

出國報告（出國類別：其他-研習）

偽造及不法藥物分析檢測技術研習

服務機關：衛生福利部食品藥物管理署

姓名職稱：張可冀助理研究員

派赴國家：德國

出國期間：中華民國 108 年 11 月 24 日至 11 月 29 日

報告日期：中華民國 109 年 2 月 7 日

摘要

有鑒於近年國際間陸續發生單株抗體藥物等新興醫療產品不法事件，為確保市面上藥品品質與安全，歐洲總體官方藥品管制實驗室網絡（General European OMCL Network, GEON），委請德國聯邦疫苗及生物藥品管理局【Federal institute for vaccines and biomedicines (Paul Ehrlich Institute, PEI)】，針對單株抗體藥物等新興醫療產品舉辦「偽造及不法藥物分析檢測技術研習」，食品藥物管理署為因應未來單株抗體藥物等新興治療產品與相關檢驗技術及管制之規範，須建立品質管制及檢驗技術相關指引，同時與國際相關領域專家建立交流管道，故於108年11月24日至11月29日派員參加此次研習，透過毛細管等電聚焦法(capillary isoelectric focusing, cIEF)與超高液相層析儀(Ultra-Performance liquid chromatography, UPLC)之技術，快速分析待測藥物，以提升我國國家實驗室檢驗偽藥、禁藥及劣藥之能力，完善我國藥品品質管理體系。

目錄

摘要	2
壹、 前言與目的	4
貳、 行程及工作紀要	6
參、 研習內容重點摘要	7
一、 運用毛細管等電聚焦法(CAPILLARY ISOELECTRIC FOCUSING, CIEF)鑑別單株抗體	7
二、 以 UPLC 進行胜肽圖譜(PEPTIDE MAPPING)進行單株抗體鑑別	16
肆、 心得與建議	25
一、 技術研習心得	25
二、 研習後建議	25
伍、 附錄	26

壹、 前言與目的

有鑒於近年國際間陸續發生單株抗體藥物等新興醫療產品不法事件，為確保市面上藥品品質與安全，在歐洲藥品品質與衛生保健局（European Directorate for the Quality of Medicines, EDQM）規畫下，透過歐洲總體官方藥品管制實驗室網絡（General European OMCL Network, GEON），自2012年起委請各官方藥品管制實驗室（Official Medicines Control Laboratories, OMCLs）網絡成員，針對偽造及不法藥物計畫舉辦18梯次「偽造及不法藥物分析檢測技術研習」，有關單株抗體等生物性(Biological)藥品相關的技術訓練始於2015年11月18-19日與2016年2月24-25日，在瑞士伯恩(Bern, Switzerland)舉辦的第7梯次與第8梯次-運用Liquid chromatography-mass spectrometry Quadrupole Time-of-Flight (LC-MS QTOF)屬於top down approach及LC-MS QTRAP® (bottom up approach)分析蛋白質體學。本次研習為整個EDQM訓練計畫的第16梯次，係委請德國聯邦疫苗及生物藥品管理局【Federal institute for vaccines and biomedicines (Paul Ehrlich Institute, PEI)】辦理本次研習，PEI的主要業務職掌為保德國國內血清，疫苗，血液製劑，組織製劑，組織，過敏原，新興治療藥物，異種藥物產品(Xenogenic medicinal products)和使用基因工程方法製造的血液製劑之品質安全(法源依據:德國藥品法第77節, Section 77 AMG [Arzneimittelgesetz, German Medicines Act)，除此之外，PEI也為歐洲藥品管理局(European Medicines Agency, EMA)、歐洲藥品品質與衛生保健局及世界衛生組織World Health Organization, WHO)合作之OMCLs，協助監控上市藥品之品質安全與相關監測活動。

為提升我國對於檢驗分析單株抗體藥物等新興治療產品能力，除了國家實驗室須具備先進的儀器與設備外，如何設計快速有效且精確的檢驗流程是提升國內檢驗體系更重要的一環，若能透過實際操作儀器的教育訓練，將相關重要之檢驗技術帶回國家實驗室，對於實際操作上建立品質管制及編撰檢驗技術相關指引皆扮演重要的角色，同時也能與國際相關領域專家建立交流管道，更能直接互換生物藥品品質安全的即時訊息，故於108年11月24日至11月29日參加此次研習，藉由本次研習達成以下目標：

- 一、瞭解近年歐洲發生單株抗體等高單價藥品之偽造及不法藥物的樣態與調查方式。
- 二、學習如何使用毛細管等電聚焦法進行快速分析生物性待測檢體。

三、運用 UPLC 取代 HPLC 進行胜肽圖譜(peptide mapping)的技術，更快速與精準的建立各種單株抗體藥物與新興蛋白質藥物的完整資訊。

透過上述兩種物化檢驗，避免偽造及不法藥品流入國內或國際生物藥品市場，以確保國人用藥品質安全。

貳、 行程及工作紀要

日期	行程及工作紀要
108年11月24日、25日 (星期日、星期一)	啟程(台北-法蘭克福)
108年11月26日 (星期二)	1. 地點:德國 PEI 2. 會晤人員: i. 免疫學組生物醫學製劑產品檢驗科 (Division Immunology, Product testing of immunological biomedicines)本次講者 Dr. Wolf Hagen Holtkamp、Nicole Keil 及 本次參與研習之助教群。 ii. EDQM 代表 Marie Bertrand iii. 本次參與研習之 OMCL 學員 3. 研習內容: i. 演講-cIEF (Dr. Wolf) ii. 演講-cIEF (Keil) iii. cIEF 檢品製備及上機 iv. peptide map 檢品製備(反應 16-22 小時)
108年11月27日 (星期三)	1. 地點:德國 PEI 2. 會晤人員: i. 免疫學組生物醫學製劑產品檢驗科 (Division Immunology, Product testing of immunological biomedicines)本次講者 Dr. Wolf Hagen Holtkamp、Nicole Keil 及 本次參與研習之助教群。 ii. EDQM 代表 Marie Bertrand iii. 本次參與研習之 OMCL 學員 3. 研習內容: i. peptide map 上機 ii. cIEF 數據分析與結果討論 iii. peptide map 數據分析與結果討論
108年11月28日、29日 (星期四、星期五)	返程(法蘭克福-台北)

參、 研習內容重點摘要

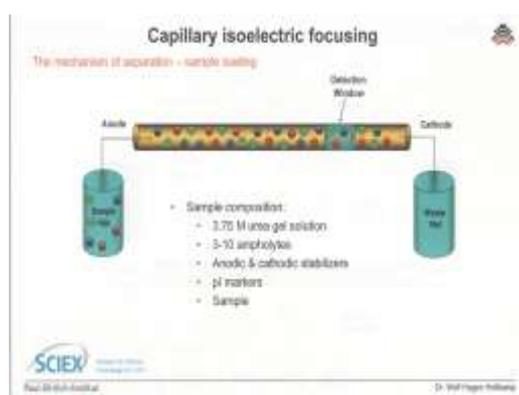
本次研習由歐洲藥品品質與衛生保健局（EDQM）規劃並委請 PEI 的免疫學組生物醫學製劑產品檢驗科安排為期 2 天的檢驗技術研習，內容主要為待建立的 2 種檢測方式（cIEF 及 peptide map by UPLC），針對單株抗體藥物的物化性質做快速的分析與鑑別，以期將此檢驗方法納入歐洲藥典，提供各國官方實驗室作為檢測一般性(general) 單株抗體藥物、新興細胞治療或蛋白質藥品物化性質之標準作業流程。

一、運用毛細管等電聚焦法(capillary isoelectric focusing, cIEF)鑑別單株抗體

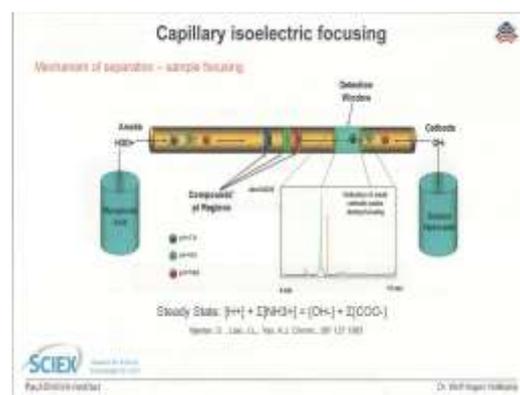
1 原理與方法

1.1 原理

毛細管等電聚焦法(cIEF)的原理係基於大分子物質上帶有不同的淨電荷，分離的方式是藉助於在均勻電場中產生人工的 pH 梯度，使得蛋白質沿著其等電點(pI)的方向移動，當蛋白質移動到等電點時，正電荷與負電荷相互抵消，且因此失去移動力而集中在此位置上，在組成分複雜大分子中，將大分子聚焦在其 pI 處會產生高度特異性的蛋白條帶，因此使該方法適合在高純度蛋白溶液以及蛋白混合物中鑑別單株抗體，通電前蛋白質分子均勻分布在毛細管內(圖一)，通電後產生 pH 梯度使得大分子移動到 pI 區(圖二)。



圖一、通電前示意圖



圖二、通電後產生 pH 梯度

(資料來源:Dr. Wolf Hagen Holtkamp 簡報)

1.2 用途

單株抗體、多株抗體及免疫血清皆可使用 cIEF 鑑別。

2 設備及材料(研習單位提供)

2.1 設備

儀器	廠牌
Capillary electrophoresis system*	AB SCIEX

*使用 UV-detector

2.2 耗材

耗材	廠牌
Neutral capillary, 50 μ m i.d. x 45 cm	AB SCIEX*
Vials for PA800	AB SCIEX
Vial caps	AB SCIEX
PCR tube, 0.2 mL	AXYGEN(VWR)*
Amicon Ultra Filter 0.5 ml; 10 k	Millipore

*可選用其他廠牌耗材替代

2.3 試藥與試劑

描述	廠牌
Water**	
cIEF gel (polymer solution)	AB SCIEX
cIEF peptide marker kit	AB SCIEX
Pharmalyte 3-10 carrier	GE Healthcare
L-Arginin	Sigma-Aldrich
Imino diacetic acid	Sigma-Aldrich
TRIS Tris(hydroxymethyl) aminomethane, 99.9+% ultrapure grade	Sigma-Aldrich
Urea	Sigma-Aldrich
Acetic acid 100%*	Merck
85% Orthophosphoric acid*	VWR
1N NaOH*	Merck
1N HCl	Merck

*可選用其他廠牌耗材替代

** Water = 1. Fresh HPLC water

2. Ultrapure water, autoclaved

3. HPLC water LiChrosolv, e.g. from Merck.

Order No.: 1.1533

2.4 溶液製備

2.4.1 陽極溶液(Anolytic, 200 mM phosphoric acid, 25 mL)

取 15 mL 水，加入 325 μ l phosphoric acid (85%)，補水至 25 mL。

2.4.2 陰極溶液(Catholytic, 300 mM NaOH, 25 mL)

取 15 mL 水，加入 7.5 mL 1M NaOH，補水至 25 mL。

2.4.3 化學移動相(Chemical mobiliser, 350 mM acetic acid, 50 mL)

取 30 mL 水，加入 1 mL acetic acid (100 %)，補水至 50 mL。

2.4.4 陰極穩定相(Cathodic Stabiliser, 500 mM L-arginin, 25mL)

取 15 mL 水，加入 2.18 g L-arginin，補水至 25 mL。

2.4.5 陽極穩定相(Anodic stabilizer, 200 mM imino diacetic acid, 25 mL)

取 15 mL 水，加入 0.68 g imino diacetic acid，補水至 25 mL。

2.4.6 4.3 M 尿素溶液(4.3 M urea solution, 50 mL)

取 30 mL 水，加入 10.8 g urea 攪拌 15 分鐘，補水至 50 mL。

2.4.7 3.0 M 尿素膠體(3.0 M urea gel, 10 mL)

取 7 mL cIEF gel 加入 1.8 g urea，震盪攪拌溶解後再補 cIEF gel 到 10 mL。

2.4.8 20 mM TRIS buffer(pH 8.0, 100 mL)

取 0.24 g TRIS 加入 75 mL 水，以 1M NaOH 調整 pH 至 8.0
補水到 100 mL。

2.5 檢品製備

2.5.1 製備 pI marker mix (控制組)

取下列物質至 0.5 mL 微量離心管

- 200 μ l urea cIEF gel
- 12 μ L pharmalyte 3-10 carrier

- 20 μL cathodic stabiliser
- 2 μL anodic stabiliser
- 2 μL of each pI marker
- 6 μL water

pI marker 至少震盪攪拌 1 分鐘，可存放在 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 一日。

2.5.2 準備檢品

為維持恆定的移動，檢品一定要置換成 tris buffer (pH 8.0) 緩衝液

- 取 100 μL 檢品置於 Amicon Ultra Filter 0.5 mL filtration unit.
- 放置在 Latter filtration unit 上
- 以 tris buffer 將體積補到 500 μL (加 400 μL tris buffer)
- 以 14,500 rpm 離心 10 分鐘
- 拋棄掉濾液，再加入 tris buffer 將體積補到 500 μL
- 以 14,500 rpm 離心 10 分鐘
- 以奇異筆在另一個新的離心管加入 10 μL tris buffer 後標記體積大小，再以微量吸管抽掉 tris buffer
- 將 filtration unit 倒置在前述已標記 10 μL 的離心管上
- 以 1,000 rpm 離心 2 分鐘
- 拋棄 filtration unit，並以 tris buffer 補到標記處(10 μL)
- 輕微震盪檢品，此檢品可進行下一步的製備

製備上機前檢品與空白對照品

Master mixture for a sample assay

200 μL urea cIEF gel
 12 μL pharmalyte 3-10 carrier
 2 μL anodic stabiliser
 2 μL pI 10.0 marker
 2 μL pI 9.5 marker
 2 μL pI 4.1 marker
 (10 μL Sample)

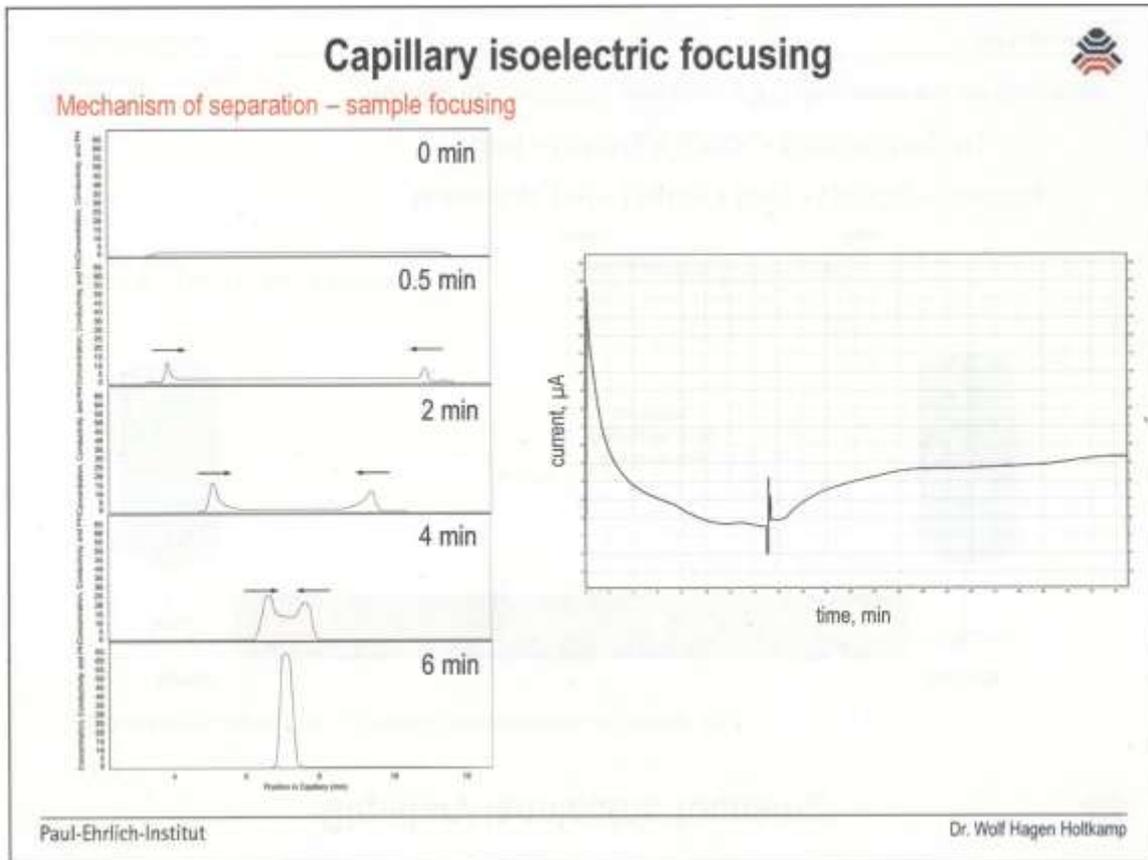
Master mixture for buffer-blank

200 μL urea cIEF gel
 12 μL pharmalyte 3-10 carrier
 2 μL anodic stabiliser
 2 μL pI 10.0 marker
 2 μL pI 9.5 marker
 2 μL pI 4.1 marker
 (10 μL Tris buffer)

- 混和震盪至少1分鐘，可存放在2-8 °C一日。
- 檢品起始濃度必須2-10 g/L，且需要以tris buffer稀釋到正確的濃度，前述濃度可適用於檢測各種抗體。
- 240 μ L的混和液與10 μ L的檢品務必震盪攪拌1分鐘以上。

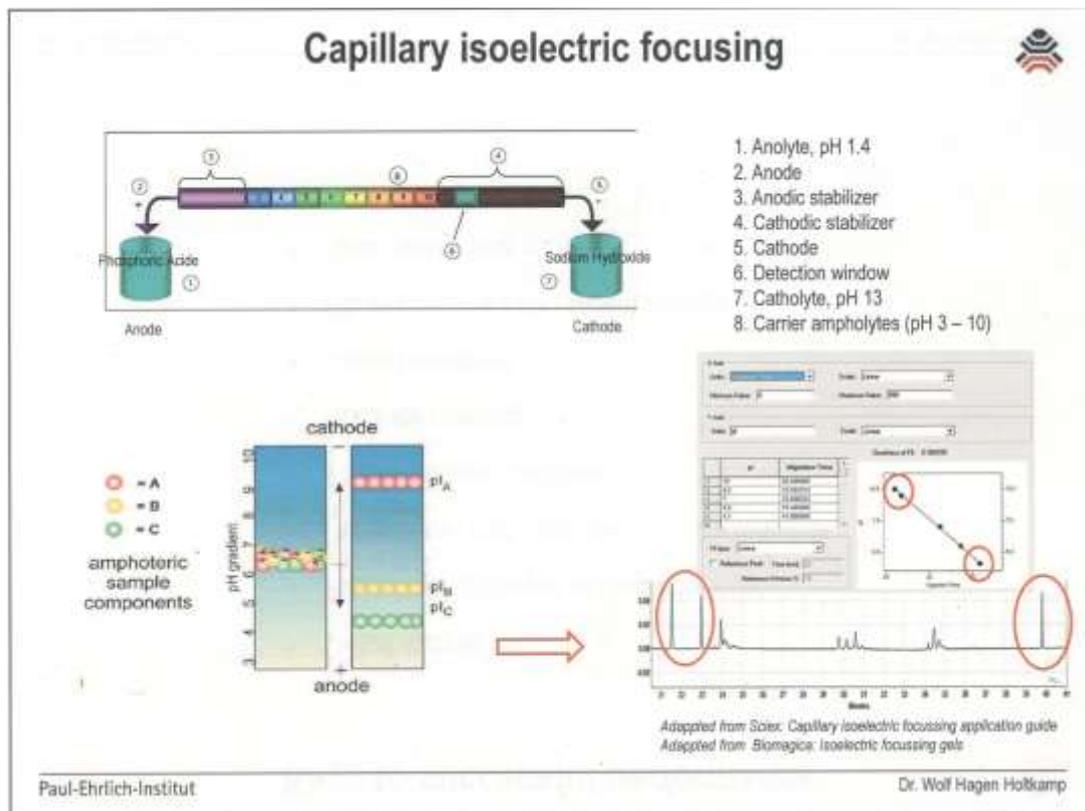
3 結果判讀

3.1 上機後觀察電流可獲得以下圖譜，於啟動6分鐘後毛細管內 pH 梯度已達到平衡狀態



圖三、毛細管等電聚焦圖。(資料來源:Dr. Wolf Hagen Holtkamp 簡報)

3.2 設定 pI marker 及其遷移時間(migration time)



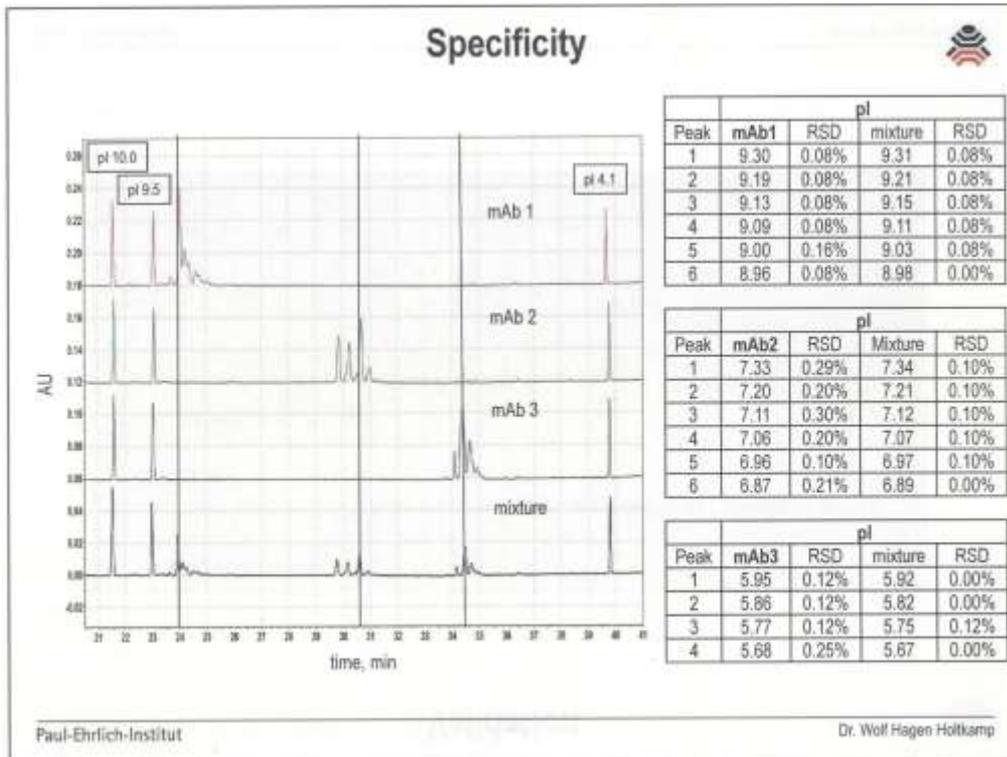
圖四、毛細管等電聚焦分子移動示意圖，由左側圖譜可設定pI與其相對應的遷移時間，由箭頭側第一個波峰為9.5，第二個為7，第三個為4.1，也可估出偵測極限（資料來源:Dr. Wolf Hagen Holtkamp 簡報）

3.3 方法確效

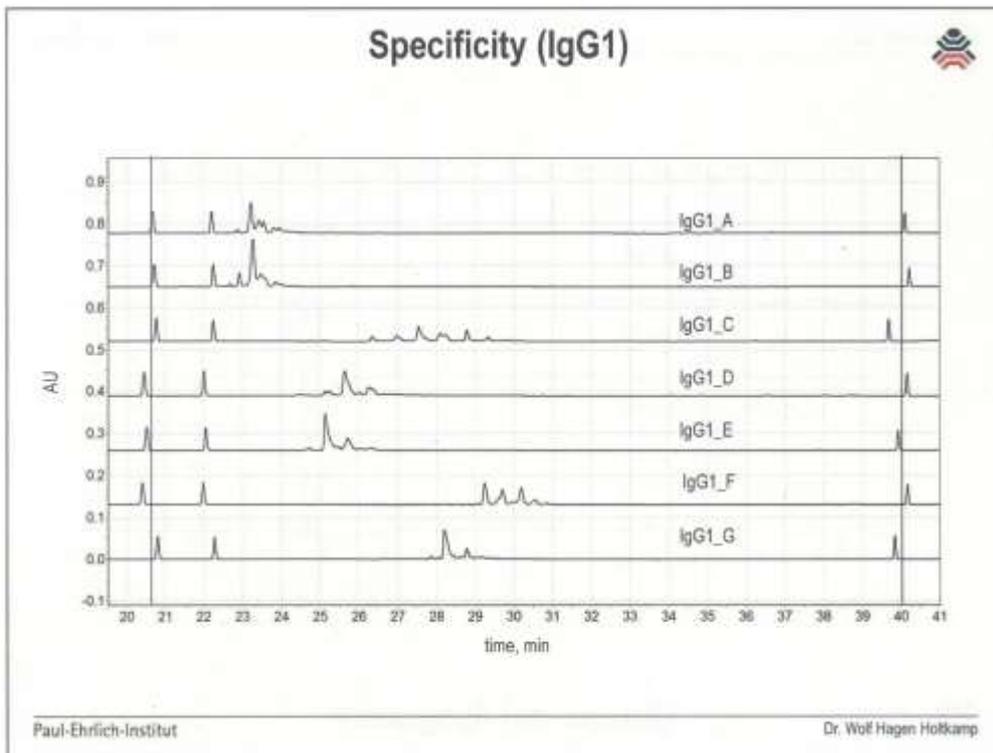
透過以下分析，依照此標準作業流程可精確分辨不同的 mAbs：

- Qualitative analysis
- According to ICH Q2(R1)(Validation of analytical procedures) ;
specificity, limit of detection
- Robustness and precision
- 6 mAbs (mAb 1-6) (IgG1, IgG2, IgG4)
- 7 IgG1 mAbs
- Co-mixing experiment

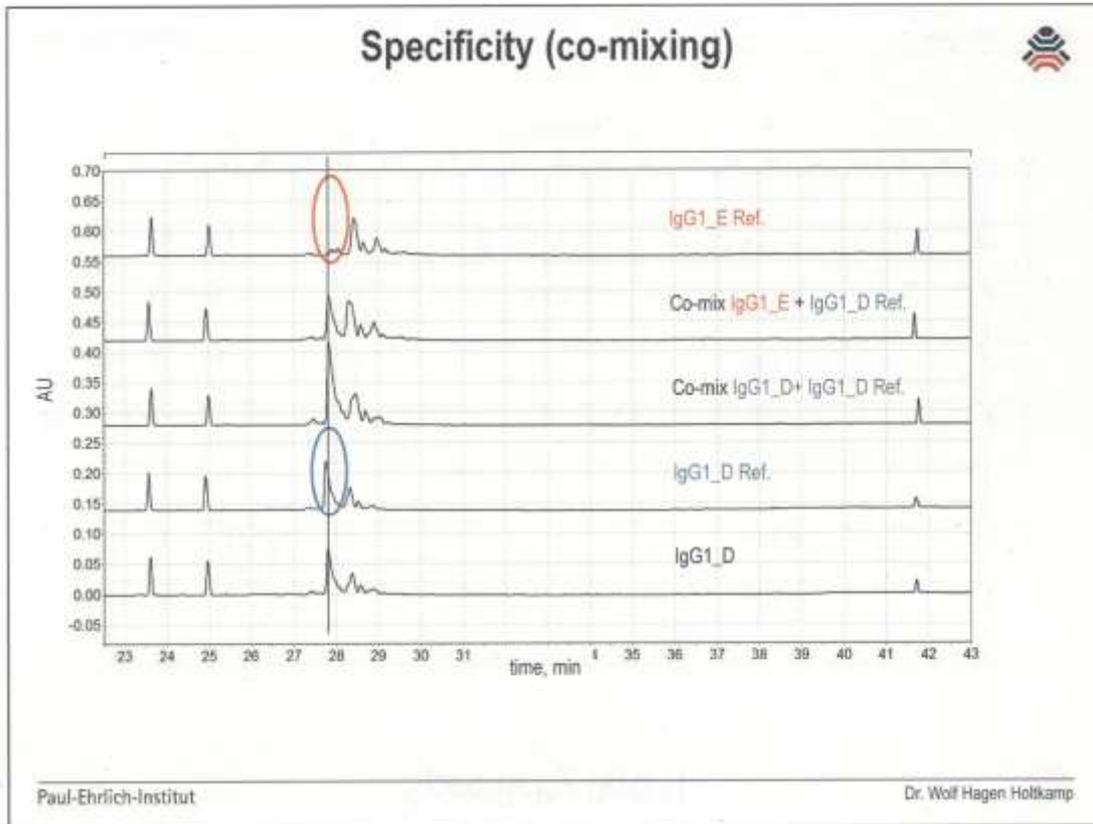
3.3.1 特異性分析(Specificity)



圖五、cIEF特異性分析圖，進行單一種mAb的cIEF可精確分辨出不同種類的mAb (IgG1, IgG2, IgG4)(資料來源:Dr. Wolf Hagen Holtkamp 簡報)

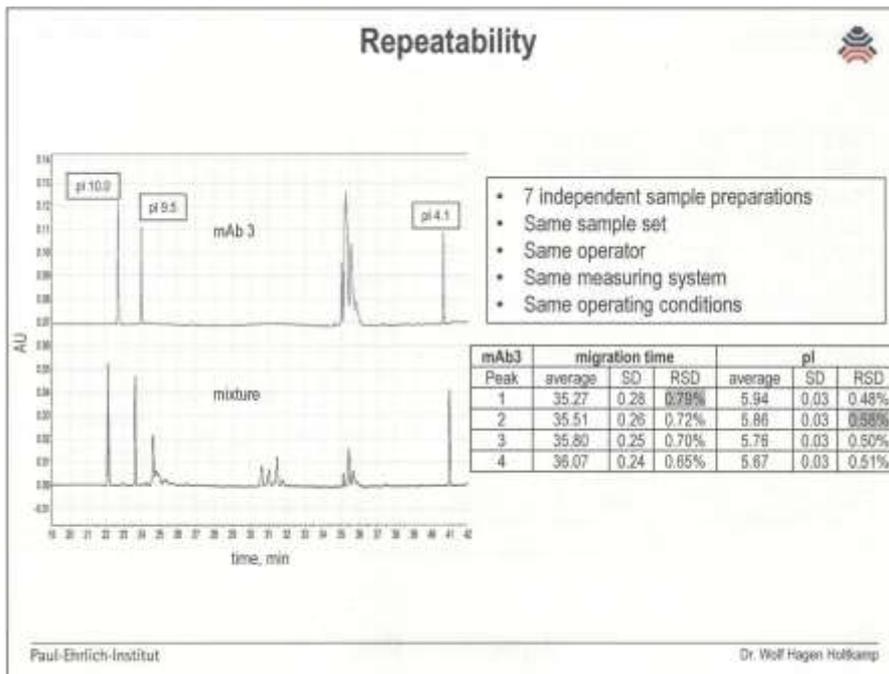


圖六、cIEF特異性分析圖(不同IgG)，即使是同一種IgG1也可由mAb上所帶的電荷不同而區分出6種types(資料來源:Dr. Wolf Hagen Holtkamp 簡報)



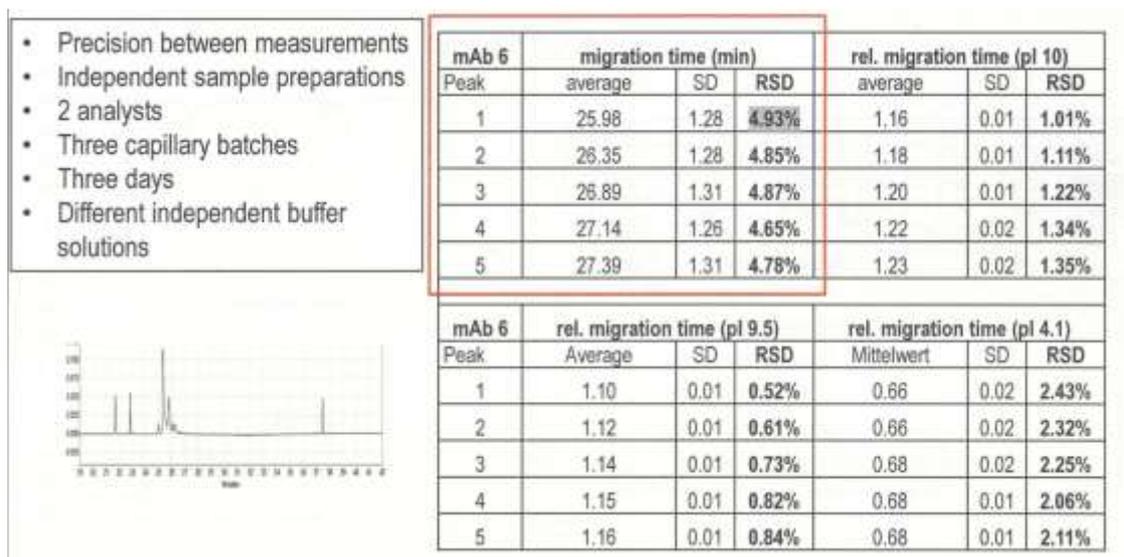
圖七、cIEF特異性分析圖(不同IgG混和後試驗)，透過混和後試驗可發現將IgG1_E與IgG1_D混和後各自的波峰皆能在圖譜中顯示在正確的時間位置，若混和IgG1_D及IgG1_D Ref.可發現主要波峰吸光值(AU)變為2倍，顯示透過cIEF也可以知道檢品中mAb相對的含量，初步估計所含的mAb量是否不同。(Qualitative analysis)。(資料來源:Dr. Wolf Hagen Holtkamp 簡報)

3.3.2 重複性(Repeatability)



圖八、cIEF 重複性分析圖，在同一位操作者重複 7 次獨立的試驗後可以發現標準差 (SD) 很小，migration time 最大的 RSD 僅 0.79%，pI 的最大 RSD 僅 0.58%，具有很高的試驗一致性。(資料來源:Dr. Wolf Hagen Holtkamp 簡報)

3.3.3 再現性(Reproducibility)



圖九、cIEF 重複性分析圖結果，由兩名不同操作者，使用 3 批不同的毛細管，分三天進行試驗，5 個波峰的最大 RSD 值為 4.93%，表示再現性高。(資料來源:Dr. Wolf Hagen Holtkamp 簡報)

3.3.4 系統適用性試驗允收標準 System suitability tests (SST) criteria

SST criteria

Run #	Status	Run Type	Phase	Sample Invert Inlet	Sample Invert Outlet	Sample Invert Duration	Sample ID	Method	FileName	Action	Owner
1		Unknown	T	SA1	SD-01-18.0	-SEP_20190227_081	-SEP_20190227_081	cIEF_Calibration.met	SEP_20190227_081.dat		Master file
2		Unknown	T	SA1	SD-01-18.0	-SEP_20190227_082	-SEP_20190227_082	cIEF_Calibration.met	SEP_20190227_082.dat		Blank
3		Unknown	T	SA2	SD-01-18.0	-SEP_20190227_083	-SEP_20190227_083	cIEF_Calibration.met	SEP_20190227_083.dat		Reference
4		Unknown	T	SA2	SD-01-18.0	-SEP_20190227_084	-SEP_20190227_084	cIEF_Calibration.met	SEP_20190227_084.dat		Reference
5		Unknown	T	SA3	SD-01-18.0	-SEP_20190227_085	-SEP_20190227_085	cIEF_Calibration.met	SEP_20190227_085.dat		Probe
6		Unknown	T	SA4	SD-01-18.0	-SEP_20190227_086	-SEP_20190227_086	cIEF_Calibration.met	SEP_20190227_086.dat		Probe
7		Unknown	T	SA4	SD-01-18.0	-SEP_20190227_087	-SEP_20190227_087	cIEF_Calibration.met	SEP_20190227_087.dat		Master file
8		Unknown	T	SA1	SD-01-18.0	-SEP_20190227_087	-SEP_20190227_087	cIEF_Calibration.met	SEP_20190227_087.dat		Master file
9		Unknown	T	SA1	SD-01-18.0	-SEP_20190227_087	-SEP_20190227_087	cIEF_Calibration.met	SEP_20190227_087.dat		Master file

SST criteria for sample set
5 pI marker mix:

- all marker peaks need to be detected in the electropherogram
- r^2 of the calibration curve > 0.980 (Goodness of fit)
- RSD of migration times of marker peaks from the first and last injection < 5.0-%

SST criteria for samples

- 3 pI-marker peaks need to be detected in the electropherogram
- No additional peaks in the electropherogram of the blank injection
- Calculated pI values from the calibration curve should not differ more than 0.1 units from the theoretical value (e.g. pI10 ± 0.1)
- RSD of migration times of sample peaks from the double injection < 2.0-%

Paul-Ehrlich-Institut Dr. Wolf Hagen Holtkamp

圖十、系統適用性試驗允收標準(cIEF)

- 在進行檢品測試前須確定的事項如下：
 - 所有的 pI 點(5 個)都必須被偵測到
 - 迴歸係數 $R^2 > 0.980$
 - 從起始到結束進樣，pI marker 波峰的 migration time RSD < 5.0%
 - 試驗後區確認的標準如下：
 - 3 個 pI marker 都必須被偵測到
 - 在空白區不能發現有額外的波峰
 - 從 calibration curve 計算後的 pI 值不能超出理論值 0.1 (例如:pI 10 ± 0.1)
 - 重複 2 次進樣波峰之 migration time RSD < 2.0%
- (資料來源:Dr. Wolf Hagen Holtkamp 簡報)

4 結論

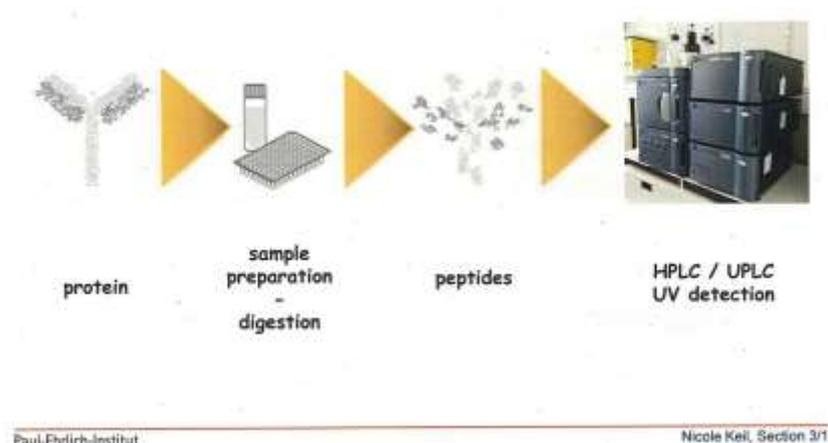
透過 cIEF 檢測 mAbs 物化特性是鑑別出 mAbs 快速且有效的方式，cIEF 具有良好的再現性，能分辨出不同 mAb 間微小的差異而進行鑑別，但 cIEF 中 migration time 易受到檢測環境的影響，故建立穩定一致的檢測微環境，對於未來要進行 mAbs 品質監測是很重要的一環；除此之外，cIEF 僅能透過比較圖譜獲得相對定量，仍需要再建立精確定量的檢測方法，未來仍需建立一般常規性的檢測方式來把關 mAbs 而非僅用於檢測偽造或不法藥物，也需建立能鑑別 mAbs biosimilars 的鑑別資料庫及可以被製藥工業接受的出廠前檢測技術。

二、以 UPLC 進行胜肽圖譜(Peptide mapping)進行單株抗體鑑別

1 原理與方法

將檢品稀釋到適當的反應濃度(5 mg/mL protein)，該檢品以 6M 的 guanidine/tris/EDTA buffer 變性蛋白質分子，再以 dithiothreitol, (DTT)還原雙硫鍵，加入 Iodoacetamide, IAM 將還原的-SH 基團烷基化避免-SH 基團氧化，再透過置換 buffer，再以胰蛋白酶水解

(於 37°C 最少 16 小時)最後再透過 UPLC 以 C18 管柱分離 peptides，經過 UV detector 獲得單一種蛋白質的獨特性圖譜示意如下圖。(資料來源:Nicole Keil 簡報)



圖十一、胜肽圖譜流程示意圖

2 設備及材料(研習單位提供)

2.1 儀器

儀器名稱	儀器名稱
Quaternary Solvent Manager (QSM)	TUV Detector (TUV)
Sample Manager Flow-Through-Needle (SM-FTN)	Thermostat plus
Column Manager-A (CMA)	Centrifuge (Multifuge X1R)

2.2 耗材

名稱	供應商
ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 130Å, 1.7 μ m, 2.1 mm X 100 mm	Waters
Amicon Ultra-15mL	Merck
PCR Tubes (可使用不同廠牌同等品)	Sarstedt
Sample vials	Waters

2.3 試藥與試劑

試藥/試劑	CAS No.	供應商
Water**	-	PEI
Acetonitril HiPerSolv	75-05-8	VWR

Formic acid*	64-18-6	Fisher Scientific
Trifluoro acetic acid*	76-05-1	Sigma
EDTA Disodium salt di-hydrate (Titriplex III)*	381-92-6	Merck
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (TRIS)*	77-86-1	Sigma Aldrich
Guanidine hydrochloride*	50-01-1	Sigma Aldrich
Acetic acid (glacial) 100%*	64-19-7	Merck
Dithiothreitol (DTT)*	3483-12-3	Sigma Aldrich
Iodoacetamid (IAM)*	144-48-9	Serva
Calcium chloride dihydrate*	10035-04-8	Sigma Aldrich
HCl 1 mol/L*	/	Merck
Trypsin	/	Promega
Methanol (Lichrosolv gradient grade)*	/	1.06007.2500

*可替換不同廠牌同等級之試藥與試劑

**可使用ultrapure water, autoclaved or “Water LiChrosolv from Merck (1.15333)”

3 溶液製備

3.1 變性緩衝液 Denaturation buffer (Guanidine-tris(hydroxymethyl)aminomethane-EDTA buffer 6 M Guanidine)

- Titriplex III 0.018 g
- TRIS 2.2 g
- Guanidine hydrochloride 28.7 g
- Water 20 mL

以100%的 acetic acid調整pH至8.6，再加水至50 mL，室溫保存。

3.2 Dithiothreitol (DTT) (154 g/mol) 1mol/L

取 50 mg 的 DTT 溶於 324.7 μ L 水中，室溫保存。

3.3 IAM (185 g/mol) 1mol/L

取 50 mg 的 IAM 溶於 270.3 μ L 水中，室溫保存。

3.4 CaCl₂·2H₂O (147 g/mol) 0,01 mol/L

取 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.074 g 溶於 50 mL 水中，室溫保存。

3.5 Tris buffer (pH 7.5)

- TRIS 1.21 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01mol/L ° 10 mL
- Water 900 mL

以 1 mol/L HCl 調整 pH 至 7.5 後再補水至 1 L，室溫保存。
配製 Tris buffer 時需新鮮配製。

3.6 終止反應溶液 Stop solution (1% formic acid in water)

取 10 μL formic acid 溶於 990 μL 水中，室溫保存。

3.7 移動相 A (Mobile Phase A)

取 0.3 mL trifluoro acetic acid 溶於 500 mL 水中，室溫保存。

3.8 移動相 B (Mobile Phase B)

取 0.15 mL trifluoro acetic acid 與水 25 mL 加入 225 mL acetonitril HiPerSolv 中，室溫保存。

3.9 Methanol solution 20%

取 200 mL methanol 溶於 800 mL 水中，以 0.22 μm 濾膜過濾後室溫保存。

4 執行試驗

4.1 準備檢品

4.1.1 變性、還原及烷基化檢品(Denaturation, reduction and alkylation)

- 將待測檢品、參考物質與對照抗體以水稀釋至蛋白濃度 5 mg/mL。
- 前一步驟物質各取 400 μL 分別加入 600 μL denaturation buffer，並且混和均勻。
- 加入 1 M DTT 溶液混和均勻後 spin down，於 37°C 作用 65 分鐘(± 5 分鐘)。
- Spin down 檢品加入 20 μL 1M IAM 溶液，混和均勻後在室溫避光作用 17 分鐘(± 2 分鐘)。
- 加入 10 μL DTT 並混和均勻。

4.2 置換緩衝液(Rebuffering)

4.2.1 空白組 Blank:

不須置換 buffer，僅需取 10 μL blank 加入 140 Tris buffer 後，取 100 μL 加入 100 μL Tris buffer 即可。

4.2.2 待測檢品與參考物質

- 以 Amicom 加入 15 mL 水，於 10°C 用 3000 g 離心 40 分鐘，清除濾液(潤濕 Amicon 濾膜)。
- 取 1mL 檢品放入 Amicom。
- 加入 14 mL Tris buffer，於 10°C 用 3000 g 離心 1 小時 15 分鐘(直到體積小於 1 mL)。
- 以微量吸管估計剩下檢品體積，將檢品以下表稀釋到檢品濃度為 1 mg/mL。

表一、檢品稀釋表

Amicon 殘留體積	濃度[mg/mL]	後續反應使用之總體積	
		檢品[μL]	Tris [μL]
1100	1.82	100	82
1050	1.90	100	90
1000	2.0	100	100
950	2.1	100	110
900	2.22	100	122
850	2.35	100	135
800	2.5	100	150
750	2.67	100	167
700	2.86	100	186
650	3.08	100	208
600	3.33	100	233

4.2.3 分解蛋白(Digestion)

- 取 100 μL 待測檢品、參考物質與空白組於 PCR 小管內，加入濃度為 0.5 mg/mL 的 Trypsin
- 混和均勻後於 37°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) 作用 16-22 小時。

- 加入 10 μ L 1% formic acid 終止反應。
- 取 100 μ L 到 sample vial，並且確實使用 pre slit lids。
- 可使用 UPLC 搭配 UV detector 進行分析。
- 檢品可至於 5°C 儲存 1 個星期。

4.3 色層分析 Chromatography

4.3.1 設定 UPL 條件

- 使用的 UPLC 是 ACQUITY UPLC H Class System 軟體是 Chromatography Software Waters Empower
- 溶液管線配置：
 - A: mobile phase A
 - B: mobile phase B
 - C: Acetonitril 100%
- 檢查所需的溶液體積至少 250 mL 以上
- 選擇必要的程式與 UPLC_UV in Empower
- 在 QSM 點選滑鼠右鍵，打開控制台選取控制儀器
- 開啟系統點選 Control tab，使用 default 設定
- 設定參數請見下表

表二、UPLC 參數設定表

Prime Solvents:	Equilibrate to Method
All line and Seal Wash 7 min	A 100% Flow: 0.21 mL/minute
Wash solvent 120 sec	Sample temp: 4°C
Purge solvent 20 cycles	Column temp: 30°C
	Column selection: Column 2

4.3.2 檢驗流程

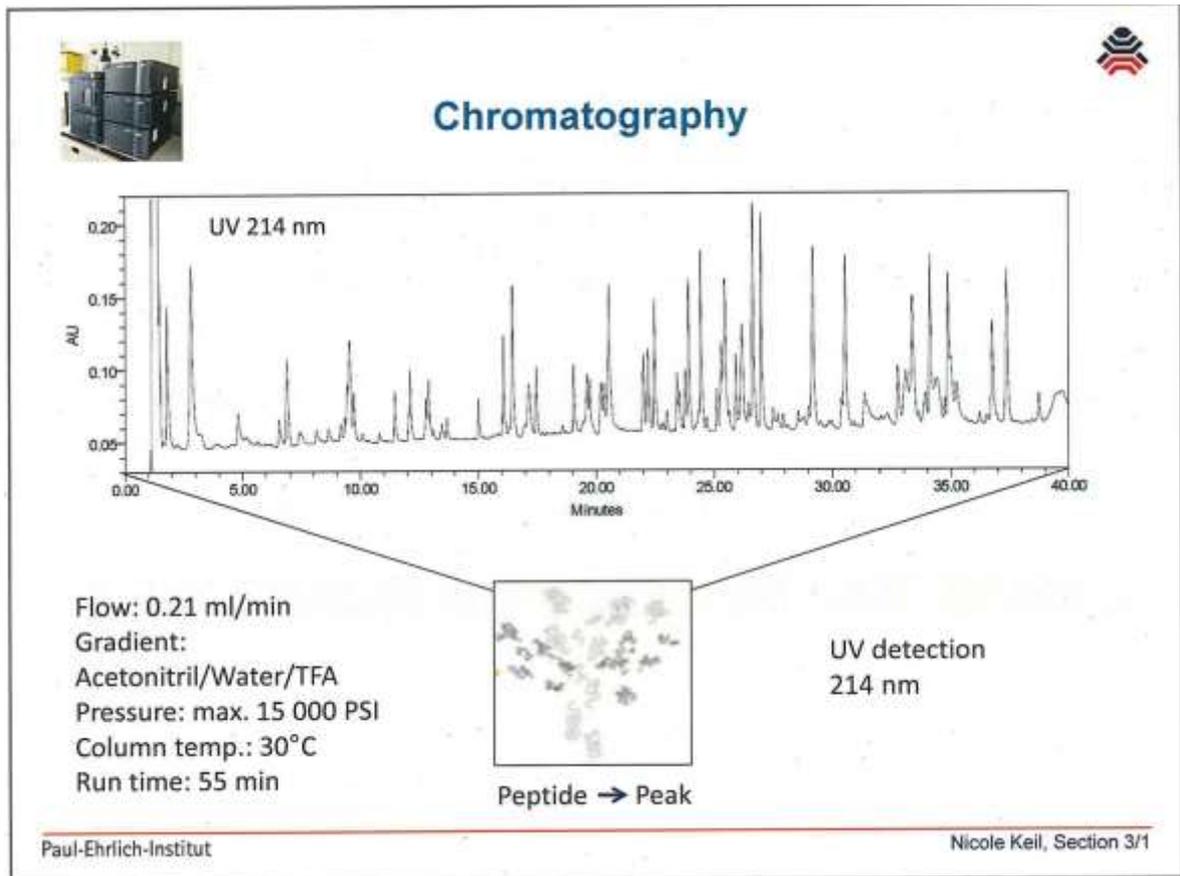
- 開啟檢品前置作業(pre-prepared sample)選擇” Template_PepMap” 輸入檢品名稱、column 名稱及 serial number
- Chromatography 儀器顯示之 method 為” PeptideMap_IM”

- 流速: 0.21 mL/min
- 最大壓力: 15000 PSI
- Method Set: PeptideMap_MS
- Inj. Volume: 10 μ L
- 分析時間: 55 分鐘

4.3.3 系統完成 System completion

- 以流速 0.3 mL/min 用 ACN 潤濕 column
- 完成前一步驟後再設定為 bypass 模式
- 以 20% methanol 潤濕儀器

5 結果分析

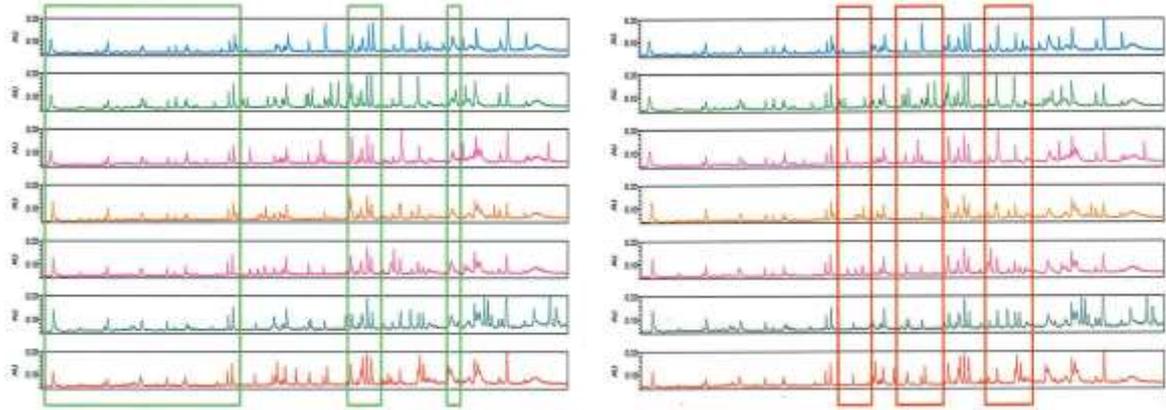


圖十二、圖譜示意圖，透過 UPLC 將檢體中 mAb 分解為 peptide 再轉變成圖譜供分析比對(資料來源:Nicole Keil 簡報)

6 方法確效

6.1 特異性(Specificity)

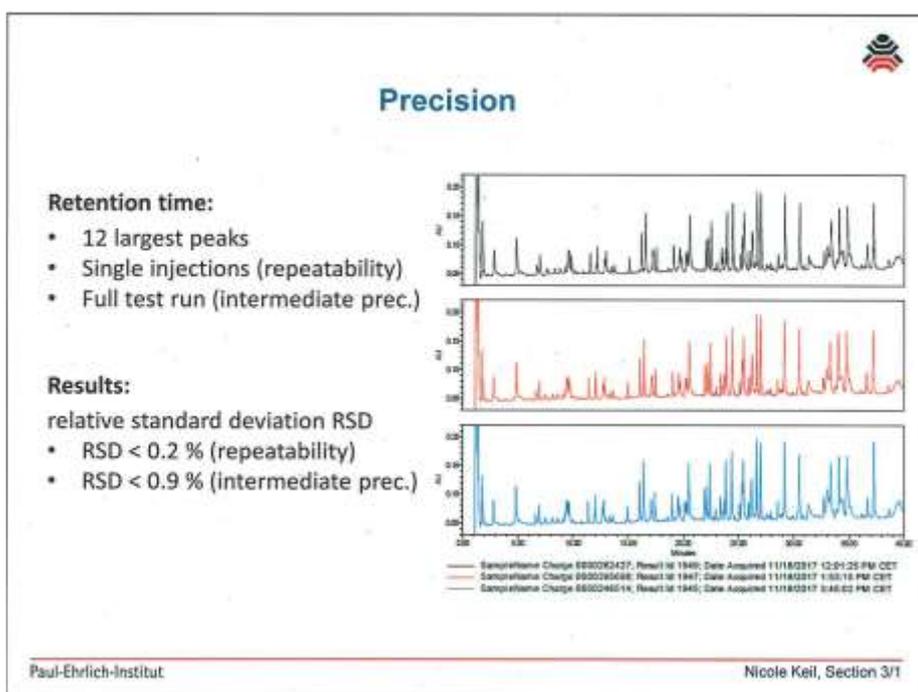
由下列兩張圖示可分辨出左圖是透過 UPLC 圖譜比對 7 種不同的 mAbs 所得到具有相同 migration time 及大小波峰的部分，右圖則是不同的部分。(資料來源:Nicole Keil 簡報)



圖十三、特异性示意圖(左：相同的波峰，右：相異的波峰)

6.2 精確度(Precision)

重複性(Repeatability): 透過 9 次的進樣來評估；中間精密度(intermediate precision): 透過 3 次完整的試驗，3 位不同的試驗人員，每次試驗間隔數天；評估條件(Evaluation): 12 個特定波峰，在進樣相同檢品濃度時，波峰會因為酵素分解的關係、胜肽濃度與 column load，產生相等或偏高的現象。若滯留時間(retention time)產生偏移(shifts)主要原因是改變緩衝液(buffer change)或是 column load，但在完整的一次試驗中滯留時間偏移是非常有限的；在相對標準偏差(Relative standard deviation, RSD)方面，重複性的 $RSD < 0.2\%$ ；中間精密度的 $RSD < 0.9\%$ 如下圖。(資料來源:Nicole Keil 簡報)



圖十四、精準度示意圖

6.3 系統適用性試驗允收標準(System suitability tests (SST) criteria)

採用 2 種標準參考物質(Standard reference material)

1. Peptide standard (SST sample “pep-ox”)

確認 UPLC system 及 separation 穩定。

2. MAB standard (Herc-ox)

用於比較 Herc-ox 及 Pep-ox 的波峰。

3. 假設有 5 個 control 波峰，全部都要能被偵測到，太近的波峰的解析度要一致。

4. Retention time 及 波峰面積之 SD 值。

6.4 穩健性(Robustness)

Parameter	Result
Stability of mobile phases	4 weeks
Column batch and age	Non-critical
Column temperature	30 °C
Digestion	16-22 hours
Trypsin batch	Non-critical
Digestion temperature	35-39 °C
Carry over	Non-critical

肆、心得與建議

一、技術研習心得

本次研習主要為運用 cIEF 及 UPLC peptide mapping 針對蛋白質藥物之物化特性進行快速的鑑別試驗，透過 cIEF 搭配特定 pI marker 的電泳方式，可在一日內即可初步分析待測檢品是否為偽造藥物或是成分為達到標示劑量之劣藥，且僅需在初次試驗時取得合格的原廠蛋白質藥物或其原廠標準品，即可快速分析達到快速鑑別之目的。

而 UPLC peptide mapping 係透過同一次檢驗，取得經分解後之胜肽圖譜，具有良好之可比較性，但進行每一次檢驗皆需要取得標準參考物質並同時上機，檢驗單位需花費較高之成本購買原廠生產之蛋白質藥物標準品或是已放行之藥物成品；另外，在整體檢驗時間上 UPLC peptide mapping 需經過 16-22 小時的 Trypsin Digestion 所花費的時間較長才能獲得圖譜。

二、研習後建議

使用 UPLC peptide mapping 可以透過後續質譜儀分析(cIEF 也可透過串接進行後續質譜分析)，獲得完整的蛋白質藥物胺基酸序列，可建立完整的蛋白藥物產品資料庫，目前本署已具有與德國 PEI 實驗室相同之 UPLC 及相關軟體，故於本次研習取得操作手冊與相關標準作業流程，可著手建立本署因應未來須調查偽造與不法單株抗體藥物之 UPLC peptide mapping 檢驗標準作業流程，惟 cIEF 方面本署刻正辦理採購 CE 儀器，新購之 CE 為新款，操作上與舊款略有差異，建請於新購置儀器後建立相關檢驗標準作業流程。

伍、 附錄



德國聯邦疫苗及生物藥品管理局【Federal institute for vaccines and biomedicines (Paul Ehrlich Institute, PEI)】正門照片



參加研習全員合照



與本次研習 PEI 主要講者
Dr. Wolf Hagen Holtkamp 合影



與義大利 ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA
Dr. Marino Francesco 合影



與法國 ANSM 的 Dr. Bouderbala Ahlem (中)及比利時 SCIENSANO 的 Dr. Vanhee
Celine(右)合影



與丹麥 Danish Medicines Agency 的 Dr. Loasby Al-Sayed Josue 合影