

Maxpeak™ High Performance Surfaces (HPS) テクノロジーを採用した CORTECS™ Premier C18 カラムを搭載した UPLC-MS/MS を用いたスニチニブおよび関連代謝物の迅速高感度分析

Brianna R Clements, Margaret Maziarz, Paul D. Rainville

Waters Corporation

要約

チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) は、がんの治療のための細胞増殖経路の変更に使用される一群の低分子医薬品です。具体的には、市販の TKI であるスニチニブは、膀胱がんを含むさまざまながんの治療に使用できます。今回、スニチニブとその活性代謝物の治療薬物モニタリングを支援する分析法を作成します。MaxPeak™ (HPS) テクノロジーを採用した新しい CORTECS Premier C₁₈ カラムを、Waters™ Xevo™ TQ Absolute システムでの MS 検出と組み合わせて利用することでこれが達成できました。この分析法により、スニチニブおよびその活性代謝物の分析において、高感度で直線性のある再現性のある結果が得られます。

アプリケーションのメリット

- Max Peak を採用した CORTECS Premier C₁₈ カラムは、従来のステンレススチール製システムおよびカラムと比較して、シグナルの高さおよび面積が 5 倍大きい
- クロマトグラフィー分離を 2 分以内で達成する
- 治療用投与量の範囲にわたる動的で高感度の直線性

はじめに

チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) は、生体におけるシグナル伝達経路を変更して細胞増殖を改変する一群の低分子医薬品です。TKI は、がんの治療に適用され、腫瘍の増殖と転移の予防に役立ちます。スニチニブは、がんの治療に利用できる多くの TKI の 1 つです¹。スニチニブは、すい臓がんなどのさまざまながんに対する有効性について承認済みで、患者の全生存率を向上させています²。薬物が体に吸収される際には、親薬物の代謝物が生成することがあります。スニチニブの場合、主要な活性代謝物は *N*-デスエチルスニチニブであり、高濃度では毒性を引き起こすことが報告されています³。したがって、安全で効果的ながん治療を確保するには、スニチニブおよびその代謝物の治療薬物モニタリング (TDM) を支援する分析法は、高い信頼性と感度を持つことが必要です。

スニチニブの TDM に必要な感度を考慮して、新規の MaxPeak HPS テクノロジーを採用した新しい CORTECS Premier C₁₈ カラムを適用しました。MaxPeak HPS テクノロジーは、クロマトグラフィーのレスポンス低下につながる、金属と分析種の望ましくない相互作用を低減することが示されています^{4,5}。さらに、MaxPeak HPS テクノロジーは、TKI に対して試験されており、これらの化合物の分析において、肯定的な変化が見られています⁶。

今回、スニチニブとその主要活性代謝物を 2 分以内で分離および定量する分析法を開発します。この分析法は、文献に記載されている治療範囲をカバーしており、スニチニブ分析の臨床分野に適用できます。さらに、MaxPeak HPS テクノロジーを採用した CORTECS Premier C₁₈ カラムがこの分析法のクロマトグラフィーにもたらすメリットについて紹介します。

実験方法

ストック溶液および標準溶液の調製は、TKI のバイオアナリシスアッセイについて実施されたメタ分析に基づいて設計しました⁷。

ストック標準溶液の調製

スニチニブは Selleck Chem (テキサス州ヒューストン) から購入しました。*N*-デスエチルスニチニブ塩酸塩は、Sigma Aldrich (ウィスコンシン州ミルウォーキー) から購入しました。スニチニブ-d₁₀ および *N*-デスエチルスニチニブ-d₅ は、Toronto Research Chemicals (オンタリオ州トロント) から購入しました。ストック溶液は、4 mL のアンバー色のバイアル中に、10 µg/mL になるように個別に調製し、100% ジメチルスルホキシド (DMSO) で希釈しました。調製時には、すべての塩要因を考慮しました。ストック溶液は 2 °C ~ 8 °C で保存しました。DMSO の物理的特性のため、ストック溶液は低温保管庫中で固化しました。バイアルをホイルでラップし、35 °C に設定したインキュベ

ーター中で約 1 時間かけてゆっくり解凍しました。スニチニブには光感受性が認められたため、ホイルを使って暗黒条件下で調製しました⁸。標準溶液の調製を行う前に、解凍したストック溶液を周囲温度に平衡化させました。

システム適合性標準試料の調製

ストック溶液を脱イオン水（希釈液）中 50% メタノールで希釈しました。重水素化スタンダードを、合計容量の 1% で濃度 1 ng/mL になるように血漿に個別にスパイクします。重水素化標準試料を使用することで、各分析種の定量目的のための内部標準（IS）の役割を果たしました。スニチニブと *N*-デスエチルスニチニブを等濃度で含む混合標準試料を、濃縮中間ストック溶液を使用して調製し、次にこれらを IS を含む血漿に、合計容量の 4% になるようにスパイクしました。スパイクを行った血漿キャリブレーション標準試料に対し、除タンパクを行いました。反応は、1.5 mL 遠心チューブ内で、血漿量の 3 倍の 100% アセトニトリルを用いて行いました。除タンパク反応のチューブを約 5 秒間ボルテックスしました。次に、15,000 rpm、4 °C で 5 分間遠心分離しました。最後に、低容量のアンバー色の HPLC バイアル内で、上清 100 μL を希釈液 100 μL と混合しました。

直線性および定量限界測定用標準溶液の調製

ストック溶液を脱イオン水（希釈液）中 50% メタノールで希釈しました。重水素化標準試料を、合計容量の 1% で濃度 1 ng/mL になるように血漿に個別にスパイクしました。重水素化標準試料を使用することで、各分析種の定量目的のための内部標準（IS）の役割を果たしました。濃縮中間ストック溶液を使用して個々の検量線のポイントを作成し、これらを IS を含む血漿に合計容量の 4% になるようにスパイクしました。スパイクを行った血漿キャリブレーション標準試料に、上記と同様の除タンパクを行いました。

LC 条件

システムのセットアップ	Premier MaxPeak HPS	従来のステンレススチール
LC システム :	ACQUITY™ Premier LC システム	ACQUITY UPLC™ I-Class システム
カラム :	CORTECS™ Premier C ₁₈ 2.1 x 50 mm、1.6 μm	CORTECS™ C ₁₈ 2.1 x 50 mm、1.6 μm
バイアル :	アンバー色ガラス HPLC バイアル - 186000848 および 186002803 (低容量)	
カラム温度 :	40 °C	
サンプル温度 :	15 °C	
注入量 :	1 μL	
流速 :	0.7 mL/分	
移動相 A :	0.1% ギ酸含有 10 mM ギ酸アンモニウム溶液	
移動相 B :	0.1% ギ酸アセトニトリル溶液	
グラジエント :	移動相 B (MPB) は、3 分間で 3% から 60% に増加します。次に、0.1 分で MPB を 95% まで増加させ、0.5 分間保持することによって、カラムを洗浄します。最後に、0.1 分で MPB を 3% まで下げ、1.8 分間保持することによって、カラムを再平衡化します。	

MS 条件

MS システム :	Waters Xevo TQ Absolute
イオン化モード :	ポジティブ ESI
データ取り込み :	MRM モード、表 1 を参照
キャピラリー電圧 :	2.00
コリジョンエネルギー :	5
イオン源温度 :	150 °C
脱溶媒ガス流量 (L/時間) :	1000
コーンガス流量 (L/時間) :	150
コリジョンガス流量 (mL/分) :	0.15
ネブライザーガス流量 (L/時間) :	300

データマネジメント

装置コントロール :	Mass Lynx V4.2
データ解析 :	Mass Lynx V4.2

表 1

化合物	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)	ソフトイオン化
スニチニブ (SUN)	399.15	283.15	18	30	はい
スニチニブ-d10 (SUN-d10)	409.21	283.15	16	30	はい
N-デスエチルスニチニブ (NDSUN)	371.18	283.15	12	26	はい
N-デスエチルスニチニブ-d5 (NDSUN-d5)	376.05	283.15	10	24	はい

結果および考察

分離法の結果

この分析法は、スニチニブ、*N*-デスエチルスニチニブ、および関連する重水素化標準試料の保持と分離において、10回の注入後にも再現性がありました。IS に対して補正した分析種の面積および保持時間の %RSD は $\leq 5\%$ でした（表 2 および表 3）。下の 10 回注入のクロマトグラムの重ね描きにより、分析法の性能が明確にわかります（図 1a および 1b）。

(面積/内部標準の面積) レスポンスの再現性	SUN	NDSUN
平均値	402.6	495.5
標準偏差	19.4	20.1
%RSD	4.8	4.1

表 2. TKI 混合標準試料のレスポンスの %RSD を含む表

保持時間	SUN	NDSUN
平均値	1.7	1.6
標準偏差	0.0	0.0
%RSD	0.3	0.0

表 3. TKI 混合標準試料の保持時間の %RSD を含む表

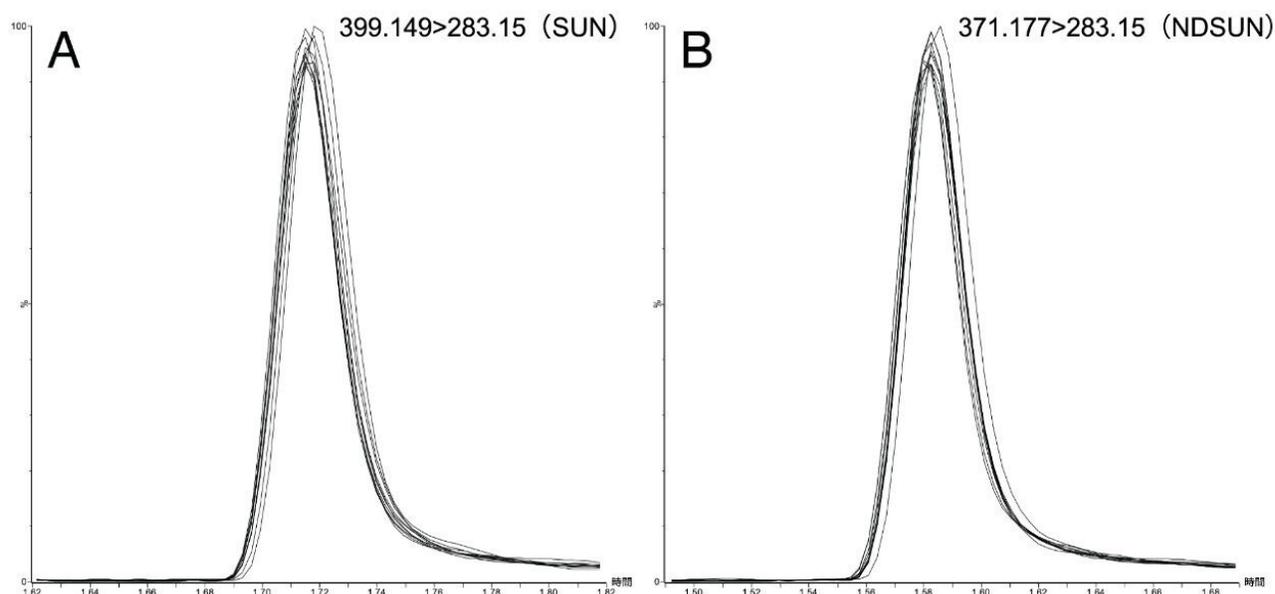


図 1a. TKI 混合標準試料の 10 回の注入にわたる SUN の定量の MRM トランジションのクロマトグラムの重ね描き

図 1b. TKI 混合標準試料の 10 回の注入にわたる NDSUN の定量の MRM トランジションのクロマトグラムの重ね描き

この分析法をステンレススチール製システムで使用した場合と比較したところ、MaxPeak HPS テクノロジーを採用した CORTECS Premier C₁₈ カラムの TKI 分析における改善点が浮き彫りになりました。各装置構成に、システム適合性標準試料を 10 回注入しました。以下に、両システムの結果を比較しています（表 4 および 5、図 2a および 2b）。

分析種の名前	保持時間 (分)	分析種の面積シグナル	(面積/内部標準の面積)レスポンス	高さシグナル
SUN	1.7	15757.4	402.6	583724.3
NDSUN	1.6	17571.6	495.5	718068.8

表 4. MaxPeak Premier HPS システムセットアップを使用した TKI 標準試料の 10 回の注入の過程で収集したデータの平均

分析種の名前	保持時間 (分)	分析種の面積シグナル	(面積/内部標準の面積)レスポンス	高さシグナル
SUN	1.7	3210.7	381.7	122167.7
NDSUN	1.6	3453.1	480.3	135664.2

表 5. 従来のステンレススチール製システムセットアップを使用した TKI 標準試料の 10 回の注入の過程で収集したデータの平均

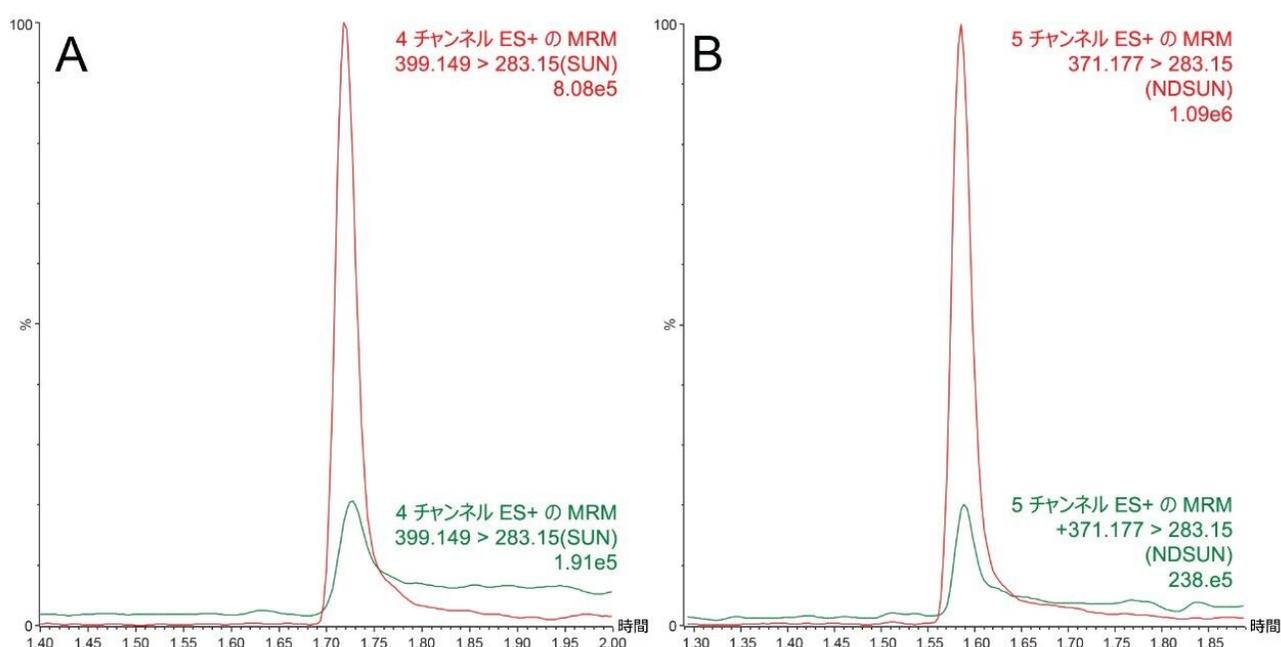


図 2a. MaxPeak Premier HPS システムセットアップ (赤色) および従来のステンレススチール製システムセットアップ (緑色) を使用した SUN の定量における MRM トランジションのクロマトグラム重ね描きの例

図 2b. MaxPeak Premier HPS システムセットアップ (赤色) および従来のステンレススチール製システムセットアップ (緑色) を使用した NDSUN の定量における MRM トランジションのクロマトグラム重ね描きの例

MaxPeak Premier HPS システムセットアップでは、従来のステンレススチール製システムおよびカラムと比較して、シグナルの高さおよび面積が 5 倍増加しました。これらの増加により分析種の検出感度が向上するため、TKI 試験においてメリットになります。

直線性の結果

SUN および NDSUN について直線性試験を行ったところ、この分析法は定量に適していることが実証されました。直線性の範囲は、スニチニブについて実施した TDM 試験を参照することによって確立されました。スニチニブの治療における血漿中濃度範囲は、The British Journal of Clinical Pharmacology により、「持続投与で 37.5 ~ 60 ng/mL、間欠投与で 50 ~ 80 ng/mL」であると提唱されています⁹。したがって、SUN と NDSUN の両方について、0.1 ng/mL ~ 100 ng/mL の血漿濃度範囲がカバーできました。これらの範囲では、文献に記載されている以前の SUN についての TDM 分析法と比較して、より低い定量限界が達成されています^{10,11}。SUN および NDSUN についての曲線を以下に示します（図 3a および 3b）。

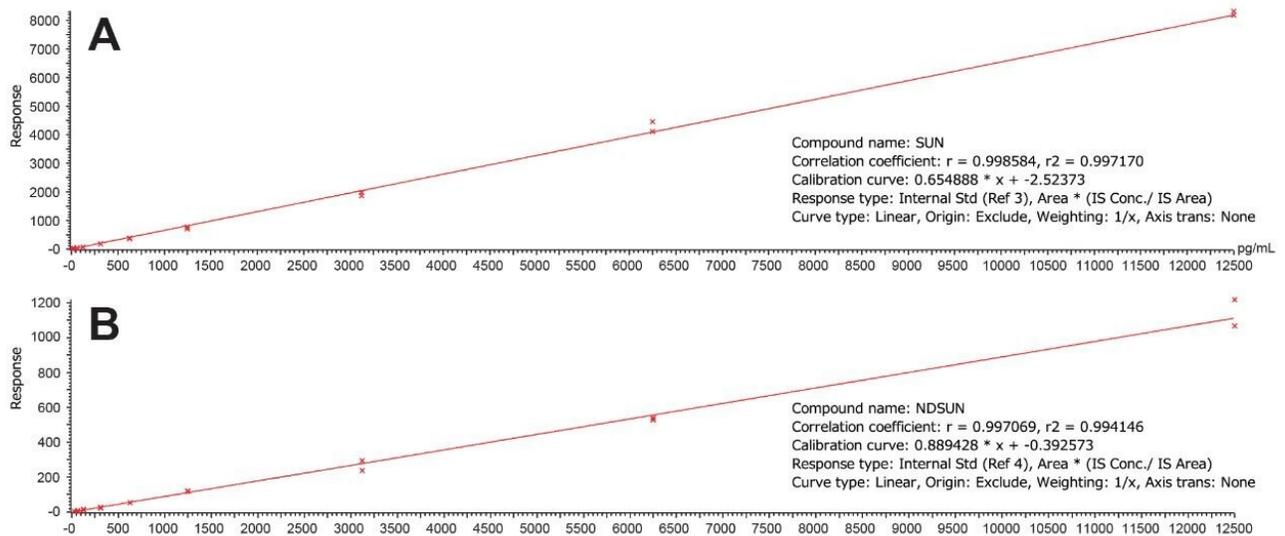


図 3a. 血漿中 0.1 ng/mL ~ 100 ng/mL にまたがる SUN の 10 点検量線。曲線の R^2 値は ≥ 0.997 でした。

図 3b. 血漿中 0.1 ng/mL ~ 100 ng/mL にまたがる NDSUN の 10 点検量線。曲線の R^2 値は ≥ 0.994 でした。

定量限界の測定結果

SUN と NDSUN について、曲線の最低点で 6 回注入して、低濃度の定量限界 (LLOQ) の再現性を確立しました。米国食品医薬品局によると、現行のバイオアナリシスアッセイのバリデーションガイドラインでは、LLOQ の正確度および精度は $\pm 20\%$ RSD 以内であるべきと推奨されています¹²。表 6 と 7、および図 4a と 4b から、この分析法の LLOQ の測定結果が明確にわかります。

計算濃度 (pg/mL)	SUN	NDSUN
平均値	12.43	12.23
標準偏差	0.55	0.76
注入の %RSD	4.42	6.22
平均回収率 (%) 理論濃度 12.5 pg/mL	99.43	97.87

表 6. SUN および NDSUN についての正確さの測定結果。平均レスポンスが定量され、標準溶液の理論濃度に照らして測定されています。この LLOQ は、分析のために除タンパクおよび希釈を行う前の血漿中の SUN または NDSUN 0.01 ng/mL に対応しています。カラムに注入する SUN または NDSUN の最終サンプルの理論濃度は、除タンパクおよび希釈後で 12.5 pg/mL です。

(面積/内部標準の面積) レスポンスの再現性	SUN	NDSUN
平均値	0.7	1.0
標準偏差	0.0	0.1
%RSD	4.4	6.3

表 7. 6 回の注入の過程における SUN と NDSUN の精度の結果。いずれの分析種も、20% RSD 以内であり、バイオアナリシスの推奨アッセイ精度の要件を満たしています。

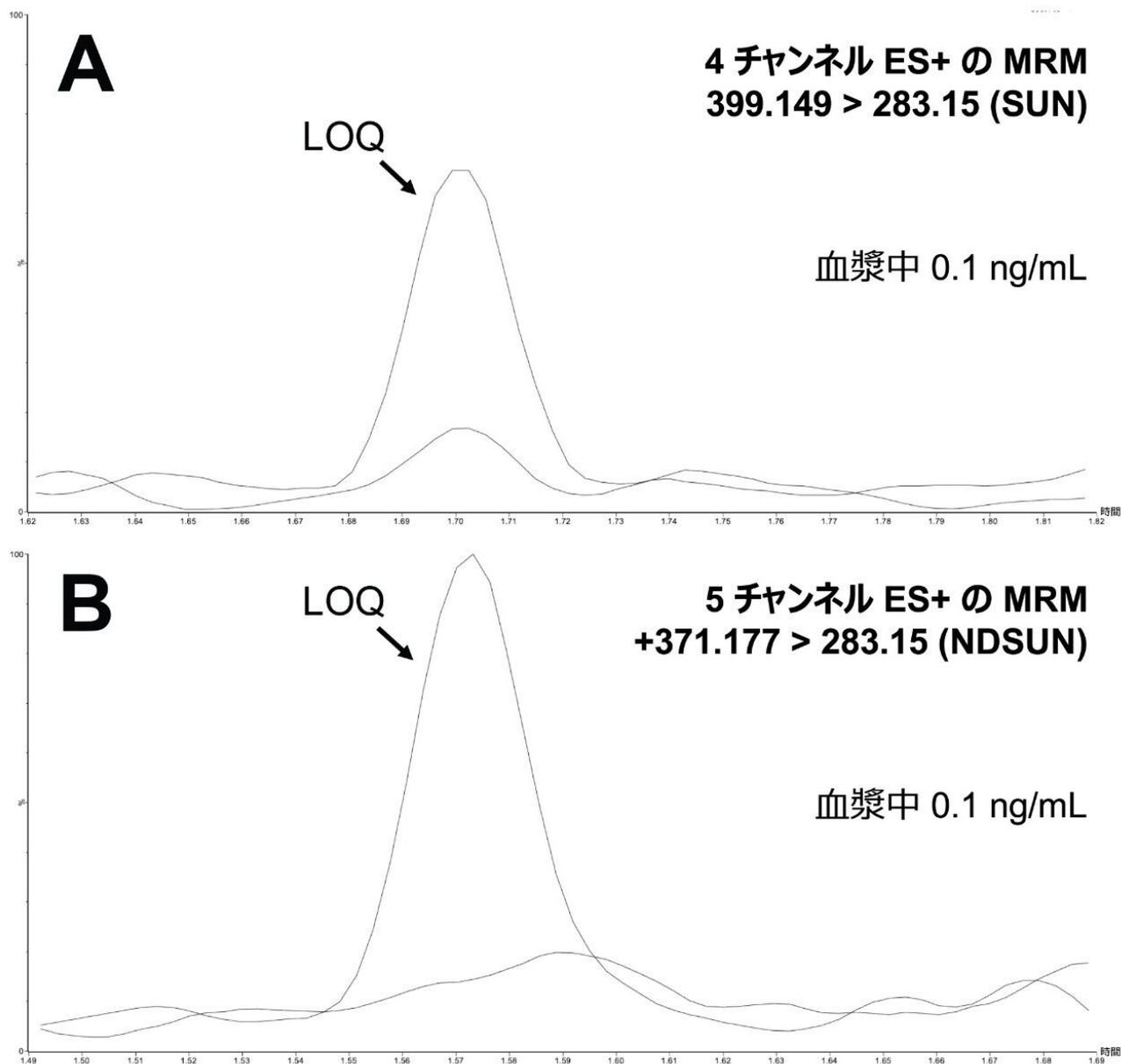


図 4a. ブランク血漿の注入と比較した SUN の LOQ の MRM トランジションの重ね描きクロマトグラム の例

図 4b. ブランク血漿の注入と比較した NDSUN の LOQ の MRM トランジションの重ね描きクロマトグラム の例

結論

今回、CORTECS Premier C₁₈ カラムと MaxPeak HPS テクノロジーを採用したシステムを使用することにより、従来のステンレススチール製クロマトグラフィーセットアップと比較して、TKI の分析が改善されました。MaxPeak HPS テクノロジーを使用することで、SUN と NDSUN のピークの高さと面積が 5 倍増加しました。さらに、この分析法により、2 分以内で再現性のある結果が得られると同時に、リニアダイナミックレンジ全体にわたって TDM が可能になります。

参考文献

1. Kim A, Balis FM, Widemann BC. Sorafenib and Sunitinib. *The Oncologist* [Internet]. 2009 Aug 1 [cited 2022 Oct 24];14(8):800–5. Available from: <https://academic.oup.com/oncolo/article/14/8/800/6398036>.
2. Faivre S, Niccoli P, Castellano D, Valle JW, Hammel P, Raoul J-L., et al. Sunitinib in Pancreatic Neuroendocrine Tumors: Updated Progression-Free Survival and Final Overall Survival From a Phase Iii Randomized Study. *Annals of Oncology* [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2020 Apr 28];28(2):339–43. Available from: [https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534\(19\)32208-2/fulltext](https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534(19)32208-2/fulltext).
3. Takasaki S, Kikuchi M, Kawasaki Y, Ito A, Arai Y, Yamaguchi H, et al. Severe Toxicity Induced by Accumulation of Active Sunitinib Metabolite in a Japanese Patient With Renal Cell Carcinoma: A Case Report. *Journal of Medical Case Reports*. 2017 Feb 1;11(1).
4. Shah D, Smith K, Yang J, Hancock P. Analysis of Fourteen Organic Acids in Various Beverages Using the ACQUITY UPLC H-Class PLUS and ACQUITY QDa Mass Detector. Waters Application Note: [720007289](#), 2021.
5. Waters Corporation. CORTECS Columns Applications Notebook, [720004739](#) <
<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004739en.pdf>> , 2014.
6. Layton C, Rainville P. Advantages of Using MaxPeak™ HPS™ Technology for the Analysis of Targeted Cancer Growth Inhibitor Therapies. Waters Application note, [720007565](#), 2022.
7. Retmana IA, Beijnen JH, Sparidans RW. Chromatographic Bioanalytical Assays for Targeted Covalent Kinase Inhibitors and Their Metabolites. *Journal of Chromatography B* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2022 Oct 24];1162:122466. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023220313428?via%3Dihub>.
8. Jolibois J, Schmitt A, Royer B. A Simple and Fast LC-MS/MS Method for the Routine Measurement of Cabozantinib, Olaparib, Palbociclib, Pazopanib, Sorafenib, Sunitinib and Its Main Active Metabolite in

Human Plasma.*Journal of Chromatography B*. 2019 Nov;1132:121844.

9. Westerdijk K, Krens SD, Graaf WTA, Mulder SF, Herpen CML, Smilde T, *et al*. The Relationship Between Sunitinib Exposure and Both Efficacy and Toxicity in Real - World Patients With Renal Cell Carcinoma and Gastrointestinal Stromal Tumour.*British Journal of Clinical Pharmacology*.2020 May 26;87(2):326–35.
10. Zhang M, Liu X, Chen Z, Jiang S, Wang L, Tao M, *et al*. Method Development and Validation for Simultaneous Determination of Six Tyrosine Kinase Inhibitors and Two Active Metabolites in Human Plasma/Serum Using UPLC–MS/MS for Therapeutic Drug Monitoring.*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.2022 Mar;211:114562.
11. de Bruijn P, Sleijfer S, Lam M-H, Mathijssen RHJ, Wiemer EAC, Loos WJ. Bioanalytical Method for the Quantification of Sunitinib and Its N-Desethyl Metabolite SU12662 in Human Plasma by Ultra Performance Liquid Chromatography/Tandem Triple-Quadrupole Mass Spectrometry.*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.2010 Mar;51(4):934–41.
12. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry [Internet]. FDA. U.S. Food and Drug Administration; 2018 May [cited 2022 Dec 23]. Available from: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>.

ソリューション提供製品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS システム <<https://www.waters.com/134613317>>

ACQUITY Premier システム <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

Xevo TQ Absolute タンデム四重極質量分析計 <<https://www.waters.com/nextgen/global/products/mass-spectrometry-systems/xevo-tq-absolute.html>>

720007845JA、2023 年 1 月

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシー](#) [商標](#) [サイトマップ](#) [キャリア](#) [クッキー](#) [クッキー環境設定](#)