

# 蛋白質科學 暨 技術服務 電子報

## 技術佈告欄 Technical Bulletin

### 單株抗體醣類分析完全攻略

介紹質譜分析技術於蛋白質醣類修飾鑑定之多種策略與應用。

值日生  
PSS

## 焦點新聞 News

狂賀!!明生技黃聖聿博士榮獲  
2015年TSMC優秀質譜技術從業人員獎!

### 參展資訊-

Bio Taiwan 2015生技展(攤位編號: M134)  
憑電子報封面至現場可兌換精美小禮乙份

### 研討會資訊-

PSS將於2015/9/10(四)舉辦分析技術研討會

### 法規資訊-

生物相似性藥: FDA發表更新指引  
TFDA公告修訂之查驗登記基準

# 醣蛋白質分析策略 –

## 單株抗體醣類分析簡介

### 前言

單株抗體 (monoclonal antibody, mAb) 是1975年由 Kcohler 和 Milstein 兩人利用 B淋巴細胞融合瘤 (hybridoma) 技術製得而成，使其可於體外開發並大量製造；在生物醫藥發展上，以抗體為治療方式的標靶藥物更是目前生技製藥產業的主流。因抗體藥物具有安全有效以及專一性高等優勢，近年來在全球藥品市場已成為高成長性的新型診斷試劑與治療性藥物。然而，抗體上所修飾醣類的多樣性，可能會影響治療功效 (therapeutic efficacy)、藥物動力學 (pharmacokinetics)、免疫引發性 (immunogenicity)、摺疊 (folding)、穩定性 (stability) 與配體結合 (ligand binding) 能力，進而影響此抗體藥物能否發揮正常功能。在 ICH Q6B 準則中，針對醣蛋白生物製劑之醣結構分析 (carbohydrate structure) 必須要廣泛且全面性的 [1]，因此，完整的醣類結構特性分析 (structural characterization) 對於產生安全、有效的抗體藥物是不可或缺的。

一個抗體分子 (以Rituximab為例) 含有兩條長鏈 (heavy chain) 及兩條短鏈分子 (light chain)，共有四個次體，次體之間以雙硫鍵連接起來，在兩條長鏈上分別帶有N-醣鏈 (N-linked glycans) 的修飾 (圖1)。這些N-醣鏈 (N-linked glycans) 的組成相當多元，造成抗體具有微異質性 (microheterogeneity) 之特性。抗體上常見的幾種醣鏈結構如(圖1下)所示，不同的種類與相對含量 (relative abundance) 皆會影響抗體藥物的功效，醣鏈內容與醣化位點的資訊對於生物藥品製造的品質管制相當重要，針對抗體醣鏈修飾之分析需求，可分成幾種不同的分析方式：

1. 分子量分析 (Intact or HC MW)
2. 醣胜肽組成分析 (Glycopeptide Composition)
3. 醣基化位點分析 (Glycosylation Site)
4. 醣鏈圖譜分析 (Glycan Profiling)
5. 醣結構分析 (Carbohydrate Structure)

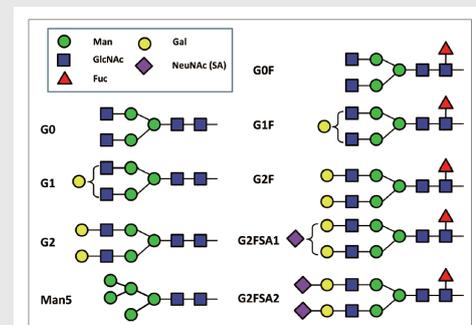
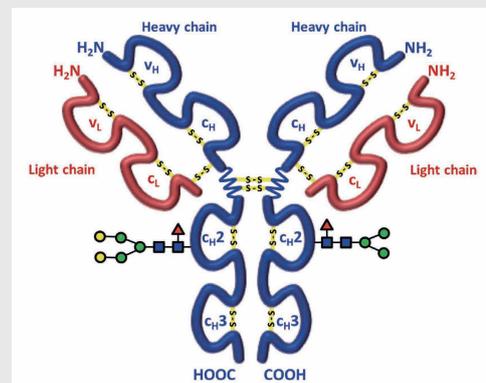
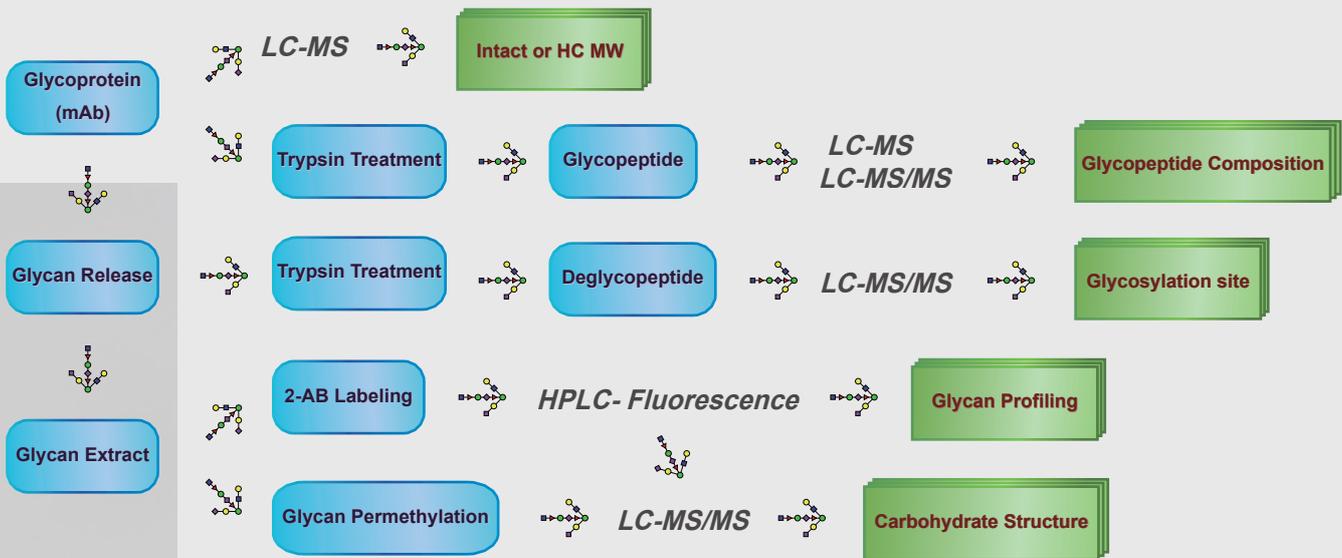


圖1. MabThera™ (Rituximab) 抗體分子結構概要圖與常見的N-醣鏈 (N-linked glycans) 結構示意圖 [2] Thermo Scientific Application Note 591 °



## 1. 分子量分析 Intact or HC MW

分子量的測定經常是分析重組蛋白（包括單株抗體等糖基化蛋白質）的第一步，對生物製劑的品質確認來說相當重要。透過高解析質譜儀，我們可以直接分析完整的抗體分子（約150 kDa）與長鏈（heavy chain，約50 kDa）的分子量（average mass）。LC-MS 分析所得到的原始圖譜經由 deconvolution 軟體運算後，可得到帶有不同糖基修飾的藥物分子（圖2）。

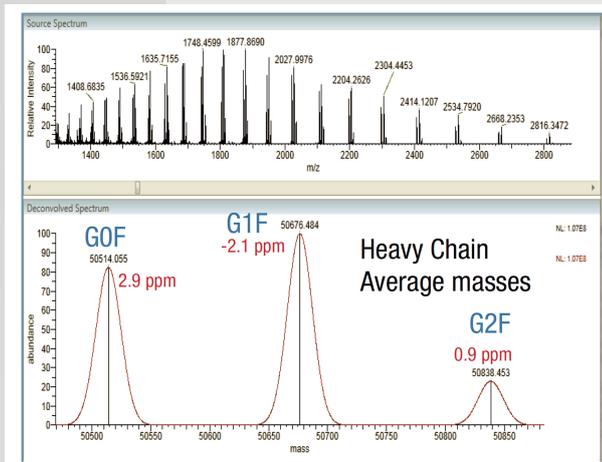


圖2. MabThera™ (Rituximab) 之 heavy chain 經質譜分析與 deconvolution 運算後，可得到帶有 G0F、G1F、G2F 修飾的藥物分子 [2] Thermo Scientific Application Note 591。

## 2. 醣胜肽組成分析 Glycopeptide Composition

質譜技術由於分析速度快、靈敏度高、樣品需求量少及具有分析複雜醣類混合物的能力，已逐漸成為醣類結構特性分析之主流分析工具。透過質譜分析我們可以獲得醣鏈序列組成 (glycan sequence)、分支模式 (branching patterns) 與醣鏈組成相對比例等資訊。圖3為 Avastin™ (bevacizumab) 經 Trypsin 作用後，其醣胜肽 (glycopeptide) 再經LC-MS分析所得之定量結果，而不同醣胜肽的結構資訊可由後續 MS/MS 圖譜分析所獲得，確認醣鏈序列結構。

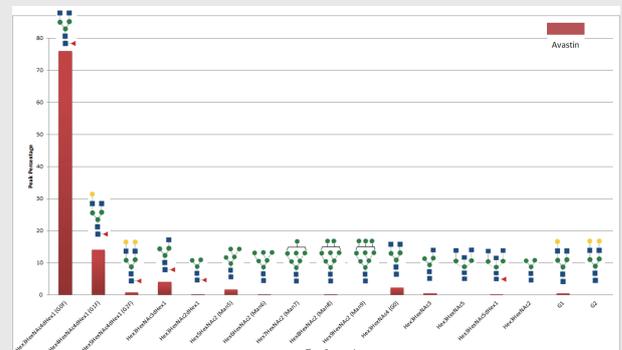


圖3. Avastin™ (bevacizumab) 完整藥物分子經 Trypsin 作用後，以質譜分析得到不同 glycopeptides 的組成比例。

### 3. 醣基化位點分析 Glycosylation site

近年來質譜已廣泛應用於醣類分子鑑定，藉由樣品前處理的協助，可快速地鑑定醣基化位點。前處理過程先利用酵素或化學方法，將 N-linked 或 O-linked 之醣基移除，再藉由液相層析串聯式質譜儀，鑑定醣基化位置。一般而言，抗體 N-linked 醣基化修飾的位點常發現在胺基酸序列 NXS/T 中 (X 為除了 Pro 外的任意胺基酸)。樣品經酵素 PNGaseF 作用後，Asn 上的醣基會被移除，使 Asn residue 發生 deamidation，增加 0.984Da。透過二次質譜圖上的斷片 (fragment ions) 資訊，可以得知正確的醣基修飾位。

### 4. 醣鏈圖譜分析 Glycan Profiling

醣鏈圖譜鑑定可用於表示抗體分子上 N-醣鏈 (N-linked glycans) 完整的醣鏈圖譜分佈。2-AB (2-aminobenzamide) 或 2-AA (anthranilic acid) 化學標定法經常應用於醣鏈圖譜分析。N-醣鏈 (N-linked glycans) 經由酵素 PNGase F 作用後，從抗體上分離之多醣分子以 2-AB 標定，再透過 HILIC (hydrophilic interaction liquid chromatography) 層析分離與螢光測定，即可得知各醣鏈分子之相對含量 (圖 4)。而不同醣鏈分子的結構資訊可由後續之質譜圖譜分析所獲得。

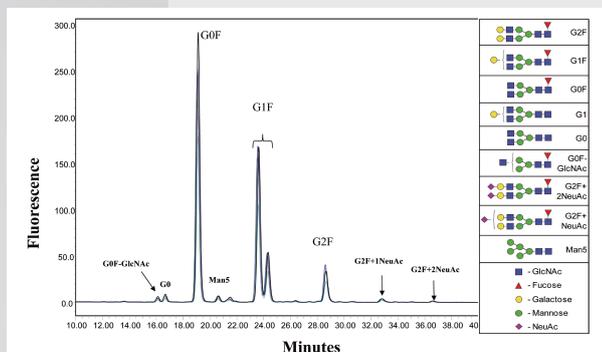


圖4. Rituxan™ (rituximab) 藥物分子經 PNGase F 作用後，所分離之 N-glycans 以 2-AB 標定，再透過 HILIC 層析分離與螢光測定所得之 N-glycan profile [3] Journal of Pharmaceutical Sciences. 2014, 103, 1967–1978 °

### 5. 醣結構分析 Carbohydrate Structure

通常在進行醣結構分析前必須先經由 PNGase F 作用切下醣鏈分子後再進行衍生化，衍生化的方法可分為兩類：其中一種是標記還原末端 (labeling reducing ends)，常使用 2-AB (2-aminobenzamide) 化學標定法，例如圖 5 即為 Avastin™ (bevacizumab) 經由 PNGase F 作用、2AB 標定與 HILIC 層析分離所收集之 2AB-G0F 經由 LC-MS/MS 分析所得之醣鏈結構圖譜；另一種衍生化的方法是保護官能基團 (protecting functional groups)，常以泛甲基化 (permethylation) 衍生方式進行分析，藉由將醣基上游離的 OH group 轉換成較疏水性且穩定的 O-methyl group，可以在質譜分析時不僅增強訊號強度，也更有利於醣結構的鑑定。

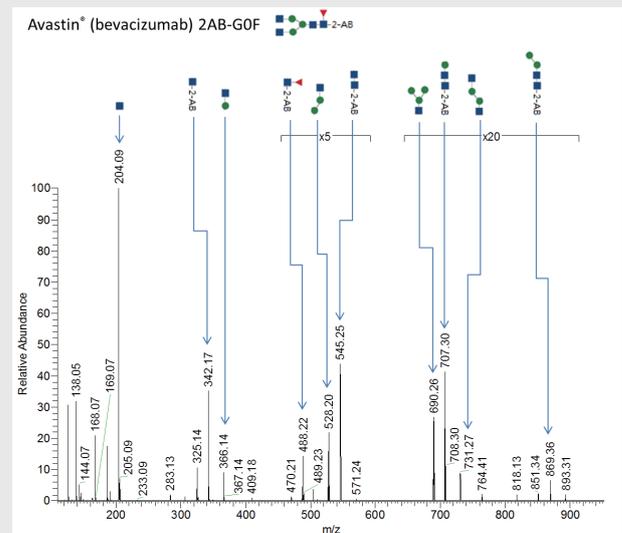


圖5. Avastin™ (bevacizumab) 藥物分子經由 PNGase F 作用、2AB 標定與 HILIC 層析分離所收集之 2AB-G0F 經由 LC-MS/MS 分析所得之醣鏈結構圖譜。

## 參考文獻：

1. ICH Q6B (1999) Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological /Biological Products.
2. Martin Samonig, Christian Huber and Kai Scheffler, Thermo Scientific Application Note 591:LC/MS Analysis of the Monoclonal Antibody Rituximab Using the Q Exactive Benchtop Orbitrap Mass Spectrometer.
3. Shang et al. Development and Application of a Robust N-Glycan Profiling Method for Heightened Characterization of Monoclonal Antibodies and Related Glycoproteins. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014, 103, 1967—1978.

## 焦點新聞-

# 狂賀!!! 明生蛋白質分析實驗室負責人 黃聖聿博士榮獲 2015年TSMS優秀質譜技術從業人員獎!

黃聖聿博士從事蛋白質體質譜分析方法開發多年，並提供學術單位及生技藥廠各式蛋白質分析服務。2012年撰寫經濟部中小企業創新研發計畫並擔任計畫主持人，順利完成為期兩年之「生物製劑於開發與產品化階段之質譜分析服務」計畫，在此期間主導建立了國內第一個、也是目前唯一的GLP蛋白質質譜分析實驗室，通過TFDA與多家藥廠查核。同期發展嶄新的自動化雙硫鍵分析技術，發表多篇論文於分析化學期刊，並應邀撰寫雙硫鍵分析方法之回顧論文。目前帶領明生生物科技蛋白質分析實驗室服務國內外客戶，提供蛋白質藥物送審所需之分析報告與技術諮詢，多次於國內外參展與演講，在質譜技術的開發及產業應用推廣上不遺餘力，獲得台灣質譜學會的肯定。



## 參展資訊-Bio Taiwan 2015生技展(攤位編號：M134)

明生生物科技公司將於7月23-26日參與Bio Taiwan 2015生技大展，歡迎各位嘉賓蒞臨現場與我們相互交流，給予我們各項建議與指教，追求各項臨床前分析試驗至臨床階段的藥品分析服務的高品質，是我們持續努力追求的核心價值。在這熱鬧的生技展中，生技公司與藥廠將有許多藥品發展的現況說明，明生蛋白質科學暨技術服務部，感謝一路上各家廠商的支持與鼓勵，這是我們不斷成長的動力來源，竭誠歡迎您的到來，與我們共襄盛舉，展覽期間內憑電子報郵件收取證明，可至現場兌換精美小禮乙份，歡迎各位業界先進廣為發送。



臨床前開發至臨床試驗階段  
專業藥品分析服務 Since 1988  
Full Analytical Support for Pharmaceutical Development

- 全方位生物藥品分析解決方案
- 蛋白質科學研究與製劑開發
- 臨床藥物動力學及DMPK服務
- 生物檢體定性及定量分析
- 藥品CMC服務

TEL: +886-2-0286-0262 Website: http://www.mithra.com.tw  
EMAIL: info@mithra.com Address: 22152新北市中和區新街154號5樓505室

Mithra 明生生物科技股份有限公司  
Mithra Biotechnology Inc.



ufi Approved Event  
2015 Bio Taiwan Exhibition  
台灣生技月 生物科技大展  
7.23(四)-26(日) 10:00-18:00 台北南港展覽館4F  
Invitation 邀請函

## 研討會資訊-2015蛋白質分析暨技術服務研討會

睽違許久，明生蛋白質分析實驗室將於2015年9月10日(四)假王朝大飯店舉辦蛋白質藥物分析研討會，近日內將會公佈報名方式。此次研討會邀請到國內各大生技公司與藥廠的要角，與大家分享蛋白質藥物在CMC階段中，品質分析需要採取的策略與可能遭遇的挑戰。生物藥品的化學製造與管控未若小分子藥物來的單純，其原料藥製造純化或是來源取得，皆需要完善的品管措施，以確保藥品批次製造的安全性與有效性。為了達到品質一致的穩定性，則需要分析方法學的介入，運用不同的分析技術來證明藥品的安全無虞，是品質分析最重要的議題。歡迎各位生物藥品開發的夥伴與先進，共同參與此次研討會，您的蒞臨將是我們最大的榮幸。



## FDA於2015年4月發表更新的生物相似藥指引，TFDA公告修訂之生物相似性藥品查驗登記基準

FDA繼2012年發表生物相似藥指引以來，今年又再次發表更新的指引文件，除修訂原有的指引外，亦新增相關額外的問答集，提供業界開發生物相似性藥品參考的依據。在建立生物相似性藥品之品質考量文件中，一再地強調廣泛的比對性分析研究，是證明生物相似性藥品與對照藥品高度相似性的必要方針。唯有在各方面的比對相似性研究中(包含比對性物理化學特性與功能性研究)提供全面且穩固的分析結果，並盡可能地分析比對參考藥品與申請藥品間的相似性，建立藥品的安全性，純度與有效性在臨床上無差異性，才有辦法讓法規單位考慮減免臨床研究數據所需。同樣地，在TFDA新修訂中的查驗登記準則中提到，雖然無法取得原廠對照藥生產的所有

必要資訊，仍應盡可能在比較性研究中，廣泛的比對與探討，透過高敏感分析系統的數據分析比較，降低非臨床與臨床所需的數據，並在整體性的分析數據同時考量下，決定申請藥品是否與對照藥品具生物相似性。

[http://www.fda.gov.tw/TC/newsContent.aspx?id=13721&ch-k=51be588f-275b-4cda-b798-e1a5ebeeaa59&param=pn%3d5%26cid%3d3%26cchk%3d46552e96-810a-42c3-83e1-bd5e42344633#.Vac\\_XZWJlU](http://www.fda.gov.tw/TC/newsContent.aspx?id=13721&ch-k=51be588f-275b-4cda-b798-e1a5ebeeaa59&param=pn%3d5%26cid%3d3%26cchk%3d46552e96-810a-42c3-83e1-bd5e42344633#.Vac_XZWJlU)

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM291128.pdf>

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM291134.pdf>