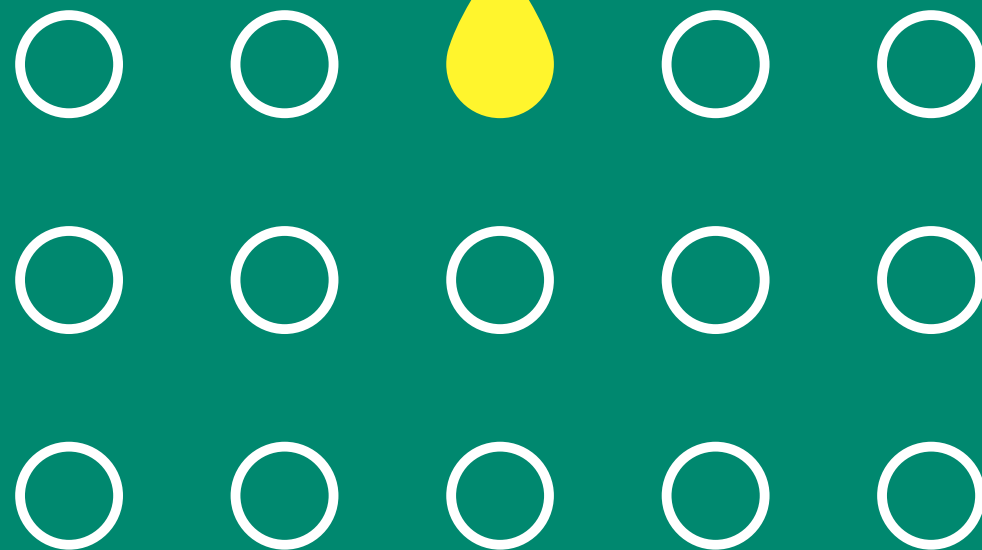


Cytiva Webinar

まもなく開始します。
もうしばらくお待ちください。

※開始時刻から30秒ほど遅れての配信となります。

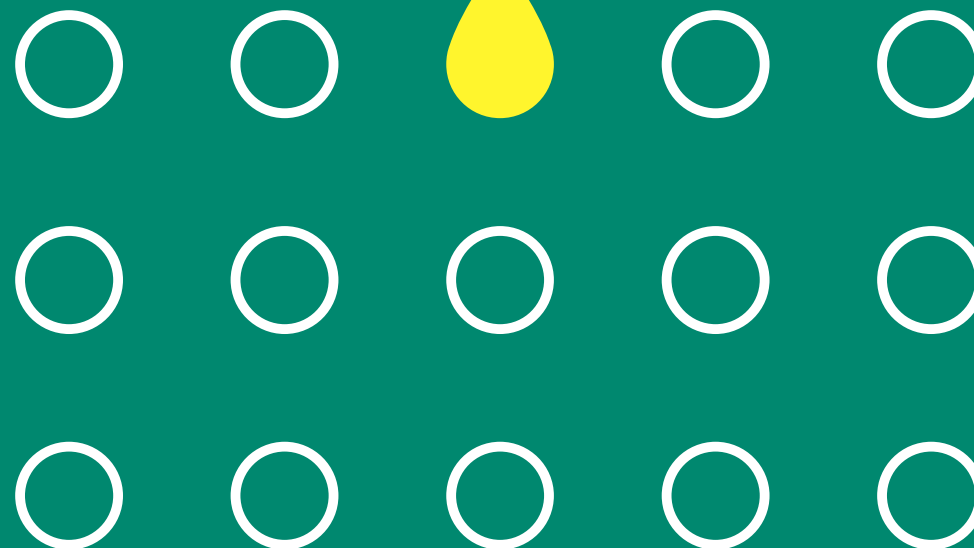


音声につきまして

- 視聴者の皆様の音声は講師、他の参加者には届きません。

ご質問につきまして

- 画面右上のはてなマークをクリックして現れる画面に質問内容を入力してください。
- 講演後まとめて講師より回答いたします。
- 入力いただいたご質問内容、質問者のお名前は、主催者にのみ公開されます。





Biacoreでタンパク質医薬品の 品質評価をするには？

分析法開発とバリデーションの基本的考え方

Masami Koinuma
September 23, 2020

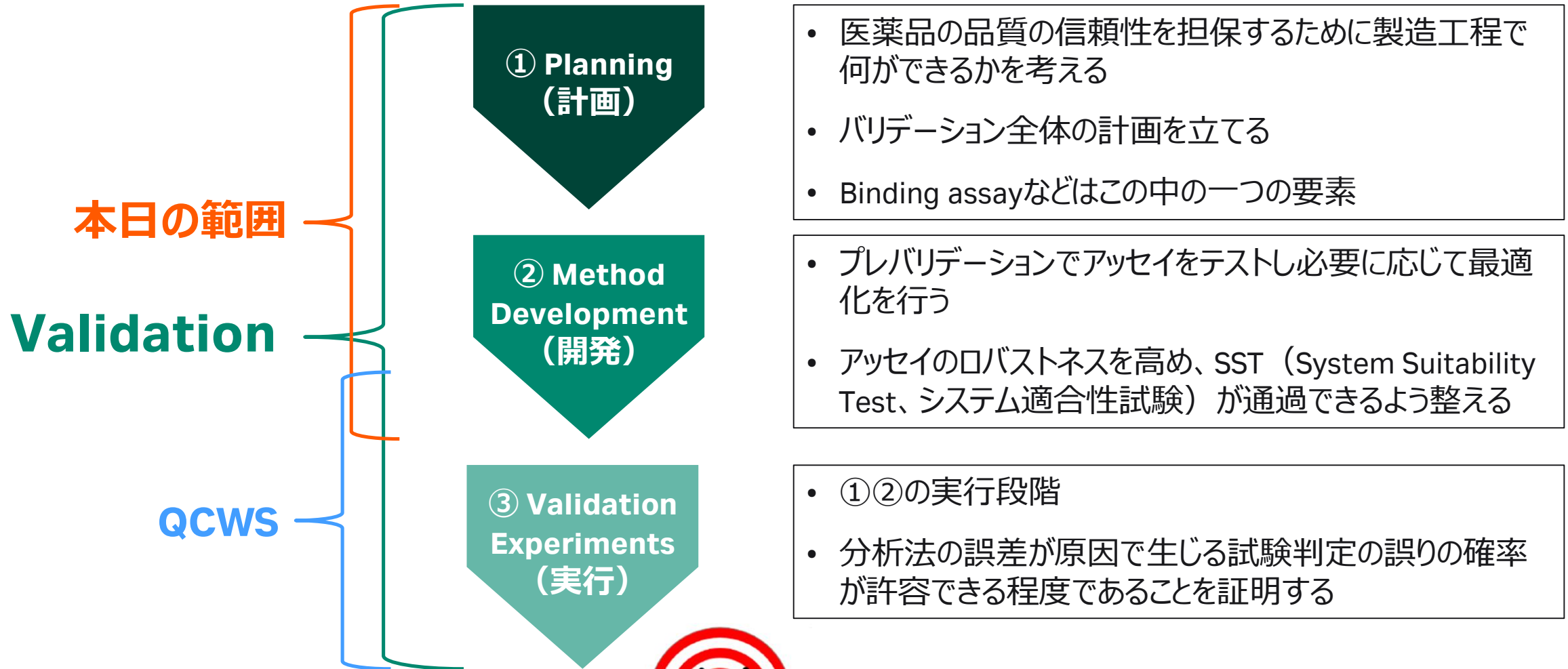
Agenda

1. タンパク質の品質評価をBiacoreで行うことの意義について
2. Validation の考え方
3. Biacore の Assay validation
 - 3-1. Report point data
 - 3-2. Sensorgram data
4. Biacore の Assay development
5. Case study
6. まとめ

- R&DでBiacoreを利用しているが、これからタンパク質の品質評価でも使っていくことになった方
- Biacoreを品質評価で使用し始めたばかりの方、改めて復習したい方



本日の " Validation " の範囲について



1

タンパク質の品質評価を Biacore で行うことの意義について

なぜ Biacore ?

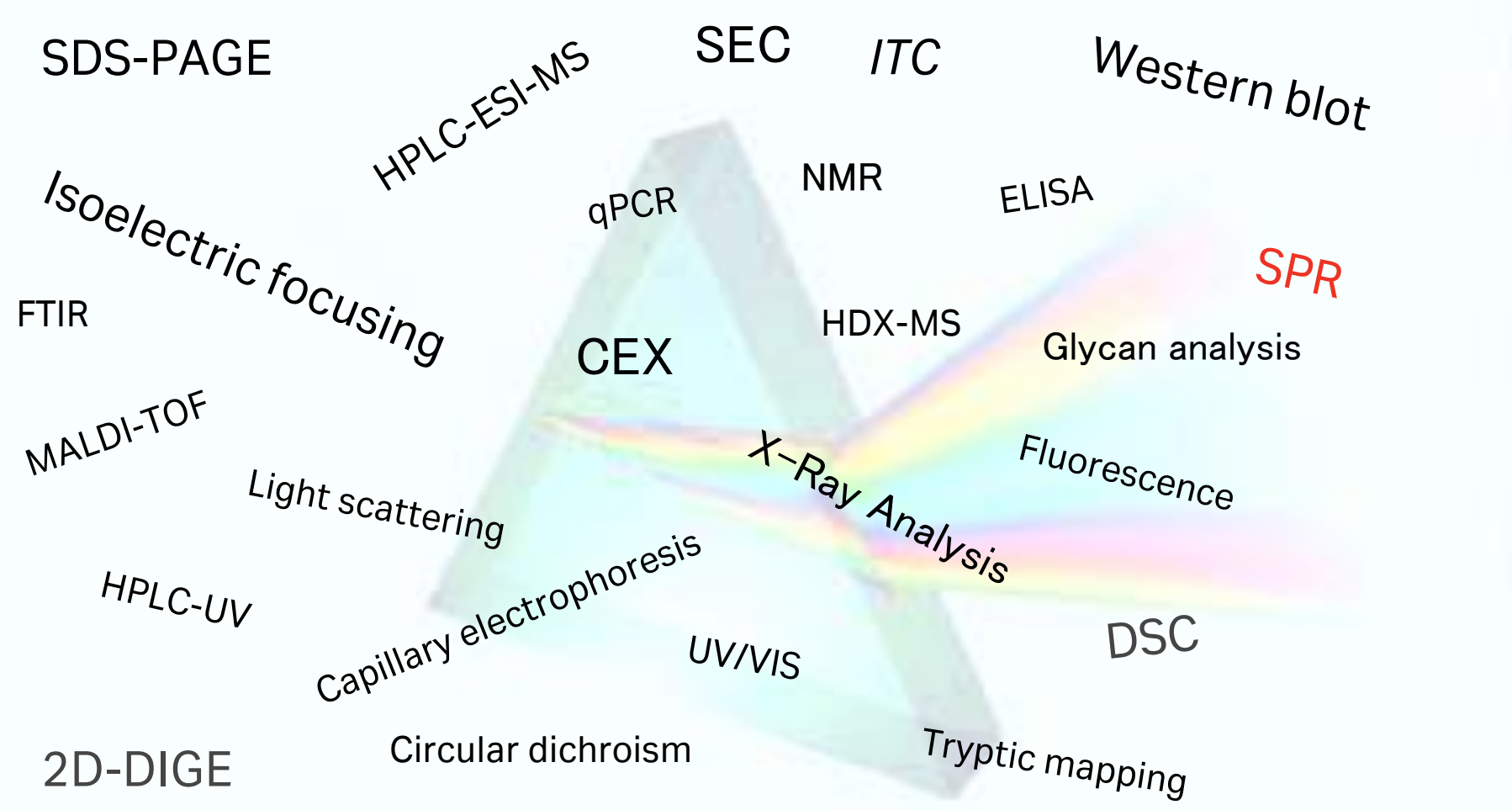
Validation の定義

① Planning
(計画)

② Method
Development
(開発)

③ Validation
Experiments
(実行)

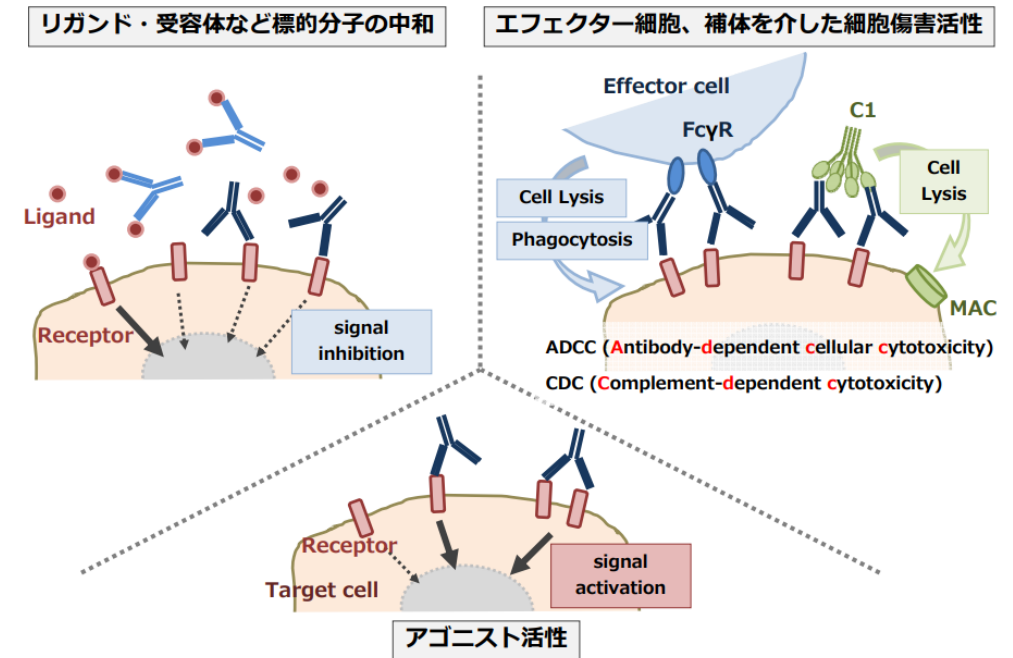
測定技術としての SPR



なぜ Biacore で Binding assay を実施するのか？

- MOAが直接結合によるものであれば Binding assay は大変有効
- 自動化でき労力が少ない
- (二次抗体を用いないので) アッセイ系構築までの時間を短縮可能
- ラベルフリー・リアルタイムで結果のバラつきが少なく、飛び値が出たときも理由が分かりやすい
- 21 CFR Part 11 準拠、GMP 準拠
- エフェクター細胞、補体を介した細胞障害活性についても相関性が見られる

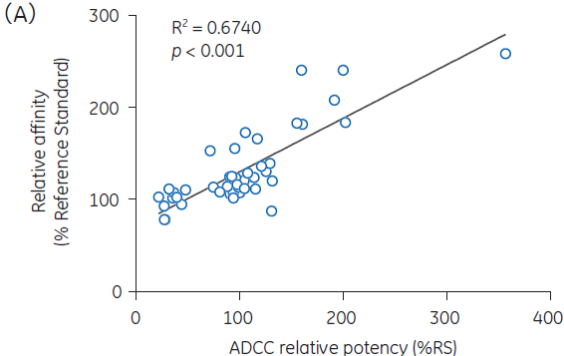
図4 抗体医薬品の主な作用機序



出典：国立医薬品食品衛生研究所ホームページ
(<http://www.nihs.go.jp/dbcb/mabs.html>より引用)

ADCC 評価のためのオルソゴナルな手法

- Sartorius Stedim BioOutsource 社によるバイオシミラーの同等性の評価
- アダリムマブ、エタネルセプト、トラスツズマブを標準品としてFcγRIIIaとの Binding assay を実施
- 細胞アッセイの ADCC 活性と Biacore の結合データに相関性があることを確認
- 製造、品質管理にまで適用を拡大できる可能性



バイオシミラー分子のキャラクタリゼーション：有効性評価のためのオルソゴナルな手法としての SPR 利用

バイオシミラーは発売および成長を続けています。2015年の時点では、米国または欧州で承認されたバイオシミラーモノクローナル抗体 (mAb) は 1 種類しかありませんでしたが、2016 年には同地域で 5 種類のバイオシミラー mAb が承認されています (表 1)。発売日は未定であるものの、FDA および EMA では同様の申請を多数審査中であり、2017 年にはさらに増える見込みです。

バイオシミラリティーを証明するために、医薬品メーカーは「そのバイオシミラーが細胞株、製造法等の相違により完全一致はしないが、先行品に非常に類似」しており、「安全性、純度、および有効性に関して、バイオシミラーと先行医薬品との間に臨床的に意味のある差がない」ことを示さなければなりません (文獻 1, 2)。バイオシミラリティーの証明に関して、規制当局は、段階的な「エビデンスの総合性 (Totality of Evidence)」アプローチをとっています。提示されたバイオシミラーと先行医薬品が構造解析および機能解析上で非常に類似していれば (すなわち “fingerprint-like” な類似)、in vivo 動物実験および臨床試験の計画および実施を行う際に、よりターゲットを絞った選択的なアプローチをとることができます。開発初期に厳密な in vitro の構造および機能のキャラクタリゼーションを行うことで、よりターゲットを絞った選択的なアプローチを選択することができます。

表 1. 2016 年に米国および欧州で承認されたバイオシミラー mAb

バイオシミラー	Benepali™	Remsuma™	Flixabi™	Erelzi™	Anjevita™
バイオシミラー開発業者	Samsung/ Biogen	Pfizer/ Celltrion	Biogen	Sandoz	Amgen
先行医薬品	Enbrel™	Remicade™	Remicade	Enbrel	Humira™
先行薬開発社	Amgen	J&J	J&J	Amgen	Abbvie
承認された地域	欧州	米国	欧州	米国	米国

Biacore を用いたタンパク質の品質評価概略

なぜタンパク質の品質評価をするか？

基礎研究

タンパク質の品質が担保されていないと、測定値（KDなど）が誤ったものになる

医薬品製造法開発

タンパク質の品質特性の変化の指標として有用

医薬品出荷試験

医薬品の有効性・安全性を証明するための品質管理をする義務がある

なぜBiacoreで品質評価するか？

- ノンラベルで Affinity や Kinetics など、他手法では得づらいデータで評価できる
- 単なる濃度測定ではなく「結合活性」濃度が評価できる
- 二次抗体などが必要なく、アッセイ系開発時間が短縮できる
- （細胞ではなく）分子を取り扱うため、管理が容易であることや再現性が高い
- 自動測定で労力が少ない
etc...

Biacore で使う数値

Validation しやすいもの

- 濃度定量値
- %EC50値

データが含有する情報が多いもの

- k_a 、 k_d 値
- KD値

新しい指標

- Sensorgram comparison
- CFCA（標品不要の濃度測定）

評価に必要な数値が何かとその測定（試験）法に求められるバリデーションの厳密さや、実務時間・労力などを総合的に見積もることが重要



Biacore が提供するサービス

Biacore SPR system



Single needle to eight needle parallel SPR analysis instruments

Structure –function analysis, binding, affinity

Biacore software



System-specific software and Biacore™ Insight Evaluation Software with software extensions

Screening, titer, affinity, kinetics, Sensorgram Comparison

Biacore consumables and sensor chips



Save time and effort with functionalized surfaces, ready-to use capture kits and sensor surfaces for a broad range of molecules

Characterization and quality control, epitope binning, kinetics, concentration, Fc-receptor binding

**トレーニング、アプリケーション紹介、サポートサービスまで提供
研究、創薬から品質管理、診断薬の適格性確認まで実施可能**

Biacore GxP パッケージが提供されています



積極的に開発・設計検証されたソフトウェア

- GxP規制環境下で使用されることを想定
- 21 CFR Part 11 に対応

GxP サービス

- IQ/OQ/IPQ の実施と文書化

その他のサポート

- HW/SW適合証明書
- システム評価報告書
- GxP ハンドブック
- 監査証跡

IQ/OQ/IPQ = installation qualification/
operational qualification/initial performance qualification

2

Validation の考え方

なぜ Biacore ?

Validation の定義

① Planning
(計画)

② Method
Development
(開発)

③ Validation
Experiments
(実行)

Validation と Specification (規格) について (1)



- 外観はともかく含量や有効性は判断できない (重要な品質特性 (CQA) 不明)
- 確認作業も最終製品からの抜取試験なので数が限られる
- 製造工程において確認できれば全数の品質の信頼性を担保できる

バリデーションの本質

あらかじめ決められた**規格**と品質に合致する製品が恒常的に製造されることを高度に保障し、それを**文書化**すること

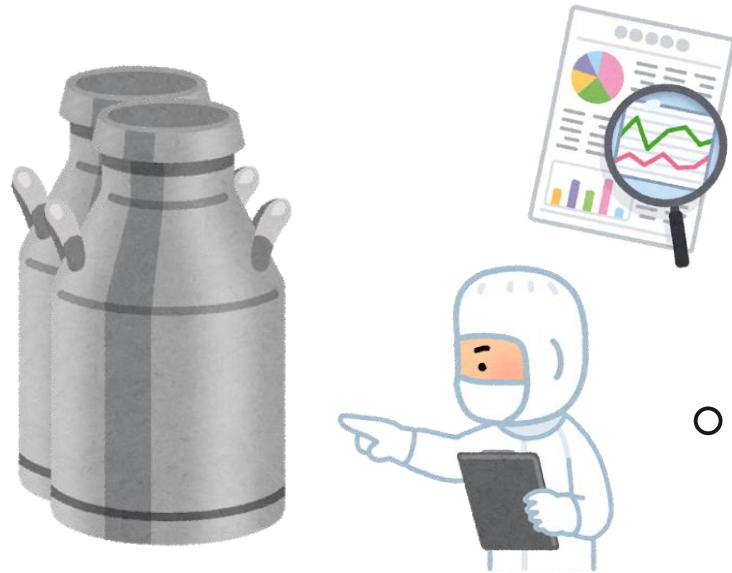
設備・工程・手順



期待された結果になることを科学的根拠に基づき検証し、これを文書化

- どんな条件で製造するか？
- 何を測定すればよいのか？
- 測定データのバラつきは許容範囲内か？

Validation と Specification (規格) について (2)

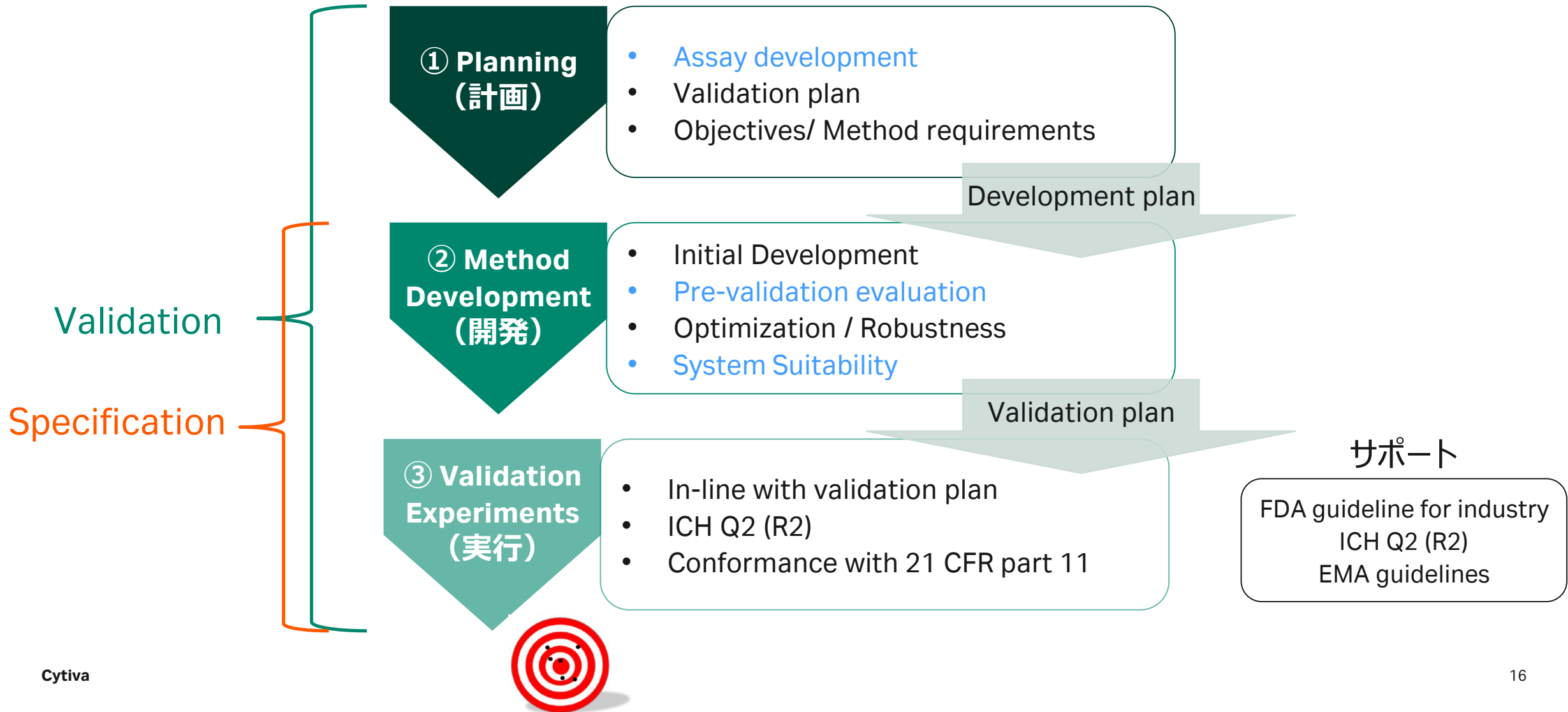


- 規定された方法に従って試験するとき、原薬や製剤がリストにあるすべての判定基準に適合する
- 各項目は、品質特性すべてを示すのではなく、安全性や有効性を確保するうえで重要な特性 CQA に焦点を絞る

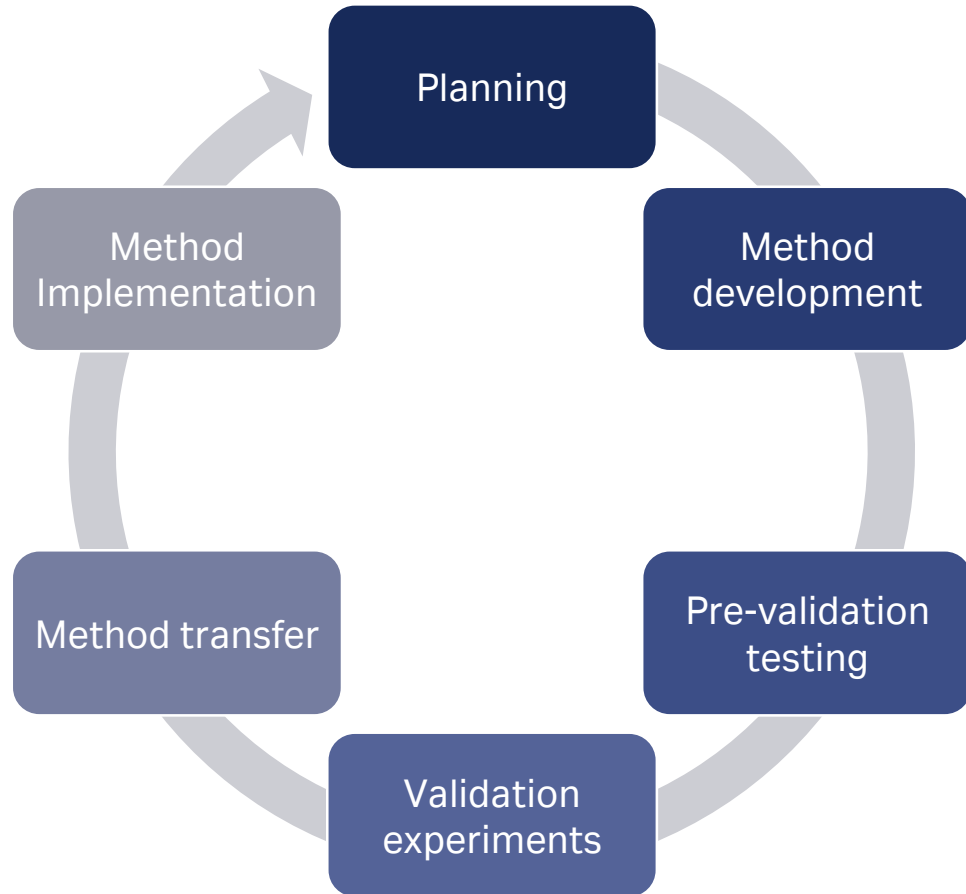
試験方法、その試験に用いる分析法に関する記載、ならびにその方法で試験したときの適否の判定基準 (限度値、許容範囲 **Acceptance criteria** あるいはその他の基準) からなるリスト

開発段階における徹底的な品質特性の解析が求められる

Validation はチームワーク



Biacore での Validation 計画ワークフロー



あまり早い段階で多くのことをしない方が賢明
その代わりに、手法の目的やアプリケーションの
重要性に応じて段階的な Validation のアプ
ローチを図る

3

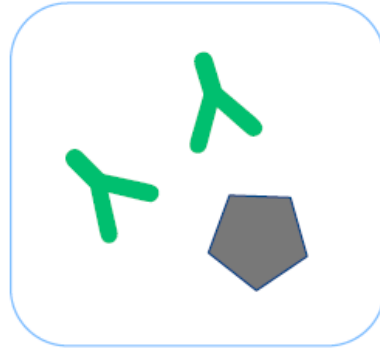
Biacore の Assay validation



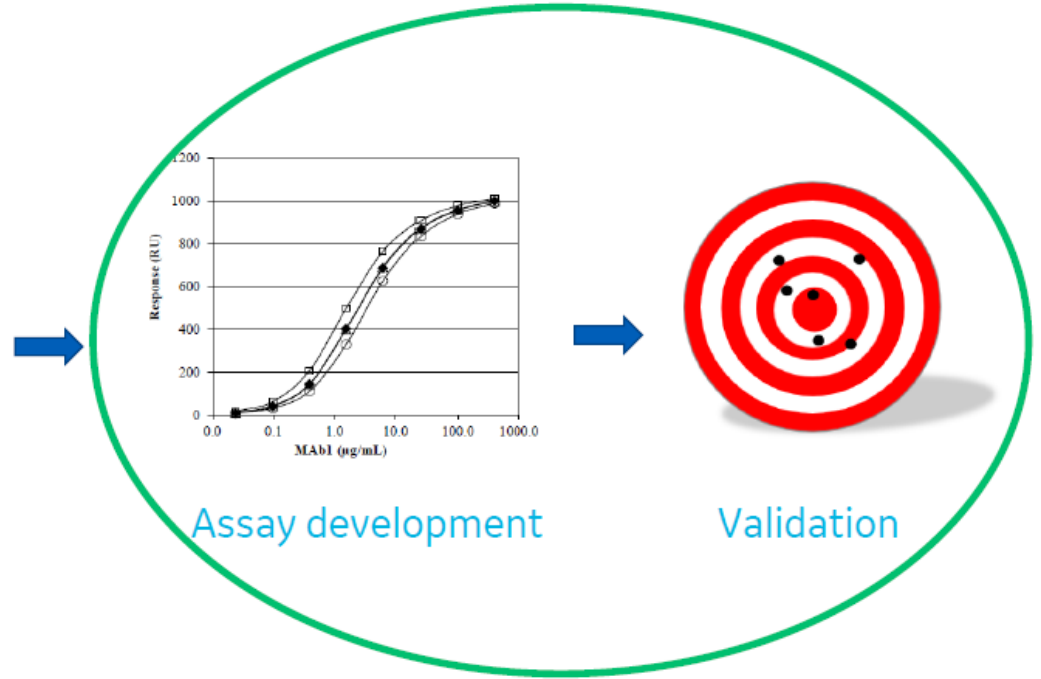
Biacore assay validation のストラテジー



Instrument qualification



Key reagents

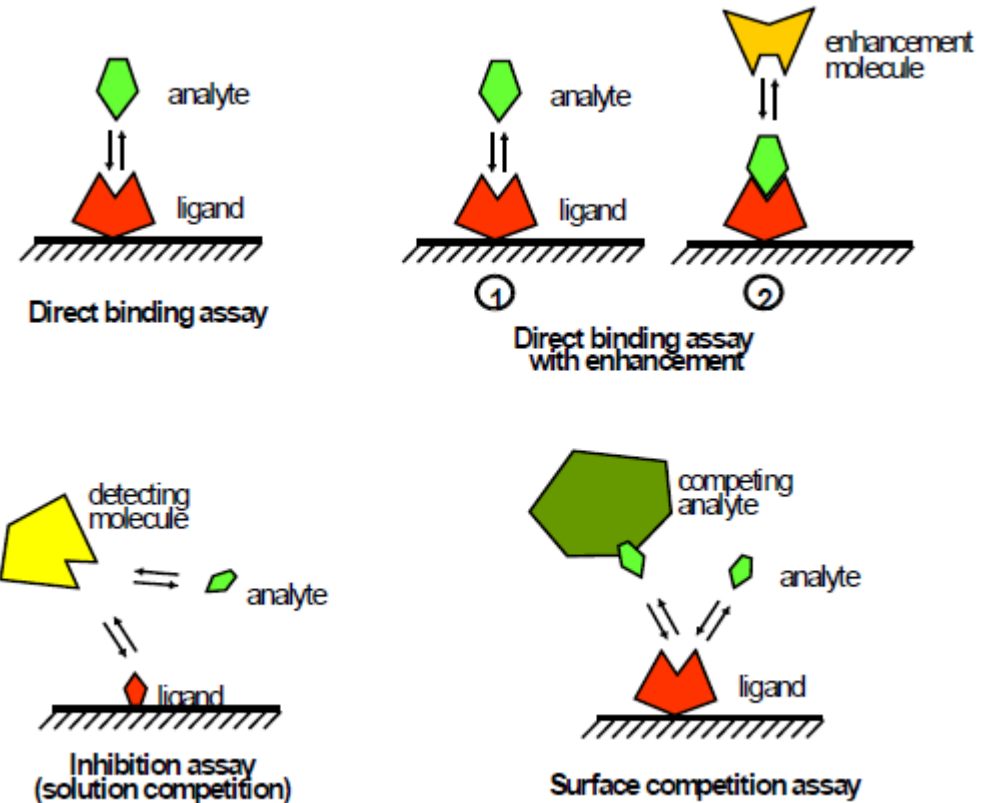


Assay development

Validation

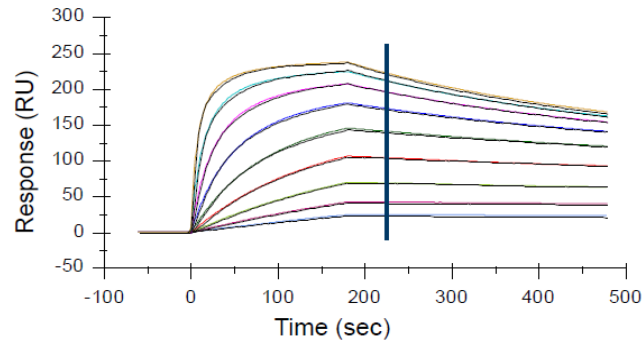
(Assay development の前に) 基本的なアッセイデザインを考える

- MOA によりアッセイデザインを選択する
 - 直接結合法？
 - 溶液競合法 (阻害法)？
 - 表面競合法？
- データのアウトプットを考える
 - 検量線ありの濃度測定？
 - Dose Response Curve を用いた Potency assay？ (EC50, PLA, Slope ratio)
 - Affinity / Kinetics？



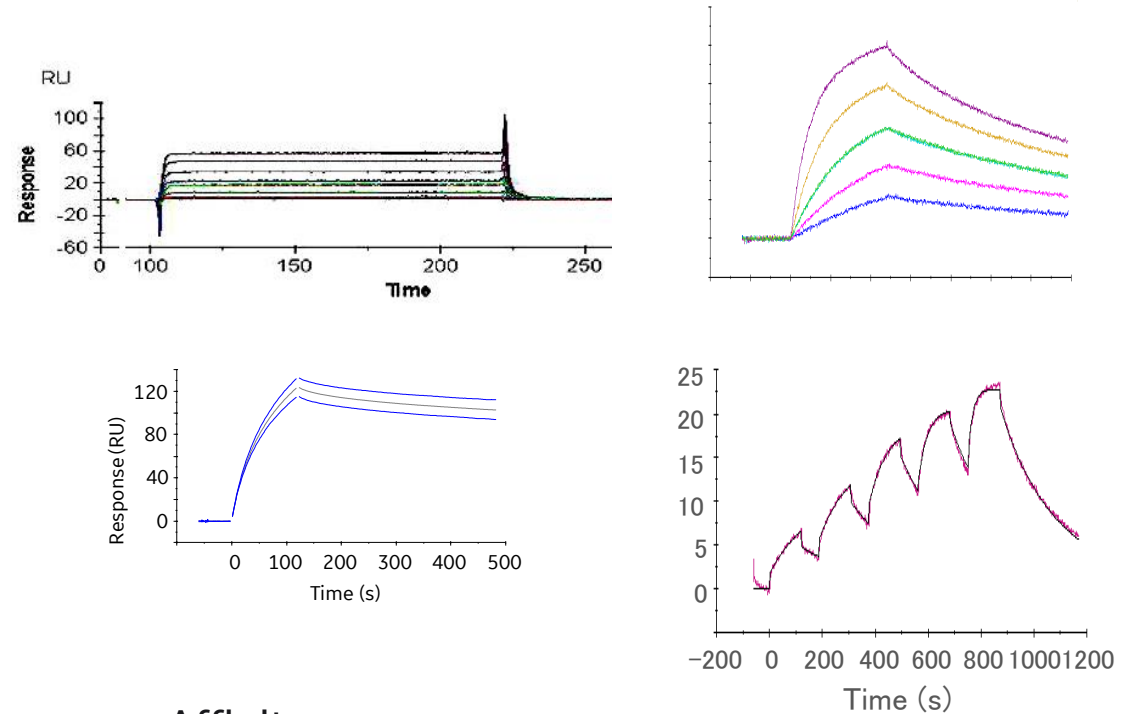
Biacore で得られる data format

Report point data



- Concentration
 - 検量線あり
 - 検量線なし (CFCA)
- EC50, PLA, 4-parameter

Sensorgram data



- Affinity
- Kinetics
- Sensorgram comparison

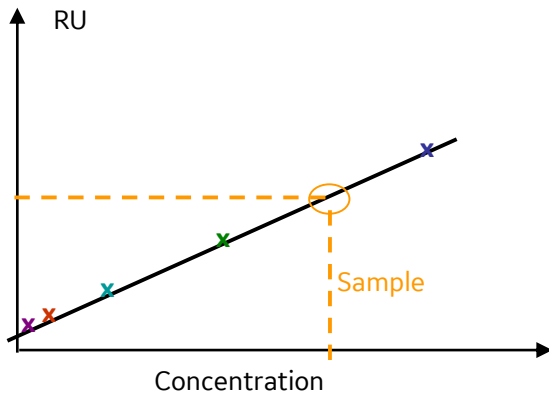
3-1

Reportpoint data

濃度測定

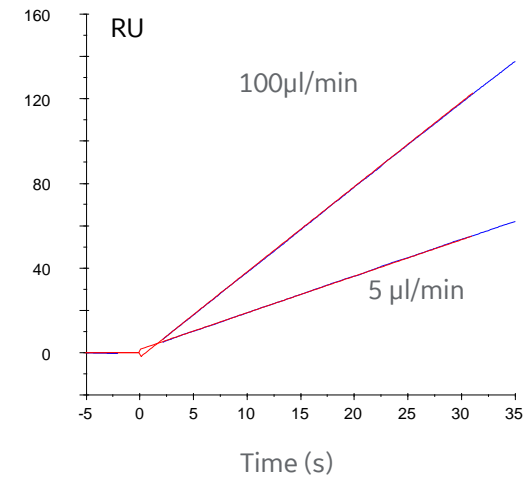
検量線ありの濃度測定

- Sample の濃度は検量線から読み取られる
- 標品が存在する場合に適している

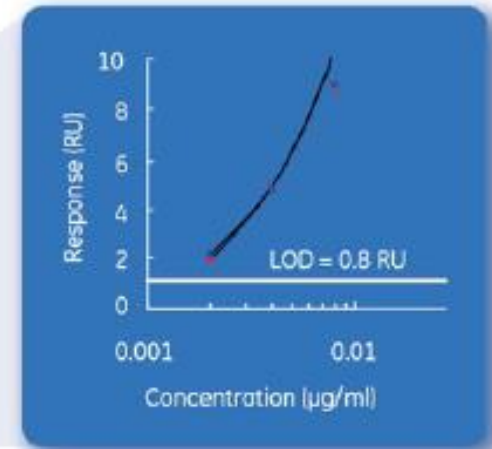
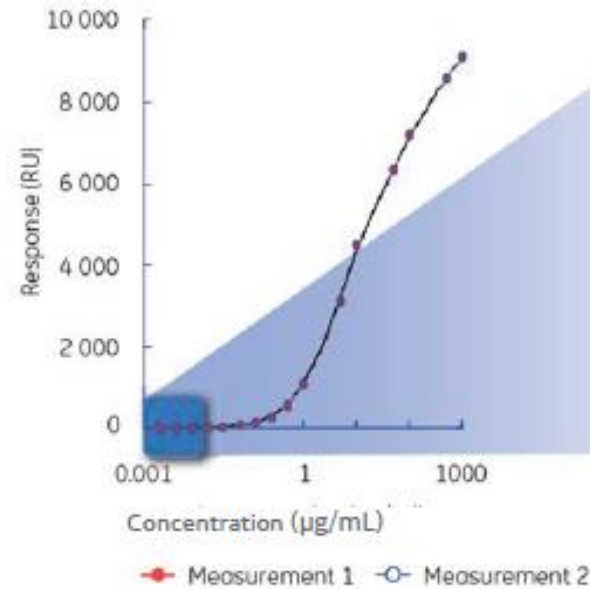
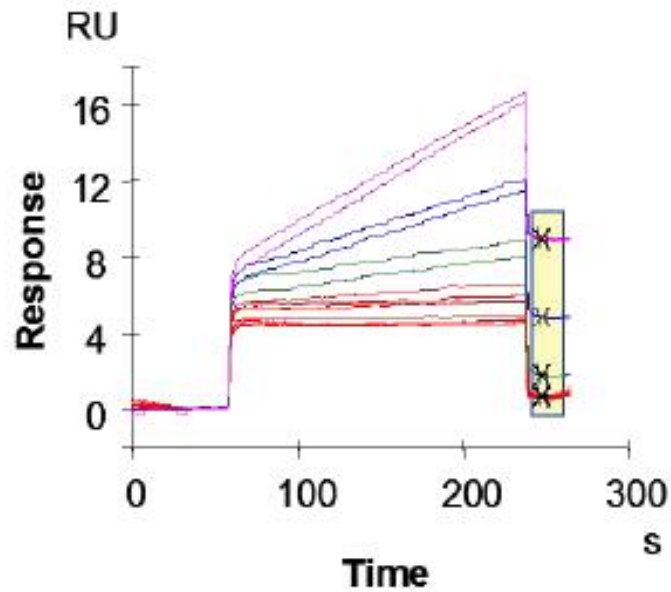


検量線なしの濃度測定 (CFCA)

- Sample の濃度はフィッティングから算出される
- 標品は不要



検量線ありの濃度測定



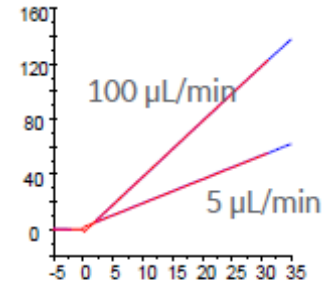
- Novartis 社の Xolair™ (オマリズマブ) を標品として検量線を描いた
- LOD は 10 blanks + 3*SD から 0.002 $\mu\text{g/mL}$ と算出された

検量線なしの濃度測定 (CFCA)

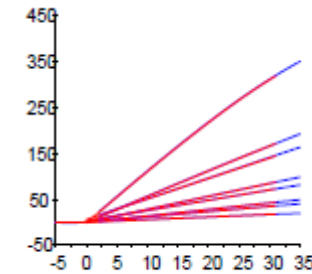
- フィッティングにより直接活性濃度が算出される
- 標品は不要
- センサーグラムの傾きは「分子量」「溶液中での拡散速度」「濃度」に依存することを利用する計算方法
- 特定のサンプルとの正確な活性濃度の比較に利用可能

Karlsson, R. Biophysical Reviews 1-12 (2016)

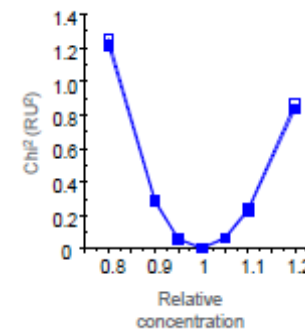
Pol et.al . Analytical Biochemistry 510 , 88 97 (2016)



5,100 µL/min において1濃度だけ添加



複数の濃度を取れば信頼性が向上



Sensitivity Check を実施すれば
信頼性の検証も

CFCAによるタンパク質の活性濃度測定

- CFCA の基本的な原理の説明
- CFCA が成立するための条件
- Protein A と anti-human Fc Ab を用いたときの 8 種類の抗体の CFCA 結果の比較
- CFCAの結果、「活性濃度」は50%程度と算出されたものもあった

Assessment of protein concentration using a calibration-free method

Kevin Lindqvist, Åsa Sparro, Robert Karlsson, Anna Sylvan, Anita Larsson, and Bwa Pol. GE Healthcare, Uppsala, Sweden.

Introduction

In development and production of biopharmaceuticals it is important to determine the concentration of functional glycoprotein molecules in a given sample. Many available methods for protein concentration measurement do not distinguish between active and inactive molecules, or rely on comparison with a standard that may or may not be a mimic of the actual sample. The method discussed here, Calibration-Free Concentration Analysis (CFCA), provides a highly sensitive and robust bio-sensor-based determination of the protein concentration and does not require a standard. The method relies on measurement of analyte binding to a target immobilized on a sensor surface at varying flow rates, under conditions where the observed rate of binding is partially or completely limited by transport of analyte molecules to the sensor surface. This transport is a diffusion-controlled process that depends on the analyte concentration. The concentration is obtained by running Biacore® binding experiments at different flow rates and fitting the binding data to the model describing the process.

In factor in instrument samples are injected in a micro flow system and transported in laminar flow to the sensor surface. Molecules reach the sensor surface from bulk solution by a diffusion-controlled transport process. In addition to the concentration of analyte molecules, factors influencing the transport rate include the diffusion coefficient, flow cell dimensions, and flow rate. The balance between their transport rate and the binding rate determines whether the observed binding will be transport limited or reaction limited. For successful CFCA, the observed binding rate must be at least partially limited by transport. In this paper, we discuss how suitable flow rates, immobilization levels, and binding data are selected for successful implementation of CFCA.

Immobilization level and concentration range

Calibration-free concentration analysis of 2-fold dilution series of β_2 -microglobulin was performed on four surfaces immobilized to increasing levels of anti- β_2 -microglobulin in a rebinding. Immobilization levels are expressed as response units (RU) divided by the molecular weight of interaction partner, M_w, to compensate for the difference in response between differently sized molecules. The protein solutions were injected at two flow rates, 5 and 90 μ l/min.

The concentration determined by the method is shown in each panel. Sensorgrams from different flow rates are obtained under equivalent conditions that return the same calculated concentration after adjustment for the dilution factor. The concentration given by sensorgrams from red and green sensorgrams are compared.

The most apparent visual indicator of data suitable for CFCA is a significant separation of the binding curves obtained at high and low flow rates.

Flow rates

Concentrations were determined for two independent antibody model systems using binding data obtained at flow rates of 5, 10, 20, 40, 60, 80 and 100 μ l/min. The binding data was analyzed using 23 pairwise combinations of flow rates, as well as in the whole data set of 7 flow rates. Results were normalized to the value obtained from 7 flow rates (shown as red line with error lines to indicate ± 1 , SD) to allow comparison between the model systems.

The results indicate that reliable concentration data is obtained when using two flow rates that differ by a factor of 10 or more.

Concentration of 8 commercial antibodies

The CFCA of eight commercial antibodies, denoted as A to H, was performed under transport limited conditions using anti-Fc antibody and protein A. The concentration values were compared to the concentrations determined by manufacturers. Activity is given as the ratio of measured and specified concentration, respectively. The concentrations of all antibodies were in good agreement when measured against two different interaction partners (although could differ as much as 50% when compared to the concentration specified by manufacturers).

How to recognize transport limited data?

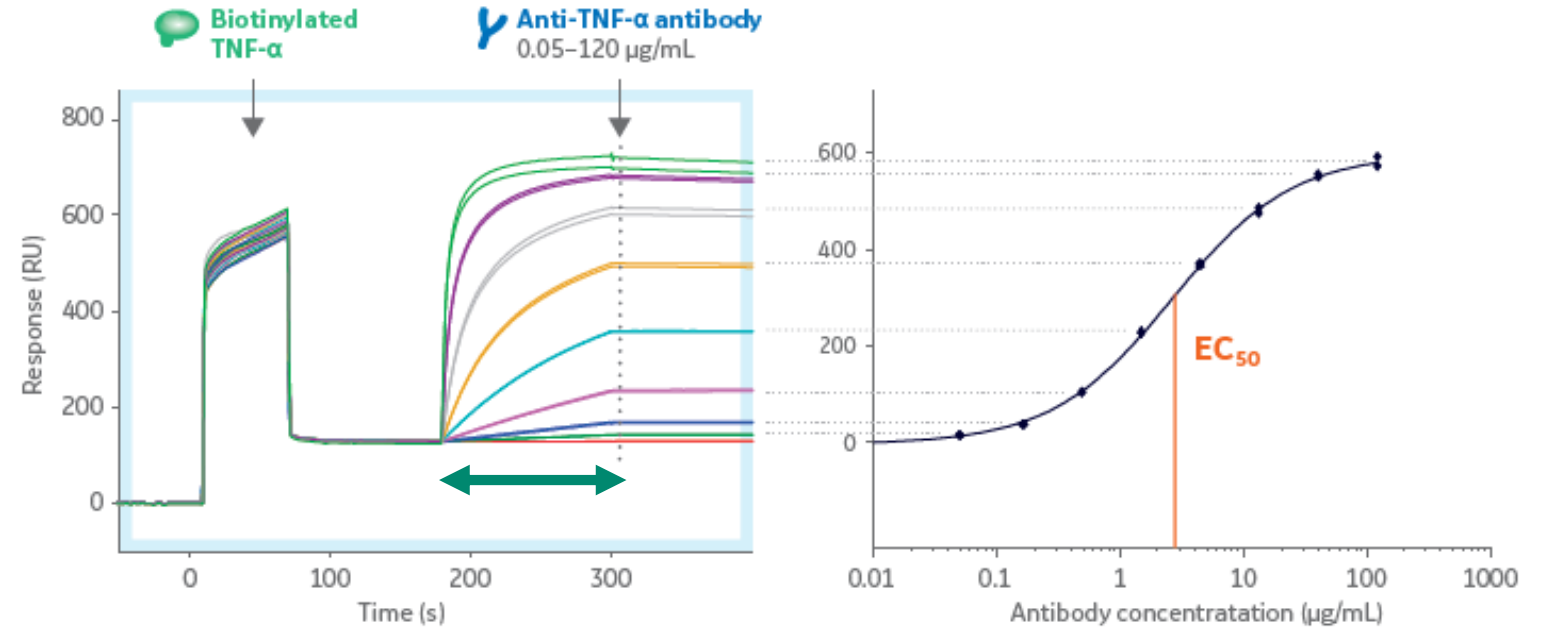
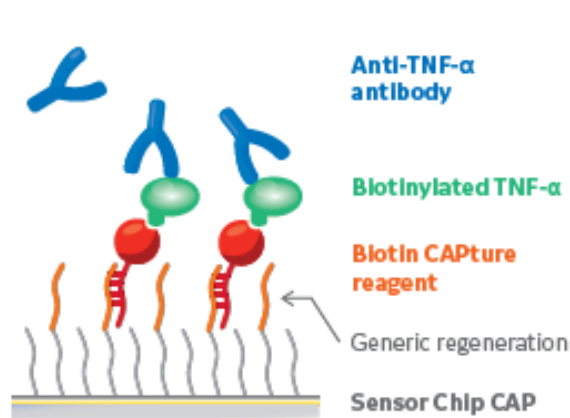
Sensorgrams obtained at two flow rates.

- Transport limited data:
 - High binding at low flow rate
 - Low binding at high flow rate
 - Highly sensitive to flow rate
 - Not suitable for CFCA
- Reaction limited data:
 - High binding at high flow rate
 - Low binding at low flow rate
 - Not sensitive to flow rate
 - Not suitable for CFCA
- Transport and reaction limited data:
 - High binding at low flow rate
 - Low binding at high flow rate
 - Highly sensitive to flow rate
 - Highly sensitive to flow rate
 - Not suitable for CFCA

Conclusions

- Calibration-free concentration analysis on Biacore systems opens new possibilities for concentration measurements that relate directly to determination of the concentration of a particular binding site.
- Measurements are direct, label-free, and do not require a calibration standard.
- Robust and reliable results are obtained when experiments are performed using:
 - at least two flow rates, where the ratio between flow rates is > 10
 - a high surface concentration, typically > 25 RU/M_w (immobilized level/M_w of interaction partner)
 - protein dilutions that give concentrations \leq 30 nM
- In the example, the concentrations of eight antibodies were in good agreement when measured against two different interaction partners targeting the antibody Fc part. However, concentrations determined by CFCA differed by up to 50% from the values specified, depending on the method used. More work is required to explain the discrepancies.

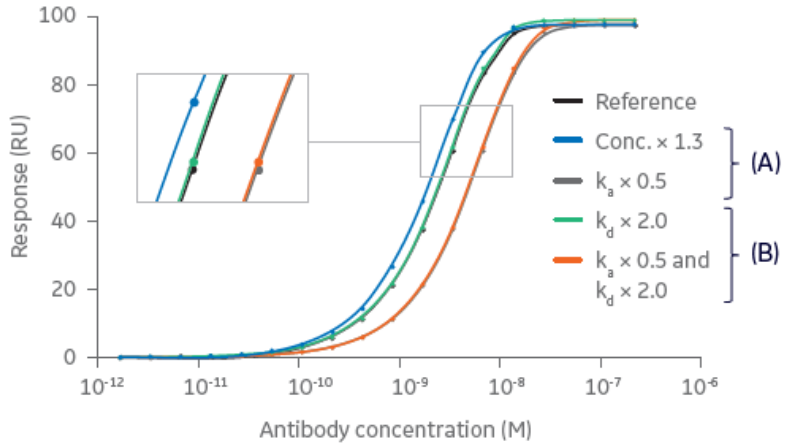
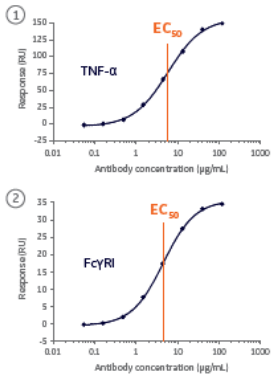
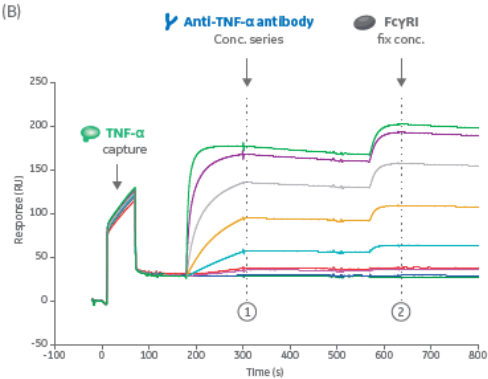
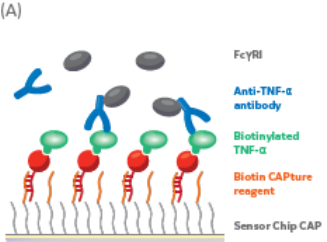
4-parameter fitting



- USP および EU のガイドラインでは 4 parameter fit を用いて Relative potency を決定する方法が記載されている
- 低濃度と高濃度の漸近線が取れていること
- カーブの直線部分に少なくとも 3 点のデータが取れていること
- 直線性の範囲内で正確であること などについて言及している

SPR を用いた Potency assay

- Biotin CAPture Kit を用いてビオチン化標的-抗体 医薬品- FcR の3ステップのデータを 1 assay で測定・解析
- 標的と FcR の EC50 をまとめて算出
- ELISA の Potency assay では確認できない kd のズレも Sensorgram comparison を利用して評価



High-resolution SPR-based surrogate potency assay to facilitate comparability and biosimilar studies
 Asa Frostell, Veronica Fridh, and Robert Karlsson
 GE Healthcare Bio-Sciences AB, Arturqvist 70, 751 84 Örebro, Sweden

Introduction
 An assay platform is needed to measure and monitor critical quality attributes (CQAs) for antibody development. The present study describes a high-resolution SPR-based surrogate potency assay for full-scale comparability and stability studies.

Surrogate potency assay using a biotinylation-based protein-coupled antibody
 Biotinylation of antibodies was used to facilitate the immobilization of antibodies on a sensor chip. The resulting biotinylated antibodies were used to immobilize antibodies on a sensor chip.

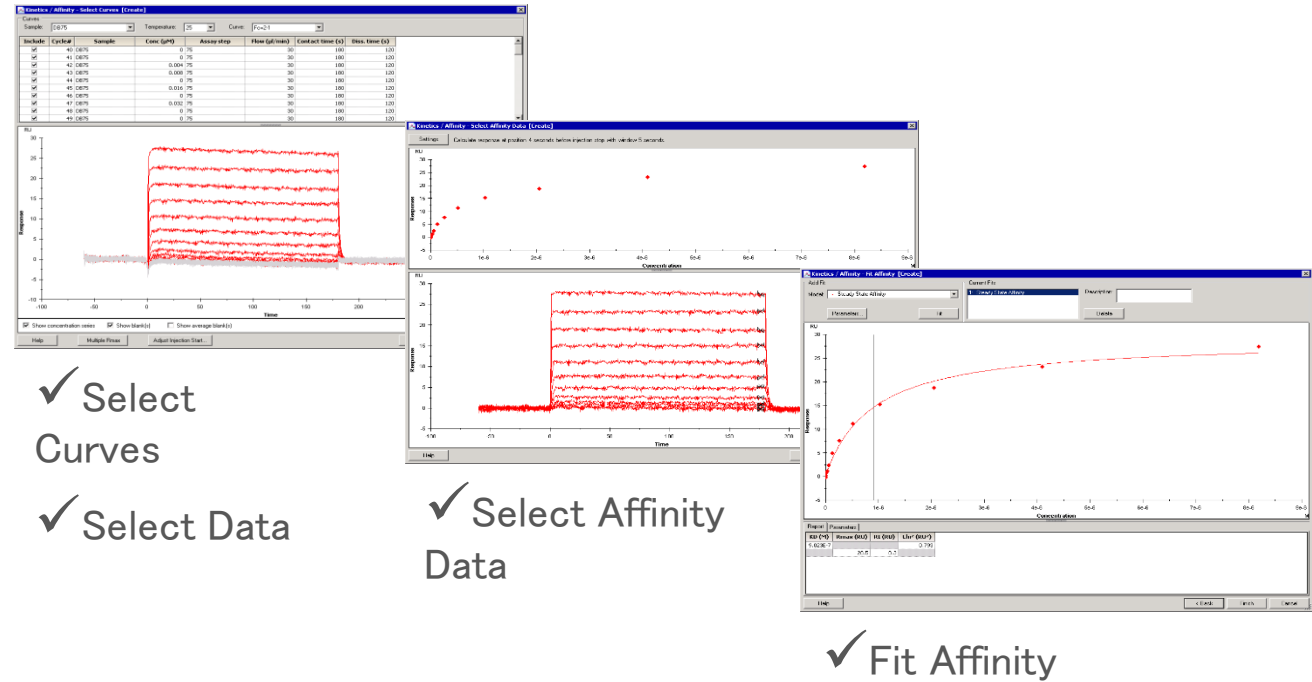
Conclusions
 A high-resolution SPR-based surrogate potency assay was developed. The assay was used to measure and monitor critical quality attributes (CQAs) for antibody development. The assay was used to measure and monitor critical quality attributes (CQAs) for antibody development.

3-2

Sensorgram data

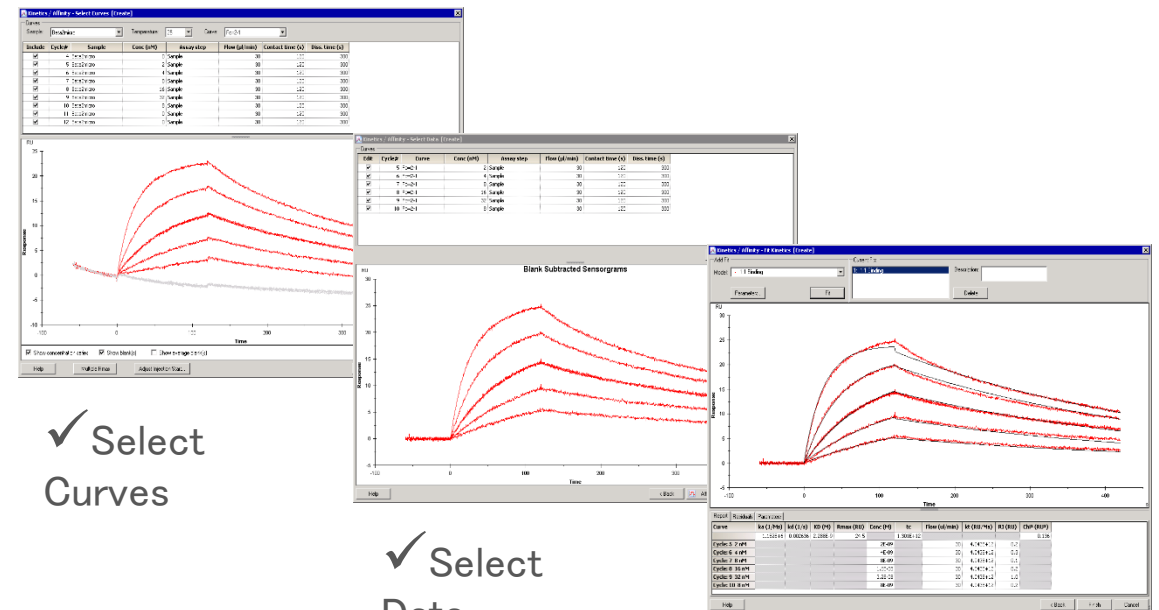
Affinity assessment

- 詳細な製品特性評価
- 先発医薬品や標品に対する同等性を評価する
- 解離定数 (KD) を算出



Kinetics assessment

- 詳細な製品特性評価
- 先発医薬品や標品に対する同等性を評価する
- 速度定数 (k_a & k_d) および解離定数 (KD) を算出



✓ Select Curves

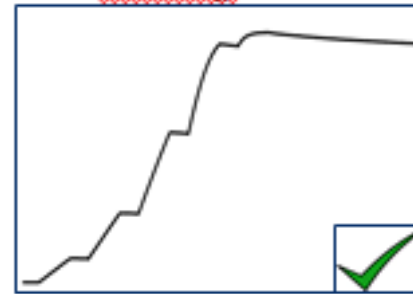
✓ Select Data

✓ Fit Kinetics

Binding data を定性的に評価するためには？

- Kinetics のデータは典型的には特性解析に用いられますが結合様式が複雑な場合は意味のあるモデル式で適合させるのが難しいことがあります。
- 実際出荷試験などではPLAや%EC50と濃度測定で多くを占め、Affinity, Kinetics を実施する例は少ないようです。（試験法として Validation が難しい... 将来は？）
- ただし Report point data で描ける Dose Response Curve は必ずしも医薬品の特性をすべて反映していない可能性もあります。
- これらを補う手段として Biacore 独自の CFCA や Sensorgram Comparison といった手法もあります。

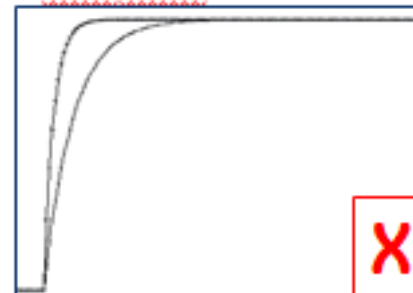
1) $K_D/k_d/k_a$
1:1 binding data



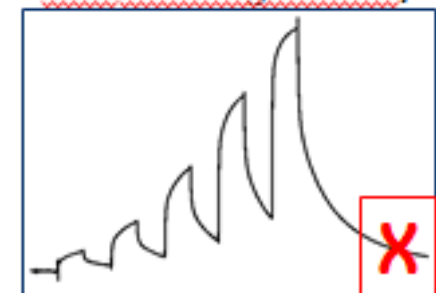
2) Report points
A limited subset of data



3) $K_D/k_d/k_a$
Too slow off rate



4) $K_D/k_d/k_a$
Too heterogeneous,



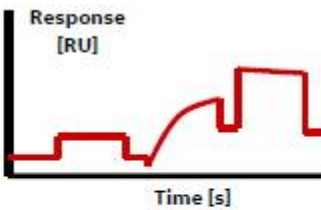
4

Biacore の Assay development




Assay development で考えるべき3つのポイント

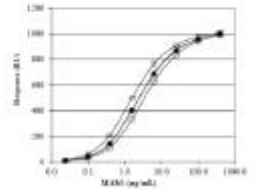
Immobilization



Regeneration, if needed



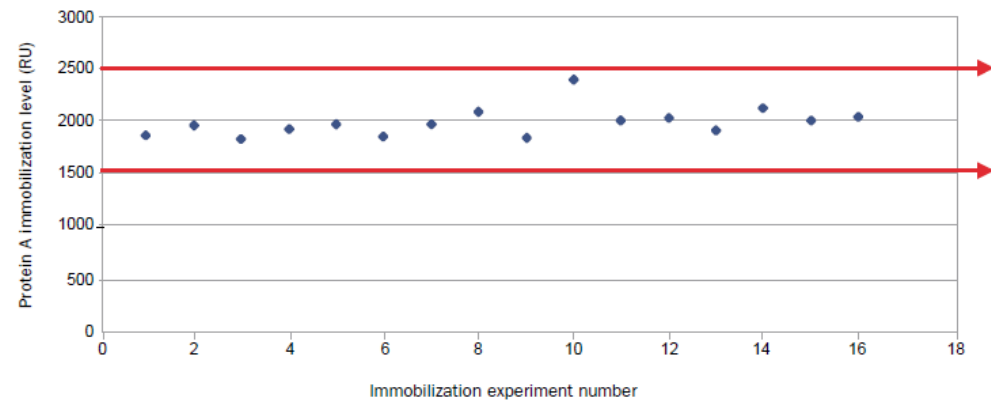
Response data from samples and reference substance



【Immobilization】リガンドの設定で考えること

- ロバストなアッセイ系を構築するために
 - リガンドの材料入手先
 - 購入先の多様性、ロット間差
 - リガンド密度とRmax
 - リガンド添加濃度
- リガンドの材料入手先はリスクベースで考える
 - 複数の販売供給元を用意して供給不足に備える
 - 複数のロットで試験しロット間差に備える
 - タンパク質の形態
 - 凍結乾燥品？再構成成品？
 - これらを包括するSOPを作成し、様々な状況に対応できるようにしておく

Immobilization levels of different lots of Protein A from one supplier



【Immobilization】適切なリガンド密度とは？

高密度のとき

新しいリガンドを測定に用いる場合：

- アナライトとの特異的結合の有無の確認のため
- 再生条件の確立のため

濃度測定の場合：

- 高感度になる
- チップも長持ちしやすい

キャプチャー分子は基本的に高密度

- キャプチャーされるリガンドが安定しやすい
- ただしドリフトが大きくなるリスクもある
- ドリフトが無視できない場合は低密度で

Analytical Biochemistry 424 (2012) 168–177, Eisai

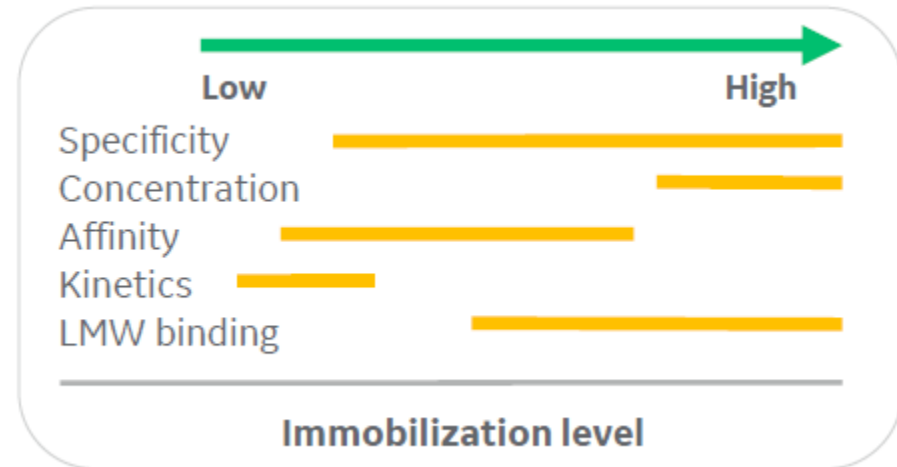
低密度のとき

Kinetics 解析の場合：

- 流速 30uL/min 以上
- $R_{max} < 50RU$

複雑な相互作用やアナライトが多量体を形成する場合：

- 複雑な相互作用レスポンスをできる限り減らす
- 可能な限り1分子のリガンドと結合させる



【Immobilization】適切なリガンド密度の範囲とは？

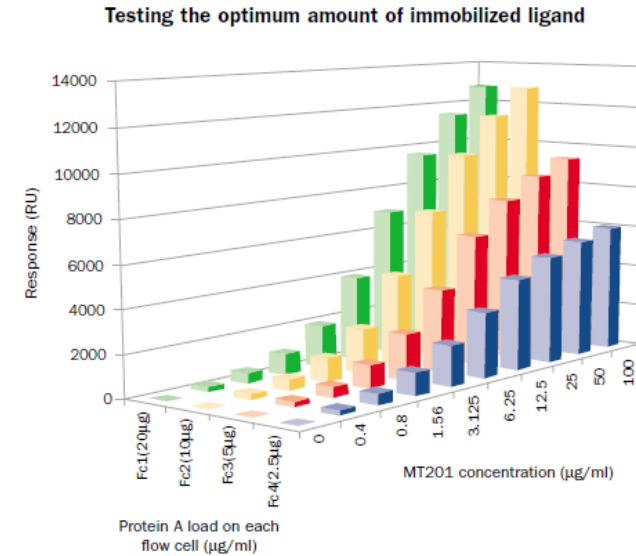
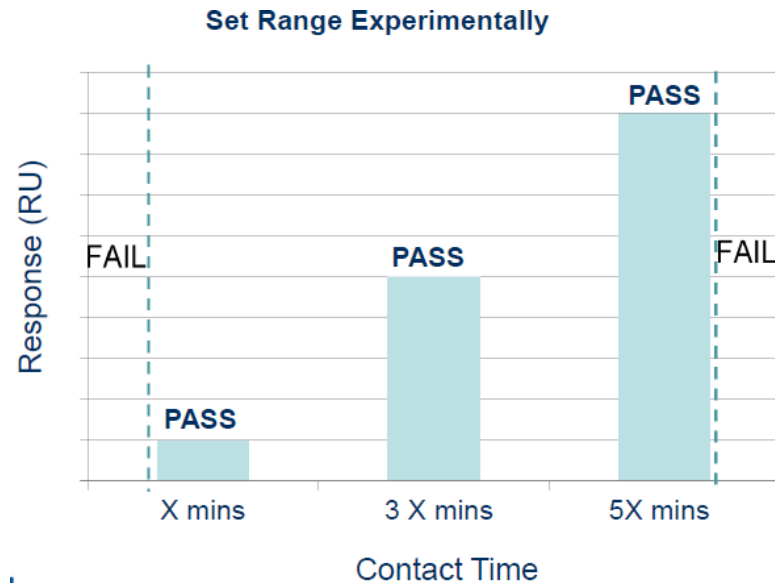


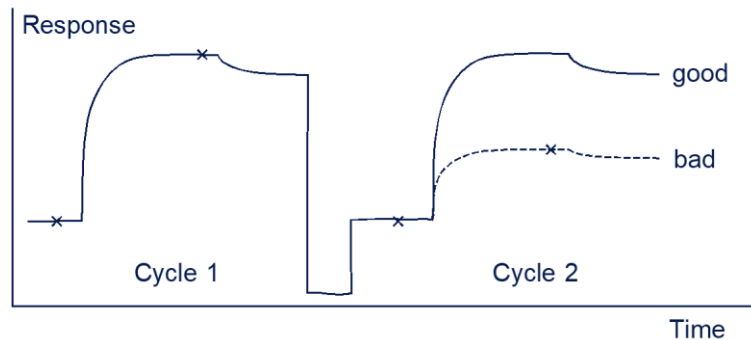
Figure 2: Optimization of ligand immobilization conditions. Maximal binding of MT201 to protein A was achieved using 10 µg/ml protein A at a flow rate of 5 µl/minute for 7 minutes.

Reference standard を用いて実験的にアッセイパフォーマンスを確認し、適切な範囲を設定する。

【Regeneration】再生溶液の検討方法は？

ロバストな再生条件は再現性に重要

- キャプチャーキットは再生条件が確立している
- 再生溶液の添加はアナライトが適切な時間内に解離するのであれば不要



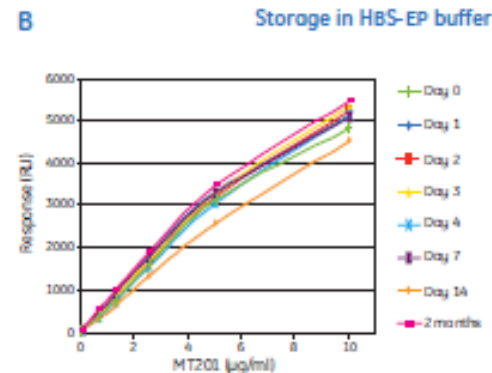
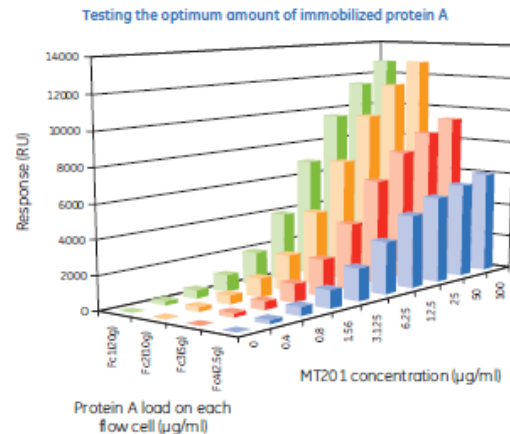
実験的には（一例）

- 一定の濃度のアナライトを添加する
- マイルドな条件からハードな条件の順に、様々な再生溶液を少なくとも 10 cycles 分は繰り返す
- 選択した再生溶液を ~100 回添加し、リガンドの活性に変化がないことを確認する
- タンパク質同士の相互作用であれば以下を順に試す
 1. 10 mM Gly-HCl 3.0-1.5
 2. エチレングリコール 50, 75, 100%
 3. 1-100 mM NaOH
 4. 1-4 M MgCl₂



抗体濃度測定のアッセイ方法

- FDA の binding assay デザインに照らし合わせた抗体の濃度測定
- 2002 年の段階から準備（Biacore C）、Micromet 社
- Risk-based なバリデーション
- 同一販売業者から 16 ロットの Protein A を用意し固定化量のバラつきの検証
- Protein A 固定化量と抗体添加濃度の適切な範囲の検証
- 再生条件、ランニング緩衝液、添加材 BSA の影響の検討
- Protein A が固定化された Sensor Chip の保存検討



Change of standard curves measured on Sensor Chip CM5 over 2 months storage in HBS-EP buffer

Application Note 38

Biacore systems

Rapid development of a GMP-compliant assay for the determination of antibody concentration

- Easy, rapid validation of assay performance
- Assays compliant with current ICH guidelines

Introduction

Manufacturing regulations require that the concentration of proteins produced by recombinant or hybridoma technology is monitored throughout the production process using validated assays. Here, we describe the process leading to the establishment of a validated assay for determining the concentration of a monoclonal, fully human anti-*EpCAM* IgG1 antibody (Naundorf et al., 2002) intended for the treatment of prostate cancer, from harvest samples, process controls and final product. The conditions were optimized within three months to deliver an accurate and reliable assay.

Assay validation: preliminary conditions

Although no definitive guidelines on the validation of binding data are available today, the FDA documents, *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation and Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation* provide generally accepted guidelines for binding assay design. Until consensus is established, individual QA departments are required to comply with the current ICH guidelines for assay validation.

Once the basic design of the assay is decided, the precise conditions under which it will be run must be determined empirically. Here, an assay was constructed according to the FDA guidelines above, in which a humanized monoclonal antibody is captured on Sensor Chip CM5 after initial immobilization of protein A serving as the IgG-specific binding molecule. Immobilization, surface regeneration, and sensor

Immobilization levels of different lots of protein A from one supplier

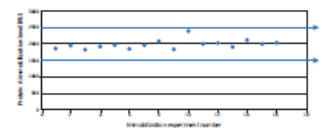


Figure 1. Immobilization levels of 16 lots of protein A from a single supplier on certified Sensor Chip CM5. The mean immobilization level using 10 µg/ml protein A at a flow rate of 5 µl/minute for 7 minutes was 1970 ± 137 RU (CV 7.0%).

chip storage were all investigated and the optimal conditions for the final assay were determined from these data. All experiments were performed using certified Sensor Chip CM5 and a Biacore™ C system.

Optimization of protein A immobilization conditions

Protein A was immobilized on certified Sensor Chip CM5 in order to measure the consistency of immobilization levels between different batches. Sixteen lots of protein A prepared at a concentration of 10 µg/ml and injected over the sensor chip at a flow rate of 5 µl/minute for 7 minutes gave immobilization levels of between 1500 and 2500 RU (Figure 1). There were no significant differences in the immobilization levels of different lots of protein A under these conditions. It is recommended that routines are established to achieve a similar level of protein A immobilization before further assay optimization.

Acknowledgement

We gratefully acknowledge Birgit Vetter, Susanne Schade, Dr Thomas Urbig and Dr Frank Handlham from Micromet AG, Munich for providing the experimental data for this Application Note.

Biacore

Biacore C を用いた濃度測定バリデーション

- Bristol-Myers Squibb 社による Biacore C を用いた抗体の濃度測定
- 各種ガイドラインと照らし合わせて Specificity, Linearity, Range, Accuracy, Precision, Robustness について考察
- Reference standard を様々な条件に曝したときのレスポンスの変動の確認
- アナライトを 286 回繰り返し追加したときの安定性のデータ

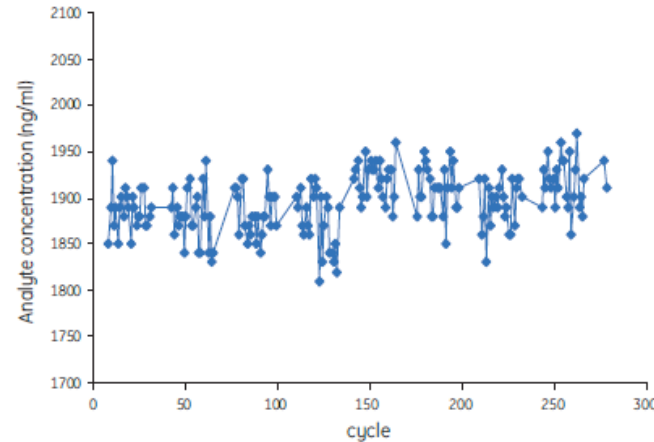
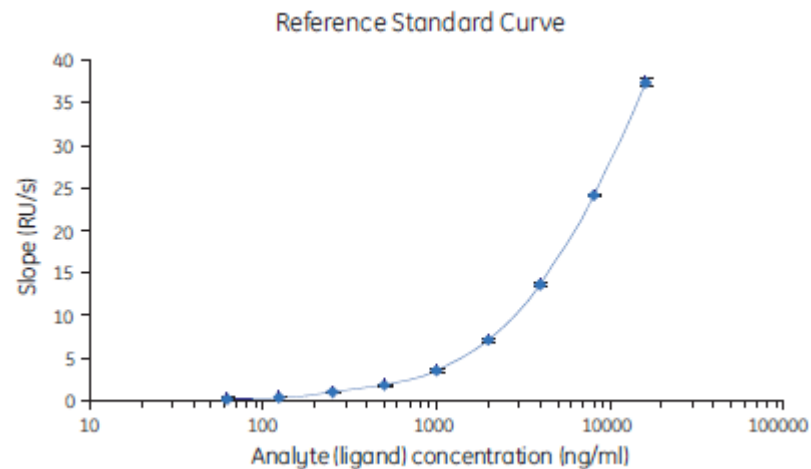


Figure 3. Test of receptor stability by repeated injection of analyte.

Application Note 48 Biacore systems

Validation of a concentration assay using Biacore C

- Guideline for development of a GxP-compliant concentration assay
- Support for informed decision making in drug development

Introduction

In the process of measuring active concentrations of pharmaceuticals, high demands are placed on the quality of the data on which any decision to proceed to clinical trials will be based. Data gathered using any technology must be accurate and precise. Method validation (defining the acceptable limits within which data is deemed reliable) is therefore a crucial part of the overall process through which a prospective drug passes before it is tested in clinical trials. Samples for pharmaceutical concentration measurements are also taken from reactor runs, to monitor the development of purification processes, in stability studies and in hybridoma screening. Here we present the results obtained during a validation process within the pharmaceutical industry for a concentration assay using Biacore™ C system. The results confirm that the quality of performance of this assay was sufficiently high to meet GxP demands placed on drug companies by regulatory authorities.

Biacore C is specifically designed for concentration analysis of pharmaceuticals. The instrument software supports GxP-regulated working processes with user-friendly wizards for assay development, immobilization strategies and data analysis. In addition, as current regulations demand restricted access to data generated by analytical instruments, Biacore C software makes it possible to lock and fix assay templates.

In the example cited here a receptor/ligand system was investigated. Both receptor and ligand are proteins. The receptor protein was immobilized at high density on the surface of an activated sensor chip. Reference material,

quality control (QC) samples and test samples were then diluted and injected over the receptor surface to generate sensorgrams in which binding data is recorded over real time. The initial binding rate of the ligand to immobilized receptor (sensorgram slope) was measured under conditions of limiting mass transfer (diffusion). The rate, expressed as resonance units per second (RU/s) correlated directly with active ligand concentration. The binding rates of the samples were converted into active concentration using the reference standard curve where the binding rate of reference material was plotted against the concentration. The final results were expressed either as percent binding of sample relative to reference material or as a concentration.

Concentration assay validation: the cornerstones

Several criteria were tested over the course of the validation outlined below. Experiments should include, but are not necessarily limited to the following tests:

Parameter	Question addressed
Specificity	To what extent does the assay cross-react with related targets?
Linearity, range, detection and quantitation limits	To what degree of certainty can concentration measurements be integrated on a standard curve and over what range can concentration measurements be confidently stated?
Accuracy	Do the determined concentration measurements lie within acceptable error limits when compared with nominal concentrations?
Precision	Can similar concentrations be measured with an acceptable level of reproducibility between users on different occasions (between assay variations and within the same assay/assay variation)?
Robustness	Is the assay robust enough to perform under sub-optimal conditions, e.g. after repeated freeze/thaw cycles of the sample or if an alternative buffer system is used?

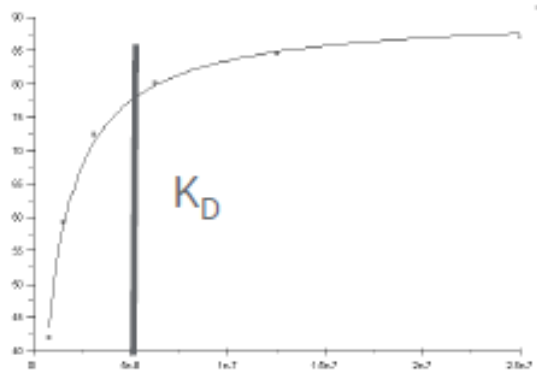
Acknowledgement

We gratefully acknowledge Dr Ralph Abraham and Mary Quimby of Bristol-Myers Squibb Inc., Pharmaceutical Research Institute, Bi analytical Sciences, Hopewell, New Jersey, USA for providing the data for this Application Note.

Biacore

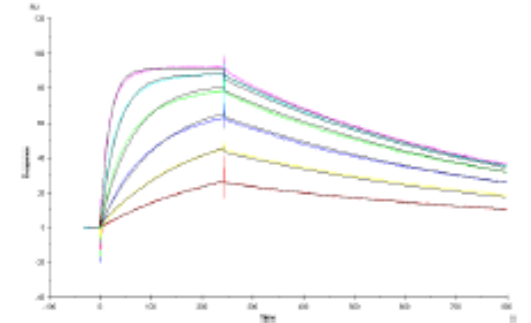
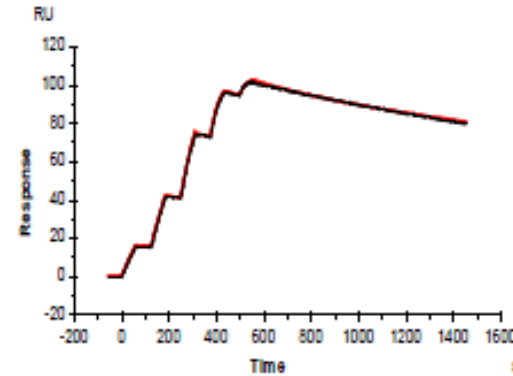
Affinity / Kinetics assay development

Affinity



- 固定化量/キャプチャー量の範囲
- アナライトの添加濃度範囲
- レスポンスが平衡値に達しているかどうか
- 最高濃度のデータが Rmax に近いのか
- Chi2 <= 10% Rmaxとなるか

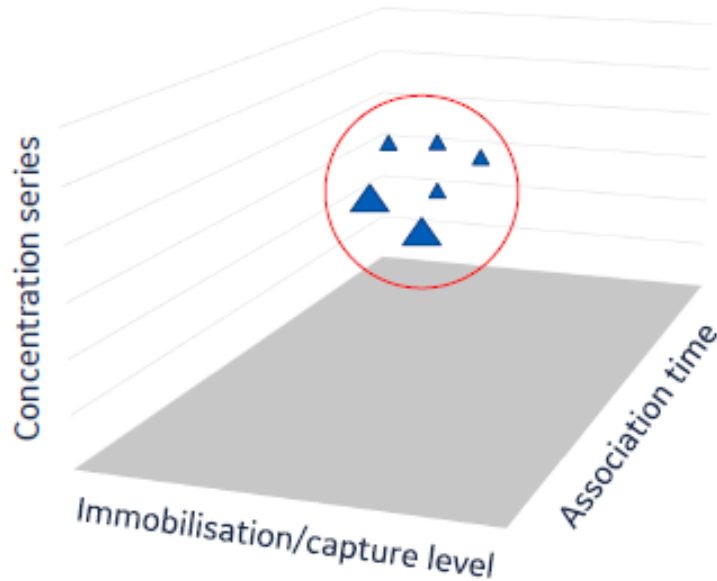
Kinetics



- 固定化量/キャプチャー量の範囲
- アナライトの添加濃度範囲
- センサーグラムがカーブを描いているかどうか
- 結合の安定性に依存した適切な解離時間が設定されているかどうか
- 最高濃度のデータが Rmax に近いのか
- Chi2 <= 10% Rmaxとなるか

どのパラメータが affinity や kinetics に影響を与えるか評価する

Parameters



実験的には

固定化量やキャプチャー量:

- 複数回、2つか3つの異なるリガンド固定化量やキャプチャー量で Reference standard を検証する
- バリデーション測定時は速度定数や親和性に再現性の取れる特定の範囲の濃度で実施する

結合時間:

- 2つか3つの異なる結合時間で検証する (30 – 180 s など)

添加濃度と希釈倍率

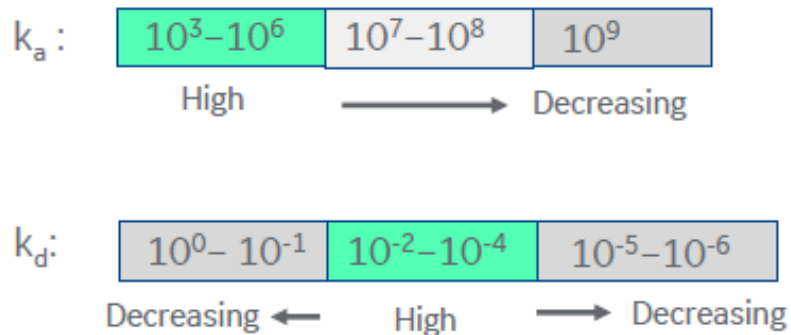
- サンプルは 2 倍や 3 倍の異なる希釈系列で検証する
- 3 から 5 濃度の SCK、5 から 8 濃度の MCK、8 から 12 濃度の steady state affinity などの異なる測定条件で検証する

アッセイの許容範囲

速度定数の合格基準

その相互作用がどれだけ速いか、遅いかによって合格基準も変化する。ロバストネスが低くなる範囲なら合格基準は広めになる。

Rate constants, level of robustness:



許容範囲の例

Kinetics

Parameter	Acceptance criteria, an example
k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	5×10^5 to 1×10^6
k_d (s^{-1})	2×10^{-3} to 4×10^{-3}
R_{max} (RU)	60 to 80

Affinity

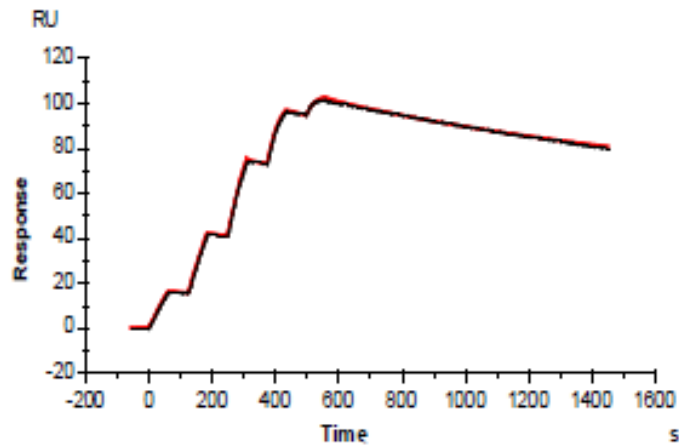
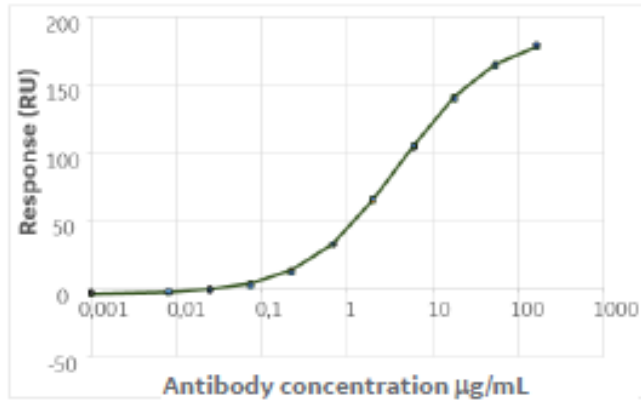
Parameter	Acceptance criteria, an example
K_D (M)	1×10^6 to 2×10^6
R_{max} (RU)	50 to 100

Additional criteria

Parameter	Qualification Target
Immobilization level for further ligand capture	% CV \leq 40%
Immobilization/capture levels for analyte binding	% CV \leq 30%
Chi ² for kinetic and affinity fit	The square root of Chi ² for the fit should be insignificant, < 5% to 10%, in relation to the binding level

レスポンスレベル、アッセイ範囲

アッセイの目的に合わせて適切なアッセイ範囲を選択する



実験的には

- 低濃度から高濃度の順に添加する
- 要求ダイナミックレンジ内の濃度で添加する
- Potency assay では低濃度・高濃度域の漸近線が明確に引けるように
- Affinity /Kinetics では 0.1 ~ 10 – 100 * KD の濃度範囲が推奨
- 時間の節約のため結合時間・解離時間は可能であれば短く設定する
- 感度が必要な場合は添加時間を延ばす
- Reference cell に非特異的結合がないことを確認する（濃度定量と potency assay の場合は Reference cell はなくても良い）
- 必要があれば Stabilization time や blank cycle を設定する

その他 Affinity / Kinetics 測定するにあたって

- ロバストな QC メソッドにするために：
 - 作業員 2 人で実施する。
 - Reference standard を用いて、3-4 回の独立した測定を実施する。
 - 測定は別々の日に実施する。可能であれば、以下も考慮する。
 - 異なるロットの試薬
 - 異なるセンサーチップ
 - 異なる Biacore システム



5

Case study





Validation of kinetic assays using Biacore X100

Quality control of raw material

Courtesy of Tanja Jarhede, Mercodia, Uppsala, Sweden

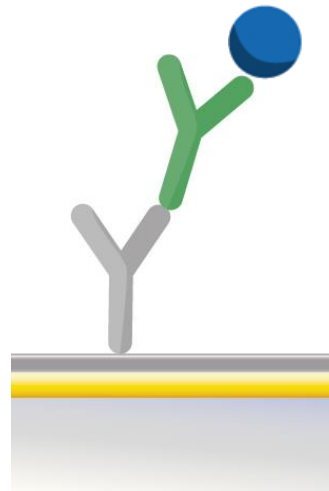
2つの抗インスリン抗体に関する kinetics アッセイの開発

- Validation は2人の分析者で実施
- 各分析者は標準品を使用して3回の独立した測定を実施
- 3枚のセンサーチップを使用
- 異なる測定日



ロバストネス

- 異なるロットの抗インスリン抗体
- センサーチップの再利用
- 異なる解析方法で評価



Insulin

Mouse anti-insulin
antibody

Anti-mouse antibody

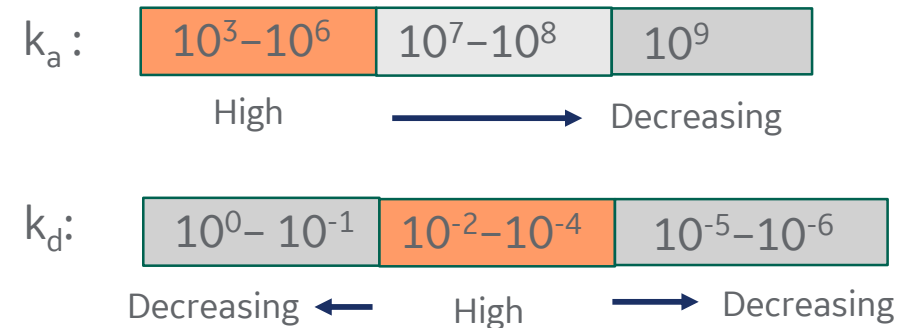
Sensor Chip CM5

Acceptance criteria の設定

- Measured R_{\max} = 15–19 resonance units (RU)
 - この範囲はロバストネスを確認すれば拡張可能
- $\text{Chi}^2 \leq 10\%$ of R_{\max}
- U-value ≤ 5 (preferred 1–3)
- Refractive index (RI) ≤ 1.5 RU
- 2回の測定でのセンサーグラムの高再現性
- 可能であれば既に承認済みの抗体（規格を合格した抗体）を同一ランに含める

Acceptance criteria for kinetic based on statistical results from the validation

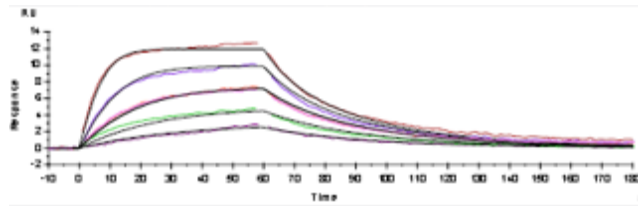
- ロバストネスは相互作用の速度に依存する



Kinetics 解析における Acceptance criteria Equal to mean +/- 3 × std.

Insulin binding to anti-insulin R-INS-6

- k_a (1/Ms): $> 8.56E+06$
- k_d (1/s): < 0.118

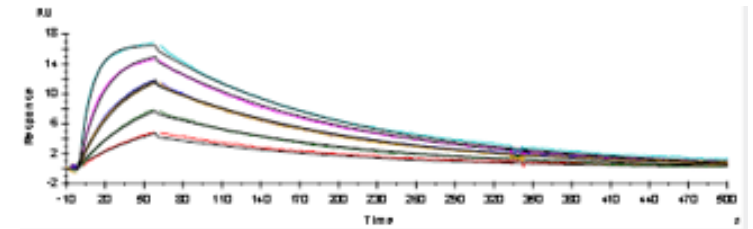


	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
Run 1	1.55E+07	0.09408	6.09E-09
Run 2	1.19E+07	0.07399	6.22E-09
Run 3	1.75E+07	0.09741	5.58E-09
Run 4	1.61E+07	0.09405	5.86E-09
Run 5*	(8.01E+06)	(0.1281)	(1.60E-08)
Run 6	1.38E+07	0.07833	5.68E-09
Run 7	1.25E+07	0.06847	5.49E-09
Mean	1.45E+07	8.44E-02	5.82E-09
CV (%)	13.67	13.29	4.55

*Not approved due to high U-value

Insulin binding to anti-insulin R-INS-5

- k_a (1/Ms): $> 6.84E+05$
- k_d (1/s): $< 7.38E-03$



	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
Run 1	1.10E+06	0.06739	6.12E-09
Run 2	1.14E+06	0.06918	6.08E-09
Run 3	9.92E+05	0.006377	6.43E-09
Run 4	1.00E+06	0.006313	6.29E-09
Run 5*	(7.99E+05)	(0.007022)	(8.78E-09)
Run 6	1.15E+06	0.006588	5.73E-09
Run 7	1.18E+06	0.006602	5.59E-09
Mean	1.05E+06	6.65E-03	6.43E-09
CV (%)	11.66	3.65	15.51

*Not approved due to high RI

解析方法を変えるとパラメータも変化する

- 1つのランデータを6つの異なる方法で解析した
- スパイクの切り取り方、RIの設定などが異なる
- 何も手を加えなかった解析結果は他の結果と乖離していたため、全てのデータは慎重にスパイクを切り取り、RIをゼロに設定して評価することが決定された

	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
No cut, fit RI local	5.84E+06	0.03385	5.80E-09
No cut, RI = 0	1.57E+07	0.09584	6.11E-09
Cut all sensorgrams similar, fit RI local	1.23E+07	0.07376	5.98E-09
Cut all sensorgrams similar, RI = 0	1.54E+07	0.09406	6.09E-09
Careful cut, fit RI local	1.24E+07	0.0744	5.98E-09
Careful cut, RI = 0	1.55E+07	0.09408	6.09E-09
Average	1.29E+07	7.77E-02	6.01E-09
CV (%)	26.75	27.89	1.80

Internal に承認されたアッセイ系と実際の QC test の結果

Anti-insulin R-INS-6	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)
Acceptance criteria	$> 8.56E+06$	< 0.0118
New lot		
Measured value	$1.94E+07$	0.01094

Anti-insulin R-INS-5	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)
Acceptance criteria	$> 6.84E+05$	$< 7.38E-03$
New lot		
Measured value	$1.14E+06$	$6.64E-03$

Approved

6

まとめ

Biacoreでタンパク質医薬品の品質評価をするには？

分析法開発とバリデーションの基本的考え方

- + アッセイ系開発にかかる時間を短縮できる、高再現性、自動測定などのメリット
- + GxPパッケージをはじめとした完全なサポート体制
- + バリデーション計画では初期段階はほどほどに、段階的にバリデーション方法を決める
- + 計画ではMOAに準じた基本的なアッセイデザインに加え、データのアウトプットを考える
- + アッセイ系開発では固定化、再生、データのアウトプットの3点が特に重要
- + どのパラメータがアッセイに寄与するかを実験的に求め、許容範囲を策定

Validation experiments (実行) へ



分析法と規制対応における課題克服のために Bio-analytical Efficiency & **Quality Control Workshop** (通称 QC ワークショップ) 10/9 10:00~17:00 予定

Program (予定)

Curve comparison for QC

Karen Duus, Research Scientist, Novo Nordisk

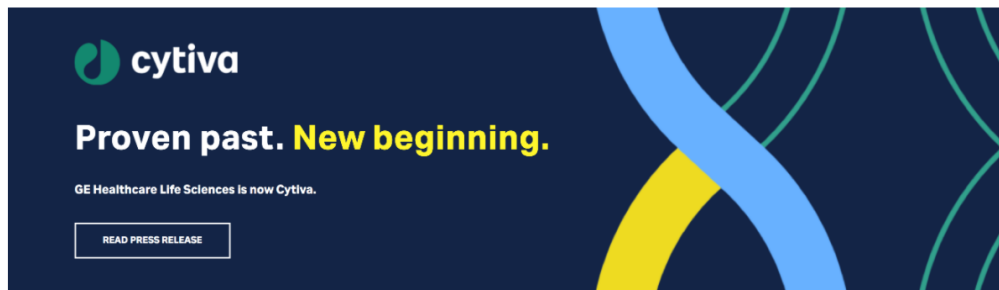
Using SPR for FDA Approved Batch Release and Assay Validation.

Matthew Rutter, QC Analyst, GSK

Global Analytics Update: Regulatory, QC and Validation White Paper Review

Fredrik Sundberg, Global Director, Cytiva

SPRバリデーションガイドラインクイズ Biacore周辺の技術、規制環境等についてディスカッション



Thank you

Masami Koinuma

【お問合せ先】

グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社

バイオダイレクトライン

TEL: 03-5331-9336 / FAX: 03-5331-9370

e-mail: Tech-JP@cytiva.com

www.cytivalifesciences.co.jp

本資料の使用については、お客様施設内での使用に限ります。他社への転送、譲渡等は禁じます。本資料の著作権その他の知的財産権は、グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社に帰属します。無断転載、無断コピー、改ざん、二次利用を禁じます。




掲載されている価格は2020年5月現在の希望小売価格です（消費税は含まれておりません）。希望小売価格は単なる参考価格であり、弊社販売代理店が自主的に設定する販売価格を何ら拘束するものではありません。掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。お問合せに際してお客さまよりいただいた情報は、お客さまへの回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただく場合があります。

弊社は、資料の掲載内容の正確性を記すべく、情報を随時更新しておりますが全ての情報が最新であることを保証するものではありません。

したがって、当資料上の掲載内容に誤りがあった場合でも弊社は責任を負いかねます。

ラボにあるBiacoreで何が出来る？ ～Biacoreの歴史と今できること～

Cytiva アプリケーションスペシャリスト 高田 元

 [Register](#)  2020年9月29日  15:00～15:50

CONTENTS

90年に初代Biacoreが誕生してから今年でおかげさまで30年目を迎えました。各機種における仕様の違いだけでなく、歴史的に発展していったアプリケーション、測定アプローチなどを振り返りたいと思います。

皆さまのラボに設置されているBiacoreで今、どんなことまでできるのかの情報をアップデートしてみませんか？



Appendix 1

Biacore GxP 補足

GxP サービスで利用される略語紹介

IQ=Installation Qualification 据付時適格性評価

- 設計及び仕様通りに装置が納品されたこと
- 設置環境が装置の仕様と操作に適していること

OQ=Operational Qualification 運転適格性評価

- システムが適切な環境下で操作され仕様通り機能すること

IPQ=Initial Performance Qualification 初期性能適格性評価

- System Check による合格判定
- ビオチン抗体を添加してのフローセルテスト、サンプルインジェクションテスト、ミックステスト

Re-qualification (PM GxP): Preventive Maintenance 予防保全

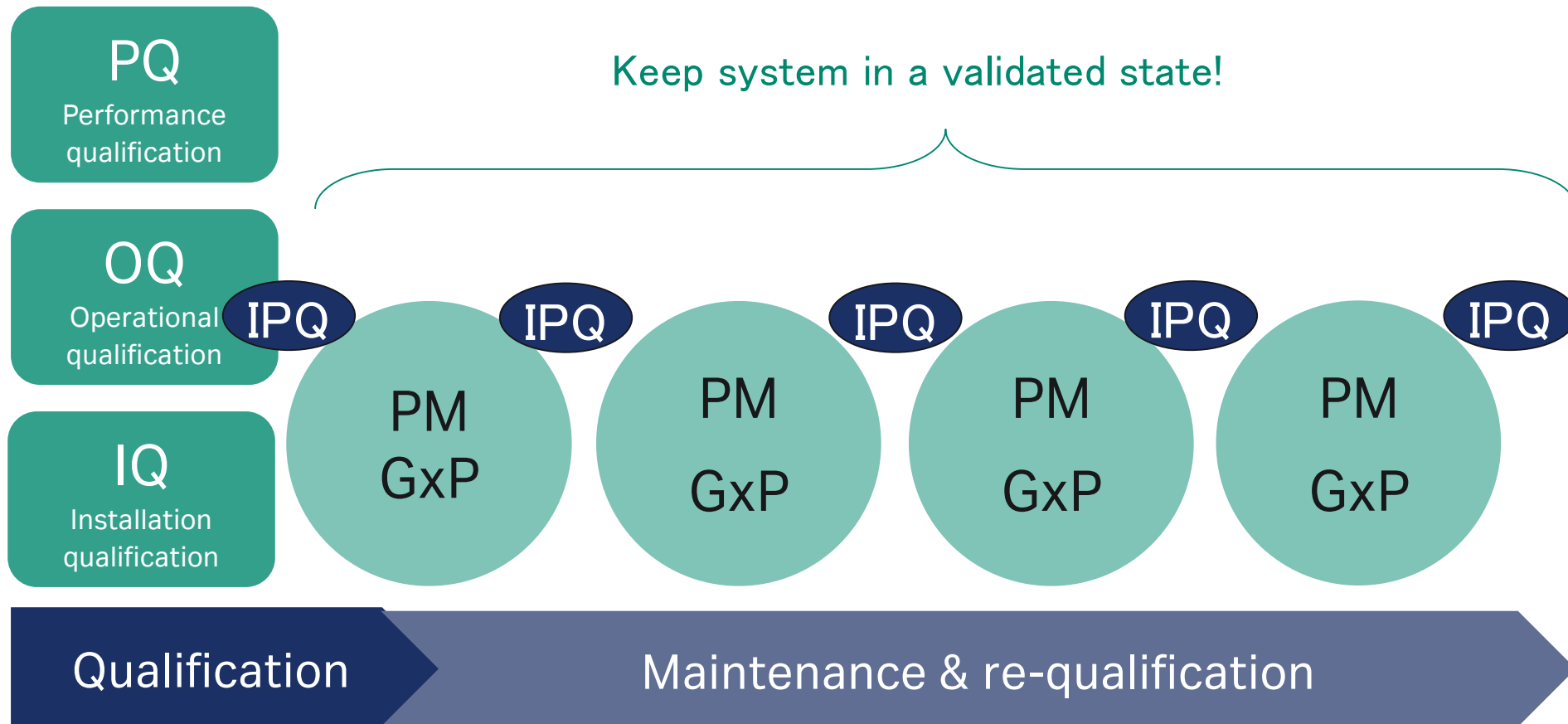
- システムの確認や消耗品の交換、動作保証

CCP=Chance Control Protocols 変更管理手順

- 新しいハードウェアが適切に取り付けられ、システムが仕様通りに機能していること



Biacore 適合性検証プロセスの概要

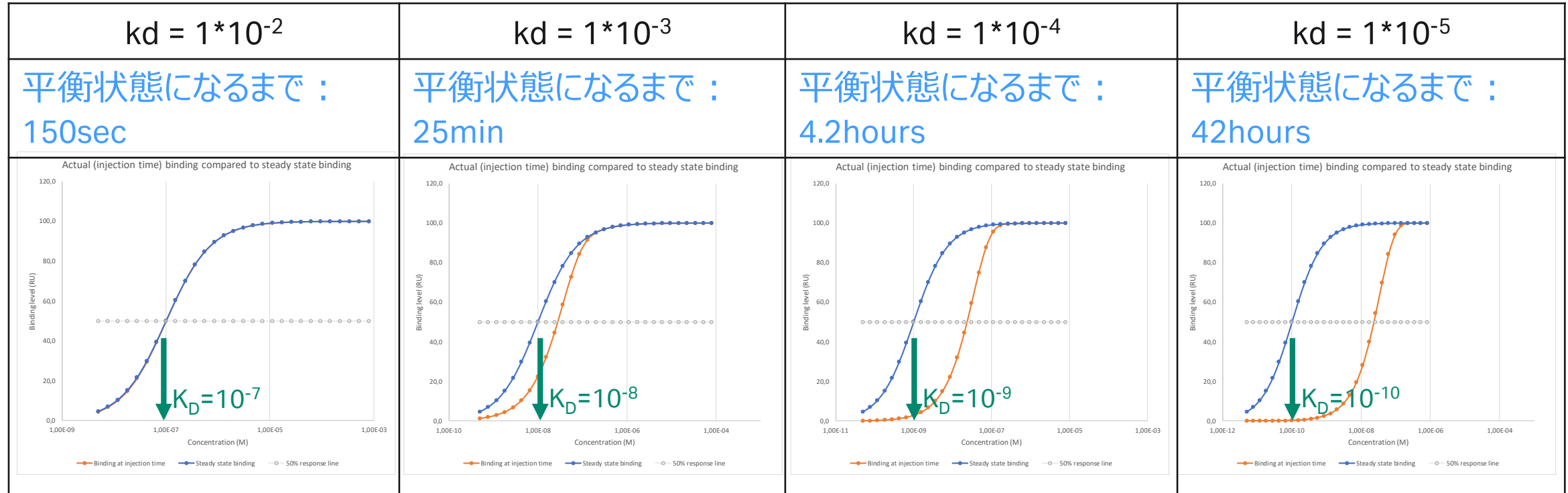


IPQ = initial performance qualification

Appendix 2

**EC50, PLA, Slope ratio
-Dose Response Curve**

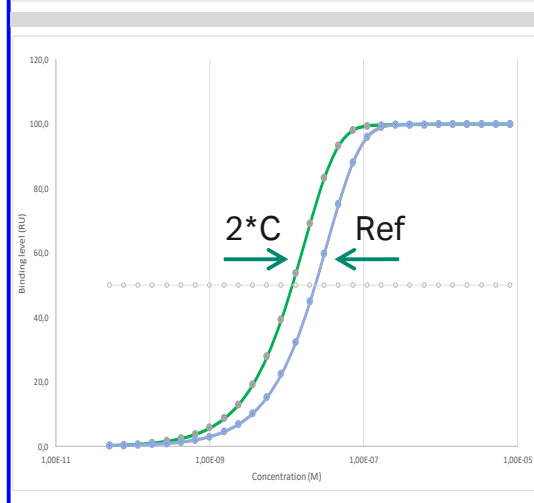
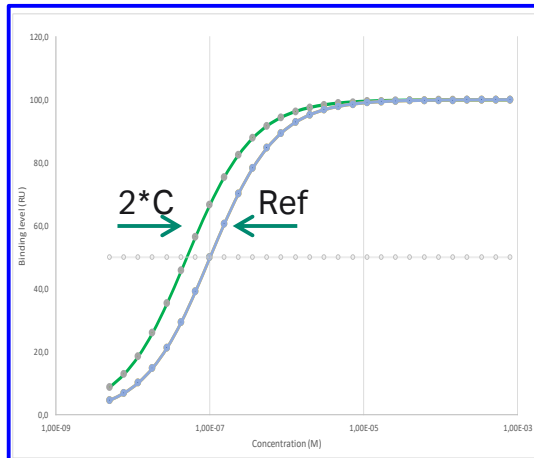
Dose Response Curve は Affinity を反映しない $k_a=1*10^5$



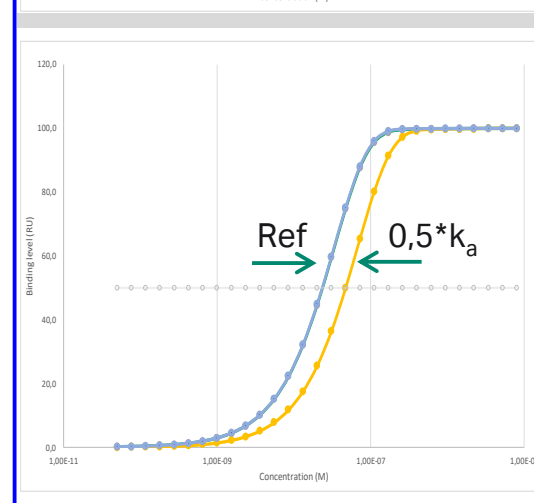
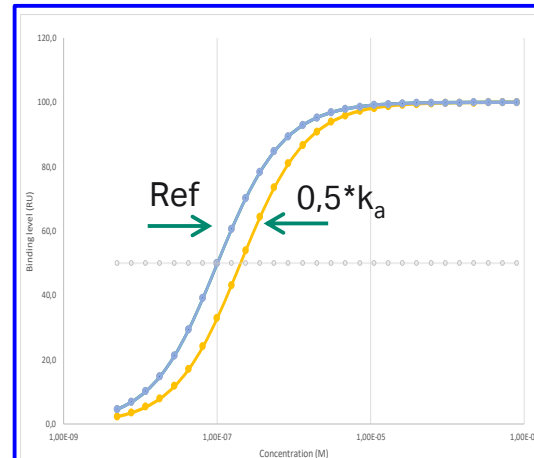
- オレンジ→平衡状態まで待たず、添加時間 300sec で測定したときのデータ
- 平衡に達する前に添加を止めるならば同じ濃度でレスポンスは低く見積られるのでカーブは右にシフト
- k_d に依存して平衡状態になるまでの時間が変動→ Dose response curve は Affinity を反映していない

Reference と Sample の比較

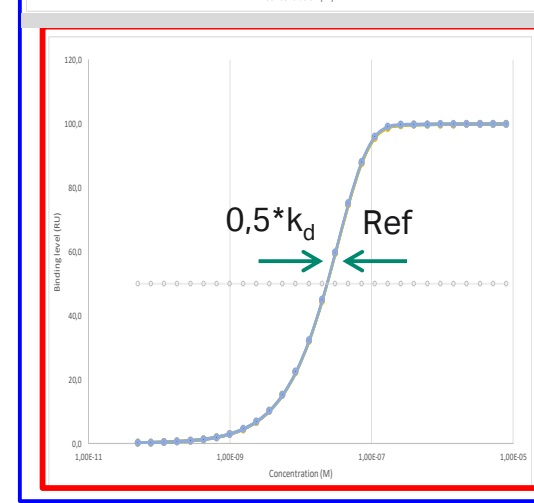
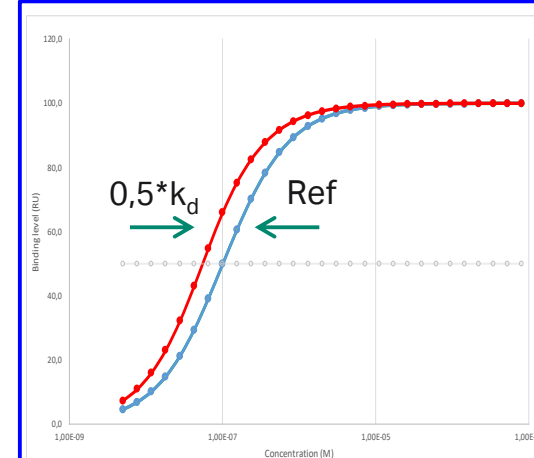
Two fold increase
in concentration



Two fold decrease
in k_a



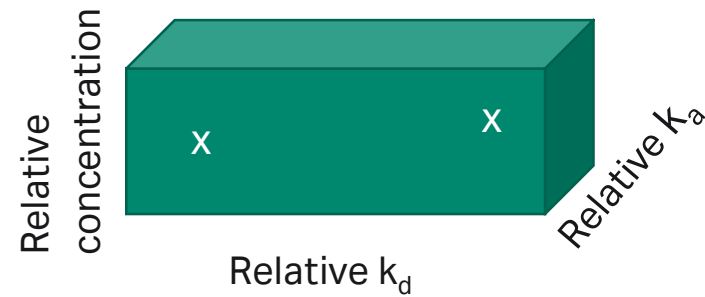
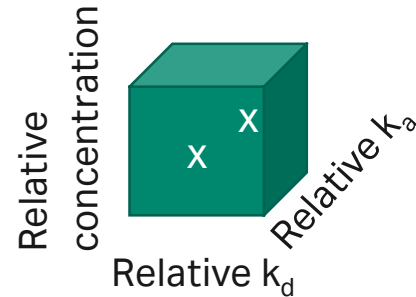
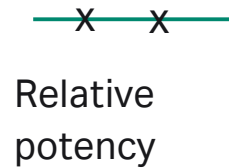
Two fold decrease
in k_d



k_a $1,0 \cdot 10^5$
 k_d $1,0 \cdot 10^{-2}$

k_a $1,0 \cdot 10^5$
 k_d $1,0 \cdot 10^{-4}$

Sensorgram のデータは医薬品の特性を見るために重要



- EC50、PLA、Slope ratio 法から導き出される Relative potency は単一の値となる
- しかしこれまで示したように実際は三次元的な値であり、結合解離速度に有意な差がある場合でも同じ値を返してしまう → Relative potency がほぼ同じでも医薬品をコントロールできていない
- Sensorgram の情報を得ることは重要と言えるが解離が遅いサンプルや複雑な結合様式だと k_d を確認しづらい → CFCA や Sensorgram Comparison が活用できる可能性がある