

SCIEX Triple Quad™ 7500系统定量分析大鼠血浆中PROTAC 药物 ARV-110

Quantitative Analysis of the PROTAC degrader ARV-110 in Rat Plasma by SCIEX Triple Quad™ 7500 System

陈俊苗, 司丹丹, 龙志敏

Junmiao Chen, Dandan Si, Zhimin Long

SCIEX应用技术中心, 中国

SCIEX, China

Key words: SCIEX Triple Quad™ 7500 system, PROTAC degrader, ARV-110

前言

PROTAC即靶向蛋白降解嵌合体 (Proteolysis-Targeting Chimeras)。PROTAC分子由三部分构成, 分别是靶向目标蛋白的配体、E3泛素连接酶配体和连接上述结构的连接器。PROTAC分子在进入细胞后, 目标蛋白配体可特异性的与相应的靶蛋白结合, 另一端可以募集E3连接酶, E3连接酶可介导泛素结合酶E2对目标蛋白配体泛素化。被泛素标记的目标蛋白可被蛋白酶体识别并降解。ARV-110 (Bavdegalutamide) 是一种治疗转移性去势抵抗性前列腺癌的PROTAC药物, 目前的报道显示其在临床试验中展现出持续的抗肿瘤活性和患者获益证据^[1]。

传统小分子需要知晓靶蛋白的内在位点和机制来结合然后起效, 而PROTAC则不用重视靶蛋白本身机制, 无需竞争位点, 只要结合上就直接将靶蛋白泛素化标记后降解^[2]。由于它的机制特殊, 仅需要少量就可发挥药效, 用量常常是纳摩尔级别, 这也给它的安全性和活性评价带来一定难度。

本方法采用沉淀蛋白后再吹干复溶的方式进行前处理, 通过SCIEX Triple Quad™ 7500系统对大鼠血浆中PROTAC药物ARV-110进行直接定量, 定量限 (LOQ) 为5 pg/mL, 方法特点如下:

1. 使用SCIEX Triple Quad™ 7500系统, 能够实现快速分析、操作简单同时获得检测灵敏度高的LC-MS/MS方法。

2. 采用高比例有机相沉淀蛋白, 再吹干复溶, 有效实现对样品净化的同时提高通量, 方法开发周期短、开发成本低、特异性强。
3. 方法检测灵敏度高 (LLOQ: 5 pg/mL), 较宽的线性范围 (5~5000 pg/mL) 以及良好的定量重现性 (RSD < 5%)。

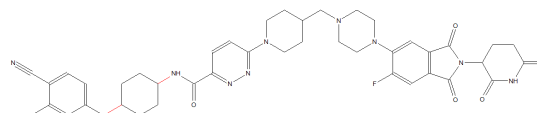


图1. ARV-110的结构式

实验方法

1. 样品制备

100 μL 大鼠血浆中加入ARV-110标准品浓度为5 ~ 5000 pg/mL, 混匀。加入600 μL沉淀剂 (甲醇:乙腈, 1:1) 对血浆样品进行蛋白沉淀, 混匀1分钟。离心机平衡至4℃, 样品在13000 rpm转速下离心10 min。取全部上清液置玻璃试管中氮气吹干, 加入200 μL复溶液 (甲醇:水; 1:1), 复溶后进样分析。

2. 液相条件

液相: Exion LC™ 30AD系统

色谱柱: Phenomenex Kinetex C18 (100 × 2.1 mm, 2.6 μm)

流动相: A: 水 (含0.05% 甲酸)

B: 乙腈 (含0.05% 甲酸)

流速: 0.3 ml/min

柱温: 40°C

梯度洗脱, 洗脱程序如表1:

表1. 液相梯度条件

时间 (min)	A%	B%
0	85	15
6.5	5	95
8	5	95
8.1	85	15
10	85	15

2. 质谱条件

SCIEX Triple Quad™ 7500系统

数据采集方法: MRM (多反应监测)

离子源: ESI源

离子源参数:

IS电压: 4000 V 气帘气 CUR: 42 psi

碰撞气 CAD: 8 雾化气 GS1: 40 psi

辅助气 GS2: 60 psi 源温度 TEM: 550 °C

多反应监测离子通道如表2:

表2. ARV-110的MRM离子对信息

化合物	母离子Q1 (m/z)	子离子Q3 (m/z)	碰撞能量CE (V)	碰撞池出口电压CXP (V)
ARV-110	812.4	452.2	53	15
ARV-110	812.4	562.2	55	15

实验结果

灵敏度和线性

本实验采用沉淀蛋白后再吹干复溶的方式进行血浆前处理, 方法简单易操作。通过 SCIEX Triple Quad™ 7500系统对大鼠血浆中的PROTAC 药物ARV-110进行直接定量, 血浆基质定量下限 (LOQ) 可达5 pg/mL (图2), 且空白中无干扰, 方法选择性好, 灵敏度高。ARV-110化合物的回归方程和线性范围见图3, ARV-110在5~5000 pg/mL的浓度范围内线性关系良好。

重现性和准确性

为了考察仪器的重现性及准确性, 分别将处理好的2个低浓度点样品5pg/mL和10 pg/mL进行重现性考察。6针样品连续采集, 两个浓度下的精密性 (RSD) 分别为3.7%和3.9%, 准确度均在80-120%之内。

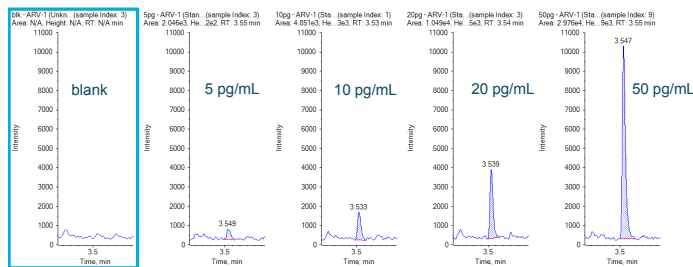


图2. ARV-110在空白血浆、5 pg/mL、10 pg/mL、20 pg/mL和50 pg/mL大鼠血浆基质中峰图信息。

Sample Name	Sample Type	Component Name	Mass Info	Actual Concentration	Area	Retention Time	Used	Calculated Concentration	Accuracy
blk	Unknown	ARV-1	812.4 / 452.2	N/A	N/A	N/A	<input type="checkbox"/>	N/A	N/A
5pg	Standard	ARV-1	812.4 / 452.2	5.00	2.046e3	3.55	<input type="checkbox"/>	5.00	100.07
10pg	Standard	ARV-1	812.4 / 452.2	10.00	4.851e3	3.53	<input type="checkbox"/>	9.91	99.10
20pg	Standard	ARV-1	812.4 / 452.2	20.00	1.049e4	3.54	<input type="checkbox"/>	19.78	98.89
50pg	Standard	ARV-1	812.4 / 452.2	50.00	2.976e4	3.55	<input type="checkbox"/>	53.48	106.95
100pg	Standard	ARV-1	812.4 / 452.2	100.00	5.580e4	3.53	<input type="checkbox"/>	99.02	99.02
1ng	Standard	ARV-1	812.4 / 452.2	1000.00	5.728e5	3.53	<input type="checkbox"/>	1003.35	100.33
2ng	Standard	ARV-1	812.4 / 452.2	2000.00	1.221e6	3.54	<input type="checkbox"/>	2137.32	106.87
5ng	Standard	ARV-1	812.4 / 452.2	5000.00	2.537e6	3.53	<input type="checkbox"/>	4438.26	88.77

Calibration for ARV-1: $y = 571.70433x + -814.41724$ ($r = 0.99787$, $r^2 = 0.99574$) (weighting: $1/x^2$)

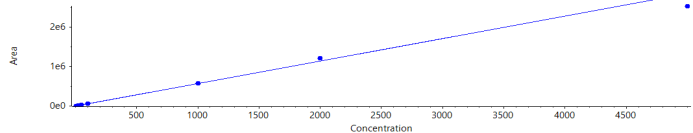


图3. ARV-110的标准曲线和线性图谱, 线性范围5~5000 pg/mL, 线性相关系数 $r=0.998$

结论

本方法采用沉淀蛋白后吹干复溶的方法进行血浆样品前处理，通过 SCIEX Triple Quad™ 7500系统对大鼠血浆中的PROTACT药物ARV-110进行直接定量。该LC-MS/MS检测方法灵敏度高、特异性好、空白血浆无干扰、线性范围较宽且具有较好的重现性和准确度（RSD < 5%）。整个方法具有操作简单，可快速分析的优点，具有较高的分析通量，可为血浆基质中PROTACT药物ARV-110的定量提供参考。

参考文献

1. Taavi K Neklesa, Lawrence B Snyder, Ryan R Willard and etc. ARV-110: an oral androgen receptor PROTACT degrader for prostate cancer. GU ASCO 2019.
2. Lawrence B. Snyder, ArvinasInc, New Haven, CT. Discovery of ARV-110, a first in class androgen receptor degrading PROTAC® for the treatment of men with metastatic castration resistant prostate cancer. www.arvinas.com

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15022-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7201
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话：020-8842-4017

官方微信：[SCIEX-China](https://www.sciex.com.cn)