

全自動LBAシステムGyrolabによるADA分析方法の開発

Development of ADA analytical methods by Gyrolab

○塚本和浩、羽成優、平山龍、園野典行、鈴木伸宏、寺村俊夫

シミックファーマサイエンス株式会社



【目的】

バイオ医薬品の中にはヒトに対して免疫原性を示すものも存在する。特に生体試料中の抗薬物抗体 (ADA: Anti-drug Antibody) は、形成されてしまうと重篤な副作用を引き起こす原因や、薬の有効性を減弱させる原因となる。このことより、ADAを正しく評価することが重要である。

従来、ADAの分析方法はELISAまたは電気化学発光法が主流だったが、近年は欧米を中心に全自動LBA (Ligand Binding Assay) システムであるGyrolabを用いた分析方法の開発が広がりをみせている。また、Gyrolabを用いた分析手法には「ブリッジング法」及び「酸乖離法」があり、米ではDrug tolerance limit濃度の観点から「酸乖離法」が注目され始めている。

そこで、本報告では抗体医薬品 (Cetuximab) に対するADA (モノクローナル抗体) を測定対象物質として、GyrolabによるADA分析方法 (「ブリッジング法」及び「酸乖離法」) の開発について検討した。

【材料】

●測定機器: Gyrolab (Gyros 社)

抗薬物抗体 (ADA)	① Anti-Cetuximab Monoclonal-Antibody / AbD19834_hIgG1 (BIO RAD, HCA222, 解離定数 (kD) = 0.5 nM) ② Anti-Cetuximab Monoclonal-Antibody / AbD19815_hIgG1 (BIO RAD, HCA223, 解離定数 (kD) = 10.5 nM) *測定項目「Drug tolerance limit濃度の確認」にのみ使用
ブランクマトリックス	ヒト血清 (個別別及びプール)
Capture抗体	Biotin標識化 - Cetuximab
Detection抗体	Alexa Fluor 647標識化 - Cetuximab
希釈液	Rexxip ADA (GYROS, P0020027)
Master Mix	Rexxip ADA (ブリッジング法) または中和緩衝液 (酸乖離法) で濃度調整後、Capture抗体及びDetection抗体を1:1 (v/v)で混和 (各25 µg/mL)
酸性緩衝液	0.5 mol/L Glycin - HCl (pH 2.7)
免疫除去試薬	Cetuximab (溶媒; 酸性緩衝液または血清)
中和緩衝液	2 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 及びRexxip ADAを1:1 (v/v)で混和
測定用CDタイプ	Gyrolab Mixing CD (GYROS, P0020026)

【測定項目】

* 分析方法「ブリッジング法」及び「酸乖離法」について、下記項目を検討した。

① カットポイントの設定及び分析感度の確認

個別別ヒト血清 (20個体、各n=1) を分析し、シグナル値よりカットポイント用換算係数を設定。また、ADA原液をヒトプール血清にて順次希釈し、分析感度確認試料を調製及び分析。シグナル値がカットポイント以上になる最低濃度を分析感度とした。

② 再現性

ADA2濃度の再現性用試料 (LPC、HPC、各n=3) を調製し、Screening assay及びConfirmatory assay (免疫除去試薬濃度=100 µg/mL) を各3バッチ分析。

③ Drug tolerance limit濃度の確認

Drug tolerance試料 (ADA濃度: 3濃度, 免疫除去試薬: 7濃度, 各n=1) を分析。換算係数を用いて求めたカットポイント以上のシグナル値を示す免疫除去試薬濃度をDrug tolerance limit濃度とした。

④ ADAのアフィニティーの違いによる影響の確認

アフィニティーの異なるADAを用いてDrug tolerance試料 (ADA濃度: 1濃度, 免疫除去試薬: 7濃度, 各n=1) を分析。分析感度及びDrug tolerance limit濃度を確認。

【分析方法】

1. 前処理

各試料を調製後、Rexxip ADAによって2倍希釈する。
(MRD: minimum required dilution = 2)



2. 機器条件

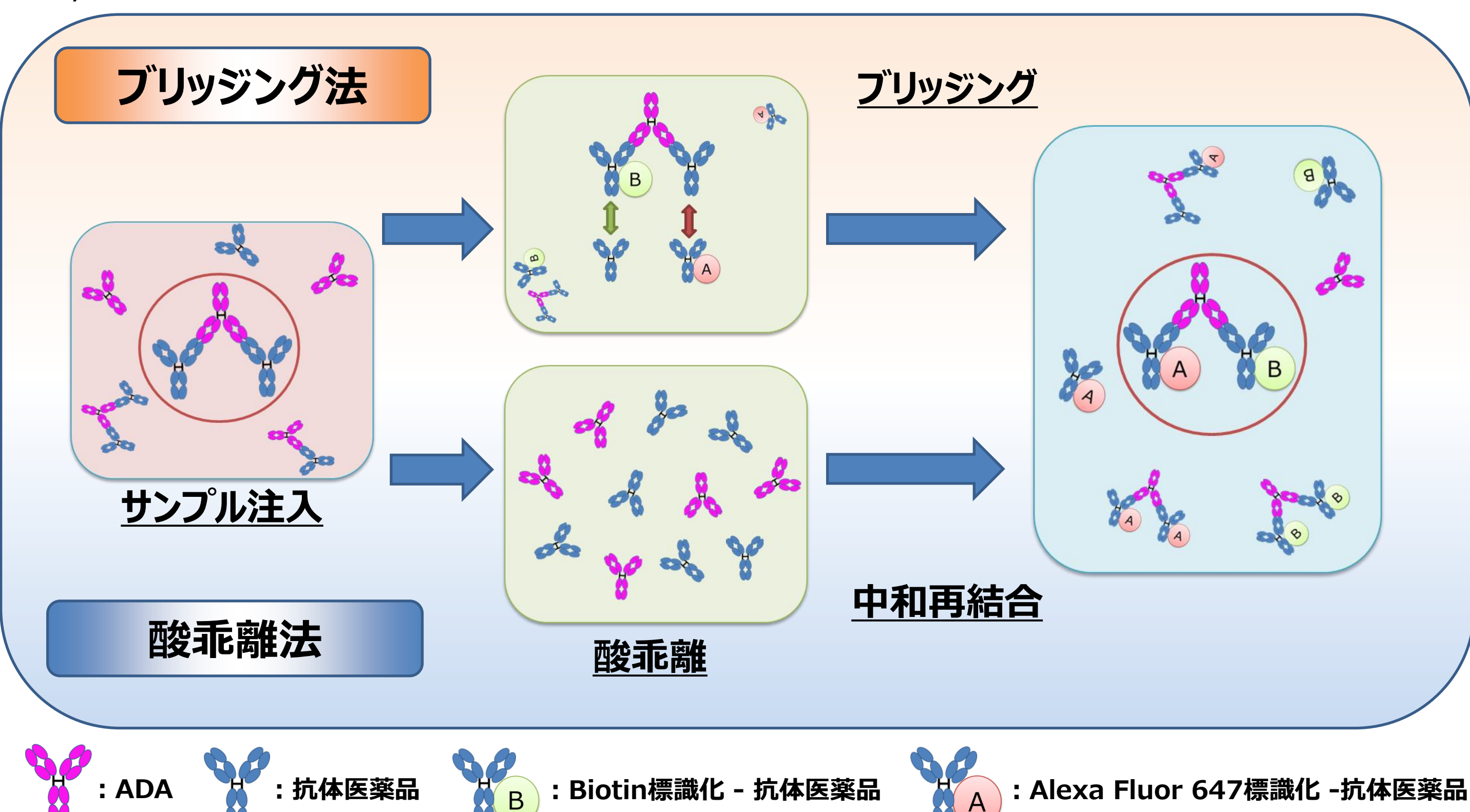
●Gyrolab測定条件

Step	ブリッジング法	酸乖離法
①	ニードル洗浄	
②	カラム洗浄 (2回)	
③	サンプル注入	
④	Rexxip ADA 注入	酸乖離 (酸性緩衝液注入)
⑤	抗体結合 (Master Mix)	中和再結合 (Master Mix)
⑥	バックグラウンド検出	
⑦	カラム洗浄 (4回)	
⑧	検出	
⑨	ニードル洗浄	

●Gyrolab設定条件

サンプル必要量	: MRD後試料; 約 5 µL (Duplicate)
酸乖離時間	: 30秒混和、10分間、インキュベート (室温)
抗体結合時間	: 30秒混和、10分間、インキュベート (室温)
Total 測定時間	: 約1時間 / 1 CD
洗浄液 1	: PBS-T (0.01 % Tween20)
洗浄液 2	: Gyrolab Wash Buffer pH 11 (GYROS, P0020096)

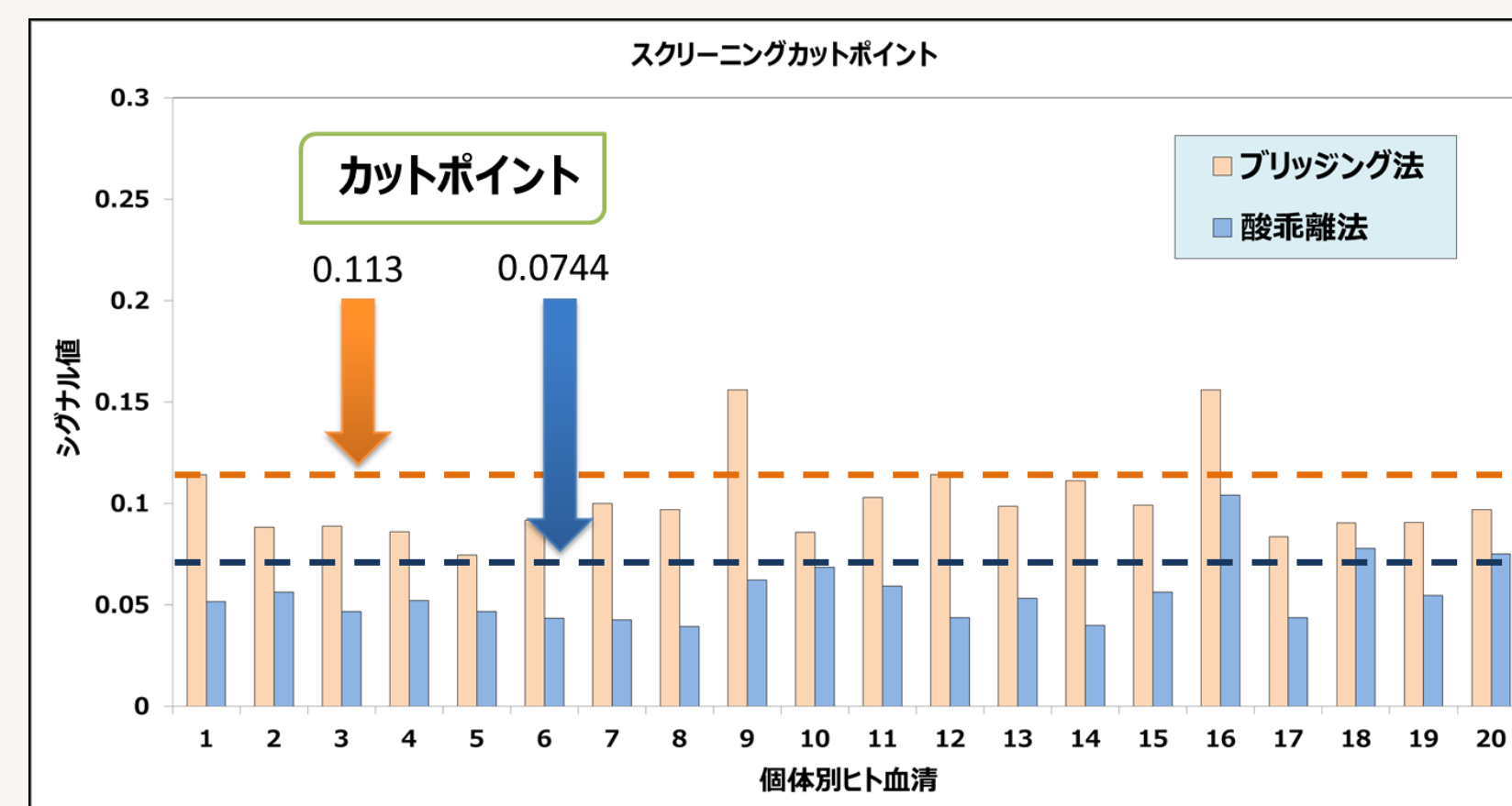
●Gyrolab分析方法概要



【結果】

1. カットポイントの設定及び分析感度の確認

1-1. カットポイントの設定

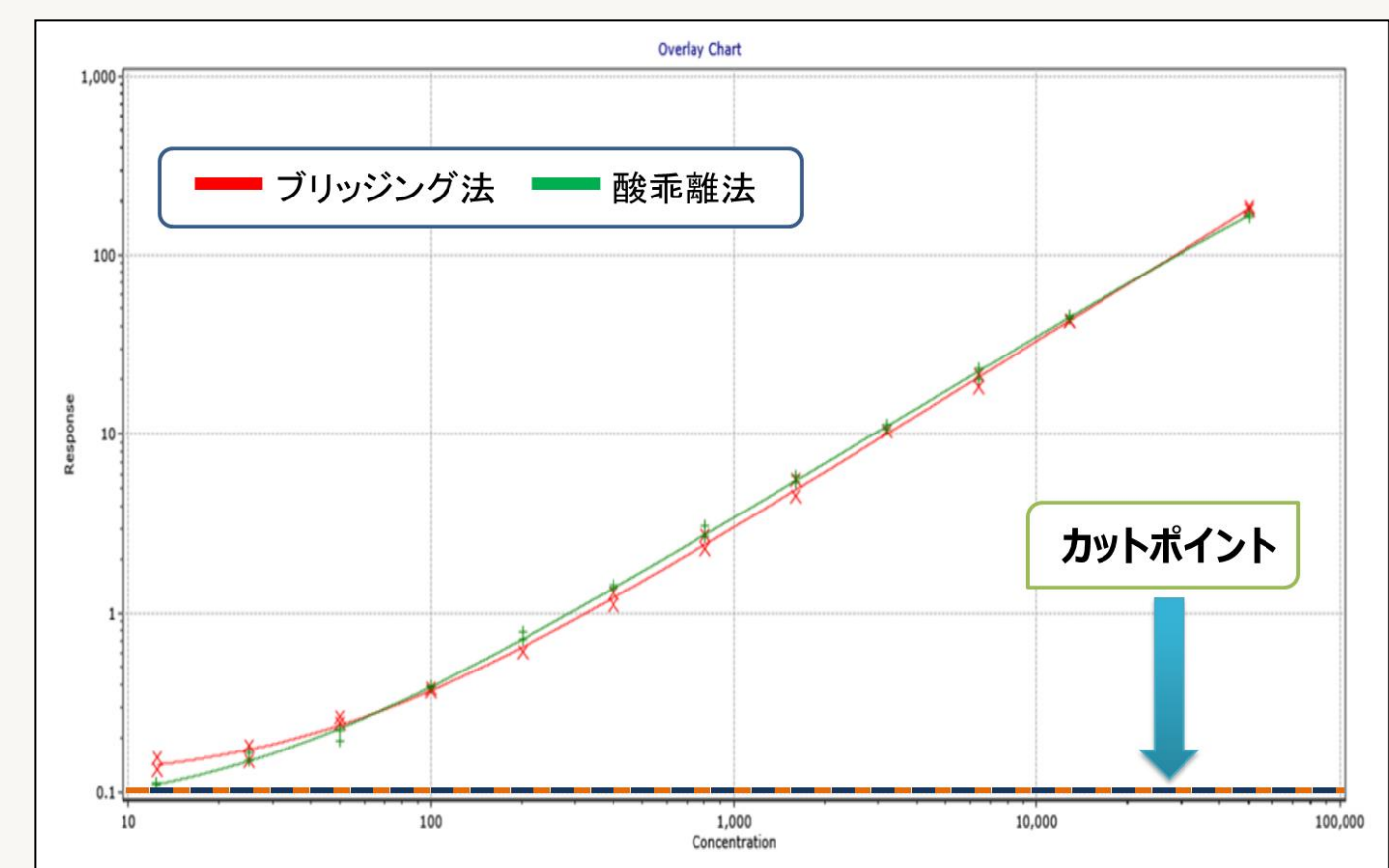


* 統計学上の外れ値は除外して算出した。

	換算係数
ブリッジング法	1.16
酸乖離法	1.33

◆各分析方法における換算係数を設定した。また、分析感度は同等であった。

1-2. 分析感度の確認



* カットポイント: ブリッジング法=0.117, 酸乖離法=0.0882

	ADA 濃度
ブリッジング法	12.5 - 50000 ng/mL
酸乖離法	12.5 - 50000 ng/mL

2. 再現性

ブリッジング法

バッチ	ADA 濃度 (ng/mL)			
	Screening assay シグナル値		Confirmatory assay 阻害率 (%)	
	LPC	HPC	LPC	HPC
1	200	10000	200	10000
	0.883	36.6	86.0	99.6
	0.749	38.3	85.0	99.6
2	0.793	37.2	86.0	99.6
	0.805	41.8	88.6	99.6
	0.750	41.2	89.0	99.7
3	0.805	41.4	87.2	99.7
	0.801	35.9	85.4	99.5
	0.796	37.0	87.6	99.6
平均	0.792	38.3	86.8	99.6
SD	0.042	2.5	1.4	0.1
CV (%)	5.3	6.5	1.6	0.1

SD: 標準偏差, CV: 変動係数

酸乖離法

バッチ	ADA 濃度 (ng/mL)			
	Screening assay シグナル値		Confirmatory assay 阻害率 (%)	
	LPC	HPC	LPC	HPC
1	200	10000	200	10000
	0.766	36.7	92.4	98.0
	0.790	36.5	92.6	97.7
2	0.770	35.7	91.9	97.5
	0.789	36.7	87.8	95.7
	0.765	36.5	88.3	94.2
3	0.805	35.7	86.9	94.0
	0.807	35.2	88.6	95.6
	0.791	32.1	85.0	94.3
平均	0.783	35.4	88.9	95.7
SD	0.017	1.6	2.8	1.7
CV (%)	2.2	4.5	3.1	1.8

SD: 標準偏差, CV: 変動係数

◆各分析方法について、Screening assay及びConfirmatory assayともに再現性のある結果が得られた。

3. Drug tolerance limit濃度の確認

ブリッジング法

Cetuximab 濃度 (µg/mL)	ADA 濃度 (ng/mL)		
	LPC	MPC	HPC
0	0.702	3.63	38.2
6.25	0.0889	0.129	11.0
12.5	0.0909	0.128	0.204
25	0.104	0.115	0.194
50	0.0896	0.115	0.174
100	0.0854	0.0998	0.136
500	0.108	0.0876	0.112

* カットポイント=0.117

ADA 濃度	Drug tolerance limit 濃度
LPC	<6.25 µg/mL
MPC	12.5 µg/mL
HPC	100 µg/mL

酸乖離法

Cetuximab 濃度 (µg/mL)	ADA 濃度 (ng/mL)		
	LPC	MPC	HPC
0	0.805	4.16	38.6
6.25	0.558	2.74	27.3
12.5	0.413	1.97	20.6
25	0.269	1.21	12.6
50	0.163	0.599	5.82
100	0.0889	0.250	2.35
500	0.0484	0.0611	0.238

* カットポイント=0.0728

ADA 濃度	Drug tolerance limit 濃度
LPC	100 µg/mL
MPC	100 µg/mL
HPC	>500 µg/mL

◆ブリッジング法に比べ、酸乖離法の方が高濃度のDrug tolerance limit濃度を得られた。

4. ADAのアフィニティーの違いによる影響の確認

▽解離定数 (kD); HCA222=0.5 nM, HCA223=10.5 nM

ブリッジング法

Cetuximab 濃度 (µg/mL)	ADA 濃度 (ng/mL)	
	HCA222	HCA223
0	10000	10000
6.25	40.4	0.874
12.5	11.8	0.397
25	0.202	0.291
50	0.199	0.246
100	0.180	0.233
500	0.150	0.161
500	0.107	0.110

* カットポイント=0.133

ADA	Drug tolerance limit 濃度
HCA222	100 µg/mL
HCA223	100 µg/mL

酸乖離法

Cetuximab 濃度 (µg/mL)	ADA 濃度 (ng/mL)	
	HCA222	HCA223
0	32.5	0.530
6.25	20.9	0.474
12.5	15.5	0.470
25	9.86	0.352
50	4.90	0.271
100	1.80	0.156
500	0.189	0.0587

* カットポイント=0.0745

ADA	Drug tolerance limit 濃度
HCA222	>500 µg/mL
HCA223	100 µg/mL

◆低アフィニティーADAを用いた場合の感度は、高アフィニティーと比べブリッジング法では約1/45、酸乖離法では約1/60となった。(Cetuximab濃度=0 µg/mL) また、ブリッジング法ではDrug tolerance limit濃度への影響はなかったが、酸乖離法では、高アフィニティーADAの方がより高濃度となった。

【考察】

- Gyrolabを用いたCetuximab抗体に対するADAの分析方法 (「ブリッジング法」及び「酸乖離法」) を確立した。
- Drug tolerance limit濃度の確認において、本系では酸乖離法の優位性が示された。
- 今回、ADAにモノクローナル抗体を用いて分析方法の確立を実施したが、ADAのアフィニティーの違いが分析感度及びDrug tolerance limit濃度へ影響する可能性が示唆された。このことから、分析法の確立を実施する際には、ADAにポリクローナル抗体を用いることが、非臨床及び臨床試験における分析精度を向上させると考えられる。