



DG2023-61

Immunogenicityの予測 —バイオアナリストの観点から—

Prediction of Immunogenicity
-from the perspective of bioanalysts-

DG members

Name	Company
岡本 裕美 Hiromi Okamoto	第一三共株式会社 Daiichi Sankyo Co., Ltd.
駒場 淳二 Junji Komaba	小野薬品工業株式会社 ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD.
齊藤 哲 Tetsu Saito	Axcelead Drug Discovery Partners 株式会社 Axcelead Drug Discovery Partners, Inc.
安原 秀典 Hidenori Yasuhara	住友ファーマ株式会社 Sumitomo Pharma Co., Ltd.

活動内容

- ◆ Jun 2023
 - ✓ メンバー募集
- ◆ 12 Jul 2023
 - ✓ キックオフミーティング
- ◆ Jul 2023～Dec 2023
 - ✓ 現状の整理と議論内容の選抜
 - ✓ In vitroの各評価系についてレビュー論文を元に役割分担決定
 - ✓ ELISpotについてDG内で講演会開催
 - ✓ 本ポスター要旨の作成
 - ✓ Immunogenicityの予測の国内実施状況についてアンケート作成/実施
- ◆ Dec 2023～ Jan 2024
 - ✓ アンケート結果の集計
 - ✓ ポスター作成
- ◆ 5 Feb 2024
 - ✓ ポスター発表

免責事項

- ◆本発表における資料等に対する調査、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

本DGの背景

バイオ医薬品は、抗原として作用し意図しない免疫反応を引き起こすことで、医薬品の有効性や安全性に影響を与えることがある。

近年*in silico*、*in vitro*を中心としたImmunogenicityの予測手法が欧米を中心に発展しており、本邦においても予測への関心は年々高まっている。



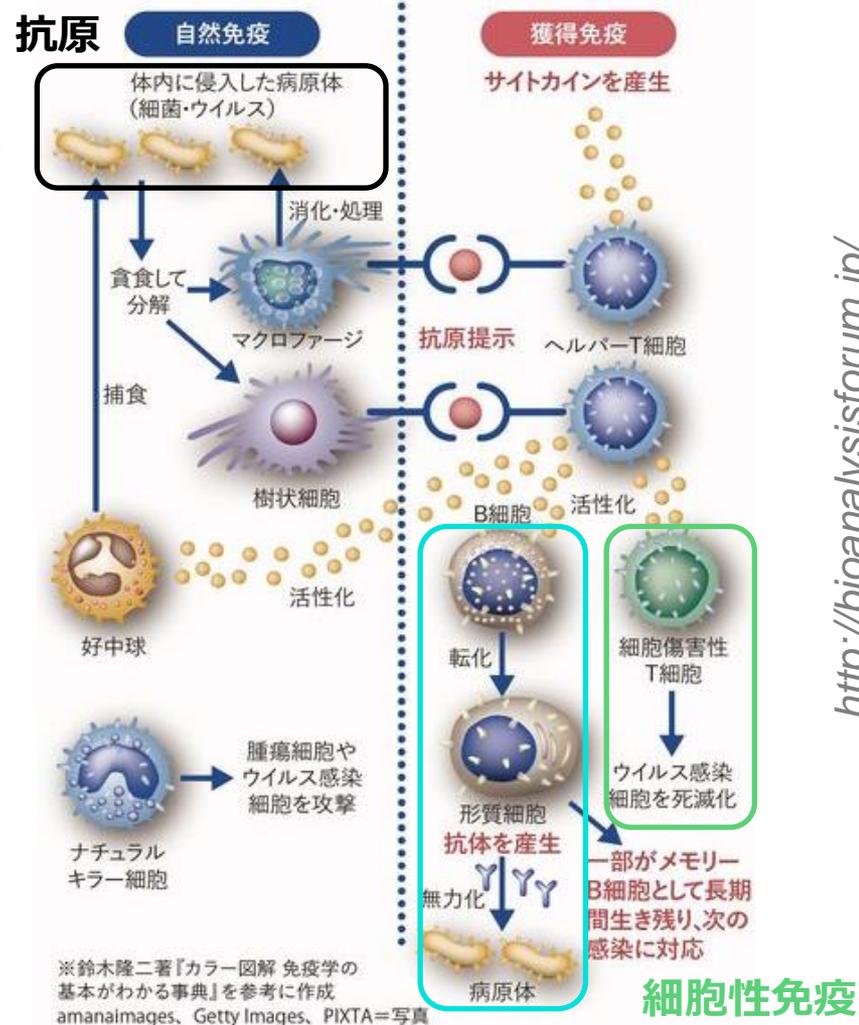
Immunogenicityの中でも抗薬物抗体産生の予測を中心に、文献から情報収集を行った。特に、ヒト末梢血単核細胞(PBMC)を用いた*in vitro*アッセイ手法及び測定に用いる分析機器を中心に、バイオアナリストの観点から情報を整理した。更にJBF参加企業へアンケートを行い、各社のImmunogenicityの予測に対する取り組みを調査した。

免疫原性とバイオ医薬品

- 一般的に、抗原が抗体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、投薬された患者で抗体産生が誘導される場合がある。
- 抗体誘導により、有効性・安全性に影響を及ぼす可能性がある。
- バイオ医薬品の有効性・安全性を確保するためには、免疫原性について十分に理解し、評価することが重要である。

出典：国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 HPより一部改変

出典：プレジデント(2020年7月3日号) オンライン



<http://bioanalysisforum.jp/>



タンパク製剤における免疫原性リスク要因

タンパク製剤の配列
/機能の観点から

ADA Consequences = **LESS SERIOUS** **SEVERE AE**

Endogenous homolog?	No	Yes	
Redundant/Unique Biology?	Redundant	Unique	
Impact of Autoimmune/KO	Minimal	No SAEs	Fatal
Intended Disease IND	Not Life-threatening	Life-threatening	
Intended Disease Post AP	Not Life-threatening	Life-threatening	
Treatment Options	Available	Not available	

患者/臨床プロトコル
の観点から

Dosing Frequency	Single	Chronic	Intermittent	
Dose Concentration	Very High	Low-Average		
Route of Administration	Oral	i.v.	s.c.	Inhaled
Patient Immune Status	Suppressed	Healthy	Activated	
Immunomodulatory Action	Immunosuppressant	Immunostimulant		
Endogenous Protein Level	High	Low		

Amy Rosenberg (FDA),
Non-clinical Immunogenicity
Assessment of Generic Peptide
Products: Development,
Validation, and Sampling
(2021)より一部抜粋

その他、製剤中に含まれる宿主由来タンパク質などの不純物も免疫原性に影響することが知られている。

PROBABILITY = **LOW** **UNKNOWN** **HIGH**

タンパク製剤における抗薬物抗体の産生機序

③ 抗原受容体※2によって、ペプチドとMHCクラスIIの複合体が認識→T細胞活性化・増殖、サイトカイン産生

Dendritic cell

T cell

B cell

① 薬物が樹状細胞※1に取り込まれ、ペプチドに分解

Receptor-mediated endocytosis

Therapeutic protein

② ペプチドとMHCクラスIIの複合体がAPC表面に提示

Fluidic phase pinocytosis

Therapeutic protein-derived peptide

MHC class II

④ サイトカインによりB細胞が活性化→抗薬物抗体を産生

※1 樹状細胞 = 抗原提示細胞 (APC)
 ※2 T細胞抗原受容体 (T-cell receptor: TCR)

Tourdot S, et al. Bioanalysis. (2019)より一部抜粋

Immunogenicityの予測とは

- ▶ タンパク製剤やその他バイオ医薬品の非臨床研究開発段階において、候補化合物のヒトにおける免疫反応を各種手法を用いて評価することで、候補化合物の免疫原性のポテンシャルを予測することである。
- ▶ 予測結果を元に候補化合物の選抜等を行い、免疫原性リスクの低い化合物を選択することで、ヒトに投与する際の安全性と有効性の確保に寄与する。
- ▶ 評価方法として、*in silico*、*in vitro* (*ex vivo*)、*in vivo*およびそれらを組み合わせた手法が用いられている。

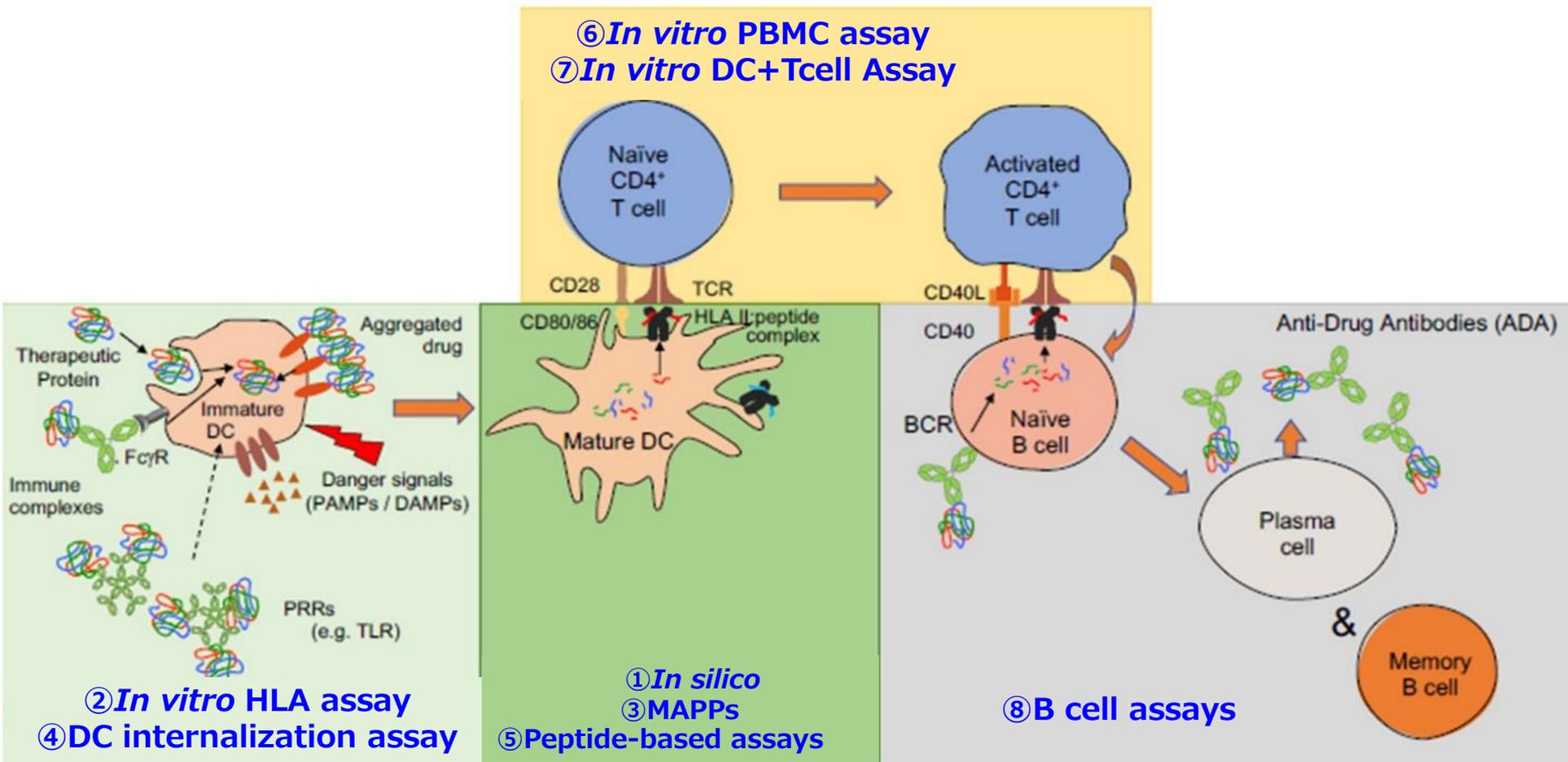
→ Immunogenicityの予測として、免疫原性リスクの低い化合物を非臨床の段階で選抜するために、上記の種々の取り組みが行われているが、その手法と技術は発展途上である。

本DGでは、主にタンパク製剤におけるImmunogenicityの予測方法について議論を行った。



各評価法の紹介

評価法Overview



DC; dendritic cells (樹状細胞),
 HLA; Human Leukocyte Antigen (ヒト白血球抗原),
 MAPPs; MHC-II-associated peptide proteomics,
 PBMC; Peripheral Blood Mononuclear Cells (末梢血単核細胞),

Ducret A, et al. MAbs. (2022)より一部抜粋



評価法Overview

Assay	Utility	Pros.	Cons.
① <i>In silico</i>	<ul style="list-style-type: none"> ●大規模な塩基配列パネルから高リスク変異体を抽出可能。 ●相同性の高いクローンをランキング ●ヒト化/非免疫化の配列設計をサポート 	<ul style="list-style-type: none"> ●ハイスループット ●低コスト 	<ul style="list-style-type: none"> ●一次配列のみに基づく ●主にMHC結合の予測に依存 ●主要な抗原プロセッシング、プレゼンテーション、T細胞認識プロセスは考慮外
② <i>In vitro</i> HLA assay	<ul style="list-style-type: none"> ●HLA分子とターゲット抗原との結合を測定し、抗体の特異的な反応性を検出 	<ul style="list-style-type: none"> ●抗体が特定のHLA型と結合するかどうかを評価できるため、個別アレルへの応答の予測可能。 ●アッセイの条件やパラメーターを制御でき、高い再現性 	<ul style="list-style-type: none"> ●HLA抗原と抗体の相互作用だけを評価するため、他の重要な免疫応答要素（如何に抗体が免疫系を活性化するか）を考慮することができない
③ MAPPs	<ul style="list-style-type: none"> ●ヒト化/非免疫化のための「ホットスポット」を特定する ●配列に関連しない変化が抗原提示(バイオシミラーなど)に及ぼす影響を評価 	<ul style="list-style-type: none"> ●頑健なアッセイ系 ●DCによる自然抗原プロセッシングに依存 ●豊富なデータ 	<ul style="list-style-type: none"> ●すべてのMHCクラスII結合因子がT細胞によって認識されたり、免疫応答を引き起こしたりするわけではない ●現在、HLA-DRにのみ適応可能
④ DC internalization assay (DC maturation assay)	<ul style="list-style-type: none"> ●抗原提示及び潜在的に免疫原性に及ぼす外的要因(例えば、凝集、汚染物質)の影響を評価 ●対象介在性の潜在的干渉を評価する前臨床免疫原性試験(例えば抗TNF)による生物学的評価 	<ul style="list-style-type: none"> ●ドナー間の一貫した反応 	<ul style="list-style-type: none"> ●抗原性や免疫原性の評価ではない
⑤ Peptide-based assays	<ul style="list-style-type: none"> ●ヒト化/非免疫化のための「ホットスポット」を早期に特定 (Peptide-based) 	<ul style="list-style-type: none"> ●評価対象となるタンパク (抗体) の作製不要 ●T細胞応答の評価 	<ul style="list-style-type: none"> ●化学的に生成されるペプチド(すべてのペプチドが細胞装置によって生成されるわけではない) ●業界で使用されるさまざまな読み取りおよびアッセイの設定

Ducret A, et al. MAb. (2022)より一部引用



評価法Overview

Assay	Utility	Pros.	Cons.
⑥ <i>In vitro</i> PBMC assay (whole protein)	● 標的HLA分布を示す異なるドナー間で、バイオ医薬品の提示ペプチドを認識するT細胞レパートリーにおける特異的TCRの頻度を評価	● DCによる自然抗原プロセッシングに依存する ● T細胞応答の評価	● 免疫調節治療薬が読み出しを妨害する可能性 ● 様々な手法と測定法があり、標準化されていない
⑦ <i>In vitro</i> DC+Tcell Assay (whole protein)	● バイオ医薬品の取り込み、プロセッシング、提示を評価し、その後、標的HLA分布を表す異なるドナー間で、バイオ治療薬の提示ペプチドを認識するT細胞レパートリーにおける特異的TCRの頻度を評価	● DCによる自然抗原プロセッシングに依存する ● T細胞応答の評価	● 免疫調節治療薬が読み出しを妨害する可能性 ● 様々な手法と手順があり、標準化されていない
⑧ B cell assays	● バイオ医薬品に対する既存/交差反応性抗体の評価 ● ADA産生が認められた患者におけるBクローンの同定	● 個々の抗体分泌B細胞を検出する唯一のアッセイ法	● 現在のところメモリーB細胞応答に限定 ● 免疫調節治療薬は読み出しを妨害する可能性がある。 ● コントロールはドナーパネル全体の反応を想起する必要がある
⑨ <i>In vivo</i> models	● バイオ医薬品の翻訳後修飾、製剤、作用機序を含む製品関連因子の評価	● 現段階では、ADA形成に至るまでに必要な免疫反応の全段階を含む唯一のアッセイ法	● モデル動物の作製は一般にコストと手間がかかる。 ● トランスジェニックモデルでは一般に、単一のHLAを含む特定のタンパク質に限定されるため、様々なポピュレーションを模倣できない。 ● 免疫原性のヒトT (およびB) 細胞エピソードに関する情報は得られない。

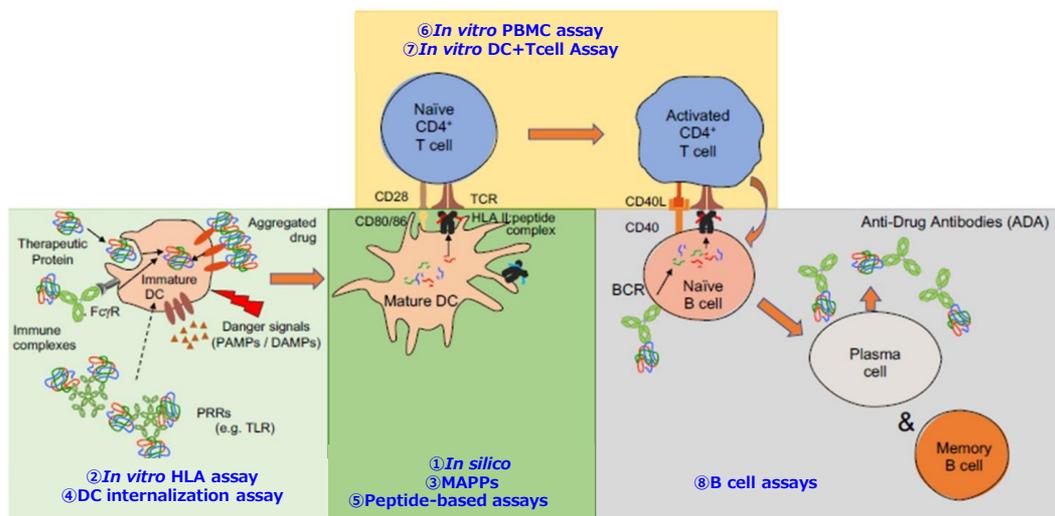
Ducret A, et al. MAbs. (2022)より一部抜粋

太字で示したAssayを中心にDG内で議論を行った。

In vitro試験のpros consと選択基準

Assay	薬物の取り込み	薬物の分解	HLAとの結合	T cell活性化	エピトープ情報	評価期間	コスト
① <i>In silico</i>	×	×	○	×	△	○	○
② <i>In vitro</i> HLA assay	×	×	○	×	○	○	△
③ MAPPs	○	○	○	×	○	×	×
④ DC internalization	○	×	×	×	×	○	△
⑥ <i>In vitro</i> PBMC assay	○	○	○	○	×	×	×
⑦ <i>In vitro</i> DC-T cell assay	○	○	○	○	×	×	×

<http://bioanalysisforum.jp/>



Ducret A, et al. MABs. (2022)より一部抜粋

1つの手法で全ての項目を満たすものは無いため、各手法の特徴を把握し、状況に応じて手法を使い分ける必要がある。

① *In silico*手法 ～概要～

- ◆ *in silico*手法は抗体の配列、構造、および相互作用パターンなどの情報を活用し、**抗体と抗原の相互作用におけるエピトープの特性やカバリッジ**などの要素から**Immunogenicity**を予測する。また、機械学習や統計的手法がモデルの改善に継続的に貢献している。
 - **ドッキングシミュレーション**：抗体の相互作用予測
 - **分子動力学シミュレーション**：抗体の立体構造とダイナミクスの結合形成モデル
 - **ホモロジーモデリング**：既知の構造と類似性のあるタンパク質構造を利用し、未知の構造を推定
 - **ファーマコフォアモデル**：抗体とターゲット間の分子相互パターンについて、特徴量を組み入れた予測 etc...
- ◆ 一度に**大量の情報**を処理できるため、費用対効果に優れているとされている。
- ◆ 非臨床試験データや臨床試験データを組み合わせたアプローチも開発されており、より精度の高い予測が試みられている。一方で、**予測モデルの標準化やガイドラインの策定**が指摘されている。
- ◆ 本項では、*in silico*活用の評価フローの一例とReview論文に記載されたデータベースを提示し、企業における活用を議論したい。

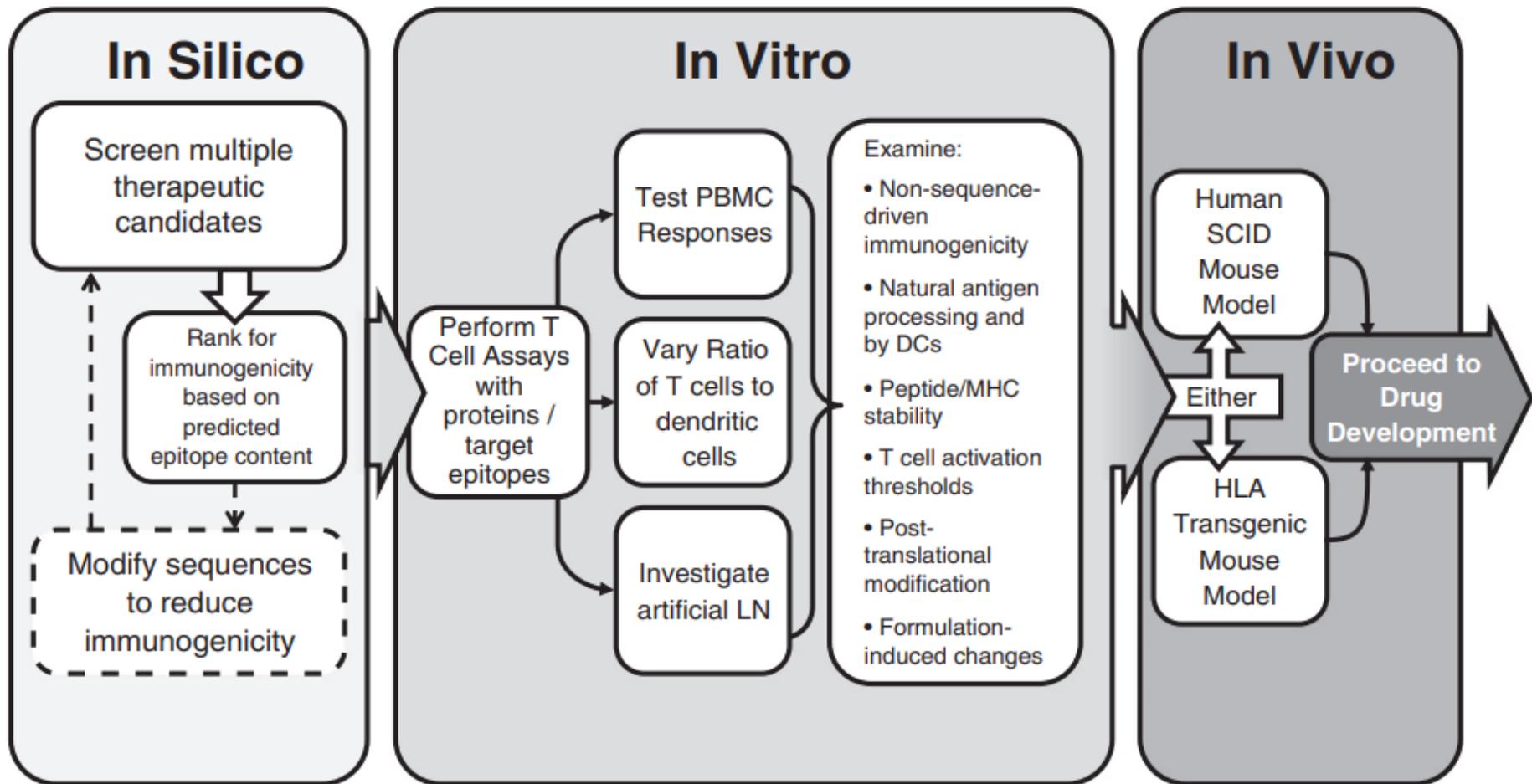
Khetan R, et al. MAbs. (2022)より一部抜粋



In silico手法 ~概要~

Example roadmap for immunogenicity prediction

Jawa V, et al. Clinical Immunology. (2013)
 Khetan R, et al. MABs. (2022)より一部抜粋



http://bioanalysisforum.jp/



In silico解析 ~データベース/ソフトウェア~

Database (free)

Khetan R, et al. MAbs. (2022)より一部抜粋

Database Name	Application	Link
Immune Epitope Database (IEDB)	Experimental data on antibody and T cell epitopes.	https://www.iedb.org/
MHCBN 4.0	A database of MHC/TAP binding peptides and T-cell epitopes.	https://webs.iitd.edu.in/raghava/mhcbn/
Bcipep	Database of B-cell epitopes.	https://webs.iitd.edu.in/raghava/bcipep/info.html
Leadscope Toxicity Database	The Leadscope Toxicity Database contains over 180,000 chemical structures with over 400,000 toxicity study results.	https://www.leadscope.com/product_info.php?product_id=78

Software (free)

Software Name	Application	Link
ANTIGENpro	Protein Antigenicity predictor	https://scratch.proteomics.ics.uci.edu/
COBEpro	Continuous B-cell epitope predictor.	https://scratch.proteomics.ics.uci.edu/
BEpro (PEPITO)	Discontinuous B-cell epitope predictor.	https://pepito.proteomics.ics.uci.edu/info.html
DiscoTope	Prediction of discontinuous B cell epitopes from protein three-dimensional structures	http://www.cbs.dtu.dk/services/DiscoTope/
ElliPro	Antibody epitope prediction	http://tools.iedb.org/ellipro/
SVMTriP	A tool to predict linear antigenic epitopes	http://sysbio.unl.edu/SVMTriP/
AbAdapt	Antibody-specific epitope prediction	https://sysimm.org/abadapt/
RANKPEP	Immunogenicity risk assessment	http://imed.med.ucm.es/Tools/rankpep.html
NetMHCIIpan	Immunogenicity risk assessment	https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetMHCIIpan-4.0/
MHCEpitopeEnergy	Rosetta-based biotherapeutic deimmunization platform	https://www.rosettacommons.org/docs/latest/rosetta_basics/scoring/MHCEpitopeEnergy
Hu-mAb	Antibody humanization tool	https://opig.stats.ox.ac.uk/webapps/sabdab-sabpred/sabpred/humab
TOPKAT	in silico toxicology assessments	https://www.toxkit.it/en/services/software/topkat

Software (paid)

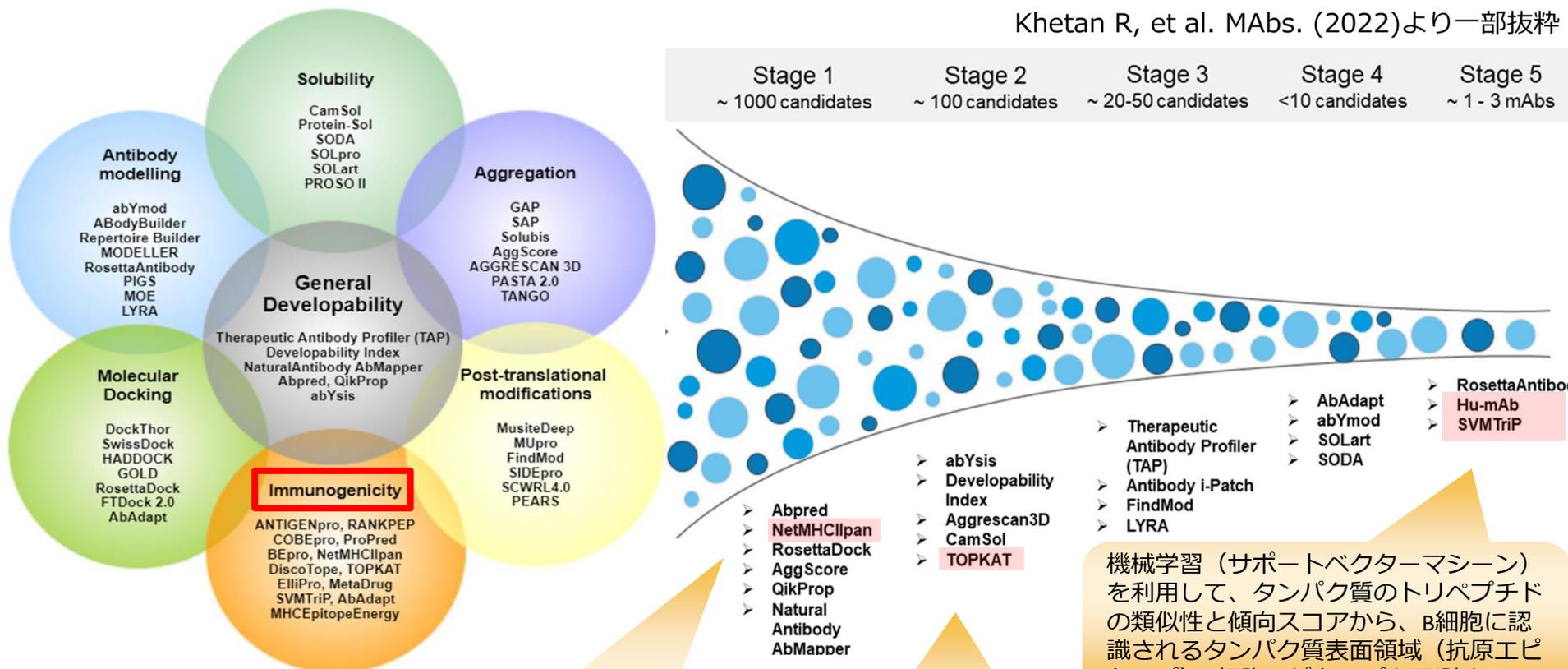
Name	Company	Application
EpiMatrix	EpiVax	An integrated toolkit for the selection and optimization of antigens and the design of epitope
LabZient™	Abzena	Predictive in-silico evaluation with laboratory methods to de-risk the application
Epibase	Lonza	In silico immunoprofiling services and in vitro cellular assays predict and compare the immunogenicity risk potential

フリーのソフトウェアは多数報告されている。一方、メーカーは社内情報を開示できないので、ライセンス料を支払い、非公開の予測ソフトウェア等を使用しているのでは？



In silico解析 ~活用事例~

Khetan R, et al. MAb. (2022)より一部抜粋



さまざまなHLA-II型と相互作用するHLA-II結合ペプチドを提示し、分子の構造と相互作用に基づいて免疫原性ポテンシャルを予測する。

機械学習をベースとした構造活性相関による毒性予測ツール。特定のエピトープとMHC（主要組織適合遺伝子複合体）分子の相互作用領域から潜在的なT細胞エピトープを予測する。

機械学習（サポートベクターマシン）を利用して、タンパク質のトリペプチドの類似性と傾向スコアから、B細胞に認識されるタンパク質表面領域（抗原エピトープ）B細胞エピトープを予測する。

➤ 聴講者の皆様
気になるところがあれば、
ポストイットにご記入ください。



免疫原性評価における*in silico*の予測の使い方は？

主には創薬段階での活用になると考えている。免疫原性リスクの高いペプチドを探索することができるので、MAPPsなどと組み合わせて、多数の候補品からの絞り込みに使用可能ではないか。一方で、全長での*in silico*予測は現段階では精度が低いのではないかと、いうことをDG内で議論した（あまり知られていないのでは？）。



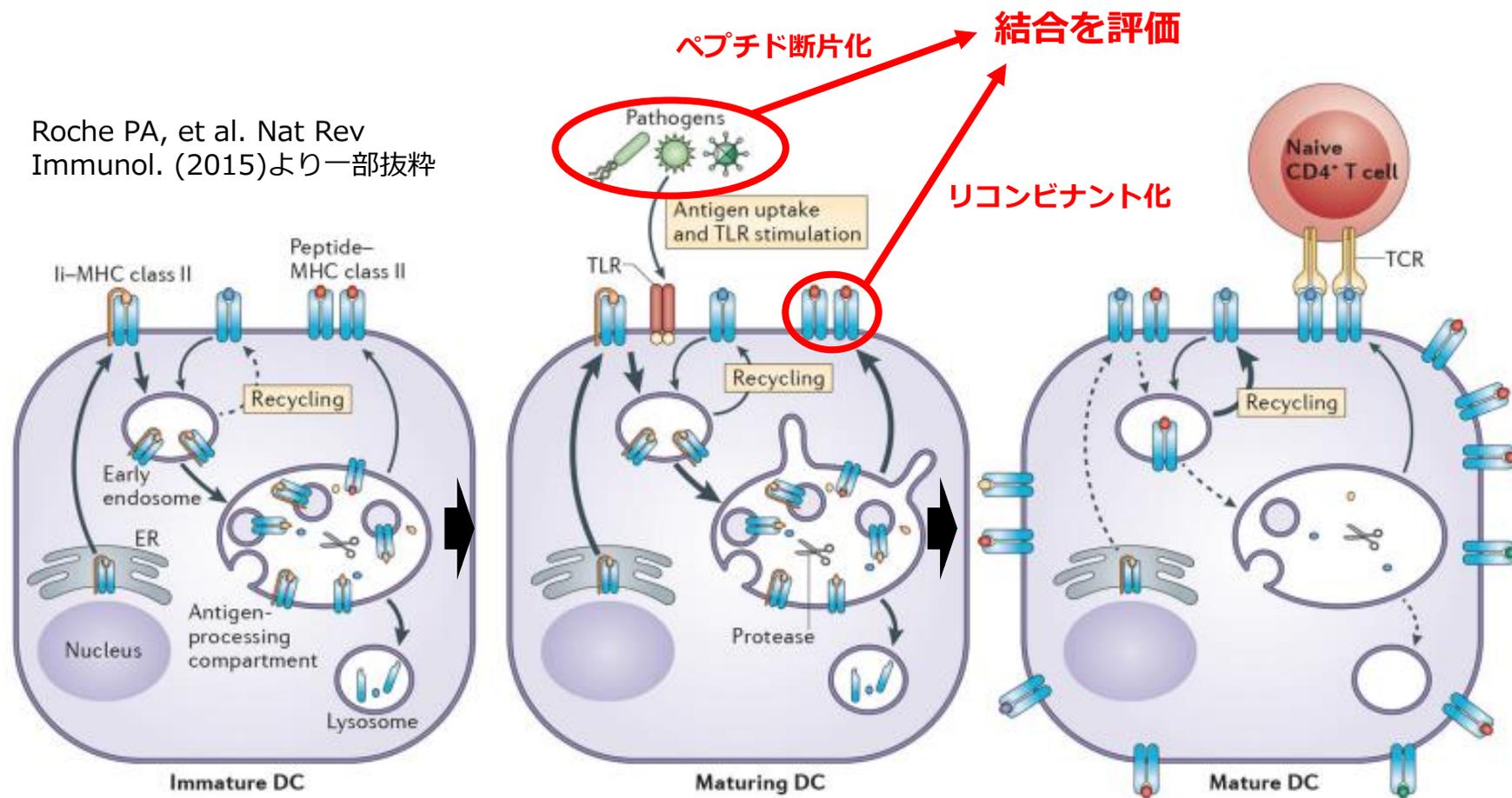
JBFで*in silico*について議論できるか？

本DGメンバーも含め、JBF参加者の多くは生体試料分析をバックグラウンドとしており、専門的に話すことができないため、今回はoff the tableとしたい。学会当日にコメントがもらえると嬉しい。

② *In vitro* HLA assay ~概要~

in vitro HLA assayは、抗原となるタンパク製剤のペプチド断片と、リコンビナントの HLA (MHC-class II) との結合を評価する手法である (細胞不使用)。

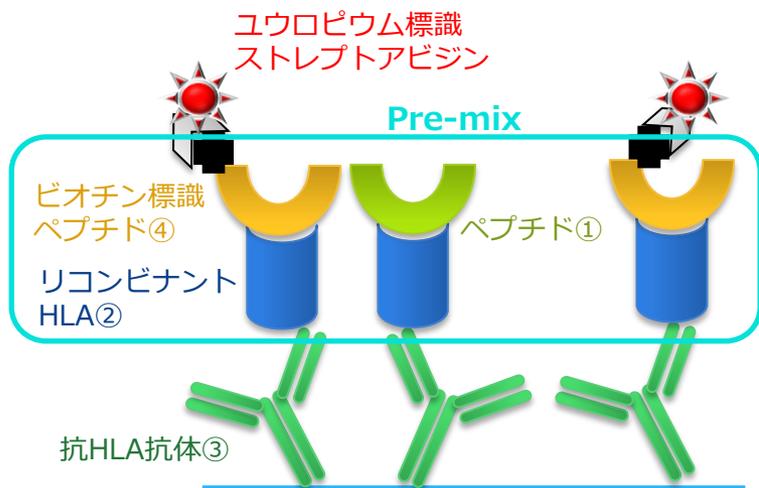
Roche PA, et al. Nat Rev Immunol. (2015)より一部抜粋



In vitro HLA assay

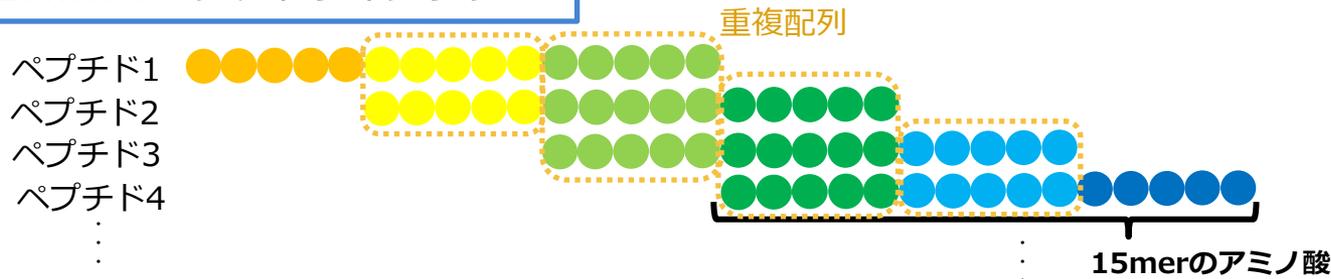
～評価フロー例～

手法の概略図



- ◆ タンパク製剤の重複したペプチドライブラリー①を作製。
- ◆ 用いるHLAアレルのタンパク②とそれに対する抗体③を準備。
- ◆ ②に結合するバイオチン標識トレーサーペプチドを準備(④)。
- ◆ 96wellプレートに③を固相。
- ◆ ①と④を②とインキュベーションしたものを、プレートに添加し③と反応させ、ユーロピウム標識ストレプトアビジンで検出。

① 互いに一部重複した15merのペプチドライブラリー



HLAとタンパク製剤のペプチド断片の反応性を確認
HLAとの結合活性で免疫原性を評価

DGコメント

➤ 聴講者の皆様
気になるところがあれば、
ポストイットにご記入ください。



In vitro HLA assayの利点と欠点は？

利点：比較的少数のHLAアレルでもリコンビナントさえ作ればアッセイを行うことが可能であり、PBMCより入手しやすいと考えられる。
欠点：ペプチドライブラリー自体の作製コストがかかる、ペプチド設計や純度、コンタミなどにより偽陽性、偽陰性が生じる可能性がある。



実施する上での留意点など、DGで出たコメントは？

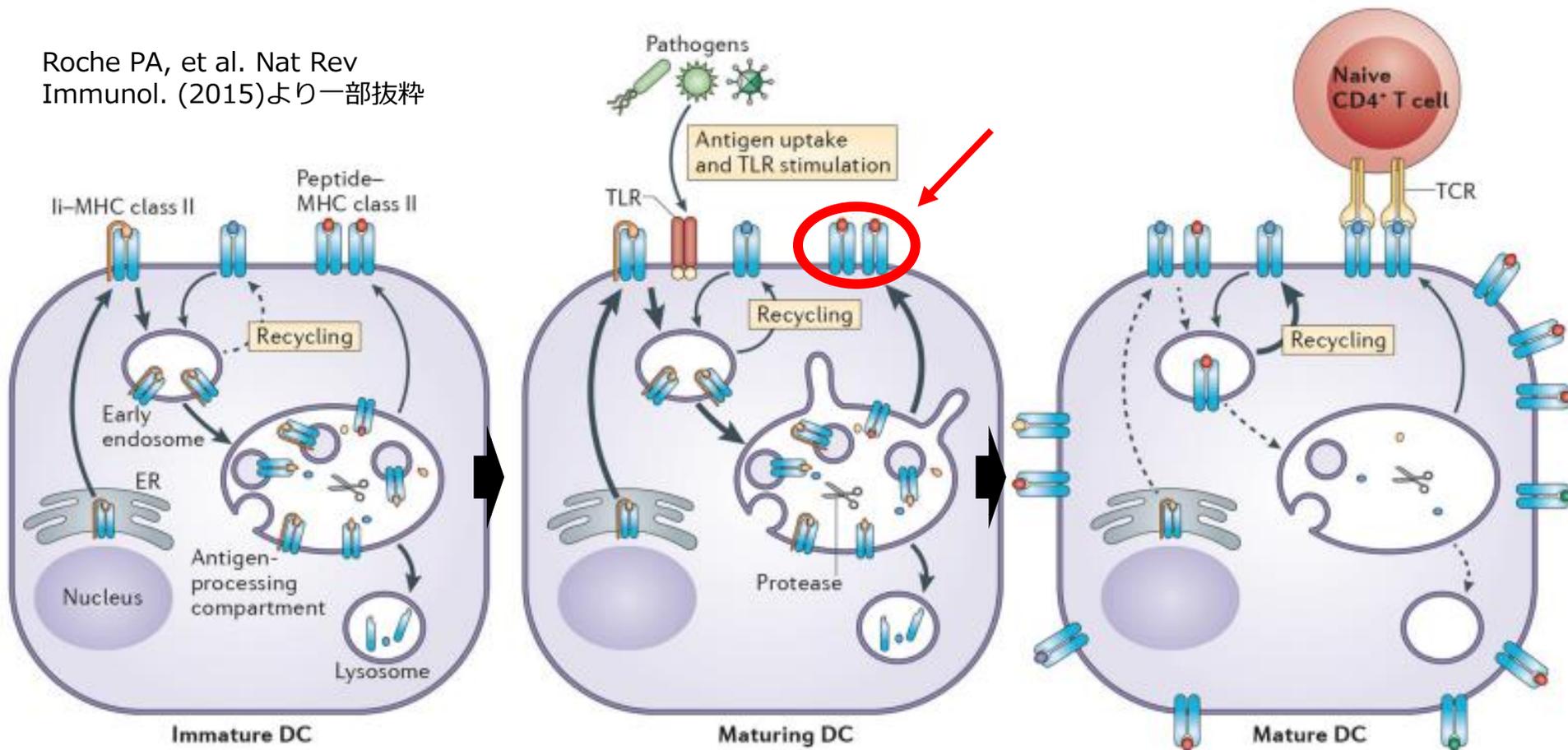
リコンビナントタンパク自体の信頼性（反応性や安定性など）の担保が課題では、というコメントがあった。また、ELISAの競合法での実施だが、条件検討などは手間がかかる可能性が高いと言えそう。欠点にもある通り、ペプチド断片化して実施することで偽陽性、偽陰性の確率は上昇すると思われるため、MAPPsの方が有用ではないかという議論になった。

③ MHC-II-associated peptide proteomics (MAPPs)

～概要～

MAPPsは、タンパク製剤そのものを細胞に添加し、樹状細胞内でHLA分子に結合した抗原由来のペプチド断片をモニターし、抗原提示されやすい配列を同定する手法である。

Roche PA, et al. Nat Rev Immunol. (2015)より一部抜粋



MAPPs ~原理と目的~

MAPPsとは？

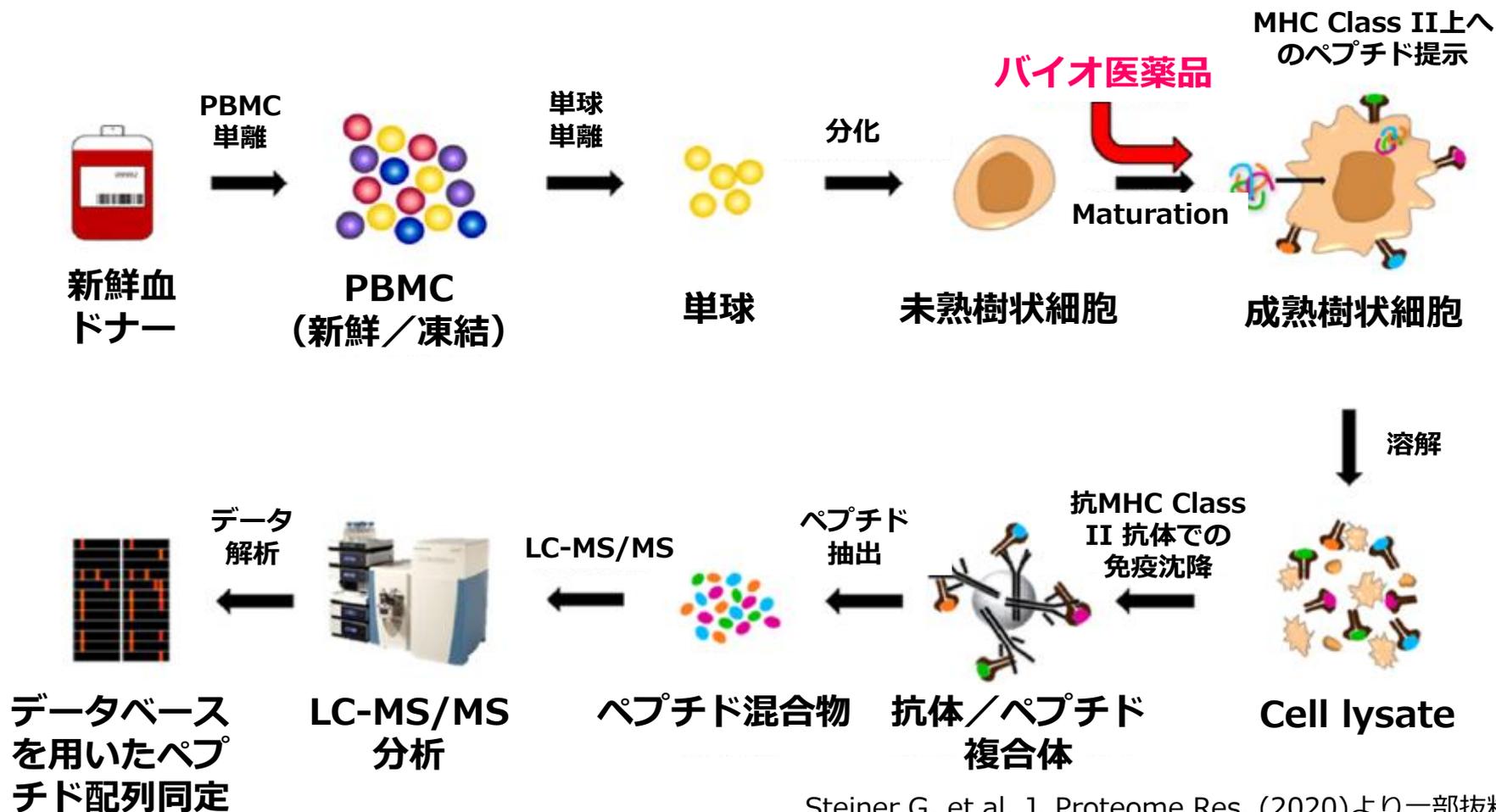
MHC-II-Associated Peptide Proteomics (MAPPs)は、DC内での抗原プロセッシングを経てHLA分子に結合した抗原由来のペプチド断片について、ペプチドの配列をLC-MS/MSを用いて同定する技術である。

*In silico*によるT細胞エピトープ予測がペプチドとHLAの結合のみを予測するのに対し、MAPPsは実際の抗原提示機構に近い状態でペプチド断片を検出できる。

MAPPsの利用目的

- ① 類似の蛋白製剤間の免疫原性の相対比較
- ② 抗原提示されやすい「ホットスポット」配列の同定
- ③ *in silico*免疫原性予測の検証
- ④ 抗原提示の機序解明

MAPPs ~具体的なフロー~



Steiner G, et al. J. Proteome Res. (2020)より一部抜粋

MAPPs ~アウトプットのイメージ~

Cluster : 共通配列を有する、
長さの異なるペプチド群



MAPPsにより同定されたMHC Class II提示ペプチド。1人のドナーからでも異なる長さのペプチドが提示される。

抗原提示のされやすさをHeatmapで表示

複数ドナーで抗原提示→免疫原性リスクが高い

Rombach-Riegraf V, et al. J. PLOS ONE. (2014)より一部抜粋

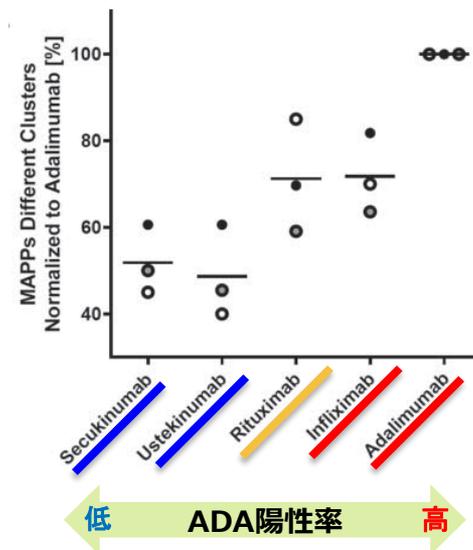
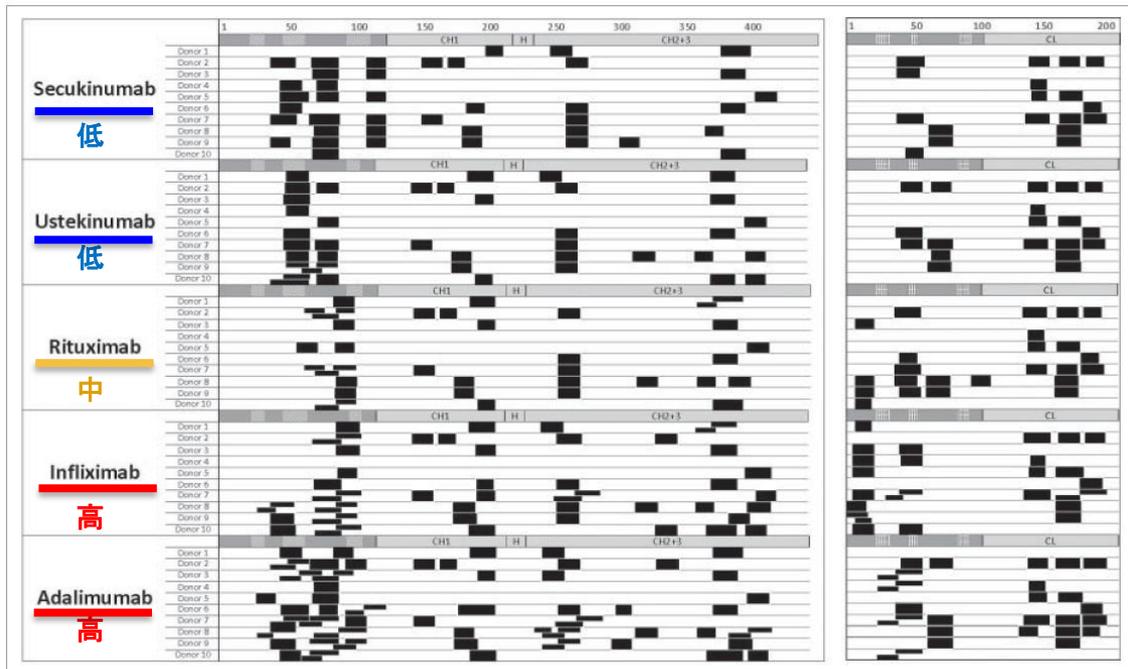


MAPPsと臨床ADA陽性率の関係

重鎖

軽鎖

臨床試験での
ADA陽性率



■ 抗原提示されたペプチドを含むCluster

臨床試験でADA陽性率が高い薬剤ほど、MAPPsで多くのClusterが認められた。

Karle A, et al. J. MAbs. (2016)より一部抜粋

論文	Sekiguchi N, et al. MABS (2018)/Chugai	Steiner G, et al. J. Proteome Res. (2020)/Roche	Di Ianni A, et al. Life Sci Alliance (2023)/Merck Serono	Hartman K, et al. Biology(2023)/Roche
評価抗体 (陽性対照)	Infliximab Adalimumab Etanercept In-houe Abs	Infliximab In-house Abs (KLH)	Infliximab Trastuzumab In-house Abs (KLH)	Adalimumab ATR-107 (KLH)
PBMCのソース	凍結	新鮮血	新鮮血	凍結
ドナー数	20	3	10	3
# of monocyte	$1.4 - 5.4 \times 10^6$	3×10^6 cells	6×10^6 cells	2.5×10^6 cells
免疫沈降に用いた抗MHC ClassII抗体	G46-6 (Becton Dickinson)	L243(BD Biosciences)	G46-6 (Becton BioLegend)	L243(RayBiotech), SPV-L3(Biotium), 1a3, B7/21(Leinco), CR3/43, WR18(Bio-Techne), Tu39(BioLegend)
免疫沈降に用いたビーズまたは固相カラム	<ul style="list-style-type: none"> •CNBr-activated Sepharose 4B beads (GE Healthcare UK) •FG NHS magnetic beads (Tamagawa Seiki) 	<ul style="list-style-type: none"> •CNBractivated Sepharose 4B • NHS-activated magnetic Sepharose Beads(GE Healthcare Europe) 	<ul style="list-style-type: none"> •Streptavidin sepharose magnetic beads (GE Healthcare) •FG-NHS magnetic beads (Tamagawa Seiki) 	Streptavidin cartridge(Agilent)
LC-MS/MS	逆相ナノLC-MS/MSシステム (いずれも高分解能質量分析装置を使用)			

	推奨条件
ドナー	ドナー数は創薬初期の配列評価で10例程度、中～後期はHLAの多様性を考慮したリスク評価として15～30例 HLAのGenotypingは必須
PBMC	新鮮血由来と凍結PBMCの両方の報告がある。 HLAのGenotypingは必須
細胞数	Monocyteとして $1\sim 6 \times 10^6$ cells
コントロールまたはベンチマーク蛋白	陰性対照：Medium 陽性対照：確実に抗原提示されるタンパク（KLHなど） ベンチマーク：臨床でのADA陽性率が明らかになっている抗体医薬（adalimumab、infliximab、rituximabなど）
QC	LC-MS/MSの性能評価のためのQCと、サンプル調製のQCは分けて考えるべき。 ・ LC-MS/MS：約5000の異なるMHC-classIIペプチドから約1000のタンパクを同定 ・ サンプル調製：各ドナーにおいて、選択されたタンパク（KLH、アルブミン、ベンチマーク抗体など）について、検出されるべきペプチドが検出されることを評価

DGコメント



MAPPsはどういった目的で使うべき？

MAPPsは比較的時間も手間も掛かるので、免疫原性予測としてルーティンに用いられる方法ではないと考えている。あるタンパクで*in vitro*のPBMCやDC/T cellアッセイで免疫原性が高いという結果が得られた際に、T細胞エピトープを予測する目的に使われることが多いのではないかと考えている。T細胞エピトープが予測できれば、アミノ酸配列を改変するなどして、より低リスクの候補分子を選択することに役立つと考えている。



MAPPsの結果はHeatmapとして得られるが、その結果からアミノ酸配列の改変などを行うための判断基準はどうすればよいか？

個人的な意見だが、改変を行うかどうかの明確な判断基準を設定することは困難と考えている。上述のように、MAPPsを行う時点で既にその分子は免疫原性が高いと考えられており、且つ、改変を行う意向が強いことが想定される。そのため、Heatmap上に他の分子では認められていない領域にClusterが明確に現れたなら、その領域を中心に改変を行うべきではないか？

➤ 聴講者の皆様
気になるところがあれば、
ポストイットにご記入ください。

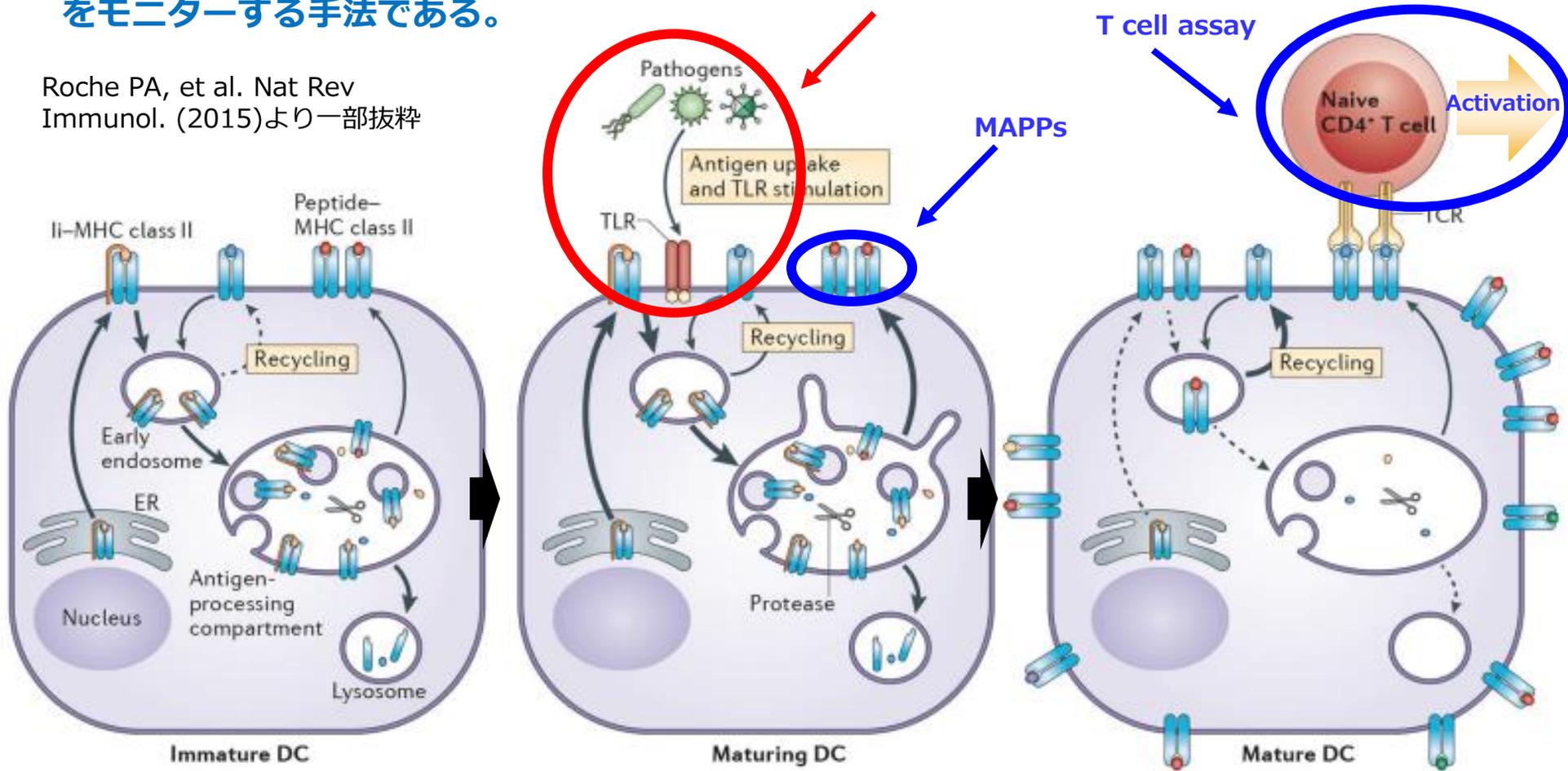


④ DC internalization

～概要～

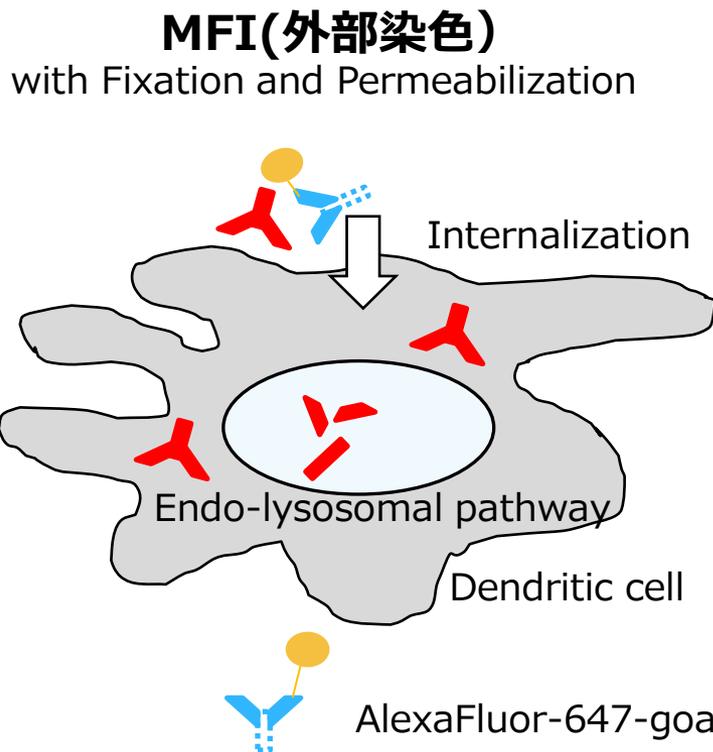
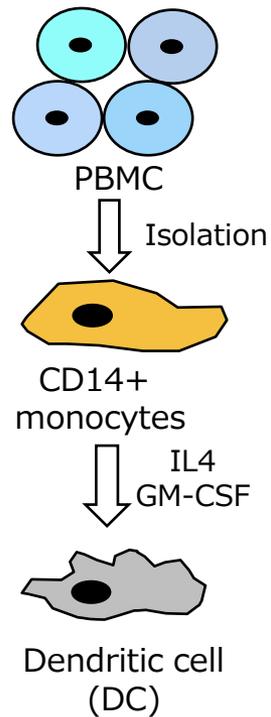
MAPPs及び次項で示すT cell assay等の評価は、いずれも免疫応答の後期過程をモニターする手法であるのに対し、DC internalizationは**最初の過程である薬物のAPCへの取り込み**をモニターする手法である。

Roche PA, et al. Nat Rev Immunol. (2015)より一部抜粋

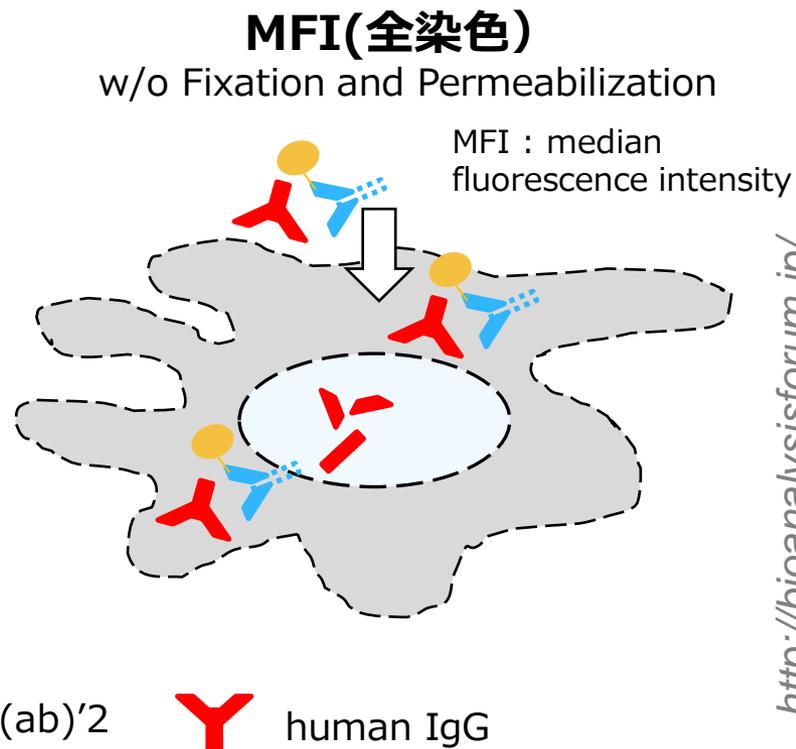


DC internalization

～評価フロー一例～



Melendez R, et al. Bioanalysis. (2022)より一部抜粋



<http://bioanalysisforum.jp/>

- ◆ PBMCからCD14陽性単球を分離し、IL4 & GM-CSF培養によるDC分化
- ◆ IgG (Mab) にFRETアッセイ用のアクチベーターを反応させ、結合
- ◆ DC分化後の細胞に100ug/mLのMabを24h、37℃処理し、内在化
- ◆ Washout後に、4%ホルマリンで固定。膜透過処理群と未処理群でFlow Cytometryで分離
- ◆ Mabに対する結合性と、透過処理後の結合性の差分から内在化指数 (=MFI(全染色)-MFI(外部染色))を算出



DC internalization

～論文条件一覧～

論文	Xue L, et al. Clin Exp Immunol. (2016) /Pfizer	Wen Y, et al. AAPS J. (2020) /Eli Lilly	Melendez R, et al. Bioanalysis. (2022) /Genentech
Assay種別	DC-T	DC-T	DC-T
実験ソース	健康なボランティア	正常ドナー	-
単球の分離	-	CD14 beads (Miltenyi)	CD14 beads (Miltenyi)
MoDCへの分化	PBMCから単球とT細胞を単離。 IL-4 + GM-CSF + 基礎培地から誘導	PBMCから単離。 IL-4 + GM-CSF + 基礎培地から誘導	PBMCから単離。 IL-4 + GM-CSF + 基礎培地から誘導
細胞数	Unknown	1.0 x10 ⁶ cells/mL	0.3x10 ⁶ cells/mL
個体数	N=9~11	N>40	N=10 (8~25の範囲で増減)
検出手法	フルオロフォアに直接的に結合された抗体の内在化をモニターする手法 (フルオロフォアの取り込みの差は内部移行の読み取りまで反映)	F(ab)' ₂ に結合したFRET対を利用し、抗体の内在化を検出する (抗体結合体がエンドリソソーム経路で内在化され、FRET対が分離し、蛍光シグナルが検出)	Fixation and Permeabilization Solution前後に蛍光標識二次抗体を添加することで、差分解析から内在指数を算出する方法論。水溶性の高いフルオロフォアの影響やアーティファクトを検出せず、特異性が高い
被験物質の濃度	50 µg/mL	4 µg/mL	100 µg/ml
ポジコン	KLH	mAb1	Bococizumab
ネガコン	PF-1	Isotype IgG	Bevacizumab Evolocumabなど

<http://bioanalysisforum.jp/>

➤ 聴講者の皆様
気になるところがあれば、
ポストイットにご記入ください。



DC internalizationは免疫原性の途中過程なので、抗原性や免疫原性の評価と直接関係せず、実際のリスク評価には活用しづらいのではないかと？

DCへの特異的な取り込みを検出できるポテンシャルを秘めており、PBMC/T cell assayとは異なるリードアウトとなることから、複合的な考察につなげられるのではないかと？一方で、PBMC/T cell assayとは違って、歴史が浅く、まだ科学的な特徴づけもなされていないため、今後の評価に注視したい。



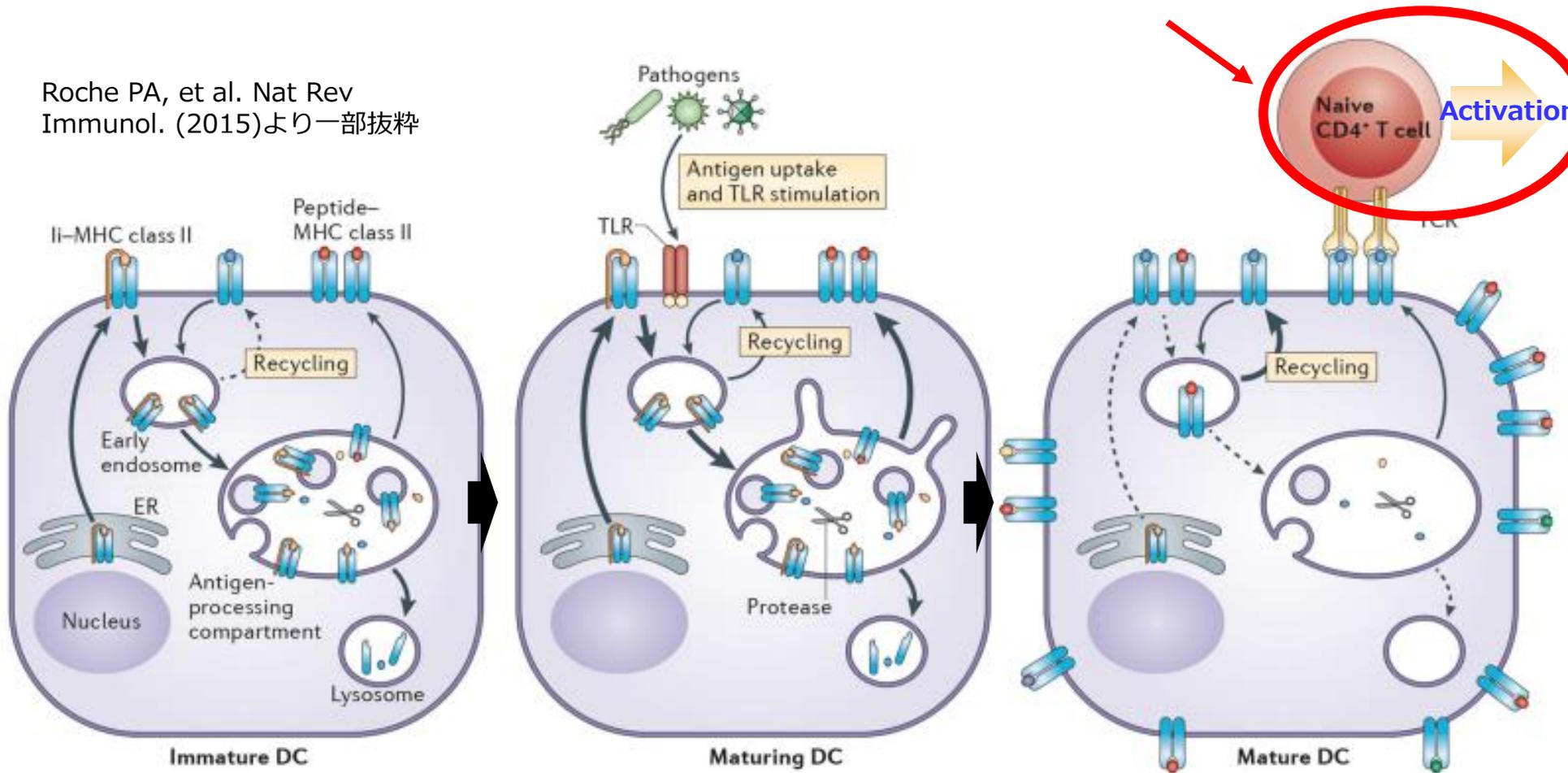
DC internalizationのメリットは？

細胞の取り込み過程であることから、PBMCを用いたほかのアッセイ（T cell assay等）と比べて、ロット差が生じがたく、一貫性のある反応と言われている。また、取り込み過程をモニターするため、スループットがよい（反応時間がPBMC/DC+T cell assayと比べて短い）点も利点と言えるのではないかと？

In vitro ⑥PBMC/⑦DC+T cell ~概要~

PBMC assayまたはDC-T cell assayは、いずれも **T cellの活性化をモニター**することで、**薬物のAPCへの取り込み→peptideの提示→T cellの活性化の一連の動きを評価する手法**

Roche PA, et al. Nat Rev Immunol. (2015)より一部抜粋



In vitro PBMC/DC+T cell ~手法の概略~

T cellの増殖・活性化を指標とした Human PBMC/DC+T cell assay それぞれの特徴

- **PBMC assay** : PBMCに含まれるDC・T cellを利用し、目的薬物を添加することによるT cellの増殖・活性化を観察。
 - Pros : 比較的簡便なassayで、ステップ数が少なく、評価期間が短くて済む
 - Cons : PBMCに含まれるDC細胞は少ないため、感度が低い。T cellに直接作用するような薬剤では正しい評価にならないことが想定される。
- **DC-T assay** : PBMCから単離したmonocyteをDCに分化させ、一定の比率でT cellと共培養したものでT cellの増殖・活性化を観察。
 - Pros : DCとT cellの比率を最適化することで、感度を高くすることが可能
 - Cons : 細胞の単離・分化などが必要なため、assayステップが多く、評価期間も長くなる。



薬物全体、部分的なpeptideいずれでも評価可能であり、生体内で生じるであろう抗薬物抗体産生につながるT cellの増殖・活性化を観察することが可能であるところが利点と考えている。

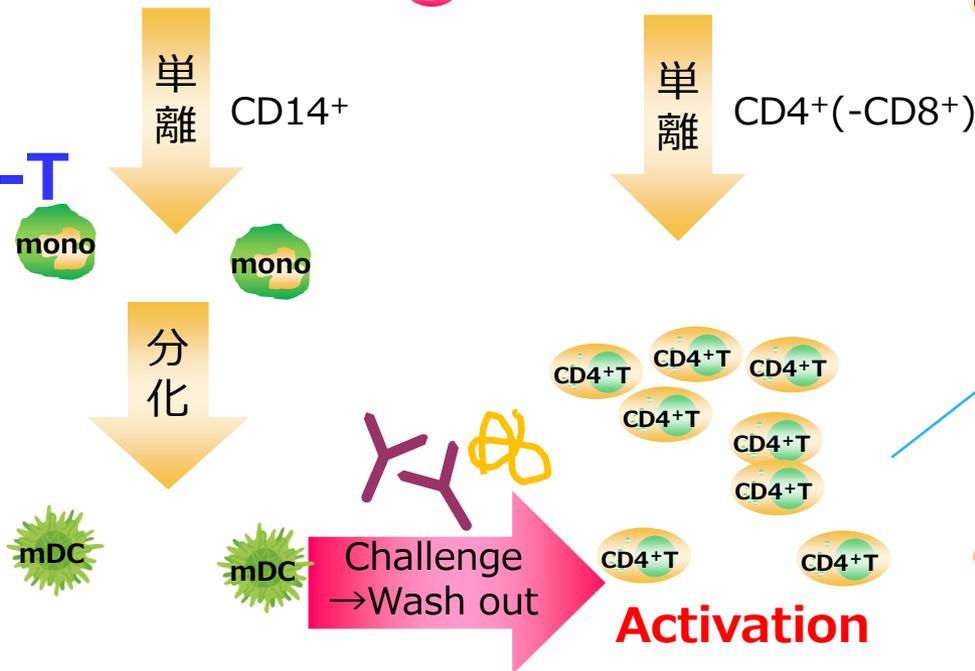


In vitro PBMC/DC+T cell ~具体的なフロー~

PBMC



DC-T



- T cellの増殖
- サイトカイン分泌

PBMC assayはシンプルな手順、DC-T assayは感度の面でメリットがあり、いずれの手法を選択するかは個別の判断と思われる。



<http://bioanalysisforum.jp/>

In vitro PBMC/DC+T cell ~assayの留意点~

➤ PBMCについて

- 使用するPBMCのcondition
 - 新鮮PBMC
 - 凍結PBMC(-80℃ or 液体窒素)
- PBMC使用条件について
 - 健常人 or 患者由来
 - HLAカバレッジ(例数)
 - 細胞数

PBMCのコンディションが結果に影響する可能性あり



必要に応じてPBMCソースを判断。HLAカバレッジや細胞数が試験コストに直結する。



➤ DC/T cellについて

- Monocyteの分離方法
- T cellの分離方法
- monocyteの分化方法
- 各細胞の細胞数 (DCとT cellの比率)

DCやT cellの分離法はいくつか知られているが、どの手法を選べばよいか悩むどころ・・・



➤ 培養・刺激条件について

- 刺激タイミング・測定までの期間
- 抗原の種類・濃度
- 刺激のポジティブ・ネガティブコントロール

培養期間と刺激タイミング・抗原刺激濃度は報告間でかなり幅がある印象。何をコントロールとすればよいかも議論がありそう。



In vitro DC-T cell assay

～論文条件例～

論文	Schneider T, et al. Blood Adv. (2017) /Novartis	Karle A, et al. MAbs. (2016) /Novartis	Xue L et al. Clin Exp Immunol. (2016) /Pfizer
Assay種別	DC-T	DC-T	DC-T
実験ソース	Healthy (and HX575 treatment patient)	Healthy	Healthy
T細胞	CD4+CD25	CD4+	CD4+
細胞培養期間	10 Days	5 Days	-
Antigen pulse(T細胞数)	5×10^4 cells	1×10^5 cells	3×10^5 cells
Antigen pulse(mDC細胞数)	1×10^4 cells	1×10^4 cells	3×10^4 cells
Antigen pulse	48 h	7 Days	7 Days
個体数	24 (responder:8, non-responders:16)	50	11
被験物質	組み換えエリスロポエチン	上市抗体	ATR-107(anti-IL-21R)
ポジコン	-	KLH・humanized A33	KLH
ネガコン	-	Medium alone	PF-1

<http://bioanalysisforum.jp/>



In vitro PBMC assay

～論文条件一覧～

論文	Mazor R, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. (2014) / NIH	Hamze M, et al. Sec. Vaccines and Molecular Therapeutics (2017) / Université Paris	Lamberth K, et al. Sci Transl Med. (2017) / Novo Nordisk
Assay種別	PBMC	PBMC	PBMC
実験ソース	Healthy (and Cancer)	Crohn's/RA	Healthy
細胞数	2×10^6 PBMCs	Not Stated	$4-6 \times 10^6$ CD8+ Depleted PBMCs
個体数	50 (16)	7	50
細胞培養期間	14-17 Days	10 Days	8 Days
被験物質	Recombinant immunotoxin mAb: Rituximab, Infliximab		rFVIIa, Vatreptacog alfa
ポジコン	-	KLH	-
ネガコン	-	Buffer	-

<http://bioanalysisforum.jp/>

In vitro PBMC assay ~推奨条件 (例) ~

項目	条件
ドナー	目的に応じてドナー数は異なると考えられる。 10~50例
PBMC	新鮮血由来と凍結PBMCの両方の報告がある。 HLAのGenotypingは必須
細胞数	PBMCとして2~5 x 10 ⁶ cells
Negative Control	Medium
Positive control	KLH
Benchmark	Adalimumab、Infliximab、Rituximabなど
抗原刺激濃度	抗原に依存
Incubation時間	7-20 日間
Detection ①	T cellの増殖
Detection ②	T cellからのサイトカイン分泌



In vitro DC-T assay

～推奨条件（例）～

項目	条件
ドナー	目的に応じてドナー数は異なると考えられる。10～50例
PBMC	新鮮血由来と凍結PBMCの両方の報告がある。HLAのGenotypingは必須
Monocyteの精製方法	接着法、CD14 ⁺ ビーズ
T cellの精製	CD4 ⁺ ビーズ、またはCD8 ⁺ ビーズ除去処理後のCD4 ⁺ ビーズ
Monocyteの細胞数	T cellの1/5～1/10
T cellの細胞数	$1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ cells/well
DCへの分化方法	GM-CSF + IL-4 (iDC)、Cytokine cocktail、TNF α (mDC)
抗原刺激濃度	5-450 μ g/ml (抗原に依存)
刺激後の培養時間	24 h～7 days
Positive controls	KLH
Negative controls	Buffer
Benchmark	Adalimumab、Infliximab、Rituximabなど
Detection ①	T cellの増殖
Detection ②	T cellからのサイトカイン分泌

- **T cellの増殖**
 - ^3H -Thymidine取り込み
 - Flow Cytometry
 - ELISpot 等

- **サイトカイン分泌**
 - ELISpot
 - Multiplex 等

詳細は各分析手法の項目の中に記載がある。各手法とも感度や実施の容易さなど、ケースに応じて分析手法を選択していると思われる。

→in vitro PBMC/DC+T cellなどでメインで使用されているFlow Cytometry及びELISpotについてはP48以降に測定法の詳細を示す。

In vitro assayと臨床ADA陽性率の関係

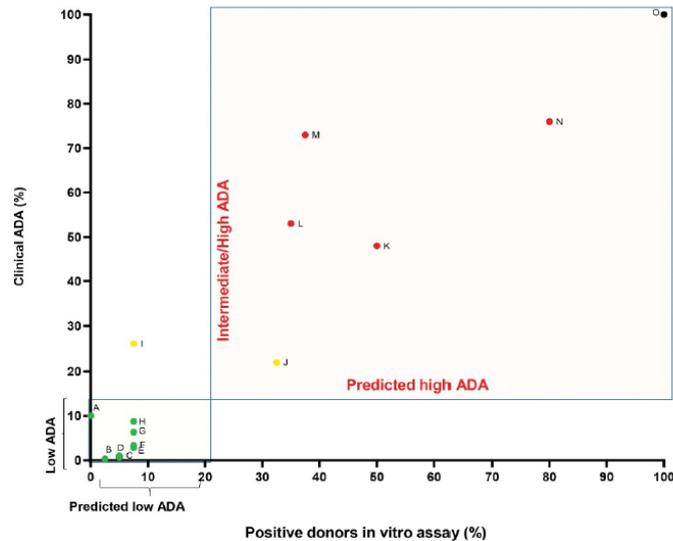
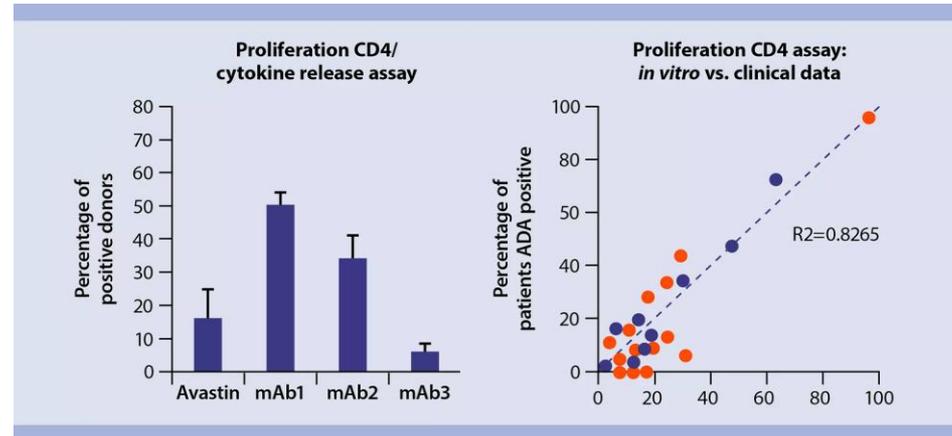


Figure 5. Summary of clinical ADA frequency and percentage of positive responding donors as determined by in the CD134/CD137 T cell activation assay. Biotherapeutics were divided into 2 groups based on their clinical ADA: low ADA (green dots) $\leq 15\%$ ADA and intermediate/high (yellow dots) or high ADA (red dots) $> 15\%$. A-Trastuzumab, B-Evolocumab, C-Bevacizumab, D-Secukinumab, E-Pertuzumab, F-RG7652, G-alirocumab, H-Etanercept, I-Adalimumab, J-Ixekizumab, K-Bococizumab, L-Anti-IL13/IL17/BITS7201A, M-HuA33, N-ATR-107, O- KLH (black dot). Rates of clinical immunogenicity were derived from the most current USPI, unless stated differently. ADA values for anti-IL13/IL17/BITS7201A and ATR-107 at single ascending-dose studies were considered for the calculation. Because secukinumab clinical ADA frequency is below 1%, an ADA = 1 was used. Because adalimumab, etanercept and ixekizumab have high variability in clinical ADA frequency, ADA was chosen based on maximal ADA in the USPI. For adalimumab-ADA = 26%, for etanercept- 8.7%, and for ixekizumab-22%.

Cohen S, et Al. MAbs. (2021)より一部抜粋



<https://www.miltenyibiotec.com/JP-en/applications/Drug-discovery-and-development/assays-for-immunogenicity-prediction.html>

T細胞活性化の評価を用いたケースで、実際の臨床ADA発生とImmunogenicity予測の関連性はいくつか報告があり、どのように比較するか難しいが、それなりに関連するという結果が出ている。

DGコメント

➤ 聴講者の皆様
気になるところがあれば、
ポストイットにご記入くだ
さい。



PBMC/DC-T cellの評価の堅牢性はどの程度ある？

細胞を用いた比較的長い期間のassayなので、評価の堅牢性は高くないと考えている。N数を増やしたり、細胞のconditionをなるべく合わせたりすることが良いように思われるが、実施例のヒアリングはまだまだできていない状況である。多くの実施例を集めたうえで留意点をまとめられると良いのだが・・・



報告によって試験条件が異なっているので、なにかしら指標になるようなものがあると良いのだが・・・

AAPSなどのreviewを見ても、試験条件が揃っている部分と揃っていない部分があり、難しい課題である。

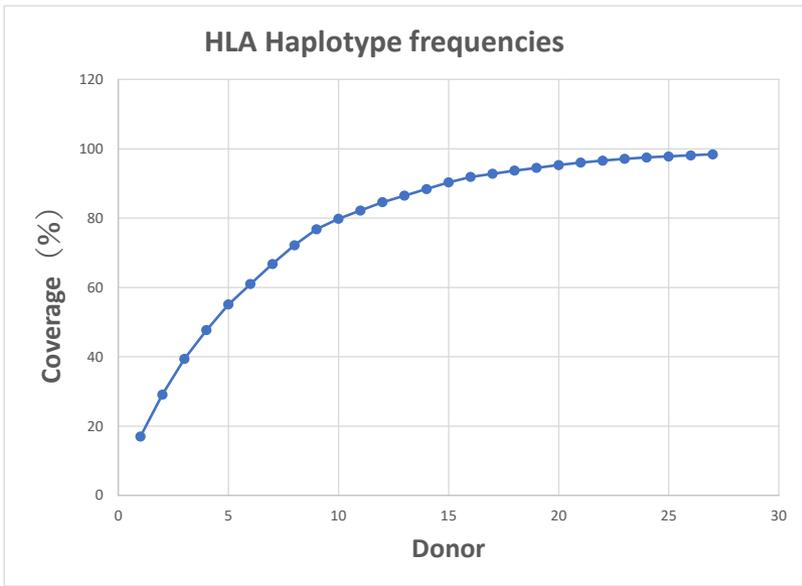


HLAの多様性と評価に用いるPBMC

各種*in vitro*評価で使用するPBMCの人口カバー率（カバーレッジ）は、その評価結果の有用性を左右する重要な指標の一つである。

➤ HLAの頻度例（DR-DQ：日本人）

DR	DQ	HP(%)	Coverage
DR15	DQ1	17.0	17
DR4	DQ4	12.1	29.1
DR9	DQ3	10.3	39.4
DR8	DQ1	8.3	47.7
DR13	DQ1	7.4	55.1
DR12	DQ7	5.9	61
DR4	DQ3	5.8	66.8
DR1	DQ1	5.4	72.2
DR14	DQ1	4.6	76.8
DR4	DQBL	3.0	79.8
DR11	DQ7	2.4	82.2
DR8	DQ4	2.4	84.6
DR4	DQ7	1.9	86.5
DR8	DQ3	1.9	88.4
DR9	DQBL	1.9	90.3
DRJ25	DQ7	1.6	91.9
DRBL	DQ1	0.9	92.8
DR14	DQ7	0.9	93.7
DR9	DQ7	0.8	94.5
DR16	DQ1	0.8	95.3
DR12	DQ3	0.7	96
DR10	DQ1	0.6	96.6
DR8	DQ7	0.5	97.1
DR7	DQ2	0.4	97.5
DR12	DQ1	0.3	97.8
DR15	DQ7	0.3	98.1
DRBL	DQ7	0.3	98.4
DR8	DQBL	0.2	98.6



https://jshi.smoozy.atlas.jp/ja/hla_data 日本組織適合性学会のデータより

求めるHLAの頻度(90%以上等)にあわせて異なるHLAハプロタイプを持つPBMCドナーの試料数を判断する必要があるが、各種ドナーのPBMCの安定的な入手とそのコストについては、DG内でも課題とする声が多く上がった。

http://bioanalysisforum.jp/



*In vitro*のImmunogenicity予測に 一般的に用いられる測定法

<http://bioanalysisforum.jp/>

各測定法の比較

Tool/Tech	Flow Cytometry (Surface)	Flow Cytometry (Intracellular)	ELISpot	ELISA
Molecule detected	Surface	intracellular and surface	Secreted (in situ)	Secreted
Multiparameter	Yes	Yes	No	No
Single cell/cell subset information	Yes	Yes	Frequencies, no subset info.	No
Antigen-specificity	Yes	Yes	Yes	Yes
Post-assay viability	Yes	No	No	Yes
Quantitation of protein	Possible	Possible	No	Yes
Instrumentation	Flow cytometer	Flow cytometer	ELISpot reader	Spectrophotometer

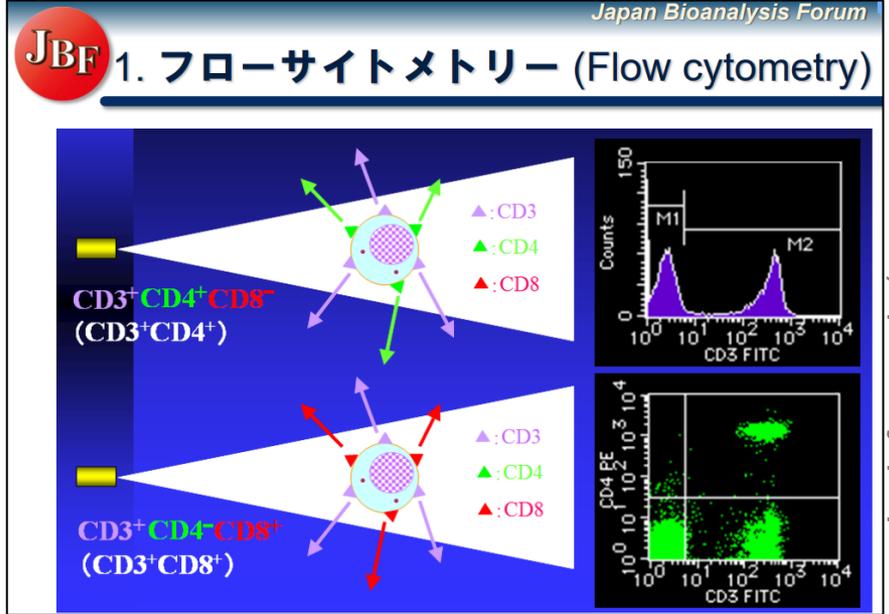
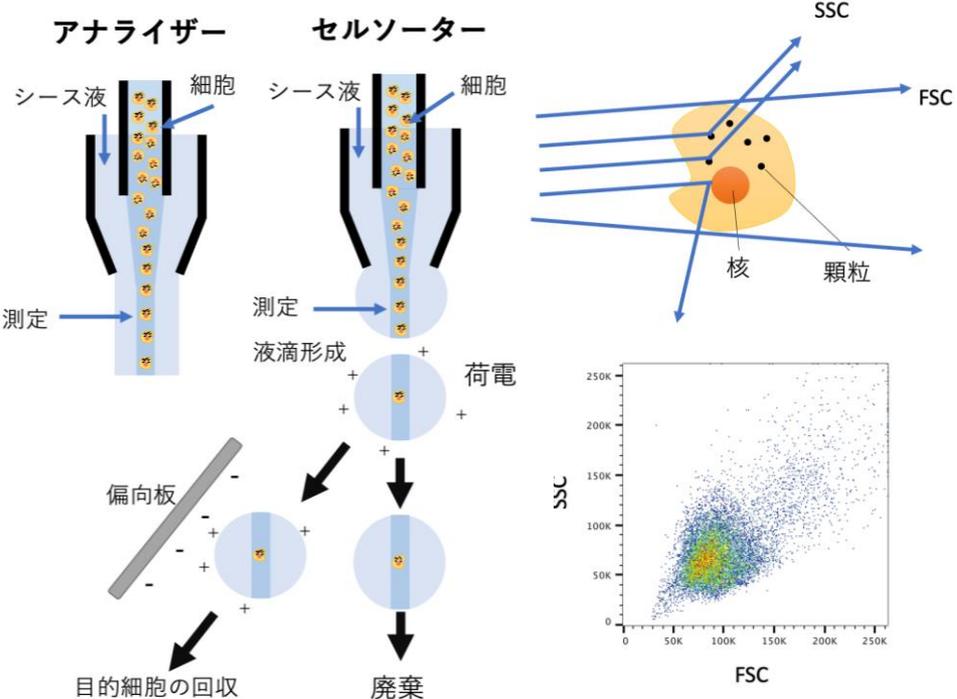
<http://bioanalysisforum.jp/>

in vitro PBMC/DC+T cellなどでメインで使用されているFlow Cytometry及びELISpotについて以降に測定法の詳細を示す。



Flow Cytometry

～原理～



高分子学会HP、およびDG2016-27より一部抜粋

<http://bioanalysisforum.jp/>

散乱光や蛍光に基づき流路内の細胞1つずつの情報を測定する方法

- ・細胞に傷害を与えないで流すための緩衝液（シース液）中で細胞1つずつを一行に並べ、レーザー光を当てて散乱光や蛍光を測定することにより細胞1つずつの情報を取得
- ・用途：**細胞計数** / 細胞の大きさ / (DNA量に基づく)細胞周期 / (蛍光標識抗体を用いた)細胞表面マーカー解析 / 細胞分取 / (蛍光標識高分子などの)細胞内導入解析

Flow Cytometry

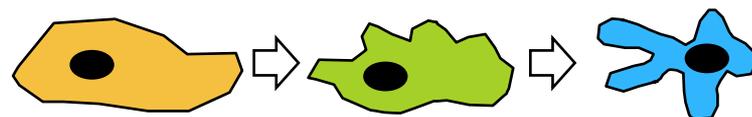
～必要なモノ～

必要な試薬・器材

- フローサイトメーター: 細胞の表面の特定のタンパク質を検出するための光学機器
- フローサイトメトリーカウティングビーズ: 一定のサイズと量のビーズが含まれており、解析時の結果の定量化とサンプル間の比較に使用される。
- 抗体プローブ: 標的タンパク質を特定するための表面抗原を認識する抗体
- 細胞培養試薬: セルベースの実験で使用する培地、成長因子、抗生物質などの試薬
- 細胞固定化剤: 適切な試料処理と安定性のために細胞を固定化するために使用される試薬
- 細胞ラベル試薬: ターゲットタンパク質を検出またはマーキングするための蛍光標識抗体や色素試薬
- バッファーソリューション: サンプルの処理や細胞の処理中に使用される試薬ソリューション

Marker	Function	Monocytes	Immature DC	Mature DC
CD14	LPS-induced Macrophage activation	+++	-/+	-
CD80	Co-stimulation for T cell activation	-	++	++
CD83	Lymphocyte activation	-	-/+	++
CD86	Co-stimulation for T cell activation	-	+	+++
HLA-DR	Antigen Presentation	+	++	+++
CD209	DC-T cell interactions, DC migration	-/+	++	+
CD40	Co-stimulation for T and B cell activation	+	+	+++

DC: dendritic cells



DG2016-27より抜粋

bioanalysisforum.jp/images/2017_8thJBFS/P8_DG2016-27_HP.pdf

【測定方法の確立】

抗体の選択: いくつかの抗体(市販品)から適切な反応を示すものを選択する。

濃度依存性: 抗体が濃度依存的に標的と反応することを確認する。

条件の設定: <抗体>

公比2で濃度を検討する。

コンペンセーションが可能な条件や蛍光色素の種類を考慮する。

<その他>

染色の時間、洗浄回数、固定*の有無を考慮する。

固定*は臨床検体などで有用である。なお、固定*の有無により

ゲーティングの位置が変わらないことを確認する。

*染色前の固定を意味し、染色後の溶血時の固定ではない。

<補足>

上記の条件は、目的によって変わる場合がある。

毒性あるいはPDを評価する場合は、条件の工夫が必要。

抗凝固剤: 血液学的検査に用いるEDTA-2Kを通常用いる。

ヘパリンを使う場合もある。

細胞数測定: 血液学的検査の結果(リンパ球数等)に得られた割合を乗ずる。

ビーズを使う場合もある。

ゲーティング: 何例かの結果を参考にゲーティングを固定して測定する。

個体によっては、ゲーティングを変更する場合もある。

【バリデーション項目】

特異性: 市販品の場合は添付書の情報を引用。濃度依存性の確認はする。

選択性: 実施していない。

個体間差: 非臨床ならn=6(雌雄各3)、臨床ならn=10程度行う。

患者では個体差に注意する。

真度: 実施していない。

日内再現性: n=3、CVIは25%以内。割合が少ない場合はCVIは考慮する。

日差再現性: 実施していない。*メタノール等で固定した場合は実施する場合がある。

測定者間差: 実施していない。*ゲーティングでは測定者間差を確認しておく。

安定性: n=3、初期値の±20%以内

基本として室温や冷蔵で24時間の安定性を調べる。

非臨床では6時間の場合もある。

臨床では48時間や72時間も調べる場合がある。

染色後の安定性も調べる。

染色前に固定する場合は、PBMCや白血球に分離後に固定する。

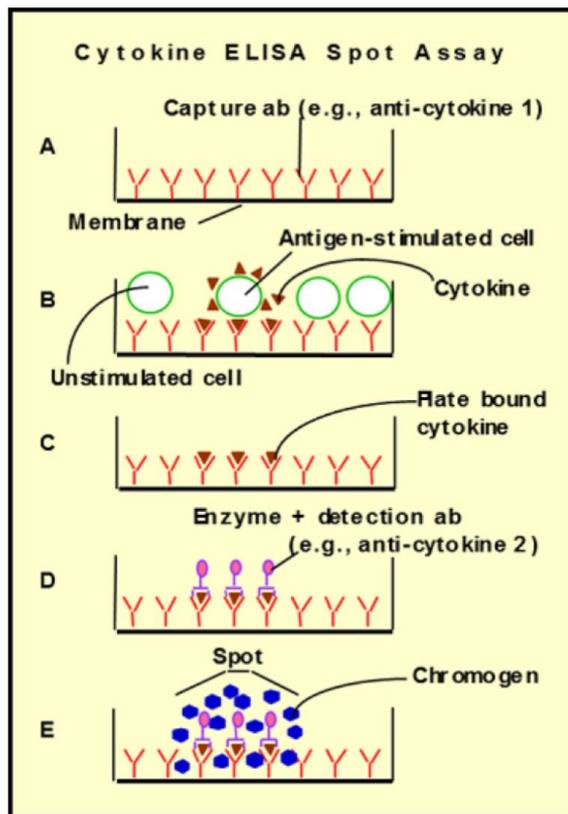
本DGではバリデーション項目については議論していない。
評価指標については適宜最新の知見を調査する必要がある。

ELISpot ~原理~

サイトカイン検出を目的としたenzyme-linked immunosorbent spot assay(ELISPOT)の原理

13th JBF Symposium DG2021-50より抜粋

<https://bioanalysisforum.jp/event/discussion.html>



(A) ウェル底面がPVDFメンブレンとなっているELISPOT用プレートにキャプチャー抗体をコートします。

(B) 単離した細胞または解凍した細胞を抗原と共にインキュベートすることで抗原特異的T細胞を活性化し、サイトカイン分泌が誘導されます。

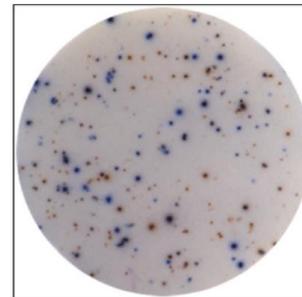
(C) 細胞は取り除かれ、サイトカインが結合した抗体のみがウェル上に残ります。

(D) 検出用抗体を添加し検出します。この図では検出用抗体に直接酵素がラベルされています。検出はストレプトアビジン-ビオチン系を使用し間接的に検出することも可能です。

(E) 発色基質を添加することでキャプチャーされたサイトカインがスポットとして発色されます。

PBMCもしくは単離したT cellなどを添加

IL-2やIFN- γ などが主



抗原により産生されるサイトカインを検出

T細胞ELISPOTアッセイキット (株式会社エムエステクノシステムズ)
<https://www.mstechno.co.jp/categories/view/85>

<http://bioanalysisforum.jp/>

<http://bioanalysisforum.jp/>

サイトカインの検出をスポットとして認識し、スポットの数の増殖 (= T cellの増殖) を確認する。

今回はフォーカスしなかったが、薬物で補足・検出し、スポットの増殖 (= B cellの活性化) を確認することで抗体産生まで確認できるという報告もある (®B cell assays)。

ELISpot ～必要なモノ～

必要な試薬・器材

- ELISpotリーダー：
- ELISpot Plate：ELISpot用のプレート。補足抗体がプレコートされたものもある。
- 補足抗体：特定のサイトカインを補足するための抗体
- 検出抗体：特定のサイトカインを検出するための標識抗体。ELISAと同様でALPやHRPの他にビオチン化されたものとストレプトアビジン-ALP/HRPを反応させて用いることも可能
- 基質：ALPもしくはHRPの基質

Immunogenicityの予測では主に一般的なサイトカインを検出している。キット化されているものが多く、測定法開発のハードルは低いと思われる。ただし、ELISpotリーダーが必要な点はデメリットとして挙げられる。

ELISpot ～他の測定法との違い～



結局サイトカインを検出するなら、ELISAやECLと何が違うの？

DGコメント：ELISAなどのLBA法は細胞培養上清中のサイトカインを検出するため、サイトカイン量の増減を示す。ELISpotはサイトカインを産生した細胞をスポットとして検出するため、細胞の増減を示す。一般的には、各細胞が産生したサイトカイン量（スポットの濃淡）はカウントせず、スポットの数をカウントし指標とする。



ELISpotは高感度だと聞くけれど、本当？高感度だからELISpotを使った方が良いの？

DGコメント：一般的な資料には、ELISpotは従来のELISAと比べて非常に高感度だと言われている。一方で、昨今はECLやデジタルELISA等高感度な機器が開発されており、それぞれサイトカインのキットも売られていることから、一概には比較が難しい。上述の通り、得られるアウトプットが異なることから、何を検出したいかによって使い分ける必要があると考えている。



ELISpot ~バリデーション①~ (参考)

GCC (Global CRO Council) の指針は、主に規制ガイドライン下での実サンプル測定を見越したバリデーションであることから、各社が非臨床研究段階で行うImmunogenicityの予測において、厳密に沿う必要はない。しかしながら、社内で堅牢な系を構築するにあたり参考になると考えられるため、下に示す。

Parameter	Recommendation
SOP	Should include PBMC isolation, counting method, cell handling, plate reading method, training requirements and equipment specific procedures It is suggested that the type of collection tube (heparin), sample collection and handling times, shipping times determined during method development and validation also be included
Normalization of results	<ul style="list-style-type: none"> • Intra- and inter-subject, as needed • Multiple baselines possible • Normalization against negative control
Critical reagents	<ul style="list-style-type: none"> • PBMC (refer to Corsaro <i>et al.</i> [30] for recommendation for using high-quality PBMC; alternative criteria may be utilized when evaluated during method development and confirmed to support the context of use); also, it is possible to consider the option of CPT tubes for collection as an alternative to removal of granulocytes at point of analysis • Detection antibodies • Positive controls • Lot-to-lot bridging should be performed • In the absence of vendor-provided stability data, stability experiments must be performed to demonstrate critical reagent stability as per usage in the assay

Islam R, et al. Bioanalysis. (2022)より一部抜粋

<http://bioanalysisforum.jp/>

SOP: Standard operating procedure.



ELISpot ~バリデーション②~ (参考)

Parameter	Recommendation	Islam R, et al. Bioanalysis. (2022)より一部抜粋
Sample type	<ul style="list-style-type: none"> • Patient samples reflecting study population should be used during method development and validation, if available • All runs should include positive controls and negative controls • Run all controls and samples in triplicate (three wells per result) during validation and sample analysis 	
Quality controls	<ul style="list-style-type: none"> • At least two levels of positive control and one negative control (media only) • Acceptable range should be established during validation • Reference sample/trending control for each day ELISpot is run 	
Validation parameters based on COU	<ul style="list-style-type: none"> • Precision • Sensitivity (LLOQ and LOD) • ULOQ/reportable range • Specificity • Ruggedness and robustness • Linearity • Critical reagent stability • Whole blood or PBMC stability 	
Precision	<ul style="list-style-type: none"> • Minimum ten donors • Inter-assay: should include a minimum of six runs with three replicates each by two analysts over multiple days • Intra-assay: minimum one run and six replicates • CV \leq 30% • Total error 40% (LLOQ 50%) 	

COU: Context of use; LLOD: Lower limit of detection.



ELISpot ~バリデーション③~ (参考)

Parameter	Recommendation	Islam R, et al. Bioanalysis. (2022)より一部抜粋
Sensitivity (LLOQ and LOD)	<ul style="list-style-type: none"> • Determined based on precision data; the intermediate precision as LLOQ should be based on the acceptable intermediate precision of 40% • LOD is determined based on two SDs above the mean of replicate negative control samples • Due to the mathematical considerations of a high % CV at low spot numbers per well, statistical testing [32] is recommended for samples that are below 30 spots per well and above the LOD • $LLOQ \geq LLOD$ 	
ULOQ	Defined as the maximum number of individual spots per well the ELISpot plate reader software can discriminate; this can be achieved by counting spots using a series of cell dilutions treated with mitogen, or peptide for a donor with a very strong peptide response	
Specificity	Positive control greater than negative control; should also be tested with non-specific peptides such as beta-actin; in the case of non-specific peptides, the response must be less than LLOQ; in addition, specificity should examine the full extent to which an assay responds to all subsets of an analyte [30]; often this may also include an assessment of specificity for the target cell type, especially for assays aiming to measure this component	
Ruggedness and robustness	<ul style="list-style-type: none"> • Maximum fold difference between assay ruggedness factor levels is expected to be less than twofold for tenfold dilution of cells; in the case of analysts and instruments – should meet the % CV criteria • Inter-laboratory comparison studies may be performed to demonstrate assay ruggedness 	

LLOD: Lower limit of detection; SD: Standard deviation.



ELISpot ~バリデーション④~ (参考)

Parameter	Recommendation	Islam R, et al. Bioanalysis. (2022)より一部抜粋
Ruggedness and robustness	<ul style="list-style-type: none"> Maximum fold difference between assay ruggedness factor levels is expected to be less than twofold for tenfold dilution of cells; in the case of analysts and instruments – should meet the % CV criteria Inter-laboratory comparison studies may be performed to demonstrate assay ruggedness 	
Linearity	<ul style="list-style-type: none"> Serial dilute PBMC from a high responder into PBMC from a non-responder Use at least six donors (high responders) and at least three dilutions Sample reactivity expected to decrease as cell input decreases R² values 0.97 	
Selectivity	<ul style="list-style-type: none"> Ten different lots/donors of PBMC (refer to Corsaro <i>et al.</i> [30] for recommendation for using high-quality PBMC) Decide on and establish level of response needed for LLOQ from the PBMCs in MD, to determine the level of reactivity needed for selectivity determination of the assay in validation Controls for selectivity are based on media and PBMC positivity criteria for a selectivity sample established based on meaningful level of reactivity of that which is below the background reactivity [30]; the difference between selectivity samples is the media controls with PBMC responses \leq LLOQ; +/- 40% \geq70% of the lots should pass this criterium 	

MD: Method development.

GCCのアンケートでも、PBMCや検出抗体は重要試薬とするコメントが多数あった。堅牢な系の構築には、バリデーションの内容と共に、それらの入手方法、取り扱いに気を付けるべきである。

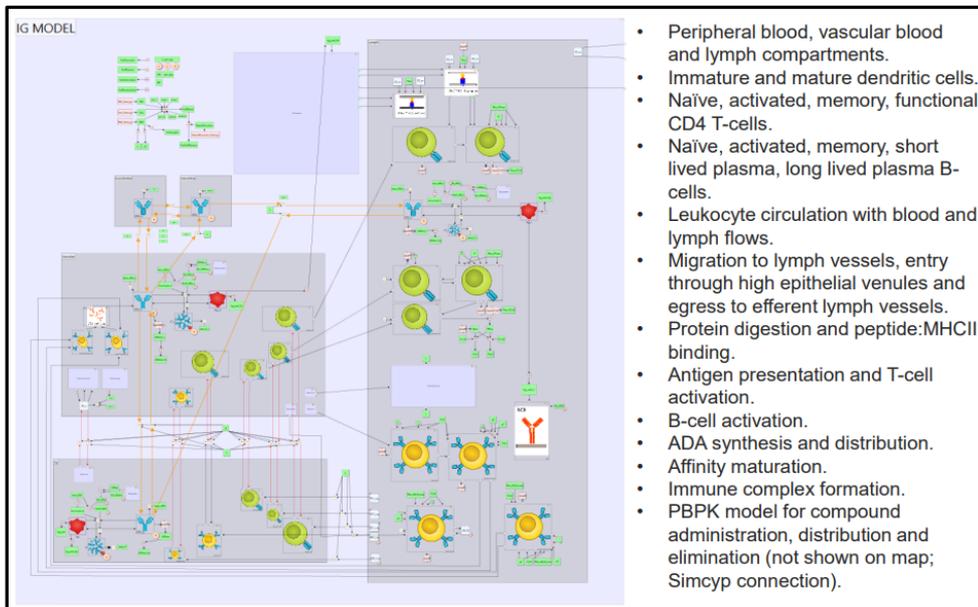


—応用— QSPモデルの活用

QSPモデルによる免疫原性予測 ～概要～

Quantitative Systems Pharmacology (QSP)は、生物学的な複雑さと薬理的な挙動を数学的にモデリングする手法である。

*In silico*や*in vitro*の免疫原性評価プラットフォームが、生体内での複雑なADA産生プロセスの中の一部のリスク因子にフォーカスしているのに対し、QSPモデルでは一連のADA産生プロセスのモデルに組み込み、ADA産生を予測する。



免疫反応モデルの一例。モデルにはADAの産生に関わる膨大なパラメータや仮説が含まれている。QSPモデルの構築と検証には大量のデータが必要であり、まだ免疫原性予測として一般的な手法ではない。

QSPモデルによる免疫原性予測～活用事例～

Input data

Bioinformatics

- T-cell epitopes
- MHC II binding
- Isoelectric point
- Hydrodynamic radius

In-vitro Assays

- T-cell proliferation
- Antigenic peptide
- MHC II binding
- DC activation

Population data

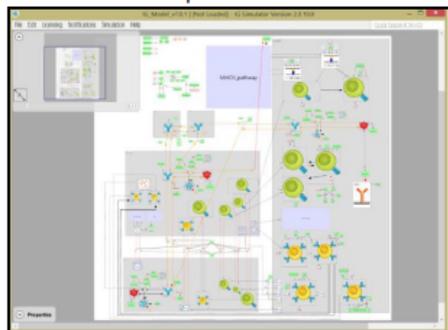
- PBPK parameters
- HLA allele frequencies
- Immune system baselines

Clinical data

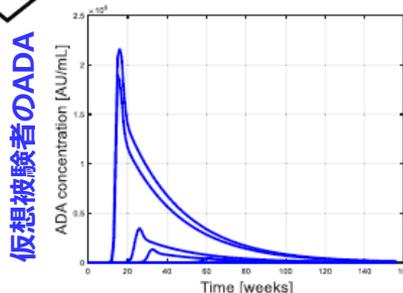
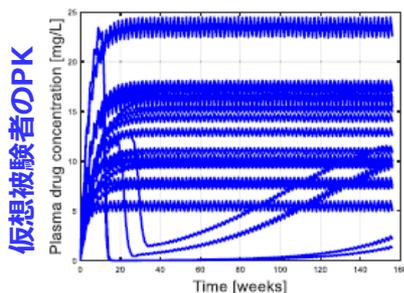
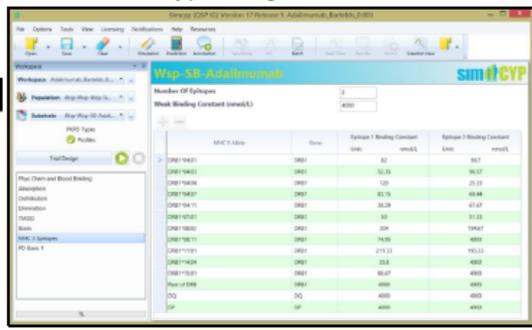
- Compound PK
- ADA titers
- Adverse events

IG Simulator

Immune response model



Simcyp Biologics PBPK model



*In silico*や*in vitro*など薬剤固有のデータ、母集団データ及び治験デザインを免疫反応モデルとPBPKモデルを統合したIG Simulatorに入力することで、患者集団におけるADAと薬剤の経時的な推移を予測する。

社内の意思決定に活用

Kierzek AM, et al. CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol. (2019)より一部抜粋

QSPモデルによる免疫原性予測～ Pros & Cons～

長所:

- 複雑な生物学的プロセスを数学的にモデリングすることで、Immunogenicityの発生メカニズムを理解しやすくなる。
- 個々の患者の遺伝子や病態に基づいた予測が可能である。
- 創薬早期段階でImmunogenicityを評価できるため、開発リスクとコストを削減することが可能である。

短所:

- QSPモデリングは非常に複雑であり、多くの生物学的パラメータと仮定が必要である。仮定の確からしさの検証は困難である。
- モデルの予測精度は、モデルがどれだけ現実の生物学的プロセスを正確に再現できるかに大きく依存する。抗体産生プロセスにはまだ解明されていない部分が多いため、予測難易度は高い。

したがって、QSPはバイオ医薬品のImmunogenicity予測における強力なツールであると考えられるものの、現時点での利用は限定的と考えられる。



Immunogenicity予測の潮流と運用

Immunogenicityの予測の世界的な流れ

◆ 近年開催されたワークショップや、論文のレビューなどを以下に示す。

3極のガイダンス：

- FDA：[Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products – Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection](#)（2019年1月）
- EMA：[Guideline on Immunogenicity assessment of therapeutic proteins](#)（2017年5月）
- MHLW：整備中？

公開シンポジウム：

- [Non-clinical Immunogenicity Assessment of Generic Peptide Products: Development, Validation, and Sampling - 01/26/2021 - 01/26/2021 | FDA](#)（2021年）
- [Workshop on immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins | European Medicines Agency \(europa.eu\)](#)（2016年）

学会発表／最新Review：

- [13th Open Scientific EIP Symposium on Immunogenicity of Biopharmaceuticals](#)（2022年）
- [14th Open Scientific EIP Symposium on Immunogenicity of Biopharmaceuticals](#)（2023年）
- [Preclinical risk assessment strategy to mitigate the T-cell dependent immunogenicity of protein biotherapeutics: State of the art, challenges and future perspectives](#)（2023年、PMID: 37311374）
- [Fit-for-Purpose Validation and Establishment of Assay Acceptance and Reporting Criteria of Dendritic Cell Activation Assay Contributing to the Assessment of Immunogenicity Risk](#)（2020年、PMID: 32839919）
- [Survey Outcome on Immunogenicity Risk Assessment Tools for Biotherapeutics: an Insight into Consensus on Methods, Application, and Utility in Drug Development](#)（2023年、PMID: 37266912）

近年発表やWSが増えており、各社・各極が興味を示している。

Immunogenicityの予測：米国でのアンケート結果

Survey Outcome on Immunogenicity Risk Assessment Tools for Biotherapeutics: an Insight into Consensus on Methods, Application, and Utility in Drug Development.

第1段階の調査は2016年に実施。製薬業界における予測ツールへの関心を評価
第2段階の調査は2018年から2021年に実施。アッセイ法とアプリケーションにフォーカス

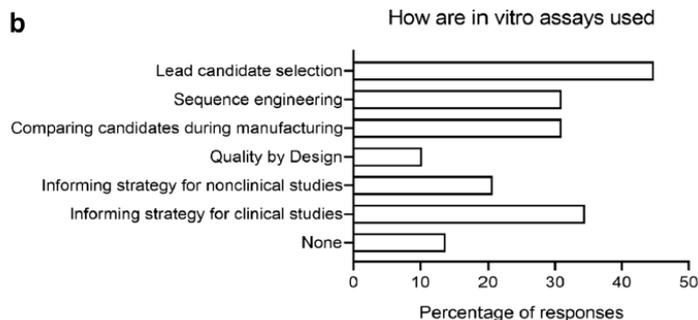
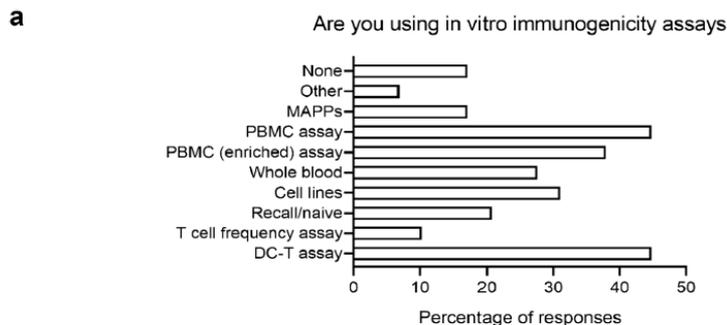


Table 1 Summary of Survey Results for PBMC Format T Cell Activation Assay

Assay parameters	Summary of responses	Finding
Cell source	Fresh whole blood or buffy coat from healthy volunteer (2/4, 50%); frozen PBMC (25%, 1/4), both fresh and frozen (25%, 1/4)	Consensus
Number of cells	A total of 1.2 million or 2.5–4 million for 6 replicates (50%, 2/4), variable or not provided (50%, 2/4)	Variable
Number of donors	10–20 (25%, 1/4), 15–25 (25%, 1/4), 40 (25%, 1/4), not provided (25%, 1/4)	Variable
Isolation	PBMC by density gradient	Consensus
Depletion of CD8+ T cells	Yes (25%, 1/4), no or not provided (75%, 3/4)	Variable
Viability	> 85 to > 90% or not provided	Consensus
Sample concentration	1 μM (25%, 1/4), not provided (75%, 3/4)	Variable
Duration of incubation	7–10 days (25%, 1/4), 14 days (25%, 1/4), not provided (50%, 2/4)	Variable
Positive criteria/threshold	Stimulation index and percentage of positive donors	Consensus
Positive controls	Not provided	N.A
Negative controls	Isotype control or medium	Consensus
Detection	T cell proliferation with CFSE (50%, 2/4), cytokines by ELISpot (25%, 1/4), not provided (25%, 1/4)	Variable

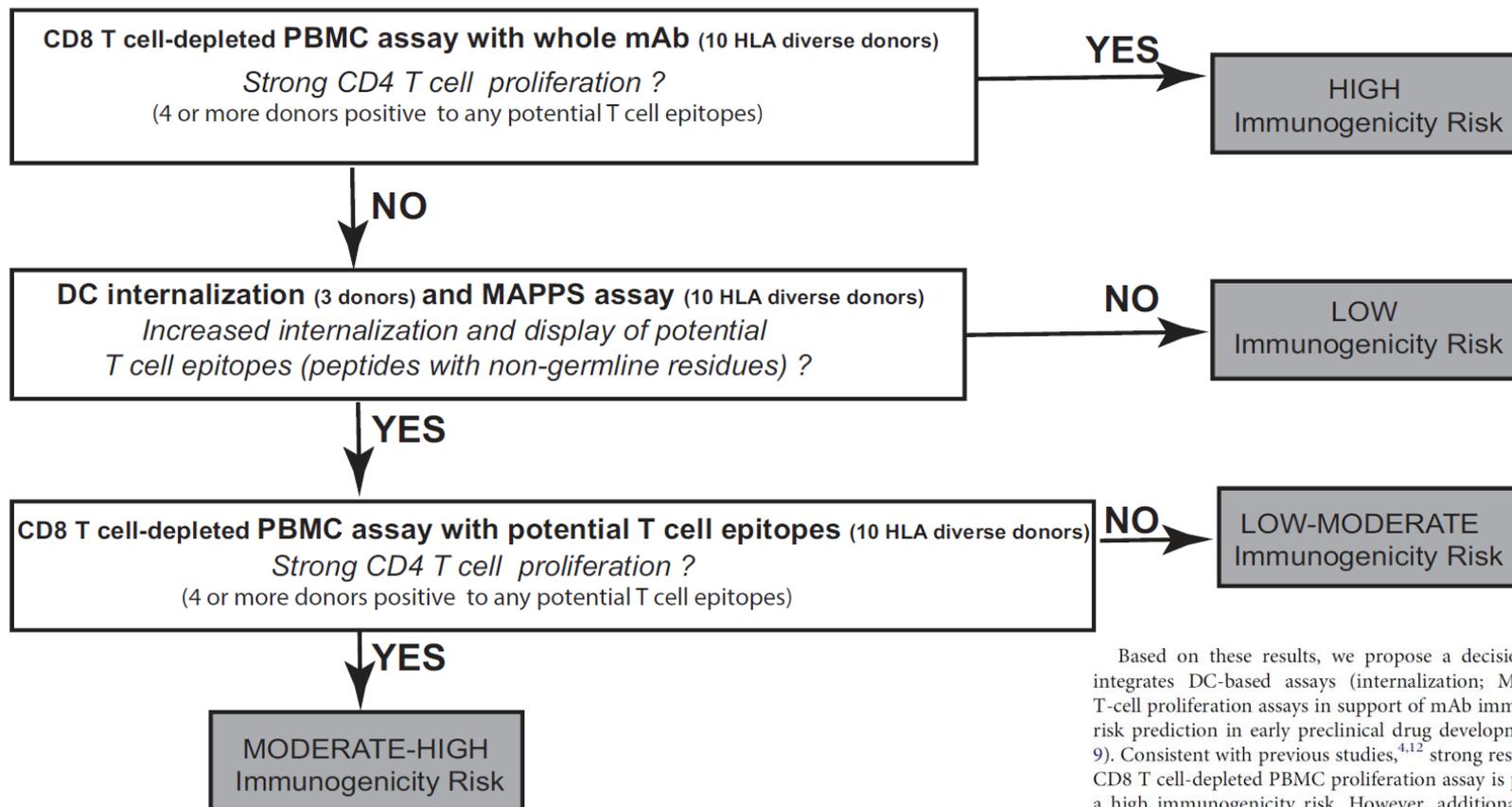
PBMC, peripheral blood mononuclear cells; SD, standard deviation; FACS, fluorescence activated cell sorting; CFSE, carboxyfluorescein succinimidyl ester; ELISpot, enzyme-linked immunosorbent spot

欧米では10年近く前からImmunogenicityの予測への関心が徐々に高まっている。各社で運用されている評価条件は似た部分と大きく異なる部分があり、今後のハーモナイズは課題であると感じた。

Gokemeijer J, et al. AAPS J. (2023)より一部抜粋

Immunogenicity予測運用例 (Eli Lilly)

Walsh RE, et al. MAb. (2022)より一部抜粋



Based on these results, we propose a decision tree that integrates DC-based assays (internalization; MAPPS) and T-cell proliferation assays in support of mAb immunogenicity risk prediction in early preclinical drug development (Figure 9). Consistent with previous studies,^{4,12} strong response in the CD8 T cell-depleted PBMC proliferation assay is predictive of a high immunogenicity risk. However, additional assays are

Figure 9. Proposed decision tree in support of mAb immunogenicity risk prediction. The number of donors used in each assay is indicated and correspond, for the T cell proliferation and DC internalization assays, to the minimal number of donors necessary to provide a consistent response with the assay positive and negative controls. For the MAPPS assay, a typical 10 donor panel samples >12 HLA-DR alleles and represent ~ 60% of the U.S. allele frequency.

Immunogenicity予測の運用案

初期Lead selection

後期Lead selection

Lead optimization

Lead候補分子が多数あり効果的な絞り込みが必要な段階

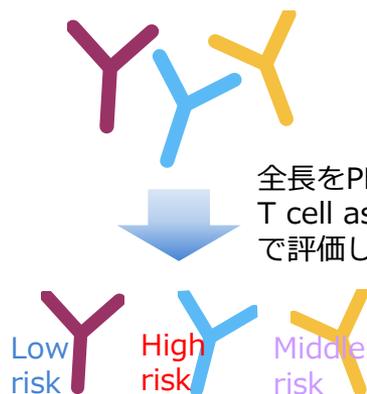
	親和性	活性	特異性	In Silico
抗体A	○	○	○	×
抗体B	○	△	△	○
抗体C	△	○	×	○
抗体D	○	○	○	△
抗体E	△	×	△	○
抗体F	△	△	○	○
抗体G	○	○	△	×
抗体H	○	△	×	○
抗体I	○	×	○	△
...

※選び方は各社判断

○工数や評価期間にメリットがあるため、初期の絞り込みは*in silico*が有用。
○*in silico*にも様々な手法があるため、適切な手法を判断する必要あり。

全長での*in silico*予測をどの程度重視するかは要議論

Lead候補分子が複数(2-4個程度?)あり絞り込みが必要な段階

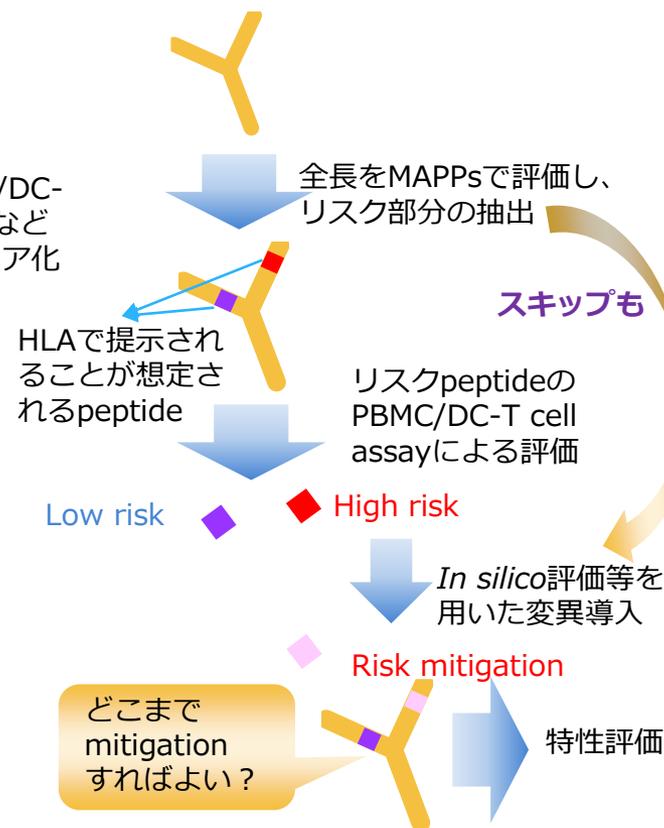


他のパラメーターも併せて総合的判断

- 親和性・特異性
- *in vitro*・*in vivo*活性
- 安定性・溶解度
- Immunogenicity ^{new} など

in vitro評価のコストと期間を許容できるか

Lead候補分子は絞り込まれ、Leadを最適化して最終薬物にする段階

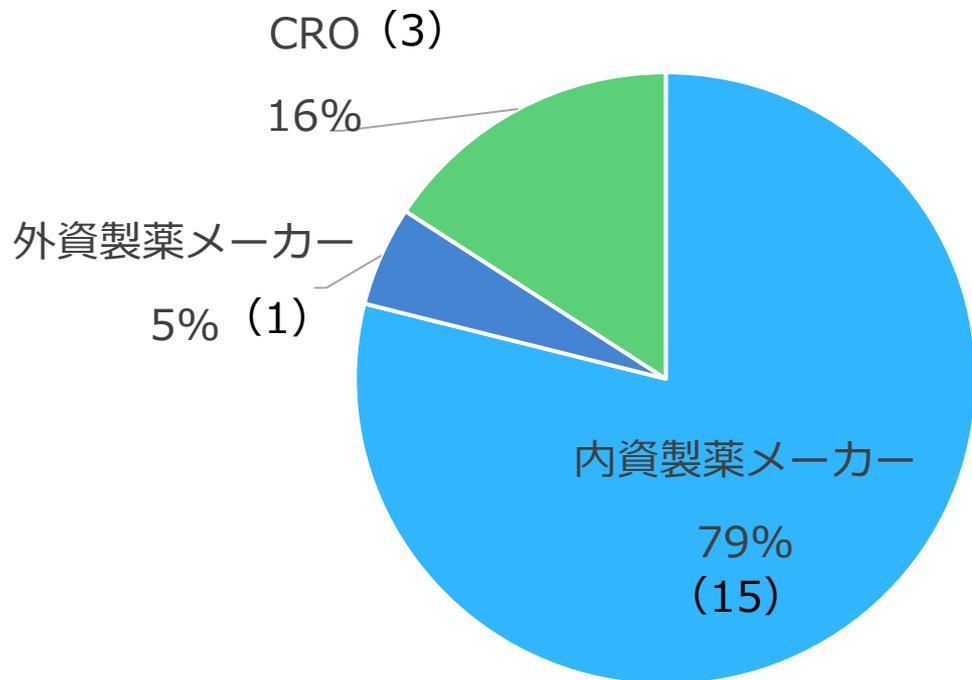




アンケート結果

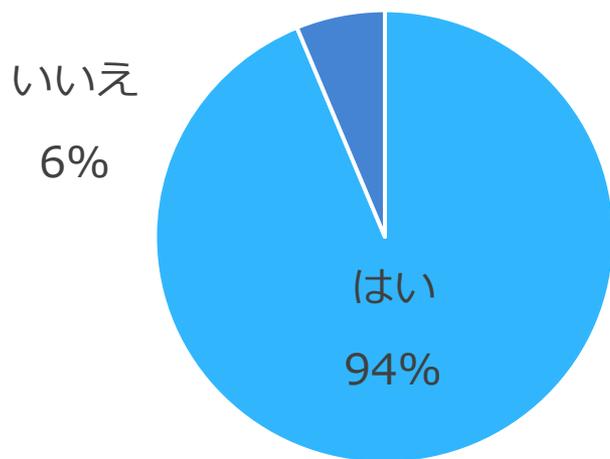
アンケート概要

- ◆ DG2023-61では、国内製薬企業及びCROにおけるImmunogenicityの予測の実施状況の調査を行った。
- ◆ アンケート期間：2023年12月14日～12月29日
- ◆ 対象者：JBFパートナー及びその関係者（回答者は各社代表1名に限定）
- ◆ 有効回答数：19

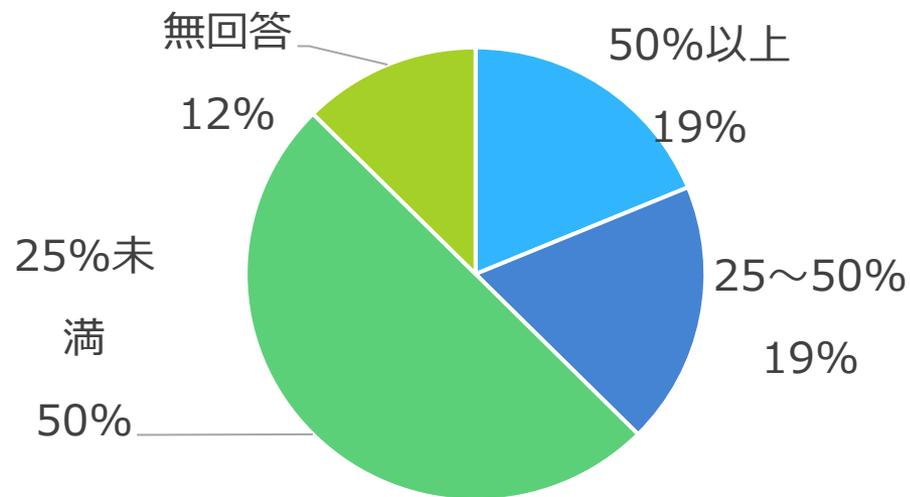


回答いただいた製薬メーカー各社の状況

Q.創薬ステージでタンパク製剤
(ペプチド含む) はありますか？
(回答数16)



Q.創薬ステージでのタンパク製剤が
占める割合 (プロジェクト数) は？
(回答数16)



多くの企業がタンパク製剤を扱っている。

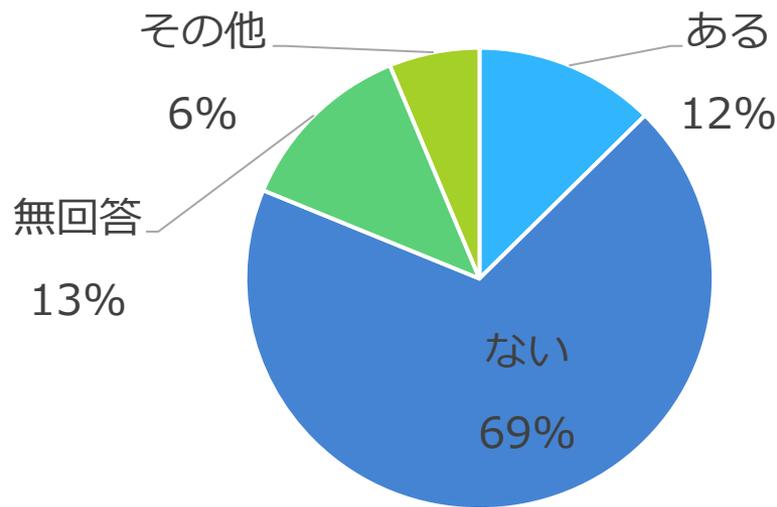
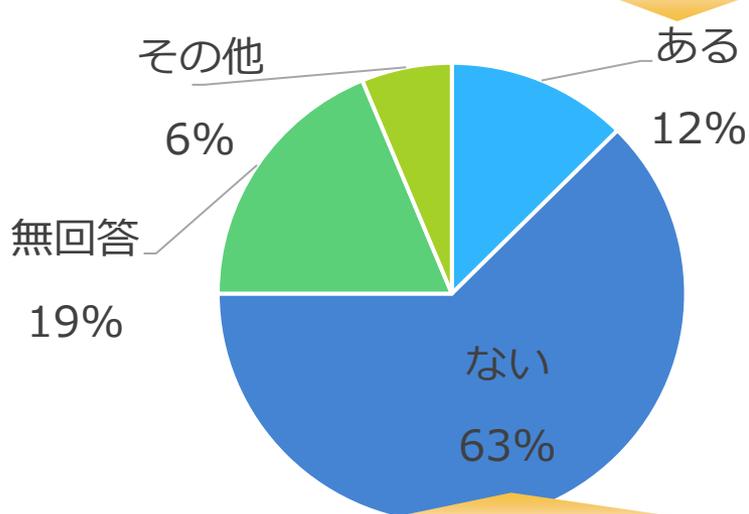
アンケート：ADA産生のプロジェクトへの影響

Q. ADAの産生が原因で開発中止または開発計画に影響が生じたことはあるか？

Q.非臨床試験（研究ステージ）

Q.臨床試験（開発ステージ）（回答数16）

コメント：薬効評価が難しいケースがある



<http://bioanalysisforum.jp/>

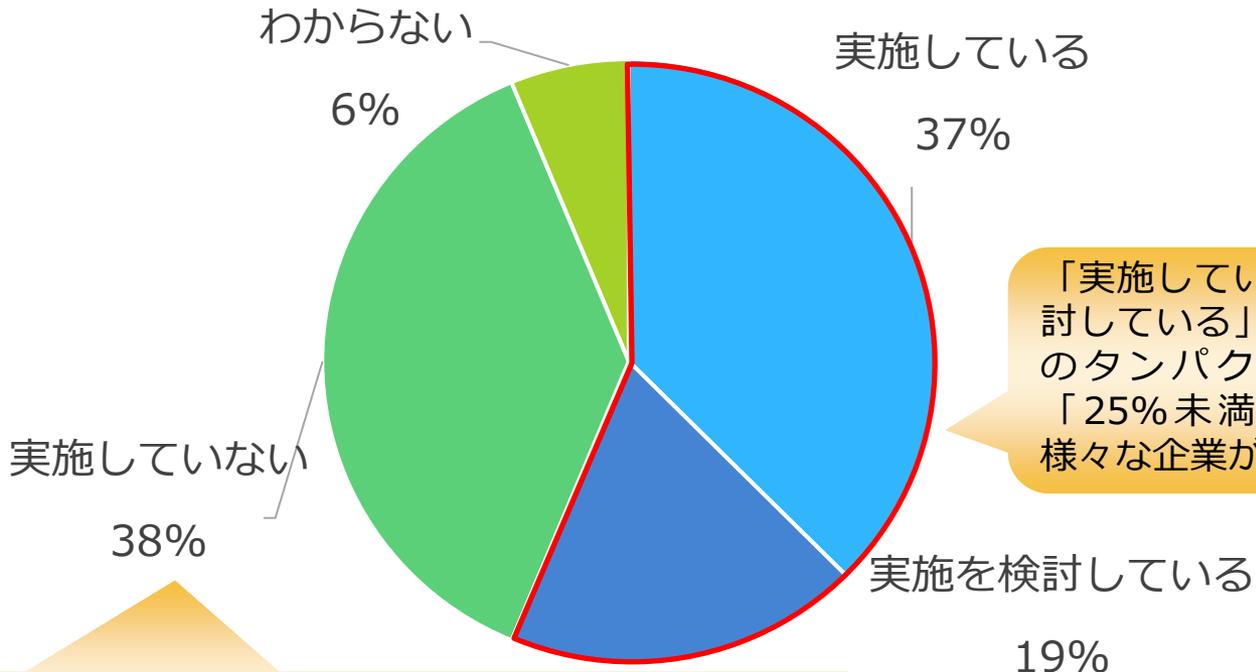
コメント：タンパク製剤の開発経験が少ないため（複数回答あり）

影響があったと回答した企業は一部ではあるが、開発経験が少ない企業が多いことも一因であると考えられる。



アンケート：Immunogenicityの予測の実施状況

Q. タンパク製剤開発におけるImmunogenicityの予測を実施しているか？
(回答数16)



「実施している」もしくは「実施を検討している」企業は、創薬ステージでのタンパク製剤が占める割合が、「25%未満」～「50%以上」まで様々な企業が含まれた。

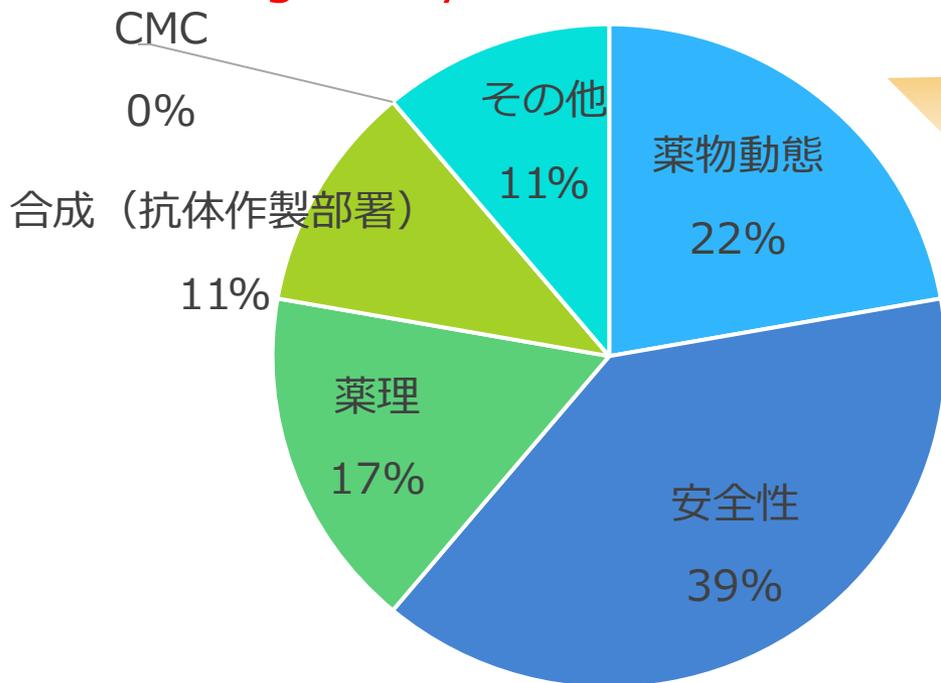
「実施していない」企業は、創薬ステージでのタンパク製剤が占める割合（プロジェクト数）が、「25%未満」もしくは「無回答」の企業のみであった。

過半数の企業が実施、もしくは実施を検討している。

http://bioanalysisforum.jp/

アンケート：実施している部署

Q. 「実施している」「実施を検討している」企業において、Immunogenicityの予測を実施している部署は？ (回答数10)



「その他」の内訳：

- 非臨床全体
- 研究（配列設計）段階では凝集傾向や安定性に関連する配列のリスク低減の観点から、またCMC開発段階では凝集やHCPなどの不純物レベル、安定性などの潜在的リスクに基づいて、CMCと創薬・前臨床が協働するケースは考えられる。

部署に切り分けが各社異なるため一概には言えないが、関連論文の著者の所属も多種多様（薬物動態、トランスレーショナルサイエンス、抗体工学など）であり、特定の部署が実施しているわけではなかった。

実施部署は安全性が最多ではあるが、各社様々である。ADAは毒性評価の観点では安全性に関わるが、PKやPDにも影響を与えること、配列設計の最適化は合成部署と、関係部署が多岐にわたること、また実施ステージによって関係部署が異なるためと考えられる。

アンケート：国内CROにおける受託状況

Q. Immunogenicityの予測に関わる試験の委託を受けたことがあるか？

(回答数3)

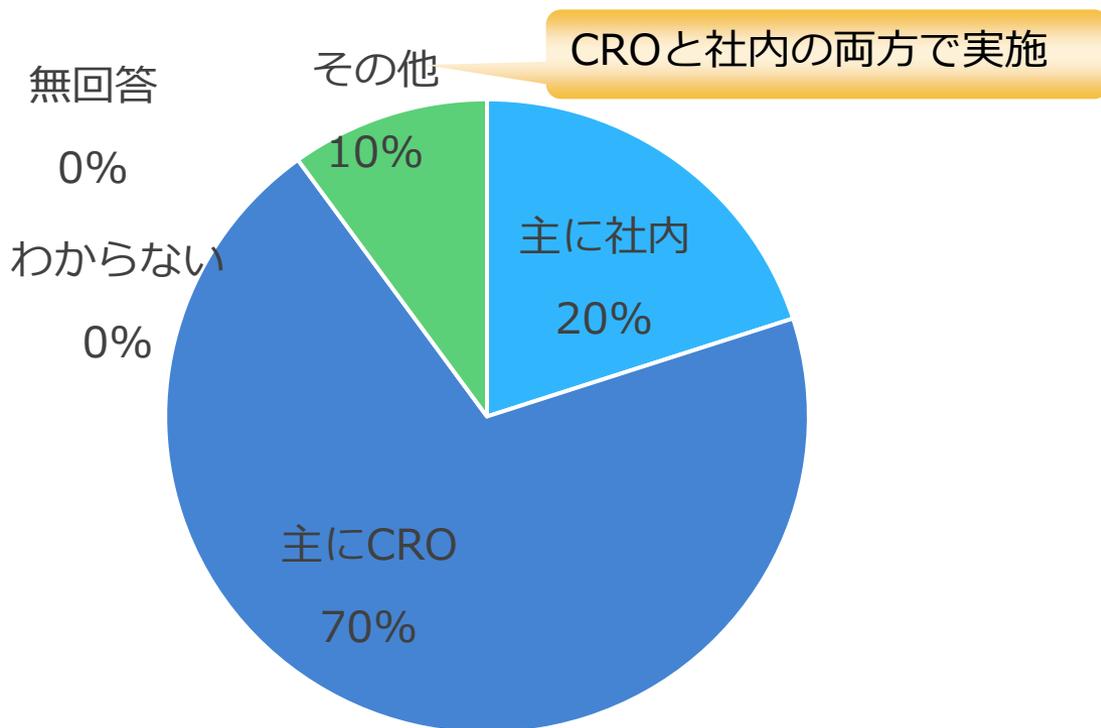
	回答数
実施したことがある	0
実施したことはないが問い合わせを受けたことがある	1
実施したことがない	2

国内CROへの委託問い合わせは少ない。

一方で、CROに委託している企業は多いことから、BAを中心としたCROではなく、それぞれ専門の海外CROへ委託しているのではないか。

アンケート：実施施設

Q. 「実施している」「実施を検討している」企業において、タンパク製剤開発におけるImmunogenicityの予測を実施している施設は？（回答数10）

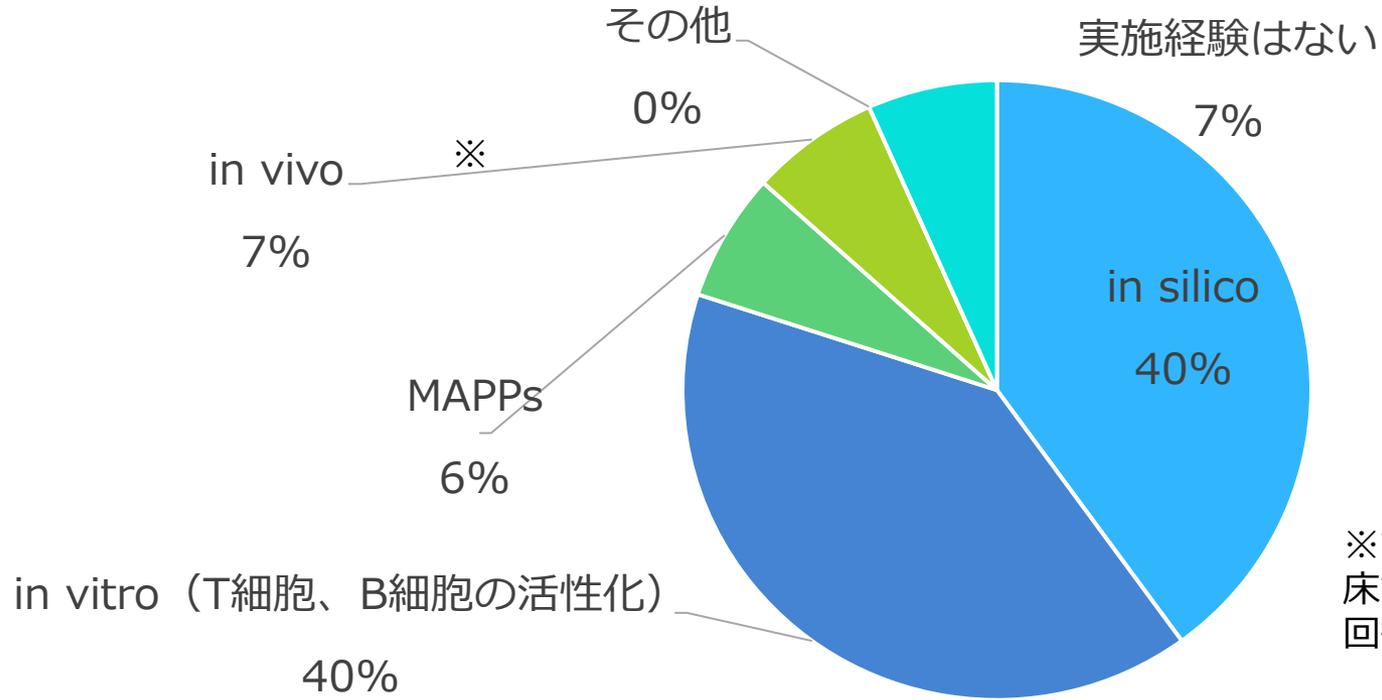


主にCROを用いて実施している企業が多い。



アンケート：実施内容

Q. 「実施している」「実施を検討している」企業において、タンパク製剤開発におけるImmunogenicityの予測として何を実施しているか？（回答数9）



※設問が悪く、通常の非臨床試験のADA測定も含んで回答された可能性もある。

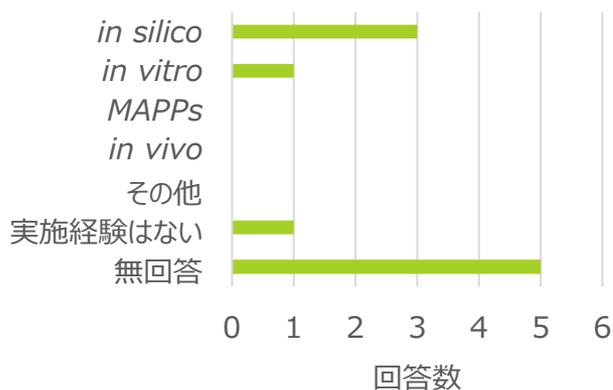
*In silico*及び*in vitro*のアッセイを実施している企業が多数。一部企業でMAPPsや*in vivo*の試験が実施されている。

<http://bioanalysisforum.jp/>

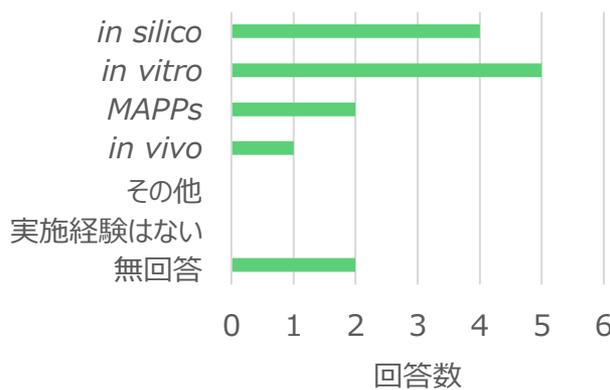
アンケート：実施時期

Q. 「実施している」「実施を検討している」企業において、何をいつ実施しているか？ (回答数9)

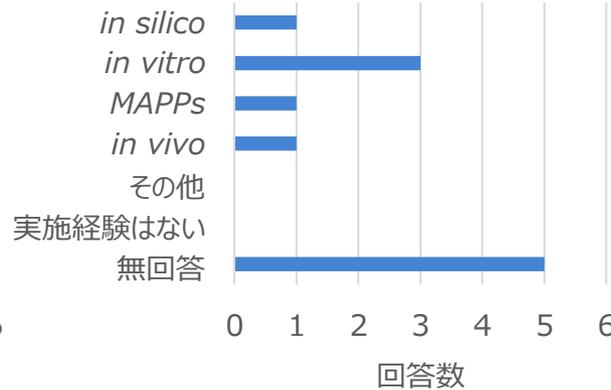
非臨床初期（化合物が多数）



非臨床中期（～5個程度）



非臨床後期（1個）



※臨床試験開始後に実施しているという回答はなかった

*In silico*は比較的初期～中期、*in vitro*やMAPPsは中期～後期のある程度化合物が絞られた段階で実施している企業が多い。

*In vitro*やMAPPsを実施するにはマンパワーとコストがかかることから、多検体で実施するのが難しいためと思われる。

アンケート：実施する化合物

Q. 「実施している」「実施を検討している」企業において、実施する化合物を決める判断基準はあるか？ (回答数8)

	回答数
判断基準はある	4
判断基準はない	4

判断基準：

- 免疫原性の低減が重要なプロジェクトかどうか。
- 薬効、物性、PK等のクライテリアを満たすこと。
- 適応疾患による。
- 対照群は設定するが、明確なクライテリアはない。

判断基準がないということは、所定のステージに上がった際は全ての候補化合物において実施すると推察される。

一方で、対象疾患やモダリティなどから、免疫原性が評価が必要と判断されたプロジェクトのみで実施するという声もあった。

アンケート：実施上の課題 ～*in silico*及び*in vitro*～

Q. *In silico*もしくは*in vitro*を実施して、課題に感じることは？

	回答内容
<i>In silico</i>	臨床外挿性は？
	現状では予測精度の判定が困難なのでどの方法がよいか判断できない。
	False positiveの可能性が拭えない。
	MHC-class IIへの結合活性を予測するツールが多いと思うが、その下流も予測できるようになって欲しい。
	様々なツール（有償・無償）があり、どれを使うべきかわからない。
<i>In vitro</i>	臨床外挿性は？
	ある程度のMHC Class IIのタイプをカバーできるのドナーの確保が困難
	判定基準の標準化と明確化がされていない。
	T細胞活性化薬などMoAによっては適切に評価するのが困難。
	（PBMCの）ロットによって反応性が異なり、比較検討しづらい。
スルーロットが悪い。	



アンケート：実施上の課題 ～MAPPs及びin vivo～

Q. MAPPsもしくはin vivoを実施して、課題に感じることは？

	回答内容
MAPPs	コストパフォーマンスが悪い。
	臨床外挿性は？データの再現性は？
	論文通りに手法をトレースしてみたが、感度が不十分であった。
	ドナーを何例集めればいいのかわからない。
	あくまでPotentialの判定であり、必ずしも免疫原性が高いペプチドが見つかるとは限らないため、使いづらい。
In vivo	非臨床から臨床への外挿性が低い。（※設問が悪く、通常非臨床試験のADA測定も含んで回答された方もいた可能性もある。）



課題に関しては、DG内でも同様の声が多く出ました。当日ぜひ議論できますと幸いです。また、特に気になる点はスライドP84の「今後の課題」の中にポストイットでコメントしていただくと参考になります。

アンケート：実施理由

Q. 実施しようと思ったきっかけは？



フォーマットが多様化する中で免疫原性が問題となるケースが今後増えると想定されたため。

実施部署の所属でないのではっきりは分からないが、免疫原性のリスクを下げるために実施していると思われる。



臨床試験での成功確率向上を目的としてヒト細胞での反応性を確認するため。

海外の学会で、欧米の製薬会社が積極的に免疫原性を評価していることを知り、社内でも取り組むべきと考えた。
一方、どこの部署がイニシアチブを取るかに関してはすんなりと決まらず、最初に提案した部署（薬物動態研究部）が担当することになった。



候補物質間での優劣をつけるため。

FDAのimmunogenicityガイダンスやEIAなどの情報から、特に最近は必要性が増していると感じたため。

アンケート結果は以上です。ご協力いただいた方、本当にありがとうございました！！

ありがとうございました





総括

Immunogenicityの予測について、技術の進展により様々な手法が開発され、製薬メーカー各社において創薬段階で実用化されていることがわかった。国内においても、多数の企業が*in vitro*評価まで実施（もしくは実施を検討）していることが窺われた。

一方で、規制下の薬物濃度測定のような厳密な規格化やクライテリア設定は行われておらず、各社がそれぞれ独自の基準を持っていることもわかったことから、DG内では判断基準のハーモナイズを要望する声もあがった。

今後の課題

DG内で話題になったものの議論できなかったこと：

- 判定のスコア化とクライテリアについて
- PBMCの入手性
- ニューモダリティーのImmunogenicityリスクと予測

その他にも興味がある、議論したい、して欲しい項目がありましたらぜひポストイットにてお知らせください！