

創薬研究サンプルの直接消化における、モノクローナル抗体医薬品定量の汎用キットベースアプローチ

Mary E. Lame, Hua Yang, Sherri Naughton, Erin E. Chambers

Waters Corporation

要約

このアプリケーションノートでは、ワークフロープロセスの簡潔化および効率化のため ProteinWorks eXpress Direct 消化キットを使用し、検討したモノクローナル抗体医薬品全てに、同一のユニバーサルなプロトコールと試薬を用いました。

ProteinWorks eXpress Direct 消化キットを使用して、代表的な検量線のセットとラット血漿の QC サンプルから、インフリキシマブ、アダリムマブ、ベバシズマブ、トラスツズマブを精製し、同時に定量化することができました。標準化されたキットベースのアプローチを実行することにより、経験の浅いユーザーでも、創薬研究において有意義なデータを即座に入手し、一刻を争う重要なプロジェクト上の判断を下すことができます。

利点

- シンプルで標準化されたタンパク質定量アプローチです。広く適用可能な最適化された消化キットにより、メソッド開発が不要になります。4～6 時間で LC-MS 分析のためのサンプル調製が終了します。

はじめに

過去 5 ～ 10 年間、製薬開発においてバイオ医薬品の割合が大幅に上昇しました¹。また一方、重要なモノクローナル抗体および他のタンパク質医薬品の多くは、2012 ～ 2020 年の間に特許が満了となります²。このため、バイオアナリシスラボ、新薬開発企業や CRO、およびバイオマーカー研究ラボにおいてタンパク質量に注目が集まっています。イムノアッセイ（IA）メソッドは感度が高く簡単に実行できますが、低い試薬の再現性、標準化の欠如、交差反応、限定的なダイナミックレンジ、その他の課題により、LC-MS への転換が進んでいます。しかしながら、これらの LC-MS ワークフローには多数のサブセグメントが含まれ、それぞれに多くのステップがあります。ほとんどのワークフローに共通するものとしては、アフィニティー精製、変性、還元、アルキル化、消化および SPE クリーンアップなどがあります（それぞれに最適化が必要）。このような従来のタンパク質量プロトコルは、通常、完了するまでに 1 日半程度かかります。また、各ステップにおいて誤差やエラーが発生する可能性も無視できません。日中にサンプルの前処理を完了して分析を開始できるような、より簡単に標準化されたワークフローが強く求められています。同時に、理想的には、汎用性のあるキットベースのメソッドを使用した場合でも、探索研究において重要な判断を下すために、十分な真度と精度で低濃度の標的タンパク質を定量できる高いアッセイ感度を保証する必要があります。図 1 で示されているように一般的なワークフローは複雑であるため、エラーが発生したり、再現性や感度が不十分であることがよくあります。このアプリケーションノートでは、ワークフロープロセスの簡潔化および効率化のため ProteinWorks eXpress Direct 消化キットを使用し、検討したモノクローナル抗体医薬品全てに、同一のユニバーサルなプロトコルと試薬を用いました。血漿内のインフリキシマブ、ベバシズマブ、トラスツズマブ、アダリムマブ（図 2～5）は直接消化後、消化ペプチドの SPE 精製まで、トータル 4 時間未満で調製されました。これにより、いくつかの 96 ウェルプレートでその日のうちにサンプル調製を終え、翌朝にはデータを取得可能でした。

実験

サンプルについて

インフリキシマブ、アダリムマブ、ベバシズマブ、トラスツズマブをヒト血漿に添加しました。その後 LC-MS 分析のために、35 μ L の添加血漿サンプルを ProteinWorks eXpress Direct 消化キットおよびプロトコルを使用して消化し、消化の後、ProteinWorks μ Elution SPE クリーンアップキットおよびプロトコルを使用して、シグネチャーペプチドをクリーンアップしました。

分析条件

LC システム:	ACQUITY UPLC
検出:	Xevo TQ-S 質量分析計、ESI+

カラム：	ACQUITY UPLC Peptide BEH C ₁₈ 、300Å、1.7 μm、 2.1 mm×150 mm
カラム温度：	55 °C
サンプル温度：	10 °C
注入量：	10 μL
移動相 A：	0.1% ギ酸水溶液
移動相 B：	0.1% ギ酸アセトニトリル
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 (°C)：	150
脱溶媒温度 (°C)：	600
コーンガス流量 (L/時)：	150
脱溶媒ガス流量 (L/時)：	1000
コリジョンガス流量 (mL/分)：	0.15
ネブライザーガス流量 (Bar)：	7

グラジエント：

時間 (分)	流速 (mL/分)	%A	%B	カーブ
0	0.3	100	0	6
1	0.3	100	0	6
7	0.3	50	50	6
8	0.3	10	90	6

タンパク質	ペプチド	MRMトランジション	コロン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
インフリキシマブ	SINSATHYAESVK	469.60>603.80	40	10
ベバシズマブ	FTFSLDTSK	523.30>797.48	16	14
アダリムマブ	APYTFGQGTK	535.30>901.44	40	24
トラスツズマブ	FTISADTSK	485.20>721.40	28	20
マウス mAb	MNSLQTDDTAK (ISTD)	612.30>978.56	20	20

表 1. 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、およびマウス mAb 内部標準の MRM 条件。

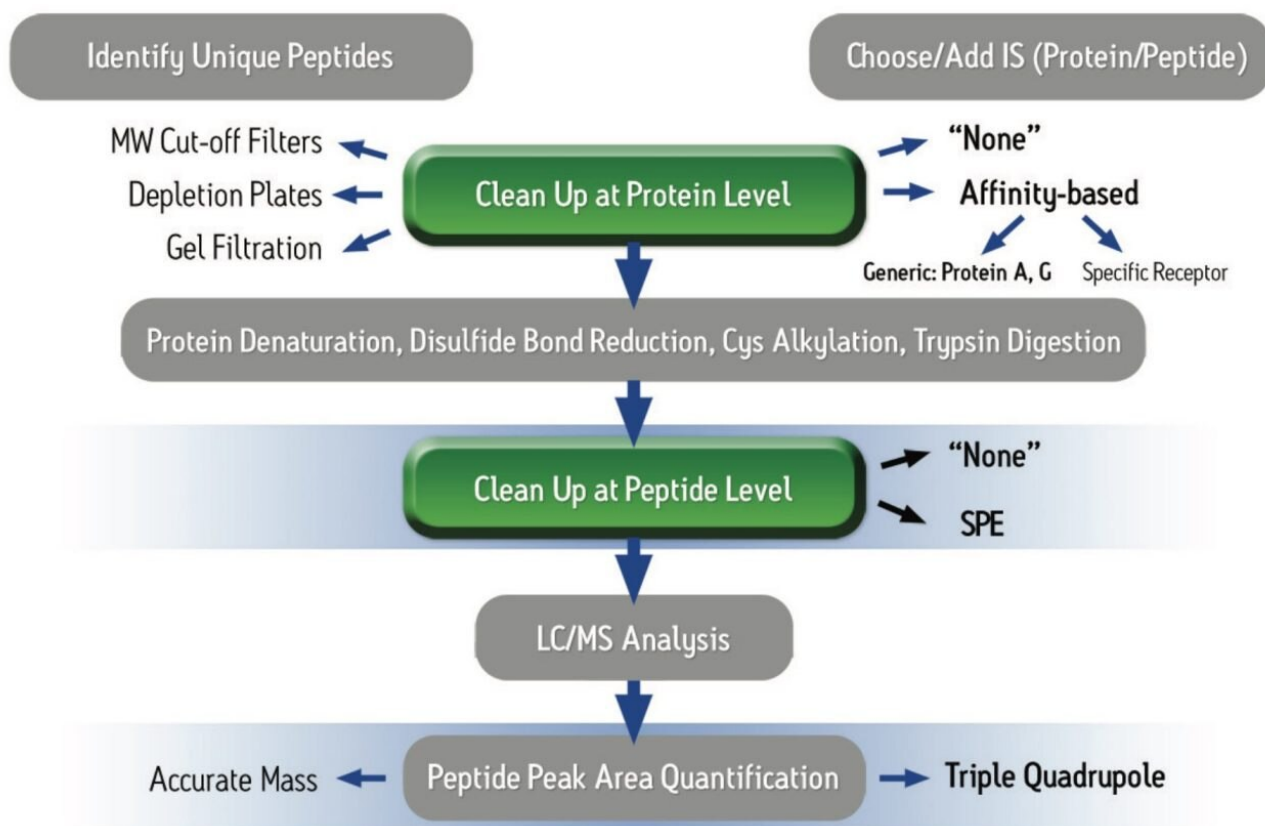


図 1. タンパク質バイオアナリシスの標準的なワークフロー。

結果および考察

前臨床の段階では、メソッド開発に時間と専門性が求められるため、簡単で、広く適用でき、汎用性のあるプロトコルであることが重視されます。直接消化と ProteinWorks eXpress Direct 消化キットを用い、複数のシグネチャーペプチドを使用して、ヒト血漿中の 4 種類のモノクローナル抗体医薬品を定量しました。広く適用可能な ProteinWorks キットを使用して、各タンパク質について、感度、直線性、真度と精度のすべてが、一般的なメソッドバリデーション要件を満たしました。35 μ L の血漿サンプルの直接消化により、4 種類のモノクローナル抗体ベースの医薬品についての定量下限は 250 ng/mL \sim 2.5 μ g/mL の範囲でした。検量線は、3.5 \sim 4 桁を超える直線性を、検量線ポイントに対する平均真度 95 \sim 105% と共に達成しました。インフリキシマブ、アダリムマブ、トラストズマブ、ベバシズマブの検量線の結果をまとめたものを、次の表 2 に示します。

タンパク質	ペプチド	検量線範囲 ($\mu\text{g/mL}$)	重み付け	直線性 (r^2)	全ポイントの 平均真度 %
インフリキシマブ	SINSATHYAESVK	0.25–250	1/X	0.996	101.74
ベバシズマブ	FTFSLDTSK	0.50–500	1/X	0.999	100.00
アダリムマブ	APYTFGQGTK	2.50–500	1/X ²	0.997	99.99
トラストズマブ	FTISADTSK	2.50–500	1/X ²	0.997	100.01

表 2. ProteinWorks eXpress Direct Digest キットを使用して消化および抽出された血漿中インフリキシマブ、アダリムマブ、トラストズマブ、ベバシズマブの検量線に関する線形ダイナミックレンジ、加重、平均真度。

Remicade 軽鎖 [2]:
DILLTQSPAILSVSPGERV/SFSCRASQFVGSSIHWHYQQRRTNGSPRLLIKAYASEMSGIPSRFSGSGSGTDFTLSINTVESEDIADYYCQQSH
SWPFTFGSGTNLEVKVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Remicade 重鎖 [2]:
EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFIFSNHWMNWVRQSPKGLEWVAEIRSKSINSATHYAESVKGRFTISRDDSKSAVYLQMNSLRTE
TGVVYCSRNYGSDYDYGQGTTLTVSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

保存領域: 青

可変領域: 赤

CDR 領域: 緑

ユニークシグネチャー

ジェネリックシグネチャー

Van Dongen 他 al. 61st ASMS, MP525 Minneapolis, Minnesota,
USA 9-13 June 2013.

化学式: $\text{C}_{6428}\text{H}_{9912}\text{N}_{1694}\text{O}_{1987}\text{S}_{46}$
分子量: 144190.3 Da

<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00065>

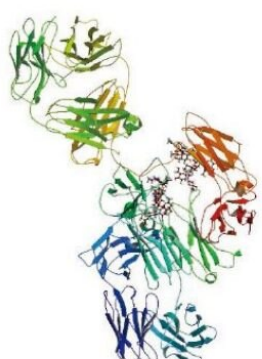


図 2. モノクローナル抗体薬インフリキシマブ (Remicade) の構造。

保存領域サロゲートペプチド

Anti-HER2 軽鎖 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS
 RFSGSRSGTDFLTITSSLPQEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK**DTYSLSSLTLSK**ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Anti-HER2 重鎖 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK**DTYIHWR**QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY
 ADSVKGR**FTIS**ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSS
 ASTK**GPSVF**PLAPSSK**STSGG**TAA**LGCLVK**DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

 ユニークシグネチャー
 ジェネリックシグネチャー

化学式：C₆₄₇₀H₁₀₀₁₂N₁₇₂₆O₂₀₁₃S₄₂
 分子量：145531.5 Da (製品添付文書では148)

<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00072>

図 3. モノクローナル抗体薬トラスツズマブ (Herceptin) の構造。



図 4. モノクローナル抗体薬ペバシズマブ (Avastin) の構造。

軽鎖: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPS
 RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSK
 ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

重鎖: EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDY
 ADSVEGRFTISRDNANKSLYLQMNSLRRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGLTVTS
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
 SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
 WQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ユニークシグネチャー
 ジェネリックシグネチャー

化学式: $C_{6428}H_{9912}N_{1694}O_{1987}S_{46}$
 分子量: 144190.3 Da

<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00051>

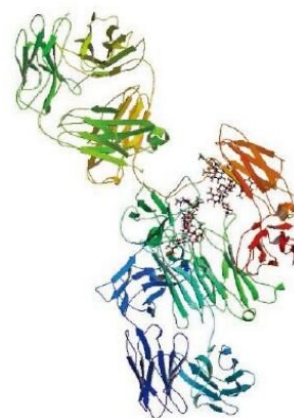


図 5. モノクローナル抗体薬アダリムマブ (Humira) の構造。

同時に、QC 試験の結果（表 3 を参照）も、平均精度値が 15% より十分に低く、平均して 10% 未満という規制ガイドライン³を十分に満たしました。

創薬研究の場合、1 µg/mL 以下という検出下限はモノクローナル抗体タイプの医薬品に対して一般的です。

ProteinWorks eXpress Direct 消化キットを使用すると、評価対象の 4 つの薬剤すべてでこの検出下限を簡単に得ることができます。図 6 の低濃度 QC 試験クロマトグラムは、単一のユニバーサルプロトコールとキットで適切な感度が得られることを示しています。

この研究では、創薬研究段階でメソッド開発の必要なくトリプシンペプチドを得るために単一のユニバーサル消化プロトコールと SPE メソッドが開発されました。最適化の必要なしに、このキットで血漿中の 4 つのモノクローナル抗体医薬品を十分な真度と精度で定量できたことは、時間が重要であり、タンパク質バイオアナリシスの限定的な経験しかない状況における、キットの広範な適用性と有効性を示しています。さらに、ロットトレーサブルな秤量済み試薬を使用したキットを適用することにより、施設間、ラボ間、またはアナリスト間でメソッドをシームレスに移管することができます。

タンパク質	ペプチド	QC 添加濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	平均測定濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	標準偏差	%CV	平均真度
インフリキシマブ	SINSATHYAESVK	0.350	0.333	0.010	3.10	95.0
		3.500	3.816	0.098	2.56	109.0
		35.000	36.075	0.576	1.60	103.1
		350.000	359.301	19.892	5.54	102.6
ベバシズマブ	FTFSLDTSK	QC 添加濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	平均測定濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	標準偏差	%CV	平均真度
		0.350	0.356	0.004	1.08	101.7
		3.500	3.393	0.196	5.78	96.9
		35.000	38.461	1.282	3.33	109.9
アダリムマブ	APYTFGQGTK	350.000	369.788	28.066	7.59	105.6
		QC 添加濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	平均測定濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	標準偏差	%CV	平均真度
		0.350	—	—	—	—
		3.500	3.978	0.570	14.34	113.7
トラスツズマブ	FTISADTSK	35.000	36.567	1.023	2.80	104.5
		350.000	380.963	18.143	4.76	108.8
		QC 添加濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	平均測定濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	標準偏差	%CV	平均真度
		0.350	—	—	—	—
ベバシズマブ	FTFSLDTSK	3.500	3.663	0.067	1.82	104.7
		35.000	39.182	2.389	6.10	112.0
		350.000	374.080	14.010	3.75	106.9

表 3. *ProteinWorks eXpress Direct Digest* キットを使用して消化および抽出された血漿におけるインフリキシマブ、アダリムマブ、トラスツズマブ、ベバシズマブの QC サンプルの統計値。

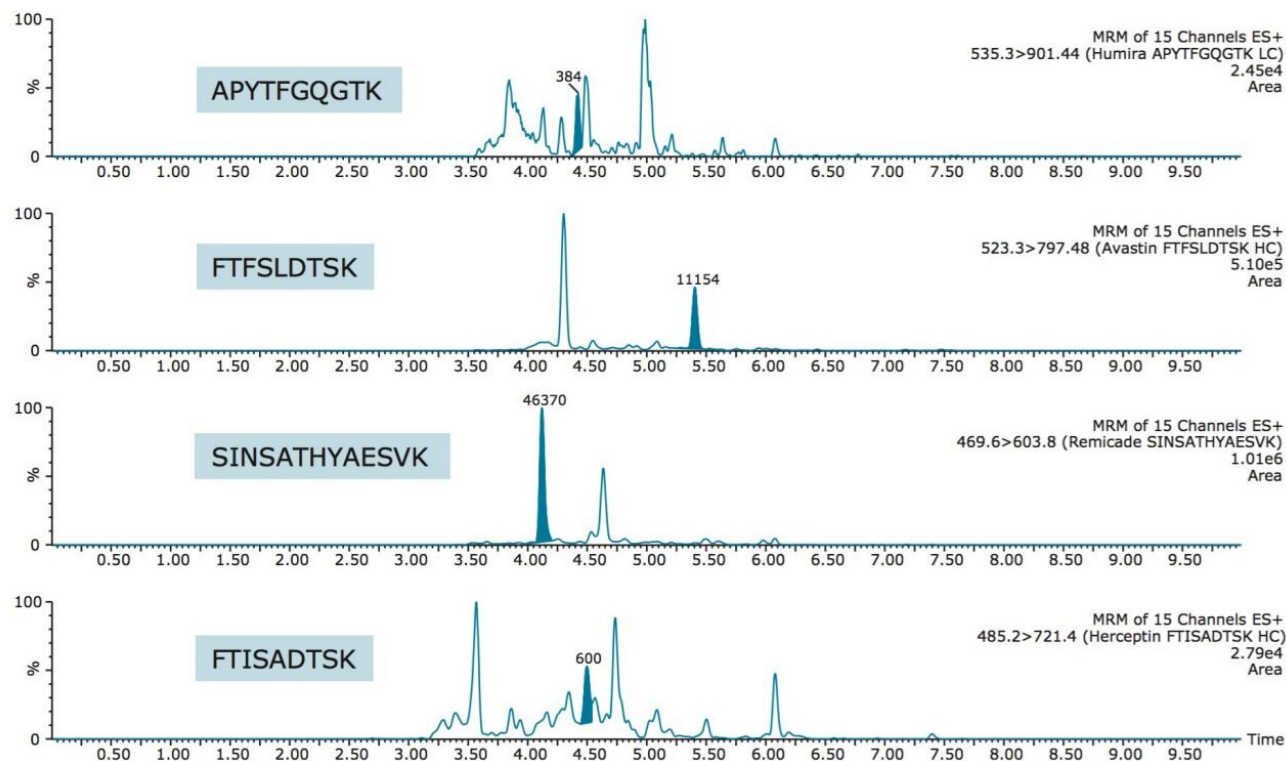


図 6. ベバシズマブ、アダリムマブ、インフリキシマブ、トラスツズマブの低濃度 QC 試験クロマトグラム (3.5 $\mu\text{g/mL}$)

結論

ProteinWorks eXpress Direct 消化キットを使用して、代表的な検量線のセットとラット血漿の QC サンプルから、インフリキシマブ、アダリムマブ、ベバシズマブ、トラスツズマブを精製し、同時に定量化することができました。各抗体について 250 ng/mL ~ 2.5 $\mu\text{g/mL}$ の定量下限を確実に達成しながら、優れた直線性と精度を維持しました。消化と SPE を含むトータルサンプル調製時間は 3 時間強でした。標準化されたキットベースのアプローチを実行することにより、経験の浅いユーザーでも、創薬研究において有意義なデータを即座に入手し、一刻を争う重要なプロジェクト上の判断を下すことができます。

参考文献

1. Dalzell, Managed Care, October 2013.
2. McKinsey and Company; Data Source: Evaluate Pharma, US Patent Expiration Dates.
3. FDA Guidance for Industry for Bioanalytical Method Validation, CDER.

ソリューション提供製品

720005541JA、2015 年 11 月

©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.