明　細　書

発明の名称 ：

ペプチド断片の調製方法およびそれに用いられるペプチド断片調製用キット、ならびに分析方法

技術分野

[0001] 本発明は、プロテアーゼを用いて、抗体等のタンパク質を位置選択的に切断して、ペプチド断片を調製する方法、およびそれに用いられるペプチド断片調製用キットに関する。さらに、本発明は、当該方法により調製されたペプチド断片を、質量分析法等により分析して、タンパク質の検出や定量を行う分析方法に関する。

背景技術

[0002] 抗体医薬の需要が急速に拡大しており、臨床現場において、血液中の抗体濃度を簡便に定量することの重要性が高まっている。従前は、抗体医薬を投与後の血液中濃度を正確に測定することは重要視されていなかったが、トラスツズマブ（商品名：Herceptin）の胃がん適用拡大に伴う臨床試験において、その血液中濃度と生存期間に有意差が見出されて以降、抗体医薬の臨床試験等においても、抗体の血中濃度を測定することが必須となりつつある。例えば、薬物動態確認等の品質管理や、後発医薬品の臨床試験等における先発医薬品との同一性確認等においても、抗体医薬の同定や、その血液中濃度の定量が要求されるようになっている。

[0003] 抗原抗体反応を用いたＥＬＩＳＡ（enzyme-linked immunosorbent assay）法は、特異性および定量性に優れているため、臨床試験等において、血液中の抗原や抗体の検出・定量等に広く用いられている。しかし、ＥＬＩＳＡ法は、単一のタンパク質（抗原または抗体）の検出を目的としたものであり、多数の異なるタンパク質を同時に検出することはできない。ＥＬＩＳＡ法により多数のタンパク質を検出するためには、検出対象ごとに特異抗体を作製して濃度測定条件を設定する必要があり、莫大な手間と費用を要する。ま

た、ＥＬＩＳＡ法は抗原抗体反応を利用するため、併用薬や代謝物との交差反応が測定結果に影響を及ぼし得ることや、一部の抗体医薬では保存検体への適用が困難である等の問題点が知られている。

[0004] そのため、種々の抗体に汎用的に適用可能な分析手法の開発が望まれている。プロテオミクスの発展に伴い、質量分析法により、タンパク質を網羅的に検出・定量可能な技術が開発されており、近年では、抗体等の巨大生体分子の解析も可能となっている。質量分析では、測定対象分子をイオン化する必要があり、抗体等の巨大生体分子をそのまま質量分析で分析することは困難な場合が多い。そのため、プロテアーゼ消化によりタンパク質を切断（断片化）し、断片化されたペプチドの中から、分析対象のタンパク質に特異的なアミノ酸配列を有するペプチド断片を選択して、質量分析装置により検出・定量する手法が採用されている。一般には、プロテアーゼによる消化効率を向上するために、高濃度の尿素やグアニジン溶液中で基質タンパク質を変性させた後、プロテアーゼ消化が行われる。

[0005] 抗体等のタンパク質をプロテアーゼ消化により断片化して質量分析を行う場合、検出対象となるペプチド断片を選択的に検出することが重要となる。しかし、多種多様な夾雑物を含む生体試料から、分析対象のタンパク質由来の特定のペプチド断片を検出することは困難を伴う場合がある。すなわち、血液等の生体試料は、多種多様な夾雑物を含有するため、生体試料にプロテアーゼを添加すると、夾雑物由来のタンパク質もプロテアーゼ消化されて、膨大な数のペプチド断片が生成する。その中から検出対象（例えば特定の抗体）由来の目的のペプチド断片を選択的に検出・定量するためには、質量分析に供する前に、ペプチド断片の分離や濃縮等の操作が必要となる。また、検出対象以外のタンパク質から、検出対象のタンパク質のペプチド断片と共通するアミノ酸配列を有するペプチド断片が産生されると、誤検出や定量性低下の原因となり得る。したがって、生体試料から生じるペプチド断片数の増加に伴って、検出対象とするペプチド断片の選択がより困難となる傾向がある。

[0006] このような生体試料の複雑性に鑑み、試料を液体クロマトグラフィー（ＬＣ）により精製した後、質量分析装置に供する方法や、衝突誘起解離（ＣＩＤ）等によりイオン開裂を生じさせる多段階の質量分析、あるいはこれらの組み合わせ（多重反応モニタリング、ＭＲＭ）により、生体試料等の複雑試料中の特定のタンパク質を定量する方法が開発されている。しかし、試料が複雑になるほど、様々な分離モードを組み合わせる必要が生じ、高精度の実験装置が必要となったり、分析条件の設定に多大な時間を要する等の問題がある。

[0007] また、抗体等の巨大タンパク質は、精製された試料を用いた場合でも、プロテアーゼ消化により多数のペプチド断片が産生されるため、その中から、検出対象に特有のアミノ酸配列を有するペプチド断片を選択的に検出・定量することが困難となる傾向がある。このような問題に鑑み、分析対象のタンパク質を位置選択的にプロテアーゼ消化して、試料中のペプチド断片の数（種類）を減少させ、分析精度を高めるとともに、分析を簡便化する方法が開発されている。例えば、特許文献１では、抗体のペプシン消化によりＦ（ａｂ’）$_2$断片を産生した後、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片をさらにトリプシン等のプロテアーゼで消化して、抗体の相補性決定領域（ＣＤＲ）を含むペプチド断片を産生し、ＣＤＲを含むペプチド断片を、質量分析により検出・定量する方法が提案されている。

[0008] ここで、抗体の構造について説明する。すべての抗体は、２本の重鎖（Ｈ鎖）と２本の軽鎖（Ｌ鎖）を有している。１本の軽鎖と１本の重鎖がジスルフィド結合で結びついてヘテロダイマーを形成し、さらに２つのヘテロダイマーが、２つのジスルフィド（Ｓ－Ｓ）結合で結びついて“Ｙ”字型のヘテロテトラマーを形成している（図２参照）。抗体は、重鎖からなる１つのＦｃ(Fragment, crystallizable)ドメインと、重鎖および軽鎖からなる２つのＦａｂ(Fragment, antigen binding)ドメインを有し、ＦｃドメインとＦａｂドメインとは、ヒンジ部を介してつながっている。

[0009] 抗体のＦｃドメインは、主に、抗体が抗原に結合した後の反応を惹起する

機能（エフェクター機能）を担っており、同一種由来の抗体のほとんどは、Ｆｃドメインのアミノ酸配列が共通している。一方、Ｆａｂドメインは、先端部分（Ｎ末端側）が抗原と結合する機能を有している。Ｆａｂドメインのうち、Ｎ末端側の部分は、多様な抗原に結合できるように、アミノ酸配列に多彩な変化がみられる。この領域は、可変領域（Ｖ領域）と称され、軽鎖の可変領域はＶＬ領域、重鎖の可変領域はＶＨ領域と称される。Ｖ領域以外のＦａｂドメインとＦｃドメインは、アミノ酸配列の変化が少ない領域であり、定常領域（Ｃ領域）と称される。軽鎖の定常領域はＣＬ領域、重鎖の定常領域はＣＨ領域と称される。ＣＨ領域はさらにＣＨ１領域，ＣＨ２領域，およびＣＨ３領域の３つに分けられる。重鎖のＦａｂドメインはＶＨ領域とＣＨ１領域からなり、重鎖のＦｃドメインはＣＨ２とＣＨ３からなる。ヒンジ部はＣＨ１とＣＨ２の間に位置する。

[0010] 抗体の特異性（すなわち抗原への特異的結合性）は、Ｖ領域のアミノ酸配列の組み合わせにより決定される。軽鎖および重鎖のそれぞれは、ＦａｂドメインのＶ領域内に、３つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を有する。ＣＤＲは、超可変領域とも称され、抗体の種類ごとにアミノ酸配列が異なる。抗体は、軽鎖と重鎖のそれぞれに３つのＣＤＲ（合計６種類のＣＤＲ）を有するため、種々の抗原に結合可能な多様性が生じる。換言すれば、ＣＤＲは抗体を特徴付ける領域であり、抗体のＣＤＲのアミノ酸配列を特定することにより、抗体を同定できる。

[0011] 前述のように、抗体のＦａｂドメインとＦｃドメインはヒンジ部を介してつながっている。プロテアーゼの一種であるパパインは、このヒンジ部を切断するため、抗体のパパイン消化によって、２つのＦａｂドメインと１つのＦｃドメインが産生される。また、プロテアーゼの一種であるペプシンは、ヒンジ部の２本のジスルフィド結合のＦｃドメイン側（Ｃ末端側）を切断するため、ペプシン消化によって、２つのＦａｂドメインが結合したＦ（ａｂ’）$_2$ドメインと、多数のＦｃドメインフラグメントが産生される。

[0012] 上記特許文献１の方法では、ペプシン消化またはパパイン消化によりＦａ

ｂドメインまたはＦ（ａｂ’）$_2$ドメインを産生させ、Ｆａｂドメインまたは Ｆ（ａｂ’）$_2$ドメインを位置選択的にプロテアーゼ消化している。この方法により、プロテアーゼ消化により産生されるペプチドの数を低減し、ＣＤＲを含むペプチドを効率的に産生できるため、質量分析法による抗体の検出・定量が簡便化される。また、特許文献２では、ペプシンやパパインと特定のイオンとを併用することにより、これらのプロテアーゼによる消化効率が向上することが報告されている。

[0013] 抗体のＦａｂドメインの精製を目的として、プロテアーゼを最適化した精製用キット等も市販されている。しかし、上記特許文献１の手法は、Ｆａｂドメインまたは Ｆ（ａｂ’）$_2$ドメインを精製した後、さらにプロテアーゼ処理を行う必要があるため、質量分析に供する試料の調製に多大な時間とコストを要し、簡便な手法であるとは言い難い。また、プロテアーゼ消化（断片化）は、消化対象となる基質タンパクの種類により、その消化効率が異なるため、質量分析に供するためのペプチド断片試料の調製を簡便化するためには、消化効率の向上が重要となる。

[0014] 近年、プロテアーゼ消化の高効率化手法として、ナノ粒子等の微小環境（マイクロリアクター）内で、プロテアーゼ消化を行う方法が注目されている。例えば、非特許文献１では、ナイロンの多孔質膜の細孔内にトリプシンを固定化し、この多孔質膜にアルブミン溶液を通過させることにより、アルブミンのトリプシン消化を高効率化した例が報告されている。非特許文献２では、細孔内にトリプシンを固定したメソ多孔シリカを用いることで、分子量の小さいタンパク質を選択的にトリプシン消化できることが報告されている。これらの方法はいずれも、多孔質体の細孔内にプロテアーゼを固定化し、固相表面のプロテアーゼと液相内の基質タンパク質とを反応させるものである。このように、微小環境中でプロテアーゼを固相に固定することにより消化効率が向上するのは、固相と液相との界面という局所的・微細的な環境中でタンパク質が変性を起こしやすいことや、溶解度や三次元構造の揺らぎ幅等が摂動を受けることにより、基質タンパク質とプロテアーゼとの接触機会

が増大し、反応確率が向上することに起因すると考えられている。

先行技術文献

特許文献

[0015] 特許文献1：ＷＯ２００８／０７９９１４号国際公開パンフレット

特許文献2：特開２０１１－１３０７４９号公報

非特許文献

[0016] 非特許文献1：Fei Xu et. al., Anal.Chem., 2010, 82, 10045-10051.

非特許文献2：Qianhao Min et. al., Chem.Commun., 2010, 46(33), 6144-6146.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0017] 上記非特許文献２の方法は、分子量の小さいタンパク質を選択的にプロテアーゼ消化することはできるが、抗体のような巨大タンパク質の選択的消化には適用できない。また、非特許文献１および非特許文献２に開示されているようなマイクロリアクターにより、位置選択的にプロテアーゼ消化を行う方法は開発されていない。

[0018] 上記のように、質量分析法により、タンパク質を簡便に検出・定量するためには、分析対象のタンパク質を位置選択的に切断し、検出対象のタンパク質に特異的なペプチド断片を効率的に産生させ、それ以外のペプチド断片の産生量を小さくすることが求められる。例えば、抗体を検出および定量分析するためには、Ｆａｂドメイン、特にＦａｂドメインのＶ領域を位置選択的にプロテアーゼ消化し、Ｆｃドメインのプロテアーゼ消化を抑制する必要がある。

課題を解決するための手段

[0019] 本発明者らが鋭意検討の結果、抗体等の基質タンパク質とプロテアーゼの両方を固相に固定することにより、基質タンパク質の位置選択的なプロテアーゼ消化が実現できることを見出し、本発明に至った。

[0020] 本発明は、タンパク質をプロテアーゼにより消化するペプチド断片の調製方法に関する。本発明の方法は、切断対象の基質タンパク質が細孔内に固定化された多孔質体と、プロテアーゼが表面に固定化された微粒子とを液体中で接触させるステップ（消化ステップ）を有する。基質タンパク質が細孔内に固定化された多孔質体は、切断対象の基質タンパク質を多孔質体の細孔内に固定化するステップ（基質固定ステップ）により得られる。本発明において、微粒子の粒径は、多孔質体の平均細孔径よりも大きいことが好ましい。

[0021] 微粒子の粒径が多孔質体の平均細孔径よりも大きい場合、微粒子表面に固定化されたプロテアーゼは、多孔質体の細孔の表層付近（多孔質体と液相の界面付近）にはアクセスできるが、細孔の奥深い位置にはアクセスできない。このように、プロテアーゼのアクセス可能領域が物理的（空間的）に制限されているため、プロテアーゼは、多孔質体の細孔内に固定化された基質タンパク質の特定の部位に選択的にアクセスする。そのため、基質タンパク質の位置選択的なプロテアーゼ消化（断片化）が可能となる。

[0022] 本発明において、基質タンパク質の所定の領域が、多孔質体に固定化されることが好ましい。当該形態では、多孔質体に固定化された領域は細孔の奥深くに位置し、固定化された領域と別の領域が細孔の表層付近に位置する。基質タンパク質の選択的切断部位と異なる領域、すなわちロテアーゼ消化されないことが好ましい領域が多孔質体に固定化されれば、細孔の表層付近に位置する基質タンパク質の選択的切断部位に、微粒子表面に固定化されたプロテアーゼがアクセスし、プロテアーゼ消化が行われる。そのため、基質タンパク質の所望の部位を位置選択的にプロテアーゼ消化することができる。

[0023] 多孔質体の細孔内には、基質タンパク質と部位特異的に相互作用するリンカー分子が固定化されていることが好ましい。また、基質タンパク質はリンカー分子を介して多孔質体の細孔内に固定化されることが好ましい。基質タンパク質が抗体である場合のリンカー分子としては、例えばprotein Gやprotein A等が挙げられる。これらのリンカー分子は、抗体のＦｃ領域と部位特異的に結合するため、抗体のＦｃ領域が多孔質体に固定化され、Ｆａｂ領域は

細孔の表層付近に位置する。当該形態によれば、抗体のＦａｂ領域を選択的にプロテアーゼ消化することができる。

[0024] 多孔質体の細孔内にリンカー分子が固定化される場合、リンカー分子と基質タンパク質とが結合した状態の分子サイズが、多孔質体の平均細孔径の０．５倍～１．５倍程度であることが好ましい。このように分子サイズを調整することにより、微粒子表面に固定化されたプロテアーゼと、基質タンパク質の選択的切断部位とのアクセス確率を高め、プロテアーゼ消化の位置選択性を向上できる。

[0025] また、微粒子の表面は、プロテアーゼと結合可能なスペーサ分子で修飾されており、プロテアーゼが当該スペーサ分子を介して微粒子の表面に固定化されていることが好ましい。スペーサ分子を介してプロテアーゼを固定化することにより、微粒子表面からのプロテアーゼの脱離が抑制され、プロテアーゼ消化の位置選択性が高められる。また、スペーサの分子サイズを調整することにより、基質タンパク質の所望の位置にプロテアーゼを選択的にアクセスさせ、位置選択性を高めることもできる。

[0026] 本発明において、微粒子表面に固定化されるプロテアーゼとしては、トリプシン、あるいはトリプシンと他のプロテアーゼの併用系が好ましい。基質タンパク質が抗体の場合、トリプシンを単独で用いるか、あるいは併用系の場合は全プロテアーゼ中のトリプシンの量が９０％以上であることが好ましい。特に、基質タンパク質が抗体である場合、トリプシンを用いることで、Ｆａｂドメインが選択的にプロテアーゼ消化され、Ｆｃドメインのプロテアーゼ消化が抑制される傾向がある。

[0027] 多孔質体の平均細孔径は、３０～１５０ｎｍ程度が好ましく、微粒子の平均粒径は１００ｎｍ以上が好ましい。特に、基質タンパク質が抗体の場合、平均細孔系および平均粒径が上記範囲であれば、Ｆａｂ領域をより確実に位置選択的に切断できる。

[0028] さらに、本発明は、上記方法に用いられるペプチド断片調製用キットに関する。本発明のペプチド断片調製用キットは、タンパク質を固定化可能な細

孔を有する多孔質体と、プロテアーゼを表面に固定化可能な微粒子とを含む。微粒子は、表面にプロテアーゼが固定化された状態で提供されてもよい。このキットの多孔質体と試料（例えば血液等の検体）とを接触させることにより、試料中の目的物質（抗体等の基質タンパク質）を多孔質体の細孔内に固定化できる。基質タンパク質を固定化後の多孔質体を、プロテアーゼが表面に固定化された微粒子と液体中で接触させることにより、基質タンパク質が位置選択的にプロテアーゼ消化される。

[0029] 上記方法により得られたペプチド断片を質量分析等により分析することで、基質タンパク質の検出（同定）や定量を行い得る。本発明では、基質タンパク質が位置選択的にプロテアーゼ消化されているため、測定試料中に含まれるペプチド断片の種類を大幅に少なくできる。そのため、質量分析の条件設定を簡略化でき、分析精度の向上も期待できる。

[0030] 例えば、基質タンパク質が抗体である場合、本発明の方法によれば、相補決定領域を含むＦａｂ領域の位置選択的なプロテアーゼ消化が可能であるため、抗体の相補性決定領域の少なくとも一部の配列を含むペプチド断片を検出対象とすることができる。相補性決定領域は各抗体に特異的なアミノ酸配列を有しているため、相補決定領域の配列を含むペプチド断片の分析により、抗体の検出や定量を行い得る。

発明の効果

[0031] 本発明によれば、簡便な方法で、抗体等のタンパク質を位置選択的にプロテアーゼ消化し、ペプチド断片を得ることができる。本発明の方法を抗体に適用した場合、抗体のＦｃ領域の消化が抑制され、ＣＤＲを含むＦａｂ領域が選択的にプロテアーゼ消化され、抗体の同定に重要なＣＤＲのアミノ酸配列を含むペプチド断片の試料中の濃度が高められる。

[0032] 本発明の方法により、測定試料中に含まれるペプチドの種類を大幅に少なくできるため、質量分析の条件設定を簡略化でき、分析精度の向上も期待できる。得られたペプチド断片を分析することにより、血液中の抗体医薬濃度の定量も可能である。そのため、本発明の方法は、前臨床や臨床試験におけ

る抗体医薬の濃度測定システムの前処理方法としても応用できる。

[0033] また、本発明の方法は、抗体医薬に限らず、多くのタンパク質に適用が可能であり、医薬産業的な応用拡大に加え、生体分子の相互作用解析をはじめとする基礎研究分野等への応用も期待できる。

図面の簡単な説明

[0034] [図1]本発明による位置選択的切断の原理を説明するための概念図である。

[図2]抗体の構造を説明するための模式図である。

[図3]ペプチド断片調製用キットの一形態を表す模式図である。

[図4]プロテアーゼの量比検討実験の電気泳動像である。

[図5]プロテアーゼの量比検討実験の質量分析（MALDI-TOFMS）スペクトルである。

[図6]消化時間検討実験の質量分析（MALDI-TOFMS）スペクトルである。

[図7]トラスツズマブのトリプシン消化断片の質量分析結果に基づくデータベース解析結果である。

[図8]トラスツズマブのトリプシン消化断片の質量分析（MALDI-TOFMS）スペクトルである。

[図9]トラスツズマブのトリプシン消化断片のLS-MS測定のクロマトグラムである。

[図10]トラスツズマブのトリプシン消化断片の質量分析（LS-MS）スペクトルである。

[図11]トラスツズマブの重鎖（Ａ）および軽鎖（Ｂ）のアミノ酸配列を表す図である。図中の下線は、本実験の質量分析により同定されたペプチド断片を示している。

[図12]混合プロテアーゼ消化検討実験の電気泳動像である。

[図13]混合プロテアーゼ消化検討実験の質量分析（MALDI-TOFMS）スペクトルである。

発明を実施するための形態

[0035] 本発明のペプチド断片の調製方法では、切断対象の基質タンパク質が、多

孔質体の細孔内に固定化され、基質タンパク質が固定化された多孔質体と、プロテアーゼが表面に固定化された微粒子とが液体中で接触させられる。図１は、本発明におけるプロテアーゼ消化の原理を説明するための概念図である。

[0036] 微粒子１０（平均粒径D_1）の表面には、プロテアーゼ１５が固定化されている。多孔質体２０は、多数の細孔２９（平均細孔径D_2）を有し、細孔内に基質タンパク質２５が固定化されている。このように、本発明の方法では、プロテアーゼ１５および基質タンパク質２５の両方が微小領域で固相に固定されており、固相同士の接触により、プロテアーゼ消化が行われる。

[0037] 微粒子１０の平均粒径D_1は、多孔質体２０の平均細孔径D_2よりも大きい。そのため、微粒子１０は細孔２９の表層付近にはアクセスできるが、細孔２９の奥深くにはアクセスできない。これに伴って、微粒子１０表面に固定化されたプロテアーゼ１５も、細孔２９の奥深くにはアクセスできない。図１において、細孔２９付近の点線は、プロテアーゼ１５がアクセスできる領域の境界を表している。

[0038] このように、細孔２９内の基質タンパク質２５へのプロテアーゼ１５のアクセスが位置特異的に制限され、基質タンパク質の液相側（図１において“Ｙ”字の部分）への相対的なアクセス確率が高められる。これにより、基質タンパク質２５を位置選択的にプロテアーゼ消化して、ペプチド断片を得ることができる。

[0039] ［基質タンパク質］

基質タンパク質２５は、分析対象となるタンパク質である。基質タンパク質の種類は特に限定されないが、位置選択的な切断を行う観点から、プロテアーゼ１５よりも分子径の大きいものが好ましい。なお、基質タンパク質はタンパク質の複合体であってもよい。分子径は、Ｘ線やＮＭＲ等による構造解析に基づいて決定された数値を各種の文献やデータベース等から入手できる。例えば、抗体の分子径は約１５ｎｍである。また、Ｘ線小角散乱等によって分子径を求めることもでき、分子量から概算で求めることもできる。参

考例として、限外濾過膜の分離特性を調べる際にマーカー分子として用いられるタンパク質の分子量と分子径を表１に示す。

[0040] [表1]

タンパク質	分子量(Da)	分子径(nm)
スクロース	340	1.1
ラフィノース	590	1.3
ビタミンB12	1,360	1.7
Bacitracin	1,410	1.7
インシュリン	5,700	2.7
チトクロームC	13,400	3.8
ミオグロビン	17,000	4.0
α-chymotrysinogene	25,000	4.6
ペプシン	35,000	5.0
オバアルブミン	43,000	5.6
Bovineアルブミン	67,000	6.4
aldolase	142,000	8.2
γグロブリン	150,000	8.4

[0041] 基質タンパク質２５は、多孔質体２０の細孔２９内に部位特異的に結合するものが好ましい。基質タンパク質２５が部位特異的に結合することで、当該結合部位以外の部位が選択的にプロテアーゼ消化される。例えばＣ末端やＮ末端等にHisタグ（６個程度の連続するヒスチジン残基からなるタグペプチド）やビオチン化ペプチド等のタグ配列を付したタンパク質や、特定の基質と特異的に結合する酵素等も、部位特異的に結合するタンパク質として用いることができる。

[0042] 本発明では、多孔質体の細孔内に、部位特異的に結合可能な基質タンパク質として、抗体が特に好ましく用いられる。抗体のＦｃドメインを多孔質体２０に固定化すれば、Ｆａｂドメインを選択的にプロテアーゼ消化することができる。抗体の種類は特に制限されないが、モノクロナール抗体が好ましい。モノクロナール抗体としては、例えばパニツムマブ（ベクティビックス）、オファツムマブ（アルゼラ）、ゴリムマブ（シンポニ）、イピリムマブ（ヤーボイ）等のヒト抗体；トシリズマブ（アクテムラ）、トラスツズマブ

（ハーセプチン）、ベバシズマブ（アバスチン）、オマリズマブ（ゾレア）、メポリズマブ（ボサトリア）、ゲムツズマブオゾガマイシン（マイロターグ）、パリビズマブ（シナジス）、ラニビズマブ（ルセンティス）、セルトリズマブ（シムジア）、オクレリズマブ、モガムリズマブ（ポテリジオ）、エクリズマブ（ソリリス）等のヒト化抗体；リツキシマブ（リツキサン）、セツキシマブ（アービタックス）、インフリキシマブ（レミケード）、バシリキシマブ（シムレクト）等のキメラ抗体等が挙げられる。これらは、抗体医薬（分子標的治療薬）として用いられるものであり、臨床試験等において、血液中の抗体濃度の定量が必要とされる。

[0043] 後に実施例で説明するように、本発明の方法によれば、モノクロナール抗体のＦａｂドメインを位置選択的にプロテアーゼ消化することができ、得られたペプチド断片の質量分析により、抗体の同定や定量を行い得る。本発明の分析方法は、抗体の可変領域由来のペプチド断片を検出することにより、抗体の同定（検出）や定量を行うものであり、抗体由来のペプチド断片を直接測定する方法である。そのため、本発明の分析方法は、抗原等の特異的結合物質を必要とせず、抗体の種類に関わらず適用可能である。したがって、本発明の方法は、上記例示の抗体に限定されず、新規に開発されたモノクロナール抗体等にも適用できる。

[0044] ［多孔質体］

多孔質体２０は、多数の細孔２９を有するものであれば、その材料は特に限定されない。図１では、半球形状の細孔が図示されているが、細孔の形状は特に限定されない。また、多孔質膜のように、多孔質体を貫通する細孔が形成されたものを用いることもできる。

[0045] 多孔質体２０としては、活性炭、多孔質膜、多孔質樹脂ビーズ、金属粒子等を用いることができる。これらの中でも、上記の基質タンパク質を選択的に結合できるものが好ましく、基質タンパク質を部位特異的に結合可能なものが特に好ましい。例えば、特定のタンパク質等の精製に用いられるアフィニティーカラム担体ビーズは、このような要件を満たし得る。

[0046] 本発明においては、多孔質体２０の細孔２９内に、基質タンパク質２５と部位特異的に相互作用するリンカー分子２１が固定化されたものが好ましく用いられる。基質タンパク質とリンカー分子との相互作用としては、化学結合、水素結合、イオン結合、錯体形成、疎水的相互作用、ファンデルワールス相互作用、静電的相互作用、立体選択的相互作用等が挙げられる。

[0047] リンカー分子は、アミノ基、カルボキシル基、エポキシ基等の官能基；ビオチン、ジゴキシゲニン等の標識化合物；アビジン、ストレプトアビジンプロテインＡ、プロテインＧ、免疫グロブリン等のタンパク質；各種リガンド；酵素の基質化合物；シリカ；金属キレート等から、基質タンパク質の種類や結合部位に応じて、最適なものを適宜に選択できる。

[0048] 基質タンパク質２５が抗体である場合、リンカー分子２１としては、プロテインＧやプロテインＡ等が好ましく用いられる。プロテインＡやプロテインＧは、抗体のＦｃドメインと部位特異的に結合する。細孔２９内にプロテインＡやプロテインＧ等のリンカー分子２１が固定化された多孔質体２０を用いることにより、細孔内に、抗体（基質タンパク質２５）のＦｃドメインが部位特異的に固定化され、Ｆａｂドメインが液相側（細孔の表層付近）に位置する。このように、細孔内で抗体を一定方向に固定化することで、細孔内での抗体の配向が制御され、プロテアーゼによるＦａｂドメインの位置選択的消化が可能となる。

[0049] また、細孔内に基質タンパク質を固定化し、固相と液相の界面という微細な環境に存在させることで、基質タンパク質は変性を起こしやすく、分子の揺らぎが摂動を受け、プロテアーゼのアタックを受ける確率が向上する。また、本発明では、プロテアーゼが粒子に固定化されることで、立体的に安定で、自己消化が生じ難い環境となるため、プロテアーゼの安定性が増すと考えられる。そのため、本発明の方法によれば、位置選択的なプロテアーゼ消化が可能となることに加えて、プロテアーゼの高活性を維持できる。

[0050] 多孔質体２０の細孔２９の大きさは特に限定されない。細孔の大きさは、基質タンパク質２５を固定化した際に、細孔２９の表層付近に基質タンパク

質の先端部分、すなわち選択的消化されるべき部位が位置するように、基質タンパク質の分子径等を考慮して決定することが好ましい。多孔質体２０の平均細孔径D_2は、例えば、１０ｎｍ～５００ｎｍ程度の範囲で、かつ微粒子１０の平均粒径D_1よりも小さい範囲で適宜に設定される。多孔質体２０の平均細孔径D_2は、例えば、２０ｎｍ～２００ｎｍ程度が好ましく、３０ｎｍ～１５０ｎｍ程度がより好ましい。特に基質タンパク質２５が抗体である場合に、Ｆｃドメインを細孔内に固定化し、Ｆａｂドメインを位置選択的にプロテアーゼ消化するためには、多孔質体の細孔径は、３０ｎｍ～１５０ｎｍが好ましく、４０ｎｍ～１２０ｎｍがより好ましく、５０ｎｍ～１００ｎｍがさらに好ましい。

[0051] リンカー分子の大きさは、細孔や基質タンパク質の大きさを考慮して、基質タンパク質の選択的切断部位が、細孔の表層付近に位置するように選択される。リンカー分子と基質タンパク質とが結合した状態の分子サイズは、多孔質体の細孔径の０．５倍～１．５倍程度が好ましく、０．６倍～１．２倍程度がより好ましく、０．７倍～１．１倍程度がさらに好ましく、０．８倍～１倍程度が特に好ましい。なお、多孔質体２０にリンカー分子が固定されておらず、多孔質体の細孔内に基質タンパク質が直接結合している場合は、基質タンパク質の分子径と多孔質体の細孔径が、上記関係を満たすことが好ましい。

[0052] ［基質タンパク質の固定化］

基質タンパク質２５を、多孔質体２０の細孔２９内に固定化する方法は特に限定されず、基質タンパク質と多孔質体（あるいは多孔質体に固定化されたリンカー分子）の特性等に応じて適宜の方法を採用できる。例えば、細孔内にprotein Aやprotein Gが固定化された多孔質体に抗体を固定化する場合は、多孔質体の懸濁液と抗体を含む溶液とを混合することにより、細孔内に抗体を容易に固定化できる。

[0053] 多孔質体と基質タンパク質の量比は、目的に応じて適宜に設定できる。例えば、基質タンパク質の定量分析を行う場合、試料中の基質タンパク質のほ

ぼ全量が多孔質体に固定化されることが望まれる。そのため、試料中の基質タンパク質の推定含有量に対して、多孔質体の量が過剰となるように量比を設定することが好ましい。

[0054] ［プロテアーゼ］

プロテアーゼ１５は、基質タンパク質のアミノ酸配列を認識し、特定の配列の特定の結合を選択的に切断する。本発明においては、プロテアーゼ１５が、多孔質体２０の細孔２９内に固定化された基質タンパク質２５を、特定のアミノ酸配列部位で切断して、ペプチド断片が得られる。

[0055] プロテアーゼとしては、トリプシン（塩基性アミノ酸残基（Ａｒｇおよび Ｌｙｓ）のＣ末端側でペプチドを切断する）、リジルエンドペプチダーゼ（Ｌｙｓ残基のＣ末端側でペプチドを切断する）、アルギニンエンドペプチダーゼ（Ａｒｇ残基のＣ末端側でペプチドを切断する）、キモトリプシン（芳香族アミノ酸残基（Ｐｈｅ、ＴｙｒおよびＴｒｐ）のＣ末端側でペプチドを切断する）、Ｖ８プロテアーゼ（Ｇｌｕ残揮のＣ末端側でペプチドを切断する）、ペプシン、パパイン等が挙げられる。なお、プロテアーゼは２種以上を組み合わせて用いることもできる。

[0056] プロテアーゼ消化後の基質タンパク質のペプチド断片を測定資料として質量分析に供する場合は、自己消化が少なく、切断配列の選択性が高いプロテアーゼを用いることが好ましい。市販のプロテアーゼを用いる場合、質量分析グレードや配列決定（シーケンス）グレードのプロテアーゼを用いることが好ましい。例えば、生体由来のネイティブのトリプシンは、自己消化によりキモトリプシン様の活性を示す疑似トリプシンを生成するため、切断部位の特異性が低いことが知られている。そのため、質量分析グレードとして、トリプシンのリジン残揮を還元メチル化して自己消化に対する抵抗性を高めたものが市販されている。

[0057] 基質タンパク質のプロテアーゼ消化の位置選択性を高めるためには、プロテアーゼが基質タンパク質にアクセスできる領域を限定することが重要である。そのため、プロテアーゼの分子径は、基質タンパク質の分子径よりも小

さいことが好ましい。より具体的には、プロテアーゼの分子径は、１０ｎｍ以下が好ましく、８ｎｍ以下がより好ましく、６ｎｍ以下がさらに好ましく、５ｎｍ以下が特に好ましい。なお、トリプシンやリジルエンドペプチダーゼ等、分子量が３０ｋＤａ程度のタンパク質の分子径は４ｎｍ程度である（前掲の表１参照）。

[0058] 上記プロテアーゼの中でも、本発明においては、トリプシンが特に好ましく用いられる。上述のように、トリプシンは分子径が小さく、かつ活性部位が分子の内部に存在している。そのため、活性部位が基質タンパク質にアクセスできる領域が制限され、プロテアーゼ消化の位置選択性を高めることができる。特に、基質タンパク質が抗体の場合には、プロテアーゼとしてトリプシンを用いることが好ましい。

[0059] プロテオーム解析研究において、ペプチド断片の回収率を向上させる技術として、トリプシンとリジルエンドペプチダーゼによる混合消化が近年着目されている（J. Proteome Res., 2012, 11(11), 5145-5156）。これは、トリプシンが立体構造の外側から段階的に分解反応を進める特徴を有するのに対して、リジルエンドペプチダーゼは、主に抗体のヒンジ領域を最初に切断することに起因すると考えられている。これに対して、抗体のヒンジ領域の切断を抑制し、Ｆａｂドメイン（より好ましくはＦａｂドメインのＶ領域）を選択的に切断するために、本発明では、トリプシンを単独で用いるか、リジルエンドペプチダーゼ等を併用する場合でも、全プロテアーゼ中のトリプシンの量を９０％以上とすることが好ましい。

[0060] ［微粒子］

微粒子１０は、その表面にプロテアーゼ１５を固定して、多孔質体２０の細孔２９内に固定化された基質タンパク質２５へのプロテアーゼのアクセスを制御する目的で用いられる。そのため、微粒子１０は、多孔質体２０の細孔２９の奥深くまで入り込まないように、その平均粒径D_1が、多孔質体２０の平均細孔径D_2よりも大きいことが好ましい。微粒子１０の平均粒径D_1は、多孔質体２０の平均細孔径D_2の１．２倍以上がより好ましく、１．５倍以

上がさらに好ましく、１．８倍以上が特に好ましい。

[0061] 微粒子１０の形状は特に限定されないが、多孔質体２０の細孔２９へのプロテアーゼのアクセスを均一化観点から、球状の微粒子が好ましい。また、微粒子１０は、平均粒径が均一であることが好ましい。

[0062] 多孔質体２０の平均細孔径が３０～１５０ｎｍ程度の場合、微粒子１０の平均粒径D_1は１００ｎｍ以上が好ましく、１５０ｎｍ以上がより好ましい。基質タンパク質２５が抗体であり、多孔質体２０の平均細孔径が５０ｎｍ～１００ｎｍ程度の場合、微粒子１０の平均粒径は、１２０ｎｍ以上が好ましく、１５０ｎｍ以上がより好ましく、１７０ｎｍ以上が特に好ましい。微粒子１０の平均粒径D_1の上限は特に限定されないが、プロテアーゼによる消化効率を高める観点から、１μｍ以下が好ましく、５００ｎｍ以下がより好ましく、３００ｎｍ以下がさらに好ましい。

[0063] 微粒子１０は、上記のプロテアーゼを表面に固定化できるものであれば、その材質は特に限定されず、金属や樹脂等が適宜に用いられる。また、金属表面を樹脂で被覆したものや、樹脂表面を金属で被覆したもの等を用いることもできる。

[0064] 微粒子１０は、表面への非特異的なタンパク質の吸着が抑制され、プロテアーゼを選択的に固定化できるものが好ましく、例えば、図１に示すように、微粒子の表面が、プロテアーゼと特異的に結合するスペーサ１１で修飾された微粒子が好適に用いられる。スペーサは、プロテアーゼと結合可能であり、かつプロテアーゼを失活させないものが好ましい。

[0065] また、微粒子１０表面に固定化されたプロテアーゼ１５のアクセス範囲を制御する観点から、スペーサ１１は分子径が小さいものが好ましい。スペーサの分子径は、５ｎｍ以下が好ましく、３ｎｍ以下がより好ましく、２ｎｍ以下がさらに好ましい。また、スペーサの分子量は２０００以下が好ましく、１５００以下がより好ましく、１０００以下がさらに好ましく、８００以下が特に好ましい。上記分子径で、プロテアーゼを固定化できるスペーサ分子は、非タンパク質が好ましく、アミノ基、アミド基、エステル基、エポキ

シ基、カルボキシル基、ビオチン、アビジン、キレート等の官能基を有する分子が好ましい。例えば、トリプシンの固定には、エステル基を有するスペーサが好ましく用いられる。また、プロテアーゼの固定化効率を高めるために、エステル基が活性化された分子もスペーサとして好ましく用いられる。

[0066] 本発明では、スペーサ分子で修飾された微粒子の市販品を用いることもできる。例えば、アフィニティー精製用微粒子として、エステル基がＮ－ヒロドキシスクシイミドで活性化されたスペーサ分子で修飾された微粒子が、商品名「FG beads NHS」として市販されている。

[0067] ［プロテアーゼ固定化微粒子の調製］

プロテアーゼ１５を微粒子１０の表面に固定化する方法は特に限定されず、プロテアーゼと微粒子（あるいは微粒子表面を修飾するスペーサ分子）の特性等に応じて適宜の方法を採用できる。例えば、トリプシンをスペーサ修飾された微粒子表面に固定化する場合は、微粒子の懸濁液とトリプシンを含む溶液とを混合することにより、微粒子表面にプロテアーゼを固定化できる。

[0068] 微粒子表面にプロテアーゼを固定化後に、微粒子表面のプロテアーゼと未結合の活性部分を不活性化させることが好ましい。例えば、微粒子表面にプロテアーゼが固定化されていないスペーサ分子が存在すると、未結合のスペーサ分子が、試料中の夾雑物等と結合して、プロテアーゼ消化に悪影響を及ぼしたり、プロテアーゼ消化により産生されたペプチド断片が微粒子に固定化される等の不具合を生じる場合がある。プロテアーゼを固定化後に、未結合のスペーサをブロックすることにより、このような不具合が抑制される。プロテアーゼと未結合の活性部分を不活性化する方法としては、化学修飾が好ましい。例えば、活性化エステル基は、アミンとの反応によりアミド結合を形成して不活性化される。

[0069] ［プロテアーゼ消化］

基質タンパク質２５が固定化された多孔質体２０と、プロテアーゼ１５が表面に固定化された微粒子１０とを液体中で接触させることにより、基質タ

ンパク質がプロテアーゼ消化され、ペプチド断片が産生される。

[0070] 本発明におけるプロテアーゼ消化の条件は特に限定されず、一般的なプロテアーゼ消化と同様の条件を適宜に採用できる。例えば、プロテアーゼの至適ｐＨ近傍に調整された緩衝溶液中で、通常３７℃程度の温度で、４時間～２０時間程度インキュベートすることが好ましい。

[0071] 基質タンパク質が固定化された多孔質体と、プロテアーゼが表面に固定化された微粒子との混合量比も特に制限されず、基質タンパク質の量に応じたプロテアーゼ量となるように設定すればよい。なお、一般的なプロテアーゼ消化条件は、基質：プロテアーゼ＝１００：１～２０：１（重量比）程度である。これに対して、本発明では、多孔質体と微粒子との組み合わせにより、基質タンパク質とプロテアーゼとのアクセスが物理的に制限されるため、一般的なプロテアーゼ消化に比べて、プロテアーゼ量を多くすることが好ましい。例えば、基質タンパク質：プロテアーゼ＝３０：１～３：１程度が好ましく、１５：１～４：１程度がより好ましく、１０：１～５：１程度がさらに好ましい。

[0072] 一般に、血液等の生体試料中の抗体を選択的にプロテアーゼ消化する場合、まずprotein G等が固定化された粒子と試料とを混合して、粒子に抗体を固定化させ、夾雑物を除去した後、粒子から抗体を溶出させ、溶出後の抗体を尿素やグアニジンで変性して、プロテアーゼ消化を行う必要がある。これに対して、本発明の方法では、多孔質体に抗体を固定化させたままの状態でプロテアーゼ消化が行われる。また、プロテアーゼ消化により産生されたペプチド断片は液相内に存在するため、抗体の溶出や変性操作を行うことなく、位置選択的にＦａｂドメインのペプチド断片が得られる。このように、本発明の方法によれば、従来法に比して簡便な操作で、かつ位置選択的にペプチド断片の回収を行うことができる。

[0073] ［ペプチド断片調製用キット］

予め準備されたペプチド断片調製用キットを用いて、本発明によるペプチド断片の調製を行うこともできる。本発明のペプチド断片調製用キットは、

基質タンパク質を固定化可能な細孔を有する多孔質体と、プロテアーゼを表面に固定化可能な微粒子を含む。キットは、さらにプロテアーゼを含んでいてもよい。また、プロテアーゼが表面に固定化された状態微粒子が提供されてもよい。

[0074] 図３は、本発明のペプチド断片調製キットの一実施形態を表す図である。図３において、プロテアーゼを表面に固定化可能な微粒子１１０は、懸濁液１３１として提供される。キットは、さらにプロテアーゼを含んでいてもよい。また、微粒子１１０が、プロテアーゼが表面に固定化された状態で提供されてもよい。スピンカラム１３２は、内容器１３５と外容器１３６からなり、これらは着脱可能な形状に形成されている。内容器１３５の底部に、基質タンパク質を固定化可能な細孔を有する多孔質膜１２０が配置されている。多孔質膜１２０は、常圧では液体を透過しない程度の細孔径を有している。

[0075] このスピンカラムを用いて、ペプチド断片の調製を行う場合、まず、基質タンパク質を含む試料（例えば、血液等の検体）をスピンカラムの内容器１３５内に入れ、試料と多孔質膜とを接触させる。試料と多孔質膜とを均一に接触させるために、必要に応じて容器を振盪してもよい。この操作により、多孔質膜１２０の細孔内に、抗体等の基質タンパク質が固定化される。

[0076] 基質タンパク質を多孔質膜に固定化後の試料液体は、内容器１３５から排出することが好ましい。ピペッティング等の操作により、内容器の開口部から液体を排出してもよく、遠心分離等により多孔質膜を介して内容器の底部から液体を排出してもよい。その後、必要に応じて、適宜の溶液により洗浄が行われる。

[0077] 基質タンパク質が多孔質膜１２０に固定化された内容器１３５内に、プロテアーゼが表面に固定化された微粒子１１０が加えられる。前述のように、プロテアーゼは予め微粒子に固定化された状態で提供されてもよく、使用直前に微粒子表面にプロテアーゼを固定化して用いることもできる。

[0078] プロテアーゼ消化条件の最適化等の目的で、必要に応じてバッファー等の

溶液をさらに加えてもよい。内容器内の多孔質膜１２０に固定化された基質タンパク質は、微粒子１１０表面に固定化されたプロテアーゼにより消化される。プロテアーゼ消化の条件は、前述のように適宜に設定され得る。プロテアーゼ消化により産生されたペプチド断片は、液相内に移動する。

[0079] プロテアーゼ消化後の液相を回収することにより、基質タンパク質が位置選択的に切断されたペプチド断片が得られる。液相の回収方法は特に限定されないが、遠心分離より、多孔質膜を介して、内容器１３５の底部から、外容器１３６内に回収する方法が簡便である。その後、多孔質膜の細孔内に保持されたペプチド断片の溶出等を目的として、洗浄や溶出等の操作等が行われてもよい。

[0080] このように、キットを使用することにより、本発明によるペプチド断片調製の操作をより簡便にすることができ、装置による自動化も容易になし得る。特に、トリプシン等は、微粒子表面に固定化された状態でも活性を保持し得るため、プロテアーゼが微粒子表面に固定化された状態でキットの構成要素として提供されれば、ペプチド断片調製の操作をさらに簡略化できる。

[0081] ［分析］

上記で得られたペプチド断片を含む試料を、クロマトグラフィーや質量分析により分析することで、基質タンパク質の同定や定量を行い得る。本発明では、基質タンパク質が位置選択的にプロテアーゼ処理されるため、試料中に含まれるペプチド断片の種類が減少されている。そのため、質量分析等による分析条件の設定を容易になし得る。分析に際しては、必要に応じて、脱塩、可溶化、抽出、濃縮、乾燥等の処理を行った後、試料を分析に用いてもよい。

[0082] プロテアーゼ消化により産生されたペプチド断片から、基質タンパク質の同定や定量を行うには、質量分析が適している。質量分析は、アミノ酸配列を決定可能であるため、ペプチド断片が抗体等の特定のタンパク質に由来のペプチド断片であるか否かを判別可能である。また、ピーク強度に基づいて試料中のペプチド断片の濃度を決定できる。

[0083] 質量分析におけるイオン化法は特に限定されず、電子イオン化（ＥＩ）法、化学イオン化（ＣＩ）法、電界脱離（ＦＤ）法、高速原子衝突（ＦＡＢ）法、マトリクス支援レーザー脱離イオン化（ＭＡＬＤＩ）法、エレクトロスプレーイオン化（ＥＳＩ）法等を採用し得る。イオン化された試料の分析方法も特に限定されず、磁場偏向型、四重極（Ｑ）型、イオントラップ（ＩＴ）型、飛行時間（ＴＯＦ）型、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴（ＦＴ－ＩＣＲ）型等を、イオン化法に応じて適宜に決定できる。また、三連四重極型質量分析装置等を用いて、ＭＳ／ＭＳ分析、あるいはMS^3以上の多段階質量分析を行うこともできる。

[0084] ペプチド断片の分離をより確実として、分析精度を高める等の目的で、質量分析に供する前の試料を、液体クロマトグラフ（ＬＣ）や、固相抽出（ＳＰＥ）等により、分離・濃縮してもよい。ＬＣにより試料の分離を行う場合、質量分析の前段としてＬＣを備えるＬＣ／ＭＳを用い、ＬＣからの溶出液を直接イオン化して質量分析に供しても良い。ＬＣとタンデム質量分析を組み合わせたＬＣ／ＭＳ／ＭＳやＬＣ／MS^nにより分析を行うこともできる。また、ＬＣからの溶出液を一度分取してから、質量分析に供してもよい。ＬＣのカラムやＳＰＥの担体は特に限定されず、ペプチドの分析に一般的に用いられるＣ３０，Ｃ１８，Ｃ８，Ｃ４等の疎水カラムや、親水性アフィニティークロマトグラフィー用の担体等を適宜に選択して用いることができる。

[0085] 質量分析結果に基づいて、抗体等のタンパク質を同定するために、既存のデータベースを用いることもできる。本発明では、抗体等の基質タンパク質が位置特異的にプロテアーゼ消化されたペプチド断片が用いられるため、データベース検索によるヒット率やデータの確度が高められる。また、多段階の質量分析等により、ペプチド断片のアミノ酸配列を特定することにより、基質タンパク質を同定することもできる。例えば、基質タンパク質が抗体である場合、抗体に特異的なアミノ酸配列を有する相補性決定領域（ＣＤＲ）の少なくとも一部のアミノ酸配列を含むペプチド断片の酸配列を決定すれば、抗体を同定できる。

[0086] なお、ＣＤＲの配列を含む特定のペプチド断片の検出結果に基づいて、抗体の検出や定量を行う場合、検出対象のペプチドは、アミノ酸残基数が５～３０程度が好ましく、７～２５程度がより好ましい。アミノ酸残基数が過度に小さいと、夾雑物や同一タンパク質の別の部位に由来するペプチド断片との区別がつき難く、誤検出等の原因となり得る。また、アミノ酸残基数が過度に大きいと、イオン化が困難となる等の理由により、検出が困難となったり、定量性が低下する場合がある。

[0087] 基質タンパク質の濃度を定量する場合、検出されたペプチド断片イオン（多段階ＭＳの場合は、ペプチド断片イオンの開裂により得られた開裂イオン）のピーク面積やピーク強度基づいて、基質タンパク質の量を算出できる。例えば、予め求められた検量線（較正曲線）とピーク面積との関連付けや、試料中に添加された内部標準由来のするピーク面積と試料由来のピーク面積との関連付け等によって、試料中のペプチド断片の濃度が算出され、ペプチド断片濃度に基づいて、基質タンパク質の量や濃度が算出される。

[0088] 以上説明したように、本発明によれば、基質タンパク質とプロテアーゼの両方を固相に固定し、両者のアクセスを物理的に制御することにより、基質タンパク質の特定の部位を位置選択的にプロテアーゼ消化することができる。得られたペプチド断片は、質量分析法等の既知の方法により分析可能であり、複雑な工程を経ることなく、試料中のタンパク質の同定や定量を行い得る。

[0089] 本発明の方法は、特に、抗体の検出や定量に適しており、Ｆａｂ領域を選択的にプロテアーゼ消化して、得られたペプチド断片試料の質量分析により、相補性決定領域のアミノ酸配列を含むペプチド断片の配列や量を決定できる。また、本発明の方法は、操作が簡便で、かつ再現性や定量性を確保できるとともに、自動化もなし得るため、薬物動態の解析、抗原抗体反応を用いた相互作用の解析、各種のインタラクトーム解析、免疫沈降タンパク質の同定等の基礎研究にも適用できる。その他、抗体医薬等の生体分子医薬の配列解析、品質保証、後発医薬品の同一性確認等への応用も期待できる。

実施例

[0090] 以下では、本発明の方法により、ヒト免疫グロブリンＧ（IgG）およびトラスツズマブ（商品名：Herceptin）をプロテアーゼ消化して、得られたペプチド断片試料を質量分析に供した実験例を示す。なお、本発明は以下の例に限定されるものではない。

[0091] 以下において、％の記載は、特に断りがない限り重量％を表す。本実験例で使用した試薬等は下記の通りである。

トリプシン （シーケンスグレード、promega）

リジルエンドペプチダーゼ （質量分析グレード、和光純薬工業）

２－モルホリノエタンスルホン酸，（MES、同人化学）

２－［４－（２－ヒドロキシエチル）－１－ピペラジニル］エタンスルホン酸（HEPES、同人化学）

トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン （Tris、和光純薬工業）

上記以外の有機溶媒等、特に記載のないものは、和光純薬工業より入手した。

[0092] また、各バッファーは、精密ｐＨメーターを用いてｐＨを調整した以下の緩衝液を使用した。

MESバッファー： ２５ｍＭ MES-NaOH, pH 5.5

HEPESバッファー： ２５ｍＭ HEPES-NaOH, pH 7.0

エタノールアミンバッファー： １Ｍ ethanolamine-HCl, pH 8.0

Trisバッファー： ２５ｍＭ Tris-HCl, pH 8.0

[0093] ＜抗体固定化多孔質体の作製＞

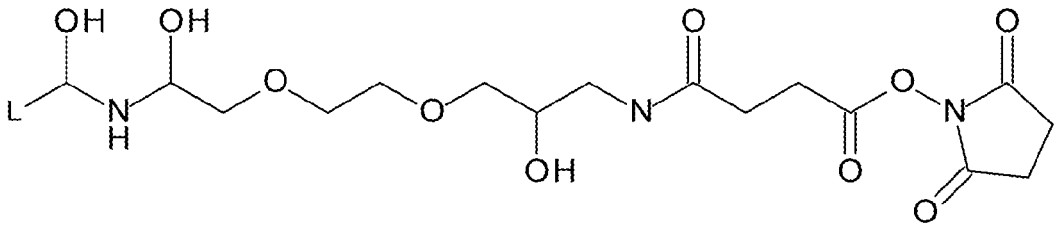
MESバッファー２００μＬ中に、多孔質ビーズの表面にProtein Gを結合した樹脂ビーズの懸濁液（Pierce Biotechnology、Protein G UltraLink resin、平均粒径：１００μｍ、細孔径：５０～１００ｎｍ）を５μＬ加え、そこに抗体溶液を加えた後、室温で約１時間ゆっくり撹拌し、樹脂ビーズ表面のProtein Gに抗体を結合させ固定化した。その後、４℃で遠心（１５０００ｒｐｍ，１分）して樹脂ビーズを沈降させ、上清を取り除いた後、Trisバッ

ファーによる洗浄と遠心を２回繰り返し、Trisバッファー（２００μＬ）中に多孔質ビーズを懸濁させた。なお、上記抗体溶液としては、ヒト免疫グロブリン（IgG）溶液（１０ｍｇ／ｍＬ、Sigma-Aldrich）、およびトラスツズマブ（Herceptin、２０ｍｇ／ｍＬ、中外製薬）溶液を用いた。

[0094] ＜プロテアーゼ固定化微粒子の調製＞

平均粒径１９０ｎｍの微粒子の表面が、カルボキシ基がＮ－ヒロドキシスクシイミドで活性化されたスペーサ（下記化学式（Ｌは微粒子表面への結合部位）参照、スペーサ長さ１ｎｍ）で修飾されたプロテアーゼ固定化用のナノ微粒子（多摩川精機、FG beads NHS）を用いた。

[0095] [化1]



[0096] FG beadsのイソプロパノール懸濁液５０μＬを、４℃で遠心（１５０００ｒｐｍ，５分）して微粒子を沈降させ、上清を取り除いた後、メタノールで洗浄した。５０μｇのプロテアーゼを含む溶液を２００μＬのHEPESバッファーに溶解したものを、上記の微粒子に加えて、微粒子を懸濁させた。なお、懸濁に際しては、懸濁液の温度が上昇しないように、数秒の超音波処理を行った。

[0097] この微粒子の懸濁液を、４℃で３０分撹拌し、４℃で遠心（１５０００ｒｐｍ，５分）して微粒子を沈降させ、上清を取り除いた後、エタノールアミンバッファー２００μＬを加えてビーズを懸濁させ、４℃で３０分撹拌して、微粒子表面の余剰のＮ－ヒロドキシスクシイミド基をエタノールアミンによりブロックした。その後、４℃で遠心（１５０００ｒｐｍ，５分）して微粒子を沈降させ、上清を取り除いた後、Trisバッファーによる洗浄と遠心を２回繰り返し、Trisバッファー（１００μＬ）中に懸濁させた。この懸濁液中のプロテアーゼ濃度は、０．５μｇ／μＬである。

[0098] ［実験１：多孔質体への抗体固定化量の確認］

抗体固定化多孔質体の作製において、１００μｇのIgGに対するProtein G結合樹脂ビーズ懸濁液の量を０～２０μＬの範囲で変化させ、上清液をＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動で分析し、電気泳動像バンドピクセル数から、上清中に残った未結合ＩｇＧの概算量（抗体残量）を求めた。Protein G結合樹脂ビーズ量の増加にともなって、抗体残量が低減される傾向がみられ、Protein G結合樹脂ビーズ量が１０μＬの場合の抗体残量は約３％であり、Protein G結合樹脂ビーズのカタログスペックをほぼ再現していることが確認できた（データ不図示）。

[0099] ［実験２：抗体とプロテアーゼの量比の検討］

IgG固定化多孔質体懸濁液（Protein G-IgG）とプロテアーゼ固定化微粒子（FG beads-Tripsin）とを混合し、３７℃で１５時間ゆっくり撹拌しながら、プロテアーゼ消化を行った。その後、４℃で遠心（１５０００ｒｐｍ，５分）して樹脂を沈降させ、液相（上清）を回収した。プロテアーゼの量が、５μｇ（水準１）、１０μｇ（水準２）、２５μｇ（水準３）となるように、プロテアーゼ固定化微粒子の量を変化させて上記実験を行った。水準４～６では、IgG固定化多孔質体懸濁液に代えて、IgGが固定化されていない多孔質体（Protein G UltraLink resin）をそのまま用いて同様の実験を行った。また、水準７，８では、多孔質体を用いず、プロテアーゼ固定化微粒子（FG beads-Tripsin）のみを３７℃で１５時間インキュベートした。

[0100] 上記各実験の水準を表２に示す。表２における重量（μｇ）は、試料中のタンパク質（IgGまたはトリプシン）の量である。得られた上清のＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動像を図４に示す。図４において、左端のレーンは分子量マーカーである。

[0101]

[表2]

	Protein G - IgG (μg)	FG beads - Tripsin (μg)
1	100	5
2	100	10
3	100	25
4	Protein Gのみ	5
5	Protein Gのみ	10
6	Protein Gのみ	25
7	-	5
8	-	10

[0102] （質量分析）

上記水準１～６の上清を、MALDI-TOFMS（島津製作所、AXIMA Resonance MALDI-QIT TOF MS）により分析した。まず、上清２０μＬに、終濃度が０．５％となるようにトリフルオロ酢酸を加え、疎水性樹脂充填チップ（Millipore、ZipTip uC18）を用いて精製を行った後、１μＬで２回の溶出を行った。溶出液は直接MALDIステンレスターゲット上にアプライし、クリーンベンチ内で風乾させた。風乾後、１０ｍｇ／ｍＬの２，５－ジヒドロキシ安息香酸溶液（DHBA、島津ＧＬＣ、水／アセトニトリル＝５０／５０）を１μＬ重層し、質量分析を行った。なお、装置のm/zは、Angiotensin II peptide（ｍ／ｚ＝１０４６．５４、Sigma-Aldrich）とACTH fragment peptide（ｍ／ｚ＝２４６５．２０、Sigma-Aldrich）を用いて行った。ＭＳスペクトルを図５に示す。

[0103] 図４の水準４～６のバンドは、いずれも水準７，８のバンドと同一であった。また、図５の水準４～６で検出されたｍ／ｚ＝８４２，１０４５，２２１１，２２８３のピークは、いずれもトリプシンの自己消化断片である。これらの結果から、プロテアーゼ固定化微粒子とProtein G多孔質体とを接触さ

せても、Protein Gは消化されないことがわかる。これは、多孔質体の細孔径が、プロテアーゼ固定化微粒子の粒径よりも小さいために、微粒子表面に固定化されたトリプシンが、細孔内のProtein Gにアクセスできないことに起因すると考えられる。

[0104] 図５の水準１～３では、トリプシンの自己消化断片以外に、ｍ／ｚ＝８３５、９１３、１１８７、１２８７、１５１０、１６７８、１９４６のピークが検出され、これらはいずれもIgGのトリプシン消化ペプチド断片であることが確認された。この結果から、IgGを固定化した多孔質体と、トリプシンを固定化した微粒子とを接触させることにより、多孔質体のProtein Gを消化することなく、IgGを選択的に消化できることが示された。

[0105] 図４の水準１～３を対比すると、トリプシン量の増加に伴い、高分子側のバンドが減少しており、抗体の消化反応がよく進んでいることがわかる。一方で、トリプシン量の増加に伴って自己消化も顕著になっている。これらの結果を踏まえて、水準２（基質：酵素比率＝１０：１）を標準条件と設定し、以降の条件検討を行った。

[0106] なお、一般的なプロテアーゼ消化条件は、基質タンパク質：プロテアーゼ＝１００：１～２０：１である。本方法では、多孔質体と微粒子との組み合わせにより、基質タンパク質とプロテアーゼとのアクセスが物理的に制限されているため、一般的なプロテアーゼ消化に比べて、プロテアーゼ量が多くなり、最適な基質酵素比率は１０：１～５：１程度と推測される。

[0107] ［実験３：消化時間に対する回収ペプチドの評価］

上記実験２の水準２の条件、すなわち、IgG固定化多孔質体懸濁液（IgG固相量１００μｇ）とプロテアーゼ固定化微粒子（トリプシン固相量１０μｇ）とを混合し、３７℃での消化時間を、（１）１５分、（２）４５分、（３）９０分、（４）１８０分ｍ、（５）３６０分、（６）１５時間（終夜、O/N）とした。それ以外は、上記実験２と同様にして、トリプシン消化を行い、得られた試料の質量分析を行った。ＭＳスペクトルを図６に示す。

[0108] 図６に示すように、消化時間の増加にともなって、ペプチド断片のピーク

が増大し、ペプチド断片の回収量が増加していることがわかる。（５）３６０分と（６）終夜とを比較すると、終夜の方が回収率は高く、特に、ｍ／ｚ＝１１８７，１５１０，１６７８等のプロテアーゼ消化を受け易い断片の集積がより顕著となる傾向がみられた。しかし、これらの断片は、抗体のＣ領域に由来する断片であり、ＣＤＲを含むペプチド断片の分析には寄与しないものである。そのため、プロテアーゼ消化時間を６時間に設定して、以降の検討を行った。

[0109] ［実験４：トラスツズマブのトリプシン消化および質量分析］

抗体としてIgGに代えてHerceptinを用いて抗体固定化多孔質体を作製し、上記実験２，３で選択した条件、すなわち、抗体固相量１００μｇに対するプロテアーゼ固定微粒子量：１０μｇ、消化時間：６時間の条件でトリプシン消化を行い、質量分析を行い、質量分析結果に基づいて、データベース（Mascot server）解析を行った。図７に示すように、Herceptin（Chain B, X-Ray Structures Of The Antigen-Binding Domains From Three Variants Of Humanized Anti-P185-Her2 Antibody 4d5 And Comparison With Molecular Modeling）が極めて高いスコアで同定されていることがわかる。

[0110] 本実験において、Herceptinのペプチド断片が質量分析により検出されていることを確認するために、より詳細な分析を行った。図８は質量分析（MALDI-TOFMS）スペクトルを表す。

[0111] また、LC-MS（島津製作所、LCMS-8080 Triple-quadrupole ultra high-performance liquid chromatography-MS）により、消化後の上清の分析を行った。LC-MSのクロマトグラムを図９に、MSスペクトルを図１０に示す。なお、LC-MSの測定に際しては、終濃度が０．５％となるように、上清にギ酸を加えたものを試料として用い、ＬＣ条件は以下の通りとした。

[0112] ＜ＨＰＬＣ溶液＞

溶液Ａ： ０．１％ギ酸、１％アセトニトリル／水溶液

溶液Ｂ： ０．１％ギ酸、アセトニトリル溶液

＜カラム＞

ShimPack ODS XR-ODS II （内径２ｍｍ、カラム長５０ｍｍ）

カラム温度： ４０℃

流速： ０．４ｍＬ／分

インジェクション量： ２０μＬ

＜グラジェントプログラム＞

０－ ２分 ： ％Ｂ＝０

２－１０分 ： ％Ｂ＝０－４０ グラジェント

１０－１１分 ： ％Ｂ＝４０－９８ グラジェント

１１－１３分 ： ％Ｂ＝９８

１３－１３．５分： ％Ｂ＝９８－０ グラジェント

１３．５－１５分： ％Ｂ＝０

[0113] トラスツズマブの重鎖（図１１（Ａ）、配列表の配列番号１）および軽鎖（図１１（Ｂ）、配列表の配列番号２）において、上記の質量分析で検出・同定されたペプチド配列部分を下線で示している。図１１（Ａ）に示すように、重鎖のＣＤＲ１（配列表の配列番号３）、ＣＤＲ２（配列表の配列番号４）、ＣＤＲ３（配列表の配列番号５）の全てが検出されていることがわかる。また、図１１（Ｂ）に示すように、軽鎖では、ＣＤＲ１（配列表の配列番号６）およびＣＤＲ２（配列表の配列番号７）が検出されている。軽鎖のＣＤＲ３（配列表の配列番号８）は、この配列を含むトリプシン消化断片の長さが、４アミノ酸残基あるいは３７アミノ酸残基であり、質量分析に適した断片が得られないたために、同定できなかったが、プロテアーゼの種類を変更すれば、質量分析により軽鎖のＣＤＲ３を検出可能なペプチド断片を調製できると考えられる。また、本実験では、軽鎖のＣＤＲ３が検出できなったが、重鎖と軽鎖の合計６つのＣＤＲのうち５つが検出されているため、図７に示すように、データベース解析によりトラスツズマブが同定されている。

[0114] 以上のように、本発明の方法により調製されたペプチド断片は、抗体が位置特異的にプロテアーゼ消化されたものであるため、複雑な測定条件の設定

を必要としない質量分析測定で、抗体を同定できることがわかる。

[0115] ［実験５：混合プロテアーゼ消化の検討］

以下では、本発明の系における混合プロテアーゼ消化の適用可能性を検討するため、トリプシンとリジルエンドペプチダーゼ（Ｌｙｓ－Ｃ）の併用系で、プロテアーゼ消化実験を行った。

[0116] 上記各実験例と同様に、抗体（IgGまたはHerceptin）１００μｇを多孔質体のProtein Gに固定化した抗体固定化多孔質体と、１０μｇのプロテアーゼを固定化した微粒子とを、３７℃で６時間撹拌して、抗体のプロテアーゼ消化を行った。抗体としてIgGを用いた場合およびHerceptinを用いた場合のそれぞれについて、トリプシンとリジルエンドペプチダーゼの比（重量比）を、（１）１０：０、（２）９：１、（３）８：２、（４）０：１０として実験を行い、消化後の上清液および多孔質体表面の固定化成分のそれぞれを、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動で分析した。電気泳動像を図１２に示す。図１２において、左端のレーンは分子量マーカーである。

[0117] 抗体としてHerceptinを用いた場合の上記水準１～４の消化後の上清を、上記実験２と同様にして、質量分析を行った。ＭＳスペクトルを図１３に示す。また、質量分析結果に基づいて、実験４と同様にMascot serverによるデータベース解析を行った。なお、水準１（トリプシン１００％）は、上記の実験４（図７および図８）と同一である。水準２～４のデータベース解析結果は以下の通りであった（データ不図示）

[0118] ＜水準２：トリプシン：リジルエンドペプチダーゼ＝９０：１０＞

Mixture

gi|442924 Mass:23708 Score: 117 Expect:4.9e-007 Matches: 13

Chain B, X-Ray Structures Of The Antigen-Binding Domains From Three Variants Of Humanized Anti-P185-Her2 Antibody 4d5 And Comparison With Molecular Modeling

gi|184747 Mass:36012 Score: 64 Expect:0.11 Matches: 10

immunoglobulin gamma-1 heavy chain constant region [Homo sapiens]

[0119] ＜水準３：トリプシン：リジルエンドペプチダーゼ＝８０：２０＞

Mixture

gi|442924 Mass: 23708 Score: 115 Expect:7.8e-007 Matches: 13

Chain B, X-Ray Structures Of The Antigen-Binding Domains From Three Variants Of Humanized Anti-P185-Her2 Antibody 4d5 And Comparison With Molecular Modeling

gi|184747 Mass: 36012 Score: 54 Expect: 1.1 Matches: 9

immunoglobulin gamma-1 heavy chain constant region [Homo sapiens]

[0120] ＜水準４：リジルエンドペプチダーゼ１００％＞

gi|184747 Mass:36012 Score: 71 Expect:0.021 Matches: 8

immunoglobulin gamma-1 heavy chain constant region [Homo sapiens]

[0121] トリプシンとリジルエンドペプチダーゼとを併用した水準２，３では、解析結果として、Herceptinの抗原結合領域に加えて、ヒト由来抗体の定常領域が示されていた。また、リジルエンドペプチダーゼのみを用いた水準４では、Herceptinが含まれず、抗体の定常領域のみが優位に検出されたとの解析結果が示された。

[0122] 図１２の電気泳動像では、リジルエンドペプチダーゼ比率の上昇にともなって、上清のペプチド断片の数が増え、バンド面積も増加する傾向があり、消化効率およびペプチド回収率が増大していることがわかる。また、図１３でも、リジルエンドペプチダーゼの比率の上昇にともなって、検出されるペプチド断片の種類や量が増加している。しかし、水準２～４で新たに検出されたペプチド断片は、HerceptinのＦｃドメイン由来のものが多く、プロテアーゼ消化の位置選択性（Ｆａｂドメインを選択的に消化する特性）が低下していることがわかる。

[0123] これらの結果から、リジルエンドペプチダーゼの使用量が増大するにつれて、抗体の消化効率は向上するもの、プロテアーゼ消化の位置選択性が低下し、定常領域のペプチド断片の産生量が増大に伴って、Ｖ領域のペプチド断片の相対的な産生量が減少するために、抗体の検出・同定精度が低下する傾

向がうかがえる。そのため、本発明の方法により、抗体のＦａｂ領域の位置選択的な切断を行い、ＣＤＲの特異的検出を行う観点においては、トリプシンを単独で用いることが好ましく、トリプシンとリジルエンドペプチダーゼとを併用する場合は、リジルエンドペプチダーゼの混合量を１０％以下とすることが好ましいといえる。

[0124] なお、リジルエンドペプチダーゼのみを用いた水準４では、部位特異的な消化が行われなかったのに対して、トリプシンのみを用いた水準１（実験４）ではデータベース解析によりＣＤＲが効率的に検出されていることから、ＦａｂドメインのＶ領域が選択的にプロテアーゼ消化されていることがわかる。以上の結果によれば、基質タンパク質が抗体である場合に、トリプシンを用いて本発明を適用すれば、抗体に対するプロテアーゼの立体的なアクセスが適切に制御され、位置選択的なプロテアーゼ消化が可能であることが示されたといえる。

[0125] また、本実験により、トリプシンとリジルエンドペプチダーゼを併用した場合に、各プロテアーゼがその機能を失うことなく、細孔内に固定化された基質タンパク質を切断し得ることが示された。抗体は、Ｖ領域が分子の先端に存在するために、リジルエンドペプチダーゼの使用量が増加すると位置特異性が低下する傾向があるが、基質として他のタンパク質を用いる場合には、プロテアーゼの併用系により、位置選択性や消化効率の向上が図られる可能性が示唆された。

[0126] 以上、各実験例でより示したように、本発明によれば、抗体等のタンパク質を簡便な方法で位置選択的にプロテアーゼ消化してペプチド断片試料が得られ、得られたペプチド断片試料が質量分析によるタンパク質の同定や検出に適していることがわかる。

符号の説明

[0127] １０ 微粒子

１１ スペーサ

１５ プロテアーゼ

２０　多孔質体

２１　リンカー分子

２５　基質タンパク質

２９　細孔

１１０　微粒子

１２０　多孔質膜

１３１　微粒子懸濁液

１３２　スピンカラム

１３５　内容器

１３６　外容器

請求の範囲

［請求項1］ 切断対象の基質タンパク質を、多孔質体の細孔内に固定化する基質固定ステップ；および

基質タンパク質が固定化された前記多孔質体と、プロテアーゼが表面に固定化された微粒子とを液体中で接触させ、前記基質タンパク質のプロテアーゼ消化を行う消化ステップ、を有し、

前記微粒子の平均粒径が、前記多孔質体の平均細孔径よりも大きいことを特徴とする、ペプチド断片の調製方法。

［請求項2］ 前記基質固定ステップにおいて、前記基質タンパク質の所定の領域が、前記多孔質体に固定化され、前記所定の領域と別の領域が位置選択的にプロテアーゼ消化される、請求項１に記載のペプチド断片の調製方法。

［請求項3］ 前記多孔質体の細孔内に、前記基質タンパク質と部位特異的に相互作用するリンカー分子が固定化されており、

前記基質固定ステップにおいて、前記基質タンパク質が前記リンカー分子を介して前記多孔質体の細孔内に固定化される、請求項１または２に記載のペプチド断片の調製方法。

［請求項4］ 前記基質固定ステップ後に、前記リンカー分子と前記基質タンパク質とが結合した状態の分子サイズが、前記多孔質体の細孔径の０．５倍～１．５倍である、請求項３に記載のペプチド断片の調製方法。

［請求項5］ 前記微粒子の表面が、前記プロテアーゼと結合可能なスペーサ分子で修飾されており、前記プロテアーゼが前記スペーサ分子を介して前記微粒子の表面に固定化されている、請求項１～４のいずれか１項に記載のペプチド断片の調製方法。

［請求項6］ 前記基質タンパク質が抗体である、請求項１～５のいずれか１項に記載のペプチド断片の調製方法。

［請求項7］ 前記抗体がモノクロナール抗体である、請求項６に記載のペプチド断片の調製方法。

[請求項8] 前記基質固定ステップにおいて，前記抗体のＦｃドメインが前記多孔質体に固定化され、

前記消化ステップにおいて，前記抗体のＦａｂドメインが前記プロテアーゼにより位置選択的に切断される、請求項６または７に記載のペプチド断片の調製方法。

[請求項9] 前記プロテアーゼがトリプシンである、請求項１～８のいずれか１項に記載のペプチド断片の調製方法。

[請求項10] 前記多孔質体の平均細孔径が３０～１５０ｎｍであり、前記微粒子の平均粒径が１００ｎｍ以上である、請求項１～９のいずれか１項に記載のペプチド断片の調製方法。

[請求項11] 請求項１～１０のいずれか１項に記載の方法に用いるためのペプチド断片調製用キットであって、

基質タンパク質を固定化可能な細孔を有する多孔質体と、プロテアーゼを表面に固定化可能な微粒子とを含み、

前記微粒子の平均粒径が、前記多孔質体の細孔径よりも大きいことを特徴とする、ペプチド断片調製用キット。

[請求項12] 前記微粒子は、表面にプロテアーゼが固定化された状態で提供される、請求項１１に記載のペプチド断片調製用キット。

[請求項13] 請求項１～１０のいずれか１項に記載の方法により調製されたペプチド断片を、質量分析法により分析する、分析方法。

[請求項14] 分析対象のペプチド断片が、抗体の相補性決定領域の少なくとも一部のアミノ酸配列を含むペプチド断片である、請求項１３に記載の分析方法。