サノフィ株式会社

オリプダーゼ アルファ（遺伝子組換え）

CTD 第二部－臨床概要

2.7.1 生物薬剤学試験及び関連する分析法

Total number of pages: 86

目　　次

2.7.1 生物薬剤学試験及び関連する分析法 1

目　　次 2

表　目　次 4

略号と用語の定義 6

1　　背景及び概観 8

1.1　　背景 8

1.2　　生体試料分析法の概要 9

1.2.1　　薬物濃度測定法 9

1.2.2　　薬力学評価のための測定法 10

1.2.2.1　　セラミド 10

1.2.2.2　　リゾスフィンゴミエリン 10

1.2.2.3　　キチナーゼ 10

1.2.2.4　　ケモカイン（C-C モチーフ）リガンド 18 10

1.2.2.5　　アンジオテンシン変換酵素 11

1.2.2.6　　交差反応性免疫物質 11

1.2.3　　抗オリプダーゼ アルファ抗体及び中和抗体の測定法 11

1.2.3.1　　特別な免疫測定法 12

1.3　　製造方法変更の概要 12

1.4　　オリプダーゼ アルファ原薬の品質及び非臨床的同等性／同質性 13

1.4.1　　初期製法* 及び 製法A* 13

1.4.2　　製法A* 及び 製法B* 14

1.4.3　　製法B* 及び 申請製法* 14

＊新薬承認情報提供時に置換

1.5 オリプダーゼ アルファ製剤の臨床的同等性／同質性 14
1.5.1 初期製法* 及び 製法A* 14
1.5.2 製法A* 及び 製法B* 15
2 個々の試験結果の要約 16
2.1 生体試料分析法 16
2.1.1 薬物濃度測定法 16
2.1.2 薬力学評価のための測定法 17
2.1.3 免疫原性分析法 24
3 全試験を通しての結果の比較と解析 30
3.1 生体試料分析法 30
3.2 製剤間の臨床薬物動態学的同等性／同質性 31
3.2.1 製法A* 製剤と 初期製法* 製剤の比較 31
3.2.2 製法B* 製剤と 製法A* 製剤の比較 32
3.3 全体的な結論 33
4 参 考 文 献 34
5 付録 35
5.1 開発中に用いた分析法のライフサイクル情報及び臨床試験で用いた分析法の性能の要約 35
5.1.1 薬物濃度測定法及び薬力学評価のための測定法 36
5.1.2 免疫原性分析法 84

＊新薬承認情報提供時に置換

表 目 次

表 1 - Olipudase alfa designation in product development 13

表 2 - Overview of olipudase alfa pharmacokinetic assay methods 16

表 3 - Overview of the pharmacodynamic assay methods 18

表 4 - Overview of olipudase alfa ADA and NAb assays 24

表 5 - Mean (range) olipudase alfa exposure in ASMD patients who were treated with 初期製法* or 製法A* 31

表 6 - Mean CV% olipudase alfa exposures with 3.0 mg/kg (every 2 weeks [Q2W]) in ASMD patients who switched from 製法A* to 製法B* 32

表 7 - Bioanalytical method life cycle information 36

表 8 - Summary of pharmacokinetic method performance 38

表 9 - Method performance in Study #SPHINGO00605 41

表 10 - Method performance in Study #DFI13412 42

表 11 - Method performance in Study #LTS13632 43

表 12 - Method performance in Trial #DFI13803 44

表 13 - Method performance in Trial #DFI12712 45

表 14 - Summary of method modifications and cross-validation results 46

表 15 - Bioanalytical method life cycle information – Ceramide 47

表 16 - Summary of pharmacodynamic method performance – Ceramide 49

表 17 - Method performance in Study #DFI13412 – Ceramide 53

表 18 - Method performance in Trial #LTS13632 – Ceramide 54

表 19 - Method performance in Trial #DFI13803 – Ceramide 55

表 20 - Method performance in Trial #DFI12712 – Ceramide 56

表 21 - Bioanalytical method life cycle information – Lyso-SPM 57

＊新薬承認情報提供時に置換

表 22 - Summary of pharmacodynamic method performance - Lyso-SPM 58

表 23 - Method performance in Trial #LTS13632 Lyso-SPM 60

表 24 - Method performance in Trial #DFI13803 Lyso-SPM 61

表 25 - Method performance in Trial #DFI12712 Lyso-SPM 62

表 26 - Bioanalytical method life cycle information - Chitinase 63

表 27 - Summary of pharmacodynamic method performance – Chitinase 65

表 28 - Method performance in Study #DFI13412 - Chitinase 69

表 29 - Method performance in Trial #LTS13632 - Chitinase 70

表 30 - Method performance in Trial #LTS13632 - Chitinase 71

表 31 - Method performance in Trial #DFI13803 - Chitinase 72

表 32 - Method performance in Trial #DFI12712 - Chitinase 73

表 33 - Summary of method modifications and cross-validation results (Chitinase) 74

表 34 - Bioanalytical method life cycle information - CCL18 76

表 35 - Summary of pharmacodynamic method performance - CCL18 78

表 36 - Method performance in Trial # DFI13412 - CCL18 80

表 37 - Method performance in Trial #LTS13632 - CCL18 81

表 38 - Method performance in Trial #DFI13803 - CCL18 82

表 39 - Method performance in Trial #DFI12712 - CCL18 83

表 40 - Immunogenicity assay summary 84

略号と用語の定義

4MU：	4-methylumbelliferone／4-メチルウンベリフェロン
4MU-TrACT：	4-methylumbelliferyl-β-D-N,N',N''-triacetylchitotrioside／4-メチルウンベリフェリル β-D-N,N',N''-トリアセチルキトトリオシド
ACE：	Angiotensin-converting enzyme／アンジオテンシン変換酵素
ADA：	Anti-drug antibody／抗オリプダーゼ アルファ抗体
ASM：	Acid sphingomyelinase／酸性スフィンゴミエリナーゼ
ASMD：	Acid sphingomyelinase deficiency／酸性スフィンゴミエリナーゼ欠損症
ASMKO：	Acid sphingomyelinase knock out／酸性スフィンゴミエリナーゼノックアウト
AUC：	Area under the plasma concentration versus time curve／血漿中濃度－時間曲線下面積
CCL18：	Chemokine (C-C motif) ligand 18／ケモカイン（C-C モチーフ）リガンド 18
CIC：	Circulating immune complex／循環性免疫複合体
CLIA：	Clinical Laboratory Improvement Amendments
C_{max}：	Maximum plasma concentration／最高血漿中濃度
CRIM：	Cross-reactive immunological material／交差反応性免疫物質
CSR：	Clinical study report／治験総括報告書
CV：	Coefficient of variation／変動係数
ELISA：	Enzyme linked immunosorbent assay／酵素結合免疫吸着測定法
HRP：	Horseradish peroxidase／ホースラディッシュペルオキシダーゼ
IAR：	Infusion associated reaction
IgE：	Immunoglobulin E／免疫グロブリン E
IgG：	Immunoglobulin G／免疫グロブリン G
ISR：	Incurred sample reanalysis
IV：	Intravenous／静脈内
LC-MS/MS：	Liquid chromatography with tandem mass spectrometry／液体クロマトグラフィータンデム質量分析
LLOQ：	Lower limit of quantitation／定量下限
lyso-SPM：	Lyso-sphingomyelin／リゾスフィンゴミエリン
MRD：	Minimal required dilution／最小希釈倍率
NAb：	Neutralizing antibody／中和抗体
OD：	Optical density／吸光度

PAP 期：	Primary analysis period／主要解析期間
PBMC：	Peripheral blood mononuclear cells／末梢血単核細胞
PD：	Pharmacodynamic／薬力学
PK：	Pharmacokinetic／薬物動態
QC：	Quality control／品質管理
SDS-PAGE：	Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis／ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動
TMB：	3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine／3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン
ULOQ：	Upper limit of quantitation／定量上限

1　背景及び概観

1.1　背景

酸性スフィンゴミエリナーゼ欠損症（ASMD）は希少疾患で、生命を脅かす可能性のあるライソゾーム病であり、現在のところは対症療法があるのみである。

オリプダーゼ アルファ（遺伝子組換え）（以下、オリプダーゼ アルファ）は、チャイニーズハムスター卵巣細胞中で発現させた遺伝子組換えヒト酸性スフィンゴミエリナーゼである。発現する遺伝子産物は、天然型の ASM が有する酵素活性及びライソゾームへの局在性を保持している。本申請では、申請者は、小児及び成人の ASMD 患者を対象に、中枢神経系以外の症状の治療のための酵素補充療法としてオリプダーゼ アルファの製造販売承認を得ることを目指している。

オリプダーゼ アルファの効果は、酸性スフィンゴミエリナーゼ（ASM）酵素活性が完全に欠損し、ASMD の全身症状及び神経症状の両方の特徴を発現した酸性スフィンゴミエリナーゼノックアウト（ASMKO）マウスにおいて検証されている。ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを反復静脈内（IV）ボーラス投与したところ、肝臓内及び脾臓内に蓄積したスフィンゴミエリンの減少が用量依存的に認められた。また、肝臓及び脾臓より程度は小さかったものの、肺中スフィンゴミエリンの減少も用量依存的に認められた。オリプダーゼ アルファは血液脳関門を通過しないため、ASMKO マウスでの神経障害の進行に対するオリプダーゼ アルファの効果は検討しなかった。また、ASMKO マウスは、ASMD の経時的な進行によって、神経障害により約 6～8 か月齢で死亡するため、ASMKO マウスにおける入手可能な長期投与データは限られる。

ASMD 患者を対象としたオリプダーゼ アルファの臨床開発プログラムには、臨床試験及び観察研究が含まれる。完了した 2 件の自然経過観察研究（MSC12840 及び SPHINGO00302）は、ASMD 患者 159 名を対象とし、ASMD の臨床的特徴、自然経過及び疾患による負荷への理解を深め、オリプダーゼ アルファの治験デザインを検討するために実施した。

- MSC12840（SPHINGO-001-00、完了）：ASMD 患者 59 名（成人 29 名、小児 30 名）を対象とした前向き、横断的、自然経過観察研究
- SPHINGO00302（完了）：ASMD 患者 100 名（うち思春期前の小児 49 名）を対象とした後ろ向き自然経過観察研究

臨床試験 5 試験（第 Ia 相臨床試験、第 Ib 相臨床試験、第 I/II 相臨床試験、第 II 相臨床試験及び第 II/III 相臨床試験）には、ASMD 患者合計 67 名（成人 47 名、小児 20 名）を組み入れた。3 試験（SPHINGO00605、DFI13412 及び DFI13803［ASCEND-Peds］）は完了し、2 試験（DFI12712［ASCEND］及び LTS13632）は進行中である。

- SPHINGO00605（第 Ia 相臨床試験、完了）：成人の ASMD 患者 11 名を対象とした単回投与、用量漸増投与試験

- DFI13412（第 Ib 相臨床試験、完了）：成人の ASMD 患者 5 名（うち 4 名は先行する第 Ia 相臨床試験から参加）を対象とした患者内用量漸増反復投与試験
- DFI13803（ASCEND-Peds、第 I/II 相臨床試験、完了）：小児の ASMD 患者 20 名を対象とした患者内用量漸増反復投与試験
- LTS13632（第 II 相臨床試験、進行中、データカットオフ日：2019 年 12 月 10 日）：先行する DFI13412 及び DFI13803（ASCEND-Peds）から移行した ASMD 患者成人 5 名及び小児 19 名を対象とした長期継続投与安全性試験
- DFI12712（ASCEND、第 II/III 相臨床試験、進行中、データカットオフ日：2019 年 10 月 17 日）：成人 ASMD 患者 36 名を対象としたプラセボ対照、反復投与ピボタル試験（うち 1 名は先行する第 Ia 相臨床試験［SPHINGO00605］に参加）

市販予定のオリプダーゼ アルファ製剤は、無菌の凍結乾燥粉末であり、滅菌注射用水で溶解した後、輸液バッグ又はシリンジに入った 0.9%注射用生理食塩液にて投与量に応じて規定量に希釈され、IV 投与される。本オリプダーゼ アルファ製剤は単回使用の米国薬局方 20 cc の Type 1 ホウケイ酸塩ガラス製バイアルに充填され、各バイアルにつき 20 mg のオリプダーゼ アルファが採取可能である。

本生物薬剤学及び関連する分析法の概要（以下、本 Module） には、オリプダーゼ アルファの血漿中濃度、オリプダーゼ アルファの免疫原性（抗オリプダーゼ アルファ抗体［ADA］及び中和抗体［NAb］の産生）並びにセラミド、リゾスフィンゴミエリン（lyso-SPM）、キチナーゼ（キトトリオシダーゼ）、ケモカイン（C-C モチーフ）リガンド 18（CCL18）及びアンジオテンシン変換酵素（ACE）を含む薬力学（PD）マーカーを評価するために開発及びバリデートした分析法を記載した。さらに、本 Module では、オリプダーゼ アルファの臨床開発の過程で製造された異なる製造方法のオリプダーゼ アルファ製剤の薬物動態（PK）の特性も要約した（表 1 ）。

1.2 生体試料分析法の概要

オリプダーゼ アルファの血漿中濃度（PK）、オリプダーゼ アルファの免疫原性（ADA、NAb）及び PD マーカーを評価するために開発及びバリデートした分析法を 2 項に要約した。

1.2.1 薬物濃度測定法

臨床試験で血漿中オリプダーゼ アルファを定量するために用いた生体試料分析法を表 2 に要約した。

バリデートした 2 つの分析法は両方ともサンドイッチ免疫測定法を用いており、血漿中オリプダーゼ アルファを定量するために開発された。最初にバリデートされた分析法（Module 5.3.1.4 [ITR-432-0409]）では、オリプダーゼ アルファに対するマウスモノクローナル抗体を検出試薬として用いた。この方法は、第 I 相臨床試験 2 試験（SPHINGO00605 及び DFI13412）で用いた（未希釈血漿中での定量下限値［LLOQ］：0.125 µg/mL［125 ng/mL］）。検出試薬として用いたマウスモノクロー

ナル抗体が入手できなくなったため、ウサギ抗オリプダーゼ アルファポリクローナル抗体を検出試薬とした新たな分析法を再開発した（Module 5.3.1.4 [ITR-653-0813]）。この新たな方法は、未希釈血漿中での LLOQ が 0.04 µg/mL（39 ng/mL）であり、以降の全ての臨床試験（DFI13803［ASCEND-Peds］、LTS13632 及び DFI12712［ASCEND］）で用いた。

Incurred sample reanalysis（ISR）を含む 2 つの生体試料分析法の詳細の要約は表 7 に記載した。

1.2.2 薬力学評価のための測定法

オリプダーゼ アルファの臨床プログラムで測定した PD マーカーは、セラミド（スフィンゴミエリンの代謝産物）及び複数の疾患負荷バイオマーカー（lyso-SPM、キチナーゼ、CCL18 及び ACE）を含む。これらの PD マーカーの詳細については、Module 2.7.2 [1.2.4 項]に示した。

1.2.2.1 セラミド

血漿中の総セラミドは、液相－液相抽出及び固相抽出操作を行った後で液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC-MS/MS）での多重反応モニタリングにより定量した（Module 5.3.1.4 [ITR-377-1207 Amendment 1]、[BMV0028]）。セラミドの総濃度を測定するために最初に構築した分析法ではセラミドの 10 種の異性体を定量するものであり、第 Ib 相臨床試験（DFI13412）及びその後これらの患者を移行した長期継続投与試験（LTS13632）に用いた（Module 5.3.1.4 [ITR-377-1207 Amendment 1]）。次いで、本分析法で測定対象に含まれなかった C16:0 異性体をヒトで検出される主要な異性体の一つとして同定したため、C16:0 異性体を測定対象に含める分析法に変更した（Module 5.3.1.4 [BMV0028]）。2.1.2 項に記載のとおり、C16:0 セラミド異性体を測定対象に含む分析法と含まない分析法の性能を比較するため、クロスバリデーション試験（Module 5.3.1.4 [SED0097]）を実施した。

1.2.2.2 リゾスフィンゴミエリン

血漿中 lyso-SPM は、タンパク質を沈殿及び濾過した後、LC-MS/MS での多重反応モニタリングで定量した（Module 5.3.1.4 [ITR-731-1014]）。詳細の要約は 2.1.2 項に記載した。

1.2.2.3 キチナーゼ

血清中キチナーゼは、酵素法を用いて定量した（Module 5.3.1.4 [ITR-137-0800]、[ITR-756-0215]）。ライフサイクルマネジメントの一部として、頑健性を向上させるため及び緩衝液で作成した検量線からヒト血清マトリックスで作成した検量線に変更するために、当初の分析法に変更を加えた。ヒト血清検体中の活性レベルを比較するため、クロスバリデーション試験（Module 5.3.1.4 [ITR-798-0815]）を実施した。詳細の要約は 2.1.2 項に記載した。

1.2.2.4 ケモカイン（C-C モチーフ）リガンド 18

血漿中 CCL18 は、サンドイッチ免疫測定法を用いて定量した（Module 5.3.1.4 [ITR-582-0412]）。詳細の要約は 2.1.2 項に記載した。

1.2.2.5 アンジオテンシン変換酵素

血清中 ACE 濃度は、Clinical Laboratory Improvement Amendments（CLIA）に準拠した測定施設において市販品を用いた標準的な測定法により測定した。ACE 活性分析法は、血清検体中の活性型 ACE により基質を開裂し、蛍光色素分子を遊離させる。この遊離した蛍光色素分子を蛍光マイクロプレートリーダーを用いて定量した。

1.2.2.6 交差反応性免疫物質

患者から得られた検体に含まれる内因性の ASM は交差反応性免疫物質（CRIM）である。患者の CRIM の状態を判定するため、線維芽細胞の抽出物から内因性 ASM を検出するためのウエスタンブロット法を開発し、患者の適格性確認に用いた（Module 5.3.1.4 [ITR-630-0413]）。この方法は、成人を対象とした第 Ib 相臨床試験（DFI13412）で使用した。分析法の処理能力を向上させるため、及び侵襲性の低い検体の使用が可能となるように、ASM 検出のためプールしたポリクローナル抗体を用いて末梢血単核細胞（PBMC）を使用した第二世代の方法を開発し、患者の適格性確認に用いた（Module 5.3.1.4 [DOH1355]）。この方法は、DFI13803（ASCEND-Peds）に組み入れられた乳児／幼児コホートに登録された患者の一部で用いた。詳細の要約は 2.1.2 項に記載した。

1.2.3 抗オリプダーゼ アルファ抗体及び中和抗体の測定法

免疫原性は、バリデートされた ADA 分析法を用いて測定し、スクリーニング試験、確認試験及び抗体価測定の段階的な生体試料分析の手法を用いた。第 Ia 相臨床試験（SPHINGO00605）では、免疫原性を評価するため、バリデートされた酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）を用いて ADA について検体をスクリーニングし（Module 5.3.1.4 [ITR-356-0607]）、別の免疫沈降法を用いて反応の特異性を確認した（Module 5.3.1.4 [ITR-356-0607B]）。

ライフサイクルマネジメントの一部として、ELISA を、免疫沈降法の代わりに薬物の競合的反応に基づく確認試験を行う方法に変更し、 製法A* 及び 製法B* で製造された製剤を用いて再バリデートした（Module 5.3.1.4 [DOH1680]及び[ABV0016]）。その後、 申請製法* で製造された製剤を用いて本分析法の性能が許容可能であることが確認された（Module 5.3.1.4 [DOH1680-Addendum 2]）。この第二世代 ADA 分析法は、第 Ia 相臨床試験（SPHINGO00605）以外の臨床試験で用いた。

第二世代 ADA 分析法で同定した ADA 陽性検体は、更に酵素活性の阻害（Module 5.3.1.4 [DOH1682]及び[NAV0011]）及び細胞内への取り込み阻害（Module 5.3.1.4 [DOH1681]、[NAV0010]及び[NAV0028]）を有する NAb であるか否かについて評価した。これらの分析法は 製法A* 及び 製法B* で製造された製剤を用いてバリデートされ、性能は 申請製法* で製造された製剤を用いて確認された（Module 5.3.1.4 [DOH1681-Addendum 1]及び [NAV0011-Addendum 1]）。

全ての免疫原性の方法の詳細の要約は 2.1.3 項に記載した。

1.2.3.1 特別な免疫測定法

過敏症の反応を示唆する中等度、重度又は再発性の infusion associated reaction（IAR）が発現した場合、免疫グロブリン E（IgE）型 ADA、血清中トリプターゼ及び補体活性化を評価するため、追加の血液検体を採取した。さらに、DFI13803（ASCEND-Peds）のみにおいて臨床症状により示されたとおり、循環性免疫複合体（CIC）についても分析した。

IgE 型 ADA

オリプダーゼ アルファに対する IgE 型 ADA は、ImmunoCAP specific IgE 技術を用いるバリデートされた蛍光酵素免疫測定法を用いて定量した（Module 5.3.1.4 [ITR-594-0912]及び[DOH1655]）。詳細の要約は2.1.3 項に記載した。

トリプターゼ

血清中トリプターゼ濃度は、 CLIA に準拠した測定施設において市販品を用いた標準的な測定法により測定した。トリプターゼの分析には、血清中濃度を定量するため UniCAP トリプターゼ蛍光酵素免疫測定法を用いた。

補体活性化

補体活性化は、CLIA に準拠した測定施設において市販品を用いた標準的な測定法により測定した。3 つの個別の酵素免疫測定法を用いて、補体分解産物である iC3b 及び C3a 並びに最終的な補体複合体である sC5b-9 の増加を検出した。1 つ以上の補体分解産物の増加は、補体活性化について陽性とした。オリプダーゼ アルファ及びその他の酵素補充療法の開発を通して得られた知見に基づき、C3a を検出することが補体活性化の評価に十分であることがわかった。そのため、2019 年 5 月以降は補体活性化の評価の目的で C3a の免疫測定法のみを実施した。

循環性免疫複合体

CIC は、CLIA に準拠した測定施設において市販品を用いた標準的な測定法により測定した。2 つの個別の酵素免疫測定法を用いて CIC を検出した。Raji 置換免疫測定法は CIC を捕捉するため補体 C3 分解産物を、C1q 免疫測定法は CIC を捕捉するため C1q を用いる。両方の分析法で、その後、抗ヒト免疫グロブリン G（IgG）抗体及び比色分析により、結合 CIC を検出した。1 つ又は両方の分析法における増加を CIC 陽性とした。

1.3 製造方法変更の概要

オリプダーゼ アルファは、チャイニーズハムスター卵巣細胞において発現させた遺伝子組換えヒト酸性スフィンゴミエリナーゼである。オリプダーゼ アルファの臨床開発中に、オリプダーゼ アルファの製造方法に段階的な変更が実施された。それぞれの製造方法を「初期製法*」、「 製法A* 」、「 製法B* 」及び「 申請製法* 」と称し、表 1 に要約した。 申請製法* は、市販品で用いる予定の製造方法である。原薬及び製剤の製造方法の詳細は、Module [3.2.S.2.6]及び Module [3.2.P.2.3]にそれぞれ記載されており、以下に要約した。

表 1 - Olipudase alfa designation in product development

Process designation	Bioreactor scale	Clinical trial[a]
初期製法*	30 L	SPHINGO00605
製法A*	30 L	DFI13412, DFI13803, LTS13632, DFI12712
製法B* [b]	500 L	DFI13803, LTS13632, DFI12712
申請製法* [c]	500 L	LTS13632, DFI12712

a Clinical trials DFI12712 and LTS13632 initiated with 製法A* and then switched to 製法B* .
b 製法B* : ■ bioreactor harvest days.
c 申請製法* : ■ bioreactor harvest days. 申請製法* to be introduced in the ongoing long term safety/extension period phase of DFI12712 and LTS13632 clinical trials.

初期のオリプダーゼ アルファ製剤は、初期製法* 及び 製法A* により 30 L スケールで製造した。初期製法* で製造された製剤は、非臨床試験及び第 Ia 相臨床試験（SPHINGO00605）で使用した。製法A* 製剤は、DFI13412、DFI13803（ASCEND-Peds）の一部、LTS13632 及び DFI12712（ASCEND）で使用した。初期製法* 製剤及び 製法A* 製剤の組成は、pH ■ の■■■■■■■■■■緩衝液中に■■■■■、■■■■■■■■■■■■及び■■■■■■■■を含む。

製法A* 製造方法は、その後、方法の生産性を重視し 500 L にスケールアップした 製法B* に切り替えられた。当初、 製法B* はバイオリアクターで ■ 日間培養し回収する方法 （ 製法B* ）であったが、後に、バイオリアクターで ■ 日間培養して回収する方法（ 申請製法* ）に短縮された。

申請製法* 製剤は市販予定製剤である。 製法B* 製剤及び 申請製法* 製剤の組成には、pH 6.5 のリン酸ナトリウム緩衝液中に精製白糖及び L-メチオニンを含む。 製法B* 製剤は、DFI13803（ASCEND-Peds）、LTS13632 及び DFI12712（ASCEND）で使用し、 製法A* 製剤から切り替えた患者と最初から 製法B* 製剤を投与された患者が含まれた。成人を対象としたピボタル第 II/III 相臨床試験（DFI12712［ASCEND］）では、 製法A* 製剤で開始した患者は主要解析期間（PAP 期）中に 製法B* 製剤へ切り替え、 製法A* 製剤及び 製法B* 製剤で開始した患者のいずれもその後は PAP 期を通して 製法B* 製剤の使用を継続した。

1.4 オリプダーゼ アルファ原薬の品質及び非臨床的同等性／同質性

1.4.1 初期製法* 及び 製法A*

初期製法*及び 製法A* で製造した原薬間のオリプダーゼ アルファの品質面での同等性／同質性は、大規模な生化学的分析及び製剤のバッチ分析に基づき評価した。結果は、初期製法* 及び 製法A* で製造したオリプダーゼ アルファ製剤が同等／同質であることを示した（Module [3.2.S.2.6] 及び Module [3.2.P.5.4]）。

1.4.2　製法A*　及び　製法B*

製法A*　及び　製法B*　で製造したオリプダーゼ アルファ原薬間の同等性／同質性は、分析試験、生物学的試験、製剤のバッチ分析及び実験動物での PD 評価の分析測定の組合せに基づき評価した（Module [3.2.S.2.6]、Module [3.2.P.2.3]、Module [3.2.P.5.4] 及び Module [2.6.2] ）。これらの非臨床試験結果は、全ての生化学的データを加味すると、 製法A*　及び　製法B*　で製造したオリプダーゼ アルファ製剤が同等／同質であるという結論を裏付けるものであった。

1.4.3　製法B*　及び　申請製法*

製法B*　及び　申請製法*　で製造した原薬間のオリプダーゼ アルファの品質面での同等性／同質性は、大規模な生化学的分析及び製剤のバッチ分析に基づき評価した。結果は、　製法B*　及び　申請製法*　で製造したオリプダーゼ アルファ製剤が同等／同質であることを示した（Module [3.2.S.2.6] 及び Module [3.2.P.5.4] ）。

1.5　オリプダーゼ アルファ製剤の臨床的同等性／同質性

品質面での同等性／同質性が示されていたため（Module [3.2.S.2.6]、Module [3.2.P.2.3]、及び Module [3.2.P.5.4]）、開発中に使用された異なるプロセスにより製造されたオリプダーゼ アルファ製剤の PK による同等性を検証するための臨床試験は行わなかった。以下の項で記載したとおり、品質面での同等性／同質性を補完するために、臨床試験間（初期製法* 製剤対　製法A*　製剤）又は同一臨床試験内で製剤を切り替える前後（ 製法A*　製剤対　　製法B*　　製剤）の PK をノンコンパートメント解析により算出して比較した。さらに、Module 2.7.2 に記載したとおり、臨床試験 5 試験（SPHINGO00605、DFI13412、DFI13803［ASCEND-Peds］、LTS13632 及び DFI12712［ASCEND］）の併合データを用いた母集団 PK モデリング手法に基づき、異なる製造方法で製造したオリプダーゼ アルファ製剤（Process A 製剤及び　製法A*　製剤対　　製法B*　　製剤）の PK に及ぼす影響の可能性を評価するための併合解析を実施した。

1.5.1　初期製法*　及び　製法A*

初期製法* 製剤及び　製法A*　製剤の同等性／同質性は、品質面での同等性／同質性が示されたことに基づき判断された。品質面での同等性／同質性を補完するため、初期製法* 製剤（SPHINGO00605）及び　製法A*　製剤（DFI13412 及び DFI12712［ASCEND］）での PK データの要約を 3 項に記載した。DFI13412 の全ての患者 5 名には治験期間中を通して　製法A*　製剤を投与した。DFI12712（ASCEND）でオリプダーゼ アルファ群にランダム化された患者 18 名中 5 名には最初に　製法A*　製剤でオリプダーゼ アルファ投与を開始し、PAP 期中に　　製法B*　　製剤に切り替えた。切替え前に PK 検体を採取した。SPHINGO00605、DFI13412 及び DFI12712（ASCEND）の治験デザインの詳細は Module 2.7.2 [2.7 項]に記載した。

1.5.2　製法A*　及び　製法B*

品質面での評価及び非臨床 PD 試験に加え、 製法A* 製剤及び 製法B* 製剤の同等性／同質性は、患者において 製法A* 製剤から 製法B* 製剤に切り替えた場合を含む臨床試験データを用いて、安全性、有効性、免疫原性及び PK の観点から評価した。安全性プロファイルの比較は Module 2.7.4 に記載し、有効性の比較は Module 2.7.3 に記載した。PK の比較は、以下に記載のとおり、本 Module に記載した。

製法A* 製剤と 製法B* 製剤間の PK に基づく同等性／同質性は、LTS13632 及び DFI12712（ASCEND）で評価した。LTS13632 では、患者 25 名のうち計 17 名（成人［18 歳以上］5 名、青年［12～18 歳未満］4 名、児童［6～12 歳未満］5 名、乳児／幼児［6 歳未満］3 名）には、先行する試験（DFI13412 及び DFI13803［ASCEND-Peds］）から移行した後も 製法A* 製剤を継続し、LTS13632 試験期間中に 製法B* 製剤に切り替えた。残る患者 8 名（児童 4 名及び乳児／幼児 4 名）には、LTS13632 のデータカットオフ日時点で投与期間中（先行する DFI13803［ASCEND-Peds］の開始から LTS13632 に移行後）を通して 製法B* 製剤を投与した。患者 17 名における PK 測定用採血は、製剤切替え時、すなわち 製法A* 製剤の最終投与後及び 製法B* 製剤の初回投与後に実施した。本試験における重要なノンコンパートメント PK パラメータの個体内比較を3 項に要約した。DFI12712（ASCEND）では、オリプダーゼ アルファ群の成人患者 18 名のうち 5 名が 製法A* 製剤から 製法B* 製剤に切り替えた。残る患者は PAP 期を通して 製法B* 製剤を投与し、継続投与期間へ移行した。これらの患者 5 名における 製法A* 製剤の PK 採血を伴う最終来院時及び 製法B* 製剤の PK 採血を伴う初回来院時の PK パラメータを 3 項に要約した。LTS13632 及び DFI12712（ASCEND）の治験デザインの詳細は Module 2.7.2 [2.7 項]に記載した。異なる患者間でのばらつきを回避するために、同一患者内での 製法B* 製剤と 製法A* 製剤を比較した。

2　個々の試験結果の要約

2.1　生体試料分析法

2.1.1 薬物濃度測定法

オリプダーゼ アルファの血漿中薬物濃度を定量するために用いた方法を表 2 に要約した。これらの分析法は、臨床試験 5 試験から得た検体を分析するために用いた。個別の試験における各方法の性能については、各治験総括報告書（CSR）に記載し、更に Module 5.3.1.4 に含めた。オリプダーゼ アルファの評価に用いた分析法の概要は表 2 に記載し、詳細は表 7 に記載した。

表 2 - Overview of olipudase alfa pharmacokinetic assay methods

Assay	Method	Matrix (anticoagulant)	LLOQ[a] (µg/mL)	Clinical trial	Report location
ITR-432-0409	ELISA	Plasma (heparin)	0.125 µg/mL[b]	DFI13412, SPHINGO00605	5.3.1.4
ITR-653-0813	ELISA	Plasma (heparin)	0.04 µg/mL	LTS13632, DFI13803, DFI12712	5.3.1.4

a In neat plasma
b Provisional LLOQ of 0.156 µg/mL for SPHINGO00605
ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; LLOQ = lower limit of quantification

ITR-432-0409：バリデーション報告書：マウス抗体を検出試薬として用いる血漿中オリプダーゼ アルファの PK のための定量免疫測定法

目的及び方法：ヘパリン処理したヒト血漿中のオリプダーゼ アルファ濃度を定量する ELISA をバリデートすることを目的とした。オリプダーゼ アルファと特異的に結合するマウスモノクローナル抗体でコーティングしたマイクロタイタープレートに最小希釈倍率（MRD）として 50 倍希釈した患者の血漿を添加してインキュベートした。規定されたインキュベーション時間後、上記の抗体と異なる部位でオリプダーゼ アルファと結合するビオチン標識マウス抗オリプダーゼ アルファモノクローナル抗体を検出試薬として加え､その後､複合体を検出するためホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)標識ストレプトアビジンを添加してインキュベートした。シグナルを可視化するため HRP 基質である 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン（TMB）を加えた。波長 450 nm での吸光度（OD）を各ウェルから読み取り、オリプダーゼ アルファを用いて作成した検量線から濃度値を補間した。最終結果は、試料の希釈を補正し、血漿 1 mL 当たりに含まれるオリプダーゼ アルファの質量（ng）から血漿 1 mL 当たりに含まれるオリプダーゼ アルファの質量（µg）に換算した。

結果：本分析法を用いることで、未希釈血漿中のオリプダーゼ アルファ濃度の定量における LLOQ が 0.125 µg/mL であり、定量上限（ULOQ）が 125 µg/mL であることが示された。検体は、 -60℃以下

で保存したとき、最大 26 か月間まで安定であった。検体は、室温で最大 4 時間まで安定であり、5 回の凍結／解凍サイクルを通して安定であった。許容可能な真度、精度（分析単位内及び分析単位間）、特異性、並びに範囲が示された（表 8）。測定した分析パラメータは、全ての許容基準を満たしていた。

臨床試験での ISR：DFI13412 及び SPHINGO00605 において本測定法の ISR を実施しなかった。

ITR-653-0813 及び改訂版 1: バリデーション報告書：ウサギ抗体を検出試薬として用いる血漿中オリプダーゼ アルファの PK のための免疫測定法

目的及び方法：ヘパリン処理したヒト血漿中のオリプダーゼ アルファ濃度を定量する ELISA をバリデートすることを目的とした。

第 Ia 相臨床試験及び Ib 相臨床試験で循環血漿中オリプダーゼ アルファを定量するために用いた第一世代の PK ELISA（バリデーション報告書：ITR-432-0409）は、マウスモノクローナル抗体を検出試薬として使用した。検出試薬として用いるマウス抗体が使用できなくなったため、第二世代の分析法（ITR-653-0813）を開発及びバリデートし、LTS13632、DFI13803（ASCEND-Peds）及び DFI12712（ASCEND）に用いた。二つの方法の手順は、検出試薬を除いて同一である。第一世代の分析法のマウス抗オリプダーゼ アルファモノクローナル抗体は、第二世代の分析法ではウサギ抗オリプダーゼ アルファポリクローナル抗体に置き換えられた。

結果：本分析法を用いたヒト血漿中のオリプダーゼ アルファ濃度の定量における未希釈血漿中での LLOQ が 0.04 µg/mL であり、ULOQ が 640 µg/mL であった。検体は、 -60℃以下で保存したとき、最大 34 か月間まで安定であった。検体は、室温で最大 3 時間まで安定であり、5 回の凍結／解凍サイクルを通して安定であった。分析単位間及び分析単位内で許容可能な真度、精度、特異性及び範囲が示された（表 8 ）。測定した分析パラメータは、全ての許容基準を満たしていた。

臨床試験での ISR：DFI12712（ASCEND）において、合計 180 検体を用いて本測定法の再現性を確認するために ISR を実施した。180 検体のうち 174 検体（96.7%）において、初回の定量値と ISR により得られた定量値の乖離度を 30%以内とした規定の許容基準を満たしていた。

DFI13803（ASCEND-Peds）において、合計 44 検体を用いて本測定法の再現性を確認するために ISR を実施した。44 検体のうち 39 検体（88.6%）において、初回の定量値と ISR により得られた定量値の乖離度を 30%以内とした規定の許容基準を満たしていた。

LTS13632 で得られた検体については、成人患者は DFI12712（ASCEND）、小児患者は DFI13803（ASCEND-Peds）で ISR を実施しているため、本測定法の ISR を実施しなかった。

2.1.2 薬力学評価のための測定法

臨床開発中に用いた PD 評価のための分析法の概要を表 3 に記載した。

表 3 - Overview of the pharmacodynamic assay methods

Study	Analyte	Matrix (anticoagulant)	Calibration curve	LLOQ in neat matrix	Accuracy, QC (%)	Within-run precision, QC (%)	Between-run precision, QC (%)	Clinical trials	Study report location
ITR-377-1207/ BMV0028 (API-4000)	Ceramide	Plasma (heparin)	1-32 µg/mL	1 µg/mL	1.6% to 5.8% Bias/ -7.7% to 3.0% Bias	1.17% to 12.11% CV/ 2.3% to 18.5% CV	5.1% to 11.4% CV/ 5.1% to 15.2% CV	DFI13412, DFI13803, LTS13632, DFI12712[a]	5.3.1.4
ITR-731-1014	Lyso-SPM	Plasma (heparin)	0.001-1 µg/mL	0.001 µg/mL	-2.8% to 1.0% Bias	1.7% to 3.6% CV	2.7% to 5.1 % CV	DFI13412, DFI13803, LTS13632, DFI12712	5.3.1.4
ITR-137-0800	Chitinase	Serum	0.05-1.5 nmol/well	15 nmol/h/mL (MRD 1:10)	Not determined	4.12% to 11.28% CV (for nmol/well values)	≤ 9.87% CV (for nmol/well values)	SPHINGO00605, DFI13412, DFI13803, LTS13632 (through May 2017)	5.3.1.4
ITR-756-0215	Chitinase	Serum	0.031-1 nmol/well	9.3 nmol/h/mL (MRD 1:10)	-9.7% to 7.4%	0.7% to 6.4% CV	≤13.8% CV	LTS13632 (May 2017-present) and DFI12712	5.3.1.4
ITR-582-0412	CCL18	Plasma (heparin)	0.008-0.500 ng/mL	4.0 ng/mL (MRD 1:500)	-17.1% to 6.6%	Not evaluated	8.9% to 14.8%CV (endogenous CCL18 in heparin plasma)	DFI13412, DFI13803, LTS13632 and DFI12712[a]	5.3.1.4
Standard CLIA methods	ACE	Serum	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	DFI13412, DFI13803, LTS13632 and DFI12712	N/A
ITR-630-0413	Detection of endogenous ASM protein (CRIM)	Cultured fibroblasts	N/A	1.56 µg of total protein from fibroblast lysates[b]	N/A	N/A	N/A	DFI13412	5.3.1.4

Study	Analyte	Matrix (anticoagulant)	Calibration curve	LLOQ in neat matrix	Accuracy, QC (%)	Within-run precision, QC (%)	Between-run precision, QC (%)	Clinical trials	Study report location
DOH1355	Detection of endogenous ASM protein (CRIM)	PBMCs	N/A	2.02 µg of total protein from PBMC lysates[b]	N/A	N/A	N/A	DFI13803 (n=4 from infant/child cohort)	5.3.1.4

ACE = angiotensin-converting enzyme; CCL18 = Chemokine [C-C motif] ligand 18; CLIA = Clinical Laboratory Improvement Amendments; CRIM = Cross Reactive Immunological Material; CV = Coefficient of variation; LLOQ = Lower limit of quantification; Lyso-SPM = Lyso-Sphingomyelin; MRD = Minimal required dilution; N/A = Not available; PBMC = peripheral blood mononuclear cells.

a For SPHINGO00605, ceramide was analyzed using a research grade method and CCL18 was analyzed using a different commercial kit that was discontinued by the vendor.

b Lowest amount of total protein that allows for detection of ASM protein by Western blot analysis.

ITR-377-1207 Amendment 1 及びBMV0028：バリデーション報告書：LC-MS/MS による血漿中セラミド定量

目的及び方法：ヒト血漿中の総セラミドを検出するための血漿中セラミド分析法をバリデートすることを目的とした。血漿中の総セラミド濃度は、液相－液相抽出及び固相抽出の処理を行った後にLC-MS/MS での多重反応モニタリングで定量した。セラミドは、様々な長さ及び様々な飽和度の長鎖脂肪酸を含む。したがって、総セラミド濃度は、セラミドの主要な異性体のピーク面積の総和で決定した。各標準試料、品質管理（QC）試料及び未知試料のピーク面積の総和を内部標準により補正し、内因性セラミドの影響を除去するためブランクを差し引いた後、検量線から補間することにより、各試料におけるセラミド濃度を決定する。当初のバリデーションでは、セラミドの異性体（C18:0、C18:0-H_2O、C20:0、C22:1、C22:0、C24:1-H_2O、C24:0、C24:1、C26:1）が総セラミドの算出に含まれた。この方法は、DFI13412 の検体及び LTS13632 の DFI13412 から移行した患者 5 名の初期の検体の分析に用いた。これらの試験の後、総セラミドの算出に C16:0 異性体を含めるため、分析法が更新された。DFI13803（ASCEND-Peds）及び DFI12712（ASCEND）から得た全ての検体（LTS13632 において DFI13803［ASCEND-Peds］から移行した患者から採取された検体を含む）は、C16:0 異性体を含む分析法を用いて定量した。治験実施中に、現行の分析ガイダンス（すなわち、標準検体の数、QC 濃度、内因性セラミドの対照検体の追加）に対して、より良く整合させるため、及び分析法の頑健性及び処理能力を向上する（すなわち、抽出中の溶媒除去のためマニホールド使用、曲線回帰のためのワトソン検定使用）ために、分析法の改善を図り、バリデートした（BMV0028）。

結果：バリデーションの結果より、LLOQ は 1.0 µg/mL であり、1.0～32.0 µg/mL の範囲において、本分析法の真度及び精度が示された。本分析法は、許容可能な抽出物の回収率を示した。ヘモグロビン、ビリルビン又は脂質の存在による干渉は観察されなかった。血漿中の内因性セラミドは、室温で 65 時間以上、2～8℃で 72 時間、5 回までの凍結／解凍サイクル後及び -60℃以下で最大 752 日間まで安定であった。C16:0 異性体を含む分析法による血漿中の内因性セラミド濃度の 95%信頼区間（2.5 及び 97.5 パーセンタイル）は、健康なドナー120 名から得た値に基づき、1.31～3.29 µg/mL と決定された。測定した分析パラメータは、全ての許容基準を満たしていた。

SED0097：LC-MS/MS 法による血漿中の C16:0 異性体の有無でのセラミドのクロスバリデーション

目的及び方法：クロスバリデーション試験を実施し、検出法に C16:0 異性体を含む分析法又は含まない分析法の血漿中の総セラミド濃度を比較することを目的とした。

結果：C16:0 異性体を含む場合及び含まない場合での結果の最初の比較では、2 つの分析間で 30%の誤差が示された。この誤差を補正するため、補正係数を算出した。この誤差を、最初の分析法で得た血漿中セラミド濃度値に適用すると、検体の 90%で算出された誤差（%）は C16 異性体を含む分析法の測定値の 30%以内であった。これらの結果は、補正係数を用いることで、2 つの分析法の結果がクロスバリデーションの許容基準を満たすことを示した。最初の分析法で得たセラミド濃度の結果に

補正係数を適用することにより、C16:0 異性体を含む更新された分析法で得たデータに対する結果との相互比較が可能となった。

ITR-731-1014: バリデーション報告書 : LC-MS/MS による血漿中リゾスフィンゴミエリンの定量

目的及び方法：ヘパリン処理したヒト血漿中の lyso-SPM 濃度を定量する LC-MS/MS 法をバリデートすることを目的とした。

血漿中の lyso-SPM は、タンパク質を沈殿及び濾過した後、LC-MS/MS での多重反応モニタリングで定量した。各標準試料、QC 試料及び未知試料より得られたピーク面積を内部標準により補正し、脱脂した血漿に lyso-SPM を添加することにより作成した検量線から補間することにより、各試料の lyso-SPM 濃度を決定した。

結果：バリデーション試験の結果より、10.0～1000 ng/mL の範囲で本分析法の真度及び精度が示され、LLOQ が 10.0 ng/mL であることが示された。本分析法では、許容可能な抽出物の回収率を示し、異なる個体より得られた 6 つの血漿ロットでマトリックス効果は観察されなかった。さらに、ヘモグロビン、ビリルビン又は脂質の存在での干渉は観察されなかった。血漿中に添加された lyso-SPM は、室温で最大 24 時間、2～8℃で最大 5 日間及び 5 回までの凍結／解凍サイクル後で安定であった。-60℃以下で保存した検体については、長期安定性が 38 か月まで確立された。健康なドナー120 名から採取した血漿検体における内因性の lyso-SPM 濃度は、定量下限以下であった。測定した分析パラメータは、全ての許容基準を満たしていた。

ITR-137-0800：バリデーション報告書：血清中キチナーゼ活性定量酵素分析法

目的及び方法：酵素分析法を用いて、ヒト血清中のキチナーゼ活性定量法の適格性を評価することを目的とした。この分析法については、MRD である 10 倍に希釈した血清検体、対照検体及び標準検体を、キチナーゼの基質である 4-メチルウンベリフェリル-β-D-N-N'-N"-トリアセチルキトトリオシド（4MU-TrACT）を加えてインキュベートした。基質から解離した 4-メチルウンベリフェロン（4MU）の濃度は、検体中に存在するキチナーゼ活性量に対し正比例した。各検体の 4MU 放出量は、励起波長 355 nm／蛍光波長 460 nm で蛍光光度計を用いて定量した。未知検体及び対照検体の値は、4MU 検量線から nmol/well に補間し、最終結果は nmol/h/mL に換算した。

結果：本分析法の LLOQ は未希釈血清中で 0.05 nmol/well（15 nmol/h/mL）で、血清中のキチナーゼ活性を定量するのに適切であることが示された。検体は、3 回までの凍結／解凍サイクルを通して安定であった。分析単位間及び分析単位内で許容可能な真度及び精度が示された。健康なドナー101 名から採取した血清中のキチナーゼ活性は 181 nmol/h/mL 以下であった。測定した分析パラメータは、全ての許容基準を満たしていた。

ITR-756-0215：バリデーション報告書：血清中キチナーゼ活性定量酵素分析法

目的及び方法：ヒト血清中のキチナーゼを定量するための新たな分析法をバリデートすることを目的とした。第一世代の方法（ITR-137-0800）と全て同じ手順を用いて分析を実施した。しかし、頑健性を改善するため複数の変更を行った。その変更には、検体及び対照検体を調製するために用いる加熱により非働化したヒト正常血清を 10%含有する緩衝液の変更、及び蛍光を減少させるための黒色プレートの使用、並びに迅速に調製するための検量線に用いる濃度の補正が含まれる。

結果：本分析法の LLOQ は未希釈血清中で 0.031 nmol/well（9.3 nmol/h/mL）であり、血清中のキチナーゼ活性を定量するのに適切であることが示された。血漿中のキチナーゼ活性は、室温で 4 時間、2～8℃で 72 時間、5 回までの凍結／解凍サイクル後及び -60℃以下で最大 25 か月間まで安定であった。分析単位間及び分析単位内で許容可能な真度及び精度が示された。健康なドナー60 名から採取した血清中のキチナーゼ活性は 651 nmol/h/mL 以下であった。測定した分析パラメータは、全ての許容基準を満たしていた。

Chitinase Method Cross-Validation Study（ITR-798-0815）：血清中キチナーゼ活性の分析法の比較

目的及び方法：ヒト血清検体のキチナーゼ活性を定量する 2 つの分析法（ITR-137-0800 及び ITR-756-0215）を比較するためのクロスバリデーション試験を行うこと、及び 2 つの分析法の結果を縦断的に比較できる変換係数を導くことを目的とした。

結果：2 つの分析法で得た結果の比較では当初は 27%の誤差が示された。新しい分析法から得た値はマトリックス中の濃度を示しており、実際の内因性キチナーゼ活性の値を反映している。

ここで見られた程度の誤差が生じた場合、濃度の測定値の違いにより、キチナーゼ活性の異なる時点間及び試験間での結果の比較に交絡を生じる可能性があるため、変換係数を算出した。この補正係数を当初の方法で得た血清中キチナーゼ濃度値に適用すると、93%の検体が、新たな分析法で得た測定値の 30%以内の誤差（%）を有していた。これらの結果は、変換係数を用いて、2 つの方法の結果がクロスバリデーションの許容基準を満たすことを示している。当初の方法で得たキチナーゼの結果に変換係数を適用することにより、新たな方法で得られた結果との相互比較が可能となった。

ITR-582-0412：バリデーション報告書：血漿中での R&D Systems ELISA キットと Biosource CCL18 キットとのケモカイン（C-C モチーフ）リガンド 18 定量免疫分析の比較

目的及び方法：ヒト血漿中の CCL18 定量について、サンドイッチ免疫測定法により、R&D Systems の市販 CCL18 分析法の適格性を評価することを目的とした。希釈した未知試料及び対照試料を、マウス抗ヒト CCL18 捕捉抗体でコーティングしたプレートに添加した。ビオチン化したヤギ抗 hCCL18 抗体を検出試薬としてプレートに添加した後、HRP 標識ストレプトアビジン及び TMB 基質を加えた。波長 450 nm における OD から波長 650 nm の OD を差し引いた値をプレートリーダーで測定し、結果となる OD を読み取った。試料中に存在する CCL18 量は呈色量に正比例しており、組換えヒト CCL18 を用いて作成した検量線により補間した。

結果：R&D Systems の ELISA キットを用いたときの LLOQ は未希釈血漿中で 4 ng/mL であり、血漿中の CCL18 を定量するのに適切であることが分かった。-60～-100℃で保管した検体は最大 40 か月間まで安定であった。検体は、28℃で最大 48 時間まで及び 3 回の凍結／解凍サイクルを通して安定であった。分析単位間及び分析単位内で許容可能な真度及び精度が示された。健康なドナーから採取したヘパリン処理血漿中の CCL18 濃度は、16.5～169.5 ng/mL の範囲であった。測定した分析パラメータは、全ての許容基準を満たしていた。

ITR-630-0413：バリデーション報告書：ヒト線維芽細胞ホモジネートでのウエスタンブロット法による内因性の酸性スフィンゴミエリナーゼタンパク質（CRIM）の検出

目的及び方法：内因性の ASM 検出のためのウエスタンブロット法の適格性を評価することを目的とした。DFI13412 のため、線維芽細胞抽出物から内因性 ASM タンパク質を検出するためのウエスタンブロットを用いた分析法を開発し適格性を確認した。患者の皮膚生検を培養し、線維芽細胞を採取してホモジナイズした。抽出物（25 µg）は、ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）で分離し、ニトロセルロース膜に転写した。ブロッキングした後、最初に膜を精製したマウス抗オリプダーゼ抗体でインキュベートしてから、希釈した IRDye800CW 標識ヤギ抗マウス IgG を加えてインキュベートすることにより、ASM タンパク質を検出した。膜上の蛍光シグナルは LI COR imager で可視化した。ヒト皮膚線維芽細胞の可溶化物より得られた陽性対照のバンドと同じ位置に検出された約 72～75 kDa のバンドを含む検体は、CRIM 陽性と判断された。

結果：内因性 ASM タンパク質は、最小 1.56 µg 総タンパク質の線維芽細胞の可溶化物から特異的に検出可能であり、再現性も確認された。線維芽細胞ホモジネート中では、ASM は、5 回までの凍結／解凍サイクル及び 2～8℃で最大 7 日間まで安定であった。測定した分析パラメータは、全ての許容基準を満たしていた。

DOH1355：バリデーション報告書：ヒト PBMC ホモジネートでのウエスタンブロット法による内因性の酸性スフィンゴミエリナーゼタンパク質（CRIM）の検出

目的及び方法：内因性の ASM 検出のためのウエスタンブロット法の適格性を評価することを目的とした。より侵襲性の低いマトリックスを使用するため、PBMC から内因性 ASM を検出するための第二世代の方法を開発し適格性を確認した。この分析法では、患者 PBMC が全血から分離され凍結された。分析日に、細胞をホモジネートし、可溶化物のセット量（総タンパク質の最小ロード量 2.02 µg）を SDS-PAGE で分離し、ニトロセルロース膜に転写した。ブロッキングした後、ニトロセルロース膜を精製したウサギポリクローナル抗 ASM 抗体を添加してインキュベートすることで、ASM タンパク質を検出した。洗浄した後、IRDye800CW 標識ヤギ抗ウサギ IgG 二次抗体を用いて検出した。膜上の蛍光シグナルは LI COR imager で可視化した。ASM の予想分子量（約 72 kDa）のバンドの存在により、試料の ASM 陽性判定を行った。

この方法は、DFI13803（ASCEND-Peds）に組み入れられた乳児／幼児コホートに登録された患者の一部で CRIM を評価するために使用した。

結果：内因性 ASM タンパク質は、最小 2.02 µg 総タンパク質の PBMC 可溶化物から特異的に検出可能であり、再現性が示された。PBMC 細胞において ASM は、2～8℃で最大 7 日間まで及び-60℃以下の凍結で少なくとも最大 7 か月間まで（延長された分析期間中の使用）安定であった。測定した分析パラメータは、全ての許容基準を満たしていた。

2.1.3 免疫原性分析法

免疫原性の分析は、バリデートされた段階的な ADA 分析法（スクリーニング試験、確認試験及び抗体価測定）を用い、ADA 陽性試料は、酵素活性及び細胞内への取り込みのそれぞれを阻害する NAb の有無を評価した。臨床症状に基づき、検体は IgE 型 ADA の有無についても評価した。免疫原性を評価するために用いた分析法の概要は以下に記載し、表 40 にも詳述した。詳細は、Module 5.3.5.3 に示した。

表 4 - Overview of olipudase alfa ADA and NAb assays

Study	Assay	Intended use	Clinical trials
ITR-356-0607	Direct ELISA for ADA Screen, Titer (初期製法* Capture)	ADA screen and titer	SPHINGO00605 (Phase 1a)
ITR-356-0607B	IRIP confirmatory assay	ADA confirmatory assay	SPHINGO00605 (Phase 1a)
DOH1680	ADA ELISA: Screen, Titer, Confirm, Titer (製法B* or 申請製法* Capture)	ADA screen, confirm, and titer	DFI13803, LTS13632, DFI12712
ABV0016	ADA ELISA: Screen, Titer, Confirm, Titer (製法A* Capture)	ADA screen, confirm, and titer	DFI13412, DFI13803, LTS13632, DFI12712
NAV0011	NAb: Catalytic activity inhibition using 製法B* or 申請製法*	Detect ADA inhibition of olipudase alfa enzymatic activity	DFI13803, LTS13632, DFI12712
DOH1682	NAb: Catalytic activity inhibition using 製法A*	Detect ADA inhibition of olipudase alfa enzymatic activity	DFI13803, LTS13632, DFI12712
NAV0010/ DOH1681	NAb: Cellular Uptake inhibition using 製法B* or 申請製法*	Detect ADA inhibition of uptake of olipudase alfa into cells	DFI13803, LTS13632, DFI12712
NAV0028	NAb: Cellular Uptake inhibition using 製法A*	Detect ADA inhibition of uptake of olipudase alfa into cells	DFI13803, LTS13632, DFI12712
ITR-594-0912	IgE ADA using 製法A*	Detect IgE anti-olipudase alfa antibodies	DFI13412, DFI13803, DFI12712, LTS13632
DOH1655	IgE ADA using 製法B*	Detect IgE anti-olipudase alfa antibodies	DFI13803, DFI12712, LTS13632

ADA = anti-drug antibody; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; IRIP = infrared immunoprecipitation assay; IgE = immunoglobulin E; MRD = minimal required dilution; Nab = neutralizing antibody.

ITR-356-0607、ITR-356-0607-Add1、及びITR-356-0607B: バリデーション報告書：血清中 IgG 型 ADA に対するオリプダーゼ アルファ免疫測定法（第一世代免疫原性分析法）

目的及び方法：オリプダーゼに特異的なヒト血清中 IgG を検出し、抗体価を判定する ELISA をバリデートすることを目的とした。スクリーニング分析のため、オリプダーゼ アルファ（初期製法* 原薬）でプレートをコーティングし、MRD である 50 倍希釈された患者血清を用いてインキュベートした。結合した ADA は、HRP 標識マウス抗ヒト IgG（Fc）二次抗体を用いて検出した。複合体は、その後 TMB を加えて可視化した。波長 450 nm で測定した OD より得られる結果となる比色分析シグナルの強度は、各試料中に存在する IgG 型 ADA の量を反映する。

スクリーニングのカットポイントを正常なヒト血清 50 検体から得た結果の 95 パーセンタイルに設定した。

OD が分析カットポイントを上回る試料は、免疫沈降分析法を用いて確認した。患者血清、並びに陽性及び陰性対照血清を、蛍光標識（Alexa Fluor 680）したオリプダーゼ アルファを添加してインキュベートした。抗体が存在した場合、免疫複合体が形成された。それらはプロテイン A 及びプロテイン G のビーズにより沈降する。抗原抗体複合体は、煮沸することにより解離し、SDS-PAGE により分離し、免疫沈降された標識オリプダーゼ アルファを LI COR Odyssey 赤外イメージングシステムでスキャンすることにより可視化した。陽性対照及び標識オリプダーゼ アルファと比較し適切なサイズで免疫沈降したバンドを可視化することにより、オリプダーゼ アルファに対する抗体反応について、試料の陽性を判定した。

これらの方法は、第 Ia 相臨床試験（SPHINGO00605）で免疫原性を評価するために用いた。

結果：分析単位間及び分析単位内で許容可能な精度、選択性及び特異度が示された。ELISA の感度は、調製した 3 つの異なるオリプダーゼ アルファに対する抗体（2 つの異なるモノクローナル抗体及び 1 つの正常なヒト血清に添加したヒト IgG との複合体を形成した精製ウサギポリクローナル抗体）の評価に基づき 42～89 ng/mL の範囲であった。確認試験の感度は、マウス抗オリプダーゼ アルファモノクローナル抗体を用いると 46 ng/mL、アフィニティー精製ウサギ抗オリプダーゼ アルファ抗体を用いると 750 ng/mL であった。測定した分析パラメータは、全ての許容基準を満たしていた。

DOH1680、ABV0016、ABV0016/DOH1680 Addendum 1 及びDOH1680 Addendum 2：バリデーション報告書：血清中 IgG 型 ADA に対するオリプダーゼ アルファ免疫測定法（第二世代免疫原性分析法）

目的及び方法：既に開発済みの ELISA を、 製法A* （ABV0016）及び 製法B* （DOH1680）の原薬を用いて再バリデートすることを目的とした。スクリーニング試験のフォーマットは、第一世代の分析法に関する記載と同一である。オリプダーゼ アルファ（ 製法A* 製剤又は 製法B* 製剤）でプレートをコーティングし、MRD である 50 倍に希釈した患者血清を用いてインキュベートした。結合した ADA は、HRP 標識マウス抗ヒト IgG（Fc）二次抗体を用いて検出した。ADA と二次抗体の複合体は、その後 HRP 用の酵素基質である TMB を加えて可視化した。波長 450 nm で測定した OD より得られる結果となる比色分析シグナルの強度は、各試料中に存在する IgG 型 ADA の量を反映する。

DFI12712（ASCEND）及びDFI13803（ASCEND-Peds）から得たベースライン検体45検体を、疾患特有のカットポイント係数を設定するために使用した（ABV0016/DOH1680 Addendum 1）。データの統計的解析に基づき、2つの患者集団（小児及び成人）間及び2つのオリプダーゼ アルファ製剤（ 製法A* 製剤及び 製法B* 製剤）間で得られた結果に統計的な差はなく、したがって、95パーセンタイルで設定された単一のカットポイント係数が全ての患者検体に適用された。

分析単位ごとに決定されたプレート特有カットポイントを上回るODを示した試料は、過剰量のオリプダーゼ アルファを添加した競合的結合分析を用いる確認試験を実施した。本確認試験では、同じELISAを用いたが、検体をスクリーニング分析で観察されたシグナル強度に基づきMRD以上で希釈し、コーティングに用いたオリプダーゼ アルファ濃度の100倍の過剰オリプダーゼ アルファ製剤（ 製法A* 製剤及び 製法B* 製剤）を用いてプレインキュベートした。オリプダーゼ アルファに対し特異的なADAは過剰なオリプダーゼ アルファに結合することから、その検体について検出されるシグナル量が低減する結果となる。

スクリーニング試験のカットポイントを設定するために使用されたDFI12712（ASCEND）及びDFI13803（ASCEND-Peds）から得た同じベースライン検体45検体を、確認試験のため疾患特有のカットポイントを設定するために使用した。データの統計的解析に基づき、2つの患者集団（小児及び成人）間及び2つのオリプダーゼ アルファ製剤（ 製法A* 製剤及び 製法B* 製剤）間で得られた結果に統計的な差はなく、したがって、99パーセンタイルで設定された単一疾患のカットポイントを全ての患者検体に適用した。確認試験用のカットポイントを上回る阻害率（%）の試料は、ADA陽性と判定した。

陽性と確認された検体は、その後更に2倍希釈スキームを用いるELISAで抗体価を測定した。抗体価は、スクリーニング試験から得た疾患特有のデータによる99.9%パーセンタイルカットポイント係数を用いて確立された特有の抗体価カットポイントを上回るODを示す最大希釈倍率として定義した。

新たな分析法は、DFI13412、LTS13632、DFI13803（ASCEND-Peds）及びDFI12712（ASCEND）に組み入れられた患者のADAを測定するために用いた。2020年1月まで、オリプダーゼ アルファのProcess B製剤を投与された患者は捕捉抗原として 製法A* 原薬を用いて測定され（ABV0016）、オリプダーゼ アルファの 製法B* 製剤を投与された患者は捕捉抗原として 製法B* 原薬を用いて測定された（DOH1680）。2020年1月以降の全ての測定では 申請製法* 原薬を用いた測定に移行した。

申請製法* 原薬を用いた分析法が同様の分析性能を有することが確認された（DOH1680-Addendum 2）。

結果：分析単位間及び分析単位内で許容可能な精度、感度、選択性及び特異度が示された。Drug toleranceは、最大5.0 µg/mLまで観察された。分析法の感度は、正常ヒト血清に添加されたヒトIgGに結合する精製ウサギポリクローナル抗オリプダーゼ アルファ抗体を用いて評価するとき、 製法B* 原薬で120 ng/mL、 申請製法* 原薬で59 ng/ml及び 製法A* 原薬で95 ng/mLであった。測定した分析パラメータは、全ての許容基準を満たしていた。

続いて 申請製法* 原薬を用いて評価したところ、 製法B* 原薬と比較して分析法の性能に影響は認められなかった。患者でのカットポイントを使用した場合、同様のADA陰性／陽性の状態が

98%の対応する検体（90/92 検体）で得られた。ADA 陰性／陽性の状態は臨床試験から得られた 63 検体で 100%一致し、ADA 陽性検体の ADA 抗体価も 100%（40/40 検体）一致した（希釈回数±1 回以内）。さらに、 申請製法* 原薬を用いた方法で評価された全ての対照検体は 製法B* 原薬を用いた方法のバリデーションで確立された判定基準に適合しており、両製造方法で一貫していた。LPC の性能が許容範囲であったことから、 申請製法* 原薬の使用によって本分析法の感度に影響がないことが示された。全体として、 申請製法* 原薬は ADA を補足し、反応の特異性を確認するための分析法における試薬として使用するのに適していることが示された。

DOH1682、NAV0011 及びNAV0011 Addendum 1：バリデーション報告書：血清中のオリプダーゼ アルファ活性阻害を指標とした NAb の検出

目的及び方法： 製法A* （DOH1682）及び 製法B* （NAV0011）で製造されたオリプダーゼ アルファの酵素活性を阻害するNAbを検出することが可能な分析法をバリデートすることを目的とした。患者血清を 0.75 µg/mL のオリプダーゼ アルファ（ 製法A* 原薬又は Process C 原薬［その時点で患者が服用している製剤に基づく］）及び合成基質（HDAPC）とインキュベートした。インキュベーション中にオリプダーゼ アルファは基質を加水分解し、生成した代謝物は波長 415 nm での OD を測定することで検出可能である。NAb の存在下で酵素活性が阻害されると、OD の低下が観察される。酵素活性の阻害がみられた場合には、細胞を酵素及び酵素活性に対する影響がほとんどみられない正常ヒト血清とインキュベートしたときと比べて、波長 415 nm での OD の低下として検出される。片側 99%予測区間の下限として確立された、分析法のカットポイントを下回る阻害率（%）の試料は、オリプダーゼ アルファの酵素活性を阻害する NAb が陽性であると判定した。

結果：分析単位間及び分析単位内で許容可能な精度及び選択性が示された。Drug tolerance は、最大 1 µg/mL まで観察された。分析法の感度は、NAb 活性を有するマウス抗オリプダーゼ アルファモノクローナル抗体を用いて評価するとき、 製法B* 原薬で 2.50 µg/mL、 申請製法* 原薬で 2.43 µg/mL 及び 製法A* 原薬で 3.06 µg/mL であった。測定した分析パラメータは、全ての許容基準を満たしていた。

申請製法* 原薬を用いて評価したところ、 製法B* と比較して分析法の性能に影響は認められなかった。 申請製法* 又は 製法B* 原薬を用いて測定した酵素活性の阻害は、用いた全てのヒト血清検体（30/30 検体）において一致していた。これらのデータは 申請製法* 及び 製法B* で得られた原薬が本分析法において同等に機能することを示すものであった。

DOH1681、DOH1681 Addendum 1、NAV0010 及びNAV0028：バリデーション報告書：オリプダーゼ アルファのヒト線維芽細胞内への取り込み阻害を指標とした NAb の検出

目的及び方法：オリプダーゼ アルファの細胞内への取り込みを阻害する NAb を検出することが可能な分析法をバリデートすることを目的とした。ヒト ASMD 患者初代線維芽細胞を培養し、25 nmol/L（1.8 µg/mL）の蛍光標識オリプダーゼ アルファ（ 製法A* 原薬［NAV0028］、 製法B* 原薬

［DOH1681/NAV0010］及び　申請製法*　原薬［DOH1681 Addendum 1］）及び患者血清とインキュベートした。標識オリプダーゼ アルファの線維芽細胞内への取り込みを、細胞内に存在する蛍光量により定量した。細胞イメージングを用いて相対蛍光単位によりデータを収集した。細胞内への取り込み阻害がみられた場合は、細胞を酵素及び細胞内への取り込みに対する影響がほとんどみられない正常ヒト血清とインキュベートしたときと比べて、蛍光の低下として検出される。片側 99%予測区間の下限として確立された、分析法のカットポイントを下回る取り込み率（%）の試料は、オリプダーゼ アルファの細胞内への取り込みを阻害する NAb が陽性であると判定した。

結果：分析単位間及び分析単位内で許容可能な精度及び選択性が示された。Drug tolerance は、0.1 µg/mL まで観察された。NAb 活性を持つウサギ抗オリプダーゼ アルファモノクローナル抗体を用いたとき、2 つの異なるロットの　製法B*　原薬から調製された蛍光標識オリプダーゼ アルファでの検出感度は 16.47 µg/mL 及び 13.02 µg/mL、　申請製法*　では 14.8 µg/mL、並びに　製法A*　では 26.6 µg/mL と判定された。測定した分析パラメータは、全ての許容基準を満たしていた。

申請製法*　原薬を用いて評価したところ、　製法B*　と比較して分析法の性能への影響は認められなかった。以前のバリデーションで設定し、これらの分析に適用した疾患特有のカットポイントを使用した場合、93%の検体（42/45 検体）で同じ NAb の結果を示した。さらに、　申請製法*　を用いた分析法で評価された全ての対照検体は、　製法B*　を用いた分析法のバリデーションで確立された判定基準に適合しており、いずれの製造方法においても対照検体の性能は一貫していた。全体として、これらのデータは、分析方法の性能が製剤の製造方法の変更によって影響されず、　申請製法*　原薬が、オリプダーゼ アルファの細胞内への取り込みを阻害する NAb を検出する分析法の試薬としての使用に適していることを示す。

ITR-594-0912 及びDOH1655：バリデーション報告書：ImmunoCAP100 を用いるオリプダーゼ アルファに対するヒト IgE 抗体の検出

目的及び方法: IgE型ADAの定量を検出する分析法をバリデートすることを目的とした。ImmunoCAP 100 機器で実施する自動化分析法で、 製法A*　（ITR-594-0912）又は　製法B*　（DOH1655）で製造されたオリプダーゼ アルファ 20 µg/mL でコーティングした ImmunoCAP を使用した。自動化分析中、検体及び対照を個別の ImmunoCAP を用いてインキュベートした。結合した IgE 型 ADA は、β-ガラクトシダーゼを結合した抗ヒト IgE 二次抗体を用いて検出した。結合した複合体は、その後 4-メチルウンベリフェリル-β-D-ガラクトシドを加えて可視化した。結合した酵素と基質の間での反応により生成した蛍光物質を ImmunoCAP 100 機器内の蛍光光度計で検出した。蛍光シグナルの強度は、検体中のオリプダーゼ アルファ特異的 IgE 抗体の量に正比例する。特異的オリプダーゼ アルファ ImmunoCAP に結合した抗体から検出されたレスポンスユニットは、世界保健機関（WHO）の 2nd International Reference Preparation 75/502 of Human Serum Immunoglobulin E に対し標準化したヒト IgE キャリブレータにより補間した。結果は国際標準単位（kUA/L）で表した。

結果：分析単位間及び分析単位内で許容可能な精度、選択性及び特異度が示された。Drug tolerance は 2 µg/mL まで観察された。分析法の感度は、正常ヒト血清に添加されたヒト IgE に結合する精製ウサギ抗オリプダーゼ アルファポリクローナル抗体を用いたとき、　製法B*　原薬で 1.08 ng/mL 及び　製法A*　原薬で 0.92 ng/mL であった。測定した分析パラメータは、全ての許容基準を満たしていた。

3　全試験を通しての結果の比較と解析

3.1　生体試料分析法

オリプダーゼ アルファの臨床開発中に LLOQ 0.04～0.125 µg/mL のバリデートされた生体試料分析法を用いて血漿中のオリプダーゼ アルファの全身曝露量を測定した。生体試料分析法では、第一の方法（ITR-432-0409）及び第二の方法（ITR-653-0813）において、それぞれ適切な感度並びに良好な分析単位内及び分析単位間の真度及び精度を示した。分析単位間での真度（%誤差）は ITR-432-0409 及び ITR-653-0813 でそれぞれ-15%～16%及び-6%～5%、分析単位間での精度（変動係数［CV］）はそれぞれ 16.3%以下及び 9.3%以下であった。血漿検体におけるオリプダーゼ アルファの安定性について、-60℃以下で保存された場合、34 か月までの安定性が示された。各臨床試験からの検体は、この安定性期間内に測定した。

PD マーカーである lyso-SPM、セラミド、キチナーゼ及び CCL18 の真度（%誤差）の範囲は -17.1%～7.4%であり、分析単位内及び分析単位間の精度（CV%）はそれぞれ 18.5%以下及び 15.2%以下であった。

CRIM 法は再現性が示され、陽性（CRIM 陽性）試料中の内因性 ASM タンパク質を特異的に検出した。感度は、線維芽細胞抽出物からの総タンパク質の 1.56 µg 又は PBMC 抽出物からの総タンパク質の 2.02 µg であった。

免疫原性はバリデートされた ELISA を用いて評価した。ADA ELISA の感度の範囲は 38～89 ng/mL、drug tolerance は 5 µg/mL であった。ADA 分析法の drug tolerance が比較的低いため、反復投与期間中の治験薬投与開始前に ADA 評価のための検体を採取した。このとき、オリプダーゼ アルファの血漿中濃度は LLOQ（0.04 µg/mL）以下となることが予想された。

臨床試験で検出された ADA 陽性試料の NAb 活性を評価するため 2 種類の NAb 分析法を開発及びバリデートした。酵素活性の阻害を検出するための NAb 分析法について、感度は　申請製法*　原薬で 2.43 µg/mL、　製法B*　原薬で 2.50 µg/mL、 製法A*　原薬で 3.06 µg/mL であった。Drug tolerance はオリプダーゼ アルファ 1 µg/mL であった。オリプダーゼ アルファの細胞内への取り込み阻害を検出する NAb 分析法については、それぞれの製造方法の感度の範囲は、13.0～26.6 µg/mL であった。Drug tolerance は 0.1 µg/mL であった。

2019 年 8 月 20 日から 2020 年 1 月 17 日までの試験期間中（DFI12712［ASCEND］の PAP 期、LTS13632 のデータカットオフ日まで、DFI13803［ASCEND-Peds］の完了まで）、患者が異なる製剤の投与（Process B 製剤又は　製法B*　製剤）を受けたときに、来院時に検体を採取し、異なる製剤に対する抗体を評価した。2020 年 1 月 17 日以降、検体は　申請製法*　に対する抗体を評価した。ELISA により ADA 陽性が検出された検体についてのみ NAb 分析法を実施した。ELISA について記載したとおり、循環血漿中オリプダーゼ アルファの濃度による交絡を回避するため、反復投与期間中の治験薬投与前に全ての ADA 検体を採取した。オリプダーゼ アルファに対する IgE の検出を目的とした追加の ADA 分析法

も、開発及びバリデートした。分析法の感度は、　製法B*　原薬で 1.08 ng/mL、 製法A*　原薬で 0.92 ng/mL であった。Drug tolerance はオリプダーゼ アルファ 2 µg/mL であった。IgE 型 ADA 測定用の検体は、過敏症反応が示唆される臨床症状が発現したとき、及び規定された免疫原性評価時のみに採取し、循環血漿中オリプダーゼ アルファ濃度が低い反復投与期間中の治験薬投与前に採取した。

3.2　製剤間の臨床薬物動態学的同等性／同質性

オリプダーゼ アルファの臨床開発において、臨床試験で使用する原薬は異なる製造方法（初期製法*、製法A*、　製法B*　及び　申請製法*　）で製造された。品質面での同等性／同質性が示されたために、異なる製造方法で製造されたオリプダーゼ アルファ製剤に関する PK に基づく同等性／同質性を検証するための生物薬剤学試験は実施しなかった。

3.2.1　製法A*　製剤と 初期製法* 製剤の比較

初期製法* 製剤（SPHINGO00605）及び　製法A*　製剤（DFI13412 及び DFI12712［ASCEND］）での PK データの要約を表 5 に記載した。オリプダーゼ アルファは第 Ia 相臨床試験（SPHINGO00605）で単回投与された。反復投与後の PK に蓄積が認められないため、DFI13412 及び DFI12712（ASCEND）での患者内用量漸増期間中の 0.3、0.6 及び 1.0 mg/kg の初回投与後の最高血漿中濃度（C_{max}）及び血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC）を、同用量の SPHINGO00605 の単回投与 PK データと比較した。品質面での同等性／同質性の結果と一致し、初期製法* 製剤と　製法A*　製剤間の C_{max} 及び AUC に大きな差はなく、数値の違いは患者数が少なかったこと及び患者間でのばらつきに起因したと考えられる。

表 5 - Mean (range) olipudase alfa exposure in ASMD patients who were treated with 初期製法* or 製法A*

Dose (mg/kg)	Trial	Process	N	C_{max} (µg/mL)	AUC[a] (µg•h/mL)
0.3	SPHINGO00605	A	2	3.55 (2.59, 4.51)	28.5 (16.8[b], 40.2)
	DFI13412	B	5	3.27 (2.74, 3.89)	34.7 (30.0, 39.3)
	DFI12712	B	5	2.44 (1.72, 3.17)	39.5 (28.9, 49.2)
0.6	SPHINGO00605	A	2	5.84 (4.62, 7.05)	50.1 (43.4, 56.8)
	DFI13412	B	5	6.93 (5.24, 9.62)	73.0 (59.6, 86.0)
1.0	SPHINGO00605	A	1	11.6	95.8
	DFI13412	B	5	11.8 (10.0, 14.3)	132 (113, 155)
	DFI12712	B	4	10.4 (7.26, 18.7)	142 (115, 203)

AUC = area under the plasma concentration versus time curve; C_{max} = maximum plasma concentration; N = total number of patients.

a $AUC_{0\text{-}48h}$ values were used for comparison since all patients in the three trials except one had plasma concentrations quantifiable up to 48 hours.

b $AUC_{0\text{-}24h}$ was reported since concentration was quantifiable up to 24 hours only.

3.2.2 製法B* 製剤と 製法A* 製剤の比較

製法B* 製剤及び 製法A* 製剤の品質面での同等性／同質性を受けて、非臨床 PD での同等性／同質性試験を ASMKO マウスで実施した（Module 2.6.2）。肝臓、脾臓及び腎臓のスフィンゴミエリン濃度を測定し、血液中のセラミド濃度も測定した。 製法B* 製剤と 製法A* 製剤でスフィンゴミエリン減少又はセラミド生成について統計的な差がなかったことから、ASMKO マウスでのオリプダーゼ アルファの同等／同質な効果が確認された。 製法A* 製剤と 製法B* 製剤間の臨床 PK での同等性／同質性を成人患者（LTS13632 及び DFI12712［ASCEND］の併合データ）並びに小児患者（LTS13632）で評価した。

LTS13632 の 製法A* 製剤から 製法B* 製剤に切り替えた成人患者 9 名（LTS13632 の患者 4 名及び DFI12712［ASCEND］の患者 5 名）並びに小児患者 12 名（LTS13632 の青年患者 4 名、児童患者 5 名、及び乳児／幼児患者 3 名）における 製法A* 製剤の最終投与後及び 製法B* 製剤の初回投与後の主要な PK パラメータを表 6 に要約した。

製法A* 製剤に対する 製法B* 製剤の C_{max} 及び投与間隔での AUC（$AUC_{0-\tau}$）の平均値の比は、成人患者ではそれぞれ 1.21 及び 1.27、小児患者ではそれぞれ 1.14 及び 1.23 であった。この結果より、成人患者及び小児患者のいずれにおいても 製法B* 製剤のオリプダーゼ アルファ曝露量が 製法A* 製剤よりおおむね高いことが示された。

表 6 - Mean CV% olipudase alfa exposures with 3.0 mg/kg (every 2 weeks [Q2W]) in ASMD patients who switched from 製法A* to 製法B*

Trial	Patients	N	製法A*		製法B*	
			C_{max} (µg/mL)	$AUC_{0-\tau}$ (µg.h/mL)	C_{max} (µg/mL)	$AUC_{0-\tau}$ (µg.h/mL)
DFI12712 and LTS13632	Adult[a]	9	30.0 (22)	567 (17)	36.2 (26)	719 (16)
LTS13632	Pediatric	12	22.8 (20)	482 (11)	25.9 (24)	592 (15)

$AUC_{0-\tau}$ = area under the plasma concentration versus time curve over a dosing interval; C_{max} = maximum plasma concentration; N = total number of patients.
a One patient was excluded since the switch from 製法A* to 製法B* occurred at 1.0 mg/kg.
Source: CSRs of DFI12712 ASCEND and LTS13632

また、全ての臨床試験 5 試験（SPHINGO00605、DFI13412、DFI13803［ASCEND-Peds］、LTS13632 及び DFI12712［ASCEND］）を併合した血漿中オリプダーゼ アルファ濃度－時間データを用いて母集団 PK 解析（POH0494）を実施し、その後、曝露－反応解析（POH0610）を実施した。解析結果の詳細は Module 2.7.2 [2.7 項]に記載した。品質面での同等性／同質性に基づき 初期製法* と 製法A* によるオリプダーゼ アルファ製剤が同等／同質とみなされることから、母集団 PK 解析で 製法B* 製剤と比較するため、これら 2 つの製造方法による製剤のデータを併合した。その結果、製造方法がオリプダーゼ アルファの PK に影響する有意な共変量であることが示された。初期製法*製剤と 製法A* 製剤の併合グループと比較したところ、 製法B* 製剤ではクリアランスが低く、中心コンパート

メント及び末梢コンパートメント 1 の両方で分布容積も小さかった。これらの差により、　製法B*　製剤を投与したとき、目標用量 3.0 mg/kg での定常状態における C_{max} 及び $AUC_{0-\tau}$ がそれぞれ 16%及び 24%高くなると推定された。しかし、臨床試験で得られたオリプダーゼ アルファの曝露量範囲では、脾容積及び一酸化炭素肺拡散能については、曝露量依存的な違いは認められなかった（POH0610）。したがって、 製法A*　製剤と　 製法B*　 製剤の曝露量の差は、臨床的に意義があるとみなされなかった。さらに、 製法A*　製剤から　 製法B*　 製剤に切り替えたときの有効性の統計解析結果では、脾容積の減少及び平均投与前血小板数の増加はおおむね同様であった。オリプダーゼ アルファの　製法A*　製剤及び　 製法B*　 製剤の全体的な免疫原性プロファイルは、成人患者と小児患者で同様であった。治験薬投与下で発現した AE、治験薬投与下で発現した重篤な AE、治験薬の投与中止、IAR 又は過敏症 IAR に関して、 製法A*　製剤又は　 製法B*　 製剤のいずれでも一貫した関連は認められず、この結果は　 製法B*　 製剤に対し、 製法A*　で製造されたオリプダーゼ アルファが安全性プロファイルに影響を及ぼさないことを示唆するものである。臨床的有効性及び安全性の比較の詳細については、それぞれ Module 2.7.3 及び Module 2.7.4 に記載した。

3.3　全体的な結論

バリデートされた分析法を用いてオリプダーゼ アルファの全身曝露、PD バイオマーカー及び免疫原性を評価した。結論として、オリプダーゼ アルファの臨床開発中に使用した、初期製法*（成人を対象とした第 Ia 相臨床試験でのみ使用）、 製法A*　及び　 製法B*　 で製造された原薬間で、品質面及び非臨床 PD での同等性／同質性が示された。さらに、初期製法* 製剤及び　製法A*　製剤は、臨床的に同等／同質であると判断された。 製法A*　製剤よりも高い全身曝露（C_{max} 及び $AUC_{0-\tau}$）が　 製法B*　製剤において認められたものの、その差は臨床的に意義があるとはみなされなかった。このように、品質面及び臨床的に示された根拠は、臨床開発に使用したオリプダーゼ アルファ製剤の同等性／同質性を支持するものであった。

4　参考文献

該当せず。

5　付録

5.1　開発中に用いた分析法のライフサイクル情報及び臨床試験で用いた分析法の性能の要約

5.1.1 薬物濃度測定法及び薬力学評価のための測定法

表 7 - Bioanalytical method life cycle information

	Method Validation #1	Method Validation #2	Phase 1a Study SPHINGO00605	Phase 1b Study DFI13412 (SPHINGO00812)	Long-term Safety Study LTS13632	Pediatric Study DFI13803	Adult Pivotal Study DFI12712
Analyte	Olipudase alfa	Olipudase alfa	Olipudase alfa	Olipudase alfa	Olipudase alfa	Olipudase alfa	Olipudase alfa
Validation type	Full validation	Full validation	In-Study	In-Study	In-Study	In-Study	In-Study
eCTD reference number	5.3.1.4	5.3.1.4	5.3.1.4	5.3.1.4	5.3.1.4	5.3.1.4	5.3.1.4
Method ID	**ITR-432-0409**	**ITR-653-0813**	**ITR-432-0409**	**ITR-432-0409**	**ITR-653-0813**	**ITR-653-0813**	**ITR-653-0813**
Duration of time method is in use	04/2009-02/2014	08/2014-01/2020	05/2009	09/2013-02/2014	08/2014-12/2019	01/2016-10/2019	08/2016-11/2019
Bioanalytical site	Sanofi US, Biomarkers and Clinical Bioanalyses, 1 The Mountain Rd, Framingham, MA 01701 USA (Previously Genzyme Clinical Laboratory Sciences)						
Matrix	Sodium Heparin Plasma						
Platform	enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)						
Format	A validated sandwich format using a purified mouse anti-olipudase alfa monoclonal antibody (clone 1H7) as capture and a second non-competing purified mouse monoclonal anti-olipudase alfa monoclonal antibody (4G11) for detection	A validated sandwich format using a purified mouse anti-olipudase alfa monoclonal antibody (clone 1H7) as capture and a purified rabbit polyclonal anti-olipudase alfa antibody for detection	A validated sandwich format using a purified mouse anti-olipudase alfa monoclonal antibody (clone 1H7) as capture and a second non-competing purified mouse monoclonal anti-olipudase alfa monoclonal antibody (4G11) for detection		A validated sandwich format using a purified mouse anti-olipudase alfa monoclonal antibody (clone 1H7) as capture and a purified rabbit polyclonal anti-olipudase alfa antibody for detection		
Stock reference,	Drug lot [redacted],	Drug lot [redacted],	Drug lot [redacted],	Drug lot [redacted],	Lot 1: Drug lot [redacted],	Lot 1: Drug lot	Lot 1: Drug lot

	Method Validation #1	Method Validation #2	Phase 1a Study SPHINGO00605	Phase 1b Study DFI13412 (SPHINGO00812)	Long-term Safety Study LTS13632	Pediatric Study DFI13803	Adult Pivotal Study DFI12712
lot number, expiration date	Standard lot# 17044-150A, exp 08-Apr-2011	Standard lot# 19063-72a, exp 27-Feb-2015	Standard lot# 17044-150A, exp 08-Apr-2011	Standard lot# 19037-179A, exp 04-Sep-14	Standard lot# 19063-72a, exp 27-Feb-2015 Lot 2: Drug lot 13CT116; Standard lot# 15-CRE-042, exp 19-May-17 Lot 3: Drug batch number C6642; Standard lot# 17NP022, exp 31-Aug-19 Lot 4: Drug batch number C6642; 19NP032, exp 30-Jun-21	13CT116; Standard lot#15-CRE-042, exp 19-May-17 Lot 2: Drug batch number C6642; Standard lot# 17NP022, exp 31-Aug-19 Lot 3: Drug batch number C6642; 19NP032, exp 30-Jun-21	13CT116; Standard lot# 15-CRE-042, exp 19-May-17 Lot 2: Drug batch number C6642; Standard lot# 17NP022, exp 31-Aug-19 Lot 3: Drug batch number C6642; 19NP032, exp 30-Jun-21
Calibration range from the lower limit of quantitation (LLOQ) to the upper limit of quantitation (ULOQ)	2.5 ng/mL to 50 ng/mL in 1/50 human plasma (125 ng/mL to 2500 ng/mL in neat plasma)	0.78 ng/mL to 50 ng/mL in 1/50 human plasma (39 ng/mL to 2500 ng/mL in neat plasma)	3.13 ng/mL to 25 ng/mL (provisional LLOQ) in 1/50 human plasma (156 ng/mL to 1250 ng/mL in neat plasma)	2.5 ng/mL to 50 ng/mL in 1/50 human plasma (125 ng/mL to 2500 ng/mL in neat plasma)	0.78 ng/mL to 50 ng/mL in 1/50 human plasma (39 ng/mL to 2500 ng/mL in neat plasma)	0.78 ng/mL to 50 ng/mL in 1/50 human plasma (39 ng/mL to 2500 ng/mL in neat plasma)	0.78 ng/mL to 50 ng/mL in 1/50 human plasma (39 ng/mL to 2500 ng/mL in neat plasma)
Matrix study population	Normal Plasma	Normal Plasma	ASMD Population	ASMD Population	ASMD Population	ASMD Population	ASMD Population
Link to reports and applicable amendments	5.3.1.4 [ITR-432-0409]	5.3.1.4 [ITR-653-0813]	5.3.3.2 SPHINGO00605 [Bioanalytical Phase Report - SPHINGO00605 - plasma GZ402665]	5.3.5.2 DFI13412 [Appendix 16.2.5]	5.3.5.2 LTS13632 [Appendix 16.2.5]	5.3.5.2 DFI13803 [Appendix 16.2.5]	5.3.5.1 DFI12712 [Appendix 16.2.5]
Synopsis of amendment history	N/A	Long-term storage stability	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

表 8 - Summary of pharmacokinetic method performance

Bioanalytical method validation report	5.3.1.4 [ITR-432-0409]: Validation Report: Acid Sphingomyelinase PK Quantitation Immunoassay			5.3.1.4 [ITR-653-0813]: Validation Report: Recombinant Human Acid sphingomyelinase PK ELISA for the Quantitation of olipudase alfa in Human Plasma Using Rabbit Detection Antibody		
Method description	A validated sandwich ELISA using a purified mouse anti-olipudase alfa monoclonal antibody (clone 1H7) as capture and a second non-competing purified mouse monoclonal anti-olipudase alfa monoclonal antibody (4G11) for detection			A validated sandwich ELISA using a purified mouse anti-olipudase alfa monoclonal antibody (clone 1H7) as capture and a purified rabbit polyclonal anti-olipudase alfa antibody for detection		
Materials used for standard calibration curve and concentration	Olipudase alfa reconstituted at 4 mg/mL			Olipudase alfa reconstituted at 4 mg/mL		
Validated assay range	Curve range: 2.5 ng/mL to 50 ng/mL 0.125 µg/mL to 2.5 µg/mL in neat plasma			Curve range: 0.78 ng/mL to 50 ng/mL 0.04 µg/mL to 2.5 µg/mL in neat plasma		
Material used for quality controls (QCs) and concentration	Olipudase alfa spiked into normal human serum at 750 ng/mL, 375 ng/mL, 187.5 ng/mL, 93.8 ng/mL and 46.9 ng/mL (VS) and 20, 10, and 2.5 ng/mL (QCs)			Olipudase alfa spiked into normal human serum ULOQ=2500 ng/mL HQC=2000 ng/mL MQC=250 ng/mL LQC=100 ng/mL LLOQ=39 ng/mL		
Minimum required dilutions (MRDs)	50			50		
Source and lot of reagents	Genzyme, lot# [redacted]			Genzyme, lot# [redacted]		
Regression model and weighting	4-parameter curve fit, no weighting			4-parameter curve fit, no weighting		
Validation parameters	Method validation summary		Source location	Method validation summary		Source location
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	Number of standard calibrators from LLOQ to ULOQ	6 (plus 2 anchor points)	Data not shown in report	Number of standard calibrators from LLOQ to ULOQ	7 (plus 1 anchor point)	Table 16
	Cumulative accuracy (%bias) from LLOQ to ULOQ	Curve data not shown in report	N/A	Cumulative accuracy (%bias) from LLOQ to ULOQ	-5.9% to 5.0%	Table 12
	Cumulative precision (%CV) from LLOQ to ULOQ	Curve data not shown in report	N/A	Cumulative precision (%CV) from LLOQ to ULOQ	Not calculated	N/A

Bioanalytical method validation report	5.3.1.4 [ITR-432-0409]: Validation Report: Acid Sphingomyelinase PK Quantitation Immunoassay			5.3.1.4 [ITR-653-0813]: Validation Report: Recombinant Human Acid sphingomyelinase PK ELISA for the Quantitation of olipudase alfa in Human Plasma Using Rabbit Detection Antibody		
Performance of QCs during accuracy and precision runs	Cumulative accuracy (%bias) in 5 VS and 3 QCs	-15% to 16%	Table 10	Cumulative accuracy (%bias) in 5 QCs	-5.9% to 5.0%	Table 12
	Inter-batch %CV (Validation samples and QCs >LLOQ)	≤16.3%	Table 9	Inter-batch %CV	≤9.3%	Table 7
	Total Error (TE)	≤30.3%	Tables 9 and 10	Total Error (TE)	≤14.6%	Table 13
Selectivity & matrix effect	3 plasma lots tested by 2 operators at multiple concentrations (starting at 2500 ng/mL and serially diluted 1/2 in matching human plasma for a total of seven additional points to 19.5 ng/mL).	Percent recovery for values in reportable range: 83.4% to 109.7% for all but one point at the ULOQ for 1 pool by 1 operator (acceptable recovery for the second operator)	Table 11	10 individual lots tested at 2 concentrations:	2 ng/mL spiked samples - 10/10 recovered with acceptable precision and accuracy. 40 ng/mL spiked samples - 8/10 samples recovered with acceptable precision and accuracy.	Table 18, 19
Interference & specificity	Lack of detection of three irrelevant recombinant human enzyme spikes.	Acceptable with results <LLOQ	Table 16	Lack of detection of the three irrelevant recombinant human enzyme spikes.	Acceptable with results <LLOQ	Table 20
Hemolysis effect	Not Performed	N/A	N/A	Not Performed	N/A	N/A
Lipemic effect	Not Performed	N/A	N/A	Not Performed	N/A	N/A
Dilution linearity & hook effect	Three normal human plasma samples were spiked with 20 µg/mL of olipudase. Each sample was diluted 1/50 in SDB and twelve serial ½ dilutions were made in SDB for each spiked sample.	% Recovery of slope: 94.6%-98.1%. All recover within 10% of the slope of the standard curve and meet acceptance criteria. Supports dilution up to at least 6400. %recovery of samples diluted in parallel demonstrate acceptable recovery with dilution up to 2500. No hook observed up to 8 x higher than the ULOQ	Table 14	A high level of olipudase alfa (10.0 µg/mL) was independently spiked into pooled normal human plasma three times. Each spiked sample was diluted 1/50 in SDB. Nine subsequent serial 2-fold dilutions were performed in StdDB so that the first two dilutions were above the range of the standard curve and one dilution was below the range of the standard curve.	Bias, -15.0% to 3.5% and -18.0% to 7.7% for LOD1 and LOD2, respectively. For LOD3 Bias ranged from -31.5% to -13.4% and failed at 4 concentrations within the curve. Acceptable bias with dilutions up to 12800. No hook observed with	Table 21

Bioanalytical method validation report	5.3.1.4 [ITR-432-0409]: Validation Report: Acid Sphingomyelinase PK Quantitation Immunoassay			5.3.1.4 [ITR-653-0813]: Validation Report: Recombinant Human Acid sphingomyelinase PK ELISA for the Quantitation of olipudase alfa in Human Plasma Using Rabbit Detection Antibody		
					concentrations up to 200 ng/mL (10 µg/mL in neat plasma)	
Bench-top/process stability	Short-Term Stability: Stable for up to 4 hours at ambient temperature (%Bias ranged -11.8% to 17.1% for all timepoints)	Acceptable up to 4 hours	Table 19	Short-Term Stability: Stable for up to 3 hours at ambient temperature (% Bias ranged -7.5% to 8.5% for all timepoints)	Acceptable up to 3 hours	Table 28
Freeze-Thaw stability	5 F/T cycles evaluated Stable for up to 5 F/T cycles. % Bias ranged -13.9% to 17.7% from nominal for all timepoints. 3 data points exceeded 20% bias (1 and 2 F/T for VS3 and 5F/T for VS1)	Acceptable up to 5 Freeze/Thaw cycles	Table 17	5 F/T cycles evaluated Stable for up to 5 F/T cycles. % Bias ranged -10.2% to 7.2% for all timepoints (except for HQC Cycle 2F/T = 22.9%)	Acceptable up to 5 Freeze/Thaw cycles	Table 27
Long-term storage	up to 26 months assessed Stable for up to 26 months at ≤ -60°C. % Bias ranged -8.2% to 19.1% from nominal for all timepoints (for samples >LLOQ)	Acceptable up to 26 months	Table 20	up to 34 months assessed Stable for up to 34 months at ≤ -60°C. %Bias ranged -11.0% to 9.8% for all timepoints	Acceptable up to 34 months	Table 29
Parallelism	Not Performed	N/A	N/A	Not Performed	N/A	N/A
Carry over	Not Applicable	N/A	N/A	Not Applicable	N/A	N/A

SDB = Sample Dilution Buffer; StdDB = Standard Dilution Buffer

表 9 - Method performance in Study #SPHINGO00605

Method performance in study #SPHINGO00605 **Method ITR-432-0409**		
Bioanalytical Phase Report-GZ402665/SPHINGO00605-Quantitation of olipudase alfa in human plasma		
Assay passing rate	63.2% passing rate (12 passed out of 19 total)	Section 3.1
Standard curve performance	Cumulative bias range: -1.23% to 1.25%	Table 2
(excluding anchors)	Cumulative precision: 2.86% to 5.08% CV	
QC performance	Cumulative bias range:-8.47% to –7.88%	Table 4
	Cumulative precision: 6.22% to 6.92% CV	
	TE: ≤14.8%	
Method reproducibility	Incurred sample re-analysis was not performed.	N/A
Study sample analysis/stability	Long term stability is currently established up to 34 months at <-60°C. All standards, QCs and samples tested in this assay were analyzed within established stability.	ITR-653-0813 amendment 1 Table 29
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	4 standard curve points from LLOQ (3.13 ng/mL) to ULOQ (25.0 ng/mL) (plus 4 anchor points)	

表 10 - Method performance in Study #DFI13412

Method performance in study # DFI13412 Method ITR-432-0409		
Bioanalytical Phase Report-GZ402665/DFI13412- Quantitation of olipudase alfa in human plasma		
Assay passing rate	76.9% passing rate (20 passed out of 26 total)	Table 1
Standard curve	Cumulative bias range: Not calculated	N/A
Performance	Cumulative precision: Not calculated	
QC performance	Cumulative bias range:-7.5% to 3.8%	Table 1
	Cumulative precision: <7.6% CV	
	TE: ≤13.7%	
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was not performed in this study	N/A
Study sample analysis/stability	Long term stability is currently established up to 34 months at <-60°C. All standards, QCs and samples tested in this assay were analyzed within established stability.	ITR-653-0813 amendment 1 Table 29
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	6 standard curve points from LLOQ to ULOQ (plus 2 anchor points)	

表 11 - Method performance in Study #LTS13632

Method performance in trial # LTS13632 **Method ITR-653-0813**		
Bioanalytical Phase Report-GZ402665/LTS13632-Quantitation of Olipudase Alfa in Human Plasma		
Assay passing rate	90.9% passing rate (40 passed out of 44 total)	Section 8.4 Appendix 4
Standard curve	Cumulative bias range: -0.43% to 0.72%	Table 2
Performance (excluding anchor)	Cumulative precision: ≤ 3.31% CV	
QC performance	Cumulative bias range: -7.91% to 2.15%	Table 4
	Cumulative precision: ≤ 11.3% CV	
	TE: ≤16%	
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was not performed in this study.	N/A
Study sample analysis/stability	Long term stability is currently established up to 34 months at ≤-60°C. All standards, QCs and samples tested in this assay were analyzed within established stability.	ITR-653-0813 amendment 1 Table 29
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	7 standard curve points from LLOQ to ULOQ (with 1 anchor point)	

表 12 - Method performance in Trial #DFI13803

Method performance in trial #DFI13803 **Method ITR-653-0813**		
Bioanalytical Phase Report-GZ402665/DFI13803-Quantitation of Olipudase Alfa in Human Plasma		
Assay passing rate	97.2% passing rate (35 passed out of 36 total)	Section 8.2 Appendix 2
Standard curve	Cumulative bias range: -0.95% to 0.47%	Table 2
Performance	Cumulative precision: ≤4.20% CV	
QC performance	Cumulative bias range: -11.85% to -1.51%	Table 4
	Cumulative precision: ≤14.8% CV	
	TE: ≤21%	
Method reproducibility	Incurred sample re-analysis was performed in 11.7% of non-placebo study samples, and 88.6% of the samples met the pre-specified criteria.	Section 8.3 Appendix 3
Study sample analysis/stability	Long term stability is currently established up to 34 months at ≤-60°C. All standards, QCs and samples tested in this assay were analyzed within established stability.	ITR-653-0813 amendment 1 Table 29
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	7 standard curve points from LLOQ to ULOQ (with 1 anchor point)	

表 13 - Method performance in Trial #DFI12712

Method performance in trial #DFI12712 **Method ITR-653-0813**		
Bioanalytical Phase Report-GZ402665/DFI12712-Quantitation of Olipudase Alfa in Human Plasma		
Assay passing rate	97.3% passing rate (110 passed out of 113 total)	Section 3.1 Appendix 3
Standard curve	Cumulative bias range: -1.49% to 0.67%	Table 2
Performance	Cumulative precision: ≤2.82% CV	
QC performance	Cumulative bias range: -8.98% to 5.33%	Table 5
	Cumulative precision: ≤9.5% CV	
	TE: ≤16.88%	
Method reproducibility	Incurred sample re-analysis was performed in 8.8% of non-placebo study samples, and 96.7% of the samples met the pre-specified criteria.	Section 7.4 Appendix 4
Study sample analysis/stability	Long term stability is currently established up to 34 months at ≤-60°C. All standards, QCs and samples tested in this assay were analyzed within established stability.	ITR-653-0813 amendment 1 Table 29
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	7 standard curve points from LLOQ to ULOQ (with 1 anchor point)	

表 14 - Summary of method modifications and cross-validation results

Table 2b. Summary of method modifications and cross-validation results: Comparison of ITR-432-0409 and ITR-653-0813			
Bioanalytical method validation report name and hyperlink	ITR-672-1113 Development Report: PK ELISA for the Quantitation of Olipudase Alfa in Human Plasma and Bronchoalveolar Lavage Fluid Using Rabbit Detection Antibody		
Changes in method	Detection antibody changed from a mouse monoclonal anti-olipudase alfa antibody to a rabbit polyclonal anti-olipudase alfa antibody		
New validated assay range if any	LLOQ of curve reduced to 0.39 µg/mL		
Validation parameters	Cross-validation performance		Source location
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	Cumulative accuracy (% bias) in standard calibrators from LLOQ to ULOQ	Not calculated	N/A
	Cumulative precision (% CV) from LLOQ to ULOQ	<20% for OD values	Table 18
Performance of QCs during accuracy and precision runs	Cumulative accuracy (% bias) in 7 QCs/VS	-5.0% to 16.3% in method ITR-432-0409 versus 2.3% to 16.8% in method ITR- 653- 0813	Table 1 from ITR-672-1113
	Inter-batch % CV	≤9%	Table 19
	Percent TE	≤26%	Table 19
Cross-validation	7 spiked samples used for cross validation method	7 of 7 samples had % recovery between 80%-120% when compared to nominal and a correlation graph of values from the two methods resulted in a slope of 1.086 and R^2 of 0.98 which met specified criteria.	Table 1
List other parameters	N/A		N/A

表 15 - Bioanalytical method life cycle information – Ceramide

	Method validation	Phase 1b study DFI13412 (SPHINGO00812)	Long-term safety study LTS13632	Pediatric study DFI13803	Adult pivotal study DFI12712
Analyte	Ceramide	Ceramide	Ceramide	Ceramide	Ceramide
Validation type	Full validation	In-study	In-study	In-study	In-study
eCTD reference number	5.3.1.4	5.3.1.4	5.3.1.4	5.3.1.4	5.3.1.4
Method ID	**ITR-377-1207/ BMV0028**	**ITR-377-1207**	**ITR-377-1207/ BMV0028**	**ITR-377-1207/ BMV0028**	**ITR-377-1207/ BMV0028**
Duration of time method is in use	01/2008- present	05/2013-01/2014	05/2014-present	09/2015‑12/2019	08/2016-present
Bioanalytical site	Sanofi US, Biomarkers and Clinical Bioanalyses, 1 The Mountain Rd, Framingham, MA 01701 USA (Previously Genzyme Clinical Laboratory Sciences)				
Matrix	Heparin Plasma				
Platform	LC/MS/MS assay				
Format	Validated assay for quantification of total ceramide levels using liquid-liquid and solid-phase extraction procedures followed by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) with multiple-reaction monitoring.				
Stock reference, lot number, expiration date	Avanti Polar Lipids, Catalog # 860052P Lot# BCER-23, expiration 6 months from date of receipt (received on multiple occasions)/ Lot# BCER-27 exp. 27Apr2022 (expiry extended to 6 years from receipt)	Avanti Polar Lipids, Catalog # 860052P Lot# BCER-25, expiration 6 months from date of receipt	Avanti Polar Lipids, Catalog # 860052P Lot# BCER-26, expiration 6 months from date of receipt Lot# BCER-27 exp. 27Apr2022	Avanti Polar Lipids, Catalog # 860052P Lot# BCER-25, expiration 6 months from date of receipt Lot# BCER-26, expiration 6 months from date of receipt Lot# BCER-27 exp. 27Apr2022	Avanti Polar Lipids, Catalog # 860052P Lot# BCER-27 exp. 27Apr2022
Calibration range from the lower limit of quantitation (LLOQ) to the upper	1.0-32 µg/mL	1.0-32 µg/mL	1.0-32 µg/mL	1.0-32 µg/mL	1.0-32 µg/mL

	Method validation	Phase 1b study DFI13412 (SPHINGO00812)	Long-term safety study LTS13632	Pediatric study DFI13803	Adult pivotal study DFI12712
limit of quantitation (ULOQ)					
Matrix study population	Normal Plasma	ASMD Population	ASMD Population	ASMD Population	ASMD Population
Link to reports and applicable amendments	5.3.1.4 [ITR-377-1207] and [BMV0028]	5.3.5.2 DFI13412 [Appendix 16.2.5]	5.3.5.2 LTS13632 [Appendix 16.2.5]	5.3.5.2 DFI13803 [Appendix 16.2.5]	5.3.5.1 DFI12712 [Appendix 16.2.5]
Synopsis of amendment history	Amendment 1 of ITR-377-1207 corrects errors, provides overall precision and bias calculations, and clarifies the interpretation of the stability data. BMV0028 captures the revalidation of the method using the API4000 mass spectrometer with the includsion of the C16:0 isomer in calculation of total CER. In addition, a human QC with endogenous CER is added and stabililty for endogenous CER determined.	N/A	Amendment 1 adds data from additional runs performed between database lock 1 and database lock 2	Amendment 1 corrects errors and adds a calculation of total error for QCs	Amendment 1 adds data from additional runs performed between database lock 1 and database lock 2

表 16 - Summary of pharmacodynamic method performance – Ceramide

Bioanalytical method validation report	5.3.1.4 [ITR-377-1207]: Validation Report: Quantitation of Total Ceramide in Human Plasma by LC/MS/MS			5.3.1.4 [BMV0028]: Partial Validation Report: Partial Method Validation of LC/MS/MS Assay for the Quantitation of Total Ceramide in Human Plasma	
Method description	A validated assay to detect ceramide in human plasma by LC/MS/MS. Liquid-Liquid extraction, then solid phase extraction (SPE) followed by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) detection with electrospray ionization.			A validated assay to detect ceramide in human plasma by LC/MS/MS. Liquid-Liquid extraction, then solid phase extraction (SPE) followed by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) detection with electrospray ionization.	
Materials used for standard calibration curve and concentration	Porcine brain ceramide, Avanti Polar Lipids, Catalog # 860052P Spiking solution prepared at 10 µg/mL in 2:1 (volume/volume) chloroform/ methanol			Porcine brain ceramide, Avanti Polar Lipids, Catalog # 860052P Spiking solution prepared at 10ug/mL in 2:1 (volume/volume) chloroform/ methanol	
Validated assay range	1.0-32 µg/mL			1.0-32 µg/mL	
Material used for quality controls (QCs) and concentration	Plasma samples spiked with porcine ceramide LLOQ: 1 µg/mL Low: 2 µg/mL Mid: 8 µg/mL High: 24 µg/mL			Plasma samples spiked with porcine ceramide LLOQ: 1 µg/mL Low: 3 µg/mL Mid: 10 µg/mL High: 25 µg/mL Matrix QC: pooled human plasma with endogenous ceramide from ASMD patients	
Minimum required dilutions (MRDs)	N/A			N/A	
Source and lot of reagents	Brain Porcine Ceramide: Avanti Polar Lipids, Catalog # 860052P, Lot#BCER-23 Internal Standard (IS): C19-D-erythro-Ceramide: Matreya LLC, Catalog# 2039			Brain Porcine Ceramide: Avanti Polar Lipids, Catalog # 860052P, Lot# BCER-27 Internal Standard (IS): C19-D-erythro-Ceramide: Matreya LLC, Catalog# 2039	
Regression model and weighting	Linear regression with 1/X weighting			Linear regression with 1/X weighting	
Validation parameters	Method validation summary		Source location	Method validation summary	Source location
Standard calibration curve performance during accuracy and	Number of standard calibrators from LLOQ to ULOQ	7	Table 5	Number of standard calibrators from LLOQ to ULOQ	8	Tables 2-3

precision runs	Cumulative accuracy (%bias) from LLOQ to ULOQ	-4.5% to 2.3%	Table 5	Cumulative accuracy (%bias) from LLOQ to ULOQ, Premier	-3.6% to 8.8%	Table 2
				Cumulative accuracy (%bias) from LLOQ to ULOQ, API-4000	-7.1% to 4.4%	Table 3
	Cumulative precision (%CV) from LLOQ to ULOQ	3.2% to 7.6%	Table 5	Cumulative precision (%CV) from LLOQ to ULOQ, Premier	1.5% to 9.1%	Table 2
				Cumulative precision (%CV) from LLOQ to ULOQ, API-4000	4.0% to 7.4%	Table 3
Performance of QCs during accuracy and precision runs	Cumulative accuracy (%bias) in 3 QC	1.6% to 5.8%	Table 3	Cumulative accuracy (%bias) in 4 QC, Premier	-2.7% to 7.0%	Table 5
	Cumulative accuracy (%bias) at LLOQ (1μg/mL)	-3.67%	Table 7	Cumulative accuracy (%bias) in 4 QC, API-4000	-7.7% to 3.0%	Table 6
	Inter-batch %CV in 3 QC	5.1% to 11.4%	Table 3	Inter-batch %CV in 4 QC, Premier	4.5% to 13.8%	Table 5
	LLOQ	16.09%	Table 7			
				Inter-batch %CV in 4 QC, API-4000	5.1% to 15.2%	Table 6
	Total Error (TE) in 3 QC	6.7% to 17.2%	Table 3	Total Error (TE), Premier	≤14.3%	Table 5
	LLOQ	19.76%	Table 7	Total Error (TE), API-4000	≤22.9%	Table 6
Selectivity & matrix effect	Porcine ceramide spiked into plasma compared to porcine ceramide spiked into 80% methanol/20% water/ 0.1% formic acid	% difference of curve slopes <15%. %bias of QCs <15%. No significant difference in QC values (p>0.05).	Tables 17, 18, Figure 6	Not Performed	N/A	N/A
		Matrix effect not significant				
Interference & specificity	Parent ion scanning showed similar profiles in 10 donor samples spiked and unspiked with porcine ceramide	Assay specific for Ceramide monitoring	Figure 7 and 8	Not Performed	N/A	N/A
			Tables 19-20			
	Human plasma with 8 µg/mL	No interference effect from				

	ceramide spiked with low (20 µg/mL) and high (600 µg/mL) of bilirubin	bilirubin was observed				
Hemolysis effect	Human plasma with 8 µg/mL ceramide spiked with low (6 µg/mL) and high (100 µg/mL) of hemoglobin	No interference effect from hemoglobin was observed	Tables 19-20	Not Performed	N/A	N/A
Lipemic effect	Human plasma with 8 µg/mL ceramide spiked with low (0.67 mg/mL) and high (10 mg/mL) of intralipid	No interference effect from lipids was observed	Tables 19-20	Not Performed	N/A	N/A
Dilution linearity & hook effect	Samples prepared at 5, 10, 20, 40, 80 and 160 µg/mL and tested in triplicate	Samples dilution linearity demonstrated from 5 to 160 µg/mL Hook effect - N/A	Table 6	Not Performed	N/A	N/A
Bench-top/process stability	Stability of porcine ceramide spiked into human plasma evaluated at 2-8°C Stability at ambient not performed Processed sample stability assessed after extraction	Samples are stable up to 5 days at 2-8°C. Extracted samples stable after storage at 2-8°C for up to 3 days	Table 12	Evaluated at ambient temperature and 2-8°C using pooled human plasma with endogenous ceramide Processed sample stability assessed after extraction.	Samples are stable up to 65 hours at ambient temperature; up to 72 hours at 2-8°C Reconstituted extracted samples are stable for at least 74 h at 2-8ºC plus 7 days at ≤-14ºC Dried extracted samples are stable for at least 7 days at ≤-60ºC	Table 12
Freeze-Thaw stability	5 F/T cycles evaluated-porcine ceramide spiked into human plasma	Acceptable for up to 5 Freeze/Thaw cycles	Table 10-11	5 F/T cycles evaluated using pooled human plasma with endogenous ceramide	Acceptable for up to 5 Freeze/Thaw cycles	Tables 12

Long-term storage	Assessed for up to 2.5 years	Samples spiked with 24 µg/mL porcine ceramide were stable up to 2.5 years at -20°C and -80°C. Samples spiked with 2 µg/mL porcine ceramide were stable up to 3 weeks at -20°C and for 1 month at -80°C	Table 15	Assessed for up to 752 days using pooled human plasma with endogenous ceramide	Acceptable up to 752 days at ≤-60°C	Table 13
Parallelism	Not Performed	N/A	N/A	Not Performed	N/A	N/A
Carry over	Not Performed	N/A	N/A	The carryover impact to LLOQ was evaluated by injecting methanol (MeOH) solvent after STD8 (32 µg/mL)	The mean carryover impact was 3.7 % for CER and 0.1% for C19:0-Ceramide.	Table 4

表 17 - Method performance in Study #DFI13412 – Ceramide

Method performance in Study #DFI13412 (CER)		
Biomarker Phase Report GZ402665/DFI13412 Determination of Total Sphingomyelin, Sphingosine, Sphingosine-1-Phosphate, and Ceramide in Human Heparin Plasma Samples from Study SPHINGO-008-12		
Assay passing rate	92% passing rate (22 passed out of 24 total)	Table 4
Standard curve performance	Cumulative bias range: -2.3% to 1.9% Cumulative precision: 3.4% to 13.0% CV	Table 4
QC performance	Cumulative bias range: -7.0% to 3.3% Cumulative precision: 5.8% to 30.8% CV TE: ≤37.8%	Table 4
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was not performed in this study	N/A
Study sample analysis/stability	Long term stability of endogenous ceramide in human plasma is currently established up to 752 days at <-60°C. All standards, QCs and samples tested in this assay were analyzed within established stability.	BMV0028 Table 13
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	7 standard curve points from LLOQ to ULOQ	

表 18 - Method performance in Trial #LTS13632 – Ceramide

Method performance in Trial #LTS13632 (CER)		
Bioanalytical Phase Report-GZ402665/LTS13632-Determination of total ceramide in heparin human plasma by LC/MS/MS		
Assay passing rate	67.6% passing rate (46 passed out of 68 total)	Section 3.1, Section 9.1
Standard curve performance	Cumulative bias range: -1.9% to 1.0% Cumulative precision: 3.9% to 9.0% CV	Table 1
QC performance	Cumulative bias range: -1.5 % to 2.3% Cumulative precision: 4.2% to 12.8% CV TE: ≤14.3%	Table 3
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was not performed in this study.	N/A
Study sample analysis/stability	Long term stability of endogenous ceramide in human plasma is currently established up to 752 days at <-60°C. All standards, QCs and samples tested in this assay were analyzed within established stability.	BMV0028 Table 13
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	7/8 standard curve points from LLOQ to ULOQ	

表 19 - Method performance in Trial #DFI13803 – Ceramide

Method performance in Trial #DFI13803 (CER)		
Bioanalytical Phase Report-GZ402665/DFI13803-Determination of total ceramide in heparin human plasma by LC/MS/MS		
Assay passing rate	70% passing rate (68 passed out of 97 total)	Section 3.1, Section 9.3 Appendix 3
Standard curve performance	Cumulative bias range: -1.9% to 2.0% Cumulative precision: 3.1% to 8.8% CV	Table 1
QC performance	Cumulative bias range: -2.7% to 3.3% Cumulative precision: 5.9% to 15.5% CV TE: ≤18.8%	Table 3
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was not performed in this study.	N/A
Study sample analysis/stability	Long term stability of endogenous ceramide in human plasma is currently established up to 752 days at <-60°C. All standards, QCs and samples tested in this assay were analyzed within established stability.	BMV0028 Table 13
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	7/8 standard curve points from LLOQ to ULOQ	

表 20 - Method performance in Trial #DFI12712 – Ceramide

Method performance in Trial #DFI12712 (CER)		
Bioanalytical Phase Report-GZ402665/DFI12712-Determination of total ceramide in heparin human plasma by LC/MS/MS		
Assay passing rate	82.0% passing rate (73 passed out of 89 total)	Section 3.1, Section 9.1
Standard curve performance	Cumulative bias range: -1.6% to 1.5% Cumulative precision: 4.6% to 11.2% CV	Table 1
QC performance	Cumulative bias range: -1.0% to 0.4% Cumulative precision: 6.3% to 11.7% CV TE: ≤12.5%	Table 3
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was not performed in this study.	N/A
Study sample analysis/stability	Long term stability of endogenous ceramide in human plasma is currently established up to 752 days at <-60°C. All standards, QCs and samples tested in this assay were analyzed within established stability.	BMV0028 Table 13
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	8 standard curve points from LLOQ to ULOQ	

表 21 - Bioanalytical method life cycle information – Lyso-SPM

	Method validation	Phase 1b study DFI13412 (SPHINGO00812)	Long-term safety study LTS13632	Pediatric study DFI13803	Adult pivotal study DFI12712
Analyte	Lyso Sphingomyelin (Sphingosylphosphorylcholine)				
Validation type	Full validation	In-study (retrospective)	In-study	In-study	In-study
eCTD reference number	5.3.1.4	5.3.1.4	5.3.1.4	5.3.1.4	5.3.1.4
Method ID	**ITR-731-1014**	**ITR-731-1014**	**ITR-731-1014**	**ITR-731-1014**	**ITR-731-1014**
Duration of time method is in use	11/2014-present	09/2016-10/2016	03/2015-present	10/2015-12/2019	08/2016-present
Bioanalytical site	Sanofi US, Biomarkers and Clinical Bioanalyses, 1 The Mountain Rd, Framingham, MA 01701 USA (Previously Genzyme Clinical Laboratory Sciences)				
Matrix	Heparin Plasma				
Platform	LC/MS/MS assay				
Format	Validated assay to quantify Lyso-SPM in plasma using protein precipitation and filtration followed by LC/MS/MS with multiple-reaction monitoring				
Stock reference, lot number, expiration date	Matreya, Cat#SPL1321, Lot#23846, exp. 23Oct2019; Lot#24175, exp. 09Jun2021	Matreya, Cat#SPL1321, Lot#24175, exp. 09Jun2021	Matreya, Cat#SPL1321, Lot#23846, exp. 23Oct2019; Lot#24175, exp. 09Jun2021	Matreya, Cat#SPL1321, Lot#23846, exp. 23Oct2019; Lot#24175, exp. 09Jun2021	Matreya, Cat#SPL1321, Lot#23846, exp. 23Oct2019; Lot#24175, exp. 09Jun2021
	Matreya stock used to prepare dry vials at 20 µg and 100 µg with an additional 4 years stability				
Calibration range from the lower limit of quantitation (LLOQ) to the upper limit of quantitation (ULOQ)	10.0-1000 ng/mL	10.0-1000 ng/mL	10.0-1000 ng/mL	10.0-1000 ng/mL	10.0-1000 ng/mL
Matrix study population	Normal Plasma	ASMD Population	ASMD Population	ASMD Population	ASMD Population
Link to reports and applicable amendments	5.3.1.4 [ITR-731-1014]	Retrospective analysis; no phase report prepared	5.3.5.2 LTS13632 [Appendix 16.2.5]	5.3.5.2 DFI13803 [Appendix 16.2.5]	5.3.5.1 DFI12712 [Appendix 16.2.5]
Synopsis of amendment history	Add additional long-term stability data for lyso-SPM stock solution and dried vials and Lyso-SPM in plasma.	N/A	Amendment 1 adds data from additional runs performed between database lock 1 and database lock 2	N/A	Amendment 1 adds data from additional runs performed between database lock 1 and database lock 2

表 22 - Summary of pharmacodynamic method performance - Lyso-SPM

Bioanalytical method validation report	**5.3.1.4 [ITR-731-1014]: Validation Report: Quantitation of Lyso Sphingomyelin (Lyso-SPM) in Human Plasma by LC/MS/MS**		
Method description	A validated assay to quantify Lyso-SPM in plasma using protein precipitation and filtration followed by LC/MS/MS with multiple-reaction monitoring		
Materials used for standard calibration curve and concentration	Delipidized plasma spiked with lyso-SPM at 10, 20, 50, 150, 300, 500, 800, 1000 ng/mL		
Validated assay range	10.0-1000 ng/mL		
Material used for quality controls (QCs) and concentration	Delipidized plasma spiked with lyso-SPM at 10 (LLOQ), 30 (LQC), 250 (MQC), 750 (HQC), 1000 (ULOQ) ng/mL		
Minimum required dilutions (MRDs)	N/A		
Source and lot of reagents	Sphingosylphosphorylcholine, Matreya, Cat#SPL1321 Lot#23846 and 24175 (for Amendment 1) Internal Standard (IS): D-9 Lyso SPM: Avanti Polar Lipids, Inc., Catalog #860583		
Regression model and weighting	Linear regression with 1/X weighting		
Validation parameters	Method validation summary		Source location
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	Number of standard calibrators from LLOQ to ULOQ	8	Table 9
	Cumulative accuracy (%bias) from LLOQ to ULOQ	-1.8% to 3.8%	Table 9
	Cumulative precision (%CV) from LLOQ to ULOQ	0.8% to 3.0%	Table 9
Performance of QCs during accuracy and precision runs	Cumulative accuracy (%bias) in 5 QC	-2.8% to 1.0%	Table 6

	Inter-batch %CV in 5 QC	2.7% to 5.1%	Table 6
	Total Error (TE)	≤ 7.9%	Calculated from Table 6
Selectivity & matrix effect	Heparin plasma from 6 donors were spiked with lyso-SPM at 30 and 750 ng/mL and tested in triplicate	No matrix effect was observed. Accuracy (%bias) was 1.3% to 10.4%. Precision (%CV) was 0.6% to 3.5%.	Tables 26-27
Interference & specificity	Delipidized plasma prepared at the LQC and HQC levels with Lyso-SPM were spiked with 0.600 mg/mL bilirubin	% difference from unspiked was within ±15%. No interference effect was observed with bilirubin	Table 28
Hemolysis effect	Delipidized plasma prepared at the LQC and HQC levels with Lyso-SPM were spiked with 10 mg/mL hemoglobin	% difference from unspiked was within ±15%. No interference effect was observed with hemoglobin	Table 28
Lipemic effect	Delipidized plasma prepared at the LQC and HQC levels with Lyso-SPM were spiked with 10 mg/mL intralipid	% difference from unspiked was within ±15%. No interference effect was observed with intralipid	Table 28
Dilution linearity & hook effect	Human plasma was spiked with 1500 ng/mL lysoSPM and diluted 2X and 5X with normal human plasma (endogenous levels <LLOQ)	Dilution integrity was acceptable at factor 2x and factor 5x. Hook effect - not applicable	Table 10
Bench-top/process stability	Sample stability assessed at ambient temperature and 2-8°C. Processed sample stability assessed for reinjection stability and reinjection reproducibility	Samples are stable up to 24 hours at ambient temperature; up to 5 days at 2-8°C Reinjection Stability: stable up to 72 hours at 2°C to 8°C Reinjection Reproducibility: stable up to 3 days at 2°C to 8°C	Tables 17-18 Tables 19-20
Freeze-Thaw stability	5 F/T cycles evaluated	Samples are stable for 5 freeze-thaw cycles at both -20°C and -80°C.	Tables 15-16
Long-term storage	Assessed up to 69 months for spiked QCs and 38 months at -80°C for incurred samples	Spiked samples are stable for up to 69 months at -80°C, incurred samples are stable for up to 38 months at -60°C.	Amendment 1 Tables 23-23A
Parallelism	Not Performed	N/A	N/A
Carry over	Evaluated by injecting solvent after the highest calibration standard.	Overall % carryover was 0.1% and IS % carryover was 0.0%. Both analyte and IS carryover were acceptable.	Table 29

表 23 - Method performance in Trial #LTS13632　Lyso-SPM

Method performance in Trial #LTS13632 (Lyso-SPM)		
Bioanalytical Phase Report-GZ402665/LTS13632- Quantitative of Lyso Sphingomyelin in human plasma using an LC/MS/MS method		
Assay passing rate	100% passing rate (27 passed out of 27 total)	Section 3.1, Section 9.1
Standard curve performance	Cumulative bias range: -3.0% to 2.0% Cumulative precision: 1.4% to 5.0% CV	Table 1
QC performance	Cumulative bias range: -1.6% to 4.0% Cumulative precision: 5.0% to 7.6% CV TE: ≤11.6%	Table 3
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was not performed in this study.	N/A
Study sample analysis/stability	Long term stability is currently established up to 38 months at <-60°C for endogenous samples and 69 months at <-80°C for QCs. All standards, QCs and samples tested in this assay were analyzed within established stability.	ITR-731-1014 amendment 1 Tables 23-23A
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	8 standard curve points from LLOQ to ULOQ	

表 24 - Method performance in Trial #DFI13803　Lyso-SPM

Method performance in Trial #DFI13803 (Lyso-SPM)		
Bioanalytical Phase Report-GZ402665/DFI13803- Quantitative of Lyso Sphingomyelin in human plasma using an LC/MS/MS method		
Assay passing rate	95% passing rate (37 passed out of 39 total)	Section 9.3
Standard curve performance	Cumulative bias range: -3.7% to 1.6% Cumulative precision: 1.4% to 3.4% CV	Table 1
QC performance	Cumulative bias range: -2.0% to 5.7% Cumulative precision: 4.7% to 7.4% CV TE: ≤13.1%	Table 3
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was not performed in this study.	N/A
Study sample analysis/stability	Long term stability is currently established up to 38 months at <-60°C for endogenous samples and 69 months at <-80°C for QCs. All standards, QCs and samples tested in this assay were analyzed within established stability.	ITR-731-1014 amendment 1 Tables 23-23A
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	8 standard curve points from LLOQ to ULOQ	

表 25 - Method performance in Trial #DFI12712　Lyso-SPM

Method performance in Trial #DFI12712 (Lyso-SPM)		
Bioanalytical Phase Report-GZ402665/DFI12712- Quantitative of Lyso Sphingomyelin in human plasma using an LC/MS/MS method		
Assay passing rate	100.0% passing rate (46 passed out of 46 total)	Section 3.1, Section 9.1
Standard curve performance	Cumulative bias range: -4.0% to 2.6% Cumulative precision: 1.8% to 4.0% CV	Table 1
QC performance	Cumulative bias range: -3.6% to 2.0% Cumulative precision: 4.4% to 9.4% CV TE: ≤11.4%	Table 3
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was not performed in this study.	N/A
Study sample analysis/stability	Long term stability is currently established up to 38 months at <-60°C for endogenous samples and 69 months at <-80°C for QCs. All standards, QCs and samples tested in this assay were analyzed within established stability.	ITR-731-1014 amendment 1 Tables 23-23A
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	8 standard curve points from LLOQ to ULOQ	

表 26 - Bioanalytical method life cycle information - Chitinase

	Method validation #1	Method validation #2	Phase 1a study SPHINGO00605	Phase 1b study DFI13412 (SPHINGO00812)	Long-term safety study LTS13632	Pediatric study DFI13803	Adult pivotal study DFI12712
Analyte	Chitinase Activity	Chitinase Activity	Chitinase Activity	Chitinase Activity	Chitinase Activity	Chitinase Activity	Chitinase Activity
Validation type	Full qualification	Full validation	In-study	In-study	In-study	In-study	In-study
eCTD reference number	5.3.1.4	5.3.1.4	5.3.1.4	5.3.1.4	5.3.1.4	5.3.1.4	5.3.1.4
Method ID	**ITR-137-0800**	**ITR-756-0215**	**ITR-137-0800**	**ITR-137-0800**	**ITR-137-0800** (through May 2017) **ITR-756-0215** (after May 2017)	**ITR-137-0800**	**ITR-756-0215**
Duration of time method is in use	07/2000-12/2019	05/2015	01/2007-03/2009	09/2013-02/2014	05/2014-present	05/2016‑12/2019	06/2017-present
Bioanalytical site	Sanofi US, Biomarkers and Clinical Bioanalyses, 1 The Mountain Rd, Framingham, MA 01701 USA (Previously Genzyme Clinical Laboratory Sciences)						
Matrix	Serum						
Platform	4-methylumbelliferone (4MU) Activity Assay						
Format	Qualified fluorescent activity assay using commercial reagents	Validated fluorescent activity assay using commercial reagents	Qualified fluorescent activity assay using commercial reagents		Qualified and Validated fluorescent activity assay using commercial reagents	Qualified fluorescent activity assay using commercial reagents	Validated fluorescent activity assay using commercial reagents

	Method validation #1	Method validation #2	Phase 1a study SPHINGO00605	Phase 1b study DFI13412 (SPHINGO00812)	Long-term safety study LTS13632	Pediatric study DFI13803	Adult pivotal study DFI12712
Stock reference, lot number, expiration date	4-MU (Sigma M-1381) Lot#9382-131 exp Jul2021	4-MU (Sigma M-1381) Lot# FMT.RGT8-28 exp.13Jan2019	4-MU (Sigma M-1381) Lot#13580-76 exp.21Jul2008; Lot#16173-109 exp.24Jul2012	4-MU (Sigma M-1381) Lot# 17978-142 exp.17Apr2016	4-MU (Sigma M-1381) Lot# 17978-142 exp.17Apr2016; Lot# 16-CRE-09 exp. 20Nov2023; Lot# FMT.RGT3-28 exp.13Jan2019 Lot# 19BM022 exp.10Feb2023	4-MU (Sigma M-1381) Lot# 17978-142 exp.17Apr2016; Lot# 16-CRE-09 exp. 20Nov2023	4-MU (Sigma M-1381) Lot# FMT.RGT8-28 exp.13Jan2019 Lot# 19BM022 exp.10Feb2023
Calibration range from the lower limit of quantitation (LLOQ) to the upper limit of quantitation (ULOQ)	0.05-1.5 nmol/well	0.031-1.0 nmol/well	0.05-1.5 nmol/well	0.05-1.5 nmol/well	0.05-1.5 nmol/well 0.031-1.0 nmol/well	0.05-1.5 nmol/well	0.031-1.0 nmol/well
Matrix study population	Normal Serum	Normal Serum	ASMD Population	ASMD Population	ASMD Population	ASMD Population	ASMD Population
Link to reports and applicable amendments	5.3.1.4 [ITR-137-0800]	5.3.1.4 [ITR-756-0215]	N/A	5.3.5.2 DFI13412 [Appendix 16.2.5]	5.3.5.2 LTS13632 [Appendix 16.2.5]	5.3.5.2 DFI13803 [Appendix 16.2.5]	5.3.5.1 DFI12712 [Appendix 16.2.5]
Synopsis of amendment history	N/A	Long-term storage stability	N/A	N/A	Amendment 1 adds data from additional runs performed between database lock 1 and database lock 2	N/A	Amendment 1 adds data from additional runs performed between database lock 1 and database lock 2

表 27 - Summary of pharmacodynamic method performance – Chitinase

Bioanalytical method validation report	5.3.1.4 [ITR-137-0800]: Qualification Report: Qualification of 4MU Chitinase Activity Assay		5.3.1.4 [ITR-756-0215]: Validation Report: Quantitation of the Chitinase Activity in Human Serum using a 4MU Standard Curve	
Method description	A qualified activity assay using 4-methylumbelliferone (4MU) standard and 4MU β-D-N,N',N''-triacetylchitotrioside (4MU-TrACT) substrate (Sigma M-5639)		A validated activity assay using 4MU standard and 4MU-TrACT substrate (Sigma M-5639)	
Materials used for standard calibration curve and concentration	4-MU (Sigma M-1381) prepared in deionized water at 0.5mM		4-MU (Sigma M-1381) prepared in deionized water at 0.5mM	
Validated assay range	0.05-1.5 nmol/well		0.031-1.0 nmol/well (0.016 nmol/well as anchor point)	
Material used for quality controls (QCs) and concentration	Chitinase (E.C.3.2.1.14 from *Streptomyces griseus*) (Sigma C6137), lyophilized crude powder Low and high controls were prepared by spiking chitinase in normal human serum to target values of 1.0 nmol/well and 0.5 nmol/well		Assay Quality Control (QC) samples were made by diluting 0.500 mM 4MU stock into Sample Dilution Buffer at the following concentrations: ULOQ=1.00 nmol/well; HQC=0.75 nmol/well; MQC= 0.200 nmol/well; LQC=0.094 nmol/well; LLOQ=0.031 nmol/well Chitinase control samples (cQCs) were made by diluting 1 mg/mL chitinase stock (from *Streptomyces griseus)* into heat inactivated normal human serum: cQC1 was prepared at a target concentration of 75 nmol/well. cQC2 was prepared at a target concentration of 2.5 nmol/well.	
Minimum required dilutions (MRDs)	10		10	
Source and lot of reagents	Standard: 4-methylumbelliferone (Sigma M-1381), Lot# 9382-131		Standard: 4-methylumbelliferone (Sigma M-1381), Lot#: FMT.RGT8-28	
Regression model and weighting	Log-log curve fit		Log-log curve fit	
Validation parameters	Method qualification summary	Source location	Method validation summary	Source location

Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	Number of standard calibrators from LLOQ to ULOQ	6	Tables 7.1.2.1; 7.1.3	Number of standard calibrators from LLOQ to ULOQ	6 (plus 1 anchor point)	Tables 10, 11
	Cumulative accuracy (%bias) from LLOQ to ULOQ	Not evaluated	N/A	Cumulative accuracy (%bias) from LLOQ to ULOQ	Assessed on 2 instruments %bias: -5.9% to 5.2%	Tables 10,11
	Cumulative precision (%CV) from LLOQ to ULOQ	2.71% to 3.61%	Table 7.1.3	Cumulative precision (%CV) from LLOQ to ULOQ	1.1% to 6.4%	Table 10, 11
Performance of QCs during accuracy and precision runs	Cumulative accuracy (%bias) of 4MU spiked into heat inactivated normal human serum from 0.05 to 2.0 nmol/well (compared to nominal)	-17.3% to -9.6%	Calculated from Table 7.5	Cumulative accuracy (%bias) in 5 QCs	-9.7% to 7.4%	Table 6
	Inter-batch %CV in 5 VS (Normal human serum spiked with chitinase)	≤9.87%	Table 7.1.1; 7.1.3	Inter-batch %CV in 5 QCs and 2 cQCs	≤13.8%	Table 6
	Total Error (TE)	Not determined	N/A	Total Error (TE) in 5 QCs	≤20.1%	Table 6
Selectivity & matrix effect	Not Performed	N/A	N/A	10 individual lots tested at 2 concentrations: 0.500 nmol/well and 5.000 nmol/well	No matrix effect observed	Table 13-14
Interference & specificity	Not Performed	N/A	N/A	Determined by lack of detection of the irrelevant molecules (rhASM and Fabrazyme were tested)	The irrelevant enzymes were not detected, assay is specific for chitinase activity	Table 19
Hemolysis effect	Not Performed	N/A	N/A	Interference was evaluated by spiking chitinase (target concentrations of 0.5 and 5.0 nmol/well) into heat inactivated human serum from donors with high and medium levels of hemoglobin (~300 mg/dL and ~1000 mg/dL)	No interference up to ~300 mg/dL	Tables 15-18

Lipemic effect	Not Performed	N/A	N/A	Interference was evaluated by spiking chitinase (target concentrations of 0.5 and 5.0 nmol/well) into heat inactivated human serum from donors with high and medium levels of lipid	No interference with medium or high lipid levels	Tables 15-16
Dilution linearity & hook effect	Three normal human serum samples were spiked at 2, 20 and 200 nmol/well of Chitinase. Each sample was initially diluted 1/10 followed by seven serial 1/2 dilutions.	Samples (3) show acceptable linearity of dilution within the reportable range of the standard curve. Hook effect was not performed	Table 7.6.1; figure 7.6.2	A high level of Chitinase (40.0 nmol/well) was independently spiked into three heat inactivated pooled normal human serum. Each spiked sample was initially diluted 1/10 followed by eight subsequent 1/3 serial dilutions. The first two dilutions were above the range of the standard curve and the last four dilutions were below the range of the standard curve. Data from linearity of dilution was analyzed by plotting the dilution curves (n=3) with expected 4MU concentrations (nmol/well) on the x-axis versus signal (RFU) values on the y-axis. The graph was visually evaluated for the presence of a steady increase or plateau at the ULOQ.	The % difference between the means of each sample dilution within the quantitative range of 0.016 to 1.0 nmol/well 4MU was within ±20% from each other and the precision (% CV) of the cumulative corrected interpolated concentrations (n=3) is 4.8%, indicating that a serial dilution scheme is acceptable. No hook observed with concentrations up to 40.0 nmol/well in neat serum	Table 20, Figures 3-4
Bench-top/process stability	Not performed	N/A	N/A	Short-Term Stability: Stable for up to 4 hours at ambient temperature (% difference from time 0 ranged from -4.6% to 2.3% for all timepoints) Stable for up to 72 hours at 2-8°C (% difference from time 0 ranged -14.2% to 13.6% for all timepoints)	Acceptable up to 4 hours at ambient temperature Acceptable up to 72 hours at 2-8°C	Tables 23-24

Freeze-Thaw stability	3 F/T cycles evaluated Stable for up to 3 F/T cycles in serum. % Bias ranged -6.9% to 13.2% for all timepoints.	Acceptable up to 3 Freeze/ Thaw cycles	Table 7.2.1	5 F/T cycles evaluated Stable for up to 5 F/T cycles. Median % difference ranged from -17.5% to 4.7% for all timepoints	Acceptable up to 5 Freeze/Thaw cycles	Tables 25-26
Long-term storage	Not performed	N/A	N/A	up to 25 months assessed Stable for up to 25 months. % difference from time 0 ranged from -9.0% to 12.0% at 25 months	Acceptable up to 25 months	Tables 27-28 Amendment 1
Parallelism	Not Performed	N/A	N/A	Not Performed	N/A	N/A
Carry over	Not Applicable	N/A	N/A	Not Applicable	N/A	N/A

表 28 - Method performance in Study #DFI13412 - Chitinase

Method performance in Study #DFI13412 (Chitinase) **Method ITR-137-0800**		
Assay passing rate	78.6% passing rate (3 failed out of 14 total)	Table 2
Standard curve performance	Cumulative bias range: -2.0% to 1.6%	Table 2
	Cumulative precision: 1.1% to 3.7% CV	
QC performance	Cumulative bias range: 7.3% to 12.1%	Table 2
	Cumulative precision: ≤19.3% CV	
	TE: ≤29.9%	
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was not performed in this study	N/A
Study sample analysis/stability	Long term stability is currently established up to 25 months at <-60°C. All standards, QCs and samples tested in this assay were analyzed within established stability.	ITR-756-0215 amendment 1 Tables 27-28
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	6 standard curve points from LLOQ to ULOQ	

表 29 - Method performance in Trial #LTS13632 - Chitinase

Method performance in Trial #LTS13632 (Chitinase)		
Method ITR-137-0800 (through May 2017)		
Bioanalytical Phase Report-GZ402665/LTS13632- Quantitative assessment of chitotriosidase activity in human serum		
Assay passing rate	81.8% passing rate (18 passed out of 22 total)	Section 8.12 Appendix 12
Standard curve performance	Cumulative bias range: -3.7% to 3.0%	Table 2
	Cumulative precision: 3.5% to 6.8% CV	
QC performance	Cumulative bias range: Not determined	Table 6
	Cumulative precision: 5.4% to 11.6% CV	
	TE: Not determined	
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was not performed in this study.	N/A
Study sample analysis/stability	Long term stability is currently established up to 25 months at <-60°C. All standards, QCs and samples tested in this assay were analyzed within established stability.	ITR-756-0215 amendment 1 Tables 27-28
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	6 standard curve points from LLOQ to ULOQ	

表 30 - Method performance in Trial #LTS13632 - Chitinase

Method performance in Trial #LTS13632 (Chitinase) **Method ITR-756-0215 (starting from June 2017)**		
Bioanalytical Phase Report-GZ402665/LTS13632- Quantitative assessment of chitotriosidase activity in human serum		
Assay passing rate	100% passing rate (17 passed out of 17 total)	Section 8.13 Appendix 13
Standard curve performance (excluding anchor)	Cumulative bias range: -2.3% to 2.9% Cumulative precision: 0.8% to 3.7% CV	Table 3
QC performance	Cumulative bias range: Not deteremined Cumulative precision: 5.3% to 6.7% CV TE: Not deteremined	Table 7
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was not performed in this study.	N/A
Study sample analysis/stability	Long term stability is currently established up to 25 months at <-60°C. All standards, QCs and samples tested in this assay were analyzed within established stability.	ITR-756-0215 amendment 1 Tables 27-28
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	6 standard curve points from LLOQ to ULOQ (plus 1 anchor point)	

表 31 - Method performance in Trial #DFI13803 - Chitinase

Method performance in Trial #DFI13803 (Chitinase) **Method ITR-137-0800**		
Bioanalytical Phase Report-GZ402665/DFI13803- Quantitative assessment of chitotriosidase activity in human serum		
Assay passing rate	72.2% passing rate (13 passed out of 18 total)	Section 8.6 Appendix 6
Standard curve performance	Cumulative bias range: -1.0% to 2.0%	Table 2
	Cumulative precision: 1.3% to 5.6% CV	
QC performance	Cumulative bias range: Not determined	Table 4
	Cumulative precision: 8.6% to 10.7% CV	
	TE: Not determined	
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was not performed in this study.	N/A
Study sample analysis/stability	Long term stability is currently established up to 25 months at <-60°C. All standards, QCs and samples tested in this assay were analyzed within established stability.	ITR-756-0215 amendment 1 Tables 27-28
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	6 standard curve points from LLOQ to ULOQ	

表 32 - Method performance in Trial #DFI12712 - Chitinase

Method performance in Trial #DFI12712 (Chitinase) **Method ITR-756-0215**		
Bioanalytical Phase Report-GZ402665/DFI12712- Quantitative assessment of chitotriosidase activity in human serum		
Assay passing rate	100% passing rate (28 passed out of 28 total)	Section 8.6 Appendix 6
Standard curve performance (excluding anchor)	Cumulative bias range: -1.90% to 2.58% Cumulative precision: 1.72% to 5.29% CV	Table 2
QC performance	Cumulative bias range: Not determined Cumulative precision: 6.00% to 11.70% CV TE: Not determined	Table 4
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was not performed in this study.	N/A
Study sample analysis/stability	Long term stability is currently established up to 25 months at <-60°C. All standards, QCs and samples tested in this assay were analyzed within established stability.	ITR-756-0215 amendment 1 Tables 27-28
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	6 standard curve points from LLOQ to ULOQ (plus 1 anchor point)	

表 33 - Summary of method modifications and cross-validation results (Chitinase)

Summary of method modifications and cross-validation results (Chitinase)			
Bioanalytical method validation report name and hyperlink	5.3.1.4 [ITR-798-0815] CROSS-VALIDATION OF METHODS FOR MEASURING CHITINASE ACTIVITY IN SERUM		
Changes in method	1. Use of buffer with 10% normal human serum (NHS) for preparation of samples and standards to maintain a constant level of matrix. 2. Use of black plates to reduce background fluorescence. 3. Change in the concentration and pH of the stop buffer to increase the efficiency of the stop step. 4. Change in the concentration of the 4-methylumbelliferyl (4MU) standard curve from 0.05, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 nmol/well with the upper limit of quantitation (ULOQ) at 1.5 nmol/well to 0.016, 0.031, 0.063, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 nmol/well with the ULOQ set at 1.0 nmol/well and the lower limit of quantitation (LLOQ) set at 0.031 nmol/well. 5. Warming of the 4MU substrate to 37ºC before adding to the plate to improve assay homogeneity.		
New validated assay range if any	0.031 nmol/well to 1.0 nmol/well		
Validation parameters	Cross-validation performance		Source location
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	Cumulative accuracy (% bias) in standard calibrators from LLOQ to ULOQ	Not calculated, all assays met assay acceptance criteria	N/A
	Cumulative precision (% CV) from LLOQ to ULOQ	Not calculated, all assays met assay acceptance criteria	N/A
Performance of QCs during accuracy and precision runs	Cumulative accuracy (% bias) in QCs	Not calculated, all assays met assay acceptance criteria	N/A
	Inter-batch % CV	Not calculated, all assays met assay acceptance criteria	N/A
	Percent TE	Not calculated, all assays met assay acceptance criteria	N/A

Cross-validation	100 human serum samples (40 sample from healthy donors and 60 samples from ASMD and Gaucher patients) were analyzed using both methods	Activity levels from 73 samples (n=24 healthy donor samples and n=49 patient samples) with values in the reportable range for both assays were on average 27% different between the two methods (higher in ITR-756-0215) Conversion factors established from the 73 data points: For values ≤1500 nmol/hr/mL Y=1.69085920193299+1.21789066570384*X For values >1500 nmol/hr/mL Y=900.860290396959+1.27845367840351*X where X= chitinase activity levels obtained using the qualified method. With use of conversion factors, the average % difference was 0.8% and the 90% limits of agreement of the bias was contained within the acceptable total error for the assay of ±30% (28% to -26.3%).	Appendix 1, Figure 1, Figure 2 Appendix 1, Figure 3, Figure 4,
List other parameters	N/A		N/A

表 34 - Bioanalytical method life cycle information - CCL18

	Method validation #1	Phase 1b study DFI13412 (SPHINGO00812)	Long-term safety study LTS13632	Pediatric study DFI13803	Adult pivotal study DFI12712
Analyte	CCL18	CCL18	CCL18	CCL18	CCL18
Validation type	Full validation	In-study	In-study	In-study	In-study
eCTD reference number	5.3.1.4	5.3.1.4	5.3.1.4	5.3.1.4	5.3.1.4
Method ID	**ITR-582-0412**	**ITR-582-0412**	**ITR-582-0412**	**ITR-582-0412**	**ITR-582-0412**
Duration of time method is in use	03/2011-present	05/2013-01/2014	06/2014-present	09/2016-12/2019	09/2018-present
Bioanalytical site	Sanofi US, Biomarkers and Clinical Bioanalyses, 1 The Mountain Rd, Framingham, MA 01701 USA (Previously Genzyme Clinical Laboratory Sciences)				
Matrix	Sodium Heparin Plasma				
Platform	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)				
Format	A qualified sandwich format commercial assay using a R&D Systems ELISA kit (DY394E)				
Stock reference, lot number, expiration date (PARC/CCL18 DuoSet ELISA kit (R&D Systems, Catalog No. DY394)	Lot# 1262371EA exp. 25Oct2015	Lot# 1262371EA exp.25Oct2015	Lot# 1262371EE exp.25Oct2015; lot# 329076 exp. 25Jul2019; lot# P151059 exp.10Nov2020; lot# P195346 exp. 01Jun2023	Lot# 329076 exp. 25Jul2019; lot# P151059 exp.10Nov2020; lot# P195346 exp. 01Jun2023	Lot# P151059 exp.10Nov2020; lot# P195346 exp. 01Jun2023
Calibration range from the lower limit of quantitation (LLOQ) to the upper limit of quantitation (ULOQ)	0.008-0.500 ng/mL				
Matrix study population	Normal Plasma	ASMD Population	ASMD Population	ASMD Population	ASMD Population
Link to reports and applicable amendments	5.3.1.4 [ITR-582-0412] and [DOH1499]	5.3.5.2 DFI13412 [Appendix 16.2.5]	5.3.5.2 LTS13632 [Appendix 16.2.5]	5.3.5.2 DFI13803 [Appendix 16.2.5]	5.3.5.1 DFI12712 [Appendix 16.2.5]
Synopsis of amendment	Long-term storage stability	N/A	Amendment 1 adds data from additional runs	N/A	Amendment 1 adds data from additional runs

	Method validation #1	Phase 1b study DFI13412 (SPHINGO00812)	Long-term safety study LTS13632	Pediatric study DFI13803	Adult pivotal study DFI12712
history	Additional stability provided in 5.3.1.4 [DOH1499]		performed between database lock 1 and database lock 2.		performed between database lock 1 and database lock 2.

表 35 - Summary of pharmacodynamic method performance - CCL18

Bioanalytical method validation report	**5.3.1.4 [ITR-582-0412]: Technical Report: Evaluation of R&D Systems ELISA Kit for Quantitation of Human CCL 18 and Comparison to Biosource CCL 18 Kit**		
Method description	A qualified sandwich format commercial assay using a R&D Systems ELISA kit (DY394E)		
Materials used for standard calibration curve and concentration	Recombinant human CCL18		
Qualified assay range	Curve range: 0.008 ng/mL to 0.500 ng/mL 4.00 ng/mL to 250 ng/mL in neat plasma		
Material used for quality controls (QCs) and concentration	Recombinant human CCL18 spiked into assay diluent at 0.02 ng/mL (LQC), 0.08 ng/mL (MQC) and 0.2 ng/mL (HQC)		
Minimum required dilutions (MRDs)	500		
Source and lot of reagents	PARC/CCL18 DuoSet ELISA kit (R&D Systems, Catalog No. DY394), Lot# 1262371EA exp. 25Oct2015		
Regression model and weighting	4-parameter curve fit, fixed weight		
Validation parameters	Method qualification summary		Source
			Table 1
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	Number of standard calibrators from LLOQ to ULOQ	7	Tables 4, 5, 9
	Cumulative accuracy (%bias) from LLOQ to ULOQ	-5.5% to 14.6%	Calculated from Table 9
	Cumulative precision (%CV) from LLOQ to ULOQ	1.6% to 10.4%	Table 9
Performance of QCs during accuracy and precision runs	Cumulative accuracy (%bias) in 3 heparin plasma samples spiked with recombinant CCL18 at 150, 50 or 16.7 ng/mL	-17.1% to 6.6%	Calculated from Table 11
	Inter-batch %CV (in 4 heparin plasma samples and 5 QCs)	4.4% to 16.6% (21.4% for 1 lot of the low control)	Table 10
	Total Error (TE)	Not calculated	N/A
Selectivity & matrix effect	3 heparin plasma samples spiked with recombinant CCL18 at 150, 50 or 16.7 ng/mL	Percent bias:-17.1% to 6.6%	Calculated from Table 11
Interference & specificity	Not Performed	N/A	N/A
Hemolysis effect	Not Performed	N/A	N/A

Lipemic effect	Not Performed	N/A	N/A
Dilution linearity & hook effect	Three normal human heparin plasma samples were spiked with 55 ng/mL of CCL18 and serially diluted in assay diluent. Assay diluent was spiked with CCL18 at 16 ng/mL (32x the ULOQ), then serially diluted 1/2 and compared to the standard curve.	% Recovery: 92.0% to 119.5%; slopes were approximately 1.0 (range 0.970-0.998) Values above the ULOQ reach a plateau with respect to OD signal, indicating no hook effect observed up to 32x the ULOQ	Table 14, Figures 2 and 4
Bench-top stability	Stable for up to 2 hours at room temperature (%recovery ranged from 82% to 110%)	Acceptable up to 2 hours	DOH1499, Table 14
Short-Term stability	Stable for up to 48 hours at 2-8°C (%recovery ranged 92.6% to 115.2% for all timepoints)	Acceptable up to 48 hours	Table 12
Freeze-Thaw stability	3 F/T cycles evaluated	Acceptable up to 3 Freeze/Thaw cycles	Table 13
	Stable for up to 3 F/T cycles. % recovery ranged 70.5% to 96.2% from nominal for all timepoints. 4 F/T cycles evaluated in DOH1499	Acceptable up to 4 Freeze/Thaw cycles	DOH1499, Table 12
	Stable for up to 4 F/T cycles. % recovery ranged 89% to 107% from nominal for all timepoints.		
Long-term storage	up to 40 months at -60 to -100°C assessed	Acceptable up to 40 months at -60 to -100°C	ITR-582-0412 (Amendment 1), Table 30
	Stable for up to 40 months Plasma control with endogenous CCL18 fell within established acceptance criteria target of mean +/- 3SD up to 40 months.		
Parallelism	Not Performed	N/A	N/A
Carry over	Not Applicable	N/A	N/A

表 36 - Method performance in Trial # DFI13412 - CCL18

Method performance in Trial # DFI13412 (CCL18)		
Assay passing rate	100% passing rate (9 passed out of 9 total)	Table 1
Standard curve performance	Cumulative bias range: -4.0% to 12.5%	Table 1
	Cumulative precision: 1.5% to 6.6% CV	
QC performance	Cumulative bias range: 0.0%	Table 1
	Cumulative precision: <8.7% CV	
	TE: ≤8.7%	
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was not performed in this study	N/A
Study sample analysis/stability	Long term stability is currently established up to 40 months at <-60°C. All standards, QCs and samples tested in this assay were analyzed within established stability.	ITR-582-0412 amendment 1 Table 30
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	7 standard curve points from LLOQ to ULOQ	

表 37 - Method performance in Trial #LTS13632 - CCL18

Method performance in Trial #LTS13632 (CCL18)		
Bioanalytical Phase Report-GZ402665/LTS13632-Analysis of the biomarker CCL18 in human plasma		
Assay passing rate	97% passing rate (29 passed out of 30 total)	Section 8.1 Appendix 1
Standard curve performance	Cumulative bias range: -3.2% to 6.5%	Table 2
	Cumulative precision: 1.81% to 9.65% CV	
QC performance	Cumulative bias range: -8.5% to 5.0%	Table 4
	Cumulative precision spiked QCs: 7.21% to 19.12% CV Cumulative precision plasma QC: 7.47 to 16.21% CV	
	TE: ≤27.62%	
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was not performed in this study.	N/A
Study sample analysis/stability	Long term stability is currently established up to 40 months at <-60°C. All standards, QCs and samples tested in this assay were analyzed within established stability.	ITR-582-0412 amendment 1 Table 30
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	7 standard curve points from LLOQ to ULOQ	

表 38 - Method performance in Trial #DFI13803 - CCL18

Method performance in Trial #DFI13803 (CCL18)		
Bioanalytical Phase Report-GZ402665/DFI13803-Analysis of the biomarker CCL18 in human plasma		
Assay passing rate	100% passing rate (16 passed out of 16 total)	Section 8.1 Appendix 1
Standard curve performance	Cumulative bias range: -2.4% to 6.5%	Table 2
	Cumulative precision: 1.10% to 6.25% CV	
QC performance	Cumulative bias range: -6.3% to 0.0%	Table 4
	Cumulative precision: 5.32% to 17.31% CV	
	TE: ≤14.36%	
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was not performed in this study.	N/A
Study sample analysis/stability	Long term stability is currently established up to 40 months at <-60°C. All standards, QCs and samples tested in this assay were analyzed within established stability.	ITR-582-0412 amendment 1 Table 30
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	7 standard curve points from LLOQ to ULOQ	

表 39 - Method performance in Trial #DFI12712 - CCL18

Method performance in Trial #DFI12712 (CCL18)		
Bioanalytical Phase Report-GZ402665/DFI12712-Analysis of the biomarker CCL18 in human plasma		
Assay passing rate	100% passing rate (16 passed out of 16 total)	Section 8.1 Appendix 1
Standard curve performance	Cumulative bias range: -2.40% to 6.25%	Table 2
	Cumulative precision: 1.42% to 8.54% CV	
QC performance	Cumulative bias range: -11.25% to -5.00%	Table 4
	Cumulative precision: 4.93% to 17.77% CV	
	TE: ≤17.07%	
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was not performed in this study.	N/A
Study sample analysis/stability	Long term stability is currently established up to 40 months at <-60°C. All standards, QCs and samples tested in this assay were analyzed within established stability.	ITR-582-0412 amendment 1 Table 30
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	7 standard curve points from LLOQ to ULOQ	

5.1.2 免疫原性分析法

表 40 - Immunogenicity assay summary

Assay	Precision	Sensitivity	Specificity/Selectivity	Clinical trial
Direct ELISA for ADA Screen, Titer 初期製法* Capture MRD: 1:50 Titer: 2-fold dilution series Report: ITR-356-0607	Intra-assay: 2.6% to 9.4% CV (3 operators) Inter-assay: 0-20% CV (3 operators)	Sensitivity experiment uses purified rabbit polyclonal anti-olipudase alfa Ab or mouse monoclonal antibody conjugated to human IgG spiked into NHS Sensitivity: 42 ng/mL and 89 ng/mL (monoclonal Abs); 86 ng/mL (polyclonal Ab)	Lack of reactivity of non-relevant antibodies to other enzymes and no binding inhibition with addition of non-specific proteins. No interference observed with up to 10 mg/mL hemoglobin or intralipid. No interference with bilirubin up to 0.6 mg/mL.	SPHINGO00605
IRIP Confirmatory Assay Report: ITR-356-0607B	All samples had bands of the appropriate MW and all samples titered within +/-1 dilution (3 operators)	Sensitivity experiment uses a mouse monoclonal Ab against olipudase alfa and an affinity purified rabbit polyclonal antibody Sensitivity: 46 ng/mL (monoclonal Ab); 750 ng/mL (polyclonal Ab)	No bands of the appropriate MW observed from serum containing irrelevant antibody controls.	SPHINGO00605
Direct ELISA for ADA Screen, Confirm, Titer MRD: 1:50 Titer: 2-fold dilution series Report: DOH1680 and Addendum 1 for 製法B* Capture and Addendum 2 for 申請製法* Capture	Intra-assay: 0.8% to 10.4% CV (1 operator) Inter-assay: 1.2% to 19.8% CV (2 operators)	Sensitivity experiment uses purified rabbit polyclonal anti-olipudase alfa Ab conjugated to human IgG spiked into NHS. Determined using the disease-specific cutpoint. 製法B* :120 ng/mL 申請製法* : 59 ng/mL	The assay tolerates up to 5 µg/mL drug. Matrix components, hemoglobin, bilirubin, and intralipid have minimal impact. No binding inhibition with addition of a non-specific protein (alglucosidase alfa).	DFI13803, DFI12712, LTS13632

＊新薬承認情報提供時に置換

Assay	Precision	Sensitivity	Specificity/Selectivity	Clinical trial
Direct ELISA for ADA Screen, Confirm, Titer 製法A* Capture MRD: 1:50 Titer: 2-fold dilution series Report: ABV0016 and Addendum 1	Intra-assay: 1.2% to 11.1% CV (1 operator) Inter-assay: 2.7% to 19.5% CV (2 operators)	Sensitivity experiment uses purified rabbit polyclonal anti-olipudase alfa Ab conjugated to human IgG spiked into NHS. Determined using the disease-specific cutpoint. Sensitivity: 95 ng/mL	The assay tolerates up to 5 µg/mL drug. Matrix components, hemoglobin, bilirubin, and intralipid have minimal impact. No impact on assay signal with addition of a non-specific protein (alglucosidase alfa).	DFI13412, DFI13803, DFI12712, LTS13632
NAb: Catalytic activity inhibition 製法B* MRD: 1:10 Report: NAV0011 and Addendum 1 for 申請製法*	Intra-assay: 2.6% to 8.4% CV (1 operator) Inter-assay: 2.4% to 8.2% CV (2 operators)	Sensitivity experiment uses anti-olipudase alfa monoclonal Ab spiked into NHS to determine the concentration that inhibits enzyme activity at the cut point. 製法B* :2.50 µg/mL 申請製法* : 2.43 µg /mL	The assay tolerates up to 1 µg/mL drug. Serum matrix has minimal impact to the assay. Interference from hemoglobin (≥1 mg/mL), bilirubin (≥0.05 mg/mL) and intralipid (≥ 2.5 mg/mL) was observed based on recovery of the LPC.	DFI13803, DFI12712, LTS13632
NAb: Catalytic activity inhibition 製法A* MRD: 1:10 Report: DOH1682	Intra-assay: 1.9% to 6.0% CV (1 operator) Inter-assay: 3.1% to 4.8% CV (2 operators)	Sensitivity experiment uses anti-olipudase alfa monoclonal Ab spiked into NHS to determine the concentration that inhibits enzyme activity at the cut point. Sensitivity: 3.06 µg/mL	The assay tolerates up to 1 µg/mL drug. 10 mg/mL or less of hemoglobin or intralipid or 0.6 mg/mL bilirubin did not impact % recovery of NHS samples.	DFI13803, DFI12712, LTS13632
NAb: Cellular Uptake inhibition 製法B* * MRD: 1:16 Report: DOH1681 and Addendum 1 for 申請製法*	Intra-assay: 7.6% to 16.8% CV (1 operator) Inter-assay: 8.3% to 19.1% CV (2 operators)	Sensitivity experiment uses anti-olipudase alfa monoclonal Ab spiked into NHS to determine the concentration that inhibits enzyme uptake at the cut point. 製法B* :16.47 µg/mL 申請製法* : 14.8 µg/mL	The assay tolerates up to 0.1 µg/mL drug. No significant interference from hemoglobin, bilirubin, or intralipid in sample matrix was observed.	DFI13803, DFI12712, LTS13632
NAb: Cellular Uptake inhibition 製法B* * MRD: 1:16 Report: NAV0010	Intra-assay: 2.7% to 10.8% CV (1 operator) Inter-assay: 5.5% to 21.7% CV (2 operators)	Sensitivity experiment uses anti-olipudase alfa monoclonal Ab spiked into NHS to determine the concentration that inhibits enzyme uptake at the cut point. Sensitivity: 13.02 µg/mL	The assay tolerates up to 0.1 µg/mL drug. No significant interference from bilirubin or intralipid in sample matrix was observed. Hemoglobin may cause false positive results.	DFI13803, DFI12712, LTS13632

Assay	Precision	Sensitivity	Specificity/Selectivity	Clinical trial
NAb: Cellular Uptake inhibition 製法A* MRD: 1:16 Report: NAV0028	Intra-assay: 4.1-17.1% CV (1 operator) Inter-assay: 4.4-22.6% CV (2 operators)	Sensitivity experiment uses anti-olipudase alfa monoclonal Ab spiked into NHS to determine the concentration that inhibits enzyme uptake at the cut point. Sensitivity: 26.6 µg/mL	The assay tolerates up to 1.0 µg/mL drug. No significant interference from bilirubin or intralipid in sample matrix was observed. Hemoglobin may cause false positive results.	DFI13803, DFI12712, LTS13632
ImmunoCAP ELISA for IgE ADA 製法B* Capture MRD: neat Report: DOH1655	Intra-assay: 1.6% to 5.2% CV (2 instruments) Inter-assay: 3.5% to 10.1% CV (2 instruments)	1.08 ng/mL using a purified rabbit polyclonal anti-olipudase alfa Ab conjugated to human IgE spiked into NHS	The assay tolerates up to 2 µg/mL drug. No binding inhibition with addition of a total IgE up to 1601 kU/L or irrelevant IgE.	DFI13803, DFI12712, LTS13632
ImmunoCAP ELISA for IgE ADA 製法A* Capture MRD: neat Report: ITR-594-0912	Intra-assay: 1.1% to 5.1% CV (2 instruments) Inter-assay: ≤3.8 % CV (2 instruments)	0.92 ng/mL using a purified rabbit polyclonal anti-olipudase alfa Ab conjugated to human IgG spiked into NHS	The assay tolerates up to 4 µg/mL drug. No interference observed with hemoglobin, bilirubin, or intralipid. No binding inhibition with addition of a total IgE up to 1257 kU/L, irrelevant IgE, or IgG up to 50 µg/mL.	DFI13412, DFI13803, DFI12712, LTS13632

Ab = antibody; ADA = anti-drug antibody; CV = coefficient of variation; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; IRIP = infrared immunoprecipitation assay; kU/L = kilo Units per liter; Nab = neutralizing antibody; NHS = normal human serum; MRD = minimal required dilution; MW = molecular weight.
Evaluated using two separate preparations of 製法B drug product.