

**DG2019-43**  
**ADA分析の道しるべ**  
**－分析法開発および非臨床・臨床試験実施に**  
**おける留意点－**

---

**Guide to ADA Analysis:  
Considerations in Developing Analytical Methods  
and Conducting Nonclinical/Clinical Studies  
(DG2019-43)**

# DG members

Name	Company
横田 喜信 Yoshinobu Yokota	株式会社新日本科学 <i>Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.</i>
酒井 和明 Kazuaki Sakai	帝人ファーマ株式会社 <i>Teijin Pharma Limited</i>
小田 祐輝 Yuki Oda	小野薬品工業株式会社 <i>Ono Pharmaceutical Co., Ltd.</i>
中沢 庸徳 Tsunenori Nakazawa	第一三共株式会社 <i>Daiichi Sankyo Co., Ltd.</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>
大岡 香織 Kaori Ooka	株式会社住化分析センター <i>Sumika Chemical Analysis Service, Ltd.</i>
羽成 優 Suguru Hanari	シミックファーマサイエンス株式会社 <i>CMIC Pharma Science Co., Ltd.</i>
早田 洋平 Yohei Hayata	株式会社新日本科学 <i>Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.</i>

## 活動の内容 (Contents of our activity)



- ・ 合計2回のFace to faceの会合
- ・ 合計6回のWebExを用いた電話会議
- ・ 合計5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

# 背景及び目的

## ADA分析に関する日本のガイドライン 未発出

- ▶ 欧米の規制情報を基に各社が自社のポリシーに沿って対応している。
- ▶ DGでは2015年を最後に新たな議論がなされていない。

## ADA分析を取り巻く環境の変化

- ▶ Drug tolerance向上のための酸処理法（SPEAD, ACE, BEADなど）が一般化した。
- ▶ 核酸、ペプチドに対するADA分析が増加している。
- ▶ 2019年1月にFDAから最新の Immunogenicity Guidanceが発出された。

## DG2019-43の目的

- ▶ メンバーより出された課題を①非臨床試験, ②臨床試験, ③分析法開発の3点に集約し, DGサポーター向けにアンケートを実施して各社の対応状況を把握する。
- ▶ 課題別に考察及び提案を示し, 今後のADA分析の一助としたい。

## No guidelines on conducting ADA analysis in Japan

- Institutions in Japan conduct ADA analysis in accordance with internal policies based on European and American regulations.
- The last Japan Bioanalysis Forum (JBF) DG regarding ADA analysis was in 2015.

## Change of circumstances surrounding ADA analysis

- New acid treatment methods (SPEAD, ACE, BEAD, etc.) have become common.
- ADA analyses are conducted for nucleic acids and peptides.
- The most recent immunogenicity guidance was issued by the FDA in January, 2019.

## Purpose of DG2019-43

- Questionnaires are given to DG supporters in order to facilitate discussion of the three following points: (1) non-clinical study, (2) clinical study, and (3) method development.
- This presentation describes the DG's proposals for each topic to help future ADA analyses.

 JBF 本発表の流れ

- ADAとは
- 免疫原性評価とは
- アンケート結果（第1回及び第2回）の紹介
- 非臨床ADAのデザイン, ストラテジー
- 臨床ADAのデザイン, ストラテジー
- 分析法の構築・バリにおける留意点
- まとめ

# バイオ医薬品におけるADA

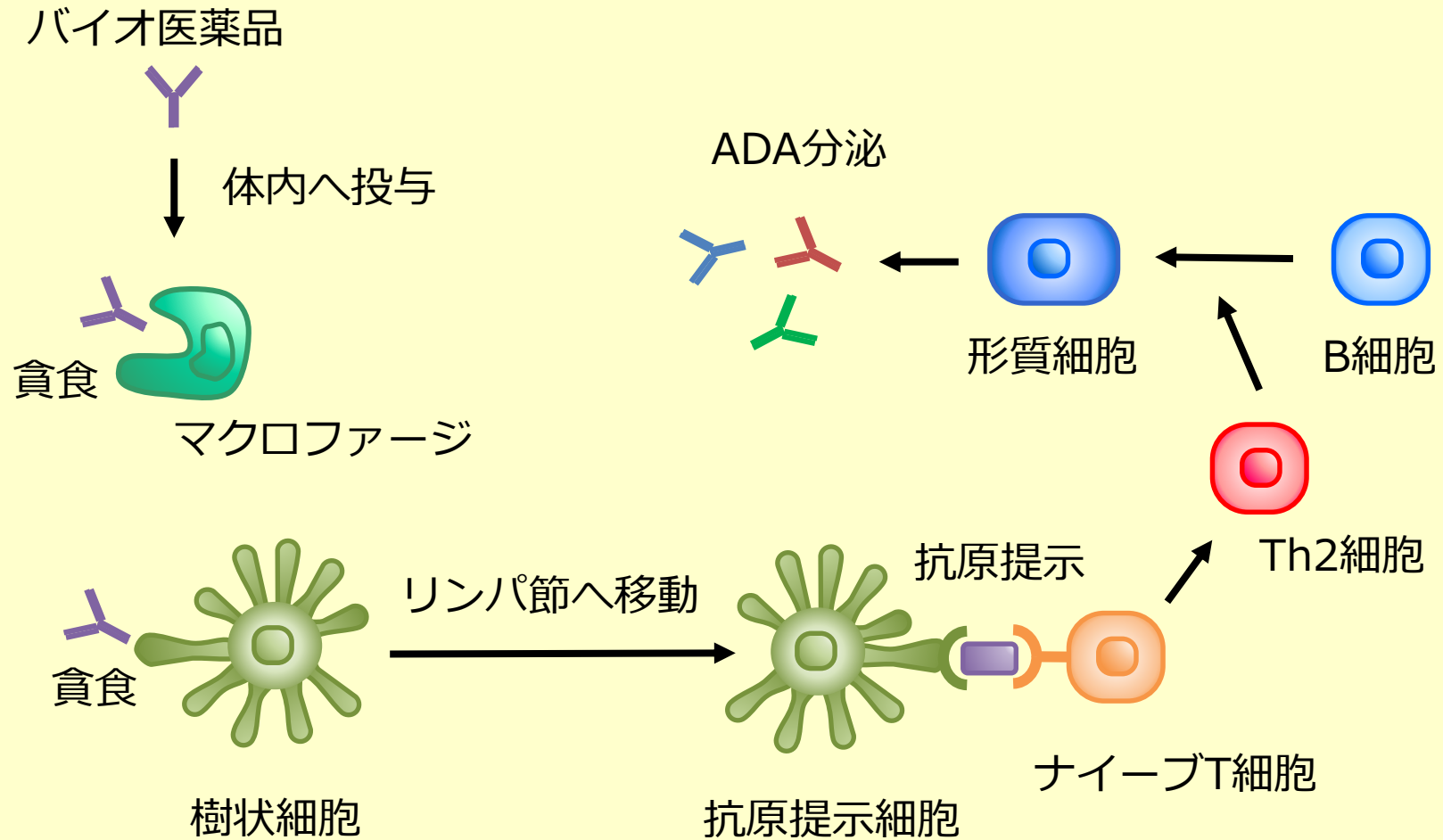
<http://www.nihs.go.jp/dbcb/immunogenicity.html>

## バイオ医薬品と免疫原性

- 一般的に、抗原が抗体の産生や細胞性免疫を誘導する性質を**免疫原性**と呼ぶ。
- バイオ医薬品は抗原として作用し、ADAの産生が誘導される場合がある。
- 免疫原性がバイオ医薬品の有効性・安全性に影響を及ぼす可能性があるが、**問題とならない場合がほとんどである。**
- 稀に有効性が低下した事例や有害な反応を引き起こした事例が報告されている。

- インターフェロン $\beta$ の活性中和抗体が誘導され、高抗体価の患者で治療効果が低下した。
- 1998年以降、欧州において、エポエチンアルファの中和抗体の誘導により、患者自身の内在性エリスロポエチンも中和されて作用しなくなり、赤血球減少による再生不良性貧血が増加した（不純物のアジュバント効果）。

## ADAができるまで



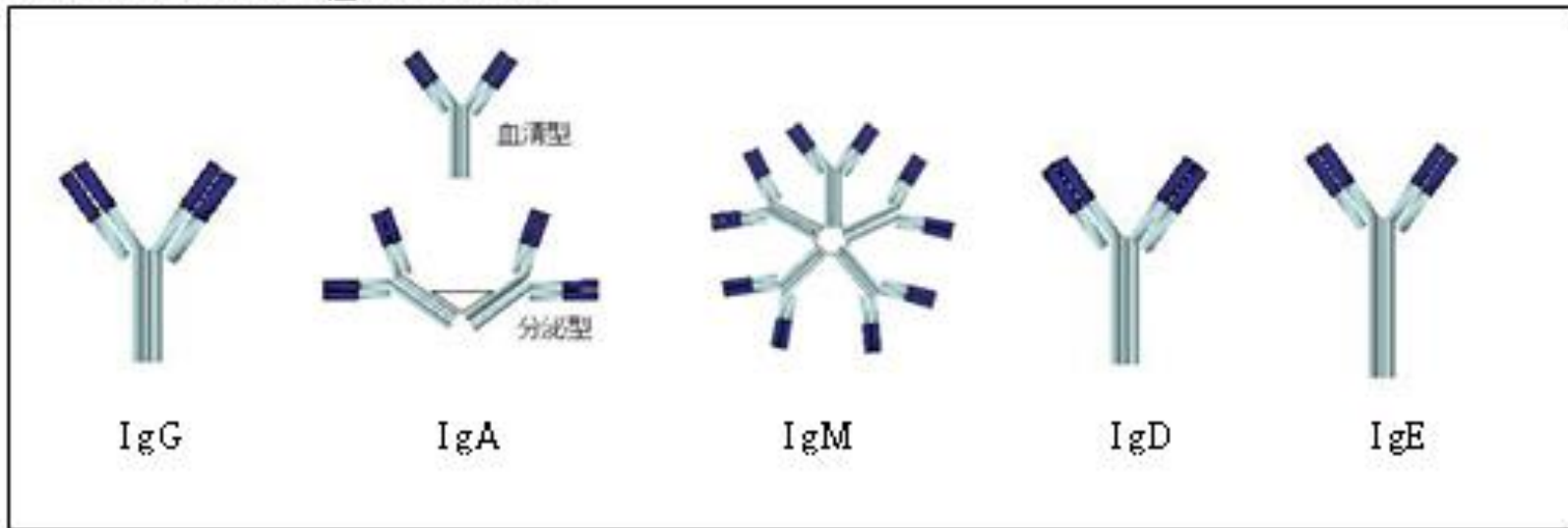
抗原提示されるには複雑性が必要（低分子医薬品は抗原提示されない）



# 抗体とは

- 抗体の本体はイムノグロブリン (immunoglobulin: Ig) である。
- 五つの異なる性状 (=クラス) IgG, IgM, IgA, IgD 及び IgE がある。
- 各クラスは, 分子内の重鎖のタイプによって区別され, 特異的な機能を示す。
- 軽鎖は  $\kappa$  鎖と  $\lambda$  鎖の 2 種類の主要タイプしかない。
- ヒトにおいては重鎖タイプの小さな差異に基づいて, 4 種類の IgG サブクラス (IgG1, IgG2, IgG3 及び IgG4) に分類される。










【免疫グロブリンの種類と構造】



一般社団法人 日本血液製剤協会

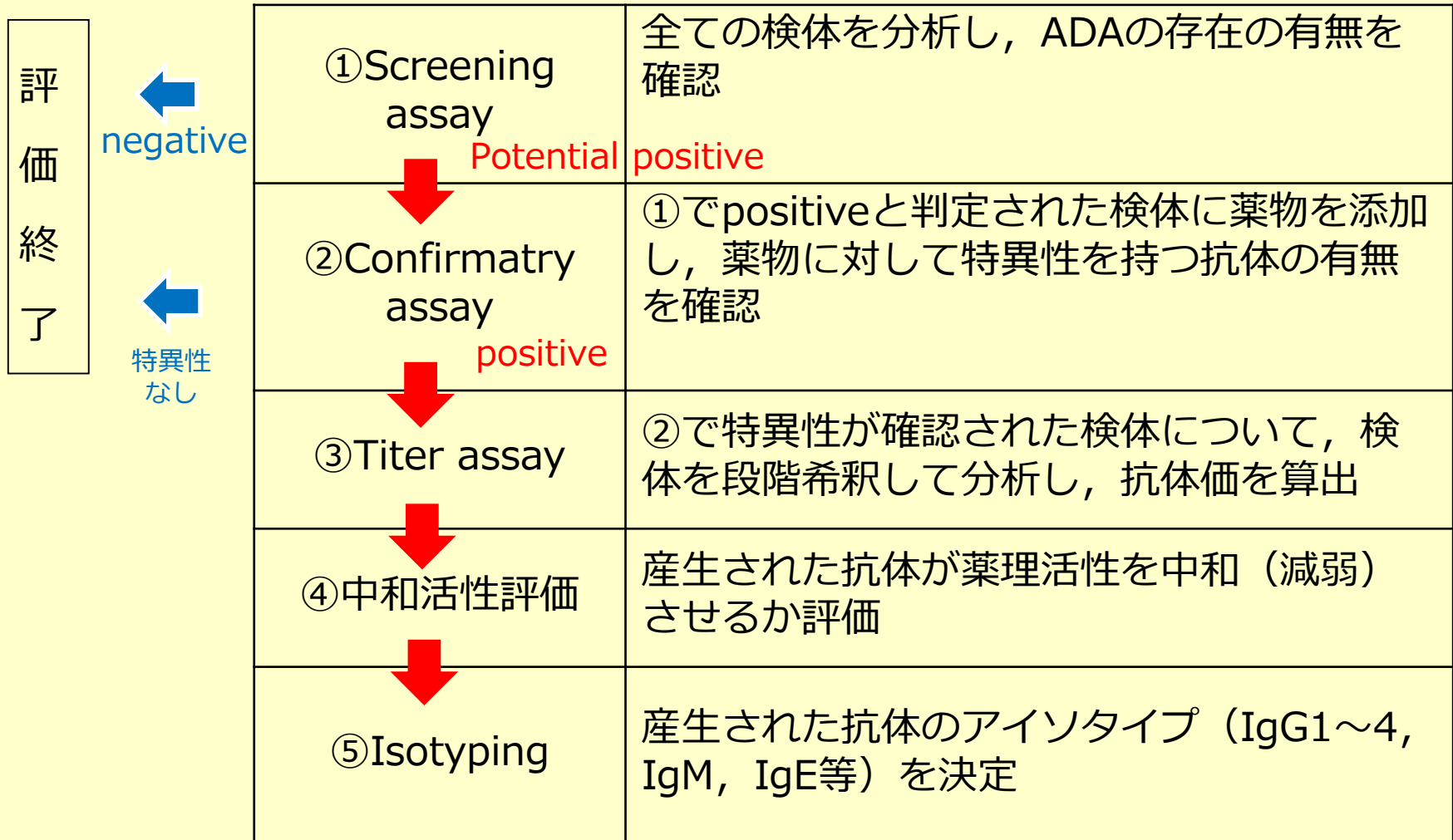
[http://www.ketsukyo.or.jp/plasma/globulin/glo\\_03.html](http://www.ketsukyo.or.jp/plasma/globulin/glo_03.html)

## PK分析法とADA分析法の違い

	PK assay	ADA assay
Analyte	Drug 	Human polyclonal antibody (highly heterogeneous)   
Reference standard	Drug 	Surrogate positive control Monoclonal or polyclonal animal Ab (no actual reference standard)   
Matrix	Variable, depending on the sample	Variable, depending on the sample <b>Interference by residual drug</b> 
Results	Drug concentration	ADA positive ratio (+) or (-) ADA characteristics (neutralizing activity, titer, isotype)

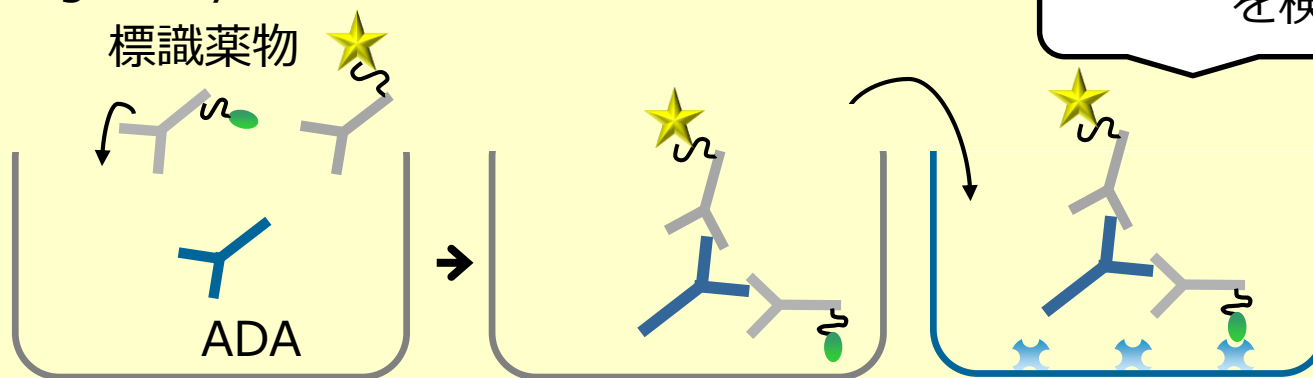
西村和子 第9回JBFシンポジウム 一部改変

## 免疫原性評価フロー



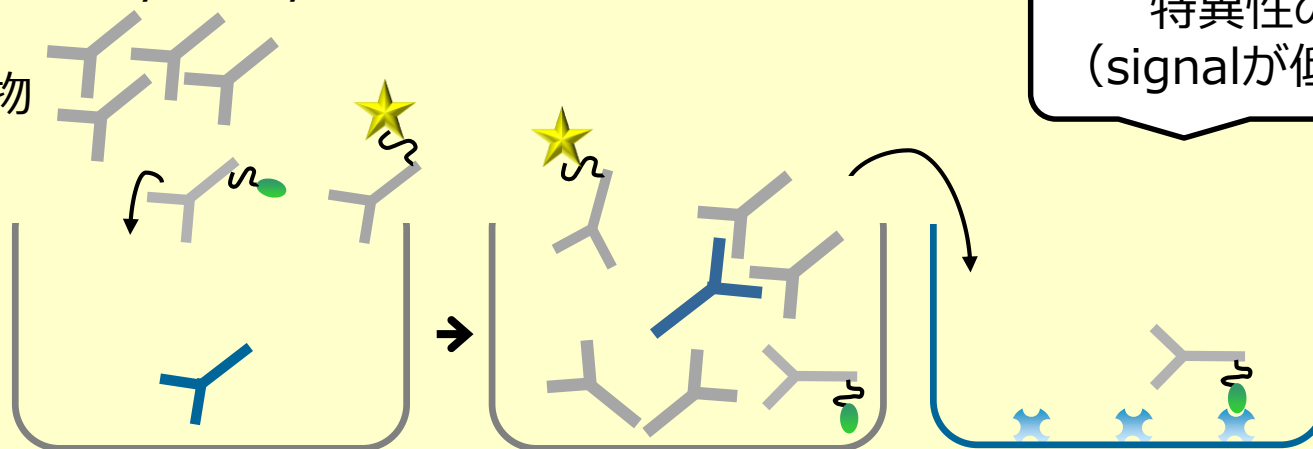
# Screening/confirmatory assay

## <Screening assay>



## <Confirmatory assay>

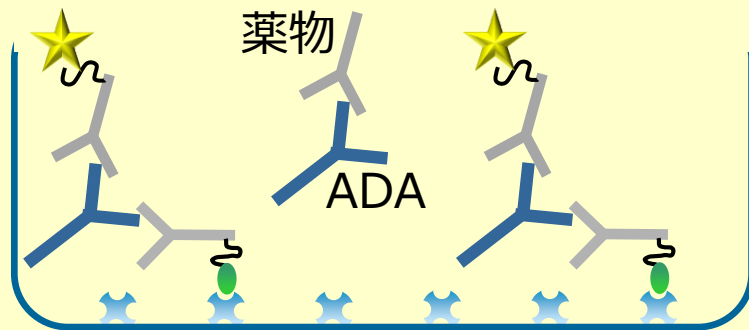
過剰量の  
未標識薬物



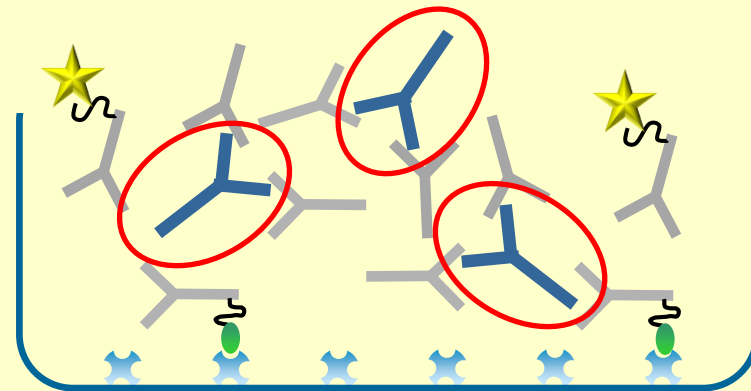
# Drug tolerance

検体中の薬物はADAの抗原として競合的に働き、ADAの検出力を低下させる。ADAを評価する際、薬物の無影響濃度が評価時点での検体中薬物濃度を下回っていると、検体中に存在しているADAを見落とす可能性がある。

薬物が**少ない**場合



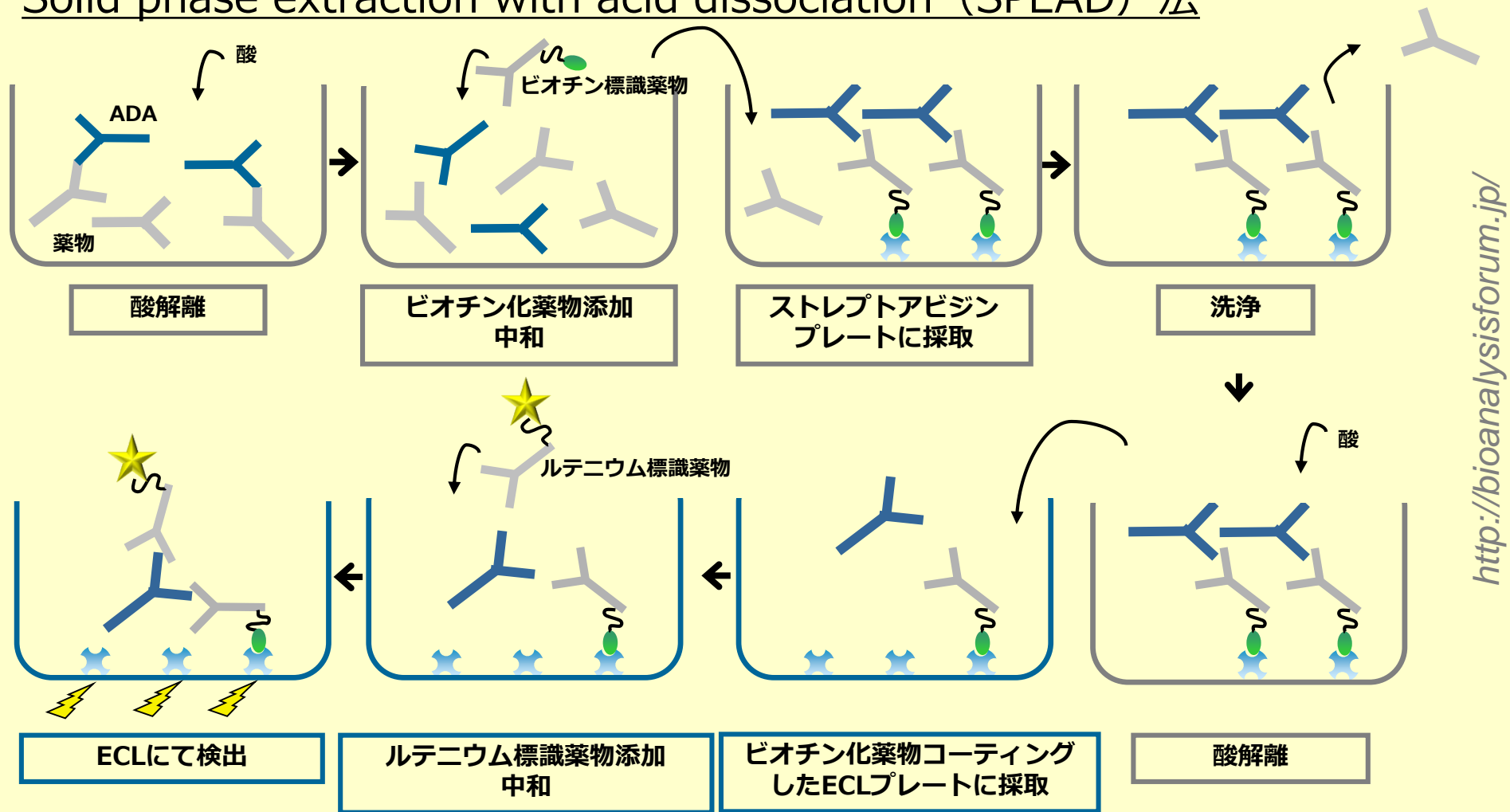
薬物が**多い**場合



ブリッジングが成立しない  
→偽陰性

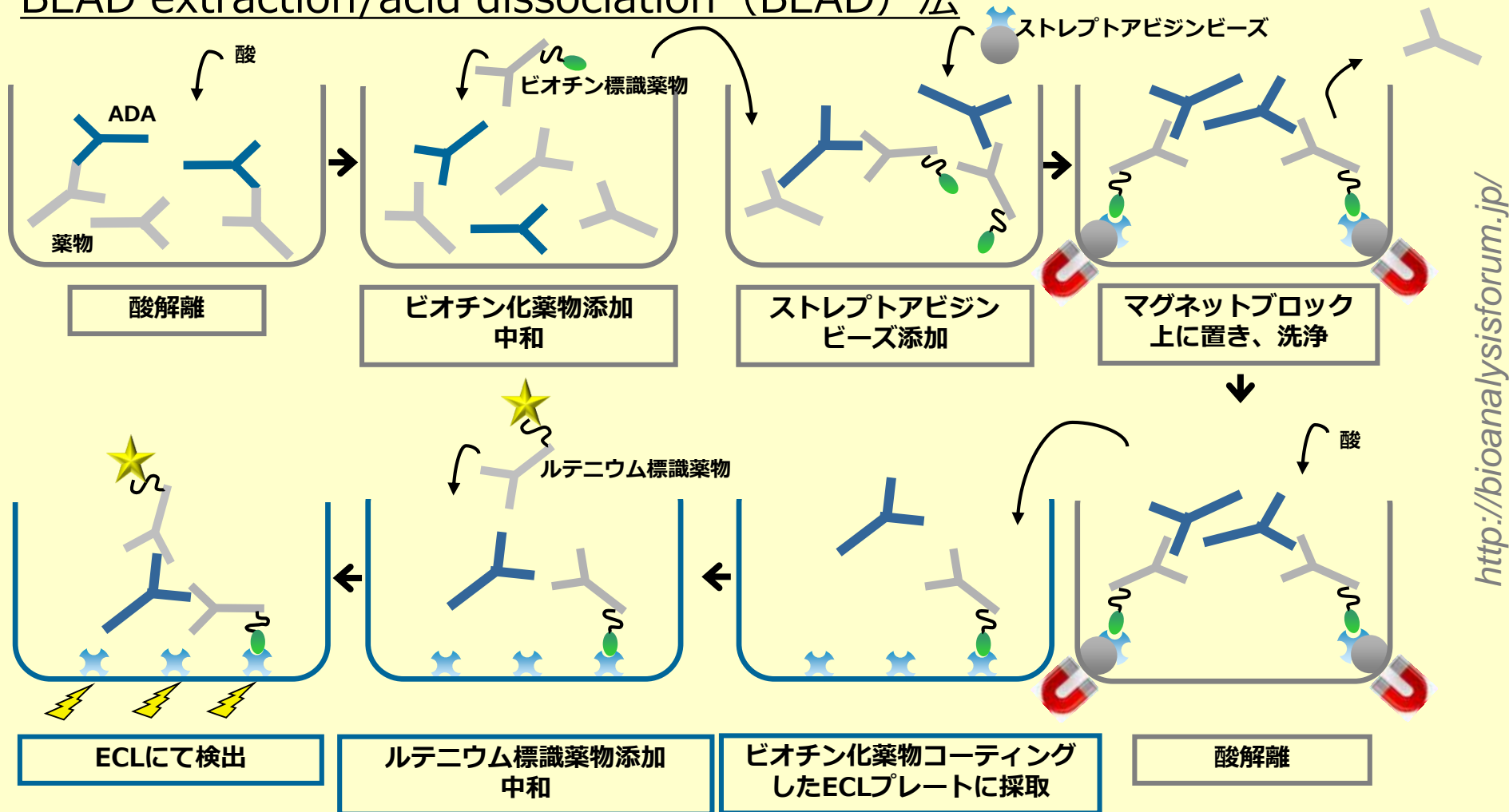
# Drug tolerance改善方法例①

## Solid phase extraction with acid dissociation (SPEAD) 法

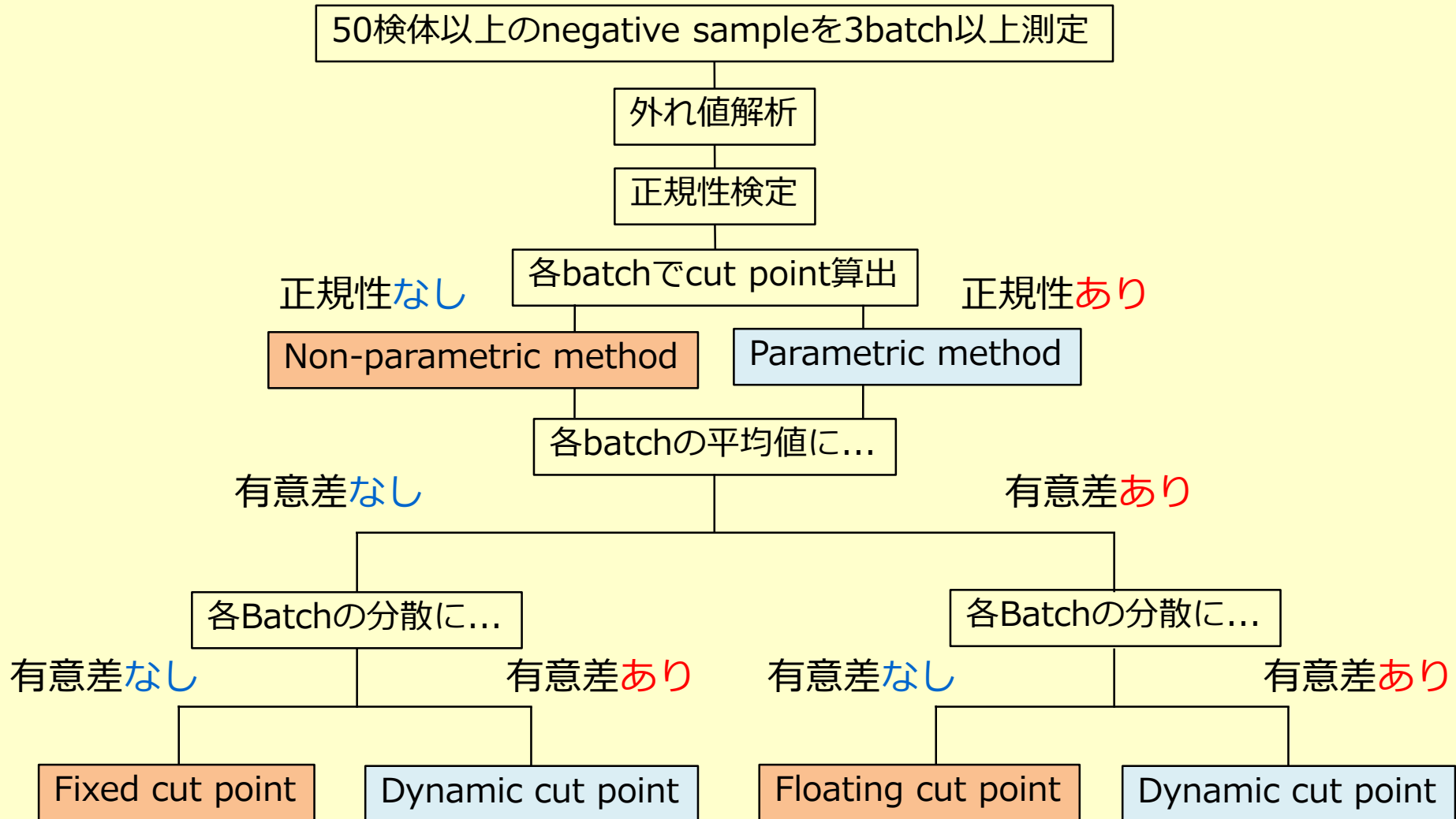


## Drug tolerance改善方法例②

## BEAD extraction/acid dissociation (BEAD) 法

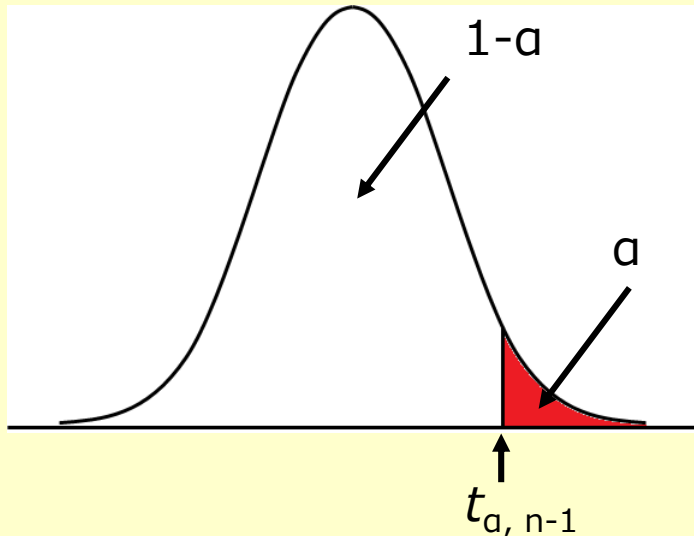


## Cut point算出フロー





# Parametric method



t分布表

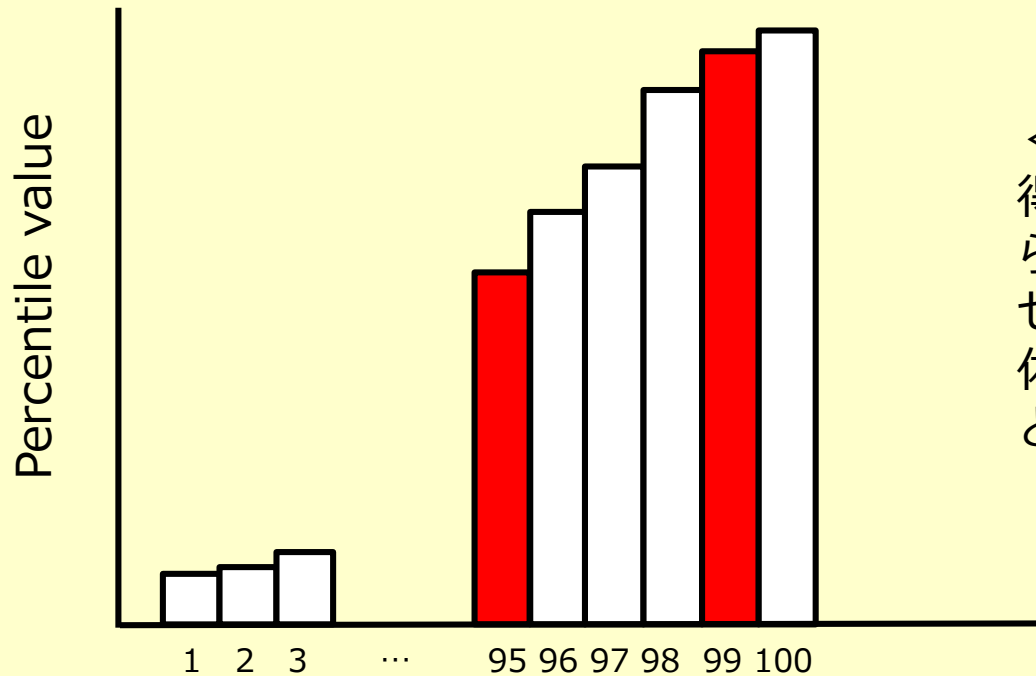
片側確率 $\alpha$	0.05	0.01
自由度df		
1	6.314	31.821
2	2.920	6.965
3	2.353	4.541
⋮	⋮	⋮
19	1.729	2.539
20	1.725	2.528
$\infty$	1.645	2.326 (FDAガイダンスでは2.33)

データに正規性が認められた場合、正規分布を用いてcut pointを設定する。検体が少ない場合、自由度 $n-1$ の $t$ 分布において、 $t_{\alpha, n-1}$  ( $t$ 統計量がその値以上になる確率が $\alpha$ であるような値)を $t$ 分布表から求め、cut pointを設定することがある。臨床試験に使用するADA分析法のバリデーションでは、cut pointの設定に50検体以上必要となるため、 $t_{\alpha, \infty}$ の値を使用する。Screening assayでは偽陽性率5% ( $\alpha=0.05$ )、Confirmatory assayでは1% ( $\alpha=0.01$ ) になるようにcut pointを設定する。

$$\text{Screening cut point} = \text{Mean} + t_{0.05, df} \times \text{SD}$$

$$\text{Confirmatory cut point} = \text{Mean} + t_{0.01, df} \times \text{SD}$$

# Non-parametric method

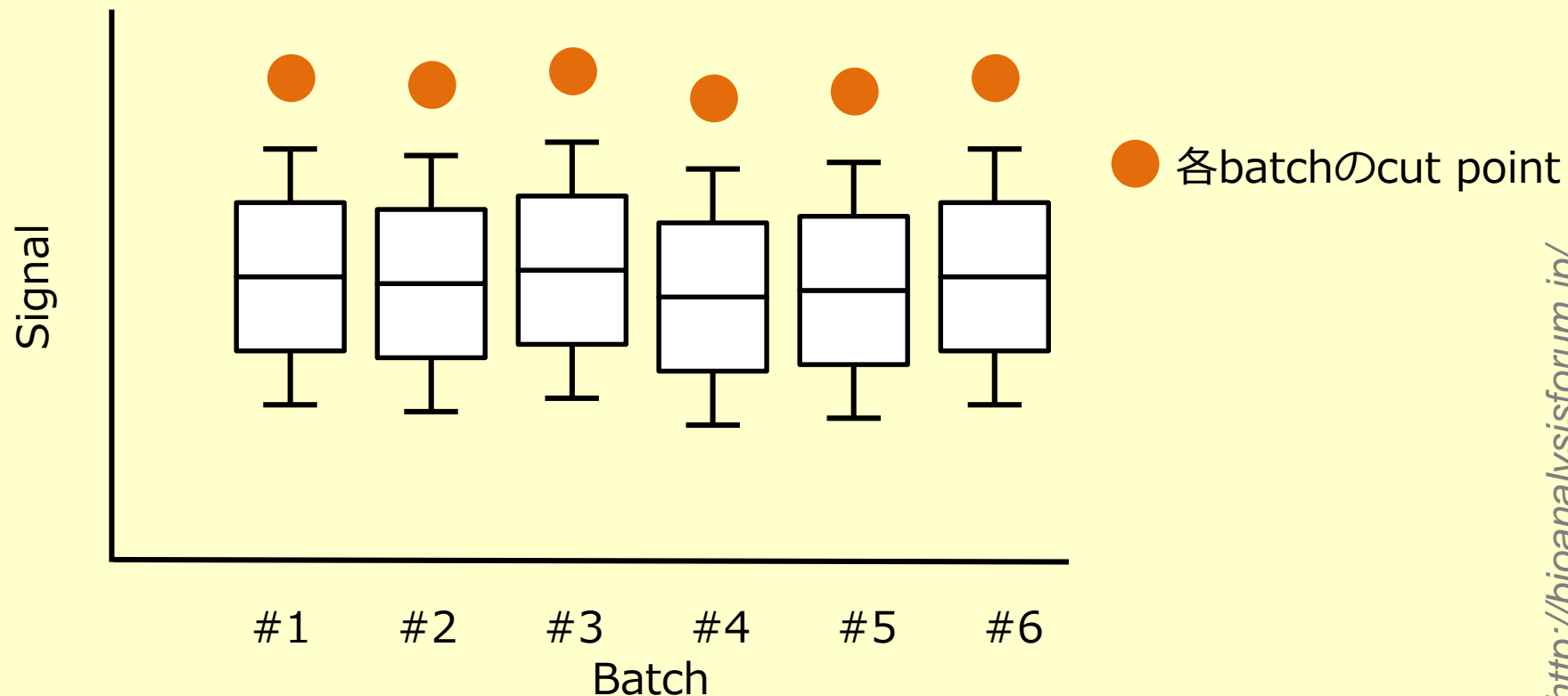


## <Percentile>

得られたデータを小さい数字から大きい数字に並び替え、パーセント表示することにより、全体における位置を測定する単位として用いられる。

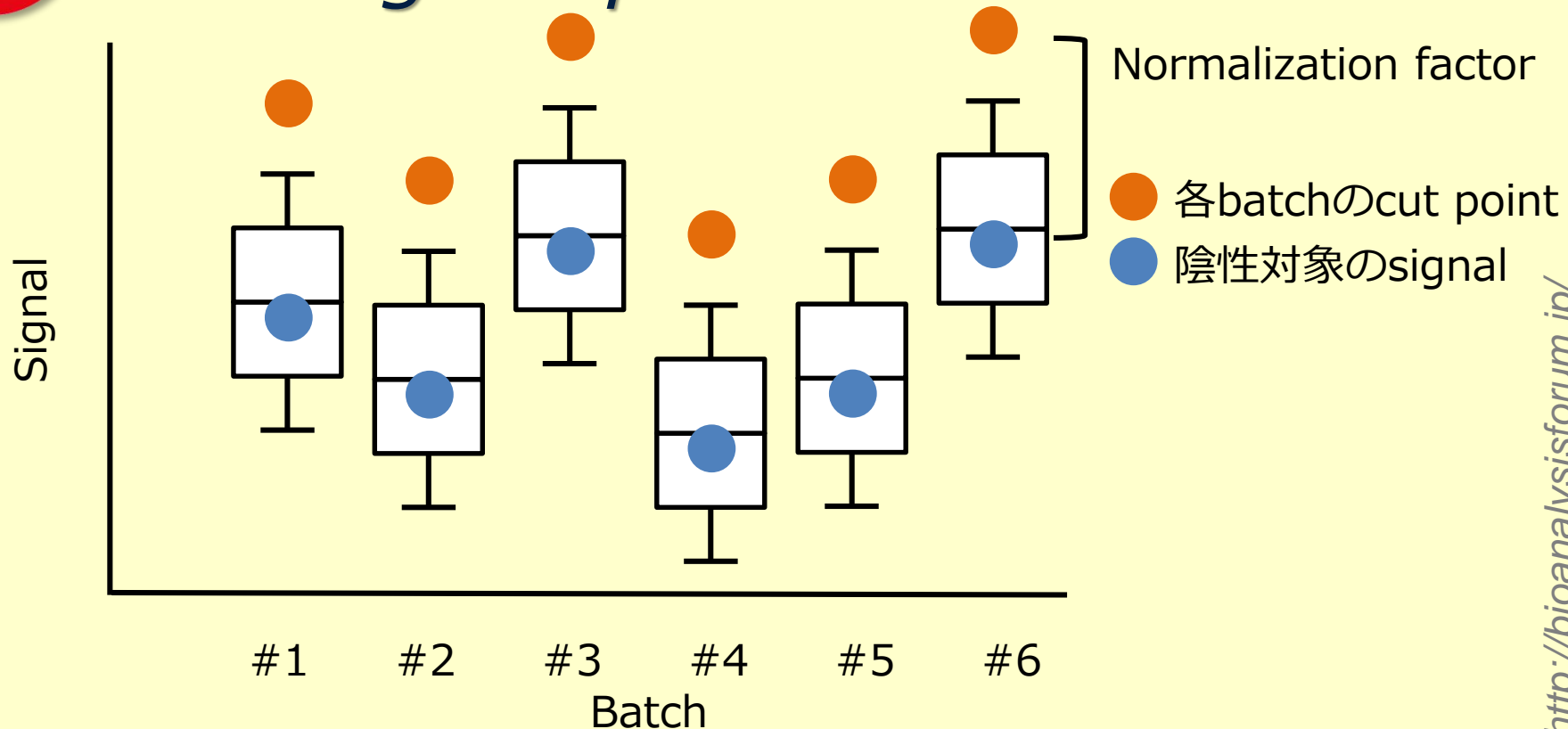
得られたデータの分布が正規分布に従わない場合、percentileを用いてcut pointを設定する。Screening assayでは95<sup>th</sup> percentile, Confirmatory assayでは99<sup>th</sup> percentileで設定する (n = 100の場合は95番目及び99番目の数値をcut pointとする)。

# Fixed cut point



各batchの平均と分散が安定しており，有意な差がない。  
→各batchのcut pointの平均値を採用する（分析法バリデーションで1つの値に固定）。

# Floating cut point

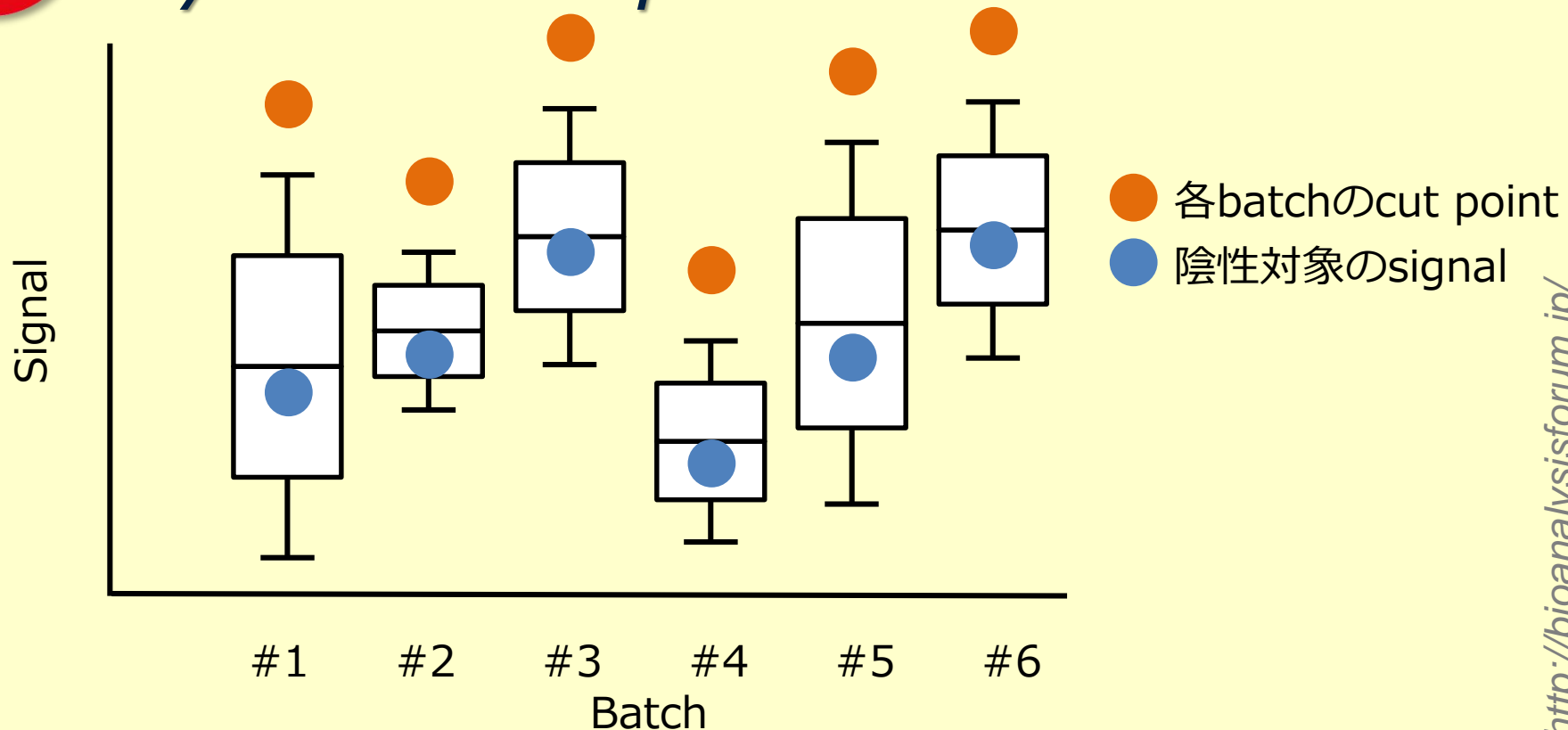


<http://bioanalysisforum.jp/>

各batchの平均は有意な差があるが、分散は有意な差がない（各batchのcut pointは異なるが、平均値から同程度離れている）。

→分析法バリデーションでnormalization factorを算出し、**各batchの陰性対象のsignalの平均値 + normalization factor**をcut pointとする（毎回異なる値）。

# Dynamic cut point



各batchの分散に有意な差がある（分析法が安定していない）。  
 →各batchで複数の陰性対象を測定して分散を算出し、各batchの陰性対象のsignalの平均値 + 1.645 SDをcut pointとする（※Screening assayの場合）。  
 毎回異なる値となる。

Dynamic cut pointは推奨されない（FDAガイダンス 2019）。

## 免疫原性に関するガイドライン (米国)

- Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products-Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection (2019)
- Guidance for Industry : Assay Development and Validation for Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products, Draft (2016)
- Guidance for Industry : Scientific Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Product (2015)
- Guidance for Industry : Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products (2014)
- Guidance for Industry : Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products, Draft (2013)
- Guidance for Industry : Assay Development for Immunogenicity Testing of Therapeutic Proteins, Draft (2009)

## 免疫原性に関するガイドライン（欧州）

- Guideline on Immunogenicity assessment of therapeutic proteins (2017)
- Guideline on Immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins , Draft (2015)
- Concept paper on the revision of the guideline on assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins, Draft (2014)
- Guideline on immunogenicity assessment of monoclonal antibodies intended for in vivo clinical use (2012)
- Guideline on immunogenicity assessment of monoclonal antibodies intended for in vivo clinical use, Draft (2010)
- Concept paper on Immunogenicity assessment of monoclonal antibodies intended for in vivo clinical use, Draft (2009)
- Guideline on Immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins (2007)
- Guideline on Immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins, Draft (2007)
- Concept paper on the revision of the guideline on Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products (2006)

# 非臨床試験におけるADA評価

ICH S6(R1) : バイオテクノロジー応用品の非臨床における安全性評価

## 3.6 免疫原性

ヒトへ適用されるバイオ医薬品の多くは、動物で免疫原性を示す。そのため、反復投与毒性試験を行う際には、これらの試験の解釈に役立てるために、この種の医薬品の投与に伴い産生された抗体を測定しなければならない。

FDA Guidance : S6 Addendum to Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals

<内容>

非臨床試験における免疫原性評価は、ヒトまたはヒト型化タンパク質のヒトにおける免疫原性を予測するものではない。ADAの測定は、薬力学的マーカーの変化、薬力学的マーカーが利用できない場合での予期せぬ薬物曝露量の変化、または免疫介在性の反応（免疫複合体病、脈管炎、アナフィラキシーなど）の所見がみられた場合に必要である。抗薬物抗体が検出された場合には、試験結果の解釈に与える影響を評価すべきである。In vivo毒性試験においてADAが検出され、薬理作用の維持を示す薬力学的マーカーがない場合には、中和活性を解析する必要がある。



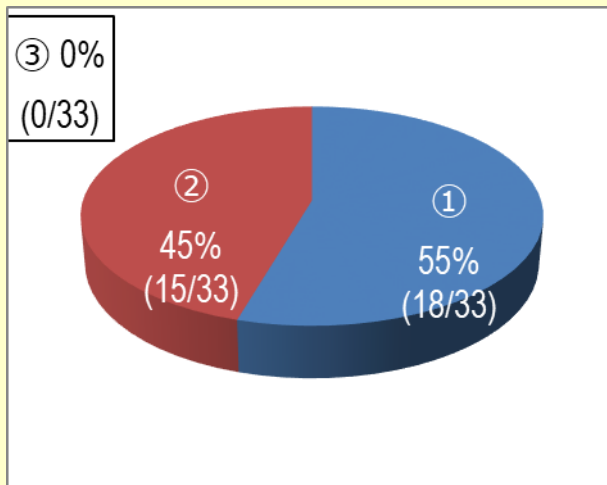
アンケート結果 *Survey result*

	第1回アンケート	第2回アンケート
内容 <i>Contents</i>	非臨床試験/分析法開発に関する課題 <i>Topics on Non-Clinical studies / Method Development</i>	臨床試験に関する課題 <i>Topics on Clinical studies</i>
実施期間 <i>Term</i>	2019/10/21- 2019/11/5	2019/10/30- 2019/11/13
実施期間 <i>Duration</i>	16 days	15 days
実施設問数 <i>Number of questions</i>	38 questions	37 questions
配布先 <i>Distributed</i>	DG supporters	DG supporters
回答者数 <i>Valid responses</i>	33 people	26 people

Q1 所属は？

Where are you working at?

Answered : 33

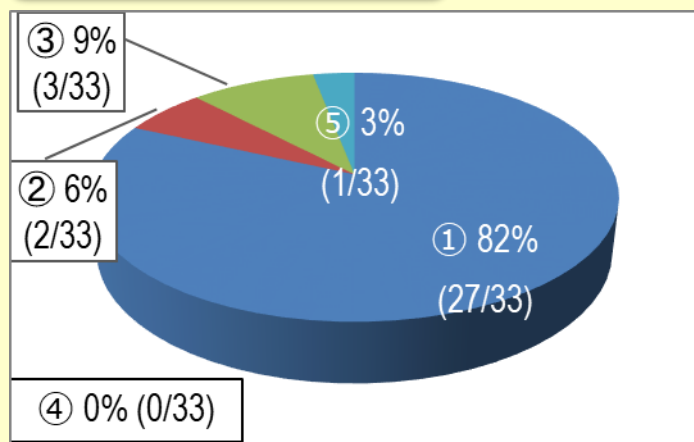


- ① 製薬企業
- ② CRO
- ③ その他（記述をお願いします）

## Q2 立場は？

Your role?

Answered : 33



- ① バイオアナリシス担当 (非臨床, 臨床両方)
- ② バイオアナリシス担当 (臨床)
- ③ バイオアナリシス担当 (非臨床)
- ④ 臨床試験のプロジェクトマネジメント担当
- ⑤ その他 (具体的に)

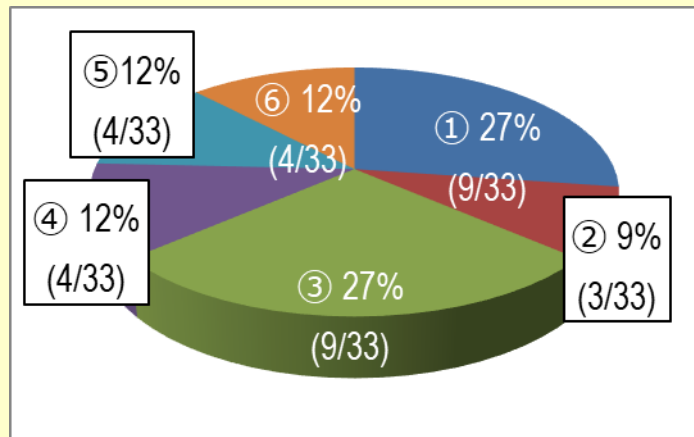
その他

・非臨床プロジェクトマネジメント

## Q3 ADA分析のご経験（担当化合物数）は？

How many compounds do you have experience of ADA assay ?

Answered : 33



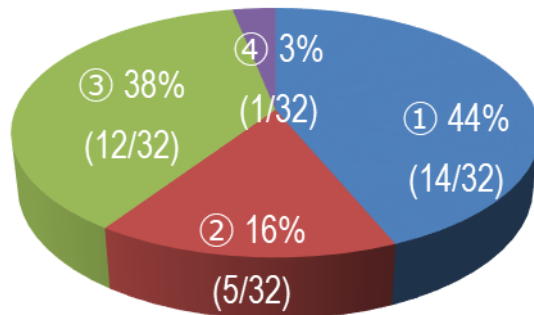
- ① 0
- ② 1
- ③ 2~5
- ④ 6~10
- ⑤ 11~20
- ⑥ 21~

● ③, ④, ⑤の合計が51%であり、過半数は2化合物以上を経験。

Q4 臨床と非臨床でADA分析項目（Screening, confirmatory, titer, 中和）を区別して考えるか？

Do you consider clinical and non-clinical ADA analysis items (Screening, confirmatory, titer and Neutralization) differently ?

Answered : 32



- ① 区別している
- ② 区別していない
- ③ (立場がCROの場合で) 顧客ごとに要望が異なるため、区別することもある、しないこともある
- ④ その他 (具体的に)

その他  
・関与していないため、わかりません

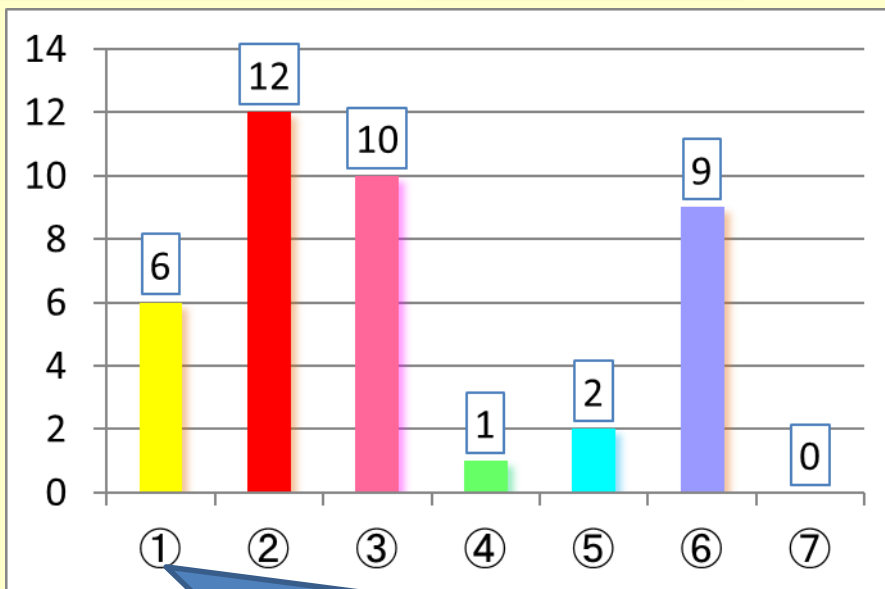
●分析項目を区別することが多いのは、臨床と非臨床で求められるレベルが異なるためと考えられた。

Q5 非臨床でADA測定はどの項目を実施？  
(複数回答可)

What are you doing for non-clinical ADA measurements?

Answered : 32

複数選択可  
Multiple answers allowed



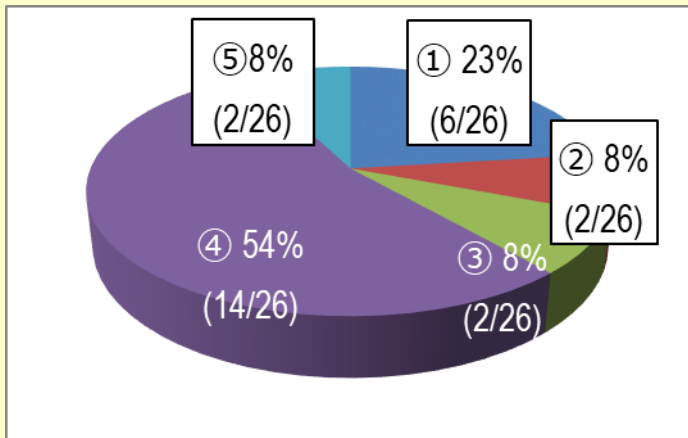
- ① Screening, Confirmatory, Titer, 中和
- ② Screening, Confirmatory, Titer
- ③ Screening, Confirmatory
- ④ Screening, Titer
- ⑤ Screeningのみ
- ⑥ 経験なし
- ⑦ その他 (具体的に)

ICH S6ガイダンスで「PDマーカが無い場合は中和活性まで評価すべき」となっているため、①はそういう状況と考えられた。

Q6 Q5にて「Screeningのみ」の評価となる場合、Screeningの信頼区間は何を用いるか？

If Q5 evaluates as "Screening only", what is the confidence interval for Screening?

Answered : 26



- ① 5%
- ② 1%
- ③ 0.1%
- ④ 経験なし
- ⑤ その他 (具体的に)

● Screeningのみの評価となる場合、偽陽性を少なくするために1%あるいは0.1%が多いと予想していたが、意外にも5%が多い。

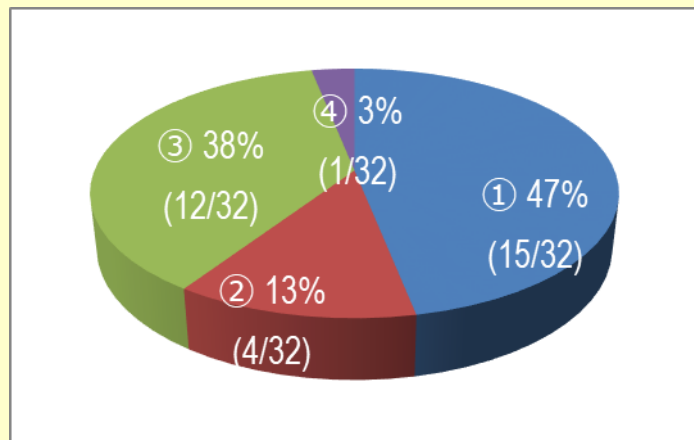
その他

- Q5でScreeningのみの評価ではないですが、Q7へ進まないため回答します。Screeningは5%です。
- 委託者のポリシーによる。

Q7 非臨床ADAにおいて確認アッセイ（Confirmatory assay）を実施する場合の信頼区間は？

What is the confidence interval for performing a confirmatory assay in a nonclinical ADA?

Answered : 32



- ① 1%
- ② 0.1%
- ③ 経験なし
- ④ その他 (具体的に)

● 1%が多いのはShankar White Paperの推奨の影響で、特殊事情としてCut Pointが小さくなりすぎるときなどに0.1%を使うこともあると考えられた。

その他

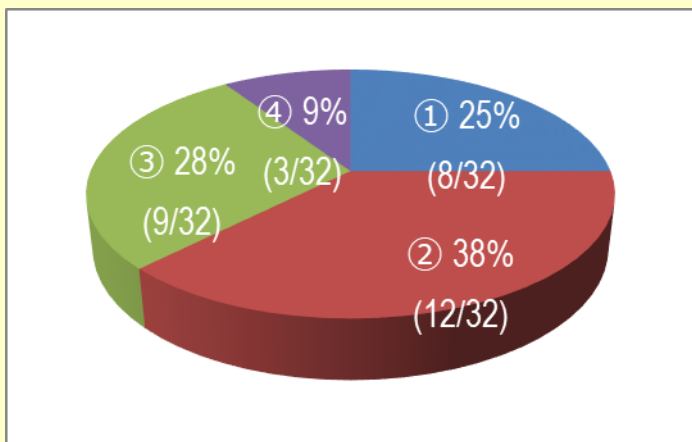
- 委託者のポリシーによる



Q8 非臨床ADAにおいてカットポイント算出時に  
統計解析（Shapiro-Wilkの正規性検定）しているか？

Is statistical analysis (Shapiro-Wilk normality test) performed at the time of cut point calculation in non-clinical ADA ?

Answered : 32



- ① している
- ② していない
- ③ 経験なし
- ④ その他 (具体的に)

- 正規性検定をしていない方が多いが、これは統計解析するに耐える例数が十分でないことと関係があると考えられた。
- この場合、正規性があるとみなしているのか、ないとしているのか、各社で状況が分かれている可能性がある。

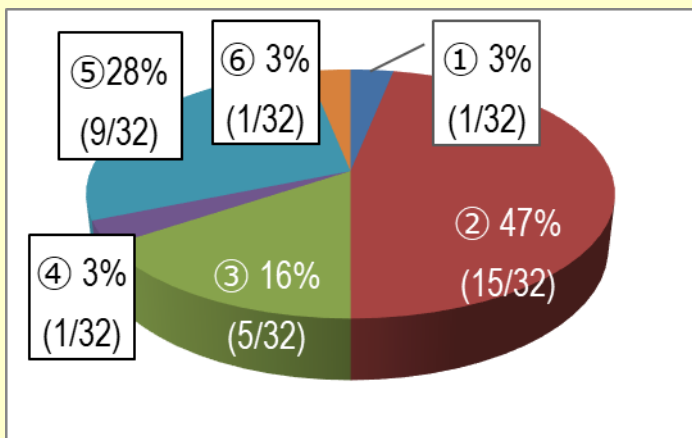
その他

- 試験によってはしている
- CROなので両方のパターンでの経験あり
- 委託者のポリシーによる

Q9 非臨床ADAにおいてScreening cut point算出に用いる検体数は？

What is the number of samples used for calculating the screening cut point in a nonclinical ADA?

Answered : 32



- ① ~10
- ② 11~25
- ③ 26~50
- ④ 51~
- ⑤ 経験なし
- ⑥ その他 (具体的に)

● 最も多いのは②となったが、これはShankar White Paperでは15例以上と記載があるためと考えられた。

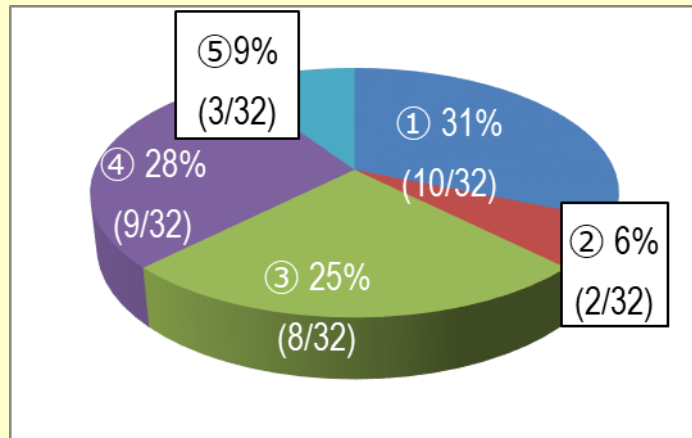
その他

- 委託者のポリシーによる

Q10 非臨床ADAでの感度目標はいくらか？

What is the sensitivity target for non-clinical ADA ?

Answered : 32



- ① 100 ng/mL
- ② 250 ng/mL
- ③ 500 ng/mL
- ④ 経験なし
- ⑤ その他 (具体的に)

● 感度目標は2019年に施行されたFDAの免疫原性ガイダンスで推奨されている100 ng/mLと以前推奨されていた500 ng/mLで分かれているようであった。

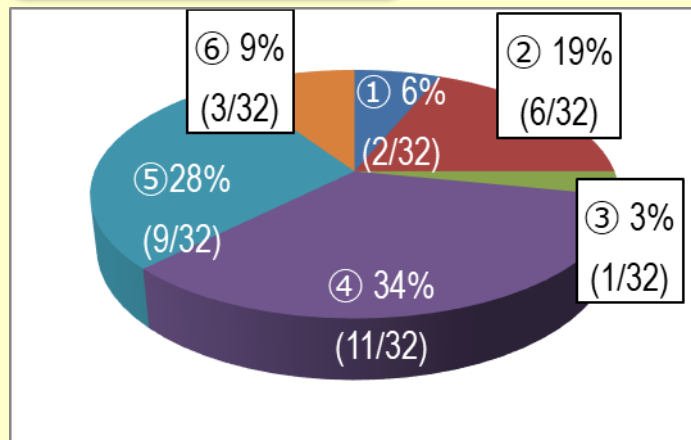
その他

- 設定していなかった (実施時)
- 100 ng/mLを目指して無理だったら500 ng/mLへ変更する.
- 委託者のポリシーによる

Q11 非臨床ADAでのDTL (Drug tolerance limit) 目標は  
どうしているか？

What is the DTL (Drug tolerance limit) target in non-clinical ADA ?

Answered : 32



- ① 予想される最高血中薬物濃度
- ② 予想されるトラフ時の血中薬物濃度
- ③ 100 µg/mL
- ④ 特に目標は定めていない
- ⑤ 経験なし
- ⑥ その他 (具体的に)

その他

- 委託者のポリシーによる (2件)
- トラフの血中濃度が理想だが  
毒性試験の場合困難なことが多い

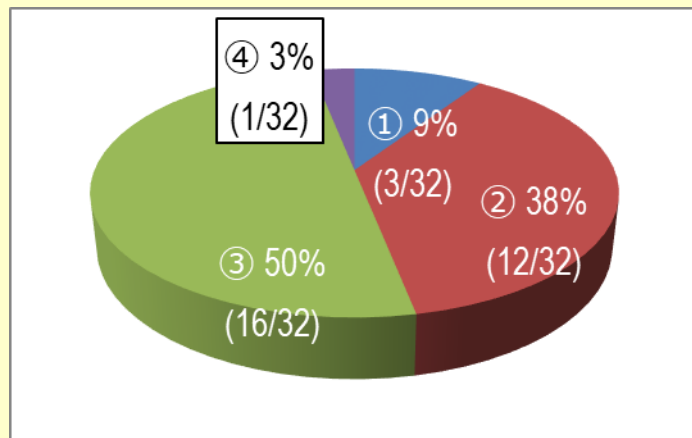
- 非臨床ではDTL目標を定め  
ない場合もあるという回答が  
34%あるが、臨床で投与し  
ないような高用量を投与する  
ことがあり、リーズナブルな  
方針であると考えられた。

Q12 ICHガイドライン「S6」には、非臨床ADA分析は薬物濃度推移の解釈のためなどに必要となる場合がある、と記載があるが、採血だけしておき、後日で測定系を構築することもあるか？

The ICH Guideline "S6" states that non-clinical ADA analysis may be necessary for interpretation of changes in drug concentration.

Do you sometimes collect blood only and then construct a assay system at a later date?

Answered : 32



- ① はい
- ② いいえ
- ③ 経験なし
- ④ その他 (具体的に)

- ADA分析する前提で準備している場合がほとんどであり、各社の保守的な姿勢が見て取れる状況であった。

その他

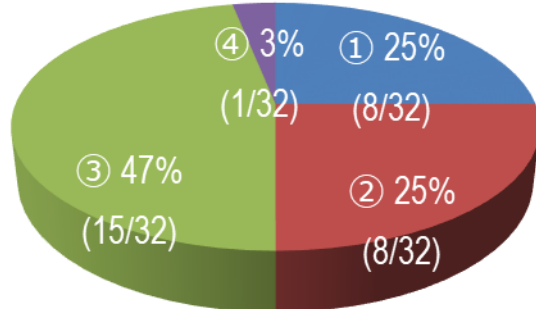
- ICH S6ガイドラインに従い、速やかにADA分析を行っている。

Q13 非臨床ADAでは、分析法準備を簡便にするためGenericなADA分析法を使用することがあるか？

(例：検出抗体にAnti-animal IgG-HRPなどを用いるなど)

Does nonclinical ADA use a generic ADA method to simplify method preparation?  
(Ex: Use Anti-animal IgG-HRP, etc.)

Answered : 32



- ① はい
- ② いいえ
- ③ 経験なし
- ④ その他 (具体的に)

- Q4にて非臨床と臨床を区別して考える割合が合計82%（どちらも経験をYesとすれば）あったが、このうちの一部の方が、非臨床用に簡易的なGenericな分析法を使用する場合があると考えられた。

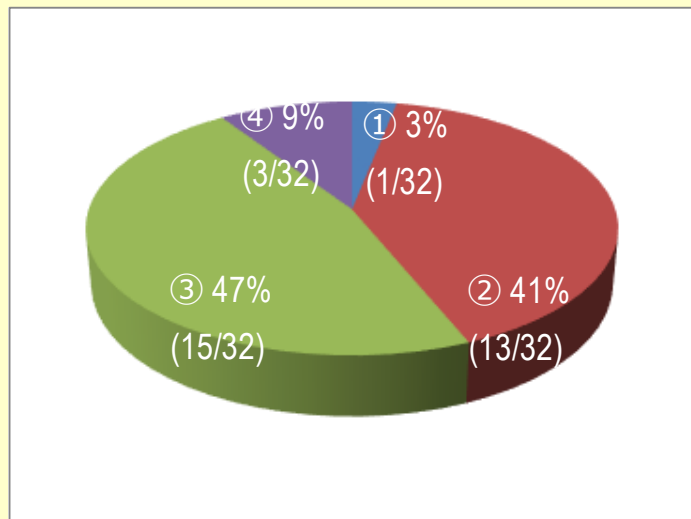
その他

- 社内判断（研究レベル）は、はい。申請試験では、いいえ。

Q14 非臨床ADAではSinglicateの分析を許容できるか？

In non-clinical ADA, do you accept for Singlicate analysis?

Answered : 32



- ① はい
- ② いいえ
- ③ 経験なし
- ④ その他 (具体的に)

- Singlicate分析を許容する実例は少ないため、科学的根拠やエビデンスが弱いのではと考えられた。

その他

- 経験はないですが考え方としてはありだと思います。
- **Titer用の試料は許容可能。**
- 許容してもいいと思うが実施経験はなし

- Titer用試料は、1試料につき多段階の測定値を観測できることからSinglicateにすることの脆弱性を補完できると考えられた。

Q15 (自由記述) 非臨床ADA分析で普段感じていることは何か？

(Free description) Please tell us what you usually feel in non-clinical ADA analysis.

Answered : 8

- 非臨床ADAは臨床ADAとは目的が違うため、簡便に評価したいという意見が多かった。

- 1 特になし
- 2 非臨床ADAはTKの結果の解釈のためという目的を考えるとFDAガイダンスに準ずるような手厚い測定はいるのかなと思う。
- 3 社内で簡単にADA産生の傾向を見るだけではGeneric法で良いと思う。GLP TOXのようなpivotal studyでは臨床に近い感覚でADA分析を行っている (n数は少ないが)。ただ、臨床へ進む場合はほぼマトリックス違いになるため、あまり苦労せず楽な時がある。
- 4 他社の状況を詳しく知りたい
- 5 全ての個体のADAが測定できれば良いのですが、サテライトやモニタリング的な採血点の個体の説明が難しいです。



Q15 (自由記述) 非臨床ADA分析で普段感じていることは何か？

(Free description) Please tell us what you usually feel in non-clinical ADA analysis.

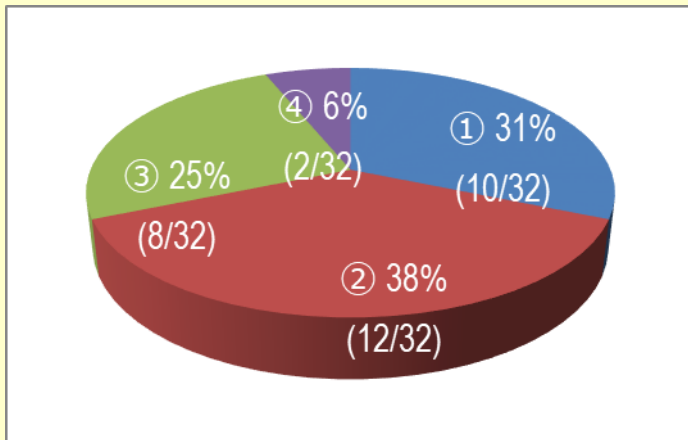
Answered : 8

- 6 サテライト群であったりモニタリング的な採血であるため、解釈に限界があつて意義が感じられにくい。  
ヒトに比べて抗体価の上がり方が極端に高かったり、ADA曝露が増えるケースが多いような感触があり、ヒトの保障には直結しにくい。  
ほとんどのケースでヒトと同じ分析法が使えないので、分析技術を磨くのに最適だと思って研鑽の材料としている。
- 7 動物の免疫原性が、ヒトの免疫原性予測に役立つわけでもなく、アッセイ系確立の苦勞と比較して、あまり有用な情報が得られないと感じている。
- 8 臨床ADAとは目的が異なるので、非臨床での評価はもっと簡易的にしてもよいのではないか。例) カットポイントを99.9%信頼区間で計算してポジネガを判定したうえでS/N比をADAの強度として用いるなど。

Q16 (非臨床・臨床共通) カットポイント算出時, 外れ値を把握するため  
予め規定数以上のロットをスクリーニングするか?

(Non-clinical / Clinical) When calculating the cut point, do you screen more individual lots than the specified number in advance to grasp outliers?

Answered : 32



- ① する
- ② しない
- ③ 経験なし
- ④ その他 (具体的に)

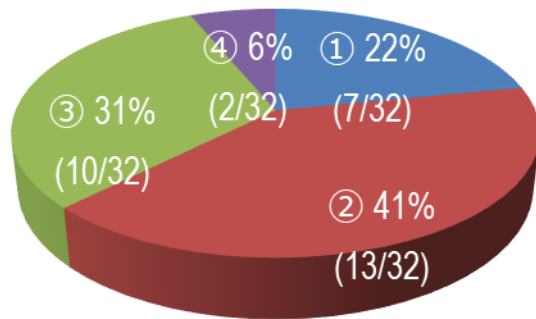
その他

- ・ 臨床のみ実施
- ・ 外れ値把握の目的ではしないが, 低シグナルの陰性対照を調製するためにスクリーニングする

Q17 (非臨床・臨床共通) 複数プレートを同日に測定する場合において、カットポイント算出時、プレート間差はどのように考慮するか？

(Non-clinical / Clinical) When measuring multiple plates on the same day, in case of calculating the cut point, how should the difference be considered between plates?

Answered : 32



- ① 複数のプレートに設置したネガティブコントロール (NC) の平均を用いてカットポイントを算出
- ② プレートごとに設置したネガティブコントロール (NC) で補正するなどしてからカットポイントを算出
- ③ 経験なし
- ④ その他 (具体的に)

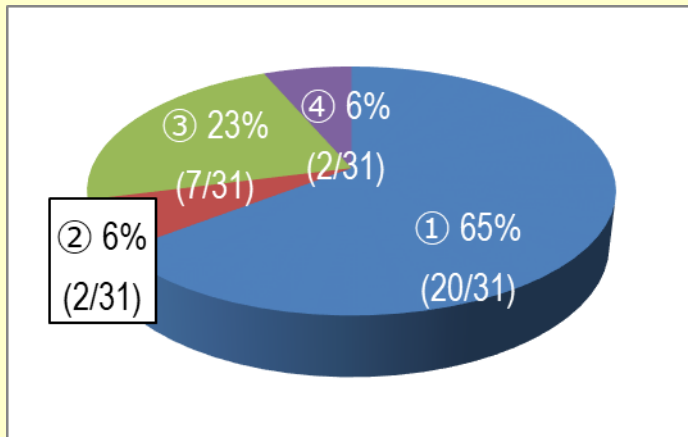
その他

- プレート毎にカットポイントを算出
- プレートごとに設置したNCからプレートごとに カットポイントを算出

Q18 (非臨床・臨床共通) 分析単位間再現性はどのように評価するか? ①

(Non-clinical / Clinical) How should inter-assay precision be evaluated? ①

Answered : 31



- ① 得られたシグナルから精度を算出
- ② 得られたシグナルをS/N比補正した値から精度を算出
- ③ 経験なし
- ④ その他 (具体的に)

その他

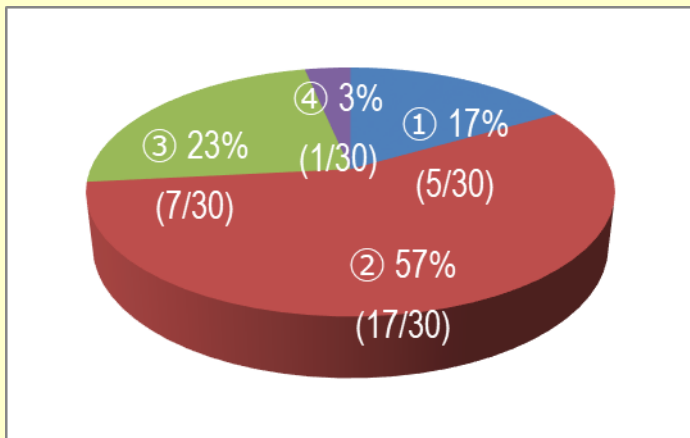
- ・ 検量線, QCサンプルを用いて濃度値に変換して評価している
- ・ ケースバイケース

- S/N比で精度を評価すると回答した方が2名いるが, これは分析単位間でシグナルにバラつきが出た場合の措置あるいは予防策だと考えられ, Floating cut pointを採用することが多いことを考えると, 合理的だと考えられた。

Q19 (非臨床・臨床共通) 分析単位間再現性はどのように評価するか? ②

(Non-clinical / Clinical) How should inter-assay precision be evaluated? ②

Answered : 30



- ① n=5×3日間 (n=15) の精度が20%以内
- ② n=3×6日間 (n=18) の精度が20%以内
- ③ 経験なし
- ④ その他 (具体的に)

- TK (LBA) では n=3×6日間での実施が多いため、TKを参考にした実施が多いように見受けられた。

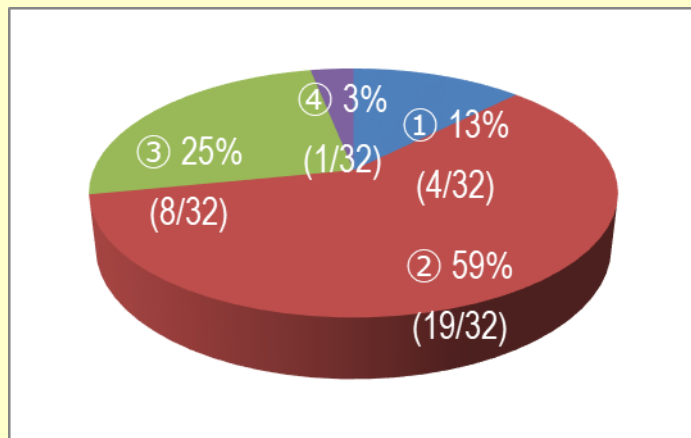
その他

- 非臨床と臨床でn数を変えている (非臨床n=12~15) , 臨床n=18)

Q20 (非臨床・臨床共通) DTL (Drug tolerance limit) は  
どうやって算出しているか？

(Non-clinical / Clinical) How should DTL (Drug tolerance limit) be evaluated?

Answered : 32



- ① 一定濃度のPositive Control試料に対して，複数濃度の薬物添加試料を測定し，添加薬物濃度で検量線を引き，カットポイントの濃度をDTLとする
- ② 一定濃度のPositive Control試料に対して，複数濃度の薬物添加試料を測定し，カットポイントを超える最大の薬物濃度をDTLとする
- ③ 経験なし
- ④ その他 (具体的に)

- 大半がカットポイントとPCシグナル値の比較でDTLを算出していた。

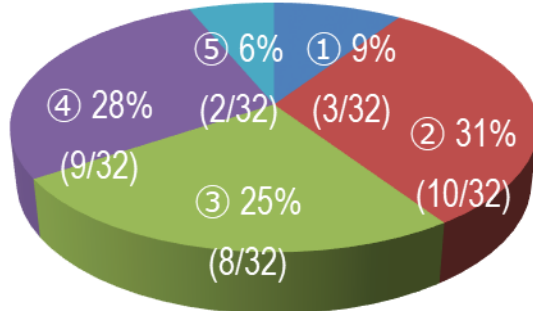
その他

- 複数濃度の抗体と複数濃度の薬物添加により確認

Q21 (非臨床・臨床共通) LPC (low positive control)の濃度設定はどのように決めているか？

(Non-clinical / Clinical) How will the concentration of LPC (low positive control) be determined?

Answered : 32



- ① Shankar et al., 2008, JPBA (Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products) の論文に沿って, 0.1% false positive rateで設定
- ② 要求感度を満たすよう設定 (例: 臨床の場合100 ng/mL に合わせる等)
- ③ 特に基準はない
- ④ 経験なし
- ⑤ その他 (具体的に)

● ケースバイケースで設定している方が多く, Shankar White Paperの設定方法が Best Practiceではないことが示唆された。

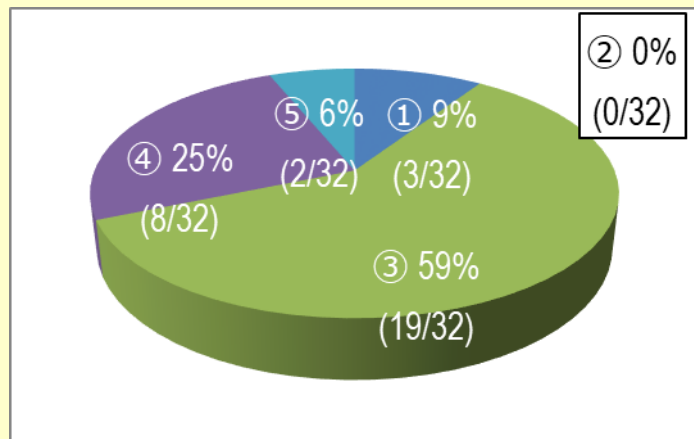
その他

- (半) 定量法の検量線 (もしくは陽性抗体の希釈曲線) から定量法のLQCに準じて設定する
- 委託者のポリシーによる

Q22 (非臨床・臨床共通) Positive controlは第一選択として何を使用しているか？

(Non-clinical / Clinical) What will be your first choice as a Positive Control?

Answered : 32



- ① モノクローナル抗体 (単体)
- ② モノクローナル抗体 (複数をプール)
- ③ ポリクローナル抗体
- ④ 経験なし
- ⑤ その他 (具体的に)

● ポリクローナル抗体が第一選択

その他

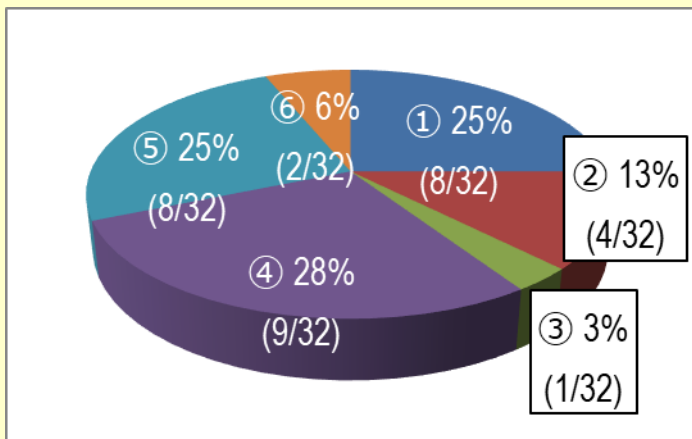
- 動物 (主にウサギ) 抗血清
- 委託者のポリシーによる



Q23 (非臨床・臨床共通) マトリックス中のPositive control (PC)の安定性はどうか評価しているか？

(Non-clinical / Clinical) How do you evaluate the stability of the positive control in the matrix?

Answered : 32



- ① 安定性試料のシグナル/調製直後のシグナル\*100
- ② 力価
- ③ Positive controlで検量線を引き, 安定性試料の定量値を算出して評価
- ④ 評価しない
- ⑤ 経験なし
- ⑥ その他 (具体的に)

● シグナルでの評価が多かったが, 評価しないという回答も多かった (PCは実質的にはADAとは異なることが前提であり, ポリクローナル抗体は血清中で安定という既報があるためと考えられた)

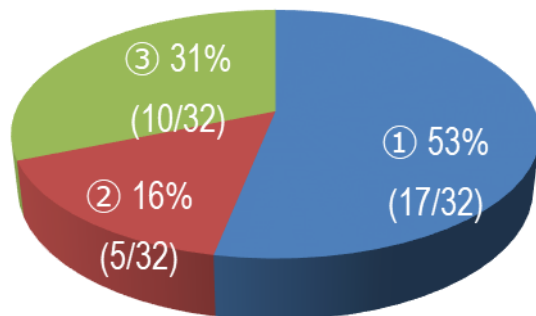
その他

- 選択肢中のシグナルと力価の両方の経験があります
- 委託者のポリシーによる

Q24 (非臨床・臨床共通) ADA分析で酸解離法 (Acid dissociation treatment) の経験はあるか?

(Non-clinical / Clinical) Do you have experience with acid dissociation in ADA analysis?

Answered : 32



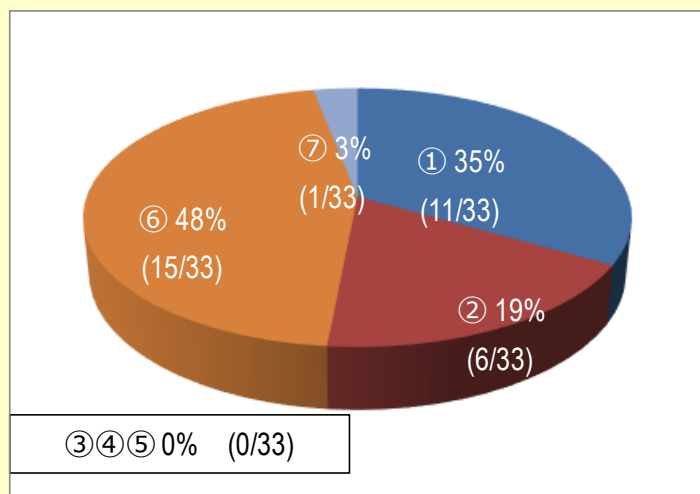
- ① はい
- ② いいえ
- ③ 経験なし

● 53%が「経験あり」と回答しており、一昔前と比べて酸処理が一般的になった様子うかがえた。

Q25 酸解離法はどのステージから実施するか？

Which stage do you start with acid dissociation ?

Answered : 33



- ① 非臨床試験
- ② 臨床試験フェーズ1以降
- ③ 臨床試験フェーズ2以降
- ④ 臨床試験フェーズ3以降
- ⑤ 製造販売後
- ⑥ 経験なし
- ⑦ その他 (具体的に)

● 非臨床試験か臨床試験フェーズ1以降が大半であった。

その他

- 委託者のポリシーによる

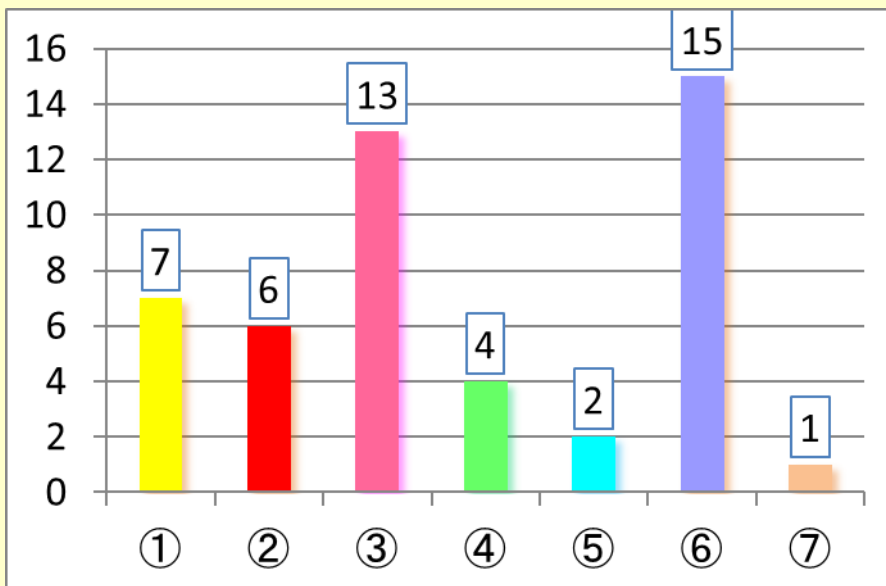
Q26 どのような酸解離の経験があるか？（複数回答可）

What acid dissociation experience do you have?

Answered : 32

複数選択可

Multiple answers allowed



- ① MSDB (Meso Scale Discovery bridging)法
- ② ACE (Affinity Capture Elution)法
- ③ SPEAD (Solid-phase extraction with acid dissociation)法
- ④ BEAD (Bead-extraction and heat-dissociation)法
- ⑤ PandA (Precipitation and Acid dissociation)法
- ⑥ 経験なし
- ⑦ その他 (具体的に)

その他

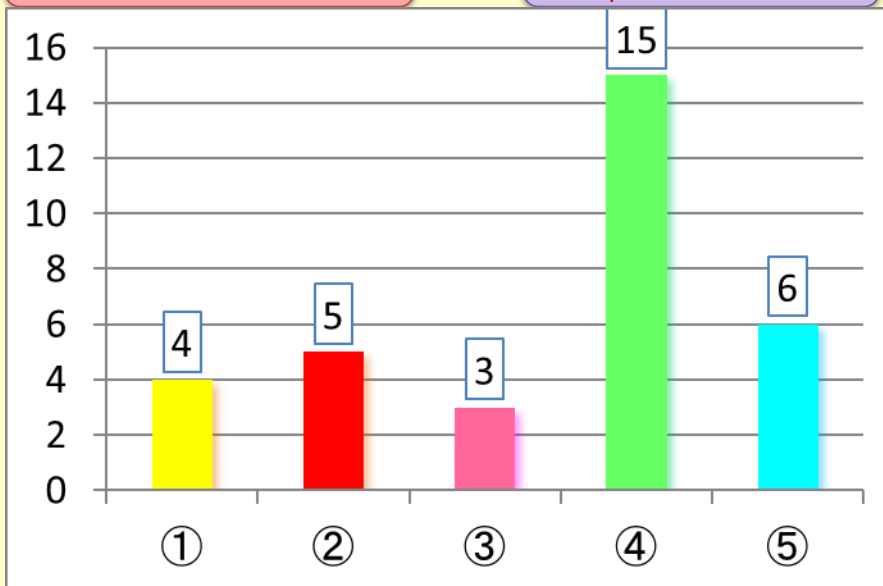
- いずれに該当するのか不明

● SPEAD法の経験者が多い。

Q27 酸解離の時間は？（複数回答可）

How long is acid dissociation?

Answered : 32

複数選択可  
Multiple answers allowed

- ① 5分
- ② 10分
- ③ 1時間
- ④ 経験なし
- ⑤ その他 (具体的に)

● 幅広い範囲の反応時間で酸解離が実施されている。

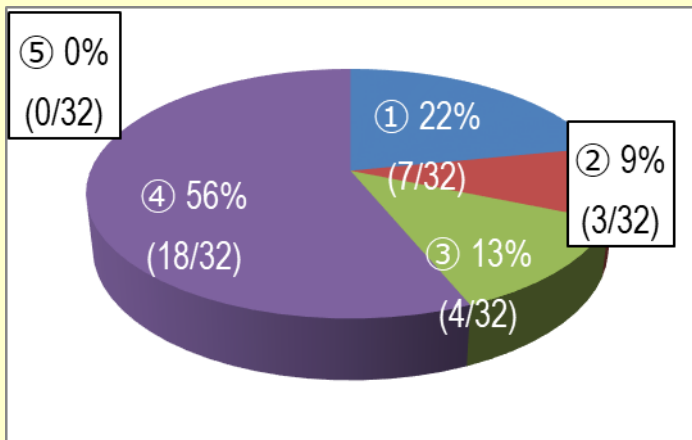
その他

- 15分
- 20分
- 酸処理液の組成により異なる
- 分析法ごとに最適化
- 委託者のポリシーによる
- Over night

Q28 酸解離の結果，ADAにダメージを与えてしまい  
反応性が低下したことはあるか？

Has any acid dissociation damaged the ADA and reduced its reactivity?

Answered : 32



- ① はい
- ② いいえ
- ③ 聞いたことはあるが、実際に比較をしたことがない
- ④ 経験なし
- ⑤ その他 (具体的に)

- 有効回答のうち約半数が経験しており，注意が必要な事象であると考えられた。

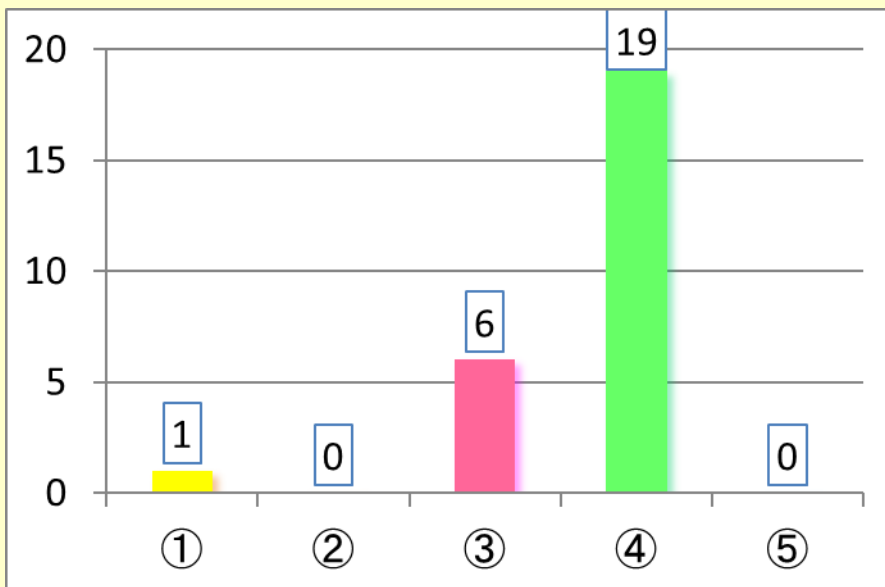
Q29 (Q28で経験ありと答えた方) その場合はどう対応したか?  
(複数回答可)

(For those who answered that they have experience in Q28 )  
What did you do when reactivity decreased due to acid dissociation?

Answered : 26

複数選択可

Multiple answers allowed



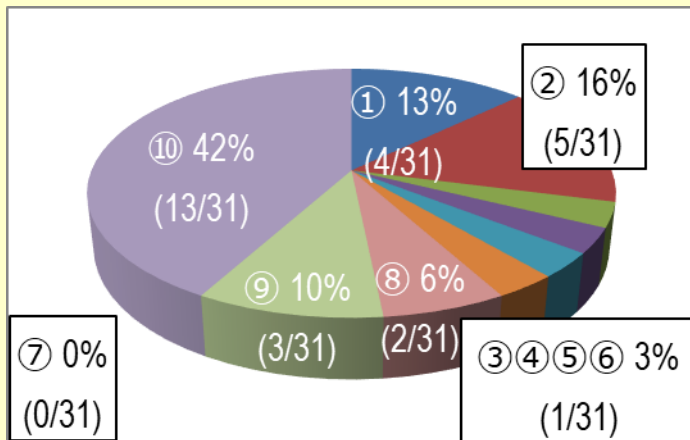
- ① 酸解離をしなかった
- ② 酸解離の濃度や反応時間を調整し, 問題ない条件を得た
- ③ 感度は低下したがDTLは向上したため反応性低下を受け入れた
- ④ 経験なし
- ⑤ その他 (具体的に)

● DTL向上という目的を果たしたため感度低下を受け入れるという回答が多かった。

Q30 中和抗体（Nab）分析の経験があるか？ある場合，Cell-based assay とELISA-based assayの実施経験の割合は？

Do you have experience in neutralizing antibody (Nab) analysis? If so, what is the percentage of experience in performing cell-based assays and ELISA-based assays?

Answered : 31



- ① Cell-based assayのみ経験あり
- ② ELISA-based assayのみ経験あり
- ③ Cell-based assay : ELISA-based assay  $\div$  9 : 1
- ④ Cell-based assay : ELISA-based assay  $\div$  8 : 2
- ⑤ Cell-based assay : ELISA-based assay  $\div$  7 : 3
- ⑥ Cell-based assay : ELISA-based assay  $\div$  1 : 1
- ⑦ Cell-based assay : ELISA-based assay  $\div$  3 : 7
- ⑧ Cell-based assay : ELISA-based assay  $\div$  2 : 8
- ⑨ Cell-based assay : ELISA-based assay  $\div$  1 : 9
- ⑩ 経験なし

- わずかにCell-basedよりELISA-based assayの割合が多い。

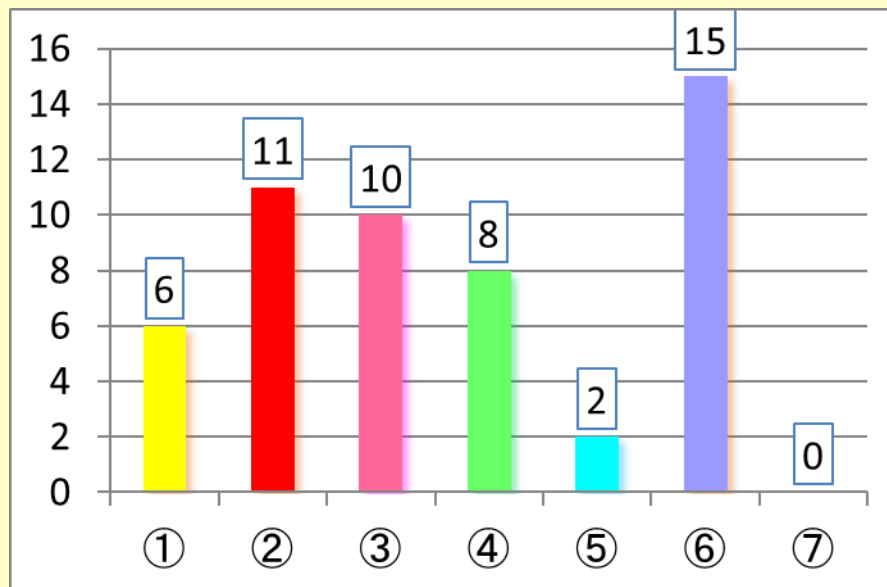


Q31 Nab分析を実施したステージは？（複数回答可）

When do you analyze Nab assay ?

Answered : 31

複数選択可  
Multiple answers allowed



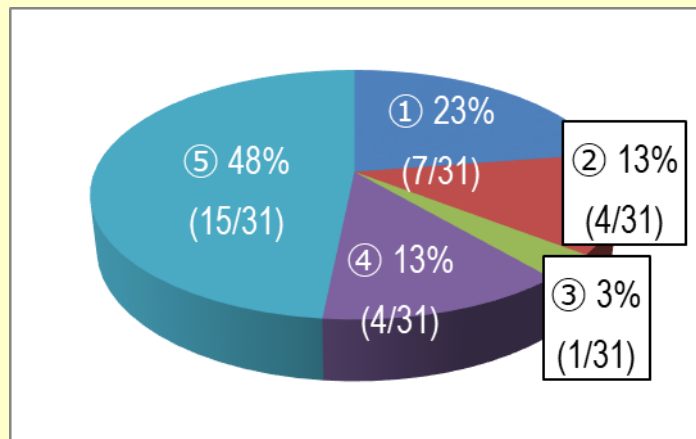
- ① 非臨床試験
- ② 臨床試験フェーズ1
- ③ 臨床試験フェーズ2
- ④ 臨床試験フェーズ3
- ⑤ 製造販売後
- ⑥ 経験なし
- ⑦ その他 (具体的に)

・P1から評価することが多い。

Q32 どのような場合にELISA-based assayを選択するか？

In what case do you choose ELISA-based assay ?

Answered : 31



- ① 細胞がない場合
- ② ターゲットが膜に発現していない場合
- ③ Cell-based assayで感度が達成できない場合
- ④ Cell-based assayでばらつきが大きく安定した系が構築できない場合
- ⑤ 経験なし

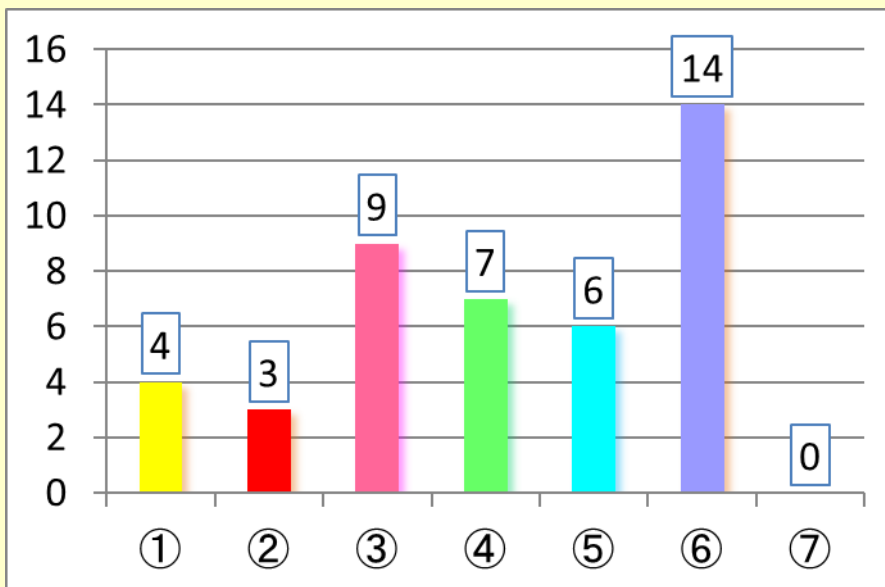
- ①のそもそも利用できる細胞が手に入らないというケースが最も多いが、②の回答はメカニズムに注目した判断軸で興味深い。

Q33 通常の抗体以外に対してのADA分析の経験があるか？  
(複数回答可)

What types of drug have you analyzed for ADA, except for antibody ?

Answered : 30

複数選択可  
Multiple answers allowed



- ① ADC
- ② Bispecific抗体
- ③ その他タンパク質
- ④ ペプチド
- ⑤ 核酸
- ⑥ 経験なし
- ⑦ その他 (具体的に)

- ペプチドや核酸など分子量が小さな化合物の開発が増えている。分子量の低下は溶解性や免疫原性の低下につながり、ポリクローナル抗体の作製時にも困ることがある。

Q34 通常の抗体以外に対してのADA分析（核酸，ペプチドなど）で  
困難を感じたこと（自由記述）

What was difficult in ADA analysis for drugs except for antibody ?

Answered : 9

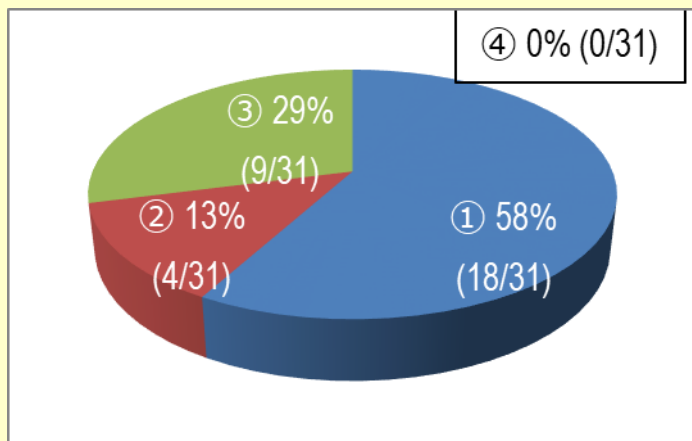
- ポリクロ抗体が得られない，標識が難しい。

1	特になし
2	薬物の標識が抗体と異なるので困難と感じる
3	ブリッジングがうまく機能しないことがあった。免疫しても抗体価が上がらず，分析に適した抗体が得られない。
4	難溶性の被験物質や核酸の標識
5	分子量の小さなものへのラベル化
6	動物で免疫しても抗体価があがらず，適当の陽性抗体がなかなか得られない。
7	標識や固相化が難しい
8	経験なし
9	ペプチドは抗体に比べて分子量がかなり小さいため，溶解度が問題になることがある。ADAブリッジングアッセイに用いるビオチン・ルテニウム標識体を作製する際，標識後の溶解性に関して注意が必要。

Q35 (臨床) カットポイント算出において統計解析  
(Shapiro-Wilkの正規性検定) しているか？

Do you statistically analyze (Shapiro-Wilk test) in cut point calculation for clinical study ?

Answered : 31



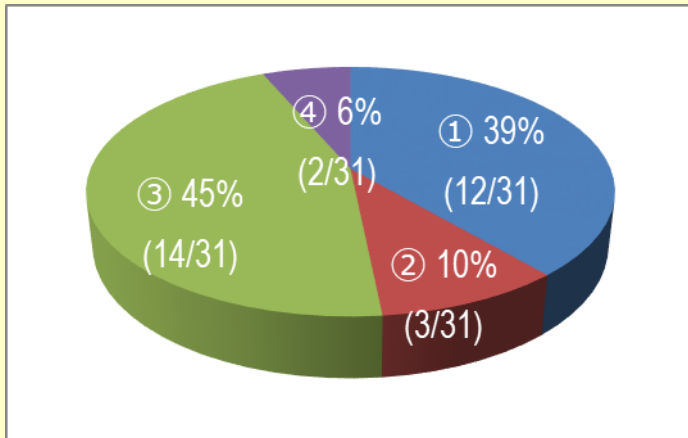
- ① はい
- ② いいえ
- ③ 経験なし
- ④ その他 (具体的に)

- 非臨床と異なり, 臨床では正規性の検討などを含めた統計解析することが多かった.

Q36 (臨床) Screeningで正規性がとれなかったら対数変換しているか？

Do you convert logarithmically when normality is rejected in cut point calculation for clinical study ?

Answered : 31



- ① はい
- ② いいえ
- ③ 経験なし
- ④ その他 (具体的に)

- 対数変換するというのが多いが、Shankar White Paper通りの対応であり、業界全体で同じ方向を向いていると考えられた。
- 一方で、しないと答えた方は、対数変換することでムラが取り除かれ、カットポイントが著しく小さくなることを懸念しているのではと考えられた。

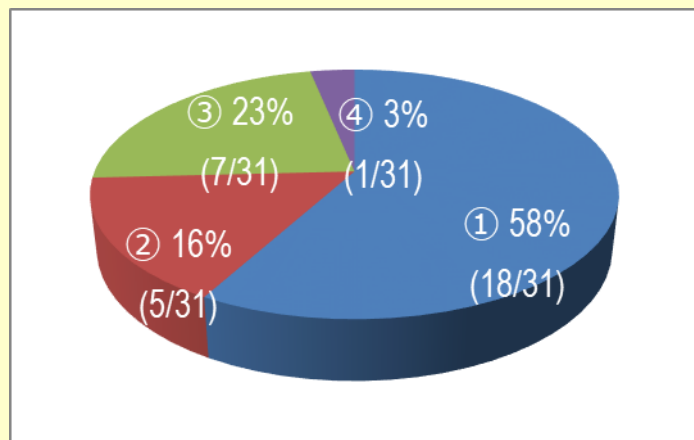
その他

- 分布形と影響を考慮してノンパラと使い分ける
- ノンパラも考慮するし、対数変換優先の時もあり、分析法と抗体の特徴により対応が変わる

Q37 (臨床) 確認アッセイ (Confirmatory assay) の信頼区間は？

Confidence interval for the confirmatory assay ?

Answered : 31



- ① 1%
- ② <0.1%
- ③ 経験なし
- ④ その他 (具体的に)

その他

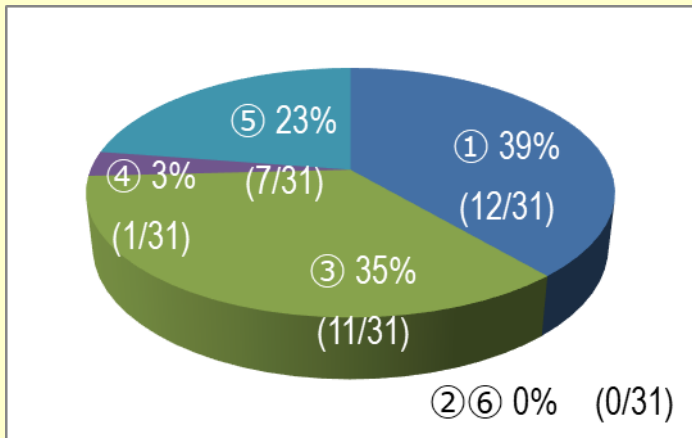
- 委託者のポリシーによる

- 1%が多いのはShankar White Paperの推奨文書の影響で、特殊事情としてカットポイントが小さくなりすぎるときなどに0.1%を使うこともあると考えられた。

Q38 (臨床) ADA分析業務にあたり、最も参考にしている文書は？

Which is the most referred document in ADA analysis work?

Answered : 31



- ① Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products – Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection (FDA, 2019)
- ② Guideline on Immunogenicity assessment of therapeutic proteins (EMA, 2017)
- ③ Shankar et al., 2008, JPBA (Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products )
- ④ バイオ医薬品の免疫原性評価に用いられる抗薬物抗体分析に関する技術的要件 (国衛研, 2018)
- ⑤ 経験なし
- ⑥ その他 (具体的に)

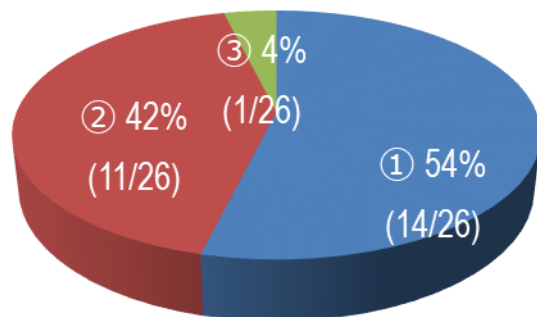
● ①FDA GLと③shankar



## Q1 所属は？

Where are you working at?

Answered : 26



- ① 製薬企業
- ② CRO
- ③ その他（記述をお願いします）

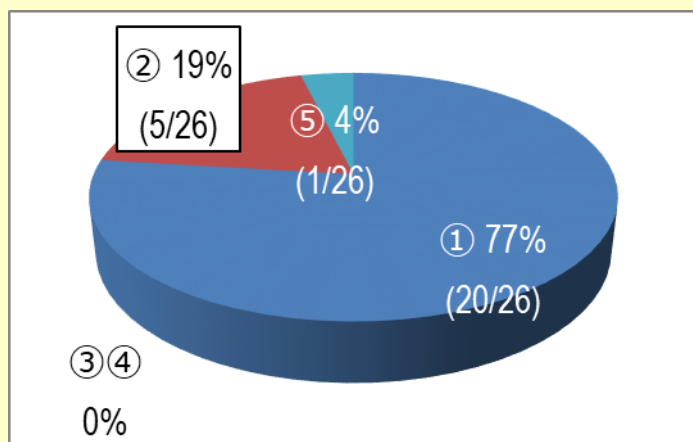
その他 ・ 特定機能病院

- 第1回と同じ割合, 回答数減少 (33→26)

## Q2 立場は？

Your role?

Answered : 26



- ① バイオアナリシス担当 (非臨床, 臨床両方)
- ② バイオアナリシス担当 (臨床)
- ③ バイオアナリシス担当 (非臨床)
- ④ 臨床試験のプロジェクトマネジメント担当
- ⑤ その他 (具体的に)

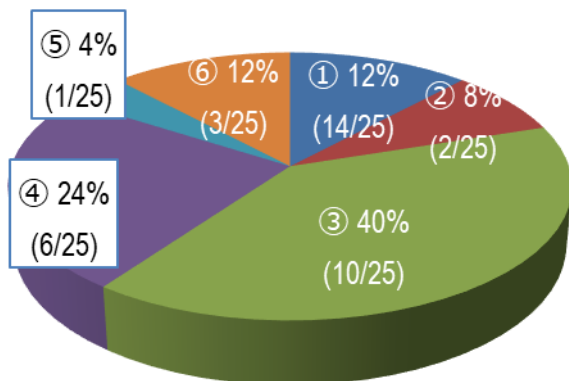
その他

- ・ 治験/臨床研究部門の副所長

## Q3 ADA分析のご経験（担当化合物数）は？

How many compounds do you have experience of ADA assay ?

Answered : 25



- ① 0
- ② 1
- ③ 2~5
- ④ 6~10
- ⑤ 11~20
- ⑥ 21~

● ③, ④, ⑤の合計が68%であり、過半数は2化合物以上を経験.

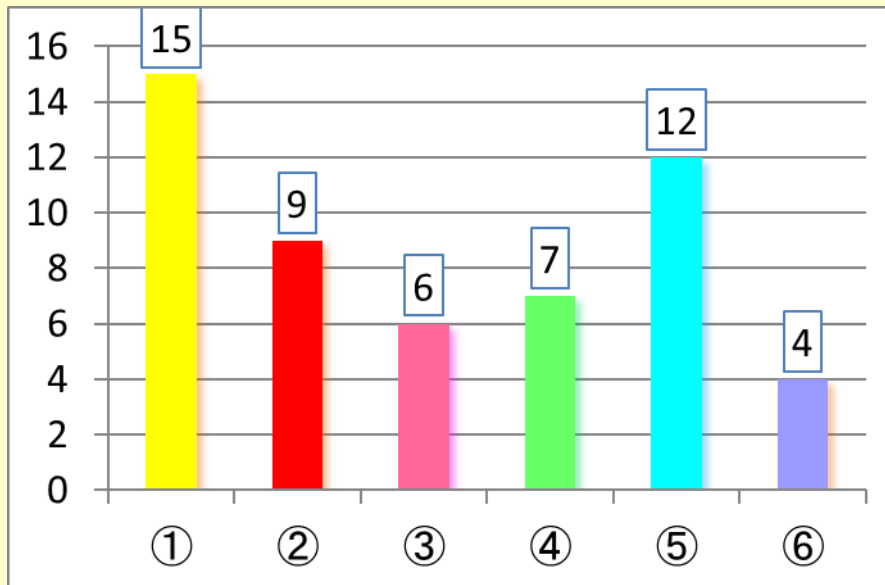
Q4 ずばりADA分析の悩みは何か？  
（臨床試験にADA分析を組み入れる場面を想像して）

What is an confusing point of ADA analysis ?

Answered : 24

複数選択可

Multiple answers allowed



- ① ADAの分析結果の解釈を明確に説明できない
- ② ADA陽性の結果をみて、ふと何を検出しているのだろうかと疑問に思うことが多い
- ③ なぜADAを分析しているのかわからなくなることがある
- ④ ADA陽性の頻度の意味を明確に第三者に説明したい
- ⑤ ADA解説虎の巻があると助かる
- ⑥ その他

- 結果を明確に説明したい
- 虎の巻があると助かる

その他 ・ 本当にADAが測定されているのか不安になる（時間とコストをかければ化学的に解明できるのだが）  
 ・ 日間再現性がとれない（シグナルが日によって異なる）  
 ・ ポジコンのバリデーションを取得していること、特に感度はポジコンの性質に左右されるため  
 100 ng/mL (LLOQ) に納得いかない、  
 ・ 全く陽性が出ず、分析系が機能しているか心配になる

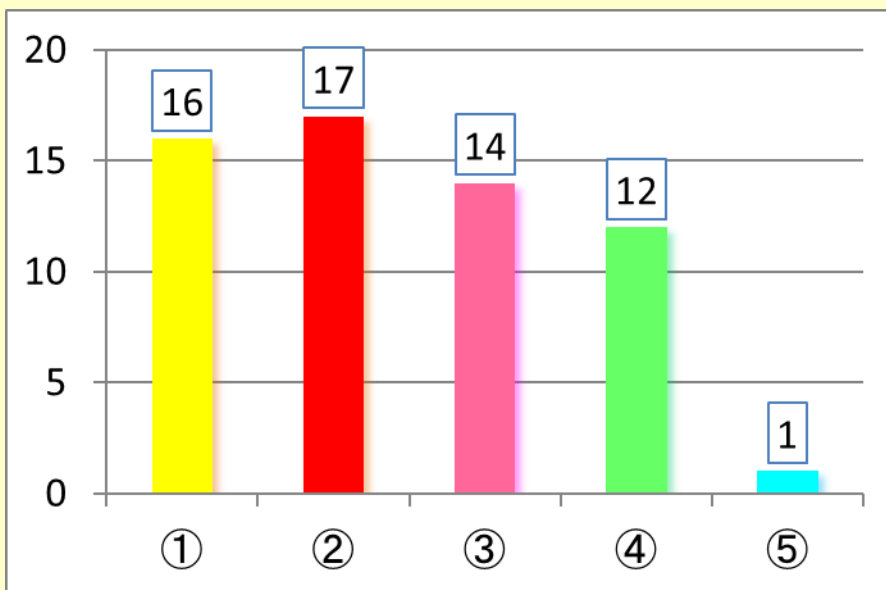
Q5 ADAの分析では、何を知ることが重要だと考えるか？

What is the most important result of ADA analysis ?

Answered : 24

複数選択可

Multiple answers allowed



- ① 薬物濃度推移への影響評価
- ② 有効性への影響評価
- ③ 長期的に見た安全性への影響評価
- ④ 急性の過敏性反応への評価
- ⑤ その他 (具体的に)

その他

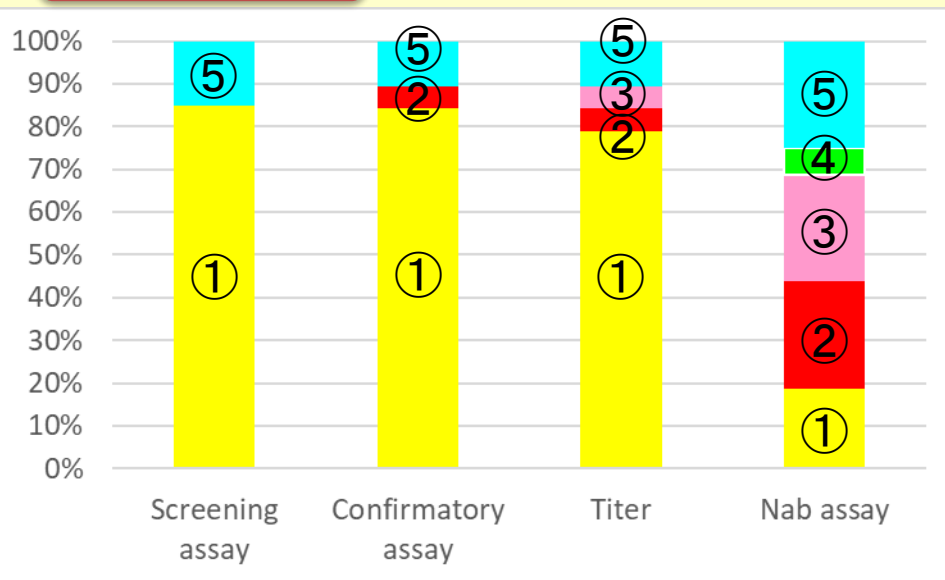
・安全性との関係性は認められないことが多い印象を持っています。

- 回答割合がほぼ同じ割合であり、複数の評価目的が入り混じっているものと考えられた。

Q6 ADA分析法はどの開発時期までに準備するか？  
(もっとも多いケース)

When do you prepare ADA analysis ? (Most cases)

Answered : 20



- ① 最初の反復投与試験開始まで
- ② 患者の反復投与試験開始まで
- ③ Pivotal 試験開始まで
- ④ 大規模臨床（臨床試験フェーズ3）開始まで
- ⑤ 特に決まっていない／その他（コメント欄に記入をお願いします）

- 最初の反復投与試験までに、Titerまで準備する方が多く、Titer評価は基本的に実施する。

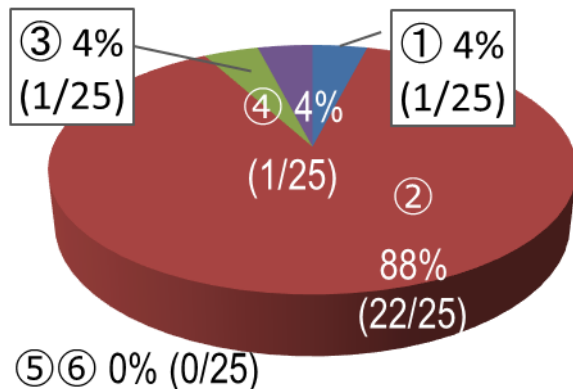
その他

- ・ Screening & Confirmatory assayのみ実施
- ・ お客様のニーズに応じて決定。その際には全ての分析法を一気に開発
- ・ Nab実施の場合は最初の反復投与試験開始までに準備するケースが多い
- ・ 中和抗体分析については、時期が早まってきている

Q7 ADA分析のアッセイプラットフォームは何を用いているか？  
(主に使用しているもの)

Which assay platform is used mainly?

Answered : 25



- ① バッチ法：放射免疫測定（RIA法），ELISA法
- ② プレート法：電気化学発光を用いた検出法（ECL法）
- ③ プレート法：ELISA法（酵素反応を利用する）
- ④ 全自動ELISAシステムGyrolab法
- ⑤ SPR (Surface Plasmon Resonance)
- ⑥ その他（具体的に）

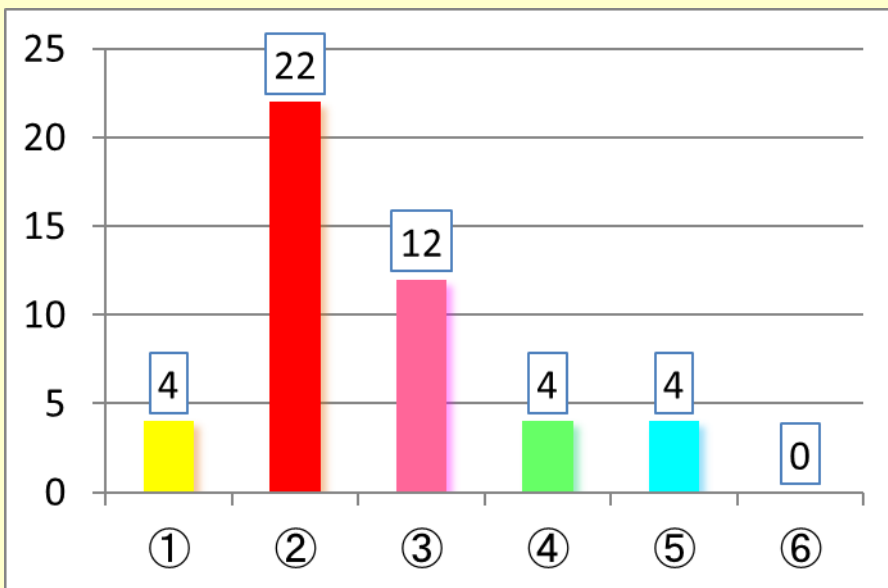
● ECL法（MSD）が9割

Q8 ADA分析のアッセイプラットフォームは何を用いているか？  
 [使用した経験があるもの（複数回答可）]

Which assay platform has been used previously?

Answered : 24

複数選択可  
 Multiple answers allowed



- ① バッチ法：放射免疫測定（RIA法），ELISA法
- ② プレート法：電気化学発光を用いた検出法（ECL法）
- ③ プレート法：ELISA法（酵素反応を利用する）
- ④ 全自動ELISAシステムGyrolab法
- ⑤ SPR (Surface Plasmon Resonance)
- ⑥ その他（具体的に）

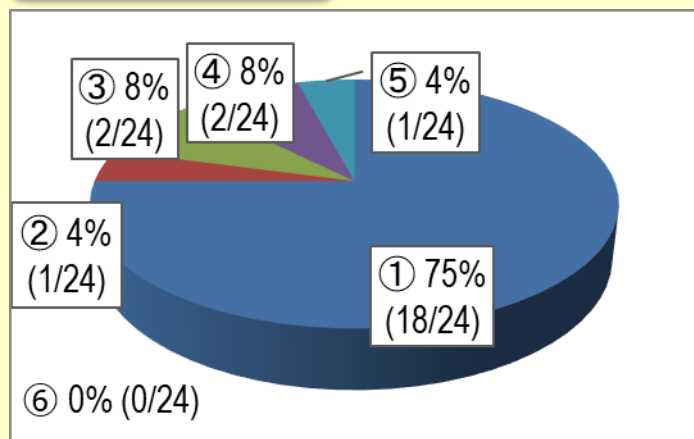
● ECL法（MSD）やELISA法が多いが、Gyrolabの経験者もいる。



Q9 ADA分析のアッセイフォーマットは主に何をを用いているか？

Which assay platform is used mainly?

Answered : 24



- ① ブリッジングアッセイ
- ② 直接結合法
- ③ 間接結合法
- ④ 競合法
- ⑤ 免疫沈降法 (Protein A/G, 薬剤変性, 他)
- ⑥ その他 (具体的に)

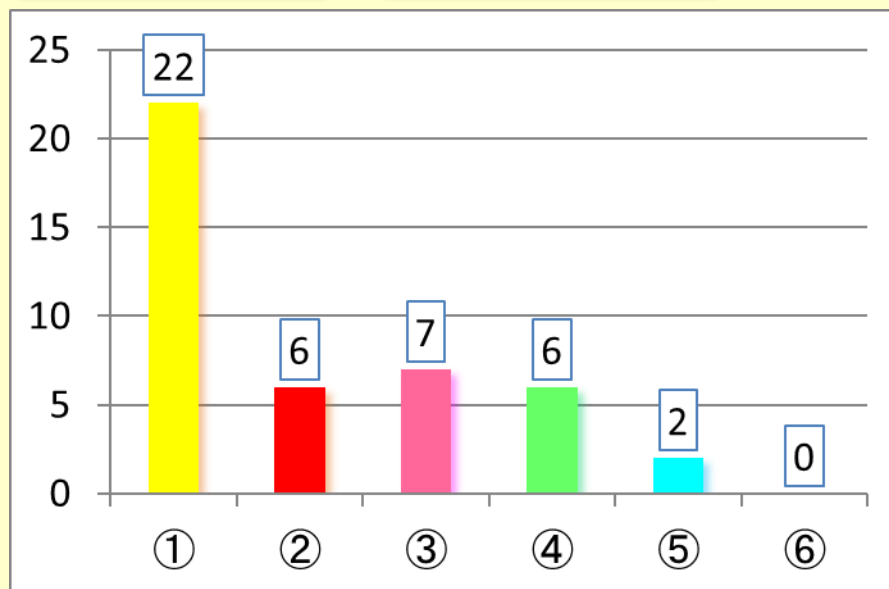
- ブリッジングアッセイが第一選択とする方が多いが、低親和性抗体を検出できることや操作が簡便なことがメリットとしてある。

Q10 ADA分析のアッセイフォーマットは主に何をを用いているか？  
[使用した経験があるもの（複数回答可）]

Which assay platform has been used previously?

Answered : 24

複数選択可  
Multiple answers allowed



- ① ブリッジングアッセイ
- ② 直接結合法
- ③ 間接結合法
- ④ 競合法
- ⑤ 免疫沈降法 (Protein A/G, 薬剤変性, 他)
- ⑥ その他 (具体的に)

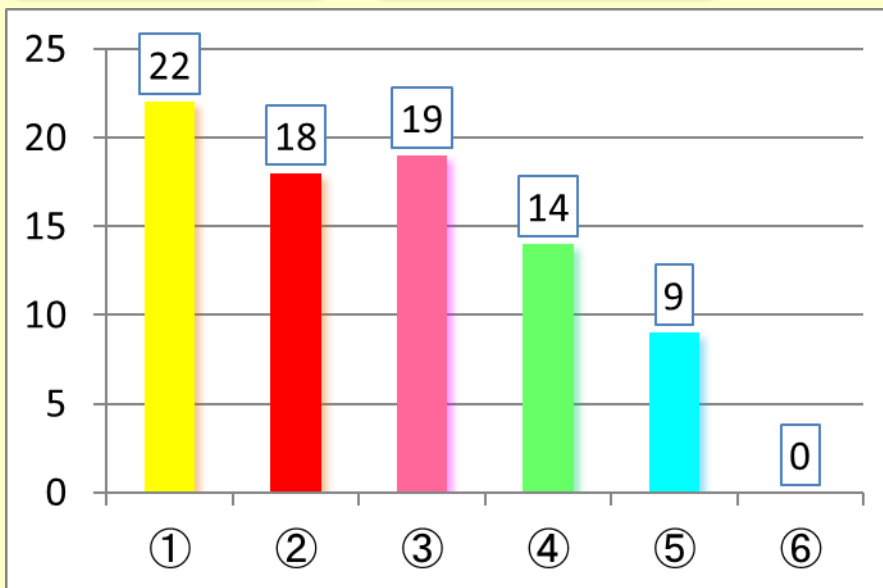
- ブリッジングアッセイ経験者が多いのは前項と同じ。
- ④競合法が増えた (2⇒6) のは, 中和抗体分析法では競合法がベースだからとも考えられた。

Q11 臨床試験内でのADA分析の採血ポイントは？  
(複数回答可)

Which time points will be selected for blood collection of ADA analysis?

Answered : 22

複数選択可  
Multiple answers allowed



- ① 薬物投与経験のない（投薬前の）時点
- ② OOCycle毎の投与前
- ③ 試験中止時
- ④ 後観察期
- ⑤ 投与後1週間程度
- ⑥ その他（具体的に）

- 投与前ならびに投与後のポイントで評価する。
- 各社、各プロジェクトにおいてそれぞれの対応をしているものと考えられた。

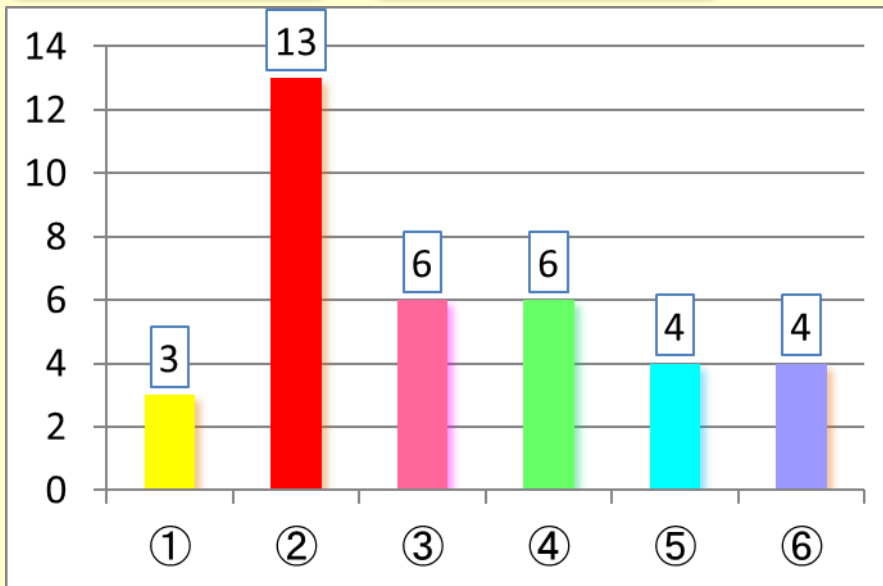
Q12 製造販売開始後のADA分析の必要性はあるか？  
(複数回答可)

ADA assay is needed after launched medicine?

Answered : 18

複数選択可

Multiple answers allowed



- ① 再審査期間が終わるまで必要
- ② 有害事象が発生したとき必要
- ③ 有効性（バイオマーカーや有効性指標としてのパラメータ）で改善がみられないとき必要
- ④ 薬物濃度が低下もしくは異常変動した場合必要
- ⑤ 原則、臨床試験のフォローアップで確認しているので不要
- ⑥ その他（具体的に）

その他

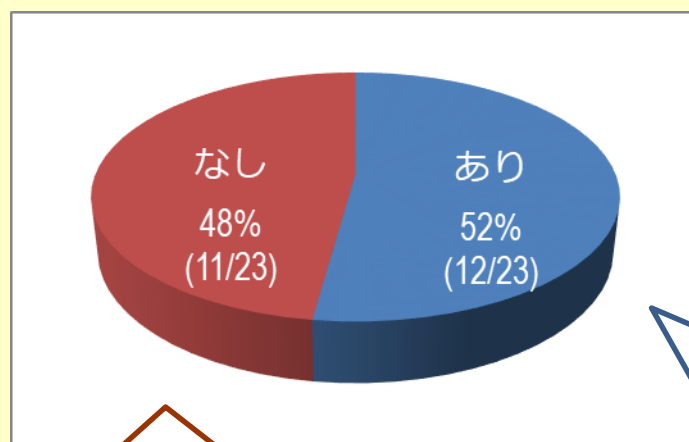
- ・ 経験がないのでわからない。おそらく有害事象が発生したときに必要と思う
- ・ 医薬品の作用機序と抗体が及ぼす影響によってADA分析の必要性も変わってくると思います
- ・ ADA発生率が高い薬物の場合は必要と考えます
- ・ 医師からの依頼がある場合もあり、分析体制の確保は必要かと考えている

- 有害事象発生時に必要と考えられることが多く、基本的には実施しない会社が多いと考えられた。

Q13 ADA分析法を途中で改良した経験はあるか？

Do you have an experience to improve the ADA assay method?

Answered : 23



- ① Yes (52%, 12/23)
- ② No (48%, 11/23)

Yes	
Pharma	58% (7/12)
CRO	42% (5/12)

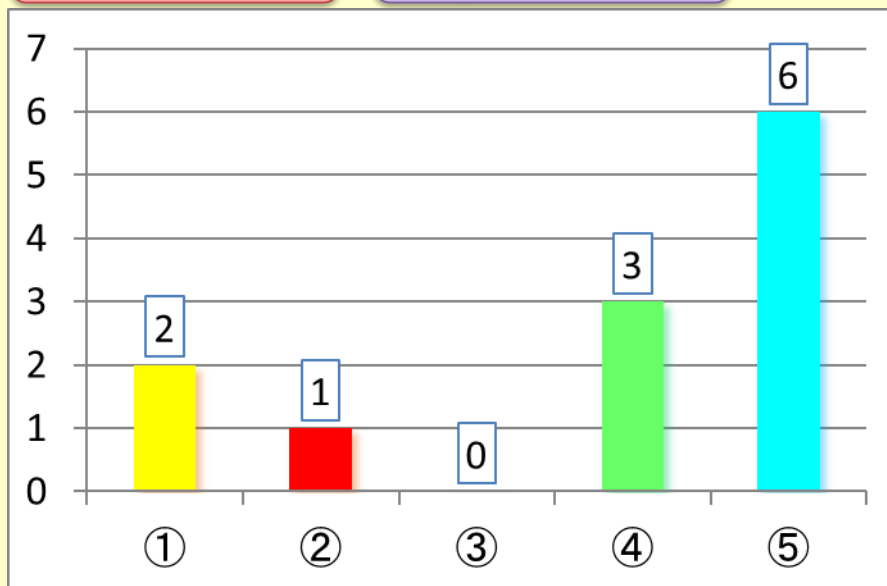
No	
Pharma	55% (6/11)
CRO	36% (4/11)
Other	9% (1/11)

Q14 Q13で「あり」と回答された方に質問です。改良を実施したきっかけは何か？（複数回答可）

For person to select YES in Q13, what is the reason to improve the assay method?

Answered : 10

複数選択可  
Multiple answers allowed



- ① スクリーニングアッセイでも陽性が全く出なかったため
- ② 一部の被験者で薬物濃度の低下が認められたがADAは陰性を示していたため
- ③ 当局に言われたため
- ④ 試薬が底をついたため
- ⑤ その他（具体的に）

- 分析法改変に至る経緯は、感度不足、DTL不足、患者種の変更、試薬の枯渇など様々。

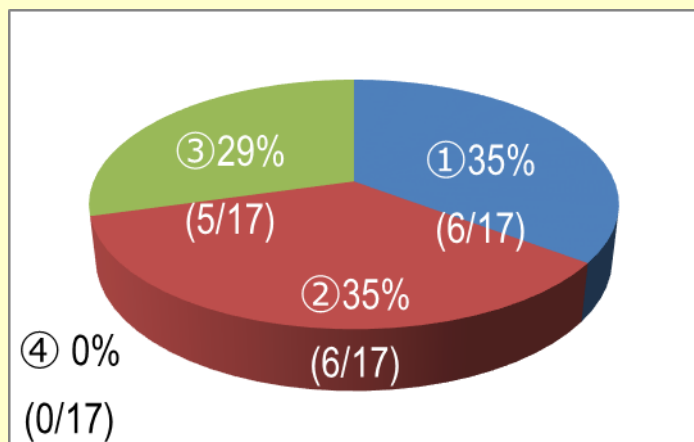
その他

- ・ 薬剤耐性改善（2件）、
- ・ 施設変更の際にトレースできず、やむを得ず変更（感度は上がった）。
- ・ 分析結果のばらつきが不安定、
- ・ 適用ガン種追加、
- ・ カットポイント再設定、
- ・ 感度不足（2件）

Q15 ADA分析は、最長で投与後どの時点まで実施するのが適切だと思えるか？（もっとも当てはまるもの）

How long period should be appropriate to collect ADA sampling after dosing?

Answered : 17



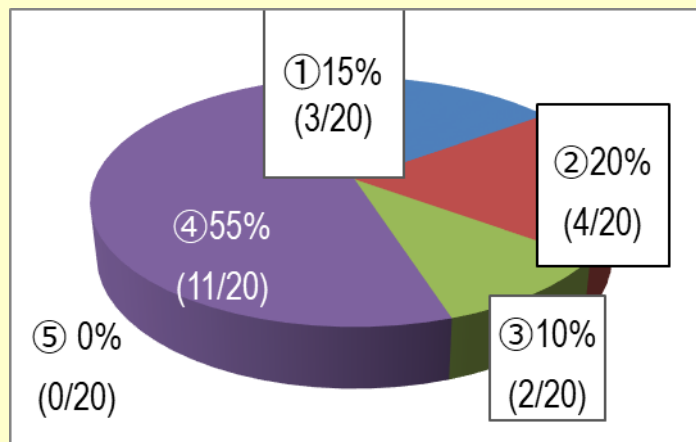
- ① 薬剤の半減期による
- ② 一律の日付を決めている
- ③ 抗薬物抗体（ADA）が検出されなくなるまで（陰性となるまで）
- ④ その他（具体的に）

- 意見が3パターンに綺麗に分かれた。
- それぞれの視点でそれぞれのメリット・デメリットがあると考えられた。

Q16 ドラッグトレランスリミット (Drug tolerance limit) でクリアすべき薬物濃度はどの様に考えるか? (もっとも当てはまるもの)

What is your desired drug tolerance limit?

Answered : 20



- ① 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ は欲しい
- ②  $C_{\text{max}}$ をカバーできるところを狙い, 出来る限り高濃度まで獲得する
- ③ 特に目標はなく, 出来る範囲で
- ④ 予想されるトラフ時の血中薬物濃度以上を獲得したい
- ⑤ その他 (具体的に)

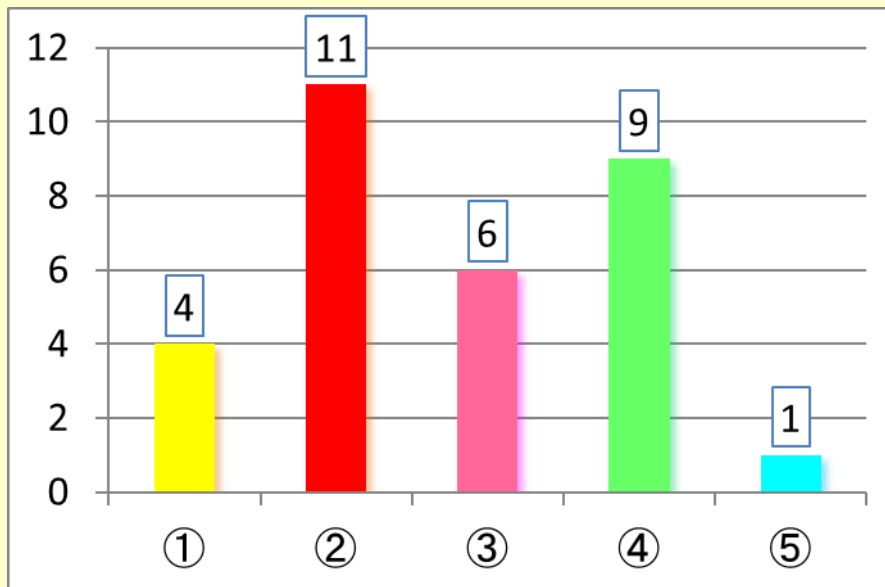
- クリアすべきはトラフ濃度以上との回答が55%となったが, これはADAの採血ポイントとして血中薬物の影響を受けにくいトラフを選ぶことが多いからであると考えられた。



Q17 ある検体でADA分析の結果、「スクリーニングアッセイで陽性、確認アッセイで陽性」となりました。次に実施すべき特性解析では、どういった点を意識するか？（複数回答可）

How do you think "ADA positive both screening assay and confirmatory assay" ?

Answered : 18



- ① 積極的にADAの特性を検討（アレルギー反応などの有害反応へ対応策）
- ② 必要に応じADA特性を検討（アレルギー反応の誘発などADAの関与が示唆された場合）
- ③ 積極的にADA特性を検討（薬物濃度への影響の有無を明らかにするため）
- ④ 必要に応じADA特性を検討（ドラッグトレランスがクリアされていることを確認した上で、薬物濃度への影響が確認された場合）
- ⑤ その他（具体的に）

その他

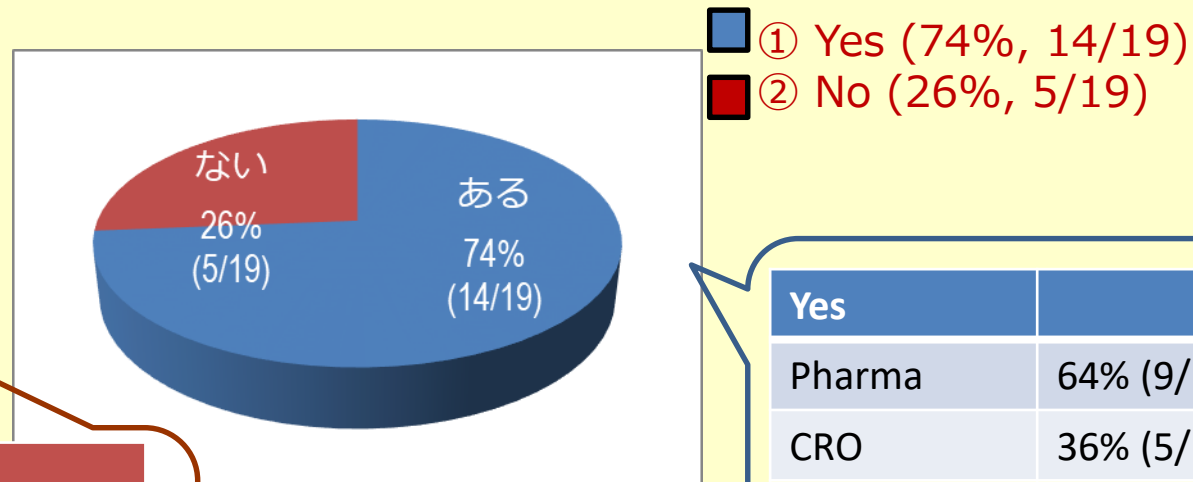
・薬効低下の観点から中和能特性に特に注目したい

● ADA生成→有害事象発現/薬物濃度低下  
→ADA特性解析

Q18 ADA分析において、Q17のようにスクリーニングアッセイ、確認アッセイともに陽性の結果を示したケースで、薬物濃度の低下が全くなかった経験があるか？

Do you have an experience to have ADA positive in both screening and confirmatory assay but not decline blood concentration like Q17 ?

Answered : 19

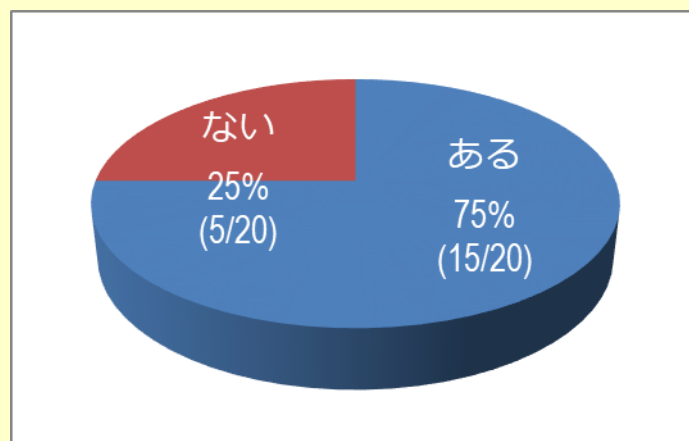


No	
Pharma	20% (1/5)
CRO	60% (3/5)
Other	20% (1/5)

Q19 投与前検体のみに陽性の結果が出た経験はあるか？

Do you have an experience that the positive result of ADA assay in only pre-dose sample?

Answered : 20



- ① Yes (75%, 15/20)
- ② No (25%, 5/20)

No	
Pharma	0% (0/5)
CRO	80% (4/5)
Other	20% (1/5)

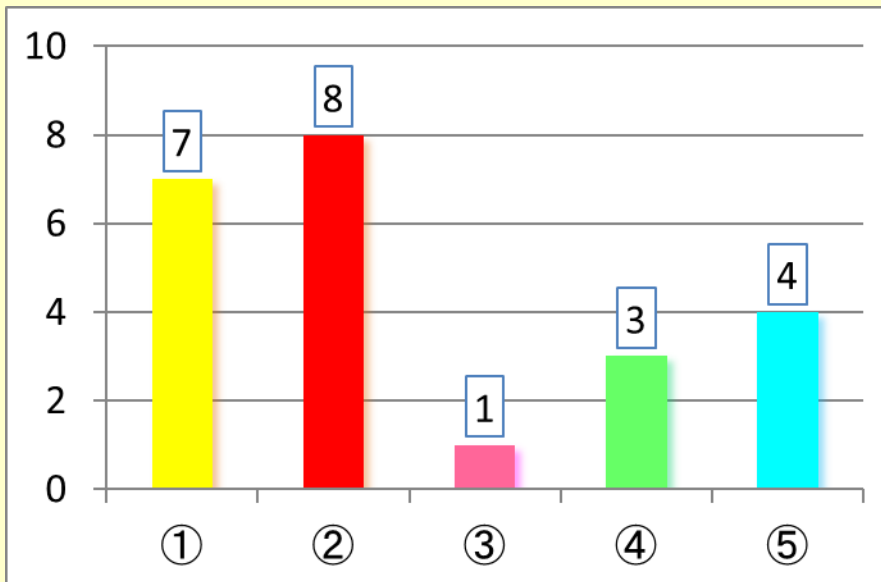
Yes	
Pharma	67% (10/15)
CRO	33% (5/15)

Q20 「投与前検体のみに陽性の結果が出た」場合、どのように臨床チームに結果を報告しているか？（複数回答可）

If positive result only in pre-dose sample, how to report to clinical team?

Answered : 10

複数選択可  
Multiple answers allowed



- ① そのままさらっと結果だけ送る
- ② 投与前検体に限らず陽性検体については bioanalysis 担当者の立場から考察する
- ③ 結果の考察は、bioanalysis 担当者とは別の特別な専門家が実施している
- ④ 解析方法案を提示しながら報告する（例：投与前の抗体価の〇倍を陽性として、陽性になった被験者群でPKなどを部分集計する、など）
- ⑤ その他（具体的に）

その他

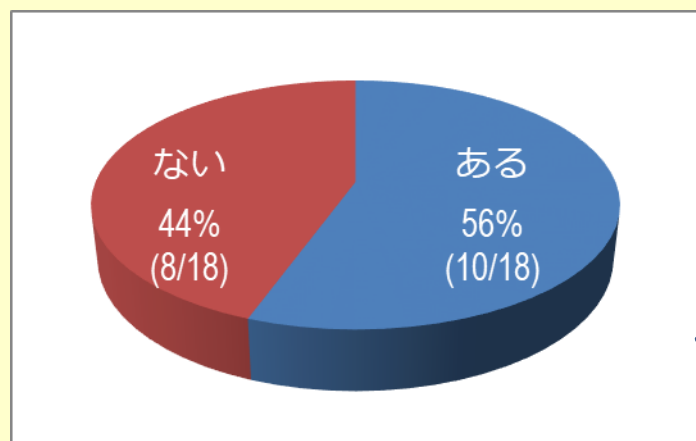
- ・ 経験なし（3件）
- ・ 結果は最初に病院に送られる。副本で開発部との事前の取り決めにより上記（④）の対応をとる

● 結果だけ、または、結果と考察を bioanalysis 担当者が送付している

Q21 「投与前検体のみに陽性の結果が出た」場合，解釈を求められたことはあるか？

Do you have an experience?

Answered : 18



- ① Yes (56%, 10/18)
- ② No (44%, 8/18)

No	
Pharma	25% (2/8)
CRO	63% (5/8)
Other	1% (1/8)

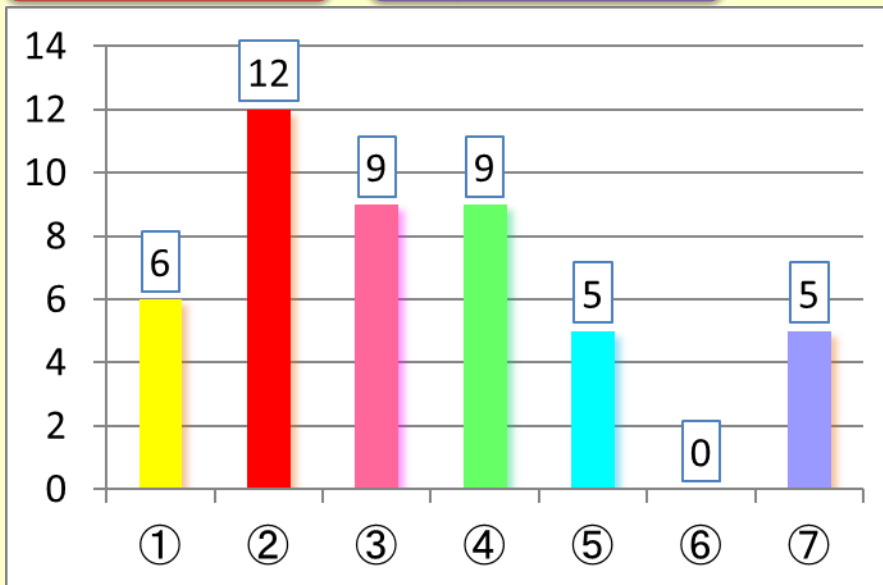
Yes	
Pharma	80% (8/10)
CRO	20% (2/10)

Q22 「投与前検体のみに陽性の結果が出た」場合, どんな議論 (回答) をしているか? (複数回答可)

When positive result of ADA was observed in only pre-dose sample, which discussion?

Answered : 10

複数選択可  
Multiple answers allowed



- ① 治験開始前に投与された別の薬物のADAが残っていた可能性があり, 薬物濃度推移に影響がある可能性がある
- ② 元々存在している生体内物質がたまたま反応
- ③ 元々一定の割合で陽性が出る測定系であり, 全検体数の割合からすると測定系の誤差と考えられる
- ④ 測定誤差, しかもTiterが特定の数値以下となれば全くの誤差と考える
- ⑤ 薬物濃度の低下が認められないことをもって, 特に影響が無いと判断している
- ⑥ 特に議論しない
- ⑦ その他 (具体的に)

その他

- ・ 経験なし
- ・ 内因性物質との交差反応 (2件)
- ・ Cut pointが低く明らかに擬陽性と思われる事例
- ・ アッセイ選択性の潜在的な限界による擬陽性の可能性, 併発病態により出現した他のAbとの反応,

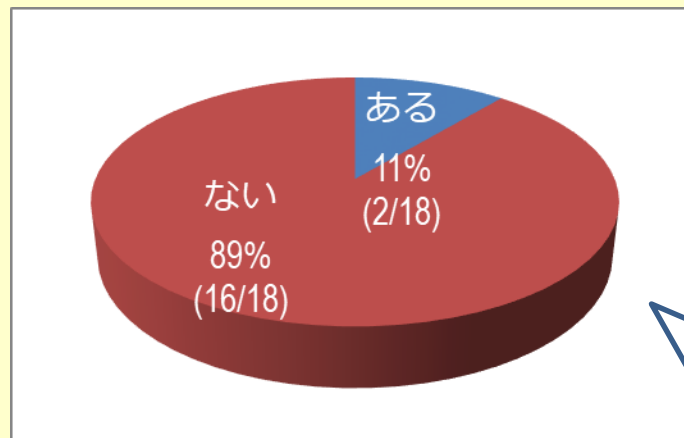
類薬の投与前歴の隠蔽参加

- 他のADA or 内因性成分の検出
- 測定系の誤差

Q23 「投与前検体のみに陽性の結果が出た」場合，陽性を示した物質の特性を調べたことはあるか？

Have you ever characterized the positive substance, when positive result of ADA was observed in only pre-dose sample?

Answered : 18



- ① Yes (11%, 2/18)
- ② No (89%, 16/18)

Yes	
Pharma	100% (2/2)
CRO	0% (0/2)

No	
Pharma	50% (8/16)
CRO	44% (7/16)
Other	6% (1/16)

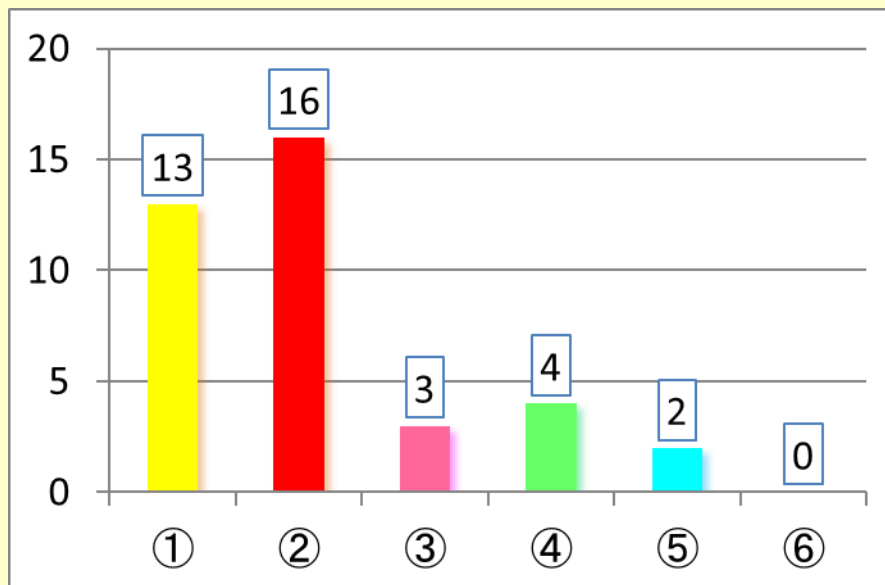
- 経験があるのは製薬企業のみ。

Q24 ADAが陽性だった場合，追加評価として何を実施したいと思うか？（複数回答可）

When positive result of ADA was observed, what additional evaluation would you do?

Answered : 20

複数選択可  
Multiple answers allowed



- ① 抗体価
- ② 中和抗体評価
- ③ IgMの検出, 定量
- ④ アイソタイプ/サブクラス特定
- ⑤ 経験がない/わからない
- ⑥ その他 (具体的に)

● 抗体価/中和抗体は多くの方が回答したが，アイソタイプ同定までしたいと思う方は少数。



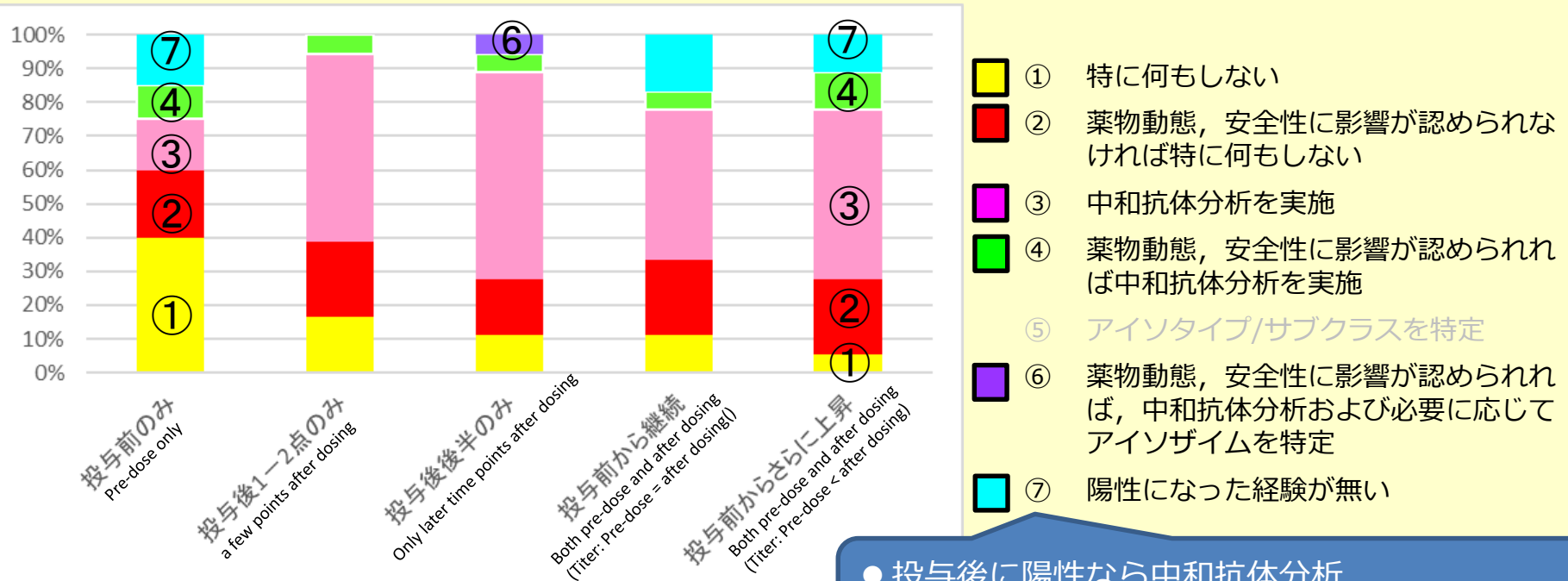
Q25 ADA陽性の結果が以下の検体から得られた場合、それぞれどこまで対応しているか？

When positive result of ADA was observed, what additional evaluation would you do?

Answered : 20

複数選択可

Multiple answers allowed



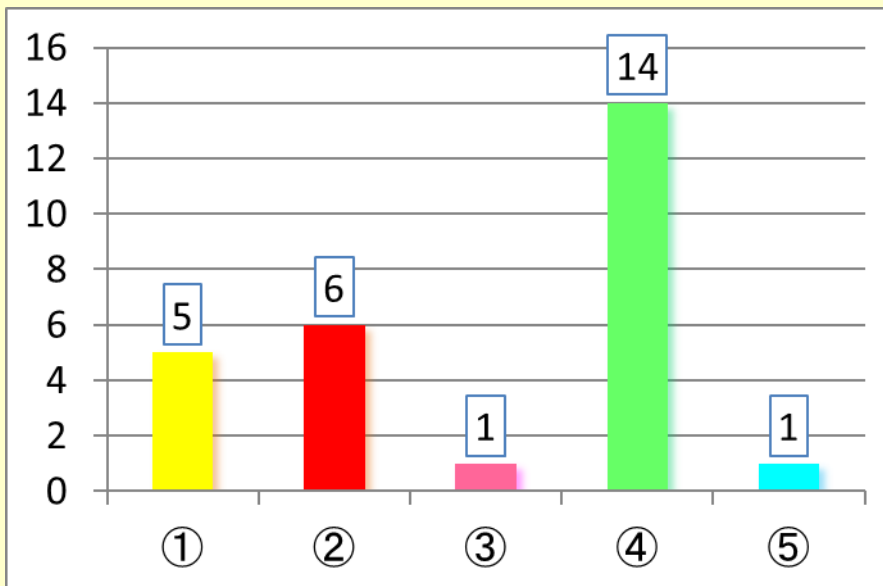
- 投与後に陽性なら中和抗体分析
- PKや安全性に影響ないなら何もしないこともあり

Q26 ADAが陽性の場合、どこまで「陽性」の結果を掘り下げて  
いまるか？（複数回答可）

When positive result of ADA was observed, what additional evaluation would you do?

Answered : 19

複数選択可  
Multiple answers allowed



- ① 特になし
- ② 被験者情報との相関を解析し、ADAが検出される傾向にある被験者情報を解析
- ③ アイソタイプ/サブクラス特定
- ④ 中和抗体評価等の特性評価
- ⑤ その他 (具体的に)

- 追加の補足評価は、中和抗体評価までとしアイソタイプ同定まで行うことは稀。
- ②のような他要素との因果関係を探すことも有効。

その他

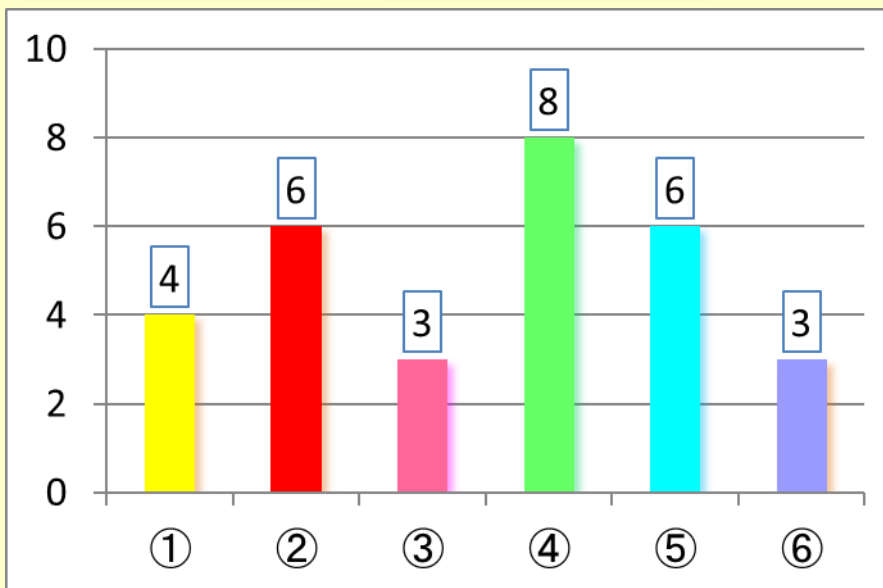
- ・ 中和活性評価系があれば中和活性、なければ抗体価の評価のみです。

Q27 ADAが陽性の場合、実際にどの時点の検体までADA分析を続けているか？〔複数回答可〕

When positive result of ADA was observed, what additional evaluation would you do?

Answered : 19

複数選択可  
Multiple answers allowed



- ① 医師が不要と判断したとき（医師が次の治療を始めるまで）
- ② 被験者が継続を辞退（拒否）したとき
- ③ 陰性になるまで（半永続的に）
- ④ ケースバイケースの対応
- ⑤ 経験なし
- ⑥ その他（具体的に）

● 医師が中止を決める場合や患者が拒否する場合もある一方、半永続的に実施するなど、ケースバイケースの対応であった。

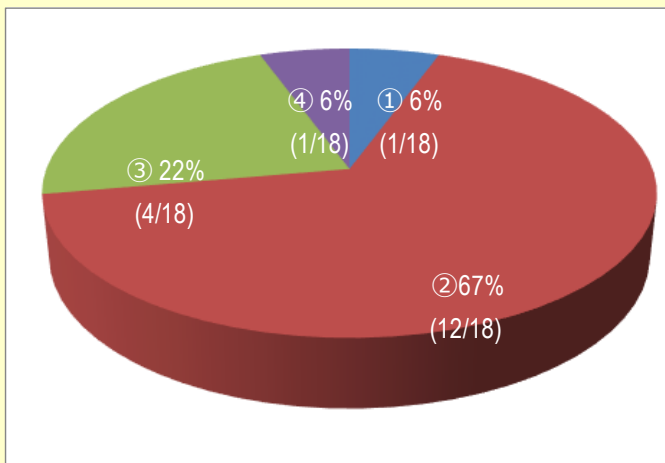
その他

- ・ 中止時または試験終了まで・治験の観察の終わりまで、最長半年を目安
- ・ 予め定められた時点

Q28 試験チームのメンバーはADAのtiterの大きさに敏感か？

Is clinical team member interested in the Titer assay result?

Answered : 18



その他  
・分からない

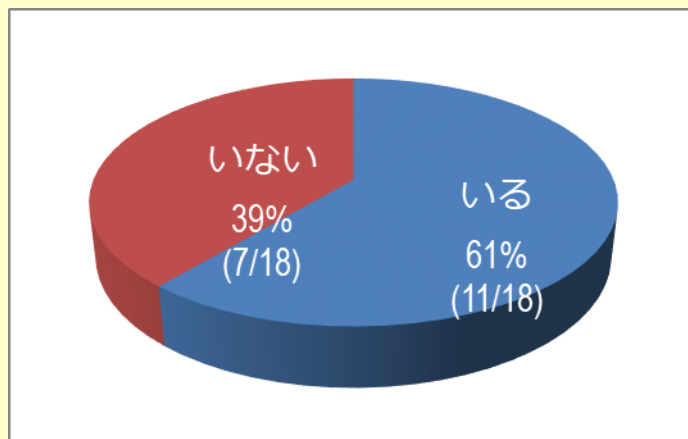
- ① 大いにある
- ② 多少ある
- ③ こだわりはない
- ④ その他 (具体的に)

●実質的なADAのインパクトの大きさを示す数値であるため、titerデータには敏感なようであった。

Q29 ADAの結果を臨床施設に報告しているか？

Do you report ADA analytical to clinical study site?

Answered : 18



- ① YES (61%, 11/18)
- ② No (39%, 7/18)

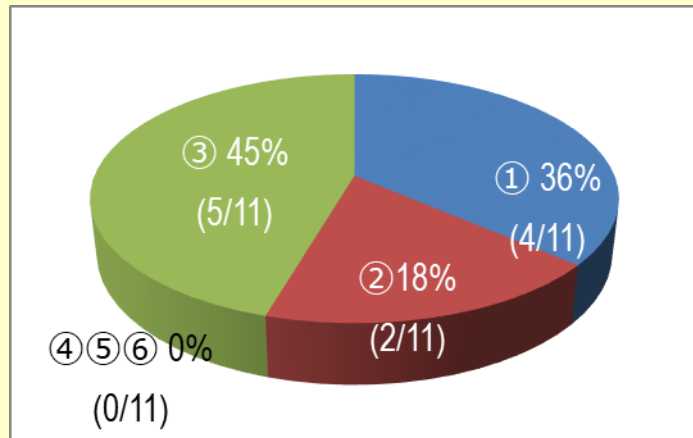
No	
Pharma	29% (2/7)
CRO	71% (5/7)

Yes	
Pharma	73% (8/11)
CRO	27% (3/11)

Q30 これまでの設問で「報告している」と回答された方に質問です。  
その場合、どのように報告しているか？（頻度）

How frequency do you report ADA assay result to clinical study site?

Answered : 11



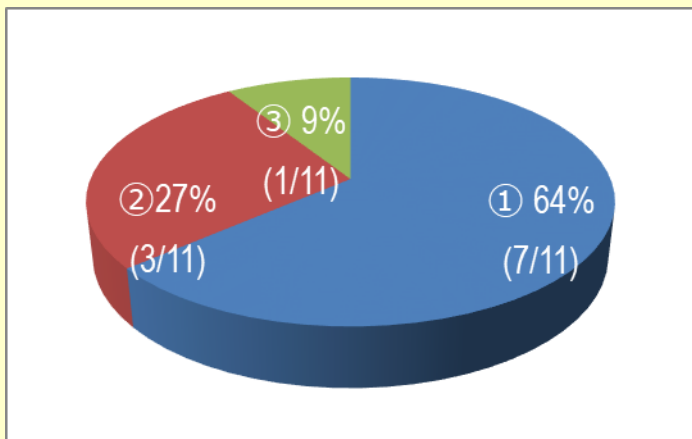
- ① 測定の都度
- ② 陽性の結果が出たときのみ
- ③ 何らかの節目でまとめて
- ④ 試験終了時に一括で
- ⑤ 特に報告はなし
- ⑥ その他 (具体的に)

● 報告頻度は様々であるが、何らかの節目でまとめて報告することが多かった。

Q31 これまでの設問で「報告している」と回答された方に質問です。  
その場合、どのように報告しているか？（手順）

How do you report ADA assay result to clinical study site? (Process)

Answered : 11



- ① メールで各施設へ
- ② 訪問時に文書のみで報告
- ③ その他 (具体的に)

- メールによる連絡が主であるが、現地訪問時に各施設へ報告することもある。

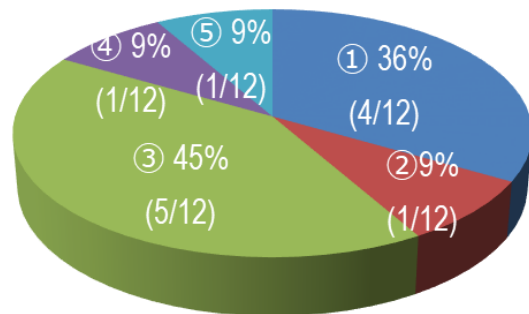
その他

- ・ 臨床CROにまとめてメールで報告し、そこから各施設へ

Q32 これまでの設問で「報告している」と回答された方に質問です。  
その場合、どのように報告しているか？（内容）

How do you report ADA assay result to clinical study site? (Contents)

Answered : 12



- ① 陽性／陰性のみ
- ② 陽性／陰性および解説
- ③ 陽性／陰性およびTiter
- ④ 陽性／陰性およびTiterならびに解説
- ⑤ その他（具体的に）

● 基本的には、測定データを全て報告しているが、そこに考察（解説）を付している人は1名のみと少なかった。

その他

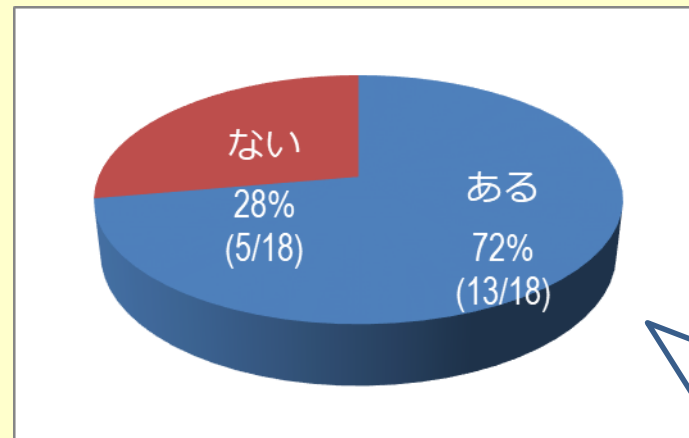
・抗体価が高いなど、特筆すべき情報がある場合は医師のご意見をうかがう。



Q33 ADAの結果の解釈について社内担当者から問い合わせを受けた経験はあるか？

Have you received any queries from internal person regarding interpretation of ADA result?

Answered : 18



- ① YES (72%, 13/18)
- ② No (28%, 5/18)

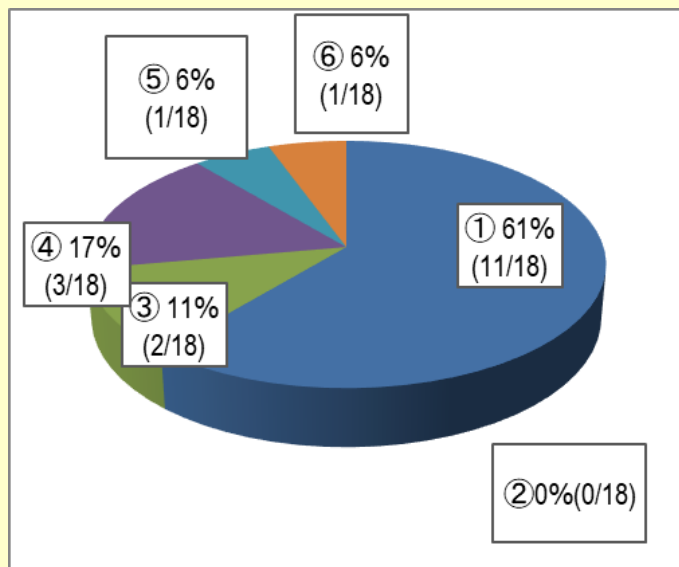
No	
Pharma	0% (0/5)
CRO	100% (5/5)

Yes	
Pharma	77% (10/13)
CRO	23% (3/13)

Q34 ADAの結果を受けて御社ではどなた（どのような機能の方）が初期の評価結果の解釈・提案をしているか？

Who does in your company interpret and propose the initial evaluation for ADA results?

Answered : 18



- ① bioanalysis 担当者
- ② メディカルライティング
- ③ 治験責任者あるいは類する人
- ④ 動態研究者
- ⑤ 業務委託先（濃度測定または薬物動態解析，他）
- ⑥ その他（具体的に）

その他  
・CROとしての結果報告のみ。

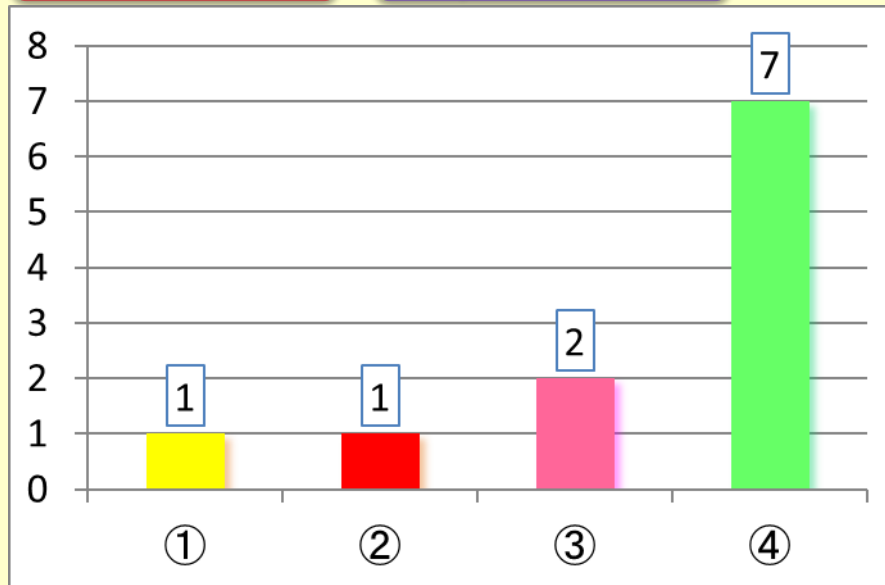
● Bioanalysis担当者が61%であり、メジャー層であった。

Q35 Q34で「bioanalysis担当者」を選択した方への質問です。  
Bioanalysis担当者はどこまで関わっているか？（複数回答可）

When positive result of ADA was observed, what additional evaluation would you do?

Answered : 9

複数選択可  
Multiple answers allowed



- ① 開発部と同行して医師に説明に行く
- ② 治験審査委員会（IRB）に参加して説明，質問対応
- ③ 社内の意思決定会議に参加する
- ④ その他（具体的に）

その他 ・CROのため該当なし（2件），  
 ・開発部への説明し，開発部担当者から医師への説明  
 ・プロジェクト担当者に情報提供する．必要に応じて各種会議に参加。  
 ・開発部門からの質問対応（黒子のような存在）  
 ・ADA陽性例がなかったため対応が必要となったケースが少ない。

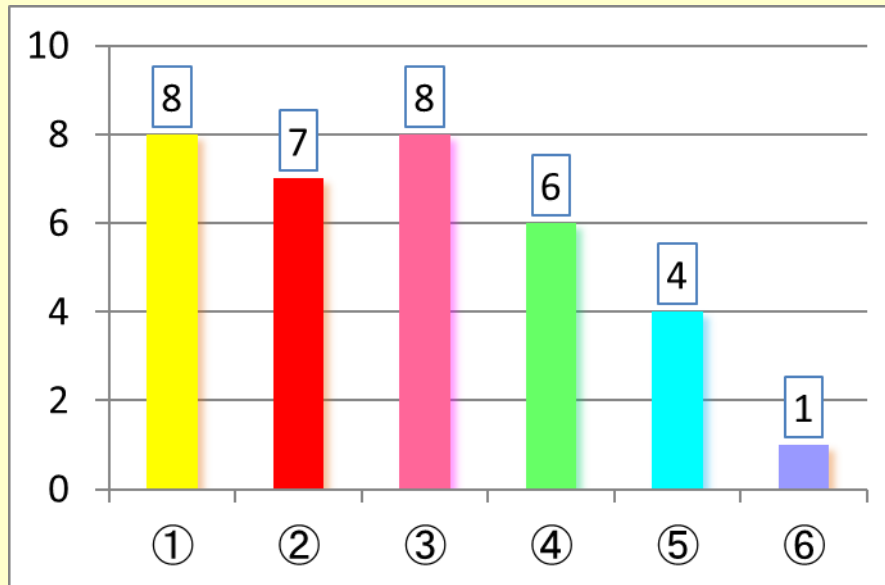
● 社内の各部門に報告し，社外に直接報告説明するケースは少ない。

Q36 中和抗体アッセイを10検体で実施して、2検体で陽性の結果が得られた場合、その後はどのような対応を考えるか？（複数回答可）

When 2 samples in 10 samples give a positive result for Nab, what would you do next?

Answered : 19

複数選択可  
Multiple answers allowed



- ① ADA陽性群, 中和抗体陽性群とADA陰性群で薬物濃度推移を比較, 影響を評価する
- ② 結果(例数, 確率)だけ記載する。(有効性の結果と合わせて総合的な考察は行う)
- ③ ADA陽性群, 中和抗体陽性群とADA陰性群でバイオマーカー等の推移を比較, 影響を評価する
- ④ 中和抗体の推移を慎重にフォローし, 内因性物質との交差反応について精査する。
- ⑤ 中和抗体測定の実験がない
- ⑥ その他(具体的に)

その他

・基本, 中和抗体の測定を実施している。

●陽性群と陰性群で, PK, 安全性, 有効性などを比較している

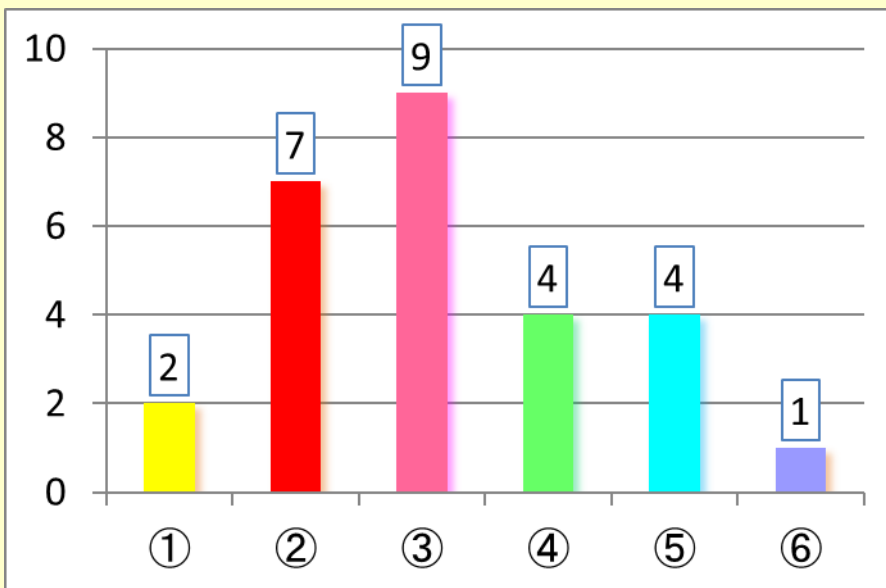
Q37 中和抗体アッセイを10検体で実施して、10検体すべてが陰性の場合、どのように考えるか？（複数回答可）

When all 10 samples in 10 samples are negative results for Nab, what do you think?

Answered : 18

複数選択可

Multiple answers allowed



- ① 中和作用はないと考えられるため、薬効は低下しない
- ② この結果だけでは中和作用がないかどうか、わからない
- ③ 有効性の結果と合わせて、総合的に議論する
- ④ ADA陽性群、中和抗体陽性群（この場合居ないけど）とADA陰性群で薬物濃度推移を比較、影響を評価する
- ⑤ 中和抗体測定の実験がない
- ⑥ その他（具体的に）

その他 ・中和抗体の感度が、スクリーニングアッセイより低い場合も多く、中和作用がないとは言い切れない

● この結果だけでは中和作用の有無を判断できず、有効性の結果と合わせた議論が必要になるとのコメントが一番多かった。

## 【前提条件】

- 非臨床ADAは、FDAの2019 Immunogenicity GuidelineのScopeからも外れており、実施根拠はICH S6ガイドラインにある。
- 臨床ADAが投薬患者における有効性・安全性を評価するために実施しているのに対し、非臨床ADAではあくまで血中薬物濃度の変動を説明するためのデータとしての扱いである。



## 【アンケート結果】

- 非臨床ADAでは臨床ADAとは異なるアプローチをとっている会社が多かった。具体的には、カットポイント設定時の統計解析の有無、感度・DTL目標の違い、測定ステップの違いなどである。



次スライドにまとめ

項目	デザイン, ストラテジー
カットポイント	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 統計解析はしないことが多い (例数が少ないため)</li> <li>■ 統計解析する場合, ①正規分布と仮定して計算, ②非正規分布と仮定して計算, どちらの場合もあり (臨床ADAと同様に実施) .</li> <li>■ 非臨床ADAの場合, アンケート結果からもわかる通り, 個別別データの統計解析を実施している回答者は過半数に満たなかった. また, 非臨床ADAは臨床ADAと目的が異なるため, 統計解析 (正規性の検定や分散分析) をせずとも予め各社のポリシーで定めておいた算出方法 (パラメトリックメソッドないしはノンパラメトリックメソッド) を使用することで問題ない.</li> </ul>
感度	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 臨床ADAのターゲットである100ng/mLを目指す</li> <li>■ 使用するメソッドはブリッジングアッセイが多い</li> <li>■ 非臨床で用いられたメソッド (重要試薬含む) がそのまま臨床で用いられるため, 非臨床フェーズから感度の高い分析法を構築しておけば後で困ることが無い.</li> </ul>

項目	デザイン, ストラテジー
DTL	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 基本的にはトラフ値を目指す</li> <li>■ 毒性試験では投与量が高いことが多く現実問題として難しい (必須要件には定めない)</li> </ul>
Singlicate測定 (一重測定)	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Singlicateでの測定を許容している方もいるが, 大多数は許容していないか経験無しであった.</li> <li>■ Titerの測定では, 一重測定も許容できると考えられる (複数段階におけるシグナルが確認可能であるため) .</li> </ul>



## 【前提条件】

- 臨床ADAは, FDAガイドラインのScopeで定められたもので, 治験患者の健康に関わることであるため, 分析の重要度は高い.
- カットポイントの設定には慎重な対応が求められ, 非臨床と比べると多くの個別別試料を分析し, 統計学的手法を用いるのがIndustry Standard
- 感度とDTLの目標設定もシビアであり, それらが足りないことが分かれば臨床試験途中でADA分析法を改良することも珍しくない.



## 【アンケート結果】

- 実際に感度やDTL目標設定がシビアなことが見て取れた. また, それ以外にも採血ポイントの設定やADA陽性結果取得時の対応, 製造販売後のADA分析の実施など, 各社により差があることが分かった.



次スライドにまとめ

項目	デザイン, ストラテジー
臨床試験中の採血ポイント	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 投与前ならびに投与後のポイントで評価する. 具体的には, 薬物投与経験のない (投薬前の) 時点, 各投与 cycle毎の投与前, 試験中止時, 後観察期, 投与後1週間程度のうち, 適切な頻度を選択する.</li> <li>■ 最長でどこまで評価するかは, 化合物の半減期による.</li> </ul>
製造販売後の検査の必要性	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 有害事象が生じない限りは不要である.</li> </ul>
ADA陽性結果取得時の対応	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 各施設あるいは各プロジェクトによって, 報告方法や報告頻度には差があるが, Bioanalysis担当者としては臨床担当者に可能な限りの情報を報告することが望ましい.</li> </ul>

項目	デザイン, ストラテジー
ADA分析の感度	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 感度は最初から高いものを用意することが望ましい。</li> </ul>
ADA分析のDrug Tolerance	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Drug Tolerance Limitは最初から高いレベルを目指すことが望ましい。</li> <li>■ 予想されるトラフ時の血中薬物濃度を担保することは必須である。稀ではあるが、もし採血ポイントでCmaxを選択する予定がある場合においてはCmaxでのDrug Toleranceを担保すべきである。</li> </ul>
投与前検体のみに陽性が出た場合などイレギュラーな結果が出た場合の対応	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 臨床チーム単独で判断したり、Bioanalysis担当者単独で判断するのではなく、異なる部署間で連携して状況を分析・対策を講じることが重要である。</li> </ul>

ADA分析法の構築にあたり，まず最初に考慮すべきこと

⇒ポジティブコントロールの選定

【ガイドラインでは・・・】

FDAのImmunogenicity Guideline 2019ではポリクローナル抗体の使用が推奨されている。理由は，生体で産生されるADAは実質ポリクローナル抗体であり，実際のADAと全く同じものを標準品（ポジティブコントロール）として準備できない以上，せめて抗体の種類を合わせておくべきという発想である。

【アンケート結果では・・・】

有効回答数22例中19例がポリクローナル抗体が第一選択と答えた一方，3例はモノクローナル抗体が第一選択と回答している。  $19/22 = 86.3\%$

モノクローナル抗体を第一選択としている方の理由をアンケートでは尋ねていなかったが，DGでその理由を議論・深掘したため，紹介したい。

## ADA分析法のポジティブコントロールとして使用する抗体のメリット比較

項目	モノクローナル抗体	ポリクローナル抗体
実ADAとの類似性	×	○
製造コスト	ケースバイケース	ケースバイケース
リードタイム	ケースバイケース	ケースバイケース
抗原とのアフィニティ	高いことが多い	低いことが多い (抗原アフィニティ精製したとしても)
拡張性 (抗イディオタイプ抗体などを用意した場合, PK分析でも応用可能など)	有用なことがある	役立たない
市販品として購入可能か	購入可能なことがある (バイオシミラーの場合等)	購入不可能
同じロットを入手可能か	可能	不可能

項目	留意点
カットポイント	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 外れ値が出ることを想定し、予め規定数を超える個体別試料を測定することが業界的に標準になってきている。</li> <li>■ 一方で、外れ値を含めたほうが本来の分布を投影できるため良いとする考えもあり、2極化している。</li> <li>■ 正規分布を仮定するのであれば、少なくとも5%以上の外れ値を含めないことが妥当であるが、その程度であればカットポイントが低値となりすぎることも実務上は問題となることに留意する必要がある。</li> <li>■ ケースバイケースでの対応となる。</li> </ul>
感度	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ アンケートの結果から、非臨床ADAと臨床ADAでは感度の目標値にずれがあることが見えたが、努力目標としては非臨床ADAでも臨床ADAの100ng/mLを目指し、どうしても厳しいときは500ng/mLに甘んじるということが現実的ではないかと考えられた。</li> </ul>

項目	留意点
Drug Tolerance	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 予想されるトラフ時の血中薬物濃度を担保することは必須である.</li> <li>■ 毒性試験では臨床試験に比べて投与量が多いことが多く, 求められるDrug Toleranceを担保することが厳しい場合もある (例えばトラフでも血中薬物濃度が2mg/mLを超えるような場合) .</li> <li>■ 非臨床ADAでは, 臨床ADAとは目的が異なることを鑑み, DTL改善だけを目的とした過度な検討は必要ないと考えられる.</li> </ul>
酸処理	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ アンケートの結果, 酸処理によりアナライトにダメージを与えてしまい, 逆に反応性が低下した事例が有効回答数14人中7人で確認されたが, White Paperでも同様の事例が報告されている.</li> <li>■ 昨今のADA分析法開発では, Drug Tolerance向上のため, 酸処理が一般化した, 場合によっては酸処理をしない選択肢も考えられる.</li> </ul>

## 分析法の構築・バリにおける留意点

Consideration for analytical method development and validation

項目	留意点
中和抗体分析法構築に、Cell-based assayを用いるかLigand-based assayを用いるかの境界線	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ FDA当局が細胞を用いた分析法の使用を推奨していることから、細胞を用いた分析法を第一選択にすることが考えられるが、実質的には利用可能な細胞が無いケースが最も多いことがアンケート結果よりわかった。</li> <li>■ ターゲットが膜に発現していない場合（開発薬剤が可溶性レセプターでターゲットがリガンドなど）には、実施しないなど機序に基づいたDecisionがベースになることもある。</li> </ul>
ADA分析業務にあたり、参考としている文書	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ アンケートを実施したところ、ほとんどの方がFDAが2019年に出した免疫原性ガイダンス文書あるいは2007年にShankarが著したWhite Paperと回答した。</li> <li>■ 国立医薬品衛生研究所が発出している文書[バイオ医薬品の免疫原性評価に用いられる抗薬物抗体分析に関する技術的要件（国衛研，2018）]も過去のJBF DGで議論されてきた方々の知恵が詰まってまとまっており参考になるため是非読んでいただきたい。</li> </ul>



- 本DGでは、ADA分析上の課題を①非臨床試験、②臨床試験、③分析法開発の3側面に分けて考えアンケートを作成した。
- その後、DGサポーターから回答を得てアンケート結果を共有した。
- アンケート結果から、それぞれの側面（非臨床ADAのデザイン・ストラテジー、臨床ADAのデザイン・ストラテジー、分析法の構築・バリにおける留意点）における考察を紹介した。

- ❑ In this DG, a survey was created considering the issues in ADA analysis in three aspects: (1) non-clinical study, (2) clinical study, and (3) analytical method development.
- ❑ After that, the answers were obtained from DG supporters and the survey result was shared.
- ❑ Based on the results of the survey, each aspect (non-clinical ADA design strategy, clinical ADA design strategy, points to consider for analytical method development) was introduced.