

Application News

No. C174

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6 ー反応条件改良による自動化分析への対応ー

■ 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する、抗体医薬の分析における画期的な技術です。

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、手順を提供しています。本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。

■ nSMOL法の静置反応

従来のnSMOL法では、トリプシン消化を振とうしながら行っていました。この方法では50℃に設定した恒温槽中に振とう機設置する必要がありましたが、本アプリケーションニュースでは消化反応を静置で行い、反応中に振とうを加えなくてもトリプシン消化効率に問題がないことを確認しました。

■ nSMOL法のサンプル処理プロトコル

nSMOL法では、試薬およびサンプル処理プロトコルが全ての抗体医薬に対して共通です。

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、約10秒振とう後、静置にて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1に定量ペプチドのMRM条件を、表2に分析条件を示しました。

表1 測定条件

抗体医薬	ペプチド	定量用MRM
Trastuzumab	IYPTNGYTR	542.80>404.70
Bevacizumab	FTFSLDTSK	523.30>797.40
Rituximab	ASGYTFTSYNMHWK	598.10>817.50
Nivolumab	ASGITFNSNGMHWVR	550.80>661.50

表2 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	: Trastuzumab... B conc. 1 % (1.5 min)/1-25 % (3.5 min)/95 % (1 min)/1 % (1 min) Bevacizumab... B conc. 1 % (1.5 min)/1-35 % (3.5 min)/95 % (1 min)/1 % (1 min)
Flow rate	: 0.4 mL/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

■ nSMOL 法の持続攪拌と静置反応の比較

nSMOL 法における酵素反応の工程において、持続攪拌と静置で反応させた場合の解析結果をトラスツズマブとベバシズマブ、リツキシマブ、ニボルマブで比較しました。図1に、50 µg/mLにおける定量ペプチドのピーク面積値を比較した結果を示しました (N=3)。持続攪拌での回収率を100%とした場合、静置反応での反応効率はトラスツズマブは84.6%、それ以外は95.7~102%でした。いずれの抗体においても定量値に影響を与える有意差は検出されず、さらに真度および感度に影響はありませんでした。

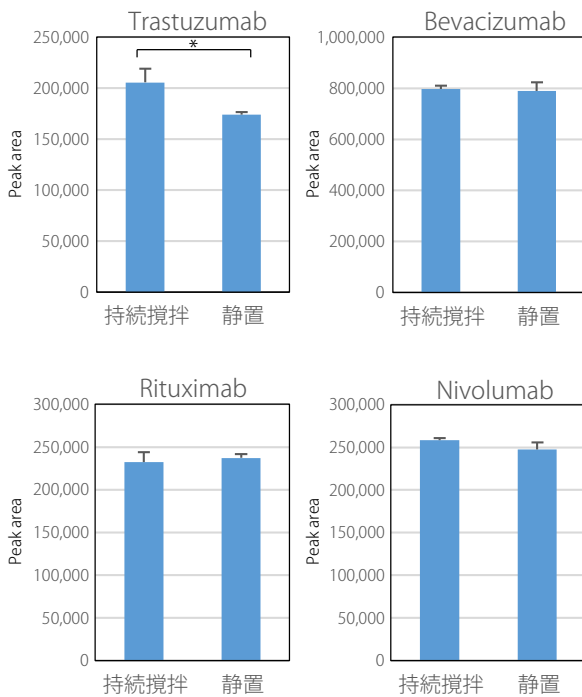


図1 各抗体医薬の持続攪拌と静置反応のピーク面積値の比較 (* : p<0.05)

■ nSMOL 静置反応のバリデーション結果

複数の抗体を対象にしたバリデーション分析において、低分子医薬品のガイドライン基準を用いた試験を実施しました。本レポートでは、トラスツズマブとベバシズマブに対し、下記表中の設定濃度に対する真度および精度の検証結果を示します (表3、4)。nSMOLを静置条件にて反応させる条件においても、その真度および精度は基準値を十分満たすことが解ります。

表3 トラスツズマブ静置反応分析結果

設定濃度 (µg/mL)	データ平均 (N=7)	CV (%)	真度 (%)
0.244	0.254	8.72	104
200	207	4.58	103

表4 ベバシズマブ静置反応分析結果

設定濃度 (µg/mL)	データ平均 (N=7)	CV (%)	真度 (%)
0.439	0.417	14.3	95.0
240	229	2.83	95.5

■ 考察

当社の nSMOL 法では、Fab 領域選択的なタンパク質分解反応により CDR 特異的なペプチドを得ることが可能です。これまで、nSMOL 反応は 50 °C 中、持続攪拌で行っていましたが、本アプリケーションで示す通り、その反応ステップを静置条件で行った場合でも約 0.1 から 300 µg/mL の濃度範囲で定量値の真度および感度を十分満たすことが確認されました。反応中における持続攪拌が不要になったことにより、振とうを加えるための専用の機器等が不要となり、より汎用性の高い分析前処理が可能となります。

本静置条件を用いた nSMOL 法の改良プロトコルにより、今後、多検体処理や自動化アッセイへの速やかな応用、さらには、前臨床やヒト臨床における抗体医薬動態試験への貢献が期待されます。

【参考文献】

Iwamoto N *et al.*, *Analyst*, DOI: 10.1039/c3an02104a
 Iwamoto N *et al.*, *Anal Methods*, DOI: 10.1039/C5AY01588J
 Iwamoto N *et al.*, *Drug Metab Pharmacokinet*, DOI: 10.1016/j.dmpk.2015.11.004
 Iwamoto N *et al.*, *Biol Pharm Bull*, DOI: 10.1248/bpb.b16-00230
 Iwamoto N *et al.*, *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.04.038

【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

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、および Shim-pack 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5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。