-Why use SLE?-

Simple Off-line Clean-up Techniques to Eliminate Phospholipids and other Matrix Interferences in LC-MS/MS Bioanalysis

Moucun Yuan, PhD

R&D, Biologics by LC-MS
PPD® Laboratories
Richmond, Virginia, USA

30th JSSX Annual Meeting, Biotage Seminar, 14th November, 2015, Tokyo, Japan

EXPECT EXCELLENCE
ADVANCING DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT

PPD®

＜＜2015年11月14日：薬物動態学会年会 ランチョンセミナー＞＞
この資料では生体試料の分析前処理におけるISOLUTE SLE+（珪藻土）のクリーンアップ性能について説明します。
ISOLUTE SLE+はシンプルな作業でリン脂質を効果的に除去できます。

About Speaker

- Moucun Yuan （袁 谋村）, PhD – Principal Scientist
  Chromatographic Sciences, **PPD® Laboratories**
- MS (1988), Chinese Academy of Sciences, China （中国科学院）
  PhD (1999), Fisheries Science, Tokyo University of Fisheries, Tokyo, Japan
  （東京水産大学, 大槻先生/ 浪越先生）
  Postdoctoral Research Fellow, Wright State University, Dayton, OH, USA
- Associate Professor (1994) in Analytical Chemistry, Xiangtan University, China
  Visiting Scientist （1994 – 1996), Yokohama National University, Yokohama, Japan
  （横浜国立大学, 土屋先生）

Dr Yuan joined PPD in 2004. As a leading scientist in R&D Group, he is managing, mentoring, and providing leadership in new research activities and techniques. He has developed and validated nearby 80 analytical methods for regulated bioanalysis. He has over 20 peer-reviewed papers, approximately 30 conference presentations and 100 technical reports on LC-MS.

In past 10 years, he has been focused on developing different sample prep techniques for GLP analysis in different matrixs, such as protein precipitation (PPT), solid phase extraction (SPE) and supported liquid extraction (SLE).

この発表資料を作成したMoucun Yuan博士の略歴です。
Yuan博士は2004年より米国PPD、R&Dグループにおいて日々新たな分析法開発に取り組まれています。
創薬におけるバイオアナリシスにおいて、これまでに80件ほどの新規分析法を開発しており、米国におけるISOLUTE SLE+のヘビーユーザーです。

PPD Overview

Headquarters
Wilmington, NC, US

- Development services **since 1985**
- **World's Best Contract Research Organizations (CROs)** (CenterWatch 2015 Global Site Survey)
- PPD has worked with **47 of the top 50 pharmaceutical* companies** and more than 750 biotechnology companies
- PPD rated excellent in site relationships in latest ***CenterWatch*** global survey
- *PharmaTimes'* 2014 **International Clinical Research Team of the Year**
- PPD named a **CIO 100 Award** winner for Preclarus™, our real-time data and analytics solution

>14,000 Professionals **worldwide**

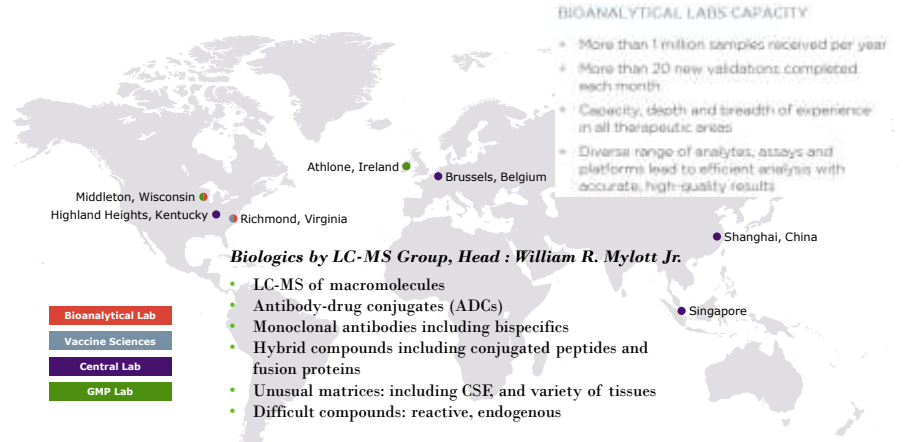
83 Offices, clinics and labs in **46** countries

PPD社の紹介です。

PPD社は米国の大手創薬CROです。

日本では株式会社新日本科学と協業関係にあります。

PPD Laboratories /Bioanalytical Lab



Both Richmond and Middleton locations have on-site R&D and validation teams to develop **custom solutions for clients' most challenging problems**

Today's Topics on the Talk

Why Use SLE in LC-MS/MS Bioanalysis?

Simple Off-line Clean-up Techniques to Eliminate Phospholipids and other Matrix Interferences

なぜ、LC-MS/MSによるバイオアナリシスにSLE法を用いるのか。
本スライドより本題に入ります。

Agenda

- **GLP Bioanalytical Method Validation and Regulation**
- **How Can We Meet Regulation Criteria with LC-MS/MS?**
- **Matrix Effect and Phospholipids**
- **Off-line Phospholipid Cleanup Evaluation Using SLE+**
- **SLE+ Application in Antibody-Drug Conjugate (ADC) Bioanalysis**

このスライド資料の内容です。

・GLP適合バイオアナリシス(生体試料中薬物濃度)のバリデーションと規制
・どのようにLC-MS/MS分析を規制基準に適合させるか
・マトリックス効果とリン脂質
・SLE+を使用したリン脂質のクリーンアップ（除去）
・抗体薬物複合体（ADC）生体分析におけるSLE+の用途

GLP Bioanalytical Method Validation and Regulation

- GLP bioanalyses are a major component of the drug development process.
- The reliability of analytical data is an essential aspect of any investigational new drug (IND) or new drug application (NDA) being reviewed by the regulatory agencies such as the U.S. Food and Drug Administration (FDA).
- LC-MS/MS methods used for GLP bioanalysis must be validated using the fundamental parameters for data reliability:
  - Accuracy
  - Precision
  - Selectivity
  - Reproducibility
  - Stability

  (May 2001 FDA Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation and the AAPS/FDA Crystal City V Conference, December 2013)
- When the method is applied to study samples

  Incurred Sample Reanalysis (ISR): Method reproducibility and accuracy in incurred samples analysis.

新薬開発におけるGLP適合バイオアナリシスではデータの信頼性が大変重要なため、常に米国食品医薬品局（FDA）や厚生労働省等の各国機関により厳しい規制を受けています。

GLP適合バイオアナリシスのための分析法は正確度、精密度、選択性、再現性、安定性等という観点で厳しくチェックされ、新たに開発した分析法を実際のサンプル（患者検体など）に適用する際にはさらにIncurred Sample Reanalysis（ISR：実サンプル再評価試験）と言われる確認試験を行う必要があります。

Key Acceptance Criteria for Bioanalytical Method Validation and Sample Analysis

- **Calibration standards**
  Residuals (absolute difference between the back calculated and nominal concentration) for each calibration standard should meet the following limits:
  - LLOQ standard < 20%
  - All other standards < 15%
- **Quality control (QC) samples**
  Allowed accuracy and precision
  - QCs at all concentrations greater than LLOQ < 15%
  - Low QC (if prepared at LLOQ) < 20%
- **Fortified specificity sample analysis**
- **Carryover**
  Carryover should be minimized (usually should < 20% of LLOQ)
- **ISR**

たとえば、GLP規制下では標準物質のレスポンスから算出される濃度と理論値の差（真度）は、定量下限において20%未満でなくてはなりません。
QCサンプルの真度についても基準値が決められており、求められる再現性についても基準値があります。
バイオアナリシスはこのような厳しい規制に適合する必要があります。

How Can We Meet these Criteria with LC-MS/MS?

- **Potential Impact of Instruments Performance**

An Example of MS lost performance

The instrument lost performance after running around 300 plasma sample (PPT extract)!

CV Test for the instrument performance (UPLC/API 5000 System)

Sample ID	Response of Test Compound	Response of Reference Compound	Peak Height or Area Response Ratio		
A-1	1017313.01	804025.03	1.2653		
A-2	868419.66	781626.12	1.1110		
A-3	938324.81	833747.62	1.1254		
A-4	1027727.42	839917.80	1.2236	Mean	1.2309
A-5	985055.84	626223.33	1.5730	STD DEV	0.1814
A-6	912548.24	839502.80	1.0870	%CV	14.7345
B-1	1035340.25	782835.33	1.3226		
B-2	1000653.86	622957.64	1.6063		
B-3	1086339.90	697237.80	1.5581		
B-4	1039986.21	750838.86	1.3851	Mean	1.3674
B-5	821773.77	857371.39	0.9585	STD DEV	0.2294
B-6	976454.24	710613.39	1.3741	%CV	16.7723

A/ B external sample injected 6 time.

Meet the criteria: maintain the instrument (autosampler, MS) accuracy and precision

厳しい規制下で使用するLC-MS/MSのパフォーマンスについて。

このデータは、除タンパク法で前処理した血漿300サンプルを分析した後のLC-MS/MS装置で、サンプルAとサンプルBを6回ずつ分析した結果です。%CVが15%前後と、MSのパフォーマンスが失われています。

How Can We Meet these Criteria with LC-MS/MS?

- **Eliminate the matrix effect**

ESI-based quantitative analysis is influenced by a phenomenon called **ion suppression** or **matrix effects**, wherein matrix components present in the biological sample influence the response of the analyte under investigation.

Matrix factor, or ion suppression, can be defined as the **change in response** observed for a given concentration of target analyte in the presence of other sample components.

$$\text{Matrix Factor (MF)} = \frac{\text{Peak response in presence of matrix components}}{\text{Peak response in absence of matrix components}}$$

MF=1 indicates **no matrix effects**
MF<1 indicates ion suppression
MF>1 indicates ion enhancement

このような（前スライドに示されるような）MSパフォーマンスの低下は生体試料中に存在するマトリックス成分によるもので、マトリックス効果と呼ばれる現象です。

マトリックス効果はスライドに示したMF値（マトリックスファクター）で数値化できます。

Reproducibility and Accuracy in Incurred Samples Analysis (ISR) May Be Altered by

- Drug stability
  Metabolites/parent drug converting
- Protein binding differences in incurred sample
  Recovery difference
- Sample inhomogeneity
- MS ionization due to matrix effects

For assurance of an acceptable ISR, it is critical to avoid matrix effect which is a major cause of ISR failure.

マトリックス効果はGLP規制下におけるISR（実サンプル再評価試験）において「不適合」の結果となる大きな要因のひとつです。

Agenda

- GLP Bioanalytical Method Validation and Regulation
- How Can We Meet Regulation Criteria with LC-MS/MS?
- **Matrix Effect and Phospholipids**
- Off-line Phospholipid Cleanup Evaluation Using SLE+
- SLE+ Application in Antibody-Drug Conjugate (ADC) Bioanalysis

マトリックス効果とリン脂質の関係について説明します。

Major Matrix Effect Focus on Phospholipids

- A major cause of matrix effects when using electrospray has been shown to be from endogenous phospholipids.

- A number of approaches have been investigated to improve reproducibility and robustness of LC/MS/MS methods that are subjected to matrix effects from phospholipids.

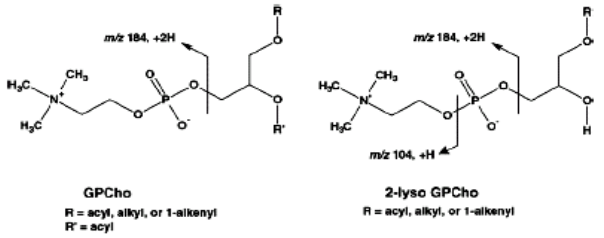
エレクトロスプレーイオン化法を用いたマトリクス効果の主な原因は、内因性のリン脂質です。

これまで、LC/MS/MS分析の再現性と堅牢性の改善を目的として、内因性リン脂質の影響を排除するために様々な検討が行われてきました。

What are phospholipids?

- Glycerol esterified to a phosphate-containing moiety (e.g. choline) and up to two fatty acids of variable chain length

- The major class of phospholipids found in human plasma are the glycerophosphocholines (GPCho's)



J.L. Little *et al.*, *J. of Chrom. B* 833, (2006) 219-230

ヒト血漿に含まれる主なリン脂質はグリセロリン脂質と言われるものです。

Why are phospholipids important to consider during LC/MS assay development?

- Co- eluting or late- eluting phospholipids are the major source of ion suppression interference issues
- Chromatographically elute over a wide retention time range
- May build up and slowly bleed off the column during subsequent injections
  - Variable ion suppression magnitude
  - Loss of sensitivity as run progresses
- Accumulation on the column may alter the column chemistry
  - Change in the retentive behavior of the stationary phase
  - Analyte retention time shifts
  - Increase the potential for column-related analyte carryover due to adsorption

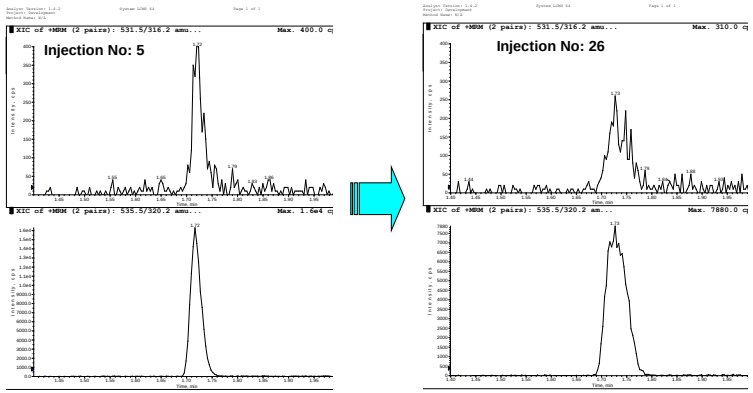
Phospholipids pose a serious ruggedness issue for assays and steps should be taken to reduce or remove them !

リン脂質は次の理由によりLC/MS分析の耐久性に深刻な問題を起こし得ます。リン脂質を低減させる、あるいは除去する前処理が必要です。

- リン脂質がイオンサプレッションの原因となる主な夾雑成分であるため
- リン脂質はLCの広範囲な保持時間にわたって溶出されるため
- リン脂質がLCカラムに蓄積する上に徐々に溶出するため
  - イオンサプレッションの程度が一定ではない
  - ランが進むにつれて感度が下がる
- リン脂質の蓄積によりLCカラムの化学特性が変化する可能性があるため
  - 保持の挙動が変化する
  - 保持時間がシフトする
  - LCカラムによるターゲットのキャリーオーバーが起こり得る

An Example of Chromatography Matrix Effect

Peak shape change may effect the LLOQ

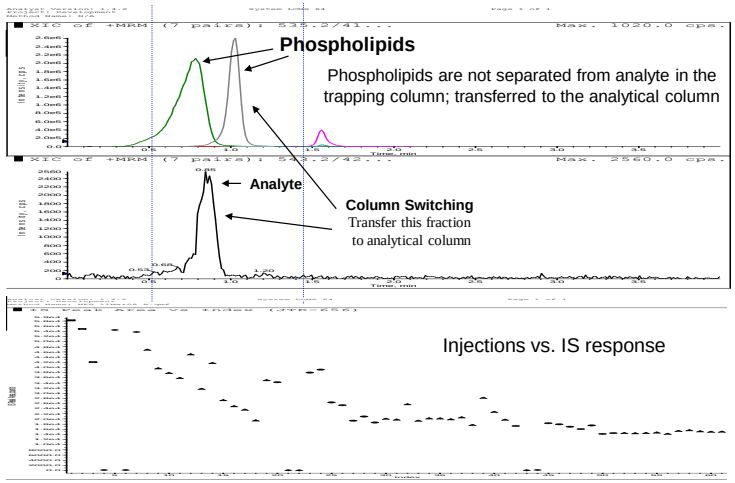


- Sample: Human Plasma PPT extract
- Although change in peak shape did not effect the quantitation due to using labeled IS, however, if the LLOQ peak height is too low, the quantitation will be not reliable.

マトリックス効果の一例です。
ピーク形状の変化は定量下限に影響を与える可能性があります。

ヒト血漿を除たんぱく法（PPT）にて前処理し分析したところ、20サンプルの連続分析でピーク形状が変化しました。
内部標準（IS）を用いれば定量値にはほぼ影響を与えずに分析できますが、定量下限値付近でのピークが小さい場合にはデータの信頼性を損ないます。

An Example of Phospholipids Impact on MS Response in 2D System



The phospholipids were transferred to the analytical column resulting in their accumulation and subsequent elution in samples injected later. The drug and IS response dropped due to the suppression effects of the late eluting phospholipids.

リン脂質がMSレスポンスに影響を与えている一例です。

リン脂質がトラップカラムで分離されず、分析カラムに蓄積し、分析を継続する過程で徐々に溶出されました。
その結果、内部標準（IS）のレスポンスが徐々に下がっています。

Agenda

- GLP Bioanalytical Method Validation and Regulation
- How Can We Meet Regulation Criteria with LC-MS/MS?
- Matrix Effect and Phospholipids
- **Off-line Phospholipid Cleanup Evaluation Using SLE+**
- SLE+ Application in Antibody-Drug Conjugate (ADC) Bioanalysis

SLE+を使用したリン脂質のクリーンアップについて説明します。

How to Eliminate Matrix Effects?

-- Purify, purify and purify the sample

-- Only pure sample = no matrix effect!

- **Sample Preparation — Off-line Cleanup**

  Removes the undesired components (proteins, salts, lipids, and other contaminants such as polyethylene glycol (PEG) and EDTA added to preserve) **while trying to retain the target analyte.**

  The Techniques: SPE, PPT, LLE, SLE+….

- **On-line Cleanup**

  Important for **components** that are **difficult to recover in traditional sample extraction methods** and where there is a **need for complete elimination of matrix effect to achieve highest sensitivity**.

  The Techniques:
  Column Switching, Guard Column Backflush/ Forwardflush, TurboFlow

マトリックス効果を解消するには、サンプルの精製を行ってクリーンなサンプルを得るしかありません。

サンプルの精製は大まかにオフライン・クリーンアップとオンラインクリーンアップに分類されますが、SLE+やSPE（固相抽出）、PPT（除タンパク）などは、分析装置をつなげずに行うオフライン・クリーンアップ（サンプル前処理）の手法です。

なお、オンライン・クリーンアップとしては、カラム交換、ガードカラム、ラン前後のカラムの洗浄、高流速洗浄などがありますが、本資料では割愛します。

Off-line Cleanup Techniques: SPE, PPT, LLE, SLE+….

↓

Simple Off-line Clean-up Techniques

↓

Here

"Simple" Refer to

+ Dilution
+ Protein precipitation (PPT)
+ Liquid-liquid extraction (LLE)
+ **Supported liquid extraction (SLE+)**

PPD Proprietary & Confidential

オフライン・クリーンアップ手法のうち、手間のかからないシンプルな手法はPPTとSLE+です。

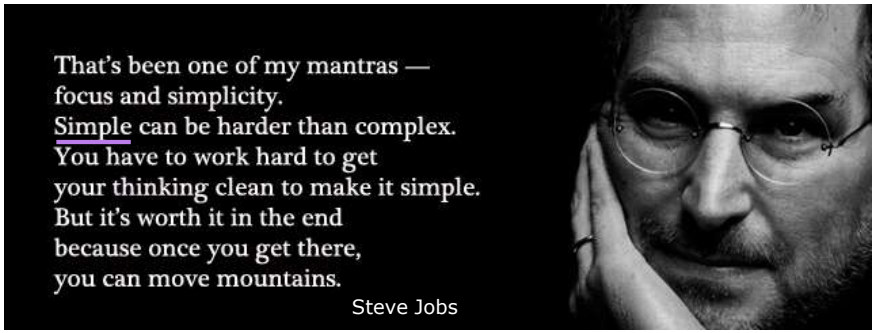
Why are Phospholipids Difficult to Remove?

- Amphipathic and zwitterionic character makes phospholipids extremely difficult to remove during extraction
- Phospholipids are a complex mixture with a wide molecular weight range, increases complexity for mass spec monitoring
- Common methods (PPT, Liquid/Liquid, SPE C18, C8, HLB, ion exchange) do not effectively remove phospholipids from biomatrix sample extracts
- Phospholipids are present at mg/mL concentrations in plasma
  + Even if 90% removed during extraction, high µg/mL quantities still remain!

リン脂質の除去が困難な理由として次の内容があげられます。

- 両親媒性で両性イオンを持つという特性のため抽出時に除去することが困難
- 幅広い分子量の複雑な混合物なので質量スペクトルのモニタリングが困難
- 一般的な前処理法で効果的に除去できない
- 血漿中に高濃度に存在するため
- 血漿中にmg/mLの濃度で存在し、仮に90%のリン脂質が除去されてもµg/mLの濃度で多量に残存する。

Simple Technique vs. Difficult to Remove ?



シンプルな方法で、困難を克服できるか？

『私は信念として「シンプルであること」にこだわっている。
シンプルであることは、複雑であることより難しい。
シンプルであるために、思考をクリーンにするよう大変な努力が必要だ。
しかし、努力する価値はある。
ひとたび「シンプル」に到達すれば、あなたは山を動かせる。』
By Steve Jobs

How Can Phospholipids be Simply Monitored Using LC-MS/MS?

- Take advantage of common CID fragment (m/z 184)
- Monitor group of selected SRM transitions to encompass known *m/z* range for the mono and diradyl GPCho's

Lysophospholipids

m/z 496 → 184
m/z 524 → 184

Phospholipids

m/z 704 → 184
m/z 758 → 184
m/z 806 → 184

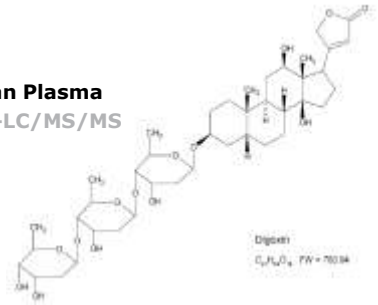
- Conduct precursor ion scan *vs.* m/z 184 product ion

リン脂質は、CIDフラグメント（m/z 184）によりモニタリングできます。

Off-line Phospholipid Cleanup Evaluation

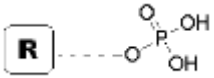
- **Case 1**

Isolation of Digoxin from Human Plasma using SLE+ for Analysis by ESI-LC/MS/MS



- **Case 2**

Extraction of a Phosphate Compound from Human Plasma using SLE+



SLE+によるリン脂質除去の検討事例を示します。

・ケース1

ヒト血漿中ジゴキシン抽出（ESI-LC/MS/MS分析）

・ケース2

ヒト血漿中リン酸化合物抽出

Case 1: Isolation of Digoxin from Human Plasma

Sample Extraction Methods

- **PPT**

  Human plasma extracted using protein precipitation with ACN/MeOH (4:1, v/v)

  + Contain highest concentrations of phospholipids!

- **SLE**

  Human plasma extracted using Supported Liquid Extraction (Biotage Isolute SLE+)

  + Phospholipids?

ケース1：ヒト血漿中ジゴキシン抽出

ヒト血漿を除タンパク法またはSLE法で前処理しました。

除タンパク溶媒は、アセトニトリル/メタノール（4：1, v/v）を用いました。

SLE法ではBiotage ISOLUTE SLE+を使用しました。

Extraction Procedure

PPT	SLE+
100 µL plasma sample + 50 µL buffer + 50 µL I.S., vortex ↓ 300 µL of 4:1 ACN:MeoH, vortex, centrifuge ↓ Evaporate to dryness and reconstitute with 250µL ↓ LC/MS/MS injection	100 µL plasma sample + 50µL buffer + 50µL I.S., vortex ↓ Transfer 200 µL to SLE+ plate, allow to absorb into bed and equilibrate for 5 min ↓ Add 400 µL of DCM and allow to equilibrate for 5 min. Apply slight vacuum. ↓ Repeat previous step and combine extracts ↓ Evaporate and reconstitute with 250 µL ↓ LC/MS/MS injection

ケース1：ヒト血漿中ジゴキシン抽出

PPTとSLE+の処理工程です。

Instrument conditions

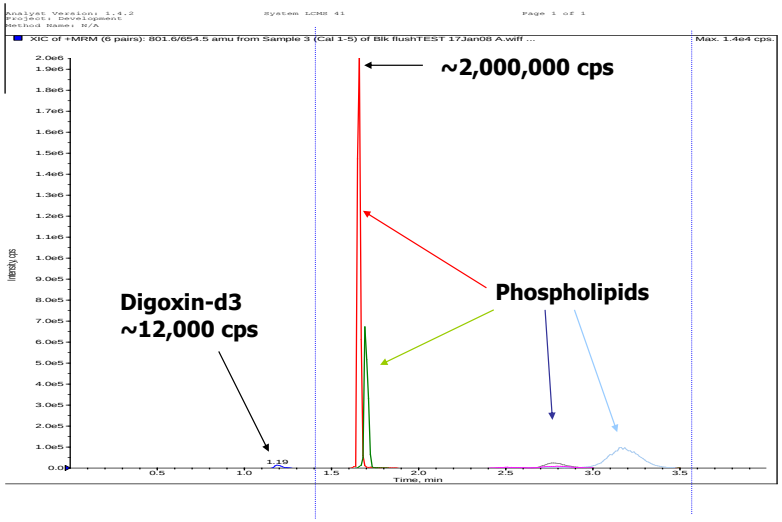
- Column: MetaGuard C18, 2x10 mm
- Gradient Elution
- Mobile Phase A: 5 mM ammonium acetate
- Mobile Phase B: 70/25/5/0.5 ACN/MeOH/Water/1 M Ammonium acetate (v/v/v/v)
- Sciex API-4000, positive ion TurboIonSpray™, MRM

Analyte	~ t_R (min)	Dwell Time (ms)	Q1 m/z	Q3 m/z	DP	CE	CXP	EP
Digoxin-d3	1.2	100	801.6	654.5	63.25	20.69	24.47	10
Phospholipid	1.7	100	496.0	184.0	63.25	20.69	24.47	10
Phospholipid	1.7	100	524.0	184.0	63.25	20.69	24.47	10
Phospholipid	2.8	100	704.0	184.0	63.25	20.69	24.47	10
Phospholipid	3.2	100	758.0	184.0	63.25	20.69	24.47	10
Phospholipid	2.8	100	806.0	184.0	63.25	20.69	24.47	10

ケース1：ヒト血漿中ジゴキシン抽出

分析条件です。

Phospholipid profile (PPT procedure, TIC)

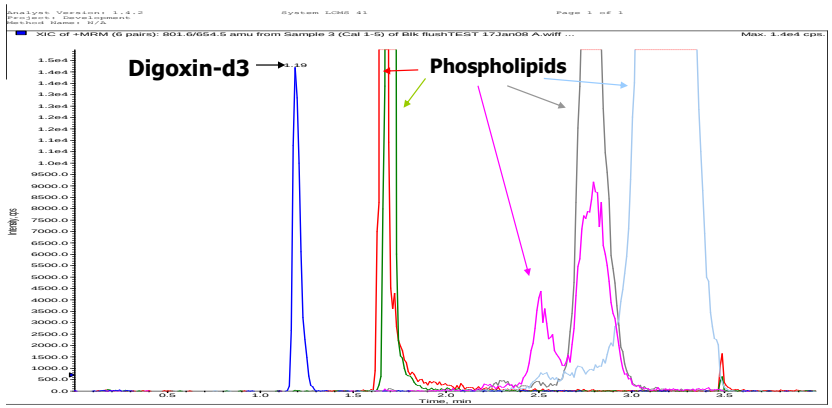


ケース1：ヒト血漿中ジゴキシン抽出

PPT処理したヒト血漿のデータです。

リン脂質が多く残り、ジゴキシンと比較して高いTICを示しました。

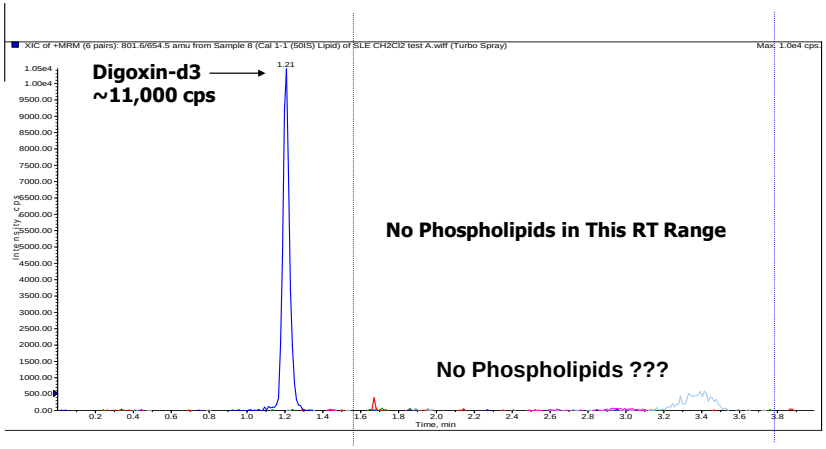
Normalized to digoxin-d_3 response



ケース1：ヒト血漿中ジゴキシン抽出

前スライドのクロマトをdigoxin-d3でノーマライズした図です。

Phospholipid profile (SLE+ procedure, TIC)



ケース1：ヒト血漿中ジゴキシン抽出

SLE+処理したヒト血漿のデータです。

リン脂質の大部分が除去されています。

Case 2: Phosphate Compound SLE Extraction

Question:

SLE can be an effective technique for off-line removal of phospholipids. Can this technique be used for phosphate compound extraction?

- Very low recovery using DCM, MtBE or Hexane as SLE elution solvent
- Using IPA in elution solvent is necessary for increasing recovery
- Ion-pairing agents (as ammonium salt) also can be used for increasing recovery in phosphate compound SLE extraction

ケース2：ヒト血漿中リン酸化合物抽出

SLEが効果的にリン脂質を除去する前処理法ということは分かりました。
このSLE法はリン酸化合物の抽出にも適用できるのでしょうか？

結果は：

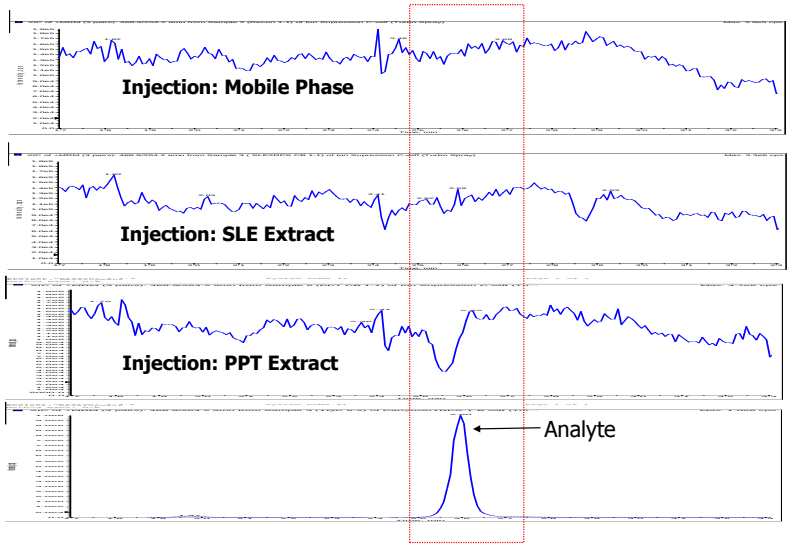
- DCM（ジクロロメタン）、MtBE（メチルtert-ブチルエーテル）、ヘキサンでは回収率が低かった
- IPA（イソプロパノール）を抽出溶媒に添加することで回収率が改善した
- イオンペア試薬（アンモニウム塩など）の使用によりリン酸化合物の回収率向上が期待できる

SLE+ Extraction Procedure

1. **50 µL plasma sample + 25µL IS + 125µL of ion-pair agent solution (ammonium salt). Vortex**
2. **Transfer 200 µL to SLE$^+$ plate, allow to absorb into bed and equilibrate for 5 min**
3. **Add 400 µL of Extraction Solution (50:40:10 DCM/MtBE/IPA, v/v/v). and allow to equilibrate for 5 min. Apply slight vacuum.**
4. **Repeat previous step and combine extracts**
5. **Evaporate and reconstitute with 200 µL**
6. **LC/MS/MS injection**

ケース2：ヒト血漿中リン酸化合物抽出

SLE+の処理工程です。
サンプル希釈の際にイオンペア試薬を使用しており、抽出溶媒はDCM、MtBE及びIPAの混合溶媒です。



Post-column infusion for ion suppression test.

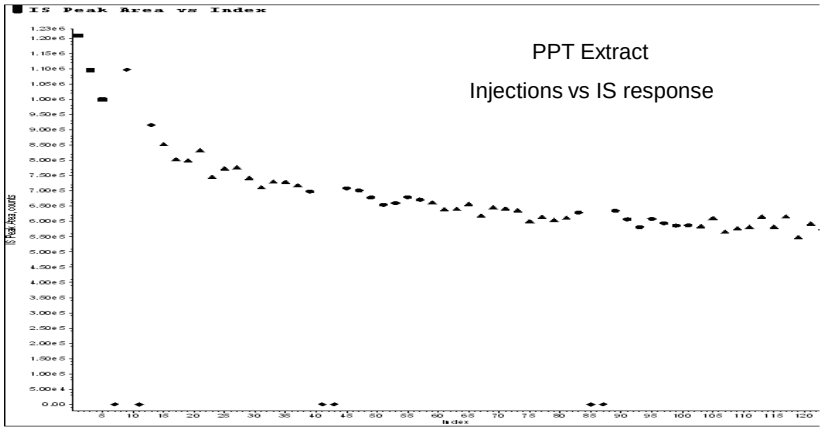
PPT extract has the ion supression for the analyte in the related RT range. While SLE extract was similar to mobile phase, no ion supression for analyte.

33

ケース2：ヒト血漿中リン酸化合物抽出

ポストカラム注入によりイオンサプレッションをテストしみました。

PPT抽出では、ターゲット（Analyte）に対してイオンサプレッションが見られました。
一方SLE抽出では、移動相のみのデータとほぼ同じクロマトになり、イオンサプレションは見られませんでした。



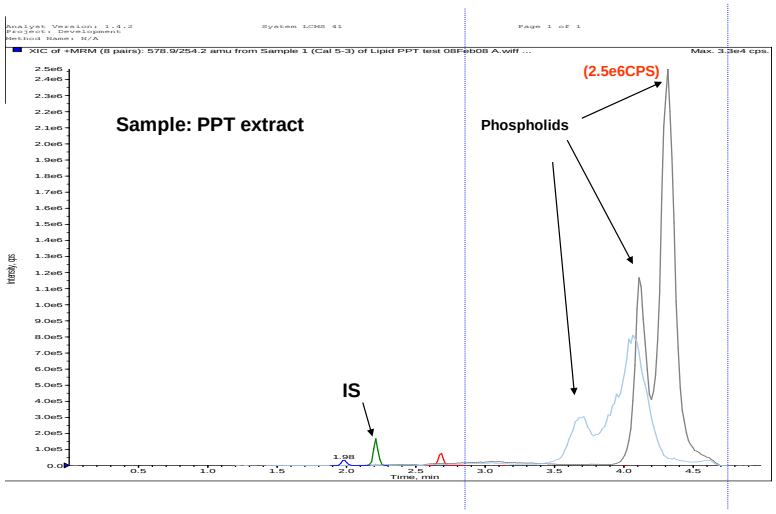
IS response dropped due to the suppression effects of the late eluting phospholipids.

34

ケース2：ヒト血漿中リン酸化合物抽出

分析の継続に伴い、内部標準（IS）のレスポンスが下がっています。
分析カラム内に蓄積したリン脂質が後から徐々に溶出し、影響を与えているためです。

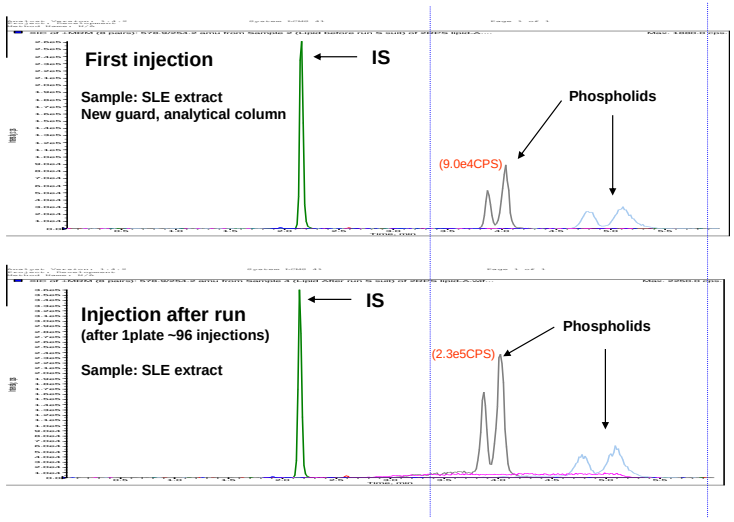
Phospholipid Profile (PPT procedure, TIC)



ケース2：ヒト血漿中リン酸化合物抽出

除タンパク前処理血漿のリン脂質プロファイルです。

Phospholipid Profile (SLE+ procedure, TIC)



ケース2：ヒト血漿中リン酸化合物抽出

SLE+前処理血漿のリン脂質プロファイルです。

上のクロマトは新しいガードカラムと分析カラムをして得られたものです。
下のクロマトは1プレート（96サンプル）分析した後のデータです。

ISピークの形状や強度に大きな変化はなく、リン脂質ピークはISピークに影響を与えない程度です。

Make it simple, but make it

significant.

-Don Draper

『シンプルに行い、しっかり成功させる。』 by Don Draper

Summary

+ SLE can be an simple and effective technique for off-line removal of phospholipids with appropriate elution solvents
+ Possible Reason:
  Phospholipids are strongly adsorbed on SLE sorbent and are not eluted by "weak" organic solvent such as DCM, MtBE.
+ **Phosphate Compound** can be extracted using SLE. Most of the phospholipids in the extract were removed, the matrix effect was minimized to the analytical run.

＜＜まとめ＞＞

-SLE法は適切な溶出溶媒を用いることでリン脂質除去をシンプル且つ効果的に行えるサンプル前処理法である。

-リン脂質を除去できる理由

リン脂質はSLE充填剤（珪藻土）に強く吸着し、DCM（ジクロロメタン）やMtBE（メチルtert-ブチルエーテル）のような弱い有機溶媒では溶出されないためと考えられる。

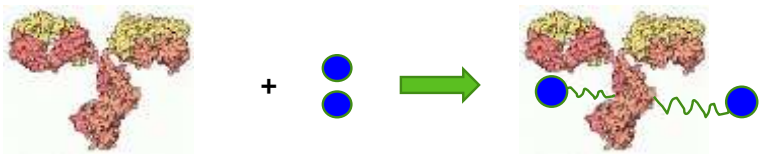
-リン酸化合物はSLE法で前処理可能である。その抽出工程でリン脂質は概ね除去され、マトリックス効果は最小限に抑えられる。

Agenda

- GLP Bioanalytical Method Validation and Regulation
- How Can We Meet Regulation Criteria with LC-MS/MS?
- Matrix Effect and Phospholipids
- Off-line Phospholipid Cleanup Evaluation Using SLE+
- **SLE+ Application in Antibody-Drug Conjugate (ADC) Bioanalysis**

最後に、近年開発が加速しているバイオ医薬品に関連して、抗体薬物複合体（ADC）バイオアナリシスにおけるSLE+の活用についてお話しします。

Antibody-Drug Conjugate (ADC)



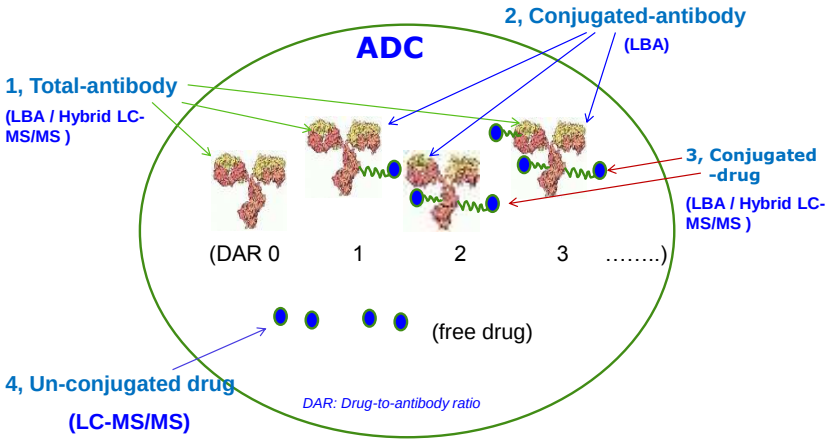
Antibody (Selectivity) | Drug (Potency/ Efficacy) | ADC (Selectivity Potency/ Efficacy)

ADC: put a "warhead" on a "guided missile"

There has been increasing interest in ADCs as they have the potential to allow targeted delivery of anticancer drugs to tumors, with minimal impact.

抗体薬物複合体（ADC）は、抗体の「選択性」と薬物の「効力と有効性」を合わせるということで、「誘導ミサイルに弾頭を搭載する」ことに似ています。抗がん剤を腫瘍へ標的輸送できる可能性を秘めているとして、近年関心が高まっています。

ADC Bioanalysis (ADC PK Assays)



White Paper on ***Validation of LC-MS/MS Bioanalytical Methods for Protein Biotherapeutics***
Rand Jenkins, et al, The AAPS Journal (# 2014), DOI: 10.1208/s12248-014-9685-5

ADCバイオアナリシス（ADC PK試験）では、総抗体量や、薬物を結合した抗体の量（conjugated antibody）、抗体に結合した薬物の量（conjugated-drug）、そして抗体に結合していないフリーな状態の薬物の量をそれぞれ測定する必要があります。

PPD Antibody and ADC Assays

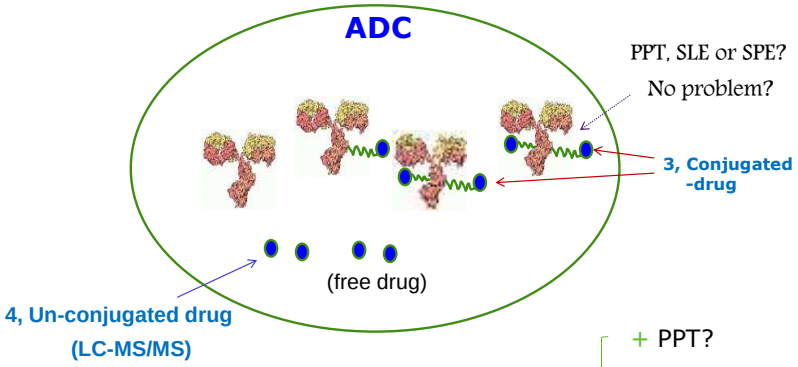
(Biologics by LC-MS Group)

- **63 Total Antibody Assays**
  - 38 Method performance evaluations (MPE)
  - 15 pre-clinical full validations
  - 10 clinical full validations
- **51 Antibody Conjugated Assays**
  - 20 Method performance evaluations (MPE)
  - 16 pre-clinical full validations
  - 15 clinical full validations
- **29 Unconjugated Toxin Assays**
  - 10 Method performance evaluations (MPE)
  - 7 pre-clinical full validations
  - 12 clinical full validations

SLE+ can be used here!

PPD社では、総抗体量の測定は63件、薬物結合抗体の測定は51件、フリーの薬物（多くの場合、毒性を示す）の測定では29件の実績があります。
SLE+法はフリー薬物の測定に使用できます。

Thinking About the Extraction for Unconjugated Toxin



How to extract the free drug from the ADC sample without breaking down the conjugated drug?

+ PPT?
+ SLE+
+ SPE?

43

抗体に結合していない薬物（unconjugated toxin）の前処理は、既に結合しているADCを分解しないように行う必要があります。

An Example of Bioanalytical Method for Unconjugated Toxin

- Matrix: human plasma containing dipotassium EDTA
- Sample volume: 100 µL
- Proposed quantitation range: 10. 0 pg/mL – 1000 pg/mL
- Extraction: SLE+ procedure

44

Unconjugated Toxin分析例

Unconjugated Toxin分析の一例を示します。
SLE+を使用しました。

Extraction Procedure: SLE+

100 µL plasma sample + 50µL buffer + 50µL I.S., vortex

↓

Transfer 200 µL to SLE⁺ plate, allow to absorb into bed and equilibrate for 5 min

↓

Add 800 µL of ethyl acetate and allow to equilibrate for 5 min. Apply slight vacuum.

↓

Repeat previous step and combine extracts

↓

Evaporate, reconstitute to 140 µL

↓

LC/MS/MS injection

Unconjugated Toxin分析例

SLE+の処理工程です。

Assay Precision and Accuracy

Back Calculated Calibration Standard Concentration

Run ID	CAL 1	CAL 2	CAL 3	CAL 4	CAL 5	CAL 6	CAL 7	CAL 8
	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)
1	10.0	16.0	20.6	54.4	103	257	430	540
	8.76	14.5	19.6	50.4	96.7	241	415	512
2	9.93	14.7	19.2	50.1	97.2	254	430	519
	10.4	15.0	19.9	54.1	97.0	248	445	507
3	9.11	14.1	20.1	53.3	100	260	456	519
	10.0	15.3	20.2	52.1	100	250	428	483
4	10.3	14.0	19.6	51.4	104	232	453	493
	10.2	15.7	19.4	49.9	99.0	249	448	522
5	10.6	14.7	20.7	49.7	99.1	249	453	507
	10.1	13.7	20.1	50.1	101	251	443	498
N	10	10	10	10	10	10	10	10
Theoretical Concentration	10.0	15.0	20.0	50.0	100	250	450	500
Mean	9.94	14.8	19.9	51.6	99.7	249	440	510
S.D.	0.573	0.744	0.495	1.82	2.46	7.95	13.6	16.3
%C.V.	5.77	5.04	2.48	3.52	2.47	3.19	3.09	3.20
% Difference from Theoretical	-0.62	-1.53	-0.30	3.10	-0.35	-0.36	-2.20	2.00

Unconjugated Toxin分析例

SLE+処理サンプルを分析した際の再現性データです。

8濃度のスタンダード試料をそれぞれn=2で5ラン（計10回）測定しました。

各スタンダードにおいて良好な%CVを示しています。

Intra-assay Precision and Accuracy

Run ID	IA0	IA1	IA2	IA3	IA4	IA5
	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)
	10.9	16.4	34.8	66.8	145	414
	10.1	18.0	35.3	71.4	143	380
1	10.3	19.6	34.0	66.0	150	389
	10.4	18.4	34.7	71.1	142	392
	10.2	19.1	35.7	69.9	147	390
	8.93	17.7	36.7	67.5	144	382
	9.03	18.0	33.5	70.5	150	393
	10.6	16.7	35.3	73.6	152	397
2	9.49	18.4	35.4	67.9	153	391
	10.1	17.0	32.4	71.9	147	374
	10.6	19.5	31.7	67.9	150	393
	9.84	18.4	33.0	66.0	149	373
	10.3	18.2	37.0	74.3	165	429
	9.80	17.9	37.0	75.8	161	413
3	9.74	17.4	37.9	72.0	157	408
	10.1	17.2	35.1	71.3	159	417
	9.88	18.4	36.2	74.4	154	418
	9.04	16.4	37.3	71.6	153	407
N	18	18	18	18	18	18
Theoretical Concentration	10	18	35	70	150	400
Mean	9.96	17.93	35.17	70.55	151	398
S.D.	0.560	0.955	1.74	2.99	6.34	16.2
%C.V.	5.62	5.33	4.94	4.23	4.19	4.07
% Difference from Theoretical	-0.36	-0.40	0.48	0.79	0.78	-0.56

Unconjugated Toxin分析例

前スライドと同じサンプルを用いて、測定濃度の正確度も確認しました。
8濃度のスタンダード資料を計18回測定したところ、算出した濃度と理論値の差はわずかでした。

Does SLE+ Procedure Cause the ADC Hydrolysis to Unconjugated Drug?

Run ID	QC1	QC5	QC10	QC11	QC15
	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)
	16.4	414	0	17.8	413
	18.0	380	0	19.6	376
1	19.6	389	0	17.0	383
	18.4	392	0	19.5	395
	19.1	390	0	16.8	392
	17.7	382	0	15.8	379
N	6	6	6	6	6
Theoretical Concentration	18	400	18	18	400
Mean	18.2	391	0.00	17.8	390
S.D.	1.13	12.1	0.00	1.53	13.6
%C.V.	6.19	3.10	0.00	8.64	3.49
% Difference from Theoretical	1.11	-2.21	0.00	-1.39	-2.58

- QC10: sample with ADC only
- QC1: with free drug only
- QC11: with free and ADC
- QC5: with free drug only
- QC15: with free and ADC

- QC10: no free drug detected
- Difference QC1/QC11: 2.5%
- Difference QC5/QC15: 0.38%

→ **SLE+ Procedure did not broken down the conjugated drug**

Unconjugated Toxin分析例

SLE+による前処理がADC（抗体薬物複合体）の加水分解を引き起こし、Unconjugated drugとして検出されないかどうか検証し、SLE+をUnconjugated drugの分析前処理に使用できることを確認しました。

QC10： ADCのみを含むサンプルです
QC1： フリー薬物のみ
QC5： フリー薬物のみ
QC11： フリー薬物とADC
QC15： フリー薬物とADC

Matrix Factor Evaluation Using SLE+

Sample ID	Analyte Peak Response	IS Peak Response	Response Ratio	Matrix Factor
EXTMF 5-1 (neat solution)	226063	110760	2.04	
MF 1-1 (Normal human plasma lot)	243954	115612	2.11	1.03
MF 2-1 (Normal human plasma lot)	261655	127580	2.05	1.00
MF 3-1 (Normal human plasma lot)	280168	135528	2.07	1.01
MF 4-1 (Normal human plasma lot)	261140	125235	2.09	1.02
MF 5-1 (5% hemolysis lot)	274566	132354	2.07	1.02
MF 6-1 (5% hemolysis lot)	257809	127717	2.02	0.989
MF 7-1 (lipemic lot)	314884	152582	2.06	1.01
MF 8-1 (lipemic lot)	304836	150978	2.02	0.989
			Mean	1.01
			S.D.	0.0153
			%C.V.	1.51

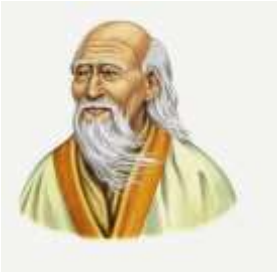
最後に、SLE+処理サンプルのマトリックスファクターを検証したデータを示します。
正常ヒト血漿サンプル、5%溶血サンプル、高脂血症サンプルにおいてマトリックスファクターがほぼ1となり、マトリクス効果がほぼないことがわかります。

See Simplicity in the complicated,

See Greatness in small things.

In the Universe, the difficult things are done as if they were easy.

(Thinking about how to do it)



-Lao Tzu-

『複雑な中の単純さを見出し、
小さきことにも偉大なことを見出す。
普遍の中では、難しいこともさも簡単に扱われる。』by老子

Thank You for Your Attention!

Questions?

Contact info:

Moucun Yuan, PhD
Principal Scientist, Research & Development
Biologics by LC-MS

PPD® Laboratories
2244 Dabney Road
Richmond, VA 23230

Phone +1 804 977 8021
Moucun.Yuan@ppdi.com
www.ppdi.com

Acknowledgements

+ PPD
  William R. Mylott Jr.
  Rand Jenkins
  Corey Nehls
  Bob Nicholson
  PPD Richmond R&D team

+ Biotage
  Toshi Yachi
  Maiko Kaneko
  Yuka Yonamine
  Elena Gairloch