

關於新藥開發不可不知的 - HCP (下)

上一期，我們介紹了 HCP ELISA 檢測技術，以及美國藥典『USP 39 Published General Chapter <1132> Residual Host Cell Protein Measurement in Biopharmaceuticals』和歐洲藥典『Ph. Eur. 2.6.34 Host cell protein assays』中，都推薦的基於螢光標記的 HCP ELISA 抗體覆蓋率評估新方法：差異螢光印跡電泳 (DIGE/DIBE) 技術。本期，我們將詳細介紹下 DIBE 技術的工作原理、蛋白點配對流程和 HCP ELISA 抗體覆蓋率的計算方法。

United States Pharmacopeia (USP)
Official from August 1, 2016

[1132] Residual Host Cell Protein Measurement in Biopharmaceuticals

3.2.2.2 Characterization of antibodies to HCPs:

*One approach, the **SDS-PAGE/Western**, is essentially a comparison of the number of spots present in the immunologically stained membrane versus the number in a duplicate gel (or blot) stained for total protein...*

*...Differential staining of each antibody preparation may power the analysis, because it can be used to analyze the same 2-D gel. ... The second approach, **immunoaffinity binding/SDS-PAGE**, ... For the purpose of sample comparison, **difference gel electrophoresis (DIGE)** technology could be helpful.*

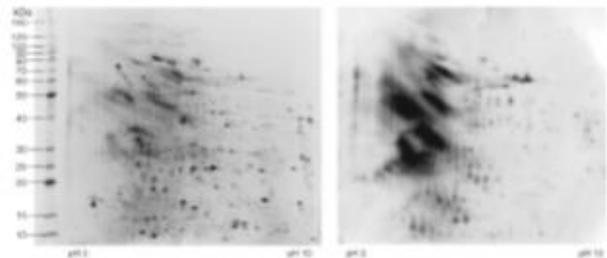
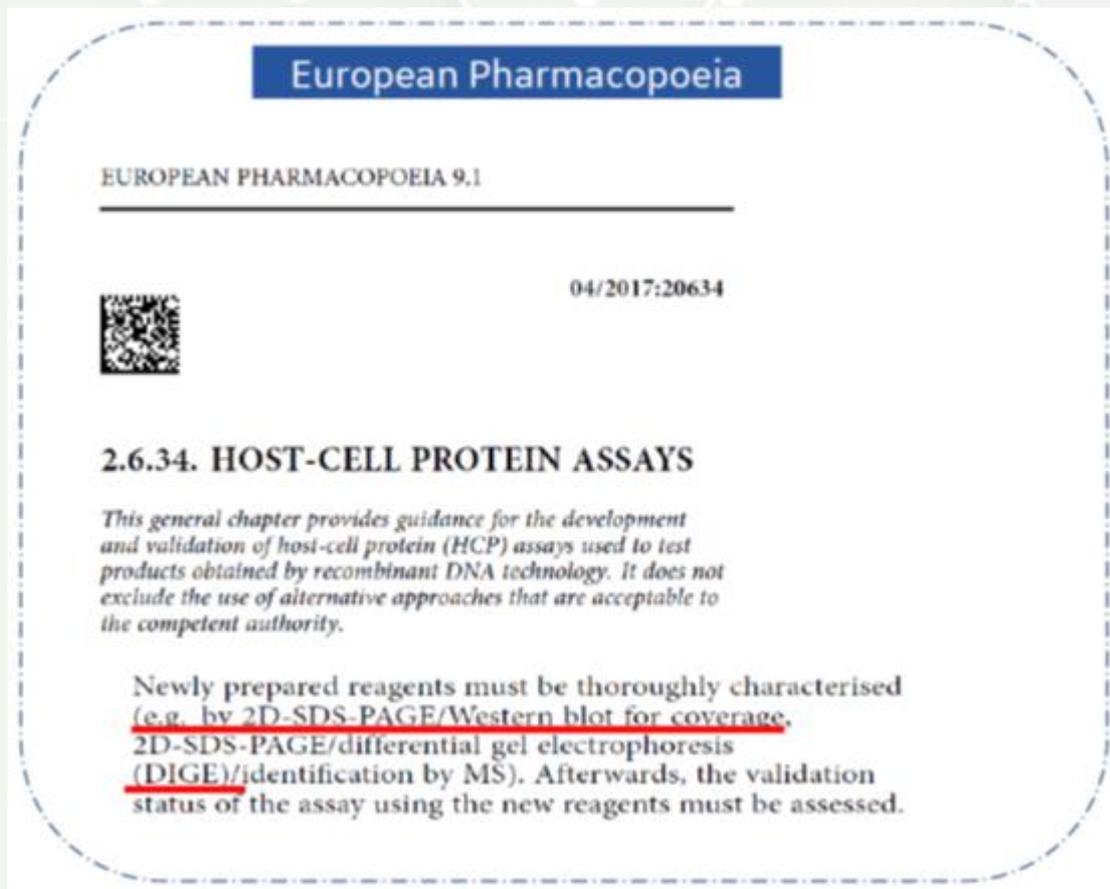
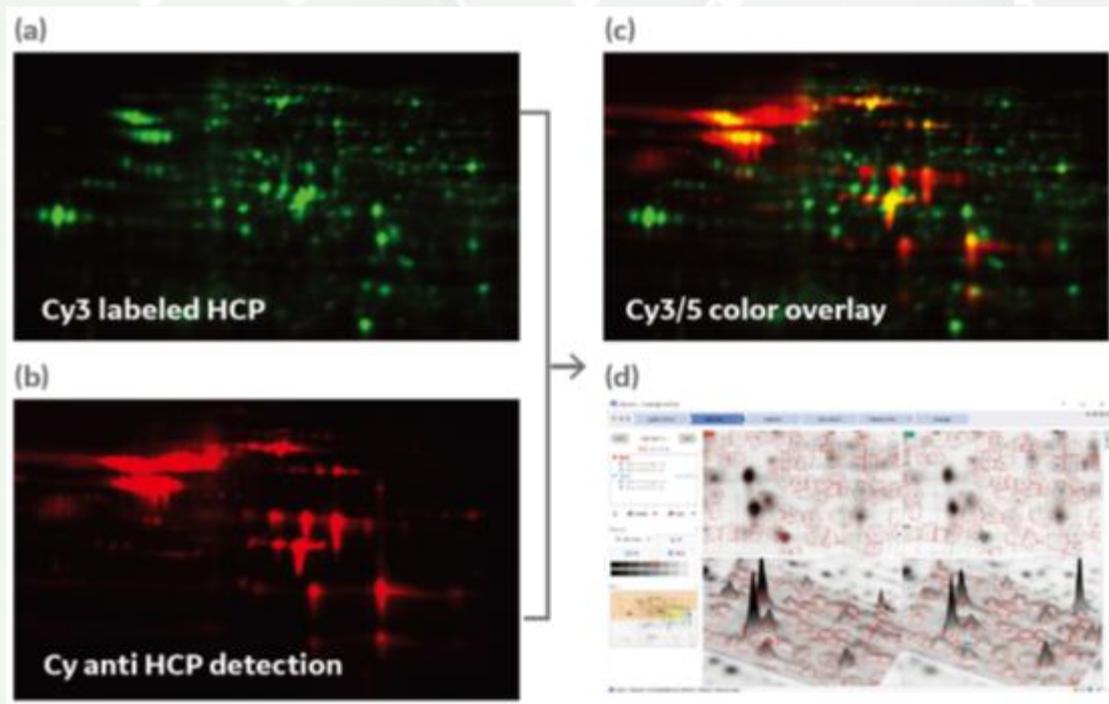


Figure 3. Left panel: 2-D gel/SDS-PAGE analysis of representative CHO HCP calibration standard stained with a sensitive fluorescent stain. Right panel: Western blot analysis of the same gel shown in the left panel.

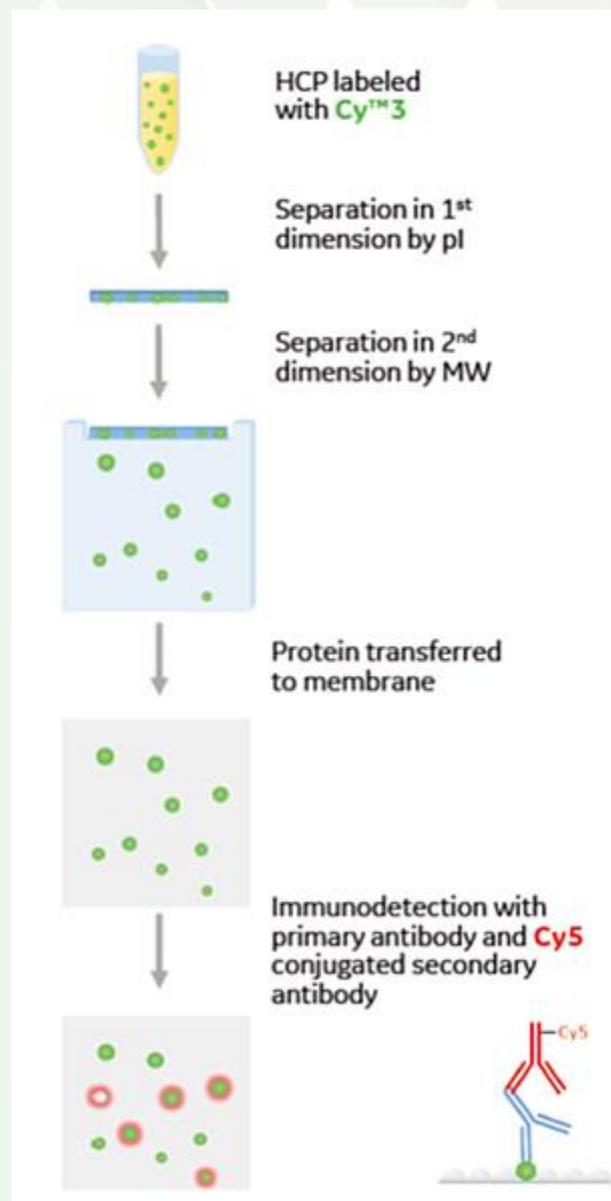


如同上期所述，評估 HCP ELISA 抗體覆蓋率的最佳方案是雙向電泳(2D-Electrophoresis)與蛋白免疫印跡技術(Western Blotting)結合的辦法，但是傳統的雙向電泳技術，由於每一片膠只能實現單一樣品的成像，並且凝膠間存在無法控制的差異、凝膠的形變以及化學發光的一次性成像等因素都會直接令實驗結果的重複性變差，使得蛋白質點配對的難度加大，這些都將嚴重影響 HCP ELISA 抗體覆蓋率的評估。

而差異螢光印跡電泳技術(DIGE/DIBE)，可以實現一個樣本，只需一片凝膠，就可以得到可靠的 HCP ELISA 抗體覆蓋率評估結果。

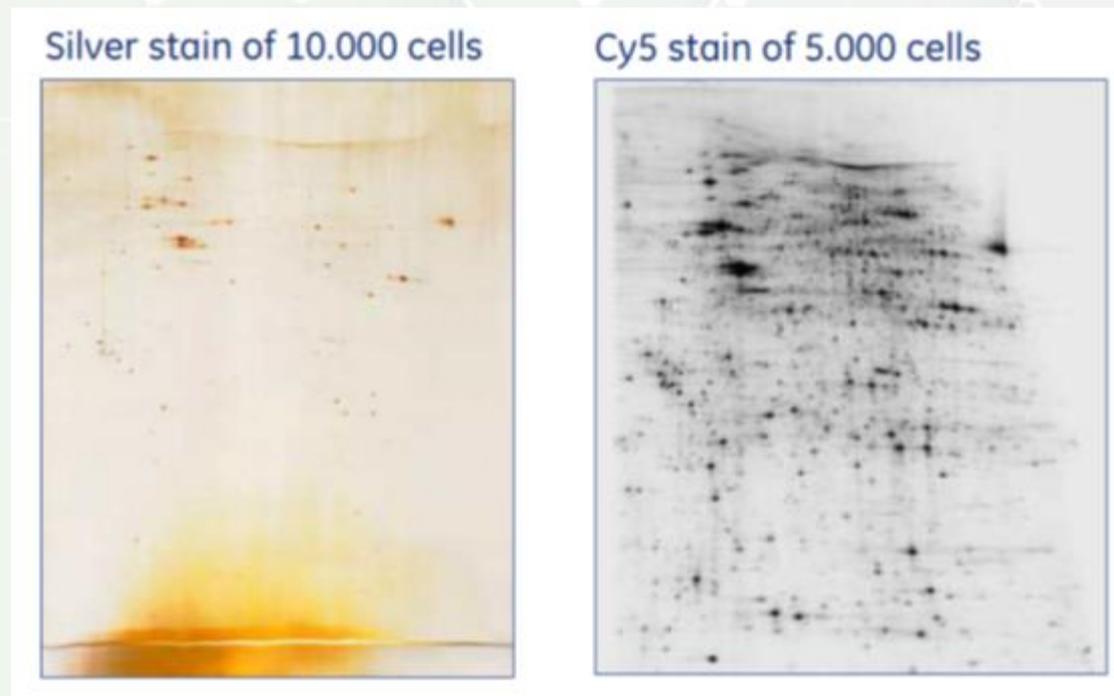


差異螢光印跡電泳技術(DIGE/DIBE)的整體原理是：電泳前將樣品用 CyDye 染劑，例如 Cy3，標記總蛋白，經過二維電泳(2D-Electrophoresis)分離後，直接進行轉漬(Transfer)並 Blocking，將 HCP 測試抗體作為一抗，進行第一次 Incubation，二抗使用 CyDye 染劑，例如 Cy5，所 conjugated 的抗體進行 Incubation。二抗反應完成後，無需使用任何呈色劑，直接可用於多螢光雷射掃描儀成像。Membrane 也可乾燥避光保存數月，隨時取出反復觀察。

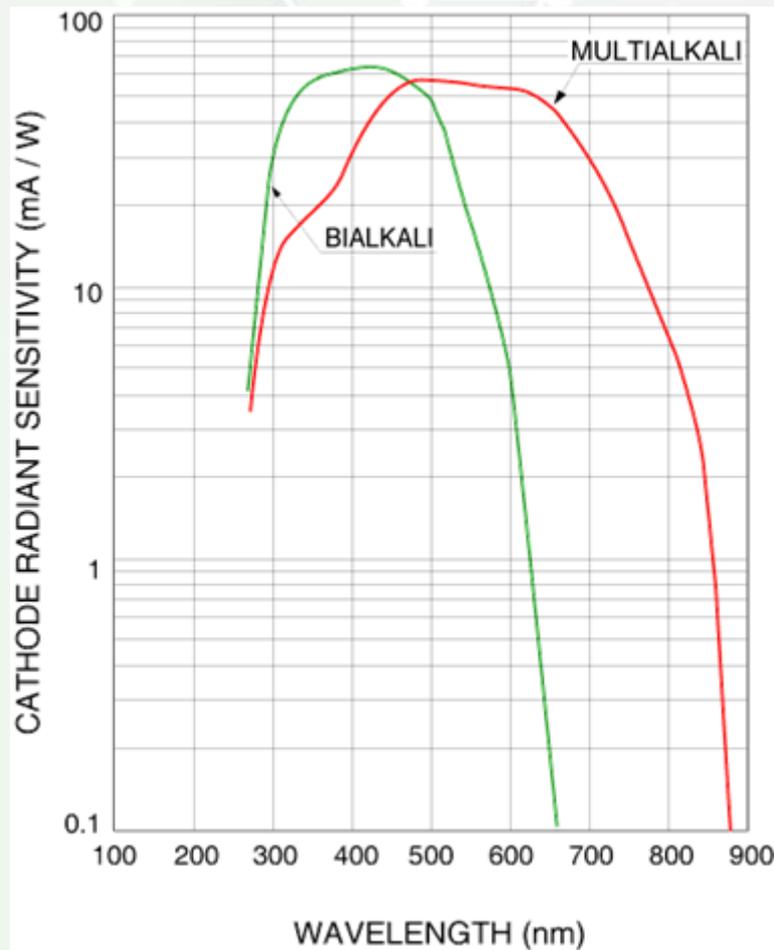


想要完美實現上述的 DIBE 技術，需要從三個層次來互相搭配：

首先，高靈敏的 CyDye 染劑，如下圖與銀染靈敏度的對比。即使只有一半的細胞數量，使用 CyDye 染色可以呈現更多微量的蛋白質點。



其次，高品質的影像表現，來自於高規格的螢光掃描儀。GE Amersham Typhoon 提供全光譜雙 PMT 檢測器，任何種類的螢光染劑皆可找到最適合的檢測器，以獲得最佳 Signal to Noise ratio 與 Dynamic Range。



最後，則是專用分析軟體。Melanie 9 Coverage 軟體可自動配對蛋白質點，同時對於影像進行 2D/3D 追蹤顯示，可以更簡單的顯現出各蛋白點的差異與訊號的高低，實現全自動化 HCP ELISA 覆蓋率計算及結果評估。節省人力與時間的花費。

隨著各國主管機關的重視，如果正在進行藥物開發的您，也關注著 HCP ELISA 覆蓋率的問題，歡迎隨時與我們聯絡，岑祥公司將竭誠為您服務！