

Application News

No. C145B

nSMOL® Antibody BA Kit

Antibody drug bioanalysis using Liquid-chromatography Triple Quadrupole Mass Spectrometry

Fab選択的タンパク質分解法nSMOL法を用いた抗体医薬のLCMSバイオアナリシスートラスツズマブの分析事例ー

■ nSMOL® Antibody BA Kit の特徴

当社のnSMOL法は、モノクローナル抗体のFab領域選択的なタンパク質分解を可能とした、全く新しい画期的な手法です。抗体医薬の種類に依存しないメソッド開発を可能とし、抗体医薬のバイオアナリシスにおけるパラダイムシフトをもたらします。

また本手法は、厚生労働省発令の「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン」基準を、抗体医薬に対して唯一クリアした手法であり、その最適化メソッド、プロトコルを提供するとともに、各施設での臨床研究等に適用可能です。

N.Iwamoto

■ nSMOL法が解決するLCMSバイオアナリシス

医薬品の薬物動態は、最も基本的な薬効指標の一つであり、その全体像を把握することは薬効や毒性等の指標を提供し、効率的な医薬品開発をサポートします。

これまで血中濃度の測定は、リガンド結合法を用いたELISA法が主流でしたが、交差や阻害物質の影響を受けるなど、原理的な課題があります。一方、質量分析法では、構造特異性を指標に分析を行うため、上記課題を解決できる可能性を持っています。

しかし質量分析法にもいくつかの課題があり、特に血漿などの複雑なマトリックスの直接的な定量分析（トップダウンプロテオミクス法）では、大過剰なアナライトの存在により、ESIインターフェイスからイオン光学系を維持できず、反復分析には不向きです。

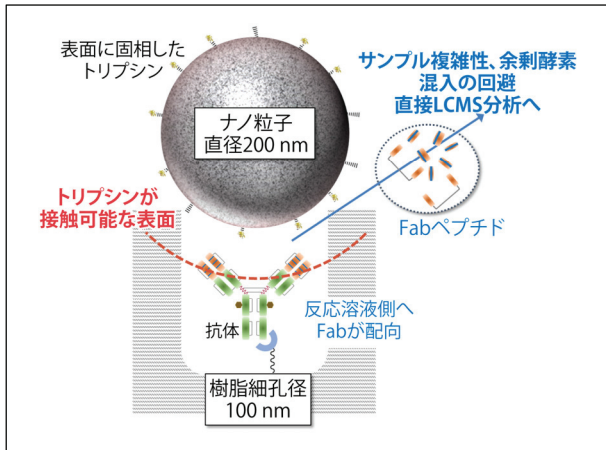
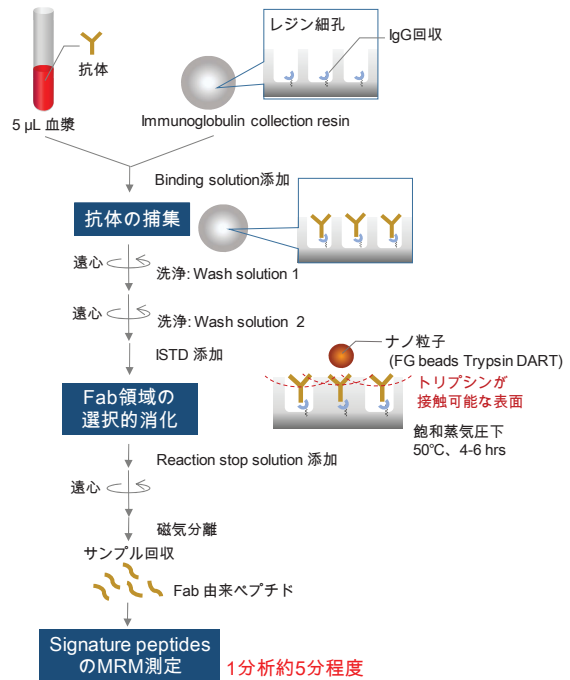


図1 nSMOL法の原理

■ nSMOL法を用いたトラスツズマブのサンプル処理プロトコルおよび分析条件

【サンプル処理プロトコル】

nSMOL法では、全ての抗体医薬に対し、同一のサンプル処理プロトコルで実施可能です。以下にその手順を記します。



【LCMS分析条件】

【LC】 NexeraX2 System

Column	: Shim-pack GISS C18 (50 mm × 2.1 mm)
Column oven	: 50 °C
Solvent A	: 0.1 % formic acid/water
Solvent B	: 0.1 % formic acid/acetonitrile
Gradient	: 1 %B (1.5 min)/1-25 %B (3.5 min)/95 %B (1 min)/1 %B (1 min)
Flow rate	: 0.4 mL/min
Injection	: 10 µL

【MS】 LCMS-8050, 8060

Ionization	: ESI Positive
DL	: 250 °C
Heat Block	: 400 °C
Interface	: 300 °C
Nebulizer gas	: 3 L/min
Drying gas	: 10 L/min
Heating gas	: 10 L/min

■ トラスツズマブ定量ペプチド

ペプチド	MRM transition	目的
P ₁₄ R	512.1>292.3 (b3+)	定量用 (IS)
	512.1>389.3 (b4+)	構造確認用
	512.1>660.4 (b6+)	構造確認用
IYPTNGYTR	542.8>404.7 (y7++)	定量用
	542.8>808.4 (y7+)	構造確認用
	542.8>610.3 (y5+)	構造確認用

※ ヒト血漿中定量範囲 : 0.0610~250 µg/ml
平均真度 : 100.7 %

定量ペプチド (signature peptide) の選択は、抗体特異性を規定する相補性決定領域 (CDR) を含むトリプシンペプチド断片から選択します。しかし、CDR 含有ペプチドであっても、内在性 IgG と同一配列でない保証はありません。そこで、使用するバイオロジカルマトリックス中で競合しないことを確認する必要があります。

また、質量分析はその原理上、基本的な m/z およびシグナル強度の情報しか取得できません。そこで当社ではバイオアナリシスにおいて、定量 MRM 設定と同時に、構造確認 MRM のモニターを推奨しています。このことでより高品質で確実な分析結果が得られます。

■ MRM クロマトグラムおよび検量線

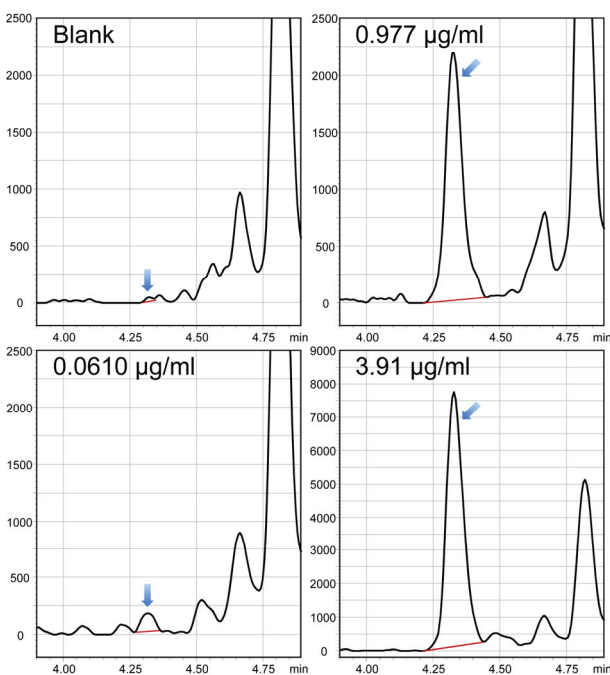


図2 IYPTNGYTR MRM クロマトグラム (ヒト血漿中)

■ トラスツズマブのフルバリデーション結果

【真度および精度】

設定濃度 [µg/ml]	データ平均 (N=15)	真度 (%)	CV (%)
2.93	2.58	88.1	8.2
200	211	106	5.6

【凍結融解試験】

設定濃度 [µg/ml]	データ平均 (N=5)	真度 (%)	温度 (°C)
2.93	2.87	98.1	-20
200	199	99.7	-20

【長期保存安定性試験】

設定濃度 [µg/ml]	データ平均 (N=5)	真度 (%)	温度 (°C)
2.93	3.03	104	-20
200	203	101	-20

【サンプル処理後 48 時間安定性試験】

設定濃度 [µg/ml]	データ平均 (N=5)	真度 (%)	温度 (°C)
2.93	3.67	91.2	5
200	211	106	5

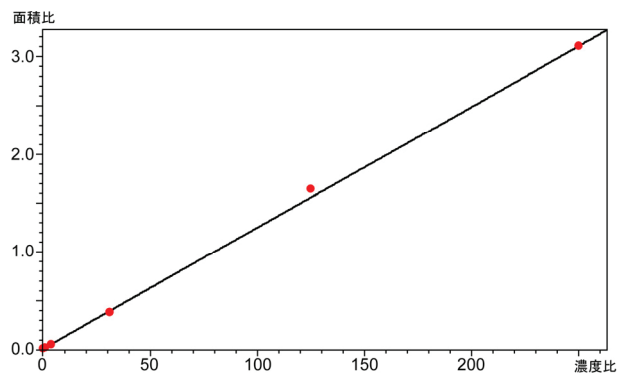


図3 トラスツズマブの検量線

■ 考察・結論・参考文献

nSMOL 法は、低分子医薬品のガイドライン基準を満たし、ヒト血漿中トラスツズマブの定量解析を可能とした。

定量下限は 0.06 µg/ml であり、前臨床～ヒト臨床試験まで同一アッセイ法で実施できる。

ノイズ成分を大幅に低減することにより、分析時間の短縮に成功した。

【参考文献】

Iwamoto N et al. *Analyst*, DOI:10.1039/c3an02104a
Iwamoto N et al., *Anal Methods*, DOI:10.1039/c5ay01588j

【開発責任者】

基盤技術研究所 岩本 典子、嶋田 崇史

注) 本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器として承認・認証を受けておりません。治療診断目的およびその手続き上での使用はできません。

株式会社 島津製作所

分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

B 改訂版発行：2017 年 3 月

初版発行：2017 年 2 月

島津コールセンター ☎0120-131691
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。