

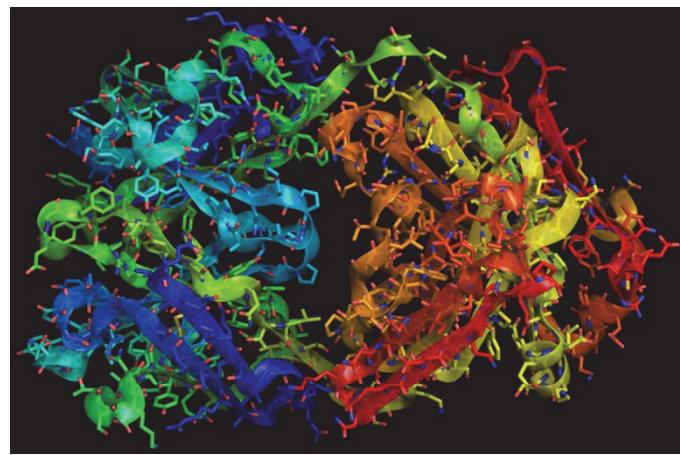
METHOD DEVELOPMENT ON QUANTITATIVE SPE-UPLC-MS/MS ANALYSIS OF A THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODY IN SERUM

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.TM佐々木 後哉¹⁾, 津田 葉子¹⁾, DONEANU Catalin ²⁾, YANG Hua ²⁾, CHAMBERS Erin ²⁾, MURPHY Jim ²⁾, CHEN Weibin ²⁾, DIEHL Diane ²⁾, BOUVIER Edouard ²⁾
1) 日本ウォーターズ, 2) ウォーターズコーポレーション

INTRODUCTION

新薬開発がバイオ医薬品へシフトを始めている現在、タンパク医薬品など高分子のPK/PD解析手法の開発が必要とされている。歴史的には生体試料中のタンパク定量にはイムノアッセイ法が使用されてきたが、アッセイ法開発に時間がかかる、再現性に乏しい、交叉反応他の問題がある。

今回生体試料中抗体医薬品trastuzumab(Fig.1)のSPE-UPLC-MS/MS MRM定量法を開発したので報告する。

Fig.1 Trastuzumab (Herceptin[®]) MW 148,000

Light Chain:
(C₁₀₃₂H₁₆₀₃N₂₇₇O₃₃₅S₆)
Heavy Chain:
(C₂₁₉₂H₃₃₈₇N₅₈₃O₆₇₁S₁₆)

WORKFLOW

- ターゲットタンパクに特異的なペプチドの *in silico* 予測と確認
- MRM条件最適化
- ターゲットペプチドの定量性評価～生体マトリックス無し
- ターゲットペプチドの定量性評価～生体マトリックス有り
- 生体マトリックスの影響評価およびサンプル前処理効果確認
- ヒト血清中 trastuzumab のSPE-UPLC-MS/MS定量

METHODS

trastuzumab をYu等による方法¹⁾で変性およびアルキル化後trypsinにより消化。酸処理と希釈を行い5 μM 溶液とし500 nM から1 nMまでの希釈溶液を調製し、アッセイ法の直線性、検出限界と相対標準偏差の評価を行った。またtrastuzumab を添加した血清を同様に処理し、イオン交換 - 逆相ミックスモード固相によるクリーンアップの効果を評価した。なお定量には*in silico*バイオインフォマティクス技術により予測されたtrastuzumabに特異的なペプチドを用いた。

Solid phase extraction

Oasis[®] WCX and MCX uElution Plates (Waters) were used to cleanup the serum digest samples. Specifically, 400–750 μL of diluted serum digest was loaded onto the plate. The analytes were eluted twice with 25 μL of 40/1/55 ACN/TFA/water for WCX. 25 μL of 40/5/55ACN/NH₄OH/water for MCX.

LC conditions

System: ACQUITY UPLC[®] system (Waters)
Column: ACQUITY UPLC BEH300™ C18, 2.1 x 150 mm, 1.7 μm
Column temp.: 35°C
Flow rate: 0.3 mL/min.
Gradient: (A) 0.1% (v/v) formic acid in water
(B) 0.1% (v/v) formic acid in acetonitrile
0% B for 1 min, followed by a linear gradient up to 35% B
Cycle time: 20 min.

MS conditions

Waters Xevo[™] TQ MS and Xevo[™] TQ-S tandem quadrupole mass spectrometers
ESI potential: 3.5 kV
Source: 90 °C
Collision energy: range from 16 eV to 50 eV
Cone voltage: range from 12 V to 60 V
Dwell time: range from 1 ms to 100 ms

RESULTS

ターゲットタンパクに特異的なペプチドの *in silico* 予測と確認

Heavy Chain:

EVQLVESGGGLVQPGGSLR (monkey peptide)
LSCAASGFNIK (mouse peptide, has Cys)
DTYIHWR
QAPGK (human/lama peptide)
GLEVVVAR (human/mouse peptide)
IPTNGYTR (bacterial peptide)
YADSVK (human/lama peptide)
FTISADTSK
NTAYLQMNSLR (has Met)
AEDTAVYYCSR (human/lama peptide, has Cys)
WGDDGF SSASTK (has Met, too long: 26 AA)
EEMTK (too short: 5 AA, missed cleavage)

Light Chain:

ASQDVNTAVAWYQQK (mouse peptide)
LLIYSASFYSGVPSR
FSGSR

(Peptides in red indicate good options.)

MRM条件最適化

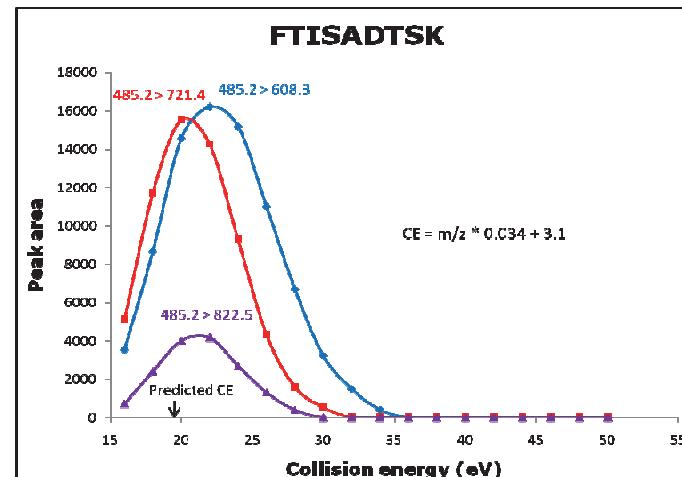


Fig.2 Collision energy was optimized by varying CE from 16 eV to 50 eV (2 eV interval). The actual optimal CE was close to the predicted CE using the formula.

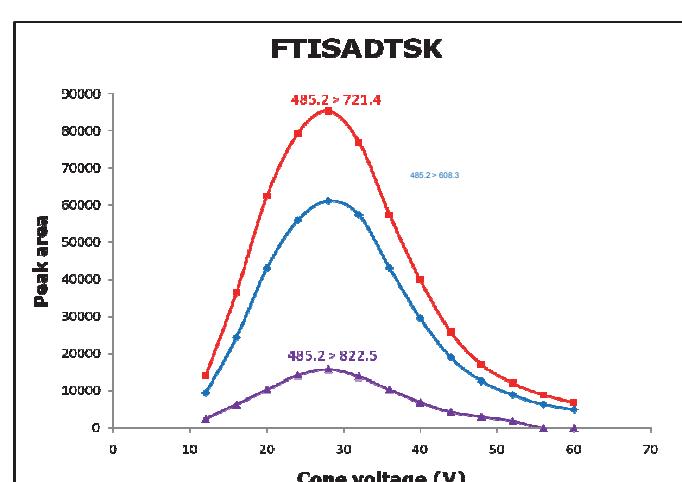


Fig.3 Cone voltage was optimized (from 12 V to 60 V at 4 V interval).

ターゲットペプチドの定量性評価

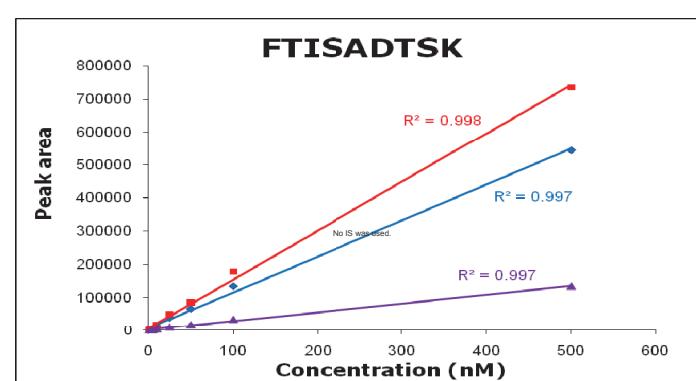


Fig.4 Calibration curve of a signature peptide without serum digest background. 5 μM tryptic digested trastuzumab was diluted in 0.1% FA to various concentrations.

生体マトリックスの影響評価およびサンプル前処理効果確認

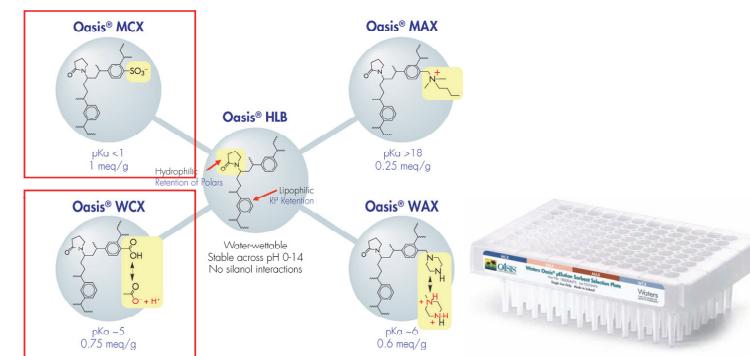
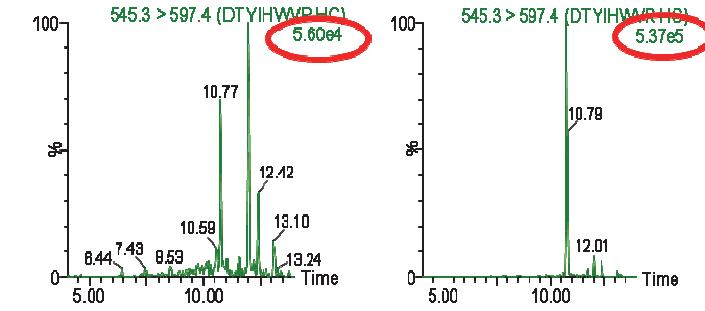
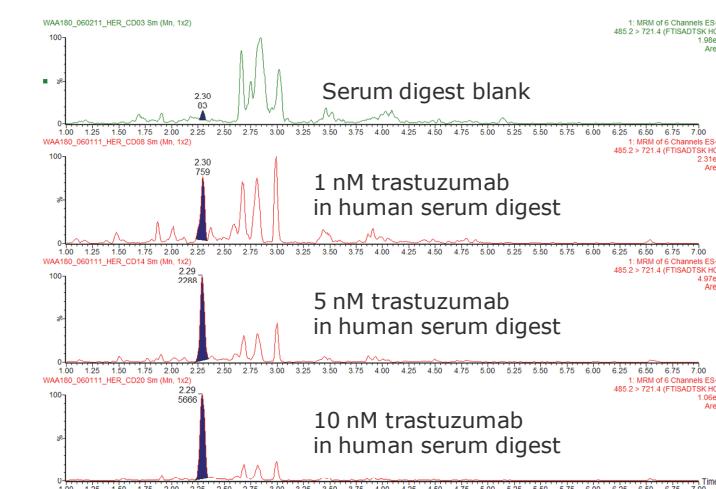


Fig.5 Ion exchange and reversed phase mixed-mode SPE and μElution plate

Fig.6 A signature peptide detected on Xevo[™] TQ-S before and after SPE sample cleanup. SPE method not only reduced the background noise, but also increased signal substantially.

ヒト血清中 trastuzumab のSPE-UPLC-MS/MS定量

FTISADTSK: 485.2 > 721.4

Fig.7 MRM quantification of trastuzumab in human serum on a Trizac Xevo TQ-S platform. MRM chromatograms for the spiked trastuzumab (1, 5, 10 nM) and the corresponding ¹³C¹⁵N-isotopically labeled peptide spiked at the same concentration in human serum.

CONCLUSION

- 血清消化マトリックスが無い場合、1 nM (~150 ng/mL) でピーク面積値の相対標準偏差は8%未満、1 nM から 500 nMにおいて良好な直線性が得られた ($R^2 > 0.98$)
- 血清消化マトリックス存在下でピーク面積値の相対標準偏差は15%未満だった
- 血清サンプルのトリプシン消化に続き固相抽出によるクリーンアップを行うことで感度と頑健性が向上した
- 今回開発したワークフローは血清中抗体医薬品の高感度ハイスクープ定量法を構築するために有用であると考えられる

REFERENCES

- Yu Y., Gilar M., Lee P., Bouvier E., and Gebler J. *Anal. Chem.*, 2003, **75** (21), 6023-6028.
- Maclean B., Tomazela D.M., Abbatiello S.E., Zhang S., Whiteaker JR., Paulovich A.G., Carr S.A., MacCoss M.J. *Anal. Chem.*, 2010, **82** (24), 10116–24.