

2018 年度 臨床薬理研究振興財団賞学術奨励賞 研究成果報告

抗体医薬の TDM の普及を志向したヒト血清中濃度測定の
分析ワークフローの構築

浜松医科大学医学部附属病院薬剤部

内 藤 隆 文 柴 田 海 斗 志 田 拓 顕
阿 部 一 樹 川 上 純 一**Construction of Quantitative Analysis Workflow for Determination of Serum Concentrations of Monoclonal Antibody Drugs Aiming to Promote Therapeutic Drug Monitoring in Clinical Practice**

Takafumi NAITO*, Kaito SHIBATA*, Hiroaki SHIDA*, Kazuki ABE* and Junichi KAWAKAMI*

* Department of Hospital Pharmacy, Hamamatsu University School of Medicine
1-20-1 Handayama, Higashi-ku, Hamamatsu 431-3192, Japan

Although ligand binding assays are commonly used for the determination of serum concentrations of monoclonal antibody drugs in humans, the serum concentrations measured by these assays are potentially increased by cross-reaction with endogenous proteins and decreased by the presence of neutralizing antibodies. Recently, proteomic approaches using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) have been employed for the measurement of monoclonal antibody drugs in human specimens. For serum concentrations of monoclonal antibody drugs, the proteomic approaches require complicated pretreatment processes including immunopurification, denaturation, reduction, alkylation, tryptic digestion, desalination, clean-up, and reconstitution. These pretreatment processes are time-consuming and potentially cause analytical variations. To date, the proteomic approaches using LC-MS/MS methods have not been fully applied to clinical practice. We have constructed quantitative analysis workflow that uses a signature peptide selected by Fourier transform mass spectrometer to ensure its uniqueness in human serum, extracts serum immunoglobulins with immobilized Protein G to reduce the matrix effect if needed, and employs immobilized trypsin for rapid protein digestion. The entire pretreatment and quantitation using the present LC-MS/MS method can be completed within one day. Additionally, the analytical performance data obtained from these methods meet the standards of international guidance. The present report describes the construction of quantitative analysis workflow for measurement of monoclonal antibody drugs in human serum. Our approaches would contribute to promote therapeutic drug monitoring of monoclonal antibody drugs in clinical practice.

Key words: monoclonal antibody drug, LC-MS/MS, therapeutic drug monitoring, pharmacokinetics*Jpn J Clin Pharmacol Ther.* 2020; 51(3): 161-166

1. はじめに

従来、抗体医薬の血中濃度測定において、Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) 法などの免疫学的測定法が用いられてきた¹⁻³⁾。免疫学的測定法では、測定感度やスループット分析において優れているものの、ヒト血清試料に適用した場合、さまざまな問題を生じる^{4,5)}。具体的には、免疫学的測定法では、(1) 測定対象の抗体医薬ごとの特異抗体や特異抗原の作製に時間と費用を必要とする、(2) 市販のキット品または抗体や抗原であっても、製品間におけるバッチ差が存在するため、十分な再現性が得られないこ

とがある、(3) 一部の患者の血清試料では内因性物質や抗薬物抗体との干渉により、十分な定量性が得られないことがある。さらには、薬価収載されてから期間の経過していない抗体医薬では、免疫学的測定キット品が市販されていない。そのため、臨床で実施可能な抗体医薬の血中濃度測定は一部の抗体医薬に限られている。

近年、質量分析計を用いた定量的標的プロテオミクスによる血中濃度測定法が抗体医薬のタンパク定量の選択肢となっている⁶⁻¹⁰⁾。質量分析計を用いた濃度測定法では、選択性や拡張性の点で優れているものの、ヒト血清試料に適用した場合に種々の問題を生じる^{6,11)}。具体的には、質量分

Table 1 Characteristics of cetuximab-derived peptides identified from Fourier transform mass spectrometer

Peptides	Region	Chain	Charge	Mass of [M+H] ⁺	Xcorr score	Confidence level
ASQSIGTNIHWYQQR	variable region	light	+3	1788.9	4.247	high
DILLTQSPVILSVSPGER	variable region	light	+2	1924.1	4.138	high
YASESISGIPSR	variable region	light	+2	1266.6	3.204	high
VSFScR	variable region	light	+2	755.3	1.031	medium
VDNALQSGNSQESVTEQDSK	constant region	light	+2	2136.0	4.541	high
VYAcEVTHQGLSPVTK	constant region	light	+2	1875.9	3.597	high
TVAAPSVFIFPPSDEQLK	constant region	light	+2	1946.0	3.576	high
DSTYLSSTLTLSK	constant region	light	+2	1502.8	2.857	high
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK	constant region	light	+3	2677.3	1.988	medium
TPEVTcVVVDVSHEDPEVK	constant region	heavy	+2	2139.0	5.105	high
STSGGTAALGcLVK	constant region	heavy	+2	1321.7	3.685	high
NQVSLTcLVK	constant region	heavy	+2	1161.6	2.719	high
EPQVYTLPPSR	constant region	heavy	+2	1286.7	2.613	high
FNWYVDGVEVHNAK	constant region	heavy	+2	1677.8	2.504	high
GPSVFPLAPSSK	constant region	heavy	+2	1186.6	2.403	high
TTPVLDSGDGFFLYSK	constant region	heavy	+2	1873.9	2.330	high
ALPAPIEK	constant region	heavy	+2	838.5	1.437	medium
SLSLSPGK	constant region	heavy	+2	788.5	1.420	medium
DTLmISR	constant region	heavy	+2	851.4	1.012	medium

The c and m indicate cysteine with carbamidomethylation and methionine with oxidation, respectively.

析計を用いた測定法では、(1) 免疫精製、変性、還元、アルキル化、脱塩などの煩雑な前処理が必要になる、(2) 抗体医薬のトリプシン消化（ペプチド断片化）に少なくとも4時間以上の時間を必要とする、(3) 共存する消化物によりイオンサプレッションを生じることで、十分な感度や定量性が得られないことがある。そのため、現在、質量分析計による血中濃度測定法は抗体医薬の薬物治療モニタリング（TDM）には、ほとんど導入されていない。

上記の背景を踏まえて、著者らは日本において上市されている抗体医薬を対象に質量分析計を用いたヒト血中濃度測定法を開発し、前処理から定量までのプロセスについて、臨床適用性を有するワークフローを構築した。本報告では、抗体医薬のTDMの普及を志向して、最適なシグネチャーペプチドの選択、前処理の迅速化、イオンサプレッションの低減による定量性の向上に取り組むとともに、それらの臨床応用に加え既存のELISA法との比較を行うことでその分析特性を評価した。

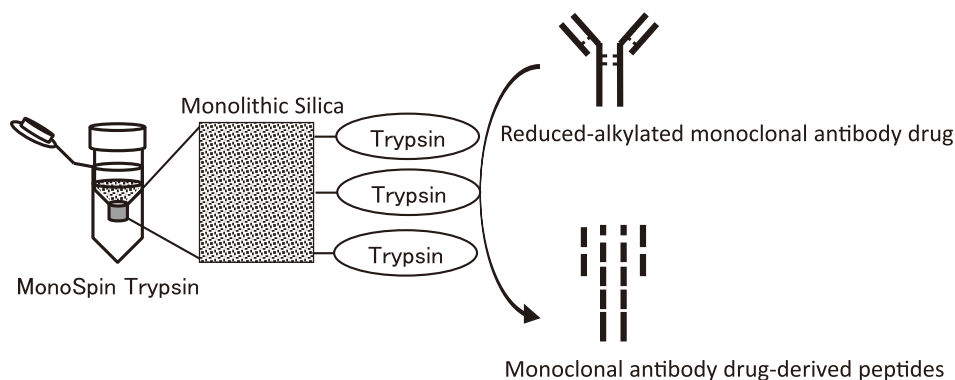
2. 最適なシグネチャーペプチドの選択

抗体医薬の濃度測定では、抗体医薬の酵素消化後に生成した特定のペプチド断片の質量情報を指標にトリプル四重極型質量分析計を用いて定量を行う。実際には、抗体医薬を変性、還元、アルキル化した後にトリプシン等で酵素消化を行い、得られたペプチド断片の中から、定量に最適なペプチド（シグネチャーペプチド）の選択が必要となる。シグネチャーペプチドの選択については、*in silico* 消化を行う方法もある^{12,13)}。本研究では、トリプル四重極型質量

分析計を用いた定量に最適なシグネチャーペプチドを選択する方法を構築した。

まず、フーリエ変換型質量分析計（Q Exactive, サーマフィッシャーサイエンティフィック, ウォルサム, 米国）を用いた高分解能精密質量オービトラップ検出によって、酵素消化後の定量に用いるペプチド断片の情報を得る。次に、その質量情報と抗体医薬のアミノ配列情報をもとに、解析ソフト（Proteome Discoverer, サーマフィッシャーサイエンティフィック）を用いて、抗体医薬に由来するペプチドを同定する。シグネチャーペプチド選択の絶対基準について、(1) 可変領域にある、(2) ブランクの血清試料から検出されない、さらに優先の選択基準について、(3) Proteome Discoverer による Xcorr スコアが高い、(4) ピーク強度が高い、(5) 相補性決定領域（CDR）のすべて、または、一部を含むペプチドをシグネチャーペプチド候補として選択した。シグネチャーペプチドは合成して、トリプル四重極型質量分析（QTRAP 3200 システム, エービー・サイエックス, フォスターシティ, 米国）の最適化を行うとともに、そのC末端のアミノ酸（Lys, Arg）を安定同位体（¹³C, ¹⁵N）標識したペプチドを内部標準物質として用いた。

実際のシグネチャーペプチドの選択については、セツキシマブでは、19本のペプチドが同定され、その中の4本のペプチドが可変領域に由来し、その中からブランクの血清試料から検出されない、かつ、Xcorr スコアの最も高いペプチドを選択した（Table 1）¹⁴⁾。その選択したペプチドはCDRを含んでいた。デノスマブでは、19本のペプチドが同定され、その中の10本のペプチドが可変領域に由来し、



Passage through an immobilized trypsin spin column at $100\times g$ at 37°C for 10 minutes twice

Figure 1 Rapid digestion of reduced-alkylated monoclonal antibody drug using an immobilized trypsin

The samples including reduced-alkylated monoclonal antibody drug were passed through an immobilized trypsin spin column (MonoSpin Trypsin, GL Sciences, Tokyo, Japan) at $100\times g$ at 37°C for 10 minutes twice, and then 50 mM ammonium bicarbonate was also passed through to wash the column.

その中にブランクの血清試料から検出されない5本のペプチドがあり、その中から CDR を含む2本のペプチドの内、ピーク強度のより高いペプチドを選択した¹⁵⁾。ニボルマブでは、14本のペプチドが同定され、その中の3本のペプチドが可変領域に由来し、その中の2本がブランクの血清試料から検出されなかった。その内のピーク強度のより高いペプチドを選択し、その選択したペプチドは CDR を含んでいた¹⁶⁾。

3. 前処理の迅速化

抗体医薬のトリプシン消化において、溶液を用いた消化では、少なくとも4時間（場合によっては、一晚）の消化時間を必要とする^{9,10,12,17)}。また、溶液の濃度を高くした場合には、トリプシンの自己消化を起こすため高濃度での消化は困難である^{18,19)}。さらに尿素などの変性剤はトリプシン消化の効率を高めるために必要とされるが、消化中にペプチドを修飾したり、付加体を生成したりする可能性がある¹¹⁾。今回、変性剤として選択した Sodium 3-[(2-methyl-2-undecyl-1,3-dioxolan-4-yl)methoxy]-1-propanesulfonate (RapiGest SF, 日本ウォーターズ, 東京) は、タンパク質の可溶化を促進し、トリプシン消化を促進する¹¹⁾。また、RapiGest SF は酸の添加によって容易に除去できるため、質量分析時に変性剤に由来するイオンサプレッションを生じにくい。本研究では、抗体医薬の迅速消化の観点から、RapiGest SF の存在下にて、連続孔を有するシリカモノリスに高濃度トリプシンを結合させた固相化トリプシン (MonoSpin Trypsin, ジーエルサイエンス, 東京) を導入した (Figure 1)。

MonoSpin Trypsin の使用により、 37°C 、 $100\times g$ 、2回の遠心消化と1回の洗浄により、消化効率は、セツキシマブでは100%を超え、デノスマブでは105.6%、ニボルマブでは

94.0%であった。また、洗浄を含めたすべての操作を30分以内で完了することが可能であった^{14~16)}。さらに、それらの消化効率は臨床で想定される患者の血清アルブミン値や血清総グロブリン値の範囲において影響を受けなかった。また、トリプシン消化後の RapiGest SF の不活性化についても、酢酸や塩酸の添加によって、イオンサプレッションを生じないレベルに処理された。MonoSpin Trypsin の導入により、従来法のトリプシン溶液を用いた場合に4時間以上必要であった酵素消化時間を30分に短縮し、前処理から測定までのプロセスを1日以内で実施することが可能となった。

4. イオンサプレッションの低減と感度の向上

血清中に含まれる抗体医薬のトリプシン消化物について、変性剤の除去および脱塩後に試料を質量分析計に注入した場合でも、シグネチャーペプチドの十分な感度が得られないことが多い。血清中の抗体医薬濃度は血清アルブミン値に比べて著しく低い。プロテイン A/G などを使用した免疫グロブリン G (IgG) 精製を行わずに、他の血清タンパクとともにトリプシン消化を行った場合には、より多くのペプチド消化物を生成する²⁰⁾。それら消化物の共存によって、質量分析計に流入するペプチド量が多い場合に、質量分析計での飽和が起り、一部のシグネチャーペプチドでは感度が著しく低下する。すなわち、質量分析において、共存するペプチドの存在によって、シグネチャーペプチドの検出が抑制されることがある。

また、多くのペプチド消化物の共存は、セミマイクロカラムでは、充填されている粒子に対する拡散飽和によるシグネチャーペプチドの分析カラムへの保持が不十分となり、ピークのブロード化による感度の低下を生じる。さらに、ほとんどのシグネチャーペプチドでは、アミノ酸が8~20

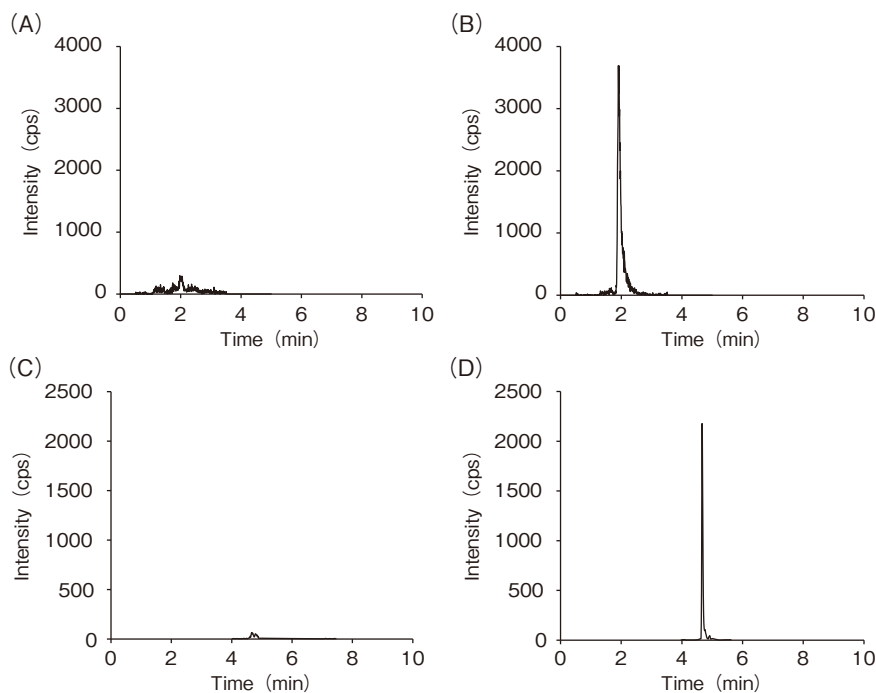


Figure 2 Comparison of the peaks of signature peptide in monoclonal antibody drug-spiked serum digests between without and with an immobilized Protein G

The peaks of signature peptide in 100 $\mu\text{g/mL}$ denosumab-spiked serum digests without (A) and with (B) an immobilized Protein G spin column. The peaks of signature peptide in 100 $\mu\text{g/mL}$ nivolumab-spiked serum digests without (C) and with (D) an immobilized Protein G spin column.

個であるため、分子量が 1000 から 3000 と大きく、通常の多孔性カラムでは、分子間の粒子への拡散速度の違いを生じ、ピークのプロード化による感度の低下を生じる²¹⁾。本研究では、シグネチャーペプチドの検出感度と定量性の向上のために、連続孔を有するシリカモノリスにプロテイン G を結合させた固相化プロテイン G (MonoSpin ProG, ジーエルサイエンス) による IgG 精製を測定感度が不十分な場合に適用した。さらに液体クロマトグラフによるシグネチャーペプチドの分離において、その保持能を向上させるために内径 3 mm のコアシェル型 ODS カラム (Aeris Peptide XB-C18, 粒子径 2.6 μm , 長さ 150 mm, フェノメネックス, トーランス, 米国) を用いて、シグネチャーペプチドのカラム保持の改善による感度の向上を試みた。

セツキシマブでは、固相化プロテイン G を使用せずにシグネチャーペプチドの十分な検出感度が得られた (定量下限, 4 $\mu\text{g/mL}$)¹⁴⁾。セツキシマブではマトリックスファクターが 59.5% [相対標準偏差 (RSD), 13.3%] であった。一方、デノスマブおよびニボルマブにおいては、イオンサプレッションを生じ、測定感度の問題から、固相化プロテイン G の導入が必要となった^{15,16)}。デノスマブおよびニボルマブでは、固相化プロテイン G の導入によりシグネチャーペプチドの検出感度が顕著に上昇した (Figure 2)。固相化プロテイン G の導入後において、デノスマブではマトリックスファクターが 39.5% (RSD, 10.1%), ニボルマブ

ブではマトリックスファクターが 42.0% (RSD, 3.5%) であった。本研究では、シグネチャーペプチドの安定同位体標識ペプチドを内部標準物質として使用している。内部標準物質によるイオンサプレッション補正を行った後のマトリックスファクターは、ほぼ 100% であることを確認している。

5. 臨床応用

確立した分析法の臨床適用のためのバリデーションは、米国食品医薬品局のガイダンスに準拠して行った²²⁾。セツキシマブでは、検量線範囲 (4~200 $\mu\text{g/mL}$, $r=0.99$), 定量下限 (4 $\mu\text{g/mL}$), 正確度 [測定内 (90.7~100.7%), 測定間 (88.0~99.8%)] および精度 [測定内 (3.1~11.7%), 測定間 (10.0~13.2%)]、定常状態における頭頸部がん患者 (初回 400 mg/m^2 , 2 回目以降 250 mg/m^2 , 毎週) の血中濃度範囲 (19~140 $\mu\text{g/mL}$) であった¹⁴⁾。デノスマブでは、検量線範囲 (2.5~80 $\mu\text{g/mL}$, $r=0.99$), 定量下限 (2.5 $\mu\text{g/mL}$), 正確度 [測定内 (88.1~104.7%), 測定間 (92.3~95.3%)] および精度 [測定内 (8.9~12.9%), 測定間 (8.8~9.4%)]、定常状態におけるがん患者 (120 mg , 4 週毎) の血中濃度範囲 (7.5~67.5 $\mu\text{g/mL}$) であった¹⁵⁾。ニボルマブでは、検量線範囲 (2~200 $\mu\text{g/mL}$, $r=0.99$), 定量下限 (2 $\mu\text{g/mL}$), 正確度 [測定内 (92.2~104.5%), 測定間 (96.9~103.4%)] および精度 [測定内 (6.8~10.0%), 測定間 (0.9~

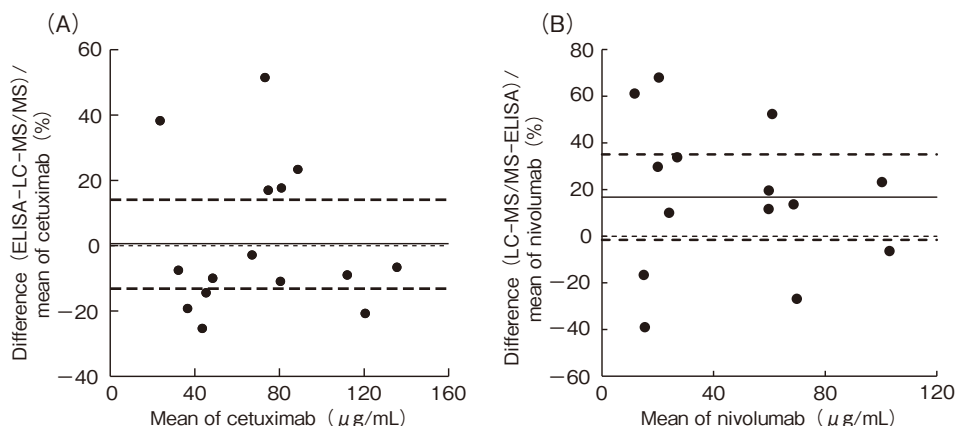


Figure 3 Bland-Altman plots for the LC-MS/MS versus ELISA correlation data of cetuximab concentrations from 15 cancer patients (A) and of nivolumab concentrations from 14 non-small cell lung cancer patients (B)

Solid line, dotted line, and heavy dotted line in the Bland-Altman plot are bias, zero, and 95% confidence interval, respectively.

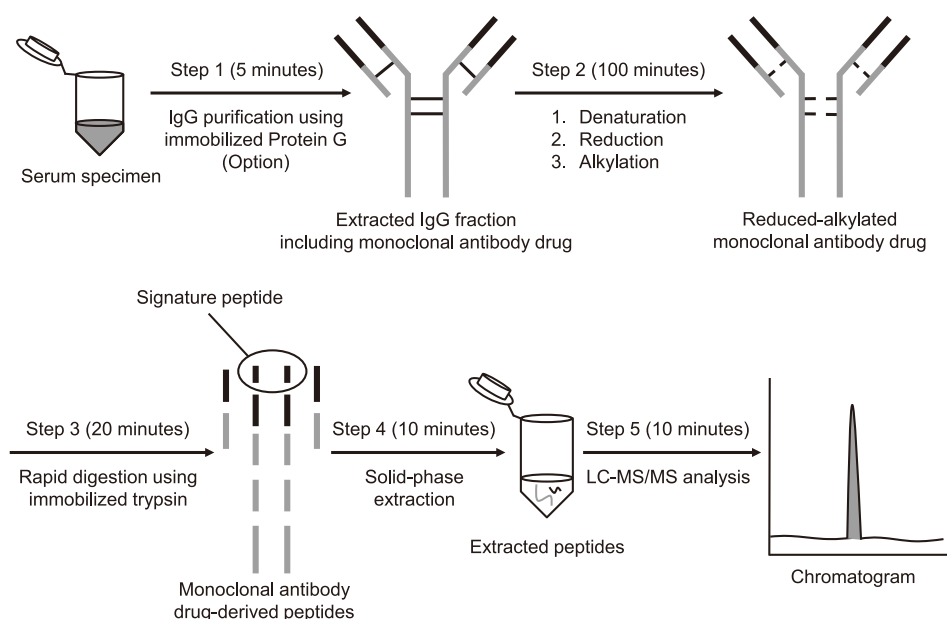


Figure 4 Workflow of sample preparation for monoclonal antibody drug quantification

5.0%)), 定常状態における非小細胞肺癌患者 (3 mg/kg, 2 週毎) の血中濃度範囲 (12~112 $\mu\text{g/mL}$) であった¹⁶⁾.

6. ELISA 法との相関性

セツキシマブおよびニボルマブに関しては、血清試料に適用可能な ELISA キット [SHIKARI Q-CET (セツキシマブ), Q-NIVO (ニボルマブ), マトリックスバイオテクノロジー, アンカラ, トルコ] が市販されているため、それらのキット品との測定値の比較を行った. 液体クロマトグラフ質量分析 (LC-MS/MS) 法によるセツキシマブの測定値は ELISA 法による測定値と相関した ($y=0.84x+12.0$, $r=0.90$, $P<0.01$). Bland-Altman プロットでは, LC-MS/

MS 法と ELISA 法間の 95% 信頼区間は, $-11.2\% \sim 14.1\%$ であった¹⁴⁾. 両測定法間の平均誤差は 1.5% であった (Figure 3). 一方, ニボルマブでも, LC-MS/MS 法による測定値は ELISA 法による測定値と相関した ($y=0.88x-0.53$, $r=0.92$, $P<0.01$). Bland-Altman プロットでは, LC-MS/MS 法と ELISA 法間の 95% 信頼区間は, $-1.5\% \sim 35.1\%$ であった. 両測定法間の平均誤差は 16.8% であった¹⁶⁾.

7. おわりに

本報告では、日本において上市されている抗体医薬のうち, IgG1 に属するヒト・マウスキメラ型モノクローナル抗

体のセツキシマブ, IgG2に属するヒト型モノクローナル抗体のデノスマブおよびIgG4に属するヒト型モノクローナル抗体のニボルマブをモデル薬物として, 質量分析計を用いたヒト血中濃度測定法の分析ワークフローを構築した(Figure 4)。今後, 抗体医薬のTDMの普及のためには, 更なる前処理の迅速化, 低コスト化および簡便化が必要であり, それらのワークフローの標準化が前処理および分析の自動化に繋がると考えられる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり, ご協力を頂きました共同研究者である浜松医科大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座の峯田周幸教授, 臨床腫瘍学講座の山田康秀教授, 内科学第2講座の須田隆文教授, 臨床検査医学講座の前川真人教授に感謝の意を表します。

本研究は2018年度臨床薬理研究振興財団賞を受けて行われたものであり, 研究の遂行にあたり, 研究費の助成をいただきました臨床薬理研究振興財団に深謝いたします。

利益相反

開示する利益相反なし。

文 献

- 1) Fracasso PM, Burris H 3rd, Arquette MA, Govindan R, Gao F, Wright LP, et al. A phase 1 escalating single-dose and weekly fixed-dose study of cetuximab: pharmacokinetic and pharmacodynamic rationale for dosing. *Clin Cancer Res.* 2007; **13**(3): 986-93. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1542.
- 2) Yonemori K, Fujiwara Y, Minami H, Kitagawa K, Fujii H, Arai T, et al. Phase 1 trial of denosumab safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics in Japanese women with breast cancer-related bone metastases. *Cancer Sci.* 2008; **99**(6): 1237-42. doi: 10.1111/j.1349-7006.2008.00803.x.
- 3) Puszkiel A, Noé G, Boudou-Rouquette P, Cossec CL, Arrondeau J, Giraud JS, et al. Development and validation of an ELISA method for the quantification of nivolumab in plasma from non-small-cell lung cancer patients. *J Pharm Biomed Anal.* 2017; **139**: 30-6. doi: 10.1016/j.jpba.2017.02.041.
- 4) Grebenchtchikov N, Geurts-Moespot AJ, Heijmen L, van Laarhoven HW, van Herpen CM, Thijs AM, et al. Quantification of patient-specific assay interference in different formats of enzyme-linked immunoassays for therapeutic monoclonal antibodies. *Ther Drug Monit.* 2014; **36**(6): 765-70. doi: 10.1097/FTD.000000000000090.
- 5) Hoofnagle AN, Wener MH. The fundamental flaws of immunoassays and potential solutions using tandem mass spectrometry. *J Immunol Methods.* 2009; **347**(1-2): 3-11. doi: 10.1016/j.jim.2009.06.003.
- 6) van den Broek I, Niessen WM, van Dongen WD. Bioanalytical LC-MS/MS of protein-based biopharmaceuticals. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2013; **929**: 161-79. doi: 10.1016/j.jchromb.2013.04.030.
- 7) Lu Q, Zheng X, McIntosh T, Davis H, Nemeth JF, Pendley C, et al. Development of different analysis platforms with LC-MS for pharmacokinetic studies of protein drugs. *Anal Chem.* 2009; **81**(21): 8715-23. doi: 10.1021/ac901991x.
- 8) El Amrani M, van den Broek MP, Göbel C, van Maarseveen EM. Quantification of active infliximab in human serum with liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a tumor necrosis factor alpha-based pre-analytical sample purification and a stable isotopic labeled infliximab bio-similar as internal standard: A target-based, sensitive and cost-effective method. *J Chromatogr A.* 2016; **1454**: 42-8. doi: 10.1016/j.chroma.2016.05.070.
- 9) Dubois M, Fenaille F, Clement G, Lechmann M, Tabet JC, Ezan E, et al. Immunopurification and mass spectrometric quantification of the active form of a chimeric therapeutic antibody in human serum. *Anal Chem.* 2008; **80**(5): 1737-45. doi: 10.1021/ac7021234.
- 10) Iwamoto N, Takanashi M, Umino Y, Aoki C, Hamada A, Shimada T. Application of nano-surface and molecular-orientation limited proteolysis to LC-MS bioanalysis of cetuximab. *Bioanalysis.* 2016; **8**(10): 1009-20. doi: 10.4155/bio-2016-0018.
- 11) Yu YQ, Gilar M, Lee PJ, Bouvier ES, Gebler JC. Enzyme-friendly, mass spectrometry-compatible surfactant for in-solution enzymatic digestion of proteins. *Anal Chem.* 2003; **75**(21): 6023-8. doi: 10.1021/ac0346196.
- 12) Wang Q, Han J, Sha C, Liang Y, Sun Y, Shao X, et al. Novel strategy using tryptic peptide immunoaffinity-based LC-MS/MS to quantify denosumab in monkey serum. *Bioanalysis.* 2017; **9**(19): 1451-63. doi: 10.4155/bio-2017-0106.
- 13) Irie K, Okada A, Yamasaki Y, Kokan C, Hata A, Kaji R, et al. An LC-MS/MS method for absolute quantification of nivolumab in human plasma: application to clinical therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit.* 2018; **40**(6): 716-24. doi: 10.1097/FTD.0000000000000558.
- 14) Shibata K, Naito T, Okamura J, Hosokawa S, Mineta H, Kawakami J. Simple and rapid LC-MS/MS method for the absolute determination of cetuximab in human serum using an immobilized trypsin. *J Pharm Biomed Anal.* 2017; **146**: 266-72. doi: 10.1016/j.jpba.2017.08.012.
- 15) Shida H, Naito T, Shibata K, Yamada Y, Kawakami J. LC-MS/MS method for denosumab quantitation in human serum with rapid protein digestion using immobilized trypsin. *Bioanalysis.* 2018; **10**(18): 1501-10. doi: 10.4155/bio-2018-0161.
- 16) Abe K, Shibata K, Naito T, Karayama M, Hamada E, Maekawa M, et al. Quantitative LC-MS/MS method for nivolumab in human serum using IgG purification and immobilized tryptic digestion. *Anal Methods.* 2020; **12**: 54-62. doi: 10.1039/C9AY02087J.
- 17) Hagman C, Ricke D, Ewert S, Bek S, Falchetto R, Bitsch F. Absolute quantification of monoclonal antibodies in biofluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 2008; **80**(4): 1290-6. doi: 10.1021/ac702115b.
- 18) Hu Z, Zhao L, Zhang H, Zhang Y, Wu R, Zou H. The on-bead digestion of protein corona on nanoparticles by trypsin immobilized on the magnetic nanoparticle. *J Chromatogr A.* 2014; **1334**: 55-63. doi: 10.1016/j.chroma.2014.01.077.
- 19) Hu M, Liu Y, Yu K, Liu X. Decreasing the amount of trypsin in in-gel digestion leads to diminished chemical noise and improved protein identifications. *J Proteomics.* 2014; **109**: 16-25. doi: 10.1016/j.jprot.2014.06.017.
- 20) Bergmann-Leitner ES, Mease RM, Duncan EH, Khan F, Waitumbi J, Angov E. Evaluation of immunoglobulin purification methods and their impact on quality and yield of antigen-specific antibodies. *Malar J.* 2008; **7**: 129-38. doi: 10.1186/1475-2875-7-129.
- 21) Todoroki K, Nakano T, Eda Y, Ohyama K, Hayashi H, Tsuji D, et al. Bioanalysis of bevacizumab and infliximab by high-temperature reversed-phase liquid chromatography with fluorescence detection after immunoaffinity magnetic purification. *Anal Chim Acta.* 2016; **916**: 112-9. doi: 10.1016/j.aca.2016.02.029.
- 22) U. S. Food and Drug Administration, Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, (2001) [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf#search=GuidanceforIndustryBioanalyticalMethodValidation (accessed 2020-01-10)].