

Protein G富集联合LC-MS/MS同时测定人血清中三种抗体类生物药

Simultaneous Determination of Three mAbs in Human Serum by Protein G Magnetic Beads Extraction combined with SCIEX Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

胡凤梅¹, 刘丹¹, 刘瑞琛¹, 张海明², 黄超¹, 赵祥龙¹, 郭立海¹
Hu Fengmei¹, Liu Dan¹, Liu Ruichen¹, Zhang haiming², Huang Chao¹, Zhao Xianglong¹, Guo Lihai¹

¹ 上海爱博才思分析仪器贸易有限公司

² 天津博纳艾杰尔科技有限公司

Keywords: Trastuzumab; Bevacizumab; Candonilimab; Protein G Magnetic Beads; LC-MS/MS

引言

抗体类生物药以其特异性高、半衰期长和安全性高的优点，在临床上的使用快速增加，被广泛应用于治疗各种疾病，包括癌症、自身免疫性疾病和代谢性疾病。虽然抗体药提供了比常规化疗更好的疗效和更低的毒性，但治疗方案仍需要根据个体进行优化，因为治疗性抗体在个体之间表现出很大的差异，一些患者对抗体治疗有反应，而一些患者随着治疗时间的推移逐渐失去应答。临床上普遍认为血清浓度不足是缺乏或失去应答的主要原因之一，因此根据用药个体进行药物浓度检测，为精准用药提供临床指导以获得最大的治疗效益显得尤为重要。

随着生物药物的应用普及，开发一种有效和通用的方法来准确定量血清中的抗体浓度具有非常迫切和实际的临床应用意义。液相色谱串联质谱法（LC-MS/MS）以其卓越的特异性，极高的检测灵敏度和高通量样本检测等优点，得到越来越多的临床认可，也逐步成为临床检验的一项重要手段。本方法基于SCIEX液相色谱串联质谱系统，采用英夫利昔作为内标的校正方法，建立了一次分析，同时准确检测血清中曲妥珠单抗、贝伐珠单抗和卡度尼利的定量方法。本实验采用Protein G进行单抗的纯化，再进一步将单抗酶解后上机分析，实验耗时较短，可以满足临床检测样品的需求。检测化合物相关信息如下。

表1. 待测化合物信息列表

中文名	英文名	缩写	CAS编号	分子式
贝伐珠单抗	Bevacizumab	Beva	216974-75-3	C ₆₆₃₈ H ₁₀₁₆₀ N ₁₇₂₀ O ₂₁₀₈ S ₄₄
曲妥珠单抗	Trastuzumab	Tras	180288-69-1	C ₆₄₇₀ H ₁₀₀₁₂ N ₁₇₂₆ O ₂₀₁₃ S ₄₂
卡度尼利	Cadonilimab	Cado	2394841-59-7	C ₈₇₇₂ H ₁₃₅₀₄ N ₂₃₈₄ O ₂₇₆₈ S ₆₂
英夫利昔单抗（内标）	Infliximab	IFLX	170277-31-3	C ₆₄₂₈ H ₉₉₁₂ N ₁₆₉₄ O ₁₉₈₇ S ₄₆

实验部分

样品前处理

本实验采用Protein G磁珠对抗体进行纯化再进行酶解的方式进行样本处理，步骤如下：

抗体药的捕获：取适量磁珠置于EP管中，清洗后，加入含样本、内标和缓冲溶液，涡匀后在混匀仪上室温环境下孵育，孵育完成后清洗两次；**抗体酶解：**使用酸性溶液将抗体从磁珠上洗脱后，取90 μL 洗脱液置于新的EP管中，加入适量碳酸氢铵溶液，高温变性后向溶液中加入15 μL 的0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的胰酶溶液，37 $^{\circ}\text{C}$ 下酶解2h；**终止酶解：**将酶解液冷却至室温，向酶解液中加入23 μL 的10%甲酸的50%乙腈水溶液，涡流混匀后15000 rpm离心5 min，取上清进样分析。

色谱条件

色谱柱：Kinetex F5, 3.0 \times 100 mm I.D, 2.6 μm , Phenomenex;

流动相：A相为含0.1%甲酸的水溶液，B相为含0.1%甲酸的乙腈溶液；

流速：0.3 mL/min；

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$ ；

洗脱方式：梯度洗脱，见表2；

表2. 液相梯度洗脱条件

时间 (min)	A(%)	B(%)
0	90	10
1	90	10
7.5	65	35
8	10	90
10	10	90
10.1	90	10
12	90	10

质谱条件：

质谱平台：SCIEX LC-M/MS

电离方式：电喷雾离子源，正离子模式；

检测方式：多反应监测 (MRM)；

离子源温度 (TEM): 600 $^{\circ}\text{C}$ ；

雾化气 (Gas1): 65 psi；

辅助气 (Gas2): 60 psi；

气帘气 (Gurtain Gas): 30 psi；

电喷雾电压：5500 V；

对应MRM通道及参数见表3。

表3. 待测组分和内标物质的质谱参数

Name	ID	Q1	Q3	DP	CE	肽段选择
贝伐珠	Beva-1-1 *	523.264	797.404	80	24.6	
	Beva-1-2	523.264	650.336	80	24.6	FTFSLDTSK
	Beva-1-3	523.264	563.304	80	24.6	
曲妥珠	Tras-1-1 *	485.248	721.373	80	22.8	
	Tras-1-2	485.248	608.299	80	25.8	FTISADTSK
	Tras-1-3	485.248	521.277	80	28.8	
卡度尼利	Cado-1-1 *	568.269	871.41	80	23.8	
	Cado-1-2	568.269	708.356	80	26.8	YTYYPDSVK
	Cado-1-3	568.269	545.323	80	35.8	

*: 为定量离子对

结果与讨论

贝伐珠、曲妥珠和卡度尼利在所选择肽段处各自出峰位置峰形对称，响应良好。在本方法条件下，三种化合物不存在互相干扰。典型液相色谱图如图1。

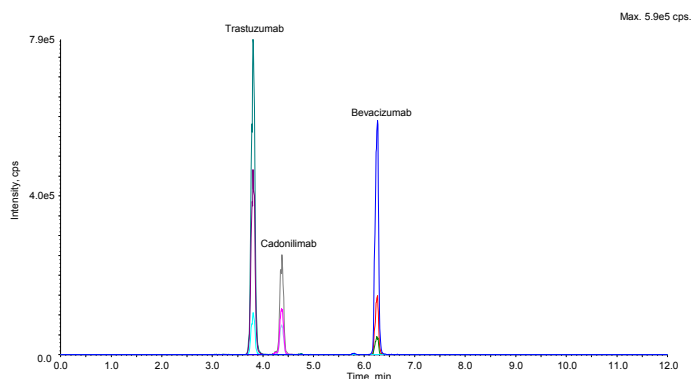


图1. 贝伐珠单抗、曲妥珠单抗和卡度尼利典型液相色谱图

标准曲线

以空白血清作为基质，配制标准工作曲线。各待测物在各自的线性范围内线性良好， $r^2 > 0.99$ ，符合生物样本检测的通用要求。具体结果见表4。

表4. 贝伐珠单抗、曲妥珠单抗和卡度尼利的标准曲线

化合物	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	回归方程 (相关系数r)
贝伐珠	1.00-200	$Y=0.02271 X + 0.02121$ ($r=0.99949$)
曲妥珠	0.200-200	$Y=0.03306 X + 0.01057$ ($r=0.99563$)
卡度尼利	0.200-200	$Y=0.04885 X + 0.00232$ ($r=0.99666$)

加标回收率

以混合实际人血清添加标液的形式制备质控样本，对3种单抗药物定量的准确度进行验证。从表5可以看出，不同浓度质控样本的准确度均在85.0~115.0%之内，满足FDA和CLSI相关法规要求。具体结果见表5。

总结

在SCIEX液质联用平台上，实现了对贝伐珠、曲妥珠和卡度尼利三种单抗的同时定量检测，方案灵敏度满足要求。方案整体采用Protein G磁珠纯化再进行酶解的样本前处理，并以英夫利昔作为内标进行校准，实现了对血清中贝伐珠、曲妥珠和卡度尼利的同时定量，方法线性良好，加标准准确度满足要求，方案无需氮吹、正压等设备，通用性强，可用于临床实际样本的检测。

仅限专业展会等使用、仅向专业人士提供的内部资料

表5. 血清中贝伐珠、曲妥珠和卡度尼利的加标准准确度

化合物名称	实际浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	检测浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	准确度 %	平均准确度 %
贝伐珠	4.00	4.5	111.3	105.6
		4.2	104.1	
		4.1	101.6	
	20.0	18.4	91.9	92.1
		19.1	95.5	
		17.8	89.0	
曲妥珠	100	105.0	105.0	100.1
		99.9	99.9	
		95.7	95.7	
	4.00	4.1	102.1	99.4
		3.8	95.2	
		4.0	101.0	
20.0	19.8	99.0	96.4	
	18.9	94.6		
	19.2	95.8		
卡度尼利	100	96.4	96.4	93.9
		93.0	93.0	
		92.3	92.3	
	4.00	4.3	108.6	107.1
		4.1	101.8	
		4.4	111.1	
20.0	19.6	98.1	99.1	
	18.5	92.4		
	21.4	106.9		
100	95.6	95.6	95.6	
	95.2	95.2		
		96.0	96.0	

SCIEX临床诊断产品仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2023 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-28716-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话: 010-5808-1388
传真: 010-5808-1390
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419-7201
传真: 021-2419-7333
官网: sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话: 020-8842-4017
官方微信: [SCIEX-China](https://www.sciex.com.cn)