

●ECL 法を用いたバイオ医薬品の免疫原性アッセイ

TN371

Immunogenicity Assay of Biologics Using ECL

[概要]

バイオ医薬品の開発において免疫原性の評価は必須です。投与製剤への抗体が産生されると、薬理活性が消失するのみならず安全性上の問題も引き起こす可能性があるため、免疫原性アッセイを行うことは大変重要です。

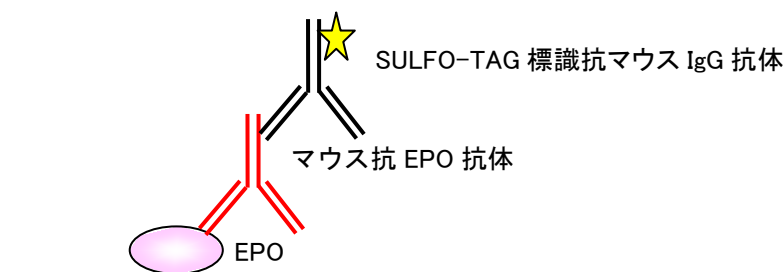
2008年4月に施行された欧州医薬品庁（EMA）のガイドラインでは、免疫原性評価のために電気化学発光（ECL）法が推奨されています¹⁾。

当社では、Meso Scale Discovery 社²⁾の電気化学発光（ECL）法を用いた免疫原性アッセイサービスを提供しており、測定方法の選択、標識抗体の合成、アッセイの条件検討及び設定、バリデーション、検体測定まで信頼性基準及び GLP に対応したサービスを承ります。

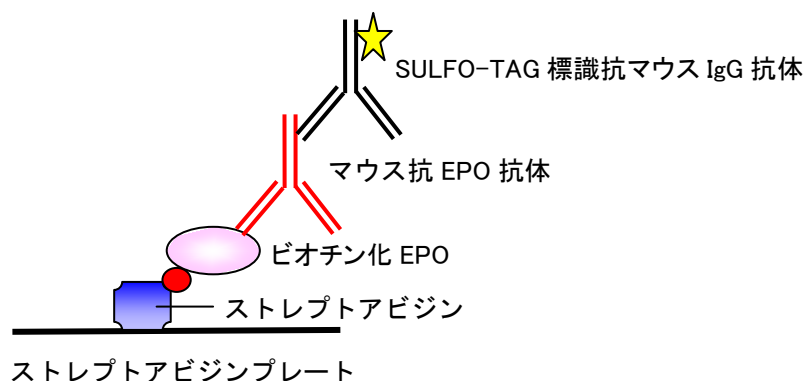
[測定方法]

免疫原性評価には以下の3種の方法があります。以下にマウス及びウサギ抗ヒトエリスロポエチン（EPO）抗体を分析対象としたモデルアッセイの例を示します。

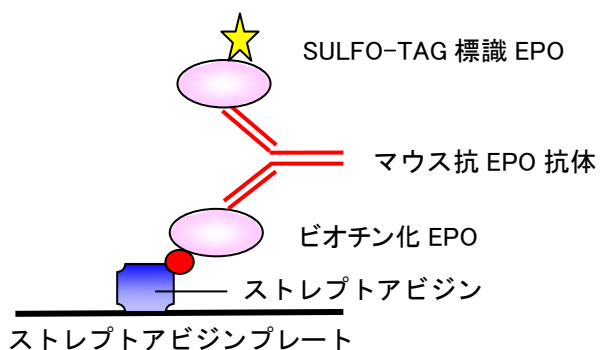
(1) 直接法



(2) 間接固相法



(3) ブリッジングアッセイ



[試験内容]

1. 試料：測定対象を含んだヒト血清
2. 方法

直接法及び間接固相法の場合

- (1) 抗原（間接固相法の場合はビオチン化抗原）をアッセイ・プレート（間接固相法の場合はストレプトアビジンプレート）に固相化
- (2) 分析試料を添加
- (3) 標識した検出抗体を添加
- (4) ECL 測定機器にて測定

ブリッジングアッセイの場合

- (1) ビオチン化抗原、分析試料、SULFO-TAG 標識抗原を混合し一定時間インキュベート
- (2) 上記の混合溶液の一部をストレプトアビジンプレートに添加
- (3) 一定時間インキュベート後、ECL 測定機器にて測定

[測定例]

表 1 の抗体及び抗原を使用し、表 2 の条件で上記の測定方法を実施しました。

表 1 抗体及び抗原

略式名	抗体名/抗原名	内容	メーカー
MAb1	MAB287	Mouse IgG1	R&D Systems, Inc.
MAb2	MAB1072	Mouse MAb	Chemicon(Millipore Corp)
MAb3	BM802	Mouse IgG1	Acris Ab GmbH
Poly1	AB-286-NA	Total Rabbit IgG	R&D Systems, Inc.
Poly2	LS-C-11323	Rabbit Polyclonal(IgG)	Life Span Bioscience
EPO	ESPO	Recombinant Human Erythropoietin- α	Kyowa Hakko Kirin Pharma.
	EPO- α		Prospec-Tany Techno gene Ltd.

表 2 測定条件

アッセイ法	抗原	検出抗体
直接法	ESPO	MAb1～3は①*を使用 Poly1及び2は②**を使用
間接固相法	ビオチン化 EPO- α	MAb1～3は①*を使用
ブリッジングアッセイ	1. ビオチン化 EPO- α 2. SULFO-TAG 標識 EPO- α	使用せず

①* : SULFO-TAG 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体、②** : SULFO-TAG 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体

(1)直接法

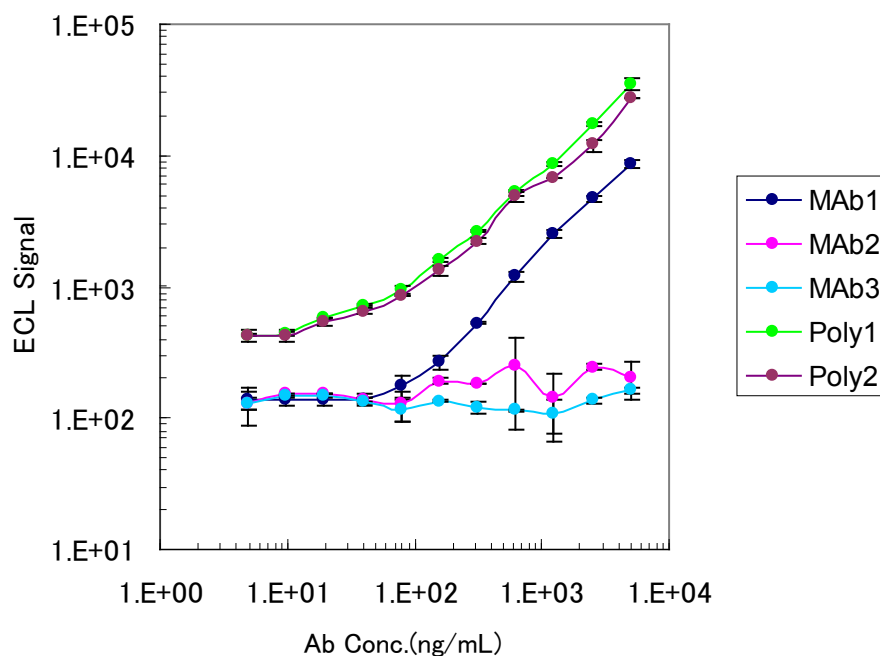


図 1 直接法の検量線

直接法の長所としては簡易であること、一方、短所としては低感度及び偽陰性を頻発することが挙げられます。

(2)間接固相法

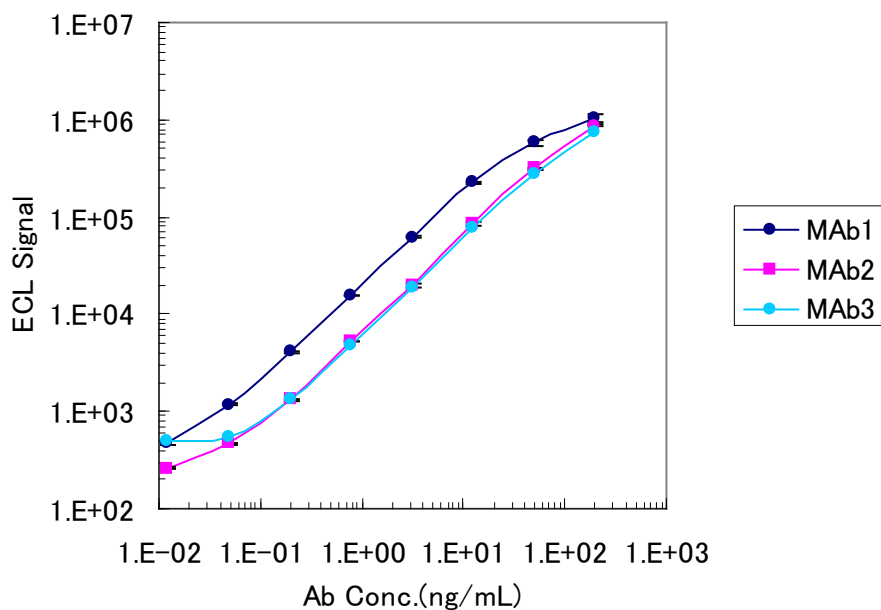


図2 間接固相法の検量線

MAb1では直接法に比較して6500倍感度が上昇しました。(表3参照)

間接固相法の長所として、直接法に比較してより高感度であり、また、偽陰性を低減することが挙げられます。

(3)ブリッジングアッセイ

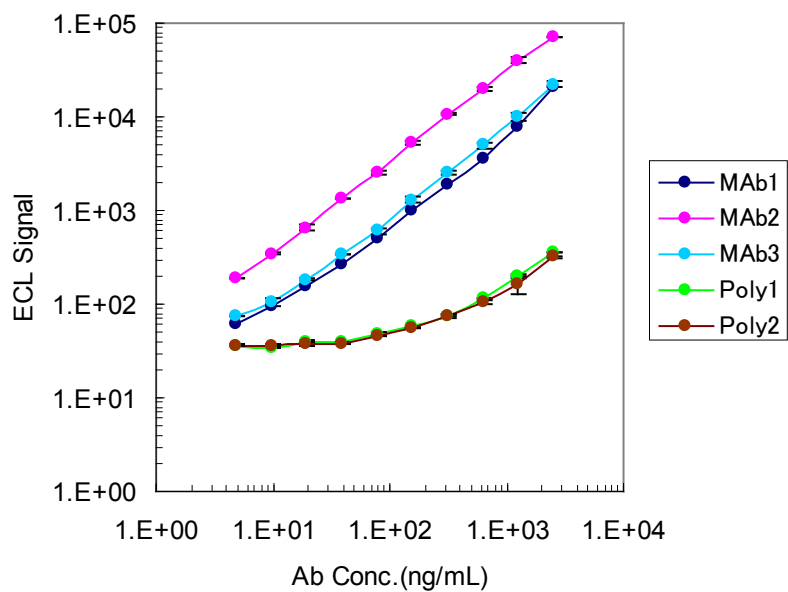


図3 ブリッジングアッセイの検量線

ブリッジングアッセイの長所としては、偽陰性を低減すること及び標識抗体が不要であることが挙げられます。

表 3 各検出法における検出範囲

抗体名	直接法	間接固相法	ブリッジングアッセイ
MAb1	78.1～5000 ng/mL	0.012～500 ng/mL	4.88～2500 ng/mL
MAb2	検出されず	0.049～200 ng/mL	4.88～2500 ng/mL
MAb3	検出されず	0.2～200 ng/mL	4.88～2500 ng/mL
Poly1	39.1～5000 ng/mL		39.1～2500 ng/mL
Poly2	39.1～5000 ng/mL		39.1～2500 ng/mL

[参考文献]

- 1) Guideline on immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins, European Medicines Agency, committee for medical products for human use (CHMP), April 2008.
- 2) Meso Scale Discovery 社ホームページ <http://www.meso-scale.com/>

[関連技術リンク]

<https://www.scas.co.jp/technical-informations/technical-news/pdf/tn359.pdf>