



# 高分子LC/MS GL-TFにおけるLC/MSを用いた 生体試料中高分子濃度測定に関する議論

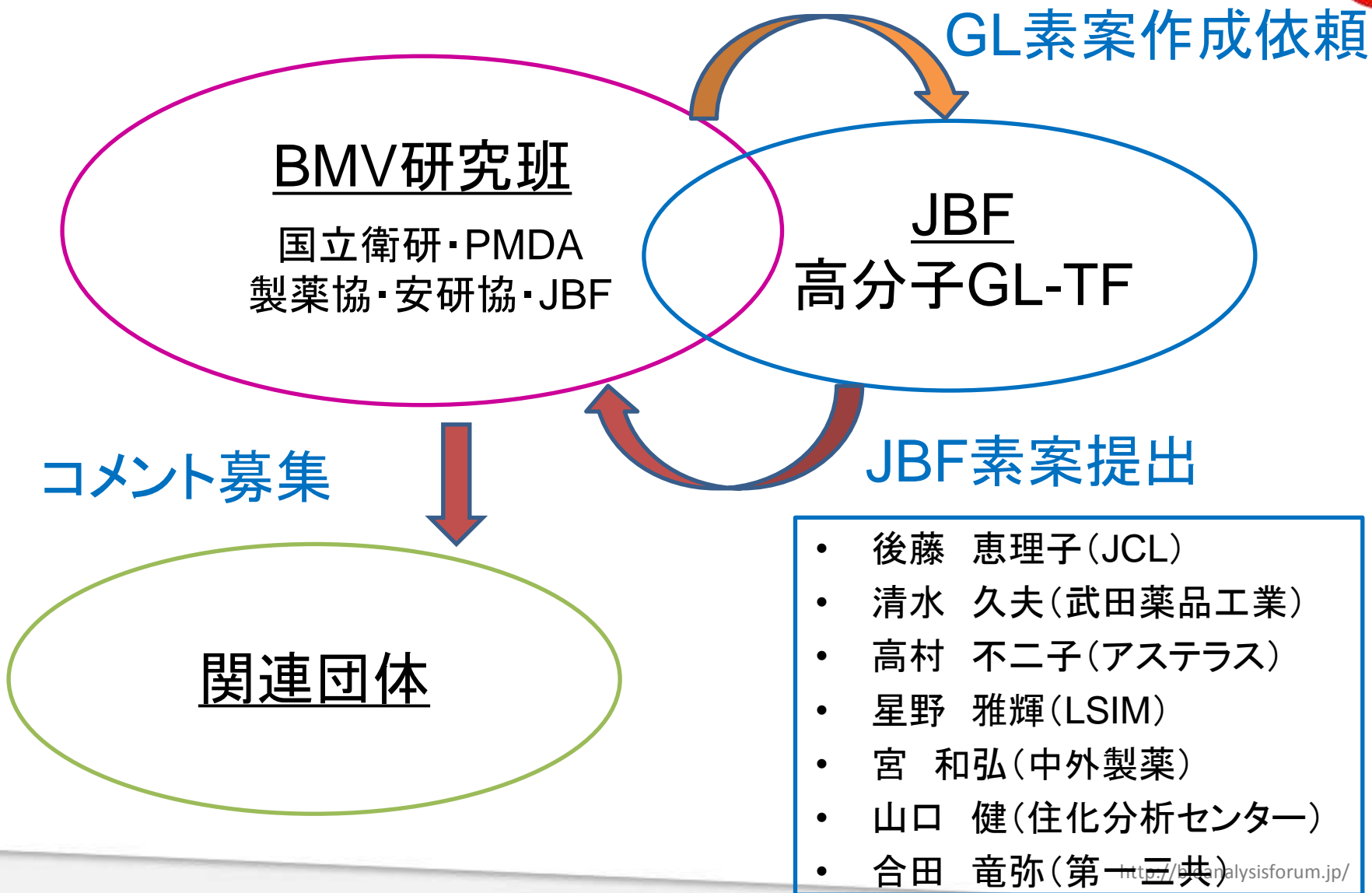
合田竜弥

第一三共株式会社

研究開発本部 薬物動態研究所

- JBF高分子LC/MS GL-TFの活動について
- ペプチド分析におけるLCの影響
- PAC-LCを用いた測定例

# BMV研究班とJBF



# 高分子LC/MS WG の目的



## ■ 高分子LC/MSのBMVガイドラインの作成を行う

- ✓ 低分子ガイドラインと共通する部分が多い場合は、それを補う形とする(単独のガイドラインとはしない)

## ■ 高分子LC/MSをバイオアナリシスに適用する際の問題点について議論し、論点をまとめる

- ✓ 前処理にリガンド結合法を用いる場合も有り(前処理の検討も重要)
- ✓ 糖鎖の違いはLC/MSでしか検出できないが、糖鎖はPKに影響を与えるためPKを絡めた議論になる

# JBF 高分子GL-TFの活動内容



## ■ 高分子LC/MS WGキックオフ(2014年2月)

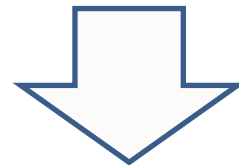
- ✓ JBF高分子LC/MS GL-TFの結成

## ■ メール及びテレカンでの議論

- ✓ ガイドラインに対する基本姿勢の確認
- ✓ ガイドラインの適用範囲の確認
- ✓ 評価項目の確認、議論点の抽出
- ✓ 最終成果物に対する意見集約

# ガイドラインに対する基本姿勢の確認

- JBF高分子GL-TFでの議論を進めるにあたって
  - ✓ 科学的な議論を先行すべきか？
  - ✓ 規制としての縛りを入れるか入れないかに力点を置くべきか？



前提が決まることで議論の分散を回避できる

規制であることを考慮した上で、評価項目は最低必要条件 (minimum requirement) にすべきと合意

# 想定される高分子LC/MS定量例



対象	インタクト				酵素消化断片			
	核酸		ペプチド		ペプチド		タンパク質	
由来	内因性	薬物	内因性	薬物	内因性	薬物	内因性	薬物
目的	マーカー	PK	マーカー	PK	マーカー	PK	マーカー	PK
現状	?	○	○	○	○	○	○	○
IS	理論上合成可能		ホール合成可能		ホール合成可能		一般的に消化断片	
IS添加時	低分子と同じ		低分子と同じ		低分子と同じ		要議論	
ブランク	要議論	○	要議論	○	要議論	○	要議論	○
前処理	<ul style="list-style-type: none"> <li>・物理化学的前処理</li> <li>・抗体による前処理・抽出</li> </ul>				<ul style="list-style-type: none"> <li>・酵素による消化反応</li> <li>・抗体による前処理・抽出</li> <li>・物理化学的前処理</li> </ul>			
測定法	ペプチドの吸着・凝集の問題、イオンペア試薬の使用、非保持ピークの問題、等							

医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析についてのガイドライン  
を想定した場合、内因性物質は現時点での議論の対象としない

# ガイドラインの適用範囲の確認



対象	インタクト		酵素消化断片	
	核酸	ペプチド	ペプチド	タンパク質
IS	理論上合成可能	ホール合成可能	ホール合成可能	消化断片の使用
IS添加時	低分子と同じ	低分子と同じ	低分子と同じ	要議論
前処理	<ul style="list-style-type: none"> <li>・物理化学的前処理</li> <li>・抗体による前処理・抽出</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>・酵素による消化反応</li> <li>・抗体による前処理・抽出</li> <li>・物理化学的前処理</li> </ul>	
測定法	ペプチドの吸着・凝集の問題、イオンペア試薬の使用、非保持ピークの問題、等			

ホールISが使用可能であり、物理化学的前処理が使用可能な場合、基本的に低分子ガイダンスに従うことが可能なのでは？



議論を進めるガイドラインの適用範囲を「酵素消化及びリガンド結合の原理を前処理に用いる場合」とすることでTF内で基本的に合意



# インタクト測定について・まとめ



- インタクトで測定可能な高分子(ペプチド、核酸オリゴマー等)の多くの場合、低分子と同様の手法で定量可能と考えられる
  - ⇒ 全てのケースにおいて新規に評価すべき項目はないと判断  
(minimum requirementの観点)
- ただし、ホールISを使用できない(=類縁体の使用)、分子量が特に大きい等の特殊な場合は、マトリックス効果、低回収率等に起因するバラツキが発生する可能性が高い
- 従って、インタクト測定であっても、低分子ガイドラインの許容基準をそのまま適応することが困難と科学的に判断できる場合には、柔軟な対応を考慮することが必要である
- 将来的な技術発展が望める領域でもあり、現時点での技術レベルに基づく議論だけでは限界があるのかもしれない(不安)

# 評価項目の確認、議論点の抽出



「酵素消化及びリガンド結合の原理を前処理に用いる場合」

- リガンド結合の原理を用いた前処理
  - ✓ LBAガイドラインを参照すれば大丈夫か？
- 酵素消化
  - ✓ 酵素消化時の定量性をどう担保すべきか？
  - ✓ 夾雑タンパク質の影響は？
- 内標準物質 (IS)
  - ✓ ホールISが使用可能な場合は？
  - ✓ 断片ISを使用する場合の添加タイミングは？
- 評価基準
  - ✓ 許容基準値を決める必要性は？
  - ✓ 現時点では実施者の判断とすることも可能か？

# リガンド結合の原理を用いた前処理



## ■ 結合試薬の品質

- ✓ 検量線やQC試料の分析結果の評価を確認することで十分
- ✓ 使用期限の設定を必要としない

## ■ 希釈直線性(希釈妥当性とは異なる)

- ✓ リガンド結合の原理を利用した前処理を行う場合は、必要に応じて希釈直線性を確認する(ULOQを超える試料濃度の適切な評価)

## ■ 選択性(低分子・内部標準物質は異なる)

- ✓ リガンド結合に用いる試薬の、生体試料中の分析対象物質に対する特異的な検出能力を評価する必要があるのかどうか、必要である場合の評価方法には現時点で定見はない

## ■ 内部標準物質

- ✓ ペプチド断片を用いる場合、前処理における回収率のバラツキを内部標準物質により補正できないことも

## ■ 標準物質

- ✓ 生物学的方法により製造されるバイオ医薬品は不均一であり、標準物質のロット変更の場合、低分子薬物の場合以上のケアが必要

# 酵素消化+ISに関して・まとめ



- ホールIS(=全長の安定同位体標識体)が使用可能な場合
  - ✓ 酵素消化時及び操作時のバラツキを補正できる
  - ✓ 上記に従うと、消化後の前処理法に関わらず定量性は担保可能
  - ✓ ただし、時間及び費用の観点からIS合成が困難な場合が多い
- 類縁タンパク質やペプチド断片をISとして使用する場合
  - ✓ その妥当性が評価できれば問題ない
  - ✓ ただし、類縁タンパク質を利用した実績は少ない
- 断片ISの添加のタイミング
  - ✓ 酵素消化反応前の添加が望ましい
  - ✓ ただし、現時点では、後添加で実施している例も多い
- 夾雑タンパク質の個体差(病態等による変動)の影響
  - ✓ 理論上、十分量の酵素を使用することで解決可能と考えられる
  - ✓ 夾雑タンパク量の変動の影響を、メソッド開発時に確認すべき(選択性、カラム負荷量、酵素量の評価等)

# 評価基準に関して・まとめ



## ■ 真度及び精度の許容基準

- ✓ 低分子及びLBAガイドラインを参考に、実施者が科学的に判断可能？
- ✓ 基本として低分子ガイドラインの基準(4-6-15ルール)では？
- ✓ LBAの代替との位置づけと考えれば、4-6-20ルールでも？

## ■ 新規技術に対する不安が多い

- ✓ 低分子化合物定量に比べて経験がかなり不足
- ✓ 酵素消化反応、多価イオンの存在、前処理の難しさ等
- ✓ 分析法開発に時間及びコストがかかる懸念
- ✓ 科学的観点から妥当に評価できているのか？等々

# 最終成果物に対する意見

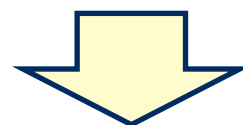


- 規制に関わるガイダンスの項目としてのminimum requirementの観点
- 現在の議論が最新の公知技術に基づいたものではあるものの、各分野において将来起こりうる技術的發展を無視して議論を進めることが妥当なのかという疑問・不安
- 既知以外の技術を開発しようとしている動きもあり、これは、現在の技術レベルが満足されていない(=改善の余地がある)ことを反映していると考えられている
- 今後の技術的發展が期待される分野で、規制としてのガイドラインを現時点で作成することは好ましくないのでは？(形骸化の恐れも？)

- JBF高分子LC/MS GL-TFの活動について
- ペプチド分析におけるLCの影響
- PAC-LCを用いた測定例

# ペプチド分析におけるLCの影響

対象	インタクト		酵素消化断片	
	核酸	ペプチド	ペプチド	タンパク質
IS	理論上合成可能	ホール合成可能	ホール合成可能	消化断片の使用
IS添加時	低分子と同じ	低分子と同じ	低分子と同じ	要議論
前処理	・物理化学的前処理 ・抗体による前処理・抽出		・酵素による消化反応 ・抗体による前処理・抽出 ・物理化学的前処理	
測定法	ペプチドの吸着・凝集の問題、イオンペア試薬の使用、非保持ピークの問題、等			



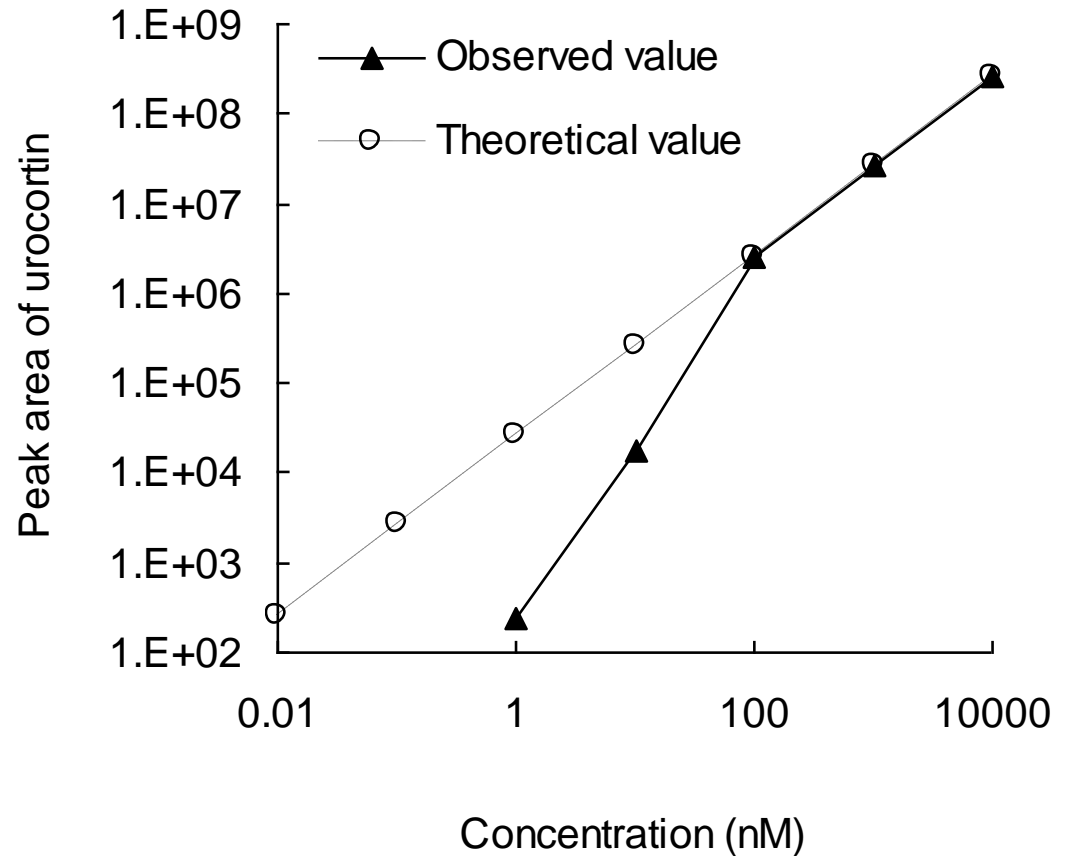
分離手法であるLCの影響についてあまり議論されていない



# ペプチドの吸着例

Urocortin (Mw. 4696) 標準溶液

- ・ペプチド: Urocortin
- ・分子量: 4696
- ・アミノ酸残基数: 40
- ・試料溶液組成: Water
- ・注入量: 100  $\mu\text{L}$



nMレベルから容器等への吸着が発生

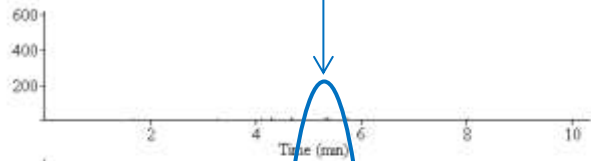
# カラム保持に与える試料中有機溶媒の影響

1 nM urocortin (Mw. ) 標準溶液 100 uL injection

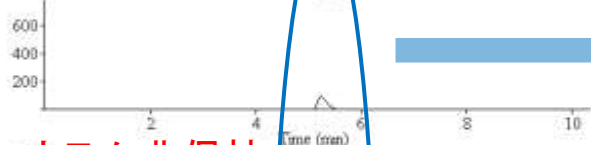
試料中  
アセトニトリル

カラムに保持したurocortin

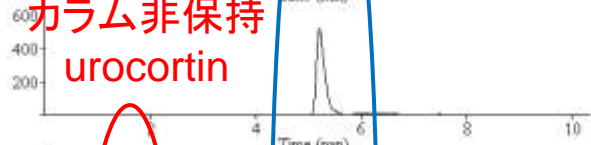
0%



20%

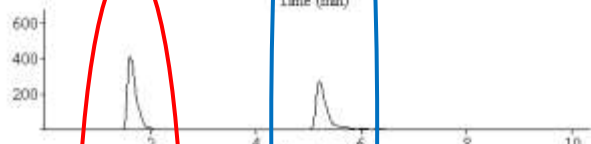


30%

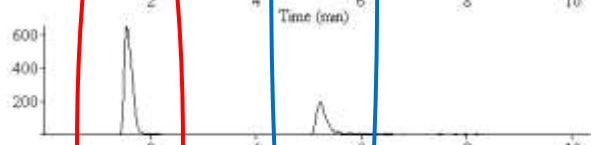


カラム非保持  
urocortin

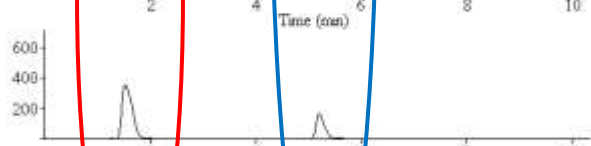
40%



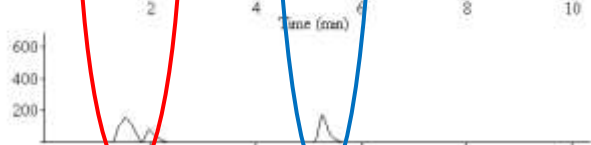
50%



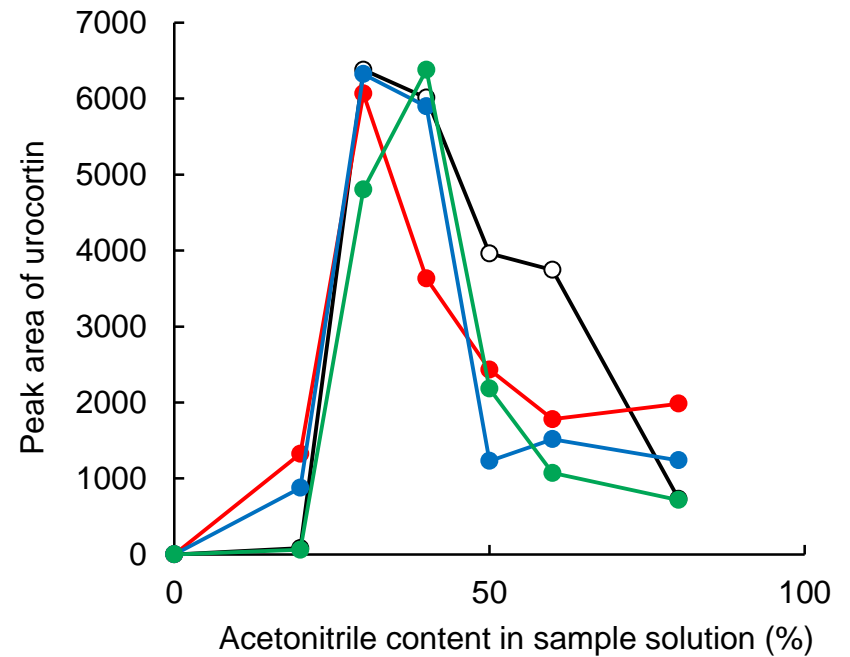
60%



80%



カラムに保持したurocortinのピーク面積



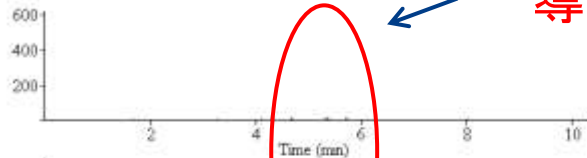
- : 4% (v/v) acetic acid
- : 4% (v/v) formic acid
- : 0.1% (v/v) TFA
- : without acid.

# 相転移理論に基づく解釈

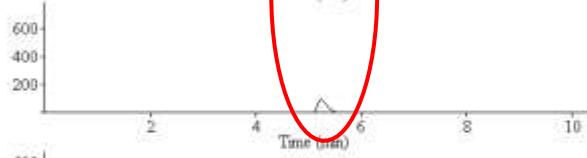
試料中  
アセトニトリル

容器等への吸着による  
導入前の損失

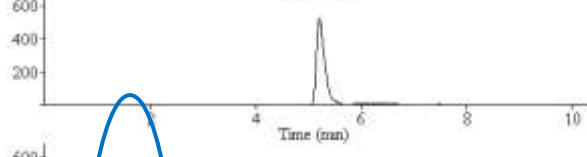
0%



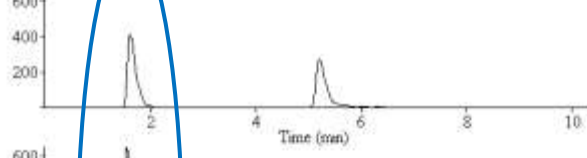
20%



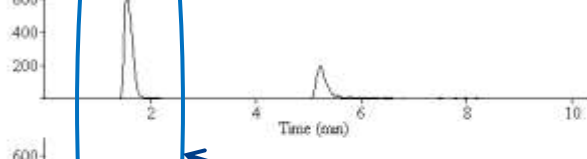
30%



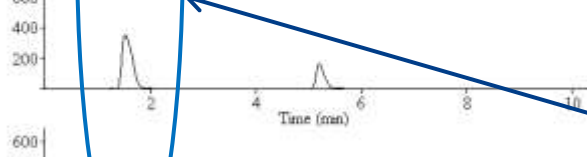
40%



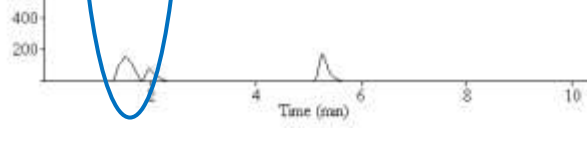
50%



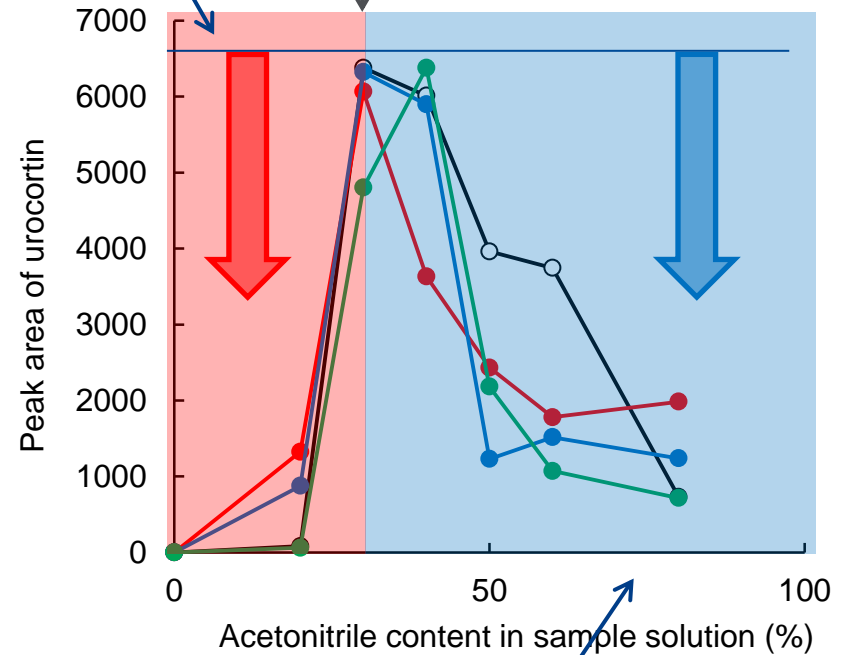
60%



80%



臨界面



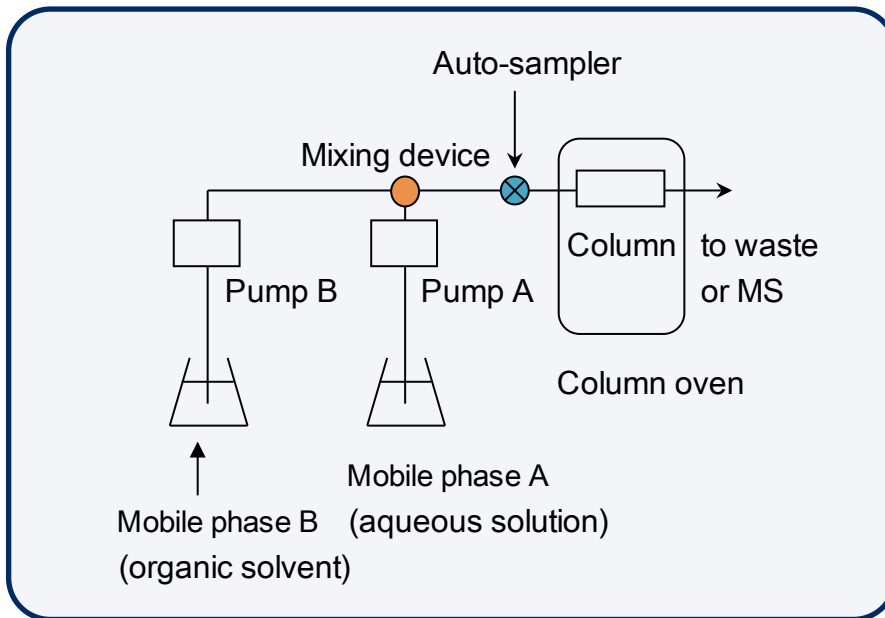
カラムを素通りした分の  
見かけ上の損失

# PAC-LCの開発

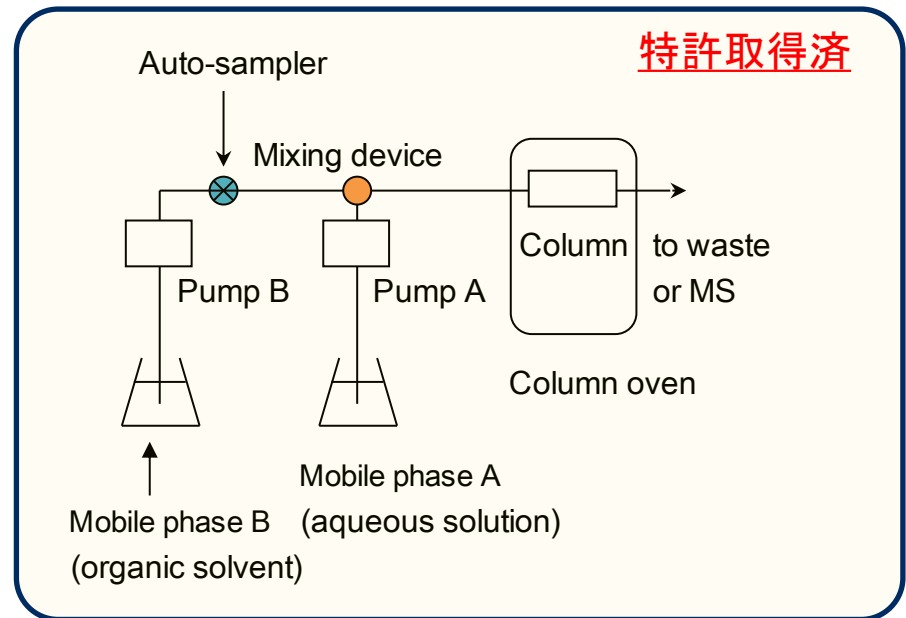
## Peptide Adsorption-Controlled (PAC)-LC

- $f_n$  値が1より大きい ( $f_n > 1$ ) 溶液中のペプチドを、固体に対する吸着およびカラム非保持による損失を発生させることなく定量可能なLCシステム

### 標準 LC



### PAC-LC



$$f_n = \sum_{i=1}^n x_i / X_i$$

$f_n < 1$ : ペプチドがカラム充填材に対する吸着能を発揮

$f_n > 1$ : ペプチドがカラム充填材に対する吸着能を喪失

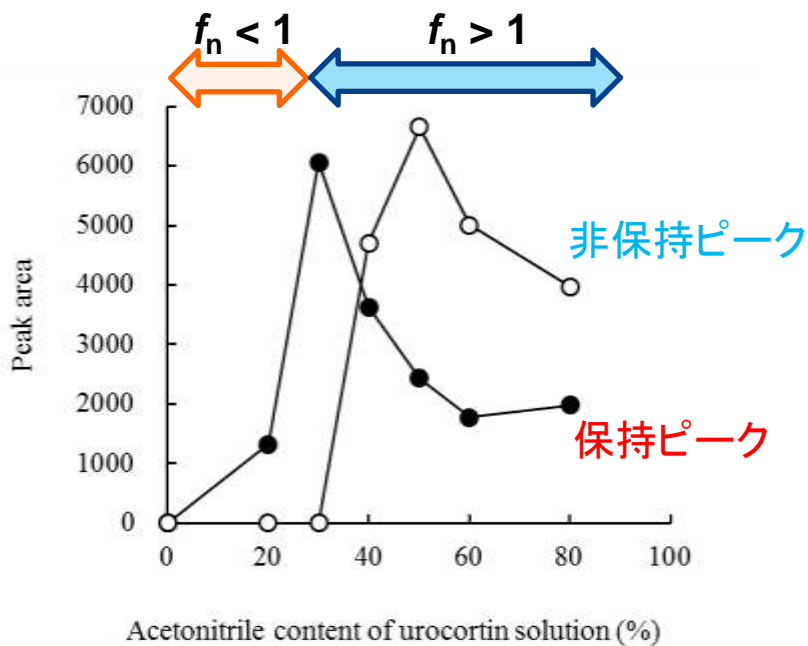
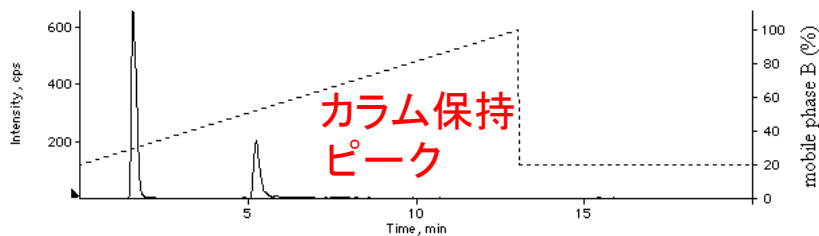
$X_i$ : ペプチドのカラム充填材に対する吸着能の変化を引き起こす各有機溶媒( $i$ )の臨界含量(%; v/v)

$x_i$ : ペプチド溶液中各有機溶媒( $i$ )の含量(%; v/v)

# 標準LCとPAC-LCの比較

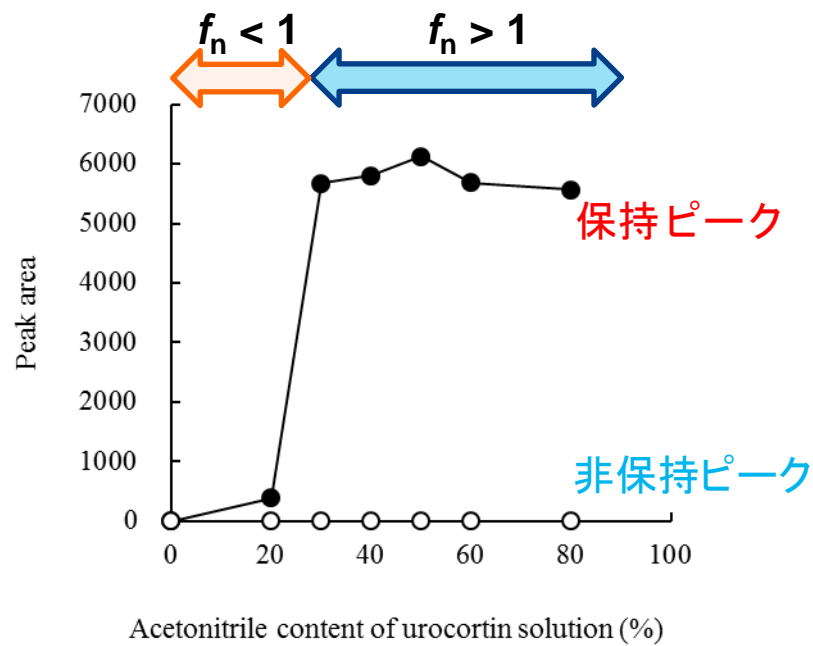
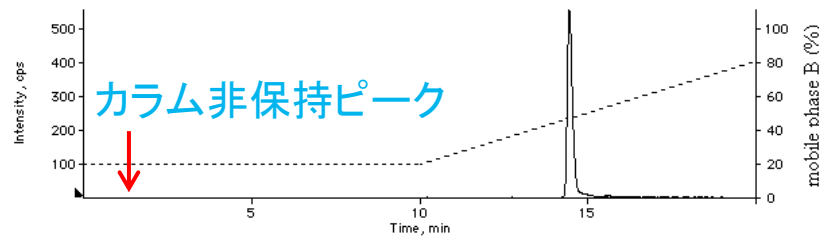
## 標準 LC

### カラム非保持ピーク



## PAC-LC

### カラム保持ピーク



# 標準LCとPAC-LCとの比較

## 測定精度

LC system	Acetonitrile content (%) of peptide solution	Peptide concentration						
		0.1 nM		1 nM		10 nM		
		Mean peak area (n=3)	CV%	Mean peak area (n=3)	CV%	Mean peak area (n=3)	CV%	
Standard	0	200	64.8	238	63.4	17861	32.1	} $f_n < 1$
	20	1679	15.4	19004	18.1	226518	6.8	
	30	2660	4.9	27910	4.0	263502	5.5	← 臨界値
	40	1729	17.6	24817	44.3	153628	2.4	} $f_n > 1$
	50	994	20.9	8345	19.9	82437	5.8	
	60	762	24.8	7511	7.4	67222	11.5	
	80	748	37.4	5817	10.5	55178	7.2	
PAC	0	84	15.8	614	26.5	43641	128.7	} $f_n < 1$
	20	1656	7.9	20477	9.8	206180	1.4	
	30	2665	2.5	28394	4.9	254617	0.9	← 臨界値
	40	2900	1.8	28606	2.2	284122	3.0	} $f_n > 1$
	50	3059	4.7	31331	4.6	274426	4.8	
	60	3077	5.6	30818	7.9	294642	0.7	
	80	3099	5.0	30882	4.6	285681	2.4	

吸着及びカラムへの非保持ピークの発生がバラツキの一因と考えられる

# 標準LCとPAC-LCとの比較

注入量増加による高感度化

LC system	Acetonitrile content (%) of peptide solution	Loaded volume (0.1 nM urocortin)				Peak area ratio (400 $\mu$ L/100 $\mu$ L)	
		100 $\mu$ L		400 $\mu$ L			
		Mean peak area (n = 3)	CV%	Mean peak area (n = 3)	CV%		
Standard	0	200	64.8	944	80.3	4.7	} $f_n < 1$
	20	1679	15.4	6263	41.2	3.7	
	30	2660	4.9	11525	7.3	4.3	← 臨界値
	40	1729	17.6	4541	43.1	2.6	} $f_n > 1$
	50	994	20.9	2337	5.3	2.4	
	60	762	24.8	1644	12.2	2.2	
	80	748	37.4	1223	14.8	1.6	
PAC	0	84	15.8	161	17.7	1.9	} $f_n < 1$
	20	1656	7.9	6639	13.4	4.0	
	30	2665	2.5	11190	2.8	4.2	← 臨界値
	40	2900	1.8	11414	3.3	3.9	} $f_n > 1$
	50	3059	4.7	12572	2.9	4.1	
	60	3077	5.6	12250	2.8	4.0	
80	3099	5.0	12324	0.8	4.0		

標準LCを用いた場合、吸着及びカラムへの非保持を回避しつつ  
注入量増加による高感度化を実施するのは難しい

- 吸着、カラムへの非保持は、測定におけるバラツキの要因
- ペプチドの吸着に対して有機溶媒の使用は有効だが、カラムへの非保持への影響を考慮する必要がある(特に標準LC)
- 標準LCでは、注入量増加による高感度化は困難な場合も



マトリックス効果のような検出 (MS) 側の問題だけでなく  
LCでの分離保持についても議論が必要  
(分析の3本柱は、前処理・分離・検出)



- JBF高分子LC/MS GL-TFの活動について
- ペプチド分析におけるLCの影響
- PAC-LCを用いた測定例

# 安定同位体標識体の有用性

## Amyloid $\beta$ -peptide ( $A\beta$ ) 定量

### ■ 検量線 (標準溶液)

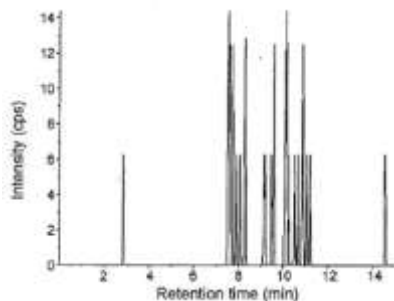
- ・濃度範囲1 – 100 pMで良好 (バリデーション許容基準内) な直線性

### ■ 日内及び日間再現性

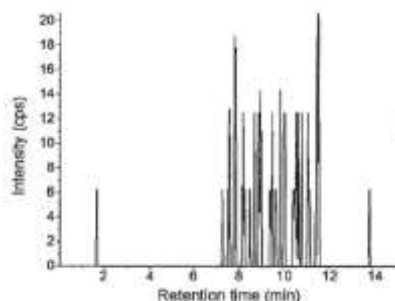
- ・真度及び精度共に15%以内 (LLOQでは20%以内)

Blank  
sample

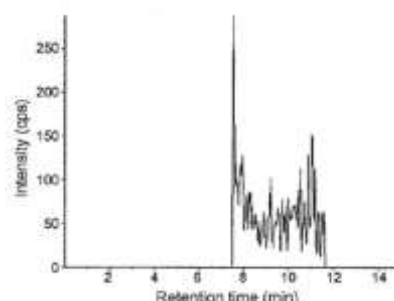
$A\beta$  1-38



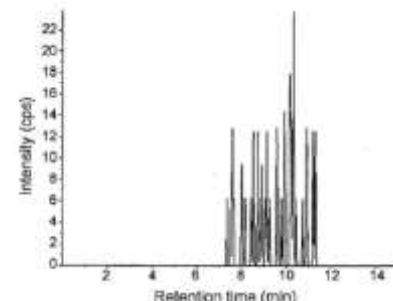
$A\beta$  1-40



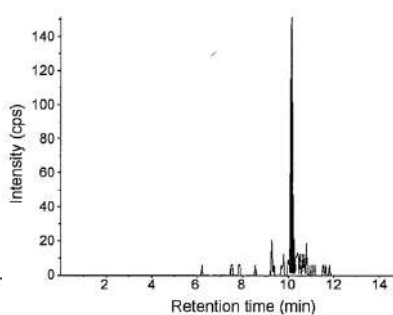
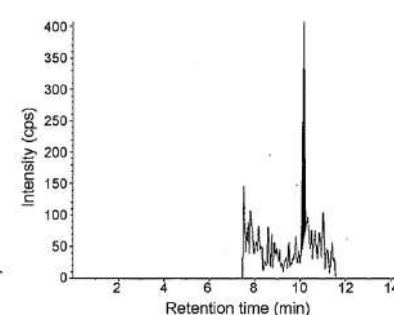
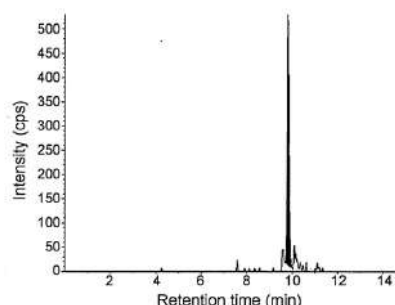
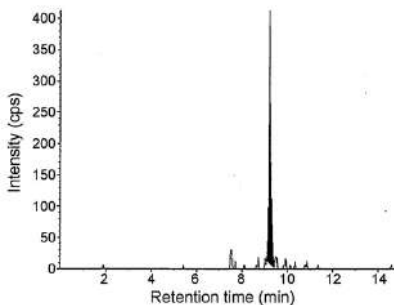
$A\beta$  1-42



$A\beta$  1-43



LLOQ  
(1 pM)



# イヌCSF中Aβ濃度

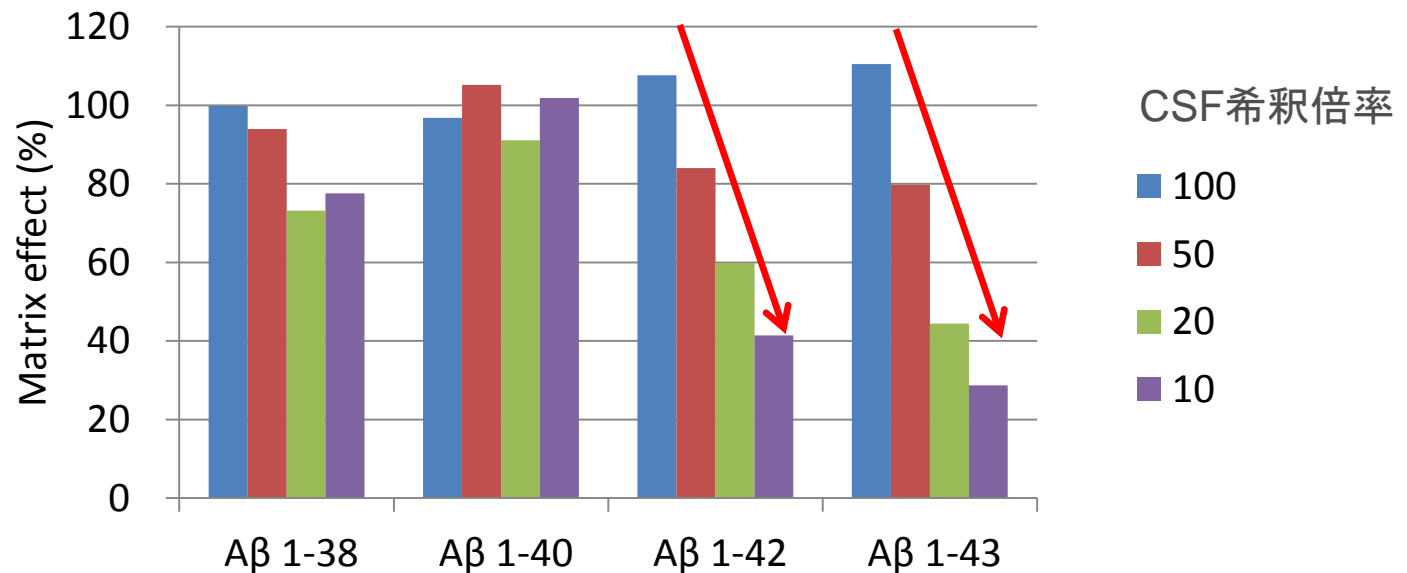
## ■ 10、20、50、100倍希釈イヌCSF試料

Peptide	Dilution factor	Observed conc. (pM)	CSF conc. (pM)	Peptide	Dilution factor	Observed conc. (pM)	CSF conc. (pM)
Aβ 1-38	100	2.86	286	Aβ 1-42	100	1.97	197
	50	6.08	304		50	4.09	205
	20	15.4	308		20	9.90	198
	10	26.3	263		10	19.1	191
	Mean CSF conc. (pM)		290		Mean CSF conc. (pM)		198
Aβ 1-40	100	9.48	948	Aβ 1-43	100	< LLOQ	NC
	50	18.5	925		50	< LLOQ	NC
	20	46.4	928		20	1.67	33.4
	10	83.3	833		10	3.47	34.7
	Mean CSF conc. (pM)		909		Mean CSF conc. (pM)		34.1

異なる希釈倍率を用いても各Aβはほぼ同じCSF中濃度を示した

## ■ マトリックス効果

= CSF試料ISピーク面積値 / 検量線試料ISピーク面積値 × 100



マトリックス効果に関わらずほぼ同じ濃度値が得られており  
安定同位体標識体(ホールIS)の有用性が示唆された

# 多価イオンの影響

Angiotensin標準溶液を用いた日内再現性

## ■ 検量線(標準溶液)

- ・濃度範囲1 – 200 pMで良好(バリデーション許容基準内)な直線性

	Conc. (pM)	Ang_I	Ang_II	Ang_III	Ang_IV
Monitor ion	-	433.2	524.1	466.5	450.5
	-	[M+3H] <sup>3+</sup>	[M+2H] <sup>2+</sup>	[M+2H] <sup>2+</sup>	[M+2H] <sup>2+</sup>
Area	1	12267	8565	29230	34739
	200	2155232	1695955	6815575	6102795
CV% (N = 10)	1	15.1	7.4	4.5	6.9
	3	5.9	6.5	2.4	4.1
	15	3.7	5.0	2.7	3.0
	150	3.0	4.8	2.1	2.4
Accuracy (N = 10)	1	87.6	90.9	111.9	86.4
	3	99.1	100.4	103.3	93.7
	15	101.6	99.3	100.9	97.6
	150	100.9	99.8	98.6	99.1

多価イオンが測定対象ということで単純にバラツキは生じない

- 抗体医薬品の分子量を15万と仮定した場合の血漿中  
10 ng/mL は 約67 pM  
⇒ 前処理（酵素消化及び抽出）次第で十分に達成可能
- ペプチド薬物（分子量1万以下）のインタクト測定例  
⇒ 血漿中LLOQ 0.2 ng/mLでも感度に余裕あり

LC/MS法でLBA法より高感度定量が可能な場合も

- 全長の安定同位体標識体を使用できれば、様々な要因を補正できる可能性が高い（ただし、コストの問題有）
- 多価イオンが存在していても、それ自体はバラツキの原因ではない可能性が高い
- LC-MS法はLBA法よりも感度が低いと言われてきたが、現状ではLC-MS法でより高感度に定量できる場合も多い

低分子と比較して経験不足は否めないが  
着実に進展しており、今後の技術的な発展が望める領域