



*DG2014 - 12*

---

*Quantitative analysis by LBA  
(PK/Biomarker)*



# Members

---

- Seiji Mito (Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation)
- Kousuke Iijima (Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.)
- Satomi, Sasahara (JCL Bioassay Corporation)
- Hiroyuki Shimizu (Toray Research Center, Inc.)
- Masako Soma (Daiichi Sankyo Co., Ltd.)
- Fumiaki Meguro (LSI Medience Corporation)
- Itadaki Yamaguchi (Sumika Chemical Analysis Service, Ltd.)
- Yoshinobu Yokota (Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.)

Biotechnology-based drugs, typified by antibody drugs, are currently being developed for various diseases. The ligand binding assay (LBA) is being used for the concentration measurement of these drugs. LBA is also commonly used to measure various biomarkers that serve as indices for drug efficacy and safety evaluations. In this regard, LBA was taken up as one of the topics in a JBF discussion group (DG) starting in 2013. Presentations were held in the fourth and fifth JBF symposium. As to this particular topic, the discussion was held with a focus on the quantitative analysis by LBA (PK/Biomarker).

In particular, this DG talked about sample preparations, LBA platforms, surrogate matrices, stability assessments, specificity, reference standards and critical reagents.

This presentation gives an overview of contents discussed in the DG to help establish the standard procedures for the quantitative analysis by LBA (PK/Biomarker) and reliability of the assay.



# Activities

---

- May 2014: Member recruitment from DG supporters.
- 24 Jun 2014: Kick off meeting with 8 members.
- Jul 2014 - Dec 2014: Monthly teleconferences and e-mail conversations.
- 20 Aug 2014: F2F meeting collaborated with DG2014-11.
- Jan 2015: Summarizes and preparation poster presentation.



# *Discussion Themes*

---

1. Sample preparation
2. LBA platform
3. Surrogate matrix
4. Stability evaluation
5. Specificity
6. Reference standard ▪ Critical reagent

# *1. Sample preparation*

---

- 1.1 Operating and inspecting pipette
- 1.2 Using low-protein binding tip and tube, and sample additives



# 1.1 Operating and inspecting pipette

---

- Back ground
- Discussion points

## Operation

- Do you use both pipetting modes (forward or reverse mode)?
- How to select the pipetting mode and the volume range

## Inspection

- When to perform the test
- Test volume



## *1.2 Using low-protein binding tip and tube, and sample additives*

- Back ground
- Discussion points
  - When to select a low-protein binding tip and tubes
  - Do you use the same tip and tube in actual sample analysis?
  - When to select to use sample additives
  - Do you use the same additives in actual sample analysis?



## *2. LBA platform*

---



## 2. LBA platform

---

- Background
- Discussion points
  - Commonly used Platforms
  - Priority criteria of Platform selection
  - Risk management of using a Platform supported by a single vendor
  - What should be done when a validated assay have to be changed its platform.
  - Will you continue to use an instrument with expired warranty terms?

## *3. Surrogate matrix (Focused on PK assay)*

---

- 1.1 Selection of a surrogate matrix
- 1.2 Analytical method validation and stability



## *3.1 Selection of a surrogate matrix*

---

- Back ground
- Discussion points
  - What is used as a surrogate matrix?
  - How to select the surrogate matrix
  - Risk management of using a surrogate matrix



## *3.2 Analytical method validation and stability*

---

- Back ground
- Discussion points
  - Analytical method validation
  - Stability

## *4. Stability Evaluation*

---

- 4-1) Considerations for Validation Study  
Stability Evaluations
- 4-2) Importance of ISS
- 4-3) Stability evaluation for Biosimilar



## 4. Stability evaluation

- Background
  - Discussion points
- 4-1) Considerations for Validation Study Stability Evaluations
- Target-relevant stability samples (PK or biomarkers)
  - Stability conditions and period
  - Stability evaluation method using individual sample
  - Stability evaluation method using SS\*-spiked sample
  - Different criteria for PK and biomarkers
  - Handling against incidental criterion non-fulfillment
- 4-2) Importance of ISS
- 4-3) Stability Evaluation for Biosimilars

\*: Standard substance



# *5. Specificity*

---



## 5. Specificity

- Background
- Discussion points
  - Related substances and selection
  - When do you not perform the specificity ?
  - Setting of spiked concentration
  - When a commercial kit is used, Is the specificity necessary?
  - When a related substance exists in a matrix
  - Judgment of necessity for additional specificity testing after a method validation is completed

## *6. Reference standard • Critical reagent*

---

- 6.1 Stability of purchased reference standard
  - 6.2 Handling of lot changes
- 6.3 Expiration date of critical reagent



## 6. Reference standard • Critical reagent

---

- Background
- Discussion points
  - Stability of purchased reference standard
  - Handling of lot changes
    - ✓ Reference standard
    - ✓ Critical reagent
    - ✓ Assay kit
  - Expiration date of critical reagent



*DG2014-12*

---

*LBAを用いる定量  
(PK/Biomarker)*



# メンバー

- 水戸 誠二 田辺三菱製薬株式会社
- 飯嶋 康祐 協和発酵キリン株式会社
- 笹原 里美 株式会社JCLバイオアッセイ
- 清水 浩之 株式会社東レリサーチセンター
- 相馬 雅子 第一三共株式会社
- 目黒 文晃 株式会社LSIメディエンス
- 山口 頂 株式会社住化分析センター
- 横田 喜信 株式会社新日本科学

現在、種々の疾患に対して抗体医薬をはじめとするバイオ医薬品が開発されており、それらの薬物濃度測定には主にligand binding assay (LBA) が使用されている。また、薬効や安全性の指標となる各種バイオマーカー測定でもLBA が使用されることが多い。そこで、2013年からJBF で開始されたディスカッショングループ (DG) においてトピックの一つとしてLBA を取り上げ、第4回及び第5回JBF シンポジウムでその成果を発表した。本トピックでは、LBA を用いる定量 (PK/Biomarker) に焦点を当て、議論を行ったので、その成果を発表する。

本 DG ではサンプル調製, LBA プラットフォーム, 代替マトリックス, 安定性評価, 特異性, 標準物質, 重要試薬をテーマとして取り上げ, メンバーで議論した。

本発表では DG の議論内容の概要を紹介し, LBA を用いる定量 (PK/Biomarker) の標準的手法のありかたや信頼性確保について議論の一助としたい。



# 活動内容

- 2014年5月：DGサポーターからメンバー募集
- 2014年6月24日：キックオフ会議. 8名のメンバーで活動開始.
- 2014年7月～2014年12月：各テーマについて、毎月1回程度のTC及びメールによる議論.
- 2014年8月20日：DG2014-11と合同でF2F会議
- 2015年1月：まとめ、シンポジウム発表準備



# 議論したテーマ

1. サンプル調製
2. LBA platform
3. 代替マトリックス
4. 安定性評価
5. 特異性
6. 標準物質・重要試薬

# 1. サンプル調製

---

- 1.1 マイクロピペットの使用, 点検
- 1.2 低吸着器材や添加剤の使用

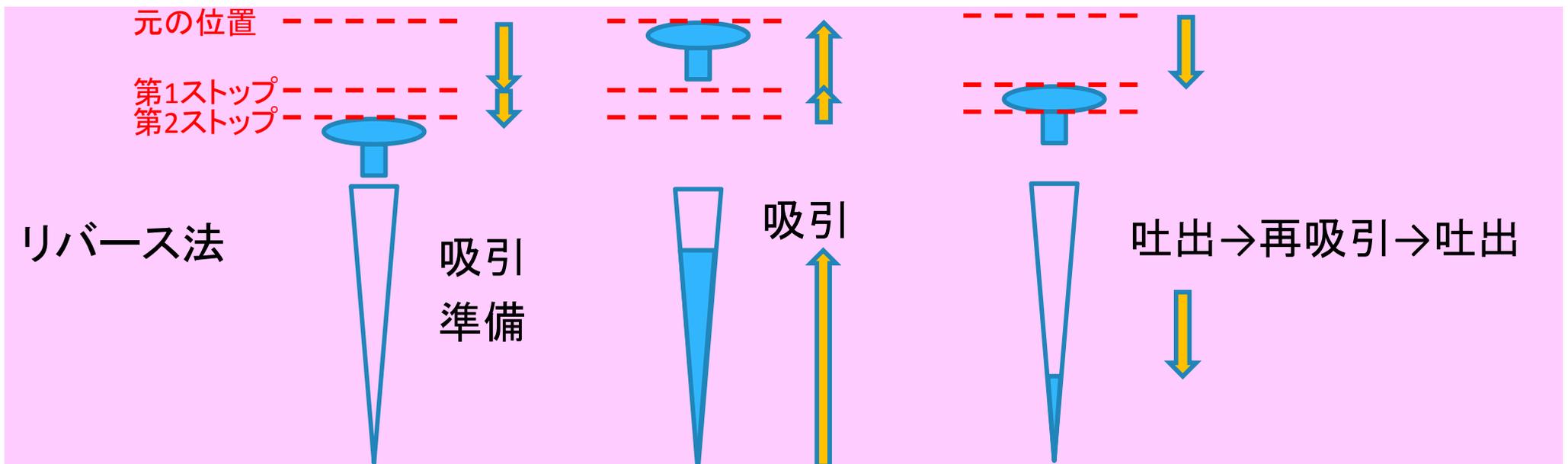
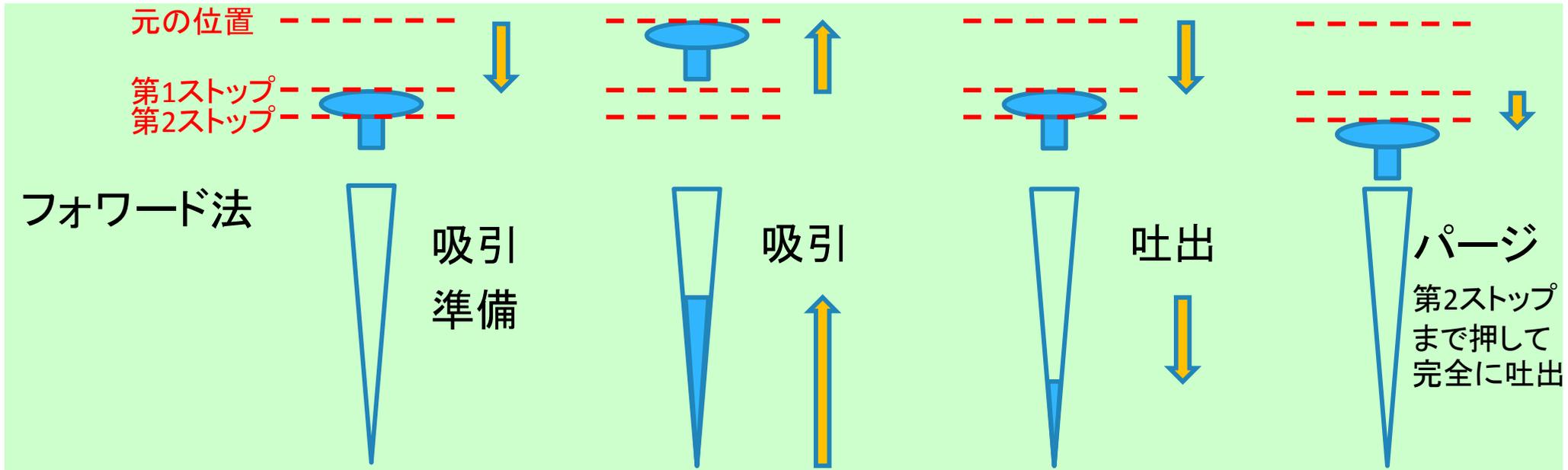
- 背景
- 議論した内容
  - ピペッティングモードの使い分けしているか？
  - ピペッティングモード選択の判断基準は何か？
  - ピペッティング容量選択の判断基準は何か？
  - ピペットの点検頻度
  - ピペットの点検容量

# 1.1 マイクロピペットの使用, 点検 背景

- マイクロピペットの使用モードには, フォワード法とリバース法がある. 理論上はどちらのモードでも採取量に違いはないはずであるが, LBAではサンプル調製が定量値に与える影響がより大きいと考えられるため, モードの使い分け, モード選択の判断基準, 容量選択の判断基準について議論した.
- ピペットの点検は, 定量値を保証する上で欠かせない. そこで, 各社の点検頻度, 点検容量については話し合った.



# 1.1 フォワード法とリバース法の概略



<http://bioanalysisforum.jp/>

## 1.1 マイクロピペットの使用 (モードの使い分け, 選択基準)

- 特に社内でモードを規定していない(個人好み?).
- 検量線, QCサンプル, サンプルの希釈など定量値により影響を与える操作はフォワード法で実施する.  
・ 8連ピペットなどでプレートに溶液を連続で添加する操作はリバース法で実施する.
- 基本的に全ての操作をリバース法で実施する. ただし, 定量値により影響を与える操作で容量の少ない場合はフォワード法で実施する.

## 1.1 マイクロピペットの使用 (モードの容量選択基準)

- 検量線とQCサンプルの調製時の容量の違いは多少気にはなるが、QCサンプルは大量に調製することが多く、検量線よりも大容量のピペットを用いる。
- 検量線とQCサンプルの段階希釈数が異なると、QCサンプルの真度がずれる場合がある。その場合は、**段階希釈数を両者で揃える**ことを考慮する。

## 1.1 マイクロピペットの点検 (点検頻度, 点検容量)

- 業者による定期点検, 社内での定期点検, 使用時点検を実施する. 定期点検で, 容量を保証する. 使用時点検で, 外観チェックやリークがないことを確認する.
- 業者による定期点検はトラブルが発生したときのみ実施する. 社内定期点検, 使用時点検で, 容量を保証する.
- 容量を保証した点検後に, 実験を行い, その後の点検で容量を保証できなかった場合, この間で行った実験をどのように保証するかという議論があった.
- 点検容量は, ピペットの最大容量のみ, 最大容量+中間容量, 最大容量+中間容量+最小容量としている.

# 1.2 低吸着器材や添加剤の使用 目次

- 背景
- 議論した内容
  - 低吸着器材使用の判断基準は何か？
  - 低吸着器材使用を実試料分析へどの程度反映させるか？
  - 添加剤使用の判断基準は何か？
  - 添加剤使用を実試料分析へどの程度反映させるか？

## 1.2 低吸着器材や添加剤の使用 背景

- 分析対象物質の物性によっては、通常のチップやチューブでは期待される定量値が得られないこともある。そのため、低吸着チップやチューブ使用の判断基準と実試料分析へどの程度反映させるかを議論した。
- 分析対象物質のマトリックス中の安定性によっては、期待される定量値が得られないこともある。そのため、添加剤使用の判断基準と実試料分析へどの程度反映させるかを議論した。

## 1.2 低吸着器材や添加剤の使用 (低吸着器材)

- 分析法開発において、分析対象物質の吸着が疑われた場合に、低吸着器材を使用する。CMC部門からの情報も考慮する。その上でバリデーションを実施する。
- バリデーションにおいて低吸着器材を使用した場合、TK, PKとも同じものを使用する。ただし、多施設のPKではコストがかかることも考えられる。

## 1.2 低吸着器材や添加剤の使用（添加剤）

- 分析法開発において、分析対象物質のマトリックス中での安定性、吸着が疑われた場合に、酵素活性阻害剤や界面活性剤などを使用する。その上でバリデーションを実施する。
- バリデーションにおいて添加剤を使用した場合、TK, PKとも同じものを使用する。ただし、PKでは実試料の採取量にばらつきがあるため、最大の実試料量にあわせてバリデーション時の添加剤濃度を決定する。



## *2. LBA platform*

---



## 2. LBA platform

### 目次

---

- 背景
- 議論した内容
  - 使用しているPlatform
  - Platform選択の優先基準
  - Single vendor使用経験, 不測事態対応について
  - 確立された系がPlatform変更を余儀なくされた場合, どうすべきか
  - メーカー保守終了機器の扱いについて

## 2. LBA platform

### 背景

近年様々なLBAプラットフォームが登場してきており、測定法の高感度化、ハイスループット化がなされている。

一方で、シングルベンダーが供給する機器、試薬、プレート等を用いたプラットフォームでは、機器・試薬類の生産ストップや大幅なスペック変更により、確立した測定法の維持が困難となる危険性が伴う。

そこで直近で話題となった測定機器保守終了問題も交え、プラットフォームの採用判断や不測の事態に対する準備状況や今後の課題・対応について議論・共有化を行った。

## 2.1 使用しているPlatform

プラットフォーム	検出物質
比色法	TMB, pNPP
化学発光法	Luminol, dioxetane
電気化学発光法	Ruthenium
蛍光法	Alexa Fluor, Europium
Immuno PCR法	DNA
SPR法	SPR

比色法, 化学発光法, 電気化学発光法, 蛍光測定法が主流.  
Immuno PCRやSPR法での経験もあり.

## 2.2 Platform選択の優先基準

何を判断(優先)基準としてplatformを選択しているか、またはいくべきかについて意見交換をした。

- PK測定に関しては、ELISA(比色法)とECLが半々で、**汎用性・頑健性を優先させる場合はELISAを、感度・汎用性を優先させる場合はECLを選択する意見が多かった。**
- ヒューマンエラーの排除、測定系開発期間の短縮を期待し、全自動蛍光測定機器の選択も候補にいれつつあるという意見あり。
- Biomarker測定では市販品使用、汎用性優先からELISAを選択する意見が多かった。

## 2.3 Single vendor使用経験，不測事態対応

Single vendor提供のLBA platformを使用しているか，また，不測の事態（機器保守終了や試薬・プレート類の供給停止）を踏まえた準備をしているかについて意見交換をした。

- **参加者のほとんどが使用していた。**
- 一方でメーカー保守契約終了に対する準備はなされていなかった。多くが保守契約終了連絡から実際の終了まで数年の猶予があると想定していた。
- 試薬類については，予定試験分のストックを準備，または依頼する対応を取るケースが多かった。
- 実際に保守契約が終了した場合は，代替または後継機器の購入を検討するが，platformを完全に変更するという意見もあり

## 2.4 確立された系がPlatform変更を余儀なくされた場合、どうすべきか

- 軽微な場合はパーシャルバリデーションを実施するという意見が多数.
- 軽微の定義としては、同等性能維持と判断できる場合という意見が大勢.
- パーシャルバリデーション内容詳細については、その場では議論せず.
- 試験の区切りなど、タイミングがあう場合は別のplatformに変更し、フルバリデーションを実施するという意見もあり.

## 2.5 メーカー保守終了機器の扱いについて

- 基本的には信頼性基準下での運用は難しく、使用は想定していない(PK及びBiomarker共通).
- 自主点検により、社内での基礎検討では使用することはある.

# 3. 代替マトリックス (*PK assay*)

---

- 1.1 代替マトリックスの選択
- 1.2 バリデーションと安定性



# 3.1 代替マトリックスの選択

## 目次

---

- 背景
- 議論した内容
  - どのような代替マトリックスを使用する？
  - 代替マトリックスの選択基準
  - 代替マトリックス使用時の問題点

# 3.1 代替マトリックスの選択

## 背景

「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」に希少マトリックスについて以下の記載がある。具体的なケースや問題点を議論した。

### 4.1. フルバリデーション

「希少なマトリックス（組織，脳脊髄液又は胆汁等）を対象とした分析法を確立する場合には，十分な数の個体から十分な量のマトリックスが得られない状況が問題となる場合がある。そのような場合には，代替マトリックスを使用することができる。」

# 3.1 代替マトリックスの選択

## 何を代替マトリックスに使用する？

入手困難なマトリックスを希少マトリックスと定義し、どのような代替マトリックスが適当か意見交換した。

希少マトリックス	代替マトリックス
病態ヒト(患者さん)マトリックス	健常人マトリックス 緩衝液*
モデル動物マトリックス	ノーマル動物マトリックス 緩衝液*
動物マトリックス	異種動物の同マトリックス (例: マウス組織をラット組織で代替) 市販試薬、緩衝液* 等

\* 緩衝液: タンパク質を含むものや人エブロッキング剤

## 3.1 代替マトリックスの選択 選択基準

「分析法バリデーションに用いるマトリックスは、抗凝固剤や添加剤を含め、**分析対象の実試料にできるだけ近いものを使用する**」と「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」に記載されているが、

**代替マトリックスは、希少マトリックスとの性状や組成の類似性にこだわらず、測定値が希少マトリックスと一致すれば良い、という意見が多かった。**

# 3.1 代替マトリックスの選択

## 問題点

代替マトリックスの使用に際し、想定される問題点について議論した。

- 希少マトリックスと代替マトリックスで測定系に与える影響が異なるため、定量値が異なることが想定される。
- バリデーションと安定性評価項目の設定が難しい。
- 病態ヒト血清において、選択性評価が成立しない経験がある。
- 目的とする感度確保と信頼性担保の兼ね合いが難しい。



## 3.2 バリデーションと安定性

### 目次

---

- 背景
- 議論した内容
  - バリデーション項目
  - 安定性評価項目

## 3.2 バリデーションと安定性

### 背景

希少マトリックスを使用する場合、マトリックスの量が少ないためにガイドラインの基準に従ったバリデーションや安定性の評価が出来ないケースがある。その際のバリデーション実施方法や基準、安定性の評価項目について検討した。

## 3.2 バリデーションと安定性

### バリデーション項目

代替マトリックスでフルバリデーションを実施し、希少マトリックスはパーシャルバリデーションを実施する、との意見で一致した。

- 代替マトリックスの検量線を用いて、希少マトリックスの選択性、再現性および希釈直線性を確認する。
- 希少マトリックスの選択性は n 数を減らして実施することもある。
- 希少マトリックスの再現性は5濃度を評価するが、マトリックスの量によっては繰り返し数を減らすこともある。
- 希少マトリックスの再現性はクライテリアを甘くして対応することもある。（試験の重要性に注意が必要）

## 3.2 バリデーションと安定性

### バリデーション項目

代替マトリックスの使用が困難な場合の対策として以下の意見が出された。

- 希少マトリックス使用量削減等の工夫をする。
  - 使用量の少ない測定系・装置を選択する。
  - 可能な限り希釈して用いる。感度が犠牲になることもある。
  - 再現性の繰り返し数を減らす。
  - バリデーション試料の調製法に工夫(MRDに希釈した溶液でバリデーション試料を調製)を凝らす。
- 内因性物質が測定系に影響を与えている場合は、内因性物質を除去した代替マトリックスを作製し、バリデーションを実施することもある。

## 3.2 バリデーションと安定性

### 安定性評価

安定性評価方法について以下を提案する。

- 代替マトリックスについては、**操作中の安定性保証のため、短期保存安定性を実施**する。凍結QCを用いる場合は長期安定性を実施する。
- 希少マトリックスについては、可能な範囲で安定性を評価する。
- 希少マトリックスの量確保が難しい場合、安定性評価が困難である。その際は**凍結融解安定性と実サンプルのISS (Incurred Sample Stability) で担保する方法を提案**する。ISSのクライテリアはISRと同様と考える。

# 4. 安定性評価 ( PK, Biomarker )

- 4-1) バリデーション試験において評価すべき項目
- 4-2) ISSの意義
- 4-3) バイオシミラーの安定性評価

- 背景
- 議論した内容
  - 4-1) バリデーション試験において評価すべき項目
    - 分析目的 (PK, Biomarker) に応じた安定性試料
    - 評価する安定性条件・期間
    - 個体別マトリックスを用いた安定性評価方法
    - 標準物質添加試料を用いた安定性評価方法
    - PKとBiomarkerの基準の違い
    - 安定性が偶発的に満たさなかった場合の対応方法
  - 4-2) ISSの意義
  - 4-3) バイオシミラーの安定性評価

LBAの安定性評価は、PKについてはガイドライン\*に従い、Biomarkerについてはガイドラインを参照しながらも、fit-for-purpose\*\*で対応している。ただし、投与に用いる薬物が内因性物質と同一の場合のPKやBiomarkerにおいては、具体的な対応方法に関してガイドラインでカバーされていない部分もある。そこで今回は、種々の状況下での安定性評価の実施方法について議論を行った。

**Let's manage "Fit-for-purpose" successfully!!**

\*:「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」(薬食審査発0711第1号)

\*\*:*Fit-for-Purpose Method Development and Validation for Successful Biomarker Measurement* (米国AAPS誌のResearch paper, 2005年)

## 4.1バリデーション試験において評価すべき項目 分析目的 (PK, Biomarker) に応じた安定性試料

各分析対象物質/分析目的 (PK, Biomarker) によって用いるべき安定性試料がどのように変わるのか？ について意見交換した。

### 【PK】

- 標準物質をブランク試料に添加し, LQC\* 及び HQC\*\* を調製する。
- 実試料を想定した高濃度の Extra QC を用いる所もあった (海外・臨床に多い)。
- 各試料の調製は n=3/試料 で実施する。

### 【Biomarker】

- 個別別マトリックスを安定性試料として用いるのが第一選択との意見が多かった。
- 個別別マトリックスの濃度が低く安定性試料として不適當な場合は, 通常の PK 同様, 標準物質を添加した LQC 及び HQC を調製するという意見が多かった。
- 海外 CRO の経験で, 5~7 例の個別別マトリックスをランダムピックアップした試料を分析することがあるとの意見もあった。

### 【投与に用いる薬物が内因性物質と同一の場合の PK】

- 基本的に, Biomarker の対応方法と同じ。

\*: Low quality control, within 3 times of LLOQ (lower limit of qualification)

\*\* : High quality control, more than one-thirds of ULOQ (upper limit of qualification)

## 4.1バリデーション試験において評価すべき項目

## 評価する安定性条件・期間

各分析対象物質/分析目的(PK, Biomarker)によって評価する安定性条件・期間がどのように変わるのか？について議論した。

基本的にPKとBiomarkerで同様の対応となるとの意見であった。

- 標準的な項目として、室温保存安定性(4時間, 24時間), 凍結融解安定性(3~5回), 凍結保存安定性(1, 3, 6カ月など)を実施するケースが多く、場合によっては、冷蔵保存安定性(4時間, 24時間)を取得する場合もあった。
- 長期保存安定性については標準的な保存期間は設けられているものの、実際には実試料の保存期間を考慮したケースバイケースの設定期間となるとの意見であった。
- 臨床でのPKやBiomarkerを想定した場合、試験施設にDeep Freezer(-80 設定)が無いことが多いため、-20 及び-80 における凍結融解, 凍結保存安定性を取得する意見が多かった。

個体別マトリックスを用いた安定性評価方法はどうするのか？について意見交換した。

- 低濃度及び高濃度を示す個体別マトリックスを確保し、バリデーションでそれらを分析する(2点校正)。
- 異なる濃度を示す個体別マトリックスが無ければ、1濃度で評価する場合もある。
- 5-7例の個体別マトリックスを用意し、安定性試料として用いる場合がある。その場合、過半数が適合基準を満たしていればよいとする考え方もあった(例:7例中の4例以上)。
- 初回分析濃度及び保存後の分析濃度から変化率を百分率で求め、その変化率で評価する(例:%Initial\* ±20%以内)。

\*: %Initial = 保存後の分析濃度 / 初回分析濃度 × 100

標準物質添加試料を用いた安定性評価方法はどうするのか？  
 について意見交換した。

## PKの場合

LQC, HQC, Extra QCの濃度を分析し、真度が±20%以内であることを確認する。

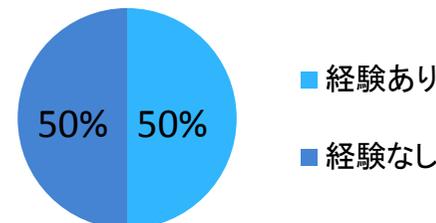
## 投与に用いる薬物が内因性物質と同一の場合のPKまたはBiomarkerの場合

LQC, HQC, Extra QC及びその調製に用いたブランク試料の濃度を分析する。LQC, HQC及びExtra QCの理論濃度にブランク試料の濃度を加算/減算することで、内因性物質の影響を除いた真の理論濃度を設定し、それに対する真度が±20%以内であることを確認する。

試料	真度の基準
LQC	±20%以内
HQC	±20%以内
Extra QC*	±20%以内

\*: 国内BMVガイドラインには組み入れられてないが、海外では入れているところが多く、また、臨床でも多い傾向。

Extra QCの経験者(8名中4名)



## 4.1バリデーション試験において評価すべき項目 PKとBiomarkerの基準の違い

### PKとBiomarkerにおける安定性評価の基準はどうするか？

について意見交換した。

- PKの場合，各極ガイドラインに従い，真度±20%以内であることを確認する。
- Biomarkerや内因性物質と同じ薬物のPKの場合において，個体別試料(真度不明の試料)を用いる場合は初期値の±20%以内であることを確認するとの意見で一致した。
- Biomarkerの場合は，事前の予備検討において，用途・目的等を考慮し，真度や精度の基準を緩めること(例:20%→25%)は許容できるとの意見が多かった。ただし，評価するBiomarkerが，開発する医薬品の有効性や安全性に直結している場合などにおいて基準を緩めることは難しいとの意見が多かった。

## 4.1バリデーション試験において評価すべき項目

安定性試料が偶発的に基準を満たさなかった場合の対応方法

安定性試料が偶発的に基準を満たさなかった事例共有及びそれにどのように対応したか？について意見交換した。

(具体例は次頁参照)

- 基準を満たさなかったことが偶発的(安定性以外の要因)であるという判断が、科学的に妥当であり、第三者的にも許容できるものであれば、最初に分析したデータを不採用とし再分析を行うことは問題ないという意見が多かった。
- 上記の対応は、基準がプラスに外れた場合においては、比較的取りやすいが、マイナス側に外れた場合は同様の対応を取るのに注意が必要との意見が多かった。

## 4.1バリデーション試験において評価すべき項目

安定性試料が偶発的に基準を満たさなかった場合の対応方法

過去の経験	対応方法
室温保存(24時間)が不適合	期間を短縮した室温保存安定性(4時間)を追加して実施した
凍結融解(5回)が不適合	凍結融解(3回)を追加して実施した
3濃度(LQC, HQC, Extra QC)で検証した際、HQCのみ基準を不適合	LQC及びExtra QCが基準を満たしており、HQCのみ基準を満たさなかったのは科学的に妥当ではないと考えられたことから初回分析データを不採用とし、再分析を実施した
n=3/試料で分析した安定性試料の中で真度の基準を満たさない試料があった	安定性試料のうち、n=1だけが異常値(n=3のCVが20%を超えていた)であったため、初回分析データを不採用とし、再分析を実施した
バイオシミラーと先行品の分析法ダブルバリデーションにおいて先行品が基準を満たし、バイオシミラーのみ僅かに基準を満たさなかった	先行品が満たしたことから、基準のずれも僅かであったため、バイオシミラーの初回分析データを不採用とし、再分析を実施した

## 4.1バリデーション試験において評価すべき項目

安定性試料が偶発的に基準を満たさなかった場合の対応方法

過去の経験	対応方法
凍結融解1回, 2回は基準を満たしたが, 3回で基準を外した	実試料分析においては凍結融解を2回までにとどめることにし, サンプル採取時に多めに分注した
凍結保存1,3,6カ月は基準を満たしたが, 2カ月は基準を満たさなかった	より長い期間の安定性データが得られているため, 6カ月間安定とした
凍結保存1,3,6カ月の安定性を検証する予定であったが, 3カ月保存安定性においてHQCが基準を満たさなかった	別途3カ月保存安定性試料を2回分析し, とともに問題なく基準を満たすことを確認した上で6カ月安定性分析を実施した
安定性試料の初期値が真度 $\pm 15\%$ を超えた	真度 $\pm 15\%$ を満たさなかった場合は, 安定性試料を再調製して再分析を実施するよう予め試験計画書に明記していた
凍結保存安定性の初期値が真度 $\pm 20\%$ をギリギリ満たしたが, 保存期間中の分析において上記の基準を満たさないポイントが確認された	初期値に対する比で評価した場合には, $\%Initial \pm 20\%$ 以内となったため, コメントを報告書に記載した

PKとBiomarkerのISS\*をどう考えるか？について意見交換した。

- PKの場合，添加したモノの安定性はバリデーションにおいて確認できているため，ISR\*\*を実施していれば，ISSは不要という意見が多かった。
- Biomarkerの場合，標準物質と内因性物質が同一であるとは限らないため，実試料を用いたISSを実施する意義があるとの意見が多かった。
- 臨床のPKにおいて，安定性試験で担保した濃度を大幅に超える濃度を検出した経験があり，実試料を用いたISSを実施したことがあるとの意見もあった。

\*: Incurred sample stability

\*\* : Incurred sample reanalysis

## 4.3 バイオシミラーの安定性評価

バイオシミラーの血中濃度分析法バリデーションを考えた場合、安定性は先行品と開発品とで別々に取得すべきか？について意見交換した。

安定性は別々に取得すべきとする意見が多かった。以下、理由として挙げたものを紹介する。

- 安定性が同等であることもバイオシミラーとしての特性を示すデータの一つであると解釈できる。
- 溶媒等も含めた安定性を評価すべきである。
- 先行品と開発品は別のモノなので、別々に評価すべきである。
- 臨床のPKにおいては、二重盲検試験があり、バイオシミラーは先行品と全く同一ではないことを考えると、特性評価の1項目として必要である。



# 5. 特異性

---

## 5. 特異性 目次

- 背景
- 議論した内容
  - 類似物質とその選択
  - 特異性を実施しない場合
  - 添加濃度の設定方法
  - 市販キットでの特異性について
  - 類縁物質がマトリックス中に存在する場合
  - バリデーション取得後の特異性実施の要否判断

## 5. 特異性 背景

「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」において、分析法の特異性を確認することが要求されている。

特異性評価において、結合試薬が分析対象物質を特異的に検出し、類似物質との交差反応性を示さない事を評価する必要がある。

特異性を実施する上で懸念される事項について意見交換した。

## 5.1 類似物質とその選択

### ● 想定される類似物質は何か？ 選択判断は？

#### 【類似物質】

- 開発品が生体内類似物質：**生体内物質**

例) 抗体の場合 → IgG

インターフェロン (IFN) 類等 → IFN- $\alpha$ ,  $\beta$ .....

生体内物質のアナログ → 生体内物質

タンパク質を改変したペプチド → タンパク質

- 共投与される物質がある場合：**共投与物質**

- その他：**代謝物**

抗体の場合に関しては他のバリデーション項目 (選択性) で特異性も担保出来ると判断できるため実施は不要

#### 【選択判断】

- 既知であること, 入手可能であること

多数存在する類似物質をどこまで確認をするのか? → 可能な範囲で確認

## 5.2 特異性を実施しない場合

- 特異性は実施しない場合もある. 実施しない場合とその時の対応は？

### 【実施しない場合】

- ① 類似物質の**存在が不明**
- ② 測定系において明らかに**交差反応性が無い場合**
- ③ 類似物質が**入手できない場合**

### 【対応】

- 実施しない旨等を試験計画書には記載しない(報告書にも記載しない)
- ②の場合, 根拠資料は必要
  - a.バリデーション試験とは別保管,
  - b.参考資料として保管

根拠資料:例)結合試薬の交差反応性情報が記載されているCOA等  
自家調製の場合はアフィニティーデータ等

## 5.3 添加濃度の設定方法

- 特異性を実施する時の類似物質の添加濃度は？
  - 実試料に存在する同等濃度を添加する。
    - 代謝物に関しては・・・
      - 予想される最大濃度を設定
      - 予備検討で確認できている濃度
    - 濃度が未知の場合・・・
      - 類似性の程度によっては実施しない可能性もあり
      - 高濃度添加

## 5.4 市販キットでの特異性について

- 市販キットを使用する場合、キット添付の交差反応性情報を根拠資料とするか？

### 【根拠資料とする(特異性実施しない)】

- 信頼性(メーカーの信頼性, 論文情報等)がある場合
- 結合試薬の作成過程でその特性が明らかになっている場合に該当

### 【根拠資料としない(特異性実施する)】

- **PK試験であれば原則必要**
  - バイオマーカーの場合は目的によっては実施しない
- 情報が十分でない場合

## 5.5 類縁物質がマトリックス存在する場合

- 類似物質がマトリックス中に存在する場合，類似物質を追加添加するか？

### 【不要】

- マトリックス中に存在している場合は，他のバリデーション項目（選択性）を実施することで評価できる
- マトリックス中の類似物質の存在に個体差がない場合
- 開発品投与で変動する可能性が低い場合

### 【必要】

- 上記以外
- 患者試料のみ類似物質が高濃度に存在する場合

## 5.5 バリデーション実施後の追加実施の 要否判断

- バリデーション実施後の追加実施についてどのように判断するか？
  - バリデーション実施時は、類似物質が入手できていなかったが、**終了後に入手できた場合**
  - 未知であった**類似物質の存在が確認された場合**
  - バリデーション実施時では想定していなかった**共投与薬が投与されていた場合**

測定系に影響が少ない: 実施しない

測定系に影響が大きい: 実施する

- ・追加バリデーション→不成立の場合はフルバリデーション
- ・フルバリデーション(測定系の変更)

## 5.5 バリデーション実施後の追加実施の 要否判断

- 実試料測定において影響があった場合はどうする？
  - 測定系の問題があると判断される場合
    - 測定系の再検討
      - フルバリデーション
      - 実試料の再測定
    - ・測定系の再検討前の結果は、その時点で確立していた測定方法での測定結果として考察する。
    - ・測定系の再確立後の再測定結果は再確立した測定方法での結果として考察する。
    - ・安定性が保証できない場合は再試験もあり得る？

## 6. 標準物質・重要試薬

---

- 6.1 購入した標準物質の安定性
- 6.2 ロット番号変更時の対応
- 6.3 重要試薬の有効期限

## 6. 標準物質・重要試薬 目次

- 背景
- 議論した内容
  - 購入した標準物質の安定性
  - ロット番号変更時の対応
    - ✓ 標準物質
    - ✓ 重要試薬
    - ✓ 測定キット
  - 重要試薬の有効期限

## 6. 標準物質・重要試薬 背景

「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」及びQ&A(No.3)において、標準物質や重要試薬のロット変更時の対応方法が記載されている。

実際にロット変更時にはどのように対応しているかに加え、購入した標準品の安定性について意見交換した。

また、国内ガイドラインのQ&A(No.25)に重要試薬の有効期限の設定について記載されていることから、有効期限が切れた重要試薬はどのように取り扱っているか意見交換した。

## 6.1 購入した標準品の安定性

- 分析証明書や取扱説明書等に記載された安定性期間を採用しているか？
  - 分析証明書や取扱説明書に従う。
    - ✓ ただし、しっかりとした分析証明書であることが必要
  - 分析証明書等において指定された溶液を用いなかったり、濃度が異なる場合は、安定性を実施する。
  - 粉末で購入した場合、溶解後の溶液についてはバリデーションにおいて安定性の確認を実施することがある。

## 6.1 購入した標準品の安定性について

- アンプル開封後に分注して保存する場合、バリデーションにおいて安定性の確認は実施する？
  - 安定性は確認していない。
  - 開封後の標準品の安定性を実施し、その情報を明記することもある。（凍結融解の回数、保存期間、保存するチューブの種類など。）

## 【標準品/PK】

- ガイドラインより、ロット間の同等性が分析証明書等により確認できた場合は、ロット間の確認は実施しないという意見が多かった。
- 予備検討として、確認を実施するという意見もあり。
- **何をもちて、ロット間の同等性とするのか**という疑問も上がった。

## 【標準品/PK】

## ● 確認方法

- 新ロットを用いて検量線及びQC試料を調製し、真度及び精度を確認.
- 旧ロットがある場合、新ロットで検量線を、旧ロットでQC試料を調製し、真度及び精度を確認.
- 旧ロットがある場合、新ロットで検量線を、新旧ロットでQC試料を調製し、真度及び精度を確認.
- QC試料の濃度は5濃度 (LLOQ, L, M, H, ULOQ) という意見多数.その他は3濃度 (L, M, H) で真度及び精度を評価.

**【重要試薬】**

- PKは確認試験を実施するが、BMはその重要度によって、実施する。
- PK及びBMともに、確認試験を実施する。
- 分析証明書等がある場合、予備的に確認は実施するが、PKにおいても確認試験を実施しない場合もあり。

**【重要試薬】**

## ● 確認方法

- 新ロットを用いて検量線及びQC試料を調製し、真度及び精度を確認するという意見が多かった。
- その他、真度及び精度に加え、新旧のロットを使用してレスポンス (シグナル, 吸光度等) を確認するという意見もあり。
- QC試料の濃度は5濃度 (LLOQ, L, M, H, ULOQ) という意見多数。その他は3濃度 (L, M, H) で真度及び精度を評価。
- ポリクローナル抗体の場合は選択性等の確認が必要かもしれない。

## 【測定キット/PK】

- 検量線とQC (5濃度: LL, L, M, H, UL) を調製し, 真度及び精度を確認するという意見が多かった. なお, 新ロットのみ, または新旧ロットで評価すると意見は様々であった.
- その他
  - 真度及び精度の他に, 新旧ロットを用いてシグナルレベル等を確認する.
  - 測定キットのロットが変わると検量線のレンジが変わることもあるため, その場合にはフルバリデーションを実施. (そうならないように同ロットを入手するようにする.)

## 【測定キット/ BM】

- 特に確認は実施しないが、マーカールの重要度に応じて、確認試験を実施するという意見が多かった。
- 実施する場合は、PKと同様。
- その他
  - バリデーション前にロット間差がないことを確認しておく。
  - 予備検討の段階でロット間差が小さい測定キットを選択する。

## 6.3 重要試薬の有効期限

- 国内ガイドラインのQ&A(No.25)に重要試薬の有効期限の設定について、「**使用する期間中の検量線やQC試料の分析結果の評価から、重要試薬の品質を確認できるならば、有効期限の設定は必ずしも必要でない**」と記載されているが、有効期限が切れた重要試薬はどのように取り扱っているか??

## 6.3 重要試薬の有効期限

- メーカーの指定に従うが、ケースバイケースで対応している。
- 抗体の入手が困難な場合など、検量線やQC試料が基準を満たせば有効期限を延長している。
- メーカー等の指定があれば従うが、指定がない場合、反応に問題がない限り使用する。
- ラベル化したものなどは安定性を確認することもある。
- 期限がないものは有効期限を10年としている。