

血清中抗体医薬品(Trastuzumab)の SPE-2D-UPLC-MS/MS アッセイ法

SPE-2D-UPLC-MS/MS ASSAY OF THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODY(TRASTUZUMAB) IN SERUM

佐々木 俊哉¹⁾, 津田 葉子¹⁾, Catalin DONEANU²⁾, Hua YANG²⁾, Edouard BOUVIER²⁾ 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。

我々は昨年の年会において生体試料中抗体医薬品 trastuzumab(Fig.1)のSPE-UPLC-MS/MS/MS SRMアッセイ法を報告したが、UPLCによる分離を2次元で行うことにより更に選択性と感度を向上させたので報告する。

また、同じく昨年の年会においてトリプシン消化位置の前または後ろに数残基延長した¹³C¹⁵N-標識ペプチドを内標準として使用することを提案したが、そこで問題となる、血清マトリックスが存在する状態でトリプシン消化効率が目的のタンパク質医薬品と同等であるかどうかについても評価を行ったので併せて報告する。

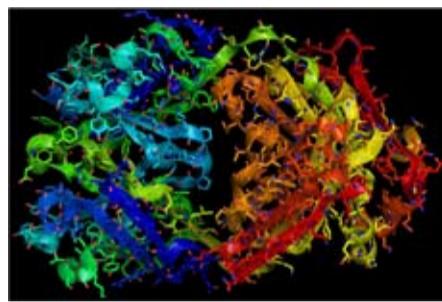
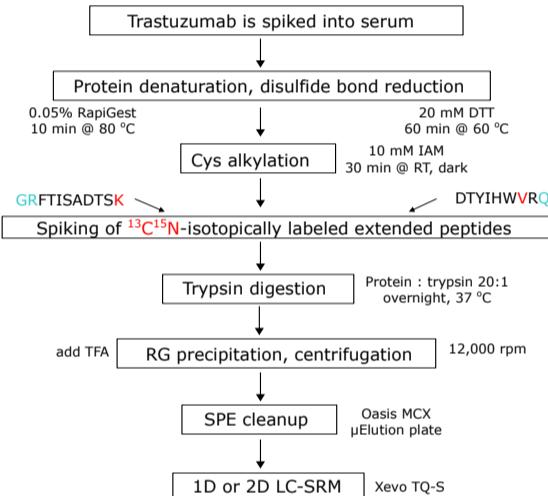


Figure 1. Trastuzumab (Herceptin®) MW 148,000
Light Chain:
(C₁₀₃₂H₁₆₀₃N₂₇₇O₃₃₅S₆)
Heavy Chain:
(C₂₁₉₂H₃₃₈₇N₅₈₃O₆₇₁S₁₆)

WORKFLOW OVERVIEW



METHODS

Sample Preparation

トリプシン消化最適化

40 μLのヒト血清に抗体医薬品 trastuzumab を消化後濃度として 5 nM または 25 nM になるように添加。サンプル溶液に RapiGest を 0.05% 添加し、80°Cで 10 分間変性後、20 mM の dithiothreitol (DTT) で 60 °Cで 60 分間還元。続けて 10 mM の iodoacetamide (IAM) で室温暗所で 30 分間アルキル化。¹³C¹⁵N-標識をした二つの合成ペプチド(GRFTISADTSK、DTYIHWVRQA)をそれぞれ消化後濃度として 5nM または 25nM になるように添加し、トリプシン消化効率の評価を行った。

ブタトリプシン(Sigma 社、T-6567)を使い、基質タンパク質/酵素比について評価を行った。

Solid phase extraction (SPE)による精製

100μLのトリプシン消化液を 4%リン酸水溶液で 1:1 希釈し、Oasis[®] MCX uElution Plates (Waters 社) ハード。

50 μL アセトニトリル/濃アソニニア水/水、25/2/73(pH10)で 2 回抽出。

MS イオンサプレッションの評価

trastuzumab とヒト血清を別々に上記方法でトリプシン消化を行い、trastuzumab 消化物と¹³C¹⁵N-標識ペプチドを血清消化物の SPE 精製溶液(1-20 倍希釈)に 5 nM または 10 nM になるように添加して評価を行った。

LC/MS Conditions

1D LC-SRM

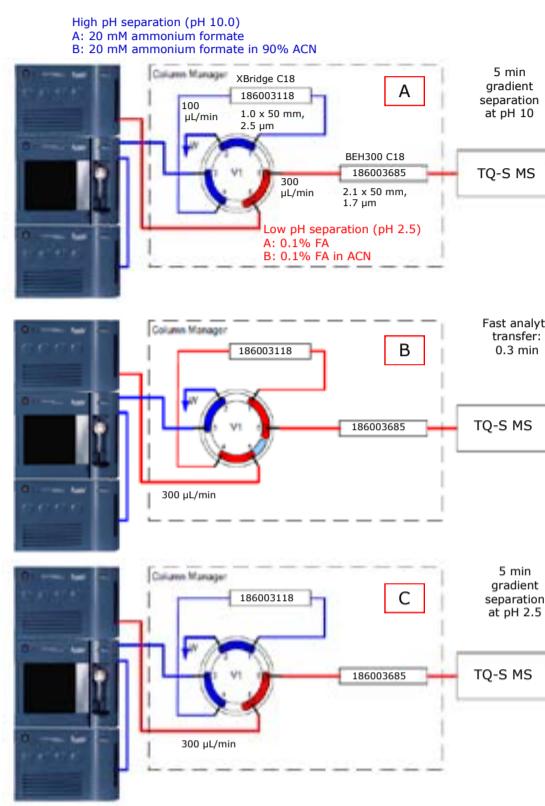
System :ACQUITY UPLC® I-Class (Waters)
Column :ACQUITY UPLC BEH300 C18 , 2.1 x 150 mm, 1.7 um
Column temp.: 35°C
Flow rate :0.3 mL/min.
Gradient :(A) 0.1% (v/v) formic acid in water
(B) 0.1% (v/v) formic acid in acetonitrile
linear gradient from 0 to 35% B in 10min

2D LC-SRM

System :ACQUITY UPLC I-Class 2D (Waters)
使用カラムおよび条件は Fig.2 参照
pH による選択性変化を利用した逆相/逆相 2D メソッド^{1),2)}によりペプチドを分離

SRM Assay

System :Xevo TQ-S tandem quadrupole mass spectrometers (Waters)
ESI potential : 3.5 kV
Source : 120 °C
MS1/MS2 IW : 0.75Da(FWHM)



Time Range	Valve Position	Analyte undergoes
0 - 6.6 min	1	high pH RP separation
6.6 - 9.9 min	2	transfer from 1 D to 2D
6.9 - 14 min	1	low pH RP separation

Figure 2: Heart cut configuration for 2-dimensional chromatography: (A) Sample loading and first dimension separation under basic conditions (pH 10.0); (B) Analyte transfer from the first dimension to the second dimension; (C) Separation in the second dimension under acidic conditions at pH 2.5.

First Dimension separation (pH=10):
Column (P/N 186003118): XBridge C18, 1.0 x 50 mm, 2.5 μ m particles, operated at 100 μ L/min, kept at 35 °C
Mobile phases: 20 mM ammonium formate in water (Solvent A)
20 mM ammonium formate in 90% ACN (Solvent B)
Gradient profile: from 0 to 40% B over 5 min

Second Dimension separation (pH=2.5):
Column (P/N 186003685): BEH300, 2.1 x 50 mm, 1.7 μ m particles, Mobile phases: 0.1% formic acid in water (Eluent A)
0.1% FA in ACN (Eluent B)
Gradient profile: from 0 to 30% B in 5 min (starts 7 min after inj.).

RESULTS

Trypsin Digestion Optimization

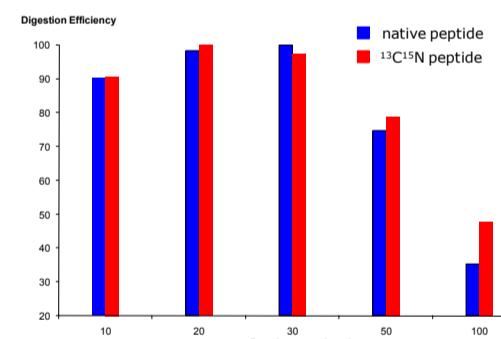


Figure 3: Protein to trypsin ratio optimization. Five digestion ratios (1:10, 1:20, 1:30, 1:50 and 1:100) were investigated for 25 nM trastuzumab and 25 nM ¹³C¹⁵N-isotopically labeled peptides digested in human serum. The samples were digested overnight (16 h) with Sigma trypsin (cat no T-6567) at 37 °C.

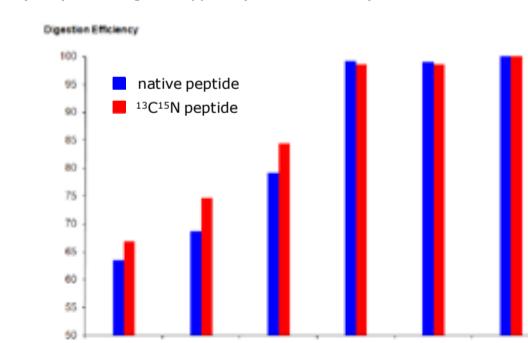


Figure 4: Effect of incubation time on digestion efficiency. Trastuzumab (25 nM) and ¹³C¹⁵N-isotopically labeled peptides (25 nM) were digested in serum for 15 min, 30 min, 1h, 3h, 6h and 16 h (overnight) with Sigma trypsin (cat no T-6567) at 37 °C.

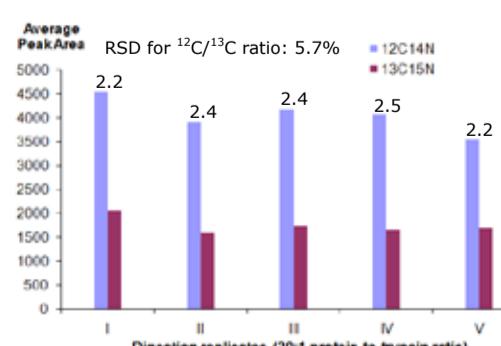


Figure 5: Reproducibility of trypsin digestion. Serum was spiked with 5 nM trastuzumab and 5 nM ¹³C¹⁵N-isotopically labeled peptides and digested overnight (16 h) with Sigma trypsin (T-6567) at 37 °C. The RSD % for the ¹²C/¹³C peptide ratio was better than 6%.

2D LC-SRM Assay

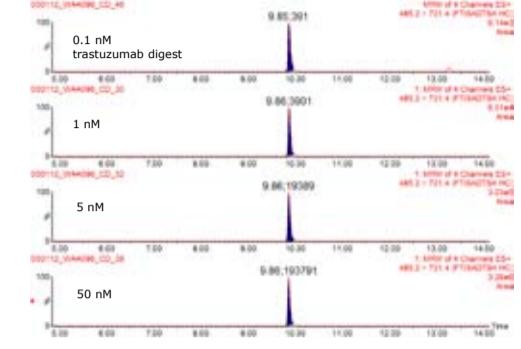


Figure 6. Linearity of the 2D-SRM assay. Four digest concentrations covering a dynamic range of 500 fold (0.1 to 50 nM trastuzumab) were prepared in 20 mM ammonium formate (pH 10) and analyzed in replicate (n=4). The RSD for this assay was better than 2%.

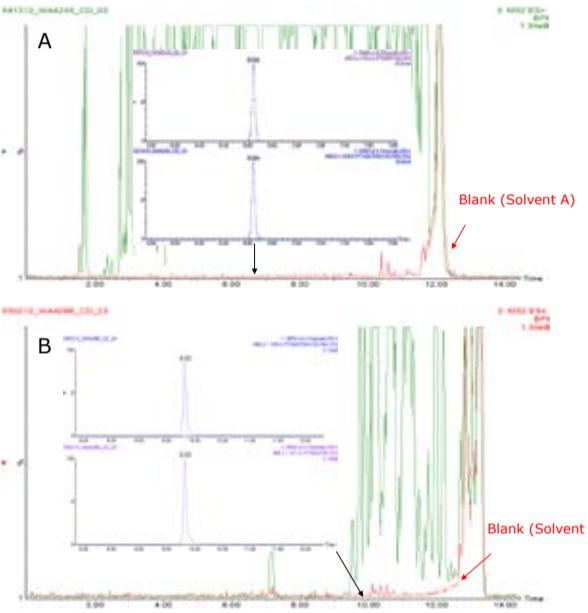


Figure 7. RADAR monitoring of SPE-cleaned samples. (A) 1D LC-SRM separation under acidic conditions (pH 2.5); (B) 2D LC-SRM separation with heart cutting. The sample was prepared by spiking a trastuzumab digest (5 nM trastuzumab and 10 nM ¹³C¹⁵N peptides) into SPE-cleaned human serum digest.

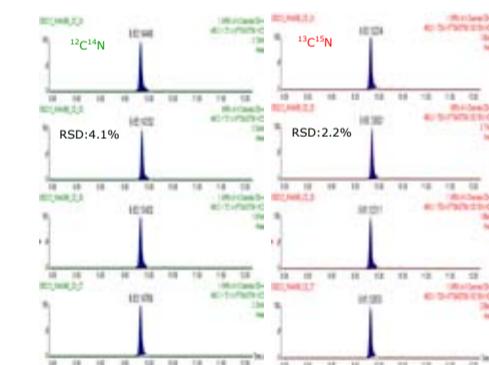


Figure 8. Reproducibility of the 2D LC-SRM assay in the presence of the serum digest. A sample containing 5 nM trastuzumab and 10 nM ¹³C¹⁵N peptides was spiked into SPE-cleaned human serum digest. Peak area RSD was better than 5.0%.

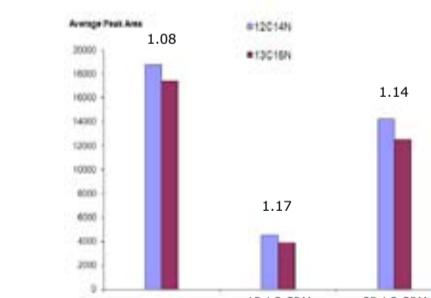


Figure 9: Evaluation of signal suppression. Comparison of average peak areas recorded for the endogenous and isotopically labeled trastuzumab peptide FTISADTSK in the absence/presence of the serum digest matrix. A sample containing 5 nM trastuzumab digest and 10 nM ¹³C¹⁵N peptides was spiked into SPE-cleaned human serum digest.

CONCLUSIONS

- 生体中のタンパク質医薬品を分画を行わずに測定する用ワークフローを開発し、ヒト血清中の抗体医薬品 trastuzumab の定量に用い良好な結果が得られた
- 血清マトリックス中の trastuzumab と内標準ペプチドのトリプシン消化効率を酵素/基質比と消化時間について検討し最適化した
- ¹³C¹⁵N-安定同位体標識された延長ペプチドを内標準として用いた場合の消化再現性は 6% 以内だった
- 移動相 pH を酸性/塩基性に切り替える逆相/逆相 2D LC はタンパク質医薬品のバイオアナリシスにおける MS イオンサプレッションを顕著に削減した

REFERENCES

- Gilar M, Olivova P, Daly AE, Gebler JC, J. Sep. Sci., 2005, 1694.
- Doneanu et al, mAbs Journal, 2012, 4:1, 24.