



Ligand Binding Assay (LBA) における ADA分析法開発基礎講座

Basic lecture on analytical method development for ADA in LBA

2023年3月1日

株式会社新日本科学 安全性研究所

野村 達希

- LBAにおける抗薬物抗体 (Anti-Drug Antibody: ADA) の分析法開発を始めようとする方や最近始めたばかりの方へ向けた基礎講座となります。
- バリデーションや実試料分析で堅牢な分析法を用いるには、適切に分析法開発を行うことが重要となります。
- 分析法プラットフォームや装置の選択及び留意すべき事項を含めて、分析法開発の進め方の一例を紹介します。
- 以下の動画も参照いただければ幸いです。

LBA分析法開発基礎講座: <https://www.youtube.com/watch?v=A1h6YgxNyrg>

LBAの技術的基礎講座: <https://www.youtube.com/watch?v=TFvDC1RsQh4>

LBAを用いた測定法についてのQ&A: <https://www.youtube.com/watch?v=ruP-p0psiWc>

発表内容に関連し、開示すべきCOI関係にある企業、組織、団体等はありません。

発表内容は個人の考えを示すものであり、所属企業の考えを示すものではありません。

- ADA分析の目的
- ADA分析法開発
 - ADA分析の段階的評価, 分析法のライフサイクルマネジメントの重要性
 - 分析法開発を行う上での5つの重要因子
- ADAにおける装置及び分析法プラットフォーム
 - 分析法の特徴, プラットフォームの一例
- 感度とDrug Tolerance Limit (DTL)
- 重要試薬
- Minimum Required Dilution (MRD)
- バリデーションに入るまでの検討項目 (選択性, 感度及びDTL)

ADA分析の目的

- ICHS6 (R1) では・・・,
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。・・・(中略)・・・, この種の**医薬品の投与に伴い産生された抗体を測定し、抗体反応の特性を明らかにし、薬理学的又は毒性学的変化との関連性について検証**しなければならない。
- ADA分析は非臨床・臨床における薬物投与によって、生体内のADA産生の有無とADA特性変化を評価するために実施する分析である。また、**薬効、安全性及び薬物動態を適切に解釈**するうえでも重要な項目となる。

ADA分析の目的のイメージ

例：10mg/kg 単回静脈内投与

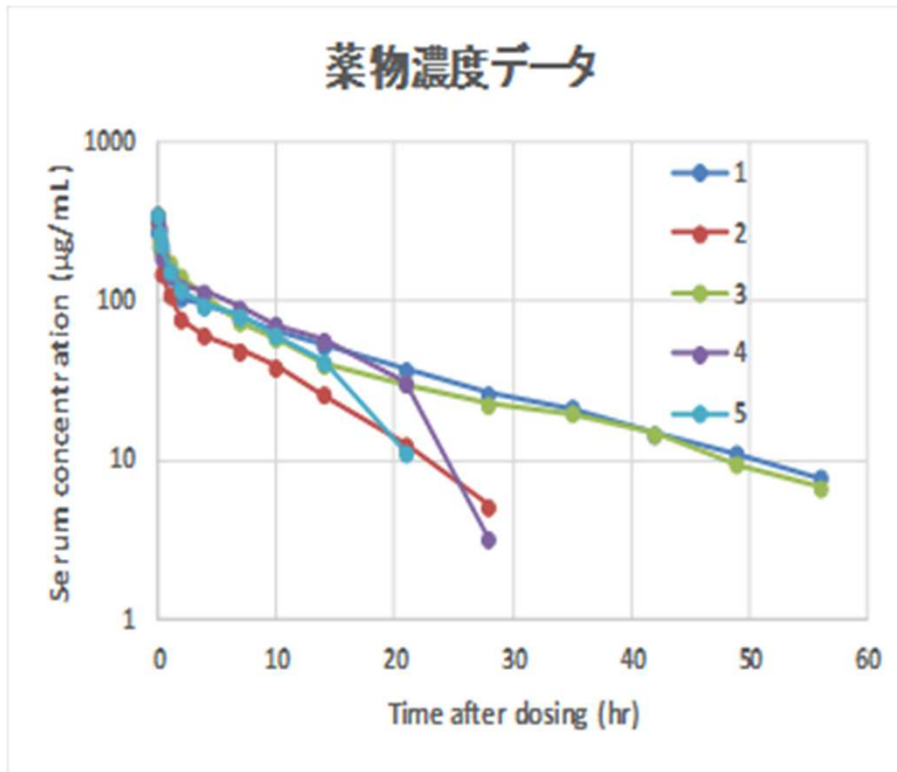


Table 4 Serum anti-COMPOUND antibody analysis in male cynomolgus monkeys

Group	Animal No.	Serum anti-COMPOUND antibody			
		Sampling point			
		Day 0 (before dosing)		Day 56	
		ADA	Titer	ADA	Titer
COMPOUND 10 (mg/kg)	1	Neg	-	Neg	-
	2	Neg	-	Positive	512
	3	Neg	-	Neg	-
	4	Neg	-	Positive	8192
	5	Neg	-	Positive	2048

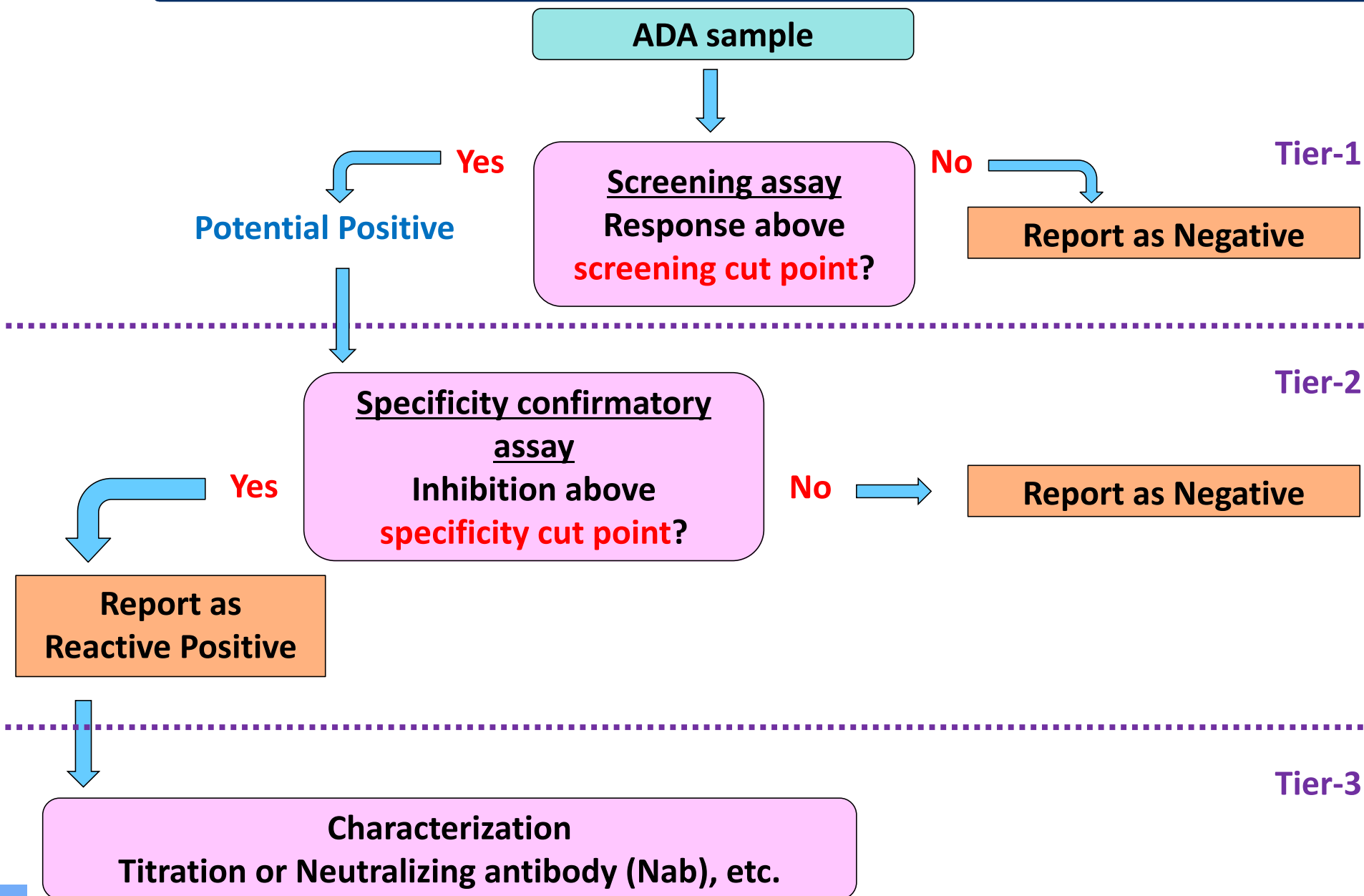
Neg: Negative, -: Not tested

急激な薬物濃度の減衰

薬物動態との因果関係を明確にする

ADA産生の有無

ADA実試料分析の段階的評価





ライフサイクルマネジメント

Life Cycle Management

- | | |
|--------------------------------|--------|
| 1. Method Development | 条件検討 |
| 2. Method Qualification | 適格性検証 |
| 3. Method Validation | 信頼性保証 |
| 4. Sample Analysis | 実試料分析 |
| 5. Partial or Cross Validation | 必要に応じて |

この間の分析法パフォーマンスをモニターすることが重要

- 重要試薬やカットポイントなど

5つの重要因子

アッセイプラットフォーム

- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Electrochemiluminescence Immunoassay (ECLIA), Gyrolabなど

感度とDrug Tolerance Limit

- 達成すべき感度は？
- 達成したいDrug Tolerance Limitは？, 酸処理分析の適用の有無

同時に
考慮

重要試薬

- 重要試薬の組み合わせ・設定濃度

Minimum Required Dilution (MRD)

- 最適なMRDは？

Cut point

- 健康成人・患者マトリックス？

別の機会でご紹介



アッセイプラットフォーム

項目	ELISA	ECLIA	Gyrolab
検出レンジ	△	◎	○
サンプル使用量	○	◎	◎
マトリックス効果	○	◎	◎
スループット	○	○	◎
コスト	◎	○	○
トレース	○	○	◎

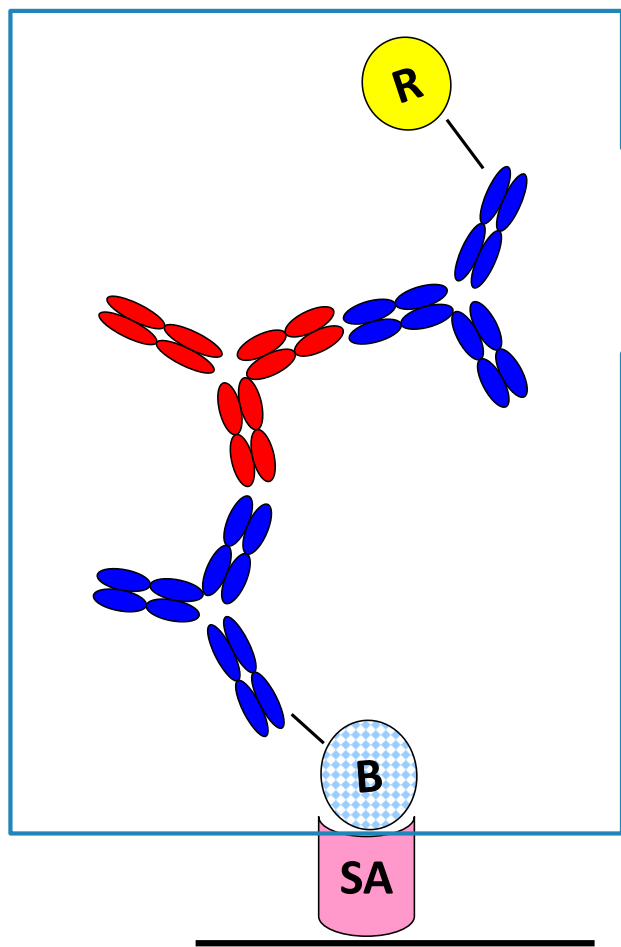
<http://bioanalysisforum.jp/>

最終的に、目的に応じたAssay Platformの選択が重要である。

→DG2015-19参照

アッセイプラットフォーム

一例：ECLIA (MSD Bridging Assay)

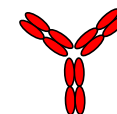


- Assay procedure -

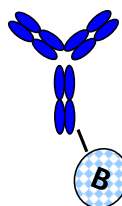
- Combine biotin-labeled drug and ruthenium-labeled drug, and sample in P.P. plate
- Incubate for overnight
- Transfer to pre-blocked Streptavidin plate
- Incubate for 2-hours
- Wash plate
- Add Read buffer
- Read plate on SECTOR



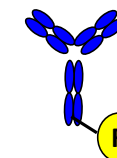
MSD Streptavidin plate



Anti-drug antibody (ADA)



Biotin-labeled drug



Ruthenium-labeled drug



感度 : *Sensitivity*

Target Sensitivity



抑えておくべきポイント!

- 前臨床: 500又は1000 ng/mL以下¹⁾
- 臨床: 100 ng/mL以下²⁾

メモ

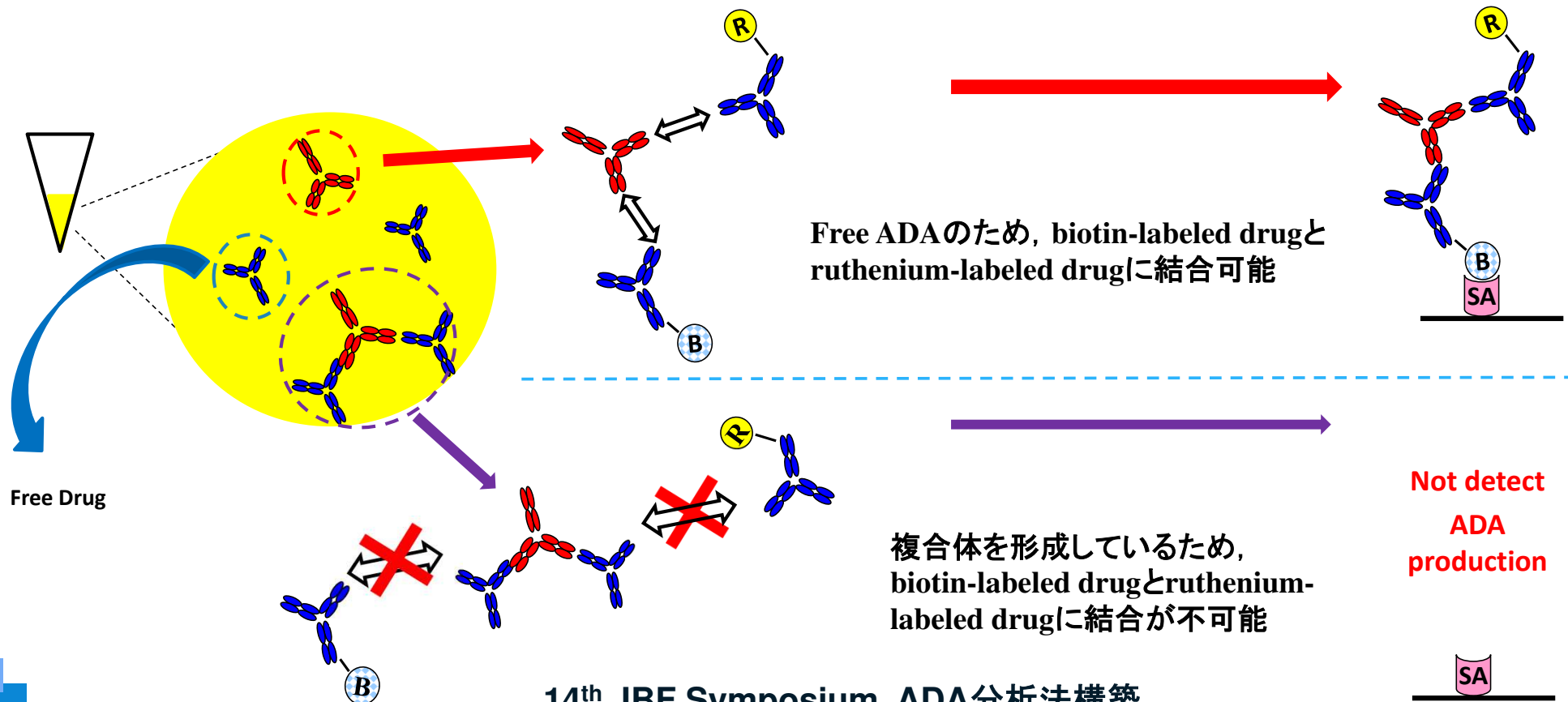
1) では500又は1000 ng/mL以下の感度を推奨していたが, 2) にともない, 100 ng/mLの感度達成を考慮する企業が増加している.

- 1) Mire-Sluis, A.R.; Barrett, Y.C.; Devanarayan, V.; Koren, E.; Liu, H.; Maia, M.; Parish, T.; Scott, G.; Shankar, G.; Shores, E.; Swanson, S.J.; Taniguchi, G.; Wierda, D.; Zuckerman, L.A. Standardization Recommendation for the design and optimization of immunoassays used in the detection of host antibodies against biotechnology products. *Journal of Immunological Methods*. 2004, 289 (1-2), p.1-16.
- 2) Guidance for Industry Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products —Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection, Food and Drug Administration, January 2019

Drug Tolerance Limit

Drug Tolerance Limit (DTL) 抑えておくべきポイント!

血清又は血漿等の生体試料中に共存する薬物 (Drug) と ADA が免疫複合体を形成することで、ADA の検出が妨げられる場合がある。共存薬物の影響を受けずに 分析系が ADA を検出することが可能な共存薬物の限界濃度値のことを指す。





Drug Tolerance Limit

Drug Tolerance Limit (DTL) 🔍 抑えておくべきポイント!

- DTLの値が高ければ高いほど、共存薬物の影響を受けずにADAを検出できる高いパフォーマンスの分析系である。
- 感度については推奨感度という形で明確な目標値があるが、DTLについては一般的な目標値はない。
- 予定している動物試験や治験における共存薬物の影響を考慮し、目標とするDTLを明確にする必要性がある。
- DTLを改善する手法として、酸解離法がある。



DTLの改善

酸解離法 (Acid Dissociation Treatment)

本来のADA productionを判定するには、免疫複合体を解離してADAを検出する必要がある。その方法として、ADA分析におけるDTLを改善することを目的として、

酸添加により免疫複合体を解離させ、共存薬物の影響を低減してADAを検出する方法を指す。

Method	Terms	Description
Meso Scale Discovery [®] bridging	MSDB	マスターミックス(ビオチン系薬剤+ルテニウム系薬剤)と反応させる前に、ADAとDrugの複合体を酸で解離する方法
Solid-phase extraction with acid dissociation	SPEAD	ビオチン標識DrugとADAを反応させ、アビジンプレート上で反応させた後、酸処理によりADAを精製する方法
Affinity capture elution	ACE	SPEADを始める前に、合計2回の酸解離を行う



DTLの改善

LY1 – LY4 : Therapeutic humanized monoclonal antibodies
LY5 : Fc-fusion protein, LY6 : Pegylated protein

Table 2. Sensitivity and drug tolerance values for the four humanized monoclonal therapeutics (LY1–4), the Fc-fusion protein (LY5), and the Pegylated protein (LY6) in the three different assay formats tested. Drug tolerance was not evaluated for LY5 and LY6 by MSDB owing to insufficient sensitivity.

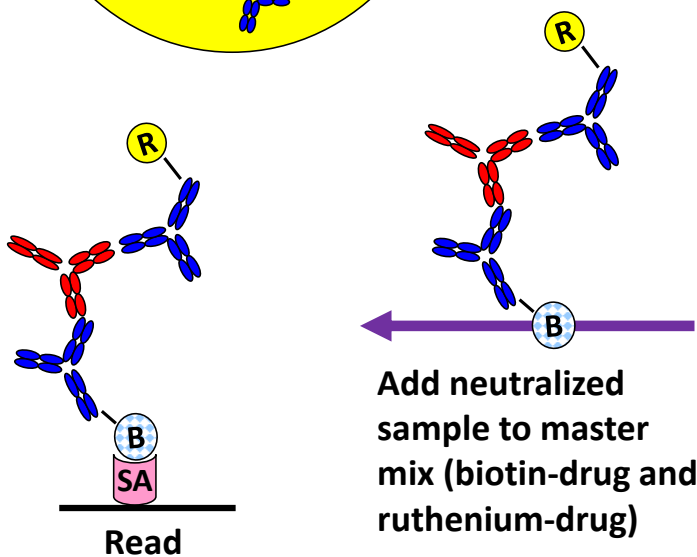
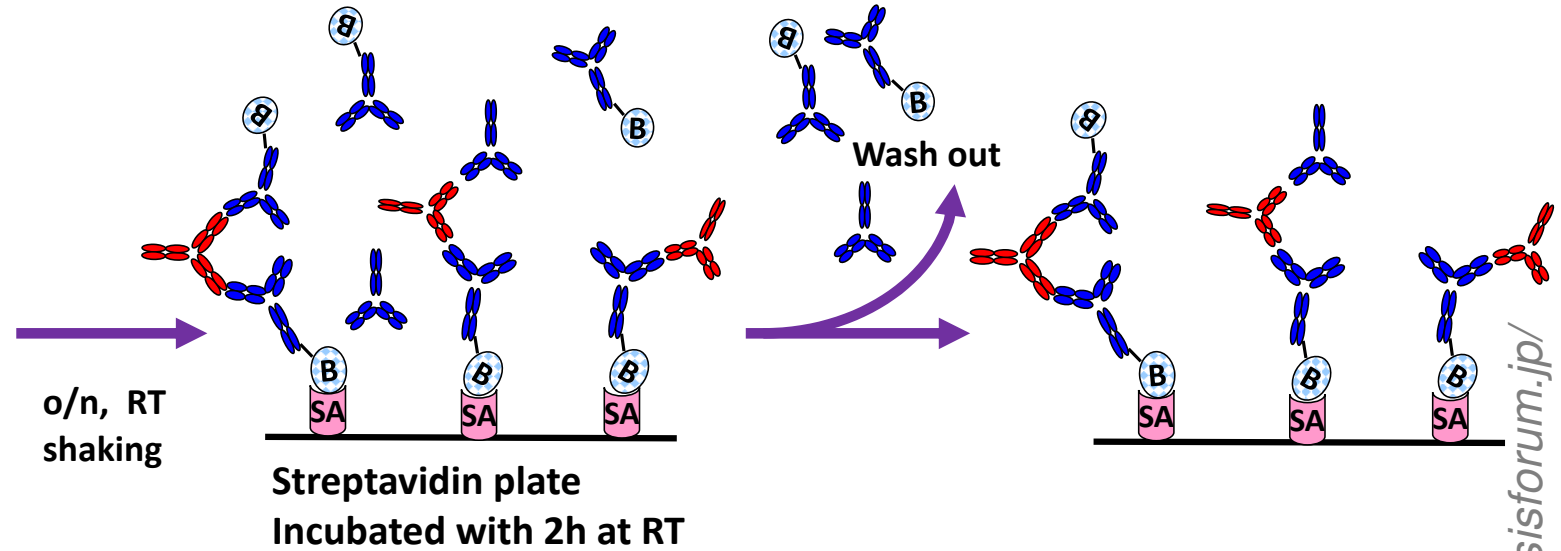
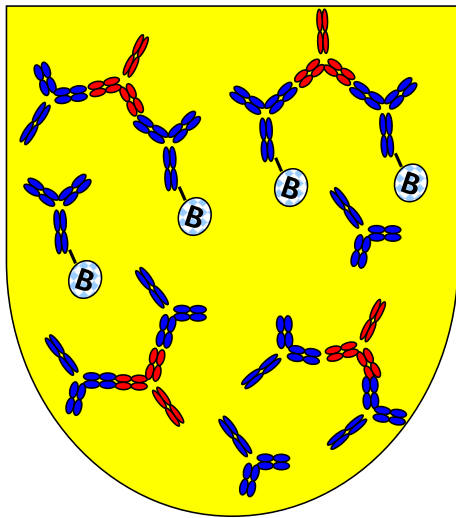
Monkey ADA serum	Control antibody sensitivity (ng/ml)			Drug tolerance ($\mu\text{g/ml}$) at 500 ng/ml analyte		
	MSDB	SPEAD	ACE	MSDB	SPEAD	ACE
LY1	125	40	16	50	500	50
LY2	62.5	8	30	50	500	200
LY3	250	125	16	25	100	200
LY4	250	160	40	50	80	62.5
LY5	2000	62.5	125	N/A	5	10
LY6	1000	8	500	N/A	10	1

ACE: Affinity capture elution; ADA: Anti-drug antibody; LY: Lilly compound; MSDB: Meso Scale Discovery® bridging; SPEAD: Solid-phase extracton with acid dissociation.

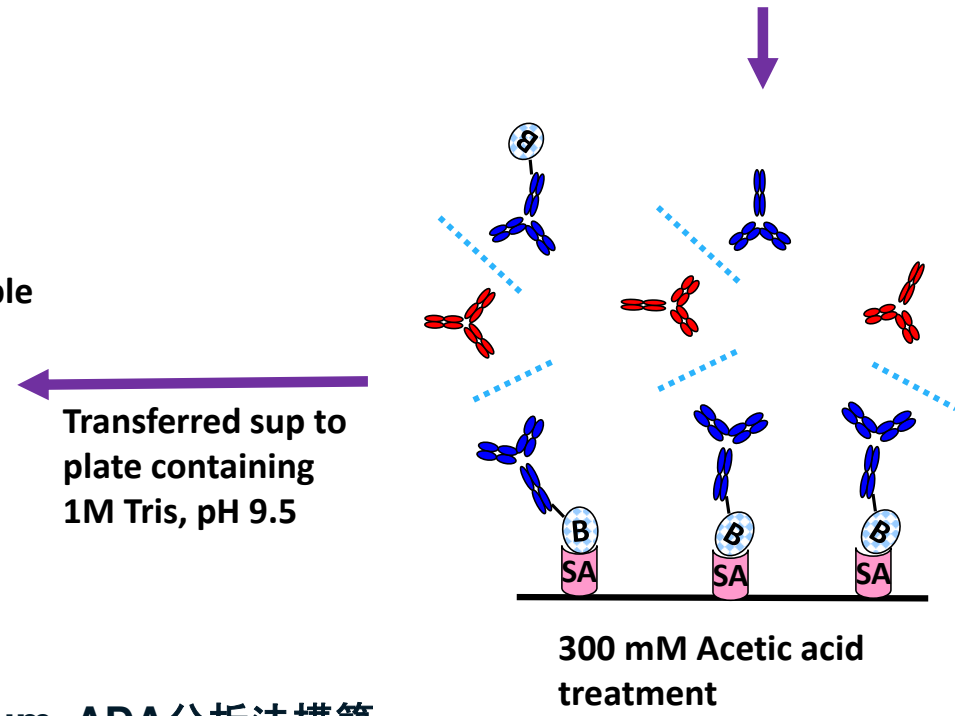
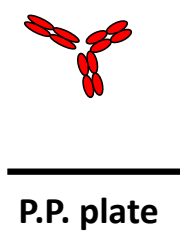
<http://bioanalysisforum.jp/>

SPEAD Assay

Biotin-drug + Sample (ADA)



Neutralized sample



<http://bioanalysisforum.jp/>



重要試薬

□ 陽性対照 (Positive control)

- サル又はウサギを免疫動物として作製
- Protein A/Gを用いてIgGの精製
- 抗原アフィニティ精製
- ヒトIgG交差性除去

□ 抗原(免疫除去): 被験物質

□ ELISA: ビオチン標識, HRP標識, ジゴキシゲニン標識

□ ECLIA: ビオチン標識, ルテニウム標識

□ Gyrolab: ビオチン標識, アレクサフルオロ標識



重要試薬

□ 陽性対照 (Positive control)

Rabbit		Cynomolgus monkey
<ul style="list-style-type: none"> □ Animal price is reasonable □ Easy to transport the sample □ Low individual difference □ Easy production of ADA 	Advantages	<ul style="list-style-type: none"> □ Phylogenically similar to humans □ Used in toxicity studies □ Large amount of circulating blood □ Weak immune response to constant domain of immunoglobulin [antigen: human (like) IgG]
<ul style="list-style-type: none"> □ Strong immune response to constant domain of immunoglobulin [antigen: human (like) IgG] <p>⇒ If necessary, purified antibodies should be adsorbed using a human IgG coupling column.</p>	Disadvantages	<ul style="list-style-type: none"> □ Animal price is expensive □ Cumbersome to transport (Washington convention, zoonosis) □ High individual difference

重要試薬

各標識体の至適濃度検討(一例)

Ruthenium-labeled Drug

		3 $\mu\text{g/mL}$			1 $\mu\text{g/mL}$			0.3 $\mu\text{g/mL}$			0.1 $\mu\text{g/mL}$			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Biotin-labeled Drug	3 $\mu\text{g/mL}$	A	100	1	0	100	1	0	100	1	0	100	1	0
		B	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL
	1 $\mu\text{g/mL}$	C	100	1	0	100	1	0	100	1	0	100	1	0
		D	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL
	0.3 $\mu\text{g/mL}$	E	100	1	0	100	1	0	100	1	0	100	1	0
		F	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL
	0.1 $\mu\text{g/mL}$	G	100	1	0	100	1	0	100	1	0	100	1	0
		H	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL

重要試薬

各標識体の至適濃度検討

Biotin-labeled drug solution (µg/mL)	Parameter	Ruthenium-labeled drug solution (µg/mL)											
		3			1			0.3			0.1		
		Positive control concentration (ng/mL)											
		100	1	0	100	1	0	100	1	0	100	1	0
3	AV	1871	426	413	2940	484	470	7928	603	543	16968	478	339
	S/N ratio	4.5	1.0	N.C.	6.3	1.0	N.C.	14.6	1.1	N.C.	50.1	1.4	N.C.
1	AV	1031	187	175	1701	198	196	4849	253	221	13609	263	151
	S/N ratio	5.9	1.1	N.C.	8.7	1.0	N.C.	21.9	1.1	N.C.	90.1	1.7	N.C.
0.3	AV	494	96	91	863	101	96	2800	122	99	9808	154	79
	S/N ratio	5.4	1.1	N.C.	9.0	1.1	N.C.	28.3	1.2	N.C.	124.2	1.9	N.C.
0.1	AV	250	69	69	449	71	70	1578	79	70	6739	115	58
	S/N ratio	3.6	1.0	N.C.	6.4	1.0	N.C.	22.5	1.1	N.C.	116.2	2.0	N.C.

AV : Analysis value, N.C. : Not calculated

S/N ratio : Signal to noise ratio = signal of positive control spiked sample / signal of 0 ng/mL sample



MRD

実施内容実例

- 陽性対照を緩衝液で公比3で段階希釈して測定（緩衝液を0 ng/mL試料）
- 6個体の個体別ブランク血清を緩衝液で10, 20及び100倍希釈（10, 5, 1%血清）
- 陽性対照を6個体のマトリックス含有緩衝液（10, 5, 1%血清）で100, 10, 1 ng/mLに希釈（マトリックス含有緩衝液を0 ng/mL試料）

着目点

- 6個体の0 ng/mL試料の個体間差
- 6個体の100, 10, 1 ng/mL試料の個体間差
- マトリックスフリー試料と6個体の差異（参考レベル）

MRD

<Buffer: Matrix free>

MRD	Percent of matrix	Parameter	Positive control concentration (ng/mL)									
			1000	300	100	30	10	3	1	0.3	0.1	0
-	0	AV	130446	39514	11202	2877	961	327	160	110	78	78
		S/N ratio	1672.4	506.6	143.6	36.9	12.3	4.2	2.1	1.4	1.0	N.C.

<Individual blank serum>

Sex	Lot No.	Parameter	Positive control concentration (ng/mL)											
			100	10	1	0	100	10	1	0	100	10	1	0
			MRD 10 (10% serum)				MRD 20 (5% serum)				MRD 100 (1% serum)			
Male	22169-006	AV	9872	869	145	66	9518	825	137	63	9395	826	141	69
		S/N ratio	149.6	13.2	2.2	N.C.	151.1	13.1	2.2	N.C.	136.2	12.0	2.0	N.C.
	22169-007	AV	12252	1178	382	293	11093	1012	253	203	9639	866	170	99
		S/N ratio	41.8	4.0	1.3	N.C.	54.6	5.0	1.2	N.C.	97.4	8.7	1.7	N.C.
	22169-008	AV	9587	1686	1037	950	9635	1270	575	509	9769	947	233	158
		S/N ratio	10.1	1.8	1.1	N.C.	18.9	2.5	1.1	N.C.	61.8	6.0	1.5	N.C.
Female	22169-031	AV	9709	858	142	66	10162	884	149	68	10100	910	148	68
		S/N ratio	147.1	13.0	2.2	N.C.	149.4	13.0	2.2	N.C.	148.5	13.4	2.2	N.C.
	22169-032	AV	17885	6902	6118	6020	14446	3843	3244	3175	10941	1501	762	710
		S/N ratio	3.0	1.1	1.0	N.C.	4.5	1.2	1.0	N.C.	15.4	2.1	1.1	N.C.
	22169-033	AV	9377	861	153	77	9918	887	156	79	10386	895	152	74
		S/N ratio	121.8	11.2	2.0	N.C.	125.5	11.2	2.0	N.C.	140.4	12.1	2.1	N.C.
	Mean		11447	2059	1330	1245	10795	1454	752	683	10038	991	268	196
	SD		3327	2394	2371	2364	1874	1181	1232	1233	563	253	244	254
	CV (%)		29.1	116.3	178.3	189.9	17.4	81.2	163.8	180.5	5.6	25.5	91.0	129.6

http://bioanalysisforum.jp/



選択性 : Selectivity

n	Analysis value		
	Serum positive control concentration (ng/mL)		
	R0	R1	R2
	0	100	600000
1	74	320	34561

MRDとしての妥当性

Sample No.	Analysis value			Difference (%)	
	Serum positive control concentration (ng/mL)			Serum positive control concentration (ng/mL)	
	S0	S1	S2	S1	S2
	0	100	600000	100	600000
Male 1	67	317	34467	-0.9	-0.3
Male 2	70	310	34025	-3.1	-1.6
Male 3	67	314	33274	-1.9	-3.7
Male 4	70	314	32740	-1.9	-5.3
Male 5	63	304	33527	-5.0	-3.0
Female 1	71	312	33744	-2.5	-2.4
Female 2	71	315	33492	-1.6	-3.1
Female 3	67	310	32933	-3.1	-4.7
Female 4	70	303	33820	-5.3	-2.1
Female 5	75	312	33528	-2.5	-3.0

Difference (%) = $(A-B) / B \times 100$

A: Analysis value of selectivity sample (S1 or S2)

B: Analysis value of reference positive control sample (R1 or R2)

感度 : Sensitivity (暫定)

n	Analysis value		
	Serum positive control concentration (ng/mL)		
	NC 0	PC1 100	PC3 600000
1	65	334	37348
2	66	332	37200
Mean	66	333	37274
Normalization factor	1.1	-	-
Screening cut point	72.6	-	-

Sample No.	Serum positive control concentration (ng/mL)	Analysis value
Sen1	0.391	65
Sen2	0.781	65
Sen3	1.56	68
Sen4	3.13	74
Sen5	6.25	85
Sen6	12.5	103
Sen7	25	135
Sen8	50	205
Sensitivity (ng/mL)		3.13



Screening cut point = Mean of analysis value of NC sample × normalization factor

http://bioanalysisforum.jp/

Drug Tolerance Limit (暫定)

n	Analysis value		
	Serum positive control concentration (ng/mL)		
	NC	PC1	PC3
	0	100	600000
1	65	334	37348
2	66	332	37200
Mean	66	333	37274
Normalization factor	1.1	-	-
Screening cut point	72.6	-	-



Sample No.	Serum antigen concentration (µg/mL)	Analysis value		
		Serum positive control concentration (ng/mL)		
		100	500	1000
DTL0	0	333	1201	2452
DTL1	0.391	120	420	1800
DTL2	0.781	82	200	1023
DTL3	1.56	71	102	512
DTL4	3.13	69	91	250
DTL5	6.25	67	68	102
DTL6	12.5	66	64	89
DTL7	25	66	66	70
DTL8	50	65	66	62
Drug tolerance limit (µg/mL)*		0.781	3.13	12.5

Screening cut point = Mean of analysis value of NC sample × normalization factor

最後に～CROの視点から～

- 現状, LBAにおけるADA分析においては, その殆どが分析法構築から始めることが多く, 移管から始まる試験は少ないのが現状である.
- ADAにおいては, 新たな分析法参入等の**Science**の面と適切なカットポイント評価等の**Regulation**の面が並行して動いている.
- この両面を踏まえた上で, 分析法構築が成り立つ事に留意する必要がある.

