

明 細 書

発明の名称：抗体を分析する方法

技術分野

[0001] 本発明は、抗体を分析する方法に関する。具体的には、質量分析を利用した抗体の定量方法に関する。

背景技術

[0002] タンパク質の定量法としては、E L I S A (E n z y m e - L i n k e d I m m u n o S o r b e n t A s s a y) が一般的に行われている。しかしながら、E L I S A は、検出したいタンパク質ごとに特異抗体を準備する必要があること、複数のタンパク質を同時に検出できないこと等の課題があった。そこで、E L I S A に代わるタンパク質の定量法として、質量分析を用いる方法の開発が行われている。

[0003] 本発明者等のグループは、抗体等のタンパク質を位置選択的にプロテアーゼによって消化することで、質量分析を用いたタンパク質の特異的検出のために最適なペプチド断片を得ることができる方法を見出している。得られたペプチド断片は液体クロマトグラフ質量分析によって効果的に検出および定量できる（特許文献1：国際公開第2015/033479号、特許文献2：国際公開第2016/194114号、非特許文献1：Iwamoto N et.al., Analyst, 2014 Feb 7; 139(3): 576-80, doi: 10.1039/c3an02104a）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第2015/033479号

特許文献2：国際公開第2016/194114号

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Iwamoto N et.al., Selective detection of complementarity-determining regions of monoclonal antibody by limiting

protease access to the substrate: nano-surface and molecular-orientation limited proteolysis, Analyst. 2014 Feb 7; 139(3): 576-80. DOI: 10.1039/c3an02104a

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0006] 質量分析により抗体を定量するためには、測定対象である抗体を用いて検量線を作成することが一般的である。しかしながら、複数の抗体を測定する場合に、測定対象ごとに検量線を作成することは効率的ではない。また、そもそも、機能的な解析で重要になってくる中和抗体や新規クローンなどの抗体においては、安定的に検量線を作成するための抗体が得られない場合も多い。本発明は、測定対象である抗体を用いて検量線を作成しなくても質量分析により抗体を定量することが可能な方法を提供する。

課題を解決するための手段

- [0007] 本発明は、
生体タンパク質および標的抗体をプロテアーゼで消化することと、
消化された前記生体タンパク質および前記標的抗体のペプチド断片を質量分析することと、
前記質量分析によって得られた前記生体タンパク質の検出強度と前記標的抗体の検出強度との比に基づいて、前記標的抗体を定量することを含み、
前記プロテアーゼで消化することは、
担体の細孔内に前記生体タンパク質および前記標的抗体を固定することと、
前記細孔の径よりも大きい径を有し、前記プロテアーゼが表面に固定された微粒子と、前記担体と、を近接させることとを含み、
前記生体タンパク質は、前記細孔に固定可能なドメインを有する、
抗体を分析する方法に関する。
- [0008] 本発明は、
生体タンパク質と、少なくとも2種の標的抗体を含む試料と、をプロテア

ーゼで消化することと、

消化された前記生体タンパク質および前記標的抗体のペプチド断片を質量分析することと、

前記生体タンパク質の検出強度と前記標的抗体の検出強度との比に基づいて、前記標的抗体を定量することを含み、

前記生体タンパク質は、モノクローナル抗体である、

抗体を分析する方法に関する。

[0009] 本発明は、

上記抗体を分析する方法に用いるプログラムであって、

前記プログラムは、

質量分析装置から出力されるマスペクトルを受付け、

前記生体タンパク質の検出強度と前記標的抗体の検出強度との比を記憶部から読出し、

前記マスペクトルから算出される前記生体タンパク質の検出量を補正し、

前記標的抗体の量を算出する処理を処理装置に実行させる、プログラムに関する。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、測定対象である抗体を用いて検量線を作成することなく、質量分析によって抗体を定量することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]抗体を位置選択的に切断する方法の一例を示す図である。

[図2]実施例で用いられた抗体のシグネチャーペプチド配列およびCDR3配列を示す表である。

[図3]実施例で用いられた抗体のシグネチャーペプチド配列を示す表である。

[図4]実験3において、抗体をプロテアーゼで消化する手順を説明する図である。

[図5]実験3において、単一試料を質量分析したときのイオンカウント数（c

p s) と、混合試料を質量分析したときの各抗体の c p s とを比較したグラフである。横軸は各抗体の略号を示し、縦軸は c p s を示している。

[図6]実験3において、内部標準を用いて単一試料の検出量を補正した値と、内部標準を用いて混合試料中の各抗体の検出量を補正した値とを比較したグラフである。横軸は各抗体の略号を示し、縦軸は内部標準を用いて補正した値（内部標準補正值）を示している。

[図7]実験4において、トラスツズマブの c p s に対する各抗体の c p s 比を示すグラフである。横軸は各抗体の濃度を示し、縦軸はトラスツズマブの c p s に対する各抗体の c p s 比を示す。

[図8]実験4において、トラスツズマブの c p s に対する各抗体の c p s 比を示すグラフである。横軸は各抗体の濃度を示し、縦軸はトラスツズマブの c p s に対する各抗体の c p s 比を示す。

[図9]実験4において、トラスツズマブの c p s に対する各抗体の c p s 比を示すグラフである。横軸は各抗体の濃度を示し、縦軸はトラスツズマブの c p s に対する各抗体の c p s 比を示す。

[図10]実験5において、トラスツズマブを用いた検量線に基づいて定量されたイピリムマブの濃度（横軸）と、イピリムマブを用いた検量線に基づいて定量されたイピリムマブの濃度（縦軸）とを比較したグラフである。

[図11]実験5において、トラスツズマブを用いた検量線に基づいて定量されたペムブロリズマブの濃度（横軸）と、ペムブロリズマブを用いた検量線に基づいて定量されたペムブロリズマブの濃度（縦軸）とを比較したグラフである。

[図12]実験6において、イピリムマブを用いた検量線に基づいて定量されたイピリムマブの濃度（横軸）と、トラスツズマブを用いた検量線に基づいて定量されたイピリムマブの濃度（縦軸）とを比較したグラフである。

[図13]実験6において、ペムブロリズマブを用いた検量線に基づいて定量されたペムブロリズマブの濃度（横軸）と、トラスツズマブを用いた検量線に基づいて定量されたペムブロリズマブの濃度（縦軸）とを比較したグラフで

ある。

[図14A]実験6において、イピリムマブを用いた検量線に基づいて定量されたイピリムマブの濃度（横軸）と、各参照タンパク質を用いた検量線に基づいて定量されたイピリムマブの濃度（縦軸）とを比較したグラフである。

[図14B]実験6において、イピリムマブを用いた検量線に基づいて定量されたイピリムマブの濃度（横軸）と、各参照タンパク質を用いた検量線に基づいて定量されたイピリムマブの濃度（縦軸）とを比較したグラフである。

[図15A]実験6において、ペムブロリズマブを用いた検量線に基づいて定量されたペムブロリズマブの濃度（横軸）と、各参照タンパク質を用いた検量線に基づいて定量されたペムブロリズマブの濃度（縦軸）とを比較したグラフである。

[図15B]実験6において、ペムブロリズマブを用いた検量線に基づいて定量されたペムブロリズマブの濃度（横軸）と、各参照タンパク質を用いた検量線に基づいて定量されたペムブロリズマブの濃度（縦軸）とを比較したグラフである。

発明を実施するための形態

[0012] [抗体を分析する方法]

本実施形態に係る抗体を分析する方法は、
生体タンパク質および標的抗体をプロテアーゼで消化することと、
消化された前記生体タンパク質および前記標的抗体のペプチド断片を質量分析することと、

前記質量分析によって得られた前記生体タンパク質の検出強度と前記標的抗体の検出強度との比に基づいて、前記標的抗体を定量することを含む。

[0013] 本実施形態において、「生体タンパク質」とは、細胞、生体組織等の生体に由来するタンパク質、又は、これらを人工合成したタンパク質を意味する。本実施形態の一側面において、上記生体タンパク質は、本実施形態に係る抗体を分析する方法において参照物質として用いられていることから、「参照タンパク質」と把握することもできる。上記生体タンパク質は、バイオロ

ジックスであることが好ましい。本実施形態において「バイオリジックス」とは、生物を用いて製造、抽出、合成などされた医薬品を意味する。上記バイオリジックスは、「バイオ医薬品」、「生物学的製剤」と把握することもできる。本実施形態の他の側面において、上記生体タンパク質としては、例えば、後述する抗体（例えば、参照抗体等）、Fc融合タンパク質、並びに、マウス、ラット及びウサギ等に由来するモノクローナル抗体等が挙げられる。本実施形態において、上記生体タンパク質は、参照抗体又はFc融合タンパク質を含むことが好ましい。

[0014] 本実施形態の一側面において、上記生体タンパク質は、参照抗体を含むことが好ましい。

[0015] すなわち、本実施形態に係る抗体を分析する方法は、
参照抗体および標的抗体をプロテアーゼで消化するステップと、
消化された参照抗体および標的抗体のペプチド断片を質量分析するステップと、

参照抗体の検出強度と標的抗体の検出強度との比に基づいて、標的抗体を定量するステップを含むことが好ましい。

[0016] 本実施形態に係る方法においては、測定対象ごとに検量線を作成する必要がないため、検量線の作成に用いられる抗体の削減および質量分析の簡素化が期待される。抗体医薬の現場においては、生体内、例えば血液または組織中の抗体量を簡便に定量することの重要性が高まっている。本実施形態によれば、測定対象である抗体によって検量線を作成することができない場合であっても、他の抗体を基準にして試料中の抗体医薬の濃度を算出することができる。また、本実施形態に係る方法によれば、汎用的なひとつの抗体を基準に用いることができるため、試料中に含まれる2種以上の抗体を同時に測定したい場合にも有用である。本実施形態に係る方法によれば、薬物動態試験の簡素化およびコスト削減が見込まれる。

[0017] 生体中には、医薬として投与された抗体（例えばモノクローナル抗体）以外にも、生体内で産生された抗体が多数存在する。生体内で産生された抗体

は検量線を作成することが容易ではなく、従来、このような抗体を質量分析により定量することは困難であった。本実施形態に係る方法によれば、生体内で産生された中和抗体、自己抗体およびそのクロノタイプ等の定量も質量分析によって行うことが可能になる。

[0018] <抗体をプロテアーゼで消化するステップ>

質量分析法により、タンパク質を簡便に精度よく検出および定量するためには、測定対象のタンパク質を位置選択的に切断し、そ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、他のペプチド断片の産生量を小さくすることが有効である。測定対象が抗体である場合には、例えばF a bドメインまたはF a bドメインの可変領域を位置選択的に消化し、一方、F cドメインの消化を抑制することにより、高感度で抗体を検出できる。

[0019] 本実施形態に係る方法において、標的抗体は、定量する対象の抗体であり、参照抗体は標的抗体を定量するために対比される抗体である。上記参照抗体は、上記生体タンパク質に相当する。本明細書において、標的抗体および参照抗体をまとめて「抗体」ということがある。抗体の一例は、F cドメインとF a bドメインとがヒンジ部を介してつながった免疫グロブリンI g Gである。抗体分子を構成する2本の重鎖および2本の軽鎖はそれぞれ定常領域と可変領域とを有する。定常領域は、同一種由来の抗体のほとんどで共通するアミノ酸配列を有する。可変領域は、相補性決定領域（C D R）と呼ばれる特異的な配列を持つ部位が各3つずつ存在する。このC D R（C D R 1、C D R 2およびC D R 3）が規定する立体構造が抗原との特異性を決定する。

[0020] 参照抗体のプロテアーゼによる消化と標的抗体のプロテアーゼによる消化とは、一方を行ったあとに他方を行ってもよいが、好ましくは同時に行う。標的抗体と参照抗体とは、同一の試料中に含まれていてもよいし、異なる試料中に含まれていてもよい。

[0021] 標的抗体は、製造された抗体を含んでよく、生体内で産生された抗体を含んでもよい。標的抗体は、例えばモノクローナル抗体またはポリクローナル

抗体を含んでよい。標的抗体は、免疫反応により生体内で産生された抗体を含んでもよく、中和抗体、自己抗体および／またはそのクロータイプを含んでもよい。標的抗体は、2種以上の抗体を含んでもよい。同時に定量できる抗体の種類は、3種、4種、5種、6種、7種、8種、9種、10種、15種、20種、40種、60種、80種またはそれ以上であってよい。複数の標的抗体は、同一の試料中に含まれていてもよいし、異なる試料中に含まれていてもよい。

[0022] 標的抗体は、培養細胞、培養組織またはその培養上清に含まれる抗体であってもよいが、好ましくは生体試料に含まれる抗体である。生体試料は、被検体から得た血液であってよく、生体組織、尿、糞便、汗、唾液、リンパ液、羊水、母乳、胸水、腹水、脳脊髄液、涙等であってもよい。血液に由来する生体試料は、全血であってもよいが、好ましくは血漿または血清である。試料は、生理食塩水、緩衝液等で希釈されてもよい。被検体は、動物であってよく、例えばヒトを含む哺乳類である。被検体は、モノクローナル抗体を抗体医薬として投与された患者であってもよい。生体試料は、生体試料の種類に応じて適宜採取すればよく、採取後に室温または低温で保存してもよい。標的抗体が生体試料に含まれる抗体であるとき、本実施形態に係る方法によって、生体内の標的抗体の濃度を決定することができる。

[0023] 参照抗体は、標的抗体として例示された抗体を使用できる。参照抗体は、標的抗体とは異なる抗体である。本実施形態の一側面において、参照抗体は、標的抗体に対して少なくとも可変領域のアミノ酸配列が異なる抗体である、と把握することもできる。一つの分析において参照抗体として用いられた抗体は、他の分析においては標的抗体であってもよい。参照抗体は濃度が特定されていることが好ましい。複数の濃度を有する参照抗体を用いて、検量線を作成できる。参照抗体は、安定性同位体アミノ酸でラベルされていてもよいし、ラベルされていなくてもよい。

[0024] 参照抗体は、入手が容易な抗体であることが好ましい。参照抗体は、濃度およびアミノ酸配列の特定が容易である観点から、好ましくはモノクローナ

ル抗体である。モノクローナル抗体としては、特に限定されないが、完全ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体であってよく、トラスツズマブ、トラスツズマブーDM1、ベバシズマブ、セツキシマブ、リツキシマブ、ニボルマブ、ブレンツキシマブ、ペムブロリズマブ、イピリムマブ、モガムリズマブ、ラムシルマブ、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、アベルマブ、インフリキシマブ、トシリズマブ、アダリムマブ、ゴリムマブ、メボリズマブ、ウスチキヌマブ、エクリズマブ、パニツムマブ、オフアツムマブ、オマリズマブ、ゲムツズマブ、パリビズマブ、ラニビズマブ、セルトリズマブ、オクレリズマブ、バシリキシマブ等が挙げられる。モノクローナル抗体の分子径は約14.5 nmである。モノクローナル抗体の特異性を維持しつつ更なる機能を付加した複合体、例えば抗体－薬物複合体（例えばブレンツキシマブーベドチン、ゲムツズマブーオゾガマイシン、トラスツズマブーエムタンシン等）も本実施形態の方法におけるモノクローナル抗体に含まれる。分析に先立って複合体の結合を解離させ、抗体部分のみを分析に供してもよいが、複合体の形態のまま分析に供することもできる。

[0025] 本実施形態において、上記生体タンパク質は、Fc融合タンパク質であってもよい。ここで、「Fc融合タンパク質」とは、機能性タンパク質又はそのドメインと、免疫グロブリンのFcドメインとを融合させた組換えタンパク質を意味する。上記機能性タンパク質又はそのドメインとしては、例えば、ヒト細胞障害性Tリンパ球抗原－4（CTLA－4）の細胞外ドメイン、ヒト血管内皮増殖因子（VEGF）受容体1及び2タンパク質の細胞外ドメイン、並びに、腫瘍壊死因子（TNF）受容体等が挙げられる。上記Fc融合タンパク質は、例えば、アバタセプト（CTLA－4の細胞外ドメインと免疫グロブリンのFcドメインとの融合タンパク質）、アフリベルセプト（VEGF受容体1及び2タンパク質の細胞外ドメインと免疫グロブリンのFcドメインとの融合タンパク質）、及び、エタネルセプト（TNF受容体と免疫グロブリンのFcドメインとの融合タンパク質）等が挙げられる。本実施形態の一側面において、上記Fc融合タンパク質は、アバタセプト、アフ

リベルセプト及びエタネルセプトからなる群より選択されることが好ましい。
。

[0026] 本実施形態の一側面において、プロテアーゼで消化するステップは、好ましくは

(a) 担体の細孔内に生体タンパク質および標的抗体を固定するステップと、

(b) 細孔の径よりも大きい径を有し、プロテアーゼが表面に固定された微粒子と、担体と、を近接させるステップとを含む。

[0027] 本実施形態の他の側面において、F a bドメイン（又は、F c融合タンパク質における機能性タンパク質のドメイン）を位置選択的に消化するために、抗体をプロテアーゼで消化するステップは、好ましくは

(a) 担体の細孔内に参照抗体（又は、F c融合タンパク質）および標的抗体を固定するステップと、

(b) 細孔の径よりも大きい径を有し、プロテアーゼが表面に固定された微粒子と、担体と、を近接させるステップとを含む。

[0028] (a) 担体の細孔内に参照抗体および標的抗体を固定するステップ

抗体を固定する担体は、多数の細孔を有する多孔質体であってよく、細孔内に抗体を結合可能である。担体の材料は特に限定されないが、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。

[0029] 細孔の形状は特に限定されないが、半球形状であってもよく、担体を貫通する形状であってもよい。細孔の大きさは、抗体を固定した際に、細孔の開口部付近に抗体の先端部分、すなわち選択的消化されるべき部位が位置するように、抗体の分子径等を考慮して決定することが好ましい。担体の平均細孔径は、例えば10 nm以上500 nm以下程度の範囲で、かつ微粒子の平均粒径よりも小さい範囲で適宜に設定される。担体の平均細孔径は、例えば20 nm以上、30 nm以上、40 nm以上または50 nm以上であってよく、200 nm以下、150 nm以下、120 nm以下または100 nm以下であってよい。担体の平均細孔径は、電子顕微鏡法によって求めることが

可能である。

[0030] 担体の細孔内に抗体を固定するために、抗体と部位特異的に相互作用するリンカーが細孔内に固定化された担体が好ましく用いられる。抗体とリンカー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。細孔内に固定されやすい観点から、好ましくは参照抗体は、より好ましくは参照抗体および標的抗体は、細孔に固定可能なドメインを有する。細孔に固定可能なドメインは、例えば抗体のFcドメインである。本実施形態の一側面において、生体タンパク質は、前記細孔に固定可能なドメインを有する。

[0031] リンカーとしては、好ましくは抗体のFcドメインと部位特異的に結合するProtein A、Protein G等が用いられる。細孔内にこれらのリンカーが固定化された担体を用いることにより、細孔内に抗体のFcドメインが固定化され、Fabドメインが細孔の開口部付近に位置する。細孔内での抗体の配向が制御されることで、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。

[0032] 本実施形態において好適に使用可能な担体として、特に限定するものではないが、例えばProtein G Ultralink樹脂 (Pierce社製)、トヨパール TSK gel (TOSOH社製)、トヨパール A Fer Protein A HC-650F resin (TOSOH社製)、Protein A Sepharose (GEヘルスケア)、Kan Cap A (KANEKA) 等が挙げられる。

[0033] 抗体を担体の細孔内に固定する方法は特に限定されず、例えば細孔内にProtein AまたはProtein Gが固定化された担体に抗体を固定化する場合は、担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。担体と抗体の量比は、目的に応じて適宜に設定できる。その後、担体を適当な緩衝液を用いて洗浄し、非特異的に結合した抗体および試料に含まれる分子を除く。緩衝液としては、例えばP

h o s p h a t e B u f f e r e d S a l i n e (P B S) 、 n - オキチルチオグリコシド (O T G) 含有 P B S 等が用いられる。洗浄は、例えばフィルター内蔵プレートを用いて吸引または遠心操作によって、多サンプルを同時に、自動化して行うことができる。

[0034] (a') 酸性条件下で還元反応を行うステップ

上記の (a) 担体の細孔内に参照抗体および標的抗体を固定するステップの後で、(a') 酸性条件下で抗体に対して還元反応を行うステップを実施してもよい。抗体は、何らかのメカニズムで、例えば S S 結合 (ジスルフィド結合) によるシステインノット構造の存在によって非常にリジッドな領域が存在して、プロテアーゼに対する耐性が生じる場合がある。例えばモノクローナル抗体の約 20 ~ 30 % は局所的なプロテアーゼ抵抗性を有することが知られている。このようなリジッドな抗体は、酸性還元処理を行うことにより、プロテアーゼによる消化効率が向上することがある。酸性還元条件では p r o t e i n A または p r o t e i n G と F c ドメインとの結合は解離しないため、抗体分子を担体上に保持したままシステインノット構造をほぐすことが可能となると考えられる。

[0035] 酸性条件下での還元反応は、例えば有機リン系還元剤の存在下でのインキュベーションによって実施することができる。有機リン系還元剤としては、例えばトリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィン (T r i s (2 - c a r b o x y e t h y l) p h o s p h i n e : T C E P) またはその塩酸塩、トリブチルホスフィン等が挙げられる。これらの還元剤は、シグマ・アルドリッチ社、ナカライテスク株式会社、フナコシ株式会社等から入手することができる。反応液中の T C E P の濃度は、例えば 100 m M 以上 500 m M 以下であってよく、例えば 250 m M である。

[0036] 還元反応は、p H 2 . 5 以下の強酸性条件下、例えば p H 1 . 5 、 p H 2 . 0 、 P H 2 . 5 等で実施することが好ましい。還元反応の時間は、限定するものではないが、10 分以上 60 分以下であれば十分であり、例えば 20 分間、30 分間、40 分間、45 分間、50 分間であり得る。60 分間を超

えて還元反応を行うことも可能であるが、その場合、測定のための作業時間が長くなる。反応温度は、限定するものではないが、例えば15℃以上30℃以下であればよく、室温で反応を実施することができる。好適には、反応温度は約25℃である。

[0037] 酸性還元処理を行わない試料と、酸性還元処理を行う試料とは同時に質量分析に供されてもよい。具体的には、担体と抗体溶液とを混合した溶液を二分し、一方はそのまま洗浄を行う。もう一方は酸性還元処理を行ったあと、洗浄を行う。洗浄後の両者の担体を合わせて、次のプロテアーゼによる消化のステップを行う。これにより、TCEP酸性還元処理を行った抗体から生じたペプチド断片とTCEP酸性還元処理を行っていない抗体から生じたペプチド断片との両方を1つのサンプルとして質量分析に供することができる。

[0038] (b) 細孔の径よりも大きい径を有し、プロテアーゼが表面に固定された微粒子と、担体と、を近接させるステップ

微粒子に固定させるプロテアーゼの種類は、質量分析による定量の対象となる抗体の種類に応じて適宜選択すればよく、例えばトリプシン、キモトリプシン、リジルエンドペプチダーゼ、V8プロテアーゼ、AspNプロテアーゼ(Asp-N)、ArgCプロテアーゼ(Arg-C)、パパイン、ペプシン、ジペプチジルペプチダーゼを単独または組み合わせて使用することができる。プロテアーゼとして、好ましくはトリプシンが用いられる。本実施形態の方法において好適に使用できるプロテアーゼとして、例えばTrypsin Gold(プロメガ社製)、Trypsin TPK-treated(シグマ社製)等が挙げられる。

[0039] 微粒子は、その表面にプロテアーゼを固定化して、担体の細孔内に固定された抗体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、微粒子は、担体の細孔の奥深くまで入り込まないように、その平均粒径が、担体の平均細孔径よりも大きいものが用いられる。微粒子の平均粒径は、担体の平均細孔径の1.2倍以上、1.5倍以上、1.8倍以上であって

よく、約2倍であってもよい。微粒子の平均粒径は、50 nm以上、100 nm以上、120 nm以上、150 nm以上または170 nm以上であってよく、500 nm以下または300 nm以下であってよい。微粒子の平均粒径は、電子顕微鏡法によって求めることが可能である。

[0040] 微粒子の形状は、特に限定されないが、担体へのプロテアーゼのアクセスの均一化の観点から、球状であることが好ましい。微粒子は、分散性が高く、平均粒径が均一であることが好ましい。

[0041] 微粒子は、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、金属および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微粒子、樹脂表面を金属で被覆した微粒子等を用いることもできる。

[0042] 微粒子は、水性媒体に分散または懸濁することができ、分散液または懸濁液から磁気分離または磁性沈殿分離により容易に回収することができる磁気ナノ粒子が好ましい。凝集が起こりにくい観点からは、その表面が有機ポリマーで被覆されていることが好ましい。有機ポリマーで被覆された磁性ナノビーズの具体例としては、FGビーズ、SGビーズ、Adem beads、nanomag等が挙げられる。市販品としては、例えば多摩川精機株式会社製のFG beads（フェライト粒子をポリグリシジルメタクリレート（ポリGMA）で被覆した粒径約200 nmのポリマー磁性ナノ粒子）が好適に用いられる。

[0043] 微粒子は、非特異的なタンパク質の吸着抑制と、プロテアーゼの選択的な固定化のために、プロテアーゼと結合可能なスペーサで修飾されていることが好ましい。スペーサ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、プロテアーゼによる消化の位置選択性が高められる。スペーサの分子サイズを調整することにより、抗体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。

[0044] 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。プロテアーゼのアクセス範囲を制御する観点から、スペーサは分子径が小さいものが好ましい。スペーサの分子径は、5 nm以下が好ましく、3 nm以下がより好ましく、2 nm以下がさらに好ましい。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い。

[0045] スペーサは、非タンパク質が好ましく、末端にアミノ基、カルボキシル基、エステル基、エポキシ基、トシル基、ヒドロキシル基、チオール基、アルデヒド基、マレイミド基、スクシンイミド基、アジド基、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、活性化されたエステル基を有するスペーサを用いることが好ましい。スペーサのうち、上記官能基以外のスペーサアーム部分は、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリアクリルアミド、ポリエチレンジイミン、ポリ（エチレンオキシド）、ポリエチレンテレフタレートおよびこれらの誘導体等の親水性分子が用いられる。

[0046] スペーサで表面修飾された微粒子としては、例えばN-ヒドロキシスクシンイミドで活性化されたエステル基（活性エステル基）を有するスペーサで修飾された微粒子が挙げられ、商品名「FG beads NHS」（多摩川精機株式会社製）として市販されている。

[0047] プロテアーゼを微粒子の表面に固定させ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）の特性等に応じて適宜の方法を採用できる。例えばスペーサ修飾された微粒子の懸濁液とプロテアーゼを含む溶液とを混合することにより、プロテアーゼが表面に固定された微粒子を得ることができる。プロテアーゼとしてトリプシンが固定された微粒子の市販品として、LC/MS/MS用前処理キット「nSMOL Antibody BA Kit」（島津製作所製）に含まれる「FG beads Trypsin DART（登録商標）」も好適に用いることができる。

[0048] 抗体が固定された担体と、プロテアーゼが固定された微粒子とを近接また

は接触させることにより、抗体の可変領域が選択的にプロテアーゼにより消化される。

[0049] プロテアーゼによる消化は、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実施することができる。プロテアーゼによる消化は、好ましくはpH7以上9以下の範囲、より好ましくはpH約8.0で実施される。プロテアーゼによる消化は、約37℃の環境下で行ってもよいが、飽和蒸気圧下、約50℃で行うことが好ましい。反応時間は、例えば30分間以上20時間以下であってよく、例えば1時間以上または3時間以上であってよく、5時間以下または8時間以下であってもよい。反応液の蒸発を防ぐために、反応を飽和蒸気圧下で行うことが好ましい。

[0050] プロテアーゼで消化するステップは、反応液を攪拌して担体と微粒子との接触を促進してもよい。反応液の攪拌は反応時間全体に亘って行ってもよく、反応時間の一部のみ、例えば反応初期のみに攪拌してもよい。

[0051] プロテアーゼによる消化によって生じたペプチド断片は、反応液中に放出される。ペプチド断片を質量分析に供するためには、担体および微粒子を除去することが必要である。これは、プロテアーゼによる消化後の反応液を濾過、遠心分離、磁気分離、透析等の操作を行うことで達成できる。

[0052] 担体および微粒子とペプチド断片との分離は、例えばポリフッ化ビニリデン (PVDF) 製のろ過膜 (Low-binding hydrophilic PVDF、孔径0.2 μ m、ミリポア社製)、ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) 製のろ過膜 (Low-binding hydrophilic PTFE、孔径0.2 μ m、ミリポア社製) 等を用いてろ過することにより簡便に行うことができる。さらに遠心を行うことにより、迅速かつ簡便なろ過が可能である。

[0053] 抗体をプロテアーゼで消化する上述の工程は、本発明者等のグループが先に開発したナノ表面および分子配向制限的タンパク分解方法 (nanosurface and molecular-orientation limited proteolysis: nSMOL法) (登録商標) を適

用でき、LC/MS/MS用前処理キット「nSMOL Antibody BA Kit」（島津製作所製）を好適に用いることができる。nSMOL法の詳細は、例えば国際公開第2015/033479号およびIwamoto N et. al., Analyst, 2014 Feb 7; 139 (3): 576-80, doi: 10.1039/c3an02104a に記載されている。nSMOL法の改良技術等は、例えば国際公開第2016/143223号、国際公開第2016/143224号、国際公開第2016/143226号、国際公開第2016/143227号、国際公開第2019/130549号、国際公開第2019/155576号、Iwamoto N et. al., Bioanalysis, doi: 10.4155/bio-2016-0018、およびIwamoto N et. al., Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2016, doi: 10.1248/bpb.b16-00230等の開示されている。これらの文献の開示内容は、参照により本明細書に組み入れるものとする。

[0054] nSMOL法のプロトコルの例は以下のようなものである。

＜ステップ（a）＞

1. 抗体が含まれる生物学的サンプル5-10 μ Lを約10-20倍量のPBS+0.1% n-オクチルチオグリコシド（OTG）に希釈する。
2. 希釈した生物学的サンプルに対して、Immunoglobulin Collection Resin（TOYOPEARL AF-r Protein A HC-650F, 50% slurry）を25 μ L加えて、混合液を得る。
3. 得られた混合液を5分程度穏やかにボルテックスで攪拌する。
4. ウルトラフリーlow-protein binding Durapore PFD（0.22 μ m）に、上記混合液の全量を回収する。
5. 上清を遠心除去する（10000g, 1分間）。
6. PBS+0.1% OTGを300 μ L加え、上清を遠心除去する（1

0000 g, 1 分間)。

7. ステップ6を繰り返す。

8. 界面活性剤 (OTG) を除くため、PBSを300 μ L加え、上清を遠心除去する (10000 g, 1 分間)。

9. ステップ8を繰り返す。

10. Reaction solutionもしくはEnhanced Reaction Solutionを75–100 μ L加える。この溶液には10 fmol/ μ LのP14R合成ペプチドを添加してもよい。

[0055] <ステップ (b) >

11. 化学修飾トリプシンを固相したFG beads (0.5 mg/mlのFG beads懸濁液) を5–10 μ L加える。

12. 飽和蒸気圧下50°Cにて、穏やかに攪拌しながら4–6時間反応を行う。

13. 反応液に10%ギ酸を10 μ L加えることで反応を停止する。

14. 遠心ろ過 (10000 g, 1 分間) し、溶液を回収する。

15. 上記溶液が収容されたチューブを磁気スタンドに立て、約1–2分間静置し、上記溶液から余剰樹脂を除去する。

[0056] 図1にnSMOL法によって抗体が位置選択的に切断される様子の一例を示す。平均粒子径 D_1 を有する微粒子10の表面には、プロテアーゼ15が固定されている。プロテアーゼ15は、スパーサ11により微粒子に固定されている。担体20は、平均細孔径 D_2 を有する多数の細孔29を有し、抗体と特異的に結合可能なリンカー21が固定されている。抗体25は、リンカー21を介して細孔内に固定されている。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。細孔内の表面に結合している抗体のFcドメインへのプロテアーゼのアクセスが制限されることにより、細孔との結合部位から離れた開口部付近に位置するFabドメインへのプロテアーゼのアクセス確率が相対的に高められる。これにより、抗体のFabドメインを位置選択的にプロテアーゼにより切断して、ペプチド断片を

得ることができる。

[0057] <ペプチド断片を質量分析するステップ>

上記ステップで得られたペプチド断片を質量分析に供する。参照抗体のペプチド断片と標的抗体のペプチド断片とは、同一試料中に含まれていてもよいし、異なる試料中に含まれていてもよい。複数の標的抗体から得られたペプチド断片は、同一試料中に含まれていてもよいし、異なる試料中に含まれていてもよい。

[0058] ペプチド断片の分離をより確実に行い、分析精度を高める目的で、質量分析に供する前の試料を、液体クロマトグラフ（LC）により、分離および濃縮することが好ましい。LCにより試料の分離を行う場合、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よい。LCとタンデム質量分析を組み合わせたLC/MS/MSまたはLC/MS_nにより分析を行うこともできる。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、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。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、試料を質量分析に用いてもよい。

[0059] 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。三連四重極型質量分析装置等を用いて、MS/MS分析、MS₃以上の多段階質量分析または多重反応モニタリング（multiple reaction monitoring：MRM）を行うこともできる。

[0060] 本実施形態の方法において特に適した装置は、特に限定するものではないが、例えばLCMS-8030、LCMS-8040、LCMS-8050、LCMS-8060、LCMS-9030、LCMS-IT-TOF（いずれも島津製作所製）を挙げることができる。

[0061] 質量分析により、標的抗体に特異的なFab領域、例えば重鎖および／または軽鎖のCDR1、CDR2、CDR3のアミノ酸配列を含むペプチド断片を検出することで、標的抗体の同定が可能である。標的抗体を同定するために、既存のデータベースを用いることができる。nSMOL法によれば、抗体が位置特異的にプロテアーゼで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及びデータの確度が高められる。Fab領域由来の複数のペプチド断片のうち、特に抗体の同定に好適なペプチド断片を分析対象として選択することができる。このように選択されるペプチド断片は「シグネチャーペプチド」と呼ばれる。

[0062] 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同定を行う場合、検出対象のペプチド断片は、アミノ酸残基数が5以上30以下程度が好ましく、7以上25以下程度がより好ましい。アミノ酸残基数が過度に小さいと、夾雑物又は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付き難く、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。

[0063] <標的抗体を定量するステップ>

質量分析によって得られた参照抗体の検出強度と標的抗体の検出強度との比に基づいて、標的抗体を定量する。本実施形態において、「検出強度」とは、質量分析に供して得られたマスペクトルにおける、対象のペプチド断片に由来するピーク面積またはピーク強度を意味する。すなわち、「参照抗体の検出強度」とは、質量分析に供して得られたマスペクトルにおける、参照抗体のペプチド断片に由来するピーク面積またはピーク強度を意味する。「標的抗体の検出強度」とは、質量分析に供して得られたマスペクトル

における、標的抗体のペプチド断片に由来するピーク面積またはピーク強度を意味する。参照抗体の検出強度と標的抗体の検出強度との比、および参照抗体の検出量と標的抗体の検出量との比に基づいて、標的抗体を定量できる。参照抗体の検出強度と標的抗体の検出強度との比に基づいて、標的抗体の検出量または参照抗体の検出量を補正することができる。参照抗体の検出量と標的抗体の検出量とは、上記の参照抗体および標的抗体のペプチド断片の質量分析で得られたマスペクトルのピーク面積またはピーク強度に基づいて算出される。

[0064] 例えば参照抗体の検出強度と標的抗体の検出強度との比に基づいて参照抗体の検出量を標的抗体における標準量に変換し、それと標的抗体の実際の検出量とを比較して、標的抗体を定量できる。例えば参照抗体の検出強度と標的抗体の検出強度との比に基づいて標的抗体の検出量を参照抗体における検出量に変換し、それと参照抗体の実際の検出量（標準量）とを比較して、標的抗体を定量できる。参照抗体は1点の濃度において質量分析されてもよく、複数の濃度点で質量分析されてもよい。複数の濃度で参照抗体を質量分析したとき、質量分析の結果に基づいて参照抗体の検量線が作成され得る。例えば参照抗体の検出強度と標的抗体の検出強度との比に基づいて、参照抗体の検量線を標的抗体の検量線に変換し、標的抗体を定量してもよい。

[0065] 参照抗体の検出強度と標的抗体の検出強度との比は、所定の濃度を有する参照抗体および所定の濃度を有する標的抗体を質量分析することによって決定することができる。例えば等量の参照抗体と標的抗体とを同条件でプロテアーゼにより消化し、質量分析に供して得られたマスペクトルのピーク面積またはピーク強度の比を、参照抗体の検出強度と標的抗体の検出強度の比とすることができる。参照抗体の検出強度と標的抗体の検出強度との比は、独立した分析を5回行い、得られた比率の中央値または平均値であってよい。通常、参照抗体の検出強度と標的抗体の検出強度との比は、その濃度によらず一定である。参照抗体の検出強度と標的抗体の検出強度との比は、予め決定しておくことができる。予め決定しておくことにより、標的抗体の定量

を簡便に行うことができる。参照抗体の検出強度と標的抗体の検出強度との比は、標的抗体を定量するための定数として、普遍的に使用することができる。

[0066] すなわち、本実施形態の一側面において、上記抗体を分析する方法は、
所定の濃度を有する前記生体タンパク質および所定の濃度を有する前記標的抗体を質量分析することと、

前記質量分析の結果に基づいて、前記生体タンパク質の検出強度と前記標的抗体と検出強度との比を予め決定することをさらに含むことが好ましい。

[0067] 本実施形態の他の側面において、上記抗体を分析する方法は、
所定の濃度を有する前記参照抗体および所定の濃度を有する前記標的抗体を質量分析することと、

前記参照抗体の検出強度と前記標的抗体と検出強度との比を予め決定することをさらに含むことが好ましい。

[0068] 所定の濃度を有する参照抗体および所定の濃度を有する標的抗体の質量分析は、特に限定されず、上記の参照抗体および標的抗体を質量分析するステップに記載の方法によって行うことができる。所定の濃度を有する参照抗体および所定の濃度を有する標的抗体の質量分析は、上記の参照抗体および標的抗体を質量分析するステップと同時に行ってよいし、上記の参照抗体および標的抗体を質量分析するステップよりも前に行っていてもよい。参照抗体および標的抗体を質量分析するステップは、所定の濃度を有する参照抗体および所定の濃度を有する標的抗体の質量分析と同じ条件で行うことが好ましい。

[0069] [キット]

本実施形態に係るキットは、
上記生体タンパク質と、
上記プロテアーゼが表面に固定された微粒子と、
上記細孔が設けられた担体とを含む。

[0070] 上記キットは、上述の抗体を分析する方法に用いられるキットである。

本実施形態に係るキットは、
参照抗体と、
プロテアーゼが表面に固定された微粒子と、
細孔が設けられた担体とを含む。

[0071] キットは、上述の抗体を分析する方法に用いられるキットであってもよい。

生体タンパク質、参照抗体、微粒子および担体は、上述の方法に記載されたものであってよい。キットは、上述の方法において使用され得るマイクロプレートおよびチューブ等の反応容器、フィルター内蔵プレート、緩衝液、洗浄液、プロテアーゼ反応液、酸性還元剤、ろ過膜、チップ、分析カラムをさらに含んでもよい。キットは、キットの使用法および／または抗体の検出のための質量分析条件を記載した説明書を含んでよい。キットは、生体タンパク質の検出強度と標的抗体の検出強度との比が示された対応表、又は参照抗体の検出強度と標的抗体の検出強度との比が示された対応表を含んでもよい。

[0072] 本実施形態に係るキットの使用により、抗体の検出のためのペプチド断片調整の操作をより簡便に行うことができ、装置による自動化もなし得る。本実施形態に係るキットの使用により、質量分析および標的抗体の定量も簡便に行い得る。

[0073] [プログラム]

本実施形態に係るプログラムは、
上記抗体を分析する方法に用いるプログラムであって、
上記プログラムは、
質量分析装置から出力されるマススペクトルを受付け、
上記生体タンパク質の検出強度と上記標的抗体の検出強度との比を記憶部から読出し、
上記マススペクトルから算出される上記生体タンパク質の検出量を補正し、

上記標的抗体の量を算出する処理を処理装置に実行させる、プログラムであってよい。

- [0074] 本実施形態に係るプログラムは、
質量分析装置から出力されるマスペクトルを受け、
参照抗体の検出強度と標的抗体の検出強度との比を記憶部から読出し、
前記マスペクトルから算出される前記参照抗体の検出量を補正し、
前記標的抗体の量を算出する処理を処理装置に実行させる。
- [0075] 本実施形態に係るプログラムは、上記の抗体を分析する方法において、標的抗体を定量するステップを実現させるプログラムであってよい。
- [0076] プログラムの一例は、質量分析装置から出力されたマスペクトルから参照抗体および標的抗体を同定し、それぞれの検出量を算出する。参照抗体の種類およびその濃度は、ユーザーから受け付け得る。受け付けた参照抗体に応じて、参照抗体の検出強度と標的抗体の検出強度との比を記憶部から読出す。参照抗体の検出強度と標的抗体の検出強度との比は、上述のように所定の濃度を有する参照抗体および所定の濃度を有する標的抗体を質量分析することによって決定された値であってよい。この値は、予め記憶部に記憶させておくことが好ましい。参照抗体の検出強度と標的抗体の検出強度との比に基づいて、マスペクトルから算出された参照抗体の検出量を定数倍し、標的抗体における標準量に変換できる。この値をマスペクトルから得られた標的抗体の検出量と比較し、標的抗体の濃度を決定できる。
- [0077] プログラムは、コンピュータ読み取り可能な記録媒体に記録されていてよい。本実施形態に係るプログラムが記録された記録媒体と下記の質量分析を実行させるためのデータが記録された記録媒体とは、同一であってもよいし異なってもよい。記録媒体に記録されたプログラムは、コンピュータシステムに読み込ませ、実行させてもよい。本明細書において「コンピュータシステム」は、OS (Operating System) および周辺機器のハードウェアを含む。「コンピュータ読み取り可能な記録媒体」は、フレキシブルディスク、光磁気ディスク、光ディスク、メモリカード等の可搬型

記録媒体、コンピュータシステムに内蔵されるハードディスク等の記憶装置を含む。「コンピュータ読み取り可能な記録媒体」は、インターネット等のネットワークおよび電話回線等の通信回線を介してプログラムを送信する場合の通信線のように、短時間の間、動的にプログラムを保持するもの、その場合のサーバーやクライアントとなるコンピュータシステム内部の揮発性メモリのように、一定時間プログラムを保持するものを含んでもよい。プログラムは、コンピュータシステムにすでに記録されているプログラムとの組み合わせにより処理を実行するものであってもよい。

[0078] [質量分析を実行させるためのデータが記録された記録媒体]

本実施形態は、本実施形態に係る方法に使用するための、質量分析を実行させるためのデータが記録されたコンピュータ読み取り可能な記録媒体も提供し得る。データは、特に限定されるものではないが、各抗体に特有のアミノ酸配列を有するペプチド断片の1以上についての、親イオン、フラグメントイオン、予想保持時間、および三連四重極のそれぞれ（第1四重極、第2四重極、第3四重極）における電圧のデータを含んでよい。データは、特定の抗体に係る情報を含むものであってもよい。

上記の予想保持時間、電圧データ等は、使用する機器および測定条件等によって変動する数値であり、機器に合わせて提供することが好ましい。条件によって変動する数値については、当業者には理解されるようにその変動幅も併せて提供することが好ましい。

[0079] [メソッドパッケージ]

本実施形態はまた、上記のプログラムおよび／またはデータが記録された記録媒体を含む、液体クロマトグラフ質量分析（LC-MS）による標的抗体の検出および定量のためのメソッドパッケージを提供し得る。

[0080] 本明細書において、「メソッドパッケージ」とは、特定の測定対象に対する液体クロマトグラフ質量分析の分析条件および／または標的抗体を定量するためのプログラムを読み取り可能な形態で含み、単独で流通可能なものをいう。メソッドパッケージに含まれるデータをLC-MSにインポートするこ

とで、詳細な検討の末に得られた最適測定条件で分析することが可能となる。メソッドパッケージに含まれるプログラムを実行させることで、標的抗体の定量が可能となる。メソッドパッケージには、上記記録媒体の使用説明書を含めることもできる。

[0081] 質量分析による測定は、非常に高精度な分析ができる一方、目的のイオンによって分析条件が全く異なってくるため、適正な分析条件の設定が非常に重要でありながら、非常に困難であり、条件設定のために膨大な時間を要する。こうした条件を予め準備しておくことで、実際に質量分析を行うユーザーの利便性を向上させることができる。

[0082] メソッドパッケージは、複数の質量分析装置で共通のデータを記載するものであってもよく、特定の質量分析装置による分析に適した種々のデータを記載するものであってもよい。

[0083] 記録媒体またはメソッドパッケージは、上記の本実施形態のキットと併せて、またはキットと別個に提供することができる。

実施例

[0084] 以下、実施例を挙げて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0085] <実験1>

nSMOL法によりプロテアーゼで消化した複数の抗体を質量分析により同時に同定できるかどうかを検証した。血清から分画した抗体をnSMOL法により消化した。得られたペプチド断片を質量分析にかけて配列を同定した。血清はヒトの標準品試薬（被検体10人の混合サンプル、Innovative Research社製、製品名「Pooled Human A B Serum Plasma Derived」）を使用した。質量分析装置はLCMS-9030（島津製作所製）を用い、取得したMSスペクトルは、mzMLファイルフォーマットに出力後、Peak Studio version 10.5を用いて解析した。個別のヒト由来の抗体配列情報（抗体のアミノ酸配列情報）は存在しないので、公共データベース（IM

GTデータベース) に対してスペクトルマッチおよび検索を実施した。

[0086] nSMOL法による抗体の消化は、「nSMOL Antibody B A Kit」(島津製作所製)を使用して次のように行った。

(1) 血清10 μ Lを約10倍量のPBS+0.1% OTGに希釈した。

(2) 希釈した血清に対して、Immunoglobulin collection resin (細孔内にProtein Aが固定化されている担体、細孔径100 nm) を25 μ L加えて、混合液を得た。

(3) 得られた混合液を5分間穏やかにボルテックスで攪拌した。

(4) ウルトラフリーlow-protein binding Durapore PVDF (0.22 μ m) (遠心分離式の限外濾過フィルター) に、上記混合液の全量を回収した。

(5) 上清を遠心除去した(10000 g, 1分間)。

(6) PBS+0.1% OTGを300 μ L加え、上清を遠心除去した(10000 g, 1分間)。

(7) ステップ(6)を繰り返した。

(8) 界面活性剤(OTG)を除くため、PBSを300 μ L加え、上清を遠心除去した(10000 g, 1分間)。

(9) ステップ(8)を繰り返した。

(10) Enhanced reaction solutionを100 μ L加えた。

(11) 化学修飾トリプシンを固相したFG beads DART (直径200 nm) (プロテアーゼが表面に固定された微粒子) を5 μ L加えた。

(12) 飽和蒸気圧下50℃にて、穏やかに攪拌しながら5時間反応を行った。

(13) 反応液に10%ギ酸を10 μ L加えることで反応を停止した。

(14) 遠心ろ過(10000 g, 1分間)し、溶液を回収した。

(15) 上記溶液が収容されたチューブを磁気スタンドに立て、約1分静置し、上記溶液から余剰磁気ビーズを除去した。

(16) 上記溶液をLCMS分析に供した。

[0087] 比較例として、ペプシン (Promega社製、製品名「Pepsin」) またはIdeS酵素 (Promega社製、製品名「IdeS Protease」) により抗体を消化したペプチド断片を質量分析に供した。結果を表1に示す。

[0088] [表1]

	ペプシン法	IdeS protease 法	nSMOL 法
血清量	10mL	10mL	10μL
同定ペプチド数	368	653	1257
同定 IgG 数	18	52	142
De novo シーケンス同定数	1554	2539	7660
高変異領域 CDR3 同定数	0	5	31

[0089] nSMOL法によって、複数の抗体の同定を同時に行うことができることが確認された。nSMOL法によれば、ペプシン法およびIdeS protease法と比較して、より少ない血清量から、より多くの配列を同定することができた。

[0090] <実験2>

nSMOL法によって消化した複数の抗体を質量分析により同時に同定できるかどうかを、配列が既知のモノクローナル抗体を用いてさらに検証した。トラスツズマブ、ベバシズマブ、セツキシマブ、リツキシマブ、ニボルマブ、ブレンツキシマブ、ペムブロリズマブ、イピリムマブ、モガムリズマブ、ラムシルマブ、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、アベルマブ、インフリキシマブ、トシリズマブ、アダリムマブ、ゴリムマブ、メポリズマブ、ウスチキヌマブおよびエクリズマブを含む20種のモノクローナル抗体をヒト血清 (Innovative Research社製、製品名「Pooled Human AB Serum Plasma Derived」) に混合した。このサンプルを実験1と同じnSMOL法により消化し、得られたペプチド断片を質量分析に供した。質量分析装置はLCMS-9030 (島津製作所製) を用いた。取得したMSスペクトルは、mzMLファイルフォ

ーマットに出力後、Peaks Studio version 10.5を用い、in-houseモノクローナル抗体FASTAデータベースに対してスペクトルマッチおよび検索を実施した。この結果、用いたすべての抗体でシグネチャーペプチドおよびCDR3配列が同定できた。nSMOL法を利用した質量分析が、普遍的に抗体の定量に応用できることが示唆された。各抗体のシグネチャーペプチド配列およびCDR3配列（配列番号1～43）は図2に示される。

[0091] <実験3>

抗体を個別に分析したときの定量値と複数の抗体を同時に分析したときの定量値との誤差を検証した。1つの抗体を添加した単一試料を定量した値と複数の抗体が添加された混合試料を定量した値とを比較した。単一試料は、ブレンツキシマブ、セツキシマブ、リツキシマブ、インフリキシマブ、アテゾリズマブ、ベバシズマブ、ペムブロリズマブ、トラスツズマブ、エクリズマブ、メポリズマブ、トシリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、イピリムマブ、ニボルマブ、ラムシルマブ、アダリムマブ、ゴリムマブ、アバタセプト、アフリベルセプトおよびエタネルセプトの21種のモノクローナル抗体又はFc融合タンパク質のうちの1種をヒト血清中に混合した試料であり、混合試料はこれらの抗体及びFc融合タンパク質を全て含む試料であった。各抗体及びFc融合タンパク質の混合量は $50\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。各抗体のシグネチャーペプチド配列は、図2および図3に示される。なお、以降の記載において、モノクローナル抗体及びFc融合タンパク質をまとめて「抗体」と呼ぶ場合がある。

[0092] この試料を以下に示す改良されたnSMOL法（図4）によって消化した。実験2との変更点として、改良nSMOL法では、多くのサンプルを処理するためにマイクロプレート上で反応を行った。遠心操作を簡略するために、フィルター内蔵マイクロプレートを使用した。プロテアーゼ抵抗性を示す抗体を分析するために、強酸還元条件で抗体を前処理した。強酸還元処理を行わない抗体と行った抗体を合わせて分析することで、プロテアーゼ処理効

率を向上させた。

[0093] 具体的な操作は次のとおりである。

(1) 10 μ L の試料を 90 μ L の PBS + 0.1% OTG で希釈した。

(2) 希釈した試料を低吸着マイクロプレート (Eppendorf 社製、製品名「Protein LoBind Plate」) に移し、IgG collection resin (細孔内に Protein A が固定化されている担体、細孔径 100 nm) を 25 μ L 更に加えた。

(3) IgG collection resin を等量に分けた。一方はそのまま PBS + 0.1% OTG で洗浄し、他方は酸性還元処理 (250 mM TCEP-HCl) 後、洗浄した。洗浄はフィルター内蔵マイクロプレート (Whatman 社製、「UNIFILTER filter plate」、孔径 20 μ m) 上で実施し、吸引マニフォールドで廃液処理を行った。

(4) フィルター内蔵マイクロプレート上の IgG collection resin を Enhanced reaction solution で懸濁後、低吸着マイクロプレートの同一ウェルにいれ、2つの条件の resin を混合した。

(5) 10 μ L の FG beads Trypsin DART (直径 200 nm) (プロテアーゼが表面に固定された微粒子) を加えた。

(6) 飽和蒸気圧下 50°C にて、穏やかに攪拌しながら 5 時間反応を行った。

(7) 反応後、10%ギ酸を 10 μ L 加えて反応を停止し、フィルター内蔵マイクロプレート (日本ポール株式会社製、「AcroPrep advance 96-well Filter plate」、孔径 200 nm) 上に回収した。

(8) 遠心 (1500 g, 10 分間) し、ペプチド断片を含む溶液を回収した。

[0094] LCMS は、次の条件で行った。

[LC] Nexera X2 システム (島津製作所製)
カラム : Shim-pack GLSS C18 (50 mm × 2.1 mm)
カラム温度 : 50 °C
溶媒 A : 0.1 %ギ酸/水
溶媒 B : 0.1 %ギ酸/アセトニトリル
勾配 : 1 %B (1分) / 1-50 %B (5分) / 95 %B (1.5分) / 1 %B (10.5分)
流速 : 0.4 mL / 分
注入量 : 10 μL

[MS] LCMS-9030 (島津製作所製)
イオン化 : ESI Positive
DL 温度 : 250 °C
ヒートブロック温度 : 400 °C
インターフェイス温度 : 300 °C
ネブライザーガス : 3 L / 分
ドライイングガス : 10 L / 分
ヒーティングガス : 10 L / 分

質量分析装置および解析方法は、実験2と同じである。

[0095] まず、単一試料 (N = 3) および混合試料 (N = 3) について、検量線の再現性および正確性が十分に高いことを確認した。単一試料と混合試料との比較は、絶対数であるイオンカウント数について、および内部標準を用いて補正した値について行った。単一試料を質量分析したときのイオンカウント数 (cps) と、混合試料を質量分析したときの各抗体の cps とを比較した結果を図5に示す。内部標準を用いて単一試料の検出量を補正した値と、内部標準を用いて混合試料中の各抗体の検出量を補正した値とを比較した結果を図6に示す。内部標準は、P14R合成ペプチド (PPPPPPPPPPPPPPR : 配列番号47) を用いた。図5および図6は、単一試料の値

を100としたときの混合試料中の各抗体の相対値である。抗体を個別に分析したときと複数の抗体を同時に分析したときとの定量正確性は6.7% (0.62%~15.9%、中央値6.5%)であった。アメリカ食品医薬品局 (FDA) のバリデーションガイダンス基準による誤差範囲は±15%以内である。複数の抗体を同時に質量分析に供して得られた定量値は、高い正確性を有していることが確かめられた。例えば生体から取得された臨床サンプルであっても、質量分析によって複数の抗体を同時に定量可能であることが示された。

[0096] <実験4>

1つの抗体の検出強度と他の抗体の検出強度との比を求めた。実験3に記載の21種のモノクローナル抗体及びFc融合タンパク質の全てが血清に添加された混合試料を用いて、トラスツズマブのcpsに対する、他の抗体のcps比を算出した。1つの抗体の検出強度と他の抗体の検出強度との比は、トラスツズマブ以外の抗体を基準としても算出できる。抗体のプロテアーゼによる消化方法および質量分析条件は、実験3と同じである。混合試料は4濃度点で、各濃度について5回の独立した分析を行った (N=5)。この条件は、FDAの基準を満たす。

[0097] トラスツズマブのcpsに対する他の抗体のcps比 (すなわち、参照抗体の検出強度と標的抗体の検出強度との比) は、抗体の濃度に関わらず一定であることが示された (図7~図9)。この比 (定数) を利用すれば、トラスツズマブによって作成された検量線を用いて、トラスツズマブ以外の抗体を定量することが可能である。1つの抗体に対する他の抗体のcps比は、複数回の実験の平均値または中央値であってよい。

[0098] <実験5>

臨床検体に含まれる抗体 (標的抗体) を、トラスツズマブ (参照抗体) を用いて作成した検量線に基づいて定量した。臨床検体は、イピリムマブを投与されたヒトの血清 (N=71) およびペムブロリズマブを投与されたヒトの血清 (N=95) である。定量は、実験3に記載の方法と同じ方法で行った。

た。トラスツズマブの検量線は、希釈系列法（ヒト血清にトラスツズマブを $1000 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加し、これを二倍希釈系列により検量線サンプルとした）によって作成した。トラスツズマブの検量線を実験4で算出したトラスツズマブの検出強度とイピリムマブの検出強度との比に基づいて補正した。補正された検量線に基づいて、イピリムマブの濃度を決定した。同じ方法で、トラスツズマブを用いて作成した検量線をトラスツズマブの検出強度とペムブロリズマブの検出強度との比に基づいて補正し、ペムブロリズマブの濃度を決定した。

[0099] 定量値の再現性を確認するために、イピリムマブを用いて作成した検量線に基づいて、同じ臨床検体中のイピリムマブを定量した。イピリムマブの検量線は、希釈系列法（ヒト血清にイピリムマブを $1000 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加し、これを二倍希釈系列により検量線サンプルとした）によって作成した。同じ方法で、ペムブロリズマブを用いて作成した検量線に基づいて、臨床検体中のペムブロリズマブを定量した。

[0100] トラスツズマブの検量線に基づいて定量されたイピリムマブの濃度と、イピリムマブの検量線に基づいて定量されたイピリムマブの濃度とを比較した。2つの方法で得られた数値をピアソンの積率相関分析すると、 $R^2 = 0.81$ であり、両者は高い再現性を有することが示された（図10）。同様に、トラスツズマブの検量線に基づいて定量されたペムブロリズマブの濃度と、ペムブロリズマブの検量線に基づいて定量されたペムブロリズマブの濃度とを比較した。2つの方法で得られた数値をピアソンの積率相関分析すると、 $R^2 = 0.86$ であり、両者は高い再現性を有することが示された（図11）。参照抗体の検出強度と標的抗体の検出強度との比を利用して、臨床検体に含まれる複数の標的抗体の濃度を、1つの参照抗体を基準にして求めることができることがわかった。

[0101] <実験6>

実験5の結果を踏まえて、トラスツズマブ以外の抗体、及びFc融合タンパク質が、参照タンパク質（すなわち、生体タンパク質）として使用できる

か検証した。すなわち、臨床検体に含まれる抗体（標的抗体）を、以下に示す参照タンパク質のいずれか一つを用いて作成した検量線に基づいて定量した。臨床検体は、イピリムマブを投与されたヒトの血清（ $N=71$ ）およびペムブロリズマブを投与されたヒトの血清（ $N=74$ ）である。定量は、実験3に記載の方法と同じ方法で行った。参照タンパク質の検量線は、希釈系列法（採取されたヒト血清に参照タンパク質を $1000\mu\text{g/mL}$ となるように添加し、これを二倍希釈系列により検量線サンプルとした。）によって作成した。当該参照タンパク質の検量線を、実験4と同様の方法で算出した当該参照タンパク質の検出強度とイピリムマブの検出強度との比に基づいて補正した。補正された検量線に基づいて、イピリムマブの濃度を決定した。同じ方法で、参照タンパク質を用いて作成した検量線を、参照タンパク質の検出強度とペムブロリズマブの検出強度との比に基づいて補正し、ペムブロリズマブの濃度を決定した。

[0102] （用いられた参照タンパク質）

トラスツズマブ（*Tra*）、ブレンツキシマブ ベドチン（*Bre*）、セツキシマブ（*Cet*）、リツキシマブ（*Rit*）、インフリキシマブ（*Ifx*）、アテゾリズマブ（*Atz*）、ベバシズマブ（*Bev*）、ペムブロリズマブ（*Pem*）、エクリズマブ（*Ecu*）、メポリズマブ（*Mep*）、トシリズマブ（*Toc*）、アベルマブ（*Ave*）、デュルバルマブ（*Dyr*）、イピリムマブ（*Ipi*）、ニボルマブ（*Niv*）、ラムシルマブ（*Ram*）、アダリムマブ（*Ada*）、ゴリムマブ（*Gol*）、アバタセプト（*Abt*）及びエタネルセプト（*Et n*）。

[0103] また、定量値の再現性を確認するために、イピリムマブを用いて作成した検量線に基づいて、同じ臨床検体中のイピリムマブを定量した。イピリムマブの検量線は、希釈系列法（ヒト血清にイピリムマブを $1000\mu\text{g/mL}$ となるように添加し、これを二倍希釈系列により検量線サンプルとした）によって作成した。同じ方法で、ペムブロリズマブを用いて作成した検量線に基づいて、臨床検体中のペムブロリズマブを定量した。

[0104] 参照タンパク質の検量線に基づいて定量されたイピリムマブの濃度と、イピリムマブの検量線に基づいて定量されたイピリムマブの濃度とを比較した（図 1 2、1 4 A、1 4 B）。2つの方法で得られた数値をピアソンの積率相関分析すると、いずれの参照タンパク質においても R^2 の値が 0.99 以上であり、高い再現性を有することが示された（表 2）。

[0105] [表2]

Reference mAb	Goodness of fit r^2
Brenzuximab vedotin	0.998
Cetuximab	0.9993
Rituximab	0.9997
Infliximab	1
Atezolizumab	0.9999
Bevacizumab	0.9999
Pembrolizumab	1
Trastuzumab	1
Eculizumab	1
Mepolizumab	1
Tocilizumab	0.9995
Avelumab	0.9974
Durvalumab	0.9999
Nivolumab	1
Ramucirumab	0.9999
Adalimumab	1
Golimumab	0.999
Abatacept	1
Etanercept	1

[0106] 同様に、参照タンパク質の検量線に基づいて定量されたペムブロリズマブの濃度と、ペムブロリズマブの検量線に基づいて定量されたペムブロリズマブの濃度とを比較した（図 1 3、1 5 A、1 5 B）。2つの方法で得られた数値をピアソンの積率相関分析すると、いずれの参照タンパク質においても R^2 の値が 0.99 以上であり、高い再現性を有することが示された（表 3）。以上の結果から、参照タンパク質の検出強度と標的抗体の検出強度との比

を利用して、臨床検体に含まれる複数の標的抗体の濃度を、1つの参照タンパク質を基準にして求めることができることがわかった。

[0107] [表3]

Reference mAb	Goodness of fit r^2
Brenzuximab vedotin	1
Cetuximab	1
Rituximab	1
Infliximab	1
Atezolizumab	1
Bevacizumab	1
Trastuzumab	1
Eculizumab	1
Mepolizumab	0.9999
Tocilizumab	1
Avelumab	0.9991
Durvalumab	1
Ipilimumab	1
Nivolumab	1
Ramucirumab	1
Adalimumab	1
Golimumab	1
Abatacept	1
Etanercept	1

[0108] [態様]

上述した複数の例示的な実施形態および実施例は、以下の態様の具体例であることが当業者により理解される。

[0109] (第1項)

一形態に係る抗体を分析する方法は、
生体タンパク質および標的抗体をプロテアーゼで消化することと、
消化された前記生体タンパク質および前記標的抗体のペプチド断片を質量分析することと、
前記質量分析によって得られた前記生体タンパク質の検出強度と前記標的

抗体の検出強度との比に基づいて、前記標的抗体を定量することを含み、

前記プロテアーゼで消化することは、

担体の細孔内に前記生体タンパク質および前記標的抗体を固定することと、

前記細孔の径よりも大きい径を有し、前記プロテアーゼが表面に固定された微粒子と、前記担体と、を近接させることとを含み、

前記生体タンパク質は、前記細孔に固定可能なドメインを有する。

[0110] 第1項に記載の抗体を分析する方法によれば、測定対象である抗体の検量線を作成することなく、質量分析により抗体を定量することができる。

[0111] (第2項)

第1項に記載の抗体を分析する方法において、所定の濃度を有する前記生体タンパク質および所定の濃度を有する前記標的抗体を質量分析することと、

前記質量分析の結果に基づいて、前記生体タンパク質の検出強度と前記標的抗体と検出強度との比を予め決定することをさらに含む。

[0112] 生体タンパク質（例えば、参照抗体等）の検出強度と標的抗体と検出強度との比を予め決定しておけば、標的抗体の定量を簡便に行うことができる。

[0113] (第3項)

第1項または第2項に記載の抗体を分析する方法において、生体タンパク質は、参照抗体又はFc融合タンパク質を含む。

[0114] 参照抗体及びFc融合タンパク質は、汎用性が高く、入手が容易であるため、生体タンパク質として適している。

[0115] (第4項)

第3項に記載の抗体を分析する方法において、参照抗体は、モノクローナル抗体である。

[0116] モノクローナル抗体は、入手が容易であり、濃度およびアミノ酸配列の特定が容易であるため、参照抗体として適している。

[0117] (第5項)

第3項に記載の抗体を分析する方法において、参照抗体は、トラスツマブ、ベバシズマブ、セツキシマブ、リツキシマブ、ニボルマブ、ブレンツキシマブ、ペムブロリズマブ、イピリムマブ、モガムリズマブ、ラムシルマブ、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、アベルマブ、インフリキシマブ、トシリズマブ、アダリムマブ、ゴリムマブ、メボリズマブ、ウステキヌマブ、およびエクリズマブからなる群より選択される。

[0118] 上記の抗体は、汎用性が高く、入手が容易であるため、参照抗体として適している。

(第6項)

第3項に記載の抗体を分析する方法において、Fc融合タンパク質は、アバタセプト、アフリベルセプト及びエタネルセプトからなる群より選択される。

[0119] 上記のFc融合タンパク質は、汎用性が高く、入手が容易であるため、生体タンパク質として適している。

[0120] (第7項)

第1項～第6項のいずれかに記載の抗体を分析する方法において、標的抗体は、生体試料に含まれる抗体である。

[0121] 第7項に記載の抗体を分析する方法によれば、被検体から採取した生体試料に含まれる標的抗体を定量することができる。

[0122] (第8項)

第1項～第7項のいずれかに記載の抗体を分析する方法において、標的抗体は、少なくとも2種の抗体を含む。

[0123] 第8項に記載の抗体を分析する方法によれば、ひとつの生体タンパク質（例えば、参照抗体等）を基準にして、複数の標的抗体の定量が可能である。2種以上の抗体は、同時に定量できる。

[0124] (第9項)

第1項～第8項のいずれかに記載の抗体を分析する方法において、標的抗体は、生体内で産生された抗体を含む。

[0125] 第9項に記載の抗体を分析する方法によれば、検量線を作成することが難しい、生体内で産生された抗体であっても定量することができる。

[0126] (第10項)

一形態に係る抗体を分析する方法は、
生体タンパク質と、少なくとも2種の標的抗体を含む試料と、をプロテアーゼで消化することと、

消化された前記生体タンパク質および前記標的抗体のペプチド断片を質量分析することと、

前記質量分析によって得られた前記生体タンパク質の検出強度と前記標的抗体の検出強度との比に基づいて、前記標的抗体を定量することを含み、

前記生体タンパク質は、モノクローナル抗体である。

[0127] 第10項に記載の抗体を分析する方法によれば、測定対象である抗体を用いて検量線を作成することなく、質量分析により抗体を定量することができる。

[0128] (第11項)

一態様に係るキットは、

第1項～第10項のいずれかに記載の抗体を分析する方法に用いるキットであって、

前記生体タンパク質と、

前記プロテアーゼが表面に固定された微粒子と、

前記細孔が設けられた担体とを含む。

[0129] 第11項に記載のキットによれば、第1項の方法を簡便に行うことができる。

(第12項)

一態様に係るプログラムは、

第1項～第10項のいずれかに記載の抗体を分析する方法に用いるプログラムであって、

前記プログラムは、

質量分析装置から出力されるマススペクトルを受付け、
前記生体タンパク質の検出強度と前記標的抗体の検出強度との比を記憶部から読出し、
前記マススペクトルから算出される前記生体タンパク質の検出量を補正し、
前記標的抗体の量を算出する処理を処理装置に実行させる。

[0130] 第12項に記載のプログラムによれば、生体タンパク質の検出強度と標的抗体の検出強度との比に基づいて、標的抗体を定量する処理を簡便に行うことができる。

符号の説明

[0131] 10 微粒子、11 スペーサ、15 プロテアーゼ、20 担体、21 リンカー、25 抗体、29 細孔。

請求の範囲

- [請求項1] 生体タンパク質および標的抗体をプロテアーゼで消化することと、
消化された前記生体タンパク質および前記標的抗体のペプチド断片を質量分析することと、
前記質量分析によって得られた前記生体タンパク質の検出強度と前記標的抗体の検出強度との比に基づいて、前記標的抗体を定量することを含み、
前記プロテアーゼで消化することは、
担体の細孔内に前記生体タンパク質および前記標的抗体を固定することと、
前記細孔の径よりも大きい径を有し、前記プロテアーゼが表面に固定された微粒子と、前記担体と、を近接させることとを含み、
前記生体タンパク質は、前記細孔に固定可能なドメインを有する、抗体を分析する方法。
- [請求項2] 所定の濃度を有する前記生体タンパク質および所定の濃度を有する前記標的抗体を質量分析することと、
前記質量分析の結果に基づいて、前記生体タンパク質の検出強度と前記標的抗体と検出強度との比を予め決定することをさらに含む、請求項1に記載の抗体を分析する方法。
- [請求項3] 前記生体タンパク質は、参照抗体又はFc融合タンパク質を含む、請求項1又は請求項2に記載の抗体を分析する方法。
- [請求項4] 前記参照抗体は、モノクローナル抗体である、請求項3に記載の抗体を分析する方法。
- [請求項5] 前記参照抗体は、トラスツズマブ、ベバシズマブ、セツキシマブ、リツキシマブ、ニボルマブ、ブレンツキシマブ、ペムブロリズマブ、イピリムマブ、モガムリズマブ、ラムシルマブ、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、アベルマブ、インフリキシマブ、トシリズマブ、アダリマブ、ゴリマブ、メポリズマブ、ウスチキヌマブ、およびエク

リズマブからなる群より選択される、請求項3に記載の抗体を分析する方法。

[請求項6] 前記Fc融合タンパク質は、アバタセプト、アフリベルセプト及びエタネルセプトからなる群より選択される、請求項3に記載の抗体を分析する方法。

[請求項7] 前記標的抗体は、生体試料に含まれる抗体である、請求項1又は請求項2に記載の抗体を分析する方法。

[請求項8] 前記標的抗体は、少なくとも2種の抗体を含む、請求項1又は請求項2に記載の抗体を分析する方法。

[請求項9] 前記標的抗体は、生体内で産生された抗体を含む、請求項1又は請求項2に記載の抗体を分析する方法。

[請求項10] 生体タンパク質と、少なくとも2種の標的抗体を含む試料と、をプロテアーゼで消化することと、

消化された前記生体タンパク質および前記標的抗体のペプチド断片を質量分析することと、

前記質量分析によって得られた前記生体タンパク質の検出強度と前記標的抗体の検出強度との比に基づいて、前記標的抗体を定量することを含み、

前記生体タンパク質は、モノクローナル抗体である、
抗体を分析する方法。

[請求項11] 請求項1又は請求項2に記載の抗体を分析する方法に用いるキットであって、

前記生体タンパク質と、
前記プロテアーゼが表面に固定された微粒子と、
前記細孔が設けられた担体と
を含むキット。

[請求項12] 請求項1又は請求項2に記載の抗体を分析する方法に用いるプログラムであって、

前記プログラムは、

質量分析装置から出力されるマススペクトルを受付け、

前記生体タンパク質の検出強度と前記標的抗体の検出強度との比
を記憶部から読出し、

前記マススペクトルから算出される前記生体タンパク質の検出量
を補正し、

前記標的抗体の量を算出する処理を処理装置に実行させる、プロ
グラム。