·生物医药前沿·

CHO 宿主细胞蛋白残留量检测方法适用性验证

张　峰[1],秦　俭[2],郭　莎[1],王　兰[1]

(1 中国食品药品检定研究院,北京 102629;2 依科赛生物科技(太仓)有限公司,太仓 215434)

[摘要]　**目的**:对 CHO 宿主细胞蛋白(host cell protein, HCP)残留量检测方法应用于候选治疗性单克隆抗体(以下简称单抗)产品生产过程中质控和放行检测的适用性进行验证。**方法**:采用荧光标记的二维差异凝胶电泳(2-dimensional difference gel electrophoresis, 2D-DIGE)测定羊抗 HCP 多克隆抗体对空发酵宿主细胞上清中 HCP 蛋白的覆盖率;采用统计学方法根据 40 次检测结果确定检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantitation, LOQ);依照人用药品注册技术要求国际协调会(ICH)Q2 要求验证方法特异性、精密性/中间精密性、准确性、线性和耐受性;依照《美国药典》〈1132〉要求验证方法用于过程中质控的适用性、关键 HCP 清除步骤和各步骤样品测定稀释度范围。**结果**:2D-DIGE 测定羊抗 HCP 多抗对 CHO HCP 的覆盖率为 56%,应用该抗体建立的 CHO HCP 检测方法的 LOD 和 LOQ 分别为 2.47 和 7.41 ng·mL^{-1}。经验证,方法特异性、精密性/中间精密性、准确性、线性和耐受性均符合要求。系列稀释单抗纯化过程中间产物,采用选定方法进行检测,确定各生产步骤产物 HCP 测定的稀释范围,计算各纯化步骤的 HCP 清除率,确定蛋白 A 亲和层析为 HCP 的主要清除步骤。根据上述结果,确定所选定的 CHO HCP 残留量测定方法可做为蛋白 A 纯化的过程中控制项目和原液的放行项目。**结论**:所选定 CHO HCP 检测方法可应用于候选治疗性单抗的过程中控制和放行。

[关键词]　宿主细胞蛋白残留量;检测;验证;覆盖率;单克隆抗体

[中图分类号]　R917　　[文献标志码]　A　　[文章编号]　1003－3734(2021)21－1967－08

Verification of applicability of the method for detecting CHO host cell protein residues

ZHANG Feng[1], QIN Jian[2], GUO Sha[1], WANG Lan[1]

(1 *National Institute for Food and Drug Control*, *Beijing* 102629, *China*;
2 *ExCell Biotech* (*Taicang*) *Co.*, *Ltd.*, *Taicang* 215434, *China*)

[**Abstract**]　**Objective**: To validate the applicability of a residual CHO host cell protein (HCP) test method for the in-process candidate therapeutic monoclonal antibody and its release control. **Methods**: The coverage ratio of goat anti-CHO HCP polyclonal antibody to the HCPs from supernatant of fermented mock CHO cells was determined by fluorescent-labeled two-dimensional differential gel electrophoresis (2D-DIGE). The limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were determined statistically from results of 40 tests. The specificity, precision/intermediate precision, accuracy, linearity and robustness were validated according to ICH Q2. To verify the suitability of the method for in-process quality control, key HCP removal steps, and sample dilution ranges for each step were determined according to USP 〈1132〉. **Results**: The coverage ratio of goat anti-CHO HCP polyclonal antibody was

[基金项目]　国家"重大新药创制"科技重大专项资助项目(2018ZX0901001-003):创新生物技术药评价及标准化研究,子课题 3:免疫检查点单抗和其他创新生物技术药的质量评价方法和标准研究

[作者简介]　张峰,男,主任技师,研究方向:治疗性单克隆抗体产品的质量研究。E-mail:zhangfeng5122@163.com。

[通讯作者]　王兰,女,研究员,研究方向:治疗性单克隆抗体产品的质量研究。联系电话:(010)53852159,E-mail:iamouran@163.com。

56%. The LOD and LOQ was 2.47 and 7.41 ng·mL^{-1}, respectively. The validation results showed that the specificity, repeatability/intermediate precision, accuracy, linearity and robustness of the selected CHO HCP test method all met the application requirements. With the detection results of serially diluted purification intermediates, the dilution factor range of intermediates and HCP clearance ratio of each purification step was confirmed, and protein A affinity chromatography was identified as the main clearance step for HCP. Deduced with the above results, the selected CHO HCP test method can be used as the in-process control method for protein A chromatography and release test for drug substance. **Conclusion**: The selected CHO HCP test method can be used in the process control and drug substance release of candidate therapeutic mAbs.

[**Key words**] residual host cell protein; detection; validation; coverage rate; monoclonal antibody

治疗性单克隆抗体产品(以下简称单抗)作为近年来快速增长的一类治疗性生物制品,其市场规模已经达千亿美元规模。当前单抗的表达和纯化已形成平台化技术,其纯化过程主要用于去除产品相关杂质(如片段、聚体、电荷变异体等)、工艺相关杂质(如宿主细胞蛋白、DNA、纯化介质等)和污染物(如细菌、病毒、内毒素等),同时过程中质控和质量标准中设置了相应项目用于监控纯化工艺的效率以确保产品质量。其中针对产品相关杂质和污染物的检验项目和方法已经成为产品放行检验中的常规项目,如 SEC-HPLC、IEC-HPLC、电泳、无菌检查和内毒素检查等。而与之形成鲜明对比的是,目前针对工艺相关杂质,特别是残留宿主细胞蛋白(host cell protein, HCP)的控制尚缺少深入的认识和成熟稳健的控制方法。随着近年来研究的深入和临床试验经验的积累,发现 HCP 对单抗制品有重要的影响,可导致免疫原性[1-2]、超敏反应[3]、蛋白降解[4-5]等问题,影响产品安全性和有效性。

当前对于单抗类产品中 HCP 的控制水平主要依据《中华人民共和国药典》尼妥珠单抗注射液个论,将≤100 ng·mg^{-1}作为最低要求[6],检测手段主要采用双抗体夹心 ELISA 方法。ELISA 方法又分为“通用型”和“产品特异型”,前者由检测试剂生产企业采用空白细胞 HCP 制备,可通过商业化渠道购买,但其抗 HCP 抗体所针对的抗原和标准品中包含的 HCP 成分同生产企业用于产品表达的宿主细胞无关,测定结果可能与制品中 HCP 的真实含量存在差异。“产品特异型”检测试剂为针对某特定产品的生产工艺所开发的专门用于该产品中 HCP 含量测定的试剂盒,其制备包被/检测抗体和标准品使用的 HCP 为产品特异性,以使检测结果最大限度接近真实值。当前对单抗 HCP 检测方法的要求为:在产品开发和中试阶段,可以采用通用试剂盒以监测工艺稳健性;上市申请前应开发产品特异性试剂盒用于产品 HCP 质控。通用型和产品特异型试剂盒的方法学验证中,目前单抗生产企业多采用经典验证模式[7],对试剂盒的产品和工艺适用性以及适用条件多无考察,本研究中依据国内外的法规和相关参考文献,以选定的 CHO 细胞表达纯化单抗产品为例,对所选定 CHO HCP 检测试剂盒是否适用于所申报制品及其使用条件进行研究。

材料与方法

1 试剂

SP2/0 宿主细胞蛋白残留量检测试剂盒(Cygnus 公司,货号:F180)、超滤管 Vivaspin 500,3 kDa(Sartorius 公司,货号:28932218)、2D Clean up kit(GE 公司,货号:80648451)、2D Quant kit(GE 公司,货号:80648356)、Cydye DIGE CY3 Minimal 5 nmol(GE 公司,货号:25801083)、IPG-Buffer, pH 3 ~ 10 NL(GE 公司,货号:17600088)、pH 3 ~ 10 13CM 固定化电解质干胶条(GE 公司,货号:17600113)、LF-PVDF 0.2 μM 254 mm × 4M(GE 公司,货号:29083266)、DIGE buffer kit(GE 公司,货号:28937452)、Anti-Goat IgG(H + L), CF™ 633 antibody produced in rabbit(Sigma 公司,货号:SAB4600148)、*N*,*N*'-二甲基甲酰胺(*n*,*n*-dimethylformicaci, DMF)(Sigma 公司,货号:22705-6)均为自购。CHO HCP 测定用试剂盒及试剂盒制备用羊抗 CHO HCP 抗体由生产商提供(生产商名称未提供)。

2 仪器

EPS301 电源(GE 公司);IPGphor3 等电聚焦电泳仪(GE 公司);SE600 Ruby 标准垂直电泳系统(GE 公司);TE62 湿转系统(GE 公司);多通道激光成像仪 Typhoon FLA 9500(GE 公司);覆盖率分析

软件 Melanie 9(GE 公司)。

3 实验细胞

CHO 细胞空发酵上清、单抗生产各阶段中间产物和戈利木单抗(golimumab)由本室保存。

4 实验方法

4.1 二维差异凝胶电泳(2-dimensional difference gel electrophoresis, 2D-DIGE)法

4.1.1 HCP 纯化 按 2D Clean up kit 说明书进行如下操作:① 样品前处理:取 CHO 细胞空发酵上清 500 μL,加入至 Vivaspin(3 kDa)超滤管 11 750 r·min^{-1}离心 30 min,水化液 A(尿素 7 mol·L^{-1},硫脲 2 mol·L^{-1},CHAPS 4%,pH 8.5)洗涤 2 次;倒置超滤管于新的 1.5 mL 离心管中,11 750 r·min^{-1}离心 30 min,收集管底换液上清。② HCP 沉淀:冰浴条件下,取 100 μL 换液上清中加入 100 μL 沉淀剂,震荡混匀并冰浴 15 min 后,加入 300 μL 共沉淀剂,震荡混匀,11 750 r·min^{-1}离心 5 min,吸尽上清。③ 洗涤:在不扰动沉淀条件下,小心加入 40 μL 共沉淀剂,冰浴 5 min,11 750 r·min^{-1}离心 5 min,吸尽上清。向沉淀中加入 25 μL 去离子水、1 mL 洗涤缓冲液(-20 ℃至少预冷 1 h)、5 μL 洗涤添加剂,震荡至沉淀完全散开(但未溶解),-20 ℃孵育 30 min 后,11 750 r·min^{-1}离心 5 min,吸弃上清,干燥沉淀。④ HCP 复溶:向干燥后沉淀中加入 10 μL 水化液 A,震荡,使沉淀复溶,11 750 r·min^{-1}离心 5 min,弃去未溶解物质。

4.1.2 纯化 HCP 定量 按 2D Quant kit 说明书进行如下操作:① 样品沉淀:取试剂盒内 2 mg·mL^{-1}牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)标准溶液 0,5,10,15,20 和 25 μL 及样品(体积不高于 50 μL)分别置 1.5 mL 离心管中,每管加入 500 μL 沉淀剂,室温震荡混匀 2~3 min,加入 500 μL 辅助沉淀剂,短暂混匀,11 750 r·min^{-1}离心 5 min,吸尽上清。② 显色:每管加入 100 μL 铜溶液、400 μL 去离子水,振荡使沉淀溶解,加入 1 mL 工作比色剂(比色剂 A 与比色剂 B 按 100∶1 比例混合),混匀后室温孵育 15~20 min。③ 测定和计算:480 nm 波长测定样品和各标准品吸光度,根据标准溶液的蛋白质含量和吸光度,绘制标准曲线,将样品吸光度代入标准曲线计算样品蛋白质含量,根据样品体积,计算样品蛋白质浓度。

4.1.3 Cy3 标记 HCP 取 5 μL DMF 至 Cydye DIGE CY3 Minimal 5 nmol 中,轻柔震荡,使染料溶解混匀制备标记溶液,保存于-20 ℃;根据蛋白定量结果,取约 50 μg 纯化 HCP 置于 0.6 mL 离心管中,精密 pH 试纸测定下调节 pH 至约 8.5,冰浴;取 0.4 μL 标记溶液加入至 HCP 中,避光冰浴 30 min 进行标记,孵育完成后,加入 10 mmol·L^{-1}赖氨酸 1 μL,冰浴 15 min 淬灭多余染料。

4.1.4 等电聚焦电泳 ① 水化:将 pH 3~10 NL 固定化电解质干胶条胶面朝上置于水化盒中,取标记后 HCP,用水化液 B(尿素 7 mol·L^{-1},硫脲 2 mol·L^{-1},3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐{3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio] propanesulfonate, CHAPs} 2%,三羟甲基氨基甲烷[Tris(hydrosymenthyl)-aminomethande, Tris] 75 mmol·L^{-1},二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT) 35 mmol·L^{-1},IPG Buffer 1%,pH 8.5)补足体积至 250 μL,加入放置有胶条的水化槽中,水化 10~12 h。② 等电聚焦:将水化后胶条置于等电聚焦电泳仪聚焦盘中,揭去覆盖膜,两端放置超纯水浸润的纸电极,安装电极板,覆盖矿物油,进行等电聚焦电泳,Ettan IPGPhor 3 软件设置聚焦条件为:Step,500 V,500 VH;Grad,1 000 V,800 VH;Grad,8 000 V,11 340 VH;Step,8 000 V,5 400 VH;Step,1 000 V,16 000 VH,维持步骤,可随时终止。③ 平衡胶条:电泳结束后取出胶条,按顺序分别放置于平衡 A 液(尿素 6 mol·L^{-1},Tris 75 mmol·L^{-1},甘油 29.3%,SDS 2%,DTT 1%,溴酚蓝 0.002%,pH 8.8)和平衡 B(尿素 6 mol·L^{-1},Tris 75 mmol·L^{-1},甘油 29.3%,SDS 2%,碘乙酰胺 2.5%,溴酚蓝 0.002%,pH 8.8)液中各 15 min,平衡液体积 20 mL·胶条$^{-1}$。

4.1.5 SDS-PAGE 电泳 按照 DIGE buffer kit 说明书进行如下操作:配制宽度为 13 cm 的 10% SDS-PAGE 胶[8],将平衡后等电聚焦电泳胶条放置至 SDS-PAGE 胶顶端,另于胶条两端放置浸润预染蛋白 Marker 的滤纸条,琼脂糖凝胶融封,按照每块凝胶 12 mA 条件进行恒流过夜电泳(16~18 h)。

4.1.6 Western-Blot 法和覆盖率分析 ① 转印:卸下凝胶,将凝胶转移至 PVDF 膜表面,两侧覆盖滤纸后按照湿转仪操作说明,80 mA 过夜转印(16~18 h)。② Western-Blot 法:50 mL PBS 冲洗 PVDF 膜,置 50 mL 封闭液(5% 脱脂奶粉/PBS)中封闭 2 h。封闭结束后加入羊抗 CHO HCP 抗体至终浓度 10 μg·mL^{-1},室温振摇孵育 2 h。以每膜 100 mL 洗涤液量(0.05% Tween 20/PBS)洗涤 2 次,每次 5 min。将 PVDF 膜置于含 1 μg·mL^{-1} Anti-Goat IgG (H+L), CF™ 633

antibody produced in rabbit 的 50 mL 封闭液孵育 2 h，结束后洗涤液洗涤 2 次，室温通风条件下干燥。③ 覆盖率分析：PVDF 膜置于 Typhoon，使用 Typhoon FLA 9500 软件分别对 Cy3 和 Cy5 通道进行扫描，生成图片文件。使用 Melanie 9 软件对 Cy3 和 Cy5 通道的扫描图像进行重合分析，计算抗 HCP 抗体覆盖率。

4.2 ELISA 测定 HCP 含量

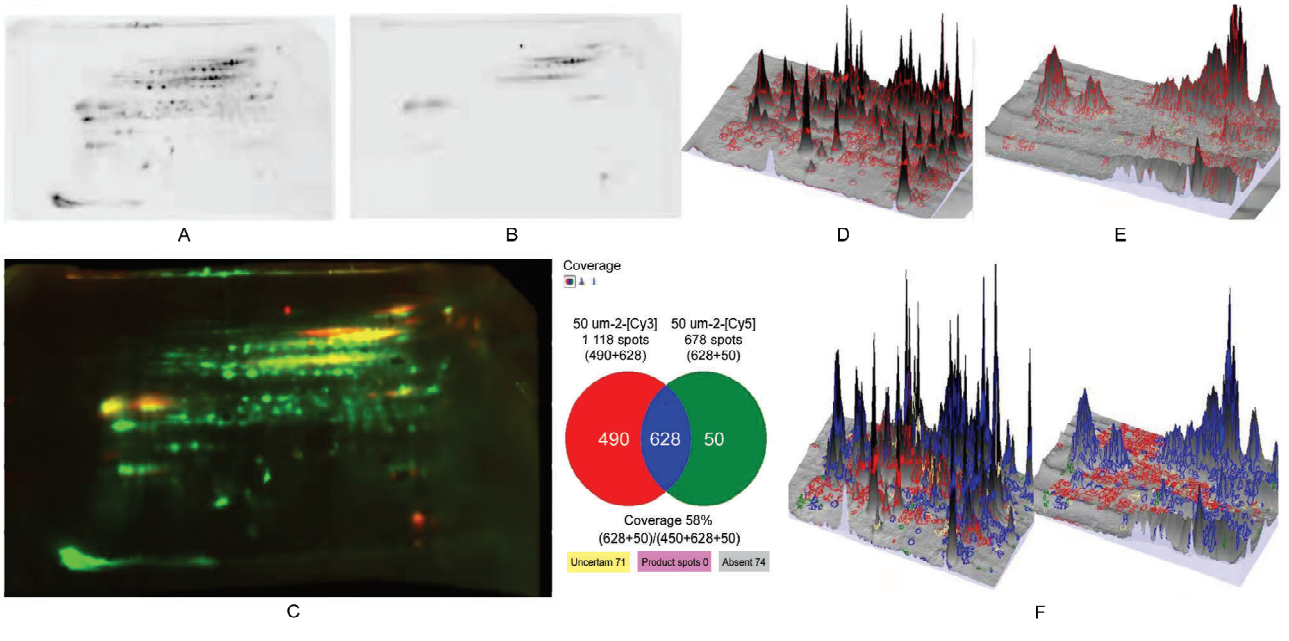
按试剂盒说明书操作。向抗 CHO HCP 抗体包被的微孔板中加入 HRP 标记检测抗体 50 μL·孔$^{-1}$，随后加入标准品、待测样本 100 μL·孔$^{-1}$。置振荡器 500 r·min^{-1}室温孵育 120 min；孵育结束倾尽微孔板，磷酸盐吐温缓冲液（PBST）洗涤 5 次，加入 3,3',5,5'-四甲基联苯胺（TMB）显色底物，室温孵育 15 min 显色；显色结束，加入 1 mol·L^{-1}的 H_2SO_4 100 μL·孔$^{-1}$，终止显色，酶标仪测定各孔 450 nm 处测 *A* 值。以 4 参数模式拟合标准品的剂量-反应标准曲线，根据拟合方程计算样品中 CHO HCP 含量。

结　果

1 覆盖率验证结果

Cy3（HCP 总蛋白）和 Cy5（抗体结合 HCP 蛋白）通道扫描结果图片以及两通道重叠图片见图 1A ~ 图 1C。Melanie 9 软件分析覆盖率，质控（quality control）、对齐（alignment）和检测（detection）步骤采用系统默认参数；点编辑（spot edition）步骤中选择 Cy3 通道中强度（intensity）≥326 作为确认蛋白染色点的阈值，共识别出 1 267 个蛋白点；当前滤镜（presence filter）步骤中在 3D 视图下对蛋白点和抗体结合点的检测条件进行进一步微调，调整完毕后，共识别 HCP 蛋白点 1 118 个（图 1D），抗体结合蛋白点 678 个（图 1E），其中抗体不能结合的 HCP 蛋白点 490 个，抗体结合的 HCP 蛋白点 628 个，抗体结合但 Cy3 未染色的蛋白点 50 个。按照下面公式计算抗 HCP 抗体覆盖率为 56%（Melanie 9 计算结果为 58%）。

抗 HCP 抗体覆盖率（%）=（抗体结合的 HCP 蛋白点）/（总 HCP 蛋白点数）×100%



A：Cy3 通道（HCP 总蛋白点）扫描结果图片；B：Cy5 通道（抗体结合 HCP 蛋白点）扫描结果图片；C：Cy3 和 Cy5 通道合成重叠图片；D：Melanie 9 软件识别的 HCP 蛋白点；E：Melanie 9 软件识别的抗体结合 HCP 蛋白点；F：覆盖率分析结果

图 1　羊抗 CHO HCP 抗体覆盖率检测/分析结果

2 方法学验证

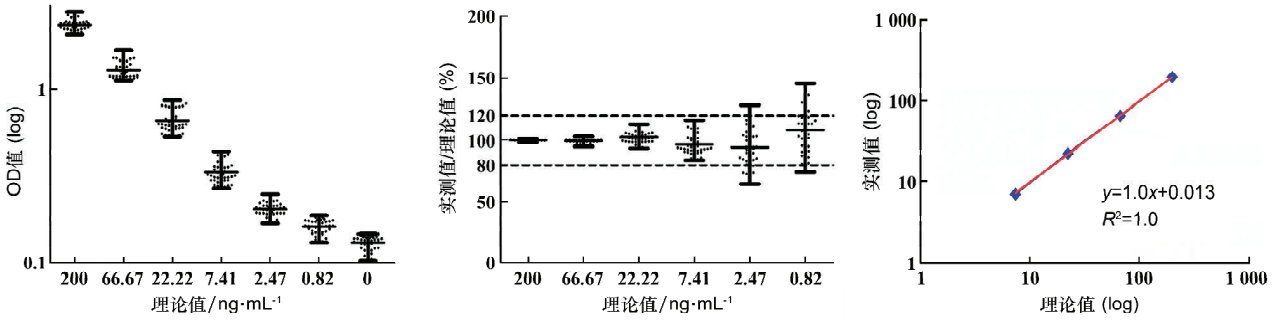
2.1 检出限和定量限

以 CHO HCP 标准品为待测样品，以 200 ng·mL^{-1} 为起始浓度，向下以 1∶3 稀释比例向下系列稀释 6 个浓度，分别为 200，66.67，22.22，7.41，2.47 和 0.82 ng·mL^{-1}，使用样品稀释液作为 0 ng·mL^{-1} 样

品,进行检测,共计检测 40 次。对各浓度样品的 OD 值和测定值进行分析,结果见表 1,图 2A 和图 2B。检出限(limit of detection,LOD)确定中,将 OD 值 95% 可信区间下限大于空白样品 OD 值 95% 可信区间上限的最低浓度确定为 LOD。定量限(limit of quantitation,LOQ)确定中,将 40 次检测测定值的 95% 可信区间位于该浓度理论值 ±20% 范围内的最低浓度确定为 LOQ。根据表 1 统计结果,该 CHO HCP 检测方法的 LOD 为 2.47 ng·mL^{-1},LOQ 为 7.41 ng·mL^{-1}。

表 1 40 次检测统计学分析结果 $n=40$

检出限计算(各浓度样品 OD 值统计分析结果)						
浓度 /ng·mL^{-1}	平均值 /ng·mL^{-1}	标准差 /ng·mL^{-1}	相对标准差 /%	95% 可信区间下限 /ng·mL^{-1}	95% 可信区间上限 /ng·mL^{-1}	95% 可信区间下限-空白样品 95% 可信区间上限
200	2.363	0.161	6.832	2.098	2.629	1.945
66.67	1.297	0.150	11.590	1.050	1.545	0.898
22.22	0.664	0.099	14.984	0.500	0.827	0.348
7.41	0.336	0.049	14.437	0.256	0.416	0.104
2.47	0.206	0.019	9.410	0.174	0.238	0.022
0.82	0.163	0.015	9.122	0.139	0.187	−0.014
0	0.133	0.012	9.077	0.113	0.152	−0.040
定量限计算(各浓度样品测定浓度统计分析结果)						
浓度 /ng·mL^{-1}	平均值 /ng·mL^{-1}	标准差 /ng·mL^{-1}	相对标准差 /%	95% 可信区间下限 /ng·mL^{-1}	95% 可信区间上限 /ng·mL^{-1}	理论值 ±20% 区间
200	200.162	0.871	0.435	198.729	201.595	160 ~ 240
66.67	66.269	0.931	1.404	64.738	67.800	53.336 ~ 80.004
22.22	22.783	1.026	4.505	21.095	24.472	17.776 ~ 26.664
7.41	7.164	0.610	8.511	6.161	8.167	5.928 ~ 8.892
2.47	2.331	0.370	15.888	1.722	2.940	1.976 ~ 2.964
0.82	0.888	0.155	17.435	0.634	1.143	0.656 ~ 0.984
0	0.130	0.079	60.375	0.001	0.260	—



A:0 ~ 200 ng·mL^{-1}样品 40 次检测 OD 值;B:0 ~ 200 ng·mL^{-1}样品 40 次实测值(数据进行了转换,使用理论值% 做图);C:7.41 ~ 200 ng·mL^{-1}样品 40 次检测结果线性检测值 vs 理论值线性拟合结果

图 2 精密性/中间精密性、准确性、线性和耐受性验证结果

2.2 特异性

250 ng·mL^{-1} SP2/0 HCP 标准品(SP2/0 宿主细胞残留量检测试剂盒)1∶12.5 比例加入浓度为 100 mg·mL^{-1}的戈利木单抗(SP2/0 细胞表达),制备含 SP2/0 HCP 为 20 ng·mL^{-1}的特异性测试样品,进行 6 次检测,结果分别为 0.239,0.192,0.155,0.167,0.127 和 0.174 ng·mL^{-1},均低于方法的 LOD(2.47 ng·mL^{-1}),方法的特异性良好。

2.3 精密性/中间精密性、准确性、线性和耐受性

如表 1 所示,当样品中 CHO HCP 含量高于方

法 LOQ(7.41 ng·mL^{-1})时:在 37 个时间点对多个浓度样品进行 40 次检测,结果的相对标准差均 < 20%,说明该方法的精密性/中间精密性良好;检测结果的 95% 可信区间均位于理论值 80% ~120% 范围内,方法的准确性良好;CHO HCP 含量高于 LOQ 的 200,66.67,22.22 和 7.41 ng·mL^{-1}。样品 40 次检测结果与理论值作图,并进行线性拟合(图 2C),拟合方程为 $y = 1.0x + 0.013$,相关系数 $R^2 = 1.0$,方法线性良好;37 个时间点进行 40 次检测,方法的精密性/中间精密性、准确性和线性均符合应用要求,证明方法耐受性良好。

3 各生产步骤中间产品的检测

HCP 检测除用于产品放行外,在工艺验证阶段和过程中控制中多被用于监测工艺稳定性。工艺监测应用中,应对 HCP 检测方法对各生产阶段中间产物的适用性进行界定,特别是要明确所使用方法的检测结果是否会受到中间产物中缓冲液成分的干扰,确定各阶段产物检测中所需要稀释的比例。使用选定的 HCP 检测方法测定单抗各生产阶段中间产物的系列稀释样品,结果见表 2。由检测结果可见,样品的检测结果并不随着稀释倍数呈现线性改变,该现象的原因主要来自:① 样品中存在的可能干扰检测的因素,如干扰物质、盐离子浓度、pH 值等。② 不同 HCP 浓度条件下检测结果的变异度存在差异,浓度越低,结果变异性越大。按《美国药典》〈1132〉要求,过程中样品 HCP 检测应选择连续的大于等于 3 个稀释度结果的变异度(CV)≤20% ~25% 的稀释度范围[9]。在选定的稀释度范围内,样品的检测结果应高于 LOQ,且结果与稀释比例间应具备近似线性关系。在最后一步超滤产物和原液的检测中,由于样品中 HCP 含量低,过高的稀释度将导致样品检测结果低于 LOQ,因此采用了非倍比稀释的方法确定稀释范围,将稀释范围分别确定为 50 ~80 倍和 40 ~70 倍稀释。同时通过检测结果可见,在所研究单抗的纯化步骤中,宿主细胞 HCP 主要由蛋白 A 亲和层析步骤去除,其后的阴/阳离子交换层析各可清除上一步骤残留 HCP 约 50%,两者合计清除约 82.10%,该结果有助于合理设定过程中控制参数。以本研究为例,对 HCP 的监控可设置为:对亲和层析产物和原液进行 HCP 检测,同时根据工艺验证数据和积累的生产数据,设定合理的警戒限和行动限。

表 2 单抗各生产步骤中间产物 HCP 含量检测结果

样品名称	样品浓度 /mg·mL^{-1}	稀释倍数	检测结果 /ng·mL^{-1}	含量 /ng·mL^{-1}	均值 /ng·mL^{-1}	采用稀释度测定结果的 CV/%	选择范围	相对含量 /ng·mg^{-1}	清除率 /%
细胞发酵培养物澄清收获液	ND	**10 000**	**75.70**	**757 000**	674 000.00	13.66	10 000 ~40 000	ND	NA
		20 000	**34.50**	**690 000**					
		40 000	**14.38**	**575 000**					
		80 000	6.53	522 000					
单抗亲和色谱收获液	13.9	10	77.59	775.87	1 054.79	11.32	20 ~80	75.88	99.85
		20	**47.00**	**939.98**					
		40	**26.15**	**1 045.97**					
		80	**14.73**	**1 178.41**					
细胞上清亲和色谱上样流穿样	ND	**10 000**	**85.20**	**852 000**	741 666.67	17.38	NA	NA	NA
		20 000	**38.65**	**773 000**					
		40 000	**15.00**	**600 000**					
		80 000	6.83	546 000					
单抗超滤收获液	8.5	**100**	**5.54**	**553.84**	623.00	16.76	100 ~400	73.29	3.41
		200	**2.86**	**572.06**					
		400	**1.86**	**743.09**					
		800	1.69	1 351.20					
单抗阴离子交换色谱纯化收获液	8.3	**10**	**22.04**	**220.37**	273.10	13.14	10 ~40	32.90	55.11
		20	**11.77**	**235.48**					
		40	**7.06**	**282.39**					
		80	3.77	301.45					

续表 2

样品名称	样品浓度 /mg·mL^{-1}	稀释倍数	检测结果 /ng·mL^{-1}	含量 /ng·mL^{-1}	均值 /ng·mL^{-1}	采用稀释度测定结果的 CV/%	选择范围	相对含量 /ng·mg^{-1}	清除率 /%
单抗超滤收获液	8	5	**32.63**	163.13	237.02	15.12	5 ~ 20	29.63	9.96
		10	**20.68**	206.84					
		20	**10.99**	219.87					
		40	7.11	284.34					
单抗阳离子交换色谱纯化收获液	8.6	**5**	**17.91**	**89.55**	127.05	17.76	5 ~ 20	13.68	53.82
		10	**11.69**	**116.87**					
		20	**6.40**	**128.02**					
		40	3.41	136.26					
单抗超滤收获液	48.9	**50**	**12.06**	**602.80**	707.81	9.38	50 ~ 80	14.47	~5.78
		60	**11.00**	**660.19**					
		70	**10.21**	**714.36**					
		80	**9.36**	**748.87**					
单抗原液	45.8	**40**	**12.31**	**492.30**	621.82	14.45	40 ~ 70	13.58	6.20
		50	**11.30**	**565.17**					
		60	**10.06**	**603.35**					
		70	**9.96**	**696.95**					

粗体字:最后选定的稀释度范围

讨　论

HCP 测定为纯化工艺纯化能力最重要的监测手段,检测方法多采用双抗体夹心 ELISA 方法[10]。与临床/科研中常使用的 ELSIA 方法不同,HCP 检测中所检测的抗原为高度复杂的混合抗原,其包含的抗原数量不低于 2 000 种[11-12],所用抗体对 HCP 抗原的覆盖率对检测结果与真实 HCP 含量的接近程度存在着直接的影响[13]。Zhang 等[14]发现,采用不同工艺生产相同单抗制品时,中间产物中 HCP 的种类具有较大差异。Inn 等[15]发现,采用不同株的空 CHO 细胞或同一细胞株采用不同的培养策略时,其上清中 HCP 的种类相似性约为 80%。说明不同细胞株或同一细胞株采用不同工艺用于重组制品生产时,其 HCP 的成分和各成分含量均具有较大差异。因此,法规规定产品上市前需建立产品特异性的 HCP 检测方法,产品特异性至少包括 2 个方面:HCP 标准品、检测用抗 HCP 抗体。标准品所含 HCP 的蛋白种类和含量应同实际生产尽量一致,检测用抗 HCP 抗体应尽量覆盖产品中所含 HCP 的种类。本研究中采用 2D-DIGE 方法对抗 HCP 抗体的覆盖率进行测定,可在同一块凝胶电泳结果中同时进行蛋白染色和 Western-Blot 染色,并通过高分辨率扫描仪配合具备 3D 视图的软件对结果进行分析,较传统的双胶分别进行银染和 Western-Blot 染色的方式,具有更高的分辨率和结果可靠性[16-17]。本研究中使用 2D-DIGE 方法检测得到的抗体覆盖率约为 56%,当前主流的覆盖率计算方式为[可同时在电泳(Cy3 染色)和 Western-Blot(Cy5 染色)中检测到的点数 + 可在 Western-Blot 中检测到但未在电泳中检测到的点数]/(电泳中检测到的点数 + 可在 WB 中检测到但未在电泳中检测到的点数)。若使用该计算方式,本研究中使用的抗 HCP 抗体的覆盖率为 58%。该计算方式中分子分母中同时增加了“可在 Western-Blot 中检测到但未在电泳中检测到的点数”,而该部分蛋白点在电泳染色中对应的蛋白点数目是未知的,通过忽略这部分未知点,虽然可变相地提高覆盖率,但存在不合理性[18]。本研究中覆盖率的计算的方式为:可同时在电泳和 WB 中检测到的点数/电泳中检测到的 HCP 点数,所得覆盖率为 56%。

在方法学验证中,本研究遵循了 ICH Q2 的内容对所选用的 CHO HCP 检测方法进行验证,但在 LOD 和 LOQ 的确定中,LOD 和 LOQ 由实际检测结果得出,而非来自空白样品的 OD 值计算[19]。对 40 次检测结果的 OD 值进行分析,将 OD 值的 95% 可

信区间下限大于空白样品 95% 可信区间上限的最低检测浓度作为方法的 LOD;将测定结果的 95% 可信区间位于理论值的 80% ~120% 范围内的最低检测浓度作为方法 LOQ,这种 LOD 和 LOQ 的确定方式更加科学合理。

本研究还对所使用的 HCP 检测方法用于工艺过程中控制的适用性进行了考察。过程中控制作为工艺监测和持续验证的重要组成部分,可对生产工艺的性能进行监控,确保终产品质量,并替代部分放行检验。HCP 作为工艺纯化能力的重要参数之一,应包含在关键中间产物的检测中,使用系列稀释的方法,对本 HCP 检测试剂盒用于各生产步骤样品检测的稀释度进行了确定,确认了结果变异度不高于 20% 的稀释度范围,以符合相关法规的要求。这部分工作应于中试或商业化工艺验证中进行,在工艺稳定性得到验证的基础上,所确认的稀释范围在应用中应具有持续性。研究中,通过计算清除率确定蛋白 A 亲和层析为 HCP 清除的关键步骤,随后的阴/阳离子层析可清除约 82.10% 的亲和层析不能清除的 HCP,该结果与文献报道一致[20-21]。根据该结果,当将 HCP 检测作为过程中控制项目时,将其置于蛋白 A 亲和层析产物样品和原液样品的检测中时,可对整个工艺清除 HCP 的能力进行较为完全的监测。

本研究中,对所选择的 CHO HCP 检测方法进行了验证,除当前企业提交资料中的方法学验证内容外,增加了抗 HCP 抗体覆盖率的验证和过程中控制的适用性考察。此外在方法学验证中采用的 LOQ 和 LOD 确定方法较当前多数企业采用的方法更科学,且具有统计学基础和依据。希望本研究能对当前较为模糊的 HCP 质控方法的验证起到一定的借鉴作用(**致谢**:衷心感谢北京绿竹生物科技有限公司的彭玲老师提供单抗产品各生产步骤中间产物)。

[参 考 文 献]

[1] ROMER T, SAENGER P, PETER F, *et al*. Seven years of safety and efficacy of the recombinant human growth hormone Omnitrope in the treatment of growth hormone deficient children: results of a phase Ⅲ study[J]. *Horm Res*, 2009, 72(6): 359 - 369.

[2] BIERICH JR. Treatment of pituitary dwarfism with biosynthetic growth hormone[J]. *Acta Paediatr Scand Suppl*, 1986, 325: 13 - 18.

[3] HANANIA NA, NOONAN M, CORREN J, *et al*. Lebrikizumab in moderate-to-severe asthma: pooled data from two randomised placebo-controlled studies[J]. *Thorax*, 2015, 70(8): 748 - 756.

[4] GAO SX, ZHANG Y, STANSBERRY-PERKINS K, *et al*. Fragmentation of a highly purified monoclonal antibody attributed to residual CHO cell protease activity[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 108(4): 977 - 982.

[5] BEATSON R, SPROVIERO D, MAHER J, *et al*. Transforming growth factor-β1 is constitutively secreted by Chinese hamster ovary cells and is functional in human cells[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 108(11): 2759 - 2764.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2015 年版, 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.

[7] ICH. Harmonised tripartite guideline Q2(R1): Validation of analytical procedures text and methodology[EB/OL]. (2005 - 11 - 01). https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf.

[8] 奥斯伯. 精编分子生物学实验指南[M]. 第五版. 北京:科学出版社,2005.

[9] USP. USP39-NF34/〈1132〉[S]. 2015.

[10] TSCHELIESSNIG AL, KONRATH J, BATES R, *et al*. Host cell protein analysis in therapeutic protein bioprocessing-methods and applications[J]. *Biotechnol J*, 2013, 8(6): 655 - 670.

[11] LEWIS NE, LIU X, LI YX, *et al*. Genomic landscapes of Chinese hamster ovary cell lines as revealed by the Cricetulus griseus draft genome[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 759 - 765.

[12] PARK JH, JIN JH, LIM MS, *et al*. Proteomic analysis of host cell protein dynamics in the culture supernatants of antibody-producing CHO cells[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 44246.

[13] BALDUS PA, BROWN M, WRIGHT RS, *et al*. Comparison of purification strategies for antibodies used in a broad spectrum host cell protein immunoassay[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2018, 115(2): 413 - 422.

[14] ZHANG QC, GOETZE AM, CUI HC, *et al*. Comprehensive tracking of host cell proteins during monoclonal antibody purifications using mass spectrometry[J]. *MAbs*, 2014, 6(3): 659 - 670.

[15] YUK IH, NISHIHARA J, WALKER D, *et al*. More similar than different: Host cell protein production using three null CHO cell lines[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2015, 112(10): 2068 - 2083.

[16] GEISLER C, GAISA NT, PFISTER D, *et al*. Identification and validation of potential new biomarkers for prostate cancer diagnosis and prognosis using 2D-DIGE and MS[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 454256.

[17] CIERESZKO A, DIETRICH MA, SŁOWIŃSKA M, *et al*. Identification of protein changes in the blood plasma of lung cancer patients subjected to chemotherapy using a 2D-DIGE approach[J]. *PLoS One*, 2019, 14(10): e0223840.

[18] HENRY SM, SUTLIEF E, SALAS-SOLANO O, *et al*. ELISA reagent coverage evaluation by affinity purification tandem mass spectrometry[J]. *MAbs*, 2017, 9(7): 1065 - 1075.

[19] DANIEL W, Tholen DW, Linnet K, *et al*. Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline[G]. EP17-A, 2004.

[20] FOLLMAN DK, FAHRNER RL. Factorial screening of antibody purification processes using three chromatography steps without protein A[J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1024(1 - 2): 79 - 85.

[21] SHUKLA AA, HUBBARD B, TRESSEL T, *et al*. Downstream processing of monoclonal antibodies: application of platform approaches[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 848(1): 28 - 39.

编辑:刘卓越/接受日期:2021 - 07 - 28