

Application News

No. C147A

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3ーニボルマブの分析事例ー

■ 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。

nSMOL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、複数の抗体医薬に対して唯一クリアした手法であり、当社ではそれぞれの最適化メソッド、プロトコルを提供しています。

N. Iwamoto

■ ニボルマブの分析バリデーション開発

がん細胞は、免疫細胞の監視機構から逃れるため、免疫抑制性のリガンドを発現することで、その細胞傷害を回避する戦略をとることが解ってきました。

ニボルマブは、その中心機構の一つであるPD-1分子に結合し、その抑制性シグナルを阻害することで、免疫細胞を活性化する画期的な医薬品として開発されました。これらのメカニズムを応用した医薬品を総称して、免疫チェックポイント阻害剤と呼ばれており、世界中の創薬プロジェクトが進行しています。

この薬剤は、高度で複雑な免疫機構に作用し、薬効を発揮する化学療法であるので、今後、より効果の高い治療法を開発するためには、多くの臨床指標やバイオマーカーを取得し、統合的な臨床研究を進めることが重要であると考えられます。

弊社では、nSMOL法を応用し、ニボルマブの薬物動態モニタリングの技術基盤となる分析バリデーションを実施し、速やかな臨床実装を可能とすべく、その分析条件の開発を行ってきました。

■ ニボルマブ定量ペプチド

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
ASGITFSNSG MHWVR	550.8>661.5 (y11++)	定量用
	550.8>746.4 (y13++)	構造確認用
	550.8>785.4 (y6+)	構造確認用

※ ヒト血漿中定量範囲	: 0.15~300 µg/ml
平均真度	: 100.4 %

■ nSMOL法を用いたニボルマブの分析条件

【サンプル処理プロトコール】

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ールで実施可能です。詳細は弊社アプリケーション（トラスツマブ分析事例）をご参照ください。

【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)/1-40 %B (3 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

■ nSMOL反応で同定されたニボルマブ定量候補ペプチドの立体構造配置

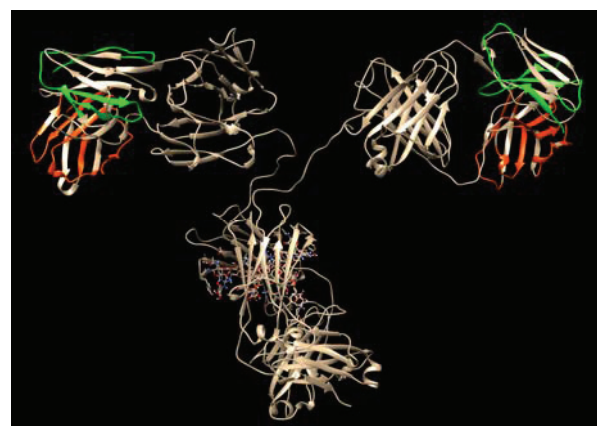


図1 ニボルマブのトリブシン断片の立体配置

ペプチドはそれぞれ赤（H鎖）、緑（L鎖）で示します。nSMOLによりFv選択的なタンパク質分解反応が進んでいることがわかる。

MRM クロマトグラム

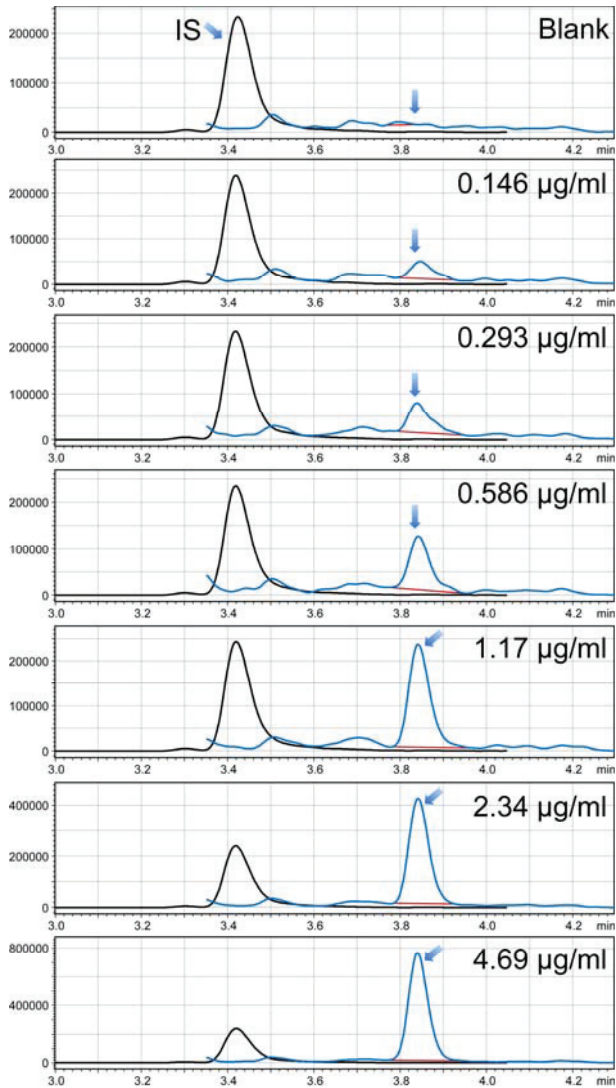


図2 ASGITFSNSGMHWVR (青)、および P₁₄R 内部標準 (黒) MRM クロマトグラム (ヒト血漿中)

ニボル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	2.97	101	7.51
200	202	101	6.75

【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	2.73	95.6	-20
200	183	96.1	-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	213	107	-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	3.08	105	5
200	195	97.6	5

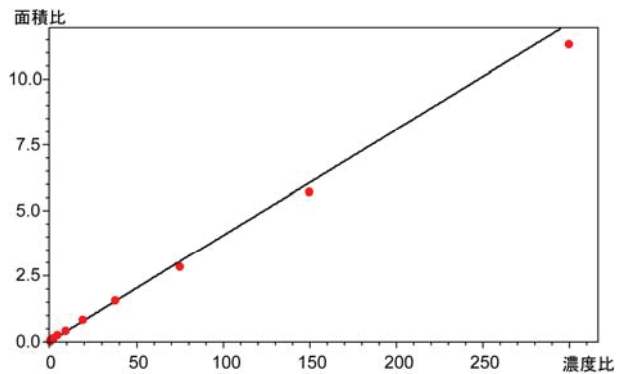


図3 ニボルマブの検量線

考察・結論・参考文献

nSMOL 法で得られた CDR 領域を含む定量候補ペプチドは 8 つであったが、そのうち薬物濃度と正の相関を示すペプチドは ASGITFSNSGMHWVR のみとなりました。このことは、内在性 IgG と完全ヒト抗体の配列相同性が極めて高いことを示す。

良好なバイオアナリシス条件を設定するためには、構造特異的なペプチド候補を厳格に選択する必要がありますが、弊社の nSMOL 法では、Fv 領域選択的な反応を用いているため、そのアッセイ法構築が非常に容易である。

定量下限は 0.15 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。

【参考文献】

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

Iwamoto N et al., *J. Chromatogr. B*, 2016, DOI:10.1016/j.jchromb.2016.04.038

【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。

A 改訂版発行：2017 年 3 月

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

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。