エムパベリ皮下注 1080 mg

＜ペグセタコプラン皮下注製剤＞

第 2 部（モジュール 2）
CTD の概要（サマリー）

2.7　臨床概要

2.7.1　生物薬剤学及び関連する分析法の概要

Swedish Orphan Biovitrum Japan 株式会社

Property of the SOBI group - strictly confidential

目次

2.7.1 生物薬剤学試験及び関連する分析法の概要 5
2.7.1.1 背景及び概観 5
2.7.1.1.1 臨床試験で使用した製剤の開発の概要 7
2.7.1.1.2 臨床試験で用いた分析法の概要 8
2.7.1.1.2.1 血清中ペグセタコプラン濃度測定の分析法 8
2.7.1.1.2.2 免疫原性モニタリングの分析法 10
2.7.1.1.2.3 薬力学的パラメータの分析法 15
2.7.1.1.2.4 組織染色の分析法 21
2.7.1.1.3 生物薬剤学的評価及び関連する分析法の総括 21
2.7.1.2 個々の試験結果の要約 22
2.7.1.3 全試験を通しての結果の比較と解析 22
2.7.1.3.1 製剤が薬物動態に及ぼす影響 22
2.7.1.3.2 製剤が免疫原性に及ぼす影響 22
2.7.1.4 付録 23

表目次

表 2.7.1-1 C3G 又は一次性 IC-MPGN に対するペグセタコプラン推奨用法・用量 6
表 2.7.1-2 C3G 又は一次性 IC-MPGN の臨床開発プログラムで用いたペグセタコプラン製剤 7
表 2.7.1-3 C3G 又は一次性 IC-MPGN の臨床開発プログラムで用いた血清中ペグセタコプラン濃度測定の分析法 9
表 2.7.1-4 C3G 又は一次性 IC-MPGN の臨床開発プログラムで用いた抗ペグセタコプランペプチド抗体アッセイ 12
表 2.7.1-5 C3G 又は一次性 IC-MPGN の臨床開発プログラムで用いた抗 PEG 抗体アッセイ 14
表 2.7.1-6 C3G 又は一次性 IC-MPGN の臨床開発プログラムで用いた中和抗体アッセイ 15
表 2.7.1-7 PD アッセイの要約 17
表 2.7.1-8 組織染色アッセイ 21
表 2.7.1-9 血清中ペグセタコプラン濃度測定の分析法バリデーションのライフサイクル情報 23
表 2.7.1-10 血清中ペグセタコプラン濃度測定の分析法のライフサイクル情報（APL2-201 試験、APL2-C3G-204 試験及び APL2-C3G-310 試験） 26
表 2.7.1-11 血清中ペグセタコプラン濃度測定の分析性能（APL2-201 試験） 27

表 2.7.1-12　血清中ペグセタコプラン濃度測定の分析性能（APL2-C3G-204 試験及び APL2-C3G-310 試験）.....31
表 2.7.1-13　分析法の変更及びクロスバリデーションの結果.....34
表 2.7.1-14　PD バリデーションレポート及び補足資料の一覧（APL2-201 試験、APL2-C3G-204 試験及び APL2-C3G-310 試験）.....36

略語・略号一覧

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
AH50	alternative complement pathway hemolytic activity	第二経路の補体価
C1q	complement component 1q	補体 C1q
C3	complement component 3	補体 C3
C3G	C3 glomerulopathy	C3 腎症
C3NeF	C3 nephritic factor	C3 腎炎因子
C4	complement component 4	補体 C4
C5	complement component 5	補体 C5
$C_{avg,ss}$	steady-state average drug concentration	定常状態での平均血清中濃度
CH50	classical complement pathway hemolytic activity	古典的溶血性補体経路活性
$C_{max,ss}$	steady-state maximum drug concentration	定常状態での最高血清中濃度
CSR	clinical study report	治験総括報告書
dsDNA	double-stranded DNA	二本鎖 DNA
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定法
EU	European union	欧州連合
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
HRP	horseradish peroxidase	西洋ワサビペルオキシダーゼ
IC-MPGN	immune complex membranoproliferative glomerulonephritis	免疫複合体型膜性増殖性糸球体腎炎
IgA	immunoglobulin A	免疫グロブリン A
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IgM	immunoglobulin M	免疫グロブリン M
LC-MS/MS	liquid chromatography with tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィータンデム質量分析法
m/z	mass-to-charge ratio	質量電荷比
MRD	minimum required dilution	最小希釈倍率
[redacted]	[redacted]	—
NAb	neutralizing antibody	中和抗体
PBS	phosphate-buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
PD	pharmacodynamic	薬力学
PEG	polyethylene glycol	ポリエチレングリコール
PEG40	polyethylene glycol (40 kDa nominal molecular weight)	ポリエチレングリコール（名目上の分子量：40 kDa）
PK	pharmacokinetic	薬物動態

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
PLA2R	phospholipase A2 receptor	ホスフォリパーゼ A2 レセプター
PNH	paroxysmal nocturnal hemoglobinuria	発作性夜間ヘモグロビン尿症
Q_1	first quadrupole mass filter	第 1 の四重極マスフィルター
Q_3	subsequent quadrupole mass filter	第 3 の四重極マスフィルター
SC	subcutaneous	皮下
sC5b-9	soluble C5b9 complex	可溶性 C5b-9
w/v	weight by volume	質量／容量

2.7.1　生物薬剤学試験及び関連する分析法の概要

2.7.1.1　背景及び概観

ペグセタコプランは、本邦を含め、米国、EU 及び他の国々で既に承認されている。本剤は、2021 年 5 月 14 日に米国で Empaveli の商品名で発作性夜間ヘモグロビン尿症を有する成人患者に対する治療薬として製造販売承認を取得し、2025 年 7 月 28 日には C3 腎症（C3G）又は一次性免疫複合体型膜性増殖性糸球体腎炎（IC-MPGN）を有する成人患者及び青年期患者に対する治療薬として米国食品医薬品局により承認された。EU でも、2021 年 12 月 13 日に Aspaveli の商品名で発作性夜間ヘモグロビン尿症を有する成人患者に対する治療薬として製造販売承認を取得した。本邦では、2023 年 3 月 27 日にエムパベリ（エムパベリ皮下注 1080 mg）の商品名で発作性夜間ヘモグロビン尿症を有する成人患者に対する治療薬として製造販売承認を取得した。発作性夜間ヘモグロビン尿症に対するペグセタコプランの推奨用法・用量は 1080 mg の週 2 回皮下投与である。

ペグセタコプランはポリエチレングリコール（PEG）化ペプチドであり、腎移植歴の有無を問わない C3G 又は一次性 IC-MPGN を有する成人患者及び 12 歳以上の青年期患者の治療薬として開発中である。ペグセタコプランは、直鎖状で 40 kDa の PEG 高分子化合物の両端に同一のペンタデカペプチド 2 分子が共有結合している対称分子である。個々のペプチド部分はコンプスタチンの誘導体であり、親化合物と同様に、C3 転換酵素及び C5 転換酵素の成分である補体タンパク質 C3 及び C3b に結合することで、古典経路及び第二経路を介した補体活性化を阻害する能力を有する。40 kDa の PEG 部分（PEG40）により、製剤を投与した後のペプチド部分は溶解性が改善し、滞留時間が延長する。

C3G 又は一次性 IC-MPGN を有する成人患者及び青年期患者に対するペグセタコプランの推奨用法・用量を表 2.7.1-1 に示す。成人患者には、治療期間を通じて全ての患者に同用量のペグセタコプランを投与する。青年期患者には、患者の体重に基づき異なる用量のペグセタコプランを投与する。ペグセタコプランは週 2 回皮下投与する。

表 2.7.1-1 C3G 又は一次性 IC-MPGN に対するペグセタコプラン推奨用法・用量

体重	初回用量 （注入量）	2 回目用量 （注入量）	維持用量 （注入量）
全ての成人患者、 体重 50 kg 以上の青年期患者	1080 mg (20 mL)	1080 mg (20 mL)	1080 mg を週 2 回 (20 mL)
体重 35 kg 以上 50 kg 未満の青年期患者	648 mg (12 mL)	810 mg (15 mL)	810 mg を週 2 回 (15 mL)
体重 30 kg 以上 35 kg 未満の青年期患者	540 mg (10 mL)	540 mg (10 mL)	648 mg を週 2 回 (12 mL)

Abbreviations: C3G = C3 glomerulopathy; IC-MPGN = immune-complex membranoproliferative glomerulonephritis.

発作性夜間ヘモグロビン尿症患者を対象とする臨床試験のため開発した複数の製剤及び分析法は、発作性夜間ヘモグロビン尿症を適応症とした初回承認申請資料 M2.7.1 に示した。本申請では、C3G 又は一次性 IC-MPGN 患者を対象とする臨床試験で、発作性夜間ヘモグロビン尿症の臨床開発プログラムで開発した市販製剤を含む 2 つの皮下投与製剤を使用した。また、血清中ペグセタコプラン濃度及び免疫原性の測定には、発作性夜間ヘモグロビン尿症の臨床開発プログラムで開発した分析方法を使用した。

C3G 又は一次性 IC-MPGN を有する成人患者及び 12 歳以上の青年期患者の適応症を裏付けるため、C3G 又は一次性 IC-MPGN 患者を対象とした以下の 4 つの臨床試験（評価資料 2 試験及び参考資料 2 試験）を実施した。

- 評価資料
  - APL2-C3G-310 試験：C3G 又は一次性 IC-MPGN 患者を対象とした第 3 相無作為化プラセボ対照試験（完了）
  - APL2-C3G-204 試験：移植後に C3G 又は一次性 IC-MPGN が再発した患者を対象とした第 2 相試験（継続中）
- 参考資料
  - APL2-201 試験：免疫グロブリン A（IgA）腎症、ループス腎炎、一次性膜性腎症又は C3G 患者を対象とした第 2 相試験（完了）
  - APL2-C3G-314 試験：APL2-C3G-310 試験の継続試験である C3G 又は一次性 IC-MPGN 患者を対象とした第 3 相試験（継続中）

本邦では、APL2-C3G-310 試験開始時に C3G 及び一次性 IC-MPGN に対する疾患概念が専門医の間で認知されていたこと、並びに薬物動態（PK）（内因性要因）及び診断基準等（外因性要因）に海外と違いはないことから、日本人も APL2-C3G-310 試験に参加した。

本概要では、以下のペグセタコプラン製剤の生物薬剤学的特性及び分析法を要約する。

- 臨床試験で使用した製剤（2.7.1.1.1 項）
  - 10 mM 酢酸緩衝液［pH 5.0、4.1%質量／容量（w/v）ソルビトール含有］（市販製剤）
  - 10 mM 酢酸緩衝液（pH 5.0、4.25% w/v マンニトール含有）

- 分析法（2.7.1.1.2 項）
  - 血清中ペグセタコプラン濃度の測定
  - 免疫原性モニタリング
  - 薬力学（PD）パラメータの測定
  - 組織染色
- 試験間の比較（2.7.1.3 項）

2.7.1.1.1　臨床試験で使用した製剤の開発の概要

発作性夜間ヘモグロビン尿症の臨床開発プログラムでは、臨床試験のため、3 種類の皮下投与用溶液製剤（5% w/v デキストロース溶液製剤、4.25%マンニトール含有 10 mM 酢酸緩衝液製剤及び約 4%ソルビトール含有 10 mM 酢酸緩衝液製剤）を開発した。第 1 相試験ではデキストロース溶液製剤及びソルビトール含有酢酸緩衝液製剤を使用した。第 2a 相試験ではマンニトール含有 10 mM 酢酸緩衝液製剤を使用した。第 3 相試験ではソルビトール含有 10 mM 酢酸緩衝液製剤を使用し、この製剤を市販製剤とした。詳細については初回承認申請資料 M2.7.1.1 項を参照のこと。

C3G 又は一次性 IC-MPGN の臨床開発プログラムでは、臨床試験のため、発作性夜間ヘモグロビン尿症の臨床開発プログラムで開発した市販製剤を含む 2 つの皮下投与製剤を使用した。APL2-201 試験の 1 日 1 回投与にマンニトール含有 10 mM 酢酸緩衝液製剤を使用した。APL2-201 試験、APL2-C3G-204 試験、APL2-C3G-310 試験及び APL2-C3G-314 試験の週 2 回投与にソルビトール含有 10 mM 酢酸緩衝液製剤（市販製剤）を使用した。C3G 又は一次性 IC-MPGN の臨床開発プログラムで用いた製剤を表 2.7.1-2 に示す。

表 2.7.1-2　C3G 又は一次性 IC-MPGN の臨床開発プログラムで用いたペグセタコプラン製剤

Formulation designation	Pegcetacoplan concentration	Route of administration	Batch number	Clinical study (status)
[redacted]	40 mg/mL	SC infusion	[redacted]	APL2-201 (part A) (completed)
10 mM acetate buffer, pH 5.0, 4.1% sorbitol (commercial formulation)	54 mg/mL	SC infusion	[redacted]	APL2-201 (part A) (completed)
			[redacted]	APL2-201 (part B) (completed)
			[redacted]	APL2-C3G-204 (ongoing)
			Randomized-controlled period	APL2-C3G-

Formulation designation	Pegcetacoplan concentration	Route of administration	Batch number	Clinical study (status)
			(active and placebo): [redacted] Open-label period (active only): [redacted]	310 (completed)
			[redacted]	APL2-C3G-314 (ongoing)

Abbreviations: C3G = C3 glomerulopathy; IC-MPGN = immune-complex membranoproliferative glomerulonephritis; SC = subcutaneous.
Sources: Study APL2-201 Interim CSR Table 5; Study APL2-201 Final CSR Synopsis; Study APL2-C3G-204 CSR (Week 52) Synopsis; Study APL2-C3G-310 CSR (Week 52) Synopsis; Study APL2-C3G-314 CSR Synopsis.

2.7.1.1.2　臨床試験で用いた分析法の概要

2.7.1.1.2.1　血清中ペグセタコプラン濃度測定の分析法

バリデートされた液体クロマトグラフィータンデム質量分析法（LC-MS/MS）を用いて、ヒト血清中ペグセタコプラン濃度を測定した。この分析法は、現行の規制要件に従って事前に規定した許容基準に適合するように開発・バリデートしたものであり、開発プログラム全体で使用した。

発作性夜間ヘモグロビン尿症の臨床開発プログラムでは、5 つの分析法（ALM-075、BAM.0484.01、BPAPL2F、BPAPL2K 及び TM20-636）を開発し、用いた（初回承認申請資料 M2.7.1.4.1 付録 1）。C3G 又は一次性 IC-MPGN の臨床開発プログラムでは、このうちの 2 つの分析法（BAM.0484.01 及び TM20-636）を用いた。BAM.0484.01 は [redacted] 社で開発された分析法であり、この分析法が [redacted] 社に移管されたものが TM20-636 である。この 2 つの分析法はクロスバリデートされた（初回承認申請資料 M5.3.1.4.7-1、M5.3.1.4.7-2）。様々な試験から入手した多くの検体を同時に分析する必要があったため、複数の研究施設でこれらの分析法を用いた。本項ではこれらの 2 つの分析法の概要を示す。

C3G 又は一次性 IC-MPGN の臨床開発プログラムで用いた血清中ペグセタコプラン濃度測定の分析法を表 2.7.1-3 に示す。分析法のライフサイクル情報の詳細を表 2.7.1-9 及び表 2.7.1-10 に示す。APL2-201 試験の分析性能の概要を表 2.7.1-11 に、APL2-C3G-204 試験及び APL2-C3G-310 試験の分析性能の概要を表 2.7.1-12 に示す。APL2-C3G-314 試験は継続中であり、本申請では PK 解析は実施しなかった。分析法の変更及びクロスバリデーション結果の概要を表 2.7.1-13 に示す。

バリデートされたヒト血清中ペグセタコプラン濃度測定の分析法では、タンパク質沈殿によりヒト血清からペグセタコプラン及び安定同位体標識内標準物質（[redacted]）を抽出する。抽出後、分析対象物を高速液体クロマトグラフィーに注入し、[redacted]［[redacted]mm：[redacted]μm（BAM.0484.01）又は[redacted]mm：[redacted]μm（TM20-636）］で分離させる。分析対象物を質量分析計［[redacted]（BAM.0484.01）又は[redacted]（TM20-636）］を用いて[redacted]でモニタリングする。得られたイオンを質量電荷比（*m/z*）に従って第1の四重極マスフィルター（Q_1）に通した後、Q_2に導入し、中性の窒素ガス分子との衝突によって断片化させる。このフラグメントイオンを続く第3の四重極マスフィルター（Q_3）に通して選別し、電子増倍管と衝突させて分析する。多価イオンのQ_1/Q_3トランジションは、ペグセタコプランでは[redacted]*m/z*（BAM.0484.01）、内標準物質では[redacted]*m/z*（TM20-636）である。内標準物質に対するペグセタコプランのピーク面積比を用いて、濃度に対してマトリックスマッチング法の検量線を作成した。$1/x^2$の重み付け線形回帰を行い、反応と濃度の関係を生成した（初回承認申請資料M2.7.1.1.2.1項）。

表 2.7.1-3　C3G又は一次性IC-MPGNの臨床開発プログラムで用いた血清中ペグセタコプラン濃度測定の分析法

Method	BAM.0484.01	TM20-636
Analyte	Pegcetacoplan	Pegcetacoplan
Bioanalytical site	[redacted] United States	[redacted] United States
Matrix	Human serum	Human serum
Platform	LC-MS/MS	LC-MS/MS
Validation reports and amendments	BIO.VR.0210-1989.01 BIO.VR.0210-1989.02 BIO.VR.0210-1989.03 BIO.VR.0210-1989.04 BIO.VR.0210-1989.05 BIO.VR.0210-1989.06	AV21-190 AV21-190 Amendment 1 AV21-190 Addendum 1 AV21-190 Addendum 2
Cross-validation reports	BIO.VR.0210-2629.01 BIO.VR.0210-2629.02	
Clinical studies supported by method Link to report	APL2-201 BIO.SR.0210-2178.01 and BIO.SR.0210-2178.02	APL2-C3G-204: Interim reports [a] AD23-1550 and AD24-1709 APL2-C3G-310: Final report AD25-1957

Abbreviations: C3G = C3 glomerulopathy; IC-MPGN = immune-complex membranoproliferative glomerulonephritis; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; PK = pharmacokinetic.
a　Study APL2-C3G-204 is ongoing.

2.7.1.1.2.2　免疫原性モニタリングの分析法

発作性夜間ヘモグロビン尿症の臨床開発プログラムでは、以下に示す特異的な抗薬物抗体（ADA）アッセイを開発した。

- 抗ペグセタコプランペプチド抗体アッセイ（ペグセタコプランのペプチド部分に対する抗体に特異的なアッセイ）
- 抗 PEG 抗体アッセイ（ペグセタコプランの PEG 成分に対する抗体に特異的なアッセイ）
- 競合的リガンド結合中和抗体（NAb）アッセイ（抗ペグセタコプランペプチド NAb を検出するアッセイ）

C3G 又は一次性 IC-MPGN の臨床開発プログラムでは、APL2-201 試験、APL2-C3G-204 試験及び APL2-C3G-310 試験でこれらのアッセイを用いた。本項にその要約を示す。APL2-C3G-314 試験は継続中であり、本申請では ADA/NAb アッセイは実施しなかった。

2.7.1.1.2.2.1　抗ペグセタコプランペプチド抗体アッセイ

当初、ヒト血清中ペグセタコプランに対する抗体の検出のため、電気化学発光を用いた免疫測定法［[redacted]社］を開発・バリデートした。この方法は薬物耐性が限られており、その後、全てのペグセタコプラン用量で、検体中の抗体を適切に検出できないことが判明した。そのため、発作性夜間ヘモグロビン尿症の臨床開発プログラムの米国食品医薬品局（FDA）市販後要件として分析法の再開発及びバリデートをし、C3G 又は一次性 IC-MPGN の臨床開発プログラムで使用した。APL2-201 試験の初期の検体は再開発前の分析法で分析したが、全ての検体を再開発後の分析法で再分析した。再分析の結果は、APL2-201 試験の最終報告書（APL2-201 Final CSR Section 11.7.3）に記載した。

ヒト血清中ペグセタコプランペプチドに対する抗体検出のため、固相抽出と標識ペグセタコプランペプチドを用いた酸解離を組み合わせたアッセイ（BAL-23-143-160-REP）を開発・バリデートした。[redacted]を用いた。バリデーションの結果、この分析法では、薬物濃度 1000 µg/mL でも、低濃度陽性対照（25 ng/mL）、中濃度陽性対照（100 ng/mL）及び高濃度陽性対照（500 ng/mL）の抗体を検出できることが示された。C3G 又は一次性 IC-MPGN の臨床開発プログラムで用いた抗ペグセタコプランペプチド抗体アッセイの要約を表 2.7.1-4 に示し、本項に詳細を示す。

検体及び対照は、分析前に酢酸及びアッセイ緩衝液又は確認用緩衝液を用いて段階的に累積[redacted]倍［最小希釈倍率（MRD）］に希釈した。アッセイ手順を以下に示す。

スクリーニングアッセイ及び抗体価アッセイのいずれも、Day 1 に[redacted]社製のストレプトアビジン 96 ウェルプレートのウェルにアッセイ緩衝液［2%ウシ血清アルブミン含有リン酸緩衝生理食塩水（PBS）］を添加し、室温で 1～2 時間インキュベートする（ブロッキング）。ブロッキングインキュベーション中、ビオチン化ペグセタコプランペプチド標識磁気ビーズを冷蔵庫から取り出し、洗浄する。その後、ビーズをアッセイ緩衝液で再懸濁し、50 µL をポリプロピレン製

プレートのウェルに移す。その間に、検体及び対照を[redacted]M 酢酸で[redacted]倍に希釈し、10 分間振とうする。酸性化した検体及び対照を磁気ビーズ含有ポリプロピレン製プレートのウェルに移す。その後、[redacted]M Tris HCl を添加し溶液を中和する。固定されたビオチン化ペグセタコプランペプチドは、中和時に検体及び対照中の ADA に結合する。ポリプロピレン製プレートを冷蔵庫内の撹拌機で振とうしながら一晩置く。

ブロッキングの手順の後、[redacted]社製プレートを洗浄し、ビオチン化ペグセタコプランペプチド（捕捉剤）[redacted]ng/mL をプレートに添加し、検出対照として選択したウェルに 1 倍濃度の PBS で調製した[redacted]ng/mL 及び[redacted]ng/mL を添加する。比較のため、コーティングしていないウェルも含める。[redacted]社製プレートを密封し、冷蔵庫内で 500 rpm で振とうしながら一晩インキュベートする。

Day 2 にポリプロピレン製プレートを冷蔵庫から取り出し、最低 30 分間、室温に平衡化する。洗浄後、プレートに[redacted]M 酢酸を添加し、標識ビーズに結合した ADA を振とうしながら解離させる。酸処理中、1 ウェルあたり 35 µL の[redacted]M Tris HCl を新たなポリプロピレン製プレートに添加する。30 分間の酸処理後に、5 分間（ビーズを沈殿させるため）又はビーズが沈殿するまで、プレートを磁石の上に置く。

ビーズが沈殿したら、上清 100 µL を[redacted]M Tris HCl 含有ポリプロピレン製プレートに移す。プレートを室温で最低 45 分間、撹拌機に置き、その間に[redacted]社製プレートを冷蔵庫から取り出す。[redacted]社製プレートを洗浄し、ポリプロピレン製プレートから得た 50 µL の検体を[redacted]社製プレートの適切なウェルに移す（デュプリケート）。60～90 分間インキュベートした後、[redacted]社製プレートを洗浄し、[redacted]（[redacted]、[redacted]及び[redacted]）を添加する。60～90 分間インキュベートした後、プレートを洗浄し、[redacted]社製[redacted]を全てのウェルに添加し、プレートを[redacted]社製 plate reader で測定する。

確認アッセイの手順は、Day 2 に確認用緩衝液を追加した点を除き、上述のスクリーニングアッセイの手順と同じである。確認用緩衝液はペグセタコプラン 10 µg/mL を含有し、プレート撹拌機上でインキュベート（振とう速度：約 500 rpm、温度：室温、時間：45 分間）する。この追加した点以外は上述の手順を完了する。

マトリックス干渉（溶血及び脂肪血症）並びに追加の凍結及び解凍サイクル（6 及び 9 サイクル）を評価するため 1 つのバリデーション変更（BAL-23-143-160.01-REP）が行われた。マトリックス干渉は認められず、追加の凍結及び解凍サイクルを最大 9 サイクルまで続けた。また、調製したビオチン化ペグセタコプラン標識ビーズが不足していたため、溶血検体及び脂肪血症検体を各 3 つではなく 2 つのみ分析した。この変更による影響は認められず、いずれのマトリックス干渉も全ての許容基準を満たした。

表 2.7.1-4　C3G 又は一次性 IC-MPGN の臨床開発プログラムで用いた抗ペグセタコプランペプチド抗体アッセイ

Parameter	Current method
Analyte	Anti-pegcetacoplan peptide antibody
Bioanalytical site	[redacted] United States
Matrix	Human serum
Surrogate positive control	[redacted]
Platform	Electrochemiluminescent immunoassay ([redacted])
Validation reports and amendments	BAL-23-143-160-REP BAL-23-143-160.01-REP
Clinical studies supported by method Link to report	APL2-201 BAL-21-143-141-REP APL2-C3G-204 Interim report [a] BAL-23-143-178-IREP APL2-C3G-310 Final report BAL-21-143-111-REP

Abbreviations: C3G = C3 glomerulopathy; IC-MPGN = immune-complex membranoproliferative glomerulonephritis; [redacted]

a　Study APL2-C3G-204 is ongoing.

2.7.1.1.2.2.2　抗 PEG 抗体アッセイ

ヒト血清中 PEG 成分に対する抗体検出のため、直接酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）を開発・バリデートした。発作性夜間ヘモグロビン尿症（初回承認申請資料 M2.7.1.1.2.2.1.3 項）及び C3G 又は一次性 IC-MPGN の臨床開発プログラムで同じ分析法を用いた。C3G 又は一次性 IC-MPGN の臨床開発プログラムで用いた抗 PEG 抗体アッセイの要約を表 2.7.1-5 に示し、本項に詳細を示す。

抗 PEG 抗体アッセイは [redacted] で最初に開発され（初回承認申請資料 M5.3.1.4.12-1）、その後 [redacted] 社に移管された（181686VRDW-APWM）。研究施設間でのクロスバリデーションは実施しなかった。APL2-201 試験の part A では [redacted] 社で分析し、APL2-201 試験の part B 及びその他の試験では [redacted] で分析した。

スクリーニングアッセイ及び抗体価アッセイのいずれも、ストレプトアビジンでコーティングした磁気ビーズをビオチン化 PEG と共にインキュベートする。検体、陽性対照及び陰性対照を室温で解凍した後、ポリプロピレン製 96 ウェルプレート内で[redacted]ブロッキング緩衝液を用いて MRD（[redacted]）まで希釈する。希釈した検体をポリプロピレン製プレート内でビーズと結合させ、4°C に設定した冷蔵庫で振とうしながら一晩インキュベートする。並行して、[redacted] 96 ウェルプレートのウェルを炭酸塩コーティング緩衝液で希釈したマルチ PEG 化ウシ血清アルブミンでコーティングし、検出対照として選択したウェルを 1 倍濃度の PBS で希

釈した[redacted]でコーティングする。プレートは室温で一晩インキュベートする。翌日、コーティングした[redacted]プレートのウェルを洗浄及び乾燥した後、プレートの全てのウェルに[redacted]緩衝液を添加する。その後、ビーズを添加したプレートを磁石の上に置き、上清を除去してビーズを洗浄する。[redacted]M 酢酸を用いて抗 PEG 抗体をビーズから解離させた後、プレートを磁石の上に置く。ビーズプレートの酸性化した上清を、[redacted]M Tris-HCl（pH 9.5）を添加した新たなポリプロピレン製プレートの適切なウェルに移して中和する。ビーズから抽出した抗 PEG 抗体を含有する中和した上清を、ブロッキングした[redacted]プレートに添加する。その後、プレートを密封して室温でインキュベートし、洗浄した後、反転して乾燥させ、プレートの適切なウェルに検出抗体カクテル［[redacted]］を添加する。その後、プレートを洗浄し、反転して軽く叩いて乾燥させ、[redacted]基質溶液を添加して発色させる。発色を停止させて 450 nm の吸光度をプレートリーダーで測定する（検出）。

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

[redacted]で用いられた抗 PEG 抗体の分析法の報告書は、5 回改訂された。

- 改訂 BAL-17-143-050.01-REP：C3 が抗 PEG 抗体の検出を妨げないことを示す 1 回の分析で生成された追加データ
- 改訂 BAL-17-143-050.02-REP：選択性、脂肪血症及び溶血が抗 PEG 抗体の検出の確認分析を妨げないことを示す 1 回の分析で生成された追加データ
- 改訂 BAL-17-143-050.03-REP：改訂 BAL-17-143-050.01-REP のヘッダーを「DRAFT」から「FINAL」に変更
- 改訂 BAL-17-143-050.04-REP：ビーズベンダーの比較可能性を示す追加データ。また、−20°C での短期保存が抗 PEG 抗体の検出に影響を及ぼさないことを示すため、安定性を検討
- 改訂 BAL-17-143-050.05-REP：Table 18 のフォーマットエラー及び表題を修正

[redacted]社で用いられた抗 PEG 抗体の分析法の報告書は 1 回改訂された。この改訂により、凍結／解凍サイクル並びに−20°C 及び−80°C での冷凍保存安定性の日数が 113 日間に更新された（初回承認申請資料 M5.3.1.4.13）。

表 2.7.1-5　C3G 又は一次性 IC-MPGN の臨床開発プログラムで用いた抗 PEG 抗体アッセイ

Parameter	Current method
Analyte	Anti-PEG antibody
Bioanalytical site	[redacted] United States [redacted] United States
Matrix	Human serum
Surrogate positive control	[redacted]
Platform	Colorimetric Immunoassay (ELISA)
Validation reports and amendments	BAL-17-143-050-REP ([redacted]) BAL-17-143-050.01-REP ([redacted]) BAL-17-143-050.02-REP ([redacted]) BAL-17-143-050.03-REP ([redacted]) BAL-17-143-050.04-REP ([redacted]) BAL-17-143-050.05-REP ([redacted]) 181686VRDW-APWM ([redacted]) 181686VRDW-APWM-R1 ([redacted])
Clinical studies supported by method Link to report	APL2-201 [redacted]: 200034ALLR_AWM_R1 [redacted]: BAL-21-143-142-REP APL2-C3G-204 [redacted]: Interim report [a] BAL-20-143-098-IREP APL2-C3G-310 [redacted]: Final report BAL-21-143-112-REP

Abbreviations: C3G = C3 glomerulopathy; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; IC-MPGN = immune complex membranoproliferative glomerulonephritis; PEG = polyethylene glycol.
a　Study APL2-C3G-204 is ongoing.

2.7.1.1.2.2.3　中和抗体アッセイ

当初、競合的リガンド結合 NAb アッセイは、内因性の C3 存在下でペグセタコプランの NAb を検出するために開発・バリデートした（BAL-23-143-161-REP）。この方法は薬物耐性が限られており、その後、全てのペグセタコプラン用量で、検体中の NAb を適切に検出できないことが判明した。そのため、発作性夜間ヘモグロビン尿症の臨床開発プログラムの FDA 市販後要件として分析法の再開発及びバリデートをし、C3G 又は一次性 IC-MPGN の臨床開発プログラムで使用した。

バリデーションの結果、競合的リガンド結合 NAb アッセイでは、高濃度陽性対照（3919 ng/mL）は薬物濃度が 1000 µg/mL まで、低濃度陽性対照（639 ng/mL）は薬物濃度が

50.0 µg/mL までのときに検出できることが示された。C3G 又は一次性 IC-MPGN の臨床開発プログラムで用いた NAb アッセイの要約を表 2.7.1-6 に示し、本項に詳細を示す。

このアッセイではプロテイン A/G/L による免疫グロブリンの固相抽出を用いる。過剰な C3 や薬剤を除去するため、プロテイン A/G/L に結合した免疫グロブリンを洗浄し、溶出及び中和する。溶出及び中和した NAb を電気化学発光検出による[redacted]社製競合的リガンド結合アッセイで検出する。このアッセイでは、[redacted]社製プレートをペグセタコプランでコーティングし、血清検体を添加した後、スルホ標識 C3 を添加する。血清検体中の NAb は、[redacted]社製プレート上のペグセタコプランと結合し、[redacted]標識 C3 とペグセタコプランとの結合を妨害することによって、電気化学発光シグナルの減少を引き起こす。NAb の発現は、検体又は対照のシグナルを統計的に導き出した閾値（アッセイのカットポイント）と比較することで判定する。最初に、検体及び対照をアッセイ緩衝液で[redacted]倍に希釈した。NAb はプロテイン A/G/L に結合し、酸で溶出させ、検体を 1.6 倍（200 µL/125 µL で算出）まで濃縮した。酸はペグセタコプランをコーティングした[redacted]社製プレート上で、酸性化された検体 50 µL と作業中和緩衝液 8.3 µL を混和することで中和され、[redacted]倍に希釈された。そのため、最終的な MRD は[redacted]（[redacted]で算出）であった。

表 2.7.1-6　C3G 又は一次性 IC-MPGN の臨床開発プログラムで用いた中和抗体アッセイ

Parameter	Current method
Analyte	Neutralizing anti-pegcetacoplan antibody
Bioanalytical site	[redacted] United States
Matrix	Human serum
Surrogate positive control	[redacted]
Platform	Electrochemiluminescent immunoassay ([redacted])
Validation report	BAL-23-143-161-REP
Clinical studies supported by method Link to report [a]	APL2-201 BAL-21-143-143-REP APL2-C3G-310 Final report BAL-21-143-115-REP

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; C3G = C3 glomerulopathy; IC-MPGN = immune complex membranoproliferative glomerulonephritis; [redacted] NAb = neutralizing antibody.
a　Study APL2-C3G-204 did not have ADA positive sample at interim analysis. Therefore, there is no NAb report.

2.7.1.1.2.3　薬力学的パラメータの分析法

C3G 又は一次性 IC-MPGN の臨床開発プログラムでは複数の PD パラメータを検討した。PD パラメータには第二経路の補体価（AH50）、古典的溶血性補体経路活性（CH50）、C3、C3a、

C3b/iC3b、C3 腎炎因子（C3NeF）、C4、C5a、C1q、二本鎖 DNA（dsDNA）、ホスフォリパーゼ A2 レセプター（PLA2R）及び可溶性 C5b-9（sC5b-9）が含まれた。

PD アッセイの要約を表 2.7.1-7 に示す。主要な PD パラメータ（AH50、C3 及び sC5b-9）の分析法について本項に詳細を示す。C3G 又は一次性 IC-MPGN の臨床開発プログラムの各試験のバリデーションレポート及び関連する分析法の一覧を表 2.7.1-14 に示す。APL2-C3G-314 試験は継続中であり、本申請では PD 解析は実施しなかった。

表 2.7.1-7 PD アッセイの要約

Assay	Matrix	Method	Laboratory	Studies supported by method [a]
AH50	Serum	Hemolytic assay	[redacted], United States	APL2-201 C3G201PDBAR-001.1
	Serum	Hemolytic assay	[redacted], United States	APL2-C3G-204 C3G204PDBAR-003
	Serum	Hemolytic assay	[redacted], United States	APL2-C3G-310 Final report: C3G310PDBAR-003.1
CH50	Serum	Hemolytic assay	[redacted], United States	APL2-201 C3G201PDBAR-001.1
	Serum	Hemolytic assay	[redacted], United States	APL2-C3G-204 C3G204PDBAR-003
	Serum	Hemolytic assay	[redacted], United States	APL2-C3G-310 Final report: C3G310PDBAR-003.1
C1q	Serum	Radial immunodiffusion	[redacted], United States	APL2-201 C3G201PDBAR-001.1
C3	Serum	Turbidimetric immunoassay	[redacted], United States	APL2-201 part A C3G201PDBAR-001.1
	Serum	Nephelometry	[redacted], United States	APL2-201 part B C3G201PDBAR-001.2
	Serum	Turbidimetric immunoassay	[redacted], United States	APL2-C3G-204[b] C3G204PDBAR-001 and C3G204PDBAR-001.1
	Serum	Turbidimetric immunoassay	[redacted], The Netherlands	APL2-C3G-310 Final report: C3G310PDBAR-004.1
C3a	Plasma	ELISA	[redacted], United States	APL2-201 C3G201PDBAR-001.1
	Plasma	ELISA	[redacted], United States	APL2-C3G-204 C3G204PDBAR-003
	Plasma	ELISA	[redacted], United States	APL2-C3G-310 Final report: C3G310PDBAR-003.1

Assay	Matrix	Method	Laboratory	Studies supported by method [a]
C3b/iC3b	Plasma	ELISA	[redacted], United States	APL2-C3G-204 C3G204PDBAR-003
	Plasma	ELISA	[redacted], United States	APL2-C3G-310 Final report: C3G310PDBAR-003.1
C3NeF	Serum	Gel electrophoresis	[redacted], United States	APL2-201 C3G201PDBAR-001.1
	Serum	Gel electrophoresis	[redacted], United States	APL2-C3G-204 C3G204PDBAR-005
	Serum	Gel electrophoresis	[redacted], United States	APL2-C3G-310 C3G310PDBAR-002
C4	Serum	Turbidimetric immunoassay	[redacted], United States	APL2-C3G-204[b] C3G204PDBAR-001 and C3G204PDBAR-001.1
	Serum	Turbidimetric immunoassay	[redacted], The Netherlands	APL2-C3G-310 Final report: C3G310PDBAR-005.1
C5a	Plasma	ELISA	[redacted], United States	APL2-201 C3G201PDBAR-001.1
	Plasma	ELISA	[redacted], United States	APL2-C3G-204 C3G204PDBAR-003
	Plasma	ELISA	[redacted], United States	APL2-C3G-310 Final report: C3G310PDBAR-003.1
dsDNA	Serum	Indirect fluorescent antibody	[redacted], United States	APL2-201 C3G201PDBAR-001.1
PLA2R	Serum	Semi-quantitative indirect fluorescence	[redacted], United States	APL2-201 C3G201PDBAR-001.1
sC5b-9	Plasma	ELISA	[redacted], United States	APL2-201 C3G201PDBAR-001.1
	Plasma	ELISA	[redacted], United States	APL2-C3G-204 C3G204PDBAR-003
	Plasma	ELISA	[redacted], United States	APL2-C3G-310 Final report: C3G310PDBAR-003.1

Abbreviations: AH50 = alternative complement pathway hemolytic activity; CH50 = classical complement pathway hemolytic activity; C3NeF = C3 nephritic factor; dsDNA = double-stranded DNA; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; PD = pharmacodynamic; PLA2R = phospholipase A2 receptor; sC5b-9 = soluble C5b9 complex.

a　Study APL2-C3G-204 is ongoing, therefore reports are interim.

b　C3G204PDBAR-001 report was amended to omit a serum sample sent in error to [redacted].

2.7.1.1.2.3.1　AH50 アッセイ

AH50 の測定を、APL2-201 試験では[redacted]で、APL2-C3G-204 試験及び APL2-C3G-310 試験では[redacted]で実施した。いずれの研究施設でも溶血アッセイを用いた。[redacted]及び[redacted]で用いた分析法の要約を以下に示す。

細胞表面上での補体活性化によるウサギ赤血球の溶血に基づく溶血アッセイで AH50 を測定した。試験試料の血清を限界量添加することで、各コンポーネントに対する AH50（補体 50%溶血用量）を測定した。段階希釈した試験試料を同等量のウサギ赤血球と混合した。この機能的アッセイで、補体活性により溶血した標的細胞から放出されるヘモグロビン量を測定し、溶血された細胞の割合を算出した。使用した細胞濃度では、最も感度の高い波長は 415 nm（ヘモグロビン吸光スペクトルのピーク値）であった。各アッセイの実行は、5 段階の標準試料及び特性評価済みの 5 種類の品質管理試料を用いて検証された。

2.7.1.1.2.3.2　C3 アッセイ

免疫比濁法による C3 の測定を、APL2-201 試験の part A では[redacted]社製[redacted]分析器を用いて[redacted]で、APL2-C3G-204 試験では[redacted]社製[redacted]分析器を用いて[redacted]で、APL2-C3G-310 試験では[redacted]社製[redacted]を用いて[redacted]社で実施した。また、APL2-201 試験の part B では[redacted]社でネフェロメトリー法による C3 の測定を実施した。

[redacted]社製[redacted]及び[redacted]並びに[redacted]社製[redacted]は、免疫比濁法によりタンパク質濃度を測定する機器である。標準試料、対照試料及び試験試料は、分析対象物に対する一定濃度の過剰量のポリクローナル抗体と混合される。これにより、散乱光を発生させる大きな抗原抗体免疫複合体が形成される。この溶液を通過した光量を測定し、標準曲線と比較して試料中の分析対象物の濃度を測定する。

APL2-201 試験の part B では、[redacted]を用いてネフェロメトリー法で C3 を測定した。免疫化学反応では、ヒト血清検体中に含まれる C3 は、特定の抗体と免疫複合体を形成する。これらの複合体は、検体を通過する光線を散乱させる。散乱光の強度は、検体中の C3 濃度に比例する。測定結果は、既知の標準試料の濃度と比較し評価する。

2.7.1.1.2.3.3　sC5b-9 アッセイ

APL2-201 試験では[redacted]で、APL2-C3G-204 試験及び APL2-C3G-310 試験では[redacted]で sC5b-9 濃度を測定した。いずれの研究施設でも[redacted]キットを用いた。[redacted]及び[redacted]で用いたアッセイ手順を以下に示す。

sC5b-9 アッセイは ELISA である。96 ウェルプレートのウェルに捕捉抗体がコーティングされている。未知の試料、標準試料又は対照試料をウェルに添加し、分析対象物をコーティングされた抗体に結合させる。試料中に存在するその他のタンパク質は洗浄により除去され、その後、分析対象物を認識する二次抗体を添加する。この二次抗体は、通常、捕捉抗体と異なるエピトープ

を認識する。また、この抗体は発色させるための酵素と結合しており、その発色によりアッセイの結果を直接読み取ることができる。

この分析では、二次抗体は HRP と結合しており、基質を添加すると発色する。発色の強度は試料中の分析対象物の量に比例する。

2.7.1.1.2.4　組織染色の分析法

組織染色アッセイの要約を表 2.7.1-8 に示す。

APL2-C3G-204 試験及び APL2-C3G-310 試験では、[redacted] で組織染色（C3c）を実施した。

抗ヒト C3c 抗体に結合する免疫蛍光色素を用いて、ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片のヒト C3c を可視化した。蛍光色素は、光を吸収し、より長い波長で独自に光を放つ色素である。この光の吸収及び放出を蛍光と呼ぶ。蛍光色素が抗ヒト C3c 抗体に結合すると、ヒト C3c と標識された抗体の間の反応部位が蛍光顕微鏡下で容易に可視化できるようになる。

表 2.7.1-8　組織染色アッセイ

Assay	Matrix	Method	Laboratory	Studies supported by method
C3c	Tissue	Paraffin immunofluorescence	[redacted] United States	APL2-C3G-204 C3G204PDBAR-004 APL2-C3G-310 C3G310PDBAR-001

2.7.1.1.3　生物薬剤学的評価及び関連する分析法の総括

血清中ペグセタコプラン濃度を測定するための分析法を開発し、適切な規制要件及び指針に従ってバリデートした。本分析法は感度、選択性及び真度が高く、かつ再現性があった。検体処理及び長期保管中のペグセタコプランの安定性が確認された。

免疫原性を測定するための分析法を開発し、適切な規制要件及び指針に従ってバリデートした。検体処理及び短期保管中の分析対象物の安定性が確認された。本分析法は感度、選択性及び真度が高く、かつ再現性があった。

異なる皮下投与製剤間の相対的バイオアベイラビリティ試験は実施しなかった。過去に実施した母集団 PK 解析では、C3G 又は一次性 IC-MPGN の臨床開発プログラムで用いた 2 種類の溶液製剤［[redacted]製剤（[redacted]）及びソルビトール含有 10 mM 酢酸緩衝液製剤（pH 5.0、4.1% w/v）］の間で、皮下投与のバイオアベイラビリティに差がないことが示された。

2.7.1.2　個々の試験結果の要約

発作性夜間ヘモグロビン尿症、C3G 又は一次性 IC-MPGN を適応症とするペグセタコプランの臨床開発プログラムで、正式なバイオアベイラビリティ試験及び生物学的同等性試験は実施しなかった。第 3 相試験で使用した製剤は、本適応症の市販予定製剤であった。

2.7.1.3　全試験を通しての結果の比較と解析

2.7.1.3.1　製剤が薬物動態に及ぼす影響

発作性夜間ヘモグロビン尿症の臨床開発プログラムでは、ペグセタコプランの製剤間の PK プロファイルを比較評価した（初回承認申請資料 M2.7.1.3）。C3G 又は一次性 IC-MPGN の臨床開発プログラムでは、追加評価は実施しなかった。

異なる製剤を比較するための正式な相対的バイオアベイラビリティ試験は実施しなかった。過去に実施した母集団 PK 解析では、健康被験者、腎機能障害を有する被験者及び発作性夜間ヘモグロビン尿症患者を含む、第 1 相から第 3 相試験までの 10 試験から得られたデータを用いた。ペグセタコプランの曝露量［定常状態での平均血清中濃度（$C_{avg,ss}$）及び定常状態での最高血清中濃度（$C_{max,ss}$）］に対する共変量としての製剤の影響を、モデルに基づくシミュレーションにより評価した。[redacted]製剤ではソルビトール含有製剤と比較して $C_{avg,ss}$ 及び $C_{max,ss}$ の予測値に意味のある影響は認められなかった。

2.7.1.3.2　製剤が免疫原性に及ぼす影響

C3G 又は一次性 IC-MPGN の臨床開発プログラムの臨床試験から得られた免疫原性の結果は M2.7.2 に示す。

APL2-201 試験では[redacted]製剤及びソルビトール含有製剤の両方を用いた。APL2-C3G-204 試験、APL2-C3G-310 試験及び APL2-C3G-314 試験ではソルビトール含有製剤を用いた。

APL2-201 試験では、[redacted]製剤を 1 日 1 回 360 mg で 21 例に投与した。このうち、12 例がソルビトール含有製剤を週 2 回 1080 mg で投与継続した（APL2-201 Interim CSR Table 35）。ADA 分析の結果、本試験は被験者数が少なくデータは限られているものの、抗ペグセタコプランペプチド抗体発現状況又は抗体価とペグセタコプランのクリアランスの間に相関性がないことが示唆された。本試験では NAb 陽性となった被験者が少なかったため（C3G コホートで 2 例）、抗ペグセタコプランペプチド NAb のペグセタコプランの安全性又は有効性に及ぼす影響について結論づけることはできなかった。製剤が免疫原性に及ぼす影響は低いと考えられる。

2.7.1.4　付録

付録１　血清中ペグセタコプラン濃度測定の分析法のライフサイクル情報

表 2.7.1-9　血清中ペグセタコプラン濃度測定の分析法バリデーションのライフサイクル情報

	Method validation No. 2	Method validation No. 5
Analyte	Pegcetacoplan	Pegcetacoplan
Validation type	Full validation	Full validation
eCTD reference number	BIO.VR.0210-1989	AV20-APL2-02
Method ID	Method BAM.0484.01	Method TM20-636
Duration of time method is in use	[redacted] to [redacted]	[redacted] to [redacted]
Bioanalytical site	[redacted], USA	[redacted], USA
Matrix	Human serum	
Platform	LC-MS/MS	
Format	A validated LC-MS/MS format using analyte extraction via protein precipitation followed by chromatographic separation and mass detection using a triple quadrupole mass spectrometer equipped with an electrospray ionization source.	
Stock reference, lot number, expiration date	APL-2, Lot [redacted], Retest [redacted]	APL-2, Lot [redacted], expiration/retest date [redacted]
Calibration range from the LLOQ to the ULOQ	10.0 to 1000 µg/mL	10.0 to 1000 µg/mL
Matrix study population	Normal	Normal
Link to reports and applicable amendments	BIO.VR.0210-1989.01 BIO.VR.0210-1989.02 BIO.VR.0210-1989.03 BIO.VR.0210-1989.04 BIO.VR.0210-1989.05 BIO.VR.0210-1989.06	AV21-190 AV21-190 Amendment 1 AV21-190 Addendum 1 AV21-190 Addendum 2
Synopsis of amendment history	Amendment [redacted], BIO.VR.0210-1989.02: This report amendment covers extended long-term stability in frozen matrix maintained at −20 °C and −80 °C.	Amendment [redacted], AV21-190 Amendment 1: The validation report was amended and re-issued in its entirety to correct a typographical error in the lot number of

	Method validation No. 2	Method validation No. 5
	Amendment [redacted] 20[redacted], BIO.VR.0210-1989.03: This report amendment summarizes a partial validation run to assess sample collection/processing integrity across the tested serum generation centrifuge temperature range, as well as across the tested time frame for serum harvest following serum generation. Tests were designed to support sample collection flexibility. Amendment [redacted] 20[redacted], BIO.VR.0210-1989.04: This report amendment summarizes a validation experiment to assess sample collection/processing integrity across the tested centrifuge temperature range used for serum generation, as well as across the tested time frame for serum harvest following serum generation. Tests were designed to support sample collection flexibility. The amendment also includes an interference check in the presence of eculizumab. Amendment [redacted] 20[redacted], BIO.VR.0210-1989.05: This amendment report covers validation experiments to demonstrate acceptable assay selectivity in 10 sources of disease-state serum, as well as acceptable performance in the presence of elevated C3 protein levels of up to approximately 5.0 mg/mL. Amendment [redacted] 20[redacted], BIO.VR.0210-1989.06: This amendment summarizes: i.) the extension of long-term stability in frozen matrix when stored at −80 °C for up to 1014 days previously demonstrated for at least 555 days at −80 °C as reported within BIO.VR.0210-1989.02, and ii.) partial validation experiments to update validation data set to meet the FDA Bioanalytical Method Validation, Guidance for Industry, May 2018 standards. The partial validation included addition of a Middle-High VS/QC level to the previously required levels of VS/QC samples used in the assay, assessment of spiked selectivity at the LLOQ VS level, and re-assessment of assay recovery to include the	internal standard [redacted]. The lot number was corrected from [redacted] to [redacted]. Addendum [redacted] 20[redacted], AV21-190 Addendum 1: This is an addendum to the previously issued method validation report AV21-190 Amendment 1, dated [redacted] 20[redacted], to include additional results of APL-2 long-term stability in human serum (512 days at −70°C) and stock solution long-term stability. Addendum [redacted] 20[redacted], AV21-190 Addendum 2: This report is an addendum to the previously issued method validation report AV21-190 Amendment 1, dated [redacted] 20[redacted], to validate selectivity blanks and accuracy and precision of APL-2 quantified in C3G disease state serum and IC-MPGN disease state serum. Additionally, long term stability (746 days at −70°C) of APL-2 in human serum was performed.

	Method validation No. 2	Method validation No. 5
	new Middle-High VS/QC level.	

Abbreviations: APL-2 = pegcetacoplan; C3G = C3 glomerulopathy; eCTD = electronic Common Technical Document; FDA = Food and Drug Administration; IC-MPGN = immune complex membranoproliferative glomerulonephritis; ID = identifier; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; LLOQ = lower limit of quantitation; No. = number; QC = quality control; ULOQ = upper limit of quantitation; VS = validation samples.

表 2.7.1-10 血清中ペグセタコプラン濃度測定の分析法のライフサイクル情報（APL2-201 試験、APL2-C3G-204 試験及び APL2-C3G-310 試験）

	Study APL2-201	Study APL2-C3G-204	Study APL2-C3G-310
Analyte	Pegcetacoplan	Pegcetacoplan	Pegcetacoplan
Validation type	In-study	In-study	In-study
eCTD reference number	APL2-201	APL2-C3G-204	APL2-C3G-310
Method ID	BAM.0484.01	TM20-636	TM20-636
Duration of time method is in use	[redacted] 20 to 20	[redacted] 20 to 20	[redacted] 20 to 20
Bioanalytical site	[redacted] USA	[redacted] USA	[redacted] USA
Matrix	Human serum		
Platform	LC-MS/MS		
Format	A validated LC-MS/MS format using analyte extraction via protein precipitation followed by chromatographic separation and mass detection using a triple quadrupole mass spectrometer equipped with an electrospray ionization source.		
Stock reference, lot number, expiration date	APL-2, Lot [redacted], expiration/retest date: [redacted] 20[redacted] APL-2, Lot [redacted], expiration/retest date: [redacted] 20[redacted]	APL-2, Lot [redacted], expiration/retest date: [redacted] 20[redacted] (Batch numbers [redacted] to [redacted] and [redacted] 20[redacted] (Batch numbers [redacted] to [redacted]	APL-2, Lot [redacted], expiration/retest date: [redacted] 20[redacted], [redacted] 20[redacted], [redacted] 20[redacted] (depending on batch number)
Calibration range from the LLOQ to the ULOQ	10.0 to 1000 µg/mL	10.0 to 1000 µg/mL	10.0 to 1000 µg/mL
Matrix study population	Diseased	Diseased	Diseased
Link to reports and applicable amendments	BIO.SR.0210-2178.01 BIO.SR.0210-2178.02	AD23-1550 AD24-1709	AD25-1957
Synopsis of amendment history	Amendment [redacted] 20[redacted] BIO.SR.0210-2178.02: This report amendment is the final report and covers all sample analysis runs performed after interim study report, BIO.SR.0210-2178.01.	Report AD23-1550 includes samples analyzed until [redacted] 20[redacted] Interim Report AD24-1709 is cumulative and includes additional samples analyzed until [redacted] 20[redacted]	NA

Abbreviations: APL-2 = pegcetacoplan; eCTD = electronic Common Technical Document; ID = identifier; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; LLOQ = lower limit of quantitation; NA = not applicable; ULOQ = upper limit of quantitation.

付録２　血清中ペグセタコプラン濃度測定の分析性能の概要

表 2.7.1-11　血清中ペグセタコプラン濃度測定の分析性能（APL2-201 試験）

Bioanalytical method validation report name, amendments, and hyperlinks	Validation of an LC-MS/MS Assay for Determination of APL-2 in Human Serum Method ID: BAM.0484.01 Report ID: BIO.VR.0210-1989.01 BIO.VR.0210-1989.02 BIO.VR.0210-1989.03 BIO.VR.0210-1989.04 BIO.VR.0210-1989.05 BIO.VR.0210-1989.06		
Method description	The analyte (pegcetacoplan) and internal standard ([redacted]) were extracted from 50 µL of human serum by protein precipitation using acetonitrile. The supernatant was then diluted and analyzed by LC-MS/MS.		
Materials used for standard calibration curve and concentration	Reference Item Item name: APL-2 Lot number: [redacted] Supplier: [redacted] Internal Standard Item name: [redacted] Lot number: [redacted] Supplier: [redacted] Calibration standards (CSs) were prepared by diluting stock solutions with control matrix to make 1000, 900, 500, 200, 100, 40.0, 20.0, and 10.0 µg/mL pools.		
Validated assay range	10.0 to 1000 µg/mL		
Material used for QCs and concentration	VSs were similarly prepared from separate stock solutions. Stock solutions were diluted in control matrix to create 750, 150, 30.0, and 10.0 µg/mL validation sample pools. The stock solutions were also diluted directly with serum to create an over-range validation sample pool at 2000 µg/mL.		
MRDs	NA		
Source and lot of reagents	See reports for details		
Regression model and weighting	Linear, $1/x^2$ weighting		
Validation parameters	**Method validation summary**		**Source location**
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	No. of standard calibrators from LLOQ to ULOQ	8	Table 3, BIO.VR.0210-1989.01, [redacted] method validation
	Cumulative accuracy (bias) from LLOQ to ULOQ	−2.2% to 2%	Table 3, BIO.VR.0210-1989.01, [redacted] method validation
	Cumulative precision (CV) from LLOQ to ULOQ	1.8% to 3.8%	Table 3, BIO.VR.0210-1989.01, [redacted] method validation
Performance of QCs during accuracy and precision runs	Cumulative accuracy (bias) in 4 QCs	−3.5% to 3%	Table 6, BIO.VR.0210-1989.01, [redacted] method validation

	Interbatch CV	2.6% to 5.9%	Table 6, BIO.VR.0210-1989.01, [redacted] method validation
	Total error	NA	NA
Selectivity & matrix effect	Healthy and disease-state human serum: Selectivity was assessed in 10 different sources of both healthy and disease-state (PNH) human serum. The results for both spiked and unspiked selectivity experiments met the acceptance criteria and demonstrate that the method is accurate in samples from multiple sources. Spiked selectivity of the method was re-examined at the LLOQ VS level (10.0 µg/mL) to update the validation data set to meet the FDA standards. The results for the spiked selectivity experiment met the acceptance criteria and demonstrated that the method is accurate in sample from multiple sources when conducted at the LLOQ VS level. Matrix effects were tested in 6 individual lots of human serum (N = 1 replicate per lot) by spiking samples with the analyte and internal standard post extraction at theoretical concentrations at the high and low end of the method range. A matrix factor was calculated for the analyte and internal standard for each replicate. The precision of the normalized MF values around the mean (CV) was 2.5% (low QC) and 3.5% (high QC), indicating that matrix effects were not significant. Disease-state human serum: Selectivity was assessed in 10 individual sources of disease-state (PNH) human serum. The results for both spiked and unspiked selectivity experiments met the acceptance criteria and demonstrate that the method is accurate in samples from multiple sources of matrix from the tested disease-state.		Page 24, Table 8, and Table 9, BIO.VR.0210-1989.01, [redacted] method validation Page 16 and Table 5, BIO.VR.0210-1989.06, [redacted] method validation Page 30 and Table 14, BIO.VR.0210-1989.01, [redacted] method validation Page 13, Page 14, Table 5, and Table 6, BIO.VR.0210-1989.05, [redacted] method validation
Interference & specificity	Interference Assessments: Selectivity of the assay in the presence of potential over-the-counter (OTC) coadministered substances was assessed. Low and high VSs, which also contained several drug substances at concentrations near the Cmax for a typical dose, were prepared. No interference was observed when tested with acetaminophen, acetylsalicylic acid, caffeine, pheniramine, dextromethorphan, diphenhydramine, ibuprofen, nicotine, phenylephrine, pseudoephedrine, and naproxen. The reported accuracy and precision met the 15.0% accuracy and precision acceptance criteria. Additional specificity and interference assessment were performed for the assay in the presence of a coadministered drug, MCA6103 human Anti-C5 (eculizumab biosimilar). For the interference assessment, low and high VSs were prepared to		Page 36, Table 21, and Table 22, BIO.VR.0210-1989.01, [redacted] method validation

	contain the coadministered drug at a concentration near its Cmax for a typical dose (270 µg/mL). For the coadministered specificity assessment, control matrix was also spiked to contain the coadministered drug at the same Cmax concentration. The coadministered substances are deemed not to impact the assay specificity, accuracy, and precision up to the concentrations spiked in the VSs. Interference assessment of samples containing elevated C3 protein serum levels (to mimic patient samples with this condition) was conducted. To mimic the desired condition, a final approximate C3 protein level of 5.0 mg/mL was achieved by adding concentrated C3 protein to normal human serum. Additionally, control matrix was spiked to contain the same C3 level and assayed. The results met the acceptance criteria. C3 protein is deemed not to impact the assay specificity, accuracy, and precision, up to approximately 5.0 mg/mL.	Page 13, Table 5, Table 6, and Table 7, BIO.VR.0210-1989.04 Page 15, Page 16, Table 7, Table 8, and Table 9, BIO.VR.0210-1989.05, [redacted] method validation
Hemolysis effect	Acceptable precision and accuracy (less than 15% CV and mean bias)	Table 10, BIO.VR.0210-1989.01, [redacted] method validation
Lipemic effect	Acceptable precision and accuracy (less than 15% CV and mean bias)	Table 11, BIO.VR.0210-1989.01, [redacted] method validation
Dilution linearity & hook effect	Over-range QC: 2000 µg/mL diluted 20-fold Mean bias: −3.5%, Precision: 3.5%	Table 7, BIO.VR.0210-1989.01, [redacted] method validation
Bench-top/process stability	At least 25 hours at room temperature	Table 15, BIO.VR.0210-1989.01, [redacted] method validation
Freeze-thaw stability	At least 4 cycles, at either −20 °C or −80 °C	Table 16 and Table 17, BIO.VR.0210-1989.01, [redacted] method validation
Long-term storage	At least 1014 days at −80 °C	Summary Table, BIO.VR.0210-1989.06, [redacted] method validation
Parallelism	NA	NA
Carryover	The carryover samples in all analytical runs met the acceptance criterion. No carryover result, expressed as a percentage of the LLOQ mean response, was greater than 5.4%.	Summary Table; Carryover, Page 24; BIO.VR.0210-1989.01, [redacted] method validation
Method performance in Study APL2-201 Bioanalytical Report: BIO.SR.0210-2178.01 (Runs 1 to 15)		
Assay passing rate	15 of 15 (100%) of the total analytical runs met the prespecified acceptance criteria.	Table 1, BIO.SR.0210-2178.01
Standard curve performance	Cumulative bias range: −0.6% to 1% Cumulative precision: ≤6.8% CV	Table 2, BIO.SR.0210-2178.01
QC performance	Cumulative bias range: −1.3% to 2.5% Cumulative precision: ≤14.6% CV	Table 4, BIO.SR.0210-2178.01

	Total error: NA	
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was performed in <10% of study samples, and 14/14 (100%) of the samples met the prespecified criteria.	Page 49 and Table 7, BIO.SR.0210-2178.01
Study sample analysis/stability	Duration of matrix stability required: 298 days at −80 °C Duration of matrix stability established: at least 1014 days at −80 °C	Sample Analysis Summary, Page 8, BIO.SR.0210-2178.01 Summary Table, BIO.VR.0210-1989.06, [redacted] method validation
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	10.0, 20.0, 40.0, 100, 200, 500, 900, 1000 µg/mL Cumulative accuracy (bias) from LLOQ to ULOQ: −0.6% to 1% Cumulative precision (CV) from LLOQ to ULOQ: 3.2% to 6.8%	
Method performance in Study APL2-201 Bioanalytical Report: BIO.SR.0210-2178.02 (Runs 16 to 20)		
Assay passing rate	4 of 4 (100%) of the total analytical runs met the prespecified acceptance criteria.	Table 1, BIO.SR.0210-2178.02
Standard curve performance	Cumulative bias range: −1.1% to 2.5% Cumulative precision: ≤5.2% CV	Table 2, BIO.SR.0210-2178.02
QC performance	Cumulative bias range: 0.3% to 1.3% Cumulative precision: ≤3.9% CV Total error: NA	Table 4, BIO.SR.0210-2178.02
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was performed in ≥10% of study samples, and 36/36 (100%) of the samples met the prespecified criteria.	Page 47 and Table 6, BIO.SR.0210-2178.02
Study sample analysis/stability	Duration of matrix stability required: 924 days at −80 °C Duration of matrix stability established: at least 1014 days at −80 °C	Sample Analysis Summary, Page 8, BIO.SR.0210-2178.02 Summary Table, BIO.VR.0210-1989.06, [redacted] method validation
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	10.0, 20.0, 40.0, 100, 200, 500, 900, 1000 µg/mL Cumulative accuracy (bias) from LLOQ to ULOQ: −1.1% to 2.5% Cumulative precision (CV) from LLOQ to ULOQ: 1.4% to 5.2%	

Abbreviations: APL-2 = pegcetacoplan; Cmax = maximum (peak) drug concentration; CV = coefficient of variation; FDA = Food and Drug Administration; ID = identifier; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; LLOQ = lower limit of quantitation; MF = matrix factor; MRD = minimum required dilution; N = number of samples; NA = not applicable; OTC = over-the-counter; PNH = paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; QC = quality control; ULOQ = upper limit of quantitation; VS = validation sample.

表 2.7.1-12　血清中ペグセタコプラン濃度測定の分析性能（APL2-C3G-204 試験及び APL2-C3G-310 試験）

Bioanalytical method validation report name, amendments, and hyperlinks	HPLC-MS/MS Assay Validation for the Determination of APL-2 from Human Serum High Range Method ID: TM20-636 Report ID: AV21-190 AV21-190 Amendment 1 AV21-190 Addendum 1 AV21-190 Addendum 2		
Method description	The analyte (pegcetacoplan) and internal standard ([redacted] were extracted from 25 µL of human serum by protein precipitation using methanol. The supernatant was then diluted and analyzed by LC-MS/MS.		
Materials used for standard calibration curve and concentration	Reference Item Item name: APL-2 Lot number: [redacted] Supplier: [redacted] Internal Standard Item name: [redacted] Lot number: [redacted] Supplier: [redacted] Standard curve working solutions were prepared by spiking blank human serum on the day of analysis with the APL-2 intermediate working solution to yield standard concentrations of 10.0, 20.0, 40.0, 80.0, 200, 500, 900, and 1000 µg/mL.		
Validated assay range	10.0 to 1000 µg/mL		
Material used for QCs and concentration	QC samples were prepared by spiking blank human serum with the intermediate working solution to yield concentrations of 10.0, 30.0, 100, 800, and 1000 µg/mL		
MRDs	NA		
Source and lot of reagents	See reports for details		
Regression model and weighting	Linear, $1/x^2$ weighting		
Validation parameters	**Method validation summary**		**Source location**
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	No of standard calibrators from LLOQ to ULOQ	8	Table 3-1, AV21-190, [redacted] method validation
	Cumulative accuracy (bias) from LLOQ to ULOQ	−6.1% to 8.0%	Table 3-1, AV21-190, [redacted] method validation
	Cumulative precision (CV) from LLOQ to ULOQ	3.2% to 6.5%	Table 3-1, AV21-190 method validation
Performance of QCs during accuracy and precision runs	Cumulative accuracy (bias) in 5 QCs	−7.5% to 6.0%	Table 3-2, AV21-190, [redacted] method validation
	Interbatch CV	4.7% to 9.5%	Table 3-2, AV21-190, [redacted] method validation
	Total error	NA	NA
Selectivity & matrix effect	Selectivity was assessed in 6 different sources of human serum. The results for both spiked and unspiked selectivity experiments met the acceptance criteria and demonstrate that the		Table 3-14, AV21-190, [redacted] method validation

	method is accurate in samples from multiple sources. Matrix effects were evaluated by analyzing 3 replicates of LQC and HQCs each prepared in different lots of commercially available human serum. In order for the matrix effects to be considered acceptable, the mean accuracy (bias) should be within 15.0% of the nominal concentration and the precision (CV) should be no greater than 15% in all individual matrix lots at each QC level. For pegcetacoplan, the bias was within 6.3% and the CV was within 6.7% at the LQC level and the bias was within 13.3% and the CV was within 4.4% at the HQC level.	Table 3-9 and Table 3-10, AV21-190, [redacted] method validation
Interference & specificity	Not performed (the method was cross-validated with method BAM.0484.01).	NA
Hemolysis effect	Acceptable precision and accuracy (less than 15% CV and mean bias)	Table 3-6, AV21-190, [redacted] method validation
Lipemic effect	Acceptable precision and accuracy (less than 15% CV and mean bias)	Table 3-7, AV21-190, [redacted] method validation
Dilution linearity & hook effect	2500 µg/mL (dilution factor: 51-fold) Accuracy (%bias): −6.0% Precision (%CV): 3.7%	Table 3-4, AV21-190, [redacted] method validation
Bench-top/ process stability	At least 6.3 hours at room temperature	Table 3-16, AV21-190, [redacted] method validation
Freeze-thaw stability	At least 4 cycles at −70 °C	Table 3-17, AV21-190, [redacted] method validation
Long-term storage	At least 746 days at −70 °C	Table 3-4, AV21-190 Addendum 2, [redacted] method validation
Parallelism	NA	NA
Carry over	The carryover analysis met the acceptance criteria of the double blank sample having an analyte peak area response less than or equal to 20% of the passing LLOQ curve point(s).	Table 3-15 AV21-190, [redacted] method validation
Method performance in Study APL2-C3G-204 Bioanalytical Report: AD23-1550 (Runs 1 to 4)		
Assay passing rate	4/4 (100%) of the total analytical runs met the prespecified acceptance criteria.	Table 3-2, AD23-1550
Standard curve performance	Cumulative bias range: −1.7% to 2.3% Cumulative precision: ≤7.6% CV	Table 3-7, AD23-1550
QC performance	Cumulative bias range: −6.4% to 8.3% Cumulative precision: ≤6.2% CV Total error: NA	Table 3-8, AD23-1550
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was performed in 22 study samples, and 21/22 (95.5%) of the samples met the prespecified criteria.	Section 3.5 and Table 3-6, AD23-1550
Study sample analysis/ stability	Duration of matrix stability required: 503 days Duration of matrix stability established: at least 746 days at −70 °C	Section 3.1, AD23-1550 Table 3-4, AV21-190 Addendum 2, [redacted] method validation

Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	10.0, 20.0, 40.0, 80.0, 200, 500, 900, 1000 µg/mL Cumulative accuracy (bias) from LLOQ to ULOQ: −1.7% to 2.3% Cumulative precision (CV) from LLOQ to ULOQ: 2.8% to 7.6%	
Method performance in Study APL2-C3G-204 Bioanalytical Report: AD24-1709 (Runs 1 to 6)		
Assay passing rate	6/6 (100%) of the total analytical runs met the prespecified acceptance criteria.	Table 3-2, AD24-1709
Standard curve performance	Cumulative bias range: −1.5% to 2.3% Cumulative precision: ≤7.0% CV	Table 3-7, AD24-1709
QC performance	Cumulative bias range: −5.6% to 4.1% Cumulative precision: ≤8.3% CV Total error: NA	Table 3-8, AD24-1709
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was performed in 22 study samples, and 21/22 (95.5%) of the samples met the prespecified criteria.	Section 3.5 and Table 3-6, AD24-1709
Study sample analysis/ stability	Duration of matrix stability required: 503 days Duration of matrix stability established: at least 746 days at −70 °C	Section 3.1, AD24-1709 Table 3-4, AV21-190 Addendum 2, [redacted] method validation
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	10.0, 20.0, 40.0, 80.0, 200, 500, 900, 1000 µg/mL Cumulative accuracy (bias) from LLOQ to ULOQ: −1.5% to 2.3% Cumulative precision (CV) from LLOQ to ULOQ: 3.4% to 7.0%	
Method performance in Study APL2-C3G-310 Bioanalytical Report: AD25-1957		
Assay passing rate	44/45 (97.78%) of the total analytical runs met the prespecified acceptance criteria.	Table 3-2, AD25-1957
Standard curve performance	Cumulative bias range: −1.0% to 1.5% Cumulative precision: ≤5.3% CV	Table 3-7, AD25-1957
QC performance	Cumulative bias range: −8.0% to 2.3% Cumulative precision: ≤11.6% CV Total error: NA	Table 3-8, AD25-1957
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was performed in 140 study samples, and 131/140 (93.6%) of the samples met the prespecified criteria.	Section 3.5 and Table 3-6, AD25-1957
Study sample analysis/ stability	Duration of matrix stability required: 726 days Duration of matrix stability established: at least 746 days at −70 °C	Section 3.1, AD25-1957 Table 3-4, AV21-190 Addendum 2, [redacted] method validation
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	10.0, 20.0, 40.0, 80.0, 200, 500, 900, 1000 µg/mL Cumulative accuracy (bias) from LLOQ to ULOQ: −1.0% to 1.5% Cumulative precision (CV) from LLOQ to ULOQ: 3.8% to 5.3%	

Abbreviations: APL-2 = pegcetacoplan; CV = coefficient of variation; HPLC-MS/MS = high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry; HQC = high level quality control; ID = identifier; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; LLOQ = lower limit of quantitation; LQC = low level quality control; MRD = minimum required dilution; NA = not applicable; QC = quality control; SOP = standard operating procedure; ULOQ = upper limit of quantitation.

付録 3　血清中ペグセタコプラン濃度測定の分析法の変更及びクロスバリデーション結果の概要

表 2.7.1-13　分析法の変更及びクロスバリデーションの結果

Bioanalytical method validation report name and hyperlink	Cross-Validation of LC-MS/MS Assays for the Determination of APL-2 in Human Serum BIO.VR.0210-2629.01 BIO.VR.0210-2629.02		
Changes in method	NA		
New validated assay range if any	NA		
Validation parameters	**Cross-validation performance**		**Source location**
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	Cumulative accuracy (bias) in standard calibrators from LLOQ to ULOQ	NA	NA
	Cumulative precision (CV) from LLOQ to ULOQ	NA	NA
Performance of QCs during accuracy and precision runs	Cumulative accuracy (bias) in QCs [redacted], [redacted], and [redacted] Phase 1	−5% to 1.2%	Table 10, BIO.VR.0210-2629.01
	Phase 2 Excluding failed data points: Including failed data points:	 −5.1% to 7.9% −10.5% to 7.9%	 Table 11, BIO.VR.0210-2629.01
	[redacted] Phase 1 Excluding Run 15: Including Run 15:	 −1.4% to 2.6% −1.4% to 2.8%	 Table 5, BIO.VR.0210-2629.02
	Phase 2 Excluding failed data points: Including failed data points:	 −5.1% to 7.9% −12% to 12%	 Table 6, BIO.VR.0210-2629.02
	Interbatch CV [redacted], [redacted], and [redacted] Phase 1	 2.6% to 5.1%	 Table 10, BIO.VR.0210-2629.01
	Phase 2 Excluding failed data points: Including failed data points:	 5.2% to 12.3% 5.2% to 12.3%	 Table 11, BIO.VR.0210-2629.01
	[redacted] Phase 1 Excluding Run 15: Including Run 15:	 3.6% to 7.7% 3.6% to 8.9%	 Table 5, BIO.VR.0210-2629.02
	Phase 2		

	Excluding failed data points: Including failed data points:	2.9% to 12.3% 2.9% to 12.3%	Table 6, BIO.VR.0210-2629.02
	Total error (percentage)	NA	NA
Cross-validation	This cross-validation was conducted in compliance with validation plan BIO.VLP. 0210-2629 and its amendment BIO.VLP. 0210 2629_A002. This body of work involved 4 bioanalytical laboratories ([redacted], [redacted], [redacted], and [redacted]). Each laboratory used its own previously validated method(s) to conduct the cross-validation and ran according to their local SOPs. This cross-validation sought to establish comparability across 6 different methods established at 4 different laboratories. It was conducted in 2 phases. In phase 1, cross-validation QCs prepared at [redacted] were analyzed by all 6 methods and the intra-run and inter-run precision and accuracy were determined for each sample. The inter-run precision was within 8.9% (including Run 15) and 7.7% (excluding Run 15), and the inter-run biases ranged from −1.4% to 2.8% (including Run 15) and −1.4 to 2.6% (excluding Run 15). This showed that all 6 methods measured these prepared samples accurately and comparably. Deming regression analysis between any pair of methods showed equivalence at the 90% confidence level for 3 of 20 pairs, with systematic differences in 10 of 20 pairs and proportional differences in 17 of 20 pairs. The phase 2 of the cross-validation was the analysis of incurred samples from those stored at [redacted]. This phase has limited statistical interpretation because of the small data set. However, at a 90% confidence level, Deming regression showed 7 of 12 method pairs to be equivalent and 5 of 12 method pairs to demonstrate some level of proportional or systematic inequality within the limits of this data set and confidence level. The reanalysis of the incurred samples was also compared with the originally reported nominal values through the use of a Bland-Altman analysis, including all 6 methods. This analysis still demonstrated a 0.997715 correlation between the original and re-analyzed concentrations. Furthermore, a histogram comparison of the percentage of similarities of the comparator methods to the nominals demonstrates both accuracy and precision within +15% of the nominal values. Although 5 incurred sample analyses failed to meet the a priori +15% sample bias criteria, the overall incurred sample data set met the criteria of 67% incurred samples within +20% and all of the comparison analyses showed good method correlation. Therefore, it is concluded that these 6 methods are equivalent within the guidance criteria for bioanalysis.		BIO.VR.0210-2629.01 BIO.VR.0210-2629.02
List other parameters	NA		NA

Abbreviations: APL-2 = pegcetacoplan; CV = coefficient of variation; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; LLOQ = lower limit of quantitation; NA = not applicable; QC = quality control; SOP = standard operating procedure; ULOQ = upper limit of quantitation.

付録 4　PD バリデーションレポート及び補足資料の一覧

表 2.7.1-14　PD バリデーションレポート及び補足資料の一覧（APL2-201 試験、APL2-C3G-204 試験及び APL2-C3G-310 試験）

Validation report number	PD parameter	Study	Laboratory	Description
24NJH-PDMVR-002	AH50	APL2-201	[redacted], United States	Assay validation summary
EXVAL.003.02	AH50	APL2-C3G-204 APL2-C3G-310	[redacted], United States	Validation report
24NJH-PDMVR-007	C1q	APL2-201	[redacted], United States	Assay validation summary
24NJH-PDMVR-012	C3	APL2-201 part A APL2-C3G-204	[redacted], United States	Assay validation summary
14MRL-PDMVR-001 17MRL-PDMVR-001	C3	APL2-201 part B	[redacted], United States	Validation report Report 14MRL-PDMVR-001 is the initial validation report. Report 17MRL-PDMVR-001 is amended validation report to update stability.
24ECL-PDMVR-005	C3, C4	APL2-C3G-310	[redacted], The Netherlands	Method performance sheet
24NJH-PDMVR-008	C3a	APL2-201	[redacted], United States	Assay validation summary
EXVAL.REPORT.004.01	C3a	APL2-C3G-204	[redacted], United States	Validation report
23ARL-PDMVR-001	C3c	APL2-C3G-204 APL2-C3G-310	[redacted]	Validation report

Validation report number	PD parameter	Study	Laboratory	Description
			[redacted], United States	
EXVAL.REPORT.024.01	iC3b	APL2-C3G-204	[redacted], United States	Validation report
24NJH-PDMVR-003	C3NeF	APL2-201	[redacted], United States	Assay validation summary
24NJH-PDMVR-010	C4	APL2-C3G-204	[redacted], United States	Assay validation summary
24NJH-PDMVR-006	C5a	APL2-201	[redacted], United States	Assay validation summary
EXVAL.REPORT.007.01	C5a	APL2-C3G-204	[redacted], United States	Validation report
24NJH-PDMVR-001	CH50	APL2-201	[redacted], United States	Assay validation summary
EXVAL.002.04	CH50	APL2-C3G-204 APL2-C3G-310	[redacted], United States	Validation report
IM-VER-016.001	dsDNA	APL2-201	[redacted], United States	Validation report
24NJH-PDMVR-011	PLA2R	APL2-201	[redacted] United States	Summary [redacted] was used for send-out referral testing.
24NJH-PDMVR-005	sC5b-9	APL2-201	[redacted]	Assay validation summary

Validation report number	PD parameter	Study	Laboratory	Description
			[redacted], United States	
EXVAL.REPORT.005.2.04	sC5b-9	APL2-C3G-204 APL2-C3G-310	[redacted], United States	Validation report

Abbreviations: AH50 = alternative complement pathway hemolytic activity; CH50 = classical complement pathway hemolytic activity; C3NeF = C3 nephritic factor; dsDNA = double-stranded DNA; NA = not applicable; PD = pharmacodynamic; PLA2R = phospholipase A2 receptor; sC5b-9 = soluble C5b9 complex.