

KOREA

DISCOVERY SUMMIT

EXPLORING DATA
INSPIRING INNOVATION



JSL Script for Determination of ADA Cut Points in Immunogenicity Studies.



Min Gyu Oh
Assistant Manager
CMC Statistics Team | Celltrion

CONTENTS

- 1 Introduction
- 2 ADA Assay Development and Validation
- 3 Determination of ADA Assay Cut Point
- 4 JSL Application Development

Introduction

Immunogenicity (면역원성)

- 면역원성은 항원과 같은 이물질이 인간이나 다른 동물의 신체에서 면역 반응을 유발하는 성질로, 약물의 품질적 특성, 치료 대상, 투여 요법 등 다양한 요인에 의해 발생할 수 있다.
- 일반적으로 백신 주사를 통해 유도될 수도 있고, 항체의약품을 투여하다 보면 생길 수 있는 Anti-drug antibody(ADA) 생성과 같이 의도하지 않은 치료용 단백질에 대한 면역 반응인 경우가 있다.
- PK(pharmacokinetics ,약물동태학), Efficacy(효능), Safety(안전성) 등 임상적 영향이 발생할 수 있다.
(ex. 중화항체에 의한 약효의 소실/항체의 체내 체류시간 단축/약물에 대한 부작용 증가 등.)
- FDA 에서도 면역원성 관련 자료를 Risk Management Plan(RMP) 에 포함하여 제출하도록 권고하고 있다.

Guideline on Immunogenicity assessment of therapeutic proteins, FDA 2017

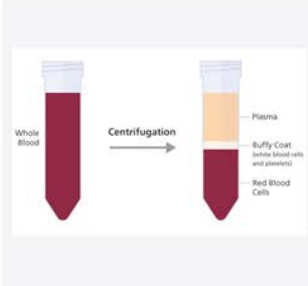
Introduction

Immunogenicity (면역원성)



혈액 채취 (Site)

- 일반적으로 투약 후 7-14일 사이에 IgM 반응, 2 - 3주 사이에 IgA 반응, 3 - 6주 사이에 IgG 반응이 일어남 (FDA, 2019)
- 약물 간섭에 의한 분석법 영향을 최소화하기 위해 pre-dose 샘플을 채취함



혈장/혈청 분리

- 원심분리기를 이용하여 혈장 (plasma) 또는 혈청 (serum) 분리
- 해당 과정이 간혹 샘플 분석에 영향 줄 가능성 있음 (e.g. 혈청 분리(응고) 과정 또는 항응고제 종류에 따라 혈소판이 활성화 → VEGF 용출)



샘플 운송

- 샘플 내 analyte (e.g. 약물/ ADA 등)의 stability 확보를 위해 -80°C에서 샘플을 냉동 시켜 드라이아이스와 함께 운송 (-20°C 이하로 온도 유지)



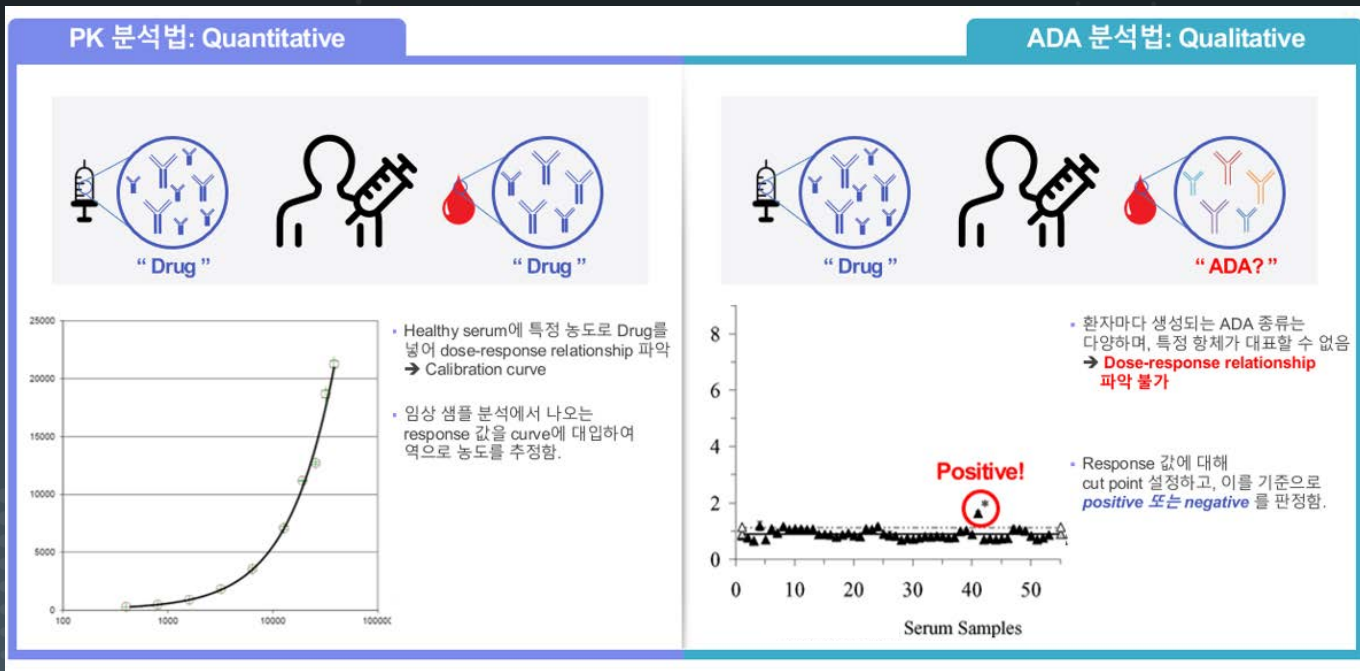
샘플 분석 (BioA)

- 주로, ECL/ELISA 등 ligand binding assay (LBA)가 이용됨
- 밸리데이션 된 분석법을 이용하여 multi-tiered approach에 따라 평가 수행

- 면역 글로불린 : IgM, IgG, IgE, IgA, IgD
- ECL : electrochemiluminescence
- ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

ADA Assay Development and Validation

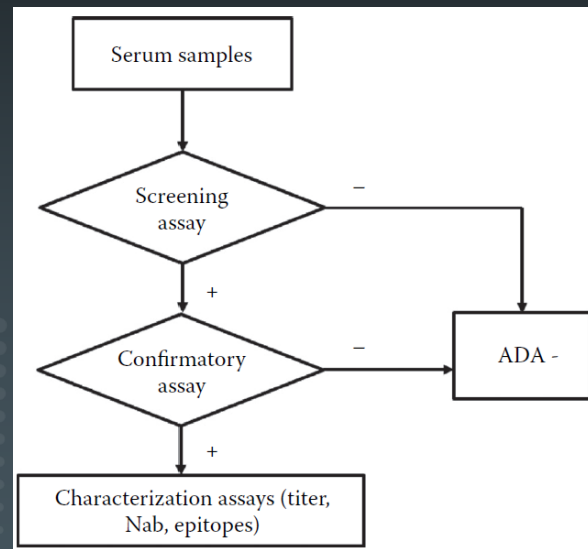
ADA 분석법 특징



ADA Assay Development and Validation

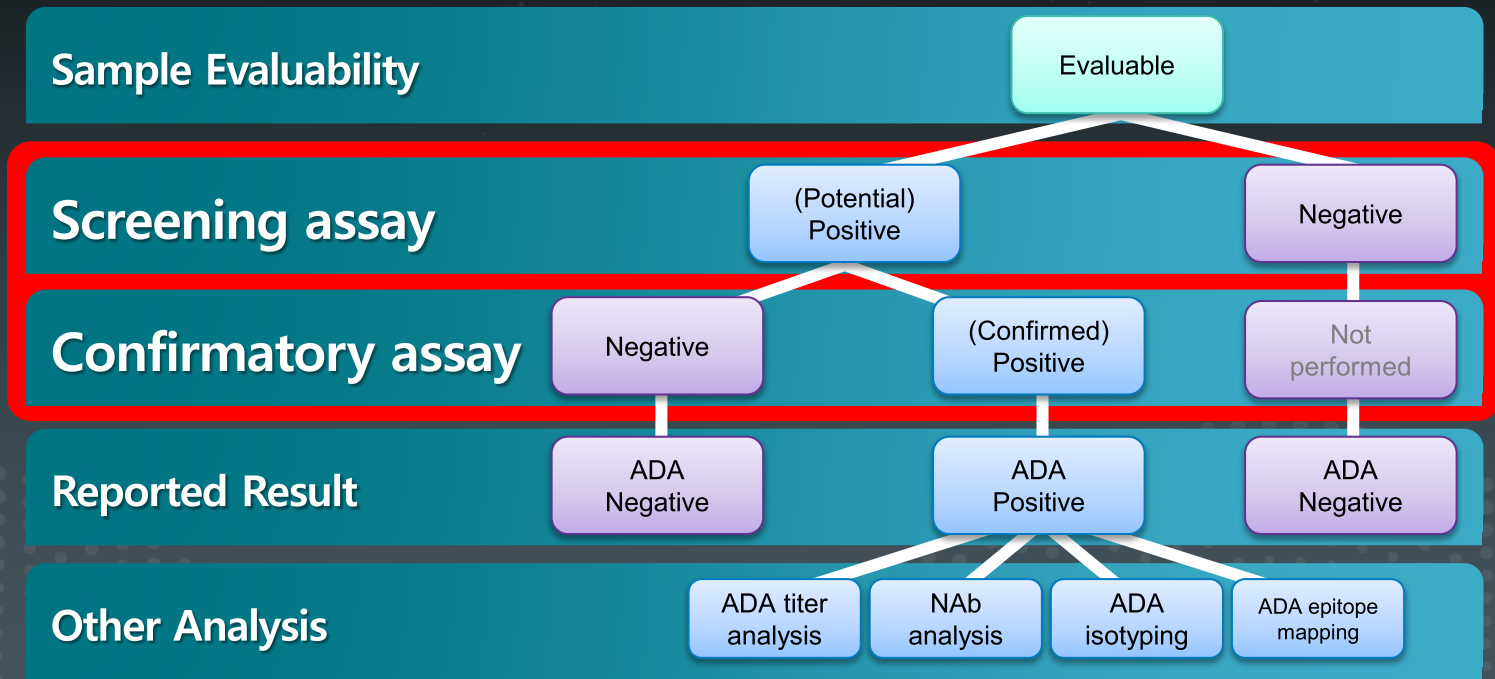
FDA Guidelines –Tiered Approach to ADA Assay development

- FDA 에서는 Screening Assay 에서 양성 반응이 나온 검체는 Confirmatory assay 까지 수행할 것을 권고하고 있다.
- Screening Assay는 치료용 단백질에 대한 모든 항체를 빠르고 민감하게 검출하고, 잠재적인 ADA 양성 검체를 탐지하는 효율적인 방법이다.
- 치료용 단백질에 대한 ADA의 특이성을 결정하기 위해서는 추가적인 분석 (Confirmatory assay)를 통해 확인 가능하다.
- 각 Assay 별로 통계적 방법으로 결정한 서로 다른 Cut point 를 사용하며, Cut point 를 기준으로 음/양성을 판별한다.
- **FDA 2016**
 - : Clinical Sample testing 의 경우 Screening assay 에 대해 5%, Confirmatory assay 에 대해서는 1% 또는 0.1% False positive rate 권장하고 있다.



ADA Assay Development and Validation

Multi-tiered Approach



Standardizing terms, definitions and concepts for describing and interpreting unwanted immunogenicity of biopharmaceuticals, 2015.

ADA Assay Development and Validation

Cut Point - Experimental Design

- USP<1106> 에 따르면 Clinical study 를 위해서는 50 donor 이상으로 부터 데이터가 수집 돼야 하며, Nonclinical study 를 위해서는 15 ~ 30 donor 로 부터 데이터를 수집하는 것을 권장하고 있다.
- 분산 분석을 통해 보다 정확한 Cut point 추정을 위해, 아래와 같은 Balanced experimental design 을 권장하기도 한다. (Latin Square Design - Shankar et al. ,2008)

Subject Grouping				
	Run	S1-S16	S17-S32	S33-S48
Analyst 1	1	Plate 1	Plate 2	Plate 3
	2	Plate 3	Plate 1	Plate 2
	3	Plate 2	Plate 3	Plate 1
Analyst 2	1	Plate 1	Plate 2	Plate 3
	2	Plate 3	Plate 1	Plate 2
	3	Plate 2	Plate 3	Plate 1

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \varepsilon_{ijk}$$

where α_i is the fixed effect of the i -th Analyst,
 β_j is the random effect of the j -th Run,
 γ_k is the random effect of the k -th Plate,
 ε_{ijk} is the error term (= the remaining variability.)

Statistical Methods for Immunogenicity Assessment (Harry Yang, et. al, 2016)

ADA Assay Development and Validation

Cut Point Determination and Evaluation

Cut point Calculation



≥ 50

Drug naïve Donor

Clinical Sample Evaluation



- Serum(Sample) : Drug-naïve Donor 대상으로 채취되며, 반복실험을 통해 Cut point 계산을 위한 데이터를 수집한다.
- 각 단계 별로 설정한 Cut point 는 추후 실제 Clinical Sample 에 대한 평가 시 참고된다.
- Cut point 보다 큰 결과값을 가지는 경우 'Positive' 로 분류하며, Screening → Confirmatory → 추가 Study 순으로 Multi-tiered Approach 가 적용된다.

Determination of ADA Assay Cut Point

Screening Assay

- 면역원성 검사 첫 단계로 복잡한 항체 결합의 특성으로 인해 발생 할 수 있는 일정 수의 False positive 검체를 허용한다.
(초기 선별 단계에서는 False negative 보다 False positive 가 더 많은 것이 적절하다.)
- Screening cut point 는 검체가 ADA의 존재에 대해 잠재적으로 양성인 것을 선별하기 위한 면역 반응 수준이다.
- Screening cut point 미만의 반응을 보이는 검체는 음성으로 선언되어 추가 테스트에서 제외된다.
- Screening cut point 또는 그 이상의 면역 반응을 가진 검체는 잠재적으로 양성 판정(Positive) 을 받고, Confirmatory assays 에서 추가 검사를 수행한다.

Determination of ADA Assay Cut Point

Confirmatory Assay

- Screening assay 에서 양성으로 판별된 검체에 대해 수행되는 두 번째 면역원성 검사이다.
- Confirmatory cut point 보다 %Inhibition 이 낮은 검체는 음성으로 선언된다.
- 검체가 양성이면 추가 특성화(characterization)가 필요할 수 있다.
- Drug-specific ADA 는 높은 %Inhibition 을 생성할 것으로 예상되므로 Confirmatory cut point 보다 클 것이다.
 - 추가 특성화 예시 : Ligand-binding assays 를 이용한 중화 항체 분석
(중화항체, Neutralizing Antibodies : 약물의 생물학적 활성을 차단하여, 잠재적으로 임상에 영향을 미칠 수 있음.)
- %Inhibition 의 경우는 Negative 값을 가질 수 있기 때문에 Log transformation 를 적용 할 수 없다.

Determination of ADA Assay Cut Point

Statistical methods for cut point determination

- Screening 단계에서는 Signal to noise ratio 데이터를, Confirmatory 단계에서는 %Inhibition 값을 데이터로 사용한다.
- Cut point 설정을 위한 데이터는 Drug-naïve sample 을 반복 측정하여 취합된 값들을 이용한다.

(예시, Drug-naïve sample 40개를 3 반복 평가하여 Cut point 설정 후, 실제 n개 Sample 에 대해 Screening 수행.)

- Cut point 는 데이터 특성에 따라 3가지 유형(Fixed cut point/Float cut point/Dynamic cut point) 로 나눌 수 있는데, Run 간 평균차이가 없다는 가정을 고려하지 않아도 되는 Floating cut point 를 주로 사용한다.

(Dynamic cut point 는 높은 수준의 Run variability 이 관찰될 때 적절할 수 있음.)

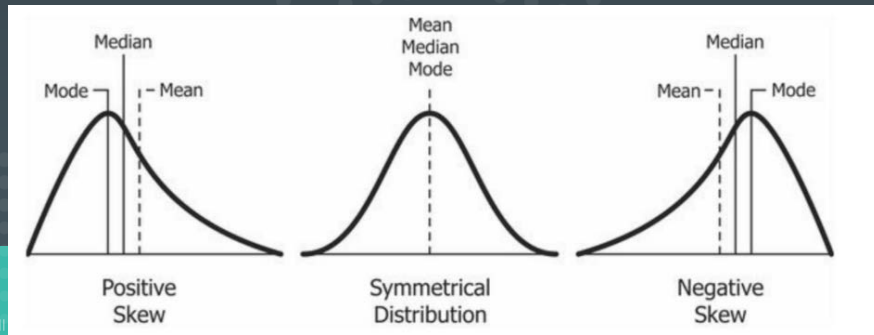
Determination of ADA Assay Cut Point

Distribution

- 데이터가 만약 정규 분포를 따르지 않는다면 로그 변환, Box-Cox 변환 등 데이터에 맞는 변환이 선택 되어야한다.
- 일반적으로 로그변환을 많이 사용하며, Box-Cox 변환은 순위 보존(Rank-preserving)변환 방식으로 데이터 값의 상대적 순서가 변환된 척도에서 원래 척도와 동일하게 유지되는 방법 입니다.

(BoxCox 변환 : 모수 λ 의 MLE를 통해 분포의 Skewness 를 수정하는 데 가장 적합한 변환을 찾음.)

- 데이터의 정규성을 평가하기 위해 Shapiro Wilk 정규성 검정을 수행 할 수 있으며, 데이터의 치우친 정도(Skewness)도 분포를 파악하는데 있어 참고 될 수 있습니다.



Determination of ADA Assay Cut Point

Exclude Outlier

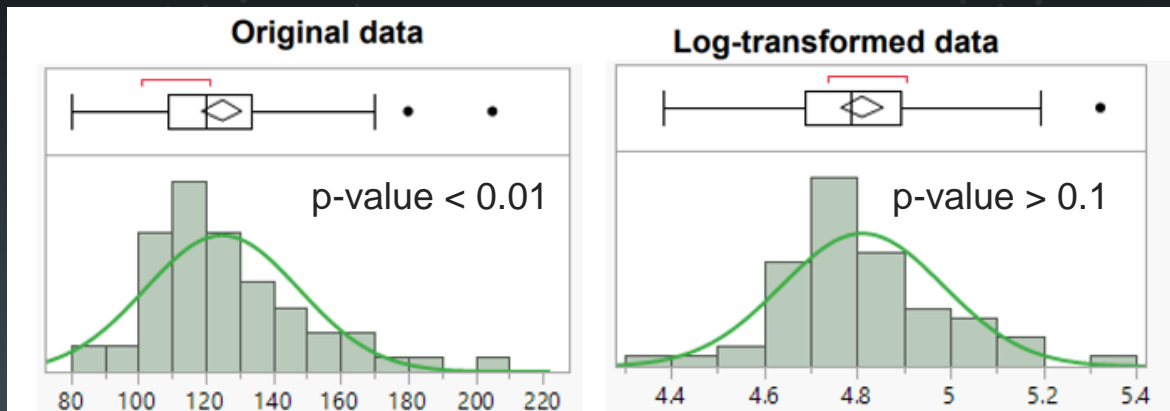
- 데이터 분포 확인 후에는 절단점을 결정하기 전에 특이치(Outliers)를 제거해야 한다.
- 일반적으로 생물학적 이상치(Biological outliers)와 분석적 이상치>Analytical outliers) 를 구분하여 제거한다.

- 생물학적 이상치(Biological outliers)
: Donor/Sample 인구의 이질성 때문에 발생 할 수 있는 이상치.
예시) 기존 항체(pre-existing antibodies) 일부가 매우 높은 신호를 나타내는 경우.

- 분석적 이상치>Analytical outliers)
: 각 Run 별 실험 변동에 의해 발생 할 수 있는 이상치.
예시) 동일한 Donor/Sample에서도 1개 Run 값이 다른 Run 의 값보다 극단적으로 높거나 낮은 경우.

Determination of ADA Assay Cut Point

Distribution & Outliers



- Original Data 에 대한 Normality testing(Shapiro-Wilk normality test) 결과 정규성을 만족하지 않는 것으로 판단 가능하다. (p-value<0.05)
- 위 예시 데이터에서는 Log-transformation 후에는 Data가 정규성 검정을 만족하며, 이런 경우 실제 분석에서도 log-scale 을 적용하여 분석 진행하게 된다.
- 1.5 IQR 방법으로 Outlier 검정했을 때, 1개 데이터가 Outlier 로 확인되므로, 해당 데이터 제거 후 Cut point 추정한다.

Reference

- Standardizing terms, definitions and concepts for describing and interpreting unwanted immunogenicity of biopharmaceuticals (Rup B et al. 2015)
- Statistical Methods for Immunogenicity Assessment (Harry Yang et al. 2016)
- Statistical Evaluation of Several Methods for Cut-Point Determination of Immunogenicity Screening Assay in Journal of Biopharmaceutical Statistics. (Meiyu Shen et al. 2014)
- Recommendations for Systematic Statistical Computation of Immunogenicity Cut Points. (Devanarayan et al. 2017)
- Guideline on Immunogenicity assessment of therapeutic proteins, FDA 2017
- Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products —Developing and Validating Assays for ADA Detection - Guidance for Industry , FDA 2019
- Assay Development and Validation for Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products , FDA 2016
- USP <1106> Immunogenicity Assays—Design and Validation of Immunoassays to Detect Anti-Drug Antibodies, United States Pharmacopeia .

KOREA

DISCOVERY
SUMMIT

EXPLORING DATA
INSPIRING INNOVATION

JSL Application Development

