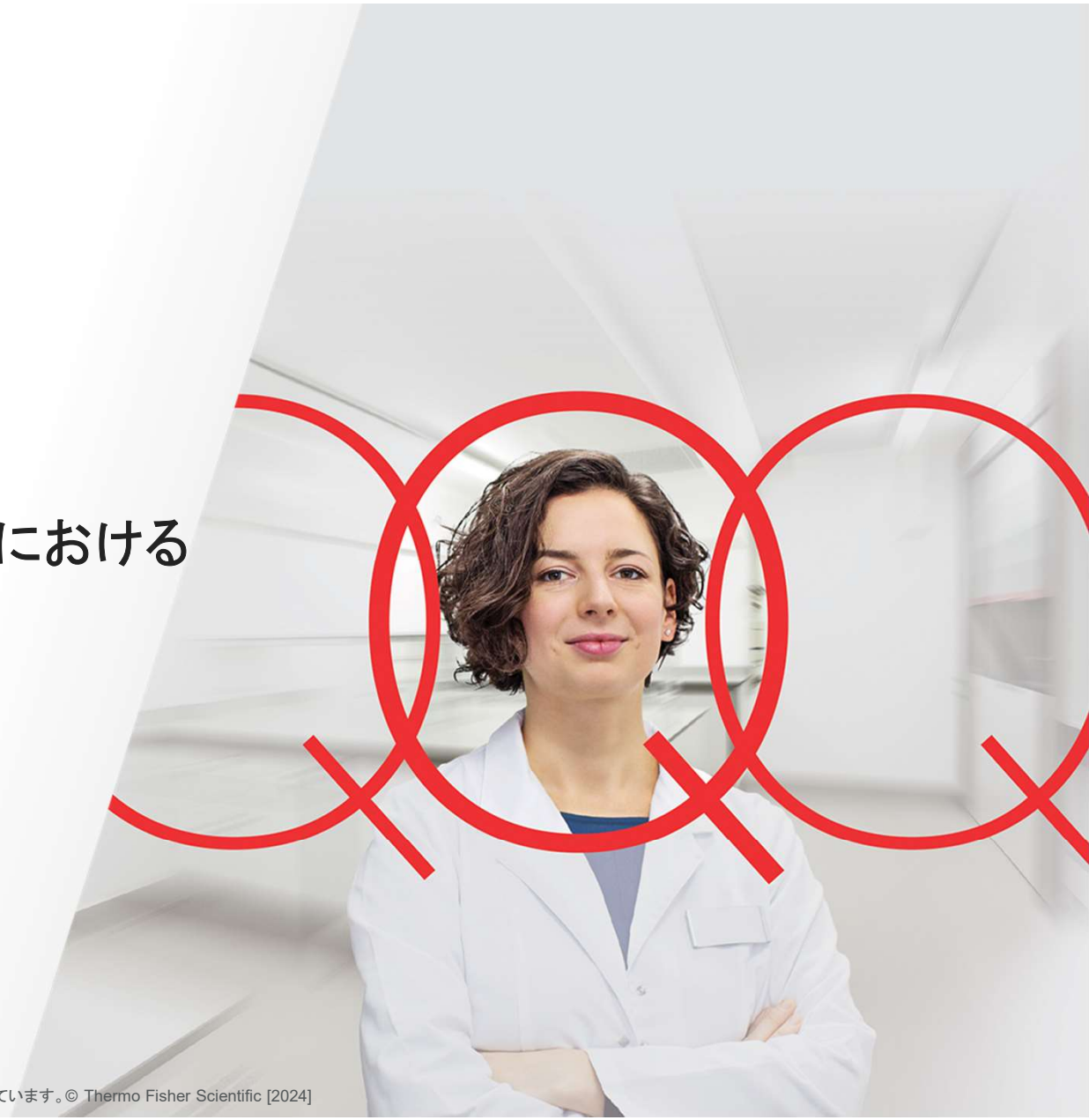


# ペプチドを対象としたバイオアナリシスにおける 課題解決へのアプローチ例の紹介

クロマトグラフィー&MS事業部  
CMSアプリケーション部 LC-MS

 The world leader in serving science



- **Cyclorazine9A5(環状ペプチド)の分析メソッド構築※)**
- Thermo Scientific™ FAIMS Pro Duo インターフェースを利用したメソッド構築
- 高分解能MSによるSurvivor-SIMメソッドの活用

※) AMED創薬基盤推進研究事業の課題である国立医薬品食品衛生研究所が主導する研究班「革新的医薬品開発のための次世代安全性評価法の開発・標準化と基盤データ取得」に参画させていただき、齊藤公亮先生ご主導のペプチド医薬品 バイオアナリシス研究班のサブトラックA1に参画してデータ取得させていただいた内容になります。

# Cyclorasin9A5 測定条件

装置	Thermo Scientific™ TSQ Altis™ Plusトリプル四重極質量分析計 + Thermo Scientific™ Vanquish™ Flex UHPLCシステム																																																																																																																								
移動相	A: 0.2%ギ酸水 B: 0.2%ギ酸含有アセトニトリル																																																																																																																								
グラジエント	<table border="1"> <thead> <tr> <th>No</th> <th>Time</th> <th>Flow [ml/min]</th> <th>%B</th> <th>Curve</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>0.000</td> <td></td> <td></td> <td>Equilibration</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>0.000</td> <td>0.300</td> <td>10.0</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>New Row</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>0.000</td> <td></td> <td></td> <td>Run</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>0.000</td> <td>0.300</td> <td>10.0</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>0.500</td> <td>0.300</td> <td>10.0</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>1.000</td> <td>0.300</td> <td>15.0</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>10.000</td> <td>0.300</td> <td>22.0</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>10.000</td> <td>0.600</td> <td>95.0</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>12.000</td> <td>0.600</td> <td>95.0</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>11</td> <td>12.000</td> <td>0.600</td> <td>10.0</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>12</td> <td>13.000</td> <td>0.600</td> <td>30.0</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>13</td> <td>13.000</td> <td>0.600</td> <td>95.0</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>14</td> <td>13.500</td> <td>0.600</td> <td>95.0</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>13.500</td> <td>0.600</td> <td>10.0</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>16</td> <td>14.500</td> <td>0.600</td> <td>30.0</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>17</td> <td>14.500</td> <td>0.600</td> <td>95.0</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>18</td> <td>15.000</td> <td>0.600</td> <td>95.0</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>19</td> <td>15.000</td> <td>0.600</td> <td>10.0</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>17.000</td> <td>0.600</td> <td>10.0</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>21</td> <td>17.000</td> <td>0.300</td> <td>10.0</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>22</td> <td>New Row</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>23</td> <td>20.000</td> <td></td> <td></td> <td>Stop Run</td> </tr> </tbody> </table>	No	Time	Flow [ml/min]	%B	Curve	1	0.000			Equilibration	2	0.000	0.300	10.0	5	3	New Row				4	0.000			Run	5	0.000	0.300	10.0	5	6	0.500	0.300	10.0	5	7	1.000	0.300	15.0	5	8	10.000	0.300	22.0	5	9	10.000	0.600	95.0	5	10	12.000	0.600	95.0	5	11	12.000	0.600	10.0	5	12	13.000	0.600	30.0	5	13	13.000	0.600	95.0	5	14	13.500	0.600	95.0	5	15	13.500	0.600	10.0	5	16	14.500	0.600	30.0	5	17	14.500	0.600	95.0	5	18	15.000	0.600	95.0	5	19	15.000	0.600	10.0	5	20	17.000	0.600	10.0	5	21	17.000	0.300	10.0	5	22	New Row				23	20.000			Stop Run
No	Time	Flow [ml/min]	%B	Curve																																																																																																																					
1	0.000			Equilibration																																																																																																																					
2	0.000	0.300	10.0	5																																																																																																																					
3	New Row																																																																																																																								
4	0.000			Run																																																																																																																					
5	0.000	0.300	10.0	5																																																																																																																					
6	0.500	0.300	10.0	5																																																																																																																					
7	1.000	0.300	15.0	5																																																																																																																					
8	10.000	0.300	22.0	5																																																																																																																					
9	10.000	0.600	95.0	5																																																																																																																					
10	12.000	0.600	95.0	5																																																																																																																					
11	12.000	0.600	10.0	5																																																																																																																					
12	13.000	0.600	30.0	5																																																																																																																					
13	13.000	0.600	95.0	5																																																																																																																					
14	13.500	0.600	95.0	5																																																																																																																					
15	13.500	0.600	10.0	5																																																																																																																					
16	14.500	0.600	30.0	5																																																																																																																					
17	14.500	0.600	95.0	5																																																																																																																					
18	15.000	0.600	95.0	5																																																																																																																					
19	15.000	0.600	10.0	5																																																																																																																					
20	17.000	0.600	10.0	5																																																																																																																					
21	17.000	0.300	10.0	5																																																																																																																					
22	New Row																																																																																																																								
23	20.000			Stop Run																																																																																																																					
注入量	5 uL																																																																																																																								
カラム	PN: 088647, mAb Pac RP 2.1 × 100 mm, 4 μm 1500 Å (カラム温度:75 °C)																																																																																																																								
トランジション(SRM)	Cyclorasin9A5: 529.8 > 524.2 (positive, 3z) Cyclorasin9A54(IS): 549.1 > 543.4 (positive, 3z)																																																																																																																								
前処理	5倍量の0.1%ギ酸含有メタノールを添加してボルテックスした後、約等量の0.1%ギ酸水を添加して遠心分離																																																																																																																								

# 簡易バリデーション

## 選択性

Analyte	Blank Matrix	Peak Area	Peak area ratio (%)
Cyclorasin 9A5	LLOQ	506	-
	Selectivity D	0	0.0
	Selectivity E	0	0.0
	Selectivity F	0	0.0
Cyclorasin 9A54 (IS)	LLOQ	463200	-
	Selectivity D	0	0.0
	Selectivity E	0	0.0
	Selectivity F	0	0.0

## キャリーオーバー

Analyte	Sample	Peak Area	Peak area ratio (%)
Cyclorasin 9A5	LLOQ (0.1 ng/mL)	506	-
	CarryoverBlank-1	173	34.2
	CarryoverBlank-2	-	-
	CarryoverBlank-3	-	-
Cyclorasin 9A54 (IS)	LLOQ	463200	-
	CarryoverBlank-1	0	0.0
	CarryoverBlank-2	-	-
	CarryoverBlank-3	-	-

## 検量線

Analyte	Nominal Concentration (ng/mL)	Normalized Peak ratio	Back-calculated Concentration (ng/mL)	Accuracy (%)
Cyclorasin 9A5	0.1	0.00109	0.10	99.0
	0.2	0.00320	0.20	100.0
	0.5	0.01028	0.54	107.4
	1	0.01887	0.95	94.7
	2	0.04012	1.96	98.0
	5	0.10065	4.84	96.9
	10	0.20612	9.87	98.7
	20	0.42226	20.17	100.9
	50	1.06042	50.59	101.2
	100	2.16332	103.15	103.2

## QC (真度・精度)

Analyte	Nominal (ng/mL)	LLQC	MQC	HQC
Cyclorasin 9A5	0.1	0.1	8	80
	Observed (ng/mL)	0.089	7.56	79.0
		0.090	7.66	78.8
	Mean	0.086	7.64	78.9
		0.088	7.62	78.9
	SD	0.0021	0.0545	0.0993
	CV (%)	2.36	0.71	0.13
	Accuracy (%)	88.3	95.2	98.7

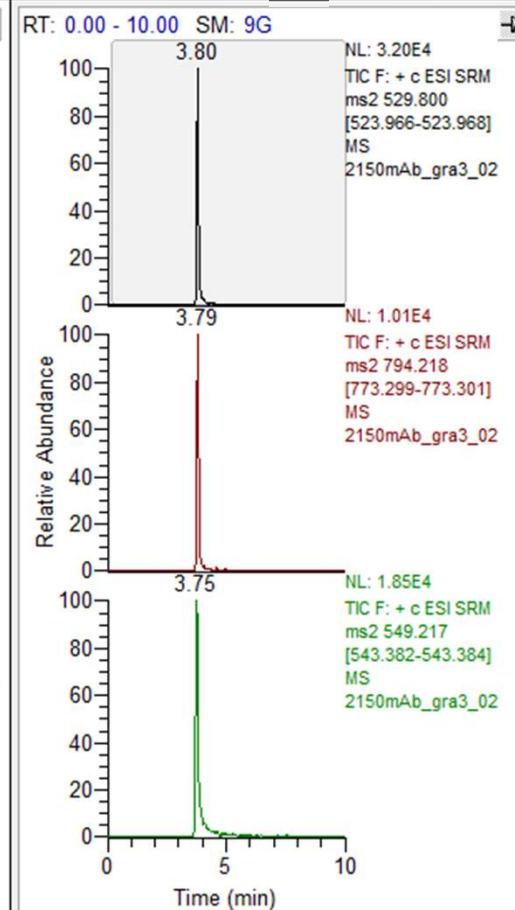
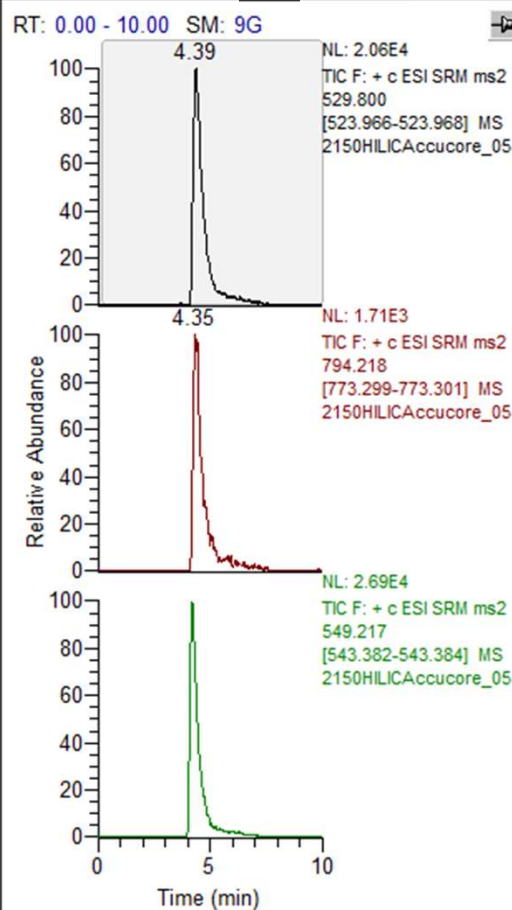
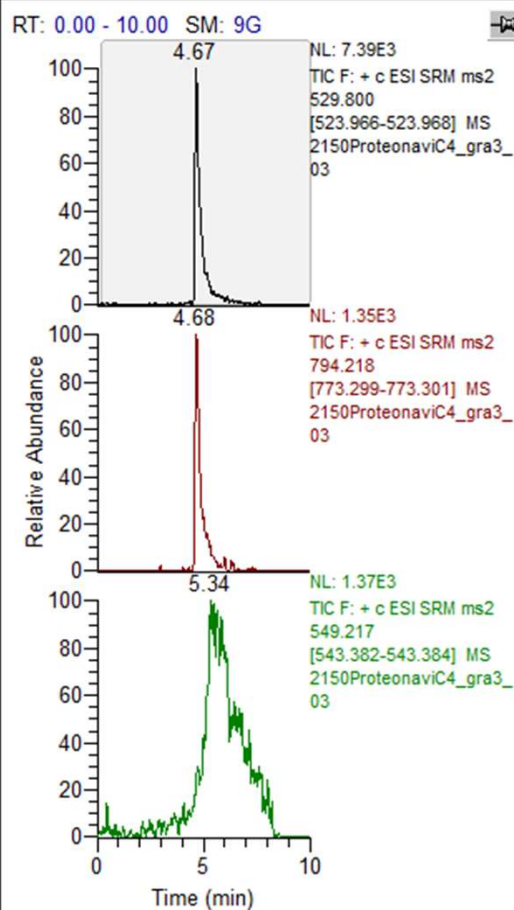
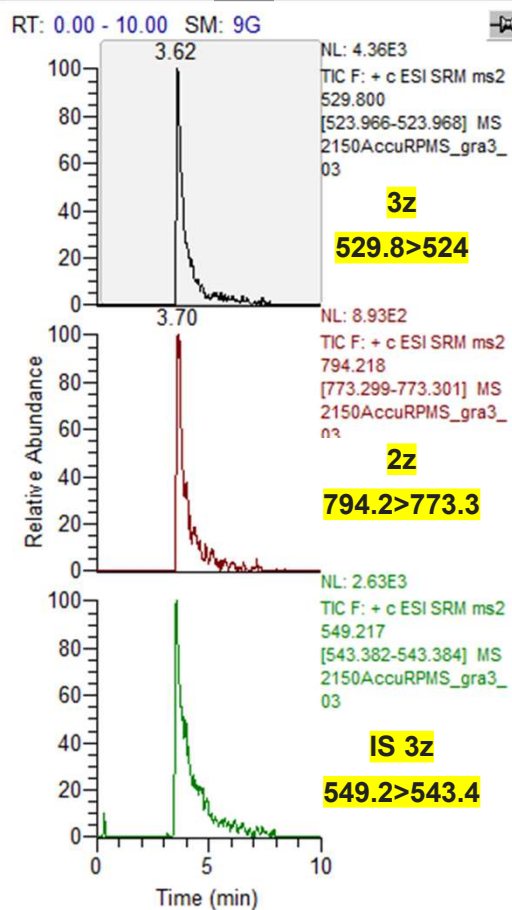
# カラムの検討

## Thermo Scientific™ Accucore™ RP-MS

C4

## Thermo Scientific™ Accucore™ HILIC

## Thermo Scientific™ MAbPac™1500 Å





# Thermo Scientific™ MAbPac™ RP LC カラム



カラムフォーマット	Analytical Column
直径 (メートル法)	2.1 mm
長さ (メートル法)	100 mm
最大圧力	4000 psi (275 bar)
粒子径	4 μm
pH	0 to 14
孔径	1500 Å
温度	<110°C
固定相	Phenyl (Ph)
製品ライン	MAbPac
梱包材	DVB (Divinylbenzene) Polymer
カラムタイプ	Reversed Phase
相	Reversed Phase
技術	Bio-LC
Unit Size	Each

## 逆相条件下で HPLC や MS に使用される有機溶媒に対応

- 樹脂は疎水性の超微細孔 4 μm ポリマー球状を基にしています
- 広範囲の pH (0 ~ 14) および高温 (110 °C まで) で安定です

## 低キャリアオーバー

- 細孔径 1,500 Å のポリマー樹脂
- 低キャリアオーバーで、タンパク質を効率的に分離できるように最適化されています

## LC/UV や LC/MS に用いることができるようにデザイン

- モノクローナル抗体や類縁物質に対する優れた分離能
- 低キャリアオーバー
- MS との優れた互換性
- 幅広い pH に対応 : 0 ~ 14
- 高温安定性 : 最高 110 °C
- ハイスループット

# 移動相の検討

A:0.1%ギ酸

B: AcN

A:0.1%ギ酸

B: MeOH

A:0.1%酢酸

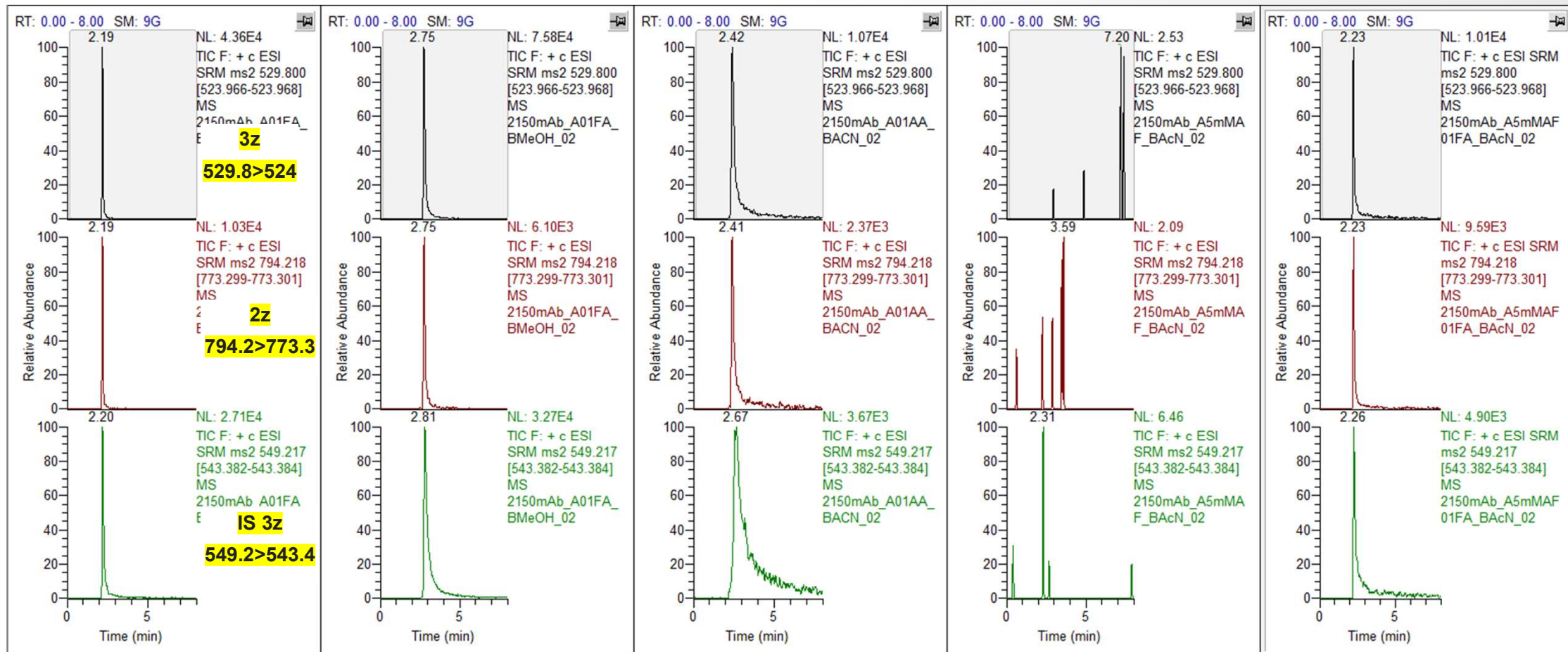
B: AcN

A:5 mMギ酸アンモ

B: AcN

A:5 mMギ酸アンモ+0.1%ギ酸

B: AcN



# グラジエントの検討

分析対象化合物であるCyclorazine9A5は流路やカラム内に残存しやすく、グラジエント時間を最適化する必要がありました。

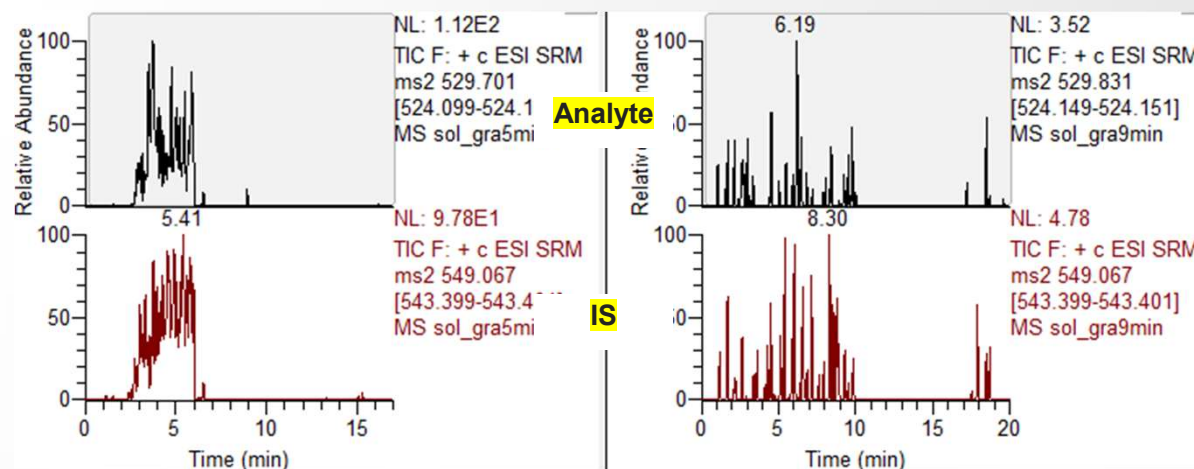
下図に示すのは、10 ng/mLのサンプルを繰り返し測定した後にSolventを測定した際のクロマトグラムで、左に示すのが赤枠で囲む範囲のグラジエント時間が5 minのクロマトグラム、右に示すのが同グラジエント時間9 minのクロマトグラムです。グラジエント時間が5 minだとシステム内に残存して次の測定に影響を与える懸念があったため9 minに設定しています。

No	Time	Flow [ml/min]	%B	Curve
1	0.000		Equilibration	
2	0.000	0.300	10.0	5
3	New Row			
4	0.000		Run	
5	0.000	0.300	10.0	5
6	0.500	0.300	10.0	5
7	1.000	0.300	15.0	5
8	10.000	0.300	22.0	5
9	10.000	0.600	95.0	5
10	12.000	0.600	95.0	5
11	12.000	0.600	10.0	5
12	13.000	0.600	30.0	5
13	13.000	0.600	95.0	5
14	13.500	0.600	95.0	5
15	13.500	0.600	10.0	5
16	14.500	0.600	30.0	5
17	14.500	0.600	95.0	5
18	15.000	0.600	95.0	5
19	15.000	0.600	10.0	5
20	17.000	0.600	10.0	5
21	17.000	0.300	10.0	5
22	New Row			
23	20.000		Stop Run	



5 min グラジエント

9 min グラジエント



10 ng/mLサンプルを繰り返し測定後のSolventのクロマトグラム



# 前処理の検討 (AcN)

9倍量 AcN

STD

Plasma

9倍量 0.1%FA AcN

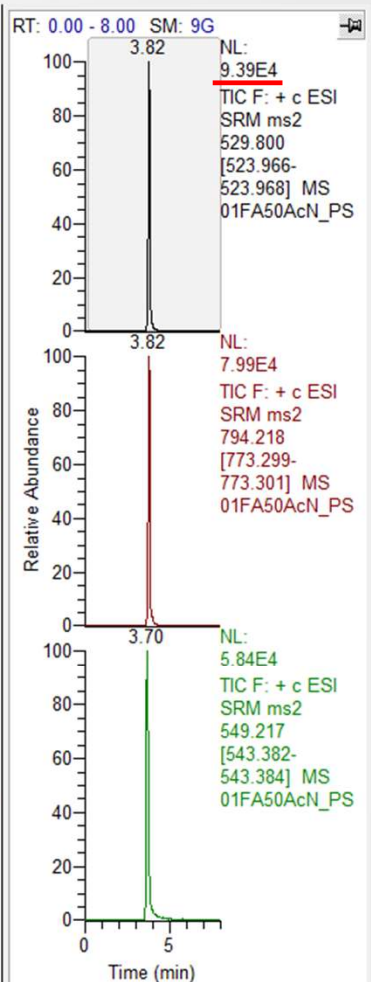
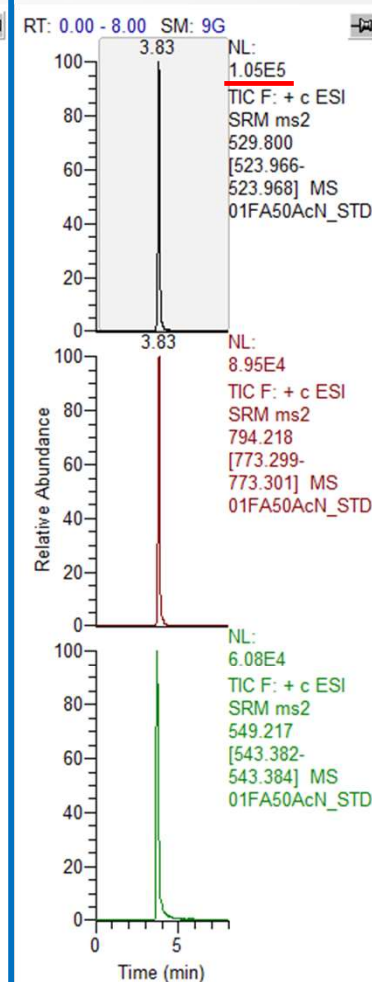
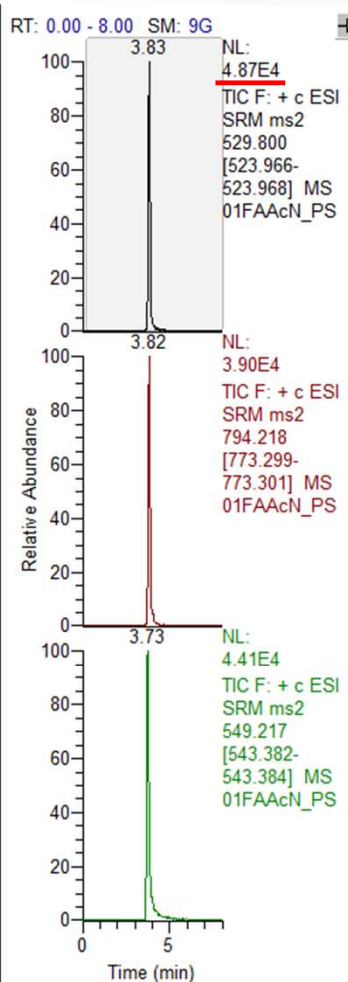
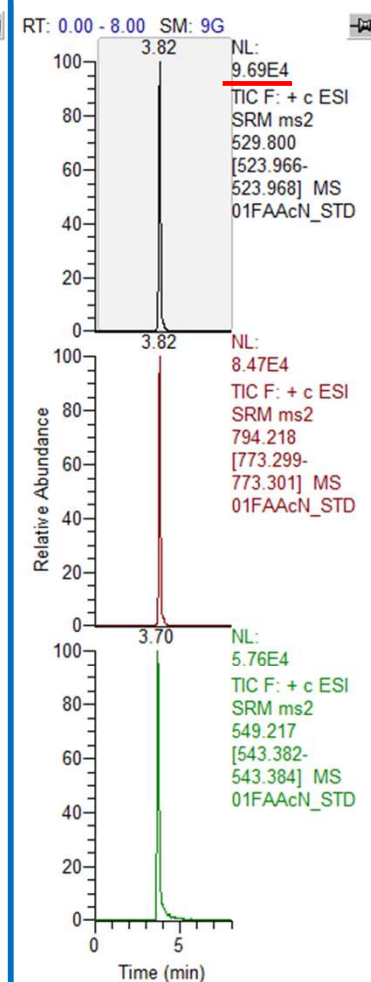
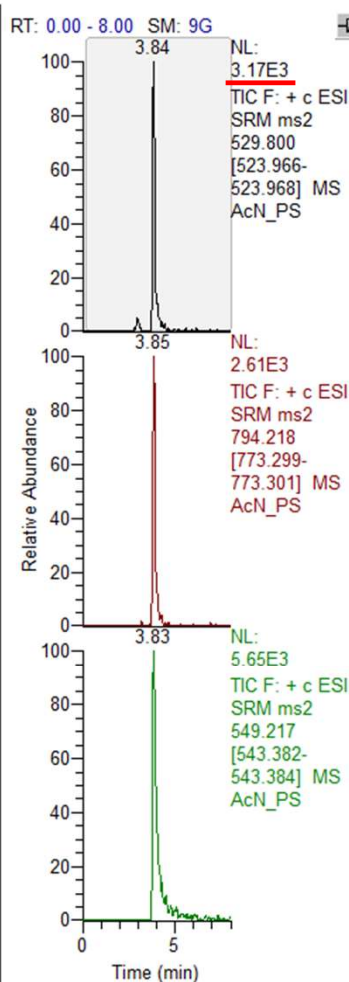
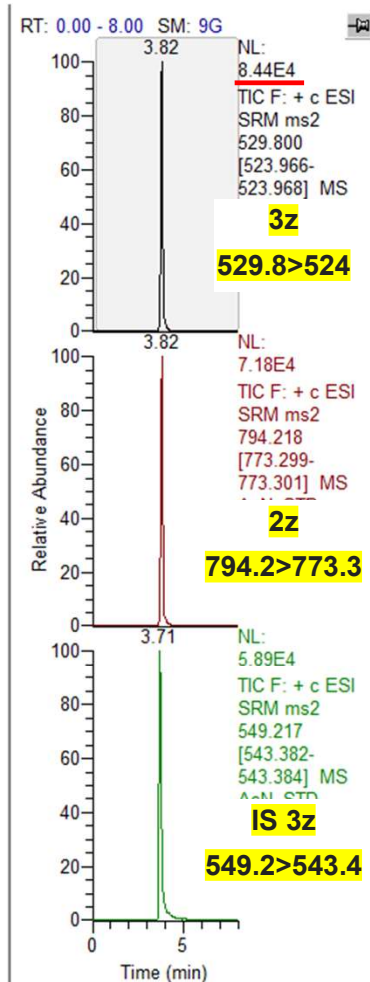
STD

Plasma

5倍量 0.1%FA AcNで徐タン後に0.1%FA水を添加

STD

Plasma



# 前処理の検討 (MeOH)

9倍量 MeOH

9倍量 0.1%FA MeOH

5倍量 0.1%FA MeOHで徐タン後に0.1%FA水を添加

STD

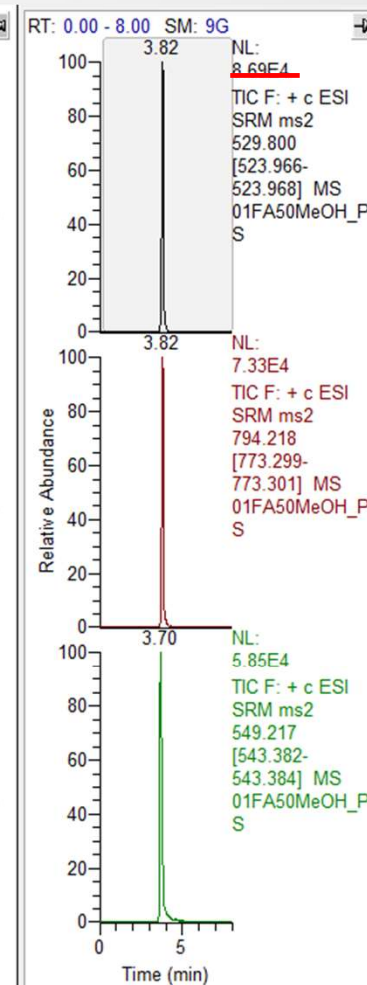
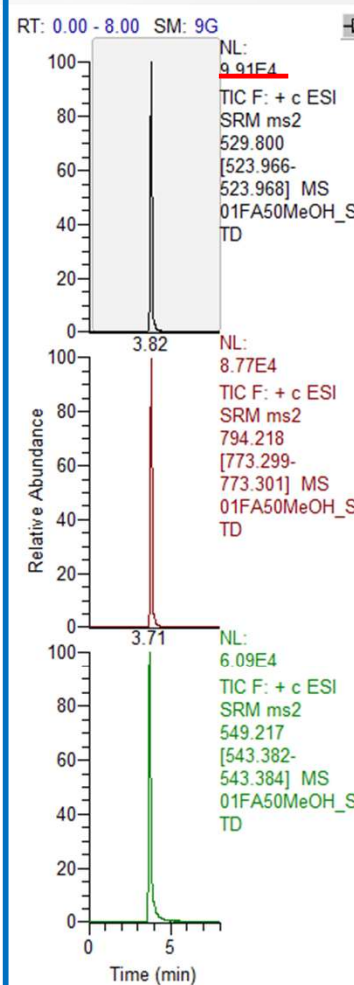
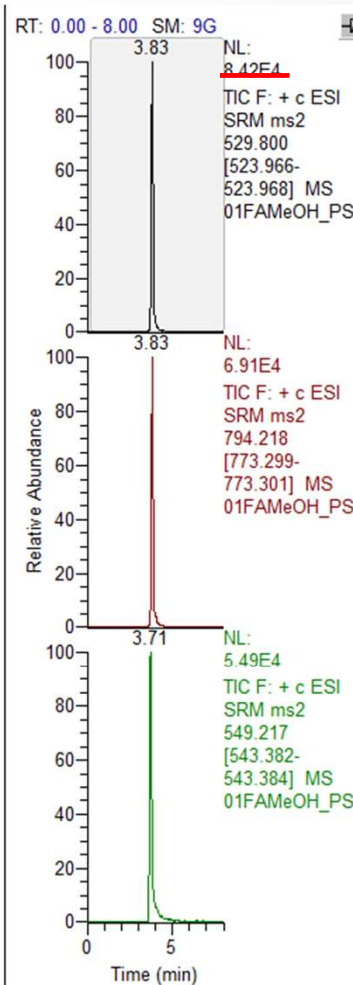
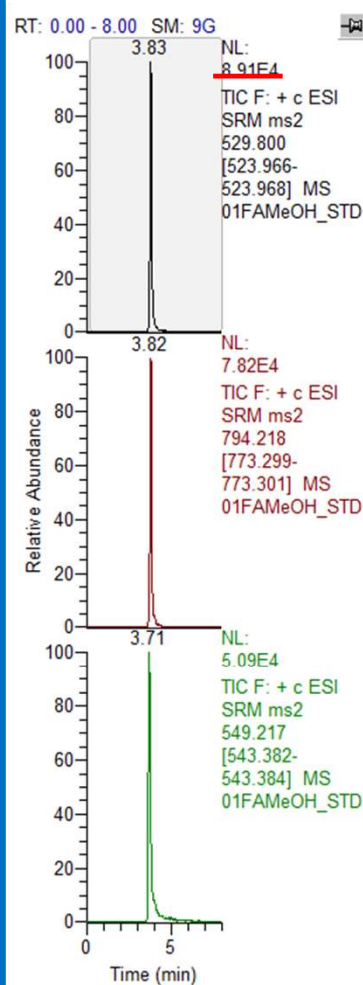
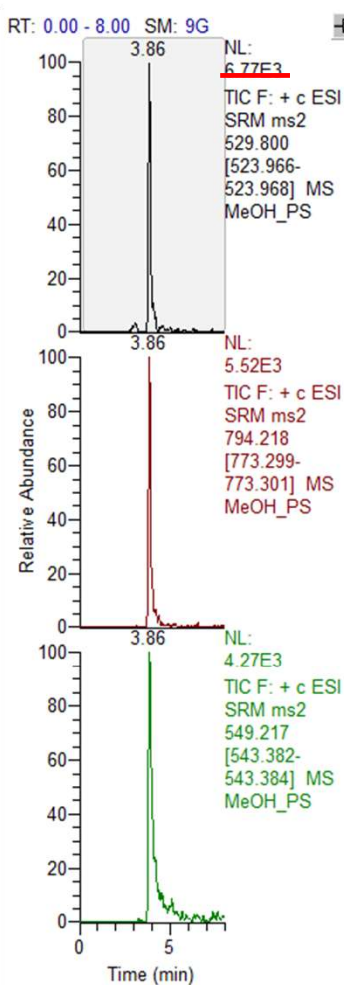
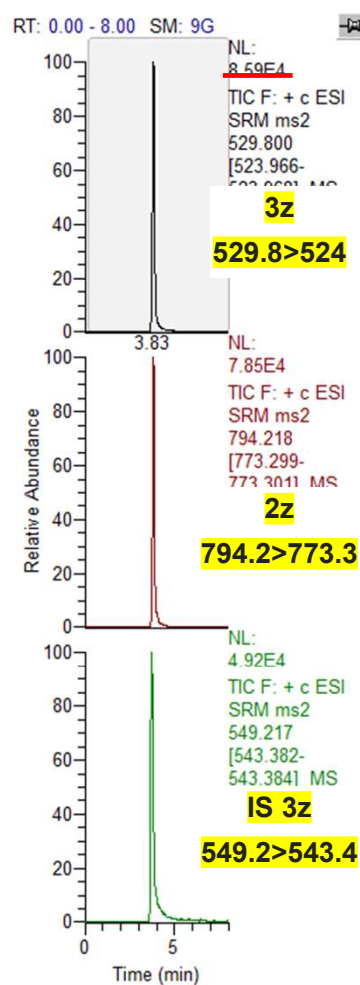
Plasma

STD

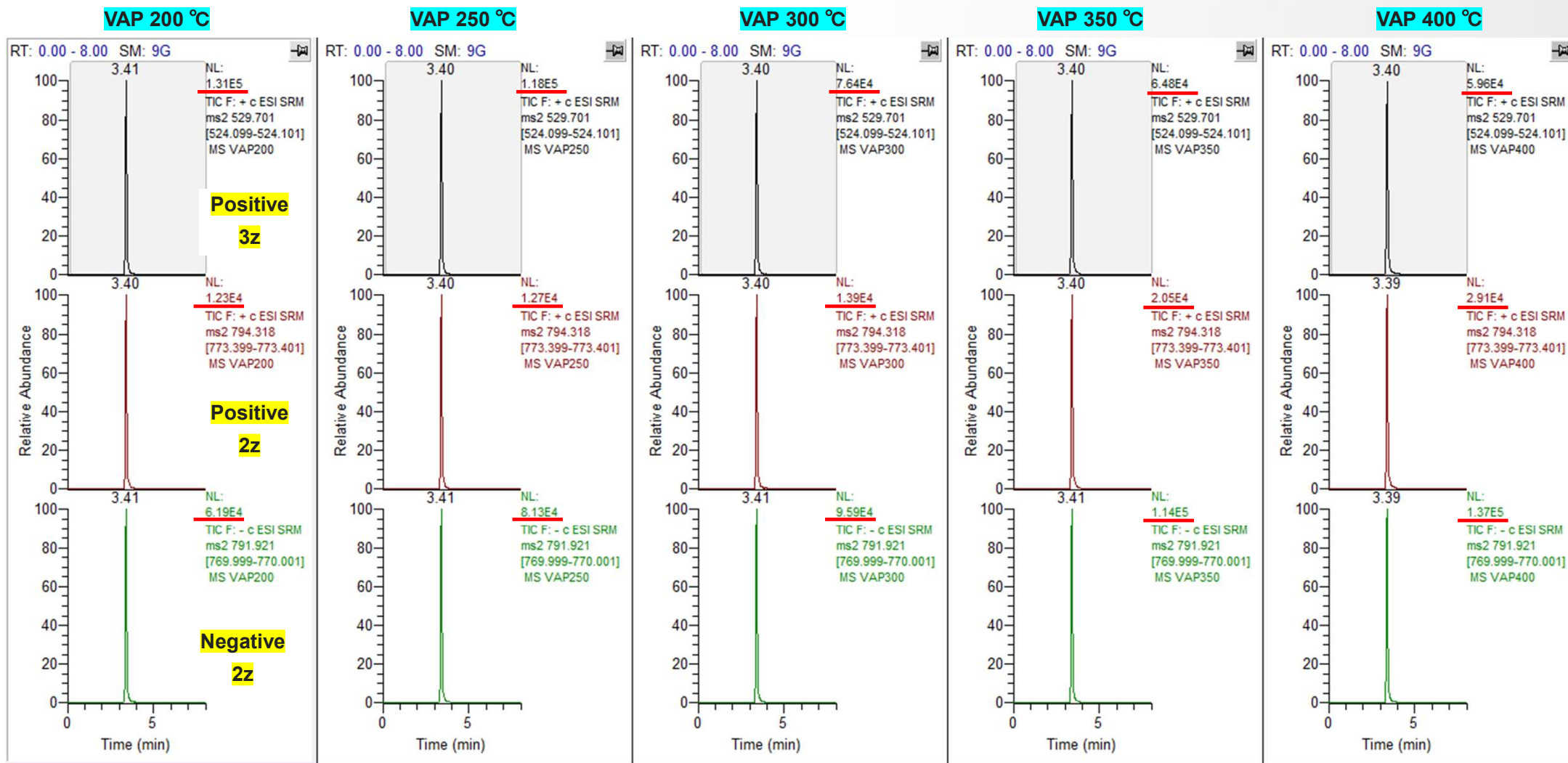
Plasma

STD

Plasma



# 参考：イオンソースの最適時における各価数のモニター



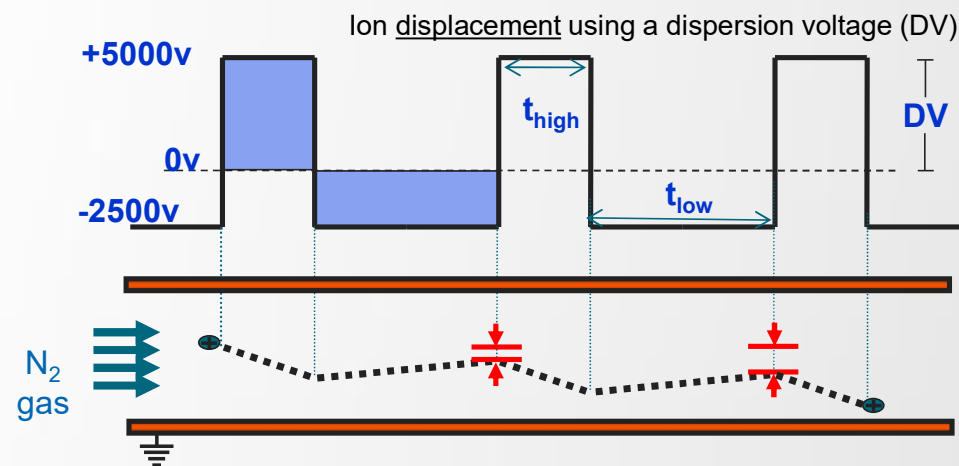
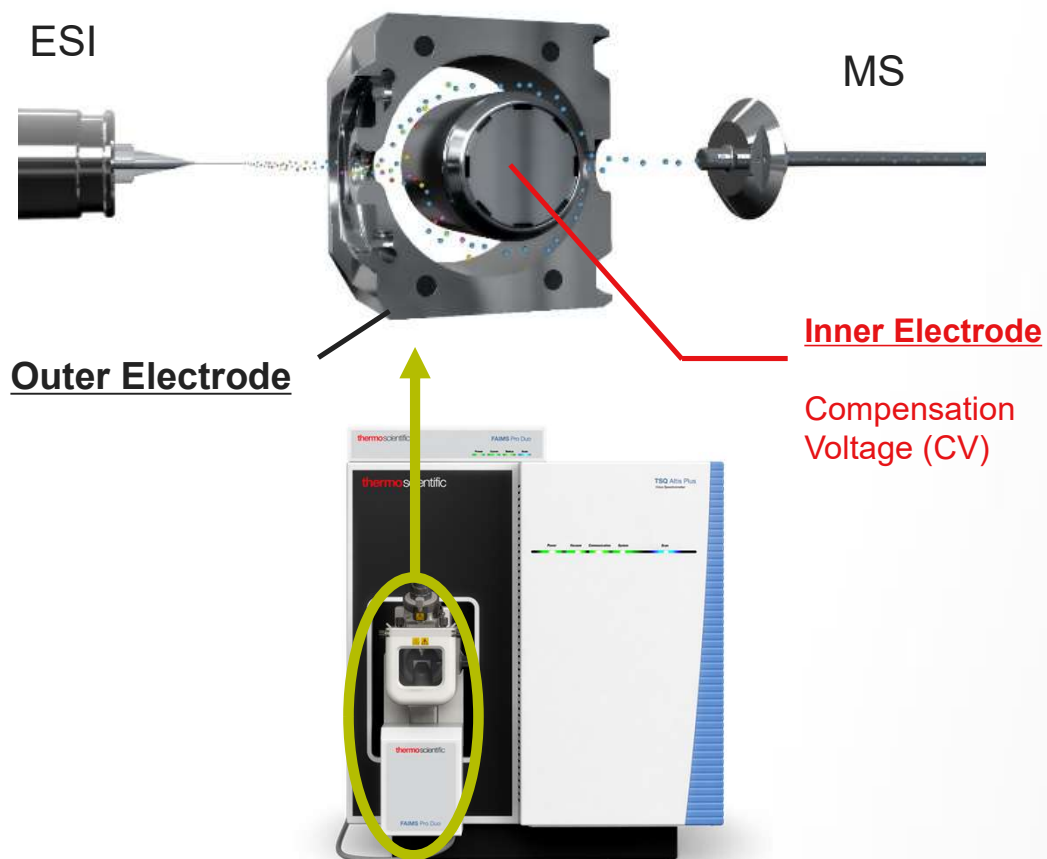
- **Cyclorazine9A5(環状ペプチド)の分析メソッド構築※)**
  - 細孔径1500 Åのポリマー樹脂を担体としたカラムとギ酸-AcN系移動相の使用
  - システムへの残存を抑えるためのグラジエントの工夫
  - 回収率およびインジェクションボリュームを考慮した前処理溶媒の選択
  - 最適な価数の選択のためのイオンソース最適化時における各価数のモニター
  
- **FAIMS Pro Duo インターフェースを用いたメソッド構築における利点**
  
- **高分解能MSによるSurvivor-SIMメソッドの活用**

※) AMED創薬基盤推進研究事業の課題である国立医薬品食品衛生研究所が主導する研究班「革新的医薬品開発のための次世代安全性評価法の開発・標準化と基盤データ取得」に参画させていただき、齊藤公亮先生ご主導のペプチド医薬品 バイオアナリシス研究班のサブトラックA1に参画してデータ取得させていただいた内容になります



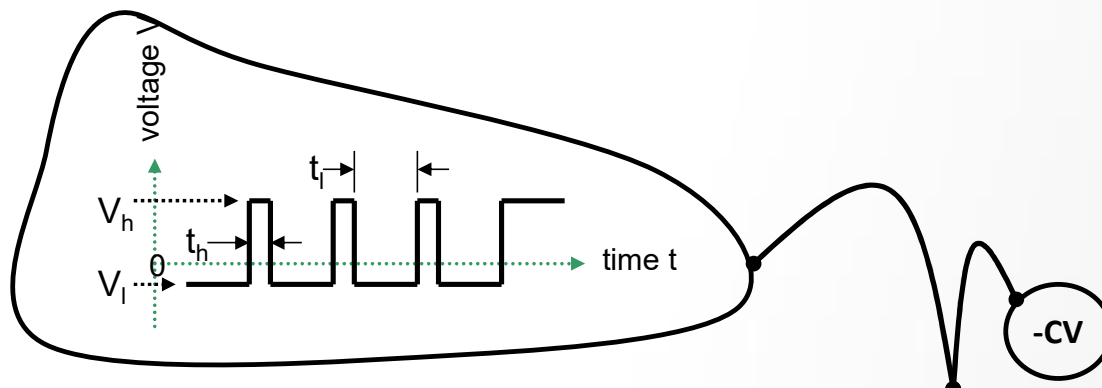
# FAIMSテクノロジーとは?

high-Field Asymmetric waveform Ion Mobility Spectrometry



# FAIMSテクノロジーとは?

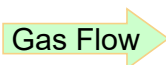
Ion selection using a Compensation Voltage (CV)



ESI source



y



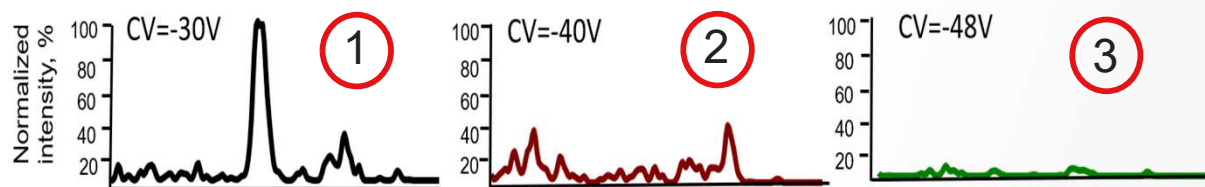
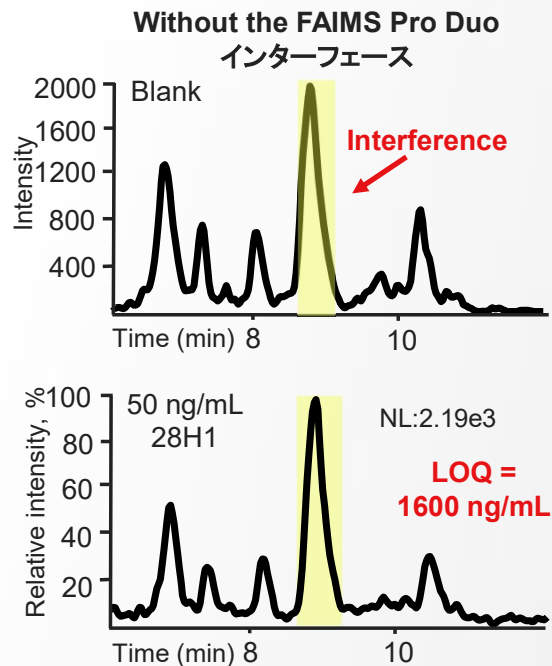
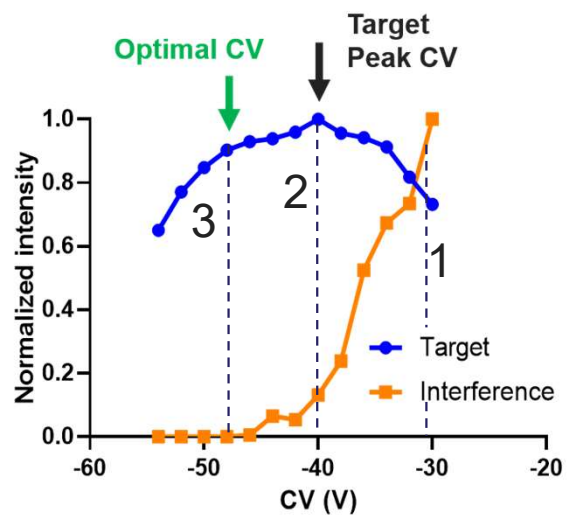
To the MS

Only Green ion  
has correct CV



# Compensation Voltage (CV) の選択

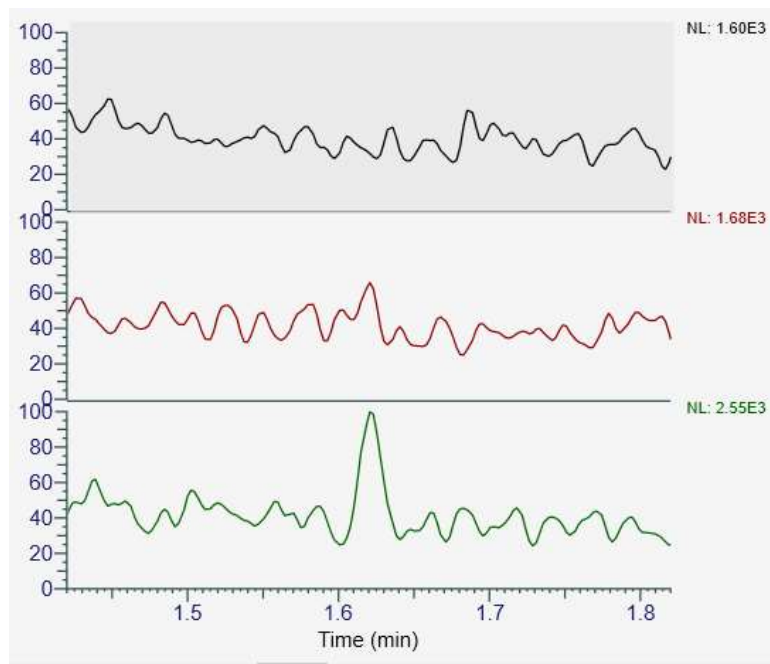
## CV値の設定



- マトリックス: ラット血漿
- **32倍のLOQの改善**

# FAIMSに期待する効果／Propranolol

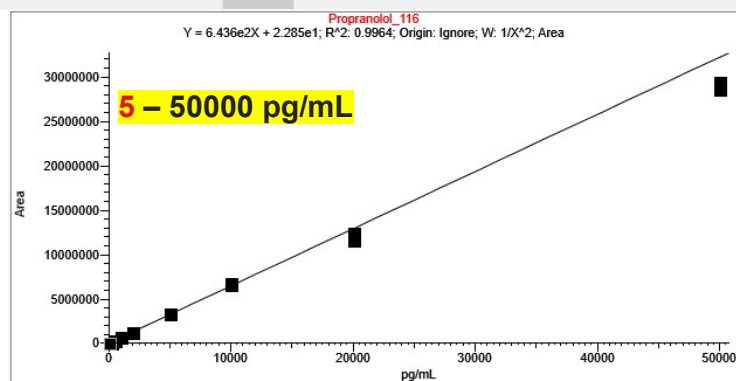
FAIMS なし



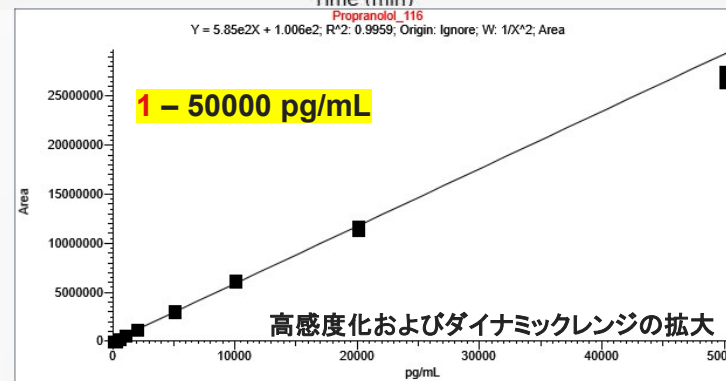
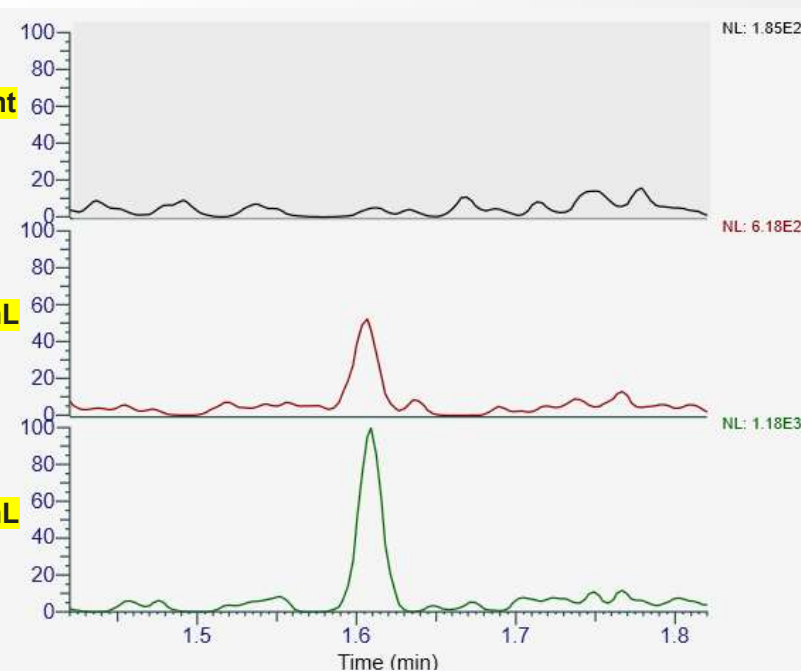
Solvent

1 pg/mL

2 pg/mL



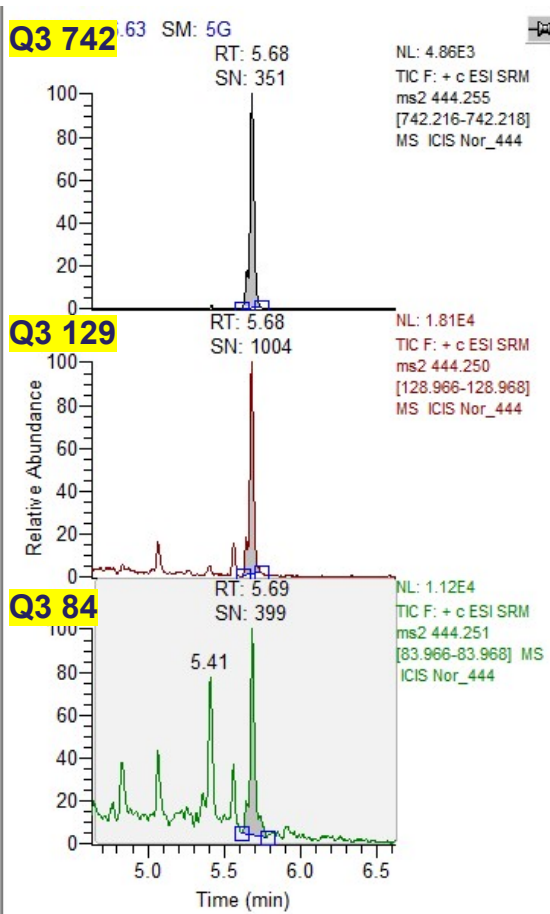
FAIMS あり



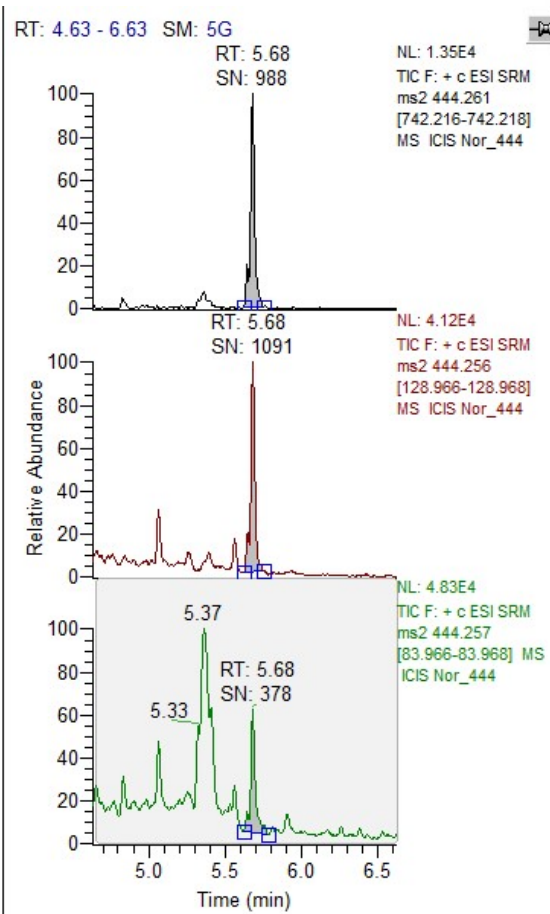


# ウマ尿サンプル中のペプチド検出 / Hexarelin ( $m/z$ 444, 2z)

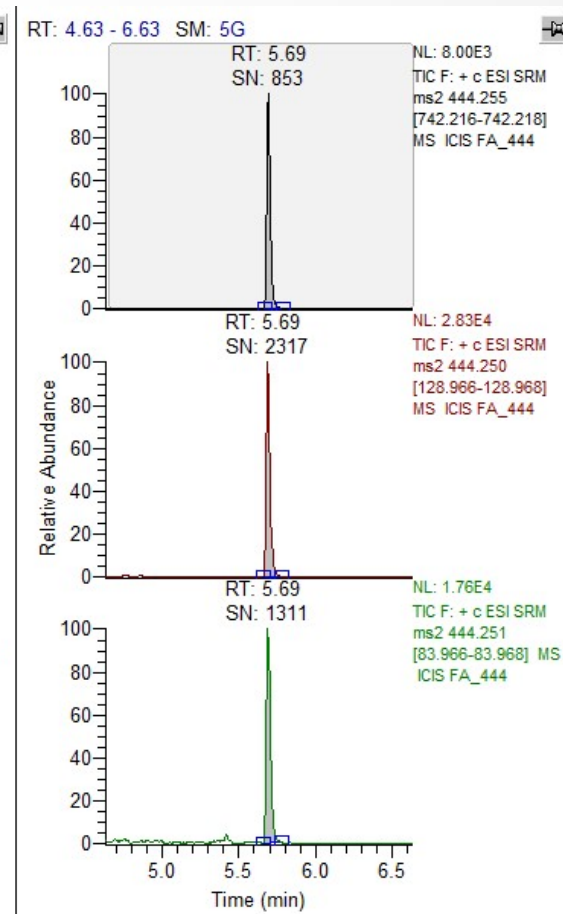
FAIMS なし  
分解能 0.7



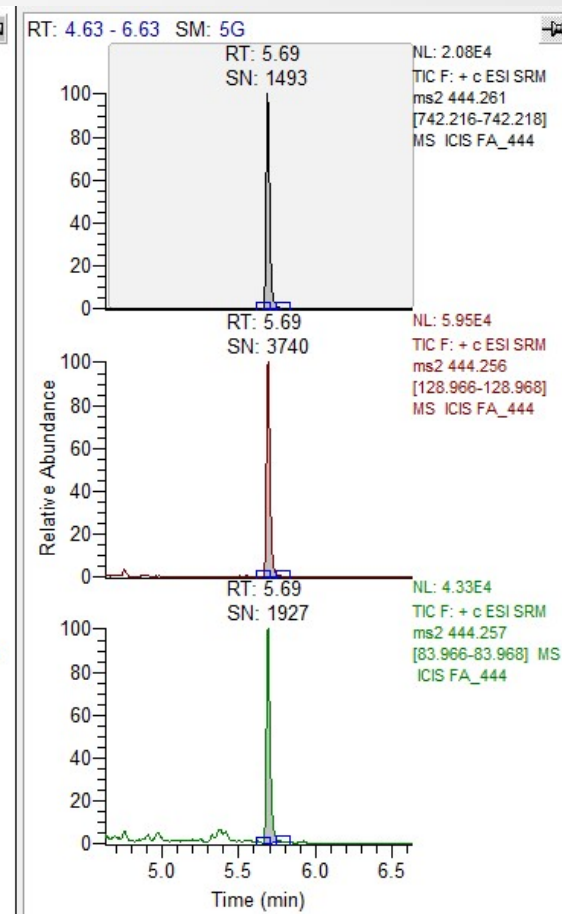
FAIMS なし  
分解能 2.0



FAIMS あり  
分解能 0.7

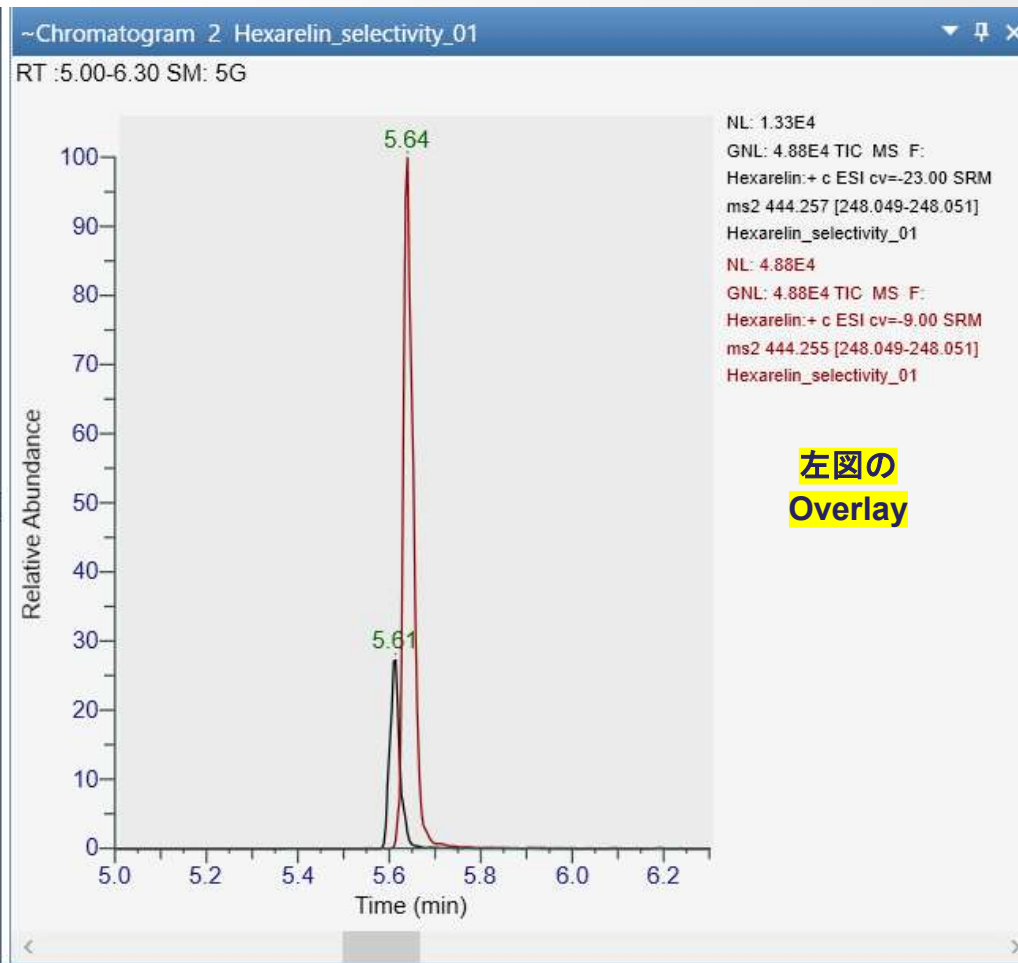
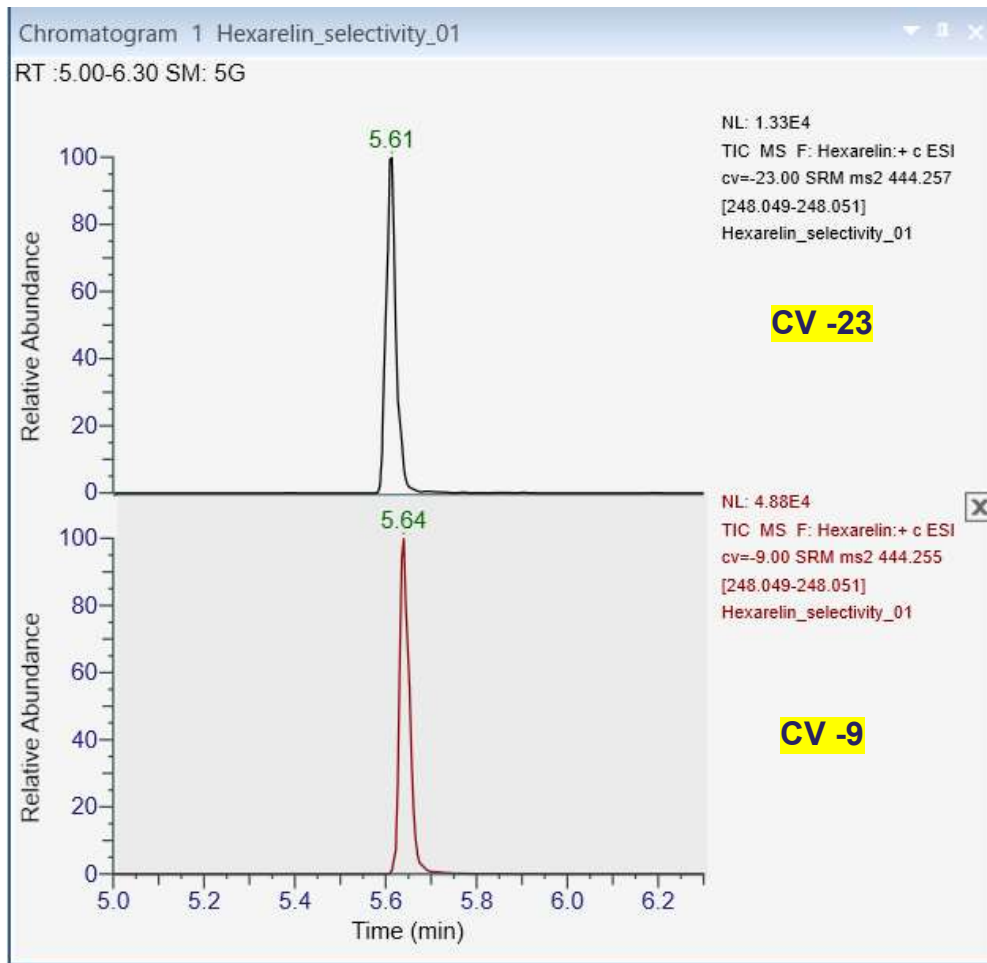


FAIMS あり  
分解能 2.0



データ提供元: 公益財団法人 競走馬理化学研究所さま

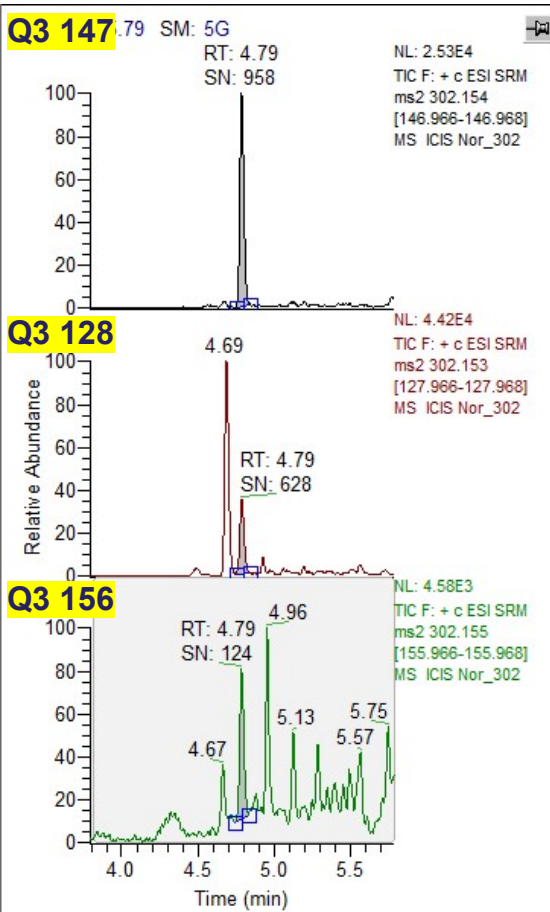
# Hexarelin / ショルダーピークとの分離



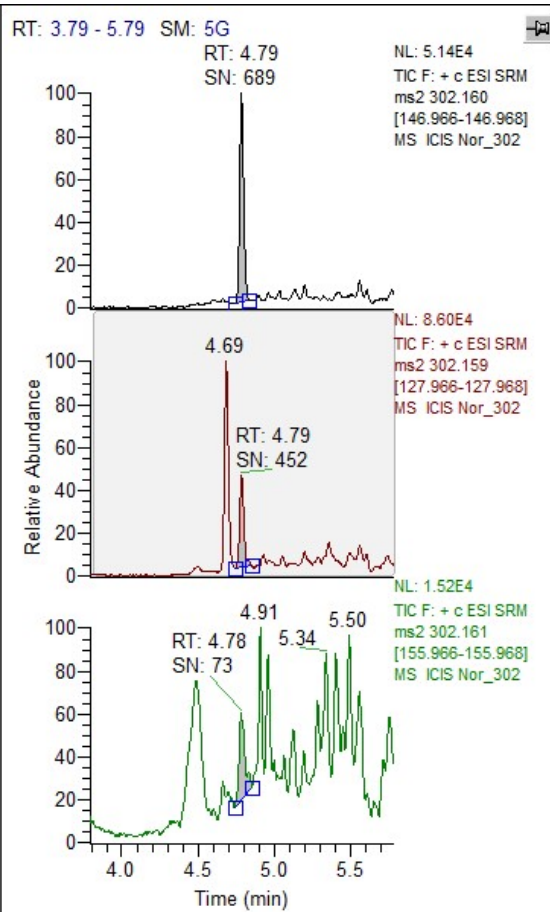
データ提供元: 公益財団法人 競走馬理化学研究所さま

# ウマ尿サンプル中のジペプチド検出 / TB-500 M5 ( $m/z$ 302, 1z)

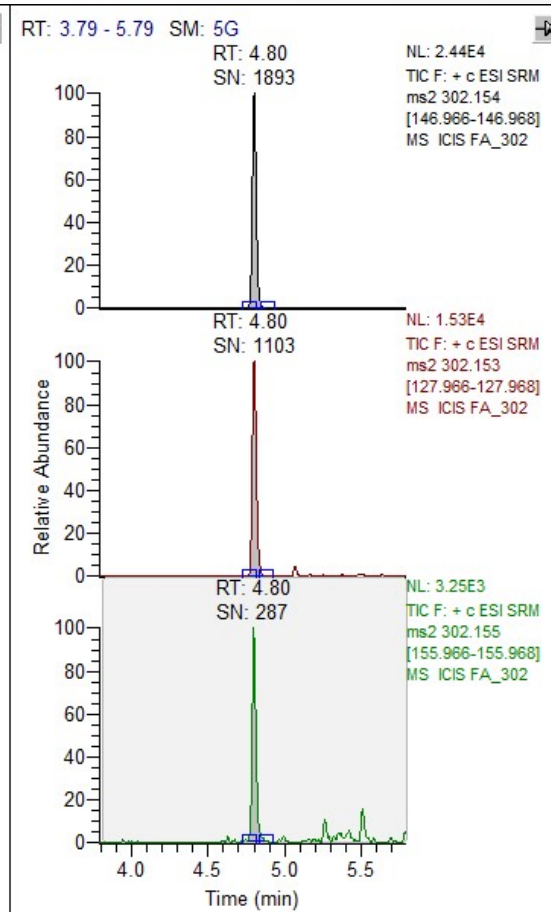
FAIMS なし  
分解能 0.7



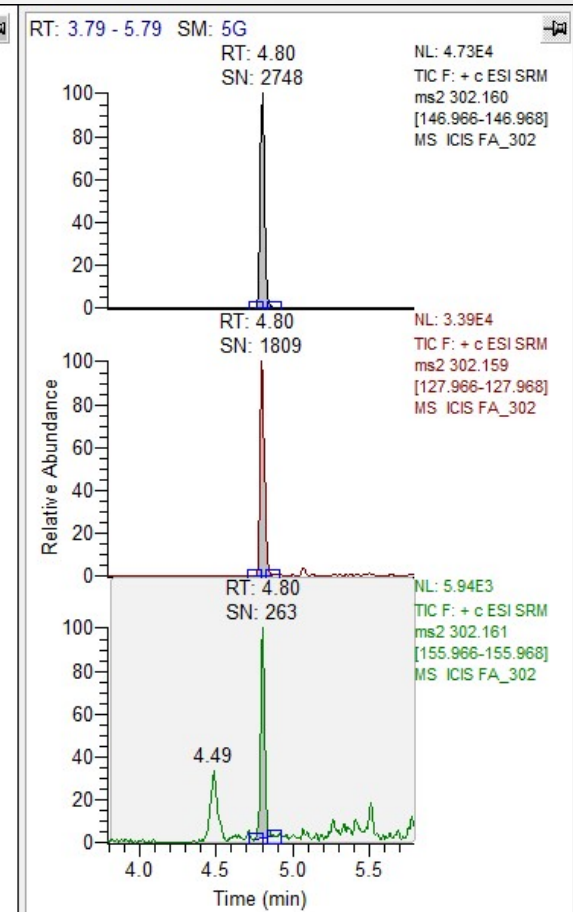
FAIMS なし  
分解能 2.0



FAIMS あり  
分解能 0.7



FAIMS あり  
分解能 2.0



- **Cyclorazine9A5(環状ペプチド)の分析メソッド構築※)**
  - 細孔径1500 Åのポリマー樹脂を担体としたカラムとギ酸系移動相の使用
  - システムへの残存を抑えるためのグラジエントの工夫
  - 回収率およびインジェクションボリュームを考慮した前処理溶媒の選択
  - 最適な価数の選択のためのイオンソース最適化時における各価数のモニター
  
- **FAIMS Pro Duo インターフェースを用いたメソッド構築における利点**
  - 特異性向上による感度(S/N)向上
  - 特異性は低いが強度の高いイオン(インモニウムイオンなど)の利用や分解能を広げることによる感度向上
  - 夾雑やショルダーピーク排除による前処理やLC条件の簡略化、選択できる確認イオンの拡充
  
- **高分解能MSによるSurvivor-SIMメソッドの活用**

※) AMED創薬基盤推進研究事業の課題である国立医薬品食品衛生研究所が主導する研究班「革新的医薬品開発のための次世代安全性評価法の開発・標準化と基盤データ取得」に参画させていただき、  
 齊藤公亮先生ご主導のペプチド医薬品 バイオアナリシス研究班のサブトラックA1に参画してデータ取得させていただいた内容になります。

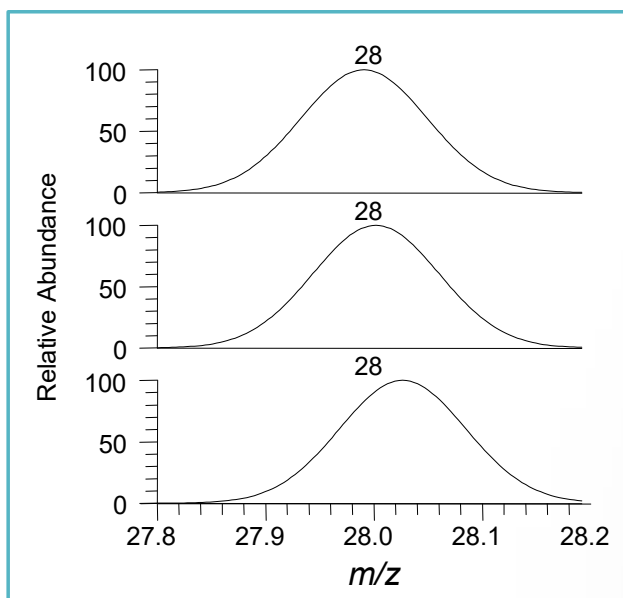


# 高分解能MSとは

$^1\text{H}$  : 1 Da  
 $^{12}\text{C}$  : 12 Da  
 $^{14}\text{N}$  : 14 Da  
 $^{16}\text{O}$  : 16 Da

ノミナル質量※	分子式	精密質量
28	CO	27.9949
28	$\text{N}_2$	28.0061
28	$\text{C}_2\text{H}_4$	28.0313

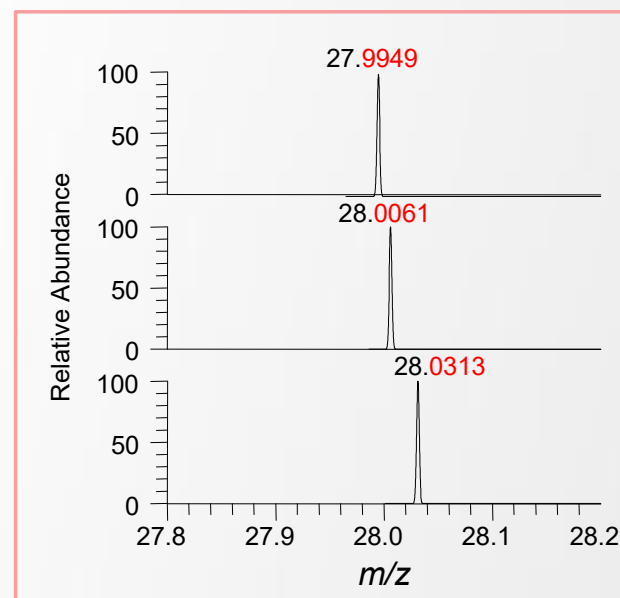
$^1\text{H}$  : 1.0078 Da  
 $^{12}\text{C}$  : 12.0000 Da  
 $^{14}\text{N}$  : 14.0031 Da  
 $^{16}\text{O}$  : 15.9949 Da



CO

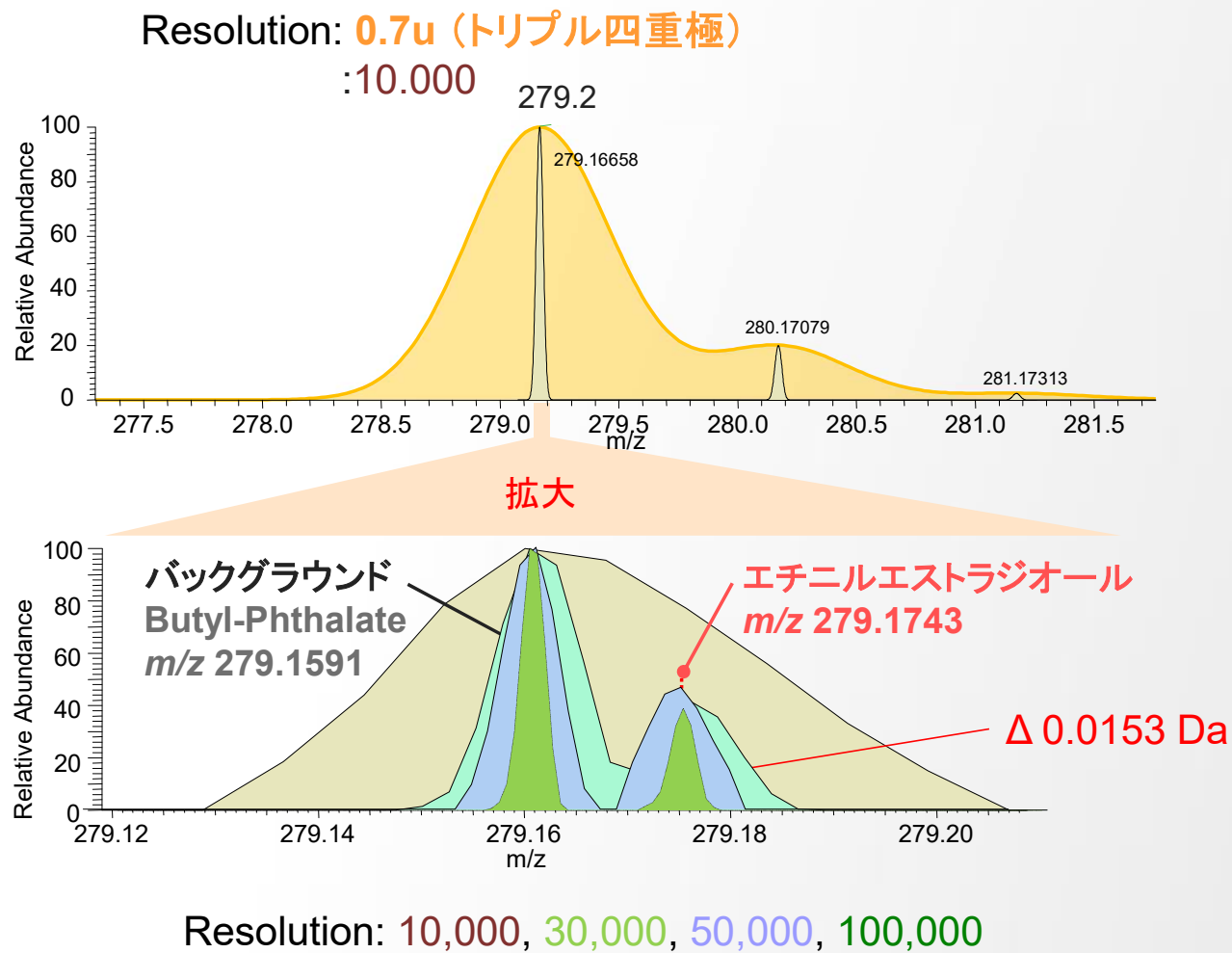
$\text{N}_2$

$\text{C}_2\text{H}_4$

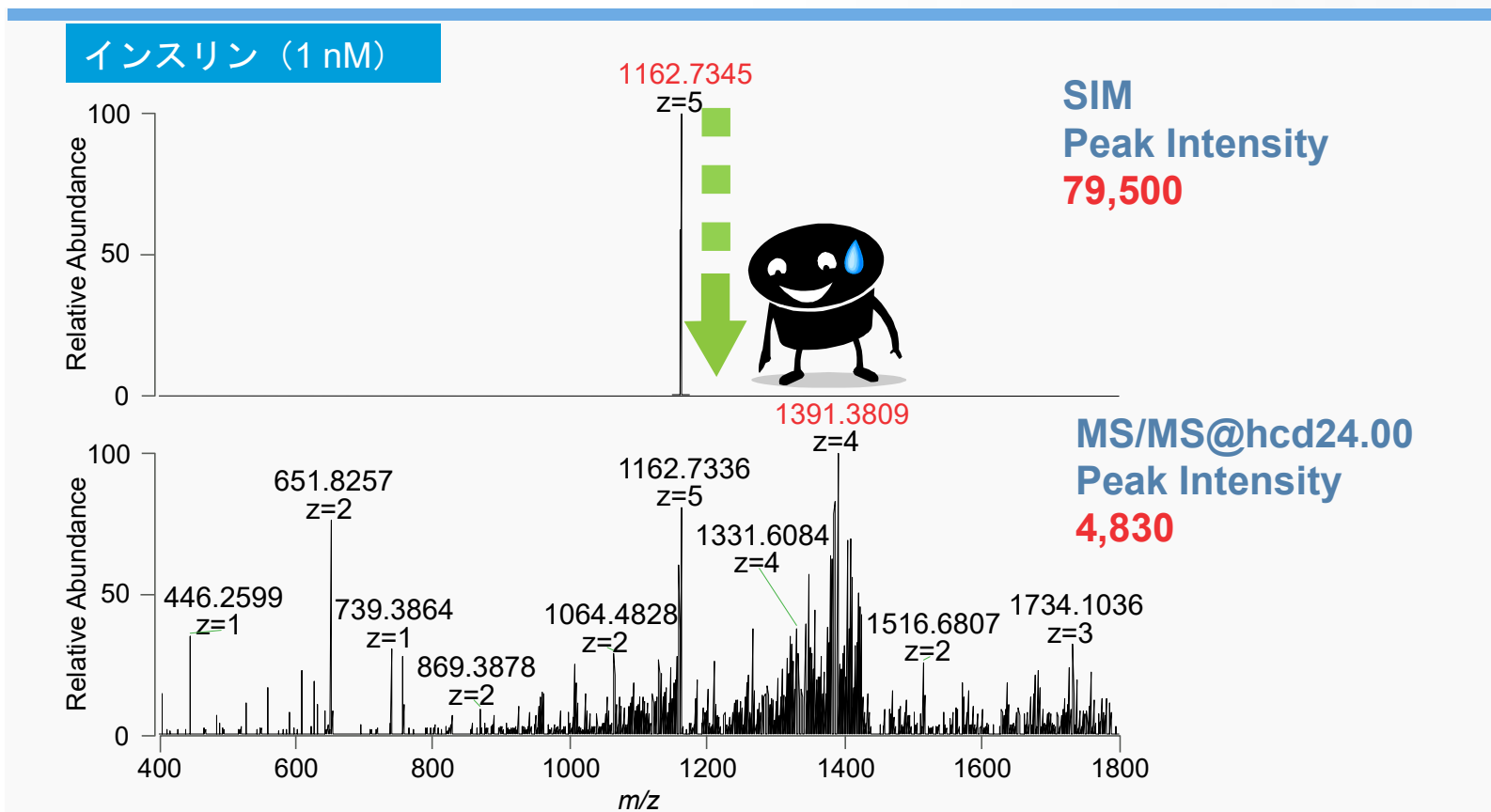


※ノミナル質量:各元素について、それぞれ天然存在比が最大の同位体の質量に最も近い整数値を用いて計算した質量(マスペクトロメトリー関係用語集より)

# 高分解能MSとは



# フラグメンテーションによる感度ロス

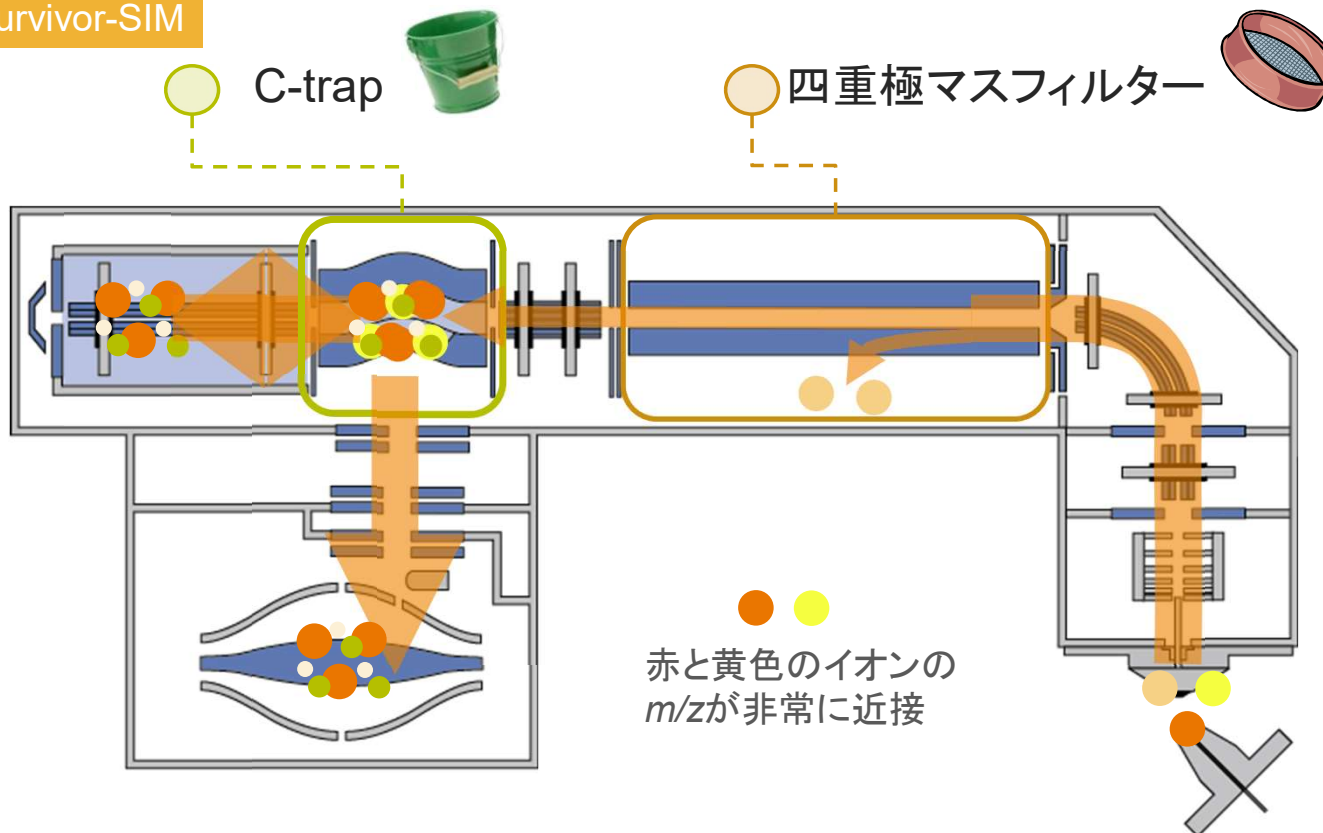


プロダクトイオンの測定 ⇒ 選択性: 向上、絶対感度: 減少

# Survivor-SIM/SIMの選択性を向上させる手法

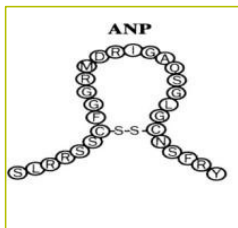
※メソッドはtMSMS (PRM)

Survivor-SIM



- (開裂しにくいイオンに対して) 夾雑イオンのみを開裂させ選択性を向上

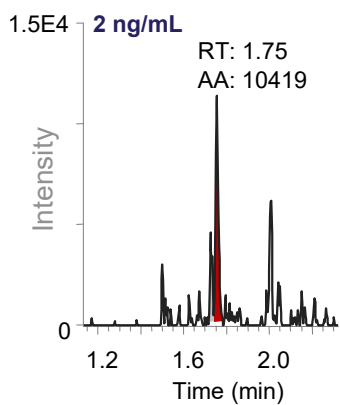
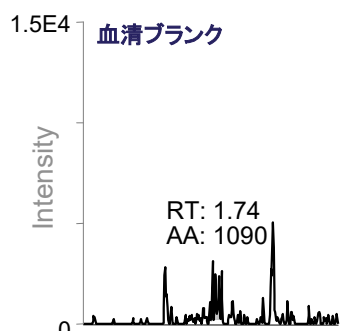
# Survivor-SIM / 環状ペプチド



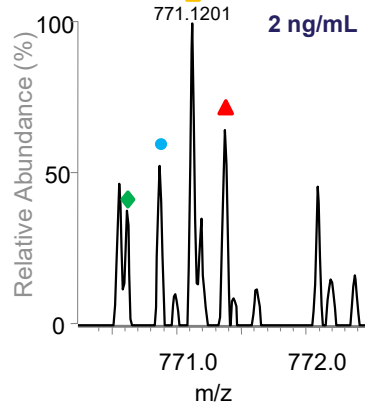
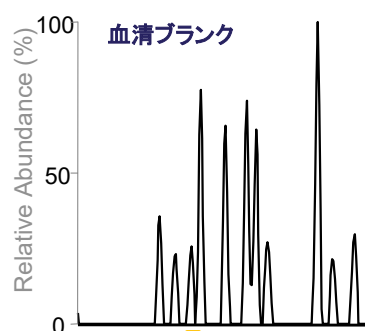
環状ペプチド

## HRAM-SIM

### マスクロマトグラム

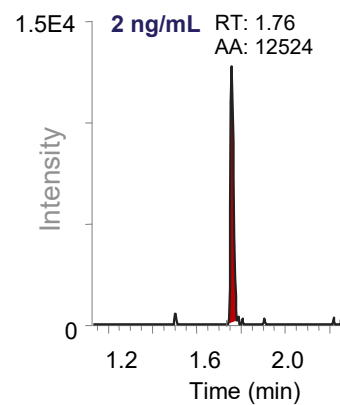
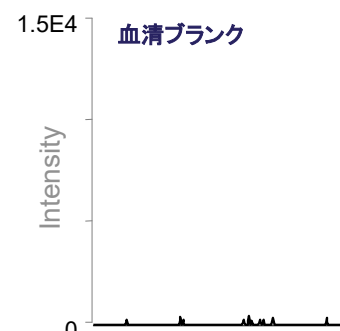


### マススペクトル

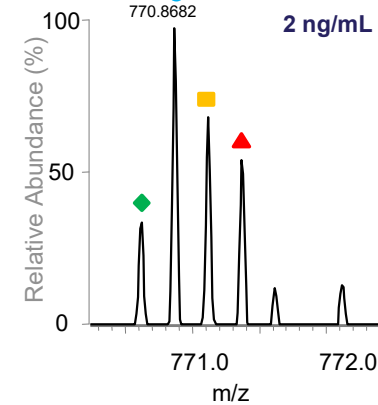
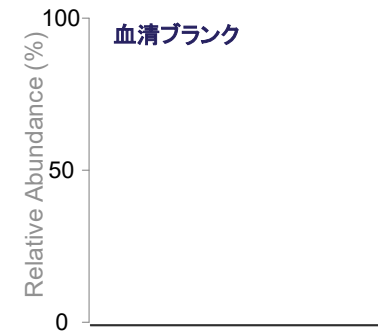


## HRAM-Survivor-SIM

### マスクロマトグラム



### マススペクトル





## まとめ

- **Cyclorazine9A5(環状ペプチド)の分析メソッド構築※)**
  - 細孔径1500 Åのポリマー樹脂を担体としたカラムとギ酸系移動相の使用
  - システムへの残存を抑えるためのグラジエントの工夫
  - 回収率およびインジェクションボリュームを考慮した前処理溶媒の選択
  - 最適な価数の選択のためのイオンソース最適化時における各価数のモニター
- **FAIMS Pro Duo インターフェースを用いたメソッド構築における利点**
  - 特異性向上による感度(S/N)向上
  - 特異性は低いが強度の高いイオン(インモニウムイオンなど)の利用や分解能を広げることによる感度向上
  - 夾雑やショルダーピーク排除による前処理やLC条件の簡略化、選択できる確認イオンの拡充
- **高分解能MSによるSurvivor-SIMメソッドの活用**
  - 高分解能MSはフラグメンテーションに不向きな化合物と相性がよく高感度化が期待できる
  - フラグメンテーションされにくい環状ペプチドなどでは、Survivor-SIMメソッドの活用で特異性の向上が期待できる

※) AMED創薬基盤推進研究事業の課題である国立医薬品食品衛生研究所が主導する研究班「革新的医薬品開発のための次世代安全性評価法の開発・標準化と基盤データ取得」に参画させていただき、齊藤公亮先生ご主導のペプチド医薬品 バイオアナリシス研究班のサブトラックA1に参画してデータ取得させていただいた内容になります。

# Thank you

研究用에만使用できます。診断用には使用いただけません。

© 2024 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.

All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

実際の価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。

価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。

標準販売条件はこちらをご覧ください。 [thermofisher.com/jp-tc](https://thermofisher.com/jp-tc)

