

免疫亲和富集-超高效液相色谱-质谱法检测人血浆中阿达木单抗浓度

丁肖梁^{1,2}, 朱圣雄^{1,2}, 刘林生^{1,2}, 刘筱雪^{1,2}, 缪丽燕^{1,2*} (1. 苏州大学附属第一医院药学部, 江苏 苏州 215006; 2. 苏州大学药物研究与转化交叉研究所, 江苏 苏州 215006)

摘要:目的 基于超高效液相色谱-四极杆-静电轨道阱-高分辨质谱(UPLC-Q Exactive-Orbitrap MS)平台联合免疫亲和富集策略建立一种高效的阿达木单抗血药浓度定量分析方法。方法 采用高分辨质谱的全扫描/二级离子扫描模式筛选候选特征肽,采用平行反应监测模式对特征肽进行定量分析;前处理采用蛋白 A 免疫磁珠捕获人血浆中免疫球蛋白和治疗性抗体,蛋白经高温变性和胰酶酶解成多肽后通过质谱分析;采用同位素标记的阿达木单抗作为内标。结果 筛选得到位于阿达木单抗重链可变区 GLEWVSAITWNSGHIDYADSVEGR 肽段具有较好的特异性和选择性,可作为阿达木单抗定量分析的特征肽段。阿达木单抗在 1~32 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内呈良好的线性关系,精密度、准确度和总误差均符合验证要求。31 个临床真实样本同时采用该质谱方法和酶联免疫吸附试验(ELISA)方法检测,Passing-Bablok 回归显示两种方法检测结果相关性较好,两种方法的浓度差均值为 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结论 本研究建立了一种可用于抗体药物定量分析的通用型免疫亲和和质谱方法,阿达木单抗血药浓度的质谱方法经验证可适用于临床样本检测。

关键词:阿达木单抗;质谱;治疗药物监测

doi:10.11669/cpj.2025.01.009 中图分类号:R969 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2025)01-0071-06

Determination of Adalimumab in Human Plasma by Immuno-Affinity Enrichment and UPLC-Q Exactive-Orbitrap MS

DING Xiaoliang^{1,2}, ZHU Shengxiong^{1,2}, LIU Linsheng^{1,2}, LIU Xiaoxue^{1,2}, MIAO Liyan^{1,2*} (1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China; 2. Institute for Interdisciplinary Drug Research and Translational Sciences, Soochow University, Suzhou 215006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an efficient method for quantification of adalimumab in human plasma based on UPLC-Q Exactive-Orbitrap MS platform combined with immuno-affinity enrichment strategy. **METHODS** Candidate surrogate peptides were screened by full MS/ddMS² and the selective surrogate peptide was quantitatively analyzed by parallel reaction monitoring. Immunoglobulins and therapeutic antibodies in human plasma were extracted by magnetic beads coupled with protein A. The proteins were denatured at high temperature and digested by trypsin. Stable-isotope labeled adalimumab was used as internal standard. **RESULTS** The peptide GLEWVSAITWNSGHIDYADSVEGR in variable region of adalimumab heavy chain was selected as signature peptide, showing specificity and selectivity. Adalimumab demonstrated good correlation within the range of 1-32 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Precision, accuracy and total error all met the verification requirements. Thirty-one clinical samples had measurable adalimumab concentrations by the established method and ELISA method, yielding a good correlation. The mean of difference between the two methods was 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. **CONCLUSION** The universal immuno-affinity mass spectrometry method established in the study is suitable for quantification of therapeutic antibodies, and can accurately and precisely determine adalimumab concentration, which provides a strategy for clinical monitoring.

KEY WORDS: adalimumab, mass spectrum, therapeutic drug monitoring

治疗性单克隆抗体是当前生物药物中最重要的一大类药物,已经成为临床治疗的重要手段,尤其在抗肿瘤和自身免疫性疾病治疗中发挥了重要的作用^[1]。修美乐(阿达木单抗)和免疫检查点抑制剂可瑞达(帕博利珠单抗)年销售额都突破了 200 亿美元。

随着临床应用越来越广泛,单抗药物治疗后出现疗效丢失或疾病进展得到了广泛的关注,这与血药浓度有着紧密的联系,比如:阿达木单抗已在多种炎症性疾病中被证实其血药浓度丢失与应答丢失密切相关^[2-4],免疫检查点抑制剂阿替利珠单抗治疗肝细胞

基金项目:国家自然科学基金青年项目资助(82003857);苏州市姑苏卫生人才计划项目资助(GSW2019001)

作者简介:丁肖梁,男,博士,副主任药师 研究方向:临床药理学 * **通讯作者:**缪丽燕,女,博士,教授,主任药师,博士生导师
研究方向:临床个体化给药 Tel:(0512)67972858

癌的临床队列中观察到药物浓度不充分伴随了更低的应答率和更差的无进展生存期^[5]。肿瘤坏死因子 α 抑制剂进行治疗药物监测(therapeutic drug monitoring, TDM)得到了指南推荐^[6-8],通过血药浓度可有效识别患者应答丢失的原因和后续治疗决策。

酶联免疫吸附试验(ELISA)是最常用的抗体药物定量分析方法,通过抗原抗体结合和酶催化反应来检测目标分析物的浓度,需要特异性的识别抗体才能保证方法的特异性和抗干扰能力,因此ELISA方法开发过于依赖关键试剂,针对单个药物的检测均需要进行关键试剂的筛选,方法的开发周期较长。质谱法作为小分子药物定量分析的金标准,在蛋白质类药物定量分析中已展现出特有的优势。质谱法定量分析单抗浓度主要是通过监测单抗药物经酶解后的特征肽,肽段具有更好的质谱兼容性,可确保分析方法的特异性和灵敏度。当前已报道了多种质谱法用于单抗药物定量分析的检测方案^[9-10]。单抗药物的质谱方法开发对于技术要求仍然较高,包括酶解前处理方案优化、特征肽选择和质谱方法优化等环节。因此,本研究以阿达木单抗作为研究对象,采用IgG免疫亲和纯化策略,并联合超高效液相色谱-四极杆-静电轨道阱-高分辨质谱(UPLC-Q Exactive-Orbitrap MS)平台,旨在建立一种高效的通用型实验方案用于单抗药物的定量分析。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Q Exactive™ Plus 组合型四极杆 Orbitrap™ 质谱仪(美国 ThermoFisher 公司),Vanquish 超高效液相色谱仪(美国 ThermoFisher 公司),ACQUITY UPLC® Peptide BEH C18 色谱柱(美国 Waters 公司),XS105 电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司),金属恒温混匀仪(型号:TS100,杭州瑞诚仪器),微孔板恒温振荡器(型号:BE-9008,海门市其林贝尔公司),磁性分离器(苏州海狸生物公司)。

1.2 试剂

阿达木单抗(修美乐,美国 AbbVie 公司),Si-Lu™ MAb Adalimumab Stable-Isotope Labeled Monoclonal Antibody (SIL-ADL, MSQC11, 美国 Sigma-Aldrich 公司),阿达木单抗独特型抗体(产品号:A01954,江苏金斯瑞生物公司),SMART Digest™ 胰蛋白酶试剂盒(60109-103,美国 ThermoFisher 公司),胰蛋白酶(产品号:V5117,美国 Promega 公司),蛋白 A 琼脂糖磁珠(产品号:70814,苏州海狸

生物公司),磷酸盐缓冲液(上海生工生物公司),碳酸氢铵(美国 Sigma-Aldrich 公司)。

2 方法

2.1 色谱条件

流动相 A 为含体积分数 0.1% 甲酸的超纯水,流动相 B 为含体积分数 0.1% 甲酸的乙腈,流速为 $0.35 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温箱温度为 $60 \text{ }^\circ\text{C}$,进样器温度为 $4 \text{ }^\circ\text{C}$,进样体积 $5 \text{ } \mu\text{L}$,洗脱程序为:0~2 min,5% B;2~8 min,5%→20% B;8~11 min,20%→38% B;11~13 min,38%→90% B;13~15 min,90% B;15~16 min,90%→5% B;16~18 min,5% B。

2.2 质谱条件

电喷雾离子源正离子模式,肽图分析扫描方式为全扫描/二级离子扫描(Full MS/ddMS²),定量分析扫描方式为平行反应监测模式(parallel reaction monitoring, PRM),喷雾电压为 3 800 V,鞘气流速为 30,辅助气流速为 15,离子传输管温度为 $320 \text{ }^\circ\text{C}$,辅助气加热温度为 $350 \text{ }^\circ\text{C}$,碰撞能量为 23(肽图分析)和 27(定量分析)。定量特征肽段母离子和子离子分别 888.42 和 1 039.98,内标肽段母离子和子离子分别为 891.76 和 1 044.99。

2.3 阿达木单抗工作溶液

用磷酸盐缓冲液稀释阿达木单抗注射液至质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备液,用人空白混合血浆稀释储备液得到校正标样和质控样品,校正标样质量浓度依次为:0.5(锚定点)、1、2、4、8、16、32 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,质控样品质量浓度分别为:1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 定量下限(lower limit of quantification, LLOQ)、3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 低质控(low quality control, LQC)、12 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 中质控(medium quality control, MQC)和 24 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 高质控(high quality control, HQC)。

2.4 内标工作溶液

采用适量体积分数 0.1% 甲酸溶液溶解内标冻干粉,配置成 $200 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内标储备液于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冻存;实验当天用超纯水稀释至 $5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标工作液。

2.5 样品前处理

精密吸取 $40 \text{ } \mu\text{L}$ 血浆样品或校正标样至深孔板中,每孔加入 $360 \text{ } \mu\text{L}$ 乙酸溶液($300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),混匀震荡 30 min 后依次加入 $96 \text{ } \mu\text{L}$ Tris 缓冲液($1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH = 9.6)、 $20 \text{ } \mu\text{L}$ 内标溶液和 $35 \text{ } \mu\text{L}$ 蛋白 A 磁珠, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 混匀震荡 1 h;采用 $600 \text{ } \mu\text{L}$ 超纯水清洗磁珠 3 次, $80 \text{ } \mu\text{L}$ 碳酸氢铵溶液

(50 mmol · L⁻¹)重悬磁珠后转移至耐高温孔板中,80 °C 1 400 r · min⁻¹震荡混匀加热 30 min;待恢复室温后加入 10 μL 胰酶,60 °C 1 400 r · min⁻¹震荡混匀加热反应 6 h;反应结束后磁性分离取上清 65 μL,加入 7 μL 体积分数 10% 甲酸终止反应,吸取适量溶液于进样小瓶中待测。

2.6 方法学验证

参照《生物样品定量分析方法指导原则》和行业白皮书的要求^[11],对方法进行验证。验证条目包括:特异性与选择性、标准曲线与定量范围、精密度与准确度和基质效应。

2.7 临床样本

收集接受阿达木单抗治疗的强直性脊柱炎患者,采集共 31 份血样。EDTA 抗凝管采集患者静脉血 1 ~ 2 mL,1 500 × g 离心 10 min,取上清血浆冻存。研究经苏州大学附属第一医院伦理委员会批准(2021 伦审批第 078-1 号),患者均被充分告知并签署知情同意书。

3 结果

3.1 方法建立

3.1.1 特征肽 开发质谱方法检测单抗药物的关键之一在于选择合适的定量特征肽。阿达木单抗经酶解后产生多肽混合物,相比于小分子药物的质谱方法开发策略要复杂。采用 UPLC-Q Exactive-Orbitrap MS 的 Full MS/dd-MS² 模式可以实现肽段混合物的分离和鉴定,得到质谱肽图。通过 BioPharma FinderTM 软件进行肽图分析与肽段归属匹配,轻链覆盖度为 68.2%,重链覆盖度为 77.1%。以文献中常用的阿达木单抗特征肽 APYTFGQGTK (APY 肽段) 为例(图 1)^[12],肽段归属后可获得该肽段的序列信息、带电荷数以及子离子信息。选择 4 条位于互补决定区的无修饰肽段进行后续方法开发,肽段信息如下:APYTFGQGTK (APY 肽段,轻链 A94-K103, M/Z: 535.268 9), LLIYAASLTQSGVPSR (轻链 L46-R61, M/Z: 559.318 2), GLEWWSAITWNSGHIDYADSVEGR (GLE 肽段,重链 G44-R67, M/Z: 888.418 3), VSYLSTASSLDYWGQGLTVTVSSASTK (重链 V99-K125, M/Z: 937.135 3)。针对候选特征肽,可直接转换 PRM 模式优化碰撞能量参数建立质谱检测方法,其中 APY 肽段和 GLE 肽段具有较稳定的质谱信号。方法专属性实验中发现人空白血浆在 APY 肽段通道中出现了干扰信号,从而限制了检测灵敏度。GLE 肽段具有较好的特异性,进入后续开发和验证。

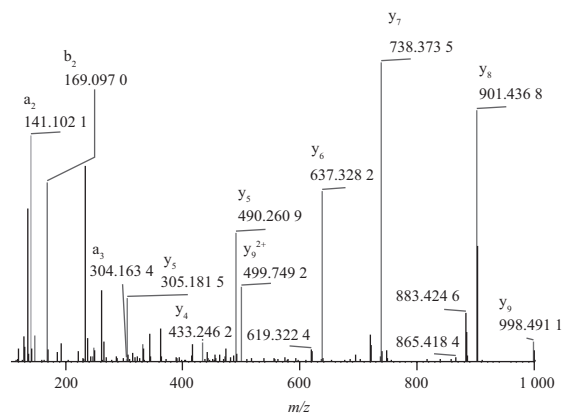


图 1 阿达木单抗特征肽段 APYTFGQGTK 带双电荷时所产生的碎片离子

Fig. 1 Fragment ions produced by APYTFGQGTK signature peptide with double charge of adalimumab

3.1.2 前处理方法 酶解前处理是获得肽段的关键。为了尽可能简化前处理操作和实现方法普适性,选择蛋白 A 磁珠亲和富集人血浆中 IgG。考察磁珠环境下直接酶解相比于捕获洗脱后酶解具有更高和更稳定的回收率。为了实现蛋白充分酶解,本研究对比了磁珠富集后蛋白直接酶解、还原烷基化处理后酶解以及高温变性后酶解等方式,结果显示磁珠富集后经高温(80 °C, 30 min, 1 400 r · min⁻¹震荡)变性后酶解(60 °C, 6 h, 1 400 r · min⁻¹震荡)可获得较高的质谱信号。采用较低的酶量(1 μg)可实现预期的检测灵敏度。考察样本中抗药抗体对阿达木单抗检测的影响,添加相同浓度的抗药抗体不会影响药物浓度检测,5 倍于药物浓度的抗药抗体会抑制约 30% 的信号,通过乙酸酸解处理可去除抗药抗体干扰。

3.2 方法验证

3.2.1 特异性和选择性 选择 6 个不同个体的空白血浆样品经处理后分析,在 GLE 肽段及内标离子通道均无法提取到色谱峰。采用个体的空白血浆配制 LLOQ 样品经处理后分析可提取色谱图,出峰时间为 12.07 min,峰形良好,无干扰,仅有 1 份血浆配制的 LLOQ 样品检查偏差超过 25%。图 2 为典型色谱图。

3.2.2 标准曲线 以校正标样理论浓度为横坐标,以特征肽与内标肽峰面积之比为纵坐标作图,采用最小二乘法进行线性回归(1/y 加权)。结果显示阿达木单抗在 1 ~ 32 μg · mL⁻¹ 浓度内呈现较好的线性关系($r^2 > 0.99$),各个浓度样本的偏差在 -12.16% ~ 19.38% 之间。

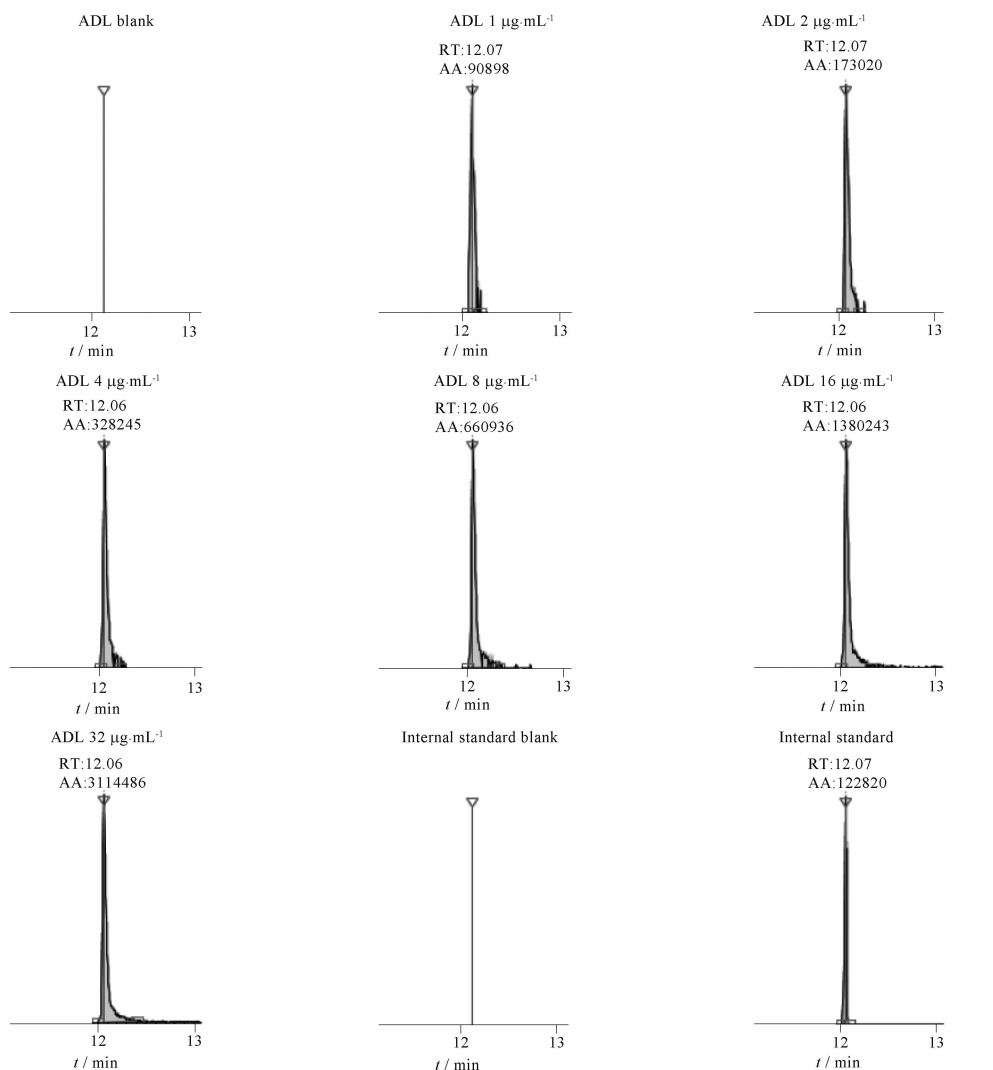


图2 阿达木单抗特征肽和内标特征肽的典型色谱图

Fig. 2 Representative chromatograms of surrogate peptides of adalimumab and internal standard

3.2.3 准确度和精密度 分别配制各浓度水平的质控样品,包含4个浓度水平,每个水平重复5次,在不同天内进行3个分析批实验,各个水平质控样品的批内批间精密度、准确度以及总误差结果见表1。

3.2.4 基质效应 用6个不同来源的人血浆或磷酸盐缓冲液为基质分别配制浓度为LQC和HQC的质控样品,每个浓度每个基质各配制3个样本。人血浆基质样本与磷酸盐缓冲液样本的特征肽峰面积的比值评价基质效应。人血浆中阿达木单抗LQC基质效应为94.37%,HQC基质效应为80.16%,变异系数(CV)分别为0.15%和11.73%。

3.3 检测方法比对

采用本研究建立的质谱方法检测31个真实临床样本,样本同时采用自建ELISA方法检测^[13],采用相同的阿达木单抗校正标样和质控样品。如图3所示,Passing-Bablok回归显示2种方法检测结果相关性较

好,呈对角线两边均匀分布,未显示出明显的系统偏差,2种方法的质量浓度差均值为 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (95%置信区间为 $-2.3 \sim 3.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

4 讨论

本研究建立了一种IgG免疫亲和富集前处理和高分辨质谱法用于检测人血浆中阿达木单抗浓度,方法稳健,操作简单,适用于生物样本分析。免疫亲和策略联合高分辨质谱可实现快速的定量分析方法开发,是一种高效的分析策略,在未获得关键试剂的情况下适用于IgG类型单抗药物的生物分析方法开发和应用。尽管已经在肽段水平进行分析,质谱定量分析蛋白质的检测灵敏度仍然难以匹敌免疫学检测模式,本研究检测灵敏度为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,不及ELISA方法,因此质谱对定量分析体内浓度较低的药物时则是一个挑战。

表 1 阿达木单抗在不同浓度水平准确度和精密度以及总误差
Tab. 1 Accuracy, precision and total error of adalimumab at different concentration levels

Statistic indicators	LLQC	LQC	MQC	HQC
	1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	12 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	24 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
Batch 1	1.027	2.780	11.063	23.120
	1.008	2.724	11.555	23.507
	0.929	2.633	11.225	23.352
	0.960	2.814	10.707	22.994
	1.037	2.969	10.814	24.558
Ave/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.99	2.78	11.07	23.51
CV/%	4.65	4.46	3.05	2.64
RE/%	-0.78	-7.20	-7.73	-2.06
(CV + RE)/%	5.43	11.66	10.78	4.70
Batch 2	1.099	2.932	11.188	23.772
	1.013	2.911	11.275	23.323
	1.037	2.544	10.602	24.286
	0.983	2.588	10.573	21.720
	1.050	2.755	10.383	23.268
Ave/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	1.04	2.75	10.80	23.27
CV/%	4.18	6.51	3.70	4.13
RE/%	3.64	-8.47	-9.97	-3.03
(CV + RE)/%	7.82	14.97	13.67	7.15
Batch 3	0.900	3.503	13.030	20.474
	0.795	2.377	9.926	28.980
	0.815	2.405	13.971	28.530
	0.782	2.876	12.835	20.387
	0.837	2.940	12.396	20.483
Ave/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.83	2.82	12.43	23.77
CV/%	5.62	16.37	12.18	19.15
RE/%	-17.42	-5.99	3.60	-0.95
(CV + RE)/%	23.04	22.36	15.78	20.11
Inter run Ave/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.95	2.78	11.44	23.52
Inter run CV/%	10.80	9.86	9.88	10.71
Inter run RE/%	-4.85	-7.22	-4.70	-2.01
Inter run (CV + RE)/%	15.66	17.08	14.58	12.72

注: Ave - 平均值; CV - 变异系数; RE - 相对偏差。

Notes: Ave - average value; CV - coefficient of variation; RE - relative deviation.

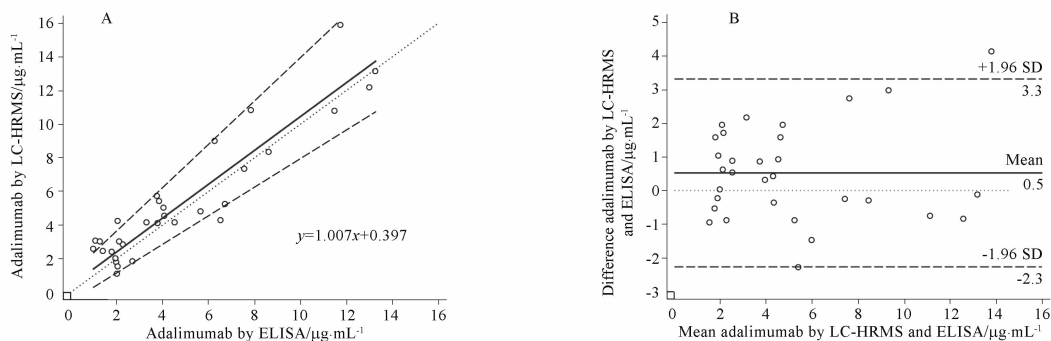


图 3 高分辨质谱法和酶联免疫法检测阿达木单抗血药浓度的 Passing-Bablok 回归分析(A)和 Bland-Altman 分析(B)

Fig. 3 Passing-Bablok regression plot(A) and Bland-Altman analysis(B) of adalimumab concentrations measured by LC-HRMS and ELISA

同位素标记的蛋白药物是最佳选择,可充分地监控酶切过程、前处理过程和质谱分析过程,但可商品化

特征肽的选择是定量分析抗体药物的关键环节,往往考虑以下几个要素:①选择位于单抗药物互补决定区的肽段,保证分析方法的特异性;②尽可能避免易携带翻译后修饰的氨基酸和序列,保证分析方法的重复性;③序列长度合适,在质谱中具有较好的检测信号,保证分析方法的灵敏度。高分辨质谱在特征肽的开发和定量分析方法转化中展现出了优越性。Full MS/dd-MS²扫描模式属于传统的数据依赖采集(DDA),通过全扫描和丰度较高的母离子进行碎裂和二级离子扫描,全扫描和二级扫描匹配,数据易于分析和搜库比对。PRM 技术利用了四级杆质量分析器的高选择性,监测候选肽段母离子信息,随后通过 Orbitrap 的高分辨率获得母离子的二级全扫描谱图,通过匹配离子对提取色谱峰定量分析待测物。综合采用高分辨质谱 DDA 模式开发候选特征肽段,以及 PRM 模式定量分析特征肽,流程简单,可大大地加快单抗药物定量分析质谱方法的开发。

阿达木单抗经免疫磁珠捕获后直接在磁珠中高温变性和酶切,该方法适用于 IgG 类型的单抗药物,联合质谱的多通道特点,可适用于多种药物的同时检测。前处理过程简单,磁性分离操作高效,可实现 96 孔板操作和半自动化,减少操作中的人为误差。相比于传统的蛋白沉淀富集和特异性结合试剂富集^[14],IgG 富集策略兼具了蛋白纯化特异性和方法通用性,同时也可减少还原烷基化处理过程。正向富集策略大大降低了基质复杂度,本研究未观察到血浆中富集待测物后影响质谱检测信号,不同基质之间变异性在可接受范围内。简便、通用型的操作过程也给内标的选择带来了一些获益。蛋白质定量分析的内标有多种选择,为了全程监控检测方法,

以考虑用作内标^[10]。单抗药物在循环中主要以游离形式存在,同时有部分以结合物的形式存在,比如与抗药抗体结合^[15]。检出浓度是何种形式往往是根据纯化富集方式推测,以特异性结合试剂捕获认为检测到游离浓度,以 IgG 富集或是沉淀后酶解处理认为检测到总浓度。研究提出抗药抗体结合药物后会减弱药物的检出,采用酸解或是表面活性剂处理可克服干扰^[16-17]。

自建的质谱方法与自建 ELISA 方法呈现较好的相关性,两者之间的偏差不足以对临床决策造成困扰。因此,本研究建立了一种可靠的、通用型的质谱方法用于抗体药物的定量分析,阿达木单抗血药浓度的质谱方法经验证可适用于临床 TDM。

REFERENCES

- [1] LYU X, ZHAO Q, HUI J, *et al.* The global landscape of approved antibody therapies[J]. *Antib Ther*, 2022, 5(4):233-257.
- [2] BARTELD S G M, KRIECKAERT C L, NURMOHAMED M T, *et al.* Development of antidrug antibodies against adalimumab and association with disease activity and treatment failure during long-term follow-up[J]. *JAMA*, 2011, 305(14):1460-1468.
- [3] DING X, ZHU R, WU J, *et al.* Early adalimumab and anti-adalimumab antibody levels for prediction of primary nonresponse in ankylosing spondylitis patients[J]. *Clin Transl Sci*, 2020, 13(3):547-554.
- [4] POUW M F, KRIECKAERT C L, NURMOHAMED M T, *et al.* Key findings towards optimising adalimumab treatment: the concentration-effect curve[J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(3):513-518.
- [5] KIM C, YANG H, KIM I, *et al.* Association of high levels of antidrug antibodies against atezolizumab with clinical outcomes and T-cell responses in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *JAMA Oncol*, 2022, 8(12):1825-1829.
- [6] FEUERSTEIN J D, NGUYEN G C, KUPFER S S, *et al.* American gastroenterological association institute guideline on therapeutic drug monitoring in inflammatory bowel disease[J]. *Gastroenterology*, 2017, 153(3):827-834.
- [7] MITREV N, VANDE CASTEELE N, SEOW C H, *et al.* Review article: consensus statements on therapeutic drug monitoring of anti-tumour necrosis factor therapy in inflammatory bowel diseases[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2017, 46(11/12):1037-1053.
- [8] KRIECKAERT C L, VAN TUBERGEN A, GEHIN J E, *et al.* EULAR points to consider for therapeutic drug monitoring of biopharmaceuticals in inflammatory rheumatic and musculoskeletal diseases[J]. *Ann Rheum Dis*, 2022.
- [9] CHIU H H, LIAO H W, SHAO Y Y, *et al.* Development of a general method for quantifying IgG-based therapeutic monoclonal antibodies in human plasma using protein G purification coupled with a two internal standard calibration strategy using LC-MS/MS[J]. *Anal Chim Acta*, 2018, 1019:93-102.
- [10] EL AMRANI M, DONNERS A A M, HACK C E, *et al.* Six-step workflow for the quantification of therapeutic monoclonal antibodies in biological matrices with liquid chromatography mass spectrometry-A tutorial[J]. *Anal Chim Acta*, 2019, 1080:22-34.
- [11] JENKINS R, DUGGAN J X, AUBRY A F, *et al.* Recommendations for validation of LC-MS/MS bioanalytical methods for protein biotherapeutics[J]. *AAPS J*, 2015, 17(1):1-16.
- [12] EL AMRANI M, BOSMAN S M, EGAS A C, *et al.* Simultaneous quantification of free adalimumab and infliximab in human plasma using a target-based sample purification and liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Ther Drug Monit*, 2019, 41(5):640-647.
- [13] ZHU S X, DING X L, WU J, *et al.* Establishment of a single bioanalysis method of adalimumab reference and its biosimilars for similarity assessment[J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 2023, 58(9):818-822.
- [14] JOSSET L, HODIN S, DELINGER S, *et al.* Development of simple and rapid method for Emicizumab quantification by LC-MS/MS in human plasma[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2023, 223:115163.
- [15] KUANG B, KING L, WANG H F. Therapeutic monoclonal antibody concentration monitoring: free or total? [J]. *Bioanalysis*, 2010, 2(6):1125-1140.
- [16] IWAMOTO N, HAMADA A, SHIMADA T. Antibody drug quantitation in coexistence with anti-drug antibodies on nSMOL bioanalysis[J]. *Anal Biochem*, 2018, 540-541:30-37.
- [17] EWLES M, MANNU R, FOX C, *et al.* LC-MS/MS strategies for therapeutic antibodies and investigation into the quantitative impact of antidrug-antibodies[J]. *Bioanalysis*, 2016, 8(24):2565-2579.

(收稿日期:2024-05-15)