ペレット消化（タンパク質を沈殿後に消化）と ProteinWorks eXpress Direct 消化キットを使用したTrastuzumabのLC-MS定量

Mary Lame, Paula Orens, Sherri Naughton, and Erin Chambers
Waters Corporation, Milford, MA, USA

目的

ProteinWorks™ キットがペレット消化と互換性があることを示します。また、ペレット消化と ProteinWorks eXpress Direct 消化 キットを組み合わせることにより、モノクローナル抗体（mAb）であるトラスツズマブ（Herceptin）に対する感度や選択性が向上することを示します。

背景

タンパク質医薬品は相互に類似しており、また他の血漿 / 血清タンパク質との間にも類似性があるため、マトリックスおよび同重体の影響が大きいことが多く、抗体や他のタンパク質ベースの医薬品に対する定量 LC-MS アッセイの選択性と感度は大きく制限される可能性があります。このような問題の主要な原因の 1 つは血清アルブミンです。アルブミンが、35～50 mg/mL 存在すると顕著なイオンサプレッションを引き起こすだけではなく、その存在によって消化の効率が低下する可能性があります。またごく少量の場合でも、必要な酵素の量が増えるためアッセイコストが大幅に上昇します。このため、サンプルの複雑さを低減し、特異性と感度を高めるため、別のクリーンアップ方法（タンパク質沈殿、Protein A/G やより特異的なアフィニティー精製、固相抽出、限外濾過フィルターなど）が採用されることがよくあります。これらの手法のうち最も効果的なものは、タンパク質消化前の有機溶媒によるタンパク質沈殿（PPT）です。PPT によって、低分子化合物、リン脂質、塩や一部のタンパク質を含む水 / 有機溶媒層が形成されます。通常、ペレットにはより大きな沈殿タンパク質が含まれます。有機溶媒の選択

多くの場合、タンパク質定量ワークフローは複雑で多くの時間と労力を要し、複雑な生体マトリックスから正確な定量のための特異性と感度を実現するには広範なサンプルクリーンアップが必要とされます。

タンパク質レベルでアフィニティー精製を行うとアッセイ感度が大幅に向上しますが、必要なコストと時間は探索研究に対しては現実的ではありません。タンパク質沈殿のようなより簡単なサンプル前処理を実施した後、標準化されたキットベースのアプローチを使用することでメソッドの開発が最小限で済みます。このタンパク質沈殿とキットベースのアプローチは、タンパク質定量を始めたばかりのアナリストでも高感度で正確かつ頑健な定量を実現できる標準的で汎用性のある選択肢です。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

および有機溶媒と血漿の比率によっては、抗体などのタンパク質を沈殿させながら、大部分のアルブミンを液層へ溶解した状態で除去することが可能です。この方法の利点は、干渉するアルブミン、界面活性剤、比較的低分子量のタンパク質、リン脂質、その他の生体マトリックス中内因性成分の大部分を除去しながら、抗体および他の大きなタンパク質を短時間で濃縮できるシンプルで低コストの方法であることです。最終的に、タンパク質バイオアナリシス用の汎用性のある標準化された LC-MS アプローチにこのオプションを組み込むことで、LC-MS によるタンパク質バイオアナリシスを始めたばかりの科学者でも探索研究を成功に導くことができるようになります。

ソリューション

開始血漿容量、有機溶媒と血漿の比率、有機溶媒の性質、遠心分離の時間と速度などを変更した一連の PPT 条件を使用して予備実験を行いました。性能を評価するため、ヒト血清アルブミン（HSA）およびトラスツズマブのトリプシンペプチドからのピーク面積値をモニターしました。トラスツズマブの感度と回収率を維持または向上させながら（トラスツズマブのペプチドピーク面積値の増加で表されます）、アルブミンの最大の除去（アルブミンのペプチドピーク面積値の減少で表されます）を達成した条件について、さらに実験を行いました。

血漿サンプル（15 µL）のPPTを行った後、バッファーでペレットを再懸濁し、ProteinWorks eXpress Direct 消化 キットとプロトコールを使用して消化しました。代表的なトリプシンペプチド（mAb とアルブミン）を対象とする UPLC-MS/MS メソッドを使用して、PPT 前処理を行った場合と行わない場合の消化済み血漿サンプルを分析しました。PPT 前処理を行わない血漿サンプルと比較したときの mAb トリプシンペプチドの感度上昇（ピーク面積値）および複数のヒト血漿アルブミンペプチドの減少（ピーク面積値）に基づいて、さまざまな血漿 PPT 前処理の中から、3 つの PPT 条件（血漿：イソプロパノール 1:1、血漿：1% のトリクロロ酢酸（TCA）を含むメタノール 1:1 、血漿：1% のトリフルオロ酢酸（TFA）を含むイソプロパノール 1:10）が選択されました。さまざまな PPT 処理を行ったときの 3 つの特定のアルブミンペプチド（AEFAEVSK、LVNEVTEFAK、QTALVELVK）

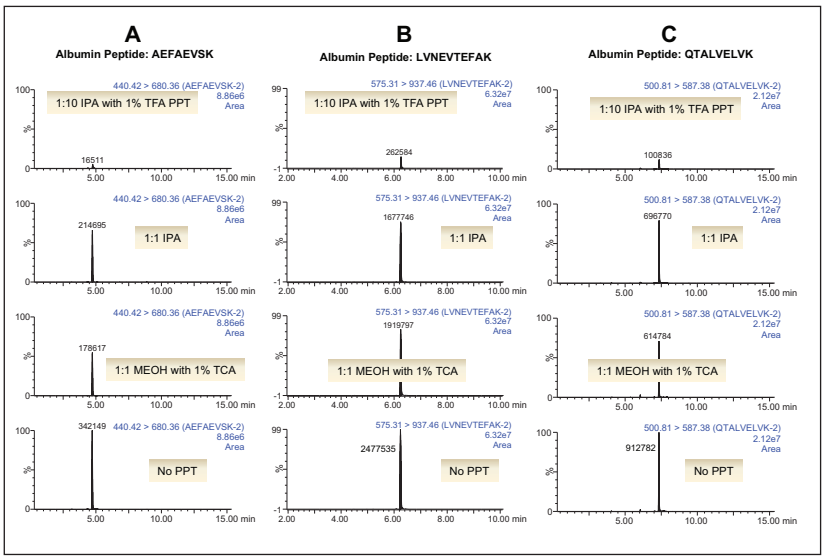

図 1. PPT 前処理および ProteinWorks eXpress Direct 消化 キットを用いた消化によるアルブミン削減（3 つの代表的ペプチド）を示すクロマトグラム。3 つの PPT 前処理の結果、および PPT 処理なしと比較したものを、それぞれ A～C に示します。

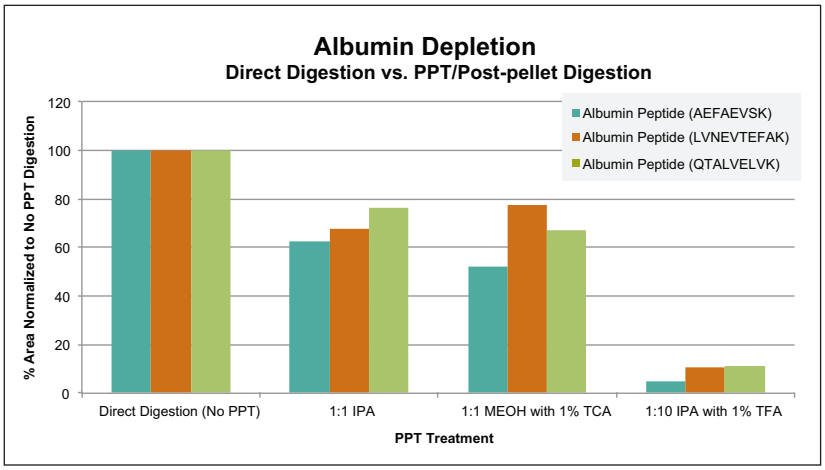

図 2. ProteinWorks eXpress Direct 消化キットを使用し、PPT 前処理を行う場合と行わない場合の、代表的アルブミンペプチド（AEFAEVSK、LVNEVTEFAK、QTALVELVK）の除去効率を示す棒グラフ。

の減少を、図 1 の A～C に示します。3 つの処理のいずれでもアルブミンはある程度除去されましたが、血漿：1% のトリフルオロ酢酸（TFA）を含むイソプロパノール（IPA）1:10 による PPT で最も効果的に（90% 以上）アルブミンペプチドが除去されました（図 2 を参照）。上記の 3 つの PPT 条件のいずれを使用した場合でも、トラスツズマブ由来の 3 つのユニークトリプシンペプチドすべてのピーク面積値が大幅に上昇しました（図 3）。実際、図 4 で示されているように、最善とされる 3 種類の PPT 前処理では、ペプチドピーク面積値が平均で 2 ～ 8 倍に増加しました。

その後、血漿を用いて検量線を作成しました。15 µL の血漿を異なる PPT 条件に適用した後、汎用の ProteinWorks eXpress Direct 消化 キットとプロトコールを使用して処理しました。性能の初期測定基準として、3 種類のユニークトラスツズマブペプチドの直線性と真度を評価しました。ProteinWorks キットを消化に使用した場合、すべての PPT 処理で、すべてのペプチドの検量線は $R^2 \geq 0.99$ の直線性が得られました（1/x の重み付けを使用）。検量線ポイントの平均 % 真度は 99% 以上でした（表 1）。血漿サンプルの PPT 前処理（1% TFA を含む 1:10 IPA）および ProteinWorks eXpress Direct 消化 キットでのペレット消化を使用して調製された 3 種類のトラスツズマブトリプシンペプチド（DTYIHWVR、IYPTNGYTR、FTISADTSK）の代表的な検量線を、図 5 の A～C に示します。

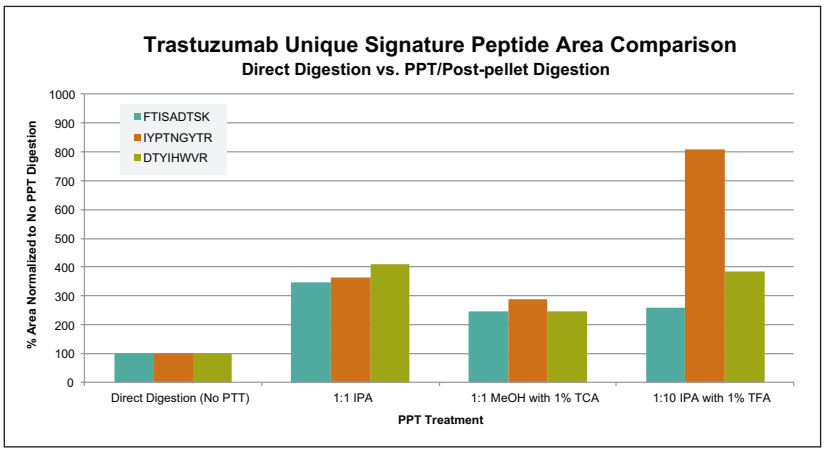

図 3. ProteinWorks eXpress Direct 消化キット を使用し、PPT 前処理を行う場合と行わない場合の、トラスツズマブにおけるユニークトリプシンペプチド 3 種類のピーク面積値の向上例

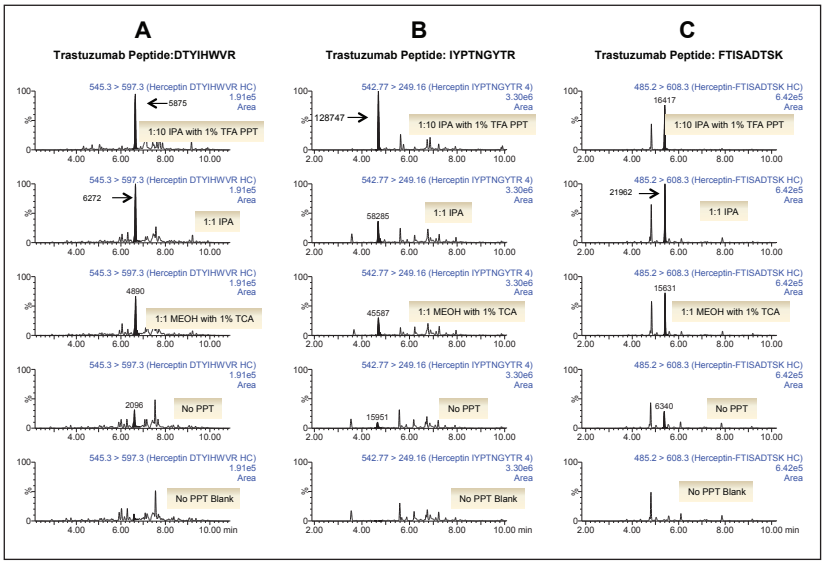

図 4. ProteinWorks eXpress Direct 消化キットを使用し、PPT 前処理を行う場合と行わない場合の、トラスツズマブの 3 種類のユニークトリプシンペプチドのクロマトグラフィーの性能およびシグナル強度の向上例

表 1. PPT および ProteinWorks eXpress Direct 消化 キットによるペレット消化後の、血漿中のトラスツズマブの定量に使用されたシグネチャーペプチドの検量線の範囲、直線性、および真度

タンパク質	ペプチド	直線性（r^2）1/xで重み付け			平均 % 真度		
検量線範囲 5.0 ～ 50.0 （µg/mL）		15 µL 血漿 IPA：1% TFA（1:10）	15 µL 血漿：IPA（1:1）	15 µL 血漿：MeOH with 1% TCA（1:1）	15 µL 血漿：IPA with 1% TFA（1:10）	15 µL 血漿：IPA（1:1）	15 µL 血漿：MeOH with 1% TCA（1:1）
トラスツズマブ	FTISADTSK	0.996	0.997	0.992	99.98	99.99	98.64
	DTYIHWVR	0.994	0.995	0.993	100.00	100.01	98.73
	IYPTNGYTR	0.999	0.997	0.995	100.00	100.01	99.31

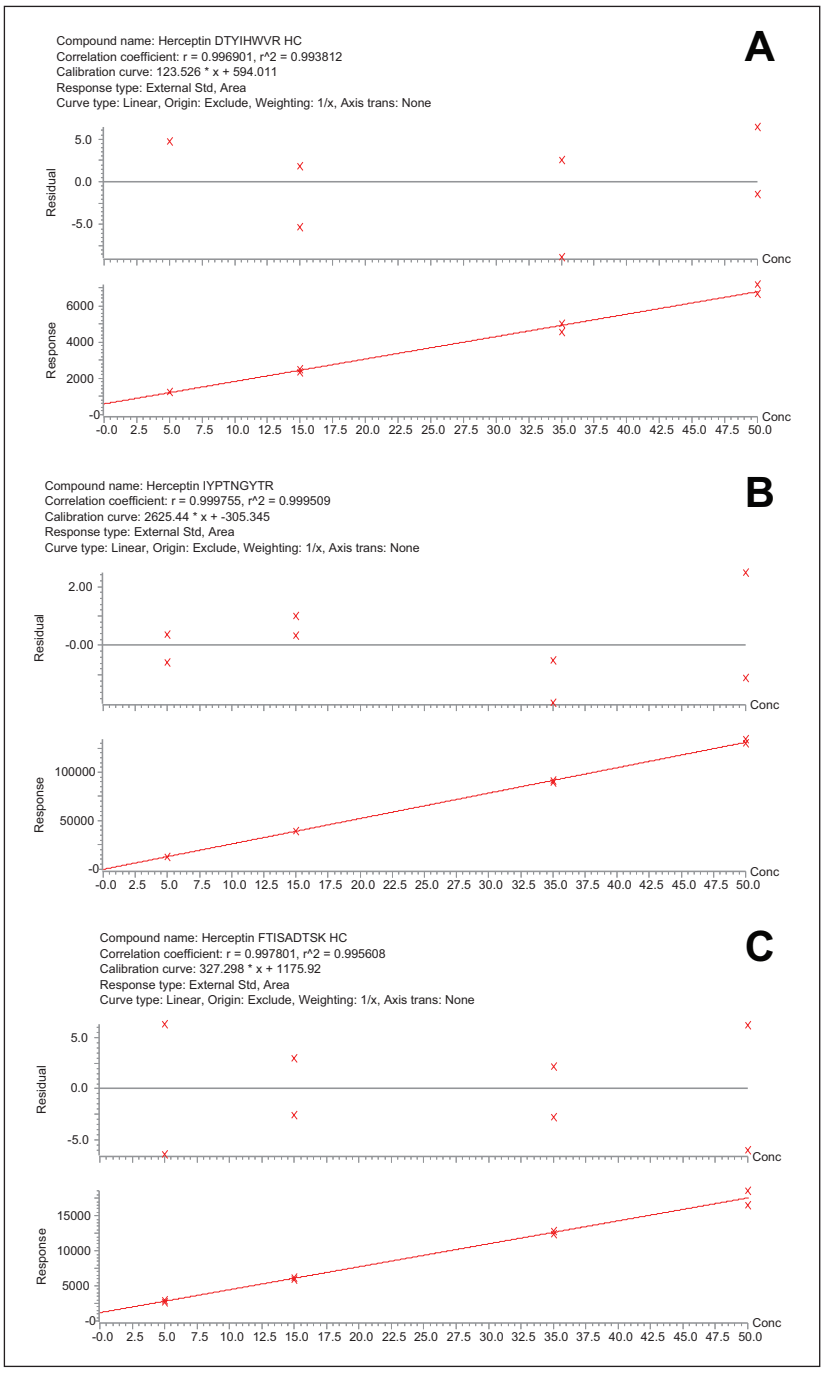

図 5. PPT 前処理（血漿：1% のトリフルオロ酢酸を含む イソプロパノール 1:10）および ProteinWorks eXpress Direct 消化 キットでペレット消化したトラスツズマブにおける トリプシンペプチド 3 種（DTYIHWVR、IYPTNGYTR、FTISADTSK）の代表的な検量線を、それぞれ A～C に示します。

まとめ

モノクローナル抗体トラスツズマブを定量するための頑健で再現可能なペレット消化および LC-MS/MS 方法論について紹介しました。ProteinWorks eXpress Direct 消化 キットを使用したシンプルな PPT クリーンアップとペレット後消化により、代替ペプチドアプローチでトラスツズマブの正確で頑健な LC-MS 定量を実現できます。上記の手法を使用するとトラスツズマブペプチドのピーク面積値が 2～8 倍に増え、感度と特異性が大幅に向上して、正確で再現可能な定量結果を得ることができました。

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 720005574JA PDF