

论工艺特异性宿主细胞蛋白检测方法在重组蛋白药物物质控中的必要性

王平, 刘岩峰*

(沈阳药科大学生命科学与生物制药学院, 沈阳 110016)

摘要: **目的** 论证工艺特异性宿主细胞蛋白(Host Cell Protein, HCP)检测方法在重组蛋白药物物质控中的必要性, 为工艺特异性 HCP 检测方法的开发策略提供合理化建议。**方法** 利用文献研究、法规研究和对比研究等方式, 论证工艺特异性 HCP 检测方法的必要性, 采用归纳总结的方式概况行业内常用的技术路线, 对工艺特异性 HCP 检测方法的开发策略提出合理化建议。**结果** 依据法规对 HCP 残留量的限度要求及文献中对 HCP 的研究案例, 论证了在重组蛋白药物物质控中采用工艺特异性 HCP 检测方法的必要性, 并根据药物研发过程中不同阶段的特点, 总结出工艺特异性 HCP 检测方法的开发策略及技术路线。**结论** 推荐药物研究机构在 II 期临床阶段完成商品化试剂盒向工艺特异性 HCP 检测方法的转换, 并推荐采用构建空质粒细胞来表达制备 HCP, 进而开发工艺特异性 HCP 检测方法的技术路线。

关键词: 工艺特异性; 宿主细胞蛋白; 酶联免疫法测定法

0 引言

随着基因工程技术的发展, 许多重组蛋白药物是通过重组 DNA 技术构建的宿主细胞(如细菌、酵母或哺乳细胞、昆虫或植物细胞系)来生产的。在生产过程中, 由宿主细胞衍生的非目标物质将不可避免的引入工艺流程, 包括宿主细胞蛋白(HCP)、核酸(DNA)、脂类和其他与工艺相关的杂质。生物制品中残留 HCP 的质量控制检测, 往往是产品杂质控制中的核心指标之一, 各国法规中都有涉及 HCP 的论述。生物制品中残留的 HCP 可能影响产品质量、安全性和有效性, 主要原因是 HCP 可能诱导产生抗 HCP 抗体, 从而引起临床过敏反应, 其次是药品中残留的 HCP 也可能起到免疫佐剂的作用, 诱导产生抗药抗体^[1]。对于所有重组蛋白, 此类杂质的存在均引发了产品潜在免疫原性的问题, 因此, 应对此类杂质进行鉴别、评估和分析^[2]。目前医药行业内有多种技术方法可对残留 HCP 展开分析, 如酶联免疫吸附测定法(ELISA)、免疫印迹法(Western Blot)、质谱法及邻位连接分析法(PLA)等^[3], 但至今为止, ELISA 法因其检测覆盖率广、灵敏度高等特点, 仍是众多技术手段中的标准方法。本文旨在论证基于 ELSIA 原理的工艺特异性 HCP 检测方法在重组蛋白药物物质控中的必要性, 探讨工艺特异性 HCP 检测方法的开发策略, 为医药行业内研究机构改进

HCP 的检测方法提供参考。

1 重组蛋白药物物质控中 HCP 检测的难点

HCP 是用于重组蛋白药物生产的宿主细胞编码产生的蛋白质, 大都为各自宿主所特有, 且其组成与丰度取决于多种因素。首先, 生物制品中 HCP 的组成与宿主表达系统本身密切相关, 如大肠杆菌有约 4300 个蛋白编码基因^[4], 而哺乳动物细胞, 如常用的小鼠骨髓瘤细胞(NS0)和中国仓鼠卵巢细胞(CHO)约有 30000 个基因^[5-6]。其次, 生物制品中 HCP 的组成与重组蛋白在宿主细胞中的表达方式有关^[7], 例如, 大肠杆菌系统可直接将重组蛋白表达在细胞质中或分泌到周质腔中, 而哺乳动物细胞则可分泌到培养基中, 不同的表达方式会导致重组蛋白中所含的 HCP 的组成和丰度不同。另外, 生物制品中所含 HCP 的组成与纯化方式也密切相关, 在纯化的不同步骤中 HCP 的组成可能会发生变化^[7-8]。

作为工艺相关杂质的一个重要类别, HCP 是重组蛋白药物工艺开发过程中被重点关注和监测的对象之一, 制造商必须证明 HCP 的清除情况以确保药物的纯度、生产过程的一致性和用药患者的安全性^[9], 但 HCP 检测往往面临着众多难点和挑战^[10]: (1)样品中仅有少量或痕量的 HCP, 其残留限度的监管标准通常为 1~100 ppm(ppm 即百万分之一)^[11], 而大量存在的重组蛋白

第一作者: 王平, 硕士, 研究方向为重组蛋白质药物开发与质量研究。

* 通信作者: 刘岩峰, 博士, 教授, 研究方向为生物医药研发及产业化。E-mail: liuyanfeng@hotmail.com

药物很可能影响检测; (2)样品中的 HCP 种类多样, 且很可能随着工艺发生变化; (3)所用的检测方法需能在短时间内测定大量不同的杂蛋白。

2 开发工艺特异性 HCP 检测试剂盒的必要性

随着技术进步, 行业内已有多种测定 HCP 的方法, 但 ELISA 法仍然是检测 HCP 的主要方法, 且因其能较好地解决 HCP 检测过程中面临的众多难题, 已被收录到各国药典^[1,12]。对于一些通用的基因工程细胞, 比如大肠杆菌、毕赤酵母等, 已有商品化的 ELISA 检测试剂盒和标准方法, 可以用于检测大多数的 HCP, 但商品化的试剂盒可能无法测定一些工艺特异性杂蛋白^[13]。这是因为商品化的 HCP 检测试剂盒为确保其广泛的市场适用性, 往往只采用基因改造前的原始宿主细胞的菌体蛋白作为标准品并制备抗体, 所以检测不到一些重组工程细胞在表达重组产品时伴随共表达的辅助蛋白或标签蛋白, 以及因基因或代谢环境改变而产生明显丰度变化的菌体蛋白。一个相关的例子曾被报道^[14], 在生长激素药物(Omnitrope)的临床开发期间意外观察到抗治疗抗体形成率极高(高达 60%), 该品种最初使用商业化试剂盒对临床样本进行检测, 结果显示 HCP 值为 20 ppm, 随后使用了特定工艺的检测方法进行检测, 结果显示 HCP 值实际上要高得多(约 1400 ppm), 这导致使用早期临床批次药品的受试者产生了抗 HCP 抗体, 并因 HCP 的佐剂作用, 增加了受试者 ATA 的发生率。此外, 有研究也表明, 在对比检测研究中约 62% 的大肠杆菌 HCP(应为特定工艺的 HCP)无法通过非特定工艺的商业 ELISA 试剂盒检测到^[15]。因此, 基于商品化试剂盒的局限性, 在临床研究的中后期采用工艺特异性 HCP 检测试剂盒成为一种必然的选择, 尤其对于一些临床使用剂量较大的重组蛋白品种, 如单抗、重组人血白蛋白等。

3 工艺特异性 HCP 检测方法的开发策略

3.1 工艺特异性 HCP 检测方法的开发阶段

重组蛋白药物的研究往往需要较长周期, 几年甚至十几年的时间。在研究初期, 采用商品化的 HCP 检测试剂盒来控制 HCP 残留水平是一个较好选择, 而随着工艺的逐步稳定, 开发工艺特异性 HCP 检测试剂盒逐渐成为行业内一种发展趋势。工艺特异性 HCP 检测方法即采用工艺专属的宿主蛋白, 而不是宿主细胞的全谱蛋白, 来作为标准品并制备相应的检测抗体^[16]。开发工艺特异性 HCP 检测试剂盒是一个复杂的过程, 涉及多个环节, 包括 HCP 抗原的制备、免疫动物制备 HCP 多抗、抗体标记及覆盖率研究、ELISA 方法开发、方法验证等。其中, 制备获得具有工艺特异性的 HCP 和制备得到高质量的抗体是最重要的两个环节, 其要点如下。

(1)工艺特异性 HCP 的制备。国内法规中只论述了采用 ELSIA 法检测 HCP, 但对于如何制备 HCP 标准品并无论述。参考国外法规^[1], 工艺特异性 HCP 的制备工艺通常需根据重组产品的实际工艺确定, 通常采用的方法是按照与表达重组产品的宿主细胞相同的基因构建方式构建一个空质粒(不含产品基因

的质粒载体)细胞, 再用空质粒细胞参照与表达重组产品的工程细胞相同的工艺方式进行发酵表达及后处理。

(2)高质量抗体的制备。制备 HCP 多抗主要包括动物免疫和抗体纯化两个环节。动物免疫通常采用背部皮下多点的免疫方式, 但不同动物免疫后的抗血清滴度可能存在明显差异, 因而在免疫时可同时免疫 2~3 种动物进行筛选。抗体免疫常用动物有小鼠、大鼠、兔子和羊等。抗体纯化多采用亲和柱层析的方式, 柱料多为 Protein A 或 Protein G, 如想进一步提高抗体特异性, 可考虑抗原亲和的纯化方式。

鉴于工艺特异性 HCP 检测试剂盒开发耗时, 需与重组蛋白药物的整体研究进程相结合来推进。在参考国内外法规的基础上, 本文建议在 II 期临床阶段采用工艺特异性 HCP 检测试剂盒(如图 1), 原因如下: 首先, 工艺特异性 HCP 检测试剂盒的开发通常需数月, 宜在重组蛋白药物工艺初步确定后就启动方法的研究; 其次, 按照行业法规要求, 方法的变更需要有一个衔接确认的过程, 即从采用商品化试剂盒转变为采用工艺特异性试剂盒, 需要对多批次样品开展平行比对检测研究, 以确保工艺质量的一致性; 另外, HCP 作为一个关键质量属性, 其检测方法的改变应尽可能在早期临床阶段完成, 否则容易被视为一个较大的变更, 进而可能需要补充更多的验证实验。因此, 在确证性临床和工艺验证之前, 即在工艺初步确定的 II 期临床阶段完成这一转变将是合理的选择。

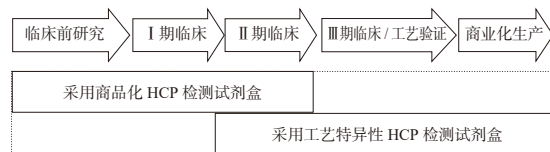


图 1 工艺特异性 HCP 检测试剂盒的建议使用阶段

3.2 开发工艺特异性 HCP 检测方法的技术路线

目前国内对于如何开发工艺特异性 HCP 检测方法并无统一标准, 综合行业内的研究现状, 工艺特异性 HCP 检测方法的技术路线主要有两种(见图 2~3)。路线一是通过构建不含重组蛋白药物基因的空质粒细胞来制备 HCP, 再用 HCP 免疫动物制备多抗, 进而开发相应的 ELISA 检测方法, 其主要流程包括: 构建空质粒细胞、通过发酵及后处理获得总杂蛋白、经鉴别及处理建立 HCP 标准品、免疫动物进行多抗制备、ELISA 方法建立等。路线二则是通过反向去除重组蛋白(即作为药物的重组蛋白)来收获 HCP 的思路, 其主要流程包括: 通过工程细胞表达获得含重组蛋白产品的全提取物、通过亲和纯化去除重组蛋白产品获得总杂质、经鉴别及处理建立 HCP 标准物、免疫动物进行多抗制备、ELISA 方法建立。

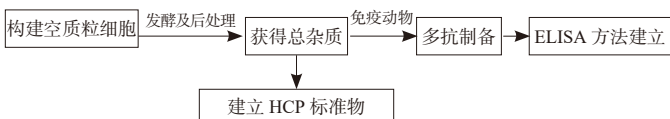


图 2 工艺特异性 HCP 检测方法的开发技术路线一

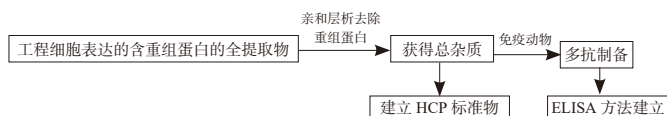


图3 工艺特异性 HCP 检测方法的开发技术路线二

4 结论

HCP 是重组蛋白药物生产过程中一类重要的工艺相关杂质,因其对产品质量、疗效以及患者安全产生影响,重组蛋白药物中的 HCP 残留量通常被视为药物的关键质量属性(CQA)之一,制造商需要建立相应的检测方法对工艺中 HCP 的去除情况和终产品中 HCP 的残留量开展质量控制检测。行业内测定 HCP 的标准方法是使用针对最广泛的潜在杂蛋白的多克隆抗体的三明治夹心免疫测定法,即 ELISA 方法。对于一些常用的基因工程载体细胞,已有很多试剂厂家开发了商业化的 HCP 检测试剂盒,该类试剂盒通常采用基因改造前的原始细胞 HCP 作为标准品,可被重组蛋白药物研究机构用于研究初期的 HCP 检测。但是,受限于细胞株来源和生产工艺的差异,商品化试剂盒很可能无法测出一些工艺特异性杂蛋白。为更加有效地控制生物制品中 HCP 的残留水平,本文讨论了开发工艺特异性 HCP 检测方法的必要性,并基于药品开发各阶段的特点,建议在 II 期临床阶段完成由商业化试剂盒向工艺特异性 HCP 检测试剂盒的转换。此外,鉴于国内法规中缺乏工艺特异性 HCP 检测方法开发路线的明确论述,本文综合国内外行业法规,归纳了开发工艺特异性 HCP 检测方法的两种常见技术路线。这两种路线各有特色,其中:路线一是采用构建空质粒细胞的方式来制备 HCP 标准品,这是是开发工艺特异性 HCP 检测方法的主流路线,被美国药典所推荐;路线二则是采用反向去除重组产品来收获杂蛋白的方式来制备 HCP 标准品,虽有成功案例^[17],但因其有一个很大的隐患,即如果重组蛋白药物未去除干净则很容易导致方法开发失败,所以采用的相对较少。综合来说,本文更推荐路线一,即构建空质粒细胞来表达制备 HCP,进而开发工艺特异性 HCP 检测方法的研究思路。当然,无论采用哪种技术路线,都需要开展验证实验来证明所制备 HCP 的代表性。开发工艺特异性 HCP 检测方法已成为行业发展趋势,且已被收录进美国药典,但在国内法规中还未见论述。本文在参考国内外法规的基础上,结合行业内的研究进展对开发工艺特异性 HCP 检测方法的必要性进行了论述,并就其可行的技术路线进行了探讨,希望能对提高国内重组蛋白药物的质控水平和完善国内医药行业的法规标准提供参考。

参考文献

- [1] Pharmacopeia U S. Residual host cell protein measurement in biopharmaceuticals [J]. USP. Published General, 2016: 39.
- [2] 国家药典委员会.人用重组DNA蛋白质制品总论[C]//中华人民共和国

共和国药典 2020 版三部[M].中国医药科技出版社,2020.

- [3] 于继伟,尹红锐,邵泓.质谱技术在单克隆抗体类药物宿主细胞残留蛋白检测中的应用进展[J].药物流行病学杂志,2023,32(04):458-465.
- [4] BLATTNER FR, PLUNKETT G, BLOCH CA, *et al*. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12 [J]. Science,1997,277(5331):1453-1462.
- [5] WATERSTON RH, LINDBLAD-TOH K, BIRNEY E, *et al*. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome [J]. Nature,2002,420(6915):520-562.
- [6] GIBBS RA, WEINSTOCK GM, METZKER ML, *et al*. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution [J]. Nature,2004,428(6982):493-521.
- [7] WANG X, HUNTER AK, MOZIER NM. Host cell proteins in biologics development: Identification, quantitation and risk assessment [J]. Biotechnol Bioeng,2009,103(03):446-458.
- [8] 王志明.基因工程药物中宿主细胞蛋白的检测与控制[J].中国新药杂志,2016,25(22):2550-2557.
- [9] PILELY K, JOHANSEN MR, LUND RR, *et al*. Monitoring process-related impurities in biologics-host cell protein analysis[J]. Anal Bioanal Chem,2022,414(02):747-758.
- [10] ZHU-SHIMONI J, YU C, NISHIHARA J, *et al*. Host cell protein testing by ELISAs and the use of orthogonal methods [J]. Biotechnol Bioeng,2014,111(12):2367-2379.
- [11] LIU DT. Points to Consider in the Production and Testing of New Drugs and Biologics Produced by Recombinant DNA Technology, Department of Health and Human Services, OBRR, NCDB, FDA, November 18, 1983.
- [12] 国家药典委员会著.中华人民共和国药典 2020 版三部通则 3412-3414[M].北京:中国医药科技出版社,2020.05.
- [13] EATON LC. Host cell contaminant protein assay development for recombinant biopharmaceuticals[J]. J Chromatogr A,1995,705(01):105-114.
- [14] DE ZAFRA CL, QUARMBY V, FRANCISSEN K, *et al*. Host cell proteins in biotechnology-derived products: A risk assessment framework [J].Biotechnol Bioeng, 2015,112(11):2284-2291.
- [15] TIAN Y, WANG X, SHAO D, *et al*. Establishment and evaluation of detection methods for process-specific residual host cell protein and residual host cell DNA in biological preparation [J]. Cell Biochem Funct,2024,42(02):e3986.
- [16] 王军志.生物技术药物研究开发和质量控制(第三版)[M],北京:科学出版社,2018:129-130.
- [17] 陈镇.植物源重组人血清白蛋白的残留宿主杂质研究[D].武汉:武汉大学,2014.