

DG2021-51

抗薬物抗体 (ADA) 分析

—ニューモダリティ及び技術的課題に関する議論—
ADA Analysis: Discussion to New Modalities and Technical Issues

DG members

Name	Company
阿部 譲 <i>Yuzuru Abe</i>	積水メディカル株式会社 <i>SEKISUI MEDICAL CO., LTD.,</i>
井上 有沙 <i>Arisa Inoue</i>	田辺三菱製薬株式会社 <i>Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation</i>
木村 美南 <i>Minami Kimura</i>	株式会社住化分析センター <i>Sumika Chemical Analysis Service, Ltd.,</i>
小島 知子 <i>Tomoko Kojima</i>	株式会社サンプラネット <i>Sunplanet Co., Ltd.,</i>
相馬 雅子 <i>Masako Soma</i>	第一三共株式会社 <i>Daiichi Sankyo Co., Ltd.,</i>
羽成 優 <i>Suguru Hanari</i>	シミックファーマサイエンス株式会社 <i>CMIC Pharma Science CO., Ltd.,</i>
安原 秀典 <i>Hidenori Yasuhara</i>	大日本住友製薬株式会社 <i>Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd.,</i>
箕浦 恭子 <i>Kyoko Minoura</i>	アステラス製薬株式会社 <i>Astellas Pharma Inc.</i>
中村 隆広 (オブザーバー) <i>Takahiro Nakamura</i>	株式会社新日本科学 <i>Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.</i>

- Jun 2021
 - ✓メンバー募集
- 6 Jul 2021
 - ✓キックオフミーティング
- Jul 2021～Dec 2021
 - ✓TCとメールを用いた議論
- Dec 2021～ Feb 2022
 - ✓ポスター作成

- 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。

本DGの目的

近年、核酸医薬品やADC, BsAb, AAV等、従来の抗体医薬品に替わる新たなモダリティの開発が広がっている。
ニューモダリティについても生体内で免疫原性を示す可能性があるため、それらを正しく評価することが重要である。

ADC: Antibody Drug Conjugate (抗体薬物複合体)
BsAb: Bispecific Antibody (二重特異性抗体)
AAV: Adeno-Associated Virus (アデノ随伴ウイルス)

モダリティの多様性に対応するためのADA分析の考え方や、Drug tolerance limit (DTL) 向上のための分析手法等、ADA分析の一助となるよう、4トピックについて議論を行った。

- ① ニューモダリティに対するADA分析
- ② 中和抗体 (NAb: Neutralizing antibody) 分析
- ③ 各種ADA分析手法の比較
- ④ ADA分析におけるトラブル事例



1. イントロダクション

バイオ医薬品と免疫原性

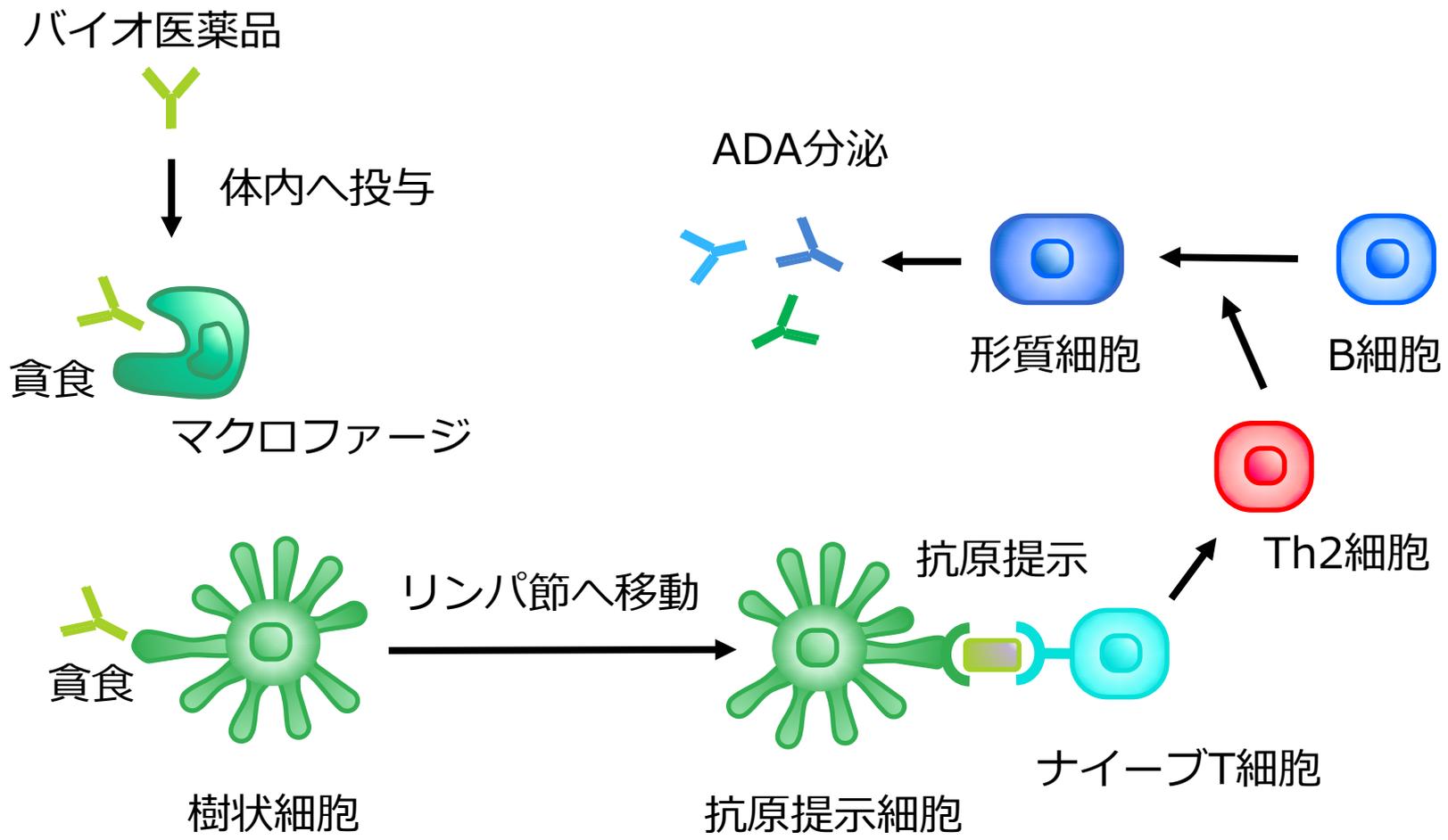
- ✓ 抗原が抗体の産生や細胞性免疫を誘導する性質を免疫原性と呼ぶ。
- ✓ バイオ医薬品は抗原として作用し、ADAの産生が誘導される場合がある。FDAの安全性情報に基づいたバイオ医薬品による抗体産生の誘導率に関する論文*¹では、誘導率は0%から約25%と製品により異なることが報告されている。
- ✓ 免疫原性がバイオ医薬品の有効性・安全性に影響を及ぼす可能性があるが、問題とならない場合がほとんどである。
- ✓ 稀に有効性が低下した事例や有害な反応を引き起こした事例が報告されている。

引用：国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 HPより

*1：Baker, M.P., Self Nonself, 1 (4), 314-322 (2010)



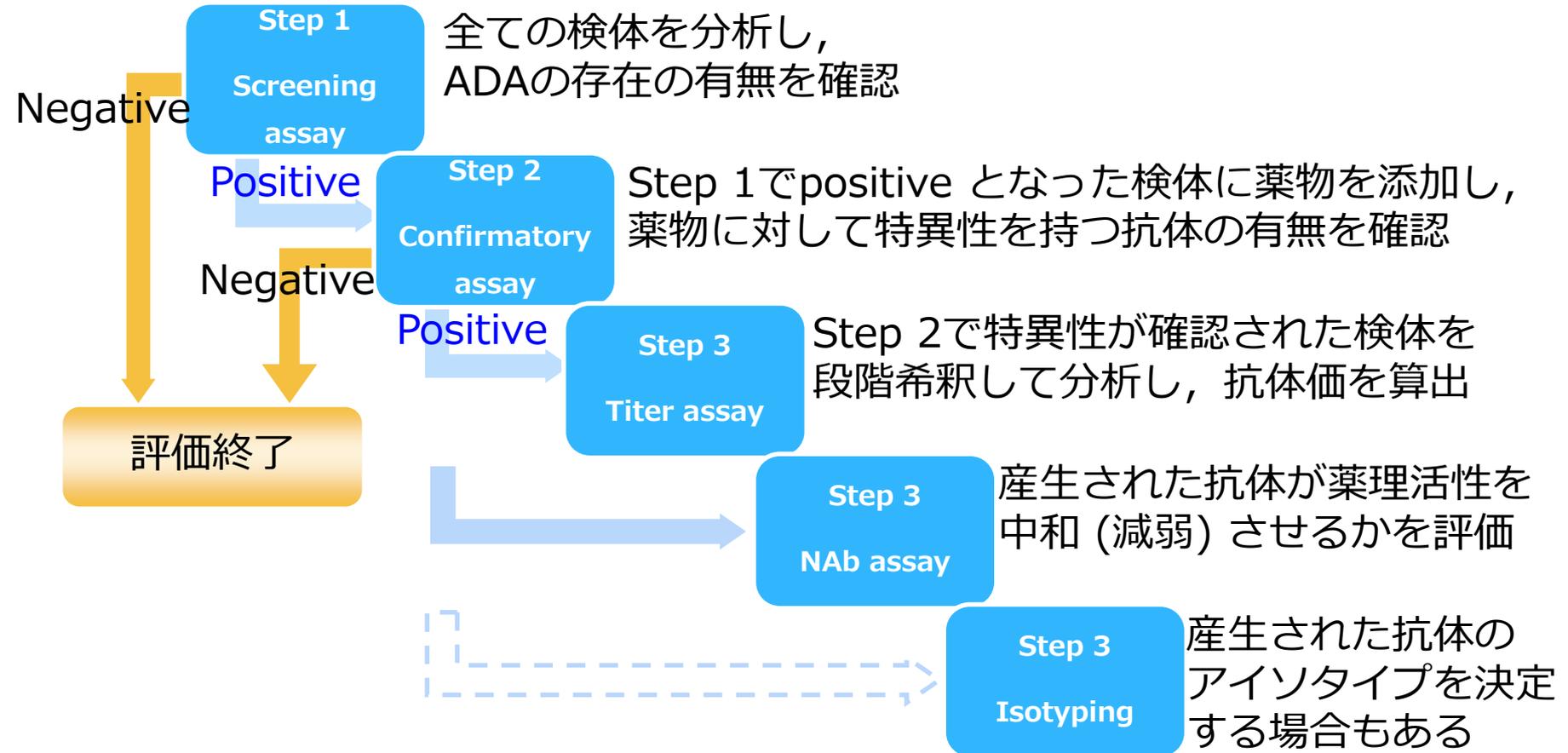
ADAができるまで



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)

引用 : 11th JBF Symposium, DG2019-43 (2020)

免疫原性評価フロー



2. ニューモダリティに 対するADA分析

核酸医薬品 調査対象市販薬

承認済核酸医薬品 (2022年1月時点、一部抜粋)

製品名 (一般名)	分類	DDS	臨床試験		承認年
			分析法	感度、陽性率、特記事項	
Givlaari (givosiran)	siRNA	GalNAc- conjugate	固相：リン酸化Givosiran 検出：Anti-Human IgM/IgGによるELISA 陽性対照：ウサギ抗KLH-ALN-TTRSC抗体	感度：37.4 ng/mL 陽性率：0.76% (1/131) 血清中抗Givosiran IgG/IgM抗体評価	米国・2019 承認 欧州・2020 承認 日本・2021 承認
Viltespo (viltolarsen)	ASO	Naked	固相：アルブミン結合Viltolarsen 検出：Protein A/GによるELISA 陽性対照：抗ビルトラルセンウサギ IgG	陽性率：0% (全例陰性) 血清中抗Viltolarsen抗体評価 Ph1/2	日本・2020 承認 米国・2020 承認
Onpattro (patisiran)	siRNA	LNP	固相：PEG2000 -C-DMG 検出：抗ヒトIgG/IgM 陽性対照：市販抗PEGウサギモノクローナル抗体	感度：250 ng/mL PEGに対するADAのみ評価。(薬剤干渉 の確認として、PEG、MC3 (Patisiranの 成分)、ALN-18328 (Patisiranの核酸部 分)、Tafamidisの影響を確認)	米国・2018 承認 欧州・2018 承認 日本・2019 承認
Spinraza (nusinersen)	ASO	Naked	固相：遊離アミン型Nusinersen 検出：Protein A/GによるELISA 陽性対照：Anti-Nusinersen	感度：50ng/mL 陽性率：4% (5/125) 血漿中抗Nusinersen抗体評価	米国・2016 承認 欧州・2017 承認 日本・2017 承認
Macugen (pegaptanib)	Aptamar	PEG- conjugate	検出：Anti-Human IgGによるELISA	情報なし	米国・2004 承認 欧州・2006 承認 日本・2008 承認
Leqvio (inclisiran)	siRNA	GalNAc- conjugate	情報なし	陽性率：1.8% (33/1,830)	欧州・2020 承認 米国・2021 承認
Oxlumo (lumasiran)	siRNA	GalNAc- conjugate	情報なし	感度：65.6 ng/mL	米国・2020 承認 欧州・2020 承認
Waylivra (volanesorsen)	ASO	Naked	ELISA	陽性率：14.2% (38/267) 血漿中抗Volanesorsen抗体 Ph2, 3	欧州・2019 承認
Tegsedi (inotersen)	ASO	Naked	固相：Inotersen 検出：Protein A/GによるELISA	感度：6.28 ng/mL 陽性率：30.4% (34/112) 血漿中抗Inotersen(IgG)抗体 Ph1, Ph2/3	米国・2018 承認 欧州・2018 承認

ASO: Antisense oligonucleotide

DDS: Drug delivery system

LNP: Lipid nanoparticle (脂質ナノ粒子)

PMDA, FDA, EMA審査報告書より抜粋

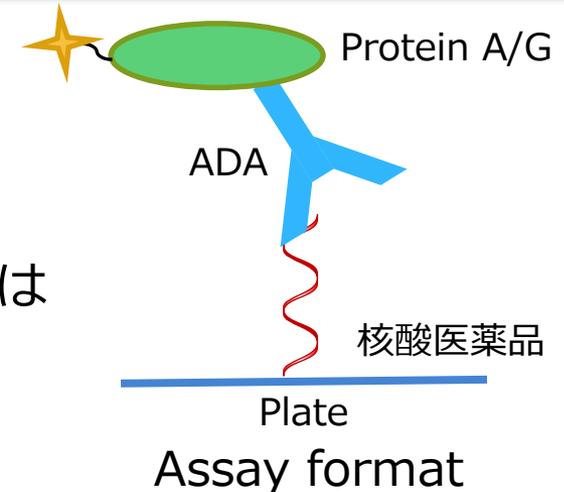
1. 分析法

ADA分析法

- 固相を核酸医薬品，検出をProtein A/GもしくはAnti-Human IgGによるELISA法が多かった。

NAb分析法

- 中和抗体実施の報告例は見られなかった。
→The neutralizing capacity of antibodies present in positive samples has not been tested. The applicant highlighted that anti-inotersen antibodies **bind to inotersen in circulation and do not make it to the intracellular site of activity of inotersen.** とあるように，ADAは循環中核酸医薬品とは結合するが，細胞内の活性部位には到達しないことから，中和抗体分析を実施する必要がないことが強調されていた（Tegsedi (Inotersen) 審査報告書より）。



2. ADA Specificity

- Onpattro (Patisiran) のように、DDSとしてPEGが付加されている核酸医薬品については、抗PEG抗体を分析しているケースもみられた。
- 一方、Givlaari (Givosiran)のような、GalNAc付加の核酸医薬品については、GalNAc特異的なADAの分析まではされていなかった。そのほか、GalNAcが使用されている核酸医薬品としてLeqvio (Inclisiran) やOxlumo (Lumasiran) があるが、審査報告書から情報が得られなかったため、傾向をつかむためにはさらなる調査が必要である。
- 核酸医薬品にはASOやsiRNA, Aptamerなどがあるが、核酸医薬品の種類によるバリデーション実施項目の違いなどは見られなかった。



ADC & BsAb

調査対象市販薬

ADC (Sacituzumab govitecan, Loncastuximab tesirine-lpyl, Disitamab vedotinは上市直後につき調査不可)

製品名 (一般名)	陽性対照取得		Nab 分析	臨床試験 (感度, 陽性率, 臨床フェーズなど)	承認年
	抗drug	抗payload			
Mylotarg (Gemtuzumab ozogamicin)	✓			4試験で1%未満, payload+linker認識2例, 国内P1/2, 海外P2	米国・2017 ⁺ 承認 欧州・2018 ⁺ 承認 日本・2005 承認
Zevalin (Ibritumomab tiuxetan)	✓*			5-100 µg/mL, 国内3.6%, 国内P1/2, 米国P1/2/3 *HAMA (ヒト抗マウス抗体)	米国・2002 承認 欧州・2004 承認 日本・2008 承認
Kadcyla (Trastuzumab emtansine)	✓	✓		115-240 ng/mL, 陽性頻度は数例, 国内P1/2, 海外 P1/2	米国・2013 承認 欧州・2013 承認 日本・2013 承認
Adcetris (Brentuximab vedotin)	✓		✓	4.032 ng/mL, 国内P1/2, 海外P2, 国際共同P3	米国・2011 承認 欧州・2012 承認 日本・2014 承認
Besponsa (Inotuzumab ozogamicin)	✓	✓	✓	215 ng/mL, 3%, 海外P1/2, 国際共同P3	米国・2017 承認 欧州・2017 承認 日本・2018 承認
Enhertu (Trastuzumab deruxtecan)	✓	✓		19.8-46.3 ng/ml, 1.1%, 国内P1/2, 海外P1/2	米国・2019 承認 欧州・2020 承認 日本・2020 承認
Akalux (Cetuximab sarotalocan sodium)	✓		✓	50.6 ng/mL, 11.1%, 国内P1, 海外P1/2a	日本・2020 承認
Polivy (Polatuzumab vedotin)				28 ng/mL, 国内P2, 海外P1b/2	米国・2019 承認 欧州・2020 承認 日本・2021 承認
Padcev (Enfortumab vedotin)	✓			全体5症例、頻度少ない(考察なし)	米国・2019 承認 日本・2021 承認

+ 市場撤退後、急性骨髄性白血病の治療薬として再承認取得

PMDA, FDA, EMA審査報告書より抜粋

<http://bioanalysisforum.jp/>



ADC & BsAb

調査対象市販薬

BsAb (Catumaxomabは市場撤退につき調査不可)

製品名 (一般名)	陽性対照取得		Nab 分析	臨床試験 (感度, 陽性率, 臨床フェーズなど)	承認年
	抗drug	抗domain			
Blincyto (Blinatumomab)	✓		✓	ADA : 8例、Nab : 6例 / 全522例, 国内・海外P1/2	米国・2014 承認 欧州・2015 承認 日本・2018 承認
Hemlibra (Emicizumab)	✓		✓	ADA : 4例、Nab : 1例 / 全379例	米国・2018 承認 欧州・2018 承認 日本・2018 承認
Rybrevant (Amivantamab)	✓			全試験でADA陽性1%	米国・2021 承認 欧州・2021 承認

PMDA, FDA, EMA審査報告書より抜粋

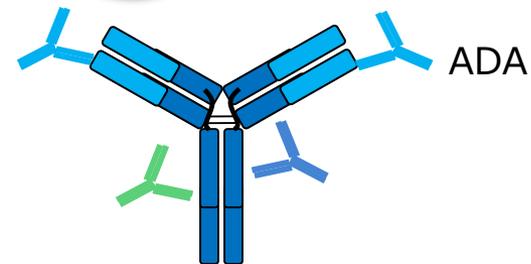
ADC, BsAbともに, 分析手法はADAはブリッジング法, NAbはCell-based assayが多く報告されていたが, 詳細を参照できないケースもあった.

ADC & BsAb Topics紹介

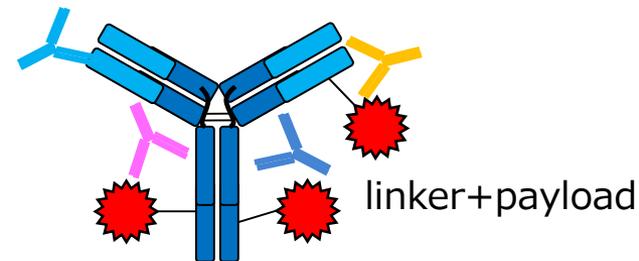
非天然の構造モチーフあるいは、マルチドメインを有するため、mAbと比較して、免疫原性のリスクが高い可能性がある (Domain specificityに注意) .

**ADCのDomain specificity**

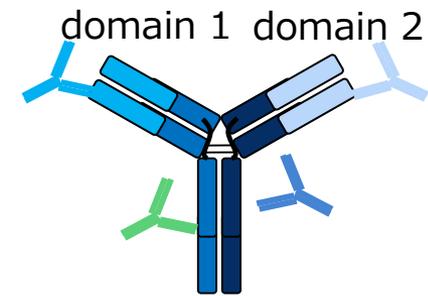
- リンカーおよびペイロードを含むADCを認識するADAと抗体を認識するADAが生じ得る。
参考 : Gemtuzumab ozogamicin, Trastuzumab emtansine, Trastuzumab deruxtecan, and so on...
- DAR (drug-antibody ratio) が高いほど、ADA発生率が高いことが報告されている。
参考 : Xenobiotica. 2019, 49: 1097-1105.
- 8つのADCの免疫原性について臨床サンプルを用いた調査の結果、ADA陽性率はmAbでの報告された患者の免疫応答を増加させる結果は観測されなかった。
(ADA domain specificity (mAb positive) は86-100%)
参考 : Bioanalysis. 2019, 11: 1555-1568.



Monoclonal antibody (mAb)



Anti-Drug Conjugate (ADC)



Bispecific Antibody (BsAb)



ADC & BsAb Topics紹介

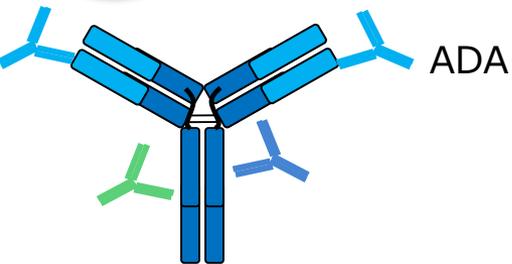
非天然の構造モチーフあるいは、マルチドメインを有するため、mAbと比較して、免疫原性のリスクが高い可能性がある (Domain specificityに注意) .



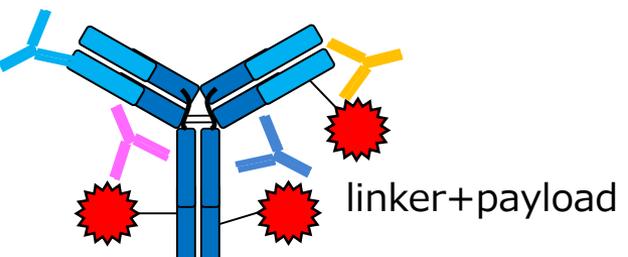
BsAbのDomain specificity

- BsAbはmAbよりも免疫原性リスクが高い。
参考：MAbs. 2019, 11: 861-869.
- 抗原結合部位の1つ、両方の部位または定常ドメインに対するADAを区別する方法論が報告されている。
参考：Bioanalysis. 2020, 12: 509-517.

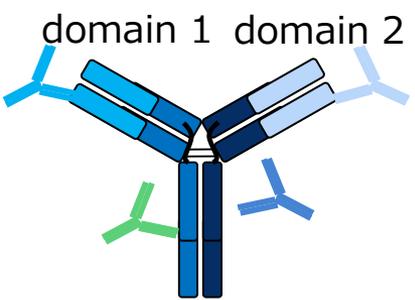
http://bioanalysisforum.jp/



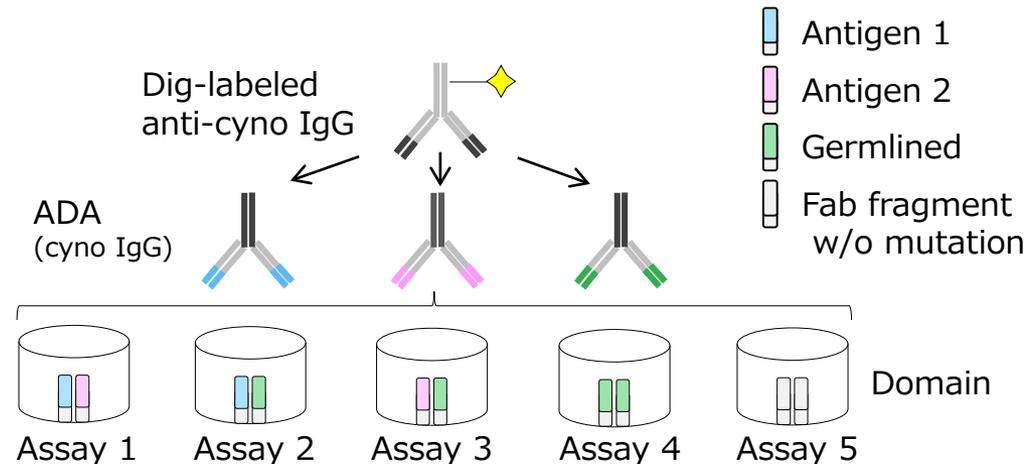
Monoclonal antibody (mAb)



Anti-Drug Conjugate (ADC)



Bispecific Antibody (BsAb)



- Clinical Pharmacology Considerations for Antibody-Drug Conjugates (FDA Draft guidance, February 2022) に下記のような記載がある。
- A multitiered immunogenicity assessment should be conducted as outlined in the FDA guidances Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products (August 2014) and Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products —Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection (January 2019), including a confirmatory assessment detecting anti-drug antibodies (ADAs) against the ADC.
- Additionally, it could be appropriate to develop multiple assays to measure the immune responses to the constituent parts of the ADC, such as additional epitopes or domains resulting from the conjugation of the constituent parts.
- 抗体, ペイロード, コンジュゲーションリンカー等, 各種ドメインに対するADAの評価が必要になると考えられる。

◆ 調査方法

- 当局申請資料調査：承認済製品数が少ない (次ページ参照) ため情報が限定的
- 論文および学会発表資料調査：Bioanalysisに関する情報は少ない
- JBF 遺伝子治療DG (DG2021-50) との合同ミーティングを開催し、情報交換および議論を実施した。

◆ AAVの免疫原性評価

以下の評価を実施する必要がある。

1. AAVベクター (カプシド) の免疫原性

AAVベクターの免疫原性評価においては「液性免疫 (humoral immunity)」と「細胞性免疫 (cellular immunity)」の両者が実施されている。抗体が中心になって抗原を排除する免疫のしくみを液性免疫、T細胞やマクロファージなどの細胞が抗原を排除するしくみを細胞性免疫という。

2. 発現産生物 (タンパク等) の免疫原性

タンパク質 (特に欠損遺伝子に相当するタンパク質) を発現するベクターを投与する際には、発現産生物に対する抗体の評価が必要である。

承認済および承認申請中・第3相臨床試験段階のAAV (2022年1月時点)

製品名 (一般名) 開発コード等	適応	ベクター	導入遺伝子	標的臓器	投与経路	承認国・年
Luxturna (voretigene neparovec)	RPE65欠損レーバー先天性黒内障	AAV2	RPE65	眼	硝子体内	米国・2017 承認 欧州・2018 承認
Zolgensma (onasemnogene abeparovec)	脊髄性筋萎縮症	AAV9	SMN1	中枢神経系 組織	静脈内	米国・2019 承認 欧州・2020 承認 日本・2020 承認
Roctavian, Valrox, BMN 270 (valoctocogene roxaparovec)	血友病A	AAV5	F8	肝臓	静脈内	欧州・2021 申請
Upstaza (eladocogene nolpharovec)	AADC欠損症	AAV2	AADC	脳	脳内	欧州・2020 申請
Lumevoq, GS010 (Lenadogene nolpharovec)	レーベル遺伝性視神経症	AAV2	ND4	眼	硝子体内	欧州・2020 申請
AAV5-hFIXco-Padua, AMT-061 (etranacogene dezaparovec)	血友病B	AAV5	F9	肝臓	静脈内	-
BIIB111 (timrepigene emparovec)	コロイデレミア	AAV2	REP1	眼	網膜下	-
BIIB112, NSR-RPGR	X連鎖網膜色素変性症	AAV8	RPGR	眼	網膜下	-
LYS-SAF302	ムコ多糖症IIIA型	AAVrh10	SGSH	脳	脳内	-
SRP-9001 (delandistrogene moxeparovec)	デュシェンヌ型筋ジストロフィー	AAV7rh74	mini-dystrophin	筋肉	静脈内	-
PF-06939926 (fordadistrogene movaparovec)	デュシェンヌ型筋ジストロフィー	AAV9	mini-dystrophin	筋肉	静脈内	-
PF-07055480, SB-525 (giroctocogene fitelparovec)	血友病A	AAV6	F8	肝臓	静脈内	-
PF-06838435 (fidanacogene elaparovec)	血友病B	AAV-Spark100	F9	肝臓	静脈内	-
RGX-314	滲出型加齢黄斑変性	AAV8	anti-VEGF Fab	眼	網膜下	-
AAV5-RPRG	X連鎖網膜色素変性症	AAV5	RPGR ORF15	眼	網膜下	-
DTX301	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	AAV8	OTC	肝臓	静脈内	-
DTX401	グルコース-6-ホスファターゼ欠損症	AAV8	G6Pase	肝臓	静脈内	-

1. AAVベクター (カプシド) の免疫原性

1-1 液性免疫

液性免疫には、**中和抗体** (Neutralizing antibody assay, NAb) と**総抗体** (Total antibody assay, TAb) 評価法がある。NAbは細胞を用いたアッセイ系で中和活性を、TAbはELISAなどのLBAでBindingを指標とする評価法である。

- ヒトのアデノ随伴ウイルスは10種類以上のセロタイプの存在が知られており、多くのヒトやサルで中和抗体を有することが報告されている。投与前血清中に中和抗体が存在すると、**薬理効果減弱やPKへの影響が懸念されることから、中和抗体 (NAb) を評価することが重要**である。また、安全性の観点からは**総抗体 (TAb) 評価の必要性も議論**されている。
- NAbとTAbの分析法にはそれぞれに特徴 (次ページ参照) がある。これらに関する情報がそろっていないため、製薬メーカーはどの測定が妥当であるかの判断が難しく、また当局もデータを収集しているようである。そのため、**NAbとTAbの両者を評価せざるを得ない状況**である。
- **NAbとTAbでポジ/ネガ判定が一致しないケースもあり**、どちらか一方の評価法を選択するのも難しいといった課題がある。



AAV Topics紹介

NAbとTAbの特徴

参考文献：

- Recommendations for the Development of Cell-Based Anti-Viral Vector Neutralizing Antibody Assays, The AAPS Journal (2020) 22: 24
- Evaluation of the Humoral Response to Adeno-Associated Virus-Based Gene Therapy Modalities Using Total Antibody Assays, The AAPS Journal (2021) 23:108

	NAb	TAb
特徴	細胞を使用した中和抗体分析	LBA (ELISA, ECL等) で分析
ガイドライン・ガイドンス	ガイドンス・ガイドラインはない	ガイダンスはあるが、遺伝子治療は対象外 “Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products – Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection”, FDA, January 2019
重要試薬	代替ウイルスベクターを使用，細胞の品質管理やバッチ間差のコントロールが難しい	開発品のカプシド中空粒子を使用
ポジティブコントロール	血清で中和抗体の抗体価が高いものを使用 NAb と TAb で判定結果が一致する検体または精製抗体を使用するのが良い	血清で中和抗体の抗体価が高いものを使用，市販品も可
カットポイント設定	カットポイントの設定根拠はないが，50%阻害率でのポジ/ネガ判定が広く用いられている	カットポイントの設定が難しい (ネガティブ個体が少ないため，多くの検体評価が必要)
Assay	時間がかかる (2日以上)	時間がかからない (1日)
CDx化	NAb ではガイダンス “In Vitro Companion Diagnostic Devices” (FDA, Aug. 2014) のクライテリアを満たさない可能性があるため，TAb を使用するケースが多い	

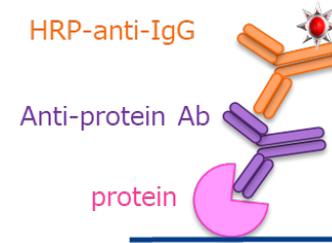
1. AAVベクター (カプシド) の免疫原性

1-2 細胞性免疫

細胞性免疫は、T細胞が刺激されることで分泌するサイトカインを検出することにより評価する。

高感度な免疫アッセイ法である ELISpot (Enzyme-Linked ImmunoSpot) が知られているが、末梢血単核球 (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC) 中のT細胞が刺激されることで分泌する IFN- γ などのサイトカインをELISpotリーダーを用いて評価・数値化できる手法である。

- NAbやTAbの評価と同様に、当局や製薬メーカーでデータを収集している状況であるため、免疫原性評価に関しては液性免疫と細胞性免疫の両者が必要か、今後の動向を注視したい。



2. 発現産物 (タンパク) の免疫原性評価

2-1 液性免疫, 細胞性免疫

ELISAやECLを使用したLBA (Ligand Binding Assay) による分析法を用い, 抗発現産物 (タンパク) 抗体 (液性免疫) を評価する. 報告例は少ないが, 細胞性免疫評価の実施例もある.

- 抗タンパク抗体の陽性対照は, 市販品を使用しても良い. 市販品がなく陽性対照を調製する際には, 発現タンパク調製の難易度によってはモノクローナル抗体を第一選択にする場合がある.
- 中和抗体評価については, 報告例は少ないものの, 凝固因子阻害活性 (ベセスダ法) などの薬理活性を指標にした評価も実施されている.
- 発現タンパクの細胞性免疫評価を実施しているケースもある.



Overview

今回調査したモダリティ3種について、ADA分析に関する注意点を下記にまとめた。

Modality	ADA分析に関する注意点
核酸医薬品	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 陽性対照の作成が難しい場合がある。 ✓ 抗DDS抗体を測定する場合もある。 (GalNacについては審査報告書から情報が得られなかったためさらなる調査が必要)
ADC & BsAb	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 免疫原性を惹起しやすいエピトープが存在する場合や内在性タンパクへの有意な相同性がある場合は、Domain specificity評価が必要となる。 参考：BioDrugs. 2020, 34: 39-54
AAV	<ul style="list-style-type: none"> ✓ AAVベクター (カプシド) の免疫原性および発現産生物 (タンパク) の免疫原性を評価する必要がある。 ✓ 液性免疫 NAbとTAb の両者の評価の必要性、さらには細胞性免疫評価の必要性についても、今後動向を注視する。



3. 中和抗体分析

背景

中和抗体分析について、主に分析面にフォーカスしDG内で疑問点や困っていることをピックアップしその内容について議論した。

議論内容

- 中和抗体実施時期
- 中和抗体分析法開発
- 中和抗体バリデーション
- 中和抗体測定

中和抗体実施時期

- ✓ 臨床ではフェーズ2以降で実施するとの意見が多かった。一方、非臨床では実施しないことがほとんどであった。
- ✓ 中和抗体を分析する試料は、ADA positiveすべてで実施されていた。
- ✓ 中和抗体分析法開発の着手時期については、Ph2開始前にバリデーションが終了するようスケジュールすることが望ましい。分析系は製薬メーカーが自社で立ち上げてCROへ移管するケースが多かった。

中和抗体分析法開発

- ✓ Cell-based assay (CBA) とCompetitive ligand binding assay (CLBA) のどちらも選択できるケースでも、**CBAが第一選択**との意見が多かった。CBAの分析法開発からスタートし、感度等に問題があった場合にCLBAに移行する。
- ✓ 一方でDG2020-49申請資料調査 (2015-2020年に承認された抗体医薬品の中和抗体分析法の調査) では、LBAが用いられるケースが多い調査結果となっており、薬物のMoAやモダリティに応じて系を選択する必要があると考えられる (DG2020-49, P54-56参照)。
- ✓ 使用するポジコンや細胞などは複数準備し確認をすることが多い。細胞はロット間差があることもあるので複数ロットで確認する場合もある。

中和抗体分析法開発

- ✓ CBAはアッセイのばらつきが多く、感度面が高くないなど、課題が多い。また、細胞の調製・維持も自社で新規に準備する必要があり、構築難易度が高い。
- ✓ CLBAによる分析手法の選択は、DTLを確認後、まず酸解離法から実施し、うまくいかない場合にSPEAD法やBEAD法に変更するケースがあった。
- ✓ LBAを用いるADAでのポジティブコントロール (PC, ポリクローナル抗体) をCBAのPCに使用できることもあるが、CBAに使用した際にうまく阻害かからずに使用できなかったケースも見られた。
- ✓ 上記対応策として、CBAのPC作製の段階で、数種類の抗体 (抗イディオタイプ抗体等) を準備しておくことが望ましいとの意見があった。

中和抗体バリデーション

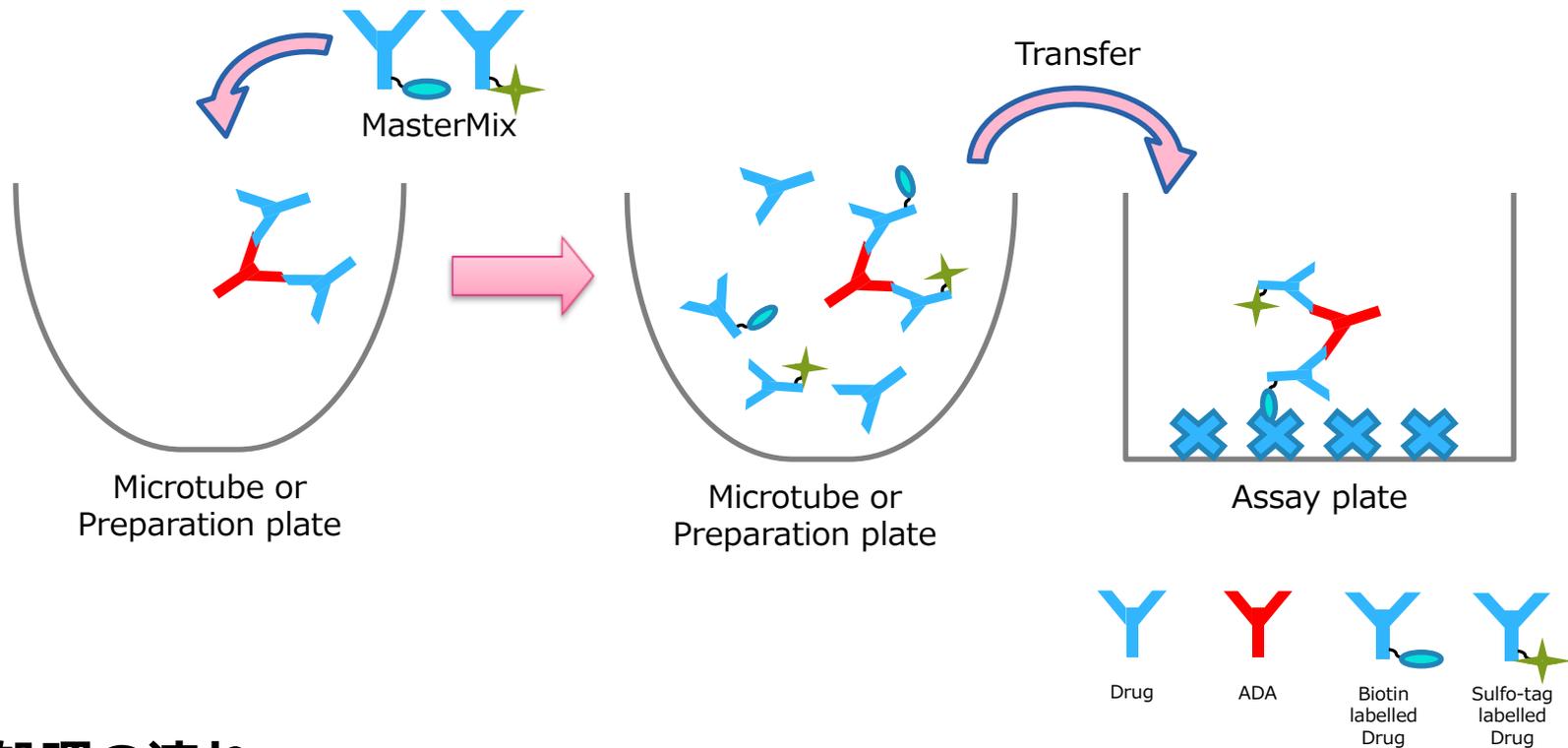
- ✓ CBAのバリデーションは細胞維持が難しく、アッセイ間のばらつきも大きいことが多いとの意見が挙がった。
- ✓ バリデーションの判断基準については、基本的には変更しないことが望ましいが、感度面等やむを得ない場合に変更せざるを得ないケースもあるようだ。予備検討の結果をもって判断基準を決定することが望ましい。
- ✓ 中和抗体のNormalization factor算出に使用する個体数は、FDAのGuidanceに従い30例で実施するケースがほとんどであった。臨床と非臨床で個体数を変更する場合がある。

中和抗体測定

- ✓ 測定についてはPositive/Negativeの判定のみがほとんどであるが、力価測定を実施したケースも見られた。
- ✓ AAVの場合にはAAVカプシドに対する中和抗体を有する人への投薬は、薬理効果減弱等の影響が懸念されるため、投薬前に力価を確認する。
- ✓ 抗AAV抗体スクリーニングにおけるTAbとNAb評価のPositive/Negativeの判定が一致しないケースがあった。薬理効果に関連する中和活性のみの評価でよいのではとの意見が挙がった（「ニューモダリティに対するADA分析」の項を参照）。

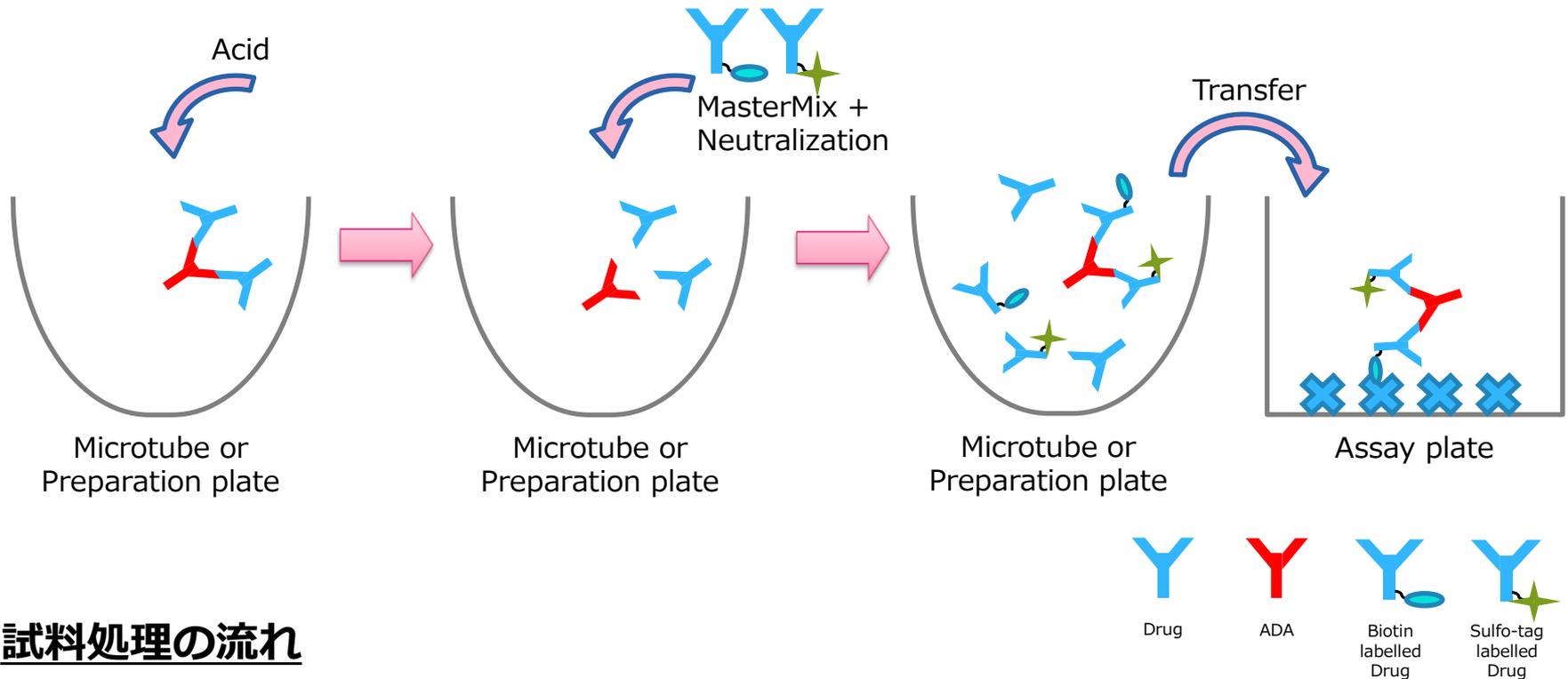
4. 各種ADA分析手法の 比較

Bridging法



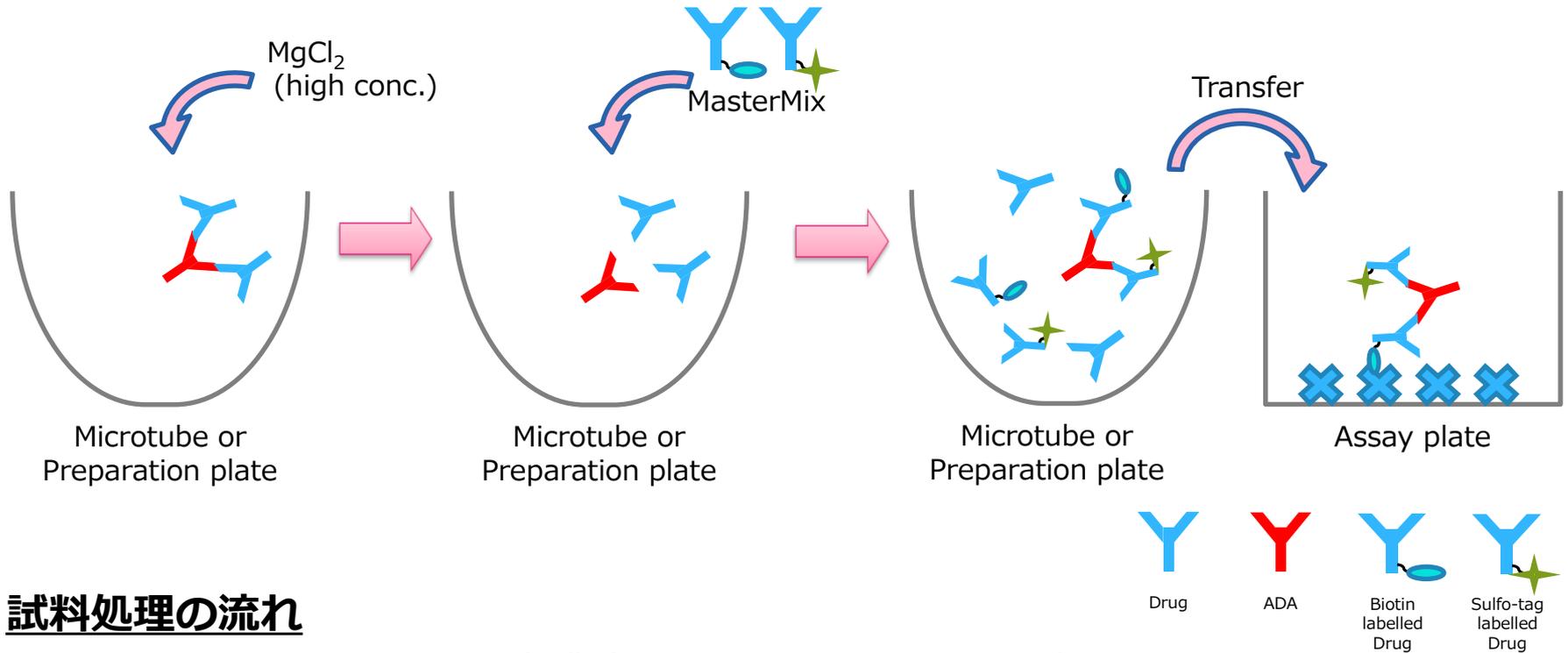
試料処理の流れ

- ✓ ADA-Drug complex中にMasterMixを添加し，置換
- ✓ Streptavidin plateに添加し測定



試料処理の流れ

- ✓ ADA-Drug complexを酸で解離
- ✓ MasterMix添加し中和
- ✓ Free drugとの競合でBiotin drug-ADA-Sulfo drug complexを作成
- ✓ Streptavidin plateに添加し測定

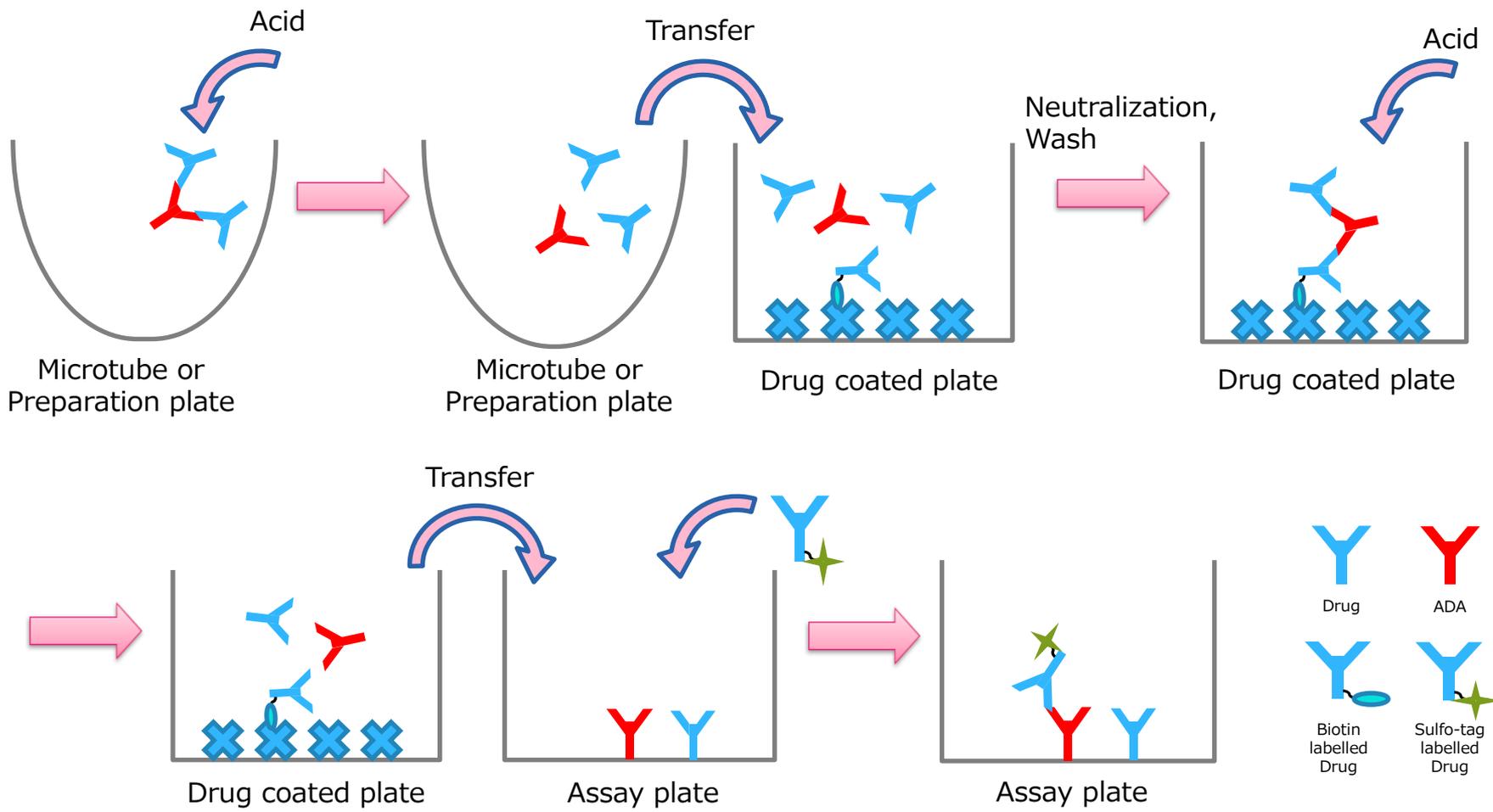


試料処理の流れ

- ✓ ADA-Drug complexを高濃度の MgCl₂ (ex. 4M) で解離
- ✓ MasterMix添加し希釈
- ✓ MgCl₂濃度を下げることによって、Free drugとの競合でBiotin drug-ADA-Sulfo drug complexを作成
- ✓ Streptavidin plateに添加し測定



ACE (Affinity Capture Elution) 法 (1/2)



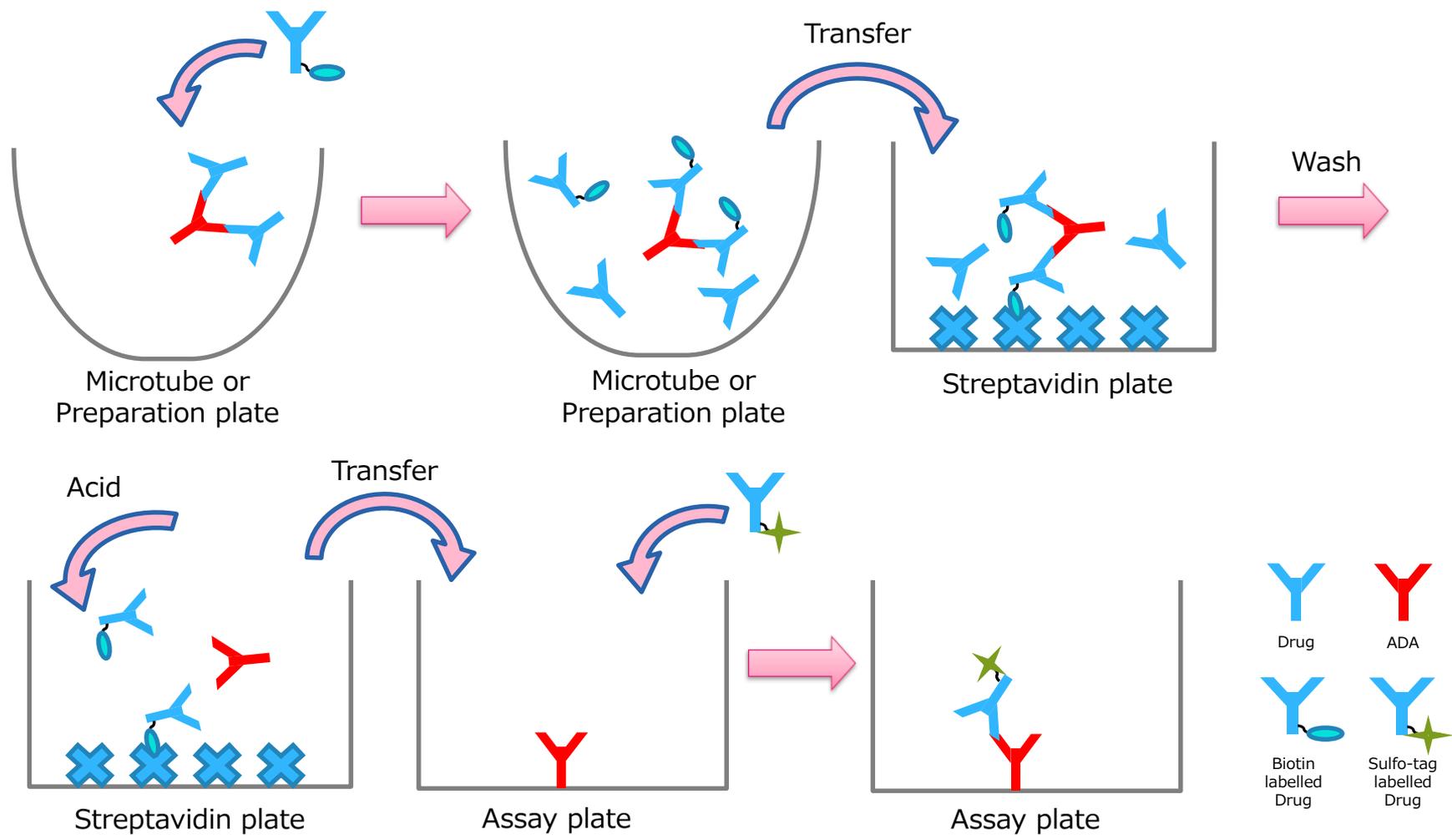
<http://bioanalysisforum.jp/>

試料処理の流れ

- ✓ ADA-Drug complexを酸で解離
- ✓ Drug-coated plateに添加し中和
- ✓ 洗浄しFree drugを除去
- ✓ ADA-Drug complexを酸で解離
- ✓ 測定プレートに物理吸着
- ✓ 検出抗体添加し測定



SPEAD (Solid-Phase Extraction with Acid Dissociation) 法 (1/2)



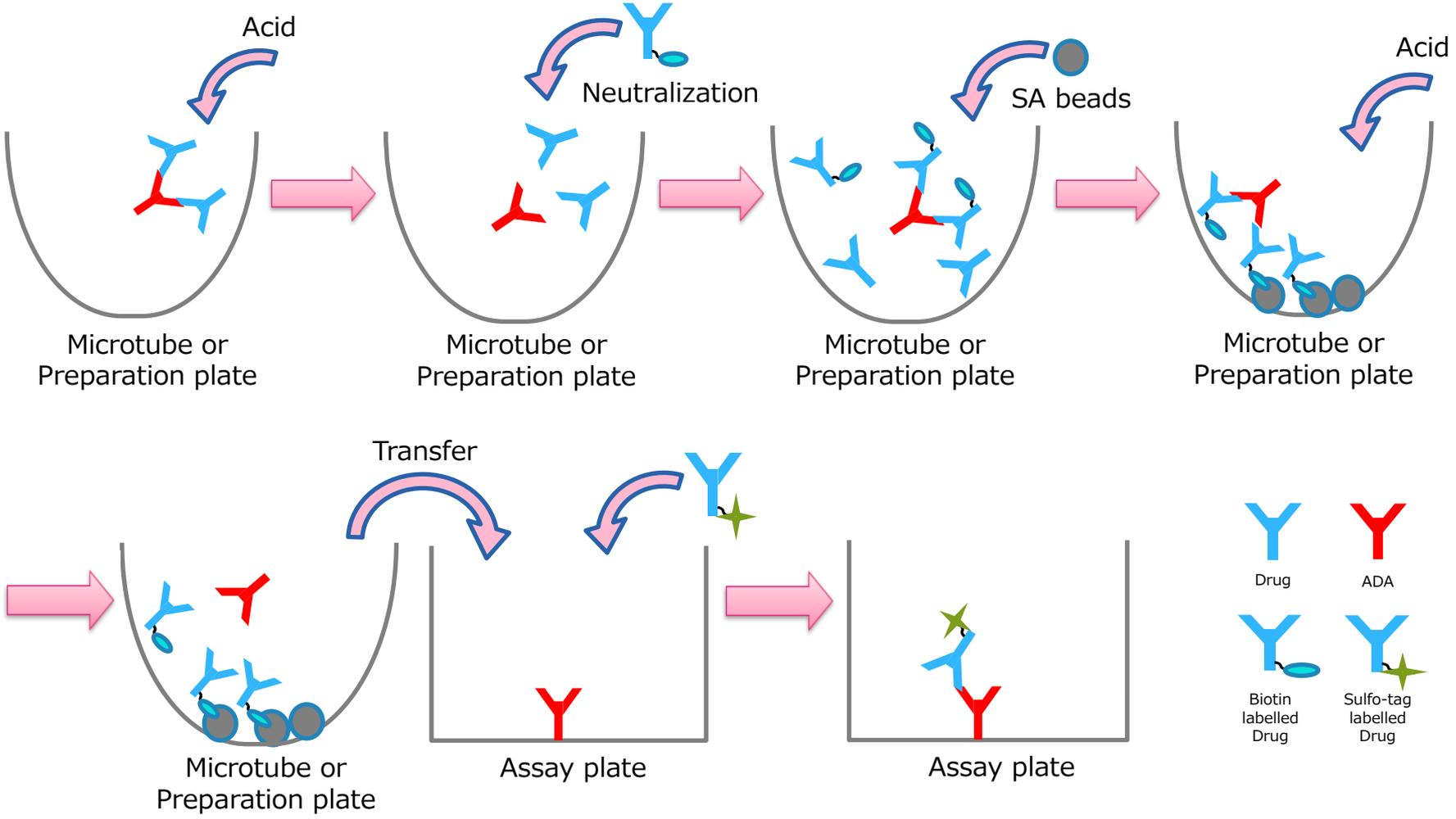
<http://bioanalysisforum.jp/>

試料処理の流れ

- ✓ ADA-Drug complexをBiotin-Drugで置換
- ✓ Streptavidin plateに添加
- ✓ 洗浄しFree drugを除去
- ✓ ADA-Biotin Drug complexを酸で解離
- ✓ 測定プレートに物理吸着
- ✓ 洗浄しBiotin Drugを除去
- ✓ 検出抗体添加し測定



BEAD (Biotin-drug extraction and acid Dissociation) 法 (1/2)



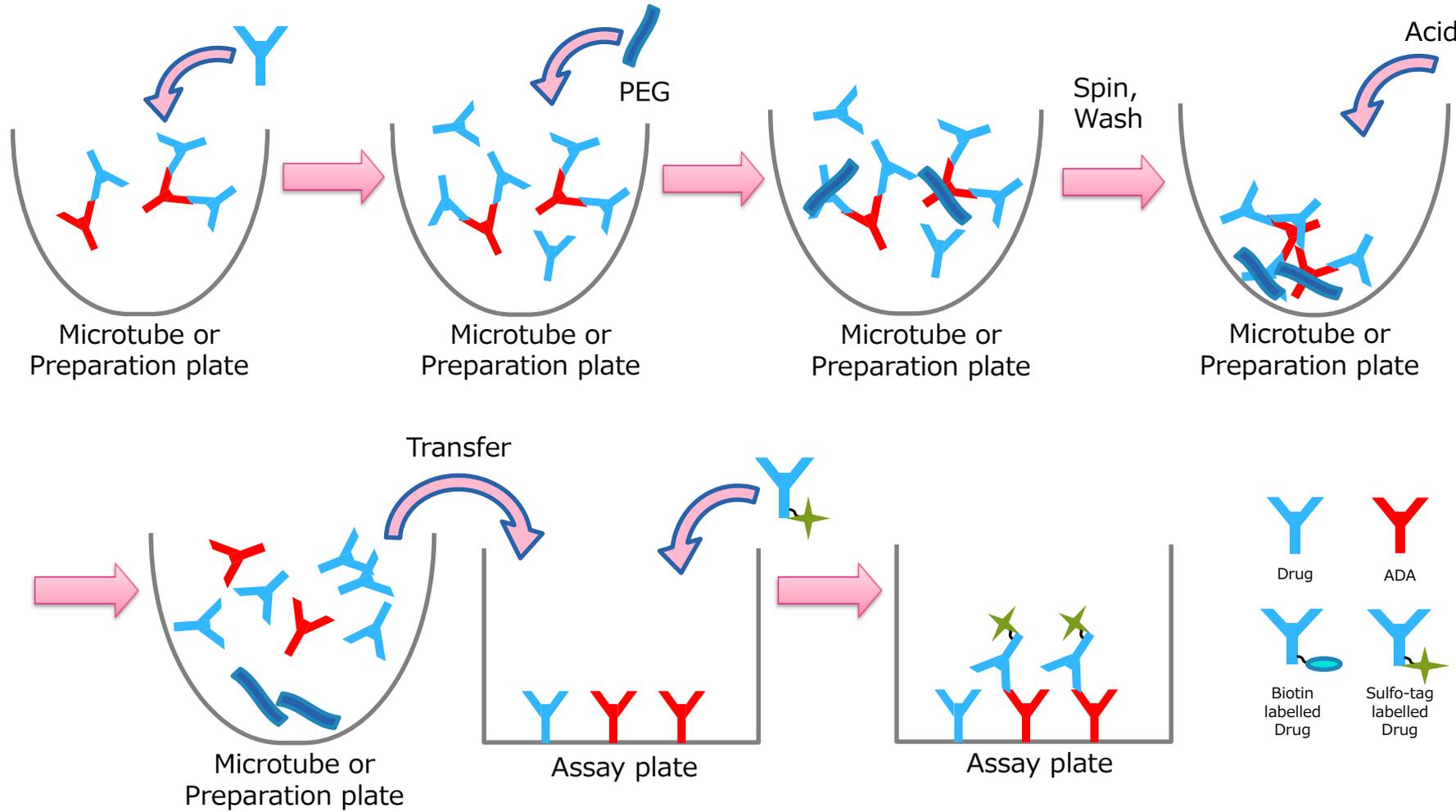
http://bioanalysisforum.jp/

試料処理の流れ

- ✓ ADA-Drug complexを酸で解離
- ✓ Biotin Drugを添加, 中和
- ✓ Streptavidin magnet beadsを添加
- ✓ 洗浄しFree drugを除去
- ✓ ADA-Biotin Drug complexを酸で解離
- ✓ 中和, 測定プレートに物理吸着
- ✓ 検出抗体添加し測定



Panda (Precipitation and Acid dissociation) 法 (1/2)



<http://bioanalysisforum.jp/>

試料処理の流れ

- ✓ Drugを添加しADA-Drug complexの反応を飽和
- ✓ PEGを添加, オーバーナイトインキュベーション
- ✓ SpinしPEG沈殿させ, 洗浄
- ✓ ADA-Drug complexを酸で解離
- ✓ High-bind plateに物理吸着
- ✓ 検出抗体添加し測定

ADA各種分析手法 Pros/Cons (1/2)

分析法	Pros	Cons
Bridging法	<ul style="list-style-type: none"> 測定系構築が簡単 実施経験が多い 	<ul style="list-style-type: none"> DTLが得にくい
酸解離法	<ul style="list-style-type: none"> Bridging法より高いDTLが得られる 実施経験が多い 	<ul style="list-style-type: none"> 酸の影響を受ける場合がある pH中和時にFree DrugとADAが再結合する可能性
HISDA法	<ul style="list-style-type: none"> 酸を使用しないため抗体の変性が起こりにくい 中和操作が無く、前処理操作が簡便 	<ul style="list-style-type: none"> 実施経験が少ない
ACE法	<ul style="list-style-type: none"> 酸解離法より高いDTLが得られる 系によっては標識体が一種類でよい 	<ul style="list-style-type: none"> 酸の影響を受ける場合がある pH中和時にFree DrugとADAが再結合する可能性

ADA各種分析手法 Pros/Cons (2/2)

分析法	Pros	Cons
SPEAD法	<ul style="list-style-type: none"> 酸解離法より高いDTLが得られる 	<ul style="list-style-type: none"> 酸の影響を受ける場合がある pH中和時にFree DrugとADAが再結合する可能性
BEAD法	<ul style="list-style-type: none"> SPEAD法より高いDTLが得られる 	<ul style="list-style-type: none"> 新規技術であり経験が少ない 前処理が煩雑で測定法構築に時間がかかる 条件検討が必要 ビーズ試薬が高価
PandA法	<ul style="list-style-type: none"> SPEAD法より高いDTLが得られる 	<ul style="list-style-type: none"> 新規技術であり経験が少ない 前処理が煩雑で測定法構築に時間がかかる PEGのロットによってばらつく可能性 条件検討が必要 米国では特許に抵触する (2018年に調べた情報)

5. ADA分析における トラブル事例

トラブル事例-1



酸解離法でバックグラウンドが高くなりました。

酸緩衝液や中和緩衝液を新たに作り変えても改善しない場合、マトリックス由来である可能性が考えられます。
マトリックス由来のバックグラウンド上昇の場合、**SPEAD法等マトリックス除去操作**ができる分析手法に変更することで改善できる可能性もあります。



内因性物質が測定系に影響を及ぼしている可能性が考えられた場合、どのように対処、もしくは結果の解釈を行っていますか？

内因性物質が影響すると考えられる場合は分析系を変えて実施することが望ましいと考えます。

- ① 検出抗体をProteinA/Gにすることで内因性物質が反応していても測定できる可能性があります。
- ② 分析手法をSPEAD法等に変更することで、内因性物質を解離・除去し、内因性物質の影響を低減することが出来ると考えます。

トラブル事例-2



GyrolabでADA分析する際の注意点を教えてください。

バックグラウンドのばらつきが小さいため、カットポイントの設定が難しい場合があります。
非臨床の場合、検出抗体をAnti-Animal IgGとすることで、MSDに劣らない感度が出る場合もあるようです。
その他、Gyrolab全般に関する議論についてはDG2021-53ポスターもご参照ください。



標識体の有効期限の設定やロット変更時の注意点を教えてください。

有効期限を設定せず、試験前に確認して使用することがあります。ロット変更時は新旧ロットを比較して、ケースバイケースでパーシャルバリデーションを実施、カットポイントに影響がある場合はフルバリデーションを取得することもあるようです。

トラブル事例-3



臨床/ADAサンプルの長期保管はどのようにしていますか？

EMA/FDA2019に長期保管に関わる記載があります。
試験ごとに試験終了時に廃棄・追加保存・廃棄を決定されているようです。ケースバイケースでの対応が必要と考えます。



臨床で投与前検体からConfirmatory Positiveの場合の解釈はどのようにすればよいのでしょうか？ NAbでNegativeなら問題にならないのでしょうか？

NAbでNegativeとなれば、基本的には問題ないと考えます。投与前及び投与後の検体を比較して、投与後の検体でADAが増加していなければ問題ないとの判断となると考えます。また、**ADA分析結果のみの評価とせず、薬理効果を踏まえた判断をするなど、トータルでの評価が必要**と考えます。

トラブル事例-4



カットポイントを算出したところ、**値が小さすぎる**事例がありました。

非臨床試験の場合、カットポイント算出のための個体数が少ない場合は外れ値検定なしで実施することが多いようです。

臨床試験の場合、外れ値検定ありでカットポイントを決定することが多く、カットポイントが小さくなる場合は外れ値検定基準の再考などが必要と考えます。



投与前検体について**Positiveの検体率が高く**、カットポイント設定に困りました。

明らかにPositiveであると思われる検体を除いてカットポイントを算出したケースもあるようです。一方で、Positiveの検体も含めてカットポイントを算出したケースも見られました。本テーマにつきまして、**シンポジウム内 (DGポスター意見交換会 : 3/1 10時半より)** でご意見を募集させていただきます。

トラブル事例-4



投与前検体についてPositiveの検体率が高く、カットポイント設定に困りました。

DGポスター意見交換会で挙がったコメント

- ✓ CPの見直しについてFalse positive rate 2~11%に入るかを確認している。
高くずれた場合：製薬メーカー視点ではあまりよろしくないが、
レギュレーションの観点からは問題ないことが多い。
低くずれた場合：レギュレーションの観点から問題となると思う。
- ✓ False positive rateの算出方法は、Screening assay positiveからConfirmatory assay negativeへと転じた試料数を全試料数で割る。
- ✓ 内因性が問題となる場合、系構築から見直す必要もあるのでは？
- ✓ 健常人ではなく、患者血清でPopulationを合わせてバリをするのも一考。
- ✓ サルでAdultと幼弱で結果が変わる場合があった。

トラブル事例-5



陽性対照が取得できませんでした。
動物に免疫してポリクローナル抗体・モノクローナル抗体、
動物非免疫でのモノクローナル抗体の取得が困難な場合、
どのように対処すればよいのでしょうか？

陽性対象としてポリクローナル抗体が取得できない場合、モノクローナル抗体の作製・使用を検討してみてもいいでしょうか。複数のモノクローナル抗体をMixして使用するケースもあるようです。陽性対象にモノクローナル抗体を使用する場合は、DTLが得られない場合もあるので注意してください。

動物に免疫してポリクローナル抗体・モノクローナル抗体、動物非免疫でのモノクロの取得が困難な場合の対処法はDG内で意見が集まらなかったため、**シンポジウム内 (DGポスター意見交換会：3/1 10時半より)** でご意見を募集させていただきます。

トラブル事例-5



陽性対照が取得できませんでした。
動物に免疫してポリクローナル抗体・モノクローナル抗体、
動物非免疫でのモノクローナル抗体の取得が困難な場合、
どのように対処すればよいのでしょうか？

DGポスター意見交換会で挙げたコメント

- ✓ いろいろトライしてどうしても無理な場合、あきらめるのも選択肢の1つかも？
- ✓ 今のところ抗体がとれなかったことはない

【DG2021-51コメント】

意見交換会ではいろいろなご意見をいただきましたが、各社PC取得に苦労する場合もある印象でした。明確な解決策を示すことが出来ませんが、免疫動物を変更してみる、KLH-conjugate体として免疫してみる等、トライ&エラーでPC取得を試みる必要があります。

- 本DGでは①ニューモダリティに対するADA分析, ②中和抗体分析, ③各種ADA分析手法の比較, ④ADA分析におけるトラブル事例, の4テーマについて議論した.
- ニューモダリティに関しては, DGメンバー内で実施経験がまだ少なかったため, 申請資料を基に議論を行い, 調査結果を纏めた.
- 今回の議論がADA分析に関する疑問を解決する一助となることを期待する.

DGポスター意見交換会 Q&A-1

Q1: 分析法について、非臨床・臨床でそれぞれどの方法を使用することが多いか?

A1: 非臨床はBridging、臨床は酸解離から始めるケースが多い。

Q2: 中和抗体分析法開発はどこ部署で実施しているか? 各社の対応を知りたい。

A2: CMCと薬物動態と協同で分析系の構築を行っている。
臨床、非臨床で主導している部署が異なる。

Q3: 臨床における中和抗体実施のタイミングは?

A3: 臨床ではP2から実施のケースが多かった。
非臨床ではNabはしないことが多い(あくまで動物の例ということ)。

Q4: GuidanceではCBA推奨だが、LBAも許容と思う。どちらを選択する?
CBAを選択しない場合、当局と相談するのか?

A4: MoAやモダリティに応じて系を選択することが望ましい。
アンタゴニスト型かアゴニスト型によっても変わると思う。

Q5: 中和抗体バリデーションはいつまでに用意しておけばよい？

A5: なるべく早めに着手しておいた方が安心。
P2までに、と思っているとあっという間にP2になっている。
PJが1st trackか否か等でも変わってくる。
最近は当局のADAに対する意識が高く、実施タイミングが早まっているのではないか？

Q6: ADA分析とNAb分析のPCは同一のものを使用するか？

ADAはポリクロ、NAbはエピトープに対するモノクロを使用する？

A6: ADA分析で使用するポリクロで中和活性があれば、同一のポリクロを第一選択とする。