

Application News

No. C169

nSMOL™ Antibody BA Kit

Fab選択的タンパク質分解法nSMOL法を用いた抗体医薬のLC-MSバイオアナリシスー5 ー装置比較ー

■ 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 LC-MS 前処理法です。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。この手法は当社トリプル四重極型質量分析計 LCMS™-8050 (以下、LCMS-8050) および LCMS™-8060 (以下、LCMS-8060) に最適化されています。

■ 当社 LCMS-8050 と A 社 LC-MS の比較

今回、当社の LCMS-8050 と A 社ハイブリッド型質量分析計 LC-MS でベバシズマブを分析し真度および感度を比較しました。前処理には両装置とも nSMOL 法を用いました。分析した際の MRM データ取得時間を表 1 に示します。

表 1 LCMS-8050 と A 社 LC-MS の MRM データ取得時間

装置	Dwell Time	Pause Time	Cycle Time (最大)
LCMS-8050	10 msec	3 msec	182 msec
A 社 LC-MS	15 msec	5 msec	280 msec

■ nSMOL 法を用いたベバシズマブの分析条件

【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。

100 nm の細孔径をもつ IgG 回収レジンを用いて血漿中に存在する全 IgG を樹脂の細孔に固定します。IgG 以外の血漿中の余分な成分をフィルター除去・洗浄後、トリプシンを結合させた微細ナノ粒子 (FG ビーズ、直径 200 nm) を加え、酵素消化を行います。反応後は Reaction stop solution を加え、樹脂と FG ビーズをスピンフィルターで除去し、そのまま LC-MS 分析に供することができます。表 2 に定量ペプチドの MRM 条件を、表 3 に分析条件を示します。

表 2 ベバシズマブの定量ペプチドおよび内部標準

ペプチド	MRM Transition	目的
P14R	512.1>292.3 (b3+)	定量用 (IS)
	512.1>389.3 (b4+)	構造確認用
	312.1>660.4 (b6+)	構造確認用
FTFSLDTSK	523.3>797.4 (y7+)	定量用
	523.3>898.5 (y8+)	構造確認用
	523.3>650.3 (y6+)	構造確認用

※ ヒト血漿中定量範囲	: 0.146~300 µg/mL
平均真度	: 100.7 %

表 3 分析条件

[LC] Nexera™X2 System	
Column	: Shim-pack™ GISS C18 (50 mm × 2.1 mm, 1.9 µm)
Column temp.	: 50 °C
Solvent A	: 0.1 % formic acid/water
Solvent B	: 0.1 % formic acid/acetonitrile
Gradient	: B conc. 1% (1.5 min) / 1-35 % (3.5 min) / 95 % (1 min) / 1 % (1 min)
Flow rate	: 0.4 mL/min (5 min)
Injection volume	: 10 µL
[MS] LCMS-8050	
Ionization	: ESI Positive
DL temp.	: 250 °C
Block Heater temp.	: 400 °C
Interface temp.	: 300 °C
Nebulizer gas flow	: 3 L/min
Drying gas flow	: 10 L/min
Heating gas flow	: 10 L/min
Probe position	: 2 mm

■ 考察・結論

nSMOL 法はヒト血漿中ペバシズマブの高精度の定量を可能とし、バリデーションにおける真度・精度は低分子医薬品のガイドライン基準を満たしました。当社 LCMS-8050 と A 社ハイブリッド型質量分析計 LC-MS でペバシズマブを分析し結果を比較したところ、A 社 LC-MS よりも高い真度および

感度を得られ、内部標準である P14R の面積値も安定して測定可能でした（表 4）。当社 LCMS-8050 では低濃度においても安定したデータが取得可能でした。このような結果が得られた要因としては、開裂ガスの種類や質量分析計の構造の違いが考えられます。

表 4 LCMS-8050 と A 社 LC-MS で比較したペバシズマブ分析結果

設定濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	LCMS-8050				A 社トリプル四重極型 LC-MS			
	面積値	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	真度 (%)	P14R 面積値	面積値	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	真度 (%)	P14R 面積値
0	445			640103	2185	< 0	N/A	382317
0.25	6436	0.257	102.8	610062	6502	0.217	84.7	416950
0.512	10358	0.485	94.8	623157	4166	0.537	104.9	150679
1.02	18712	1.04	101.8	597366	18452	1.00	98.2	408900
2.56	45959	2.63	102.9	623257	43997	2.66	103.7	409648
6.4	108651	6.57	102.6	609288	83687	6.85	107.1	315272
16	265218	15.6	97.3	634878	250600	16.6	103.7	396643
40	638375	38.7	96.8	617491	619589	38.9	97.3	420638
100	1662475	102	102.5	609322	1583550	105	105.2	399268
250	3927201	250	100.1	590061	3798713	253	101.3	398236
平均				615499				369855
%RSD				0.024				0.212

■ IgG 特異的な高い選択性・簡便な装置メンテナンス

nSMOL 法では測定対象のペプチドを選択的に回収でき、分析サンプルのコンタミネーションを最小限に抑えることが可能です。そのため、LC-MS におけるバイオアナリシスで問題となるマトリックス効果による分析精度や再現性、回収率の低下が回避でき、LC-MS の連続分析耐久性にも貢献します。

さらに、LCMS-8050 を含む当社のトリプル四重極型 LC-MS は ESI キャピラリー交換が工具なしで可能、DL パイプも真空を解除せず交換できるため、ダウンタイムを短縮できます。各部品の費用も他社と比較して安価に設定されています。

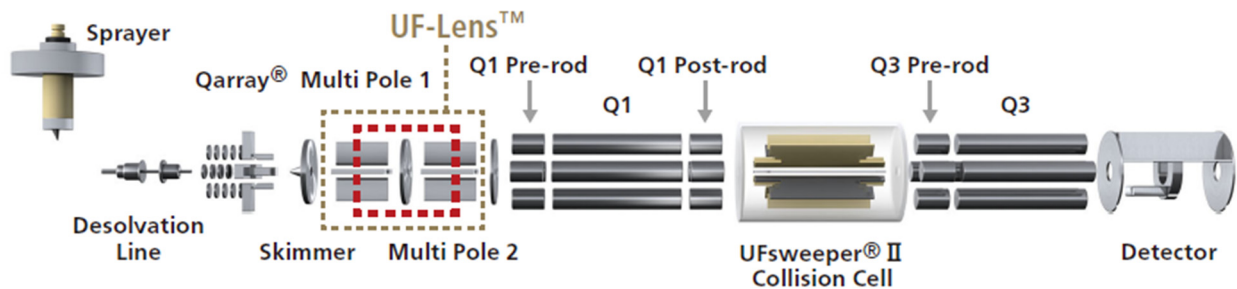


図 1 LCMS-8050、LCMS-8060 の構造

【参考文献】

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

Iwamoto N *et al.*, *Drug Metab Pharmacokinet*, DOI: 10.1016/j.dmpk.2015.11.004

【開発責任者】

グローバルアプリケーション開発センター 前島 希
基盤技術研究所 岩本 典子、嶋田 崇史

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。

nSMOL、LCMS、Nexera、Shim-pack、UF-Lens、Qarray、および UFsweeper は、株式会社 島津製作所の商標です。本文書に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。なお、本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

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：2018 年 4 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。