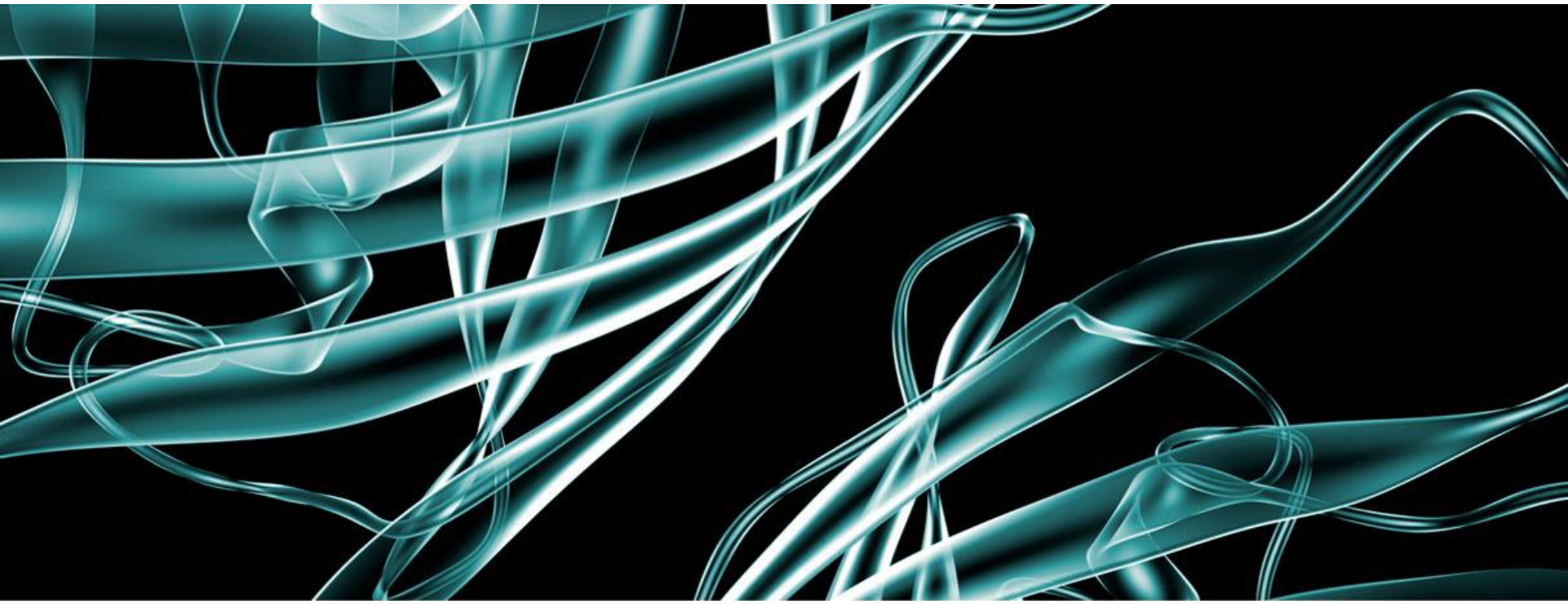


Современные технологии масс-спектрометрии в изучении путей биотрансформации лекарственных средств.

Александр Кирилюк PhD

Москва, ул Краснопролетарская, 7 т. 499-973-92-80,

ХИМЭКСПЕРТ

SCIEX

Исследование метаболизма:

- Фармакокинетика – описывает что организм делает с лекарством
  - **A**bsorption (*Абсорбция*)
  - **D**istribution (*Распределение*)
  - **M**etabolism (*Метаболизм*)
  - **E**xcretion (*Экскреция*)
- Фармакодинамика– изучение, как лекарство влияет на организм

…комплекс количественного и качественного анализа для понимания эффектов взаимодействия организма и лекарства

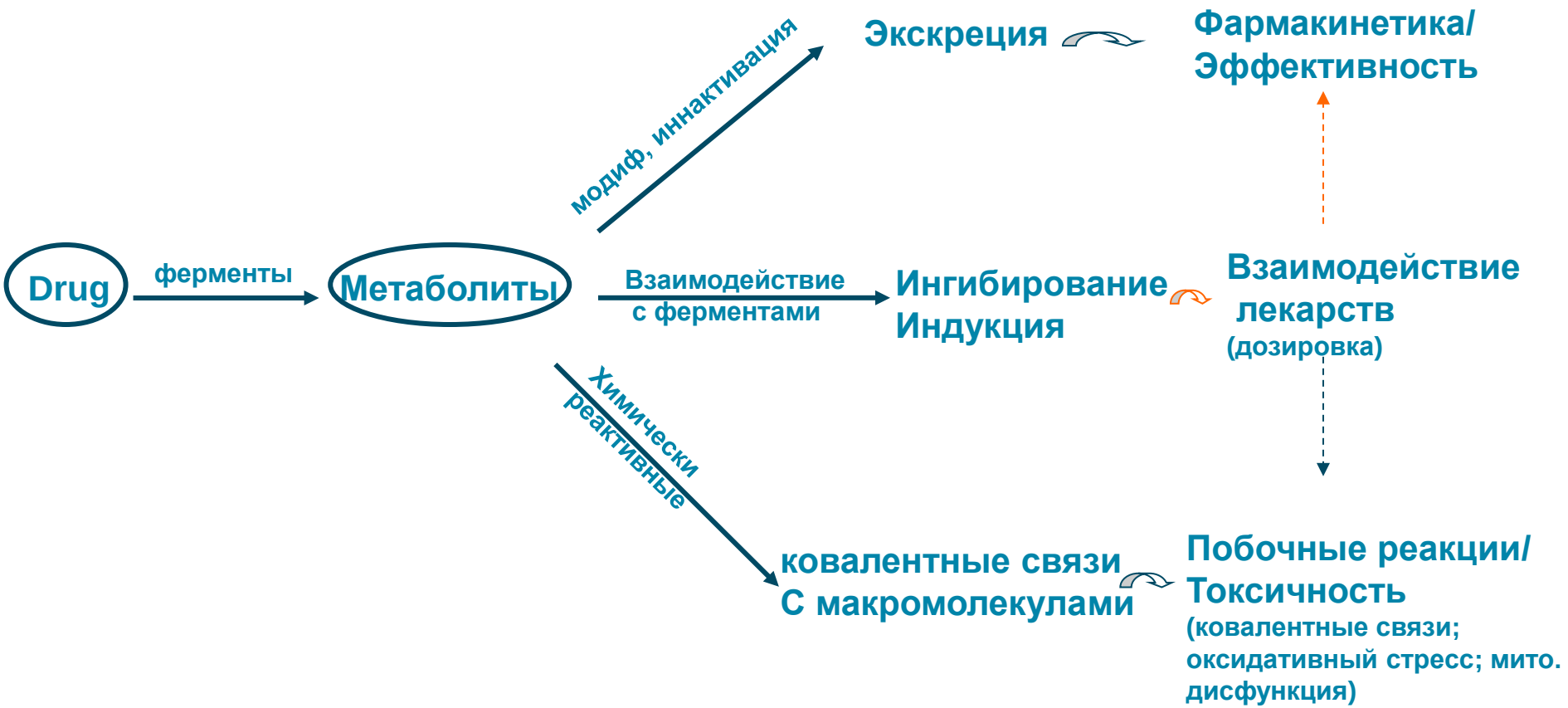
© 2013 AB SCIEX

- Нужно определить, что происходит с лекарством после попадания его в организм
  - Организм воздействует на лекарство, делая его более полярным, что облегчает выведение
  - **Наша цель – найти и описать эти Мет.**
  - В дальнейшем – определить их токсичность, возможность накопления в организме и основные пути выведения.
- Метаболитные реакции разделяют на биотрансформации Фазы I и Фазы II
  - Реакции Фазы I - введение функциональной группы или раскрытие существующей
  - Реакции Фазы II (биосинтетические реакции) конъюгация с глюкуроновой, серной кислотами, глутатионом…
- Метаболизм происходит главным образом в печени

Для исследований метаболизма лекарственных препаратов исследователи используют микросомальную фракцию или гепатоциты печени человека

© 2013 AB SCIEX

Метаболизм – полный набор химических реакций, происходящих в живом организме (освобождение от лекарства)



© 2013 AB SCIEX

Разные цели на разных этапах

- **Discovery**
  - **ID наиболее “быстрых” Мет**
  - **Определение сайтов трансформации** для возможности изменения структуры лекарства и предотвращения формирования токсичных Мет
  - **Типично использование *in vitro* систем** – чистые матрицы
  - **Быстрота анализа** – описание 80% Мет с фокусировкой на наиболее выраженных основных Мет
- **Development**
  - **First-in-man**
  - **Описание всех Мет**
  - **Мониторинг активных Мет в сложных грязных матрицах.**

© 2013 AB SCIEX

Как мы проводим поиск и идентификацию метаболитов (Met ID)?

- К счастью, трансформация происходит по хорошо изученным метаболитным путям:

  Гидроксилирование, окисление, деметилирования ....

  Глюкуронидация ...

- Как правило, в первую очередь исследователи старались предсказать, какие метаболиты могут быть и целенаправленно искать эти соединения.
- Относительно простые эксперименты
- Сравнение образца и контроля (контроль- матрица без инкубации
- Любые пики в образце, отсутствующие в контроле- потенциальные Мет
- При анализе данных используется простой интуитивный рабочий процесс, создающий извлеченные ионные хроматограммы для ожидаемых метаболитов

© 2013 AB SCIEX

- **Общепринятые *in vitro* системы:**
  - **Hepatocyte: fresh or cryo-preseved**
  - **Liver S9 fraction**
  - **Liver microsome**
  - **Recombinate P450s and other metabolizing enzyms**

- ***in vivo* образцы (живых организмов)**
  - **моча**
  - **желчь**
  - **кровь/плазма и тд**

Сложные матрицы

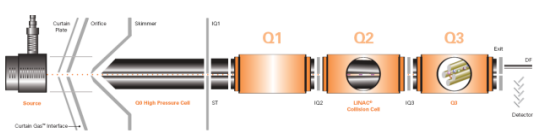
© 2013 AB SCIEX

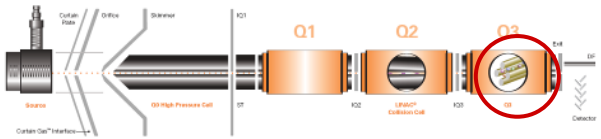
Что движет исследование метаболизма потенциального лекарства:

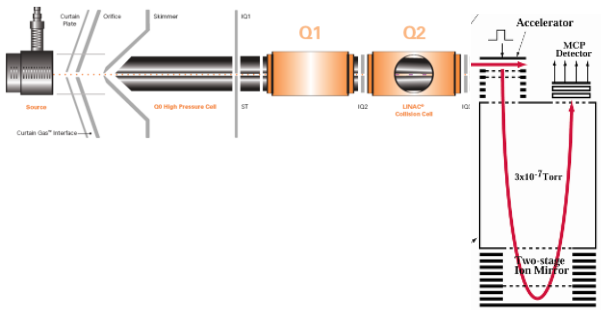
- Создание нового лекарственного препарата – это длительный процесс и включает множество этапов, прежде чем потенциальный лекарственный препарат выйдет на уровень клинических испытаний. (Среднее время от синтеза потенциального соединения до утверждения нового препарата (new drug application, NDA) значительно увеличилось до 12-13 лет
- Время –деньги! Разработка и внедрение нового лекарства в сжатые и экономически обоснованные сроки
- Быстрое описание метаболизма лекарства (Э**то не значит выявление точных масс метаболитов!**): показания и противопоказания к применению, установление химического строения основных метаболитов, их токсичности и фармакотерапевтического вклада в общую активность препарата, дозировка, фармакокинетика

© 2013 AB SCIEX

Основные МС платформы







TripleQuad™

- Количественный анализ
- ID - MRM

QTRAP®

- Количественный анализ
- ID - MRM
- **ID - MS/MS**

TripleTOF™

- Количественный анализ
- ID – точность определения массы
- ID - MS/MS и библиотечный поиск
- **SWATH**
- **Ретроспективный анализ**

Уверенность в определении неизвестных соединений

QqTOF (TrpleTOF)

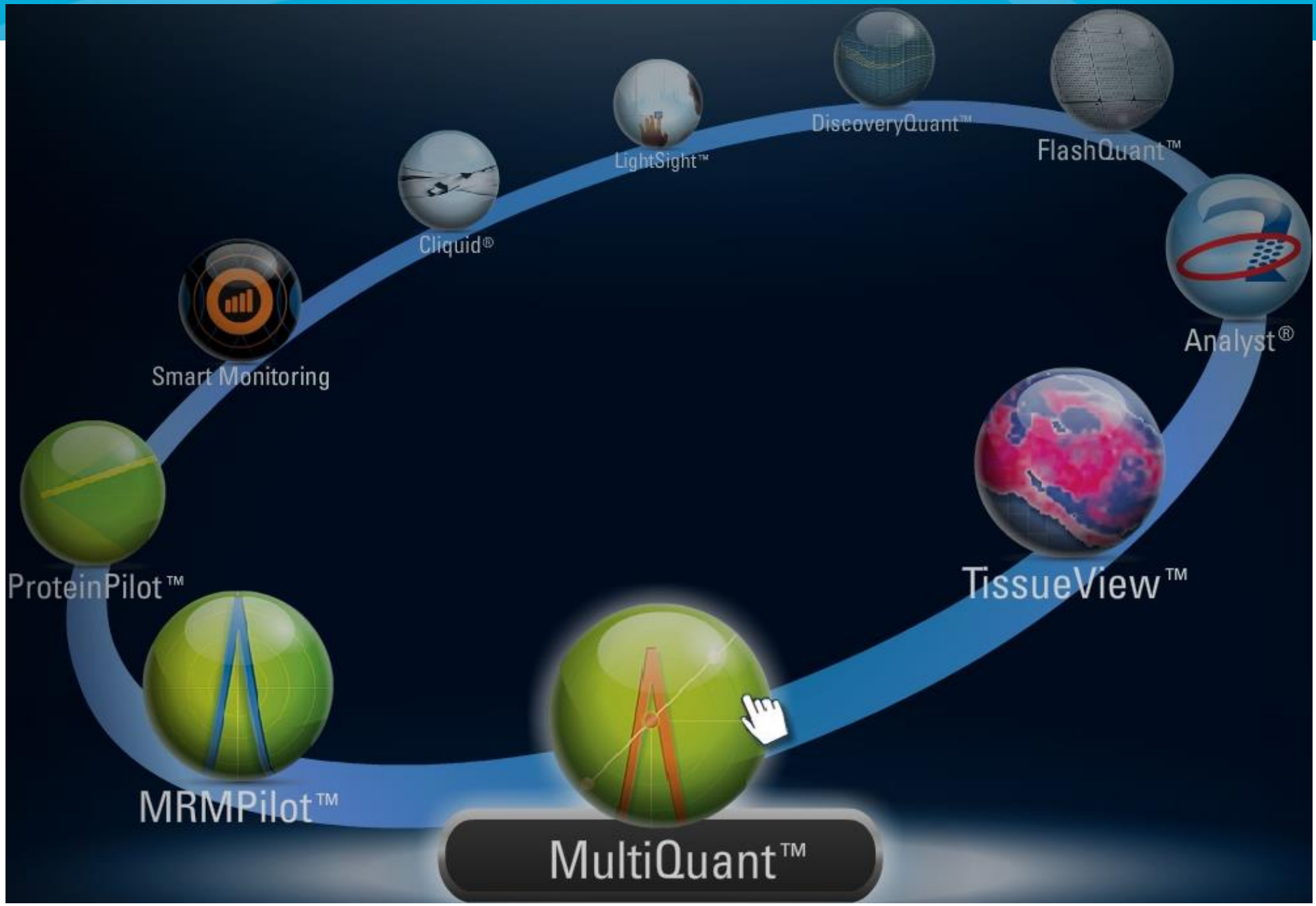
ограниченная линейность и чувствительность по сравнению с 3Q
Высокая скорость сканирования (100 Гц)
Высокое разрешение (MS и MS/MS) на всем диапазоне масс с сохранением высокой скорости сканирования
Высокая точность определения массы (менее 1 ppm для MS и MS/MS)

QTRAP

Отличная линейность динамического диапазона (более 6 порядков)
Отличная чувствительность для количественного (для номинальных масс) и качественного анализа
Низкое разрешение в 3Q компенсируется более точным определением массы в LIT (окончательная идентификация – MS/MS в режиме EPI)

© 2013 AB SCIEX

Программные решения



SCIEX 6500+ with HED+ Detector

Industry proven performance: IonDrive™ Turbo V™ ion source and QJet® ion guide

- Улучшенная чувствительность с ***HED+ detector technology***
- Усиленная производительность DMS SelexION+ с ***“new jet injector DMS cell”***
- **Быстрое переключение полярности** (5 msec)
- Значительное уменьшение шумности

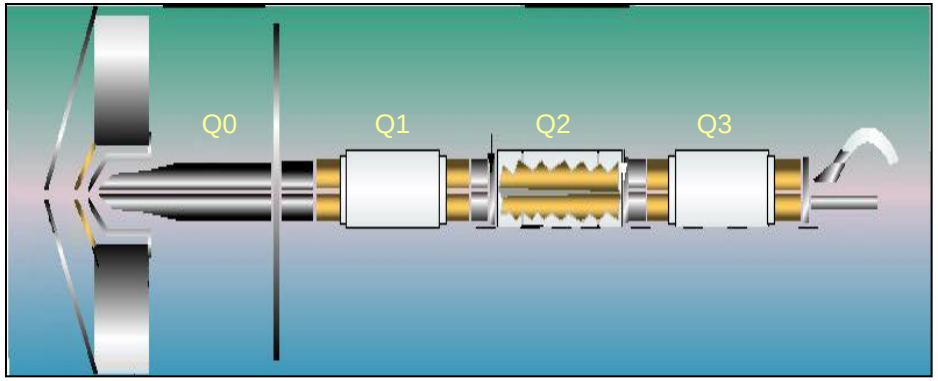


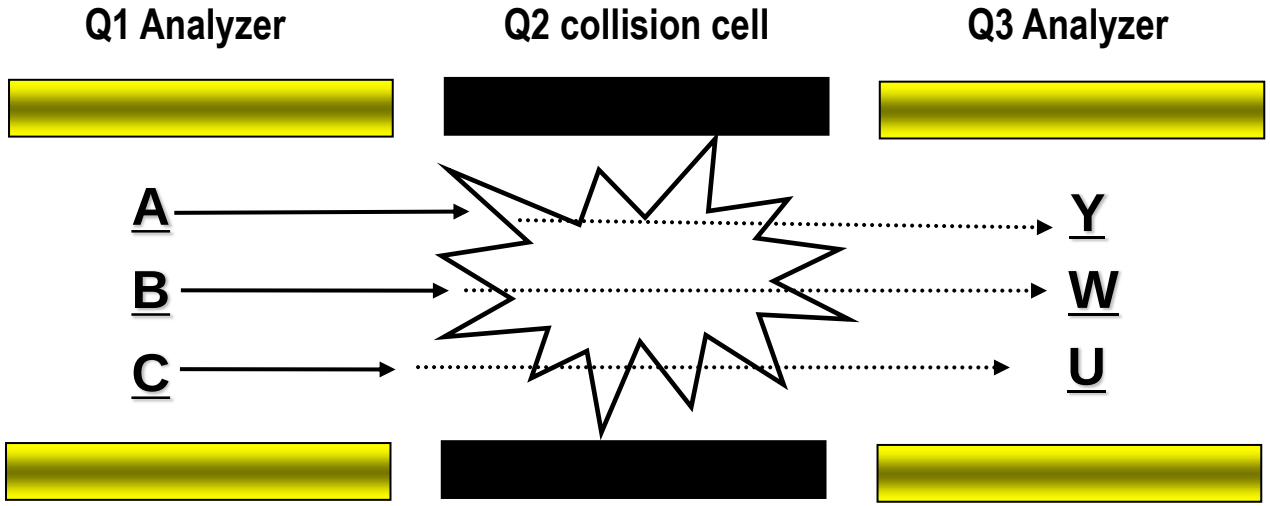
ХИМЭКСПЕРТ SCIEX

SCIEX

Multiple Reaction Monitoring (MRM)

Best S/N – lowest detection limits
Quantitation of multiple analytes



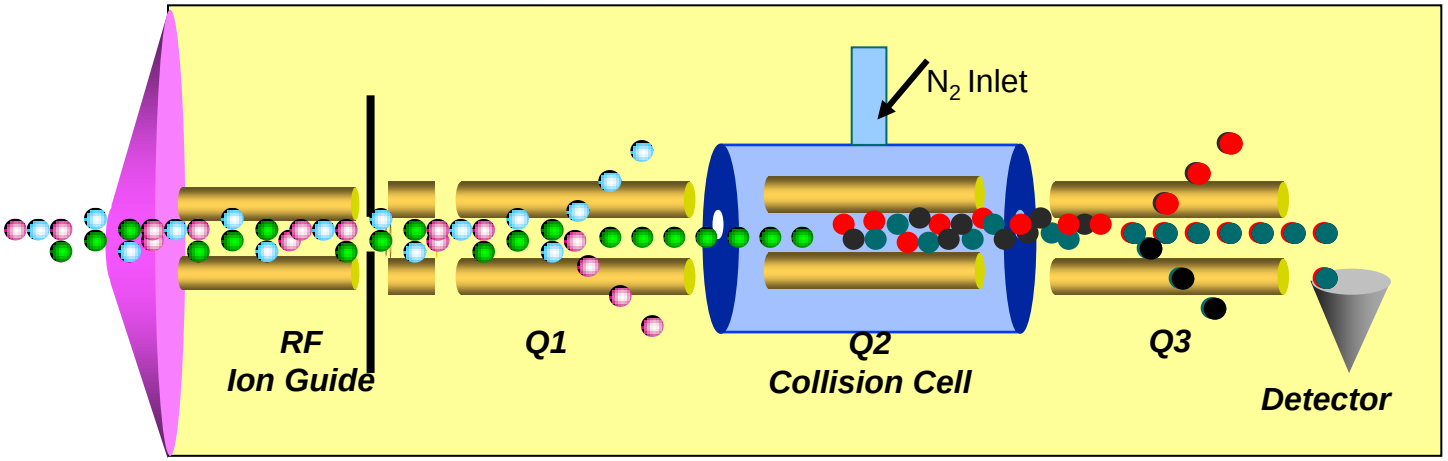


Quantitative Analysis

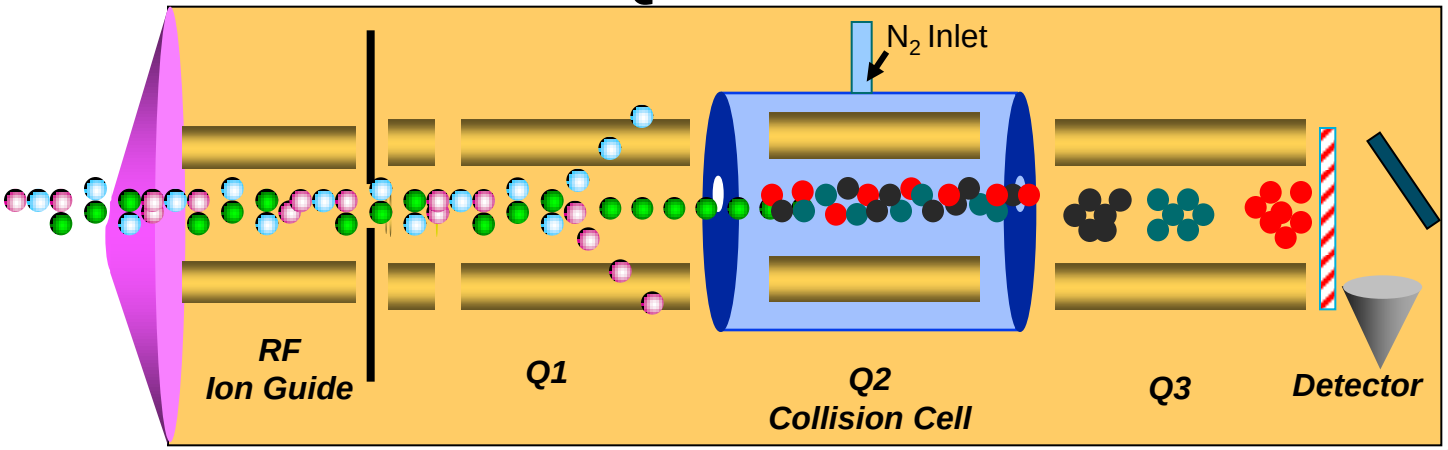
A-Y : Quantitation
B-W : Confirmation
C-U : ISTD

© 2013 AB SCIEX

Triple quadrupole MS/MS



QTRAP MS/MS



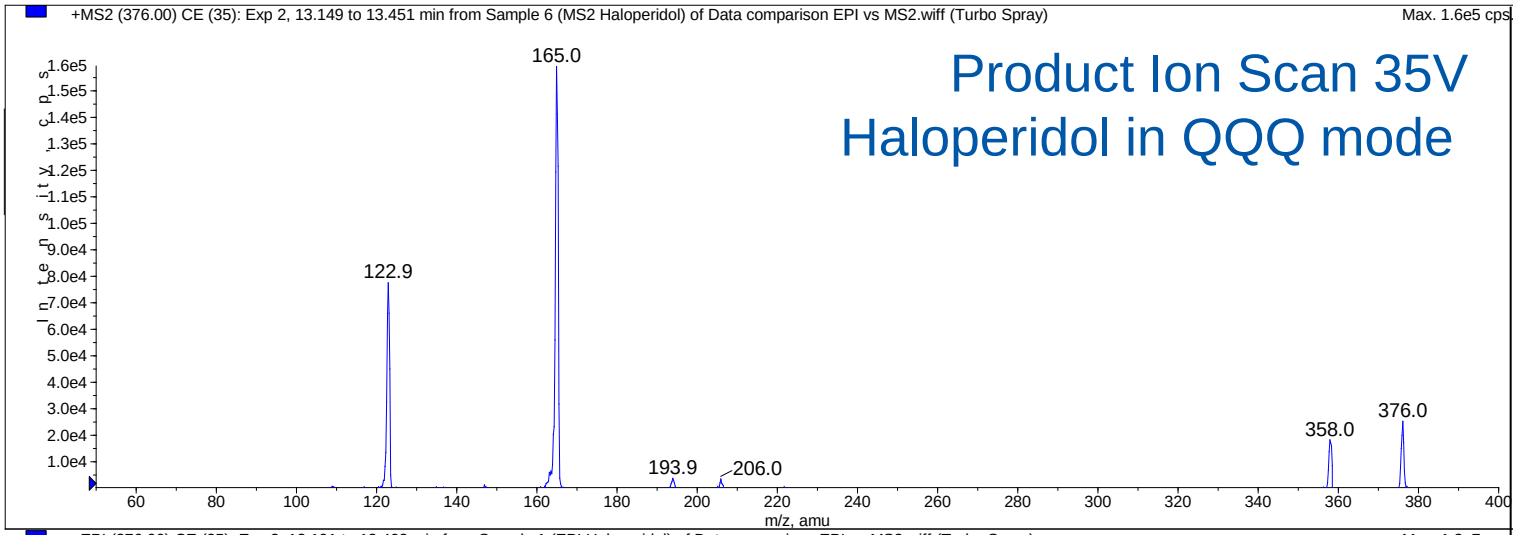
© 2013 AB SCIEX

Особенности технологии QTRAP®

- Система QTRAP® это масс-анализатор типа тройной квадруполь, со всеми возможностями данного типа
  - Все виды сканирования (MRM, *Scheduled* MRM™, скан ионов-предшественников, скан нейтральной потери)
  - Все возможности тройного квадруполя, без компромиссов, потерь чувствительности или селективности
- **Дополнительные возможности системы QTRAP® .**
  - Быстрое и чувствительное ER сканирование
  - Быстрое и чувствительное MS/MS сканирование
  - Быстрое и чувствительное MS/MS/MS сканирование
  - Высоко селективный режим MRM^3
  - Все типы сканирования можно комбинировать с методом IDA (Информационно-Зависимым Анализом)

© 2013 AB SCIEX

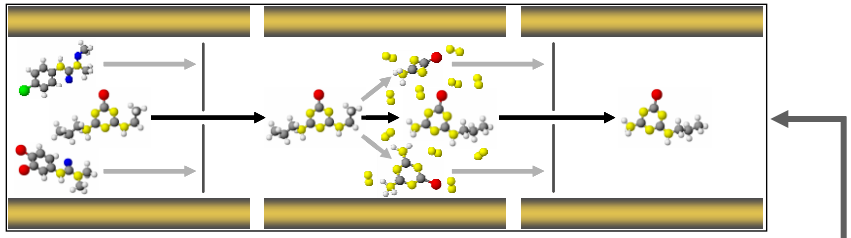
MS/MS versus Enhanced MS/MS

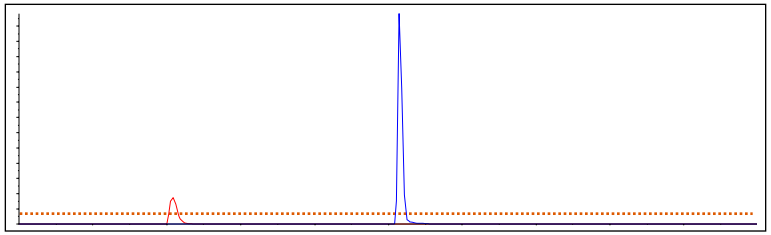


© 2013 AB SCIEX

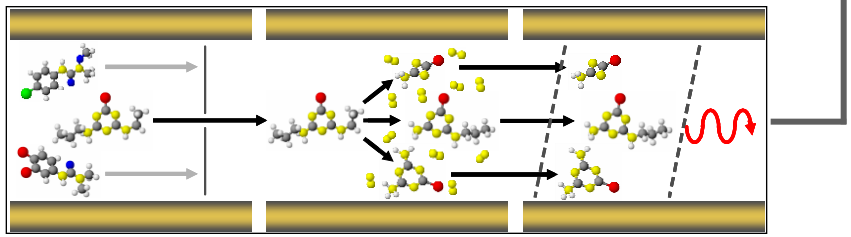
TripleTrap
Количественный анализ с MS/MS идентификацией

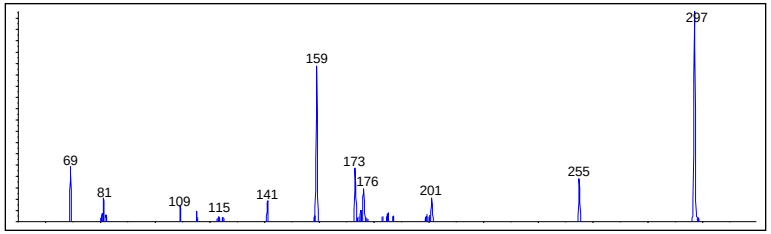
Scheduled MRM™ обзор



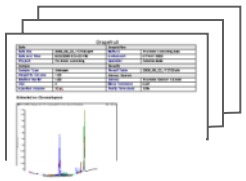


EPI





Анализ



© 2013 AB SCIEX

Взаимодополняющие решения для метаболомных задач



TripleTOF™ system solutions

QTRAP® system solutions

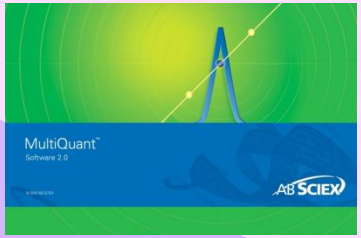












Нецелевой **Целевой**

© 2013 AB SCIEX

Сравнение Нецелевого и Целевого Анализа

Нецелевой анализ

MS → MS/MS

Преимущество:

Обнаружение любых метаболитов

Недостатки:

Ниже динамич. диапазон и чувствительность. Требование к ПО.

Целевой анализ

MRM и MRM-MS/MS

Преимущество:

чувствительность, производительность, динамический диапазон, количественный анализ, простая информатика

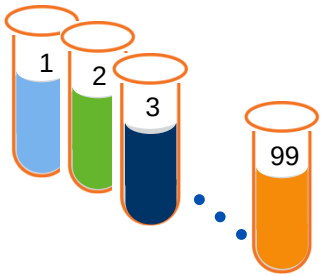
Недостатки:

Метод разрабатывается предварительно, обнаружение неизвестных соединений менее эффективно

© 2013 AB SCIEX

Общие Подходы в Метаболомике







Метаболитный профиль
MS → MS/MS

Дифференциальное профилирование

ID релевантных метаболитов

Целевая метаболомика
QQQ → MS/MS

ID релевантных метаболитов

Количественный анализ

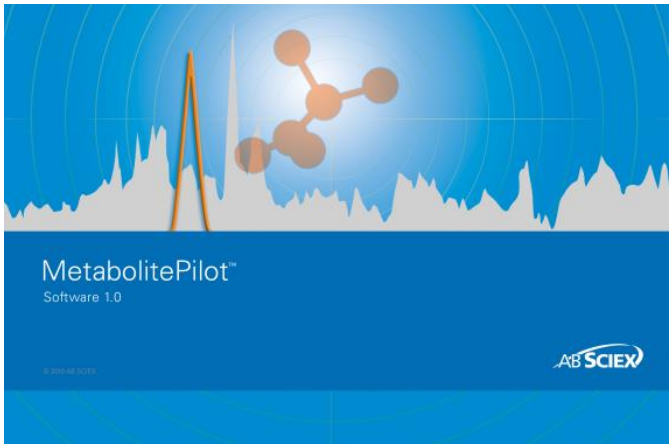
Отчет

© 2013 AB SCIEX

MetabolitePilot™ Software

This is our accurate mass metabolite identification software for the TripleTOF System:

- A compound library and results database for storage of compound and metabolite information
- Ability to process multiple samples in a batch mode (process accurate mass metabolism data)
- Quickly review the results with associated confidence scoring.
- Multiple Mass Defect filtering capabilities for cleaner, more relevant data
- Formula prediction with a high level of chemical intelligence

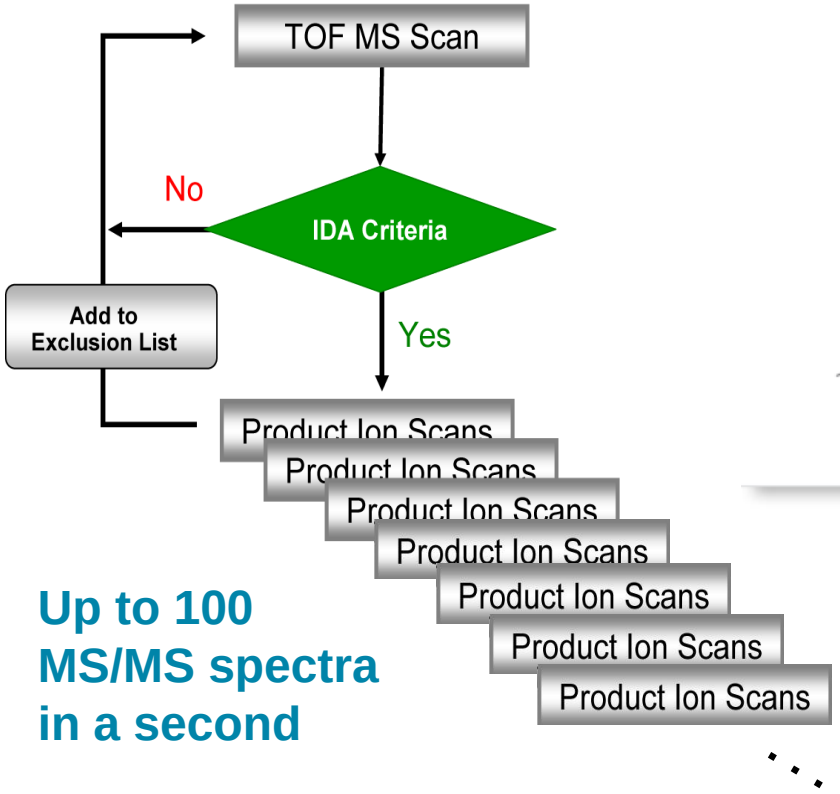




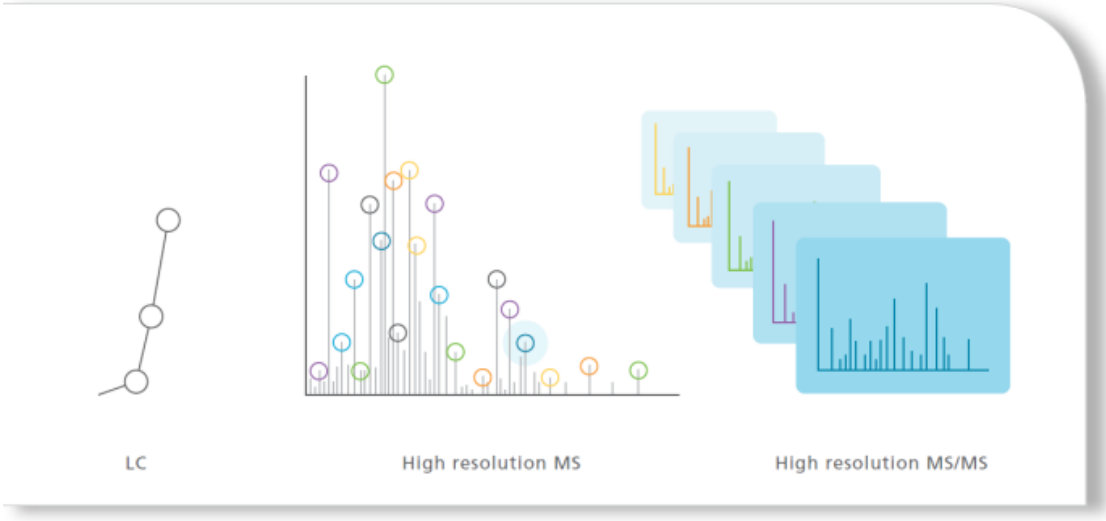


© 2013 AB SCIEX

Data Dependent Acquisition



Up to 100 MS/MS spectra in a second



- Fast scan speed with smart IDA logics
  - Dynamic Background Subtraction
  - Neutral Loss IDA
  - Multiple Mass Defect Filtering
  - iTRAQ™ option

© 2013 AB SCIEX

Ключевые преимущества QTRAP® системы с ПО LightSight® для поиска и идентификации метаболитов





- Четко разработанная стратегия и рабочий процесс
- Поиск GSH реактивных метаболитов благодаря:
  - Быстрому переключению полярности
  - Быстрым сканам поиска по фрагменту или по нейтральной потере
  - Автоматическому формированию метода– *LightSight ПО*
  - Короткому времени анализа отдельной реакции– 1-*2 мс*
- Поиск неизвестных метаболитов с использованием сканирования в линейной ионной ловушке LIT
- Высокая чувствительность и скорость сканирования– *20,000 Da/c*

© 2013 AB SCIEX

Стратегия поиска и идентификации метаболитов

- Предсказательный подход для формирования списка Мет. через MRM
  - Самая чувствительная технология
  - Практически полный лист потенциальных Мет.
  - Возможность сканирования сотен Мет.
  - MS/MS для подтверждения в одном анализе
- Поиск по фрагменту/ нейтральной потере
  - Фильтрация сигнала на основе структурной информации
  - Идеально для реактивных метаболитов (коньюгаты глютатиона)

© 2013 AB SCIEX

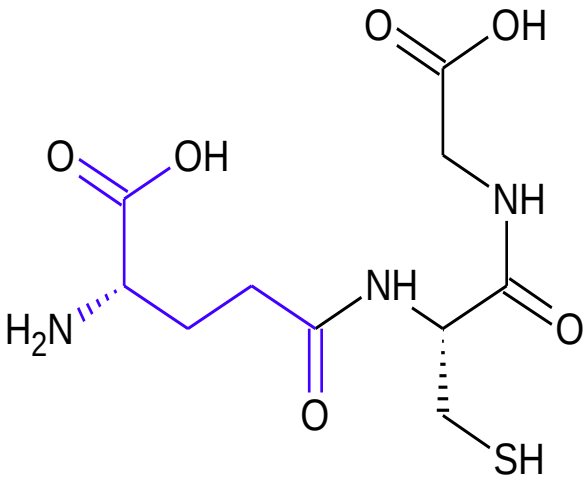
Стратегия поиска и идентификации метаболитов





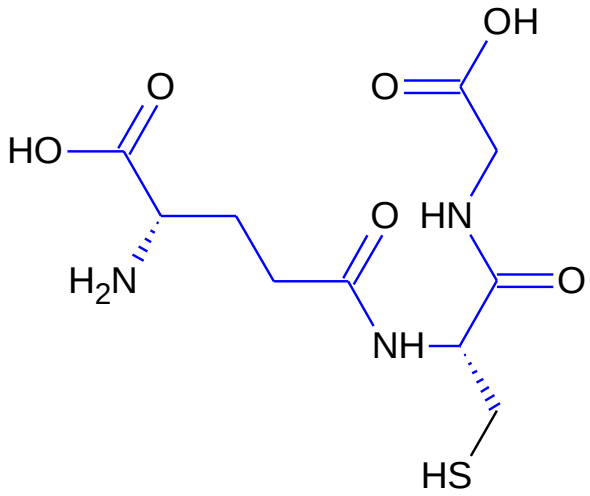
© 2013 AB SCIEX

Поиск GSH реактивных метаболитов



(+) Neutral Loss of 129

- Applicable to a wide variety of GSH adducts
- Sensitive and selective
- Optimum collision energy can vary significantly based on substrate
- Glutamic acid loss is common

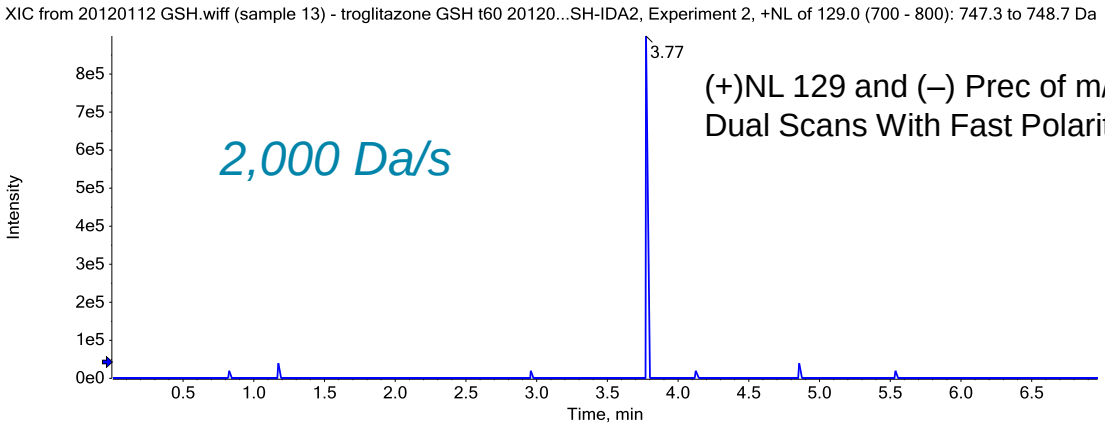


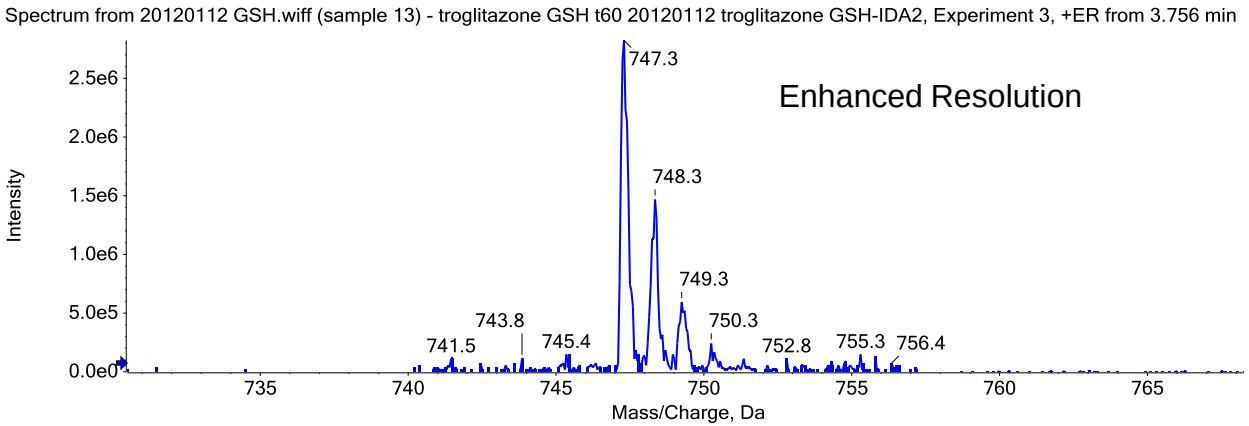
(-) Precursors of m/z 272

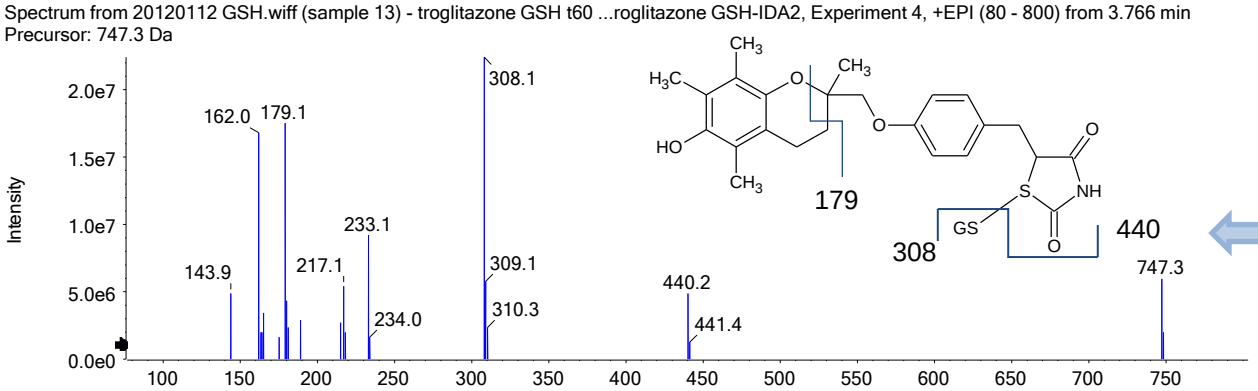
- Highly selective since it is done in negative ion mode
- Collision energy is largely independent of substrate structure
- High sensitivity
- Requires polarity switch back to positive ion to obtain full product ion spectrum

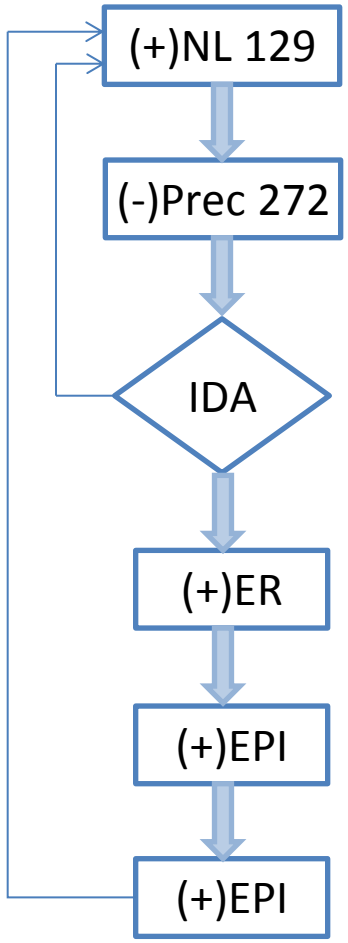
© 2013 AB SCIEX

Определение коньюгатов глутатиона

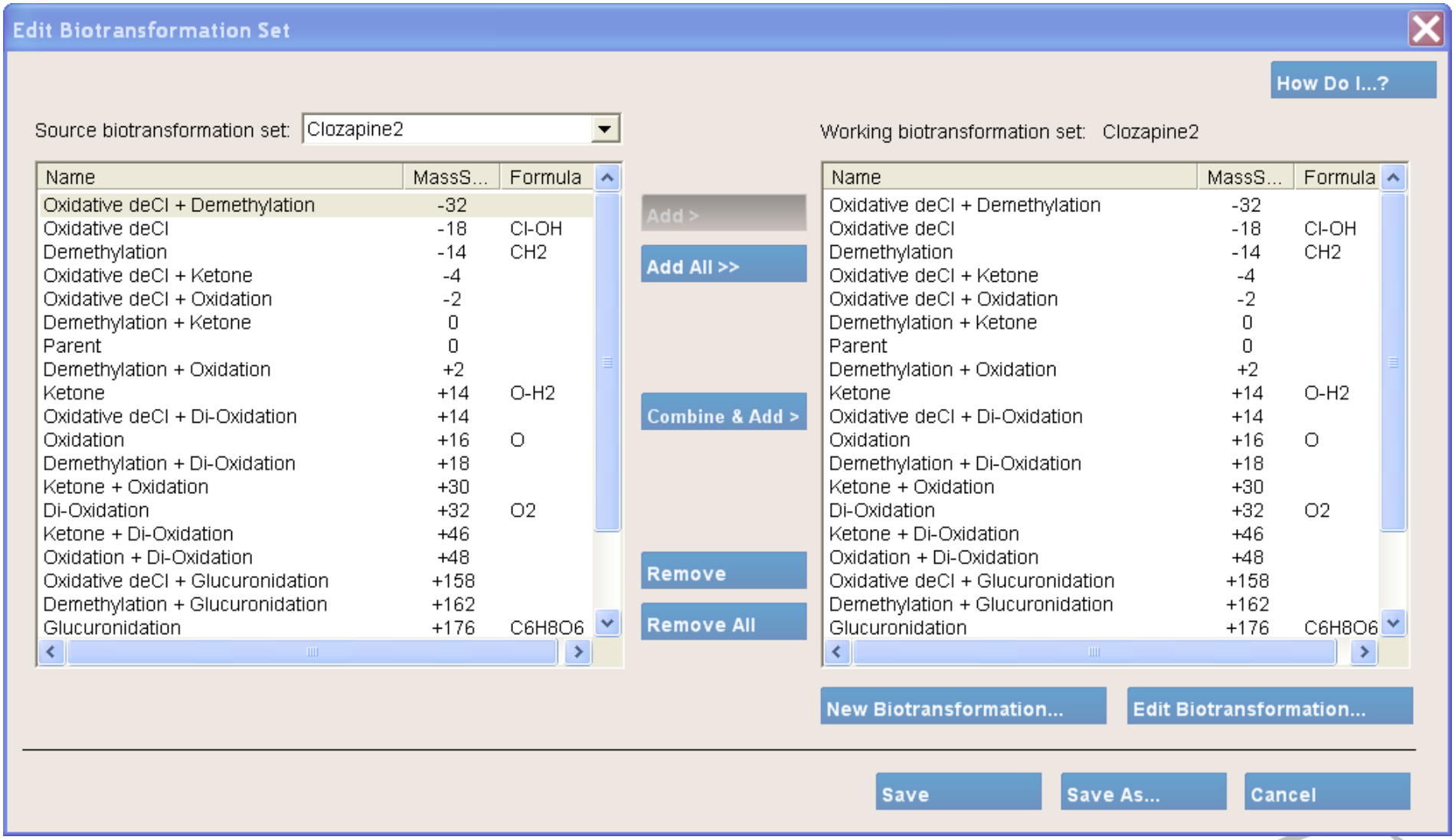








LightSight™ ПО Создает Расширенный Список Трансформаций

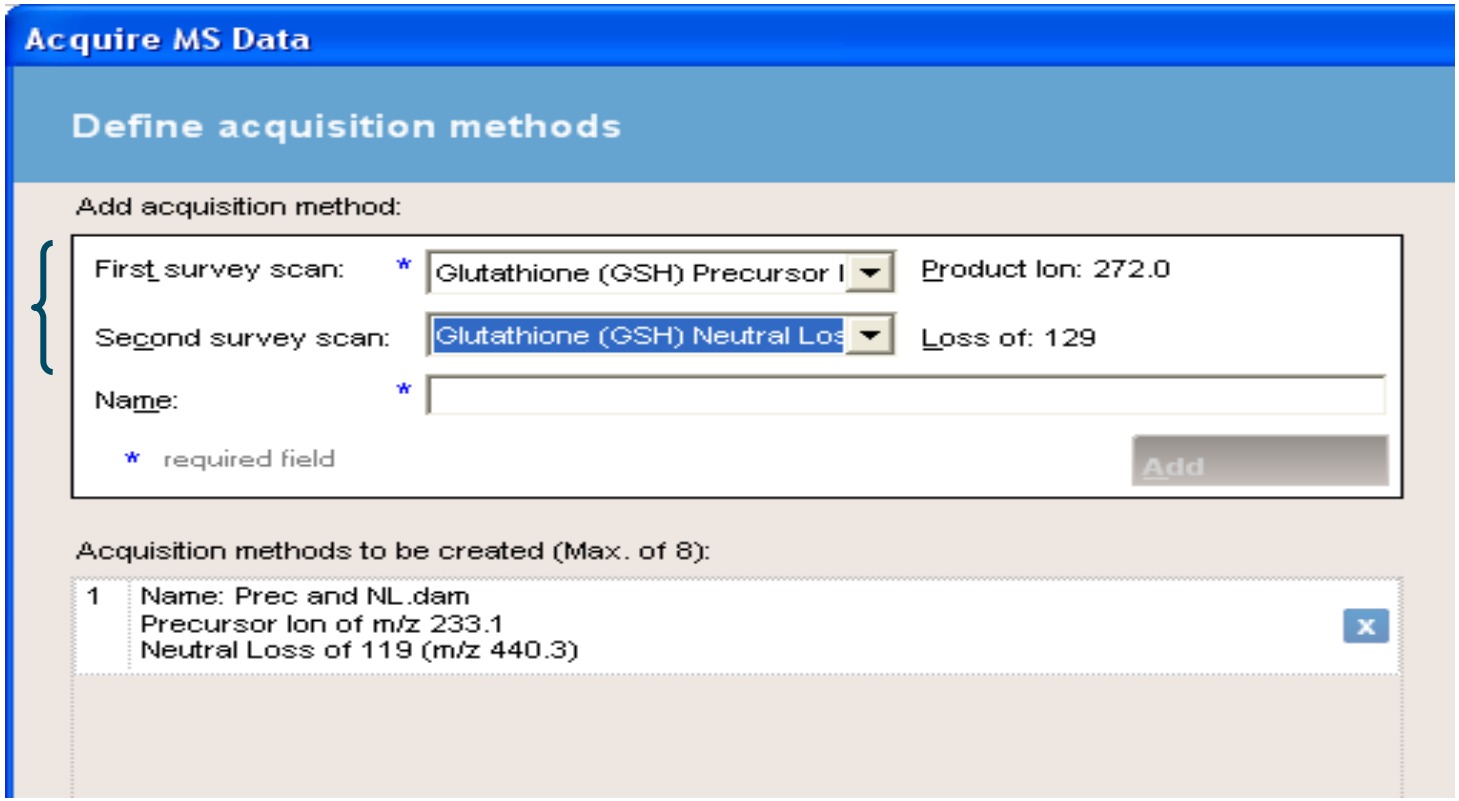


© 2013 AB SCIEX

Автоматический генератор метода для QTRAP® системы

- Комбинирование разных типов сканов в одном методе

Создание нескольких обзорных сканов



© 2013 AB SCIEX

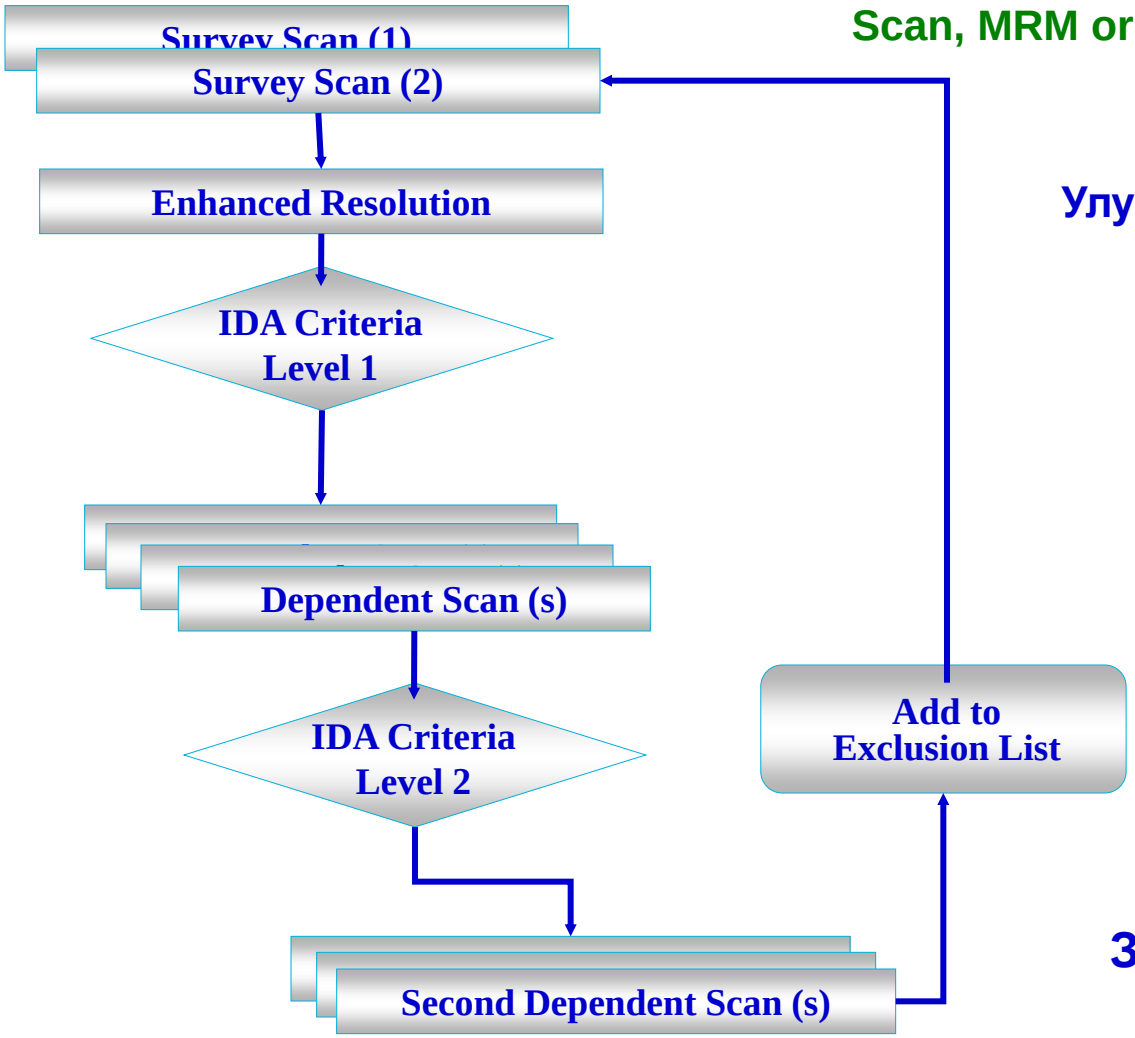
Теоретический список MRM генерируемый в LightSight™

Q1	Q3	Dwell	DP	CE	CXP
295.2	192.1	20	50	55	14
295.2	160.1	20	50	55	14
295.2	174.1	20	50	55	14
295.2	178.1	20	50	55	14
309.2	192.1	20	50	55	14
309.2	174.1	20	50	55	14
313.2	192.1	20	50	55	14
313.2	178.1	20	50	55	14
323.2	192.1	20	50	55	14
323.2	188.1	20	50	55	14
323.2	174.1	20	50	55	14
323.2	206.1	20	50	55	14
325.2	192.1	20	50	55	14
325.2	190.1	20	50	55	14
325.2	174.1	20	50	55	14
325.2	208.1	20	50	55	14
327.2	192.1	20	50	55	14
327.2	178.1	20	50	55	14
327.2	206.1	20	50	55	14
329.2	192.1	20	50	55	14
329.2	194.1	20	50	55	14
329.2	178.1	20	50	55	14
329.2	208.1	20	50	55	14
341.2	192.1	20	50	55	14
341.2	206.1	20	50	55	14
341.2	174.1	20	50	55	14
341.2	190.1	20	50	55	14
341.2	208.1	20	50	55	14
343.2	192.1	20	50	55	14
343.2	208.1	20	50	55	14
345.2	192.1	20	50	55	14
345.2	210.1	20	50	55	14
345.2	178.1	20	50	55	14
345.2	194.1	20	50	55	14
345.2	208.1	20	50	55	14
357.2	192.1	20	50	55	14
357.2	222.1	20	50	55	14
357.2	206.1	20	50	55	14
357.2	208.1	20	50	55	14
359.2	192.1	20	50	55	14
359.2	224.1	20	50	55	14
359.2	208.1	20	50	55	14
373.2	192.1	20	50	55	14
373.2	238.1	20	50	55	14
373.2	206.1	20	50	55	14
373.2	222.1	20	50	55	14
373.2	208.1	20	50	55	14
375.2	192.1	20	50	55	14
375.2	240.1	20	50	55	14
375.2	208.1	20	50	55	14
375.2	224.1	20	50	55	14
485.2	192.1	20	40	55	14
485.2	350.1	20	40	55	14
485.2	309.2	20	40	55	14
485.2	174.1	20	40	55	14
485.2	368.1	20	40	55	14
489.2	192.1	20	40	55	14
489.2	354.1	20	40	55	14
489.2	313.2	20	40	55	14
489.2	178.1	20	40	55	14
489.2	368.1	20	40	55	14
503.2	192.1	20	40	55	14
503.2	368.1	20	40	55	14
503.2	327.2	20	40	55	14
517.2	192.1	20	40	55	14
517.2	382.1	20	40	55	14
517.2	341.2	20	40	55	14
517.2	206.1	20	40	55	14
517.2	368.1	20	40	55	14
519.2	192.1	20	40	55	14
519.2	384.1	20	40	55	14
519.2	343.2	20	40	55	14
519.2	208.1	20	40	55	14
519.2	368.1	20	40	55	14
535.2	192.1	20	40	55	14
535.2	400.1	20	40	55	14
535.2	359.2	20	40	55	14
535.2	208.1	20	40	55	14
535.2	384.1	20	40	55	14
535.2	368.1	20	40	55	14

LightSight™ ПО автоматически формирует параметры для потенциальных метаболитов

© 2013 AB SCIEX

Информационно-зависимый анализ



Обзорный скан: EMS, Neutral Loss, Precursor Scan, MRM or EPI (возможна комбинация двух сканов)

Улучшенное разрешение/ точность

Критерии выбора

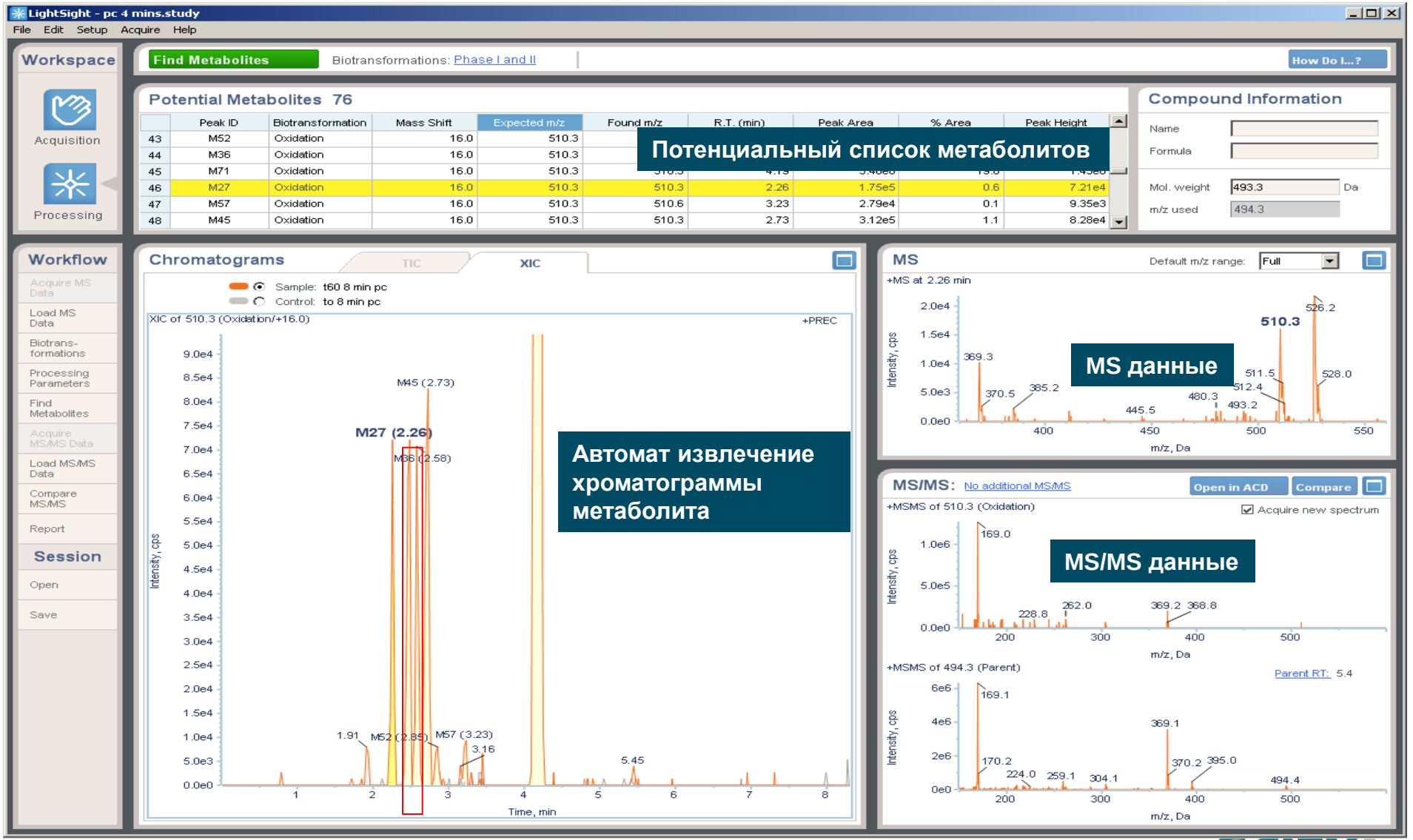
Зависимые сканы (EPI, Product Ion and MS3)

Список включения/исключения

Зависимые сканы второго уровня (MS^3)

© 2013 AB SCIEX

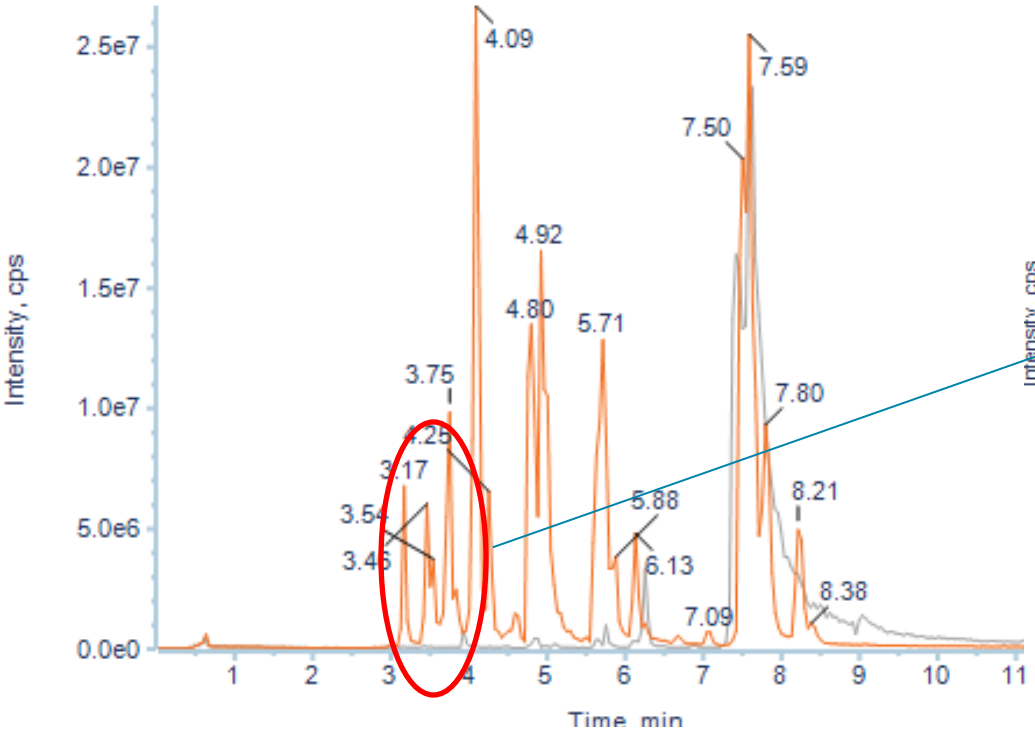
Простой рабочий процесс в LightSight®

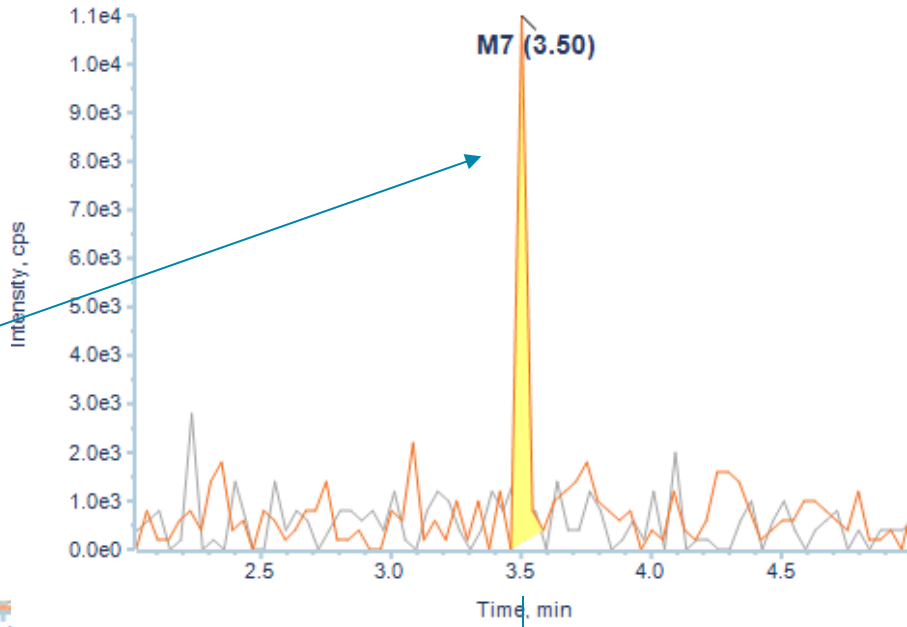


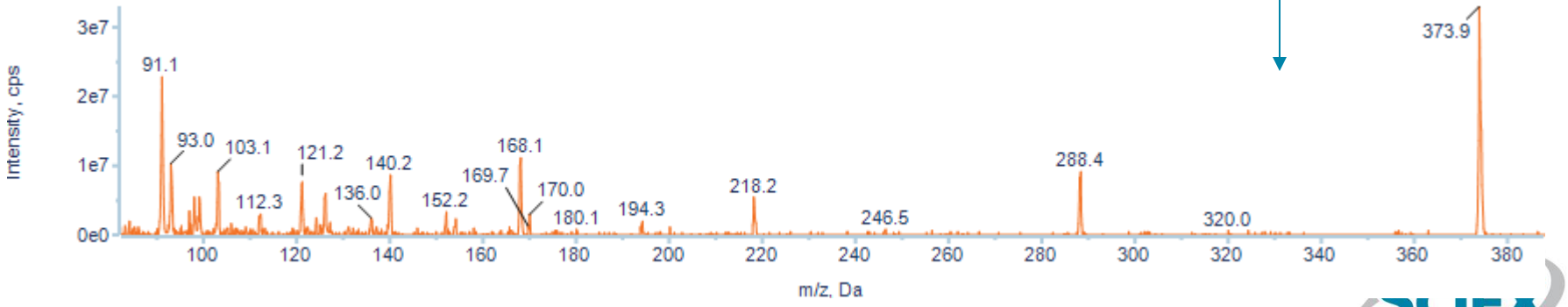
© 2013 AB SCIEX

Nefazadone

pMRM







© 2013 AB SCIEX



Спасибо

Александр Кирилюк, PhD
Москва, ул Краснопролетарская, 7 т. 499-973-92-80
akirilyuk@khimexpert.ru