

單株抗體Durvalumab檢驗方法之評估研究

巫博智 詹鈞凱 陳怡帆 王嘉宇 許家銓 林美智 曾素香 王德原

食品藥物管理署研究檢驗組

摘 要

單株抗體(monoclonal antibody)製劑多以基因工程技術由細胞培養而成，製程繁複且可能有蛋白質轉譯後修飾變異之風險，本研究擬建立癌細胞程序死亡配體programmed death-ligand 1 (PD-L1)抑制劑durvalumab之分析方法。本研究運用新興技術建立單株抗體製劑品質檢驗研究評估體系，除以液相層析四極柱飛行時間串聯式質譜儀(liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometer, LC-Q-TOF)與毛細管電泳分析儀分析durvalumab之物理化學特性，亦建立生物活性檢驗方法。結果顯示，durvalumab之主要醣化結構為G0F，次要醣化結構為G1F、G0及G2F。重鏈(heavy chain, HC)與輕鏈(light chain, LC)之分子量分別為50,908.95 Da與23,570.99 Da，以胰蛋白酶(trypsin)進行前處理後，比對HC與LC胺基酸序列涵蓋率達100%，並確認16對雙硫鍵鍵結位置。還原與非還原態之毛細管電泳分析(CE-SDS)，結果顯示其純度分別為99.99%與92.52%，電位異質性分析顯示主要波峰之面積為67.53%，酸性波峰之面積總和為23.35%，皆符合原廠規定。生物活性分析方法結果顯示，本實驗方法之可重複性為5.95%且中間精密度為8.81%，不同durvalumab濃度下反應之 R^2 值為0.996且回收率介於86.77% - 117.76%。本研究所建立之durvalumab單株抗體檢驗分析方法，可供品質管制之參考，未來亦可運用於產品上市後品質監測之參考方法，確保國人用藥安全。

關鍵詞：單株抗體、液相層析四極柱飛行時間串聯式質譜儀、毛細管電泳分析儀、PD-L1

前 言

新興生物藥品應用在醫療銷售比重自99年的18%逐漸增加至107年的28%，據統計，107年全球生物藥品銷售額約為2430億美金，年成長幅度達9.2%，然整體藥品成長率僅小於4.5%⁽¹⁾。新興生物藥品如單株抗體等之主要結構為胜肽或蛋白質並經基因工程技術製成。相對於化學合成而言，以微生物發酵或是細胞培養，其培養環境、參與成分及生物代謝複雜且

多變，因此生產生物藥品時，其結構及相關後修飾作用等品質管控相當重要。任何製程的改變都應考量再次進行確效，以降低蛋白質結構的不確定性。目前各國藥典對於生物藥品之特性描述區分為物化特性分析與生物活性分析，而傳統的物化分析方法無法有效分析其結構及相關後修飾物，再加上不同細胞種類及生產批次所製造產品之生物活性可能亦存在些微不同，因此建立此類藥品物化特性及功能性檢驗分析平台將是未來生物藥品鑑別與品質維護的

趨勢。以往以化學合成為主的小分子藥物，因其構造及分子量相較於蛋白質分子較為簡單，僅需使用液相層析儀就可明確對於小分子藥物進行定性與定量。隨著近年來科技提升、生物資訊與分析技術更加成熟，新興生物藥品須透過液相層析串聯質譜儀的分析方法來進行其結構分析⁽²⁾。

105年全球生物藥品銷售狀況，以單株抗體產品擁有最高的銷售額，達808億美金⁽³⁾，其中癌症治療藥物durvalumab即為單株抗體產品之一。據經濟部108年生技產業白皮書⁽⁴⁾統計資料顯示107年全球銷售額前十大生物藥品中有七種為單株抗體產品。由於durvalumab相關專利到期後預期相似藥品將逐漸上市，為因應相關產品將逐漸增加，本研究以durvalumab為標的建立單株抗體分析方法與藥品身份資料。

Durvalumab為全人源之單株抗體製劑，其構型為IgG1之免疫檢查點抑制劑(check point inhibitor)，藉由抑制PD-L1來調控T淋巴細胞的功能以造成癌細胞的凋亡，可有效控制晚期非小細胞肺癌之治療方式。Durvalumab生產並純化自基因工程改造之中國倉鼠卵巢細胞(chinese hamster ovary cell, CHO)懸浮液⁽⁵⁾，並以親合性及離子交換層析純化後獲得。Durvalumab的平均分子量約為150 kDa，具16對雙硫鍵鍵結於Asn301具有醣基化結構⁽⁶⁻⁹⁾。

本研究以durvalumab為目標，建立前處理步驟(含透析、酵素消化與去鹽純化)並以液相層析四極柱飛行時間串聯式質譜儀為分析儀器⁽¹⁰⁾，透過top-down、middle-down及bottom-up等三種不同分析方法⁽⁶⁾，及毛細管電泳分析儀以建立其分子量、胺基酸序列、雙硫鍵鍵結位置、純度及蛋白質轉譯後修飾等檢驗方法及特徵資料庫。並運用生物測定法建立durvalumab功能性檢驗分析平台，藉由細胞間免疫檢查點之抑制程度評估其生物活性。盼所建立之檢驗方法可應用於單株抗體藥品檢驗基準之制定並

作為食藥署及產業界品質管控之參考依據，亦供未來上市後產品品質監測之方法依據，確保國人用藥品質安全。

材料與方法

一、物化分析之材料

(一)樣品來源：Durvalumab市售品(Catalent Indiana LLC, USA)。

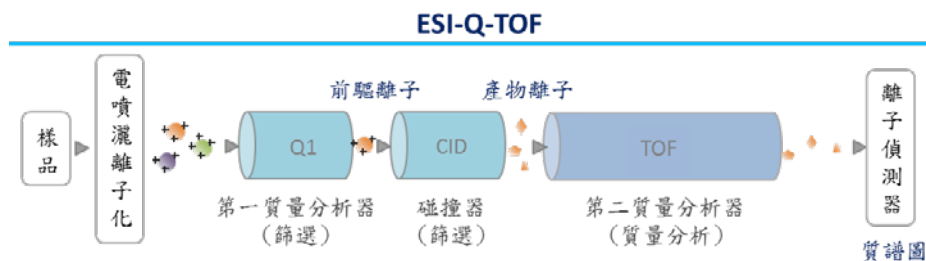
(二)試劑：碳酸氫銨(Sigma, USA)、二硫蘇糖醇(Sigma, USA)、碘乙醯胺(Sigma, USA)、胰蛋白酶(Promega, USA)、胰凝乳蛋白酶(Promega, USA)、甲酸(Sigma, USA)、乙酸(Merck, Germany)、乙腈(J.T. Baker, USA)、RapiGest (Waters, USA)、磷酸(Sigma, USA)、氫氧化鈉(Merck, Germany)、精胺酸(Sigma, USA)、亞胺基乙二酸(Sigma, USA)、毛細管等電點聚焦(capillary isoelectric focusing, cIEF)膠體聚合溶液(AB Sciex, USA)、pI標記套組(AB Sciex, USA)、CEQ樣品上樣液(AB Sciex, USA)、尿素(Sigma, USA)。

(三)儀器設備

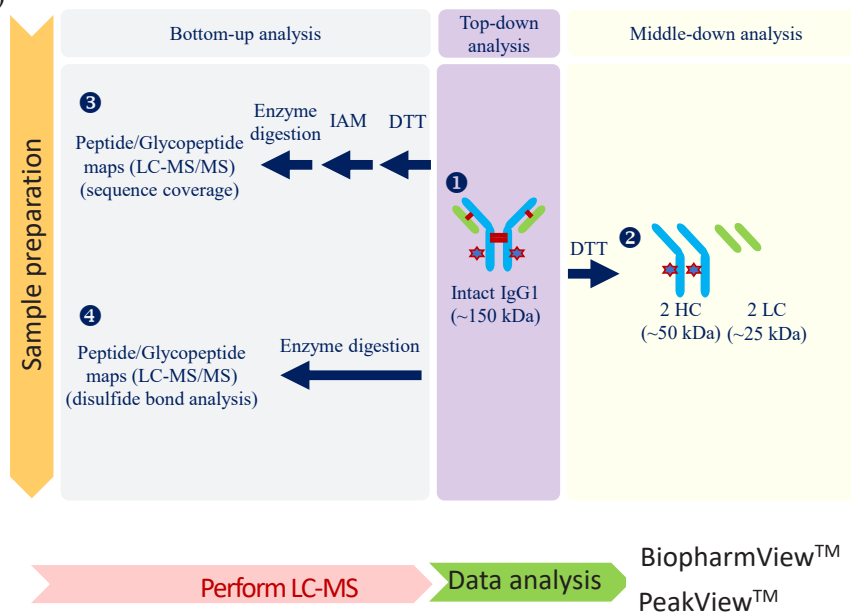
1. ZipTip (10 µL C18, Millipore, USA)
2. 透析裝置(Slide-A-Lyzer 2K MWCO, Thermo, USA)
3. 超音波振盪器(Delta Sonicator DC300H, Stillwater, MN, USA)
4. 離心機(3740, Kubota, Japan)
5. 恆溫乾燥箱(Memmert 854, Schwabach, Germany)
6. 超微量分光光度計(2000/2000c, NanoDrop, USA)
7. 高通量快速蒸發濃縮系統(EZ-2, Genevac, USA)
8. 超高效液相層析系統(UltiMate 3000 Rapid Separation LC system, Thermo,

- USA)
9. 完整蛋白分析用液相層析管柱(Acquity UPLC® BEH C4 column, 300 Å, 2.1 × 100 mm, 1.7 µm, Waters, USA)
 10. 胜肽分析用液相層析管柱(Acquity UPLC® BEH C18 column, 2.1 × 150 mm, 1.7 µm, Waters, USA)
 11. CE-SDS管柱(fused-silica capillaries of 50 µm ID, 20 cm, AB Sciex, USA)
 12. cIEF管柱(LLC eCAP neutral capillary 50µm ID, 67 cm total length, AB Sciex, USA)
 13. 四極柱飛行時間串聯式質譜儀(TripleTOF®5600 System, AB Sciex, USA)，搭配電噴灑游離法(electrospray ionization, AB Sciex, USA)。本研究所使用之ESI-Q-TOF質譜分析概念如圖一a所示
 14. 質譜資料之分析軟體BioPharmaView™ 3.0 (AB Sciex, USA)及PeakView™ 2.2

(a)



(b)



圖一、本研究使用ESI-Q-TOF質譜分析法示意圖

(a)質譜儀之檢品離子化與離子篩選流程；(b) Durvalumab分析流程圖

(AB Sciex, USA)

15. Capillary electrophoresis system (PA 800 plus, AB Sciex, USA)

二、效價分析之材料

(一)樣品來源：Durvalumab市售品(Catalent Indiana LLC, USA)、Durvalumab對照標準品(Vetter Pharma-Fertigung GmbH & Co. KG, Germany)。

(二)細胞：PD-1 effector cells (Promega, USA)、PD-L1 aAPC/CHO-K1 cells (Promega, USA)。

(三)試劑：RPMI 1640 medium (Promega, USA)、Ham's F-12 medium (Promega, USA)、Fetal bovine serum (Promega, USA)、Bio-Glo™ luciferase assay substrate (lyophilized) (Promega, USA)、Bio-Glo™ luciferase assay buffer (Promega, USA)、磷酸鹽緩衝生理食鹽水(Merck, Germany)、胰蛋白酶(Sigma, USA)、Cell counting Kit-8 (Sigma, USA)。

(四)儀器設備

1. ELISA Reader (SYNERGY Mx., Biotek, USA)
2. 生物安全櫃(ABS1200C LS2-MK-2, Bioquell, UK)
3. 二氧化碳培養箱(MCO-19AIC, Sanyo, Japan)

三、物化分析法

(一)Top-down分析法

1. 溶液製備

(1)取約100 µg蛋白質濃度之檢液置於透析裝置，再將其置於50 mM碳酸氫銨溶液50 mL內，於4°C靜置，隔天再更換新的50 mM碳酸氫銨溶液50 mL靜置4小時後，取出檢液。

(2)分裝每管約含10 µg檢品至1.5 mL離

心管，置入設定37°C的真空幫浦抽乾液體後，於-20°C儲存或是以20 µL層析沖提液A(含0.1%甲酸)回溶其最後濃度為0.5 µg/µL，再上機分析。本研究對於durvalumab分析流程如圖一b所示。

2. 測定

(1)液相層析四極柱飛行時間串聯式質譜儀條件

層析管柱：ACQUITY UPLC BEH C4 300 Å, 2.1 × 100 mm, 1.7 µm

樣本分析時間：30 min

層析管柱溫度：60°C

流速：0.4 mL/min

注入量：10 µL

離子源：電噴灑正離子模式

3. 結果判定

利用軟體BioPharmaView™ 3.0及PeakView™ 2.2分析質譜數據。

(二)Middle-down分析法

1. 溶液製備

(1)取適量體積之50 mM碳酸氫銨溶液直接溶解檢體做為檢液。

(2)透析：取約100 µg蛋白質濃度之檢液置於透析裝置，再將其置於50 mM碳酸氫銨溶液50 mL內，於4°C靜置，隔天再更換新的50 mM碳酸氫銨溶液50 mL靜置4小時後，取出檢液。

(3)蛋白酶分解作用：取檢液約20 µg分別加入二硫蘇糖醇(使其最後濃度為10 mM)於60°C靜置30分鐘，並以微量吸管上下吸取方式而非用渦流等劇烈方式混勻樣本，室溫下於13,000 × g的條件下，離心10分鐘，吸取上清液。

(4)分裝每管約含10 µg檢品至1.5 mL離心管，置入設定37°C的真空幫浦抽乾液體後，以20 µL層析沖提液A(含

0.1%甲酸)回溶後，使其最後濃度為0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，再上機分析。

2. 測定

(1)液相層析四極柱飛行時間串聯式質譜儀條件

層析管柱：ACQUITY UPLC BEH C4 300 Å, 2.1 $\times$ 100 mm, 1.7 μm

樣本分析時間：30 min

層析管柱溫度：60°C

流速：0.3 mL/min

注入量：10 μL

離子源：電噴灑正離子模式

3. 結果判定

利用軟體BioPharmaView™ 3.0及PeakView™ 2.2分析質譜數據。

(三)Bottom-up分析法

1. 溶液製備

(1)取適量體積之50 mM 碳酸氫銨溶液直接溶解檢體做為檢液。

(2)透析：取約100 μg 蛋白質濃度之檢液置於透析裝置，再將其置於50 mM 碳酸氫銨溶液50 mL內，於4°C靜置，隔天再更換新的50 mM 碳酸氫銨溶液50 mL靜置4小時後，取出檢液。

(3)還原作用：將檢液加入3 μL 之0.5 M 二硫蘇糖醇，使其最後濃度為5 mM 二硫蘇糖醇。並以微量吸管上下吸取方式而非用渦流等劇烈方式混勻樣本。於60 $\pm$ 2°C靜置30分鐘後，改置於室溫靜待回至室溫。

(4)烷化作用：將上一步處理後之檢液加入3 μL 之0.5 M碘乙醯胺，使其最後濃度為15 mM碘乙醯胺，並以微量吸管上下吸取方式而非用渦流等劇烈方式混勻樣本，於室溫下避光靜置30分鐘。

(5)蛋白酶分解作用：取上一步處理後之檢液加入不同酵素如胰蛋白酶(1：

50)於37°C靜置18小時，加入10%甲酸，使其最後濃度為0.5% (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)以終止反應，並以微量吸管上下吸取方式而非用渦流等劇烈方式混勻樣本，於室溫下離心13,000 $\times g$ ，時間10分鐘，吸取出上清液為含胜肽片段之檢液。

(6)以C18材質之ZipTip再次純化胜肽及去鹽處理：取10 μL pipette接上一支新的ZipTip，下列前二步為活化並平衡ZipTip：(a)吸取100%乙腈10 μL 置換2次以活化ZipTip (過程須棄置廢液)，(b)再以0.1%甲酸置換3次(過程須棄置廢液)，(c)吸附樣品：重複吸取10次之上一步處理後胜肽檢液(過程須回收檢液)，(d)清洗樣品雜質：以0.1%甲酸置換3次(過程須棄置廢液)，(e)沖提樣品：以乙腈/甲酸/水(50：0.1：49) 10 μL 置換5次(過程須回收檢液)，(f)沖提樣品：以乙腈/甲酸/水(75：0.1：24.9) 10 μL 置換5次(過程須回收檢液)，(g)重複(a)-(f)步驟四次，(h)再將(e)及(f)混於至同一管1.5 mL離心管，此時每管約含10 μg 檢品，置入設定37°C的真空幫浦抽乾液體後，於-20°C儲之或是以層析沖提液A 20 μL (含2% ACN及0.1%甲酸)回溶後，使其最後濃度為0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，再上機分析之。

2. 測定

(1)液相層析四極柱飛行時間串聯式質譜儀條件

層析管柱：ACQUITY UPLC BEH C18, 2.1 $\times$ 100 mm, 1.7 μm

樣本分析時間：120 min

層析管柱溫度：40°C

流速：0.3 mL/min

注入量：10 μL

離子源：電噴灑正離子模式

3. 結果判定

利用軟體BioPharmaView™ 3.0及PeakView™ 2.2分析質譜檔案。

(四)毛細管等電點聚焦電泳分析法

1. 溶液製備

(1)陽極溶液(analytic, 200 mM phosphoric acid)

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

(2)陰極溶液(catholyte, 300 mM NaOH)

取15 mL水，加入7.5 mL 1M NaOH，補水至25 mL。

(3)化學移動相(chemical mobiliser, 350 mM acetic acid)

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

(4)陰極穩定相(cathodic stabilizer, 500 mM L-arginine)

取15 mL水，加入2.18 g L-arginine，補水至25 mL。

(5)陽極穩定相(anodic stabilizer, 200 mM amino dactic acid)

取15 mL水，加入0.68 g amino diabetic acid，補水至25 mL。

(6)4.3 M尿素溶液(4.3 M urea solution)

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

(7)3.0 M尿素膠體(3.0 M urea gel)

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。

(8)20 mM TRIS buffer (pH 8.0)

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

(9)檢品製備

a. 製備pI marker 混合液

分別將200 μ L urea cIEF gel、12

μ L pharmalyte 3 - 10 carrier、20 μ L cathodic stabiliser、2 μ L anodic stabiliser、2 μ L each pI marker及6 μ L water混合。

b. 檢品製備

為維持管柱移動性，檢品中溶液需置換為tris buffer (pH 8.0) 緩衝液。

取100 μ L 檢品置於amicon ultra filter (0.5 mL filtration unit)，以tris buffer 將體積補到500 μ L (加400 μ L tris buffer)以 14,500 rpm離心10分鐘並拋棄濾液，補tris buffer 至500 μ L體積，以 14,500 rpm離心10分鐘。將filtration unit 倒置於新離心管上，以1,000 rpm 離心2分鐘，並以tris buffer補至10 μ L，以此檢品進行上樣。

2. 分析條件

等電聚焦之裝置，pH 值介於3 - 10，陰極為40 g/L氫氧化鈉溶液，陽極為2.87%乙酸溶液，進樣量為15 μ L，使用電壓為1500 V，電流為7 mA，瓦數25W進行電泳60分鐘。

(五)毛細管膠體電泳法

1. 溶液製備

(1)製備烷化溶液(25 mM iodoacetamide 溶液)

取46 mg碘乙醯胺與1 mL超純水混合均勻，可於避光室溫環境下儲存24小時。

(2)還原(reduced)檢品溶液

取100 μ g檢品液(濃度2.3 μ g/ μ L以上)並依序混入50 μ L SDS-MW樣品液、2 μ L 10 kDa內標準品及5 μ L 2-mercaptoethanol，混合均勻後以300 $\times$ g離心1分鐘，以石蠟膜包覆完全並於70°C下加熱10分鐘，室溫冷卻3分鐘後以300 $\times$ g離心1分鐘，轉移70 μ L

到90 μ L之新微量離心管。

(3)非還原(non-reduced)檢品溶液

取100 μ g檢品液(濃度2.3 μ g/ μ L以上)並依序混入50 μ L SDS-MW樣品液、2 μ L 10 kDa內標準品及5 μ L 250 mM碘乙醯胺溶液，混合均勻後以300 $\times$ g離心1分鐘，以石蠟膜包覆完全並於70 $^{\circ}$ C下加熱10分鐘，室溫冷卻3分鐘後以300 $\times$ g離心1分鐘，轉移70 μ L到90 μ L之新微量離心管。

2. 分析條件

使用之毛細管為未塗覆 50 μ m $\times$ 30 cm (20 cm to detection)，分離時以40 mM Na₂HPO₄，pH 2.5，再加0.03% HPMC作為緩衝液，電壓15 kV，溫度為25 $^{\circ}$ C，偵測器波長為220 nm，進行35分鐘泳動；每次分析前均以0.1 M NaOH清洗毛細管3分鐘，之後以H₂O洗3分鐘，再以running buffer洗3分鐘後進行分析。

四、效價分析之方法

(一)PD-L1 aAPC/CHO-K1細胞培養

將FBS與Ham's F-12 medium按比例配製成PD-L1 aAPC/CHO-K1專用培養基。於無菌操作台內取專用培養基15 mL加入T-75 flask後置於37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培養箱30分鐘進行回溫及平衡酸鹼值。從-80 $^{\circ}$ C冰箱取出PD-L1 aAPC/CHO-K1細胞凍管，立即放入37 $^{\circ}$ C 水中快速解凍，並移入操作櫃內，以微量分注器取出細胞懸浮液，與PD-L1 aAPC/CHO-K1專用培養基混合之懸浮液置入96孔盤，細胞密度約為1 $\times$ 10⁴ cells/well，於37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培養箱培養隔夜。

(二)檢液製備

取Durvalumab市售品溶液(50 mg/mL)與試驗稀釋液混合使其濃度為2000 ng/mL，並

適當序列稀釋以進行下述實驗。

(三)免疫檢查點活性抑制偵測

待上述之檢液與PD-1 Effector細胞於96孔盤共同培養6小時，加入80 μ L之Bio-Glo™試劑，於室溫作用5 - 30分鐘後，以ELISA吸光儀讀取其冷光值。

(四)結果分析

反應曲線：將line B-G不同濃度之反應結果，利用CombiStats軟體以四參數邏輯回歸分析(four parameter logistic regression)，以濃度之log₁₀為x軸，冷光值為y軸作出S曲線圖，並算出R²值。

結 果

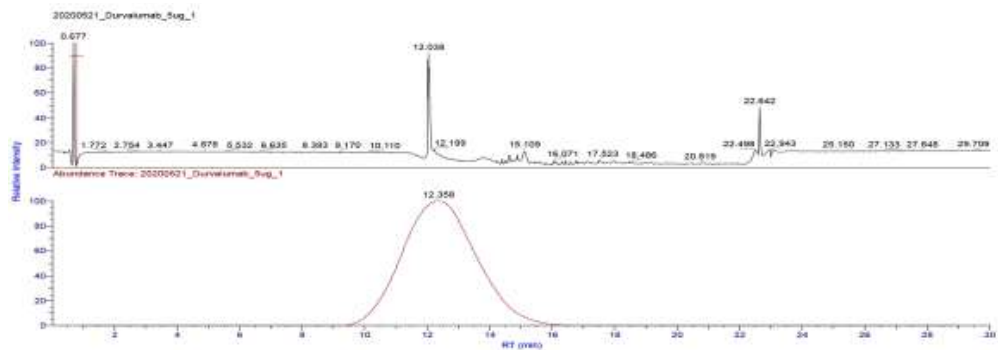
一、Durvalumab分子量

利用top-down質譜法直接分析durvalumab完整蛋白質之分子量，樣品前處理後，以液相層析四極柱飛行時間串聯式質譜儀分析。於TIC圖譜中滯留時間12.038分鐘具有一明顯波峰(圖二a)。選取該波峰進行後續質譜分析可得一級質譜圖(圖二b)。將質譜分析之結果以軟體計算，發現durvalumab可區分為四種帶醮化結構之波峰，分別為(1) G0F; G0F protein terminal Lys-loss、(2) G0F; G0; protein terminal Lys-loss、(3) G0F; G1F; protein terminal Lys-loss及(4) G0F; G2F; protein terminal Lys-loss。其中以帶有G0F; G0F protein terminal Lys-loss醮化結構之蛋白質為主要波峰，其醮化分子量為148,956.04 Da (圖二c)。

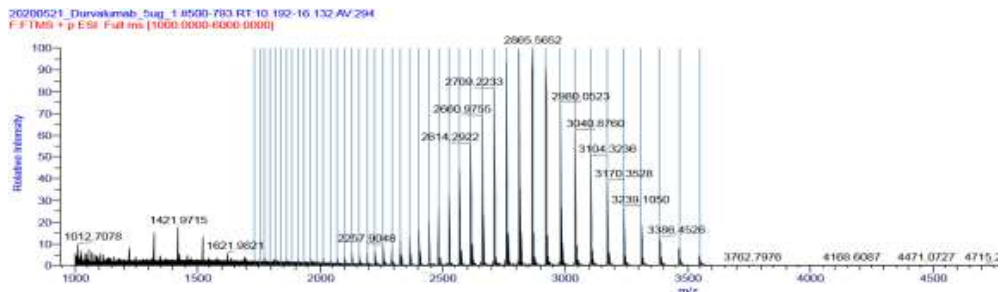
而middle-down質譜法可進一步確認durvalumab之分子量。樣品以二硫蘇糖醇(打斷雙硫鍵)處理後以液相層析四極柱飛行時間串聯式質譜儀分析。結果顯示經二硫蘇糖醇處理後可獲得一對含醮基之重鏈(HC)與一對輕鏈(LC)(圖三)，其中含醮基之重鏈分子量為50,908.95 Da，輕鏈分子量為23,570.99 Da，因durvalumab結構含2對輕鏈與2對重鏈回推之分

單株抗體Durvalumab檢驗方法之評估研究

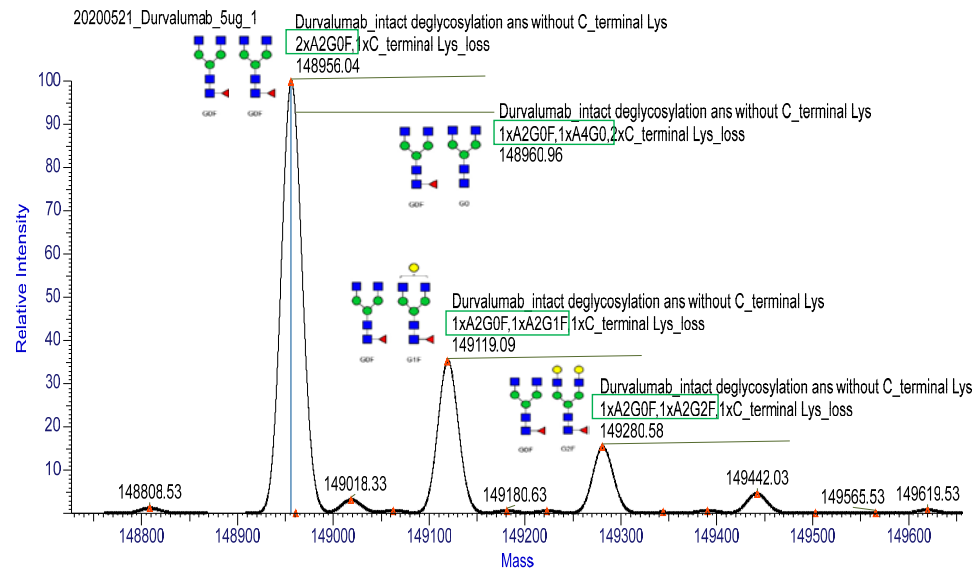
(a)



(b)

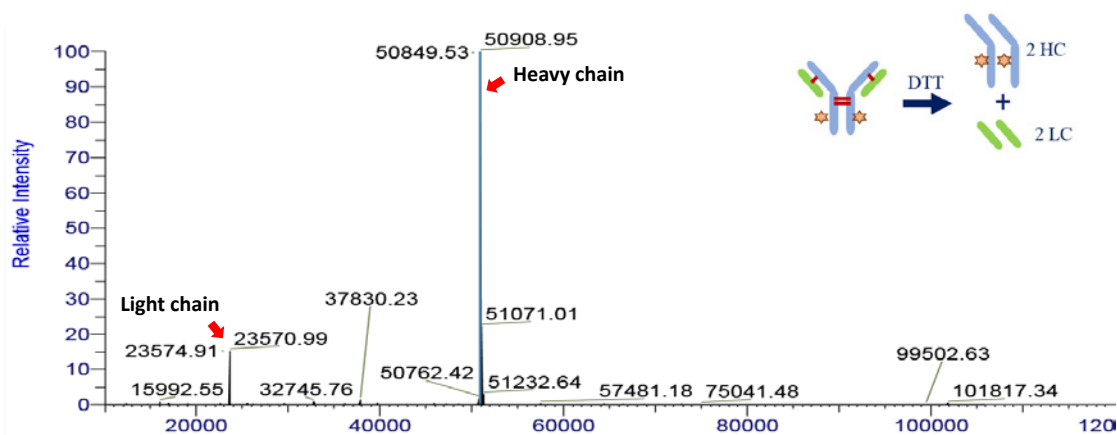


(c)



圖二、經top-down法處理之durvalumab市售品分子量分析之結果

(a)總離子層析圖譜；(b)一級質譜圖譜；(c)軟體計算(deconvolution)之糖化分子量圖譜(優勢糖型為GOF糖化結構)



圖三、經middle-down法分析之durvalumab市售品分子量分析之結果

子量為148959.88 Da。

二、Durvalumab胺基酸序列

完成durvalumab主要分子量測量後，進一步以bottom-up質譜法，鑑別durvalumab之胺基酸完整序列。樣品經透析、還原及烷化作用後，分別以胰蛋白酶消化處理，並去鹽純化回溶後，以液相層析四極柱飛行時間串聯式質譜儀分析，經質譜分析後可獲得durvalumab之胺基酸片段序列，序列覆蓋率可達100% (圖四)。

三、Durvalumab雙硫鍵鍵結位置

Durvalumab為IgG單株抗體具有16對雙硫鍵鍵結位置，因抗體對稱性故可分為9對不同雙硫鍵鍵結位置，為確定durvalumab之蛋白質摺疊結構，因此進行雙硫鍵鍵結位置之確認試驗。樣品經透析及胰蛋白酶作用，以液相層析四極柱飛行時間串聯式質譜儀分析，以本研究所得之durvalumab胺基酸片段序列資訊經軟體比對後可獲得9種雙硫鍵鍵結位置(表一)。

四、Durvalumab之蛋白質轉譯後修飾

進一步分析所獲得之durvalumab胺基酸片段序列，經軟體分析及比對資料庫後，結果顯

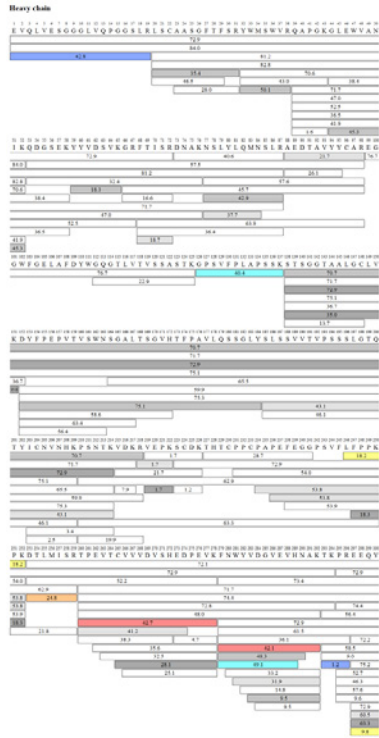
示TIC圖譜滯留時間於12.41分鐘時(圖五a)具有Asn301醮化序列之二級圖譜(圖五b)，經軟體比對後顯示於Asn301具有G0F之醮化結構(圖五c)。

五、Durvalumab之等電點與純度分析

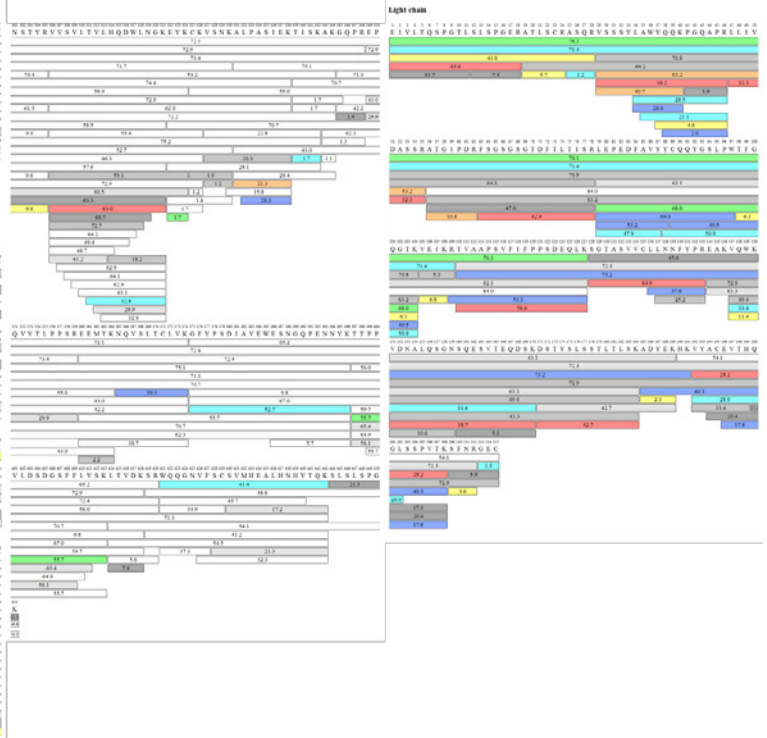
為評估檢品中蛋白質之同(異)質性，利用蛋白質於凝膠電場環境下泳動並聚集於等電點之特性，檢品前處理時混入pI 5.5、9.5及10.0之內部標準品，比對出durvalumab主要波峰之pI值為8.13，並佔67.535%之面積百分比，而偏酸性波峰總合佔23.35% (圖六)。

CE-SDS為評估蛋白質純度之普遍方法之一，將檢品分別經還原或非還原前處理，以毛細管電泳分析儀進行電泳分析(圖七)。單株抗體經還原作用之前處理，藉電泳分離可見HC、LC或其他不純物，還原之durvalumab對照標準品HC與LC面積總和為100.00%，還原之durvalumab檢品之HC與LC面積總和為99.99%。而單株抗體未經還原作用直接進行電泳，則藉由分析其主要波峰面積以測得純度，非還原之durvalumab對照標準品主波峰面積為94.76%，非還原之durvalumab檢品主波峰面積為92.52%，皆符合原廠之規範。

(a) Heavy chain



(b) Light chain



圖四、經bottom-up法分析durvalumab市售品序列覆蓋率之結果

(a) Heavy chain ; (b) Light chain

表一、Durvalumab市售品雙硫鍵鍵結位置分析

No. of disulfide bonds	Fragment sequence	Charge	RT	Theoretical mono m/z	Observed mono m/z
1	LSCAASGFTFSR;AEDTAVYYCAR	4	42.59	627.03	627.04
2	ATLSR;LEPEDFAVYYCQYQGLPWTFGQGGTK	4	65.29	919.43	919.43
3	STSESTAALGCLVK; TYTCNVDHKPSNTK	4	28.71	743.61	743.68
4	SGTASVVCLLNNFYPR; VYACEVTHQGLSSPVTK	3	57.97	889.94	889.94
5	GEC; RVEPKSCDK	2	57.77	683.81	683.79
6	THTCPPCAPEFEGGPSVFLFPPKPK	8	66.49	695.34	695.47
7	THTCPPCAPEFEGGPSVFLFPPKPK	8	66.49	695.34	695.47
8	TPEVTCVVVDVSHEDPEVK; CKVSNK	4	35.59	690.09	690.10
9	NQVSLTCLVK; WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK	3	48.44	641.81	641.81

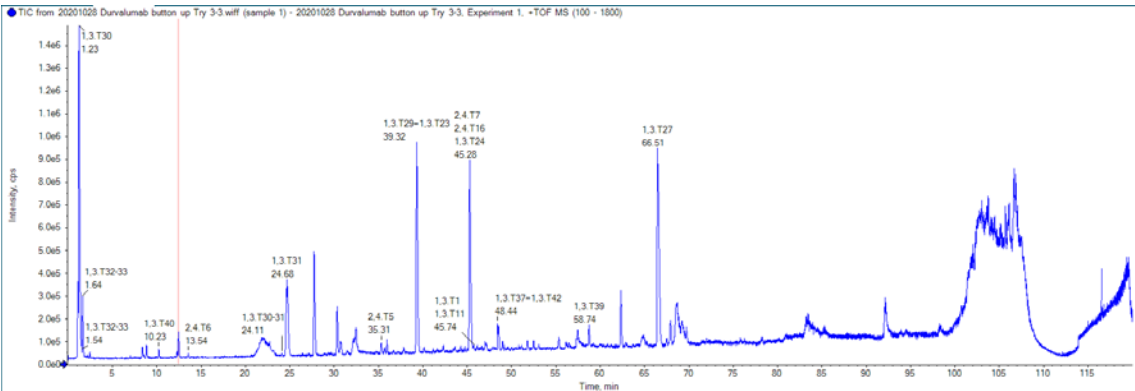
六、Durvalumab之效價分析

除了上述對durvalumab之物化特性分析，

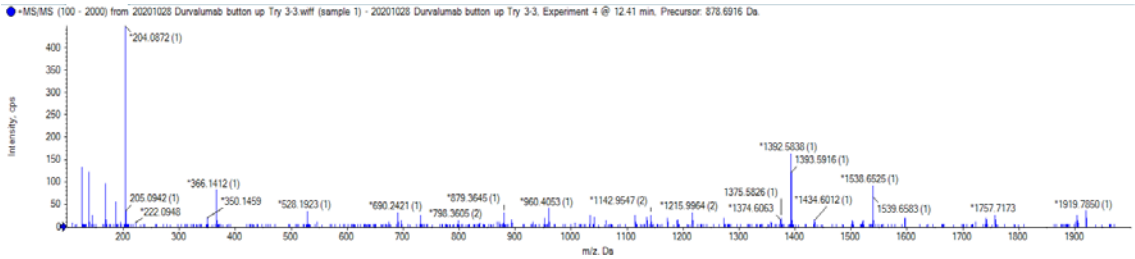
另以細胞為基礎評估durvalumab之功能性作

用，將不同濃度之durvalumab (PD-1阻斷劑)與

(a)



(b)



(c)

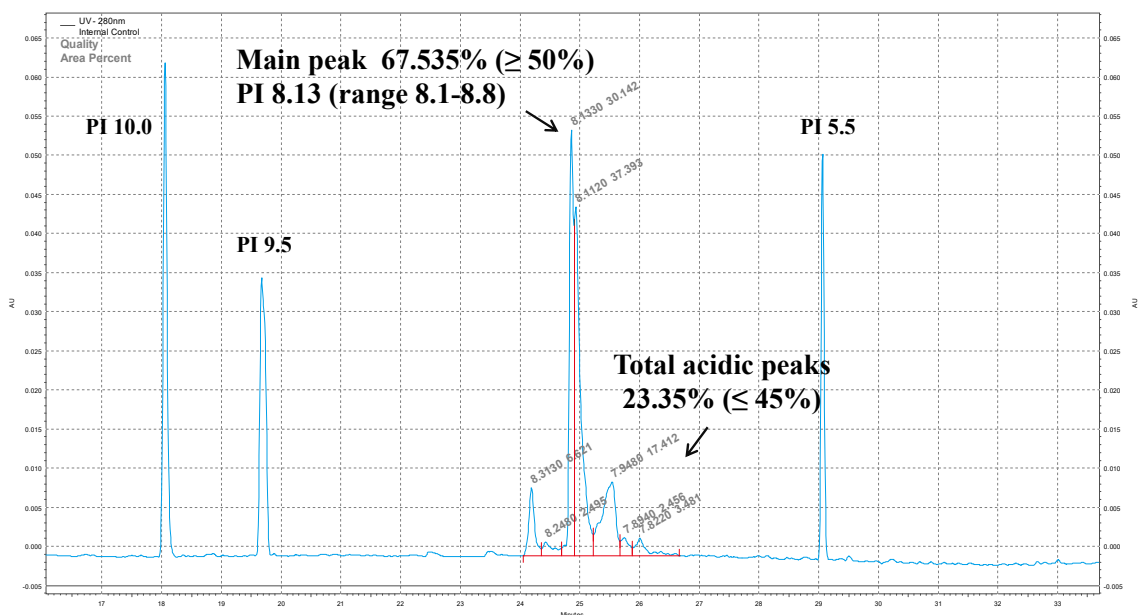
Show: ☒ Basic ☐ Advanced (including internal fragments)

Residue	b #	b	b+2	b+3	y	y+2	y+3	y #
E	1	130.0499	-	-	-	1317.5266	878.6868	9
E	2	259.0925	130.0499	-	-	1253.0053	835.6726	8
Q	3	387.1510	194.0792	129.7219	-	1188.4840	792.6584	7
Y	4	550.2144	275.6108	184.0763	-	1124.4547	749.9722	6
N(G0F)	5	-	1054.8992	703.6019	-	1042.9230	695.6178	5
S	6	-	1098.4152	732.6126	526.2620	263.6346	176.0922	4
T	7	-	1148.9391	766.2951	439.2300	220.1186	147.0815	3
Y	8	-	1230.4707	820.6496	338.1823	169.5948	113.3989	2
R	9	-	-	-	175.1190	-	-	1

圖五、Durvalumab市售品之醮化位置分析之結果
(a)Durvalumab一級質譜圖；(b)Durvalumab於Asn301醮化序列之二級質譜圖；(c)經圖譜質量比對後顯示Asn301具有G0F醮化結構

PD-L1 aAPC / CHO-K1及PD-1 effector細胞共培養後，可由檢品濃度之對數值與代表免疫檢查點活性抑制程度之吸光值獲得反應曲線(圖八a)，並分析不同次實驗之精密度、再現

性與中間精密度(表二)。在線性範圍分析中，將濃度2000 ng/mL標準品作為預期相對效價100%，並分別配製不同相對效價檢液(包含25%、50%、100%、150%與200%)進行效價分



圖六、Durvalumab市售品之電荷異質性分析之結果

析(圖八b)。以測量效價值進行線性分析，其 R^2 值達0.996以上，各預測相對效價之回收率皆介於80-120% (表三)，皆顯示此細胞模式之效價分析方法具良好之再現性與中間精密度。

討 論

隨著抗體開發及生物技術之成熟，且相對於傳統小分子藥物，抗體藥物可提高療效專一性及降低副作用等優勢，使抗體藥物近來深受矚目，而此類生物性藥品具大分子量特性及分子結構複雜具生物異變性(如醮化之後修飾作用、產生聚合體等)，及製程中不純物之殘留，皆可能引發使用者過敏或不可預期之生理

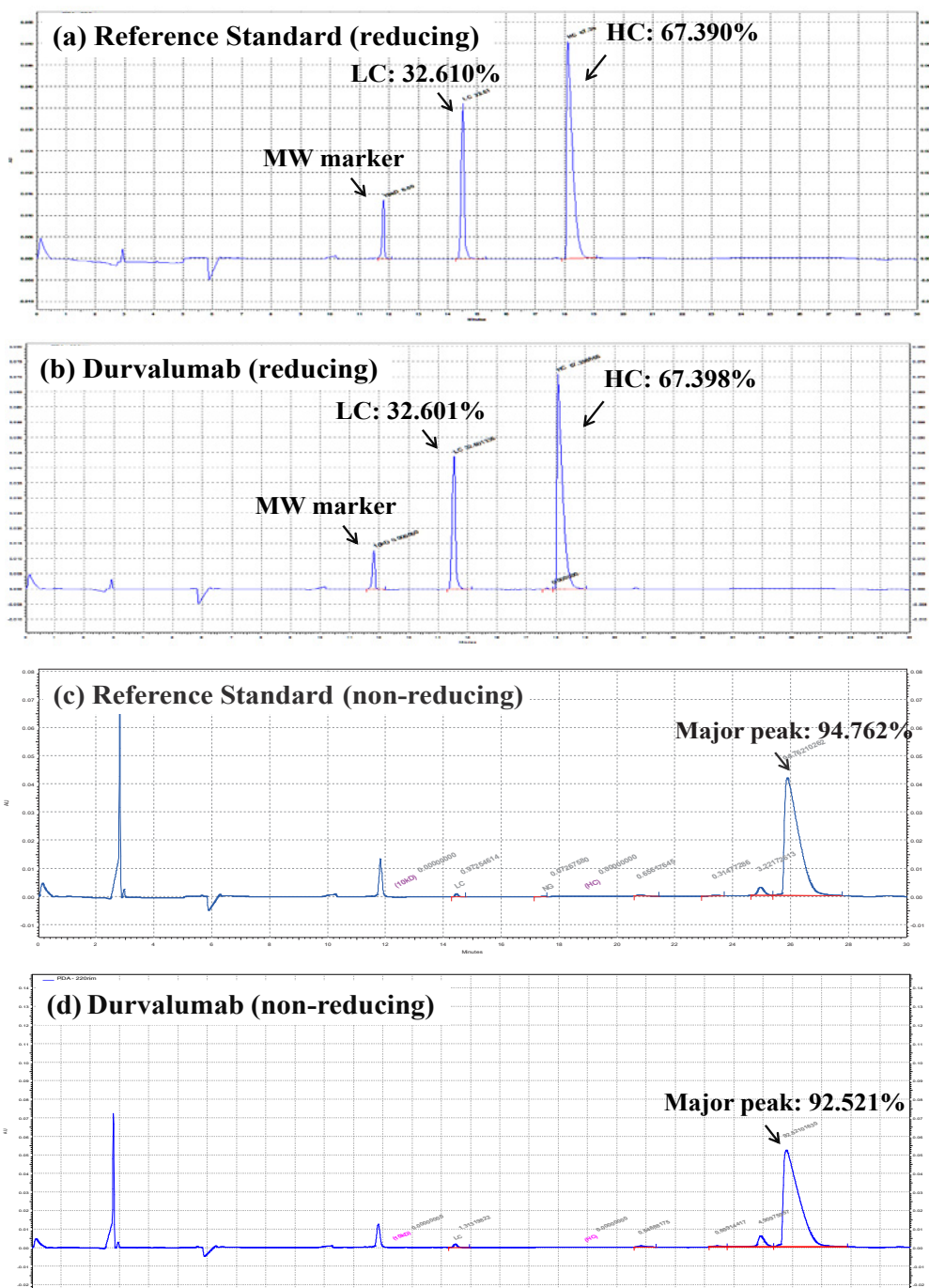
反應⁽¹¹⁾，分子生物及生物化學等傳統分析方法已不敷使用，因此建立抗體藥物鑑別之技術刻不容緩，目前於臺灣市場上已有多種單株抗體藥物，然而中華藥典尚未收載單株抗體製劑相關檢驗方法，因此發展抗體藥物的檢驗平台及

表三、不同濃度之效價及回收率

Expected Relative Potency (%)	Measured Relative Potency (%)	Recovery (%)
25	29.44	117.76
50	53.76	107.52
100	100.00	100.00
150	137.47	91.60
200	173.54	86.77

表二、效價試驗之平均精密度、再現性與中間精密度結果(n = 3)

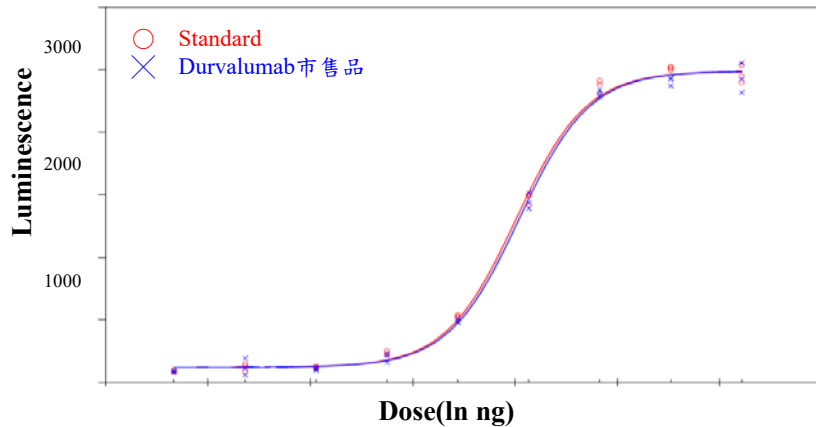
Sample	Potency	Mean bias	Plate CV (repeatability)	Assay CV (intern. precision)
Durvalumab對照標準品	100.00	5.00%	-	-
Durvalumab市售品	92.51	4.89%	5.95%	8.81%



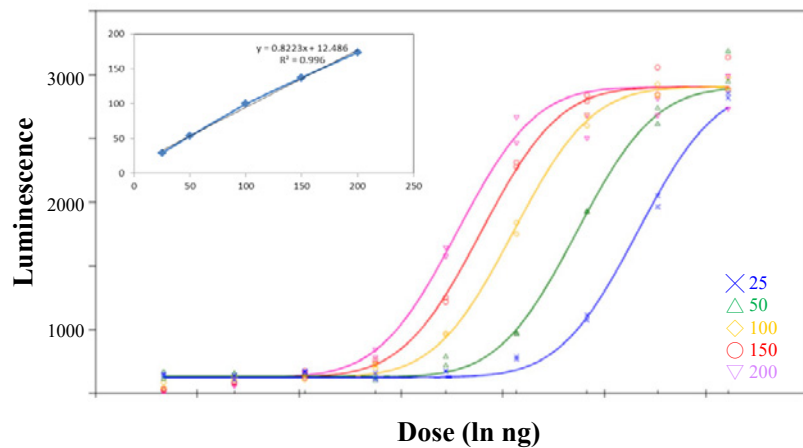
圖七、Durvalumab市售品毛細管電泳分析純度之結果

(a)還原之Durvalumab對照標準品HC與LC面積總和為100.00%；(b)還原之Durvalumab市售品之HC與LC面積總和為99.99%；(c)非還原之Durvalumab對照標準品主波峰面積為94.76%；(d)非還原之Durvalumab市售品主波峰面積為92.52%

(a)



(b)

圖八、Durvalumab之反應曲線與 R^2 分布情形

(a) Durvalumab市售品與標準品反應曲線之比較；(b) Durvalumab市售品於不同濃度反應曲線

建立相關蛋白質結構資料庫有其必要性，本研究運用新興蛋白質體分析方法建立單株抗體製劑物化特性檢驗平台及蛋白質特徵資料，並運用體外細胞模式建立單株抗體製劑功能性分析方法。

本研究以液相層析四極柱飛行時間串聯式質譜儀建立durvalumab分析之平台，以top-

down、middle-down及bottom-up等三種不同方法剖析其結構，以期獲得可信和穩定之檢驗結果。初期所遇到的困難點為利用單一酵素處理時，序列覆蓋率不佳及無法確認所有雙硫鍵之鍵結位置，經測試不同酵素組合將檢品做不同的前處理後，再進樣分析其圖譜，最後完成序列覆蓋率可達100%及確認所有的雙硫鍵之鍵

結位置。

結 論

隨著全球藥廠生物製劑蓬勃發展，我國藥廠也與時俱進，生物製劑發展將成為主流。因原開發藥物專利陸續到期，全球已有數家藥廠發展durvalumab生物相似性藥品，並已獲准上市。考量國際藥典尚未收載單株抗體製劑相關檢驗方法，建立單株抗體製劑相關檢驗平台為當務之急。本研究利用液相層析四極柱飛行時間串聯式質譜法建立物化特性分析平台，目前完成durvalumab鑑別，確認其分子量、序列覆蓋率可達100%、雙硫鍵之鍵結位置及蛋白質轉譯後修飾差異，另利用細胞模式完成durvalumab抑制免疫檢查點之功能性分析。本研究建立之檢驗平台有助於抑制免疫檢查點製劑及相關生物相似性藥品上市後之品質安全性監測，且將可應用於單株抗體藥品偽藥檢驗方法，並作為納入中華藥典之參考。

參考文獻

1. Evaluate, Ltd. 2019. Evaluate Pharma. 12th edition. pp. 8-9. Evaluate, Ltd, UK.
2. Zhang Z., Pan H. and Chen X. 2009. Mass spectrometry for structural characterization of therapeutic antibodies. Mass Spectrom Rev. 28 : 147-176.
3. Dewan S. 2017. Antibody Drugs : Technologies and Global Markets. BCC research.
4. 吳忠勳等。2019。2019生技產業白皮書。經濟部工業局，臺北。
5. Dahodwala H. and Lee KH. 2019. The fickle CHO : a review of the causes, implications, and potential alleviation of the CHO cell line instability problem. Curr. Opin. Biotechnol. 60 : 128-137.
6. Beck A., Wanger-Rousset E., Ayoub D., Van Dorsselaer A. and *et al.* 2013. Characterization of therapeutic antibodies and related products. Anal. Chem. 85 : 715-736.
7. Liu H., Ponniah G., Zhang HM., Nowak C. and *et al.* 2014. *In vitro* and *in vivo* modifications of recombinant and human IgG antibodies. mAbs. 6 : 1145-1154.
8. Gahoual R., Biacchi M., Chicher J., Kuhn L. and *et al.* 2014. Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry. mAbs. 6 : 1464-1473.
9. de Jong KA., van Breugel SJ., Hillebrand MJ., Rosing H. and *et al.* 2020. Bottom-up sample preparation for the LC-MS/MS quantification of anti-cancer monoclonal antibodies in bio matrices. Bioanalysis. 12 : 1405-1425.
10. Rehder DS., Dillion TM., Pipes GD. and Bondarenko PV. 2006. Reversed-phase liquid chromatography/mass spectrometry analysis of reduced monoclonal antibodies in pharmaceuticals. J Chromatogr A. 1102 : 164-75.
11. Pineda C., Castañeda Hernández G., Jacobs IA. and Alvarez DF. 2016. Assessing the Immunogenicity of Biopharmaceuticals. BioDrugs. 30 : 195-206.

The Assessment of Testing Methods of Durvalumab Monoclonal Antibody Preparations

PO-CHIH WU, JHAN-KAI JHAN, YI-FAN CHEN, JIA-YU WANG,
JIA-CHUAN HSU, MEI-CHIN LIN, SU-HSIANG TSENG
AND DER-YUAN WANG

Division of Research and Analysis, TFDA

ABSTRACT

Precision medicine products, such as monoclonal antibody, were manufactured from cell cultured by genetic engineering technology, the processes were complicated and variations of post-translational modification would increase risk factors. The objectives of this study were to establish the measuring methods of programmed death-ligand 1 (PD-L1) inhibitor durvalumab, one of the monoclonal antibodies established on genetic engineering technology. The physical and chemical properties were based on the liquid chromatography-quadrupole time-of-flight instrument (LC-Q-TOF) and capillary electrophoresis analyzer, the evaluation of bioactivity platform was performed. The results showed that the main glycosylation of durvalumab was G0F, followed by G1F, G0 and G2F. The molecular mass of heavy chain (HC) and light chain (LC) were 50,908.95 and 23,570.99 Da, respectively. The analytical coverage rate of amino acid sequence was 100%, and the position of 16 disulfide bond bridges had been completed and qualified. Reduced and non-reduced capillary electrophoresis (CE-SDS) results showed that purities were 99.99% and 92.52%, respectively, and the charge isoforms analysis showed the areas of main peak was 67.53% and total area of acid wave peaks was 23.35%. The results of the biological activity analysis displayed that the titer was 92.51% (compared to standard), repeatability was 5.95%, and the intermediate precision was 8.81%. The R^2 value of the reaction under different durvalumab concentrations was 0.996, and the recovery rate was between 86.77% and 117.76%. The analytical method built by this project could be a reference method for quality control of this department. It could also be applied to product post-market monitoring to ensure the medication safety of people.

Key words: monoclonal antibody, LC-Q-TOF, capillary electrophoresis analyzer, PD-L1