

15th JBF Symposium, 2024.02.05

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

メディフォード株式会社 森 民樹



mediford
A Member of PHC Group

Mediford Corporation

はじめに

- Ligand Binding Assay (LBA) を用いた抗薬物抗体 (Anti-Drug Antibody : ADA) の分析法開発を今後始めようとしている方や最近始めたばかりの方へ向けた基礎講座です。
- 堅牢なADA分析法を構築するには、薬物やバイオマーカーの濃度分析法とは多少異なる視点をもって、分析法を開発していく必要があります。
- 本講座では、昨年の基礎講座*で紹介されたADA分析法開発の基本的な進め方を踏まえて、さらにカットポイントの設定にも触れながら、その手順や考え方、留意すべき事項などについて基礎的な部分を説明します。

*) 14th JBF Symposium, 2023.03.01 「LBAにおけるADA分析法開発基礎講座」
https://bioanalysisforum.jp/images/2022_14thJBFS/LBA_ADA_nomura.pdf

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。

本日の発表内容

- 免疫原性評価について
- アッセイプラットフォームについて
- 薬物濃度分析法と**ADA**分析法の違い
- **ADA**分析法開発の流れ
- **ADA**分析における評価ストラテジー
- カットポイント設定の流れと議論のポイント
- **ADA**分析法開発時における留意点

免疫原性評価について

免疫原性 (**Immunogenicity**) とは、免疫系を刺激して抗体産生や細胞性免疫を誘導する性質

● Wanted

代表的なものは、ワクチンに関連した免疫応答であり、抗原（ワクチン）を投与することで病原体に対する免疫応答を誘発し、将来の暴露やその影響から生体を保護することを目的とした、意図的な免疫反応

● Unwanted

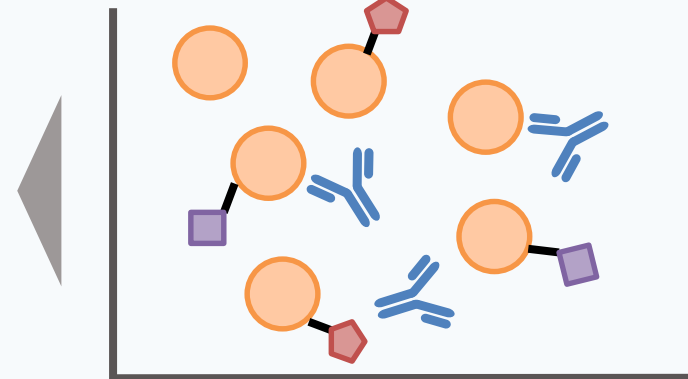
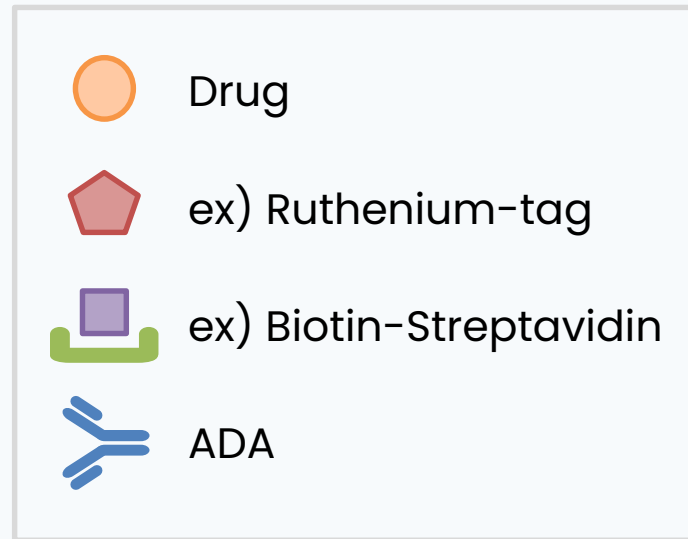
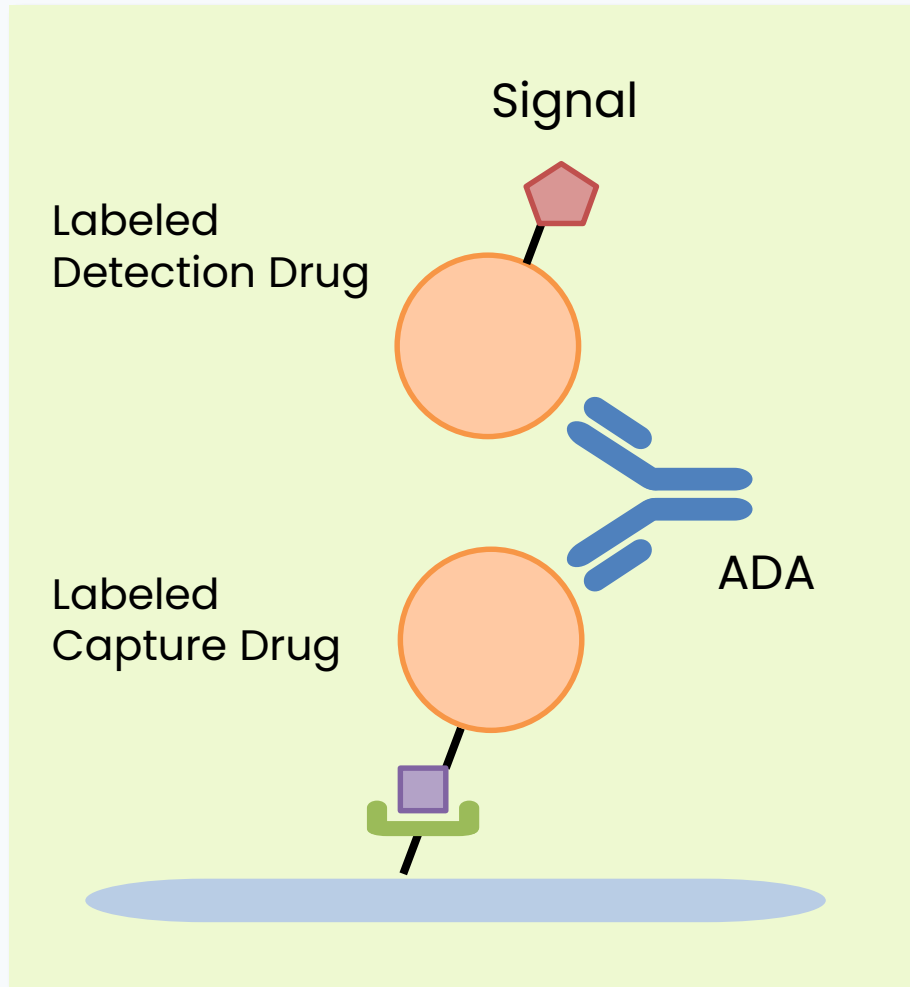
バイオ医薬品などの投与に関連した免疫応答であり、一部の患者で抗薬物抗体 (Anti-drug antibody: ADA) の産生をもたらし、医薬品の効果に影響を及ぼし、また潜在的に有害事象を誘発する可能性をもつ免疫反応

※ADAの産生は、投与薬物の薬効、安全性及び薬物動態にも影響 (⇒ADA産生による各データへの影響を把握することは、非臨床試験における評価目的のひとつ)

評価目的によって求められる評価基準も異なる点に留意する

アッセイプラットフォームについて

Bridging Assay



ECLIA (MSD Bridging Assay)

アッセイ手順

- 標識薬物 (biotin-labeled capture drug, ruthenium-labeled detection drug) と測定サンプルを混和し、インキュベーション
- 反応液をブロッキング済みの Streptavidin coated plate に移してインキュベーション
- プレートを洗浄後、Read buffer を加えて、検出装置で測定

	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

薬物濃度分析法とADA分析法の違い

In LBA	PK	ADA
分析対象	薬物	薬物に対するポリクローナル抗体 (多様性をもつ)
分析法	定量分析	定性または半定量分析
参照物質	標準物質	代替とする陽性対照 及び陰性対照
検量線	あり	なし
感度	分析法としての精度管理基準を みたす最低濃度	もちいた陽性対照における 見かけの数値 (カットポイントに基づく)
報告結果	質量単位	主に、陽性/陰性、力価
精度と真度	両方を評価	精度のみ評価

ADA分析法開発の流れ（例）

分析法開発

- アッセイプラットフォームの選択
- 重要試薬の準備と濃度条件等の検討
- 最小希釈倍率（Minimum Required Dilution, MRD）の確認
- 感度と共存薬物耐性（Drug Tolerance Limit, DTL）の確認
- 選択性の確認
- **カットポイント設定の準備**



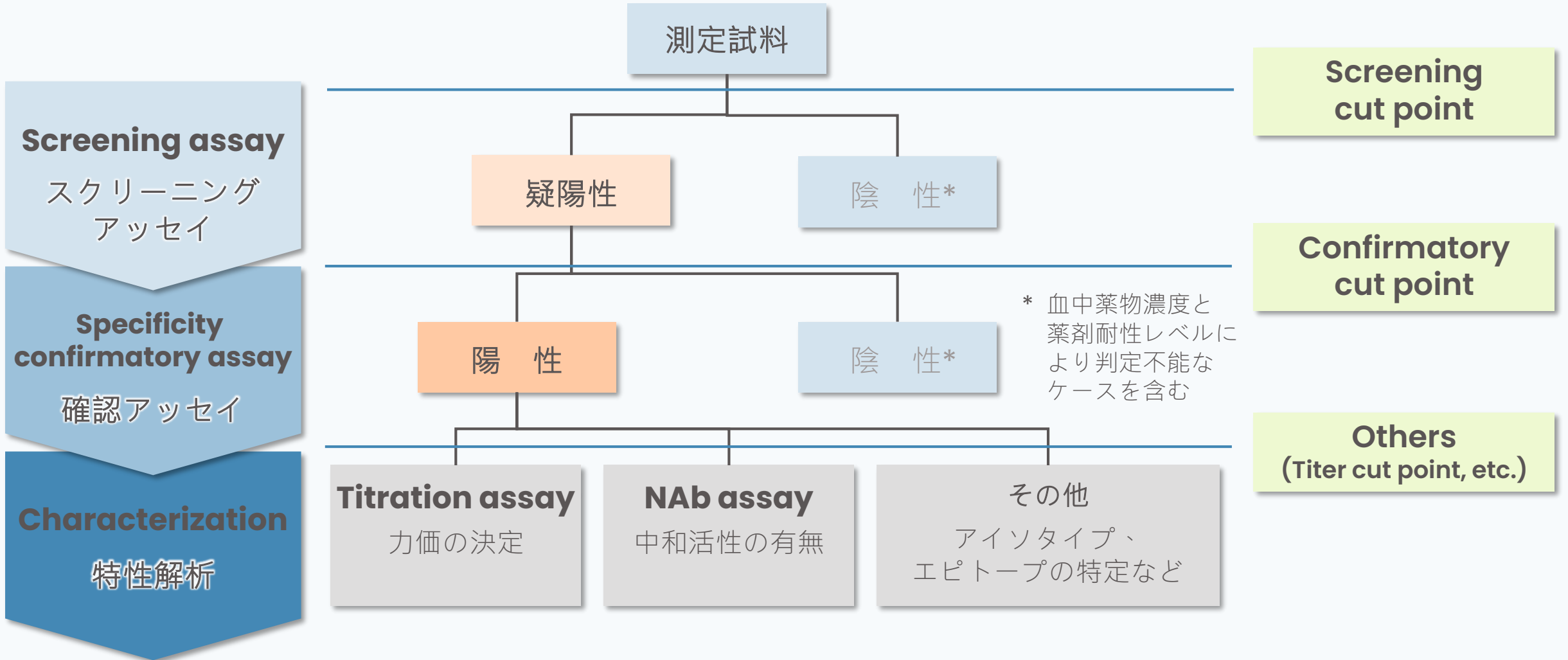
分析法バリデーション

- カットポイントの設定（pre-study）
- 特異性
- 選択性
- 精度
- 感度（検出下限）
- フック効果（レスポンスの直線性）
- 共存薬物耐性（DTL）

*) 14th JBF Symposium, 2023.03.01 「LBAにおけるADA分析法開発基礎講座」
https://bioanalysisforum.jp/images/2022_14thJBFS/LBA_ADA_nomura.pdf

ADA分析における評価ストラテジー

- 多段階アプローチ

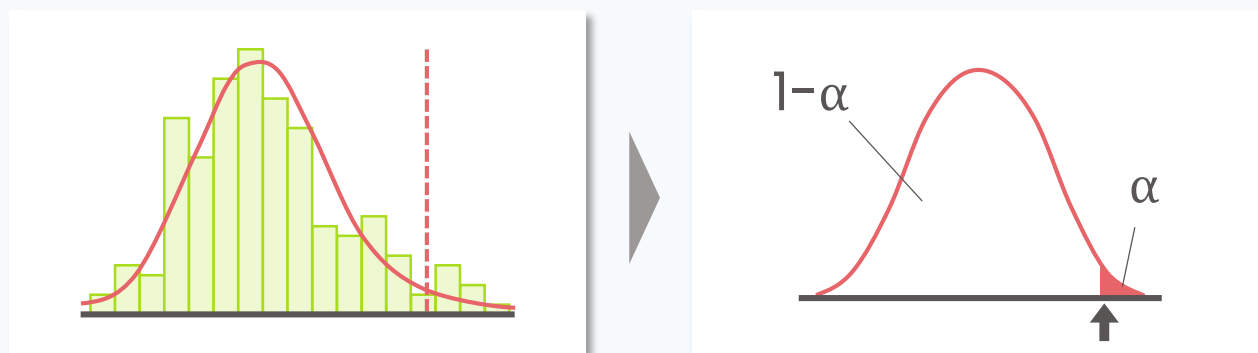


各段階のカットポイント

Screening cut point, Confirmatory cut point, Titer cut point, etc.

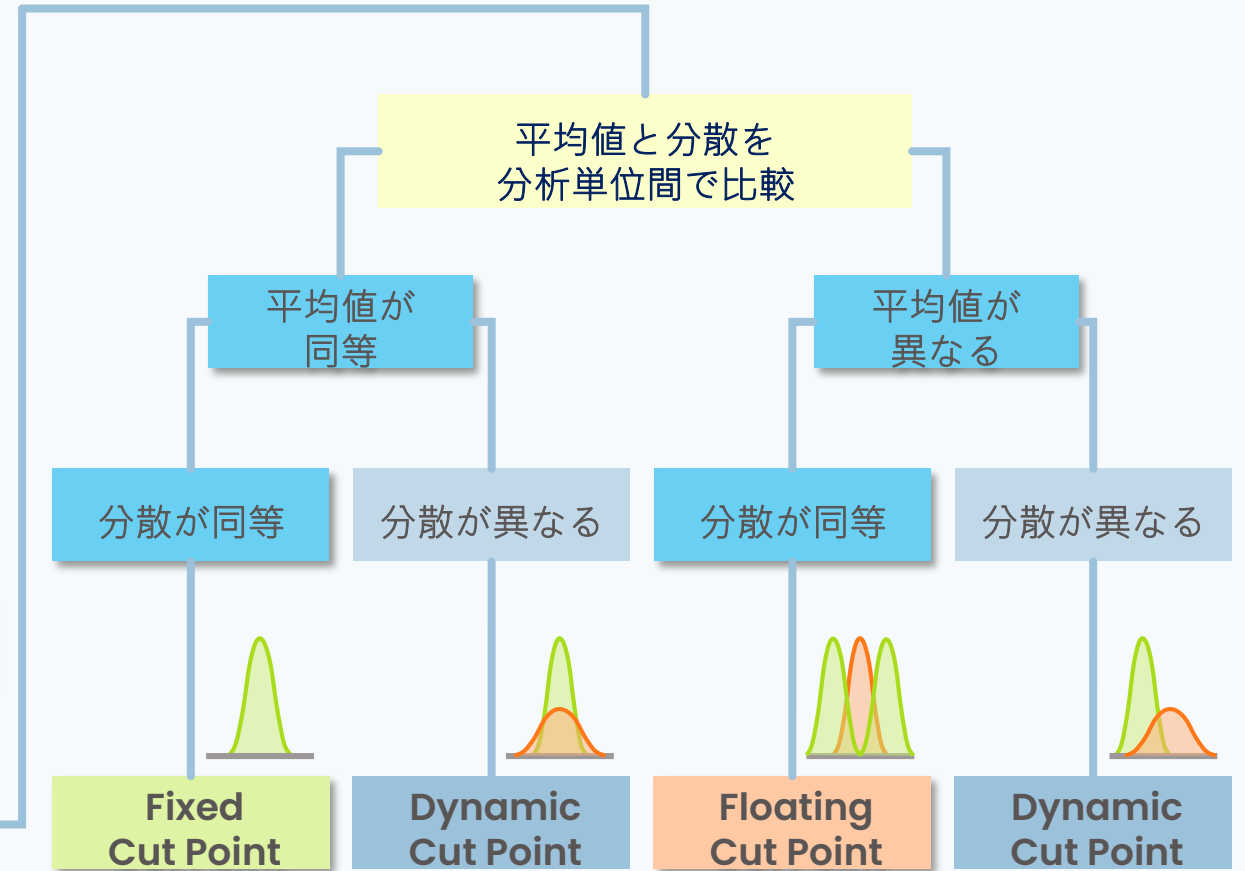
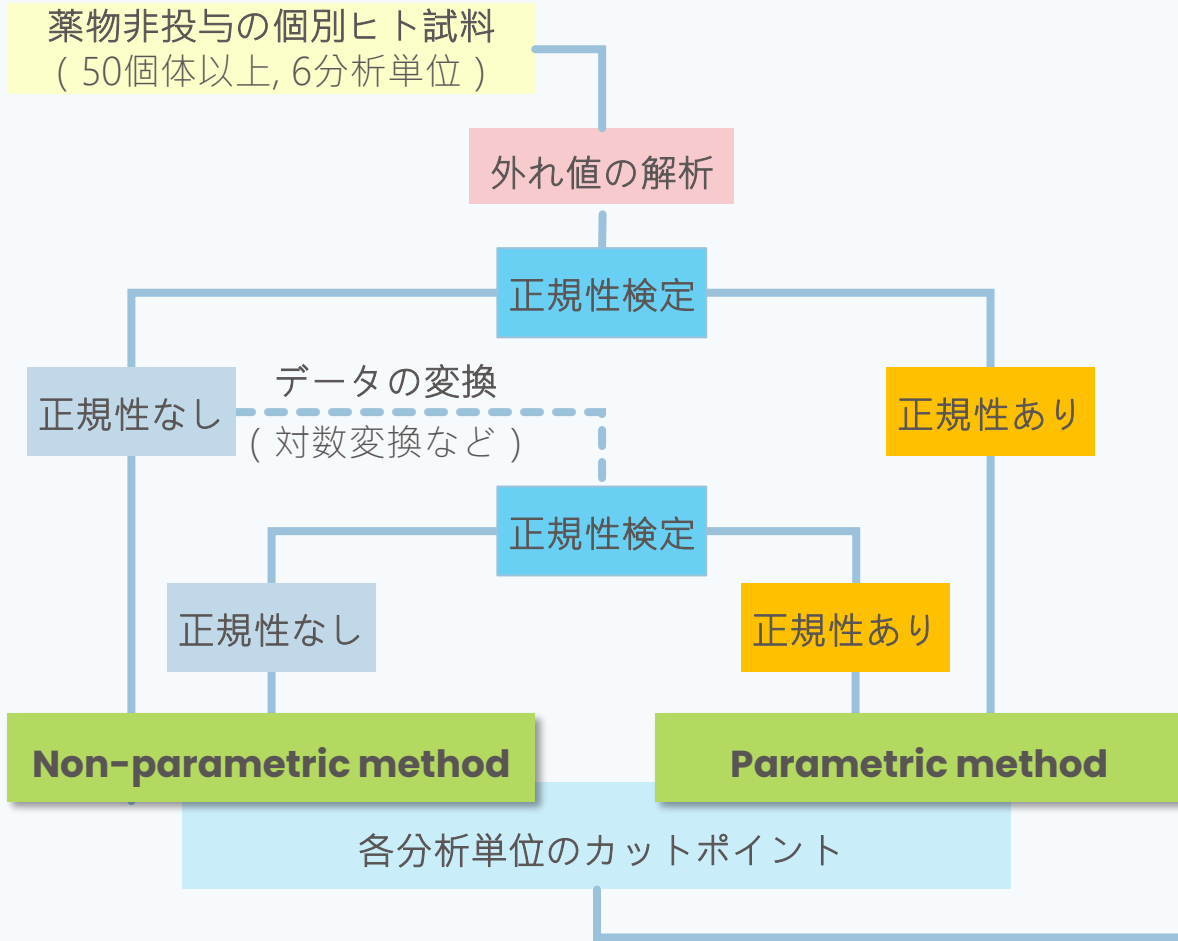
それ以上の時にサンプルが「**Reactive**」 (Potential positive) 、
それ未満の時におそらく「**Negative**」である、と判定されるスクリーニングアッセイにおけるレスポンスレベル、と定義される。

リスクベースアプローチに基づけば、スクリーニングにおいては
「**False-negative (偽陰性)**」よりも「**False positive (偽陽性)**」をもつことが適当である。

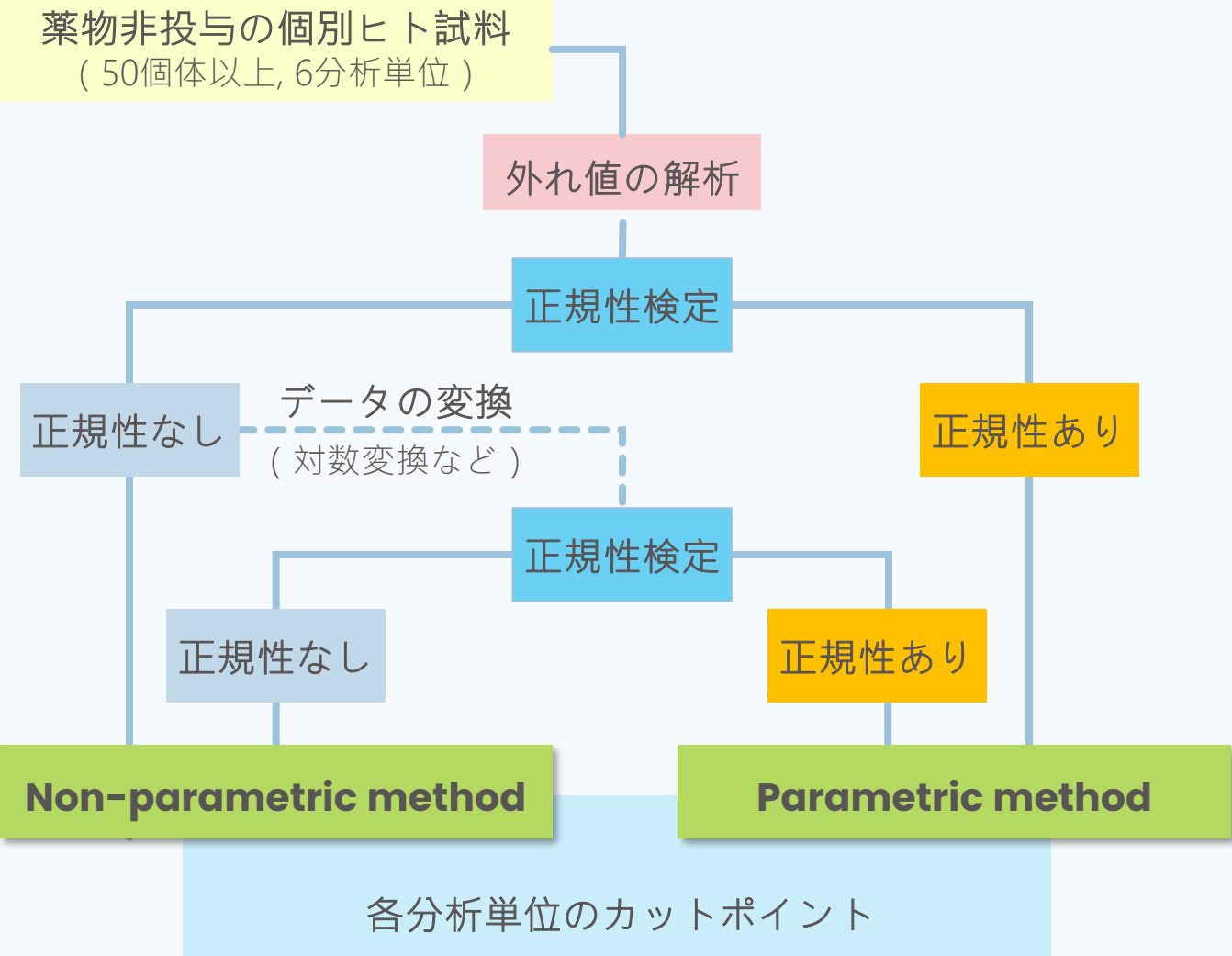


薬物非投与の (**naïve** な) 集団から得られるバックグラウンドレベルのレスポンス分布から、一定の偽陽性率を考慮した閾値として統計手法を用いて設定

カットポイント算出フローの一例

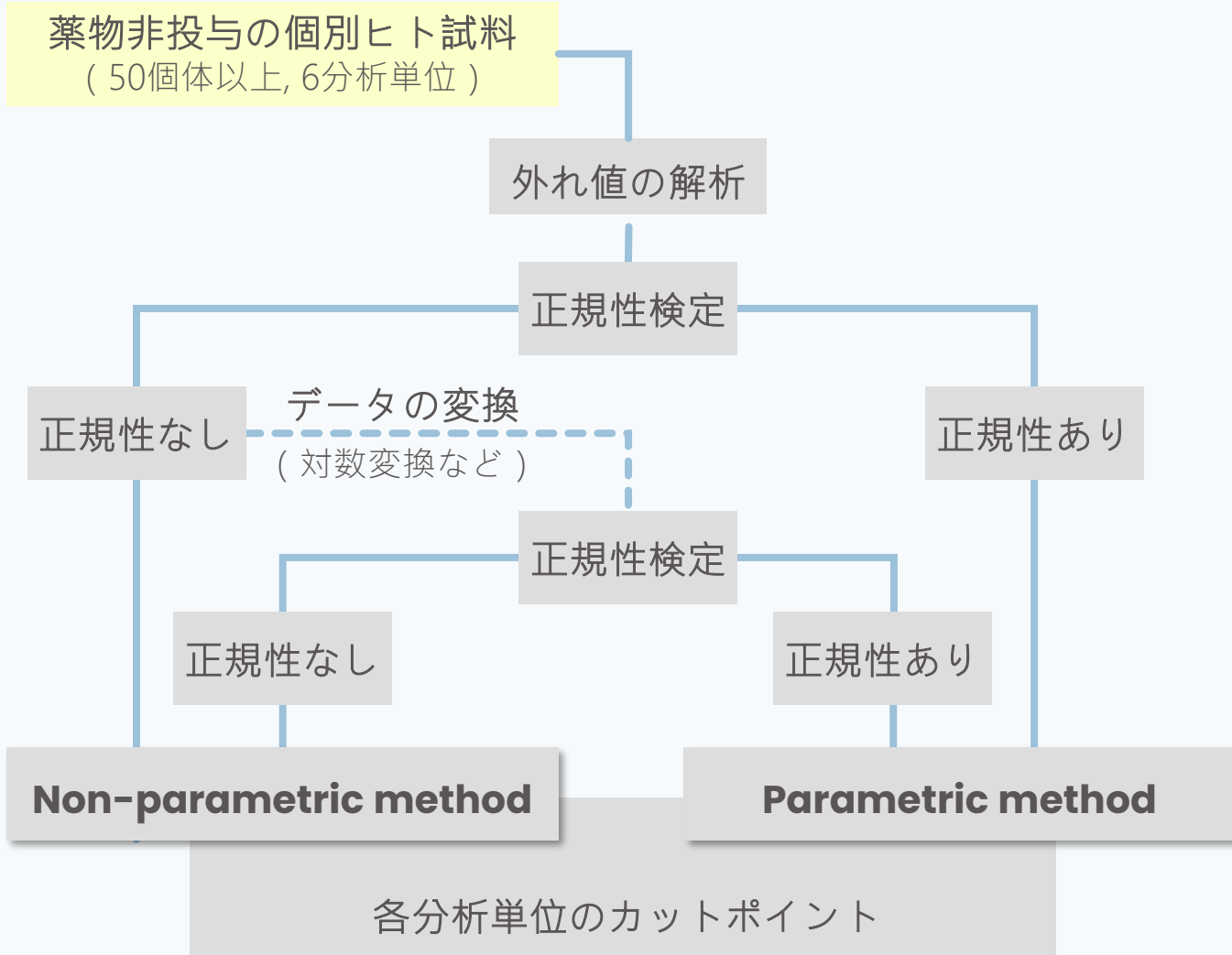


カットポイント算出フローの一例 (1/2)



薬物非投与の個別試料
(Negative sample)
から
各分析単位のカットポイントを
算出するまでの流れ

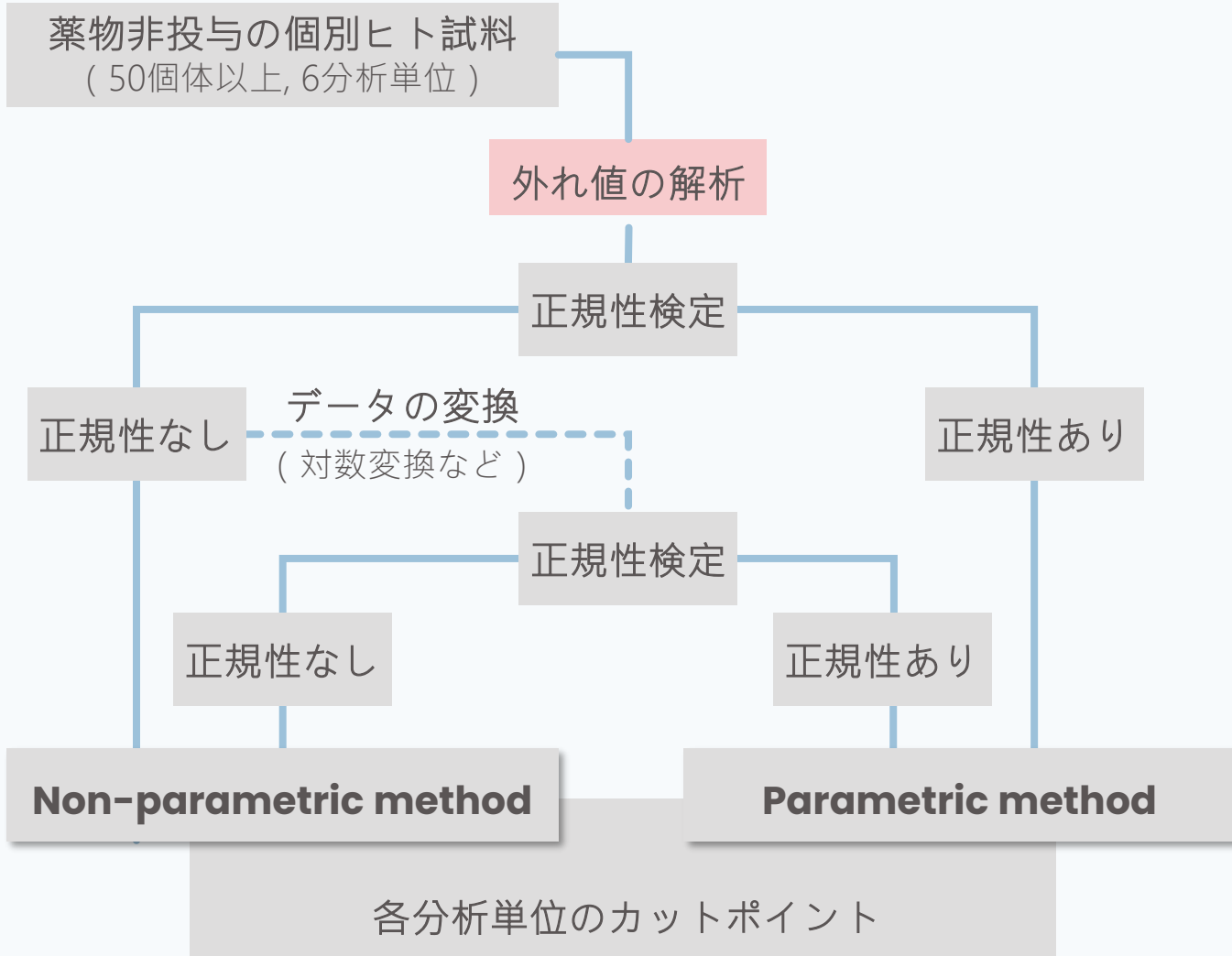
カットポイント算出フローと議論のポイント



Negative sample の選択

- 市販の個別マトリックスを利用するケースが一般的
 - ・ 被験者集団を代表するものであるか
 - ・ 健常群か疾患群か
- 実試験の投与前試料を使用することも可能
 - ・ サンプルサイズは適切か

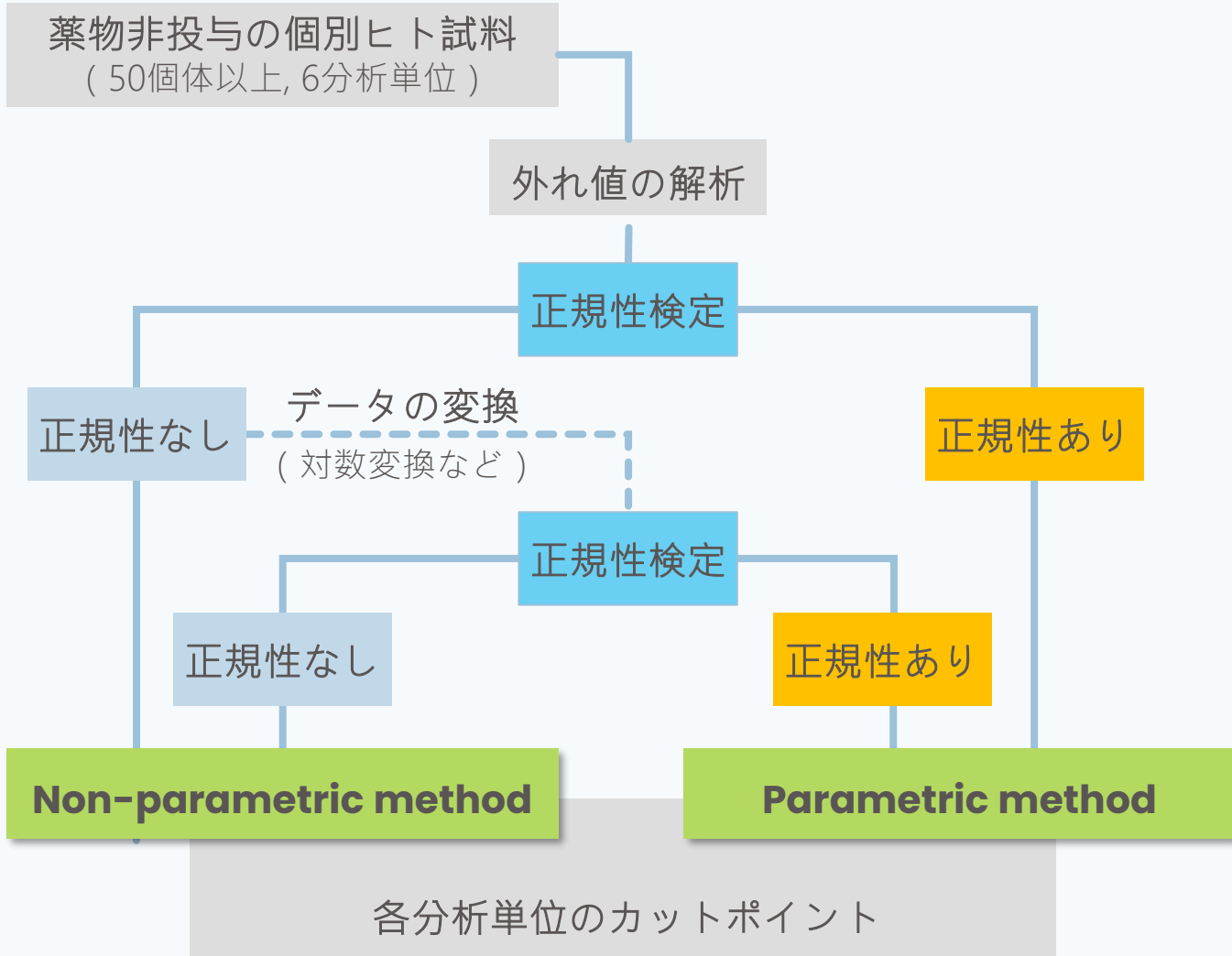
カットポイント算出フローと議論のポイント



外れ値の解析

- 外れ値の除外の要否
- 外れ値の評価方法と基準
- 外れ値の評価タイミング
- Analytical (technical) / Biological (subject-level) outlier の評価の要否

カットポイント算出フローと議論のポイント

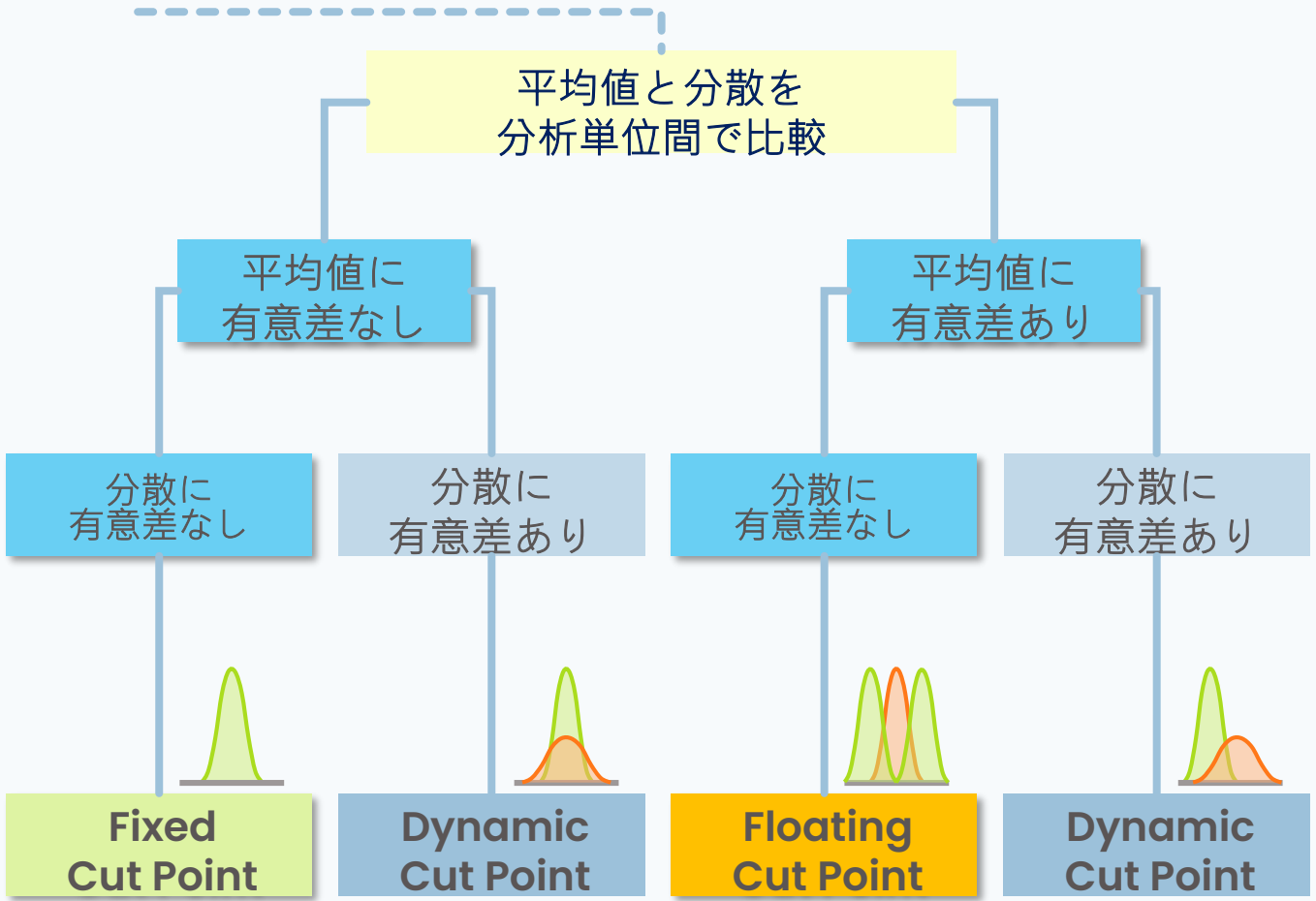


データ分布の確認

- 正規性や歪度の評価
- データ変換とその要否
(対数変換やS/N [Signal/noise] 比など)
- カットポイント算出のための統計手法の選択
- 危険率 (偽陽性率) の設定

カットポイント算出フローの一例 (2/2)

各分析単位のデータ分布から
分析の変動を評価し、
カットポイントのタイプを
選択するまでの流れ



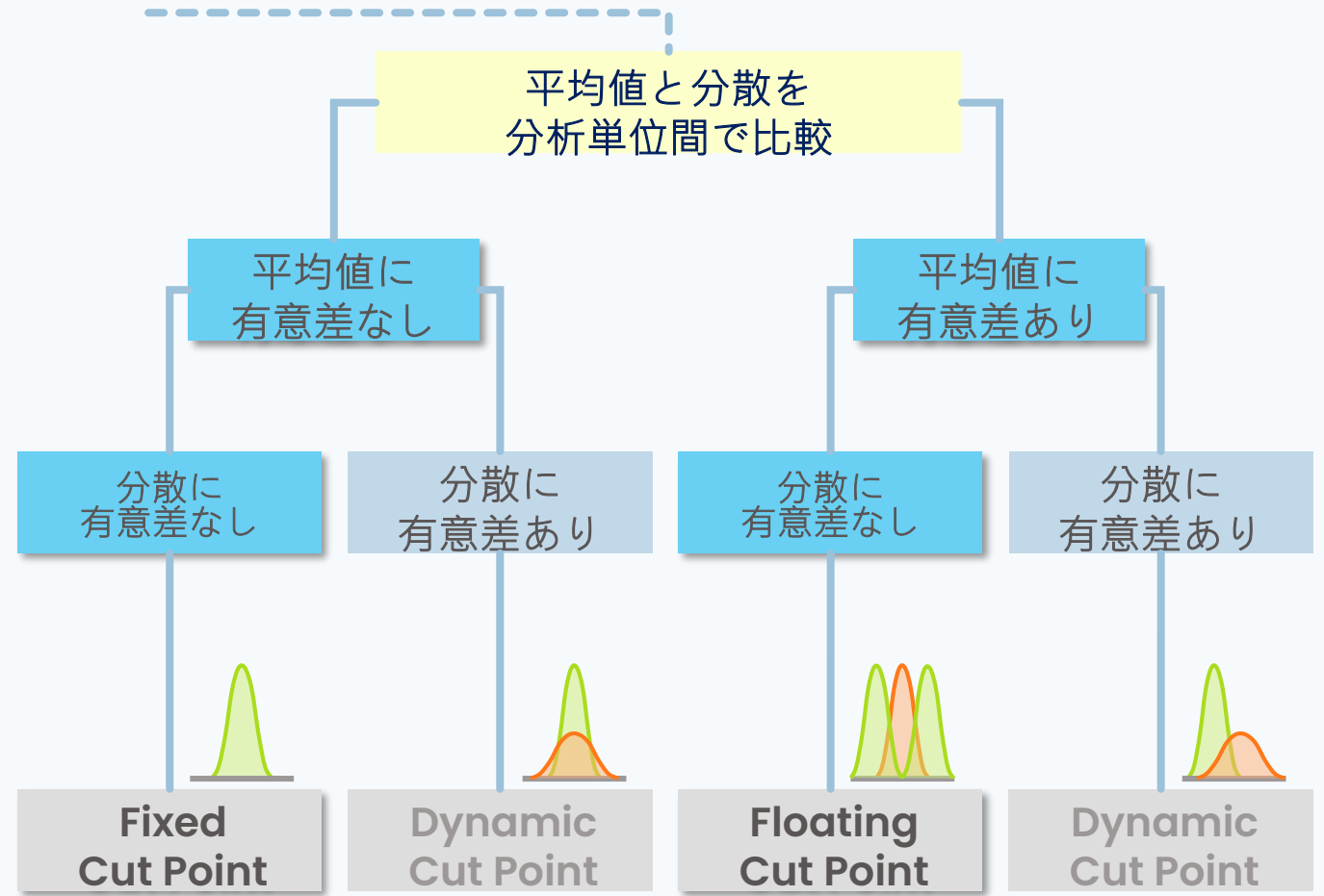
カットポイント算出フローと議論のポイント

測定の変動を評価

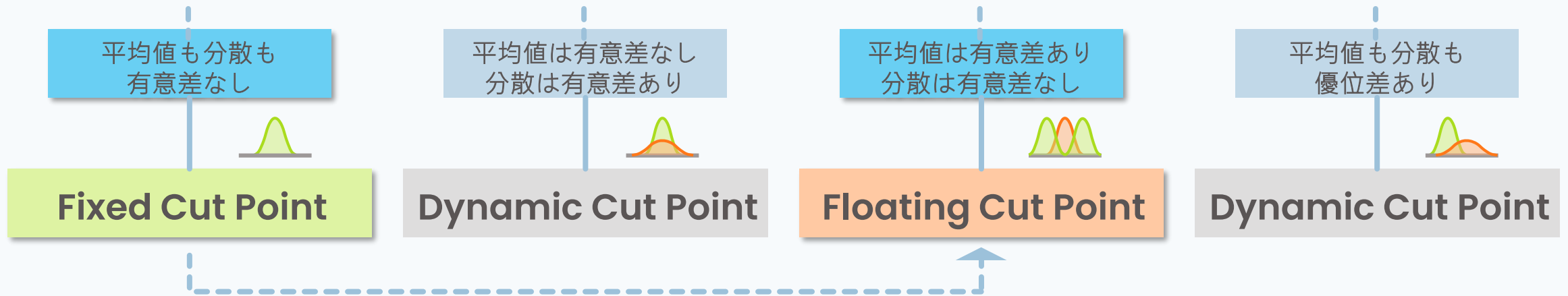
- 分析単位間の平均値の同等性評価
- 分析単位間の分散の同等性評価
 - ・ 分析担当者間、日間などに有意な差はないか

カットポイントタイプの選択

- ・ 固定値、または補正值での設定が可能か
- ・ 事前設定が困難な分析法性能ではないか



カットポイント算出フローと議論のポイント



Fixed cut point

- ・ 算出されたカットポイント値そのもの
- ・ 実試料測定時にもその固定値を使用
- ※S/N比を評価に使用する場合、実質的には Floating Cut Point に相当

Dynamic cut point (非推奨)

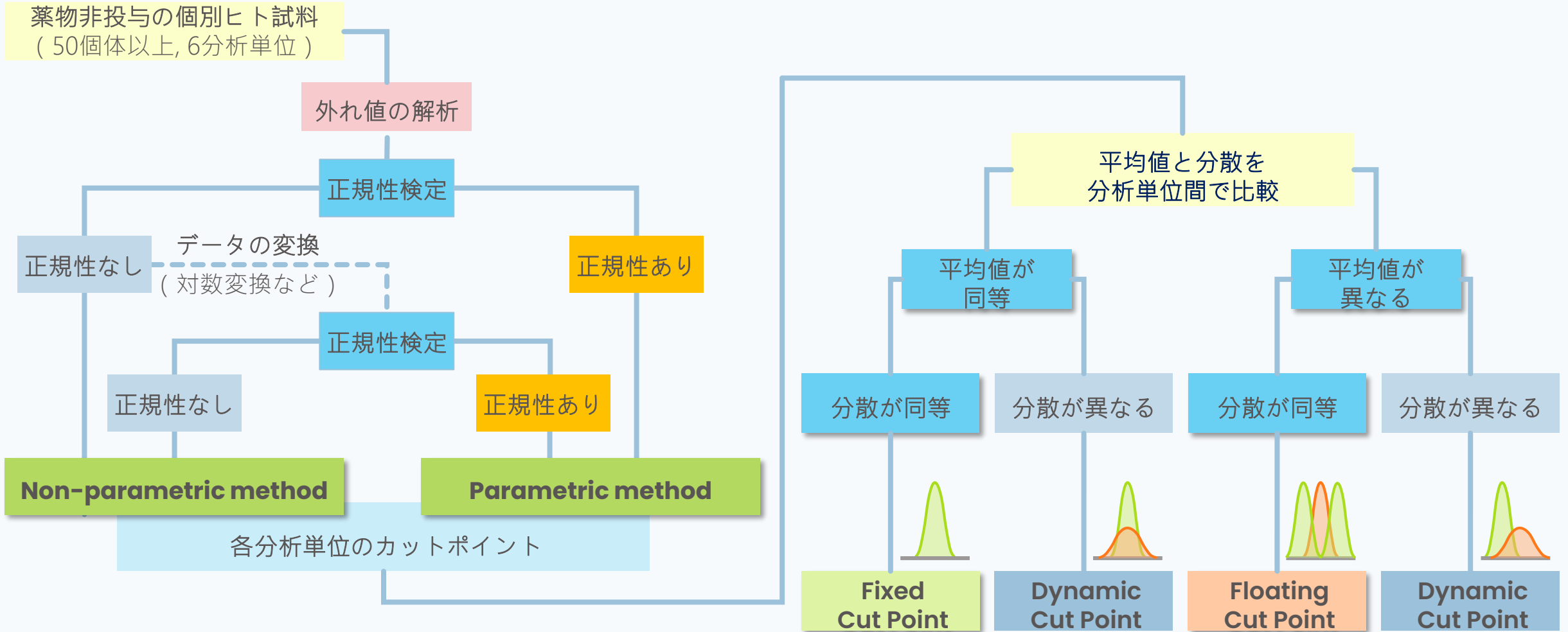
- ・ 実試料測定時にカットポイントを算出

Floating cut point

- ・ 算出されたカットポイント値と陰性対照[NC]から Normalization factor [NF] を算出
- ・ 実試料測定時はプレート毎にNCとNFから算出 (補正值)

分散の変動要因を検証し、分析法を再構築することが望ましい

カットポイント算出フローの一例 (再掲)



ADA分析法開発の流れ（例）

分析法開発

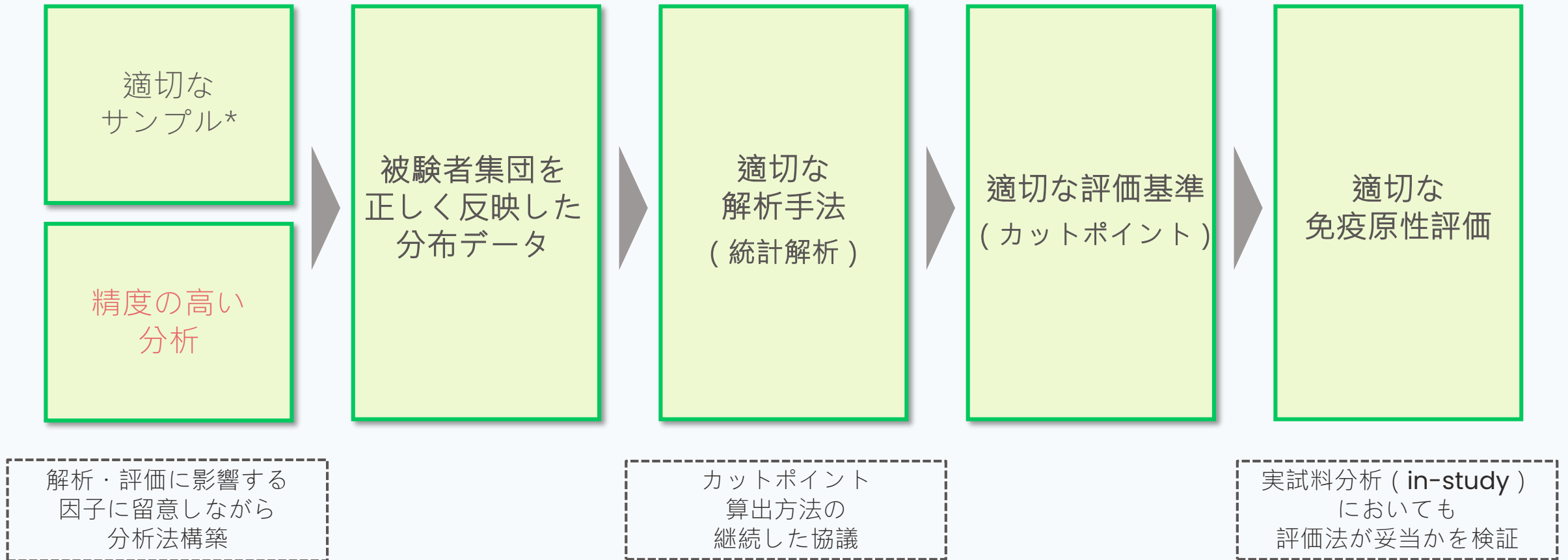
- アッセイプラットフォームの選択
- 重要試薬の準備と濃度条件等の検討
- 最小希釈倍率（Minimum Required Dilution, MRD）の確認
- 感度と共存薬物耐性（Drug Tolerance Limit, DTL）の確認
- 選択性の確認
- **カットポイント設定の準備**

暫定的なスクリーニングカットポイント
（陰性対照の**1.1**~**1.3**倍の値など）を用いて
分析法を評価

⇒ ある程度の分析条件が定まり次第、早い段階で
対象となる集団の個別マトリックス
（**negative sample**）を評価しておく

ADA分析法開発時における留意点 -適切な免疫原性評価のために-

*pre-study では入手に限界あり



LBAにおける変動要因

- 標識体やバッファー等の試薬、プレートなど器具のロット差
- ピペット操作
- サンプルや試薬の添加スピード
- インキュベーション時間や管理温度とその許容幅
- プレートの振とうスピードや、プレートウォッシャー等の機器性能
- **DTL**の改善のため酸処理を行う場合はその反応時間や中和タイミング など

変動要因は様々であるが、レスポンスに影響する因子はできるだけ、その影響を把握し、排除または影響を最小限にする

参考 ⇒ 12th JBF Symposium, 関連講座「LBAの技術的基礎講座-バラツキの原因と対策-」<https://www.youtube.com/watch?v=TFvDC1RsQh4>

カットポイント算出用データの取得

スクリーニングアッセイ：薬物に結合する抗体を検出

⇒ Screening Cut Point：薬物に暴露されていない集団のレスポンスから設定

確認アッセイ：過剰量の未標識薬物を添加してレスポンスが低下するか、結合の特異性を確認

⇒ Confirmatory Cut Point：過剰量の未標識薬物を添加した際のレスポンスの阻害率から設定

■ プレートレイアウト例

A)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			3	3	7	7	11	11	15	15	19	19
B			3	3	7	7	11	11	15	15	19	19
C			4	4	8	8	12	12	16	16	20	20
D			4	4	8	8	12	12	16	16	20	20
E	1	1	5	5	9	9	13	13	17	17		
F	1	1	5	5	9	9	13	13	17	17		
G	2	2	6	6	10	10	14	14	18	18		
H	2	2	6	6	10	10	14	14	18	18		

B)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			7	7	15	15			7	7	15	15
B			8	8	16	16			8	8	16	16
C	1	1	9	9	17	17	1	1	9	9	17	17
D	2	2	10	10	18	18	2	2	10	10	18	18
E	3	3	11	11	19	19	3	3	11	11	19	19
F	4	4	12	12	20	20	4	4	12	12	20	20
G	5	5	13	13			5	5	13	13		
H	6	6	14	14			6	6	14	14		

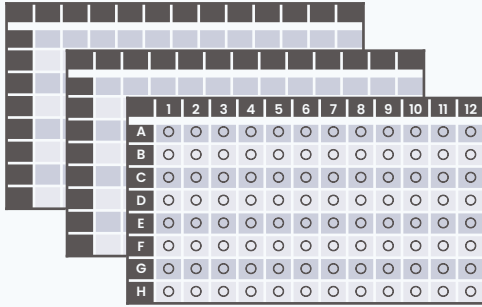
C)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			3	3	7	7	11	11	15	15	19	19
B			4	4	8	8	12	12	16	16	20	20
C	1	1	5	5	9	9	13	13	17	17		
D	2	2	6	6	10	10	14	14	18	18		
E			3	3	7	7	11	11	15	15	19	19
F			4	4	8	8	12	12	16	16	20	20
G	1	1	5	5	9	9	13	13	17	17		
H	2	2	6	6	10	10	14	14	18	18		

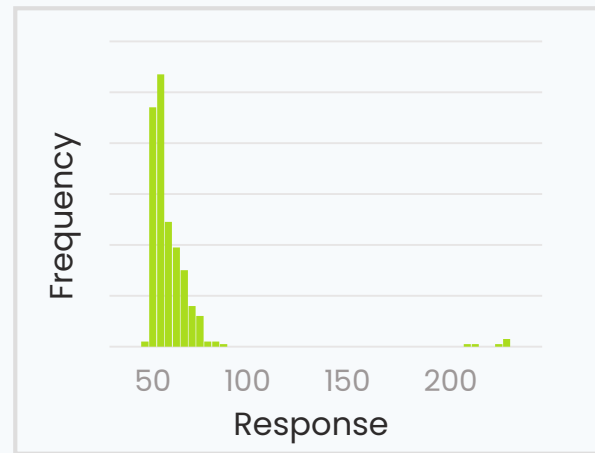
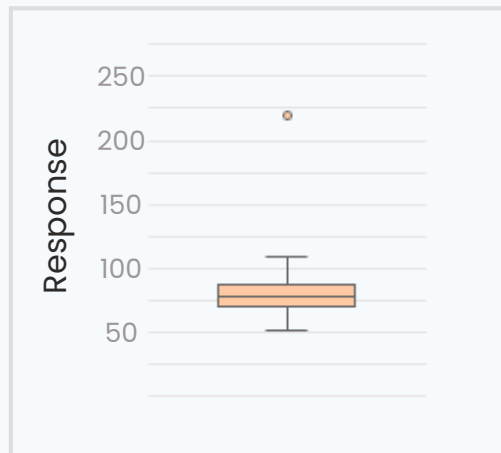
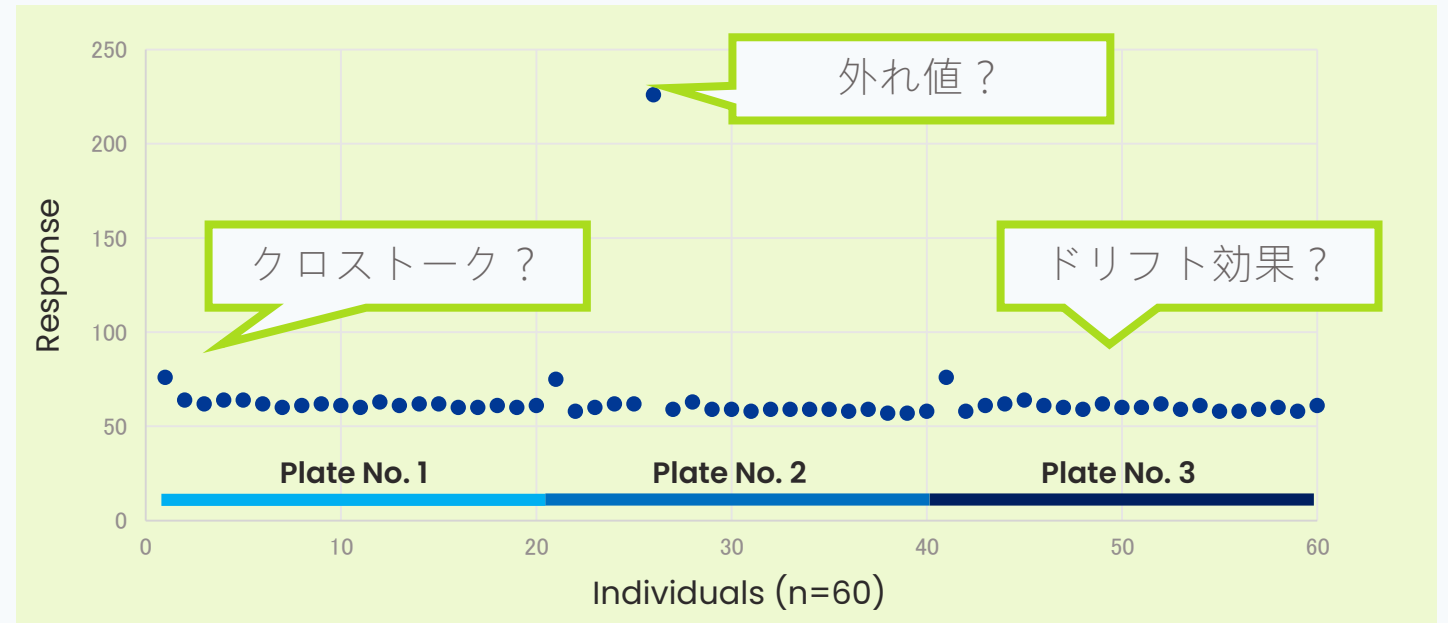
■ 薬物非添加試料

■ 薬物添加試料

カットポイント算出用データの取得

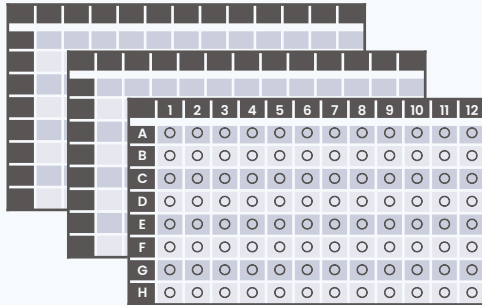


薬物非添加試料,
60 個体分 (20個体毎×3プレート)



- データを Plate viewer やグラフ等で視覚的に捉えることも有益
- 得られたレスポンスデータに加え、データ変換 (対数変換、S/N比) 後のデータでも同様に観察することで、変動要因だけでなく、その後の解析手法の選択の助けにもなる

参考：バランスデザイン



薬物非投与の個別ヒト試料、
60 個体分 (Individual no. 1~60)
6分析単位 (3 runs × 2 analysts)

Plate	Analyst A			Analyst B		
	Run 1	Run 2	Run 3	Run 4	Run 5	Run 6
No. 1	1-20	21-40	41-60	1-20	21-40	41-60
No. 2	21-40	41-60	1-20	21-40	41-60	1-20
No. 3	41-60	1-20	21-40	41-60	1-20	21-40

- 完全には避けられないバイアス要因を最小限にするために
アッセイデザイン (プレートレイアウトや測定順序、等) の工夫も有効

最後に

- 構築したADA分析法、そしてpre-studyで定めたカットポイントの妥当性は、その後も継続して評価していく必要がある。事前に予想した偽陽性率から乖離した結果が得られる可能性もあり、医薬品の開発期間を通して慎重な評価が求められる。
- カットポイントの設定に関しては、算出のための統計手法など、様々な議論が継続している。
- 一方で、どれだけ精査された解析手法を用いても、元となるデータが多様なバイアスのかかったデータでは正しい設定は行えない。分析法開発時から、その後の解析・評価に影響するであろう因子をできるだけ明らかにし、必要に応じて排除や影響を最小限にする工夫が必要となる。
- そこにはADA分析法に特有のものもあるが、基本となるのはLBA分析のための基本事項であり、習熟した分析技術に基づく。