

# **IDKmonitor<sup>®</sup> Vedolizumab drug level LC-MS/MS Kit**

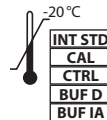
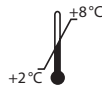
*Zur in-vitro-Bestimmung der Konzentration des  
Vedolizumab (z. B. Entyvio<sup>®</sup>) in EDTA-Plasma und Serum*

*For the in vitro determination of vedolizumab  
concentration (e. g. Entyvio<sup>®</sup>) in EDTA plasma and serum*

Gültig ab / Valid from 2017-05-10



**KM9600**



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)



# Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	2
4. INHALT DES VEDOLIZUMAB <i>ImmuTube</i> ® EXTRAKTIONSKITS	3
5. INHALT DES VEDOLIZUMAB <i>ImmuTube</i> ® DIGEST KIT	3
6. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
7. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	4
8. PROBENVORBEREITUNG MITTELS VEDOLIZUMAB <i>ImmuTube</i> ® EXTRAKTIONSKIT FÜR 80 PROBEN	6
9. PEPTIDVORBEREITUNG MITTELS VEDOLIZUMAB <i>ImmuTube</i> ® DIGEST KIT FÜR 80 PROBEN	7
10. CHROMATOGRAPHISCHE BEDINGUNGEN	8
11. MS/MS-METHODE	9
12. AUSWERTUNG	10
13. QUALITÄTSKONTROLLE	10
14. VORSICHTSMASSNAHMEN	11
15. TECHNISCHE MERKMALE	11
16. ENTSORGUNG	11
17. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Die hier beschriebene LC-MS/MS-Applikation ist für die quantitative Bestimmung des humanen  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin-Therapieantikörpers Vedolizumab (z.B. Entyvio®) aus EDTA-Plasma und Serum geeignet. Nur für Forschungszwecke.

## 2. EINLEITUNG

Patienten mit mittelschweren bis schweren aktiven Formen der Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, die unzureichend auf eine konventionelle Therapie oder einen Tumornekrosefaktor-alpha (TNF $\alpha$ )-Antagonisten ansprechen, können auch mit Vedolizumab behandelt werden. Vedolizumab, ein humanisierter monoklonaler Therapieantikörper, bindet selektiv  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf aktivierten Lymphozyten und verhindert damit, dass diese in die Darmschleimhaut einwandern. Vedolizumab greift also über einen anderen Wirkmechanismus als die TNF $\alpha$ -Antagonisten in die Entzündungsreaktion ein und unterdrückt gezielt Entzündungen im Gastrointestinaltrakt.

Die Wirksamkeit der Vedolizumab-Therapie korreliert in der Regel mit der Menge an Therapieantikörper, die kurz vor der nächsten Medikamentengabe im Serum des Patienten nachweisbar ist, dem sogenannten Talspiegel. Verschiedene Faktoren beeinflussen die Höhe des Talspiegels. Zu diesen zählen unter anderem die Dosis, die Krankheitsaktivität, individuelle Unterschiede in der Pharmakokinetik und das Auftreten von Antikörpern gegen die Therapieantikörper (anti-drug antibodies, ADA). Die IDKmonitor® LC-MS/MS-Applikation zur Bestimmung von Vedolizumab (z.B. Entyvio®) misst die Wirkstoffkonzentration und bietet dem behandelnden Arzt die Möglichkeit, die Therapie zu begleiten und frühzeitig zu optimieren.

## 3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KM9600LA	MOPHA A	Laufmittel A	1 x 250 ml
KM9600LB	MOPHA B	Laufmittel B	1 x 250 ml
KM9600KA	CAL 1 CAL 2 CAL 3	Kalibrator 1 bis 3, lyophilisiert (Rekonstitutionsvorgaben und Konzentrationen der Spezifikation entnehmen)	5 x je 3 Fläschchen
KM9600KO	CTRL 1 CTRL 2	Kontrolle 1 und 2, lyophilisiert (Rekonstitutionsvorgaben und Bereiche der Spezifikation entnehmen)	5 x je 2 Fläschchen
KM9600RE	RECSOL	Rekonstitutionslösung	3 x 15 ml
KM9600AC	ACTSOL	Aktivierungsreagenz	1 x 2 ml

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KM9600SO	SOL A	Lösung A	2 x 25 ml
KM9600IS	INT STD	Interner Standard, lyophilisiert (Rekonstitutionsvorgaben und Konzentrationen der Spezifikation entnehmen)	5 x 1 Fläschchen
KM9610		Vedolizumab <i>ImmuTube</i> ® Extraktionskit	1 Kit
KM9620		Vedolizumab <i>ImmuTube</i> ® Digest Kit	1 Kit

Zur Vorbereitung der IDKmonitor® LC-MS/MS-Applikation zur Messung des  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin-Therapieantikörpers Vedolizumab ist das Tuning notwendig. Das Tuning ist für die Findung der optimalen LC-MS/MS-Einstellungen sowie für die Überprüfung der ausreichenden Empfindlichkeit erforderlich. Die UPLC-Trennsäule (KM9600RP) kann separat bei Immundiagnostik bestellt werden. Bitte fordern Sie unsere Einzelkomponentenliste an.

#### 4. INHALT DES VEDOLIZUMAB *ImmuTube*® EXTRAKTIONSKIT

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KM9610SI	COLUMNS	<i>ImmuTube</i> ®-Säulen zur Aufreinigung von Vedolizumab aus der Probe	80 Säulen
KM9610WL	WASHSOL	Waschpuffer	1 x 300 ml
KM9610EL	ELUREAG	Elutionsreagenz	1 x 20 ml

#### 5. INHALT DES VEDOLIZUMAB *ImmuTube*® DIGEST KIT

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KM9620B	BUF ABC	Puffer ABC, konzentriert	5 x 1 Fläschchen à 2 ml
KM9620D	BUF D	Puffer D, lyophilisiert	5 x 1 Fläschchen
KM9620IA	BUF IA	Puffer IA, lyophilisiert	5 x 1 Fläschchen
KM9620ER	ENZSOL	Enzymreagenz	1 x 1,5 ml
KM9620E	ENZ	Enzym, lyophilisiert	1 Fläschchen
KM9620SL	STOP	Stop-Lösung	1 x 1,5 ml

## 6. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser\*
- Reagenzgefäße aus Glas, LC-MS/MS-geeignet
- 500 ml Messzylinder, LC-MS/MS geeignet
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 1 000 g
- Vortex-Mixer
- Vakuumentrifuge oder Stickstoffverteiler
- Laborübliche Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Thermoblock, aufheizbar bis mindestens 60 °C
- Brutschrank
- Überkopfschüttler
- LC-MS/MS-Anlage
- RP-C18 Säule für Peptidanalytik, (z.B. Acquity BEH130 C18, 1,7 µm (2,1 × 50 mm))

\* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

## 7. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 5 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung von Laufmitteln:** Die **Laufmittel (MOPHA A, MOPHA B)** müssen vor Gebrauch mit **0,2 % Aktivierungsreagenz (ACTSOL)** versetzt werden (z. B. 250 ml MOPHA A/MOPHA B + 0,5 ml ACTSOL), gut mischen. **Hinweis:** ACTSOL wenn möglich mit einer Glaspipette pipettieren. Die Laufmittel können bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Mit ACTSOL versetzte Laufmittel können **nach der Aktivierung bei 2–8 °C für 4 Wochen** aufbewahrt werden.

**ACHTUNG:** Das **Aktivierungsreagenz** muss unter dem **Abzug** zugesetzt werden. Alle zu verwendenden Gefäße müssen absolut sauber und detergenzienfrei und vorzugsweise aus LC-MS/MS geeignetem Glas sein.

- **Die lyophilisierten Kontrollen (CTRL) und Kalibratoren (CAL)** sind bei **-20 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Die CTRL und CAL werden mit je **100 µl** Rekonstitutionslösung (RECSOL) rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. **Kalibratoren und Kontrollen** (rekonstituierte CAL und CTRL) **sind nicht stabil und können nicht gelagert werden.**
- **Der lyophilisierte interne Standard (INT STD)** ist bei **-20 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Der INT STD wird in **Lösung A (SOL A)** rekonstituiert (Volumen der Spezifikation entnehmen), vorsichtig gemischt und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. **Interner Standard** (rekonstituierter INT STD) **ist nicht stabil und kann nicht gelagert werden.**

**Achtung: internen Standard erst direkt vor der Verwendung ansetzen!**

- **Lagerung der ImmuTubes®:** Die Matrix der *ImmuTubes*® darf nie länger als einige Sekunden trocken stehengelassen werden. **Die Matrix muss immer feucht gehalten werden!**
- **Vorbereitung der Puffer:**
  - Das **Pufferkonzentrat ABC (BUF ABC)** ist bei **4 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch wird er in einem Verhältnis von **1:20** in **Rekonstitutionslösung (RECSOL)** verdünnt, gut mischen.
  - Die **lyophilisierten Puffer D (BUF D) und IA (BUF IA)** sind bei **-20 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch werden sie in je **500 µl Puffer ABC** gelöst. **Puffer D und IA** (rekonstituierte BUF D und BUF IA) **sind nicht stabil und können nicht gelagert werden.**
- Das **lyophilisierte Enzym (ENZ)** ist bei **-20 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Es wird **direkt vor der Verwendung** in **1 ml Enzymreagenz (ENZSOL)** bei **2–8 °C** gelöst. Enzym (rekonstituiertes ENZ) kann **6 Monate bei -20 °C gelagert werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und bei **2–8 °C** gelagert bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 8. PROBENVORBEREITUNG MITTELS VEDOLIZUMAB *ImmuTube*® EXTRAKTIONSKIT FÜR 80 PROBEN

Als Probe eignet sich Serum und Plasma. Proben müssen vor dem Einsatz gevortext werden.

Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.

1.	Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, die <b>Raumtemperatur</b> (18–26 °C) aufweisen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben gut mischen.
2.	<i>ImmuTubes</i> ® in einen geeigneten Ständer stellen und sicherstellen, dass die enthaltene Suspension nicht im Deckel verbleibt. <i>ImmuTubes</i> ® beschriften.
3.	Den Deckel der <i>ImmuTubes</i> ® abdrehen und den Auslass durch das Abbrechen des Endstücks an der Sollbruchstelle <b>öffnen</b> . <i>ImmuTubes</i> ® in geeignete Röhrchen setzen. Matrix <b>waschen</b> (500 µl Waschpuffer (WASHSOL) zugeben und ca. 30 s bei 1000 g zentrifugieren). Den Waschschritt noch <b>zweimal wiederholen</b> .
4.	<b>500 µl Waschpuffer</b> (WASHSOL) in die <i>ImmuTubes</i> ® vorlegen (Matrix darf nicht austrocknen!). Den Auslass der <i>ImmuTubes</i> ® durch rückwärtiges Anbringen des Endstücks wieder <b>verschließen</b> und fest drücken. <b>Zügig 25 µl Kalibrator/Probe/Kontrolle</b> (CAL/SAMPLE/CTRL) dazupipettieren. <i>ImmuTubes</i> ® verschließen (Deckel zudrehen) und den Inhalt vorsichtig <b>durch Invertieren mischen</b> .
5.	Langsames <b>“Mixing-Rotation”</b> (end-over-end Rotation) für <b>1 Stunde</b> bei Raumtemperatur. Nach Ende der Inkubation die Säulen kurz an zentrifugieren, um Matrixreste aus dem Deckel zu sammeln.
6.	Den Deckel der <i>ImmuTubes</i> ® abschrauben und den Auslass wieder <b>öffnen</b> . <i>ImmuTubes</i> ® in Plastikreagenzgefäße setzen, 30 s bei 1000 g zentrifugieren. <b>500 µl Waschpuffer</b> (WASHSOL) dazupipettieren und 30 s bei 1000 g zentrifugieren. Den Schritt <b>noch einmal mit Waschpuffer und dreimal mit Reinstwasser</b> wiederholen. Dazwischen wenn nötig den Durchlauf verwerfen.



7.	<p><i>ImmuTubes</i>® in neue, bereits beschriftete 1,5-ml-Reaktionsgefäße (Immunodiagnostik AG empfiehlt Protein LowBind Tubes von Eppendorf) einsetzen.</p> <p><b>100 µl ELUREAG</b> (Elutionsreagenz für <i>ImmuTubes</i>®) pipettieren, 30–60 s bei 1000 g zentrifugieren und das Eluat mit dem Vedolizumab im Reaktionsgefäß sammeln.</p> <p>Den Schritt <b>nochmals mit 50 µl ELUREAG</b> wiederholen und im selben Reaktionsgefäß sammeln.</p>
8.	<p>Das <b>Eluat</b> unter Stickstoffstrom bei 37 °C oder in einer Vakuumzentrifuge trocknen.</p>

Das getrocknete Eluat ist bei -20 °C für zwei Wochen stabil.

## 9. PEPTIDVORBEREITUNG MITTELS VEDOLIZUMAB *ImmuTube*® DIGEST KIT FÜR 80 PROBEN

**Hinweis:** Vor jeder Inkubation die Gefäße kurz abzentrifugieren, um Reagenzien am Gefäßboden zu vereinigen.

1.	<p>Alle Lösungen für die enzymatische Reaktion sollten immer <b>frisch hergestellt</b> werden.</p>
2.	<p>Das eingetrocknete Eluat wird in <b>20 µl Puffer D</b> (BUF D) durch intensives Vortexen gelöst. Bei Bedarf ca. 5 min im Ultraschallbad schallen.</p>
3.	<p>Bei <b>60 °C</b> in einem Thermoblock für <b>1 Stunde</b> inkubieren.</p>
4.	<p>Anschließend <b>20 µl Puffer IA</b> (BUF IA) zugeben, kurz vortexen und für <b>30 min</b> bei Raumtemperatur unter <b>Lichtausschluss</b> leicht <b>schütteln</b>.</p>
5.	<p>Je <b>100 µl Puffer ABC</b> (BUF B) auf die Proben pipettieren.</p>
6.	<p>Jetzt das <b>lyophilisierte Enzym</b> in <b>1 ml Enzymreagenz</b> (ENZSOL) bei <b>2–8 °C</b> rekonstituieren.</p>
7.	<p><b>Vorbereitung der Enzymlösung:</b> Das rekonstituierte <b>Enzym</b> für jede Probe auf <b>50 µl Endvolumen</b> mit <b>Puffer ABC</b> (BUF ABC) auffüllen, z. B. pro Probe 10 µl Enzymlösung + 40 µl Puffer ABC (BUF ABC).</p> <p>Das restliche rekonstituierte Enzym aliquotieren und sofort bei -20 °C bis zur nächsten Verwendung lagern.</p>

8.	Jeweils <b>50 µl Enzymlösung</b> auf eine Probe geben und bei <b>37 °C</b> in einem Brutschrank bzw. Thermoblock <b>über Nacht</b> (circa 16 h) inkubieren.
9.	Die Reaktion wird durch Zugabe von <b>10 µl STOP-Lösung</b> (STOP) abgestoppt.
10.	Lyophilisierten internen Standard ( <b>INT STD</b> ) in Lösung A lösen und <b>je 200 µl</b> auf eine Probe geben (Endvolumen: 400 µl). Kurz vortexen und die Proben in LC-MS/MS-geeignete Gefäße überführen. <b>25 µl</b> in das HPLC-System <b>injizieren</b> .

## 10. CHROMATOGRAPHISCHE BEDINGUNGEN

Beispiel einer vergleichbaren UPLC-Methode

<b>Säulenmaterial:</b>	z. B. Acquity UPLC® BEH130 C18 (Waters); 1,7 µm
<b>Säulendimension:</b>	2,1 × 50 mm
<b>Fluss:</b>	0,1 ml/min
<b>Säulentemperatur:</b>	45 °C
<b>Auftragsvolumen:</b>	25 µl
<b>Laufzeit:</b>	25 min
<b>Gradient:</b>	

Zeit	Laufmittel A	Laufmittel B
0 min	97 % A	3 % B
5,1 min	97 % A	3 % B
15,1 min	55 % A	45 % B
15,2 min	20 % A	80 % B
17,0 min	20 % A	80 % B
17,1 min	97 % A	3 % B
25,0 min	97 % A	3 % B

Wir empfehlen die Verwendung einer Vorsäule/Vorfilter, um die Säulenhaltbarkeit zu verlängern.

Nach der Analyse kann die Trennsäule mit ca. 50 ml MOPHA A mit dem oben genannten Gradienten gewaschen werden. Die Säule kann in 80% Acetonitril gelagert werden.

## 11. MS/MS-METHODE

Die MS/MS-Methode ist beispielhaft aufgeführt für ein TSQ Vantage Triple Quadrupol-Massenspektrometer von Thermo Fisher Scientific\*.

<b>Modus:</b>	SRM
<b>Polarität:</b>	ESI+
<b>Kapillartemperatur [°C]:</b>	350
<b>Vaporizer-Temperatur [°C]:</b>	400
<b>Sheath-Gas-Druck [Arb]:</b>	60
<b>Aux-Gas-Druck [Arb]:</b>	15
<b>Sprayspannung [V]:</b>	4000
<b>Auflösung im 1. und 3. Quadrupol [FWHM]:</b>	0,7
<b>Kollisionsgas [mTorr]:</b>	1,5
<b>Cycle Time [s]:</b>	0,5–1

\* Die Einstellungen sind Richtwerte und können je nach Gerät und Hersteller abweichen. Immunodiagnostik AG empfiehlt, vor der eigentlichen Analyse das Tuning durchzuführen. Das Tuning ist für die Findung der optimalen LC-MS/MS-Einstellungen sowie für die Überprüfung der ausreichenden Empfindlichkeit erforderlich.

*SRM-Übergänge (m/z)***Vedolizumab, zu quantifizierendes Peptid: MH1+: 2237,0357 (MH2+: 1119,022)**

Transitionen			
Vorläuferion	Fragmention	S-LENS-Spannung	Kollisionsenergie
1119,022	429,213	231	37
1119,022	956,472	231	28
1119,022	728,340	231	28
1119,022	1281,571	231	33

**Interner Standard****(isotopisch markiertes Peptid: MH1+: 2245,28 (MH2+: 1123,029))**

Transitionen			
Vorläuferion	Fragmention	S-LENS-Spannung	Kollisionsenergie
1123,029	429,213	231	37
1123,029	956,472	231	28
1123,029	1001,965	231	26
1123,029	1289,585	231	33

**12. AUSWERTUNG**

Als Modell zur Auswertung kann die lineare Regression verwendet werden. Zwischen den drei Kalibratorkonzentrationen wird eine Gerade gelegt. Anhand dieser können dann die Proben berechnet werden.

**13. QUALITÄTSKONTROLLE**

Wir empfehlen Kontrollen bei jedem Testansatz mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen einer oder mehrere Werte außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Werte nicht gewährleisten.

## 14. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zu Forschungszwecken.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.

## 15. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

## 16. ENTSORGUNG

Laufmittel (MOPHA A, MOPHA B), Lösung A (SOL A), Aktivierungsreagenz (ACTSOL), Rekonstitutionslösung (RECSOL) und Stop-Lösung (STOP) müssen als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden.


## 17. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu Forschungszwecken verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- *IDKmonitor*® und *ImmuTube*® sind Marken der Immundiagnostik AG.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der

Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

### Verwendete Symbole:

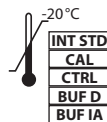
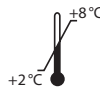
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	Nur für Forschungszwecke		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten

# **IDKmonitor<sup>®</sup> vedolizumab drug level LC-MS/MS Kit**

*For the in vitro determination of vedolizumab  
concentration (e. g. Entyvio<sup>®</sup>) in EDTA plasma and serum*

Valid from 2017-05-10

**REF** **KM9600**



**RUO**



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

## Table of Contents

1. INTENDED USE _____	15
2. INTRODUCTION _____	15
3. MATERIAL SUPPLIED _____	15
4. MATERIAL SUPPLIED WITH THE VEDOLIZUMAB <i>ImmuTube</i> ® EXTRACTION KIT	16
5. MATERIAL SUPPLIED WITH THE VEDOLIZUMAB <i>ImmuTube</i> ® DIGEST KIT _____	16
6. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED _____	17
7. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS _____	17
8. SAMPLE PREPARATION WITH THE VEDOLIZUMAB <i>ImmuTube</i> ® EXTRACTION KIT FOR 80 SAMPLES _____	18
9. PEPTIDE PREPARATION WITH THE VEDOLIZUMAB <i>ImmuTube</i> ® DIGEST KIT FOR 80 SAMPLES _____	20
10. CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS _____	21
11. MS/MS METHOD _____	22
12. CALCULATION _____	23
13. QUALITY CONTROL _____	23
14. PRECAUTIONS _____	23
15. TECHNICAL HINTS _____	23
16. DISPOSAL _____	23
17. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE _____	24



## 1. INTENDED USE

This LC-MS/MS application is for the quantitative determination of the human  $\alpha_4\beta_7$  integrin therapeutic antibody vedolizumab (e.g. Entyvio®) in EDTA plasma and serum. For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

## 2. INTRODUCTION

Patients with moderately to severely active Colitis ulcerosa and Crohn's disease, who have had an inadequate response to conventional therapy or to anti-tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) agents, can also be treated with vedolizumab. The humanised monoclonal therapeutic antibody vedolizumab binds  $\alpha_4\beta_7$  integrin on activated lymphocytes and stops them from migrating into the intestinal mucosa. Thus, vedolizumab suppresses the inflammatory response via a different mechanism than anti-TNF $\alpha$  agents and specifically targets inflammation in the gastrointestinal tract.

The clinical efficacy of vedolizumab therapy correlates with the trough level, that is the drug level just before the next application of vedolizumab. Several factors influence the trough level, among them dosage and frequency of vedolizumab infusion, disease activity, individual pharmacokinetics and immune reaction (formation of anti-drug antibodies, ADA). The IDKmonitor®LC-MS/MS application for the determination of vedolizumab (e.g. Entyvio®) measures reliably the effective drug concentration, giving the treating physician an opportunity to monitor and optimise the therapy early on.

## 3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
KM9600LA	MOPHA A	Mobile phase A	1 x 250 ml
KM9600LB	MOPHA B	Mobile phase B	1 x 250 ml
KM9600KA	CAL 1 CAL 2 CAL 3	Calibrator 1 to 3, lyophilised (Concentrations and reconstitution details are given in the specification data sheet.)	5 x 3 vials each
KM9600KO	CTRL 1 CTRL 2	Control 1 and 2, lyophilised (Ranges and reconstitution details are given in the specification data sheet.)	5 x 2 vials each
KM9600RE	RECSOL	Reconstitution solution	3 x 15 ml
KM9600AC	ACTSOL	Activation reagent	1 x 2 ml

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
KM9600IS	INT STD	Internal standard, lyophilised (Concentrations and reconstitution details are given in the specification data sheet.)	5 x 1 vial
KM9600SO	SOL A	Solution A	2 x 25 ml
KM9610		Vedolizumab <i>ImmuTube</i> ® Extraction Kit	1 Kit
KM9620		Vedolizumab <i>ImmuTube</i> ® Digest Kit	1 Kit

As a first step for the application of the IDKmonitor® LC-MS/MS application for the determination of the therapeutic  $\alpha_4\beta_7$  integrin antibody vedolizumab, a tuning is necessary to estimate the optimal LC-MS/MS settings as well as to assess the sufficiency of the sensitivity. The UPLC separation column (KM9600RP) can be ordered separately from Immundiagnostik AG. Please ask for our single components price list.

#### 4. MATERIAL SUPPLIED WITH THE VEDOLIZUMAB *ImmuTube*® EXTRACTION KIT

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
KM9610SI	COLUMNS	<i>ImmuTube</i> ® columns for affinity purification of vedolizumab from the samples	80 columns
KM9610WL	WASHSOL	Wash buffer	1 x 300 ml
KM9610EL	ELUREAG	Elution reagent	1 x 20 ml

#### 5. MATERIAL SUPPLIED WITH THE VEDOLIZUMAB *ImmuTube*® DIGEST KIT

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
KM9620B	BUF ABC	Buffer ABC concentrate	5 x 1 vial à 2 ml
KM9620D	BUF D	Buffer D, lyophilised	5 x 1 vial
KM9620IA	BUF IA	Buffer IA, lyophilised	5 x 1 vial
KM9620ER	ENZSOL	Enzyme reagent	1 x 1,5 ml
KM9620E	ENZ	Enzyme, lyophilised	1 vial
KM9620SL	STOP	Stop solution	1 x 1,5 ml

## 6. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water\*
- Glass tubes, suitable for LC-MS/MS
- 500 ml graduated cylinder, suitable for LC-MS/MS
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl tips
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 1 000 g
- Vortex
- Vacuum centrifuge or nitrogen distributor
- Standard single-use laboratory plastic vials, cups, etc.
- Thermal block, heatable up to at least 60 °C
- Incubator
- Upside-down shaker
- LC-MS/MS equipment
- RP-C18 column for peptide analysis, (e.g. Acquity BEH130 C18, 1,7 µm (2,1 × 50 mm))

\* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

## 7. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 5 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- **Preparation of mobile phases:** The **mobile phases (MOPHA A, MOPHA B)** have to be spiked with **0.2 % activation reagent (ACTSOL)** before use (e.g. 250 ml MOPHA A/MOPHA B + 0,5 ml ACTSOL), mix well. **Hint:** If possible, use glass pipets to pipet ACTSOL. The **mobile phases** are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Mobile phases spiked with activation reagent** can be stored for four weeks in a closed flask at **2–8 °C**.  
**Attention:** The **activation reagent** must be added under the **fume hood**. All vials to be used must be absolutely clean, detergent-free and preferably made of glass suitable for LC-MS/MS.
- The **lyophilised controls (CTRL)** and **calibrators (CAL)** are stable at **-20 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, the standards and con-

trols have to be reconstituted with each **100 µl of reconstitution solution (RECSOL)**. Mix the vial content well and allow it to dissolve for 10 minutes to ensure complete reconstitution. **Controls and calibrators** (reconstituted CTRL and CAL) **are not stable and cannot be stored.**

- The **lyophilised internal standard** (INT STD) is stable at **-20 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, the INT STD has to be reconstituted with **solution A** (SOL A; see specification data sheet for volume). Mix the vial content well and allow it to dissolve for 10 minutes to ensure complete reconstitution. **Internal standard** (reconstituted INT STD) **is not stable and cannot be stored.**

**Attention: Do not prepare internal standard until directly before use!**

- **Preparation of buffers:**

- The **buffer concentrate ABC** (BUF ABC) is stable at **4 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, the BUF ABC has to be diluted **1:20 with reconstitution solution** (RECSOL), mix well.
- The **lyophilised buffers D** (BUF D) and **IA** (BUF IA) are stable at **-20 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, they have to be reconstituted with each **500 µl of buffer ABC**, mix well. **Buffers D and IA** (reconstituted BUF D and BUF IA) **are not stable and cannot be stored.**
- The **lyophilised enzyme (ENZ)** is stable at **-20 °C** until the expiry date stated on the label. **Directly before use**, it is reconstituted with **1 ml of enzyme reagent** (ENZSOL). **Enzyme** (reconstituted ENZ) **can be stored at -20 °C for 6 months.**
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2–8 °C**.

## **8. SAMPLE PREPARATION WITH THE VEDOLIZUMAB ImmuTube® EXTRACTION KIT FOR 80 SAMPLES**

Serum and plasma samples can be used with this assay. All samples must be vortexed before use in the test.

Quality control samples should be analysed with each run.

1.	Bring <b>all reagents and samples</b> to <b>room temperature</b> (18–26 °C) and mix well.
2.	Put the <i>ImmuTubes</i> ® into an appropriate rack. Assure that the included suspension does not stick to the lid. Label the <i>ImmuTubes</i> ®.
3.	Unscrew the lids of the <i>ImmuTubes</i> ® and <b>open</b> the outlet by breaking the endpiece at the predetermined breaking point. Put the <i>ImmuTubes</i> ® into appropriate tubes. <b>Wash</b> the matrix (add 500 µl wash buffer (WASHSOL) and centrifuge for 30 s at 1000 <i>g</i> ). <b>Repeat</b> the washing step <b>twice</b> .
4.	Put <b>500 µl wash buffer</b> (WASHSOL) into the <i>ImmuTubes</i> ®. <b>Close</b> the <i>ImmuTubes</i> ® firmly by recapping the outlet with the upside-down endpiece. Speedily add <b>25 µl calibrator/sample/control</b> (CAL/SAMPLE/CTRL). <b>Close</b> the <i>ImmuTubes</i> ® by screwing the lid on and <b>mix</b> the content carefully by gentle inversion.
5.	Mix for <b>1 hour</b> by slow <b>end-over-end rotation</b> at room temperature. After the incubation, shortly centrifuge the columns to collect matrix remains in the lid.
6.	Unscrew the lid of the <i>ImmuTubes</i> ® and open the outlet. Put the <i>ImmuTubes</i> ® into plastic test tubes and centrifuge for 30 s at 1000 <i>g</i> . Add <b>500 µl wash buffer</b> (WASHSOL) and centrifuge for 30 s at 1000 <i>g</i> . <b>Repeat</b> this step <b>once with wash buffer</b> and <b>three times with ultra pure water</b> . Discard flow-through if necessary.
7.	Place <i>ImmuTubes</i> ® in already labelled new 1.5 ml test tubes (Immundiagnostik AG recommends Protein LowBind Tubes from Eppendorf). Add <b>100 µl ELUREAG</b> (elution reagent for <i>ImmuTubes</i> ®), centrifuge for 30–60 s at 1000 <i>g</i> and collect the eluate containing the vedolizumab in the test tube. <b>Repeat</b> this step once with <b>50 µl ELUREAG</b> , collect the eluate in the same test tube.
8.	Dry the <b>eluate</b> under a nitrogen stream at 37 °C or in a vacuum centrifuge.

Dried eluate is stable for two weeks at -20 °C.

## 9. PEPTIDE PREPARATION WITH THE VEDOLIZUMAB *ImmuTube*® DIGEST KIT FOR 80 SAMPLES

Before each incubation, spin the tubes shortly to pool all reagents at the bottom of the tube.

1.	All solutions for the enzymatic reaction should always be <b>prepared directly before use</b> .
2.	Reconstitute the dried eluate in <b>20 µl buffer D</b> (BUF D) by intense vortexing. If necessary, incubate for 5 min in an ultrasonic bath.
3.	Incubate for <b>1 hour</b> in a thermal block at <b>60°C</b> .
4.	Add <b>20 µl buffer IA</b> (BUF IA), vortex shortly and <b>shake gently</b> for <b>30 min</b> at room temperature <b>in the dark</b> .
5.	Add <b>100 µl buffer ABC</b> (BUF B) to the samples.
6.	Now <b>reconstitute</b> the <b>lyophilised enzyme</b> in <b>1 ml enzyme reagent</b> (ENZ-SOL) at <b>2–8°C</b> .
7.	<b>Preparation of the enzyme solution:</b> For each sample, fill the reconstituted <b>enzyme</b> up to a <b>final volume of 50 µl</b> with <b>buffer ABC</b> (BUF ABC), e.g. per sample 10 µl enzyme solution + 40 µl buffer ABC (BUF ABC). Aliquot the remaining enzyme and store it immediately at -20°C until the next usage.
8.	Add <b>50 µl enzyme solution</b> to each sample and incubate in an incubator or thermal block at <b>37°C over night</b> (~ 16 h).
9.	Stop the reaction by adding <b>10 µl stop solution</b> (STOP).
10.	Reconstitute lyophilised <b>internal standard</b> (INT STD) in solution A and add <b>200 µl</b> to each sample (final volume: 400 µl). Vortex shortly and put the samples in vials suitable for LC-MS/MS. <b>Inject 25 µl</b> into the HPLC system.

## 10. CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS

Example of a comparable UPLC method

**Column material:** e.g. Acquity UPLC® BEH130 C18 (Waters); 1.7 µm

**Column dimension:** 2.1 × 50 mm

**Flow rate:** 0.1 ml/min

**Column temperature:** 45°C

**Injection volume:** 25 µl

**Running time:** 25 min

**Gradient:**

Time	Mobile phase A	Mobile phase B
0 min	97 % A	3 % B
5.1 min	97 % A	3 % B
15.1 min	55 % A	45 % B
15.2 min	20 % A	80 % B
17.0 min	20 % A	80 % B
17.1 min	97 % A	3 % B
25.0 min	97 % A	3 % B

It is recommended to use a guard column/filter to extend the column's life.

After the analysis, the separation column can be washed with ~ 50 ml MOPHA A using the above mentioned gradient. The column can be stored in 80 % acetonitrile.

## 11. MS/MS METHOD

The MS/MS method shown below is an example for a TSQ Vantage Triple Quadrupol-mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific)\*.

<b>Mode:</b>	SRM
<b>Polarity:</b>	ESI+
<b>Capillary temperature [°C]:</b>	350
<b>Vaporizer temperature [°C]:</b>	400
<b>Sheath gas pressure [Arb]:</b>	60
<b>Aux gas pressure [Arb]:</b>	15
<b>Spray voltage [V]:</b>	4000
<b>Resolution in 1st and 3rd Quadrupol [FWHM]:</b>	0,7
<b>Collision gas [mTorr]:</b>	1,5
<b>Cycle time [s]:</b>	0.5–1

\* These settings are sample settings and can be different depending on the manufacturer and the machine used. Before analysis, tuning is necessary to estimate the optimal LC-MS/MS settings as well as to assess the sufficiency of the sensitivity.

*SRM transitions (m/z)*

**Vedolizumab, peptide for quantification: MH1+: 2237.0357 (MH2+: 1119.022)**

Transitions			
Precursor ion	Fragment ion	S-LENS voltage	Collision energy
1119.022	429.213	231	37
1119.022	956.472	231	28
1119,022	728.340	231	28
1119.022	1281.571	231	33

**Internal Standard (isotopic labelled peptide: MH1+: 2245.28 (MH2+: 1123.029))**

Transitions			
Precursor ion	Fragment ion	S-LENS voltage	Collision energy
1123.029	429.213	231	37
1123.029	956.472	231	28
1123.029	1001.965	231	26
1123.029	1289.585	231	33



## 12. CALCULATION

Linear regression can be used as model for evaluation of the results. The three calibrator concentration points are connected by a straight line. The samples can be calculated using this obtained line.

## 13. QUALITY CONTROL

Control samples should be analysed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

## 14. PRECAUTIONS

- For research use only
- Quality control samples should be analysed with each run.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.

## 15. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.











## 16. DISPOSAL

Mobile phase (MOPHA A, MOPHA B), solution A (SOL A), activation reagent (ACTSOL), reconstitution solution (RECSOL) and stop solution (STOP) have to be disposed as non-halogenated solvents.

## 17. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- All reagents in the kit package are for research use only.
- The guidelines for laboratories should be followed.
- *IDKmonitor*® and *ImmuTube*® are trademarks of Immundiagnostik AG.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

### Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue Number
	For research use only		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use