

## 技術佈告欄 Technical Bulletin

### 向Edman說Bye Bye!!

利用Top-down質譜技術分析蛋白質N端與C端序列，分析速度快，可同時分析帶有修飾的末端序列。

值日生  
PSS

## 焦點新聞 News

### FDA批准第一個生物相似性藥-Zarxio™

#### FDA Approves First Biosimilar - Zarxio™

美國食品藥物管理局近期通過第一個生物相似性藥的上市，是生物相似性藥發展的重要里程碑。

### 2015抗體藥物及新藥研發高峰會-成都

#### 5th Antibody Drugs & Novel Biological Summit 2015-Chengdu

明生生物科技首次於對岸研討會展示服務內容，推廣抗體藥物分析服務，獲得廣大迴響！



# 蛋白質末端定序的新趨勢 –

## 淺談質譜分析技術應用於蛋白質末端定序

### 前言

生物藥品是利用重組DNA技術製造，以蛋白質為活性成份的醫療藥物。在罕見與重症疾病治療上，有標靶性高、療效佳與副作用低等優點，近年來在全球藥品市場上迅速成長而佔有一席之地。由於生物藥品的結構比化學小分子藥物更為複雜，法規單位對於結構特性分析(structural characterization)都有嚴謹的要求，在ICH Q6B準則中，生物藥品結構特性分析必須要有蛋白質末端胺基酸序列確認<sup>[1]</sup>。傳統Edman定序法一直是蛋白質末端序列分析的主流，然而此方法也有諸多限制之處，隨著高解析質譜儀的問世與分析技術的進展，讓蛋白質末端定序有了新的選擇。

### Top-down質譜分析技術

質譜儀是偵測帶電分子的質荷比(m/z)而得到質譜數據(mass spectrum)，所以如何讓分子量巨大的蛋白質帶有電荷，使之游離化(ionization)便是一個關鍵。幸賴「基質輔助雷射脫附游離法」(MALDI)與「電噴灑游離法」(ESI)的發明，讓蛋白質可以被游離化，於質量分析器中被解析、偵測，得到蛋白質的質譜數據。另一方面，隨著高解析質譜儀不斷推陳出新，也讓分子量更高的糖基化蛋白質可以直接被分析，例如完整的抗體分子(約150 kDa，圖1)。

至於我們如何從蛋白質的質譜分析中，得到更多關於結構特性的資訊呢？我們可以使用串聯式質譜儀，讓游離化的蛋白質在質譜分析中藉由與其他惰性氣體分子的碰撞，使蛋白質的胜肽骨架(peptide backbone)解離(dissociation)後產生許多胜肽片段，再由質譜儀掃描這些片段而得到二次質譜數據，這些數據可以提供我們序列或殘基修飾等資訊。由於這樣的質譜分析方式，有別於傳統先將蛋白質以特定蛋白酶(例如trypsin)水解成胜肽片段，再以液相層析串聯式質譜儀搭配資料庫搜尋統整回原蛋白質序列的Bottom-up研究策略，因此我們稱之為Top-down，也就是從完整蛋白質(intact protein)開始，由上而下的蛋白質質譜分析技術。此方法除了快速，最大的優點就是保留了蛋白質最原始的狀態，避免了分析前處理過程中各種可能的干擾。

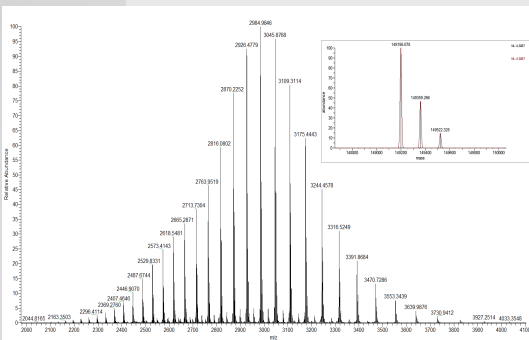


圖1: Avastin™ (bevacizumab) 完整藥物分子經質譜分析與deconvolution運算後，可得帶有不同糖基修飾的藥物分子(右上)。

## 以質譜分析蛋白質末端序列

1950年 Pehr Edman發表以化學反應的方法直接自肽N端定出胺基酸序列<sup>[2]</sup>，以之為名的Edman sequencing多年來一直是蛋白質末端定序法的主流，儘管此方法有其難以取代的部分優勢，但也有許多侷限之處，例如低效率產出(low throughput)、無法分析帶有末端修飾(N-terminal block，例如acetylation、pyroglutamate等)的蛋白質等。近年來，隨著質譜分析(mass spectrometry)的科技發展，憑藉其快速分析與可分析帶有修飾的胺基末端或殘基等優勢，已然成為蛋白質末端定序法的新趨勢。

以高解析質譜儀Q-Exactive進行蛋白質Top-down串聯質譜分析為例，我們將分子量約6.7kDa的蛇毒蛋白與Avastin™ (bevacizumab)單株抗體的light chain經ESI游離化後

進入Orbitrap質量分析器(mass analyzer)，得到帶有多種價數離子的質譜數據(圖2與圖3上)，此圖譜經過deconvolution可以得到精確分子量資訊，接著我們以「高能量碰撞解離」(Higher-energy Collisional Dissociation, HCD)的方式，使蛋白分子與氬氣分子碰撞後解離出靠近N端與C端的肽碎片，藉由Q-Exactiv質譜儀獨特的圖譜疊合科技(Spectral Multiplexing)得到肽碎片的圖譜，進而推測出N端與C端的胺基酸序列(圖2與圖3下)。當蛋白質的N端或殘基帶有修飾而無法以Edman sequencing分析時，Top-down仍可藉分子量差異進行序列與修飾的確認。

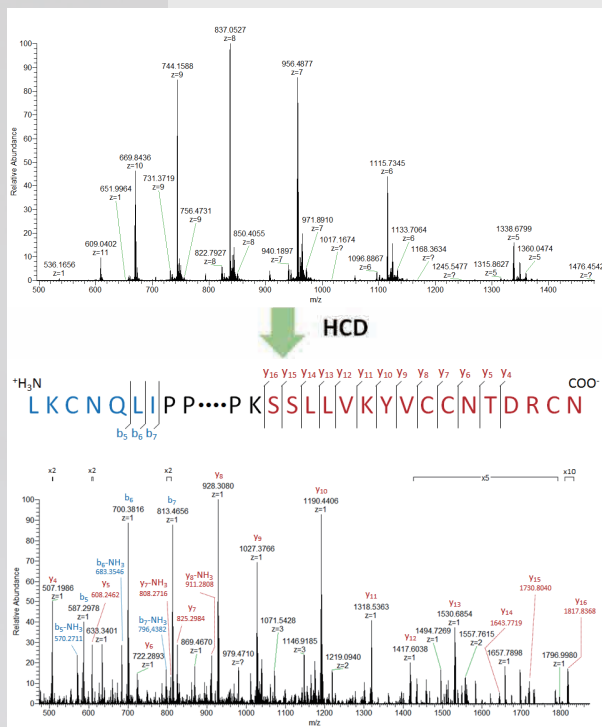


圖2: 蛇毒蛋白經高解析質譜儀Q-Exactive串聯質譜分析後產生的肽片段2次質譜圖，由質荷比(m/z)我們可以推測肽片段的胺基酸序列以及在蛋白質全序列中的位點。

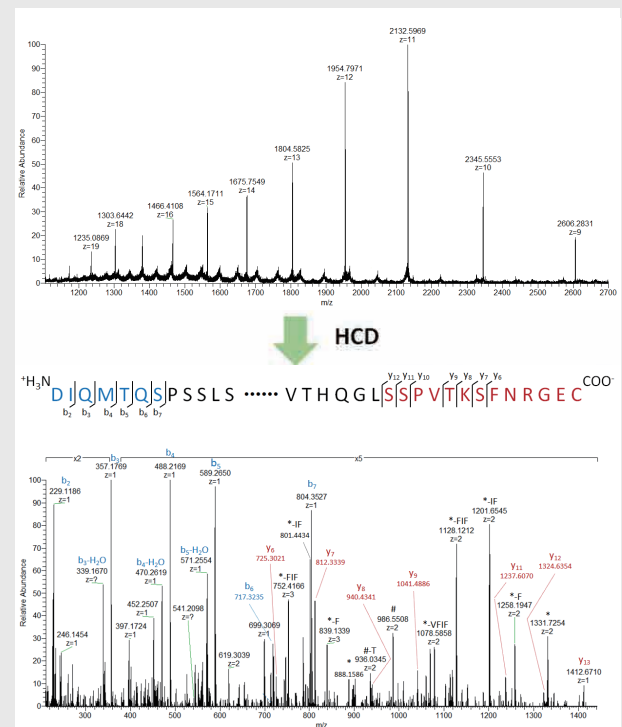


圖3: Avastin™ (bevacizumab)單株抗體藥物的light chain經高解析質譜儀Q-Exactive串聯質譜分析後產生的肽片段2次質譜圖，由質荷比(m/z)我們可以推測肽片段的胺基酸序列以及在蛋白質全序列中的位點。

表：Edman sequencing與Top-down串聯式質譜儀進行末端序列分析之比較

分析技術	Edman Sequencing	Top-down MS/MS Analysis
末端定序位置	N端定序	N端與C端皆可
樣品型態	純化蛋白質	純化或可藉LC分離之蛋白質混合物
優點	1.蛋白質N端初始定序 ( <i>de novo</i> sequencing) 2.可搭配SDS-PAGE(western blot) 3.可辨別Leucine與Isoleucine	1.分析速度較快 2.可分析C端序列 3.可分析帶有N端blocked或其它殘基修飾的蛋白質
缺點	1.低效率產出(low-throughput)分析數據，1個殘基的反應時間約40分鐘 2.無法分析帶有N端blocked蛋白質(例如acetylation、pyroglutamate等) 3.無法得知C端序列	無法辨別出同分子量的胺基酸Leucine與Isoleucine

參考文獻：

1. ICH Q6B (1999) Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products.
2. Edman, P.; Högfel dt, Erik; Sill é n, Lars Gunnar; Kinell, Per-Olof (1950). "Method for determination of the amino acid sequence in peptides". Acta Chem. Scand. 4: 283—293.



## 焦點新聞-

# FDA 批准第一個生物相似性藥(Zarxio™)上市



2015年3月6日，全球生物製藥業關注的重大訊息發布，FDA核准了第一個依據醫療改革法案(Patient Protection and Affordable Care Act)途徑申請上市的生物相似性藥，是由諾華旗下的Sandoz公司拔得此頭籌。Zarxio™是Amgen旗下Neupogen™(filgrastim)的生物相似性藥物，雖未獲得與原廠藥interchangeability的批准，且目前仍與Amgen公司有專利訴訟案，但在FDA已逐步進入審核單株抗體與其他生物相似性藥，顯見FDA當局對於生物相似性藥的趨勢持有樂觀的態度。生物相似性藥的上市可協助數百萬的美國人民選擇費用較為低廉，但安全性與有效性無顯著差異的生物藥品，是健保醫療系統中相當重要的里程碑。

歐盟在生物相似性藥的核可腳步較美國迅速許多，目前已核准近20個生物類似藥上市，2013年更是核准了第一個單株抗體(Remicade™)生物相似性藥上市(Inflextra™)，其中Celltrion公司旗下的單抗生物相似性藥(Remsima™)，也是第一個進入FDA審核程序的單抗生物相似性藥，FDA日前要求提供更多的相關資訊，顯見FDA對第一個單抗Biosimilar的審核相當謹慎，近期FDA若可順利核准通過Infliximab-Biosimilar的上市，無疑對生物相似性藥的發展將有著更大的影響力。

參考資料:

<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm436648.htm>

## 明生生物科技參與2015年成都抗體藥物及新藥研發高峰會，展出獲熱烈迴響！

明生生物科技於2015年3月15-16日參與在成都舉辦的第五屆抗體藥物及新藥研發高峰會，峰會上匯集了來自中國各地抗體藥物開發的產官學研單位；會議期間，明生蛋白質分析實驗室展示蛋白質藥物分析相關服務內容，推廣實驗室多項抗體藥物分析的新穎技術，並與多家蛋白質藥品公司深入洽談，為對岸的抗體藥物研發生產與品質管控，帶來全面性的解決方案。

依IMS Health公司統計，中國已是全球第三大藥品市場，2017年將成長為全球第二大。目前已有多達350種以上的生物相似性藥品(Biosimilar)在市場上銷售，年銷售額約佔中國市場的十分之一金額。2014年，中國CFDA核准了10項生物藥品與2項進口生物藥品上市，批准了110件生物藥品的臨床研究試驗，近日更發布了生物相似性藥研發與評價技術指導原則草案，各項數據顯示中國政府正積極的引導生物製藥公司製造更高品質的生物類似藥。明生蛋白質科學暨技術服務部為積極參與全球生物製藥的開發，扮演好委託分析服務的角色，繼2013與2014年參與在日本東京舉辦的BIOTECH Japan後，再次成功地在中國市場展出，我們將不斷地在藥物分析服務領域上持續精進，還請各位藥業先進一同為我們鼓勵，慶祝展會的圓滿落幕!

