

基于亲和质谱法的通用方法测定临床样本中的总体单克隆抗体药物

唐家澍

赛默飞世尔科技(中国)有限公司

关键词

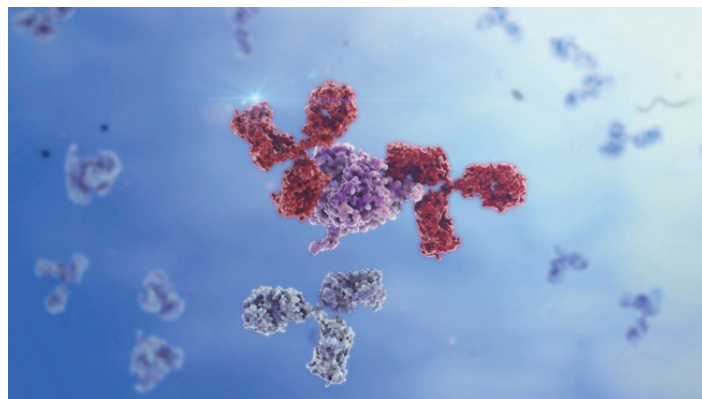
单抗药物生物分析, 临床阶段, 亲和质谱法, 总体单抗药物, SMART Digest, Orbitrap

方法优势

- 简单快速, 整个前处理过程仅需4小时, 并且可以实现无人值守的全程自动化和通量化
- 方法通用性, 对所有的人源化单克隆抗体药物采用完全相同的样品前处理流程, 且不需要使用任何特化试剂
- 方法开发简单, 对于一个新的单抗药物仅需要重新选定和优化特征肽段以及内标肽段, 方法开发时间小于一周
- 灵敏度高于不经历富集的直接酶解法

前言

生物分析对于生物大分子药物的早期研发, 临床前研究乃至临床研究阶段都具有非常重要的意义。为了提供药代动力学 (pharmacokinetics, PK), 药效动力学 (pharmacodynamics, PD) 和毒动学 (toxicokinetics, TK) 所需的时间序列数据, 我们对在生物基质中测定生物大分子药物浓度的准确性, 灵敏度, 选择性和通量均提出了非常高的要求^[1]。基于免疫结合的方法 (Ligand Binding Assay, LBA), 例如酶联免疫吸附 (ELISA) 方法由于其出色的灵敏度和通量, 一直是生物大分子药物生物分析的金标准方法。但其固有的一些不足也在后续的研究中一直困扰着单抗药物的生物分析:



(1) 免疫法通常依赖于一对高质量抗体来识别蛋白药物的不同抗原表位。这些试剂其开发周期较长, 在药物开发的早期通常难以获得。

(2) 免疫法的线性范围较窄, 在一些情况下不能完全符合药代动力学实验的需求。

(3) 易受基质干扰影响, 方法通常限定于特定的生物基质。

(4) 易受动物体内抗药物抗体的影响。

和LBA方法不同, 质谱法是基于目标蛋白特征肽段的氨基酸独特序列信息来实现方法的选择性, 从而降低了对关键试剂的依赖。目前大多数由质谱进行的生物分析方法都采用了自下而上的蛋白质组学策略 (bottom-up strategy), 这种方法需要将蛋白质药物首先酶解成肽段, 随后采用三重四级杆质谱进行选择反应监控 (Selected Reaction Monitoring, SRM)^[2, 3] 或者高分辨质谱进行平行反应监控 (Parallel Reaction Monitoring, PRM)^[4, 5] 的方式来定量该蛋白药物的一条或者多条特征肽段。

单抗药物在生物体内存在着多种形式, 单抗药物可以和游离抗原以及循环系统中的抗药抗体 (Anti-Drug antibody, ADA) 结合形成所谓的结合形式, 没有完全被抗原或者抗药抗体封闭的单抗药物则称

为游离单抗药物 (mAb_{free}) 或者活性单抗药物 (active mAb)。由于一份子单抗药物通常能够结合两分子抗原, 因此游离单抗还包括了一价 (monovalent, 还能结合一份子抗原) 和二价游离 (bivalent, 还能结合两分子抗原) 两种形式。在大多数情况下, 游离单抗药物更直接和药效相关, 因为其直接反应了体内抗体药物可以结合抗原的能力。而总体单抗药物浓度 (游离单抗+结合单抗) 则可进一步确认单抗药物和抗原之间的体内动态结合关系, 为PD研究提供数据支撑。此外测量单抗药物的总体浓度也更多的被毒理学家所关注, 因为单抗药物的上靶和脱靶效应都会影响其安全性。采用LBA的方法测量游离单抗药物一般采用抗原进行捕获, 而测量总体单抗则相对较为复杂, 一般有两种常见方式: (1) 使用非竞争性的抗单抗药物CDR的抗体 (即捕获抗体不占据单抗药物的抗原结合位点) 进行捕获, 随后进行anti-human Fc的检测; (2) 首先加入过量的抗原, 将所有的抗体均转变为抗体-抗原复合物, 随后使用非竞争性的抗抗原抗体 (即捕获抗体使用了和单抗药物不同的抗原表位) 进行捕获, 随后进行非竞争性的anti-CDR或者anti-human Fc的检测^[6]。这两种LBA的方法均对试剂具有非常高的要求, 且需要进行抗原干扰实验来对测量值进行验证^[6]。采用直接酶解质谱法对于测量总体单抗药物非常友好^[3, 7, 8], 因为其完全不受游离抗原和抗药抗体的干扰。但在人血清样本中采用直接酶解法测定总体单抗药物会受到灵敏度的挑战, 因为特征肽段只能从CDR区域筛选, 很有

可能无法挑选到酶解效率高且质谱响应好的肽段。因此许多工作采用了anti-Fc的富集来提升方法的灵敏度^[9, 10]。但值得注意的是人血清基质中有高达12mg/mL的IgG, 因此在进行anti-Fc富集时这些内源的IgG也会被不可避免的富集下来, 导致灵敏度提升的倍数有限。在之前的工作中, 我们使用CaptureSelect™ anti-human IgG Fc biotin conjugate在动物基质中特异的富集人源化的单抗药物^[11], 但是由于成本原因这个试剂并不适用于人血清样本。在这里我们使用了Pierce™ Protein A/G磁性琼脂糖, 该富集试剂结合磁珠和琼脂糖各自的优势, 即保留了Protein A, Protein G琼脂糖对IgG的高载量, 极大的压缩了成本, 又可以使用基于磁珠的自动化设备, 例如KingFisher自动化磁珠处理平台来实现方法的自动化。在酶解步骤我们使用了SMART Digest可溶性胰酶来进行高效快速的酶解, 该方法通过加热来进行目标蛋白的变性, 从而省略了繁琐的尿素变性, 还原烷基化, 以及后续的固相萃取操作, 使得整个前处理过程可以在4小时以内完成。在内标的选择上我们使用了鼠源单克隆抗体标准品, 并挑选和目标单抗特征肽段保留时间接近的肽段作为内标肽段。鼠源单克隆抗体标准品亦可以被Protein A/G磁性琼脂糖捕获, 因此可以将整个样品前处理过程和质谱分析的误差进行归一化。在整个方法流程中, 我们均使用了通用试剂, 使得对于所有的单抗药物我们形成了完全通用的样品前处理方法, 极大的简化了在临床样品中测量总体单抗的方法开发流程。

实验方法

样品前处理主要试剂耗材

Pierce™ Protein A/G Magnetic Beads (P/N: 88802)

SMART Digest™ Soluble Trypsin Kit (P/N: 60113-101)

Intact Murine mAb Mass Check Standard (Waters, P/N: 186006552)

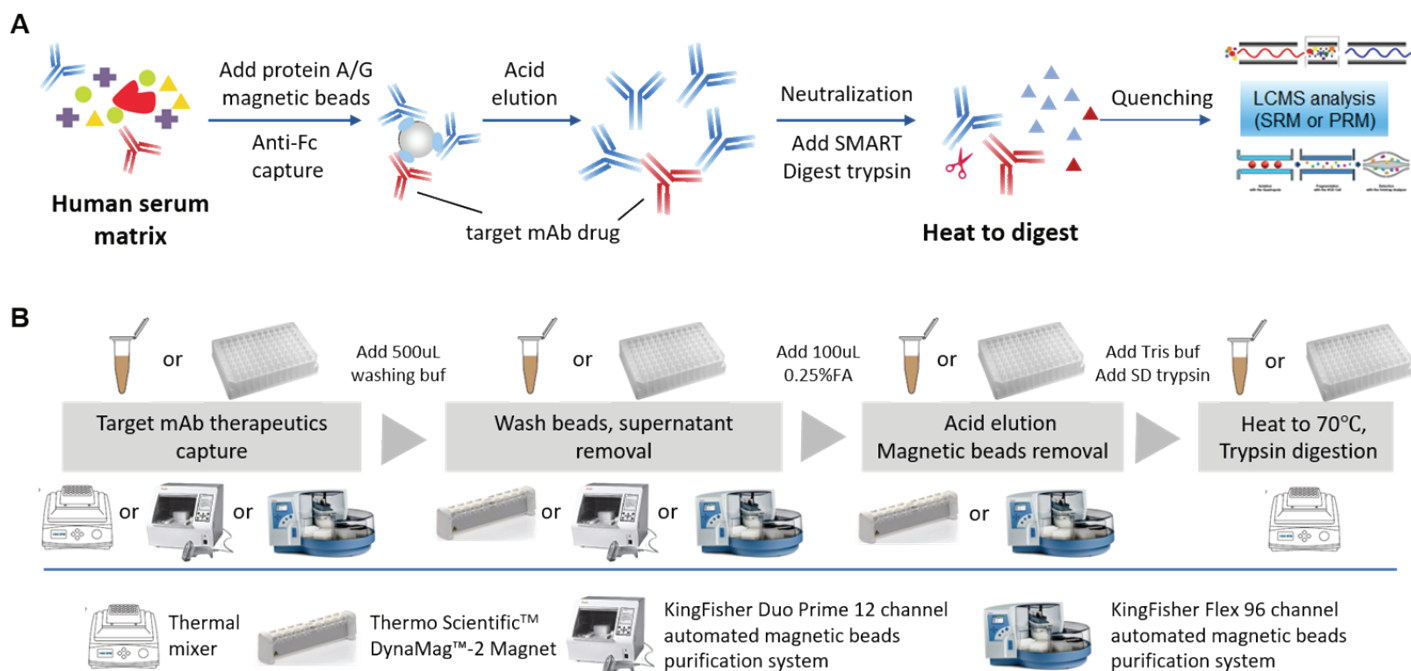


图1. 采用ProteinA/G 磁性琼脂糖结合可溶SMART Digest胰酶检测总体单抗药物的原理和操作示意

样品前处理主要设备

- DynaMag™-2 Magnet (P/N: 12321D)
- KingFisher™ Duo Prime (P/N: 5400110) 或者KingFisher™ Flex (P/N: 5400630) 磁珠纯化系统
- Thermal Mixer多功能恒温震荡仪 (P/N: 13687722)
- HulaMixer™ Sample Mixer (P/N: 15920D)

标准曲线，质控品和内标工作液配置

将各种目标单抗制剂配制在人血清中，形成终浓度为0.1 µg/µL的储备液，每个ep管分装100 µL，在-80 °C长期冻存。在每天实验前，将0.1 µg/µL的储备液用人血清稀释至25.6 µg/mL，随后通过梯度稀释配制出浓度为 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8, 25.6 µg/mL的标准曲线。三个浓度的质控品同样采用0.1µg/µL的储备液用人血清进行稀释配制而成，浓度分别为0.4ug/mL, 2.0ug/mL和20ug/mL，配制完成后每个ep管分装100 µL，在-80 °C长期冻存。内标标准品Intact Murine mAb Mass Check Standard按照供应商的说明使用200µL去离子水溶解，随后用1% BSA/PBS溶液稀释至终浓度为30 µg/mL的工作液，分装后在-80 °C长期冻存。

样品前处理步骤

- 内标掺入: 取60µL 样品（或者标曲，质控品）加入15µL内标工作液, 再加入675µL PBS进行稀释，温和混匀。
- 目标单抗捕获：在2.0mL ep管或者96孔板中每个孔分装40µL Protein A/G磁性琼脂糖，加入500µL PBS缓冲液清洗三次。随后每个ep管中加入250µL上述稀释后的样品，采用温和震荡的方式室温孵育60分钟。孵育完后使用500µL 0.1%BSA/TBS清洗两次，再使用500µL 0.1%BSA/ddH2O清洗一次。
- 目标单抗酶解：将0.1%BSA/ddH2O移去后加入100µL 0.25%FA将IgG组分从磁珠上洗脱，随后移去磁珠，取出90µL 洗脱液加入预先放置了12µL中和缓冲液（1M Tris/HCl缓冲液, pH 8.8）的ep管中。新取一个ep管，加入150µL SMART Digest酶解缓冲液，再加入50µL中和后的样品和5µL SMART Digest可溶胰酶，70℃酶解90分钟。
- 酶解终止：酶解完成后冷却10分钟，12,000 g离心 2分钟，取出180µL上清，加入20µL 10% FA/50% ACN以完全终止酶解反应。随后进样40µL样品用于LC-MS/MS检测。

液相色谱条件

- Thermo Scientific™ Vanquish™ Binary Flex UHPLC 包含以下组件
- System Base Vanquish Flex (P/N VF-S01-A)
 - Binary Pump F (P/N VF-P10-A-01)
 - Split Sampler FT (P/N VF-A10-A)
 - Column Compartment H (P/N VH-C10-A)
 - MS Connection Kit Vanquish (P/N 6720.0405)
 - Vanquish F Pumps 100µL Mixer Set (P/N 6044.5100)
 - Vanquish Split Sampler HT Sample Loop, 100µL (P/N 6850.1913)

分离条件

流动相A: 0.1%甲酸/水; 流动相B: 0.1%甲酸/乙腈

色谱柱: Thermo Scientific™ Acclaim™ Polar Advantage, 2.1mm * 100mm (P/N: 072623)

柱温: 50℃, still air

表1. 液相色谱梯度

Time (min)	Flow rate	Flow path	%A	%B
0.0	0.4 mL/min	To waste	95	5
1.8	0.4 mL/min	Main path	95	5
2.0	0.4 mL/min	Main path	95	5
13.0	0.4 mL/min	Main path	65	35
15.0	0.4 mL/min	Main path	10	90
16.9	0.4 mL/min	Main path	10	90
17.0	0.4 mL/min	Main path	95	5
20.0	0.4 mL/min	Main path	95	5

质谱条件

仪器

Thermo Scientific™ Fusion Lumos三合一质谱仪

表2. 质谱参数

源参数		质谱设置	
极性	正离子模式	PRM scan	
喷雾电压	3700 V	S-lens RF	40
鞘气压力	50 Arb	隔离窗口	1.4 Th
辅助器压力	15 Arb	二级分辨率	15,000
反吹气压力	0 Arb	碎裂模式	HCD
雾化温度	300 °C	AGC target	1e5
离子传输管温度	320 °C	MicroScan	1

表3. Bevacizumab 特征肽段和内标肽段的离子对信息

	Sequence	Location	Charge	Precursor mass (m/z)	Quantitative ion (m/z)	Confirming ion (m/z)	Ion Ratio	Retention time (min)	NCE
IgG1_2	FTFSLDTSK	Heavy Chain [68-76]	2+	523.265	y7+ (797.403)	y6+ (650.336)	0.309	9.04	24
IgG1_3	VLIYFTSSLHSGVPSR	Light Chain [46-61]	3+	588.322	y14 ²⁺ (775.902)	y13 ²⁺ (719.360)	0.863	9.63	20
Murine_2	DSTYSMSSTLTLTKEDEYER	Light Chain [175-193]	3+	743.341	y15 ²⁺ (880.922)	-	-	8.95	24
Murine_4	DVLTITLTPK	Heavy Chain [244-253]	2+	550.832	y8+ (886.561)	-	-	9.50	20

表4. Denosumab 特征肽段和内标肽段的离子对信息

	Sequence	Location	Charge	Precursor mass (m/z)	Quantitative ion (m/z)	Confirming ion (m/z)	Ion Ratio	Retention time (min)	NCE
IgG2_1	GLEWVSGITGSGGSTYYADSVK	Heavy Chain [44-65]	2+	1118.036	y13+ (1291.579)	y11+ (1147.527)	0.488	10.69	23
IgG2_10	LEPEDFAVFYC(Alkylated)QQYGSSPR	Light Chain [79-97]	2+	1147.517	y10+ (1245.530)	y9+ (1082.468)	0.606	11.28	27
Mouse2_1	DDPEVQFSWFVDDVEVHTAHTQPR	Heavy Chain [264-287]	4+	714.583	y13 ²⁺ (752.861)	-	-	11.78	26
Mouse2_3	SVSELPIMHQDWLNGK	Heavy Chain [297-312]	3+	618.646	y11 ²⁺ (669.834)	-	-	10.33	26

表5. Natalizumab 特征肽段和内标肽段的离子对信息

	Sequence	Location	Charge	Precursor mass (m/z)	Quantitative ion (m/z)	Confirming ion (m/z)	Ion Ratio	Retention time (min)	NCE
IgG4_6	ASGYTFTNYYMYWVR	Heavy Chain [24-38]	2+	961.934	y9+ (1295.585)	y10+ (1442.654)	0.786	12.55	26
IgG4_7	GVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPR	Light Chain [28-49]	4+	628.562	y20 ³⁺ (785.715)	y18 ³⁺ (723.022)	0.270	8.78	20
Mouse4_1	DSTYSMSSTLTLTKEDEYER	Light Chain [175-193]	3+	743.341	y15 ²⁺ (880.922)	-	-	8.94	24
Mouse4_3	DDPEVQFSWFVDDVEVHTAHTQPR	Heavy Chain [264-287]	4+	714.583	y13 ²⁺ (752.861)	-	-	11.74	26

实验结果和讨论

1. 测量总体单抗（mAb_{total}）的整体工作流程

测量总体单抗药物所选择的前处理方法和面对的生物基质以及灵敏度需求有关。采用直接酶解的方法无疑提供了质谱法最大的优势，即完全不受抗原和抗药抗体的干扰^[3, 7, 8]。当此方法应用于临床前阶段，即面对的是动物血清时，我们可以选择抗体药物上所有的肽段作为替代肽段，一般来说我们可以得到约0.2 μg/μL的定量下限，基本上能满足绝大多数分析需求^[9]。然而当我们考虑一个临床阶段的方法，即面对的基质是人血清时，我们仅能选择包含CDR区的肽段做为特征肽段，这是因为人血清中含有大量的内源IgG，而人源化的单抗药物其恒定区序列和内源IgG完全保守。这样的条件下我们能选择的特征肽段则非常少，因此很可能难以挑选出酶切效率高且质谱响应好的肽段用于定量。为了提升方法所需的灵敏度，我们可以采用适当的免疫富集方法。在进行总体单抗检测时，我们一般采用anti-Fc的富集方式，因为在人血清中存在的游离抗原和抗药抗体都是和抗体可变区结合，一般情况下不会影响单抗药物Fc区和配

体的结合。由于人血清中有浓度高达12mg/mL的内源IgG，因此在进行anti-Fc富集时，我们无法避免的会将所有内源的IgG均捕获下来，因此我们需要选择载量高且成本低廉的富集试剂。在这里我们使用了Pierce™ Protein A/G磁性琼脂糖，该富集试剂结合磁珠和琼脂糖各自的优势，即保留了Protein A, Protein G琼脂糖对IgG的高载量，极大的压缩了成本，又可以使用基于磁珠的自动化设备，例如KingFisher自动化磁珠处理平台来实现方法的自动化。前处理流程另一个关键点即为酶解过程，传统的酶解过程需要经历尿素变性，还原烷基化，过夜酶解和固相萃取除盐等步骤。而在这里我们使用了SMART Digest可溶胰酶，该胰酶经历了工程化的改造，在70度时拥有更高的活性，温度的提升一方面激活了胰酶活性，另一方面使得目标单抗药物变性，得到了非常高的酶解效率^[12]。通过结合使用Protein A/G磁性琼脂糖和SMART Digest胰酶，我们的整个工作流程仅需要以下4个步骤：(1) 室温条件下从基质中富集IgG组分；(2) 对IgG组分进行洗脱；(3) 加入SMART Digest胰酶和酶解缓冲液，在70℃进行酶解；(4) 加酸终止酶解，质谱分析（图1）。

2. 免疫富集回收率

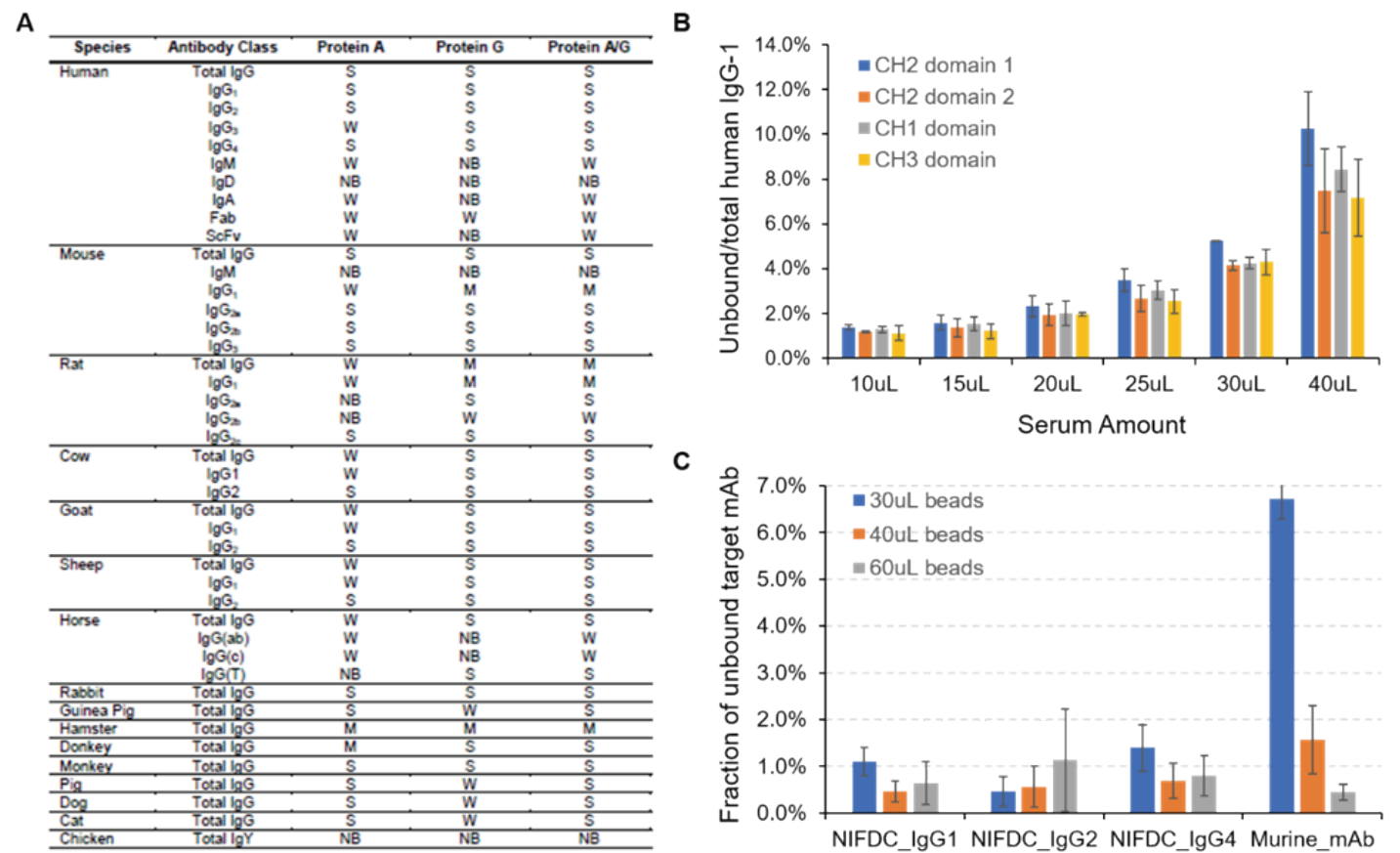


图2. Protein A/G 磁性琼脂糖的亲和能力评估。A. Protein A, Protein G, Protein A/G结合免疫球蛋白的特异性; B. Protein A/G磁性琼脂糖结合人血清中IgG的载量; C. Protein A/G磁性琼脂糖对各种IgG亚型的单抗的免疫富集的回收率（20uL 血清，单抗浓度40ug/mL）

Protein A/G 磁性琼脂糖可以识别人血清中的IgG, IgM和IgA组分 (图2A)。为了考察Protein A/G 磁性琼脂糖对人血清中IgG的载量, 我们使用单位体积的Protein A/G 磁性琼脂糖 (40μL) 对不同体积的人血清进行了捕获, 并使用质谱检测上清中游离的IgG的恒定区肽段。结果显示40μL Protein A/G 磁性琼脂糖可对30μL人血清中的IgG组分进行高效的富集, 仅有约4%的内源IgG未能和磁珠结合 (图2B)。随后我们在20μL人血清基质中掺入了40μg/mL的Bevacizumab (IgG1亚型单抗药物), Denosumab (IgG2亚型单抗药物),

Natalizumab (IgG4亚型单抗药物) 和Murine mAb standard (鼠源IgG), 以考察Protein A/G 磁性琼脂糖对外源IgG药物的免疫富集回收率。在对上清中的外源药物进行检测时, 我们使用PRM模式监控其CDR区的肽段来获得检测的特异性。结果显示40μL Protein A/G 磁性琼脂糖可对20 μL人血清基质中的所有外源药物以及鼠源IgG获得98%以上的免疫富集回收率 (图2C)。最终我们将前处理的步骤锁定为使用40μL 琼脂糖对20μL人血清基质中的IgG组分进行富集。

3. 洗脱和酶解条件的优化

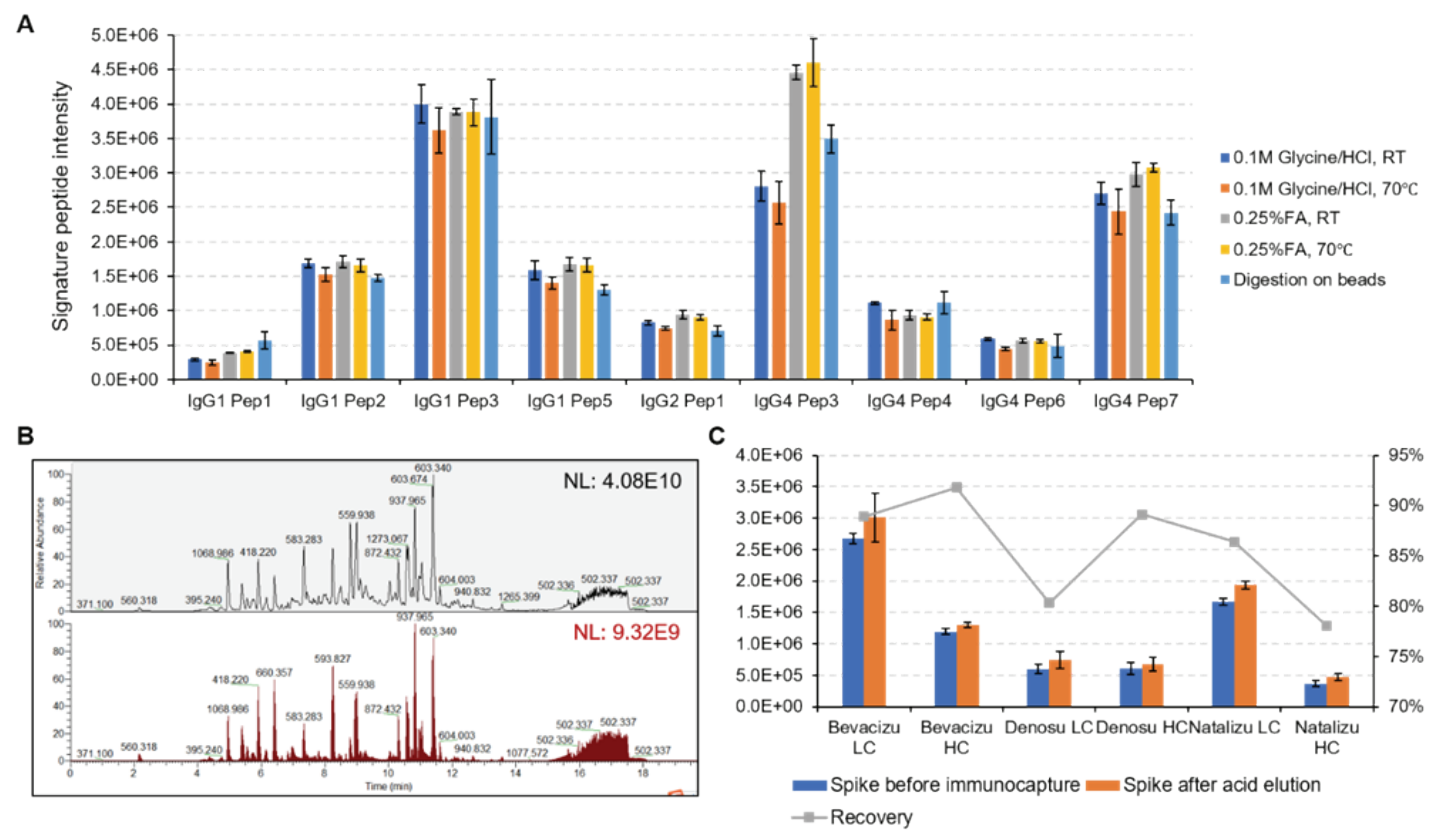


图3. 免疫富集和洗脱条件的优化。A. 洗脱条件的优化，测试多种类型单抗药物，通过可变区的特征肽段的信号响应来评估各种洗脱条件的得率；B. 使用 Protein A/G磁性琼脂糖对IgG进行免疫富集并酸洗脱，酶解后进行质谱全扫描的TIC和BPC图；C. 三种类型的单抗药物进行免疫富集的样品前处理回收率（采用0.25% FA，室温洗脱）

由于在血清中进行anti-Fc的富集会将所有内源的IgG组分捕获下来，因此必须对IgG组分进行酶解才能使用质谱法来对目标单抗药物进行定量。为了获得更高的整体样品前处理回收率，我们对IgG组分的洗脱和酶解条件进行了优化。我们考察了以下5个条件：a. 0.1M Glycine/HCl, pH2.5 室温洗脱后酶解；b. 0.1M Glycine/HCl, pH2.5 70°C洗脱后酶解；c. 0.25% FA, 室温洗脱后酶解；d. 0.25% FA, 70°C洗脱后酶解；e. 磁珠上酶解。结果显示对于大多数单抗药物，他们的特征肽段在不同的处理条件下表现出了类似的质谱信号影响（图3A）。除了对目标特征肽段进行PRM的靶向定量，我

们还对IgG洗脱组分的肽段进行了一级质谱全扫描的观测，可见背景信号非常高（图3B），这是由于anti-Fc的富集将所有内源的IgG都进行了捕获，因此在人血清基质中采用anti-Fc的富集方式对方法最终的灵敏度提升是有限的。鉴于条件c (0.25% FA, 室温洗脱后酶解)获得了更稳定的特征肽段响应和稍低的背景信号，我们选择了该条件作为最终的洗脱和酶解条件。我们随后使用了前后加标对比的方式，对样品前处理的整体回收率进行了评估，结果显示对于三种亚型的单抗药物其整体的样品前处理回收率均在80%以上（图3C）。

4. 特征肽段的选择和方法特异性

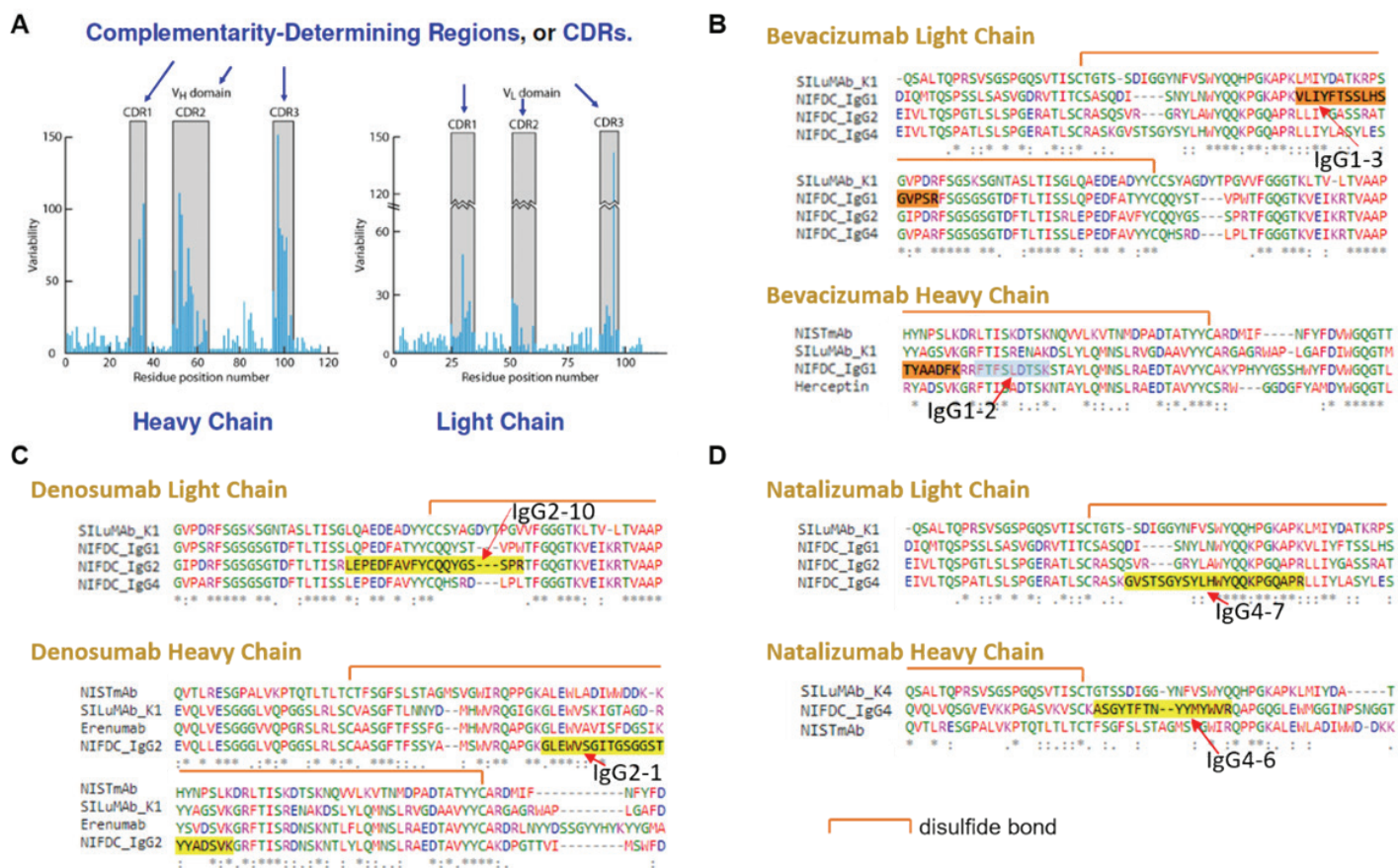


图4. 各单抗药物的特征肽段选择。A. 抗体CDR区序列变化热点, B. Bevacizumab (IgG1亚型) 的特征肽段; C. Denosumab (IgG2亚型) 的特征肽段; D. Natalizumab (IgG4亚型) 的特征肽段

在该方法中我们采取了anti-Fc的富集方式, 人血清中内源的IgG会全部被捕获并且洗脱, 因此我们只能选择目标单抗包含CDR区域的特征肽段来获得方法的特异性。CDR区域在单抗抗重链的具体位置会有一定的热点集中(图4A), 因此我们可以首先通过肽图分析(最好加入BSA基质一起酶解)得到各酶解肽段的相对峰强度, 随后选择包含CDR区域的且强度较高肽段作为候选肽段, 进行质谱参数的优化和特异性的评估。质谱法进行单抗药物生物分析的一大优点就是灵活性, 我们可以通过选择不同的特征肽段来达到不同的监控目的。在这里为了更好的监控单抗药物在体内的完整性, 我们在单抗轻链和重链上分别选择了一条特征肽段用于定量(表3, 表4, 表5, 图4B, 图4C, 图4D)。IgG2亚型的Denosumab在选择特征肽段时遇到了一定的挑战, 由于序列和二硫键结构的原因其候选特征肽段

非常有限, 最后我们在Denosumab的轻链上选择了一个包含巯基的肽段来作为特征肽段, 这就意味着我们需要在酶解完成后进行还原烷基化, 使得前处理步骤增加。随后我们对这些特征肽段的特异性进行了评估, 大多数特征肽段在人血清基质中均未发现明显基质干扰(图5)。Denosumab轻链上包含巯基的特征肽段IgG2_10是一个特例。该肽段响应最强的碎片离子是y11+, 但这个碎片离子在人血清基质中存在着较强的基质干扰(图5)。因此我们只能将强度较低的碎片离子y10+作为肽段IgG2_10的定量离子, 该碎片离子在人血清基质中也存在着较低的基质干扰, 因此尽管IgG2_10肽段的特征碎片y10+在0.1μg/mL的浓度下是亦有着不错的强度和线性, 但是我们只能将定量的LLOQ定在0.4μg/mL。

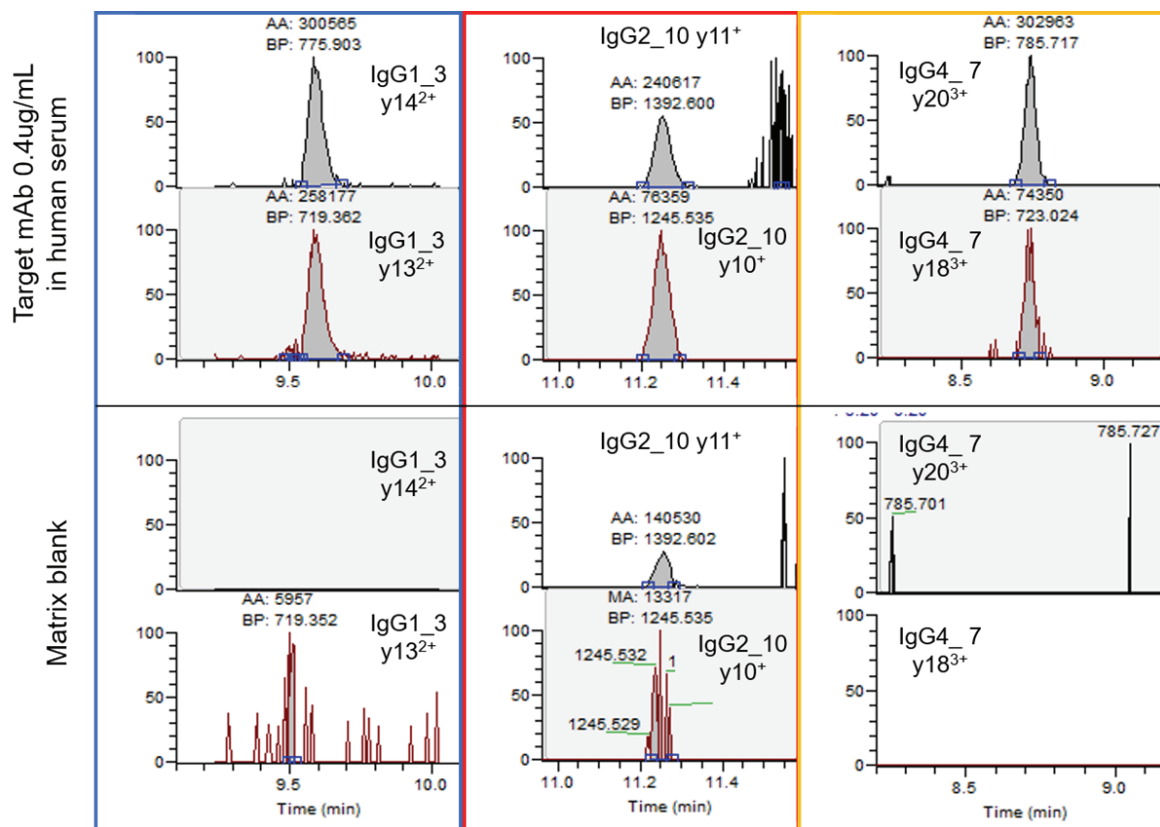
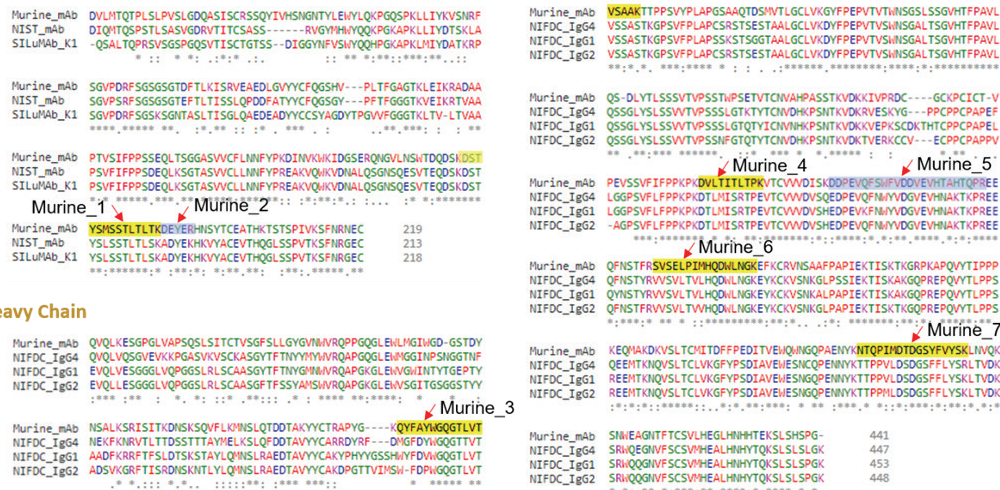


图5. 特征肽段在人血清基质中的特异性。在人血清基质中掺入0 μ g/mL 或者0.4 μ g/mL的目标单抗, 经过anti-Fc的富集和酶解后采用PRM检测各单抗特征肽段相应的离子对。

5. 内标的选择和评估

A Light Chain



Heavy Chain

B

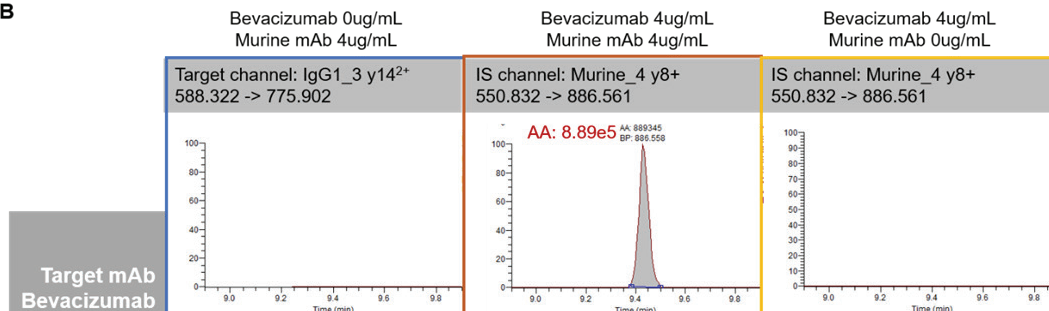


图6. 鼠源单抗标准品作为内标的表现。A. 小鼠单抗标准品的序列比对和选择的内标特征肽段; B. 人血清基质中加入图示浓度的Bevacizumab和小鼠单抗标准品, 观察目标和内标离子对通道以考察内标肽段的特异性

在使用质谱法进行生物分析时一般都需要引入内标来对整个分析过程进行归一化^[1]。可以选择的内标包括重同位素标记的肽段^[10]，其他的单抗药物^[9]或者重同位素标记的单抗标准品^[11]。在该方法中我们只能选择包含CDR区域的特征肽段，因此我们无法容易的获得包含这些特征肽段的同位素表单抗标准品。为了方法的通用型，减少对特化试剂的依赖，我们选择了一个鼠源的单抗标准品作为内标。使用该内标的优点是可以对整个样品前处理过程（包括免疫富集和酶解）进行归一化，且整个鼠源单抗的所有肽段均可作为内标肽段使用，另外这个试剂作为一个被业界大量使用的标准品，其批间稳定性也有很好的保证。为了尽可能的让内标肽段可以对质谱分析时

的信号响应也进行归一化，我们应尽量选择和目标单抗药物特征肽段保留时间接近的内标肽段。我们将鼠源单抗标准品掺入人IgG基质进行质谱分析和参数优化，建立了内标肽段的数据库（图6）。该数据库中应当包含特征肽段的序列，离子对，优化后的碰撞能，保留时间，质谱峰面积和在血清基质空白中的基质干扰响应（表6）。这样我们就可以为不同单抗药物的特征肽段选择保留时间接近的内标肽段，并且通过内标肽段的质谱响应来调整内标蛋白的掺入量。值得注意的是，在掺入内标后，我们需要在含有内标的基质中对目标单抗的特征肽段进行检测，以确保内标不会对目标肽段的检测造成干扰（图6B）。

表6. 小鼠单抗标准品的特征肽段用作内标的数据库

	Position	Sequence	Precursor	Fragmenta I ion	Slens RF	NCE	Retention Time	Area	Matrix Blank
Murine_1	Light Chain [175-188]	DSTYSMSSTLTGTK	767.869(2+)	y10+(1068.560)	40	22	8.59min	4.50E+05	0
Murine_2	Light Chain [175-193]	DSTYSMSSTLTGTKDEYER	743.341(3+)	y15 ²⁺ (880.922)	40	24	8.86min	2.30E+05	0
Murine_3	Heavy Chain [103-120]	QYFAYWGQGLTVSAAK	996.008(2+)	y12+(1131.637)	40	22	11.42min	3.90E+05	0
Murine_4	Heavy Chain [244-253]	DVLTITLTPK	550.832(2+)	y8+(886.561)	40	20	9.43min	8.50E+05	0
Murine_5	Heavy Chain [264-287]	DDPEVQFSWFVD DVEVHTAHTQPR	714.583(4+)	y13 ²⁺ (752.861)	40	26	11.64min	5.10E+05	0
Murine_6	Heavy Chain [297-312]	SVSELPIMHQDWLNGK	618.646(3+)	y11 ²⁺ (669.834)	40	26	10.28min	1.02E+06	0
Murine_7	Heavy Chain [388-404]	NTQPIMDTDGSYFVYSK	983.449(2+)	y14+(1622.740)	40	24	9.46min	1.10E+06	0

6. 方法的总体定量性能

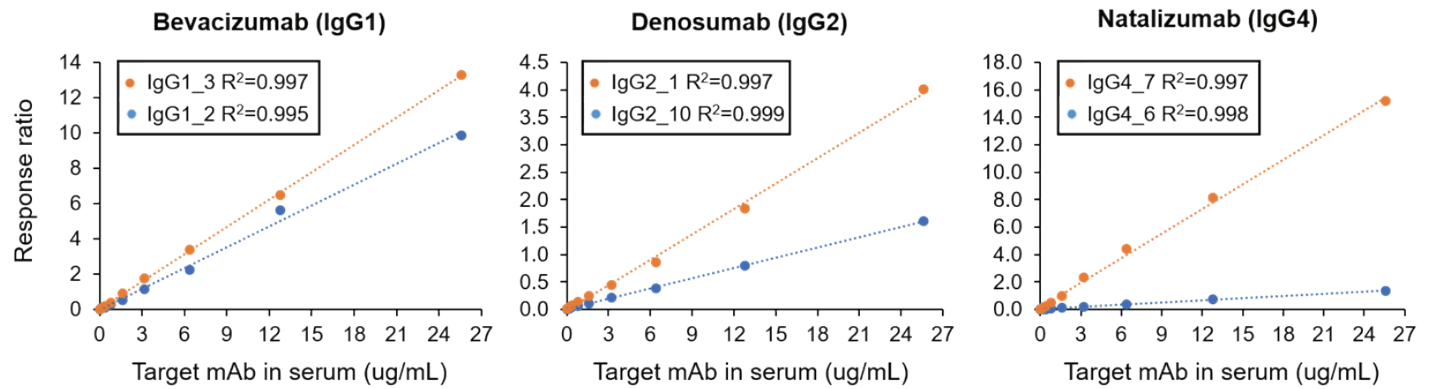


图7. 各种单抗药物在人血清基质中的线性。

我们随后使用Bevacizumab (IgG1亚型), Denosumab (IgG2亚型)和 Natalizumab (IgG4亚型) 为实例对该方法的定量性能进行了初步的评估。各个单抗药物由于选择的特征肽段不同，其定量下限也不相同。Bevacizumab和Natalizumab的定量下限可达约0.1 $\mu\text{g/mL}$ （表7），而Denosumab由于基质中存在一定程度的干扰（图5），因此其定量下限定格在0.4 $\mu\text{g/mL}$ （表7）。各条特征肽段在其线性范围内

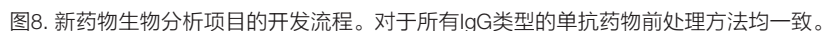
（LLOQ – 25.6 $\mu\text{g/mL}$ ）均表现出了非常优秀的线性（图7）。对内标的峰面积进行外标法考察，可见四条肽段的内标响应高度稳定（RSD均在10%以内），表明整个分析方法具有非常高的稳定性。最后，我们以Bevacizumab为实例对3个浓度的质控样品进行了定量精密度和准确性的考察，结果可见日内和日间精密度以及定量回收率均能很好的满足法规要求（表8）。

	Domain	Sequence	Linear range	r ² , linear fit, 1/x weight	LLOQ	IS CV%
Bevacizumab	Light Chain	VLIYFTSSLHSGVPSR	0.1 - 25.6 ug/mL	0.997	0.1 ug/mL	6.55
	Heavy Chain	FTFSLDTSK	0.1 - 25.6 ug/mL	0.995	0.1 ug/mL	5.83
Denosumab	Light Chain	LEPEDFAVFCY(Alkylated)QQYGSSPR	0.4 - 25.6 ug/mL	0.997	0.4 ug/mL	6.00
	Heavy Chain	GLEWWSGITGSGGSTYYADSVK	0.4 - 25.6 ug/mL	0.999	0.4 ug/mL	3.86
Natalizumab	Light Chain	GVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPR	0.1 - 25.6 ug/mL	0.997	0.1 ug/mL	10.09
	Heavy Chain	ASGYTFTNYYMYWVR	0.2 - 25.6 ug/mL	0.998	0.2 ug/mL	4.13

肽段序列		QCL (0.4 ug/mL)			QCM (2 ug/mL)			QCH (20 ug/mL)		
		日内CV% (n = 6)	日间CV% (n = 4)	Diff%	日间CV% (n = 6)	日内CV% (n = 4)	Diff%	日内CV% (n = 6)	日间CV% (n = 4)	Diff%
Light Chain	VLIYFTSSLHSGVPSR	5.62	7.81	6.25	2.56	5.21	-2.13	1.26	3.04	1.23
Heavy Chain	FTFSLDTSK	6.21	7.58	5.86	3.67	6.02	-0.12	2.12	4.21	-0.08

因为我们在整个前处理方法中没有引入任何特化试剂，因此在人血清基质中对任何人源化单抗药物的总体浓度（ mAb_{total} ）进行测定时可以采用完全一致的前处理流程。我们也以Bevacizumab, Denosumab和Natalizumab三种不同IgG亚型的单抗药物对该流程进行了验证。对于一个新的药物我们仅需要经历特征肽段挑选，质谱参数优化，离子对精选和内标挑选四个步骤即可完成整个方法开发流程，整个过程约需一周的时间（图8）。在特征肽段挑选步骤如果实验室拥有高分辨质谱会对方法开发有较大的帮助，我们可以在BSA基质中掺入目标单抗药物，随后进行肽图分析，挑选包含CDR

区域且强度较高的肽段作为候选特征肽段。而当实验室没有高分辨质谱时，我们可以对目标单抗药物进行理论酶解挑选所有包含CDB区域的肽段作为候选特征肽段，由于候选肽段较多，会在后面的质谱参数优化和离子对精选步骤花费更多的时间。由于单抗药物通常都能足量供应，在质谱参数优化阶段我们一般会对该药物（不含任何基质）进行酶解和除盐，随后采用在线优化的方式得到最优质谱参数，进行后面的精选过程。在内标肽段的选择上，我们可以将鼠源单抗标准品掺入人IgG基质，随后进行肽图分析，挑选出和目标单抗药物特征肽段保留时间接近的肽段，随后进行柱上优化，得到优化的碰撞能和离子对，随后掺入实际基质中进行验证并通过强度响应决定内标蛋白的掺入量。



结论

我们通过使用Pierce™ Protein A/G磁性琼脂糖，SMART Digest可溶性胰酶和Intact Murine mAb Mass Check Standard建立了基于免疫质谱的在临床样本中检测总体单抗药物的通用方法。该方法具有简单快速，高泛用型以及可自动化的优点，可以用于临床研究阶段的单抗药物药代动力学分析以及上市后药物的药物浓度监控。该方法不需要任何特化试剂，对于一个全新的单抗药物方法开发仅需一周的时间，极大提升了药企，CRO和医院药学的生产力。

参考文献

- Jenkins, R., et al., Recommendations for validation of LC-MS/MS bioanalytical methods for protein biotherapeutics. AAPS J, 2015. 17(1): p. 1-16.
- Heudi, O., et al., Towards absolute quantification of therapeutic monoclonal antibody in serum by LC-MS/MS using isotope-labeled antibody standard and protein cleavage isotope dilution mass spectrometry. Anal Chem, 2008. 80(11): p. 4200-7.
- Yuan, L., et al., Simple and efficient digestion of a monoclonal antibody in serum using pellet digestion: comparison with traditional digestion methods in LC-MS/MS bioanalysis. Bioanalysis, 2012. 4(24): p. 2887-96.
- Mekhssian, K., J.N. Mess, and F. Garofolo, Application of high-resolution MS in the quantification of a therapeutic monoclonal antibody in human plasma. Bioanalysis, 2014. 6(13): p. 1767-79.
- Nguyen, T., et al., Investigating the utility of minimized sample preparation and high-resolution mass spectrometry for quantification of monoclonal antibody drugs. J Pharm Biomed Anal, 2018. 159: p. 384-392.
- Lee, J.W., et al., Bioanalytical approaches to quantify "total" and "free" therapeutic antibodies and their targets: technical challenges and PK/PD applications over the course of drug development. AAPS J, 2011. 13(1): p. 99-110.
- Hashii, N., et al., Generic MS-based method for the bioanalysis of therapeutic monoclonal antibodies in nonclinical studies. Bioanalysis, 2020. 12(4): p. 231-243.
- Tang, J., 基于沉淀酶解法的IgG-1类型单克隆抗体药物临床前生物分析的通用方法. 2020: ThermoFisher Application Note 20059.
- Ewles, M., et al., LC-MS/MS strategies for therapeutic antibodies and investigation into the quantitative impact of antidrug-antibodies. Bioanalysis, 2016. 8(24): p. 2565-2579.
- Fernandez Ocana, M., et al., Clinical pharmacokinetic assessment of an anti-MAdCAM monoclonal antibody therapeutic by LC-MS/MS. Anal Chem, 2012. 84(14): p. 5959-67.
- Jiashu Tang, X.Z., Yue Zhou, Min Du, A fast and simple immuno-mass spectrometry method for preclinical bioanalysis for IgG1 mAb. 2020: ThermoFisher Application Note 73684.
- Lanshoeft, C., O. Heudi, and S. Cianferani, SMART Digest compared with pellet digestion for analysis of human immunoglobulin G1 in rat serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Anal Biochem, 2016. 501: p. 23-5.



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

Thermo Fisher
S C I E N T I F I C