

Immunoaffinity-MSによる バイオアナリシスの現状について

DG2024-66

Current Status of Bioanalysis Using Immunoaffinity-mass spectrometry

氏名 (Name)	所属 (Company)
水落 正慶 (Masayoshi Mizuochi) [※]	シミックファーマサイエンス株式会社 (CMIC Pharma Science Co., Ltd.)
明石 知也 (Tomoya Akashi)	田辺三菱製薬株式会社 (Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation)
喜多 健二 (Kenji Kita)	株式会社サンプラネット (Sunplanet Co., Ltd.)
下田 瞳 (Hitomi Shimoda)	第一三共株式会社 (Daiichi Sankyo Co., Ltd.)
下村 幸子 (Sachiko Shimomura)	メディフォード株式会社 (Mediford Corporation)
鈴木 康平 (Kohei Suzuki)	株式会社大塚製薬工場 (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.)
高見 祐哉 (Yuya Takami)	小野薬品工業株式会社 (ONO PHARMACEUTICAL CO.,LTD.)
東 秀行 (Hideyuki Higashi)	興和株式会社 (Kowa Company, Ltd.)
八木 遼太郎 (Ryotaro Yagi)	東レ株式会社 (Toray Industries, Inc.)
八幡 季子 (Toshiko Yahata)	アステラス製薬株式会社 (Astellas Pharma Inc.)
吉岡 陽子 (Yoko Yoshioka)	株式会社東レリサーチセンター (Toray Research Center, Inc.)

※リーダー

背景

- バイオアナリシスの分野において、バイオマーカーなどの中高分子化合物測定の需要が増加している
- 従来のLigand Binding Assay (LBA)法を補完する形で、特異性や感度の課題に対処するためのImmunoaffinity – MS* (IA-MS) の使用が増えている
- IA-MSは抗体を試料精製に用いる手法であり、従来のLC-MSの試料前処理法に比べて高い特異性と感度を提供する

DG2024-66の目的

- IA-MSの有用性を広く知ってもらうことで、LC-MSユーザーの分析の幅を広げる
- これからIA-MSを始める方にとっての足掛かりとなることを期待し、現地でのポスターを通じて意見交換や議論を行いたい

* : 同じような単語として、Immunoprecipitation – MSやLBAとの組み合わせという意味でHybrid-LC-MSなど様々な用語があるが、本DGでは広い意味でIA-MSという単語に統一してポスターを作成した

活動方針に関する議論

■ 調査

- アンケートを通じたIA-MSの普及状況や応用範囲

■ 情報収集

- IA-MSが分析法として選択される理由や特徴
- 操作のコツや資材の選択・検討方法
- バイオアナリシスにおけるIA-MSの応用

■ 議論

- Protein A/Gやアプタマーなど、物質に対して特異的な親和性を持つツールの利用について
- 試料前処理における磁気ビーズや自動化装置の使用による効率的なプロセス開発への応用について

グループを2つに分けて次の内容で活動

グループA： IA-MSに関するアンケート調査、IA-MSが選択される背景や実施状況の情報収集とその成果発表

グループB： IA工程における実際の操作に関わる部分についての議論とその成果発表



活動実績

2024 5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	2025 1月	2月	3月
★5/24		メンバー決定				★10/30				JBF Symposium 3/3 – 3/5
		★7/11	kick off						★2/3	
		★7/26					★12/17			
			★8/23	(On-site)					★1/30	
				★9/10		★11/26				
					★10/2			★12/24		
				★9/13			★12/11			
					★10/8			★1/16		
		7/17		9/18		11/20		1/15	2/19	

<http://bioanalysisforum.jp/>

推進委員会

全体 Mtg

グループA Mtg

グループB Mtg



IA-MS

- IA-MS（免疫親和性質量分析法）は、特定のタンパク質やその修飾体を高感度かつ高特異的に検出するための技術である
- 多くの場合、免疫沈降法（Immunoprecipitation、IP）と質量分析法（MS）を組み合わせた手法が用いられ、2000年頃から発展してきた技術である
- 近年、この技術は医薬品開発や疾患の診断、バイオマーカー研究など、さまざまな分野で利用されている

2000年代～現在

- LC-MS/MS性能のさらなる向上（HRMSやTOF-MSなど）
- 磁気ビーズの高性能化
- IA-MSの応用範囲拡大、医薬品開発に不可欠な技術となりつつある

1980年代～1990年代

- LC-MSの実用化（APCIやESIなどのイオン化技術の開発）
- LC-MS/MS（トリプル四重極質量分析計）の登場～技術発展
- IA-MSの登場（1990年代）

1960年代～1980年代

- イムノアフィニティクロマトグラフィー（IAC）の概念確立～技術発展
- LBAの基礎構築～技術発展
- 磁気ビーズの使用開始（1970年代後半）

【目的】 標的タンパク質の精製

【実施例】



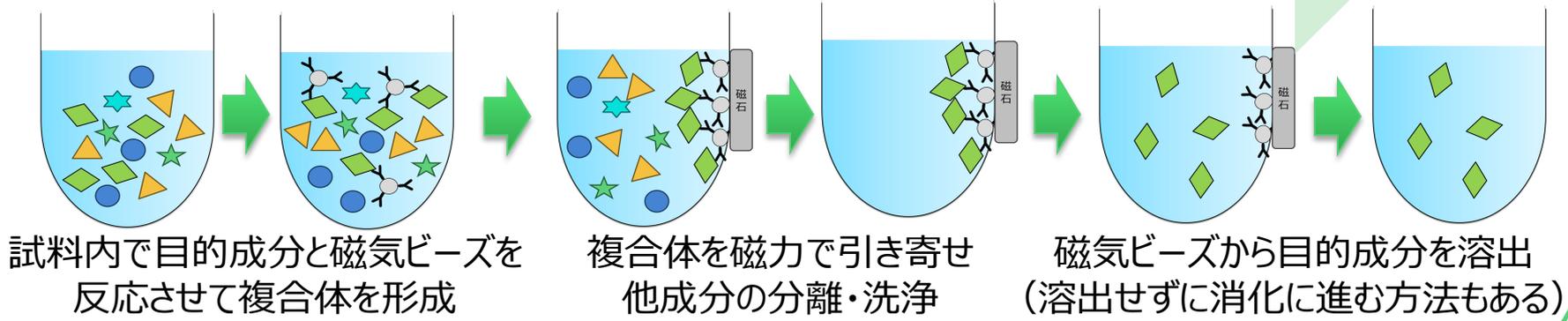
実施例には酵素消化前の前処理を示しているが、酵素消化を行わないインタクト分析でも同様の効果が得られる

【効果】 LC-MS/MS分析での夾雑ピークの減少、バックグラウンド低下

JBF IA-MSの手順



IPのワークフロー例



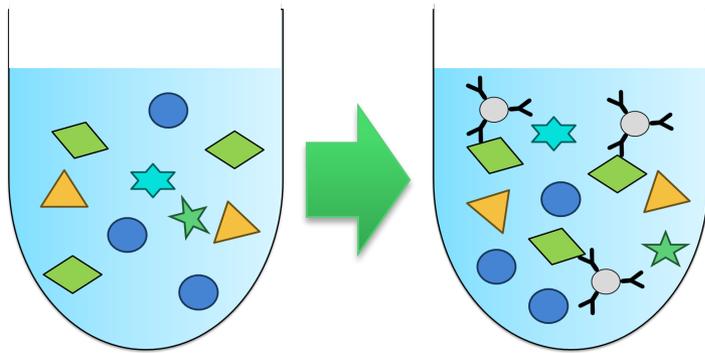
<http://bioanalysisforum.jp/>

JBF IPの原理 (1/2)

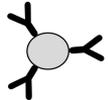
IPとは、特定の抗原に対する特異的な抗体を用いて溶液中の抗原を選択的に分離・分析する手法と定義されている

近年は、生体内のタンパク質（バイオマーカー等）や治療薬の分離・分析を目的に、それらに親和性を示す抗体やタンパク質が免疫沈降反応に用いられる

タンパク質を免疫沈降する例

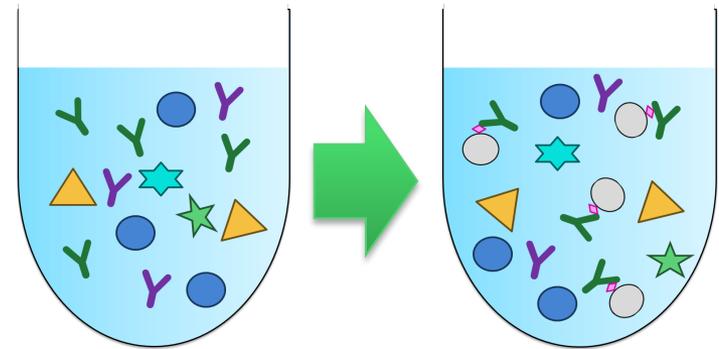


目的タンパク質



特異的な抗体を結合させたビーズ

治療薬抗体を免疫沈降する例



治療薬抗体



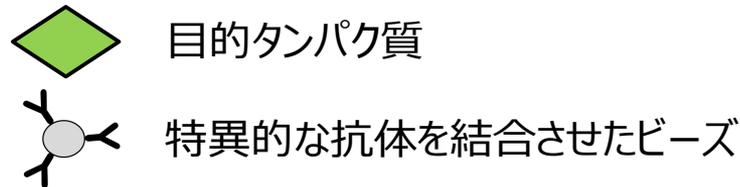
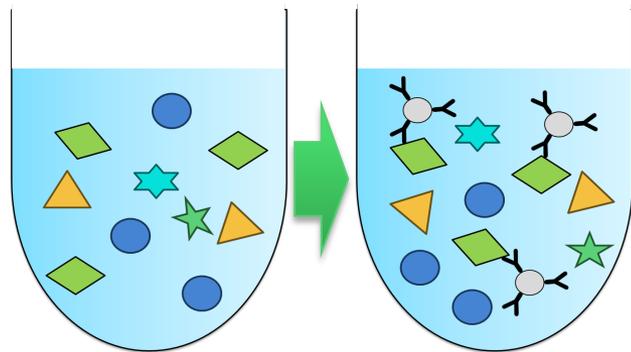
抗原を結合させたビーズ

JBF IPの原理 (2/2)

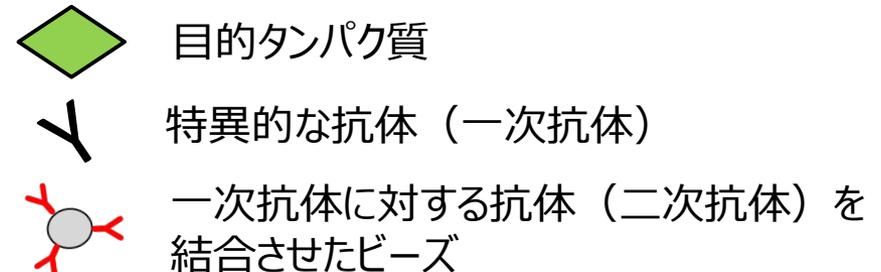
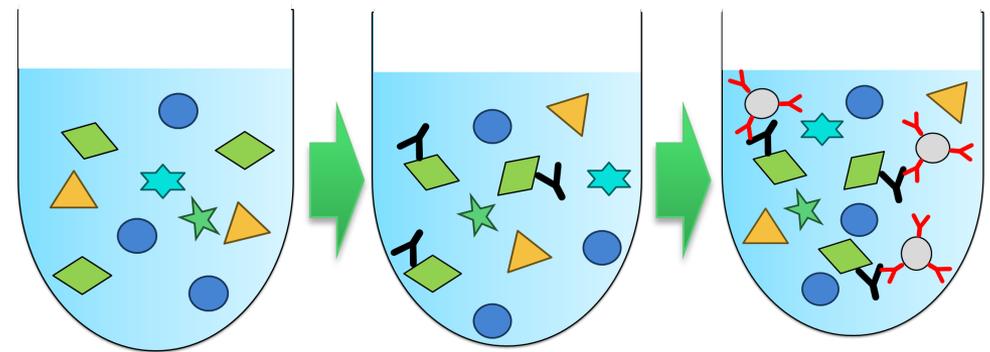
IPは試験に用いる資材（captureとして使用する抗体やタンパク質、ビーズの種類、buffer・洗浄液・溶出液の種類等）、反応条件（反応時間、pH、温度等）や洗浄方法により目的タンパク質の回収率が異なる

下記に目的タンパク質とビーズの複合体を形成させる2つの手法を示した

直接法の例



間接法の例





LC-MS/MSでのタンパク定量のこれまでのDG活動

本DGの主題

過去DG (DG2016-25, DG2017-31) での議論

生体試料

タンパク
精製

変性
&
可溶化

還元
&
アルキル化

酵素消化

ペプチド
精製

LC-
MS/MS

JBF 酵素消化までの一般的な工程

変性 denaturation
タンパク質高次構造の破壊

還元 reduction
ジスルフィド結合の還元

アルキル化 alkylation
ジスルフィド再形成の抑制

酵素消化 enzyme digestion
ペプチドへの断片化

8th JBF Symposium, DG2016-25 23

JBF 定量向きの消化反応の条件

- 特異性が高いこと
 - たんぱく質 → 目的以外の断片が少ない
- 再現性が良好であること
 - ペプチド (Sample 1, Sample 2, Sample 3)
- 高効率な酵素を用いること
 - 短時間でプラトーに達する
 - 必要な酵素の量が少ない (実用上取り扱やすい)
- その他
 - 反応条件の許容範囲が広い (ぶれない)
 - 生成する目的のペプチドが安定
 - トータルのコストが安い ... など

8th JBF Symposium, DG2016-25 21

JBF 測定対象ペプチド選択までの流れ

目的タンパク質のアミノ酸配列の確認
□ データベースの活用 (内因性タンパク質/抗体医薬)

酵素消化で断片化されるペプチド配列の確認
□ データベースやソフトウェアの活用

測定に適したペプチド配列の選定
□ 構成アミノ酸からの選定
□ データベースの活用

実際に測定してみても絞り込み
□ 感度や保持時間、妨害ピークの確認

9th JBF Symposium, DG2017-31 9

JBF 処理パターンの比較

	変性&還元アルキル化後に消化	(変性なし)還元アルキル化後に消化	変性後消化(還元アルキル化なし)	直接消化(変性&還元アルキル化なし)
消化効率	高い	中程度	中程度	低い
作業工程	多い	中程度	中程度	少ない
目的外のペプチド等夾雑物の生成	多い	中程度	中程度	少ない

✓ 変性→還元・アルキル化→酵素消化の手順が一般的ではあるが・・・

感度が十分 → 作業工程を減らしてみる
夾雑物が多い → 消化効率をあげて低くする } という選択肢もあり

アンケート: Q13-16

8th JBF Symposium, DG2016-25 25

JBF 消化酵素 (第一選択)

	Trypsin	Lys-C
Pros	<ul style="list-style-type: none"> 最も一般的に用いられている C末端がLys 又はArgとなり、ペプチド断片の感度が上昇 	<ul style="list-style-type: none"> TrypsinよりもpH許容範囲が広い 自己消化が少ない C末端がLysとなりペプチド断片の感度が上昇 Lys-Pro配列も切断可能
Cons	<ul style="list-style-type: none"> 自己消化に注意が必要 切断されないLys部位が残ることがある 	<ul style="list-style-type: none"> 切断後のペプチド配列が長い

消化したい位置に応じて使い分ける
Trypsin/Lys-C mixの選択肢もある

アンケート: Q11

8th JBF Symposium, DG2016-25 26

JBF 定量に使用するMSの種類

四重極MS	高分解能MS
<p>三連四重極型 (QQQ)</p>	<p>飛行時間型 (TOF) Kingdon trap型 Orbital trap型</p>
m/zによりイオンを選択的に透過するマスフィルターとしての四重極2本の間に衝突室としての四重極1本を配置したタイプの質量分析計	m/zの違いによる検出器までの到達時間の違いを利用するTOF型や電場や磁場により発生させた周回運動の周期からm/zを検出するKingdon trap型、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴 (FT-ICR) など

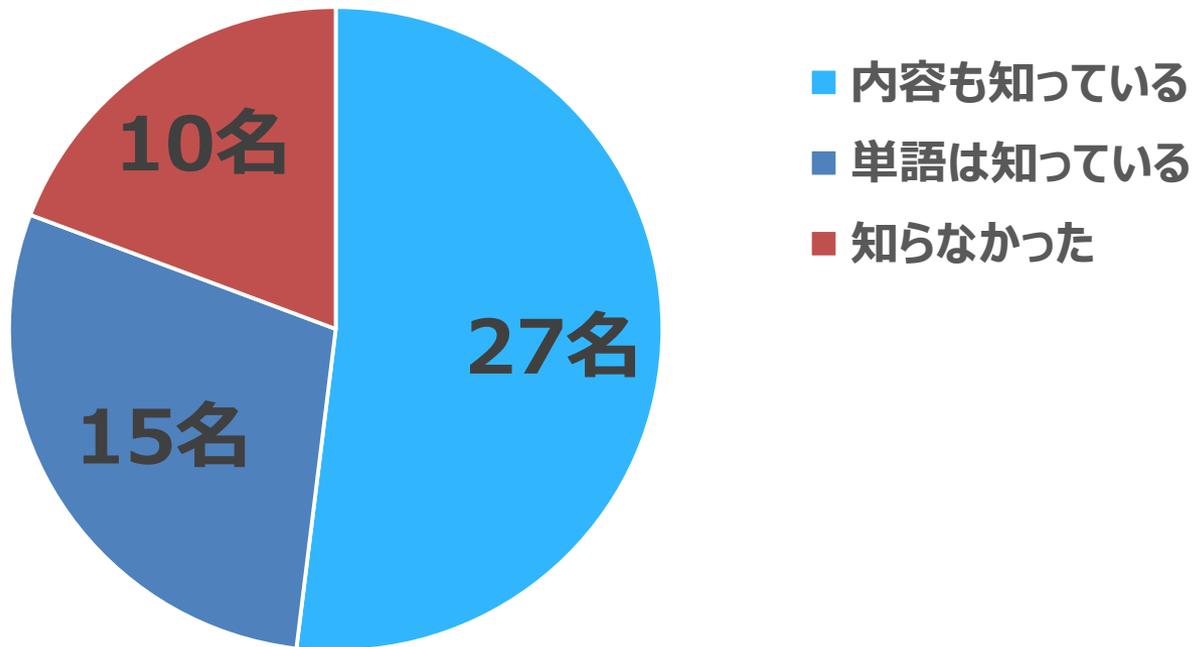
9th JBF Symposium, DG2017-31 41

http://bioanalysisforum.jp

IA-MSの導入状況

(アンケートより)

Q3 Immunoaffinity (IA) -MSについてご存知ですか？（回答者数52名）

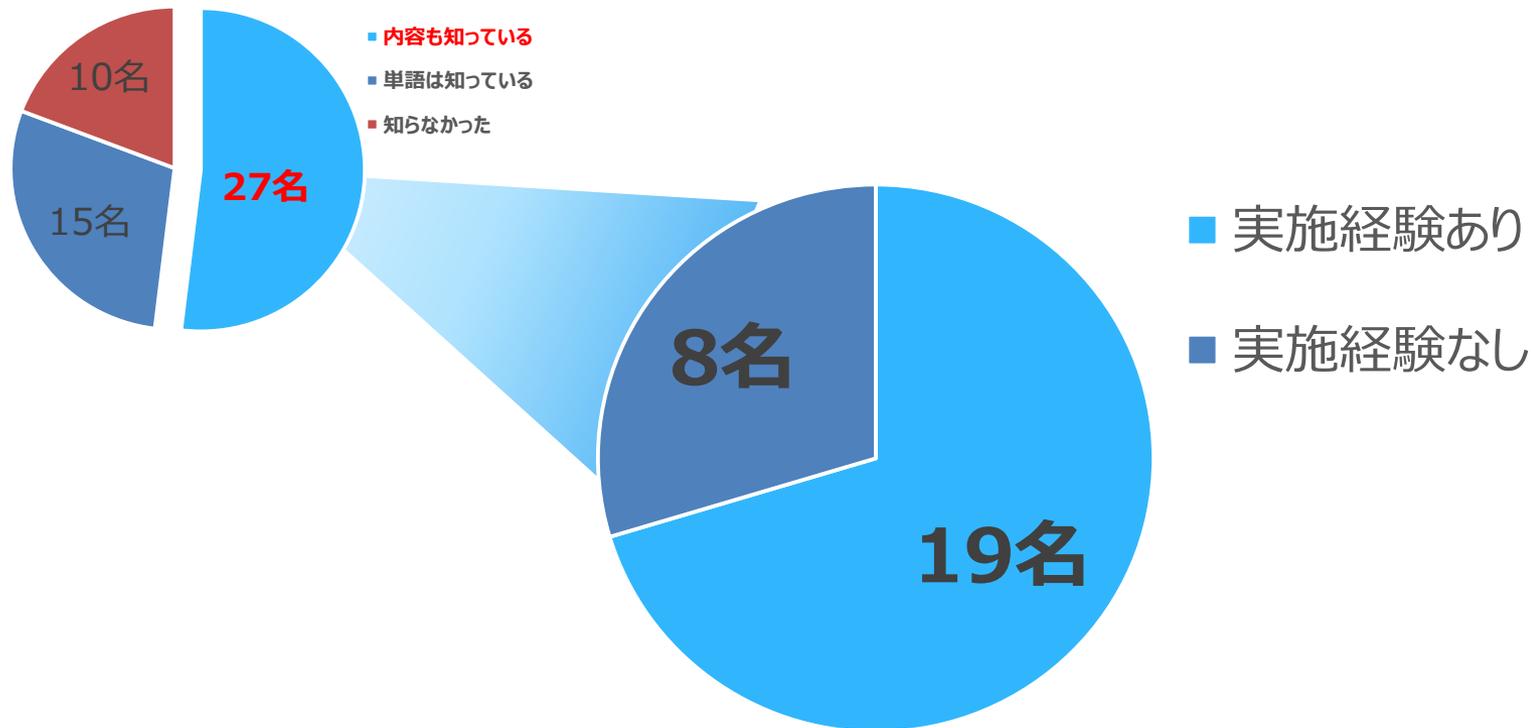


半数以上が「内容も含めて知っている」と回答

「もともと知らない」DGサポーターからのアンケート回答率が低いと想定すると、実際の認知度はさらに低い可能性がある

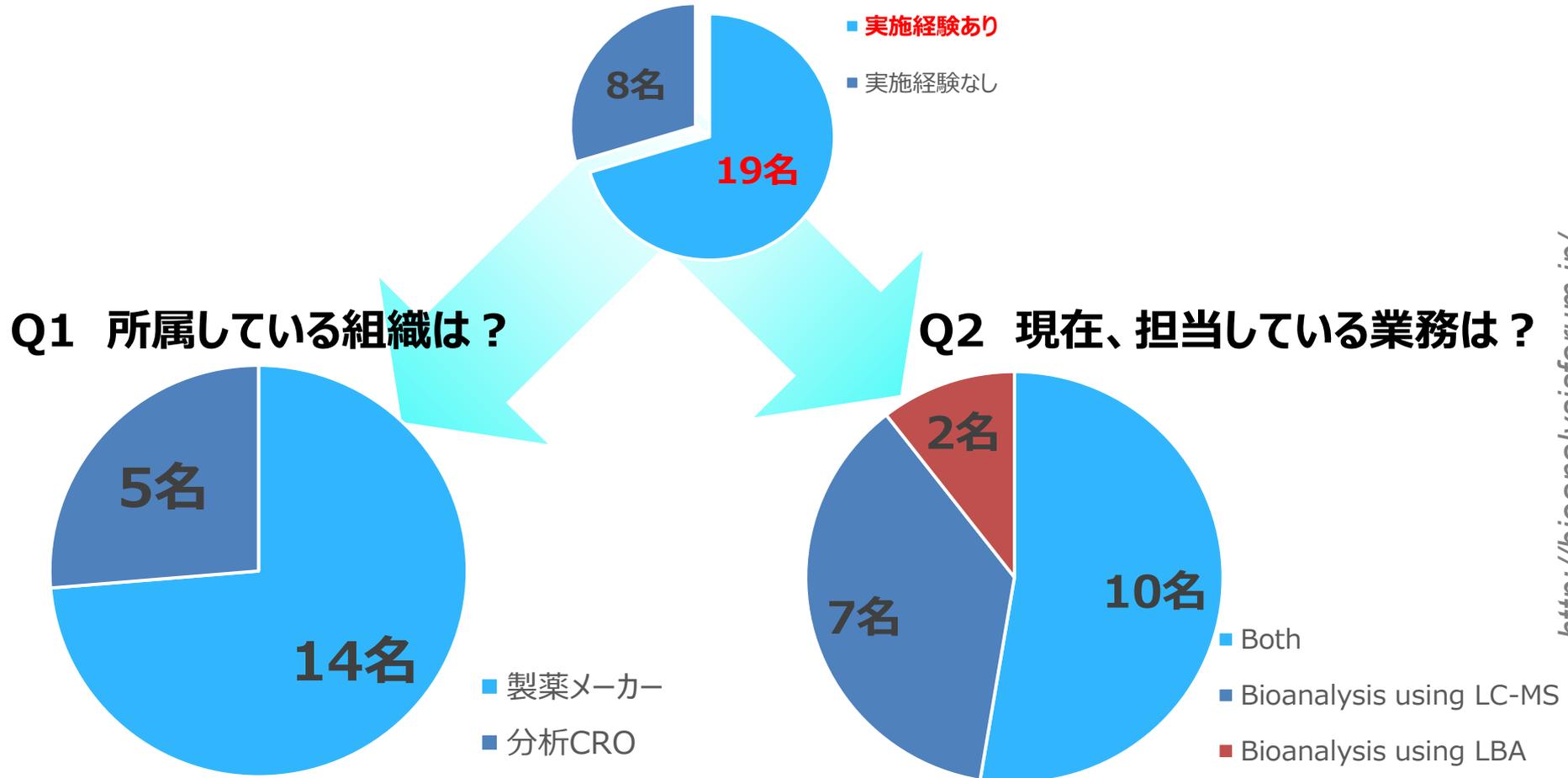
JBF IA-MSの経験者

Q4 IA-MSの実施経験について教えてください。



IA-MSを知っている回答者の内、約7割が経験者であった

JBF 経験者の内訳

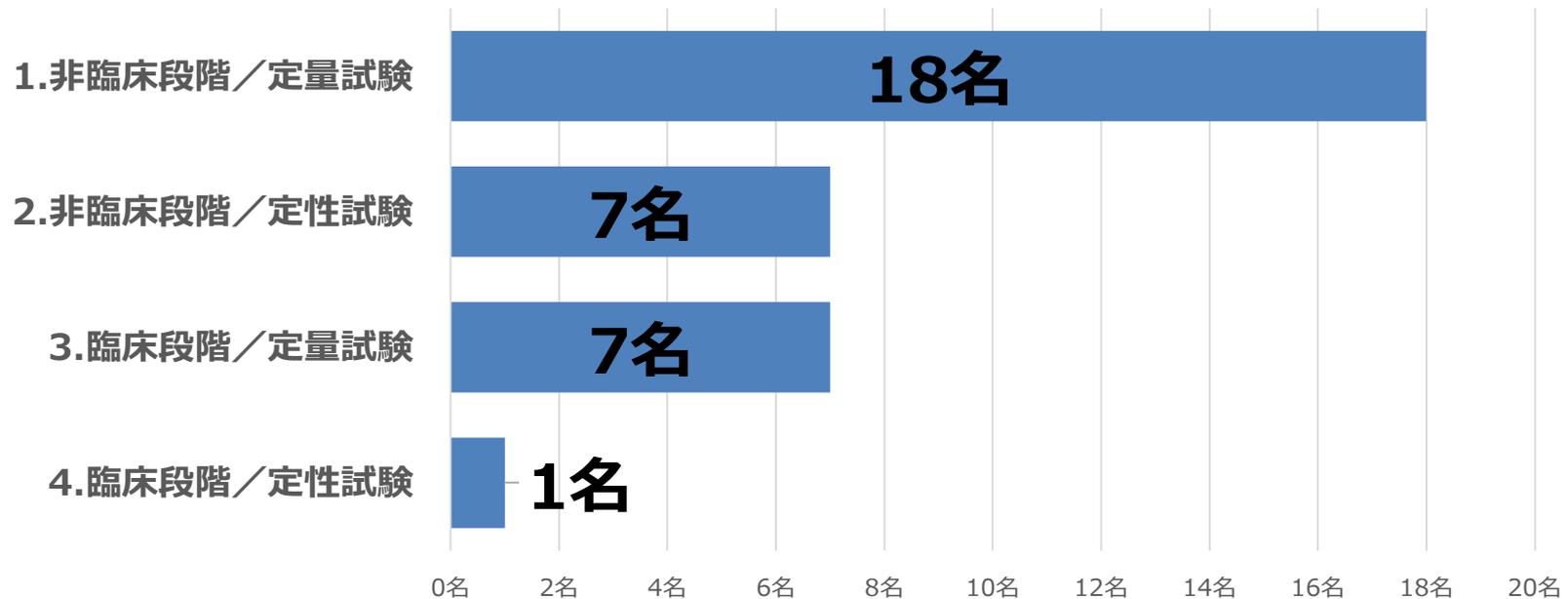


<http://bioanalysisforum.jp/>

LBAとLC-MSのバイオアナリシスを兼務している担当者が半数以上

IA-MSが実施されるステージ

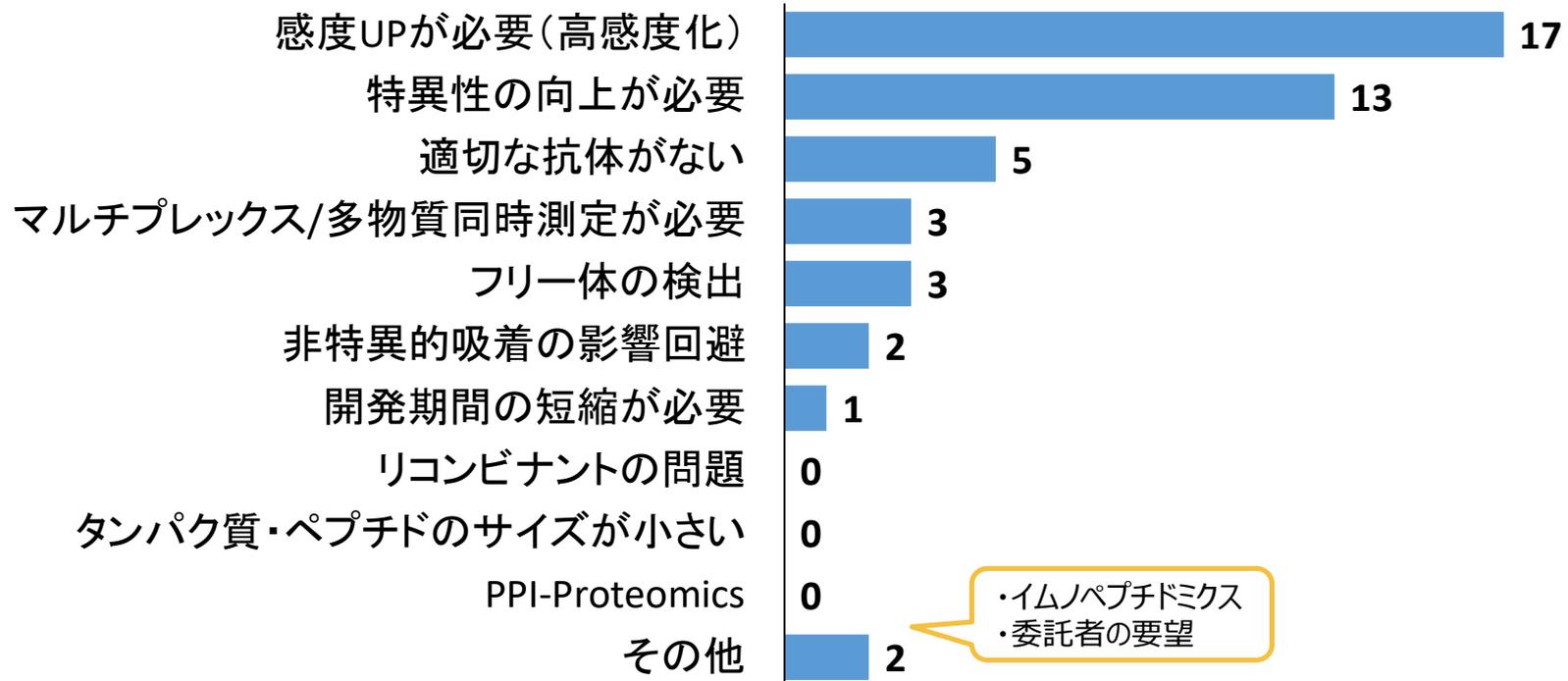
Q2 現在、担当している業務は？（臨床／非臨床、定性／定量）
（IA-MS経験者からの回答：回答数19、複数回答）



非臨床ステージの方がIA-MS経験者が多い

IA-MSの使用理由

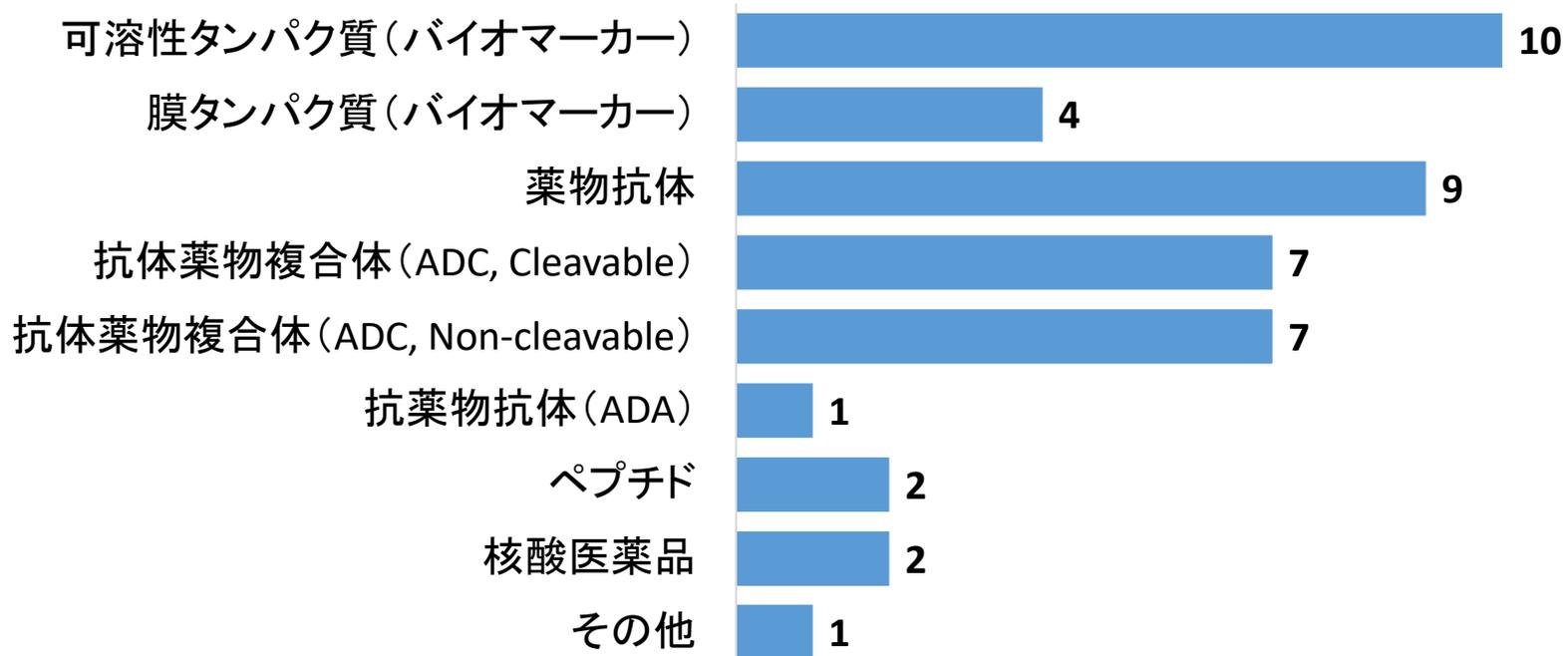
Q5 IA-MSを使用した理由をお知らせください。(回答者数19名、複数回答)



- 感度または特異性向上を目的とした使用が多い
- 抗体の問題や同時測定など、LBAでは実施困難な場合にも使用されている

IA-MSの測定対象

Q6 IA-MSにおける測定対象をお知らせください。（回答者数18名、複数回答）



バイオマーカータンパク質、抗体、核酸など、
測定対象は多岐にわたる

IA-MSの活用事例紹介



IA-MSの使用目的例

Table 3. Practical implementation of key IA-LC-MS/MS workflows enabling pharmaceutical and clinical applications.

Immunoaffinity strategy	Protein Biomarker Analyte	Peptides measured (when using digestion)	Key Application	Reagent and Assay Considerations	Example References
<p>A</p> <p>Antiprotein Ab</p>	Total	One or several proteotypic peptides	Quantify protein biomarker	Binding partners don't exist or antibody can out-compete potential binding partner	(15, 55, 144-146)
感度向上、特異性の向上					
<p>B</p> <p>Antiprotein Ab against region common to all/selected forms of a protein</p>	All or selected isoforms	One or several peptides from common region and one or several peptides representing modified regions	Quantify different forms of the protein biomarker	Capture reagent against modified region can also be used for verification or quantification of modified protein biomarker	(47, 48, 57, 147, 148)
単一の蛋白のDifferent formの検出					
<p>C</p> <p>Antiprotein Ab does not compete with binding protein or biotherapeutic</p>	Total (free and bound to binding partner)	One or several peptides from biomarker; may include peptides from binding protein or biologics	Total biomarker irrespective of protein binding; total target engagement assay for protein therapeutics	Co-IA assay can measure target and its binding partner or biologics; lack of competition needs to be confirmed experimentally; can incorporate dissociation	(51, 149, 150)
Total biomarkerの定量、相互作用検証					
<p>D</p> <p>Antiprotein Ab competes with binding protein or biotherapeutic (not shown)</p>	Unbound (free) from binding partner	One or several peptides from biomarker	Free protein biomarker assay; free form of biomarker may be the active form; measures of target suppression following administration of protein therapeutic	Reagent properties assessed and selected to avoid/minimize disruption of preexisting target/ binding partner equilibrium; effect of binding protein/ protein therapeutic needs to be demonstrated	(51, 151)
Free proteinの定量					

Table 3. (continued)

<p>E</p> <p>Co-IA; antiprotein Ab binds to binding protein or biotherapeutic and does not compete with target binding</p>	Binding partner and protein biomarker complexed to binding partner	At least one peptide from binding partner and from protein biomarker	Targeted interaction studies; bound assay for PK/PD; i.e., direct information on target engagement or duplex PK/bound target assay	Likely relative measurement only of the bound protein; ensure washing conditions post capture don't dissociate protein biomarker	(22, 106)
Target engagement, PK/bound target assay					

http://bioanalysisforum.jp/

IA-MSを用いた分析法開発事例報告について調査した
以下のスライドにてIA-MS活用の目的とその事例について文献内容を紹介する

IA-MS活用目的	Analyte (ページ番号)
感度向上	IL-21 (P26) S1PR1 (P27) CYFRA21-1 (P28)
特異性向上	抗SARS-CoV抗体 (P29) Relaxin (P30)
感度向上・特異性向上	ProGRP (P31) PD1, PD-L1 (P32) ASO (P33) PromarkerD (P34) Amyloid- β (P35)
Conjugate/Freeの分離	IL-21 (P36) ADC (P37)
自己抗体の検出	ADA, Nab (P38-39)

Protein Biomarker Quantification by Immunoaffinity Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Current State and Future Vision

Hendrik Neubert,^{1*} Christopher M. Shuford,² Timothy V. Olah,³ Fabio Garofolo,⁴ Gary A. Schultz,⁵ Barry R. Jones,⁶ Lakshmi Amaravadi,⁷ Omar F. Latorza,⁸ Keyang Xu,⁹ and Bradley L. Ackermann¹

- 複数のバイオマーカーにおけるIP-MS活用事例がある (右図)
- 一部測定法は臨床応用に用いられ、CLIAラボラトリーで適応したものも存在 (Thyroglobulin, parathyroid hormone-related peptide)

Table 1. Quantitative human protein mass spectrometry assays representing applications in clinical diagnostics (A) and pharmaceutical and academic research (B).

Analyte(s)	Extraction	LC	Ionization	Detection	References
(A) Representative clinical diagnostics applications					
C-peptide, insulin	IA-protein	Yes	ESI	QqQ	(6)
Thyroglobulin	IA-peptide	Yes	ESI	QqQ	(10, 11)
Angiotensin-1 (renin activity)	SPE	Yes	ESI	QqQ	(12)
Insulin-like growth factor-1	SPE	Yes	ESI	Q-ToF	(7, 13)
ADAMTS13 activity	IMAC	No	MALDI	ToF	(14)
Lp-PLA ₂	IA-peptide	Yes	ESI	QqQ	(8)
Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP)	IA-protein	Yes	ESI	QqQ	(15)
Immunoglobulin light and heavy chain (M-proteins)	IA-protein	No	MALDI	ToF	(16)
IgG subclasses	None	Yes	ESI	QqQ	(17, 18)
Vitamin D binding globulin	None	Yes	ESI	QqQ	(19)
Serum apolipoprotein panel (apoA1, B, C1, C2, C3, E)	None	Yes	ESI	QqQ	(9)
Galectin-3-binding protein, scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein M130	Depletion	Yes	ESI	QqQ	(20, 21)
High-density lipoprotein particle panel (Apo A1, C1, C2, C3)	Coaffinity purification	Yes	ESI	QqQ	(22, 23)
β-Amyloid (Aβ-42)	SPE	Yes	ESI	Orbitrap	(24)
Hemoglobin A _{1c}	None	Yes	ESI	QqQ	(25)

(B) Representative pharmaceutical and academic applications

β-Amyloid peptides (Aβ)	SPE	Yes	ESI	QqQ	(26)
Glucagon	SPE	Yes	ESI	QqQ	(27)
Hepcidin	SPE	No	MALDI	ToF	(28)
Hepcidin	PPT	Yes	ESI	QqQ	(29)
Insulin and therapeutic analogs	SPE	Yes	ESI	QqQ	(30)
Insulin growth factor-1 (IGF-1) and leucine-rich α-2-glycoprotein (LRG)	PPT	Yes	ESI	QqQ	(31)
Hemoglobin variants	Liq-liq	Yes	ESI	FT-MS	(32)
Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9)	SPE	Yes	ESI	QqQ	(33)
Insulin and therapeutic analogs	IA-protein	No	MALDI	ToF	(34)
Insulin growth factor-1 (IGF-1)	IA-protein	No	MALDI	ToF	(35)
Protein C inhibitor	IA-peptide	No	MALDI	ToF	(36)
β-2-Microglobulin	IA-protein	No	MALDI	ToF	(37)
Retinol binding protein	IA-protein	No	MALDI	ToF	(38)
Apolipoprotein C1, CII, CIII	IA-protein	No	MALDI	ToF	(39)
Brain natriuretic factor (BNP)	IA-peptide	No	MALDI	ToF	(40)
Macrophage migration inhibitory factor (MIF)	IA-protein	No	MALDI	ToF	(41)
Serum transferrin receptor	IA-peptide	Yes	ESI	QqQ	(42)
Clinical protein panel	IA-peptide	Yes	ESI	QqQ	(43)
Total salivary pepsin/pepsinogen	IA-peptide	Yes	ESI	QqQ	(44)

Analyte(s)	Extraction	LC	Ionization	Detection	References
Clinical protein panel	IA-protein	Yes	ESI	QqQ	(45)
β-Amyloid peptides (Aβ)	IA-protein	Yes	ESI	ITD	(46)
Tau-protein	IA-protein	Yes	ESI	QqQ	(47)
Brain natriuretic factor (BNP)	IA-protein	Yes	ESI	QqQ	(48)
Glucagon-like peptide-1 (GLP-1), glucagon, oxyntomodulin (OXM)	IA-protein	Yes	ESI	QqQ	(49)
Oxyntomodulin (OXM)	IA-protein	Yes	ESI	Orbitrap	(50)
Interferon γ-induced protein-10 (IP-10)	IA-protein	Yes	ESI	QqQ	(51)
Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9)	IA-protein	Yes	ESI	QqQ	(52)
Progastrin releasing peptide (ProGRP) and neuron-specific enolase (NSE)	IA-protein	Yes	ESI	QqQ	(53)
Carbonic anhydrase II	IA-protein	Yes	ESI	QqQ	(54)
Angiotensin 1 (renin activity)	IA-protein	Yes	ESI	QqQ	(55)
Platelet frataxin	IA-protein	Yes	ESI	Orbitrap	(56)
High-mobility group box 1 (HMGB1)	IA-protein	Yes	ESI	Orbitrap	(57)
Fibroblast growth factor 21 (FGF21)	IA-protein	Yes	ESI	QqQ	(58)
β-Nerve growth factor (β-NGF)	IA-sequential	Yes	ESI	QqQ	(59)
Interleukin 21	IA-sequential	Yes	ESI	QqQ	(60)

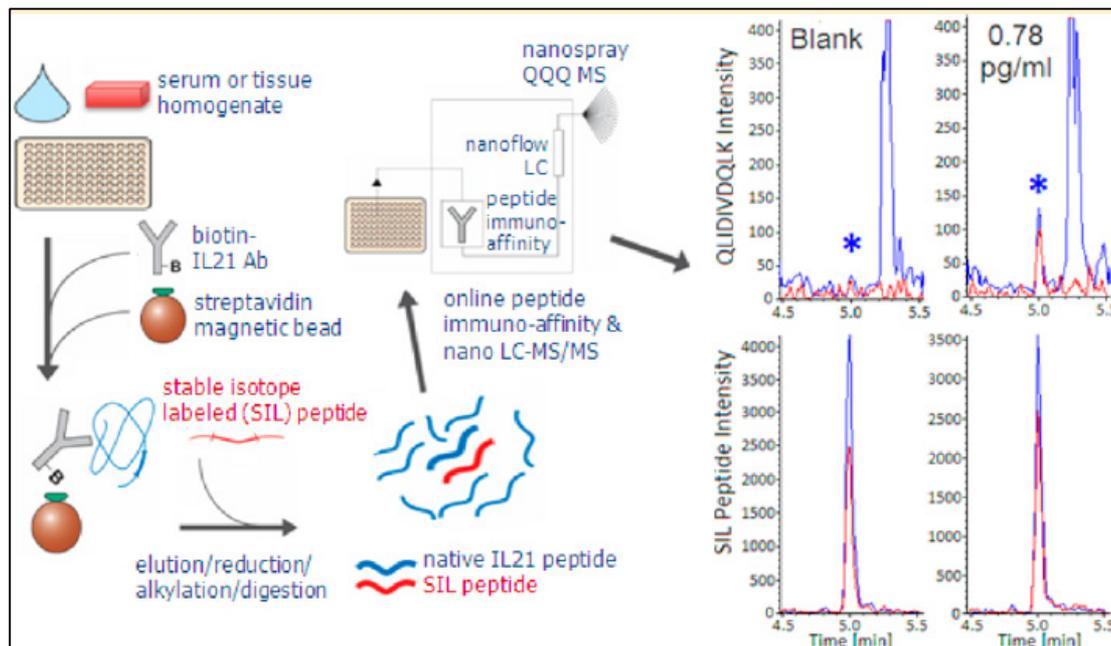
FTMS = Fourier transform MS; IA = immunoaffinity; IMAC = immobilized metal affinity chromatography; ITD = ion trap detector; Liq-Liq = liquid/liquid extraction; PPT = protein precipitation; Q-ToF = quadrupole time-of-flight; SPE = solid phase extraction; ToF = time-of-flight.

H Neubert et al., Clin Chem. 2020 Feb 1;66(2):282-301.

Highly Specific and Sensitive Measurements of Human and Monkey Interleukin 21 Using Sequential Protein and Tryptic Peptide Immunoaffinity LC-MS/MS

Joe Palandra,* Alyce Finelli, Ming Zhu, Jaime Masferrer, and Hendrik Neubert

Pfizer Worldwide Research & Development, Andover, Massachusetts 01810, United States



- サイトカインのELISAは特異性の懸念あり。自己免疫疾患患者は多種の自己抗体・補体が存在するため、ELISAへの干渉の可能性が高い
- 抗IL-21抗体及び抗特異的消化ペプチド抗体を用い測定対象のみをcaptureすることで、高い特異性及び検出感度（LLOQ; 0.78 pg/mL）を達成した

J Palandra *et al.*, Anal Chem. 2013 Jun 4;85(11):5522-9.

Research Article

For reprint orders, please contact: reprints@future-science.com

Bioanalysis

A peptide immunoaffinity LC-MS/MS strategy for quantifying the GPCR protein, S1PR1 in human colon biopsies

Hongwei Zhang^{*}, Eugene Ciccimaro, Jacob Zalaznick, Bogdan G Slecza, Laurence Menard, Timothy V Olah & Petia Shipkova
 Research & Development, Bristol Myers Squibb, Princeton, NJ 08543, USA
^{*}Author for correspondence: Tel.: +1 609-252-6797; hongwei.zhang@bms.com

Background: S1PR1, a G protein-coupled receptor (GPCR) protein, is a therapeutic target for treatment of autoimmune diseases. As a potential biomarker for drug effect and patient stratification, it is of great significance to measure it in biological samples. However, due to the hydrophobic nature of S1PR1 and the difficulties in extraction and solubilization, as well as low expression levels, quantitative determination of S1PR1 remains challenging. **Results:** In this work, a peptide immunoaffinity LC-MS/MS method was developed to quantify S1PR1 in biopsy-sized colon samples with an LLOQ of 7.81 pM. **Conclusion:** Peptide immunoaffinity LC-MS/MS based strategy has achieved the desired sensitivity for low abundance S1PR1, and the same strategy could be applied to quantify S1PR1 in multiple species and other GPCR proteins.

First draft submitted: 27 May 2020; Accepted for publication: 12 August 2020; Published online: 18 September 2020

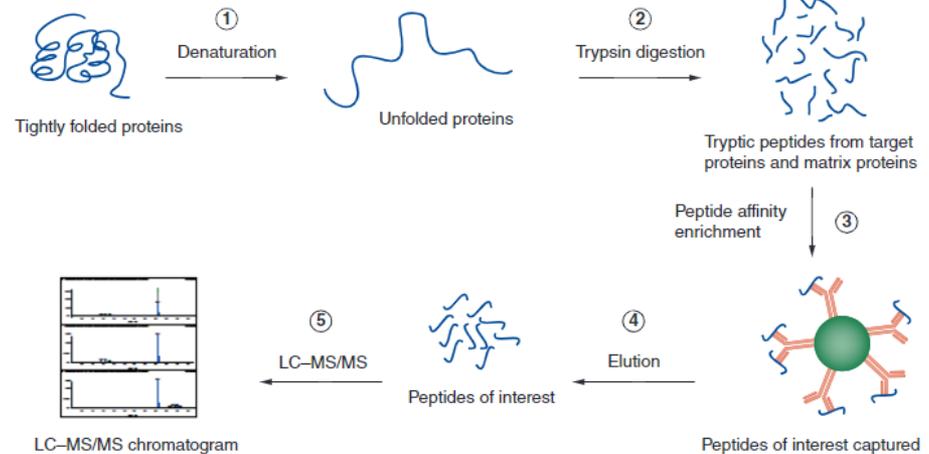


Figure 2. The workflow of peptide immunoaffinity LC-MS/MS for S1PR1 quantitation.

- GPCRタンパク質S1PR1の定量分析に関する報告
- 結腸組織からのS1PR1の抽出と可溶化して、トリプシン消化後に産生されたペプチドをtosylactivated beadsで精製して分析感度を向上
- トリプシン消化後にimmunocaptureを行う場合、トリプシンがimmunocaptureを阻害する恐れがあるため、トリプシンを失活させる必要がある（この報告では、immunocapture前にサンプルを99℃で30分間インキュベーションを実施）

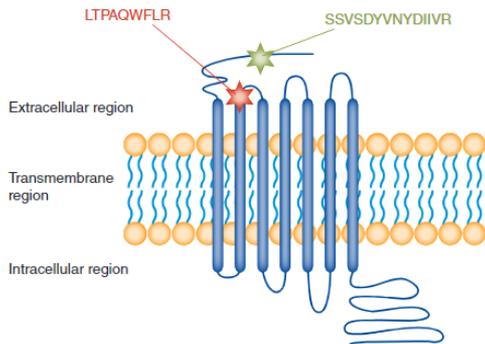


Figure 1. Structural biology of the S1PR1 receptor.

H Zhang *et al.*, *Bioanalysis*. 2020 Sep;12(18):1311-1324

Open Access Published by De Gruyter October 30, 2023

Quantification of the lung cancer tumor marker CYFRA 21-1 using protein precipitation, immunoaffinity bottom-up LC-MS/MS

Sylvia A.A.M. Genet , Sebastian A.H. van den Wildenberg, Maarten A.C. Broeren, Joost L.J. van Dongen, Luc Brunsveld, Volkher Scharnhorst and Daan van de Kerkhof 

From the journal *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*
<https://doi.org/10.1515/cclm-2023-0795>

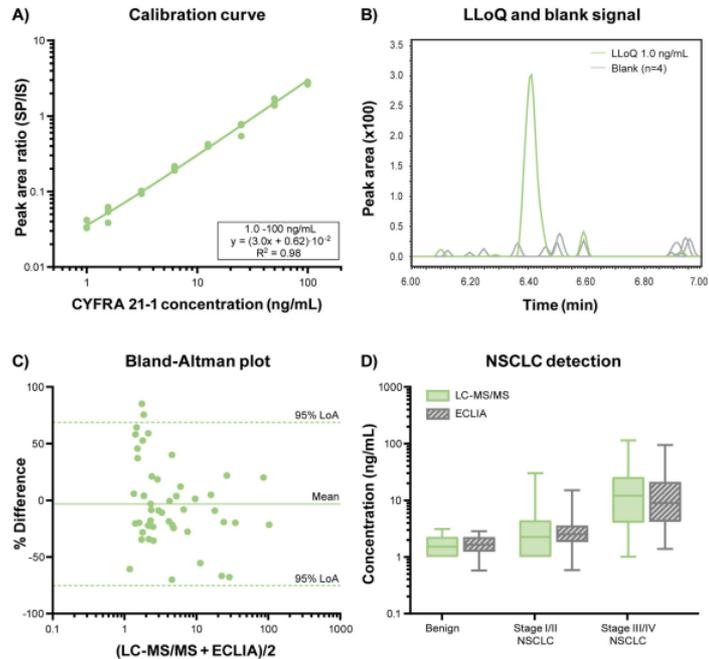


Figure 2: Analytical validation. (A) Calibration curve of CYFRA 21-1 (4 days). (B) LC-MS/MS quantifier signal at LLoQ (green, 1.0 ng/mL) overlaid with four blank BOV samples (gray). (C) Bland-Altman plot and (D) boxplots of the CYFRA 21-1 concentration in benign (n=20), stage I/II NSCLC (n=20) and stage III-IV NSCLC (n=20) patients measured using ECLIA and LC-MS/MS. %Difference=100|(ECLIA - LC-MS/MS)/average. CYFRA 21-1, cytokeratin 19 fragment 21-1; LC-MS/MS, liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LLoQ, lower limit of quantification; BOV, bovine serum; ECLIA, electrochemiluminescence assays; IA, immunoaffinity; LoA, limit of agreement.

サイトケラチン 19 フラグメント 21-1 (CYFRA 21-1)

非小細胞肺癌 (NSCLC) の (早期) 診断・治療バイオマーカー
 従来定量化免疫測定法では干渉を受けやすい



・硫酸アンモニウム沈殿と免疫親和性精製後にLC-MS/MSへ導入
 検量線範囲：1.0～100 ng/mL ($R^2=0.98$)

・LC-MS/MSとECLIAの分析バイアスは -3.3 % (図 4C)
 ・良性疾患、ステージ I-II の NSCLC、ステージ III-IV の NSCLC
 患者の血清中の濃度は両方のアッセイで同等 (図 4D)

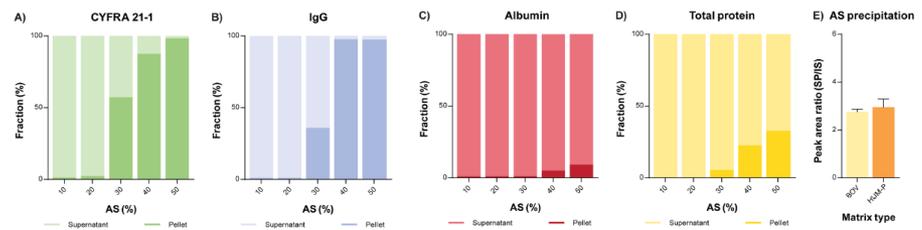


Figure 3: AS precipitation. (A) AS precipitation pattern of CYFRA 21-1, (B) IgG, (C) albumin and (D) total protein. (E) AS precipitation followed by IA purification and LC-MS/MS analysis in BOV and HUM-P revealing no significant differences between the matrices (n=4). AS, ammonium sulfate; CYFRA 21-1, cytokeratin 19 fragment 21-1; IgG, immunoglobulin; IA, immunoaffinity; LC-MS/MS, liquid chromatography-tandem mass spectrometry; BOV, bovine serum; HUM-P, four independent patient serum pools.

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 205 (2021) 114319



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jpba

Short communication

Quantification of anti-SARS-CoV-2 antibodies in human serum with LC-QTOF-MS

Karen A.M. de Jong^{a,*}, Hilde Rosing^a, Marit Vermunt^a, Alwin D.R. Huitema^{a,b,c},
Jos H. Beijnen^{a,d}^a Department of Pharmacy & Pharmacology, Antoni van Leeuwenhoek/The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands^b Department of Clinical Pharmacy, University Medical Center Utrecht, Utrecht, The Netherlands^c Department of Pharmacology, Princess Máxima Center for Pediatric Oncology, Utrecht, The Netherlands^d Division of Pharmacoepidemiology and Clinical Pharmacology, Faculty of Science, Department of Pharmaceutical Sciences, Utrecht University, The Netherlands

Abstract

The aim of this study was to develop the first quantitative serological test for anti-SARS-CoV-2 antibodies in human serum with liquid chromatography - quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS). Other assays, mostly immunoassays, are only qualitative or semi-quantitative, and hence, actual antibody concentrations after SARS-CoV-2 infection are unknown. In our assay, anti-SARS-CoV-2 antibodies were isolated with spike protein subunit 1 (S1) coupled to magnetic beads. **IgG1 signature peptide GPSVFPLAPSSK** was selected for quantification using **ipilimumab calibration standards** and **SILuMAb K1** as the stable-isotope labeled **internal standard**. The anti-SARS-CoV-2 IgG1 calibration range was from 1.35 to 135 nM. Inter-assay accuracies were between 98.8%– 107% with inter-assay precisions between 8.37%– 13.5% measured at 3 concentration levels on three separate occasions. Anti-SARS-CoV-2 IgG1 antibodies were quantified in PCR-positive patients with mild to severe symptoms. **IgM signature peptide DGFFGVPR** was detected in patients that recently recovered from COVID-19. A unique and quantitative LC-QTOF-MS method to quantify anti-SARS-CoV-2 IgG1 in serum was successfully developed and its clinical applicability has been demonstrated.

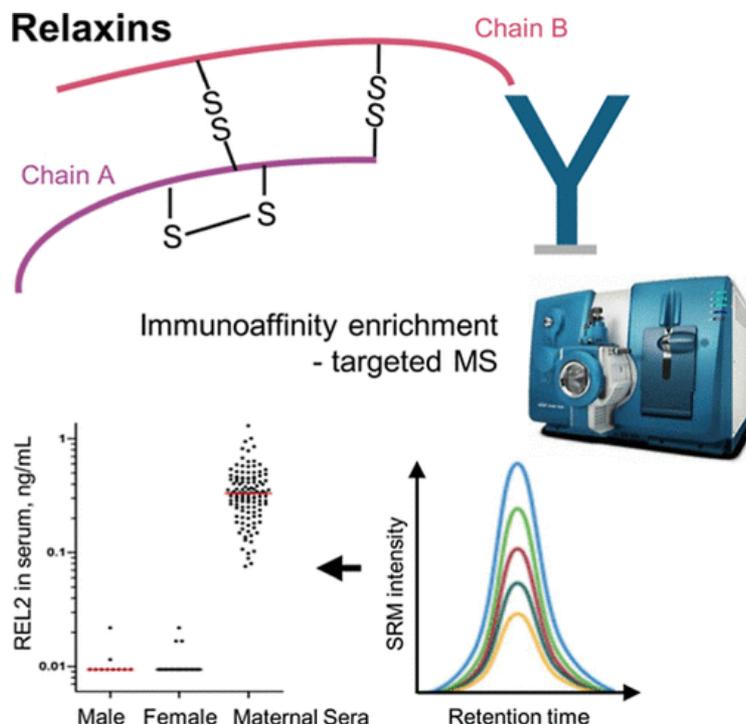
- 抗SARS-CoV-2抗体は、磁気ビーズに結合したスパイクタンパク質サブユニット1（S1）を使用して単離
 - 安定同位体標識内部標準としてSILuMAb K1を使用
 - IgG1のシグネチャーペプチドとしてGPSVFPLAPSSKを選択
 - イピリムマブから得られるシグネチャーペプチドを使用して検量線を作成
 - COVID-19 から回復直後の患者からは IgM シグネチャーペプチド DGFFGVPRを検出
- ELISAによる抗SARS-CoV-2抗体の測定は絶対定量ではなく、存在する相対的な力価による結果であり試験間での比較が難しい
 - LC-MSを使用することによりサンプル中に存在する抗SARS-CoV-2抗体の濃度を得ることができ、試験間での比較が容易になる
 - 抗SARS-CoV-2抗体は免疫グロブリンのいくつかのアイソタイプ（IgG、IgM、IgAなど）の混合物であり、本手法によりそれらを区別して定量することが可能となる

K. A. M. de Jong *et al.*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 205 (2021)p. 114319.

Identification and Quantification of Human Relaxin Proteins by Immunoaffinity-Mass Spectrometry

Published as part of *Journal of Proteome Research virtual special issue "Canadian Proteomics"*.

Yasmine Rais and Andrei P. Drabovich*



- Human relaxin にはREL1及びREL2が存在しており、ELISAではtotal relaxinとして定量。一方、IA-MSでは区別して定量可能
- ELISAとIA-MSでは、ELISAの方が感度が数倍高かった
- IA-MSで測定した定量値に比べて、ELISAでは一部のサンプルで血漿中REL濃度が高く、過大評価の可能性が考えられた

Yasmine R *et al.*, *J Proteome Res.* 2024 Jun 7;23(6):2013-2027.



RSC Advances

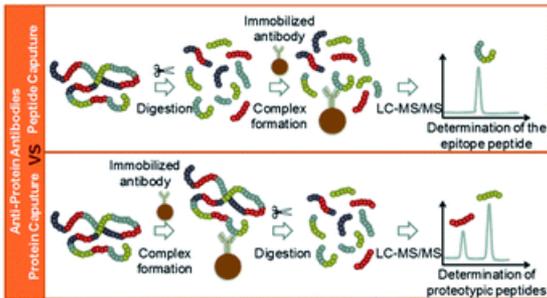
PAPER

Check for updates

Cite this: RSC Adv., 2019, 9, 34902

Immunocapture sample clean-up in determination of low abundant protein biomarkers – a feasibility study of peptide capture by anti-protein antibodies†

Maren C. S. Levernæs,^a Bassem Farhat,^a Inger Oulie,^a Sazan S. Abdullah,^a Elisabeth Paus,^b Léon Reubsæet^a and Trine G. Halvorsen^{a*}



※抗体の認識部位が線状エピトープである事 (*in silico* 消化による事前確認を要する)

ProGRP：小細胞肺がんのバイオマーカー
血清中の基準値は pg/mLオーダー

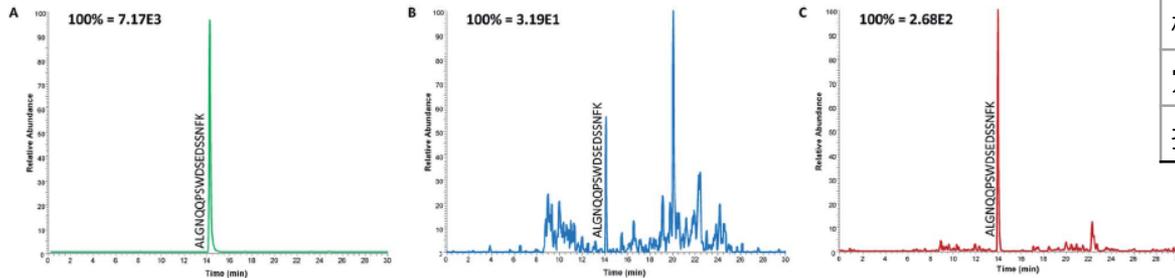


Fig. 4 Extracted ion chromatograms of the proteotypic epitope peptide after the analysis of serum samples from a spiked standard containing 100 ng mL⁻¹ ProGRP (A), a healthy individual (B) and from a patient with SCLC (C).

抗タンパク質抗体を用いてペプチドを補足する利点

- ① 時間と費用のかかる抗ペプチド抗体の開発を省略しプロテオタイプ（またはシグネチャ）ペプチドを濃縮できる
- ② タンパク質分解ステップはIA前に実行されるため、抗体を再利用できる可能性がある
- ③ タンパク質消化由来の夾雑ピークが少なくなり、クリーンアップされた試料が得られる

抗タンパク質抗体を用いた比較

	ペプチド	未消化タンパク質
検出限界*	54 pg/mL	459 pg/mL
定量限界*	181 pg/mL	1532 pg/mL
抽出効率	96.6%	—

* : S/Nに基づき算出

Maren C S Levernæs *et al.*, RSC Adv. 2019 29;9(60):34902-34911.

16th JBF Symposium, 2025

Received: 29 May 2020 | Revised: 6 July 2020 | Accepted: 7 July 2020
DOI: 10.1002/rcm.8896

RESEARCH ARTICLE



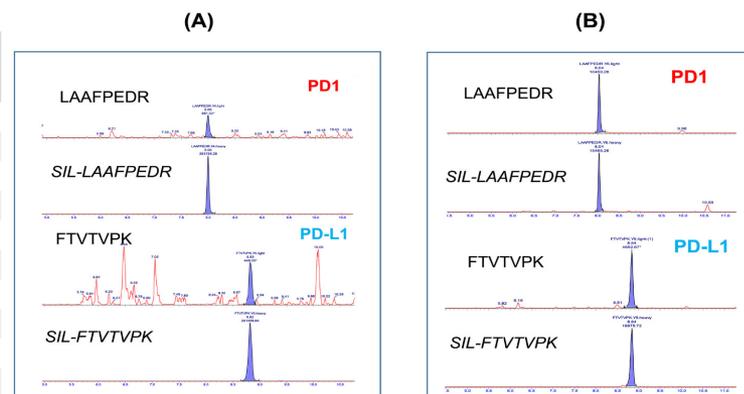
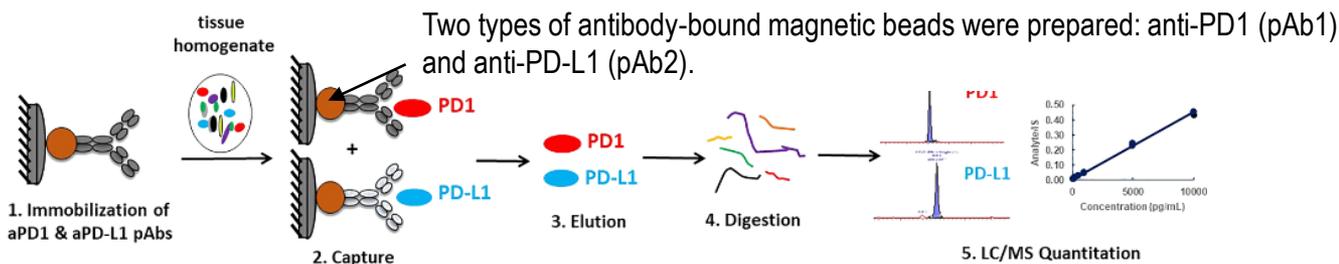
Immunoaffinity microflow liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the quantitation of PD1 and PD-L1 in human tumor tissues

Yongxin Zhu | Jacob Zalaznick | Bogdan Slecza | Karen Parrish |
Zheng Yang | Timothy Olah | Petia Shipkova**TABLE 2** Calibration curve data with quadratic regression (1/x; n = 3) for PD1 and PD-L1 standards and quality control (QC) samples spiked into mouse tumor with a mixture of magnetic beads immobilized with pAb1 and pAb2

Sample	Concentration (pg/mL)	PD1				PD-L1			
		Mean	SD	%CV	Accuracy	Mean	SD	%CV	Accuracy
STD	62.5	55.1	3.3	6.0	88.2	58.4	3.50	6.00	93.4
STD	125	127.4	13.6	10.6	101.9	126.4	18.7	14.8	101.1
STD	250	260.7	58.1	22.3	104.3	286.5	35.2	12.3	114.6
STD	500	485.1	71.2	14.7	97.0	508.2	45.6	8.97	101.6
STD	1000	1045	134.4	12.9	104.5	1024	92.2	9.01	102.4
STD	5000	5401	968.8	17.9	108.0	5240	274.5	5.24	104.8
STD	10000	9959	848.5	8.5	99.6	9718	262.7	2.70	97.2
QC	125	130.4	20.3	15.6	104.4	130.3	19.3	14.8	104.2
QC	500	482.8	93.8	19.4	96.6	455.1	86.7	19.0	91.0
QC	5000	4790	631.8	13.2	95.8	5175	458.0	8.85	103.5

CV, coefficient of variation; SD, standard deviation; STD, Standards Coefficient of variation.

IAとmicroflow LC/MS/MSを組み合わせることにより、高感度で堅牢なPD1・PD-L1タンパク質の同時分析法を開発した報告

**FIGURE 2** Liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) chromatograms of surrogate peptides generated from the digestion of A, lower limit of quantitation (62.5 pg/mL) and B, 5000 pg/mL of PD1 and PD-L1 recombinant proteins spiked in mouse tumor extract and their corresponding stable-isotope-labeled internal standards. Microflow LC/MS conditions are described in section 2 [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]**FIGURE 1** Schematic diagram for quantifying PD1 and PD-L1 in tumor tissues [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Hybridization Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry: An Alternative Bioanalytical Method for Antisense Oligonucleotide Quantitation in Plasma and Tissue Samples

Pei Li,* Yuqing Gong, Jaeah Kim, Xingrong Liu, James Gilbert, Hannah M. Kerns, Rachel Groth, and Michael Rooney

Cite This: *Anal. Chem.* 2020, 92, 10548–10559

Read Online

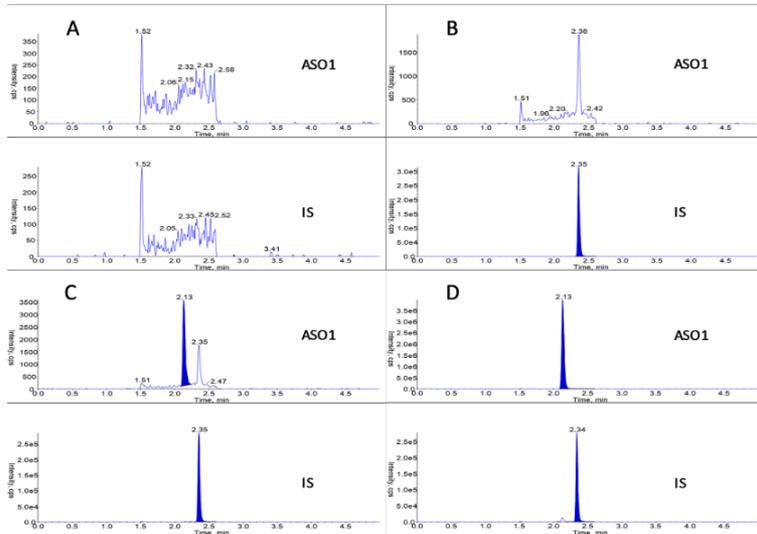


Figure 4. LC–MS/MS chromatograms of ASO1 and the IS from (A) blank rat plasma sample, (B) blank rat plasma processed with the IS, (C) LLOQ sample (0.5 ng/mL) in rat plasma, and (D) ULOQ (500 ng/mL) in rat plasma.

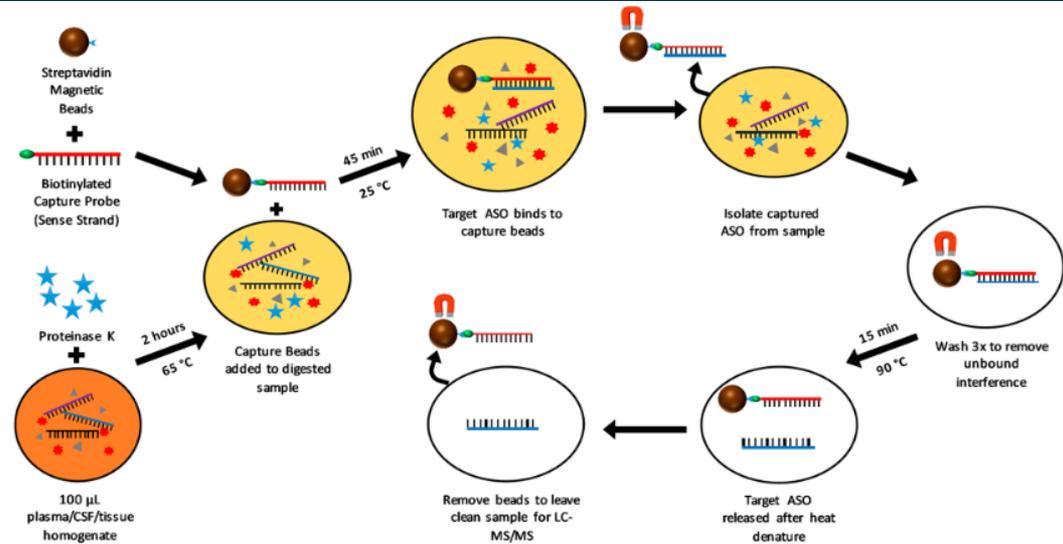


Figure 1. Sample preparation process including sample pretreatment, bead preparation, and hybridization extraction.

- IAを活用したアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)の高感度(100 μ L の血漿で 0.5 ng/mL)分析法
- 標的ASOは、ストレプトアビジン磁気ビーズに結合したビオチン化センス鎖オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションにより、生体試料から抽出された
- IAの工程をKingfisher Flexにより自動化、サンプル前処理の時間は2時間

- LBAでの未変化体と切断された代謝物を測定で区別できない課題をLC-MS/MSで克服できる
- ハイブリダイゼーション LC-MS/MS 分析法は、LBA と同等レベルまでの感度向上の可能性あり

Weixian Zhou *et al.*, *Clin Chem.* 2018;64(3):526-535.

RESEARCH

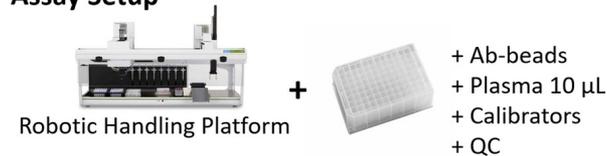
Open Access

A robust multiplex immunoaffinity mass spectrometry assay (PromarkerD) for clinical prediction of diabetic kidney disease

Scott Bringans^{1*}, Jason Ito¹, Tammy Casey¹, Sarah Thomas¹, Kirsten Peters¹, Ben Crossett², Orla Coleman³, Holger A. Ebhardt³, Stephen R. Pennington³ and Richard Lipscombe¹



Assay Setup



Incubation

37°C
90 min

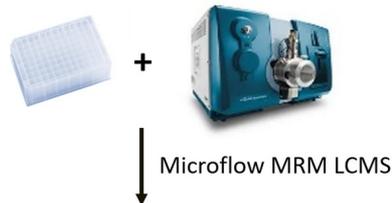
Washes



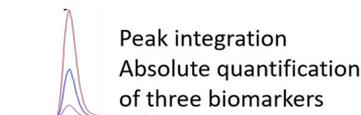
Processing

+ Labelled Peptides
 1. Reduction
 2. Alkylation
 3. Trypsin digestion

LCMS



Analysis



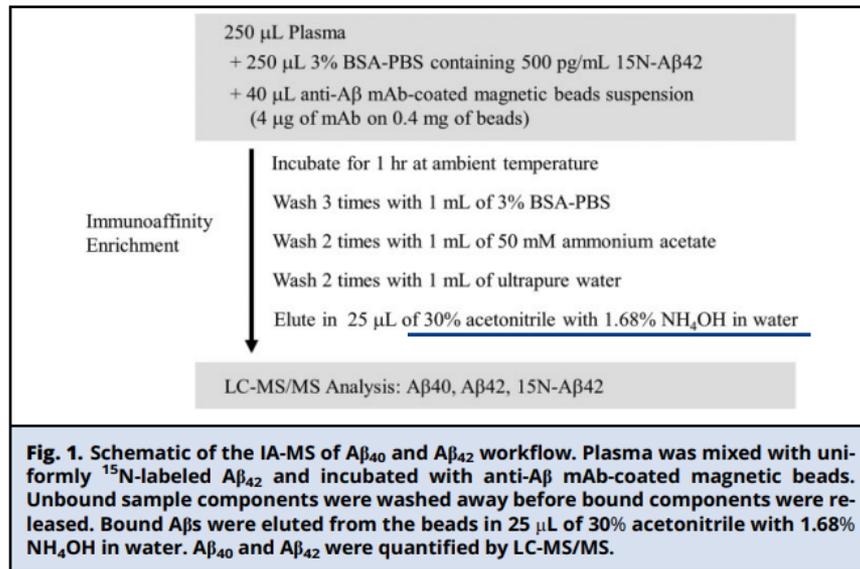
- 2 型糖尿病患者の糖尿病性腎疾患 (DKD) または腎機能低下リスク評価のための血液検査。DKDの血漿バイオマーカー (CD5L、APOA4、IBP3) を同時測定
- 96 well plateとRobotic Handling Platformにより自動化
- 検出感度は測定対象により大きく異なる LOD
 APOA4 : 9.40 μ g/mL
 CD5L : 0.100 μ g/mL
 IBP3 : 0.0100 μ g/mL

S Bringans *et al.*, Clin Proteomics. 2020;20:17:37.

ARTICLE

Quantification of Amyloid- β in Plasma by Simple and Highly Sensitive Immunoaffinity Enrichment and LC-MS/MS Assay

Takuya Iino,^{a,*} Shunsuke Watanabe,^a Kazuto Yamashita,^a Eiya Tamada,^a Takehiro Hasegawa,^b Yasuhiro Irino,^a Shigeki Iwanaga,^a Amane Harada,^a Kenta Noda,^a Kouzou Suto,^c and Tomokazu Yoshida^a

ヒト血漿におけるアミロイド- β を選択的、高感度に分析できる方法の開発と検証

Magnetic beadsからanalyteの溶出にアルカリ性の溶媒を使用

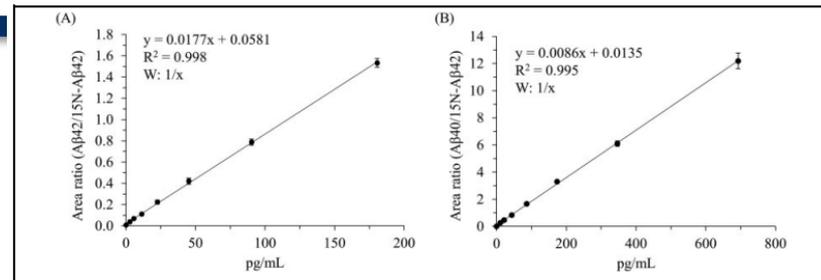


Fig. 3. (A), Example calibration curve constructed with A β ₄₀ at 10.8, 21.7, 43.3, 86.6, 173.2, 346.4, and 692.8 pg/mL and the internal standard (n = 6). (B), Example calibration curve constructed with A β ₄₂ at 2.8, 5.6, 11.3, 22.6, 45.2, 90.3, and 180.6 pg/mL and the internal standard (n = 6). The error bars indicate 1 SD.

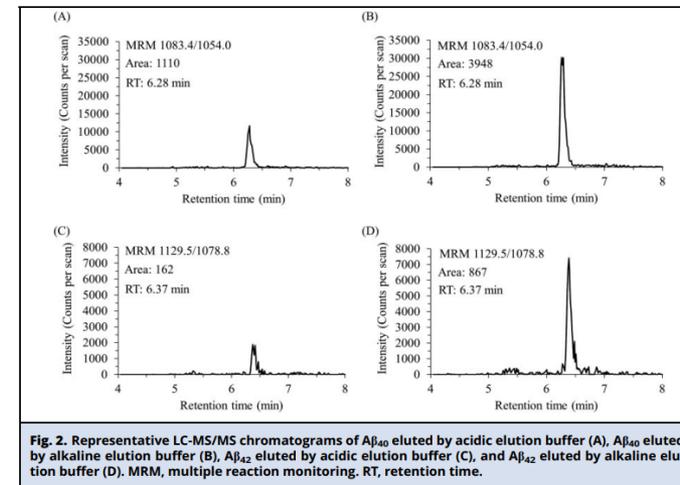


Fig. 2. Representative LC-MS/MS chromatograms of A β ₄₀ eluted by acidic elution buffer (A), A β ₄₀ eluted by alkaline elution buffer (B), A β ₄₂ eluted by acidic elution buffer (C), and A β ₄₂ eluted by alkaline elution buffer (D). MRM, multiple reaction monitoring. RT, retention time.

酸性溶出液とアルカリ性溶出液の比較

→酸性溶出液中でのアミロイド β の凝集を回避するためにアルカリ性溶出液を検証して、アルカリ性溶出液の試料の方が有意に目的ピークが大きいことが判明

溶出液の最適化が重要

Research Article

For reprint orders, please contact: reprints@future-science.com

Bioanalysis

Immunoaffinity LC-MS/MS for quantitative determination of a free and total protein target as a target engagement biomarker

Hongwei Zhang^{*1}, Huidong Gu¹, Petia Shipkova¹, Eugene Ciccimaro¹, Huadong Sun¹, Qihong Zhao¹ & Timothy V Olah¹

¹Research & Development, Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ 08543, USA

* Author for correspondence: Tel.: +1 609 252 6797; Hongwei.zhang@bms.com

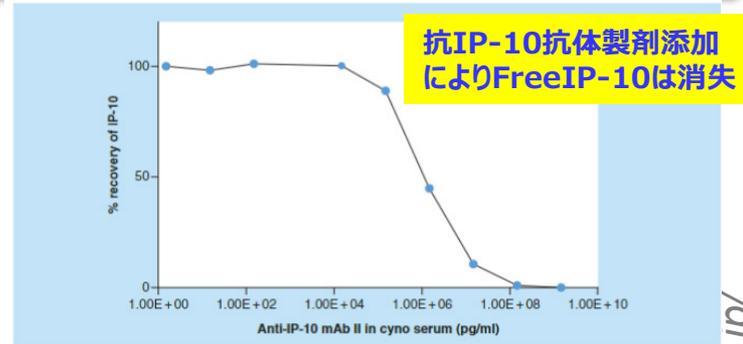
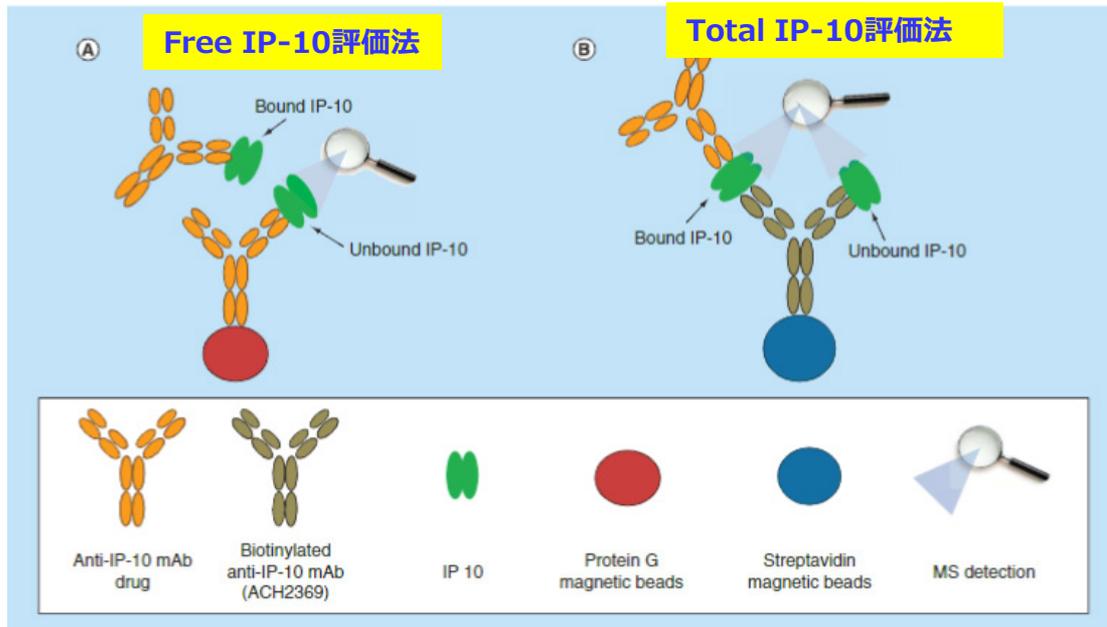
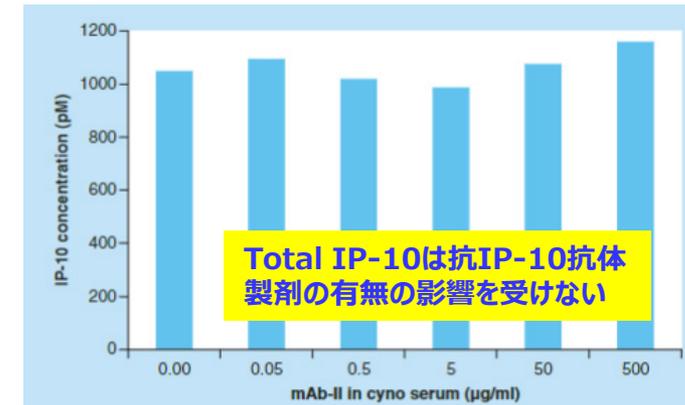


Figure 10. Inhibition titration test for free IP-10 assay on IP-10 spiked serum samples with increasing amount of mAb-II.



<http://bioanalysisforum.jp/>

- PKPD評価のためにFree IP-10の評価が必要。しかしFree測定には高感度測定系が必要
- Free測定（右図）：抗AP10抗体製剤をcaptureとして用い、FreeIP-10のみに結合。消化後にIP-10ペプチドをMS検出
- LLOQ = 1 pMの測定系を達成。PK/PD関係の確立、ヒトへの投与量の決定に使用することができた



Journal of Chromatography B

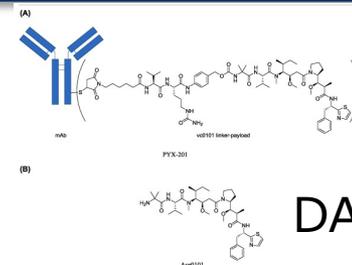
Volume 1223, 15 May 2023, 123715



Bioanalysis of an antibody drug conjugate (ADC) PYX-201 in human plasma using a hybrid immunoaffinity LC-MS/MS approach

Abstract

PYX-201 is an anti-extra domain B splice variant of fibronectin (EDB+FN) antibody drug conjugate (ADC) composed of a fully human IgG1 antibody, a cleavable mcValCitPABC linker, and four Auristatin 0101 (Aur0101, PF-06380101) payload molecules. To better understand the pharmacokinetic (PK) profile of PYX-201 after it is administered to cancer patients, the development of a reliable bioanalytical assay to accurately and precisely quantitate PYX-201 in human plasma is required. In this manuscript, we present a hybrid immunoaffinity LC-MS/MS assay used to successfully analyze PYX-201 in human plasma. PYX-201 was enriched by MABSelect beads coated with protein A in human plasma samples. The bound proteins were subjected to "on-bead" proteolysis with papain to release the payload Aur0101. The stable isotope labelled internal standard (SIL-IS) Aur0101-d₈ was added and the released Aur0101 was quantified as a surrogate for the total ADC concentration. The separation was performed on a UPLC C18 column coupled with tandem mass spectrometry. The LC-MS/MS assay was validated over the range 0.0250 to 25.0 µg/mL with excellent accuracy and precision. The overall accuracy (%RE) was between -3.8% and -0.1% and the inter-assay precision (%CV) was <5.8%. PYX-201 was found to be stable in human plasma for at least 24h on ice, 15 days after being stored at -80°C, as well as after five freeze/thaw cycles of being frozen at -25°C or -80°C and thawed on ice. The assay this paper reports on, has been successfully applied to human sample analysis to support clinical studies.



DAR=4

2.4. Assay procedure

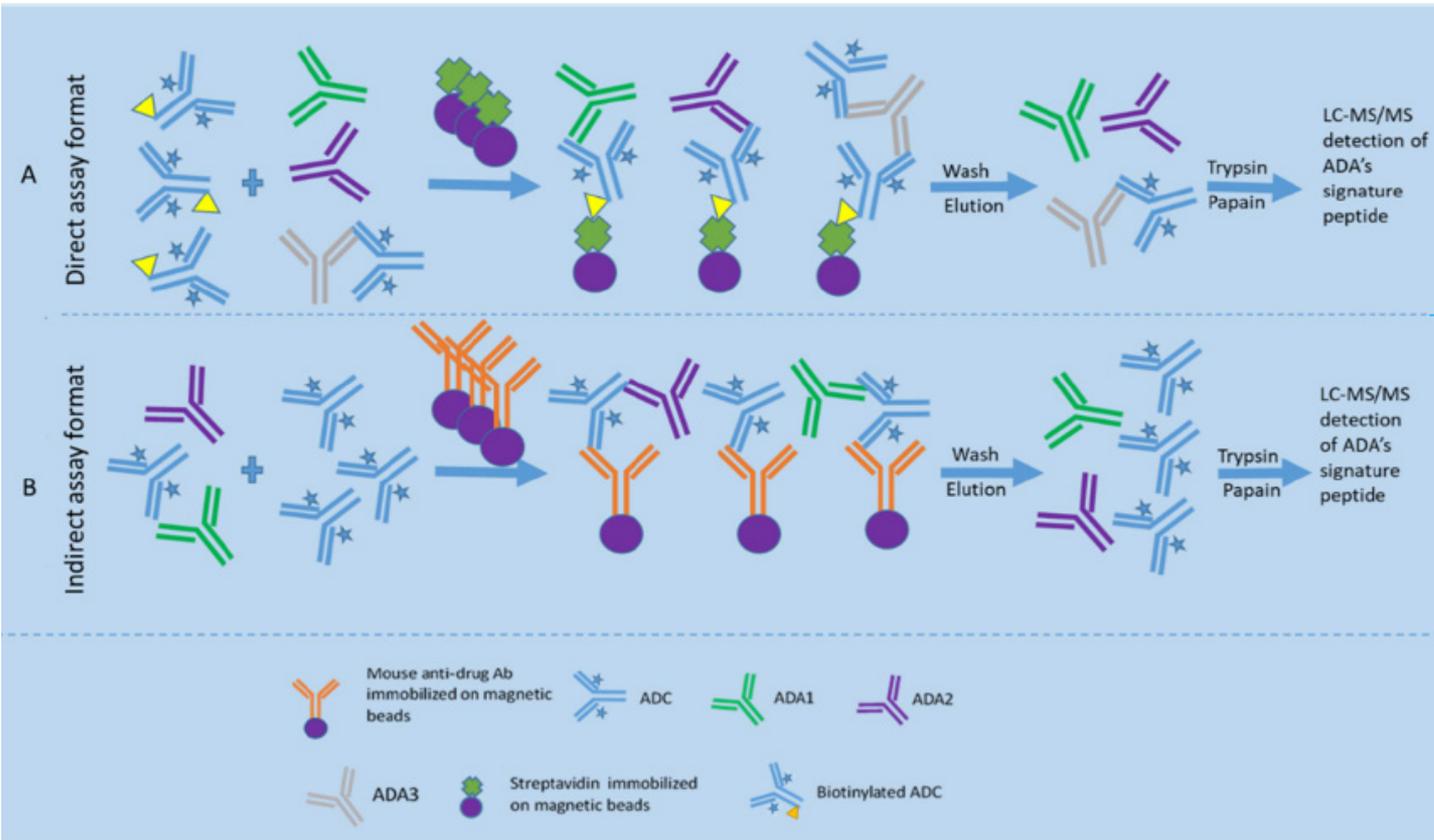
Human plasma samples were thawed on ice. MabSelect bead slurry in PBS (400 µL) was filtered in a 96-well filter plate and mixed well with 100 µL of 1% BSA in PBS and 25 µL of the thawed human plasma sample. The sample mixture was incubated for approximately 1 h with shaking at room temperature, filtered by centrifugation, then washed three times with 200 µL of 20 mM ammonium acetate. 200 µL of 2 mg/mL papain in 20 mM ammonium acetate and 2 mM L-cysteine solution was mixed and incubated at 37°C for 15 min before adding into the sample. The sample was incubated at 25°C for 1 h, then 25 µL of Aur0101-d₈ at 10 ng/mL was added in the sample mixture and mixed well. The sample mixture was filtered by centrifugation. 100 µL of ACN was added to each well of the filter plate and the sample mixture was filtered by centrifugation again. The eluants were combined with 500 µL of ACN. 200 µL of the supernatant was evaporated to dryness under nitrogen (N₂) and reconstituted in 120 µL of 35/65/0.1 ACN/H₂O/formic acid for LC-MS/MS analysis. Detailed LC-MS/MS conditions were summarized in Table 1.

- PYX-201をプロテインAでコーティングしたMABSelectビーズで濃縮、パパインでオンビーズタンパク質分解を行い、ペイロードであるAur0101を遊離
- 放出されたAur0101をADC濃度の代替分析物として定量

<http://www.jaibioanalysisforum.jp/>

Article
**Optimization of a Quantitative Anti-Drug Antibodies against
 Infliximab Assay with the Liquid Chromatography-Tandem
 Mass Spectrometry: A Method Validation Study and
 Future Perspectives**

Erin H. Smeijsters ^{1,2}, Kim C. M. van der Elst ¹, Amy Visch ¹, Camiel Göbel ¹, Floris C. Loeff ², Theo Rispens ²,
 Alwin D. R. Huitema ^{1,3,4}, Matthijs van Luin ¹ and Mohsin El Amrani ¹

**Direct assay :**

Biotinated-ADCをキャプチャーとして使用し、結合するADAをペプチド消化し測定

Indirect assay :

抗ADC抗体をキャプチャーとして使用結合するADAをペプチド消化し測定

Journal of Translational Autoimmunity 1 (2019) 100004

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Translational Autoimmunity

journal homepage: www.journals.elsevier.com/journal-of-translational-autoimmunity/

Quantification of neutralizing anti-drug antibodies and their neutralizing capacity using competitive displacement and tandem mass spectrometry: Infliximab as proof of principle



Mohsin El Amrani^{a,*}, Camiel Göbel^a, Annelies C. Egas^a, Stefan Nierkens^b, C. Erik Hack^b, Alwin D.R. Huitema^{a,c}, Erik M. van Maarseveen^a

^a Department of Clinical Pharmacy, Division of Laboratory Medicine and Pharmacy, University Medical Center Utrecht, Utrecht University, the Netherlands

^b Laboratory of Translational Immunology, University Medical Center Utrecht, Utrecht University, the Netherlands

^c Department of Pharmacy & Pharmacology, Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, the Netherlands

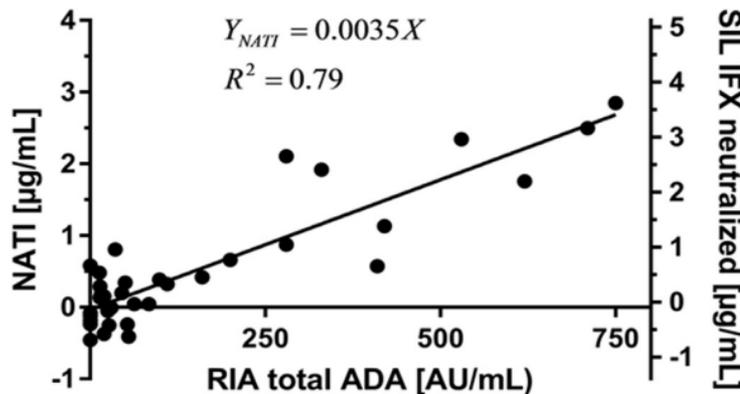


Fig. 5. Total ADA versus NATI (left y-axis) and SIL IFX neutralized (right y-axis), $n = 36$, levels >880 AU/mL were not included.

LC-MS/MS (NAb)とRIA (total ADA) に相関あり

M El Amrani et al., *J Transl Autoimmun.* 2018;11:100004.

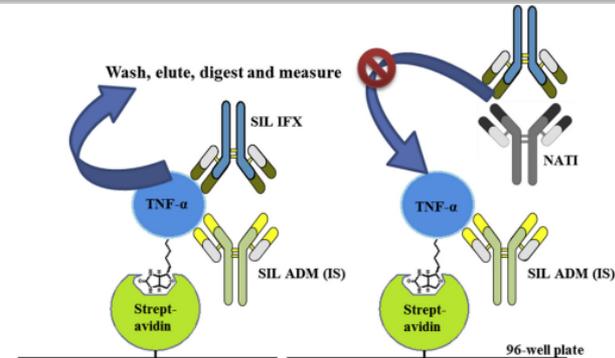


Fig. 1. Principle of the assay; In the absence of NATI in the sample, the maximum signal is measured (left). Lower SIL IFX signal is obtained proportional to the concentration of NATI present in the sample (right). SIL ADM is used as internal standard to correct for loss during sample preparation and as a quality assurance indicator.

- infliximab (IFX)に対する中和抗体（NAb）をLC-MS/MSで分析した事例
- SIL IFXに対するTNF-αとNAbの競合反応を用いてNAbを評価
- 従来のセルベースアッセイの交差反応による特異性の欠如による偽陰性となる課題，標準化が難しいセルベースアッセイの課題をLC-MS/MSを用いることで解決出来る

IA-MS技術関連文献

Bioanalysis. 2012 February ; 4(3): 281–290. doi:10.4155/bio.11.319.

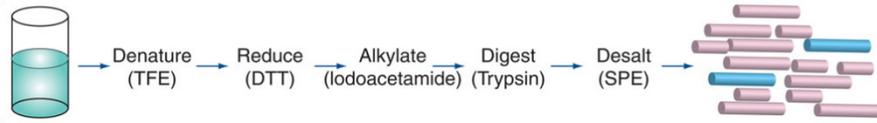
Replacing immunoassays with tryptic digestion-peptide immunoaffinity enrichment and LC-MS/MS

Jessica O Becker¹ and Andrew N Hoofnagle^{*1,2}

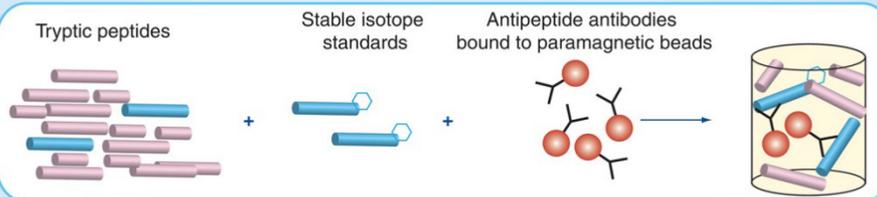
¹Department of Laboratory Medicine, Campus Box 357110, University of Washington, Seattle, WA 98195-7110, USA

²Department of Medicine, University of Washington, Seattle, WA, USA

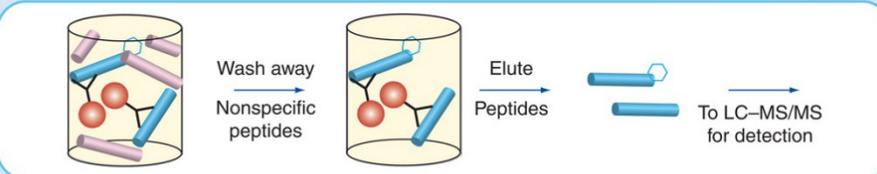
Step 1. Digestion of plasma proteins to peptides



Step 2. Capture of peptides



Step 3. Elution of peptides



Bioanalysis © Future Science Group (2012)

- 著者らはトリプシン消化後に、signature peptideに対する抗peptide抗体を使用してアフィニティー精製を実施
- 内部標準物質として安定同位体標識 peptideを使用
- これらの手法は「stable-isotope standards and capture by anti-peptide antibodies (SISCAPA)」と呼ばれている

抗peptide抗体を用いることにより、通常の方法と比べて、以下の利点が見られる

- 感度の向上
- 交叉反応の回避
- マトリックスが簡素化されることによるクロマトグラフィーのRun time短縮

J. O. Becker *et al.*, *Bioanalysis*. 4 (2012)pp. 281–290.

IA-MS技術関連文献 : IA-MSの手順紹介報告

Proteome Letters 2022 ; 7 : 9-14
Doi:10.14889/jpros.7.1_9

テクニカルレポート

免疫沈降－質量分析によるタンパク質の翻訳後修飾および相互作用の解析

西野耕平, 小迫英尊*

*E-mail: kosako@tokushima-u.ac.jp

徳島大学先端酵素学研究所藤井節郎記念医学科学センター : 770-8503 徳島市蔵本町 3-18-15

<抄録>

目的とするタンパク質の生体内での機能を明らかにする上で、生体試料の抽出液からそのタンパク質を含む複合体を免疫沈降し、沈降物を酵素消化後に質量分析する方法（免疫沈降－質量分析法，以下IP-MS法）は有用である。IP-MS法によって目的タンパク質の様々な翻訳後修飾や、その相互作用タンパク質を大規模に同定・定量することが可能である。著

者は細胞質タンパク質・核内タンパク質・膜タンパク質・細胞外タンパク質など、多様なタイプのタンパク質を対象としてIP-MSを多数行ってきており、実験プロトコルを最適化してきた。その結果、従来の免疫沈降物をウェスタンブロット解析する場合などと比較して、IP-MSを行う際の免疫沈降では様々なステップの条件を変更した方が良いことが分かってきた。そこで本稿では、プロテオミクスを専門としない研究者にとっても重要である、免疫沈降の操作から消化ペプチドの調製までのステップを中心に紹介したい。

西野耕平, 小迫英尊, 日本プロテオーム学会誌. 7 (2022)pp. 9-14.

細胞からの分析を例として、効果的なIP-MSのために注意すべきポイントやIP-MS法の手順として以下の項目を紹介

- 細胞の低濃度ホルムアルデヒド処理
- 細胞溶解液の調製
- 抗体固定化磁気ビーズの作製
- 免疫沈降とビーズ上での酵素消化
- 還元・アルキル化
- 脱塩と濃縮
- ペプチド定量



Article

Evaluation of Aptamers as Affinity Reagents for an Enhancement of SRM-Based Detection of Low-Abundance Proteins in Blood Plasma

Sergey Radko ^{1,*}, Konstantin Ptitsyn ¹, Svetlana Novikova ¹, Yana Kiseleva ², Alexander Moysa ¹, Leonid Kurbatov ¹, Maria Mannanova ¹, Victor Zgoda ¹, Elena Ponomarenko ¹, Andrey Lisitsa ¹ and Alexander Archakov ¹

Abstract

... One approach used to overcome this problem is the immunoaffinity enrichment of target proteins for SRM analysis, employing monoclonal antibodies. **Aptamers appear as a promising alternative to antibodies for affinity enrichment.**

Here, using recombinant protein SMAD4 as a model target added at known concentrations to human blood plasma and SRM as a detection method, we investigated a relationship between the initial amount of the target protein and its amount in the fraction enriched with SMAD4 by an anti-SMAD4 DNA-aptamer immobilized on magnetic beads. It was found that the aptamer-based enrichment provided a **30-fold increase in the sensitivity** of SRM detection of SMAD4. These results indicate that the aptamer-based affinity enrichment of target proteins can be successfully employed to improve quantitative detection of low-abundance proteins by SRM in undepleted human blood plasma.

Table 1. Sequence of DNA-aptamer to rSMAD4 protein. The complementary parts of the sequence are underlined. The regions responsible for binding to SMAD4 (SMAD-binding element, SBE) and poly(dA)₅ linker are shown in bold and italic, respectively; 'M' stands for biotin or FAM (6-carboxyfluorescein) attached to the 3'-terminus.

Aptamer Name	Aptamer Sequence
Anti-SMAD4	5'-CGAAGTCTAGACAGCGTTTTCGCTGTCTAGACTTCGAAAAA-3'-M

- 近年、抗体によるアフィニティー精製の代替法として、核酸アプタマーによる精製法が提案されている
- 著者らはSELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment)方により、新たにアプタマーを作成した

アプタマーは抗体に比べて以下の利点を有している

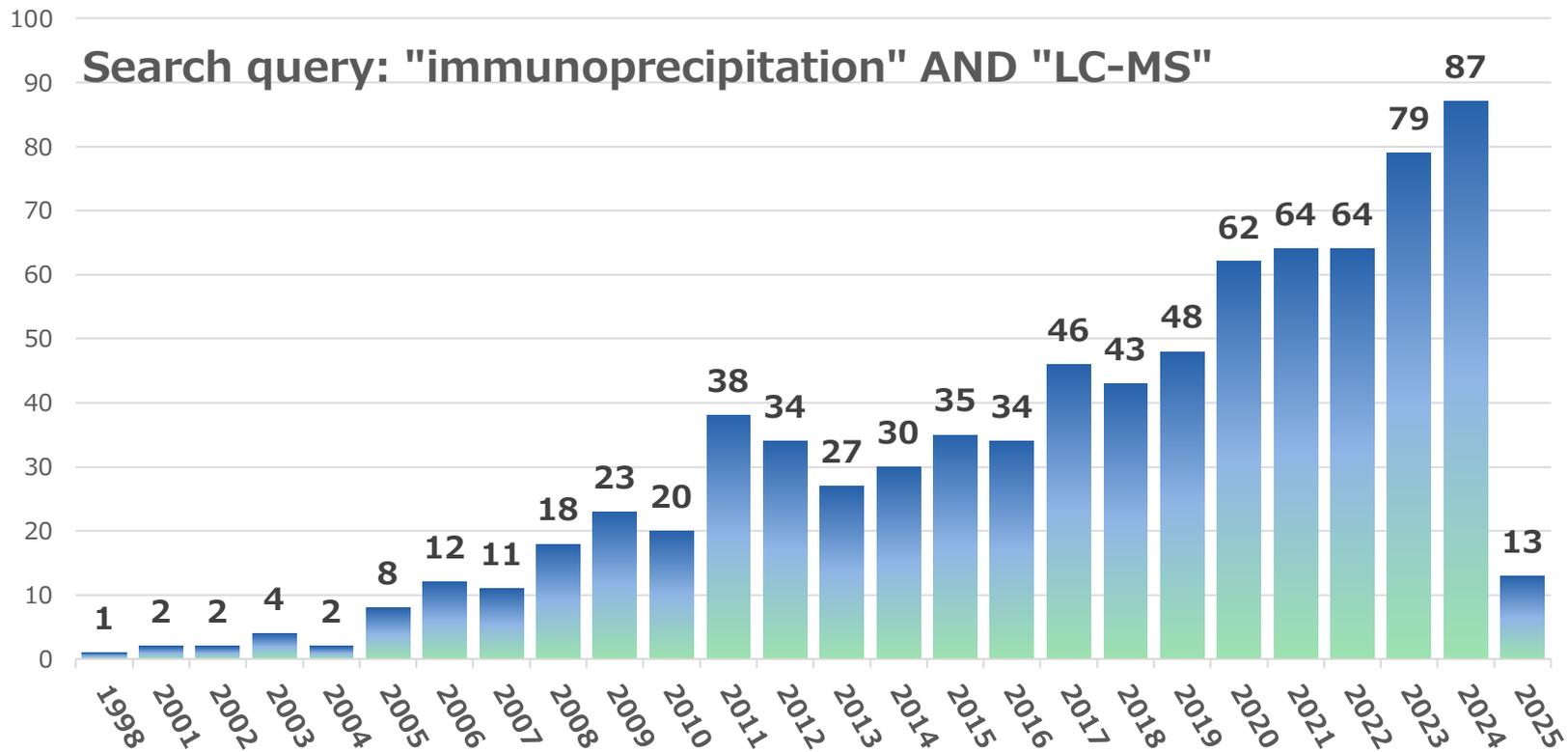
- ✓ 抗体に劣らない親和性が得られる
- ✓ 抗体に比べてバッチ間の親和性の差が少ない
- ✓ 配列の末端にリンカーを修飾することにより、容易に固相化できる
- ✓ キャプチャー後に直接トリプシン消化を行っても、ペプチドの複雑性が増加しない

ストレプトアビジンの磁気ビーズにビオチン修飾したアプタマーを固相化 (ビーズ濃度 : 10 mg/mL、アプタマー-25pmol/ビーズ100µg)

S. Radko *et al.*, Biomedicines. 8 (2020)p. 133.

文献数の推移（参考）

◆ Pubmedで「immunoprecipitation」 AND 「LC-MS」を検索



2000年以降増加傾向

- 測定対象は多岐にわたる（バイオマーカータンパク質、抗体、核酸など）
- 現状、感度・特異性の向上を目的とした使用が多く、LBAが実施困難な場合（適切な抗体がない場合や同時測定など）に使用されている
- 感度及び特異性の向上、マルチプレックス化、質量分析による定量性の向上などメリットは多く、今後、活用は拡大していくと予想される

IAフローの各論

免疫沈降法（IP）のワークフロー

IP

① **Matrix**
試料量・濃度/希釈バッファー

② **Target**
ターゲットと捕捉試薬

③ **Beads**

④ **Binding**
反応時間
反応温度
使用機器

⑤ **Wash**
バッファー
ブロッキング
回数

⑥ **Elute**

Digest

**Clean
up**

**LC-
MS/MS**

①～⑥の各論について、実施経験、アンケート調査および文献調査から、検討項目や試薬など実際の操作に関わる部分について議論した

① Matrix

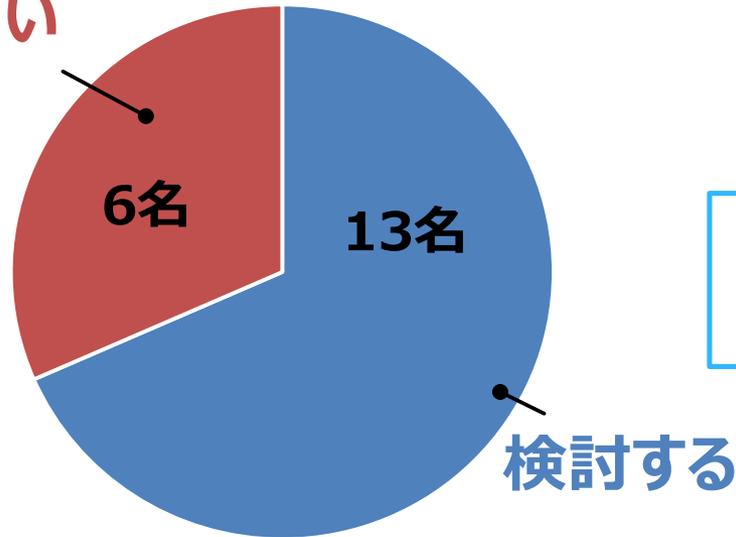
(試料量・濃度/希釈バッファー)

試料量についてのアンケート結果

アンケートQ10『IAを検討する際に評価している項目について』より抜粋

試料量を検討するか？

検討しない



過半数以上が試料量
を検討している

■ DGでの議論

- 測定法構築時に検討
- 文献などを参考に試料中濃度を予測し、測定範囲も考慮して検討している

試料

■ 報告事例

- ヒト/サル/マウス血漿、サル血清、担がんマウス腫瘍、ヒト/サル/マウス大腸、細胞培養液（限外濾過で濃縮）、サル尿（ペプチド断片化後）

■ DGでの議論

- 多くの動物種の血漿、組織で測定経験あり
- 測定マトリックスが原因で不適合となった経験はない

組織可溶化バッファー

■ 報告事例

- 担がんマウス腫瘍：1% Protease inhibitor/tissue protein extraction reagent I
- ヒト/サル/マウス大腸：Tissue protein extraction reagent

■ DGでの議論

- RIPA、SDSの使用経験あり

■ 報告事例

希釈バッファー

リン酸緩衝液	PBS、PBS-Tween 20 (PBST) 、0.03% CHAPS/PBS、 1% BSA/0.05% Tween 20/PBS、3% BSA/PBS
トリス緩衝液	Tris Buffered Saline-Tween 20 (TBST) 、1.5 mol/L Tris (pH10)
HEPES緩衝液	0.2% Tween 20/HEPES buffered saline-EDTA polysorbate

■ DGでの議論

- 希釈バッファーの種類
 - 文献によって様々
 - PBSで上手くいったので、他のバッファーは検討したことがない
 - 血漿で希釈することもある
- 希釈バッファーの量
 - 測定法構築時に検討、例) 血漿50 μ Lにバッファー200 μ Lを添加
 - 希釈しないこともある

■ 報告事例-1

- 所定量のサンプルを添加する（例 20～500 μL ）
- ビオチン付補足抗体を添加する（例 1 μg ）
- 希釈バッファー（1% BSA/0.05% Tween 20/PBS）をサンプルの3～5倍量添加する
- 4℃にて一晩反応させる

Note：初回評価時は、例えば20～500 μL のサンプル量で最適な試料量の検討を推奨する。少量の場合は、検出感度に影響するが、マトリックス由来蛋白質の非特異的な結合を軽減できる。多量の場合は、高感度化が期待できるが、96ウェルプレートでの高倍率の希釈が難しいこともある。

Palandra *et al.*, *Methods Mol Biol* (2022) 2466. 111-119.

■ 報告事例-2（ADC、naked抗体）

- ヒト血漿10 μL とTBST 300 μL を混合する
- ビオチン付抗原を結合したストレプトアビジン磁気ビーズを25 μL 添加する
- 4°Cにて一晩反応させる

Yin *et al.*, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci (2023) 1228. 123844.

■ 報告事例-3（ペプチド）

- ヒト血漿250 μL を添加する
- 内標準物質を含む3% BSA/PBS 250 μL を添加する
- 室温にて30分間インキュベーションする
- 抗体を結合した磁気ビーズ（4 μg 抗体/0.4 mgビーズ）40 μL を添加する
- 室温にて1時間反応させる

Iino *et al.*, J Appl Lab Med (2021) 6. 834-845.

■ 報告事例-4（膜タンパク質）

- ヒト/サル/マウス大腸から蛋白質を抽出する
- 抽出溶液50 μL とPBST 100 μL を混合する
- 抗体を結合した磁気ビーズ（30 mg/mLビーズ）を25 μL 添加する
- 2時間反応させる

Caporuscio *et al.*, *Bioanalysis* (2020) 12. 1439-1447.

■ 報告事例-5（バイオマーカー）

- サル尿50 μL をペプチド断片化する
- ペプチド溶液70 μL に、0.03% CHAPS/PBS 20 μL 、抗体mix 5 μL （各1 μg ）、内標準ペプチド 5 μL （各333.3 fmol）を添加する
- 室温にて1時間反応させる

Gautier *et al.*, *Toxicol Appl Pharmacol* (2016) 303. 1-10.

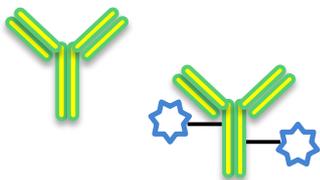
② Target

(ターゲットと捕捉試薬)

捕捉試薬 (Capture reagent) の種類

ターゲット

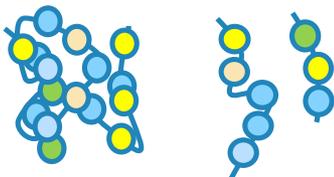
薬物 (ヒト抗体)
Ab/ ADC



抗薬物抗体 : ADA



バイオマーカー
(タンパク、ペプチド)



捕捉試薬

- Protein A/G/(L) (抗体結合タンパク質)
- 抗ヒト抗体
- 抗原 (薬物のターゲット)
- 抗体または核酸アプタマー*
 - 抗薬物抗体
 - 抗ペイロード抗体
 - 抗イデオタイプ抗体

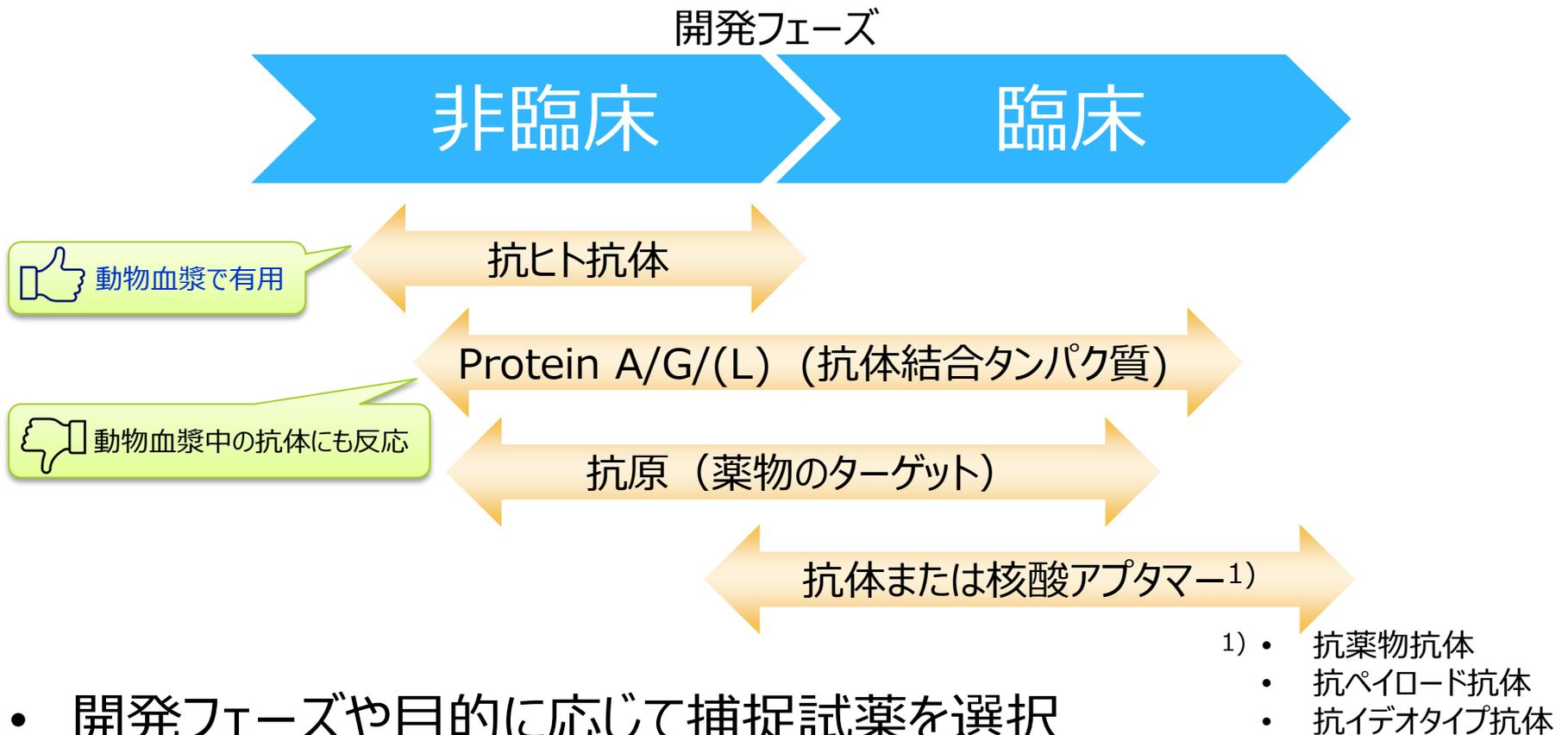
抗ヒト抗体, Protein A/G
結合ビーズが市販されている

- 薬物
- 薬物を構成する一部分

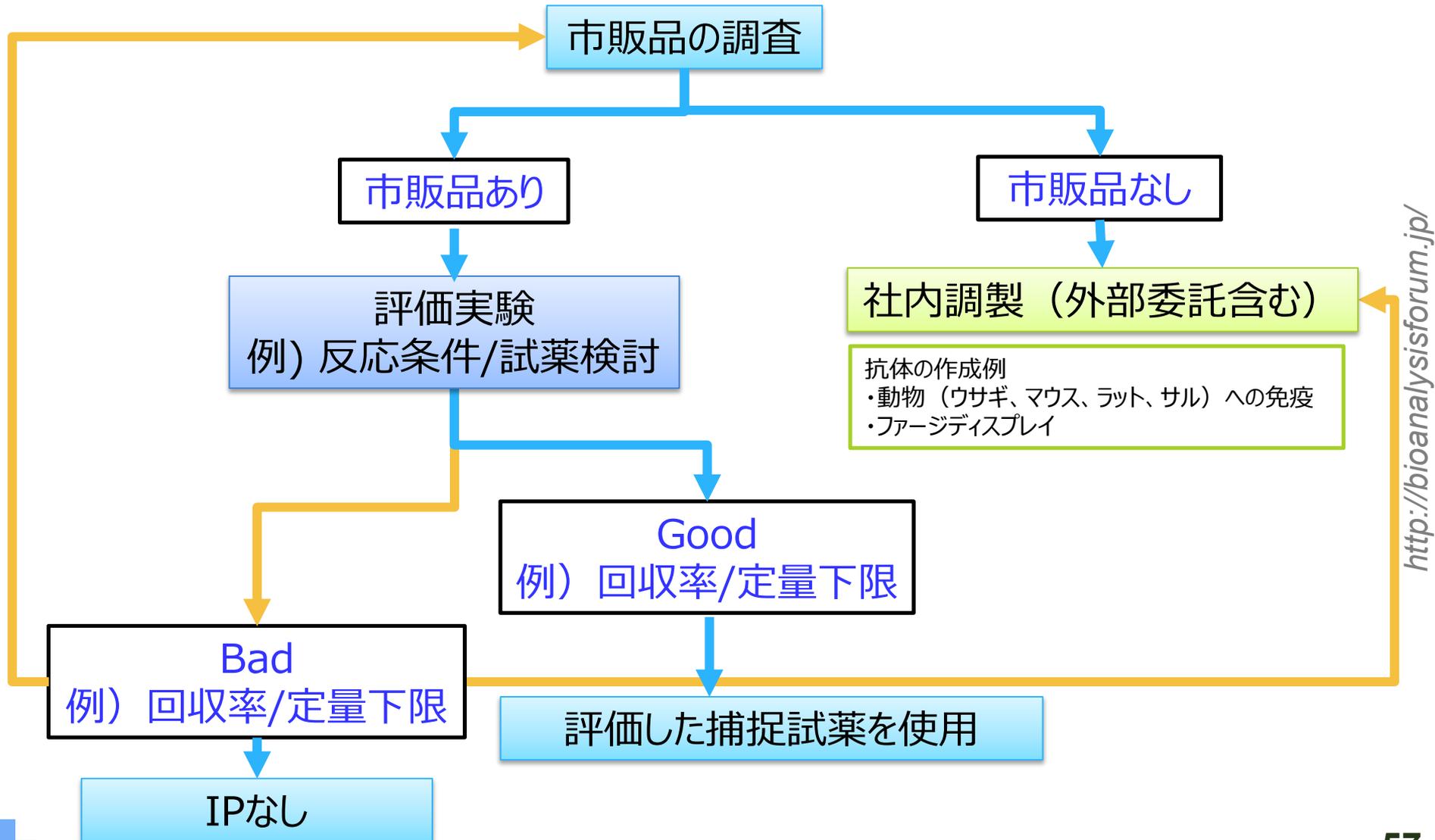
- 抗タンパク抗体、抗ペプチド抗体
- 核酸アプタマー*

*一本鎖DNA/RNA
「IA-MS技術関連文献 : Aptamerを使用した分析法」スライド参照

抗体医薬開発時の捕捉試薬使用事例

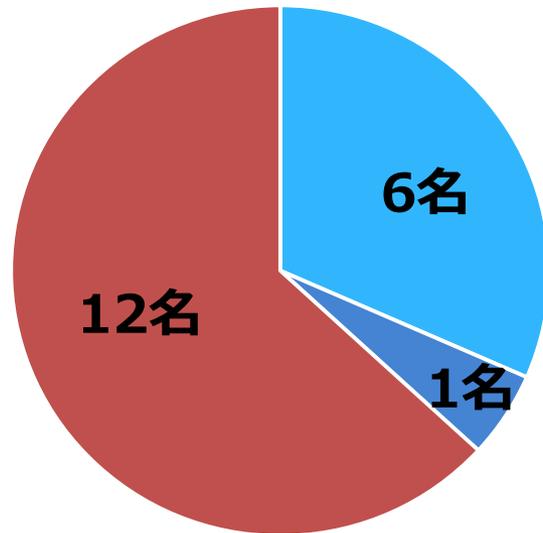


- 開発フェーズや目的に応じて捕捉試薬を選択
- 臨床に向けて、選択性の高い捕捉試薬（抗体、核酸アプタマー）を必要に応じて早期に準備開始



アンケートQ13『ビーズにコートする抗体について』より抜粋

抗体の入手



- 市販品を使用
- 社内調製品（委託合成含む）を使用
- どちらも使用

選択理由（回答数19、複数回答）

◆ 市販品を使用

- ・ 社内調製できないから（3名）
- ・ 抗体開発は時間とコストがかかるから（3名）
- ・ 継続的な入手を可能にするため（3名）

◆ 社内調製品（委託合成含む）を使用

- ・ 市販品がないから（1名）

◆ 市販品、社内調製品どちらも使用

- ・ 社内調製できないから（3名）
- ・ 抗体開発は時間とコストがかかるから（9名）
- ・ IAの特異性をあげるため（7名）
- ・ 継続的な入手を可能にするため（8名）
- ・ 開発フェーズによって使い分けているため（6名）

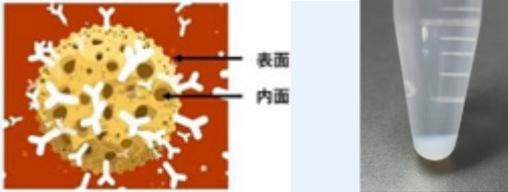
測定法構築期間や開発フェーズに応じて、入手元を選択している



③ Beads

免疫沈降（IP）に使用可能なビーズの比較

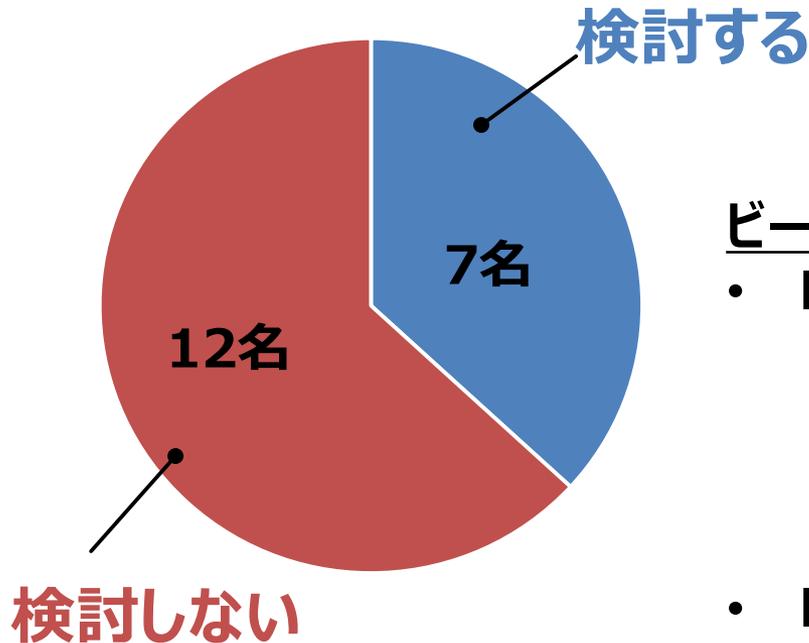
MBLのHP (<https://ruo.mbl.co.jp/bio/support/method/immunoprecipitation.html>) および
 VERITASのHP (<https://www.veritastk.co.jp/sciencelibrary/learning/dynabeads-ip-learning.html>) より引用

	アガロースビーズ	磁気ビーズ (Dynabeadsの基本スペック)
ビーズ径	約100 μm	約1~5 μm
模式図・写真		
抗体結合量	多い	やや少ない
サンプルロス	多い (ゲル洗浄の際にロス)	少ない (磁気で固定出来るため)
遠心操作	要	不要
磁気ラック	不要	要
ビーズの見やすさ	見にくい	見やすい
IPの所要時間	2-3時間	40分未満
再現性	低い	高い
その他の特徴	安価	分散性が高い (自動化に有用)

ビーズに関するアンケート結果

ビーズの種類を検討するか？

アンケートQ18『よくご使用されるビーズのブランドについて』および
アンケートQ10『IAを検討する際に評価している項目について』より抜粋



ビーズの使用状況について寄せられた回答

- **Dynabeads (12名)**
 - MyOne Streptavidin T1 (1名)
 - MyOne Streptavidin C1 (1名)
 - 詳細記載なし (10名)
- **Magnosphere (2名)**
 - MS300 (1名)
 - 詳細記載なし (1名)

磁気ビーズが使用されている

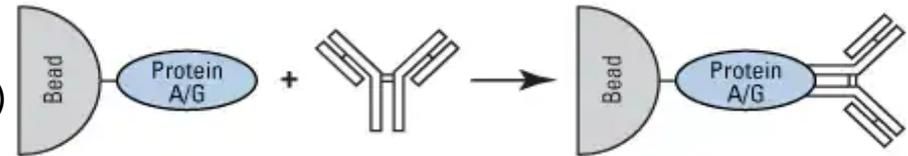
ビーズの種類・選択について

	固定化による分類	タンパク質のNH ₂ 基への固定化	アフィニティ結合で固定化	Avidin-biotin結合で固定化	タンパク質のSH基、NH ₂ 基への固定化	タンパク質のHis-tagへの固定化	クリックケミストリーで固定化
概要		NH ₂ 基を有する化合物、抗体またはタンパク質を直接ビーズへ固定化することが可能。	アフィニティ精製で主に抗体(IgG)をビーズへ固定化することが可能。	ビオチン化した化合物やビオチン標識抗体、DNAなどを固定化することが可能。	タンパク質などのNH ₂ 基やフェノール性OH基の固定化が可能。	His-Tagを導入したタンパク質を部位選択的に固定化することが可能。	アジド基/アルキンをもつ化合物をクリックケミストリー反応により、容易にビーズへ固定化が可能。
固定化対象による分類	抗体固定化	◎	◎	◎	○	○	△
	抗原固定化	◎	×	◎	○	○	△
精製方法による分類	直接法	◎	◎	◎	○	○	△
	間接法	×	△	◎	×	○	△
推奨ビーズ (・表面修飾)	表面活性化ビーズ ・カルボキシル基 ・スクシンイミド基	Protein A/G結合ビーズ ・Protein A ・Protein G	ストレプトアビジン結合ビーズ ・Streptavidin ・NeutrAvidin	表面活性化ビーズ ・エポキシ基	表面活性化ビーズ ・トシル基	表面活性化ビーズ ・アジド基 ・アルキン	

◎：推奨 ○：可能 △：条件次第で可能 ×：利用不可

■ DGでの議論

- 非臨床試験のPKでヒト化抗体（薬物抗体）を投薬されている場合に有用



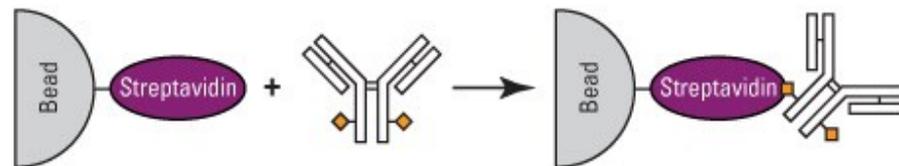
■ 報告事例

表面修飾	捕捉試薬 (抗体/抗原等)	測定対象物	リファレンス
Protein A	—	ADAs against infliximab	E H Smeijsters <i>et al.</i> , <i>Pharmaceutics.</i> , 15(5):1477 (2023).
	—	Transtuzumab Pertuzumab	S Schokker <i>et al.</i> , <i>MAbs.</i> , 12(1): 1795492 (2020).
Protein G	Anti-CK19 Ab	CYPRA 21-1	S A A M Genet <i>et al.</i> , <i>Clin Chem Lab Med.</i> , 62(4): 720-728 (2023).
	2種の抗体 (ペプチド配列-EEAKと-YGLRを認識する抗体)	Osteopontin peptide	J C Gautier <i>et al.</i> , <i>Toxicol Appl Pharmacol.</i> , 303: 1-10 (2016).

ストレプトアビジン結合ビーズの特徴と報告事例

■ DGでの議論

- 特異性の向上を目的とし、動物試験の中でも動物種がサル等の場合には本ビーズが選択され得る
- IPの反応時間が短い利点もある



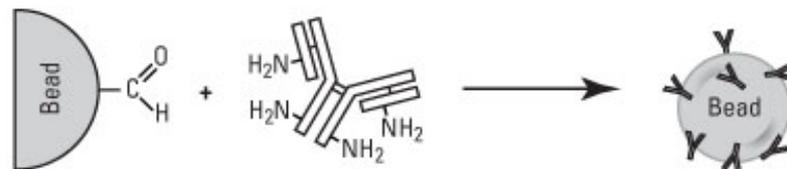
■ 報告事例

表面修飾	捕捉試薬 (抗体/抗原等)	測定対象物	リファレンス
Streptavidin	ビオチン化IL-21 Ab	IL-21	J Palandra <i>et al.</i> , <i>Anal Chem.</i> , 85(11): 5522-9 (2013).
	ビオチン化センス鎖	ASO	P Li <i>et al.</i> , <i>Anal Chem.</i> , 92(15): 10548-10559 (2020).
	ビオチン化 ADC	ADAs	Q Qin <i>et al.</i> , <i>Molecules.</i> , 27(19): 6299 (2022).
	ビオチン化アプタマー	SMAD4	S Radko <i>et al.</i> , <i>Biomedicines.</i> , 8(5): 133 (2020).
	ビオチン化S1タンパク質	anti-SARS-CoV-2 Ab	K A M de Jong <i>et al.</i> , <i>J Pharm Biomed Anal.</i> , 205: 114319 (2021).

表面活性化ビーズの特徴と報告事例

■ DGでの議論

➤ ビオチン化出来ない場合に本ビーズを使用することがある



➤ 本ビーズを用いることで、ビオチン化工程を省略できることから（1 Step減るだけでもバリデーションでは楽になるため）、1stチョイスされることもある

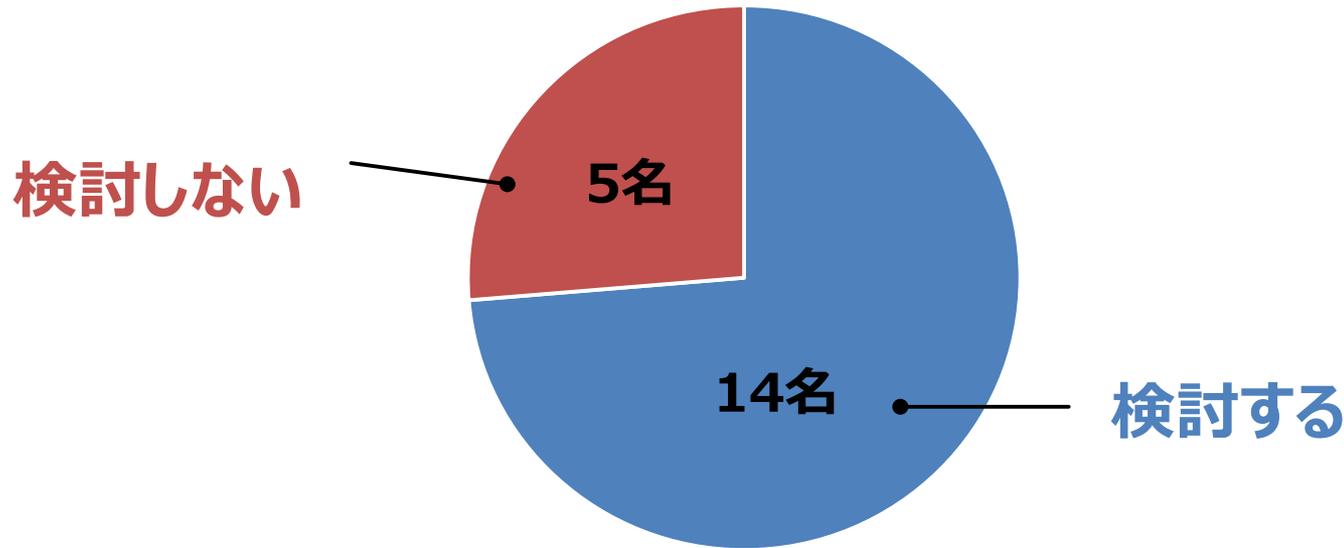
■ 報告事例

表面修飾	捕捉試薬 (抗体/抗原等)	測定対象物	リファレンス
トシル基	—	GPCRタンパク質S1PR1の消化後ペプチド	H Zhang <i>et al.</i> , <i>Bioanalysis.</i> , 12(18): 1311-1324 (2020).
トシル基	Anti-PD-1 Ab Anti-PD-L1 Ab	PD-1 PD-L1	Y Zhu <i>et al.</i> , <i>Rapid Commun Mass Spectrom.</i> , 34(20): e8896 (2020).
スクシンイミド基	Anti-AFP Ab	α -fetoprotein (AFP)	Y Takahata <i>et al.</i> , <i>Mass Spectrom (Tokyo).</i> , 12(1): A0122 (2023).
エポキシ基	Anti-A β Ab	A β _{40/42}	T Iino <i>et al.</i> , <i>J Appl Lab Med.</i> , 6(4): 834-845 (2021).
カルボキシル基	—	宿主防御ペプチド (RP-182 and D4E1)	M J O' Neill <i>et al.</i> , <i>J Pharm Biomed Anal.</i> , 181: 113093 (2020).

ビーズに関するアンケート結果

アンケートQ10『IAを検討する際に評価している項目について』より抜粋

ビーズの量（抗体使用量）を検討するか？



ビーズ量（使用抗体量）について寄せられた検討内容

- IAしたい標的濃度とキャプチャー抗体との親和性を加味して使用抗体量を見積もり、その濃度前後で回収率の飽和確認を実施する
- 推奨量の前後 3 倍程度
- ビーズの濃度と量を検討

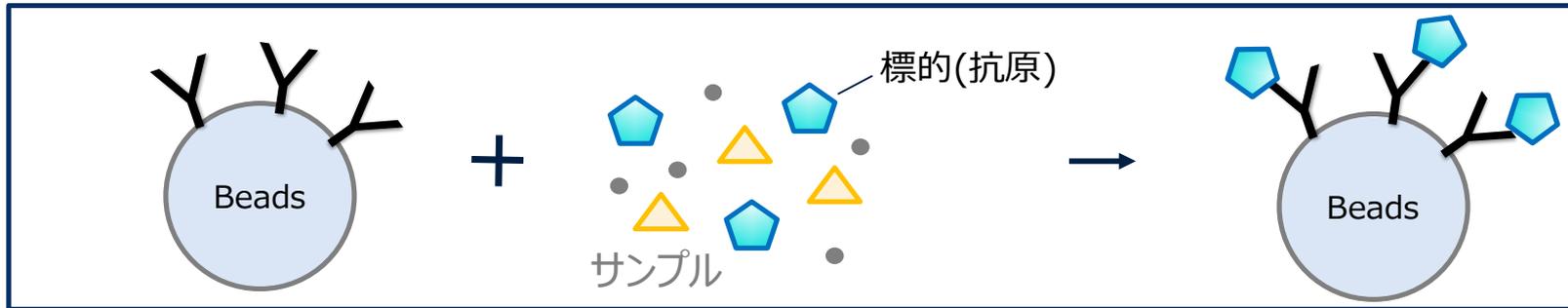
④ Binding

(反応時間、反応温度、使用機器)

免疫沈降法における「直接法」と「間接法」

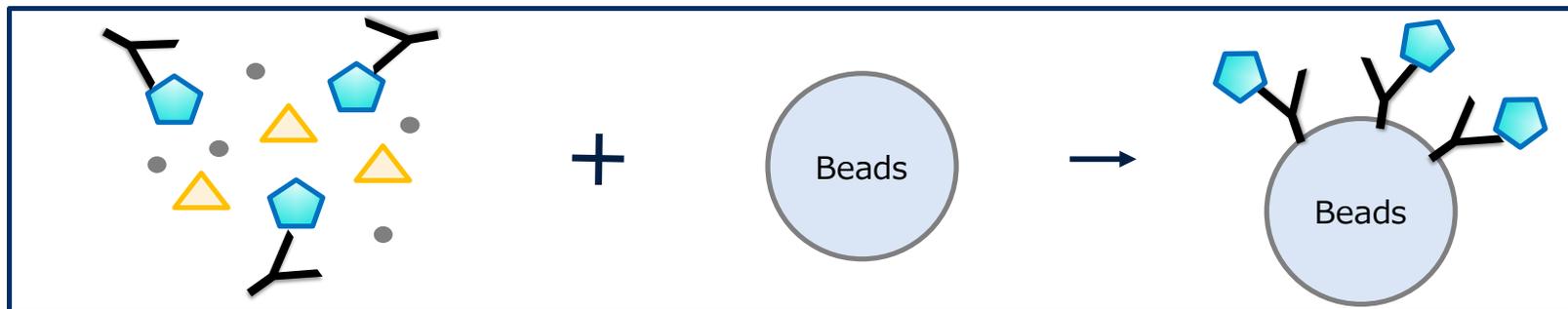
直接法 (Direct法)

予めビーズに結合させておいた一次抗体を 標的(抗原)と反応させる方法



間接法 (Indirect法)

一次抗体と抗原を反応させてからビーズに抗原-抗体複合体を結合させる方法



「直接法」と「間接法」の使い分け

直接法 (Direct法)	間接法 (Indirect法)
<ul style="list-style-type: none"> 一般的な方法 (1stチョイスとされる場合が多い) 標的抗原が多い場合 	<ul style="list-style-type: none"> 抗体のアフィニティが弱い場合 標的抗原が少ない場合
 抗体使用量が少ない 予め抗体ビーズを調製可能	 サンプルとビーズのインキュベーションを最小限にし、非特異結合を減らすことが可能 (直接法で純度が低い時に有効)  表面活性化ビーズは使用不可

■ DGでの議論

● 検討例

直接法から間接法へ変更

- 直接法でターゲットが回収できない場合、バックグラウンドが高い場合、間接法へ変更することで改善される可能性がある
- 間接法を検討する場合は、抗体の使用量には十分注意が必要
 (過剰量の抗体を用いると、フリーの抗体が多くなり、それらは抗原抗体複合体より早くビーズに結合し、標的抗原の収量を減少させることがあるため)

間接法の検討では、まず一次抗体の最適濃度を決定し、その後、抗体の回収に必要なビーズ量を計算することが推奨される

ベリタスHP (<https://www.veritastk.co.jp/sciencelibrary/learning/dynabeads-ip-video-compilation.html>) 参照

反応温度、反応時間について

■ DGでの議論

- 室温で反応が多い
- 反応時間はアフィニティの強さやターゲットの量により条件検討が必要である
- 直接法では抗体ビーズとサンプルを30min～2h 反応させることが多い
集まった情報の中でも反応時間の幅が広がった
- 間接法の場合、抗体とサンプルの反応条件は検討が必要
ビーズとの反応時間は短く設定している（30min）

検討例

● 反応時間の短縮

- ・ 反応時間が長いとバックグラウンドが高くなる可能性がある
- ・ 非特異吸着が起きる場合、バッファー検討と共に、インキュベーション時間を短縮することで改善する場合がある

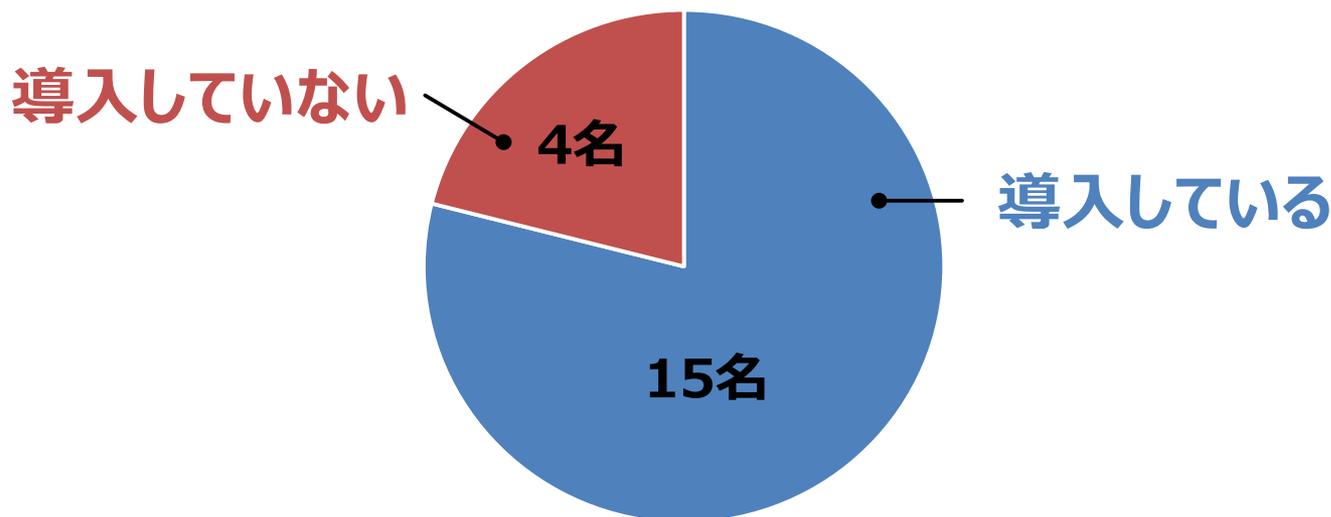
● 反応温度の変更：室温 → 4℃、Overnight

- ・ 不安定なタンパク質またはタンパク質複合体の場合、低温（4℃）で反応させる場合がある
- ・ 温度を下げると結合速度が遅くなるため、インキュベーション時間を長くする必要がある

自動前処理装置についてのアンケート結果 (1/2)

アンケートQ19『自動前処理装置を導入について』より抜粋 回答者数：19

自動前処理装置を導入しているか？



自動化のメリット	スループットが向上、作業時間短縮、再現性UP
自動化のデメリット	専用プレート使用のため、吸着の影響が出た場合に対応が難しい、コストUP

自動前処理装置についてのアンケート結果 (2/2)

自動前処理装置使用の工程

アンケートQ20 『どの工程を自動化していますか』より抜粋 (回答者数 : 15、複数回答可)



**ビーズ複合体形成から溶出まで、
ビーズを扱ういずれの工程で
使用実績があった**

自動前処理装置導入 (使用) のタイミング (回答数 15)

アンケートQ21『自動前処理装置を使用するタイミング』より抜粋 (回答者数 : 15)

- ・分析法開発の検討段階から・・・ 8名
- ・多検体処理から (検討時はマニュアルで実施)・・・ 7名

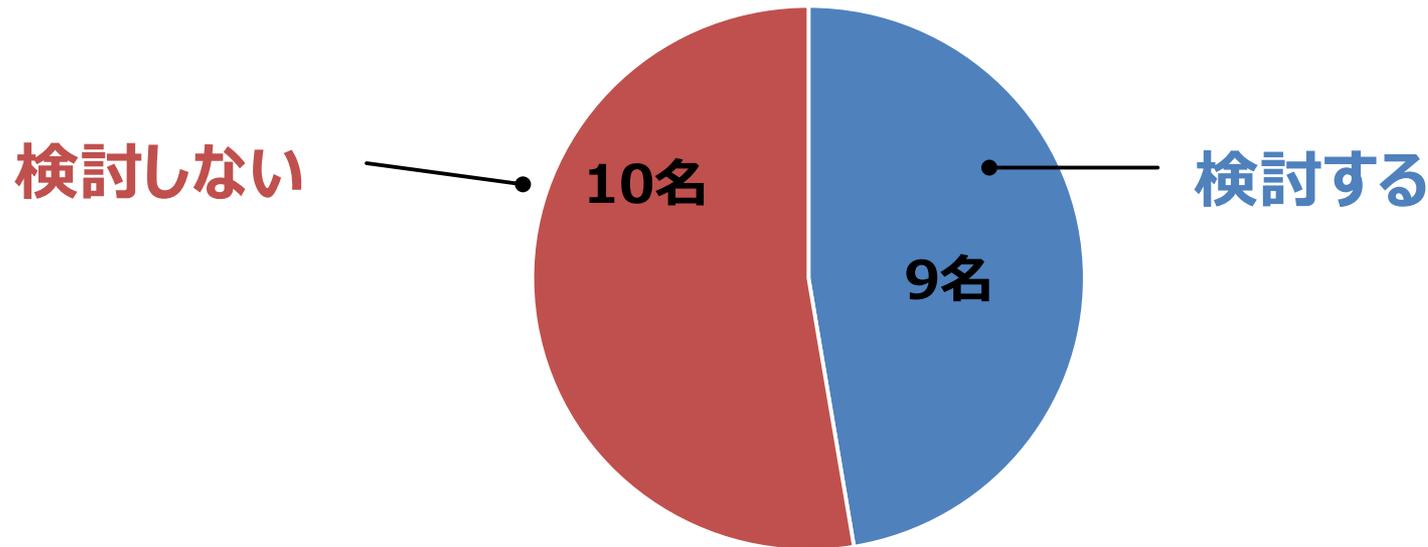
⑤ Wash

(バッファー、ブロッキング、回数)

Wash条件に関するアンケート結果

アンケートQ10『IAを検討する際に評価している項目について』より抜粋

Wash条件を検討するか？



Wash条件について寄せられた検討内容

- 界面活性剤の添加有無
- Wash回数
- 他の実施項目の後、さらなる改善が必要な場合
- 種類、回数、量



WASHについて (1/2)

Wash条件検討のゴール：

目的の特異的タンパク質相互作用を維持しつつ、非特異的タンパク質結合を除去する条件を作り出すこと

【基準となる洗浄バッファー】生理的なレベルのpHと塩分をもったPBSやTBS

【添加剤】目的の相互作用が維持するレベルでストリンジェンシーをさらに上げる

添加剤	濃度	目的
Detergent (NP-40, TritonX-100, CHAPS etc.)	0.5-1%	バックグラウンドノイズの低減
NaCl	0.5-1M	イオンの、静電的相互作用の減少
DTT, BME	1~2mM	ジスルフィド橋が介在する非特異的相互作用を破壊するのに役立つ

 JBF WASHについて (2/2)

【その他のバッファー】

- BSA (～2%) : ブロッキング効果、タンパクの凝集予防
- Ammoniumubicarbonatや水

【回数】

- 通常2回以上は実施する
- 新しいチューブに移し替える
- 最後の洗浄溶媒には界面活性剤を含めないバッファーや蒸留水

■ DGでの議論

- アナライトによって使い分けるよりは、各施設において経験的実験に基づいて添加剤がテストされることが多い
- 最終的に消化ステップの邪魔にならない、LC/MSに適合する状態であることが望ましい



⑥ Elute

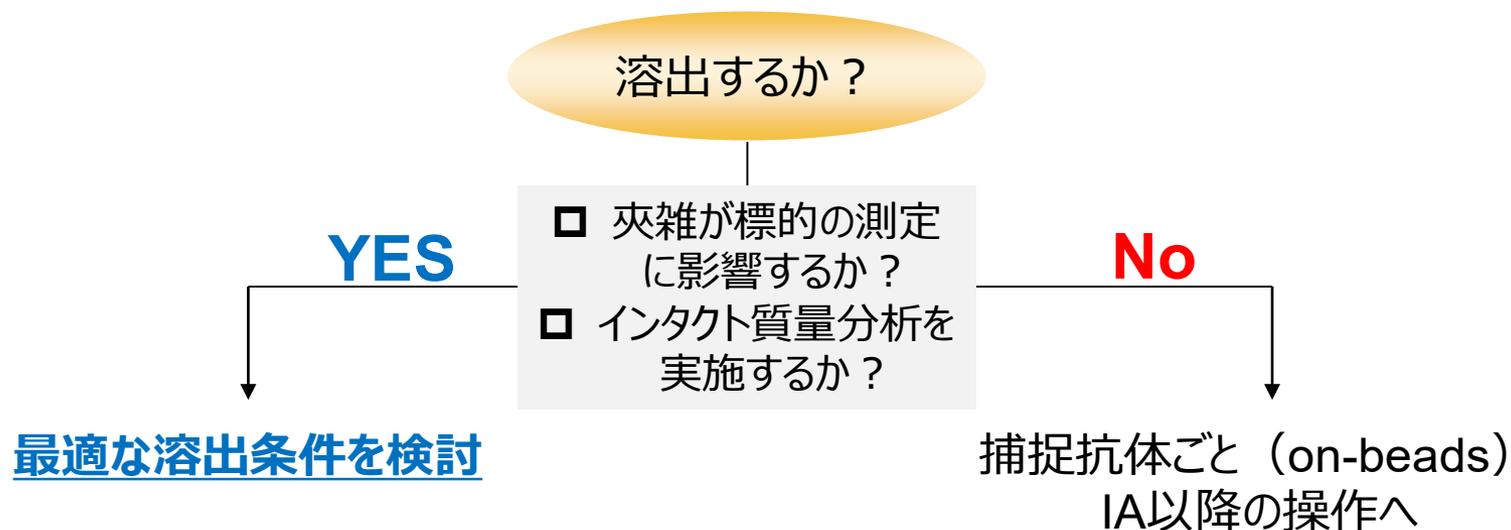
溶出（Elution）が必要な場合

① IAに使用した捕捉試薬が共存することで、標的（抗原、抗体）のLC/MS測定に影響する場合

- 多量の夾雑の影響によって、目的の蛋白質のMSシグナルがマスクされる可能性がある
- 測定対象のペプチドが捕捉抗体にも存在する場合、定量できない

② IA後、インタクト質量分析によりADAやADCのDARなどを分析する場合

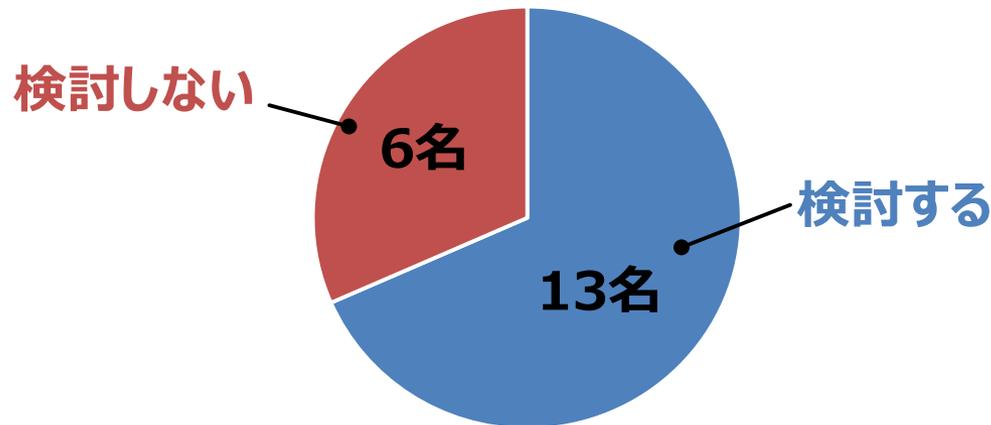
- 分析対象を単離する必要がある



溶出操作に関するアンケート結果

アンケートQ10『IAを検討する際に評価している項目について』より抜粋

溶出条件を検討するか？

**溶出条件を検討しない場合**

- on beadsで消化工程へ
- 尿素添加で変性させる

溶出条件を検討する場合

- 溶出液の量、種類（移動相、水、バッファーなど）、温度条件を検討
- ADCの場合はリンカーによって開裂酵素の種類やpHを検討

Eluents	Composition
Organic Solvent Eluents	
Methanol	30% Methanol, 0.1% TFA
Acetonitrile	30% Acetonitrile, 0.1% TFA
Ethanol	30% Ethanol, 0.1% TFA
Acetone	30% Acetone, 0.1% TFA
isopropanol	30% Isopropanol, 0.1% TFA
Tris-HCl-Based Eluents	
0% Acetonitrile	20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0% Acetonitrile
10% Acetonitrile	20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10% Acetonitrile
30% Acetonitrile	20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 30% Acetonitrile
50% Acetonitrile	20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50% Acetonitrile
80% Acetonitrile	20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 80% Acetonitrile
TFA-Based Eluents	
0% Acetonitrile	0.1% TFA
10% Acetonitrile	0.1% TFA, 10% Acetonitrile
20% Acetonitrile	0.1% TFA, 20% Acetonitrile
30% Acetonitrile	0.1% TFA, 30% Acetonitrile
50% Acetonitrile	0.1% TFA, 50% Acetonitrile
80% Acetonitrile	0.1% TFA, 80% Acetonitrile
100% Acetonitrile	0.1% TFA, 99.9% Acetonitrile
Urea-Based Eluents	
0% Acetonitrile	8 M Urea, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)
10% Acetonitrile	8 M Urea, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10% Acetonitrile
20% Acetonitrile	8 M Urea, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20% Acetonitrile
30% Acetonitrile	8 M Urea, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 30% Acetonitrile
40% Acetonitrile	8 M Urea, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 40% Acetonitrile

TFA = trifluoroacetic acid

● 有機溶媒



濃度を高くすることで、溶出力が向上

Beadsに非特異的に結合している蛋白質も溶出



標的の溶解性低下

蛋白質が沈殿するリスクあり

● TFA、塩酸、酢酸

抗体から抗原を溶出するための一般的な酸性エンハンサー

● 尿素、グアニジン塩

抗体からの抗原放出を促進する蛋白質変性剤

標的蛋白質の安定性 及び

消化操作が続く場合には、

酵素反応を阻害しない組成であることも重要

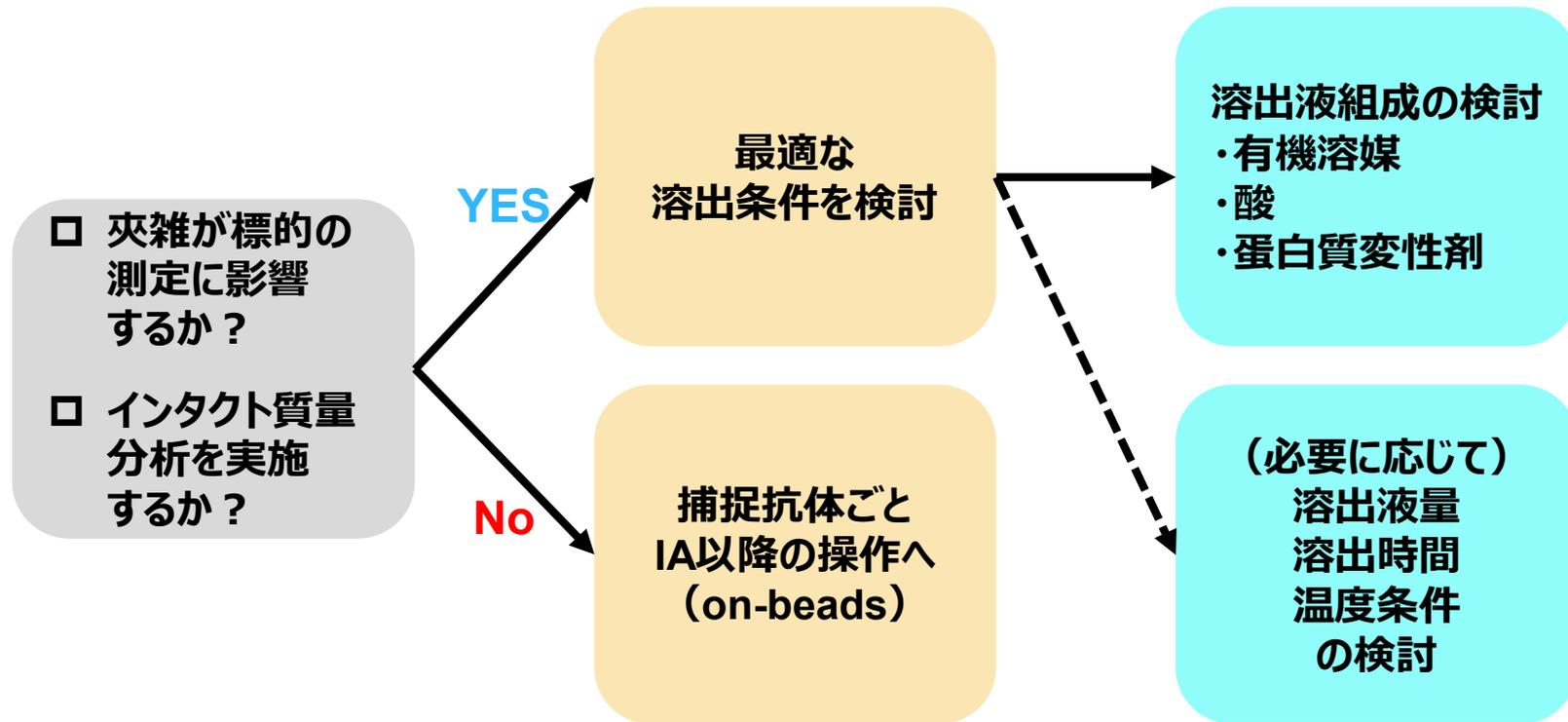
Takahata, Yoshio et al. *Mass spectrometry (Tokyo, Japan)* vol. 12,1 (2023): A0122.

溶出条件（反応温度、溶出時間）

推奨方法が存在するわけではなく、
各社・各研究グループによって様々な条件があった

反応	温度	時間
攪拌／ボルテックス (1000 rpmなど)	室温、2℃、…	2分、10分、…

溶出液組成と同様に、事前検討が必要と考えられる
反応温度 | 標的蛋白質の安定性
溶出時間 | 最大溶出を達成する時間



■ DGでの議論

- 溶出あり／なし両方を検討することもある
- 熱変性という方法もある

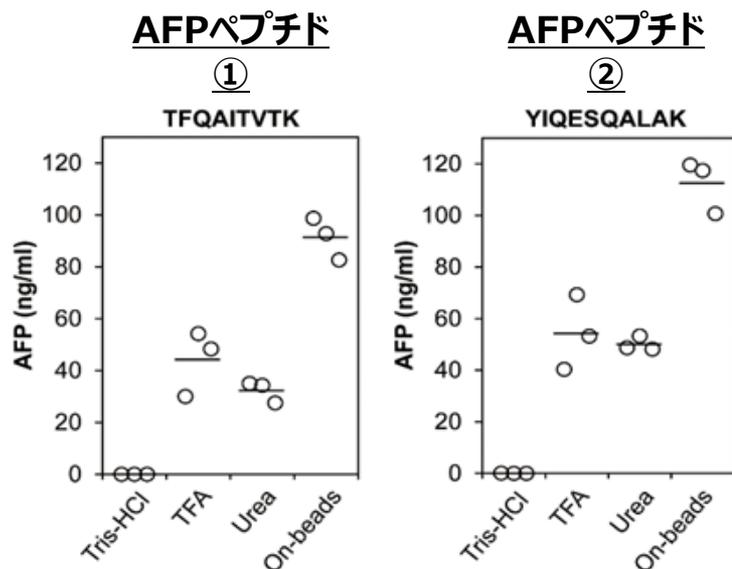
測定対象	Carbonic anhydrase 12 (CA12)
捕捉用beads	抗CA12抗体 + Dynabeads Protein G
溶出	50 mM 塩酸 5% 酢酸 0.2 M 炭酸ナトリウム pH 11 4 M 尿素/50 mM 塩酸 を検討
溶出条件	Vortex / 室温 / 2分

Elution Condition	IP #1 - CA12-FLAG recovery (%)	IP #2 - CA12-FLAG recovery (%)
50 mM HCl	72	66
5% acetic acid	56	60
0.2 M sodium carbonate, pH 11.0	47	33
4 M urea, 50 mM HCl	86	80

⇒4M 尿素/50 mM 塩酸による溶出回収率が最も高かった

Rafalko, Agnes *et al.* *Analytical chemistry* vol. 82,21 (2010): 8998-9005.

測定対象	血清α-フェトプロテイン (AFP)
捕捉用beads	抗AFP抗体+N-ヒドロキシスルホスクシンイミド (NHS) FGビーズ
溶出	on-beadsも含めて様々な方法を比較検討
溶出条件	1000 rpm/2℃/10分

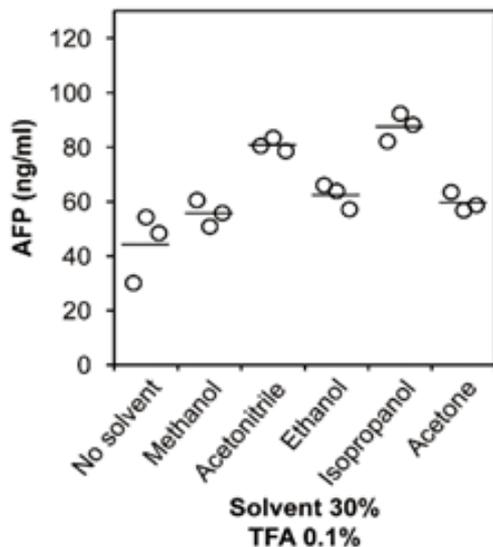


*理論濃度 : 100
ng/mL

回収率は、

1. on-beads (溶出無し)
 2. 0.1% TFA
 3. 8 M Urea/50 nM Tris-HCl/pH 8
 4. 50 nM Tris-HCl/pH 8
- の順で高かった

測定対象	血清α-フェトプロテイン (AFP)
捕捉用beads	抗AFP抗体+N-ヒドロキシスルホスクシンイミド (NHS) FGビーズ
溶出	on-beadsも含めて様々な方法を比較検討
溶出条件	1000 rpm / 2℃ / 10分

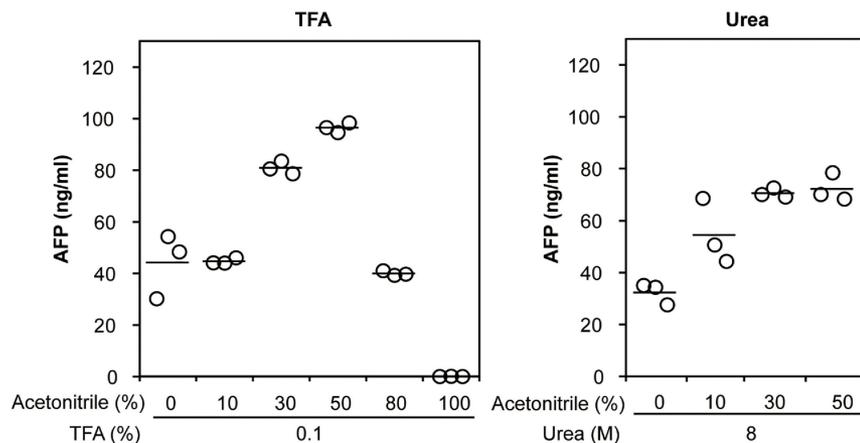


回収率は、有機溶媒のうち、
アセトニトリル・イソプロパノールで高かった

→ アセトニトリルの方が、化学反応性が低く、
水との混和性が高く、粘度が低いため、
推奨される

Takahata, Yoshio et al. *Mass spectrometry (Tokyo, Japan)* vol. 12,1 (2023): A0122.

測定対象	血清α-フェトプロテイン (AFP)
捕捉用beads	抗AFP抗体+N-ヒドロキシスルホスクシンイミド (NHS) FGビーズ
溶出	on-beadsも含めて様々な方法を比較検討
溶出条件	1000 rpm / 2℃ / 10分



- **0.1% TFAで溶出**
アセトニトリル濃度50%で
最も高い回収率
- **8 M Ureaで溶出**
アセトニトリル濃度30~50%で
最も高い回収率

※ アセトニトリル濃度が高すぎると、
標的の溶解性低下・非特異的蛋白質の
増加が確認された

Takahata, Yoshio *et al.* *Mass spectrometry (Tokyo, Japan)* vol. 12,1 (2023): A0122.



小括 (1/2)

フロー	検討項目	ポイント
① Matrix	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 試料量 (濃度) ➤ 組織可溶化、希釈バッファの種類・量 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 対象マトリックスは、血漿、血清、組織抽出液、細胞培養液、尿など多岐にわたる ✓ 測定法構築時に試料中濃度を予測し、測定範囲を考慮する
② Target	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 捕捉試薬の種類 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 開発フェーズや目的に応じて捕捉試薬 (抗体、核酸アプタマー) を選択する
③ Beads	<ul style="list-style-type: none"> ➤ ビーズの種類 ➤ ビーズの量 (使用抗体量) 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 磁気ビーズが主流 ✓ 目的によってビーズを使い分ける必要があり、ビーズ量 (使用抗体量) は検討される場合が多い
④ Binding	<ul style="list-style-type: none"> ➤ IA手法 <ul style="list-style-type: none"> • 直接法 • 間接法 ➤ 反応時間、温度 ➤ 自動前処理装置の導入 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ IA手法や、ビーズの種類・標的蛋白質の安定性等により、適切な反応時間、反応温度が異なるため、幅広く検討する


小括 (2/2)

フロー	検討項目	ポイント
⑤ Wash	<ul style="list-style-type: none"> ➤ バッファーの種類、回数、量 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 回収率と非特異結合の低下の兼ね合いで、バッファーの種類、回数、量などを検討する
⑥ Elute	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 溶出の有無 ➤ 溶出条件（溶出が必要な場合） <ul style="list-style-type: none"> • 溶出液の組成 • 溶出液の量 • 溶出時間 • 溶出温度 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 溶出条件は標的蛋白質の安定性やその後の操作により使い分ける ✓ On beads消化を1stチョイスとする場合もある

感度及び特異性の向上を目的とし、使用材料の選択から各反応工程まで様々な条件検討が行われている



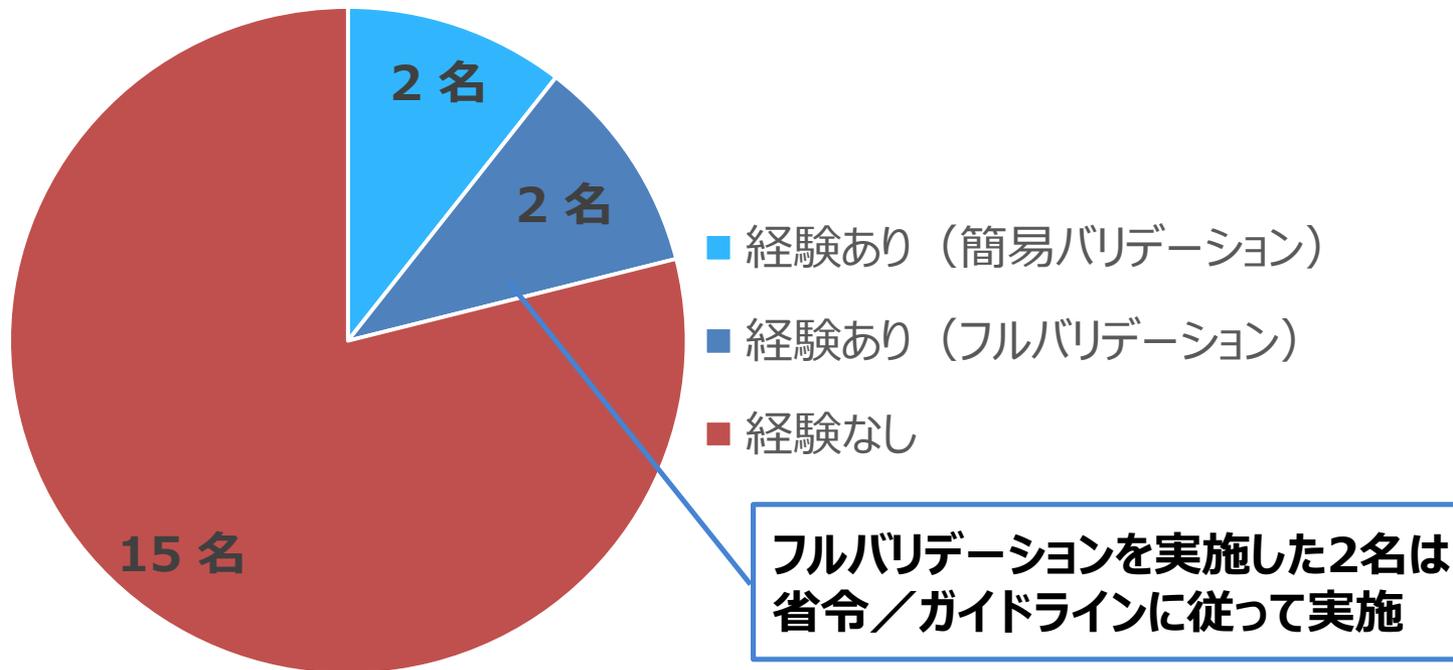
バリデーション

IA-MSのバリデーションの現状

- IA-MSの主なターゲットは抗体医薬品関連または高分子バイオマーカーが多い
- 抗体医薬品についてはM10に準拠することで対応
- バイオマーカーについては現時点で、国内では分析法バリデーションについて明確に述べられているガイドラインはない

IA-MSのバリデーション経験

Q8 IA-MSを用いてバリデーションを実施したご経験はありますか？（回答数19名）
⇒ IA-MS経験者からの回答



バリデーション未経験者が多数

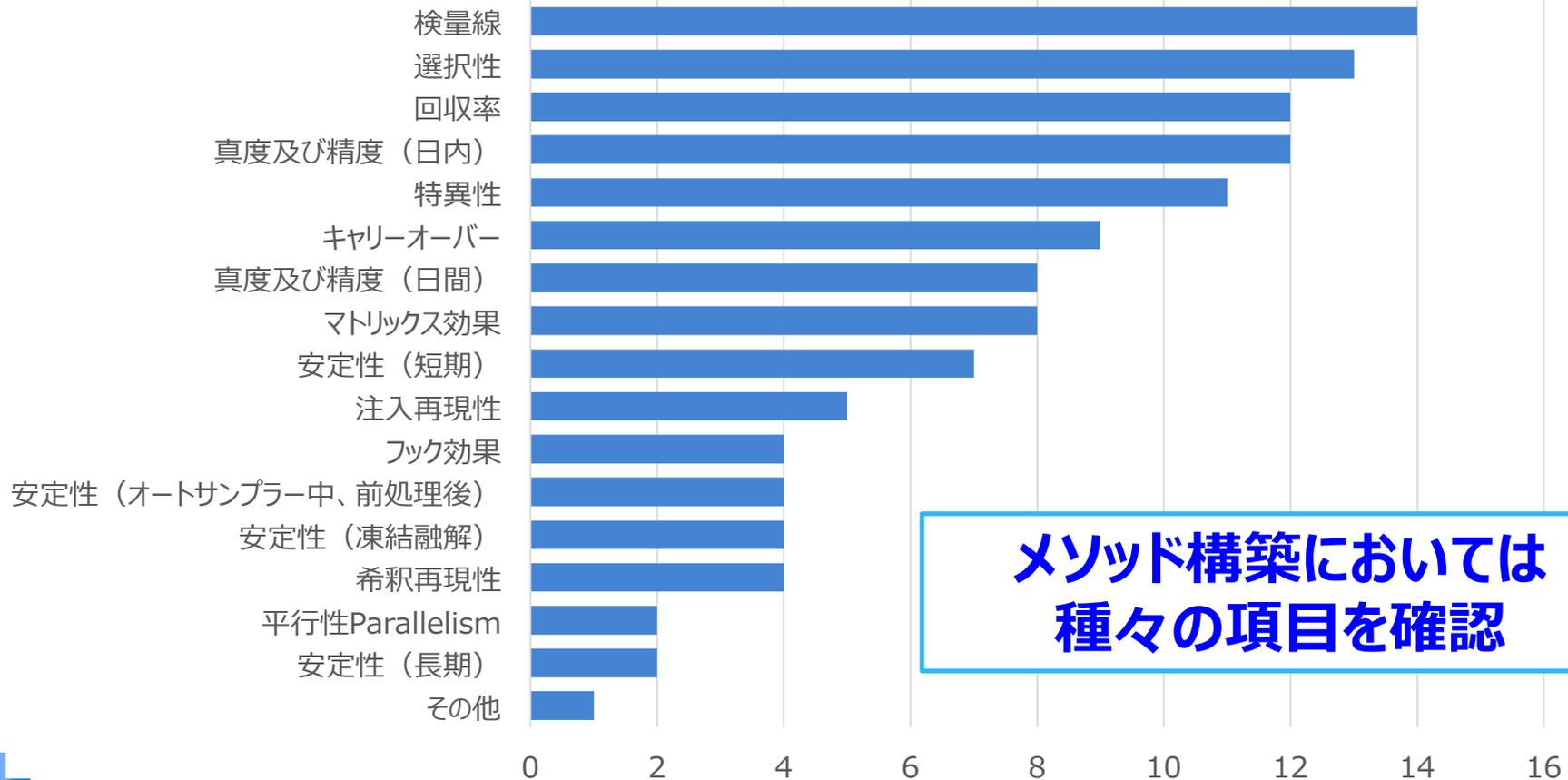
IA-MSメソッド構築時の確認項目

Q9 IA-MSのメソッド構築において確認する項目を教えてください？

メソッド構築時に確認する項目

検討項目

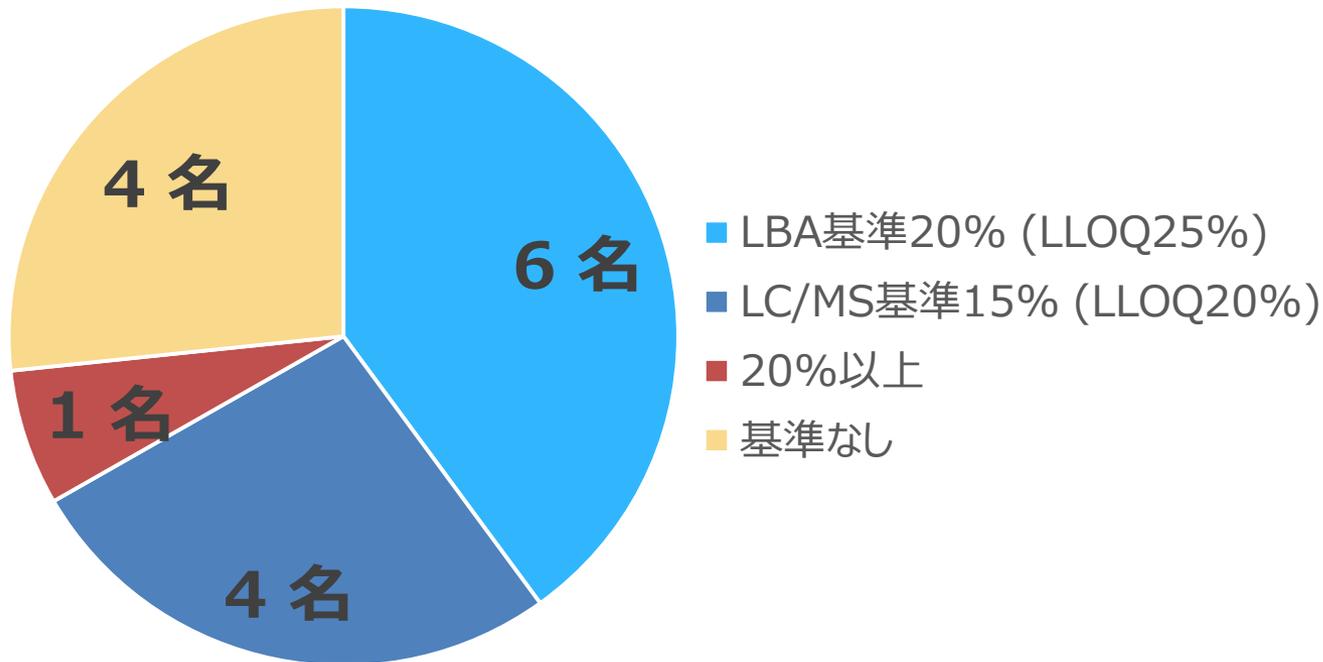
回答数（19名、複数回答）



メソッド構築においては
種々の項目を確認

IA-MSのバリデーション判定基準

Q15 メソッドバリデーションの判断基準はどのように設定されていますか。(回答数15名)
⇒ IA-MS経験者からの回答



バリデーションの経験者は少ないが、メソッド構築においては多くの項目を検討、かつ独自の基準を設けている

1月22日にFDAからバイオマーカーのBMVについてのガイダンス発行

Bioanalytical Method Validation for Biomarkers Guidance for Industry

Additional copies are available from:
Office of Communications, Division of Drug Information
Center for Drug Evaluation and Research
Food and Drug Administration
10001 New Hampshire Ave., Hillendale Bldg., 4th Floor
Silver Spring, MD 20993-0002
Phone: 855-543-3784 or 301-796-3400; Fax: 301-431-6353
Email: druginfo@fda.hhs.gov

<https://www.fda.gov/drugs/guidance-compliance-regulatory-information/guidances-drugs-and/or>

Office of Communication, Outreach and Development
Center for Biologics Evaluation and Research
Food and Drug Administration
10903 New Hampshire Ave., Bldg. 71, Room 3128
Silver Spring, MD 20993-0002
Phone: 800-835-4709 or 240-402-8010
Email: ocod@fda.hhs.gov

<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/guidance-compliance-regulatory-information-biologics/biologics-guidances>

U.S. Department of Health and Human Services
Food and Drug Administration
Center for Drug Evaluation and Research (CDER)
Center for Biologics Evaluation and Research (CBER)

January 2025
Clinical Pharmacology

ガイダンスより

...when biomarker data will be used to support regulatory decision-making, such as the pivotal determination of safety and/or effectiveness to support approval or to support dosage instructions in product labeling, the assay should be fully validated as described in the guidance for industry *M10* ...

The accuracy, precision, sensitivity, selectivity, parallelism, range, reproducibility, and stability of a biomarker assay are important characteristics that define the method.

医薬品分析 ≡ バイオマーカー分析？

IA-MSなどのアフィニティ精製と組み合わせたLC-MSの信頼性は通常のLC-MS法と同様か？

■ DGでの意見

- ISの選択肢が限定的になるため、通常のLC-MSで使用されるSIL-ISに比べて補正効果が落ちる可能性がある
- ISを添加が処理工程の後段になることが多く、工程全体での補正効果が低い
- LBAに比べてバックグラウンドの影響が少ないと考えられるので、LBAより厳しい判断基準を採用すべき
- 消化工程についても回収率評価が必要
- ターゲットや前処理法（例えば、消化や溶出の有無）によって判断基準を変える必要がある

⇒ 通常のLC-MSとは区別して評価する必要がある

IA-MSのバリデーション基準の考え方

どの基準が適切か？ LC-MSの基準、LBAの基準、その他の基準…

項目	基準の例
検量線、真度／精度	15% (LLOQ : 20%)、20% (LLOQ : 25%) ...
選択性／特異性	LLOQの20%以下／6ロット、80%がBLQ／10ロット...
マトリクス効果	15%以下、20%以下...
キャリーオーバー	20%以下...
試料中安定性	15%以下、20%以下...
ISR	乖離度 : 20%以下、25%以下、30%以下...

LC-MSに合わせる？ / LBAに合わせる？ / 新しい基準を設ける？

現状、精度管理においても6本中4本が「15%以下」と「20%以下」の意見が混在



まとめ

➤課題

- ✓ IA-MSの認知度や普及度合いが低いこと
- ✓ LBAとLC-MS、両者の幅広い経験を要すること
- ✓ さらなる技術普及とユーザー教育が必要

➤活動

- ✓ IA-MSの普及状況と応用範囲をアンケート調査で把握し、技術情報などを収集
- ✓ IA-MSが選択される背景や実施状況の情報収集、実際の操作について議論
- ✓ IA-MSの応用範囲を示すとともにメソッド構築において検討すべき項目やパラメーターを提案

➤まとめ

DG活動を通して作成した本ポスターが、これからIA-MSを始めるバイオアナリストの一助となることを期待します。

メンバーからの意見・感想

- 他社状況や文献情報からIA-MSの活用範囲やメソッド構築について包括的に知ることができた。社内活用に役立てていきたい。
- IA-MSにおける他社の状況、ノウハウを知ることができるよい機会であった。また論文情報の集約も合わせて、検討ポイントが明らかとなり、今後のメソッド開発に大いに役立つ情報を得ることができた。
- 私を含め弊社はIA-MSの実施経験はなかったが、実施時の検討項目やノウハウを知ることが出来る良い機会であった。今後、IA-MSを始める足掛かりとなったように感じる。
- IA-MSの基本原理からノウハウまで幅広く情報収集できた。特に、自動前処理装置の導入割合が想像以上に高く、業務効率や再現性を高めるために工夫されている現状を知ることができて参考になった。
- 通常業務ではほぼLC-MSしか操作することがなくLBAに関連する操作の理解が深まった。今後、数年以内にはこのバイオアナリシスではIA-MSの操作技術が必須になると感じた。

メンバーからの意見・感想

- IA-MSにおける他社の状況、ノウハウを知ることができるよい機会でしたし、IA-MSを用いたバイオアナリシスの活用範囲が今後さらに拡大していくものと確信できました。アンケート結果ではバリデーションについては経験者が少数だったので当日議論してみたいです。
- IA-MSにおける他社の状況、弊社で実施経験のない測定対象の実例や検討項目を知ることができ、大変参考になった。

Background

- ✓ The demand for measuring medium- to high-molecular-weight compounds, such as biomarkers, is increasing in the field of bioanalysis.
- ✓ To complement the traditional Ligand Binding Assay (LBA) method and address issues of specificity and sensitivity, the use of Immunoaffinity-MS (IA-MS) is on the rise.
- ✓ IA-MS employs antibodies for sample purification, offering higher specificity and sensitivity than conventional LC-MS sample preparation methods.

Objectives

- ✓ To widely disseminate the utility of IA-MS, thereby broadening the analytical scope for LC-MS users.
- ✓ To serve as a starting point for those new to IA-MS, facilitating the exchange of opinions and discussions through on-site posters.

Challenges

- ✓ Limited awareness and adoption of IA-MS.
- ✓ Requires extensive experience with both LBA and LC-MS.
- ✓ Further dissemination of the technology and enhancement of user education are necessary.

Activities

- ✓ Conducted surveys to understand the status and scope of IA-MS adoption and collected technical information.
- ✓ Collected information on the background and status of IA-MS implementation and discussed its practical operations.
- ✓ Proposed items and parameters to consider in method development, demonstrating the application range of IA-MS.

Conclusion

- ✓ We hope that this poster, created through DG activities, will help bioanalysts who are beginning to use IA-MS.