

Protein G富集联合LC-MS/MS同时测定人血清中八种抗体类生物药

Simultaneous Determination of Eight Therapeutic Monoclonal Antibodies in Human Serum by Protein G Magnetic Beads Extraction combined with SCIEX Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry.

胡凤梅, 刘丹, 黄超, 赵祥龙, 郭立海
Hu Fengmei, Liu Dan, Huang Chao, Zhao Xianglong, Guo Lihai
上海爱博才思分析仪器贸易有限公司

Key words: Trastuzumab; Bevacizumab; Candonilimab; Pertuzumab; Rituximab; Adalimumab; Ustekinumab; Infliximab; 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，在临床上的应用快速增加，被广泛应用于各种疾病的治疗，包括癌症、自身免疫性疾病和代谢性疾病等。虽然抗体药提供了比常规化疗更好的疗效和更低的毒性，但不同个体之间抗体药物的效果差异较大，所以用药方案仍需要根据个体进行优化。临床试验表明对单抗类药物进行治疗药物监测可以有效地提高临床治疗响应以及获得更好的成本效益。

目前检测单抗类药物的主流方法为ELISA，但该方法本身具有局限性：

- 线性范围窄，对于超线性范围的样本无法准确定量
- 依赖于抗原，新项目开发难，耗费大

- 容易受到干扰，如受基质、抗药抗体等因素干扰造成检测结果不准确
- 不能进行多单抗药物的同时检测，在多种药物的临检场景下，通量较低

因此，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，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，建立了血清中曲妥珠单抗、贝伐珠单抗、卡度尼利、帕妥珠单抗、利妥昔单抗、阿达木单抗、乌司奴单抗和英夫利昔单抗共8种单抗类药物的同时定量方法。

样品信息

曲妥珠单抗、贝伐珠单抗、卡度尼利、帕妥珠单抗、利妥昔单抗、阿达木单抗、乌司奴单抗、英夫利昔单抗和维得利珠单抗的化合物信息如下，其中维得利珠作为实验用内标。

表1. 待测单抗化合物信息列表

中文名	英文名	缩写	CAS编号	分子式
帕妥珠单抗	Pertuzumab	PERT	380610-27-5	C ₆₄₇₆ H ₉₉₅₄ N ₁₇₁₀ O ₂₀₁₆ S ₄₄
卡度尼利	Cadonilimab	CADO	2394841-59-7	C ₈₇₇₂ H ₁₃₅₀₄ N ₂₃₈₄ O ₂₇₆₈ S ₆₂
曲妥珠单抗	Trastuzumab	TRAS	180288-69-1	C ₆₄₇₀ H ₁₀₀₁₂ N ₁₇₂₆ O ₂₀₁₃ S ₄₂
贝伐珠单抗	Bevacizumab	BEVA	216974-75-3	C ₆₆₃₈ H ₁₀₁₆₀ N ₁₇₂₀ O ₂₁₀₈ S ₄₄
利妥昔单抗	Rituximab	RITX	174722-31-7	C ₆₄₁₆ H ₉₈₇₄ N ₁₆₈₈ O ₁₉₈₇ S ₄₄
阿达木单抗	Adalimumab	ADAM	331731-18-1	C ₆₄₂₈ H ₉₉₁₂ N ₁₆₉₄ O ₁₉₈₇ S ₄₆
乌司奴单抗	Ustekinumab	USTE	815610-63-0	C ₆₄₈₂ H ₁₀₀₀₄ N ₁₇₁₂ O ₂₀₁₆ S ₄₆
英夫利昔单抗	Infliximab	IFLX	170277-31-3	C ₆₄₂₈ H ₉₉₁₂ N ₁₆₉₄ O ₁₉₈₇ S ₄₆
维得利珠单抗	Vedolizumab	VEDO	943609-66-3	C ₆₄₂₈ H ₁₀₀₇₂ N ₁₇₃₂ O ₂₀₄₂ S ₄₂

实验部分

样品前处理

本方案采用Protein G富集提取结合胰蛋白酶酶解的方式进行样本前处理，经酸终止酶解后，LC-MS/MS上机分析。

色谱条件

色谱柱：Aeris Peptide XB-C18 , Phenomenex;

流动相：A相为含酸的水溶液，

B相为含酸的乙腈溶液；

流速：0.3 mL/min；

柱温：40 °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 (%)
0.0	90	10
1.0	90	10
7.5	65	35
8.0	10	90
10.0	10	90
10.1	90	10
12.0	90	10

质谱条件：

质谱平台：SCIEX LC-MS/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 °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。

结果与讨论

本方案采用单抗纯化酶解后结合特异性肽段进行定量的分析策略，其中特异性肽段的选择是根据skyline软件结合高分辨质谱获得的。在本方案梯度洗脱条件下，八种单抗的肽段不存在互相干扰，各自峰形对称，响应良好。典型色谱图如图1。

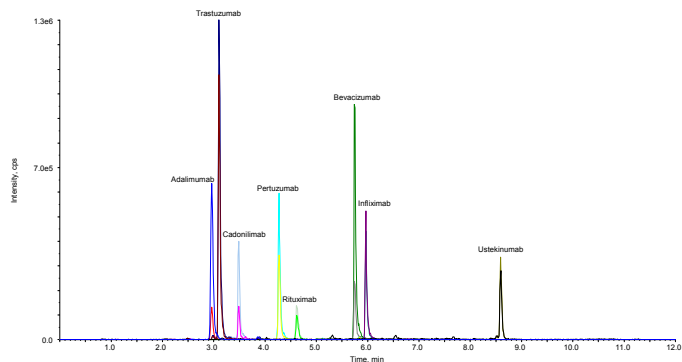


图1. 8种单抗的典型色谱图

表3. 待测单抗的质谱参数

Name	ID	Q1	Q3	DP	CE	肽段选择
帕妥珠单抗	PERT-1-1*	419.2	589.3	80	19.5	FTLSVDR
	PERT-1-2	419.2	476.2	80	22.5	
卡度尼利	CADO-1-1*	568.3	871.4	80	23.8	YTYYPDSVK
	CADO-1-2	568.3	708.4	80	26.8	
曲妥珠单抗	TRAS-1-1*	485.2	721.4	80	22.8	FTISADTSK
	TRAS-1-2	485.2	608.3	80	25.8	
贝伐珠单抗	BEVA-1-1*	523.3	797.4	80	24.6	FTFSLDTSK
	BEVA-1-2	523.3	563.3	80	27.6	
利妥昔单抗	RITX-1-1*	803.9	926.5	80	44.4	FSGSGSGTSYSLTISR
	RITX-1-2	803.9	839.5	80	41.4	
阿达木单抗	ADAM-1-1*	535.3	901.4	80	28.2	APYTFGQGTK
	ADAM-1-2	535.3	637.3	80	22.2	
乌司奴单抗	USTE-1-1*	887.4	1019.5	80	42.5	GLDWIGIMSPVSDIR
	USTE-1-2	887.4	888.4	80	44.5	
英夫利昔单抗	IFLX-1-1*	648.8	876.5	80	30.8	SAVYLQMTDLR
	IFLX-1-2	648.8	763.4	80	27.8	
维得利珠单抗 (内标)	VEDO-2	1119.0	956.4	80	44.8	LEWIGEIDPSESNTNYNQK

*: 为定量离子对

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. 8种单抗的线性范围及标准曲线示例

化合物	线性范围 (µg/mL)	回归方程 (相关系数r)
帕妥珠单抗	0.200-100	$Y=0.14414X+0.00860$ ($r=0.99717$)
卡度尼利	0.200-100	$Y=0.10753X+0.02455$ ($r=0.99752$)
曲妥珠单抗	0.200-100	$Y=0.34225X+0.08575$ ($r=0.99709$)
贝伐珠单抗	0.200-100	$Y=0.21004X+0.01517$ ($r=0.99775$)
利妥昔单抗	0.200-100	$Y=0.04174X+0.00793$ ($r=0.99622$)
阿达木单抗	1-100	$Y=0.20491X+0.73813$ ($r=0.99960$)
乌司奴单抗	0.200-100	$Y=0.06427X+0.00149$ ($r=0.99605$)
英夫利昔单抗	0.200-100	$Y=0.10452X+0.00961$ ($r=0.99564$)

加标准确度

以混合实际人血清添加标准品的形式制备质控样本，对8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CLSI相关法规要求。具体结果见表5。

方案优势

本方案具有以下优势：

- 简单快速，整个前处理过程仅需4-5小时，且操作简单
- 基于一般实验室通用的方法开发流程，对特殊仪器和耗材依赖程度低
- 方案中所用磁珠，不局限于进口，国产磁珠也可以满足性能要求
- 本方案兼具免疫法的灵敏度和质谱法的选择性，具有高灵敏度和高选择性
- 采用单抗药物作为内标，对整个样本分析过程进行校正，经济简便易实现

表5. 血清中8种单抗的加标准确度

化合物名称	实际浓度 (µg/mL)	检测浓度 (µg/mL)	准确度 %	平均准确度%	化合物名称	实际浓度 (µg/mL)	检测浓度 (µg/mL)	准确度 %	平均准确度%		
帕妥珠单抗	5.00	4.43	88.6	92.2	利妥昔单抗	5.00	4.93	98.6	106.9		
		4.83	96.6				5.67	113.3			
		4.58	91.5				5.44	108.8			
	10.0	9.82	98.2			99.7	10.0	11.4		114.5	106.1
		9.44	94.4					10.7		106.5	
		10.6	106.4					9.73		97.3	
50.0	55.4	110.9	105.8	50.0	56.7	113.4	110.6				
	50.7	101.4			53.1	106.1					
	52.5	105.0			56.2	112.4					
卡度尼利	5.00	4.64	92.8	104.4	阿达木单抗	5.00	4.29	85.8	88.7		
		5.28	105.7				4.45	88.9			
		5.73	114.6				4.57	91.3			
	10.0	8.81	88.1			92.8	10.0	9.54		95.4	97.7
		9.01	90.1					10.4		103.9	
		10.0	100.2					9.39		93.9	
50.0	54.4	108.8	100.5	50.0	49.3	98.6	96.9				
	47.5	95.1			43.5	86.9					
	48.8	97.5			52.6	105.1					
曲妥珠单抗	5.00	4.39	87.7	100.6	乌司奴单抗	5.00	4.91	98.2	97.1		
		5.27	105.4				4.82	96.4			
		5.43	108.7				4.83	96.7			
	10.0	9.94	99.4			105.7	10.0	11.0		109.9	105.6
		11.4	114.2					10.7		106.7	
		10.4	103.5					10.0		100.3	
50.0	54.9	109.7	103.8	50.0	51.3	102.6	101.0				
	48.4	96.7			48.6	97.1					
	52.5	104.9			51.6	103.2					
贝伐珠单抗	5.00	5.31	106.3	105.8	英夫利昔单抗	5.00	4.77	95.4	97.6		
		5.49	109.8				4.28	85.6			
		5.07	101.3				5.15	103.0			
	10.0	11.3	113.0			105.4	10.0	10.3		102.7	97.6
		10.7	106.7					10.0		100.4	
		9.66	96.6					8.96		89.6	
50.0	54.7	109.3	107.2	50.0	50.5	101.0	96.9				
	51.0	102.1			43.2	86.4					
	55.1	110.1			51.6	103.2					

总结

本方案基于SCIEX液质联用平台，实现了对八种单抗的同时定量检测，方法简单快速，易于自动化，通用性高，可用于抗体类药物研发、临床前药代动力学研究以及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

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。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-29307-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](#)