

# Identifikation von Peptiden und deren Metaboliten mittels hochauflösender LC-MSMS und Mass-MetaSite

**Thum Nicola**

Bachelor-Thesis, Molecular Life Sciences, Chemie

Auftraggeber: Dr. Andreas Brink, F. Hoffmann-La Roche Ltd.

Experte: Dr. Markus Ehrat, EK Biosciences GmbH

Begleitdozent: Prof. Dr. Götz Schlotterbeck, Fachhochschule Nordwestschweiz

## ZUSAMMENFASSUNG

Therapeutische Peptide haben einen immer grösser werdenden Stellenwert in der Erforschung und Entwicklung von Medikamenten und können als Biomarker oder Wirkstoff eingesetzt werden. Um die Peptide in verschiedenen Matrices nachweisen zu können, sind Informationen über den Metabolismus sowie robuste und empfindliche analytische Methoden erforderlich. In dieser Arbeit wurde ausgehend von Cyclosporin eine Methode entwickelt um Peptide und deren Metaboliten mittels LC-MSMS nachzuweisen. Dabei wurden die Peptide in vitro mit humanen Lebermikrosomen (HLM) inkubiert. Die Messungen wurden an zwei verschiedenen Geräten (Waters Xevo G2 QTOF und Thermo Q Exactive Orbitrap) mit drei Aufnahmetechniken ( $MS^E$ , AIF und  $MS^2$ ) durchgeführt. Die erhaltenen Daten wurden manuell mit der gerätespezifischen Software und mit einer geräteunabhängigen Software (Mass-MetaSite) ausgewertet. Die Resultate wurden untereinander und mit Literaturwerten verglichen und die Anwendbarkeit der entwickelten Methode zum Schluss durch die Messung weiterer, strukturell verschiedener Peptide bestätigt.

## EINLEITUNG

Cyclosporin ist ein zyklisches Peptid mit der Summenformel  $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$ , einer monoisotopischen Masse von 1201.8414 Da und der Aminosäuresequenz

*MeBmt-Abu-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal*.

Es eignet sich sehr gut für die Methodenentwicklung in dieser Arbeit, da die Fragmentierungsmuster und Metaboliten weitgehend bekannt und zugänglich sind [1]. Als Hauptmetaboliten treten das einfach (M+16 Da), zweifach hydroxylierte (M+32 Da) und das demethylierte (M-14 Da) Cyclosporin auf (Abbildung 1) [2].

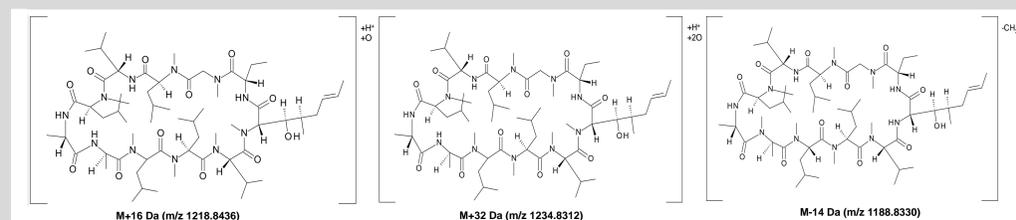


Abbildung 1: Die Hauptmetaboliten von Cyclosporin: M+16 Da (links), M+32 Da (mitte) und M-14 Da (rechts)

## RESULTATE

Mit der entwickelten Methode konnte Cyclosporin und seine Hauptmetaboliten M+16 Da, M+32 Da und M-14 Da an beiden Geräten chromatographisch getrennt (Abbildung 2) und mittels MS- Spektrum sowohl manuell als auch mit Mass-MetaSite identifiziert werden. Der Verlauf der Metabolisierung konnte durch die Abnahme des Parents und Zunahme der Metaboliten verfolgt werden (Graphik 1).

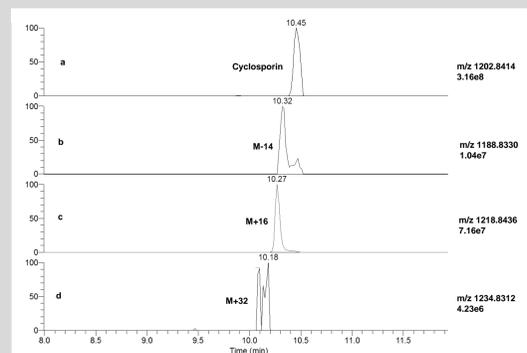
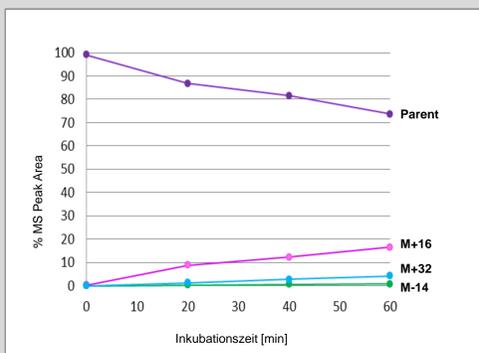


Abbildung 2: Manuell extrahiertes Massen-Chromatogramm von Cyclosporin (a) und seinen Metaboliten M-14 (b), M+16 (c) und M+32 (d) zum Inkubationszeitpunkt 60min. Die Peaks wurden auf 100% normiert, gemessene Peakintensitäten und isolierte m/z sind rechts ersichtlich



Graphik 1: Zeitlicher Verlauf der Metabolisierung: Abnahme des Parents und Zunahme der Hauptmetaboliten. M+16 erfährt dabei die grösste Zunahme, M-14 die geringste

Die Geräte und Aufnahmetechniken zeigten deutliche Unterschiede in Bezug auf die Nachweisbarkeit und Peakintensität der Metaboliten. Die  $MS^E$ -Daten waren im Vergleich zu den AIF- und  $MS^2$ -Daten sowohl für die manuelle als auch für die Auswertung mit Mass-MetaSite weniger geeignet.

Im  $MS^E$ -Spektrum waren nur  $[M+H]^+$  (m/z 1202.8),  $[M+Na]^+$  (m/z 1224.8) und  $[MH-H_2O]^+$  (m/z 1184.8) an relevanten Ionen sichtbar (Abbildung 3).

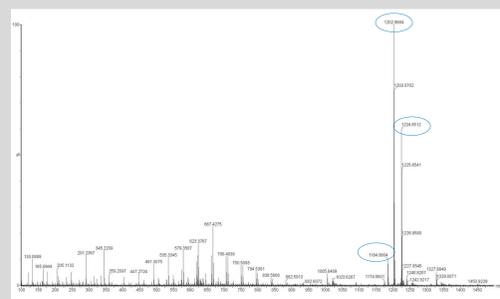


Abbildung 3:  $MS^E$ -Spektrum von Cyclosporin gemessen am Waters Xevo G2 QTOF.

Deutlich sichtbar war aber ein PEG-Muster im Bereich von m/z 400-800 Da, das aus unerklärlichen Gründen in der Probe oder dem Gerät enthalten war. Durch diese Verunreinigung wurde die Ionisierung von Cyclosporin wahrscheinlich unterdrückt, was die geringe Empfindlichkeit und die fehlenden Fragmente erklären würde.

Im Gegensatz zum  $MS^E$ -Spektrum waren in den AIF- und  $MS^2$ -Spektren die aus der Literatur bekannten und charakteristischen Fragmente [2] deutlich sichtbar (Abbildung 4).

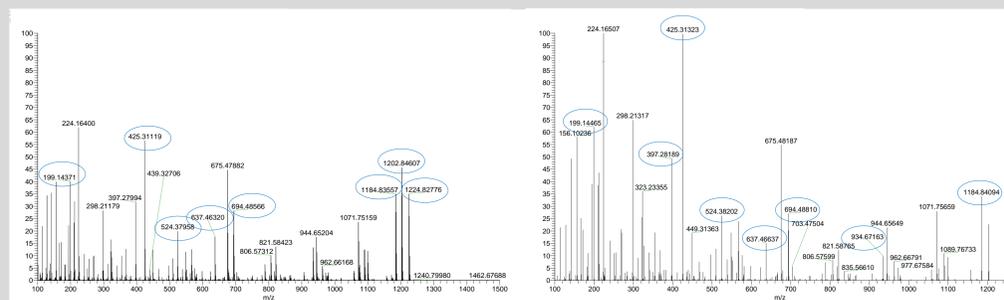


Abbildung 4: AIF-Spektrum (links) und  $MS^2$ -Spektrum (rechts) von Cyclosporin mit den charakteristischen Fragmenten (blau markiert). Gemessen an der Thermo Q Exactive Orbitrap.

Bei der Auswertung mit Mass-MetaSite konnten bei allen Aufnahmetechniken brauchbare Resultate erzielt werden, was ein entscheidender Vorteil gegenüber der manuellen Auswertung darstellt. Die Resultate waren ausserdem schneller zugänglich und es konnten Metaboliten identifiziert werden, die bei der manuellen Auswertung übersehen wurden. Die Strukturvorschläge und Markush-Strukturen haben zusätzlich dabei geholfen, eine mögliche Metabolitstruktur einzugrenzen (Abbildung 5).

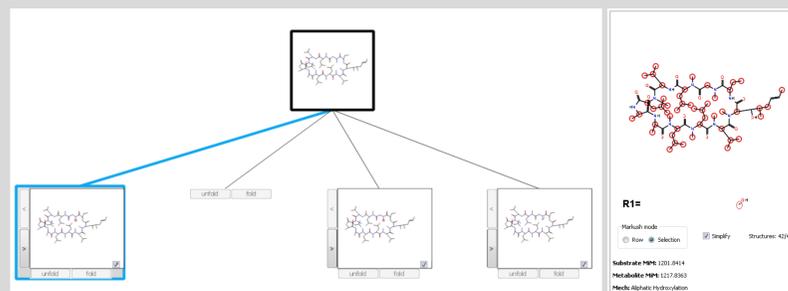


Abbildung 5: Strukturvorschläge (links) und Markush-Struktur (rechts) von Mass-MetaSite für die gefundenen Metaboliten (mögliche Positionen der Hydroxylierung oder Demethylierung sind rot markiert)

## SCHLUSSFOLGERUNG

Der Vergleich der Geräte, Aufnahmetechniken und Auswertungen hat deutlich gezeigt, dass die  $MS^2$ -Messung den anderen Aufnahmetechniken und Mass-MetaSite der manuellen Auswertung überlegen ist. Eine Kombination aus  $MS^2$ , Orbitrap und Mass-MetaSite scheint daher die beste Variante zu sein, um Peptide und deren Metaboliten mittels LC-MSMS nachzuweisen.

## REFERENZEN

- [1] Havlicek, V., et al., Sequencing of Cyclosporins by Fast Atom Bombardment and Linked-scan Mass Spectrometry. Organic Mass Spectrometry, 1993. 28: p. 1440-1447
- [2] Fang, Z.G., et al., Analysis of cyclosporine A and its metabolites in rat urine and feces by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., 2010. 878(15-16): p. 1153-62.