[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

ProteinWorks eXpress 消化キットを用いたベバシズマブ（Avastin）のシンプルで標準化された高感度定量

Mary Lame, Hua Yang, Sherri Naughton, and Erin Chambers
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションのメリット

- シンプルで標準化されたタンパク質定量アプローチです。広く適用可能な最適化された消化キットにより、探索研究のメソッド開発が不要になります。4～6 時間で LC-MS 分析のためのサンプル調製が完了します。ベバシズマブで検出下限 100 ng/mL の高感度を達成しました。

ウォーターズのソリューション

ProteinWorks™ eXpress 消化キット
（製品番号 176003689）

Intact mAb Mass Check スタンダード
（製品番号 186006552）

ACQUITY UPLC® ペプチド BEH C_{18}、300Å、1.7 µm、カラム（製品番号 186003687）

ACQUITY UPLC システム

Xevo® TQ-S 質量分析計

ProteinWorks µElution SPE クリーンアップキット
（製品番号 186008304）

キーワード

モノクローナル抗体、ベバシズマブ、Avastin、タンパク質定量、eXpress 消化

はじめに

2013 ～ 2020 年にかけて、世界的売上上位の抗体ベースの医薬品の多くが特許切れになります。[1] 約 60 億ドルの売上を誇るベバシズマブも例外ではなく、2020 年に特許が満了となります。また、2013 年の時点で、338 種類の新しいモノクローナル抗体医薬品が開発されています。[2] これは現在開発中のバイオ医薬品の中で最も多いものです。このように、ベバシズマブおよび他の重要な抗体医薬品の特許が切れることに加えて、新しい抗体医薬品の開発が進んでいます。そのため、従来主流だった低分子医薬品のための簡単で単純なサンプル前処理および分析方法による LC-MS を用いたバイオアナリシス手法に変わる効率的な LC-MS タンパク質バイオアナリシス手法とアプローチに対するニーズが拡大し続けています。

腫瘍血管新生抑制剤であるベバシズマブ（Avastin、Genentech/Roche）は、人の血管内皮増殖因子（VEGF）と選択的に結び付いて正常化するため、特に大腸がん、肺がん、子宮頸がん、腎臓がんの補助化学療法に使用されています。[3,4] 標準的な投与量は、適応に応じて、2 ～ 3 週間ごとに 5 ～ 15 mg/kg の範囲です。1 mg/kg を超える投与により、ベバシズマブの血清中濃度が 14 日間以上の間 10 µg/ml 以上になったことが報告されています。[5] これは、検出下限が 100 ng/mL 以上、定量上限（ULOQ）が数百 µg/mL の定量方法が適応することを示しています。この濃度は低分子バイオアナリストにとってはそれほど問題ではありませんが、生体高分子の取り扱いおよびサロゲートペプチドアプローチによるタンパク質定量に精通していないと、抗体医薬バイオアナリシスに必要な高品質のデータを取得するのは容易なことではありません。高分子医薬品開発に広く適用できる、LC-MS を使用したタンパク質バイオアナリシスの汎用的でかつ標準化されたアプローチがあれば、生体高分子の取扱経験が少ない科学者であっても探索研究を成功に導くことが可能になります。さらに、そのような実績のある方法論を使用することで、施設間でのメソッドの移管が容易になり、結果の再現性が保証されます。本アプリケーションノートでは、ProteinWorks eXpress 消化キットおよびプロトコールを用いて、ラット血漿からベバシズマブを迅速かつ高い感度で定量する方法を説明します（図 1）。秤量済みでロット追跡可能な試薬および綿密に開発された汎用性のあるシンプルで段階的な手順を使用する単一のユニバーサルなサンプル前処理メソッドにより、35 µL のラット血漿からベバシズマブ 100 ng/mL の LLOQ が得られました。

実験条件

サンプル詳細

ベバシズマブは、最初に、96 ウェルのプロテイン A アガロースベースプレートを使用して 35 µL のラット血漿から免疫精製を行いました。その後、ProteinWorks eXpress 消化キットとそのプロトコールを使用して LC-MS 分析用のサンプルを調製しました。最後に、ProteinWorks µElution SPE クリーンアップキットとプロトコールを使用して、シグネチャーペプチドをクリーンアップしました。

LC 条件

LC システム： ACQUITY UPLC

検出： Xevo TQ-S 質量分析計、ESI+

カラム： ACQUITY UPLC ペプチド BEH C_{18}、300 Å、1.7µm、2.1 mmn × 150 mm

カラム温度： 55℃

サンプル温度： 10℃

注入量： 10 µL

移動相 A： 0.1% ギ酸水溶液

移動相 B： 0.1% ギ酸アセトニトリル溶液

グラジエント：

グラジエント：

流速 (mL/min)	時間 (min)	グラジエント %A	%B	カーブ
0.3	0.0	100	10	6
0.3	1.0	100	10	6
0.3	7.0	50	50	6
0.3	8.0	10	90	6

データ管理： MassLynx® (v4.1)

MS 条件

キャピラリー電圧 (kv)： 3

コーン線圧 (V)： 30

ソースオフセット (V)： 50

ソース温度：(℃)： 150

脱溶媒温度：(℃)： 600

コーンガス流量 (L/h)： 150

脱溶媒和ガス流量 (L/h)： 1000

コリジョンガス流量 (mL/min)：0.15

ネブライザーガス流量 (Bar)： 7

ペプチド	MRM トランジッション	コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
FTFSLDTSK*	523.30>797.48	16	14
STAYLQMNSLR*	642.30>748.45	36	20
DSTYSLSSTLTLSK	751.88>836.47	31	24
SVSGGTAALGC[+57.0]LVK	661.34>576.32	31	25
NTQPIMDTDGSYFVYSK (ISTD)	983.95>397.21	32	26

* ユニークシグネチャーペプチド

表 1. ベバシズマブペプチドおよび内標準ペプチドの MRM 条件

ベバシズマブ軽鎖
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
SLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ベバシズマブ重鎖
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSK
STAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS

REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK

ユニークシグネチャー

ジェネリックシグネチャー

化学式: $C_{6538}H_{10034}N_{1716}O_{2033}S_{44}$
分子量:149000.0 Da

http://www.drugbank.ca/drugs/DB00112

図 1. ベバシズマブ (Avastin) タンパク質構造

結果および考察

ベバシズマブの米国での特許が切れる 2020 年が近づいており、CRO におけるこの重要な薬物およびバイオ後続品研究ラボに対する注目が増しています。しかし、一般的なワークフローは非常に複雑であり、多数の選択肢とオプションがあります。ベバシズマブや他のモノクローナル抗体ベースの医薬品研究のための高感度 LC-MS メソッドの開発はとりわけ困難です。このアプリケーションノートでは、ProteinWorks eXpress 消化キットを使用してプロセスを簡潔化および効率化しました。ベバシズマブサンプルは、アフィニティー精製、消化、固相抽出 (SPE) によるペプチド精製までトータル 6 時間以内で調製できました。これにより、いくつかの 96 ウェルプレートでその日のうちにサンプル調製を終え、翌朝にはデータを取得可能でした。複数のユニークシグネチャーペプチドとヒトジェネリックペプチドを同時にモニターして定量に使用しました。最高の感度と特異性が重鎖の可変部位のユニークペプチド FTFSLDTSK を使用して実現され、追加のジェネリック (STSGGTAALGC+57LVK、重鎖) およびユニーク (STAYLQMNSLR、重鎖) ベバシズマブペプチドが確認のためにモニターされました。Intact mAb Mass Check スタンダード (製品番号 186006552) のシグネチャーペプチド (NTQPIMDTDGSYFVYSK) を内標準として使用しました。

キットの最適化されたプロトコールと試薬を使用して、ベバシズマブの 100 ng/mL の定量下限を達成するために必要な血漿はわずか 35 µL でした（図 2）。各ペプチドの検量線の直線性と真度を、表 2 にまとめます。主要且つ最も高感度で特異的な定量ペプチド FTFSLDTSK は、検量線上の全てのポイントに対して 100 % の平均真度で 3.5 桁を超える範囲で直線でした。追加の 3 つのペプチドは、検量線上の全てのポイントに対して 99% 以上の平均真度で 3 ～ 3.5 桁を超える範囲で直線でした。

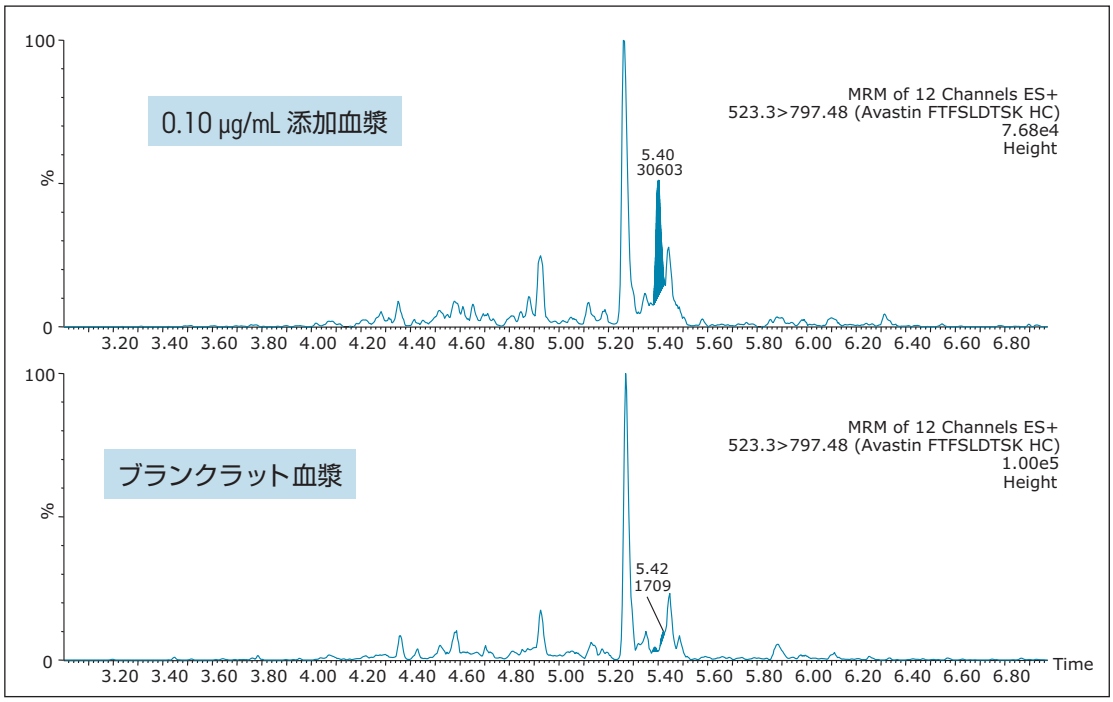

図 2. ブランクラット血漿と、ベバシズマブ 100 ng/mL 添加血漿のクロマトグラム比較。ユニークペプチド FTFSLDTSK が示されています。

ペプチド	検量線範囲 (µg/mL)	重み付け	直線性 (r^2)	ポイントの平均真度 %
FTFSLDTSK*	0.05–250	1/X	0.998	100.00
STAYQMNSLR*	0.50–500	$1/X^2$	0.997	100.02
DSTYSLSSTLTLSK	0.25–500	$1/X^2$	0.996	100.00
STSGGTAALGC+57LVK	0.05–250	$1/X^2$	0.996	100.60

*ユニークシグネチャーペプチド

表 2. ラット血漿でのベバシズマブの定量に使用されたシグネチャーペプチドのダイナミックレンジおよび検量線の統計値

さらに、QC サンプルの真度および精度は相対標準偏差(%CV)が全て 7% 以下と優れていました。これを表 3 にまとめます。実際の FTFSLDTSK ペプチドの QC サンプルに対する平均 %CV は 4% でした。同様に、STAYLQMNSLR ペプチドの QC サンプルに対する平均 %CV はわずか 3% でした。さらに、低濃度 QC 試験 の精度は全てのペプチドに渡って 3% でした。全ペプチドの平均真度は 100% 近くでした。

ペプチド	QC 濃度 (µg/mL)	平均測定濃度 (µg/mL)	標準偏差	%CV	平均真度
FTFSLDTSK*	0.035	–	–	–	–
	0.350	0.342	0.013	3.82	97.7
	3.500	3.553	0.126	3.56	101.5
	35.000	32.386	0.611	1.89	92.5
	350.000	290.135	21.024	7.25	82.9
ペプチド	**QC 濃度 (µg/mL)**	**平均測定濃度 (µg/mL)**	**標準偏差**	**%CV**	**平均真度**
STAYLQMNSLR*	0.035	–	–	–	–
	0.350	0.345	0.004	1.12	98.6
	3.500	3.819	0.110	2.89	108.3
	35.000	35.065	1.262	3.60	100.2
	350.000	335.347	15.208	4.54	95.8
ペプチド	**QC 濃度 (µg/mL)**	**平均測定濃度 (µg/mL)**	**標準偏差**	**%CV**	**平均真度**
DSTYSLSSTLTLSK	0.035	–	–	–	–
	0.350	0.351	0.016	4.61	100.3
	3.500	3.397	0.045	1.32	97.1
	35.000	32.082	0.469	1.46	91.7
	350.000	320.836	9.141	2.85	91.7
STSGGTALGC+57LVK	0.035	–	–	–	–
	0.350	0.366	0.012	3.36	104.4
	3.500	3.509	0.063	1.79	100.2
	35.000	33.015	1.406	4.26	94.3
	350.000	305.140	3.259	1.07	87.2

表 3. 定量に使用されたすべてのベバシズマブペプチド QC サンプルの統計値

高品位のクロマトグラフィーデータ、最適化および制御されたプロトコール、標準化された秤量済み試薬セットの使用という 3 つの主要な要素の組み合わせにより、ベバシズマブ分析で一貫して 10% 未満の真度と精度を達成しました。これら 3 つの主要な要素は ProteinWorks eXpress 消化キットの適用により実現されたもので、低濃度サンプルにおける検出、内因性妨害成分との分離、および非常に高い真度と精度を可能にします。以上の性能は、図 3 および 4 の代表的なシグネチャーペプチドの QC クロマトグラムに示されています。

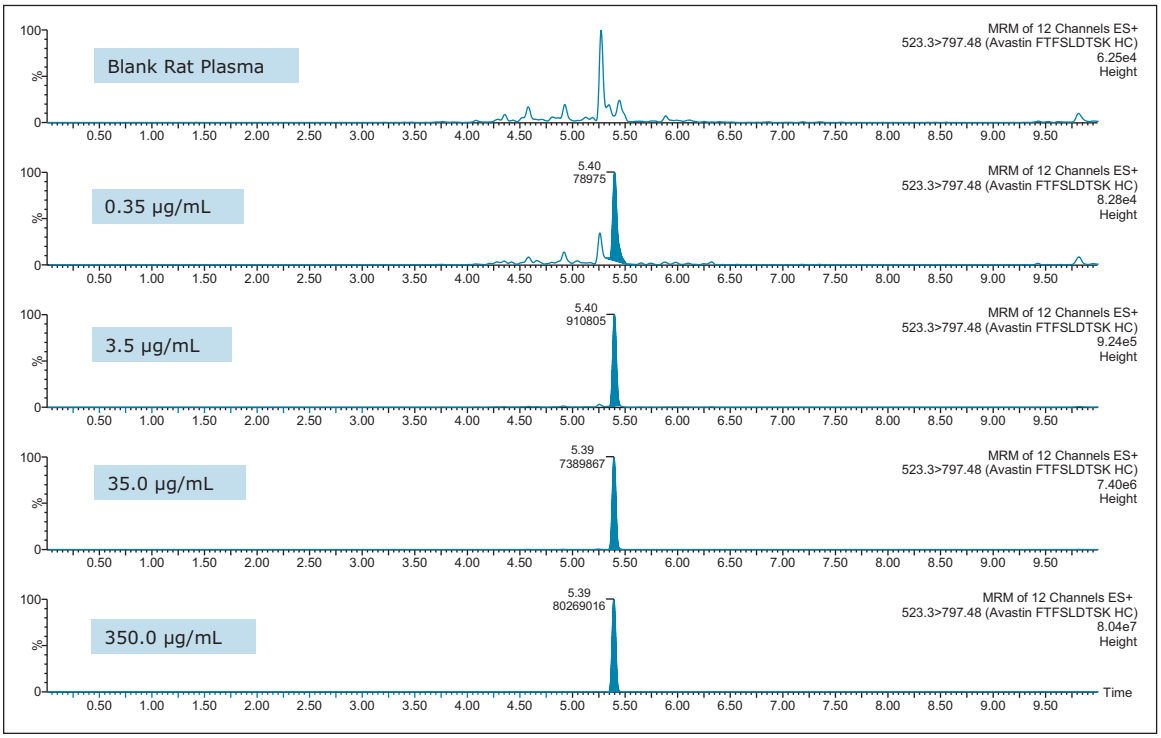

図 3.FTFSLDTSK ユニークシグネチャーペプチドのベバシズマブ QC クロマトグラム

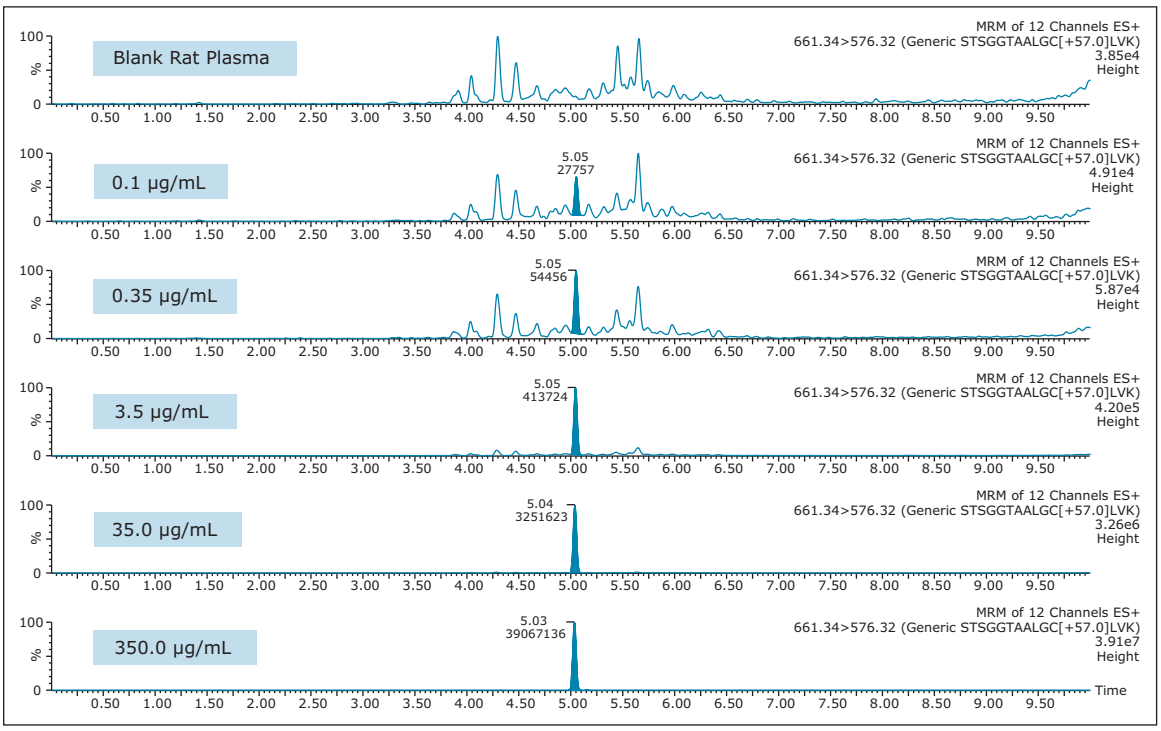

図 4.STSGGTAALGC+57LVK ジェネリックシグネチャーペプチドのベバシズマブ QC クロマトグラム

結論

ProteinWorks eXpress 消化キットを使用して、代表的な検量線用サンプルとラット血漿の QC サンプルからベバシズマブを精製することができました。100 ng/mL という定量下限をわずか 35 µL のラット血漿から確実に実現し、優れた直線性と 10% 未満の精度を保ちました。アフィニティー精製ステップを含む総サンプル調製時間は 6 時間未満でした。消化処理はわずか 2 時間強で完了しました。ユニバーサルなキットベースのアプローチにより、経験の浅いユーザーでも、シンプルで段階的なプロトコールと標準化された秤量済み試薬一式を使用して低い検出下限を達成することができます。同時にメソッドに必要な感度と移管性の双方が保証されます。

さらに、この最適化されたキットは、モノクローナル抗体からのユニークペプチドとジェネリックペプチド双方を同時に高感度で定量するために十分な柔軟性を備えています。これは、複数のペプチドから得られた確証的データにより、タンパク質のバイオアナリシスワークフローにおける LC-MS 使用の信頼性が裏付けられるという点できわめて重要です。

参考文献

1. McKinsey and Company; Data Source: Evaluate Pharma, US Patent Expiration Dates.
2. Medicines in Development: *Biologics*, PhRMA, phrma.org report 2013.
3. Avastin product insert, *Roche*
4. Genentech site for Health Care Professionals, www.avastin-hcp.com
5. Emily Bergsland and Maura N. Dickler, *The Oncologist*, June 2004 vol. 9 Supplement 1 36–42.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com

東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12 第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118

大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 新大阪トヨタビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734

ショールーム 東京 大阪

サービス拠点 東京 大阪 札幌 福島 静岡 富山 名古屋 徳島 福岡

Waters、ACQUITY UPLC、Xevo、MassLynx および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。ProteinWorks は Waters Corporation の商標です。の他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2016 Waters Corporation. Produced in Japan. 2016年4月 720005534JA PDF