

モノクローナル抗体定量キットを用いた mAb の LC-MS/MS 分析 - インフリキシマブにスポットライトを当てる

Dominic Foley, Dorothée Lebert, Lisa J. Calton

Waters Corporation, Promise Proteomics

免責事項

このテクニカルノートに記載したデータでは、サンプル前処理専用のキットと、液体クロマトグラフィーおよび質量分析装置を組み合わせ使用して、定量分析を行っています。

欧州以外の規制機関は、記載している *mAbXmise* キットを、診断目的では承認していません。分析法の完全な開発およびバリデーションは、エンドユーザーの責任下で行ってください。*Promise Proteomics mAbXmise* キットは、一部の国では販売されていません。提供状況については、最寄りのウォーターズの営業担当者にお問い合わせください。

本書はアプリケーションブリーフであり、詳細な実験方法のセクションは含まれていません。

要約

モノクローナル抗体医薬品 (t-mAb) は、さまざまな疾患の治療に臨床医が使用できる、革新的な治療ツールになりました。個別化医療の時代において、用量の最適化およびコスト管理を目的として、mAb を測定する必要性に対する認識が広がっています。リガンド結合アッセイ (LBA) に基づく mAb 測定の手法は、十分に確立されているものの、性能の悪さ、標準化されていない、限られた数のサンプルを処理する場合の高コスト、限られたダイナミックレンジ、交差反応性の可能性などのいくつかの制限があります。さらに、市販のキットで利用できる mAb の数は限られています。低分子のモニタリングに臨床ラボで広く使用されているテクノロジーである質量分析は、これらの制限を克服する上

で興味深い代替手段です。このアプリケーションブリーフでは、すぐに使用できる市販の mAbXmise キットとタンデム質量分析（LC-MS/MS）を搭載した液体クロマトグラフィーの併用が、mAb 測定をシンプルに行える方法であり、ラボの担当者にとって、分析性能が高かつ使いやすく、柔軟性も高いことを実証します。このアプリケーションブリーフでは、このアプローチを用いたインフリキシマブ（IFX）測定に焦点を当てています。

はじめに

t-mAb は、消化管の炎症からさまざまながんに至るまで、さまざまな疾患の治療に使用される重要なクラスの医薬品です。現在、100 を超える抗体医薬品が FDA によって承認されており、過去 5 年間では、毎年平均 10 種類の抗体医薬品が EU と米国で最初の承認を受けています。これらの分子は、患者の管理および転帰に変革をもたらし、現在では臨床医が使用する主要な治療ツールになっています。t-mAb 濃度と有効性の関係、および免疫原性による有効性の低下が報告されています。これらの観察結果およびそのコストの高さのため、t-mAb を測定する必要性に対する認識が高まっています¹。さらに、一部の先駆的な mAb の特許の有効期限が切れた後は、バイオシミラーがますます一般的になっています。特に、IFX には現在、5 種類を超えるバイオシミラーが市販されています。

リガンド結合アッセイは、mAb の濃度測定に使用できる最初のアプローチであり、すぐに臨床ラボにおける mAb 測定の主力のテクノロジーになりました。一方、LBA は、試薬のロット間のばらつきや市販の分析法間の統一がなされていないため、再現性が得られないなどの欠点を伴う場合があります²。これらの制限を克服するため、低分子の分析にすでに使用されているテクノロジーである LC-MS に基づく分析法など、代替のテクノロジーが開発されています。タンパク質レベルの分析のための LC-MS/MS サロゲートペプチドアプローチは、プロテオミクス分野では十分に確立されていますが、まだ臨床における t-mAb のルーチン定量に広く使用されてはいません。これは主に、LC-MS/MS を用いたタンパク質の測定に使用できる、容易に導入できる市販のソリューションが存在しないためです。

IFX 測定における LC-MS/MS および mAbXmise キットの使用

IFX は、炎症性の消化管疾患の治療に使用される十分に確立された t-mAb です。IFX 測定のための LC-MS/MS ベースの分析法の開発が文献に記載されています^{3,4,5,6}。このような分析法は通常、トリプシン消化シグネチャーペプチドの質量検出を介する LC-MS/MS による濃度測定に基づいており、これによって、IFX 分析に良好な選択性がもたらされるため、広いダイナミックレンジにわたる精度および正確性が得られます。LC-MS 分析の前に血漿/血清サンプルを前処理するための、すぐに使用できる LC-MS キットが最近入手可能になったことは、確実に mAb 測定に LC-MS アプローチをより幅広く採用できるようにするための重要な 1 ステップです。LC-MS/MS LDT 分析法の日間再現性および使いやすさは、Promise Proteomics mAbXmise キットなどの市販の LC-MS キットを採用することで、最適化できる可能性があります。このキットでは、完全長の同位体標識 mAb（SIL-mAb）を内部標準として使用し、これによって、再現性が高く、頑健で、正確な mAb の定量が可能になります⁴。さらに、キットには、ロット間の再現性が高い標準試料、品質管理（QC）、試薬、消耗品が含まれています。このことは、LC-MS プラットホーム全体での分析法の統合に役立

ち、さまざまなラボでの採用が容易になります。

サロゲートペプチド分析法および Promise Proteomics mAbXmise サンプル前処理消耗品を利用することで、サンプル前処理、クロマトグラフィー分離、マルチプルリアクションモニタリング（MRM）質量検出によって得られる分析法の選択性により、トリプシン消化シグナチャーペプチドを使用して IFX を測定することができます。

Promise Proteomics mAbXmise キットを用いたサンプル前処理

mAbXmise の使用説明書（IFU）に従って、LC-MS/MS 分析用にサンプルを前処理しました。インフリキシマブ定量のワークフローの手順を図 1 に示します。ワークフローのステップには以下が含まれます：

1. サンプルの前処理：キャリブレーション試薬および品質管理試料を含む血漿サンプル 20 μ L を、凍結乾燥した安定同位体標識インフリキシマブの入った mAbXmise プレートに分注します。
2. サンプルの精製：サンプルを PuriXmise プレートに移してインフリキシマブのイムノキャプチャーを行い、マトリックス干渉を低減するためにサンプルを洗浄します。サンプルをコレクションプレート中に溶出し、蒸発乾固させます。
3. サンプルの消化：サンプルを再懸濁し、プロテアーゼ（CutXmise）をサンプルに添加して、インフリキシマブを一晚消化します。消化を止めると、サンプルをすぐに分析できます。
4. LC-MS 分析：LC-MS 装置にサンプルを注入して分析し、標識ペプチドおよび非標識ペプチドを検出します。インフリキシマブおよびその SIL 標準試料のペプチドトランジションを表 1 に示します。

mAbXmise キットに含まれるキャリブレーション試薬、QC 試料、内部標準を性能の実証に使用しました。キャリブレーション試料の濃度は 2 ~ 100 μ g/mL、QC 試料の濃度は 4 μ g/mL および 25 μ g/mL でした。さらに、29 点の IFX の血漿サンプルの分析により、分析で得られた IFX のさまざまなシグネチャーペプチドの濃度間の比較が可能になりました。

LC-MS/MS 分析

サンプルは、ACQUITY UPLC™ I-Class FL に注入し、実行時間 4.5 分のアセトニトリル/水/ギ酸のグラジエントを使用して XSelect™ Premier HSS T3、2.1 mm $\times$ 50 mm、2.5 μ m カラムで分離し、Xevo™ TQ-XS 質量分析計で検出を行いました。サンプルの再分析は、Xevo TQ-S micro 質量分析計と同じセットアップを使用して行いました。分析に使用したシグネチャーペプチドの MRM トランジションを表 1 に示します。

シグネチャーペプチド	略語	ターゲット	MRM	コロン電圧 (V)	コリジョン (V)
SINSATHYAESVK	SIN	定量 (定性)	469.8>603.8 (546.8)	40	10 (12)
		SIL	472.5>607.8	40	10
GLEWVAEIR	GLE	定量 (定性)	536.8>488.3 (773.5)	40	14
		SIL	541.8>498.3	40	14
SAVYLQMTDLR	SAV	定量 (定性)	648.8>763.4 (876.5)	40	18
		SIL	653.8>773.4	40	18
DILLTQSPAILSVSPGER	DIL	定量 (定性)	632.9>731.4 (844.5)	40	16
		SIL	636.0>741.4	40	16
ASQFVGSSIHWYQQR	ASQ	定量 (定性)	598.6>754.4 (818.4)	40	15
		SIL	602.0>685.8	40	15

表 1. インフリキシマブのシグネチャーペプチド（定量イオンおよび定性イオン）および安定同位体標識内部標準のトランジション

結果および考察

分析感度およびキャリブレーションの直線性

IFX について複数のトリプシン消化シグネチャーペプチドを測定したところ、IFX のキャリブレーション標準試料（2 μ g/mL）において、SINSATHYAESVK（SIN）、次いで ASQFVGSSIHWYQQR（ASQ）で最大レベルの分析感度が得られ、Xevo TQ-XS と Xevo TQ-S micro のいずれを使用しても最も高いピークレスポンスおよびシグナル：ノイズ比（S/N 比）が得られることがわかりました。すべてのペプチドで S/N 比（PtP）が 10:1 超であり、これらのペプチドがインフリキシマブの LoQ（2 μ g/mL）としての使用に適していることを示しています。いずれのシステムでも、検量線は、各ペプチドについて $r^2 > 0.998$ で、直線性を示すことがわかりました。

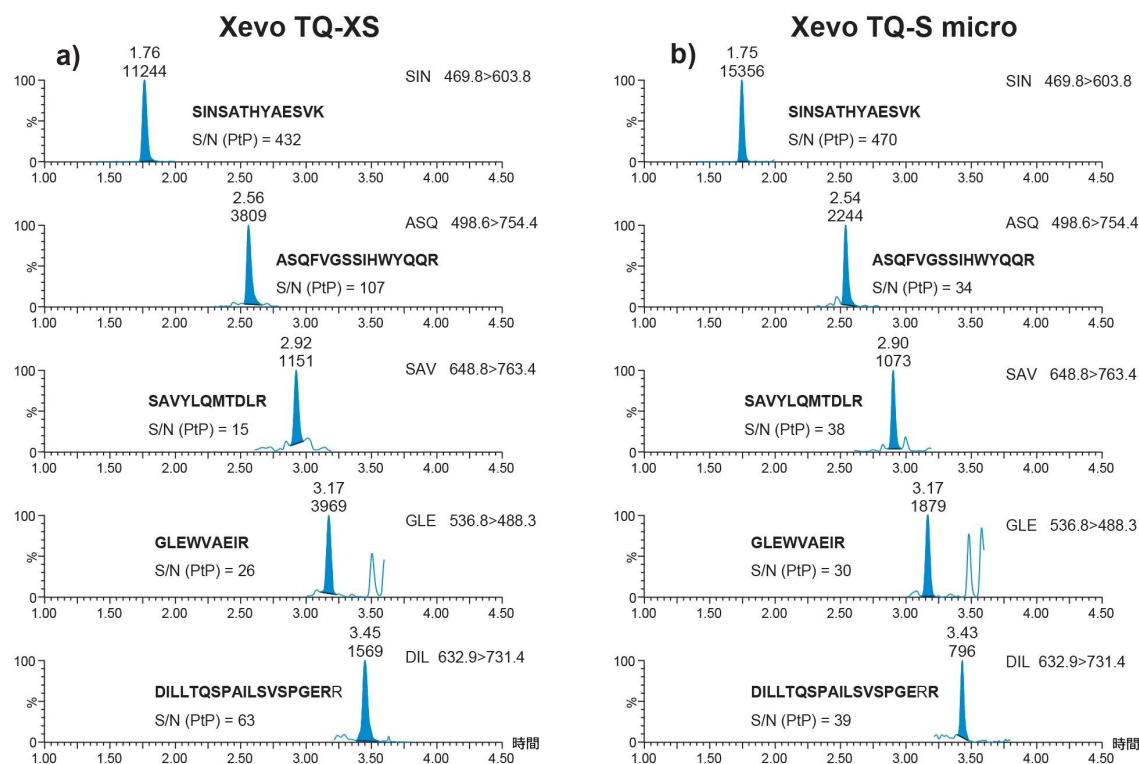


図 2. ACQUITY UPLC I-Class と Xevo TQ-XS (5 μ L 注入) および Xevo TQ-S micro (15 μ L 注入) を使用した場合における、5 つの IFX のシグネチャーペプチド (2 μ g/mL) についての分析法の分析感度

精度

Xevo TQ-XS および Xevo TQ-S micro の精度を、同梱の QC 物質を使用し、4 μ g/mL および 25 μ g/mL で 5 回繰り返しにわたって評価しました。QC 濃度全体にわたる合計精度は、IFX のシグネチャーペプチドについて 9.5% CV 以下で、IFX のノミナル濃度と比較して 95 ~ 108% という正確性でした (表 2)。このデータは、キットと LC-MS/MS システムの両方の日内再現性を実証しています。

	QC 1 (4 µg/mL)				
	SIN	GLE	DIL	SAV	ASA
	Xevo TQ-XS				
平均値	4.1	4.2	4.1	4	4.2
SD	0.2	0.1	0.4	0.2	0.3
RSD	5.40%	1.20%	9.50%	4.80%	7.40%
正確性	104%	105%	102%	101%	105%
	Xevo TQ-S micro				
平均値	4	3.8	3.9	4.1	3.9
SD	0.1	0.3	0.2	0.3	0.4
RSD	3.70%	6.50%	6.20%	6.60%	10.00%
正確性	100%	96%	97%	102%	97%

	QC 2 (25 µg/mL)				
	SIN	GLE	DIL	SAV	ASA
	Xevo TQ-XS				
平均値	26	25.7	25.4	26.4	25.3
SD	0.7	0.6	0.9	1	1.3
RSD	2.70%	2.30%	3.40%	3.70%	5.00%
正確性	104%	103%	101%	105%	101%
	Xevo TQ-S micro				
平均値	26.3	25.5	27.1	26.8	23.7
SD	0.7	1.3	1.7	0.6	1.1
RSD	2.50%	5.10%	6.40%	2.20%	4.40%
正確性	105%	102%	108%	107%	95%

表 2. Xevo TQ-XS および Xevo TQ-S micro を使用した、血漿中の IFX シグネチャーペプチド（SIN、GLE、DIL、SAV、ASA）（4 µg/mL および 25 µg/mL）の 5 回繰り返し分析にわたる精度および正確性

ペプチドの比較

29 点の IFX 血漿サンプルの LC-MS/MS 分析を行い、IFX のさまざまなトリプシン消化シグネチャーペプチドを比較しました。図 3 に、Xevo TQ-XS 分析で得られた IFX のシグネチャーペプチドの間に見られた違いを示しており、SIN ペプチドは、サンプル中の他のペプチドと比較して低濃度でした。29 サンプルにわたる 5 種類のペプチドの平均再現性

(CV 29%) は、SIN 以外の 4 種類のペプチドの平均再現性 (CV 10%) と比較して、はるかに高いことがわかりました。

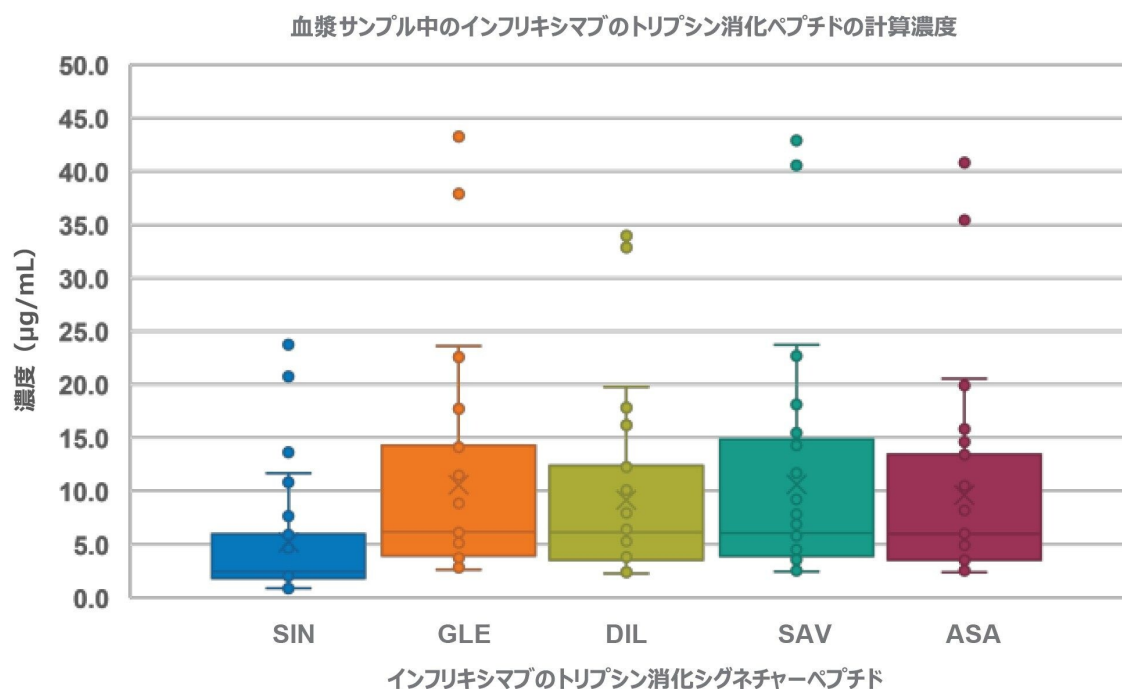


図 3. 29 点の IFX 血漿サンプルの LC-MS/MS シグネチャーペプチド濃度の比較

IFX SIN ペプチドの濃度減少は、脱アミド化の受けやすさによって説明できる可能性があります。未処理の血漿サンプル中のアスパラギン-セリン (NS) モチーフでの脱アミド化の結果、分子量が 0.98 Da 増加します。これにより、一部の MRM トランジションのための IFX SIN 非標識ペプチドが減少しますが、スパイク物質を含むキャリブレーション試薬および QC 物質によって補正されません⁷。このデータおよび補足情報に基づき、ラボにおいては、この分析法の目的のために、インフリキシマブの定量に使用するペプチドを評価および選択することを推奨します。

結論

LC-MS/MS テクノロジーを使用して mAb 医薬品を定量するためのソリューションが、臨床試験で使用できるようになりました。このアプリケーションブリーフでは、サンプル前処理用の市販のキットを使用した血漿中のインフリキシマブの定量およびそれに続く LC-MS/MS の例を示しています。

Promise Proteomics mAbXmise キットを使用することで、分析が利用しやすく容易に導入できるようになります。また、このキットは自動化にも適しています。測定範囲が 2 µg/mL ~ 100 µg/mL に拡張されたため、イムノアッセイで時折見られる希釈が不要になり、高濃度サンプルの処理時間が向上します。さらに、希釈および再分析が減ることで、キットが利用しやすくなり、コスト管理にも役立ちます。このキットは、正しく選択したペプチドのターゲット LC-MS/MS 分析のための、IFX のイムノキャプチャーおよびトリプシン消化の日間再現性を高めるのに役立ちます。このキットで使用するプロセスは、直接消化サロゲートペプチドワークフローと比較して、マトリックス干渉が低減して分析感度が向上し、より少ないサンプル量で済むようになります。

この分析法は、予想範囲にわたって IFX を定量できるダイナミックレンジ、および血漿サンプル中の低レベルの IFX サロゲートペプチドを定量できる選択性および分析感度を有する Xevo TQ-XS 質量分析計および Xevo TQ-S micro 質量分析計の両方で実行できることが実証されています。

参考文献

1. Hirsch I, Goldstein DA, Tannock IF, Butler MO, Gilbert DC. Optimizing the dose and schedule of immune checkpoint inhibitors in cancer to allow global access. *Nat Med.* 2022 Nov;28(11):2236–2237. doi: 10.1038/s41591-022-02029-1. PMID: 36202999.
2. Hoofnagle AN, Wener MH. The fundamental flaws of immunoassays and potential solutions using tandem mass spectrometry. *J Immunol Methods.* 2009 Aug 15;347(1–2):3–11. doi: 10.1016/j.jim.2009.06.003. Epub 2009 Jun 16. PMID: 19538965; PMCID: PMC2720067.
3. Tron C, Lemaitre F, Bros P, Goulvestre C, Franck B, Mouton N, Bagnos S, Coriat R, Khoudour N, Lebert D, Blanchet B. Quantification of infliximab and adalimumab in human plasma by a liquid chromatography tandem mass spectrometry kit and comparison with two ELISA methods. *Bioanalysis.* 2022 Jun;14(11):831–844. doi: 10.4155/bio-2022-0057. Epub 2022 Jun 23. PMID: 35735172.
4. Jourdil JF, Lebert D, Gautier-Veyret E, Lemaitre F, Bonaz B, Picard G, Tonini J, Stanke-Labesque F. Infliximab quantitation in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: towards a standardization of the methods? *Anal Bioanal Chem.* 2017 Feb;409(5):1195–1205. doi: 10.1007/s00216-016-0045-4. Epub 2016 Nov 8. PMID: 27826630.
5. El Amrani M, van den Broek MP, Göbel C, van Maarseveen EM. Quantification of active infliximab in human serum with liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a tumor necrosis factor alpha -based pre-analytical sample purification and a stable isotopic labeled infliximab bio-similar as internal standard: A target-based, sensitive and cost-effective method. *J Chromatogr A.* 2016 Jul 8;1454:42–8. doi:

10.1016/j.chroma.2016.05.070. Epub 2016 May 22.PMID: 27264745.

6. Willrich MA, Murray DL, Barnidge DR, Ladwig PM, Snyder MR. Quantitation of infliximab using clonotypic peptides and selective reaction monitoring by LC-MS/MS. *Int Immunopharmacol*. 2015 Sep;28(1):513-20. doi: 10.1016/j.intimp.2015.07.007. Epub 2015 Jul 25. PMID: 26210595.

7. Sydow JF, Lipsmeier F, Larraillet V, Hilger M, Mautz B, Molhoj M, et al. Structure-based prediction of asparagine and aspartate degradation sites in antibody variable regions. *PloS one*. 2014;9(6):e100736.

特記事項

このアプリケーションブリーフは研究目的のみに使用してください。診断用には使用できません。

ヨーロッパでは、*mAbXmise* キットは専門のラボでの使用を目的とする体外診断用医療機器です。*mAbXmise* キットにより、モノクローナル抗体の血漿中濃度を決定できます。分析性能は、装置の特性およびその設定によって決まります。分析法のバリデーションは、内部慣行に従って実施するものとします。詳細については、それぞれに固有の指示を参照してください。*PROMISE Proteomics* 製品は世界中で販売されていますが、それぞれの国における製品の使用、応用、入手可能性は、各国の規制登録の状況によって異なります。製品は登録されておらず、その他の製品もすべて研究目的のみに使用してください。製造者 *PROMISE PROTEOMICS SAS 7, parvis Louis Néel • 38040 Grenoble France • Phone +33 4 38 02 36 50 • contact@promise-proteomics.com • RCS Grenoble B 433 546 504*

ソリューション提供製品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS システム <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-XS タンデム四重極質量分析計 <<https://www.waters.com/134889751>>

Xevo TQ-S micro タンデム四重極質量分析計 <<https://www.waters.com/134798856>>

MassLynx MS ソフトウェア <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

720007979JA、2023 年 8 月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシー](#) [商標](#) [キャリア](#) [クッキー](#) [クッキー環境設定](#)