

VU Research Portal

Advances in drug-protein adduct analysis Using LC-MS based proteomics

Switzar, L.

2013

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Switzar, L. (2013). *Advances in drug-protein adduct analysis Using LC-MS based proteomics*.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

NEDERLANDSE SAMENVATTING

De ontdekking en ontwikkeling van medicijnen is een langdurig en kostbaar proces waarbij vele duizenden kandidaat-medicijnen worden onderzocht om uiteindelijk één nieuw medicijn op de markt te brengen. Eén van de hoofdredenen voor dit hoge uitvalspercentage en de hoge kosten voor de farmaceutische industrie zijn de mogelijke bijwerkingen (ADRs) van de kandidaat-medicijnen. Uit een vergelijking van de oorzaken voor de uitval van kandidaat-medicijnen tussen 1991 en 2000 blijkt dat, naast werkzaamheid en commerciële redenen, toxicologische kwesties in toenemende mate een reden zijn voor het hoge uitvalspercentage. [1] Ook een meer recente studie, uitgevoerd over de periode 2007-2010, laat zien dat de uitval van kandidaat-medicijnen tijdens fase II en fase III klinische studies de veiligheid van medicijnen een belangrijke rol blijft spelen in de ontwikkeling van nieuwe medicijnen en verantwoordelijk is voor 22% van alle uitval van kandidaat-medicijnen. [2]

De beoordeling van de metabole stabiliteit van medicijnen en de karakterisering van medicijnmetabolieten is een belangrijk aspect in de productie van veiligere medicijnen. De zogenoemde MIST protocollen (metabolites in safety testing) [3] schrijven de controle en de veiligheidsbeoordeling van (re)actieve metabolieten voor tijdens het hele ontwikkelingsproces. Karakterisering van reactieve metabolieten wordt veelal uitgevoerd door deze te 'vangen' met kleine moleculen, zoals glutathion, om een beter begrip te krijgen van de metabole routes die leiden tot de (bio)activering van medicijnen. [4-5] De farmaceutische industrie wil de kansen op metabolische activering van (kandidaat)medicijnen zo veel mogelijk beperken omdat dit als eerste stap richting toxiciteit wordt gezien. [6]

In **Hoofdstuk 1** worden de verschillende theorieën over het mechanisme achter de bijwerkingen van medicijnen besproken. Eén van de aannames die ten grondslag liggen aan dit proefschrift is dat de covalente binding van reactieve metabolieten aan proteïnen een belangrijke rol speelt bij het ontstaan van bijwerkingen. Dit staat bekend als de haptene theorie. [7] In de huidige praktijk worden de covalent-gebonden reactieve metabolieten aan leverproteïnen, de zogenoemde medicijn-proteïneadducten, alleen globaal bepaald met behulp van radio-gelabelde medicijnen en radioactiviteitsmetingen. Een conservatieve drempelwaarde van 50 pmol medicijn equiv/mg totaal leverproteïne is voorgesteld om te helpen bij de selectie van geschikte kandidaat-medicijnen [6], maar minder strikte eisen worden gesteld aan medicijnen voor ernstige ziekten die moeilijk te behandelen of onbehandelbaar zijn [8].

Studies hebben echter aangetoond dat niet alle medicijn-proteïneadducten een immuunreactie geven. Een *in vivo* studie in muizen heeft bijvoorbeeld aangetoond dat bij vergelijkbare covalente bindingsniveaus van paracetamol (APAP) en zijn niet-toxische regioisomeer 3'-hydroxyacetanilide alleen APAP resulteert in levertoxiciteit. [9] Deze observatie zou kunnen betekenen dat alleen adductvorming aan bepaalde kritieke proteïnen een rol speelt bij orgaantoxiciteit. Echter, in een andere, *ex vivo* studie uitgevoerd op precies-gesneden leverplakjes van rat en mens is aangetoond dat dezelfde regioisomeer leidt tot vergelijkbare of zelfs meer toxiciteit dan APAP. [10] Een gedetailleerd onderzoek is daarom nodig om vast te stellen welke medicijn-proteïneadducten worden gevormd en of deze gerelateerd zijn aan

bijwerkingen. De huidige methoden voor identificatie van leverproteïnen die doelwit zijn van reactieve metaboliëten gebruiken radio-gelabelde medicijnen in dierexperimenten gevolgd door de analyse van leverproteïnen met twee-dimensionale gelelektroforese gecombineerd met radioactiviteitsmetingen en massaspectrometrie. [11] De lijst met geïdentificeerde proteïnen blijft groeien, maar de identificatie van het specifieke metabolië, het doelproteïne en de locatie van de modificatie met methoden zoals deze is zeer uitdagend omdat de peptiden die het adduct dragen meestal niet gedetecteerd worden. [12]

Het doel van het onderzoek dat beschreven is in dit proefschrift was de ontwikkeling van geavanceerde analytische methoden, gebaseerd op "proteomics"-technieken, om medicijn-proteïneadducten te bestuderen in *in vivo* biovloeiëstoffen en uiteindelijk in weefsels. Het essentiële verschil tussen een globale strategie en onze voorgestelde aanpak is dat wij het onderwerp op het proteïne-niveau wilden benaderen om onomstotelijk bewijs van medicijn-proteïneadductvorming te verkrijgen. Het doel was om doelgerichte proteomics-technieken te gebruiken om de identiteit van medicijn-proteïneadducten vast te stellen op het (enkele) proteïne-niveau en deze informatie te gebruiken om de mate van adductvorming (semi-)kwantitatief te bepalen.

De proteomics-aanpak bestaat uit een aantal stappen: (1) scheiding en/of fractionering van een complex proteïne-monster, (2) denaturatie, reductie en alkylatie van (het mengsel van) geïsoleerde proteïnen, (3) enzymatische digestie van de proteïnen tot peptiden, (4) LC-MS/MS-analyse van de peptiden, en (5) verwerking van de data met bioinformaticatechnieken. De omzetting van proteïnen tot peptiden is één van de kritieke stappen in de gehele procedure. Om dit proces adequaat te kunnen volgen en te optimaliseren zijn alle monstervoorbewerkingsstappen geoptimaliseerd. Daarnaast moest ook de LC-MS/MS analyse geoptimaliseerd worden, vooral omdat nieuwe rapid-resolution LC-kolommen, gepakt met (in die dagen) innovatieve 1.8 µm ID deeltjes, zouden worden gebruikt. Hierbij is het belangrijk om het beste compromis te vinden tussen de analysesnelheid en de verkregen informatie. De optimalisatie kan gericht worden op een optimale gevoeligheid voor een bepaald medicijn-proteïneadduct of op de hoogst mogelijke dekkinggraad van de proteïnesequentie. Het eerste punt is bijzonder belangrijk voor de doelgerichte analyse van bekende medicijn-proteïneadducten, terwijl het tweede punt juist belangrijk is voor de ontdekking van nog onbekende medicijn-proteïneadducten. Dezelfde gedachtegang kan toegepast worden op enzymatische proteïne-digestie. In de meeste proteomics-experimenten ligt de nadruk op het behalen van een hoge dekkinggraad van de proteïnesequentie voor een nauwkeurige proteïne-identificatie, waarbij detectie en identificatie van de modificatie en de locatie ervan, dat wil zeggen een bepaald deel van de proteïnesequentie, essentieel is voor vaststelling van medicijn-proteïneadductvorming. De *in vivo* concentraties van medicijn-proteïneadducten zijn zeer laag omdat meestal minder dan 1% van een proteïne wordt gemodificeerd. Daarom is een goed-ontworpen en geoptimaliseerde analytische strategie nodig om de uitdaging in de detectie en identificatie van lage concentraties van medicijn-proteïneadducten aan te gaan.

Hoofdstuk 3 beschrijft de optimalisatie van alle fasen van monstervoorbewerking en analyse specifiek voor medicijn-proteïneadducten, waarbij de focus voornamelijk ligt op de enzymatische digestie. Het effect van verschillende enzymen en digestiecondities op de identificatie van medicijn-albumineadducten wat betreft de sequentiedekkinggraad en de detectie van het gemodificeerde peptide is geëvalueerd

met de innovatieve toepassing van een “Design of Experiments”. Deze aanpak geeft een meer efficiënte en nauwkeuriger bepaling van de optimale digestiecondities door middel van gelijktijdige optimalisatie van meerdere variabelen en uitleesparameters. Het vermijdt de nadelen van de meer traditionele één-variabele-per-keer aanpak. De digestiecondities zijn geoptimaliseerd met een model-adduct van monochloorbimaan aan humaan serumalbumine (HSA), en de geoptimaliseerde condities zijn vervolgens toegepast op het adduct van *N*-acetyl-*p*-benzoquinoneimine (NAPQI), het reactieve metaboliet van APAP aan HSA (NAPQI-HSA). In deze studie is aangetoond dat optimalisatie van de digestiecondities voor een specifiek doeleinde zeer zinvol is omdat het tot een verhoogde efficiëntie en gevoeligheid voor de identificatie van NAPQI-HSA adducten leidt. Vooral voor het minder specifieke en minder goed gedocumenteerde enzym thermolysine was de sequentiedekkingsgraad en de gevoeligheid voor de locatie van de adductmodificatie sterk verbeterd.

De hierboven beschreven aanpak wordt “bottom-up proteomics” genoemd omdat de proteïnen eerst worden gedigesteerd tot peptiden en vervolgens worden deze peptiden geïdentificeerd om de identiteit van het oorspronkelijke proteïne vast te stellen, dus van onder naar boven. Ondanks de toenemende populariteit van andere proteomics-methoden, heeft de bottom-up aanpak nog steeds de voorkeur voor de analyse van proteïnen (en hun modificaties). Proteïnedigestie is de meest cruciale stap in zulke methoden en kan op verschillende manieren gedaan worden met behulp van proteolytische enzymen of met behulp van chemicaliën voor non-enzymatische digestie. Hiervoor zijn veel verschillende enzymen en chemicaliën beschikbaar, maar klassieke digestieprotocollen maken gebruik van trypsine, de gouden standaard in enzymatische digestie, en worden uitgevoerd tijdens een overnacht digestie. Proteïnedigestie is vaak het knelpunt omdat het veel tijd kost. Recentelijk is veel aandacht besteed aan de versnelling van dit proces. Een verbetering van de monsterdoorvoer kan ook worden behaald door de digestie uit te voeren in een online systeem. Dat kan dan worden geautomatiseerd waardoor het aantal handmatige monstervoorbewerkingsstappen afneemt. Deze state-of-the-art digestietechnieken worden behandeld in **Hoofdstuk 2** van dit proefschrift en kunnen de digestieduur reduceren van uren naar enkele seconden wat de duur van de monstervoorbewerking sterk verkort.

Omdat *in vivo* analyse van medicijn-proteïneadducten het doel is, is de extractie van het doelproteïne uit een complexe biologische matrix een belangrijk onderdeel van de monstervoorbewerking. Omdat minder dan 1% van een proteïne gemodificeerd wordt door reactieve metabolieten, is een meer dan honderdvoudige overmaat van een sterk overeenkomend, niet-gemodificeerd proteïne aanwezig. Selectieve opzuiveringsmethoden voor de extractie van alleen het proteïneadduct zijn nog niet beschikbaar. Dus wordt, na opzuivering van het doelproteïne, een mengsel verkregen van het medicijn-proteïneadduct (<1%) en het niet-gemodificeerd proteïne (>99%). Daarom moet voldoende doelproteïne opgezuiverd worden, anders zal de aanwezigheid van het medicijn-proteïneadduct worden gemaskeerd door de overmaat van het niet-gemodificeerde proteïne. **Hoofdstuk 5** beschrijft de ontwikkeling van een protocol voor specifieke monstervoorbewerking, digestie en analyse ten behoeve van de *in vivo* identificatie en kwantificering van medicijn-albumineadducten in serum. Dit protocol bestaat uit een aantal stappen: (1) affiniteitschromatografie voor de extractie van albumine uit serum, (2) bufferuitwisseling van het opgezuiverde albuminemonster naar denaturatiebuffer met een gelfiltratiekolom, (3) disulfide-reductie and cysteine-alkylering voor complete ontvouwing van het

opgezuiverde albumine, (4) bufferuitwisseling naar water met een gelfiltratiekolom, (5) vriesdrogen om het monster te concentreren en het NAPQI-albumineadduct binnen de detectielimiet te brengen, (6) enzymatische digestie met behulp van de geoptimaliseerde condities van **Hoofdstuk 3**, (7) LC-MS/MS analyse van de verkregen peptiden, en (8) data-analyse, zowel handmatig als softwarematig, voor de identificatie van medicijn-albumineadducten.

Voor de uiteindelijke toepassing van het ontwikkelde protocol op echte biologische monsters is een samenwerking gezocht met één van onze partners uit de projectgroep. Zij verrichten dierexperimenten voor het bestuderen van (onder andere) immunoactiviteit van medicijn-proteïneadducten in muismodellen. Voor ons project hebben we serum monsters uit een medicijnblootstellingsonderzoek ontvangen waarin de muizen een hoge dosis APAP toegediend hebben gekregen op één of op zeven opeenvolgende dagen. Aangezien de muis een klein dier is, waren alleen kleine hoeveelheden van de serummonsters beschikbaar wat een extra uitdaging met zich meebrengt. De muizenstudie was ontworpen om de kinetiek van ADRs te bestuderen via de verschillende behandelgroepen. Dus was het ook noodzakelijk om een kwantificeringsmethode van de NAPQI-albumine adducten te ontwikkelen. Verscheidene opties, zoals het gebruik van albuminen van andere diersoorten en synthetische NAPQI-albumineadducten, zijn geëvalueerd, maar de meest betrouwbare aanpak bleek een relatieve kwantificering te zijn waarbij een vergelijking wordt gemaakt van de piekoppervlakken van specifieke peptiden voor het albumineadduct en voor het niet-gemodificeerd albumine. Een andere aandachtsfactor was de aanwezigheid van twee vrije cysteines in muizen serumalbumine (MSA), terwijl humaan albumine maar één vrije cysteine heeft. Uiteindelijk bleek de ontwikkelde methode succesvol en is voor het eerst het NAPQI-MSA-adduct geïdentificeerd *in vivo* in muizenserum. De NAPQI modificatie werd alleen gedetecteerd aan één van de vrije cysteines, wat in zou kunnen houden dat er *in vivo* een voorkeur is voor modificatie van deze locatie. Ondanks een hoge toegediende dosis van 300 mg APAP/kg werden alleen extreem lage concentraties van NAPQI-albuminebinding gedetecteerd van 0.2%. Dit zou kunnen betekenen dat de concentratie van het NAPQI-albuminemodificatie op de andere locatie misschien onder de detectielimiet zat. Verder zijn vergelijkbare adductniveaus gedetecteerd in beide behandelgroepen, wat kan suggereren dat een enkele hoge dosis APAP al voldoende is om de leverfunctie sterk te beïnvloeden en dus ook de productie van zowel reactief metabooliet als serumalbumineadduct.

De monstervoorbewerkingsprotocollen voor bottom-up proteomics kunnen heel uitgebreid en langdurig zijn, wat vooral nadelig is wanneer grote aantallen monsters behandeld moeten worden. Wanneer een grote groep monsters geanalyseerd moet worden voor vergelijkingsstudies of kwantificeringsdoeleinden, moet de monstervoorbewerking en analyse idealiter in één keer uitgevoerd worden. **Hoofdstuk 4** beschrijft de ontwikkeling van een hoge-doorvoer monstervoorbewerkingsmethode gebaseerd op 96-wel-filterplaten waarmee 96 monsters gelijktijdig opgewerkt kunnen worden. Het gebruik van een membraan met een bepaalde poriegrootte heeft meerdere voordelen, zoals het terugbrengen van het aantal benodigde monsteroverbrengstappen, waarbij mogelijk monsterverlies wordt beperkt, en de mogelijkheid tot gelijktijdige concentrering van het monster. Daarmee kan ook een vriesdroogstap worden vermeden, wat de totale gevoeligheid verhoogt. Het protocol dat beschreven wordt in dit hoofdstuk is ontwikkeld voor globale celproteomics en presteerde beter dan het gelfiltratieprotocol wat betreft de aantallen geïdentificeerde peptiden en proteïnen. Het verschil in prestatie was al zichtbaar bij analyse van de

monsters met het rapid-resolution LC–QTOF systeem, maar was nog duidelijker wanneer de filterplaatmethode gecombineerd werd met een meer-geavanceerd nanoLC–Orbitrap MS systeem. Het uiteindelijke protocol voor de filterplaatopwerking en LC–MS analyse resulteerde in de identificatie van meer dan 400 cellulaire proteïnen. Dit aantal kan nog vergroot worden door de toepassing van tweedimensionale LC voor een verbeterde scheiding en detectie van peptiden. De ontwikkelde methodologie kan ook gebruikt worden voor doelgerichte proteomics en kan toegepast worden op andere typen proteïne monsters.

REFERENTIES

- [1] Kola, I., Landis, J., Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004, 3, (8), 711-715.
- [2] Khanna, I., Drug discovery in pharmaceutical industry: productivity challenges and trends. *Drug Discov. Today.* 2012, 17, (19-20), 1088-1102.
- [3] FDA, Guidance for Industry. Safety Testing of Drug Metabolites. 2008, <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm079266.pdf>
- [4] Dragovic, S., Boerma, J.S., van Bergen, L., Vermeulen, N.P.E., Commandeur, J.N.M., Role of Human Glutathione S-Transferases in the Inactivation of Reactive Metabolites of Clozapine. *Chem. Res. Toxicol.* 2010, 23, (9), 1467-1476.
- [5] Dragovic, S., Gunness, P., Ingelman-Sundberg, M., Vermeulen, N.P.E., Commandeur, J.N.M., Characterization of Human Cytochrome P450s Involved in the Bioactivation of Clozapine. *Drug Metab. Dispos.* 2013, 41, (3), 651-658.
- [6] Evans, D.C., Watt, A.P., Nicoll-Griffith, D.A., Baillie, T.A., Drug–protein adducts: an industry perspective on minimizing the potential for drug bioactivation in drug discovery and development. *Chem. Res. Toxicol.* 2004, 17, (1), 3-16.
- [7] Kevin Park, B., Coleman, J.W., Kitteringham, N.R., Drug disposition and drug hypersensitivity. *Biochem. Pharmacol.* 1987, 36, (5), 581-590.
- [8] Baillie, T.A., Cayen, M.N., Fouda, H., Gerson, R.J., Green, J.D., *et al.*, Drug metabolites in safety testing. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2002, 182, (3), 188-196.
- [9] Tirmenstein, M.A., Nelson, S.D., Subcellular binding and effects on calcium homeostasis produced by acetaminophen and a nonhepatotoxic regioisomer, 3'-hydroxyacetanilide, in mouse liver. *J. Biol. Chem.* 1989, 264, (17), 9814-9819.
- [10] Hadi, M., Dragovic, S., Swelm, R., Herpers, B., Water, B., *et al.*, AMAP, the alleged non-toxic isomer of acetaminophen, is toxic in rat and human liver. *Arch. Toxicol.* 2013, 87, (1), 155-165.
- [11] Ikehata, K., Duzhak, T.G., Galeva, N.A., Ji, T., Koen, Y.M., *et al.*, Protein targets of reactive metabolites of thiobenzamide in rat liver *in vivo*. *Chem. Res. Toxicol.* 2008, 21, (7), 1432-1442.
- [12] Koen, Y.M., Yue, W., Galeva, N.A., Williams, T.D., Hanzlik, R.P., Site-specific arylation of rat glutathione s-transferase A1 and A2 by bromobenzene metabolites *in vivo*. *Chem. Res. Toxicol.* 2006, 19, (11), 1426-1434.