

## 27L-pm13

サロゲートペプチドを使用した LC/MS によるタンパク質バイオアナリシス実施における考慮点

○佐々木 俊哉<sup>1</sup>, Erin CHAMBERS<sup>2</sup> (<sup>1</sup>日本ウォーターズ, <sup>2</sup>ウォーターズコーポレーション)

【目的】タンパク質及びペプチド医薬品の定量は、歴史的にリガンドバイディングアッセイ(LBA)で行われてきた。近年、複数のターゲットの同時定量、選択性改善及び広い定量範囲と迅速なメソッド開発などの利点と交差反応や抗薬物抗体(Anti drug Antibodies: ADAs)効果など LBA の問題点の克服から LC/MS による定量が注目されている。しかしながら LC/MS によるタンパク質定量には確立された標準ワークフローが無く、多くの選択肢の中から最適なものを選ぶことは困難であった。実践的なメソッド開発のガイドラインとサロゲートペプチド選択における比較、タンパク質レベルでの予備分画と消化、ペプチドレベルでの精製と内標準(IS)の選択などの標準化を目的とし、infliximab, bevacizumab, adalimumab 及び trastuzumab を例として検討を行った。

【方法】上記抗体及び安定同位体内標準 (SiluMab またはインタクトマウスモノクローナル抗体)をスパイクしたヒトと動物の血漿を変性還元アルキル化し、トリプシン消化を行った。陽イオン交換-逆相ミックスモード固相により精製された消化ペプチドを  $2\mu\text{m}$  以下の C18 パーティクルを充填した  $2.1 \times 150\text{mm}$  カラムを使用した LC/MS で分析した。

【結果と考察】ミックスモード固相による精製は検討した抗体のジェネリックおよびユニークサロゲートペプチド両方に高い回収率と正しい定量結果を与えた。平均定量下限値(LLOQ)は  $10\text{-}100\text{ ng/mL}$  で高い真度と精度を達成する、前臨床試験における要求事項を満足する標準ワークフローが構築された。これにより分析者は多数ある選択肢の組み合わせが与える分析感度と特異性への影響を理解する助けとなり、更に効率的なメソッド開発を可能にするものと結論される。