

DG2014-11 ADA assay

DG members:

Ken-ichi Yamamoto ¹, Kenta Kadotsuji ², Fujiko Takamura ³, Noboru Tanaka ⁴,
Tatuki Nomura ⁵, Jun Hosogi ⁶, Kazuhiro Miya ⁷, Hiroe Miyamoto ⁸

¹ LSI Medience Corporation, ² Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd., ³ Astellas Pharma Inc.,

⁴ JCR Pharmaceuticals Co., Ltd., ⁵ Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.,

⁶ Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd., ⁷ Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.,

⁸ Sumika Chemical Analysis Service, Ltd.

メンバー *Members*

- 角辻 賢太 大日本住友製薬
- 高村 不二子 アステラス製薬
- 田中 登 JCRファーマ
- 野村 達希 新日本科学
- 細木 淳 協和発酵キリン
- 宮 和弘 中外製薬
- 宮本 裕恵 住化分析センター
- 山本 健一 LSIメディエンス

要旨 Summary

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DGでは、引き続き抗薬物抗体 (ADA) 測定に焦点を当て、議論を行ったので、その成果を発表する。

本DGではADA測定のブランクマトリクスの使用期限，標準抗体の設定，最少希釈倍率の設定方法，中和活性測定の必要性並びにメソッド，バオシミラーのADA測定，極めて小さいカットオフ値が算出された場合の対応などを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，ADA測定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。

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 has been taken up as one of the topics in a JBF discussion group (DG) starting in 2013. And the outcomes were presented at the fourth and fifth JBF symposium. This time, our poster presentation will focus on the continuous discussion over the anti-drug antibody (ADA) assay.

**要旨**

Summary

In particular, this DG discussed about the expiration date of blank matrix, establishment of standard antibodies, setting the method for the minimum required dilution (MRD), the necessity of neutralization activity assay and assay method, ADA assay of biosimilar, and the corresponding method for extremely small cutoff values.

This presentation gives a overview of contents discussed in the DG to help establish a standard procedure for the ADA assay and reliability of the assay.

活動内容 *Activities*

- May 2014: DGサポーターからメンバー募集
 - Member recruitment from DG supporters.
- Jun 2014: キックオフTC, 8名のメンバーで活動開始
 - Kick off meeting with 8 sophisticated members.
- From Jul 2014 to Nov 2014: ADA assayに関するトピックについて, 毎月1回程度のTC及びメールによる議論
 - Monthly teleconferences and e-mail conversations.
- From Dec 2014 to Jan 2015: まとめ, シンポジウム発表準備
 - Summarizes and preparation of the poster presentation.

1. 重要試薬 Critical Reagents
 - ブランクマトリクス, 標準抗体の設定等
 - Blank matrix, positive control antibody
2. 最小希釈倍率 Minimum Required Dilution (MRD)
 - MRDの設定方法等
 - Minimum required dilution determination
3. 中和抗体測定 Neutralizing Antibody Assay
 - 中和抗体測定の測定フォーマット, 実施時期等
 - Format for Nab assays, timing of implementation
4. バイオシミラー Biosimilar
 - バイオシミラーのADA測定等
 - ADA assays in biosimilar development
5. カットオフ値 Cutpoint Value
 - 極めて小さいカットオフ値が算出された場合の対応等
 - Cut point calculation with very small deviation

1. Critical Reagents

- 1.1 Blank Matrix
- 1.2 Positive Control

- 背景
- 議論した内容
 - Blank Matrixの使用期限
 - 長期試験における対応
 - プールマトリックスの調製
 - Blank Matrixの凍結融解

1.1 Blank Matrix 背景

- 前回のDG2013-05での協議及びアンケートでは Negative control (Blank Matrix) の取り扱いに各社毎の差が大きく標準的なものが無いように思えたので、新たなメンバーで議論した。
- Blank Matrixに関してのトラブルの経験はないか、またその場合の対応について議論した。

1.1 Blank Matrix (使用期限)

- 購入品はメーカーの定めた使用期限にしたがっており、製品情報等に記載があればこちらを優先とする。
- 各社SOPでも定めており、1年または3年としているが、これに関する根拠資料はなし。
- 長期にわたる試験で使用期限が切れた場合でも測定値(シグナル値)に問題が無いのであれば、期限の延長も可能。劣化等が原因の測定系への影響などの経験はあまりなかった。

1.1 Blank Matrix (長期間の試験での対応)

- Blank Matrixの変更が必要となった場合、スクリーニングから実施する。カットポイントの再設定については必要との意見が多かった。
- 新旧のブランクマトリックスのシグナルを確認し、カットポイントを再設定(補正)

例) 新カットポイント = 旧カットポイント × (新ブランクマトリックスのシグナル / 旧ブランクマトリックスのシグナル)

1.1 Blank Matrix (調製及び凍結融解)

- 市販の予めプールされたものを購入し、使用している。(非臨床ではスクリーニングした個体別をプールする場合もあり)
- 凍結融解安定性の確認については「実施している」or「実施していない」で意見が分かれたが、ほとんどが、凍結融解を避けるために小分け分注し、3回～5回の間で使い切るようにしている。

1.2 Positive control 目次

- 背景
- 議論した内容
 - Clinical ADA assayの標準抗体
 - 開発ステージにおける標準抗体
 - 中和抗体測定時の標準抗体
 - 市販抗体の使用

1.2 Positive control 背景

- 臨床試験，非臨床試験ADA測定における標準抗体は，測定法の信頼性を担保する目的から必要である。
- ADA測定法は，様々な方法があり、使用する標準抗体も測定方法に則した抗体を選定する必要がある。現状、各社で様々な抗体を使用している。
- そこで，標準抗体の作製，臨床試験，非臨床試験の各ステージにおける標準抗体の設定，中和抗体測定時の標準抗体選択に関して，議論した。

1.2 Positive control (定義)

- 標準抗体は、ADA測定法における陽性対照であり、ADA測定法構築、分析法バリデーション、検体測定の際に必要となる。
- Bridging ELISA (ECLを含む)、SPR等の各ADA測定法に、最適な標準抗体を使用する必要がある。
- 標準抗体としては、動物(ウサギ、サル等)を用いて調製したポリクローナル抗薬物抗体、もしくはモノクローナル抗薬物抗体を使用するのが、一般的である。

1.2 Positive control (Clinical ADA assay)

- 臨床試験ADA測定 (Bridging ELISA, SPR等) で、使用する標準抗体は、動物 (ウサギ, サル等) 由来の抗薬物抗体 (Protein A精製もしくは抗原カラム精製品) を用いている。
- クラスタイピングの場合は、抗Drug抗体Fab-hIgG共有結合体を用いる場合がある。
- 臨床試験ADA測定におけるクラスタイピングの標準抗体は、上記の標準抗体が必要であるが、クラスタイピングの必要性については、疑問が残る。クラスタイピングは、当局からあまり要求されたことがない。

1.2 Positive control (開発ステージ)

- 各開発ステージ(非臨床試験、臨床試験)を通して、同一の標準抗体を用いることに問題はない。
- 各開発ステージの薬物との反応性確認は必須。
- 動物由来のポリクローナル抗体は、PK測定を検出抗体等にも使用する場合があり、開発初期に調製した抗体量では、不足する場合がある。その際には、必要となった時点での開発ステージの薬物を用いて、再調製している(調製頻度は、数年に1回程度)。

1.2 Positive control (NAb assay)

- ADA測定における1)スクリーニング, 2)確認試験, 3)抗体価測定, 4)中和活性測定)の各段階で, 同一の標準抗体を用いることに問題はないと考える。
- Nab測定と他の測定では, 標準抗体の検出感度が異なる場合がある。しかしながら, 測定系の評価の意味から, 同一抗体を用いることに問題はない。
- 標準抗体によっては, 中和活性が極めて低い, もしくは中和活性がない場合がある。その際には, 中和活性を有するモノクローナル抗体に変更する。

1.2 Positive control (市販抗体)

- 開発薬物が既知の場合，市販抗体を標準抗体として使用可能と考えている。
- 市販抗体を使用する場合には，開発薬物との反応性確認は必須である。反応性確認については，分析法バリデーション前に実施すべきである。
- 市販抗体と測定マトリックス中類縁物質に対する交差性確認，免疫吸収等についても考慮する必要がある。



2. Minimum Required Dilution

Minimum Required Dilution (MRD)の設定

MRD 目次

- 背景
- 議論した内容
 - MRDの設定方法
 - MRD設定時の実情
 - MRDと感度

MRD 背景

- 抗薬物抗体(ADA)などの定性試験におけるMRDの設定は、レスポンスのバックグラウンドレベルと密接な関係にあり、最終的に、カットポイント評価に影響を与えることがある。Matrixの影響を一定にするために、バリデーション前に適切なMRDを決定する必要があるものの、MRDの設定方法について詳細を記載している文書は少ない。そこで、MRDの具体的な設定方法について、メンバーと議論した。

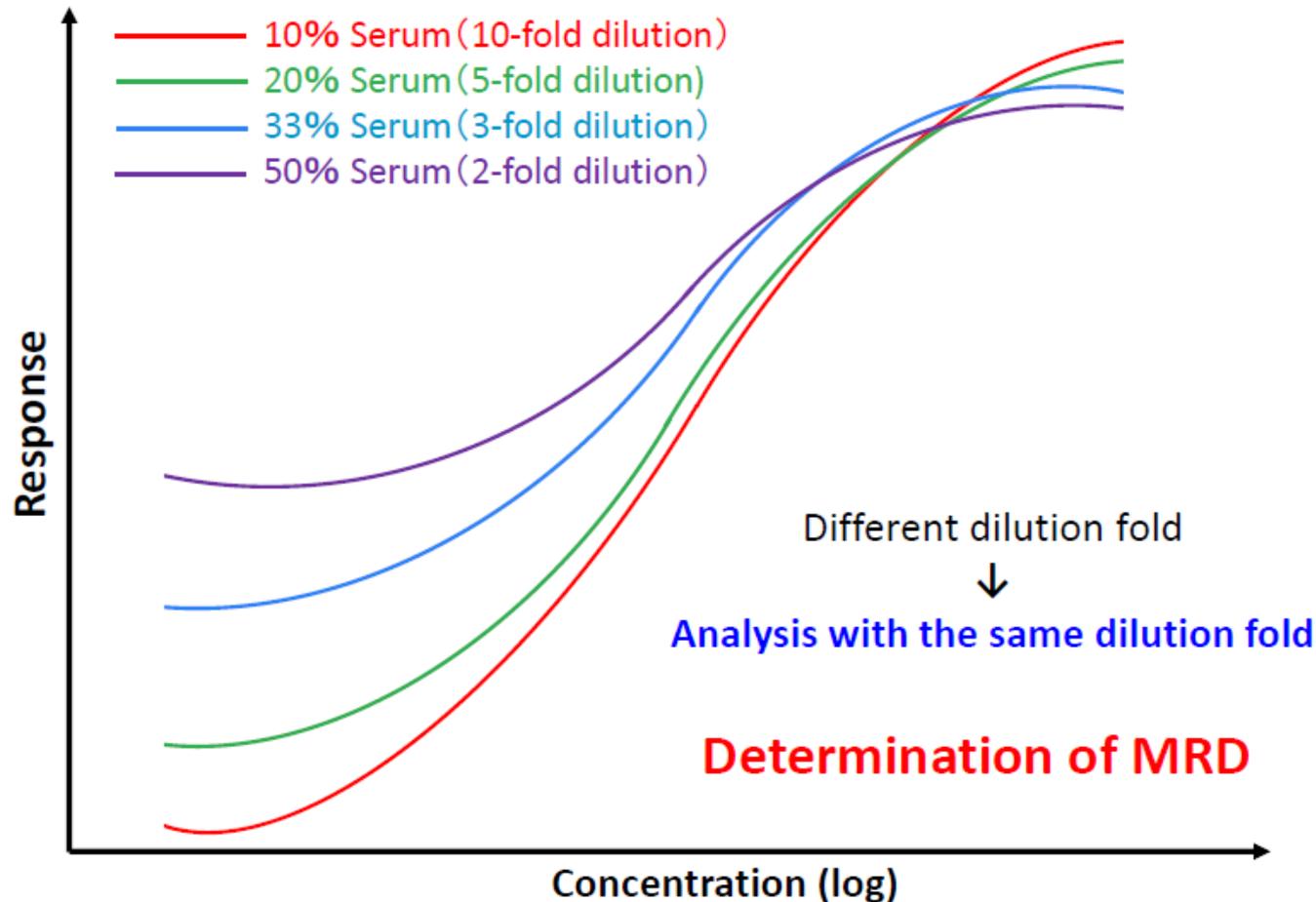
MRD (設定方法)

- 希釈液 (Matrix free) で複数濃度の陽性サンプルを測定する。これはあくまで、Matrix free 下での反応性を参考までに確認するため。
- Pool Matrix 又は複数例の個体別 Matrix を複数の倍率で希釈し、これらで複数濃度の陽性サンプルを測定する。
- 個体間のレスポンスのバラツキが小さく、希釈液又は個体間の反応性が平行である希釈倍率を MRD として選択する。
- 個体間のレスポンスのバラツキ及び推定される感度を考慮する必要性がある。



MRD (設定方法)

- 例示



MRD (設定時の実情)

- 検討するMRDは、2～50倍で検討するケースが多く、バリデーションや実試料分析において、10倍を超えるMRDを設定しているケースは少なかった。
- バリデーションや実試料分析においては、Matrix freeの条件下で測定するケース又は比較するケースが無いこと及び測定に支障が無い程度まで希釈できれば問題は無い。
このことから、Matrix効果を消失させるために希釈液 (Matrix free) のレスポンスと同程度となるまで希釈する必要はない。

MRD (設定時の実情)

- MRD1 (Matrix含有率100%) の条件下において、Matrix効果が認められない場合であっても、MRD1を設定しているケースは少なかった。測定試料量が十分に確保できること及び感度とDrug toleranceとの兼ね合いを考慮して決定すべきとの意見が多かった。
- 適切なMRDを選択する上で、バックグラウンドレベル (レスポンス) の目標値としては、吸光度の場合は0.1前後、発光強度の場合は250未満としているケースが半数を占めていたが、適用疾患によってバックグラウンドレベルは異なることから、レスポンスの上限値は設けていない。

MRD (MRDと感度)

- 十分な感度(前臨床:500~1000 ng/mL、臨床:250~500 ng/mL)を担保できる場合において、100倍希釈を超えるMRDを設定することの妥当性について協議したが、十分な感度を担保出来るのであれば、MRDに上限値を設ける必要はないとの意見が多かった。

Reference

Recommendations for the Design and Optimization of Immunoassays used in the detection of host antibodies against biotechnology products. A.R.Mire-Sluis, et al., 2004. J. Immunol. Meth. 289:1-16



3. Neutralizing Antibody Assays (NAb assays)

NAb assays 目次

- 背景
- 議論した内容
 - 測定フォーマット
 - カットポイントの算出
 - 実施時期

NAb assays 背景

- EMA guideline [1] 及びFDA draft guidance [2] では抗薬物抗体の中和活性を明らかにすることが求められている。しかしながら、実施すべきタイミングや測定フォーマットに関しては、詳細な記載がないことから、NAb assaysの具体的な手法や実施タイミングについて、メンバーと議論した。

1. Guideline on immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins, EMA, 2007.
2. Draft guidance, Assay Development for Immunogenicity Testing of Therapeutic Proteins, US FDA, 2009.

NAb assays (測定フォーマット)

- FDAガイダンスにおいて、cell-based biologic assayが推奨されている。しかし、cell-based biologic assayは、感度、薬剤耐性、robustな面で課題があり、中和抗体を精度良く測定できない場合が多い。このため、抗体医薬 (antagonist) についてはcompetitive ligand-binding assayで良いのではないか。
- 測定系は固相化抗原に対する標識開発抗体の結合を中和抗体が競合阻害するのを検出する方法が多数であった(競合LBA)。競合LBAは薬剤耐性が劣る点が課題である。

NAb assays (カットポイント)

- LBA NAb assayのカットポイントの算出は、ADAスクリーニングアッセイと同様の方法により行っている。
 - ✓ 個体数：非臨床試験では15－20個体，臨床試験では50個体
 - ✓ 算出方法：スクリーニングアッセイと同様の統計解析法
- 非臨床試験では中和抗体測定を実施しないという意見もあった。

NAb assays (実施時期)

- 臨床においては、P1健康成人における試験では不要であり、P2以降の患者における試験から中和抗体測定を実施すればよい。
- 開発薬物が内因性たんぱく質の組換え体の場合は、重篤な副作用を示す可能性もあるため、初期臨床で確認することが必要ではないか。FDAからP1で評価することを推奨された事例もあった。
- 抗がん剤開発においては、中和抗体測定は全く不要ではないかという意見もあった。



4. ADA assays in Biosimilar development



Biosimilars 目次

- 背景
- 議論した内容
 - One-assay vs. two-assay
 - Availability of originators active pharmaceutical Ingredient (API)
 - Positive controls
 - Assay methodology

Biosimilars 背景

- Biosimilar開発時にOriginatorとの比較試験・同等性試験が行われ、免疫原性についても評価される。ADA測定を実施するうえで、Biosimilar特有の注意点を議論した。

Biosimilars (One-assay vs. two-assays 1)

- OriginatorとBiosimilarのADA測定で、同一標識薬物を使用する方法(one-assay) にするべきか。それともOriginatorとBiosimilarの各標識薬物を使用する方法(two-assays) がよいか。

Biosimilars (One-assay vs. two-assays 2)

- Biosimilarの開発においてはoriginatorとBiosimilarの免疫原性を比較する必要がある。
- 潜在的に薬物の免疫原性が異なる可能性を考慮すると、two-assaysの方が、より適切であるという意見で合意した。
- ただし、非臨床でoriginatorとの比較試験を実施する場合、非臨床試験はヒトでの免疫原性を予測するものではないため、one-assayでよい。

Biosimilars (originators API 1)

- OriginatorとBiosimilarにおけるADA測定用に two-assayを構築する場合、被標識薬物としては、原薬を使用するのか？
- Biosimilar開発においては、Originator原薬を入手することが不可能な場合がある。その場合、どういった対応をするのが良いのか？

Biosimilars (originators API 2)

- Originator原薬入手については、極めて困難であり、Biosimilar開発の課題である。
- 市場から市販製剤を入手する以外に手段はない。
- 基本的に製剤からADA 測定の標識薬物作製をすることで問題はないと考えられる。ただし、製剤中に含まれる添加物等を事前に確認し必要に応じてバッファー交換を行う等の対応が必要であることに注意する。

Biosimilars (Positive control 1)

- OriginatorとBiosimilarのADA分析でPositive controlは同一のものを使用するのがよいか。それとも別々にするのがよいか。
- ADA測定はsurrogate assayであるため同一のPositive controlをOriginatorとBiosimilarの両方のADA測定に使用できるという意見で一致した。ただし、両方の薬物に対して概ね同程度の反応性を有することを確認しておく必要がある。

Biosimilars (Positive control 2)

- One-assayの場合でも他方の薬物との反応性を確認しておく必要がある。
 - One-assayでの反応性を確認する方法としては、
 - 両方の薬物による免疫除去
 - 他方の標識薬物で簡易的にブリッジングアッセイを構築して確認
 - 両方の薬物を固相化してPositive controlの結合を確認

Biosimilars (Assay methodology 1)

- OriginatorとBiosimilarのADA測定プラットフォームについて、OriginatorのCTD及び論文等からADA測定プラットフォームが判明している場合、Biosimilarの測定プラットフォームを、Originatorに合わせる必要があるのか？

Biosimilars (Assay methodology 2)

- 可能な限り、その時点の技術トレンドにあった優れた技術を用いて分析したほうが望ましく、Originatorと合わせる必要は無いという意見で一致した。
- Originatorの開発時とは原理的に異なる分析法であっても、その方法で免疫原性を比較するので問題は無いと考える。



Biosimilars その他

- 改変体の場合はtwo-assayを使用する。
- 改変体の場合, Positive controlが同じで良いかどうかは改変の程度による。
- 薬物濃度はone-assayでかまわない。ただし, 検量線・QCは, それぞれの薬物から調製する。

5. *Cut Point*

極めて小さいカットポイントが算出された
場合の対応

Cut Point 目次

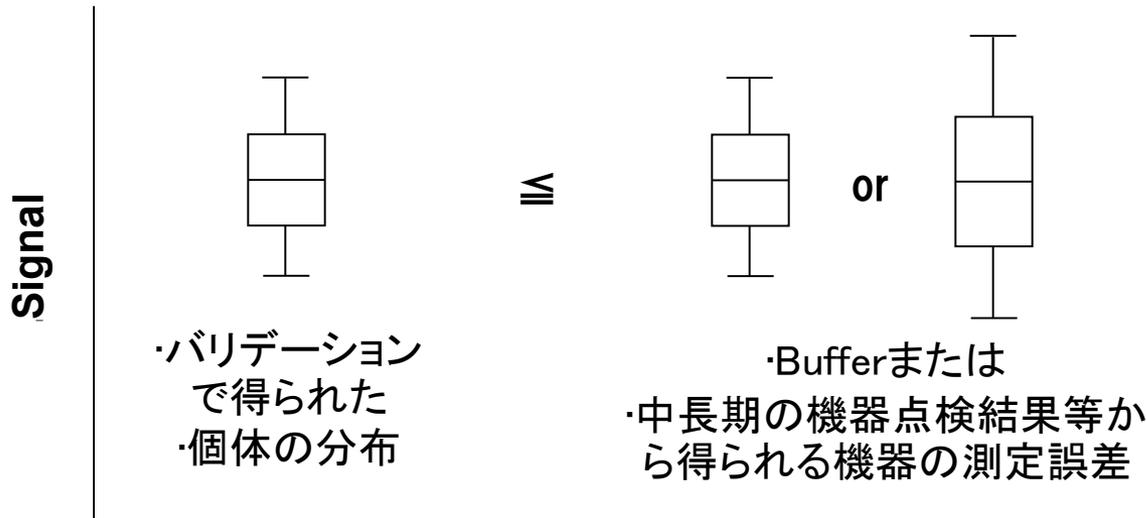
- 背景
- 議論した内容
 - 振れの少ない場合のカットポイント算出
- まとめ

Cut Point 背景

- ADAのカットポイントの算出法は基本的に「Pharma Biomed Anal 2008. 1267-81に従った統計手法を用いて算出している。
- この方法では、非常に小さい値が算出される場合があるがやむを得ない。

Cut Point 背景

下記のような場合、バリデーション試験で測定した個体の分布は機器や測定法の測定誤差を反映しているに過ぎないといえる。



そこで、極めて小さいカットオフ値が算出された場合の対応策について、メンバーと議論した。

【振れの少ない場合のカットポイント算出1】

最少有意変化 (Least Significant Change, LSC) の利用

骨代謝マーカーの評価で使用され、最少有意変化以上の変動があった場合に、骨密度に有意な変化があったと判断する。(測定値が前回測定値に対して有意な変動として認めるか否かを判断するための判定基準、有意であると信頼できる値の最小の変化)

$$LSC = Z' \times CV \times \sqrt{2}$$

Z':統計水準で決まる係数, 95%信頼水準の場合1.96

算出例:

バリデーションの再現性の精度の最大値が15%の場合

$$LSC = 1.96 \times 15\% \times \sqrt{2} (42\%)$$

ネガティブコントロールの値の1.42倍をカットポイントとする。

【振れの少ない場合のカットポイント算出2】

Negative Controlの分布 \geq 個体別のシグナル分布の分布なら

Negative Controlの再現性データから単純にカットポイントを決めても良いのではないかと考えられる。

Negative Control (NC) のシグナルは正規分布しているなら95%の確率でMean \pm 1.645 x SDの範囲に入るはず。

算出例:

① Cut point = NC の値 + 1.645

x NCのバリデーションでの同時再現性のSD

また、実測定時にNegative Controlをn=3以上で測定するなら

② Cut point = NCのMean+ 1.645 x 同じプレートで測定したNCのSD

Cut Point まとめ

振れの少ない場合のカットポイント算出として2つの対策案について議論したが、対策案を使用する場合の基準が不明確であることやconfirmatory assayを実施することから、本DG内の了解は得られなかった。

MRDを下げることにより、バラつきを大きくするという意見もあったが、小さいカットポイントが算出された場合でも、Screening assayで疑陽性が多くなる可能性はあるが、confirmatory assayにて最終的には判定できるので、問題ないという意見でまとまった。

DG2014-11 wrap up

- ADA assayを対象としたDGを実施した。
 - Discussion group aimed at ADA assay.
- ADA assayに関するトピックについてメンバーで議論した（重要試薬，最少希釈倍率，中和抗体測定，バイオシミラー，カットポイント）。
 - Discussion over the topics regarding ADA assay.
 - Critical Reagents, MRD, Neutralizing Antibody Assay, Biosimilar, Cutpoint Value

1. 重要試薬 Critical Reagents

Blank Matrix

- 使用期限は購入品はメーカーの定めた期限にしたがっており、製品情報等に記載があればこちらを優先とする。各社SOPでも定めており、1年または3年としているが、これに関する根拠資料はなし。
- Blank Matrixの変更が必要となった場合は、スクリーニングから実施する。カットポイントの再設定については必要との意見が多かった。
- 凍結融解安定性の確認については「実施している」or「実施していない」で意見が分かれたが、ほとんどが、凍結融解を避けるために小分け分注し、3回～5回の間で使い切るようにしている。

1. 重要試薬 Critical Reagents

Positive Control

- ADA測定に使用する標準抗体は、使用する測定系に則した抗体を選択する必要があり、開発ステージごとに適切な対応が必要である。
- 臨床試験ADA測定の標準抗体は、動物由来の抗薬物抗体を調製して用いることが多い。
- ADA測定及びNab測定では、共通の標準抗体を使用することは可能であるが、Nab測定の検出感度等が問題となる場合には、モノクローナル抗体等を使用する場合もある。

2. 最小希釈倍率 Minimum Required Dilution (MRD)

- Pool Matrix又は複数例の個体別Matrixを複数の希釈倍率で希釈し、これらで複数濃度の陽性サンプルを測定する。
- 個体間のレスポンスのバラツキが小さく、個体間の反応性が平行である希釈倍率をMRDとして選択する。
- バリデーションや実試料分析においては、Matrix freeの条件下で測定するケース又は比較するケースが無い。このことから、Matrixの影響を消失させるために希釈液 (Matrix free) のレスポンスと同程度となるまで希釈する必要性はない。

3. 中和抗体測定 Neutralizing Antibody Assay

- 抗体医薬 (antagonist) については、cell based ではなく competitive ligand-binding assay で良いのではないか。
- 測定系は競合LBAが多数であった。競合LBAは薬剤耐性が劣る点が課題である。
- LBA NAb assay のカットポイントの算出は、ADAスクリーニングアッセイと同様の方法により行っている。
- 中和抗体測定は非臨床試験では実施しないという意見もあった。
- 臨床における中和抗体測定の実施時期はP2以降でよい。ただし、開発薬物が内因性たんぱく質の組換え体の場合は、初期臨床で確認することが必要ではないか。

4. バイオシミラー Biosimilar

- Biosimilar開発においてはoriginatorとBiosimilarの免疫原性を比較する必要があることから、two-assays ADA測定が推奨される。ただし、非臨床でoriginatorとの比較試験を実施する場合は、one-assay ADA測定で実施可能。
- 同一Positive controlをOriginatorとBiosimilarの両ADA測定に使用可能。ただし、両薬物に対する反応性を確認する必要がある。
- Originator原薬入手は、困難であることから、製剤からADA測定の標識薬物を作製する。ただし、製剤中の添加物等の影響については、注意が必要。
- ADA測定系としては、技術トレンドにあった優れた技術を用いて分析したほうが望ましく、Originatorと合わせる必要は無い。

5. カットオフ値 Cutpoint Value

- 極めて小さいカットオフ値が算出された場合でも、Screening assayで疑陽性が多くなる可能性はあるが、confirmatory assayにて最終的には判定できるので、問題ないという意見でまとまった。