

基于Orbitrap技术的高分辨质谱结合Compound Discoverer软件在阿可替尼体内代谢产物鉴定中的应用

吴珊瑚 刘国强 徐牛生

赛默飞世尔科技(中国)有限公司, 上海 201206

关键词

阿可替尼, 代谢产物, Q Exactive Focus, Compound Discoverer

1. 前言

套细胞淋巴瘤是非霍奇金淋巴瘤的一种亚型, 相对罕见且难治, 常见表征为淋巴结肿大, 经常伴随全身症状, 复发率极高预后很差。近年来靶向疗法和免疫疗法的兴起改善了套细胞淋巴瘤患者的生存期和生活质量。其中开发的靶向治疗药物之一阿可替尼, 英文名为Acalabrutinib (AstraZeneca, Cambridge, UK), 是Bruton酪氨酸激酶(BTK)的高选择性的口服靶向共价抑制剂(TCI), 2017年10月获得美国食品和药物管理局(FDA)加速批准, 用于治疗复发性或难治性套细胞淋巴瘤^[1]。BTK是一种在B细胞、髓细胞、肥大细胞和血小板表达的Tec家族激酶, 作为B细胞受体通路的重要信号分子, 在B淋巴细胞的各个发育阶段表达, 在恶性B细胞的增殖和存活起着重要作用^[2]。BTK的不可逆失活被认为是一种治疗B细胞恶性肿瘤的有价值的临床靶点^[3]。阿可替尼基于降低反应活性和提高BTK选择性和而开发^[4], 提高了患者的耐受性, 降低了严重不良反应如房颤和大出血的发生率。初步的临床试验表明阿可替尼作为一种靶向共价抑制剂具有吸收快, 系统暴露量低, 血浆半衰期短的特点。

现有公开的文献中对阿可替尼的体内研究较少, 尤其是对体内代谢机理方面的研究尚不完善^[5-6], 因而对阿可替尼的体内代谢产物鉴定显得尤为重要。本实验基于探究阿可替尼的体内代谢过程, 建立了简单高效液质联用方法, 并以Compound Discoverer 3.1软件自带的药物代谢流程对数据进行处理, 最终鉴定出15个代谢产物, 可对后续阿可替尼的体内研究提供重要参考依据。

2. 实验方法

1. 样品信息

样本信息: 对照组: 小鼠空白血浆, 样品组: 小鼠给药后的血浆。血浆以三倍乙腈沉淀后离心取上清液2 μ L进样。

2. 色谱方法

超高液相Vanquish flex系统, 色谱柱为BEH Amide (2.1 \times 100 mm, 1.7 μ m), 流动相水相为以氨水调节pH值到10的水, 有机相为乙腈, 梯度洗脱条件如下:

Time(min)	Flow Rate (ml/min)	A	B
0.0	0.3	5	95
0.5	0.3	5	95
4.0	0.3	40	60
7.4	0.3	40	60
7.5	0.3	5	95
10	0.3	5	95

3. Q Exactive Focus质谱方法

采用DDA模式获得样本的一级和二级信息。离子源参数如下: 喷雾电压(+/-): 3800V/3000V; 离子传输管温度: 320 $^{\circ}$ C; 鞘气压力45 arb; 辅助气压力15 arb; S-lens: 60。离子源温度: 350 $^{\circ}$ C。质谱扫描参数: 扫描范围(DA): 120-1200; Full Mass分辨率: 70000, MS/MS分辨率: 17500; 二级归一化碰撞能设置为20、40和60, 设置TOP3的模式采集二级数据。

3. 实验结果与讨论

3.1 数据处理流程

采集的数据均导入Compound Discoverer 3.1软件（简称CD）进行数据处理，将空白血浆样本类型设置为control（对照）组，给药组设置为sample（样品）组，将ratio（比值）定义为sample比control。选择CD软件药物代谢应用方向的默认工作流程（MetID w Stats Expected and Unknown w MMDF and Background Removal）进行代谢物鉴定。

如图1所示，该工作流程以两种模式并行进行阿可替尼母药的代谢产物鉴定，其中一种模式为以质量亏损过滤（filter by mass defect, MDF）进行非目标代谢物的查找。在此基础

上，基于母药和代谢物结构类似，具有共同特征二级碎片离子的特点，对所有MDF过滤查找出的潜在目标代谢物再进行特征碎片离子搜索，匹配上特征碎片的代谢物就会标记class coverage得分，匹配上的二级碎片越多，该化合物的class coverage分数越高，本次工作流程共导入8个阿可替尼的二级特征碎片离子（图2）。

另外一种模式为目标代谢物查找，具体是给定母药的分子式，根据选择的代谢反应库进行代谢物搜索。其中CD软件写入了常见的34个一相和二相代谢反应，本实验根据母药阿可替尼的结构特征又自定义了两个酰胺键水解相关的代谢反应。在目标代谢物查找模式中，可对所有查找到的代谢物及其二级碎片进行代谢反应解析和结构注释，其中generate expected compounds 这个node的参数设置见图3。

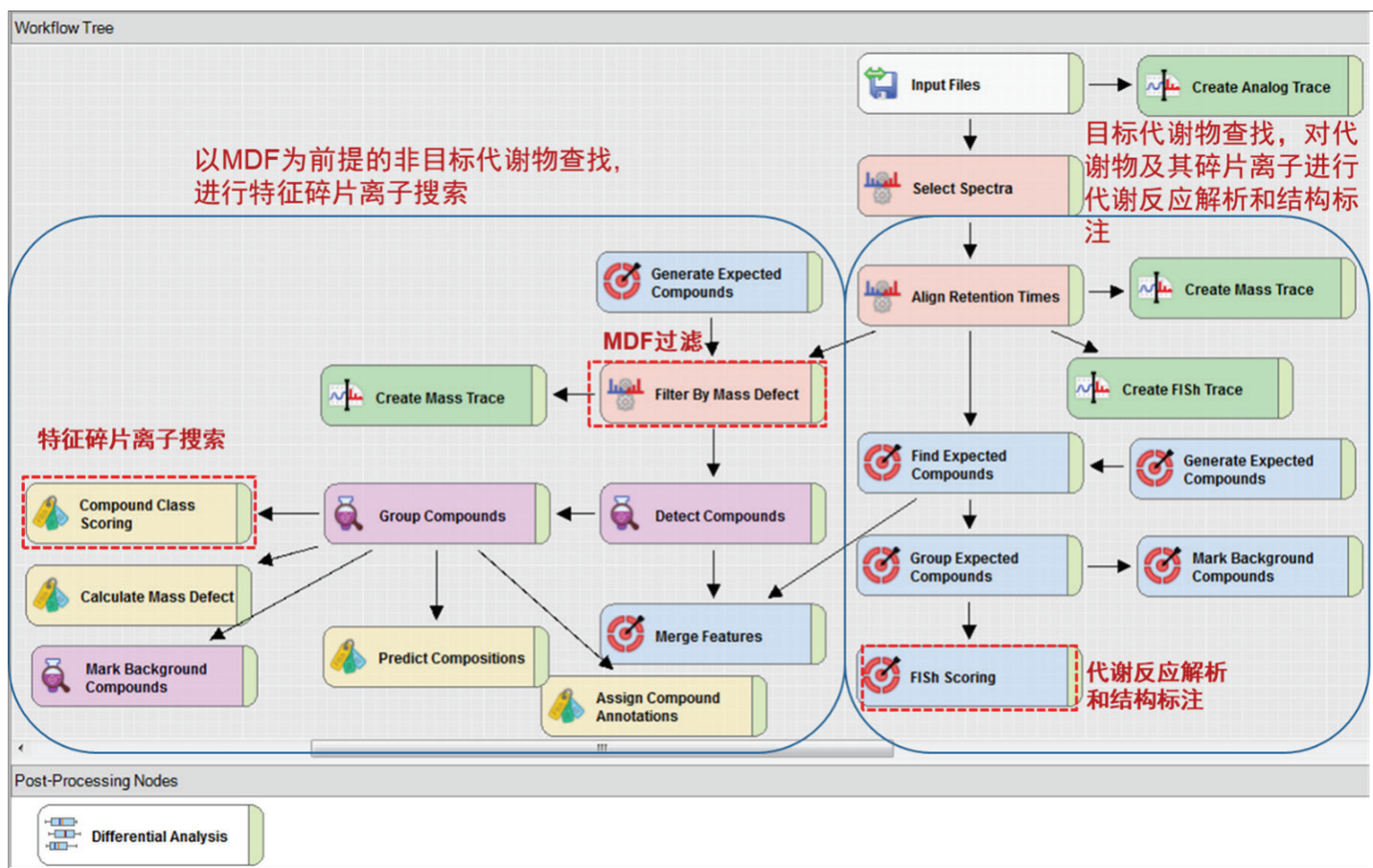


图1 Compound Discoverer软件非靶标代谢组学workflow

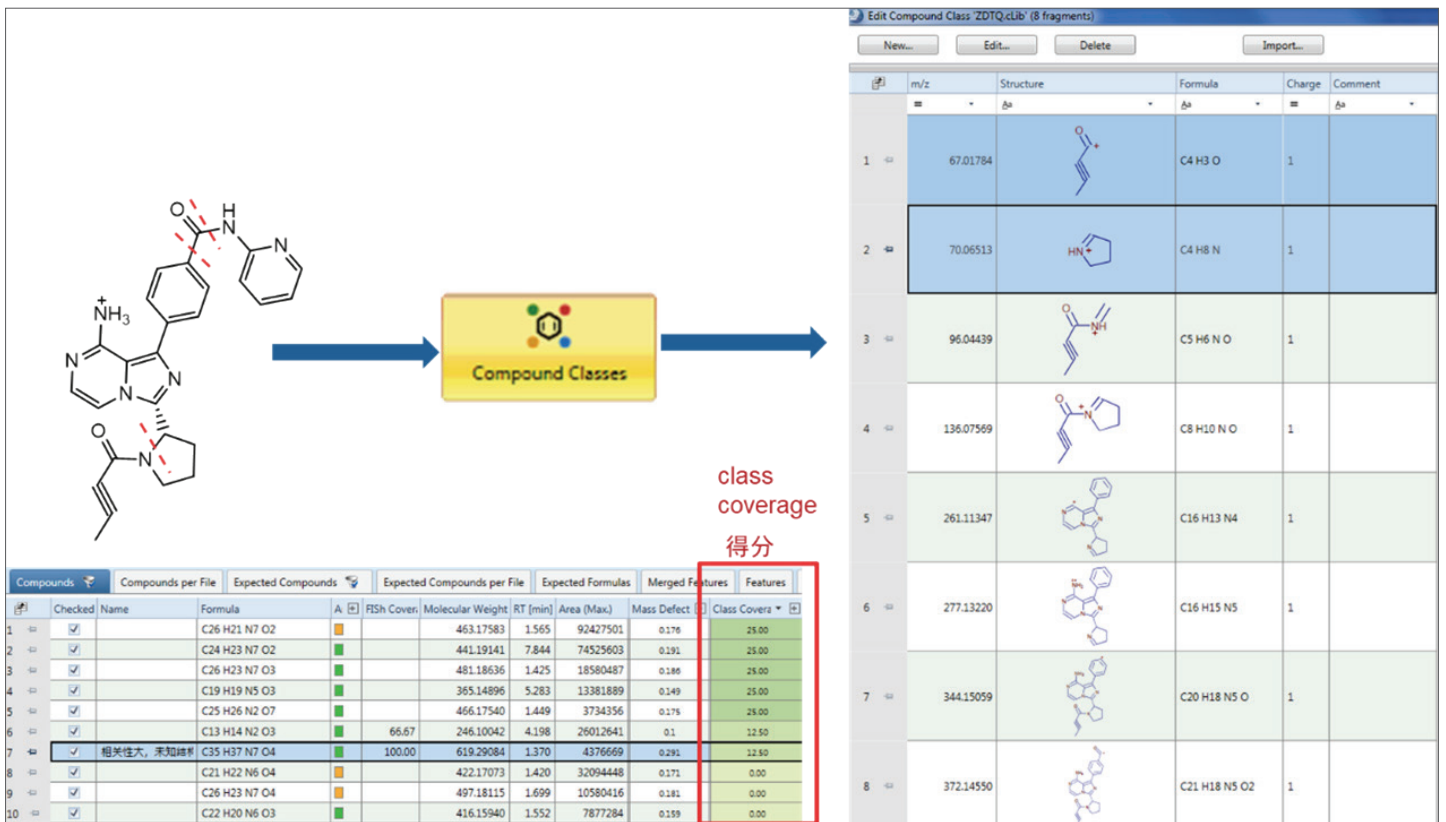


图2 导入的阿可替尼的二级特征碎片离子



图3 阿可替尼目标代谢物查找参数设置

3.2 目标代谢物搜索用于代谢产物鉴定

为快速查找代谢物并进行结构鉴定，将搜索到的所有化合物结果进行过滤，首先样品组与空白组的比值大于等于1，其次采集到了二级谱图。在完成过滤操作后，先从目标代谢物搜索结果中（共计过滤出96个可能代谢物）去找可能的目标代谢物，然后对MDF非目标提取代谢物模式得到的结果筛选class coverage分数大于等于12.5分的化合物（共计过滤到193个可能代谢物）。

目标代谢反应库中代谢物的鉴定以m/z 482.19391为例，具体鉴定流程如图4，首先进行一级同位素模式匹配（图4b），绿色标注的为匹配上的同位素峰；其次与母药二级谱图比对进行碎片离子解析，如图4c所示，为m/z 482.19391的二级原始谱图与母药二级谱图的镜像对比图，图中质谱峰标注为蓝色对应的碎片离子为母药或其碎片可通过代谢反应产生，标注为绿色对应的二级碎片为与母药相同的碎片离子，标注了颜色的碎片离子均会注释结构，如果是代谢反应产生的，还会标注代谢反应，因而有助于代谢物的结构推测，最终根据图4d中变化位点的标注结构，推测氧化位点发生在五元吡咯环的N原子的邻位C上。根据这种鉴定模式，一共鉴定到13个代谢物，具体鉴定结果见图6。

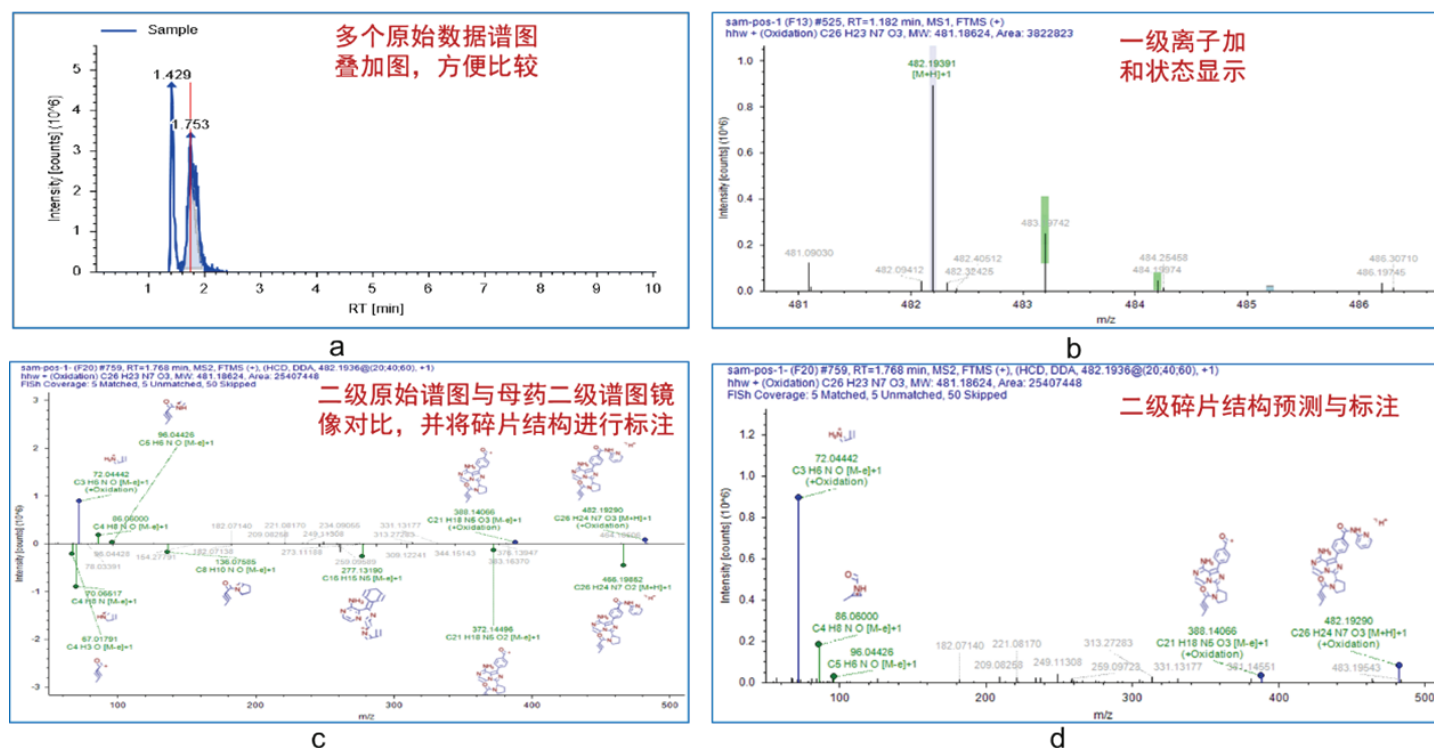


图4 m/z 482.19391代谢物鉴定流程

3.3 MDF非目标代谢物搜索用于代谢产物鉴定

目标代谢物查找模式相对来说是比较简单常规的，可获得常见的代谢产物，而MDF非目标查找代谢物结果远多于目标查找结果，它除了通过MDF进行潜在代谢产物的过滤外，还可以通过导入的母药二级特征碎片离子搜索代谢产物，这种非目标的代谢物查找模式对于查找一些不常规的代谢产物来说非常有效。

在这个模式查找出的代谢产物通常需要根据二级质谱图推测目标代谢产物的结构，可将候选的代谢物结构导入，计算理

论碎片覆盖率，覆盖率越高提示结构可信度越高。如图5所示，m/z 247.10765的class coverage为12.5分，匹配到了一个特征碎片离子，根据二级的裂解规律将推测的候选结构导入，再对其进行二级理论碎片的标注，图5显示大部分二级碎片都有合理结构标注，说明推测的代谢物结构的可信度较高。

通过MDF非目标查找代谢物模式鉴定得到的阿可替尼体内代谢物，大部分与目标代谢反应库鉴定到的代谢物结果重复，除去重复的结果，共鉴定得到两个代谢物，具体鉴定结果见图6。

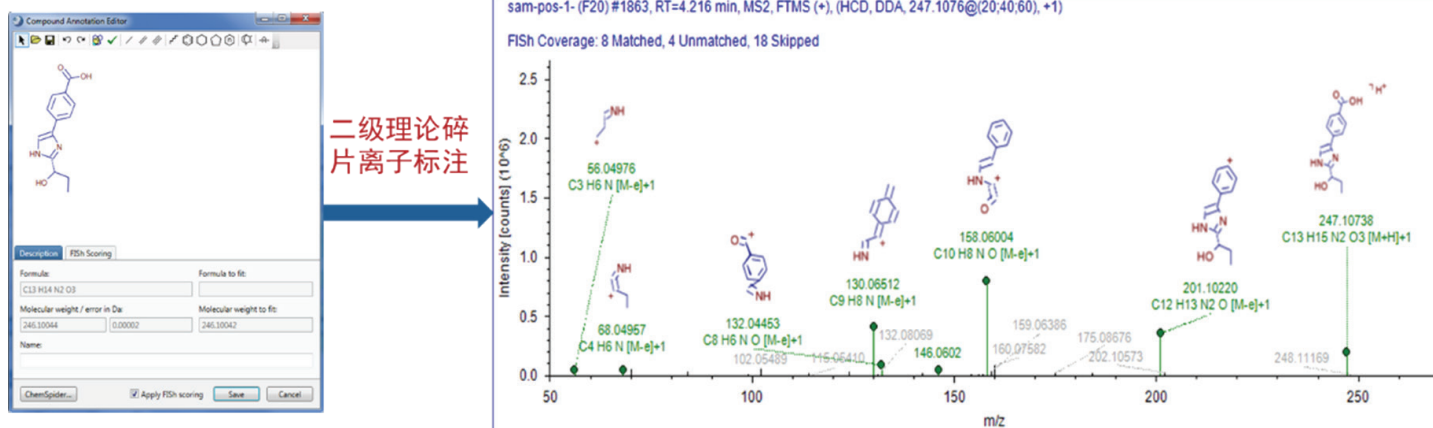


图5 对二级谱图进行理论碎片标注

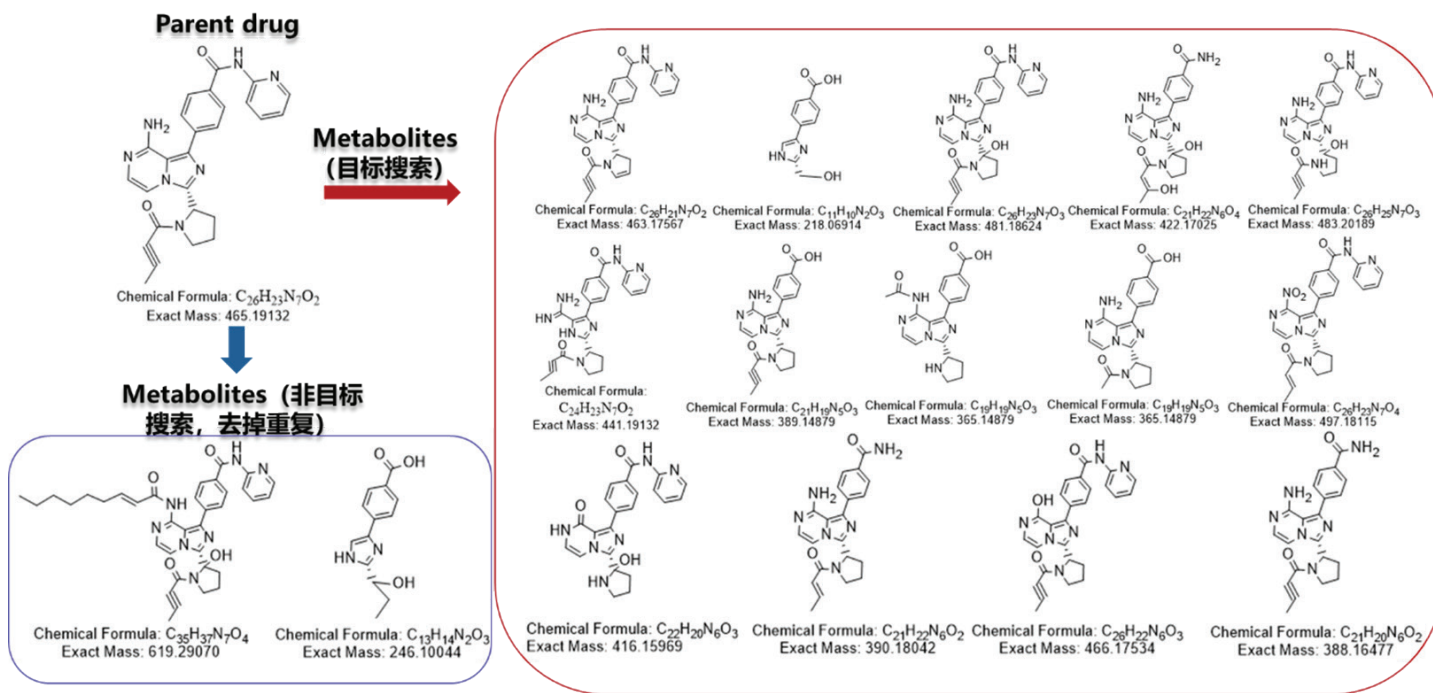


图6 CD软件鉴定阿可替尼的体内代谢产物结果

4. 总结

本次实验建立的液质联用方法，采用10min的梯度，基于母药极性较大，液相模式选择Hilic模式，大部分代谢产物保留时间都大于母药的保留时间，采用Full MS-ddMS2的质谱扫描模式，一次数据采集同时获得样品的一级和二级质谱信息，方法简单高效。

数据处理均在Compound Discoverer 3.1软件上完成，本次阿可替尼代谢产物鉴定选用的工作流程包括两种代谢物查找模式，分别是目标代谢物查找和非目标代谢物查找模式，目标代谢物查找模式中除了搜索CD软件自带的代谢反应库外，根据阿可替尼的母药结构特征自定义了两种酰胺键断裂的代谢反应类型；非目标代谢物查找模式基于MDF过滤和特征碎片离子查找功能，相比于目标查找扩大了代谢物查找范围，这两种查找代谢物模式相结合对于全面查找阿可替尼的体内代谢产物非常有益。

本次实验共鉴定了15个阿可替尼的体内代谢产物，并对代谢产物的结构进行了合理推测，对后续阿可替尼的体内代谢机制研究提供了参考依据。同时本文所述的CD软件药物代谢物鉴定工作流程有利于为复杂基质中未知代谢产物的鉴定提供综合解决方案。

5. 参考文献

- [1] Wang, M., Rule, S., Zinzani, P. L., Goy, A., Casasnovas, O., Smith, S. D., ... & Panizo, C. (2018). Acalabrutinib in relapsed or refractory mantle cell lymphoma (ACE-LY-004): a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *The Lancet*, 391(10121), 659-667.
- [2] Buggy, J. J., & Elias, L. (2012). Bruton tyrosine kinase (BTK) and its role in B-cell malignancy. *International reviews of immunology*, 31(2), 119-132.
- [3] Ponader, S., & Burger, J. A. (2014). Bruton's tyrosine kinase: from X-linked agammaglobulinemia toward targeted therapy for B-cell malignancies. *Journal of clinical oncology*, 32(17), 1830.
- [4] Barf, T., Covey, T., Izumi, R., van de Kar, B., Gulrajani, M., van Lith, B., ... & Verkaik, S. (2017). Acalabrutinib (ACP-196): a covalent Bruton tyrosine kinase inhibitor with a differentiated selectivity and in vivo potency profile. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 363(2), 240-252.
- [5] Podoll, Terry, et al. "Bioavailability, biotransformation, and excretion of the covalent Bruton tyrosine kinase inhibitor acalabrutinib in rats, dogs, and humans." *Drug Metabolism and Disposition* 47.2 (2019): 145-154.
- [6] Edlund, Helena, et al. "Population Pharmacokinetics of the BTK Inhibitor Acalabrutinib and its Active Metabolite in Healthy Volunteers and Patients with B-Cell Malignancies." *Clinical pharmacokinetics* 58.5 (2019): 659-672.



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

Thermo Fisher
SCIENTIFIC