Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

キットベースの標準化された迅速なアプローチで ラット血漿中のインフリキシマブを高感度定量

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可能です。インフリキシマブにおいて検出下限 10 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

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

ACQUITY UPLC® Peptide BEH C_{18}、
300Å 1.7 µm、2.1 mm × 150 mm、カラム
(製品番号 186003687)

ACQUITY UPLC

Xevo® TQ-S 質量分析計

ProteinWorks µElution SPE クリーンアップキット

キーワード

モノクローナル抗体、インフリキシマブ、Remicade、タンパク質定量、eXpress Digest

はじめに

医薬品開発の分野では、抗体や ADC などの高分子が注目を集めており、従来の「低分子」を扱ってきた科学者は、複雑で時間のかかる研究の性質はもとより、LC-MS によるタンパク質定量における多大な潜在的ワークフローにより、困難な状況に置かれています。このことは、ELISA および他のイムノアフィニティー(IA)メソッドの使用が一般的であるタンパク質バイオマーカーの研究に携わる研究者にも当てはまります。IA メソッドは感度が高く簡単に実行できますが、低い試薬の再現性、標準化の欠如、交差反応、限定的なダイナミックレンジ、その他の問題点により、LC-MS への転換が進んでいます。探索および早期開発段階 / 前臨床研究においてもこの傾向は顕著です。しかしながら、LC-MS のワークフローには多数のサブセグメントが含まれ、それぞれに多くのステップがあります。試薬の選定、時間、温度、試薬の濃度やステップの決定はすべて感度に影響を与え、目的の検出限界を達成するメソッドに短期間で到達するのは困難です。このアプリケーションノートでは、ProteinWorks eXpress 消化キットおよびプロトコールを用いて、ラット血漿からインフリキシ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)。秤量済みでロットトレーサブル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ユニバーサルなサンプル調製メソッドにより、10 ng/mL の インフリキシマブの定量下限値(LLOQ)が得られました。

Formula: $C_{6428}H_{9912}N_{1694}O_{1987}S_{46}$
Molecular Weight: ~ 144190.3 Da

http://www.drugbank.ca/drugs/DB00065

図 1. インフリキシマブ(Remicade)タンパク質の構造

実験方法

サンプル調製

インフリキシマブは、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 のラット血漿からアフィニティー精製されました。その後、ProteinWorks eXpress 消化キットおよび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およびプロトコールを使用して、シグネチャーペプチドを精製しました。

分析条件

LC システム： ACQUITY UPLC

検出： Xevo TQ-S 質量分析計、ESI+

カラム： ACQUITY UPLC Peptide BEH C_{18}、300Å、1.7 µm、2.1 mm × 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：

流速 (mL/min)	時間 (min)	プロファイル %A	% B	Curve
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 (kv)：3

コーン電圧 (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/時)：150

コリジョンガス流量 (mL/分)：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)
DILLTQSPAILSVSPGER*	633.10›731.80	31	21
SINSATHYAESVK*	469.6›603.80	40	10
DSTYSLSSTLTLSK	751.88›836.47	31	24
SVSELPIMHQDWLNGK (ISTD)	618.64›834.41	16	12

* ユニークシグネチャーペプチド

表 1. インフリキシマブペプチドおよび内標準ペプチドの MRM 条件

結果および考察

インフリキシマブの米国での特許が切れる 2017 年が近づいており [1]、CRO におけるこの重要な医薬品およびバイオシミラー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。このことが、高感度メソッドの開発を困難なものにしています。本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。インフリキシマブのサンプルは、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 時間以内で調製されました。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。最高の感度は重鎖からのユニークペプチド SINSATHYAESVK を使用して実現され、追加のユニーク（DILLTQSPAILSVSPGER、軽鎖）およびジェネリック（DSTYSLSSTLTLSK、軽鎖）インフリキシマブペプチドが確認のためにモニターされました。一般的なマウス由来 mAb スタンダード（製品番号 186006552）のユニークペプチド（SVSELPIMHQDWLNGK）が内部標準として使用されました。

キットの最適化されたプロトコールと試薬を使用して、インフリキシマブを 10 ng/mL で検出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の定量ペプチド SINSATHYAESVK は、検量線上の全ポイントにおいて 98% を超える平均真度で 4 桁を超える直線性でした。追加の 2 つのペプチドは、全検量線ポイントにおいて 99% 以上の平均真度で 3.5 桁を超える直線性でした。

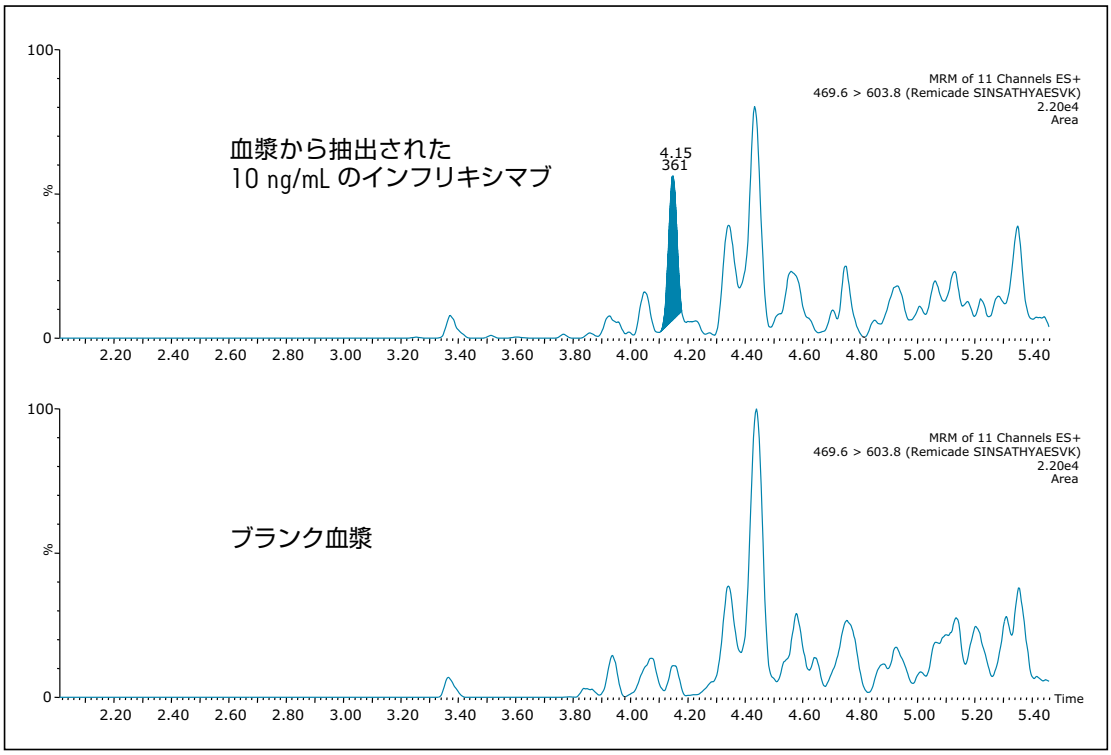

図 2. ブランクラット血漿との比較でラット血漿中のインフリキシマブ 10 ng/mL を示すクロマトグラム。インフリキシマブはユニークペプチド SINSATHYAESVK を使用して定量

ペプチド	検量線範囲（µg/mL）	重み付け	直線性（r^2）	全ポイントの平均真度 %
DILLTQSPAILSVSPGER*	0.05–250	1/X	0.998	100.00
SINSATHYAESVK*	0.01–100	$1/X^2$	0.995	98.47
DSTYSLSSTLTLSK	0.10–500	$1/X^2$	0.997	99.34

* ユニークシグネチャーペプチド

表 2. ラット血漿でのインフリキシ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全相対標準偏差（%CV）が 6% 未満と優れていました。これを表 3 にまとめます。実際の SINSATHYAESVK ペプチドからの QC サンプルに対する平均 %CV は 3% 未満でした。

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
SINSATHYAESVK*	0.035	0.036	0.001	2.78	103.1
	0.350	0.331	0.003	0.80	94.5
	3.500	3.330	0.105	3.15	95.1
	35.000	38.287	1.168	3.05	109.4
	350.000	–	–	–	–
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**
DILLTQSPAILSVSPGER*	0.035	–	–	–	–
	0.350	0.359	0.015	4.10	102.6
	3.500	3.210	0.026	0.81	91.7
	35.000	37.054	0.581	1.57	105.9
	350.000	327.304	13.672	4.18	93.5
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	0.333	0.010	2.85	95.3
	3.500	3.271	0.186	5.70	93.5
	35.000	36.256	1.999	5.51	103.6
	350.000	369.975	7.432	2.01	105.7

* ユニークシグネチャーペプチド

表 3. 定量に使用されたすべてのインフリキシマブペプチドからの QC サンプルの統計値

クロマトグラフィーデータの評価から、ピーク幅および残留内因性成分からの分離に関するデータの品質により、低い定量下限値と共に非常に高い真度と精度の実現が促進されたことが明らかです。このことは、図 3 ～ 5 で示されている全シグネチャーペプチドからの QC クロマトグラムで認められます。

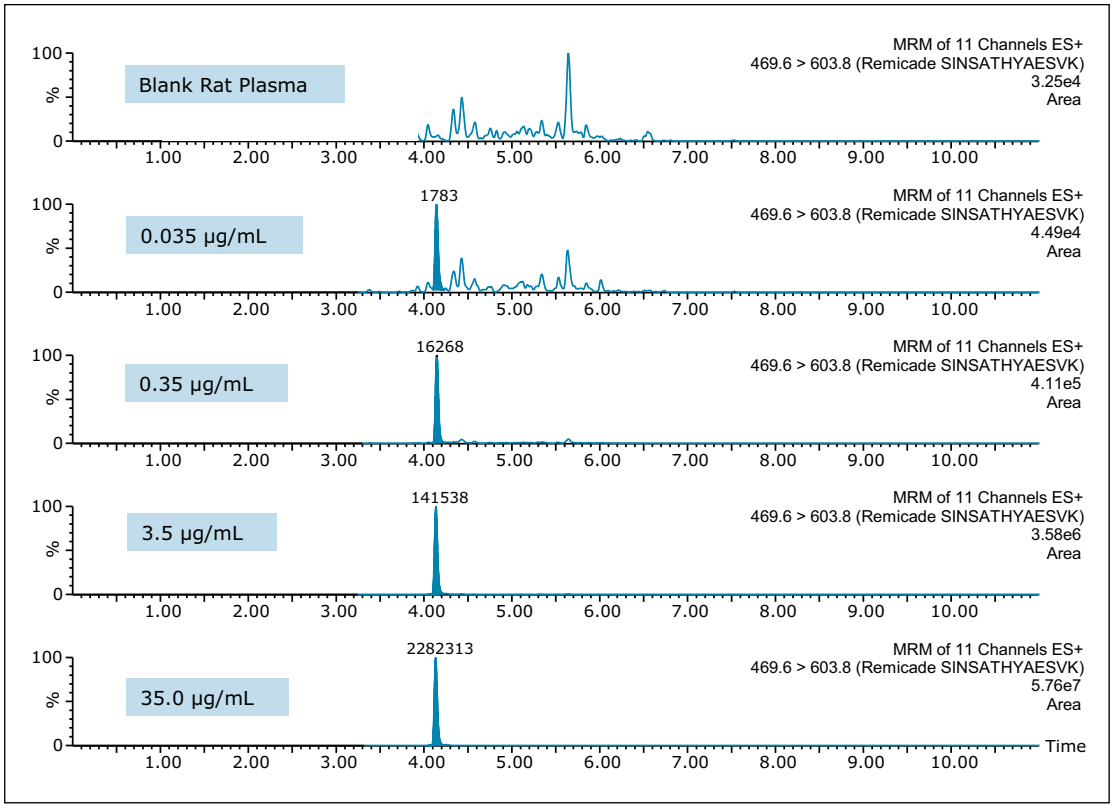

図 3. SINSATHYAESVK ユニークシグネチャーペプチドのインフリキシマブ QC クロマトグラム

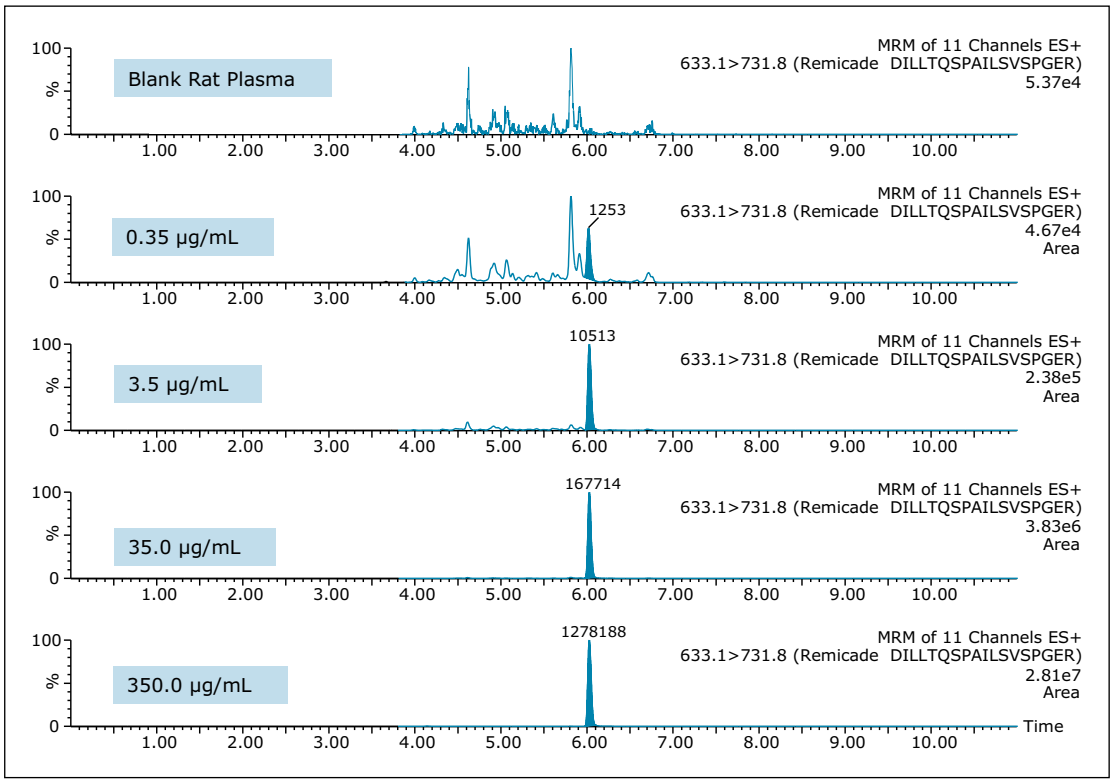

図 4. DILLTQSPAILSVSPGER ユニークシグネチャーペプチドのインフリキシマブ QC クロマトグラム

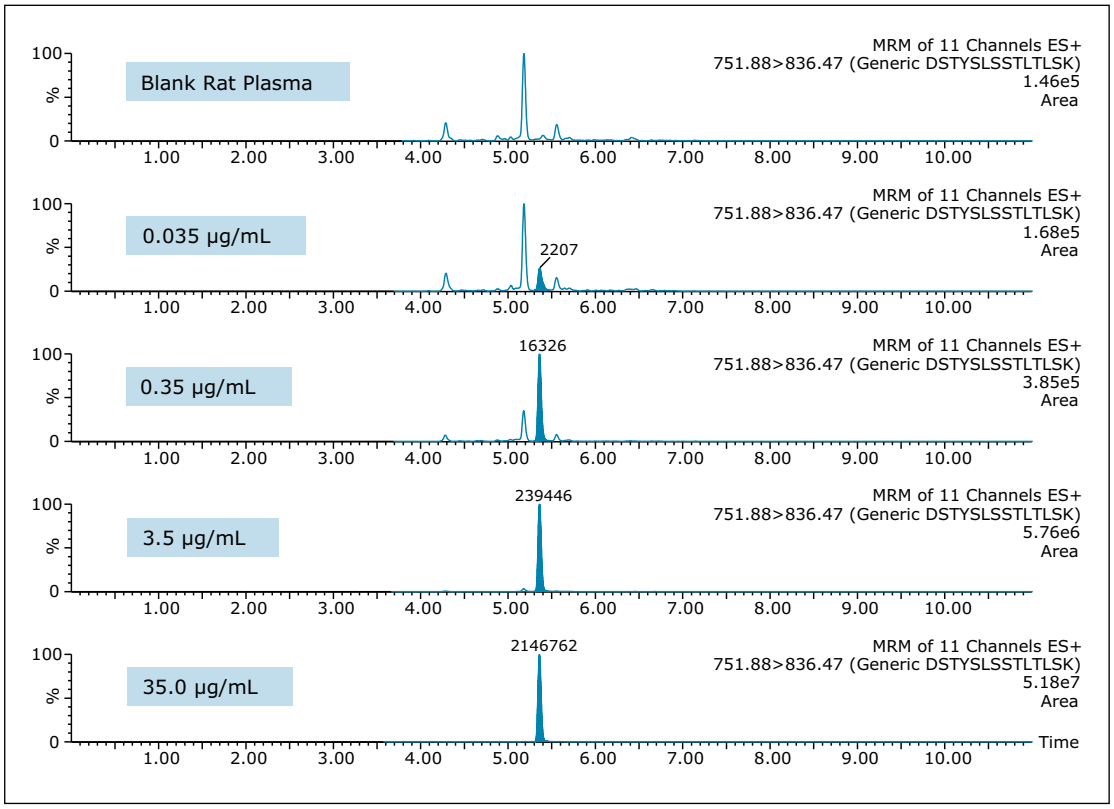

図 5. DSTYSLSSTLTLSK ジェネリックシグネチャーペプチドのインフリキシマブ QC クロマトグラム

結論

ProteinWorks eXpress 消化キットを使用して、代表的な検量線のセットとラット血漿の QC サンプルからインフリキシマブを精製することができました。10 ng/mL という定量下限を確実に実現し、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。その中で消化処理に係る時間はわずか 2 時間強でした。ユニバーサルで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非常に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求められる移管性の双方が保証されます。

参考文献

1. McKinsey and Company; Data Source: Evaluate Pharma, US Patent Expiration Dates.

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。
ProteinWorkds は Waters Corporation の商標です。そ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 720005535JA PDF