

生技產業與質譜應用的發展趨勢

以蛋白質藥物 (生物藥品) 為例

內容

- 簡介
- 何謂生物藥品(BioPharmaceuticals)
- 生物藥品特性及相關法規狀況
- 生物藥品(BioPharmaceuticals) 市場規模及未來性
- 委外研發服務公司(Contract Research Organization, CRO) 的定位與角色
- 我國生技/醫藥產業鏈現況
- 蛋白質生物藥品結構確認

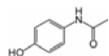
何謂生物藥品(BioPharmaceuticals)

- 由生物細胞製造, 非化學合成
 - Cell, E.coli, Yeast, etc
- 早期生物藥品多由生物樣品萃取製造
 - 血漿, 抗蛇毒血清, 減毒疫苗等等
- 現有大多數生物藥品係由基因工程/ 重組DNA技術所生產
 - Recombinant DNA Technology
- 大多數生物藥品為蛋白質或胜肽
 - 但部分含有核酸, 醣類或脂類

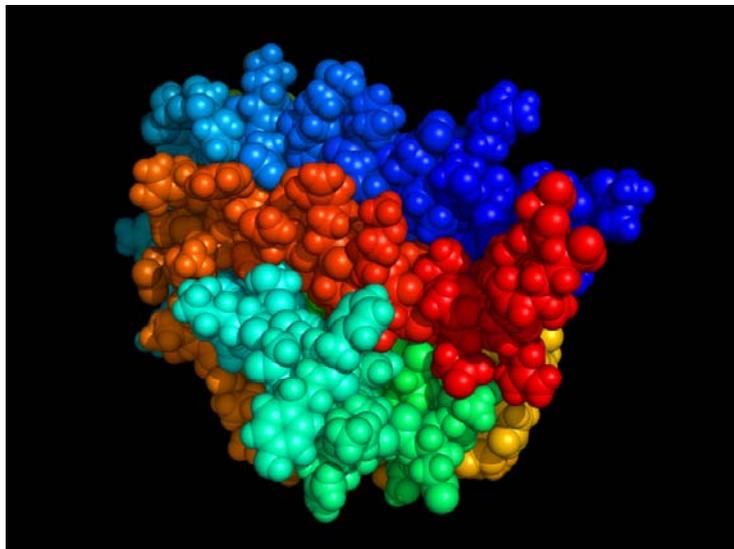
何謂生物藥品(BioPharmaceuticals)

- 生技藥品之主成分從簡單之胜肽(20-30氨基酸)、蛋白質、抗體、疫苗、血漿製劑、基因、細胞、至動物組織, 其構造、組成、及生物活性是漸趨複雜。主要產品類別包括:
 - 紅血球生成素 (Erythropoietins, EPO)
 - 干擾素 (Interferons, IFN)
 - 胰島素 (Insulins)
 - 單株抗體 (Monoclonal Antibodies)
 - 血液因子 (Blood Factors)
 - 細胞集落刺激因子 (Colony Stimulating Factor, CSF)
 - 生長賀爾蒙 (Growth Hormones, GH)
 - 介白素 (Interleukins)
 - 成長因子 (Growth Factors)
 - 治療用疫苗 (Therapeutic Vaccines)
 - 其他蛋白質藥品 (Other Therapeutic Proteins)

小分子藥物 Vs 生物藥物



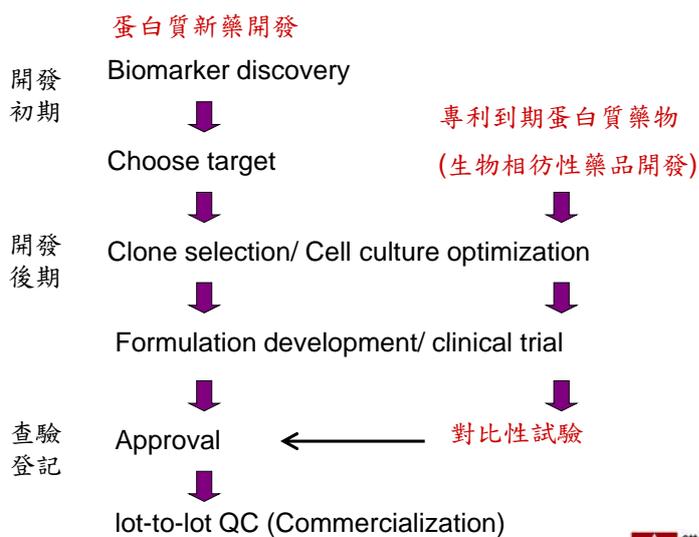
acetaminophen

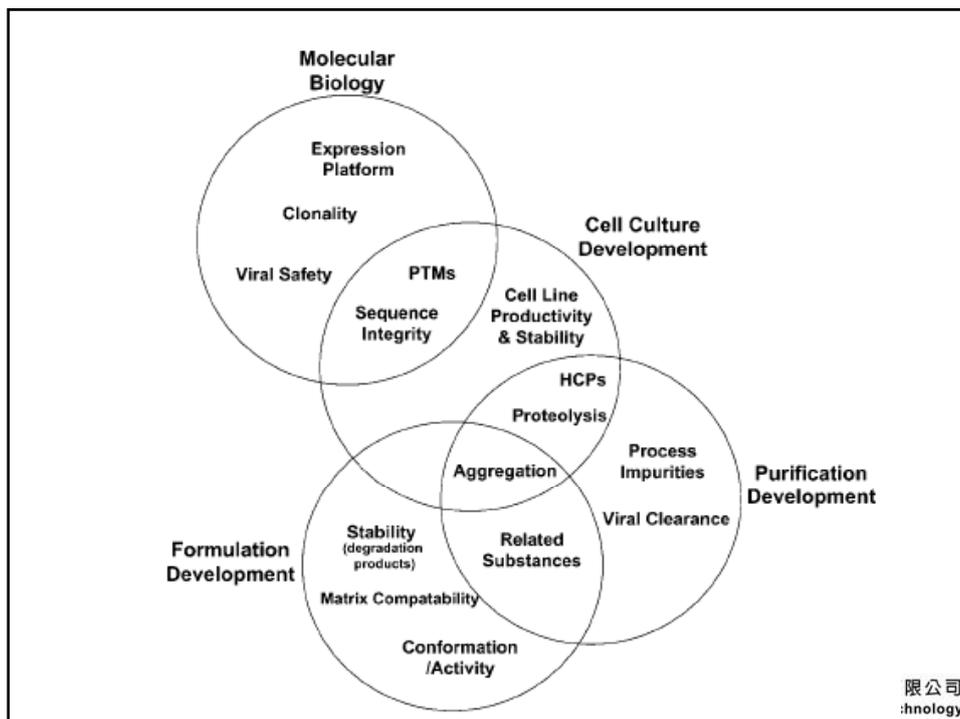


EPO



蛋白質生技產品商業化流程





小分子藥物 Vs 生物藥物

項目	小分子藥物 (化學合成藥物)	生物藥物 (蛋白質藥物)
製造	化學合成	生物細胞製造
分子量大小	數百 Dalton	數千至數十萬 Dalton
物理化學特性	單純/單一	複雜/多樣
分析確效	純度易測定	純度難測定
免疫反應	可能性低	可能性高
投藥方式	多樣性(口服/注射等等)	大多為注射
保存	大多為常溫	大多為低溫
生物性雜質	可能性低/無	可能性高

生技藥品市場規模及成長性

- 總體市場

- 在過去數年中，全球生技藥品快速成長，與全球醫葯市場相比，生技藥品的市場占有率也呈現逐年攀昇的趨勢，預估2011年生技藥品市場將達90 B USD
- 2006年之後雖然成長率趨緩，並非需求下降，而是因為全球的產能無法在短期快速擴充，由於生物製劑的生產時程及複雜度較高，加上更為嚴格的品管要求，生產效率往往比不上傳統化學藥品，在市場需求的大量成長之下，生物製劑的產量供給成為產業成長的重要關鍵，產能不足將影響市場的成長。另外，許多老牌的生技藥品開始面臨主要專利過期的壓力，價格調降與其他的競爭因素，都可能影響市場的成長速度

生技藥品市場規模及成長性

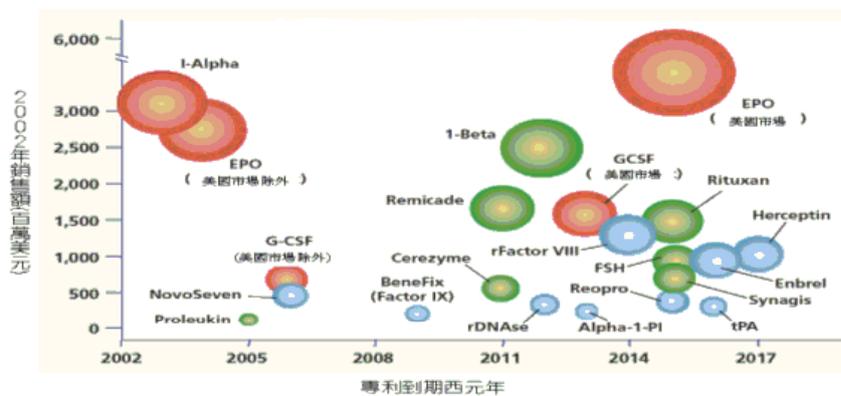
- 生技新葯研發市場

- 目前生技藥品市場僅約佔全球醫葯市場10%，但在新葯物研發領域中，生技藥品佔所有研發葯物的百分比卻明顯提高甚多，可預見生技藥品的未來成長性將遠高於小分子化學製葯。

生技藥品市場規模及成長性

- 生技學名藥 (生技相似性藥)
 - 而在所謂生技學名藥的市場，近幾年，將陸續有許多生技藥品專利到期，單以2007年一年為例，可能釋出的市場高達20 B USD，對生技學名藥來說商機無限，全球亦有許多生技公司及藥廠已陸續投入生技學名藥研發與製造。

全球生技藥品專利到期日及其市場價值



註：球的面積大小代表銷售額

資料來源：Nature Biotechnology, 2004;生技中心 ITIS 計畫整理

生技藥品特性及相關法規狀況

- 蛋白質生技藥品的生物活性及免疫性，深受結構及修飾的影響，因此要製造相同(sameness)的蛋白質藥品，所使用的生物來源及製程管控等因素，必須完全相同。
- 任何製程的改變(如宿主細胞更動，DNA質體修改，培養基配方更動，培養溫度或pH值不同等)，或是製程放大(如50g放大至kg等級)，均有可能導致蛋白質結構的改變，如序列改變，或是轉譯後修飾(PTM)的改變，如糖基化或磷酸化等，進而影響其活性。
- 歐盟及美國的法規皆強調，任何製造過程之改變，需要以個案來評估。而所需之數據，從製程確效、物理化學特性分析、安定性試驗，到非臨床及/或臨床試驗的需要與否，皆視此產品之複雜性而定。

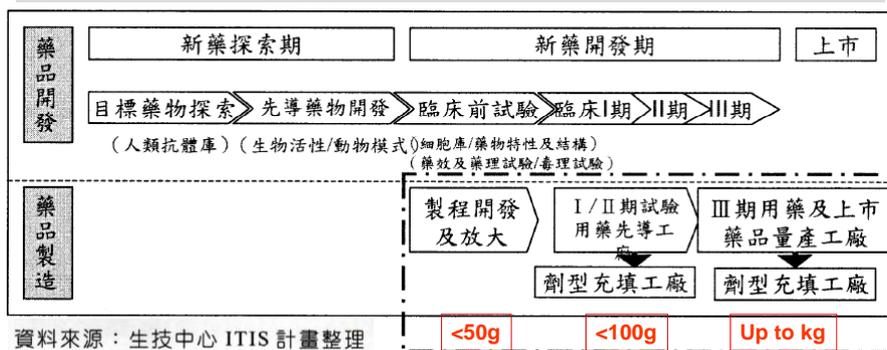
生技藥品特性及相關法規狀況

- 而一般的生技學名藥的生物來源及製造過程，不可能與原開發廠藥品的條件完全一樣，所以生技學名藥將很難做到跟『原廠生技藥品』相同。但是生技藥品的化性較不穩定，易受微生物污染，生物活性更與製造過程息息相關，體內藥物動力參數也不易測量，因此，不同來源之生技藥品無法以小分子化學學名藥的標準來決定是否相等(即BA/BE的概念)，因此「學名藥(Generic)」這名詞是否適用於非原開發廠的生技藥品，遂成為法規與科學之熱門話題。美國FDA特稱之為「生技仿製藥(follow-on biologics)」，歐盟則稱為「相似生技藥(similar biological product)」。
- 在生技學名藥的相似性，應以製造過程改變後，所影響之層面來做漸進式考量，均需提供足夠的蛋白質藥物結構比對證據。
- 2005年底歐盟已經確定了生技學明藥的審查程序，先帶動了EPO的市場，但全球最大的藥品市場:美國，以及亞洲最大的市場:日本，其生技學名藥的審查規則則尚未確定，我國也僅止於在2007年3月提出草案階段。

蛋白質生技藥品結構確認主要包括內容

- 分子量 (M.W.) 精確分析
- 全序列鑑定分析(100% sequence coverage)
- 蛋白質轉譯後修飾(PTM)鑑定
 - 磷酸化(Phosphorylation)
 - 雙硫鍵(di-sulfide bond)
 - 醣基化(Glycosylation)
 - 氧化(Oxidation)
 - 甲基化(Methylation)
 - 其他修飾
- 胺基酸單點置換; etc.)
- 蛋白質身分鑑定 (Protein ID)
- 副產物 (side product) ; 不純物 (impurity) 分析
- 主要技術為生技質譜儀分析

生技藥品產業之研發及生產需求



在蛋白質生技藥品研發過程中，從製程開發，到製程須隨研發流程而放大(從小於50g放大到kg等級，如上圖)，任何製程的改變，均需提供足夠的蛋白質藥物結構鑑定證據。

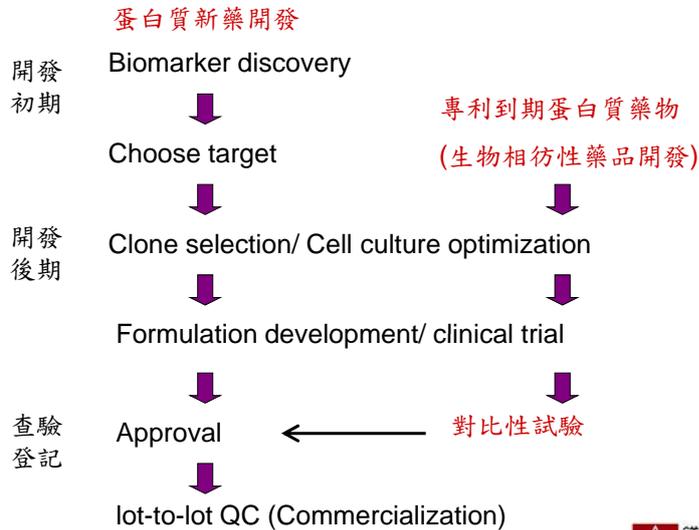
衛生署相關查驗登記審查準則

- 現有相關查驗登記基準
 - 血漿製劑
 - 生物性体外診斷試劑
 - 基因工程藥品
 - 過敏原生物藥品
 - 疫苗類藥品
 - 以基因轉殖動物生產之人用藥品的研發生產及測試要點
 - 生物相似性藥品(草案)
 - ...等等

以“基因工程藥品之查驗登記”為例

- 第三條之二之(二) 化學特性試驗、製程管制以及最終產品試驗，例如：
 - 1、胺基酸組成
 - 2、部份胺基酸序列分析
 - 3、胜肽圖譜
 - 4、分子量之測定
 - 5、選殖基因之滯留 (cloned-gene retention)：
 - 6、總蛋白質
 - 7、醣類之測定
 - 8、化學純度
 - 9、宿主細胞衍生性蛋白質、DNA 之分析
 - 10、免疫化學分析
 - 11、生物負荷量·內毒素之定量分析法
- 第三條之三、對於出現轉譯後修飾的蛋白質成分（如醣基化、硫酸化、磷酸化或甲醯化等），則需要更多的物理化學特性資料

蛋白質生技產品商業化流程



鎂陞科技股份有限公司
Mass Solutions Technology

開發階段—尋找標靶藥物

- 在不同組織/發育過程/疾病/毒物/藥物治療/等等比較下
 - 何種蛋白質表現有明顯變化 (Identification)
 - 轉譯修飾作用的確認 (Characterization)
 - 表現量的差異 (Expression/Quantitation)

鎂陞科技股份有限公司
Mass Solutions Technology

開發階段後期與產品化階段— 純化/蛋白質結構鑑定

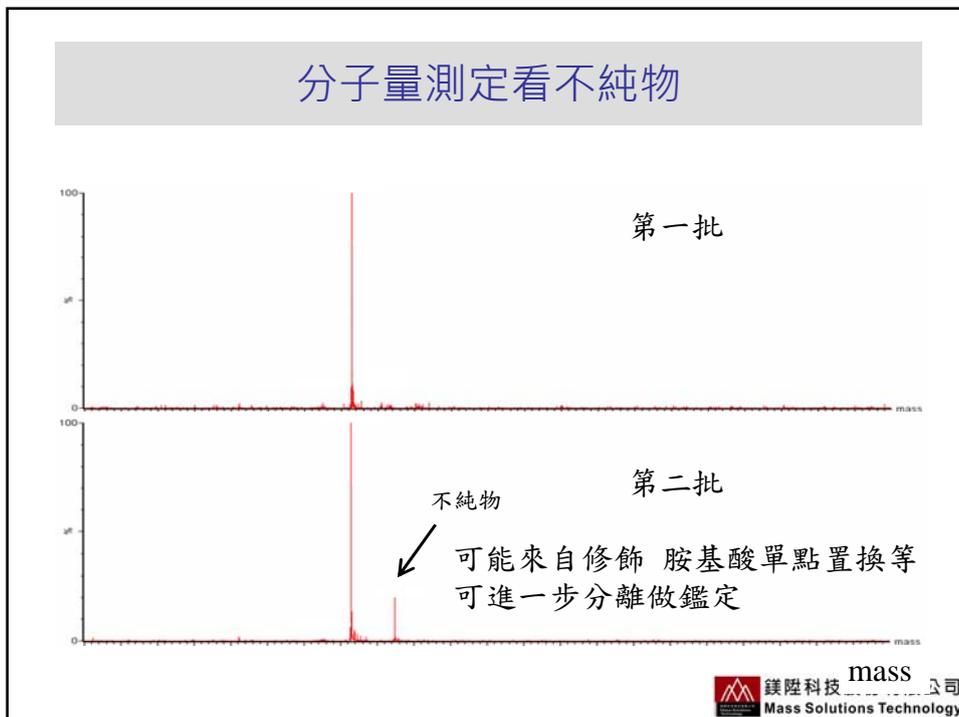
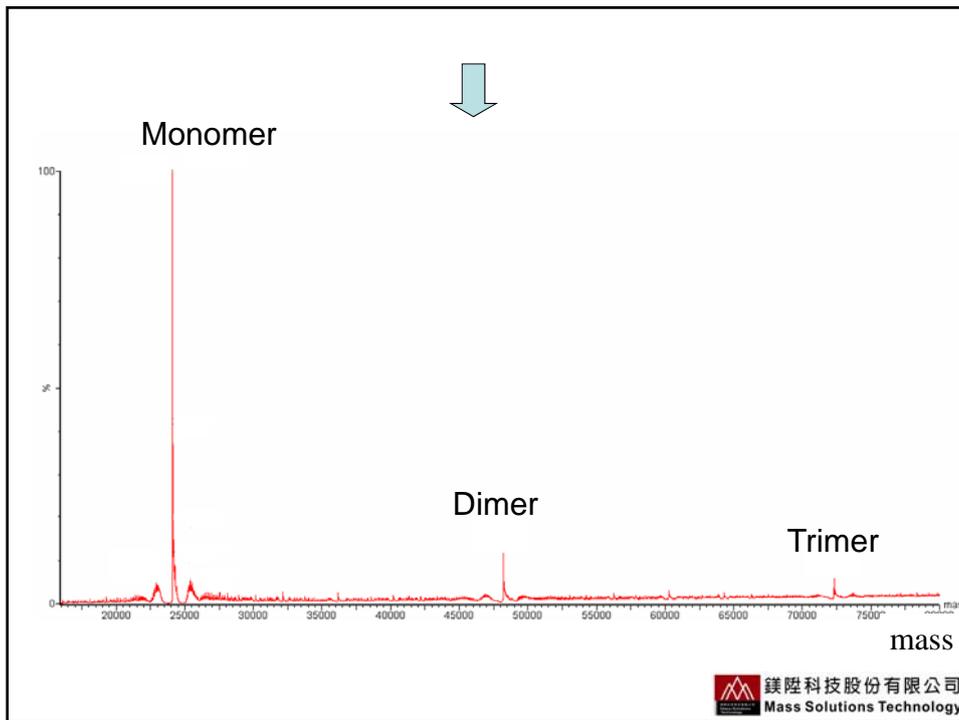
- 蛋白質分子量鑑定
- 蛋白質身分鑑定
- 蛋白質/胜肽全序列鑑定分析(100% sequence coverage)
- 胺基酸單點置換分析
- 副產物、不純物分析
- 蛋白質轉譯後修飾分析
 - 磷酸化(Phosphorylation)
 - 雙硫鍵(di-sulfide bond)
 - 糖基化(Glycosylation)
 - 氧化(Oxidation)
 - 甲基化(Methylation)
 - 其他修飾

- ➡
1. Clone selection, cell culture optimization
 2. Comparability test (與市售藥的相似性比較分析)
 3. QC (lot to lot)

蛋白質分子量分析

初步分析蛋白身分與蛋白純度

應用：快速檢驗重組蛋白純度或方法純化效果



全序列鑑定(100%覆蓋率)

就蛋白質鑑定而言，~5-20% 覆蓋率已經足夠知道蛋白質身分，但就產品化而言，**覆蓋率須達100%**

Sequence Coverage: 17%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```
1 MSRQFSSRSY YRSGGGFSSG SAGIINYQRR TTSSSTRRSY GGGGRFSSCG
51 GGGGSGFAGG GFGSRSLVNL GGSKISISV ARGGGRSGF GGGYGGGGFG
101 GGGFGGGGFG GGGIGGGGFG GFGSGGGGFG GGGFGGGGYG GYGVPVCPFG
151 GIQEVNTINQ LLOPLNVEID PEIQKVSRE REQIKSLMNQ FASFIDKVRV
201 LEQQNQVLQT KWELLQQVDT STRTHNLEPY FESFINNLR RVDQLKSDQS
251 RLDSELKRMQ DMVEDYRNKY EDEINKRTNA ENEFVTIKKD VDGAYMTKYD
301 LQAKLDNLQQ EIDFLTALYQ AELSQMOTQI SETNVILSMD NNRSLDLDSI
351 IAEVKAQNEI IAQKSKAEAE SLYQSKYEEL QITAGRHGDS VRNSKIEISE
401 LNRVIQRLRS EIDNVKQIS NLQQSISDAE QRGENALKDA KNKLNLEDA
451 LQAKEDLAR LLRDYQELMN TKLALDLEIA TYRTLEGEI SRMSGECAPN
501 VSVSVSTSHI TISGGGSRGG GGGGYSGGS SYSGGGGSY SGGGGGGGG
551 SYSGGGSSY SGGGSYSGG GGGHGSYGS GSSSGYRGG SGGGGGGSSG
601 GRSGGGSSG GSIGGRGSS GVKSSGGSS SVRFVSTTYS GVTR
```

影響蛋白質覆蓋率的因素

- 蛋白質總量
 - 酵素消化：選擇性與難易度
 - 質譜儀偵測範圍
 - 蛋白質分子量極大或形成四級結構
- ➔
- 蛋白質總量對重組蛋白通常不是問題
 - 分別使用數種不同酵素或混搭合適之酵素
 - 調整適當的m/z與質譜參數
 - 使用適當的條件使蛋白展開

成功案例

MSMS based

Not just peptide mapping

(100% coverage)

DELRTVERFV CVKMNGDEDD SASSERTYPY IKIVDDESAE

TERRENCEAN DPHILIPARE TERRIFICHA HADRFTSDEE

CASEERTLLY CINDYISPRE TTYMNGDEDT TSWSDRLVIV

GGHGFRKIP STELRTAARK LKVRDDESEE VVGNMREAVI

LREPEEDVNA WERTRKLIKA

*本序列僅為示意圖，非真實案例



胺基酸單點置換分析

重組蛋白有時會碰到的問題

利用質譜參數適當設定搭配進階資料庫搜尋，可以找出胺基酸單點置換

656.1927	1310.3709	1310.6619	-0.2910	0	(48)	1	L.TVLHQDWLNGK.E + [+0.9840 at N9]
656.2845	1310.5544	1310.6619	-0.1075	0	(53)	1	L.TVLHQDWLNGK.E + [+0.9840 at N9]
656.2968	1310.5790	1310.6619	-0.0829	0	(51)	1	L.TVLHQDWLNGK.E + [+0.9840 at N9]
656.3055	1310.5965	1310.6619	-0.0654	0	(65)	1	L.TVLHQDWLNGK.E + [+0.9840 at N9]
656.3305	1310.6465	1310.6619	0.0154	0	72	1	L.TVLHQDWLNGK.E + [+0.9840 at N9]
656.3402	1310.6658	1310.6619	0.0039	0	(53)	1	L.TVLHQDWLNGK.E + [+0.9840 at N9]
655.7919	1964.3539	1965.1046	-0.7507	0	55	1	Y.RVVSVLTVLHQDWLNGK.E + [+0.9840 at N9]
655.9784	1964.9135	1964.0844	0.8292	0	(49)	1	Y.RVVSVLTVLHQDWLNGK.E + [+0.9840 at N9]

Possible Assignments:
Deamidated (NQ) [+0.9840]
Asn->asp (N) [+0.9840]

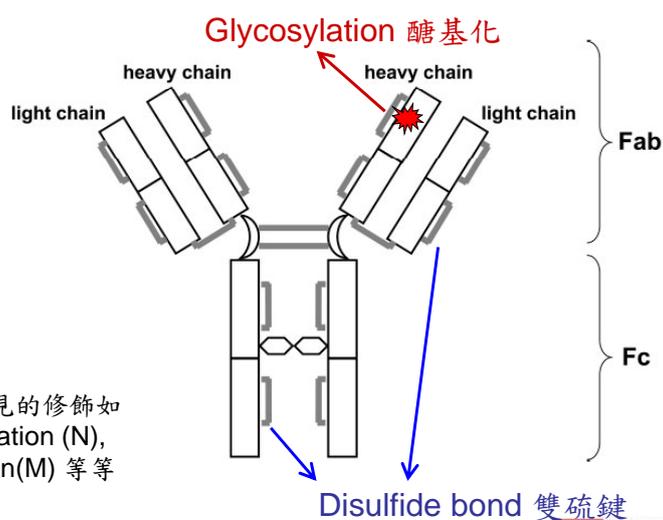


蛋白質轉譯後修飾分析

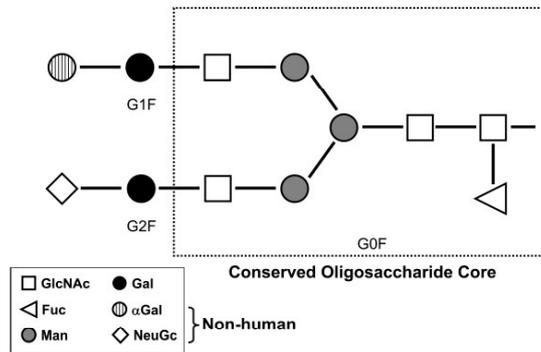
磷酸化(phosphorylation)
醣基化(glycosylation)
雙硫鍵(disulfide bond)
氧化 (Met oxidation)
Deamidation of Asn

應用：尋找生物標記、重組/純化蛋白質產品QC

A Case study-- A monoclonal antibody



Glycosylation of mAb



Murine myeloma cell lines 可以產生非人類的glycoform 造成免疫反應，**必須選擇適當的clone以及細胞培養條件使此修飾降至最低**

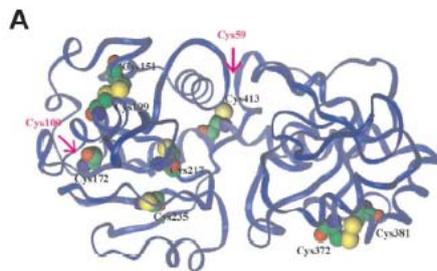
2005 Hunag et al. 利用**LCMSMS**成功地對抗體上非人類之醣基修飾做分析

2002 Cruz et al. 利用**MALDI-TOF**對0-62代BHK21A cell做glycoform分析



Disulfide bonds

雙硫鍵的形成穩定了蛋白質的三級結構
 形成不完全，會導致抗體無法與抗原結合
 形成錯誤雙硫鍵，會造成酵素活性改變



2003 Yen et al.利用**LCMSMS** 證明

Cys217受環境影響形成分子間雙硫鍵，降低此蛋白質之活性

將Cys217→ Ser後，活性變的穩定，對環境較不敏感。顯示此Cys217並非蛋白有活性之必要條件，但因環境因素使之形成錯誤的雙硫鍵卻降低蛋白活性

Transferase 9 Cysteines,

八個cysteines 形成雙硫鍵，一個free thiol



Deamidation of Asn

1992, Kroon et al., 2001 Harris et al., 2005 Wang et al.
皆以 **LCMS PMF** 方式發現在一系列抗體藥物的 heavy chain 上有 Asn deamidation

若此修飾發生在 complementarity- determining region 上，
將對抗體作用有顯著的影響

在特定溶液條件中會自然發生，檢測 deamidation 可以幫助
蛋白質藥物製劑的 formulation development

Met oxidation

OKT3: 為一器官移植後，抗急性排斥之抗體藥物
(murine monoclonal IgG2a antibody)

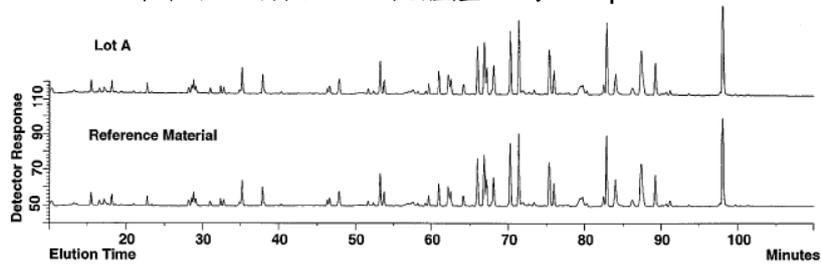
1992 Kroon et al. 利用 **LC-MS PMF** 發現在低溫保存之 14-
36 個月之 OKT3 製劑有氧化現象，氧化程度越高者與抗
原作用的能力越差。質譜數據亦證明，同樣低溫保存，
在有氮氣覆蓋之製劑則沒有 Met oxidation 的證據。

Comparability test

針對序列結構相同之蛋白質藥物，改變製程或製劑形式之新藥。

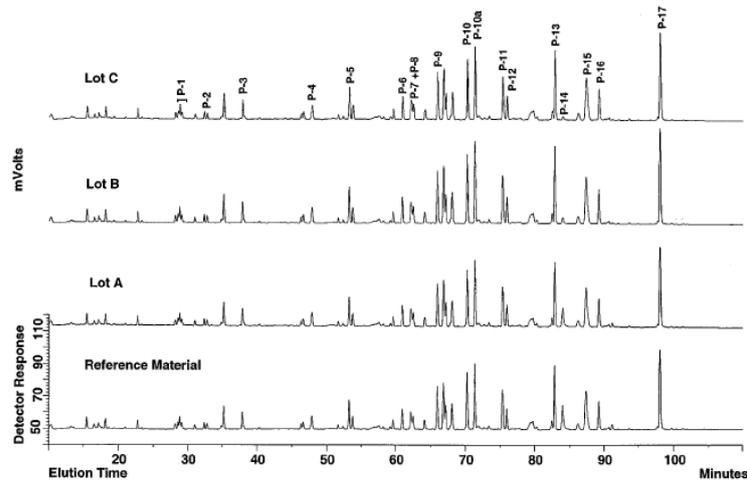
質譜測試已經常性用來分析市售藥與新藥之相似度，提供一級結構序列鑑定與各種修飾之證據，加速查驗登記速度

LCMS: 結果相似，顯示此二抗體產品為comparable



1997 Kanan et al.
鎂陞科技股份有限公司
Mass Solutions Technology

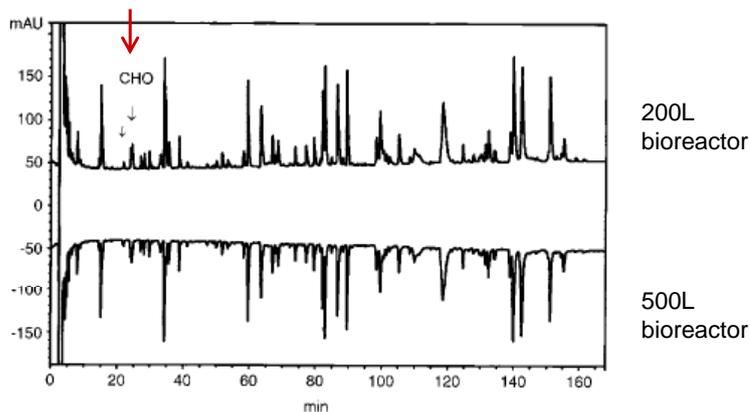
Lot-to-lot QC



鎂陞科技股份有限公司
Mass Solutions Technology

Scale up for manufacturing

此抗體的heavy chain 上的 glycopeptide 有質量差異



1999 Schenerman et al.
錕陸科技股份有限公司
Mass Solutions Technology

生技質譜儀在蛋白質生技產品的應用

- 研發階段 (I) 尋找生物標記 (biomarker discovery) 與疾病相關的藥物標靶
 - 蛋白質身分鑑定 (protein ID)
 - 蛋白質轉譯後修飾 (PTMs) 鑑定 (Glycosylation; disulfide bond; oxidation, deamidation, phosphorylation etc...)
 - 蛋白表現差異相對定量 (Differential protein expression profiling) 。
 - 全系統快速蛋白質鑑定 (comprehensive protein ID)
- 研發階段 (II) 選擇clone, 細胞培養條件最佳化, 動物試驗/人體試驗
 - 分子量精確分析/全序列鑑定/轉譯後修飾 (PTMs) 鑑定/胺基酸單點置換..etc)
 - 副產物 (side product) ; 不純物 (impurity) 分析
 - 蛋白質/胜肽 (Protein/peptide) 的定性確認
 - 絕對定量分析 (血中濃度/尿中濃度...)
- 產品階段 產品QC
 - 分子量精確分析/全序列鑑定/轉譯後修飾 (PTMs) 鑑定/胺基酸單點置換..etc)
 - 副產物 (side product) ; 不純物 (impurity) 分析

錕陸科技股份有限公司
Mass Solutions Technology