[TECHNOLOGY BRIEF]

ProteinWorks eXpress 消化キットを使用した抗体定量

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

目的

ProteinWorks™ eXpress Direct 消化 キットが、LC-MS/MS によるモノクローナル抗体（mAb）医薬品の定量において、多様なサンプル容量でも幅広く適用が可能で、柔軟性を有していることを示します。

背景

過去 10 年間で、MS プラットホームテクノロジーの感度と使いやすさは着実に向上してきました。同時に、この感度の向上によって、より少容量のサンプルへの適用も可能となってきました。このように、現在ではマイクロサンプリングは一般的に使用されるものとなっています。マイクロサンプリングは、前臨床の段階における齧歯動物などの小動物からの採血において、動物の使用を最小限に抑えることができます。また、バイオ医薬品の開発が増えることで、治療用および内因性のペプチドとタンパク質の定量における LC-MS の使用も増加しています。タンパク質およびペプチドの定量分析において、サンプル少容量化の要求は、複雑なワークフローと、低分子化合物と比較して低い MS 感度と共に、大きな課題となります。一部の研究では 50 µL 未満の容量のサンプル使用が主流になっている一方、他の研究では感度を高めるためにさらに多くのサンプルを必要としています。したがって、広範な血漿容量に対応し、誰にでも簡単に実行できるワークフローからなる、シンプルなキットベースのアプローチが求められています。

近年、ペプチドやタンパク質医薬品のバイオアナリシスにおける LC-MS の利用が注目されています。これは、LC-MS の [多成分同時分析可能、優れた特異性、広いダイナミックレンジおよびメソッド開発時間の短縮] などの多くのメリットからです。しかしながら、タンパク質の定量に関しては、感度、サンプルの少容量化、多くの労力を要する複雑なワークフローなどの課題が依然として存在します。これらは特にリガンド結合アッセイと対照的であると言えます。そのため、少容量サンプル [50 µL 未満] に理想的な、シンプルで適用範囲の広い標準化されたタンパク質定量ワークフローが強く求められています。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

ソリューション

治療用および内因性のタンパク質を定量するための LC-MS の使用は着実に拡大していますが、低分子の LC-MS 分析とは異なり、新しい特有の課題が数多く発生しています。この方法では、通常、血漿で酵素消化（最も一般的なものはトリプシン）を実行した後、LC-MS /MS の MRM を使用して 1 つまたは複数の代表的トリプシンペプチドの定量を実行する必要があります。本手法の単一の標準ワークフローというものは存在せず、多くの場合、高分子化合物に特有の複雑かつ面倒なワークフローを学習して実施しなければなりません。必要なサンプル容量は、アッセイまたは感度の要件によって異なります。そのため、何から始めればよいのか分かりにくいことがあります。特に、分子量、構造、アミノ酸配列が大きく異なる可能性がある多様なタンパク質を考慮する場合は複雑です。このような理由から、モノクローナル抗体医薬品（血漿量が 70 µL 以下のインフリキシマブ、アダリムマブ、ベバシズマブ、トラスツズマブ）の同時定量用に、ProteinWorks eXpress Direct 消化 キット（製品番号 176003695）を使用した、柔軟性が高く汎用性があるキットベースのサンプル前処理方法を開発しました。検討した内容を概略します。まず、mAb を 5 ～ 50 µg/mL の濃度で血漿に添加しました。その後、15、35、70 µL の mAb 添加血漿を、ProteinWorks eXpress Direct 消化 キットの汎用プロトコールで直接消化しました。ProteinWorks キットを消化に使用した場合、検討したすべての血漿サンプル容量で、全 mAb 薬品由来の定量用ペプチドの検量線は $R^2 \geq 0.99$ の直線性でした（1/x の重み付けを使用）。各検量線ポイントの平均真度は 99% 以上でした（表 1）。代表的なインフリキシマブトリプシンペプチド（DILLTQSPAILSVSPGER）における各開始血漿容量の検量線を、図 1 のパネル A ～ C に示します。インフリキシマブ、ベバシズマブ、トラスツズマブ、アダリムマブの代表的シグネチャーペプチドの複数の添加濃度におけるクロマトグラムを図 2 のパネル A ～ D に示します。

表 1. ProteinWorks eXpress Direct 消化 キットを使用したインフリキシマブ、アダリムマブ、トラスツズマブ、ベバシズマブの各開始時血漿容量における検量線の直線性と平均真度

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	35 µL 血漿	70 µL 血漿	15 µL 血漿	35 µL 血漿	70 µL 血漿
Infliximab	SINSATHYAESVK	0.999	0.999	0.997	100.00	99.99	99.99
	DILLTQSPAILSVSPGER	0.999	0.998	0.994	99.99	100.00	100.01
Trastuzumab	FTISADTSK	0.997	0.993	0.998	100.00	100.01	99.99
	DTYIHWVR	0.995	0.995	0.996	100.00	100.02	100.02
	IYPTNGYTR	0.998	0.996	0.991	99.98	99.98	98.79
Bevacizumab	STAYLQMNSLR	0.999	0.998	0.995	100.00	100.01	99.99
	FTFSLDTSK	0.999	0.999	0.993	100.02	100.00	100.00
Adalimumab	APYTFGQGTK	0.994	0.997	0.995	99.99	99.99	99.99
	NYLAWYQQKPGK	0.997	0.998	0.999	99.99	100.02	100.01

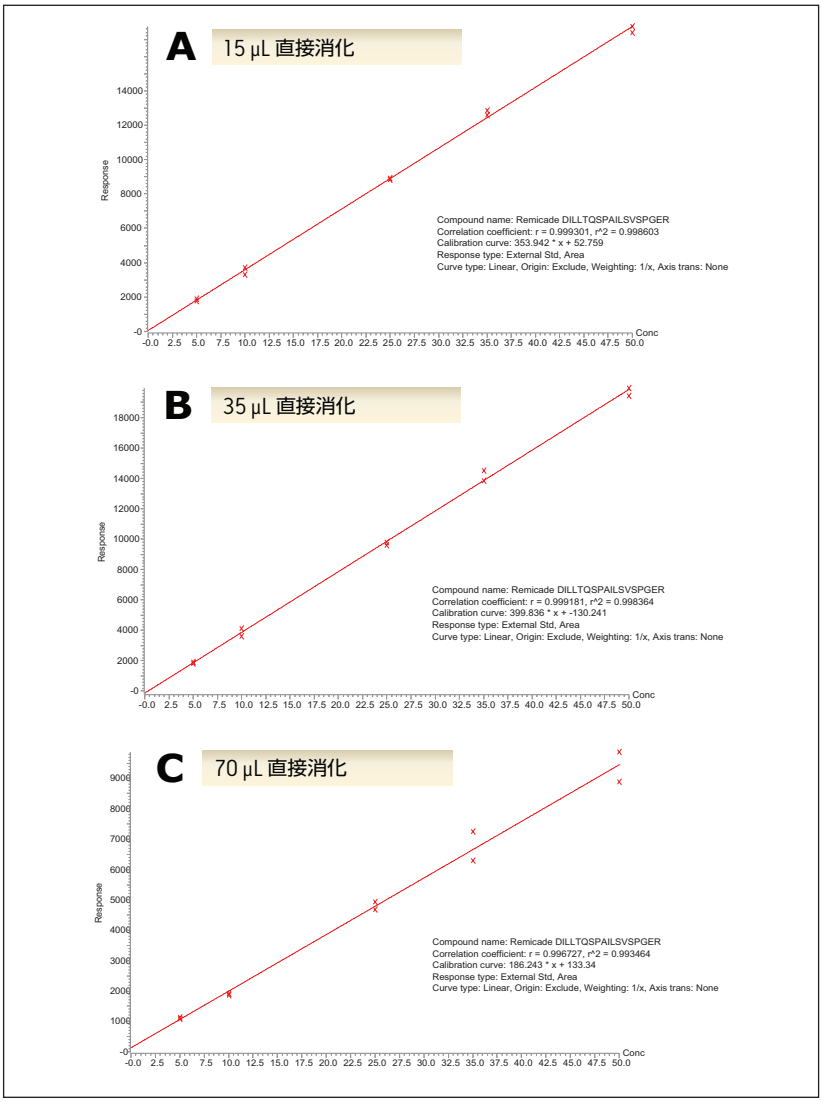

図 1. 15、35、70 µL の血漿の直接消化における代表的な検量線。インフリキシマブシグネチャーペプチド DILLTQSPAILSVSPGER の例

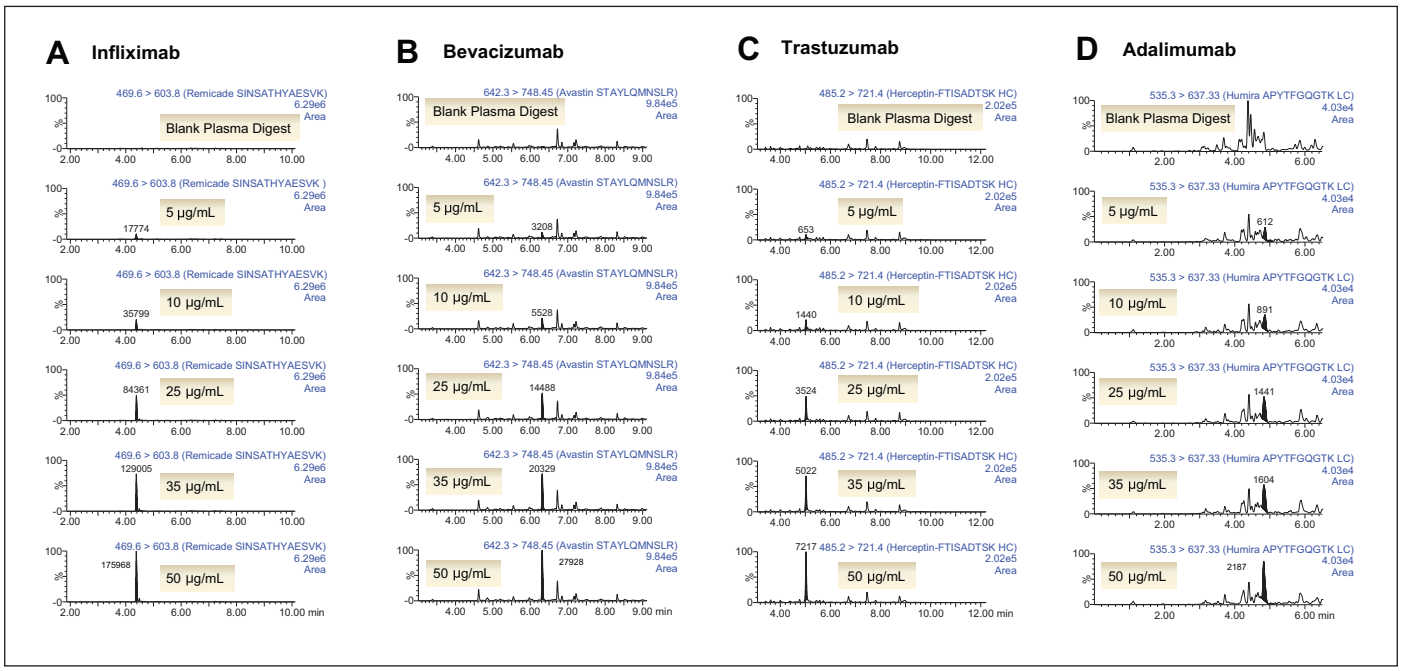

図 2. インフリキシマブ、ベバシズマブ、トラスツズマブ、アダリムマブ（15 µL 開始血漿）の各添加濃度（5～50 µg/mL）におけるクロマトグラム

まとめ

本検討の結果、15～70 µL の範囲の血漿容量に対して、単一のプロトコールを使用した柔軟性のある「キットベース」のアプローチにより、探索研究においてメソッド開発を必要とせず、4 種類のモノクローナル抗体医薬品を正確に定量できることが確認されました。

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4月 720005575JA PDF