

Application News

No. C176

マイクロ流量液体クロマトグラフ質量分析システム

Nexera Mikros™ と nSMOL™ 法を用いた トラスツズマブの高感度 LC/MS バイオアナリシス

■ 高感度と堅牢性を両立するマイクロ LC/MS

高速液体クロマトグラフ質量分析 (LC-MS) システムは、分析の高感度化と高速化を実現し、幅広い分野で用いられています。しかし、特に医薬品の研究開発分野においては、さらに高感度な LC-MS システムが要求され続けています。

LC-MS では LC 流量を低減させることにより、MS 部でのイオン化およびイオン取り込みの効率を向上させ、より高感度な分析を可能とします。従来より超高感度分析には、LC 流量をナノ流量 (数十~数百 nL/min.) にまで下げたナノ LC/MS が用いられていますが、堅牢性やスループットに課題がありました。

一方、LC 流量をマイクロ流量 (1~10 μ L/min. 付近) まで低減したマイクロ LC/MS では、従来のセミマイクロ LC/MS に準じた堅牢性、スループットを維持しつつ、セミマイクロ LC/MS に対して数~数十倍の高感度化が可能です。島津「Nexera Mikros」は、高感度と堅牢性の両立を実現したマイクロ LC-MS システムです。

本アプリケーションニュースでは、トラスツズマブの前処理と Nexera Mikros での高感度検出を組み合わせた定量分析メソッドのバリデーション結果をご紹介します。

M. Oguri, T. Matsubara, W. Fukui



図1 ミクロ LC-MS システム「Nexera Mikros™」

■ 高感度 LC/MS の抗体分析への応用

これまで抗体医薬品の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した。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があります。一方で抗体医薬品の種類によっては詳細な血中濃度情報を得るには感度が不十分でした。高感度化を実現したマイクロ LC-MS はこの課題を解決し、抗体医薬品のさらなる低濃度領域での定量が可能となります。

■ nSMOL™ Antibody BA kit を用いた トラスツズマブの前処理プロトコル

また、抗体の前処理にも大きな課題がありました。一般的にはトリプシンを用いた消化により抗体由来ペプチドを得ますが、この方法は抗体全体を消化するためペプチド断片の選択性が低いことが問題でした。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画期的な前処理手法で、抗体医薬品の種類に依存しない全く新しいメソッド開発が可能です。

図2に nSMOL 法によるトラスツズマブの前処理プロトコルを示します。nSMOL 法では、全ての抗体医薬品に対し、同一のサンプル処理プロトコルで前処理を実施可能です。本アプリケーションでは、トラスツズマブ標準品をスパイクしたヒト血漿とブランク血漿に nSMOL 法を適用しました。

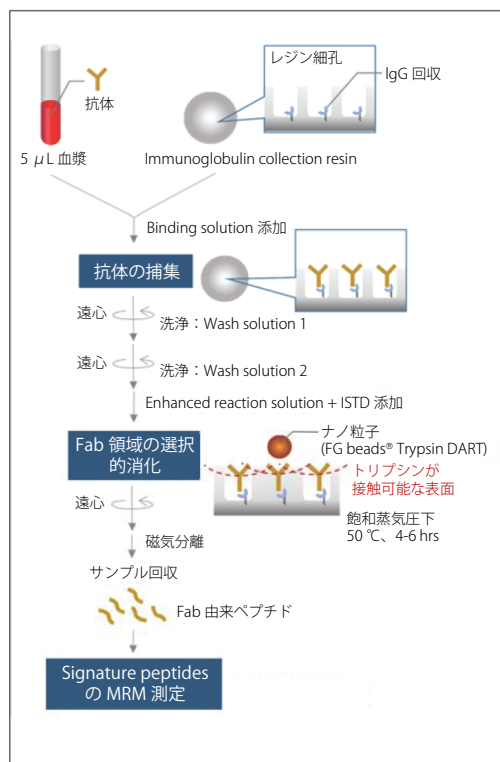


図2 nSMOL 法による前処理プロトコル

表 1-1 分析条件 (LC)

[LC] Nexera Mikros System (Analytical)	
Column	: Shim-Pack™ MC C18 (50 mm×0.175 mm)
Flow Rate	: 4 μ L/min.
Oven Temp.	: 50 °C
Solvent A	: 0.1 % Formic acid in water
Solvent B	: 0.1 % Formic acid in Acetonitrile
Gradient	: 0.00-0.50 min. 5 %B→4.50 min. 25 %B →4.51 min. 95 %B→5.00 min. 95 %B →5.01 min. 5 %B→11.00 min. STOP
(Trap)	
Trap column	: L-column 2 ODS Micro (5 mm×0.3 mm)
Oven Temp.	: 50 °C
Solvent A	: 0.05 % Trifluoroacetic acid in water
Solvent B	: 0.1 % Formic acid in Acetonitrile
Inj. Volume	: 10 μ L

表 1-2 分析条件 (MS)

[MS] LCMS™-8060 with Micro-ESI 8060	
Ionization	: ESI Positive
DL Temp.	: 250 °C
Heat Block Temp.	: 400 °C
ESI Temp.	: 100 °C
Nebulizer Gas	: 2 L/min.
Drying Gas	: OFF
Heating Gas	: 3 L/min.

表 1-3 トラスツズマブ定量ペプチドのMRM トランジション

ペプチド	MRM トランジション	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

ペプチド (signature peptide) の選択は、抗体特異性を規定する相補決定領域 (CDR) を含むトリプシンペプチド断片から選択しました。

■ トラスツズマブ由来ペプチド定量精度評価

図 3 に血漿中トラスツズマブの直線性評価結果を示します。設定濃度と測定濃度において、 $R^2=0.99$ 以上の良好な相関関係が得られました。また、真度および精度も良好でした (表 2)。さらに、Nexera Mikros では血漿中トラスツズマブの LLOQ は $0.00763 \mu\text{g/mL}$ であることが確認されました。

図 4 に Nexera Mikros、図 5 に一般的なセミマイクロ LC-MS システムによる MRM クロマトグラム (Application News C145A より引用) をそれぞれ示します。セミマイクロ LC-MS システムでは検出できなかった濃度が Nexera Mikros では十分な感度を持って検出できていることが分かります。

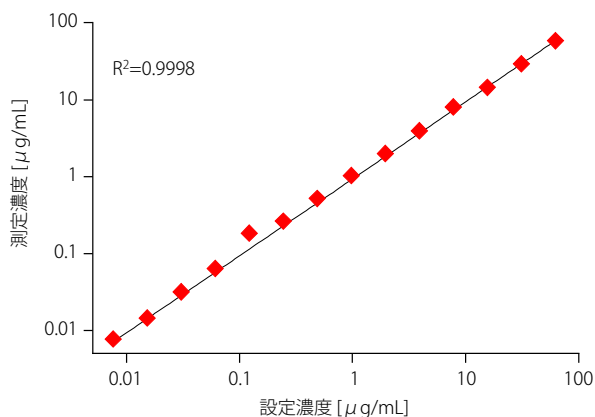


図 3 直線性評価結果 (血漿中)

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., *Application News* No. C145A

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。

Nexera Mikros、nSMOL、Shim-Pack、および LCMS は、株式会社 島津製作所の商標です。FG beads は、多摩川精機株式会社と国立大学法人東京工業大学の登録商標です。

表 2 各濃度における真度および精度

設定濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	QC set 1 (N=5 for each level)			QC set 2 (N=5 for each level)		
	平均濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	真度 (%)	再現性 (%)	平均濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	真度 (%)	再現性 (%)
0.00763	0.00741	97.1	5.69	0.00762	100	11.3
0.0229	0.0234	102	6.68	0.0232	101	2.84
5.86	6.19	106	2.67	5.83	99.4	3.12
50.0	46.9	94.0	6.36	45.8	91.7	7.23

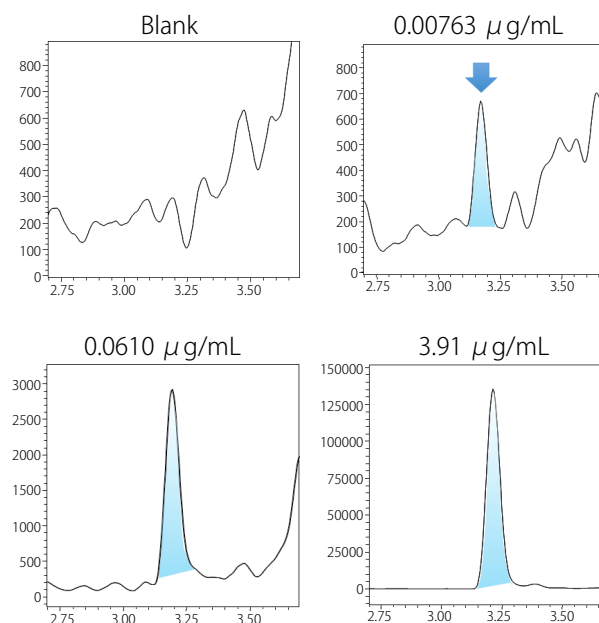


図 4 MRM クロマトグラム (LC 流量: $4 \mu\text{L/min}$.)

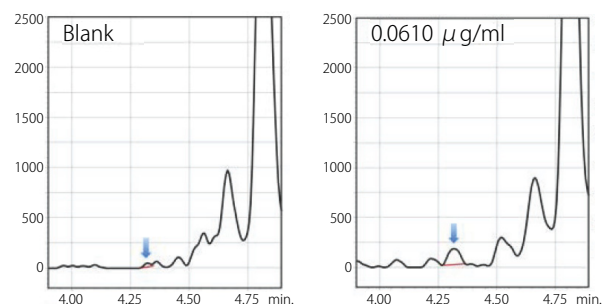


図 5 MRM クロマトグラム (LC 流量: 0.4 mL/min .)

* Application News C145A より引用