

宿主细胞蛋白和蛋白质 A 的分析与检测

王星

淄博云桥生物技术公司
美国 Array Bridge Inc。

2011年11月25日

第一部分：宿主细胞蛋白质的分析

第二部分：蛋白质 A 的分析

第一部分：宿主细胞蛋白质的分析

- 宿主细胞蛋白质的基本信息
- 相关管理机构的执导方针
- 宿主细胞蛋白质的风险分析
- 分析方法的建立与确证
- 案例分析
- 结论

1.为什么要做宿主细胞蛋白质分析？

- 潜在的人体副作用，包括免疫抗性的产生
- 应用于蛋白质纯化过程的建立
- 应用于质量控制

生物药的多样性和杂质的分析

与产品有关的杂质

- 分子局部缺失
- 聚合物
- 蛋白质脱氨
- 蛋白质氧化
- 共价键错接
- 蛋白质构像变化

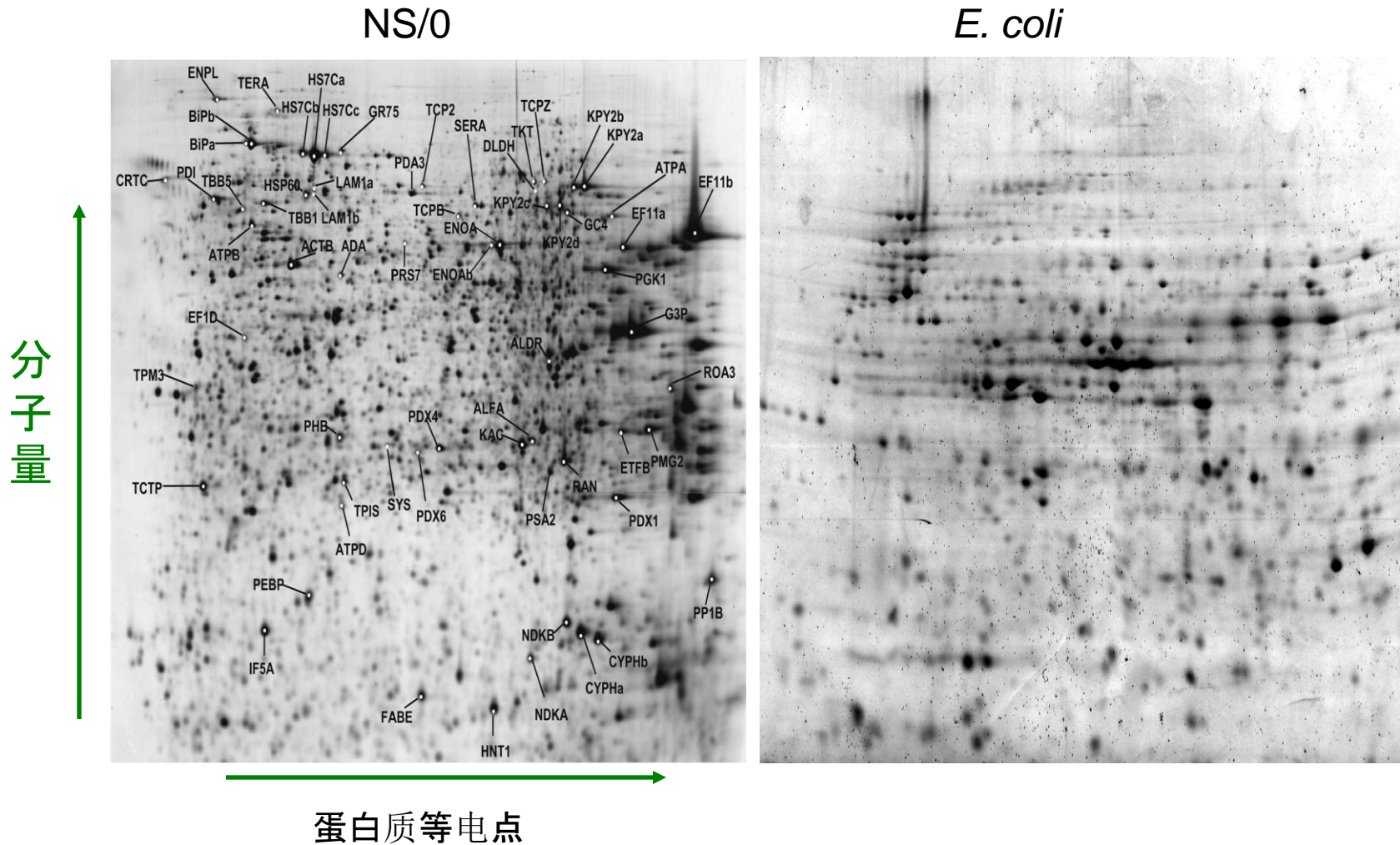
与纯化过程有关的杂质

- 细胞宿主蛋白
- 细胞宿主DNA
- 细胞内毒素
- 蛋白质 A
- 添加剂

细胞宿主蛋白质的定义

- 来源于宿主细胞的蛋白质和蛋白质衍生物
- 宿主细胞蛋白质的组成取决于以下多个变量：
 - 不同的表达系统 (E. coli, NS/O, CHO)
 - 表达系统的遗传背景
 - 蛋白质的分离方法
 - 蛋白质的纯化方法
- 被定义为纯化过程相关杂质
- 通常用百万分之几表达 (ppm)

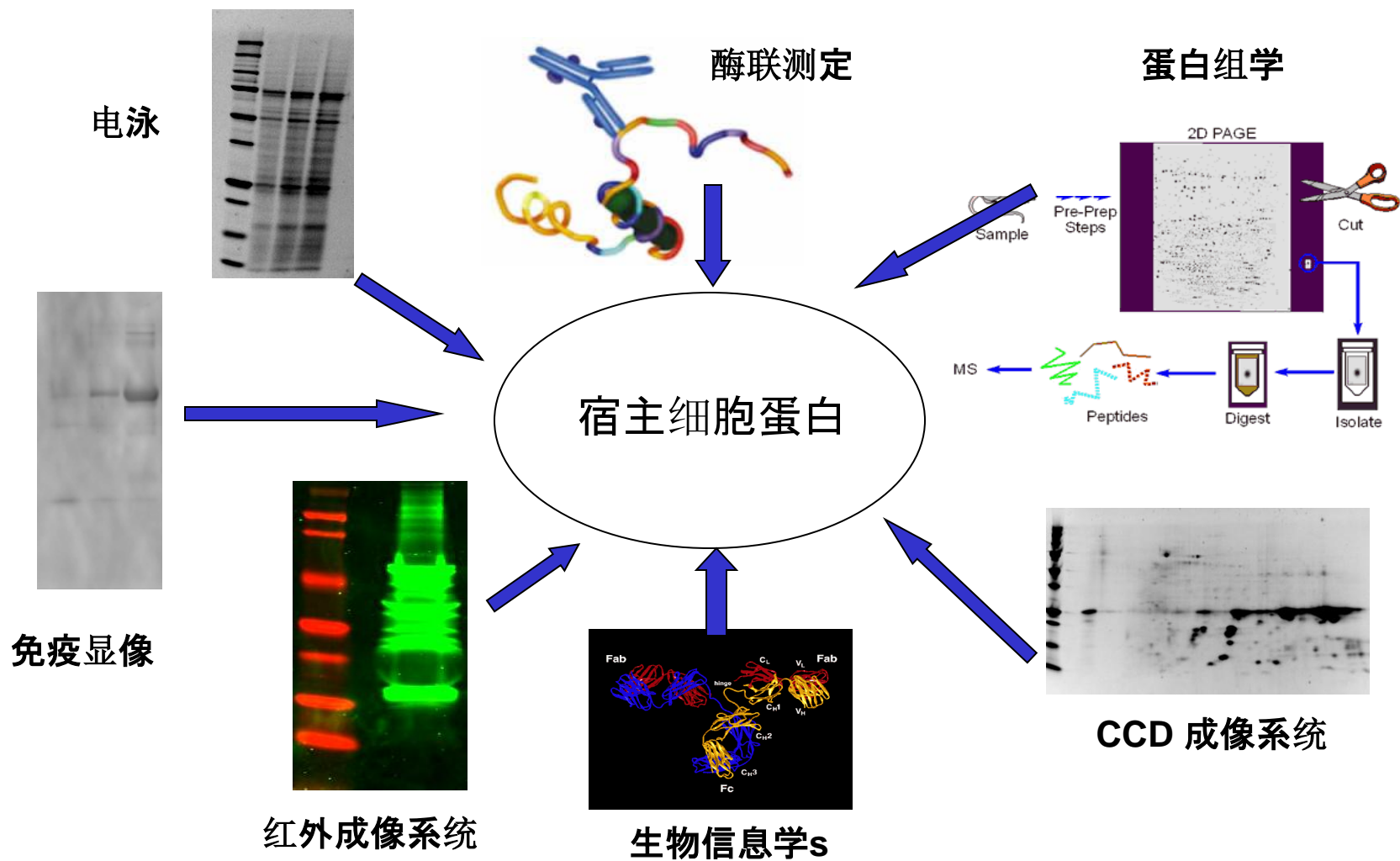
细胞宿主蛋白质的多样性



细胞宿主蛋白质的常用分析方法

方法	优点	缺点
高效液相	分辨率高	灵敏度低
电泳	灵敏度中等 2 ng/band (200 ppm) 样品分成多条带	对结果的解释不够确定 蛋白质药物对分析有干扰 是定性分析, 过程比较烦琐
Western Blot (1-D/2-D)	免疫方法测定 灵敏度: 0.1-1 ng/band (10-100 ppm) 原理与其它方法不同	定性分析, 过程比较烦琐 不能检测所有存在的蛋白质
酶联法测定	高灵敏度 < 1 ng/mL (1 ppm) 半定量分析. 客观性分析	不能分离多个组分 部分宿主细胞蛋白质检测不到

细胞宿主蛋白质的分析技术



测定宿主细胞蛋白质的原因

- 宿主细胞蛋白质的分布和数量是蛋白纯化的重要指标
- 对蛋白质纯化过程的建立很重要
- 通常会随生物药的深度开发而增加需求

质量控制 (*QC release testing*)

等价性研究 (*Comparability*)

纯化过程原因调查 (*Characterization for cause (e.g. process deviation investigations)*)

纯化过程的建立 (*Process validation*)

- 管理机构预期每个公司都要有一个科学基础之上的宿主细胞蛋白质测定项目
- 美国医检局的先例: 百万分之一到百万分之一百。

2. 国际性管理机构的相关规定 (Guidance for Industry Q6B: Specifications)

2.3.1

Adequate design of a process and knowledge of its capability are part of the strategy used to develop **a manufacturing process that is controlled and reproducible**, yielding a drug substance or drug product that meets specifications. In this respect, limits are justified based on critical information gained from the entire process spanning the period from early development through commercial scale production.

4.1.3

Process-related impurities (section II.A.4) in the drug substance may include cell culture media, host cell proteins, DNA, monoclonal antibodies or chromatographic media used in purification, solvents, and buffer components. **These impurities should be minimized by the use of appropriate, well controlled manufacturing processes.**

2. 国际性管理机构的相关规定 Guidance for Industry Q6B: Specifications

6.2.1 *Process-related impurities and contaminants*

These are derived from the manufacturing process (section 2.1.4) and are classified into three major categories: cell substrate-derived, cell culture derived and downstream-derived.

- a) Cell substrate-derived impurities include, but are not limited to, **proteins derived from the host organism**, nucleic acid (host cell genomic, vector, or total DNA). **For host cell proteins, a sensitive assay e.g., immunoassay, capable of detecting a wide range of protein impurities is generally utilized. In the case of an immunoassay, a polyclonal antibody used in the test is generated by immunization with a preparation of a production cell minus the product-coding gene, fusion partners, or other appropriate cell lines.** The level of DNA from the host cells can be detected by direct analysis on the product (such as hybridization techniques). Clearance studies, which could include spiking experiments at the laboratory scale, to demonstrate the removal of cell substrate-derived impurities such as nucleic acids and host cell proteins may sometimes be used to eliminate the need for establishing acceptance criteria for these impurities.

3. 宿主细胞蛋白质的风险分析

目前比较灵敏的电泳与染色方法可达到灵敏度百万分之800 (假设每个蛋白的测定灵敏度为 8 ng, 标准上样 10 μg /跑道).

假设每人每次单抗注射量为 600 毫克 (每公斤10 毫克, 60 公斤平均体重), 这样每次注射单种蛋白质低于500微克将不会被检测出来 ($600 \times 0.8 \mu\text{g} = 480 \mu\text{g}$).

能够产生免疫反应的最低蛋白量是多少?

老鼠: $< 1 \mu\text{g}$.

兔子: $< 10 \mu\text{g}$.

人体? $< 100 \mu\text{g}$?

(信息来源: *Antibodies. A Laboratory Manual.* pp100. By Ed Harlow & David Lane.)

宿主细胞蛋白质的风险分析的两种理论假设

1. 宿主细胞蛋白质抑制体内的调节蛋白质, 直接作用.
 2. 宿主细胞蛋白质所产生的抗体作用于体内的受体蛋白, 间接作用
- 人体的平均血液量为5升, 500 微克宿主细胞蛋白质可以在体内达到的浓度为100 ng/ml.

已知的人体血液中调节蛋白的浓度低于< 1 ng/ml: Interleukin-2, 4, 5, 6, 10, 12, 1ra, 1beta;
Interferon alpha; TNF alpha: Tissue Factor; MIP-1 alpha;
TNF Binding protein; More to be identified. (*L. Anderson, 2002; MCP*)
宿主细胞蛋白质可能与以上的蛋白质具有同源性从而干扰体内调节蛋白质的功能

宿主细胞蛋白质也可能产生抗体从而抑制体内的受体, 阻止信息传导

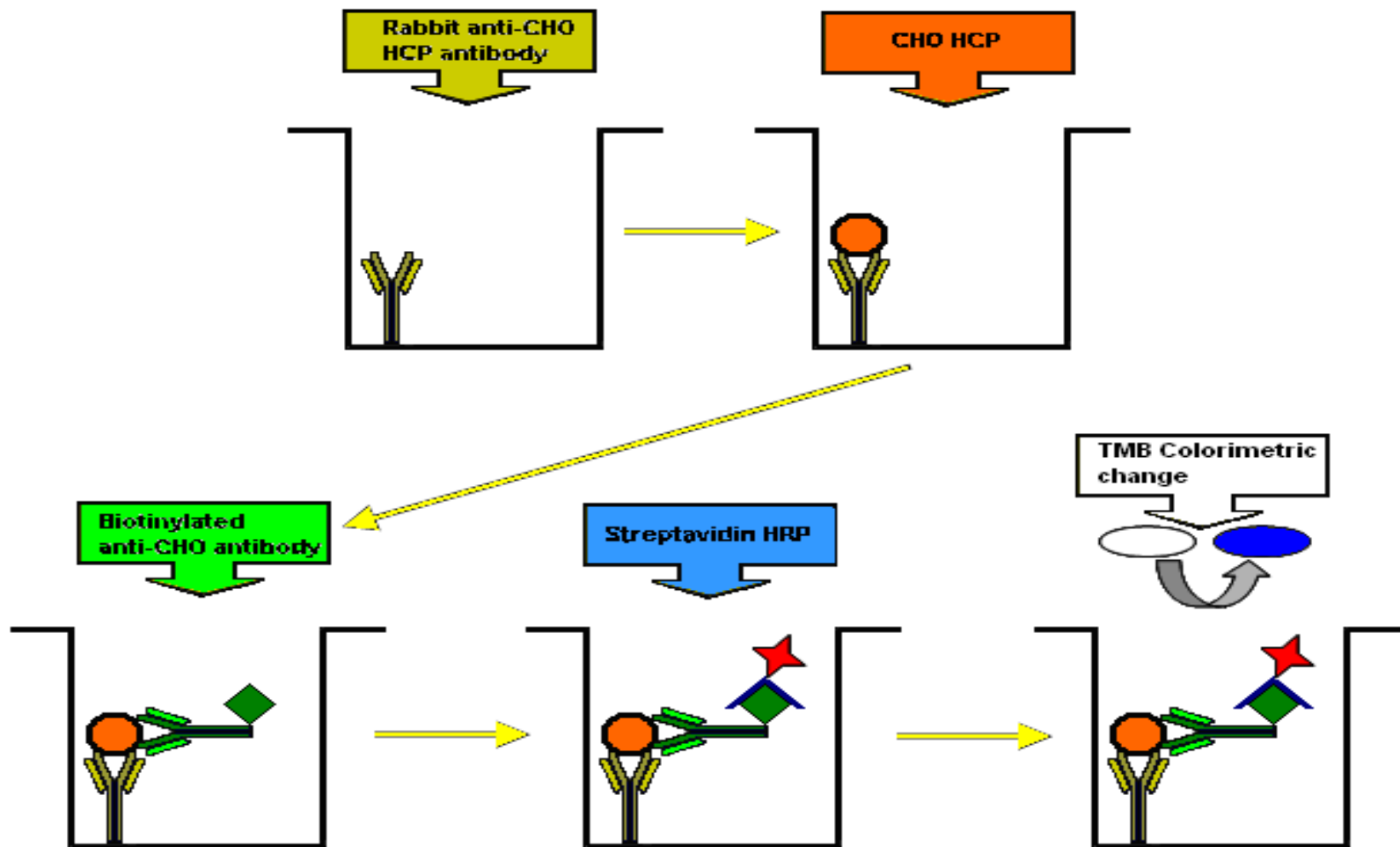
鼠类 (仓鼠等) 与人类拥有80%共同的基因 (*Nature, 2002, Vol. 420*)

宿主细胞蛋白质的风险评估建议

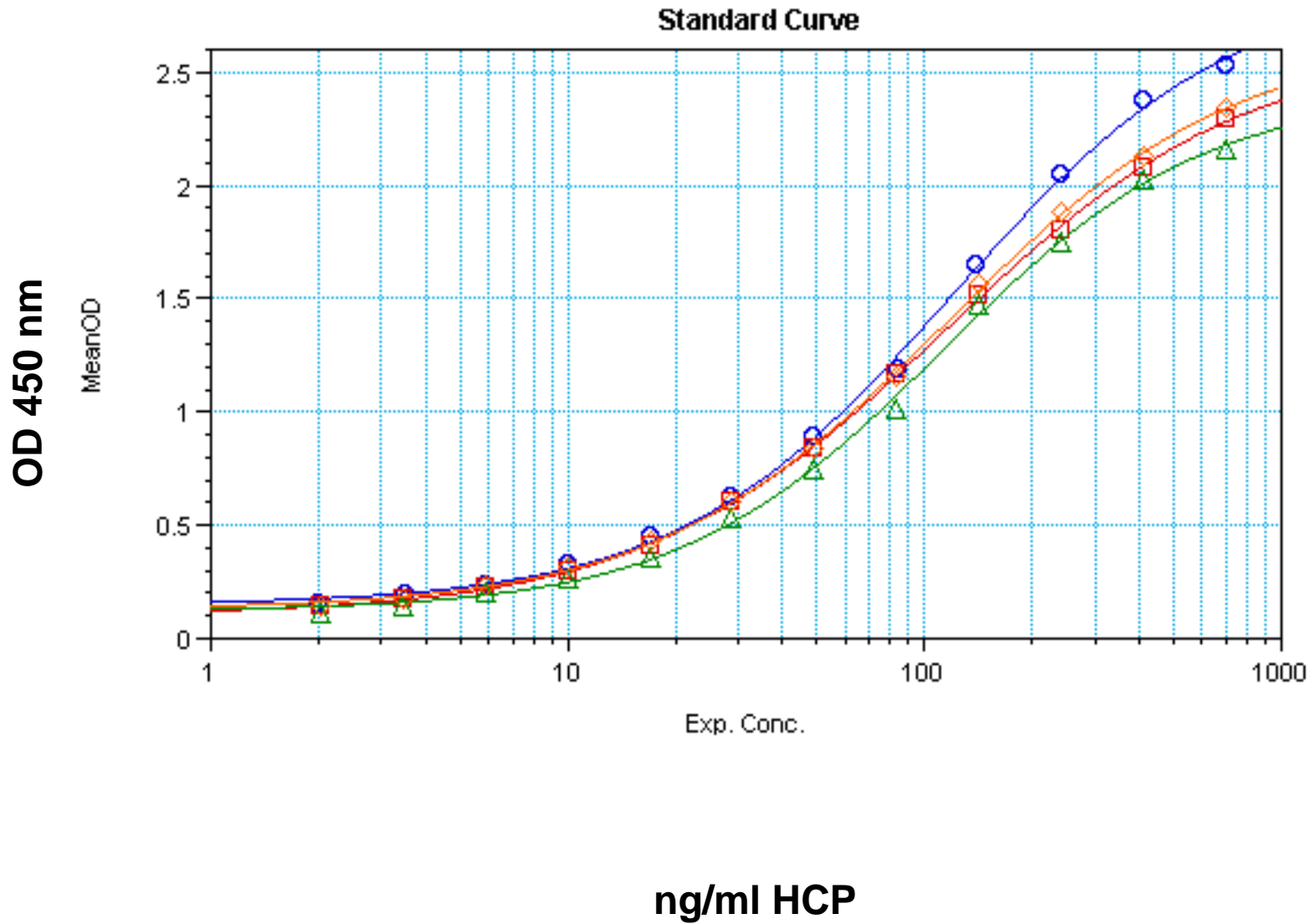
		<u>isolation technique</u>	<u>HCP assay</u>	<u>S</u>	<u>O</u>	<u>D</u>	
Microbial	<i>E. coli</i>	homogenate	commercial	3	5	3	45
		periplasm	commercial	3	4	3	36
		homogenate	custom	3	5	2	30
		inclusion bodies	commercial	3	3	3	27
	Yeast	periplasm	custom	3	4	2	24
		inclusion bodies	custom	3	3	2	18
		secreted	commercial	3	2	3	18
		secreted	custom	3	2	2	12
Mammalian	CHO, NS0, etc	secreted (non-mAb)	commercial	3	2	3	18
		secreted (non-mAb)	custom	3	2	2	12
	CHO, NS0, etc	secreted (mAb), +protein A/G	commercial	3	1	3	9
		secreted (mAb), +protein A/G	custom	3	1	2	6

(Xing Wang, Alan K. Hunter, Ned M. Mozier. Biotech. Bioeng. Vol. 103, p446-458, 2009)

4. 宿主细胞蛋白质定量酶联反应方法的建立



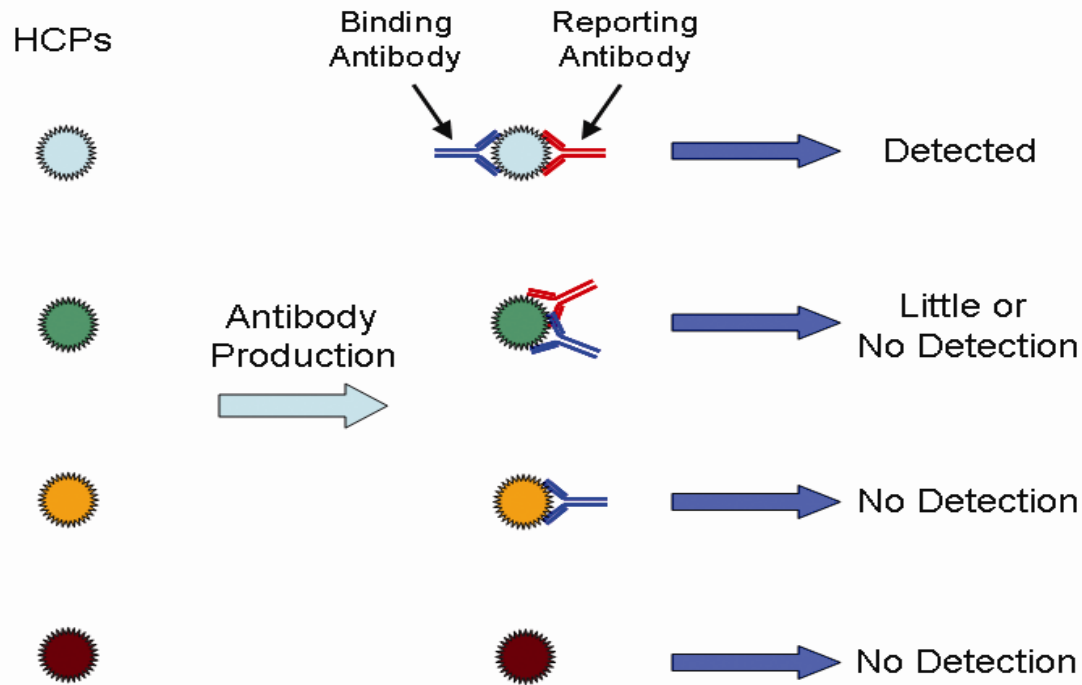
宿主细胞蛋白质定量酶联反应标准曲线图示



目前宿主细胞蛋白质定量酶联反应潜在的问题

1. 不是每一个宿主细胞蛋白质都能产生抗体.
2. 对于能产生抗体的宿主细胞蛋白质, 不是每一个宿主细胞蛋白质都能产生可用于定量酶联反应的两种抗体
3. 定量酶联反应中宿主细胞蛋白质标准的种类和分布与产品中宿主细胞蛋白质的种类和分布不尽相同
4. 不同时间和动物个体所产生的抗宿主细胞蛋白质抗体会发生变化
4. 用户专一性的抗体生产和定量酶联反应的建立需要约一年的时间和10万美元

目前的宿主细胞蛋白质测定实际上是测定蛋白质的免疫性

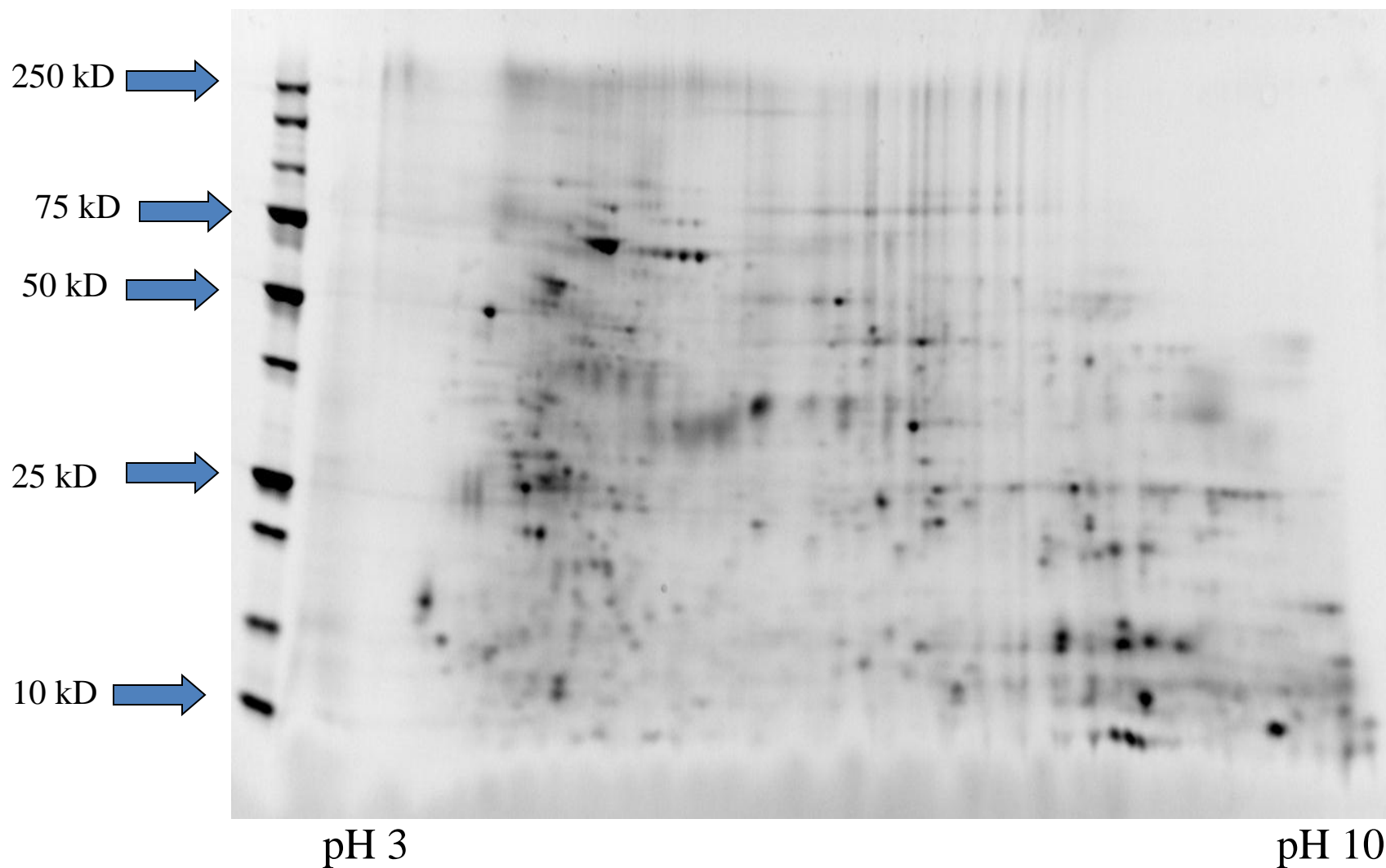


(Xing Wang, Alan K. Hunter, Ned M. Mozier. Biotech. Bioeng. Vol. 103, p446, 2009)

5.宿主细胞蛋白质案例分析-1:

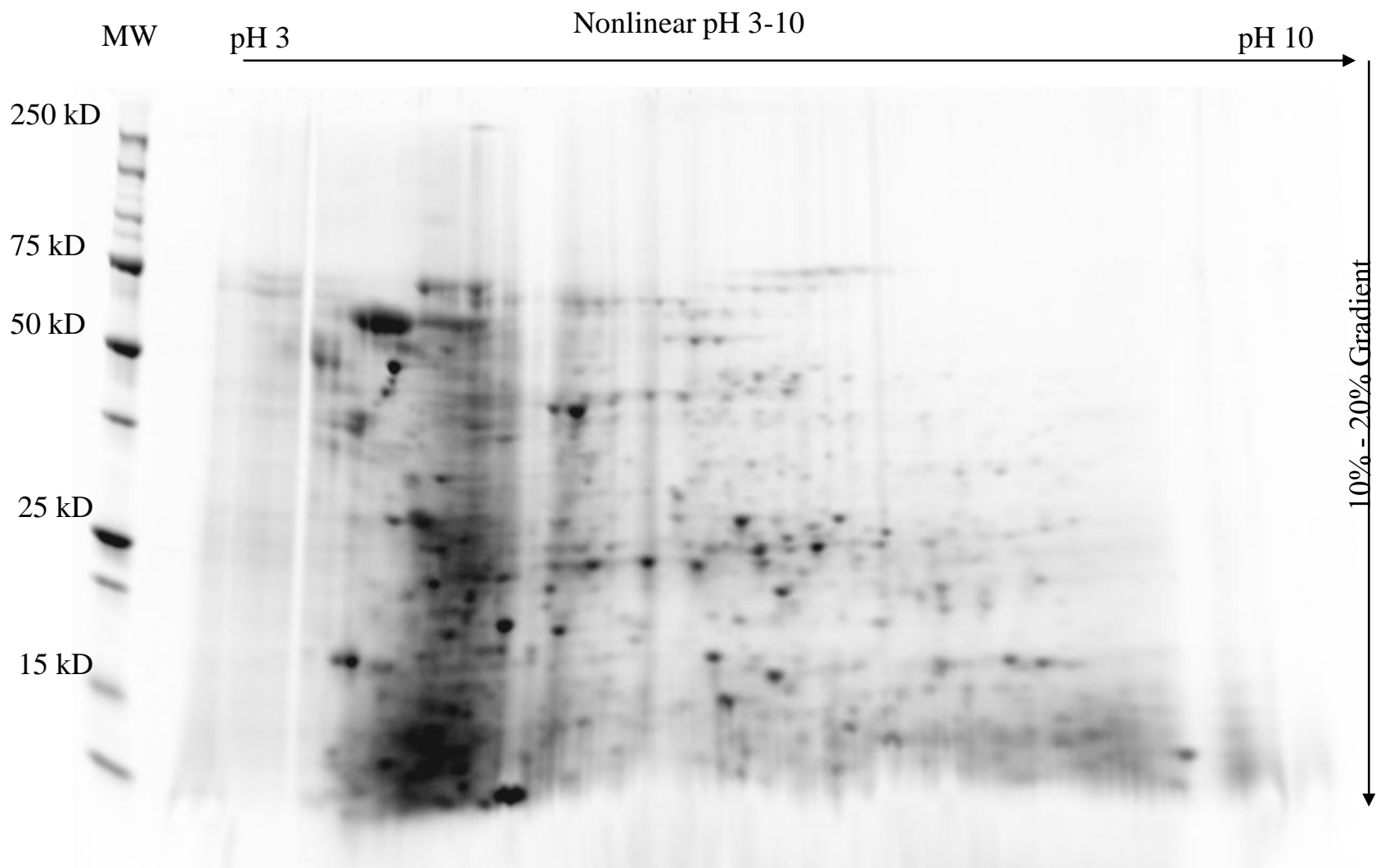
商业性宿主细胞蛋白质检测盒与纯化过程专一性宿主细胞蛋白质检测盒的比较

纯化过程专一性无表达细胞株免疫原的二维凝胶电泳分析

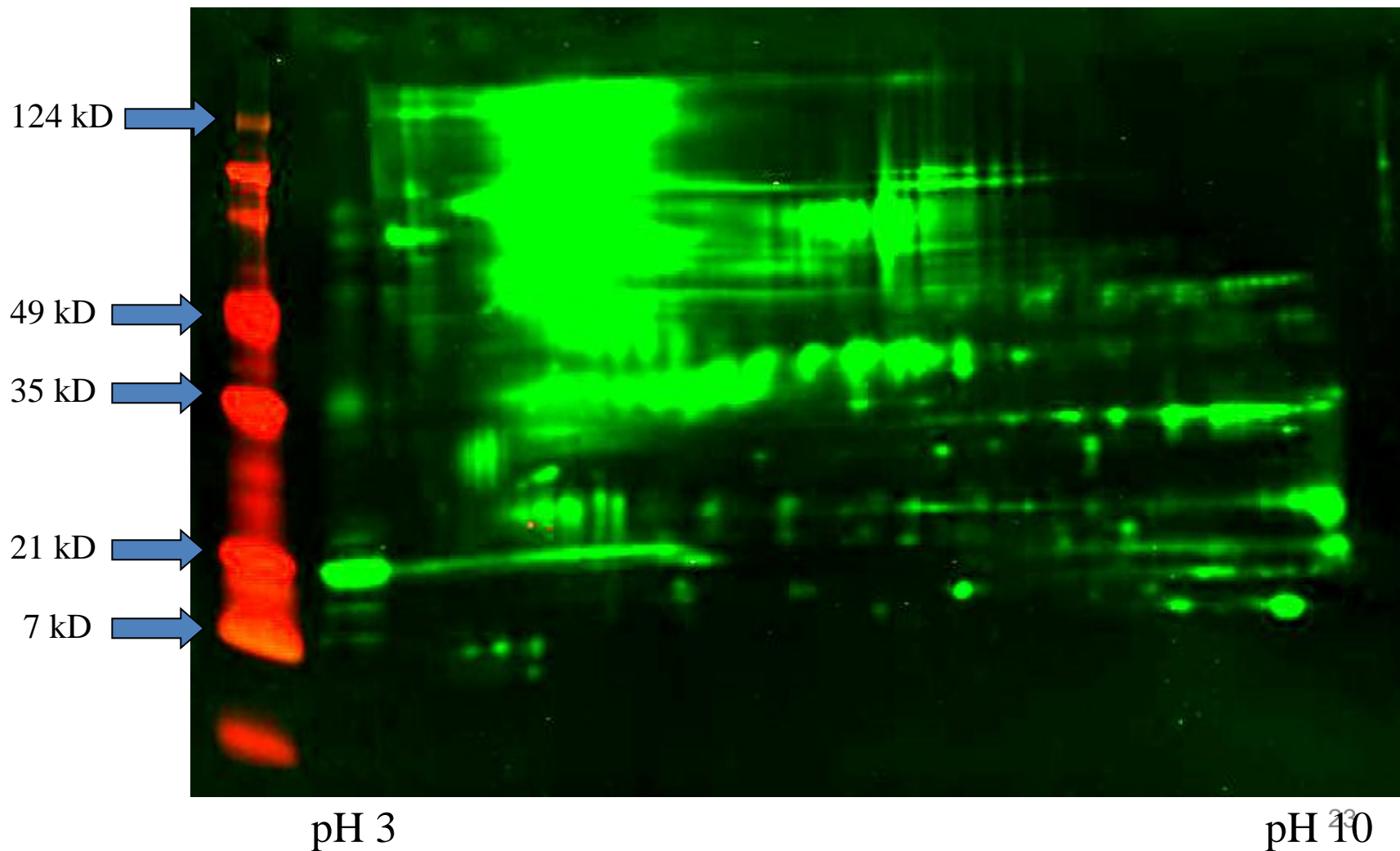


HCPs from the broth loaded at 100 $\mu\text{g}/\text{gel}$

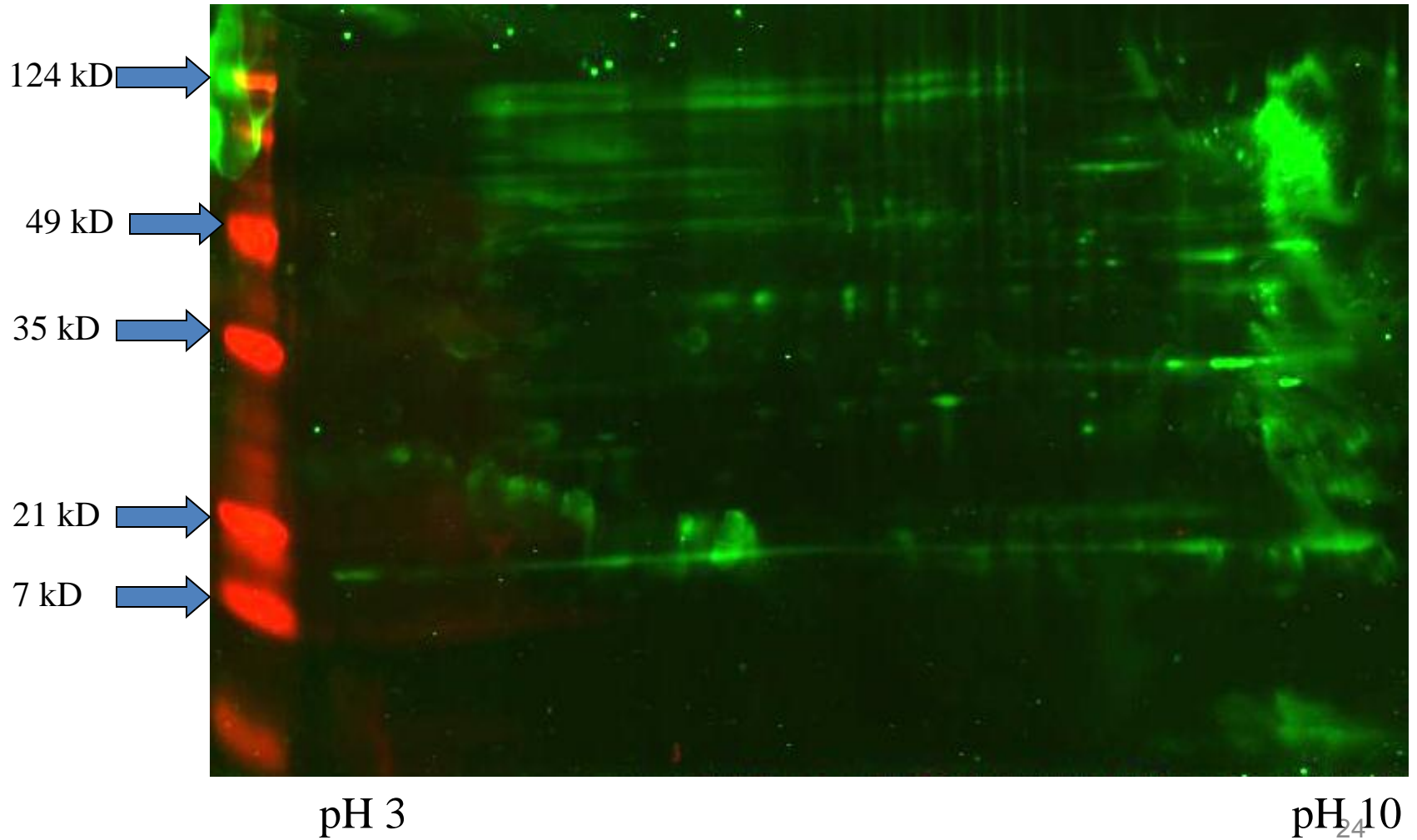
商业化无表达细胞株免疫原的二维凝胶电泳分析



纯化过程专一性无表达细胞株免疫原的二维凝胶电泳免疫分析



商业性无表达细胞株免疫原的二维凝胶电泳免疫分析



商业化与专一性宿主细胞蛋白质定量酶联测定比较

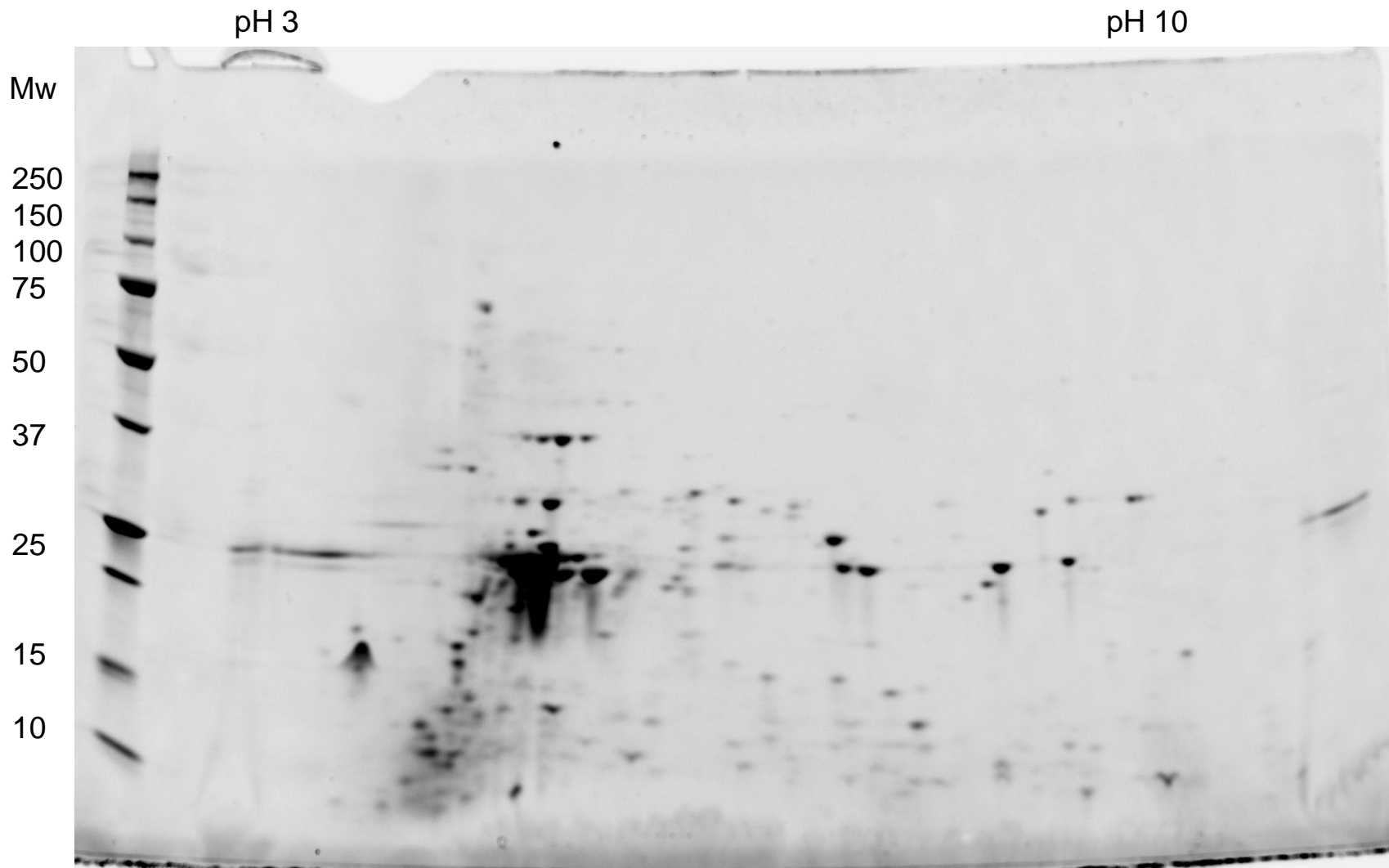
HCP ELISA	Run 1, Commercial Kit (ng/mg)	Run 1 In-house (ng/mg)
Upstream	145	1072
Downstream	5	24
Final Drug Substance	<1	<1

HCP ELISA	Run 2, Commercial Kit (ng/mg)	Run 2 In-house (ng/mg)
Upstream	114	990
Downstream	4	48
Final Drug Substance	<1	<1

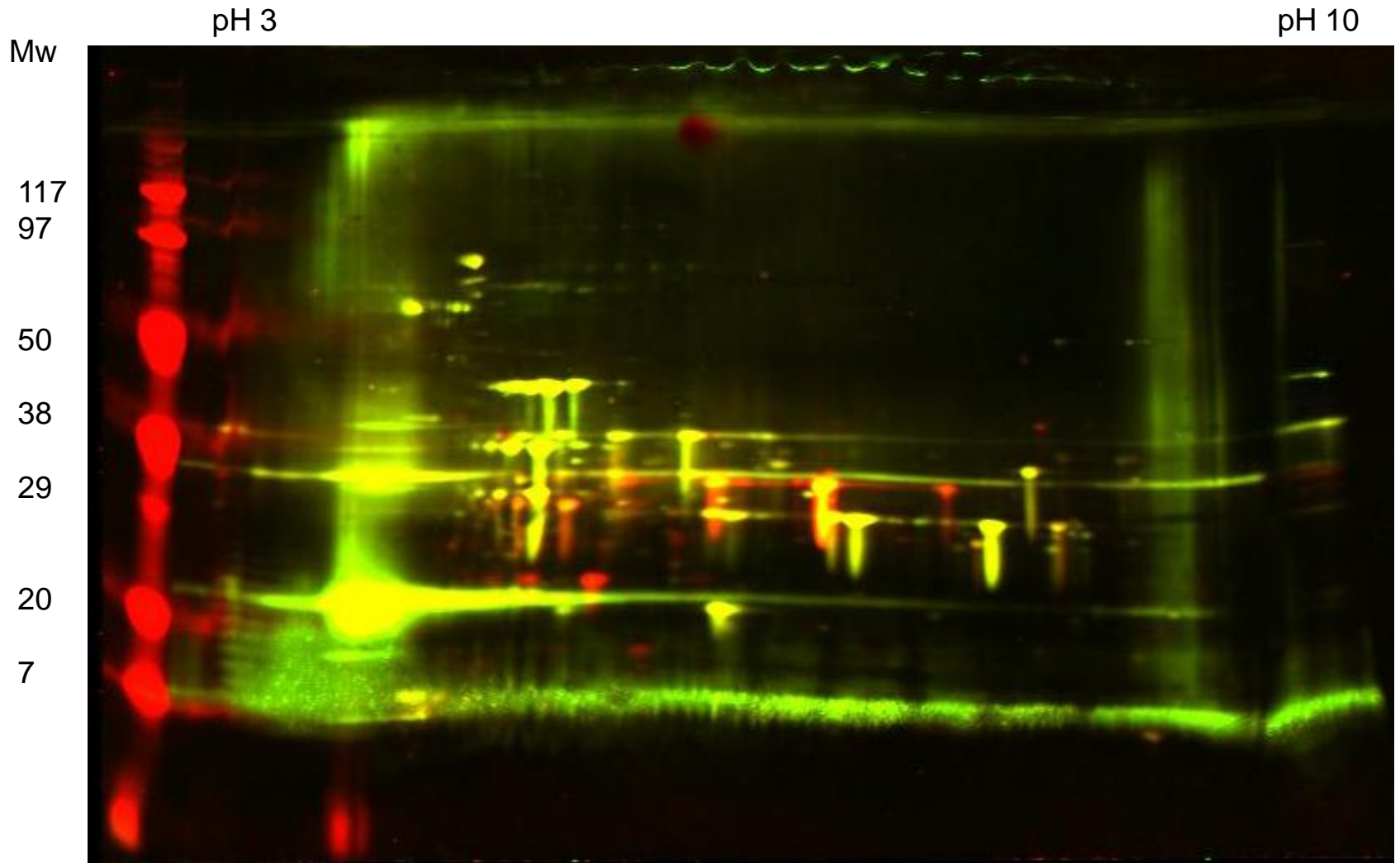
HCP ELISA	Run 3, Commercial Kit (ng/mg)	Run 3 In-house (ng/mg)
Upstream	130	1222
Downstream	4	42
Final Drug Substance	<1	<1

商业性和纯化过程专一性宿主细胞蛋白质抗体用于 大肠杆菌的二维凝胶电泳及免疫分析

二维凝胶电泳和 Sypro Ruby 蛋白质染色

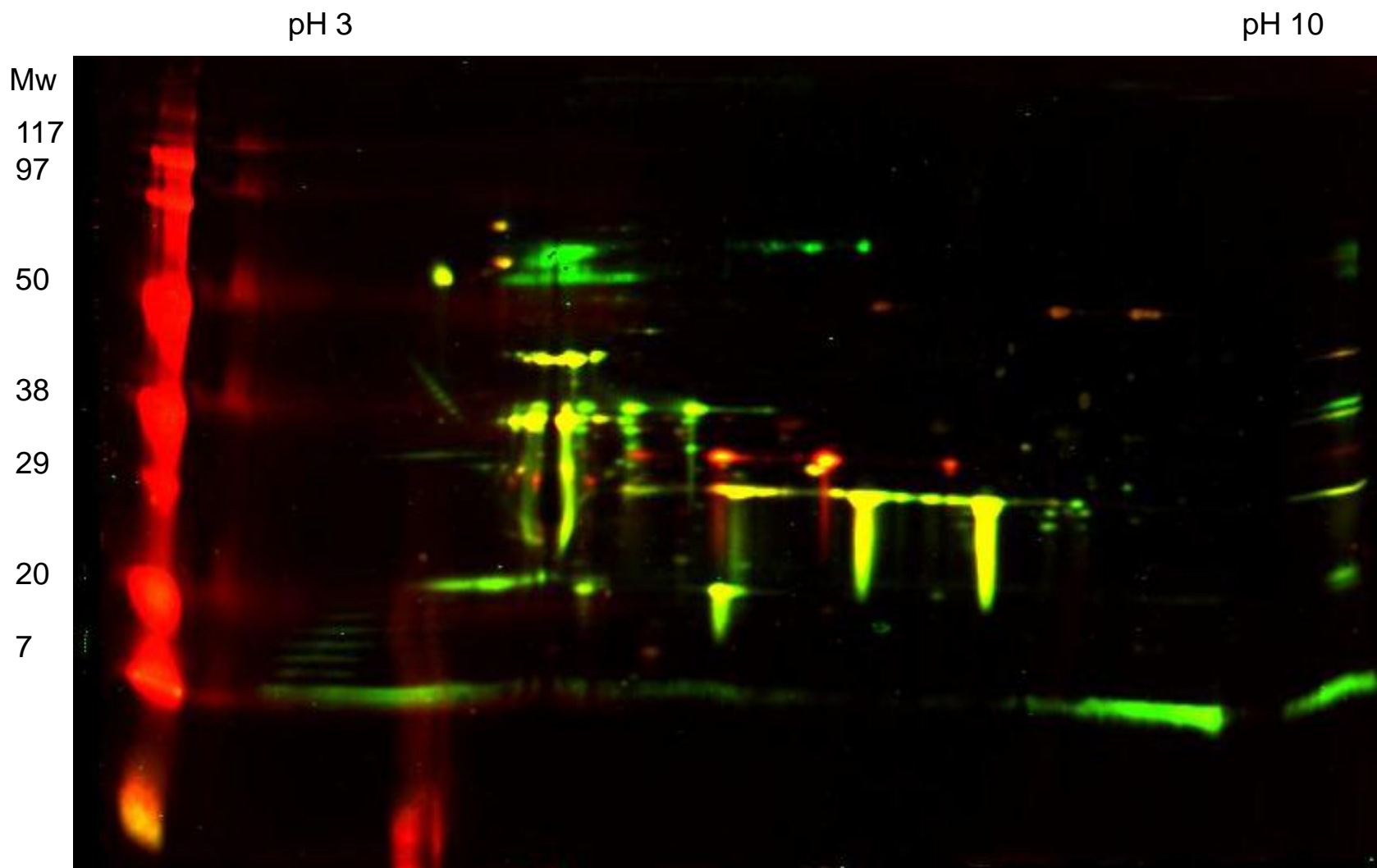


商业性和纯化过程专一性宿主细胞蛋白质抗体用于大肠杆菌上游纯化过程的二维凝胶电泳及免疫分析



绿色：纯化过程专一性宿主细胞蛋白质抗体；红色：商业性宿主细胞蛋白质抗体；
黄色：两种抗体都有识别

商业性和纯化过程专一性宿主细胞蛋白质抗体用于大肠杆菌下游纯化过程的二维凝胶电泳及免疫分析



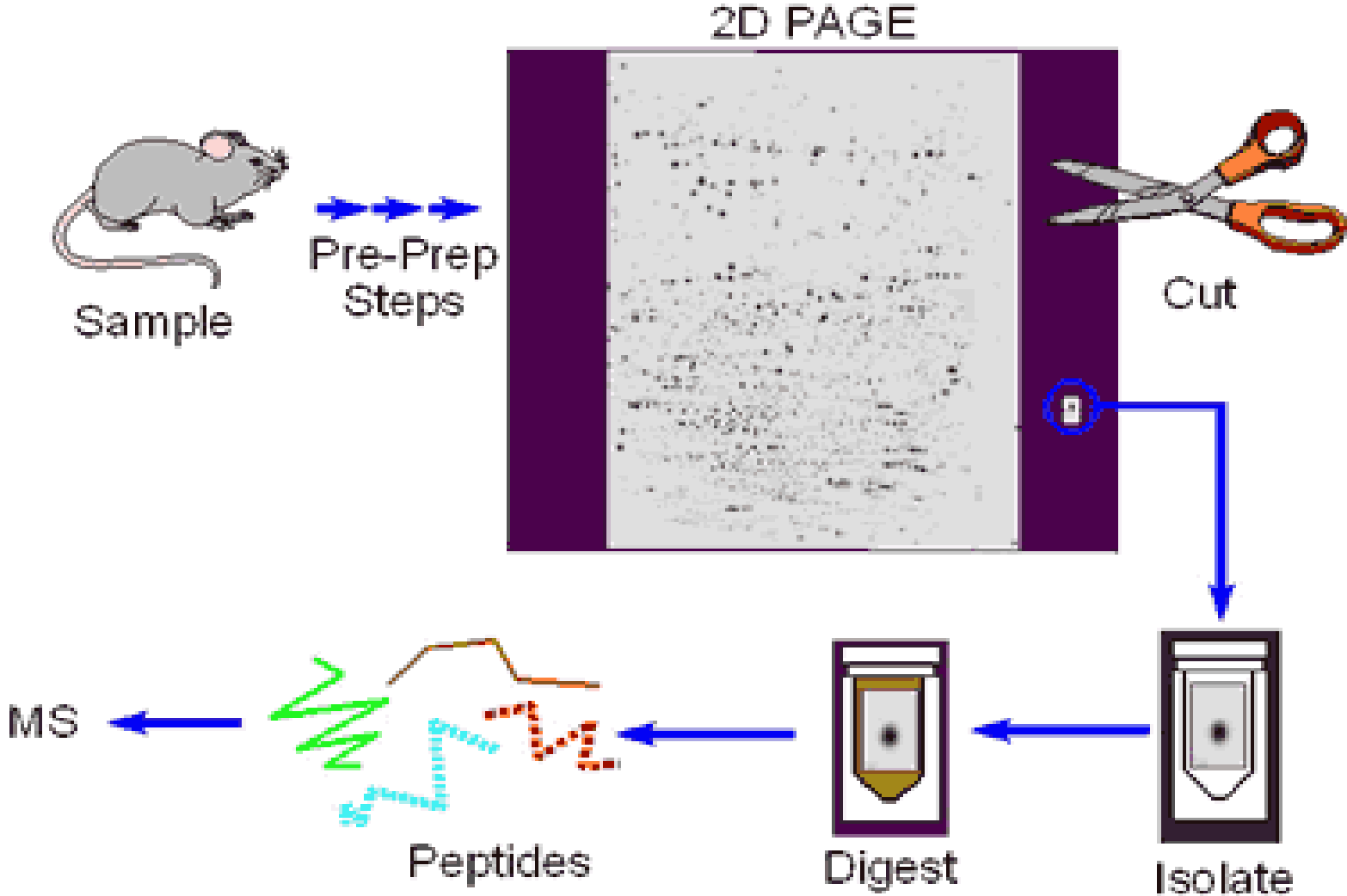
绿色：纯化过程专一性宿主细胞蛋白质抗体；红色：商业性宿主细胞蛋白质抗体；
黄色：两种抗体都有识别

5.宿主细胞蛋白质案例分析-2:

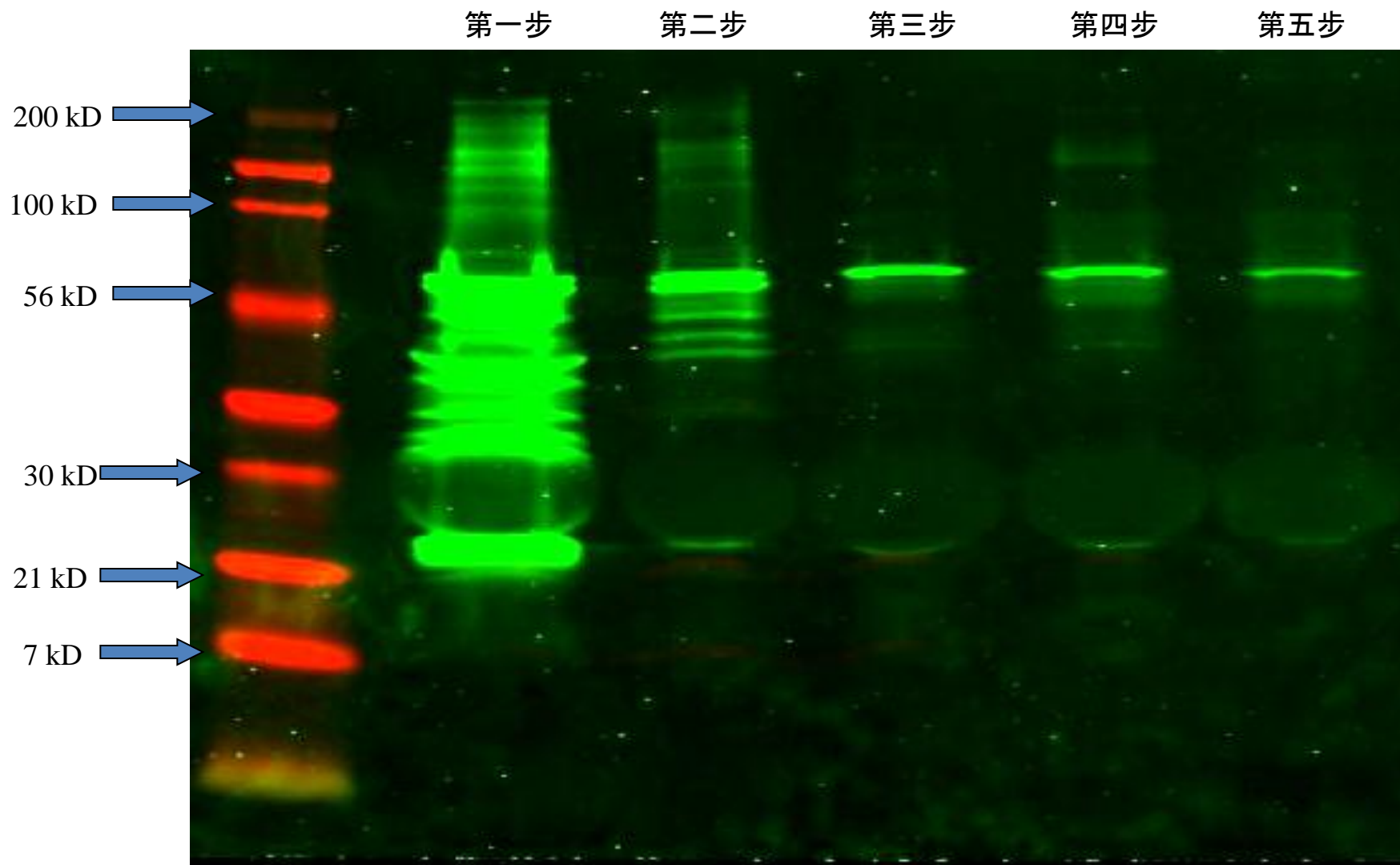
蛋白质组学 (Proteomics) 在检测和鉴定宿主细胞蛋白质中的应用

蛋白质组学的定义: Proteomics is the analysis of the entire PROTEin complement expressed by a genOME, or by a cell or tissue type

蛋白质组学应用的一种



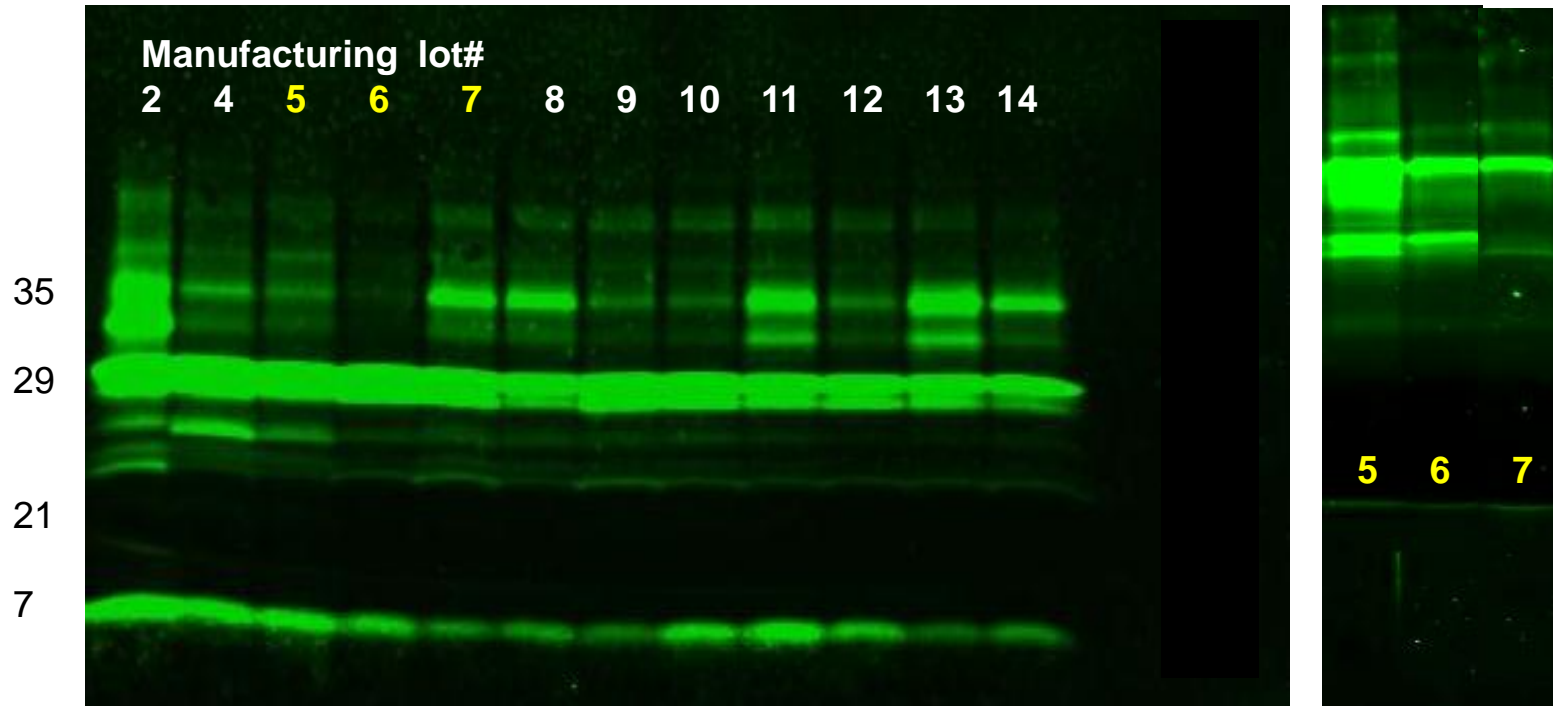
通过凝胶电泳免疫方法检测蛋白质纯化过程中难以去除的宿主细胞蛋白



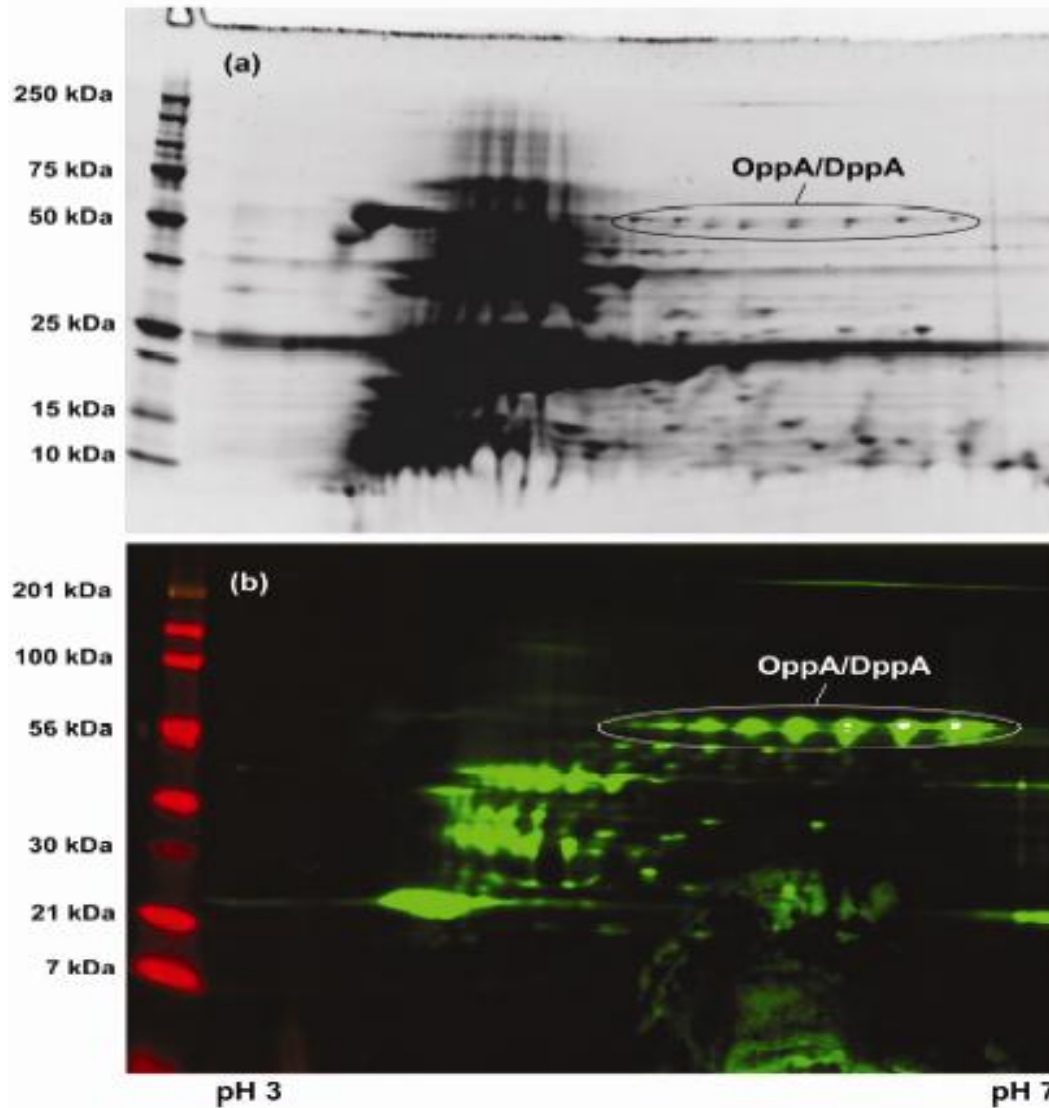
凝胶电泳免疫方法检测蛋白质纯化过程的宿主细胞蛋白质

纯化过程专一性宿主细胞蛋白质抗体

商业性宿主细胞蛋白质抗体



二维凝胶电泳对疏水性层析柱蛋白质纯化的分析



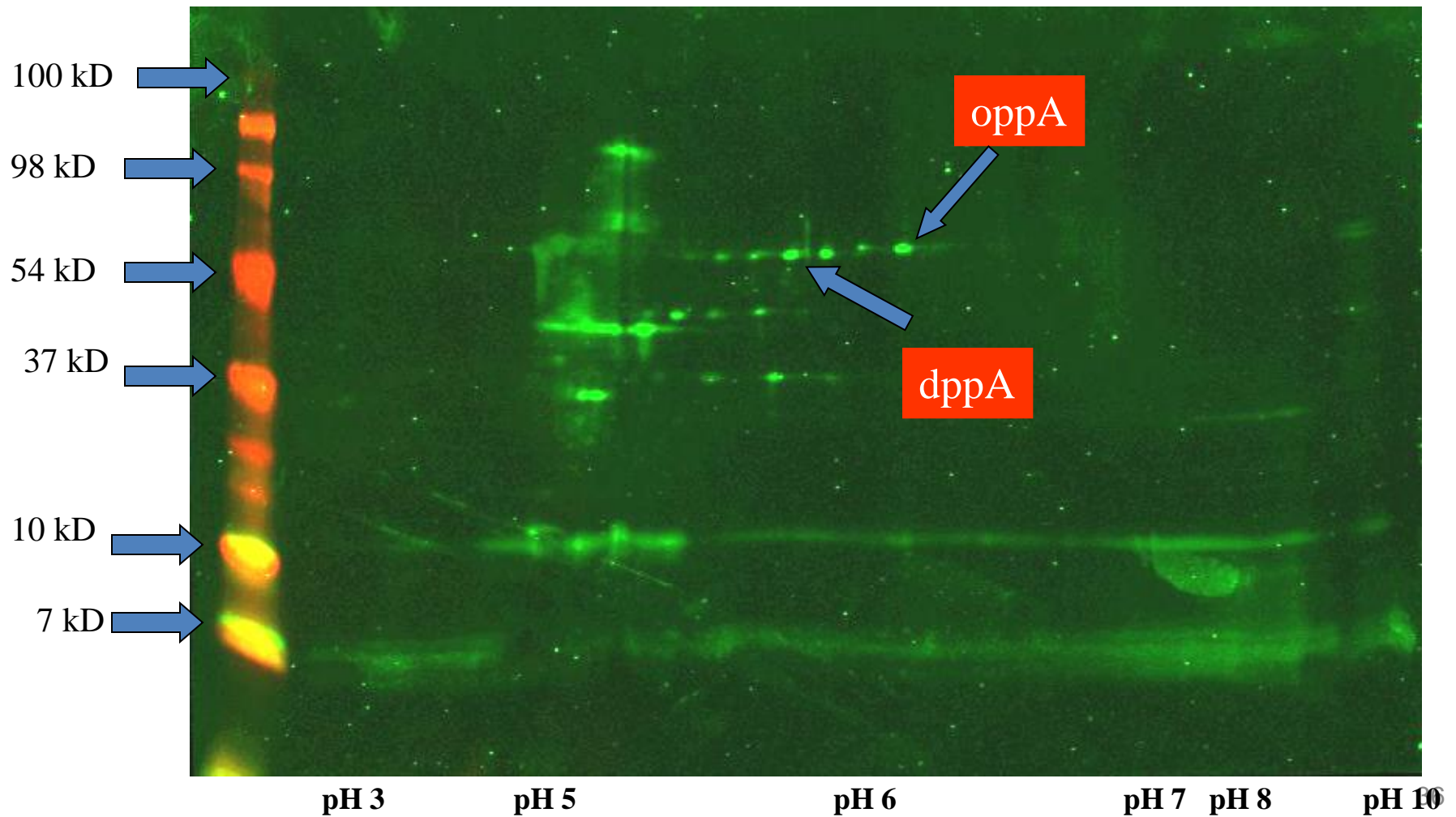
总体蛋白染色

大肠杆菌宿主细胞
蛋白质的免疫测定

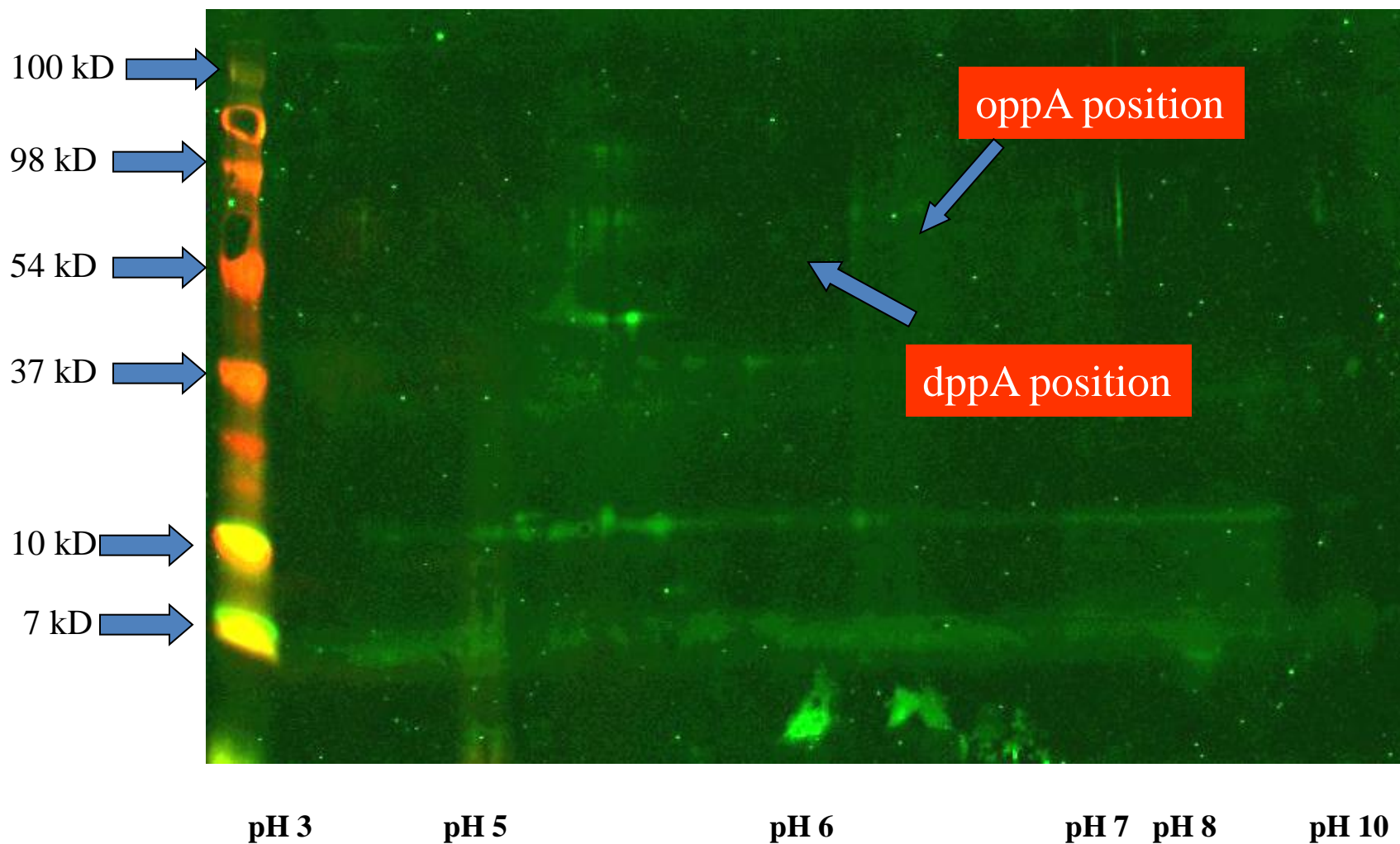
“难以去除” 宿主细胞蛋白质的鉴定

- 质谱序列测定方法鉴定出两个大肠杆菌多肽运输蛋白：
 - oligopeptide binding protein (oppA), 543 AA residues, MW = 60,899 Da, pI = 6.25; also identified by Edman Degradation
 - dipeptide binding protein (dppA), 535 amino acid residues, MW = 60,294 Da, pI = 5.91
 - Main physiological function: transport of oligo- or di-peptides into the cell for nutrition
 - Genes encoding both proteins can reportedly be deleted without affecting the viability of the cell
- 另外一个糖类运输蛋白也得到鉴定

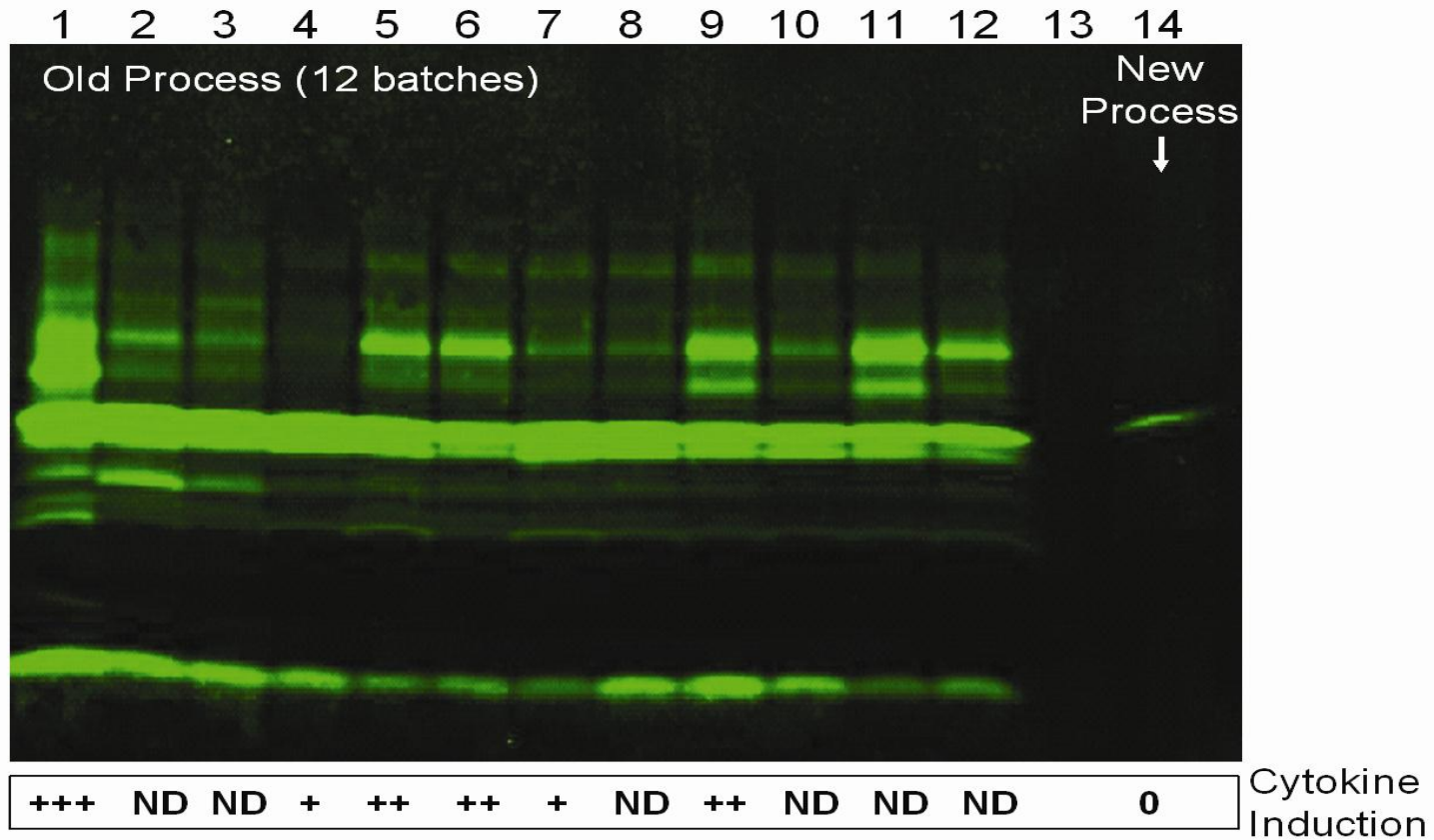
二维凝胶电泳免疫方法检测蛋白质纯化终端样品的 宿主细胞蛋白质 ---- 起始菌株



二维凝胶电泳免疫方法检测蛋白质纯化终端样品的 的宿主细胞蛋白质 ---- 基因去除后菌株



纯化过程专一性宿主细胞蛋白质抗体的免疫检测



(Xing Wang, Alan K. Hunter, Ned M. Mozier. Biotech. Bioeng. Vol. 103, p446, 2009)

5. 宿主细胞蛋白质案例分析-3:

单克隆抗体药物与抗宿主细胞蛋白质抗体的交叉反应

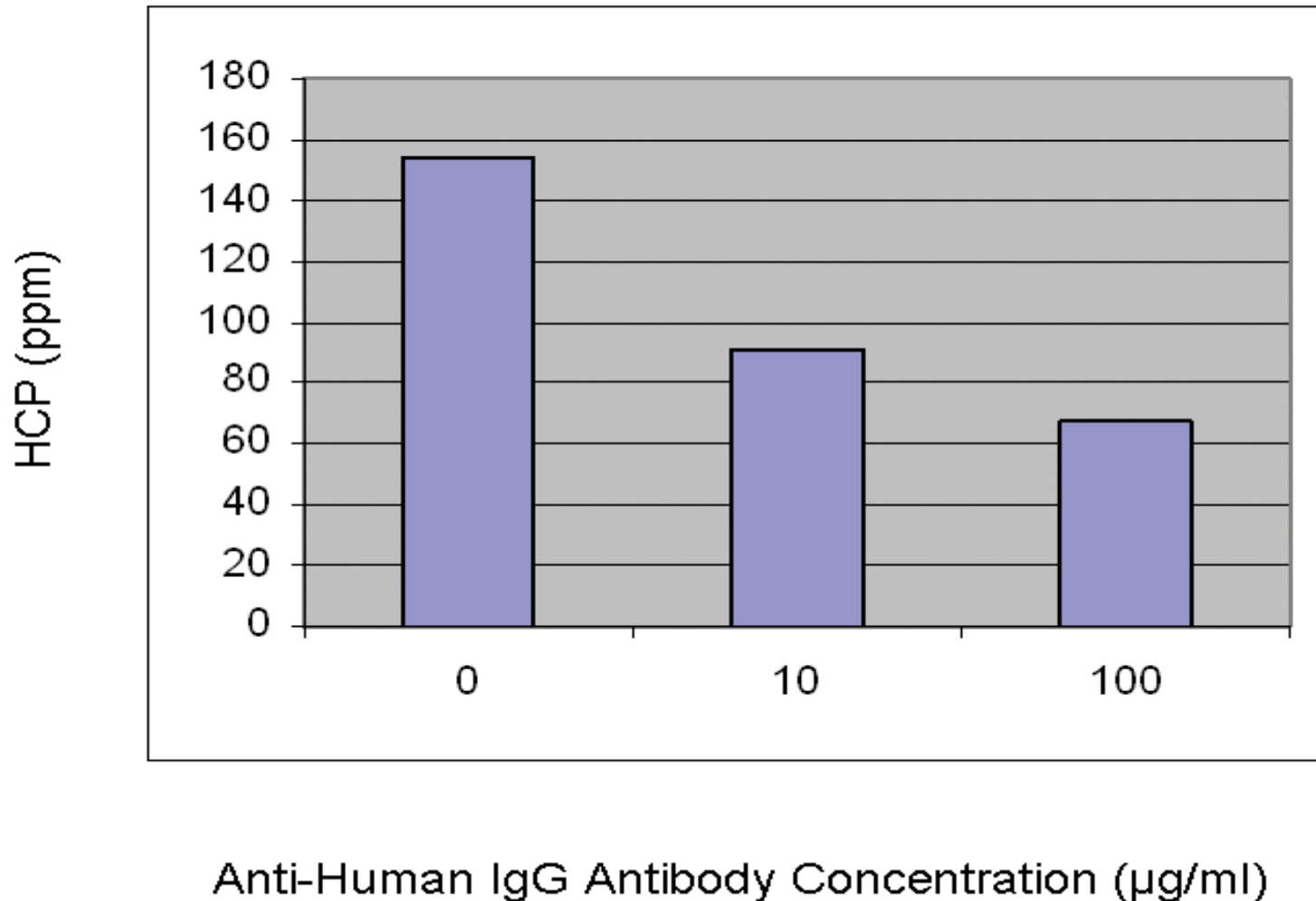
表 1. 抗人体免疫球蛋白抗体在宿主细胞蛋白质酶联测定中的作用

Sample ID	CHO HCP ELISA without anti-human IgG antibody incubation HCP (ppm)	CHO HCP ELISA with anti-human IgG antibody incubation HCP (ppm)
mAb-1	3 ± 0.09	4 ± 0.18
mAb-3	3 ± 0.14	4 ± 0.14
mAb-4	7 ± 0.06	7 ± 0.12
mAb-5	6 ± 0.01	5 ± 0.31
mAb-6	10 ± 0.15	7* ± 0.42
mAb-7	3 ± 0.08	2 ± 0.06
mAb-8	39 ± 0.78	19* ± 0.38
mAb-9	77 ± 3.85	17* ± 5.10

*Reduction in reported HCP reading by 30% or more. MAb-9 was used for most of the studies in this report. mAb-2 was analyzed in Western Blot but not in HCP ELISA due to the availability of material.

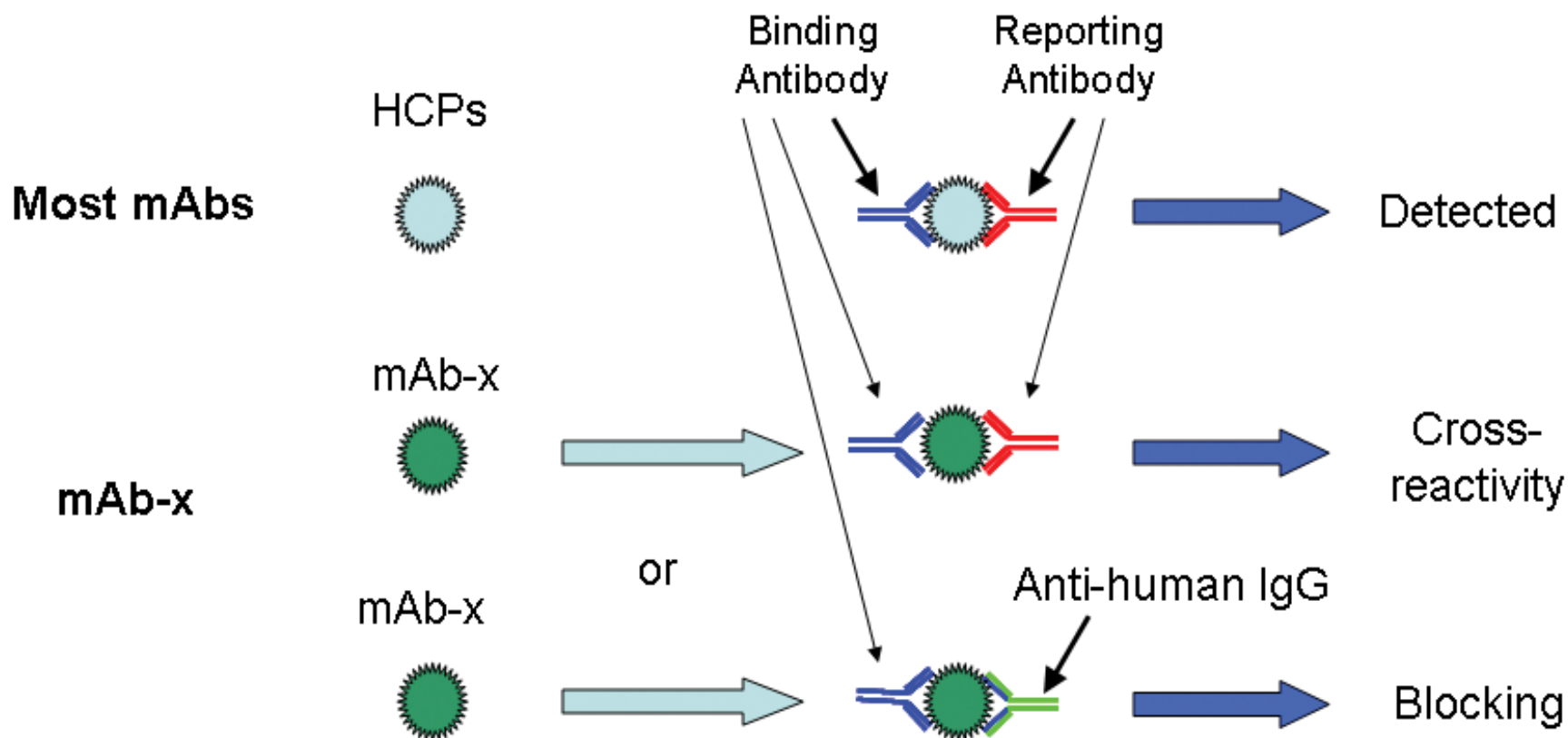
抗人体免疫球蛋白抗体对宿主细胞蛋白测定的影响

Effect of antibody Blocking on the HCP reading



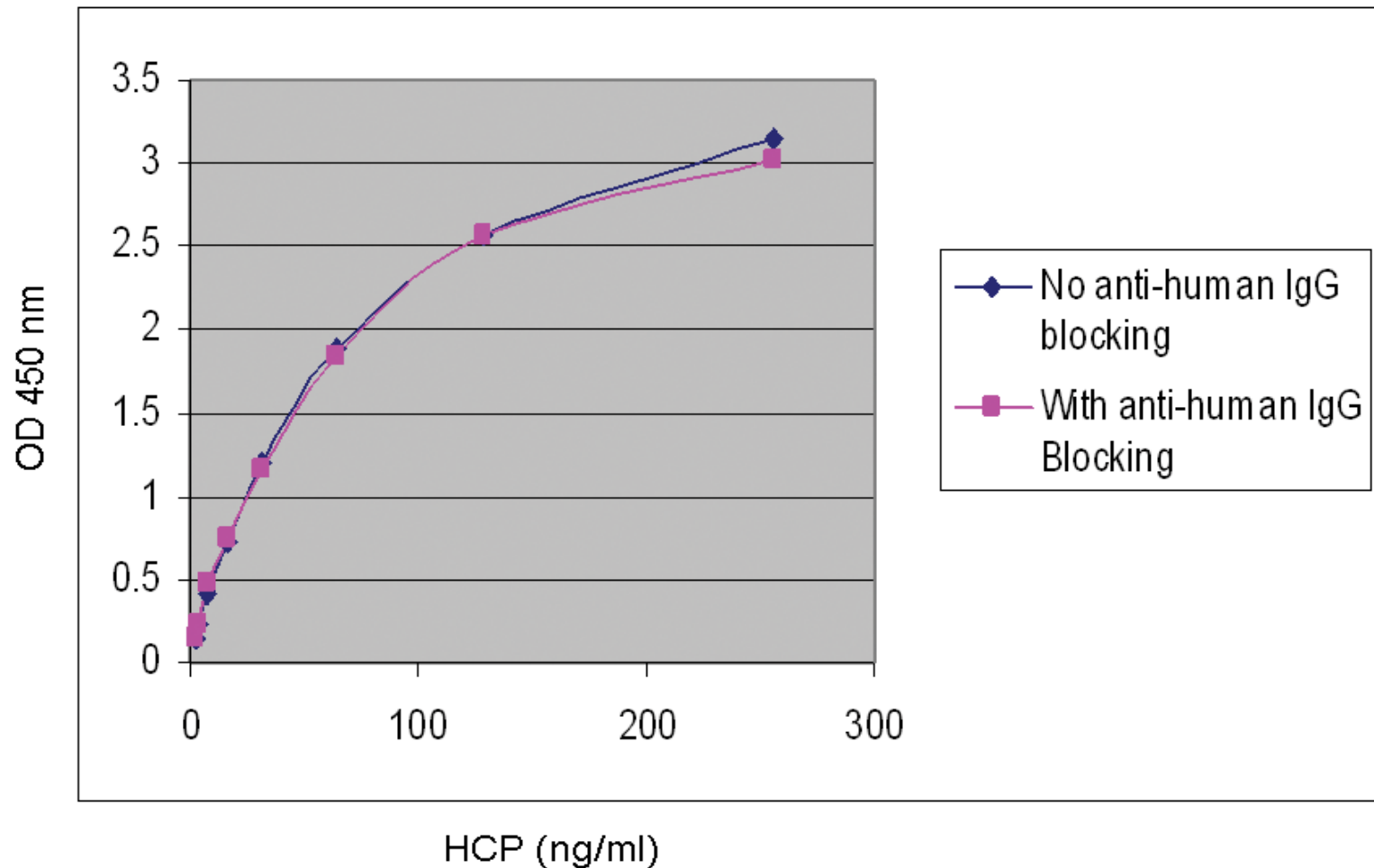
用抗人体免疫球蛋白抗体阻断交叉反应的原理

Use Anti-human Polyclonal Antibody to Block the Nonspecific Interaction

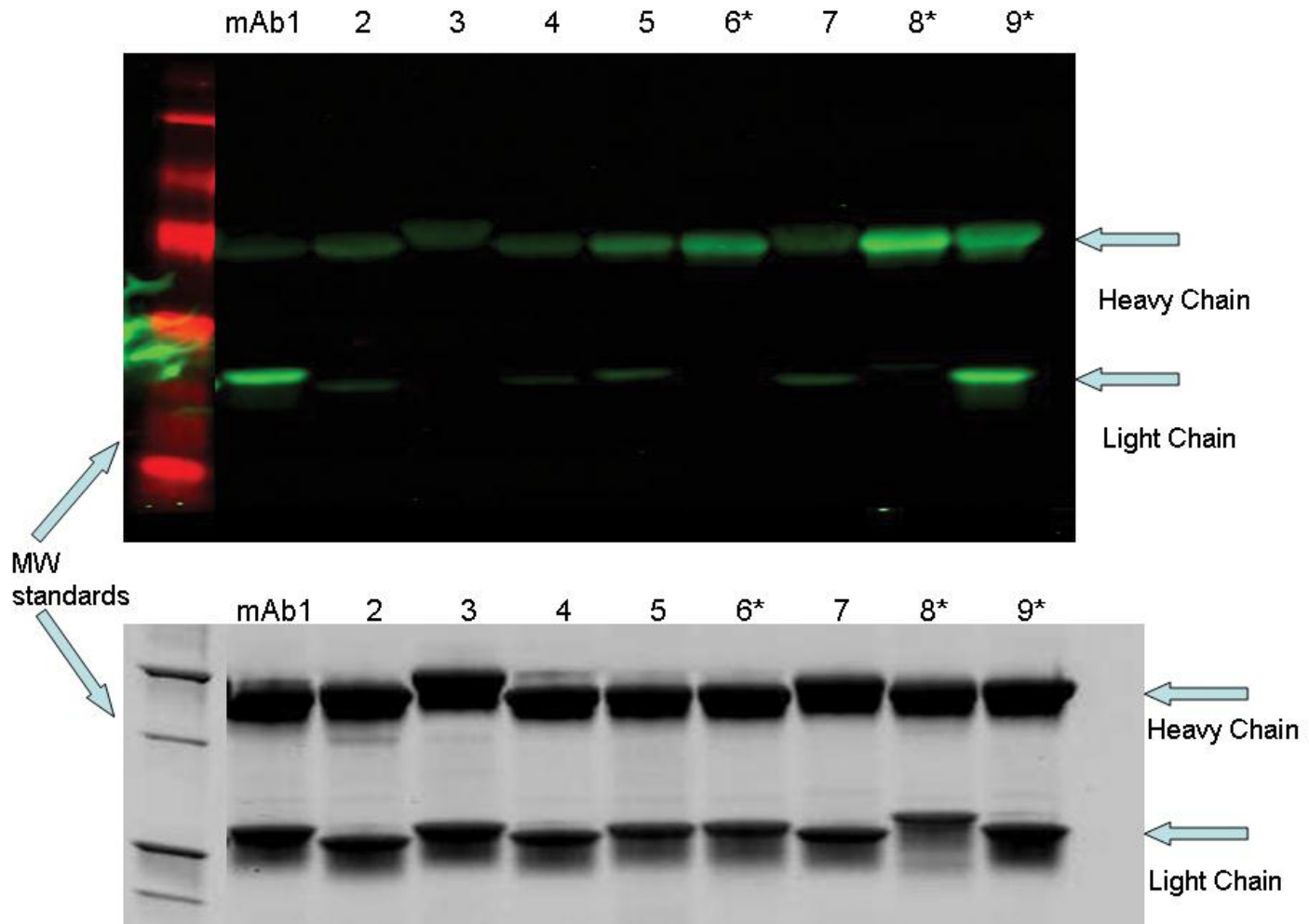


抗人体免疫球蛋白抗体对宿主细胞蛋白质的测定没有影响

Anti-human IgG has no effect on Host Cell Protein Detection



单克隆抗体药物与抗宿主细胞蛋白质抗体交叉反应的凝胶电泳免疫分析



6. 结论

- 宿主细胞蛋白质是一个复杂的问题，了解它的复杂性是能作出正确分析和判断的基础.
- 三明治酶联测定法是目前生物制药业的行业标准
- 不同于三明治酶联测定法原理的其它方法应当用来作为检测宿主细胞蛋白质的互补方法.
- 分子生物学可以用于宿主细胞蛋白质基因的去除，从而改进蛋白质纯化过程的效率

第二部分. 单克隆抗体药物中蛋白质 A 的分析

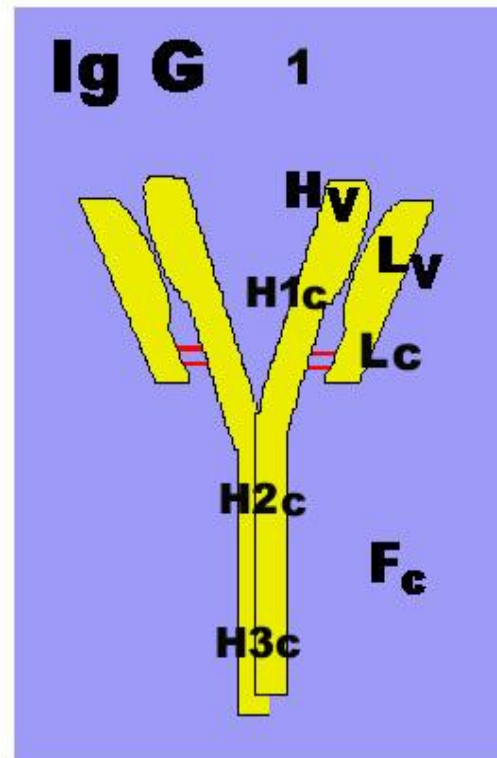
一个快速有效的蛋白质A 测定方法对于单克隆抗体药物的研发和生产非常重要

1. 蛋白质A 是 *Staphylococcus aureus* 细胞壁的组份蛋白质, 对人体有潜在的毒性.
2. 固定化蛋白质A 是纯化单克隆抗体的主要手段, 单克隆抗体中蛋白质A 残留的去除是一项主要纯化指标。
3. 蛋白质A 可能在人体内具有多种生物学效应, 包括引导细胞介素的形成 ($\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-2 , IL-4), 蛋白质A 对人体健康的影响现在还不清楚 .

蛋白质A 与抗体之间的相互作用

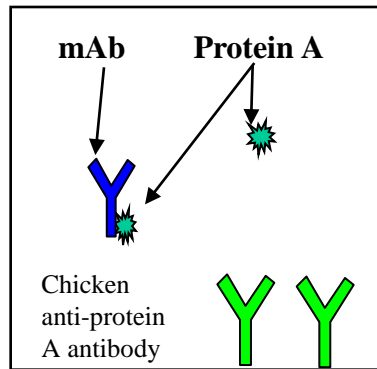
Species	Protein A
Human IgG1	++++
Human IgG2	++++
Human IgG3	-
Human IgG4	++++
Mouse IgG1	+
Mouse IgG2a	++++
Mouse IgG2b	+++
Mouse IgG3	++
Rat IgG1	-
Rat IgG2a	-
Rat IgG2b	-
Rat IgG2c	+
Hamster	+
Guinea Pig	++++
Rabbit	++++
Horse	++
Cow	++
Pig	+++
Sheep	+/-
Goat	-
Chicken	-

- Protein A is a 42 kDa polypeptide that binds the residues in the CH2 and CH3 domains (Fc region) of immunoglobulin heavy chains.



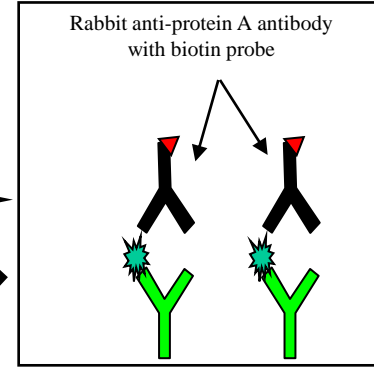
- Chicken IgY is not bound in the Fc region, so is a good source as a specific antibody reagent raised to protein A (in the variable region)

蛋白质A 酶联测定图示

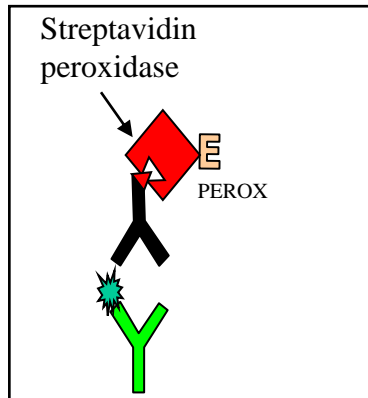


Pre-coated chicken anti-protein A antibody captures protein A in Mab

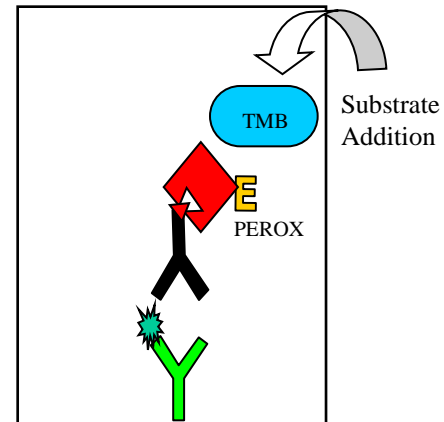
Protein A potentially associated with mAb product is dissociated by low pH



Rabbit anti-protein A biotin probe detects captured protein A



Streptavidin peroxidase binds with high affinity to biotin



The peroxidase enzyme reacts with substrate TMB to produce a colour change measured at 450nm

分析方法总结

	方法
Avoid interaction between protein A and Fc region of Mab	<ul style="list-style-type: none">• Buffer exchange• Incubation at acid condition (~pH 3.5)
样品需求	2.5 mg
灵敏度	~ 2 ng / mg IgG
回收率	~70%
分析时间和效率	每个分析需要六小时， 每个平板可分析四个样品