Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

采用快速、标准化的试剂盒方法对大鼠血浆中的英夫利昔单抗进行高灵敏度的定量分析

Mary Lame, Hua Yang, Sherri Naughton和Erin Chambers
沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德)

应用优势

- 简单、标准化的蛋白定量方法；普遍适用的优化酶解套装，为新药研发省去了方法开发步骤；仅需4–6小时即可完成LC-MS分析的样品前处理；分析英夫利昔单抗获得了10 ng/mL的高灵敏度检测限。

沃特世解决方案

ProteinWorks™ eXpress酶解套装

完整单克隆抗体检测标准品
(部件号186006552)

ACQUITY UPLC® Peptide BEH C_{18},
300Å 1.7 µm, 2.1 mm x 150 mm肽分析专用柱
(部件号186003687)

ACQUITY UPLC

Xevo® TQ-S质谱仪

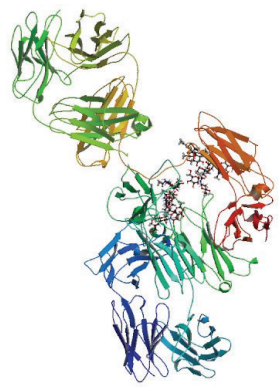
ProteinWorks µElution SPE净化试剂盒

关键词

单克隆抗体，英夫利昔单抗，Remicade，蛋白定量，eXpress酶解

简介

随着越来越多的药物开发聚焦于抗体或ADC等大分子，研究传统“小分子”的科学家面临着挑战，这种挑战不仅来源于小分子研究复杂且耗时的特点，还来自于使用LC-MS进行蛋白定量时可能会涉及的多个工作流程。经常使用ELISA和其它免疫亲和(IA)方法研究蛋白质生物标志物的研究人员也面临同样的问题。虽然IA方法非常灵敏且操作简单，但其试剂重现性较差、缺乏标准化方法和交叉反应、线性动态范围有限，还有其它一些缺点，由此推动了转向LC-MS的方法开发，尤其是在发现研究和早期开发/临床前研究领域。然而，LC-MS工作流程包含多个子部分，每个子部分又包含许多步骤。有关特定试剂以及每个步骤的时间、温度和试剂浓度都可影响灵敏度，导致我们很难快速获得能够达到期望检测限的方法。本应用纪要描述了使用ProteinWorks eXpress酶解套装和方案快速、灵敏地对大鼠血浆中的英夫利昔单抗进行定量分析(图 1)的方法。采用一套通用的样品前处理方法，使用经预先称重且具有批次可溯源性的试剂，在一系列精心开发的通用型简单分步操作说明的指导下分析英夫利昔单抗，可达到10 ng/mL的LLOQ(定量下限)。



分子式： $C_{6428}H_{9912}N_{1694}O_{1987}S_{46}$
分子量：约 ~ 149.1 kD

http://www.drugbank.ca/drugs/DB00065

图1. 英夫利昔单抗(Remicade)的蛋白质结构。

实验

样品描述

首先使用蛋白A琼脂糖基96孔板对35 µL大鼠血浆中的英夫利昔单抗进行免疫纯化。然后使用ProteinWorks eXpress酶解套装和方案处理样品以用于LC-MS分析。最后使用ProteinWorks µElution SPE净化试剂盒和方案纯化特征肽段。

方法条件

LC系统: ACQUITY UPLC

检测: Xevo TQ-S质谱仪，ESI+

色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C_{18}, 300Å, 1.7 µm, 2.1 mm x 150 mm肽分析专用柱

柱温: 55 °C

样品温度: 10 °C

进样体积: 10 µL

流动相A: 0.1%甲酸水溶液

流动相B: 0.1%甲酸的乙腈溶液

梯度:

流速 (mL/min)	时间 (min)	比例 %A	比例 % B	曲线
0.3	0.0	100	10	6
0.3	1.0	100	10	6
0.3	7.0	50	50	6
0.3	8.0	10	90	6

数据管理: MassLynx® (4.1版)

MS条件

毛细管电压 (kV): 3

锥孔电压 (V): 30

电离源补偿 (V): 50

离子源温度 (°C): 150

脱溶剂气温度 (°C): 600

锥孔气流速 (L/h): 150

碰撞气体流速 (mL/min): 0.15

喷雾器气流 (Bar): 7

肽段	MRM通道	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
DILLTQSPAILSVSPGER*	633.10>731.80	31	21
SINSATHYAESVK*	469.6>603.80	40	10
DSTYSLSSTLTLSK	751.88>836.47	31	24
SVSELPIMHQDWLNGK (ISTD)	618.64>834.41	16	12

*独有的特征肽段

表1. 英夫利昔单抗肽段和内标物肽的MRM条件。

结果与讨论

随着英夫利昔单抗的美国专利有效截止期限2017年越来越近[1]，CRO(合同研究机构)和生物仿制药研究实验室对这种重要药物的关注度也日益增加。然而，典型的工作流极其复杂，而且有多种选择和选项。这使得开发高灵敏度方法充满了挑战。在本应用纪要中，我们使用ProteinWorks eXpress酶解套装来简化和精简流程。使用SPE方法，在总共不到6小时的时间内就完成了英夫利昔单抗样品的亲和纯化、酶解和肽段提取。该方法让我们在同一天即可开始采集数据，到第二天早上仍有多个96孔板正在运行。我们同时监控了多种独特的特征肽段和一种通用人类肽段用于定量。使用来自重链的特征肽SINSATHYAESVK时获得了最佳灵敏度，英夫利昔单抗的其它特征肽段(DILLTQSPAILSVSPGER，轻链)及通用肽段(DSTYSLSSTLTLSK，轻链)的监控数据被用于结果确证。将来自普通小鼠mAb标准品(部件号186006552)的特征肽段(SVSELPIMHQDWLNGK)作为内标。

使用试剂盒提供的优化的方案和试剂，仅需35 µL血浆就能在英夫利昔单抗分析中达到10 ng/mL的检测限(图2)。表2汇总了各个肽段的标准曲线的线性和准确度。主要定量肽段SINSATHYAESVK的灵敏度最高，在超过4个数量级的范围内均保持线性，且标准曲线上所有点的平均准确度大于98%。另外两个肽段在超过3.5个数量级的范围内保持线性，且标准曲线上所有点的平均准确度大于99%。

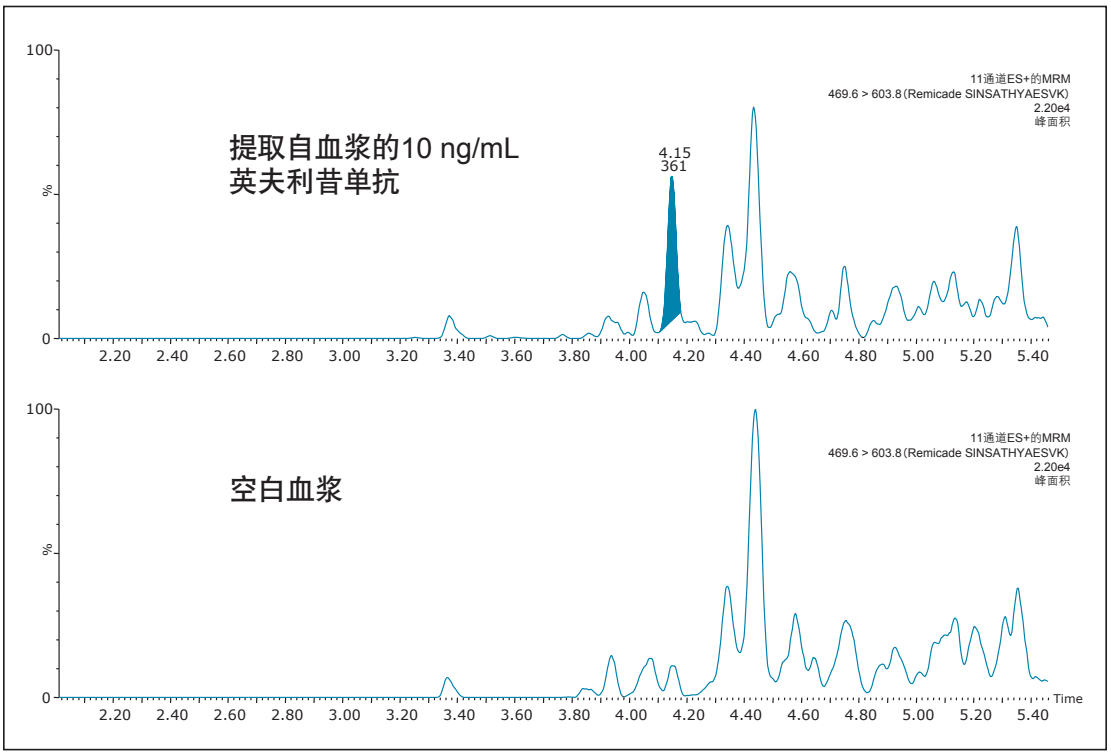


图2. 大鼠血浆样品的色谱图，图中显示了浓度为10 ng/mL的英夫利昔单抗(与空白大鼠血浆样品相比)。使用特征肽段SINSATHYAESVK对英夫利昔单抗进行定量。

肽段	标准曲线范围 (µg/mL)	权重	线性拟合 (r^2)	所有点的平均准确度(%)
DILLTQSPAILSVSPGER*	0.05–250	1/X	0.998	100.00
SINSATHYAESVK*	0.01–100	$1/X^2$	0.995	98.47
DSTYSLSSTLTLSK	0.10–500	$1/X^2$	0.997	99.34

*独有的特征肽段。

表2. 用于定量大鼠血浆中英夫利昔单抗的特征肽段的线性动态范围和标准曲线统计数据。

此外，QC样品的准确度和精度非常出色，所有变异系数(%CV)均小于6%。相关数据汇总于表3中。事实上，SINSATHYAESVK肽段的QC样品的平均变异系数小于3%。

肽段	QC浓度 (µg/mL)	平均计算浓度 (µg/mL)	标准差	%CV	平均准确度
SINSATHYAESVK*	0.035	0.036	0.001	2.78	103.1
	0.350	0.331	0.003	0.80	94.5
	3.500	3.330	0.105	3.15	95.1
	35.000	38.287	1.168	3.05	109.4
	350.000	–	–	–	–
肽段	**QC浓度 (µg/mL)**	**平均计算浓度 (µg/mL)**	**标准差**	**%CV**	**平均准确度**
DILLTQSPAILSVSPGER*	0.035	–	–	–	–
	0.350	0.359	0.015	4.10	102.6
	3.500	3.210	0.026	0.81	91.7
	35.000	37.054	0.581	1.57	105.9
	350.000	327.304	13.672	4.18	93.5
肽段	**QC浓度 (µg/mL)**	**平均计算浓度 (µg/mL)**	**标准差**	**%CV**	**平均准确度**
DSTYSLSSTLTLSK	0.035	–	–	–	–
	0.350	0.333	0.010	2.85	95.3
	3.500	3.271	0.186	5.70	93.5
	35.000	36.256	1.999	5.51	103.6
	350.000	369.975	7.432	2.01	105.7

*独有的特征肽段。

表3. 用于定量的所有英夫利昔单抗肽段QC样品的统计数据。

通过色谱数据评估可以明显看出，峰宽和残留内源性组分分离方面的数据质量提升帮助我们实现了低浓度水平的检测并获得了极高的准确度和精度。图3-5中所有特征肽段的QC色谱图都可以得出该结论(并且图中已突出显示)。

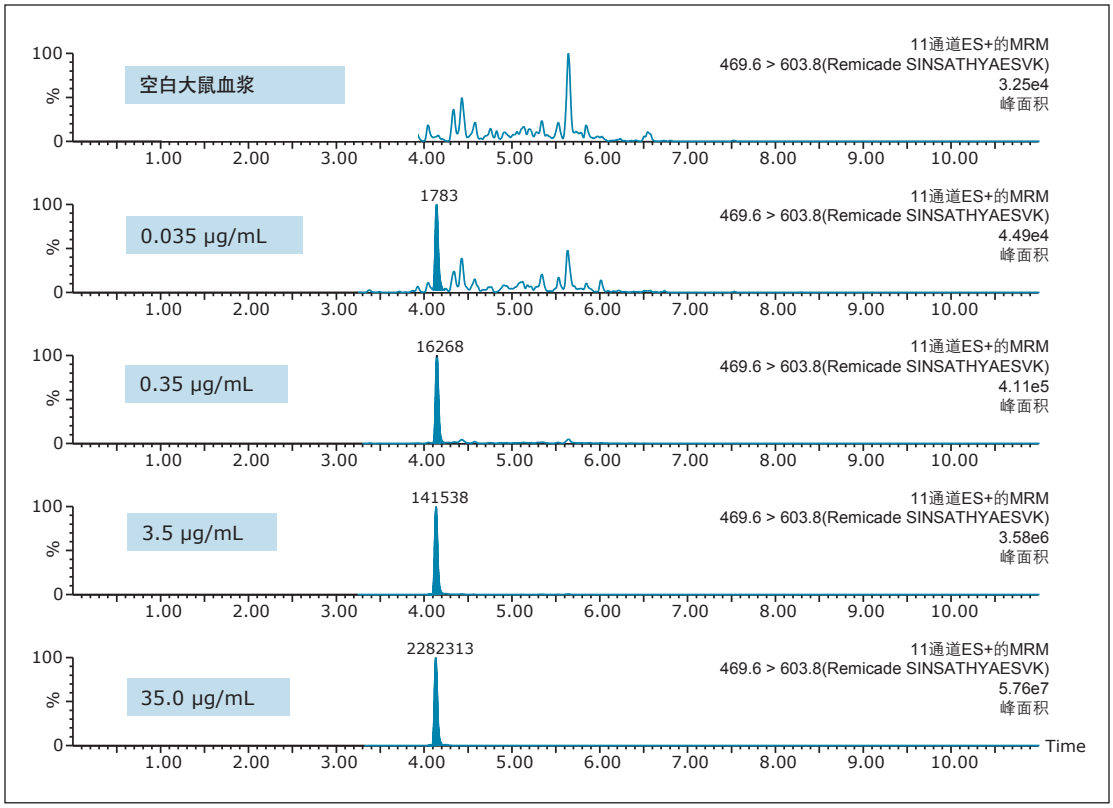


图3. 英夫利昔单抗独有的特征肽段SINSATHYAESVK的QC色谱图。

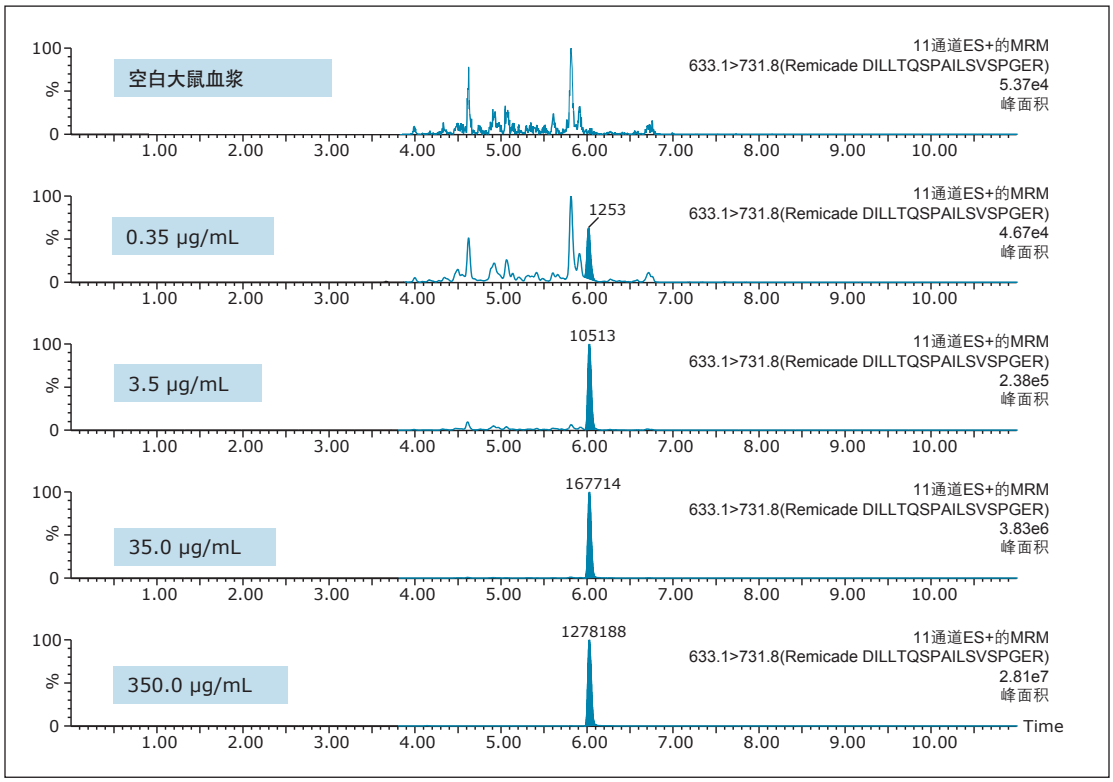


图4. 英夫利昔单抗独有的特征肽段DILLTQSPAILSVSPGER的QC色谱图。

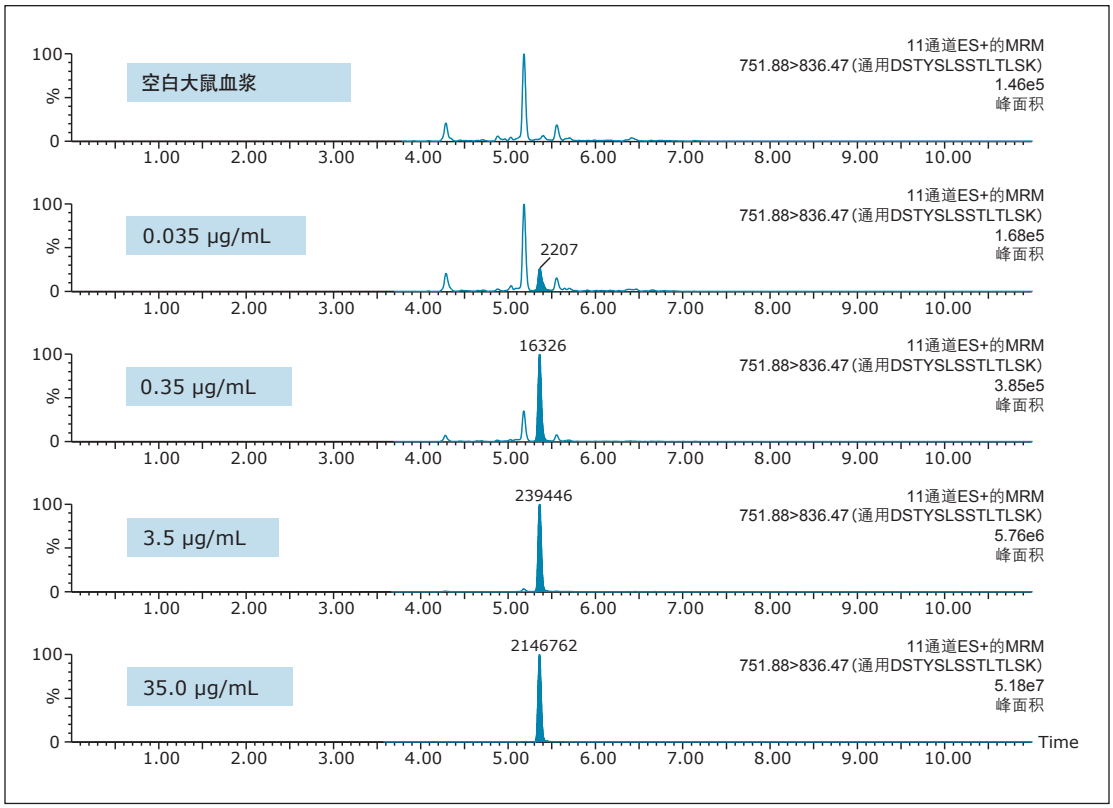


图5. 英夫利昔单抗的通用特征肽段DSTYSLSSTLTLSK的QC色谱图。

结论

我们应用ProteinWorks eXpress酶解套装，利用一系列典型的标准曲线和大鼠血浆QC样品成功地对英夫利昔单抗进行了纯化。在保持出色线性和个位数精确度的同时，轻松达到了10 ng/mL的定量限。包含亲和纯化步骤在内的总样品前处理时间不超过6小时。总的酶解准备时间仅2小时。基于试剂盒的通用方法让初学者能够通过简单的分步方案和一系列标准化、经预先检测的试剂获得超低的检测限，还可确保实现所需的灵敏度，同时保证了此类方法能够灵活转换。

参考文献

1. McKinsey and Company; Data Source: Evaluate Pharma, US Patent Expiration Dates.

扫一扫，关注沃特世微信

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, The Science of What's Possible, ACQUITY UPLC, Xevo和MassLynx是沃特世公司的注册商标。
ProteinWorks是沃特世公司的商标。其它所有商标均归各自的拥有者所有。

©2015年 沃特世公司 中国印刷 2015年11月 720005535ZH AG-PDF

沃特斯中国有限公司
沃特世科技(上海)有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 5999
成都：028 - 6765 3588
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com