

# Application News

## No.C130A

LC/MS  
Liquid Chromatography Mass Spectrometry

### Skyline によるモノクローナル抗体の MRM メソッド作成

Development of MRM Methods for Monoclonal Antibodies Using Skyline

抗体医薬品の血中濃度定量において、従来手法であるリガンド結合アッセイでは、ターゲットに対して高い特異性と親和性を有する検出抗体を作製する必要があり、分析法の確立に莫大な時間と費用を要します。一方、LC/MS/MS による分析では抗体の作製が不要なため、分析法開発の期間とコストを大幅に削減することができます。本稿では、Skyline ソフトウェア<sup>1)</sup>と LCMS-8050/8060 を組み合わせ、生体試料中のモノクローナル抗体を特異的に検出するための MRM メソッド作成法についてご紹介します。

免疫グロブリンの基本構造は分子量約 23,000 の重鎖と分子量 50,000-70,000 の軽鎖から構成されており、動物種によって保存されたアミノ酸配列をもつ部分は定常領域、抗体分子ごとに多様なアミノ酸配列を有する部分は可変領域と呼ばれています。可変領域のなかでも、特に抗原認識の特異性を規定する領域は相補性決定領域 (CDR) と呼ばれており、抗体分子間で特にアミノ酸配列に多様性をもってます。免疫グロブリンには重鎖、軽鎖それぞれ 3 カ所ずつ CDR が含まれており (Fig. 1, 2)、血液サンプル中の抗体医薬品などのモノクローナル抗体を内因性の抗体と区別して定量するためには、CDR を選択的に検出する必要があります。

T. Matsubara

1) Skyline はワシントン大学の MacCoss Lab of Biological Mass Spectrometry より開発されたソフトウェアです。

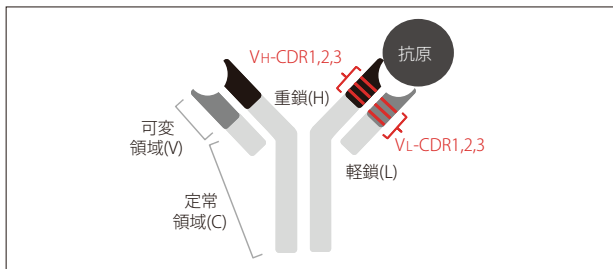


Fig. 1 免疫グロブリンの構造と相補性決定領域 (CDR) Structure of Immunoglobulin and Complementarity Determining Regions (CDRs)

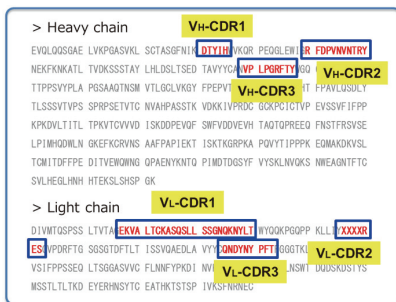


Fig. 2  $\beta$ アミロイド抗体 (6E10) のアミノ酸配列と CDR Amino acid Sequences and CDRs in  $\beta$ -Amyloid Antibodies (6E10)

全長モノクローナル抗体のアミノ酸配列情報 (FASTA ファイル) を Skyline ヘインポートし、酵素消化によって生じるペプチド断片を予測しました。さらに、CDR を含むペプチド断片を選択

し、予測される全てのトランジションとコリージョンエネルギーを LabSolutions LCMS の分析メソッドとして出力しました。

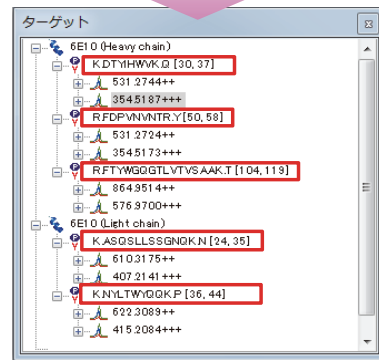
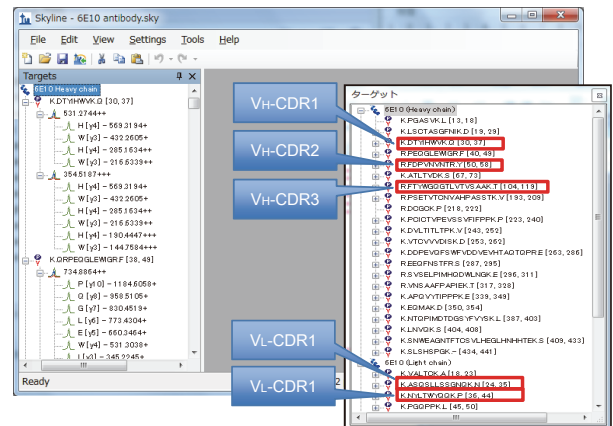


Fig. 3 Skyline を用いた分析メソッドの作成 (CDR を含むトリプシン消化断片を選択) Creation of Analysis Methods Using Skyline (Selection of Trypsin Digestion Fragments Containing CDRs)

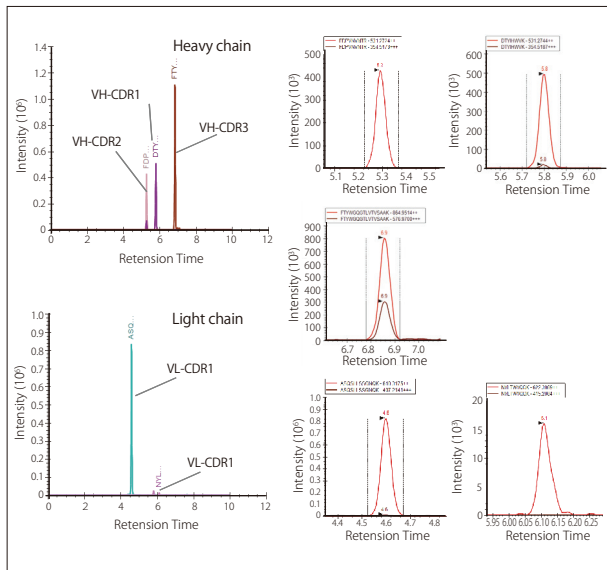
### Skyline ソフトウェアを用いた CDR を含むトリプシン消化断片の MRM メソッド作成

Development of MRM Method for Tryptic Fragment Containing CDR Using Skyline Software

本稿では、LCMS-8060/8050 を用いた LC/MS/MS 法に Skyline<sup>1)</sup> ソフトウェアを組み合わせ、生体試料中のモノクローナル抗体を特異的に検出するためのペプチドの MRM メソッドの作成から、検量線の作成までを行った分析例を紹介します。標品とアミノ酸配列 (CDR を含む) の情報があれば、Skyline と LCMS-8060/8050 を組み合わせることで、短時間で安価に抗体医薬品の定量メソッドを開発することが可能になります。

タンパク質は分子量が大きいため、LC/MS で分析する場合は一般的にタンパク質消化酵素を使って断片化します。生体試料中のタンパク質を MRM で選択的に測定するためには、共存ペプチドと区別できるアミノ酸配列をもつ消化断片をターゲットとする必要があります。

ここでは、βアミロイド抗体 (6E10) の CDR を含むペプチド断片を標的として、標品モノクローナル抗体をトリプシンで消化したサンプルを使って分析メソッドを作成しました。Skyline ソフトウェアを用いるとモノクローナル抗体のアミノ酸配列をインポートするだけで、酵素消化によって生じるペプチドのアミノ酸配列を予測でき (Fig. 3)、さらに、各ペプチドのプリカーサーイオンとコリージョンエネルギー、コリージョンによって生じるプロダクトイオンを予測することができます。これら予測情報に基づいて、CDR を含むペプチド断片の最適な装置パラメーターを LabSolutions LCMS のメソッドとしてエクスポートしました。

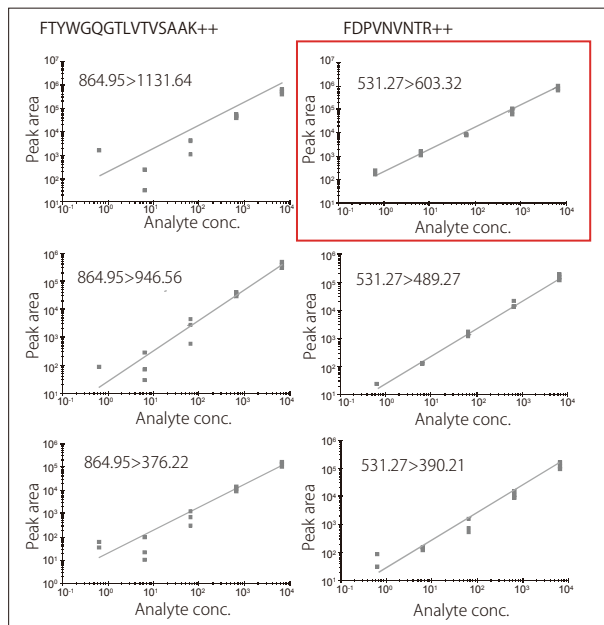


a) 検出ペプチドごとに強度を比較  
価数およびプロダクトイオンごとに強度比較して、感度良く検出可能なターゲットを選択した。

## LCMS-8050/8060 と Skyline ソフトウェアを組み合わせた分析メソッド最適化

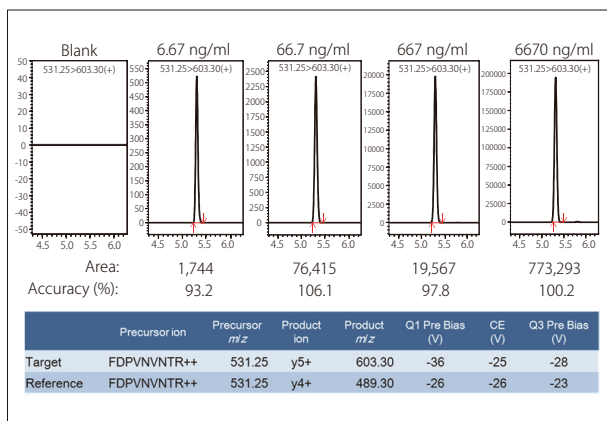
Optimization of Analytical Method Using a Combination of the LCMS-8050/8060 and Skyline Software

得られた分析メソッドを用いて、実際にモノクローナル抗体をトリプシン消化したサンプルを測定しました。測定後、データファイルをそのまま Skyline へインポートして、検出感度の良好なペプチド断片および定量性の高いトランジションを選択し (Fig. 4)、定量に最適な分析条件を絞り込むことができました。LCMS-8050/8060 と Skyline ソフトウェアの組み合わせにより、定量分析メソッド作成の生産性を飛躍的に向上させることができます。

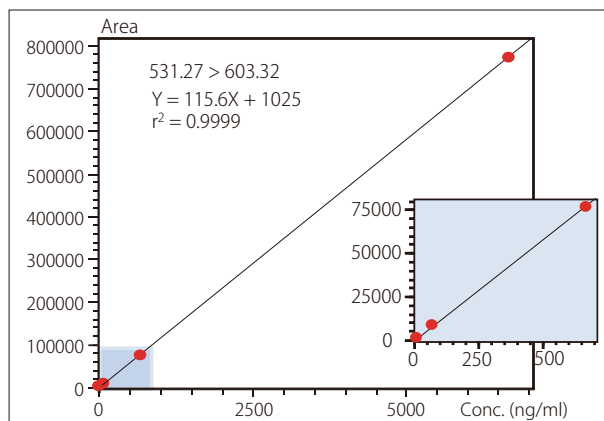


b) 各トランジションにおける検量線比較  
ダイナミックレンジの広い 531.27>603.32 を選択した。

Fig. 4 標品モノクローナル抗体 (6E10) のトリプシン消化サンプルを用いた CDR 含有トリプシン断片の検出 (Skyline によるデータ解析)  
Detection of Trypsin Fragments Containing CDRs Using Standard Monoclonal Antibodies (6E10) Subjected to Trypsin Digestion (Data Analysis by Skyline)



a) 代表的な CDR 含有ペプチドの MRM クロマトグラム  
b) 代表的な CDR 含有ペプチドの分析パラメーター



c) 検出感度、直線性、ダイナミックレンジが良好な分析条件を簡単に選択することが可能

Fig. 5 標品モノクローナル抗体 (6E10) のトリプシン消化サンプルを用いた分析結果  
Analysis Results Using Standard Monoclonal Antibodies (6E10) Subjected to Trypsin Digestion

標品モノクローナル抗体の希釈系列を作製して、Skyline で作成した分析メソッドを用いて、MRM 測定を行った結果、6.67~6670 ng/mL (Injection vol.: 30 μL) 範囲において、良好な Accuracy (%) の検量線を作成することができました。

注) ・本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器等法に基づく医療機器として承認・認証を受けた機器ではありません。  
・本文書に記載されている分析手法を診断目的で使用することはできません。

A改訂版発行: 2016年4月

初版発行: 2016年3月

株式会社 島津製作所 分析計測事業部  
グローバルアプリケーション開発センター

島津コールセンター ☎ 0120-131691  
(075)813-1691