

LC-MS/MSによる抗体医薬品測定法の検討及び評価

○阿部 純子、森 香奈絵、新田 真一郎、北嶋 千賀、上田 哲也
(株式会社LSIメディエンス)

Introduction

現在、抗体医薬品は、日米欧で70品目以上が承認され、癌や自己免疫疾患の治療に欠かせない存在となっている。抗体医薬品開発における測定には、主にLBA (Ligand-Binding Assay) が用いられているが、抗薬物抗体が産生されることで目的とする抗体医薬品と結合し検出が出来ず、定量値が変動することが報告されている。その解決手段として質量分析法での測定が期待されている。質量分析法を用いることにより、LBA法と比較して定量レンジを広く設定できる、複数成分の同時分析が可能である等の利点があることが知られている。我々は、血漿中の抗体医薬品2品目 (Rituximab, Trastuzumab) の濃度測定法として、アフィニティー精製後にトリプシン消化を行い、可変領域の特異的断片をLC-MS/MSにて測定する方法を開発した。他方、前処理法としてnano-surface and molecular-orientation limited proteolysis (nSMOL)を採用したnSMOL Antibody BA Kit (SHIMADZU) が販売され、簡便且つ高感度に測定出来ることが報告されている。本研究では、我々が開発した測定法 (従来法) とnSMOLを用いた測定法を比較し、その有用性を評価した。

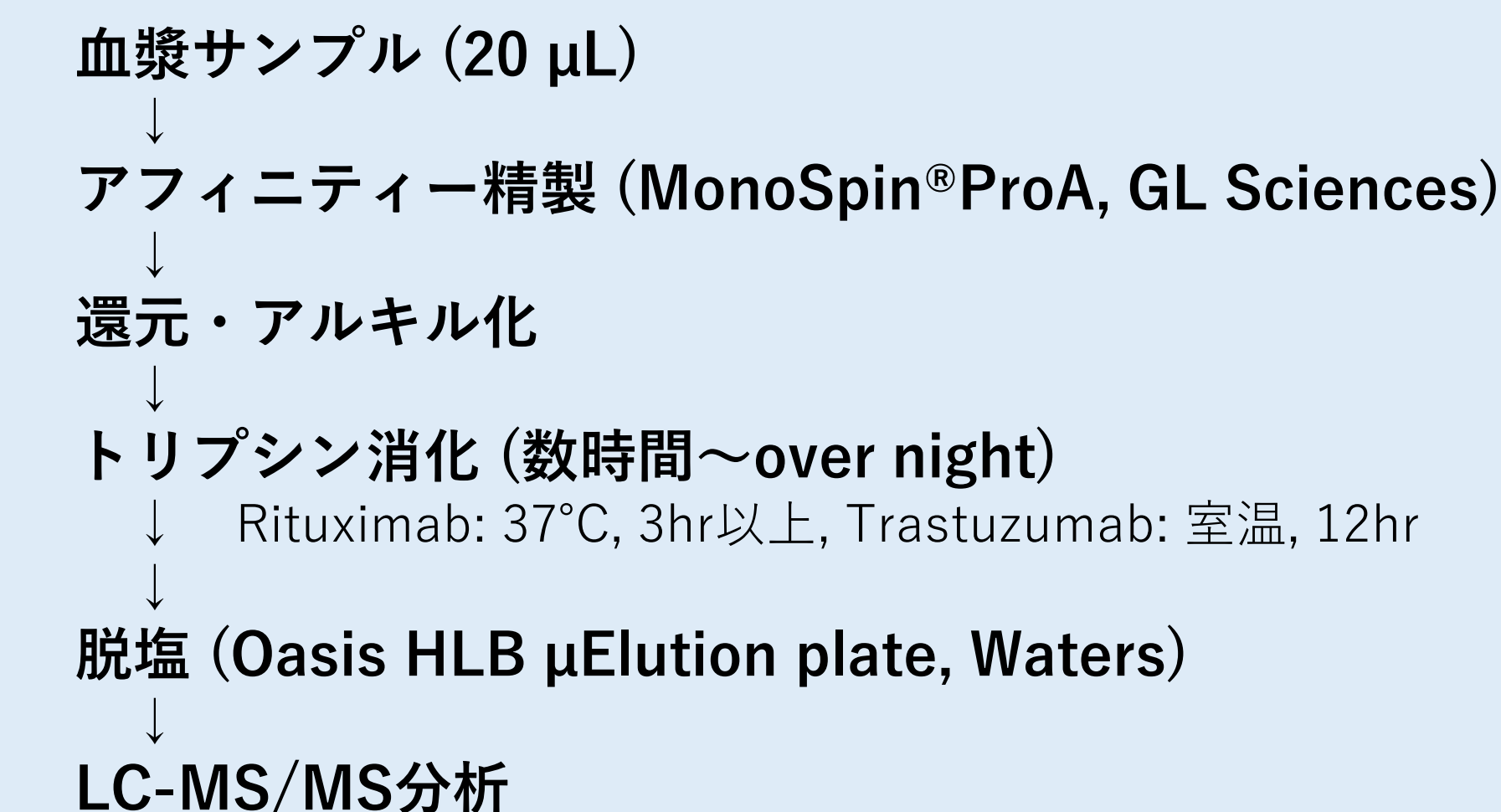
Pre-treatment

【従来法の特徴】

- 各工程での作業・反応に、数時間要する
- 還元・アルキル化に、複数のフレッシュな試薬が必要
- 消化断片が多数作成できる (夾雑ピーク検出の要因ともなる)

Conventional Method

前処理所要時間：7時間～1.5日

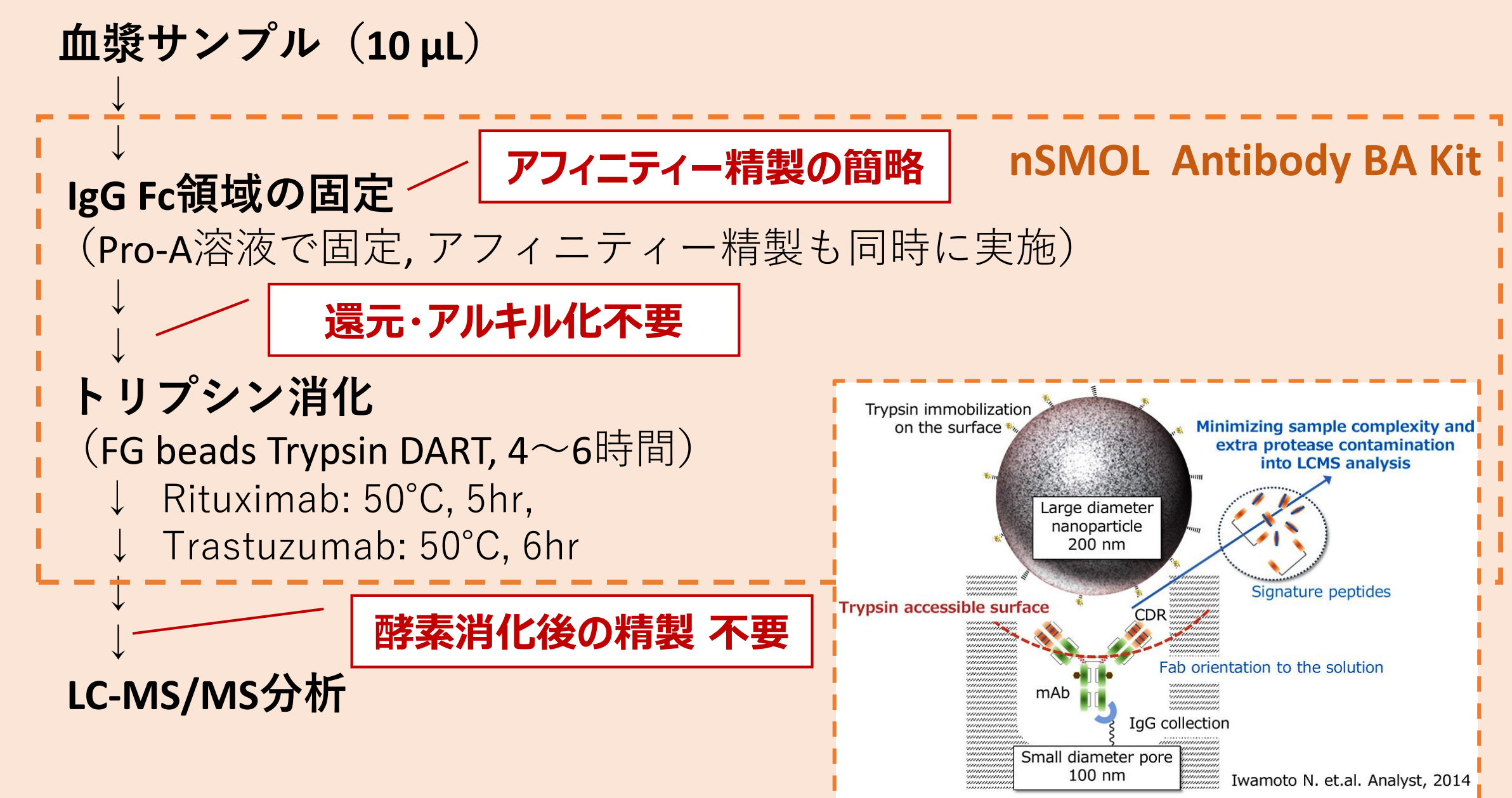


【nSMOL法の特徴】

- 還元・アルキル化 不要
- Fab領域を選択的に酵素消化
- 高温で短時間の酵素消化
- 酵素消化後の精製 不要
- 不要な断片ペプチド 減少
- 測定における夾雑ピークの溶出を回避
- 短時間でサンプル処理が可能 (前処理の簡易化)

nSMOL Method

前処理所要時間：5～7時間



LC-MS/MS Condition

Rituximab

LC condition	Nexera X2 system (SHIMADZU CORPORATION)	
Column	XBridge Peptide BEH C18 Column, 300Å, 3.5 µm, 2.1 X 50 mm (Waters)	
Column temperature	50°C	
Mobile phase A	Water / formic acid (100: 0.01, v/v)	Linear Gradient
Mobile phase B	Acetonitrile / formic acid (100: 0.01, v/v)	
Run time	13.5 min, (nSMOL: 11.5 min)	

MS condition	Triple Quad 5500 (AB SCIEX)	
Ionization mode	Turbo ion spray	
Scan type	MRM	
Detection mode	Positive	
Ion spray voltage	3500 V	
TEM	650°C	
Monitoring ions	Rituximab	GLEWIGAIYPGNGDTSYNQK: m/z 1092.0 → 1180.6
	IS	GLEWIGAIYPGNGDTSYNQ[K]: m/z 1096.0 → 1188.6

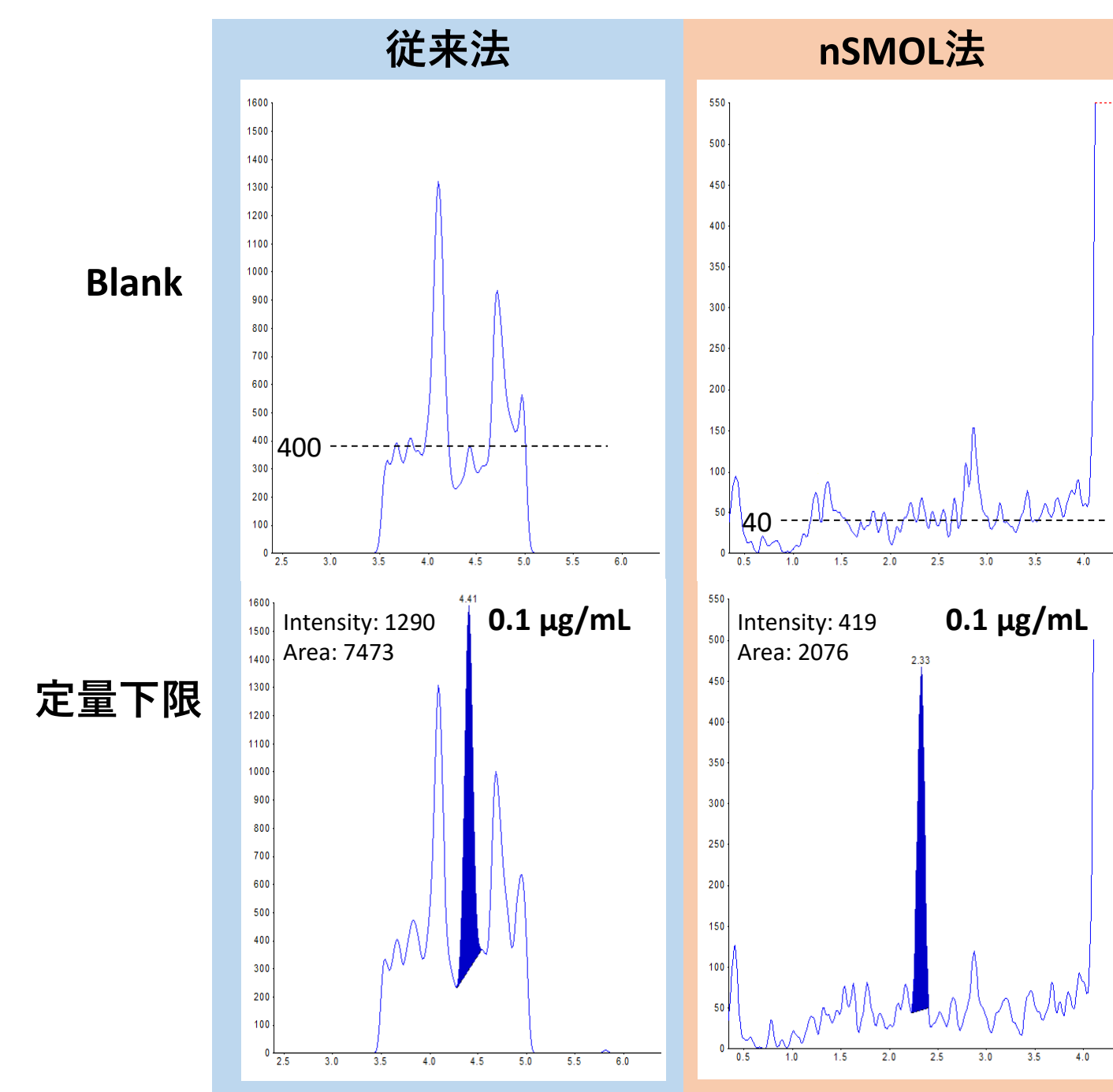
Trastuzumab

LC condition	Nexera X2 system (SHIMADZU CORPORATION)	
Column	XBridge Peptide BEH C18 Column, 300Å, 3.5 µm, 2.1 X 50 mm (Waters)	
Column temperature	60°C, (nSMOL: 50°C)	
Mobile phase A	5 mmol/L ammonium hydrogen carbonate solution (nSMOL: Water / formic acid (100: 0.01, v/v))	Linear Gradient
Mobile phase B	Methanol (nSMOL: Acetonitrile / formic acid (100: 0.01, v/v))	
Run time	8.0 min, (nSMOL: 11.5 min)	

MS condition	Triple Quad 5500 (AB SCIEX)	
Ionization mode	Turbo ion spray	
Scan type	MRM	
Detection mode	Positive	
Ion spray voltage	2000 V	
TEM	700°C, (nSMOL: 600°C)	
Monitoring ions	Trastuzumab	DTYIHWVR: m/z 545.4 → 597.3
	Trastuzumab (nSMOL)	IYPTNGYTR: m/z 542.8 → 404.7
	IS	DTYIHW[V]R: m/z 548.4 → 603.3

Result

Rituximab

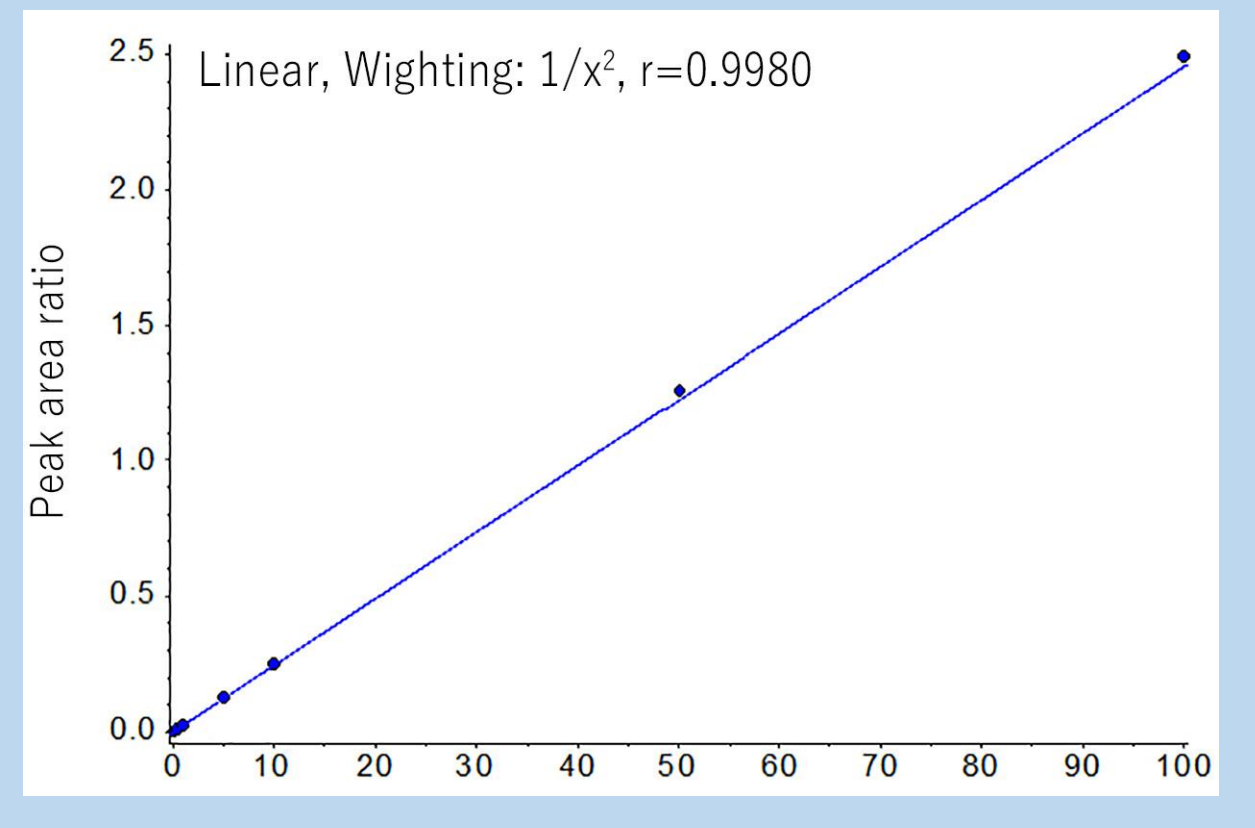


- nSMOL法では従来法と比較してベースラインが下がりS/N比が向上した
- 従来法ではいくつかの個体で未知ピークが検出されたがnSMOL法では検出されなかった Fab領域を選択的に消化した結果であると推察された

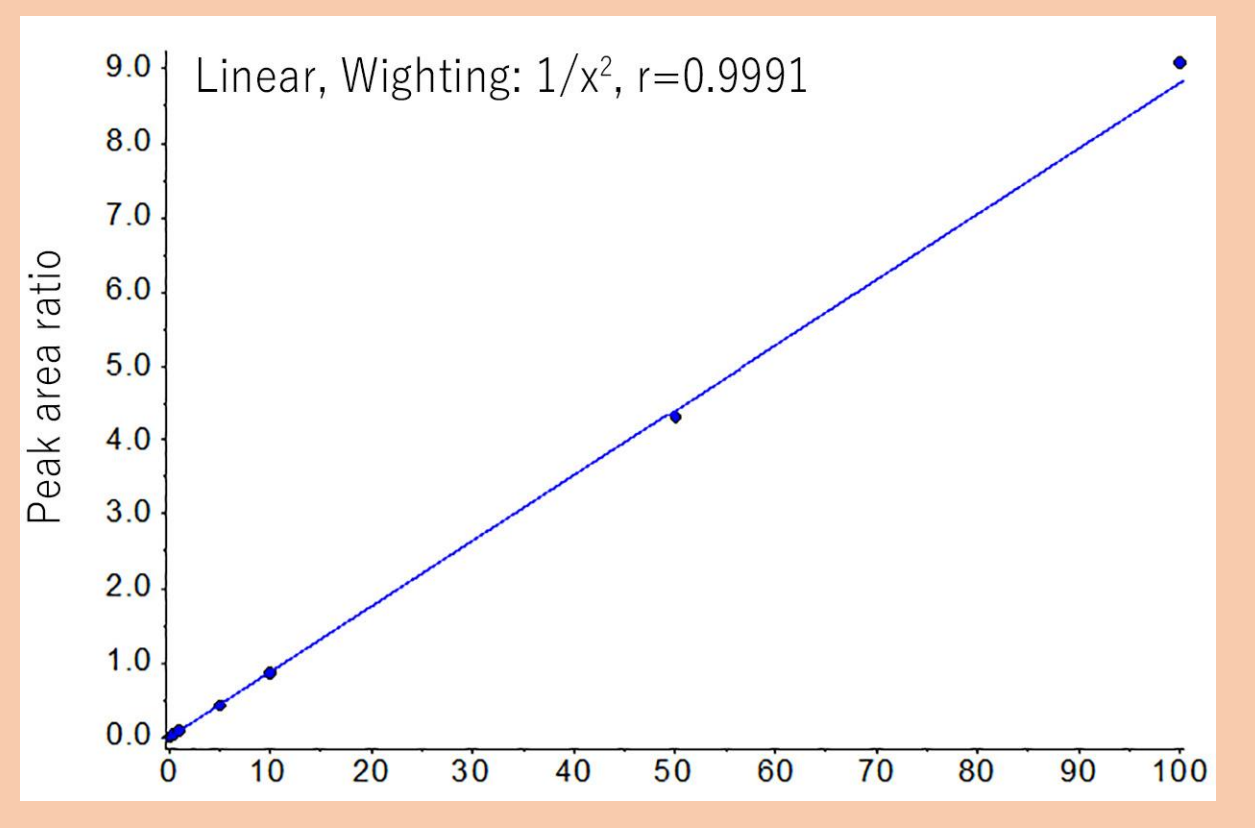
Linearity

調製濃度 (µg/mL)	従来法			nSMOL法		
	逆回帰値 (µg/mL)	R.E. (%)	C.V. (%)	逆回帰値 (µg/mL)	R.E. (%)	C.V. (%)
0.100	0.106	6.0	13.2	0.0970	-3.0	3.8
0.200	0.182	-9.0	13.2	0.214	7.0	3.8
0.500	0.461	-7.8	13.2	0.483	-3.4	6.7
1.00	0.982	-1.8	2.4	1.02	2.0	8.4
5.00	5.24	4.8	2.6	4.90	-2.0	3.9
10.0	10.3	3.0	2.6	9.78	-2.2	2.6
50.0	51.5	3.0	2.6	49.2	-1.6	2.1
100	102	2.0	2.6	103	3.0	2.1

Typical calibration curve (従来法)



Typical calibration curve (nSMOL)



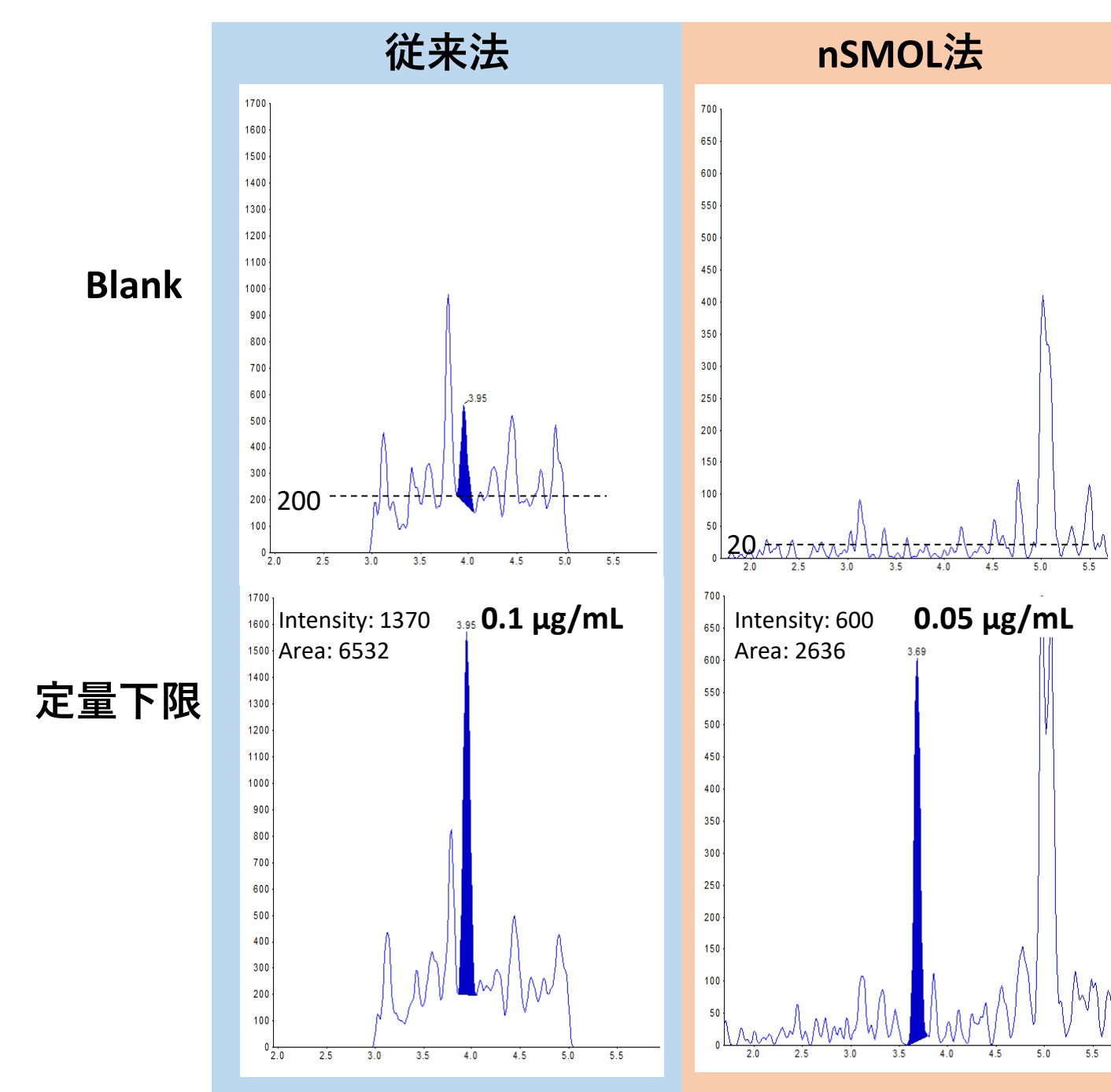
Within-run

調製濃度 (µg/mL)	従来法				nSMOL法			
	定量値 (µg/mL)	平均値 (µg/mL)	R.E. (%)	C.V. (%)	定量値 (µg/mL)	平均値 (µg/mL)	R.E. (%)	C.V. (%)
0.100	0.0997	0.114	14.0	13.2	0.0860	0.0859	-14.1	3.8
0.300	0.129	0.299	-0.3	0.3	0.264	0.285	-5.0	6.7
8.00	7.86	8.18	1.0	2.4	7.84	7.81	-2.4	2.4
80.0	74.4	80.8	-5.7	6.5	79.1	78.0	-2.5	1.8

Between-run

調製濃度 (µg/mL)	従来法				nSMOL法			
	定量値 (µg/mL)	平均値 (µg/mL)	R.E. (%)	C.V. (%)	定量値 (µg/mL)	平均値 (µg/mL)	R.E. (%)	C.V. (%)
0.300	0.311	0.312	4.0	0.6	0.264	0.271	-9.7	3.7
8.00	8.00	8.14	1.8	1.7	7.84	7.41	-7.4	8.4
80.0	75.2	71.5	-8.4	2.6	79.1	76.8	-2.5	2.1

Trastuzumab

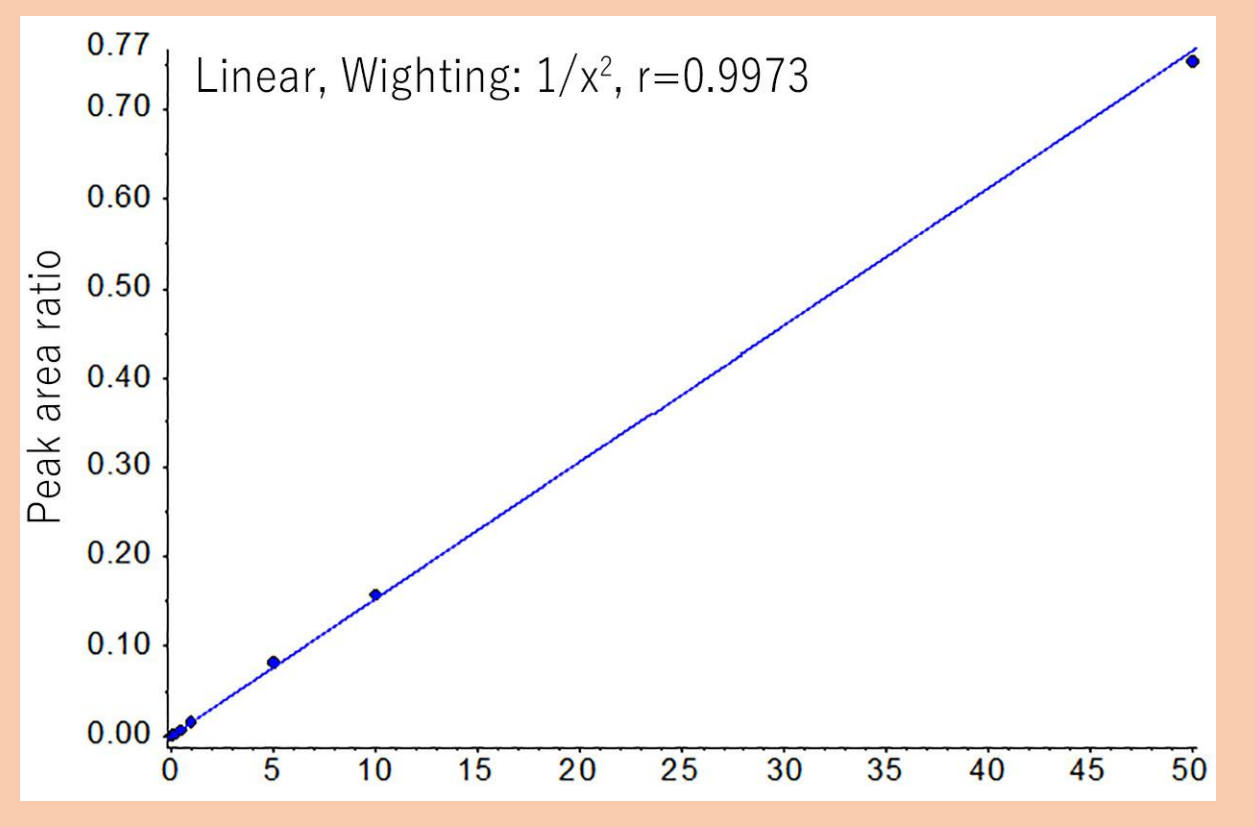


Linearity

調製濃度 (µg/mL)	nSMOL法			nSMOL法		
	逆回帰値 (µg/mL)	R.E. (%)	C.V. (%)	逆回帰値 (µg/mL)	平均値 (µg/mL)	R.E. (%)
0.0500	0.0519	3.8	6.1	0.0529	0.0558	11.6
0.100	0.0955	-4.5	6.1	0.0547	0.163	8.7
0.200	0.192	-4.0	6.1	0.174	4.36	3.9
0.500	0.445	-11.0	6.1	4.49	4.34	8.5
1.00	1.07	7.0	6.1	4.36	4.34	8.5
5.00	5.35	7.0	6.1	4.49	4.34	8.5
10.0	10.3	3.0	6.1	45.2	45.9	14.8
50.0	49.2	-1.6	6.1	45.1	47.3	2.6

従来法で測定対象としたペプチド断片 (DTYIHWVR) は nSMOL法では消化が十分に進行しなかったため測定対象とするペプチド断片をIYPTNGYTRに変更した nSMOL法では還元・アルキル化を実施しないため還元・アルキル化を行わないと消化効率の上がないペプチド断片を用いての測定は難しいものと推察された

Typical calibration curve (nSMOL)



Conclusion

- nSMOL法は従来法に比べ良好なS/N比が認められ、更なる高感度化測定の可能性があることが示唆される結果であった。
- nSMOL法は従来法に比べ前処理時間を大幅に短縮させることが可能であった。
- nSMOL法は、還元・アルキル化工程が不要な消化断片を用いる必要があることが示唆された。