出國報告（出國類別：其他－國際會議）

生物製劑之醣基化分析研討會

服務機關：衛生福利部食品藥物管理署
姓名職稱：謝郁琦薦任技士
派赴國家：美國
出國期間：**104** 年 **8** 月 **24** 日至 **28** 日

摘要

美國藥典委員會(United State Pharmacopeial Convention)成立於1820年，以提升藥品及食品安全及品質為宗旨，除藥典處方集編修與標準品之供應等任務外，美國藥典委員會也不定期提供相關訓練課程及研討會，公開給所有有興趣的人士參與，針對目前新興產品、技術及法規等趨勢提供意見交流與討論之平台。

本次生物製劑之醣基化分析研討會即為藥廠、學術單位及法規單位共同討論對於蛋白質醣基化分析之觀點，及醣基化對於產品品質之影響。研討會內容涵蓋：蛋白質藥物中醣基化所扮演的關鍵角色，是否對藥物的療效等產生實質影響；探討相關分析技術之選用及可能面臨的挑戰，在使用新興方法的同時對於過去未曾發現的結果又該如何探討其意義；美國藥典於醣基化相關篇章之編修現況及標準品之研發供應，提供此一領域新興產品之標準化參考依據，並提供相關法規單位於醣基化分析之觀點。因此透過研討會可了解製造廠如何評估醣基化之影響，進而從何角度去制定相關品質管制項目，亦對於醣基化之相關分析技術有初步認識，並了解官方角色於此一議題應關注之重點為何，獲益良多。

本次有包含台灣、美國、歐洲及日本等官方、學術單位、製造廠代表在內共計91人參加，本次研討會除演講內容包含蛋白質藥物之發展趨勢及醣基化為何成為此類產品關注之重點及相關分析技術、法規趨勢外，會中亦有壁報論文展示，內容多為儀器分析廠商開發之新興方法或改進技術，提供精進醣基化分析之參考。

目次

壹、 目的..... ..4

貳、過程..... 5

參、 會議內容重點摘要 6

肆、 心得及建議 24

壹、目的

近年來生技產業蓬勃發展，許多蛋白質藥物研發上市，除原具有複雜醣基化之外，某些醣基化亦因被發現可以增加受體結合、藥效或提高生體利用等優點而使醣蛋白藥物之開發增加，國內目前亦有自行研發且領先歐美之醣蛋白疫苗於臨床試驗階段中。醣基化是蛋白質藥物中一關鍵之蛋白質轉譯後修飾作用，其對於功能、藥物動力學、藥效學、穩定性以及免疫原性扮演著重要的角色，然而由於不同來源或生成方式將可能導致蛋白質上醣基化出現差異，造成其對產品品質安全之影響，因此如何維持醣基化之一致性及如何確認其結構特性即成為一重要議題。

因應此一國際趨勢及國內新興醣蛋白疫苗研發進程，本署於 104 年起規劃進行「關鍵時代藥物轉型創新方案」，持續運用新興科技建立所需之檢驗平台與技術規範，提升國家評估研究能力與檢驗水準。為了解國際上針對醣蛋白藥物之分析技術及品質管制規範制定等趨勢，本次奉派參加美國藥典委員會於 104 年 8 月 25~26 日在美國馬里蘭州舉辦之「生物製劑之醣基化分析」研討會，研討會內容包含蛋白質藥物中醣基化之關鍵作用、相關分析技術、美國藥典於醣基化之標準化進程、醣質設計(glycoengineer)之新興技術及醣基化品質管制之法規觀點等，未來可將所獲相關知識應用於醣基化分析相關檢驗方法之開發研究及檢驗基準之建立，作為產品上市前後品質管制之參考，促進產業發展及確保國人健康。

貳、過程

日期	過程
8 月 24 日	啟程與抵達美國 (臺北-日本東京轉機-美國華盛頓)
8 月 25 日	報到/參加生物製劑之醣基化分析研討會
8 月 26 日	參加生物製劑之醣基化分析研討會
8 月 27 日	返程 (美國華盛頓-日本東京轉機)
8 月 28 日	抵東京轉機返臺

參、會議內容重點摘要

一、 蛋白質藥物中醣基化之角色

(一) 抗體融合蛋白(IgG fusion protein)之醣基化特性及影響

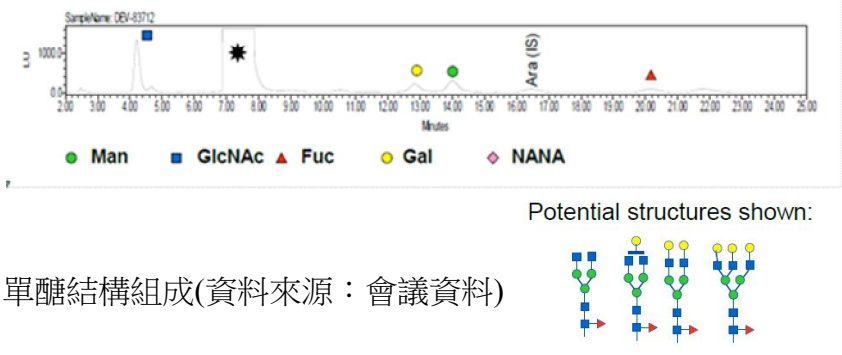
在單株抗體的Y字形結構中，上半部分為抗體的可變區(Fab)，為抗原辨識位置，而下半部分則是常說的恆定區(Fc)，主要是維持抗體的特定結構及特性，包括體內穩定性，誘發細胞毒殺作用(ADCC)與補體毒殺作用(CDC)等各種生物學功能。而抗體Fc融合蛋白為單株抗體之Fc domain與受體分子或其他胜肽連結，其核心即是借助抗體的Fc domain以提高蛋白的穩定性，延長體內半衰期及維持生物學功能，因此類融合蛋白無抗體可變區，所以其治療效果與抗體識別特定抗原並無關連，其藥理和藥效取決於與Fc融合的分子。

N-醣基化為蛋白質藥物中一關鍵之後轉譯修飾，大多數以哺乳類細胞株表現的單株抗體均在Fc的CH2 domain上有一N-醣基化位置。而Fc融合蛋白通常有多一個N-醣基化位置，並且在其醣基末端帶有負電的sialic acid。通常以CHO細胞表現之雙體抗體融合蛋白的型式，總共有6個N-醣基化位置，其中一個位於Fc CH2 domain上，另兩個位於融合的分子上(雙體)。

而醣基化特性之分析主要為：

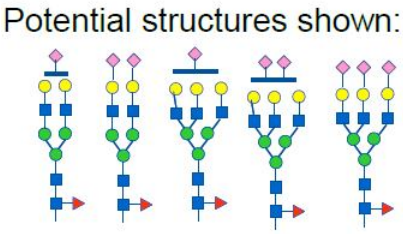
1. 醣基化組成分析：了解蛋白質藥物中單醣的整體組成。

   A. 單醣分析：將抗體融合蛋白以強酸水解(如20% TFA, 110℃, 3小時)，將單醣分別釋放出來並以鄰-羰基苯胺(2-Aminobenzoic acid, 2-AA)標記後，利用逆向液相層析及螢光偵測器分析之。因N-醣基有其核心結構，因此依據分析圖譜中蛋白質藥物所含單醣則可初步預測N-醣基的可能結構組成。



圖一、單醣結構組成(資料來源：會議資料)

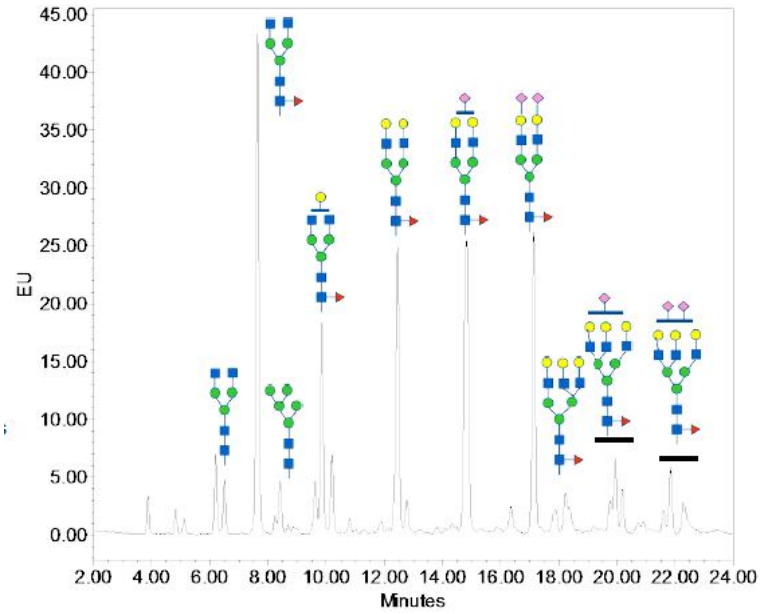
B. Sialic acid分析：因sialic acid亦因強酸高溫降解，因此改將抗體融合蛋白以弱酸水解(如2M 醋酸, 60℃, 2小時)，將sialic acid釋放出來並以4,5-亞甲二氧基-1,2-鄰苯二胺鹽(1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene, DMB)標記後，利用逆向液相層析及螢光偵測器分析之。依據分析圖譜中蛋白質藥物所含單醣及sialic acid則可初步預測N-醣基末端是否有sialic acid及其可能結構組成。



圖二、含sialic acid之可能結構組成(資料來源：會議資料)

2. 醣基化圖譜(glycosylation profile)分析：了解蛋白質藥物中寡醣的整體組成。

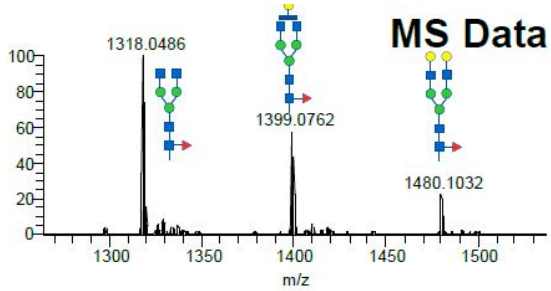
以PNGase F酵素將醣基從抗體融合蛋白上釋放出來並以2-氨基苯甲酰胺(2-Aminobenzamide, 2-AB)標記，分離出標記之醣基，利用逆向液相層析及螢光偵測器分析之。可藉由層析圖譜得知寡醣結構組成之相對量等整體資料。



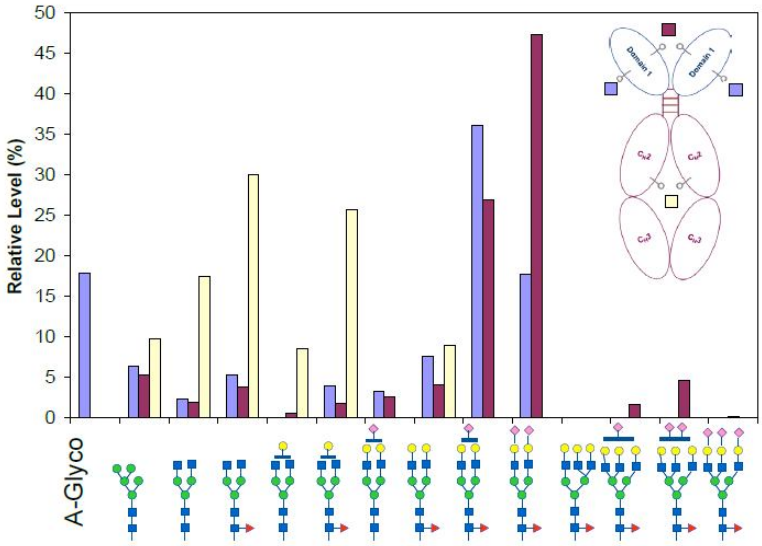
圖三、寡醣組成圖譜 (資料來源：會議資料)

3. 特定位點之醣基化圖譜(Site-specific glycosylation profiling)：了解在特定位點之寡醣組成。

以Endo-protease酵素將抗體融合蛋白消化分解為帶有醣基之胜肽序列，利用逆向層析分離並以質譜儀偵測分析，所得的胜肽圖譜為N-醣基連接於特定胜肽序列上，因此可得知在胜肽序列特定位點之寡醣組成。此一技術可用於半定量，可得知特定位點寡醣組成及其相對量。



圖四、醣胜肽(glycopeptide)質譜分析圖譜(資料來源：會議資料)



圖五、特定位點之醣基化圖譜(資料來源：會議資料)

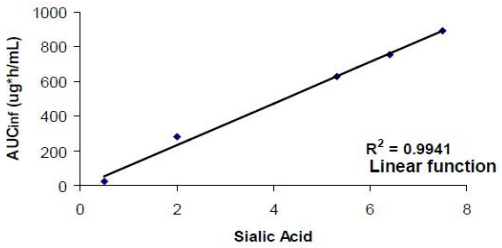
分析出抗體融合蛋白中醣基化之特性後即須要了解其醣基化對於療效或藥物動力學等影響，目前相關研究指出，N-醣基末端若帶有負電的 sialic acid 可能可延長蛋白質藥物之半衰期；而若末端為無唾液酸化(asialylated)之 galactose 或是 High mannose 結構在觸角處（antennae，即是醣鏈末端形成分支）缺乏乳糖或 N-乙醯葡萄糖胺殘基（GlcNAc），則可能使藥物有較快的清除率；另外，側鏈的 fucose 則被認為與細胞毒殺作用(ADCC)的生物學功能有關。因此，針對可能造成醣基化變異的因素，如序列之突變、製程上游中各項變因及製程下游的產能放大等，都可透過體外的安定性、生物活性及

體內的藥動/藥效學模式評估是否對於蛋白質的治療效果或生體利用產生影響。

在實驗中可看到，若融合分子之 domain 1 中有突變點，比較其在位點 1(site 1)、位點 2(site 2)或是 2 個位點均突變的生物活性，均與標準品無明顯差異，由此可知在 domain 1 中醣基化之巨觀異質性(macro-hetrogeneity)，如佔據位點(occupancy)並不會影響蛋白質藥物之體外活性。

另外，研究指出 N-醣基末端若帶有 sialic acid 將可延長藥物半衰期，而製程中各項變因均可能使醣基化過程中產生末端的 sialic acid 含量不同，因此利用動物試驗了解不同 sialic acid 含量對於藥物在體內濃度的差異。實驗結果證實，sialic acid 含量對於最高血中濃度(C_{max})並無影響，但確實對於蛋白質藥物的清除率及暴露(exposure)有影響，尤其在 sialic acid 含量極低的蛋白質藥物中，相較於其他組別有極快速的清除率；且蛋白質藥物於體內的暴露(AUC_{inf}，即進入人體的藥量)與 sialic acid 含量有線性關係，隨著 sialic acid 含量增多而增加。

Group	Sialic Acid	C_{max} (ug/mL)	AUC_{inf} (ug*d/mL)	$t_{1/2}$ (d)	CL (mL/kg/d)
A	0.5	79.5 (8.70)	23.1 (5.65)	2.16 (0.70)	135 (30.0)
E	2	61.8 (10.7)	279 (49.0)	7.60 (1.92)	11.0 (2.12)
B	5.3	74.3 (2.38)	627 (25.1)	9.23 (1.73)	4.79 (0.20)
C	6.4	65.8 (5.01)	755 (81.9)	10.6 (1.53)	4.01 (0.44)
D	7.5	99.7 (41.4)	894 (166)	11.6 (1.76)	3.46 (0.80)



圖六、sialic acid含量之藥物動力學研究結果(資料來源：會議資料)

因此，若想了解一蛋白質藥物之醣基化對於藥效及藥物動力學影響，可參照以上模式，先以適當的分析工具與方法，獲得藥物上醣基組成與結構，甚至是蛋白質上的接合位點，再利用相關的體內或體外模式評估不同結構組

成及位點之醣基化功能，了解不同醣基化對於治療效果可能的影響，並得以應用於藥物開發及品質管制項目制定等。

(二) 單株抗體藥物可變區(Fab)醣基化之影響

此一內容利用探討單株抗體藥物可變區醣基化之影響為案例，了解如何從確認一影響因素是否為產品之關鍵品質項目，進而轉化出相關品質管制策略。

一般而言，單株抗體藥物在恆定區(Fc)重鏈上有一 N-醣基化位點，被認為與藥物的療效及藥物動力學有極大關聯，然而前述提到在單株抗體的 Y 字形結構中，上半部分為抗體的可變區(Fab)，為抗原辨識位置，若癌細胞上的抗原是過度表現的接受器(receptor)，當單株抗體與抗原結合後，可阻斷接受器過度活化的訊號傳遞，讓癌細胞不再受到過度生長刺激，除此之外，單株抗體亦會啟動體內重要的免疫反應：ADCC 及 CDC。因此，若在可變區(Fab)重鏈上亦有一 N-醣基化位點，是否也會對於藥物療效及藥物動力學產生影響，並將其訂為品質管制項目，即是我們想了解與探討的。

首先評估 Fab 醣基化潛在的影響：

1. 醣基化位點(site occupancy)：醣基化位點突變可能對於專一性造成影響。
2. 醣基化圖譜(glycosylation profile)：
   A. 效價(potency)：資料顯示醣基化差異仍有相同的結合特性，因此對於效價影響風險極低。
   B. 作用功能(Effector function)：通常 effector function 與 Fc 及受體的結合調控有較大關聯，因此在 Fab 醣基化差異對此一功能影響風險亦低。
   C. 免疫源性(Immunogenicity)：由於是 CHO 細胞株產製，因此產生免疫源性的風險很低。
   D. 藥物動力學：醣基化可能與調節清除率的受體結合有潛在關聯，因此醣基化差異對於藥物動力學影響評估為中度風險。Fab 醣基結構之末端可能為 sialic acid、galactose 或 N-acetylglucosamine 等，若末端為 sialic acid 其可遮蔽醣基與 asialoglycoprotein 受體之結合；若為 galactose 可能與 asialoglycoprotein 受體結合；而 N-acetylglucosamine 則是會與 high mannose 受體結合。其中醣基與 asialoglycoprotein 受體及 high mannose 受體結合均可能使藥物有較高清除率。

由上述可知 Fab 醣基化之影響除在藥物動力學有中度風險外，其餘效價、作用功能及免疫源性等潛在風險均是較低的，因此若想評估 Fab 醣基化對於藥物動力學實際的影響，可透過以下 2 種方式進行：

1. 評估含有不同醣基結構分布之批次間其藥物動力學資訊，即利用藥物批次間含有欲分析之醣基其不同相對量對於藥動學影響，然而此一藥動研究模式需要足夠的病例數以減小患者間本身清除率之差異，且因較微量之醣基於整體清除率中影響較小，因此難以評估其對於藥物動力學之實際影響。
2. 監測不同醣基間的體內清除率，即能夠以含有欲分析之醣基結構之藥物主成分之單一批次進行藥物動力學評估，並可評估主要及微量醣基之相對清除率，惟需要有一可測定體內寡醣圖譜之分析工具，通常可以液相層析質譜儀進行分析。

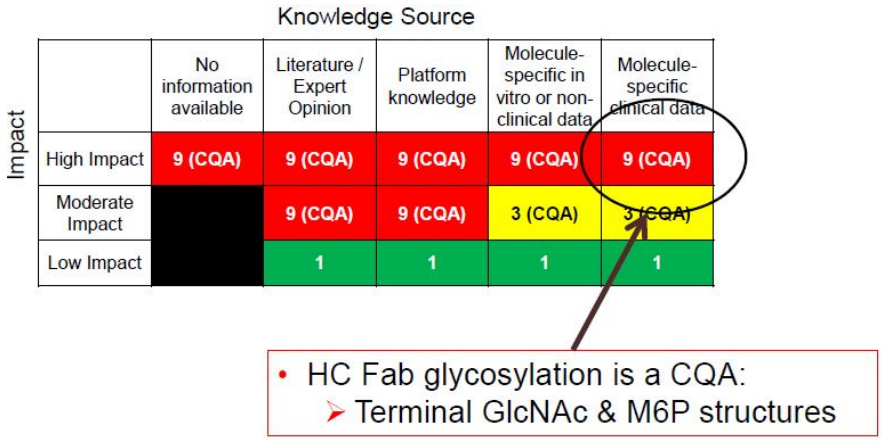
相較之下利用監測不同醣基間的體內清除率比評估含不同醣基結構分佈批次間之清除率差異更加容易、準確且可獲得整體資訊，然而如何從人血漿中分離出欲分析之單株抗體藥物以了解其 Fab 醣基化對於藥物動力學之影響是具挑戰性的，因為若以抗人來源抗體(anti-human Ab)捕捉血漿中欲分析的單株抗體，雖可用於非人血樣品之分析(如小鼠之藥物動力學分析)，但在人血樣品中因大量的人免疫球蛋白亦被抗體捕捉，造成背景值過高，就算以液相層析質譜儀亦無法偵測；而若改以特異抗原去捕捉血漿中單株抗體，亦可能因為患者體內原本即具有與單株抗體結合之抗原使靈敏度降低，並可能因某些醣基具較強親和性而產生潛在偏差。

因此，可利用以下方法將單株抗體自人血漿樣品中分離出來：首先加入過量抗原使其與單株抗體結合，再加入可與抗原另一辨識位置結合之 biotinylated mAb，並利用 streptavidin 樹脂(resin)捕捉前述之複合物，洗掉血漿中其他的人免疫球蛋白等多餘蛋白，最後再將欲分析之單株抗體從樹脂上流洗分離以進行分析。

分離出之單株抗體以 Papain 酵素切斷成 Fab 及 Fc 片段，並以二硫蘇糖醇(Dithiothreitol, DTT)打斷雙硫鍵形成輕鏈及重鏈片段後，以液相層析質譜分析 Fab 及 Fc 重鏈上的醣基圖譜。由圖譜中可得知在 Fab 之醣基其唾液酸化較 Fc 多，雖先前在小鼠的藥物動力學研究中以得知，Fab 醣基的唾液酸化對於清除率並無影響，而若末端為 N-acetylglucosamine 之醣基則有較快的清

除率。但為明確評估醣基化在人體中藥物動力學之影響，在臨床研究中收集3位病患分別於給藥1小時、1天、7天、28天及56天後之血漿，分析個醣基化結構於不同時間後相對量的變化，結果發現在 Fab 末端含有 N-acetylglucosamine 或 Mannose-6-phosphate 結構者有較快速的清除率，末端為 sialic acid 或 galactose 者則不影響清除率，且在3位病患中均可看出此一趨勢。

經前述臨床分析結果可得知 Fab 醣基化對於單株抗體藥物於人體內之藥物動力學確實有實際影響，因此若以關鍵品質因素(critical quality attribute, CQA)之風險評估工具，Fab 醣基化為一具高度影響之關鍵品質因素。



圖七、關鍵品質因素(critical quality attribute, CQA)之風險評估工具

而分析評估出Fab醣基化為一關鍵品質因素後，如何轉化相關資訊成為品質管制策略，可利用風險優先係數RPN(Risk Priority Number)之概念，風險優先係數是嚴重性(Severity)、發生機率(Occurrence)、偵測能力(Detectability)的綜合效應，其中嚴重性可視為關鍵品質管制項目評估，如有效性、安全性、免疫源性及藥效/藥動學等；發生機率則為製程參數評估；偵測能力即為檢驗策略，如檢驗方法能力、放行規格制定、關鍵製程品管項目等，較易偵測者風險分數較低，利用風險評估以獲得整合的品質管制策略，以Fab醣基化對於藥物動力學之影響為例，試驗設計即需要可識別關鍵製程參數及範圍以確保Fab重鏈末端之N-acetylglucosamine或Mannose-6-phosphate於細胞培養過程中能夠維持恆定量，而嚴重性及發生機率顯示建立相關的品管規格(偵測能力)是必須的，其可基於先前製程發生的變異或前期分析研究結果等制定可使藥

物得到預期品質之規格，並需要選定一適當的分析方法可偵測該項品質管制項目。

二、 醣基化之分析技術

(一) 醣基化分析之常見挑戰

1. 單醣分析：

主要測定連結於蛋白質上的醣基是由何個別單醣所組成，通常以酸水解醣蛋白以分離釋放其單醣分子，此一分析面臨的挑戰即為酸水解條件及定量分析。

其中酸水解的困難點之一在於酸水解雖會釋放單醣分子，卻也在過程中破壞它；此外，並非所有的醣苷鍵(glycosidic bond)都同樣不安定的，而造成酸水解過程中釋放之單醣分子含量差異。因此，酸水解條件必須優化至可獲得最大量單醣之釋放並將其降解減到最低，可嘗試優化的條件有酸濃度、水解時間及溫度，於不同的條件下測試單醣分子回收率，選定回收率最佳的酸水解條件。一般常用於中性糖分子之水解條件為：2N TFA, 100℃, 4 小時；而胺糖分子(amino sugars)常用的條件為：6N HCl, 100℃, 4 小時，可先嘗試利用此初始條件，若回收率或分析結果不佳再逐步調整優化。而定量分析的困難點則是酸水解的再現性不佳，每次水解出單醣分子之量不一致，且難以取得已知量之單醣標準品。目前常用的單醣分析方法有：氣相層析質譜，即單醣經 TMS (trimethysilyl)化學衍生後，可以氣相層析質譜儀進行分離檢測；高效陰離子層析搭配脈衝安培偵測器(HPAEC-PAD)及將單醣以螢光標記後利用液相層析或毛細管電泳分離檢測。其中 HPAEC-PAD 因不須衍生化且靈敏度高，為目前單醣分析之常用方法。

2. Sialic acid 分析：

Sialic acid 在 N-醣基末端具重要角色，因此建立相關分析方法以測定連結於蛋白質之醣基是否在末端有 sialic acid，可利用酸水解或是酵素消化醣蛋白以分離釋放 sialic acid，此一分析面臨的挑戰除酸水解或酵素消化的條件外，sialic acid 的安定性不佳及其定量分析均是困難點。目前常用的分析方法有：以 DMB 標記後再利用液相層析分離檢測，及 HPAEC-PAD。

針對上述 2 種單醣分析方法所面臨的挑戰，建議可建立一對照醣蛋白，確認酸水解條件是否可使單醣分子之釋出有最佳的回收率；此外，因酸水解過程中可能對於樣品中其他物質產生不可預期之反應，因此建議執行分析時應加入空白對照組及其他對照組(如緩衝液的使用、清潔劑等)；所有使用的試劑均須建立其允收規範及效期等，耗材(如試管、樣品瓶、濾膜等)亦須經測試後盡量維持相同品項之使用，以減少試驗之變因。最後建議絕不要為校正酸水解造成的漏失而將單醣標準品(非醣蛋白)與樣品一起水解，因為對於醣蛋白酸水解雖會破壞單醣，但同時亦具釋出單醣分子之功能，而無須經酸水解釋放之單醣標準品則只剩破壞之效果，若以此做標準曲線定量醣蛋白水解釋出之單醣分子，將可能高估其含量。

3. 寡醣分析：

將寡醣從蛋白質上分離釋放出來，以測定連結於蛋白質上之寡醣組成。此一分析面臨的挑戰在於：如何完整釋出寡醣分子並維持其結構完整性、分離偵測之選擇及定量分析。目前常見的分析方法有：以螢光標記後利用液相層析(HPLC)或親水作用層析法(HILIC)分離偵測、毛細管電泳搭配雷射誘導螢光偵測器(CE-LIF)、HPAEC-PAD 及串聯式質譜儀等。

因此分析時寡醣分子須考量的因素有：因醣基化具 N-linked 及 O-linked 兩種，必須區別 N-醣基化及 O-醣基化釋出之寡醣分析方法；而因寡醣標準品之數量有限且通常並非定量標準品，造成定量分析之困難度增加；使用需標記寡醣之偵測法時，則須注意標記溶劑之品質與效期，其為分析之重要變因；此外，在酸性條件下標記時必須小心控制以減少 sialic acid 之漏失，且要確保標記之完整性及非選擇性，將所有寡醣分子完全標記以獲得完整之醣基化圖譜。此外，分離管柱之壽命與效能、偵測方法的差異與選擇性、對照標準品的使用等也都是需要考量的因素。簡而言之，醣基化分析大多需要一種以上檢測方法以交互確認，而在眾多方法中如何選用適當的檢測方法，則須明確定義想分析的標的物，考量需要多高的準確度、試驗操作者及分析頻率等因素，以選擇一最佳之檢測技術達到預定分析之目標。

(二) 現行之醣基圖譜分析方法

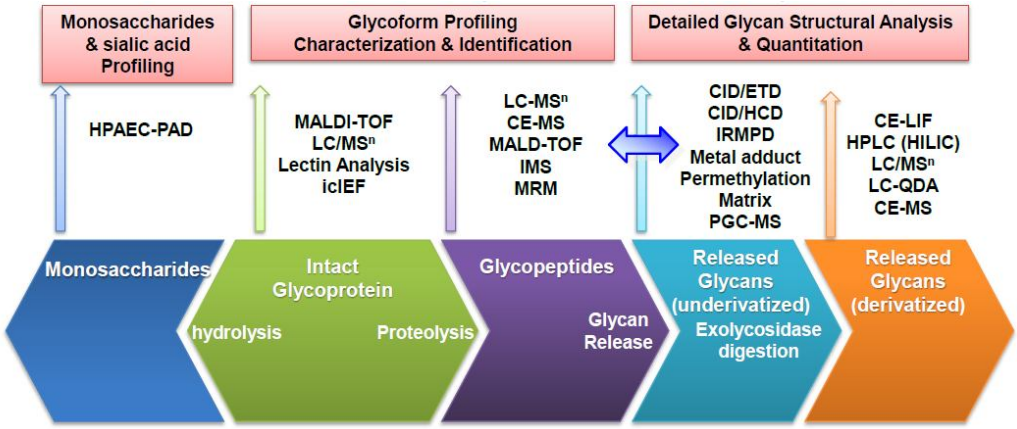
醣基化於蛋白質藥物中的結構與功能均扮演非常重要的角色，為一關鍵的轉譯後修飾(post-translational modification)，可能影響蛋白質藥物之免疫源性、藥物動力學及安定性等，並為蛋白質藥物產生異質性(heterogeneity)的主要原因，需要建立交互驗證的方法(orthogonal methods)以進行醣基化之相關結構特性等分析，而最終最重要的目的仍然是應了解醣基化與蛋白質功能間的關聯。目前已知與蛋白質藥物療效或藥物動力學等功能相關的醣基化有：N-醣基核心結構之fucose，因可增加與Fc γ RIIIa受體100倍以上之親和力，而可提高細胞毒殺作用(ADCC)；galactose則是可增加與C1q的結合因此提高補體毒殺作用(CDC)；N-acetylglucosamine除會增加與mannose受體結合使半衰期減低外，若為二分支之N-acetylglucosamine(bisecting GlcNAc)則可增強與Fc γ RIIIa結合，增強細胞毒殺作用；High mannose之N-醣基結構亦會與mannose受體結合而降低半衰期，若結構中無fucose則可提升細胞毒殺作用，但若結構末端無galactose則會降低補體毒殺作用；唾液酸化(sialylation)因影響藥物清除率因此可延長半衰期，並具有抗發炎活性。也由於醣基化的複雜結構及功能，因而規範在藥物研發、生產、放行、上市及安定性等階段須執行之結構特性分析或醣基化與藥物功能間關聯之相關研究(圖八)。

Table 1: Typical testing strategies; MoA = method of action, RTPs = recombinant therapeutic proteins, MAbs = monoclonal antibodies

Stage	Type of Test	MAbs	RTPs
Product characterization (early investigational new drug, IND phase)	Investigate or consider impact of glycoforms on MoA Full characterization (e.g., branch structure, and so on) Rapid test (glycokit, PNGase —> RP-HPLC, IEF, and so on)	Yes No Optional (early phase)	Yes Case by case Case by case
Product characterization (for biologics license application, BLA)	Investigate impact of glycoforms on MoA Full characterization Rapid test	Yes Yes Yes	Yes Yes Yes
Cell culture process changes	Full characterization Rapid test	No Yes	Yes —
Purification process changes	—	No	Case by case
Lot release	Full characterization Rapid test	No Case by case	No Yes
Stability	—	No	Case by case

圖八、各階段應執行之醣基化相關管控(資料來源：會議資料)

而現今醣基化之蛋白藥所執行相關結構特性之分析過程及儀器方法等略述如圖九，單醣分析主要可獲得單醣及sialic acid之組成圖譜，完整醣蛋白(glycoprotein)及醣胜肽(glycopeptide)則可瞭解其醣質圖譜作為結構特性分析及鑑定，而將醣基從蛋白上釋出後即為取得更佳詳細的醣基結構並做進一步之定量分析，全面了解醣基化對於蛋白質藥物功能之關聯影響。



圖九、醣蛋白藥物結構特性分析之主要途徑(資料來源：會議資料)

目前常用於N-醣基分析之方法主要有：Lectin column, HPAEC-PAD, CE-LIF with APTS, HPLC with derivatization (HILIC…), Labchip, LC/MS, CE/MS等；而比較HILIC-FLD、CE-LIF及Labchip三種分析方法之優缺點，其中HILC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)為親水性作用液相層析，適合用於分析中至高極性的化合物，醣基衍生化後經HILIC分離以螢光偵測，優點是具極佳分離效能，然而缺點則是分析時間長且檢品製備步驟繁複，目前已有新的衍生化套組可縮短檢品步驟時間。CE-LIF(Capillary Electrophoresis with Laser Induced Fluorescence)利用毛細管電泳原理將衍生化之醣基分離，優點是分離時間較UPLC/HPLC短，但某些醣基可能無法完全分離。另一Labchip則是將CE-LIF流程應用於微流體晶片(microfluidic chip)之分析技術，欲分析之醣蛋白於96孔盤中變性、消化及衍生化標記，將樣品盤及晶片一起上機後即注射及分離樣品，因此操作上非常方便且可同時操作多個樣品，分離時間亦非常短，每個樣品約只需要45秒，惟缺點為解析度較差。

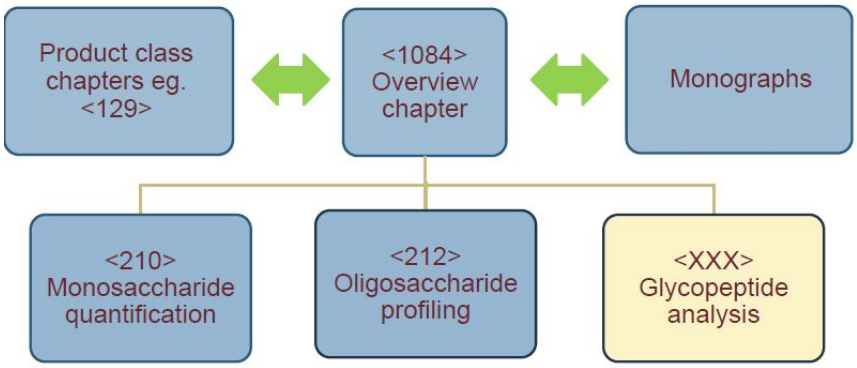
HILIC		CE		Caliper	
Strength	Limitation	Strength	Limitation	Strength	Limitation
Great separation power	Long run time	Good separation	Difficult Glycan identification	Easy and fast sample prep	Lack of flexibility
MS Compatible	Tedious sample preparation	No sample cleaning required	Lack resolving power for some glycans	Shortest run time (45s/sample)	Chip has short shelf life once used
On-line database (NIBRT Glycobase)		**Shorter run time is than UPLC/HPLC**		**96 well plate format, high throughput**	Low resolution
Improved sample prep time with new RapiFluor Tag		Improved separation using 1:1 mix (dsDNA1000) gel buffer		Relatively low cost	

圖十、HILIC、CE及Labchip(Caliper)分析法之優缺點(資料來源：會議資料)

三、 標準化

(一) 美國藥典篇章

目前美國藥典收載或即將納入之醣基化分析相關篇章為：<1084> Overview chapter、<212> Oligosaccharide profiling、<210> Monosaccharide quantification及<129> (related monoclonal antibody)，相關篇章均是以<1084>的總論概念作衍生建立，除前述已建立或已成草案之篇章外，未來將建立醣胜肽分析(glycopeptide analysis)及逐步建立相關藥品之個論規範。



圖十一、美國藥典之醣基化相關章節(資料來源：會議資料)

其中<1084>主要為簡介醣蛋白之醣基化，概述一些分析醣基化的方法，如完整醣蛋白、醣基切除及單醣分析等，給予分析者於醣基分析適當方法步驟之選擇指引，並作為未來更詳細分析方法篇章撰寫之主要架構。在此篇章中亦提到蛋白質醣基化主要分為以下四種：

1. N-醣基化（N-Glycosylation）：複雜的醣基連接於N-X-S/T（其中X可為除了proline外之任何胺基酸）此三個組合之胺基酸序列中asparagine殘基的末端醯胺上。其醣基的核心結構為Man-GalNAc-GalNAc，且通常醣鏈末端為sialic acid。
2. O-醣基化（O-Glycosylation）：通常為較小的醣基鏈中之GalNAc (N-acetylglucosamine)與serine/threonine連接，醣鏈末端亦常為sialic acid。另有其他的O-醣基化係醣基鏈與hydroxyproline或tyrosine連接。
3. Glycosylphosphatidylinositol anchor (GPI anchor)：一種可連接於C端的醣脂，可使蛋白質連接上細胞膜。目前尚無含有此類修飾的產品及建立相關分析方法。
4. C-醣基化（C-Glycosylation）：tryptophan之indole環二號碳與α-mannopyranosyl殘基一號碳的位置間結合。

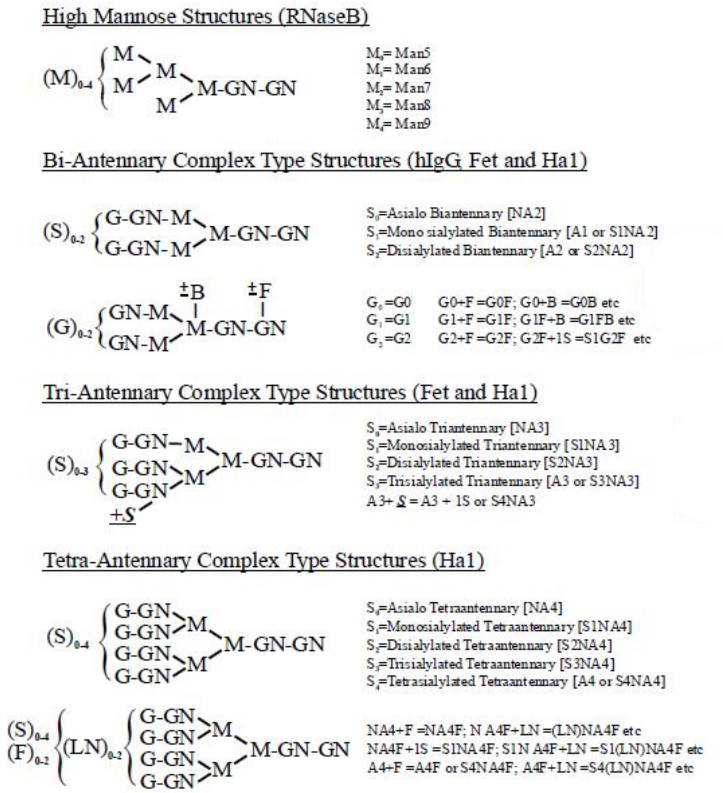
<210>篇章之內容為單醣定量，主要提到醣蛋白中醣基之單醣組成，可藉由酵素或水解方式將單醣從醣蛋白上釋出，可利用層析法或是呈色法分析，並在篇章中提及相關定量對照標準品之使用。目前首先鎖定於sialic acid之定量分析，再逐漸擴充至其他中性醣分子之分析，主要用於定量sialic acid，可用酵素或酸水解後，以HPAEC-PAD分離偵測，或是以螢光標記後以液相層析分離並搭配螢光檢測器分析之，未來也將逐步納入以可釋出α2,3-及α2,6-linked sialic acid之選擇性酵素水解方法，以及O-acetylated sialic acid之分析。此外，在此一篇章中並不會提及產品之規格，產品規格會分別訂於相關個論中。篇章<210>之第一版草案將會約在2016年初發布於藥典論壇(Pharmacopeial Forum)以廣納各方意見，若想於藥典論壇中發表相關意見，可至USP網站中點選"USP-NF"並進入" Pharmacopeial Forum"註冊，每一草案均會在論壇中公開3個月並讓所有人士提供相關意見。

<212>篇章則為寡醣圖譜之分析，內容已包含相關可用之分析方法，但仍需要更加優化，如特定產品中之混合醣基、使用不同製造廠之層析管柱、以UPLC分析及不同螢光標記、梯度等。此一篇章連結至某些對照標準品，其混和醣基來自於模擬在不同類別產品中之非專利蛋白。醣基鏈的分離與鑑定主要可用正向液相層析(HILIC)、HPAEC或毛細管電泳等，搭配對照標準品之使用。此外，若使用與藥典不同的方法進行分析，其對照標準品之分析結果應至少與藥典方法分析結果一樣好。跟<210>相同，在此篇章中並不會提到資料分析方法及產品規格。

<212>寡醣圖譜之分析中提及的對照標準品為市售醣蛋白以酵素消化製備而得的醣基：

1. Ribonuclease b (RNase B)：主要為high mannose chain寡醣分析之對照標準品。
2. Human polyclonal IgG (hIgG)：主要為雙觸角鏈(biantennary chain) 寡醣分析之對照標準品。
3. Human α1 glycoprotein (Ha1)：主要為有高度唾液酸化及較多分支之寡醣分析之對照標準品。
4. Bovine fetuin (fet)：主要為有中度唾液酸化及延展分支之寡醣分析之對照標準品。

下圖為各種N-linked醣鏈結構及其可搭配使用之對照標準品。



圖十二、N-linked醣鏈結構及可搭配使用對照標準品(資料來源：會議資料)

以上4種對照標準品之包裝並非現行USP常規使用之方式，其為每管20 μL中含約20 μg total saccharide，且不含賦形劑，分裝於塑膠小管中並放在96-vial tray中(圖十三)儲存於-20℃，已完成大多數的安定性資料已可供參考。

圖十三、醣基圖譜分析用對照標準品之包裝材料(資料來源：會議資料)

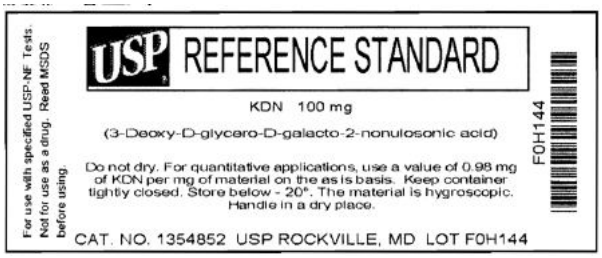
最後提到的是<129>重組治療型單株抗體之分析流程的篇章，為一產品等級之分析方法概論，以單株抗體為首要建立的篇章是因為許多單株抗體的醣基化均為關鍵品質項目，並調節影響許多功能，例如：與臨床治療效果息息相關之細胞毒殺作用。在此一篇章中會提及醣基分析及2種方法，目前已藉由專家會議確認相關方法及要求是一致且適當的，並已於藥典論壇中(PF 39(3))採納相關建議，將出版於美國藥典第39版。

(二) 美國藥典標準品

標準品可能為單一成分組成或是多成分組成，可能如寡醣分析所使用之標準品為混合物，也可能是標準品內含賦形劑，大多都適用於藥典方法，其建立及公布販售均需經相關專家諮議會授權。以下簡述美國藥典生物性標準品開發過程的流程：首先取得符合應用需求的原液材料，進而設計如何確認標準品品質、含量等之試驗方法及需要多個實驗室進行共同標定研究，共標完成後會先初步審閱各實驗室的資料數據及標準品標定數值的計算制定等，並將相關結果做成RSCEP(reference standard candidate evaluation package)草案供後續審查，專家委員會審查並核准後即可進行包裝貼標等事宜，當然亦必須經過品管試驗及品保人員之查閱後才能開始供應。

以下為蛋白質醣基化之相關藥典篇章其對應之標準品：

1. <210>單醣分析：目前尚在開發中，主要會先著重於sialic acid定量標準品之建立，包含有N-Acetylneuraminic acid (NeuAc)、N-Glycolylneuraminic acid (NeuGc)及3-deoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonic acid (KDN)標準品三種。下圖即為前述其中一項標準品之外標籤，因是定量用標準品，因此會有標註其純度等定量所需數值資訊。



圖十四、KDN標準品之外標籤(資料來源：會議資料)

2. <212>寡醣分析：目前有系統適用性混合寡醣A-D此一類型標準品，將會納入美國藥典第38版第2本補篇中，主要用於評估方法流程之分析效能，可代表不同種N-linked醣基圖譜做為系統適用性確認，為一定性用標準品，因此標籤上標示之數值並非實際經共標之確切含量或濃度，而是會在標準品成績書中提供典型之層析/電泳圖譜。先前已提過是由市售之蛋白水解而得，製備流程為：將醣蛋白以PNGaseF消化，因而水解為N-linked醣基、蛋白質骨架及PNGaseF，利用C18固相萃取將2者分離，取所需的N-linked醣基經正向HPLC分離後凍乾。此一標準品是與NIBSC共同標定。

3. <129>重組治療型單株抗體之分析流程：將會納入美國藥典第39版，內容包含單株抗體之N-linked醣基之醣基化分析標準品及sialic acid分析之相關定量標準品。

另有其他蛋白質醣基化之產品個論及其相關標準品，每一個論均會有涵蓋N-linked醣基之水解方式、螢光標記及如何分離等之專一性方法。簡言之，目前美國藥典已開發一些可供用於蛋白質醣基化分析之標準品，其品質均經確認並經共同標定含量，可作為鑑別試驗之標記或醣基圖譜之陽性對照，亦可供相關單位作為新方法或流程開發時之對照確認。

四、蛋白質藥物醣基化品質管控之法規觀點

對於蛋白質藥物首先要有的概念是必須了解每個產品都是有差異的，甚至是同一分類下的產品，不會有一個可以達到所有需求相同的醣基化品質管制策略，因此應該考慮的是如何去確認蛋白質藥物醣基化之結構特性、與標的之連結以及藉由品質管控達到良好的再現性。前面主題中已可大致了解醣基化對於蛋白質藥物的影響，從影響酵素活性或配位體結合之活性構型、安定性、免疫源性、生體可用率、半衰期及療效等，因此醣基化結構特性之確認與分析即是非常重要，一般而言除了前面內容中均有提到的單醣分析、以層析或毛細管電泳分析醣基圖譜、以液相層析質譜分析之醣基鑑定及醣基化位點等之外，亦可藉由分析電荷差異(charge variants)作為產品醣基化品質管控之工具之一。電荷差異是利用單株抗體之等電點原為 8.7-9.1，而當出現一些轉譯後修飾造成等電點之改變時，以毛細管等電點聚焦電泳或毛細管電泳分析，因帶電程度不同其位移時間不同，因此可利用圖譜間的差異獲得醣基化等相關訊息；例如：若出現酸性電荷波峰表示產品中有唾液酸化之醣及及磷酸基；此外，也可獲得 Asparagine deamidation 等非關醣基化之產品相關變異之訊息。因此在研發後期或是產品申請查驗登記階段時可開發此一定量方法及制定相關規格作為品質管制項目。

單醣及醣基分析均是為了確保與治療或藥物動力學等相關作用機轉有關之單醣及醣基均無變異，最重要的是要可辨識醣基化影響的關鍵因素，就算是組成比例較低的醣基也可能是最關鍵的，要先了解各個醣基及其功能之關聯，再利用不同的分析方法確認之。而分析醣基圖譜關鍵的地方在於，假若無法確切得知醣基化之功能，不清楚多了或少了此一醣基化對於產品是否有影響，則可藉由維持一致的醣基圖譜，維持與過去產製產品之醣基化相同

確保品質。整體的醣基圖譜差異也可能影響蛋白質藥物的三級結構、聚合(aggregation)、半衰期及免疫源性等。

除了針對醣基化之相關分析之外，也應該開發其與作用機轉相關之試驗(assay)以了解醣基化與其功能間的關聯，如受體結合試驗、作用功能之生物試驗(ADCC 及 CDC)、酵素活性試驗(可了解細胞如何攝入(uptake)單株抗體)及效價生物試驗等。簡而言之，需要全面了解醣基化之影響，品質研究包含醣基化分析、物化性質測試、功能試驗、生物試驗等均是確認其品質之重要品質管制項目；而藉由動物實驗可了解對於藥動/藥效學及生體分佈之影響；臨床試驗則除評估藥效/藥動學之外，最重要的即是確認安全性及有效性。

由於醣基化之發生難以預測且易產生變異，在許多案例中變更前與變更後之產品都沒有相同的醣基化，就算是製程中的一個小改變都可能於醣基化有顯著的影響，大多對於在前段製程之改變較敏感，如細胞株的改變，而製造規模或地點的改變若無伴隨其他變更時則風險較小。因此，在製程變更後應建立醣基化的相關可比性(comparability)。

而醣基化的品質管制策略可分為 3 階段

1. 研發前期：藉由醣基圖譜、胜肽圖譜、單醣含量、醣蛋白分子量及電荷差異等結構特性的確認，並盡可能地建立規格限制以確保產品品質，惟若醣基圖譜之結果過於複雜則在此一階段以對照品做比較是可接受的。
2. 在研發階段中：要能夠辨識醣基化的關鍵品質管制項目(如 sialic acid 含量、關鍵單醣之含量、關鍵醣基結構)，並挑選出相對應之功能性試驗，了解批次之間於這些關鍵品質管制項目的差異，進而在品質管制策略中實施適當的試驗及制定相關規格。
3. 後期產品：藉由製程管控跟放行檢驗作為關鍵醣基化管控的重要關鍵，制定相關規格限制以確保臨床或市售批次與臨床經驗之可比性。而到了產品階段，對於市售產品已不能接受僅與對照品做比較，應針對醣基差異有定量限制，目標是對於醣基化有一客觀的品質管控，並制定定量限制以管控醣基的相對含量，即使是未知功能的醣基亦必須有所管控，因為有一致的醣基圖譜可反應其製程的管控良好，而若可保持醣基相對含量的一致性及良好的製程管制，即可使低含量醣基亦維持一致性。

在品質管制中測定醣基化之相關分析方法，FDA 並不規範或限制特定方法之使用，更新及靈敏的技術可以提供更佳的靈敏度及結果，只要能夠符合

需求使用的方法，即可用於醣基化之結構特性分析，而以發展中的方法作為放行試驗之分析方法是具有挑戰性的，因在 cGMP 規範中放行試驗之方法是需要提供多位操作者、多儀器分析之一致性資料的，如現今開發許多利用質譜儀分析醣基化之方法，然而質譜儀需考慮其再現性、各儀器間差異、分析方法操作、人員訓練及 trouble shooting 等困難度。

而近年來蓬勃發展的生物相似性藥品與醣基化，參照 Guidance for Industry: Quality Considerations in Demonstrating Biosimilarity of a Therapeutic Protein Product to a Reference Product 提出相關法規論點，首先應全面確認目標產品及對照藥品醣基化之本質、位置及含量等，以及不同異構物之變異範圍，並清楚描述與討論目標產品與對照藥品間醣基化中任何差異之形式、本質及程度。在開發一生物相似性藥品中，均要研究夠多批次之對照藥品以了解其醣基化之變異，並在目標的生物相似性藥品中亦必須研究夠多的批次以說明其醣基化與對照藥品具一致的相似性。且由於醣基化的複雜性成為生物相似性藥品開發之挑戰，因可能在醣基化中有許多差異，無法實際的去統計比較在每一個 N-linked 及 O-linked 位點中每一個醣基變異的含量；因此，整體策略應為去統計比較已知對於功能有關鍵影響之醣化模式、個別醣基或單醣，至於統計方法及應多精確則取決於其差異對於安全性及有效性影響之風險。但若是對於醣基化差異影響風險較小的可藉由比較原始數據之方式(如層析圖譜)代替。醣基化的相似性亦必須針對品質研究、動物試驗及臨床試驗去做整體品質、藥效/藥動學、安全性及有效性之評估，必須無任何有意義的差異出現。

總結醣基化之品質管制，首先必須了解醣基化與蛋白質生物活性之關聯，進而發展整體的品質管制策略，若是未知功能之醣基化則藉由製程管制達到其目標，而若在品質管制項目檢測中有任何無預期之發現，亦未必都是負面結果，只要有足夠的科學證據解釋即可。面對醣基化的複雜性法規也應該有足夠彈性的，且不該預期醣基化可完全辨識，而是應該藉由品質管制或規格制訂維持其一致性。而對於生物相似性藥品之可比性及相似性評估亦並不需要完全一樣的醣基化，但必須提供證據顯示其差異並不會影響蛋白質功能。

肆、 心得及建議

一、持續並積極參與國際研討會

本次為期兩天的研討會中，透過各生物製劑藥廠、學術機構及法規單位講者之分享，對於醣基化分析之相關技術有初步了解，並了解醣基化之關鍵影響、於產品品質管制之關注重點、美國藥典相關篇章及標準品之現況，以及法規單位該從何角度切入使可確保產品品質安全，而亦可在許多尚未明朗的醣基化修飾中保留些許彈性，在產業發展與用藥安全間取得良好平衡。內容包含許多面相十分充實，除可增進相關技術知識、汲取國外法規單位之相關經驗及了解國際趨勢外，亦可藉此機會與相關專家建立交流管道，建議持續參加相關研討會，以提昇相關業務人員之專業知識及國際視野。

二、醣基化檢驗方法及基準之建立

醣基化在許多蛋白質藥物中扮演非常重要的角色，除了影響結構、安定性等物化性質外，亦可能會影響療效及藥物動力學等臨床治療效果，尤其近年來標靶治療興起，單株抗體藥物於市場上使用、銷售量極高，其醣基化變異即可能會對療效等造成影響；建議應積極建立相關檢驗技術及基準，可應用於產品之上市後品質調查研究，確保國人用藥品質安全；且國內生技產業蓬勃發展，相關檢驗基準亦可供國內相關單位作為產品研發或品質管制之參考。

三、藥典編修及標準品供應

本次研討會中美國藥典委員會分享目前收載與即將納入美國藥典之醣基化分析相關篇章，及可對應於其分析方法之對照標準品，顯示美國藥典對於此一新興領域之重視與投入。對照於我國藥典在新興產品之更新常是較為緩慢的，因此除了建議增加人力及經費，應擴增藥典編修之專家領域，使中華藥典在新興領域之編修能夠與時俱進。至於對照標準品之研發與供應亦一向是困難所在，除受限其需龐大人力、經費及設備等資源之投入外，原料來源亦是主要問題，然而若中華藥典收載品目可比照美國藥典模式，於分析方法中使用對應之對照標準品，則可促進標準化之完善，提升藥典之實用性，因此雖短期內難以克服相關限制，仍

建議未來可積極投入相關設備、資源，與中華藥典編修達相輔相成之效。

四、各領域之分工與專業人才之進用

生物製劑種類繁多且發展快速，國外相關單位組織龐大且分工精細，人員可專精於相關領域，因此能夠及時針對新興產品需求研擬相關規範及檢驗方法之開發，而我國受限於人員編制，常無法吸引專業人才之投入，且人力不足無法與國外一樣依專長領域分工，因此建議應增加可吸引專業領域人才投入之編制職缺，廣納專才以縮短培育人員所需花費之時間，並可提升專業領域之技術發展、增進工作效率。

五、國際研討會之舉辦

本次研討會主題為醣基化分析，由於醣基化十分複雜，目前仍尚未有非常明確、具代表性的分析技術或規範，故研討會即成為一個良好的討論交流平台，講者分享各自單位內所使用、開發之分析技術，互相分享經驗，法規單位提供概念性指引，並透過這樣一個交流溝通，可得知目前製造廠研發趨勢及所面臨的問題，而製造廠亦可藉此了解法規單位關注重點而精進其相關品質管制，製造廠之間亦可以透過經驗分享了解自身使用技術或品管策略之優缺點，截長補短共同成長，如此才能夠在這樣一個複雜的新興議題上有所共識，共同發展出一套完善之品質管理政策。未來國內亦可透過舉辦國際研討會方式，針對新興產品或議題廣召國內外專家、製造廠及學術單位共同交流討論，透過溝通與經驗分享，加速新興產品領域之進展。