

基于 nSMOL 技术和 Skyline 软件的曲妥珠单抗 LC-MS/MS 定量分析方法开发

LCMSMS-243

摘要： 本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 与 Skyline 软件联用建立曲妥珠单抗定量分析方法。通过 Skyline 软件完成 MRM 通道的设计和方法的输出，LabSolutions 基于 Skyline 导出的 MRM 分析方法，进行肽段筛选、碰撞能量优化，最终确认曲妥珠单抗的特征肽段及其对应的 MRM 离子对。基于以上所建立的方法，本文完成血浆中曲妥珠单抗药物的定量分析方法开发，定量特征肽段为 IYPTNGYTR(542.80>404.70)，线性范围为 0.122 µg/mL~125 µg/mL。

关键词： 三重四极杆质谱 Skyline 曲妥珠单抗 定量分析

曲妥珠单抗是一种抗 Her2 的重组 DNA 衍生的人源化单克隆抗体，它通过将自己附着在 Her2 上来阻止人体表皮生长因子在 Her2 上的附着，从而阻断癌细胞的生长，曲妥珠单抗还可以刺激身体自身的免疫细胞去摧毁癌细胞。随着曲妥珠单抗在临床的广泛应用，对该药物在人体血浆中定量检测的精密度和准确度要求也日益提高。

随着液相色谱和质谱技术以及生物样品分离技术的发展，LC-MS/MS 定量技术在蛋白质定量研究中的应用日益广泛。相对于传统的免疫分析方法（例如 ELISA），LC-MS/MS 定量技术提高了蛋白分析的精密度和准确度。基于质谱法的蛋白定量在抗体药物临床前及临床研究中受到越来越多的关注，为了使蛋白质定量技术与药物研究和临床检验更加紧密结合，岛津公司将其超快速液相色谱 - 质谱联用平台和强大的定量蛋白质组学软件 Skyline 集成一体。根据蛋白质序列和用户自定义，Skyline 软件可以用来设计、改善以及优化选择反应监

测 (SRM)/ 多反应监测 (MRM)、全扫描质谱和串联质谱定量法。Skyline 软件不仅将结果和方法优化结合起来，也为蛋白质定量的研究工作提供了标准化的工作流程。同时岛津研发工程师们为简化复杂生物基质中抗体药物的定量分析工作，对抗体药物前处理过程进行了独特的设计，发明了 nSMOL 前处理试剂包，该方法能够有效富集血浆 / 血清中的抗体药物，实现 Fab 区域的选择性酶解，提高酶解效率，极大降低了酶解产物的复杂性，对于复杂生物基质中抗体药物的准确定量提供了非常有利的工具。

本文基于岛津 LCMS-8060 液质联用系统，通过 Skyline 设计完成 MRM 通道的优化，实现抗体药物定量及定性肽段的初步筛选，进一步通过血浆样品的分析，挑选特异性的定量和定性肽段，完成 LCMS 方法结合 nSMOL 前处理技术定量分析血浆中曲妥珠单抗的方法开发工作。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.82 SP1 色谱工作站，Skyline Ver.3.5.0.9319 软件。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱: Waters BEH Peptide C18 2.0 mm I.D.
× 150 mm L., 1.7 μm(方法开发)/Inertsil
Sustain Swift C18 Column(2.1 mm I.D.
×50 mm L., 1.9 μm)(定量分析)

流动相: A相 -0.1% 甲酸水溶液
B相 -0.1% 甲酸乙腈

流速: 0.4 mL/min

柱温: 40°C

进样量: 10 μL

肽段筛选洗脱条件:

梯度洗脱, B相初始浓度为 5%, 洗脱程序
0.0-3.0 min, 5%; 3.0-35.0 min, 5%~40%;
35.0-37.5 min, 40%~95%; 37.5~45.0 min, 95%;
45.5-50.0 min, 5%

定量分析洗脱条件:

梯度洗脱, B相初始浓度为 1%, 流速
0.4 mL/min; 洗脱程序 0.00-1.50 min, 1%;

1.50-5.00 min, 1%~30%; 5.02-5.83 min, 95%;

5.85~7.00 min, 1%; 0-5.01 min, 0.4 mL/min;

5.03-6.20, 1 mL/min; 6.20-7.00 min, 0.4 mL/min

质谱条件

分析仪器: LCMS-8060

离子化模式: ESI(+)

离子源接口电压: 1.0 kV

加热气: 空气 15.0 L/min

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 5.0 L/min

碰撞气: 氦气

源温度: 300°C

DL 温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 17 ms

延迟时间: 3 ms

定量分析 MRM 参数: 见表 1

1.3 样品前处理过程

肽段筛选和 MRM 通道构建:

10 μg/mL 曲妥珠单抗标准品, 按照 nSMOL 试剂盒样品前处理过程进行曲妥珠单抗酶解, 获得的酶解混合物直接上机分析。

血浆中曲妥珠单抗的定量分析:

配制曲妥珠单抗血浆基质标准曲线: 浓度分别为 0.122、0.244、0.488、0.975、1.95、3.90、7.80、15.6、31.3、62.5、125 μg/mL, 按照 nSMOL 试剂盒操作步骤进行样品前处理, 获得的酶解混合物直接上机分析。

表1 MRM参数(曲妥珠单抗定量分析方法)

肽段选择	MRM 通道[m/z]	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)	肽段作用
	415.70→660.30*	-16.0	-15.0	-34.0	
GLEWVAR	415.70→531.30	-16.0	-16.0	-40.0	定性肽段
	415.70→345.20	-16.0	-20.0	-24.0	
	485.15→721.30*	-19.0	-18.0	-38.0	
FTISADTSK	485.15→608.30	-19.0	-20.0	-32.0	定性肽段
	485.15→521.20	-19.0	-21.0	-26.0	
	542.80→404.70*	-20.0	-18.0	-30.0	
IYPTNGYTR	542.80→808.40	-20.0	-18.0	-28.0	定量肽段
	542.80→610.30	-20.0	-25.0	-22.0	
	512.10→292.30*	-38.0	-20.0	-20.0	
P14R (IS)	512.10→389.30	-38.0	-16.0	-28.0	内标
	512.10→757.50	-38.0	-19.0	-38.0	
	512.10→660.40	-38.0	-17.0	-24.0	
	512.10→563.30	-38.0	-17.0	-40.0	

注: *表示定量离子

结果讨论

2.1 曲妥珠单抗特征肽段的筛选

利用 Skyline 软件预测曲妥珠单抗特征肽段的操作流程如图 1 所示。将 Skyline 软件预测的曲妥珠单抗的离子对列表直接导入到 LabSolutions 中建立完整的 LC-MS/MS 方法(图 2), 利用该方法分析检测曲妥珠单抗酶解产物(见图 3), 然后将分析结果导入 Skyline 软件, 排查色谱峰, 删除未检出肽段, 结果如图 4 所示。

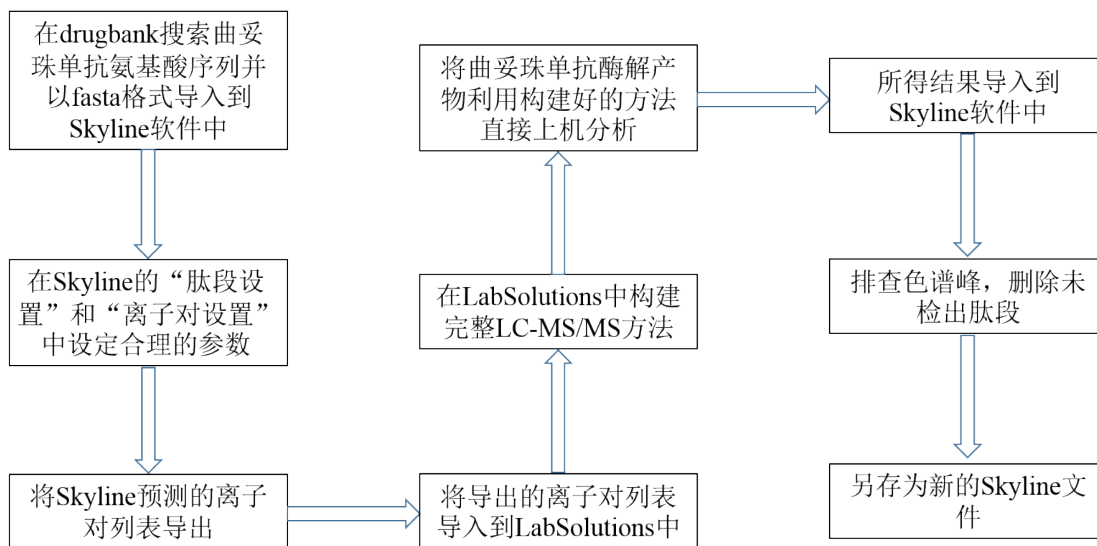


图1 Skyline软件预测曲妥珠单抗特征肽段的操作流程

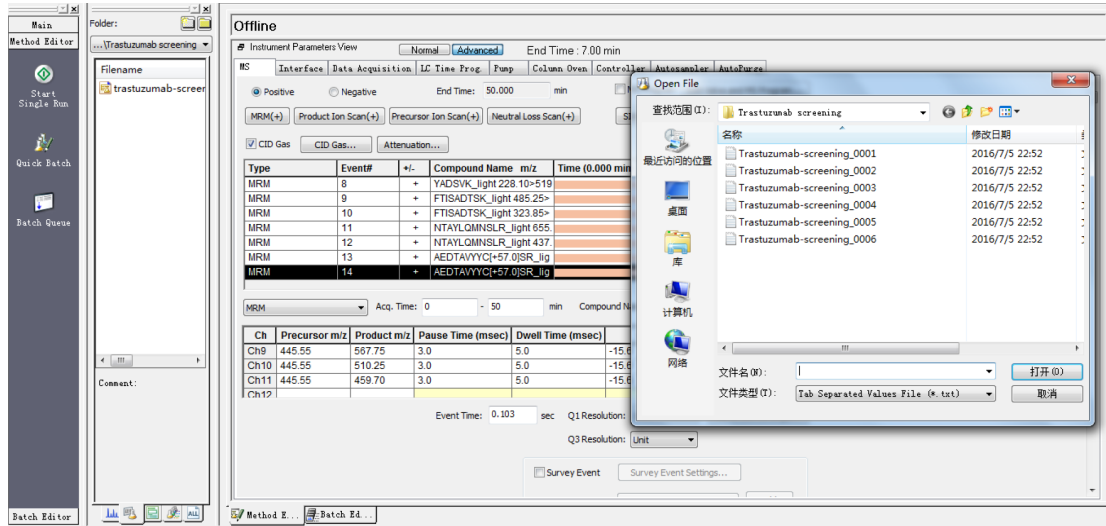


图2 将Skyline预测的离子对列表信息导入LabSolutions构建完整的LC-MS/MS方法

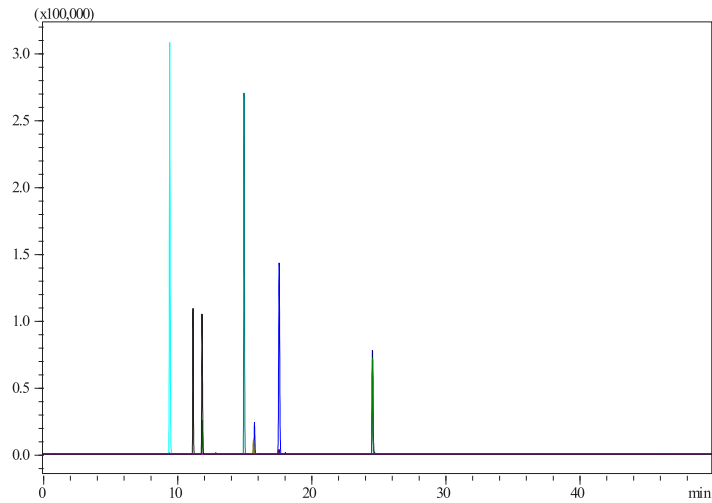


图3 肽段筛选获得的MRM色谱图

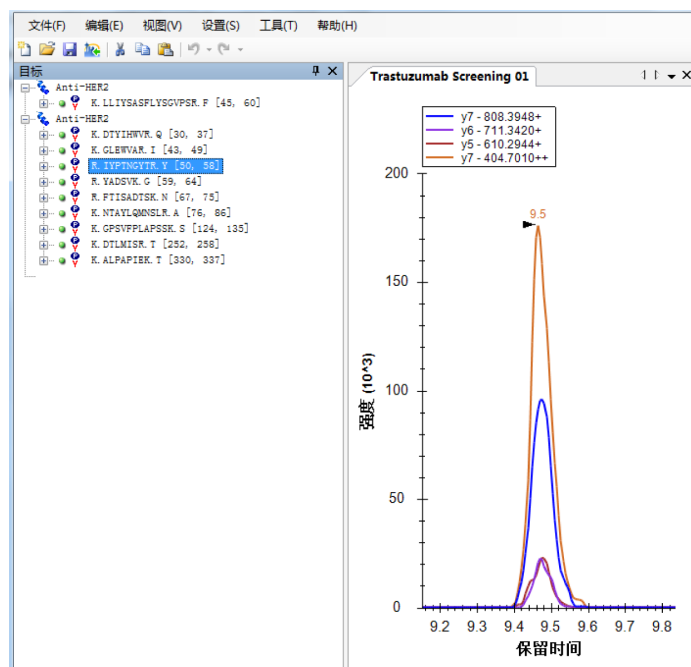


图4 筛选结果导入Skyline文件后的检出肽段确认

2.2 碰撞能量优化

将 Skyline 软件中的导出参数设置为“预定模式”、“碰撞能量优化”，导出 MRM 离子对列表，基于筛选时采用的液相分离条件，同步对已筛选的 10 个肽段的 MRM 通道进行碰撞能量优化，LCMS-8060 能够实现 Dwell time 最小 0.8 ms，Pause time 最小 1.0 ms 的设置，极大地提高了 MRM 通道的单次分析通量，曲妥珠单抗的 10 个肽段 MRM 通道碰撞能量同步进行优化。将 LabSolutions 的分析结果导入 Skyline 软件，对碰撞能量优化结果进行确认，碰撞能量优化过程重复 1 次，不同能量下所选择肽段的 MRM 通道面积变化重复性良好 (见图 5)，最终根据两次分析的平均值导出含有最佳碰撞能量值的 MRM 离子对列表 (见表 2)。表 2 中所涉及到曲妥珠单抗相关肽段中与 Fab 区域相关的特征肽段包括 LLIYSASFLYSGVPSR、DTYIHWVR、IYPTNGYTR、GLEWVAR、YADSVK、FTISADTSK、NTAYLQMNSLR、GPSVFPLAPSSK；与 Fc 区域相关的特征肽段包括 DTLMISR、ALPAPIEK。根据抗体药物的结构特点，绝大多数抗体药物的保守区域氨基酸序列差异较小，可变区域的氨基酸序列具有较大差异。在 LCMS 定量分析目标蛋白方法开发的过程中，主要工作即是挑选出目标蛋白的特异性肽段，该实验利用 nSMOL 技术处理样品，该技术利用纳米颗粒表面固定化胰酶技术实现抗体药物的 Fab 区域的选择性酶解，所筛选出的 10 个肽段中有 8 个位于 Fab 区域，从而极大地降低了酶解产物的复杂性，大大缩小了目标肽段的筛选范围，充分体现了 nSMOL 技术的高选择性。因此利用 nSMOL 前处理可以简化 LCMS 方法开发阶段的筛选过程，提高方法开发的速度。

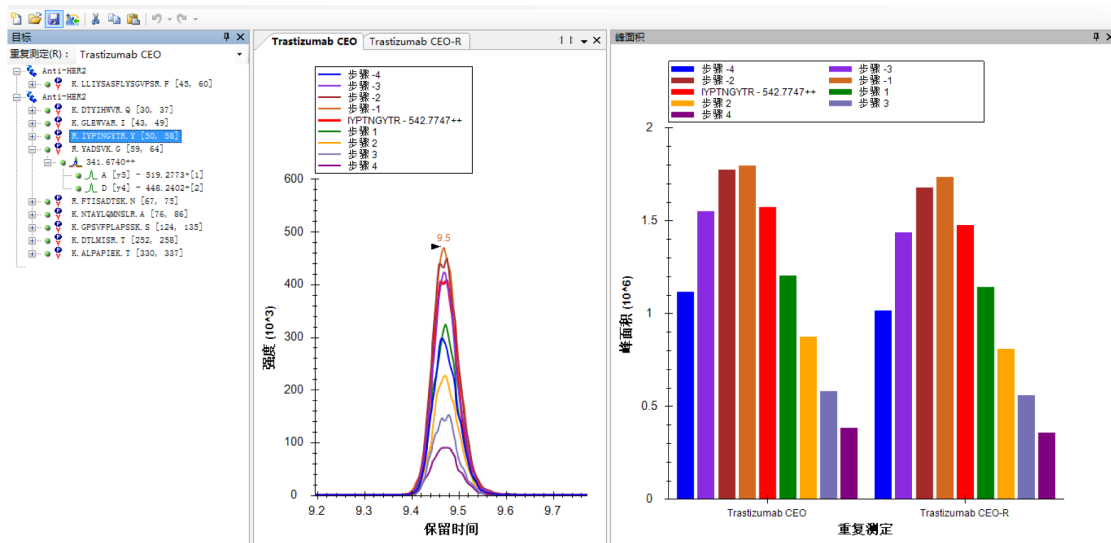


图5 Skyline软件进行碰撞能量优化结果查看

表2 MRM参数(Skyline筛选最佳碰撞能量肽段列表)

肽段选择	前体离子	产物离子	CE (V)	肽段归属
LLIYSASFLYSGVPSR	886.98	1270.64 [y12+]	-33.0	VL/CDR2
	[M+2H] ²⁺	359.20 [y3+]	-27.0	
	591.66	765.39 [y7+]	-19.1	
	[M+3H] ³⁺	602.32 [y6+]	-21.1	
DTYIHWVR	363.85 [M+3H] ³⁺	359.20 [y3+]	-15.1	VH/CDR1
		597.32 [y4+]	-18.6	
		460.27 [y3+]	-14.6	
		487.76 [y7++]	-14.6	
GLEWVAR	415.73 [M+2H] ²⁺	437.24 [y6++]	-10.6	VH/CDR2
		660.35 [y5+]	-16.1	
		531.30 [y4+]	-16.1	
IYPTNGYTR	542.77 [M+2H] ²⁺	808.39 [y7+]	-19.2	VH/CDR2
		711.34 [y6+]	-27.2	
		610.29 [y5+]	-25.2	
		404.70 [y7++]	-17.2	
YADSVK	341.67 [M+3H] ²⁺	519.28 [y5+]	-15.2	VH/Fab
		448.24 [y4+]	-13.2	
FTISADTSK	485.25 [M+2H] ²⁺	721.37 [y7+]	-14.9	VH/Fab
		608.29 [y6+]	-18.9	
		521.26 [y5+]	-18.9	
NTAYLQMNSLR	655.83 [M+2H] ²⁺	1024.52 [y8+]	-23.7	VH/Fab
		861.46 [y7+]	-25.7	
		748.38 [y6+]	-23.7	
GPSVFPLAPSSK	593.83 [M+2H] ²⁺	846.47 [y8+]	-19.2	CH1/Fab
		699.40 [y7+]	-21.2	
		418.23 [y4+]	-29.2	
DTLMISR	418.22 [M+2H] ²⁺	619.36 [y5+]	-16.2	CH2/Fc
		506.27 [y4+]	-16.2	
ALPAPIEK	419.75 [M+2H] ²⁺	654.38 [y6+]	-14.3	CH2/Fc
		486.29 [y4+]	-20.3	
		327.69 [y6++]	-14.3	

2.3 血浆中曲妥珠单抗定量分析结果

利用 Skyline 软件导出含最佳碰撞能量的 MRM 列表, 构建 LC-MS/MS 方法, 根据蛋白定量特异性原则选择 CDR 区域的 GLEWVAR、FTISADTSK、IYPTNGYTR 作为特征肽段进行定量分析, 定量分析的典型色谱图如图 6 所示, 在 0.122~125 $\mu\text{g/mL}$ 范围内 IYPTNGYTR 具有良好的线性关系, 标准曲线见图 7。实验结果证明通过 Skyline 筛选出的特征肽段在生物基质中满足特异性要求, 其中 IYPTNGYTR 灵敏度较高, 作为定量肽段; GLEWVAR 和 FTISADTSK 具有较好的选择性, 可作为定性肽段进行分析。

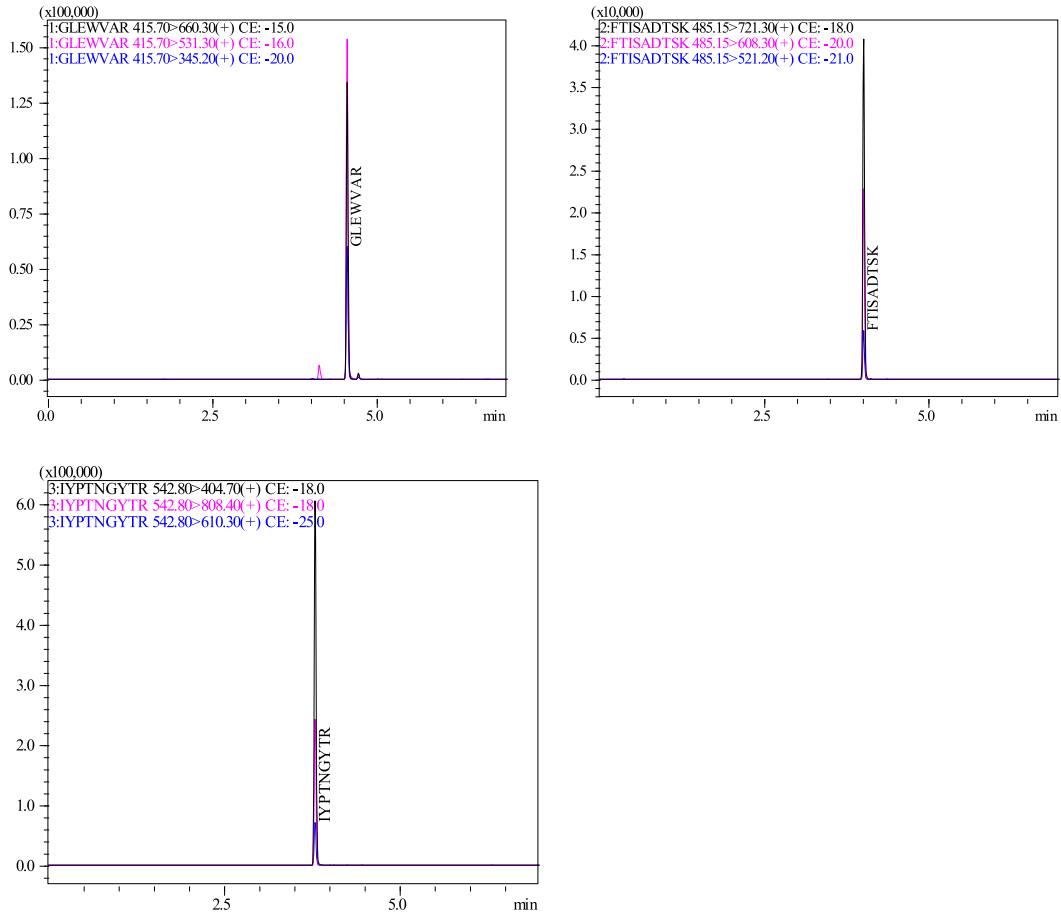


图6 血浆中曲妥珠单抗nSMOL前处理后LC-MS/MS分析获得的典型色谱图

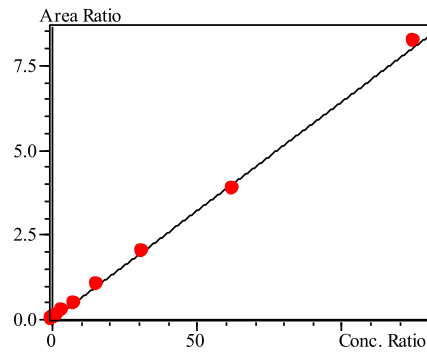


图7 曲妥珠单抗定量检测的标准曲线 (IYPTNGYTR (542.80>404.70))

表3 标准曲线的线性方程和相关系数

抗体药物名称	肽段信息	校准曲线	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	相关系数 r	准确度(%)
曲妥珠单抗	IYPTNGYTR(定量)	$Y = (0.0644864)X + (-0.00317900)$	0.122~125	0.9995	91.5~114.0

■ 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 与 Skyline 软件联用建立血浆中曲妥珠单抗定量分析的工作流程。结合 nSMOL 前处理技术, 实现抗体药物 Fab 区域选择性酶解, 从而显著降低了方法开发的复杂程度。在本实验筛选阶段, 共有 10 个肽段具有明显的色谱峰, 其中 8 条肽段与曲妥珠单抗的 Fab 区域相关, 而曲妥珠单抗具有代表性的特异性肽段集中于 Fab 区域, 充分体现了 nSMOL 技术的高选择性, 从而极大地降低了酶解产物的复杂性, 提高方法开发的速度。实验通过 Skyline 软件完成 MRM 通道的设计和方法的输出, LabSolutions 基于 Skyline 导出的 MRM 分析方法, 进行肽段筛选、碰撞能量优化, 最终确认曲妥珠单抗的特征肽段及其对应的 MRM 离子对。基于以上所建立的方法, 本文完成血浆中曲妥珠单抗药物的定量分析方法开发, 定量特征肽段为 IYPTNGYTR(542.80>404.70), 线性范围为 0.122 $\mu\text{g/mL}$ ~125 $\mu\text{g/mL}$ 。