

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016年9月15日(15.09.2016)



(10) 国際公開番号
WO 2016/143227 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 30/72 (2006.01) *G01N 30/06* (2006.01)
G01N 1/10 (2006.01) *C12N 11/02* (2006.01)
G01N 27/62 (2006.01) *C12Q 1/00* (2006.01)
G01N 30/00 (2006.01) *C12Q 1/37* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/085459
- (22) 国際出願日: 2015年12月18日(18.12.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-047729 2015年3月10日(10.03.2015) JP
- (71) 出願人: 株式会社島津製作所 (SHIMADZU CORPORATION) [JP/JP]; 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 嶋田 崇史 (SHIMADA Takashi); 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP). 岩本 典子 (IWAMOTO Noriko); 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕2丁目5番1号 愛宕グリーンヒルズMORIタワー32階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: KIT FOR PREPARING SAMPLE FOR DETECTING MONOCLONAL ANTIBODY

(54) 発明の名称: モノクローナル抗体の検出のためのサンプル調製用キット

(57) Abstract: The present invention provides a kit for preparing a sample for the provision of an extremely versatile analysis method that is not influenced by antibody diversity, difference between types, matrix, etc. Provided is a kit for preparing a sample for detecting a monoclonal antibody by means of high-speed liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), said kit including: a porous body for immobilizing the monoclonal antibody to be measured; nanoparticles in which a protease is immobilized; a reaction vessel for bringing the porous body and the nanoparticles into contact and selectively digesting the monoclonal antibody; a buffer solution that is introduced into the reaction vessel along with the nanoparticles and the porous body and serves to cause a digestion reaction of the protease; and a filtration membrane that serves to remove the porous body and the nanoparticles after the digestion reaction and extract the digestion reaction product along with the buffer solution.

(57) 要約: 抗体の多様性や、種間差、マトリックスなどの影響を受けない、極めて汎用性の高い分析手法を提供するための、サンプル調製用キットを提供する。高速液体クロマトグラフ質量分析 (LC-MS) によってモノクローナル抗体を検出するためのサンプル調製用キットであって、測定対象のモノクローナル抗体を固定化するための多孔質体と、プロテアーゼを固定化したナノ粒子と、前記多孔質体と前記ナノ粒子とを接触させてモノクローナル抗体を選択的に消化するための反応容器と、前記ナノ粒子及び多孔質体と共に前記反応容器内に導入され、前記プロテアーゼによる消化反応をさせるための緩衝液と、前記消化反応後に前記多孔質体および前記ナノ粒子を除去して、前記消化反応の生成物を前記緩衝液と共に抽出するためのろ過膜と、を含む、上記キットを提供する。

WO 2016/143227 A1

明 細 書

発明の名称：

モノクローナル抗体の検出のためのサンプル調製用キット

技術分野

[0001] 本発明は質量分析によってモノクローナル抗体を検出するためのサンプル調製用キットに関し、より具体的には、モノクローナル抗体の特異的配列を含むペプチド断片を選択的に消化し、より効率的な分析を可能とするためのキットに関する。

背景技術

[0002] 創薬領域における最大の課題は、副作用が少なく高い薬効を発揮する薬の開発である。そのために現在着目されているのが薬物動態、特に濃度モニタリング (therapeutic drug monitoring, TDM) である。処方した薬が適正量であるかどうか、病変部位に到達しているかどうかを指標にシーズのスクリーニングが行われることで、ドロップアウトする薬を早期に発見し、この情報を早期創薬開発や臨床試験で有効に利用することが出来るようになる。以前はオーダーメイド医療とも言われる個別化医療への期待があったが、現実的には医療技術や医薬品を個別化することは、一部富裕層を除けば医療経済の観点からも現実不可能といっても良い。そのため、入手できる医療機器や医薬品を、実際に治療効果のある患者へ届けるという試みに移行しつつあり、これを最適化医療と呼んでいる。医薬品開発における最適化医療への最大の試みがTDMを用いた創薬開発である。特にがんや自己免疫疾患等の分野では、昨今は分子標的薬と呼ばれる創薬が主流である。分子標的薬の効果的な薬効は、病変部位に蓄積し薬効を発揮しているかどうかを測定し、医師自身が判断できることが重要である。

[0003] 分子標的薬としては現在、病原タンパク質を標的抗原とする抗体医薬が注目されている。抗体は本来体内に存在するタンパク質であるため、副作用が低いことが予想され、分子標的効果を高めるために高濃度で投与することも

可能である。さらに、抗体医薬は複数の医薬品を用いたカクテル療法にも適し、劇的に奏功が得られる症例報告も出てきている。また、ドラッグデリバリー領域からのアプローチとして、抗体に低分子抗がん剤を結合した次世代抗体医薬（抗体医薬コンジュゲート）も登場している。更に、糖鎖改変によって薬効を増強した抗体や、免疫細胞を活性化することで抗がん効果をもたらす、いわゆる免疫チェックポイント抗体等も出てきており、抗体医薬のニーズは、今後ますます高まるものと予想される。

[0004] 抗体はその性質上、極めて高い分子特異性を示し、標的となる病変に蓄積されると言われてきたが、それをきちんと検証する技術は存在しなかった。また、抗体医薬そのものの薬価の問題もあり、適正使用による最適化医療というものが、患者にとっても医療経済的にも重要であると議論されるようになってきている。そのためには抗体医薬の局在や濃度を測定することで、最適な投薬量を設定することも重要である。さらには、投薬した薬の薬効指標をきちんと観察し薬理評価をするための、抗体医薬濃度の定量にも大きな需要がある。

[0005] 抗体等のタンパク質の定量のための最も一般的な技術はELISA（Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay）である。これは測定対象のタンパク質に対する抗体を作製し、さらに検出用抗体でサンドイッチすることで、簡便に測定対象分子を定量する技術である。ELISAは極めて汎用性の高い技術であり、また自動化支援環境も整っているため、今後も診断技術としてはゴールドスタンダードとなると予想される。

[0006] しかしながら、ELISAには、例えば、測定対象を直接測定していないため、異常値が出る可能性があること、また測定対象ごとに抗体を作製する必要があり、時間やコストがかかること、複数の解析対象を同時に測定できないことなど、多くの課題が存在する。特に抗体医薬に関しては、内在性抗体との交差反応も生じ、正確な測定が難しい。さらに、中和抗体と抗原が結合した状態では抗原認識部位がふさがれ、ELISAで測定出来ないことも多い。

[0007] また、動物試験フェーズで採用されたELISAの分析条件では、種間交差の問

題からそのまま大型動物やヒトには応用できないこともしばしばである。つまり、創薬開発段階とヒト臨床試験では、別々の測定条件で比較せざるを得ない。病変組織中の薬剤濃度のELISAでは、検出を阻害するマトリックス成分が異なるため、ELISAベースで薬物動態を行うためには、複数の抗体の作製が必要となってしまう。このことは、膨大なコストや後期開発におけるドロップアウトなど、非常に大きなリスクをはらんでいる。

[0008] 一方、質量分析を用いたタンパク質の定量および構造解析は、質量分析技術やデータ解析サーバ・ソフトウェアの発展と共に、飛躍的にその応用範囲を広げている。特に、質量分析を用いた絶対定量技術は、特異的抗体に依存しない方法として、認知度が高まっている。

[0009] 例えば、市販抗体のないタンパク質を定量する場合、従来はタンパク質を大量に精製する必要があったが、質量分析を用いることで、このステップが省略されるため、飛躍的に効率的となった。医学の分野でも、従来は病理切片の薄切方法、保存方法など医師の手技の誤差、施設間差などの問題で、免疫組織染色に差が出てしまい、陽性、偽陽性、陰性の判定が難しいことはしばしば起こり得た。これに対して病理切片中の目的病原タンパク質を質量分析で定量することで、高発現タンパク質であるかどうかの判定が可能である。さらに昨今では、レーザーマイクロダイセクションと呼ばれる、細胞一個を切り出してくる装置が汎用的に使える状況にある。例えば、がん細胞のみを回収し、その細胞内の病原タンパク質の発現変動解析を、質量分析で直接観察することが可能となる。これは特に病理や臨床の現場で極めて画期的な技術革新であり、分析技術の標準化などの整備が望まれている状況である。

[0010] 精度の高い分析技術である一方で、生物学的サンプル中のタンパク質を質量分析によって検出する場合には、測定対象のタンパク質をプロテアーゼ消化して断片化することが多いため、夾雑物を含む多様なペプチド断片から目的のペプチド断片を効率的に選択することが重要となってくる。

[0011] 特許文献1では、サンプル中の抗体の検出のために、ペプシンを用いて非免疫グロブリンタンパク質の分解と共に抗体を消化してF(ab')₂断片を産生さ

せた後に更にトリプシン消化を行うことが開示されている。また特許文献2は、質量分析に先立つ液体クロマトグラフィー段階で適切に分離されたペプチドのみを定量対象として選択するというものである。非特許文献1は抗ペプチド抗体を用いて測定対象ペプチドを濃縮するというものである。

[0012] また近年、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。非特許文献3では、ナイロン膜にトリプシンを固定化し、タンパク質のトリプシン消化を高効率化した例が報告されている。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。

[0013] 非特許文献4はサンプル中のモノクローナル抗体と内在性の抗体とを識別するためのハイスループット法を提案するものである。

[0014] パラフィン包埋された病理切片からのタンパク質回収は、アジレント、AMR、キアゲンなどからキットとして販売されている。また、病理切片からのがん細胞レーザーマイクロダイセクションによる回収、脱パラフィン処理、タンパク質抽出および消化を経て、質量分析による病変タンパク質の定量と臨床相関について発表されている。

先行技術文献

特許文献

[0015] 特許文献1：特表2010-515020号

特許文献2：特開2012-197258号

非特許文献

[0016] 非特許文献1：N. Leigh Anderson等, Mass Spectrometric Quantitation of Peptides and Proteins Using Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies (SISCAPA), Journal of Proteome Research, 2004,

3(2), 235

非特許文献2: Qianhao Min等, Size-selective proteolysis on mesoporous silica-based trypsin nanoreactor for low-MW proteome analysis, Chemical Communications, 2010, 46, 6144

非特許文献3: Fei Xu等, Facile Trypsin Immobilization in Polymeric Membranes for Rapid, Efficient Protein Digestion, Analytical Chemistry, Analytical Chemistry, 2010, 82, 10045

非特許文献4: Xiaotao Duan等, High-Throughput Method Development for Sensitive, Accurate, and Reproducible Quantification of Therapeutic Monoclonal Antibodies in Tissues Using Orthogonal Array Optimization and Nano Liquid Chromatography/Selected Reaction Monitoring Mass Spectrometry, Analytical Chemistry, 2012, 84, 4373

非特許文献5: N. Iwamoto等, 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, 139, 576

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0017] 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、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求められる。従って、抗体の場合には、Fabドメイン、特にFabドメインの可変領域を位置選択的に消化し、一方Fcドメインの消化を抑制する必要がある。

[0018] 本発明者等は、基質となる抗体とプロテアーゼ酵素の両方を固相に固定化することによって、モノクローナル抗体の位置選択的なプロテアーゼ消化を実現することができた (N. Iwamoto等, Selective detection of complementarity determining regions of monoclonal antibody by limiting protease access to the substrate: nano-surface and molecular-orientation limi

ted proteolysis, Analyst, 2014, 139, 576) (非特許文献5)。この方法は、測定対象のモノクローナル抗体を細孔内に固定化した多孔質体と、プロテアーゼを固定化したナノ粒子とを液体中で接触させてモノクローナル抗体の選択的プロテアーゼ消化を行い、得られたペプチド断片を液体クロマトグラフ質量分析(LC-MS)によって検出するものである。プロテアーゼとしてはトリプシンとリジルエンドペプチダーゼ(Lys-C)を9:1の比率で使用する二重消化が最も効率的であると報告した。

[0019] 上記の方法は、固相-固相反応を用いてモノクローナル抗体の選択的なプロテアーゼ消化を行う画期的な方法であるが、実際に使用するためには更に検討する余地を残している。

[0020] 本発明の課題は、抗体の多様性や、種間差、マトリックスなどの影響を受けない、極めて汎用性の高い分析手法を提供するための、サンプル調製用キットを提供することである。

課題を解決するための手段

[0021] 本発明者等は上記課題を念頭に鋭意検討した結果、測定者の技能に依存せず高精度かつ簡便な分析を可能とするために、質量分析によって検出するペプチドの調製のための条件を種々検討し、最適条件を満たすキットを提供することを検討し、本発明を完成させるに至った。

[0022] すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

[0023] (1) 高速液体クロマトグラフ質量分析(LC-MS)によってモノクローナル抗体を検出するためのサンプル調製用キットであって、

測定対象のモノクローナル抗体を固定化するための多孔質体と、

プロテアーゼを固定化したナノ粒子と、

前記多孔質体と前記ナノ粒子とを接触させてモノクローナル抗体を選択的に消化するための反応容器と、

前記ナノ粒子及び多孔質体と共に前記反応容器内に導入され、前記プロテアーゼによる消化反応をさせるための緩衝液と、

前記消化反応後に前記多孔質体および前記ナノ粒子を除去して、前記消

化反応の生成物を前記緩衝液と共に抽出するためのろ過膜と、
を含む、上記キット。

(2) 前記ろ過膜が、圧力又は遠心力を加えない条件下では前記緩衝液及び前記プロテアーゼによる消化反応によって生成するペプチドをほとんど透過せず、圧力又は遠心力を加えた条件下では前記緩衝液及び前記ペプチドを透過することができるものである、(1)記載のキット。

(3) 前記ろ過膜がポリフッ化ビニリデン (PVDF) 製の膜である、(1) または (2) 記載のキット。

(4) 前記キットが多検体を同時に処理するためのキットであり、前記ろ過膜のハウジング素材がポリアクリロニトリル樹脂である、(1) ~ (3) のいずれか記載のキット。

(5) (1) ~ (4) のいずれか記載のキットに、更にモノクローナル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む、高速液体クロマトグラフ質量分析 (LC-MS) によるモノクローナル抗体検出のためのキット。

(6) 測定対象となるモノクローナル抗体に特異的なアミノ酸配列を含む1以上の内部標準ペプチドを更に含む、(1) ~ (5) のいずれか記載のキット。

(7) 測定対象がトラスツズマブ、トラスツズマブ-DM1、ベバシズマブ、またはリツキシマブであって、内部標準ペプチドが配列番号1~47のいずれか1以上のアミノ酸配列を有するペプチドである、(6) 記載のキット。

(8) 測定対象のモノクローナル抗体を細孔内に固定化した多孔質体と、プロテアーゼを固定化したナノ粒子とを液体中で接触させてモノクローナル抗体の選択的プロテアーゼ消化を行い、得られたペプチド断片を高速液体クロマトグラフ質量分析 (LC-MS) によって分析することによって前記モノクローナル抗体の検出を行う方法に使用するための、前記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であって、前記データが、前記モノクローナル抗体のプロテアーゼ消化によって得られるペプチドの1以上に対して、少なくとも親イオン、フラグメントイオン、予想

保持時間、三連四重極のそれぞれにおける電圧のデータを含む、上記記録媒体。

(9) (8) 記載の記録媒体と、前記記録媒体の使用説明書とを含む、高速液体クロマトグラフ質量分析 (LC-MS) によるモノクローナル抗体の検出のためのメソッドパッケージ。

(10) 前記モノクローナル抗体が、トラスツズマブ、トラスツズマブ-DM1、ベバシズマブ、リツキシマブの1種以上である、(8) 記載の記録媒体または(9) 記載のメソッドパッケージ。

(11) 前記データが、配列番号1~47のいずれか1以上のアミノ酸配列を有するペプチドに対するものである、(8) 記載の記録媒体または(9) 記載のメソッドパッケージ。

[0024] 本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2015-047729号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0025] 本発明のキットは、液体クロマトグラフ質量分析計 (特に三連四重極型) の前処理用として使用する。本発明を実施するために使用可能な質量分析装置としては、例えばLCMS-8030、LCMS-8040、LCMS-8050、及びLCMS-8080 (いずれも島津製作所社製) が挙げられる。また、本発明のキットを使用して前処理したサンプルの解析のために、LCMS-IT-TOF、LCMS-Q-TOF (島津製作所社製) を使用することもできる。

図面の簡単な説明

[0026] [図1]本発明のキットを用いて抗体を消化する方法の原理を示す。

[図2-1]トラスツズマブ消化断片の検出のために用いるろ過膜素材の検討の結果を示す。ペプチド回収率を検証するため、ポリテトラフルオロエチレン (polytetrafluoroethylene、PTFE)、およびポリフッ化ビニリデン (polyVinylidene difluoride、PVDF) を比較した。(A)トラスツズマブ 100.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、(B)トラスツズマブ 33.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[図2-2]トラスツズマブ消化断片の検出のために用いるろ過膜素材の検討の結果を示す。

果を示す。ペプチド回収率を検証するため、ポリテトラフルオロエチレン、およびポリフッ化ビニリデンを比較した。(C)トラスツズマブ 11.1 $\mu\text{g/ml}$ 、(D)トラスツズマブ 3.7 $\mu\text{g/ml}$ 。

[図2-3]トラスツズマブ消化断片の検出のために用いるろ過膜素材の検討の結果を示す。ペプチド回収率を検証するため、ポリテトラフルオロエチレン、およびポリフッ化ビニリデンを比較した。(E)トラスツズマブ 1.2 $\mu\text{g/ml}$ 、(F)トラスツズマブ 0.4 $\mu\text{g/ml}$ 。

[図3-1]ベバシズマブ消化断片の検出のために用いるためのろ過膜素材の検討の結果を示す。ペプチド回収率を検証するため、ポリテトラフルオロエチレン、およびポリフッ化ビニリデンを比較した。(A)ベバシズマブ 100.0 $\mu\text{g/ml}$ 、(B)ベバシズマブ 33.3 $\mu\text{g/ml}$ 。

[図3-2]ベバシズマブ消化断片の検出のために用いるためのろ過膜素材の検討の結果を示す。ペプチド回収率を検証するため、ポリテトラフルオロエチレン、およびポリフッ化ビニリデンを比較した。(C)ベバシズマブ 11.1 $\mu\text{g/ml}$ 、(D)ベバシズマブ 3.7 $\mu\text{g/ml}$ 。

[図3-3]ベバシズマブ消化断片の検出のために用いるためのろ過膜素材の検討の結果を示す。ペプチド回収率を検証するため、ポリテトラフルオロエチレン、およびポリフッ化ビニリデンを比較した。(E)ベバシズマブ 1.2 $\mu\text{g/ml}$ 、(F)ベバシズマブ 0.4 $\mu\text{g/ml}$ 。

[図4-1]多検体の検出のために用いるろ過膜プレートのペプチド回収率を検証するため、2つの膜素材 (PTFE、PVDF) およびハウジング3種を比較した結果を示す。ペプチドとして(A)FTISADTSK(配列番号3)、(B)ASQDVNTAVAWYQQKPGK(配列番号47)をそれぞれ用いた。

[図4-2]多検体の検出のために用いるろ過膜プレートのペプチド回収率を検証するため、2つの膜素材 (PTFE、PVDF) およびハウジング3種を比較した結果を示す。ペプチドとして(C)GLEWVAR(配列番号6)、(D)DTYIHWVR(配列番号5)をそれぞれ用いた。

[図5]本発明の方法に用いるナノ粒子の経時的安定性を示す。(A)トリプシン

基質の切断により増加するp-ニトロアニリンの吸光度。縦軸：405nmにおける吸光度、横軸：反応時間（分）、(B)酵素活性。

[図6]本発明の方法に用いるナノ粒子の経時的安定性を示す。(A)-20℃保存の場合、(B)4℃保存の場合をそれぞれ示す。

発明を実施するための形態

[0027] 本発明は、高速液体クロマトグラフ質量分析（LC-MS）によってモノクローナル抗体を検出するためのサンプル調製用キットであって、

測定対象のモノクローナル抗体を固定化するための多孔質体と、

プロテアーゼを固定化したナノ粒子と、

前記多孔質体と前記ナノ粒子とを接触させてモノクローナル抗体を選択的に消化するための反応容器と、

前記ナノ粒子及び多孔質体と共に前記反応容器内に導入され、前記プロテアーゼによる消化反応をさせるための緩衝液と、

前記消化反応後に前記多孔質体および前記ナノ粒子を除去して、前記消化反応の生成物を前記緩衝液と共に抽出するためのろ過膜と、
を含む、上記キットに関する。

[0028] 本発明のキットを用いてモノクローナル抗体を消化する方法の原理を図1に示す。以下、本発明を、上記の方法と関連付けて具体的に説明する。

[0029] <質量分析の概要>

質量分析を用いた定量技術は、近年では主に三連四重極と呼ばれるハイブリッド型質量分析装置によって行われる。具体的には、イオン化された生体分子はまず、オクトポールと呼ばれる部分を通過することで、そのイオン分子振動半径を小さくする。次に第1四重極の中で、特定の質量数を持つイオンを共振させることで選択し、他のイオンを排除する。このステップはシングルイオンモニタリング（single ion monitoring, SIM）とも呼ばれる。

[0030] 選択されたイオンは第2四重極に運ばれ、アルゴンと衝突することで開裂が行われる。この反応は衝突誘起解離（collision-induced dissociation, CID）という。この開裂反応の結果、生成した特異的な断片を第3四重極で選

択することで、非常に高感度で、かつ高選択的な定量が可能となる。この一連の分析を多重反応モニタリング (multiple reaction monitoring, MRM) と呼ぶ。

- [0031] 質量分析を用いた生体試料の定量は、生体分子の構造特異的なイオンを指標に定量できるという最大の利点があり、これを高速液体クロマトグラフに連結することで、連続的解析を可能とすることができる。現存する分析機器の中で、ほぼ唯一といって良い利点を持つ技術である。
- [0032] 質量分析により抗体を検出するためには、まず血液や組織などの生体試料より抗体を抽出し、適切な溶媒に溶解することが必要である。また、抗体はそのまま分析するには分子が大きいため、プロテアーゼによりペプチドに分解し、その後液体クロマトグラフで分離した後に質量分析を行う。分析に適したペプチドの分子量は約1000~3000 Da程度である。
- [0033] しかしながら、一般的なタンパク質分子をプロテアーゼ分解すると、ペプチド断片が約100本程度、抗体の場合には200本を遙かに超えるペプチド断片が生成する。従って、単一のタンパク質だけでも測定対象数は膨大になり、複雑な生体試料を対象にした場合には、巨大なサンプルセットとなる。
- [0034] また、抗体分子では、CDR領域等のごく一部の配列のみが異なり、残りの部分は共通配列であるため、上記の巨大で複雑なサンプルから、目的の特異的配列のみを分析、定量するためには、質量分析ステップの前に高分離能及び再現性のよい液体クロマトグラフが必須となる。現在は、超高速・高圧クロマトグラフ機器があり、それに対応した、粒径が均一で非常に細かいカラム樹脂なども開発されており、このような高速、高分離、耐高圧カラムを用いることで、飛躍的に分離能向上が図れるようになってきている。しかしながら、プロテオミクスなど、タンパク質セットを対象とする研究分野においてはまだまだ十分とは言えない現状がある。
- [0035] また、高精度な質量分析による解析における課題として、「マトリックス効果」というものがある。マトリックス効果とは、同じ液滴内にイオン化阻害物質が存在すること、もしくは同時に多種のイオンが存在することで、目

的物質のイオン化効率が低減してしまう現象である。イオン化に与えられるエネルギーは等しいので、イオン化対象物質が増えると、必然的にエネルギーが分散し、イオン量が減少してしまう。

[0036] 解析対象ペプチドの本数が増えると、カラム分離で完全に分離することは困難である。よって、マトリックス効果によるイオン化効率の低下、結果的には感度や定量再現性の低下を引き起こす要因となる。これを改善するために質量分析側で、高速チャンネル切り替え機能などを作り、改善を図っているが、根本的には母集団の低減をしない限りは、このマトリックス効果を克服することは出来ない。

[0037] 上記のような種々の問題点を考慮し、本発明は、測定対象の特異性を維持しながら、解析対象の母集団を減らすことを意図するものである。

[0038] <抗体>

本発明のキットを用いてLC-MSによる検出のためのサンプルを調製する測定対象はモノクローナル抗体である。モノクローナル抗体は、2本の重鎖（分子量50 kDa）と2本の軽鎖（分子量25 kDa）がジスルフィド結合でつながった構造を有する生体高分子である。FabドメインとFcドメインがヒンジを介してつながっており、また重鎖及び軽鎖はそれぞれ定常領域と可変領域から成る。定常領域は、抗体の特徴的なY字型の形を保つ構造（フレームワーク構造）を有し、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している。一方、可変領域には、相補性決定領域（complementarity-determining region, CDR）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CDR（CDR1、CDR2、CDR3）領域が規定する立体構造が抗原との特異的結合に関わっており、それによって抗体-抗原複合体が形成される。

[0039] 抗体の高次構造でさらに特徴的なものは、リジッドな構造を持つ定常領域に対し、非常にフレキシブルなヒンジ、及び可変領域である。重鎖のC末端にはProtein AやProtein Gと呼ばれる特定のタンパク質が結合する部位が存在することが分かっている。

[0040] 近年では、種々の疾患に対して特異的に作用し得る抗体医薬として、数多

くのモノクローナル抗体が開発されている。測定対象となり得るモノクローナル抗体としては、限定するものではないが、例えばパニツムマブ、オファツムマブ、ゴリムマブ、イピリムマブ等のヒト抗体；トシリズマブ、トラスツズマブ、トラスツズマブ-DM1、ベバシズマブ、オマリズマブ、メポリズマブ、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、モガムリズマブ、エクリズマブ等のヒト化抗体；リツキシマブ、セツキシマブ、インフリキシマブ、バシリキシマブ等のキメラ抗体等が挙げられる。尚、モノクローナル抗体の分子径は約14.5nmである。

[0041] また、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Fc融合タンパク質、抗体-薬物複合体（例えばゲムツズマブ・オゾガマイシン、トラスツズマブ-エムタンシン等）も本発明の方法における測定対象のモノクローナル抗体に含めるものとする。この場合、測定に先立って複合体の結合を解離させて抗体のみをLC-MSに供しても良く、あるいは複合体の形態のままLC-MSに供することもできる。当業者であれば、本明細書の記載に基づいて、測定対象に応じて本発明の方法のための最適な条件を設定することができる。

[0042] 本発明のキットは、モノクローナル抗体のFabドメインを位置選択的にプロテアーゼ消化し、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うために用いるものである。

[0043] <多孔質体>

本発明のキットに含まれる多孔質体は、多数の細孔を有するものであれば、その材料は特に限定されず、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、抗体を部位特異的に結合可能なものが特に好ましい。

[0044] 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。多孔質体の細孔の大きさは特に限定されず、抗体を固定化した際に、細孔の表層付近に選択的に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。多孔質体の平均細孔径D2は、10nm～200nm程度の範囲で、かつナノ粒子の平均粒径D1よりも小さい範囲で適宜に設定される。多孔質体の平均細孔径D2は、例えば、20nm～200nm程度が好ましく、30nm～150nm程度がより好ましい。抗体の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、特に約100nmがさらに好ましい。

[0045] 本発明に係る方法は、測定対象のモノクローナル抗体を多孔質体の細孔内に固定化する。細孔内に抗体を固定化し、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、抗体は変性を起こしやすく、分子の揺らぎが摂動を受け、プロテアーゼの攻撃を受ける確率が向上する。また、本発明では、後述するようにプロテアーゼがナノ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。

[0046] 本発明においては、多孔質体の細孔内に、抗体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たものが好ましく用いられる。抗体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] リンカー分子としては、抗体のFcドメインと部位特異的に結合するProtein AやProtein G等が好ましく用いられる。細孔内にこれらのリンカー分子が固定化された多孔質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ドメインが細孔の表層付近に位置する。このように、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。

[0048] リンカー分子の大きさは、抗体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。リンカー分子と抗体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、多孔質体にリンカー分子が固定されておらず、細孔内に抗体を直接結合させる場合は、抗体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。

[0049] 本発明において好適に使用可能な多孔質体として、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、TSKgel（TOSOH社製）等が挙げられる。例えばProtein G Ultralink樹脂では、樹脂に結合したProtein Gの95%は細孔内にあることがわかっている。

[0050] <多孔質体への抗体の固定化>

抗体を多孔質体の細孔内に固定化する方法は特に限定されず、抗体と多孔質体あるいは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。

[0051] 多孔質体と抗体の量比は、目的に応じて適宜に設定できる。例えば、抗体の定量分析を行う場合、試料中の抗体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、試料中の抗体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。

[0052] <ナノ粒子>

本発明のキットに含まれるナノ粒子は、その表面にプロテアーゼを固定化して、多孔質体の細孔内に固定化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、ナノ粒子は、多孔質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 D_1 が、多孔質体の平均細孔径 D_2 よりも大きいものとする（図1）。

[0053] ナノ粒子の形状は特に限定されないが、多孔質体の細孔へのプロテアーゼのアクセスの均一化の観点から、球状のナノ粒子が好ましい。また、ナノ粒

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。

[0054] ナノ粒子の平均粒径D1は、50nm～500nmの範囲であり、多孔質体の平均細孔径D2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、例えば約2倍が特に好ましい。例えば多孔質体の平均細孔径が30～150nm程度の場合、ナノ粒子の平均粒径D1は100nm以上が好ましく、150nm以上がより好ましい。多孔質体の平均細孔径が50nm～100nm程度の場合、ナノ粒子の平均粒径は、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。ナノ粒子の平均粒径D1の上限は、プロテアーゼによる消化効率を高める観点から500nm以下が好ましく、300nm以下がさらに好ましい。

[0055] ナノ粒子は、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。

[0056] ナノ粒子の種類としては、水性媒体に分散又は懸濁することができ、分散液又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。また、凝集が起こりにくいという点において、その表面が有機ポリマーで被覆された磁気ナノ粒子がより好ましい。磁気ナノ粒子の基材としては、酸化鉄（マグネタイト (Fe_3O_4)、マグヘマイト ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)）、フェライト ($(\text{Fe}/\text{M})_3\text{O}_4$)などの強磁性合金が挙げられる。フェライト ($(\text{Fe}/\text{M})_3\text{O}_4$)において、Mは、鉄イオンと共に用いて磁性金属酸化物を形成することのできる金属イオンを意味し、典型的には Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} などが用いられる。また、磁気ナノ粒子を被覆する有機ポリマーとしては、ポリグリシジルメタクリレート（ポリGMA）、GMAとスチレンのコポリマー、ポリメタクリル酸メチル(PMMA)、ポリアクリル酸メチル(PMA)などを挙げることができる。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、Adembeads、nanomagなどが挙げられる。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200nmのポリマー磁性ナノ粒子）が好適に用いられる。

[0057] 上記ナノ粒子は、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分子で修飾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、ナノ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、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。

[0058] 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。ナノ粒子表面に固定化された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、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い。

[0059] 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、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分子が好ましい。また、スペーサ分子のうち、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及びその誘導体、ポリプロピレングリコール及びその誘導体、ポリアクリルアミド及びその誘導体、ポリエチレンイミン及びその誘導体、ポリ（エチレンオキシド）及びその誘導体、ポリ（エチレンテレフタル酸）及びその誘導体などの親水性分子が用いられる。

[0060] このようなスペーサ分子で表面修飾されたナノ粒子もまた市販されており

、それらを利用すればよい。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）を有するスペーサ分子で修飾されたナノ粒子は、商品名「FG beads NHS」（多摩川精機株式会社）として市販されている。FG beads NHSの粒子径は約200nm±20nmであり、ナノ粒子として非常に均質のものである。

[0061] 本発明のキットは、上記のナノ粒子にプロテアーゼを固定化させたものを含むのが良い。しかしながら、ナノ粒子とプロテアーゼとを別個に提供し、使用前に固定化する態様を企図することもできる。

[0062] <プロテアーゼ>

本発明に係る方法は、プロテアーゼが、多孔質体の細孔内に固定化された抗体を特定のアミノ酸配列部位で切断してペプチド断片を生じさせるものである。

[0063] プロテアーゼは、単独で、あるいはナノ粒子の表面に固定化された状態でキットに含めることができる。

[0064] 本発明においてナノ粒子に固定化させるプロテアーゼの種類は、質量分析による定量又は同定の対象となるタンパク質の種類に応じて適宜選択すればよく、限定はされないが、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などが挙げられる。プロテアーゼは2種以上を組み合わせることもできる。

[0065] 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。トリプシンは基質特異性が高く、また切断後のペプチドのC末端にLys又はArgがあるためにペプチドの電荷量及び電荷局在を均質にすることができ、質量分析のための試料の作製のために特に好適である。またトリプシンは分子径が小さく（約3.8nm）、かつ活性部位が分子の内部に存在している。そのため、活性部位が抗体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。

[0066] プロテアーゼ消化後の抗体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、自己消化活性が高かったり、キモトリプシン様の活性を示すトリプシンが含まれているため、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基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。

[0067] 本発明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 TPCK-treated（Sigma Aldrich社製）が挙げられる。

[0068] <ナノ粒子へのプロテアーゼの固定化>

プロテアーゼをナノ粒子の表面に固定化する方法は特に限定されず、プロテアーゼとナノ粒子（あるいはナノ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、例えば、プロテアーゼをスペーサ修飾されたナノ粒子表面に固定化する場合は、ナノ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、ナノ粒子表面にプロテアーゼを固定化できる。上記のスペーサ分子の官能基を介したナノ粒子とプロテアーゼのアミンカップリング法が好ましい。例えば、ナノ粒子に表面修飾したカルボキシル基をN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）でエステル化して活性化エステル基とし、これに、プロテアーゼのアミノ基を結合させることができる。このカップリング反応には、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDAC)、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、ビス(2,6-ジイソプロピルフェニル)カルボジイミド(DIPC)等のカルボジイミドを縮合剤の存在下に行うことができる。また、ナノ粒子に表面修飾したアミノ基に、グルタルアルデヒド、2官能性スクシンイミド、ビス(スルホスクシンイミジル)スベレート(BS3)、スルホニルクロリド、マレイミド、ピリジルジスルフィド等の架橋剤を用いてプロテアーゼのアミノ基を結合させてもよい。

[0069] スペーサ分子の官能基を介したナノ粒子とプロテアーゼのカップリング法は、ナノ粒子の懸濁液にプロテアーゼ溶液を添加し、一定の条件下で混合攪拌するという簡便な操作で行うことができる。

[0070] ナノ粒子表面にプロテアーゼを固定化後に、ナノ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、ナノ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ナノ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、未結合のスペーサ分子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、一級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せることができる。

[0071] <プロテアーゼ消化>

抗体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ナノ粒子とを液体中で接触させることにより、抗体がプロテアーゼ消化され、ペプチド断片が産生される。ここで、「液体」とは、基質（固相）及び酵素（固相）が液相中で接触することを意味するものであり、またプロテアーゼ消化反応に適した水性媒体を意図する。

[0072] 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、1時間～20時間程度インキュベートすることが好ましい。

[0073] 抗体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ナノ粒子との混合量比も特に制限されず、抗体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、多孔質体とナノ粒子との組み合わせにより、抗体とプロテア

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、抗体：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。

[0074] 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プロテアーゼ消化が行われる。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、位置選択的に目的のペプチド断片が得られる。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。

[0075] より具体的には、例えば細孔径100nmのProtein G樹脂上に抗体のC末端側を固定化し、抗体の可変領域は必ず溶液側に配向するようにする。次に、粒子径200nmのナノ粒子表面にプロテアーゼを固定化する。プロテアーゼの抗体への接触を制限することで、可変領域選択的な抗体分解反応を行う反応場を形成することが可能となる。また相対表面積の非常に大きなナノ粒子表面をプロテアーゼ反応場として用いることで、抗原との接触確率を向上させることが可能となる。

[0076] プロテアーゼ消化は、特に限定するものではないが、緩やかな回転による攪拌とともに定期的なタッピングを伴うタッピングローテーション下で行うことができる。「緩やかな回転」は、例えば3～10rpm程度の回転数を指し、また、「タッピング」は、弾くような、若しくは、ショックを与えるような瞬間動作（頻度：例えば、1分間あたり1～5回、好ましくは2～4回）を指す。これによって、抗体を固定化した多孔質体とプロテアーゼを固定化したナノ粒子が共に分散状態を保持しながら効果的に接触し、プロテアーゼ消化反応効率を高めることができる。

[0077] <多孔質体及びナノ粒子の除去>

プロテアーゼ消化によって得られた目的のペプチド断片を質量分析に供するためには、多孔質体及びナノ粒子を除去することが必要である。これは、プロテアーゼ消化後のサンプルに対してろ過、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。

[0078] ろ過によって多孔質体及びナノ粒子を除去する場合、使用するろ過膜の孔径は、上記の多孔質体及びナノ粒子が通過できず、かつ消化されたペプチドの通過を可能とする範囲で選択される。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 $0.2\mu\text{m}$ 、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 $0.2\mu\text{m}$ 、ミリポア社製) 等を用いてろ過することにより、多孔質体及びナノ粒子を簡便に除去することができる。ろ過は、遠心ろ過とすると迅速かつ簡便なるろ過が可能である。

[0079] ろ過膜は、限定するものではないが、遠心ろ過を可能とする二重構造のフィルターチューブ形態のものを好適に使用することができる。例えば一サンプルの調製のためには $0.2\mu\text{m}$ の濾過膜スピンフィルター、例えばミリポア ウルトラフリー-PVDF、 $0.2\mu\text{m}$ やミリポア UFC30LG00 ウルトラフリー-C3LCR、 $0.2\mu\text{m}$ を使用することが好適である。また、複数のサンプルを同時に調製するためには $0.2\mu\text{m}$ のろ過膜プレート、例えばミリポア マルチスクリーンP VDF、Barex、 $0.2\mu\text{m}$ を好適に使用することができる。

[0080] これらのチューブ形態のろ過膜を使用する場合、チューブをプロテアーゼ消化反応のための反応容器として使用することができる。この場合、プロテアーゼを固定化したナノ粒子と抗体を固定化した多孔質体とを反応のための媒体 (緩衝液を含む) をチューブ内に入れてプロテアーゼ消化を行うことができる。あるいはまた、サンプル中の抗体の多孔質体への固定化をチューブ内で行い、洗浄操作を行った後に、プロテアーゼを固定化したナノ粒子を添加することもできる。当業者であれば、本発明のキットを用いたプロテアーゼ消化反応、多孔質体及びナノ粒子の除去等の一連の操作手順を適宜改変することができる。

[0081] <液体クロマトグラフ質量分析 (LC-MS) >

上記で得られたペプチド断片を含む試料を、LC-MSにより分析することで、抗体の同定や定量を行い得る。

- [0082] 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) により、分離・濃縮する。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良い。LCとタンデム質量分析を組み合わせたLC/MS/MSやLC/MSn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。
- [0083] 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。本発明では、抗体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。
- [0084] 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MS3以上の多段階質量分析を行うこともできる。
- [0085] 本発明の方法の使用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、及びLCMS-8080 (いずれも島津製作所)、LCMS-IT-TOF、LCMS-Q-TOF (島津製作所) を挙げるができる。

[0086] 質量分析結果に基づいて、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もできる。本発明では、抗体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、抗体を同定することもできる。抗体に特異的なアミノ酸配列、例えばCDR2領域のアミノ酸を含むアミノ酸配列を有するペプチド断片が検出できれば、目的の抗体を同定・定量することができる。

[0087] なお、検出結果に基づいて、抗体の同定や定量を行う場合、検出対象のペプチドは、アミノ酸残基数が5～30程度のものが好ましく、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。

[0088] 抗体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、親イオンの開裂により得られたフラグメントイオン）のピーク面積やピーク強度に基づいて、抗体の量を算出できる。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に由来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、抗体の量や濃度が算出される。

[0089] <本発明のサンプル調製用キット>

本発明は、上記した高速液体クロマトグラフ質量分析（LC-MS）によってモノクローナル抗体を検出する方法において使用するためのサンプル調製用キットであって、

測定対象のモノクローナル抗体を固定化するための多孔質体と、

プロテアーゼを固定化したナノ粒子と、

前記多孔質体と前記ナノ粒子とを接触させてモノクローナル抗体を選択

的に消化するための反応容器と、

前記ナノ粒子及び多孔質体と共に前記反応容器内に導入され、前記プロテアーゼによる消化反応をさせるための緩衝液と、

前記消化反応後に前記多孔質体および前記ナノ粒子を除去して、前記消化反応の生成物を前記緩衝液と共に抽出するためのろ過膜と、
を含む、上記キットに関する。

[0090] 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、適切なサンプル調製と適正な分析条件の設定が非常に重要である。例えば臨床の場においてより簡便に正確な検査結果が得られるようにするために、本発明は、上記の方法を実施するために利用できるサンプル調製用キットを提供する。

[0091] 本発明のキットに含まれる多孔質体及びナノ粒子は、上記した通りである。反応容器としては、多孔質体に固定化されたモノクローナル抗体と、ナノ粒子に固定化されたプロテアーゼとを液相中で接触させることが可能な容器であればいずれでも良く、特に限定するものではないが、質量分析で検出するサンプル調製用であることを考慮すれば、マイクロチューブやプレートとすることが好ましい。反応のために行うボルテックス又はローテーターによる混合、反応後のペプチドと多孔質体及びナノ粒子との分離のためのろ過等の反応工程を考慮して、当業者であれば適切な反応容器を想定することができる。

[0092] 本発明のキットに含まれる緩衝液は、前記ナノ粒子及び多孔質体と共に前記反応容器内に導入され、前記プロテアーゼによる消化反応をさせるためのものであって、プロテアーゼ消化のために適した反応条件を提供するものである。反応条件は、選択されるプロテアーゼ等によって、適宜決定することができ、緩衝液の組成も適宜決定することができる。

[0093] 本発明のキットはまた、プロテアーゼ消化反応後に前記多孔質体および前記ナノ粒子を除去して、消化反応の生成物を前記緩衝液と共に抽出するためのろ過膜を含む。プロテアーゼ消化によって得られた目的のペプチド断片を質量分析に供するためには、多孔質体及びナノ粒子を除去することが必要で

ある。

- [0094] また、本発明のキットにおけるろ過膜は、圧力又は遠心力を加えない条件下では緩衝液及びプロテアーゼ消化によって生成するペプチドをほとんど透過せずに「反応容器の底」として機能し、かつ遠心分離等の操作の際には緩衝液及びペプチドを透過することができる「ザル」として機能するものであることが好ましい。
- [0095] ろ過膜が緩衝液及びペプチドを透過することができるために加える遠心分離条件としては、限定するものではないが、例えば3,000~10,000gの範囲が好ましい。
- [0096] 本発明のキットにおいて好適に使用可能なろ過膜としては、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) を挙げることができる。
- [0097] キットが多検体を同時に処理するためのキットである場合、例えばろ過膜がPVDF製であり、ハウジング素材がポリアクリロニトリル樹脂、例えばBarex (登録商標) (三井化学ファイン株式会社製) であるものを使用することができる。
- [0098] 本発明のキットにはまた、キットの使用法、及び／又はモノクローナル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めることができる。
- [0099] 本発明のキットはまた、1以上の内部標準ペプチドを含めることができる。内部標準ペプチドは、検体と同時に、又は別個に、同じ条件で分析することで、より確実な分析結果を提供する。内部標準ペプチドは、測定対象のモノクローナル抗体の特異的アミノ酸配列を含み、本発明のキットに含まれるプロテアーゼによる消化によって生じるペプチドとする。
- [0100] 例えば測定対象がトラスツズマブ、トラスツズマブ-DM1、ベバシズマブ、またはリツキシマブである場合、内部標準ペプチドは配列番号1~47のいずれか1以上のアミノ酸配列を有するペプチドから選択することができる。
- [0101] より具体的には、測定対象のモノクローナル抗体がトラスツズマブ又はトラスツズマブ-DM1であって、プロテアーゼがTrypsin Gold (プロメガ社製)

の場合、内部標準ペプチドは配列番号1～7で示されるアミノ酸配列を有するペプチドの1以上とすることができる。

[0102] 測定対象のモノクローナル抗体がベバシズマブであって、プロテアーゼがTrypsin Gold (プロメガ社製) の場合、内部標準ペプチドは配列番号8～12で示されるアミノ酸配列を有するペプチドの1以上とすることができる。

[0103] 測定対象のモノクローナル抗体がリツキシマブであって、プロテアーゼがTrypsin Gold (プロメガ社製) の場合、内部標準ペプチドは配列番号13～19で示されるアミノ酸配列を有するペプチドの1以上とすることができる。

[0104] 測定対象のモノクローナル抗体がトラスツズマブ又はトラスツズマブ-DM1であって、プロテアーゼがTrypsin TPCK-treated (シグマ社製) の場合、内部標準ペプチドは配列番号1～7で示されるアミノ酸配列を有するペプチドに加えて、配列番号20～28、46及び47で示されるアミノ酸配列を有するペプチドの1以上とすることができる。

[0105] 測定対象のモノクローナル抗体がベバシズマブであって、プロテアーゼがTrypsin TPCK-treated (シグマ社製) の場合、内部標準ペプチドは配列番号8～12で示されるアミノ酸配列を有するペプチドに加えて、配列番号29～38で示されるアミノ酸配列を有するペプチドの1以上とすることができる。

[0106] 測定対象のモノクローナル抗体がリツキシマブであって、プロテアーゼがTrypsin TPCK-treated (シグマ社製) の場合、内部標準ペプチドは配列番号13～19で示されるアミノ酸配列を有するペプチドに加えて、配列番号39～45で示されるアミノ酸配列を有するペプチドの1以上とすることができる。

[0107] 内部標準ペプチドは、測定対象となるモノクローナル抗体に特異的なアミノ酸配列を含むペプチド、より具体的にはFaドメインのアミノ酸配列、より好ましくは重鎖又は軽鎖のCDR2領域由来のアミノ酸を含むアミノ酸配列からなるペプチドとすることが好ましい。

[0108] 本発明のキットを使用することにより、モノクローナル抗体の同定・定量

のための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、ナノ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、プロテアーゼがナノ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。

[0109] 本発明のキットは、より具体的には、例えば以下のような構成で提供される。

[0110] <1. シングル分析用>

ーサンプルずつ分析するための試薬キットは、例えば以下の構成のものである。

0.2 μm のろ過膜スピンフィルター（ミリポア ウルトラフリー-PVDF、0.2 μm ）

細孔径100 nmのProtein G樹脂スラリー（4°C保存）

粒子径200 nmのナノ粒子に固定化されたトリプシンビーズ（-20°C保存）

血漿希釈用低吸着チューブ

溶液回収マイクロチューブ

血漿希釈用バッファー（PBS + 0.1% n-オクチル- β -D-チオグリコシドもしくは相当する界面活性剤、例えばn-オクチル- β -D-グリコシド）

ビーズ洗浄用バッファー（PBS）

プロテアーゼ反応用バッファー（25 mM Tris-HCl, pH 8.0 + プロテアーゼ反応促進添加剤）

10%ギ酸水溶液

使用説明書

[0111] <2. マルチサンプル分析用>

例えば96サンプル同時分析を可能とする多検体処理用の試薬キットは、例えば以下の構成のものである。

0.2 μm のろ過膜プレート（ミリポア マルチスクリーンPVDF、Barex、0.2 μm ）

細孔径100 nmのProtein G樹脂スラリー (4°C保存)

粒子径200 nmのナノ粒子に固定化されたトリプシンおよびプロテアーゼ
ビーズ (-20°C保存)

血漿希釈用低吸着プレート

溶液回収用プレート

溶液廃棄用プレートリザーバー

プロテアーゼビーズ用プレート

血漿希釈用バッファー (PBS + 0.1% n-オクチル-β-D-チオグリコシドも
しくは相当する界面活性剤、例えばn-オクチル-β-D-グリコシド)

ビーズ洗浄用バッファー (PBS)

プロテアーゼ反応用バッファー (25 mM Tris-HCl, pH 8.0 + プロテアー
ゼ反応促進添加剤)

10%ギ酸水溶液

プレートカバーシール

オートサンプラー用DMSO耐性、ニードルピアシブルプレートカバーシ
ール

使用説明書

[0112] <3. 付加的試薬>

本発明のキットに場合によって含めるものとして、例えば内部標準ペプチドがある。これは、バイオ医薬品定量用ペプチドの定量精度を高めるためのものであって、バイオ医薬ごとに複数のペプチドを用意し、別売することが望ましい。内部標準ペプチドには、安定同位体アミノ酸でラベルしたものを含めても良く、その場合、同位体を含まないペプチドと比較すると質量分析定量条件が異なるため、内部標準用定量条件を同封することが好ましい。

[0113] <構成 : >

内部標準ペプチド (例えばトラスツズマブ用として、配列番号1~7のペプチドのいずれか1以上)

試薬品質保証データ (質量分析データ、および原子純度測定結果)

定量条件ファイルパッケージ

使用説明書

[0114] <メソッドパッケージ>

本発明はまた、測定対象のモノクローナル抗体を細孔内に固定化した多孔質体と、トリプシンを固定化したナノ粒子とを液体中で接触させてモノクローナル抗体の選択的トリプシン消化を行い、得られたペプチド断片を高速液体クロマトグラフ質量分析（LC-MS）によって分析することによって前記モノクローナル抗体の検出を行う方法に使用するための、メソッドパッケージを提供する。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を読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。

[0115] 上記した通り、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。本出願人はこれまでに、ユーザーが例えば農薬や動物医薬品の質量分析をより簡便に行うことを可能とするために、これらのLC-MSによる分析のためのメソッドパッケージを提供してきた。従って本発明は、試料中のモノクローナル抗体のLC-MSによる同定・定量のためのメソッドパッケージも提供する。

[0116] すなわち、本発明は、測定対象のモノクローナル抗体を細孔内に固定化した多孔質体と、プロテアーゼを固定化したナノ粒子とを液体中で接触させてモノクローナル抗体の選択的プロテアーゼ消化を行い、得られたペプチド断片を高速液体クロマトグラフ質量分析（LC-MS）によって分析することによって前記モノクローナル抗体の検出を行う方法に使用するための、前記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

媒体であって、前記データが、限定するものではないが、例えば前記モノクローナル抗体のプロテアーゼ消化によって得られるペプチド、例えばFabドメイン、より好ましくはCDR領域のアミノ酸を含むアミノ酸配列を有するペプチドの1以上に対して、少なくとも親イオン、フラグメントイオン、予想保持時間、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む、上記記録媒体を提供する。尚、上記の予想保持時間、電圧データ等は、使用する機器及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。また、当業者には理解されるように、条件によって変動する数値についてはその変動幅も併せて提供することが好ましい。

[0117] 記録媒体はどのような形態のものでも良く、特に限定するものではない。例えば情報を磁氣的、光学的に記録することが可能なディスクやメモリを挙げることができる。

[0118] より具体的には、上記のメソッドパッケージ中には、例えば以下の情報及びソフト機能を含むことができる。

- ・最適化※されたペアレントイオンm/z値
- ・最適化されたフラグメントイオンm/z値
- ・最適化されたQ1 pre bias電圧値
- ・最適化されたQ2 collision energy電圧値
- ・最適化されたQ3 pre bias電圧値
- ・目的イオンの予想保持時間および質量分析時間
- ・定量値換算式
- ・解析結果レポート出力機能

※：各条件項目を実測し、最もイオン強度の高いもの、および最も再現性のあるm/z値を採択し、これを最適値とする。

[0119] 本発明はまた、上記の記録媒体と、記録媒体の使用説明書とを含む、高速液体クロマトグラフ質量分析（LC-MS）によるモノクローナル抗体の検出のためのメソッドパッケージを提供する。

- [0120] 上記の記録媒体又はメソッドパッケージの例として、特定のモノクローナル抗体に限定した情報のみを含むものが挙げられる。従って、モノクローナル抗体が、例えばトラスツズマブ、トラスツズマブ-DM1、ベバシズマブ、又はリツキシマブである場合、それらに適した分析条件を記載した記録媒体またはメソッドパッケージを提供することができる。
- [0121] この場合、記録媒体に含まれるデータは、例えば配列番号1～47のいずれか1以上のアミノ酸配列を有するペプチドに対する分析条件に関するものとすることができる。
- [0122] 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良く、あるいは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良い。
- [0123] 記録媒体又はメソッドパッケージは、上記の本発明のキットと併せて、あるいはキットと別個に提供することができる。

実施例

- [0124] 以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

[0125] [実施例1 サンプル調製用キット]

単一サンプルの分析のために、以下の構成のキットを準備する。

- (1) PBS緩衝液 (PBS + 0.1% n-オクチル- β -D-チオグルコシド, Dojindo)
- (2) 酵素反応緩衝液 (25 mM Tris-HCl, pH8.0)
- (3) 酵素反応停止液 (10% ギ酸)
- (4) フィルターチューブ (Low-binding hydrophilic PVDF、孔径0.2 μ m、ミリポア社)
- (5) 低吸着チューブ (リッチェル マイクロレシコチューブ 92017)
- (6) LCMSバイアル、インサート (島津GLC GLC4010-VPターゲットバイアル VP、C4010-630P Target PP Polyspring)
- (7) 多孔質体 (Pierce 53126 Protein G UltraLink Resin、40 μ l分注)

- (8) ナノ粒子（トリプシン固定化FGビーズ（トリプシン 40 μg ））
- (9) 使用説明書

[0126] <プロトコール（使用説明書(9)に記載）>

1. 血液サンプル20 μl を低吸着チューブ(5)にとり、緩衝液(1)を180 μl で希釈する。
2. 多孔質体(7)を卓上遠心機にて遠心し、上清を捨てる。緩衝液(1)を100 μl 加え、軽く攪拌後遠心し、上清を捨てる。この操作を3回行う。その後40 μl の緩衝液(1)を加え懸濁した後、フィルターチューブ(4)へ移す。この操作はフィルターチューブ(4)上で行ってもよい。
3. ステップ1の血液希釈サンプルを、フィルターチューブ(4)へ移す。
4. タッピングロータリーミキサー（日伸理化）で軽くタッピングしながら、室温で1時間攪拌する。
5. 遠心ろ過（10,000g x 1分）し、溶液を分離する。緩衝液(1)を200 μl 加え遠心ろ過し、ろ液を廃棄する。この操作を3回行う。
6. PBS緩衝液(1)を200 μl 加え、軽く攪拌後遠心ろ過し、ろ液を捨てる。この操作を1回行う。
7. ステップ6の多孔質体に、緩衝液(2)を200 μl 加える。
8. ナノ粒子(8)を氷上で溶解する。手早く超音波洗浄機もしくはボルテックスミキサーで均一に分散し、ステップ7へ加える。
9. フィルターチューブに溶液回収用チューブをとりつけ、ふた側にパラフィルムなどを用いシールをする。タッピングロータリーミキサーで軽くタッピングしながら、37°Cで6時間攪拌して、タンパク質分解を行う。
10. 反応混合液を遠心ろ過（10,000g x 1分）し、樹脂を除去する。ろ液を回収する。
11. ステップ10に、酵素反応停止液(3)を15 μl 加える。
12. LC-MSバイアルセット(6)に移し、底の気泡を除去する。
13. LC-MSのオートサンプラーにセットし、分析を行う。
14. LC-MS分析条件リストは、別紙添付する（表1～表6）。

[0127] <抗体医薬定量用ペプチドの質量分析条件（記録媒体に含める）>

[表1]

トラスツズマブ、およびトラスツズマブ-DM1 の定量ペプチドおよびその質量分析情報
 使用した固相酵素: Trypsin Gold(プロメガ)

ペプチド配列	親イオン m/z	フラグメント イオン m/z	保持時間 [分]	Q1 Pre Bias [V]	Collision Energy [V]	Q3 Pre Bias [V]
IYPTNGYTR	542.8	808.4	3.405	-40	-18	-30
IYPTNGYTR	542.8	711.3	3.405	-40	-26	-38
IYPTNGYTR	542.8	610.3	3.405	-40	-24	-22
IYPTNGYTR	542.8	404.7	3.405	-20	-18	-15
IYPTNGYTR	542.8	277.2	3.405	-20	-16	-30
AEDTAVYYCSR	667.8	1134.5	3.473	-24	-24	-34
AEDTAVYYCSR	667.8	1019.5	3.473	-24	-25	-30
AEDTAVYYCSR	667.8	918.4	3.473	-24	-25	-36
AEDTAVYYCSR	667.8	847.4	3.473	-24	-23	-32
AEDTAVYYCSR	667.8	748.3	3.473	-24	-21	-40
AEDTAVYYCSR	667.8	585.2	3.473	-24	-24	-22
AEDTAVYYCSR	667.8	422.2	3.473	-24	-22	-30
AEDTAVYYCSR	667.8	488.2	3.473	-24	-20	-25
FTISADTSK	485.2	822.4	3.635	-18	-18	-32
FTISADTSK	485.2	721.4	3.635	-11	-18	-26
FTISADTSK	485.2	608.3	3.635	-18	-19	-32
FTISADTSK	485.2	521.3	3.635	-18	-19	-38
FTISADTSK	485.2	335.2	3.635	-18	-24	-24
LSCAASGFNIK	584.3	967.5	3.921	-40	-21	-36
LSCAASGFNIK	584.3	807.4	3.921	-40	-22	-30
LSCAASGFNIK	584.3	736.4	3.921	-40	-22	-38
LSCAASGFNIK	584.3	665.4	3.921	-40	-21	-34
LSCAASGFNIK	584.3	578.3	3.921	-22	-23	-40
LSCAASGFNIK	584.3	484.2	3.921	-40	-19	-17
DTYIHWVR	363.9	597.3	4.097	-27	-17	-22
DTYIHWVR	363.9	460.3	4.097	-27	-19	-23
DTYIHWVR	363.9	437.2	4.097	-27	-11	-30
DTYIHWVR	363.9	299.2	4.097	-26	-16	-21
GLEWVAR	415.7	660.3	4.077	-30	-15	-24
GLEWVAR	415.7	531.3	4.077	-30	-16	-40
GLEWVAR	415.7	345.2	4.077	-16	-17	-24
GLEWVAR	415.7	246.2	4.077	-30	-18	-17
NTAYLQMNSLR	655.8	1095.6	4.144	-24	-23	-42
NTAYLQMNSLR	655.8	1024.5	4.144	-24	-22	-40

[0128]

ペプチド配列	親イオン m/z	フラグメント イオン m/z	保持時間 [分]	Q1 Pre Bias [V]	Collision Energy [V]	Q3 Pre Bias [V]
NTAYLQMNSLR	655.8	861.5	4.144	-24	-22	-32
NTAYLQMNSLR	655.8	748.4	4.144	-24	-23	-28
NTAYLQMNSLR	655.8	620.3	4.144	-24	-23	-32
NTAYLQMNSLR	655.8	489.3	4.144	-24	-23	-25
NTAYLQMNSLR	655.8	375.2	4.144	-24	-22	-19

*C が含まれるペプチドは、還元アルキル化処理を行ったもの

[0129]

[表2]

ペバシズマブの定量ペプチドおよびその質量分析情報

使用した固相酵素: Trypsin Gold(プロメガ)

ペプチド配列	親イオン m/z	フラグメント イオン m/z	保持時間 [分]	Q1 Pre Bias [V]	Collision Energy [V]	Q3 Pre Bias [V]
AEDTAVYYCAK	645.8	1090.5	3.501	-24	-22	-42
AEDTAVYYCAK	645.8	975.5	3.501	-24	-24	-38
AEDTAVYYCAK	645.8	874.4	3.501	-24	-23	-34
AEDTAVYYCAK	645.8	803.4	3.501	-24	-20	-30
AEDTAVYYCAK	645.8	704.3	3.501	-24	-20	-38
AEDTAVYYCAK	645.8	541.2	3.501	-24	-21	-40
AEDTAVYYCAK	645.8	488.2	3.501	-24	-17	-11
AEDTAVYYCAK	645.8	587.3	3.501	-24	-17	-22
STAYLQMNSLR	642.3	1095.6	4.147	-24	-24	-42
STAYLQMNSLR	642.3	1024.5	4.147	-24	-25	-40
STAYLQMNSLR	642.3	861.5	4.147	-24	-25	-20
STAYLQMNSLR	642.3	748.4	4.147	-24	-22	-28
STAYLQMNSLR	642.3	620.3	4.147	-24	-24	-32
STAYLQMNSLR	642.3	489.3	4.147	-24	-22	-25
STAYLQMNSLR	642.3	375.2	4.147	-24	-22	-27
FTFSLDTSK	523.3	898.5	4.432	-38	-20	-34
FTFSLDTSK	523.3	797.4	4.432	-38	-18	-30
FTFSLDTSK	523.3	650.3	4.432	-38	-19	-34
FTFSLDTSK	523.3	563.3	4.432	-38	-22	-40
FTFSLDTSK	523.3	450.2	4.432	-20	-23	-30
FTFSLDTSK	523.3	335.2	4.432	-20	-25	-24
FTFSLDTSK	523.3	399.2	4.432	-38	-17	-11
FTFSLDTSK	523.3	249.1	4.432	-38	-17	-17
VLIYFTSSLHSGVPSR	588.3	832.4	4.515	-22	-19	-30
VLIYFTSSLHSGVPSR	588.3	775.9	4.515	-22	-18	-28
VLIYFTSSLHSGVPSR	588.3	719.4	4.515	-22	-18	-26
VLIYFTSSLHSGVPSR	588.3	637.8	4.515	-22	-18	-24
VLIYFTSSLHSGVPSR	588.3	564.3	4.515	-22	-22	-20
VLIYFTSSLHSGVPSR	588.3	602.3	4.515	-22	-28	-22
VLIYFTSSLHSGVPSR	588.3	359.2	4.515	-22	-26	-26
VLIYFTSSLHSGVPSR	588.3	213.2	4.515	-22	-20	-23
LSCAASGYFTNYGMNWVR	733.3	1039.5	4.896	-28	-25	-40
LSCAASGYFTNYGMNWVR	733.3	848.4	4.896	-28	-18	-32
LSCAASGYFTNYGMNWVR	733.3	925.4	4.896	-28	-25	-36

[0130]

ペプチド配列	親イオン m/z	フラグメント イオン m/z	保持時間 [分]	Q1 Pre Bias [V]	Collision Energy [V]	Q3 Pre Bias [V]
LSCAASGYTFTNYGMNWVR	733.3	762.4	4.896	-28	-26	-40
LSCAASGYTFTNYGMNWVR	733.3	705.4	4.896	-26	-24	-34
LSCAASGYTFTNYGMNWVR	733.3	574.3	4.896	-28	-22	-30
LSCAASGYTFTNYGMNWVR	733.3	520.2	4.896	-28	-18	-36
LSCAASGYTFTNYGMNWVR	733.3	503.2	4.896	-28	-18	-36

*C が含まれるペプチドは、還元アルキル化処理を行ったもの

[0131]

[表3]

リツキシマブの定量ペプチドおよびその質量分析情報

使用した固相酵素: Trypsin Gold(プロメガ)

ペプチド配列	親イオン m/z	フラグメント イオン m/z	保持時間 [分]	Q1 Pre Bias [V]	Collision Energy [V]	Q3 Pre Bias [V]
ATLTADK	360.2	648.4	2.809	-26	-14	-24
ATLTADK	360.2	547.3	2.81	-13	-13	-20
ATLTADK	360.2	434.2	2.81	-26	-16	-22
ATLTADK	360.2	333.2	2.81	-26	-19	-24
ATLTADK	360.2	262.1	2.81	-13	-21	-29
VTMTCR	384.2	668.3	2.887	-28	-16	-34
VTMTCR	384.2	567.2	2.887	-28	-14	-40
VTMTCR	384.2	436.2	2.887	-28	-16	-16
VTMTCR	384.2	335.1	2.887	-14	-17	-23
VTMTCR	384.2	201.1	2.887	-28	-14	-21
LASGVPVR	399.7	685.4	3.426	-29	-17	-34
LASGVPVR	399.7	614.4	3.426	-30	-16	-32
LASGVPVR	399.7	527.3	3.426	-15	-16	-38
LASGVPVR	399.7	371.2	3.426	-15	-17	-28
ATSNLASGVPVR	586.3	912.5	3.728	-22	-25	-34
ATSNLASGVPVR	586.3	685.4	3.728	-22	-23	-38
ATSNLASGVPVR	586.3	614.4	3.728	-22	-25	-24
ATSNLASGVPVR	586.3	527.3	3.728	-22	-25	-40
ATSNLASGVPVR	586.3	470.3	3.728	-22	-19	-17
ATSNLASGVPVR	586.3	371.2	3.728	-22	-17	-27
FSGSGSGTSYSLTISR	803.9	1084.6	4.051	-30	-32	-42
FSGSGSGTSYSLTISR	803.9	926.5	4.051	-30	-34	-36
FSGSGSGTSYSLTISR	803.9	839.5	4.051	-30	-36	-32
FSGSGSGTSYSLTISR	803.9	839.5	4.051	-30	-36	-32
FSGSGSGTSYSLTISR	803.9	589.4	4.051	-30	-34	-22
FSGSGSGTSYSLTISR	803.9	476.3	4.051	-30	-32	-17
FSGSGSGTSYSLTISR	803.9	375.2	4.051	-30	-33	-27
ASGYTFTSYNMHWVK	597.9	1064.5	4.399	-22	-24	-40
ASGYTFTSYNMHWVK	597.9	860.9	4.399	-22	-18	-32
ASGYTFTSYNMHWVK	597.9	817.4	4.399	-22	-18	-30
ASGYTFTSYNMHWVK	597.9	788.9	4.399	-22	-18	-30
ASGYTFTSYNMHWVK	597.9	707.3	4.399	-22	-18	-26
ASGYTFTSYNMHWVK	597.9	656.8	4.399	-22	-18	-24
ASGYTFTSYNMHWVK	597.9	583.3	4.399	-22	-22	-22

[0132]

ペプチド配列	親イオン m/z	フラグメント イオン m/z	保持時間 [分]	Q1 Pre Bias [V]	Collision Energy [V]	Q3 Pre Bias [V]
ASSSVSYIHWFAQK	556.6	798.9	4.399	-20	-17	-30
ASSSVSYIHWFAQK	556.6	755.4	4.399	-20	-16	-28
ASSSVSYIHWFAQK	556.6	711.9	4.399	-20	-19	-26
ASSSVSYIHWFAQK	556.6	668.3	4.399	-40	-16	-24
ASSSVSYIHWFAQK	556.6	618.8	4.399	-20	-17	-22
ASSSVSYIHWFAQK	556.6	550.3	4.399	-20	-14	-40
ASSSVSYIHWFAQK	556.6	403.2	4.399	-20	-29	-25

*C が含まれるペプチドは、還元アルキル化処理を行ったもの

[0133]

[表4]

トラスツズマブ、およびトラスツズマブ-DM1 の定量ペプチドおよびその質量分析情報
 使用した固相酵素: Trypsin TPCK-treated(シグマ)

ペプチド配列	親イオン m/z	フラグメント イオン m/z	保持時間 [分]	Q1 Pre Bias [V]	Collision Energy [V]	Q3 Pre Bias [V]
VTITCR	375.2	650.3	3.077	-30	-16	-34
VTITCR	375.2	549.3	3.077	-28	-14	-40
VTITCR	375.2	436.2	3.077	-14	-16	-16
VTITCR	375.2	201.1	3.077	-28	-13	-22
LYSGVPSR	439.7	765.4	3.343	-30	-19	-28
LYSGVPSR	439.7	602.3	3.343	-10	-17	-22
LYSGVPSR	439.7	515.3	3.343	-16	-18	-38
LYSGVPSR	439.7	359.2	3.343	-30	-16	-25
LYSGVPSR	439.7	277.2	3.343	-30	-15	-10
IHWVR	355.7	597.3	3.253	-13	-16	-22
IHWVR	355.7	460.3	3.253	-13	-16	-17
IHWVR	355.7	299.2	3.253	-26	-16	-20
IHWVR	355.7	251.2	3.253	-26	-15	-28
TTPPTFGQGTK	567.8	932.5	3.401	-40	-19	-36
TTPPTFGQGTK	567.8	835.4	3.401	-40	-25	-32
TTPPTFGQGTK	567.8	466.8	3.401	-40	-19	-17
TTPPTFGQGTK	567.8	418.2	3.401	-22	-26	-30
AEDTAVY	768.3	316.1	3.439	-28	-34	-22
AEDTAVY	768.3	488.2	3.439	-28	-25	-18
AEDTAVY	768.3	587.3	3.439	-28	-23	-30
IYPTNGYTR	542.8	808.4	3.364	-40	-18	-30
IYPTNGYTR	542.8	711.3	3.364	-40	-26	-38
IYPTNGYTR	542.8	404.7	3.364	-20	-18	-15
IYPTNGYTR	542.8	277.2	3.364	-20	-16	-30
IYPTNGYTR	542.8	808.4	3.364	-40	-18	-30
AEDTAVYYCSR	667.8	1134.5	3.434	-24	-24	-34
AEDTAVYYCSR	667.8	1019.5	3.434	-24	-25	-30
AEDTAVYYCSR	667.8	918.4	3.434	-24	-25	-36
AEDTAVYYCSR	667.8	847.4	3.434	-24	-23	-32
AEDTAVYYCSR	667.8	748.3	3.434	-24	-21	-40
AEDTAVYYCSR	667.8	585.2	3.434	-24	-24	-22
AEDTAVYYCSR	667.8	422.2	3.434	-24	-22	-30
AEDTAVYYCSR	667.8	488.2	3.434	-24	-20	-25
LQMNSLR	431.2	748.4	3.572	-16	-20	-28

[0134]

ペプチド配列	親イオン m/z	フラグメント イオン m/z	保持時間 [分]	Q1 Pre Bias [V]	Collision Energy [V]	Q3 Pre Bias [V]
LQMNSLR	431.2	620.3	3.572	-16	-18	-32
LQMNSLR	431.2	489.3	3.572	-16	-19	-18
LQMNSLR	431.2	242.1	3.572	-16	-16	-27
FTISADTSK	485.2	822.4	3.599	-18	-18	-32
FTISADTSK	485.2	721.4	3.599	-11	-18	-26
FTISADTSK	485.2	608.3	3.599	-18	-19	-32
FTISADTSK	485.2	521.3	3.599	-18	-19	-38
FTISADTSK	485.2	335.2	3.599	-18	-24	-24
LSCAASGFNIK	584.3	967.5	3.865	-40	-21	-36
LSCAASGFNIK	584.3	807.4	3.865	-40	-22	-30
LSCAASGFNIK	584.3	736.4	3.865	-40	-22	-38
LSCAASGFNIK	584.3	665.4	3.865	-40	-21	-34
LSCAASGFNIK	584.3	578.3	3.865	-22	-23	-40
LSCAASGFNIK	584.3	484.2	3.865	-40	-19	-17
DTYIHWVR	363.9	597.3	4.056	-27	-17	-22
DTYIHWVR	363.9	460.3	4.056	-27	-19	-23
DTYIHWVR	363.9	437.2	4.056	-27	-11	-30
DTYIHWVR	363.9	299.2	4.056	-26	-16	-21
GLEWVAR	415.7	660.3	4.033	-30	-15	-24
GLEWVAR	415.7	531.3	4.033	-30	-16	-40
GLEWVAR	415.7	345.2	4.033	-16	-17	-24
GLEWVAR	415.7	246.2	4.033	-30	-18	-17
NTAYLQMNSLR	655.8	1095.6	4.099	-24	-23	-42
NTAYLQMNSLR	655.8	1024.5	4.099	-24	-22	-40
NTAYLQMNSLR	655.8	861.5	4.099	-24	-22	-32
NTAYLQMNSLR	655.8	748.4	4.099	-24	-23	-28
NTAYLQMNSLR	655.8	620.3	4.099	-24	-23	-32
NTAYLQMNSLR	655.8	489.3	4.099	-24	-23	-25
NTAYLQMNSLR	655.8	375.2	4.099	-24	-22	-19
DTYIHW	417.7	719.4	4.425	-16	-16	-26
DTYIHW	417.7	618.3	4.425	-16	-13	-22
DTYIHW	417.7	455.2	4.425	-30	-14	-17
DTYIHW	417.7	342.2	4.425	-30	-19	-24
WGGDGFY	801.3	416.2	4.499	-30	-30	-15
WGGDGFY	801.3	473.2	4.499	-30	-30	-23
WGGDGFY	801.3	620.2	4.499	-30	-26	-32
WGGDGFY	801.3	602.2	4.499	-30	-30	-22
LLIYSASF	913.5	687.3	5.149	-36	-31	-26

[0135]

ペプチド配列	親イオン m/z	フラグメント イオン m/z	保持時間 [分]	Q1 Pre Bias [V]	Collision Energy [V]	Q3 Pre Bias [V]
LLIYSASF	913.5	574.3	5.149	-34	-31	-40
LLIYSASF	913.5	503.3	5.149	-22	-30	-36
LLIYSASF	913.5	590.4	5.149	-36	-29	-30
LLIYSASF	913.5	661.4	5.149	-38	-27	-34
LLIYSASF	913.5	748.4	5.149	-36	-26	-28
LLIYSASF	913.5	643.4	5.149	-34	-30	-24

*C が含まれるペプチドは、還元アルキル化処理を行ったもの

[0136]

[表5]

ペバシズマブの定量ペプチドおよびその質量分析情報

使用した固相酵素: Trypsin TPCK-treated(シグマ)

ペプチド配列	親イオン m/z	フラグメント イオン m/z	保持時間 [分]	Q1 Pre Bias [V]	Collision Energy [V]	Q3 Pre Bias [V]
TSSLHSGVPSR	564.3	739.4	2.944	-40	-25	-28
TSSLHSGVPSR	564.3	602.3	2.944	-40	-26	-22
TSSLHSGVPSR	564.3	515.3	2.944	-40	-26	-38
TSSLHSGVPSR	564.3	359.2	2.944	-40	-23	-25
FTSSLHSGVPSR	425.6	564.3	3.326	-16	-15	-40
FTSSLHSGVPSR	425.6	513.8	3.326	-16	-14	-36
FTSSLHSGVPSR	425.6	470.3	3.326	-16	-17	-17
FTSSLHSGVPSR	425.6	852.5	3.326	-16	-18	-26
FTSSLHSGVPSR	425.6	739.4	3.326	-30	-21	-28
FTSSLHSGVPSR	425.6	602.3	3.326	-30	-20	-30
FTSSLHSGVPSR	425.6	515.3	3.326	-16	-21	-38
TGEPTYAADFKR	452.6	534.8	3.495	-17	-15	-40
TGEPTYAADFKR	452.6	599.3	3.495	-17	-15	-22
TGEPTYAADFKR	452.6	627.8	3.495	-17	-14	-22
TGEPTYAADFKR	452.6	486.3	3.495	-17	-18	-25
TGEPTYAADFKR	452.6	870.4	3.495	-17	-20	-34
TGEPTYAADFKR	452.6	707.4	3.495	-17	-20	-36
AEDTAVYYCAK	645.8	1090.5	3.476	-24	-22	-42
AEDTAVYYCAK	645.8	975.5	3.476	-24	-24	-38
AEDTAVYYCAK	645.8	874.4	3.476	-24	-23	-34
AEDTAVYYCAK	645.8	803.4	3.476	-24	-20	-30
AEDTAVYYCAK	645.8	704.3	3.476	-24	-20	-38
AEDTAVYYCAK	645.8	541.2	3.476	-24	-21	-40
AEDTAVYYCAK	645.8	488.2	3.476	-24	-17	-11
AEDTAVYYCAK	645.8	587.3	3.476	-24	-17	-22
GMNWVR	381.7	574.3	3.669	-14	-14	-40
GMNWVR	381.7	460.3	3.669	-30	-15	-17
GMNWVR	381.7	274.2	3.669	-28	-18	-29
INTYTGEPTYAADFKR	616.3	867.4	3.858	-24	-18	-32
INTYTGEPTYAADFKR	616.3	810.4	3.858	-24	-19	-30
INTYTGEPTYAADFKR	616.3	759.9	3.858	-24	-20	-28
INTYTGEPTYAADFKR	616.3	678.3	3.858	-24	-18	-34
INTYTGEPTYAADFKR	616.3	627.8	3.858	-24	-18	-32
INTYTGEPTYAADFKR	616.3	534.8	3.858	-24	-21	-20

[0137]

ペプチド配列	親イオン m/z	フラグメント イオン m/z	保持時間 [分]	Q1 Pre Bias [V]	Collision Energy [V]	Q3 Pre Bias [V]
INTYTGEPITYAADFKR	616.3	1068.5	3.858	-24	-27	-42
INTYTGEPITYAADFKR	616.3	707.4	3.858	-24	-27	-36
VTITCSASQDISNY	779.9	984.4	4.212	-30	-21	-38
VTITCSASQDISNY	779.9	826.4	4.212	-30	-19	-32
VTITCSASQDISNY	779.9	739.3	4.212	-30	-20	-40
VTITCSASQDISNY	779.9	611.3	4.212	-30	-18	-22
VTITCSASQDISNY	779.9	496.2	4.212	-30	-20	-17
VTITCSASQDISNY	779.9	948.4	4.212	-30	-18	-36
VTITCSASQDISNY	779.9	1063.5	4.212	-30	-27	-42
VTITCSASQDISNY	779.9	1176.6	4.212	-30	-19	-46
STAYLQMNSLR	642.3	1095.6	4.105	-24	-24	-42
STAYLQMNSLR	642.3	1024.5	4.105	-24	-25	-40
STAYLQMNSLR	642.3	861.5	4.105	-24	-25	-20
STAYLQMNSLR	642.3	748.4	4.105	-24	-22	-28
STAYLQMNSLR	642.3	620.3	4.105	-24	-24	-32
STAYLQMNSLR	642.3	489.3	4.105	-24	-22	-25
STAYLQMNSLR	642.3	375.2	4.105	-24	-22	-27
VLIYFTSSLH	590.3	1080.6	4.791	-22	-20	-44
VLIYFTSSLH	590.3	967.5	4.791	-22	-19	-36
VLIYFTSSLH	590.3	854.4	4.791	-22	-20	-32
VLIYFTSSLH	590.3	691.3	4.791	-22	-21	-26
VLIYFTSSLH	590.3	544.3	4.791	-22	-23	-28
VLIYFTSSLH	590.3	443.2	4.791	-22	-20	-16
VLIYFTSSLHSGVPSR	588.3	832.4	4.476	-22	-19	-30
VLIYFTSSLHSGVPSR	588.3	775.9	4.476	-22	-18	-28
VLIYFTSSLHSGVPSR	588.3	719.4	4.476	-22	-18	-26
VLIYFTSSLHSGVPSR	588.3	637.8	4.476	-22	-18	-24
VLIYFTSSLHSGVPSR	588.3	564.3	4.476	-22	-22	-20
VLIYFTSSLHSGVPSR	588.3	602.3	4.476	-22	-28	-22
VLIYFTSSLHSGVPSR	588.3	359.2	4.476	-22	-26	-26
VLIYFTSSLHSGVPSR	588.3	213.2	4.476	-22	-20	-23
FTFSLDTSK	523.3	898.5	4.406	-38	-20	-34
FTFSLDTSK	523.3	797.4	4.406	-38	-18	-30
FTFSLDTSK	523.3	650.3	4.406	-38	-19	-34
FTFSLDTSK	523.3	563.3	4.406	-38	-22	-40
FTFSLDTSK	523.3	450.2	4.406	-20	-23	-30
FTFSLDTSK	523.3	335.2	4.406	-20	-25	-24
FTFSLDTSK	523.3	399.2	4.406	-38	-17	-11

[0138]

ペプチド配列	親イオン m/z	フラグメント イオン m/z	保持時間 [分]	Q1 Pre Bias [V]	Collision Energy [V]	Q3 Pre Bias [V]
FTFSLDTSK	523.3	249.1	4.406	-38	-17	-17
VTITCSASQDISNYLNWYQQKPGK	934.5	1244.6	4.875	-40	-28	-48
VTITCSASQDISNYLNWYQQKPGK	934.5	1194.1	4.875	-38	-29	-46
VTITCSASQDISNYLNWYQQKPGK	934.5	1114	4.875	-40	-28	-42
VTITCSASQDISNYLNWYQQKPGK	934.5	1070.5	4.875	-40	-30	-40
VTITCSASQDISNYLNWYQQKPGK	934.5	1035	4.875	-40	-28	-40
LSCAASGYTFTNYGMNWVR	733.3	848.4	4.87	-28	-18	-32
LSCAASGYTFTNYGMNWVR	733.3	1039.5	4.87	-28	-25	-40
LSCAASGYTFTNYGMNWVR	733.3	925.4	4.87	-28	-25	-36
LSCAASGYTFTNYGMNWVR	733.3	762.4	4.87	-28	-26	-40
LSCAASGYTFTNYGMNWVR	733.3	705.4	4.87	-26	-24	-34
LSCAASGYTFTNYGMNWVR	733.3	574.3	4.87	-28	-22	-30
LSCAASGYTFTNYGMNWVR	733.3	520.2	4.87	-28	-18	-36
LSCAASGYTFTNYGMNWVR	733.3	503.2	4.87	-28	-18	-36
GLEWVGWINTYTGEPTYAADFKR	892.1	1045.5	5.211	-34	-26	-40
GLEWVGWINTYTGEPTYAADFKR	892.1	1017	5.211	-34	-25	-38
GLEWVGWINTYTGEPTYAADFKR	892.1	924	5.211	-34	-25	-34
GLEWVGWINTYTGEPTYAADFKR	892.1	867.4	5.211	-34	-26	-32
GLEWVGWINTYTGEPTYAADFKR	892.1	1095	5.211	-34	-27	-42
GLEWVGW	846.4	361.2	5.396	-32	-30	-26
GLEWVGW	846.4	300.2	5.396	-20	-36	-21
GLEWVGW	846.4	486.2	5.396	-34	-30	-18
GLEWVGW	846.4	585.3	5.396	-32	-25	-30
GLEWVGW	846.4	642.3	5.396	-32	-25	-24

*Cが含まれるペプチドは、還元アルキル化処理を行ったもの

[0139]

[表6]

リツキシマブの定量ペプチドおよびその質量分析情報

使用した固相酵素: Trypsin TPCK-treated(シグマ)

ペプチド配列	親イオン m/z	フラグメント イオン m/z	保持時間 [分]	Q1 Pre Bias [V]	Collision Energy [V]	Q3 Pre Bias [V]
ATLTADK	360.2	648.4	2.787	-26	-14	-24
ATLTADK	360.2	547.3	2.787	-13	-13	-20
ATLTADK	360.2	434.2	2.787	-26	-16	-22
ATLTADK	360.2	333.2	2.787	-26	-19	-24
ATLTADK	360.2	262.1	2.787	-13	-21	-29
VTMTCR	384.2	668.3	2.868	-28	-16	-34
VTMTCR	384.2	567.2	2.868	-28	-14	-40
VTMTCR	384.2	436.2	2.868	-28	-16	-16
VTMTCR	384.2	335.1	2.868	-14	-17	-23
VTMTCR	384.2	201.1	2.868	-28	-14	-21
NMHWVK	407.7	700.4	3.163	-30	-18	-26
NMHWVK	407.7	569.3	3.163	-30	-16	-30
NMHWVK	407.7	432.3	3.163	-15	-19	-16
NMHWVK	407.7	246.2	3.163	-15	-17	-28
NMHWVK	407.7	285.2	3.163	-30	-16	-20
TSNPPTFGGGTK	582.3	975.5	3.287	-22	-21	-38
TSNPPTFGGGTK	582.3	488.2	3.287	-22	-17	-17
TSNPPTFGGGTK	582.3	861.4	3.287	-22	-21	-32
TSNPPTFGGGTK	582.3	431.2	3.287	-22	-22	-16
TSNPPTFGGGTK	582.3	764.4	3.287	-22	-23	-40
TSNPPTFGGGTK	582.3	382.7	3.287	-22	-26	-27
TSNPPTFGGGTK	582.3	419.2	3.287	-22	-34	-30
LASGVPVR	399.7	685.4	3.375	-29	-17	-34
LASGVPVR	399.7	614.4	3.375	-30	-16	-32
LASGVPVR	399.7	527.3	3.375	-15	-16	-38
LASGVPVR	399.7	371.2	3.375	-15	-17	-28
ATSNLASGVPVR	586.3	999.6	3.687	-22	-24	-38
ATSNLASGVPVR	586.3	798.5	3.687	-22	-25	-40
ATSNLASGVPVR	586.3	685.4	3.687	-22	-22	-36
ATSNLASGVPVR	586.3	614.4	3.687	-22	-24	-32
ATSNLASGVPVR	586.3	527.3	3.687	-22	-22	-38
ATSNLASGVPVR	586.3	470.3	3.687	-40	-19	-24
ATSNLASGVPVR	586.3	371.2	3.687	-22	-19	-13
ATSNLASGVPVR	586.3	801.4	3.687	-22	-16	-30

[0140]

ペプチド配列	親イオン m/z	フラグメント イオン m/z	保持時間 [分]	Q1 Pre Bias [V]	Collision Energy [V]	Q3 Pre Bias [V]
SQSPAILSASPGEK	686.4	1156.6	3.77	-26	-24	-44
SQSPAILSASPGEK	686.4	1069.6	3.77	-26	-22	-40
SQSPAILSASPGEK	686.4	535.3	3.77	-26	-24	-38
SQSPAILSASPGEK	686.4	901.5	3.77	-26	-29	-26
SQSPAILSASPGEK	686.4	788.4	3.77	-26	-26	-30
SQSPAILSASPGEK	686.4	675.3	3.77	-26	-28	-26
STSGGTAALGCLVK	661.3	1046.6	4.087	-40	-24	-40
STSGGTAALGCLVK	661.3	989.5	4.087	-40	-24	-38
STSGGTAALGCLVK	661.3	932.5	4.087	-40	-24	-36
STSGGTAALGCLVK	661.3	831.5	4.087	-40	-25	-32
STSGGTAALGCLVK	661.3	760.4	4.087	-40	-25	-28
STSGGTAALGCLVK	661.3	689.4	4.087	-40	-24	-36
STSGGTAALGCLVK	661.3	576.3	4.087	-40	-23	-30
FSGSGSGTSYSLTISR	803.9	1084.6	4.015	-30	-32	-42
FSGSGSGTSYSLTISR	803.9	926.5	4.015	-30	-34	-36
FSGSGSGTSYSLTISR	803.9	839.5	4.015	-30	-36	-32
FSGSGSGTSYSLTISR	803.9	676.4	4.015	-30	-33	-26
FSGSGSGTSYSLTISR	803.9	589.4	4.015	-30	-34	-22
FSGSGSGTSYSLTISR	803.9	476.3	4.015	-30	-32	-17
FSGSGSGTSYSLTISR	803.9	375.2	4.015	-30	-33	-27
IYATSNLASGVPVR	724.4	999.6	4.125	-40	-28	-38
IYATSNLASGVPVR	724.4	685.4	4.125	-40	-29	-26
IYATSNLASGVPVR	724.4	614.4	4.125	-40	-26	-32
IYATSNLASGVPVR	724.4	527.3	4.125	-40	-25	-40
IYATSNLASGVPVR	724.4	371.2	4.125	-40	-22	-27
IYATSNLASGVPVR	724.4	1077.6	4.125	-40	-19	-42
GPSVFPLAPSSK	593.8	945.5	4.372	-40	-21	-36
GPSVFPLAPSSK	593.8	846.5	4.372	-40	-21	-32
GPSVFPLAPSSK	593.8	699.4	4.372	-40	-22	-36
GPSVFPLAPSSK	593.8	489.3	4.372	-40	-27	-25
GPSVFPLAPSSK	593.8	418.2	4.372	-40	-28	-30
GPSVFPLAPSSK	593.8	769.4	4.372	-40	-18	-30
ASGYTFTSYNMHWVK	597.9	860.9	4.392	-22	-18	-32
ASGYTFTSYNMHWVK	597.9	817.4	4.392	-22	-18	-30
ASGYTFTSYNMHWVK	597.9	788.9	4.392	-22	-18	-30
ASGYTFTSYNMHWVK	597.9	707.3	4.392	-22	-18	-26
ASGYTFTSYNMHWVK	597.9	656.8	4.392	-22	-18	-24
ASGYTFTSYNMHWVK	597.9	656.8	4.392	-22	-18	-24

[0141]

ペプチド配列	親イオン m/z	フラグメント イオン m/z	保持時間 [分]	Q1 Pre Bias [V]	Collision Energy [V]	Q3 Pre Bias [V]
ASGYTFTSYNMHWVK	597.9	1064.5	4.392	-22	-24	-40
ASSSVSYIHWVFQVK	556.6	798.9	4.338	-20	-17	-30
ASSSVSYIHWVFQVK	556.6	755.4	4.338	-20	-16	-28
ASSSVSYIHWVFQVK	556.6	711.9	4.338	-20	-19	-26
ASSSVSYIHWVFQVK	556.6	668.3	4.338	-40	-16	-24
ASSSVSYIHWVFQVK	556.6	618.8	4.338	-20	-17	-22
ASSSVSYIHWVFQVK	556.6	550.3	4.338	-20	-14	-40
ASSSVSYIHWVFQVK	556.6	403.2	4.338	-20	-29	-25
GLEWIGAIYPGNGDTSYNQK	728.4	792.9	5.008	-28	-17	-30
GLEWIGAIYPGNGDTSYNQK	728.4	672.3	5.008	-28	-16	-24
GLEWIGAIYPGNGDTSYNQK	728.4	590.8	5.008	-28	-21	-22
GLEWIGAIYPGNGDTSYNQK	728.4	740.4	5.008	-28	-27	-28
GLEWIGAIYPGNGDTSYNQK	728.4	840.5	5.008	-28	-16	-32

*C が含まれるペプチドは、還元アルキル化処理を行ったもの

[0142] [実施例 2 ろ過膜の検討 1]

ろ過に使用する膜素材によるペプチド回収率の相違を検証するため、ポリテトラフルオロエチレン (polytetrafluoroethylene、PTFE) およびポリフッ化ビニリデン (polyvinylidene difluoride、PVDF) の2つの膜素材を比較した。

[0143] 回収率の検証は、100 μ g/ml トラスツズマブを開始とし、3倍希釈系列を作成 (N=4) し、トリプシンを固定化したナノ粒子 (Trypsin TPCK treated) にてプロテアーゼ消化を行った後、配列を記載したそれぞれのペプチド (LFPPK PK(配列番号 4 6)、LYSGVPSR(配列番号 2 1)、FTISADTSK(配列番号 3)、ASQD VNTAVAWYQQKPGK(配列番号 4 7)、GLEWVAR(配列番号 6)、DTYIHWVR(配列番号 5)) に対し、質量分析法 (LCMS-8040(島津製作所社製)) にてペプチド回収率を定量した。PRFEの結果を基準としたPVDFの結果を相対値 (変化倍率) として図 2 に示す。有意差検定はT検定を用い、 $p < 0.05$ (*)、 $p < 0.01$ (**) をマークした。

[0144] その結果、高濃度のペプチドの場合は差がないが、ペプチドが低濃度の場合には回収率に大きな有意差が生じ、ろ過膜としてPVDFが好適であることが

判明した。

[0145] [実施例3 ろ過膜の検討2]

実施例2と同様の実験を、ベバシズマブを用いて検証した。結果を図3に示す。

[0146] その結果、実施例2と同様に、高濃度のペプチドの場合は差がないが、ペプチドが低濃度の場合には回収率に大きな有意差が生じ、ろ過膜としてPVDFが好適であることが判明した。

[0147] [実施例4 ろ過膜の検討3]

多検体の測定に用いるためのろ過膜プレートのペプチド回収率を検証するため、2つの膜素材（PTFE、PVDF）およびハウジング3種を比較した。マルチスクリーンプレートとして、1) PTFE membrane/Solvinert housing（メルク社）、2) PVDF membrane/Acryl clear housing（メルク社）、3) PVDF membrane/Barex white housing（メルク社）を用いて比較した。

[0148] 回収率の検証は、400 $\mu\text{g/ml}$ トラストズマブを開始とし、2倍希釈系列を作成（N=4）し、酵素消化を行った後、それぞれのペプチドに対し、回収率を質量分析法（LCMS-8040）にて定量した。結果を図4に示す。有意差検定はT検定を用い、 $p < 0.05$ （*）、 $p < 0.01$ （**）をマークした。

[0149] その結果、ペプチドの高濃度側ではPTFEが優位だが、低濃度側ではPVDFが勝っていた。臨床的には5-20 $\mu\text{g/ml}$ が求められるペプチド濃度範囲であるため、PVDF Barexを選定することが有効と判定した。Barex樹脂を用いた場合の高濃度のペプチドでの飽和については、タンパク質成分の凝集が考えられる。臨床的に想定される血液サンプルでは、多量に抗体が含まれること、および界面活性剤での洗浄工程があるため、この飽和現象は解消されるものと考えられる。尚、アクリル樹脂は物理吸着によるペプチドロスが大きく、選定から除外した。

[0150] [実施例5 プロテアーゼ活性の安定性評価]

ナノ粒子に固定化するプロテアーゼ（トリプシン）の活性の安定性をモニターするために、酵素活性測定を行った。ナノ粒子が基質吸光度を阻害する

ので、従来法に対し、いくつかの改変を加えた。

[0151] プロテアーゼとしてTrypsin Gold, Mass Spec Grade (プロメガ社製) (以下、「Gold」と表記する) およびTrypsin TPCK Treated from bovine pancreas, Product Number T1426 (Sigma Aldrich社製) (以下、「TPCK」と表記する) の2種のトリプシン、ならびに「Gold」、「TPCK」をそれぞれ実施例1に記載のキットを用いてナノ粒子に固定化した「FG-Gold」、「FG-TPCK」を用いて、種々の条件下で酵素反応を行い、酵素安定性を調べた。尚、「Gold」は、キモトリプシン失活処理 (TPCK処理) に加え、還元ジメチル化反応を施すことによって、自己消化に対して抵抗性を有し、温度やpHに依存することなくブロードに高い活性を維持している質量分析グレードのプロテアーゼである。一方、「TPCK」は、キモトリプシン失活処理をしているが、キモトリプシンが残存するプロテアーゼである。

[0152] 基質として、N- α -ベンゾイル-DL-アルギニン-p-ニトロアニリド塩酸塩 (MW=434.9) を用い、加水分解反応により基質より遊離するパラニトロアニリン (p-NA) の吸光度 (405 nm, 吸光係数=9920 M⁻¹ · cm⁻¹) を測定することで酵素活性を測定した。

[0153] <プロトコール>

プロテアーゼ基質を終濃度10 mMとなるよう、DMSOに溶解し、ストック溶液とする。

下記のように混合する。

- ・ 基質 10 μ l (100 nmol)
- ・ 反応緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH8.0) 200 μ l
- ・ 固定化酵素懸濁液 (0.5 mg/ml) 2 μ l

[0154] ナノ粒子 (FGビーズ) 自体の懸濁による吸光度、および壁面への物理吸着によるFGビーズのロスがあるため、コントロールとして基質なしのサンプルウェルを作り、同時測定を行う。各サンプルN=2の測定をし、平均値を吸光度とする。FGビーズは、添加前に十分懸濁する。

[0155] それぞれの条件でプロテアーゼ消化反応を1.5時間、ボルテックス攪拌下に

て行った。反応終了時は、2N-HClを50 ml加えて反応を完全に停止した。マルチスクリーンフィルタープレート（ミリポア マルチスクリーンPVDF、Barex、0.2 μm ）でろ過し、ナノ粒子を除去後、オプティカルボトムプレート（コスモ・バイオ株式会社製）に分注し、マイクロプレートリーダー（TECAN Infinite M200Pro、テカンジャパン株式会社製）を用いて基質より遊離したパラニトロアニリン（p-NA）の吸光度（405 nm, 吸光係数=9920 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ）を測定し、酵素活性を評価した。

[0156] 25°C室温にて、1分ごとに装置内ボルテックス攪拌直後に吸光度測定、120回連続測定を行う。吸光度増加に伴う近似直線を作成し、その傾きを酵素反応速度とする。

[0157] トリプシンを固定化したナノ粒子は、4°Cおよび-20°Cにて保存し、約3ヶ月モニターすることで、その酵素活性を評価した。結果を図5に示すように、保存安定性は温度に左右されることはなく、キットとして提供するにあたり、保管温度は4°Cとすれば良いことが判明した。

[0158] [実施例6 スケールアップによる影響評価]

プロテアーゼ固定化ナノ粒子の大量製造に対し、プロテアーゼ活性に変化が生じるか否かを検証した。測定方法は、実施例5と同様の改変に加え、反応緩衝液を50 mM Tris-HCl、pH8.0に変更した。

[0159] 比較のために、初期仕込みナノ粒子量をラボスケール（5 mg、Scale A）、ミリグラムスケール（20 mg、Scale B）、ラージスケール（200 mg、Scale C）で比較を行った。酵素活性は約2ヶ月モニターを行った。結果を図6に示す。

[0160] その結果、スケールアップによる酵素活性の低下はないものと判断できた。

[0161] [実施例7 スケールアップによる影響評価]

ナノ粒子の大量製造に伴い、洗浄工程が不十分となる可能性が考えられる。洗浄工程の効率化を図る目的で、固定化後の洗浄液に界面活性剤を使用し、その効果を検証した。

- [0162] 酵素活性評価の結果、
 マスクングなし (detergent -) FGビーズトリプシン : 5.784E-03
 マスクングあり (detergent +) FGビーズトリプシン : 5.902E-03
となり、界面活性剤洗浄による酵素失活はないと判断できた。

産業上の利用可能性

- [0163] 本発明のキットを用いれば、試料中のモノクローナル抗体の同定・定量が簡便となり、かつ手技の誤差を減らすことが可能である。また、対象となるイオン種が決定されているため、ユーザーの質量分析条件の設定は不要である。
- [0164] 特に抗体医薬の質量分析による濃度定量技術は、現行ELISA法を置き換えるポテンシャルがあり、本発明は臨床薬理分野への進出、マーケット拡大に貢献し得る。
- [0165] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] 高速液体クロマトグラフ質量分析 (LC-MS) によってモノクローナル抗体を検出するためのサンプル調製用キットであって、
測定対象のモノクローナル抗体を固定化するための多孔質体と、
プロテアーゼを固定化したナノ粒子と、
前記多孔質体と前記ナノ粒子とを接触させてモノクローナル抗体を選択的に消化するための反応容器と、
前記ナノ粒子及び多孔質体と共に前記反応容器内に導入され、前記プロテアーゼによる消化反応をさせるための緩衝液と、
前記消化反応後に前記多孔質体および前記ナノ粒子を除去して、前記消化反応の生成物を前記緩衝液と共に抽出するためのろ過膜と、
を含む、上記キット。
- [請求項2] 前記ろ過膜が、圧力又は遠心力を加えない条件下では前記緩衝液及び前記プロテアーゼによる消化反応によって生成するペプチドをほとんど透過せず、圧力又は遠心力を加えた条件下では前記緩衝液及び前記ペプチドを透過することができるものである、請求項1記載のキット。
- [請求項3] 前記ろ過膜がポリフッ化ビニリデン (PVDF) 製の膜である、請求項1または2記載のキット。
- [請求項4] 前記キットが多検体を同時に処理するためのキットであり、前記ろ過膜のハウジング素材がポリアクリロニトリル樹脂である、請求項1～3のいずれか1項記載のキット。
- [請求項5] 請求項1～4のいずれか1項記載のキットに、更にモノクローナル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む、高速液体クロマトグラフ質量分析 (LC-MS) によるモノクローナル抗体検出のためのキット。
- [請求項6] 測定対象となるモノクローナル抗体に特異的なアミノ酸配列を含む1以上の内部標準ペプチドを更に含む、請求項1～5のいずれか1項

記載のキット。

[請求項7] 測定対象がトラスツズマブ、トラスツズマブ-DM1、ベバシズマブ、またはリツキシマブであって、内部標準ペプチドが配列番号1～47のいずれか1以上のアミノ酸配列を有するペプチドである、請求項6記載のキット。

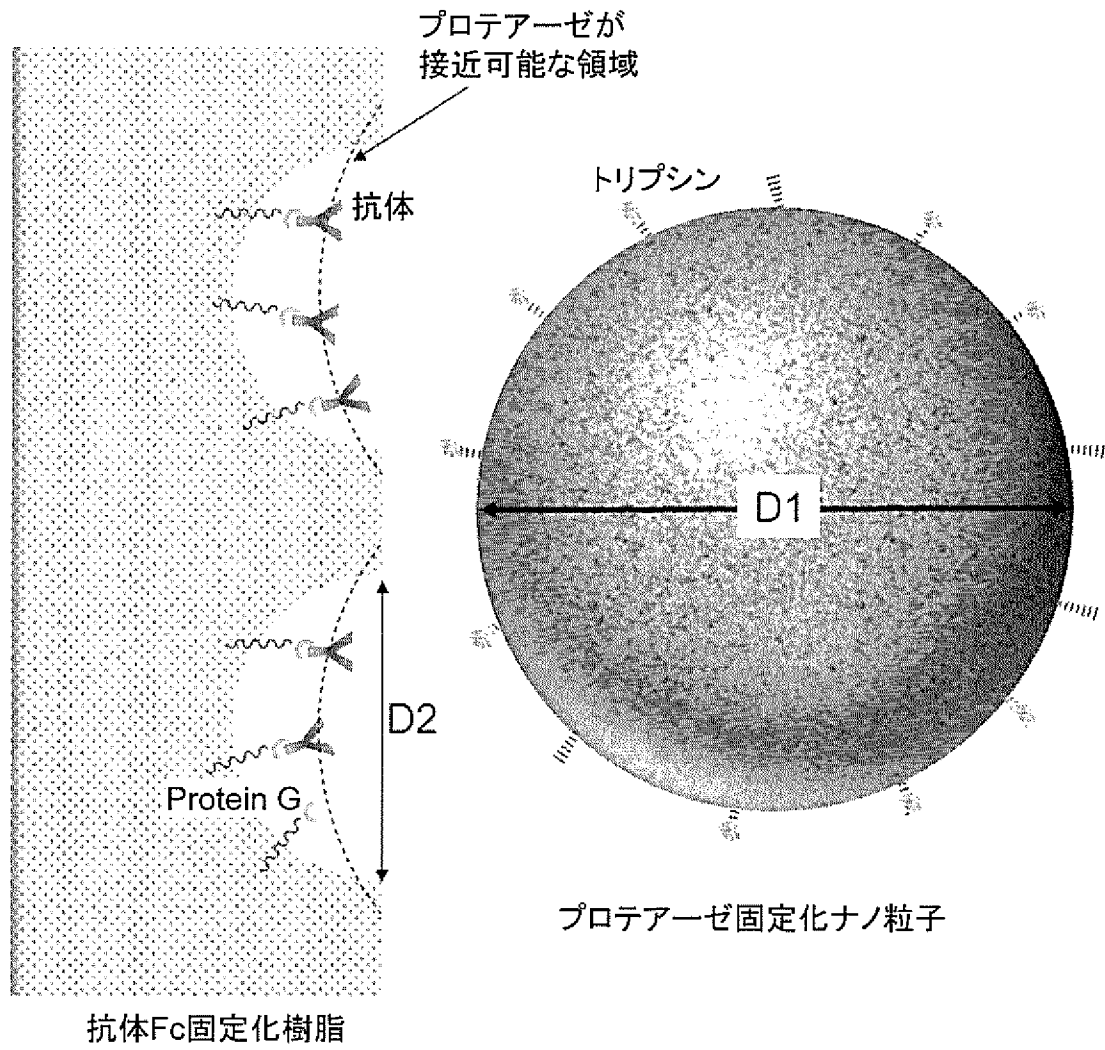
[請求項8] 測定対象のモノクローナル抗体を細孔内に固定化した多孔質体と、プロテアーゼを固定化したナノ粒子とを液体中で接触させてモノクローナル抗体の選択的プロテアーゼ消化を行い、得られたペプチド断片を高速液体クロマトグラフ質量分析(LC-MS)によって分析することによって前記モノクローナル抗体の検出を行う方法に使用するための、前記質量分析を実行させるためのデータが記録されたコンピュータ読み取り可能な記録媒体であって、前記データが、前記モノクローナル抗体のプロテアーゼ消化によって得られるペプチドの1以上に対して、少なくとも親イオン、フラグメントイオン、予想保持時間、三連四重極のそれぞれにおける電圧のデータを含む、上記記録媒体。

[請求項9] 請求項8記載の記録媒体と、前記記録媒体の使用説明書とを含む、高速液体クロマトグラフ質量分析(LC-MS)によるモノクローナル抗体の検出のためのメソッドパッケージ。

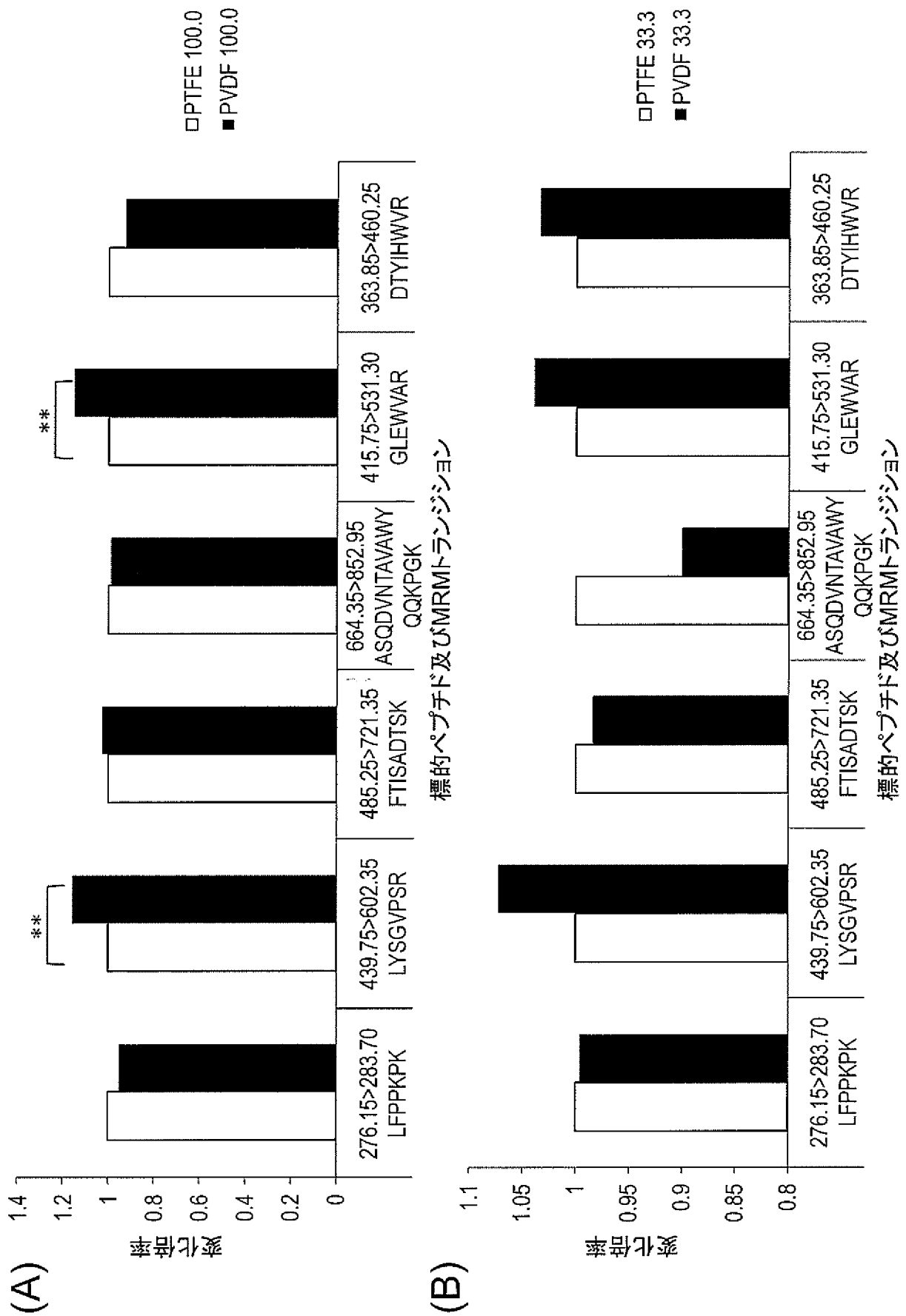
[請求項10] 前記モノクローナル抗体が、トラスツズマブ、トラスツズマブ-DM1、ベバシズマブ、リツキシマブの1種以上である、請求項8記載の記録媒体または請求項9記載のメソッドパッケージ。

[請求項11] 前記データが、配列番号1～47のいずれか1以上のアミノ酸配列を有するペプチドに対するものである、請求項8記載の記録媒体または請求項9記載のメソッドパッケージ。

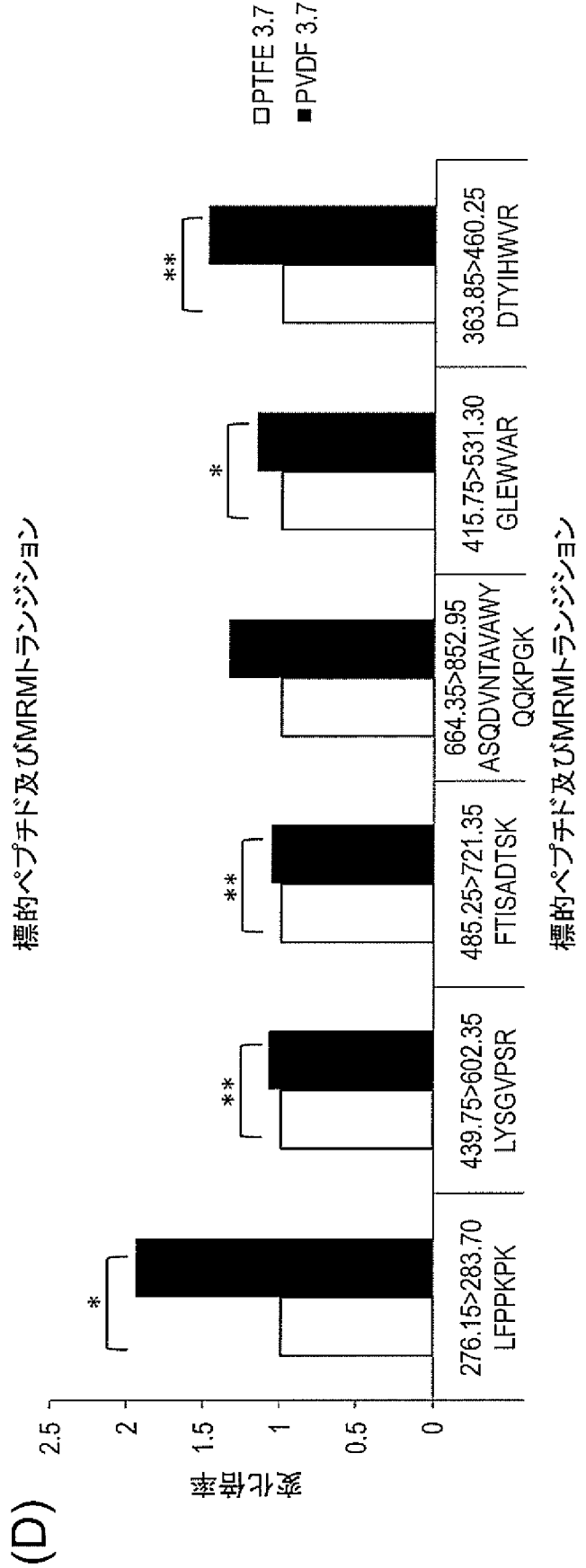
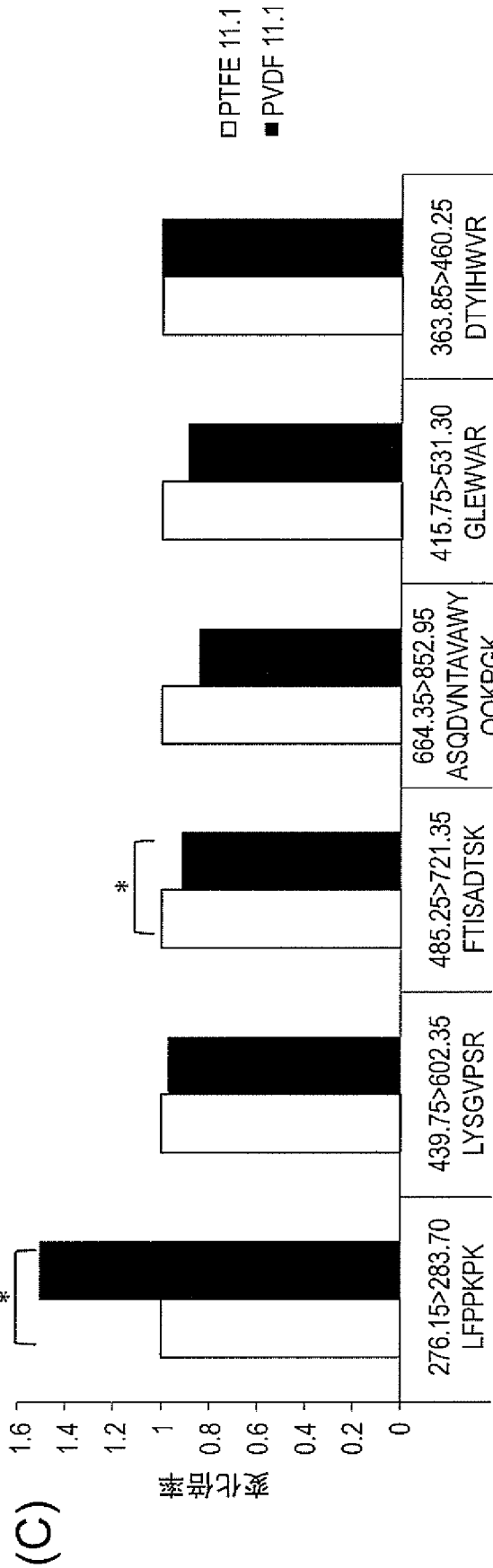
[図1]



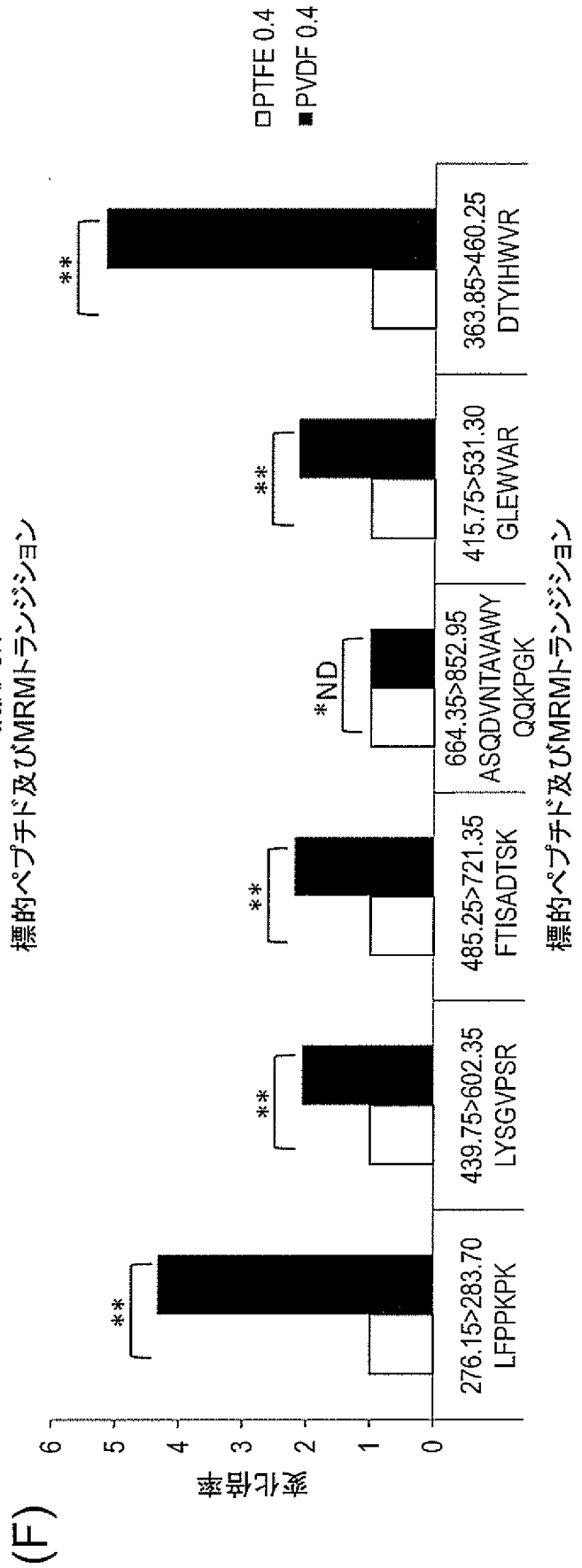
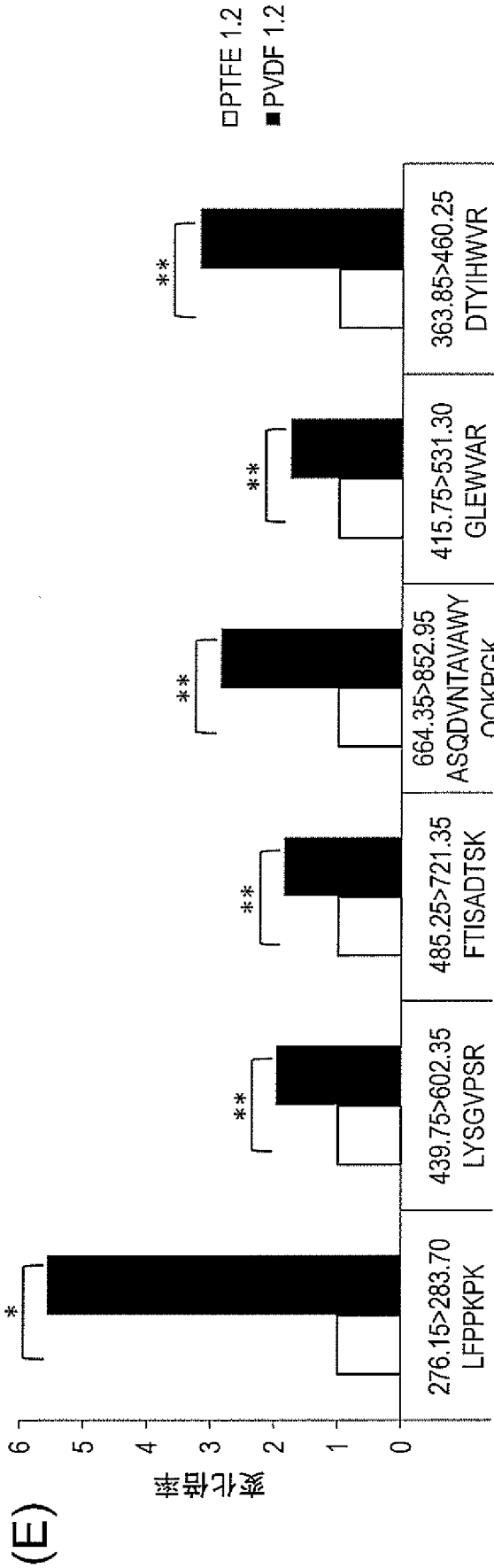
[図2-1]



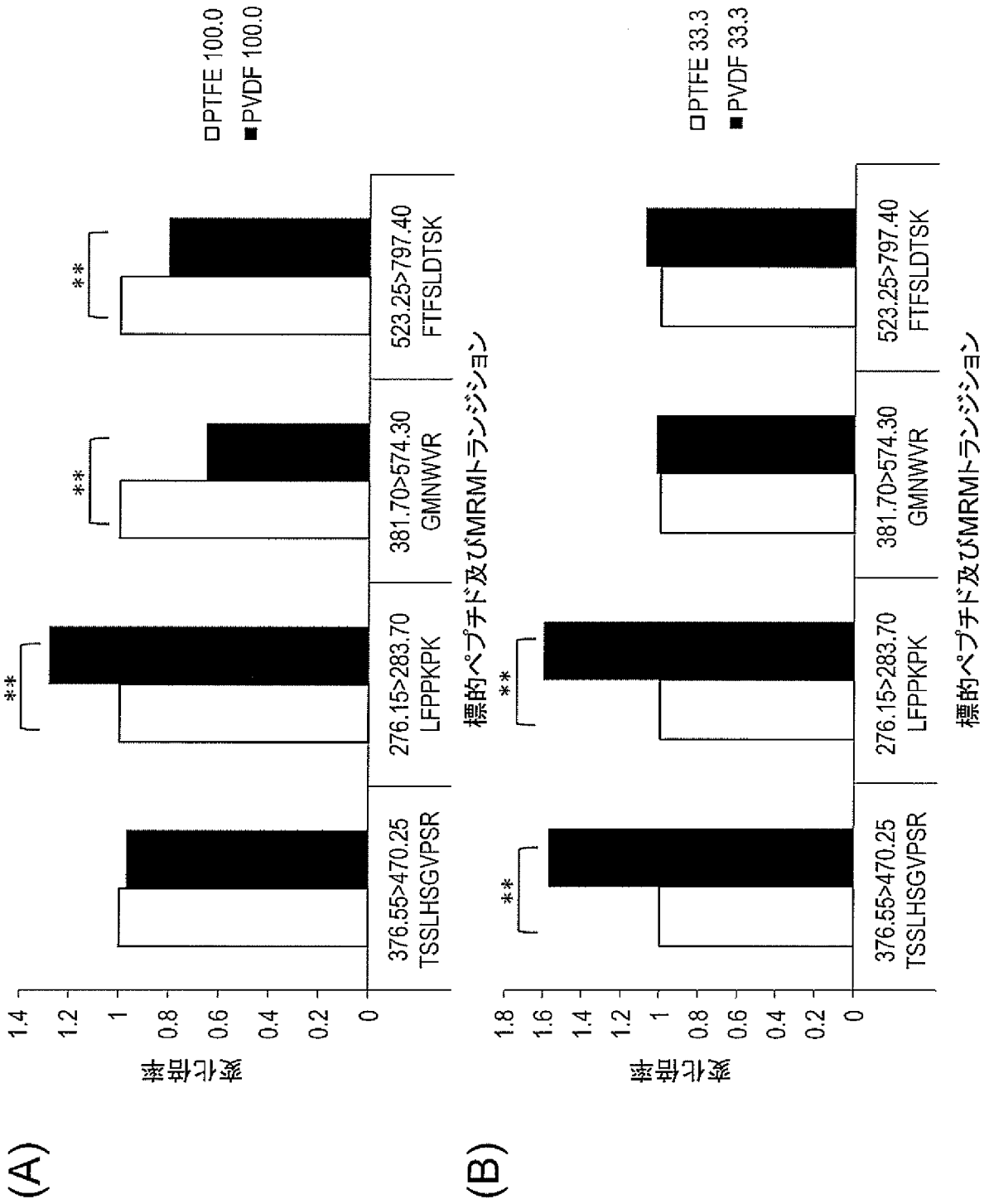
[図2-2]



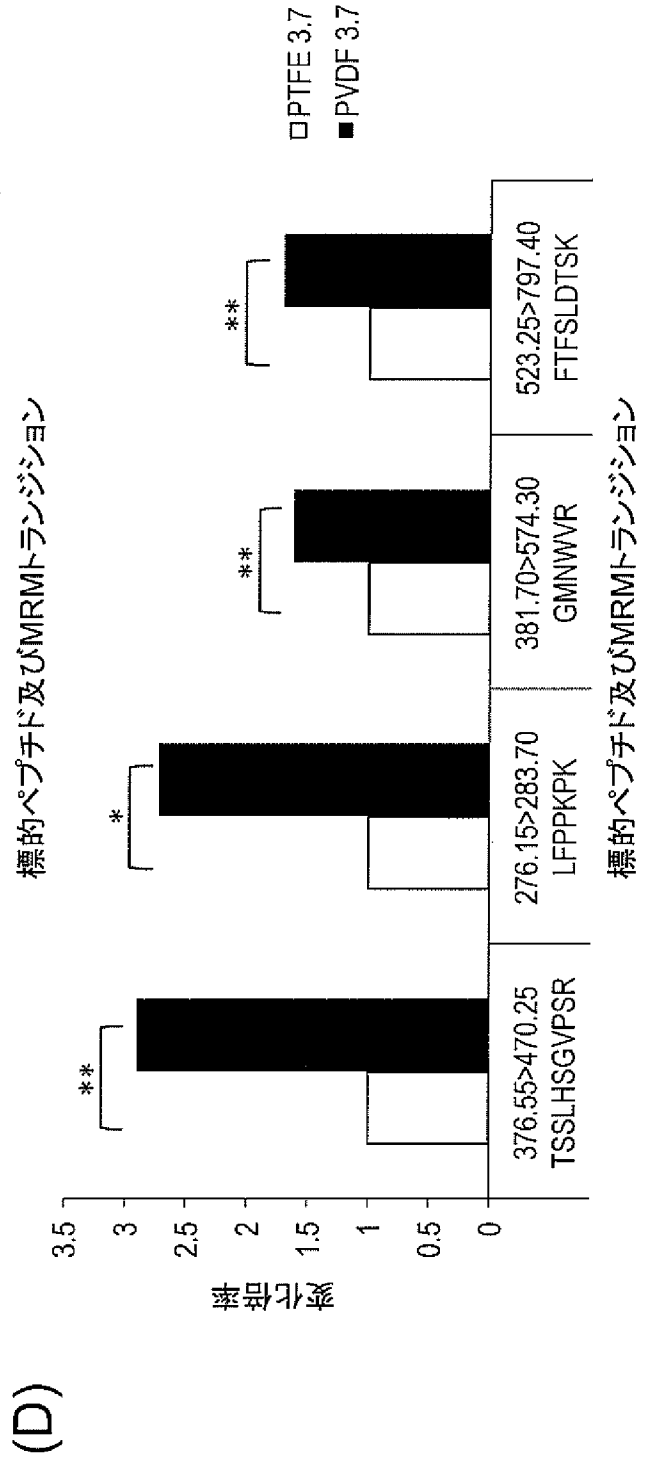
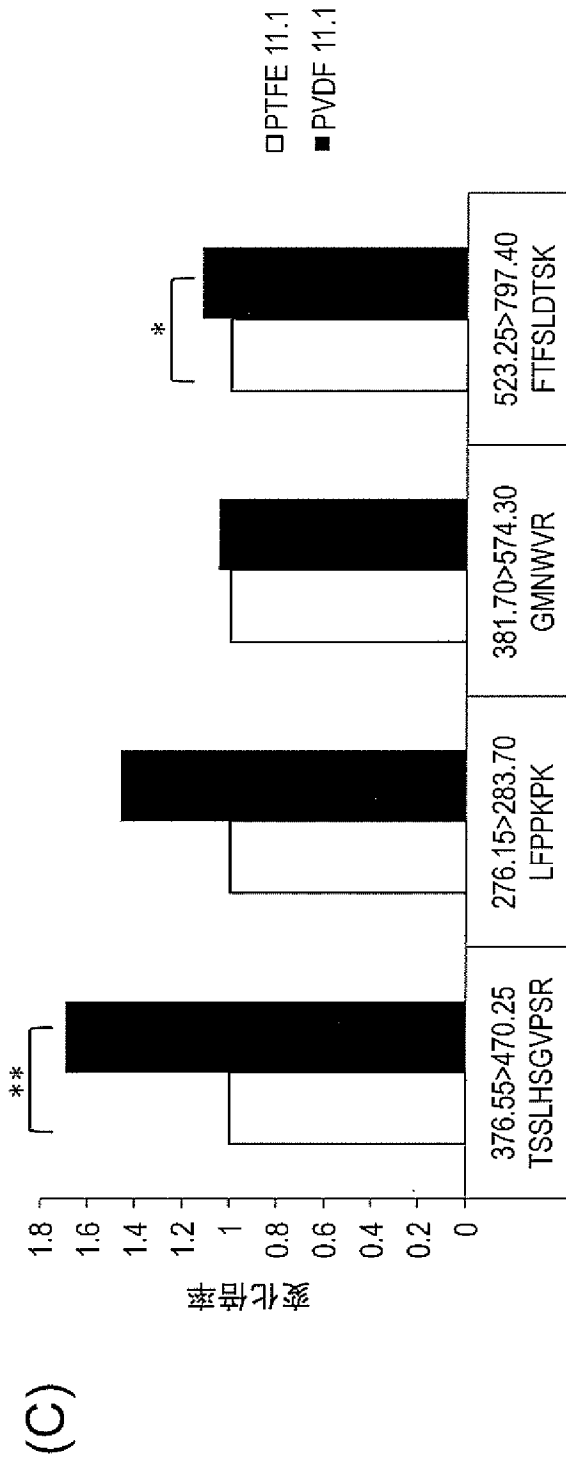
[図2-3]



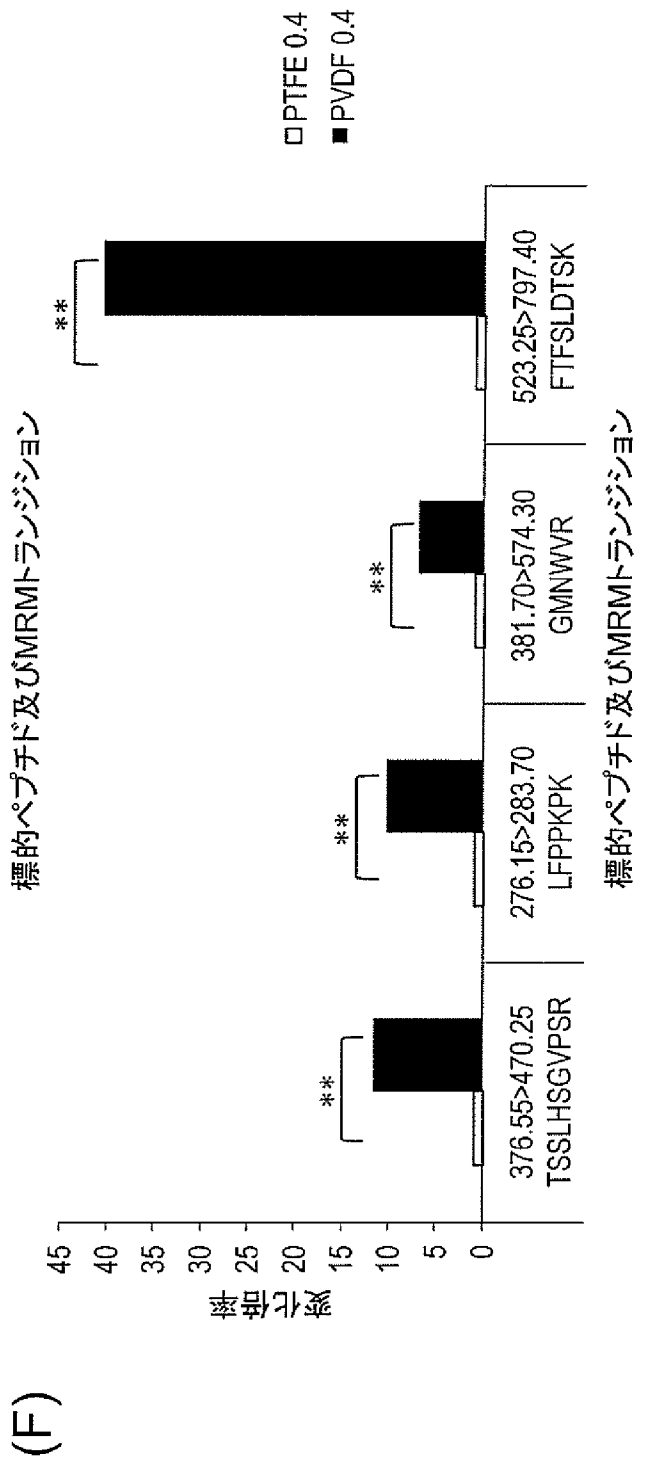
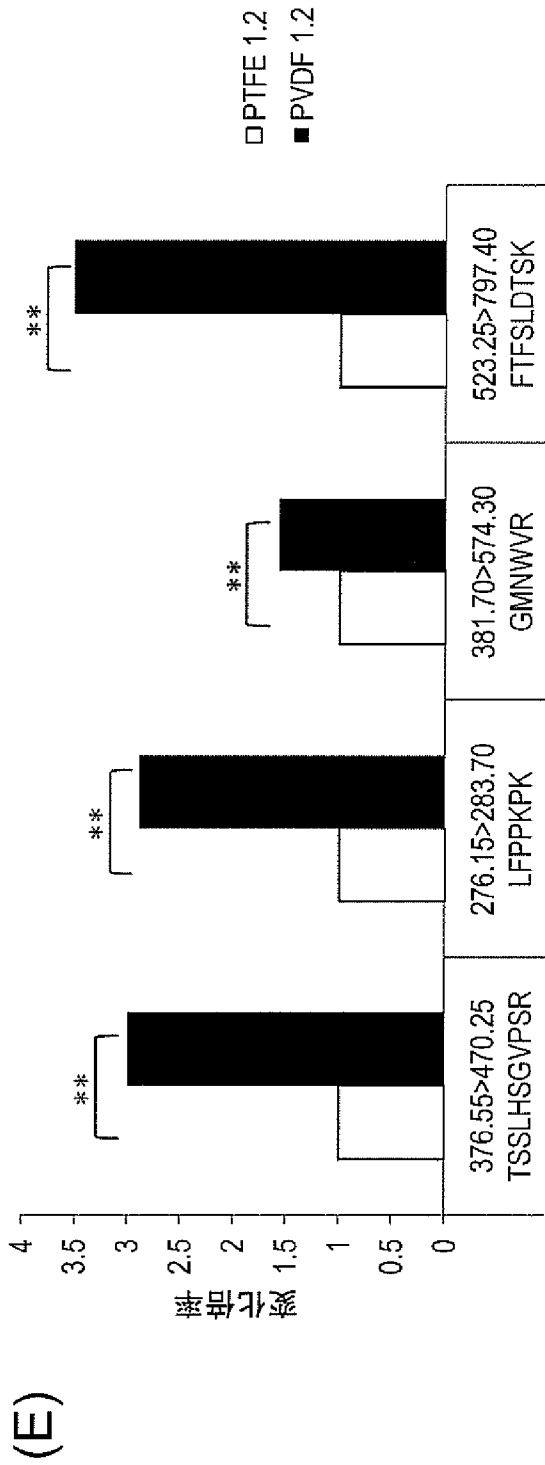
[図3-1]



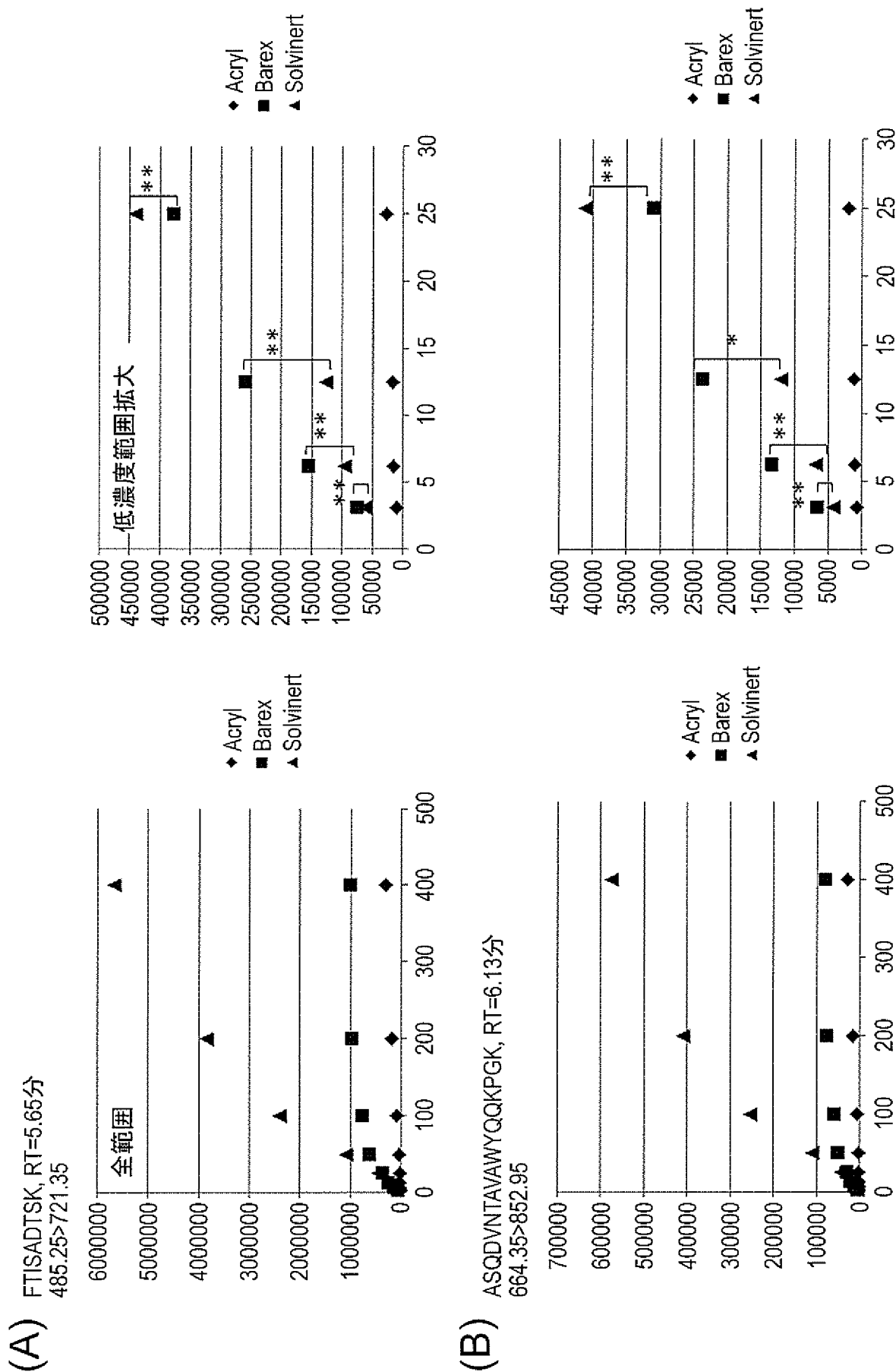
[図3-2]



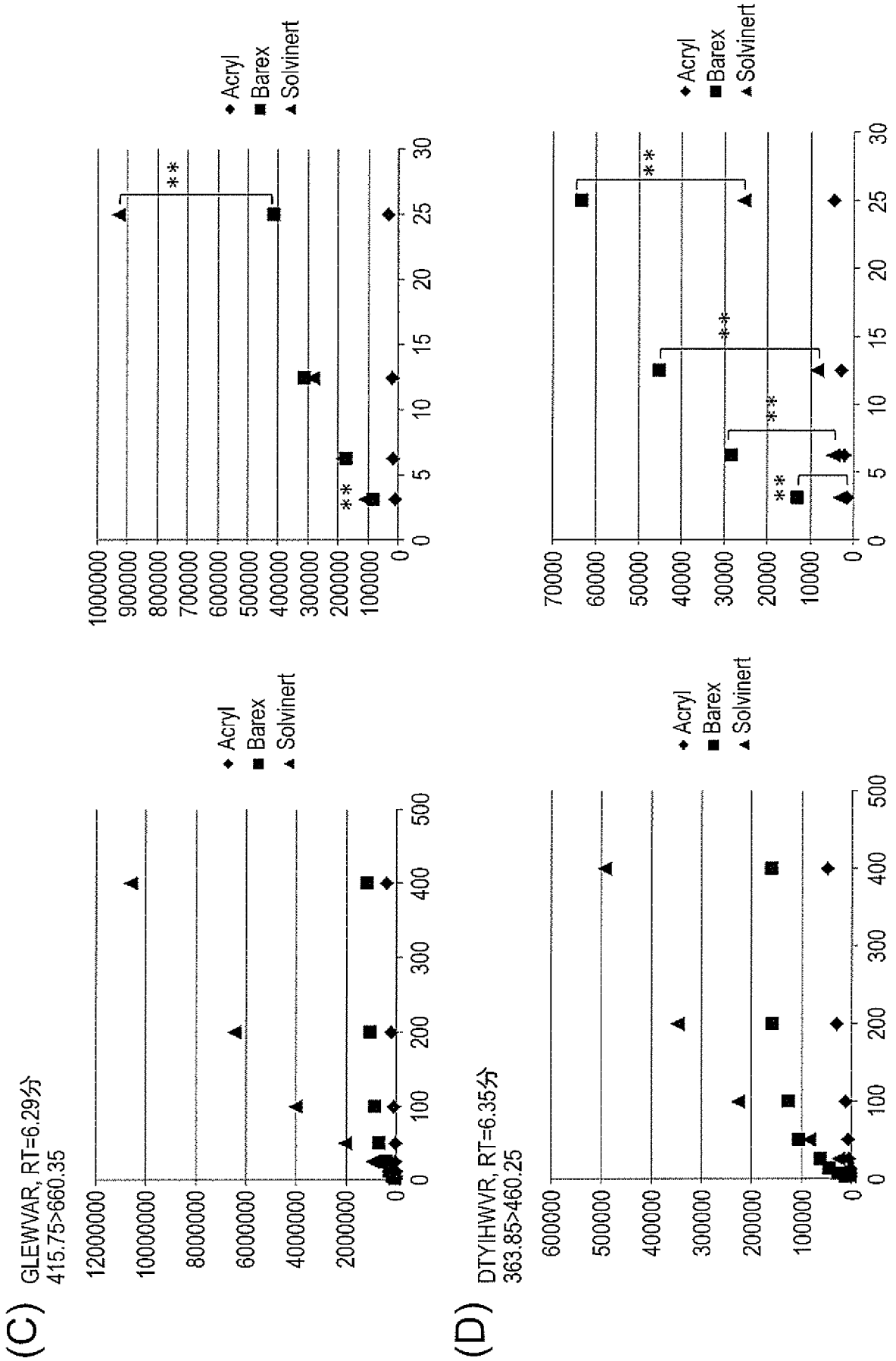
[図3-3]



[図4-1]

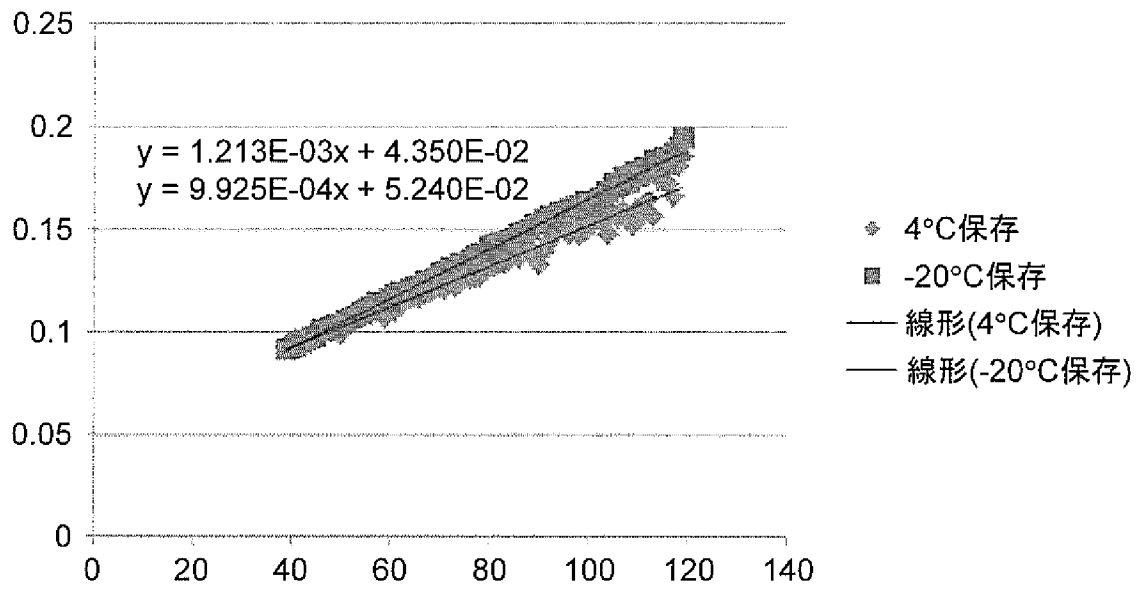


[図4-2]

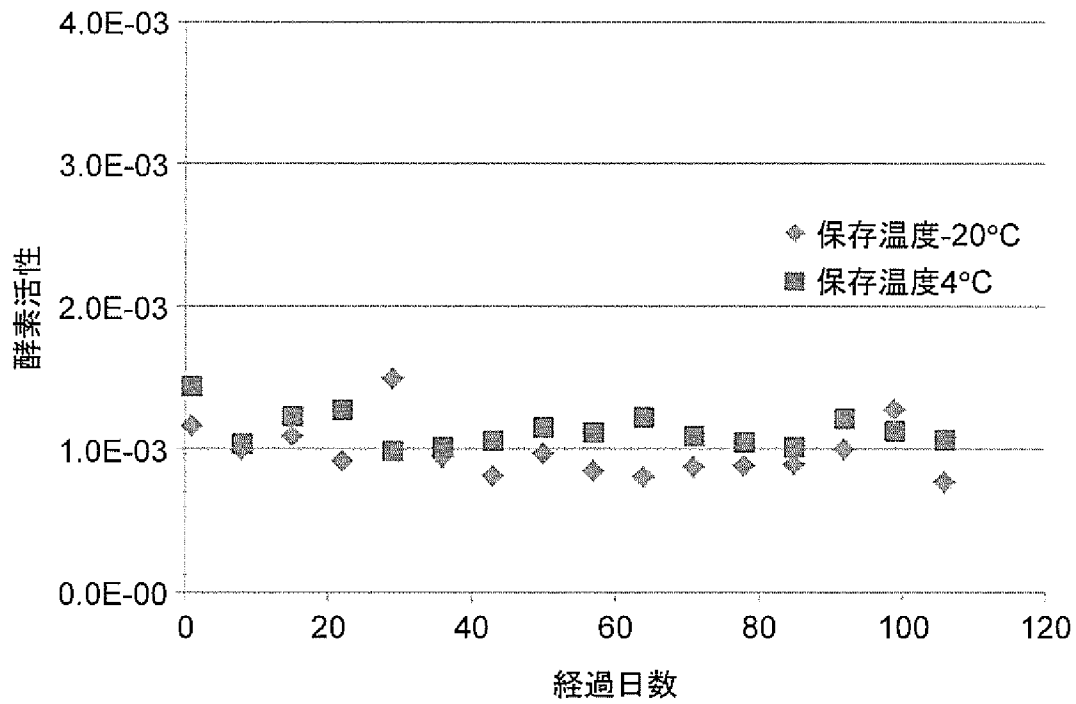


[図5]

(A)

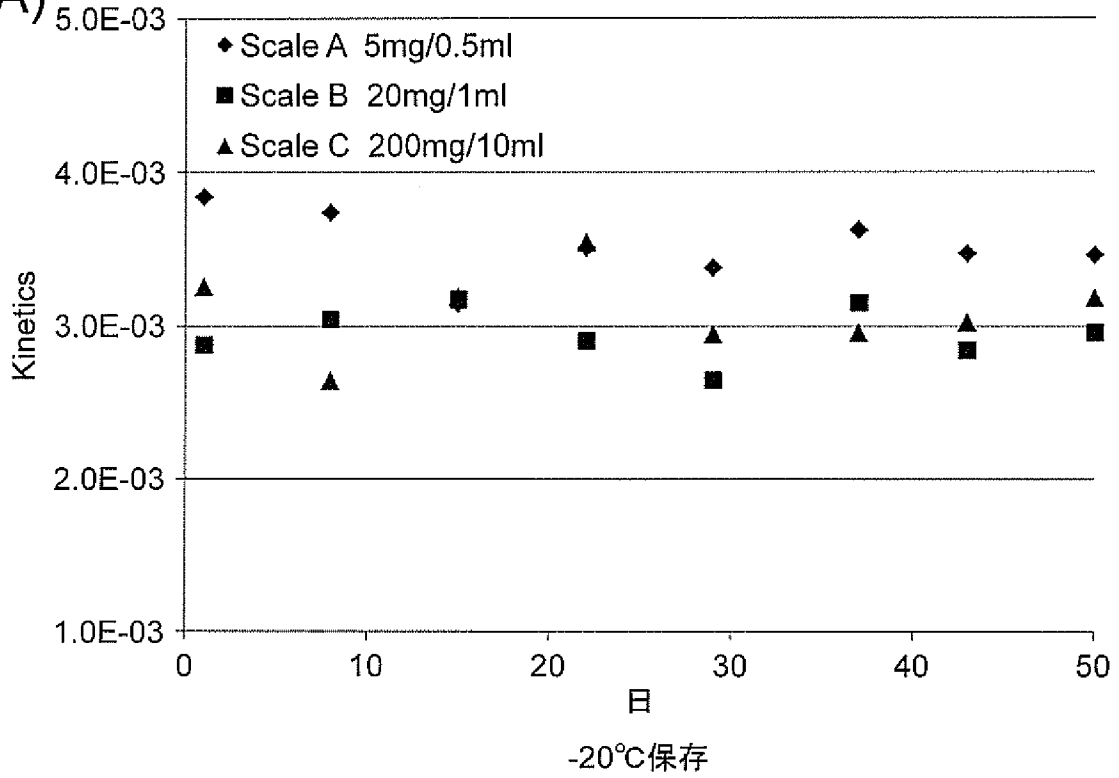


(B)

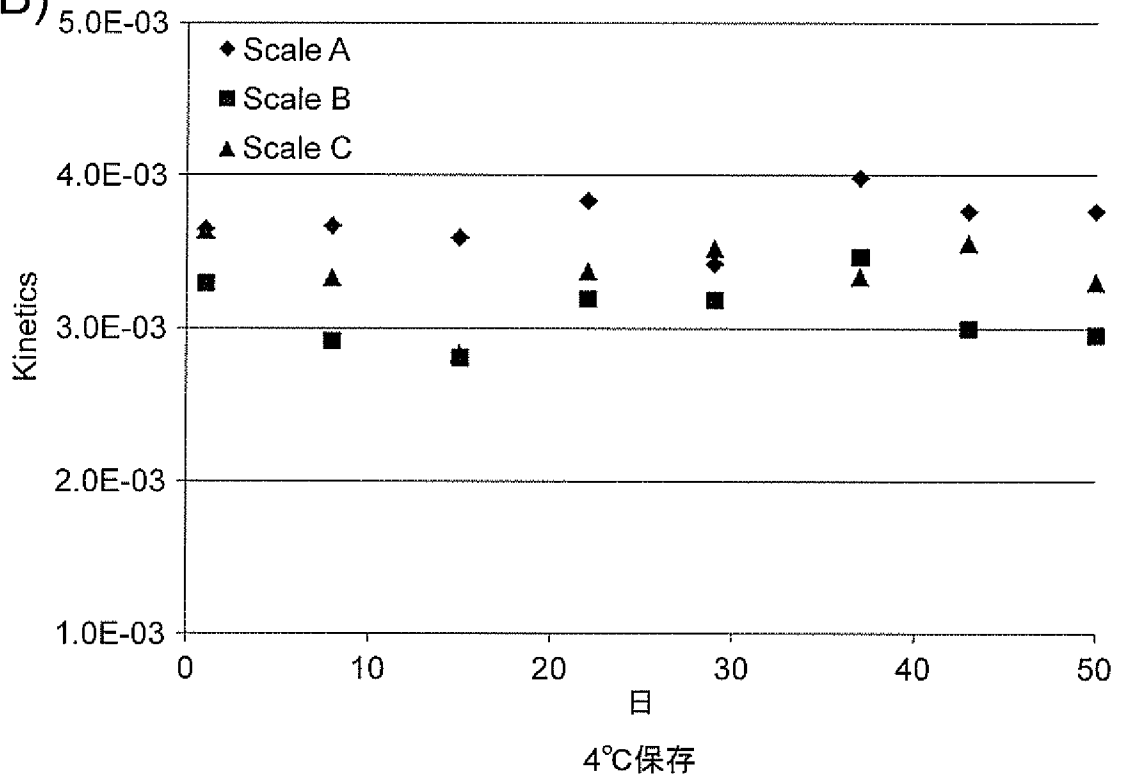


[図6]

(A)



(B)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/085459

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N30/72(2006.01)i, G01N1/10(2006.01)i, G01N27/62(2006.01)i, G01N30/00(2006.01)i, G01N30/06(2006.01)i, C12N11/02(2006.01)n, C12Q1/00(2006.01)n, C12Q1/37(2006.01)n
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N30/72, G01N1/10, G01N27/62, G01N30/00, G01N30/06, C12N11/02, C12Q1/00, C12Q1/37

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
 Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	IWAMOTO N, Selective detection of complementarity-determining regions of monoclonal antibody by limiting protease access to the substrate: nano-surface and molecular-orientation limited proteolysis, Analyst, 2014.02.07, 139(3), 576-580, Supplementary Information	8-11
Y		1-7
Y	Merck Millipore Bunsekiyo Filter Catalog 2014, Merck Millipore, 2014, pages 17, 21	1-7

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 17 February 2016 (17.02.16)	Date of mailing of the international search report 01 March 2016 (01.03.16)
--	--

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/085459

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions claimed in claims 1-7 relate to a kit that comprises a porous body, nanoparticles, a reactor, a buffer solution and a filtration membrane.

The inventions claimed in claims 8-11 relate to a recording medium that contains data of parent ion, etc. for one or more peptides obtained by protease digestion of an Mab.

As said above, the inventions of claims 8-11 have no common special technical feature between themselves and the invention of claim 1.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. G01N30/72(2006.01)i, G01N1/10(2006.01)i, G01N27/62(2006.01)i, G01N30/00(2006.01)i, G01N30/06(2006.01)i, C12N11/02(2006.01)n, C12Q1/00(2006.01)n, C12Q1/37(2006.01)n</p>														
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. G01N30/72, G01N1/10, G01N27/62, G01N30/00, G01N30/06, C12N11/02, C12Q1/00, C12Q1/37</p>														
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:30%;">日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2016年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2016年	日本国実用新案登録公報	1996-2016年	日本国登録実用新案公報	1994-2016年			
日本国実用新案公報	1922-1996年													
日本国公開実用新案公報	1971-2016年													
日本国実用新案登録公報	1996-2016年													
日本国登録実用新案公報	1994-2016年													
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), PubMed</p>														
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width:10%;">引用文献の カテゴリー*</th> <th style="width:70%;">引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th style="width:20%;">関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td rowspan="2">IWAMOTO N, Selective detection of complementarity-determining regions of monoclonal antibody by limiting protease access to the substrate: nano-surface and molecular-orientation limited proteolysis, Analyst, 2014.02.07, 139(3), 576-580, Supplementary Information</td> <td>8-11</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>メルクミリポア 分析用フィルターカタログ 2014, メルクミリポア, 2014, 17, 21 頁</td> <td>1-7</td> </tr> </tbody> </table>				引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X	IWAMOTO N, Selective detection of complementarity-determining regions of monoclonal antibody by limiting protease access to the substrate: nano-surface and molecular-orientation limited proteolysis, Analyst, 2014.02.07, 139(3), 576-580, Supplementary Information	8-11	Y	1-7	Y	メルクミリポア 分析用フィルターカタログ 2014, メルクミリポア, 2014, 17, 21 頁	1-7
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号												
X	IWAMOTO N, Selective detection of complementarity-determining regions of monoclonal antibody by limiting protease access to the substrate: nano-surface and molecular-orientation limited proteolysis, Analyst, 2014.02.07, 139(3), 576-580, Supplementary Information	8-11												
Y		1-7												
Y	メルクミリポア 分析用フィルターカタログ 2014, メルクミリポア, 2014, 17, 21 頁	1-7												
<p>☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。</p>		<p>☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>												
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>		<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」同一パテントファミリー文献</p>												
<p>国際調査を完了した日</p> <p style="text-align: center;">17.02.2016</p>		<p>国際調査報告の発送日</p> <p style="text-align: center;">01.03.2016</p>												
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p style="text-align: center;">日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>		<table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:50%;">特許庁審査官 (権限のある職員)</td> <td style="width:10%; text-align: center;">2 J</td> <td style="width:40%; text-align: center;">3 3 1 6</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">赤坂 祐樹</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>電話番号 03-3581-1101 内線</td> <td></td> <td style="text-align: center;">3 2 5 2</td> </tr> </table>		特許庁審査官 (権限のある職員)	2 J	3 3 1 6	赤坂 祐樹			電話番号 03-3581-1101 内線		3 2 5 2		
特許庁審査官 (権限のある職員)	2 J	3 3 1 6												
赤坂 祐樹														
電話番号 03-3581-1101 内線		3 2 5 2												

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求項1-7は、多孔質体、ナノ粒子、反応容器、緩衝液及びろ過膜を含むキットに関する発明である。

請求項8-11は、Mabのプロテアーゼ消化によって得られるペプチドの1以上に対して、親イオン等のデータを含む、記録媒体に関する発明である。

上記のとおり、請求項8-11に係る発明は、請求項1に係る発明との間に共通する特別な技術的特徴を有していない。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。