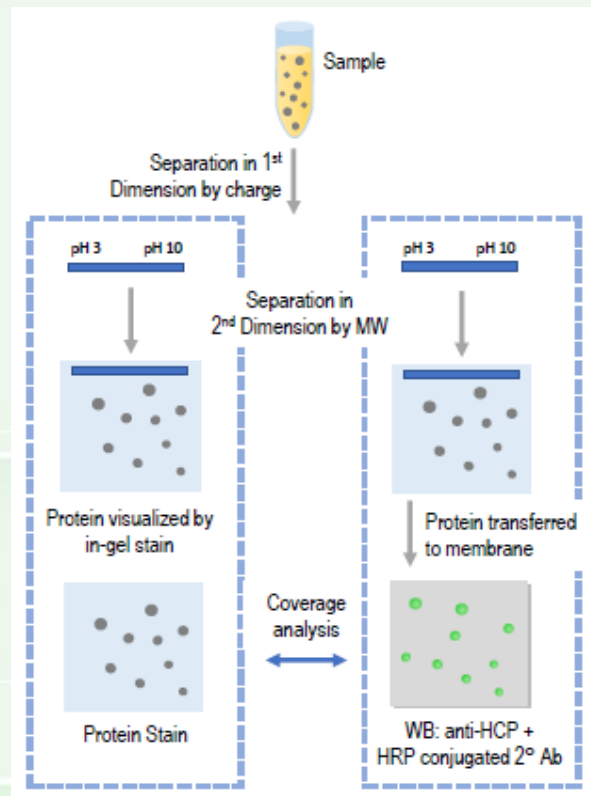


## 關於新藥開發不可不知的 - HCP (上)

宿主細胞是生產諸如重組蛋白、抗體藥物或疫苗藥物時最常使用的材料，不同用途的藥物常會採用不同的宿主細胞，如重組蛋白常用的 CHO cell (中國倉鼠卵巢細胞)，新型疫苗常使用 Vero cell (非洲綠猴腎臟細胞)、MDCK cell (犬腎上皮細胞)及昆蟲細胞等，而傳統疫苗則常會選擇 E. coli (大腸桿菌) 或雞胚做為宿主細胞。

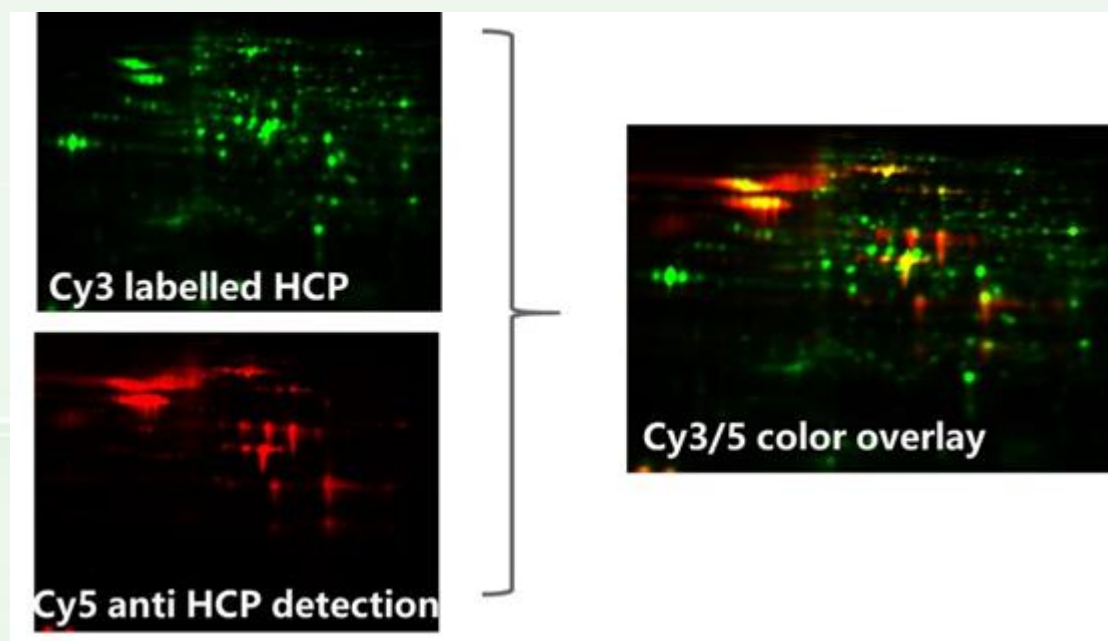
然而宿主細胞本身的蛋白質 (Host cell proteins, HCPs) 如果殘留在製劑當中的話，就可能引發人體的免疫反應，如發熱、紅腫甚至於休克。所引發的症狀及嚴重程度則與 HCPs 的濃度、數量及每個人免疫系統的差異息息相關。因此 HCPs 的監控變得越來越重要，也是目前各國藥物主管機關監控的重點項目之一。然而新藥開發的週期長，成功率又低，為了使整體開發流程可以順利執行，因此在新藥開發的中後期就必須非常留意製程設計中 HCPs 的控制。否則，藥物中 HCPs 的殘留量將會影響後續臨床試驗的效果，如果出現了免疫反應，還會進而導致臨床試驗延遲、終止甚至得要重新設計製程。即便藥品成功被開發，若是想進入不同國家的市場，就必須符合當地主管機關的要求標準，因此藥廠都需要遵照不同國家的藥典要求，建立嚴格的 HCP 監控系統。



目前廣泛被使用於 HCP 檢測的方法為 ELISA 法，透過 substrate 呈色或螢光的方式成像來計算 HCPs 的含量。然而並非所有的 HCPs 都可以作為抗原產生出抗體，因此難免會有漏網之魚，所以還必須評估 ELISA 中所使用的 HCP 抗體的覆蓋率 (Coverage)。HCP 抗體覆蓋率的評估方法一般會採用 2D 電泳與 Western Blotting 兩種技術結合的方法。2D 電泳利用蛋白質的等電點與分子量的差異，在 SDS gel 中將蛋白質進行分離，所以 HCPs 會在 gel 中形成許多獨立的蛋白質點。一個樣本至少需要準備二重複的 gel，電泳後其中一片 gel 直接染色成像，另一片則進行 transfer, blocking, HCP 抗體 incubation 等 western blotting 的步驟，最後加入 substrate 進行冷光成像。最後將兩份影像疊加並配對蛋白質點，分別紀錄配對與未配對的蛋白點數量以計算覆蓋率。

如果上述過程一切順利，那恭喜你可以去買樂透了！！

然而這類結合 2D 電泳與 Western blotting 的方法，常因為冷光成像和總蛋白的染色成像結果並非來自於同一片 gel，而 gel 與 gel 之間的差異以及電泳過程中所導致的 gel 扭曲變形都使得蛋白點的配對變得極度困難，只能人工配對，大幅增加時間成本。



還好，有個新方法可以完全避免因為影像來源不同所造成配對困難，大大的改善整個實驗的簡易性—Differential In Blot Electrophoresis, DIBE。無論是美國藥典 (United States Pharmacopeia, USP) 或是歐洲藥典 (European Pharmacopoeia 9.1, Ph. Eur.) 中都推薦使用差異性螢光電泳技術 (DIGE/DIBE)

做為計算 HCPs 抗體覆蓋率的新方法。

DIGE/DIBE 技術只需製備一片 SDS gel，最終在同一張 membrane 上同時表現出兩種螢光色彩，其一為 HCPs 總蛋白質，另一則是被帶有螢光的抗體所辨識到的 HCPs。利用多功能 DIGE/DIBE 技術可避免膠體間的差異和凝膠的變形，搭配 HCP 專用分析軟體，可以輕易地完成蛋白點自動配對，透過 2D/3D 呈現完整表達配對效果，並可直接計算 Coverage 結果。

