

Q. Beaulieu , B. Llopis , N. Tissot, C. Funck-Brentano, N. Zahr.

Service de Pharmacologie, Hôpital Pitié-Salpêtrière - AP-HP. Sorbonne Université - Paris (France)

Introduction :

Le Bélimumab, est la première thérapie ciblée à recevoir une AMM dans le lupus érythémateux systémique (LES). Notre étude a eu pour but de mettre au point son dosage à l'aide de la spectrométrie de masse en tandem LC-MS/MS. Ce dosage sera utilisé ultérieurement pour une étude Pharmacocinétique/Pharmacodynamique sur la pertinence du suivi thérapeutique pharmacologique du Bélimumab.

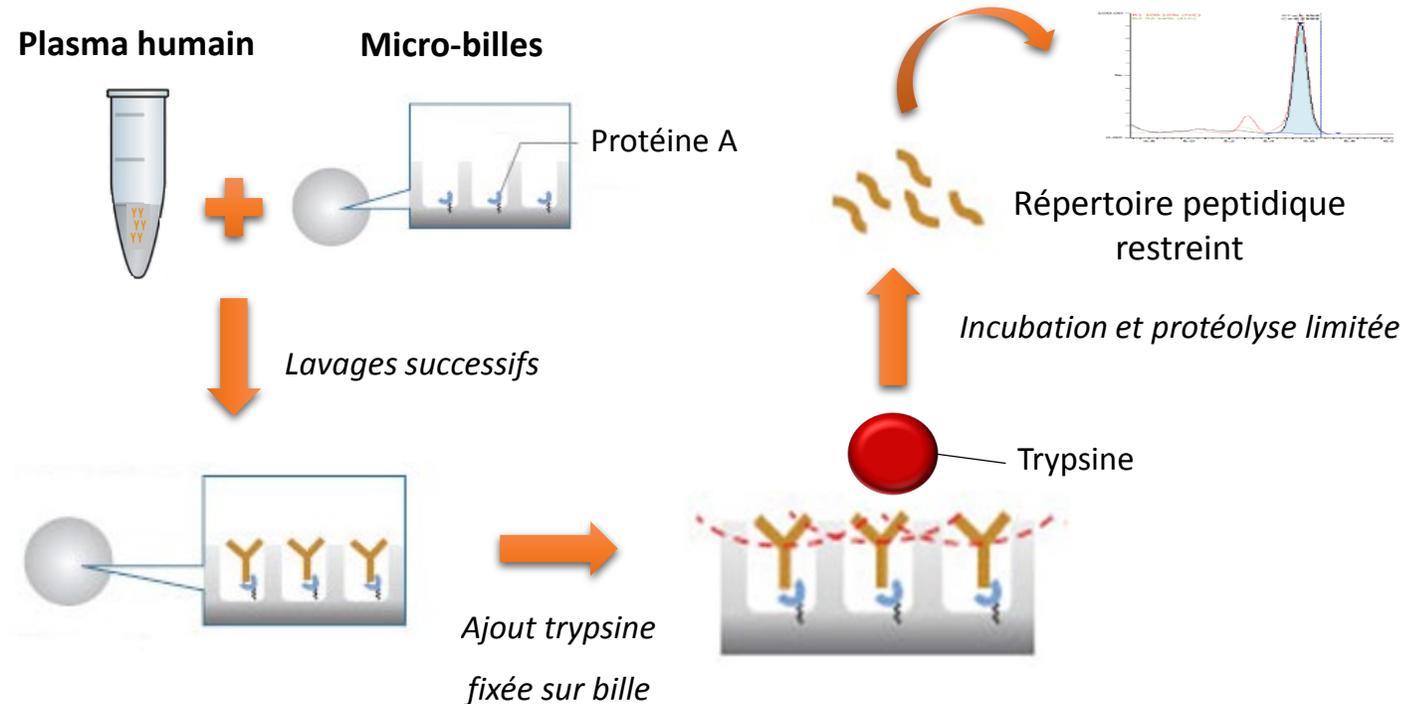
Méthode:

- Extraction par capture sur billes (protéine A au fond de micro-puits) et protéolyse limitée par encombrement stérique. (nSmol[®], Shimadzu, Japon).

-Analyse des composants par UPLC-MS/MS (Nexara X2, MS 8060, Shimadzu). Détection en mode MRM positif avec détecteur triple quadrupole

- 3 peptides signatures analysés (YSQ, QAP et DLL). La quantification est réalisée sur un seul peptide, les autres servant de confirmation.

-2 étalons internes sont utilisés : le Silu[™]MAB ajouté avant digestion et le P14R ajouté après. Quantification corrigée sur le P14R (14 prolines répétées).



Protocole d'extraction des segments peptidiques d'intérêt du Bélimumab

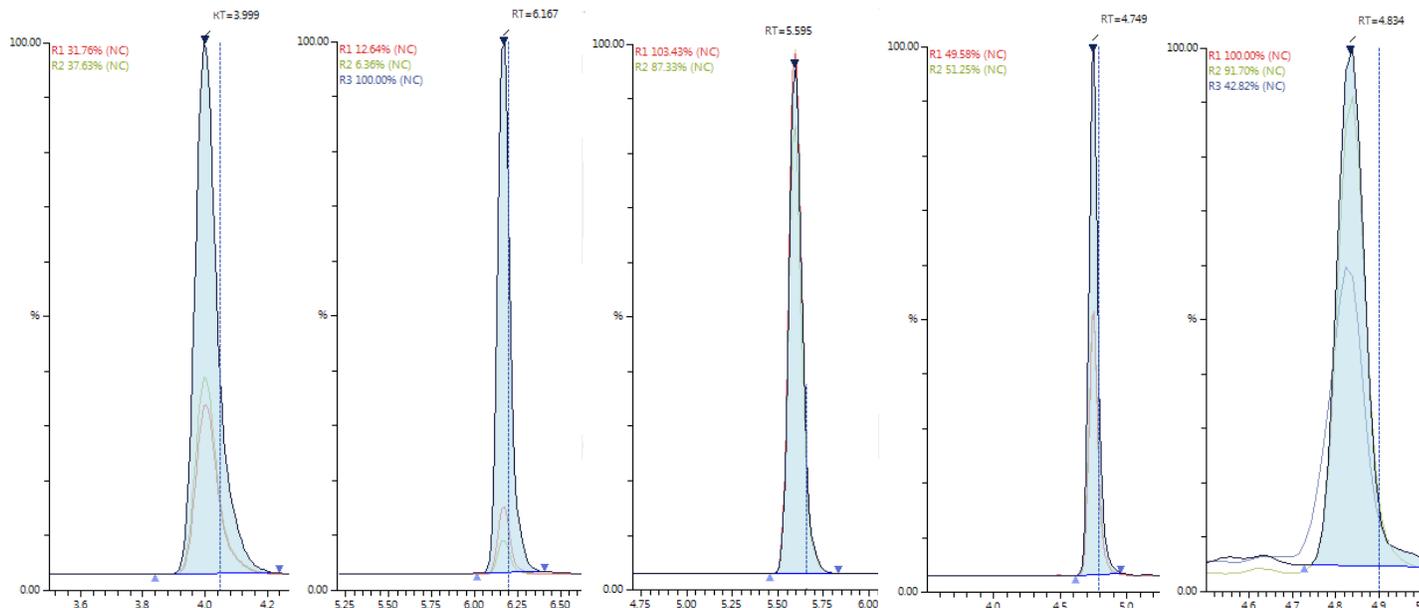
Résultats:

- Gamme d'étalonnage réalisée entre 10 et 800 ng/ml (0, 10, 50, 100, 200, 400, 800), linéaire ($R^2 > 0.993$)
- CQ aux niveaux 10, 200 et 800 (ng/ml)

Méthode :

- répétable et reproductible ($CV < 14\%$)
- absence d'interférences et de carry-over ($< 5\%$)

- Quantification sur le peptide QAP



Chromatogramme pour les peptides YSQ, QAP, DLL, le P14R et le Silu™ MAB

CQ en ng/ml (CV en %)	10	200	800	CV Répétabilité (%)	CV Reproductibilité (%)	R^2
YSQ	8.4 (9)	193.7 (2)	731.6 (2)	5,3	13,9	0,996
QAP	7.9 (8)	196.0 (3)	792.0 (2)	5,2	10,3	0,996
DLL	6.0 (10)	181.7 (5)	804 (3.5)	7,1	11,5	0,993

Résultats de la répétabilité, de la reproductibilité et de la linéarité pour chaque peptide

Conclusion:

Cette première méthode de dosage du Bélimumab par LC-MS/MS offre des perspectives intéressantes dans le cadre de son suivi thérapeutique pharmacologique (STP). Cette méthode innovante de par son système de protéolyse va contribuer à faciliter le dosage des anticorps par LC-MS/MS.