

DG2023-59: 中和抗体分析 (Cell-based assay)

**DG2023-59:
Neutralizing Antibody Assay (Cell-based assay)**

Name	Company
小田 祐輝 Yuki Oda	小野薬品工業株式会社 <i>Ono Pharmaceutical Co., Ltd.</i>
小宮 薫 Kaoru Komiya	シミックファーマサイエンス株式会社 <i>CMIC Pharma Science Co., Ltd.</i>
摺木 志保 Shiho Suruki	協和キリン株式会社 <i>Kyowa Kirin Co., Ltd.</i>
土田 諄 Jun Tsuchida	メディフォード株式会社 <i>Mediford Corporation</i>
山中 洋幸 Hiroyuki Yamanaka	科研製薬株式会社 <i>Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.</i>
清水 浩之 (オブザーバー) Hiroyuki Shimizu	田辺三菱製薬株式会社 <i>Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation</i>

活動の内容

2023 7	8	9	10	11	12	2024 1	2
TC ★ 7/4	F2F ★ 8/3	TC ★ 9/12	TC ★ 10/13	TC ★ 11/14	TC ★ 12/7	TC ★ 1/9	JBFシンポ ★ 2/5-7
	△ 8/23 推進委員会		△ 10/18 推進委員会	ポスター作成			
					△ 12/20 推進委員会		

- ・ 1回のF2F meetingと合計6回のTeamsを用いた電話会議
- ・ 合計3回のDG推進委員との定期進捗報告会
- ・ 活動期間中はeメールでのコミュニケーションをベースとした

- 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。

背景及び目的

中和抗体分析のアッセイフォーマット

- ▶ バイオ医薬品の臨床試験で薬効を評価する際、抗薬物抗体で陽性と判定された試料については中和抗体分析を実施することが多い。
- ▶ DG2020-49「中和抗体分析－アッセイフォーマット選択とアッセイパフォーマンス向上のための議論－」では、2015年から2020年に国内で承認されたバイオ医薬品の申請資料を調査した。
- ▶ 酵素や血液凝固線溶系因子は酵素活性測定、抗体はCell-based assay (CBA) と Ligand binding assay がアッセイフォーマットとして用いられていた。

中和抗体分析のアッセイパフォーマンス

- ▶ CBA は感度や頑健性に課題があり、中和抗体分析法開発の難易度が高い。

DG2023-59の目的

- ▶ 2020年から2023年までに国内で承認されたバイオ医薬品の申請資料を調査し、前回の結果と比較した。
- ▶ 調査で得られたCBAに関する情報を基に分析面、規制面での課題点及び疑問点について議論した。
- ▶ 本発表では、DGの議論内容の概要を紹介し、CBAに取り組む方々の一助としたい。

Background and Purpose

Assay Format of Neutralizing Antibody Assay

- When evaluating the efficacy in clinical studies of biopharmaceuticals, samples that are confirmed positive for anti-drug antibodies are often subjected to neutralizing antibody analysis.
- DG2020-49 “Neutralizing antibody analysis: Discussion to select assay format and improve assay performance” investigated CTD of biopharmaceuticals approved in Japan between 2015 and 2020.
- The assay formats used were enzyme activity measurement for enzymes and blood coagulation/fibrinolytic factors, and cell-based assay (CBA) and ligand binding assay for antibodies.

Assay Performance of Neutralizing Antibody Assay

- CBA has issues of sensitivity and robustness, and the development of neutralizing antibody assay is difficult.

Purpose of DG2023-59

- CTD of biopharmaceuticals approved in Japan between 2020 and 2023 were reviewed and compared with previous results.
- Issues and questions from analytical and regulatory aspects were discussed based on the information on CBA obtained from the survey.
- In this presentation, we will introduce the outline of the contents of discussions in the DG to help those working on CBA.

本発表の流れ

- 中和抗体とは
- 申請資料調査
- 事例紹介
 - ソムアトロゴン
 - ベストロニダーゼ アルファ
 - ジヌツキシマブ
- CBAに関する分析面、規制面での課題点及び疑問点についての議論
- まとめ



中和抗体とは

バイオ医薬品におけるADA

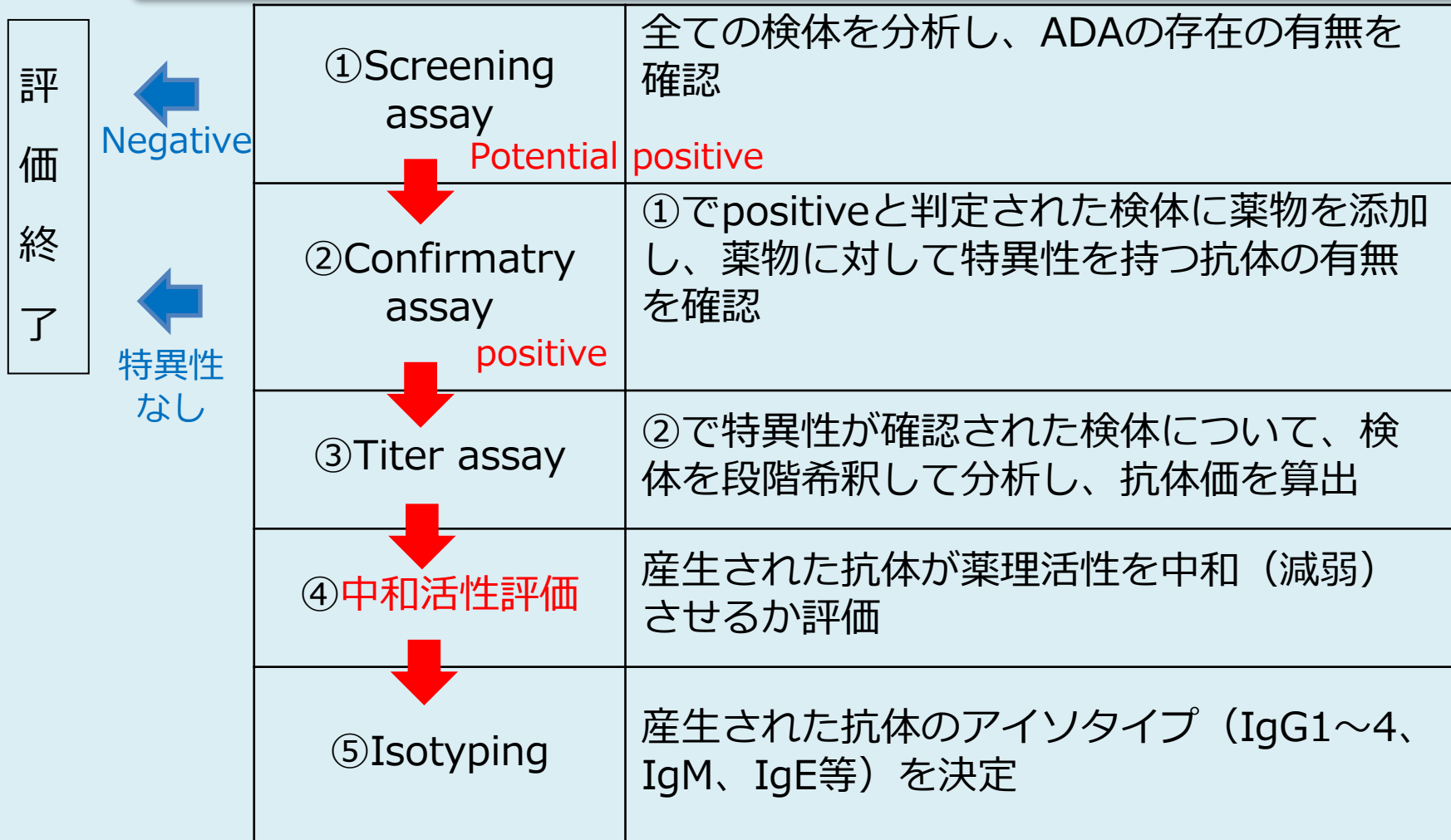
<http://www.nihs.go.jp/dbcb/immunogenicity.html>

バイオ医薬品と免疫原性

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

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

免疫原性評価フロー



Strategy for Selecting NAb Assay Format

European Bioanalysis Forum

27Sept2016

Jim McNally, Ph.D.

Associate Director, Global Early Development

Head of Clinical Bioanalytics

Merck KGaA

- AAPS Working Group on NABsから、中和抗体分析のアッセイフォーマット選択のストラテジーが提言された。
(White Paper)
- EBFシンポジウムで発表された。

<https://e-b-f.eu/wp-content/uploads/2018/06/fw201609-12-Jim-McNally.pdf>

Strategy for Selecting NAb Assay Formats AAPS Working Group on Neutralizing Antibodies

The AAPS Journal (© 2016)
DOI: 10.1208/s12248-016-9954-6



White Paper

Strategies to Determine Assay Format for the Assessment of Neutralizing Antibody Responses to Biotherapeutics

Bonnie Wu,^{1,11} Shan Chung,² Xu-Rong Jiang,³ Jim McNally,^{4,5} Joao Pedras-Vasconcelos,⁶ Renuka Pillutla,⁷ Joleen T. White,^{5,8} Yuanxin Xu,⁹ and Shalini Gupta¹⁰

Received 22 March 2016; accepted 21 June 2016

Abstract. Most biotherapeutics can elicit immune responses in dosed recipients generating anti-drug antibodies (ADAs). Neutralizing antibodies (NABs) are a subpopulation of ADAs that can potentially impact patient safety and directly mediate loss of drug efficacy by blocking the biological activity of a therapeutic product. Therefore, NAB detection is an important aspect of immunogenicity assessment, requiring sensitive and reliable methods reflective of the therapeutic mechanism of action (MoA). Both cell-based and non cell-based assays are viable options for NAB assessment. However, the scientific approach for the selection of a suitable assay format (cell-based or non cell-based) for NAB assessment is not currently well defined. In this manuscript, the authors summarize the design and utility of cell-based and non cell-based NAB assays and recommend a NAB assay format selection approach that relies on a combination of three factors. These include (i) the therapeutic MoA, (ii) the evidence of desirable assay performance characteristics, and (iii) risk of immunogenicity. The utility of correlating NAB response with pharmacodynamic data is also discussed. The aim of this paper is to provide a consistent strategy that will guide the selection of scientifically justified assay formats capable of detecting clinically relevant NABs for biotherapeutics with varying MoAs and diverse complexity.

KEYWORDS: assay format; biotherapeutic; mechanism of action; neutralizing antibody.

Bonnie Wu – Janssen R&D, Johnson & Johnson

Shan Chung - Genentech

Xu-Rong Jiang – AstraZeneca

Jim McNally – Pfizer/Merck KGaA

Joao Pedras-Vasconcelos - FDA

Renuka Pillutla – Bristol Myers Squibb

Joleen White – Biogen/Merck KGaA

Manoj Rajadhyaksha - Regeneron

Yuanxin Xu – Genzyme/Alnylam

Shalini Gupta - Amgen

NAb: Neutralizing antibody

Revisiting the rationale and providing a MoA based approach to select a format

Scientific basis for NAb assay formats selection

Risk Based Assessment

- Both of generating an immune response and of immune response having an impact
- High rates of ADA positivity affecting sample numbers for testing
- Impact on non-redundant endogenous compounds
- Concentrations of NAb that would impact *in vivo*

- 免疫反応の発現とその影響
- ADA産生率の高さ
- 豊富でない内因性因子への影響
- in vivo*で影響のあるNAb濃度

Mechanism of Action

- Reflect the biology of the biotherapeutic
- Incorporates the pharmacology of the target
- Mode of drug-target interaction
- Design characteristics of the biotherapeutic for desired effect

- バイオロジーの反映
- 標的への薬理作用の組み込み
- 薬物-標的相互作用の機序
- 目的の効果のためのバイオ医薬品のデザイン上の特性

Assay Performance

- Sensitivity
- Matrix interference: specificity and selectivity
- Drug tolerance (sensitivity in presence of C_{trough})
- Reactivity of cells to other sera components including soluble target
- Reproducibility across time course of clinical program
- Relevance of cell line receptor expression

- 感度、マトリックス干渉（特異性、選択性）
- 薬物耐性（ C_{trough} での感度）
- 可溶性標的を含む他血清成分に対する細胞の反応性
- 経時的な再現性
- 受容体発現細胞株の妥当性

薬物のMoA、アッセイパフォーマンス、免疫原性のリスクの3つのファクターを考慮して、アッセイフォーマットを選択。これらのうち、MoAが第一のファクターと提言。

Revisiting the rationale and providing a MoA based approach to select a format

Primary Determinant - MoA

申請資料調査におけるMoAによるNAb測定法の分類

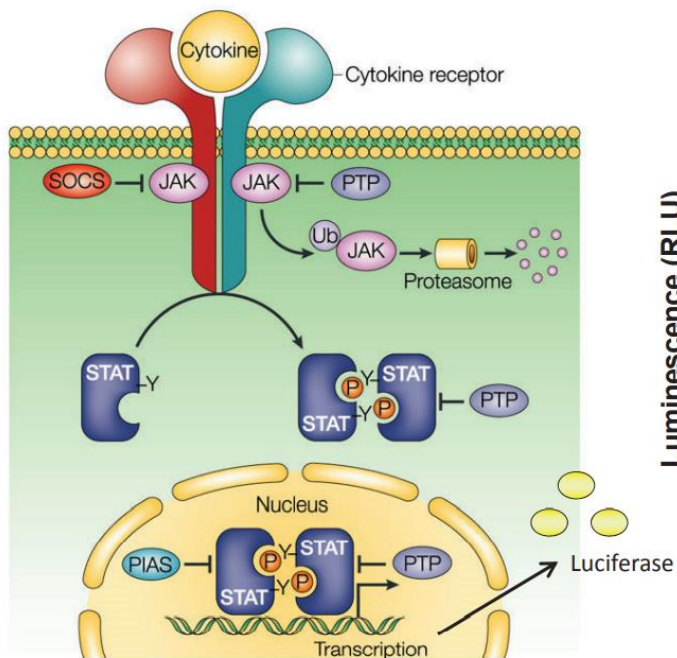
MoA	Drug Modality	Drug Target	Drug-target Interaction	Examples	Recommended Assay Format
Agonist	Recombinant protein or antibody アゴニスト	Cellular receptor	Drug binds and activates receptor	Cytokines, growth factors, EPO agonists with no homology to endogenous protein	<u>Cell-based assay</u> <u>Cell-based assay as primary choice, non cell-based assay as an alternative</u>
Antagonist	Monoclonal antibody アンタゴニスト (液性因子)	Humoral target	Drug binds and inhibits the target	Golimumab, Ustekinumab, Adalimumab	<u>Non cell-based CLB assay</u>
	Monoclonal antibody アンタゴニスト (細胞受容体)	Cellular receptor	Drug binds cellular receptor and competitively inhibits receptor-ligand interaction	Natalizumab, Trastuzumab, Tocilizumab	<u>Cell-based assay</u> or <u>non cell-based assay</u>
	Soluble receptor アンタゴニスト (リガンド)	Ligand	Soluble receptor binds ligand and blocks receptor-ligand interaction	Etanercept, Abatacept	<u>Non cell-based CLB assay recommended; cell-based assay possible with a suitable cell line</u>
Targeted intra-cellular delivery of a potent cytotoxin mediated by antibody	ADC 細胞傷害活性 (ADC)	Cellular receptor	ADC binds the cellular receptor and mediates the internalization of payload	Brentuximab vedotin, Adotrastuzumab emtansine	<u>Cell-based assay(s)</u>
Target cell lysis through antibody effector function	Monoclonal antibody 細胞傷害活性	Target cell receptor, FcγR or complement	Antibody binds to target cell receptor through variable region and FcγR or complement through Fc domain	Rituximab, Cetuximab, Alemtuzumab	<u>Cell-based effector assay recommended, cell-based binding assay or non cell-based CLB assay acceptable with justification</u>
Enzyme replacement	Enzyme 補充療法 (酵素)	Replace deficient protein in circulation or in target cells; may need cellular receptor for enzyme uptake	Enzyme functions in circulation or through cellular uptake	Human factor IX, Imiglucerase, Idursulfase, Galsulfase	<u>Enzyme bioactivity assay and/or cell-based assay; two assay may be needed</u>

薬物のMoA、モダリティ、標的、標的との相互作用からアッセイフォーマットを推奨。

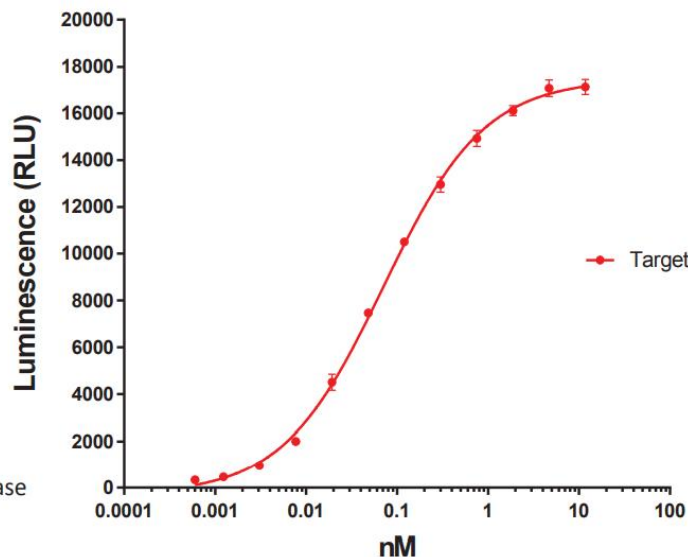
Cell-based assay構築例

IC80濃度の目標値およびEC80濃度を用いて実験ウインドウを定義した方法

Cell-based nAb assay



Concentration-Response Curve



Adapted from Shuai & Liu, Nature Reviews Immunology 3, 900-911 (2003)

EC₅₀: Approx. 0.1 nM (3.3 ng/mL)

<図の状況>

Target : サイトカイン

Drug : サイトカインに対する抗体

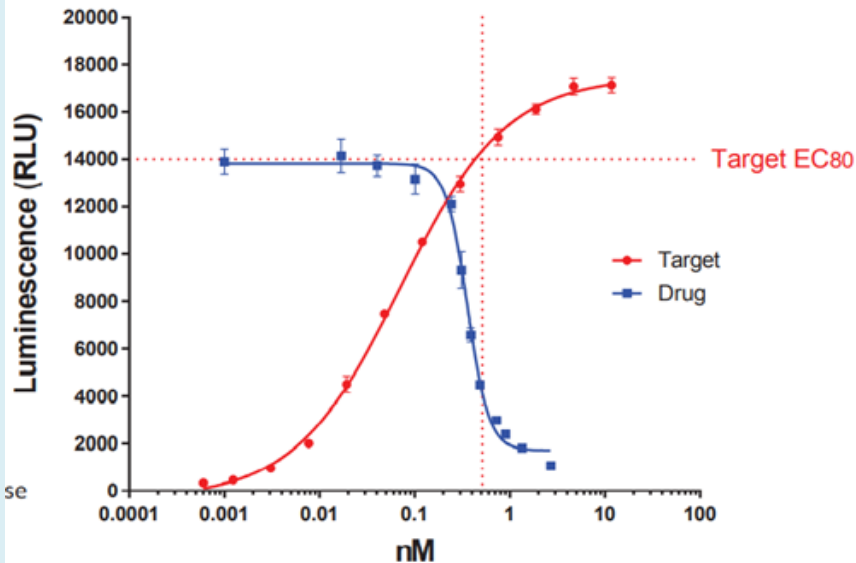
細胞はサイトカインの受容体を発現していて、リン酸化STAT結合配列をプロモーター領域に組み込んだルシフェラーゼ遺伝子が導入されている。

まず、細胞にサイトカインを曝露するとシグナル経路が活性化され発光量が上がっていく。

Cell-based assay構築例

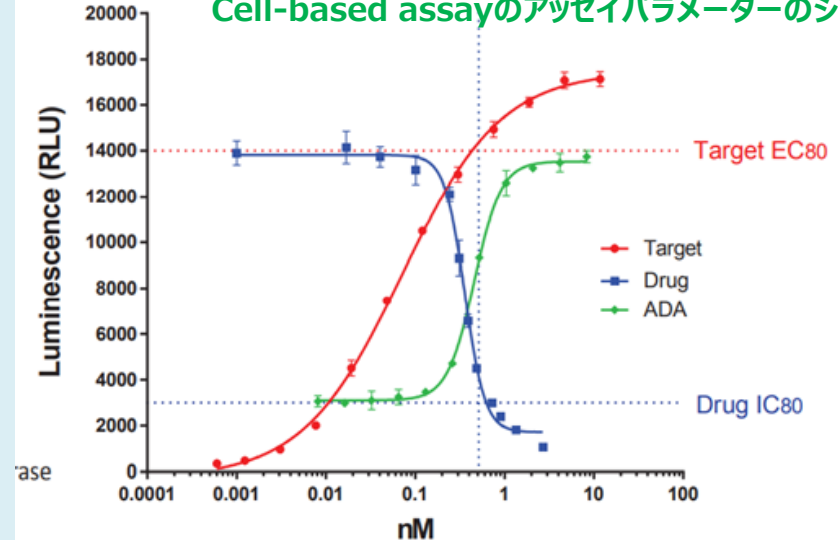
IC80濃度の目標値およびEC80濃度を用いて実験ウィンドウを定義した方法

Concentration-Response Curve



Concentration-Response Curve

Cell-based assayのアッセイパラメーターのシフト



Target EC₈₀の濃度を採用すると、サンプルからのサイトカインの混入による影響を最小限にできる。次に、サイトカインの濃度をEC₈₀に固定しサイトカインに対する抗体の濃度を上げていくと、シグナル経路が抑制され、**発光量が下がっていく**。

サイトカインとそれに対する抗体の濃度をそれぞれEC₈₀とIC₈₀に固定しADAの濃度を上げていくと、シグナル経路が活性化され、**発光量が上がっていく**。

結論：サンプルに含まれるTargetやDrugの濃度によって、NAb評価を混乱させる場合があるため、最適化する必要がある。ADAの相互パートナーであるDrugやそのTargetについても深く理解する必要がある。



申請資料調査

申請資料調査

調査対象 : PMDA申請資料概要

薬物 : バイオ医薬品

期間 : 2020 – 2023年 に日本で承認

- ✓ 承認年
- ✓ モダリティ
- ✓ 作用機序
- ✓ 中和抗体の測定法
- ✓ カットポイント
- ✓ 感度
- ✓ Drug Tolerance Limit

各項目について調査し、2015–2020年の結果と比較した。

作用機序によるNAb測定法の分類

調査対象：PMDA申請資料概要

薬物：バイオ医薬品

期間：2020-2023年に日本で承認

35品目

活性測定：酵素活性測定、血液凝固因子の活性測定等

LBA: Ligand Binding assay

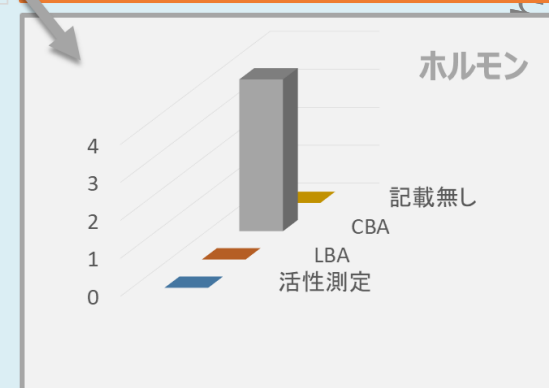
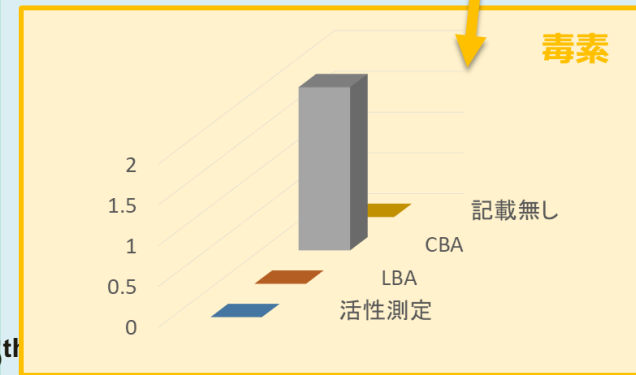
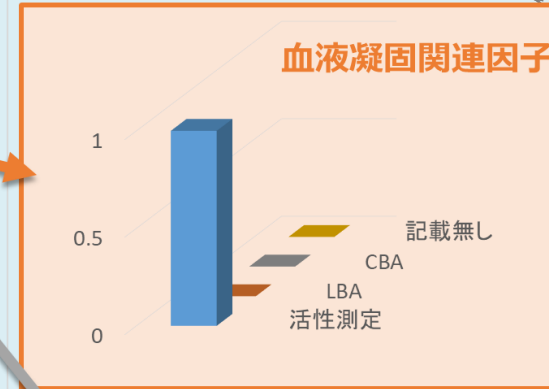
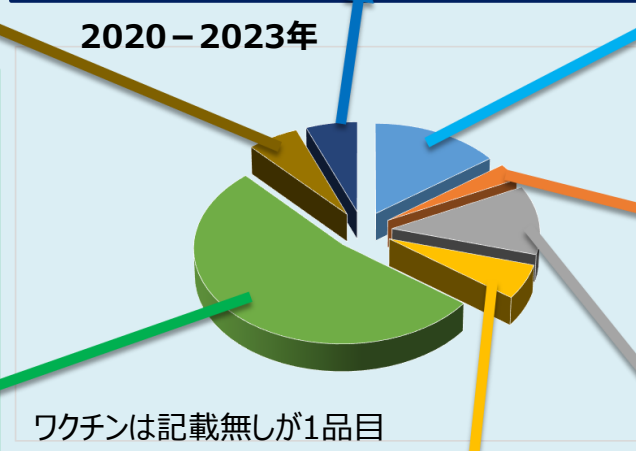
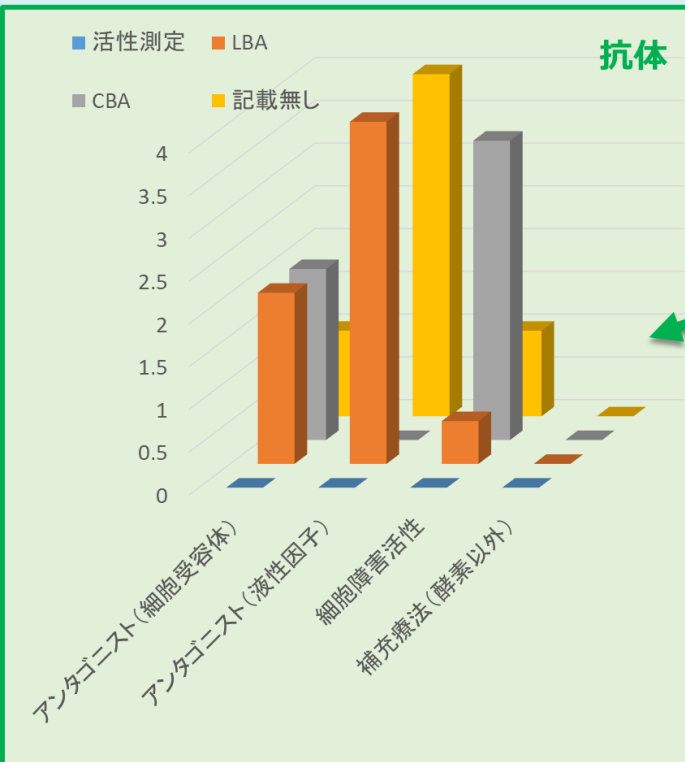
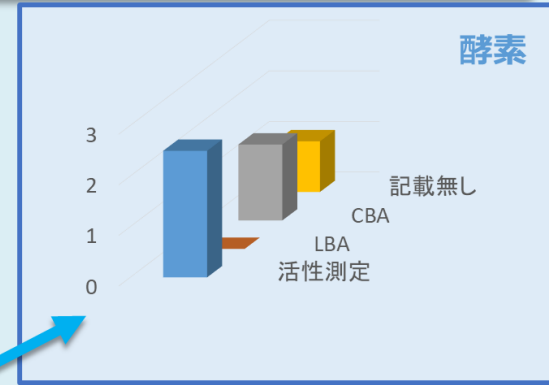
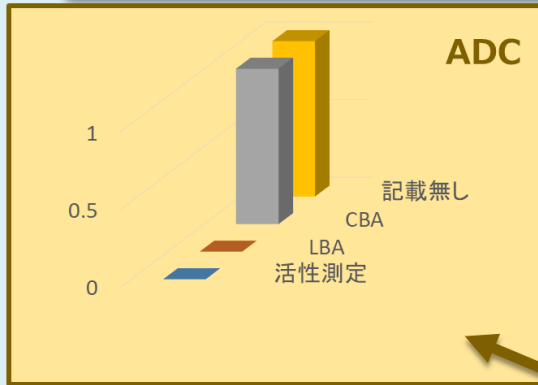
CBA: Cell-based assay

モダリティ	作用 (MOA)	合計	NAbの測定法				
			活性測定	LBA	CBA	記載無し	
酵素	補充療法(酵素)	5	2.5	0	1.5	1	
血液凝固関連系因子	補充療法(酵素以外)	1	1	0	0	0	
ホルモン	アゴニスト	4	0	0	4	0	
ワクチン	ワクチン	1	0	0	0	1	
抗体	アンタゴニスト (細胞受容体)	18	5	0	2	2	1
	アンタゴニスト (液性因子)		8	0	4	0	4
	細胞傷害活性		5	0	0.5	3.5	1
	補充療法(酵素以外)		0	0	0	0	0
融合タンパク質	アンタゴニスト (リガンド)	2	0	2	0	0	
ADC	細胞傷害活性	2	0	0	1	1	
毒素	細胞傷害活性	2	0	0	2	0	
		35	3.5	8.5	14	9	

開発途中で測定法が変更になった薬物は、それぞれ0.5でカウントした。



作用機序によるNAb測定法の分類



作用機序によるNAb測定法の分類

調査対象：PMDA申請資料概要

薬物：バイオ医薬品

期間：2015-2020年に承認

53品目

活性測定：酵素活性測定、血液凝固因子の活性測定等

LBA：Ligand Binding assay

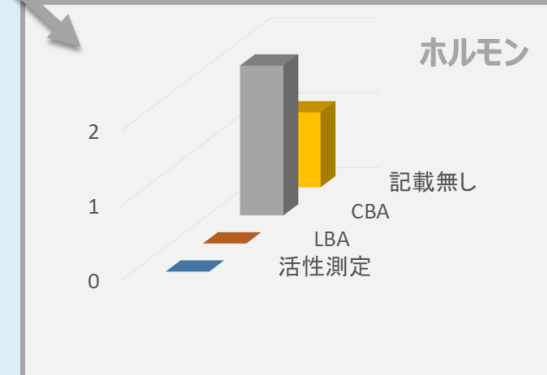
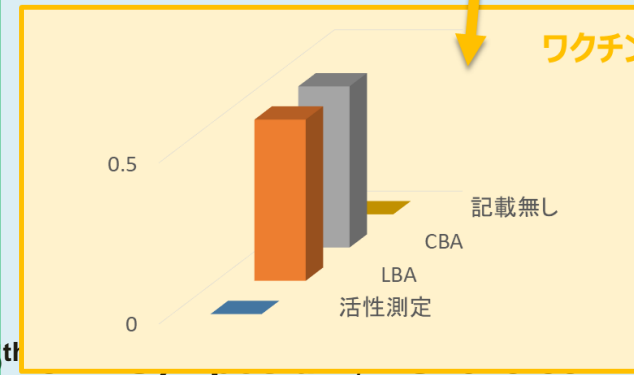
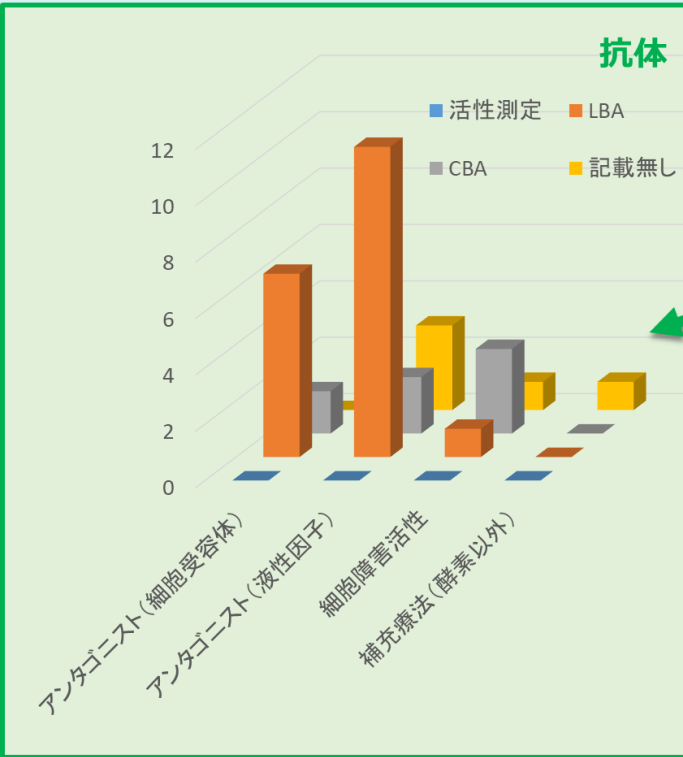
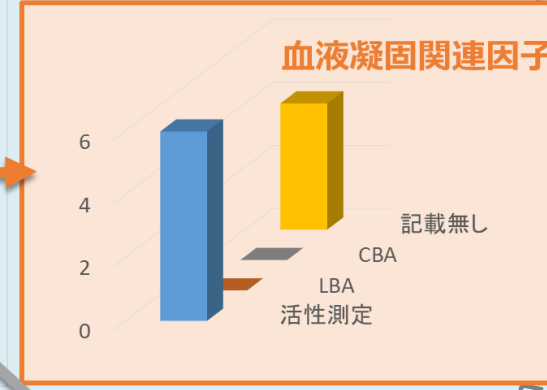
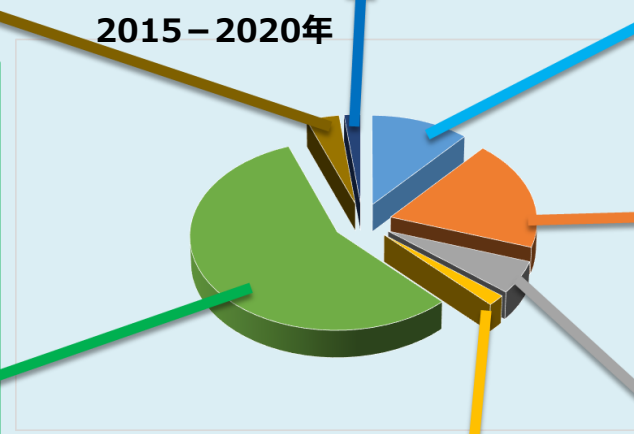
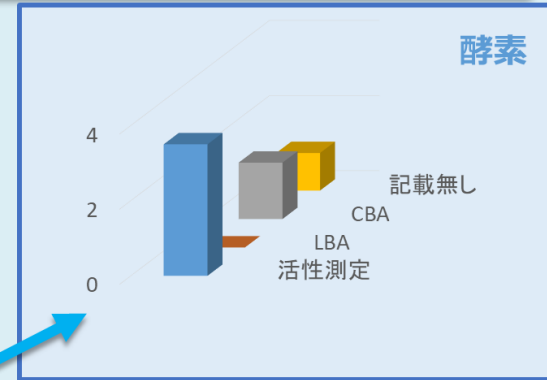
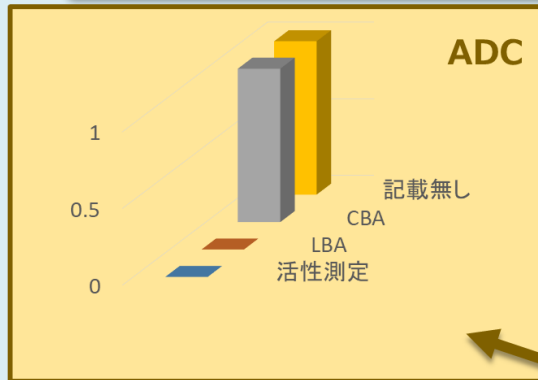
CBA：Cell-based assay

モダリティ	作用 (MOA)	合計	NAbの測定法				
			活性測定	LBA	CBA	記載無し	
酵素	補充療法(酵素)	6	3.5	0	1.5	1	
血液凝固関連系因子	補充療法(酵素以外)	10	6	0	0	4	
ホルモン	アゴニスト	3	0	0	2	1	
ワクチン	ワクチン	1	0	0.5	0.5	0	
抗体	アンタゴニスト (細胞受容体)	30	8	0	6.5	1.5	0
	アンタゴニスト (液性因子)		16	0	11	2	3
	細胞傷害活性		5	0	1	3	1
	補充療法(酵素以外)		1	0	0	0	1
融合タンパク質	アンタゴニスト (リガンド)	1	0	1	0	0	
ADC	細胞傷害活性	2	0	0	1	1	
		53	9.5	20	11.5	12	

開発途中で測定法が変更になった薬物は、それぞれ0.5でカウントした。



作用機序によるNAb測定法の分類



NAb測定法の傾向

補充療法（酵素、血液凝固関連因子）

酵素活性測定が主流。

抗体

LBAが主流。

細胞傷害活性をMoAとする場合はCBAが主流。

ホルモン、ADC、毒素

CBAが主流。

NAb測定法の分類結果は2015～2020年の結果と同様の傾向であった。細胞傷害活性をMoAとするバイオ医薬品のNAb測定法はCBAを推奨する。

DGコメント





事例紹介

今回の申請資料調査でCBAに関する情報が多く得られた以下の3品目についてまとめた。

- ◆ ソムアトロゴン（2022年承認）
- ◆ ベストロニダーゼ アルファ（2021年承認）
- ◆ ジヌツキシマブ（2021年承認）

事例紹介-ソムアトロゴン

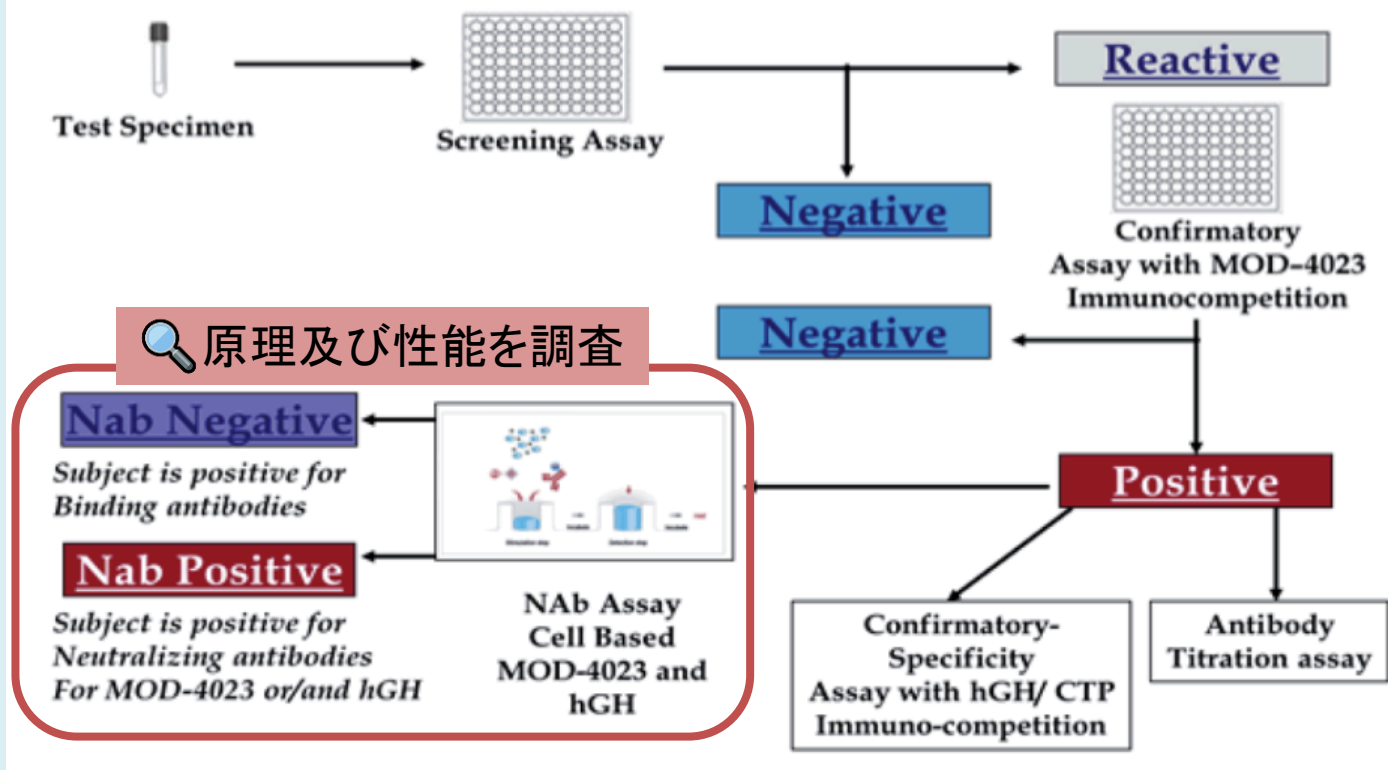
◆ ソムアトロゴン（エヌジェンラ皮下注）

- 遺伝子組換え融合糖タンパク質 [ヒト成長ホルモン（hGH）、ヒト絨毛性ゴナドトロピンβサブユニットのC末端ペプチド（CTP）]
- 骨端線閉鎖を伴わない成長ホルモン分泌不全性低身長症に対する治療薬
- 成長ホルモン受容体に結合後、STAT5bシグナル伝達経路の活性化及び血中IGF-I濃度の上昇を引き起こし、その結果、小児成長ホルモン分泌不全性低身長症患者の成長速度を高める。

事例紹介-ソムアトロゴン

- 免疫原性評価フロー：下図

Figure 1. Somatrogon Immunogenicity Testing Paradigm (All Study Periods)

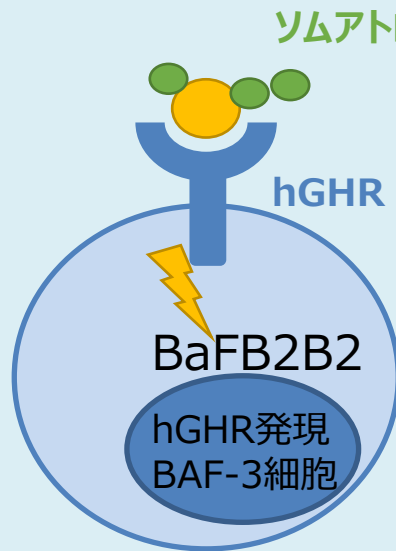


ソムアトロゴンCTDより、MOD-4023 = ソムアトロゴン

事例紹介-ソマトロゴン

抗ソマトロゴン中和抗体分析法の原理

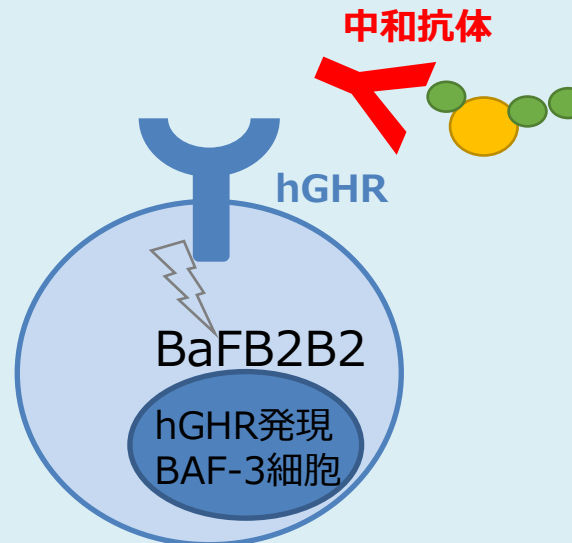
✓ 中和抗体なし



細胞増殖

吸光度 ↑ ↑

✓ 中和抗体あり



細胞増殖

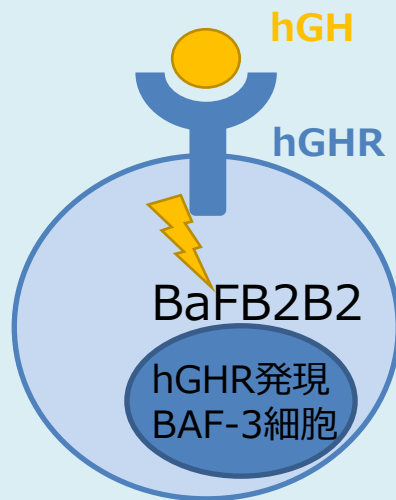
吸光度 ↓ ↓



事例紹介-ソムアトロゴン

抗成長ホルモン（hGH）中和抗体分析法の原理

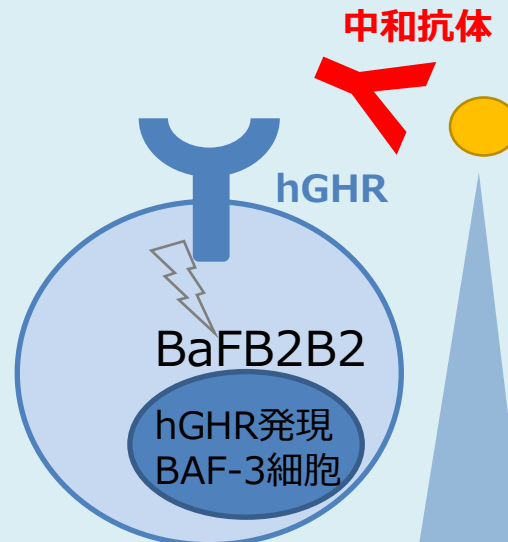
✓ 中和抗体なし



細胞増殖

吸光度 ↑ ↑

✓ 中和抗体あり



細胞増殖

吸光度 ↓ ↓

ソムアトロゴンは内因性タンパク質の配列を含む。
→内因性タンパク質の作用を中和するか評価する。



事例紹介-ソムアトロゴン

FPR: false positive ratio
 GHD: 成長ホルモン分泌不全性低身長症
 NC: Negative control
 NS: Normalized signal

- 抗ソムアトロゴン中和抗体分析法のバリデーション試験結果まとめ-1
 (4試験実施)

	AR2862	AR4268	AR5265	C0317007
Cut point	【Original】Normal, 1.222OD, Mean-2SD	【Original】GHD, 0.787OD, 5%FPR	【Original】Normal, 0.826OD, 5%FPR	初期? : NCのODで補正なし。約5% FPR
対象集団, Cut point, Cut pointの水準	2SD	【Addendum1】 集団不明、0.694NS predose CP-4-006, 0.538NS 1%FPR	【Addendum1】Normal, 1.204OD, 1%FPR 【Addendum3】CP-4-004 in-study, 0.263NS, 1%FPR 【Addendum4】CP-4-005 in-study, 0.287NS, 1%FPR	中期? : NCのODで補正なし。1% FPR
※各試験のオリジナルバリデーションと追加バリデーションの時系列は明記されていないため、初期・中期・後期の区分は推察				後期? : NCのODで補正あり。1% FPR
Sensitivity	【Ammendment1】 19.5 µg/mL	【Addendum1】 8.18 µg/mL	-	【Original】 13.6 µg/mL (rabbit pAb), 11.5 µg/mL (goat pAb)

感度は10 µg/mL付近

審査報告書に006試験陽性率の記載あり。

審査報告書に009試験陽性率の記載あり。

事例紹介-ソムアトロゴン

- 抗ソムアトロゴン中和抗体分析法のバリデーション試験結果まとめ-2
(4試験実施)

	AR2862	AR4268	AR5265	C0317007
Precision	【Original】	【Original】 【Addendum1】	【Original】 【Addendum1】	【Original】
Drug tolerance	-	-	【Addendum1】 【Addendum2】	【Original】
Selectivity, matrix effect	【Original】GH deficient serum	【Original】 normal serum 【Addendum1】 集団不明, Hemolysis, lipemia, Icterus	【Addendum1】 normal and GHD pediatric, Hemolysis, Lipemia	【Original】 Patient, hemolysis, lipemia
Dilutional linearity	-	【Addendum1】	-	【Original】 No prozone
Stability	【Original】 24h RT, 5F&T	-	【Addendum1】 72h RT	【Original】 24h ambient temperature, 8F&T
Robustness	【Original】	-	-	【Original】

審査報告書に009試験陽性率の記載あり。

審査報告書に006試験陽性率の記載あり。

1. 抗hGH中和抗体分析法のバリデーション試験結果 (4試験実施)

	AR2919	AR4266	AR5266	C0317008
Precision	【Original】	【Original】 【Ammend1】Add3	【Addendum1】【Ammend2】	【Original】
Cut point 対象集団, Cut point, Cut pointの水準	【Original】 Normal, 0.810OD, Mean-2SD	【Ammend1】0.856OD, Cut point factor 0.275	【Addendum1】【Ammend2】 normal, 1.008OD, 1%FPR	【Original】 GHD pediatric, 0.636
※各試験のオリジナルバリデーションと追加バリデーションの時系列は明記されていないため、初期・中期・後期の区分は推察		【Ammend1/2】in-study CP-4-004, 0.126NS, 1%FPR 【Ammend1/3】in-study CP-4-006, 0.395NS, 1%FPR 0.574NS, 1%FPR (control)	【Addendum3】in-study CP-4-005, 0.400NS, 1%FPR	
Sensitivity	Amend1, 4.90 µg/mL	【Ammend1】0.48-0.31 µg/mL 感度は0.5-5 µg/mL付近。	-	【Original】 0.52 µg/mL (goat pAb), 0.57 µg/mL (rabbit pAb)
Drug tolerance	-	【Ammend1】	【Addendum1】	【Original】
Selectivity, matrix effect	【Original】 GH deficient serum	【Ammend1】Add3, pediatric GHD, Hemolysis, lipemia, Icterus	【Addendum1】【Ammend2】 normal, Hemolysis, Lipemia	【Original】Patient, hemolysis, lipemia
Dilutional linearity	【Original】	-	-	【Original】No prozone
Stability	【Original】 24h RT, 5F&T	【Ammend1】24h RT in pediatric GHD, 5F&T	【Addendum1】 【Ammend2】72h RT	【Original】24h ambient temperature, 8F&T
Robustness	【Original】	【Ammend1】	-	【Original】

初期? : NCのODで補正なし。約5% FPR

中期? : NCのODで補正なし。1% FPR

後期? : NCのODで補正あり。1% FPR

事例紹介-ソムアトロゴン

<審査報告書（免疫原性）まとめ>

- ADA陽性となった被験者：18/22例（009試験）、84/109例（006試験）
- 抗ソムアトロゴン中和抗体陽性となった被験者：2/18例（009試験）、2/84例（006試験）⇒006の1例を除き一過性であり陽性率は低い。
- 抗体産生による本剤の安全性及び有効性への影響は認められなかった。
- 抗hGH中和抗体は審査報告書に記載なし。

※1時点以上で陽性となった被検者 = 陽性

<考察>

- 006試験（AR4268）と009試験（C0317007）は別にバリデートされた分析法で測定している。
- 抗ソムアトロゴン中和抗体陽性率が非常に低いので、分析法による陽性率の違いは明らかではない。

- ◆ **ベストロニダーゼ アルファ (メプセヴィ点滴静注液)**
- **遺伝子組み換えヒトβ-グルクロニダーゼ(GUS)**
 - ムコ多糖症 (GUS欠損) に対する治療薬
 - 酵素補充療法
 - マンノース-6-リン酸 (M6P)受容体を介して細胞内に取り込まれた後、リソソーム内でGUS活性を示す。
- **中和抗体分析法**
 - Cell-based assayを行っており、定性的な分析である。
 - ADAのスクリーニング分析及び確認分析の両方が陽性であった被験者試料でのみ測定。



事例紹介-ベストロニダーゼ アルファ

中和抗体分析法

λ_{em} 446nm

患者血清由来抗体

UX003

ベストロニダーゼ
アルファ

GUS欠損ヒト
線維芽細胞

細胞を凍結融解し、溶解させる。

中和抗体あり

中和

4-MUG

4-MU

蛍光
↓ ↓

中和抗体なし

4-MUG

4-MU

蛍光
↑ ↑

<http://bioanalysisforum.jp/>

UX003 : ベストロニターゼ アルファ

バリデーションパラメータ	成績
Minimum required dilution	1 : 10
Cut point	0.892×陰性対照の平均RFU
Sensitivity	17.8 µg/mL
Selectivity	許容範囲
Precision (within-run)	3.6~14.5%
Precision (between-run)	低濃度陽性対照 CV 9.6% 中濃度陽性対照 CV 12.5% 高濃度陽性対照 CV 38.6%
Short-term stability	2~8℃及び17~27℃で24時間 保存で標準対照の30%以内
Freeze and thaw stability	3~5回の凍結融解サイクルで 標準対照の30%以内
Drug tolerance	1.13 µg/mL

感度は低いが結果は陽性陰性の判定のみで、許容範囲である。

高濃度でCVが高いが陽性陰性の判定のみで、許容範囲である。

事例紹介-ベストロニダーゼ アルファ

- NAb分析法のバリデーションパラメータは高濃度陽性対照の分析単位間精度を除き、すべて許容基準を満たした。
- ただし、NAb分析法は定性的であるため高濃度に存在するときの精度は重要ではない。
- 臨床試験においてADAの産生が認められた被験者がおり、一部でNAbも検出された。
- ADA価とNAb産生との間に明らかな相関は認められず、ADA存在は薬力学的マーカーであるuGAGの減少にも影響しない。

uGAG : urinary glycosaminoglycan (尿中グリコサミノグリカン)

事例紹介-ベストロニダーゼ アルファ

- 海外第1/2相(CL201) ADA陽性66.7% (2/3例) NAb陽性50.0% (1/2例)
 - 海外第2相(CL203) ADA陽性100% (8/8例) NAb陽性37.5% (3/8例)
 - 海外第3相(CL301) ADA陽性58.3% (7/12例) NAb陽性71.4% (5/7例)
 - 国内試験(SDG001) ADA陽性66.7% (2/3例) NAb陽性0.0% (0例)
- ADA及びNAbの産生が散見される。
 - また、ADA及びNAb陽性患者ではIARの発現が高い傾向だった。
しかし、症例数が限られており、IARは適切な処置で管理可能であった。
 - 現時点では抗体産生による安全性上の明らかな懸念は認められない。
 - 抗体産生が本剤の有効性に対して特段の影響は認められなかった。

IAR : Infusion associated reaction (投与関連反応)

事例紹介-ジヌツキシマブ

◆ ジヌツキシマブ（ユニツキシシン点滴静注）

➤ キメラ抗GD2抗体

ヒト神経芽腫細胞表面に発現するジシアロガングリオシド（GD）2を特異的に認識し結合するマウス抗GD2モノクローナル抗体の可変部領域とヒト免疫グロブリンGの定常領域からなるマウス-ヒトキメラ型モノクローナル抗体

➤ 適応症：大量化学療法後の神経芽腫

➤ MOA：ADCC、CDC作用を介した細胞傷害活性

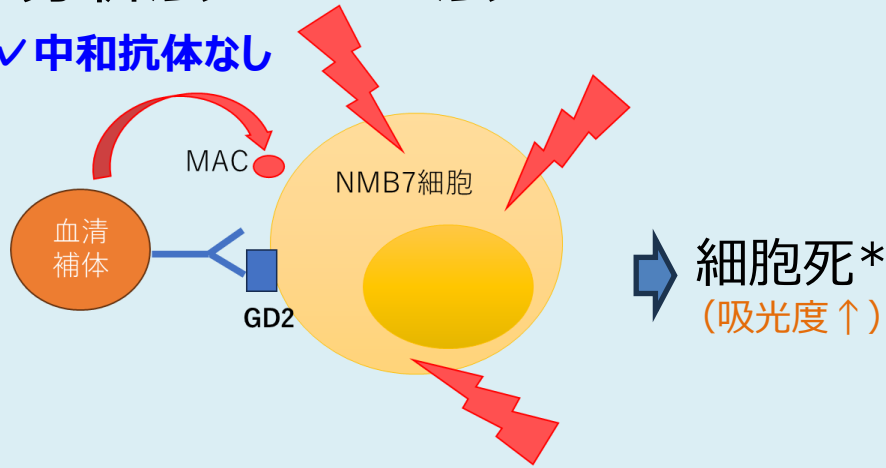
- 日本での承認申請では、中和抗体評価として、**2種類のcell based assay**の結果が用いられた



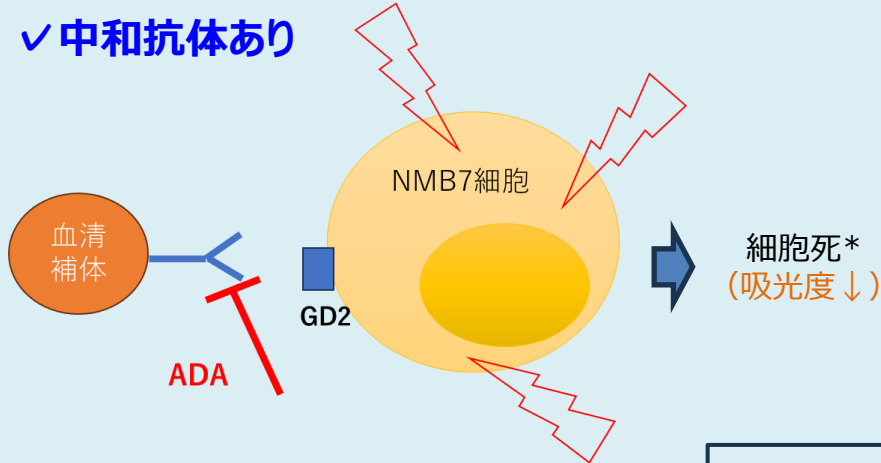
事例紹介-ジヌツキシマブ

・分析法1: CDC法

✓中和抗体なし



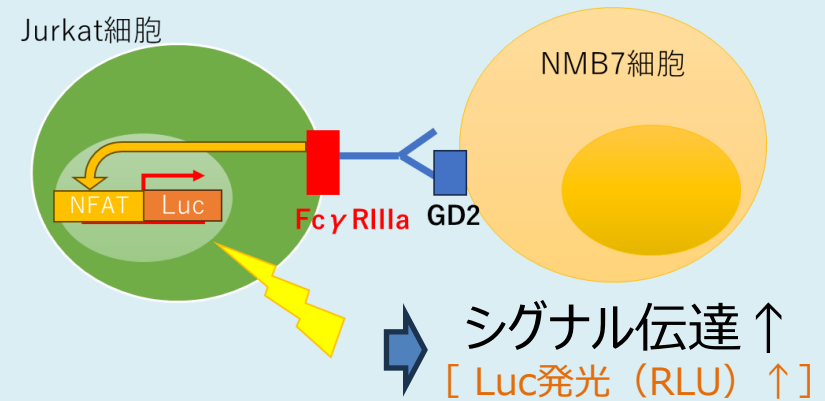
✓中和抗体あり



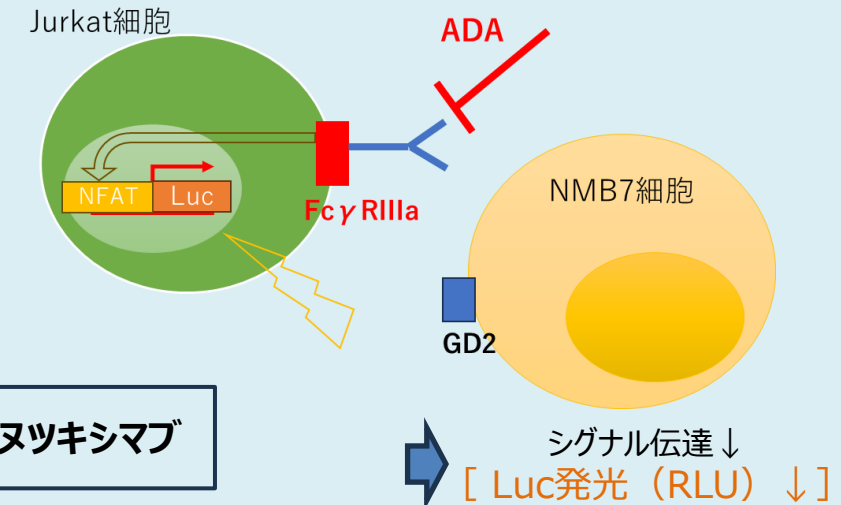
・分析法2: ADCC法**

** : 市販キットを使用

✓中和抗体なし



✓中和抗体あり



* : 490nmの吸光度を測定し評価

: ジヌツキシマブ

http://bioanalysisforum.jp/

事例紹介-ジヌツキシマブ

- 分析法バリデーション

Parameters	分析法1	分析法2
MRD	50倍	100倍
Cut point	陰性対照検体の吸光度で補正した吸光度に1.33を乗じた値	陰性対照検体のRLU で補正した発光量に 0.844 を乗じた値
Sensitivity	<u>55.0 µg/mL</u> (陽性対照)	<u>5.04 µg/mL</u> (陽性対照)
Selectivity	—	許容範囲内
Specificity	許容範囲内 (ヒトIgG 存在下)	許容範囲内 (ヒトIgG 存在下)
Precision (within-run)	30%以下	30%以下
Precision (Between-run)	30%以下	1Run以外 (操作ミス) 許容範囲内
Drug Tolerance	許容範囲内	許容範囲内

事例紹介-ジヌツキシマブ

中和抗体評価法の開発経緯と使用分析法

US承認 (2015.3)



※：表中の 1-2 桁数字は月を表す。

★：分析法2で再評価

ジヌツキシマブCTD 1.5項 開発の経緯図を一部改変

・分析法1を使用したFDA審査時に、被験物質存在下での中和抗体分析法の感度が不足しているとコメントされた (Postmarketing Requirements)。その後、分析法を改良し (分析法2)、GD2-PII試験では分析法2を使用した。国内申請時の中和抗体の評価はGD2-PII試験の結果を使用して考察した。

・分析法1で実施した試験の一部については、ADA陽性検体を分析法2で再評価 (★) したが、国内申請の考察には使用していない [検体取得後の保存期間が長いことが一因である可能性が示唆された (最長で7-8年保存)] 。

事例紹介-ジヌツキシマブ

- 分析法による陽性率の違い（DIV-NB-201、DIV-NB-302及びDIV-NB-303試験の合計）

	陽性率
分析法1	4% [15/414例（ADA陽性:83例）、ただし11例はジヌツキシマブ投与前]
分析法2	10.8% [45/418例（ADA陽性:86例）]

分析法の改良により陽性率が上昇し、改善が認められた。

- ADAがジヌツキシマブの有効性及び安全性に及ぼす明確な結果は得られていないが、臨床試験での検討結果は限られていることから、ADAがジヌツキシマブの有効性及び安全性に及ぼす影響について結論付けることは困難と判断（PMDA）。
- FDAは、分析法1の分析感度（55.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）では低感度との判断であり、その後改善された分析法2の感度（5.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を考慮すると、両者の間にFDAが許容する中和抗体の分析感度があると推察された。

参考 : Postmarketing Requirements

FDAから、NAb分析に必要な分析感度について言及されているが、今回の分析法の分析感度は、分析法1、2ともに、500 µg/mLを満たしており、FDAの意図はわからなかった。

Clinical Pharmacology

13. To conduct an assessment of neutralizing antibodies response to dinutuximab with a validated assay (under CMC PMC m) capable of sensitively detecting neutralizing antibodies responses in the presence of dinutuximab levels that are expected to be present at the time of patient sampling. The neutralizing antibodies response and its clinical impact will be evaluated in all available samples from ANBL0032 [DIV-NB-301 and DIV-NB-302], DIV-NB-303, and DIV-NB-201 studies.

UTC Response: UTC has no preliminary comments at this time and looks forward to discussion with the Division.

Discussion during the meeting: FDA acknowledged UTC's response and asked UTC to provide information regarding immunogenicity samples in Studies ANBL0032, (DIV-NB-301 and DIV-NB-302) and DIV-NB-303 and DIV-NB-201. UTC stated that archived samples from Studies DIV-NB-301, DIV-NB-302, and DIV-NB-303 have been evaluated for immunogenicity and the assessment is considered complete. FDA stated that the issue is that the neutralizing antibodies (NAb) assay is considered to be relatively insensitive. The FDA stated that a sensitivity of 500 µg/mL would definitely be considered adequate to ensure detection of NAb. UTC expressed concern (b)(4)

FDA stated that they understood the concern, however the current NAb assay is too insensitive to characterize the incidence of NAb and that an assay with improved sensitivity is required to adequately characterize this aspect of product quality. The FDA further stated that UTC should either develop a new assay or optimize the current assay to improve assay sensitivity. FDA stated that UTC should use the archived samples collected under Study ANBL0032 and available samples from DIV-NB-303 and DIV-NB-201. If there are insufficient samples available for assessing neutralizing antibody response, UTC should conduct a new study in which immunogenicity will be assessed.

事例紹介まとめ

- 一口にCell based assayと言っても、その原理は多様であった。
- 薬剤のMoA及びアッセイ系の性能を考慮して構築していると推察された。
- バリデーション項目として、共通してCut point、感度、選択性、精度、Drug toleranceが含まれていた。
- 複数の分析法を構築・使用した薬剤もあった。
時系列が不明なものもあるが、その時点での最新の科学に基づき分析法を見直し、評価していくことが必要と考えられた。

CBAに関する分析面、規制面での課題点及び疑問点についての議論

本DG活動期間中にDGメンバーからCBAに関する分析面、規制面での課題点及び疑問点が挙がった。その際の議論内容をカテゴリーごとにQ&A形式でまとめた。

Q&A (細胞)

Q1. 継代数はどのように決定しているか

A1. 活性の指標（細胞生存率、サイトカイン濃度等）やダブリングタイム等を考慮する。
最終的にはバリデーションにて決定。

Q2. 細胞の管理はどうしているか

A2. 液体窒素（気相）での管理が望ましい。
同日に分注したロットでも活性が変わってしまう事もあるので、担当で細かい手技の統一が必要。

Q&A (細胞)

Q3.FBSのLotの切り替わりはどのようにしているか

A3.Lotの切り替わりの際は細胞の反応性の確認を実施してLot間差を見る事を推奨。

初期実験の段階から複数Lot確認しておくが良い。

製薬メーカーからCROへ試験を依頼する際は検討の段階からLotを揃えることが望ましい。

Q4.細胞購入の際に気を付けることは？

A4. 第三者が使用する際の権利の関係を事前に確認しておく必要がある。

委託の際に細胞を譲渡できず、細胞の選定からやり直す場合があるので注意が必要。

Q&A (重要試薬)

Q1.どのような項目を評価しているか

A1.作製時に標識率の確認、蛋白定量を行う。

Q2.品質の担保について

A2.ICH M10ではRetest dateの記載が求められている。
NAbはスコープ外であるが、必要時にNC及びPC
のシグナル値を確認し、系全体の品質を担保する
ことを推奨する。

Q1.ポリクロ？モノクロ？

A1.ポリクローナル抗体を選択する方が望ましいが、感度を考えて選択する必要がある。
ポリクローナル抗体では中和活性が低いことがあり、モノクローナル抗体を選択するケースもある。

Q&A (実験)

Q1. DTL評価に対するDrugの濃度はどう設定する？

A1. 予想されるトラフ濃度以上に設定することが多い。

Q2. 感度はどれくらいあればいいか？

A2. 1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を目標に系を構築するのが望ましい。
55.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で感度不足と当局から指摘され、
別の系に変えたケースがある（ジヌツキシマブ、
42枚目）。

Q3. 精度はどこまで許容するか？

A3. CBAは30%程度。

高濃度側では精度が30%を超えても陽性判定自体には影響しないため、許容されたケースがある（ベストロニダーゼ アルファ、35枚目）。

- 2020-2023年に日本で承認されたバイオ医薬品35品目の申請資料から、中和抗体分析で選択されたアッセイフォーマットをまとめた。補充療法（酵素、血液凝固関連因子）では酵素活性測定が、抗体ではLBAが、ホルモン、ADC及び毒素ではCBAが主に用いられていた。細胞傷害活性がMoAの場合はCBAが主流であった。上記の結果は、前回の調査結果（2015-2020年）と同様の傾向であった。
- 調査でCBAに関する情報が多く得られた3品目（ソムアトロゴン、ベストロニダールゼ アルファ、ジヌツキシマブ）の事例を紹介した。
- 調査で得られた CBA に関する情報を基に分析面、規制面での課題点及び疑問点について議論し、Q&A形式で紹介した。

- ❑ We summarized the assay format selected for neutralizing antibody analysis from CTD of 35 biopharmaceuticals approved in Japan between 2020 and 2023. Enzyme activity assay was mainly used for replacement therapy (Enzymes, coagulation factors). LBA was mainly used for antibodies. CBA was mainly used for hormones, ADCs, and toxins. When the cytotoxic activity was MoA, CBA was dominant. The above results showed a similar tendency to the results of the previous survey (2015 to 2020).
- ❑ We introduced the cases of 3 products (Somatrogon, Vestronidase Alfa, Dinutuximab) from which much information on CBA was obtained from the survey.
- ❑ Based on the information on CBA obtained from the survey, issues and questions from the analytical and regulatory aspects were discussed and introduced in the form of Q & A.