

# 蛋白質科學 暨 技術服務 電子報

## 技術佈告欄 Technical Bulletin

### 定量蛋白質體學分析方法簡介 Quantitative Proteomics

介紹蛋白質定量分析如何應用於生物標記  
(Biomarker)之尋找與驗證。

值日生  
PSS

## 焦點新聞 News

### 市場焦點-

Anti-TNF- $\alpha$  生物相似藥品新里程碑 - 美國、歐盟與台灣

### 參展資訊-

- BIOtech Japan 2016 (攤位編號：4-26)
- BioTaiwan 2016 第十四屆 台灣生技月-生物科技展(攤位編號：L118)
- 生物藥品分析高峰會2016-演講邀請與壁報展示  
7th Annual Biotherapeutics Analytical Summit (Mar. 14-18, 2016 in Bethesda, MD)

# 定量蛋白質體學於生物標記分析之方法簡介

## (Quantitative Proteomics for Biomarker Analysis)

### 前言

生物標記(Biomarker)-是一種可被量測與評估的生物特徵，並作為正常生理狀態，疾病過程或是對於療程中藥理反應的指標。廣義的生物標記可能是一種表現徵狀，如發燒是一種生理反應的生物標記；生物標記也可能是一種物質，如特定分子、基因、賀爾蒙或蛋白質等。在臨床化學分析技術尚未成熟前，找尋化學分子或蛋白質等生物標記是相當具挑戰性的。近年來，在蛋白質體學技術快速發展的協助下，利用定量蛋白質體學作為生物標記的找尋較以往迅速且便利，並且帶來了靈敏度佳、專一性高且大規模的分析方式，促使定量蛋白質體學為生物標記搜尋帶來更多不同狀態下的候選分子。而利用ELISA或標的定量質譜分析等方式進行確認，可加速生物標記的確認與應用，以下將介紹定量蛋白質體學如何應用於生物標記的搜尋與確認。

Biomarker 尋找過程可分為兩部分，一為以差異定量的方法，高通量 (High throughput) 篩選，並利用生物資訊學的手段縮小候選 (Biomarker candidate) 驗證的範圍；二為利用各種驗證手段對前期高通量篩選的結果進行驗證，找出最具有潛力的 Biomarker candidate。以質譜分析為基礎的定量蛋白質體學已逐漸成為一項重要且功能強大的工具，可用做系統化地解析不同樣品間的表現量差異。定量蛋白質體學完整地檢視接受不同刺激的細胞狀態下，不同的細胞族群內整體蛋白質之相對或絕對含量，解析蛋白質活性或修飾作用，了解蛋白質間交互作用關聯。蛋白質定量方法可分為兩種，無標的定量 (Non-targeted quantification) 與標的定量 (Targeted quantification)(圖1)；無標的定量屬於Biomarker discovery階段，從有代表性的差異樣品中盡可能的鑑定大量蛋白質的身分，並發現有意義的蛋白質，再進一步進行驗證；標的定量屬於Biomarker verification 階段，只關注有興趣的蛋白質，並藉由篩檢大量的檢體以確認目標

蛋白的含量變化具有顯著的統計意義。表1列出兩者的差別與應用。

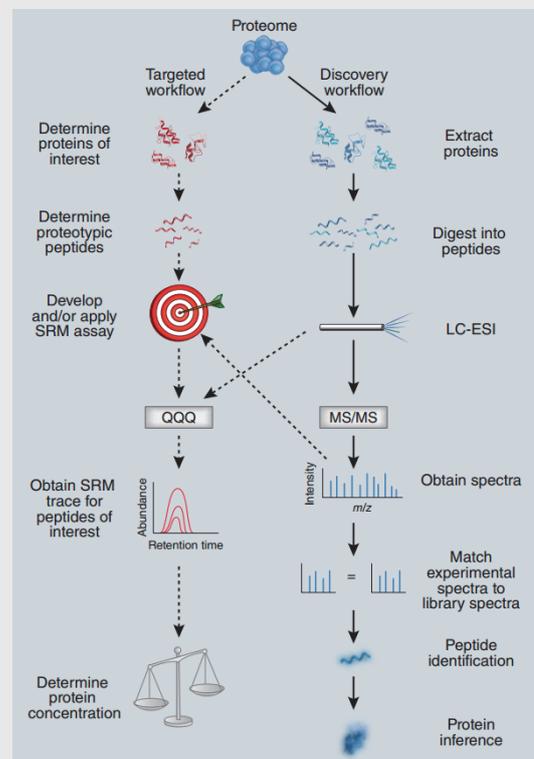


圖1. Non-targeted quantification及Targeted quantification示意圖<sup>[1]</sup>(Nature Methods, 2013, 10, 23)。

定量蛋白質體學中的無標的定量 (Non-targeted quantification)，通常須將有代表性之樣品(如健康組織和癌症組織)之蛋白質萃取出來，進一步水解為肽片後進入質譜分析，鑑定出蛋白質身分，而過程中導入定量技術即得到蛋白質相對含量的資訊，相關研究方法有膠體電泳法(Gel-based densitometry/fluorescence)、穩定同位素標記定量法 (Isotope-based strategies) 及非標記定量法 (Label-free)；定量蛋白質體學之標的定量 (Targeted quantification) 則是針對有興趣的標的蛋白質，進行驗證，因此會使用大量的檢體進行測試，其研究方法常用的有配位體鍵結分析法 (Ligand binding assay) 及多重反應監測質譜法 (MRM/PRM)。

#### A. 無標的定量(Non-targeted quantification)

1. 膠體電泳法(Gel-electrophoresis/DIGE)
2. 穩定同位素標記定量法(Isotope-based strategies)
3. 非標記定量法(Label-free approach)

#### B. 標的定量(Targeted quantification)

1. 配位體鍵結分析法(Ligand binding assay)
2. 多重反應監測質譜法(MRM/PRM)

### A. 無標的定量

#### Non-targeted quantification

##### 1. 膠體電泳法

##### Gel-electrophoresis/DIGE

膠體電泳是利用等電點 (Isoelectric point) 和分子量 (Molecular weight) 兩個特性來分離蛋白質，並利用顯色來判斷不同樣品之間的蛋白質含量差異，並進一步選取切下進行質譜分析，鑑定蛋白質身分，但不同次跑膠之間會有差異，可能影響蛋白質的含量分析。二維膠體螢光差異凝膠電泳 (DIGE-Difference gel electrophoresis)，基於電泳凝膠的技術可以定量複雜混合物的蛋白質含量，不同樣品鍵結不同螢光染劑(如Cy2、Cy3和Cy5)，

可以於同一膠片上進行蛋白質含量比對，減少膠片不同引起的差異。在DIGE二維電泳的高解析度與蛋白質樣品的螢光標籤標記具有高靈敏度 (~1 ng) 及卓越動態範圍 (Dynamic range約  $10^5$ )。二維膠體電泳技術可提供許多蛋白質在不同條件處理後所產生的蛋白質變化訊息。此外，目標蛋白質於膠上可以進一步被選取切下使用質譜鑑定蛋白質身分 (圖2)。然而受限於跑膠本身的限制，等電點與分子量若太大或太小的蛋白質難以被分析。

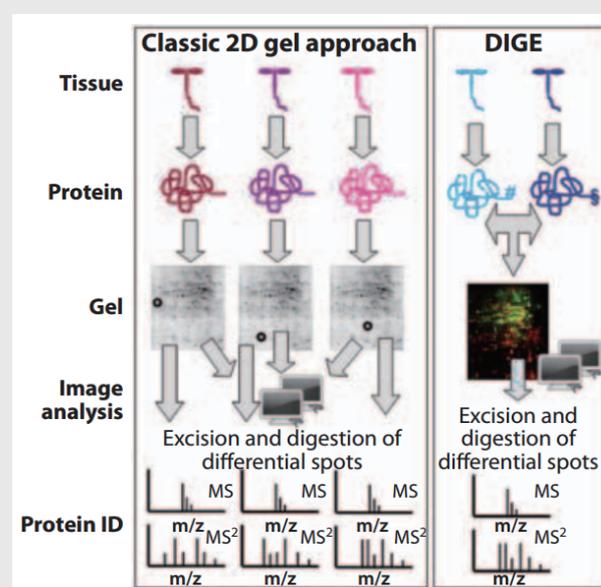


圖2. 膠體電泳搭配質譜技術定量方法<sup>[2]</sup> (Annual Review of Plant Biology, 2010, 61)。

##### 2. 穩定同位素標記定量法

##### Isotope-based strategies

質譜可以分辨分子量差異且鑑定蛋白質身分，當導入同位素時更可以同步進行定量分析。依同位素導入方式不同可分為，同位素代謝標記法 (Metabolic isotope incorporation)、穩定同位素化學標記法(Isotope labeling by chemical derivatization)、酵素催化同位素標記法 (Enzyme-catalyzed isotope incorporation)。依方法不同，標記同位素的樣品於不同的步驟混合；樣品越早混合，其預處理步驟所引入的系統誤差越小，定量的準確度越高(圖3)。各個方法有其特色與限制，其應用與優缺點列於表2。

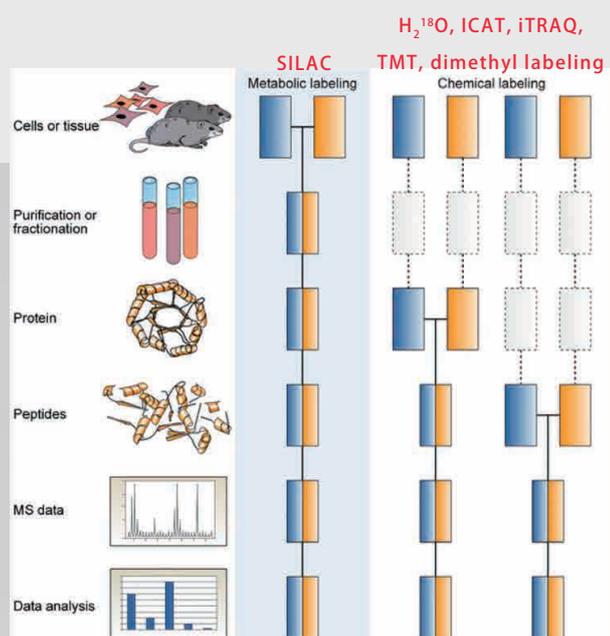


圖3. 不同樣品狀況下導入定量方法示意圖<sup>[3]</sup>(Nat Chem Biol, 2005, 1(5))<sup>[4]</sup> (Anal Bioanal Chem, 2007, 389(4))。

## 2-1. 同位素代謝標記法

### Metabolic isotope incorporation

此方法目前廣泛使用於 *in Vivo* 穩定同位素標記上，以 SILAC (Stable isotope labeling by amino acids in cell culture) 為例，將細胞的兩個群體利用含有同位素的培養基(如<sup>13</sup>C、<sup>15</sup>N、D)進行培養，當細胞生長經至少五代後，同位素標記的蛋白質通常能夠達到百分之九十以上，兩個細胞群蛋白質合併處理後，一起進行適當的蛋白質分離、酵素消化與後續的質譜分析，質譜訊號強度可反應出蛋白質含量的差異。

## 2-2. 酵素催化同位素標記法

### Enzyme-catalyzed isotope incorporation

此方法是通過加入 H<sub>2</sub><sup>18</sup>O，在蛋白水解酵素催化作用下將羧基上的2個<sup>16</sup>O替換成<sup>18</sup>O(圖4)，<sup>18</sup>O標記於胜肽片段的C端，使得標記與不標記之胜肽片段質量相差4Da，樣品混合後進入質譜分析，質譜訊號強度可反應出蛋白質含量的差異。

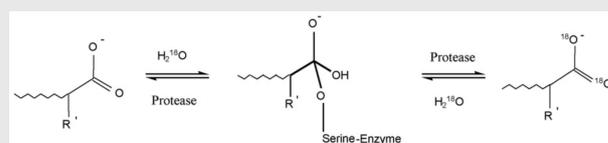


圖4. 酵素催化同位素標記法<sup>[5]</sup>(Journal of Chromatography B, 2007, 855)。

## 2-3. 穩定同位素化學標記法

### Isotope labeling by chemical derivitization

目前最廣泛使用的化學衍生標記試劑有以下幾種：同位素親和標記法 ICAT(Isotope-coded affinity tags)、同重同位素標記定量法 iTRAQ (Isobaric tags for relative and absolute quantification)、串聯質譜標記法 TMT (Tandem mass tag)、雙甲基標記定量法 (Dimethyl labeling)；其中ICAT與雙甲基標記法是以比較同位素標記的樣品在一次質譜圖 (MS) 的波峰強度/波峰面積得到蛋白質的相對定量；而iTRAQ與TMT則是透過比較樣品在二次質譜圖 (MS/MS) 的特徵性碎片離子的波峰強度得到蛋白質的相對定量。

### 2-3-1. 同位素親和標記法

#### ICAT (Isotope coded affinity tags)

ICAT試劑主要由三部分構成(圖5A)，親和標籤 (Biotin tag)，用於ICAT標記胜肽後的純化過程；連接子 (Linker)，用來連接穩定同位素 (Light and heavy)；硫醇基反應基團 (Thiol reactive group)，用來結合半胱氨酸。首先，將不同樣品分別加入不同穩定同位素標記的ICAT試劑，反應後樣品進行混合酵素水解，利用抗生物素蛋白管柱 (Avidin column) 可以選擇性將有標記的胜肽純化出來，進行LC-MS/MS分析，可以分析不同狀態的細胞內蛋白的含量變化(圖5B)。

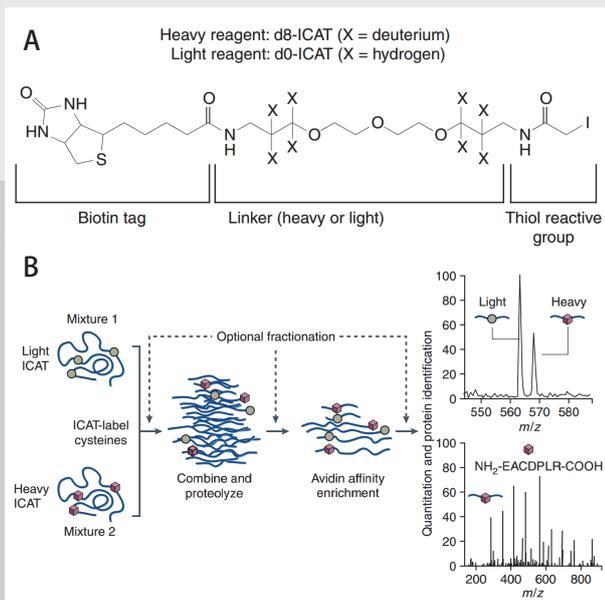


圖5. (A) ICAT試劑結構；(B) ICAT定量法<sup>[6]</sup> (Nat. Protoc., 2006, 1(1))。

### 2-3-2. 同重同位素標記定量法

#### iTRAQ (Isobaric tags for relative and absolute quantification)

iTRAQ技術使用4種(或8種)等重的同位素試劑來同時標記和比較4種(或8種)不同的蛋白質樣品。以4種不同的同重同位素試劑為例，這些試劑包括三部份(圖6)，報告基團 (Reporter group)、平衡基團 (Balance group) 和胜肽反應基團 (Reactive group)。不同的報告基團 (分子量分別為114 Da、115 Da、116 Da、117 Da) 分別與相應的平衡基團 (分子量分別為31 Da、30 Da、29 Da、28 Da) 相配，總分子量為145Da。胜肽反應基團將iTRAQ標籤與胜肽片段的N端和每個離氨酸 (Lysine)側鏈相連，可標記所有酵素水解胜肽片段，再將標記樣品相混合，以MS/MS進行分析。不同同位素標記的樣品在一次質譜圖上有著相同的質荷比，在二次圖譜中的reporter ions可看出量的差異，其優點為一次質譜圖的複雜度較低，且不會有同位素稀釋的效應。

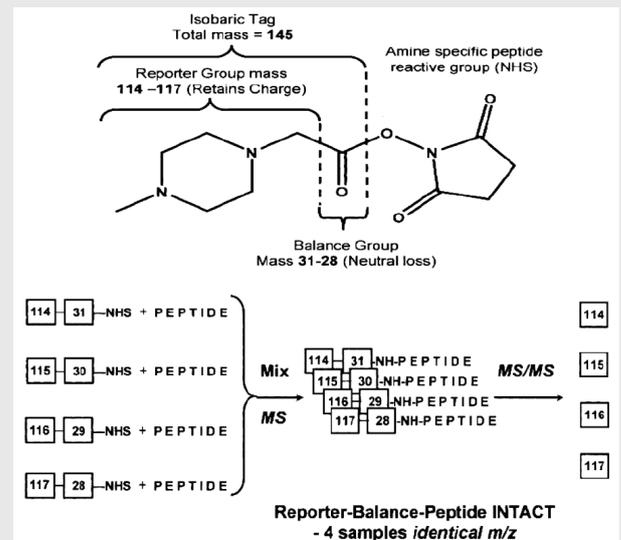


圖6. iTRAQ試劑結構與定量法<sup>[7]</sup> (Mol. Cell. Proteomics, 2004, 3(12))。

### 2-3-3. 串聯質譜標記法

#### TMT (Tandem mass tag)

TMT的概念與iTRAQ相似，其試劑亦由三部份構成(圖7)，報告基團(Mass reporter)、平衡基團 (Mass normalizer) 和反應基團 (NH<sub>2</sub> reactive group)構成，形成2種、6種或10種相對分子量均等量的異位標籤，可同時比較2組、6組或10組不同樣品中蛋白質的相對含量。TMT試劑通過反應基團能夠有效的標記酵素水解後胜肽片段。在一次質譜圖中，Mass normalizer使任何一種TMT試劑標記的不同樣品中的同一胜肽片段表現為相同的質荷比。在二次質譜圖中，每個Mass reporter都有各自獨特的分子量，並且能夠反應出所標記的胜肽片段的樣品含量，根據Mass reporter的訊號強度值可獲得樣品間相同胜肽片段的定量資訊，再經過軟體處理得到蛋白質的定量資訊。

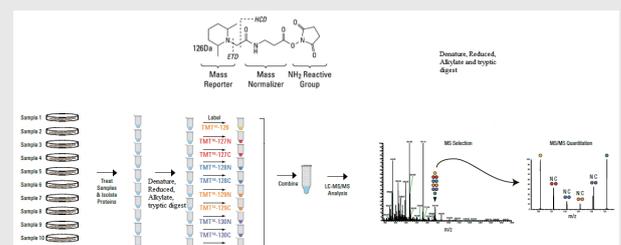


圖7. TMT結構與定量法<sup>[8]</sup> (<https://www.thermofisher.com>)。

### 2-3-4. 雙甲基標記定量法 Dimethyl labeling

甲醛可與胜肽N端的胺基及離胺酸殘基之  $\epsilon$  胺基反應形成Schiff base，再經氫硼氫化鈉 ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) 還原後可得反應性較高的二級胺，繼續與另一分子的甲醛反應形成二甲基胺(圖8)。氫原子標示對每個標示位點使其分子量增加 28 Da；氘原子對每個標示位點則使其分子量增加 32 Da。標記樣品混合後，用LC-MS/MS進行分析，其蛋白質定量資訊可藉由比較一次質譜圖取得。此反應試劑價格便宜，反應時間短，且無副反應，因此被廣泛應用於蛋白質相對定量分析。

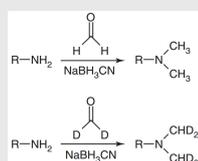


圖8. Dimethyl labeling 結構與反應<sup>[9]</sup> (Anal Chem, 2003, 75(24))。

### 3. 非標記定量法 Label-free approach

非標記定量法是通過質譜儀對蛋白質水解後之胜肽片段進行分析，直接以軟體分析比較不同樣品中相應之胜肽片段的離子強度(XIC-extracted ion chromatogram)，從而對胜肽片段對應的蛋白質進行相對定量。此方法通常須有穩定的液相層析系統以減少不同次分析間的差異性，當系統穩定時，就不如同位素方法般分析樣品數目受到限制。

### B. 標的定量 Targeted quantification

標的定量並非要發現新蛋白質，而是針對有興趣的蛋白質或胜肽，分析其在大批檢體中是否有預期的變化。常用的檢測技術有配位體鍵結分析法 (Western blotting、ELISA-enzyme-linked immunosorbent assay) 及多重反應監測質譜方法 (MRM-Multiple reaction monitoring、SRM- Selected reaction moni-

toring)，兩種分析方法曾詳細報導於「蛋白質藥物動力學研究方法」之電子報 (2015, Vol.1, No.3)<sup>[10]</sup><http://www.mithracro.com/image/files/PSS%20e-paper%20V1%20N3.pdf>。

以 ELISA (酵素免疫結合分析方法) 而言，此技術是利用抗體與標的蛋白的專一性結合，產生不同程度的呈色反應，藉由適合的偵測器去讀取反應的數值，以獲得標的蛋白質在樣品內的含量資訊，具有方便、快速、一次可處理大量的樣品及高靈敏度及特異性的優勢。

使用質譜技術定量蛋白質的含量，採用「液相層析—多重反應監測質譜分析法」(LC-MRM-MS)，MRM(亦稱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，於碰撞室(Collision cell) 被擊碎後，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，也就是說，此模式乃偵測特定「前驅離子→產物離子」離子對 (Transition)，具有高靈敏度與選擇性，其分析方法搭配「同位素稀釋質譜分析法」(Isotope-Dilution Mass Spectrometry)，也就是搭配穩定同位素標定的蛋白質 (如 PSAQ-Protein Standard for Absolute Quantification) 或是胜肽片段(如 AQUA-Absolute Quantification of Abundance) 作為內部標準品 (Internal Standard)，可對特定蛋白質分析物的濃度進行相對或絕對定量。AQUA是將待測樣品酵素水解後加入已知量的同位素標定之識別胜肽內標物，通過比較目標胜肽和添加內標物的信號強度，得到目標胜肽的含量，PSAQ是採用序列相同、帶有同位素標定的蛋白質分子，具有同位素標定的蛋白質分子可以直接加入細胞萃取液中，與樣品一同經過處理後，以MRM測得到目標蛋白質的絕對量 (圖9)。質譜技術可以大量分析檢體樣品中有興趣蛋白質並獲取其含量資訊，並具有靈敏、準確和具特異性等優點。

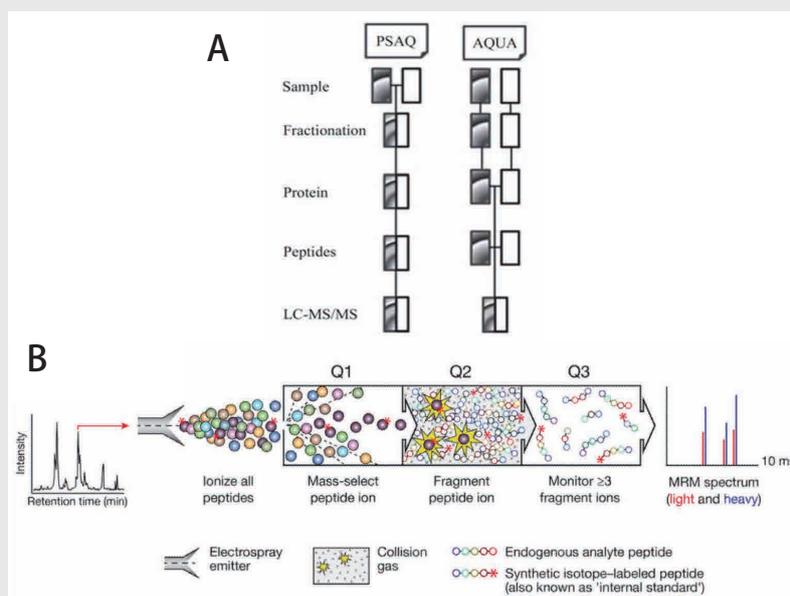


圖9. MRM與穩定同位素稀釋蛋白質絕對定量法分析示意圖<sup>[11]</sup>(Nat Methods., 2013, 10(1))<sup>[12]</sup>(Mass Spectrom Rev, 2013, 32(1))。

表1. 定量蛋白質體學

分類	目的	方法	應用
無標的定量	於代表性差異樣品中，鑑定及比對大量的蛋白質並發現有意義之蛋白質。	膠體電泳法、穩定同位素定量標記定量法(SILAC、 $H_2^{18}O$ 、ICAT、iTRAQ、TMT、Dimethyl Labeling)、非標記定量法(Label-free)。	Biomarker discovery and Drug target discovery
標的定量	分析大量樣品中特定蛋白質含量變化。	配位體鍵結分析法(Western Blotting、ELISA)、多重反應監測方法(MRM/PRM-AQUA、PSAQ)。	Biomarker verification、藥物動力學研究、不純物測定

表2. 無標的定量之蛋白質相對定量方法比較

方法	常用同位素	同位素標記方式	優點	缺點
二維凝膠電泳法	無	無	快速簡單，易觀測，成本較低。(DIGE靈敏度高)	靈敏度低，難以檢測疏水性膜蛋白質及低含量蛋白質，膠片之間會有再現性的問題，等電點與分子量範圍受限。
同位素代謝標記法	<sup>12</sup> C ( <sup>13</sup> C) <sup>14</sup> N ( <sup>15</sup> N) <sup>1</sup> H (D)	<i>In Vivo</i>	標記效率高，系統誤差低，沒有放射性。	僅適用於活體培養細胞，組織、血液、尿液等樣品不適合，成本較高。
同位素親和標記法	<sup>1</sup> H (D) <sup>12</sup> C ( <sup>13</sup> C)	<i>In Vitro</i>	適於多種類型的樣品，標記胜肽可純化，整體系統複雜度低。	僅適用於含有半胱氨酸的蛋白分析，不適合分析蛋白質修飾，資料檢索複雜，可能有同位素效應 (Isotopic effect)。
酵素催化同位素標記法	<sup>16</sup> O ( <sup>18</sup> O)	<i>In Vitro</i>	操作簡單，標記所有的胜肽片段(蛋白質C端除外)，副反應少。	受酵素水解過程和條件影響較大， <sup>18</sup> O原子摻入個數有不確定性，需除水及回收率差，可能有同位素效應 (Isotopic effect)。
同重同位素標記定量法(iTRAQ/TMT)	<sup>12</sup> C ( <sup>13</sup> C) <sup>14</sup> N ( <sup>15</sup> N) <sup>16</sup> O ( <sup>18</sup> O)	<i>In Vitro</i>	可同時標記四種/八種(iTRAQ)；六種/十種(TMT)不同樣品，蛋白質覆蓋率高，可信度高，不會增加MS複雜度。	樣品預處理和酵素水解過程可能引起平行樣品之間差別，造成結果偏差；成本較高，保存期限短，定量的數據來自單張MS/MS所得，可能有同位素效應 (Isotopic effect)。
雙甲基標記定量法	<sup>1</sup> H (D)	<i>In Vitro</i>	反應完全，速度快，成本較低。	酵素水解過程可能引起平行樣品之間有差別，造成結果偏差；可能有同位素效應 (Isotopic effect)。
非標記定量法親和標記法	無	無	簡單易行，不受樣品數量限制，無需同位素標記過程。	樣品的處理與分析並不是同時進行，定量準確性可能比標記定量法有較大誤差)；難以檢測低含量胜肽片段，需搭配穩定高效率的液相層析儀。

## 結論

定量蛋白質體學已成為找尋或確認蛋白質分子相關生物標記的重要方法，而上述各項無標的定量分析方式，各有其優缺點。如何針對樣品的來源種類與分析目的選擇適當的分析方法，設計適當的分析試驗，則是定量蛋白質體學分析成功的關鍵所在。選擇適當的生物標記候選分子後，必須輔以生物標記確認的分析方法；依目前蛋白質分子的生物標記如欲申請法規單位的核准，必須經過一連串分析試驗的確效與驗證等。然而，一旦找尋到可利用的生物標記，對於疾病診斷預防、藥物開發、藥品療效與個人化醫療評估等，都有相當大的幫助。明生蛋白質科技處提供多項客製化定量蛋白質體學分析服務，以及設計確認生物標記的實驗，歡迎與我們聯繫討論。

## 參考文獻：

1. Allison Doerr, Mass spectrometry-based targeted proteomics, *Nature Methods*, 2013, 10, 23
2. Waltraud X. Schulze and Bjorn Usadel, Quantitation in Mass-Spectrometry-Based, *Annual Review of Plant Biology*, 2010, 61:491-516
3. Ong S E, Mann M., Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative, *Nat Chem Biol*, 2005, 1(5): 252
4. Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, et al., Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review, *Anal Bioanal Chem*, 2007, 389(4): 1017
5. Catherine Fenselau, A review of quantitative methods for proteomic studies, *Journal of Chromatography B*, 2007, 855, 14–20
6. Shio Y, Aebersold R., Quantitative proteome analysis using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry, *Nat. Protoc.*, 2006, 1(1):139~145
7. Ross P L, Yulin N. Huang, Jason N. Marchese, Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents, *Mol. Cell. Proteomics*, 2004, 3(12):1154~1169
8. <https://www.thermofisher.com>
9. Hsu J L, Huang S Y, Chow N H, et al., Stable-isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics, *Anal Chem*, 2003, 75(24): 6843
10. 蛋白質藥物動力學研究方法, 明生生物科技電子報 2015, Vol.1, No.3, <http://www.mithracro.com/image/files/PSS%20e-paper%20V1%20N3.pdf>
11. Michael A Gillette, Steven A Carr, Quantitative analysis of peptide and proteins in biomedicine by targeted mass spectrometry, *Nat Methods.*, 2013, 10(1): 28–34
12. Rodr í guez-Su á rez E, Whetton A D., *Mass Spectrom Rev*, 2013, 32(1): 1

## 市場焦點-

# Anti-TNF- $\alpha$ 生物相似藥品新里程碑-美國、歐盟與台灣

FDA繼去年三月份核准第一個生物相似藥 (Zarxio)上市後，近日核准第二個生物相似藥 -Inflectra上市，這是FDA核准的第一個抗體生物相似藥物，為生物相似藥物開發進程再往前邁進一步。 Inflectra 的原廠參考藥品是 Janssen Biotech 公司生產的 Remicade (infliximab)，於2015年全球銷售額達65億美元，主要適應症為自體免疫疾病如類風濕性關節炎與乾癬症等。而生產製造 Inflectra的韓國公司Celltrion在2013年獲得EMA的第一個抗體生物相似藥物核准上市後，更在美國這個重要的生物藥品市場拔得頭籌，迄今已獲得71個國家的核准上市。無獨有偶的是，EMA 的 CHMP (Committee for Medicinal Products for Human Use) 亦在近日建議另一個由 Samsung Bioepis 生產製造，同為Remicade的生物相似藥-Flixabi核准上市，為歐洲地區的單株抗體生物相似藥再添一例。

另一項Anti-TNF- $\alpha$  的重量級銷售蛋白質藥物-Enbrel，則在今年一月份於歐洲市場核准上市第一個生物相似藥- Benepali。在整個歐洲的蛋白質藥物市場中，Anti-TNF- $\alpha$  有將近100億美金的銷售額，此項生物相似藥品的上市，將為自體免疫的慢性發炎治療，提供一項新的選擇，也為Fc-fusion protein的臨床應用寫下新的一頁。Benepali 是由 Samsung Bioepis所申請上市，這是一家由 Biogen 與 Samsung Biologics 所共同投資的公司，旗下還有多項生物相似藥品正在開發中。台灣的生物相似藥產業也有捷報傳出，由國內CMO大廠所開發製造的TuNEX，原廠參考藥品同為Enbrel，近期公佈第三期臨床試驗的一部份數據，結果顯示，主要的療效指標具統計上的意義，另一組臨床數據也將於今年6月公佈，相信很快在國內將會出現第一個由國人自行開發的生物相似藥核准上市。

## 參展資訊-

### BIOTECH Japan2016(攤位編號：4-26)

明生生物科技公司將於5月11-13日參加於日本東京國際展示場 (Tokyo Big Site) 舉辦之 Life Science World 生技展 (BIOTECH Japan 2016與PHARCON Japan 2016聯展)，歡迎各位生技產業的夥伴與先進蒞臨現場與我們相互交流。此次遠赴日本參與展出，期待能與國外的生技藥品開發廠商有更多的交流與互動，給予實驗室各項建議與指教。透過承接國外客戶的委託分析，將提升實驗室與國際市場接軌的重要契機，這也是我們持續努力追求高品質的核心價值。

### 第十四屆 台灣生技月-生物科技展，BioTaiwan 2016(攤位編號：L118)

BioTaiwan 2016生技展將於7月21-24日於南港展覽館舉行，期間明生生物科技將於生技中心(DCB)展場區內參與攤位展示，此次生技月之高峰論壇將有生物藥品與細胞免疫治療等議程，精彩可期，歡迎各位生技業的夥伴在參觀生技展的同時，蒞臨攤位現場與我們一同共襄盛舉。



# 2016生物藥品分析高峰會-演講邀請與壁報展示

## 7th Annual Biotherapeutics Analytical Summit (Mar. 14-18, 2016 in Bethesda, MD)

明生科技蛋白質科技處今年三月參加舉辦於美國貝塞斯達(Bethesda, MD)之生物藥品分析高峰會，並應邀在新穎生物藥分析技術的議程(Advances in Characterization Methods and Approaches)中演講，題目為Automatic Disulfide Bond Analysis for Structural Characterization of Biopharmaceuticals (自動化分析蛋白質藥物雙硫鍵)。內容涵蓋近年PSS團隊於分析化學期刊所發表之多篇雙硫鍵分析技術。此次會議聚集了學術單位、法規單位(FDA&USP)、檢驗單位與多家蛋白質藥物大廠，討論選擇標的藥物與發展性、新穎分析技術、以及如何呈現可比性與生物相似性等三大主題，並分享在發展生物藥品過程中的突破或瓶頸。質譜儀一如往常是分析方法的焦點之一，除了廣泛使用在蛋白質藥的修飾鑑定外，許多團隊嘗試將其用在

輔助結構分析 (higher order structure) 與變異分析 (variant analysis)，近年因為抗體藥物複合物(antibody drug conjugate, ADC)的發展，在不使蛋白質變性的條件下進行質譜檢測 (Native mass spectrometry) 也是熱門議題之一，然而受限於緩衝液的使用與儀器偵測範圍，非變性之質譜條件需要針對不同的蛋白質進行微調。在呈現生物相似性的議題中，多位演講者聚焦在原廠藥與生物相似藥的高級結構的比較，包括DSC, CD, FTIR, NMR等分析，以及準備CMC的策略與法規單位重視的議題等。針對抗體藥物複合物的分析，多位演講者提及ADC的可比性 (comparability)，必須從藥物研發的前端針對其前驅物就要開始密切監控，以因應多步驟的生產流程與製程方法或場地的改變，提高整體研發的成功率。

**Automatic Disulfide Bond Assignment for Structural Characterization of Biopharmaceuticals**

Sheng Yu Huang  
Mithra Biotechnology  
7F, No.104, Sec.1, Xintai 5th Rd., Xizhi Dist., New Taipei City

**Summary**  
This is a newly developed approach for structural characterization of biopharmaceuticals (BP) using LC-MS/MS and automated software, PABAR, to analyze the disulfide bonds in proteins. Disulfide bonding is an essential post-translational modification which controls the biological activity of proteins. During MS/MS fragmentation, disulfide bonds can be broken and the resulting peptides can be identified individually. With such information, the number of possible disulfide combinations is reduced to disulfide bond identification becomes easier. Furthermore, we developed a comprehensive algorithm to facilitate the identification of disulfide bonds in proteins using LC-MS/MS data. This approach is applicable to the analysis of disulfide bonds in proteins and peptides. The approach was validated by analyzing the disulfide bonds of two monoclonal antibodies, and small molecule and biotechnological proteins. The results of this study indicate that this approach is applicable to the analysis of disulfide bonds in high and medium molecular weight proteins and small molecule drugs. In addition, this approach can be used to analyze the disulfide bonds of protein pharmaceuticals and to help identify forms without protein separation. Using the integrated method allows the quality assessment and facilitates the structural development.

**Disulfide Bond Analysis of mAbs**  
The conventional method used to identify disulfide bonds in antibodies is by using SDS-PAGE and Western blotting. However, this method is not applicable to the analysis of disulfide bonds in antibodies. This is because the reduction of disulfide bonds is required for the separation of the heavy and light chains. This is not suitable for the analysis of disulfide bonds in antibodies. The integrated method allows the quality assessment and facilitates the structural development.

**Disulfide Bond Analysis of Protein Mixture**  
Disulfide bond analysis of protein mixtures is a challenging task due to the complexity of the samples. The integrated method allows the quality assessment and facilitates the structural development.

**Reference**  
1. Huang, S.Y., Chen, S.P., Chen, C.C., Huang, H.W., Wu, W.G., Song, W.C. Global disulfide bond mapping in antibody systems using chemical labeling coupled with mass spectrometry and 2D-DAR based antibody characterization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, 104, 1812-1819.  
2. Fan, Z.L., Chen, S.P. & Huang, S.Y. Mass spectrometry-based approach for protein disulfide bond identification. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012, 101, 177-186.  
3. Huang, S.Y., Hsieh, Y.T., Chen, C.C., Wang, W.C., Chen, S.P., & Chen, S.T. Automatic disulfide bond assignment using LC-MS/MS data. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012, 101, 899-906.  
4. Huang, S.Y., Wang, S.T., Li, P.T., Hsieh, C.C., Chen, C.C., & Lan, Y. Assignment of disulfide bond topology using LC-MS/MS data. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008, 97, 1215-1219.

