目次

2.7.1　生物薬剤学試験及び関連する分析法 4
2.7.1.1　背景及び概観 4
2.7.1.1.1　臨床試験で使用した製剤の開発の概要 5
2.7.1.1.2　臨床試験で用いた分析法の概要 7
2.7.1.1.2.1　血清中ペグセタコプラン濃度測定の分析法 9
2.7.1.1.2.2　免疫原性モニタリングの分析法 9
2.7.1.1.2.3　薬力学的パラメータの分析法 12
2.7.1.2　個々の試験結果の要約 14
2.7.1.3　全試験を通しての結果の比較と解析 15
2.7.1.3.1　製剤が薬物動態に及ぼす影響 15
2.7.1.3.1.1　製剤の評価 15
2.7.1.3.1.2　皮下投与のバイオアベイラビリティの推定 16
2.7.1.3.1.3　母集団薬物動態解析による製剤の評価 17
2.7.1.3.2　製剤が免疫原性反応に及ぼす影響 18
2.7.1.4　付録 20
2.7.1.4.1　付録 1：分析法のライフサイクル情報 20
2.7.1.4.2　付録 2：分析性能の概要 27
2.7.1.4.3　付録 3：分析法の変更及びクロスバリデーション結果の概要 47

表目次

表 2.7.1-1　ペグセタコプランの臨床試験で使用した製剤の一覧 7
表 2.7.1-2　薬物動態、薬力学及び免疫原性の評価に用いた分析法の要約 9
表 2.7.1-3　分析法バリデーションのライフサイクル情報 20
表 2.7.1-4　分析法のライフサイクル情報（APL-CP0713-1、APL-CP1014、APL2-CP-HV-401、APL2-101 及び APL2-205 試験） 23
表 2.7.1-5　分析法のライフサイクル情報（APL2-202、APL2-204、APL-CP0514、APL2-102、APL2-302 及び APL2-308 試験） 25
表 2.7.1-6　血清中ペグセタコプラン濃度測定に用いた分析法（APL-CP0713-1 試験、APL-CP1014 試験、APL2-CP-HV-401 試験、APL2-101 試験、APL2-HV-PV-205 試験、APL2-202 試験及び APL2-CP-PNH-204 試験） 27
表 2.7.1-7　血清中ペグセタコプラン濃度測定に用いた分析法（APL-CP0514 試験） 33
表 2.7.1-8　血清中ペグセタコプラン濃度測定に用いた分析法（APL-CP0514 試験及び APL2-102 試験） 36
表 2.7.1-9　血清中ペグセタコプラン濃度測定に用いた分析法（APL2-302 試験） 40
表 2.7.1-10　血清中ペグセタコプラン濃度測定に用いた分析法（APL2-308 試験） 44
表 2.7.1-11　分析法の変更及びクロスバリデーションの結果 47

図目次

図 2.7.1-1　健康被験者を対象とした 2 試験で 2 種類の製剤を反復投与後の平均ペグセタコプラン濃度－時間プロファイル..... 16
図 2.7.1-2　ペグセタコプラン 1440 mg 単回皮下投与後及び 1500 mg 単回静脈内投与後の 平均ペグセタコプラン濃度－時間プロファイル..... 17

略語・略号一覧

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
AH50（AP50）	alternative complement pathway hemolytic activity	代替経路補体活性
APL-2	pegcetacoplan	ペグセタコプラン
$AUC_{0\text{-}inf}$	area under the drug concentration-time curve from zero to infinity	時間 0 から無限時間までの濃度–時間曲線下面積
C3	complement component 3	補体 C3
$C_{avg,ss}$	steady-state average drug concentration	定常状態での平均血清中濃度
CH50	total hemolytic complement activity assay	総溶血補体価
$C_{max,ss}$	steady-state maximum drug concentration	定常状態での最高血清中濃度
EIA	enzyme immunoassay	酵素免疫測定法
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定法
FLAER	fluorescein-labeled proaerolysin	フルオレセイン標識プロアエロリジン
GlyA	glycophorin A	グリコフォリン A
GPI	glycosylphosphatidylinositol	グリコシルホスファチジルイノシトール
HRP	horseradish peroxidase	西洋ワサビペルオキシダーゼ
Ig	immunoglobulin	免疫グロブリン
MAC	membrane attack complex	膜侵襲複合体
MRD	minimum required dilution	最小希釈倍率
MSD	Meso Scale Discovery	－
m/z	mass-to-charge ratio	質量電荷比
NAb	neutralizing antibody	中和抗体
PEG	polyethylene glycol	ポリエチレングリコール
PK	pharmacokinetic	薬物動態
PNH	paroxysmal nocturnal hemoglobinuria	発作性夜間ヘモグロビン尿症
Q_1	first quadrupole mass filter	第 1 の四重極マスフィルター
Q_3	subsequent quadrupole mass filter	第 3 の四重極マスフィルター
w/v	weight by volume	質量／容量

2.7.1　生物薬剤学試験及び関連する分析法

2.7.1.1　背景及び概観

ペグセタコプラン（APL-2）は、発作性夜間ヘモグロビン尿症の成人患者の治療薬として開発中のポリエチレングリコール（PEG）化ペプチドで、直鎖状で 40 kDa の PEG 分子の両端に同一のペンタデカペプチド 2 分子が共有結合している対称分子である。ペプチド部分が補体 C3（C3）と結合し、補体カスケードを幅広く阻害する。40 kDa の PEG 部分は投与した製剤の体内での溶解度を向上させ、滞留時間を延長させる。ペグセタコプランの推奨用量は 1080 mg の週 2 回皮下投与である。

APL-2 の臨床開発プログラムは、健康被験者を対象とした臨床薬理試験 5 試験、腎機能障害を有する被験者を対象とした特別な集団の試験 1 試験及び発作性夜間ヘモグロビン尿症患者を対象とした 5 試験のデータから構成されている。発作性夜間ヘモグロビン尿症患者を対象とした試験 5 試験には、ピボタル試験の第 III 相実薬対照試験（補体 C5 阻害薬の治療を受けている発作性夜間ヘモグロビン尿症患者を対象とした APL2-302 試験）及び裏付け試験 3 試験（APL2-CP-PNH-204 試験、APL2-202 試験、APL-CP0514 試験）に加え、参考資料とした第 III 相試験 1 試験（APL2-308 試験）が含まれる。裏付け試験のうち、2 試験（APL2-CP-PNH-204 試験及び APL2-202 試験）はエクリズマブの治療歴のない患者を対象とし、1 試験（APL-CP0514 試験）はエクリズマブの治療歴のある患者を対象とした。

本概要では、市販予定製剤であるペグセタコプラン 10 mM 酢酸緩衝液製剤［pH 5.0、4.1%質量／容量（w/v）ソルビトール含有］の使用を裏付けるため、以下のペグセタコプラン製剤の生物薬剤学的特性を要約する。

- 臨床試験で使用した製剤（第 2.7.1.1.1 項）
  - 市販予定製剤［第 III 相試験で使用した製剤、10 mM 酢酸緩衝液（pH 5.0、4.1% w/v ソルビトール含有）］
  - その他 2 種類の溶液製剤［5% w/v デキストロース液（緩衝液非含有）及び 10 mM 酢酸緩衝液（pH 5.0、4.25% w/v マンニトール含有）］
  - 凍結乾燥製剤（5% w/v デキストロース液に再溶解）
  - 静脈内投与製剤［10 mM 酢酸緩衝液（pH 5.0、0.9% NaCl）］
- 以下のプロセスで使用した分析法（第 2.7.1.1.2 項）
  - ペグセタコプラン血清中濃度の測定
  - 免疫原性モニタリング
  - 薬力学パラメータの測定
- 試験間比較及び母集団薬物動態（PK）モデル解析による皮下投与のバイオアベイラビリティの推定（第 2.7.1.3.1 項）
- 製剤が免疫原性に及ぼす影響（第 2.7.1.3.2 項）

生物薬剤学的評価の要約を以下に記載する。

- 市販予定製剤の PK 特性は、健康被験者及び発作性夜間ヘモグロビン尿症患者共に十分に評価されている。
- 血清中ペグセタコプラン濃度を測定するための分析法を開発し、適切な規制要件及び指針に従ってバリデーションを実施した。本分析法は感度、選択性及び真度が高く、かつ再現性があった。検体処理及び長期保管中の分析対象物の安定性が実証された。
- 免疫原性を測定するための分析法を開発し、適切な規制要件及び指針に従ってバリデーションを実施した。本分析法は感度、選択性及び真度が高く、かつ再現性があった。検体処理及び長期保管中の分析対象物の安定性が実証された。しかしその後、ペグセタコプランのペプチド部分に対する抗薬物抗体（ADA、抗ペグセタコプランペプチド抗体）及び中和抗体（NAb）アッセイは、定常状態の濃度でペグセタコプランに対する tolerance が低いことが判明した。両アッセイの再開発及び再バリデーションを実施中である。
- 相対的バイオアベイラビリティ試験及び絶対的バイオアベイラビリティ試験は実施しなかったが、健康被験者を対象に実施した皮下投与試験（APL-CP0713-1 試験）及び静脈内投与試験（APL2-CP-HV-401 試験）で得られた用量補正した時間 0 から無限時間までの濃度–時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}inf}$）の比較により、皮下投与のバイオアベイラビリティは約 87%と推定された。
- 母集団 PK 解析の結果、皮下投与のバイオアベイラビリティは 3 種類の溶液製剤［市販予定製剤、5% w/v デキストロース溶液製剤（緩衝液非含有）及び 10 mM 酢酸緩衝液製剤（pH 5.0、4.25% w/v マンニトール)］の間で差がないことが示された。これらの溶液製剤のバイオアベイラビリティは 76.6%と推定され、凍結乾燥製剤の推定値（94.7%）の方が高かった。これらの推定値は、用量補正した $AUC_{0\text{-}inf}$ の試験間比較で得られた結果とおおむね一致する。
- ペグセタコプランの全体的な PK は、デキストロース溶液製剤と酢酸緩衝液製剤の間で類似しており、異なる濃度のペグセタコプラン製剤間でも同様であった。
- 開発プログラムを通して免疫原性に注目すべき差は認められなかった。

2.7.1.1.1　臨床試験で使用した製剤の開発の概要

ペグセタコプランの臨床開発プログラムで使用した製剤の一覧を表 2.7.1-1 に示す。

第 I 相試験で使用した製剤は 2 種類で、ペグセタコプランを 5% w/v デキストロース液に溶解した製剤、及び凍結乾燥原薬を 5% w/v デキストロース液に再溶解する凍結乾燥製剤（添加物非含有）であった。ペグセタコプラン両製剤の PK 特性を、健康被験者を対象とした試験で評価した（APL-CP0713-1 試験及び APL-CP1014 試験でデキストロース溶液製剤を評価、APL2-102 試験で凍結乾燥製剤を評価)。これらの製剤は発作性夜間ヘモグロビン尿症患者を対象とした初期の臨床試験でも使用した（APL-CP0514 試験では両製剤、APL2-CP-PNH-204 試験では 5%デキストロース溶液製剤を使用)。

第 Ib/IIa 相試験で使用した製剤は皮下投与用の 10 mM 酢酸緩衝液に溶解した製剤（pH 5.0、4.25% w/v マンニトール含有）であった。本製剤は発作性夜間ヘモグロビン尿症患者を対象とした APL-CP0514 試験、APL2-CP-PNH-204 試験及び APL2-202 試験で使用した。

第 III 相試験である APL2-302 試験及び APL2-308 試験で使用したペグセタコプラン製剤は、皮下投与用の 10 mM 酢酸緩衝液に原薬を溶解した溶液製剤（pH 5.0、4.1% w/v ソルビトール含有）であり、市販予定製剤と剤形及び組成が同一であった。本製剤の PK を APL2-101 試験で評価した（第 2.7.2 項を参照）。

上記製剤に加え、静脈内投与用製剤［10 mM 酢酸緩衝液（pH 5.0、0.9% NaCl）］を第 I 相試験である APL2-CP-HV-401 試験で評価した。酢酸緩衝液製剤は APL2-101 試験でも異なるソルビトール濃度で評価した。

ペグセタコプランの臨床試験で使用した製剤の開発の詳細は第 3.2.P.2.2 項に記載した。

表 2.7.1-1　ペグセタコプランの臨床試験で使用した製剤の一覧

Formulation designation	Pegcetacoplan concentration	Route of administration	Clinical study	Subjects	PK data available
5% w/v dextrose, no buffer	Multiple concentrations (10 mg/mL, 40 mg/mL, 100 mg/mL, and 150 mg/mL)	SC injection	Study APL-CP0713-1	Healthy	Yes
			Study APL-CP1014	Healthy	Yes
			Study APL-CP0514	PNH	Yes
			Study APL2-CP-PNH-204	PNH	Yes
	40 mg/mL	SC infusion	Study APL2-CP-PNH-204	PNH	Yes
Lyophilized drug substance, no excipients (to be reconstituted in 5% w/v dextrose)	120 mg/vial or 380 mg/vial (reconstituted to 100 mg/mL with 5% w/v dextrose)	SC injection	Study APL2-102	Healthy	Yes
			Study APL2-CP-HV-205	Renal impairment	Yes
			Study APL-CP0514	PNH	Yes
	380 mg/vial (reconstituted to 40 mg/mL with 5% w/v dextrose)	SC infusion	Study APL-CP0514	PNH	Yes
10 mM acetate buffer, pH 5.0, 0.9% NaCl	24 mg/mL	IV injection, bolus	Study APL2-CP-HV-401	Healthy	Yes
10 mM acetate buffer, pH 5.0, 4.25% mannitol	40 mg/mL	SC infusion	Study APL-CP0514	PNH	Yes
			Study APL2-CP-PNH-204	PNH	Yes
			Study APL2-202	PNH	Yes
10 mM acetate buffer, pH 5.0, 4.4% sorbitol	36 mg/mL	SC infusion	Study APL2-101	Healthy	Yes
10 mM acetate buffer, pH 5.0, 4.0% sorbitol	65 mg/mL	SC infusion	Study APL2-101	Healthy	Yes
10 mM acetate buffer, pH 5.0, 4.1% sorbitol [a]	54 mg/mL	SC infusion	Study APL2-101	Healthy	Yes
			Study APL2-302	PNH	Yes
			Study APL2-308	PNH	Yes

Abbreviations: IV = intravenous; PK = pharmacokinetic; PNH = paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; SC = subcutaneous; w/v = weight by volume.
[a] commercial formulation

2.7.1.1.2　臨床試験で用いた分析法の概要

血清中ペグセタコプラン濃度及び免疫原性を測定するための分析法を開発し、現行の規制要件に従って事前に規定した許容基準に適合することをバリデートし、開発プログラム全体で使用した。血清中ペグセタコプラン濃度の測定に用いた分析法は感度、選択性及び真度が高く、かつ再現性があった。

ペグセタコプランに対する免疫原性を測定するために用いた分析法では、抗 PEG 抗体アッセイで感受性が高く、drug tolerance を示した。しかし、抗ペグセタコプランペプチド抗体（ADA）及び NAb アッセイでは drug tolerance が低いことが判明した（低濃度の抗ペグセタコプランペプチド抗体は、体循環中に薬剤が存在しない場合のみ検出できる）。これらのアッセイで測定したデータを示したが、偽陰性の件数が不明なため、真の発現割合を過小評価している可能性がある。drug tolerance を高めたアッセイを開発中である。

ペグセタコプランの臨床開発で用いた薬力学パラメータの測定法を含むこれらの分析法を表 2.7.1-2 に要約する。

分析法のライフサイクル情報を第 2.7.1.4.1 項に、分析性能の概要を第 2.7.1.4.2 項に、分析法の変更及びクロスバリデーション結果の概要を第 2.7.1.4.3 項に示す。

表 2.7.1-2　薬物動態、薬力学及び免疫原性の評価に用いた分析法の要約

Assay	Matrix/anticoagulant	Method
Serum concentration (PK)		
Pegcetacoplan	Serum	LC-MS/MS
Immunogenicity		
Anti–pegcetacoplan peptide antibody	Serum	Electrochemiluminescent
Anti-PEG antibody	Serum	ELISA
Pegcetacoplan neutralizing antibodies	Serum	Electrochemiluminescent
Pharmacodynamics		
AH50/AP50	Serum or plasma (lithium heparin)	Hemolytic assay
CH50	Serum	Hemolytic assay, ELISA
C3	Serum	Immunoturbidimetric
PNH Panel 2 (CD59, CD235a, C3d)	Whole blood (sodium heparin)	Flow cytometry
PNH Panel 3 (CD14, CD15, CD24, CD45, CD64, FLAER)	Whole blood (sodium heparin)	Flow cytometry

Abbreviations: AH50/AP50 = functional assays measuring activity of the complement alternative pathway; CH50 = functional assay measuring activity of the complement classical pathway; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; FLAER = fluorescein-labeled proaerolysin; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; PEG = polyethylene glycol; PK = pharmacokinetics; PNH = paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.

2.7.1.1.2.1　血清中ペグセタコプラン濃度測定の分析法

バリデートされたヒト血清中ペグセタコプラン濃度測定の分析法では、タンパク質沈殿によりヒト血清からペグセタコプラン及び安定同位体標識内標準物質（[redacted]）を抽出する。検体を調製後、分析対象物を高速液体クロマトグラフィーに注入し、[redacted]（[redacted] mm：[redacted]、[redacted] 又は [redacted] μm）で分離させる。分析対象物を質量分析計（[redacted]）を用いて[redacted]でモニタリングする。得られたイオンを質量電荷比（*m/z*）に従って第 1 の四重極マスフィルター（Q_1）に通した後、Q_2 に導入し、中性の窒素ガス分子との衝突によって断片化させる。このフラグメントイオンを続く第 3 の四重極マスフィルター（Q_3）に通して選別し、電子増倍管と衝突させて分析する。多価イオンの Q_1/Q_3 トランジションは、ペグセタコプランでは [redacted] *m/z*、内標準物質では [redacted] *m/z* である。内標準物質に対するペグセタコプランのピーク面積比を用いて、濃度に対してマトリックスマッチング法の検量線を作成した。$1/\chi^2$ の重み付け線形回帰又は二次回帰を行い、反応と濃度の関係を生成した。

2.7.1.1.2.2　免疫原性モニタリングの分析法

初期の臨床試験（APL-CP0713-1 試験、APL-CP1014 試験、APL2-CP-HV-401 試験、APL-CP0514 試験、及び APL2-CP-PNH-204 試験の被験者 6 名）で得られた検体の免疫原性試験は、[redacted] 社の ADA アッセイを用いて評価した。本アッセイでは、測定結果をペグセタコプラン分子全体に対する ADA 反応として報告した。その後、より特異性の高いアッセイとして、ペグセタコプランのペプチド部分に対する ADA（抗ペグセタコプランペプチド抗体）に特異的なアッセイ、及びペグセタコプランの PEG 成分に対する ADA（抗 PEG 抗体）に特異的なアッセイを開発した。また、ペグセタコプランの NAb を検出するために競合的リガンド結合 NAb アッセイを開発

し、バリデーションを実施した。その後、抗ペグセタコプランペプチド抗体（ADA）及びNAbアッセイでは、drug tolerance が低いことが判明した。このため、両アッセイの再開発及び再バリデーションを実施中である。具体的には、ペグセタコプランの活性部位に結合する抗体を検出及び抗体価を測定するための高感度のアッセイを開発している。このアッセイは、検体採取時に予想される血清中濃度のペグセタコプラン存在下で抗ペグセタコプラン抗体を検出することができる。また、検出された抗ペグセタコプラン抗体の中和活性を評価できる高感度のアッセイの開発を進めている（これらのアッセイの完成及び報告予定時期は2023年5月）。これらの高感度のアッセイを再開発し、バリデーションを実施した後、APL2-302試験及びAPL2-308試験の検体を再分析してペグセタコプランの安全性及び有効性に及ぼす影響を確認する予定である（再分析の完了及び報告予定時期は2026年8月）。

2.7.1.1.2.2.1　抗薬物抗体アッセイ

2.7.1.1.2.2.1.1　ELISAを用いた抗薬物抗体アッセイ（[redacted]社の抗薬物抗体アッセイ）

ヒト血清中ペグセタコプランに対するADAを定性的に測定するため、精度及び感度が高く、かつ再現性のある直接酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）を用いた分析法がバリデートされた（[redacted] Report：M5.3.1.4.8 AR5556）。本アッセイでは、ペグセタコプランを固定したELISAプレートに検体を添加して1時間インキュベートする。インキュベーション後、プレートを高塩濃度の緩衝液で洗浄した。結合抗体を西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）標識ヤギ抗ヒトIgG/IgA/IgM（[redacted]）で検出し、[redacted]を用いて可視化する。[redacted] nmで[redacted]。その後、[redacted] nmの波長補正を行い、波長[redacted] nmで発色強度を測定する。

2.7.1.1.2.2.1.2　電気化学発光を用いた抗ペグセタコプランペプチド抗体アッセイ

スクリーニングアッセイ及び抗体価アッセイのいずれも（[redacted] Report：M5.3.1.4.9-1、M5.3.1.4.9-2、M5.3.1.4.9-3、M5.3.1.4.9-4、M5.3.1.4.9-5 BAL-17-143-048-REP、[redacted] Report：M5.3.1.4.10 190339VMES-APWM）、ストレプトアビジンでコーティングした磁気ビーズをビオチン化PEGと共にインキュベートする。検体、陽性対照及び陰性対照を室温で解凍した後、ポリプロピレン製96ウェルプレート内で[redacted]ブロッキング緩衝液を用いて最小希釈倍率[redacted]まで希釈する。希釈した検体をプレート内でビーズと結合させ、4°Cに設定した冷蔵庫に移して振とうしながら一晩インキュベートする。

並行して、Meso Scale Discovery（MSD）社製標準結合96ウェルプレートの適切なウェルを、[redacted]で調製した50 µLのペグセタコプランコーティング原液[redacted]µg/mL、[redacted] ng/mL又は[redacted] ng/mLでコーティングし、室温で一晩インキュベートする。翌日、ビーズと検体の混合物を含むポリプロピレン製プレートを冷蔵庫から取り出し、室温に戻す。プレートをプレート型磁石の上に置き、上清150 µLを新たなポリプロピレン製プレートに移す。その後、上清50 µLをMSDプレートに移す（デュプリケート）。MSDプレートを密閉し、室温で振とうしながら60～90分間インキュベートする。プレートを洗浄し、

反転させて吸水紙の上で軽く叩いて乾燥させ、50 µL[redacted]（[redacted] [redacted] ng/mL、[redacted] ng/mL 及び[redacted] ng/mL）をプレートの適切なウェルに添加する。プレートを密閉し、室温でインキュベートした後、洗浄し、反転させて吸水紙の上で軽く叩いて乾燥させ、2 倍濃度の Read Buffer T 150 µL をプレートに添加する。添加後、速やかにプレートを MSD Imager 600 Reader で測定する。

確認アッセイの手順は、検体及び対照をペグセタコプラン 4 µg/mL を含有する緩衝液を用いて MRD まで希釈し、室温で 30～60 分間振とうしながらインキュベートすることを除き、上述したスクリーニングアッセイ及び抗体価アッセイの手順と同じである。

2.7.1.1.2.2.1.3　抗 PEG 抗体アッセイ

スクリーニングアッセイ及び抗体価アッセイのいずれも（[redacted] Report：M5.3.1.4.12-1、M5.3.1.4.12-2 BAL-17-143-050、[redacted] Report：M5.3.1.4.13 181686VRDW-APWM）、ストレプトアビジンでコーティングした磁気ビーズをビオチン化 PEG と共にインキュベートする。検体、陽性対照及び陰性対照を室温で解凍した後、ポリプロピレン製 96 ウェルプレート内で[redacted]ブロッキング緩衝液を用いて MRD（[redacted]）まで希釈する。希釈した検体をプレート内でビーズと結合させ、4°C に設定した冷蔵庫に移して振とうしながら一晩インキュベートする。並行して、[redacted] 96 ウェルプレートのウェルを炭酸塩コーティング緩衝液で希釈したマルチ PEG 化ウシ血清アルブミン、1 倍濃度のリン酸緩衝生理食塩液で調製した[redacted] でコーティングし、室温で一晩インキュベートする。翌日、コーティングした[redacted]プレートのウェルを洗浄及び乾燥した後、すべてのウェルに[redacted]緩衝液を添加する。その後、ビーズを添加したプレートを磁石の上に置き、上清を除去してビーズを洗浄する。[redacted]M 酢酸を用いて抗 PEG 抗体をビーズから解離させた後、プレートを磁石の上に置く。酸性化した上清を、ビーズプレートから適切なウェルに[redacted]M Tris-HCl（pH 9.5）を添加した新たなポリプロピレン製プレートに移して中和する。ビーズから抽出した抗 PEG 抗体を含有する中和した上清を、ブロックした[redacted]プレートに添加する。その後、プレートを密封し、室温でインキュベートし、洗浄し、反転させて乾燥させ、プレートの適切なウェルに検出抗体カクテル（[redacted]）を添加する。その後、プレートを洗浄し、反転させ、軽く叩いて乾燥させ、[redacted]基質溶液を添加する。発色を停止させ、プレートの 450 nm の吸光度をプレートリーダーで測定する（検出）。

確認アッセイの手順は、検体及び対照を 40 kDa の PEG 400 µg/mL を含有する緩衝液を用いて MRD まで希釈し、室温で 45～60 分間インキュベートすることを除き、上述したスクリーニングアッセイ及び抗体価アッセイの手順と同じである。

2.7.1.1.2.2.2　中和抗体アッセイ

ペグセタコプランの標的である内因性の C3 存在下でペグセタコプランの NAb を検出するため、競合的リガンド結合 NAb アッセイ（[redacted] Report：M5.3.1.4.14 BAL-17-143-027-REP）を開発した。最初に、プロテイン A/G/L セファロースカラムを用いて検体中に存在する多くの免疫グロブリンを結合させる。本手順は高濃度の C3 から NAb の可能性があるものを分離する

ために実施する。その後、pH 2.5 の [redacted]M グリシンを用いて検体をセファロースカラムから溶出させ、ペグセタコプランでコーティングした MSD 標準結合プレート上で pH 9.0 の [redacted]M の Tris で中和する。NAb はペグセタコプランと結合するが、その結合はスルホ標識ヒト C3 タンパク質と競合する。NAb 量が多いほど、スルホ標識ヒト C3 の結合量が少なくなり、電気化学発光シグナルの生成が少なくなる。

2.7.1.1.2.3　薬力学的パラメータの分析法

2.7.1.1.2.3.1　AH50/AP50

2.7.1.1.2.3.1.1　AH50 アッセイ

代替経路補体活性（AH50）は、補体代替経路の溶血活性を測定する機能的アッセイである。補体の代替経路及び終末経路（B 因子、D 因子、プロパージン、C3、C5、C6、C7、C8 及び C9）に依存し、ウサギ赤血球を溶解させ、溶解した細胞から放出されたヘモグロビン量を測定することにより AH50 を定量する。結果は、任意の単位（通常は血清 1 mL 当たりの AH50 単位）で表され、50%の溶血を生じる血清の希釈倍率の逆数を示す。その大きさは赤血球の濃度及び脆弱性、Mg^{++}及び Ca^{++}濃度、pH、反応時間、並びに温度などの因子にも依存する。これらの因子が測定間で一貫している場合、検体の AH50 値は経時的に一定となる。この一貫性は経時的及びこれらの因子を標準化するために用いる標準検体にも依存する。

2.7.1.1.2.3.1.2　AP50 アッセイ

代替経路補体活性（AP50）アッセイは補体代替経路の溶血活性を測定する AH50 機能的アッセイと同様である。このバリデートされたアッセイは市販の AP50 補体活性アッセイ（HaemoScan）に基づく。補体 AP50 アッセイでは、古典経路の活性を阻害するエチレングリコール四酢酸の存在下で、非感作ウサギ赤血球を血漿又は血清検体の連続希釈液とインキュベートする。ウサギ赤血球は代替経路を活性化し、検体の活性は赤血球の 50%を溶解させるマトリックスの希釈倍率を示す単位で表す。AP50 アッセイはウサギ赤血球の 50%の溶解を得るために必要なマトリックスの希釈倍率を報告することで、代替経路の活性を測定する。

2.7.1.1.2.3.2　CH50

2.7.1.1.2.3.2.1　CH50 アッセイ

総溶血補体価（CH50）アッセイは、ヒツジ赤血球を膜侵襲複合体（MAC：終末経路の最終段階）の標的として用い、生じた溶解量を示す値として遊離ヘモグロビンを用いて、終末経路までの古典経路の機能性を評価する。赤血球を抗体でコーティングすることにより C1 がその表面を認識し、古典経路を活性化する。古典経路の活性化は、ヘモグロビンの溶解量及び遊離量によって測定する。被験者の古典経路若しくは終末経路の構成成分が欠損している場合、又はいずれかの成分が機能していない場合、溶解量が低くなり、CH50 は低値となる。同様に、採血時に古典経路又は最終経路が十分に活性化されている場合、必須の補体成分が枯渇し、CH50 は低値となる。また、被験者が補体阻害薬の投与を受けている場合、MAC 形成が阻害されるため、CH50 は低値となる。

2.7.1.1.2.3.2.2　CH50 Eq 酵素免疫測定法

MicroVue CH50 Eq 酵素免疫測定法（EIA）は、標準的な条件下で生成される MAC の定量により、血清中の古典経路の総補体活性を直接評価できる。MicroVue CH50 Eq EIA は固有のネオ抗原に対するモノクローナル抗体を用いて MAC の分析対象物を捕捉する。CH50 Eq EIA 及び CH50 アッセイはいずれも MAC の生成に依存し相関するため、CH50 Eq EIA の結果は 1 mL 当たりの CH50 単位換算で表す。

2.7.1.1.2.3.3　C3 アッセイ

C3 アッセイは免疫比濁法で、検体に C3 抗体を添加したときに不溶性の免疫複合体が形成されることによって生じる検体の濁度の増加を測定する。これらの複合体は検体を通過した光線を散乱させる。散乱光の強度は検体中の C3 濃度に比例する。結果は既知の標準検体の濃度と比較して評価する。

2.7.1.1.2.3.4　フローサイトメトリー

2.7.1.1.2.3.4.1　PNH パネル 2 アッセイ

発作性夜間ヘモグロビン尿症はグリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカー型タンパク質を発現できない血液細胞の集合体を特徴とする病態である。*PIG-A*（GenBank BC038236.1、別名：*PIG-A*）遺伝子の変異がこれらの欠損を引き起こす。補体の制御への関与が知られている CD55 や CD59 などの GPI アンカー型タンパク質の非存在下では、活性化された補体によって赤血球が溶解されやすくなる。そのため、発作性夜間ヘモグロビン尿症患者は溶血性貧血に罹患していることが多い。PNH パネル 2 アッセイでは、赤血球の特異的マーカーである CD235a［グリコフォリン A（GlyA）］を赤血球の陽性マーカーとして用いて CD235a 陽性細胞での CD59 及び C3d の発現量を評価する。

PNH パネル 2（CD59、CD235a 及び C3d）は、末梢全血中の発作性夜間ヘモグロビン尿症に関連する赤血球異常の特性を評価するためにデザインされたフローサイトメトリー法である。本アッセイは臨床検査測定機関である [redacted]（現在は [redacted] の一部）で開発され、[redacted] でバリデーションが実施された。PNH パネル 2 は CD59 を発現していない PNH 赤血球クローン（タイプ III 細胞）、又は CD59 を高発現する正常な赤血球（タイプ I 細胞）と比較して CD59 の発現レベルが低い PNH 赤血球クローン（タイプ II 細胞）を、同定するようにデザインされている。さらに、I、II 及び III 型赤血球の細胞表面に結合した C3d を評価する。この 3 カラー、ダブルチューブ、溶解／洗浄なしのフローサイトメトリー法は、GlyA 陽性赤血球上の CD59 並びに CD59 陰性 GlyA 陽性赤血球、CD59 弱陽性 GlyA 陽性赤血球及び CD59 高値 GlyA 陽性赤血球上の C3d の発現を評価するためにデザインされた。アイソタイプチューブはゲート設定のためのアイソタイプコントロールのみを含むのに対し、実験用チューブは抗体（抗 CD59、抗 CD235a 及び抗 C3d）で染色した細胞を含む。本アッセイでは準定量的及び定性的な結果が得られる。

2.7.1.1.2.3.4.2　PNH パネル 3 アッセイ

GPI アンカー型タンパク質の欠損は、白血球でも認められる。CD14 及び CD24 は白血球で発現する GPI アンカー型タンパク質であるのに対し、CD15 及び CD64 は白血球の膜貫通分子であるが GPI アンカー型ではない。PNH パネル 3 アッセイでは、単球及び顆粒球の CD14 及び CD24 の発現をそれぞれ評価するため、CD15 及び CD64 を用いて単球（CD64 強陽性）及び顆粒球（CD15 陽性）を特異的に識別する。また、フルオレセイン標識プロアエロリジン（FLAER）を用いて、分析対象物の細胞表面での GPI アンカー型分子の発現を評価する。FLAER は Alexa Fluor 488 で標識された非溶解性の変異型アエロリジンである。アエロリジンはエロモナス・ハイドロフィラが分泌するタンパク質であり GPI アンカー型構造に結合することが知られているため、白血球に FLAER が結合していなければ GPI アンカー型分子が欠損していることを示す。本パネルには、検体の品質が分析に適していることを保証するための生細胞の染色色素である 7-アミノアクチノマイシン D も含まれている。

PNH パネル 3（CD14、CD15、CD24、CD45、CD64、FLAER）アッセイは、末梢全血中の PNH に関連する異常白血球の特性を評価するためにデザインされたフローサイトメトリー法である。本分析法は臨床検査測定機関である [redacted]（現在は [redacted] の一部）で開発され、[redacted] でバリデーションが実施された。PNH パネル 3 は CD14（単球上）又は CD24（顆粒球上）を異常発現している PNH 白血球を同定するようにデザインされている。

この 7 カラー、シングルチューブ、溶解／洗浄ありのフローサイトメトリー法は、CD14 陰性 CD64 陽性単球及び CD15 陽性 CD24 陰性顆粒球を評価するようにデザインされている。本アッセイでは準定量的及び定性的な結果が得られる。

2.7.1.2　個々の試験結果の要約

ペグセタコプランの開発中に正式なバイオアベイラビリティ試験及び生物学的同等性試験は実施しなかった。市販予定製剤は第 III 相試験で使用した製剤と同じであることから、正式な生物学的同等性試験は実施しなかった。ただし、第 2.7.2 項に詳述した臨床薬理試験を実施し、各種製剤を用いたペグセタコプランの臨床開発の裏付けとした。

各試験で使用した製剤の一覧を表 2.7.1-1 に示す。また、個々の試験結果を第 2.7.2 項に示す。皮下投与試験では、3 種類の溶液製剤（5% w/v デキストロース溶液製剤、4.25%マンニトール含有 10 mM 酢酸緩衝液製剤、及び約 4%ソルビトール含有 10 mM 酢酸緩衝液製剤）を評価した。デキストロース溶液製剤及び酢酸緩衝液製剤を用いた試験で得られた PK 結果に基づき、製剤が PK に及ぼす影響を評価し、第 2.7.1.3.1 項に記載した。また、製剤が免疫原性反応に及ぼす影響は第 2.7.1.3.2 項に記載した。

2.7.1.3　全試験を通しての結果の比較と解析

2.7.1.3.1　製剤が薬物動態に及ぼす影響

2.7.1.3.1.1　製剤の評価

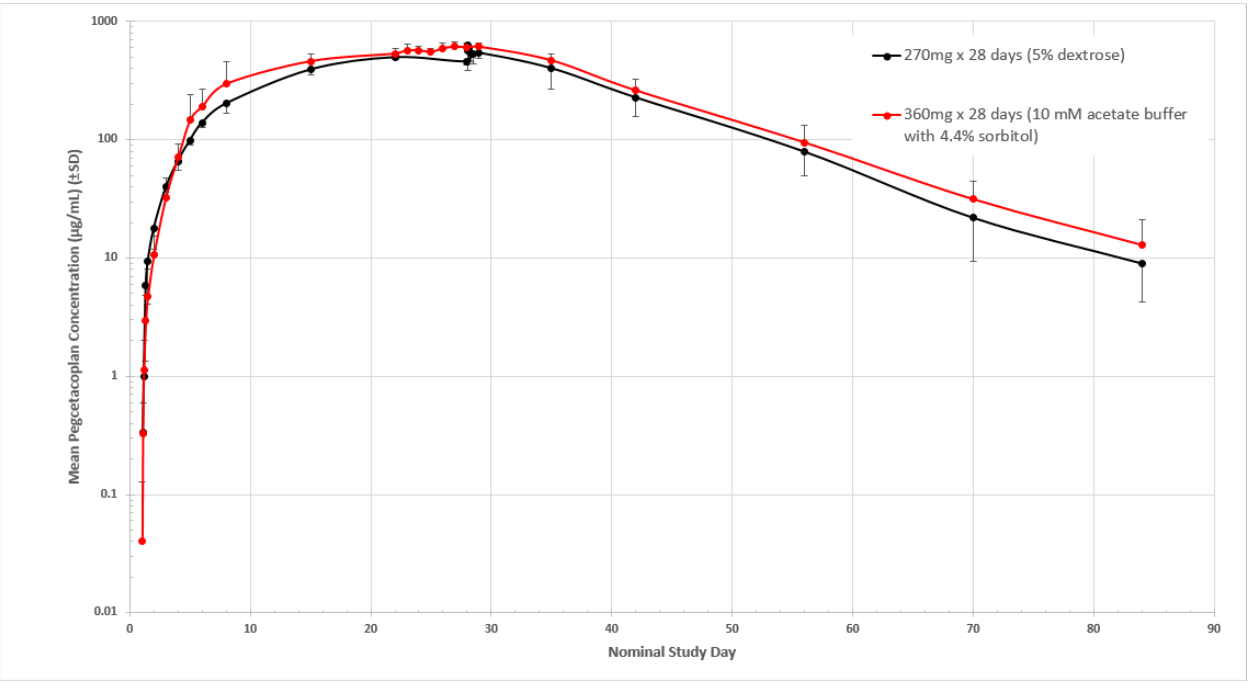
表 2.7.1-1 に示したように、3 種類の溶液製剤（5% w/v デキストロース溶液製剤、4.25%マンニトール含有 10 mM 酢酸緩衝液製剤及び約 4%ソルビトール含有 10 mM 酢酸緩衝液製剤）を評価した。

健康被験者を対象とした 2 試験でデキストロース溶液製剤及び酢酸緩衝液製剤を反復投与後の平均ペグセタコプラン濃度－時間プロファイルを評価し、PK を比較した。APL-CP1014 試験のコホート 4 では 5% w/v デキストロースに溶解したペグセタコプラン 270 mg（ペグセタコプラン濃度 150 mg/mL）を 1 日 1 回皮下投与し、APL2-101 試験のコホート 1 では 4.4% w/v ソルビトール含有 10 mM 酢酸緩衝液に溶解したペグセタコプラン 360 mg（ペグセタコプラン濃度 36 mg/mL）を 1 日 1 回皮下投与した。いずれの試験でも 28 日間反復投与した。

これらの製剤の組成及び濃度の違いがペグセタコプランの PK に及ぼす影響を評価するため、各コホートの平均濃度－時間プロファイルを図で示した（図 2.7.1-1）。平均濃度は用量で補正されていないが、吸収及び排泄のプロファイルが一致していることは明らかである。これらのデータから、ペグセタコプランの全体的な PK はデキストロース溶液製剤とソルビトール含有酢酸緩衝液製剤との間、及びペグセタコプラン濃度の異なる製剤間で本質的に同様であることが示された。

3 種類の溶液製剤のうち、デキストロース溶液製剤及びソルビトール含有酢酸緩衝液製剤を 11 試験中 7 試験の臨床試験で使用した（表 2.7.1-1）。マンニトール含有酢酸緩衝液製剤は、発作性夜間ヘモグロビン尿症患者を対象としてトラフ時の検体のみを採取した第 Ib 相及び第 IIa 相試験でも使用した。溶液製剤 3 種類の皮下投与のバイオアベイラビリティは、母集団 PK 解析の一環として評価し、第 2.7.1.3.1.3 項に要約する。

図 2.7.1-1　健康被験者を対象とした 2 試験で 2 種類の製剤を反復投与後の平均ペグセタコプラン濃度－時間プロファイル

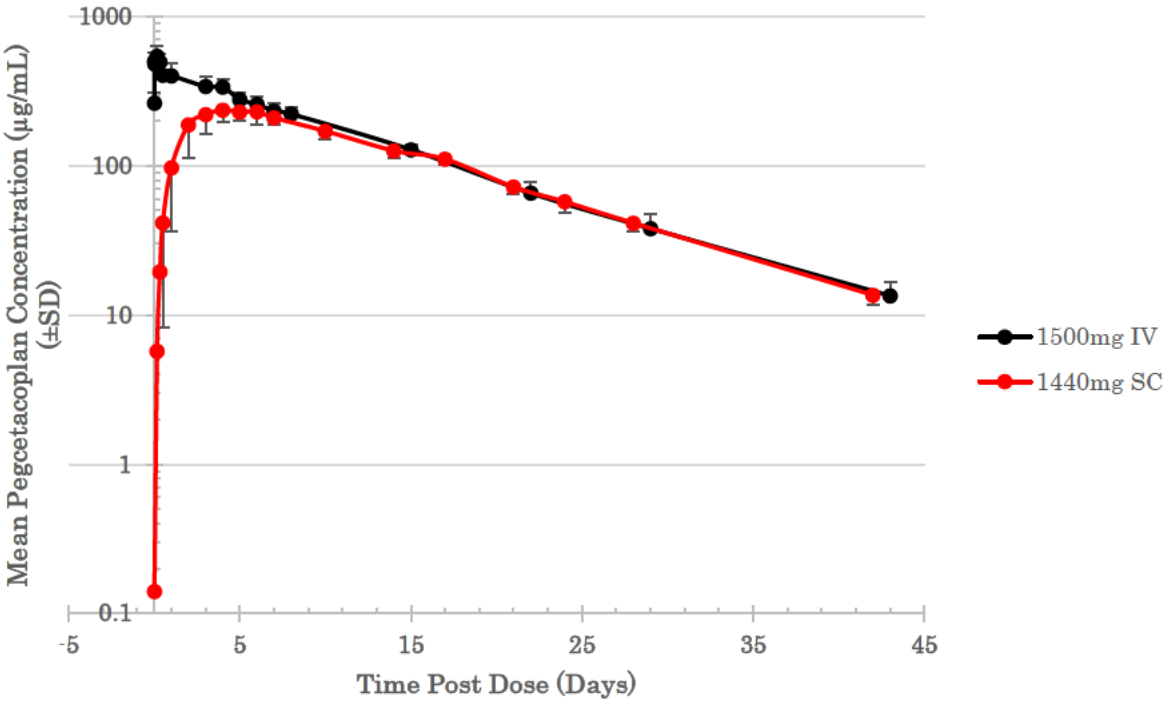


Source: M5.3.3.1.1 APL-CP1014 CSR Table 14.2.1.1 (270 mg); M5.3.3.1.4 APL2-101 CSR Table 14.2.1.1.1 (360 mg).

2.7.1.3.1.2　皮下投与のバイオアベイラビリティの推定

ペグセタコプランの正式なバイオアベイラビリティ試験は実施しなかったが、健康被験者にペグセタコプラン 1440 mg を単回皮下投与後（APL-CP0713-1 試験）又は 1500 mg を単回静脈内投与後（APL2-CP-HV-401 試験）に得られた PK データを比較してバイオアベイラビリティを推定した。これら 2 試験の平均濃度－時間プロファイル（図 2.7.1-2）は、2 つの投与経路で消失プロファイルが同様であることを示している。$AUC_{0\text{-inf}}$ の幾何平均値は 1440 mg の皮下投与後で 97320 µg·h/mL、1500 mg の静脈内投与後で 117000 µg·h/mL であった。用量補正後のペグセタコプラン皮下投与のバイオアベイラビリティは約 87%と推定された。

図 2.7.1-2　ペグセタコプラン 1440 mg 単回皮下投与後及び 1500 mg 単回静脈内投与後の平均ペグセタコプラン濃度－時間プロファイル



Abbreviations: IV = intravenous; SC = subcutaneous.
Source: M5.3.3.1.3 APL-CP0713-1 CSR Table 14.2.1.1 (1440 mg SC); M5.3.3.1.2 APL2-CP-HV- 401 CSR Table 14.2.1.1.2 (1500 mg IV).

2.7.1.3.1.3　母集団薬物動態解析による製剤の評価

健康被験者、腎機能障害を有する被験者及び発作性夜間ヘモグロビン尿症患者を対象とした試験を含む第 I 相から第 III 相試験 10 試験で得られたデータを用いて、ペグセタコプランの母集団 PK 解析（M5.3.3.5.1 APL-EX20-CP-002）を実施した。皮下投与によるトランジットコンパートメント吸収及び一次消失を伴う 1 コンパートメントモデルにより、皮下投与後又は静脈内投与後のペグセタコプランの PK は適切に記述された。

ペグセタコプランの曝露量［定常状態での平均血清中濃度（$C_{avg,ss}$）及び定常状態での最高血清中濃度（$C_{max,ss}$）］に対する共変量としての製剤の影響を、モデルに基づくシミュレーションにより評価した。全体として、凍結乾燥製剤ではソルビトール含有製剤と比較して $C_{avg,ss}$ 及び $C_{max,ss}$ が 38%高く、曝露量に重要な影響が認められた。デキストロース溶液製剤及びマンニトール含有製剤ではソルビトール含有製剤と比較して $C_{avg,ss}$ 及び $C_{max,ss}$ の予測値に重要な影響は認められなかった。

母集団 PK 解析の一環として皮下投与のバイオアベイラビリティを評価した。バイオアベイラビリティは、ソルビトール含有製剤、マンニトール含有製剤及びデキストロース溶液製剤の 76.6%に対し、凍結乾燥製剤で高かった（94.7%）。これらの推定値は用量補正した $AUC_{0\text{-}inf}$ の試験間比

較で得られた結果とおおむね一致しており、ペグセタコプランの皮下投与後の吸収は良好であることが示された。

2.7.1.3.2　製剤が免疫原性反応に及ぼす影響

すべての臨床薬理試験で得られた免疫原性の結果を第 2.7.2 項に要約する。

デキストロース溶液製剤及び静脈内投与製剤で得られた免疫原性反応を、ペグセタコプラン分子全体に対する反応が報告された初期の臨床試験（APL-CP0713-1 試験、APL2-CP-HV-401 試験、APL-CP1014 試験、APL-CP0514 試験、APL2-CP-PNH-204 試験）で用いた ADA アッセイで評価した。陽性が確認された被験者の割合はデキストロース溶液製剤又は静脈内投与製剤を用いた試験間で 0%から 11.1%であった（第 2.7.2 項 表 2.7.2-38）。

その後、より特異性の高いアッセイとして、ペグセタコプランのペプチド部分に対する ADA（抗ペグセタコプランペプチド抗体）に特異的なアッセイ、及びペグセタコプランの PEG 成分に対する ADA（抗 PEG 抗体）に特異的なアッセイを開発し、バリデーションを実施した。マンニトール含有溶液製剤、ソルビトール含有溶液製剤及び凍結乾燥製剤で得られた免疫原性反応を、抗ペグセタコプランペプチド抗体アッセイ及び抗 PEG 抗体アッセイの両方で評価した。

アッセイの開発段階で複数の技術を調査することで、これらのアッセイの drug tolerance を可能な限り高くするための取組みがなされてきた。開発初期の drug tolerance から改善がみられたが、分析法の適切なバリデーションを達成したうえで、drug tolerance をさらに改善することは、技術的に困難であった。ペグセタコプランに対する ADA アッセイの開発を、2 つの重要な要因（PEG 化された薬剤の性質、及び患者から採取した検体中の予想濃度から必要とされる drug tolerance）により推進した。最初は、MSD 及び ELISA プラットフォーム上で直接 ADA を測定する簡単な分析法の開発から開始した。これらのフォーマットを用いて広範な開発を試みたが、いずれの方法も、適切な MRD（< 100 倍）でマトリックス効果を解決したり、適切な drug tolerance を得ることができなかった。そのため、次のステップは、アフィニティーキャプチャ溶出フォーマットでより頑健で、薬剤に左右されないアッセイを構築することを目的に行われた。このフォーマットは実際には、直接 ADA フォーマットでみられるレベルからの信号を大幅に減少させた。その結果、感度を低下させ、drug tolerance の上昇が妨げられた。最終的に、抗 PEG 抗体の固相抽出を行うためのストレプトアビジンでコーティングした磁気ビーズを用いた新しいアッセイフォーマットを開発した。この前抽出は、ペグセタコプランのペプチド部分に対する反応と PEG 成分に対する反応を区別する上で重要であり、drug tolerance を大幅に高めることができた。抗ペグセタコプランペプチド抗体（ADA）アッセイは、フルバリデーションが実施され、事前に規定したすべての許容基準に適合し、20[redacted] 年以降に実施した 100 回以上の検体の分析で高い頑健性及び再現性が示されている。

一方、抗ペグセタコプランペプチド抗体（ADA）特異的アッセイ及び NAb アッセイは、投与中の高い定常状態での薬物濃度に対する十分な drug tolerance を有しておらず、一部の検体（件数不明）で偽陰性となることが明らかになった。定常状態で予想されるペグセタコプラン濃度と同レベルの代替陽性対照を用いた各アッセイの感度は、抗ペグセタコプランペプチド抗体とそ

の中和能の検出に対する臨床的感度が不十分であることを示す。Drug tolerance を改善するためにいくつかの戦略を採用して高感度のアッセイを再開発中であり、バリデーションを 2023 年に終了する予定である。

抗ペグセタコプランペプチド抗体アッセイの結果を第 2.7.2 項の表 2.7.2-36 に要約する。マンニトール含有溶液製剤、ソルビトール含有溶液製剤及び凍結乾燥製剤を評価した試験で、抗体陽性が確認された被験者の割合は 0%から 11.8%であった。これらの試験全体で、ペグセタコプランを投与した被験者の抗ペグセタコプランペプチド抗体の発現割合は低く、その多くは一過性であった。

抗 PEG 抗体アッセイの結果を第 2.7.2 項の表 2.7.2-39 に要約する。投与前に採取した検体中で、既存の抗 PEG 抗体陽性の割合が高かった。しかし、治験薬投与下で発現した又は治験薬投与下で増強した抗 PEG 抗体の発現割合は概して低く、これらの反応の多くは一過性であった。

2.7.1.4　付録

2.7.1.4.1　付録 1：分析法のライフサイクル情報

表 2.7.1-3　分析法バリデーションのライフサイクル情報

	Method validation No. 1	Method validation No. 2	Method validation No. 3	Method validation No. 4	Method validation No. 5
Analyte	Pegcetacoplan	Pegcetacoplan	Pegcetacoplan	Pegcetacoplan	Pegcetacoplan
Validation type	Full validation	Full validation	Full validation	Partial validation	Full validation
eCTD reference number	VAL075	BIO.VR.0210-1989	ARAPL2F	ARAPL2K	AV20-APL2-02
Method ID	Method ALM-075	Method BAM.0484.01	Method BPAPL2F	Method BPAPL2K	Method TM20-636
Duration of time method is in use	[redacted]/20[redacted]–[redacted]/20[redacted]	[redacted]/20[redacted]– Present	[redacted]/20[redacted]–[redacted]/20[redacted]	[redacted]/20[redacted]–[redacted]/20[redacted]	[redacted]/20[redacted]– Present
Bioanalytical site	[redacted] Australia	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
Matrix	Human serum				
Platform	Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)				
Format	A validated LC-MS/MS format using analyte extraction via protein precipitation followed by chromatographic separation and mass detection using a triple quadrupole mass spectrometer equipped with an electrospray ionization source.				
Stock reference, lot number, expiration date	APL-2, Lot 原薬ロットM*; Retest [redacted] 20[redacted]	APL-2, Lot 原薬ロットN*, Retest [redacted] [redacted] 20[redacted]	APL-2, Lot 原薬ロットA*; Lot 原薬ロットM*; and Lot 原薬ロットN*, expiration/retest dates [redacted] [redacted] 20[redacted], [redacted] [redacted] 20[redacted], and [redacted] [redacted] 20[redacted].	APL-2, Lot 原薬ロットM*; expiration/retest date [redacted] 20[redacted]	APL-2, Lot 原薬ロットO*, expiration/retest date [redacted] [redacted] 20[redacted]

＊新薬承認情報提供時に置換

	Method validation No. 1	Method validation No. 2	Method validation No. 3	Method validation No. 4	Method validation No. 5
			respectively		
Calibration range from the lower limit of quantitation (LLOQ) to the upper limit of quantitation (ULOQ)	0.100 to 10.0 µg/mL	10.0 to 1000 µg/mL	0.100 to 10.0 µg/mL	5.00 to 500 µg/mL	10.0 to 1000 µg/mL
Matrix study population	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Link to reports and applicable amendments	M5.3.1.4.1 VAL075 Validation Report - V1; M5.3.1.4.2 STAB056 Report	M5.3.1.4.3-1 BIO.VR.0210-1989.01; BIO.VR.0210-1989.02; BIO.VR.0210-1989.03; M5.3.1.4.3-2 BIO.VR.0210-1989.04; M5.3.1.4.3-3 BIO.VR.0210-1989.05	M5.3.1.4.4-1 ARAPL2F_MV Report (31222)-QCV04-QAV01; M5.3.1.4.4-2 ARAPL2F_A1_MV Report (32131)-QCV03-QAV01; M5.3.1.4.4-3 ARAPL2F.A2_MV Report (34636)-QCV03-QAV01	M5.3.1.4.5-1 ARAPL2K_MV Report (32411)-QCV03-QAV01; M5.3.1.4.5-2 ARAPL2K.A1 MV Report (32411)-QCV02-QAV01	M5.3.1.4.6 AV21-190 (AV20-APL2-02)
Synopsis of amendment history	Amendment [redacted] 20[redacted], STAB056: This report presents additional validation data for the Analytical Laboratory Method ALM-075. The objective of this project was to partially validate the inclusion of high concentration QC samples in Analytical Laboratory Method ALM-075 for the determination of APL-2 in	Amendment [redacted] 20[redacted], BIO.VR.0210-1989.02: This report amendment covers extended long-term stability in frozen matrix maintained at –20°C and –80°C. Amendment [redacted] 20[redacted], BIO.VR.0210-1989.03: This report amendment summarizes a partial validation run to assess sample collection/processing integrity across the tested serum generation centrifuge	Amendment [redacted] 20[redacted], report APAPL2F.A1: This amendment reported the results of a method transfer cross-validation, and added method characteristics and method development information. Amendment [redacted] 20[redacted], report ARAPL2F.A2: This amendment reported additional long-term matrix freezer stability.	Amendment [redacted] 20[redacted], report ARAPL2K.A1: ARAPL2K is reissued in its entirety to add the report date to the Addendum/Amendment Notes section and to correct the Statement of Quality Assurance date reported to management. Data from Batch 原薬バッチA* were to report additional long-term matrix freezer stability. Relevant sections were	N/A

	Method validation No. 1	Method validation No. 2	Method validation No. 3	Method validation No. 4	Method validation No. 5
	human serum. This was required because of the large number of study samples which have shown concentrations above the previously validated range of 0.100 to 10.0 µg/mL. The preparation of the high concentration QC samples also required the addition of a high concentration stock solution into ALM-075. The method was validated to investigate intra run accuracy and precision, dilution (1 in 20 followed by 1 in 10 = 1 in 200 for ultra high QC and 1 in 20 for medium high QC) and stability (ie, freeze-thaw, bench-top, long term, and stock solution).	temperature range, as well as across the tested time frame for serum harvest following serum generation. Tests were designed to support sample collection flexibility. Amendment [redacted] 20[redacted], BIO.VR.0210-1989.04: This report amendment summarizes a validation experiment to assess sample collection/processing integrity across the tested centrifuge temperature range used for serum generation, as well as across the tested time frame for serum harvest following serum generation. Tests were designed to support sample collection flexibility. The amendment also includes an interference check in the presence of eculizumab. Amendment [redacted] 20[redacted], BIO.VR.0210-1989.05: This amendment report covers validation experiments to demonstrate acceptable assay selectivity in 10 sources of disease state serum, as well as acceptable performance in the presence of elevated C3 protein levels of up to ~5.0 mg/mL.		updated.	

Abbreviations: APL-2 = pegcetacoplan; eCTD = electronic Common Technical Document; ID = identifier; QC = quality control.

表 2.7.1-4　分析法のライフサイクル情報（APL-CP0713-1、APL-CP1014、APL2-CP-HV-401、APL2-101 及び APL2-205 試験）

	Clinical study No. 1 APL-CP0713-1	Clinical study No. 2 APL-CP1014	Clinical study No. 3 APL2-CP-HV-401	Clinical study No. 4 APL2-101	Clinical study No. 5 APL2-205
Analyte	Pegcetacoplan	Pegcetacoplan	Pegcetacoplan	Pegcetacoplan	Pegcetacoplan
Validation type	In-study	In-study	In-study	In-study	In-study
eCTD reference number	APL-CP0713-1	APL-CP1014	APL2-CP-HV-401	APL2-101	APL2-205
Method ID	ALM-075	ALM-075	ALM-075	ALM-075	ALM-075
Duration of time method is in use	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
Bioanalytical site	[redacted] Australia	[redacted] Australia	[redacted] Australia	[redacted] Australia	[redacted] Australia
Matrix	Human serum				
Platform	Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)				
Format	A validated LC-MS/MS format using analyte extraction via protein precipitation followed by chromatographic separation and mass detection using a triple quadrupole mass spectrometer equipped with an electrospray ionization source.				
Stock reference, lot number, expiration date	APL-2, Lot 原薬ロットM; retest date [redacted]	APL-2, Lot 原薬ロットM; retest date [redacted]	APL-2, Lot 原薬ロットM; retest date [redacted]	APL-2, Lot 原薬ロットM; retest date [redacted]	APL-2, Lot 原薬ロットM; retest date [redacted]
Calibration range from the lower limit of quantitation (LLOQ) to the upper limit of quantitation (ULOQ)	0.100 to 10.0 µg/mL	0.100 to 10.0 µg/mL	0.100 to 10.0 µg/mL	0.100 to 10.0 µg/mL	0.100 to 10.0 µg/mL
Matrix study population	Healthy	Healthy	Healthy	Healthy	Healthy, renal impairment

	Clinical study No. 1 APL-CP0713-1	Clinical study No. 2 APL-CP1014	Clinical study No. 3 APL2-CP-HV-401	Clinical study No. 4 APL2-101	Clinical study No. 5 APL2-205
Link to reports and applicable amendments	M5.3.1.4.26 APL-CP0713-1 PK Report	M5.3.1.4.27 APL-CP1014 (DAG)	M5.3.1.4.28 Bioanalytical report APL2-CP-HV-401 (EAS) Report	M5.3.1.4.29 FBE Report	M5.3.1.4.30 Bioanalytical report APL2-CP-PV-205_FBD Report
Synopsis of amendment history	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Abbreviations: APL-2 = pegcetacoplan; eCTD = electronic Common Technical Document; ID = identifier.

表 2.7.1-5　分析法のライフサイクル情報（APL2-202、APL2-204、APL-CP0514、APL2-102、APL2-302 及び APL2-308 試験）

	Clinical study No. 6 APL2-202	Clinical study No. 7 APL2-204	Clinical study No. 8 APL-CP0514	Clinical study No. 9 APL2-102	Clinical study No. 10 APL2-302	Clinical study No. 11 APL2-308
Analyte	Pegcetacoplan	Pegcetacoplan	Pegcetacoplan	Pegcetacoplan	Pegcetacoplan	Pegcetacoplan
Validation type	In-study	In-study	In-study	In-study	In-study	In-study
eCTD reference number	APL2-202	APL2-204	APL-CP0514	APL2-102	APL2-302	APL2-308
Method ID	ALM-075	ALM-075	BPAPL2F, BPAPL2K	BPAPL2K	BAM.0484.01	Method TM20-636
Duration of time method is in use	[redacted]	[redacted]	BPAPL2F: [redacted] BPAPL2K: [redacted]	[redacted]	[redacted]-present	[redacted]-present
Bioanalytical site	[redacted] Australia	[redacted] Australia	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
Matrix	Serum					
Platform	liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)					
Format	A validated LC-MS/MS format using analyte extraction via protein precipitation followed by chromatographic separation and mass detection using a triple quadrupole mass spectrometer equipped with an electrospray ionization source.					

	Clinical study No. 6 APL2-202	Clinical study No. 7 APL2-204	Clinical study No. 8 APL-CP0514	Clinical study No. 9 APL2-102	Clinical study No. 10 APL2-302	Clinical study No. 11 APL2-308
Stock reference, lot number, expiration date	APL-2, Lot 原薬ロットM* expiration/retest date [redacted] (retest)	APL-2, Lot 原薬ロットM* expiration/retest date [redacted] (retest)	APL-2, Lot 原薬ロットM* expiration/retest date [redacted] APL-2, Lot 原薬ロットN*, expiration/retest date [redacted]	APL-2, Lot 原薬ロットM* expiration/retest date [redacted]	APL-2, Lot 原薬ロットN*, expiration/retest date [redacted]	APL-2, Lot 原薬ロットO*, expiration/retest date [redacted]
Calibration range from the lower limit of quantitation (LLOQ) to the upper limit of quantitation (ULOQ)	0.100 to 10.0 µg/mL	0.100 to 10.0 µg/mL	0.100 to 10.0 µg/mL (BPAPL2F) 5.00 to 500 µg/mL (BPAPL2K)	5.00 to 500 µg/mL	10.0 to 1000 µg/mL	10.0 to 1000 µg/mL
Matrix study population	Diseased Report, p 10	Diseased Report, p 10	Diseased Report, p 10	Normal	Diseased	Diseased
Link to reports and applicable amendments	M5.3.1.4.31 GAL_Report	M5.3.1.4.32 DBY_Report	M5.3.1.4.33-1 APL-CP0514 Bioanalytical Report (31493)-QCV05-QAV01	M5.3.1.4.34-1 APL2-102 Bioanalytical Report (33009)-QCV04-QAV01	M5.3.1.4.35-1 BIO.SR.0277-2221.01	M5.3.1.4.36 APL2-308 - AD21-1248 - [redacted]
Synopsis of amendment history	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Abbreviations: APL-2 = pegcetacoplan; eCTD = electronic Common Technical Document; ID = identifier.

2.7.1.4.2　付録 2：分析性能の概要

表 2.7.1-6　血清中ペグセタコプラン濃度測定に用いた分析法（APL-CP0713-1 試験、APL-CP1014 試験、APL2-CP-HV-401 試験、APL2-101 試験、APL2-HV-PV-205 試験、APL2-202 試験及び APL2-CP-PNH-204 試験）

Bioanalytical method validation report name, amendments, and hyperlinks	Validation of an Analytical Method for Determination of APL-2 in Human Serum Using LC-MS/MS Method ALM-075 M5.3.1.4.1 VAL-075 Validation Report - V1 M5.3.1.4.2 STAB056 Report
Method description	The analyte (pegcetacoplan) and internal standard ([redacted]) were extracted from 100 µL of human serum by protein precipitation using acetonitrile. The supernatant was filtered, evaporated to dryness, reconstituted, and then analyzed by LC-MS/MS. The objective of this study was to transfer a method for the determination of pegcetacoplan in human serum. The method was validated to investigate method matrix effects, selectivity, method accuracy, precision and linearity, and reinjection stability. Note: Validation parameters dilution integrity, selectivity, recovery, and stability were assessed by another laboratory ([redacted], Study ID MV-2014-914).
Materials used for standard calibration curve and concentration	Reference Item Item name: APL-2 Lot number: 原薬ロットM* Supplier: [redacted] Internal Standard Item name: [redacted] Lot number: 原薬ロットP* Supplier: [redacted] APL-2 stock solutions were prepared in duplicate in dilution solution (50% ACN) at 2.00 mg/mL. The solutions were verified against each other and deemed acceptable for use (within 5% of each other) prior to mixing together to create a combined stock solution. This combined stock solution was further diluted in dilution solution to create a solution at a concentration of 200 µg/mL. Calibration curve samples were prepared in bulk on [redacted] 20[redacted] and [redacted] 20[redacted] (SS1 only) by spiking diluted stock solution into control human serum followed by serial dilutions. Calibration curve samples were stored in a monitored freezer at nominal –80 °C prior to use. Calibration curve samples were prepared at the following concentrations: 0.100, 0.200, 0.400, 1.00, 2.00, 5.00, 9.00, 10.0 µg/mL
Validated assay range	0.100-10.0 µg/mL
Material used for quality controls (QCs) and concentration	Quality control samples were prepared in bulk by spiking diluted stock solution into control human serum followed by serial dilutions. Quality control samples were stored in a monitored freezer at nominal –80°C prior to use. Quality control samples were prepared at the following concentrations: 0.100 (SQCLOQ), 0.300 (SQCL), 3.00 (SQCM), 8.00 (SQCH), 20.0 (SQCDi) µg/mL
Minimum required dilutions (MRDs)	N/A

＊新薬承認情報提供時に置換

Source and lot of reagents	N/A		
Regression model and weighting	Calibration curves were constructed based on peak area ratio and quadratic regression with 1/x2 weighting.		
Validation parameters	Method validation summary		Source location
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	No of standard calibrators from LLOQ to ULOQ	8	Table 3, VAL075 validation report
	Cumulative accuracy (bias) from LLOQ to ULOQ	–2.7% to 4.0%	Table 3, VAL075 validation report
	Cumulative precision (CV) from LLOQ to ULOQ	≤8.0%	Table 3, VAL075 validation report
Performance of QCs during accuracy and precision runs	Cumulative accuracy (bias) in 4 QCs	–1.7% to 2.0%	Table 7, VAL075 validation report
	Interbatch CV	≤10.9%	Table 7, VAL075 validation report
	Total error (TE)	N/A	
Selectivity & matrix effect	Selectivity was assessed in 6 different sources of human serum. The selectivity of the analyte from the internal standard in 6 of 6 individual serum lots was deemed acceptable. Matrix effects were tested by spiking, in triplicate, 6 different sources of serum at low QC level (0.3µg/mL). The accuracy (bias) of each serum source was calculated and ranged from –6.0 to 11.7%, indicating that matrix effects were not significant.		Section 10.2, and Table 4, and Table 5 VAL075 validation report
Interference & specificity	Selectivity of the assay in the presence of potential over-the-counter (OTC) coadministered substances was assessed. No interference with the analyte or internal standard was observed when tested with amoxicillin, desipramine, tetracycline, aspirin, lidocaine, salicylic acid, theophylline, theobromine, xanthine, acetaminophen, ibuprofen, caffeine, chlorpheniramine maleate, naproxen and R,R (-)-pseudoephedrine.		Summary, and Section 10.2, VAL075 validation report
Hemolysis effect	Mean normalized MF (normal): 1.07 (low QC) and 1.09 (high QC) Mean normalized MF (2% hemolyzed): 1.15 (low QC) and 1.14 (high QC)		Summary, VAL075 validation report
Lipemic effect	Mean normalized MF (normal): 1.07 (low QC) and 1.09 (high QC) Mean normalized MF (hyperlipidemic): 1.12 (low QC) and 1.24 (high QC)		Summary, VAL075 validation report
Dilution linearity & hook effect	N/A		
Bench-top/process stability	Bench-top stability at room temperature: 21 hours Processed sample stability at room temperature: 66 hours		Summary, VAL075 validation report
Freeze-thaw stability	3 cycles		Summary, VAL075 validation report
Long-term storage	Long-term stability for APL-2 in human serum at nominal –20°C: 94 days Long-term stability for APL-2 in human serum at nominal –80°C: 776 days		Summary, VAL075 validation report, and STAB056 validation report
Parallelism	N/A		
Carryover	Carryover was assessed prior to the acquisition of each validation run during system suitability testing and deemed acceptable.		Section 10.2, VAL075 validation report

Method performance in Study APL-CP0713-1		
Assay passing rate	14 of 16 (87.5%) of the total analytical runs met the prespecified acceptance criteria.	Table 1, APL_CP0713_1_PK_Report_Final
Standard curve performance	Cumulative bias range: –3.7% to 4.0% Cumulative precision: ≤6.7% CV	Table 3, APL_CP0713_1_PK_Report_Final
QC performance	Cumulative bias range: –1.0% to 4.0% Cumulative precision: ≤11.3% CV TE: N/A	Table 4, APL_CP0713_1_PK_Report_Final
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was performed in ≥10% of study samples, and 40/45 (88.9%) of the samples met the prespecified criteria.	Section 12.6 and Table 13, APL_CP0713_1_PK_Report_Final
Study sample analysis/stability	N/A	
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	0.100, 0.200, 0.400, 1.00, 2.00, 5.00, 9.00, 10.0 µg/mL Cumulative accuracy (bias) from LLOQ to ULOQ: 2.7% to 4.0% Cumulative precision (CV) from LLOQ to ULOQ: ≤8.0%	Table 3, VAL075 validation report
Method performance in Study APL-CP1014		
Assay passing rate	11 of 14 (78.6%) of the total analytical runs met the prespecified acceptance criteria.	Table 1, APL_CP1014 (DAG) Report Final
Standard curve performance	Cumulative bias range: –2.9% to 4.2% Cumulative precision: ≤7.6% CV	Table 3, APL_CP1014 (DAG) Report Final
QC performance	Cumulative bias range: –15.7% to 6.2% Cumulative precision: ≤15.8% CV TE: N/A	Table 4, APL_CP1014 (DAG) Report Final
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was performed in ≥10% of study samples, and 33/42 (78.6%) of the samples met the prespecified criteria.	Section 12.5 and Table 10, APL_CP1014 (DAG) Report Final
Study sample analysis/stability	N/A	
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	0.100, 0.200, 0.400, 1.00, 2.00, 5.00, 9.00, 10.0 µg/mL Cumulative accuracy (bias) from LLOQ to ULOQ: 2.7% to 4.0% Cumulative precision (CV) from LLOQ to ULOQ: ≤8.0%	Table 3, VAL075 validation report

Method performance in Study APL2-CP-HV-401		
Assay passing rate	7 of 7 (100%) of the total analytical runs met the prespecified acceptance criteria.	Table 1, Bioanalytical report APL2-CP-HV-401 (EAS) Report Final
Standard curve performance	Cumulative bias range: –1.4% to 1.8% Cumulative precision: ≤7.5% CV	Table 3, Bioanalytical report APL2-CP-HV-401 (EAS) Report Final
QC performance	Cumulative bias range: –2.7% to 0.3% Cumulative precision: ≤8.2% CV TE: N/A	Table 4, Bioanalytical report APL2-CP-HV-401 (EAS) Report Final
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was performed in 10% of study samples, and 27 of 31 (87.1%) of the samples met the prespecified criteria.	Section 11.4, Table 9, Bioanalytical report APL2-CP-HV-401 (EAS) Report Final
Study sample analysis/stability	N/A	
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	0.100, 0.200, 0.400, 1.00, 2.00, 5.00, 9.00, 10.0 µg/mL Cumulative accuracy (bias) from LLOQ to ULOQ: 2.7% to 4.0% Cumulative precision (CV) from LLOQ to ULOQ: ≤8.0%	Table 3, VAL075 validation report
Method performance in Study APL2-101		
Assay passing rate	15 of 16 (94%) of the total analytical runs met the prespecified acceptance criteria.	Table 1, FBE Report Final
Standard curve performance	Cumulative bias range: –0.8% to 2.0% Cumulative precision: ≤7.5% CV	Table 3, FBE Report Final
QC performance	Cumulative bias range: –6.2% to 2.3% Cumulative precision: ≤8.2% CV TE: N/A	Table 4, FBE Report Final
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was performed in 10% of study samples, and 81 of 91(89.0%) of the samples met the prespecified criteria.	Section 11.4, Table 6, FBE Report Final
Study sample analysis/stability	N/A	
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	0.100, 0.200, 0.400, 1.00, 2.00, 5.00, 9.00, 10.0 µg/mL Cumulative accuracy (bias) from LLOQ to ULOQ: 2.7% to 4.0% Cumulative precision (CV) from LLOQ to ULOQ: ≤8.0%	Table 3, VAL075 validation report

Method performance in Study APL2-HV-PV-205		
Assay passing rate	6 of 6 (100%) of the total analytical runs met the prespecified acceptance criteria.	Table 1, Bioanalytical report APL2-CP-PV-205_FBD Report_Final
Standard curve performance	Cumulative bias range: –1.8% to 4.0% Cumulative precision: ≤9.0% CV	Table 3, Bioanalytical report APL2-CP-PV-205_FBD Report_Final
QC performance	Cumulative bias range: –3.0% to 3.3% Cumulative precision: ≤6.6% CV TE: N/A	Table 4, Bioanalytical report APL2-CP-PV-205_FBD Report_Final
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was performed in 10% of study samples, and 30 of 32 (93.8%) of the samples met the prespecified criteria.	Table 6 and Section 11.4, Bioanalytical report APL2-CP-PV-205_FBD Report_Final
Study sample analysis/stability	N/A	
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	0.100, 0.200, 0.400, 1.00, 2.00, 5.00, 9.00, 10.0 µg/mL Cumulative accuracy (bias) from LLOQ to ULOQ: 2.7% to 4.0% Cumulative precision (CV) from LLOQ to ULOQ: ≤8.0%	Table 3, VAL075 validation report
Method performance in Study APL2-202		
Assay passing rate	4/4 (100%) of the total analytical runs met the prespecified acceptance criteria.	Section 11 and Table 1, GAL_Report_Final
Standard curve performance	Cumulative bias range: -1.2% to 1.0% Cumulative precision: ≤ 7.7 % CV	Table 3, GAL_Report_Final
QC performance	Cumulative bias range: –6.8% to 1.0% Cumulative precision: ≤5.8% CV TE: N/A	Table 4, GAL_Report_Final
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was performed in >10% of study samples, and 20/20 (100%) of the samples met the prespecified criteria.	Section 11.5 and Table 7, GAL_Report_Final
Study sample analysis/stability	N/A	
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	0.100, 0.200, 0.400, 1.00, 2.00, 5.00, 9.00, 10.0 µg/mL Cumulative accuracy (bias) from LLOQ to ULOQ: 2.7% to 4.0% Cumulative precision (CV) from LLOQ to ULOQ: ≤8.0%	Table 3, VAL075 validation report

Method performance in Study APL2-CP-PNH-204		
Assay passing rate	19 of 19 (100%) of the total analytical runs met the prespecified acceptance criteria.	Table 1, DBY_Report_FINAL
Standard curve performance	Cumulative bias range: –0.5% to 0.8% Cumulative precision: ≤7.1% CV	Table 3, DBY_Report_FINAL
QC performance	Cumulative bias range: –13.5% to 1.0% Cumulative precision: ≤8.9% CV TE: N/A	Table 4, DBY_Report_FINAL
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was performed in 10% of study samples, and 41 of 42 (97.6%) of the samples met the prespecified criteria.	Section 11.4 and Table 6, DBY_Report_FINAL
Study sample analysis/stability	N/A	
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	0.100, 0.200, 0.400, 1.00, 2.00, 5.00, 9.00, 10.0 µg/mL Cumulative accuracy (bias) from LLOQ to ULOQ: 2.7% to 4.0% Cumulative precision (CV) from LLOQ to ULOQ: ≤8.0%	Table 3, VAL075 validation report

Abbreviations: ACN = acetonitrile; APL-2 = pegcetacoplan; CV = coefficient of variation; LC-MS/MS = liquid chromatography–tandem mass spectrometry; LLOQ = lower limit of quantitation; MF = matrix factor; N/A = not applicable; SS1 = serum standard 1; ULOQ = upper limit of quantitation.
Note: Concentration data from impacted samples were removed for pharmacokinetic analysis

表 2.7.1-7　血清中ペグセタコプラン濃度測定に用いた分析法（APL-CP0514 試験）

Bioanalytical method validation report name, amendments, and hyperlinks	Method Validation Report for the Determination of APL-2 in Human Serum Using LC-MS/MS Method BPAPL2F M5.3.1.4.4-1 ARAPL2F MV Report-V1 M5.3.1.4.4-2 ARAPL2F.A1 MV Report M5.3.1.4.4-3 ARAPL2F.A2 MV Report
Method description	The analyte (pegcetacoplan) and internal standard ([redacted]) were extracted from 100 µL of human serum by protein precipitation using acetonitrile. The supernatant was filtered, evaporated to dryness, reconstituted, and then analyzed by LC-MS/MS.
Materials used for standard calibration curve and concentration	Reference Item Item name: APL-2 Lot number: 原薬ロットA 原薬ロットM* Supplier: [redacted] Internal Standard Item name: [redacted] Lot number: 原薬ロットP* Supplier: [redacted] APL-2 calibration curve solutions were prepared at concentrations of free drug, corrected for purity, moisture content, residual solvents, and salt content when applicable. At least 2 independent weighings of stocks were required for the analysis. APL-2 substock was prepared at a solution concentration of 2 mg/mL. Calibration curve samples were prepared at the following concentrations: 0.100, 0.200, 0.400, 1.00, 2.00, 5.00, 9.00, 10.0 µg/mL
Validated assay range	0.100-10.0 µg/mL
Material used for quality controls (QCs) and concentration	APL-2 QC solutions were prepared at concentrations of free drug, corrected for purity, moisture content, residual solvents, and salt content when applicable. At least 2 independent weighings of stocks were required for the analysis. APL-2 QC substock was prepared at a solution concentration of 2 mg/mL. Quality control samples were prepared at the following concentrations: 0.300, 3.00, 8.00 µg/mL
Minimum required dilutions (MRDs)	N/A
Source and lot of reagents	N/A
Regression model and weighting	Quadratic (1/x2)

＊新薬承認情報提供時に置換

Validation parameters	Method validation summary		Source location
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	No of standard calibrators from LLOQ to ULOQ	8	Table 2, ARAPL2F validation report
	Cumulative accuracy (bias) from LLOQ to ULOQ	–2.94% to 2.17%	Table 2, ARAPL2F validation report
	Cumulative precision (CV) from LLOQ to ULOQ	≤7.05%	Table 2, ARAPL2F validation report
Performance of QCs during accuracy and precision runs	Cumulative accuracy (bias) in 4 QCs	–4.85% to 3.86%	Table 5, ARAPL2F validation report
	Interbatch CV	≤8.67%	Table 5, ARAPL2F validation report
	Total error (TE)	N/A	
Selectivity & matrix effect	Selectivity was assessed in 6 different sources of human serum. The selectivity of the analyte from the internal standard in 6 of 6 individual serum lots were deemed acceptable. Matrix effects were tested in 6 individual lots of human serum (N = 1 replicate per lot) by spiking samples with the analyte and internal standard post extraction at theoretical concentrations of the low and high QC samples. A matrix factor (MF) was calculated for the analyte and internal standard for each replicate. The precision of the normalized MF values around the mean (CV) was 1.81% (low QC) and 3.28% (high QC) for each QC level, indicating that matrix effects were not significant.		Section 4.2, Section 4.8 and Table 9, ARAPL2F validation report
Interference & specificity	N/A		
Hemolysis effect	One 2% hemolyzed serum lot N = 3 replicates tested (%DevMF/CV) 7.00%/5.33% (low QC) 5.07%/2.32% (high QC) The matrix effects values (%DevMF) for the hemolyzed lots were within ±15% and precision was ≤15%, indicating that matrix effects are not in hemolyzed human serum.		Summary, Section 4.8, and Table 9, ARAPL2F validation report,
Lipemic effect	One lipemic serum lot (>300 mg/dL of triglycerides) N = 3 replicates tested (%DevMF/CV) 4.51%/5.36% (low QC) 14.3%/12.4% (high QC) The matrix effects values (%DevMF) for the lipemic lots were within ±15% and precision was ≤15%, indicating that matrix effects are not in hyperlipemic human serum.		Summary, Section 4.8, and Table 9 ARAPL2F validation report
Dilution linearity & hook effect	N/A		
Bench-top/process stability	21 hours		Summary, ARAPL2F validation report

Freeze-thaw stability	–20 °C: 3 cycles –70 °C: 3 cycles	Summary, ARAPL2F validation report
Long-term storage	Long-term freezer storage stability (–20°C): 339 days Long-term freezer storage stability (–70°C): 2114 days	Summary, ARAPL2F.A2 validation report,
Parallelism	N/A	
Carryover	Carryover was assessed by measuring analyte and internal standard response in extracted Bl/Bl samples injected immediately following the high calibration standards. Significant carryover (>20% of the mean peak response of the LLOQ standards) was observed in Run 32131_001, which is typical for the method. The carryover impact assessments suggested no negative impact on the samples as a result of injector carryover. Significant carryover (>5% of the mean peak response of the Bl/IS samples) was not observed for the internal standard.	Section 5.3, ARAPL2F.A1 validation report
Method performance in Study APL-CP0514		
Assay passing rate	5 of 7 (71%) of the total analytical runs met the prespecified acceptance criteria.	Table 1, APL-CP0514 Bioanalytical Report (31493)-QCV05-AQV01
Standard curve performance	Cumulative bias range: –1.39% to 1.34% Cumulative precision: ≤6.58% CV	Table 3, APL-CP0514 Bioanalytical Report (31493)-QCV05-AQV01
QC performance	Cumulative bias range: –6.15% to –4.83% Cumulative precision: ≤10.0% CV TE: N/A	Table 7, APL-CP0514 Bioanalytical Report (31493)-QCV05-AQV01
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was performed in ≥10% of study samples, and 20 of 23 (87%) of the samples met the prespecified criteria.	Section 7.3 and Table 6, POT-CP043014 BIOANALYTICAL REPORT (31728)-QCV04-QAV01
Study sample analysis/stability	Duration of matrix stability required: 113 days Duration of matrix stability established: 339 days	Summary, Section 9.1, 7.1, 7.2, 7.3; APL-CP0514 Bioanalytical Report (31493)-QCV05-AQV01
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	0.100, 0.200, 0.400, 1.00, 2.00, 5.00, 9.00, 10.0 µg/mL Cumulative accuracy (bias) from LLOQ to ULOQ –2.94% to 2.17% Cumulative precision (CV) from LLOQ to ULOQ ≤7.05%	Table 2, ARAPL2F validation report

Abbreviations: APL-2 = pegcetacoplan; Bl/Bl = control human serum blank samples; Bl/IS = blank samples with internal standards; CV = coefficient of variation; LC-MS/MS = liquid chromatography–tandem mass spectrometry; LLOQ = lower limit of quantitation; N/A = not applicable; ULOQ = upper limit of quantitation.
Note: Concentration data from impacted samples were removed for PK analysis.

表 2.7.1-8　血清中ペグセタコプラン濃度測定に用いた分析法（APL-CP0514 試験及び APL2-102 試験）

Bioanalytical method validation report name, amendments, and hyperlinks	Method Validation Report for the Determination of APL-2 in Human Serum (High Range) Using LC-MS/MS Method BPAPL2K M5.3.1.4.5-1 ARAPL2K MV Report M5.3.1.4.5-2 ARAPL2K MV Report - Amendment 1		
Method description	A method was previously validated for pegcetacoplan in human serum at a dynamic range of 0.100-10.0 µg/mL (ARAPL2F). A partial validation study was conducted to modify the dynamic range to 5.00-500 µg/mL and reported herein. The analyte (pegcetacoplan) and internal standard ([redacted]) were extracted from 50 µL of human serum by protein precipitation using acetonitrile. The supernatant was then diluted and analyzed by LC-MS/MS.		
Materials used for standard calibration curve and concentration	Reference Item Item name: APL-2 Lot number: 原薬ロットM* Supplier: [redacted] Internal Standard Item name: [redacted] Lot number: 原薬ロットP* Supplier: [redacted] APL-2 calibration curve solutions were prepared at concentrations of free drug, corrected for purity, moisture content, residual solvents, and salt content when applicable. At least 2 independent weighings of stocks were required for the analysis. APL-2 substock was prepared at a solution concentration of 10 mg/mL.		
Validated assay range	5.00-500 µg/mL		
Material used for quality controls (QCs) and concentration	APL-2 calibration curve solutions were prepared at concentrations of free drug, corrected for purity, moisture content, residual solvents, and salt content when applicable. At least 2 independent weighings of stocks were required for the analysis. APL-2 QC stock was prepared at a solution concentration of 400 µg/mL.		
Minimum required dilutions (MRDs)	N/A		
Source and lot of reagents	N/A		
Regression model and weighting	Quadratic (1/x2)		
Validation parameters	Method validation summary		Source location
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	No of standard calibrators from LLOQ to ULOQ	8	Table 2, ARAPL2K.A1 validation report
	Cumulative accuracy (bias) from LLOQ to ULOQ	–3.10% to 3.96%	Table 2, ARAPL2K.A1 validation report
	Cumulative precision (CV) from LLOQ to ULOQ	≤9.07%	Table 2, ARAPL2K.A1 validation report

＊新薬承認情報提供時に置換

Performance of QCs during accuracy and precision runs	Cumulative accuracy (bias) in 4 QCs	–10.6% to 7.18%	Table 5, ARAPL2K.A1 validation report
	Interbatch CV	≤8.67	Table 5, ARAPL2K.A1 validation report
	Total error (TE)	N/A	
Selectivity & matrix effect	Selectivity was assessed in 6 different sources of human serum. The selectivity of the analyte from the internal standard in 6/6 individual serum lots were deemed acceptable. Matrix effects were tested in 6 individual lots of human serum (N = 1 replicate per lot) by spiking samples with the analyte and internal standard post extraction at theoretical concentrations of the low and high QC samples. A matrix factor (MF) was calculated for the analyte and internal standard for each replicate. The precision of the normalized MF values around the mean (CV) was 3.56% (low QC) and 3.13% (high QC) for each QC level, indicating that matrix effects were not significant.		Section 4.2, Section 4.6, and Table 6, ARAPL2K.A1 validation report
Interference & specificity	N/A		
Hemolysis effect	One 2% hemolyzed serum lot N = 3 replicates tested (%DevMF/CV) 2.81%/3.75% (Low QC) 1.59%/1.14% (High QC) The matrix effects values (%DevMF) for the hemolyzed lot was within ±15% and precision was ≤15% indicating that matrix effects are not in hemolyzed human serum.		Summary, Section 4.6, and Table 6, ARAPL2K.A1 validation report
Lipemic effect	One lipemic serum lot (>300 mg/dL of triglycerides) N = 3 replicates tested (%DevMF/CV) 6.07%/6.94% (Low QC) 2.67%/2.01% (High QC) The matrix effects values (%DevMF) for the lipemic lot was within ±15% and precision was ≤15% indicating that matrix effects are not in hemolyzed human serum.		Summary, Section 4.6, and Table 6, ARAPL2K.A1 validation report
Dilution linearity & hook effect	N/A		
Bench-top/process stability	Matrix stability (RT) 23 hours Extract Stability (RT) 77 hours		Summary, ARAPL2K.A1 validation report
Freeze-thaw stability	–20 °C: 4 cycles –70 °C: 4 cycles		Summary, ARAPL2K.A1 validation report
Long-term storage	Long-term freezer storage stability (–20 °C): 343 days Long-term freezer storage stability (–70 °C): 343 days		Summary, ARAPL2K.A1 validation report
Parallelism	N/A		

Carryover	Significant injector carryover (>20% of the mean peak response of the LLOQ standards) was not observed for the analyte in the extracted blank samples injected immediately following the high calibration standards in all primary validation batches. There were no quantifiable peaks at the retention times of the analyte in carryover assessment blank samples following the high calibration standard. Significant injector carryover (>5% of the mean peak response of the Bl/IS samples) was not observed for the internal standard in the extracted blank samples injected immediately following the high calibration standard. There were no detected peaks at the retention time of the internal standard in the carryover assessment blank samples.	Section 4.3, ARAPL2K.A1 validation report
Method performance in Study APL-CP0514		
Assay passing rate	19 of 22 (86%) of the total analytical runs met the prespecified acceptance criteria.	Table 1, APL-CP0514 Bioanalytical Report (31493)-QCV05-AQV01
Standard curve performance	Cumulative bias range: –1.26% to 0.93% Cumulative precision: ≤5.60% CV	Table 5, APL-CP0514 Bioanalytical Report (31493)-QCV05-AQV01
QC performance	Cumulative bias range: 2.58% to 5.25% Cumulative precision: ≤10.2% CV TE: N/A	Table 8, APL-CP0514 Bioanalytical Report (31493)-QCV05-AQV01
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was performed in >10% of study samples, and 26 of 31 (83.9%) of the samples met the prespecified criteria.	Section 9.4 and Table 12, APL-CP0514 Bioanalytical Report (31493)-QCV05-AQV01
Study sample analysis/stability	Duration of matrix stability required: 332 days Duration of matrix stability established: 343 days	Summary, Section 9.1, 7.1, 7.2, 7.3; APL-CP0514 Bioanalytical Report (31493)-QCV05-AQV01
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	5.00, 10.0, 20.0, 50.0, 100, 250, 450, 500 µg/mL Cumulative accuracy (bias) from LLOQ to ULOQ –3.10% to 3.96% Cumulative precision (CV) from LLOQ to ULOQ ≤9.07%	Table 2, ARAPL2K.A1 validation report

Method performance in Study APL2-102		
Assay passing rate	10 of 10 (100%) of the total analytical runs met the prespecified acceptance criteria.	Table 1, APL2-102 Bioanalytical Report (33009)-QCV04-QAV01
Standard curve performance	Cumulative bias range: –2.41% to 1.07% Cumulative precision: ≤4.67% CV	Table 3, APL2-102 Bioanalytical Report (33009)-QCV04-QAV01
QC performance	Cumulative bias range: 4.25% to 9.30% Cumulative precision: ≤5.25% CV TE: N/A	Table 5, APL2-102 Bioanalytical Report (33009)-QCV04-QAV01
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was performed in >10% of study samples, and 47/47 (100%) of the samples met the prespecified criteria.	Section 7.3 and Table 6, APL2-102 Bioanalytical Report (33009)-QCV04-QAV01
Study sample analysis/stability	Duration of matrix stability required: 64 days Duration of matrix stability established: 343 days	Section 7.1, APL2-102 Bioanalytical Report (33009)-QCV04-QAV01
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	5.00, 10.0, 20.0, 50.0, 100, 250, 450, 500 µg/mL Cumulative accuracy (bias) from LLOQ to ULOQ: –3.10% to 3.96% Cumulative precision (CV) from LLOQ to ULOQ: ≤9.07%	Table 2, ARAPL2K.A1 validation report

Abbreviations: APL-2 = pegcetacoplan; Bl/IS = blank samples with internal standards; CV = coefficient of variation; LC-MS/MS = liquid chromatography–tandem mass spectrometry; LLOQ = lower limit of quantitation; N/A = not applicable; ULOQ = upper limit of quantitation.
Note: Concentration data from impacted samples were removed for pharmacokinetic analysis.

表 2.7.1-9　血清中ペグセタコプラン濃度測定に用いた分析法（APL2-302 試験）

Bioanalytical method validation report name, amendments, and hyperlinks	Validation of an LC-MS/MS Assay for Determination of APL-2 in Human Serum Method ID: BAM.0484.01 Report ID: M5.3.1.4.3-1 BIO.VR.0210-1989.01 M5.3.1.4.3-1 BIO.VR.0210-1989.02 M5.3.1.4.3-1 BIO.VR.0210-1989.03 M5.3.1.4.3-2 BIO.VR.0210-1989.04 M5.3.1.4.3-3 BIO.VR.0210-1989.05
Method description	The analyte (pegcetacoplan) and internal standard ([redacted]) were extracted from 50 µL of human serum by protein precipitation using acetonitrile. The supernatant was then diluted and analyzed by LC-MS/MS.
Materials used for standard calibration curve and concentration	Reference Item Item name: APL-2 Lot number: 原薬ロットN* Supplier: [redacted] Internal Standard Item name: [redacted] Lot number: 原薬ロットP* Supplier: [redacted] Calibration standards (CSs) were prepared by diluting stock solutions with control matrix to make 1000, 900, 500, 200, 100, 40.0, 20.0, and 10.0 µg/mL pools.
Validated assay range	10.0-1000 µg/mL
Material used for quality controls (QCs) and concentration	Validation samples (VSs) were similarly prepared from separate stock solutions. Stock solutions were diluted in control matrix to create 750, 150, 30.0, and 10.0 µg/mL validation sample pools. The stock solutions were also diluted directly with serum to create an over-range validation sample pool at 2000 µg/mL.
Minimum required dilutions (MRDs)	N/A
Source and lot of reagents	N/A
Regression model and weighting	Linear, 1/x2 weighting

＊新薬承認情報提供時に置換

Validation parameters	Method validation summary		Source location
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	No. of standard calibrators from LLOQ to ULOQ	8	Table 3, BIO.VR.0210-1989.01, [redacted] method validation
	Cumulative accuracy (bias) from LLOQ to ULOQ	–2.2% to 2%	Table 3, BIO.VR.0210-1989.01, [redacted] method validation
	Cumulative precision (CV) from LLOQ to ULOQ	1.8% to 3.8%	Table 3, BIO.VR.0210-1989.01, [redacted] method validation
Performance of QCs during accuracy and precision runs	Cumulative accuracy (bias) in 4 QCs	–3.5% to 3%	Table 6, BIO.VR.0210-1989.01, [redacted] method validation
	Interbatch CV	2.6% to 5.9%	Table 6, BIO.VR.0210-1989.01, [redacted] method validation
	Total error (TE)	N/A	
Selectivity & matrix effect	Selectivity was assessed in 10 different sources of both healthy and disease state human serum. The results for both spiked and unspiked selectivity experiments met the acceptance criteria and demonstrate that the method is accurate in samples from multiple sources. Matrix effects were tested in 6 individual lots of human serum (N = 1 replicate per lot) by spiking samples with the analyte and internal standard post extraction at theoretical concentrations at the high and low end of the method range. A matrix factor (MF) was calculated for the analyte and internal standard for each replicate. The precision of the normalized MF values around the mean (CV) was 2.5% (low QC) and 3.5% (high QC), indicating that matrix effects were not significant.		Page 24, page 30, Table 8, Table 9, and Table 14, BIO.VR.0210-1989.01, [redacted] method validation Page 14, Table 5 and Table 6, BIO.VR.0210-1989.05, [redacted] method validation
Interference & specificity	Interference Assessments: Selectivity of the assay in the presence of potential over-the-counter (OTC) coadministered substances was assessed. Low and high validation samples (VSs) were prepared which also contained several drug substances at concentrations near the C_{max} for a typical dose. No interference was observed when tested with acetaminophen, acetylsalicylic acid, caffeine, pheniramine, dextromethorphan, diphenhydramine, ibuprofen, nicotine, phenylephrine, pseudoephedrine, and naproxen. The reported accuracy and precision met the 15.0% accuracy and precision acceptance criteria. Additional specificity and interference assessment were performed for the assay in the presence of a coadministered drug, MCA6103 Human Anti-C5 (eculizumab biosimilar). For the interference assessment, low and high VSs were prepared to contain the coadministered drug at a concentration near its C_{max} for a typical dose (270 µg/mL). For the coadministered specificity assessment, control matrix was also spiked to contain the coadministered drug at the same C_{max} concentration. The coadministered substances are deemed not to impact the assay specificity, accuracy, and precision up to the concentrations spiked in the VSs.		Page 36, Table 21 and 22, BIO.VR.0210-1989.01, [redacted] method validation; Page 13, Table 5, Table 6, and Table 7, BIO.VR.0210-1989.04 Pages 15 and 16, Table 7, Table 8, and Table 9, BIO.VR.0210-

	Interference assessment of samples containing elevated C3 protein serum levels (to mimic patient samples with this condition) was conducted. To mimic the desired condition, a final approximate C3 protein level of 5.0 mg/mL was achieved by adding concentrated C3 protein to normal human serum. Additionally, control matrix was spiked to contain the same C3 level and assayed. The results met the acceptance criteria. C3 protein is deemed not to impact the assay specificity, accuracy, and precision, up to ~5.0 mg/mL.	1989.05, [redacted] method validation
Hemolysis effect	Acceptable precision and accuracy (less than 15% CV and mean bias)	Table 10, BIO.VR.0210-1989.01, [redacted] method validation
Lipemic effect	Acceptable precision and accuracy (less than 15% CV and mean bias)	Table 11, BIO.VR.0210-1989.01, [redacted] method validation
Dilution linearity & hook effect	N/A	
Bench-top/process stability	At least 25 hours at room temperature	Table 15, BIO.VR.0210-1989.01, [redacted] method validation
Freeze-thaw stability	At least 4 cycles, at either –20 °C or –80 °C	Table 16, and Table 17, BIO.VR.0210-1989.01, [redacted] method validation
Long-term storage	At least 555 days at –20 °C and –80 °C	Summary Table, BIO.VR.0210-1989.02, [redacted] method validation
Parallelism	N/A	
Carryover	The carryover samples in all analytical runs met the acceptance criterion. No carryover result, expressed as a percentage of the LLOQ mean response, was greater than 5.4%.	Summary Table; Carryover, page 24; BIO.VR.0210-1989.01, [redacted] method validation
Method performance in Study APL2-302		
Assay passing rate	28/31 (90%) of the total analytical runs met the prespecified acceptance criteria.	Sample Analysis Summary, page 8, BIO.SR.022-2221.01
Standard curve performance	Cumulative bias range: –0.8% to 1.0% Cumulative precision: ≤4.4% CV	Table 2, BIO.SR.022-2221.01
QC performance	Cumulative bias range: –0.8% to 2.0% Cumulative precision: ≤15.6% CV TE: N/A	Table 5, APL2-BIO.SR.022-2221.01

Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was performed in at least 10% of study samples, and 57 of 57 (100%) of the samples met the prespecified criteria.	Table 9, BIO.SR.022-2221.01
Study sample analysis/stability	Duration of matrix stability required: 448 days Duration of matrix stability established: 555 days	Sample Analysis Summary, page 8; Method Description, page 12; Preparation of CS and VS/QC, page 13; BIO.SR.022-2221.01
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	10.0, 20.0, 40.0, 100, 200, 500, 900, 1000 µg/mL Cumulative accuracy (bias) from LLOQ to ULOQ –2.2% to 2% Cumulative precision (CV) from LLOQ to ULOQ 1.8% to 3.8%	Table 3, BIO.VR.0210-1989.01, [redacted] method validation

Abbreviations: APL-2 = pegcetacoplan; CV = coefficient of variation; LC-MS/MS = liquid chromatography–tandem mass spectrometry; LLOQ = lower limit of quantitation; N/A = not applicable; OTC = over-the-counter; ULOQ = upper limit of quantitation.
Note: Concentration data from impacted samples were removed for pharmacokinetic analysis.

表 2.7.1-10　血清中ペグセタコプラン濃度測定に用いた分析法（APL2-308 試験）

Bioanalytical method validation report name, amendments, and hyperlinks	HPLC/MS/MS Assay Validation for the Determination of APL-2 from Human Serum High Range Method ID: TM20-636 Report ID: M5.3.1.4.6 AV21-190 (AV20-APL2-02)		
Method description	The analyte (pegcetacoplan) and internal standard ([redacted]) were extracted from 25 µL of human serum by protein precipitation using methanol. The supernatant was then diluted and analyzed by LC-MS/MS.		
Materials used for standard calibration curve and concentration	Reference Item Item name: APL-2 Lot number: 原薬ロットO* Supplier: [redacted] Internal Standard Item name: [redacted] Lot number: 原薬ロットQ* Supplier: [redacted] Standard curve working solutions were prepared by spiking blank human serum on the day of analysis with the APL-2 intermediate working solution to yield standard concentrations of 10.0, 20.0, 40.0, 80.0, 200, 500, 900, and 1000 µg/mL.		
Validated assay range	10.0-1000 µg/mL		
Material used for quality controls (QCs) and concentration	QC samples were prepared by spiking blank human serum with the intermediate working solution to yield concentrations of 10.0, 30.0, 100, 800, and 1000 µg/mL		
Minimum required dilutions (MRDs)	N/A		
Source and lot of reagents	N/A		
Regression model and weighting	Linear, 1/x2 weighting		
Validation parameters	Method validation summary		Source location
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	No of standard calibrators from LLOQ to ULOQ	8	Table 3-1, AV20-APL2-02, [redacted] method validation
	Cumulative accuracy (bias) from LLOQ to ULOQ	–6.1% to 8.0%	Table 3-1, AV20-APL2-02, [redacted] method validation
	Cumulative precision (CV) from LLOQ to ULOQ	3.2% to 6.5%	Table 3-1, AV20-APL2-02 method validation

＊新薬承認情報提供時に置換

Performance of QCs during accuracy and precision runs	Cumulative accuracy (bias) in 5 QCs	–7.5% to 6.0%	Table 3-2, AV20-APL2-02, [redacted] method validation
	Interbatch CV	4.7% to 9.5%	Table 3-2, AV20-APL2-02, [redacted] method validation
	Total error (TE)	N/A	
Selectivity & matrix effect	Selectivity was assessed in 6 different sources of human serum. The results for both spiked and unspiked selectivity experiments met the acceptance criteria and demonstrate that the method is accurate in samples from multiple sources. Matrix effects were evaluated by analyzing n = 3 replicates of LQC and HQCs each prepared in different lots of commercially available human serum. In order for the matrix effects to be considered acceptable, the mean accuracy (bias) should be within 15.0% of the nominal concentration and the precision (CV) should be no greater than 15% in all individual matrix lots at each QC level. For APL-2 the bias was within 6.3% and the CV was within 6.7% at the LQC level and the bias was within 13.3% and the CV was within 4.4% at the HQC level.		Table 3-14 (selectivity),and Table 3-9 and Table 3-10 (matrix effects), AV20-APL2-02, [redacted] method validation
Interference & specificity	N/A		
Hemolysis effect	Acceptable precision and accuracy (less than 15% CV and mean bias)		Table 3-6, AV20-APL2-02, [redacted] method validation
Lipemic effect	Acceptable precision and accuracy (less than 15% CV and mean bias)		Table 3-7, AV20-APL2-02, [redacted] method validation
Dilution linearity & hook effect	N/A		
Bench-top/process stability	At least 6.3 hours at room temperature		Table 3-16, AV20-APL2-02, [redacted] method validation
Freeze-thaw stability	At least 4 cycles at –70°C		Table 3-17, AV20-APL2-02, [redacted] method validation
Long-term storage	At least 33 days at –70°C		Table 3-18, AV20-APL2-02, [redacted] method validation
Parallelism	N/A		
Carry over	The carryover analysis met the acceptance criteria of the double blank sample having an analyte peak area response less than or equal to 20% of the passing LLOQ curve point(s).		Table 3-15 AV20-APL2-02, [redacted] method validation

Method performance in Study APL2-308		
Assay passing rate	9/10 (90%) of the total analytical runs met the prespecified acceptance criteria.	Table 3-2, APL2-308 - AD21-1248 - [redacted]20[redacted]
Standard curve performance	Cumulative bias range: –5.0% to 4.6% Cumulative precision: ≤6.7% CV	Table 3-5, APL2-308 - AD21-1248 - [redacted]20[redacted]
QC performance	Cumulative bias range: –4.7% to 2.9% Cumulative precision: ≤9.0% CV TE: N/A	Table 3-6, APL2-308 - AD21-1248 - [redacted]20[redacted]
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis (ISR) was performed in batch 6 for 27 samples. Per SOP, two-thirds (66.7%) of the ISR samples must exhibit a difference of less than 20% from their respective original values to meet acceptance criteria, and 27 of 27 (100%) of the samples met this criteria.	Table 3-7, APL2-308 - AD21-1248 - [redacted]20[redacted]
Study sample analysis/stability	Duration of matrix stability required: 499 days Duration of matrix stability established: 33 days. This will be amended once adequate long term stability time is established. At our other bioanalytical labs matrix stability has been established at 2114 and 343 days at –70 °C and 776 and 555 days at –80 °C.	Page 14, APL2-308 - AD21-1248 - [redacted]20[redacted]
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	10.0, 20.0, 40.0, 80.0, 200, 500, 900, 1000 µg/mL Cumulative accuracy (bias) from LLOQ to ULOQ –6.1% to 8.0% Cumulative precision (CV) from LLOQ to ULOQ 3.2% to 6.5%	Table 3-1, AV20-APL2-02, [redacted] method validation

Abbreviations: APL-2 = pegcetacoplan; CV = coefficient of variation; HQC = high level quality control; LQC = low level quality control; LC-MS/MS = liquid chromatography–tandem mass spectrometry; LLOQ = lower limit of quantitation; N/A = not applicable; SOP = standard operating procedure; ULOQ = upper limit of quantitation.
Note: Concentration data from impacted samples were removed for pharmacokinetic analysis.

2.7.1.4.3　付録 3：分析法の変更及びクロスバリデーション結果の概要

表 2.7.1-11　分析法の変更及びクロスバリデーションの結果

Bioanalytical method validation report name and hyperlink	Cross-Validation of LC-MS/MS Assays for the Determination of APL-2 in Human Serum M5.3.1.4.7-1 BIO.VR.0210-2629.01, M5.3.1.4.7-2 BIO.VR.0210-2629.02		
Changes in method	N/A		
New validated assay range if any	N/A		
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	N/A	N/A
	Cumulative precision (CV) from LLOQ to ULOQ	N/A	N/A
Performance of QCs during accuracy and precision runs	Cumulative accuracy (bias) in 5 QCs	N/A	N/A
	Interbatch CV	N/A	N/A
	TE (percentage)	N/A	N/A
Cross-validation	This cross-validation was conducted in compliance with validation plan BIO.VLP.0210-2629 and its amendment BIO.VLP.0210-2629_A002. This body of work involved 4 bioanalytical laboratories ([redacted]). Each laboratory used its own previously validated method(s) to conduct the cross-validation and ran according to their local SOPs. This cross-validation sought to establish comparability across 6 different methods established at 4 different laboratories. It was conducted in 2 phases. In phase one, cross-validation QCs prepared at [redacted] were analyzed by all 6 methods and the intrarun and interrun precision and accuracy were determined for each sample. The interrun precision was within 8.9% (including Run 15) and 7.7% (excluding Run 15), and the interrun biases ranged from –1.4% to 2.8% (including Run 15) and –1.4 to 2.6% (excluding Run 15). This showed that all 6 methods measured these prepared samples accurately and comparably. Deming regression analysis between any pair of methods showed equivalence at the 90% confidence level for 3 of 20 pairs, with systematic differences in 10 of 20 pairs and proportional differences in 17 of 20 pairs. The second phase of the cross-validation was the analysis of incurred samples from those stored at [redacted]. This phase has limited statistical interpretation because of the small data set. However, at a 90% confidence level, Deming regression showed 7 of 12 method pairs to be equivalent and 5 of 12 method pairs to demonstrate some level of proportional or systematic inequality within the limits of this data set and confidence level. The reanalysis of the incurred samples was also compared with the originally reported nominal values through the use of a Bland-Altman analysis, including all 6 methods. This analysis still demonstrated a 0.997715 correlation between the original and reanalyzed concentrations. Furthermore, a histogram comparison of the percentage of similarities of the comparator methods to the nominals demonstrates both accuracy and precision within +15% of the nominal values. Although 5 incurred sample analyses failed to meet the a priori +15% sample bias criteria, the overall incurred sample data		BIO.VR.0210-2629.01, [redacted] method cross-validation BIO.VR.0210-2629.02, [redacted] method cross-validation

	set met the criteria of 67% incurred samples within +20% and all of the comparison analyses showed good method correlation. Therefore, it is concluded that these 6 methods are equivalent within the guidance criteria for bioanalysis.	
List other parameters	N/A	

Abbreviations: CV = coefficient of variation; LLOQ = lower limit of quantitation; N/A = not applicable; QC = quality control; TE = total error;
ULOQ = upper limit of quantitation.