LC-MS/MS 技术在蛋白质药物生物定量分析中的应用进展

宇家仪[1,2]，郝依萌[1,3]，马 璟[1,2]*

（1. 中国医药工业研究总院，上海 201203；2. 上海益诺思生物技术股份有限公司，上海 201203；3. 复旦大学，上海 201203）

摘要：蛋白质药物包括治疗用蛋白质（酶和调节蛋白）、靶向蛋白质（抗体药物）、蛋白质疫苗及诊断用蛋白质等，因特异性强、不良反应小且疗效显著而成为新药研发的热点领域之一。随着蛋白质药物的快速发展，对其生物分析方法也提出了更高的要求。为支持此类药物在药代动力学和毒代动力学方面的研究，需建立更加灵敏、准确和高通量的生物分析方法。近年来，液相色谱 - 串联质谱（LC-MS/MS）技术发展迅速，已成为蛋白质药物定量分析的新方法。该研究介绍了 LC-MS/MS 技术在蛋白质药物定量分析方法中的应用进展，并详细介绍了自下而上分析方法的具体试验流程，为 LC-MS/MS 技术测定蛋白质药物的研究提供了参考。

关键词：蛋白质药物；定量分析；LC-MS/MS

中图分类号：R917 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2022)12-1689-10

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.12.003

Advances in LC-MS/MS for Biological Quantitative Analysis of Protein Drugs

YU Jiayi[1,2], HAO Yimeng[1,3], MA Jing[1,2]*

(*1. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203; 2. Shanghai InnoStar Biotech Co., Ltd., Shanghai 201203; 3. Fudan University, Shanghai 201203*)

ABSTRACT: Protein drugs include therapeutic proteins with enzymatic or regulatory activity, targeted protein such as antibody drugs, protein vaccines and protein diagnostics. Protein drugs have been one of the most focused areas in new drug development due to their strong specificity, slight adverse drug reaction and significant therapeutic effect. With the rapid development of protein drugs, higher requirements are put forward for their bioanalysis methods. To support the research of pharmacokinetics and toxicokinetics, more sensitive, accurate and high-throughput bioanalytical methods need to be established. In recent years, LC-MS/MS has emerged as a promising and versatile tool for quantitative analysis of protein drugs, owing to its rapid development. In this study, the application progress of LC-MS/MS to the quantitative analysis of protein drugs is summarized, and the specific experimental process of bottom-up analysis method in detail is introduced, which provides a reference for the study of LC-MS/MS in the determination of protein drugs.

Key Words: protein drug; quantitative analysis; LC-MS/MS

蛋白质药物包括治疗用蛋白质（酶和调节蛋白）、靶向蛋白质（抗体药物）、蛋白质疫苗及诊断用蛋白质等[1]，其中治疗用蛋白药物及抗体药物的治疗领域主要有恶性肿瘤、自身免疫性疾病、代谢疾病和心血管疾病等[2]。与小分子药物相比，蛋白质药物具有独特的优势，本身及其作用都具有高度的特异性，这使其具有药效准确、不良反应较小的优点，因此备受青睐[3]。2014 至 2021 年美国 FDA 批准上市的所有药物中蛋白质药物占据 27%（96/352），其中单克隆抗体药物占据了蛋白质药物的主要市场，2021 年批准了 8 种单抗药物，约占批准药物总数的 16%（8/50），是所有新药类型中增

收稿日期：2022-03-01

作者简介：宇家仪(1996—)，女，硕士，从事抗体分析研究。

通信作者：马 璟(1963—)，女，研究员，博士生导师，从事药物毒理学/药理学的研究。

E-mail：jingma2019@163.com

长最快的药物[4]。随着蛋白质药物的快速发展，对其生物分析方法也提出了更高的要求，建立一种同时兼顾特异性和精密度、准确度和灵敏度，并且具有高回收率和宽线性范围，还可同时检测及区别药物、代谢产物和干扰物的分析方法，以支持蛋白质药物的药代动力学和毒代动力学研究，对此类药物的研发具有重要意义。传统上，以酶联免疫吸附测定（ELISA）为代表的配体结合试验（ligand-binding assay，LBA）是定量分析抗体及治疗用蛋白药物的主要手段[5—6]。但 LBA 法需要制备特异性抗体，这在药物早期研发阶段是费时且昂贵的[7]。而且，LBA 法不能同时测定药物与代谢物，具有抗原决定簇的代谢片段可能会增加试验结果的误差，并且不同来源的抗体与相同蛋白的反应可能有较大的差异[8]。此外，基质的干扰以及抗药抗体（antidrug antibody，ADA）的存在都会影响 LBA 法定量的准确性[9]。尽管这些基于抗体 - 配体结合原理的技术非常灵敏，但其存在的局限性促进了研究者对替代检测平台的探索。目前，基于液相色谱 - 串联质谱（LC-MS/MS）技术分析检测大分子蛋白质药物具有独特优势，受到越来越多的关注[10]。与传统 LBA 法相比，LC-MS/MS 法有几个重要的优点[11]，首先，LC-MS/MS 法基本不需要制备特异性抗体，方法开发时间可短至几天或几周，开发成本较低；其次，LC-MS/MS 法具有更高的特异性，可抵抗目标蛋白类似物的干扰，还可检测蛋白质的降解产物及其翻译后修饰物（post-translational modifications，PTMs）；此外，LC-MS/MS 法的线性范围更宽，也更易在不同基质和种属之间进行方法转移[12—13]。近年来，随着 LC-MS/MS 技术的日臻成熟，该方法已经成为一种很有前景的 LBA 定量分析蛋白质药物的替代或补充方法，并已成功应用于多种治疗用蛋白药物及抗体药物的定量分析。本研究将对基于 LC-MS/MS 技术的蛋白质药物生物定量分析方法进行综述，包括自上而下（top-down）、自中而下（middle-down）以及自下而上（bottom-up）3 种不同的分析策略，并详细介绍目前较为常用的自下而上分析方法的具体试验流程。

1　基于 LC-MS/MS 技术的蛋白质药物生物定量分析方法概述

与 LBA 法相比，LC-MS/MS 法的优势在于可以实现多种分析物的同时定量，并且无基质和种属依赖性。但是，LC-MS/MS 法的样品制备过程复杂、步骤烦琐，因此在方法开发过程中，必须对每一步进行充分验证。采用 LC-MS/MS 方法对蛋白质药物进行定量分析，大体上可以分为自上而下、自中而下和自下而上 3 种蛋白质组学方法。

1.1　自上而下和自中而下的定量分析法

自上而下和自中而下的定量分析法是使用高分辨质谱（high resolution mass spectrometry，HRMS），如离子阱质谱或飞行时间质谱，对完整和半完整的蛋白质进行定量分析的方法。由于省去了蛋白质展开及酶解步骤，可直接进行质谱分析，使生物分析工作流程更快，理论上还可获得更完整的生物信息。

自上而下的 LC-MS/MS 技术可对完整的蛋白质进行定量分析。在这种方法中，选择完整蛋白质的离子作为用于碰撞诱导解离（collision-induced dissociation，CID）的母离子，然后选择合适的碎片离子在质谱多反应监测（multiple reaction monitoring，MRM）模式中进行定量分析，但是通过 CID 将相对分子质量超过 10^4 的完整蛋白质片段化是极其困难的[14]。并且，由于治疗性蛋白药物的结构与内源性 IgG 蛋白相似，在样品前处理过程中必须使用抗特异性抗体或配体进行蛋白纯化。

采用自中而下的方法对蛋白质药物进行生物学分析包括铰链消化以及去糖基化 2 种方法。铰链消化是指对抗体的铰链区进行特定位点的酶切后再对抗体还原处理，产生约 2.5×10^4 的 3 个重复亚单元（Fc/2 片段、Fab 轻链和 Fab 重链，各 2 条），而后采用 HRMS 进行定量分析[15]。另一种方法是采用 *N*- 糖酰胺酶 F 对蛋白质进行去糖基化处理以简化蛋白质的电荷包膜来获得更高的检测信号[16]。

此外，在药代动力学研究中，动物体内药代和毒代的研究过程中通常需要更低的定量下限（lower limit of quantitation，LLOQ），如 0.1 ng/ml 或更低[17]。受限于 LLOQ 的要求，自上而下以及自中而下的定

量分析方法未能获得广泛应用[18]。

1.2 自下而上的定量分析法

目前，基于LC-MS/MS技术的大分子蛋白药物定量分析较常用的方法是自下而上分析法，可在蛋白药物肽段水平进行定量。相较于自上而下和自中而下分析法，在肽段水平的定量检测只需要在低分辨的三重四极杆质谱仪上即可实现。自下而上的LC-MS/MS法试验流程包括特征肽段（signature peptide）的选择、内标（internal standard，IS）的选择、LC-MS/MS条件优化、样品前处理、酶解条件优化和方法学验证。下面将详细介绍以上试验流程的具体内容。

2 自下而上的LC-MS/MS法试验流程

2.1 特征肽段的选择

自下而上分析方法最重要的一步在于选择特征肽段作为目标蛋白药物的替代分析物，在这一步骤需要明确蛋白药物的肽段序列。目前已经获批上市的蛋白药物肽段序列可在Immunogenetics Information System®（http://www.imgt.org/）或Drugbank（http://www.drugbank.ca）中查询。将目标分析物的序列信息输入PeptideAtlas、Skyline和BLAST（http://blast.ncbi.nlm.nih.gov）等分析软件[19—20]，可预测蛋白药物的特征肽段。然后通过高通量的动态正交阵列优化（orthogonal array optimization，OAO）过程获得所有候选肽段的最佳LC-MS/MS条件。确定LC-MS/MS条件后，在酶解后的基质体系中对所有候选肽段的稳定性和灵敏度进行评估。最后，在稳定的肽段中筛选出信噪比（*S/N*）最高的肽段作为特征肽段。理想的特征肽段应该具备以下性质：可通过酶切方法快速获得，且可重复；在整个分析过程中稳定存在；可在色谱柱上充分保留；在质谱分析过程中易电离[21]。

2.2 内标的选择

为了在生物分析中准确定量蛋白质药物，必须使用内标来校正样品分析中引起变化的各种因素。随着大分子蛋白药物相对分子质量和复杂性的增加，内标的选择也更为困难。目前，BRONSEMA等综述了基于LC-MS/MS技术的蛋白药物定量分析方法中内标选择的策略[22]，后续也有关于内标选择策略的报道[23—24]。在此基础上，本项将详细介绍文献中报道过的内标种类及目前常用的内标选择方法。

2.2.1 蛋白药物的类似蛋白（analogue proteins）

蛋白药物的类似蛋白是常用的目标蛋白纯化及消化过程的内标校正物[25—31]。目标蛋白药物的特征肽段与类似蛋白之间氨基酸序列的相似性决定了校正水平的准确性。然而在酶解过程中，类似蛋白产生的肽段与目标蛋白药物产生的特征肽段仍存在差异，这种差异的存在可能导致对偏差的校正效果并不理想。

2.2.2 稳定同位素标记的（stable isotope-labeled，SIL）蛋白

在LC-MS/MS分析方法中，利用SIL蛋白可对样品的全部预处理和分析过程进行校正，被认为是定量蛋白内标选择的金标准[32]。选择SIL蛋白作为内标的优势在于可以对整个分析过程，包括样品的前处理、酶解以及LC-MS/MS分析进行校准，相较于其他方法，该方法提供了更可靠的试验结果[33—34]。KUHN等在对S100B蛋白进行定量分析时发现，相比于使用SIL肽段作为内标，使用SIL蛋白作为内标可以将准确度从50%提高到98%[35]。但是，制备完全等效的同位素标记蛋白难度大，培养条件的微小差异都会导致糖链或氨基酸修饰上的改变。此外，商业化的同位素标记蛋白价格也十分昂贵，仅有少数同位素标记的单克隆抗体可以购买。目前，受限于同位素标记蛋白的合成难度及成本，此种内标选择方法未被广泛使用。

2.2.3 SIL肽段

SIL肽段是LC-MS/MS方法定量分析蛋白药物最常用的内标[34]。该方法是在选择特征肽段的基础上，将特征肽段中一个或多个氨基酸进行同位素标记，合成SIL特征肽段作为内标。相较于SIL蛋白，SIL肽段的合成更容易且成本较低，一些常见的SIL肽段已实现商业化，这对于蛋白药物定量分析方法的开发更为高效。对于一种蛋白药物定量分析方法的开发，还可以选择多个SIL肽段

作为内标。BUDHRAJA 等开发了一种双稳定同位素标记的（double stable isotope-labeled，dSIL）方法，该方法使用 2 种不同的替代肽作为内标来定量分析 Herclon® 在人血清中的含量，方法学分析表明 Herclon® 在 5 ～ 500 μg/ml 内线性关系良好 [36]。但是，SIL 肽段作为内标时仅对 LC-MS/MS 分析过程具有很好的校正作用，对上游样品的前处理和酶解过程并不能起到校正作用 [34]。此外，该内标策略使用肽段作为定量目标，是在假设样品处理后酶消化效率接近 100%的前提下定量蛋白药物的浓度，但酶消化效率实际很难达到 100%，这就导致该方法会存在明显的偏差，而且这种偏差在样本分析中很难观察到。NOURI-NIGJEH 等使用蛋白质药物的类似蛋白作为一种校准物质，同时使用 SIL 肽段作为内标，该方法在对蛋白药物进行定量分析过程中获得了更好的精密性和准确性 [37]。

2.2.4 SIL 延伸肽段

为了更好地反映目标蛋白的酶解效率，可选择添加延伸的可酶解基团到同位素标记的肽段上，形成 SIL 延伸肽段 [38]，一般在 SIL 延伸肽段的 N 段或 C 段都有 3 ～ 6 个侧位氨基酸残基。这种内标的优势在于合成相对简单、价格便宜，并且能校正蛋白质在消化过程中降解和修饰上的变化 [39—40]。但在分别使用 SIL 肽段和 SIL 延伸肽段作为内标的对比试验中，观察到由于 SIL 延伸肽段在消化过程中会产生与蛋白消化过程不相关的变化，因此使用 SIL 肽段作为内标的校准性能更好。

2.2.5 差异二甲基标记肽段法

JI 等报道了使用差异二甲基标记肽段的方法，该方法使用 d_2- 甲醛和甲醛来标记胰蛋白酶消化后的肽段 [41]。与同位素标记方法相比，这种方法使用了相对便宜且容易获得的有机试剂。但在标记过程中，需要反复优化反应条件，以获得最优的标记效率。由于同位素标记肽段的方法目前已较成熟，而且可获得高纯度的标记肽段，所以差异二甲基标记肽段的方法并未得到更广泛的应用。

2.3 LC-MS/MS 条件优化

色谱分离以及 MS/MS 条件优化是方法开发的关键步骤，也是提高分析灵敏度的关键。LC-MS/MS 分析方法开发还需关注样品纯化的程度，如果能在样品前处理过程中通过特定捕获的方式获得目标样品，那么色谱分离时间可以显著缩短。在不影响分析时间的情况下还可通过使用适合肽分离的色谱柱如 C_8 柱、C_{18} 柱、C_{SH} 柱，升高柱温，使用超高效液相色谱（UPLC）等方法来提高色谱分离效率 [42]。选择最佳的特征肽段并监测丰度最高的母离子和子离子可以降低检测方法的定量下限。特征肽段大多由 7 ～ 20 个氨基酸组成，可能带有 1 个或多个电荷，肽段定量时常采用多反应监测（MRM）模式，使用三重四极杆质谱首先对母离子进行扫描，选择出丰度最高的母离子，然后对母离子进行击碎，再选择出丰度最高的子离子。在质谱条件优化过程中，可对碰撞电压进行调整以获得最佳的母离子与子离子。改进 MRM 方法可提高三重四极杆质谱的灵敏度和选择性，这对实现“ng/ml”水平以下的准确蛋白定量至关重要 [43]。

2.4 样品前处理

样品前处理主要指对目标蛋白进行富集和纯化，对于大分子蛋白药物的生物分析，需要消除背景基质的影响以减少内源性化合物的干扰，富集目标蛋白药物以提高生物分析性能。蛋白质药物的纯化可通过除去潜在干扰物或免疫亲和的方法富集目标蛋白来实现。

2.4.1 颗粒消化（pellet digestion）

颗粒消化这一样品制备技术可概括为先在血清中进行蛋白沉淀获得蛋白颗粒，将蛋白颗粒重悬浮后再使用胰蛋白酶进行消化。该技术可提高治疗用蛋白药物及抗体药物的消化效率，同时除去血清中的盐类、磷脂和可溶性蛋白，目前已有大量文献报道了该技术的使用 [44—46]。常用的蛋白沉淀剂为甲醇、乙腈等有机溶剂，OUYANG 等比较了几种常见有机溶剂的沉淀效率，结果为乙腈 > 甲醇 > 乙醇 > 异丙醇，但由于使用乙腈生成的蛋白颗粒排列密集，难以充分重悬浮以供后续胰蛋白酶消化，所以推荐使用甲醇作为蛋白沉淀剂 [44]。YUAN 等发现对于直接消化时消化效率很低的某些蛋白，颗粒

消化法可将消化效率提高约 30 倍，并成功将该技术应用于猴血清中单抗的 LC-MS/MS 检测 [47]。

2.4.2 白蛋白消除

背景基质中 50%以上的干扰蛋白为白蛋白 [48]，使用白蛋白消除试剂盒、硫酸铵与十二水合硫酸钠可方便且快速地除去内源性干扰蛋白，以达到富集含量较低的待测治疗用蛋白质药物或抗体药物的目的 [46]。

2.4.3 固相萃取（solid-phase extraction，SPE）

SPE 是将待测物在固相和液相之间进行分离，以富集和纯化待测物，降低方法的定量下限。固相吸附剂的选择可控制 SPE 的选择性、亲和力和样品容量，是 SPE 中的关键因素。固相吸附剂对样品的保留涉及极性、非极性或离子的相互作用，很大程度上取决于待测分析物的理化性质 [42]。SPE 的优势包括回收率高、可有效富集待测物以提高浓度、操作简便、可实现自动化等 [49]。但 SPE 柱为一次性使用产品，成本较高，并且 SPE 操作耗时较长，有时批间重现性较差。有报道表明样品经 SPE 进一步纯化后，可提高 LC-MS/MS 对单抗的检测灵敏度，降低定量下限至 0.5 μg/ml[50]。

2.4.4 免疫捕获

与 LBA 法不同，在使用 LC-MS/MS 对大分子蛋白药物进行定量分析的过程中，针对抗原结合位点的免疫捕获方式是对游离药物浓度进行定量，针对 Fc 片段的免疫捕获方式是对总药物浓度进行定量。针对抗原结合位点的免疫捕获方式是利用固定在磁珠或 96 孔板上的特异性抗体或配体捕获生物基质中的目标蛋白，但只有具有至少 1 个游离位点的大分子蛋白药物才能通过该方法被纯化 [51]。蛋白 A（protein A）和蛋白 G（protein G）是通过 Fc 区域与人源化 IgG 蛋白药物结合的细菌细胞壁蛋白 [30,52]，在体内可保护 IgG 免受免疫系统的伤害，可针对抗体药物进行总药物浓度定量分析。但是在使用蛋白 A 或蛋白 G 纯化抗体药物时也会捕获内源性的 IgG，影响定量的准确性。

2.5 酶解条件的优化

蛋白质的三级结构是由疏水键、离子键、氢键和二硫键作用形成的。在蛋白纯化后，蛋白药物需要经历变性、还原和烷基化的过程，打开其天然结构，以便在接下来的酶解步骤中使消化酶更易进入裂解位点。

2.5.1 变性、还原和烷基化

目前文献中介绍的蛋白质变性试剂主要包括胍类、尿素、表面活性剂等。其中，盐酸胍和尿素为较常用的试剂。盐酸胍的变性能力相对较强，在室温下 6 mol/L 左右就可使蛋白质完成变性；尿素的变性能力相对较弱，一般在 8 mol/L 左右可展开蛋白结构。在蛋白酶消化之前，为防止蛋白质变性试剂影响酶活性，需除去溶液中的盐酸胍，而尿素须稀释至 1 mol/L 以下。表面活性剂中推荐使用脱氧胆酸钠，因其较易在质谱检测前通过酸沉淀去除 [53]。常用的蛋白质二硫键还原剂为二硫代苏糖醇（DTT）或三羧基乙基膦（TCEP），其中 DTT 更常用，因其 pH 值呈中性，更适合下游蛋白酶消化。蛋白还原后需加入烷基化试剂，使还原后的巯基烷基化，以形成稳定的硫化物使蛋白药物彻底变性。常用的烷基化试剂为碘乙酰胺（IAA）。

2.5.2 酶解

作为蛋白水解酶，胰蛋白酶在自下而上法中较受青睐。精氨酸和赖氨酸这 2 种碱性氨基酸在电喷雾电离过程中很易电离，胰蛋白酶通过裂解精氨酸和赖氨酸位置的肽键形成肽段，供后续基于 LC-MS/MS 技术的定量分析。此外，商业化的固定化胰蛋白酶因能提供快速和完全的消化，并且能与高温结合使用而被广泛应用。

另一种蛋白水解酶为谷氨酰内肽酶（Glu-C），是从金黄色葡萄球菌中分离出来的。谷氨酰内肽酶的裂解原理与胰蛋白酶基本相似，它是在 2 个酸性氨基酸即天冬氨酸和谷氨酸的 C 端进行裂解 [54]。

IWAMOTO 等研发了一种通过限制蛋白酶和抗体结合来选择性水解抗体 Fab 段的方法，将其命名为纳米表面和分子取向限制的蛋白水解（nano-surface and molecular-orientation limited proteolysis，nSMOL）[55]。该方法通过蛋白 A 或蛋白 G 将抗体 Fc 段结合到树脂上，使 Fab 段向外朝向溶液，将

蛋白酶固定在球形纳米颗粒上，利用蛋白酶颗粒和抗体树脂孔径差异限制蛋白酶与抗体接触。采用nSMOL可高效、定量地检测CDR区的肽段，同时减少样品中干扰肽段的数量，消化后的肽段较易通过离心法或磁性沉淀法收集，并且在纳米表面进行蛋白质水解无需抗体变性。

2.6 方法学验证

对于一种全新的生物分析方法，为满足监管要求，必须进行全面的方法学验证以保证使用该方法得到的数据具有说服性、科学性及可靠性。对于使用传统LBA方法进行生物分析的蛋白质药物，可根据美国FDA《Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry》、欧洲药品管理局《Guideline on Bioanalytical Method Validation》及《中华人民共和国药典》2020年版的生物样品定量分析方法验证指导原则等规定的验证内容进行完整的方法学验证[56—57]，包括标准曲线与定量范围、特异性、精密度与准确度、选择性、稳定性、钩状效应与稀释线性等6个方面。对于使用LC-MS/MS法进行分析的蛋白药物，还未有明确具体的指导原则。美国药学科学家协会在白皮书中提出了对生物治疗蛋白质所用的LC-MS/MS生物分析方法的验证建议，用于蛋白质生物分析的LC-MS/MS法与用于小分子的方法需要不同的开发和验证考虑[58]。分析方法的开发和验证需根据正在建立的特定分析方法进行定制，并考虑到分析方法的预期用途、蛋白质的特性和与内源性蛋白的相似性以及方法应用的物种或人群，需要综合传统小分子药物的LC-MS/MS分析方法和生物制剂免疫分析及LBA分析方法二者的要求。白皮书建议的分析方法验证内容包括选择性、特异性、基质效应、精密度与准确度、标准曲线与定量范围、稀释线性及稳定性等。

3 采用LC-MS/MS定量分析蛋白质药物的实际应用举例

以上介绍涵盖了目前采用LC-MS/MS技术进行蛋白质药物定量分析的一般步骤及详细内容，在此对LC-MS/MS方法的实际应用进行举例，以反映该方法的部分应用进展，包括方法的受试物、内标、样品前处理方法、蛋白酶解方法及液相质谱系统。

3.1 阿柏西普（aflibercept）

阿柏西普是一种拮抗血管内皮生长因子（VEGF）的融合蛋白，可结合并灭活血流和血管外循环的VEGF，是治疗新生血管性年龄相关黄斑变性的一线药物，也是转移性结直肠癌联合治疗的重要药物，但由于存在游离和结合形式的阿柏西普，使用ELISA定量分析时需开发2种完全独立的方法来分别定量这2种形式，具有一定的局限性，所以研究开发了LC-MS/MS方法，以阿柏西普和VEGF的特征肽段量化阿柏西普和阿柏西普-VEGF复合物的总浓度，通过从阿柏西普的总浓度中减去阿柏西普-VEGF复合物的浓度来计算游离的阿柏西普浓度。

开发的LC-MS/MS方法以nSMOL作为蛋白纯化和酶解的方法，以ProteoMass^{TM} $P_{14}R$ MALDI-MS标准品（$P_{14}R$）作为内标，使用ACQUITY超高效液相色谱仪，色谱柱为Agilent Poroshell 120 EC-C_{18}色谱柱（2.1 mm×100 mm，2.7 μm），以及Triple Quad 4500型质谱仪，结果阿柏西普的线性范围为0.05～50 μg/ml，阿柏西普-VEGF复合物的线性范围为0.05～5 μg/ml[59]。

3.2 XMT-1522

XMT-1522是一种处于Ⅰ期临床阶段的、靶向表达人表皮生长因子受体2（HER2）肿瘤细胞的抗体-药物偶联物（ADC），是首个基于Dolaflexin®技术平台构建的具有高药物-抗体比的ADC。由于ADC含有大分子抗体部分和小分子药物部分，ADC的生物分析通常需要多种分析物策略，所以开发了一种能同时测量总抗体和抗体偶联药物的LC-MS/MS定量分析方法。

开发的LC-MS/MS法以同位素标记的肽段作为内标，以包被特异性抗XMT-1522抗体的磁珠进行免疫捕获纯化样品，使用胰蛋白酶酶解蛋白，使用Exion超高效液相色谱仪，色谱柱为Waters XBridge BEH C_4柱（2.1 mm×50 mm，3.5 μm），以及Triple Quad 6500型质谱仪，结果总抗体的线性范围为50～5 000 ng/ml，抗体偶联药物的线性范围为

3.3 ～ 330 ng/ml[60]。

3.3 一种用于单抗定量分析的通用方法

单抗疗法的使用正在迅速增加，但单抗浓度个体之间差异很大，并可能随后影响单抗的暴露和治疗反应，这强调了单抗治疗药物监测的重要性，需要开发一种有效且可靠的方法来准确量化血浆样品中的单抗。

有研究者开发了一种高效准确的通用 LC-MS/MS 定量分析方法，用于定量 5 种单抗，即贝伐单抗、依洛尤单抗、纳武单抗、派姆单抗和曲妥珠单抗，开发的 LC-MS/MS 法以托珠单抗为内标，使用蛋白 G 磁珠进行免疫捕获纯化样品，在磁珠上通过高温进行快速胰蛋白酶消化，然后进行常规 pH 洗脱，使用 Agilent 1290 型超高效液相色谱仪，色谱柱为 Aeris^{TM} PEPTIDE XB-C_{18} 柱（2.1 mm×100 mm，1.7 μm），以及 Agilent 6460 型三重四极杆质谱，方法的线性范围为 10 ～ 200 μg/ml[61]。

3.4 宿主细胞蛋白（host cell protein，HCP）

HCP 是源自生物治疗药物制造过程中上游工艺的工艺相关杂质。药品中残留的 HCP 会影响产品的质量、稳定性和安全，因此开发一种监测残留 HCP 的通用方法至关重要。

有研究者开发了一种灵敏且稳健的方法，能检测低至 1×10^{-7} 的残留 HCP，在高蛋白浓度下进行消化，在还原步骤中添加脱氧胆酸钠以减少消化过程中 HCP 的遗漏，进行 LC-MS/MS 分析之前使用 50％乙腈洗脱进行 SPE 以确保去除单抗，以上流程将对 HCP 的识别灵敏度提高了 10 ～ 100 倍，使用 UltiMate 3000 RSLCnano 型液相色谱系统，色谱柱为 CSH C_{18} 柱（75 μm×50 cm，1.7 μm），以及 Orbitrap Exploris 480 型质谱仪[62]。

4 小结及展望

近年来，LC-MS/MS 技术已逐渐成为蛋白质药物定量分析的一个重要工具。基于 MRM 的 LC-MS/MS 自下而上分析是蛋白质组学研究的一个自然延伸，多年来从蛋白质组学中获得的经验也显著加快了这种分析方法的发展。

LC-MS/MS 技术可有效解决传统 LBA 方法定量分析蛋白药物的某些问题，如定量范围窄、易发生交叉反应、基质和 ADA 的干扰、非特异性结合等。该方法具有良好的特异性和重现性，可很容易地在不同基质和种属中进行方法转移，不依赖于特异性抗体等关键试剂，方法开发耗时短、成本低，并且能在一次分析中同时定量多种蛋白质。尽管如此，LC-MS/MS 方法依旧存在还未被克服的缺点，如方法灵敏度较低、最低为“ng”级、样品制备的通量较低等。未来随着液质联用技术的不断发展，LC-MS/MS 方法的灵敏度大概率会得到提高，对主要的样品制备步骤实现自动化，如一些小化合物样品制备程序能进行常规自动化处理。

综上所述，LC-MS/MS 技术对蛋白质药物的定量检测具有其独特的优势，是对传统 LBA 定量方法的补充，特别是在特异性抗体不易获得或可用抗体存在交叉反应的情况下。目前，采用 LC-MS/MS 方法定量检测蛋白质药物尚未被认可用于新药申报，对于 LC-MS/MS 方法的开发及验证也未制定专门详细的指导原则。虽然在短时间内 LC-MS/MS 方法不会完全取代传统的 LBA 方法，但生物医学研究以及制药行业日益增长的需求终将推动基于 LC-MS/MS 技术的蛋白质药物定量方法发展成熟。

参考文献：

[1] LEADER B, BACA Q J, GOLAN D E. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification [J]. *Nat Rev Drug Discovery*, 2008, **7**(1): 21-39.

[2] WALSH G. Biopharmaceutical benchmarks 2018 [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, **36**(12): 1136-1145.

[3] SINGH S, KUMAR N K, DWIWEDI P, *et al*. Monoclonal antibodies: a review [J]. *Curr Clin Pharmacol*, 2018, **13**(2): 85-99.

[4] DE LA TORRE B G, ALBERICIO F. The pharmaceutical industry in 2021. An analysis of FDA drug approvals from the perspective of molecules [J]. *Molecules*, 2022, **27**(3): 1075-1090.

[5] DAMEN C W N, DE GROOT E R, HEIJ M, *et al*. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of trastuzumab in human serum and plasma [J]. *Anal Biochem*, 2009, **391**(2):

114-120.

[6] DAMEN C W N, SCHELLENS J H M, BEIJNEN J H. Bioanalytical methods for the quantification of therapeutic monoclonal antibodies and their application in clinical pharmacokinetic studies [J]. *Hum Antibodies*, 2009, **18**(3): 47-73.

[7] SAVOIE N, GAROFOLO F, AMSTERDAM P V, *et al*. 2010 White paper on recent issues in regulated bioanalysis & global harmonization of bioanalytical guidance [J]. *Bioanalysis*, 2010, **2**(12): 1945-1960.

[8] CASTEELE N V, BUURMAN D J, STURKENBOOM M G, *et al*. Detection of infliximab levels and anti-infliximab antibodies: a comparison of three different assays [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2012, **36**(8): 765-771.

[9] HOOFNAGLE A N, WENER M H. The fundamental flaws of immunoassays and potential solutions using tandem mass spectrometry [J]. *J Immunol Methods*, 2009, **347**(1): 3-11.

[10] CICCIMARO E, BLAIR L A. Stable-isotope dilution LC-MS for quantitative biomarker analysis [J]. *Bioanalysis*, 2010, **2**(2): 311-341.

[11] ZHANG S, JIAN W. Recent advances in absolute quantification of peptides and proteins using LC-MS [J]. *Rev Anal Chem*, 2014, **33**(1): 31-47.

[12] LI H, ORTIZ R, TRAN L, *et al*. General LC-MS/MS method approach to quantify therapeutic monoclonal antibodies using a common whole antibody internal standard with application to preclinical studies [J]. *Anal Chem*, 2012, **84**(3): 1267-1273.

[13] JIANG H, ZENG J, TITSCH C, *et al*. Fully validated LC-MS/MS assay for the simultaneous quantitation of co-administered therapeutic antibodies in cynomolgus monkey serum [J]. *Anal Chem*, 2013, **85**(20): 9859-9867.

[14] JIAN W, EDOM R W, WANG D, *et al*. Relative quantitation of glycoisoforms of intact apolipoprotein C3 in human plasma by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2013, **85**(5): 2867-2874.

[15] KELLIE J F, KEHLER J R, MENCKEN T J, *et al*. A whole-molecule immunocapture LC-MS approach for the *in vivo* quantitation of biotherapeutics [J]. *Bioanalysis*, 2016, **8**(20): 2103-2114.

[16] LANSHOEFT C, CIANFERANI S, HEUDI O. Generic hybrid ligand binding assay liquid chromatography high-resolution mass spectrometry-based workflow for multiplexed human Immunoglobulin G1 quantification at the intact protein level: application to preclinical pharmacokinetic studies [J]. *Anal Chem*, 2017, **89**(4): 2628-2635.

[17] WILLEMAN T, JOURDIL J F, VEYRET E G, *et al*. A multiplex liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the quantification of seven therapeutic monoclonal antibodies: application for adalimumab therapeutic drug monitoring in patients with Crohn's disease [J]. *Anal Chim Acta*, 2019, **1067**: 63-70.

[18] ZHANG L, VASICEK L A, HSIEH S, *et al*. Top-down LC-MS quantitation of intact denatured and native monoclonal antibodies in biological samples [J]. *Bioanalysis*, 2018, **10**(13): 1039-1054.

[19] MACLEAN B, TOMAZELA D M, SHULMAN N, *et al*. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments [J]. *Bioinformatics*, 2010, **26**(7): 966-968.

[20] DEUTSCH E W, LAM H, AEBERSOLD R. PeptideAtlas: a resource for target selection for emerging targeted proteomics workflows [J]. *EMBO Rep*, 2008, **9**(5): 429-434.

[21] LEE J W, KELLEY M, KING L E, *et al*. Bioanalytical approaches to quantify "total" and "free" therapeutic antibodies and their targets: technical challenges and PK/PD applications over the course of drug development [J]. *AAPS J*, 2011, **13**(1): 99-110.

[22] BRONSEMA K J, BISCHOFF R, MERBEL N C. Internal standards in the quantitative determination of protein biopharmaceuticals using liquid chromatography coupled to mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2012, **893**: 1-14.

[23] AMRANI M E, 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.

[24] TODOROKI K, MIZUNO H, SUGIYAMA E, *et al*. Bioanalytical methods for therapeutic monoclonal antibodies and antibody-drug conjugates: a review of recent advances and future perspectives [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, **179**: 112991.

[25] CHIU H H, TSAI I L, LU Y S, *et al*. Development of an LC-MS/MS method with protein G purification strategy for quantifying bevacizumab in human plasma [J]. *Anal*

Bioanal Chem, 2017, **409**(28): 6583-6593.

[26] OSAKI F, TABATA K, OE T. Quantitative LC/ESI-SRM/MS of antibody biopharmaceuticals: use of a homologous antibody as an internal standard and three-step method development [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2017, **409**(23): 5523-5532.

[27] LEGERON R, XUEREB F, CHAIGNEPAIN S, *et al*. A new reliable, transposable and cost-effective assay for absolute quantification of total plasmatic bevacizumab by LC-MS/MS in human plasma comparing two internal standard calibration approaches [J]. *J Chromatogr B*, 2017, **1070**: 43-53.

[28] DUBOIS M, FENAILLE F, CLEMENT G, *et al*. Immunopurification and mass spectrometric quantification of the active form of a chimeric therapeutic antibody in human serum [J]. *Anal Chem*, 2008, **80**(5): 1737-1745.

[29] YANG Y, WYSOCKI E, ANTWI K, *et al*. Development and validation of a targeted affinity-enrichment and LC-MS/MS proteomics approach for the therapeutic monitoring of adalimumab [J]. *Clin Chim Acta*, 2018, **483**: 308-314.

[30] 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.

[31] YANG Z, HAYES M, FANG X, *et al*. LC-MS/MS approach for quantification of therapeutic proteins in plasma using a protein internal standard and 2D-solid-phase extraction cleanup [J]. *Anal Chem*, 2007, **79**(24): 9294-9301.

[32] HEUDI O, BARTEAU S, ZIMMER D, *et al*. Towards absolute quantification of therapeutic monoclonal antibody in serum by LC-MS/MS using isotope-labeled antibody standard and protein cleavage isotope dilution mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2008, **80**: 4200-4207.

[33] BRUN V, DUPUIS A, ADRAIT A, *et al*. Isotope-labeled protein standards: toward absolute quantitative proteomics [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2007, **6**(12): 2139-2149.

[34] BRUN V, MASSELON C, GARIN J, *et al*. Isotope dilution strategies for absolute quantitative proteomics [J]. *J Proteomics*, 2009, **72**(5): 740-749.

[35] KUHN E, WHITEAKER J R, MANI D R, *et al*. Interlaboratory evaluation of automated, multiplexed peptide immune affinity enrichment coupled to multiple reaction monitoring mass spectrometry for quantifying proteins in plasma [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2012, **11**(6): 111.

[36] BUDHRAJA R H, SHAH M A, SUTHAR M, *et al*. LC-MS/MS validation analysis of trastuzumab using dSIL approach for evaluating pharmacokinetics [J]. *Molecules*, 2016, **21**(11): 1464-1474.

[37] NOURI-NIGJEH E, ZHANG M, JI T, *et al*. Effects of calibration approaches on the accuracy for LC-MS targeted quantification of therapeutic protein [J]. *Anal Chem*, 2014, **86**(7): 3575-3584.

[38] BARNIDGE D R, GOODMANSON M K, KLEE G G, *et al*. Absolute quantification of the model biomarker prostate-specific antigen in serum by LC-MS/MS using protein cleavage and isotope dilution mass spectrometry [J]. *J Proteome Res*, 2004, **3**(3): 644-652.

[39] OCANA M F, JAMES I T, KABIR M, *et al*. Clinical pharmacokinetic assessment of an anti-MAdCAM monoclonal antibody therapeutic by LC-MS/MS [J]. *Anal Chem*, 2012, **84**(14): 5959-5967.

[40] GONG C, ZHENG N, ZENG J, *et al*. Post-pellet-digestion precipitation and solid phase extraction: a practical and efficient workflow to extract surrogate peptides for ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry bioanalysis of a therapeutic antibody in the low ng/mL range [J]. *J Chromatogr A*, 2015, **1424**: 27-36.

[41] JI C, SADAGOPAN N, ZHANG Y, *et al*. A universal strategy for development of a method for absolute quantification of therapeutic monoclonal antibodies in biological matrices using differential dimethyl labeling coupled with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2009, **81**(22): 9321-9328.

[42] NOVAKOVA L, VLCKOVA H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, **656**(1/2): 8-35.

[43] VAN DEN BROEK I, NIESSEN W M A, VAN DONGEN W D. Bioanalytical LC-MS/MS of protein-based biopharmaceuticals [J]. *J Chromatogr B*, 2013, **929**: 161-179.

[44] OUYANG Z, FURLONG M T, WU S, *et al*. Pellet digestion: a simple and efficient sample preparation technique for LC-MS/MS quantification of large therapeutic proteins in

plasma［J］. *Bioanalysis*, 2012, **4**(1): 17-28.

［45］ LANSHOEFT C, WOLF T, HEUDI O, *et al*. The use of generic surrogate peptides for the quantitative analysis of human immunoglobulin G1 in pre-clinical species with high-resolution mass spectrometry［J］. *Anal Bioanal Chem*, 2016, **408**(6): 1687-1699.

［46］ AMRANI M E, SZANTO C L, HACK C E, *et al*. Quantification of total dinutuximab concentrations in neuroblastoma patients with liquid chromatography tandem mass spectrometry［J］. *Anal Bioanal Chem*, 2018, **410**(23): 5849-5858.

［47］ YUAN L, ARNOLD M E, AUBRY A F, *et al*. Simple and efficient digestion of a monoclonal antibody in serum using pellet digestion: comparison with traditional digestion methods in LC-MS/MS bioanalysis［J］. *Bioanalysis*, 2012, **4**(24): 2887-2896.

［48］ ANDERSON N L, ANDERSON N G. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects［J］. *Mol Cell Proteomics*, 2002, **1**(11): 845-867.

［49］ KATAOKA H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis［J］. *TrAC-Trends Anal Chem*, 2003, **22**(4): 232-244.

［50］ YUAN L, AUBRY A F, ARNOLD M E, *et al*. Systematic investigation of orthogonal SPE sample preparation for the LC-MS/MS bioanalysis of a monoclonal antibody after pellet digestion［J］. *Bioanalysis*, 2013, **5**(19): 2379-2391.

［51］ AMRANI M E, VAN DEN BROEK M P H, GOBEL C, *et al*. Quantification of active infliximab in human serum with liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a tumor necrosis factor alpha-based pre-analytical sample purification and a stable isotopic labeled infliximab bio-similar as internal standard: a target-based, sensitive and cost-effective method［J］. *J Chromatogr A*, 2016, **1454**: 42-48.

［52］ VIALARET J, BROUTIN S, PUGNIER C, *et al*. What sample preparation should be chosen for targeted MS monoclonal antibody quantification in human serum?［J］. *Bioanalysis*, 2018, **10**(10): 723-735.

［53］ DOMANSKI D, PERCY A J, YANG J, *et al*. MRM-based multiplexed quantitation of 67 putative cardiovascular disease biomarkers in human plasma［J］. *Proteomics*, 2012, **12**(8): 1222-1243.

［54］ HANSEN K, SZARKA S, ESCOFFIER E, *et al*. Glu-C, an alternative digestive enzyme for the quantitative LC-MS/MS analysis of an IgG-based antibody biotherapeutic［J］. *Bioanalysis*, 2018, **10**(13): 997-1007.

［55］ IWAMOTO N, SHIMADA T, UMINO Y, *et al*. Selective detection of complementarity-determining regions of monoclonal antibody by limiting protease access to the substrate: nano-surface and molecular-orientation limited proteolysis［J］. *Analyst*, 2014, **139**(3): 576-580.

［56］ Food and Drug Administration. Bioanalytical method validation guidance for industry［S］. The United States of America, 2018.

［57］ European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation［S］. Europe, 2011.

［58］ 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.

［59］ KONG L, LIU F, HUO L, *et al*. A novel LC-MS/MS approach to the pharmacokinetic study of free and bound aflibercept simultaneously［J］. *Anal Bioanal Chem*, 2020, **412**(4): 1003-1010.

［60］ XU L, ZHANG Z, XU S, *et al*. Simultaneous quantification of total antibody and antibody-conjugated drug for XMT-1522 in human plasma using immunocapture-liquid chromatography/mass spectrometry［J］. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, **174**: 441-449.

［61］ CHIU H H, TSAI Y J, LO C, *et al*. Development of an efficient mAb quantification assay by LC-MS/MS using rapid on-bead digestion［J］. *Anal Chim Acta*, 2022, **1193**: 339319.

［62］ YANG F, LI D, KUFER R, *et al*. Versatile LC-MS based workflow with robust 0.1 ppm sensitivity for identifying residual HCPs in biotherapeutic products［J］. *Anal Chem*, 2021, **94**(2): 723-731.