



LC-MS/MS method for denosumab quantitation in human serum with rapid protein digestion using immobilized trypsin

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2019-03-28 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 志田, 拓顕 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/00003534

博士（医学） 志田 拓顕

論文題目

LC-MS/MS method for denosumab quantitation in human serum with rapid protein digestion using immobilized trypsin

（固相化トリプシンを用いた迅速タンパク質消化によるヒト血清中デノスマブ定量のための LC-MS/MS 法）

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

デノスマブはヒト型抗 receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) 抗体であり、骨粗鬆症の治療やがん骨転移による骨関連事象の抑制に用いられる。優れた有効性を示す反面、低カルシウム血症や顎骨壊死などの有害作用を引き起こすが、これらと血清中濃度との関係は不明である。

抗体医薬の血清中濃度は一般的に免疫学的手法で測定されるが、これには交叉反応性や使用される試薬の入手が困難などの問題点がある。そこで近年質量分析計を用いた抗体医薬の定量法が報告されているが、これには定量のための抗体医薬由来ペプチドを適切に選択する必要がある、タンパク質消化に時間がかかる、血清由来の夾雑タンパク質による質量分析計の飽和が生じるといった問題点がある。また、臨床に適用可能なヒト血清中デノスマブの質量分析計を用いた定量法は未だ報告されていない。

そこで本研究では、ヒト血清中デノスマブの質量分析計による定量法を確立すること、およびその定量法を臨床に適用することを目的とする。

〔患者ならびに方法〕

血清の前処理のため、プロテイン G 固相化カラムを用いて血清から免疫グロブリン画分を抽出した。抽出物に内部標準物質として安定同位体標識ペプチドを加えた後、変性剤、還元剤、アルキル化剤を順次添加し、トリプシン固相化カラムで処理してタンパク質をペプチド断片化した。C18 カラムを用いて脱塩処理した後、減圧乾固した。

前処理したサンプルをフーリエ変換型質量分析計で分析し、デノスマブ由来のペプチド断片を同定した。同定されたペプチド断片の中から、以下の基準を満たすペプチドを測定に用いるペプチド（シグネチャーペプチド）として選択した。(1)デノスマブの相補性決定領域を含む、(2)デノスマブ添加血清のみから検出されデノスマブ非添加の血清からは検出されない、(3)質量分析計で分析した際に十分な強度を有する。

デノスマブの定量のため、前処理したサンプルをトリプル四重極型質量分析計で分析し、シグネチャーペプチドと内部標準ペプチドをポジティブイオン多重反応モニタリングモードで定量分析した。直線性・選択性・マトリックス効

果・安定性・真度および精度について、米国食品医薬品局ガイダンスに基づきバリデーションを行った。

対象患者は、浜松医科大学医学部附属病院において、がん骨転移に対してデノスマブの治療を受けている 15 名とした。デノスマブ投与 6 回目以降における投与直前の血清中デノスマブ濃度を測定し、本測定が臨床へ適用可能であることを確認した。

本研究のヒトを対象とした臨床研究は、浜松医科大学のヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得て実施した。本研究のヒトを対象としたすべての試験は、ヘルシンキ宣言の精神を遵守し実施した。被験者には、本研究について口頭および文書で説明した後、自由意思に基づく参加への同意を文書で得た。

[結果]

フーリエ変換型質量分析計を用いて同定されたデノスマブ由来ペプチド 19 種類の中から、選択基準に基づいて LEPEDFAVFYcQQYGSSPR の配列を持つペプチドをシグネチャーペプチドとして選択した。

質量分析計による分析時間は 8 分であった。デノスマブを添加した血清とデノスマブ治療後の患者血清から、シグネチャーペプチドおよび内部標準ペプチドのピークが 2.8 分に観察された。一方で、デノスマブ非添加血清およびデノスマブ治療前の患者血清からはシグネチャーペプチドは検出されなかった。血清中デノスマブは 2.5–80 $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲で直線性を示し、その定量下限は 2.5 $\mu\text{g/mL}$ であった。プロテイン G を用いたデノスマブの抽出率は 76.4%、脱塩処理におけるペプチドの抽出率はシグネチャーペプチドについては 95.8%、内部標準ペプチドについては 106.6%であった。シグネチャーペプチドおよび内部標準ペプチドのマトリックスファクターは 39.5%と等値であった。血清中デノスマブの安定性は室温で 24 時間保管後 90.5%、4℃で 1 か月間保管後 101.2%であり、また 1 回および 2 回の凍結融解後の安定性はそれぞれ 103.5%および 90.5%であった。測定内・測定間の真度および精度はそれぞれ 88.1–104.7%以内、および 12.9%以下であった。

デノスマブの投与を受けている患者 15 名の血清に本測定法を適用したところ、その濃度範囲は 7.5–67.5 $\mu\text{g/mL}$ であり、全ての患者が本測定法の検量線範囲内であった。

[考察]

本測定法で選択されたシグネチャーペプチドは、デノスマブに特異的であることが実測で確認されており、測定に用いるペプチドの選択として妥当である。プロテイン G を用いて血清からデノスマブを含む免疫グロブリン画分を抽出することにより、質量分析計に導入するペプチドの量を減少させ、質量分析計の飽和を緩和することが可能である。また安定同位体標識ペプチドを内部標準物

質として用いることで、マトリックス効果を補正することが可能である。従来型の可溶化トリプシンでは通常一晚の反応時間を要する一方、本測定法では固相化トリプシンを用いることでタンパク質消化に要する時間は 14 分と短縮された。これにより前処理から測定までを 1 日以内に完了することができ、臨床での使用に適していると考えられる。本測定法は米国食品医薬品局のガイダンスに基づきバリデーションされており、またがん骨転移を有する患者に対して適用可能であった。我々の知る限り、本研究はヒト血清中デノスマブの定量を質量分析計で行った最初の報告である。

〔結論〕

固相化プロテイン G および固相化トリプシンを用いた迅速で実用的なデノスマブの定量法が確立された。本定量法はがん骨転移を有する患者に適用可能であった。