

ヒト血漿中のRemdesivirおよび代謝物の 一斉分析

はじめに

Remdesivir (販売名:ベクルリー) はエボラ出血熱の治療薬として Gilead Sciences 社 (U.S.) が開発した一本鎖 RNA ウィルスに対して抗ウイルス活性を示すプロドラッグであり、一部が生体内で活性型の GS-441524 へ代謝する事が知られています¹⁾。本報では、選択性に優れた分析手法である LC/MS/MS (図1) を用いて、Remdesivir およびその代謝物の同時測定を可能とする分析系を構築したので、研究成果をご紹介します。
E. Imoto, D. Kawakami



図1 LCMS-8060の外観図

分析条件および試料の前処理

測定対象化合物である Remdesivir (PN:C8799*), GS-441524 (PN:C8847*) およびその安定同位体である [U-Ring-¹³C₆]-Remdesivir (PN:C8845*), [¹³C₅]-GS-441524 (PN:C8855*) は、いずれも島津製作所グループ会社 Alsachim 社から購入し、[U-Ring-¹³C₆]-Remdesivir、[¹³C₅]-GS-441524 を内部標準物質として用いました。Remdesivir、GS-441524 の構造式を図2に示します。市販されている EDTA 2K 処理したヒト血漿に Remdesivir および GS-441524 を添加し、検量線の作成を行いました。表1に示す LC および MS の分析条件、表2に示す MRM の取得パラメータを用いて測定を行いました。分析カラムは Shim-pack Scepter C18-120 (50 mm×2.1 mm I.D., 1.9 μm, P/N:227-31012-03) を使用しました。図3に MS クロマトグラムを示します。

Remdesivir は 100, 500, 1000, 2500, 5000 ng/mL、GS-441524 は 5, 25, 50, 250, 500 ng/mL を検量点とし、それぞれ n=5 で測定を行いました。メタノールを用いて [U-Ring-¹³C₆]-Remdesivir (2.5 μg/mL)、[¹³C₅]-GS-441524 (0.25 μg/mL) の混合溶液を作製し、ISTD として用いました。

前処理法のフローを以下に示します。75%IPA 20 μL、血漿 50 μL、ISTD 10 μL、アセトニトリル 100 μL を添加し、十分に攪拌を行った後、遠心分離で得られた上清を LC バイアルに移して測定を行いました。

* 島津ジーエルシーおよび Alsachim 製品番号

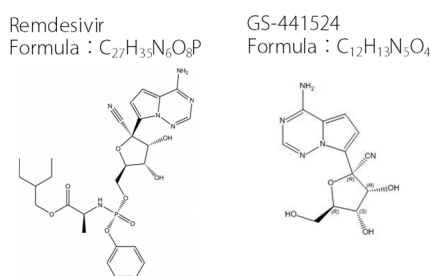


図2 Remdesivir および GS-441524 の構造式

表1 LC および MS の分析条件

<LC 分析条件>		<MS 分析条件>	
UHPLC	Nexera X2	LC-MS/MS システム	LCMS-8060
分析カラム	Shim-pack Scepter C18-120 (50 mm×2.1 mm I.D., 1.9 μm)	インターフェイス	加熱 ESI
移動相	A: 0.05% 酢酸-水 B: 0.05% 酢酸-アセトニトリル	MS 測定モード	MRM (+)
グラジエントプログラム (%B)	5% (0 - 0.30 min) → 30% (0.35 min) → 70% (1.50 min) → 90% (1.80 - 2.80 min) → 5% (2.90 - 4.50 min)	ヒートブロック温度	400 °C
流速	0.4 mL/min	DL 温度	200 °C
カラムオープン温度	40 °C	インターフェイス温度	300 °C
注入量	2.0 μL (水 20 μL 共注入)	ネブライザーガス流量	3 L/min
洗浄溶液 (外部洗浄のみ)	MeOH : IPA = 1 : 1 (v/v)	ドライイングガス流量	10 L/min
		ヒーティングガス流量	10 L/min

表2 Remdesivir および GS-441524 の MRM トランジション

化合物名	イオン	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)
Remdesivir	定量イオン	603.05	272.10
	定性イオン	603.05	229.00
[¹³ C ₆]-Remdesivir	定量イオン	609.05	278.20
	定性イオン	609.05	229.15
GS-441524	定量イオン	291.90	163.05
	定性イオン	291.90	173.05
[¹³ C ₅]-GS-441524	定量イオン	296.90	164.10
	定性イオン	296.90	174.10

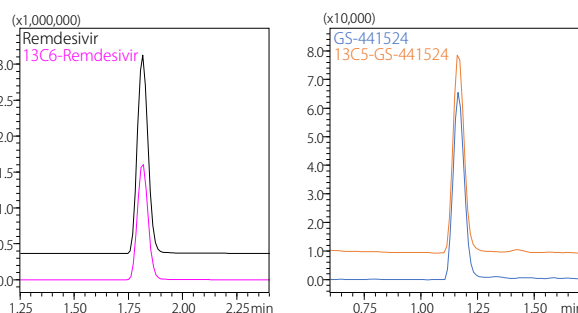


図3 Remdesivir、[U-Ring-¹³C₆]-Remdesivir (左)、および GS-441524、[¹³C₅]-GS-441524 (右) の MS クロマトグラム

■ 検量線の作成

血漿添加サンプルにより検量線を作成した結果を表3に示します。Remdesivir および GS-441524 について、設定した濃度範囲において良好な直線性を得ました。真度（正確さ）および精度（再現性）を評価した結果、定量下限を含む全濃度範囲において、Remdesivir の精度は%RSD 0.8%–1.8%であり、GS-441524 の精度は%RSD 2.2%–5.0%でした。また、Remdesivir の正確さは92.0%–107%、GS-441524 の正確さは94.8%–106%と100±15%以内となりました。

表3 血漿中 Remdesivir、GS-441524 分析の直線性、真度および精度

Compound	Remdesivir				GS-441524				
	ID	Spiked Conc. (ng/mL)	Measured Conc. (ng/mL)	Precision %RSD	Accuracy %	Spiked Conc. (ng/mL)	Measured Conc. (ng/mL)	Precision %RSD	Accuracy %
Blank	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Level 1	100	92.0	1.2	92	5	4.74	3.8	95	
Level 2	500	535	0.8	107	25	26.6	2.8	106	
Level 3	1000	1036	0.9	104	50	50.7	5.0	101	
Level 4	2500	2433	1.8	97	125	121	2.2	97	
Level 5	5000	5004	1.8	100	250	252	2.3	101	

Calibration Curve

■ 分析系の安定性試験

今回構築した分析系の堅牢性および繰り返し再現性を評価するために、ヒト血漿に Remdesivir 1000 ng/mL および GS-441524 50 ng/mL を添加した試料を用いて、計 100 回測定を 2 日間に分けて実施しました。各注入時に得られた面積値を 1 回目の注入時に得られた面積値で正規化し、プロットした結果を図4に示します。ヒト血漿中の測定において、各化合物の%RSD は 2.2%–3.9%であり、高い注入再現性を実現する事ができました。以上の結果から、本分析系は高感度な分析を長時間維持し、高い堅牢性であることが示されました。

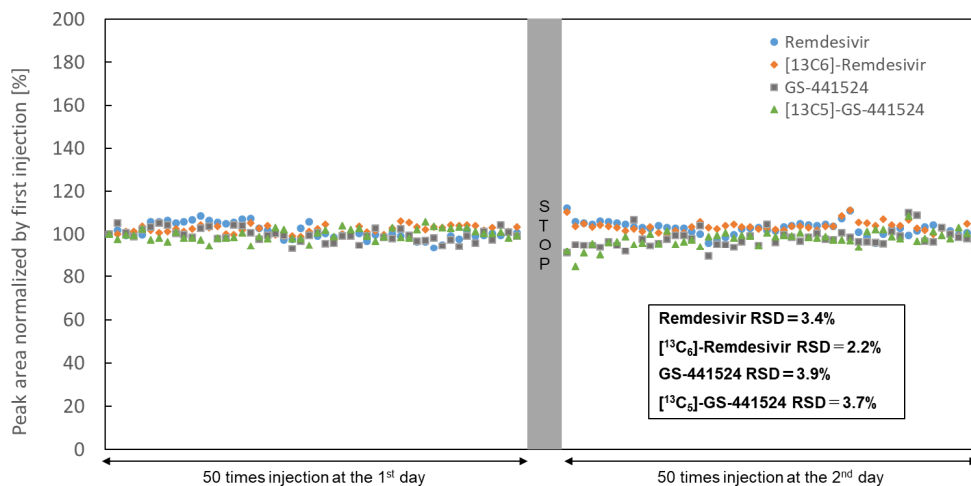


図4 Remdesivir、[U-Ring-¹³C₆]-Remdesivir、GS-441524、[¹³C₅]-GS-441524 の 100 回測定結果 1 回目の注入時に得られた面積値で正規化し、各注入結果をプロット

■ まとめ

Remdesivir とその代謝物である GS-441524 を血漿に添加したサンプルを用いて LC-MS/MS の分析系を構築しました。検量線を作成したところ良好な直線性を得ることができ、また、分析系の堅牢性を評価するために計 100 回の測定を実施した結果、高感度な分析を長時間維持した高い堅牢性であることが示されました。

<参考文献>

- Richard T et al., "Remdesivir: A Review of Its Discovery and Development Leading to Emergency Use Authorization for Treatment of COVID-19", ACS Cent. Sci.

本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。