



15th JBF Symposium

February 5-7, 2024 MIYAKO MESSE, Kyoto, Japan

「生体試料中ペプチドLC-MS/MS分析法の開発と標準化研究」

Research in development and standardization of LC-MS/MS based peptide bioanalysis

国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 室長

齊藤公亮

COI

本講演に関して開示すべき利害関係はありません

本日の内容

- 1. 研究班の紹介**
2. 研究班で構築した分析法の紹介
3. 構築課題で得られた課題
4. 今後の計画

ペプチド医薬品バイオアナリシスの課題

主要分析法の特徴	LBA法	LC-MS法
抗体	必要	不要
代謝物、不純物との識別	難	可能
感度	高い	LBAよりは低い
定量範囲	狭い	広い

抗体入手、抗体作成（特に非天然割合が多い場合）

LBA法を用いることができない場合がある

IP-LC/MS法のような高感度化処理ができない場合がある

吸着

基材、機器への吸着によって、回収率の低下、ベンチトップ安定性の低下、キャリーオーバー等が起きる場合がある

高感度化

標的分子や組織への高親和性化による、低用量化、血中分布量の低下に追い付く必要がある

検出イオンの制限

特異的なプロダクトイオン得られない場合がある



上記の課題は、バイオアナリシス手法の構築を妨げ、
医薬品開発の隘路となりうる

20社以上の製薬企業、CROへのアンケート調査からも裏付け



共通の課題解決に向け、AMED研究班を構想

ペプチド医薬品 バイオアナリシス研究班

アクセリード (株)

青山 和誠、白崎 幹雄、神野 文宏

味の素 (株)

嵐田 直子、山元 一輝、中山 聡

イーザイ (株)

井上 和子、菊池 きよ美

メディフォード (株)

新井 浩司、新田 真一郎

大和 遼、相川 博明

小野薬品工業 (株)

吉本 直樹

サーモフィッシャー (株)

高原 健太郎、山元 良馬

シミックファーマサイエンス (株)

水落 正慶、西口 有美

新日本科学 (株)

川端 光彦、福田 卓

岩崎 佳代、家木 克典

(株)住化分析センター

山口 建、村田 和之、重山 拓摩

第一三共 (株)

合田 竜弥、岸野 有紀

武田薬品工業 (株)

藤田 央、掛樋 真彰

田辺三菱製薬 (株)

齋藤 昌良

東和薬品 (株)

立木 秀尚、内山 仁

山岡 真理子、宇根 理香子

国立衛研

齋藤 嘉朗 (副所長)
出水 庸介、三澤 隆史 (有機化学部)
石川 リカ (医薬安全科学部)

(敬称略)

Funded by AMED、委託研究

1 3社にご参加いただき、研究班を始動

研究班の目的

ペプチド薬物複合体のように現在開発が活性化しているペプチド医薬品の、薬物動態評価に必要な生体試料中薬物濃度等分析法に関し、課題となっている点の解決を含め、標準的な方法を、参画企業と共に構築

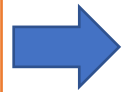
標準的な手法に必要な要素：再現性・普遍性



メイントラック：複雑なモダリティに対する標準化を目標

構造が複雑なペプチド薬物複合体（PDC）を対象とし、衛研で分析法を構築し、多施設バリデーションを行う

親ペプチドと構成成分
の個別分析法構築



統合分析法の構築



多施設評価

サブトラック：ペプチド医薬品全般の潜在化する様々な課題解決・標準化を目標

参加企業ニーズを踏まえ、環状非天然ペプチドを対象とし、多施設で同時に分析法の構築、簡易バリデーションを行い、その結果を踏まえて、多施設バリデーション等追加で評価を実施

分析法構築



簡易評価

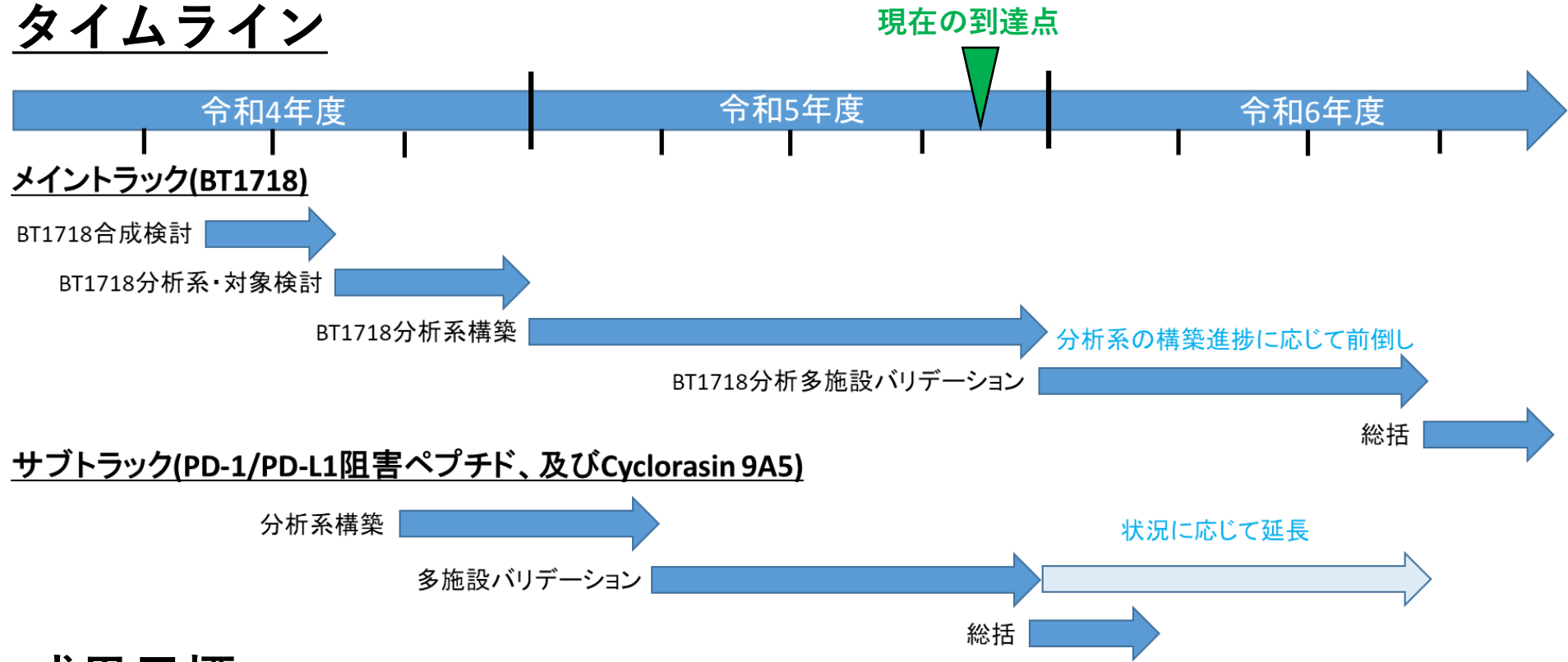


追加評価

分析法の構築過程から、保存、前処理（抽出・精製）、分析（LC/MS）における、高感度化、高速化、堅牢化に必要な要素・留意点を蓄積・共有

研究計画のタイムラインと成果目標

タイムライン



成果目標

- ・ ICH M10を満たすための技術指針の発出
 - ・ 標準的分析法の確立
- ⇒ 医薬品開発の促進

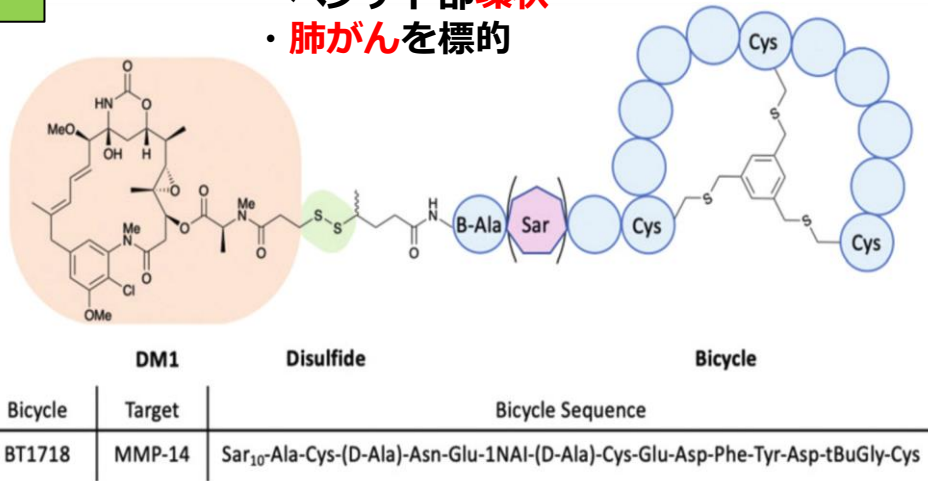
・ (副次的) 医薬品開発の高度化により、血中濃度分析や体内分布評価から、組織部位特異的濃度、細胞内濃度、標的分子結合濃度といったより詳細な評価に移り行くことが想定されるため、その重要な基盤となる

分析対象分子

メイントラック

- Phase1/2
- ペプチド部環状
- 肺がんを標的

BT1718

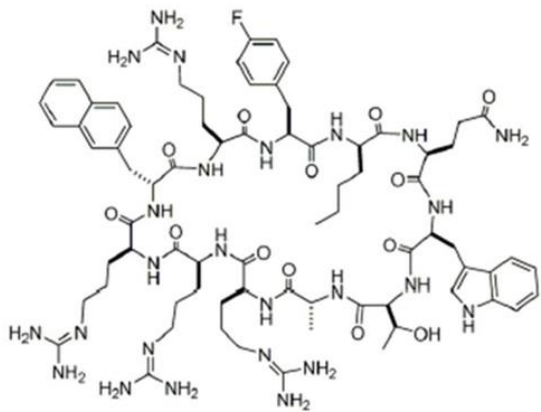


- ペプチド部 (Bicycle)、スペーサー、リンカー、ペイロード (DM1) で構成
- Phase1/2aの検量線レンジは5-1000 ng/ml 程度 (薬物動態の濃度プロットから推察)
- S-S結合は細胞内 (還元性環境) で開裂しやすく、SH基は細胞外 (酸化性環境) で架橋が形成されやすい
- 主要消失経路は短くなったペプチド部と結合したDM1の腎排泄

衛研で分析法構築を開始

サブトラック

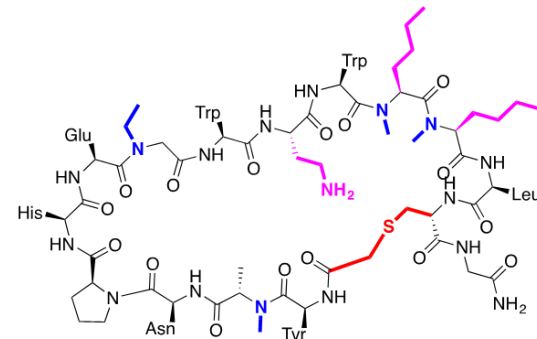
サブトラックA1: Cyclorasin 9A5



- Rasを阻害する環状ペプチド
- 細胞透過能あり
- 市販品として入手可 (Merck, Sigma, ペプチド研究所)
- 生体試料中分析法は未確立 (逆相LCによる精製、検出情報はあり)

6施設で分析法構築を開始

サブトラックA2: PD-1/PD-L1阻害ペプチド



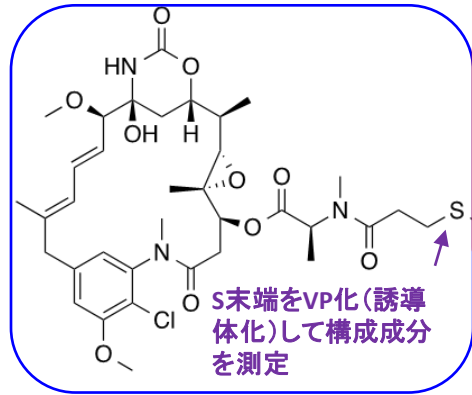
- PD-1/PD-L1相互作用を阻害するペプチド (がんの免疫回避を妨害)
- ニボルマブ、ペムブロリズマブ等と同様の薬効が期待
- 類縁体のBMS-986189は臨床第一相を実施しているため、LC/MS法が存在するはずだが、開示されていない

6施設で分析法構築を開始

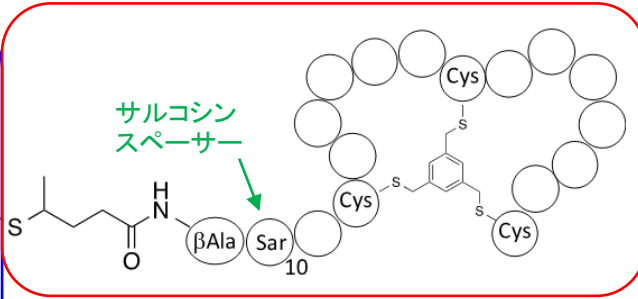
本日の内容

1. 研究班の紹介
- 2. 研究班で構築した分析法の紹介**
3. 構築課題で得られた課題
4. 今後の計画

ペプチド薬物複合体BT1718分析法構築



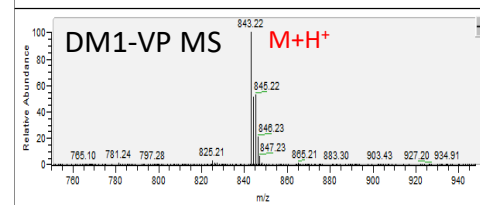
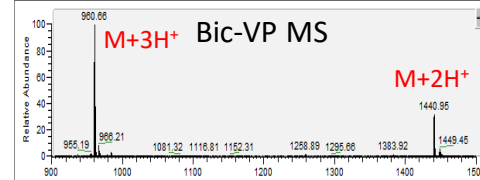
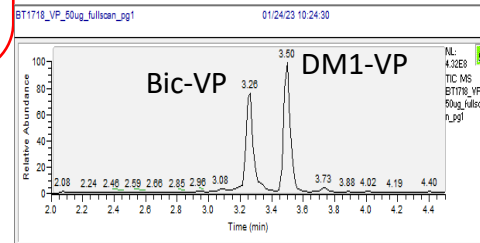
DM1(ペイロード)



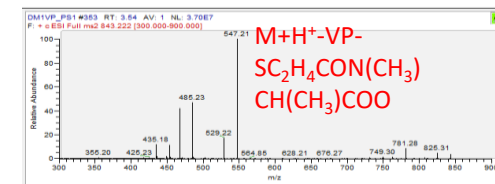
BT1718 ペプチド部

BT1718 ペイロード(DM1)

還元誘導体化後、
H₂O-ACN ギ酸系で測定イオンを探索(ramp)



DM1-VP: M+H⁺ Product ion scan

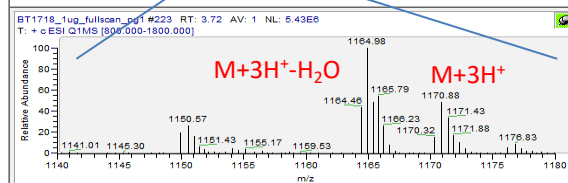
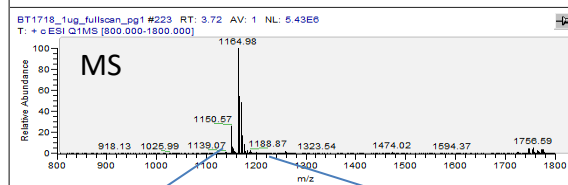
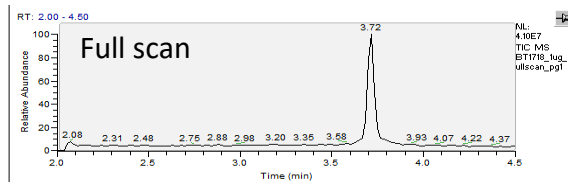


Productイオン候補として、
Intact: 脱水脱炭酸体
DM1-VP: アシル開裂体
を得た

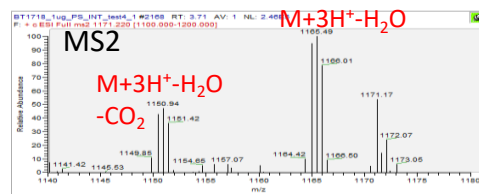
BT1718 intact

H₂O-ACN ギ酸系で測定イオンを探索(ramp)

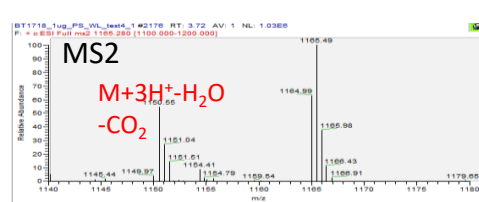
Positive ion mode



M+3H⁺ Product ion scan



M+3H⁺-H₂O Product ion scan



BT1718 intact 分析法

前処理

<前処理方法>

Plasma 50 μ L
 + 10 μ L IS (82.3 nM) in 50% ACN with 0.1% FA
 + 215 μ L ACN with 0.1% FA
 Centrifuge (20000g, 4°C, 10 min)
 Collect sup (200 μ L)
 Dry up
 Dissolve in 40 μ L 40% ACN with 0.1% FA
 LC/MS

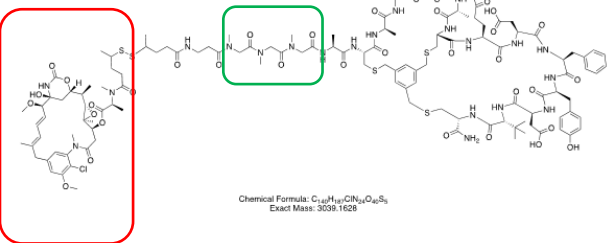
*混和時はボルテックス

IS working solution:
 329 nM in 50% ACN with 0.1% FA

除タンパク+乾固

内部標準は類縁体を別途合成 (DM3-Sar3-Bic)

サルコシンスペーサー



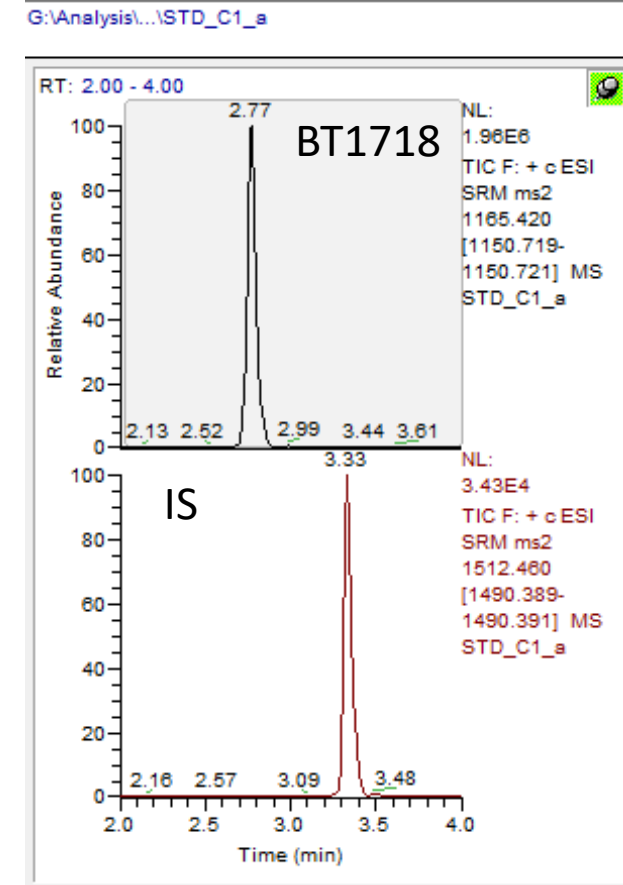
DM1の類縁体: DM3

LC-MS

Liquid Chromatography		Ultimate 3000 HPLC (Thermo Fisher Scientific)
Mobile phase A		H ₂ O 0.1% FA
Mobile phase B		ACN 0.1% FA
Flow rate (μ L/min)		400
Column		Triart Bio C18 (2.1 \times 100 mm, 3 μ m) (YMC)
Column temperature ($^{\circ}$ C)		50
Gradient program		40% B (0-1 min) - 60% B (3 min) - 95% B (3.1- 5 min)- 20% B (5.1-7 min)
Auto sampler temperature ($^{\circ}$ C)		5
Injection volume (μ L)		4

Mass spectrometer		TSQ-Quantiva (Thermo Fisher Scientific)
Ionization mode		ESI
Scan type		SRM
Detection mode		Positive
Ion source voltage (V)		3500
Ion source gas (AU)		Sheath/Aux/Sweep: 40/5/0
Ion source temperature ($^{\circ}$ C)		Ion transfer tube: 350, Vaporizer: 200
Collision energy (V)		BT1718: 10, IS: 16
Collision gas type and pressure (AU)		Ar, 2
Resolution		2/1.2 or 2 (Q1/Q3)
Transition	BT1718 IS	1165.42/1150.72 $M+3H^+-H_2O/M+3H^+-H_2O-CO_2$ 1512.46/1490.39 $M+2H^+-H_2O/M+2H^+-H_2O-CO_2$

クロマトグラム



選択性、検量線、キャリアオーバー、マトリックス効果、日内日間真度精度、安定性を評価

BT1718 ペイロード/ペプチド 分析法

前処理

<前処理方法>

Plasma 50 μ L
 + 120 μ L IS (6.8 nM)
 in 50 mM AB with 8.3% plasma
 + 20 μ L 50 mM TCEP
 ↓ 75 °C 30 min 還元
 + 10 μ L 25%/75% 4VP/ACN
 ↓ RT 30 min VP化
 + 1 mL ACN 除タンパク

Centrifuge (20000g, 4°C, 5 min)
 Collect sup (900 μ L) sup
 Dry up 乾固
 Dissolve in 40 μ L 50% ACN
 Centrifuge (20000g, 4°C, 5 min)
 Dilute with 0.25 volume of H₂O

LC/MS

*混和時はボルテックス

IS working solution:
 82.3 nM in plasma

LC-MS

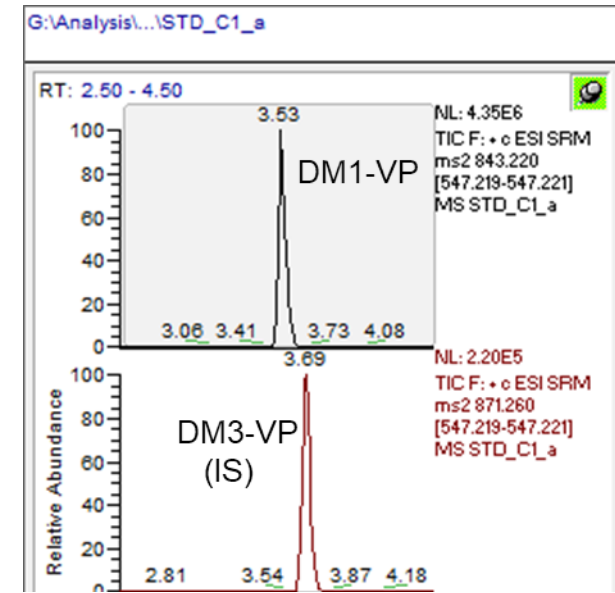
Liquid Chromatography		Ultimate 3000 HPLC (Thermo Fisher Scientific)
Conditions	Mobile phase A	H ₂ O 0.1% FA
	Mobile phase B	ACN 0.1% FA
	Flow rate (μ L/min)	400
	Column	Triart Bio C18 (2.1 \times 100 mm, 3 μ m) (YMC)
	Column temperature (°C)	50
	Gradient program	20% B (0-1 min) - 80% B (4 min) - 95% B (4.1- 6 min)- 20% B (6.1-8 min)
	Auto sampler temperature (°C)	5
	Injection volume (μ L)	4

Mass spectrometer		TSQ-Quantiva (Thermo Fisher Scientific)		
Parameters	Ionization mode	ESI		
	Scan type	SRM		
	Detection mode	Positive		
	Ion source voltage (V)	3500		
	Ion source gas (AU)	Sheath/Aux/Sweep: 40/5/0		
	Ion source temperature (°C)	Ion transfer tube: 350, Vaporizer: 200		
	Collision gas type and pressure (AU)	Ar, 2		
	Scan filter	DM1-VP	DM3-VP (IS)	
	Collision energy (V)	28	26	
	Transition	843.22/547.22	871.26/547.22	
Resolution (Q1/Q3)	0.7/0.7	0.7/0.7		

M+H⁺/M+H⁺-
OCOR-VP

M+H⁺/M+H⁺-
OCOR-VP

クロマトグラム



選択性、検量線、キャリーオーバー、マトリックス効果、日内日間真度精度、安定性を評価

Cyclorasin9A5 分析法構築

以下の分析法構築目安に沿って 6施設で同時に構築開始 (→5施設で構築済み)

サンプル種: ラット血漿
サンプル量: 50 μ L
定量下限: 1 ng/mL
検量線レンジ: 1000倍
内部標準: Cyclorasin 9A54

前処理手法

- ・除タンパク: 4施設
> 乾固あり: 2施設
* 全施設抽出液にMeOH入り
- ・固相: 1施設

低吸着基材

- ・基本的に使用: 4施設
* 全てLC-QMS
- ・使用なし: 1施設

LC-MSシステム

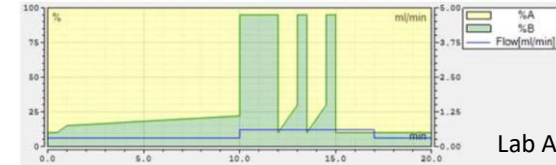
- ・LC-QMS: 4施設
> ACNベース移動相: 3施設
> MeOHベース移動相: 1施設
- ・PAC-LC-QMS: 1施設

分離カラム

- ・C18系: 4施設
- ・ポリマー系(ワイドポア): 1施設

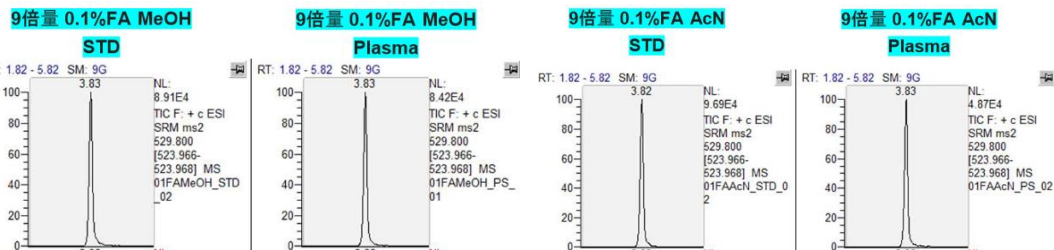
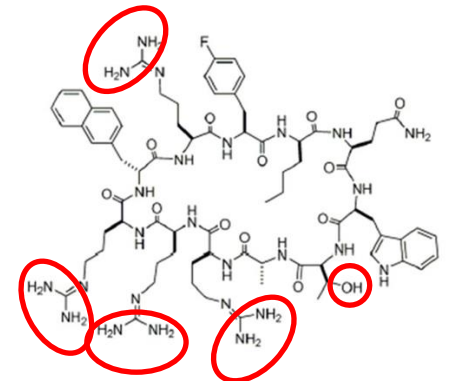
分析条件中のLC洗浄

- ・あり: 4施設
* 全てLC-QMS
- ・なし: 1施設



Scan Filter

- ・Parent ion
> 4価: 1施設
> 3価: 3施設
> 2価: 1施設
* 全てM+xH⁺
- ・Product ion (putative)
> 脱水: 5施設
> 脱NHCNH?: 2施設
> 脱水+脱NHCNH?: 1施設
* 重複あり



MeOHを入れる方が回収率が良い

Lab A

Cyclorasin9A5 分析法 簡易バリデーション

選択性、検量線、キャリアオーバー、日内真度精度を評価(5施設の結果まとめ)

選択性 (N=1-3で実施)

- ・1%以下:3施設
- ・5%以下:4施設
- *1施設は未集計

特段問題なし

検量線

- ・1-1000 ng/ml:4施設
- *7-9ポイント
- ・0.1-100 ng/ml:1施設
- *10ポイント
- ・逆回帰真度:全施設10%以下

特段問題なし

キャリアオーバー(N=1-3で実施)

- ・全て20%以下:2施設
- *全ての施設で最大10%以上
- ・いずれかが20%以上:3施設

懸念有

ポリカチオンが影響?

日内真度精度(3-4濃度, n=3)

- ・真度全て $\pm 12\%$ 以下:5施設
- ・精度LLOQを除き15%以下:5施設
- *LLOQは16.4%
- ・バッチ数:1-3バッチ
- ・QC濃度数:3-4濃度

特段問題なし

PD-1/PD-L1阻害ペプチド 分析法構築

以下の分析法構築目安に沿って 6施設で同時に構築開始 (→4施設で構築済み)

サンプル種: ラット血漿
サンプル量: 50 μ L
定量下限: 1 ng/mL
検量線レンジ: 1000倍
内部標準: 3004pep (類縁物質)

前処理手法

- ・除タンパク: 2施設
> 乾固あり: 1施設
* 全施設抽出液はまちまち
- ・固相: 2施設
> 複数検討: 1施設
* 除タンパク(乾固なし)からの変更で感度増

低吸着基材

- ・基本的に使用: 2施設
- ・使用なし: 2施設
* 吸着を疑う現象は認められず

LC-MSシステム

- ・LC-QMS: 2施設
> ACNベース移動相: 2施設
- ・LC-HRMS: 1施設(追加評価)
- ・PAC-LC-QMS: 2施設

分離カラム

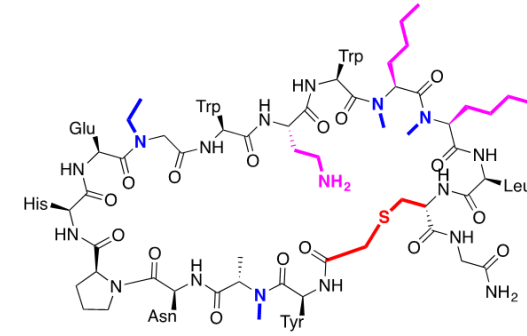
- ・C18系: 4施設
* 1施設でC4も検討し、キャリーオーバーの回避を確認

分析条件中のLC洗浄

- ・あり: 2施設
- ・なし: 2施設

Scan Filter

- ・Parent ion
> 3価: 1施設
> 2価: 3施設
* 全てM+xH⁺



- ・Product ion (putative)
> 開裂体OR脱アミノ酸体?: 4施設
* 複数の施設で選択的なプロダクトイオンが得られず、選択に苦戦

イオンの選択に懸念有(感度がとりにくい)
* 落ちやすい側鎖が無い?

PD-1/PD-L1阻害ペプチド 分析法 簡易バリデーション

選択性、検量線、キャリーオーバー、日内真度精度を評価(4施設の結果まとめ)

選択性 (N=1-3で実施)

- ・1%以下:2施設
- ・5%以下:1施設
- *1施設は未集計

特段問題なし

検量線

- ・1-1000 ng/ml:3施設
- *7-8ポイント
- ・3-1000 ng/ml:1施設
- *6ポイント, 感度に課題
- ・逆回帰真度:全施設6%以下

選択的なイオンが得にくく
感度がとりにくい
真度は問題なし

キャリーオーバー(N=1-3で実施)

- ・検出なし:4施設

特段問題なし

*少ないチャージ(-1)、
Nメチルの影響?

日内真度精度(3-4濃度, n=3)

- ・真度LLOQ以下を除き±11%以下:4施設
- *LLOQ以下0.3ng/mLは-27.8%
- ・精度11.5%以下:4施設
- *LLOQ以下0.3ng/mLを除き10%以下
- ・バッチ数:1バッチ
- ・QC濃度数:3-4濃度

特段問題なし

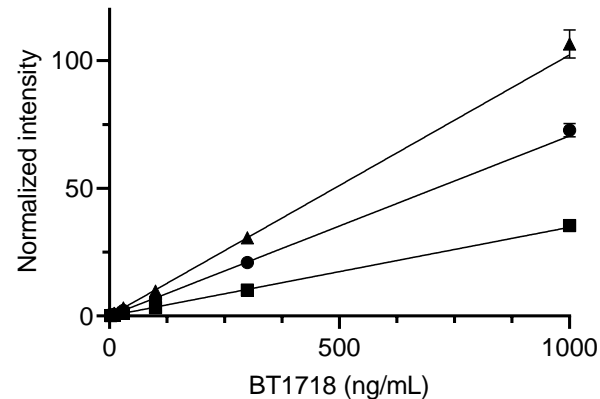
本日の内容

1. 研究班の紹介
2. 研究班で構築した分析法の紹介
- 3. 構築課題で得られた課題**
4. 今後の計画

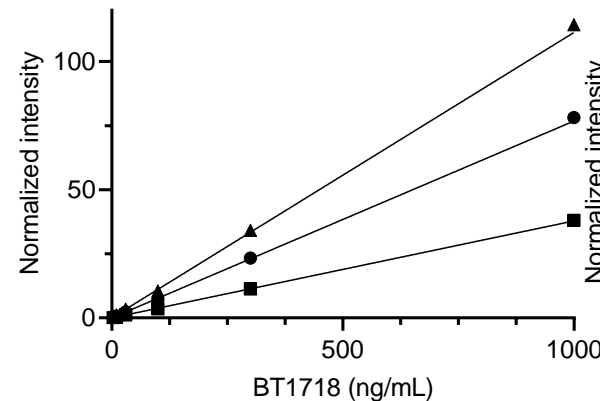
内部標準のスキャンフィルター

	Nominal concentration (ng/mL)	IS: Intact- H ₂ O loss			IS: Intact-H ₂ O, CO ₂ loss			IS: H ₂ O loss-H ₂ O, CO ₂ loss		
		Intact-H ₂ O loss	Intact-H ₂ O, CO ₂ loss	H ₂ O loss-H ₂ O, CO ₂ loss	Intact-H ₂ O loss	Intact-H ₂ O, CO ₂ loss	H ₂ O loss-H ₂ O, CO ₂ loss	Intact-H ₂ O loss	Intact-H ₂ O, CO ₂ loss	H ₂ O loss-H ₂ O, CO ₂ loss
RE (%)	1000	3.31	1.94	4.21	1.81	0.51	2.68	4.50	3.15	5.43
	300	-1.16	-2.82	-0.16	1.18	-0.47	2.25	-1.19	-2.82	-0.13
	100	-6.18	-5.56	-5.29	-6.40	-5.76	-5.48	-6.67	-6.07	-5.75
	30	0.45	2.28	2.20	1.34	3.17	3.10	0.11	1.93	1.88
	10	-0.34	1.12	-0.99	0.79	2.31	0.14	0.38	1.84	-0.27
	3	5.79	4.69	-0.44	2.06	0.78	-4.20	4.30	3.14	-1.88
	1	-1.84	-1.70	0.15	-0.75	-0.54	1.28	-1.40	-1.24	0.63
Correlation coefficient (r)		0.9984	0.9985	0.9988	0.9987	0.9988	0.9985	0.9987	0.9990	0.9988

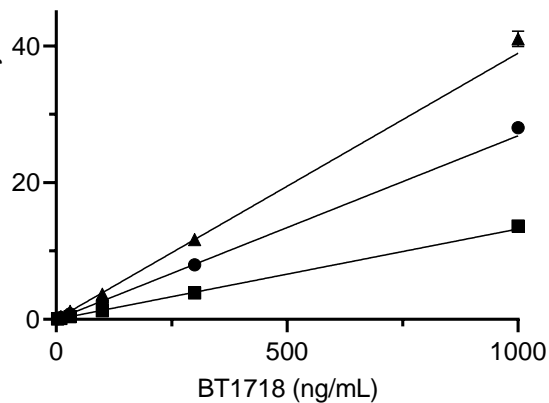
IS: Intact-H₂O loss



IS: Intact-H₂O, CO₂ loss



IS: H₂O loss-H₂O, CO₂ loss

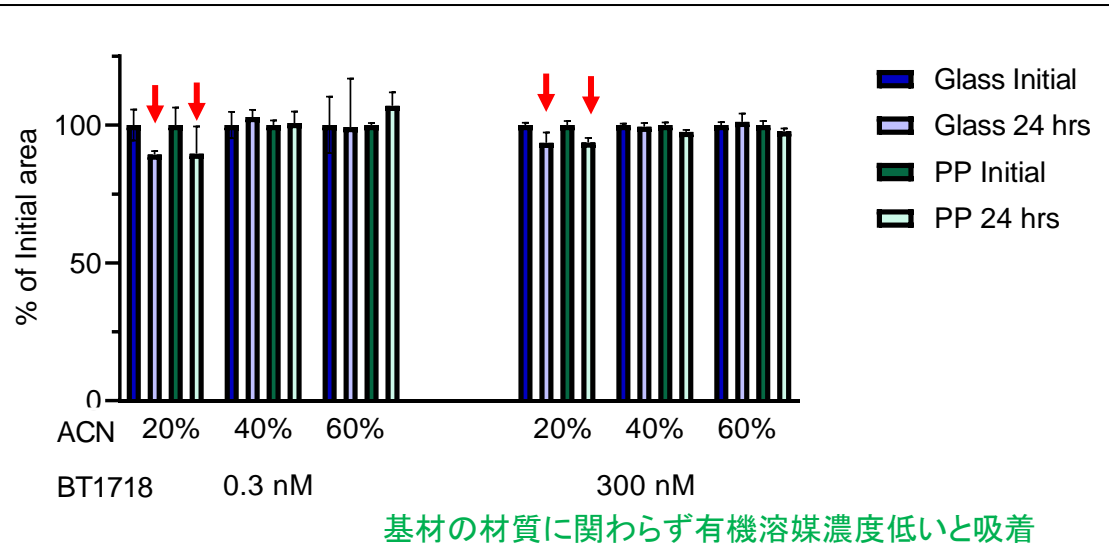


- BT1718 Intact-H₂O loss
- BT1718 Intact-H₂O, CO₂ loss
- ▲ BT1718 H₂O loss-H₂O, CO₂ loss

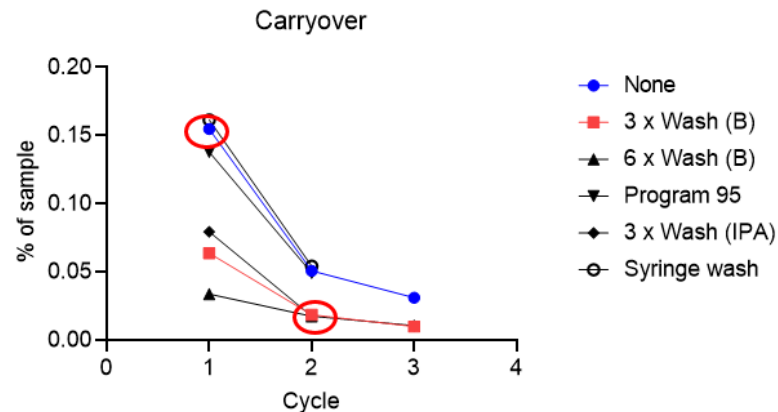
ISのいずれのスキャンフィルターを用いても検量線は同等

基材への吸着

溶媒中標準試料の測定バイアルへの吸着



溶媒中標準試料のLCシステムへの吸着



LCシステムの洗浄とブランクサンプルによって、0.02%以下のキャリーオーバーに

その後Plasmaからの抽出を検討したところ、洗浄及びブランクサンプル無しでもキャリーオーバーはほとんど認められず(0.012%以下)、洗浄及びブランクサンプルは適用せず

1 μ g/mL 導入直後runの残存率
*検量線レンジを1000倍にすると、0.02%以下に抑えたい

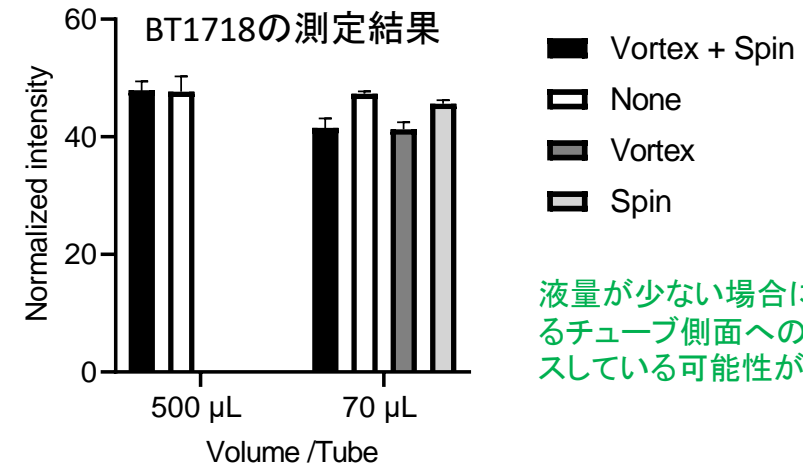
調製したQC試料の保管チューブへの吸着

* QC試料において、真度が10%弱上振れする事象が発生(再現あり)
→QC試料と検量線試料の保管液量が異なる(凍結保存時のみ認められる)

	Nominal Conc. (nM)	Determined conc. (nM)	CV (%)	Accuracy (%)
QC1	0.3	0.343387546	6.1	114.46
QC2	0.9	1.024023886	7.2	113.78
QC3	90	100.9183959	4.48	112.13
QC4	240	275.5716626	3.24	114.82

繰り返し評価で15%を上回る事例がある

QC試料保管液量(500 μ L/tube)と検量線試料保管液量(70 μ L/tube)を比較
*凍結試料であり、解凍後ボルテックスと遠心を行っていたため、この操作を比較



液量が少ない場合に、ボルテックスによるチューブ側面への拡散で吸着によりロスしている可能性が示唆

	Nominal Conc. (nM)	Determined conc. (nM)	CV (%)	Accuracy (%)
QC1	0.3	0.308935566	6.53	102.98
QC2	0.9	0.853058423	4.82	94.78
QC3	90	83.51533182	2.48	92.79
QC4	240	228.6081509	2.08	95.25

ボルテックスを実施せず再評価し、上振れの解消を確認

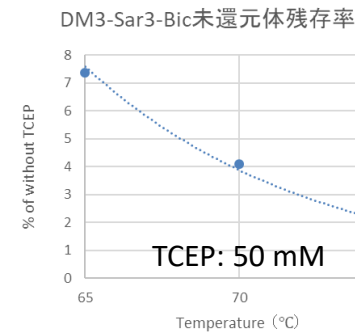
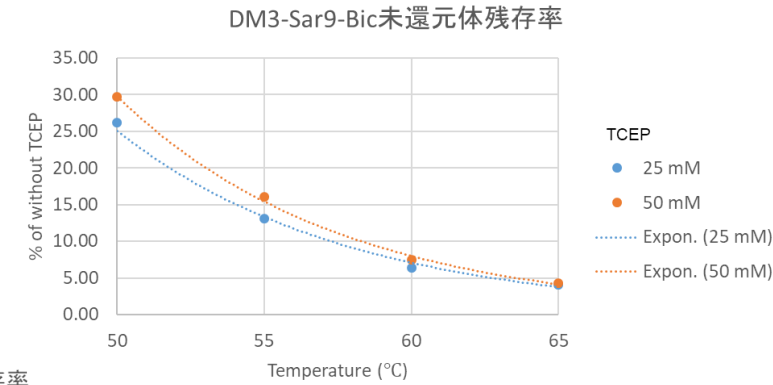
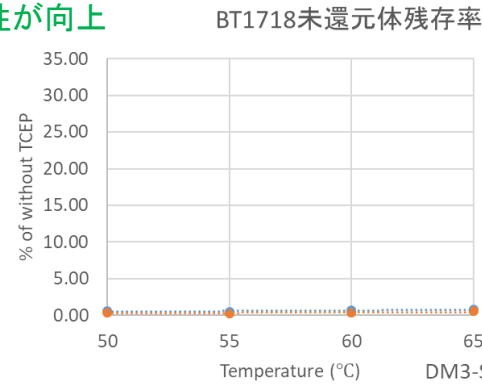
前処理（溶媒、誘導体化温度、試薬の質）

ISの抽出液への導入（BT1718 intact分析）

- A: Plasma + IS in ACN with 0.1% FA 直入れしないことで再現性が向上
 B: Plasma + IS in 50% ACN with 0.1%FA + ACN with 0.1% FA

IS response (DM3-Sar9-Bic)	Method A		Method B	
	mean	CV (%)	mean	CV (%)
Scan filter				
M+3H+/M+3H+-H ₂ O	32518	24.45	176507	3.65
M+3H+/M+3H+-H ₂ O-CO ₂	13563	26.19	61548	3.81
M+3H+-H ₂ O/M+3H+-H ₂ O-CO ₂	37057	17.79	207487	2.85

ISの還元条件（ペイロード分析）



DM3のかさ高さのためか、より高い還元温度が必要
 (スぺーサー数も還元温度と逆相関)

⇒ 反応温度を上げ残存率をコントロール(2%を切る75°Cへ)

ISの還元バッファーへの導入（ペイロード分析）

- A: Plasma + IS in 50 mM AB 直入れしないことで再現性が向上
 B: Plasma + IS in plasma + 50 mM AB

IS response (DM3-Sar3-Bic)	Method A		Method B	
	mean	CV (%)	mean	CV (%)
Scan filter				
DM3-VP	686816	9.42	920876	6.53

本日の内容

1. 研究班の紹介
2. 研究班で構築した分析法の紹介
3. 構築課題で得られた課題
- 4. 今後の計画**

研究班の今後の計画

- ・BT1718に対する血漿からの濃度測定法について、多施設バリデーションを実施し、分析系移管における課題抽出を行う
- ・Clyclorasin9A5及びPD-1/PD-L1阻害ペプチド(3003pep)に対する血漿からの濃度測定法について、課題解決に向けた追加解析、構築の継続/新規開始と簡易バリデーションを行う
- ・上記の分析系構築過程におけるアンケートを実施し、その結果の集計、班会議における議論や文献調査をもとに、技術指針の作成を行う

**ご静聴、
有難うございました！
Contact: saitok2@nihs.go.jp**

