



DG2020-49
中和抗体分析
– アッセイフォーマット選択と
アッセイパフォーマンス向上のための議論 –

**Neutralizing Antibody Assay:
Discussion to Select Assay Format and
Improve Assay Performance
(DG2020-49)**



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>
小島 知子 Tomoko Kojima	株式会社サンプラネット <i>Sunplanet Co., Ltd.</i>
中井 直子 Naoko Nakai	第一三共株式会社 <i>DAIICHI SANKYO CO., LTD.</i>
小田 祐輝 Yuki Oda	小野薬品工業株式会社 <i>Ono Pharmaceutical Co., Ltd.</i>
清水 啓友 Hiroto Shimizu	旭化成ファーマ株式会社 <i>Asahi Kasei Pharma Corporation</i>
若松 明 Akira Wakamatsu	グラクソ・スミスクライン株式会社 <i>GlaxoSmithKline K.K.</i>
横田 喜信 Yoshinobu Yokota	パレクセル・インターナショナル株式会社 <i>Parexel International Inc.</i>

活動の内容 (Contents of Our Activity)

2020 8	9	10	11	12	2021 1	2	3
TC ★ 8/24	TC ★ 9/23	TC ★ 10/28	TC ★ 11/26	TC ★ 12/22	TC ★ 1/21	TC ★ 2/10	TC ★ 2/25
△ 8/19 推進委員会		△ 10/21 推進委員会		△ 12/16 推進委員会	→ ポスター作成		★ 3/9-11 JBFシンポ
						△ 2/17 推進委員会	

- 合計8回のTeamsを用いた電話会議
- 合計4回のDG推進委員との定期進捗報告会
- 活動期間中はeメールでのコミュニケーションをベースとした

- 本発表における資料等に対する翻訳、集計等はDGメンバーが行ったものである。正しくは元の資料等を参照されたい。

背景及び目的

中和抗体分析のアッセイフォーマット

- 特に臨床試験での抗薬物抗体分析において、ADA陽性と判定された試料については中和抗体分析を実施することがある。
- その際に、どのようにアッセイフォーマットを選択し、いつ分析法を構築すべきか明確な指針はない。
- DG2019-43で実施されたJBFサポーターへのアンケート結果においても、cell-based assayとligand binding assayの両方が用いられていた。

中和抗体分析のアッセイパフォーマンス

- 一般的には、cell-based assayのアッセイパフォーマンスはligand binding assayよりも低いと考えられる。

DG2020-49の目的

- 中和抗体分析に関するいくつかの文献等を参照し、バイオ医薬品の薬効機序に着目してどのようなアッセイフォーマットが用いられているか調査した。調査の過程でレビューした薬物耐性の改善とカットポイント設定に関する文献も紹介する。
- 過去の申請資料から、それぞれのバイオ医薬品の中和抗体分析で選択されたアッセイフォーマットを調査した。
- Cell-based assayのアッセイパフォーマンス向上のための対策を議論した。
- 本発表では、DGの議論内容の概要を紹介し、DGからの提案を共有する。



Background and Purpose

Assay Format of Neutralizing Antibody Assay

- Neutralizing antibody (NAb) assay is potentially conducted on samples that are determined as ADA positive, particularly in clinical studies.
- There are no clear guidelines on how to select the assay format and when to develop the assay.
- According to the results of the questionnaire to JBF supporters by DG2019-43, both cell-based assay and ligand binding assay were used.

Assay Performance of Neutralizing Antibody Assay

- The assay performance of cell-based assay is generally considered to be lower than that of ligand binding assay.

Purpose of DG2020-49

- We investigated what assay format was used by focusing on the mechanism of action (MoA) of biotherapeutics with reference to several literatures on NAb assay. The literatures on drug tolerance improvement and cut point setting reviewed during our discussion are also introduced.
- The assay format selected for NAb assay of each biotherapeutic was reviewed based on each CTD.
- We discussed measures to improve the assay performance of cell-based assay.
- An overview of our DG's discussion and proposal on assay format is presented.

- Strategy for Selecting NAb Assay Format from EBF Symposium
- Feedback from EBF Focus Workshop
 - e. ケーススタディ：薬物ターゲットの干渉と薬物耐性の改善法
 - g. 補足：スクリーニングアッセイにおけるカットポイント設定
- 申請資料調査
- Cell-based assayにおけるアッセイパフォーマンス
- まとめ



Strategy for Selecting NAb Assay Format from EBF Symposium

<http://bioanalysisforum.jp/>

Strategy for Selecting NAb Assay Format

European Bioanalysis Forum

27Sept2016

Jim McNally, Ph.D.

Associate Director, Global Early Development

Head of Clinical Bioanalytics

Merck KGaA

- AAPS Working Group on NABsから、中和抗体分析のアッセイフォーマット選択のストラテジーが提言された。
(White Paper)
- EBFシンポジウムで発表された。

<https://e-b-f.eu/wp-content/uploads/2018/06/fw201609-12-Jim-McNally.pdf>

DGメンバーで本発表資料をレビュー、議論した。発表内容をまとめて、重要な点をピックアップした。

Strategy for Selecting NAb Assay Formats AAPS Working Group on Neutralizing Antibodies

The AAPS Journal (© 2016)
DOI: 10.1208/s12248-016-9954-6



White Paper

Strategies to Determine Assay Format for the Assessment of Neutralizing Antibody Responses to Biotherapeutics

Bonnie Wu,^{1,11} Shan Chung,² Xu-Rong Jiang,³ Jim McNally,^{4,5} Joao Pedras-Vasconcelos,⁶ Renuka Pillutla,⁷ Joleen T. White,^{5,8} Yuanxin Xu,⁹ and Shalini Gupta¹⁰

Received 22 March 2016; accepted 21 June 2016

Abstract. Most biotherapeutics can elicit immune responses in dosed recipients generating anti-drug antibodies (ADAs). Neutralizing antibodies (NABs) are a subpopulation of ADAs that can potentially impact patient safety and directly mediate loss of drug efficacy by blocking the biological activity of a therapeutic product. Therefore, NAB detection is an important aspect of immunogenicity assessment, requiring sensitive and reliable methods reflective of the therapeutic mechanism of action (MoA). Both cell-based and non cell-based assays are viable options for NAB assessment. However, the scientific approach for the selection of a suitable assay format (cell-based or non cell-based) for NAB assessment is not currently well defined. In this manuscript, the authors summarize the design and utility of cell-based and non cell-based NAB assays and recommend a NAB assay format selection approach that relies on a combination of three factors. These include (i) the therapeutic MoA, (ii) the evidence of desirable assay performance characteristics, and (iii) risk of immunogenicity. The utility of correlating NAB response with pharmacodynamic data is also discussed. The aim of this paper is to provide a consistent strategy that will guide the selection of scientifically justified assay formats capable of detecting clinically relevant NABs for biotherapeutics with varying MoAs and diverse complexity.

KEYWORDS: assay format; biotherapeutic; mechanism of action; neutralizing antibody.

Bonnie Wu – Janssen R&D, Johnson & Johnson

Shan Chung - Genentech

Xu-Rong Jiang – AstraZeneca

Jim McNally – Pfizer/Merck KGaA

Joao Pedras-Vasconcelos - FDA

Renuka Pillutla – Bristol Myers Squibb

Joleen White – Biogen/Merck KGaA

Manoj Rajadhyaksha - Regeneron

Yuanxin Xu – Genzyme/Alnylam

Shalini Gupta - Amgen



Historical performance for cell-based NAb format

□ Genesis of the cell-based NAb performance

- Neutralizing antibodies are associated with potential impact to the overall risk/benefit assessment of the biotherapeutic
 - Potential efficacy impact in all biotherapeutics
 - Potential safety impact for molecules with endogenous counterparts, neutralizing both the biotherapeutic and the endogenous molecules
 - Neutralization of endogenous molecules can be life-threatening depending on the uniqueness of function and the biological effects.
- The preference for the cell-based format is based on assessing the entirety of the biological action rather than a subset of interactions that are neutralizing
- **Theoretical example:** Binding to the receptor may be necessary for the biological function, but it may not be sufficient. There may be a structural change(s) required for downstream biology that other NAb epitopes could affect.
- NAbはバイオ医薬品の全体的なリスク/ベネフィット評価に影響を及ぼす可能性がある。
- Cell-based formatの選択は、中和する相互作用のサブセットではなく、生物学的作用の全体を評価することに基づく。
- Theoretical example : 受容体への結合は、生物学的機能に必要なものであるが、十分ではない。他のNAbエピトープが影響する可能性のある下流のバイオロジーに必要な構造変化があるかもしれない。

MoAの定義が重要。例えば、単に薬物の受容体への結合だけでなく、受容体が構造変化しサブユニットが結合して薬効を発揮する場合などは、これら全体の作用を含んでMoAと考えるべき。

Revisiting the rationale and providing a MoA based approach to select a format

□ Scientific basis for NAb assay formats selection

Risk Based Assessment

- Both of generating an immune response and of immune response having an impact
 - High rates of ADA positivity affecting sample numbers for testing
 - Impact on non-redundant endogenous compounds
 - Concentrations of NAb that would impact *in vivo*
- 免疫反応の発現とその影響
 - ADA産生率の高さ
 - 豊富でない内因性因子への影響
 - in vivo*で影響のあるNAb濃度

Mechanism of Action

- Reflect the biology of the biotherapeutic
 - Incorporates the pharmacology of the target
 - Mode of drug-target interaction
 - Design characteristics of the biotherapeutic for desired effect
- バイオロジーの反映
 - 標的への薬理作用の組み込み
 - 薬物-標的相互作用の機序
 - 目的の効果のためのバイオ医薬品のデザイン上の特性

Assay Performance

- Sensitivity
 - Matrix interference: specificity and selectivity
 - Drug tolerance (sensitivity in presence of C_{trough})
 - Reactivity of cells to other sera components including soluble target
 - Reproducibility across time course of clinical program
 - Relevance of cell line receptor expression
- 感度、マトリックス干渉（特異性、選択性）
 - 薬物耐性（ C_{trough} での感度）
 - 可溶性標的を含む他血清成分に対する細胞の反応性
 - 経時的な再現性
 - 受容体発現細胞株の妥当性

薬物のMoA、アッセイパフォーマンス、免疫原性のリスクの3つのファクターを考慮して、アッセイフォーマットを選択。これらのうち、MoAが第一のファクターと提言。

Revisiting the rationale and providing a MoA based approach to select a format

□ Primary Determinant - MoA

申請資料調査におけるMoAによるNAb測定法の分類

MoA	Drug Modality	Drug Target	Drug-target Interaction	Examples	Recommended Assay Format
Agonist	Recombinant protein or antibody アゴニスト	Cellular receptor	Drug binds and activates receptor	Cytokines, growth factors, EPO agonists with no homology to endogenous protein	<u>Cell-based assay</u> <u>Cell-based assay as primary choice, non cell-based assay as an alternative</u>
Antagonist	Monoclonal antibody アンタゴニスト (液性因子)	Humoral target	Drug binds and inhibits the target	Golimumab, Ustekinumab, Adalimumab	<u>Non cell-based CLB assay</u>
	Monoclonal antibody アンタゴニスト (細胞受容体)	Cellular receptor	Drug binds cellular receptor and competitively inhibits receptor-ligand interaction	Natalizumab, Trastuzumab, Tocilizumab	<u>Cell-based assay or non cell-based assay</u>
	Soluble receptor アンタゴニスト (リガンド)	Ligand	Soluble receptor binds ligand and blocks receptor-ligand interaction	Etanercept, Abatacept	<u>Non cell-based CLB assay recommended; cell-based assay possible with a suitable cell line</u>
Targeted intra-cellular delivery of a potent cytotoxin mediated by antibody	ADC 細胞傷害活性 (ADC)	Cellular receptor	ADC binds the cellular receptor and mediates the internalization of payload	Brentuximab vedotin, Adotrastuzumab emtansine	<u>Cell-based assay(s)</u>
Target cell lysis through antibody effector function	Monoclonal antibody 細胞傷害活性	Target cell receptor, FcγR or complement	Antibody binds to target cell receptor through variable region and FcγR or complement through Fc domain	Rituximab, Cetuximab, Alemtuzumab	<u>Cell-based effector assay recommended, cell-based binding assay or non cell-based CLB assay acceptable with justification</u>
Enzyme replacement	Enzyme 補充療法 (酵素)	Replace deficient protein in circulation or in target cells; may need cellular receptor for enzyme uptake	Enzyme functions in circulation or through cellular uptake	Human factor IX, Imiglucerase, Idursulfase, Galsulfase	<u>Enzyme bioactivity assay and/or cell-based assay; two assay may be needed</u>

薬物のMoA、モダリティ、標的、標的との相互作用からアッセイフォーマットを推奨。



Potential assay formats

□ Case Study A

Antibody drug conjugate targeting Her2 receptor and carrying a cytotoxic molecule

Mechanism of Action:

- ADC, targeting cellular receptor
- Bind to tumor cells overexpressing Her2 and deliver cytotoxic payload

Proposed NAb format based on MoA:

- Cell based assay preferred
- Measure inhibition of cell death induced by ADC
- Most scientifically relevant assay format

Targeted intra-cellular delivery of a potent cytotoxin mediated by antibody	ADC	Cellular receptor	ADC binds the cellular receptor and mediates the internalization of payload	Brentuximab vedotin, Adotrastuzumab emtansine	<u>Cell-based assay(s)</u>
---	-----	-------------------	---	---	----------------------------



Potential assay formats

□ Case Study B

Antibodies against PD-1 or PD-L1 (checkpoint inhibitors)

Mechanism of Action:

- Agonist, receptor target
- Bind to PD-1 or PD-L1, inhibiting binding of the other

Normal biological activity of target:

- Inhibit the immune response: "checkpoint"

Proposed NAb format based on MoA:

- Competitive ligand binding assay or cell-based assay equally viable (agnostic assay for agonists)
- Measure inhibition of biotherapeutic binding to receptor
 - soluble receptor in CLB
 - cell-bound receptor in CBA, measure directly or through restored cell-cell interaction

Agonist	Recombinant protein or antibody	Cellular receptor	Drug binds and activates receptor	Cytokines, growth factors, EPO agonists with no homology to endogenous protein	<u>Cell-based assay</u> <u>Cell-based assay as primary choice, non cell-based assay as an alternative</u>
---------	---------------------------------	-------------------	-----------------------------------	--	--



Potential assay formats

□ Case Study C

Enzyme replacement therapy

Mechanism of Action:

- Replace deficient protein

Normal biological activity of target:

- Intracellular uptake
- Activation of enzymatic activity

Proposed NAb format based on MoA:

- 2 assays:
 - Enzymatic activity neutralization where NAb could prevent conformational change necessary for activity
 - Cell based assay to assess uptake into the target cell

Enzyme replacement	Enzyme	Replace deficient protein in circulation or in target cells; may need cellular receptor for enzyme uptake	Enzyme functions in circulation or through cellular uptake	Human factor IX, Imiglucerase, Idursulfase, Galsulfase	<u>Enzyme bioactivity assay and/or cell-based assay</u> ; two assay may be needed
--------------------	--------	---	--	--	---

Secondary considerations of risk assessment and assay performance

□ Secondary Determinants – Risk Assessment and Assay Performance

Risk Assessment

- Risk of high ADA incidence yet low risk of impact may favor competitive ligand binding due to throughput and robustness
 - High risk of impact on endogenous molecules provides less flexibility to choose the less-preferred option from mechanism of action
 - High risk of impact places greater emphasis on assay sensitivity in presence of drug, which may favor competitive ligand-binding
- 高いADA産生率のリスクがあるが、影響のリスクが低い場合、スループットと頑健性のために競合的LBAが有利になる可能性がある。
- 内因性分子への影響が高い場合、MoAから考えて間違ったオプションを選択する余地は少ない。
- 影響のリスクが高い場合、薬物存在下での感度がより重要となり、競合的LBAが有利になる可能性がある。

免疫原性のリスクとアッセイパフォーマンスが、アッセイフォーマット選択の第二のファクター。

Assay Performance

- Strong influence when two different formats are equally viable: test both in early assay development
 - Manipulations to improve drug tolerance: more options available for competitive ligand binding formats
 - Sera concentrations of both drug and soluble target
 - Totality of assay performance
 - Selection of cell lines and other reagents for optimal performance and relevance to mechanism of action (one CBA is not like all others)
- 2つの異なるフォーマットを同時に実行可能な場合、強く影響を受ける（初期の分析法開発で両方をテストする）。
- 薬物耐性を改善するための操作（競合的LBAのためのより多くのオプション）
- 薬物及び可溶性標的両方の血清中濃度
- 総合的なアッセイパフォーマンス
- 最適なパフォーマンス及びMoAとの関連性を検討するための細胞株や他試薬の選択（あるCBAは他の全てと異なる）



Feedback from EBF Focus Workshop

<http://bioanalysisforum.jp/>

Conference Report

For reprint orders, please contact: reprints@future-science.com

Bioanalysis

Feedback from the European Bioanalysis Forum: focus workshop on current analysis of immunogenicity: best practices and regulatory hurdles

Joanne Goodman¹, Simon Cowen², Viswanath Devanarayan³, David Egging⁴, Thomas Emrich⁵, Michaela Golob⁶, Daniel Kramer⁷, Jim McNally⁸, James Munday⁹, Robert Nelson¹⁰, João A Pedras-Vasconcelos¹¹, Timo Piironen¹², Denise Sickert¹³, Venke Skibeli¹⁴, Marianne Scheel Fjording¹⁵ & Philip Timmerman^{*,16}

First draft submitted: 23 October 2017; Accepted for publication: 8 December 2017; Published online: 18 January 2018

EBF Focus Workshop
について記された資料を元に
DGメンバーでレビュー議論し
重要な点をまとめた。

<http://bioanalysisforum.jp/>

Contents

- a. Summary (European Bioanalysis Forum Workshop..... 2016)
- b. Introduction (In early 2016 the European Bioanalysis Forum (EBF)....)
- c. The current regulatory landscape & future challenges
- d. A rapidly changing regulatory environment
- e. Challenges of drug tolerance & interferences in immunogenicity assays
- f. Alternatives for NAb assessment
- g. Cut-point setting in ADA & NAb assays
- h. Closing panel discussion & meeting outputs
- i. Conclusion & future perspective

- a. 概要
- b. 序論
- c. 規制の現状と今後の課題
- d. 急速に変化する規制環境
- e. 免疫原性試験における薬物耐性と干渉の課題
- f. NAb評価の代替法
- g. ADA & NAbアッセイにおけるカットポイント設定
- h. クロージングパネルディスカッション&会議のアウトプット
- i. 結論と今後の展望

a. 概要

b. 序論

European Bioanalysis Forum Workshop, Lisbon, Portugal, September 2016

At the recent European Bioanalysis Forum FocusWorkshop, 'current analysis of immunogenicity: best practices and regulatory hurdles', several important challenges facing the bioanalytical community in relation to immunogenicity assays were discussed through a mixture of presentations and panel sessions. The main areas of focus were the evolving regulatory landscape, challenges of assay interferences from either drug or target, cut-point setting and whether alternative assays can be used to replace neutralizing antibody assays. This workshop report captures discussions and potential solutions and/or recommendations made by the speakers and delegates.

In early 2016 the European Bioanalysis Forum (EBF) [1] created an immunogenicity strategy workstream to address challenges within the bioanalytical community when developing, validating and implementing assays for antidrug antibody (ADA) assessment during biotherapeutic drug development.

Just prior to the strategy workstream formation, the European Medicines Agency (EMA) had published a revised draft to the 2006 immunogenicity guideline EMEA/CHMP/BMWP/14327/2006 [2], shortly followed in 2016 by a new draft guidance from the US FDA focused on immunogenicity assay development and validation [3]. The EBF community reviewed and commented on both documents during public consultation and it became evident there were several key challenges that warranted further discussion in the format of a focus workshop [4]. This meeting took place in Lisbon in September 2016 with around 80 delegates and 13 speakers.

EBF Focus Workshopで主な焦点となった領域

- ✓ 規制状況の進展
- ✓ 薬物または
薬物ターゲットのアッセイ干渉
- ✓ カットポイント設定
- ✓ 中和抗体アッセイに代わる
代替アッセイの使用可否

【EMA】

2006 : 免疫原性ガイドライン 発出
2016 : 改定案 発表

【FDA】

2009 : ガイダンス 発出
2016 : 改定案 発表

(免疫原性アッセイの開発とバリデーションに焦点)

この両方の文書をレビューし、**ワークショップ**で討議

(2016年9月 : **今回の発表内容**)

【FDA】

- ✓ Guidance for Industry : Clinical Immunogenicity Considerations for Biosimilar and Interchangeable Insulin Products, Draft (2019)
- ✓ Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products-Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection (2019)

【EMA】

- ✓ Guideline on Immunogenicity assessment of therapeutic proteins (2017)

C. 規制の現状と今後の課題

The starting point of the discussions was an overview of the current regulatory landscape given by Michaela Golob (on behalf of the EBF). Globally, there are various regulatory documents concerning immunogenicity, however, [guidance documents specifically describing immunogenicity assay development and validation](#) have only been published by the EMA and FDA. Within the International Council for Harmonization (ICH) regions such as Japan and Brazil, there are currently no regulations or guidelines released on this topic. Outside the ICH regions there are several documents delineating immunogenicity but no dedicated regulations describing immunogenicity assay development and validation. The EBF invited EMA and FDA representatives to present their current draft guidelines and to inform the audience on current discussions and thinking within their agencies. Joao A. Pedras-Vasconcelos represented the FDA and gave an update on the US perspective on therapeutic protein immunogenicity. He explained regulatory expectations on providing an immunogenicity risk assessment and a suitable sampling plan for clinical studies.

As well as the development of validated ADA assays, containing a multi-tiered approach of a binding antibody (screening) assay, a confirmatory assay, a titer assay and potentially a neutralizing antibody (NAb) depending on the stage of development. Joao referred to preclinical immunogenicity with the primary utility being the interpretation of toxicology and pharmacology data. Nevertheless such preclinical assessment may also reveal potential antibody-related toxicity that could be monitored in clinical trials and therefore appropriate storage of preclinical immunogenicity samples is strongly recommended. [The level of immunogenicity testing within the clinical development program is highly correlated to the potential risk and should be described by a formal risk assessment starting early in development.](#) Joao then discussed the FDA view on assay design and validation parameters, [especially recommending cell-based NAb assays due to their tendency to be more reflective of the in vivo situation.](#) However, [competitive ligand-binding assays \(CLBAs\) might be a suitable alternative in some situations.](#) Additionally, he presented the FDA recommendation on clinical sampling and storage strategy, the latter being of importance should an agency request reanalysis following submission of the Biological License Application.

免疫原性アッセイの開発およびバリデーションを具体的に記載したガイダンス文書

2016年9月（ワークショップ当時）：EMAおよびFDAによって発出されたもののみ。

日本やブラジルなどの国際調和会議（ICH）参加国で、この話題に関して発表された規制やガイドラインはない

臨床開発プログラムにおいて、いつどのような免疫原性試験を実施すべきか

潜在的なリスクと高い相関を示すので、開発の初期から正式なリスク評価によって実施されるべき

FDAの見解

in vivoの状況をより反映する傾向があるため

- ✓ **Cell-based NAbアッセイを推奨。**
- ✓ **しかし、状況によっては競合的リガンド結合アッセイ（CLBAs）が適切な代替法となる可能性がある。**

DGコメント

LBAsのほうがin vivoの状況をより反映する状態とは？

Cell-based assayを構築するにあたり
生体内の状態から著しく乖離している条件を設定する必要がある場合
生体内の状態よりもかなり多くのリガンドを添加しないと定量できない場合 など

d. 急速に変化する規制環境

Following on from Michaela's introduction to the immunogenicity landscape plus the presentations from the FDA and EMA reviewers, the regulatory theme was continued with further focus on the EMA and FDA draft guidance documents released for public consultation in 2015 and 2016 respectively. The aims of the session were to update delegates on the main comments and suggested revisions submitted by the EBF to both agencies and highlight the key areas of comment. This was followed by a regulatory panel session where questions were posed to the two regulators plus Michaela Golob and Joanne Goodman.

The summary of the EBF comments on the two new draft guidance documents was presented by Joanne (on behalf of the EBF). While a significant number of comments were received, the main focus of the presentation concerned the scope of the documents, molecule formats, biosimilars, positive controls, sensitivity, drug tolerance, specificity/characterization, assay cut-points, NAb and general comments. While parts of the guidance documents are aligned between the two agencies, one of the challenges for the community as a whole is to adhere to both documents to cover multiple filings in different regions. Ideally an ICH harmonization effort dedicated to immunogenicity could be initiated, yet unfortunately this would require at least one more ICH region to produce a guidance document to fulfil the ICH rules.

The definition of a biologic and therefore the need for immunogenicity assessment varied especially in the area of peptides dependent on their size. A risk assessment for any molecule format is vital and multifactorial approaches should be taken when producing the assessment. Additionally, it is recommended that this assessment is formed early in development. However, clinical consequence of the immunogenic response should be the driving factor rather than ADA incidence. Everyone was in agreement that where an endogenous nonredundant counterpart is present, then this should automatically be classed as high risk.

EMAガイドライン と FDAガイダンス の比較

(適用範囲、分子フォーマット、バイオシミュラー、陽性対照、感度、薬物耐性、特異性/特性評価、アッセイのカットポイント、等)

課題：異なる地域における複数の申請に対応するために両文書を遵守する必要がある

免疫原性に特化したICHの取組みが開始されることが理想。
しかし、ICH規則を満たすための指針文書を作成するためには、少なくともさらにもう1つのICH参加国によるガイダンスの発出が必要となる。

両ガイダンスの記載内容は概ね整合性が取れている。

両ガイダンス文書の記載に差があるポイント

生物学的製剤の定義 および そこから派生する免疫原性評価の必要性

上記のように両ガイダンスで異なった分類分けとなった場合でも・・・
いかなる分子フォーマットのリスク評価も重要。
評価を行う際には多元的なアプローチをとるべき。

評価：開発初期の実施を推奨。

ADA発現率よりも、むしろ免疫原性応答の臨床的な結果が
(リスク評価を) 促進する因子となる。
内因性物質がそれにあたる場合は、自動的に高リスクに分類されるべき。

d. 急速に変化する規制環境

It should be remembered that an immunogenicity assay is only validated when deemed so by regulatory review. This can raise the requirement for further testing and therefore sample storage becomes critical; it is not uncommon for applicants to the FDA, as well as to the EMA, to have to reassess their data or revalidate assays during development. Since it is well known and documented that antibodies are stable in serum and plasma matrices [5], the recommendation was to use trending analysis of positive controls as a viable alternative to formal stability assessments. Validated assays are only required at Biological License Application submission and when supporting a pivotal trial that was generally agreed as Phase III.

Although for high-risk molecules this could be as early as Phase I. Otherwise it is acceptable for an assay to only be qualified in the earlier stages of drug development.

Furthermore it is usually rare that real-time immunogenicity analysis is required and will only be requested when there is a related safety signal; such cases equate to less than 10% of FDA submissions.

Finally, NAb assays still need further consideration within the guidance documents, the choice of the assay format is well described but there are no details with respect to the expectation for relative sensitivity and drug tolerance in such assays.

免疫原性試験 結果の評価

規制当局の審査により、その妥当性が確認および判断されるまで未確定

→ 開発中にデータを再評価したり、測定法を再更新したりしなければならないことは珍しくない。

【FDAの推奨】

抗体が血清および血漿マトリックス中で安定であることがよく知られているため

正式にADA自身の安定性評価を実施することは不可能なので、

それに代わる方法として陽性対照を保存した場合の分析結果を用いる

FDAガイダンス(p.16) : Because it is generally not feasible to establish the stability of subject samples, FDA recommends storing subject samples in a manner that preserves antibody reactivity at the time of testing.

測定法 (Full Validationの必要性)

フルバリデートされた測定系：バイオ医薬品の認可申請時、および一般的に第Ⅲ相として合意されたピボタル試験を支持する場合にのみ必要。(高リスク分子については、第Ⅰ相試験までの早い段階での準備が求められるが、それ以外の場合は、試験の **適格性が確認** されていれば良い)
臨床試験実施中にリアルタイムで免疫原性の解析が必要となることは通常まれであり、関連する安全性情報がある場合にのみ要求されるであろう (リアルタイム報告：FDA提出の10%未満)。

アッセイフォーマットの選択について

NAbアッセイについてはガイダンス文書の中でさらに検討が必要であり、アッセイ形式の選択は十分に記述されているが、このようなアッセイにおける相対的な感度および薬物耐性に対する期待に関して詳細はない。

「バリデーション」>> 適格性確認
という意味合い

バリデーション = Full Validation

適格性確認 = Fit for Propose

目的に準じて分析法をある程度確認

(実施者が判断しながら評価項目を決定) と考えられる。

DGコメント



e. 免疫原性試験における薬物耐性と干渉の課題

The session on 'challenges of drug tolerance and interferences' included case studies and presentations by James Munday (Covance), Robert Nelson (Novimmune) and Thomas Emrich (Roche Pharma Research and Early Development). This session reviewed the challenges associated with drug tolerance and target interference for immunogenicity assessment assays. James gave an introduction to [why ADA assay tolerance and target interference are important to understand and how they can affect data interpretation](#). He then reviewed [strategies that can be applied to improve assay sensitivity when drug tolerance and target interference are an issue](#).

- ✓ 薬物耐性と干渉が、データ解釈にどのように影響しうるか
- ✓ 上記が問題である場合のアッセイ感度を改善するために適用できる戦略

FDAガイダンスには、以下の一文として簡単に記載してあるのみ。

FDA ガイダンス(p.22)

V. ASSAY DEVELOPMENT

D-Development of Neutralization Assay

5. Additional Considerations for Neutralization Assay

d. The presence of onboard drug should also be considered when designing neutralization assays, particularly when drugs with a long half-life are used.

中和アッセイを設計する際、特に半減期の長い薬剤を使用する場合は、共存している薬剤の存在も考慮する必要がある。

ケーススタディ

詳細別途後述記載 (p.25 – p.33)

1) 薬物ターゲットの干渉と薬物耐性は、ADAおよびNAbアッセイに影響を及ぼす。

その克服方法について。(2つのケーススタディ)

上記文献：ケース1 ADAの薬物耐性の改善について (今回のDGの対象外)
 ケース2 NAbの薬物耐性の改善について (DG discussionの対象)

2) ADA解析のピットフォール(落とし穴) とその課題を克服するために使用できる戦略について。

e. ケーススタディ：薬物ターゲットの干渉と薬物耐性の改善法

The first presentation given by James Munday described how the existence of biological therapeutics with long acting exposure is resulting in an increased requirement for designing ADA assays with an increased tolerance of free drug. The presentation reviewed methods that can be applied to improve drug tolerance, including optimization of assay design (co-incubation vs stepwise approach), standard acid dissociation as described by Patton et al. [6], solid phase extraction with acid dissociation (Smith et al.) [7], affinity capture elution (Bourdage et al.) [8] and precipitation and acid dissociation (PandA) (Zogbhi et al.) [9]. The review showed how the equipment platform choice, assay design and assay format can all influence the drug tolerance achieved in an ADA assay.

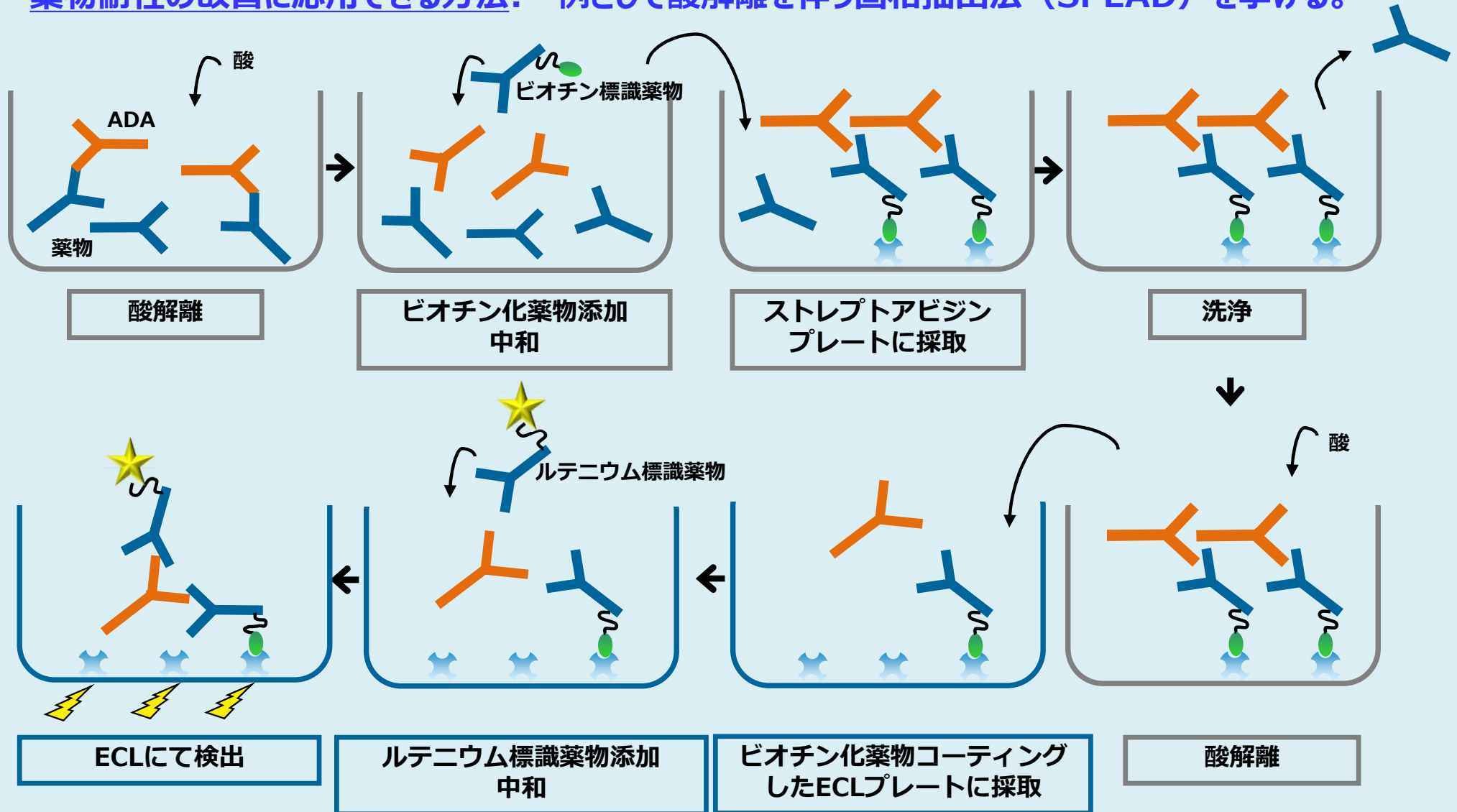
薬物耐性の改善に応用できる方法

- アッセイデザインの最適化
(共インキュベーション VS 段階的手法)
- 標準酸解離 (MSDB)
- 酸解離を伴う固相抽出 (SPEAD)
- アフィニティーキャプチャー溶出 (ACE)
- 沈殿と酸解離 (PandA) 等

<https://www.e-b-f.eu/wp-content/uploads/2018/06/fw201609-08-Robert-Nelson.pdf>

e. ケーススタディ：薬物ターゲットの干渉と薬物耐性の改善法

薬物耐性の改善に応用できる方法：一例として酸解離を伴う固相抽出法（SPEAD）を挙げる。



e. ケーススタディ：薬物ターゲットの干渉と薬物耐性の改善法

The performance of ADA bridging assays, where the presence of the drug target can cause ADA assay interference, was also reviewed and discussed. A drug target may inhibit ADA binding at the interface between drug and its target epitope resulting in a false negative ADA result. Alternatively, if the target is multimeric it may form a bridge with the critical reagents used in the assay resulting in a false-positive ADA result. Strategies for overcoming such target interference were discussed. These involved either removal of the target by affinity capture/acid dissociation techniques or by inhibition of the drug–target interaction with the target receptor or with antibodies to a different complementarity-determining region (CDR) to that used by the drug.

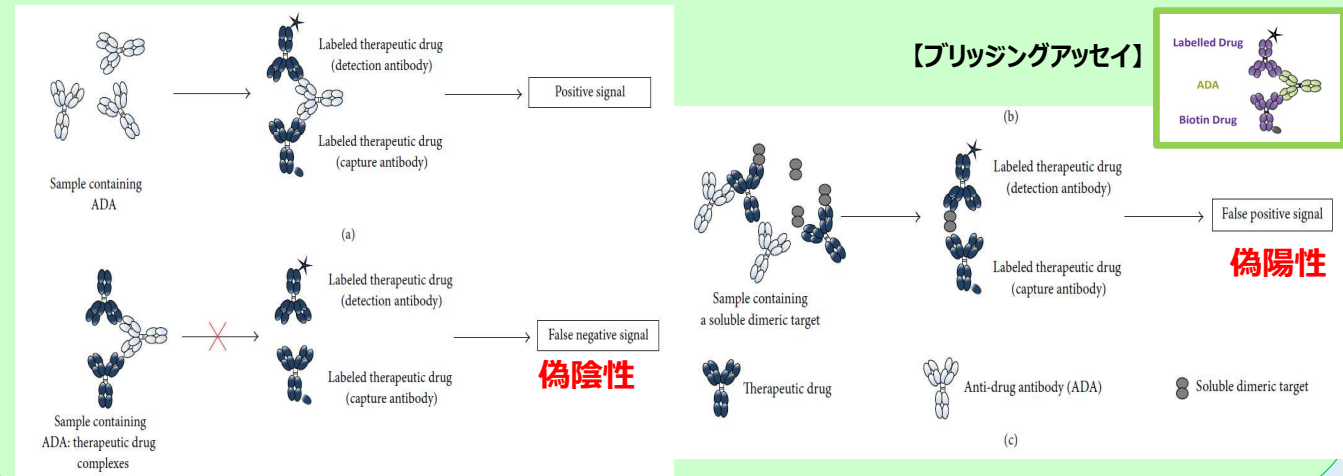
Robert Nelson then presented two case studies on 'overcoming drug and target interference in ADA and Nab assays'. The first case study examined challenges in bridging ADA assays when the therapeutic target is soluble and multimeric. Robert showed how anti-target antibodies that are noncompetitive with the monoclonal antibody (mAb) therapeutic had been used in a methodology to deplete the target and so minimize the risk of false-positive results in the screening assay. The method included a mild acidic treatment to dissociate drug: ADA complexes and increase drug tolerance and minimize the risk of false-negative screening results.

ケース1：ADAの薬物耐性の改善について（今回のDGの対象外）

薬物ターゲットの存在がアッセイ干渉を引き起こす可能性があるADAブリッジングアッセイ

薬物ターゲットが薬物とその標的エピトープの間の界面でADA結合を阻害し、**偽陰性**となる可能性がある。

また、ターゲットが多量体である場合、アッセイで使用される重要な試薬とブリッジを形成し、**偽陽性**となる可能性もある。



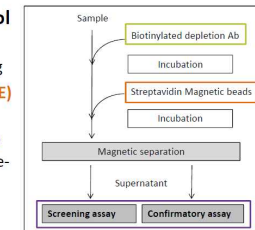
上記を克服するための戦略

- ✓ アフィニティーキャプチャー/酸解離技術による薬物ターゲットの除去
- ✓ ターゲット受容体と薬物-ターゲット相互作用の阻害
- ✓ 薬物の結合部位とは異なる相補性決定領域 (CDR) に対する抗体による除去

→ 偽陰性 & 偽陽性の発生を回避

Case Study 1: ADA Assay Development

- Target Depletion Protocol
 - Anti-target antibody non-competitive with drug
 - Solid phase extraction (SPE) with magnetic beads
 - Anti-target Ab competitive with drug added to capture-detection mixture



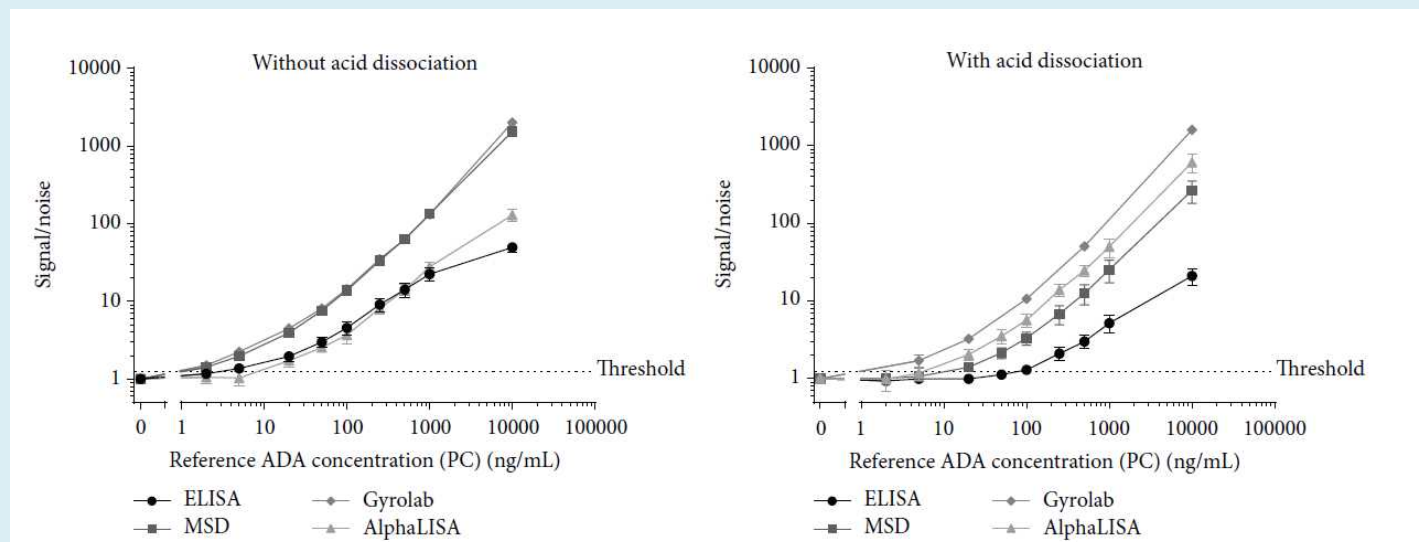
e. ケーススタディ：薬物ターゲットの干渉と薬物耐性の改善法

Using case studies, Thomas presented the impact of assay conditions (incubation time and native/acid pretreatment), the nature of ADA positive controls and to a minor extent different bridging-immunoassay platforms (ELISA and ECLIA) on the analytical sensitivity, especially in the presence of residual drug (drug interference).

ケース1：ADAの薬物耐性の改善について（今回のDGの対象外）

分析条件（インキュベーション時間および 処理なし/酸性下での前処理）、ADA陽性対照の性質、および少しずつ異なるブリッジングイムノアッセイプラットフォーム（ELISAおよび ECLIA）が、特に残留薬物（薬物干渉）の存在下で分析感度に及ぼす影響を提示

各アッセイプラットフォームが、特に残留薬物の存在下で分析感度に及ぼす影響



e. ケーススタディ：薬物ターゲットの干渉と薬物耐性の改善法

In the second case study, Robert described how EC80 levels of target and IC80 levels of drug were used to define the experimental window in a cell-based assay to assess the neutralizing activity of ADA, and how the presence of even low levels of target and drug present in samples could confound the NAb assessment. Robert illustrated how a mild acidic treatment was employed to dissociate drug-ADA complexes and denature the soluble target; anti-idiotypic antibodies were then used to remove the mAb therapeutic and minimize the risk of false negative results. The method included a size exclusion buffer exchange step to remove sample and buffer components, which were incompatible with the cell-based assay. In his talk, Thomas Emrich emphasized the need for a deep understanding not only of the characteristics of ADAs analytes themselves, but also of their interaction partners, the drug and its target.

ケース2：NAbの薬物耐性の改善について（今回のDGの対象）

ケース1で偽陰性&偽陽性を回避したのと同じ薬物

Case Study 2: nAb Assay Considerations

Cell-based nAb assay

- Most appropriate format based on mechanism of action
- Matrix interference

- ✓ 作用機序に基づく最も適切なフォーマット
- ✓ マトリックス干渉

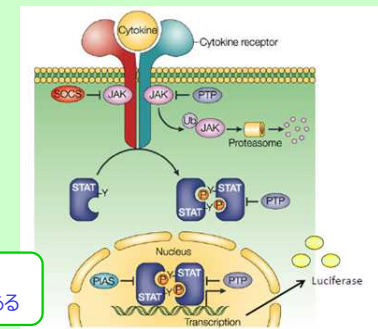
Drug interference

- May be complexed with nAb (false negative)
- May cause shift in cell-based assay parameters

Target interference

- May cause shift in cell-based assay parameters

- ✓ Nabと複合体を形成することがある(偽陰性)
- ✓ 細胞ベースのアッセイパラメーターのシフトを引き起こす可能性がある



IC80濃度の目標値およびEC80濃度を用いて実験ウィンドウを定義した方法

薬物-ADA複合体を解離させ、可溶性ターゲットを変性させるために穏やかな酸性処理を採用する。抗イデオタイプ抗体を用いて、Drugを除去し、偽陰性結果のリスクを最小限に抑える。
(検体および緩衝液成分を除去するためのサイズ排除緩衝液交換ステップが含まれ、除去した緩衝液成分は細胞ベースのアッセイに影響がない)

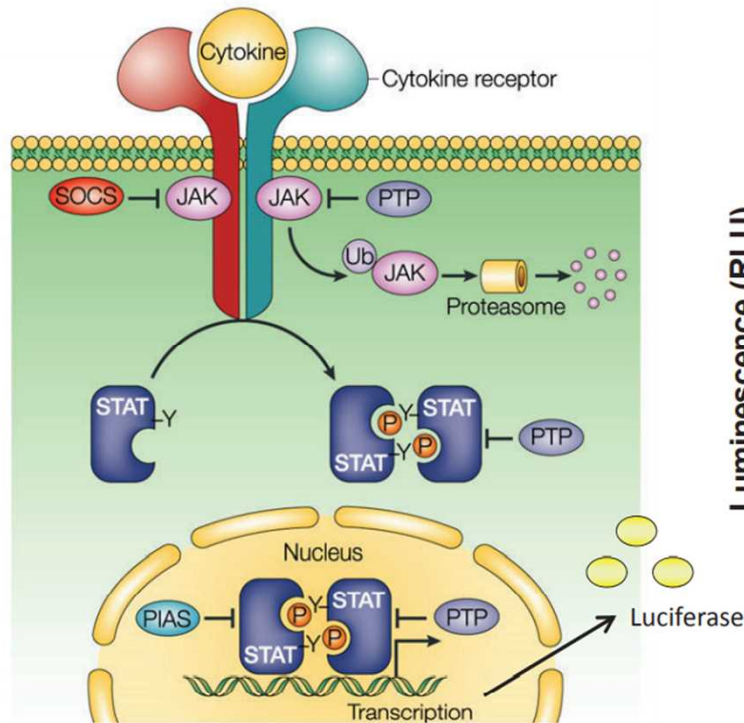
ADAs分析対象物質自身の特性だけでなく、それらの相互作用パートナー、薬物およびそのターゲットの深い理解が必要である。

(次ページに実験内容詳細記載)

e. ケーススタディ：薬物ターゲットの干渉と薬物耐性の改善法

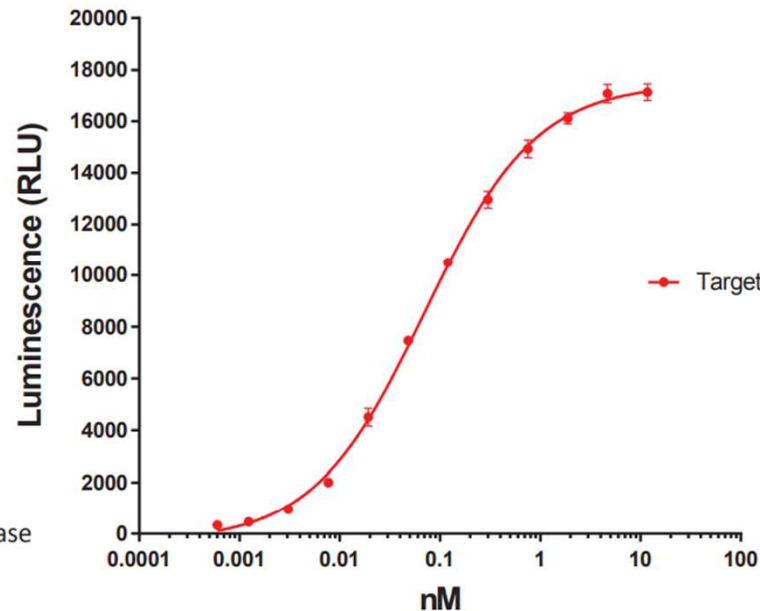
IC80濃度の目標値およびEC80濃度を用いて実験ウインドウを定義した方法

Cell-based nAb assay



Adapted from Shuai & Liu, Nature Reviews Immunology 3, 900-911 (2003)

Concentration-Response Curve

EC₅₀: Approx. 0.1 nM (3.3 ng/mL)

<図の状況>

Target : サイトカイン

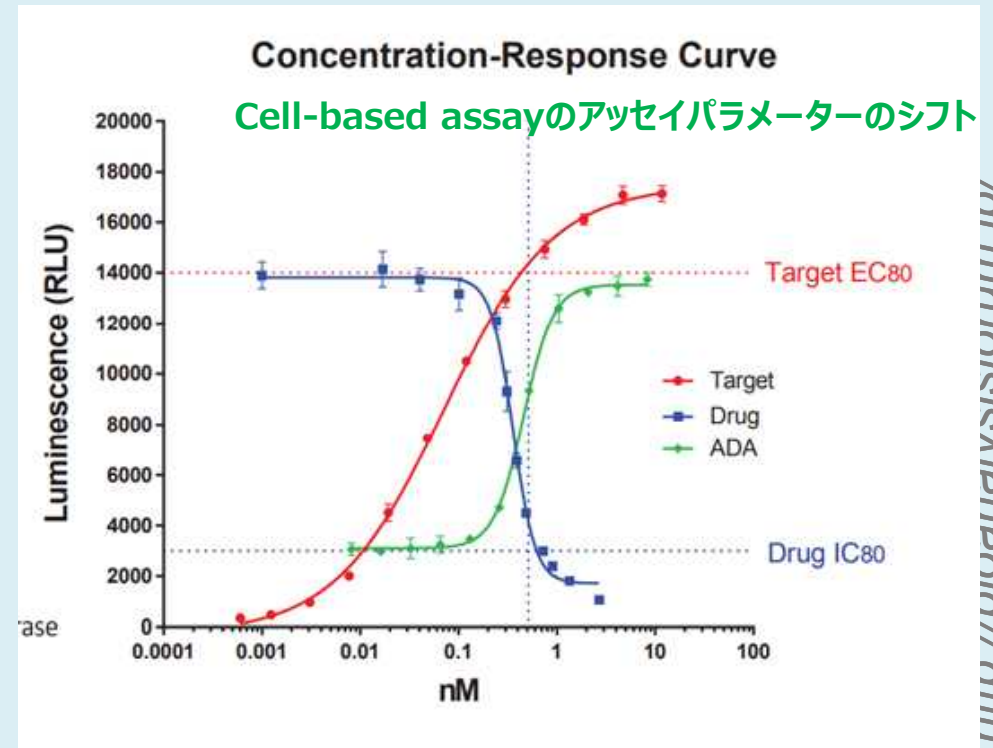
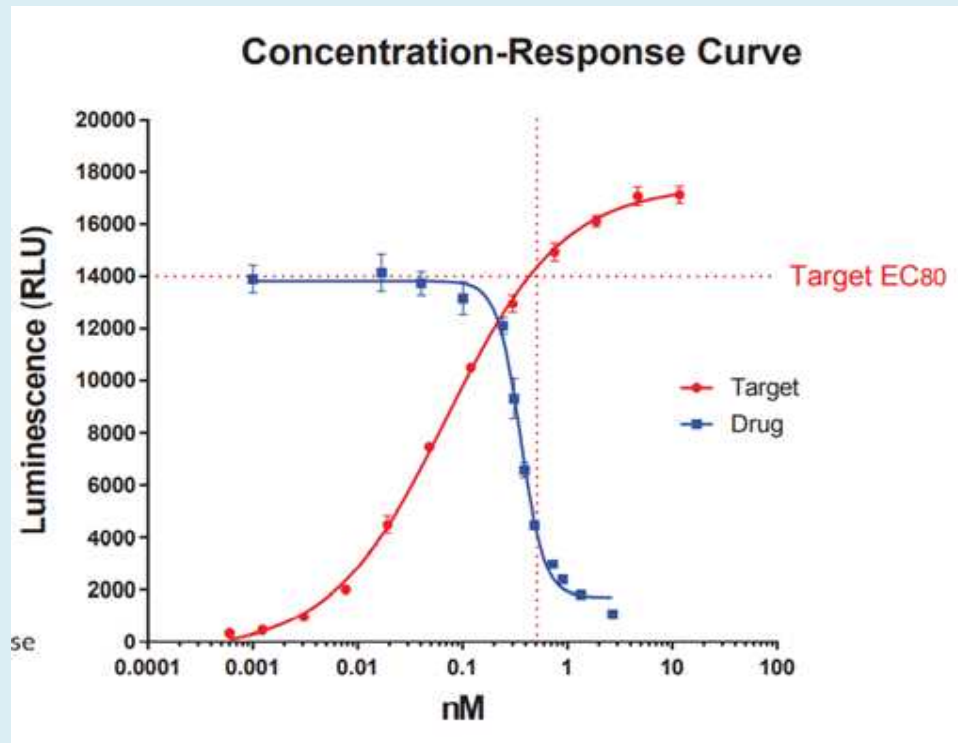
Drug : サイトカインに対する抗体

細胞はサイトカインの受容体を発現していて、リン酸化STAT結合配列をプロモーター領域に組み込んだルシフェラーゼ遺伝子が導入されている。

まず、細胞にサイトカインを曝露するとシグナル経路が活性化され発光量が上がっていく。

e. ケーススタディ：薬物ターゲットの干渉と薬物耐性の改善法

IC80濃度の目標値およびEC80濃度を用いて実験ウィンドウを定義した方法



Target EC_{80} の濃度を採用すると、サンプルからのサイトカインの混入による影響を最小限にできる。次に、サイトカインの濃度を EC_{80} に固定しサイトカインに対する抗体の濃度を上げていくと、シグナル経路が抑制され、**発光量が下がっていく**。

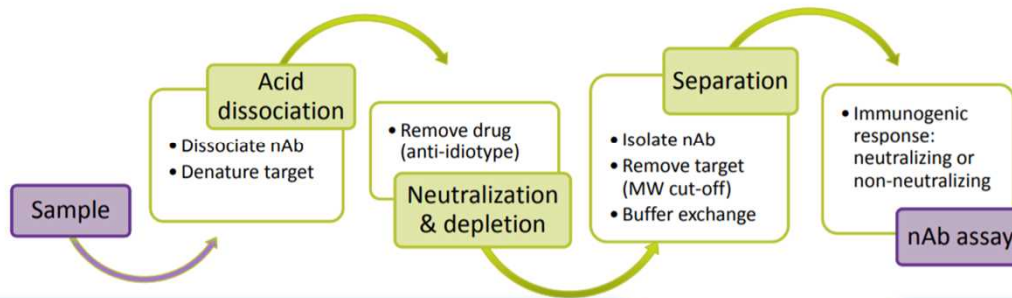
サイトカインとそれに対する抗体の濃度をそれぞれ EC_{80} と IC_{80} に固定しADAの濃度を上げていくと、シグナル経路が活性化され、**発光量が上がっていく**。

結論：サンプルに含まれるTargetやDrugの濃度によって、NAb評価を混乱させる場合があるため、最適化する必要がある。ADAの相互パートナーであるDrugやそのTargetについても深く理解する必要がある。



e. ケーススタディ：薬物ターゲットの干渉と薬物耐性の改善法

Drug and Target Depletion Protocol

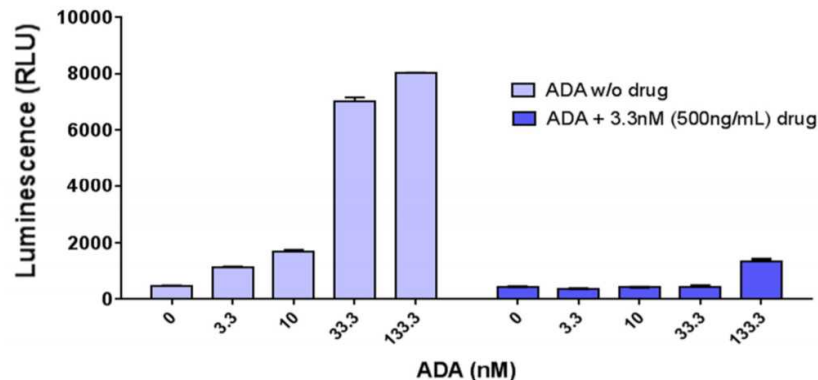


Cell ベースのアッセイで Drug Tolerance の例
3.3 nM (500ng/mL) の Drug で影響を受けている。

Drug and Target Depletion をしたら・・・
影響を受けにくくなった。

Without Drug and Target Depletion Protocol

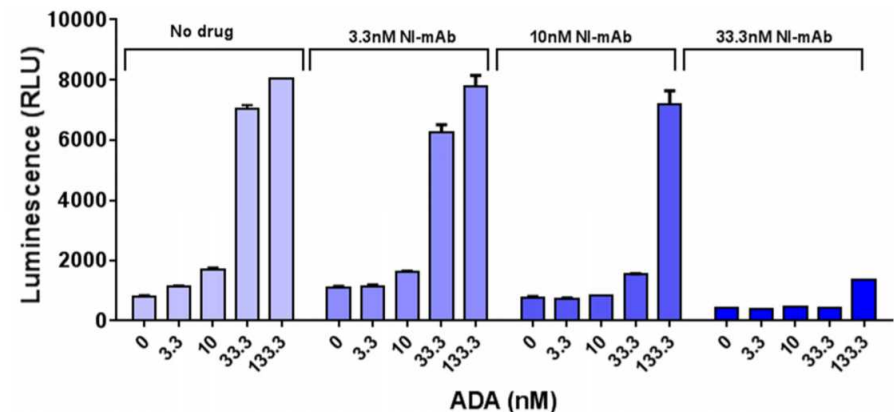
Low levels of drug interfere with nAb detection



3.3 nM = 500 ng/mL, 10 nM = 1500 ng/mL, 33.3 nM = 5,000 ng/mL, 133.3 nM = 20,000 ng/mL

With Drug and Target Depletion Protocol

Drug interference greatly reduced



3.3 nM = 500 ng/mL, 10 nM = 1500 ng/mL, 33.3 nM = 5,000 ng/mL, 133.3 nM = 20,000 ng/mL

<http://bioanalysisforum.jp/>

e. ケーススタディ：薬物ターゲットの干渉と薬物耐性の改善法

In another example, it was shown how even low abundant oligomeric soluble targets can mimic ADA responses in a classical bridging ADA assay (target interference) that may lead to false-positive interpretation of ADA testing results. Workarounds by using competitive anti-target antibodies or balanced reduction of sensitivity by sample dilution and benefit from increased drug tolerance/sensitivity due to complex dissociation were presented.

試料中に存在するターゲットおよび薬物の濃度が低くても
NAb評価を複雑にする場合がある

ADA解析のピットフォール
(落とし穴)

少量のオリゴマー可溶性ターゲットであっても、ADA検査結果の偽陽性解釈につながる可能性のある古典的なブリッジングADAアッセイ（ターゲット干渉）において、ADA応答を模倣できる方法がある。

競合的抗ターゲット抗体を用いることによる作業、または検体希釈による感度のバランスのとれた減少、および複雑な解離による薬物耐性／感受性の増加から得られるベネフィットが示された。

e. 免疫原性試験における薬物耐性と干渉の課題

In summary, careful characterization of ADA assays and understanding of the interacting proteins of ADAs under assay conditions is a prerequisite for sensitive and specific detection of ADAs. However, clinically meaningful investigation of immunogenicity is always an integrated analysis of ADA impact on exposure by measurement of pharmacological active drug, clinical safety and efficacy markers.

The session showed that there are a broad array of techniques and assays in the analytical toolbox to build sensitive ADA assays that address the challenges of drug tolerance and target interference. However, to do this the analytical scientist needs a deep understanding of the interacting proteins that are used to build both NAb and ADA assays.

It is only then that we can be certain of generating clinically meaningful immunogenicity assessment results. The panel discussion highlighted the challenges faced across the community with building assays that can meet all the requirements but identified ways forward. There was some caution noted on applying acid dissociation techniques to all assays, whether this was needed or not; acid dissociation can change immunogenic epitopes and should therefore only be applied in situations where there is a demonstrated need to increase drug tolerance. Changing the method equilibrium can sometimes be a more effective way of improving assay performance.

測定法の検討において必須なこと

NAbとADA、両方のアッセイを構築する上で使用される、相互作用タンパク質への深い理解

高感度、特異性の高い検出を実現するため

臨床的に意味のある免疫原性の検討

- 薬理活性をもつ薬物
 - 臨床的安全性および有効性マーカー
 - 曝露に対するADAの影響
- を常に統合的に解析すべき

必要条件をすべて満たすことも必要だが、
前に進めるために適切な方法を構築することも大切。

酸解離技術：適用するには、注意が必要

酸解離は免疫原性エピトープを変化させる可能性がある。

したがって、薬物耐性を高める必要性が実証されている状況でのみ適用すべきである。

f. NAb評価の代替法

The aim of the session was to discuss alternatives for detecting clinically relevant NABs using risk based assessment regarding varying modes of action (MoA) and complexity of biotherapeutics. In addition to evaluating the use of cell-based versus non-cell-based assays, there are ongoing discussions within the biopharmaceutical industry to replace NAb assays with ADA and PK/PD assays, which was highlighted by the first speaker Daniel Kramer (Sanofi). Jim McNally's (Merck Serono) presentation focused on the recent White Paper from the AAPS Working Group on NABs, which described when to select cell-based versus competitive ligand binding (CLBA) NAb assay formats.

Although there is a strong tendency within the biopharmaceutical industry to replace dedicated NAb assays with an integrated assessment of ADAs and PK/PD, regulatory agencies are rather hesitant and still request the standard three-tiered approach (including in vitro NAb assays). Daniel Kramer acknowledged that there are indeed instances in which NAb results do provide data that, but ADA and PK/PD alone, are not sufficient for risk management of patients. This is especially the case if the presence of NABs is associated with a high safety risk for patients (therapeutic proteins partially or fully identical to a nonredundant endogenous counterpart). However, in most other cases, dedicated in vitro NAb assays are not really needed to interpret immunogenicity data adequately. Retrospectively this can be seen for example with anti-TNF α mAbs for which the combination of ADA titers, PK and clinical end points were used successfully. Daniel Kramer emphasized that further discussion with authorities is urgently needed in order to gain a common understanding on this topic.

【前例】抗TNF α mAb

ADA力価、PKおよび臨床的エンドポイント
の組合せで現象を説明できた。

様々な作用機序(MoA)および生物学的製剤の複雑性に基づくリスク評価より臨床的に重要なNAbを検出するための代替法について議論する。

「細胞ベースのアッセイと非細胞ベースのアッセイの使用を評価」に加えて

NAbアッセイをADAおよびPK/PDアッセイに置き換えることの議論が進行中

専用のNAbアッセイを、ADAとPK/PDの統合的評価に置き換える強い傾向があるが、規制当局にはかなりためらいがあり、依然として標準的な3段階アプローチ (in vitro NAbアッセイを含む) を要求している。

実際にNAbの結果からは（患者のリスク管理に十分な）データが得られるが、ADAおよびPK/PDのみでは患者のリスク管理に十分ではないという例がある。特に、NABsの存在が患者に対する高い安全性リスク(内因性の重複していないカウンターパートと部分的または完全に同一のタンパク製剤) と関連している場合に当てはまる。

**しかし、多くの場合、
免疫原性データを適切に解釈するための
専用のin vitro NAbアッセイは本当に必要ではない。**

→ 規制当局とのさらなる議論が緊急に必要であると強調

f. NAb評価の代替法

To address the selection of NAb assay format, an AAPS Working Group published a White Paper in 2016 [10] that focused on using anMoA rationale for assay design. Jim McNally presented how the choice between cell-based and non-cell-based formats should be driven by a strong scientific rationale that assesses the neutralization of the biotherapeutic's function. Of secondary concern should be the typical parameters associated with development and validation of a bioanalytical assay: sensitivity, tolerance of matrix, drug tolerance and reproducibility. In practical terms, the assessment of potential assay formats should begin early in the development of a biotherapeutic. The need to generate reagents and identify viable cell lines can require long lead times and, therefore, should be initiated based on a robust immunogenicity risk assessment for the program. In addition, early and frequent consultation with the regulatory agencies can mitigate potential clinical holds and questions around the immunogenicity of the biotherapeutic.

In conclusion, only a minority of safety issues have been detected due to traditional NAb assay findings. Indeed, ADA and PK/PD assays could predict better NAb status in some cases. However, regulatory agencies may not (yet) consider ADA and PK/PD assays as replacements to dedicated NAb assays. In addition, the validation of PD assays can be challenging. Thus, retrospective and prospective analyses are needed to obtain a better understanding of the utility of these assays. In theory, a single PK assay for the determination of active drug may be enough for the determination of NAb status.

NAbアッセイフォーマット選択における薬物の作用機序を理論的根拠としたアッセイの構築に焦点を当てたホワイトペーパーを公表

(AAPS Working Group on Neutralizing Antibodies ; 2016年)

NAb Assayフォーマットの検討

タンパク製剤の開発の初期から開始されるべき

必要な試薬の作製と試験に使用できる細胞株の確認には長いリードタイムを要する可能性がある。
開発計画プログラムに対する頑健な免疫原性リスク評価に基づいて開始すべきである。

タンパク製剤の開発計画プログラム：
開発初期～第3相試験、申請までの臨床試験、どの試験でどのように安全性や有効性を確認するかという、開発計画プログラム

さらに、規制当局との早期かつ頻繁な相談により、生物学的製剤の免疫原性に関する潜在的な臨床上の懸念や疑問を緩和することができる。

NAb Assayフォーマットの選択

従来のNAbアッセイの知見：安全性の問題はごく少数しか検出されていない。理論的には、NAb産生の状態を把握するには、活性本体の薬物を捉えられる1種類のPK測定法で十分であるが、当局とのさらなる議論が必要である。

f. NAb評価の代替法

Further discussions with authorities are needed in order to gain common understanding in this topic. Additionally CLBAs can be used to replace cell-based NAb assays by utilizing a risk based approach evaluating the MoA and complexity of biotherapeutic treatment. For example, high risk of ADA incidence and low risk of ADA impact may favor CLBAs due to increased throughput and robustness compared with cell-based assays.

High risk of ADA impact may place greater emphasis on assay sensitivity in the presence of circulating drug, which may also favor CLBAs. Finally, implementation of the most suitable NAb assay format should always be based on scientific justification. It may be beneficial to develop both CLBA and cell-based Nab assays early during the drug-development process to collect data and gain understanding for the assay format selection.

NAb Assayフォーマットの選択（続き）

CLBAsが選択される場合

リスクベースのアプローチを利用することにより、CLBsは細胞ベースのNAbアッセイの代わりに使用することができる。

例1) ADA発現率の高リスクおよびADAによる影響の低リスク

細胞ベースのアッセイと比較して、処理能力および頑健性の増加によりCLBAに有利に働く可能性がある。

例2) 循環血中に薬物が存在する場合

ADAによる影響のリスクが高いことから、アッセイ感度に重点が置かれる可能性があり、CLBAsに有利に働く可能性もある。

最も適切なNAbアッセイフォーマットの実施：常に科学的正当性に基づくべき

データを収集し、アッセイ形式の選択のための理解を得るために、薬剤開発過程の初期にCLBAsと細胞に基づくNAbアッセイの両方を開発することは有益であろう。

g. ADA & NAbアッセイにおけるカットポイント設定

Statistical aspects of **cut-point setting in ADA and NAb assays** were covered by two speakers. The first presentation given by Simon Cowen (LGC) focused on the basic concepts, delineating different approaches described in the literature. These vary from classical unbiased estimators of the percentile in question to the use of robust methods and prediction or tolerance limits. **Particular emphasis was placed on the underlying statistical question each of these addresses, and the performance of several methods was compared.**

A particular discussion point was the recent draft FDA guidance on setting the cut-point, which seeks to control the FPR at the cost of a potentially biased estimate of the relevant percentile [11]. **This is a departure from previous guidance. The simulations presented [12] showed that the FPR of the cut-point proposed in the draft of the FDA guidance may yield 10% FPR on average for the screening assay, which is not congruent with the original intent of the earlier AAPS White Papers [11,13,14], which advocated an average 5% FPR.**

However the simulation presented in [12] were based on a sample size of approximately, $n = 50$. When considering the balanced design proposed in [11] that would yield a total of over $n = 300$ sample results (50 subjects times three independent runs by each of two analysts), the FPR of the cut-point presented in [12] should be much lower than 10% on average. Further evaluation using data from several ADA assays has shown the FPR to be approximately 6–7%.

ADAおよびNAbアッセイにおけるカットポイント設定の統計学的側面

1) 基本的考え方に焦点を当て、 文献に記載された異なるアプローチを描写

カットポイントの設定法の更新 (EBF Focus Workshopでの特別な議論点)

FDAガイダンス案 (2016) と AAPS発信のWhite paper (2008) との比較

FDAガイダンス案 (関連するパーセンタイルの潜在的に偏った推定値に代えてFPR (偽陽性率) を制御する方法) でシミュレーションすると
提案されたカットポイントのFPRは、スクリーニングアッセイに対して平均して10% FPRをもたらす可能性がある

平均5% FPRを提唱
(発信当初の意図)

← 一致しなくなった

詳細別途後述記載 (p.49)

提示されたシミュレーションは、約 $n=50$ の被験者数に基づいていた。 $n=300$ 個を超える標本結果 (2人の分析者のそれぞれが3回の独立したランの50被験者) を生成するバランスの取れたデザインを検討する場合、表示されるカットポイントのFPRは平均10%よりもはるかに低くなる。

いくつかのADAアッセイのデータを用いたさらなる評価により、FPRは約6~7%であることが示されている。

g. ADA & NAbアッセイにおけるカットポイント設定

The second speaker, Viswanath Devanarayan (Abbvie), provided a comprehensive practical guide to setting the cut-point that adheres to the requirements laid out previously, which is also straightforward to implement despite the potential complexity of the task. The outlier evaluation process can be tackled using statistical modelling where statistician support is available, or by the simplified approach described here.

Of particular practical importance is the suitability of a prestudy cut-point determined during validation for use during in-study implementation, as the former is an estimate based on a sample with an associated uncertainty. This was investigated by simulation using the Shankar et al. design [11], and it was found that in 95% of the cases the FPR varied between 2 and 11%. It was recommended that if the in-study baseline samples yielded an FPR outside these limits, a statistical comparison of the means and variances between the prestudy validation data and the in-study predose baseline data should be made to further understand the differences, and a new in-study cut-point should be established.

Additional questions, such as the evaluation of the suitability of negative quality control as a normalization factor for floating cut-point calculations, when and how to use titration cut-points, objective statistical criteria for comparing titer results between samples and criteria for determining treatment-boosted ADA were also discussed.

2) 先に述べた要件を遵守したカットポイントを設定するための

包括的な実践的ガイドを提供

外れ値の評価プロセス

統計モデリングあるいは、簡略化されたアプローチによって取り組むことが可能。実践上特に重要なのは、試験実施中に使用するためにバリデーション中に決定された試験前のカットポイントの適合性であり、それは関連する不確実性を伴うサンプルに基づく推定値である。

シミュレーションにより検討

95%の症例でFPRが2～11%の間で変動していた。試験中のベースライン・検体でこれらの限界値から外れたFPRが得られた場合には、その差をさらに理解するために、試験前のバリデーションデータと試験中の投与前のベースラインデータとの平均値および分散の統計学的比較を行い、新たな試験中のカットポイントを設定することが推奨される。

詳細別途後述記載 (p.47)

g. ADA & NAbアッセイにおけるカットポイント設定

The session then moved onto two speakers who presented some of the everyday challenges related to cut-point setting. Timo Piironen (Syrinx Bioanalytics) emphasized that to date Shankar et al. [11] has been the only White Paper to provide specific instructions for the validation of immunogenicity assays. This has become a standard approach within the industry and the recent EMA and FDA guidelines follow the same principles. However, the recommendations may be suitable for some assay formats and problematic for others. Very sensitive assays (at or below ng/ml range) with a biological background signal close to the instrument background/noise and low variability often do not pass the statistical tests and recommendations of the article.

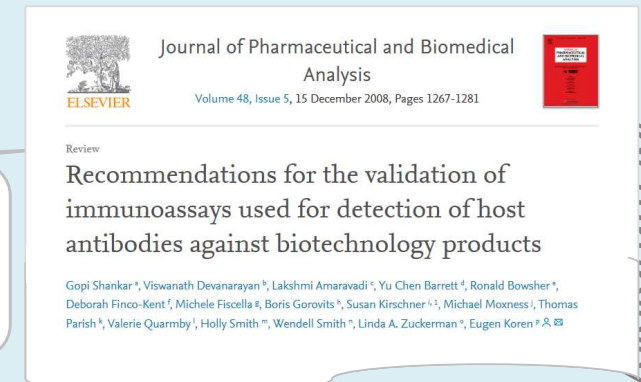
Therefore, robust alternatives for cut-point calculation may be needed. Additionally, sensitivity and selection of the low positive control (LPC) level is often set at an inappropriately low level. For the run control acceptance, the determination of lower limits for positive controls should be adequate, higher limits are not necessary. Furthermore, drug tolerance testing is not meaningful for the LPC sample. This should be performed using a threefold higher level than LPC. For confirmatory assays it may not be possible to inhibit the LPC below the confirmation assay cut-point as the signal has already reached the instrument background level. Thus, the percent inhibition limit should not be applied for the LPC.

カットポイント設定に関連する日常的課題

Validationに関する具体的な指示を提供する唯一のWhite Paper (2008当時)

業界内の標準的なアプローチ：
EMAおよびFDAのガイドラインも同じ原則に従う。

しかし、推奨されている事項は、ある種のAssay法にのみ特化しており、特に、バックグラウンドが低く非常に感度の高い測定法には適していない。



カットポイント算出のための強固な代替案が必要となる可能性がある。

感度および低陽性対照 (LPC) レベルの選択
試験の合否判定にあたっては、陽性対照の下限値の設定が適切である必要がある
Drug tolerance limit (DTL)検査はLPC検体にとって意味がない。
LPCの3倍のレベルを用いて行うべき。
確認アッセイでは、信号が機器バックグラウンドレベルにすでに到達しているため、
確認アッセイのカットポイント以下でLPCを阻害することができない場合がある。

したがって、LPCについては%阻害限界を適用すべきではない。

g. ADA & NAbアッセイにおけるカットポイント設定

During immunogenicity assay validation, especially for human therapeutic antibodies, samples with pre-existing antibodies are usually removed as biological outliers from cut-point analysis. However, with the development of new antibody constructs, for example, nanobodies or single chain fragments there is growing evidence for increased incidence of pre-existing antibodies. Denise Sickert (Novartis) emphasized that immunogenicity cutpoint determination is challenging when a high incidence of pre-existing antibodies is observed, for example, from 20 to up to 100% of treatment naive subjects. Currently, no standard cut-point evaluation procedure exists for such cases.

Therefore, an appropriate assay strategy needs to be established which: distinguishes pre-existing antibodies from false-positive results due to other interfering factors (e.g., multimeric drug target); avoids generation of an inappropriately high cut-point; and reduces the risk of false-negative results.

In Denise's presentation three case studies were discussed: usage of immunoglobulin depleted naive sera for cut-point evaluation; immunogenicity sample measurement directly in a confirmatory assay; and selection of pre-existing antibody negative samples assuming a mixed distribution model for cut-point evaluation. **Finally it was concluded that the incidence of pre-existing antibodies should be reported along with treatment-induced and treatment-boostered ADA responses. Additionally the impact of pre-existing antibodies on immunogenicity (such as higher immunogenicity incidence in subjects with pre-existing antibodies vs those without) combined with PK, PD, safety and efficiency should be evaluated.**

カットポイント解析（ヒト治療用抗体）

バリデーション試験 既存の抗体：生物学的外れ値として除去される。

しかし、新しいコンストラクト（例：ナノボディまたは単鎖フラグメントの開発など）に伴い、既存の抗体の発生率が増加するエビデンスが増えている。

既存の抗体の発現率が高い場合

既存の抗体（投与前検体中の抗体）がある場合のカットポイント評価手順はない

治療歴のない被験者の20~100%に達するまで、免疫原性のカットポイント決定は困難。

適切なアッセイ戦略を確立する必要がある

- ✓ 既存の抗体を他の妨害因子（多量体薬物標的等）による偽陽性結果から区別する
- ✓ 不適切に高いカットポイントの生成を回避する
- ✓ 偽陰性結果のリスクを低下させる。 など

投与前検体中の抗体の発現率（当局への報告必須）

既存の抗体の発現率について

- ✓ 「投与により誘導されるADA反応」や「投与により増強されるADA反応」とともに報告すべき。
- ✓ PK、PD、安全性及び有効性と相まって、既存の抗体が免疫原性に及ぼす影響（既存の抗体を有する被験者の方が有さない被験者よりも免疫原性の発現割合が高いなど）も評価すべき。

g. ADA & NAbアッセイにおけるカットポイント設定

The session wrapped up with a panel discussion that covered a number of topics related to setting of cut-points and practicalities of performing assays.

Of the three types of cut-point that can be calculated following the Shankar et al. design [11]: fixed, floating and dynamic, there was general consensus that a floating cut-point was most desirable for screening assays, and that this method could even be applied in cases where a fixed cut-point was indicated, providing additional reassurance in case of small changes in assay performance during the in-study phase. The use of a dynamic cut-point was strongly discouraged, and was seen as a red flag prompting questions about the robustness of the assay itself.

Discussing the FPR of the screening assay, it was not foreseen that a statistical method yielding a 10% FPR [12] at the validation stage would provide any practical benefit. **Calculation of an FPR at the 5% level in validation would be expected to yield an in-study FPR of 2–11%.** If the in-study baseline samples yielded an FPR outside these limits, this would be a trigger to evaluate an in-study cut-point.

In populations with a relatively high incidence of pre-existing ADA, likely no standard approach is possible. Strategies may include immunoglobulin-depleted drug naive sera for cut-point setting, analysis of all samples in the confirmatory assay using subject specific cut-points, as well as application of titers in determining subject status, although the latter may be difficult in cases of high titers of pre-existing antibodies. Regulators acknowledge these difficulties and advise to interact with them early on a case-by-case basis.

On the practicalities of performing assays it was noted that three duplicate negative control samples are most often used, spread across the immunoassay plate. Inclusion of a mid-positive control was considered beneficial by some regulators in evaluating the robustness of assay performance when reviewing the validation package, but was not considered a requirement in sample analysis.

【パネルディスカッション】

「fixed」「floating」「dynamic」の3種類のカットオフポイント

- ✓ **Floating**カットポイント：スクリーニングアッセイで推奨（fixedカットポイントが適応とされた症例でも適用可能。試験段階中にアッセイ性能に変化量が生じた場合でも対応可能）
- ✓ **Dynamic**カットポイント：推奨しない（アッセイ自体の頑健性が不安視）

スクリーニングアッセイのFPR

バリデーション期で10% FPR をもたらす統計的手法がベネフィットをもたらすことは予想されない。バリデーションで5%レベルのFPRを算出すると試験中のFPRは2～11%になると予想される。試験中のベースライン・検体からこれらの限界値を外れたFPRが得られた場合、これは試験中のカットポイントを評価するためのトリガーとなるであろう。

詳細別途後述記載（p.47）

既存のADAの発現割合が高い集団

→ 標準的なアプローチは不可能である可能性が高い。

- 【戦略】
- カットオフポイント設定のための免疫グロブリン除去薬物ナイーブ血清
 - 被験者特異的カットオフポイントを用いた確認アッセイにおける全サンプルの分析
 - 被験者の状態を決定する際の力価の適用（既存の抗体の高力価の場合には困難）

規制当局はこれらの困難を認め、ケースバイケースで早期に協業するよう助言する。

h. クロージングパネルディスカッション&会議のアウトプット

The workshop closed with a final discussion where the summaries from each session were presented. There were five tangible outputs from the meeting:

A need for retrospective and prospective analysis to address whether alternative assay formats such as functional PK assays can be used to replace NAb assays. Such examples should be shared at conferences and via publications with an emphasis on whether immunogenicity safety signals would have been missed if alternative approaches were employed in the place of an NAb assay.

It is apparent that the industry has not standardized the methods for reporting drug tolerance and that the practical methods differ between laboratories. Additionally antibody titer can be calculated with or without the inclusion of the minimal required dilution; even when minimal required dilution is included in the titer calculation it may range from only the initial sample dilution or may include other sources of dilution such as acid dissociation and/or dilution when added to labelled reagents. Further discussion on this topic is warranted with the aim to standardize these parameters.

A consortium should be formed to share data and one suggestion was an interaction of the EBF with the European Immunogenicity Platform.

A focus workshop to discuss case studies where immunogenicity has adversely impacted PK.

The EBF to consider providing training on immunogenicity, maybe as a preworkshop activity.

5つの明白なアウトプット

- 1) **機能的PKアッセイのような別のアッセイ形式がNAbアッセイの代わりに使用できるかどうかを検討するためのレトロスペクティブおよびプロスペクティブ解析の必要性**
(NAb試験の代わりに別の方法を採用した場合には、免疫原性の安全性シグナルが見逃されたかどうか重点を置いて、学会や出版物で共有すべき)
- 2) **業界が薬物耐性の報告方法を標準化すべき**
(実際的な方法が臨床試験間で異なる)
- 3) **抗体力価：MRDを含む場合と含まない場合とで計算することができる。**
(MRDが力価計算に含まれる場合であっても、最初の試料希釈のみからの範囲であってもよいし、又は標識試薬に添加された場合に酸の解離及び/又は希釈のような他の希釈源を含むことがある。これらのパラメータを標準化するための議論が必要。)
- 4) **データを共有するためにコンソーシアムを形成すべき**
(EBFとヨーロッパ免疫原性プラットフォームとの相互作用。免疫原性がPKに悪影響を及ぼしたケーススタディを議論するフォーカスワークショップ)
- 5) **トレーニングの提供を検討：EBFは、おそらくワークショップ前の活動として、免疫原性に関するトレーニングの提供を検討する。**

i. 結論と今後の展望

Immunogenicity and appropriate strategies to confidently and accurately assess immune responses in both preclinical and clinical studies is a constantly evolving landscape. New draft guidance documents from both the EMA and FDA have been published and as a result have improved alignment across regulatory regions in some areas of immunogenicity assay development and validation but differences still exist. Harmonization through ICH would be of benefit but not a short-term reality. As further clinical examples are discovered and our understanding deepens, more emphasis on assay performance and characterization of the immune response is requested from regulators..

While patient safety is always of upmost concern, the context and relevance of these requests must come from the impact of a resultant clinical response, if indeed one is seen. This should be considered through the generation of a molecule specific risk assessment, preferably at an early stage of drug development. However, there should be a balance of fulfilling regulatory requirements as they appear in the guidance documents and applying sound scientific logic; simply following guidance to the letter will not guarantee a successful drug registration and conversely omitting certain parameters does not automatically mean rejection of the submission.

Continued presentation of case studies and discussion within the industry is required and the EBF aim to be an integral part of those activities. For more details please visit the conference website [15].

前臨床研究と臨床研究の両方において、免疫応答を確信を持って正確に評価するための免疫原性と適切な戦略は、絶えず発展している。EMAとFDAの両方からの新しいガイダンス文書案が発表され、その結果、免疫原性アッセイの開発とバリデーションの一部の分野で規制地域間が無くなるように改善されてきているが、相違点は依然として存在する。

ICHを通じた調和は有益であるが、短期的な実現はないであろう。さらなる臨床例が発見され、われわれの理解が深まるにつれて、アッセイの性能および免疫応答の特徴付けにさらに重点を置くことが規制当局から要請される。

患者の安全性は常に最も懸念されるものであるが、もし実際に反応が見られた場合、規制当局からの要請の背景と妥当性は、結果として生じる臨床反応の影響からもたらされる。

このことは、分子特異的なリスク評価を作成することを通して、できれば医薬品開発の初期段階で考慮すべきである。

しかし、ガイダンス文書に記載されている規制要件を満たすことと、科学的に信頼できる論理を適用することとの間にはバランスが必要である。単に文書としてのガイダンスに従うだけでは、医薬品登録の成功を保証することはできず、また、逆にある種のパラメータを省略しても、自動的に申請を拒絶することにはならない。

ケーススタディの継続的な発表と業界内での議論が必要であり、EBFはそれらの活動の不可欠な部分であることを目指している。詳細はカンファレンスホームページを確認。

European Bioanalysis Forum. Focus slides. <http://focus201609.europeanbioanalysisforum.eu/slides-2/>



**「*g.* ADA & NAbアッセイにおけるカ
ットポイント設定」の補足**

**スクリーニングアッセイにおける
カットポイント設定**

g. 補足 : スクリーニングアッセイにおけるカットポイント設定

Journal of Biopharmaceutical Statistics, 25: 269–279, 2015

ISSN: 1054-3406 print/1520-5711 online

DOI: 10.1080/10543406.2014.979196



Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

STATISTICAL EVALUATION OF SEVERAL METHODS FOR CUT-POINT DETERMINATION OF IMMUNOGENICITY SCREENING ASSAY

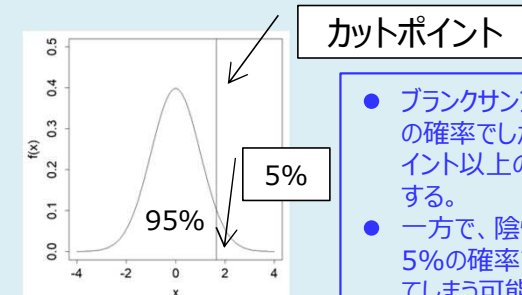
Meiyu Shen, Xiaoyu Dong, and Yi Tsong

Office of Biostatistics/Office of Translational Sciences, Center for Drug Evaluation and Research, U.S. Food and Drug Administration, Silver Spring, Maryland, USA

The cut point of the immunogenicity screening assay is the level of response of the immunogenicity screening assay at or above which a sample is defined to be positive and below which it is defined to be negative. The Food and Drug Administration Guidance for Industry on Assay Development for Immunogenicity Testing of Therapeutic recommends the cut point to be an upper 95 percentile of the negative control patients. In this article, we assume that the assay data are a random sample from a normal distribution. The sample normal percentile is a point estimate with a variability that decreases with the increase of sample size. Therefore, the sample percentile does not assure at least 5% false-positive rate (FPR) with a high confidence level (e.g., 90%) when the sample size is not sufficiently enough. With this concern, we propose to use a lower confidence limit for a percentile as the cut point instead. We have conducted an extensive literature review on the estimation of the statistical cut point and compare several selected methods for the immunogenicity screening assay cut-point determination in terms of bias, the coverage probability, and FPR. The selected methods evaluated for the immunogenicity screening assay cut-point determination are sample normal percentile, the exact lower confidence limit of a normal percentile (Chakraborti and Li, 2007) and the approximate lower confidence limit of a normal percentile. It is shown that the actual coverage probability for the lower confidence limit of a normal percentile using approximate normal method is much larger than the required confidence level with a small number of assays conducted in practice. We recommend using the exact lower confidence limit of a normal percentile for cut-point determination.

p.47
参照

FDAは、ブランクサンプル (negative control patients) 測定値の95パーセンタイルをスクリーニングアッセイのカットポイントに推奨している (下図)。



- ブランクサンプルにおいて、5%以下の確率でしか観察されない、カットポイント以上の測定値を、陽性と判断する。
- 一方で、陰性であるにもかかわらず、5%の確率で陽性と間違えて判断してしまう可能性を含む [5%偽陽性率 (FPR)]。

正規分布からランダムにサンプリングした測定値を仮定した場合、上記のカットポイントは、ばらつきを持った点推定値であり、サンプル数の増加に伴いそのばらつきは小さくなる。サンプル数が十分でない場合、点推定値の信頼度は低くなり、5%偽陽性率 (FPR) を保証できなくなる。

この点を考慮して、点推定値ではなく、パーセンタイルの下側信頼限界をカットポイントに用いることを提案する。

p.48
参照

本論文では、いくつかのスクリーニングアッセイのカットポイント設定方法を比較検討し、推奨方法を提示する。

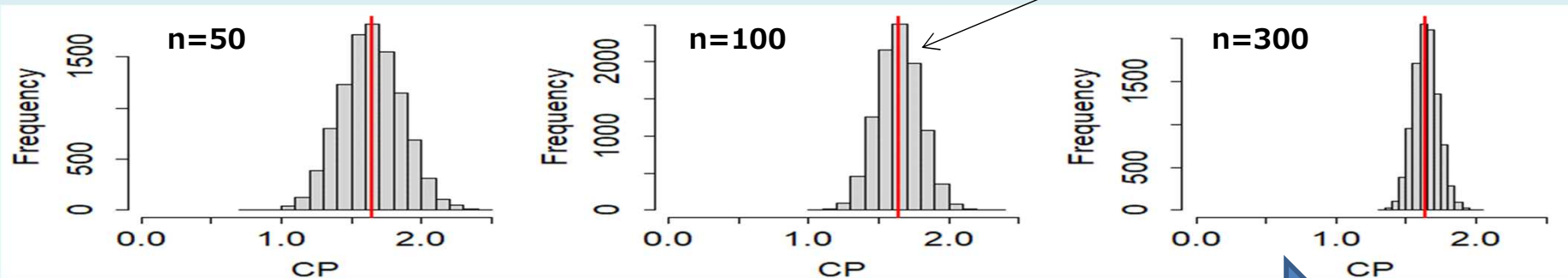
g. 補足 : スクリーニングアッセイにおけるカットポイント設定

Question

- カットポイントは、ばらつきを持った点推定値であり、サンプル数の増加に伴いそのばらつきは小さくなる、とは？ (スライド p.46の疑問)
- バリデーションで算出した5%偽陽性率を示すカットポイントは、試験中（検体測定）において、2～11%偽陽性率になる可能性がある、とは？ (スライド p.39、42の疑問)

- ① 母平均=0、母標準偏差=1の正規分布からランダムに値をサンプリングした。
- ② $n=50$ でサンプリングした値の平均値および標準偏差 (SD) を、母集団の母平均値および母標準偏差として、95パーセンタイル (=平均値 + 1.645 × SD) を算出し、これを推定カットポイントとした。
- ③ ②の操作を10000回繰り返し、算出した10000個の推定カットポイントのヒストグラムを作成した。
- ④ $n=100$ 、 $n=300$ でサンプリングした場合のヒストグラムと比較し、ばらつきの違いをみた。

赤線：母平均=0、母標準偏差=1の正規分布における、95パーセンタイル = 1.645



$n=50$ の場合、推定カットポイントの95%信頼区間（正規分布を仮定）は、1.211~2.056であった。これは、偽陽性率2.0% ~ 11.3%を示した。

サンプル数 (n) の増加に伴い推定カットポイントのばらつきは小さくなる

- この計算はShen (J Biopharm Stat; 2015) の、Method 1の方法に基づいています
- 標本サンプルから推定する95パーセンタイルの90%下側信頼限界の正確な値は、論文をご参照ください。

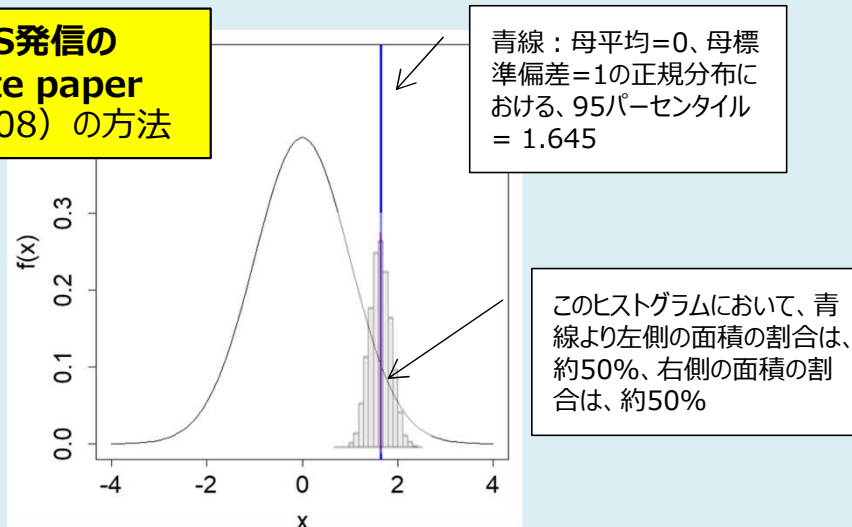
g. 補足 : スクリーニングアッセイにおけるカットポイント設定

Question

点推定値ではなく、パーセンタイルの下側信頼限界をカットポイントに用いることを提案する、とは？
(スライド p.46の疑問)

- 前スライドの、 $n=50$ でサンプリングを繰り返した時のカットポイントのヒストグラムを、母平均=0、母標準偏差=1の正規分布を重ねたもの。

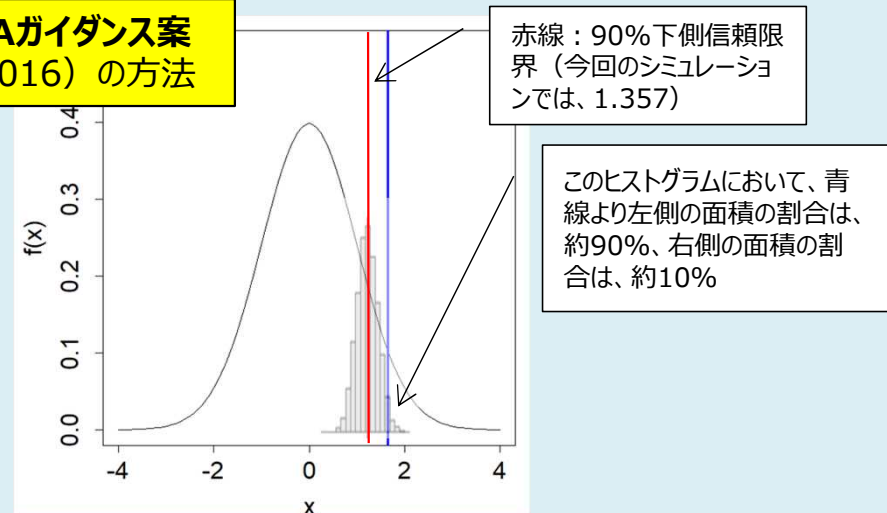
AAPS発信の White paper (2008) の方法



- 1回のサンプリングでは、カットポイントが上図のヒストグラムのどの位置に来るかわからない。カットポイントが青線よりも右側に位置すると、偽陽性率が5%以下になり、5%偽陽性率を保証できなくなる。その確率は約50%である。



FDAガイダンス案 (2016) の方法



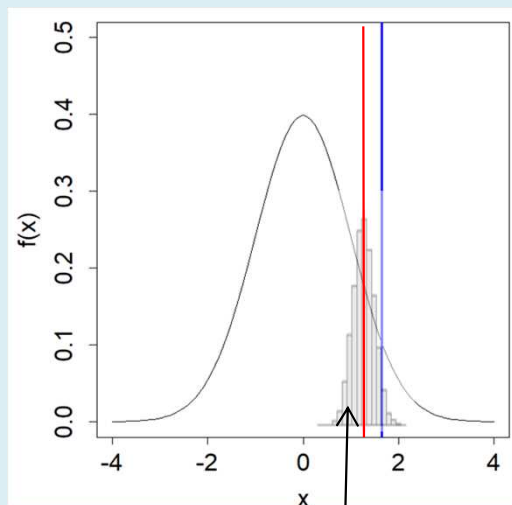
- そこで、ヒストグラムの面積の90%が、青線の左側に来るように、カットポイントを左側にずらして設定 (赤線) し、1回のサンプリングで、カットポイントが青線よりも右側に位置する確率を10%にする。これは、95パーセンタイルの片側90%信頼区間の下限値をカットポイントにする、ということ。偽陽性率が5%以下になる確率は、10%となり、5%偽陽性率を保証できる。

5%偽陽性率を保証するとは、実際の臨床検体測定時、5%以下の偽陽性率で、陽性サンプルを見落としてしまう確率を低く抑えること。

g. 補足 : スクリーニングアッセイにおけるカットポイント設定

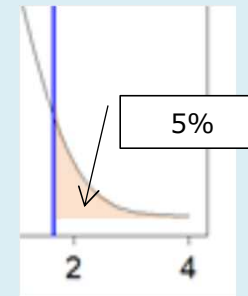
Question

FDAが提唱するスクリーニングアッセイにおけるカットポイントは、10%偽陽性率か、5%偽陽性率か？
(スライドp.38の疑問)



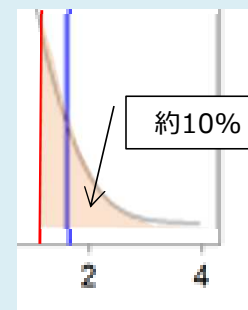
このヒストグラムにおいて、青線より左側の面積の割合は、約90%、右側の面積の割合は、約10%
⇒ 赤線は、青線に対する、片側90%信頼区間の下限値

**AAPS発信の
White paper
(2008) のカ
ットポイント：青線**



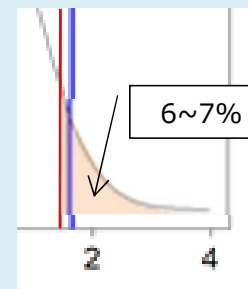
- n=50でサンプリングを繰り返した時のカットポイントの平均値（青線）は、5%偽陽性率に近づく

**FDAガイダンス案
(2016) のカ
ットポイント
(n=50)：赤線**



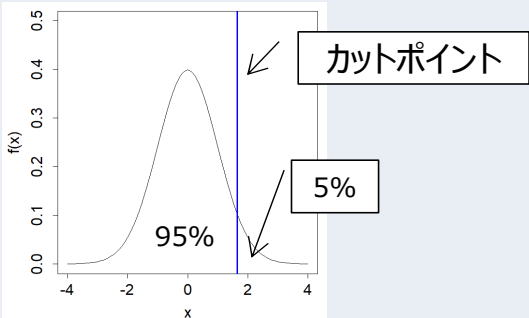
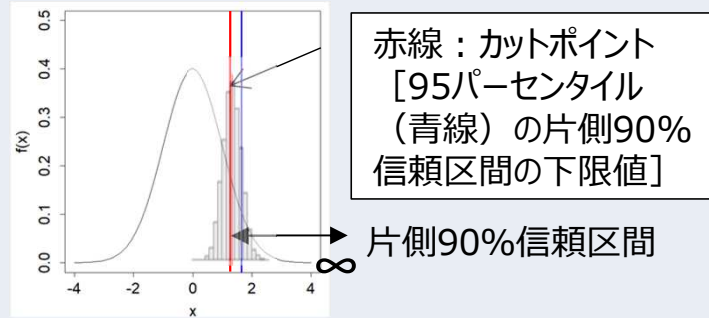
- ヒストグラムの面積の90%が、青線の左側に来るように、カットポイントを左側にずらして設定（赤線）した場合、n=50でサンプリングを繰り返した時のカットポイントの平均値（赤線）は、約10%偽陽性率に近づく

**FDAガイダンス案
(2016) のカ
ットポイント
(n=300)：赤線**



- n数を増やせば、カットポイントの平均値（赤線）は5%に近づく。n=300でサンプリングを繰り返した時のカットポイントの平均値（赤線）は、6~7%偽陽性率に近づく

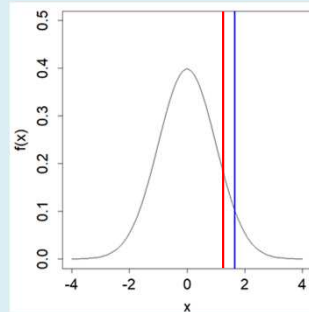
g. 補足 : スクリーニングアッセイにおけるカットポイント設定

		Shankar (J. Pharm. Biomed. Anal; 2008)	Shen (J Biopharm Stat; 2015)
Cut-point 設定方法		点推定値 [AAPS発信のWhite paper (2008) の方法]	信頼区間の下限値 [FDAガイダンス案 (2016) の方法]
課題点 (Shankar) と 解決方法 (Shen)		95パーセントイルの点推定値をカットポイントにすると、約50%の確率で、5%以下の偽陽性率を示すカットポイントに設定される	左記の課題に対し、95パーセントイルの下側信頼限界をカットポイントに設定すれば、5%以下の偽陽性率を示すカットポイントに設定される確率をより低く抑えることができる
具体例	データ分布	正規性あり	正規性あり
	n数	n=50	n=50
	計算式	カットポイント = 平均値 + 1.645 × 標準偏差 (SD) (下図青線)	95パーセントイルの点推定値の片側90%信頼区間の下限値をカットポイントとする (下図赤線) $\hat{\theta}_3 = \hat{\theta}_p - b\sqrt{\text{var}(\hat{\theta}_p)} = \bar{X} + CZ_p S - b \times \frac{S}{\sqrt{n}} \sqrt{1 + nZ_p^2(C^2 - 1)}$ $C = \sqrt{\frac{n-1}{2}} \Gamma\left(\frac{n-1}{2}\right) / \Gamma\left(\frac{n}{2}\right)$ 計算式の詳細は論文をご参照ください
	Cut-point のイメージ		

g. 補足 : スクリーニングアッセイにおけるカットポイント設定

Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products — Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection

Guidance for Industry



FDAガイダンスは、スクリーニングアッセイの場合、カットポイントを左図の青線（95パーセンタイル）ではなく、赤線【95パーセントタイル（青線）の片側90%信頼区間の下限値】にしようと言っている。

VI. ASSAY VALIDATION

B. Validation of Screening Assay

2. Cut-Point of Screening Assay

One approach that allows for high assurance of a 5% false-positive rate is to apply a 90% one-sided lower confidence interval for the 95th percentile of the negative control population (Shen et al. 2015). This will assure at least a 5% false-positive rate with a 90% confidence level. This approach improves the probability of the assay identifying all subjects who may develop antibodies.

When using the approach published by Shen et al., the reportable value for each sample should be the average of the six measurements. The statistical method used to determine the cut-point should be based on the statistical distribution of the data. For example, the 95th percentile of the normal distribution is estimated by the mean plus 1.645 standard deviation. Other approaches may be used for estimating 95th percentile, including the use of median and median absolute deviation value instead of mean and standard deviation.

C. Validation of Confirmatory Assay

One approach for the estimation of the confirmatory assay cut-point is to use an 80% to 90% one-sided lower confidence interval for the 99th percentile. Because the purpose of this assay is to eliminate false-positive samples arising as a result of non-specific binding, it is adequate to use a 1% false-positive rate for the calculation of the confirmatory cut-point.

FDAガイダンスでの記載内容

スクリーニングアッセイのカットポイントは、95パーセンタイルの点推定値の片側90%信頼区間の下限値とする。これは、少なくとも、90%の信頼度で、5%偽陽性率を保証している。

正規分布における95パーセンタイルは、平均値 + 1.645 × 標準偏差 (SD) で推定される。

確認試験のカットポイントは、99パーセンタイルの点推定値の片側80~90%信頼区間の下限値とする。

他、タイトレーションアッセイ、中和抗体アッセイのカットポイントに関する記載では、特に信頼区間について、言及していない。



申請資料調査

<http://bioanalysisforum.jp/>

申請資料調査

調査対象：PMDA申請資料概要

薬物：バイオ医薬品

期間：2015－2020年 に承認

- ✓ 承認年
- ✓ モダリティ
- ✓ 作用機序
- ✓ 中和抗体の測定法
(Cell-based assay、Ligand binding assay 等)
- ✓ カットポイント
- ✓ 感度
- ✓ Drug Tolerance Limit

各項目について調査。

作用機序によるNAb測定法の分類

調査対象：PMDA申請資料概要

薬物：バイオ医薬品

期間：2015-2020年に承認

53品目

活性測定：酵素活性測定、血液凝固因子の活性測定等

LBA：Ligand Binding assay

CBA：Cell-based assay

モダリティ	作用 (MOA)	合計	NAbの測定法				
			活性測定	LBA	CBA	記載無し	
酵素	補充療法(酵素)	6	3.5	0	1.5	1	
血液凝固関連系因子	補充療法(酵素以外)	10	6	0	0	4	
ホルモン	アゴニスト	3	0	0	2	1	
ワクチン	ワクチン	1	0	0.5	0.5	0	
抗体	アンタゴニスト (細胞受容体)	32	8	0	6.5	1.5	0
	アンタゴニスト (液性因子)		16	0	11	2	3
	細胞障害活性		5	0	1	3	1
	細胞障害活性 (ADC)		2	0	0	1	1
	補充療法(酵素以外)		1	0	0	0	1
融合タンパク質	アンタゴニスト (リガンド)	1	0	1	0	0	
		53	9.5	20	11.5	12	

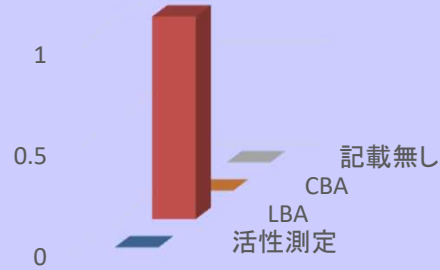
開発途中で測定法が変更になった薬物は、それぞれ0.5でカウントした



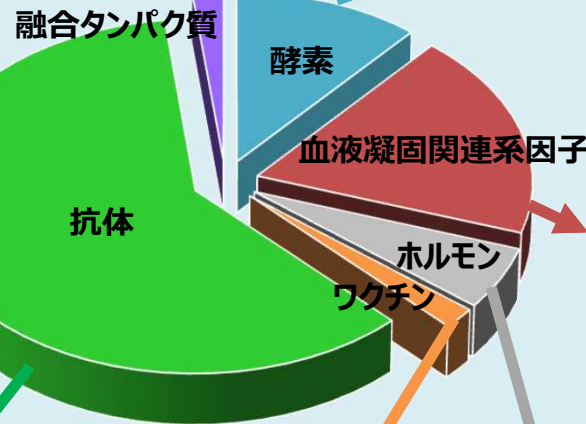
作用機序によるNAb測定法の分類

- 酵素
- 血液凝固関連因子
- ホルモン
- ワクチン
- 抗体
- 融合タンパク質

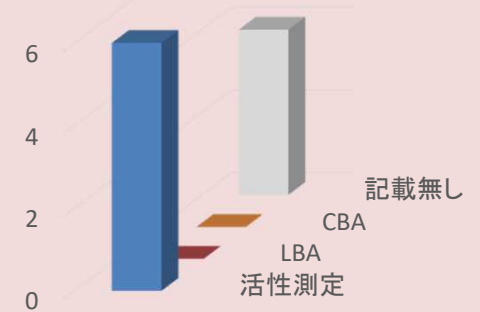
【融合タンパク質】



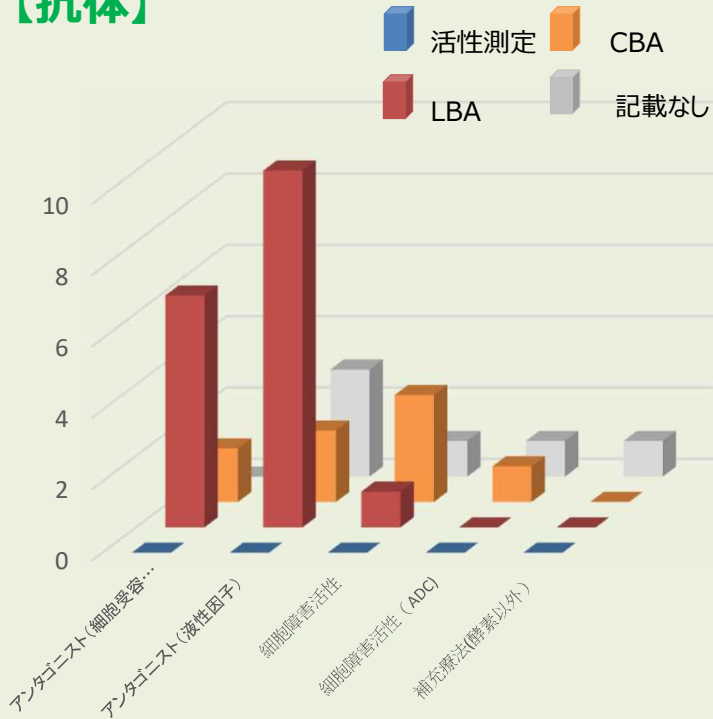
【酵素】



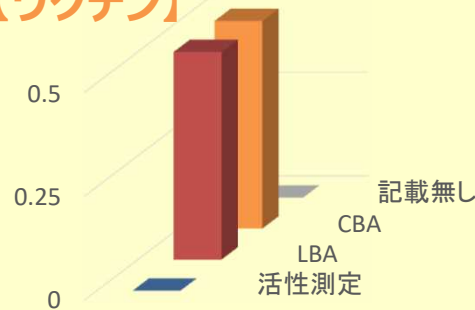
【血液凝固関連因子】



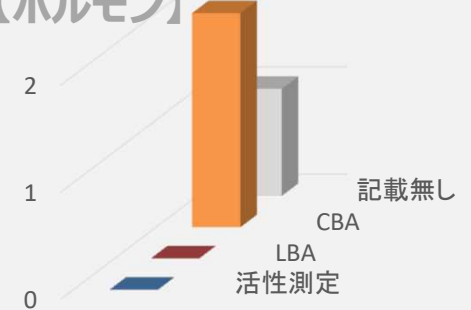
【抗体】



【ワクチン】

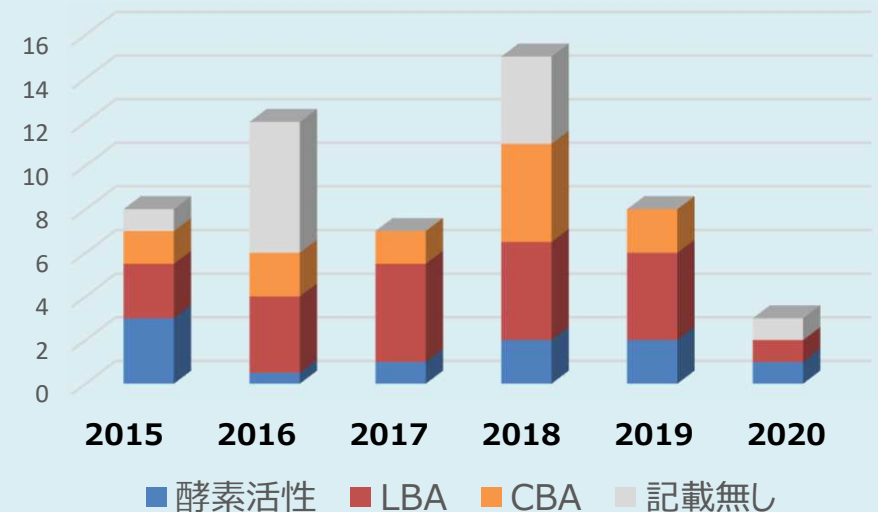


【ホルモン】



年代別によるNAb測定法の分類

承認年度	NAbの測定法			
	酵素活性	LBA	CBA	記載無し
2015	3	2.5	1.5	1
2016	0.5	3.5	2	6
2017	1	4.5	1.5	0
2018	2	4.5	4.5	4
2019	2	4	2	0
2020	1	1	0	1
合計	9.5	20	11.5	12



<http://bioanalysisforum.jp/>

✓ 作用機序による分類

測定法の傾向

補充療法（酵素、血液凝固関連因子）
→ 酵素活性測定が主流

抗体 → LBAが主流

✓ 年代別による分類

測定法の傾向

大きな傾向は確認されなかった。

DGコメント





*Cell-based assay*における アッセイパフォーマンス

<http://bioanalysisforum.jp/>

- 一般的には *Ligand binding assay* よりも低いと考えられる。
- *Cell-based assay* のパフォーマンスがなぜ低いか？ については、明確に明らかにはされていないため、まずはメンバー間でブレインストーミングし、潜在的な課題がどこにあるのかを見極めた上で解決策を議論した（以降、スライドに記述）。

- ①細胞増殖因子などのマトリックスの影響の排除
(細胞死を見る場合)
- ②細胞の品質の担保 (例: 細胞の抗原発現量が安定しない、
継代に伴う生細胞数の減少や活性の低下、コンタミ防止など)
- ③活性の指標 (サイトカイン産生量など) が薬物添加により急峻
に増加又は低下する
- ④感度が低い
- ⑤ばらつきが大きい

Q.細胞増殖因子などのマトリックスの影響をどう排除するか？

A.マトリクス由来であれば、**SPEAD法**や**BEAD法**などで除去可能である。

Q.細胞の抗原発現量が安定しないとき、どうするか？

A.一過性発現細胞ではなく、**安定発現細胞**を用いる。

Q.継代に伴い活性を持つ細胞の数が減るとき、どうすべきか？

A. **Cell line**の場合、活性の指標が大きく変化してくる継代数を目安とすることが考えられる。また、**Cell viability**を目安とすることができる。

Q.細胞のコンタミ防止の観点から、どのように保管すべきか？

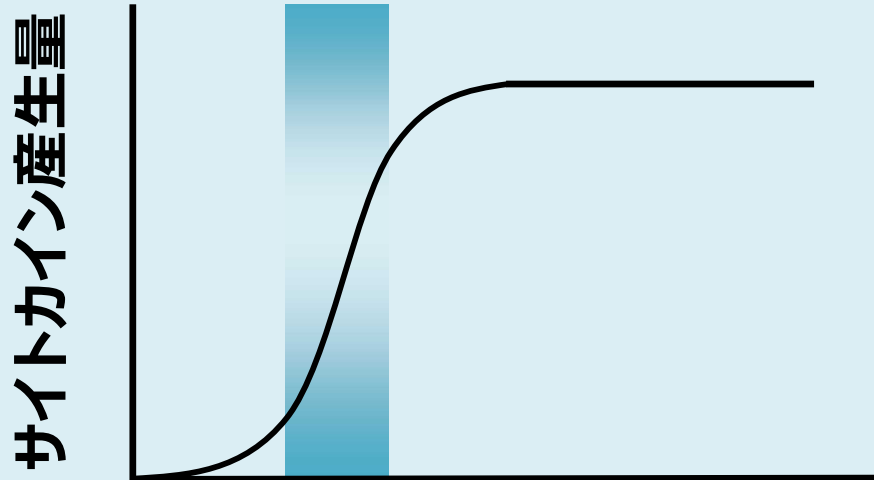
A. 保管方法はもとより、**メディウム調製時にコンタミチェックすべき**（ディッシュに取って数日間インキュベータで静置）。また、元になる細胞については、**液体窒素下で保管することでコンタミを抑止できる**。

DGとしての回答

Q. 活性の指標（サイトカイン産生量など）が薬物添加により急峻に増加することへの対応としては？

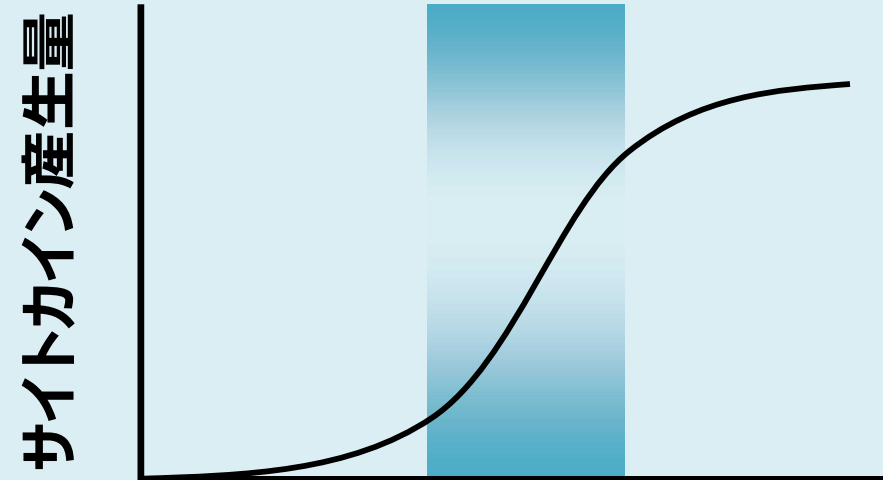
A. 細胞のロットや種類を変更することで対応可能な場合がある。また、共培養系の場合は相互の細胞数の割合を最適化することで対応可能な場合がある。
（細胞AとBの比較を以下に例示）

細胞A



薬物濃度

細胞B



薬物濃度

Q.感度を向上させるためにできることは？

A.細胞の種類や検出法、細胞Lot選択、培養条件の最適化（培地組成、細胞密度、培養時間など）を検討すべきである。また、本質はともかくポジコンを変更することも問題解決手法の一案である。

Q.ばらつきを抑制するためにできることは？

A.可能な限り培養条件を揃えて均質な実験系にする。また、原因がマトリックス由来のものであれば、*SPEAD*法や*BEAD*法などで除去可能であるので、酸処理法を検討すべきである。

 JBF まとめ

- 中和抗体分析に関するいくつかの文献等を参照し、バイオ医薬品の薬効機序に着目してどのようなアッセイフォーマットが用いられているか調査した。薬効機序、アッセイパフォーマンス、免疫原性のリスクを考慮し、アッセイフォーマットを選択すべきであった。選択における重要な点をまとめた。
- 薬物耐性の改善、カットポイント設定に関する文献等を紹介した。
- 近年のバイオ医薬品53品目の申請資料から、中和抗体分析で選択されたアッセイフォーマットをまとめた。補充療法（酵素、血液凝固関連因子）では酵素活性測定が、抗体ではLBAが主に用いられていた。
- Cell-based assayのアッセイパフォーマンス向上のための対策を議論し、DGの回答を紹介した。



Summary

- ❑ We investigated what assay format was used by focusing on the mechanism of action (MoA) of biotherapeutics with reference to several literatures on NAb assay. An assay format should be selected by considering MoA, assay performance and risk based assessment. Critical points on the selection of assay format were summarized.
- ❑ The literatures on drug tolerance improvement and cut point setting were introduced.
- ❑ The assay format selected for NAb assay based on the recent application of 53 biotherapeutics was summarized. Enzyme bioactivity assay was mainly used for replacement therapy (Enzymes and blood coagulation-related factors). LBA was mainly used for antibodies.
- ❑ We discussed measures to improve the assay performance of cell-based assay and introduced our proposals.