

SCIEX LC-MS/MS系统定量检测大鼠血浆中分子胶药物 Mezigdomide

Quantitative Analysis of the Molecular Glue degrader Mezigdomide in Rat Plasma by SCIEX LC-MS/MS System

周超, 龙志敏

Chao Zhou, Zhimin Long

SCIEX 应用支持中心, 中国

SCIEX, China

Key Words: Sciex LC-MS/MS; Molecular glue drug; Mezigdomide

前言

分子胶降解剂是一类可诱导E3泛素连接酶底物受体与靶蛋白之间发生相互作用, 经泛素化被蛋白酶体降解的小分子。分子胶对E3泛素连接酶和靶蛋白具有双配体结构特征, 兼具同两个蛋白结合的功能, 促进两个蛋白发生泛素化, 对那些非可药性靶标以及蛋白-蛋白相互作用也可因之而降解。分子胶是一类没有Linker连接的蛋白降解剂, 与PROTAC相比, 分子胶的分子量更小成药性也更高, 在透膜性和生物利用度上更具优势^[1]。

CRBN是沙利度胺等免疫调节剂的作用靶点。研究表明, 沙利度胺可以诱导CRL4CRBN (cullin4-damaged DNA-binding-RING box-domain protein) E3泛素连接酶复合物的形成, 该复合物可促进IKZF1和IKZF3泛素化并降解, 从而抑制恶性浆细胞的增殖。转录因子IKZF1和IKZF3是多发性骨髓瘤恶性浆细胞存活的关键调节因子, 其转录后可分别表达锌指蛋白Ikaros和Aiolos^[2]。Mezigdomide是一种新型E3泛素连接酶cereblon (CRBN) 调节剂, 具有免疫调节、抗增殖、促凋亡的作用^[3]。

本方法采用乙腈沉淀蛋白后离心取上清液直接进样的方式, 通过SCIEX LC-MS/MS系统对大鼠血浆中分子胶药物Mezigdomide进行直接定量, 定量限 (LOQ) 10pg/mL, 方法特点如下:

1、使用SCIEX LC-MS/MS系统, 5.0分钟色谱条件, 能够实现高通量定量分析, 同时获得较高的灵敏度LC-MS/MS方法。

- 2、采用纯乙腈沉淀蛋白, 离心后直接上机测定, 在实验样品净化的同时提高样本处理效率, 方法开发周期短、成本低、特异性好。
- 3、方法灵敏度高 (LLOQ:10pg/mL), 线性范围广 (10~100000pg/mL), 定量重现性好 (RSD<10%)。

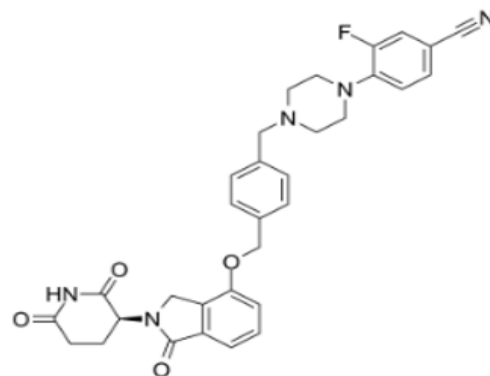


图1. Mezigdomide结构式

实验方法

1. 样本制备

100 μ L大鼠血浆中加入Mezigdomide标准品制备为浓度10~100000pg/mL的基质标液, 混匀。加入300 μ L乙腈对血浆中的蛋白进行沉淀, 混匀1分钟。离心机平衡至4 $^{\circ}$ C, 样本在15000rpm/min转速下离心10分钟。取上清液, 直接测定。

2. 仪器设备



图2. ExionLC™ AD系统和SCIEX MS/MS系统

3. 液相条件

液相：SCIEX ExionLC™ AD系统

色谱柱：ACQUITY UPLC® BEH C18(2.1 × 50mm 1.7 μm)

流动相：A: 水 (含0.1%甲酸)

B: 乙腈 (含0.1%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	80	20
0.5	80	20
2.5	10	90
3.0	10	90
3.1	80	20
5.0	80	20

4. 质谱条件

SCIEX Triple Quad MS 系统

数据采集方法：MRM (多反应监测)

离子源：ESI源

离子源参数：

气帘气CUR: 35psi

IS电压: 5500V

源温度 TEM: 600°C

雾化气Gas1: 50psi

辅助气Gas2: 50psi

碰撞气 CAD: Medium

多反应监测离子通道如表2

表2. Mezigdomide的MRM离子对信息

化合物	母离子 Q1(m/z)	子离子 Q3(m/z)	DP (V)	CE (V)
Mezigdomide 1	568.3	252.2	130	44
Mezigdomide 2	568.3	363.1	130	35

实验结果

灵敏度和线性

本实验采用乙腈沉淀血浆中蛋白后离心，取上清液直接分析。配合5.0分钟的液相梯度方法实现样本的高通量分析，前处理方法简单易操作。通过对大鼠血浆中的分子胶药物Mezigdomide进行直接测定，血浆基质定量下限 (LOQ) 可达10pg/mL(图2)，空白干净无干扰，方法特异性好、灵敏度高。Mezigdomide化合物线性范围和回归方程 (图3)，Mezigdomide在10~100000pg/mL的浓度范围内线性良好。每个标点连续进样3针，RSD%均小于10% (表3)，偏差小。

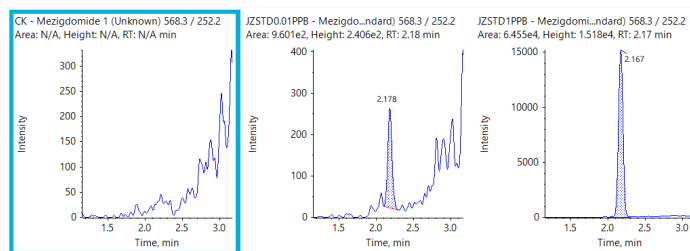


图2. Mezigdomide 在空白血浆、10pg/mL和1000pg/mL大鼠血浆基质中峰图信息

Calibration for Mezigdomide 1: $y = 6.39588e4 x + 290.29254$ ($r = 0.99861$, $r^2 = 0.99723$) (weighing: 1 / x²)

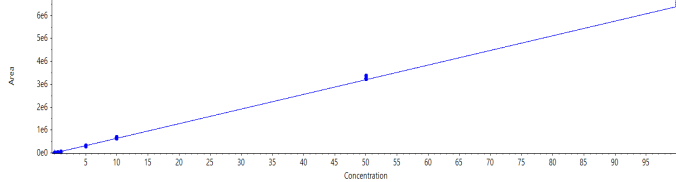


图3. Mezigdomide的标准曲线和线性回归方程，线性相关系数 $r^2 > 0.995$

表3. 标准点重复进样3针RSD%

浓度(ng/mL)	峰面积	平均值	RSD%
0.01	9.60E+02	9.33E+02	9.09
	8.66E+02		
	9.72E+02		
0.1	6.60E+03	6.45E+03	7.20
	5.95E+03		
	6.80E+03		
0.5	3.16E+04	3.10E+04	3.91
	2.96E+04		
	3.18E+04		
1	6.46E+04	6.52E+04	1.15
	6.60E+04		
	6.49E+04		
5	3.25E+05	3.11E+05	3.93
	3.02E+05		
	3.06E+05		
10	6.85E+05	6.59E+05	3.66
	6.54E+05		
	6.37E+05		
50	3.37E+06	3.29E+06	2.20
	3.26E+06		
	3.23E+06		
100	6.58E+06	6.58E+06	1.91
	6.71E+06		
	6.46E+06		

重现性和准确性

为考察方法的重现性和准确性，分别将处理好的LOQ浓度点10pg/mL样本进行重复性考察。6针样品(图5)连续采集，精密度(RSD)为6.03%，准确度在90%~115%之间。

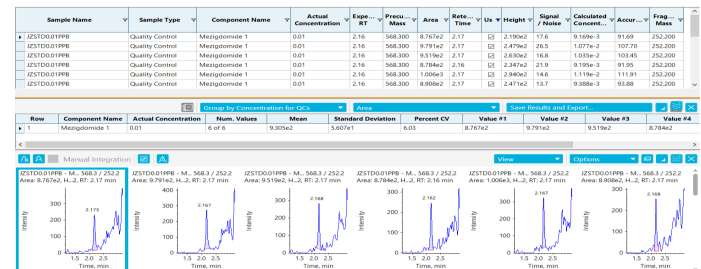


图4. LOQ标点连续进样6针色谱图，峰面积、保留时间、准确率列表

回收率

取9份大鼠空白血浆，分别配制成低、中、高三个浓度梯度，每个梯度3个平行样本。经前处理后上机测试，考察样本的回收率。样本回收率表 (Table.1) 可知，低、中、高浓度的样本回收率均在90~115%之间，回收率良好。

表4. 3种不同添加浓度样本回收率表

化合物	加标量 (ng/mL)	检测结果 (ng/mL)	回收率 %
Mezigdomide	0.01	0.0110	110.0
		0.0104	104.0
		0.0092	92.0
	1	1.0631	106.3
		1.0383	103.8
		0.9928	99.3
	10	10.29	102.9
		10.21	102.1
		10.40	104.0

结论

本方法采用乙腈直接沉淀蛋白后离心取上清液直接测定的前处理方法，利用SCIEX LC-MS/MS系统对大鼠血浆中的分子胶药物Mezigdomide进行直接测定。该方法灵敏度高、特异性好、空白无干扰、线性范围宽、检测通量高，重现性和稳定性好（RSD<5%）。方法前处理简单易操作，色谱梯度时间短，具有高通量快速分析的优点，为血浆基质中分子胶药物Mezigdomide的定量提供参考。

参考文献

- [1] Dong G, Ding Y, He S, Sheng C. (2021) Molecular Glues for Targeted Protein Degradation: From Serendipity to Rational Discovery. *J Med Chem.* 64(15):10606-10620.
- [2] Ito, T.; Ando, H.; Suzuki, T.; Ogura, T.; Hotta, K.; Imamura, Y.; Yamaguchi, Y.; Handa, H. Identification of a Primary Target of Thalidomide Teratogenicity. *Science* 2010, 327, 1345–1350.
- [3] Ajay K Nooka , Sagar Lonial. Mechanism of Action and Novel IMiD-Based Compounds and Combinations in Multiple Myeloma. *Cancer J* 2019 Jan/Feb;25(1):19-31.

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。

© 2023 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-11578-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)