



Characterization of Metabolites in Rat and Liver Microsomes after Intravenous Injection of MMAF by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry

Yu TANG ^{1,2}, Xiang-yang WANG ², Xiao-hui MA ², Hui YE ¹, Fang ZHOU ¹ & Guang-ji WANG ^{1*}

¹ Key Lab of Drug Metabolism and Pharmacokinetics,
China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

² Tasly Pharmaceutical Group Co., Ltd., Institute of Pharmacology
and Toxicology Research Institute, Tianjin 300402, China

SUMMARY. A rapid, sensitive and reliable method using pMRM-IDA-EPI scans with QTRAP 5500 UPLC-MS/MS and Lightsight software was established for the identification of metabolites in rat and liver microsomes from different species after intravenous injection of MMAF (monomethyl auristatin F). MMAF is a new auristatin derivative, which has been employed as the payloads in a number of antibody-drug conjugates (ADCs). Separation of the metabolites of MMAF was achieved by column chromatography in this study. Using our approach, a total of five metabolites were identified from both *in vivo* and *in vitro* models. The possible metabolic pathway was proposed, including O-demethylation, amide hydrolysis, N-demethylation, oxidation and demethylation + oxidation. In summary, we developed a simple, sensitive and reliable approach for metabolite identification, which is expected to contribute to our better understanding of MMAF metabolism behavior *in vivo* and *in vitro*. Furthermore, it provides support for the process optimization, mechanism-based research, new antibody conjugate technology and preclinical study of ADCs with conjugated MMAF.

RESUMEN. Se estableció un método rápido, sensible y fiable utilizando exploraciones pMRM-IDA-EPI con QTRAP 5500 UPLC-MS / MS y software Lightsight para la identificación de metabolitos en ratas y microsomas de hígado de diferentes especies después de inyección intravenosa de MMAF (monometil auristatina F). MMAF es un nuevo derivado de auristatina, que se ha empleado como carga útil en varios conjugados anticuerpo-fármaco (ADCs). En este estudio la separación de los metabolitos de MMAF se consiguió por cromatografía en columna. Un total de cinco metabolitos fueron identificados a partir de modelos *in vivo* e *in vitro*. Se propuso la posible vía metabólica, incluyendo O-desmetilación, hidrólisis de amida, N-desmetilación, oxidación y desmetilación + oxidación. En resumen, desarrollamos un enfoque simple, sensible y confiable para la identificación de metabolitos, que se espera que contribuya a nuestra mejor comprensión del comportamiento del metabolismo del MMAF *in vivo* e *in vitro*. Además, brinda apoyo para la optimización de procesos, la investigación basada en mecanismos, la nueva tecnología conjugada de anticuerpos y el estudio preclínico de ADCs con MMAF conjugado.

KEY WORDS: antibody-drug conjugates, LC-MS/MS, metabolites, MMAF.

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: guangjiwang@hotmail.com