

●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]

2017 年 12 月に施行された欧州医薬品庁 (EMA) のガイドラインでは、低親和性抗体を含むサンプルでの偽陰性の発生の危惧から、免疫原性評価のブリッジングアッセイ (Bridging assay)、電気化学発光ベースのアッセイ (ECL : Electro chemiluminescence)、表面プラズモン共鳴法 (SPR : Surface plasmon resonance) など適切なスクリーニングアッセイを選択することを要求しています²⁾。

当社では、Meso Scale Discovery 社³⁾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ます。測定方法の選択、標識抗体の調製、アッセイの条件検討および設定、バリデーション、検体測定まで信頼性基準および GLP 基準に対応しております。

本稿では、直接固相法 (Direct coating method)、間接固相法 (Indirect coating method)、ブリッジングアッセイの 3 種の免疫原性評価法を用いて抗ヒトエリスロポエチン (EPO) 抗体を分析対象とした評価事例と各手法の特徴を紹介します。

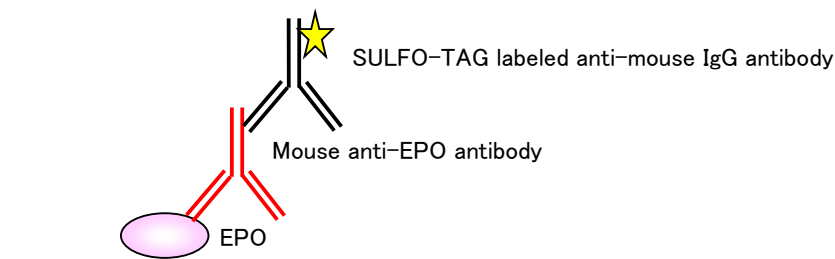
[背景]

体内に投与されたバイオ医薬品 (生物学的製剤) が抗原として作用し、そのバイオ医薬品を標的に誘導される抗薬物抗体 (ADA: Anti-drug antibody) が発現する場合があります。ADA の中にはバイオ医薬品に対して中和活性を示す中和抗体 (NAbs: Neutralizing antibodies) があり、その抗体は投薬での治療効果を失わせることがあります。特に内因性の (バイオ医薬品の) 類似物質の活性が中和活性によって弱められ、完全に阻害されることで、自己免疫型欠損症候群を引き起こす可能性が懸念されます¹⁾。

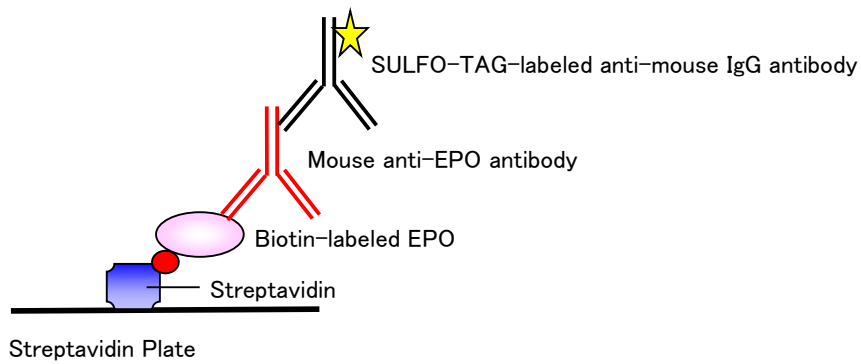
[測定方法]

免疫原性評価には以下の 3 種の方法があります。以下にマウスおよ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。

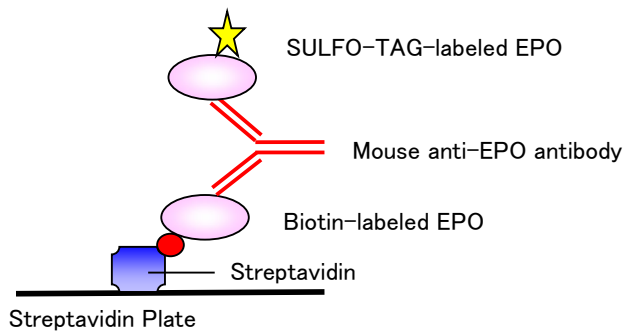
(1) Direct coating method



(2) Indirect coating method



(3) Bridging assay



[試験内容]

1. 試料：測定対象を含んだヒト血清
2. 方法

直接固相法およ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]

Table1 記載の 5 種類の抗 EPO 抗体および 2 種類の EPO を使用し、Table 2 の条件で上記の測定方法を実施しました。

Table1 Antigens and antibodies used

Abbreviation of analyte antibody	Name of Antibody/Antigen	Specification	Supplier
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.

Table2 Assay Condition

Assay format	Drug	Detection antibody
Direct coating method	ESPO	Use ①* for MAb1 to 3 Use ②** for Poly1 and 2
Indirect coating method	Biotin labeled EPO- α	Use ①* for MAb1 to 3
Bridging assay	1. Biotin labeled EPO- α 2. SULFO-TAG labeled EPO- α	Not used

① * : SULFO-TAG labeled goat anti-mouse IgG antibody

② ** : SULFO-TAG labeled goat anti-rabbit IgG antibody

Table 3 に直接固相法、間接固相法、ブリッジングアッセイの測定結果を示します。

Table3 Detection range

Abbreviation of analyte antibody	Direct coating method	Indirect coating method	Bridging assay
MAb1	78.1~5,000 ng/mL	0.012~500 ng/mL	4.88~2,500 ng/mL
MAb2	Not detected	0.049~200 ng/mL	4.88~2,500 ng/mL
MAb3	Not detected	0.2~200 ng/mL	4.88~2,500 ng/mL
Poly1	39.1~5,000 ng/mL		39.1~2,500 ng/mL
Poly2	39.1~5,000 ng/mL		39.1~2,500 ng/mL

以下に、3 種の免疫原性評価法（直接固相法、間接固相法、ブリッジングアッセイ）各手法の特徴を示します。

[3種の免疫原性評価法の特徴]

(1) Direct coating method

直接固相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および偽陰性を頻発することが挙げられます。

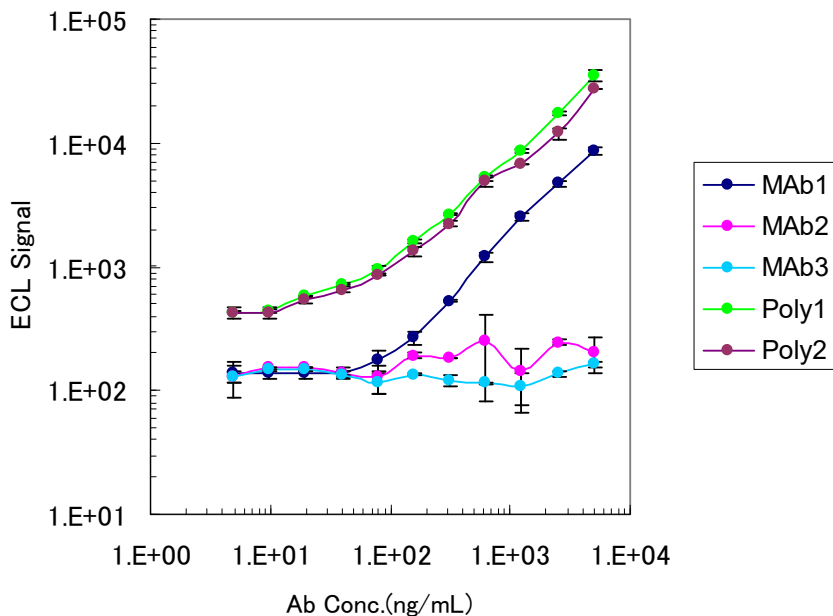


Fig. 1 Calibration curve of direct coating method

(2) Indirect coating method

MAb1では直接固相法に比較して6,500倍感度が上昇しました。(Table 3 参照)

間接固相法の長所として、直接固相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。

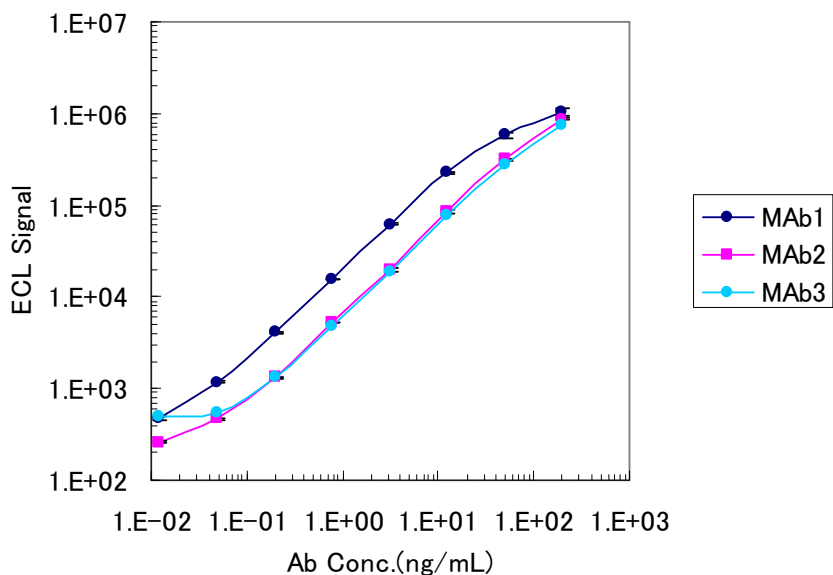


Fig.2 Calibration curve of indirect coating method

(3) Bridging assay

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および標識抗体が不要であることが挙げられます。

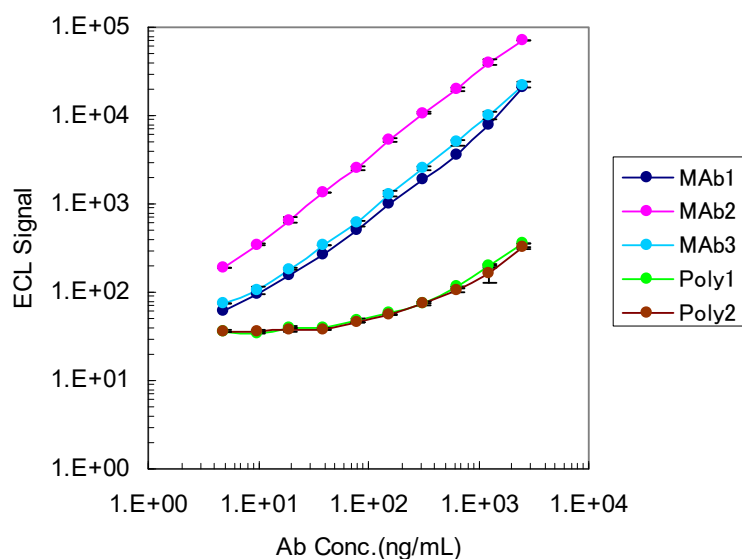


Fig.3 Calibration curve of bridging assay

[参考文献]

- 1) Anthony R. Mire-Sluis, Yu Chen Barrett, Viswanath Devanarayan, Eugen Koren, Hank Liu, Mauricio Maia, Thomas Parish, George Scott, Gopi Shankar, Elizabeth Shores, Steven J. Swanson, Gary Taniguchi, Daniel Wierda, Linda A. Zuckerman, *J. Immunol. Methods*, 289, 1(2004).
- 2) Guideline on Immunogenicity assessment of therapeutic proteins, European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), May 2017
- 3) Meso Scale Discovery, Bridging Immunogenicity Assays Guidelines for Assay Development
<<https://www.mesoscale.com/~media/files/technical%20notes/bridging%20immunogenicity%20assay.pdf?la=ja-jp>>(accessed 2025.7.2)

[住化分析センターの分析メニューと技術事例]

生体試料中の高分子（抗体、糖タンパク、ADC）濃度測定

<https://www.scas.co.jp/services/lifescience/pharmaceuticals/concentration/new-modality.html>

[関連技術リンク]

TN376 ECL 法を用いた薬物共存下における抗薬物抗体測定

<https://www.scas.co.jp/technical-informations/technical-news/pdf/tn376.pdf>