

Application News

No. C148A

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—4— —マルチプレックス分析事例—

■ 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

■ 抗体医薬の種類とその定量ペプチド選択について

分子標的薬である抗体医薬開発は、近年飛躍的に進歩し、ほとんどの抗体医薬のFc（定常領域）部位はヒトIgG由来の構造になっている。nSMOL法は、Protein A ビーズによりIgGのFc領域を介して血漿中のIgG画分を回収し、ナノ粒子に固相したトリプシンによって抗体医薬の可変領域選択的なタンパク質分解を可能とする手法です。そのため、抗体の構造化学的な特徴を反映した定量ペプチド選択が可能で、抗体は重鎖、軽鎖にそれぞれ3カ所のCDRを有するが、nSMOL法で回収できるペプチドは、そのCDRを含むペプチドとなります。

近年、抗体医薬の多様化、また併用投与などが進んでおり、一度の分析で多種類の抗体を定量できる技術の開発が求められています。nSMOL法はマルチプレックス分析にも対応しており、一度の分析で多種類の抗体を精度よく定量可能です。これは抗体医薬の併用療法における薬物動態試験を可能にする技術の一つとして応用できることを示します。

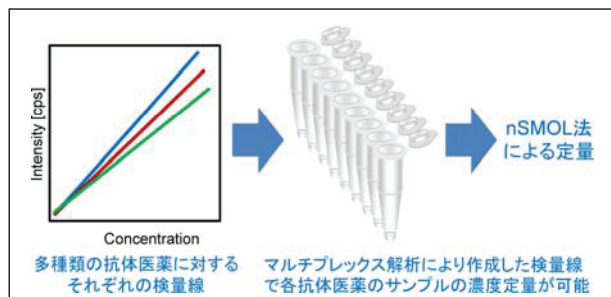


図1 nSMOL法を用いたマルチプレックス解析

■ nSMOL法を用いたマルチプレックス分析条件

【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（トラスツズマップ分析事例）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)/1-42 %B (4 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

■ マルチプレックス分析用定量ペプチド

| 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 |
| Brentuximab vedotin (VLIYAASNLE SGIPAR) | 837.5>343.1 (y3+) | 定量用 |
| | 837.5>600.3 (y6+) | 構造確認用 |
| | 837.5>213.1 (b2+) | 構造確認用 |
| Rituximab (ASGYTFTSY NMHWVK) | 598.1>817.5 (y13++) | 定量用 (IS) |
| | 598.1>707.5 (y11++) | 構造確認用 |
| | 598.1>657.1 (y10++) | 構造確認用 |
| Cetuximab (SQVFFK) | 378.2>540.3 (y4+) | 定量用 |
| | 378.2>441.2 (y3+) | 構造確認用 |
| | 378.2>294.2 (y2+) | 構造確認用 |

| | |
|-------------|------------------|
| ※ ヒト血漿中定量範囲 | : 0.58~300 µg/ml |
| 真度 | : 91.5~115 % |
| 精度 | : 4.4~11.8 % |

MRM クロマトグラム

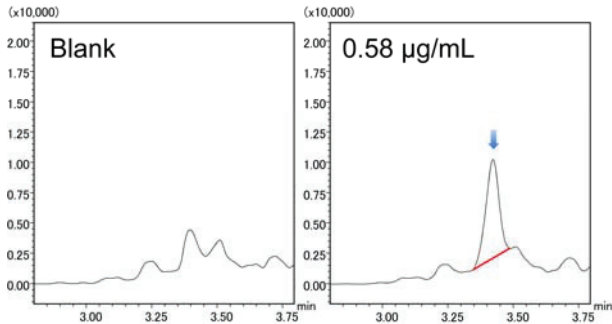


図2 Brentuximab MRM クロマトグラム (ヒト血漿中)

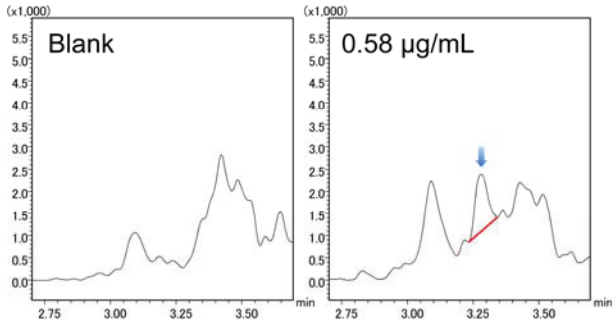


図3 Rituximab MRM クロマトグラム (ヒト血漿中)

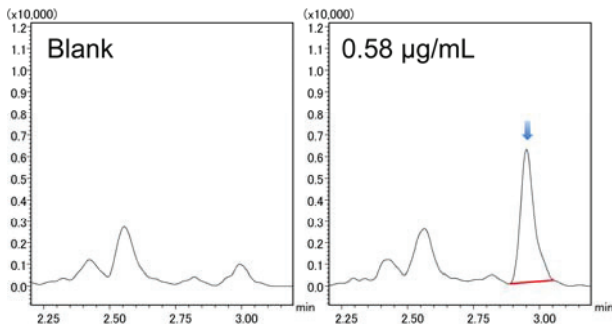


図4 Cetuximab MRM クロマトグラム (ヒト血漿中)

マルチプレックス解析の分析精度

○Brentuximab vedotin

| 設定濃度 [µg/ml] | データ平均 (N=9) | CV (%) | 真度 (%) |
|-----------------|----------------|-----------|-----------|
| 1.76 | 1.74 | 7.60 | 99.2 |
| 240 | 249 | 7.12 | 104 |

○Rituximab

| 設定濃度 [µg/ml] | データ平均 (N=9) | CV (%) | 真度 (%) |
|-----------------|----------------|-----------|-----------|
| 1.76 | 1.77 | 5.44 | 101 |
| 240 | 247 | 9.65 | 104 |

○Cetuximab

| 設定濃度 [µg/ml] | データ平均 (N=9) | CV (%) | 真度 (%) |
|-----------------|----------------|-----------|-----------|
| 1.76 | 1.71 | 8.48 | 97.5 |
| 240 | 255 | 5.52 | 106 |

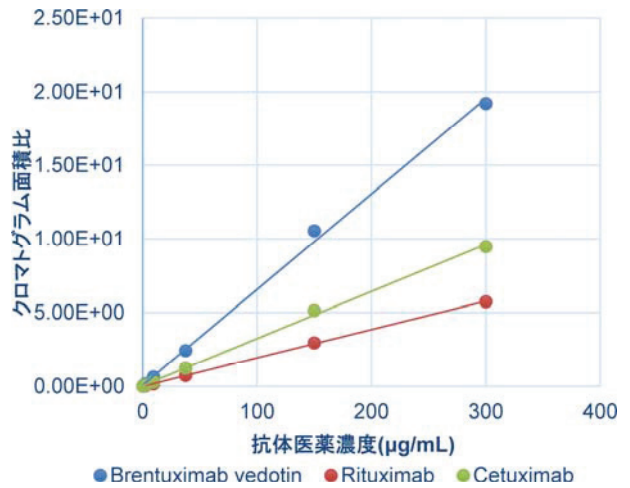


図5 マルチプレックス解析検量線

考察・結論・参考文献

nSMOL 法を用いることで、一度の分析で多種類の抗体医薬の検出を行うことが可能。

複数抗体医薬を血漿に混合し nSMOL 法定量解析することで、一度の分析で複数の抗体医薬に対する検量線の作成が可能。

定量値の真度・精度は、今回用いた 3 種類の抗体医薬で、FDA が発行するガイドラインのバリデーション基準をクリアした。

定量下限は 0.58 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., *Clinical Pharmacology & Biopharmaceutics*, DOI:10.4172/2167-065X.1000164

【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

A 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。