

## 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—7 — トシリズマブの分析事例 —

### ■はじめに – トシリズマブの免疫機構 –

トシリズマブは日本で開発されたヒト化抗ヒトインターロイキン 6 (IL-6) レセプターモノクローナル抗体です。その作用機序は「IL-6 レセプターと結合することによる IL-6 を介するシグナル伝達の遮断」とされています。IL-6 は 1980 年代に発見され、その後の研究で炎症反応や免疫反応などに関与し、様々な生理活性があることが示されています。関節リウマチ・キャスルマン病・若年性特発性関節炎などの自己免疫性炎症性疾患では、IL-6 が体内で異常生産されていることが明らかとなっており、これによって過剰な免疫反応が引き起こされ症状を呈します。トシリズマブの投与はこの異常生産された IL-6 による炎症誘導を遮断・抑制することで、今まで難病とされてきた疾患の症状をコントロールできるようになりました。また IL-6 が病態に関与する他の疾患に対してトシリズマブは高い治療効果をもたらす可能性があり、昨今社会問題となっている新型コロナウイルス重篤肺炎等、急性炎症に対する治療が期待されています。

K. Yokoyama

### ■ 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、抗体医薬品分析におけるパラダイムシフトをもたらします。また厚生労働省発令の「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、複数の抗体医薬品に対してクリアした手法でもあり、当社ではそれぞれの最適化メソッド、プロトコールを提供しています。

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) 及び LCMS™-8060 (以下、LCMS-8060) に最適化されています。

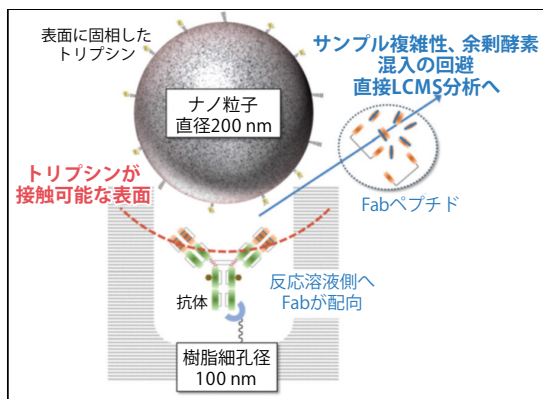


図1 nSMOL 法の原理

### ■ LC-MS の抗体医薬品分析への応用

これまで抗体医薬品の血中濃度測定はリガンド結合法を用いた ELISA 法が主流でしたが、交差反応性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。しかし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。

また、昨今の生命科学分野における研究の進展に伴い、抗体医薬の多様化や、既存の抗体医薬品の様々な疾患への適応拡大が進んでいます。抗体医薬の使用はこれまで難病とされてきた様々な疾患に対して多大な治療効果をもたらしてきましたが、一方で継続的な使用によって治療効果が減少していく患者も存在しており、その患者の一部では抗薬物抗体の存在が確認されています。

このような背景から、臨床研究や生命科学研究において抗体医薬の血中濃度測定は今後需要が高まると予想され、LC-MS を使用した分析法はこれらの研究に貢献できる可能性があります。



図2 LCMS™-8050 (左) および LCMS™-8060 (右)

### ■ nSMOL 法を用いたトシリズマブの サンプル処理プロトコール

nSMOL 法ではすべての抗体医薬の前処理を同一のプラットフォームで実施することが可能です。しかし、抗体の一部にはトリプシン反応抵抗性を示すものもあり、測定データの感度に大きく影響を及ぼすことがあります。このような抗体医薬品でも、トリプシン消化反応の前に酸性条件下での還元処理を行うことで反応効率を高め、十分な感度を得ることができます。

#### 【サンプル処理プロトコール】

100 nm の細孔径を持つ IgG 回収レジンを用いて血漿もしくは血清中に存在する全 IgG を樹脂の細孔に固定します。IgG 以外の血漿/血清の余分な成分をフィルター除去した後、酸性条件下で還元するために、250 mM TCEP-HCl を加え 30 分室温でインキュベーションします。IgG を固定したレジン洗浄後、トリプシンを結合させた微細ナノ粒子 (FG beads®、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 beads をスピニング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。

## ■ LCMS 分析条件

表 1 に LC-MS 分析の分析条件を、表 2 にトシリズマブの定量ペプチド及び内部標準の測定条件を示します。

表 1 LC および MS の分析条件

[HPLC conditions] (Nexera™ X2)	
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	: 2 %B (0 - 1.5 min)/2-30 %B (1.5 - 4.5 min)/ 95 %B (4.5 - 5.5 min)/2 %B (5.5 - 6.5 min)
Flow rate	: 0.4 mL/min
Injection volume	: 10 µL
[MS conditions] (LCMS-8050/8060)	
Ionization	: ESI (Positive mode)
Mode	: MRM
Nebulizing gas flow	: 3.0 L/min
Drying gas flow	: 10.0 L/min
Heating gas flow	: 10.0 L/min
DL temp.	: 250 °C
Block heater temp.	: 400 °C
Interface temp.	: 300 °C

表 2 トシリズマブの定量ペプチド及び内部標準

ペプチド	MRM トランジション	目的
	310.2>520.2	定量用
VTMLR	310.2>419.2	構造確認用
	310.2>201.0	構造確認用
P14R	512.1>292.3	定量用 (IS)
	512.1>389.3	構造確認用
	512.1>660.4	構造確認用

※ ヒト血浆（血清）中定量範囲：0.781～200 µg/mL

※ P14R（内部標準）はトリプシン消化反応液を調製する際に添加（終濃度 10 fmol/µL 程度）

## ■ トシリズマブのバリデーション結果

表 3 にバリデーション試験項目である真度・精度の結果を、図 3 に検量線を示します。また、代表的なクロマトグラムを図 4 に示します。

表 3 トシリズマブのバリデーションデータ（真度及び精度）

	設定濃度 [µg/mL]	データ平均 [µg/mL]	真度 (%)	CV (%)
day1 (N=5)	2.34	2.39	102	5.87
	160	170	106	1.32
day2 (N=5)	2.34	2.35	100	3.40
	160	166	104	3.83
day3 (N=5)	2.34	2.59	111	3.32
	160	158	98.6	3.50
N=15	2.34	2.44	104	5.92
	160	165	103	4.31

## ■ 検量線および MRM クロマトグラム

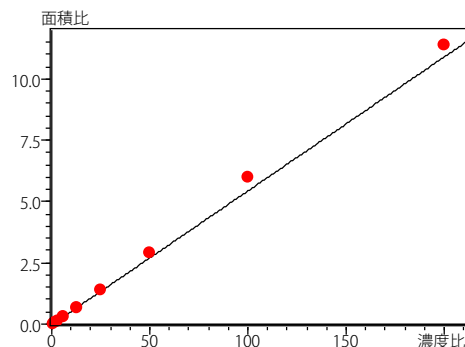


図 3 トシリズマブの検量線

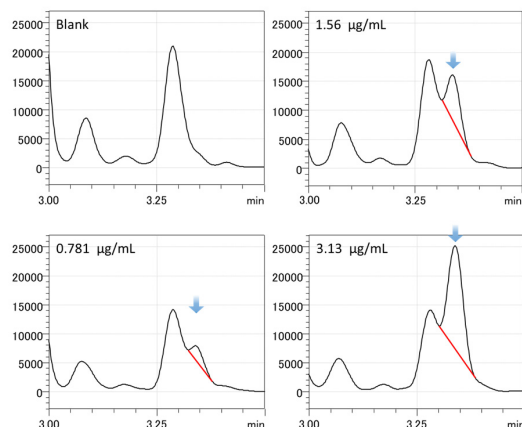


図 4 代表的な MRM クロマトグラム（ヒト血清中）

## ■ 考察・結論

トシリズマブは従来の nSMOL 法ではトリプシンとの反応効率が悪く、これはトシリズマブが局所的にトリプシン抵抗性のある構造を有することを示唆しています。今回、酸性下での還元処理を追加することで、0.781～200 µg/mL の範囲で、厚生労働省が発行するバリデーションガイドラインの基準をクリアした定量法を開発できました。

これらの結果により、トシリズマブの血中モニタリング技術として nSMOL 分析が十分な真度・精度を有していることが検証されました。

なお、トリプシン抵抗性は、他のモノクローナル抗体でも複数観察されており、プロトコルの使い分けが重要です。

### <参考文献>

Iwamoto N et al. Analyst, DOI:10.1039/c3an02104a  
Iwamoto N et al. J Pharm Biomed Anal, DOI: 10.1016/j.jpba.2018.11.019  
Iwamoto N et al. J Immunol Methods, DOI: 10.1016/j.jim.2019.06.014  
Hashizume M et al. Folia Pharmacol Jpn, DOI: 10.1254/fpj.144.172

本文書に記載されている製品は、医薬用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 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。  
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。

**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：2020年8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。