

## 利用 Fab 选择性蛋白质酶解法 nSMOL 进行的抗体药物 LCMS™ 生物分析 -7- 托珠单抗分析事例 -

### ■ 前言 - 托珠单抗的免疫结构 -

托珠单抗是日本开发的一种人源化白细胞介素 6 (IL-6) 受体的单克隆抗体。其作用机理是“阻断通过与 IL-6 受体结合、介由 IL-6 进行的信号传导”。IL-6 发现于 20 世纪 80 年代, 在之后的研究过程中发现与炎症反应和免疫反应等有关, 有着各种各样的生理活性。在类风湿性关节炎、卡斯尔门病、幼年特发性关节炎等自身免疫性炎症性疾病当中, 发现体内的 IL-6 产生量异常, 因而呈现出过度免疫反应引发的症状。服用托珠单抗, 可阻断、抑制异常产生的 IL-6 所引发的炎症, 可以控制以往被视为疑难杂症的疾病症状。此外, 针对由 IL-6 引起的其他疾病, 托珠单抗也很可能带来很好的治疗效果, 期待其对近来已成为社会问题的新型冠状病毒肺炎等急性炎症的治疗效果。

K. Yokoyama

### ■ nSMOL™ Antibody BA Kit 的特点

本公司的 nSMOL 法是一种可进行单克隆抗体的 Fab 区域选择性酶解, 崭新的跨时代 LCMS 预处理法。方法开发可不依存于抗体药物的种类, 带来抗体药物分析中的典范转移。此外, 本方法还针对多个抗体药物, 满足厚生劳动省发布的“关于医药品开发时活体试样中药物浓度分析法的验证指导原则”标准, 本公司向您提供各自最佳的方法、方案。

本方法为本公司三重四级质谱仪 LCMS™-8050 (以下称为 LCMS-8050) 及 LCMS™-8060 (以下称为 LCMS-8060) 进行了优化。

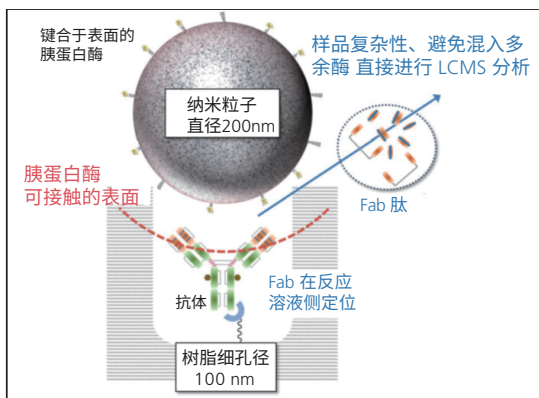


图 1 nSMOL 法的原理

### ■ LC-MS 抗体药物分析的应用

以往测定抗体药物血药浓度的主流方法是采用配体结合的 ELISA 法, 但是存在交叉反应和受干扰物质影响。而质谱分析法以结构特异性为指标进行分析, 因此可能能够解决上述问题。

此外, 伴随近来生命科学领域研究的发展, 抗体药物的多样化, 现有抗体药物对于各种疾病的适应正在扩大。虽然抗体药物的使用对于以往被视为疑难杂症的各种疾病带来了极大的治疗效果, 但是另一方面, 还有一部分患者因不断使用而导致治疗效果降低, 在这些患者的一部分人中已经发现了抗体耐药性。

基于此背景, 预计未来临床研究和生命科学研究中抗体药物的血药浓度测定需求将会提高, 使用 LCMS 的分析法可能有助于推动这些研究。



图 2 LCMS™-8050 (左) 及 CMS™-8060 (右)

### ■ 使用 nSMOL 法的托珠单抗样品处理方案

使用 nSMOL 法可以在同一平台下对所有抗体药物实施预处理。但是, 部分抗体会呈现胰蛋白酶反应抵抗性, 有时会对测定数据的灵敏度产生较大影响。针对此类抗体药物, 可以在胰蛋白酶酶解之前, 在酸性条件下进行还原处理, 提高反应效率, 获得足够的灵敏度。

#### 【样品处理方案】

使用 100nm 细孔径的 IgG 回收树脂, 将存在于血浆或血清中的所有 IgG 固定在树脂细孔中。过滤去除 IgG 以外的多余血浆/血清后, 添加 250mM TCEP-HCl, 在室温下孵育 30 分钟, 以在酸性条件下还原。清洗固定 IgG 的树脂后, 加入已键合胰蛋白酶的微细纳米粒子 (FG beads®、直径 200 nm), 进行酶解。反应后加入反应停止溶液, 使用旋转过滤器去除树脂和 FG 珠, 可直接供 LC-MS 进行分析。

## LCMS 分析条件

表 1 所示为 LC-MS 分析的分析条件，表 2 所示为托珠单抗的定量肽及内标的测定条件。

表 1 LC 及 MS 的分析条件

[HPLC 条件] (Nexera™ X2)	
色谱柱	: Shim-pack™ GISS C18 (50 mm×2.1 mm)
柱温箱	: 50 °C
溶剂 A	: 0.1% 甲酸水溶液
溶剂 B	: 0.1% 甲酸乙腈溶液
梯度	: 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)
流速	: 0.4 mL/min
进样量	: 10 μL
[MS 条件] (LCMS-8050/8060)	
离子源	: ESI (正模式)
模式	: MRM
雾化气流量	: 3.0 L/min
干燥气流量	: 10.0 L/min
加热气流量	: 10.0 L/min
DL 温度	: 250 °C
加热模块温度	: 400 °C
接口温度	: 300 °C

表 2 托珠单抗的定量肽及内标

肽	MRM 通道	目的
VTMLR	310.2>520.2	定量用
	310.2>419.2	结构确认用
	310.2>201.0	结构确认用
P14R	512.1>292.3	定量用 (IS)
	512.1>389.3	结构确认用
	512.1>660.4	结构确认用

※ 人血浆 (血清) 中定量范围: 0.781 ~ 200 μg/mL  
 ※ P14R (内标) 为在制备胰蛋白酶消化反应液时添加 (最终浓度为 10 fmol/μL 左右)

## 托珠单抗的验证结果

表 3 所示为验证试验项目的准确度、精密度的结果，图 3 所示为标准曲线。此外，图 4 所示为具有代表性的色谱图。

表 3 托珠单抗的验证数据 (准确度及精密度)

	设定浓度 [μg/mL]	数据平均 [μg/mL]	准确度 (%)	CV (%)
第 1 天 (N=5)	2.34	2.39	102	5.87
	160	170	106	1.32
第 2 天 (N=5)	2.34	2.35	100	3.40
	160	166	104	3.83
第 3 天 (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

## 标准曲线及 MRM 色谱图

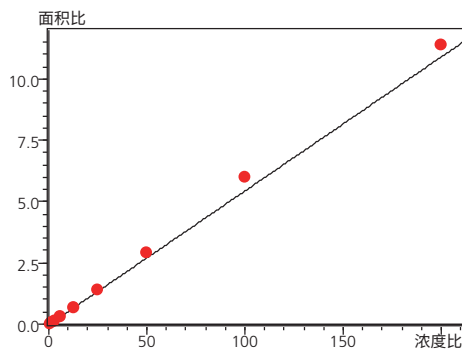


图 3 托珠单抗的标准曲线

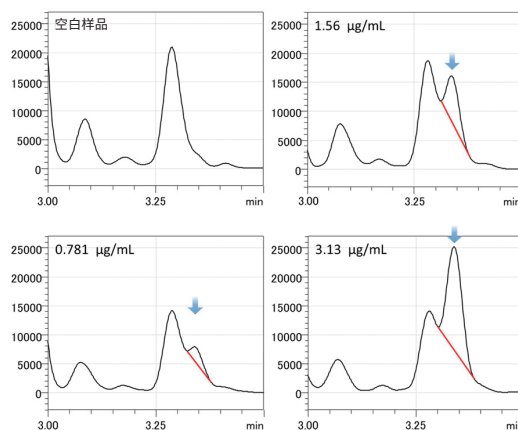


图 4 具有代表性的MRM色谱图 (人血清中)

## 考察、结论

托珠单抗在以往的 nSMOL 法下，与胰蛋白酶的反应效率不佳，由此可以看出托珠单抗在结构上与胰蛋白酶有局部抵抗。此次，通过在酸性条件下追加还原处理，在 0.781~200 μg/mL 的范围内开发出定量法，满足厚生劳动省发布的验证指导原则标准。

由此结果得出结论，nSMOL 法作为托珠单抗的血药监控技术，具有足够的准确度、精密度。

此外，还通过其他单克隆抗体观察了多次胰蛋白酶抵抗性，分别采取不同方案十分重要。

### < 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

本文中描述的产品尚未根据医药和医疗器械法被批准为医疗器械。

岛津应用云

