

蛋白質科學 暨 技術服務 電子報

技術佈告欄 Technical Bulletin

蛋白質藥物動力學研究方法

Ligand binding assay vs.
Mass spectrometry

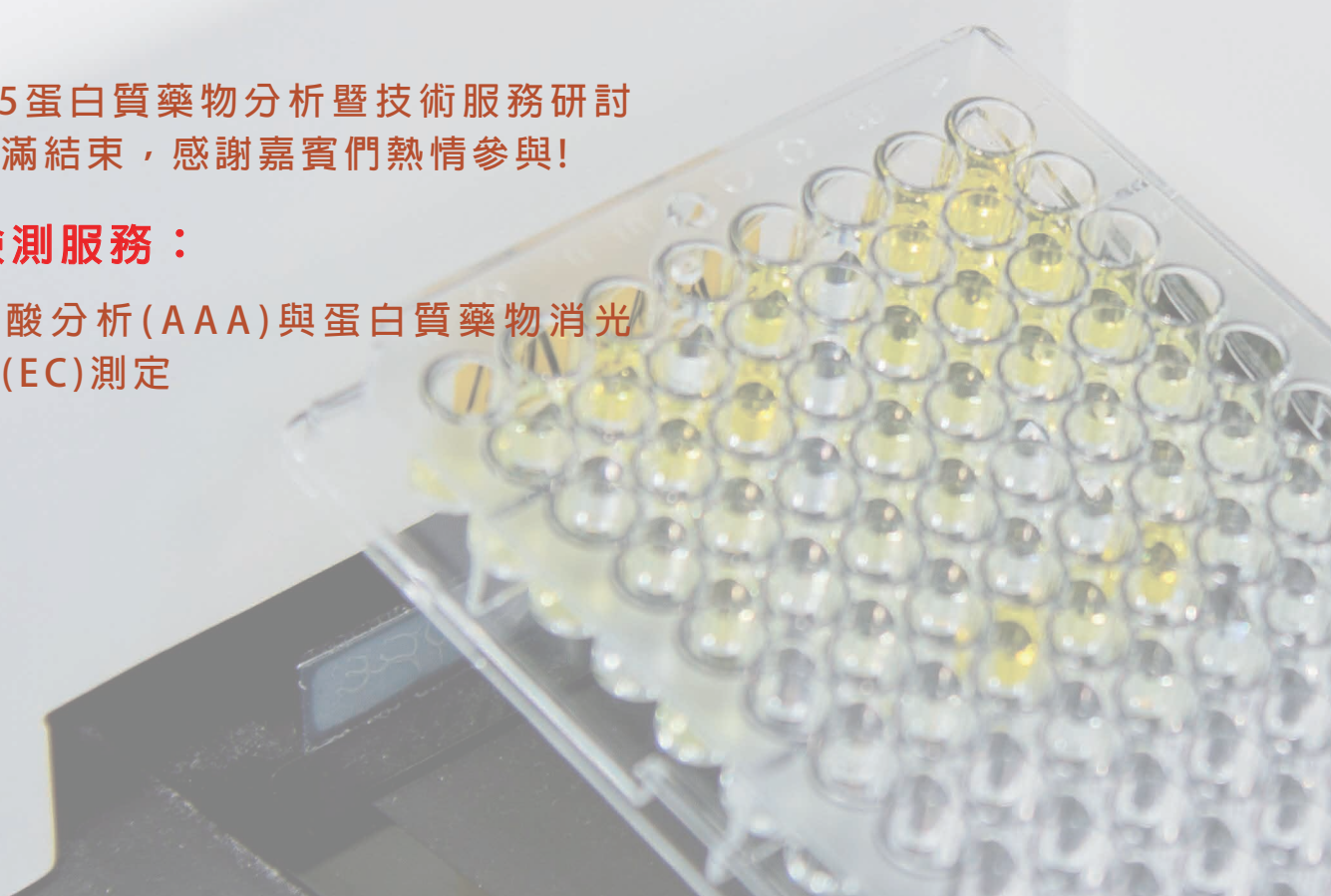
值日生
PSS

焦點新聞 News

2015蛋白質藥物分析暨技術服務研討
會圓滿結束，感謝嘉賓們熱情參與！

新檢測服務：

胺基酸分析(AAA)與蛋白質藥物消光
係數(EC)測定



蛋白質藥物動力學研究方法探討一

配位體鍵結分析與質譜方法應用

Ligand binding assay vs. Mass spectrometry

前言

在藥物的開發過程中，臨床前及臨床的藥物動力學(pharmacokinetics, PK)研究數據是必須且重要的參考依據，藉由此類試驗，可了解藥物於體內隨時間的動態變化，進而決定最理想的給藥方式，包括給藥途徑、劑量、頻率、次數及時間長短等。而藥物動力學(PK)主要由藥物、生物體、時間等三個元素所組成，其重點在於：藥物在生物體內連貫的吸收(Absorption)、分布(Distribution)、代謝(Metabolism)及排泄(Excretion)的過程(ADME processes)(圖1)。

配位體結合方法是蛋白質藥物動力學定量分析的主流方法，然而尋找適合的抗體以及方法最佳化經常耗時費工，且抗體的專一性以及內生性蛋白質等可能影響定量準確性的議題也不斷被討論。近年質譜儀已被廣泛使用於小分子藥物的定量，而在蛋白質藥物的定量上，質譜儀也被認為有很大的潛力。由於針對特定的胜肽做定量，能夠達到高度專一性，且可能有更佳的線性範圍，然而其前處理方法牽涉到標的蛋白的純化與水解(digestion)，方法中可能的變異使質譜在蛋白質藥物定量應用上仍有許多挑戰。以下介紹這兩種蛋白質藥物於生物檢體中之定量方法。

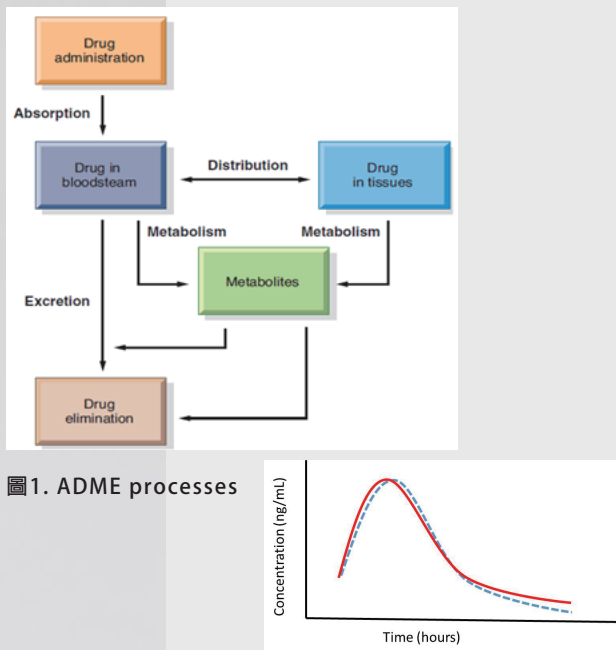


圖1. ADME processes

酵素結合免疫吸附分析 (ELISA) 方法

目前在蛋白藥物的藥物動力學(PK)研究中，大量被使用於偵測目標藥物的定量分析方法為S-ELISA(Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay)。圖2為方法示意圖。此方法是利用抗原(Antigen)與抗體(Antibody)間高親和力的結合，進行樣品中微量蛋白藥物的定量分析。其中有下列優點：方便、快速、一次可以處理大量樣品，並且具有高靈敏度、高特異性及高再現性等特色。

要建立此分析方法必須先找到一組合適的抗體對。即針對有興趣的蛋白藥物找到補捉抗體

(Capture Antibody)以及檢測抗體(Detection Antibody)。而這組抗體對能夠個別結合到蛋白藥物體上不同的表面抗原決定位(Epitope)形成穩定的免疫複合物。再透過含有酵素標記物質的抗體與檢測抗體做結合，一方面放大反應訊號，一方面抗體上的酵素標記物質與呈色基質間的交互作用，產生不同程度的呈色反應。藉由相關的偵測器去讀取反應的數值，以獲得蛋白質藥物在樣品內的含量資訊。

在篩選抗體對時，有一些重點是必須留意的，例如：捕捉抗體與檢測抗體是否皆可以與蛋白藥物形成穩定的複合物、是否與蛋白藥物有足夠的親和力、是否有針對不同的抗原決定位進行結合。並且能有較高的靈敏度及範圍較大的偵測區間等，這些都是篩選的要件。

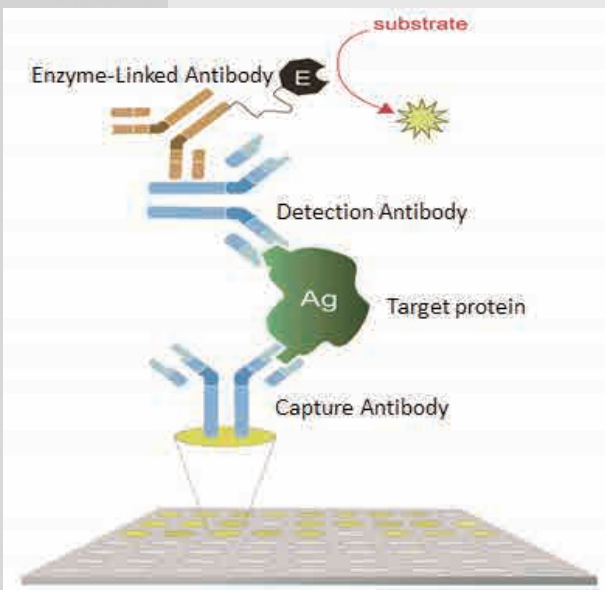


圖2. S-ELISA (Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay)

質譜儀應用於藥物動力學研究

在藥物動力學的研究中，質譜儀已經常被使用於生物檢體內的小分子藥物定量分析(Bio-analysis)，其最大的挑戰在於如何克服生物檢體(例如血漿或血清)中高濃度的各類分子所組成的基質(Matrix)對於分析物偵測所造成的干擾，因此，高選擇性(Selectivity)、高靈敏度(Sensitivity)的質譜分析方法成為關鍵。隨著多年儀器科技的發展，「液相層析—多重反應監測質譜分析法」(LC-MRM-MS)已成為質譜儀應用於生物檢體分析中的主流定量分析法。

何謂「多重反應監測質譜分析法」？

串聯式質譜分析法中常用的定量模式為「多重反應監測 (Multiple Reaction Monitoring, MRM)」，亦稱為「選擇性反應監測 (Selected Reaction Monitoring, SRM)」，其游離化後的分析物離子(亦稱前驅離子或母離子, Precursor Ion)在第一個質量分析器(Mass Analyzer)被篩選出來(圖3中Q1)，於碰撞室(Collision Cell)被擊碎後(圖3中Q2)，其選定之碎片離子(亦稱產物離子或子離子, Product Ion)在第二個質量分析器中被篩選與偵測(圖三中Q3)，也就是說，此模式乃偵測特定「前驅離子→產物離子」離子對(Transition)，相較於以往的質譜分析法，MRM具有高靈敏度與選擇性。

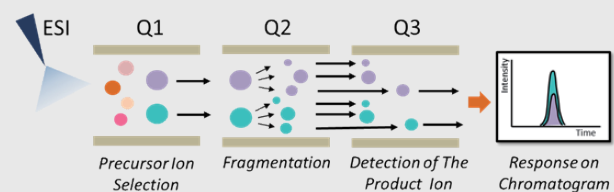


圖3. 串聯式質譜分析法中「多重反應監測」(MRM)分析原理示意圖

液相層析串聯式質譜分析法應用於蛋白質藥物的生物檢體分析

對於利用質譜儀定量的生物分析法，其分析策略常採用「同位素稀釋質譜分析法」(Isotope-dilution Mass Spectrometry)，也就是在樣品與校正標準品中，加入定量、帶有同位素標定、與分析物相同或近似的分子作為內部標準品(Internal Standard)，在MRM分析模式下，有質荷比差異的分析物與內部標準品離子對訊號在相同滯留時間分別被偵測到，並以「分析物/內部標準品」層析曲線下面積比值(Response)作為定量計算標準(圖4)。

相較於小分子藥物的生物分析，大分子蛋白質藥物需採取「由下而上」(Bottom-up)的研究策略，也就是必須經由蛋白酶消化水解後產生胜肽片段，再以具代表性的識別胜肽(Signature Peptide)的定量分析來代表蛋白質分子的定量分析，因此在蛋白質藥物生物分析方法學的開發上所需考量的因素也比較多，列舉如下：

一、挑選合適的識別胜肽於定量分析：

這部分可從胜肽的獨特性(是否為Proteotypic Peptide)、消化水解再現性、串聯式質譜分析被偵測機率與MS2圖譜品質等因素考量。以抗體藥物為例，由於藥物分子經由基因重組與表現後通常與血漿中的內生性(Endogenous)抗體有一定程度的基因同質性(Homogeneity)，例如人源化抗體(Humanized Antibody)，因此，識別胜肽可針對抗原決定部位(Complementary Determining Region)的序列挑選出可被胰蛋白酶消化水解、串聯質譜分析中具有良好產物離子訊號的胜肽做為識別胜肽。除此之外，此胜肽的選擇更需考量序列的穩定性與蛋白酶的切位，容易在實驗過程中產生氧化、或是不落在偵測範圍的胜肽亦不適合作為識別胜肽。

二、內部標準品的選擇：

一般而言，最理想的內部標準品是序列相同、帶有同位素標定的蛋白質分子(例如Protein Standard for Absolute Quantification, PSAQ)，於樣品未經任何處理時加入(圖4，Opt.1)，可完整彌補所有前處理步驟過程中可能產生的系統誤差。但由於成本考量，實際應用多以同位素標定之識別胜肽(例如Absolute Quantification, AQUA 胜肽，圖4，Opt.3)，或是於同位素標定識別胜肽之N端與C端延長數個殘基(Residue)的加長型識別胜肽(圖4，Opt.2)作為內部標準品。在蛋白酶消化水解前加入加長型識別胜肽內部標準品(例如Winged Peptide)，經水解後可產生同位素標定識別胜肽，相較於一般識別胜肽的內部標準品，可彌補消化水解效率所產生的誤差。

三、萃取或純化：

由於血液中蛋白質藥物分子濃度比其他內生性蛋白質或其他分子含量還低，為了避免基質的干擾與提升定量偵測極限，針對蛋白質藥物分子或其識別胜肽的萃取或純化(Enrichment)步驟是不可或缺的，通常使用的方法為免疫捕捉(Immunocapture)法，以抗體藥物為例，可使用高專一性的單株抗體或辨識抗體Fc區域的Protein A或Protein G等；或者先使用粗萃或分離等低專一性的方法，例如去除血漿中高含量蛋白質、SDS-PAGE等，再搭配高專一性免疫捕捉法(例如SISCAPA方法)純化識別胜肽。

四、蛋白酶消化水解：

為了定量分析方法的穩定度與數據再現性，消化水解的每一步驟，從蛋白質變性(Denaturation)、還原反應(Reduction)、烷化反應(Alkylation)、胰蛋白酶(Trypsin)的添加比例與反應條件，甚至緩衝液(Buffer)的pH值等因素都必須最佳化，以達到最好的水解效率。

五、液相層析與質譜儀偵測：

為了定量分析方法的穩定度與數據再現性，液相層析串聯式質譜分析系統當中的每個環節也必須考慮。就液相層析來說，就包括分析管柱 (Column) 種類的選擇、使用極低流速的 Nano-LC或超高效能的UHPLC系統、動相比例與梯度等因素；在質譜儀偵測的部分，包括游離化條件，以及在多重監測反應分析模式下，識別胜肽的離子對選擇、離子對的碰撞碎裂能量與電壓等條件也必須最佳化，以達到儀器偵測最佳靈敏度。

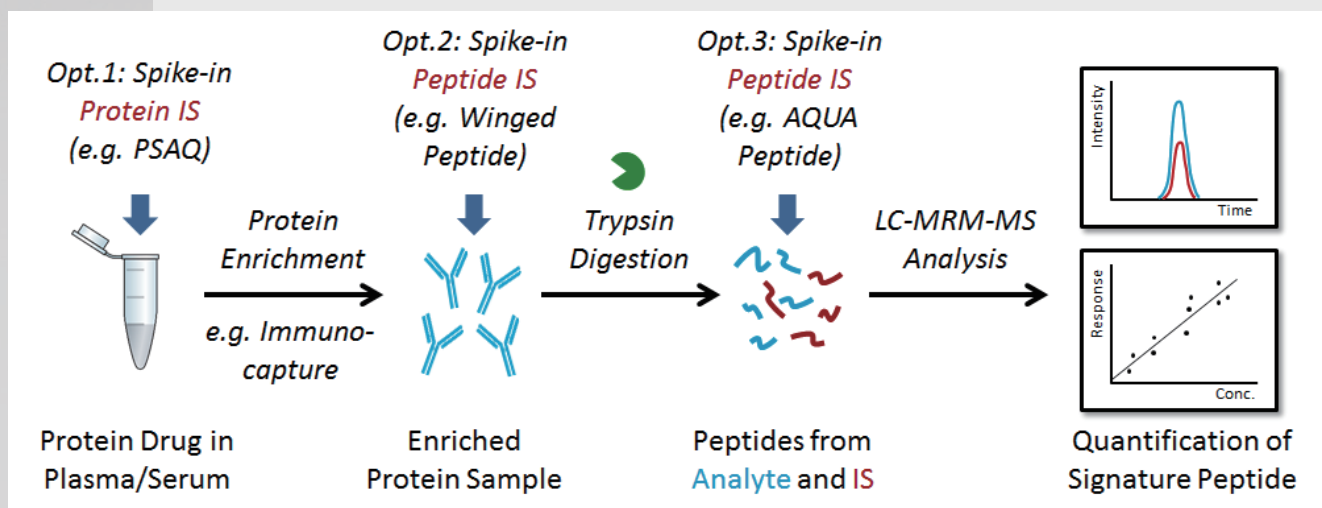


圖4. 質譜定量分析血液中蛋白藥物之實驗流程與三種內部標準品(IS)的選擇與加入時機點(Opt.1 to 3)

參考文獻：

1. Joy Bellis Sakai. CHAPTER 3 Pharmacokinetics: The Absorption, Distribution, and Excretion of Drugs. Practical Pharmacology for the Pharmacy Technician. (2008)
2. van den Broek, Irene, Wilfried MA Niessen, and William D. van Dongen. "Bioanalytical LC—MS/MS of protein-based biopharmaceuticals." Journal of Chromatography B 929 (2013): 161-179.
3. Dufield, Dawn, et al. "2014 White Paper on recent issues in bioanalysis: a full immersion in bioanalysis (Part 2-hybrid LBA/LCMS, ELN & regulatory agencies' input)." Bioanalysis 6.23 (2014): 3237-3249.
4. Stevenson, Lauren, et al. "2014 White Paper on recent issues in bioanalysis: a full immersion in bioanalysis (Part 3-LBA and immunogenicity)." Bioanalysis 6.24 (2014): 3355-3368.

焦點新聞-

2015蛋白質藥物分析暨技術服務研討會圓滿結束，感謝嘉賓們熱情參與！

2015蛋白質藥物分析研討會已圓滿落幕，此次研討會特別邀請中央研究院 蔡明道院士、台灣浩鼎生技 李威漢經理、藥華醫藥 何愈處長與有聯生技 詹維康總經理，與來賓分享蛋白質藥物開發心得與經驗；同時由明生生物科技 蔡沛倫副理為大家介紹生物藥品醣類修飾質譜分析的各項策略，感謝講者們的分享與精彩的演說。同時也要感謝各位嘉賓提供的各項建議與指教，我們會持續地努力與精進，提供更完整的蛋白質藥品分析解決方案。此次研討會計有150位嘉賓參與，集合了國內重要生技研發單位，與超過30家的生技公司及蛋白質藥廠的同仁共襄盛舉，會中交流與討論的氣氛熱絡，為國內蛋白質藥物發展共同努力，相信生技界的夥伴都相當期待看到由國內自行開發的蛋白質新藥獲得上市許可。



胺基酸分析(AAA)與蛋白質藥物消光係數(EC)測定服務

為因應胺基酸分析服務需求，同時提升效率與數據品質，實驗室特別添購高效液相層析儀，並搭配有automix的自動進樣器與紫外光及螢光偵測器，適用於胺基酸分析(amino acid analysis)之柱前衍生化標定方法(pre-column derivatization)，可連續進行多個樣品的分析，快速地完成樣品前處理與檢品偵測。在ICH-Q6b準則中，針對生物藥品結構特性分析(structural characterization)提到透過胺基酸分析決定蛋白質含量與蛋白質消光係數(EC, Extinction Coefficient)，為滿足藥品開發階段及藥品特性分析所需，實驗室已完整建構AAA與EC服務平台，可承接如細胞培養液的胺基酸含量分析、蛋白質藥品之消光係數分析與蛋白質含量測定。實驗室將持續增加檢測項目，以提供更完整的生物藥品分析服務平台。

