[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

# キットベースの汎用アプローチによる、血漿中抗体医薬品トラスツズマブとその抗体薬物複合体トラスツズマブエムタンシン（T-DM1）定量

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

## アプリケーションのメリット

抗体薬物複合体（ADC）医薬品およびモノクローナル抗体（mAb）医薬品を高い再現性で正確に定量可能なシンプルで標準化されたアプローチです。幅広く適用でき最適化された消化キットがメソッド開発を不要にします。

## ウォーターズのソリューション

ProteinWorks™ eXpress Direct 消化 キット（製品番号 176003688）

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

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

ACQUITY UPLC システム

Xevo® TQ-S 質量分析計

## キーワード

抗体薬物複合体、モノクローナル抗体、トラスツズマブエムタンシン、T-DM1、トラスツズマブ、タンパク質定量、eXpress Direct 消化、ProteinWorks

## はじめに

モノクローナル抗体（mAb）および抗体薬物複合体（ADC）は、ターゲット特異性、低い毒性、および高い薬効を持つことから、成長が著しいバイオ医薬品です。mAb 治療薬や ADC 治療薬に対する関心の高まりと共に、医薬品開発をサポートする LC-MS を用いたバイオアナリシスに対する要望も高まっています。従来は、mAb および ADC の定量は、ゴールドスタンダードである ELISA などのリガンドバインディングアッセイ（LBA）により実施されてきました。これらの免疫学的アッセイは感度が高く簡単に実行できますが、試薬の再現性が低いこと、標準化されていないこと、交差反応があること、検量線の直線範囲が限定されることなどの課題があるため、LC-MS への移行が進んでいます。対照的に、MSを使った方法には従来の LBA と比べ、たとえば多成分分析、広い直線範囲、優れた特異性、およびメソッド開発時間の短縮など数多くのメリットがあります。しかし、LC-MS におけるタンパク質定量の問題が無くなったわけではありません。標準化された単一のワークフローが無く、多種多様なワークフローオプションには複雑で多くの労力を要するものもあり、タンパク質バイオアナリシスに慣れていない科学者が実施することは困難です。また、ADC は複雑で不均一な性質を持つため、その開発段階では多くの場合、有効性や毒性の確認、および PK/PD 解析のために複数のバイオアナリシスアッセイを実施することが必要になります。ADC や mAb の酵素消化に LC-MS/MS 分析を組み合わせたトップダウンアプローチは、ADC や mAb の定量においてルーチンになりつつあります。ADC の特性解析および定量に必要な数多くの実験の中でも、総抗体量の測定は重要です。このアプリケーションノートでは、ProteinWorks eXpress Direct 消化キットとプロトコールを用いて、ラット血漿からトラスツズマブ単体と、その ADC であるトラスツズマブエムタンシン（T-DM1）の総量を定量する方法を説明します。

## 実験条件

### サンプル詳細

標準試料溶液および品質管理サンプル（QC）は、トラスツズマブまたは T-DM1 をさまざまな濃度（0.1 ～ 500 µg/mL）でラット血漿に添加し調製しました。マウス由来の Intact mAb Mass Check スタンダード（製品番号 186006552）を汎用の内標準として使用しました。続いて、上記添加血漿サンプル（35 µL）を ProteinWorks eXpress Direct 消化キットの還元アルキル化を含む 5 ステップ消化プロトコールを用いて消化し、LC-MS 用サンプルを調製しました。

### LC条件

LC システム：　ACQUITY UPLC

検出：　Waters Xevo TQ-S 質量分析計、ESI+

カラム：　ACQUITY UPLC Peptide BEH $C_{18}$、300Å、1.7 µm、2.1 × 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
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 (分) | プロファイル %A | %B | カーブ |
|---|---|---|---|---|
| 0.3 | 0.0 | 100 | 0 | 6 |
| 0.3 | 1.0 | 100 | 0 | 6 |
| 0.3 | 16.0 | 50 | 50 | 6 |
| 0.3 | 16.5 | 10 | 90 | 6 |
| 0.3 | 17.5 | 10 | 90 | 6 |
| 0.3 | 18.0 | 100 | 0 | 6 |
| 0.3 | 20.0 | 100 | 0 | 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/Hr）：　150

脱溶媒ガス流量：（L/Hr）：　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

## 結果および考察

トラスツズマブは、ヒト化抗 HER2 モノクローナル抗体で、1998 年に FDA に承認されました。2014 年 7 月の EU 特許満了および目前に迫った 2019 年の米国特許満了に伴い、トラスツズマブおよび その次世代の新しい薬剤である ADC などに対する関心は着実に高まっています。トラスツズマブエムタンシン（T-DM1）は、FDA に承認された ADC で、カドサイラという商品名で市販され、進行乳癌患者の治療薬として使用されています。[1-3] T-DM1 など ADC は、抗体とそれにリンカーを介して共有結合した細胞毒性低分子薬物（ペイロード）で構成されています。ADC は複雑で不均一な性質を持つため、結合型 ADC と非結合型 ADC のそれぞれと、それを合わせたトータル mAb 量、およびペイロード、その他の様々な分解産物や代謝産物を定量するために、複数のバイオアナリシスアッセイが必要になります。LC-MS による ADC や mAb の定量では、通常酵素消化（最も一般的なものはトリプシン）を実行した後、LC-MS/MS 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を定量します。

ProteinWorks eXpress Direct 消化キットとプロトコールを使用して、T-DM1 またはトラスツズマブを含む血漿（35 µL）を直接消化しました。Xevo TQ-S トリプル四重極 MS を使って、シグネチャーペプチドの LC-MS/MS 定量を行いました。クロマトグラフィー分離は、ACQUITY UPLC Peptide BEH $C_{18}$（300A、1.7 µm、2.1 × 150 mm）カラムおよび ACQUITY UPLC システムで行いました。定量では、以下の 3 つのシグネチャートリプシンペプチドを使用しました：IYPTNGYTR、FTISADTSK、および GPSVFPLAPSSK。MS 条件を表 1 にまとめます。

| タンパク質 | 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） |
|---|---|---|---|---|
| T-DM1/トラスツズマブ | IYPTNGYTR | 542.77>249.16 | 36 | 16 |
| | | | 12 | 16 |
| トラスツズマブ | FTISADTSK | 485.20>721.40 | 28 | 22 |
| | | | 28 | 22 |
| トラスツズマブ | DTYIHWVR | 543.30>597.30 | 28 | 24 |
| | | 545.30>710.40 | 28 | 28 |
| トラスツズマブ | GPSVFPLAPSSK * | 593.83>699.40 | 31 | 21 |
| ペイロードを結合している T-DM1の不完全開裂ペプチド | FTISADTSKNTAYLQMNSLR | 1073.17>547.20 | 35 | 38 |
| | | 1073.17>485.22 | 35 | 38 |
| | GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK | 1073.17>547.20 | 35 | 38 |
| マウス mAb（IS） | SVSELPIMHQDWLNGK | 618.64>834.41 | 16 | 12 |
| | VNSAAFPAPIEK | 622.30>654.44 | 28 | 16 |

*表 1. トラスツズマブおよびトラスツズマブエムタンシン（T-DM1）の MRM 条件*
** ジェネリック IgG ペプチド*

分析の視点からは、T-DM1 はリジンをリンカーとする ADC であるため、T-DM1 の定量にはトリプシン消化とそれにより生成するシグネチャーペプチドの選択が課題となります。トリプシンはリジンアミノ酸残基の C 末端側でペプチドを切断しますが、リジン残基が細胞毒性薬剤（ペイロード）を結合している場合には切断しません（不完全開裂）。したがって、T-DM1 の定量にリジンを含むペプチドを選択した場合には、リジンがペイロードと結合しているとリジン残基の不完全開裂がおこる可能性があります。シグネチャーペプチド IYPTNGYTR にはリジン残基が含まれないため、T-DM1 とトラスツズマブの両方を高い信頼性で正確に定量するために使用できます。この理由から、T-DM1 の正確な定量においてリジンを含む 2 種類のペプチド FTISADTSK および GPSVFPLAPSSK を使用する場合は注意が必要です。この 2 種類のペプチドは共にペイロードを結合する可能性を持ち、リジン残基不完全開裂の可能性があり、リジンを含まないペプチドよりも測定濃度が低くなることがあります。

このアプリケーションでは、感度、直線性、真度、および精度のデータが一般的なメソッド検証要件を満たしました。[4] 検量線は、各検量線ポイントに対する平均真度が 100% で 3.5 桁を超える直線性でした。IYPTNGYTR、FTISADTSK、および GPSVFPLAPSSK のトリプシンペプチドについては、0.5 ～ 1.0 µg/mL の定量下限を達成しました。トラスツズマブの検量線から得られた結果のまとめを表 2 に示します。さらに、トラスツズマブ検量線を用いて定量したトラスツズマブおよび T-DM1 の QC サンプルの真度および精度は、% CV が 8 未満と優れていました。これを表 3 にまとめます。

| ペプチド | 検量線範囲（µg/mL） | 重み付け | 直線性（$r^2$） | 平均％真度 |
|---|---|---|---|---|
| IYPTNGYTR | 0.5–500 | $1/x^2$ | 0.995 | 100.01 |
| FTISADTSK | 1.0–500 | 1/x | 0.999 | 100.01 |
| GPSVFPLAPSSK* | 0.5–500 | $1/x^2$ | 0.990 | 100.00 |

*表 2. ProteinWorks eXpress Direct 消化キットを使用して消化された血漿中トラスツズマブの検量線の直線性および範囲、重み付け、平均真度*
** ジェネリック IgG ペプチド*

| mAb/ADC | 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 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| トラスツズマブ | IYPTNGYTR | 0.65 | 0.64 | 0.03 | 4.58 | 99.77 |
| | | 3.5 | 3.25 | 0.19 | 5.96 | 92.90 |
| | | 6.5 | 6.83 | 0.16 | 2.29 | 105.13 |
| | | 35 | 36.41 | 0.42 | 1.16 | 104.03 |
| | | 65 | 63.31 | 2.18 | 3.44 | 97.40 |
| | | 350 | 345.64 | 18.66 | 5.40 | 98.73 |
| T-DM1 | IYPTNGYTR | 0.65 | 0.65 | 0.05 | 6.94 | 100.50 |
| | | 3.5 | 3.36 | 0.24 | 7.10 | 95.87 |
| | | 6.5 | 7.1 | 0.05 | 0.66 | 109.20 |
| | | 35 | 34.51 | 1.09 | 3.17 | 98.57 |
| | | 65 | 59.74 | 3.72 | 6.22 | 91.90 |
| | | 350 | 324.72 | 17.06 | 5.25 | 92.80 |
| mAb/ADC | 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 |
| トラスツズマブ | FTISADTSK | 3.5 | 3.47 | 0.17 | 4.89 | 99.20 |
| | | 6.5 | 6.70 | 0.11 | 1.69 | 103.07 |
| | | 35 | 38.30 | 0.28 | 0.73 | 109.47 |
| | | 65 | 64.12 | 1.68 | 2.63 | 98.67 |
| | | 350 | 357.47 | 9.65 | 2.70 | 102.13 |
| T-DM1 | FTISADTSK | 3.5 | 3.03 | 0.06 | 1.87 | 86.60 |
| | | 6.5 | 6.91 | 0.30 | 4.37 | 106.30 |
| | | 35 | 33.35 | 0.65 | 1.94 | 95.27 |
| | | 65 | 58.70 | 2.93 | 4.99 | 90.30 |
| | | 350 | 322.02 | 7.51 | 2.33 | 92.00 |
| mAb/ADC | 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 |
| トラスツズマブ | GPSVFPLAPSSK | 0.65 | 0.66 | 0.05 | 7.97 | 100.87 |
| | | 3.5 | 3.04 | 0.07 | 2.29 | 86.90 |
| | | 6.5 | 6.27 | 0.09 | 1.41 | 96.50 |
| | | 35 | 35.5 | 1.62 | 4.55 | 101.43 |
| | | 65 | 71.38 | 3.04 | 4.26 | 109.83 |
| | | 350 | 379.79 | 21.64 | 5.70 | 108.50 |
| T-DM1 | GPSVFPLAPSSK | 0.65 | 0.67 | 0.02 | 2.84 | 103.30 |
| | | 3.5 | 3.1 | 0.06 | 1.80 | 88.47 |
| | | 6.5 | 6.19 | 0.31 | 4.98 | 95.15 |
| | | 35 | 33.55 | 1.44 | 4.29 | 95.87 |
| | | 65 | 63.08 | 4.04 | 6.40 | 97.03 |
| | | 350 | 336.36 | 15.35 | 4.56 | 96.10 |

*表 3. 定量に使用された IYPTNGYTR、FTISADTSK、および GPSVFPLAPSSK のペプチドから得られたトラスツズマブおよび T-DM1 の QC サンプルに関する統計値*

3 種類すべてのシグネチャーペプチドに対する QC クロマトグラフィー性能と高感度定量の達成は、それぞれ図 1～3の A（トラスツズマブ）および B（T-DM1）で明確に示されています。

抗体に結合した細胞毒性薬剤分子の疎水性および立体構造の違いにより、結合した T-DM1 ペプチドは通常、クロマトグラフィーではジアステレオマーとして遅く溶出します。さらに、T-DM1 ペプチドは、衝突誘起解離（CID）により、共通のフラグメント（547.2 *m/z*）を生成します。このフラグメントは、CID プロセスで分解した薬剤分子の一部に相当します。

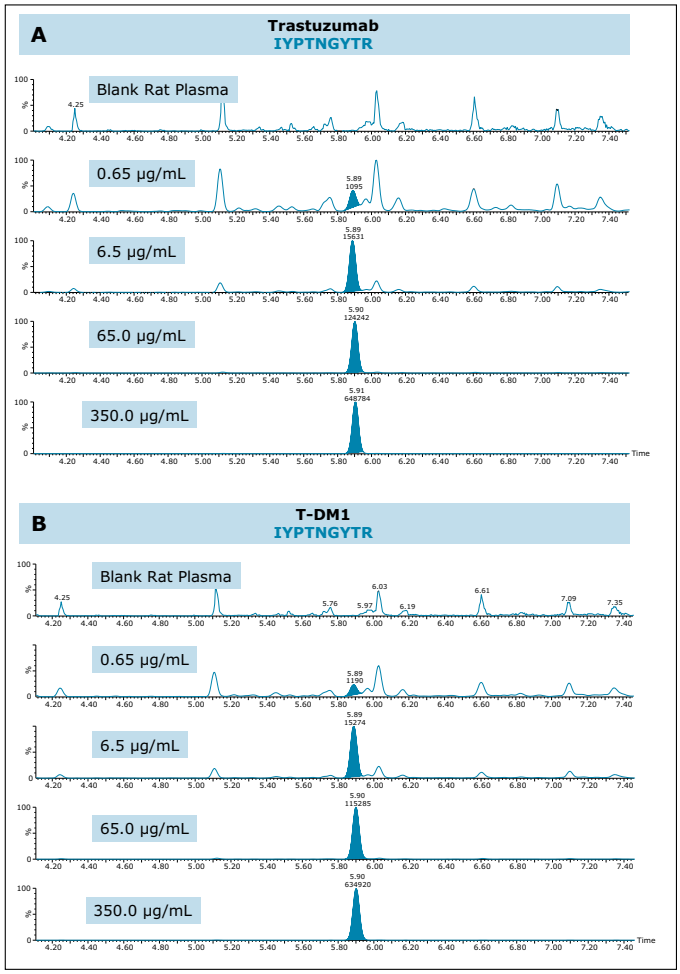


*図 1. トラスツズマブ (A) および T-DM1 (B) の QC クロマトグラム : ユニークシグネチャーペプチド IYPTNGYTR*

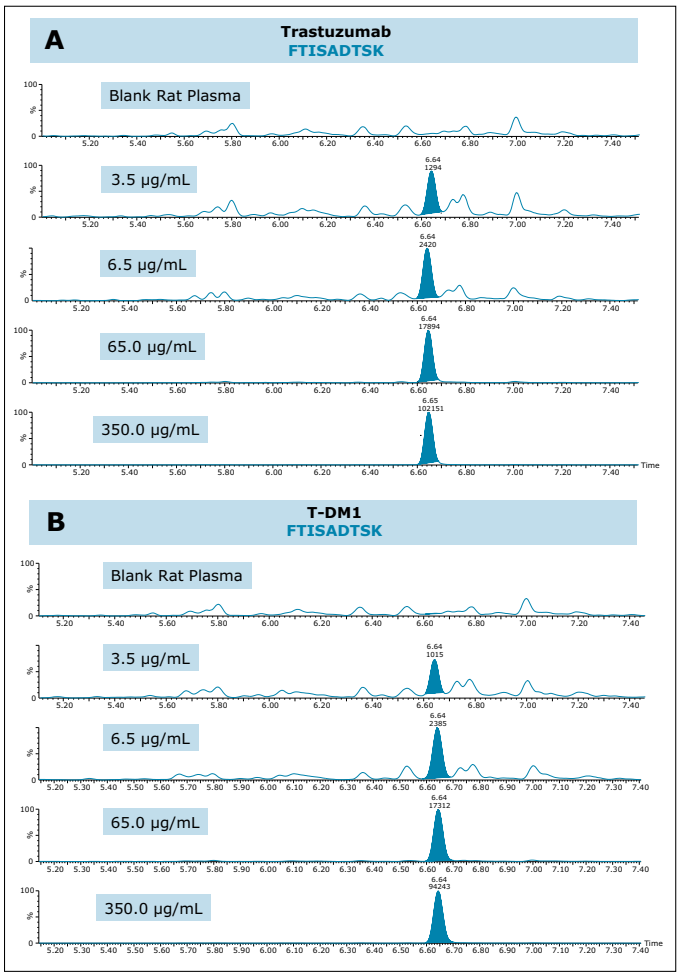


*図 2. トラスツズマブ (A) および T-DM1 (B) の QC クロマトグラム : ユニークシグネチャーペプチド FTISADTSK*

このアプリケーションでは、TDM-1 から 2 種類の不完全開裂ペプチド（FTISADTSKNTAYLQMNSLR および GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK）を検出することに成功しました。これらのペイロード結合ペプチドは、結合したペイロードに由来する共通フラグメント（547.2 *m/z*）を含んでおり、クロマトグラフィーでは結合による異性体として遅く溶出しました。図 4 の A と B は、TDM-1 添加血漿サンプル（350 µg/mL）の中にこれらの結合ペプチドが存在することを、トラスツズマブ添加血漿サンプル（350 µg/mL）およびブランクのラット血漿サンプルとの比較で示したものです。結合ペプチド FTISADTSKNTAYLQMNSLR の存在は、複数の MRM トランジッションで確認されており、図 5 に示しています。さらに、この　2 種類の TDM-1 結合ペプチドは TDM-1 の濃度上昇と共に増加しました。これは、図 6 の A および B で明確に示されています。

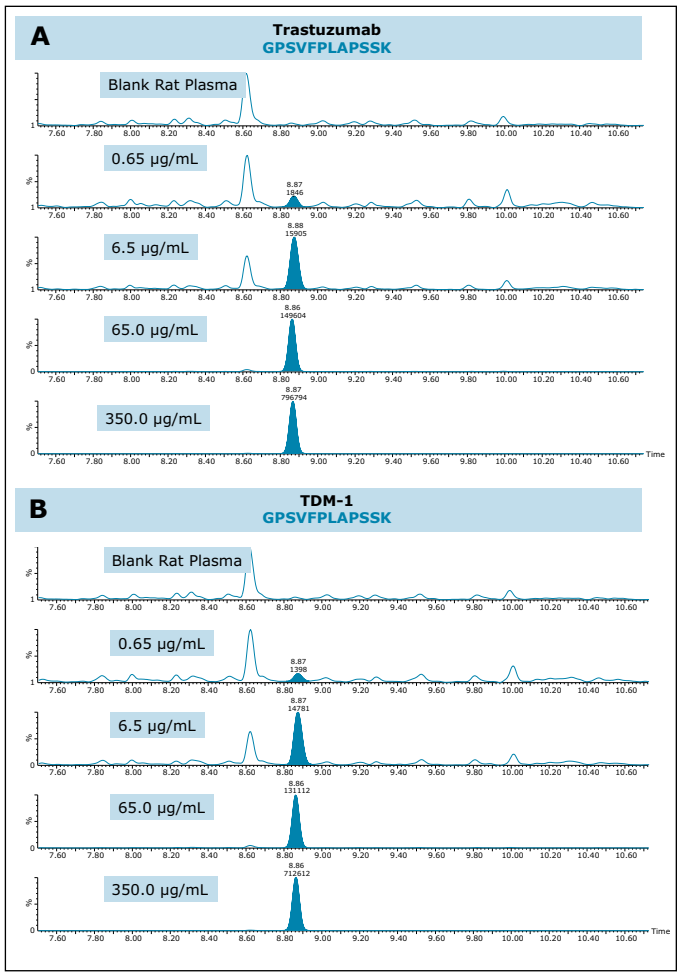


*図 3. トラスツズマブ (A) および T-DM1 (B) の QC クロマトグラム：ジェネリック IgG シグネチャーペプチド GPSVFPLAPSSK*

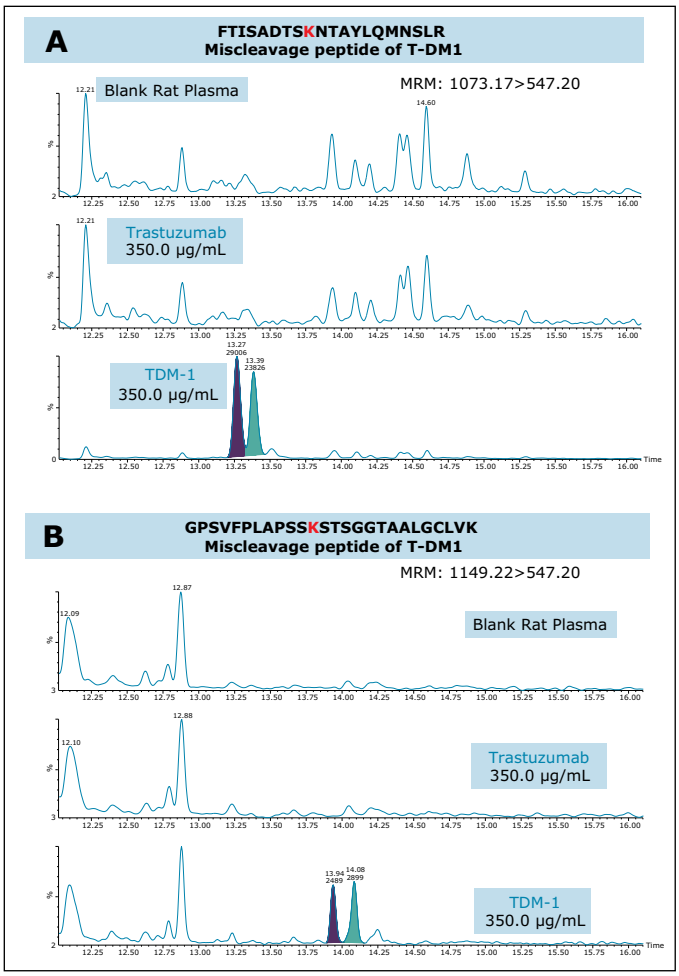


*図 4. ProteinWorks eXpress Direct 消化キットを使って消化した場合に T-DM1（350 µg/mL）において不完全開裂したペプチドが存在することを、トラスツズマブ（350 µg/mL）およびブランクのラット血漿との比較で示したクロマトグラム A：FTISADTSKNTAYLQMNSLR、B：GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK*

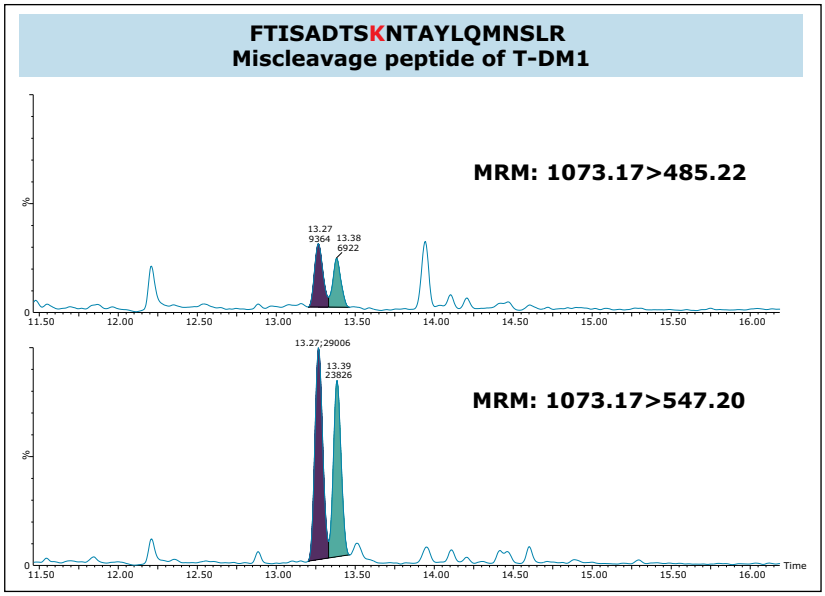


*図 5. 複数の MRM トランジッション（1073.17 > 547.20 m/z および 1073.17 > 485.22 m/z）により確認された結合ペプチド FTISADTSKNTAYLQMNSLR の存在を示すクロマトグラム*

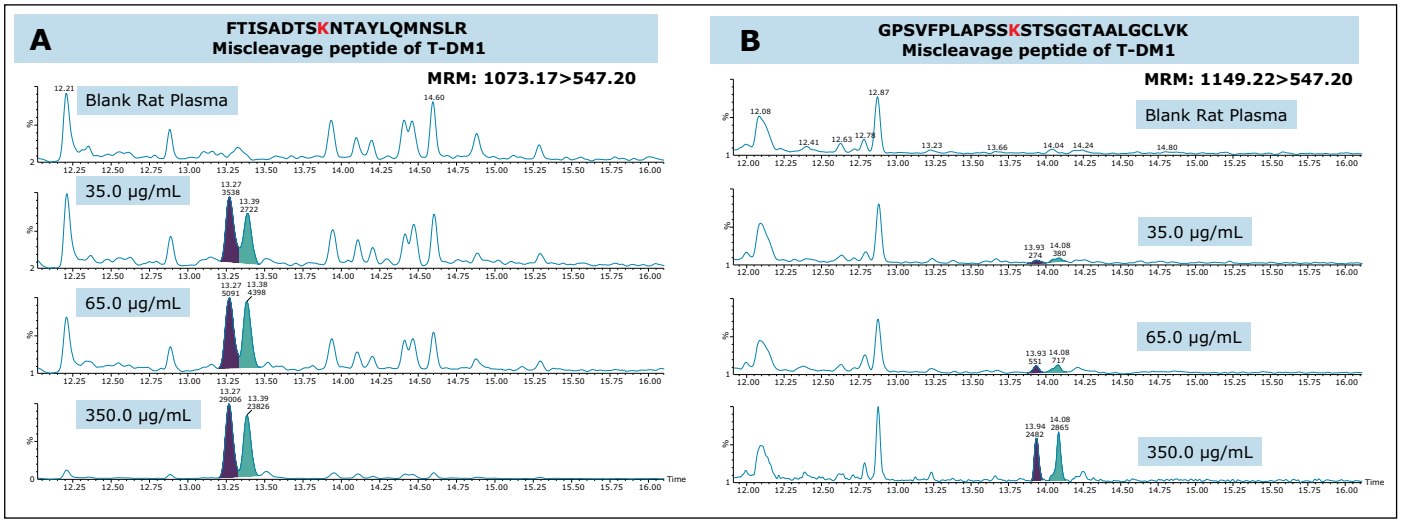


*図 6. ProteinWorks eXpress 直接消化キットを使って消化および抽出した場合に、血漿中の T-DM1 濃度の上昇に伴い T-DM1 の結合ペプチドが増加することを示すクロマトグラム A：FTISADTSKNTAYLQMNSLR、B：GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK*

## 結論

ProteinWorks eXpress Direct 消化キットを、代表的な検量線用サンプルと血漿添加 QC サンプルに適用し、トラスツズマブおよびその ADC である T-DM1 を定量することに成功しました。血漿 35 µL の直接消化で、優れた直線性、精度、および真度を維持しながら、0.5 ～ 1.0 µg/mL という定量下限を達成しました。このキットベースの汎用アプローチにより、経験の浅いユーザーでもシンプルな段階的プロトコールとあらかじめ秤量された標準試薬を使って高い感度を達成することができ、創薬研究において時間的制約のある重要なプロジェクトの決定を下すのに必要な感度と再現性の両方が確保されます。

## 参考文献


1. Peddi PF, Hurvitz SA. Trastuzumab emtansine: the first targeted chemotherapy for treatment of breast cancer. *Future oncology (London, England)*. 2013;9(3): 10.2217/fon.13.7. doi:10.2217/fon.13.7.
2. Barok M, Joensuu H, Isola J. Trastuzumab emtansine: mechanisms of action and drug resistance. *Breast Cancer Res*. 2014 Mar5;16(2):209.doi: 10.1186/bcr3621.
3. http://www.drugbank.ca/drugs/DB05773
4. FDA Guidance for Industry for Bioanalytical Method Validation, CDER.


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 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5月 720005619JA PDF