

Application News

No. C130

LC/MS
Liquid Chromatography Mass Spectrometry

使用 Skyline 创建单克隆抗体的 MRM 方法

Development of MRM Methods for Monoclonal Antibodies Using Skyline

在抗体药物的血药浓度定量分析中，使用配体结合的传统方法进行测定时，必须针对目标药物制备具有高度特异性和亲和性的检测抗体，并且确立分析方法也需要耗费大量的时间和费用。而使用 LC/MS/MS 进行分析，由于不需要制备抗体，不仅大幅度缩短了分析方法的创建时间，还可以降低成本。本文向您介绍使用 Skyline 软件¹⁾和 LCMS-8050/8060 创建 MRM 方法，对生物样品中的单克隆抗体进行特异性检测的分析示例。

免疫球蛋白的基本结构是由分子量约 23,000Da 的轻链和分子量 50,000~70,000Da 的重链构成，不同物种之间氨基酸序列保持一致称为保守区域，各抗体分子中不同氨基酸序列部分被称为可变区。在可变区中，规定抗原识别特异性的区域被称为互补决定区 (CDRs)。该区域在抗体分子间的氨基酸序列存在多样性。免疫球蛋白中，重链和轻链分别含有 3 处 CDRs (图 1、2)，为了将血液样品中的抗体药物等单克隆抗体与内源性抗体区分开定量，必须选择性地检测 CDRs。

1) Skyline 是由华盛顿大学的 MacCoss Lab of Biological Mass Spectrometry 开发的软件。

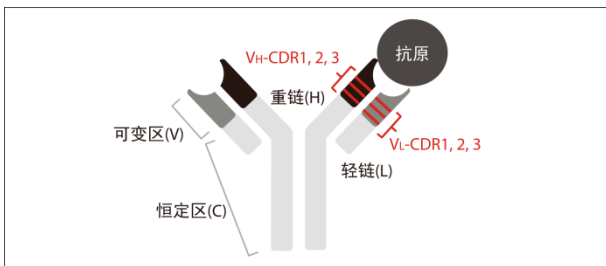


图 1 免疫球蛋白的结构和互补性决定区 (CDRs)
Structure of Immunoglobulin and Complementarity Determining Regions (CDRs)

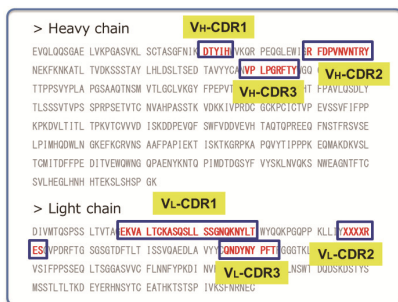


图 2 β 淀粉样蛋白抗体 (6E10) 的氨基酸序列和 CDRs
Amino Acid Sequences and CDRs in β-Amyloid Antibodies (6E10)

将全长单克隆抗体的氨基酸序列信息 (FASTA 文件) 导入到 Skyline 中，预测因酶解产生的肽碎片。然后选择位于 CDRs 的肽

肽段，并将所有预测的离子对和碰撞能量作为 LabSolutions LCMS 的分析方法进行输出。

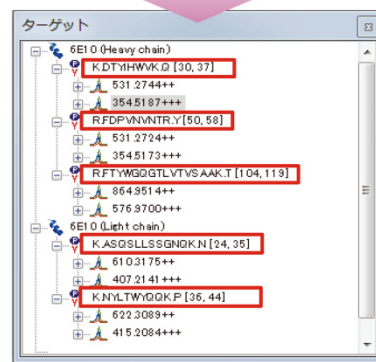
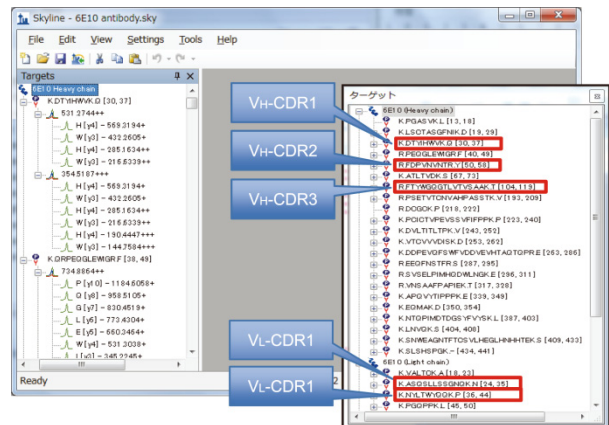


图 3 使用 Skyline 创建分析方法 (选择含 CDRs 的胰酶酶解后肽段)
Creating Analysis Methods Using Skyline
(Selecting Trypsin Digestion Fragments Containing CDRs)

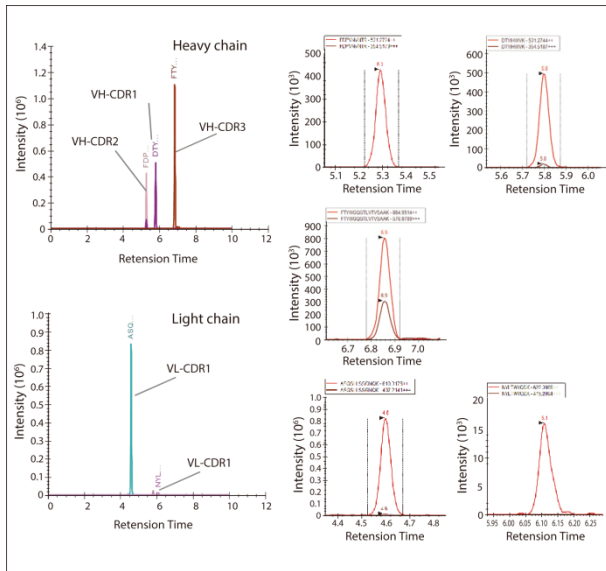
■ 使用 Skyline 软件创建含 CDRs 的胰酶酶解后肽段 MRM 方法

Development of MRM Method for Trypsin Fragment Containing CDR Using Skyline Software

本文向您介绍使用 LCMS-8060/8050 的 LC/MS/MS 法和 Skyline¹⁾ 软件，对生物样品中单克隆抗体进行特异性检测创建肽的 MRM 方法和绘制标准曲线。只要有标准样品和氨基酸序列 (含 CDRs) 的信息，通过组合 Skyline 和 LCMS-8060/8050，即可在短时间内以较低的成本开发抗体药物的定量方法。

由于蛋白质分子量较大，进行 LC/MS 分析时，通常使用蛋白酶使其成为碎片。为了使用 MRM 对生物样品中的蛋白质进行选择测定，必须选择具有特异氨基酸序列的多肽片断酶解片段作为目标。

在此，以含有β淀粉样蛋白抗体（6E10）CDRs的多肽碎片为目标，使用经胰蛋白酶酶解的单克隆抗体标准样品创建了分析方法。使用 Skyline 软件和导入单克隆抗体的氨基酸序列，即可预测酶解产生的多肽氨基酸序列（图3）。此外，还可以预测多肽的母离子和碰撞能量以及因碰撞产生的子离子。根据上述预测信息，将位于 CDRs 区域的多肽片断的最佳仪器参数作为 LabSolutions LCMS 方法进行输出。

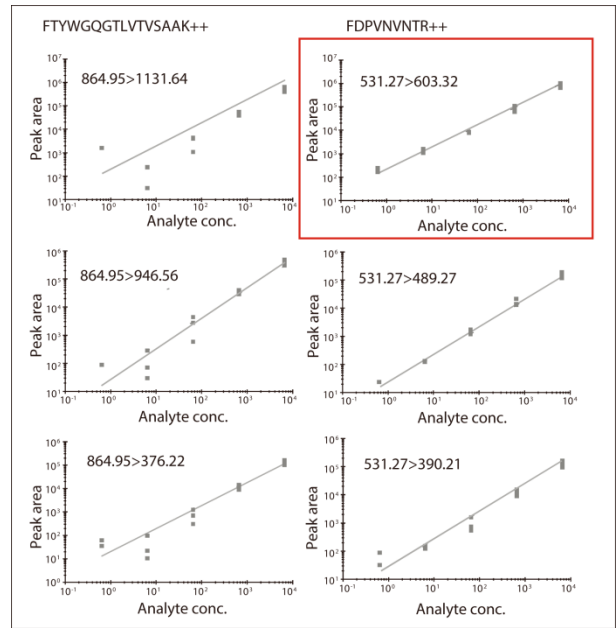


a) 分别对检测到的肽进行强度比较对前体离子的不同电荷数和子离子进行强度比较，选择了高灵敏度的目标离子。

■ 使用 LCMS-8050/8060 和 Skyline 软件以优化分析方法

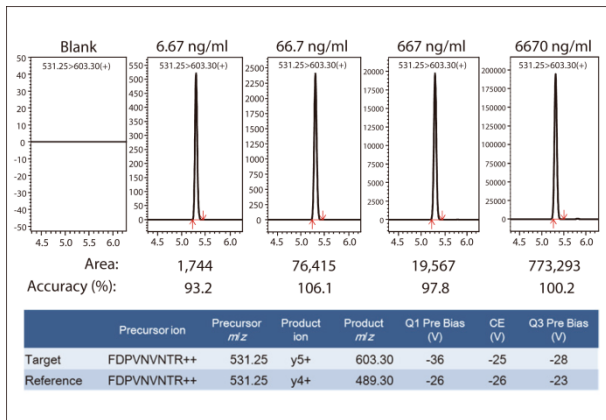
Optimization of Analytical Method Using a Combination of the LCMS-8050/8060 and Skyline Software

使用创建的分析方法测定经胰蛋白酶酶解的单克隆抗体。测定后数据文件将直接导入到 Skyline，并自动选择高灵敏度的肽碎片和定量灵敏度高的离子对（图4），由此筛选最佳定量分析条件。因此，LCMS-8050/8060 和 Skyline 软件的组合使用，缩短定量分析方法的建设时间。

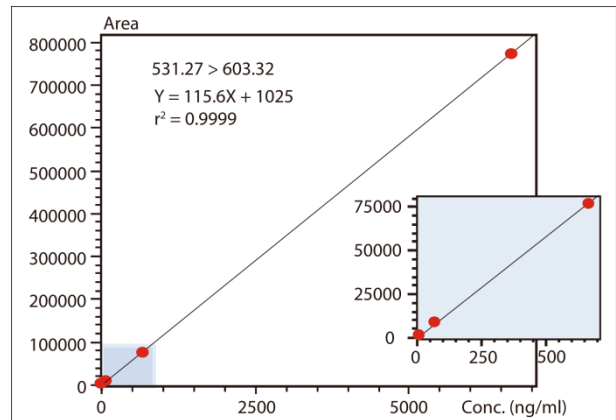


b) 各离子对的标准曲线的比较选择了动态范围较大的 531.27>603.32。

图4 使用单克隆抗体标准品（6E10）的胰蛋白酶解样品检测含 CDRs 的多肽片断（使用 Skyline 进行数据分析）
Detection of Trypsin Fragments Containing CDR1-3 Using Standard Monoclonal Antibodies (6E10) Subjected to Trypsin Digestion (Data Analysis by Skyline)



a) 代表性的含 CDRs 肽的 MRM 色谱
b) 代表性的含 CDRs 肽的分析参数



c) 可简单选择检测灵敏度、直线性、动态范围良好的分析条件

图5 使用单克隆抗体标准品（6E10）的胰蛋白酶解样品的分析结果
Analysis Results Using Standard Monoclonal Antibodies (6E10) Subjected to Trypsin Digestion

综上所述，使用 Skyline 创建的分析方法对单克隆抗体系列标准样品进行 MRM 测定。结果表明，在 6.67~6670 ng/mL（Injection vol.: 30 μL）范围内得到了精确度良好的标准曲线。

注) · 本应用报告中记载的产品并非并非为经国内相关法律批准和认证的医疗器械。
· 请勿将本应用报告中记载的分析方法用于诊断目的。



岛津企业管理（中国）有限公司
岛津（香港）有限公司

http://www.shimadzu.com.cn

用户服务热线电话： 800-810-0439
400-650-0439

免责声明：

※ 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；
※ 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2016年5月