Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

使用ACQUITY UPLC I-Class & Xevo TQ-S液质联用系统建立并验证单克隆抗体英夫利昔的生物定量分析方法

王晖，陈熙，沃特世科技（上海）有限公司
彭晓云，上海张江生物技术有限公司，抗体药物与靶向治疗国家重点实验室

应用关键词

沃特世蛋白生物定量分析解决方案，英夫利昔，Xevo TQ-S，IntelliStart™自动方法开发，胰蛋白酶酶解

前言

随着生物技术的发展，单克隆抗体药物越来越受到各大制药公司的关注，也有越来越多的单克隆抗体药物上市。因此，单克隆抗体药物的生物定量分析具有非常重要的意义。但是，单克隆抗体的分子量很大(150 K左右)，不适合直接测定进行生物定量分析，需要将单克隆抗体药物酶解后，使用特征性肽段进行定量分析。

英夫利昔是一种特异性阻断α肿瘤坏死因子的人鼠嵌合型单克隆抗体，属于α肿瘤坏死因子拮抗剂，临床上用于治疗风湿性关节炎和克罗恩氏病。研究发现，英夫利昔对溃疡性结肠炎等有很好的作用，因此，能准确测定英夫利昔在生物体内的浓度对药物临床及此类药物的研发有非常重要的意义。

在本文中，我们使用液质联用系统建立了单克隆抗体英夫利昔的生物定量分析方法（定量下限为0.39 μg/mL），并进行了方法学验证。我们使用此方法测定了来自4个人的48个临床样品，其药时曲线与ELISA方法的测试结果趋势一致。

实验方法

液相方法

系统:	ACQUITY UPLC® I-Class
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH 130 C_{18}, 1.7 µm, 2.1 × 150 mm
柱温:	60 ˚C
流速:	0.3 mL/min
水相:	0.1% 甲酸水溶液
有机相:	0.1% 甲酸乙腈溶液

质谱方法

质谱: Waters Xevo® TQ-S三重四极杆
喷雾电压: 3.0 KV
特征性肽段 (SINSATHYAESVK) MRM方法: 469.6/603.8
同位素标记的内标的MRM 方法: 471.0/605.9

样品前处理方法

取25 µL血清抗体样品 (标准曲线和实际样本), 加入甲醇沉淀血清中的蛋白, 涡旋, 17000 g离心, 去除上清; 剩余的沉淀加入100 mM的NH_4HCO_3, 涡旋, 加入10 µL 100 mM的DTT进行二硫键的还原, 60 ˚C反应。60 min后, 加入100 mM的MIA进行烷基化, 30 ˚C反应。30 min加入Trypsin, 50 ˚C反应。60 min进行酶切, 10%FA/H_2O终止胰酶切, 最后17000 g离心后质谱进样并分析 (同位素肽在酶切前加入)。

结果和讨论

图 1 所示为立英夫利昔生物定量分析方法的基本流程。向含有英夫利昔的人血清中加入甲醇沉淀血清中的蛋白，离心后，去除上清；剩余的沉淀加入100 mM的NH_4HCO_3，涡旋后加入100 mM的DTT还原，再加入100 mM的MIA进行烷基化，之后加入胰蛋白酶进行酶切，酶切完后加入10%甲酸水溶液终止胰酶切，离心取上清后，质谱进样分析。

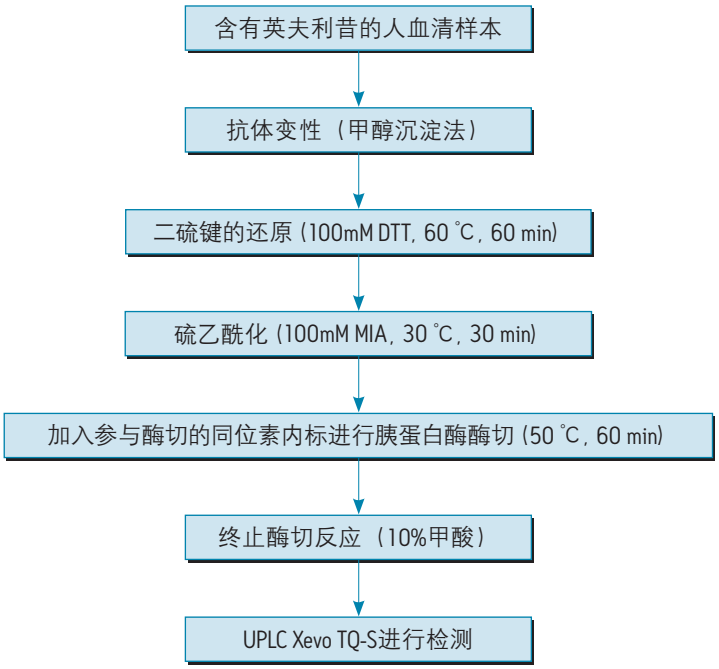

图1. 英夫利昔的生物定量分析基本流程。

液质联用方法开发

1.1英夫利昔特征性肽段的查找

英夫利昔特征性肽段的查找对生物定量分析方法的建立非常重要，对于单克隆抗体药物，重组变异区（CDR）是其发挥作用的主要区域。此区域的肽段在体内的浓度也能代表单克隆抗体药物的浓度。在CDR区找到了两个特征性肽肽段，只有在重链区域的SINSATHYAESVK（HC-T7）有更好的灵敏和选择性，因此，我们选择它作为特征性肽段进行定量分析。

1.2 Xevo TQ-S进行英夫利昔特征性肽段MRM方法的优化

多肽MRM方法开发有很多难点，容易带多电荷，且在高能量下产生很多碎片，手动开发需要花费很多时间。Waters Xevo TQ-S创新性的StepWave™技术（图2），大大提高了灵敏度，且扫描质量范围宽（大于2000 Da），可以满足特征性肽段的要求。使用Waters IntelliStart软件，可以自动进行多肽的MRM方法开发，可以大大提高方法开发的效率。在本实验中，我们使用酶切后的同位素内标（未标记的特征性肽段不易得到）进行了MRM的方法开发（见图3），此结果可以类推到特征性肽段的MRM方法上。

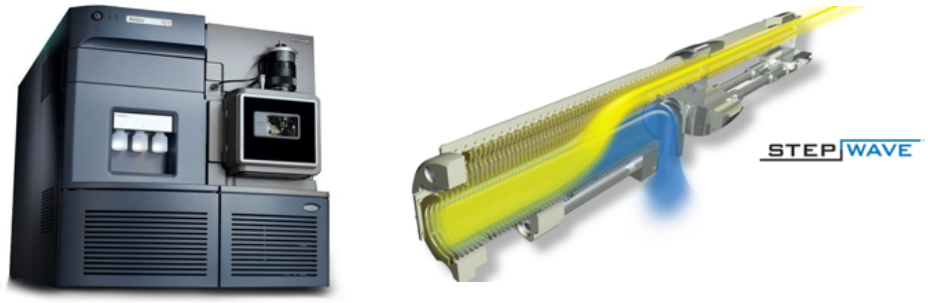

图2. Waters Xevo TQ-S及StepWave技术。

Compound	Parent m/z	Cone Voltage	Daughters	Collision Energy	Ion Mode
IS	471.09	22	605.91	12	ES+
	471.09	22	597.20	16	ES+
	471.09	22	548.89	14	ES+
	471.09	22	465.09	12	ES+

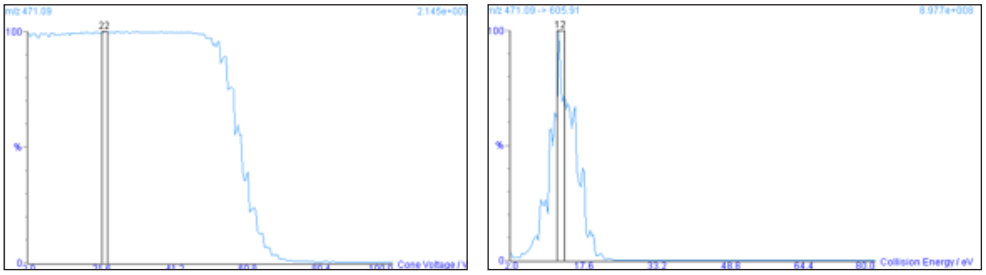

图3. IntelliStart软件优化的MRM结果。

1.3 优化胰蛋白酶的酶解条件

在胰蛋白酶酶解条件的选择时，我们优化了三个条件：英夫利昔与酶的比例（5:1, 10:1, 20:1和50:1），酶解时间（0.5 hr, 0.75 hr, 1 hr, 2 hr, 3 hr, 4 hr）和温度（37 ℃, 50 ℃）。结果表明, 在英夫利昔与酶的比例为10:1, 50 ℃酶解1 hr的酶解效率最好（结果见图4和5）。

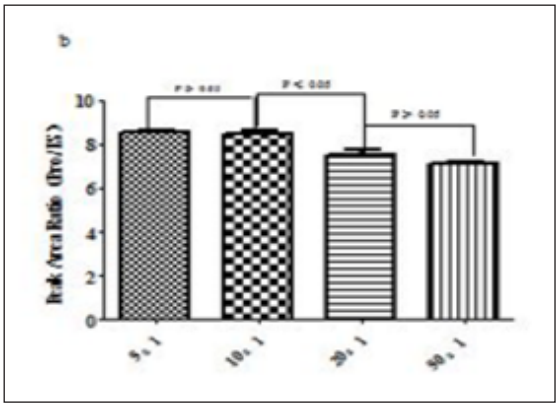

图4. 英夫利昔与酶的比例的考察结果。

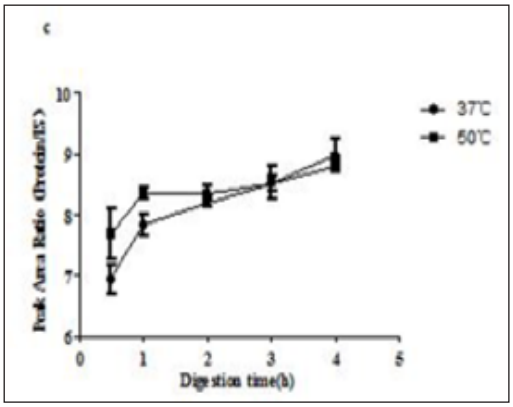

图5. 不同温度和不同酶解时间的考察结果。

液相方法的建立

血清中英夫利昔酶解后的组分非常复杂，为了更好地进行分离，我们使用了150 mm的沃特世肽分析专用柱开发了超高效液相分离（图6）。此方法不仅有效地将特征性肽段与血清中的干扰有效分离，且系统残留很小，满足定量的要求。

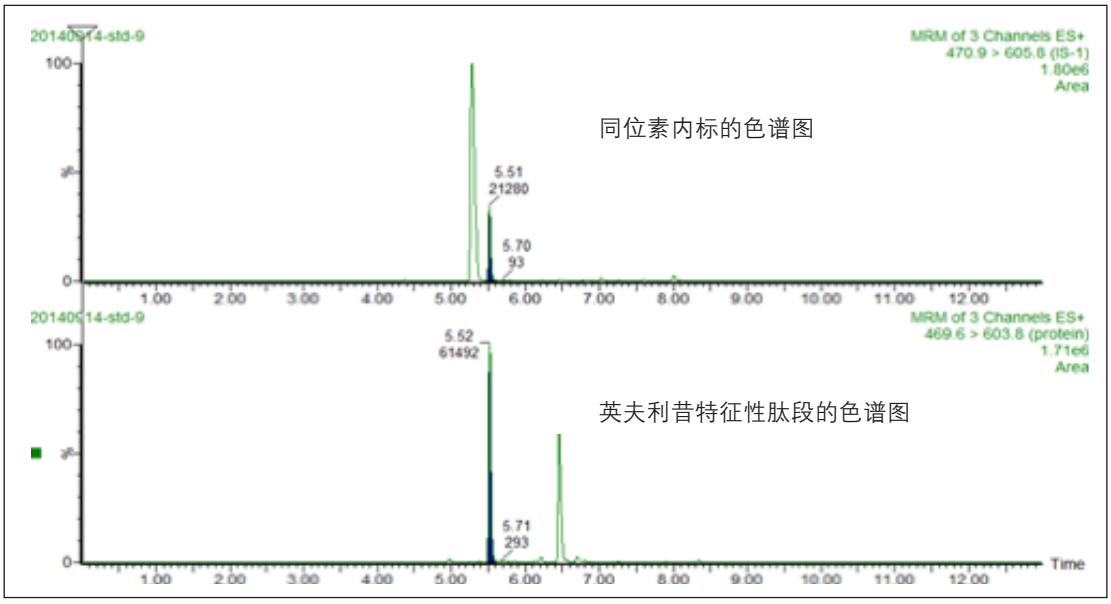

图6. 特征性肽段和同位素内标的特征性色谱图。

方法学验证

我们对此方法进行了方法学验证，包括：

- 定量下限及线性范围、专属性、残留、日内精密度和日间精密度的考察；
- 血浆样品室温放置1天的稳定性，血浆样品三次冻融的稳定性；
- 血浆样品处理后4 ˚C 放置1天的稳定性，血浆样品处理后4 ˚C 放置2天的稳定性。

2.1 定量下限及线性范围

英夫利昔在人血清中的定量下限为0.39 μg/mL，信噪比为13（见图7），线性范围为0.39-100 μg/mL，线性拟合r2=0.9924（见图8）。

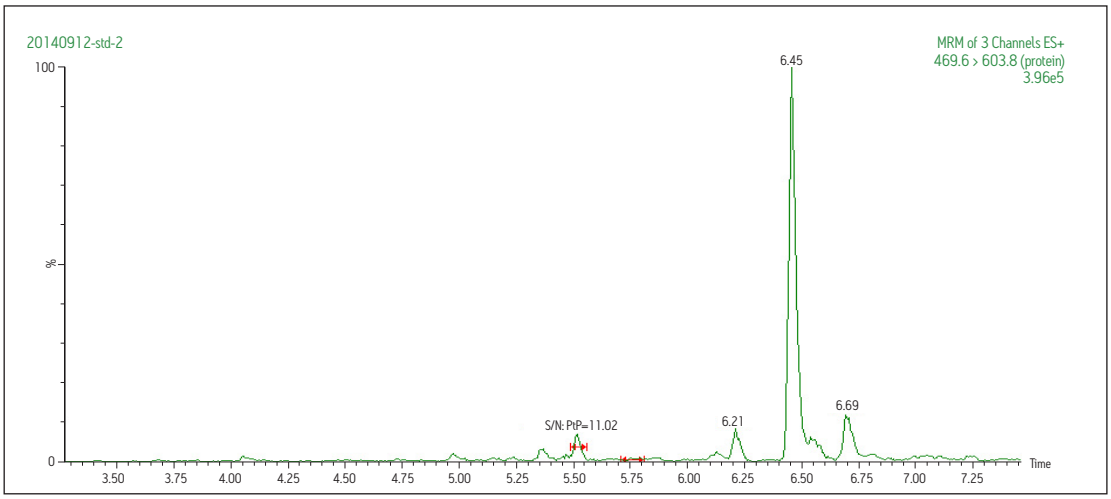

图7. 定量下限的谱图及信噪比。

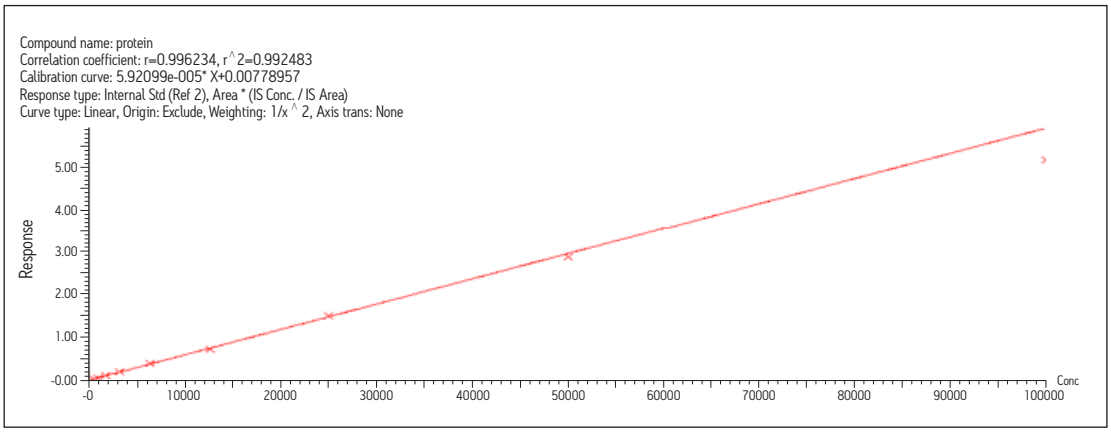

图8. 线性拟合结果。

2.2 专属性

使用6个不同人的空白血浆样本进行处理，得到空白血清处理后的样本，进行专属性的考察。实验证明，6个不同人的空白血浆中不存在特征性肽段的干扰（见图9）。

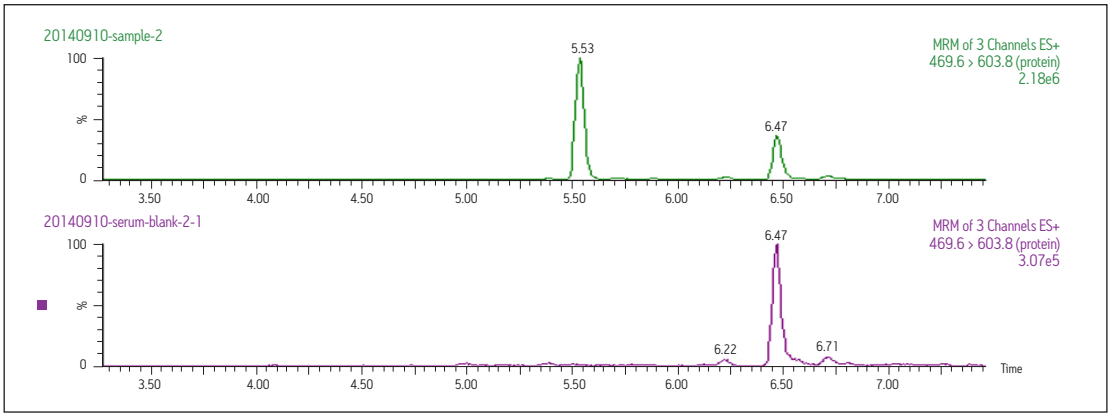

图9. 空白血清样本处理后与加标后的血清样本的比较。

2.3 日内日间准确度和精密度

取空白血清配制的最低定量限，低、中、高4个浓度质控样品连续进样三天（0.39 μg/mL，1 μg/mL，9 μg/mL和80 μg/mL），连续测定三天，根据当日的标准曲线，计算QC样品的测得浓度。根据QC样品结果计算本法的准确度与精密度，每一浓度水平的QC样品，日内精密度（RSD）均小于8.5%（表1），日间精密度（RSD）均小于13%，准确度（Dev.）在15 %之间（最低定量下限满足20%的要求）。

2.4 血清样品放置及血清样品处理后的稳定性

本实验考察了英夫利昔血清样品室温放置1天，血清样品-20 ℃冻融三次的稳定性，血清样品处理后4 ℃放置2天和血清样品处理后室温放置2天的稳定性。稳定性考察时，每一浓度水平至少进行三样本分析。结果表明英夫利昔血清样品室温放置1天和-20 ℃冻融三次是稳定的; 血清样品处理后4 ℃放置2天和室温放置2天是稳定的。

样品测定

用本方法测定了来自4个人的48个样本，并将测定的药时曲线与ELISA测定的药时曲线进行了比较，结果表明，两种方法测得的药时曲线一致（图10）。

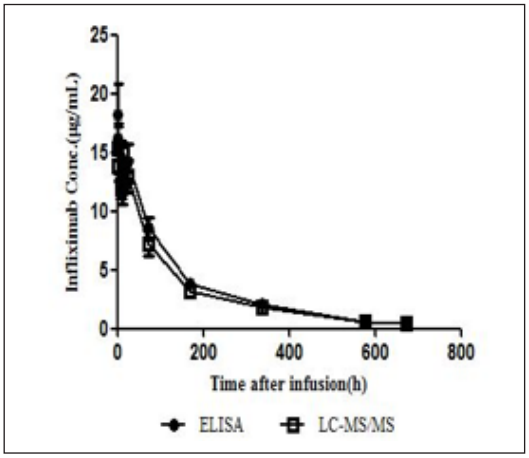

图10. ELISA与液质联用（UPLC-MSMS）测得的药时曲线的比较。

结论

本文使用ACQUITY UPLC I-Class和Xevo TQ-S结合沃特世蛋白定量分析的创新性解决方案， 建立了单克隆抗体英夫利昔的液质连用方法，并进行了方法学验证，此方法的定量下限为0.39 μg/mL。使用此液质联用方法测定了单克隆抗体英夫利昔的48个临床样本（来自 4 个人），并将定量结果与ELISA进行比较。结果表明，两种方法测得的药时曲线一致。

相比于传统的ELISA方法，基于UPLC® -MSMS系统建立的蛋白生物定量分析方法成本低，效率高，其必将成为单克隆抗体药物研发中的有力工具。

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters，The Science of What's Possible，ACQUITY UPLC，UPLC和Xevo是沃特世公司的注册商标。
StepWave和IntelliStart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。印制于中国。

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 6555
成都：028 - 6578 4990
香港：852 - 2964 1800

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