로 적절한 분석시험법: 각 임상 단계 동안 사용된 면역원성 평가 전략 및 임상 중 개발된 다양한 시험법에 대한 특성분석을 포함해야 한다. 추가로 이 부분은 적응증을 뒷받침하는 핵심 임상 시험에 대한 시험법 개발 및 밸리데이션 보고서를 참조해야 한다.
- c. 임상시험 디자인 및 시료채취 전략: 면역원성 평가를 수행하는 모든 임상시험에 대한 면역원성 시료 채취 계획을 포함해야 한다. 이 부분에는 가능한 경우 면역원성 및 약동학 시료 채취 시점을 포함해야 한다.
- d. 임상 면역원성 데이터 분석: 항-약물 항체 상태와 약동학, 약력학, 효력 및 안전성(이상 반응) 데이터 간의 선형 또는 비-선형 상관성 분석 결과가 포함된 면역원성 평가를 포함하는 모든 임상시험에 대한 면역원성 분석의 요약 결과를 제시해야 한다. 이 부분은 항-약물 항체를 평가한 시료에서 측정된 약물 수준을 포함해야 하고, 개별 임상 시험에서 사용된 약물의 로트가 추적되어야 한다. 기-존재하는 또는 치료에 의해 증가되었거나 생성된 항체가 치료용 단백질의 약동학, 약력학, 유효성 및 안전성에 미치는 영향을 평가해야 한다.
- e. 결론 및 위해성 평가 및 완화 전략(적용가능한 경우): 치료용 단백질 제제의 면역원성이 환자의 안전성 및 유효성에 미치는 영향에 대한 고찰이 포함되어야 한다. 추가적으로, 시판 후 치료용 단백질 제제의 면역원성 모니터링 방법과 이것이 어떻게 위해성 평가 및 완화 전략 계획에 포함될 것인지에 대해 고려되어야 한다. 마지막으로 시험법 재평

가 계획 및 시판 후 조사를 위한 계약 기관으로의 시험법 이전을 포함하여 승인된 면
역원성 시험법의 전주기 관리에 대해 검토되어야 한다.

참고문헌

- 유전자재조합의약품 면역원성 평가에 관한 가이드라인 (2019)
- Guidance for industry : Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products - Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection (FDA, 2019)
- ICH guidance for industry Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology
- Guidance for industry : Bioanalytical Method Validation (FDA, 2018)

부록 : 항-약물 항체 시험법 개발을 위한 단계적인 접근방법



발 행 일 2021년 10월 25일

발 행 인 서 경 원

편집위원장 박 인 숙

편 집 위 원 정지원, 백대현, 김은경, 도희정, 최경민, 권도연, 김진아, 최민정,
권오석, 최예진, 김지원

발 행 부 서 식품의약품안전평가원 바이오생약심사부 유전자재조합의약품과

연 락 처 식품의약품안전평가원 바이오생약심사부 유전자재조합의약품과

전 화 번 호 043-719-3503

팩 스 번 호 043-719-3500

공익신고자 보호법이 항상 당신의 양심을 지켜드립니다.

식약처의 공무원이나 관계자가 부조리한 행위를 하거나 부당하게 처리한 경우가 있을 때는 다음으로 신고하여 주시기 바랍니다. 신고자의 신원은 절대보장 하겠으며 향후 민원처리에 있어 추호의 불편함이 없도록 최선을 다하여 도와드릴 것을 약속드립니다.

공익신고자 보호제도란?

공익신고자 등(친족 또는 동거인 포함)이 공익신고 등으로 인하여 피해를 받지 않도록 **비밀보장, 불이익보호조치, 신변보호조치** 등을 통하여 보호하는 제도

※보호조치요구방법

전화 044-200-7770, 7772~8 / 팩스 044-200-7949

우편(30102) 세종특별자치시 도움5로 20, 국민권익위원회 신고자보호과

청렴포털_부패공익신고(www.clean.go.kr)