



DG2018-38

LBAにおけるパラレルリズム

Parallelism in ligand binding assay





DG members

Name	Company
清水 浩之 Hiroyuki Shimizu	田辺三菱製薬株式会社 <i>Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation</i>
羽原 広 Hiromi Habara	第一三共株式会社 <i>DAIICHI SANKYO CO., LTD.</i>
前田 健一 Kenichi Maeda	積水メディカル株式会社 <i>SEKISUI MEDICAL CO., LTD.</i>
高木 秀行 Hideyuki Takagi	科研製薬株式会社 <i>KAKEN PHARMACEUTICAL CO., LTD.</i>
横田 喜信 Yoshinobu Yokota	<i>Altasciences Preclinical Seattle LLC</i> (2018.10.1 ~, SNBL USAより派遣)

<http://bioanalysisforum.jp/>



活動の内容 (Contents of our activity)

- ◆ 2018年5月 May 2018
 - ✓ DGサポーターからDGメンバー募集
Member recruitment
- ◆ 2018年7月12日 Jul 12, 2018
 - ✓ キックオフ会議 Kick off meeting
- ◆ 2018年8月～12月 Aug to Dec 2018
 - ✓ Web会議(平均月1回)及びメールによる議論
Monthly teleconferences and e-mail conversations
- ◆ 2018年12月～2019年1月 Dec 2018 to Jan 2019
 - ✓ 議論のまとめ及びシンポジウム発表準備
Summary of discussion and poster preparation



背景及び目的

- ◆ Ligand binding assay (LBA) におけるパラレルリズムは、実試料の希釈系列における用量反応曲線と検量線系列の用量反応曲線が平行であり、実試料の数段階の希釈における換算値に希釈倍率による差が認められないとき、平行性が成立していると定義される*。
- ◆ 必ずしもすべての分析についてパラレルリズムを評価する必要はないが、平行性が問題になる可能性が疑われる際には、可能な範囲で科学的に妥当な評価を行い定量値への影響を考察すべきであろう。

*: 医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法(リガンド結合法)のバリデーションに関するガイドライン質疑応答集(Q&A)



背景及び目的

- ◆ 一方で、バイオマーカー分析における平行性については、いくつかの規制文書（例えばC-PathのPoints to Consider Document*）でパラレルリズムの重要性が説かれている。これらの文書には具体的な実施方法の記載があるものの、各社それぞれのポリシーで実施方法や基準が設定されていると推測する。
- ◆ 本DGでは、PK (TK) とBiomarker に分けて、平行性についての実施時期や実施方法、基準の設定を議論した。本発表ではDGの議論内容の概要を紹介し、LBAにおけるパラレルリズムの議論の一助としたい。

*: Points to Consider Document: Scientific and Regulatory Considerations for the Analytical Validation of Assays Used in the Qualification of Biomarkers in Biological Matrices issued by C-Path



Background and Objective

- ◆ Parallelism in ligand binding assays (LBAs) is defined as an established parallel relationship between a dose-response curve from a study sample dilution series and a curve from a calibration standard series, with no difference among back-calculated concentrations for multiple dilutions of a study sample*.
- ◆ Evaluation of parallelism is not necessarily required for all analytical methods. However, if parallelism is an intrinsic issue for an LBA-based bioanalytical method, scientifically valid evaluation and assessment of the impact on measured concentrations should be considered to the extent possible.

*: Q&A for the Guideline on Bioanalytical Method (LBA) Validation in Pharmaceutical Development issued by MHLW



Background and Objective

- ◆ On the other hand, some regulatory articles (e.g., Points to Consider Document: Scientific and Regulatory Considerations for the Analytical Validation of Assays Used in the Qualification of Biomarkers in Biological Matrices issued by C-Path) emphasize the importance of parallelism. Although the details of parallelism implementation are described in those articles, it seems to the DG members that parallelism is performed based on various policies.
- ◆ Therefore, this DG mainly focused on when or how parallelism should be performed as well as the acceptance criteria of parallelism for both PK (TK) and biomarker studies. The anticipated issues and approaches for resolution were discussed. This presentation provides an overview of our discussion to facilitate an efficient parallelism analysis by LBAs.



議論の内容-1 (Contents of discussion)

- ◆ パラレルリズムの概念 (Concept of Parallelism)
 - ✓ パラレルリズム評価の目的及び方法 (概略)
 - ✓ パラレルリズムの定義, 規制文書から見たパラレルリズム
 - ✓ 以下の相違点での議論
 - PKとBiomarker (BM)
 - シングルプレックスとマルチプレックス
 - Dilutional LinearityとDilutional Parallelism
- ◆ パラレルリズムの評価方法及び基準 (Evaluation and Criteria of Parallelism)
 - ✓ 基本方法, 使用マトリックス, 希釈公比, 段階希釈数及び各段階希釈におけるn数, 評価基準の設定





議論の内容-2 (*Contents of discussion*)

- ◆ パラレルイズムの推奨プロセス (Recommended Process of Parallelism)
 - ✓ BM分析の場合
 - ✓ PKの場合
- ◆ パラレルイズムの具体的事例 (Examples of Parallelism)
 - ✓ パラレルイズム評価の成立事例
 - ✓ パラレルイズム評価の不成立事例
 - ✓ パラレルイズムが不成立となる場合の仮説
- ◆ アンケート結果 (Results of a Questionnaire Survey)





パラレルリズムの概念

Concept of Parallelism



パラレルリズム評価の目的

Biomarker (BM)	PK(薬物が内因性たんぱく質)
<p>内因性物質と標準物質 (Recombinant protein) の重要試薬に対する反応性が同等であるか確認することにある。副次的な目的として、Matrix効果確認によるMRD設定、希釈妥当性評価も含まれる。</p>	<p>最適化したアッセイ系において個体別ブランク試料中に内因性濃度が残っているかどうかで状況は異なる。 ブランク試料中に内因性濃度が検出される場合のPKにおいては、</p> <ul style="list-style-type: none"> ①内因性に起因したシグナル ②投与した薬剤に起因したシグナル <p>を分けて考える必要がある。つまり、これらの濃度を足し算や引き算を用いて補正していく場合、①のシグナルが②のシグナルと比べてParallelであるかどうか確認しておく必要がある。その上で、パラレルリズムが確認された希釈倍率を使用した場合、補正してもよい。</p> <p>一方、ブランク試料に内因性濃度が検出されない場合のPKにおいては(例:MRDを上げて検出されないレベルとした場合)、PK(薬物が非内因性たんぱく質)と扱ってよい。</p>

http://bioanalysisforum.jp/



パラレルリズム評価の方法（概略）

Biomarker (BM)	PK
<p>バッファーで調製した検量線試料と実試料を段階希釈したものをそれぞれ測定して評価する。</p> <p>概念的には、実試料濃度（シグナル）が希釈によって減弱する割合が、検量線試料の希釈によって減弱する割合と比べてどうなのかを見る。この割合が異なる場合、パラレルリズムは無いと結論付ける。</p>	<p>通常はEMAのガイドラインに則って精度のみの評価（%CVが30%以内）としているが、実際には精度、真度の両方が必要な場合もある。その場合の理論濃度の定義はBMに順ずる。</p>

<http://bioanalysisforum.jp/>





パラレルイズムの定義

- ◆ MHLWガイドライン2014のQ&Aの定義
 - ✓ 「実試料の希釈系列における用量反応曲線と検量線系列の用量反応曲線が平行であり、実試料の数段階の希釈における換算値に希釈倍率による差が認められないとき、平行性が成立している」
- ◆ FDAガイダンス2018の定義
 - ✓ 「Parallelism demonstrates that the serially diluted incurred sample response curve is parallel to the calibration curve. Parallelism is a performance characteristic that can detect potential matrix effects and interactions between critical reagents in an assay」
- ◆ C-Path (Points to Consider Document) 2017の定義
 - ✓ 「Parallelism is the extent to which the dose-response relationship between two materials (i.e., calibrator versus unknown specimens) is constant for the examined range of concentrations.」
 - ✓ 「Parallelism is the demonstration that the sample dilution response curve is parallel to the standard concentration response curve」



規制文書から見たパラレルリズム (MHLW)

◆ MHLWガイドライン2014

- ✓ 実試料の希釈系列における用量反応曲線と検量線系列の用量反応曲線が平行であり、実試料の数段階の希釈における換算値に希釈倍率による差が認められないとき、平行性が成立していると定義される。本ガイドライン発出の時点では、平行性が成立しなかった事例、平行性不成立の原因、平行性の不成立が医薬品開発に与える影響の程度等について、国内外ともに十分な知見が蓄積され議論が成熟している状況ではないことから、必ずしもすべての分析について平行性を評価する必要はない。ただし、分析対象物質や分析法の特性、あるいは、医薬品開発の過程で集積されたデータから、平行性が問題になる可能性が疑われる際には、可能な範囲で科学的に妥当な評価を行い定量値への影響を考察すべきである。



規制文書から見たパラレルリズム (FDA)

◆ FDAガイダンス2018

- ✓ Parallelism demonstrates that the serially diluted incurred sample response curve is parallel to the calibration curve. Parallelism is a performance characteristic that can detect potential matrix effects and interactions between critical reagents in an assay.
- ✓ Parallelism should be evaluated for assays for endogenous compounds.
- ✓ Matrix effects evaluation involves comparing calibration curves in multiple sources of the biological matrix against a calibration curve in the matrix for parallelism (serial dilution of incurred samples) and nonspecific binding.





規制文書から見たパラレルリズム (EMA)

◆ EMAガイドライン2012

- ✓ If study samples are available, parallelism between the calibration standard curve and serially diluted study samples should be assessed to detect possible matrix effect or differing affinities for metabolites.
- ✓ A high concentration study sample (preferably close to C_{max}) should be diluted to at least three concentrations with blank matrix. The precision between samples in a dilution series should not exceed 30%.
- ✓ In case the sample does not dilute linearly (i.e. in a non parallel manner), a procedure for reporting a result should be defined a priori. If study samples are not available during the validation of the method, parallelism should be evaluated as soon as study samples become available.



各論①PKとBMで違いは？（DGメンバーの意見）

- ▶測定しているバイオマーカーと標準物質として用いているRecombinant proteinが異なる前提であるのがBM. 同一なのがPK.
- ▶BMは様々なPaperで言及されているとおり、パラリズムは評価すべきパラメーターである。PKについては、具体的な必要性は感じないが、ガイドラインに記載があるため仕方なく実施している状況である。
- ▶パラリズム実施の目的は色々あるが、PMDAやFDAのガイダンスでは検量線と実試料(内因性物質)の反応性が平行であるかどうかを検証することと定義しているの、それを目的とするとPKの場合、実施する必要がないのではないか。

<PKでパラリズムを評価する意義>

- ▶代謝物が影響する事例は聞いたことが無い。しかし、干渉物質(抗体医薬のターゲットやADA)の場合は影響することがある。仮にADAが薬物濃度を下げているケースでは、パラリズムの実験をすると、希釈倍率が高いほど検量線と平行になる。
- ▶抗原(ターゲット)が血液中にあり、抗体と抗原とこれらの複合体が共存している場合、希釈に伴って遊離型抗体の濃度が変化するケースがあった。



各論②シングルプレックスとマルチプレックスの違いは？ (DGメンバーの意見)

- ▶マルチプレックスの場合、全てのアナライトでパラレルリズムが基準を満たすことは難しいため、感度とパラレルリズムのバランスを取る必要がある。
- ▶基本的にはバリデーションをマルチプレックスでは取らないことにしている。バリデーションを取ったとしても内容は再現性(真度と精度)で評価している。その際の適用基準は厳しくしていない。
- ▶何アナライト以上の測定が厳しいというよりは、各アナライトごとの定量範囲がどれだけ異なるかが影響するのではないか。
- ▶マルチプレックスでも要求水準は単一のバイオマーカー測定と同じはずであるが、アナライト間の定量範囲の差が起因して望まれる基準を達成できないことがほとんどである。パラレルリズムの評価を実施する場合は予備検討でバラツキを検討し、バリデーションでは評価基準を緩めて実施する。
- ▶バリデーションをする場合としない場合がある。バリデーションをしたとしても基準を満たせない場合がある。





各論③ Dilutional LinearityとDilutional Parallelismの違いは？ (DGメンバーの意見)

【Dilutional linearity】

<PKの場合>

- 試料に添加する標準物質: Recombinant protein
- 試料を希釈する溶液: 血清などのマトリックス, その後MRD希釈で測定

<BMの場合>

- 試料に添加する標準物質: Recombinant protein (パラレルリズムを実施する内因性高濃度試料がない場合)
- 試料を希釈する溶液: バッファー (血清などのマトリックスでも良いが, そうすると実試料分析時も内因性フリーのマトリックスが必要となるため, 避けたい)

【Dilutional parallelism】

<PKの場合>

- 試料: 実試料
- 試料を希釈する溶液: 血清などのマトリックス, その後MRD希釈で測定

<BMの場合>

- 試料: 実試料
 - 試料を希釈する溶液: バッファー
- 内因性高濃度の実試料が無い場合は, Dilution linearityを代替法とする.



パラレルイズムの 評価方法及び基準

Evaluation and Criteria of Parallelism

<http://bioanalysisforum.jp/>



DG内の意見

- 実試料をバッファーで数段階希釈して、測定し、希釈倍率による差が無いことを確認する.
- 個体別実試料(検量線のULOQを超える)を段階希釈(PKの場合:マトリックス, BMの場合:バッファー)する. 傾きが検量線と平行であることを確認する.
- 実試料(ULOQを超える濃度, C_{max} 付近)をバッファーで数段階希釈し、測定値に対して希釈倍率を戻したときの値が希釈倍率によって大きく変わらないかを評価する.
- 定量可能濃度(段階希釈後)を示す個体別実試料について、公比1.5または2(C-path)で段階希釈を行い、各希釈倍率における濃度を得る(複数段階). それらの濃度の傾きが検量線の傾きと平行であるかどうかを確認する.
- 個体別実試料を段階希釈(少なくとも3点)し、検量線と平行である範囲を確認する.



JBF 使用マトリックス

使用するマトリックスはプールかあるいは個体別か？
個体別マトリックスの場合何個体で実施するか？

DG内の意見

- 個体別マトリックス. 少なくとも3個体. 内因性濃度は個体によって異なり, 高い個体, 低い個体があるため. また, 数段階の希釈を実施するために内因性濃度の高い個体が必要となるため.
- 個体別マトリックス. 少なくとも3個体(内因性LQC, MQC, HQC)の実施が必要. その準備のために6個体以上のスクリーニングは行いたい.
- 内因性物質の濃度の高い個体別マトリックスが必要. ガイドラインや論文を見ていると, 少なくとも3~4例あればよい?
- 個体別マトリックス. 10個体をスクリーニングし, 定量範囲内で最大濃度の試料, 最低濃度の試料, 中間点の試料(LQC, MQC, HQCのように)を選択する. (予備検討で300程度のスクリーニングを行った.)
- 個体別マトリックスを使用する必要がある. 内因性濃度の高い数個体(少なくとも3例)の平行性を確認. LQC, MQC, HQCのサンプルの準備.



希釈公比

希釈の公比はどの程度か？

DG内の意見

- 検量線の範囲と用いるマトリックスの内因性濃度にもよるが公比は2.
- 公比1.5, 2又は4(定量範囲に合わせて予備検討で決定)
- C-pathに1.5-2 fold serial dilutionsと記載
- 公比2
- 公比1.5, 2又は4. 公比と平行範囲のバランスを考える.

<http://bioanalysisforum.jp/>



段階希釈数及び各段階希釈におけるn数

段階希釈数はいくつ必要か？

DG内の意見

- 3段階は必要ではないか.
- 少なくとも3段階, 可能な限り4段階にチャレンジ. 定量範囲にもよるが, ELISAだと測定レンジをカバーできるのではないかと.
- 段階数としては3~6段階くらい.
- 段階数は7~8段階での経験があるが, 実際には4段階程度.
- 段階数としては低, 中, 高の3段階くらい.

各希釈段階におけるn数はいくつ必要か？

DG内の意見

- n数は少なくとも3.
- FDAガイダンス2018の希釈直線性ではn=5と記載.



評価の方法及び基準の設定は？

DG内の意見

- 真度 $100 \pm 20\%$, 各希釈段階でのCV20%以下
- 論文では4パラまたは5パラメータ回帰した時のパラメータB (Hill slope) で比較したものも挙げられている.
- MRDにおける測定値を理論値として各希釈段階試料の平均値の真度を算出(基準は $100 \pm 20 \sim 30\%$. 理想は $100 \pm 20\%$), 各希釈段階試料 (n=3) のCVを算出(基準は20%以下).
- 各希釈段階(3段階希釈の場合)試料に希釈倍率を乗じた濃度(希釈前濃度, 100%マトリックス中濃度)の9個の濃度値のCVを算出(基準は30%以下←EMAガイドライン2012).



評価基準の設定

DG内の意見

- いずれかの希釈倍率における濃度を理論値と規定し、真度を算出(MRDにおける測定濃度を理論値と設定)。その後、真度が $100 \pm 20\%$ であることを確認。また、希釈倍率換算後の濃度のCVが20%以下であることを確認。
- 同一個体において、希釈倍率換算後の濃度のCVが20%以内



真度で評価する場合の理論値の設定は？

DG内の意見

- MRDにおける測定値を理論値とする.
- MRDもしくは定量範囲内で最も高濃度の試料における測定値を理論値とする.
- ①MRDにおける濃度, ②LLOQを上回る最大希釈サンプルの濃度, ③パラレルイズムが認められる各希釈段階サンプルの平均値の3パターンを提唱する文献もある. (Jing Tu & Patrick Bennett. Parallelism experiments to evaluate matrix effects, selectivity and sensitivity in ligand-binding assay method development: pros and cons. *Bioanalysis* (2017) 9(14), 1107-1122)



パラレルイズムの推奨プロセス

Recommended Process of Parallelism

<http://bioanalysisforum.jp/>





パラレルリズムの推奨プロセス (BM分析)

① 個体別マトリックス (10例程度) のスクリーニング

➤ 内因性濃度の確認

② 高, 中, 低濃度 (最少で3例) の個体あり

➤ Recombinant protein 添加が必要か判断

② 高, 中, 低濃度 (最少で3例) の個体なし

②' プールもしくは個体別マトリックスに
Recombinant protein 添加

③ バッファーで段階希釈

➤ 公比: 1.5, 2, 4 のいずれか (定量範囲による)

➤ 段階希釈数: 3~8 (定量範囲による)

➤ 各段階希釈の繰り返し数: $n=3$

④ 理論値の設定

➤ MRD もしくは 定量範囲内で最も高濃度の試料における測定値

⑤ 評価

➤ 各段階希釈試料全ての希釈前濃度の精度: 30% 以下

➤ 各段階希釈試料の希釈前濃度の理論値からの真度: $100 \pm 20 \sim 30\%$

真度評価が必要な場合

<http://bioanalysisforum.jp/>



パラレルリズムの推奨プロセス (PK)

【薬物が内因性タンパクの場合】

【薬物が非内因性タンパクの場合】

① 個体別ブランク試料中の内因性濃度の確認

② 内因性濃度が検出される場合

③ 以下がパラレルであることを検証

- 内因性たんぱく質に起因するシグナル
- 投与した薬剤に起因するシグナル

④ 評価

- 各段階希釈試料全ての希釈前濃度の精度: 30%以下* (FDAガイダンス2018, EMAガイドライン2012)

⑤ 評価基準を満たさない場合

- 可能な範囲で科学的に妥当な評価を行い定量値への影響を考察

② 内因性濃度が検出されない場合

FDAガイダンス2018, EMAガイドライン2012に従い, 必要に応じて評価

*: 精度の具体的基準はEMAガイドライン2012にのみ記載

http://bioanalysisforum.jp/





パラレルイズムの具体的事例

Examples of Parallelism

<http://bioanalysisforum.jp/>





パラレルリズム評価の成立事例-1

条件		内容
対象		BM分析
評価の位置付け		申請レベル
実施時期		分析法開発中
サンプル数		3例(個体別)*
サンプルの希釈溶液		代替マトリックス(Buffer)
段階 希釈:	ポイント数	6点
	公比	2
	濃度範囲	LQC付近、MQC付近、HQC付近
	ポイント内での繰り返し 分析回数	n = 3
理論濃度設定		MRDサンプルの濃度
評価基準設定		各測定値の真度 100±20% 希釈前理論濃度の精度** ≤30%

<http://bioanalysisforum.jp/>





パラレルリズム評価の成立事例-1

◆ 成立要因

ブランクマトリックス中BM濃度は定量範囲上限以上で、実サンプル中BM濃度は定量下限以下であった。つまり、BM分析の用途が薬物投与により減少することを意図したものであったため、正常ないしは患者試料の使用でパラレルリズムを実施するに足りる十分な内因性濃度が検出されたことが成立要因と考えられた。

☆前頁の補足

- * 実際には、数十例の個体別血漿中BM濃度を定量し、その中から低濃度、中濃度、高濃度の血漿サンプルを選択した。
- ** 希釈前理論濃度の精度: 各希釈倍率サンプルから得られた濃度値を希釈倍率で補正した値の精度。





パラレルリズム評価の成立事例-2

条件		内容
対象		BM分析
評価の位置付け		社内意思決定レベル
実施時期		実試料分析中
サンプル数		3例(個体別)
サンプルの希釈溶液		代替マトリックス(Buffer)
段階 希釈:	ポイント数	3-5点
	公比	2
	濃度範囲	低濃度、中濃度、高濃度
	ポイント内での繰り返し 分析回数	n = 3
理論濃度設定		MRDサンプルの濃度
評価基準設定		各希釈倍率内の平均真度 $100 \pm 20\%$ 各希釈倍率内の精度 $\leq 20\%$ 希釈前理論濃度の精度 $\leq 30\%$

<http://bioanalysisforum.jp/>



パラレルリズム評価の成立事例-2

◆ 成立要因

- ✓ 個体別血清中のBM濃度がパラレルリズムに適したものであり、MRDに設定した希釈サンプル～検量線の低濃度付近までの希釈サンプルで、特にレスポンスに問題はなかった。





パラレルリズム評価の成立事例-3

条件		内容
対象		BM分析
評価の位置付け		探索・検討レベル
実施時期		実試料分析中
サンプル数		8例(個体別)
サンプルの希釈溶液		代替マトリックス(Buffer)
段階 希釈:	ポイント数	4点
	公比	2
	濃度範囲	低 - 中濃度 (マトリックス中濃度が低 - 中濃度のため)
	ポイント内での繰り返し 分析回数	n = 1
理論濃度設定		MRDサンプルの濃度
評価基準設定		各希釈倍率内の真度 100 ± 20%

<http://bioanalysisforum.jp/>



パラレルリズム評価の成立事例-3

◆成立要因

- ✓ 入手したマトリックス中に存在するアナライトが検量線の定量範囲内であったため、パラレルリズムの評価ができ、パラレルリズムも成立した。





パラレルリズム評価の不成立事例-1

条件		内容
対象		BM分析
評価の位置付け		探索・検討レベル
実施時期		分析法開発前(市販キット)
サンプル数		6例(個体別)
サンプルの希釈溶液		代替マトリックス(Buffer)
段階 希釈:	ポイント数	3点
	公比	2
	濃度範囲	低濃度 (マトリックス中濃度が低濃度のため)
	ポイント内での繰り返し 分析回数	n = 1
理論濃度設定		MRDサンプルの濃度
評価基準設定		各希釈倍率内の平均真度 100±20%

<http://bioanalysisforum.jp/>





パラレルリズム評価の不成立事例-1

◆不成立要因

- ✓ 入手したブランクマトリックス中に存在するBM濃度がほぼ検量線の定量下限未満であり、パラレルリズムの評価ができなかった。
- ✓ 実サンプル中BM濃度は定量範囲内と考えられるが、サンプルが貴重なため検討レベルでは使用できなかった。

◆対応策

- ✓ 代替として、検量線に使用するリコンビナントの標品を添加して希釈直線性を行った。





パラレルリズム評価の不成立事例-2

条件		内容
対象		BM分析
評価の位置付け		探索・検討レベル
実施時期		分析法開発中
サンプル数		2 - 3例(個体別)
サンプルの希釈溶液		代替マトリックス(Buffer)
段階 希釈:	ポイント数	3 - 5点
	公比	1.5 - 6
	濃度範囲	LQC - HQC付近の濃度
	ポイント内での繰り返し 分析回数	n = 2 - 3
理論濃度設定		MRDサンプルの濃度
評価基準設定		各希釈倍率内の精度 $\leq 20\%$

<http://bioanalysisforum.jp/>





パラレルリズム評価の不成立事例-2

◆不成立要因

- ✓ 本BMIは薬物の標的抗原であり、血液中に存在する。このとき、血漿中には遊離型抗原、抗原/薬物複合体、遊離型薬物が混在することになる。Ligand Binding Assayで薬物を重要試薬として用いて抗原濃度測定を行うと、原理的には遊離型抗原を定量することになると考えられる。しかし、Bufferによる希釈によって上記3者のバランスが崩れ、遊離型抗原濃度が変動し、パラレルリズムが成立しなかったと推測される。

◆対応策

- ✓ 希釈倍率を最小限に設定して測定した。





パラレルリズム評価の不成立事例-3

条件		内容
対象		PK(薬物が非内因性たんぱく質)
評価の位置付け		探索・検討レベル
実施時期		分析法開発中
サンプル数		2-3例(個体別)
サンプルの希釈溶液		代替マトリックス(Buffer)
段階 希釈:	ポイント数	3-5点
	公比	1.5-6
	濃度範囲	LQC-HQC付近の濃度
	ポイント内での繰り返し 分析回数	n = 2-3
理論濃度設定		MRDサンプルの濃度
評価基準設定		各希釈倍率内の精度 $\leq 20\%$

<http://bioanalysisforum.jp/>





パラレルリズム評価の不成立事例-3

◆不成立要因

- ✓ 不成立事例2の薬物からの視点. 本薬物の標的抗原は血液中に存在する. このとき, 血漿中には遊離型抗原, 抗原/薬物複合体, 遊離型薬物が混在することになる. Ligand Binding Assayで抗原を重要試薬として用いて薬物濃度測定を行うと, 原理的には遊離型薬物を定量することになると考えられる. しかし, Bufferによる希釈によって上記3者のバランスが崩れ, 遊離型薬物濃度が変動し, パラレルリズムが成立しなかったと推測される.

◆対応策

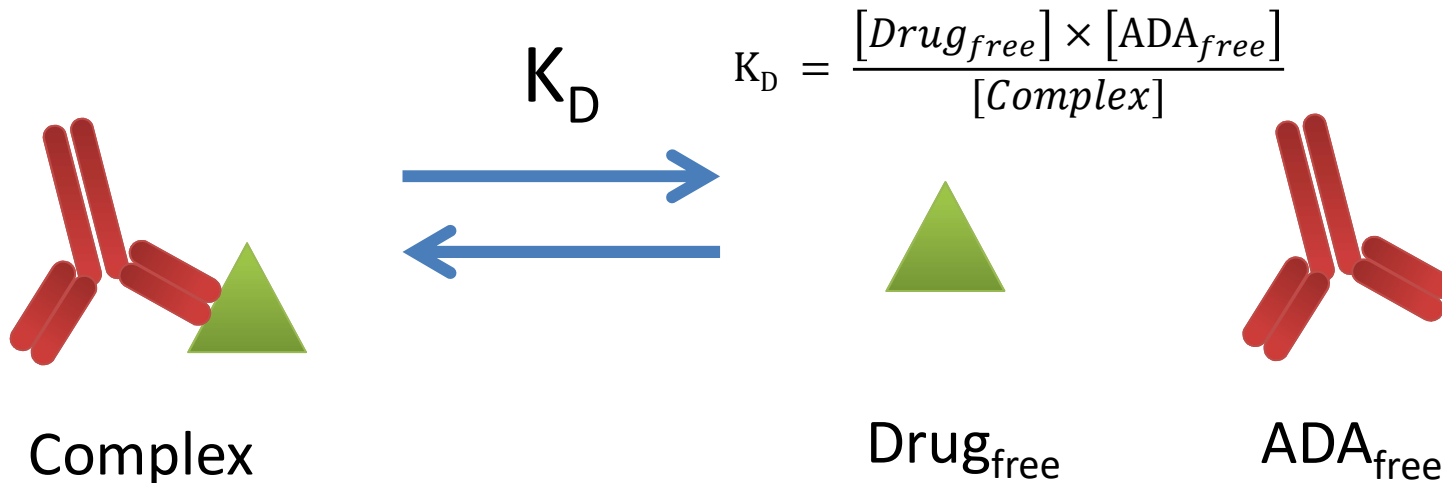
- ✓ 希釈倍率を最小限に設定して測定した.





パラレルリズムが不成立となる場合の仮説-1

具体的事例 (PK or BM)	不成立の要因の考察	確認方法案
PK: ADAが存在する 場合	ADAが存在する場合, 定量値として得られる薬物濃度は実濃度よりも低くなる可能性がある. このサンプルを希釈することで, 薬物とADAの結合が一部解離し薬物濃度の定量値が高くなり, パラレルリズムが成立しない可能性が考えられる.	パラレルリズムが不成立の場合はADA評価を実施する. ADAポジティブであれば, ADAネガティブサンプルでパラレルリズムを評価する.





パラレルリズムが不成立となる場合の仮説-2

具体的事例 (PK or BM)	不成立の要因の考察	確認方法案
PK及びBM: 患者マトリックス を事前に使用で きない場合 (稀少マトリクス など)	事前の評価ができず, 実試料で パラレルリズムを行ない不成立の 場合.	事前の対策は難しく, なるべく実 サンプルに近い代替マトリックス を用意する. 不成立だったとしても, 全サンプ ルで希釈倍率を同じにする, な どの対策を取る.

<http://bioanalysisforum.jp/>





パラレルリズムが不成立となる場合の仮説-3

具体的事例 (PK or BM)	不成立の要因の考察	確認方法案
PK及びBM: 重要試薬の ロット変更	重要試薬類のロット変更により, パーシャルバリデーションを実施し たところ, 前のロットでは成立して いたパラレルリズムが成立しなくなっ た.	ロット変更のパーシャルバリ デーションでパラレルリズムが必 要か否かの議論をしたい.

<http://bioanalysisforum.jp/>





パラレルリズムが不成立となる場合の仮説-4

具体的事例 (PK or BM)	不成立の要因の考察	確認方法案
BM: BMの改変体を投与する場合	<p>膜たんぱく質(A)と抗体のFc部分を融合させたFusion proteinが薬物(B)の場合. このときにBMとしてSoluble Aの濃度を測定したい場合, 投与前サンプルではSoluble Aのみを定量できるが, 投与後のサンプルでは投与薬剤であるBが多量に存在し, Soluble Aの定量に影響しうる. また, 固相抗体や検出抗体に対する反応性がAとBで異なる場合, パラレルリズム評価にも影響が出ると考えられる.</p>	<p>■AとBを測り分ける場合</p> <ul style="list-style-type: none"> ・抗Fc抗体でBを抜き取って, A結合抗体でAを定量する. ・B特異的に検出可能な重要試薬に変更してBを定量する. ・A+BからA(Pre)を差し引く. <p>ただし, アフィニティの違い, 内因性濃度変動に注意が必要.</p> <p>■AとBをまとめて測定する場合</p> <ul style="list-style-type: none"> ・AとBのアフィニティの違いに注意.

<http://bioanalysisforum.jp/>





- ◆ パラレルイズムの目的, 実施方法はバイオマーカー分析とPK(TK)で異なる. それぞれの目的に合わせた評価基準が重要と考える.
- ◆ バイオマーカー分析におけるパラレルイズム評価は, 分析法が持つ相対的な真度を特徴づけるのに有用であろう.
- ◆ PK(TK)におけるパラレルイズム評価は, マトリックスに含まれる因子などによる希釈直線性阻害の影響の考察に有用であろう.



Summary

- ◆ The objectives and methods of parallelism for biomarker analysis and PK (TK) are different from each other. We think that acceptance criteria in consideration of each objective are important.
- ◆ Evaluation of parallelism for biomarker analysis is considered useful to characterize relative accuracy for a developed method.
- ◆ Evaluation of parallelism for PK (TK) is considered useful to assess the effect for the interference of dilutional linearity caused by a matrix component and so on.



アンケート結果

Results of a Questionnaire Survey

<http://bioanalysisforum.jp/>





アンケート概要

- ◆ 実施期間 : 2018年11月28日～12月11日
- ◆ 設問数 : 20問
- ◆ 収集回答数 : 17件

<http://bioanalysisforum.jp/>

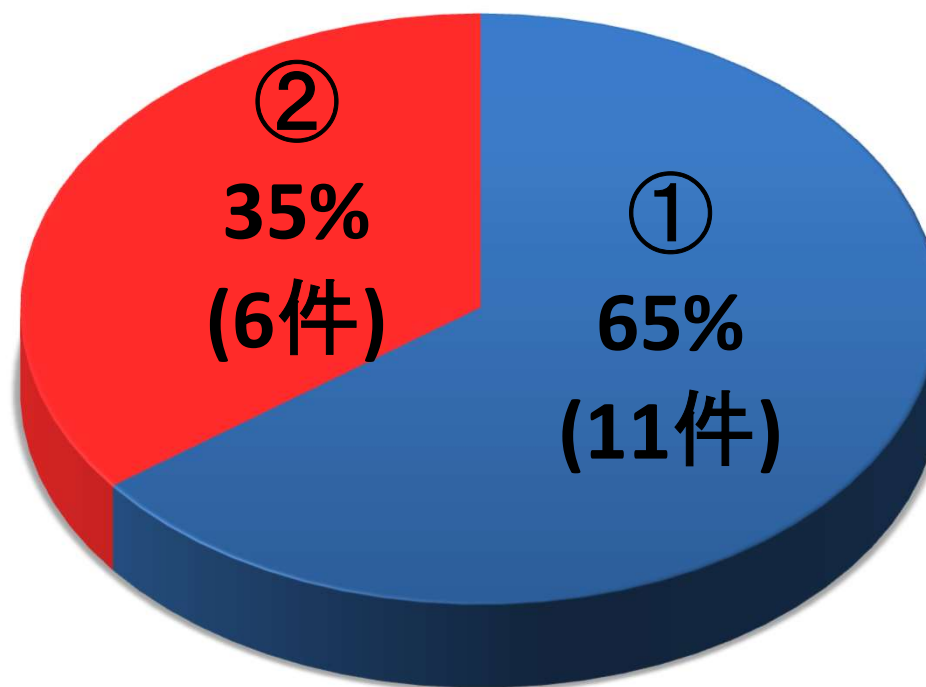




Q1 所属について

①製薬企業

②CRO

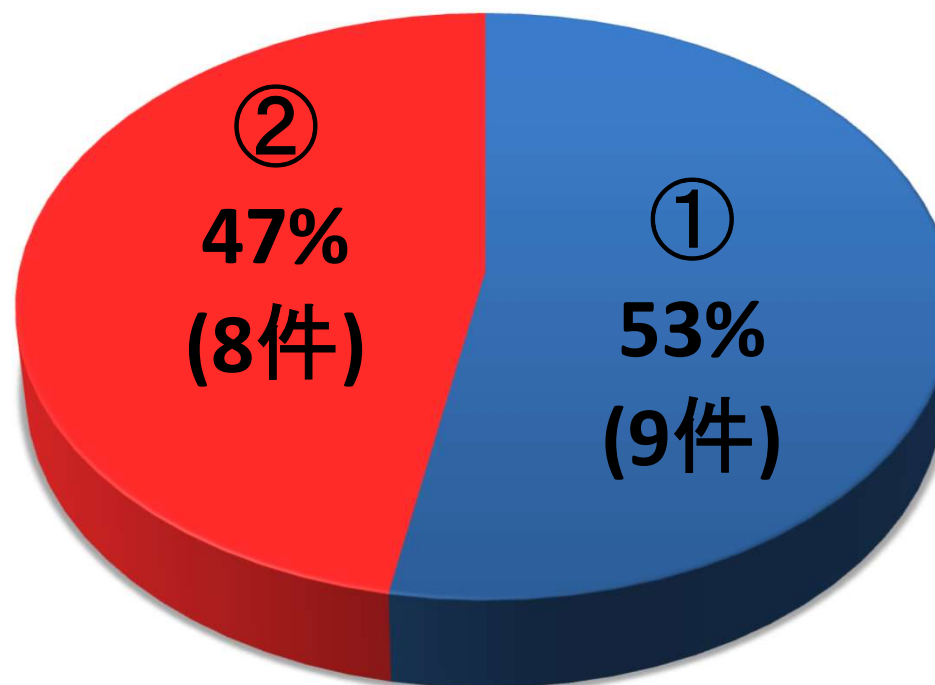


<http://bioanalysisforum.jp/>



Q2 パラレルリズム評価の経験について

- ① 経験あり
- ② 経験なし

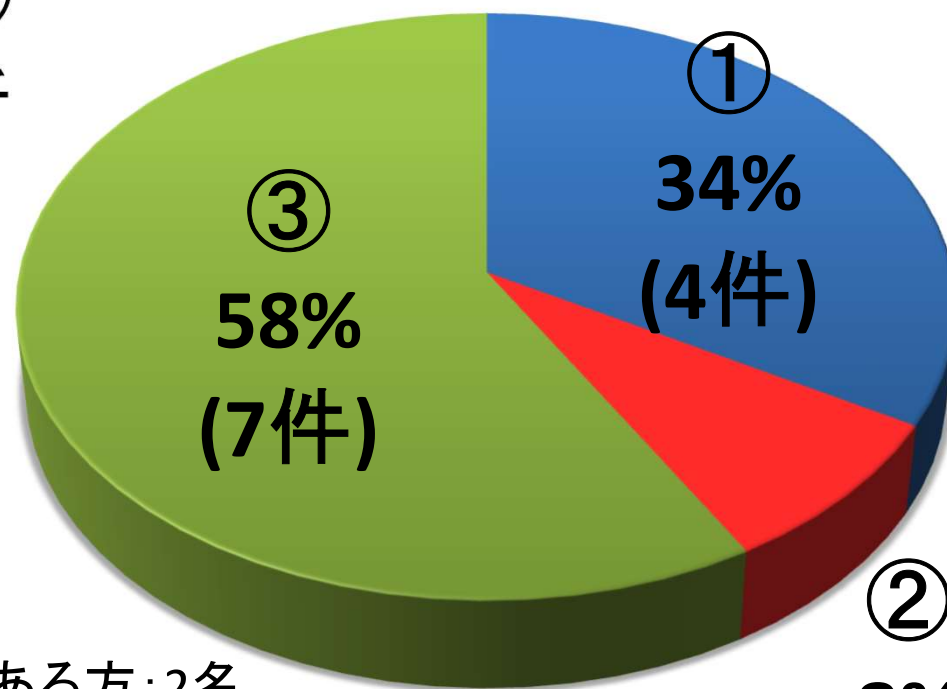


<http://bioanalysisforum.jp/>



Q3 評価経験のあるものについて

- ①PK(薬物が非内因性タンパク質)
- ②PK(薬物が内因性物質のリコンビナントタンパク質もしくはその改変体)
- ③バイオマーカー分析



<http://bioanalysisforum.jp/>

*複数経験のある方のご回答は項目ごとにカウント

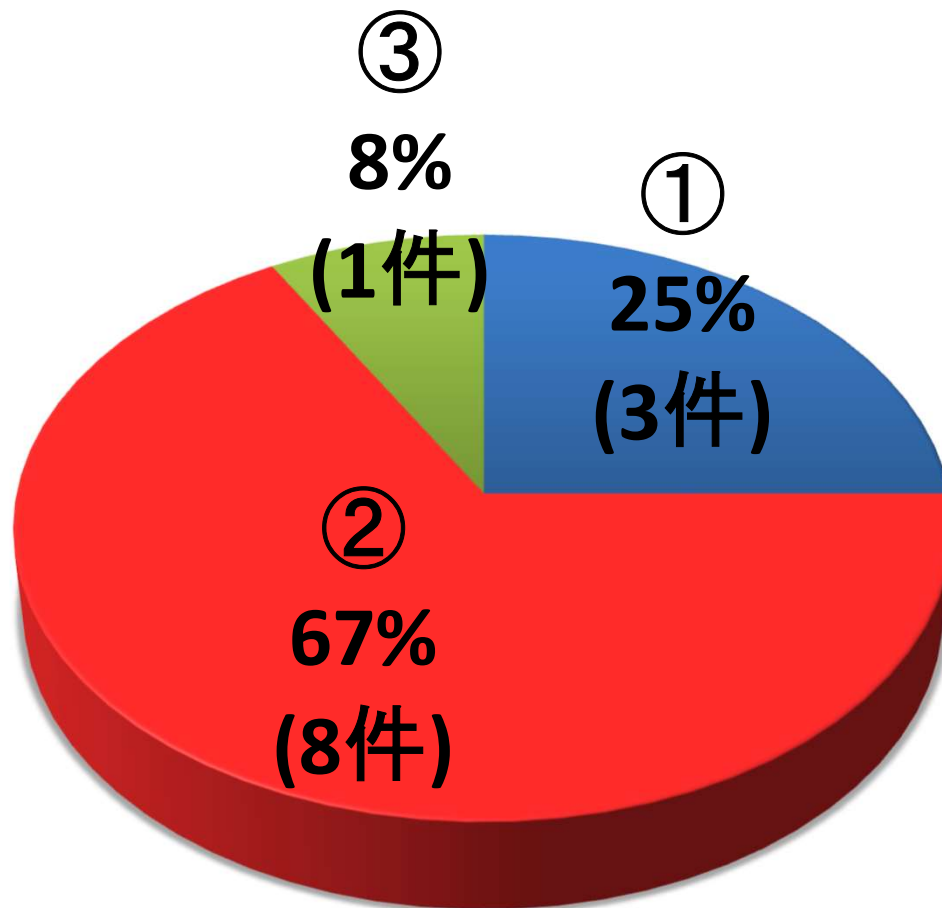
- ・PK(非内因性)とBMの経験がある方:2名
- ・PK(内因性)とBMの経験がある方:1名

②
8%
(1件)



Q4 評価の経験数について

- ① 1回
- ② 2~5回
- ③ 6回以上



<http://bioanalysisforum.jp/>

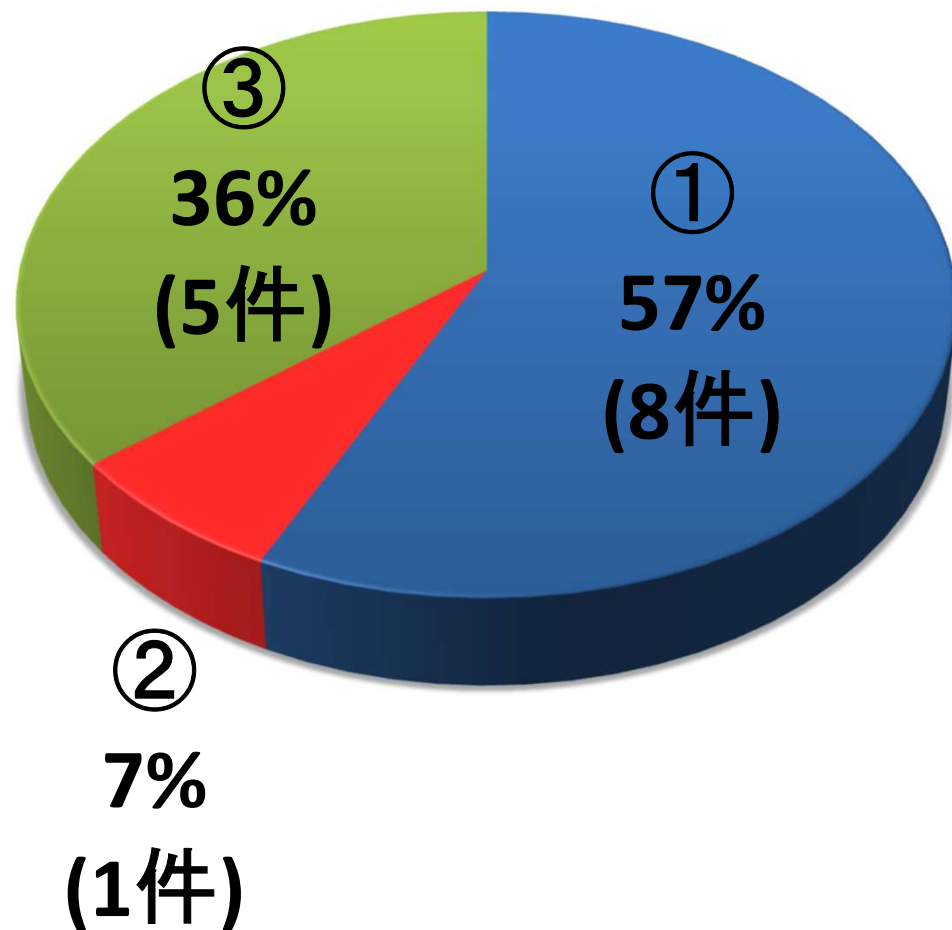
回答者背景			
	PK (非内因性)	PK (内因性)	BM
①	2		1
②	2	1	5
③			1



Q5 評価の位置づけについて

- ①探索・検討レベル
- ②社内意思決定レベル
- ③申請資料レベル
- ④その他: **0% (0件)**

回答者背景			
	PK (非内因性)	PK (内因性)	BM
①	1	1	6
②			1
③	3		2
④			



<http://bioanalysisforum.jp/>

Q5 評価の位置づけについて

【補足事項】

複数の位置づけで評価を活用される方の回答は項目ごとにカウント

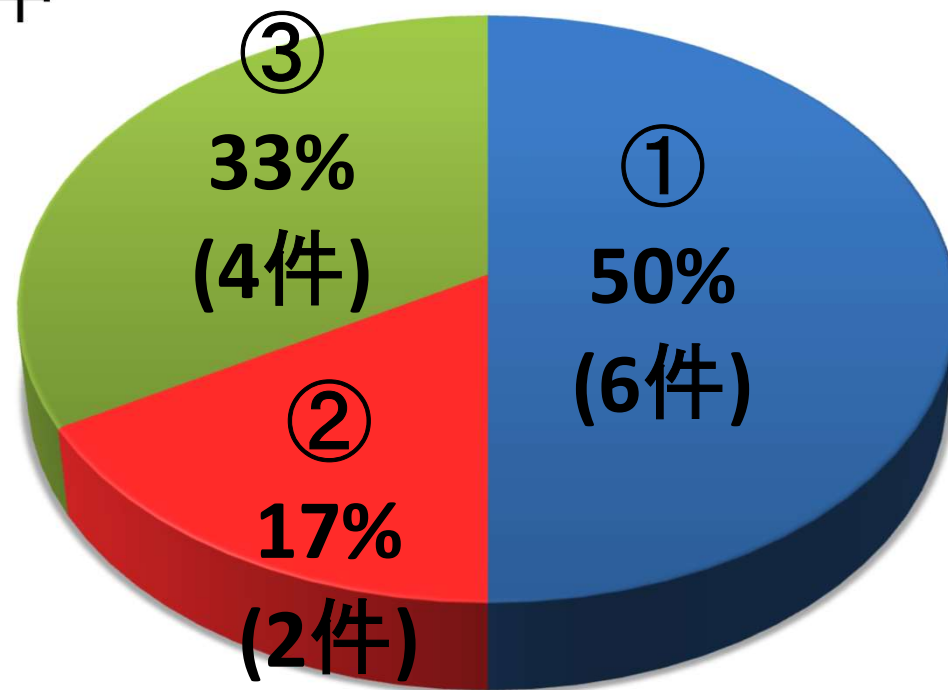
- ・「探索・検討レベル」と「社内意思決定レベル」の両方に使用する方:1名 (BMで評価経験のある方)
- ・「探索・検討レベル」と「申請資料レベル」の両方に使用する方:1名 (BMで評価経験のある方)



Q6 評価の実施時期について

- ①分析法開発中
- ②分析法バリデーション中
- ③実試料分析中
- ④その他: **0% (0件)**

回答者背景			
	PK (非内因性)	PK (内因性)	BM
①	1		5
②			2
③	3		1
④			



<http://bioanalysisforum.jp/>

Q6 評価の実施時期について

【コメント】

（「探索・検討レベル」と「申請資料レベル」で分けて評価をされる方（BMで評価経験のある方）から）

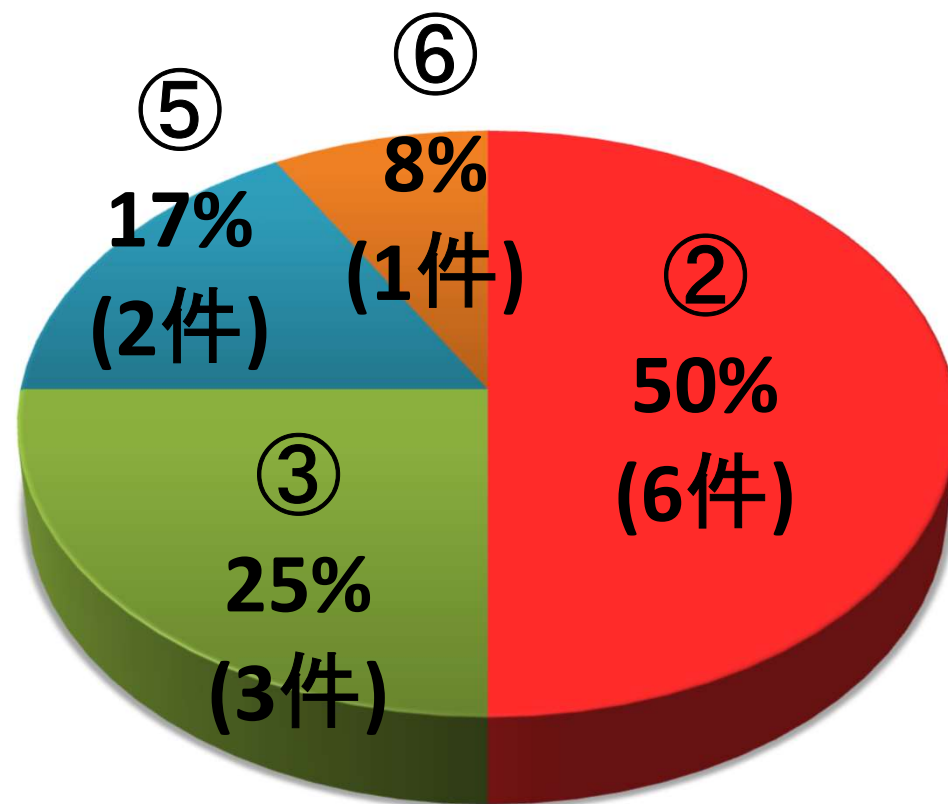
探索・検討レベルなら実試料分析中に、申請資料レベルなら分析法開発中～バリデーション中に評価を実施する。



Q7 用いるサンプル数（個体数）について

- ① 1個体 : 0% (0件)
- ② 2~3個体
- ③ 4~6個体
- ④ 7個体以上 : 0% (0件)
- ⑤ プールマトリックス
- ⑥ その他

回答者背景			
	PK (非内因性)	PK (内因性)	BM
①			
②	3		3
③	1		2
④			
⑤			2
⑥			1



<http://bioanalysisforum.jp/>

Q7 用いるサンプル数（個体数）について

【コメント】

（プールマトリックスを使用されている方（BMで評価経験のある方）2名から）

内因性濃度が低く、リコンビナントタンパク質を添加する場合はプールマトリックスを使用している。（通常は2～3個体で実施）

（その他を選択された方から）

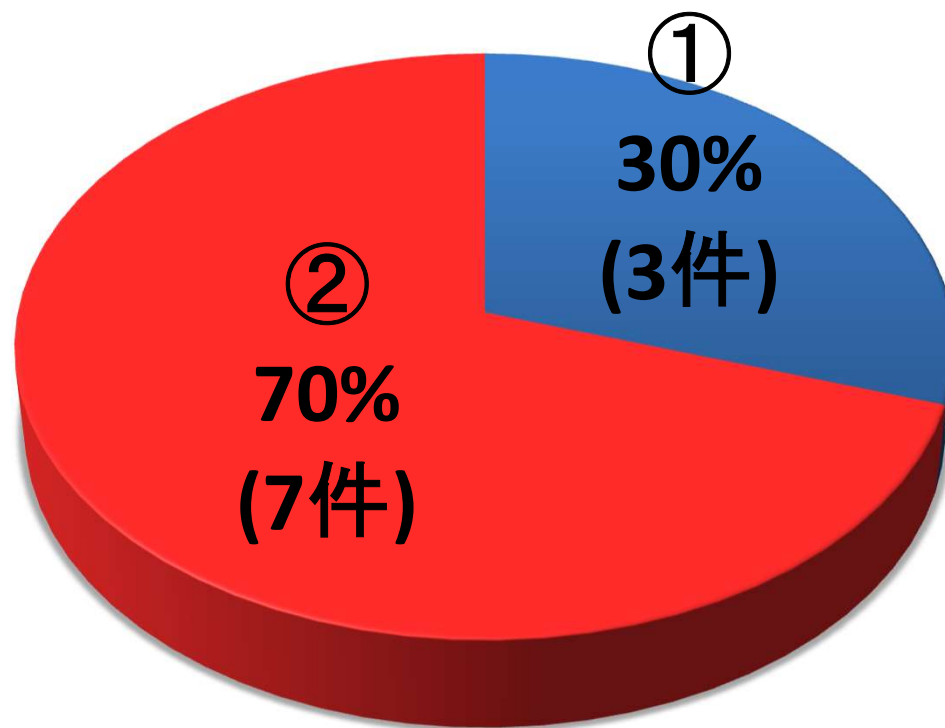
いくつか試料を測定していたら、平行性がなかった。



Q8 サンプルの希釈溶液について

- ①マトリックス（血清など）
- ②代替マトリックス（バッファーなど）
- ③その他：0% (0件)

回答者背景			
	PK (非内因性)	PK (内因性)	BM
①	3		
②	1		6
③			



<http://bioanalysisforum.jp/>





Q8 サンプルの希釈溶液について

【コメント】

(代替マトリックスを使用されている方(BMで評価経験のある方)2名から)

- 実試料分析時に血清などのマトリックスを使用したくないため.
- 低濃度のマトリックスが得られれば, マトリックスによる希釈も考える.

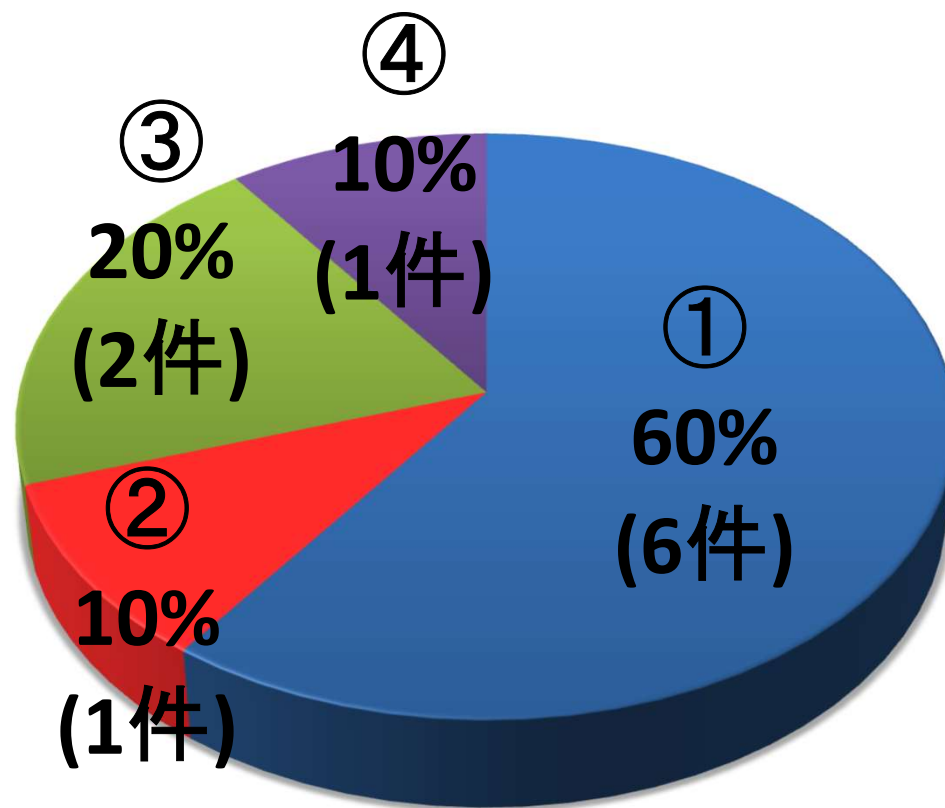




Q9 段階希釈のポイント数について

- ① 3ポイント (最低3ポイント, 3ポイント以上も含む)
- ② 2~4ポイント
- ③ 3~5ポイント
- ④ 4ポイント

回答者背景			
	PK (非内因性)	PK (内因性)	BM
①	2		4
②			1
③	1		1
④	1		



<http://bioanalysisforum.jp/>

Q9 段階希釈のポイント数について

【コメント】

(3ポイントと回答された方(BMで評価経験のある方)2名から)

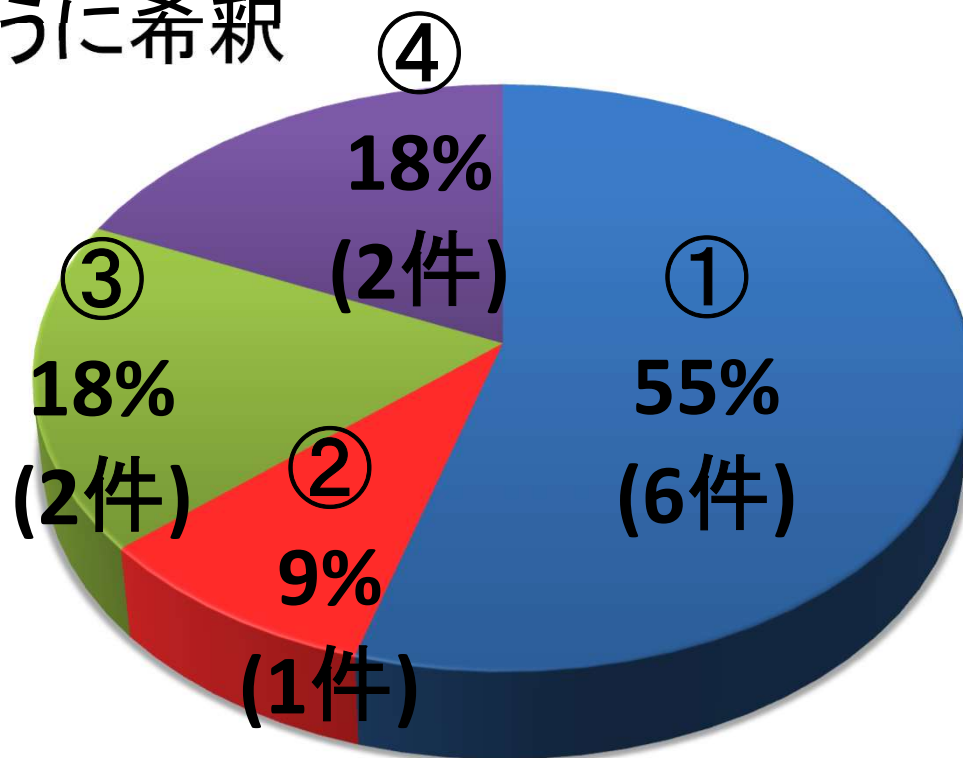
- ・検量線のLLOQ~ULOQの範囲内で少なくとも3ポイント設定する. 多い分には問題ないと考える. もし結果が良くなければ, 良くない結果を除外する.
- ・定量範囲とサンプルの濃度に依存するが(特にバイオマーカーの場合), 最低3点程度は必要と思う.



Q10 段階希釈の濃度範囲について

- ①検量線の低濃度(LQC)付近～高濃度(HQC)付近
- ②検量線の低濃度付近～中濃度付近
- ③検量線の範囲内
- ④できるだけ幅広くなるように希釈

回答者背景			
	PK (非内因性)	PK (内因性)	BM
①	2		4
②			1
③	1		1
④	1		1



<http://bioanalysisforum.jp/>

Q10 段階希釈の濃度範囲について

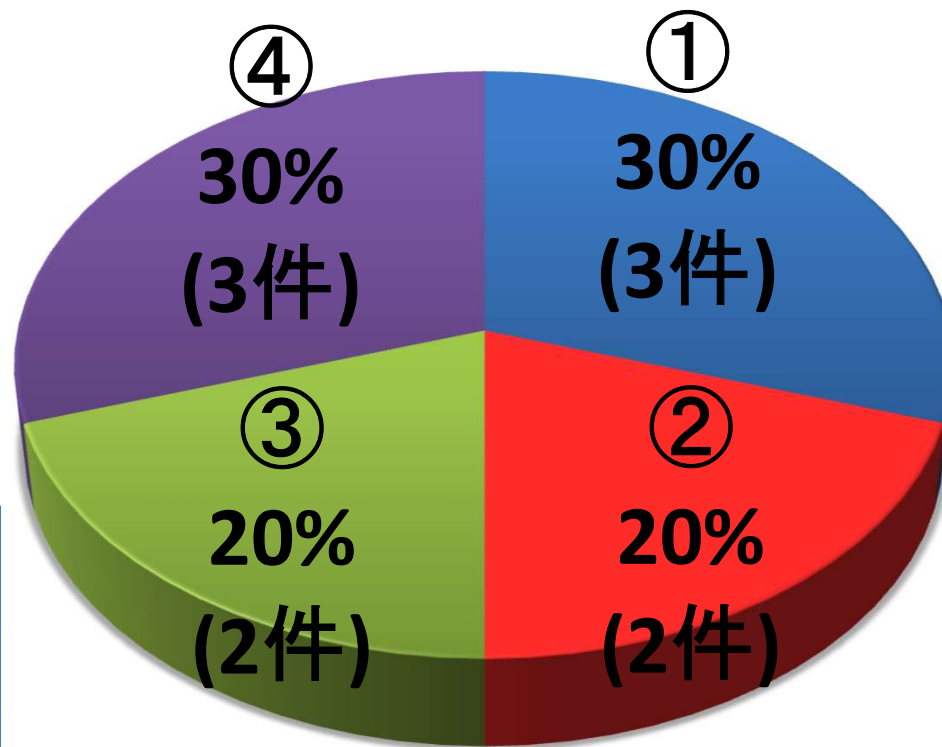
【コメント】

- ・ 定量範囲を外れた場合の解釈に困るので、極端に LLOQ, ULOQ に近い濃度は避けたほうが無難ではないかと考える。
- ・ 定量範囲が狭い場合は、濃度範囲が検量線の LLOQ ~ ULOQ になることもやむを得ないが、LLOQ と ULOQ のバッファ-QC の真度が危うい場合は、極力、低濃度付近 ~ 高濃度付近としたい。



Q11 繰り返し分析の回数について

- ① 1回
- ② 1～3回
- ③ 2～3回
- ④ 3回



<http://bioanalysisforum.jp/>

回答者背景			
	PK (非内因性)	PK (内因性)	BM
①	2		1
②	1		1
③	1		1
④			3



Q11 繰り返し分析の回数について

【コメント】

バラつきが大きい場合は最大で6回までの繰り返し分析を行うべきと考える。

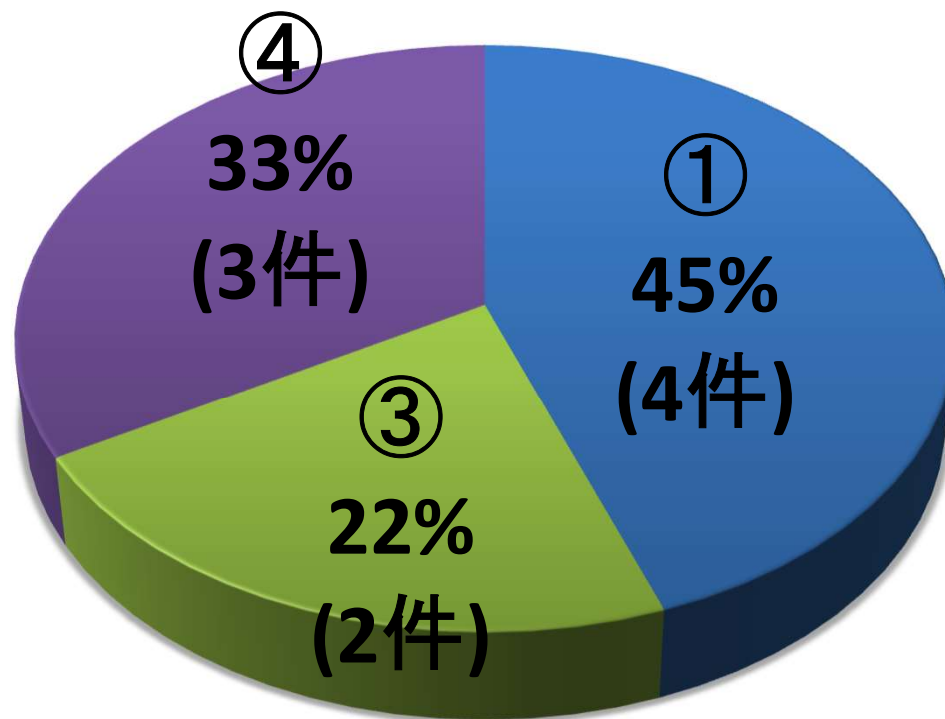




Q12 理論濃度の設定について

- ① 定量上限以下の最小希釈倍率 (MRD) サンプルの濃度
- ② 定量下限以上の最大希釈倍率サンプルの濃度: **0% (0件)**
- ③ パラレルリズム評価をしたすべての希釈サンプルの濃度の
平均値
- ④ その他

回答者背景			
	PK (非内因性)	PK (内因性)	BM
①	1		3
②			
③	1		1
④	2		1



<http://bioanalysisforum.jp/>



Q12 理論濃度の設定について

【コメント】

「パラレルリズム評価をしたすべての希釈サンプルの濃度の
平均値」について

- ・平均値を出す意味はないのではないか？

Q12 理論濃度の設定について

【コメント】

その他の意見

- 実試料測定時に得られた濃度値（定量範囲内）を理論濃度とした。（この試料を2, 4, 8倍希釈しても検量線の範囲内に入るため、希釈前濃度を理論濃度とした。）
- 臨床のPKであれば、症例報告書（CSR）に記載する初回測定時の測定値を設定する。バイオマーカーであれば、精度のみを評価するが、測定法開発時の目安としては定量上限以下のMRDサンプルの濃度に対する値も確認する。
- 検討の結果次第でいずれの選択肢を採用しても問題ないと思う。

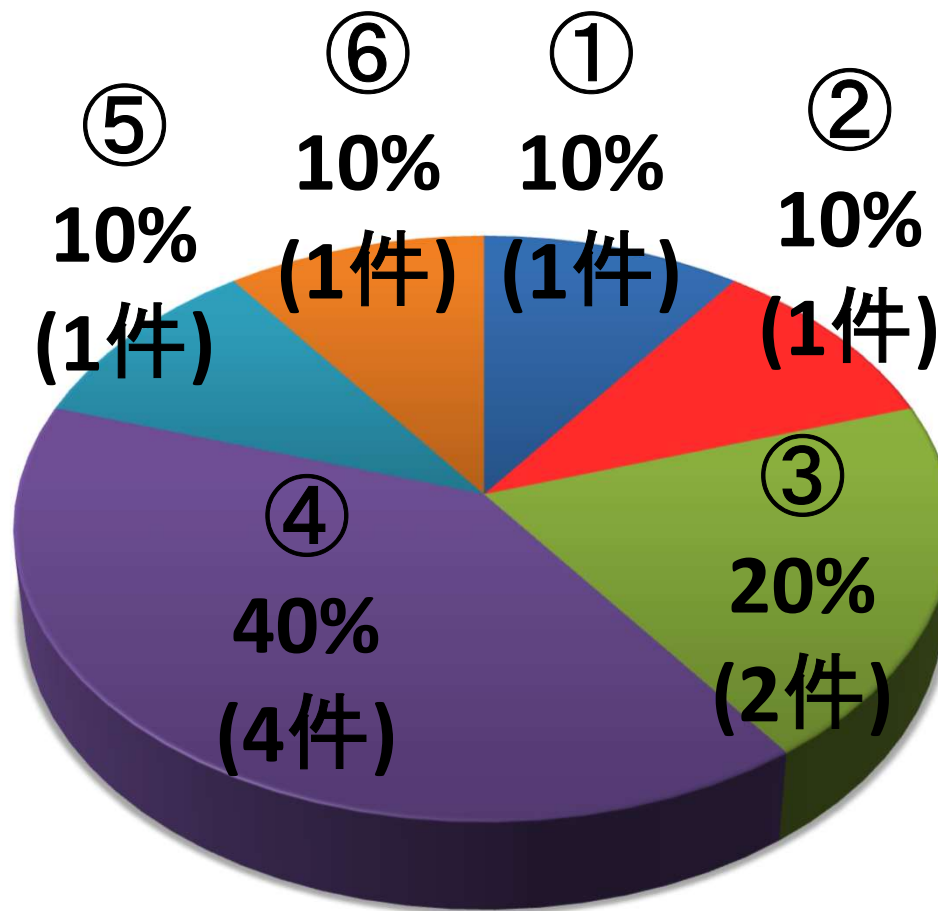
Q13 評価基準の設定について

- ① 真度のみ, 評価基準なし
- ② 真度のみ, 理論濃度の $\pm 20\%$ 以内
- ③ 精度のみ, 各希釈倍率で 30% 以下
- ④ 精度のみ, 各希釈倍率で 20% 以下
- ⑤ 真度及び精度: 各希釈倍率のサンプルの真度は $\pm 20\%$ 又は $\pm 30\%$ 以内, 精度は 20% 以下又は 30% 以下(検討の結果で決定). 希釈倍率を乗じた濃度の精度は 30% 以下.
- ⑥ 真度及び精度: 定量範囲に入った測定値について, 真度: 理論濃度の $\pm 20\%$ 以内、精度: 20% 以下. これに加え希釈倍率を乗じた濃度の精度: 30% 以下を評価する場合もあり.



Q13 評価基準の設定について

回答者背景			
	PK (非内因性)	PK (内因性)	BM
①			1
②	1		
③	1		1
④	2		2
⑤			1
⑥			1



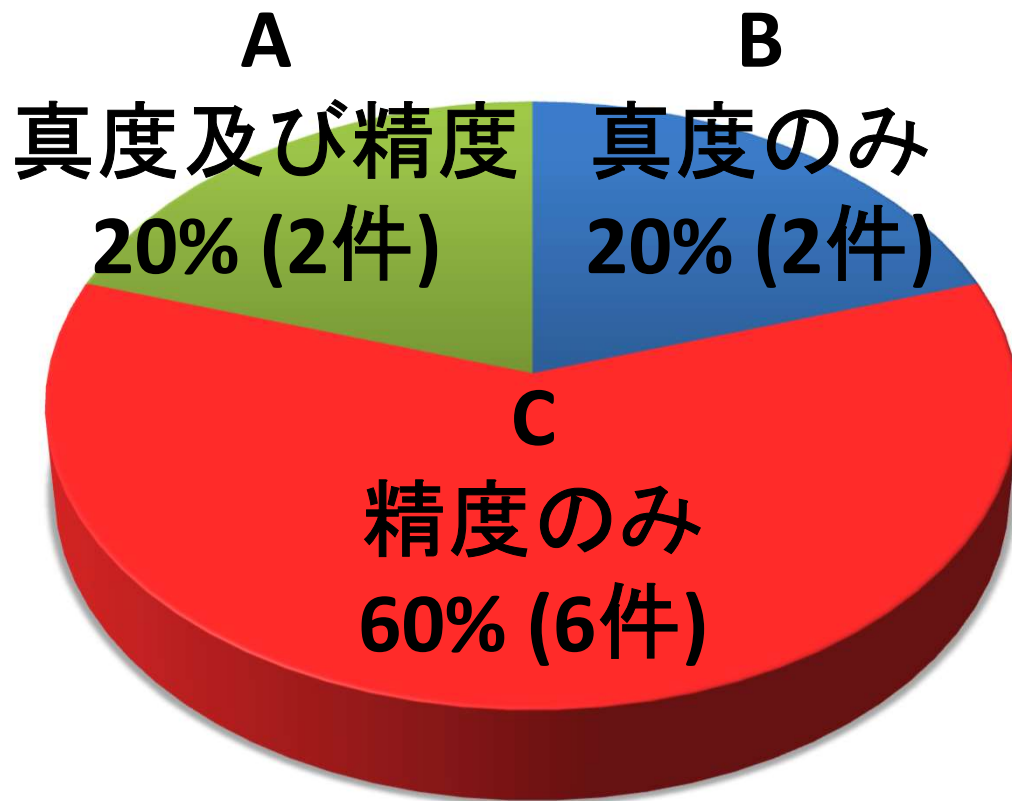
<http://bioanalysisforum.jp/>





Q13 評価基準の設定について

回答者背景			
	PK (非内因性)	PK (内因性)	BM
A	1		1
B	3		3
C			2



*評価基準の設定について

A: 真度及び精度

B: 真度のみ

C: 精度のみ

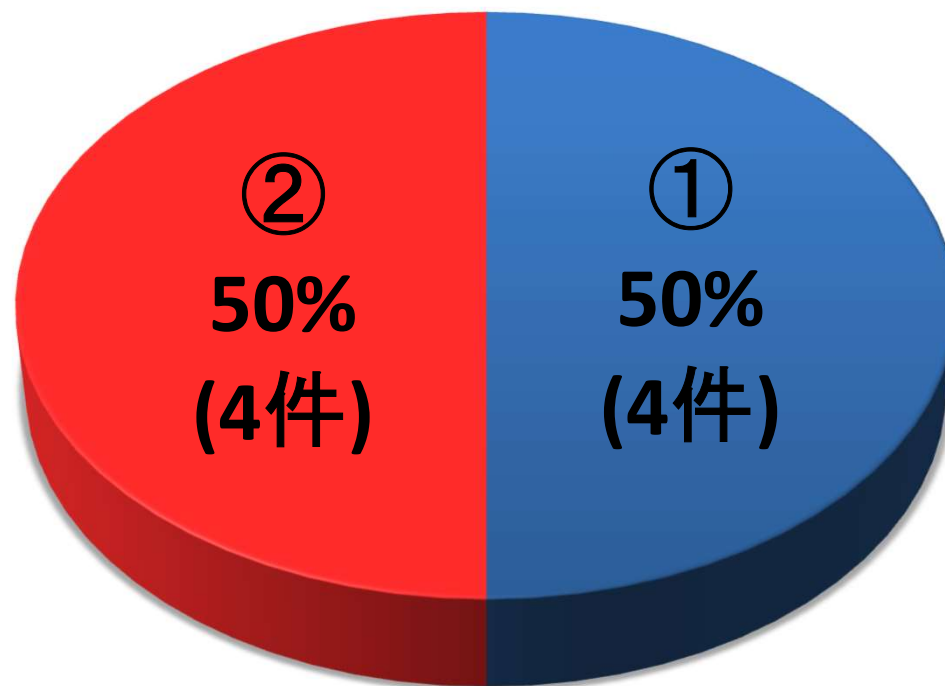
の3つに大まかに分類

<http://bioanalysisforum.jp/>

Q14 実施した評価の成立/不成立について

- ① 成立
- ② 不成立

回答者背景			
	PK (非内因性)	PK (内因性)	BM
①	2		2
②	1		3



<http://bioanalysisforum.jp/>



不成立の場合の原因及び対策について

〈PK〉

【原因】抗原が血液中に存在し、薬物と抗原の複合体の割合が希釈によって変動したため、パラリズムが不成立になった。

【対策】段階希釈倍率をなるべく小さくする。

不成立の場合の原因及び対策について

〈BM〉

【原因】標準品と内因性物質の物性が完全には同じではないために不成立となった。

【対策】抜本的な対策は困難. 半定量的な測定系として使用する, といった対応をとる.

経験ありの方:2名

- ・マルチプレックスのうち, 1つのマーカーだけ内因性物質濃度が高く, リコンビナント非添加で実施. その他のマーカーは内因性濃度が低く, リコンビナントを添加した. そのため, マルチプレックスとはいいながらサンプル調製を2パターンで行う必要があり, マルチプレックスの利点が損なわれた.
- ・バイオマーカーでは, 各バイオマーカーの濃度が異なるため, 適切な希釈倍率を設定することが困難だった.

〈PK〉

【原因】ADAが生成していて、高希釈倍率でADAが薬物から解離し検量線とパラレルになる。

【対策】ADAを測定しているタイムポイントではパラレルリズム不成立の考察ができる。可能な限りパラレルリズムサンプルはADAを測定することが望ましい。

〈BM〉

【原因】バリデーションではパラレルリズムは問題なく成立したのに、実試料を用いると不成立となる。

【対策】バイオマーカー(タンパク質)には、薬物やその受容体が結合している可能性があり、希釈倍率を上げると検量線と平行になってくる可能性があるかもしれない。できるだけバリデーション時にこれらの干渉物質の影響を考慮しておくのが望ましい。

〈BM〉

【原因】標準品と内因性物質が完全には同じでない。

【対策】マトリックス効果が原因の場合には, MRDを変更する。

【原因】標準物質と内因性物質の反応性がものによって違う。

【対策】標準物質や抗体を変更する。



Q16 パラレルリズム不成立と想定される事例

〈BM〉

【原因】患者血清における内因性物質の影響

【対策】(回答なし)

【原因】原因は不明な場合が多い。

【対策】現実的にはMRDを上げるくらいと考える。



〈PK及びBM〉

【原因】測定対象の分析に影響するもの（併用薬，内因性リガンド，ADA等）が試料中にある場合

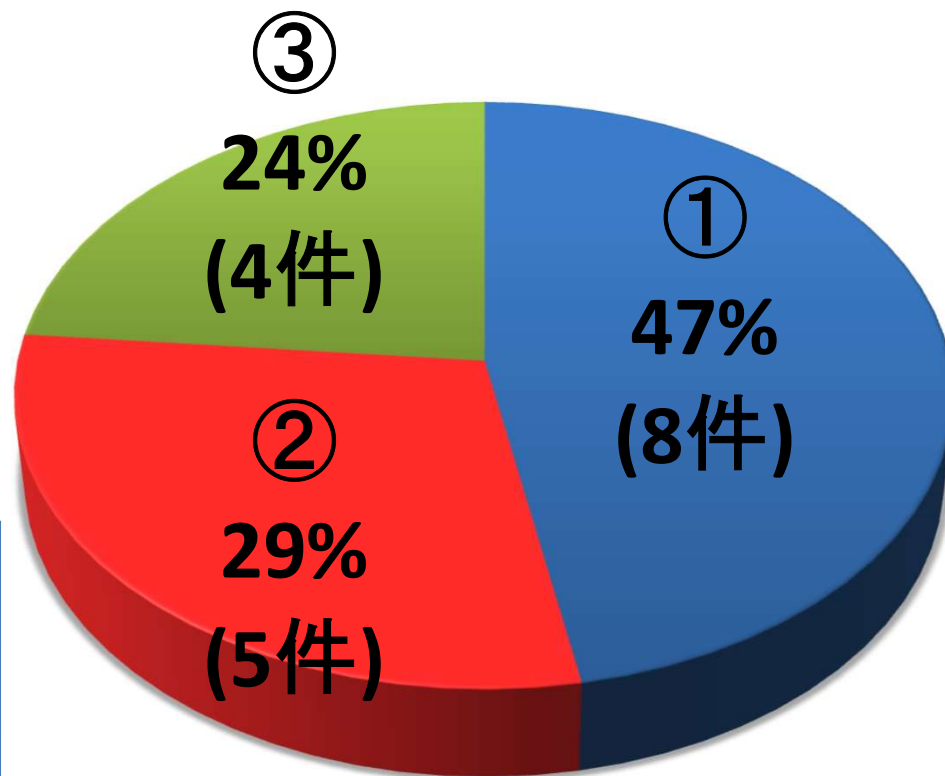
【対策】重要試薬の種類や添加量を検討し，これらの影響を最小限にする。

- ADCの場合などは特別な不成立要因が出てくるのかもしれない。
- LBAで代謝物の反応性が未変化体と異なる場合に可能性があると考えられるが、具体的な経験はない。



Q18 パラレルリズム評価の必要性について

- ①必要
- ②不必要
- ③その他



<http://bioanalysisforum.jp/>

回答者背景			
	PK (非内因性)	PK (内因性)	BM
①			5
②	3	1	
③	2		



「その他」を選択された方からのご意見

- ケースバイケース
- 測定項目によって必要な場合と不必要な場合がある
- 希釈による影響が疑われる場合は必要
- 申請時におけるガイドラインに従う. 国内では不必要, 海外では必要



Q19 Q18の回答理由について

BMでパラリズム評価が**必要**な理由

- パラリズム不成立が科学的に考えられる場合は分析法開発の段階で対策を講じた上で評価すべきと考える.
- MRDの設定, 再現性の代わりなど有益な情報が得られるため.
- BMは実施した方がよいと思うが, 基準設定については難しく, 詳細な議論が必要. また, パラリズムが成立しなくても, その結果に応じて適切な対応を実施することでOKとして欲しい(例えば, パラリズムが成立した範囲で段階希釈する, 希釈倍率を全サンプルで一定にする, など).

<http://bioanalysisforum.jp/>

Q19 Q18の回答理由について

BMでパラレルリズム評価が**必要**な理由

- ・リコンビナントタンパク質と内因性物質で反応性が異なる可能性があることから、適切に測定を実施できる濃度範囲について確認する必要があると考えられるため。
- ・標準物質と内因性のマーカーは別のものと考えられるため。
- ・実試料と検量線試料とでは、マトリックスだけではなく、検出される物質に違いがある。この違いを明らかにしておく必要があると思われるため。



Q19 Q18の回答理由について

BMでパラレルリズム評価が**必要**な理由

- 試料によって検量線と平行性がないものがあるため.
- 標準品との反応性の違いなどを把握し, 測定法の性能を理解する上でも重要性が高いため.

Q19 Q18の回答理由について

PKでパラリズム評価が**不必要**な理由

- ・パラリズム不成立が科学的に考えられない場合は必須と捉えていないため.
- ・パラリズム不成立が強く懸念される場合のみ実施すれば十分であると思うため.
- ・ガイドラインに必須と明記されていないため.
- ・非内因性タンパク質のPKでは, 希釈直線性が成立していればパラリズムが不成立になる事例の想定ができないため.

Q19 Q18の回答理由について

PKでパラレルリズム評価が**不必要**な理由

- ・標準物質と薬物は同一であることから, 抗体への反応性が異なると考えにくいいため.
- ・PKのように外因性の物質を測定している場合, パラレルリズム不成立の可能性は非常に低く, ルーチンでの評価は不要と考えるため.

Q19 Q18の回答理由について

「その他」を選択された方からのご意見

- ・希釈倍率による報告値への影響は測定時に発生する誤差と思われるので、できれば避けたい。ただ、通常に対応としては、希釈直線性などの評価で十分ではないかと考える。
- ・CROであるので、委託者からの要望で対応するが、申請時におけるガイドラインに従い、国内では不必要、海外では必要といった対応をとる傾向がある。

困ったこと

- ・パラレルリズムが不成立となる原因が結局不明であり, 対応としてMRDを上げるのが現実的になっている. 重要試験の変更で解決しなかったりする.
- ・パラレルリズムが実際に問題となった事例について情報が欲しい. 特にTKにおける事例が知りたい.
- ・バリデーション試験でのパラレルリズムの必要性 (TK, PK測定時またはPD測定時) について.



Q20 困ったこと, 議論したいことなど

議論したいこと

- C-path文書が重要であるなら, これをベースにBMVガイドラインに基準を記載してはどうか.
- パラレルリズムが不成立となり, 分析法の改善の余地がない場合, 実試料測定データをどのように使うことが許容されるのか.
- PKについて, 原則パラレルリズム評価は不要であるといった公式見解が欲しい.

<http://bioanalysisforum.jp/>



Q20 困ったこと, 議論したいことなど

その他(情報共有)

- ・実試料を使用するので, 治験のインフォームドコンセントに測定系の検討に試料を使用することを盛り込む必要があった.