サノフィ株式会社

efanesoctocog alfa

CTD 第二部－臨床概要

2.7.1 生物薬剤学及び関連する分析法の概要

Total number of pages: 71

目　　次

2.7.1 生物薬剤学及び関連する分析法の概要 1

目　　次 2

表 目 次 4

略号と用語の定義 6

1　　背景及び概観 7

1.1　　背景 7

1.2　　概観 7

1.2.1　　原薬及び製剤の分析学的同等性／同質性と製法変更の概要 8
1.2.1.1　　原薬 8
1.2.1.2　　製剤 8

1.2.2　　分析法の概要 9
1.2.2.1　　FVIII 活性測定法 11
1.2.2.2　　免疫原性の測定 12

2　　個々の試験結果の要約 14

2.1　　分析法 14

2.1.1　　FVIII 活性測定法—凝固一段法 14
2.1.1.1　　凝固一段法の概要 14
2.1.1.2　　血漿中FVIII活性測定のための凝固一段法—全試験の治験参加者のスクリーニングに使用(試験番号：VAL-20[redacted]001.001） 15
2.1.1.3　　Advate の FVIII 活性測定のための凝固一段法—242HA101 試験、242HA102 試験及び PKM17085 試験で使用（試験番号：VAL-20[redacted]003.001） 17
2.1.1.4　　Adynovi の FVIII 活性測定のための凝固一段法—PKM17085 試験で使用（試験番号：MVR-CT-20[redacted]002.001） 17
2.1.1.5　　BIVV001 の FVIII 活性測定のための凝固一段法—242HA101 試験及び 242HA102 試験で使用（試験番号：MVR-CT-20[redacted]007.002） 18
2.1.1.6　　BIVV001 の FVIII 活性測定のための凝固一段法—EFC16293 試験、EFC16295 試験、LTS16294 試験、PKM16978 試験及び PKM17085 試験で使用（試験番号：MVR-CT-20[redacted]008.001） 20

2.1.2 FVIII 活性測定法—発色合成基質法 23
2.1.2.1 FVIII 活性測定のための発色合成基質法—治験参加者のスクリーニング並びに 242HA101 試験及び 242HA102 試験での Advate の PK 評価に使用（試験番号：8306-942） 24
2.1.2.2 FVIII 活性測定のための発色合成基質法—242HA101 試験及び 242HA102 試験での BIVV001 の PK 評価に使用（試験番号：MVR-CT-20[redacted]-010.001） 26
2.1.2.3 FVIII 活性測定のための発色合成基質法—EFC16293 試験、EFC16295 試験及び LTS16294 試験での BIVV001 の PK 評価に使用（試験番号：MVR-CT-20[redacted]-001.001） 28
2.1.3 免疫原性測定法 31
2.1.3.1 FVIII インヒビターの測定 32
2.1.3.2 ヒト血漿中 ADA の測定 35

2.2 溶出試験 42

2.3 バイオアベイラビリティ及び生物学的同等性試験 42

3 全試験を通しての結果の比較と解析 43

3.1 製造方法変更に関連した分析学的試験 43

3.2 FVIII 活性測定法 43
3.2.1 初期の FVIII 活性測定法：凝固一段法 43
3.2.2 代替 FVIII 活性測定法：発色合成基質法 45
3.2.3 凝固一段法と発色合成基質法の比較 46
3.2.4 フィールド試験：BIVV001 の FVIII 活性評価における測定施設間のばらつき 46

3.3 免疫原性測定法 47

3.4 総括 47

4 参 考 文 献 49

5 補足情報 51

6 付録 55

表 目 次

表 1 - Bioanalytical assays employed for the BIVV001 clinical studies 10

表 2 - Summary of FVIII one-stage clotting activity assays and associated validation reports for the BIVV001 clinical studies 15

表 3 - Summary of validation results for determination of FVIII activity by one-stage clotting assay with plasma standard in human plasma 16

表 4 - Summary of validation results for determination of BIVV001 FVIII activity by one-stage clotting assay with BIVV001 product-specific self-standard in human plasma 19

表 5 - Summary of validation results for determination of BIVV001 and plasma FVIII activity by one-stage clotting assay with plasma standard in human plasma 21

表 6 - Summary of two-stage chromogenic substrate FVIII activity assays and associated validation reports for the BIVV001 clinical studies 24

表 7 - Summary of validation results for determination of FVIII activity (participant screening and Advate) by two-stage chromogenic substrate assay with plasma standard in human plasma 25

表 8 - Summary of validation results for determination of BIVV001 FVIII activity by two-stage chromogenic substrate assay with BIVV001 product-specific self-standard in human plasma 27

表 9 - Summary of validation results for determination of BIVV001 and plasma FVIII activity by two-stage chromogenic substrate assay with plasma standard in human plasma 30

表 10 - Summary of immunogenicity assays and associated validation reports for the BIVV001 clinical studies 32

表 11 - Summary of validation results for determination of inhibitors to FVIII by the Nijmegen modified Bethesda assay in human plasma 34

表 12 - Summary of validation results for detection of anti-BIVV001 antibodies in human plasma 36

表 13 - Summary of validation results for detection of anti-XTEN antibodies in human plasma 38

表 14 - Summary of validation results for detection of anti-D'D3 antibodies in human plasma 40

表 15 - Comparison of one-stage clotting assays for determination of BIVV001 FVIII activity by BIVV001 product-specific self-standard and plasma standard 44

表 16 - Comparison of one-stage clotting assays for determination of plasma FVIII activity and BIVV001 FVIII activity using plasma standard 45

表 17 - Overview on cell lines, manufacturing processes and formulations used in clinical studies 51

表 18 - Summary of bioanalytical studies associated with clinical studies 52

表 19 - Summary of incurred sample reanalysis conducted in clinical studies 54

表 20 - Summary of life cycle information of one-stage clotting assay used to measure BIVV001 FVIII activity in plasma 55

表 21 - Summary of life cycle information of chromogenic substrate assay used to measure BIVV001 FVIII activity in plasma 57

表 22 - Summary method performance of one-stage clotting assay with BIVV001 product-specific self-standard to measure BIVV001 FVIII activity in plasma in 242HA101 and 242HA102 studies 59

表 23 - Summary method performance of one-stage clotting assay with plasma standard to measure BIVV001 FVIII activity in plasma in EFC16293, EFC16295 and PKM17085 studies 62

表 24 - Summary method performance of chromogenic substrate assay with BIVV001 product-specific self-standard to measure BIVV001 FVIII activity in plasma in 242HA101 and 242HA102 studies 66

表 25 - Summary method performance of chromogenic substrate assay with plasma standard to measure BIVV001 FVIII activity in plasma in EFC16293 and EFC16295 studies 69

略号と用語の定義

ADA:	anti-BIVV001 antibody／抗 BIVV001 抗体
aPTT:	activated partial thromboplastin time／活性化部分トロンボプラスチン時間
BSA:	bovine serum albumin／ウシ血清アルブミン
BU:	Bethesda Unit／ベセスダ単位
ELISA:	enzyme-linked immunosorbent assay／酵素結合免疫吸着測定法
Fc:	fragment crystallizable domain of IgG1／結晶化可能フラグメント
FcRn:	neonatal Fc receptor／胎児型 Fc 受容体
FIXa:	activated coagulation factor IX／活性化血液凝固第 IX 因子
FVIII:	factor VIII／血液凝固第 VIII 因子
FVIIIa:	activated coagulation factor VIII／活性化第 VIII 因子
FX:	coagulation factor X／血液凝固第 X 因子
FXa:	activated coagulation factor X／活性化血液凝固第 X 因子
HRP:	horseradish peroxidase／西洋ワサビペルオキシダーゼ
IgG1:	immunoglobulin G1／免疫グロブリン G1
ISR:	incurred sample reanalysis
LLOQ:	lower limit of quantification／定量下限
MRD:	minimum required dilution／最小希釈倍率
PD:	pharmacodynamic(s)／薬力学
PK:	pharmacokinetic(s)／薬物動態
QC:	quality control
rFVIII:	recombinant FVIII／遺伝子組換え第 VIII 因子
TMB:	tetramethylbenzidine／テトラメチルベンジジン
ULOQ:	upper limit of quantitation／定量上限
VWF:	von Willebrand factor／フォンヴィレブランド因子
WHO:	World Health Organization／世界保健機関
XTEN:	unstructured hydrophilic polypeptide(s), composed of repeating motifs of 6 natural amino acids (G, A, P, E, S, T)／6 種類の天然アミノ酸（G、A、P、E、S、T）からなるモチーフの反復配列で構成される非構造親水性ポリペプチド

1　背景及び概観

1.1　背景

Efanesoctocog alfa（開発コード：BIVV001）は、遺伝子組換え第 VIII 因子 Fcーフォンヴィレブランド因子ーXTEN（rFVIIIFc-VWF-XTEN）の融合タンパク質で、新しいクラスの最初の血液凝固第 VIII 因子（FVIII）補充療法薬である。Efanesoctocog alfa は内因性 VWF の影響を受けないようにデザインされており、VWF に起因する半減期の上限に影響されず、週 1 回の投与で FVIII 活性を高く維持することができる。Efanesoctocog alfa は成人及び小児の血友病 A（FVIII 欠乏症）の治療のために開発されている。本モジュール及び治験総括報告書では efanesoctocog alfa を BIVV001 と表記する。

BIVV001 は、単鎖 B ドメイン除去ヒト FVIII、ヒト免疫グロブリン G1（IgG1）の結晶化可能フラグメント（Fc）ドメイン、ヒト VWF の FVIII 結合 D′D3 ドメイン及び 2 つの XTEN で構成されている。XTEN は天然アミノ酸のみで構成される非構造性ポリペプチドである。VWF の D′D3 ドメインは、FVIII と相互作用する領域である。VWF の D′D3 ドメインを rFVIII-Fc 融合タンパク質に付加することで、FVIII の保護と安定化をもたらし、さらには FVIII と内因性 VWF の相互作用を防ぐため、VWF の半減期（約 15～18 時間(1)）によって制約される FVIII の半減期の限界を克服している。BIVV001 の IgG1 の Fc 領域は胎児型 Fc 受容体（FcRn）に結合する。FcRn を介したリサイクル経路は、もともと生体に存在する経路で、免疫グロブリンを循環血中へリサイクルさせることにより、リソソームによる免疫グロブリンの分解を遅らせ、これにより融合タンパク質の血漿中半減期が延長する。BIVV001 の XTEN は本分子の流体力学的半径を変化させることによって融合タンパク質の半減期を延長し、クリアランスを低下させる(2)。このように、BIVV001 の各構成部分は血漿中の FVIII 分子の半減期を延長させるようにデザインされている(3) (Module 2.7.2 1.1 項)。

BIVV001 の臨床開発プログラムは、7 試験を含み、そのうち 6 試験は治療歴のある重症血友病 A 患者を、1 試験（PKM16978 試験）は 2N 型又は 3 型フォンヴィレブランド病患者を組み入れた（Module 2.7.2 [表 1]）。

BIVV001 の市販予定製剤は使い捨てのバイアルに充填された無菌の凍結乾燥製剤（力価 250～4000 IU/vial）で、プレフィルドシリンジで提供される 3 mL の注射用水に溶解して静脈内投与用注射液を調製する。

1.2　概観

本モジュールでは、異なるプロセスで製造された原薬及び製剤の分析学的同等性／同質性並びに BIVV001 の臨床試験で FVIII 活性及び免疫原性の評価に使用された測定法に関する情報を要約する。

1.2.1 原薬及び製剤の分析学的同等性／同質性と製法変更の概要

臨床試験で使用された BIVV001 の製剤の概要を以下に示す（表 17）。市販品には、第 3 相試験と同じ製造プロセスの原薬及び製剤を用いる予定である。分析学的同等性／同質性及び開発段階における製法変更の詳細を Module 3（原薬 Module 3.2.S.2.6、製剤 Module 3.2.P.2.3）に示す。

1.2.1.1 原薬

BIVV001 の原薬は、安定的に遺伝子導入した HEK293 細胞を用いて標準的な哺乳類細胞培養プロセスにより製造した。

臨床開発段階において、原薬の製造プロセスは変更された。

- Process BIVV001-A（[redacted]）は[redacted]の[redacted]で原薬を製造するもので、以下の臨床試験に使用された（DS part of Module 3 参照）：
  - 第 1/2a 相 242HA101 試験（TDU16220）
  - 第 1/2a 相 242HA102 試験（TDR16219）
- Process BIVV001-B（[redacted]）は Process BIVV001-A を部分的に変更し、[redacted]の[redacted]で原薬を製造するもので、以下の臨床試験に使用された：
  - 第 1 相 PKM17085 試験
  - 第 1 相 PKM16978 試験（進行中）
  - 第 3 相 EFC16293 試験（XTEND-1）
  - 第 3 相小児対象 EFC16295 試験（XTEND-Kids、進行中）
  - 第 3 相長期 LTS16294 試験（XTEND-ed、進行中）

Process BIVV001-B は[redacted]の[redacted]で、市販用原薬を製造するために用いられる予定である（Module 3.2.S.2.2 参照）。

臨床開発段階において細胞株は変更されなかった。BIVV001 の原薬バッチは、2017 年以降マスターセルバンクバイアル（MCB 22237C）又は MCB 22237C から製造されたワーキングセルバンクバイアルを用いて、Process BIVV001-B により製造された。

BIVV001 原薬は、約 1 mg/mL BIVV001、10 mmol/L L-ヒスチジン、250 mmol/L L-アルギニン塩酸塩、5w/v%精製白糖、5 mmol/L 塩化カルシウム及び 0.05w/v%ポリソルベート 80 を含有し、pH7.0 である。

1.2.1.2 製剤

臨床開発段階において、BIVV001 の製剤は 2 つのプロセスを用いて製造された（Module 3.2.P.2.3 参照）。

- BIVV001-A-001 は Process BIVV001-A で製造された原薬を使用し、1000 IU/vial の力価に調製された。このプロセスは以下の臨床試験に使用された：
  - 第 1/2a 相 242HA101 試験
  - 第 1/2a 相 242HA102 試験
- BIVV001-B-00X（Module 3.2.P.2.3 参照）は Process BIVV001-B で製造された原薬を使用し、250～4000 IU/vial の範囲で異なる力価の製剤が追加された。追加された力価の製剤は製剤中の BIVV001 濃度を変更することによって調製される。剤形、添加剤の濃度、充填量又は容器に関する他の変更はなかった。BIVV001-B-00X 製剤は以下の臨床試験に使用された：
  - 第 1 相 PKM17085 試験
  - 第 1 相 PKM16978 試験（進行中）
  - 第 3 相 EFC16293 試験（XTEND-1）
  - 第 3 相小児対象 EFC16295 試験（XTEND-Kids、進行中）
  - 第 3 相長期 LTS16294 試験（XTEND-ed、進行中）

市販製剤には BIVV001-B-00X を使用する予定である。

Process BIVV001-A-001 により製造された BIVV001 の製剤は、バイアル含有量を除き、Process BIVV001-B-00X により製造された製剤と同じ組成であった。BIVV001 の製造中に新たな添加剤は加えられなかった。そのため、製剤の製造プロセスの変更は製品の品質プロファイルに影響を与えない（Module 3.2.S.4.4 及び Module 3.2.P.5.4）。確認のため、本剤の出荷試験と特性解析試験の結果について BIVV001-A-001 と BIVV001-B-00X を比較したところ、バイアル力価にかかわらず同等であった。

BIVV001 の市販予定製剤（BIVV001-B-00X）は第 3 相試験で使用されたものと同じ無菌、凍結乾燥製剤で、溶解後静脈内投与に用いる。250～4000 IU/vial の様々な力価の無菌充填使い捨てバイアルで供給される。上述のように、凍結乾燥前の添加剤の組成は、全ての力価について同様である。投与用製剤はプレフィルドシリンジで提供される 3 mL の注射用水に溶解する（Module 3.2.P.1）。

BIVV001 の市販予定製剤は、90～1340 IU/mL の有効成分、10 mmol/L L-ヒスチジン、250 mmol/L L-アルギニン塩酸塩、5w/v%精製白糖、5 mmol/L 塩化カルシウム及び 0.05w/v%ポリソルベート 80 を含有し、pH7.0 である。有効成分の力価はバイアルに充填される量によって様々である。BIVV001 の製造プロセスによって調製される本剤のバイアル力価は次の 6 つである：(1) 250 IU、(2) 500 IU、(3) 1000 IU、(4) 2000 IU、(5) 3000 IU 及び(6) 4000 IU。

1.2.2 分析法の概要

第 1 相から第 3 相までの臨床試験における検体測定に使用された全ての測定法を 2.1 項に要約する。ガイドライン(4)(5)(6)(7)(8)に従って測定法をバリデートした。

下記の 2 つの評価のために測定法を開発し、バリデートした。

1. 血漿中 FVIII 活性（スクリーニング目的及び BIVV001 を含む様々な rFVIII 製剤の PK 評価）
2. 全ての FVIII に対する中和抗体（FVIII インヒビター）及び抗 BIVV001 抗体（ADA）の発現とその抗体価の評価を含む免疫原性

BIVV001 の臨床試験で使用された測定法の概要を表 1 に示す。これらの測定法を開発した根拠を以下に簡潔に記載する。

表 1 - Bioanalytical assays employed for the BIVV001 clinical studies

Assay purpose	Assay type	Analyte[a]	Assay standard	Clinical studies[b]
One-stage clotting (OSC) assays				
Screening	OSC	Plasma FVIII activity	Plasma standard[c]	All BIVV001 studies (242HA101, 242HA102, EFC16293, EFC16295, LTS16294, PKM16978, PKM17085)
PK	OSC	Advate® FVIII activity	Plasma standard[c]	242HA101, 242HA102, PKM17085
PK	OSC	Adynovi®/Adynovate® FVIII activity	Plasma standard[c]	PKM17085
PK	OSC	BIVV001 FVIII activity	BIVV001 self-standard[d]	242HA101, 242HA102
PK	OSC	BIVV001 FVIII activity	Plasma standard[c]	EFC16293, EFC16295, LTS16294, PKM16978, PKM17085
Chromogenic substrate (CS) assays				
Screening and PK	CS	Plasma FVIII activity and Advate FVIII activity	Plasma standard[c]	242HA101, 242HA102
PK	CS	BIVV001 FVIII activity	BIVV001 self-standard[d]	242HA101, 242HA102
PK	CS	BIVV001 FVIII activity	Plasma standard[c]	EFC16293, EFC16295, LTS16294
Nijmegen-modified Bethesda assay (neutralizing ADAs against FVIII)				
Immunogenicity	OSC	FVIII inhibitors	Plasma standard[c]	All BIVV001 studies (242HA101, 242HA102, EFC16293, EFC16295, LTS16294, PKM16978, PKM17085)

Assay purpose	Assay type	Analyte[a]	Assay standard	Clinical studies[b]
BIVV001 ADA assay				
Immunogenicity	ELISA	ADAs	N/A	All BIVV001 studies (242HA101, 242HA102, EFC16293, EFC16295, LTS16294, PKM16978, PKM17085)

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; CS = chromogenic substrate; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; FVIII = coagulation factor VIII; N/A = not applicable; OSC = one-stage clotting; PK = pharmacokinetic; WHO = World Health Organization.

a Advate is a recombinant full length FVIII (rFVIII) product; Adynovi is a PEGylated full length rFVIII product.

b For the ongoing PKM16978 study, no PK or BIVV001 ADA (other than inhibitor) data are presented in this dossier. For the ongoing LTS16294 study, no BIVV001 ADA (other than inhibitor) data are presented in this dossier.

c Plasma standard calibrated against WHO International Standard.

d Calibration curve was generated using BIVV001 product-specific self-standard.

1.2.2.1 FVIII 活性測定法

血液凝固系は恒常性維持に必須のカスケードであり、複数の酵素（凝固因子）の関与を必要とする。内因系及び外因系の2つの古典的な凝固カスケードが提唱されている。両系の始まりは別々であるが、途中で共通の経路を経て、フィブリンクロットの形成に至る。FVIII は内因系カスケードの一部であり、活性化第 VIII 因子（FVIIIa）は活性化血液凝固第 IX 因子（FIXa）（血液凝固第 X 因子［FX］から活性化血液凝固第 X 因子［FXa］への変換を促進する）のコファクターとして作用する。FVIIIa はリン脂質表面（一般に活性化血小板）の FIXa 及び FX（テナーゼ複合体）と相互作用することによって、FX の分解を促進する。

血友病 A は、主に *F8* 遺伝子の遺伝的欠乏による血漿中 FVIII 活性の定量的又は定性的欠乏によって引き起こされる。血友病 A の重症度は、FVIII 活性測定法により評価可能な残存内因性 FVIII 活性とよく相関する。一般的に FVIII 活性は血友病 A の FVIII 補充療法における薬物動態（PK）及び薬力学（PD）の評価のために用いられる。

内因性 FVIII 及び rFVIII の血漿中 FVIII 活性を評価するために、主に 2 つの測定法が用いられる：

- 活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）に基づく凝固一段法
- 発色合成基質法

凝固一段法は内因系カスケードの凝固活性を測定する。原則として、本法は、テナーゼ複合体の形成、プロトロンビンからトロンビンへの変換及びフィブリンクロットの形成を、内因系カスケードの人工的トリガー（aPTT 活性化剤）を用いて測定する。FVIII は内因系カスケードにおいて重要なコファクターであるため、aPTT に基づく凝固一段法は、臨床において FVIII 製剤の補充療法の治療を受けている患者の血漿検体中の FVIII 活性を測定するためによく使用される(9)。

凝固一段法は BIVV001 の臨床開発プログラムにおいて、FVIII 活性を測定するための主要な測定法である。BIVV001 の全ての臨床試験（第 1 相、第 1/2a 相及び第 3 相）では、[redacted]（現[redacted]）において、Clinical Laboratory Improvement Amendments（CLIA）で認定されたバリデート済みの凝固一段法（活性化剤は Actin FSL）を用いた（2.1.1 項）。基本的に凝固一段法の定量下限（LLOQ）は正常

FVIII 活性の 0.5%又は 1%である。これは治療時の FVIII 活性の最小閾値（正常 FVIII 活性の 1%）に近く、この値を下回ると自然出血のリスクが有意に増加する(10)。

血漿中 FVIII 活性測定の代替法は 2 段階の発色合成基質法である。発色合成基質法は、微量のトロンビンと過剰の FIXa、FX、Ca^{2+}及びリン脂質の存在下で、FVIIIa が仲介する FX から FXa への変換を定量する。第 1 段階では、希釈血漿検体中の FVIII がトロンビンによって定量的に FVIIIa へ活性化される。FVIIIa は、FIXa、FX、Ca^{2+}及びリン脂質の添加によって、FX から FXa の変換に関与する FIXa のコファクターとして作用する。第 2 段階では、FXa が発色合成基質を加水分解する。生成物（酵素的に遊離したパラニトロアニリン）の発色強度は FXa 量に直接比例し、同時に、血漿検体中の FVIII 量に比例する。凝固一段法と同様に、発色合成基質法は FVIII 補充療法における FVIII 活性をモニターするために使用される。

PKM17085 試験を除く全ての臨床試験（第 1 相、第 1/2a 相及び第 3 相）において、FVIII 活性の評価のために、主要な凝固一段法に加えて、[redacted]で CLIA 認定バリデート済みの BIOPHEN™ FVIII:C キットを用いた発色合成基質法を使用した。

第 1/2a 相試験（242HA101 試験及び 242HA102 試験）における FVIII 活性を測定するため、凝固一段法及び発色合成基質法の両方を、BIVV001 製剤を標準物質として用いて[redacted]でバリデートした。以後の血友病 A に対する全ての臨床試験（第 3 相試験及び PKM 試験）では、凝固一段法及び発色合成基質法の両方を FVIII の第 6 次又は第 8 次世界保健機関（WHO）国際標準品に基づいて較正した標準血漿を用いてバリデートした。標準物質の BIVV001 製剤から標準血漿への変更は、FVIII 補充療法の国際的な臨床評価にそろえたものである。

FVIII 活性測定法は以下のように要約される：

- ヒト血漿中 FVIII、Advate、Adynovi/Adynovate（以降は Adynovi と記載）及び BIVV001 の FVIII 活性を定量するための凝固一段法（2.1.1 項）
- ヒト血漿中 FVIII、Advate、Adynovi 及び BIVV001 の FVIII 活性を定量するための発色合成基質法（2.1.2 項）

臨床試験における FVIII 活性評価に加えて、世界の臨床検査施設における BIVV001 の FVIII 活性測定の性能を評価するため、国際的なフィールド試験を実施した。本試験では、薬物投与後の FVIII 活性の代用として種々の濃度の BIVV001 又は Advate を添加した FVIII 欠乏血漿中の FVIII 活性を、様々な aPTT 及び発色試薬並びに異なる装置を用いて測定した。この BIVV001 又は Advate（対照薬）添加検体のブラインド測定の結果は 3.2.4 項に要約する。詳細な結果は Module 5.3.1.4 [PMH0205]に示す。

1.2.2.2 免疫原性の測定

BIVV001 は rFVIII であるため、治療において、ADA の産生を含む免疫反応のトリガーとなる可能性がある。FVIII 補充製剤に対する抗体は中和抗体（FVIII インヒビター）と非中和抗体に分類される。

中和抗体（FVIII インヒビター）測定法は、FVIII の機能的エピトープに結合して FVIII のコファクター活性を阻害する中和抗体を検出及び定量するために使用される(11)(12)。FVIII インヒビターの測

定は、血友病 A における治療法の選択及び FVIII インヒビターをもつ患者の免疫寛容導入療法の管理のために、臨床上重要である。FVIII 製剤の投与（出血時補充療法又は定期補充療法）によって、治療歴のない重症血友病患者の約 1/3 にインヒビターの発現が認められ、そのリスクは FVIII 製剤の最初の 20～30 曝露日数で最大と考えられる(13)。それに対して、治療歴のある患者におけるインヒビター発現のリスクは低く、1000 人・年あたり 3 件（95%信頼区間＝2～4）の頻度と推定される(14)。FVIII インヒビターの測定は、BIVV001 を含む新たな FVIII 製剤の臨床開発において重要な安全性評価項目である(15)。

FVIII インヒビター測定は、外部ソースの凝固因子（例えば正常プール血漿）と FVIII インヒビターを含む可能性のある患者血漿を混合し、FVIII 活性の低下を測定する。本法は血漿検体中の FVIII を不活化するため、あらかじめ検体を加熱する。対照として、患者血漿の代わりに FVIII インヒビターを含まないコントロール血漿を測定した。インキュベート後、混合液中の残存 FVIII 活性を aPTT に基づく凝固一段法により測定した。残存 FVIII 活性はコントロール検体に対する測定検体の FVIII 活性の相対パーセントとして定義される。Bethesda 法の Nijmegen 変法は International Society on Thrombosis and Haemostasis により FVIII インヒビター測定法として推奨されている。1 ベセスダ単位（BU）は検体中の FVIII 活性を 50%低下させるインヒビター量として定義される(16)。

FVIII インヒビター（中和抗体）に加えて、BIVV001 に対する免疫反応によって非中和抗体が産生する可能性がある。両タイプの ADA は、薬物に特異的に結合する血清又は血漿中の免疫グロブリンを検出する酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）によって評価することができる。BIVV001 の臨床試験で使用された ADA 測定法は、BIVV001 に対して反応する全ての免疫グロブリンを検出するようにデザインされたブリッジングアッセイである。検出される免疫グロブリンには、BIVV001 分子の構成部分（FVIII、Fc、XTEN 又は D′D3）に特異的な抗体が含まれる可能性がある。

BIVV001 の免疫原性測定法は以下のように要約される：

- FVIII インヒビター測定法：FVIII に対するインヒビター力価を測定するための Bethesda 法の Nijmegen 変法（2.1.3.1.1 項）
- ADA 測定法：ヒト血漿中の ADA を検出するブリッジング ELISA で、スクリーニング及び確認試験並びに抗体価測定を含む。ADA が陽性であった検体は FVIII、Fc（2.1.3.2.1 項）、XTEN（2.1.3.2.2 項）及び D′D3（2.1.3.2.3 項）に対する特異性を確認した。

2　個々の試験結果の要約

2.1　分析法

BIVV001 の臨床試験で使用された全ての分析法を本項に要約する。これらの測定法は第 1 相試験から第 3 相試験における PK 及び PD 並びに免疫原性評価のための検体測定に使用された。Incurred sample reanalysis（ISR）及び検体の安定性に関する詳細も本項に記載する。各測定法の性能は Module 5.3.1.4 の測定法バリデーション報告書に、臨床試験における測定報告書は対応する治験総括報告書の appendix に示す。

2.1.1　FVIII 活性測定法—凝固一段法

2.1.1.1　凝固一段法の概要

aPTT に基づく凝固一段法は内因系凝固カスケードの凝固活性を測定する。測定法の原理は FVIII 欠乏血漿に対する FVIII 製剤による凝固時間の延長の程度を測定するものである。FVIII 欠乏血漿に検体血漿及び aPTT 試薬を添加して混合後、3～5 分間インキュベートする。この間、血液凝固第 XI 因子が活性化される。更に混合液にカルシウムを添加することによって、凝固系が活性化される。カルシウム添加からフィブリン形成までの時間を記録する。これには aPTT 試薬（活性化剤）及び FVIII 力価に応じて 40～140 秒を要する。標準血漿の希釈系列の凝固時間をプロットすることにより作成した検量線に対して検体の凝固時間を比較することにより、FVIII 凝固活性を測定した。

BIVV001 の試験では、Dade Actin FSL の aPTT 試薬を用い、Siemens BCS XP analyzer（Siemens Healthcare Diagnostics）によって FVIII 活性を測定した。検量線は高濃度（0.050～1.500 IU/mL）及び低濃度（0.0025～0.150 IU/mL）の 2 種を用いた。高濃度検量線には 1%ウシ血清アルブミン（BSA）を含むトリス緩衝液、低濃度検量線には免疫除去を行った FVIII 欠乏血漿（FVIII 活性は 0.01 IU/mL 未満、他の因子は少なくとも 0.75 IU/mL、VWF は 30%超）を、それぞれ用いて正常ヒト血漿を希釈し、それぞれの検量線を作成した。全ての他の因子を標準化するため、試験試料、quality control（QC）試料及び被験者検体を FVIII 免疫除去血漿と混合した。aPTT 試薬を添加して混合後、インキュベートした。インキュベーション後、塩化カルシウムを添加して混合後、凝固時間を光学測定し、検量線と比較した。FVIII 活性を X 軸に、凝固時間を Y 軸にプロットして検量線を作成した。

バリデート済みの測定法は、ヒト血漿中 rFVIII 製剤（Advate、Adynovi 及び BIVV001）のスクリーニング及び PK 評価に使用した。BIVV001 の測定法は、第 1 相及び第 2 相試験のために BIVV001 製剤、他の全ての試験のために WHO 国際標準品により較正した標準血漿を、それぞれ標準物質として用いてバリデートした。

BIVV001 の臨床試験で使用された凝固一段法の概要及びバリデーション報告書を表 2 に示す。

表 2 - Summary of FVIII one-stage clotting activity assays and associated validation reports for the BIVV001 clinical studies

Analyte	Assay standard	Clinical studies	Range	Validation report	Provider
Plasma FVIII activity	Plasma standard[a]	All BIVV001 studies (participant screening)	0.005 to 5.968 IU/mL	VAL-20[redacted]-001.001	[redacted] ([redacted])
Advate FVIII activity	Plasma standard[a]	242HA101, 242HA102, PKM17085	0.005 to 5.968 IU/mL	VAL-20[redacted]-003.001	[redacted] ([redacted])
Adynovi FVIII activity	Plasma standard[a]	PKM17085	0.006 to 3.000 IU/mL	MVR-CT-20[redacted]-002.001	[redacted] ([redacted])
BIVV001 FVIII activity	BIVV001 self-standard[b]	242HA101, 242HA102	0.010 to 6.000 IU/mL	MVR-CT-20[redacted]-007.002	[redacted] ([redacted])
BIVV001 FVIII activity	Plasma standard[a]	EFC16293, EFC16295, LTS16294, PKM16978[c], PKM17085	0.010 to 6.000 IU/mL	MVR-CT-20[redacted]-008.001	[redacted] ([redacted])

Advate is a recombinant full length FVIII (rFVIII) product; Adynovi is a PEGylated full length rFVIII product.
a Plasma standard calibrated against WHO 6th International Standard.
b Calibration curve was generated using BIVV001 product-specific self-standard.
c For the ongoing PKM16978 study, no PK data are presented in this dossier.

2.1.1.2 血漿中 FVIII 活性測定のための凝固一段法—全試験の治験参加者のスクリーニングに使用（試験番号：VAL-20[redacted]-001.001）

目的及び方法：本試験の目的は、治験参加者のスクリーニングのための血漿中 FVIII 活性（内因性又は血漿成分由来）測定法をバリデートすることであった。標準物質として FVIII の WHO 国際標準品により較正した標準血漿を用いた。Siemens BCS XP coagulation analyzer を用いて bioanalytical method validation guidelines に従ってバリデートした。同様の方法は、rFVIII 補充療法製剤である Advate 及び Advnovi（2.1.1.3 項及び 2.1.1.4 項）の FVIII 活性の測定にも用いられた。測定法の概要を 2.1.1.1 項に示す。

この凝固一段法では、それぞれ 6 ポイントからなる高濃度及び低濃度検量線を作成した。検量線は二重測定した。高濃度及び低濃度検量線は log-linear カーブフィッティングによって作成した。おおむね、被験者検体は、はじめに高濃度検量線測定用試料（1% BSA 添加トリス緩衝液を用いて 1:2、1:4 及び 1:8 の割合で希釈）を調製して測定し、必要な場合は更に低濃度検量線測定用試料（無希釈並びに 1% BSA 添加トリス緩衝液を用いて 1:2 及び 1:4 の割合で希釈）を調製して測定した。

結果：本測定法は、分析単位内及び分析単位間の真度及び精度、ベンチトップ安定性、凍結融解安定性並びに血漿中 FVIII を含む検体の長期保存安定性についてバリデートされた。本測定法は、最も

低濃度の FVIII を含む検体（0.005 IU/mL）を十分正確に測定できると考えられ、LLOQ を 0.005 IU/mL に設定した。測定範囲は 0.005～5.968 IU/mL であった。分析単位内及び分析単位間の真度及び精度、感度並びに測定範囲は満足できるものであった。全ての評価項目が判定基準を満たした。本測定法の性能（安定性を含む）を表 3 に示す。本測定法を用いた大部分の検体が LLOQ 未満又は付近であったため、ISR は実施しなかった。

表 3 - Summary of validation results for determination of FVIII activity by one-stage clotting assay with plasma standard in human plasma

Method validation items	Description		
Type of assay	One-stage clotting assay		
Instrument	Siemens BCS XP coagulation analyzer (optical clot detection)		
aPTT reagent	Siemens Actin FSL (ellagic acid activator)		
Standard	Normal Reference Plasma (Precision BioLogic Inc.) with %FVIII assigned against WHO 6th international plasma standard		
Species	Human		
Biological matrix	Plasma (sodium citrate)		
Quantitative range in biological matrix			
Minimum nominal activity	0.005 IU/mL for plasma FVIII and Advate, 0.006 IU/mL for Adynovi in 100% plasma		
Maximum nominal activity	1.5 IU/mL in 100% plasma (highest calibrator)		
Reportable assay range	0.005 to 5.968 IU/mL in 100% plasma (plasma FVIII and Advate), and 0.006 to 3.000 IU/mL in 100% plasma (Adynovi)		
	Plasma FVIII activity	**Advate FVIII activity**	**Adynovi FVIII activity**
Intra-assay precision (%CV)	4.1% to 11.6%	3.7% to 8.6%	0.0% to 18.7%
Inter-assay precision (%CV)	0.7% to 6.5%	3.0% to 6.9%	3.6% to 10.1%
Accuracy (versus nominal)	92.0% to 105.0%	101.6% to 116.0%	87.9% to 119.3%
Acceptance criteria for standards	5 of 6 back-fit calibrator values on high curve and 4 of 5 on low curve (excluding anchor point), must be within 15% of their nominal concentration (20% at LLOQ and ULOQ); the correlation coefficient (R2) of the calibration curve must be ≥0.99		
Acceptance criteria for QC samples	Duplicate control results must be within ±15%; at least 67% of control results must be within 15% of their nominal value		
Dilution linearity	Pass (±15% of target for 1:4 on-instrument dilutions) for plasma FVIII, Advate, and Adynovi		
Interference	No interference from icterus, lipemia and hemolysis		

Method validation items	Description
Sample stability	
Short-term stability	Up to 6 hours at ambient (room) temperature
Cold block stability	Up to 6 hours at 4°C
Long-term stability	Up to 12 months at -70°C for plasma FVIII and Advate, up to 6 months at -70°C for Adynovi
F/T stability	3 F/T cycles

Abbreviations: aPTT = activated partial thromboplastin time; %CV = percent coefficient of variation; F/T = freeze/thaw; FVIII = coagulation factor VIII; LLOQ = lower limit of quantitation; QC = quality control; ULOQ = upper limit of quantitation; WHO = World Health Organization.
Advate is a recombinant full length FVIII (rFVIII) product; Adynovi is a PEGylated full length rFVIII product.
Source: [redacted] validation reports VAL-20[redacted]-001.001; VAL-20[redacted]-003.001; MVR-CT-20[redacted]-002.001.

2.1.1.3 Advate の FVIII 活性測定のための凝固一段法—242HA101 試験、242HA102 試験及び PKM17085 試験で使用（試験番号：VAL-20[redacted]-003.001）

目的及び方法：本試験の目的は、クエン酸ナトリウム添加ヒト血漿中 Advate の FVIII 活性測定法をバリデートすることであった。標準物質として FVIII の WHO 国際標準品により較正した標準血漿を用いた。本測定法は 242HA101 試験、242HA102 試験及び PKM17085 試験における被験者検体の測定に使用した。

Advate の FVIII 活性測定のための凝固一段法は、血漿中 FVIII 活性測定のための凝固一段法（測定法の詳細は 2.1.1.2 項）に基づいて構築し、バリデートした。

結果：本測定法は、分析単位内及び分析単位間の真度及び精度、ベンチトップ安定性、凍結融解安定性並びに血漿中 Advate の長期保存安定性についてバリデートされた。測定範囲は 0.005～5.968 IU/mL であった。本測定法の性能（安定性を含む）を表 3 に示す。

ISR：本測定法の ISR は PKM17085 試験の検体を用いて実施した。104 検体のうち、10 検体を用いて ISR を実施し、9 検体が判定基準を満たした（判定基準適合率 90%）。ISR の総合的な結果は判定基準を満たした。ISR のデータを表 19 に示す。

2.1.1.4 Adynovi の FVIII 活性測定のための凝固一段法—PKM17085 試験で使用（試験番号：MVR-CT-20[redacted]-002.001）

目的及び方法：本試験の目的は、クエン酸ナトリウム添加ヒト血漿中 Adynovi の FVIII 活性測定法をバリデートすることであった。標準物質として FVIII の WHO 国際標準品により較正した標準血漿を用いた。本測定法は PKM17085 試験における被験者検体の測定のみに使用した。

Adynovi の FVIII 活性測定のための凝固一段法は、血漿中 FVIII 活性測定のための凝固一段法（測定法の詳細は 2.1.1.2 項）に基づいて構築し、バリデートした。

結果：本測定法は、分析単位内及び分析単位間の真度及び精度、ベンチトップ安定性、凍結融解安定性並びに血漿中 Adynovi の長期保存安定性についてバリデートされた。測定範囲は 0.006～3.000 IU/mL であった。本測定法の性能を表 3 に示す。

ISR：本測定法の ISR は PKM17085 試験の検体を用いて実施した。130 検体のうち、13 検体を用いて ISR を実施し、11 検体が判定基準を満たした（判定基準適合率 85%）。ISR の総合的な結果は判定基準を満たした。ISR のデータを表 19 に示す。

2.1.1.5 BIVV001 の FVIII 活性測定のための凝固一段法—242HA101 試験及び 242HA102 試験で使用（試験番号：MVR-CT-20[redacted]-007.002）

目的及び方法：本試験の目的は、クエン酸ナトリウム添加ヒト血漿中 BIVV001 の FVIII 活性測定法をバリデートすることであった。標準物質として BIVV001 製剤を用いた。本測定法は血漿中 FVIII 活性測定のための凝固一段法（2.1.1.2 項）に基づいて構築及びバリデートし、242HA101 試験及び 242HA102 試験における被験者検体の測定に使用した。測定法の概要を 2.1.1.1 項に示す。

BIVV001 の凝固一段法では、BIVV001 製剤の表示力価に基づいてそれぞれ 7 ポイントの高濃度及び低濃度検量線を作成した。高濃度検量線（0.050～1.500 IU/mL）は、既定の FVIII 活性に調製した検量線用標準試料を、BSA 添加トリス緩衝液により 1:2 の割合で希釈して測定した。低濃度検量線（0.0025～0.150 IU/mL）は、1.0 IU/mL の BIVV001 検量線用標準試料を、BCS XP analyzer を用いて免疫除去後の FVIII 欠乏血漿（Siemens Healthcare Diagnostics）により希釈し、測定した。濃度測定は二重測定で実施した。高濃度及び低濃度検量線は log-linear カーブフィッティングによって作成した。

検体は、最初の測定値が 0.100 IU/mL よりも高いか低いかによって、高濃度検量線測定用試料（BSA 添加トリス緩衝液により 1:2、1:4 及び 1:8 の割合で希釈）又は低濃度検量線測定用試料（無希釈並びに免疫除去後の FVIII 欠乏血漿により 1:2 及び 1:4 の割合で希釈）のいずれかを調製した。希釈検体を調製後、全ての検量線用標準試料、被験者検体及び QC 試料を免疫除去後の FVIII 欠乏血漿と 1:1 の割合で混合した。aPTT 試薬（Dade Actin FSL）を添加して混合後、インキュベートした。インキュベーション後、塩化カルシウムを添加し、凝固時間を光学的に測定した。各希釈検体の測定値が平均値の±15%である場合に、その平均値を FVIII 活性の報告値とした。LLOQ 付近を除き、報告値の算出には少なくとも 2 つの希釈系列の測定値が必要であった。

結果：本測定法は、BIVV001 製剤を標準物質として用いた凝固一段法であり、ヒト血漿中の FVIII 活性の定量が可能である。分析単位内及び分析単位間の真度及び精度、感度並びに測定範囲は満足できるものであった。評価した全てのパラメータは判定基準を満たした。LLOQ、定量上限（ULOQ）、希釈直線性、キャリーオーバー、選択性（妨害）及び安定性の評価結果を表 4 に示す。

表 4 - Summary of validation results for determination of BIVV001 FVIII activity by one-stage clotting assay with BIVV001 product-specific self-standard in human plasma

Method validation items	Description	
Type of assay	One-stage clotting assay	
Instrument	Siemens BCS XP coagulation analyzer (optical clot detection)	
aPTT reagent	Dade Actin FSL, Siemens Healthcare Diagnostics	
Standard	BIVV001 self-standard[a]	
Species	Human	
Biological matrix	Plasma (sodium citrate)	
Quantitative range in biological matrix		
Minimum nominal activity	0.010 IU/mL in 100% plasma	
Maximum nominal activity	1.5 IU/mL in 100% plasma (highest calibrator)	
Reportable assay range	0.010 to 6.000 IU/mL in 100% plasma	
Acceptance criteria for standards	6 of 7 back-fit calibrator values on high curve and 5 of 6 on low curve (excluding anchor point), must be within 20% of their nominal concentration (25% at LLOQ and ULOQ); the correlation coefficient (R2) of the calibration curve must be ≥0.99	
Acceptance criteria for QC samples	Duplicate control results must be within ±15%; at least 67% of control results must be within 20% of their nominal value	
Precision	**Intra-assay precision (%CV)**	**Inter-assay precision (%CV)**
HV-1 (2.500 IU/mL)	0.5% to 4.8%	4.2%
HV-2 (1.200 IU/mL)	1.9% to 4.7%	3.6%
HV-3 (0.600 IU/mL)	2.7% to 8.6%	6.2%
HV-4 (0.250 IU/mL)	0.2% to 11.5%	7.7%
LV-1 (0.120 IU/mL)	2.2% to 5.4%	4.4%
LV-2 (0.075 IU/mL)	3.0% to 7.8%	4.8%
LV-3 (0.010 IU/mL)	3.0% to 6.6%	6.7%
Accuracy	**Intra-assay accuracy (%RE)**	**Inter-assay accuracy (%RE)**
HV-1 (2.500 IU/mL)	-2.6% to 7.3%	1.7%
HV-2 (1.200 IU/mL)	4.0% to 11.0%	7.4%
HV-3 (0.600 IU/mL)	3.6% to 16.1%	11.6%
HV-4 (0.250 IU/mL)	2.9% to 18.1%	11.8%
LV-1 (0.120 IU/mL)	8.2% to 16.8%	12.6%
LV-2 (0.075 IU/mL)	9.3% to 15.7%	12.0%
LV-3 (0.010 IU/mL)	12.0% to 32.0%[b]	19.0%

Method validation items	Description
Dilution linearity	Pass (±15% of target for 1:4 on-instrument dilutions)
Carryover	Pass
Selectivity	Pass
Assay interference	Pass for samples containing 20 mg/dL bilirubin (icterus); 700 mg/dL triglycerides (lipemia); and grade 4 hemolysis (hemolysis)
Sample stability	
Short-term stability	Up to 24 hours at ambient (room) temperature
Cold block stability	Up to 6 hours at 2 to 8°C
Long-term stability	Up to 37 months at -70°C
F/T stability	Up to 3 F/T cycles

Abbreviations: aPTT = activated partial thromboplastin time; %CV = percent coefficient of variation; F/T = freeze/thaw; FVIII = coagulation factor VIII; HV = high validator; LV = how validator; LLOQ = lower limit of quantitation; QC = quality control; %RE = percent relative error; ULOQ = upper limit of quantitation.

a Calibration curve was generated using BIVV001 product-specific self-standard.

b Intra-assay accuracy fell outside the acceptance criteria for LV-3 in one run. Intra-assay accuracy was acceptable in six other accuracy and precision assay runs.

Source: [redacted] validation data report MVR-CT-20[redacted]-007.002.

2.1.1.6 BIVV001 の FVIII 活性測定のための凝固一段法—EFC16293 試験、EFC16295 試験、LTS16294 試験、PKM16978 試験及び PKM17085 試験で使用（試験番号：MVR-CT-20[redacted]-008.001）

目的及び方法：本試験の目的は、クエン酸ナトリウム添加ヒト血漿中 BIVV001 の FVIII 活性測定法をバリデートすることであった。標準物質として FVIII の WHO 国際標準品により較正した標準血漿を用いた。本測定法は第 3 相試験（EFC16293 試験、EFC16295 試験及び LTS16294 試験）及び第 1 相試験（PKM16978 試験及び PKM17075 試験）の検体を測定するために使用した。本測定法は、BIVV001 製剤を標準物質として用いた BIVV001 の FVIII 活性測定のための凝固一段法（2.1.1.5 項）に基づいて構築及びバリデートした。測定法の概要を 2.1.1.1 項に示す。

本測定法では、ヒト標準血漿（Siemens Healthcare Diagnostics）を用いてそれぞれ 7 ポイントの高濃度及び低濃度検量線を作成した。検体は、最初の測定値が 0.250 IU/mL よりも高いか低いかによって、高濃度検量線測定用試料（BSA 添加トリス緩衝液により 1:2、1:4 及び 1:8 の割合で希釈）又は低濃度検量線測定用試料（無希釈並びに免疫除去後の FVIII 欠乏血漿により 1:2 及び 1:4 の割合で希釈）のいずれかを調製して測定した。

結果：本測定法により、ヒト血漿中 BIVV001 の FVIII 活性の定量が可能である。分析単位内及び分析単位間の真度及び精度、感度並びに測定範囲は満足できるものであった。評価した全てのパラメータは判定基準を満たした。LLOQ、ULOQ、真度、精度、選択性及び妨害などの主要なパラメータを表 5 に示す。BIVV001 の安定性は、評価済み（2.1.1.5 項）であるため、本試験では評価しなかった。本測定法は、血漿中 FVIII 活性測定のためにもバリデートされた。分析単位内及び分析単位間の真度及び

精度、感度並びに測定範囲は満足できるものであった。安定性を含む評価した全てのパラメータは判定基準を満たした（表 5）。

ISR：本測定法の ISR は EFC16293 試験及び PKM17085 試験の検体を用いて実施した。PKM17085 試験の 198 検体のうち、21 検体を用いて ISR を実施し、21 検体が判定基準を満たした（判定基準適合率 100%）。EFC16293 試験の 2625 検体のうち、198 検体を用いて ISR を実施し、192 検体が判定基準を満たした（判定基準適合率 97%）。ISR の総合的な結果は判定基準を満たした。ISR のデータを表 19 に示す。

表 5 - Summary of validation results for determination of BIVV001 and plasma FVIII activity by one-stage clotting assay with plasma standard in human plasma

Method validation items	**Description**			
Type of assay	One-stage clotting assay			
Instrument	Siemens BCS XP coagulation analyzer (optical clot detection)			
aPTT reagent	Dade Actin FSL, Siemens Healthcare Diagnostics			
Standard	Standard human plasma (Siemens Healthcare Diagnostics), with %FVIII assigned against WHO 6th plasma international standard (IS)			
Species	Human			
Biological matrix	Plasma (sodium citrate)			
Quantitative range in biological matrix				
	BIVV001 FVIII activity		**Plasma FVIII activity**	
FVIII source	BIVV001		CRYOcheck™ Pooled Normal Plasma	
Minimum nominal activity	0.010 IU/mL in 100% plasma		0.010 IU/mL in 100% plasma	
Maximum nominal activity	1.5 IU/mL in 100% plasma (highest calibrator)		0.993 IU/mL in 100% plasma (highest calibrator)	
Reportable assay range	0.010 to 6.000 IU/mL in 100% plasma		0.010 to 0.993 IU/mL in 100% plasma	
Intra-assay precision (%CV)	HV-1 (6.000 IU/mL)	0.9% to 6.8%	HV-5 (0.993 IU/mL)	3.3% to 6.9%
	HV-2 (1.200 IU/mL)	2.9% to 7.6%	HV-6 (0.497 IU/mL)	2.4% to 9.3%
	HV-3 (0.600 IU/mL)	2.5% to 5.4%	HV-7 (0.149 IU/mL)	3.7% to 7.5%
	HV-4 (0.250 IU/mL)	1.6% to 10.1%	LV-4 (0.119 IU/mL)	2.7% to 11.8%
	LV-1 (0.120 IU/mL)	3.2% to 10.3%	LV-5 (0.030 IU/mL)	2.9% to 7.8%
	LV-2 (0.030 IU/mL)	1.5% to 7.9%	LV-6 (0.010 IU/mL)	0.0% to 14.2%
	LV-3 (0.010 IU/mL)	4.7% to 17.6%		

Method validation items	Description			
Inter-assay precision (%CV)	HV-1 (6.000 IU/mL)	3.4%	HV-5 (0.993 IU/mL)	6.6%
	HV-2 (1.200 IU/mL)	5.3%	HV-6 (0.497 IU/mL)	8.0%
	HV-3 (0.600 IU/mL)	4.6%	HV-7 (0.149 IU/mL)	7.5%
	HV-4 (0.250 IU/mL)	6.8%	LV-4 (0.119 IU/mL)	7.9%
	LV-1 (0.120 IU/mL)	7.6%	LV-5 (0.030 IU/mL)	8.8%
	LV-2 (0.030 IU/mL)	7.0%	LV-6 (0.010 IU/mL)	11.2%
	LV-3 (0.010 IU/mL)	9.7%		
Intra-assay accuracy (%RE)	HV-1 (6.000 IU/mL)	-10.4% to -5.3%	HV-5 (0.993 IU/mL)	-10.7% to 1.9%
	HV-2 (1.200 IU/mL)	-8.5% to -3.6%	HV-6 (0.497 IU/mL)	-9.3% to 5.9%
	HV-3 (0.600 IU/mL)	3.6% to 11.5%	HV-7 (0.149 IU/mL)	-2.6% to 11.5%
	HV-4 (0.250 IU/mL)	13.0% to 21.6%	LV-4 (0.119 IU/mL)	-14.3% to 1.3%
	LV-1 (0.120 IU/mL)	-9.2% to -0.8%	LV-5 (0.030 IU/mL)	-20.0% to -2.0%
	LV-2 (0.030 IU/mL)	-17.3% to -5.3%	LV-6 (0.010 IU/mL)	-8.0% to 20.0%
	LV-3 (0.010 IU/mL)	-2.0% to 6.0%		
Inter-assay accuracy (%RE)	HV-1 (6.000 IU/mL)	-8.4%	HV-5 (0.993 IU/mL)	-5.9%
	HV-2 (1.200 IU/mL)	-5.3%	HV-6 (0.497 IU/mL)	-4.0%
	HV-3 (0.600 IU/mL)	8.4%	HV-7 (0.149 IU/mL)	4.6%
	HV-4 (0.250 IU/mL)	14.6%	LV-4 (0.119 IU/mL)	-5.4%
	LV-1 (0.120 IU/mL)	-4.0%	LV-5 (0.030 IU/mL)	-12.7%
	LV-2 (0.030 IU/mL)	-10.0%	LV-6 (0.010 IU/mL)	7.0%
	LV-3 (0.010 IU/mL)	3.0%		

Method validation items	Description
Acceptance criteria for standards	6 of 7 back-fit calibrator values on high curve and 5 of 6 on low curve (excluding anchor point), must be within 20% of their nominal concentration (25% at LLOQ and ULOQ); the correlation coefficient (R2) of the calibration curve must be ≥0.99
Acceptance criteria for QC samples	Duplicate control results must be within ±15%; at least 67% of control results must be within 20% of their nominal value
Selectivity	Pass
Dilution linearity	Pass
Assay interference	Pass for samples containing 20 mg/dL bilirubin (icterus); 700 mg/dL triglycerides (lipemia); and grade 4 hemolysis (hemolysis)
Sample stability[a]	
Short-term stability	Up to 24 hours at ambient (room) temperature
Cold block stability	Up to 6 hours at 2 to 8°C
Long-term stability	Up to 37 months at -70°C
F/T stability	Up to 3 F/T cycles

Abbreviation: aPTT = activated partial thromboplastin time; %CV = percent coefficient of variation; F/T = freeze/thaw; FVIII = coagulation factor VIII; HV = high validator; IS = international standard; LLOQ = lower limit of quantitation; LV = low validator; QC = quality control;
%RE = percent relative error; ULOQ = upper limit of quantitation.

a Sample stability was established on the validation study MVR-CT-20[redacted]-007.002 as the stability is independent of assay standard change. In addition, long-term stability (-70°C) was confirmed at up to 25 months by using plasma-standard assay.

Source: [redacted] validation report MVR-CT- 20[redacted]-008.001.

2.1.2 FVIII 活性測定法—発色合成基質法

2 段階の発色合成基質法は、FVIII 活性の測定法として、血友病 A 患者の診断及び FVIII の補充療法のモニタリングに使用した。第 1 段階で、検体を試薬及び基質（FIXa、FX、リン脂質、塩化カルシウム、プロトロンビン又はトロンビン）と混合し、これにより FX を FXa へ速やかに変換させる。第 2 段階で、FXa に特異的な発色合成基質を添加する。FXa は発色合成基質を加水分解し、その結果生じる生成物（パラニトロアニリンが酵素的に遊離する）の吸光度を測定した。吸光度は FXa の量に直接比例、すなわち試料中の FVIII の量に比例する。

2 段階の発色合成基質法は BIVV001 の臨床試験において PK 及び PD 評価のために使用した。本法の概要をバリデーション報告書とともに表 6 に示す。BIVV001 の発色合成基質法は、第 1/2a 相試験（242HA101 試験及び 242HA102 試験）のために BIVV001 製剤を標準物質として、第 3 相試験（EFC16293 試験、EFC16295 試験及び LTS16294 試験）のために FVIII の WHO 国際標準品により較正した標準血漿を標準物質として用いてバリデートした。

表 6 - Summary of two-stage chromogenic substrate FVIII activity assays and associated validation reports for the BIVV001 clinical studies

Analyte	Assay standard	Clinical studies	Range	Validation report	Provider
Plasma FVIII activity (participant screening) and Advate FVIII activity	Plasma standard[a]	242HA101, 242HA102	0.008 to 0.420 IU/mL	8306-942	[redacted]
BIVV001 FVIII activity	BIVV001 self-standard[b]	242HA101, 242HA102	0.010 to 2.500 IU/mL	MVR-CT-20[redacted]-010.001	[redacted]
BIVV001 FVIII activity	Plasma standard[c]	EFC16293, EFC16295, LTS16294	0.033 to 8.275 IU/mL	MVR-CT-20[redacted]-001.001	[redacted]

FVIII = coagulation factor VIII; WHO = World Health Organization.
Advate is a recombinant full length FVIII (rFVIII) product.
a Plasma calibrated against WHO 8th International Standard.
b Calibration curve was generated using BIVV001 product-specific self-standard.
c Plasma calibrated against WHO 6th International Standard.

2.1.2.1 FVIII活性測定のための発色合成基質法—治験参加者のスクリーニング並びに242HA101試験及び242HA102試験でのAdvateのPK評価に使用（試験番号：8306-942）

目的及び方法：本試験の目的はクエン酸ナトリウム添加ヒト血漿中のFVIII活性測定のための発色合成基質法をバリデートすることであった。標準物質としてFVIIIのWHO国際標準品により較正した標準血漿を用いた。本法は、第1/2a相試験（242HA101試験及び242HA102試験）において、治験参加者のスクリーニング及びAdvateのPK評価のために使用した。

BIOPHEN FVIII:CはFVIIIのコファクター活性を測定するための発色合成基質法である。一定量のFIXa、リン脂質及びCa^{2+}の存在下で、トロンビンにより活性化されたFVIIIは酵素複合体を形成し、過剰量の一定濃度で添加されたFXをFXaに活性化する。一定濃度で過剰量のFIXaの存在下ではFVIII量が制御因子となるため、この活性は直接FVIIIの量に相関する。生成されたFXaの活性はFXaに特異的な発色合成基質を用いて正確に測定される。FXaは基質を分解し、パラニトロアニリンを遊離させる。パラニトロアニリンの生成量は直接FXa活性に比例する。検体中のFVIII活性はFXa活性に直接相関し、FXa活性は遊離パラニトロアニリン量を405 nmの吸光度で測定することによって評価する。

本測定法は96ウェルプレートを用い、FXa活性による発色を405 nmの吸光度によって測定した。バックグラウンド（エンドポイント値）を超える吸光度の増加を検量線用標準試料中のFVIII理論濃度に対してプロットして検量線を作成し、測定試料中のFVIII活性を求めた。4-パラメータ回帰モデルを用いて検量線を作成した。

結果：本測定法により、標準血漿を用いたFVIII活性の定量が可能である。分析単位内及び分析単位間の真度及び精度、感度並びに測定範囲は満足できるものであった。評価した全てのパラメータは判定基準を満たした。LLOQ、ULOQ、真度、精度、選択性及び安定性の主要なパラメータを表7に示す。

ISR：治験参加者のスクリーニングに用いた発色合成基質法は、本測定法を用いて得られた測定値の大部分が LLOQ（0.008 IU/mL）未満又は付近であったため、ISR は実施しなかった。Advate の発色合成基質法の ISR は 242HA101 試験の検体を用いて実施した。218 検体のうち、25 検体を用いて ISR を実施し、23 検体が判定基準を満たした（判定基準適合率 92%）。ISR の総合的な結果は判定基準を満たした。ISR のデータを表 19 に示す。

表 7 - Summary of validation results for determination of FVIII activity (participant screening and Advate) by two-stage chromogenic substrate assay with plasma standard in human plasma

Method validation items	Description	
Type of assay	Chromogenic substrate assay	
Analyte	FVIII activity	
Biological matrix	Human FVIII-deficient citrated plasma (DefP)	
Calibrator	Pooled normal human plasma, potency verified versus WHO 8th International Standard	
Preservative	None	
Assay method number	ELISA-0611	
Assay volume required	500 µL (300 µL minimum)	
Validated range	0.008 to 0.42 IU/mL in 100% DefP (0.44 IU/mL in current method version with current PCS lot)	
Regression type	4-PL (4PL Marquardt)	
Assay selectivity	Assay selectivity was demonstrated for FVIII in FVIII-deficient human plasma.	
Assay specificity		
Potentially interfering substances	The results demonstrated no interference by lipemia. Potential interference from hemolysis was observed at all FVIII levels. Thawed plasma samples are visually evaluated on a relative hemolysis scale and samples with ≥70 mg/dL hemoglobin are noted on sample analysis worksheets but not rejected.	
Plasma FVIII dilution linearity	Dilution integrity was validated for plasma FVIII from 0.9 IU/mL up to a 64-fold dilution.	
Robustness	The results demonstrated that changes in equipment and analyst do not have a significant impact on the method.	
Intra-assay accuracy and precision	**Range %CV**	**%Bias (range)**
LLOQ (0.008 IU/mL)	4.2% to 22.7%	-9.7% to 44.5%
LQC (0.023 IU/mL)	5.2% to 9.3%	-5.2% to 14.5%
MQC (0.086 IU/mL)	3.9% to 12.3%	0.8% to 9.6%
HQC (0.334 IU/mL)	3.2% to 6.1%	3.9% to 13.3%
ULOQ (0.420 IU/mL)	2.9% to 7.9%	-1.8% to 9.1%

Method validation items	Description		
Inter-assay accuracy and precision	**%CV**	**%RE**	**%Total Error (%CV + %RE)**
LLOQ (0.008 IU/mL)	19.4%	10.4%	29.8%
LQC (0.023 IU/mL)	10.3%	7.9%	18.2%
MQC (0.086 IU/mL)	6.4%	4.6%	11.0%
HQC (0.334 IU/mL)	5.0%	7.5%	12.5%
ULOQ (0.420 IU/mL)	6.0%	2.5%	8.5%
Stability			
Long-Term Stability	Stability for plasma FVIII and QC samples was demonstrated to 48 months at -70°C ±10°C.		
Benchtop Stability	Benchtop stability was demonstrated for up to 2.5 hours on ice.		
F/T Stability	Up to 4 F/T cycles		

Abbreviations: %CV = percent coefficient of variation; %RE = percent of relative error; DefP = human FVIII-deficient citrated plasma; F/T = freeze/thaw; FVIII = coagulation factor VIII; HQC = high quality control; LLOQ = lower limit of quantitation; LQC = low quality control; MQC = medium quality control; PCS = plasma calibration standard; QC = quality control; ULOQ = upper limit of quantitation.
Source: Study 8306-942 Validation Report.

2.1.2.2 FVIII 活性測定のための発色合成基質法—242HA101 試験及び 242HA102 試験での BIVV001 の PK 評価に使用（試験番号：MVR-CT-20[redacted]-010.001）

目的及び方法：本試験の目的はクエン酸ナトリウム添加ヒト血漿中 BIVV001 の FVIII 活性測定のための発色合成基質法をバリデートすることであった。標準物質として BIVV001 製剤を用いた。本測定法は、第 1/2a 相試験（242HA101 試験及び 242HA102 試験）における BIVV001 の PK 評価に使用した。測定法の概要を以下に示す。

BIVV001 の FVIII 活性は、BCS XP analyzer（Siemens Healthcare Diagnostics）を用いて CS BIOPHEN FVIII:C assay（Hyphen BioMed）により測定した。測定法の原理は 2.1.2.1 項と同様である。

本測定法では、BIVV001 製剤を標準物質として用い、それぞれ 8 ポイントの高濃度検量線（0.150～1.500 IU/mL）及び低濃度検量線（0.008～0.200 IU/mL）を作成した。高濃度検量線用に、初めに BSA 添加トリス緩衝液を用いて約 1.000 IU/mL の BIVV001 添加試料を調製し、更に BSA 添加トリス緩衝液により希釈して 1:4 の割合で希釈後の既定濃度の検量線用標準試料を調製した。希釈後の高濃度検量線用標準試料は、反応系内で BCS XP analyzer を用いて BSA 添加トリス緩衝液により 1:10 の割合で更に希釈された。低濃度検量線用に、初めに約 1.000 IU/mL の BIVV001 添加試料を FVIII 欠乏血漿（Helena Laboratories）により 1:4 の割合で希釈し、更に FVIII 欠乏血漿により希釈して既定濃度の検量線用標準試料を調製した。希釈後の低濃度検量線用標準試料は、反応系内で BCS XP analyzer を用いて BSA 添加トリス緩衝液により 1:15 の割合で更に希釈された。検量線は二重測定し、X 軸に FVIII 活性（IU/mL）及び Y 軸に吸光度の変化（absorbance/min）をプロットした。高濃度検量線は対数直線回帰、低濃度検量線は直線回帰により作成した。

結果：本測定法により、BIVV001 製剤を標準物質として用いた FVIII 活性の定量が可能である。分析単位内及び分析単位間の真度及び精度、感度並びに測定範囲は満足できるものであった。評価した全てのパラメータは判定基準を満たした。LLOQ、ULOQ、真度、精度、選択性及び安定性の主要なパラメータを表 8 に示す。

表 8 - Summary of validation results for determination of BIVV001 FVIII activity by two-stage chromogenic substrate assay with BIVV001 product-specific self-standard in human plasma

Method validation items		**Description**		
Type of assay		BIOPHEN chromogenic substrate assay		
Analyte		BIVV001 FVIII activity		
Biological matrix		Human FVIII-deficient citrated plasma		
Calibrator/assay standard		BIVV001 product-specific self-standard		
Instrument		BCS XP analyzer		
Validated range		0.010–2.500 IU/mL		
LLOQ		0.010 IU/mL		
Assay selectivity		Pass		
Carry-over		Pass		
Dilution Integrity and linearity		Pass		
Assay specificity potentially interfering substances		Pass for samples 1000 mg/dL triglycerides (lipemia) and grade 4 hemolysis (hemolysis); assay interference was observed in samples containing 60 mg/dL of bilirubin.		
Accuracy and precision			**% RE (Accuracy)**	**Range % CV (Precision)**
Intra-assay	High curve	HV-1 (2.500 IU/mL)	-10.6% to -4.6%	1.1% to 5.3%
		HV-2 (1.200 IU/mL)	-6.3% to 3.9%	1.0% to 3.1%
		HV-3 (0.600 IU/mL)	8.5% to 18.8%	1.1% to 4.7%
		HV-4 (0.250 IU/mL)	16.2% to 29.7%[a]	1.9% to 4.7%
	Low curve	HV-3 (0.600 IU/mL)	-1.8% to 0.1%	0.5% to 2.6%
		HV-4 (0.250 IU/mL)	-0.1% to 7.1%	0.9% to 4.1%
		LV-1 (0.150 IU/mL)	0.1% to 12.1%	0.8% to 2.4%
		LV-2 (0.075 IU/mL)	4.3% to 16.5%	1.0% to 2.0%
		LV-3 (0.030 IU/mL)	4.7% to 15.3%	1.2% to 2.1%
		LV-4 (0.010 IU/mL)	-8.0% to 2.0%	3.9% to 9.6%

Method validation items		Description		
			% RE (Accuracy)	Range % CV (Precision)
Inter-assay	High curve	HV-1 (2.500 IU/mL)	-7.2%	3.4%
		HV-2 (1.200 IU/mL)	-1.8%	4.1%
		HV-3 (0.600 IU/mL)	14.1%	4.2%
		HV-4 (0.250 IU/mL)	21.8%[a]	4.6%
	Low curve	HV-3 (0.600 IU/mL)	-0.6%	1.8%
		HV-4 (0.250 IU/mL)	3.9%	4.2%
		LV-1 (0.150 IU/mL)	6.6%	3.9%
		LV-2 (0.075 IU/mL)	11.3%	4.0%
		LV-3 (0.030 IU/mL)	11.0%	3.6%
		LV-4 (0.010 IU/mL)	-4.0%	6.3%
Stability				
Instrument reagent stability		Up to 10 hours		
Short-term stability		Up to 24 hours at room temperature (18-25°C)		
Long-term stability		Up to 12 months at both -20°C and -70°C		
Benchtop stability		Up to 6 hours on both instrument and cold block (~2-8°C)		
F/T stability		Up to 3 F/T cycles		

Abbreviations: %CV = percent coefficient of variation; %RE = percent of relative error; F/T = freeze/thaw; FVIII = coagulation factor VIII;
HV = high validator; LLOQ = lower limit of quantitation; LV = low validator.

a *Intra- and inter-assay accuracy failed for HV-4 when tested on the high calibration curve, but was acceptable when tested on the low calibration curve.*

Source: [redacted] Validation Report MVR-CT-20[redacted]-010.001.

2.1.2.3 FVIII活性測定のための発色合成基質法—EFC16293試験、EFC16295試験及びLTS16294試験でのBIVV001のPK評価に使用（試験番号：MVR-CT-20[redacted]-001.001）

目的及び方法：本試験の目的はクエン酸ナトリウム添加ヒト血漿中BIVV001のFVIII活性測定のための発色合成基質法をバリデートすることであった。標準物質としてFVIIIのWHO国際標準品により較正した標準血漿を用いた。本測定法は、EFC16293試験、EFC16295試験及びLTS16294試験におけるBIVV001のPK評価に使用した。本測定法はBIVV001製剤を標準物質として用いた発色合成基質法（2.1.2.2項）に基づいて構築し、バリデートした。方法は、標準物質以外は前項と同様である。測定法の概要を以下に示す。

BIVV001のFVIII活性は、BCS XP analyzer（Siemens Healthcare Diagnostics）を用いて、CS BIOPHEN FVIII:C assay（Hyphen BioMed）により測定した。BIOPHEN™ Plasma Calibrator（Hyphen BioMed）を用いて、それぞれ8ポイントの高濃度検量線（0.150～1.500 IU/mL）及び低濃度検量線（0.008～0.200 IU/mL）を作成した。高濃度検量線用に、約1.000 IU/mLのBIOPHEN™ Plasma CalibratorをBSA添加トリス緩衝液により希釈して1:4の割合で希釈後の既定濃度の検量線用標準試料を調製した。希釈後の高濃

度検量線用標準試料は、反応系内で BCS XP analyzer を用いて BSA 添加トリス緩衝液により 1:10 の割合で更に希釈された。低濃度検量線用に、初めに BIOPHEN™ Plasma Calibrator を FVIII 欠乏血漿（Helena Laboratories）により 1:4 の割合で希釈し、更に FVIII 欠乏血漿により希釈して既定濃度の検量線用標準試料を調製した。希釈後の低濃度検量線標準試料は、反応系内で BCS XP analyzer を用いて BSA 添加トリス緩衝液により 1:15 の割合で更に希釈された。検量線は二重測定し、X 軸に FVIII 活性（IU/mL）及び Y 軸に吸光度の変化（absorbance/min）をプロットした。高濃度検量線は対数直線回帰、低濃度検量線は直線回帰により作成した。

発色合成基質法と凝固一段法の間で BIVV001 の比活性が異なるため(3)、発色合成基質法による BIVV001 の活性は凝固一段法によって測定された FVIII 活性よりも 3.3 倍高い値に調整された。調整係数は BIVV001 標準溶液を両測定法で高濃度検量線を用いて測定した結果に基づいて設定した。

結果：本測定法により、標準血漿を用いた FVIII 活性の定量が可能である。分析単位内及び分析単位間の真度及び精度、感度並びに特異性は満足できるものであった。評価した全てのパラメータは判定基準を満たした。安定性は BIVV001 製剤を標準物質として用いた発色合成基質法と同様の方法で評価した。バリデーションパラメータ及び安定性を表 9 に示す。

BIOPHEN 発色合成基質法を、FVIII 活性のソースとして正常プール血漿を用いてバリデートした。バリデーション結果から、本発色合成基質法は添付文書のとおり、良好な真度及び精度で血漿中 FVIII 活性を測定できることが示された（表 9）。

ISR：BIVV001 の発色合成基質法の ISR は EFC16293 試験の検体を用いて実施した。EFC16293 試験の 2609 検体のうち、187 検体を用いて ISR を実施し、173 検体が判定基準を満たした（判定基準適合率 93%）。ISR の総合的な結果は判定基準を満たした。ISR のデータを表 19 に示す。

表 9 - Summary of validation results for determination of BIVV001 and plasma FVIII activity by two-stage chromogenic substrate assay with plasma standard in human plasma

Method validation items		Description			
Type of assay	BIOPHEN chromogenic substrate assay				
Analyte	FVIII activity				
Biological matrix	Human FVIII-deficient citrated plasma				
Calibrator/assay standard	Plasma standard calibrated against WHO international standard (IS)				
Instrument	BCS XP				
Assay selectivity	Pass				
Carry-over	Pass[a]				
Dilution integrity and linearity	Pass				
Analyte	BIVV001 FVIII activity, Plasma FVIII activity				
Validated range	0.033 to 8.275 IU/mL (BIVV001); 0.010-1.004 IU/mL (Plasma FVIII)				
LLOQ	0.033 IU/mL (BIVV001); 0.010 IU/mL (Plasma FVIII)				
Assay specificity (Interference)	Pass for samples containing 20 mg/dL bilirubin (icterus); 700 mg/dL triglycerides (lipemia); and grade 4 hemolysis (hemolysis)				
Accuracy and precision					
	Calibrator levels	**%RE (Accuracy)**	**Range %CV (Precision)**	**%RE (Accuracy)**	**Range %CV (Precision)**
		Intra-assay (BIVV001)	Intra-assay (BIVV001)	Inter-assay (BIVV001)	Inter-assay (BIVV001)
High curve	V-1 (8.275 IU/mL)	-8.0% to 9.8%	0.8% to 6.9%	0.8%	6.1%
	V-2 (1.324 IU/mL)	-10.2% to -4.0%	0.8% to 3.3%	-5.7%	2.9%
	V-3 (0.662 IU/mL)	5.7% to 11.3%	0.9% to 2.2%	9.1%	2.4%
	V-4 (0.265 IU/mL)	17.1% to 28.9%	1.2% to 3.4%	23.8%	3.7%
Low curve	V-3 (0.662 IU/mL)	-9.1% to 0.4%	1.7% to 2.5%	-4.1%	4.6%
	V-4 (0.265 IU/mL)	-7.9% to 1.9%	0.9% to 5.7%	-2.5%	5.5%
	V-9 (0.089 IU/mL)	-2.2% to 8.1%	0.8% to 2.3%	1.4%	3.8%
	V-5 (0.033 IU/mL)	0.9% to 8.2%	1.1% to 3.2%	4.5%	3.2%

Method validation items	Description				
	Calibrator levels	%RE (Accuracy)	Range %CV (Precision)	%RE (Accuracy)	Range %CV (Precision)
		Intra-assay (Plasma FVIII)	Intra-assay (Plasma FVIII)	Inter-assay (Plasma FVIII)	Inter-assay (Plasma FVIII)
High curve	V-10 (1.004 IU/mL)	-4.2% to -2.2%	0.8% to 3.8%	-3.3%	2.4%
	V-11 (0.500 IU/mL)	4.5% to 9.0%	1.4% to 3.5%	7.3%	2.5%
	V-12 (0.250 IU/mL)	15.9% to 21.3%	1.2% to 3.5%	18.4%	2.6%
Low curve	V-11 (0.500 IU/mL)	-14.6% to -3%	1.8% to 7.7%	-9%	6.2%
	V-12 (0.250 IU/mL)	-14.2% to -0.1%	1.5% to 3.9%	-6.4%	6.3%
	V-6 (0.150 IU/mL)	-16.8% to -5.9%	2.4% to 5.5%	-12.1%	6.1%
	V-7 (0.025 IU/mL)	-16.8% to -3.2%	1.7% to 6.3%	-8.8%	6.1%
	V-8 (0.010 IU/mL)	-6% to 10%	0.0% to 5.3%	4.0%	6.7%
Stability	**BIVV001**			**Plasma FVIII**	
Instrument reagent stability	Up to 6 hours[a]			Up to 6 hours	
Long-term stability	Up to 12 months at both -20°C and -70°C[a]			Up to 3 months at -20°C and 6 months at -70°C	
Benchtop stability	Up to 6 hours on both instrument and cold block (~2 to 8°C)[a]			Up to 6 hours on instrument and 3 hours on cold block (~2 to 8°C)	
F/T Stability	Up to 3 F/T cycles[a]			Up to 3 F/T cycles	

Abbreviations: %CV = percent coefficient of variation; %RE = percent of relative error; F/T = freeze/thaw; FVIII = coagulation factor VIII;
HV = high validator; IS = international standard; LLOQ = lower limit of quantitation; LV = low validator.
a Refer to [redacted] Validation Report MVR-CT-20[redacted]-010.001.
Source: [redacted] Validation Report MVR-CT-20[redacted]-001.001.

2.1.3 免疫原性測定法

FVIII インヒビター（中和抗体）及び ADA（中和抗体及び非中和抗体）の発現を全ての BIVV001 の臨床試験で評価した。

Bethesda 法の Nijmegen 変法を、FVIII インヒビターを検出するために全ての BIVV001 の臨床試験で使用した。測定法バリデーションにおいて、加熱による不活化処理を行って drug tolerance（薬剤共存下での ADA の検出能力）を評価した。本測定法における BIVV001 の drug tolerance level（ADA 測定に影響しない最高薬物濃度）は 1.0 IU/mL（すなわち 100% BIVV001）であった。

臨床試験に使用される ADA 測定法には、BIVV001 に反応する全ての免疫グロブリンを検出するため、ブリッジング ELISA を用いた。さらに、BIVV001 分子の 4 つの構成部分（FVIII、Fc、XTEN、D'D3）に特異的な ADA の特性解析を行った。

BIVV001 の臨床試験で使用された免疫原性測定法を表 10 に要約する。

表 10 - Summary of immunogenicity assays and associated validation reports for the BIVV001 clinical studies

Assay type	Analyte	Clinical studies	Sensitivity	Validation report	Provider
Nijmegen-modified Bethesda assay	FVIII inhibitors	242HA101, 242HA102, EFC16293, EFC16295, LTS16294, PKM16978, PKM17085	0.42 BU/mL	VAL-20[redacted]-010.001	[redacted] ([redacted])
ADA ELISA	Anti-BIVV001 antibodies, including ADA characterization of anti-FVIII and anti-Fc components	242HA101, 242HA102, EFC16293, EFC16295, LTS16294, PKM16978, PKM17085	Screening: 10.635 ng/mL	8374-746	[redacted]
ADA ELISA	Anti-XTEN antibodies (characterization of anti-XTEN component)	242HA102, EFC16293, EFC16295, LTS16294, PKM16978, PKM17085	Screening: 37.0 ng/mL	186552	[redacted]
ADA ELISA	Anti-D'D3 antibodies (characterization of anti-D'D3 component)	242HA102, EFC16293, EFC16295, LTS16294, PKM16978, PKM17085	Screening: 3.70 ng/mL	186548	[redacted]

Abbreviations: ADA = anti-drug antibodies; BU = Bethesda unit; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay.

2.1.3.1 FVIII インヒビターの測定

2.1.3.1.1 Bethesda 法の Nijmegen 変法—BIVV001 の全ての臨床試験でのインヒビターの評価に使用（試験番号：VAL-20[redacted]-010.001）

目的及び方法：本試験の目的はクエン酸ナトリウム添加ヒト血漿中の FVIII インヒビターを定量するために Bethesda 法の Nijmegen 変法をバリデートすることであった。

FVIII インヒビター測定法は、FVIII インヒビターを含む被験者検体を正常血漿と混合した際の対照に対する FVIII 活性の低下を、活性化試薬として Actin FSL を用いた凝固一段法により測定する。検体の FVIII インヒビター力価は、FVIII インヒビターを含まない FVIII 欠乏血漿と FVIII のソース血漿を混合した対照に対する FVIII 活性の低下から算出した。高力価のインヒビターを含む検体は、ほぼ 50%の活性低下（1 BU/mL と定義）に達するまで希釈する(11)。Bethesda 法の Nijmegen 変法では、FVIII のソースとして緩衝化した正常プール血漿を用い、また陰性対照及び被験者検体の希釈に、緩衝液ではなく FVIII 欠乏血漿を用いることにより、低力価のインヒビターを含む検体に対する感度及び特異性が改善されている(12)(17)。FVIII インヒビター力価は、0.6 BU/mL 未満を陰性、0.6 BU/mL 以上を陽性とすることが国際的に合意されている。また、0.6~5 BU/mL は低力価、5 BU/mL 超は高力価とみなされる。一般的に高力価の患者は凝固因子補充療法に抵抗性を示す(18)。

BIVV001 の FVIII 部分の全ての機能的ドメインのタンパク質のシークエンス及び構造は天然型の血漿中 FVIII と同様である。このため BIVV001 の FVIII 活性に対する中和抗体は、内因性 FVIII も同程度に中和すると考えられる。

BIVV001 の臨床開発において FVIII 中和活性を検出するため、FVIII のソースとして正常ヒト血漿を用いる Bethesda 法の Nijmegen 変法が [redacted] でバリデートされた。

測定前に被験者血漿及び対照試料を、内因性又は残存する血漿中 FVIII 活性を不活化するために、58°C で 90 分間加熱する。この加熱により、1.0 IU/mL（つまり 100% BIVV001）までの BIVV001 の FVIII 活性を不活化し、BIVV001 による Bethesda 法の Nijmegen 変法に対する妨害を防いだ。加熱による不活化後、緩衝化した FVIII 欠乏血漿を用いて被験者検体を希釈した。希釈後の検体を等量の緩衝化した正常プール血漿（FVIII 活性は約 1.0 IU/mL）と混合した。混合液を 37°C で 2 時間インキュベートし、その後反応を停止するために氷浴（2°C～8°C）で 10 分間冷却した。被験者検体及び対照試料は高濃度検量線用に 1:2 の割合で一段のみ希釈し、BCS XP を用いて FVIII の残存活性を凝固一段法で測定した（2.1.1 項）。その後、インヒビターを含まない対照試料に対する被験者検体の FVIII 活性の比を算出した。希釈試料の FVIII 残存活性が 25%～75%を示す場合、それを報告値とした。残存活性が 25%未満の場合、残存活性が 25%～75%になるまで、更に希釈して測定した。無希釈の検体の残存活性が 75%を超える場合、その検体はインヒビター陰性と考えられた。被験者検体の 2 つの希釈倍率の残存活性が 25%～75%の場合は、50%に近いほうの値を用いた。被験者検体の 2 つの希釈倍率の残存活性がいずれも 50%に同程度に近い場合は、希釈倍率が低いほうの BU 値を報告した。

加えて、血漿 FVIII 又は Advate、Advnovi 及び BIVV001 のような補充療法製剤について評価したところ、インヒビター力価に有意な差がみられなかったことから、臨床試験における測定には血漿 FVIII（緩衝化した正常血漿）のみを用いた。国際的な合意に基づき、力価が 0.6 BU/mL 未満の場合は「陰性」と報告した(18)。EMA ガイドライン(8)を含む規制当局のガイダンスに従って、力価が 0.6 BU/mL 以上で、元の検体採取から 2～4 週間後に採取した別の検体も 0.6 BU/mL 以上であることが確認された場合、FVIII に対するインヒビターが産生されたと定義した。

結果：分析単位内及び分析単位間の真度及び精度は満足できるものであった。評価した全てのパラメータは判定基準（凍結融解安定性を含む）を満たした。バリデーションパラメータの概要を表 11 に示す。データから本測定法はヒト血漿中のFVIIIインヒビターの定量に適していることが示された。各臨床試験における測定法の性能はそれぞれの治験総括報告書に示す。

表 11 - Summary of validation results for determination of inhibitors to FVIII by the Nijmegen modified Bethesda assay in human plasma

Method validation items	Description
Type of assay	FVIII neutralizing activity assay
Analyte	FVIII inhibitors
Standard	None
Species	Human
Biological matrix	Plasma (sodium citrate)
Minimum dilution	1:1
Quantitative range in biological matrix	
Minimum nominal concentration	0.42 BU/mL (= minimum quantifiable titer; validated range >0.6 BU/mL)
Maximum nominal concentration	None
Acceptance criteria for QC samples	FVIII control must be within ±20% of expected value Heat inactivation control must have <0.05 IU/mL FVIII High positive control (25 BU/mL) and low positive control (1 BU/mL) must be within ±2.5 SD of their expected mean value Negative control (0.25 BU/mL) must be negative (<0.6 BU/mL)
Accuracy and precision	Plasma FVIII
Accuracy (average % trueness)	90.6% to 99.0%
Precision, intra-assay %CV	9.4% to 10.2%
Precision, inter-assay %CV	5.1% to 9.9%
Specificity	25 BU/mL spike in 6 donor plasmas was 22.9 ±2.0 BU/mL 1 BU/mL spike in 6 donor plasmas was ≥0.6 BU/mL
Freeze and thaw stability	Up to 3 F/T cycles
BIVV001 tolerance level	Up to 1 IU/mL

Abbreviations: %CV = percent coefficient of variation; BU = Bethesda unit; FVIII = coagulation factor VIII; F/T = freeze/thaw; QC = quality control; SD = standard deviation.
Source: [redacted] validation reports VAL-20[redacted]-010.001.

2.1.3.2 ヒト血漿中 ADA の測定

2.1.3.2.1 BIVV001 の全ての試験における ADA の検出、確認及び抗体価の測定並びに FVIII 及び Fc に対する ADA の特性解析（試験番号：8374-746）

目的及び方法：本試験の目的はヒト血漿中 ADA の検出、確認及び抗体価の測定法をバリデートすることであった。本測定法は FVIII 及び Fc に結合する ADA の特性解析も含む。

本測定法はクエン酸ナトリウム添加ヒト血漿中の ADA を検出するためにデザインされた。本法は 3 つの段階を含む：（1）スクリーニング試験、初めに陽性又は陰性を判定する、（2）確認試験、スクリーニング試験で陽性と判定された検体の特異性を評価する、（3）抗体価測定、確認試験で陽性と判定された検体について抗体価を評価する。更に、確認試験で陽性と判定された検体について、2 つの特性解析を行い、薬剤の構成部分である rFVIII（Advate）又は Fc（ヒト IgG1）に対する ADA の反応性を評価した。測定フォーマットはビオチン及びジゴキシゲニン標識薬剤を用いたブリッジング ELISA である。検出には、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）標識抗ジゴキシゲニン抗体を用いた。測定法の概要を以下に示す。

<u>スクリーニング試験</u>

対照試料及び検体を assay buffer により 1:10 の割合で希釈し、次にビオチン及びジゴキシゲニン標識 BIVV001 の等モル混合液を加えた。対照試料及び検体の最終希釈倍率は 1:20 で、本測定法の最小希釈倍率（MRD）であった。37℃ で 2 時間インキュベーションの間に、検体中の ADA はビオチン標識 BIVV001 及びジゴキシゲニン標識 BIVV001 に結合し、複合体を形成する。抗 FVIII 抗体 GMA-8023（Green Mountain Antibody）を陽性対照として用いた。あらかじめ assay buffer（5% BSA を含む Tween 20 添加トリス緩衝生理食塩水）でブロッキングしたストレプトアビジンプレートに複合体を含む混合液を添加した。複合体中のビオチン標識 BIVV001 はストレプトアビジンに結合し、それに結合しない成分は洗浄によって除去される。プレートを洗浄後、プレートに結合した複合体を検出するため、HRP 標識抗ジゴキシゲニン抗体を添加してインキュベートした。プレートを洗浄後、発色基質のテトラメチルベンジジン（TMB）を用いてプレートに結合している複合体を測定した。発色は酸の添加によって停止した。450 nm における吸光度（対照試料又は検体中の ADA 量に比例する）をマイクロプレートリーダーによって測定した。検体のシグナルの平均値がカットオフ値以上の場合にスクリーニング陽性と判定した。

<u>確認試験</u>

スクリーニング試験で陽性と判定された検体を確認試験で評価した。確認試験では、複合体の結合相互作用の特異性を評価するため、過剰の非標識 BIVV001 を添加して競合させた。標識薬剤の混合液は、過剰の BIVV001 含むものと含まないものの両方を調製した。対照試料と検体は assay buffer で 1:10 に希釈し、ビオチン標識 BIVV001 及びジゴキシゲニン標識 BIVV001 を含む混合液と混和した。混合液は 37℃ でインキュベートし、スクリーニング試験と同様の方法で評価した。カットオフ値以上の阻害率を示す検体を陽性とした。

抗体価測定

確認試験で陽性と判定された検体について、抗体価を測定した。抗体価の測定はスクリーニング試験と同様の方法で行った。ただし、あらかじめ検体を陰性対照のブランク血漿を用いて段階的に希釈後、MRD で希釈して、それぞれの希釈検体を測定した点がスクリーニング試験とは異なる。検体の抗体価は、スクリーニングカットポイント以上のシグナルを示し、以降の希釈系列がスクリーニングカットポイント未満を示す最も高い希釈倍率に MRD を乗じることにより、算出した。

特性解析

確認試験で陽性と判定された検体について、特性解析を行った。過剰の Advate（rFVIII）又はヒト IgG1（Fc のソース）との競合反応によって、ADA と標識薬剤の結合相互作用の特異性を評価した。標識薬剤の混合液は、過剰の Advate 又はヒト IgG1 を含むものと含まないものの両方を調製した。対照試料と検体は、Advate 又はヒト IgG1 を含む又は含まない assay buffer で 1:10 に希釈し、ビオチン標識 BIVV001 及びジゴキシゲニン標識 BIVV001 を含む混合液と混和した。Advate 又はヒト IgG1 とのインキュベーションによって、薬剤の特定の部分、つまり rFVIII 又は Fc に対する検体中の ADA の反応性を解析する。混合液は 37°C でインキュベートし、スクリーニング試験と同様の方法で評価した。カットオフ値以上の阻害率を示す検体を陽性とした。

結果：分析単位内及び分析単位間の精度は満足できるものであった。評価した全てのパラメータは判定基準（安定性を含む）を満たした（表 12）。データから本測定法はヒト血漿中の ADA の評価に適していることが示された。

本測定法を 242HA101 試験以外の全ての臨床試験での検体測定に使用した。242HA101 試験では ADA 陽性を示す被験者がいなかったため、更なる特性解析は実施しなかった。

表 12 - Summary of validation results for detection of anti-BIVV001 antibodies in human plasma

Method validation items	Description
Analyte	Anti-BIVV001 antibodies
Biological matrix	Human FVIII deficient sodium citrate plasma
Type of assay	ELISA
Positive control	BIVV001: murine Anti-FVIII (GMA-023)
Capture phase	Biotin-BIVV001
Detection phase	DIG-BIVV001, anti-DIG HRP conjugate
Minimum required dilution	1:10 working (1:20 in well)
QC concentration	HPC (screening assay): 4000 ng/mL LPC (screening assay): 15 and 30 ng/mL Confirmation/characterization assay control (C-HPC): 4000 ng/mL Confirmation/characterization assay control (C-LPC): 15 and 30 ng/mL Titration assay control (TC): 4000 ng/mL
Screen and confirmatory cut point	Evaluated for normal human sodium citrate plasma

Method validation items		Description
Performance of quality control samples		
System suitability (acceptance criteria limits of assay controls)		
Ranges	NC response	0.033 ≤NC ≤0.086
	LPC response	0.069 ≤LPC ≤0.109
	HPC response	1.589 ≤HPC ≤3.489
Intra-assay precision - %CV range (anti-FVIII antibodies)		
Screening	LPC (n=3 in 6 assays)	LPC (15 ng/mL): 2.2% to 14.3%
	HPC (n=3 in 6 assays)	0.9% to 14.3%
	NC response (n=3 in 6 assays)	2.5% to 33.8%
Confirmation	LPC (n=6)	4.8% to 10.7% BIVV001 and 2.8% to 22.7% Advate
	HPC (n=6)	0.2% to 0.5% BIVV001 and 0.0% to 0.2% Advate
Titration	HPC	Titers for all samples tested in each assay within ±3200 dilution of the target titer
Inter-assay precision - %CV (anti-FVIII antibodies)		
Screening	LPC (n=6)	LPC (15 ng/mL): 7.5%
	HPC (n=6)	14.6%
	NC Response (n=6)	13.8%
Confirmation	LPC (n=6)	9.2% BIVV001 and 24.4% Advate
	HPC (n=6)	0.4% BIVV001 and 0.4% Advate
Titration	PC (n=14)	12 titers within ±1 dilution of the target titer (target titer was established to be 1024)
Selectivity	Assay selectivity was demonstrated in the screening, confirmation, and characterization assays for anti-FVIII antibodies (confirmed with BIVV001 [confirmatory] and Advate [characterization]) in hemophilia A patient plasma. Selectivity in hemolytic and lipemic matrix was demonstrated for anti-FVIII antibodies (except LPC confirmed with BIVV001, confirmatory). Selectivity was demonstrated for anti-Fc antibodies (confirmed with hIgG1, characterization). Selectivity was demonstrated through a lack of confirmation (confirmed negative).	
Sensitivity and drug tolerance	Assay sensitivity was established to be 10.635 ng/mL. Anti-FVIII antibodies at concentration 31.25 ng/mL can be detected in the presence of up to 250 ng/mL of BIVV001 (the highest tested drug concentration).	
Stability (normal human serum)	F/T stability: Demonstrated up to 8 F/T cycles for both PCs (anti-FVIII antibodies) Benchtop stability: Demonstrated up 23 hours and 55 minutes Refrigerator stability: Demonstrated up 69 hours and 50 minutes	
Prozone/hook effect	No hook effect was detected for anti-FVIII antibodies	

Method validation items	Description

%CV = percent coefficient of variation; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; F/T = freeze/thaw; FVIII = coagulation factor VIII; hIgG1 = human immunoglobulin G1; HPC = high positive control; LPC = low positive control; NC = negative control; PC = positive control;
QC = quality control; TC = titration assay control.
Advate is a recombinant full length FVIII (rFVIII) product.
Source: [redacted] Method Validation Report 8374-746.

2.1.3.2.2 BIVV001 の全ての試験における XTEN に対する ADA の特性解析（試験番号：186552）

目的及び方法：本試験の目的はクエン酸ナトリウム添加ヒト血漿中の抗 XTEN 抗体を検出するための測定法をバリデートすることであった。本測定法により BIVV001 の XTEN に結合する ADA を検出する。測定法の概要を以下に示す。

XTEN を MaxiSorp™ 96 ウェル平底プレートに添加し、室温で約 1 時間インキュベートした。プレートを洗浄後、ブロッキングのために希釈緩衝液を添加して室温で約 1 時間（最大 3 時間）インキュベートした。プレートを洗浄後、希釈緩衝液で 1:20 に希釈したヒト抗 XTEN 抗体陽性対照及びプールした陰性対照を含む試料を添加し、37°C で約 1 時間インキュベートした。プレートを洗浄後、HRP 標識ヤギ抗ヒト IgG（H＋L）抗体を含む溶液を添加して、37°C で約 1 時間インキュベートした。プレートを洗浄後、TMB ペルオキシダーゼ基質溶液を添加し、室温で約 5 分インキュベートした。発色は試料中の抗 XTEN 抗体量に比例した。リン酸を添加して反応を停止し、プレートリーダーを用いて 2 つの波長で測定した（検出 450 nm、バックグラウンド 650 nm）。

結果：BIVV001 の構成部分である XTEN に対するクエン酸ナトリウム添加ヒト血漿中の ADA を検出するための ELISA をバリデートした。測定感度はスクリーニング試験では 37.0 ng/mL、確認試験では 35.9 ng/mL であった。分析単位内の精度は満足できるものであった。バリデーションパラメータ（安定性を含む）を表 13 に示す。データから本測定法はヒト血漿中の XTEN に対する ADA の評価に適していることが示された。本測定法を XTEN に結合する ADA の特性解析に用いた。抗 XTEN 抗体の特性解析の最終結果は、スクリーニング及び確認試験の結果（陽性又は陰性）に基づいて報告した。

表 13 - Summary of validation results for detection of anti-XTEN antibodies in human plasma

Method validation items	Description
Analyte	Anti-XTEN antibodies
Biological matrix	Human plasma (sodium citrate)
Type of assay	ELISA
Positive control	Anti-XTEN antibodies (IgG 015/016) (human antibody generated in-house at Sanofi)
Capture phase	XTEN polypeptide 011 (XTEN polypeptide 288)
Detection phase	Goat anti-human IgG (H+L) HRP conjugate
Minimum required dilution	1:20

Method validation items	Description	
QC concentration	HPC: 1500 ng/mL MPC: 750 ng/mL LPC: 125 ng/L (for validation), 52.3 ng/mL (for sample analysis), 62.8 ng/mL (for sample analysis) addendum I	
Screen and confirmatory cut point	Screening assay cut point factor (X): 1.23 Titration assay cut point factor (XTCP): 1.68 Confirmatory assay cut point (% signal inhibition): 24.5%	
Sensitivity	Screening assay 37.0 ng/mL Confirmatory assay 35.9 ng/mL	
Performance of quality control samples for plate acceptance		
System suitability (acceptance criteria limits of assay controls)		
Ranges	PNC raw signal	≤1.02
	LPC raw signal (validation)	≥0.159
	MPC raw signal	≥0.639
	HPC raw signal	≥1.28
Intra-assay precision - %CV range (anti-XTEN antibodies)		
Screening (n=3)	PNC	3.10%
	LPC	10.8%
	MPC	NA
	HPC	2.83%
Inter-assay precision - %CV (anti-XTEN antibodies)		
Screening[a] (n=34)	PNC	45.7%
	LPC	32.6%
	MPC	26.8%
	HPC	21.0%
Titration assay precision (n=9)		65.3%
Selectivity	10/10 spiked individual lots of normal plasma met the criteria. 9/10 blank individual lots of normal plasma met the criteria. 9/10 spiked individual lots of FVIII deficient plasma met the criteria. 8/10 blank individual lots of FVIII deficient plasma met the criteria. No effects were observed with 2.5% hemolysate, 5% hemolysate, or 2% intralipid.	
Drug interference	At 125 ng/mL of anti-XTEN antibodies, addition of 1.00 µg/mL of XTEN polypeptide 011 resulted in a negative signal, indicating interference. At 750 ng/mL of anti-XTEN antibodies, addition of 25.0 µg/mL of XTEN polypeptide 011 resulted in a negative signal, indicating interference. At 1500 ng/ml of anti-XTEN antibodies, addition of 200 µg/mL of XTEN polypeptide 011 resulted in a negative signal, indicating interference.	
Stability (normal human serum)	F/T stability: Demonstrated up to 5 F/T cycles for low and high PCs Benchtop stability (ambient temperature): Demonstrated up to 4 hours	
Prozone/hook effect	No prozone effects observed up to 160 000 ng/mL antibody.	

Method validation items	Description

%CV = percent coefficient of variation; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; F/T = freeze/thaw; FVIII = coagulation factor VIII;
HPC = high positive control; HRP = horseradish peroxidase; IgG = immunoglobulin G; MPC = mid positive control; LPC = low positive control; PNC = pooled negative control; QC = quality control; XTEN polypeptide 11 or XTEN polypeptide 288 = a polypeptide chain containing XTEN polypeptide 288 sequence (same sequence as present in BIVV001 between A2 and A3 domains), flanked by 10 amino acid residues at either end from FVIII acidic region 2 at the N-terminus and 10 amino acid residues from FVIII acidic region 3 at C-terminus.

a Data obtained during the intra-assay precision assessments is used to establish the %CV acceptance range for controls and samples. The final precision criterion of the assay is based off of the intra-assay precision assessment.

Source: [redacted] Method Validation Report 186552.

2.1.3.2.3 BIVV001 の全ての試験における D'D3 に対する ADA の特性解析（試験番号：186548）

目的及び方法：本試験の目的はクエン酸ナトリウム添加ヒト血漿中の抗 D'D3 抗体を検出するための測定法をバリデートすることであった。本測定法により BIVV001 の D'D3 部分に結合する ADA を検出する。測定法の概要を以下に示す。

血漿を用いて調製した陽性対照（抗 D'D3 抗体）及び陰性対照を、300 mM 酢酸を用いて 3:19 の割合で希釈した。希釈後の陽性対照、陰性対照及び検体はビオチン標識 D'D3 組換えタンパク質とインキュベートし、中和のための 600 mM トリス緩衝液を含むストレプトアビジンプレートに添加した。プレートを洗浄後、300 mM 酢酸を用いて、ビオチンーアビジン相互作用によってプレートに結合している抗 D'D3 抗体を溶出した（血漿中の内因性 VWF による妨害が減弱する）。中和のための 1.5 M トリスを含む VWF 15- D'D3 をコートした MaxiSorp™ 96 ウェル平底プレートに溶出液を添加し、37°C で約 1 時間インキュベートした。抗 D'D3 抗体はプレートにコートされた D'D3 に結合する。プレートを洗浄後、HRP 標識ヤギ抗ヒト IgG（H＋L）抗体を含む溶液を添加して、37°C で約 30 分間インキュベートした。プレートを洗浄後、TMB ペルオキシダーゼ基質溶液を添加し、約 5 分インキュベートした。発色は試料中の抗 D'D3 抗体量に比例した。リン酸を添加して反応を停止し、プレートリーダーを用いて 2 つの波長で測定した（検出 450 nm、バックグラウンド 650 nm）。

結果：陽性対照として抗 D'D3 抗体を用いて、クエン酸ナトリウム添加ヒト血漿中の抗 D'D3 抗体を検出するための ELISA をバリデートした。測定感度はスクリーニング試験では 3.70 ng/mL、確認試験では 5.36 ng/mL であった。分析単位内の精度は満足できるものであった。バリデーションパラメータ（安定性を含む）を表 14 に示す。データから本測定法はヒト血漿中の D'D3 に対する ADA の評価に適していることが示された。本測定法を D'D3 に結合する ADA の特性解析に用いた。抗 D'D3 抗体の特性解析の最終結果は、スクリーニング及び確認試験の結果（陽性又は陰性）に基づいて報告した。

表 14 - Summary of validation results for detection of anti-D'D3 antibodies in human plasma

Method validation items	Description
Analyte	Anti-D'D3 antibodies
Biological matrix	Human plasma (sodium citrate)
Type of assay	ELISA

Method validation items		Description
Positive control		Anti-D'D3 A09.02 antibody (human antibody recombinantly generated in-house at Sanofi)
Capture phase		VWF15-D'D3-biotin, VWF15-D'D3 (recombinant D'D3 protein generated in-house at Sanofi)
Detection phase		Goat anti-human lgG (H+L) HRP conjugate
Minimum required dilution		1:50
QC concentration		HPC: 2500 ng/mL MPC: 500 ng/mL LPC: 25.0 (for validation), 17.7 (for screening analysis) and 33.4 ng/mL (for confirmatory analysis)
Screen and confirmatory cut point		Screening assay cut point factor (X): 1.55 Titration assay cut point factor (XTCP): 2.17 Confirmatory assay cut point (% signal inhibition): 43.2%
Sensitivity		Screening assay: 3.70 ng/mL Confirmatory assay: 5.36 ng/mL
Performance of quality control samples for plate acceptance		
System suitability (acceptance criteria limits of assay controls)		
Ranges	PNC raw signal	≤0.0303
	LPC normalized signal (validation)	≥1.42
	MPC normalized signal	≥7.75
	HPC normalized signal	≥22.5
Intra-assay precision - %CV range (anti-XTEN antibodies)		
Screening (n=3)	PNC	4.60%
	LPC	1.78%
	MPC	NA
	HPC	2.08%
Inter-assay precision - %CV (anti-XTEN antibodies)		
Screening[a] (n=24)	PNC	39.6%
	LPC	28.8%
	MPC	35.1%
	HPC	35.0%
Titration assay precision (n=9)		20.1%

Method validation items	Description
Selectivity	10/10 spiked individual lots of normal plasma met the criteria. 6/10 blank individual lots of normal plasma met the criteria. 10/10 spiked individual lots of FVIII deficient plasma met the criteria. 10/10 blank individual lots of FVIII deficient plasma met the criteria. No effects were observed with 2.5% hemolysate, 5% hemolysate, or 2% intralipid.
Drug Interference	At 25.0 ng/mL of anti-D'D3 antibodies, addition of 200 µg/mL of VWF 15-D'D3 resulted in a negative signal, indicating interference. At 500 ng/mL and 2500 ng/mL of anti-D'D3 antibodies, addition of 200 µg/mL of VWF 15-D'D3 still resulted in a positive signal.
Stability (normal human serum)	F/T stability: Demonstrated up to 5 F/T cycles for low and high PCs Benchtop stability (ambient temperature): Demonstrated up to 24 hours
Prozone/hook effect	No prozone effects observed up to 228 000 ng/mL antibody.

%CV = percent coefficient of variation; D'D3= D'D3 domain of human von Willebrand factor; F/T = freeze/thaw; FVIII = coagulation factor VIII; HPC = high positive control; IgG = Immunoglobulin G; MPC = mid positive control; LPC = low positive control; PNC = pooled negative control; QC = quality control; VWF = von Willebrand factor.

a Data obtained during the intra-assay precision assessments is used to establish the %CV acceptance range for controls and samples. The final precision criterion of the assay is based off of the intra-assay precision assessment.

Source: [redacted] Method Validation Report 186548.

2.2 溶出試験

該当なし。

2.3 バイオアベイラビリティ及び生物学的同等性試験

物理化学的及び生物学的分析評価において、BIV001-B 原薬は BIVV001-A 原薬と同等／同質であった。同様に、分析学的同等性／同質性試験において、Process BIVV001-A-001 又は Process BIVV001-B-00X で製造された製剤間で著しい相違は認められなかった。このため、生物薬剤学的又は臨床 PK 同等性試験は実施しなかった。原薬の同等性／同質性に関する詳細は Module 3.2.S.2.6、製剤の同等性／同質性に関する詳細は Module 3.2.P.2.3 に示す。

3　全試験を通しての結果の比較と解析

3.1　製造方法変更に関連した分析学的試験

臨床開発期間中に、BIVV001 原薬の製造プロセスは Process BIVV001-A から Process BIVV001-B へ変更された。変更内容は、細胞株の変更を伴わない[redacted]であった。BIVV001 製剤の製造プロセスは Process BIVV001-A-001 から Process BIVV001-B-00X へ変更された。変更内容は、バイアルの充填容量及び製剤濃度を多様にすることによって、様々な含有量のバイアルを追加可能とするものであり、それ以外は変更されなかった。第 3 相試験期間中に原薬（BIVV001-B）及び製剤（BIVV001-B-00X）の製造プロセスは変更されず、これらは市販後にも使用される予定である。物理化学的及び生物学的分析評価において、第 3 相試験に使用及び市販後に使用予定の原薬（BIVV001-B）は第 1/2a 試験で使用された原薬（BIVV001-A）と同等／同質であった（Module 3 3.2.S.2.6）。同様に、第 3 相試験に使用及び市販後に使用予定の製剤（BIVV001-B-00X）は第 1/2a 試験で使用された製剤（BIVV001-A-001）と同等／同質であった（Module 3.2.P.2.3）。このため、臨床同等性試験は実施しなかった。

3.2　FVIII 活性測定法

FDA から認可された *in vitro* 検査法（Siemens Healthcare Diagnostics）に基づいて血漿中 FVIII を測定するために、Dade Actin FSL を aPTT 試薬として用いる凝固一段法を[redacted]で独自に改良した（2.1.1.2 項）。その後、本測定法を、rFVIII（Advate）（2.1.1.3 項）及び PKM17085 試験における PEG 化 rFVIII（Adynovi）（2.1.1.4 項）の FVIII 活性測定のためにバリデートして使用した。

3.2.1　初期の FVIII 活性測定法：凝固一段法

rFVIII 製剤のため、BIVV001 の力価は Actin FSL を活性化剤として用いる凝固一段法によって評価される（Module 3.2.S.4.2）(3)。加えて、凝固一段法は BIVV001 の *in vivo* 凝固活性を正確に反映するため、臨床検体の測定法として推奨される(3)。このため、BIVV001 の試験を通して、凝固一段法を PK 評価のための主要な測定法として使用した。2 段階の発色合成基質法（3.2.2 項）は代替法として使用した(8)。

第 1/2a 相試験（242HA101 試験及び 242HA102 試験）の検体を測定するため、BIVV001 製剤を標準物質として用いて凝固一段法をバリデートした（2.1.1.5 項）。その後、第 3 相試験及び第 1 相試験（PKM17085 試験及び PKM16978 試験）のために、WHO 国際標準品により較正した標準血漿を用いて凝固一段法をバリデートした（2.1.1.6 項）。標準物質の変更にもかかわらず、2 つの凝固一段法の測定結果は同等であった（Module 2.7.2 [3.1 項]）。標準血漿を用いた凝固一段法は臨床検査施設で広く使用されており、WHO 国際標準品により較正されるが、一方、BIVV001 製剤を標準物質として用いた凝固一段法は、異なる施設で独自に測定法バリデーションを実施することになるため、望ましく

ない(8)(19)。標準物質として BIVV001 製剤を用いた測定法と標準血漿を用いた測定法間の相違を表 15 に要約する。両測定法は等しく十分な感度をもち、良好な分析単位内及び分析単位間の真度及び精度を示す（表 4 及び表 5）。

表 15 - Comparison of one-stage clotting assays for determination of BIVV001 FVIII activity by BIVV001 product-specific self-standard and plasma standard

	BIVV001 OSC assay with BIVV001 self-standard	**BIVV001 OSC assay with plasma standard**
Assay standard/calibrators	BIVV001 self-standard	Standard human plasma
Calibrator curve selection for result extrapolation	High curve: 0.100 to 6.000 IU/mL Low curve: 0.010 to 0.100 IU/mL	High curve: 0.250 to 6.000 IU/mL Low curve: 0.010 to 0.250 IU/mL
Analyte	FVIII activity	
Biological matrix	Human plasma (sodium citrate)	
Type of assay	One-stage clotting with Actin FSL as the activator	
aPTT reagents	Dade Actin FSL, Siemens Healthcare Diagnostics	
Instrument	Siemens BCS XP coagulation analyzer (optical clot detection)	
Reportable assay range	0.010 to 6.000 IU/mL in 100% plasma	
LLOQ	0.010 IU/mL	
QC	BIVV001	

Abbreviations: aPTT = activated partial thromboplastin time; FVIII = coagulation factor VIII; LLOQ = lower limit of quantitation,
OSC = one-stage clotting; QC = quality control.

同じ標準血漿を用いて血漿中の FVIII 活性と BIVV001 の FVIII 活性を測定する凝固一段法は、QC 試料が異なるにもかかわらず、非常に類似している（表 16）。凝固一段法は主として BIVV001 の治験参加者のスクリーニングに用いた。これらの 2 つの測定法の性能を比較するために、BIVV001 の凝固一段法を、正常対照血漿を用いて、血漿由来の FVIII 活性を測定するためにバリデートした。BIVV001 の凝固一段法は、0.010～0.993 IU/mL の範囲の血漿 FVIII 活性を測定可能であり、良好な感度並びに真度及び精度を示した（表 5）。BIVV001 の凝固一段法は血漿 FVIII の凝固一段法と同等であり、BIVV001 による治療前の血漿 FVIII 活性のベースラインを測定することができる。

表 16 - Comparison of one-stage clotting assays for determination of plasma FVIII activity and BIVV001 FVIII activity using plasma standard

	Plasma FVIII OSC assay	BIVV001 FVIII OSC assay
Assay standard/calibrator	CRYOcheck Normal Reference Plasma, Precision BioLogic (anchored against the WHO 6th plasma IS)	Standard human plasma, Siemens Healthcare Diagnostics (anchored against the WHO 6th plasma IS)
Reportable assay range	0.005 to 5.968 IU/mL	0.010 to 6.000 IU/mL
LLOQ	0.005 IU/mL	0.010 IU/mL
QC samples	Precision BioLogic QC plasma	BIVV001
High calibration curve	1.5, 1.0, 0.5, 0.3, 0.1, 0.05 (IU/mL)	1.5, 1.0, 0.75, 0.5, 0.3, 0.1, 0.05 (IU/mL)
Low calibration curve	0.15, 0.08, 0.03, 0.01, 0.005, 0.0025 (IU/mL)	0.15, 0.08, 0.05, 0.03, 0.01, 0.005, 0.0025 (IU/mL)
Analyte	FVIII activity	
Biological matrix	Human plasma (sodium citrate)	
Type of assay	One-stage clotting with Actin FSL as the activator	
aPTT reagents	Dade Actin FSL, Siemens Healthcare Diagnostics	
Instrument	Siemens BCS XP coagulation analyzer (optical clot detection)	

Abbreviations: aPTT = activated partial thromboplastin time; FVIII = coagulation factor VIII; IS = international standard; LLOQ = lower limit of quantitation; OSC = one-stage clotting; QC = quality control; WHO = World Health Organization.

3.2.2 代替 FVIII 活性測定法：発色合成基質法

発色合成基質法は、FVIII 活性測定のための重要な代替法である(8)。過剰の FIXa の存在下で、FXa の生成量は血漿検体中の FVIII 活性量に比例する。FXa の生成量は発色合成基質を用いて測定され、FVIII 活性は検量線から算出される。発色合成基質法は凝固一段法のように広く使用されていないが、測定系内の成分（例えば FVIII 欠乏血漿）及び分析前の変動因子による妨害を凝固一段法に比べて受けづらい(19)。

BIOPHEN FVIII:C（Hyphen Biomed）キットを用いた発色合成基質法を自社で開発し、[redacted] へ移管した。96 ウェルプレートリーダーを用いて FVIII 活性を測定した。第 1/2a 相試験（242HA101 試験及び 242HA102 試験）では、治験参加者のスクリーニング及び Advate の PK 評価のための FVIII 活性測定に発色合成基質法を使用した（2.1.2.1 項）。第 1/2a 相試験での BIVV001 の PK 評価には、Siemens BCS XP analyzer を使用し、BIVV001 製剤を標準物質として用いた発色合成基質法を用いた（2.1.2.2 項）。その後、第 3 相試験（EFC16293 試験、EFC16295 試験及び LTS16294 試験）には、WHO 国際標準品により較正された標準血漿を用いた発色合成基質法を使用した（2.1.2.3 項）。

3.2.3　凝固一段法と発色合成基質法の比較

FVIII 活性測定では、複数の rFVIII 製剤について、発色合成基質法と aPTT に基づく凝固一段法の間で著しい相違が認められている(8)。これは標準血漿を用いた BIVV001 の測定でも見られ、発色合成基質法で測定された FVIII 活性は、凝固一段法に比べて約 2.5 倍高かった（Module 2.7.2 [2.6.1.2.4 項]）。これは、BIVV001 のモル比活性について、発色合成基質法と凝固一段法の測定値が異なることと一致する。凝固一段法と発色合成基質法による測定結果が異なる理由については、Module 2.6.2 に詳細に記載する。凝固一段法と発色合成基質法による BIVV001 のモル比活性の相違は、BIVV001 が単鎖 FVIII であり、それに共有結合した VWF-D'D3 ドメインをもち、活性化に 2 回のトロンビン切断を必要とすること、あるいは XTEN 周辺のトロンビン切断や D′D3-XTEN の遊離にわずかな差があることより説明可能である。これは、測定系内のトロンビン濃度及びテナーゼ複合体形成までのトロンビンのインキュベーション時間によって影響され、結果的に凝固一段法での凝固時間の延長をもたらす。

3.2.4　フィールド試験：BIVV001 の FVIII 活性評価における測定施設間のばらつき

臨床検体の FVIII 活性評価に加えて、世界の臨床検査施設での BIVV001 の FVIII 活性測定法の性能を評価するため、盲検、国際、多施設（13 か国、35 施設）のフィールド試験を実施した。これらの検査施設では、添加血漿中の BIVV001 及び Advate の FVIII 活性を測定する際に、様々な aPTT 及び発色試薬並びに異なる機器を用いた。本試験の結果を以下に記載し、詳細は Module 5.3.1.4 [PMH0205]に示す。

BIVV001 又は市販の rFVIII 製剤（Advate）を、表示力価に基づいて 0.80、0.20 又は 0.05 IU/mL になるように先天性の FVIII 欠乏血漿に添加した。Advate は施設及び試薬をまたいで測定法の性能を評価するための対照として用いた。BIVV001 の表示力価は Actin FSL 試薬を用いた凝固一段法で決められた。検査施設は、FVIII 標準血漿と一般的な市販の試薬及び／又はキットを用いて、各施設の FVIII 活性測定法で添加検体を測定した。全ての施設はルーチン検査の作業を行った。大多数の施設が凝固一段法と発色合成基質法の両方を実施した。複数の凝固一段法試薬又は発色合成基質法キットを用いた施設はほとんどなかった。

凝固一段法について、BIVV001 測定時に試薬起因のばらつきが見られ（n=51）、FVIII 濃度が低いほどばらつきが大きかった。しかし、aPTT 活性化試薬（エラグ酸、カオリン又はシリカ）について一定の傾向はみられなかった。BIVV001 について、Actin FSL を試薬として用いた場合（n=7）、全ての活性で理論値の±25%と信頼できる結果が得られた。しかし、Actin FS を試薬として用いた場合（n=10）、3 つの全ての活性で約 2.5 倍までの過大な回収率が認められた。SynthASil を用いた場合（n=15）、理論活性に比べて回収率が約 30%低かった。

試薬に起因するばらつきは Advate にも見られたが、より小さく、評価した大部分の凝固一段法試薬について±25%の判定基準内であった。

大部分の発色合成基質法のキット（n=42）で、3 つの活性のいずれも BIVV001 添加検体の FVIII 活性の回収率は約 2～3 倍であった（つまり 200%～300%）。この過大な回収率は、それまでの非臨床及び臨床データから予測されるものであり、Actin FSL（BIVV001 の力価測定試薬）を用いた凝固一段法

に比べて、発色合成基質法は約 2.5 倍高いモル比活性値を示す（3.2.3 項）。凝固一段法に比べて、発色合成基質法は、BIVV001 添加血漿検体について測定法間のばらつきが小さかった。異なる発色合成基質法で評価された Advate についても測定法間のばらつきが見られたが、その程度は BIVV001 に比べて小さかった。

施設内のばらつきは、凝固一段法及び発色合成基質法のいずれについても、2 つの FVIII 製剤で同程度であった。凝固一段法について、測定法間のばらつきは、BIVV001 のほうが Advate に比べて大きかった。

測定法間の相違は FVIII 補充療法、とりわけ長半減期延長型の製剤のモニターでは一般的である(20)。本試験では、凝固一段法は Actin FSL 及び他の aPTT 試薬を用いて BIVV001 の FVIII 活性を確実に測定できるが、他の市販の修飾 FVIII 製剤と同程度のばらつきで、BIVV001 の FVIII 活性を過少及び過大評価した。Actin FS 試薬を用いた凝固一段法又は多くの発色合成基質法について、理論活性に対して約 2.5 倍の過大評価が見られた。

3.3 免疫原性測定法

BIVV001 の免疫原性を評価するため、BIVV001 の臨床開発プログラムにおいて FVIII インヒビター（中和抗体）のモニター及び定量のために Bethesda 法の Nijmegen 変法を用いた（2.1.3.1.1 項）。

BIVV001 の臨床試験における ADA の評価には段階的アプローチを用いた。BIVV001 の ADA 測定法の開発において、マウス抗 FVIII 抗体を陽性対照として用いた。測定フォーマットは、捕捉及び検出試薬として BIVV001 の標識体を用いるサンドイッチ ELISA である。測定法は BIVV001 分子の様々な部分に結合する ADA を検出することができる。更に BIVV001 投与後に生成される ADA の特異性を評価するため、4 種の特性解析（FVIII、Fc、D′D3 及び XTEN）を実施した。FVIII 及び Fc 部分に結合する ADA の特性解析は、それぞれ過剰の Advate 及びヒト IgG により生じる競合反応を用いてバリデートした。XTEN 及び D′D3 に対する ADA 測定法は、抗 XTEN 抗体及び抗 D′D3 抗体をそれぞれ陽性対照として用いてバリデートした（2.1.3.2.2 項及び 2.1.3.2.3 項）。これらの測定は確認試験で ADA 陽性が確定した検体についてのみ実施した。

要約すると、ADA 測定法は、中和活性の有無にかかわらず、BIVV001 に結合する全ての ADA を検出することができる。更に、特性解析によって BIVV001 分子の 4 つの構成部分（FVIII、Fc、XTEN、D′D3）に結合する ADA の特異性を評価することができる。

3.4 総括

臨床開発プログラムで使用された BIVV001 の原薬及び製剤の製造プロセスは分析学的に同等／同質であった。原薬及び製剤の製造プロセスは第 3 相試験期間中には変更されず、市販製剤は同じプロセスで製造される予定である。

BIVV001 の臨床試験において、BIVV001 の FVIII 活性及び免疫原性を評価するため、種々のバリデート済みの測定法を使用した。BIVV001 投与後の FVIII 活性のプロファイルを評価するために 2 つの

測定法を使用した。凝固一段法は力価及び主要な PK 評価のための測定法であり、発色合成基質法は代替法である。免疫原性測定法は ADA を評価するためにバリデートした。免疫原性測定法は、BIVV001 分子の 4 つの構成部分（FVIII、Fc、XTEN、D′D3）に対する結合特異性を評価するための特性解析と FVIII に対する中和抗体（インヒビター）を評価するための Bethesda 法の Nijmegen 変法を含む。

4 参考文献

1. Pipe SW, Montgomery RR, Pratt KP, Lenting PJ, Lillicrap D. Life in the shadow of a dominant partner: the FVIII-VWF association and its clinical implications for hemophilia A. Blood 2016;128(16):2007-16.
2. Schellenberger V, Wang CW, Geething NC, Spink BJ, Campbell A, To W, et al. A recombinant polypeptide extends the in vivo half-life of peptides and proteins in a tunable manner. Nat Biotechnol. 2009;27(12):1186-90.
3. Seth Chhabra E, Liu T, Kulman J, Patarroyo-White S, Yang B, Lu Q, Drager D, et al. BIVV001, a new class of factor VIII replacement for hemophilia A that is independent of von Willebrand factor in primates and mice. Blood. 2020;135(17):1484-96.
4. FDA, CDER/CBER. Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry, May 2018; 44 p.
5. FDA, CDER/CBER. Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products —Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection. FDA guidance document FDA-2009-D-0539. 2019; 37 p.
6. EMA. Guideline on Bioanalytical Method Validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2. 2011:1-23.
7. EMA. Guideline on Immunogenicity Assessment of Therapeutic Proteins. EMEA/CHMP/BMWP/14327/2006 Rev. 1. 2017:1-24.
8. EMA. Guideline on the clinical investigation of recombinant and human plasma-derived factor VIII products. EMA/CHMP/BPWP/144533/2009 rev. 2. 2018:1-23.
9. Kitchen S, Tiefenbacher S, Gosselin R. Factor Activity Assays for Monitoring Extended Half-Life FVIII and Factor IX Replacement Therapies. Semin Thromb Hemost. 2017;43(3):331-7.
10. Collins PW, Fischer K, Morfini M, Blanchette VS, Björkman S; International Prophylaxis Study Group Pharmacokinetics Expert Working Group. Implications of coagulation factor VIII and IX pharmacokinetics in the prophylactic treatment of haemophilia. Haemophilia. 2011;17(1):2-10.
11. Kasper CK, Aledort L, Aronson D, Counts R, Edson JR, van Eys J, et al. Proceedings: A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. Thromb Diath Haemorrh. 1975;34(2):612.
12. Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Boezeman J, van den Berg M, Mauser-Bunschoten E. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. Thromb Haemost. 1995;73(2):247-51.
13. Peyvandi F, Ettingshausen C. E, Goudemand J, Jimenez-Yuste V, Santagostino E, Makris M. New findings on inhibitor development: from registries to clinical studies. Haemophilia. 2017;23(1):4-13.
14. Xi M, Makris M, Marcucci M, Santagostino E, Mannucci PM, Iorio A. Inhibitor development in previously treated hemophilia A patients: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression. J Thromb Haemost. 2013 Sep;11(9):1655-62.
15. Kempton CL. Inhibitors in previously treated patients: a review of the literature. Haemophilia. 2010;16:61-5.

16. Verbruggen B. Diagnosis and quantification of factor VIII inhibitors. Haemophilia. 2010;16(102):20-4.
17. Giles AR, Verbruggen B, Rivard GE, Teitel J, Walker I and the Association of Hemophilia Centre Directors of Canada. A detailed comparison of the performance of the standard versus the Nijmegen modification of the Bethesda assay in detecting factor VIII:C inhibitors in the haemophilia A population of Canada. On behalf of Factor VIII/IX Subcommittee of Scientific and Standardization Committee of International Society on Thrombosis and Haemostasis. Thromb Haemost. 1998;79(4):872-5.
18. Neugebauer B, Drai C, Haase M, Hilger A, Keller-Stanislawski B, Laitinen-Parkkonen P, et al. Factor VIII products and inhibitor development: concepts for revision of European regulatory guidelines. Haemophilia. 2008;14(1):142-4.
19. Marlar RA, Strandberg K, Shima M, Adcock DM. Clinical utility and impact of the use of the chromogenic vs one-stage factor activity assays in haemophilia A and B. Eur J Haematol. 2020;104(1):3-14
20. Gray E, Kitchen S, Bowyer A, Chowdary P, Jenkins PV, Murphy P, et al. Laboratory measurement of factor replacement therapies in the treatment of congenital haemophilia: A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation guideline. Haemophilia. 2020;26(1):6-16.

5 補足情報

表 17 - Overview on cell lines, manufacturing processes and formulations used in clinical studies

Drug product	BIVV001-A-001	BIVV001-B-00X
Cell line	Recombinant HEK293 cells	Recombinant HEK293 cells
Formulation	10 mM L-histidine buffer, 250 mM L-arginine HCl, 5% (w/v) sucrose, 5 mM calcium chloride, 0.05% (w/v) polysorbate-80, at pH 6.5 to 7.5	10 mM L-histidine buffer, 250 mM L-arginine HCl, 5% (w/v) sucrose, 5 mM calcium chloride, 0.05% (w/v) polysorbate-80, at pH 6.5 to 7.5
Presentation	Lyophilized powder	Lyophilized powder
Clinical studies	242HA101, 242HA102	EFC16293, EFC16295, LTS16294

Abbreviations: HEK293 = human embryonic kidney 293.

表 18 - Summary of bioanalytical studies associated with clinical studies

Study (method)	Assay	Analyte	Matrix (anticoag.)	Calibration curve	LLOQ	Within-run accuracy (%)[a]	Between-run accuracy (%)[a]	Within-run precision (%)	Between-run precision (%)	Clinical studies	Study report location
VAL-20[redacted]-001.001	OSC	Plasma FVIII activity	Plasma (citrated)	0.005 to 5.968 IU/mL	0.005 IU/mL	NA	92.0% to 105.0%	4.1% to 11.6%	0.7% to 6.5%	242HA101, 242HA102, EFC16293, EFC16295, LTS16294, PKM16978, PKM17085	5.3.1.4 [VAL-20[redacted]-001.001]
VAL-20[redacted]-003.001	OSC	Advate FVIII activity	Plasma (citrated)	0.005 to 5.968 IU/mL	0.005 IU/mL	NA	101.6% to 116.0%	3.7% to 8.6%	3.0% to 6.9%	242HA101, 242HA102 PKM17085	5.3.1.4 [VAL-20[redacted]-003.001]
MVR-CT-20[redacted]-002.001	OSC	Adynovi FVIII activity	Plasma (citrated)	0.006 to 3.000 IU/mL	0.006 IU/mL	81.2% to 127.7%	87.9% to 119.3%	0.0% to 18.7%	3.6% to 10.1%	PKM17085	5.3.1.4 [MVR-CT-20[redacted]-002.001]
MVR-CT-20[redacted]-007.002	OSC assay to measure BIVV001 FVIII activity-self standard	BIVV001 FVIII activity	Plasma (citrated)	0.010 to 6.000 IU/mL	0.010 IU/mL	97.4% to 132.0%	101.7% to 119.0%	0.2% to 11.5%	3.6% to 7.7%	242HA101, 242HA102	5.3.1.4 [MVR-CT-20[redacted]-007.002]
MVR-CT-20[redacted]-008.001	OSC assay to measure BIVV001 FVIII activity-plasma standard	BIVV001 FVIII activity	Plasma (citrated)	0.010 to 6.000 IU/mL	0.010 IU/mL	82.7% to 121.6%	90% to 114.6%	0.9% to 17.6%	3.4% to 9.7%	EFC16293, EFC16295, LTS16294, PKM16978, PKM17085	5.3.1.4 [MVR-CT- 20[redacted]-008.001]
8306-942	CS	Plasma FVIII activity and Advate FVIII activity	Plasma (citrated)	0.008 to 0.42 IU/mL	0.008 IU/mL	90.3% to 144.5%	102.5% to 110.4%	2.9% to 22.7%	5.0% to 19.4%	242HA101, 242HA102	5.3.1.4 [8306-942]

2.7.1 生物薬剤学及び関連する分析法の概要
efanesoctocog alfa

Study (method)	Assay	Analyte	Matrix (anticoag.)	Calibration curve	LLOQ	Within-run accuracy (%)[a]	Between-run accuracy (%)[a]	Within-run precision (%)	Between-run precision (%)	Clinical studies	Study report location
MVR-CT-20[redacted]-010.001	CS assay to measure BIVV001 FVIII activity-self standard	BIVV001 FVIII activity	Plasma (citrated)	0.010 to 2.500 IU/mL	0.010 IU/mL	89.4 to 116.5%	92.8 to 111.3%	0.5 to 9.6%	1.8 to 6.3%	242HA101, 242HA102	5.3.1.4 [MVR-CT-20[redacted]-010.001]
MVR-CT-20[redacted]-001.001	CS assay to measure BIVV001 FVIII activity-plasma standard	BIVV001 FVIII activity	Plasma (citrated)	0.033 to 8.275 IU/mL	0.033 IU/mL	89.8% to 111.3%	94.3% to 109.1%	0.8% to 6.9%	2.4% to 6.1%	EFC16293, EFC16295, LTS16294	5.3.1.4 [MVR-CT-20[redacted]-001.001]
VAL-20[redacted]-010.001	Nijmegen-modified Bethesda assay (Inhibitor)	FVIII Inhibitors	Plasma (citrated)	NA	0.6 BU/mL	78.9 to 108.0%	90.6% to 99.0%	9.4% to 10.2%	5.1% to 9.9%	242HA101, 242HA102, EFC16293, EFC16295, LTS16294, PKM16978, PKM17085	5.3.1.4 [VAL-20[redacted]-010.001]
8374-746	ADA assay	BIVV001 ADA	Plasma (citrated)	NA	10.635 ng/mL	NA	NA	Screening: 0.9% to 33.8% Confirmation: 0.2% to 10.7% for BIVV001; 0.0% to 22.7% for Advate	Screening: 7.5% to 14.6% Confirmation: 0.4% to 9.2% for BIVV001; 0.4% to 24.4% for Advate	242HA101, 242HA102, EFC16293, EFC16295, LTS16294, PKM16978, PKM17085	5.3.1.4 [8374-746]

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; CS = chromogenic substrate; FVIII = coagulation factor VIII; LLOQ = lower limit of quantitation; OSC = one-stage clotting; NA = not available.
Advate is a recombinant full length FVIII (rFVIII) product; Adynovi is a PEGylated full length rFVIII product.
a Accuracy recovery (% of theoretical value).

表 19 - Summary of incurred sample reanalysis conducted in clinical studies

Study (method)	Analyte	Pass rate (%)	ISR conducted in clinical studies (Study population)	Study report location
BIVV001 FVIII activity by OSC assay with plasma standard	BIVV001 FVIII activity	97%	EFC16293 (hemophilia A)	5.3.5.1 [EFC16293]
BIVV001 FVIII activity by CS assay with plasma standard	BIVV001 FVIII activity	93%	EFC16293 (hemophilia A)	5.3.5.1 [EFC16293]
Advate FVIII activity by OSC assay with plasma standard	Advate FVIII activity	90%	PKM17085 (hemophilia A)	5.3.3.2 [PKM17085]
Adynovi FVIII activity by OSC assay with plasma standard	Adynovi FVIII activity	85%	PKM17085 (hemophilia A)	5.3.3.2 [PKM17085]
BIVV001 FVIII activity by OSC assay with plasma standard	BIVV001 FVIII activity	100%	PKM17085 (hemophilia A)	5.3.3.2 [PKM17085]
Advate FVIII activity by using CS assay with plasma standard	Advate FVIII activity	92%	242HA101 (hemophilia A)	5.3.3.2 [242HA101]

CS = chromogenic substrate; FVIII = coagulation factor VIII; OSC = one-stage clotting.
Advate is a recombinant full length FVIII (rFVIII) product; Adynovi is a PEGylated full length rFVIII product.

6 付録

Appendix A Summary of life cycle information of assay methods used during development and performance of pharmacokinetic assays used in pivotal clinical studies

表 20 - Summary of life cycle information of one-stage clotting assay used to measure BIVV001 FVIII activity in plasma

	Method validation #1	**Method validation #2**	**Clinical studies 242HA101, 242HA102**	**Clinical studies EFC16293, EFC16295, LTS16294, PKM16978, PKM17085**
Analyte	BIVV001 FVIII activity	BIVV001 FVIII activity	BIVV001 FVIII activity	BIVV001 FVIII activity
Validation type	Full	Full	In-study	In-study
eCTD reference number	Section 5.3.1.4	Section 5.3.1.4	Section 5.3.1.4	Section 5.3.1.4
Method ID	MVR-CT-20[redacted]-007.002 (Version 1.0)	MVR-CT-20[redacted]-008.001 (Version 1.0)	MVR-CT-20[redacted]-007.002 (Version 1.0)	MVR-CT-20[redacted]-008.001 (Version 1.0)
Duration of time method is in use	08/20[redacted]-04/20[redacted]	12/20[redacted]-present	08/20[redacted]-04/20[redacted]	12/20[redacted]-present
Bioanalytical site	[redacted], [redacted], USA	[redacted], [redacted], USA	[redacted], [redacted], USA	[redacted], [redacted], USA
Matrix	Plasma (Sodium Citrate)			
Platform	Clot-Based Assay			
Format	BIVV001 FVIII activity is determined utilizing an aPTT-based one-stage clotting assay with Dade® Actin® FSL reagent on a Siemens BCS® XP analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics).			
Stock reference, lot number, expiration date	BIVV001 Drug Product, lot [redacted], expiration date [redacted] 20[redacted]	BIVV001 Drug Product, lot [redacted], expiration date [redacted] 20[redacted]	BIVV001 Drug Product, lot [redacted], expiration date [redacted] 20[redacted]	BIVV001 Drug Product, lot [redacted], expiration date [redacted] 20[redacted]

	Method validation #1	Method validation #2	Clinical studies 242HA101, 242HA102	Clinical studies EFC16293, EFC16295, LTS16294, PKM16978, PKM17085
Calibration range from the lower limit of quantitation (LLOQ) to the upper limit of quantitation (ULOQ)	0.010 (LLOQ) to 6.000 (ULOQ) IU/mL	0.010 (LLOQ) to 6.000 (ULOQ) IU/mL	0.010 (LLOQ) to 6.000 (ULOQ) IU/mL	0.010 (LLOQ) to 6.000 (ULOQ) IU/mL
Matrix study population	Diseased	Diseased	Diseased	Diseased
Link to reports and applicable amendments	5.3.1.4 [MVR-CT-20[redacted]-007.002]	5.3.1.4 [MVR-CT-20[redacted]-008.001]	5.3.3.2 [242HA101] 5.3.3.2 [242HA102]	5.3.5.1 [EFC16293] 5.3.5.2 [EFC16295] 5.3.3.2 [PKM17085]
Synopsis of amendment history	Interim Reports: VAL-CT-20[redacted]-007.001 ([redacted] 20[redacted]) VAL-CT-20[redacted]-007.002 ([redacted] 20[redacted]) VAL-CT-20[redacted]-007.003 ([redacted] 20[redacted]) VAL-CT-20[redacted]-007.004 ([redacted] 20[redacted]) MVR-CT-20[redacted]-007.001 ([redacted] 20[redacted])	Interim Reports: VAL-CT-20[redacted]-008.001 ([redacted] 20[redacted]) VAL-CT-20[redacted]-008.002 ([redacted] 20[redacted]) VAL-CT-20[redacted]-008.003 ([redacted] 20[redacted]) VAL-CT-20[redacted]-008.004 ([redacted] 20[redacted])	Not applicable	Not applicable

表 21 - Summary of life cycle information of chromogenic substrate assay used to measure BIVV001 FVIII activity in plasma

	Method validation #1	**Method validation #2**	**Clinical studies 242HA101, 242HA102**	**Clinical studies EFC16293, EFC16295, LTS16294**
Analyte	BIVV001 FVIII activity	BIVV001 FVIII activity	BIVV001 FVIII activity	BIVV001 FVIII activity
Validation type	Full	Full	In-study	In-study
eCTD reference number	Section 5.3.1.4	Section 5.3.1.4	Section 5.3.1.4	Section 5.3.1.4
Method ID	MVR-CT-20[redacted]-010.001 (Version 1.0)	MVR-CT-20[redacted]-001.001 (Version 1.0)	MVR-CT-20[redacted]-010.001 (Version 1.0)	MVR-CT-20[redacted]-001.001 (Version 1.0)
Duration of time method is in use	08/20[redacted]-04/20[redacted]	12/20[redacted]-present	08/20[redacted]-04/20[redacted]	12/20[redacted]-present
Bioanalytical site	[redacted], [redacted], USA	[redacted], [redacted], USA	[redacted], [redacted], USA	[redacted], [redacted], USA
Matrix	Plasma (Sodium Citrate)			
Platform	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)			
Format	BIVV001 FVIII activity is determined utilizing a two-stage chromogenic substrate assay with BIOPHEN FVIII:C reagent on a Siemens BCS® XP analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics).			
Stock reference, lot number, expiration date	BIVV001 Drug Product, lot [redacted], expiration date [redacted] 20[redacted]	BIVV001 Drug Product, lot [redacted], expiration date [redacted] 20[redacted]	BIVV001 Drug Product, lot [redacted], expiration date [redacted] 20[redacted]	BIVV001 Drug Product, lot [redacted], expiration date [redacted] 20[redacted]
Calibration range from the lower limit of quantitation (LLOQ) to the upper limit of quantitation (ULOQ)	0.010 (LLOQ) to 2.500 (ULOQ) IU/mL	0.033 (LLOQ) to 8.275 (ULOQ) IU/mL	0.010 (LLOQ) to 2.500 (ULOQ) IU/mL	0.033 (LLOQ) to 8.275 (ULOQ) IU/mL
Matrix study population	Diseased	Diseased	Diseased	Diseased
Link to reports and applicable amendments	5.3.1.4 [MVR-CT-20[redacted]-010.001]	5.3.1.4 [MVR-CT-20[redacted]-001.001]	5.3.3.2 [242HA101] 5.3.3.2 [242HA102]	5.3.5.1 [EFC16293] 5.3.5.2 [EFC16295]

	Method validation #1	Method validation #2	Clinical studies 242HA101, 242HA102	Clinical studies EFC16293, EFC16295, LTS16294
Synopsis of amendment history	Interim Reports: VAL-CT-20[redacted]-010.001 ([redacted] 20[redacted]) VAL-CT-20[redacted]-010.002 ([redacted] 20[redacted]) VAL-CT-20[redacted]-010.003 ([redacted] 20[redacted]) VAL-CT-20[redacted]-010.004 ([redacted] 20[redacted]) VAL-CT-20[redacted]-010.005 ([redacted] 20[redacted])	Interim Report: VAL-CT-20[redacted]-001.001 ([redacted] 20[redacted])	Not applicable	Not applicable

表 22 - Summary method performance of one-stage clotting assay with BIVV001 product-specific self-standard to measure BIVV001 FVIII activity in plasma in 242HA101 and 242HA102 studies

Bioanalytical method validation report name, amendments, and hyperlinks	5.3.1.4 [MVR-CT-20[redacted]-007.002] BCS XP FVIII (BIVV001) One-Stage Clot Assay Using BIVV001 Product Calibrator		
Method description	Factor VIII (FVIII) activity is measured using a modification of the activated partial thromboplastin time (aPTT) using Dade Actin FSL activated PTT reagent on the BCS®XP analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics).		
Materials used for standard calibration curve and concentration	BIVV001 product-specific self-standard (lot [redacted]); Stock solution: 10.0 IU/mL		
Validated assay range	0.010 (LLOQ) to 6.000 (ULOQ) IU/mL		
Material used for quality controls (QCs) and concentration	BIVV001 (lot [redacted]) High Curve (HQC 1 ~1.200 IU/mL; HQC 2 ~0.500 IU/mL; HQC 3 ~0.250 IU/mL); Low Curve (LQC 1 ~0.120 IU/mL; LQC 2 ~0.050 IU/mL; LQC 3 ~0.025 IU/mL)		
Minimum required dilutions (MRDs)	Neat		
Source and lot of reagents	Dade Actin FSL Activated PTT Reagent (Siemens Healthcare Diagnostics Lot #: 547480, 556910A, 562640) 0.025 mol/L Calcium Chloride (Siemens Healthcare Diagnostics Lot #: 539780, 563805, 563890) Immuno-depleted FVIII Deficient Plasma (Siemens Healthcare Diagnostics Lot #: 547628A, 547649, 547656, 560816) Pooled Congenital FVIII Deficient Plasma (HRF Inc. Lot # 16P19F8; George King BioMedical Inc. Lot #: 6065, 6106, 7165)		
Regression model and weighting	Log-lin regression, no 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	High curve: 7 Low Curve: 6	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-007.002 Validation summary table
	Cumulative accuracy (%bias) from LLOQ to ULOQ	≤20% (%RE) for both high and Low curve	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-007.002 Table 5 and Table 7
	Cumulative precision (%CV) from LLOQ to ULOQ	≤15% for both high and Low curve	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-007.002 Table 5 and Table 7

Performance of QCs during accuracy and precision runs	Cumulative accuracy (%bias) in QCs	≤20% (%RE)	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-007.002 Table 12
	Inter-batch %CV	≤15%	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-007.002 Table 12, Table 13, Table 14, and Table15
	Total Error (TE)	Not applicable	Not applicable
Selectivity & matrix effect	Ten (10) independent congenital FVIII deficient donor plasma sources with FVIII activity of <0.010 IU/mL and varying levels of Von Willebrand Factor were spiked with BIVV001 to 0.015 IU/mL of FVIII activity. The assessment passed the acceptance criteria.		5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-007.002 Table 24
Interference & specificity	Assay Interference by Icterus, Lipemia and hemolysis was assessed. No interference was observed.		5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-007.002 Table 25, Table 26, and Table 27
Hemolysis effect	Up to Grade 4 of hemolysis does not interfere with the assay.		5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-007.002 Table 27
Lipemic effect	Assay interference in samples containing 700 mg/dL of intralipid (lipemia) was not observed.		5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-007.002 Table 26
Dilution linearity & hook effect	HV-1 (2.500 IU/mL) and the Dilution Validator (6.000 IU/mL) using the high calibration curve 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 and 1:32 dilutions prepared by the BCS XP in Tris/BSA buffer. Bias% was within ±20.0%.		5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-007.002 Table 22
Bench-top/process stability	Short-Term stability at ambient (room) temperature is up to 24 hours.		5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-007.002 Table 31
Freeze-Thaw stability	3 F/T cycles		5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-007.002 Table 32
Long-term storage	Up to 37 months at -70°C		5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-007.002 Table 34, Table 35, and Table 36
Parallelism	Not applicable		Not applicable
Carry over	Instrument carryover was assessed by testing 11 aliquots of the LV-4 and 10 aliquots of HV-2 in the sequence described in the CLSI EP10 A3 guidance. The difference between the mean of LV-4 validators tested after HV-2 validators and the mean of the LV-4 validators tested after LV-4 validators was <3 times the SD of the LV-4 tested after LV-4 validators.		5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-007.002 Table 23

	Method performance in study 242HA101	
Assay passing rate	17/17 assay runs passed acceptance criteria. 244 of 255 samples have reportable results.	5.3.3.2 242HA101
Standard curve performance	Cumulative bias range (%RE): ±20% (±25% at LLOQ) Cumulative precision (%CV): ≤10%	5.3.3.2 242HA101
QC performance	Cumulative bias range (%RE): high curve -6.1 to -1.7%; low curve -8.5 to 13.9% Cumulative precision (%CV): high curve 1.4 to 7.6%; low curve 0.7 to 9.6% TE (LBA only): Not applicable	5.3.3.2 242HA101
Method reproducibility	Incurred sample re-analysis was not performed.	5.3.3.2 242HA101
Study sample analysis/ stability	All standards, QCs and samples tested in this assay were analyzed within established stability range (273 days (9 months) at -70°C or 88 days (3 months) at -20°C). The maximum time between sample collection & analysis was 140 days.	5.3.3.2 242HA101
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	High curve: 1.538, 1.000, 0.741, 0.500, 0.299, 0.100, 0.050 IU/mL Low curve: 0.149, 0.079, 0.050, 0.030, 0.010 (LLOQ), 0.005, 0.0025 IU/mL	
	Method performance in study 242HA102	
Assay passing rate	24/24 assay runs passed acceptance criteria. 473 of 473 samples have reportable results.	5.3.3.2 242HA102
Standard curve performance	Cumulative bias range (%RE): ±20% (±25% at LLOQ) Cumulative precision (%CV): ≤10%	5.3.3.2 242HA102
QC performance	Cumulative bias range (%RE): high curve -11.8 to -1.4%; low curve -7.2 to 4.3% Cumulative precision (%CV): high curve 3.1 to 13.3%; low curve 4.1 to 10.2% TE (LBA only): Not applicable	5.3.3.2 242HA102
Method reproducibility	Incurred sample re-analysis was not performed.	5.3.3.2 242HA102
Study sample analysis/ stability	All standards, QCs and samples tested in this assay were analyzed within established stability range (365 days at -70°C 3 months (88 days) at -20°C). The maximum time between sample collection & analysis was 101 days.	5.3.3.2 242HA102
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	High curve: 1.538, 1.000, 0.741, 0.500, 0.299, 0.100, 0.050 IU/mL Low curve: 0.149, 0.079, 0.050, 0.030, 0.010 (LLOQ), 0.005, 0.0025 IU/mL	

%CV = percent coefficient of variation; aPTT = activated partial thromboplastin time; BSA = bovine serum albumin; F/T = freeze/thaw;
FVIII = coagulation factor VIII; HQC = high quality control; LBA = ligand binding assay; LLOQ = lower limit of quantitation; LQC = low quality control; QC = quality control; %RE = relative error; TE = total error; ULOQ = upper limit of quantitation.

表 23 - Summary method performance of one-stage clotting assay with plasma standard to measure BIVV001 FVIII activity in plasma in EFC16293, EFC16295 and PKM17085 studies

Bioanalytical method validation report name, amendments, and hyperlinks	5.3.1.4 [MVR-CT-20[redacted]-008.001] BCS XP FVIII (BIVV001) One-Stage Clot Assay Using Plasma Calibrator		
Method description	Factor VIII (FVIII) activity is measured using a modification of the activated partial thromboplastin time (aPTT) using Dade Actin FSL activated PTT reagent on the BCS®XP analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics).		
Materials used for standard calibration curve and concentration	Standard Human Plasma (Siemens Healthcare Diagnostics) at 1.000 IU/mL, calibrated against WHO 6th International Standard (IS).		
Validated assay range	0.010 (LLOQ) to 6.000 (ULOQ) IU/mL		
Material used for quality controls (QCs) and concentration	BIVV001 (lot [redacted]) High Curve (HQC 1 ~1.200 IU/mL; HQC 2 ~0.500 IU/mL; HQC 3 ~0.200 (0.250 IU/mL for Amendment A and B studies); Low Curve (LQC 1 ~0.120 IU/mL; LQC 2 ~0.050 IU/mL; LQC 3 ~0.025 IU/mL)		
Minimum required dilutions (MRDs)	Neat		
Source and lot of reagents	Dade Actin FSL Activated PTT Reagent (Siemens Healthcare Diagnostics Lot #: 556925, 562604, 562640) 0.025 mol/L Calcium Chloride (Siemens Healthcare Diagnostics Lot #: 563830, 563878A, 563890) Immuno-depleted FVIII Deficient Plasma (Siemens Healthcare Diagnostics Lot #: 547675A, 547694A, 560816) Standard Human Plasma (Siemens Healthcare Diagnostics Lot #: 503261B, 503274, 503290) Pooled Congenital FVIII Deficient Plasma (HRF Inc. Lot # 16P19F8, 17P3F8, 19P1F8, 15P24F8, 20P7F8; George King BioMedical Inc. Lot #: POOL-6488, 6555, 6986)		
Regression model and weighting	Log-lin regression, no 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	High curve: 7 Low Curve: 6	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-008.001 Validation summary table
	Cumulative accuracy (%bias) from LLOQ to ULOQ	≤20% (%RE) for both high and Low curve	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-008.001 Table 4 and Table 8
	Cumulative precision (%CV) from LLOQ to ULOQ	≤15% for both high and Low curve	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-008.001 Table 4 and Table 8

Performance of QCs during accuracy and precision runs	Cumulative accuracy (%bias) in QCs	≤20% (%RE)	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-008.001 Table 11
	Inter-batch %CV	≤15%	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-008.001 Table 11
	Total Error (TE)	Not applicable	Not applicable
Selectivity & matrix effect	Ten (10) independent congenital FVIII deficient donor plasma sources with FVIII activity of <0.010 IU/mL and varying levels of Von Willebrand Factor were spiked with BIVV001 to 1.200 IU/mL and 0.010 IU/mL of FVIII activity. The assessment passed the acceptance criteria.		5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-008.001 Table 20
Interference & specificity	Assay Interference by Icterus, Lipemia and hemolysis was assessed. No interference was observed.		5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-008.001 Table 21-23
Hemolysis effect	Up to Grade 4 of hemolysis does not interfere with the assay.		5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-008.001 Table 23
Lipemic effect	No interference was observed for intra-lipids (triglycerides) up to 700 mg/dL.		5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-008.001 Table 21 and Table 22
Dilution linearity & hook effect	The Dilution Validator (6.000 IU/mL) was tested using the high calibration curve at 1:8, 1:16 and 1:32 dilutions prepared by the BCS XP in Tris/BSA buffer. Bias% was within ±20.0%.		5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-008.001 Table 14
Bench-top/process stability	Short-Term stability at Ambient (room) temperature is up to 24 hours. (Refer to study MVR-CT-20[redacted]-007.002)		5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-007.002 Table 31
Freeze-Thaw stability	3 F/T cycles (Refer to study MVR-CT-20[redacted]-007.002)		5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-007.002 Table 32
Long-term storage	Up to 37 months at -70°C (Refer to study MVR-CT-20[redacted]-007.002)		5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-007.002 Table 34-36 5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-008.001 Table 24
Parallelism	Not applicable		Not applicable
Carry over	Instrument carryover was assessed by testing 11 aliquots of the LV-4 and 10 aliquots of HV-2 in the sequence described in the CLSI EP10 A3 guidance. The difference between the mean of LV-4 validators tested after HV-2 validators and the mean of the LV-4 validators tested after LV-4 validators was <3 times the SD of the LV-4 tested after LV-4 validators. (Refer to study MVR-CT-20[redacted]-007.002)		5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-007.002 Table 23

	Method performance in study EFC16293	
Assay passing rate	213/222 assay runs passed acceptance criteria. 3155 of 3160 samples have reportable results (including reanalysis results)	5.3.5.1 EFC16293
Standard curve performance	Cumulative bias range (%RE): ±20% (±25% at LLOQ) Cumulative precision (%CV): ≤10%	5.3.5.1 EFC16293
QC performance	Cumulative bias range (%RE): high curve -4.9 to 11.8%; low curve -6.0 to 28.1% Cumulative precision (%CV): high curve 3.0 to 8.8%; low curve 4.5 to 14.5% TE (LBA only): Not applicable	5.3.5.1 EFC16293
Method reproducibility	Out of 2625 samples from Study EFC16293, 198 samples (7.5%) were retested for ISR and 192 samples met the pre-specified criteria (pass rate was 97%).	5.3.5.1 EFC16293
Study sample analysis/ stability	All standards, QCs and samples tested in this assay were analyzed within established stability range (37 months (1125 days) at -70°C, 3 months (88 days) at -20°C). The maximum time between sample collection & analysis was 756 days.	5.3.5.1 EFC16293
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	Lot #: [redacted] High Curve: 1.500, 1.000, 0.750, 0.500, 0.300, 0.100, 0.050 Low Curve: 0.150, 0.080, 0.050, 0.030, 0.010, 0.005, 0.0025 Lot #: [redacted] High Curve: 1.450, 1.024, 0.757, 0.497, 0.300, 0.100, 0.050 Low Curve: 0.150, 0.080, 0.050, 0.030, 0.010, 0.005, 0.0025 Lot #: [redacted] High Curve: 1.455, 1.000, 0.762, 0.500, 0.302, 0.100, 0.050 Low Curve: 0.149, 0.080, 0.050, 0.030, 0.010, 0.005, 0.0025 Lot #: [redacted] High Curve: 1.509, 0.976, 0.755, 0.503, 0.302, 0.100, 0.050 Low Curve: 0.151, 0.080, 0.050, 0.030, 0.010, 0.005, 0.0025	
	Method performance in study EFC16295	
Assay passing rate	45/46 assay runs passed acceptance criteria. 529 of 529 samples have reportable results.	5.3.5.2 EFC16295
Standard curve performance	Cumulative bias range (%RE): ±20% (±25% at LLOQ) Cumulative precision (%CV): ≤10%	5.3.5.2 EFC16295
QC performance	Cumulative bias range: (%RE): high curve -4.3 to 10.2%; low curve -5.3 to 12.4% Cumulative precision: high curve 2.4 to 10.8%; low curve 0.7 to 11.3% TE (LBA only): Not applicable	5.3.5.2 EFC16295
Method reproducibility	Incurred sample re-analysis was not performed for the interim analysis. ISR data will be available in the final report.	5.3.5.2 EFC16295
Study sample analysis/ stability	All standards, QCs and samples tested in this assay were analyzed within established stability range (14 months (425 days) at -70°C, 3 months (88 days) at -20°C). The maximum time between sample collection & analysis was 241 days.	5.3.5.2 EFC16295

Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	Lot #: [redacted] High Curve: 1.455, 1.000, 0.762, 0.500, 0.302, 0.100, 0.050 Low Curve: 0.149, 0.080, 0.050, 0.030, 0.010, 0.005, 0.0025 Lot #: [redacted] High Curve: 1.509, 0.976, 0.755, 0.503, 0.302, 0.100, 0.050 Low Curve: 0.151, 0.080, 0.050, 0.030, 0.010, 0.005, 0.0025	
	Method performance in study PKM17085	
Assay passing rate	9/10 assay runs passed acceptance criteria. 198 of 198 samples have reportable results.	5.3.3.2 PKM17085
Standard curve performance	Cumulative bias range (%RE): ±20% (±25% at LLOQ) Cumulative precision (%CV): ≤10%	5.3.3.2 PKM17085
QC performance	Cumulative bias range: (%RE): high curve -3.8 to 3.8%; low curve -12.0 to 5.9% Cumulative precision (%CV): high curve 0.9 to 5.3%; low curve 0.0 to 6.4% TE (LBA only): Not applicable	5.3.3.2 PKM17085
Method reproducibility	Out of 198 study samples, 21 (10.6%) were retested for ISR and 21 samples met the pre-specified criteria (pass rate was 100%).	5.3.3.2 PKM17085
Study sample analysis/ stability	All standards, QCs and samples tested in this assay were analyzed within established stability range (14 months (425 days) at -70°C, 3 months (88 days) at -20°C). The maximum time between sample collection & analysis was 136 days.	5.3.3.2 PKM17085
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	High Curve: 1.509, 0.976, 0.755, 0.503, 0.302, 0.100, 0.050 Low Curve: 0.151, 0.080, 0.050, 0.030, 0.010 (LLOQ), 0.005, 0.0025.	

%CV = percent coefficient of variation; aPTT = activated partial thromboplastin time; BSA = bovine serum albumin; F/T = freeze/thaw;
FVIII = coagulation factor VIII; HQC = high quality control; IS = international standard; ISR = incurred sample reanalysis; LBA = ligand binding assay; LLOQ = lower limit of quantitation; LQC = low quality control; QC = quality control; %RE = relative error; TE = total error;
ULOQ = upper limit of quantitation.

表 24 - Summary method performance of chromogenic substrate assay with BIVV001 product-specific self-standard to measure BIVV001 FVIII activity in plasma in 242HA101 and 242HA102 studies

Bioanalytical method validation report name, amendments, and hyperlinks	5.3.1.4 [MVR-CT-20[redacted]-010.001] BCS XP FVIII (BIVV001) Chromogenic Assay Using BIVV001 Product Calibrator		
Method description	Factor VIII (FVIII) activity is measured using a chromogenic BIOPHEN FVIII:C assay (Hyphen BioMed) on the BCS XP analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics).		
Materials used for standard calibration curve and concentration	BIVV001 product-specific self-standard (lot [redacted]); Stock solution: 10.0 IU/mL		
Validated assay range	0.010 (LLOQ) to 2.500 (ULOQ) IU/mL		
Material used for quality controls (QCs) and concentration	BIVV001 (lot [redacted]) High Curve (HQC 1 ~1.200 IU/mL; HQC 2 ~0.500 IU/mL; HQC 3 ~0.250 IU/mL); Low Curve (LQC 1 ~0.120 IU/mL; LQC 2 ~0.050 IU/mL; LQC 3 ~0.025 IU/mL)		
Minimum required dilutions (MRDs)	Neat		
Source and lot of reagents	Biophen FVIII Chromogenic Kit (Hyphen BioMed Lot #: F1700013P2/P4; F1701533P5) Pooled Congenital FVIII Deficient Plasma (Helena Laboratories Lot # 2-17-5193; 3-16-5193)		
Regression model and weighting	Log-lin regression for high curve, Lin-lin regression for low curve, no 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	High curve: 8 Low Curve: 8	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-010.001 Validation summary table
	Cumulative accuracy (%bias) from LLOQ to ULOQ	≤20% (%RE) for both high and Low curve	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-010.001 Table 3 and Table 4
	Cumulative precision (%CV) from LLOQ to ULOQ	≤15% for both high and Low curve	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-010.001 Table 3 and Table 4
Performance of QCs during accuracy and precision runs	Cumulative accuracy (%bias) in QCs	≤20% (%RE)	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-010.001 Table 5
	Inter-batch %CV	≤15%	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-010.001 Table 5
	Total Error (TE)	Not applicable	Not applicable

Selectivity & matrix effect	Ten (10) independent congenital FVIII deficient donor plasma sources with FVIII activity of <0.010 IU/mL and varying levels of Von Willebrand Factor, were spiked with BIVV001 to 0.010 IU/mL of FVIII activity.	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-010.001 Table 14
Interference & specificity	Assay interference was observed in samples containing 60 mg/dL of bilirubin. No assay interference by lipemia and hemolysis was observed.	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-010.001 Table 15 and Table 16
Hemolysis effect	Two independent lysed erythrocyte dilution mixtures (EDM) were prepared. The high and LLOQ hemolysis sample mixtures were tested. Up to Grade 4 of hemolysis does not interfere with the assay.	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-010.001 Table 16
Lipemic effect	There levels of validator with pooled congenital FVIII deficient plasma samples containing 2X the concentration of intralipid were assessed. Assay interference in samples containing 1000 mg/dL of intralipid (lipemia) was not observed.	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-010.001 Table 15
Dilution linearity & hook effect	Dilutional linearity and integrity was considered acceptable. Bias% was within ±20.0%.	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-010.001 Table 8, Table 9, and Table 10
Bench-top/process stability	Short-Term Stability on Instrument is up to 6 hours; Short-Term Stability on the Cold Block is up to 6 hours; Short-Term stability at Ambient (room) temperature is up to 24 hours.	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-010.001 Table 17, Table 18, and Table 20
Freeze-Thaw stability	3 F/T cycles	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-010.001 Table 21
Long-term storage	Up to 12 months at -70°C	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-010.001 Table 22-23
Parallelism	Not applicable	Not applicable
Carry over	Instrument carryover was assessed by testing 11 aliquots of the LV-4 and 10 aliquots of HV-2 in the sequence described in the CLSI EP10 A3 guidance. The difference between the mean of LV-4 validators tested after HV-2 validators and the mean of the LV-4 validators tested after LV-4 validators was <3 times the SD of the LV-4 tested after LV-4 validators.	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-010.001 Table 13
	Method performance in study 242HA101	
Assay passing rate	34/38 assay runs passed acceptance criteria. 242 of 247 samples have reportable results.	5.3.3.2 242HA101
Standard curve performance	Cumulative bias range (%RE): ±20% (±25% at LLOQ) Cumulative precision: ≤10% CV	5.3.3.2 242HA101
QC performance	Cumulative bias range (%RE): high curve: -4.2 to 6.0%; low curve: -0.2 to 5.3% Cumulative precision (%CV): high curve 0.5 to 5.5%; low curve 0.0 to 8.7% TE (LBA only): Not applicable	5.3.3.2 242HA101
Method reproducibility	Incurred sample re-analysis was not performed.	5.3.3.2 242HA101

Study sample analysis/ stability	All standards, QCs and samples tested in this assay were analyzed within established stability range (12 months (365 days) at -70°C and at -20°C). The maximum time between sample collection & analysis was 148 days.	5.3.3.2 242HA101
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	High curve: 1.481, 1.212, 1.000, 0.755, 0.500, 0.301, 0.200, 0.150 IU/mL Low curve: 0.208, 0.147, 0.100, 0.050, 0.025, 0.015, 0.010, 0.0075 IU/mL	
	Method performance in study 242HA102	
Assay passing rate	20/21 assay runs passed acceptance criteria. 469 of 470 samples have reportable results.	5.3.3.2 242HA102
Standard curve performance	Cumulative bias range (%RE): ±20% (±25% at LLOQ) Cumulative precision (%CV): ≤10%	5.3.3.2 242HA102
QC performance	Cumulative bias range (%RE): high curve: -6.6 to 0.7%; low curve: -0.6 to 8.1% Cumulative precision (%CV): high curve: 4.3 to 5.6%; low curve: 3.4 to 13.8% TE (LBA only): Not applicable	5.3.3.2 242HA102
Method reproducibility	Incurred sample re-analysis was not performed.	5.3.3.2 242HA102
Study sample analysis/ stability	All standards, QCs and samples tested in this assay were analyzed within established stability range (12 months (365 days) at -70°C and at -20°C). The maximum time between sample collection & analysis was 57 days.	5.3.3.2 242HA102
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	Lot# [redacted]: High curve: 1.481, 1.212, 1.000, 0.755, 0.500, 0.301, 0.200, 0.150 IU/mL Low curve: 0.208, 0.147, 0.100, 0.050, 0.025, 0.015, 0.010, 0.0075 IU/mL Lot# [redacted]: High curve: 1.481, 1.212, 1.000, 0.755, 0.500, 0.301, 0.200, 0.150 IU/mL Low curve: 0.208, 0.147, 0.100, 0.050, 0.025, 0.015, 0.010, 0.0075 IU/mL .	

%CV = percent coefficient of variation; aPTT = activated partial thromboplastin time; EDM = erythrocyte dilution mixture; F/T = freeze/thaw; FVIII = coagulation factor VIII; HQC = high quality control; LBA = ligand binding assay; LLOQ = lower limit of quantitation; LQC = low quality control; QC = quality control; %RE = relative error; SD = standard deviation; TE = total error; ULOQ = upper limit of quantitation.

表 25 - Summary method performance of chromogenic substrate assay with plasma standard to measure BIVV001 FVIII activity in plasma in EFC16293 and EFC16295 studies

Bioanalytical method validation report name, amendments, and hyperlinks	5.3.1.4 [MVR-CT-20[redacted]-001.001] BCS XP FVIII (BIVV001) Chromogenic Assay Using Plasma Calibrator		
Method description	Factor VIII (FVIII) activity is measured using a chromogenic BIOPHEN FVIII:C assay (Hyphen BioMed) on the BCS XP analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics).		
Materials used for standard calibration curve and concentration	BIOPHEN™ Plasma Calibrator at 1.000 IU/mL, calibrated against WHO 6th International Standard (IS).		
Validated assay range	0.033 (LLOQ) to 8.275 (ULOQ) IU/mL		
Material used for quality controls (QCs) and concentration	BIVV001 (lot [redacted]) High Curve (HQC1, 0.994 IU/mL; HQC2, 0.494 IU/mL; HQC3, 0.261 IU/mL); Low Curve (LQC1, 0.104 IU/mL; LQC2, 0.075 IU/mL; LQC3, 0.052 IU/mL)		
Minimum required dilutions (MRDs)	Neat		
Source and lot of reagents	BIOPHEN FVIII Chromogenic Kit (Hyphen BioMed) F1900485P1 & P2 (Exp. Date 02 Oct 2021) Congenital FVIII Deficient Plasma (Helena Laboratories Lot# 2-19-5193 Exp. Date 31 Jul 2021; Lot # 1-20-5193 Exp. Date 31 Jan 2022) BIOPHEN Plasma Calibrator (Hyphen BioMed Lot# F181501026 Exp. Date 22 Dec 2020)		
Regression model and weighting	Log-lin regression for high curve, Lin-lin regression for low curve, no 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	High curve: 8 Low Curve: 8	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-001.001 Validation summary table
	Cumulative accuracy (%bias) from LLOQ to ULOQ	≤20% (%RE) for both high and Low curve	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-001.001 Table 2 and Table 3
	Cumulative precision (%CV) from LLOQ to ULOQ	≤15% for both high and Low curve	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-001.001 Table 2 and Table 3
Performance of QCs during accuracy and precision runs	Cumulative accuracy (%bias) in QCs	≤20% (%RE)	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-001.001 Table 4 and Table 5
	Inter-batch %CV	≤15%	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-001.001 Table 4 and Table 5
	Total Error (TE)	Not applicable	Not applicable
Selectivity & matrix effect	Ten congenital FVIII deficient donor plasma sources with varying levels of von Willebrand factor were spiked with BIVV001 to high and LLOQ levels of FVIII activity. The mean FVIII activities of the donor spiked samples fell within ±20.0% (±25.0% for LLOQ) the expected FVIII chromogenic activity.		5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-001.001 Table 18

Interference & specificity	Assay Interference by Icterus, Lipemia and hemolysis was assessed. No interference was observed.	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-001.001 Table 19 and Table 20
Hemolysis effect	Two independent lysed erythrocyte dilution mixtures (EDM) were prepared. The high and LLOQ hemolysis sample mixtures were tested. Up to Grade 4 of hemolysis does not interfere with the assay.	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-001.001 Table 20
Lipemic effect	Assay interference in samples containing 700 mg/dL of intralipid (lipemia) was not observed.	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-001.001 Table 19
Dilution linearity & hook effect	Dilutional linearity and integrity was considered acceptable. Bias% was within ±20.0%.	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-001.001 Table 9-11
Bench-top/process stability	Short-Term Stability on Instrument is up to 6 hours; Short-Term Stability on the Cold Block is up to 6 hours; Short-Term stability at Ambient (room) temperature is up to 24 hours. (Refer to study MVR-CT-20[redacted]-010.001)	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-010.001 Table 17, Table 18, and 20
Freeze-Thaw stability	3 F/T cycles (Refer to Study MVR-CT-20[redacted]-010.001)	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-010.001 Table 21
Long-term storage	Up to 12 months at -70°C (Refer to study MVR-CT-20[redacted]-010.001)	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-010.001 Table 22-23
Parallelism	Not applicable	Not applicable
Carry over	Instrument carryover was assessed by testing 11 aliquots of the LV-4 and 10 aliquots of HV-2 in the sequence described in the CLSI EP10 A3 guidance. The difference between the mean of LV-4 validators tested after HV-2 validators and the mean of the LV-4 validators tested after LV-4 validators was <3 times the SD of the LV-4 tested after LV-4 validators. (Refer to study MVR-CT-20[redacted]-010.001)	5.3.1.4 MVR-CT-20[redacted]-010.001 Table 13
	Method performance in study EFC16293	
Assay passing rate	54/54 assay runs passed acceptance criteria. 2609 of 2613 samples have reportable results	5.3.5.1 EFC16293
Standard curve performance	Cumulative bias range (%RE): ±20% (±25% at LLOQ) Cumulative precision: ≤10% CV	5.3.5.1 EFC16293
QC performance	Cumulative bias range (%RE): high curve -5.8 to 1.2%; low curve -7.7 to 4.8% Cumulative precision (%CV): high curve 1.6 to 6.3%; low curve 2.6 to 8.9% TE (LBA only): Not applicable	5.3.5.1 EFC16293
Method reproducibility	Out of the 2609 primary samples from Study EFC16293, 187 samples (7.2%) were retested for ISR and 173 samples met the pre-specified criteria (pass rate was 93%).	5.3.5.1 EFC16293
Study sample analysis/ stability	All standards, QCs and samples tested in this assay were analyzed within established stability range (12 months (365 days) at -70°C and at -20°C). The maximum time between sample collection & analysis was 343 days.	5.3.5.1 EFC16293

Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	Lot #: [redacted] High Curve: 1.503, 1.211, 0.991, 0.752, 0.501, 0.301, 0.200, 0.150 Low Curve: 0.195, 0.152, 0.101, 0.050, 0.025, 0.015, 0.010, 0.0075 Lot #: [redacted] High Curve: 1.520, 1.200, 0.991, 0.748, 0.501, 0.300, 0.200, 0.150 Low Curve: 0.207, 0.153, 0.100, 0.050, 0.025, 0.015, 0.010, 0.0075 Lot #: [redacted] High Curve: 1.481, 1.212, 1.000, 0.755, 0.500, 0.301, 0.200, 0.150 Low Curve: 0.208, 0.147, 0.100, 0.050, 0.025, 0.015, 0.010, 0.0075 Lot#: [redacted] High Curve: 1.481, 1.212, 1.000, 0.755, 0.500, 0.301, 0.200, 0.150 Low Curve: 0.208, 0.147, 0.100, 0.050, 0.025, 0.015, 0.010, 0.0075	

Method performance in study EFC16295

Assay passing rate	21/22 assay runs passed acceptance criteria. 499 of 500 samples have reportable results.	5.3.5.2 EFC16295
Standard curve performance	Cumulative bias range (%RE): ±20% (±25% at LLOQ) Cumulative precision: ≤10% CV	5.3.5.2 EFC16295
QC performance	Cumulative bias range (%RE): high curve -5.3 to -0.8%; low curve -8.5 to 0.7% Cumulative precision (%CV): high curve 2.5 to 6.9%; low curve 2.3 to 8.4% TE (LBA only): Not applicable	5.3.5.2 EFC16295
Method reproducibility	Incurred sample re-analysis was not performed for the interim analysis. ISR data will be available in the final report.	5.3.5.2 EFC16295
Study sample analysis/ stability	All standards, QCs and samples tested in this assay were analyzed within established stability range (12 months (365 days) at -70°C and at -20°C). The maximum time between sample collection & analysis was 196 days.	5.3.5.2 EFC16295
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	Lot #: [redacted] High Curve: 1.520, 1.200, 0.991, 0.748, 0.501, 0.300, 0.200, 0.150 Low Curve: 0.207, 0.153, 0.100, 0.050, 0.025, 0.015, 0.010, 0.0075 Lot #: [redacted] High Curve: 1.481, 1.212, 1.000, 0.755, 0.500, 0.301, 0.200, 0.150 Low Curve: 0.208, 0.147, 0.100, 0.050, 0.025, 0.015, 0.010, 0.0075 Lot #: [redacted] High Curve: 1.481, 1.212, 1.000, 0.755, 0.500, 0.301, 0.200, 0.150 Low Curve: 0.208, 0.147, 0.100, 0.050, 0.025, 0.015, 0.010, 0.0075	

%CV = percent coefficient of variation; EDM = erythrocyte dilution mixture; F/T = freeze/thaw; FVIII = coagulation factor VIII; HQC = high quality control; IS = international standard; ISR = incurred sample reanalysis; LBA = ligand binding assay;
LLOQ = lower limit of quantitation; LQC = low quality control; QC = quality control; %RE = relative error; SD = standard deviation; TE = total error; ULOQ = upper limit of quantitation.