

LC-MS/MS を用いた抗体医薬品の血中濃度分析

南谷 武春, 本田 裕恵, 柳橋 努, 渡邊 康春, 小島 理恵子, 相川 幸彦, 薬事研究会生物部会

Analysis of blood concentrations of antibody drugs using LC-MS/MS

Takeharu MINAMITANI, Hiroe HONDA, Tsutomu YANAGIBASHI, Yasuharu WATANABE, Rieko KOJIMA, Yukihiko AIKAWA and the Biological Analysis Group in Toyama Pharmaceutical Research Association

要 約

近年、様々な疾患における治療、予防のためにバイオ医薬品の研究開発が進んでいる。バイオ医薬品やバイオシミラーの開発において、血中濃度を正確に定量し、生体内での動態を把握することは重要であり、これまでは、主にリガンド結合 (RBA) 法により測定されてきた。一方で、RBA法に比べ選択性が高く、ダイナミックレンジが広いなどの理由から、三連四重極質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた選択反応モニタリング (Selected reaction monitoring, SRM) 法の有用性が注目されている。そこで、令和4年度の生物部会では、LC-MS/MSを用いた抗体医薬品の血中濃度測定技術の習得を目指し、活動を行ったので報告する。測定ターゲットとするペプチド (サロゲートペプチド) の設定や検体の前処理法、測定条件の詳細な検討を行い、測定法確立の手順を学んだ。以上より、バイオ医薬品の研究開発に重要となる血中濃度測定についての知識と経験を深める事ができたと考えており、本研究の中で得られた技術や経験は、富山県内企業などの支援に活用していきたい。

Summary

In recent years, research and development of biopharmaceuticals for the treatment and prevention of various diseases has advanced. In the development of biopharmaceuticals and biosimilars, it is important to accurately quantify blood concentrations and understand their in-vivo kinetics, and until now, these have been measured mainly by ligand binding assay (RBA) techniques. On the other hand, the selective reaction monitoring (SRM) method using a triple quadrupole mass spectrometer (LC-MS/MS) has been attracting attention because of its greater selectivity and larger dynamic range than the RBA approach. Therefore, in this paper, we report on the activities of the Biological Analysis Group in Toyama Pharmaceutical Research Association in 2022 aimed at acquiring techniques for measuring blood concentrations of antibody drugs using LC-MS/MS. We learned the procedures for establishing the measurement method by selecting the target peptides (surrogate peptides) to be measured, preparation methods for the samples, and detailed examination of the measurement conditions. We believe that these studies help us gain a deeper understanding of blood concentration measurement, which is crucial for the study and development of biopharmaceuticals, and we would like to utilize the techniques and experience acquired through this research to support companies in Toyama Prefecture.

緒 言

近年、感染症、がん、自己免疫疾患など、様々な疾患における治療や予防に向け、抗体医薬品などのバイオ医薬品の研究開発が進んでいる。バイオ医薬品やバイオシミラーの開発においても、低分子医薬品と同様に、有効性・安全性の評価を行うために、血中濃度を正確に定量し、生体内での動態を把握することは重要である。

抗体医薬品の血中濃度は、酵素結合免疫吸着法 (ELISA) 等のリガンド結合 (LBA) 法により測定されることが多い。しかしながら、抗イディオタイプ抗体などの特異性の高い試薬が必要であることや、ダイナミックレンジが狭く、測定する血清試料を最適に

希釈する必要がある点などが欠点としてあげられる。そこで、LBA法を補完する目的で、1. 選択性が高い、2. ダイナミックレンジが広い、3. 短期間での測定法開発が可能、4. 抗体の複数のドメインに由来するペプチドを同時に検出・定量できる、などの理由から、抗体医薬品の血中濃度測定法として、三連四重極質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた選択反応モニタリング (Selected reaction monitoring, SRM) 法の有用性が注目されている (1)。

そこで、令和4年度の生物部会ではLC-MS/MSを用いた抗体医薬品の血中濃度測定技術の習得を目指した。具体的には、代表的な抗体医薬品を試料として、マウス血清およびヒト血清を用いて検量線を作成し、抗体医薬品を投与したマウスの血中濃度の推移につい

て調べたので報告する。本定量法では、測定ターゲットとする抗体由来のペプチド（サロゲートペプチド）の設定が重要となるため、その方法論についても議論した。

以上により、バイオ医薬品の研究開発に重要となる血中濃度測定についての知識と経験を深める事ができたと考えている。

方法及び結果

1. 使用した抗体医薬品

本研究では、抗体医薬品の例として、リツキシマブの点滴静注液を使用した。リツキシマブは、ヒト B 細胞表面に存在する CD20 に結合する抗ヒト CD20 抗体であり、CD20 陽性の B 細胞性非ホジキンリンパ腫や免疫抑制状態下の CD20 陽性 B 細胞性リンパ増殖性疾患等に適用される。また、この抗体はマウス由来であるが、定常領域をヒトの IgG1（重鎖）、Igk（軽鎖）と置換したヒト・マウスキメラ抗体であり、この領域はヒト由来であることが特徴である。

2. LC-MS/MS 用サンプルの測定前処理

リツキシマブをマウス、またはヒト血清と混合し、内部標準物質である安定同位体元素ラベル抗体（SIL-Ab）（PROMISE Advanced Proteomics）を 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように加え、リツキシマブの終濃

度が 0, 0.05, 0.2, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 75.0, 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように調製した（血清は 10 倍希釈で測定するため、検量線も 10 倍希釈で作成）。次に、国立医薬品食品衛生研究所（国衛研）を含むグループからの引用文献（2）にある条件に従って、8.1 mmol/L Tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP) 水溶液で 60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間還元処理を行い、19.4 mmol/L Iodoacetamide (IAM) 水溶液で遮光下、37 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間アルキル化処理を行った。その後、31.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ トリプシン水溶液にて 37 $^{\circ}\text{C}$ 、4 時間消化処理を行い、Oasis HLB $\mu\text{Elution}$ plate (Waters) を用いてペプチド精製を行った（図 1）。その後、マウス血清サンプルについては、0.1% ギ酸 (FA) : 0.1% FA/100% アセトニトリル (CAN) = 3:1 の溶媒を、ヒト血清サンプルについては、0.1% FA : 0.1% FA/100% ACN=95:1 の溶媒を用いて、溶媒置換を行った。

本研究では、内部標準物質として、安定同位体ラベルされたリツキシマブ (SIL-Ab) を用いた。リツキシマブは市販された抗体医薬品であるため、SIL-Ab が安価で入手可能であるが、抗体医薬品の開発初期段階においては、SIL-Ab の新規作製コストが大きくなることが課題である。この対策として、酵素消化等の前処理段階の効率等が補正できない点に注意が必要となるが、サロゲートペプチドを安定同位体ラベルして合成し (SIL-peptide)、内部標準物質として使用することも考えられる。

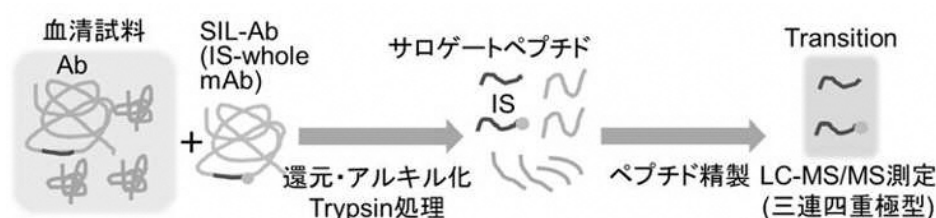


図1. LC-MS/MS用サンプルの測定前処理

3. サロゲートペプチド候補の設定

LC-MS/MS を用いた抗体濃度測定では、SRM 法において、分析対象に特徴的な配列を有し、定量値を算出するために測定ターゲットとする、トリプシンで切断されたペプチドであるサロゲートペプチドの設定が必要である。まず、マウス血清試料の場合は、リツキシマブの定常領域はヒト IgG1（重鎖）、Igk（軽鎖）であるため、この領域に設定可能である。一方で、ヒト血清試料の場合は、定常領域では血清中の抗

体との区別がつかなくなるため、より特異性の高い配列を設定することが必要となる。このため、多くの場合、可変領域の相補性決定部位 (Complementarity-determining regions; CDR) のペプチドを選択することが望ましいと考えられる。サロゲートペプチドは下記の手順に従い設定した (1)。

- ① 抗体の重鎖と軽鎖のアミノ酸配列から CDR 領域などの特徴を調べた後に (IMGT web site: <https://www.imgt.org/>)、サンプル前処理での

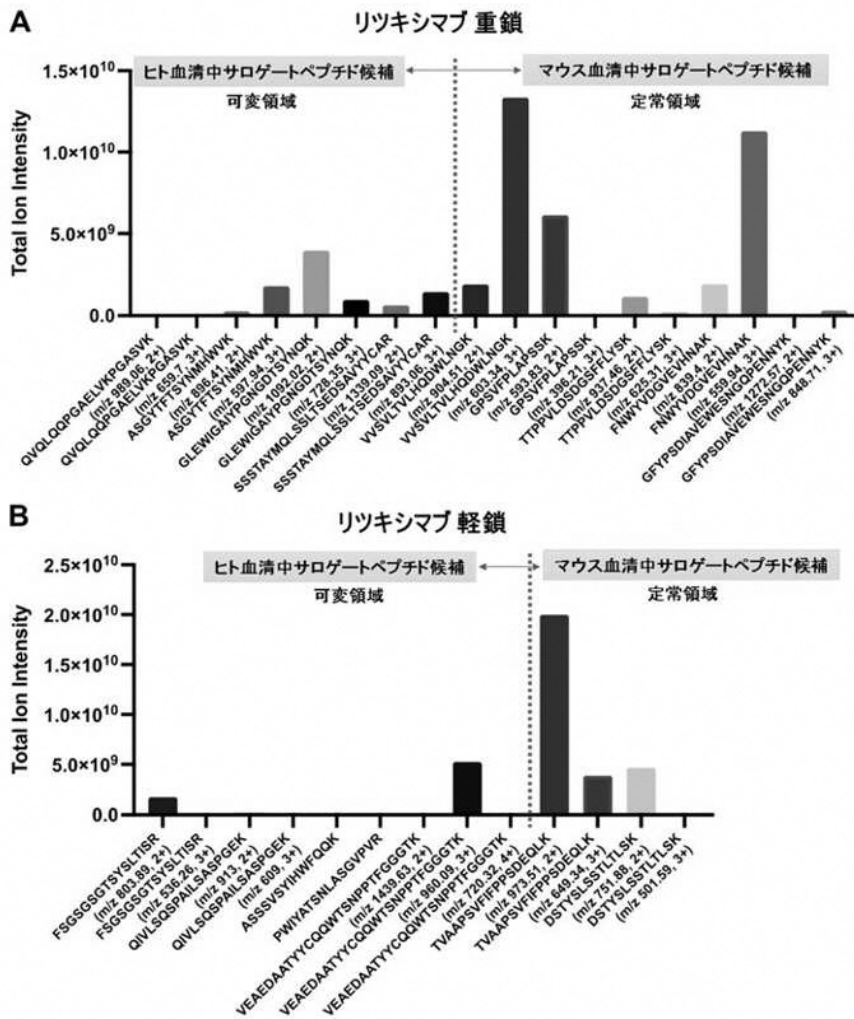


図2. リツキシマブ重鎖 (A) と軽鎖 (B) のプリカーサーイオンのTotal Ion Intensity

トリプシン消化によって生成するペプチド断片をin silicoで予想する (ExPASy PeptideMass web site; https://web.expasy.org/peptide_mass/).

- ② LC-MS/MS でのフルスキャン解析からピーク強度やフラグメンテーションパターン等 (MASCOT software (Matrix Science)) を基準に候補を設定する。
- ③ 実際に SRM 法による解析を行ってマトリックス成分から検出されないことなどを基準にサロゲートペプチドを設定する。

まず、アミノ酸のピークやフラグメンテーションの情報を網羅的に得るために、LC-MS/MS (オービトラップ型質量分析計 (nanoLC (AMR) - Orbitrap Fusion Lumos Tribrid 質量分析計 (Thermo Fisher Scientific)) を用いてフルスキャ

ンデータの取得と解析を行い、重鎖のプリカーサーイオンの Total Ion Intensity のグラフを示した (図 2A)。ヒト血清中サロゲートペプチド候補となる可変領域では、m/z 597.94: 3 価のペプチド ASGYTFTSYNMHWVK (pASG) や m/z 1092.02: 2 価のペプチド GLEWIGAIYPGNGDTSYNQK (pGLE) が比較的高い Total Ion Intensity を示し、マウス血清中のサロゲートペプチド候補となる定常領域では、m/z 603.34: 3 価のペプチド VVSVLTVLHQDWLNGK (pVVS) や m/z 559.94: 3 価のペプチド FNWYVDGVEVHNAK (pFNW) が比較的高い値を示した。一方、図 2B に示すように、軽鎖においては、ヒト血清中のサロゲートペプチド候補となる可変領域では、m/z 803.89: 2 価のペプチド FSGSGSGTSYSLTISR (pFSG) や m/z 960.09: 3 価のペプチド VEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTK



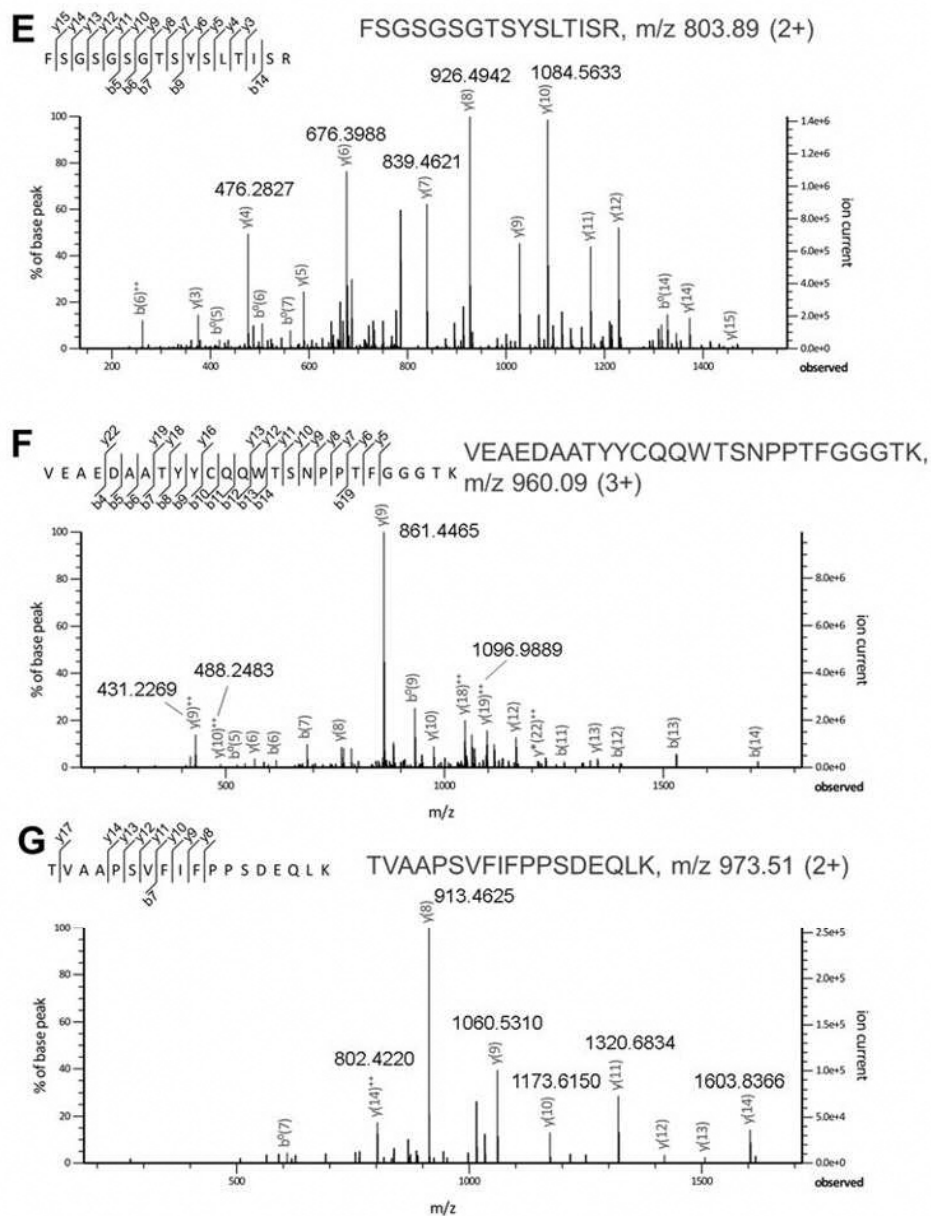


図3. サロゲートペプチド候補のプロダクトイオンのピーク

(pVEA) が比較的高い Total Ion Intensity を示し、マウス血清中のサロゲートペプチド候補となる定常領域では、 m/z 973.51:2 個のペプチド TVAAPSVFIFPPSDEQLK (pTVA) が比較的高い値を示した。次に、これらのプリカーサーイオンの MS/MS フラグメンテーション後のプロダクトイオンのピークデータを図 3 A-G に示した。① 特定のフラグメントイオンが強く検出されていること、② ペプチド数が 10 前後であることの 2 点を指標 (1) に解析したところ、図 3 A の pASG と図 3 C

の pVVS が該当したため、マウス血清中リツキシマブの測定では pVVS (VVSVLTVLHQDWLNGK)、ヒト血清中リツキシマブの測定では pASG (ASGYTFTSYNMHWVK) をサロゲートペプチド候補として設定した (図 4)。

4. LC, および MS の測定条件の検討

LC-MS/MS (三連四重極質量分析計 (Xevo TQ-XS, ACQUITY UPLC H-Class (Waters))) を用いて条件検討を行い、サロゲートペプチドと測定条件の組み合

>Rituximab heavy chain chimeric	
可変領域 (マウス由来)	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNG KFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNV
定常領域 (ヒト由来)	WGAGTTIVTVAASKGSPVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKHTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTEPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYR VVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSYMHEALHNHYTQKLSISLSPGK

>Rituximab light chain chimeric	
可変領域 (マウス由来)	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFFQQKPGSSPKPWYIATSNLASGVPVRFSGS GSGTSYSLTISR VEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK
定常領域 (ヒト由来)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDK STYLSLSTLTL SKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

CDR 領域

- マウス血清中濃度測定用(pVVS 定常領域)
- ヒト血清中濃度測定用(pASG 可変領域)

図 4. リツキシマブのアミノ酸配列とサロゲートペプチド候補

LC装置: ACQUITY UPLC H-Class (Waters)
 カラム: ACQUITY UPLC Peptide BEH C18 Column, 1.7µm,
 300 Å (1 mm x 150 mm) (Waters)
 MS装置: Xeno TQ-XS (Waters)

マウス測定条件 (pVVS)

◆ LC条件	◆ MS条件
<ul style="list-style-type: none"> ・ 移動相A: 0.1% FA ・ 移動相B: 0.1% FA/100% ACN ・ グラジエント <ul style="list-style-type: none"> 0-8 min: 25-40%B 8-8.5 min: 40-90% B 8.5-10 min: 90% B 10-10.5 min: 90-25% B 10.5-15 min: 25% B ・ 流速: 100 µL/min ・ カラム温度: 55 °C ・ 注入量: 10 µL 	<ul style="list-style-type: none"> ・ Splay voltage: 3 kV <p><u>Transition 1: pVVS</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ・ Cone voltage: 30 V ・ Collision energy: 16V ・ Transitions: Q1(m/z)>Q3(m/z) 603.3>805.4 <p><u>Transition 2: IS-whole mAb</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ・ Cone voltage: 30V ・ Collision energy: 16V ・ Transitions: Q1(m/z)>Q3(m/z) 606>809.4

ヒト測定条件 (pASG)

◆ LC条件	◆ MS条件
<ul style="list-style-type: none"> ・ 移動相A: 0.1% FA ・ 移動相B: 0.1% FA/100% ACN ・ グラジエント <ul style="list-style-type: none"> 0-8 min: 15-40%B 8-8.5 min: 40-90% B 8.5-10 min: 90% B 10-10.5 min: 90-15% B 10.5-15 min: 15% B ・ 流速: 100 µL/min ・ カラム温度: 55 °C ・ 注入量: 40 µL 	<ul style="list-style-type: none"> ・ Splay voltage: 3 kV <p><u>Transition 1: ASG peptide</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ・ Cone voltage: 30 V ・ Collision energy: 16V ・ Transitions: Q1(m/z)>Q3(m/z) 598.3>817.9 <p><u>Transition 2: IS-whole mAb</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ・ Cone voltage: 30 V ・ Collision energy: 16 V ・ Transitions: Q1(m/z)>Q3(m/z) 601>821.9

図 5. LC-MS/MSによる血中リツキシマブ濃度測定のための測定条件

わせを決定した (図5). 測定にマトリックス成分が影響しないことを確認し, サロゲートペプチドを図4で示したペプチドに決定した.

サロゲートペプチドの選定について, 本研究ではフルスキャン解析結果から選定したが, 引用文献 (2), (3) と同一のペプチドが選定された.

5. マウス血清, およびヒト血清を用いた検量線の作成

設定したサロゲートペプチドを用いてマウス (図6A) およびヒト (図6B) 血清中のリツキシマブ濃度測定用の検量線を 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 50.0, 100.0, 250.0, 500.0, 750.0 および 1000.0 $\mu\text{g/mL}$ で作成した. マウス血清では 0.5-1000 $\mu\text{g/mL}$, ヒト血清では 1.0-1000 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で $1/X^2$ の重みづけで $r > 0.99$ の検量線を作成でき, 各々のプロットの真度が $\pm 20\%$ 以内であった. このことから, 血清 1 μL を用いて, マウスでは 0.5 $\mu\text{g/mL}$, ヒトでは 1.0 $\mu\text{g/mL}$ の定量下限 (LLOQ) で濃度測定が可能であった.

本研究では, 富山県薬事総合研究開発センターに設置された装置を用いて, LC-MS/MSの測定条件を検討し, 最適化を行った. この条件は, 引用文献 (2), (3)

の条件と一致するものではなく, 使用する機器において最適化を行う必要があることが確認された. また, ヒト血清中のリツキシマブの測定について, 引用文献 (3) においてはPeptide Adsorption-Controlled (PAC)-LC の系を用いた測定系を用いることで, サンプルの測定機器等へのペプチドの吸着を防ぎ測定系の感度を向上させることに成功している. 本研究で我々はインフラの関係からこの系を採用できなかったが, サンプルを溶媒置換操作と LC のグラジエント開始時のアセトニトリル濃度を最適化することで, 目標とした LLOQ をクリアする感度を得ることに成功した. しかしながら, 条件検討には時間を要したことから, 今後は PAC-LC システムの導入についても検討していきたい.

6. LC-MS/MS, および ELISA を用いたリツキシマブ投与マウスの血中濃度測定

マウスの尾静脈より, リツキシマブを 50 または 150 μg 投与し, 0, 2, 5, 24, 72 および 192 時間後に約 20 μL を尾採血し (図7A), 血清中リツキシマブ濃度を LC-MS/MS を用いて測定した (図7B). ま

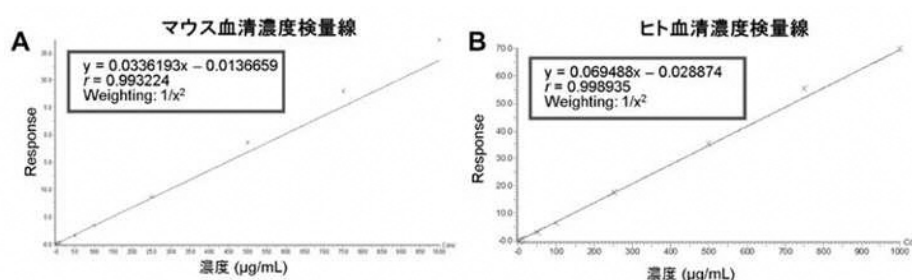


図6. リツキシマブ血清濃度の検量線

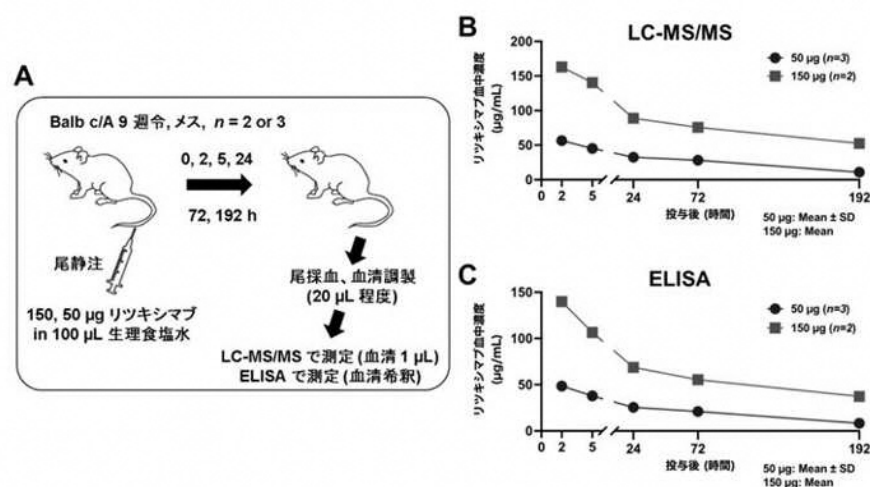


図7. マウスのリツキシマブ血中濃度推移

た、抗イディオタイプ抗体を用いた市販 ELISA kit (Aybay ImmunoGuide Rituximab ELISA (mAb-based)) により、血清中リツキシマブ濃度を測定し (図7C)、結果を比較検討した。その結果、血清中リツキシマブの濃度推移は同様の傾向が認められた。このことから、本研究で確立した LC-MS/MS を用いたリツキシマブ濃度測定法の妥当性を示すことができたと考えている。

本研究では、LC-MS/MS での測定結果は、ELISA での測定結果と同様の血中濃度推移を示しただけでなく、血中濃度値も類似の値であった。しかしながら、LC-MS/MS での測定は、サロゲートペプチドの濃度測定系であり、ELISA での測定は、抗イディオタイプ抗体が結合する部位のペプチドだけでなく、二次抗体が認識する定常領域までを含む抗体分子のみを検出する系であることから、測定値に違いが生じる可能性があることに注意が必要であると考えられる。

まとめ

抗体医薬品は、タンパク質であるが故に生体内において非自己として分解されやすかったり、また、逆に自己として保護され、分解されにくかったりする。このことから、開発段階などにおいて有効性・安全性の評価を行うために、血中濃度を正確に定量し、生体内での動態を把握することは非常に重要である。令和4年度の生物部会では、血中濃度測定についての知識と経験を深める事ができた。今後、本研究の中で得られた技術的知識や情報を積極的に活用し、抗体医薬品だけでなく、タンパク質製剤やペプチド医薬品の濃度測定に関する相談に対応し、富山県内企業等の支援に繋がりたいと考えている。

参考文献

- 1) 橋井則貴, 鶴藤雅裕, 大津善明, 加藤 望, 合田竜弥, 後藤理恵子, 他, 液体クロマトグラフィー/質量分析を利用した抗体医薬品の血中薬物濃度測定. CHROMATOGRAPHY. クロマトグラフィー科学会; 2018 Feb 20;39(1):7-19.
- 2) Hashii N, Tousaka Y, Arai K, Goda R, Inoue N, Murata K, et al. Generic MS-based method for the bioanalysis of therapeutic monoclonal antibodies in nonclinical studies. Bioanalysis; 2020 Feb;12(4):231-43.
- 3) Hashii N, Tousaka Y, Arai K, Enoki Y, Fukuda S, Goda R, et al. Bioanalysis of

therapeutic monoclonal antibody by peptide adsorption-controlled LC-MS. Bioanalysis; 2021 Feb;13(4):265-76.