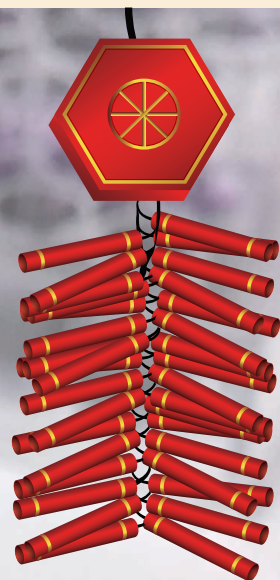
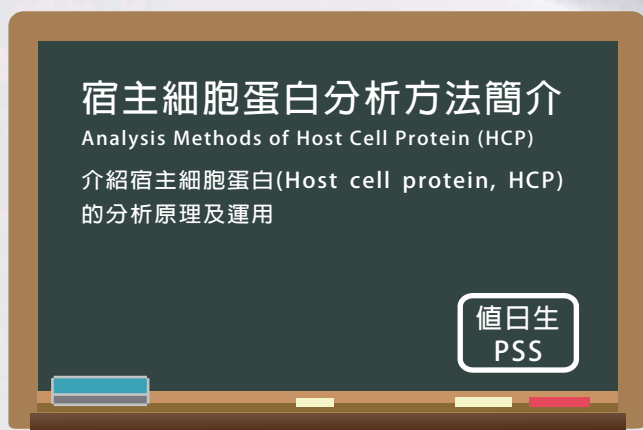


蛋白質科學 暨 技術服務 電子報

技術佈告欄 Technical Bulletin




焦點新聞 News

🎆 市場焦點 -

FDA發布生物相似藥可互換性指引草案
(interchangeability draft guidance) 

🎆 參展資訊 -

BioPharma Asia 2017展會
(攤位：D23, Mar.21-23, Singapore) 



宿主細胞蛋白 HCP 分析方法簡介

(Host Cell Protein (HCP) Analysis in Biologics Development)

前言

生物藥相對於合成藥有著低副作用、高選擇性及製程不易模仿等優勢，然而藉由細胞株生產目標藥物的製程中會出現許多宿主DNA、宿主細胞蛋白(HCP)及代謝物等雜質，其中HCP具有降低產物功效、影響臨床反應及誘導人體免疫反應等風險，在國際醫藥法規(ICH Q6B)裡HCP被認為是一種需要監測的關鍵品質要素(Critical quality attribute, CQAs)，此外，美國食品藥品管理局(FDA)及歐洲藥品管理局(EMA)也提出需要互補的方法檢測HCP確保其數據精確以降低對於人體所造成的風險，以美國藥典公約(USP)公布的人類重組胰島素為例，其HCP的容許含量便不得超過10ng/mg^[1]，因此在生物藥的製程中HCP監控策略有著相當重要的地位。目前有許多HCP的分析方式，根據其原理可以分成兩大類，分別是用於偵測含量的免疫特異性偵測法以及用於鑑定其身分的非特異性偵測法，藉由了解這些分析方式的原理並根據不同的情況中選擇適當的方法，將有助於製程的改善及優化，以下將介紹上述分析方式的運作原理及其可以運用的範圍。

HCP的風險管理與監測策略在生物藥製程的初期便須開始進行，如圖1^[2]所示，其最終目的是降低HCP的含量，因此在過程中不斷的追蹤HCP含量變化是有其必須性的，此外為了更有效率的改善製程，鑑定HCP的主要成分並擬定針對性的純化製程也是相當重要的一部份，藉由持續的檢測並改善及優化製程，最終便能得到HCP在容許範圍內的生物藥。在HCP的分析方式中用於檢測含量的方法為免疫特異性偵測法(Immuno-specific methods)，其抗體來源往往來自於製程中所需要用到的空細胞株，將之培養後純化獲得HCP並製成多株抗體，利用抗體鍵結生物藥中的HCP並透過呈色計算其含量，該方式有著專一性高、靈敏度高、偵測範圍廣泛等優點，能夠一次偵測多種生物製劑中含有的HCP，由於有許多商用試劑或通用抗體，因此使用上相當便利，根據抗體的使用方式可以分為酵素免疫分析法(ELISA)、西方墨點法(Western blot)及鄰近連接分析法(Proximity ligation assay)等；另外

一種偵測法為非特異性偵測法(Non-specific methods)，其藉由鑑定製劑中的蛋白身分能夠掌握HCP中主要的成分，同時也能用來比較追蹤不同製程中對HCP所產生的影響或改變，該種偵測方式有二維膠體電泳(2D gel electrophoresis)與液相層析串聯式質譜儀(LC-MS/MS)。

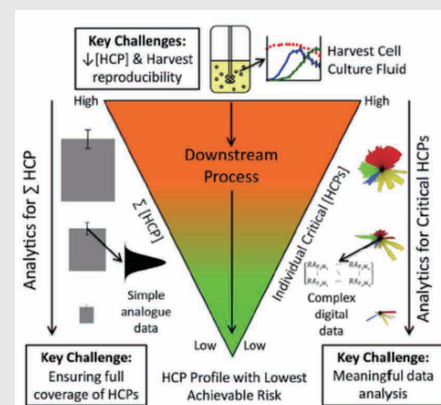


圖1. 在生物藥製程中HCP的管理流程，藉由分析HCP的總量與鑑定HCP的身分蒐集資訊，再以純化方法降低產品中高風險之HCP含量^[2](Biotechnol. bioeng., 2015, 112 (9): 1727-37)。

A. 免疫特異性偵測法:

1. ELISA

ELISA是透過專一性抗體辨認抗原，配合酵素呈色反應所設計之偵測法，根據其檢測類型又可以分為三明治法(Sandwich)、間接法(Indirect)及競爭法(Competitive)，三明治法是利用捕捉抗體(Capture antibody)將抗原留下，接著利用帶有酵素的檢測抗體(Detecting antibody)接上抗原後進行呈色，由於三明治法藉由兩種專一性抗體辨認多價位抗原並鍵結之(如圖2^[3]所示)，具有專一性高的優點，此外，ELISA的偵測靈敏度相當高(1ng/mL)^[4]。市面上有許多通用型試劑盒可以用在HCP含量的檢測，在美國藥典公約^[5]中也有提出必須用ELISA對製劑中的HCP進行定量，然而市售的ELISA試劑盒雖然含有通用型的抗體，卻無法完全預測不同生物藥製程中HCP的多變性，在圖3^[6]中可以看到用捕捉抗體(Capture Antibody)與偵測抗體(Detection Antibody)所辨認的蛋白並不一致，另外過去的研究中^[7]也提到ELISA無法對製劑中特定的HCP定量的例子，這樣的結果可能是因為HCP在帶有載體的細胞株中產生了修飾，導致其抗體結合位出現改變，如此一來便有可能錯估HCP在製劑中的含量進而提高製劑的風險，因此確保ELISA的數據可信度是相當重要的。

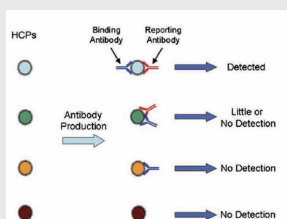


圖2. Sandwich ELISA抗體的運作示意圖^[3](Biotechnol. bioeng., 2009, 103 (3): 446-58)。

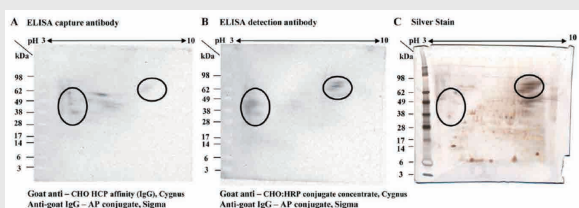


圖3. 商用ELISA 試劑盒抗體對於HCP辨別程度不一，(A)商用試劑盒捕捉抗體對HCP之反應(B)商用試劑盒偵測抗體對HCP之反應(C)二維電泳對照圖^[6](Biotechnol. J., 2013, 8: 655-70)。

2. Western blot

Western blot是藉由將蛋白質鑲嵌在聚偏二氟乙烯膜 (PVDF membrane) 上，並利用具有抗原專一性的一抗以及具有一抗專一性的二抗進行目標蛋白的檢測，根據是否有經過電泳分離不同大小的蛋白，又能夠進一步地分成一般的Western blot與Dot/Slot blot；有別於ELISA的定量，Western blot必須透過internal control來進行比較作相對定量，然而其實驗結果卻可以觀察到不同分子量的HCP變化，如圖4^[8]所示，藉由電泳分離不同大小的蛋白質後，透過Western blot觀察HCP在不同製程階段中的改變，如此一來便能選擇較佳的製程策略，此外，Dot/Slot blot則是省略電泳的步驟，直接將蛋白轉漬於PVDF上進行抗體鍵結的步驟，此方法無法觀察到不同的蛋白質，僅以呈色深淺來得知HCP含量的變化，可以迅速得知結果；然而利用這兩種方式必須注意二抗交叉反應(Cross-reaction)的可能，例如若其生產的目標蛋白屬於疫苗或抗體等，來自中國倉鼠卵巢細胞株(CHO)或小鼠骨髓瘤細胞(NS0)的人類IgG可能與作為二抗的IgG有著較高的同源性，如此一來便有可能錯認蛋白使結果出現差異，在這類型的試驗中可以藉由加入IgG標準品做為對照組(圖5^[3])或直接利用一抗進行呈色反應觀察結果，以降低實驗上的誤差。

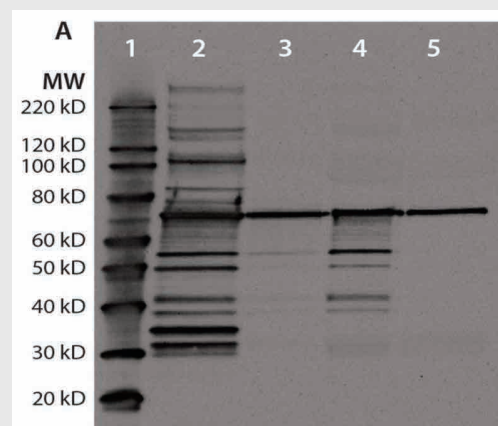


圖4. 利用Western blot 觀察不同製程對於HCP造成的變化 (1)Marker (2)未純化產物 (3)純化管柱一洗脫物 (4)純化管柱二洗脫物 (5)最終產物^[8](BioProcess Intl., 2015)。

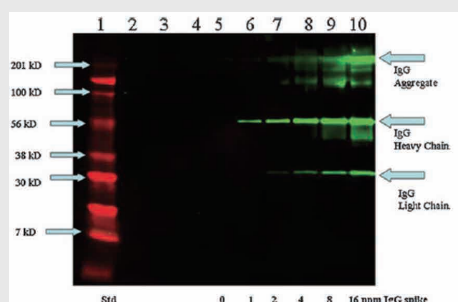


圖5. 在HCP分析中加入IgG標準品作為交叉反應的對照組(1-4)分析物(5-10)加入不同濃度之IgG對照組^[3](*BioTechnol. bioeng.*, 2009, 103 (3): 446-58)。

3. Proximity ligation assay

Proximity ligation assay需要兩種帶著寡核苷酸序列(Oligo_nucleotide sequence)的專一性抗體以及捕捉抗原的捕捉抗體，藉由捕捉體將抗原留住，其中帶有序列的兩個鄰近抗體藉由互補的连接子(Connector)再利用酵素(Ligase)能使序列相連(Ligation)，最後利用即時聚合酶鏈鎖反應 (Real-time PCR)針對序列進行定量(圖6^[9])，由於 Real-time PCR 是以螢光系統進行偵測，因此其靈敏度相當高 (0.025 ng/mL)^[6]，另一方面也減少了交叉反應的可能，然而該方式需要具有三種鍵結價位的抗原，同時也必須給予足夠的空間進行抗體的鍵結，因此縮限了能夠偵測HCP的量。

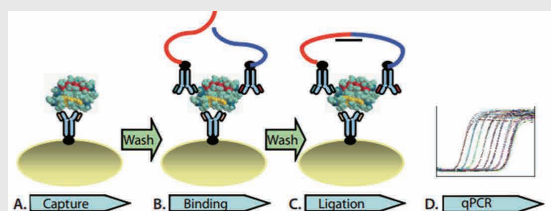


圖6. 利用抗原相鄰的序列連結進行即時定量^[9](*BioProcess Intl.* 10 (2): 44-50)。

4. Threshold

Threshold是藉由偵測尿素水解所產生的閾值來檢測蛋白質含量的方法，其原理是將抗原一端接上帶有生物素標定 (Biotinylated) 抗體，另一端則接上帶有尿素酶(Urease)的抗體，接著與鏈親合素(Streptavidin)進行結合並產生水解反應，接著透過機器讀取數值獲得HCP含量數據，該方法屬於類似ELISA的三明治法，具有高專一性高靈敏度的特色，此外由於捕捉抗體不必事先

處理固定在讀取盤上，因此能夠自行加入複數抗體與抗原混合偵測HCP含量^[10]，然而該方法的抗體需配合修飾加工才能進行反應，因此與其他方式相比其抗體的選擇上較少。

5. Biosensors

Biosensors的靈敏度可以到 $10^{-18}M$ ，其原理是利用生物層上的抗體與偵測溶液中的抗原結合，藉由偵測其電壓或波長的改變來計算HCP的含量，由於操作簡易且分析時間短，因此適用於大量樣品分析的自動化操作，然而同時也有著抗體與抗原保存不易、再生次數有限，容易受到環境影響等問題^[11]，因此大多數都是用在製程已經穩定的階段。

B. 非特異性偵測法:

1. 2D gel electrophoresis

2D gel electrophoresis可以根據分子量與等電點觀察到不同的蛋白質，原理是先讓蛋白質在帶有pH梯度的膠體進行等電點聚焦電泳(Isoelectric focusing, IEF)，帶著電荷的蛋白質在等電點對應的pH值中淨電荷等於零，因此便能分離出帶有不同電荷的蛋白質，接著再將膠體進行SDS electrophoresis，將蛋白質根據分子量大小做二次分離，並利用蛋白質染劑呈色，如此一來便能得到較為詳細的蛋白質資訊，透過該方法能夠比較不同製程階段的HCP變化，如圖7^[6]所示，然而一般分析時實驗條件可能出現些微的差異使蛋白質印跡出現位移，進而導致難以跟先前的結果圖做比較，因此還有一種方式是藉由不同顏色的螢光染劑CyDye將不同階段的樣本染色，接著將所有樣本跑在同一片膠上，如此一來便能降低實驗時所出現的人為誤差(圖8^[7])，需要注意的是，螢光染劑CyDye是透過改變蛋白質性質的疏水性與電荷以接上Lysines，因此在結果分析或要做後續的質譜鑑定時便需要特別加註。此外，利用同位素標定法具有不會改變蛋白質且高靈敏度的優點，但放射顯影曝光時間長且操作上的安全風險相對較高^[13]。

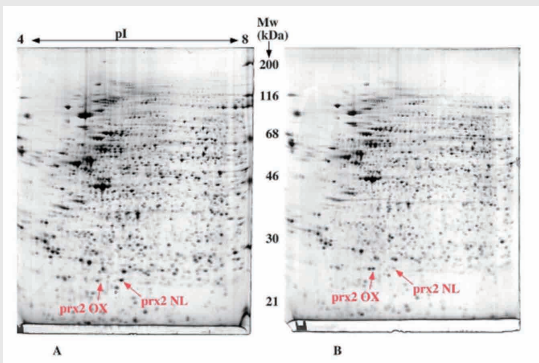


圖7. 透過二維式電泳分析不同階段的蛋白質分布改變 (A)未純化產物 (B)純化後產物^[10](J. Proteomics 2010, 73, 2064–77)。

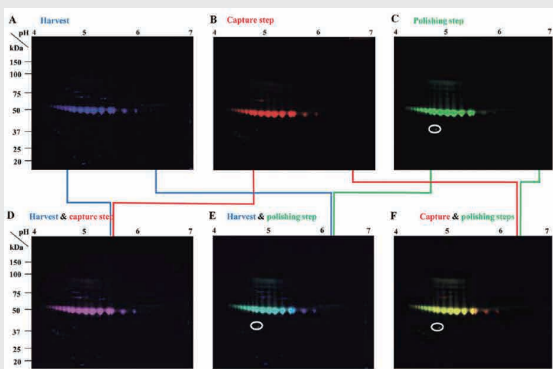


圖8. 利用螢光染色降低實驗手法的誤差並追蹤不同階段對HCP及產物造成的影響(A,B,C)為三種不同純化階段之結果(D,E,F)為上述其中兩種階段之疊圖結果，白圈處為偵測到的未知雜質^[6](Biotechnol. J., 2013, 8: 655-70)。

2. 液相層析串聯式質譜(LC-MS/MS)

雖然二維膠體電泳能夠比較不同分子量與pI值的蛋白質分布，但在樣品數目龐大且複雜的情形下，其分離效率就會受到限制，利用液相層析串聯式質譜(LC-MS/MS)方法能夠快速分析不同製程階段的樣品，且藉由資料庫軟體比對可以減少人為比對到蛋白質的錯誤率。液相層析串聯式質譜的分析方法，是先將複雜的蛋白質樣品經由酵素水解反應後，形成特定的胜肽片段，之後將這些胜肽片段導入液相層析串聯式質譜儀做偵測，胜肽首先會利用液相層析作第一步的分離，分離後的胜肽再進入串聯式質譜儀，此時質譜儀會先掃描一張全範圍圖譜，根據此圖譜來篩選特定的胜肽離子，再將這些胜肽離子導入碰撞室以產生這些胜肽的裂解離子(fragment ions)，這些裂解離子進入二次質譜分析，就能得到這些胜肽的序列資訊，藉由軟體可以將這些得到的圖譜轉換成電腦可以運算的資料並送入蛋白質資料庫做

比對與鑑定，就可以得知複雜樣品中有那些蛋白質與其酵素水解產生的胜肽序列資訊；液相層析串聯式質譜的靈敏度相當高(1-50 fmole)，透過電腦收集得到的數據可以做到許多不同的應用，例如先收集各製程階段液相層析質譜的數據得知蛋白質分布情形，相互比較來達到監測HCP改變的可能(圖9^[14])，在過去的研究中^[7]便有提到透過液相層析串聯式質譜的分析並結合軟體運算以提高樣品中蛋白質體覆蓋率(proteome coverage)，用以鑑定製劑中的HCP主要成分，如此一來便能根據其特性擬定純化策略，增加整個過程的效率。

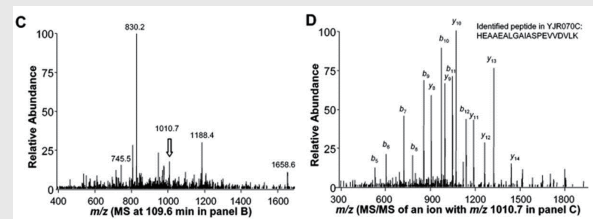


圖9. 利用LC-MS/MS針對酵母菌蛋白質進行大規模分析^[14](J. Proteome Res. 2003, 2(1): 43-50)。

結論

在生物製劑的製造過程中HCP的定量及鑑定是相當重要的，由於在定量上尚未有一個全面性的分析方式，因此必須要選擇複數試驗方法來相互佐證其準確度，在表1^[6]列出了上述中不同方式的差異，可以看到ELISA靈敏度雖然不是最高的，但仍是不可或缺的一種定量方式，這是因為ELISA有著定量精準且商用選擇眾多的優點，因此衡量分析方式的優劣是否適合該階段的實驗是相當重要的；另一方面，雖然二維電泳能呈現不同階段的蛋白質分布圖，然而蛋白質過多會導致印跡雜亂，且關鍵蛋白質身份的鑑定最終都得仰賴質譜儀，因此二維電泳較適合製程穩定時進行少數蛋白質的比較與觀察，而LC-MS/MS的優勢在於能分析複雜度高的樣品，在初期能夠迅速獲得大量的蛋白質資訊，降低人為操作的所產生的偏差及失誤率，且具有相當高的靈敏度能處理低濃度的樣品，因此了解實驗需求並選擇適當的方法將有效率地得到最佳結果。

Table 1. Overview of methods for HCP detection

	Method	Comment	Limit of detection	Type of host cell	
Immuno-specific	ELISA		1.0 ng/mL	<i>E. coli</i> , SP 2/0	
	Threshold		0.5 ng/mL	<i>E. coli</i>	
	Western blot		Colorimetric (e.g. BCIP/NBT ^a)	0.2–0.5 ng/protein	<i>E. coli</i>
			Chemiluminescent (e.g. TMB ^b)	0.1–0.3 ng/protein	SP 2/0
	Slot blot		6.0 ng/mL	<i>E. coli</i>	
	Automated PLA ^c		0.025 ng/mL	CHO	
	Biosensors		10 ⁻¹⁸ M	<i>E. coli</i>	
Non-specific	1D and 2D electrophoresis	Silver stain	2.0–13.0 ng/protein ^d	<i>E. coli</i> , SP 2/0	
		Coomassie	8.0–52.0 ng/protein ^d	<i>E. coli</i>	
		SYPRO Ruby	0.3–1.0 ng/protein ^d	<i>E. coli</i> , CHO	
		CyDyes	0.03–0.08 ng/protein ^d	<i>E. coli</i> , CHO	
		Autoradiography	0.1–2 pg/protein	CHO	
	MS		1–50 fmol	<i>E. coli</i> , CHO	
	2D chromatography	MS	50 ppm for complex samples	<i>E. coli</i>	

a) BCIP = 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, NBT = nitro blue tetrazolium. b) TMB = 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine. c) PLA = proximity ligation assay. d) Depending on protein and staining protocol.

表1. HCP检测方法分類^[6](Biotechnol. J. 2013, 8: 655-70)。

參考文獻：

1. USP Monographs: Insulin Human.
2. D. G. Bracewell, R. Francis, C. M. Smales. The Future of Host Cell Protein (HCP) Identification During Process Development and Manufacturing Linked to a Risk-Based Management for Their Control. *Biotechnol. bioeng.* 2015, 112 (9): 1727-37.
3. X. Wang, A. K. Hunter, N. M. Mozier. Host Cell Proteins in Biologics Development: Identification, Quantitation and Risk Assessment. *Biotechnol. bioeng.* 2009, 103 (3): 446-58.
4. K. Hoffman. Strategies for Host Cell Protein Analysis. *Biopharm.* 2000, 13 (6): 38-45.
5. USP Chapter <1132>: Residual Host Cell Protein Measurement in Biopharmaceuticals
6. A. L. Tscheliessnig, J. Konrath, R. Bates, et al. Host cell protein analysis in therapeutic protein bioprocessing-methods and applications. *Biotechnol. J.* 2013, 8: 655-70.
7. J. Zhu-Shimoni, C. Yu, J. Nishihara, et al. Host Cell Protein Testing by ELISAs and the Use of Orthogonal Methods. *Biotechnol. bioeng.* 2014. 111 (12): 2367-79.
8. X. Lu, C. F. Xu, S. Liu, et al. Identification and Quantification of Heat-Shock Protein 70: A Major Host-Cell Protein Contaminant from HEK Host Cells. *Bioprocess Intl.* 2015.
9. N. Liu, M. axim Brevnov, M. Furtado, et al. Host cellular protein quantification. 2012. *Bioprocess Intl.* 10 (2): 44-50.
10. N. Dagouassat, J. F. Haeuw, V. Robillard, et al. Development of a quantitative assay for residual host cell proteins in a recombinant subunit vaccine against human respiratory syncytial virus. *J. Immunol. Methods.* 2001. 251 (1): 151-59.
11. K. Teeparuksapun, M. Hedström, P. Kanatharana, et al. Capacitive immunosensor for the detection of host cell proteins. *J. Biotechnol.* 2010, 157, 207–13.
12. T. Rabilloud, M. Chevallet, S. Luche, et al. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *J. Proteomics* 2010, 73, 2064–77.
13. S. H. Stansfield, E. E. Allen, D. M. Dinnis, et al. Dynamic analysis of GS-NS0 cells producing a recombinant monoclonal antibody during fed-batch culture. *Biotechnol. Bioeng.* 2007, 97, 410–24.
14. J. Peng, J. E. Elias, C. C. Thoreen, et al. Evaluation of multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/LC-MS/MS) for large-scale protein analysis: the yeast proteome. *J. Proteome Res.* 2003, 2(1): 43-50.

市場焦點-

◆ FDA發布生物相似藥可互換性指引草案(interchangeability draft guidance)

2017年1月，FDA發布了生物相似藥的interchangeability指引草案，提供業界關於證明生物相似藥具可互換性的審查標準。生物相似藥的可互換性對生物相似藥品開發製造商而言是一大利多，它提供臨床試驗設計的準則，證明生物相似藥與原廠藥若交互使用於任一病人，在安全性與有效性上，並不會造成影響而增加使用的風險。一旦生物相似藥能證明與原廠藥具有可互換性，將能更廣泛地被選擇使用在病患的治療上，而不再須要由開立處方藥品的醫師所決定。雖然指引草案不如預期能較早被FDA提出，但藥商們仍是樂觀其成。除此之外，FDA也對生物相似藥的命名提供了依循的準則，這些指引的建立，對於生物相似藥發展的趨勢將更為確立。

FDA Interchangeability-Draft Guidance下載:

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM537135.pdf>

參展資訊-

◆ BioPharma Asia 2017展會(攤位：D23, Mar.21-23, Singapore)

明生公司將於今年3月21-23日參加於新加坡(Suntec Singapore International Exhibition & Convention Centre)舉辦之BioPharma Asia Convention 2017展會，該展會是亞洲最大的生物藥品開發相關產業的聚會，每年吸引超過兩千人與會，今年的重要議題包含新藥開發、藥品製造、分析方法、臨床試驗、法規面向等，將有多家亞太區域之國際大藥廠參與。明生今年積極開發拓展海外市場，參展首站選擇新加坡，我們將在會場展示各藥品分析項目的解決方案，以生物藥品分析為出發，導入大小分子藥物的CRO臨床檢體分析服務，透過國際藥廠委託案的合作，落實品質方案與國際市場接軌，歡迎各位生技產業的夥伴與先進蒞臨現場與我們相互交流。



BioPharma Asia 2017展會連結：<http://www.terrapinn.com/exhibition/bio-asia/index.stm>

專業生物藥品分析服務

Expert Analytical Services for Biologics

生物藥品與生物相似藥之質譜分析

LC-MS Based Analysis for Biologics Development

- mAb, ADC, Peptides, Glycoproteins, Recombinant Proteins, Vaccine
- ☑ Full Structural Characterization
- ☑ Determination of Impurities
- ☑ Production Optimization
- ☑ Comparability Studies of Biosimilars
- ☑ QC Release Testing
- ☑ Stability Testing

依據ICH Q6B準則執行GLP生物藥品分析服務

GLP Bioanalytical Services in Accordance with ICH Q6B

- ☑ Physicochemical Characterization
 - Molecular Weight and Size
 - Amino Acid Sequencing
 - Terminal Sequencing
 - Peptide Mapping
 - Disulfide Bridges
 - Carbohydrate Structure
- ☑ Process- and Product-related Impurities
 - Truncated Forms
 - Post-translational Modifications
 - Host Cell Proteins
 - Antibiotics

藥品臨床試驗分析與客製化方法開發

Bioanalysis & Customized Method Development

- ☑ ELISA Assay
- ☑ BA/BE/PK Studies
- ☑ Biomarker Discovery and Verification
- ☑ Immunogenicity

