

# Application News

## No. C146A

### nSMOL® Antibody BA Kit

Antibody drug bioanalysis using Liquid-chromatography Triple Quadrupole Mass Spectrometry

## Fab選択的タンパク質分解法nSMOL法を用いた抗体医薬のLCMSバイオアナリシスー2ーベバシズマブの分析事例ー

### ■ 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手法です。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。

N.Iwamoto

### ■ 抗体医薬の種類とその定量ペプチド選択について

モノクローナル抗体は、抗体産生リンパ球と骨髄腫細胞のハイブリドーマから産生されます。宿主は主にマウスですが、近年では様々な宿主から、モノクローナル抗体の産生が可能となっています。さらに、可変領域Fvのみをファージディスプレイ技術により産生し、親和性配列の組み合わせを高速にスクリーニングすることも一般化しています。

抗体医薬はその構造により、主に4つに分類されます。

“マウス”⇒“キメラ”⇒“ヒト化”⇒“完全ヒト”抗体となるに従って、抗体の特異性を規定する相補性決定領域(CDR)が小さくなり、特に構造を指標に定量解析を行うnSMOL法においては、より厳密な定量ペプチドの選択が重要になってきます。

nSMOL法は、可変領域選択的なタンパク質分解を可能とします。そのため、抗体の構造化学的な特徴を反映した定量ペプチド選択が可能で、抗体は重鎖、軽鎖にそれぞれ3つのCDRを持ち、抗原に最初に接触する領域はCDR2であるとされています。nSMOL法で回収できるペプチドは、そのCDR2を含むペプチドとなります。

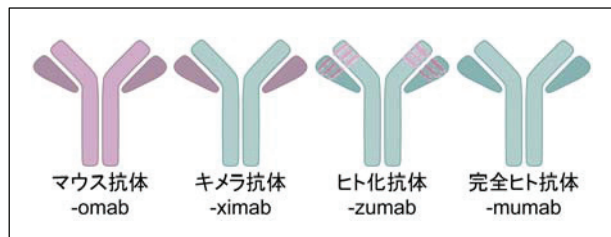


図1 抗体医薬の種類とその命名法

### ■ 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。詳細は弊社アプリケーション(トラスツズマブ分析事例)をご参照ください。

#### 【LCMS分析条件】

【LC】 NexeraX2 System  
 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 : 1 %B (1.5 min)/1-35 %B (3.5 min)/95 %B (1 min)/1 %B (1 min)  
 Flow rate : 0.4 mL/min  
 Injection : 10 µL

#### 【MS】 LCMS-8050, 8060

Ionization : ESI Positive  
 DL : 250 °C  
 Heat Block : 400 °C  
 Interface : 300 °C  
 Nebulizer gas : 3 L/min  
 Drying gas : 10 L/min  
 Heating gas : 10 L/min

### ■ ベバシズマブ定量ペプチド

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
	512.1>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
STAYYLQMN SLR	642.3>748.4 (y6+)	定量用
	642.3>861.5 (y7+)	構造確認用
	642.3>620.3 (y5+)	構造確認用
VLIYFTSSLH SGVPSR	588.3>775.9 (y14++)	定量用
	588.3>602.3 (y6+)	構造確認用
	588.3>939.5 (y9+)	構造確認用

※ ヒト血漿中定量範囲 : 0.15~300 µg/ml  
 平均真度 : 101.3 %

## MRM クロマトグラム

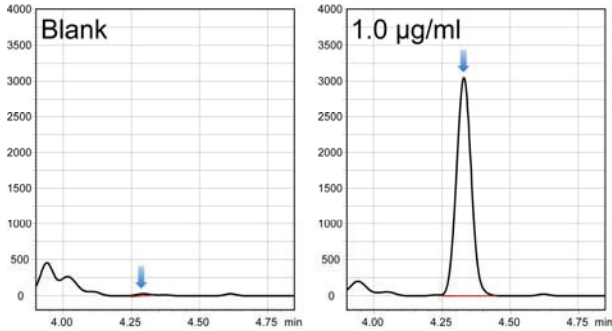


図2 FTFSLDTSK MRM クロマトグラム (ヒト血漿中)

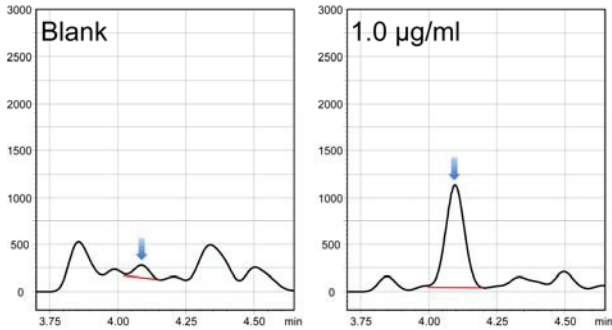


図3 STAYYLQMNSLR MRM クロマトグラム (ヒト血漿中)

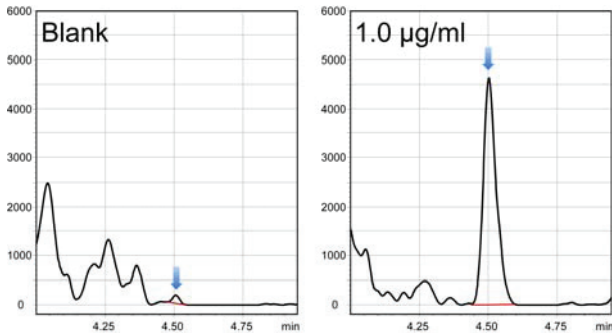


図4 VLIYFTSSLHSGVPSR MRM クロマトグラム (ヒト血漿中)

## ベバシズマブのフルバリデーション結果

### 【真度および精度】

設定濃度 [µg/ml]	データ平均 (N=15)	真度 (%)	CV (%)
0.439	0.464	106	11.7
240	235	98.1	4.45

### 【凍結融解試験】

設定濃度 [µg/ml]	データ平均 (N=5)	真度 (%)	温度 (°C)
0.439	0.395	89.9	-20
240	253	106	-20

### 【長期保存安定性試験】

設定濃度 [µg/ml]	データ平均 (N=5)	真度 (%)	温度 (°C)
0.439	0.477	109	-20
240	223	93.1	-20

### 【サンプル処理後 48 時間安定性試験】

設定濃度 [µg/ml]	データ平均 (N=5)	真度 (%)	温度 (°C)
0.439	0.445	101	5
240	245	102	5

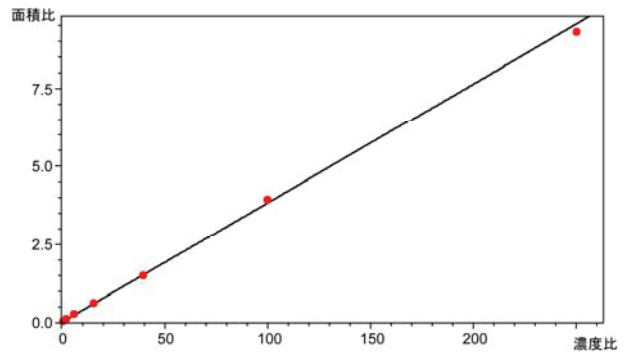


図5 ベバシズマブの検量線

## 考察・結論・参考文献

nSMOL 法で得られた定量ペプチドは、トラスツズマブ・ベバシズマブともに同一の領域由来でしたが、内在性 IgG との競合により、分析可能な配列が異なる。

ベバシズマブは、三つの配列に対してマルチプレックス定量を実施し、フルバリデーション基準をクリアした。

定量下限は 0.15 µg/ml であり、前臨床～ヒト臨床試験まで同一アッセイ法で実施できる。

### 【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】

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・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。

A 改訂版発行：2017 年 3 月

初版発行：2017 年 2 月

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

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。