[TECHNOLOGY BRIEF]

ジェネリック内標準とタンパク質バイオアナリシスワークフローチェック用スタンダードとしてのマウス由来インタクトモノクローナル抗体

Authors: Mary Lame, Hua Yang, Sherri Naughton, and Erin Chambers

目的

マウスのインタクトモノクローナル抗体がジェネリック内標準として、またタンパク質バイオアナリシスにおけるワークフローチェックとシステム性能評価用スタンダードとして有用性があることを示します。

背景

低分子のバイオアナリシスを行っている科学者がタンパク質のバイオアナリシス研究を行う必要性に直面した場合、問題は容易ではないかもしれません。最初に直面する課題の 1 つは、内標準（IS）の選択です。シンプルで簡単な低分子用のワークフローが一般的になっている一方、タンパク質の定量には消化やアフィニティー精製などの馴染みのないプロセスが多く含まれます。これらのプロセスの有効性をモニターするには、適切な内標準を使用する必要があります。同位体標識や末端アミノ酸残基が延長されたシグネチャーペプチドなどのオプションは、消化効率の補正、あるいはタンパク質のプルダウンアッセイにおいてはあまり有効ではありません。代替ペプチドアプローチによるタンパク質定量の最適な IS はタンパク質です。SILu™ Mab などの標識付き抗体 IS はありますが、極めて高価な場合があります。

タンパク質の定量ワークフローは複雑で多くの課題があり、その中でも内標準の選択や分析能力の証明に関する課題は少なくありません。長い間、リガンド結合法（LBA）が高分子定量のゴールドスタンダードでしたが、LC-MS は、特異性の改善、真度および精度の改善、さらに標準化が難しい事が多い生物学的試薬の長い開発スケジュールを回避できることにより、分析法の第一の選択肢となりました。

LC-MS によるタンパク質バイオアナリシスには明らかなメリットがあるものの、比較的新しい技術であり、従来の低分子用のトレーニングを受けた科学者（タンパク質などの高分子の取扱に慣れていない科学者）によって実施されることが多くあります。

ウォーターズは LC-MS によるタンパク質バイオアナリシスをサポートすることを目的として、マウス由来モノクローナル抗体スタンダードを開発しました。抗体医薬品創薬研究のためのジェネリック内標準として、またこうした新しいワークフローの技能評価をする上で使用することができます。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

また、タンパク質バイオアナリシスワークフローには多くのセグメントや各セグメント内に複数のステップが存在するだけでなく、ワークフローのかなりの部分は一般的な低分子バイオアナリシスの担当者にとって未知の技術で構成されています。不慣れなステップに加え、多くの特殊な（生物学的なものも含む）試薬を前調製する必要性により、エラー、精度低下、再現性低下などが生じる可能性があります。特性が明らかとなっているワークフローチェック用標準と、キットおよびプロトコールの使用は、プロセスの習得と検証のみならず、分析技能の証明においても理想的な方法です。

ソリューション

ウォーターズは、ProteinWorks™ eXpress Digest キットと共に使用するジェネリック内標準およびタンパク質バイオアナリシスの技能評価とワークフローチェックのツールとして、マウス由来インタクトモノクローナル抗体（製品番号 186006552）を開発および検証してきました。このスタンダードを繰り返し使用して、これらのワークフローに対するシステムの準備状況と正常性を確認することもできます。このマウス抗体は、サンプル前処理の前に添加して、複数の段階からなる複雑なワークフローのすべてのステップにおける変化や、サンプルロスを効率的かつ効果的に補正することができ、代替ペプチドアプローチによる抗体定量に理想的な内標準です。また、本マウス抗体を内標準として使用することにより、血漿からのタンパク質医薬品のアフィニティー精製（使用されている場合）における効率、回収率、その他の変化を補正することもできます。さらに、抗体アナログ医薬品定量に必要な、消化効率や容量の変化に対する補正に理想的であり、探索研究用に適した汎用 IS です。なお、IS として使用する場合は、血漿中の最終濃度を 20 ～ 50 µg/mL にすることをお勧めします。

マウス抗体の適用範囲を広げるため、このマウス抗体から複数のシグネチャーペプチドを識別しました。使用されているシグネチャーペプチドに応じて、ヒト、ラット、または他の種での特異性を獲得できます。たとえば、重鎖からの SVSELPIMHQDWLNGK および VNSAAFPAPIEK ペプチドはラット、ヒト、およびマウスの血漿において特異的です。MNSLQTDDTAK ペプチドはヒトとマウスでは特異的ですがラットの血漿では特異的ではありません。最後のペプチド NTQPIMDTDGSYFVYSK も、ヒトとマウスの血漿では特異的ですが、ラットでは必ずしも特異的ではありません。ワークフローの性能を確認およびモニターするために、MRM およびクロマトグラフィーテスト条件が提供されています。本マウス由来インタクトモノクローナル抗体の一次配列と、使用可能なシグネチャーペプチドを図 1 に示します。本抗体を ProteinWorks eXpress 消化キットと共にそのプロトコールに従って使用すると、ヒト化モノクローナル抗体タイプの医薬品からのユニークおよびジェネリック両方のシグネチャーペプチドと同じ保持時間に、シグネチャーペプチドが溶出します。たとえば、図 2 は、ProteinWorks eXpress 消化キットで推奨されるクロマトグラフィー条件での、マウスペプチドの溶出プロファイルと、トラスツズマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、ベバシズマブなど抗体医薬品の複数の代表的なユニークおよびジェネリックシグネチャーペプチドを比較したものを示します。さらにウォーターズアプリケーションノート 720005535JA に示されているように、内標準として使用することで、インフリキシマブに対して真度および精度における変動が 10% 以内で、10 ng/mL の定量限界を可能にしました。

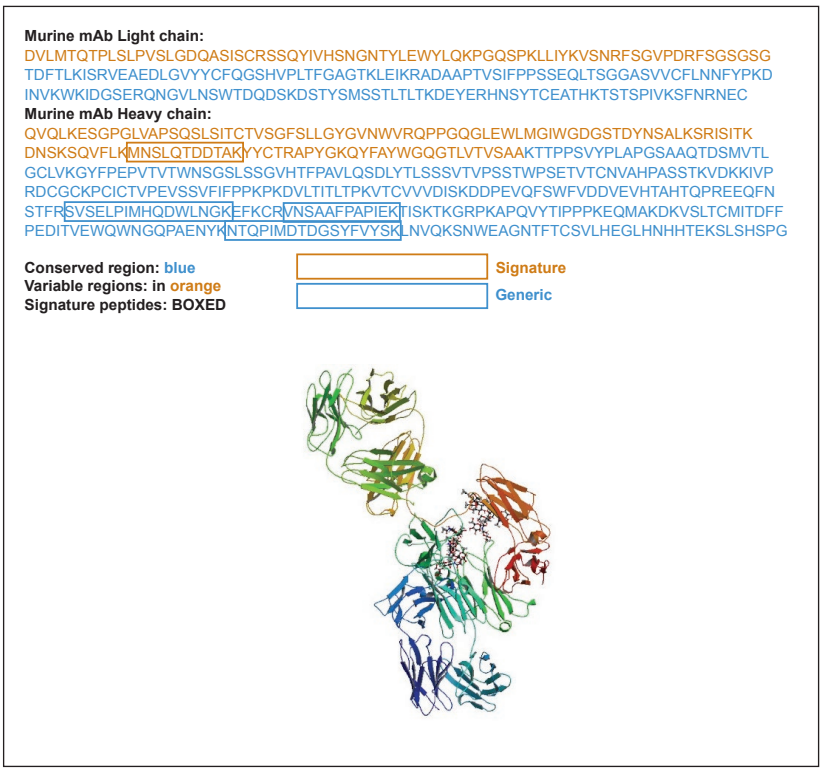
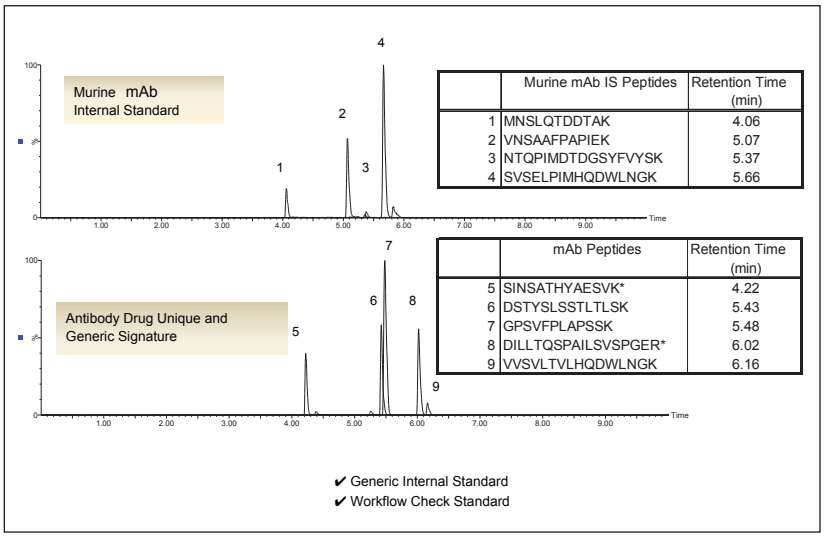


図 1. マウス由来インタクトモノクローナル抗体標準のシーケンスとシグネチャーペプチドオプション

まとめ

マウス由来インタクトモノクローナル抗体が開発され、指定されている MRM および LC 条件と組み合わせて、タンパク質バイオアナリシスワークフローにおける汎用 IS、またはワークフローと分析システムのチェック用標準として使用できます。ProteinWorks eXpress 消化キットのユニバーサルな実証済みプロトコールと、測定済みのロット追跡可能な試薬を併用することで、マウス由来インタクトモノクローナル抗体は、タンパク質バイオアナリシスを簡潔にし、経験の浅いユーザーでも探索研究において高品質のデータをすばやく取得可能にします。さらに、この汎用抗体を使用することにより、分析者の技能と LC-MS システムの性能を評価することができます。



	Murine mAb IS Peptides	Retention Time (min)
1	MNSLQTDDTAK	4.06
2	VNSAAFPAPIEK	5.07
3	NTQPIMDTDGSYFVYSK	5.37
4	SVSELPIMHQDWLNGK	5.66

	mAb Peptides	Retention Time (min)
5	SINSATHYAESVK*	4.22
6	DSTYSLSSTLTLSK	5.43
7	GPSVFPLAPSSK	5.48
8	DILLTQSPAILSVSPGER*	6.02
9	VVSVLTVLHQDWLNGK	6.16

図 2. マウス由来インタクトモノクローナル抗体のシグネチャーペプチドのクロマトグラフィー溶出プロファイル（上段）と、さまざまな 抗体医薬品のシグネチャーペプチド（下段）の比較

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 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。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2月 720005543JA PDF