

殘留宿主細胞蛋白質試驗法

現今許多藥品生產係由經過重組技術之宿主細胞（例如：細菌、酵母菌、哺乳動物細胞、昆蟲或植物細胞株）所製成。製造此類產品時，不可避免引入一些非產品或由宿主細胞衍生而來之物質於製程中，故製程生產所得產品其實是包含預期產物與宿主細胞所衍生不純物之混合物，包括：宿主細胞蛋白（host cell protein, HCP）與將透過生物製程予以清除之其他製程相關不純物。

殘留 HCP 可能影響產品之品質、安全性及有效性，因此須將產品純化製程最佳化以穩定地去除最大量 HCP，盡可能提高產品純度。

生物藥品中之 HCP 的主要疑慮在於 HCP 可能誘發抗 HCP 抗體，此抗體可能對患者產生臨床效應；此外，HCP 亦可能具備佐劑效用，誘導患者產生抗藥物抗體（anti-drug antibodies, ADA），進而影響藥物安全性與有效性。探討有關免疫原性對臨床前與臨床研究的影響，請參見免疫原性測定法—抗藥物抗體之免疫測定法的設計與確效（通則 4069）。HCP 亦可直接影響產品本身品質，例如：即便只存在微量具蛋白水解能力的 HCP，仍可隨時間而逐漸切割蛋白質，因而降低或消除該產品之生物效價或改變其安定性。

本通則主要介紹用於檢測以重組技術所生產蛋白質藥品中之 HCP 的免疫分析方法，本通則未涉及疫苗或基因、細胞或組織產品，雖然

內容提及一般原則可能適用於上述產品之 HCP 檢測。基於以下原因，HCP 之免疫分析方法的設計與確效有其獨特且顯著的挑戰：(1)藥品中存在各種各樣可能之 HCP；(2)一般使用多株抗體試劑進行檢測；(3)缺乏完全吻合之定量標準品；(4)在某些情況下，檢品稀釋效應會造成相當大影響；(5)量測單一種類 HCP 之既有限制。

本通則包括整個產品與製程開發生命週期中的分析方法開發策略，以及如何證明分析方法的適用性(例如：說明單元操作如何清除 HCP，批次放行)。由於 HCP 免疫測定法之複雜性，關鍵試劑的開發與特性分析須十分謹慎，特別是用以引發抗 HCP 抗體之免疫原、抗體試劑及測定 HCP 標準品。由於 HCP 檢測為製程開發與產品品質管制之必要環節，因此 HCP 檢測的討論應結合法規要求以及考量 HCP 整體管制策略的相關指引。

1. 製造、鑑別及一致性考量

各式細胞表現系統已被應用於藥品製造，例如：細菌（大腸桿菌與螢光假單胞菌）、酵母菌（釀酒酵母與嗜甲醇酵母菌）、哺乳動物細胞（中國倉鼠卵巢細胞（Chinese hamster ovary, CHO）、小鼠骨髓瘤細胞株 NSO 及其他）、昆蟲細胞（桿狀病毒感染之草地貪夜蛾（*Spodoptera frugiperda*）細胞）及植物細胞（煙草、阿拉伯芥及稻米）。特定宿主細胞經過特定培養條件與製程後，所產生之

HCP 有其獨特性與專一性。根據所使用的宿主細胞與製程，HCPs 的等電點（3~11）與疏水性皆會有所差異，且 HCP 分子量呈現大範圍分布（5 kDa~至少 250 kDa）。根據宿主細胞與培養條件，上游檢品中之 HCPs 數量可從數百至一千多種蛋白質。儘管以細胞為宿主應用於生物藥品製造行之有年，大部分經驗主要來自使用大腸桿菌、哺乳動物細胞 CHO、NSO、SP2/0 及人胚腎細胞 HEK293。本通則指引主要借助上述表現系統之使用經驗，然其一般性原仍可廣泛適用於任何宿主細胞系統。

於哺乳動物細胞表現系統中，重組蛋白通常與許多 HCPs 一併自細胞分泌至細胞培養液（cell culture fluid, CCF）。然而，已知在生產培養時細胞內蛋白質運輸可能不會以正常方式進行，例如：於大量存活細胞培養液中可發現蛋白質通常與溶酶體等細胞內胞器相連，因為該細胞株是以最大蛋白質輸出特性進行選殖。此外，製程中有些細胞死亡，其可溶性細胞內蛋白質亦會被釋放到細胞培養液中；收集細胞過程亦會造成細胞裂解，使得收集細胞培養液通常含有分泌性與細胞內的宿主蛋白。當這些蛋白質混合物於發酵器中培養，可能因存在酵素活性（例如：蛋白酶或唾液酸酶）而造成額外的 HCP 族群變化。

HCP 分析可提供進入下游回收製程的材料組成以及每個純化步驟

如何影響 HCP 清除之重要資訊。某些情況下，HCPs 甚至會與特定產品結合並一起被純化。為得知何項製程步驟可去除 HCPs，並證明這些步驟的耐變性可達到一致的去除效能，製程的特性分析與確效研究是必要的。因此，HCP 分析是純化製程開發不可或缺的一部分且有助於確保製程一致性。具再現性且可靠的 HCPs 分析方法對檢測原料藥中殘留的 HCPs 非常重要，因殘餘 HCPs 將跟隨原料藥製成藥品，最終進入患者體內。HCP 含量應於(1)毒理學評估之臨床前批次、(2)臨床開發期間之所有批次以及(3)來自最終製程之製程確效檢品進行檢測。藥品獲得批准後，HCP 監控可能被要求做為控制系統之要件。本通則後續章節將更詳細地討論 HCP 分析在製程確效與優良製造規範（GMP）控制系統中之應用。

2. 名詞解釋

為在文獻與主管機關間建立一套共同名詞，表 1 列出常用名詞與其定義（說明於本章中之用法）以及過去曾使用之同義詞。注意，

「平台」一詞意指製造者使用同套標準品與試劑來測試相似上游培養條件之相同類型表現系統（例如：CHO 細胞）所製成之各種產品。以 HCP 分析平台為例，抗 HCP 抗體係以 HCPs 為免疫原誘發動物免疫反應而得，該 HCPs 來自於多種產品共通之上游製程，無關其下游純化製程差異。此方法允許引用先前產品之知識，以

使用相同表現系統與共通的上游條件來說明分析方法適用於新產品，通常是較簡單且直接的方式。

用於產生分析平台所需抗 HCP 抗體及作為校正標準品之 HCP 免疫原為大範圍之 HCPs 組成；相反地，「特定製程」一詞係指免疫原/標準品為特定製程所產出之 HCP（獨特上游細胞培養製程或獨特下游純化製程）。因此，特定製程的分析在應用面有其限制，每個分析須完全符合個別製程要求。特定製程免疫原與校正標準品的應用範圍較窄小且專屬於某一製程。由供應商生產「商業化」分析套組通常為不同細胞品系與不同收集物/純化製程之組合，使其具有廣泛的應用性；但這些商業化分析套組並非針對特定製造商專有的細胞株而設計，使用端無法確保試劑供應無虞與批次間之一致性。

表 1 HCP 相關名詞解釋

名詞	定義	舊稱
商業化販售 commercially available	對公眾進行商業販售；通常是供應商製造之上游分離物與相應抗體的組合，作為試劑或試劑盒出售。	通用名

平台 platform	以製造商專屬之宿主細胞品系開發同一套HCP標準品與抗體；當上游條件相似時，可廣泛應用於使用同一類型細胞（例如：CHO）之不同產品。	客製、內部或專屬
上游特定製程 upstream process specific	當上游培養製程明顯偏離平台時所設計的分析方法。通常在進行任何純化之前，如參數相似則可以應用於一種以上之產品。	客製、內部、特定產品或專屬
下游製程特定 downstream process specific	當利用下游單元操作來增加HCP族群時所設計的分析方法，如參數相似則可應用於一種以上之產品。現今很少使用此方法，除了某些具有個別下游製程產品，不建議使用此方	客製、內部、特定產品或專屬

	法。	
個別HCP分析 assay for an individual HCP	使用已經鑑定之單一已知HCP與其特異性抗體所組成之標準品進行分析。	單一分析物分析或客製、特定HCP
覆蓋率 coverage	描述多株抗體對HCP族群識別程度之評估。可以對用做HCP抗原之HCP族群或從產品生產培養物進行覆蓋率評估。	
驗證 qualification	證明分析方法（包括該方法所使用之試劑）應用於特定製程與製程中檢品之適用性。	
蛋白質A/G-親和性純化 Protein A/G-affinity purification	以固定化蛋白質A或G純化抗體 ^a	親和性層析
HCP-親和性純	以固定化HCP（抗原） ^a 純	親和性層析、免疫親

化 HCP-affinity purification	化抗體	和性層析
無表達細胞 Null cell	用於生產但不包含特定產 物基因之細胞株；包括未 轉染之親代細胞與以無產 物基因之表達載體轉染後 的細胞。	親代、空白、或模擬 轉染細胞
ng/mg	每個產品之HCP含量（比 例），其中ng代表HCP質 量，mg代表產品質量，為 將HCP濃度（ng/mL）除 以產品蛋白質濃度 （mg/mL）計算而得。	百萬分之一 ppm ^b
^a 在某些情況下，兩種純化都需要進行，通常是先以蛋白A/G純化，再進行HCP親和性層析。 ^b 儘管長久以來一直使用 ppm，但不建議使用此術語，因為該術語用於表示其他類型檢測的單位體積質量。公認的是，ng 通常用作從 HCP 標準曲線（以 ng/mL 為單位）利用內插法得出的值，其信		

號代表抗體結合，而非嚴謹地反映可能存在的 HCP 質量，不同於治療性蛋白質之濃度測量。

3. HCP 免疫分析方法

免疫分析方法主要依賴儘可能廣泛地辨認進入下游純化製程 HCPs 之抗體，因此，以多株抗體設計之三明治型免疫分析（sandwich immunoassay）成了 HCP 偵測與定量的主要方式。這種分析方法提供高靈敏度、專一性、處理量、自動化潛力、可快速重複、定量結果及低單位分析成本之組合，此為其他當前可用分析技術所無法比較的。由於缺乏三明治型分析所具備之專一性或靈敏度，其他免疫分析形式（例如：競爭性免疫分析）不一定適用。雖然這些方法對於指定批次產生單一 HCP 值，當試劑存在高親和力之抗體時，該 HCP 數值更顯重要；對於在分析中未被辨識或被低親和力抗體辨識之 HCP 數值則為無或低重要性。基於這些原因，通常需要對產品純度進行正交測量(orthogonal measures)。有關這些方法的細節請參見「5. HCP 殘留之偵測、鑑定及測量之備援技術」。

免疫分析之基本原理與設計敘述於免疫試驗方法－酵素結合免疫分析法（通則 7020）。最常用於 HCP 之檢測型式為附帶偵測系統

之三明治型免疫分析，例如：比色、電化學發光（electrochemiluminescent, ECL）、化學冷光、放射性或其他。均相型免疫分析法（包括競爭性分析）為所有試劑加在一起，抗原抗體在一個步驟中互相結合且無潤洗步驟。由於抗原可能過量而造成抗體不足（見本通則後續章節），因此應謹慎使用此類型分析。因為均相型分析會降低動態範圍與靈敏度，一般多選用通則 7020 描述之非均相三明治型免疫分析。這些分析型式之優、缺點將於免疫試驗方法之一般考量（通則 4049）進一步討論。數據分析通常以多種標準濃度產生之 S 形曲線進行非線性擬合，雖然部分分析為了提高靈敏度可能集中於曲線低點。

3.1. 分析開發週期

圖 1 為常見分析開發計畫圖示，取決於各階段可用試劑。以下情況需少量銜接性研究：(1)已有平台試劑與(2)上游製程回溯呈現一致性。圖 1A 為製程確效階段前，若平台方法尚未開發，可暫時採用商業上可取得的分析方法，並對該分析方法進行適當驗證。進入臨床三期以後，分析方法可採用平台或是根據上游特定製程，如有更換分析方法，應進行銜接性研究。如預計將商業分析方法使用於臨床三期與核准上市後，須注意已充分證明分析試劑適用於檢測製程 HCPs。另一個考慮因素是生物藥品製造商對提供試

劑之外部供應商的管控較少。

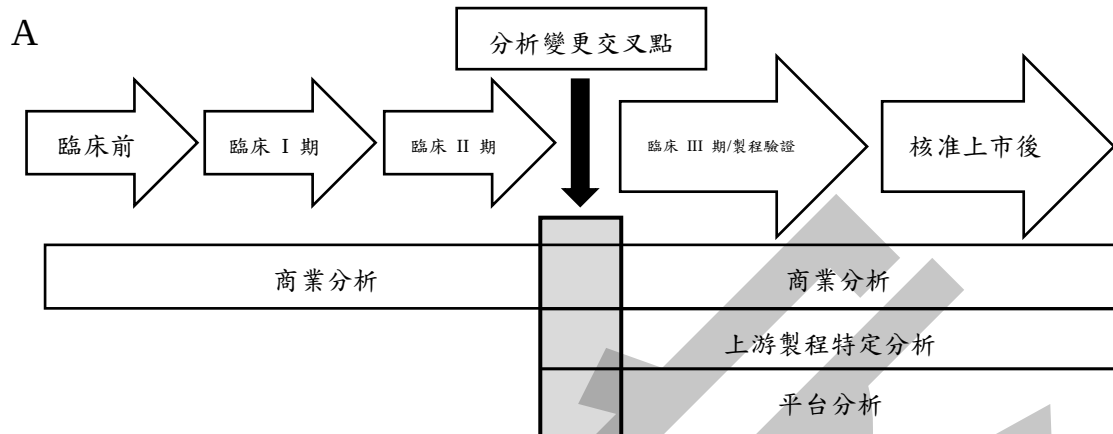


圖 1A 如果在開始產品開發之前沒有平台檢測方法。

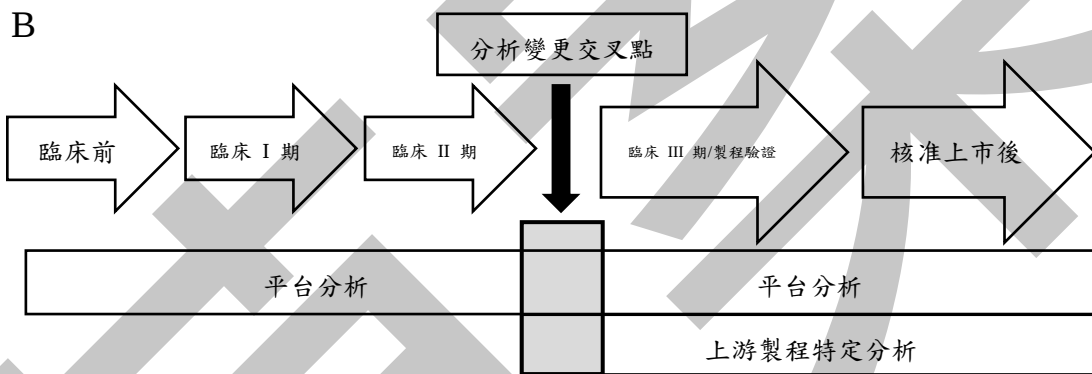


圖 1B 在開始產品開發之前已有平台分析。

圖 1B 表示如果產品開發起始時期已經有可用的平台分析，則此平台分析可用於產品開發所有階段。應驗證此平台分析是否可適用於每一個新產品。如果細胞培養製程相較於平台製程有重大變更，且可能引入明顯不同的 HCP 族群，則可能應於臨床三期或製程確效及其後階段切換到上游製程特定的分析方法，並進行銜接性研究以支持分析方法之更換。

應考慮下游製程特定之 HCP 分析限制，因可能以零基因表現之

HCPs 通過第一管柱且以後端管柱之收集物 (pool) 誘發動物免疫反應，而誤以為 HCP 分析有所改善。從過往經驗得知，理論上免疫原與標準品容易富含於最可能進入回收製程 (recovery process) 且存於最終產品的 HCPs。與其使用含有數千種不相關蛋白質的免疫原，此策略基於「最可能存在於製程之蛋白質會出現在免疫原中」的假設，，因此焦點將集中在最感興趣之 HCP 族群。這種方法可能產生潛在問題是：

(1)如果僅使用來自第一支管柱之無表達細胞 (null cell run) 收集

所得之 HCPs，則製程開發期間之後續改變 (例如：改變管柱運作條件) 可能導致 HCPs 分析無效。因此，製程開發將變得非常受限，即使是製程的些微改變亦可能需要開發多個 HCP 分析 (或需要管理其不確定性)。

(2)與產品共純化之 HCPs 可能因為直接或間接與產品蛋白質結合，則沒有產品蛋白質之無表達細胞生產將會錯失這些 HCPs。

(3)對層析樹脂非專一性吸附現象並不罕見，且通常不具再現性。

與第一次通過管柱相比，再次將無表達細胞生產物質通過管柱時，其 HCPs 組合可能與通過新樹脂管柱者有所不同。

3.2. HCP 試劑開發與特性分析

3.2.1. 抗原/HCP 標準品製備

按 1. 製造、鑑別及一致性考量中所述，總 HCP「抗原」是一個複雜蛋白質族群；因此，當製作 HCP 抗原/標準試劑時，應確保：(1)校正標準品足以代表該細胞株與製程，(2) 其蛋白質濃度可準確定量，(3)免疫原的給予方式應產生盡可能對多種不同 HCPs 具有反應性的多株抗體，HCP 抗原組成亦應具全面性，使其在產品生命週期中可以承受常態性的製程變更。

除上述用途外，HCP 抗原亦可用於製備純化抗血清之親和性管柱。如使用親和性純化，應仔細計劃 HCP 抗原需用量。生產數量要足夠大，才足以提供若干年之充分庫存（通常為 10 至 20 年）；理想狀況為可以涵蓋整個產品壽命。抗原製備程序應以利於再生產補給之方式執行並記錄。

由於 HCP 分析用於偵測僅含有微量 HCP 不純物的原料藥檢品，因此抗 HCP 抗體與產品任何交叉反應都可能危及檢測方法與產出偏差結果，必須避免 HCP 抗原被產品污染以防止產生抗產品抗體。

3.2.1.1. 從哺乳動物細胞製備 HCP 抗原

目前生產之生物製藥產品大多數為哺乳動物細胞所表現，例如：CHO 細胞。圖 2 概述製備 CHO 細胞 HCP 抗原之一般程序。

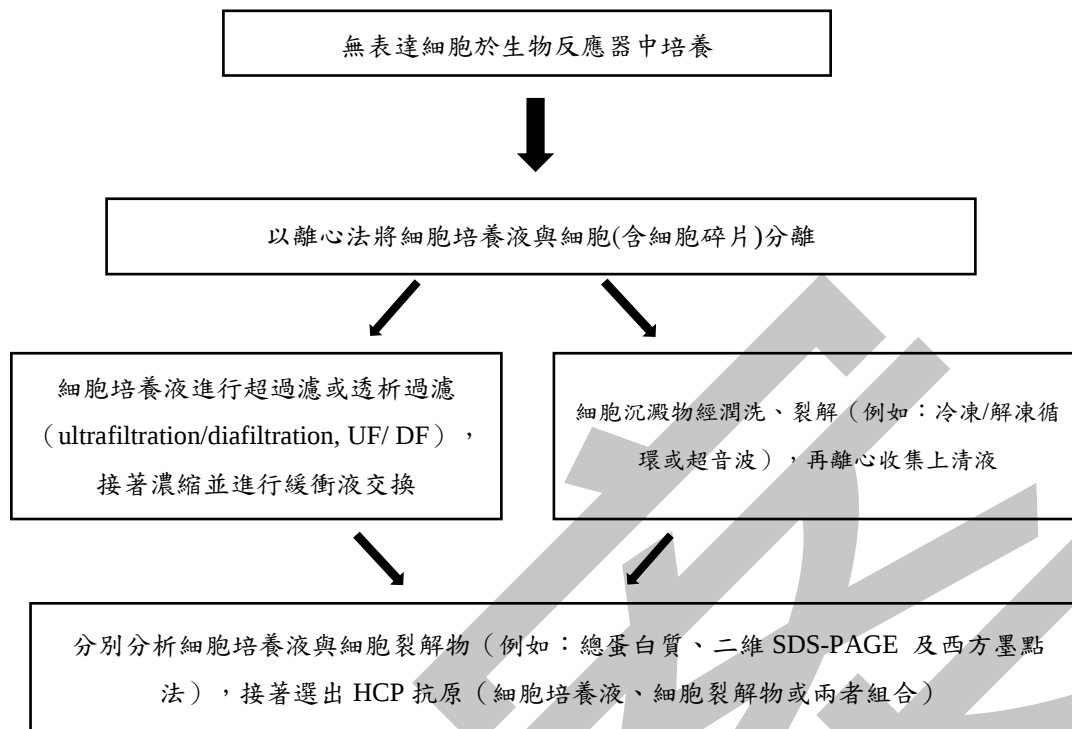


圖 2. 哺乳動物 HCP 抗原製備實例。

第一步是建立一個不表現產品基因之無表達細胞，可使用與製備產品之細胞具有共同起源之未轉染（即親代）細胞，或是以不帶產品基因之表達載體轉染之細胞（傳統稱為“模擬”轉染）。後者主要優點在於表現選擇性標記（例如：二氫葉酸還原酶或麩胺酸合成酶），或者可另行誘發選擇性標記之抗體。另一個優點是模擬轉染之無表達細胞不僅會表現選擇性標記，且可在更接近製程細胞培養條件下生長。使用尚未選殖模擬轉染之無表達細胞庫可形成最多可能之遺傳多樣性，因此具有產生廣泛 HCPs 族群之最高潛能。然而，這些以未選殖細胞庫接種之培養，於不同次操作間有較多變異性。「未轉染（親代）與模擬轉染」

是兩種常用方法，但仍有以下問題：針對生產細胞株之最適化細胞培養過程對無表達細胞可能不會造成相似之存活力與細胞密度。此外，無表達細胞缺乏產生大量產品蛋白質細胞所經歷之壓力，可能呈現不同 HCPs 表現。這些在存活力、細胞代謝及細胞密度的變化可能改變 HCP 的抗原組成，而降低其製程代表性。更多關於選擇合適 HCP 抗原製備條件於以下討論。

一旦建立無表達細胞，HCP 抗原便能於反映產品或製程之細胞培養條件之生物反應器、細胞培養瓶或細胞培養袋中被製備。

可以應用數個產品共通的代表性細胞培養製程平台（例如：CHO 細胞衍生之單株抗體）。通常所得之 HCP 抗原只進行最小程度後製以確保廣泛之 HCP 圖譜（HCP spectrum），使得抗原可適用於製程平台所生產數種產品之 HCP 監測。平台 HCP 抗原亦可以由組合數個無表達細胞培養與略微不同之培養條件而產生（例如：允許培養物在生物反應器中保留更長的時間以改變細胞活力）。此方法被用以獲得更廣泛之 HCP 圖譜，且以此為免疫原所產生之抗血清可適用於些微製程差異之產品 HCP 偵測。對於製程變化，這些試劑亦可增加 HCP 免疫分析的耐變性。

或者，可利用上游特定製程方法製備 HCP 抗原，其細胞培養過

程為模擬獨特產品之生產過程或特定製程。此方法之優點為所得 HCP 抗原對於特定上游製程具有高相關性。如同平台試劑，由於不包括額外加工純化步驟，故抗原含有廣泛 HCP 族群，且在下游生產製程改變後，此抗原通常仍適用於 HCP 監測。此方法之缺點是試劑使用通常受限於單個（或少數）產品或製程。HCP 抗原可以從具代表性之小規模、試製規模或生產規模所生產，每種方法各有其利弊。試製或生產規模可能最可以模擬實際製程；然而，僅應用一次大規模生產可能無法反映不同批次細胞培養間之正常變異。相反地，匯集數次小規模製備可以更適切地反映細胞培養製程之批次變化。無論規模如何，都應積極避免產品存在，因為在 HCP 免疫原中含有產品時，所得之免疫分析抗血清品質將會受到影響。

如圖 2 所示，在進行無表達細胞培養後，HCP 抗原可從細胞裂解物、濃縮之 CCF 或兩者混合製備而得。如果抗原是從 CCF 製備而來，則可以於進行生產線收集時或數天後收集細胞，如此使得某些細胞進行裂解並釋放 HCP 到 CCF 中，從而獲得更寬廣之 HCP 圖譜。

為了從細胞裂解物製備免疫原，細胞以離心收集，並將細胞沉澱物潤洗與裂解（例如：以重複冷凍/解凍循環或高壓均質化）。

通常選擇模擬生產過程之條件（意即從 CCF 製備免疫原，以離心去除細胞與碎片，再以超濾/滲濾方式處理 CCF），置換緩衝液（例如：置換成 PBS 或 HEPES）並濃縮 CCF。過濾門檻應以 HCP 損失最少為主，例如 10kDa 或更低。

3.2.1.2. 從細菌細胞製備 HCP 抗原

上述許多用於哺乳動物細胞 HCP 抗原製備原理也適用於原核細胞培養。然而，有些獨特因素必須去考慮，特別是細菌表現系統製程變異更多，例如細菌表現系統生成濃縮蛋白質沉積物，也就是所謂包涵體(inclusion body)，佔總細胞蛋白質高達 95%。HCP 不純物也存在於包涵體中，包括細菌膜蛋白、核糖體次單位蛋白及細胞質蛋白，例如：小熱休克蛋白或伴護蛋白(chaperone)。生產菌株中包涵體的形成使得從無表達細胞發酵過程產生具代表性之 HCP 製備變得更加困難。如上所述，無表達細胞可能不具有相同之 HCP 組成，且不會生成與特定 HCP 可以共純化之包涵體。在其他情況下，如果可以無表達細胞進行生產製程，則 HCP 是從周質(periplasmic)分泌系統產生。由於無明顯方法可以克服這些限制，實際上細菌表現系統常使用無表達細胞發酵後，從潤洗過細胞之裂解物製備細菌 HCP；上述之無表達細胞發酵生長與誘導條件皆儘可能地與上游製程

相似。對於任何 HCP 抗原，皆應於其使用於分析方法開發前證明 HCP 組成對於製程具有代表性。此法產生出完整表現且非常廣泛之 HCP。

由於大多數動物已接觸過細菌抗原，且可能已經預先存在許多辨識細菌細胞蛋白之抗體，因此必須鑑別預先存在之抗體反應，且適當考慮使用特定無病原(specific pathogen-free, SPF)動物。預先存在之抗 HCP 抗體達到顯著含量時可能混淆抗體反應分析；因此，進行動物免疫前，對動物之免疫前血清進行已存在抗體篩選非常重要。

以含有伴護基因之表達載體轉染空細菌細胞可能大量表現此基因（如：總 HCP 的 5%），對於過度表達之特定 HCP 不純物，有必要開發特定不純物之單分析物測定法（參見 6.1 個別 HCP 分析）。

3.2.1.3. HCP 抗原特性分析

在進行免疫前建議進行分析項目如下：(1)蛋白質含量（總蛋白質測定）；(2)沒有產品存在（以西方墨點法、免疫分析與/或質譜分析呈現）；(3)以一維或二維-聚丙稀醯胺膠體電泳（polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE）進行特性分析。測量蛋白質濃度以建立標準品濃度供將來使用，並確定所製備之

抗原總量。最常用的方法是二辛可寧酸法 (bicinchoninic assay, BCA)、考馬氏亮藍法 (Bradford) 及胺基酸分析 (amino acid analysis, AAA)，儘管比色法需要之標準品 (例如：牛血清白蛋白 (BSA)) 與待分析物 (HCP) 不大吻合。亦可使用波長 280 nm 之吸光度 (A280) 測量，雖然此法對蛋白質專一性較低 (例如：亦測量核酸)。這些方法學通常提供類似結果，但是某些方法可能比其他方法更明顯地受到干擾物質影響，使用者應考量使用兩種正交方法以排除特定方法高估或低估蛋白質濃度。更多詳細資訊請參見總蛋白質含量測定法 (通則 7015)，其中討論了各種蛋白質分析方法優缺點。HCP 濃度須以符合科學方法判別，並在產品週期內持續使用。可使用膠體、抗產品蛋白質之西方墨點法或其他適當方法以評估是否有產品的存在。最後，一維與二維膠體有助於鑑別 HCP 模式，呈現廣泛蛋白質圖譜的存在，且呈現其與生產過程之合理適配性。然而，這點可能因為大量產品存在使得 HCP 偵測失準而受質疑。對此，則可以使用在「5. HCP 殘留之偵測、鑑定及測量備援技術」中討論之正交方法，利用空培養物與生產培養物中產生 HCP 之特定族群進行比較。

3.2.1.4. HCP 標準參考試劑

冷凍 HCP 通常可以長時間穩定保存，但應隨時監測 HCP 標準試劑之安定性，因為分析生命期可能很長，透過 HCP 免疫分析與正交方法監測 HCP 標準品之效能，以確認 HCP 標準品安定性。

可以建立分析範圍內之適當對照品以監測分析效能，對照品可由 HCP 標準品、產品檢品或中間物匯集或外加產品檢品之獨立稀釋液製備。然而，做為來自相同 HCP 標準物質所稀釋製備對照檢品可能與未稀釋 HCP 標準物質以相同速率降解，且此標準品之降解不會被偵測到。為了降低風險，通常針對每個分析之數個標準曲線參數（例如：訊號、背景、斜率及決定係數）進行數據評估，並用於支持 HCP 標準品之安定性。使用不同於對照標準品之材料來製備對照組將有助於確保降解速率是獨立的，且可以容易地偵測到 HCP 標準品降解。

可以建立分析對照圖表且用於記錄參考曲線參數、對照檢品值與關鍵試劑之特定批次資訊，例如標記之 HCP 抗體。應根據多次操作（通常為 20~30 次）之數據建立對照品允收範圍，且可作為常規分析之允收基準之一。此外，來自重複標準品與對照品之變異係數（%CV）值通常是分析允收基準一部分。當 HCP 標準曲線紀錄或 HCP 對照水平隨時間產生差異或分析變異性

增加時，則可能表示 HCP 標準品缺乏安定性。

3.2.2. 抗體製備與特性分析

3.2.2.1. 抗 HCP 抗體製備

抗 HCP 抗體常被長期用於許多分析（西方墨點法與免疫分析）

（例如：產品或平台預期壽命）。因此，材料需求不應被低估。

抗血清量建議取決於以下因素，包括預期用途、從既定體積抗

血清中純化後之預期可得量、微量滴定盤之塗佈量以及許多其

他考慮因素。用於產生抗 HCP 抗體之動物物種選擇取決於免疫

原、特定方法之需求及個別研究者的偏好。通常選用兔、綿羊

及山羊進行免疫接種。在某些情況下，已使用過數種動物物種。

在此情況下，使用演化關係較遠之動物（例如：雞）有助於針

對哺乳類動物共通之 HCP 蛋白產生抗 HCP 抗體。動物物種的

選擇也可能取決於想增加一或數隻動物（山羊或綿羊）可獲得

之抗血清量，或是一種策略應用，藉由使用來自單一物種之更

多動物個體以獲得較大的反應變異性（例如：兔子）。產生抗血

清庫（antiserum pool）之動物數量取決於所用物種與免疫步驟

持續時間。如果使用較小動物產生抗血清，通常需要較多動物

個體（例如：10~20 隻兔子）。相反地，如果使用較大動物（山

羊或綿羊），研究人員通常會按照步驟免疫 3~10 隻動物。一般

而言，典型免疫步驟使每隻兔子約可提供抗血清 100~150 mL 或每隻山羊約可提供抗血清 500 mL，且經蛋白質 A 或蛋白質 G 純化後之總抗體量為每隻兔子約 1 g 或每隻山羊 5 g。動物應在免疫前預先篩選已存在抗原料藥之抗體，如果呈現陽性結果，則應將該動物排除在免疫接種之外。

所製備之部分 HCP 抗原與適當佐劑（最常見是弗氏佐劑或混合不完全佐劑）混合後用於動物免疫。每隻動物都接受初始免疫，接著進行多次（通常 4~8 次）免疫補強，以促使免疫反應成熟並產生高效價、高親和力之抗體反應。於初始免疫（時間 0）之前與補強劑量後之適當間隔（通常 10~14 天），持續從每隻動物收集抗血清。每隻動物通常進行 4~6 次採血。然而，為了可以收集更多高效價抗血清，亦可透過增加補強免疫次數，進而延長免疫步驟持續時間。其他免疫策略也可能有幫助（例如：級聯免疫（cascade immunization）或將 HCP 免疫原進行大小分級）。

研究人員應在抗血清匯集之前對個別試驗血液進行效價或西方墨點分析以篩選與去除(1)具有低效價、(2)對一小群 HCPs 呈現優勢之免疫反應、或(3)具有非專一性結合特徵或抗產品反應性的血清。對最終抗體匯集物亦應進行評估以證明 HCPs 涵蓋範

圍廣以及不會結合治療產物。此外，有些實驗室發現可使用分子篩層析法評估抗體聚集體，如下述。酸析出條件可能導致一些抗體聚集，這種多聚體類型，特別是以生物素或HRP標記時，可能導致分析背景值增加。此外，有些實驗室納入一個最終製程規模級之分子篩層析步驟，以將聚集體含量降至低水平（例如： $<5\%$ ）。

多種從抗血清匯集物中純化抗體的方法已經成功地產生適用於HCP免疫分析之抗體。抗體純化通常透過蛋白A、蛋白G或HCP親和性管柱層析進行，某些情況下亦可利用塗覆磁珠。由產生抗體的動物物種決定選用蛋白A或蛋白G進行純化，製造商為這些常規抗體純化提供了標準步驟；當進行親和性純化抗HCP抗體時，應避免使用先前已用於其他產品之層析樹脂等材料，並應採用額外清潔循環以盡量減少殘留物污染，理想情況下，製造商應使用從未接觸過產品之樹脂。親和性純化步驟之前，有些實驗室還包括一個初始以50%硫酸銨沉澱粗抗血清之步驟使抗體集中與濃縮，從而延長親和性管柱的效能與使用壽命。使用蛋白A或蛋白G純化策略產生之試劑，其抗HCP專一性抗體只佔總抗體組成之較小比例；相反地，HCP親和純化策略可選擇性地自抗血清或富含抗體之製備物中純化抗HCP

專一性抗體。在這種情況下，HCP 抗原與活化樹脂進行偶聯製成親和性層析管柱，抗血清按照已建立之步驟或樹脂製造商之說明進行純化。純化抗體可藉由分子篩層析法進一步純化以去除聚集體，接著透析、濃縮及等分分裝，然後冷凍保存（通常-70°或更低溫）。純淨抗血清也應冷凍保存（有關血清檢品儲存與其他資訊，請參閱（通則 4069）免疫原性測定法—抗藥物抗體之免疫測定法的設計和確效）。

使用 HCP 固定之層析管柱進行專一性抗體之親和性純化，須仔細管理層析管柱製備與使用，確保該層析管柱之再生並用於下次純化。此外，如果重複使用，應適當評估與控制樹脂之保存與再生程序，以避免保存過程中發生降解。如能適當執行上述注意事項，親和性純化是一個可靠及具有再現性的過程，可產生一致的抗 HCP 抗體與 HCP 免疫分析。抗血清加載於層析管柱後，最佳化潤洗程序至關重要，因為此時製備液是一個含有不同親和力抗體之混合物，所以大量充分潤洗可以移除低親和力抗體；相似地，如果抗血清中抗體混合物辨識之抗原決定位非常接近，此時將大量抗 HCP 抗血清加載於層析管柱可置換低親和力抗體，最後得到高親和力抗體。上述任一情況都可以去除低親和力抗體。理論上，將較高親和力抗體析出也更具挑戰

性。無論最初選擇用於抗原專一性親和純化之加載與潤洗條件是哪一種，這些條件都必須維持以用於生產未來的抗體批次。

表 2 中顯示兩種純化策略之比較，兩種方法都常被使用。

表 2 抗體純化策略

純化類型	利	弊
蛋白質 A/G-親和性管柱層析	耐變且有再現性，可快速將 IgG 與其他血清蛋白分離。	HCP 特異性抗體之比例較低，並且可能含有大量之低親和性抗體。
HCP-親和性管柱層析	富含專一高親和性抗 HCP 抗體；排除非專一性抗體與血清蛋白。	需要更多技術與文件紀錄以一致地製備與維護樹脂。有些高親和性抗 HCP 抗體可能無法以可用形式析出，也可能無法回收。

3.2.2.2. HCP 抗體特性分析

製備用於捕捉與檢測之抗體會進行獨立評估並做為三明治型免疫分析配對一部分。未經修飾抗體之濃度最常以波長 280 nm 吸光度、AAA 或 BCA 等方法決定。每種方法都是可接受的，只

要可穩定地應用並且（如果是比色法）標準化後為相近的，決定每批次捕捉與檢測抗體之濃度是重要的，因為這些抗體將於最適化之免疫分析方法中稀釋至一定濃度。檢測與捕捉抗體之鑑別為其在免疫分析方法所表現之效能。標記與抗體結合的最佳比例也應根據經驗（主要基於能達到最佳的分析效能）評估。當未來製備新標記抗體時，應以最佳比例為目標。最後，儘管抗體於冷凍（例如：-70°）時通常非常穩定，但研究人員應確保儲存完整性並決定明確使用期限，此部分可透過進行連續監測趨勢圖或以指定時間間隔之再驗證實驗來實現。

配對抗體品質（捕捉與檢測）通常以兩種方式評估：

(1)顯示配對抗體對一個免疫分析方式之專一性與靈敏度，此時

HCP 係來自特定純化方案之單元操作中所取得一系列檢品，包括 DS。本主題在 4. HCP 免疫分析方法確效中有更詳細的討論。在概念上，由既定製程開發中產品所得一系列實際製程檢品證明偵測與測量 HCP（免疫反應性）的能力應包含下列資料：於產品純化過程中依序清除、檢品經系列稀釋後之線性及缺乏對產物或基質的交叉反應。純化過程中 HCP 減少係由清除因子決定，清除因子為過程中每個步驟之 HCP 含量（ng/mg）除以前一步驟中之量。通常，起始檢品為細胞培養

物時可具有數十萬至數百萬的 HCP 含量 (ng/ mg)，並且最終產品為含有 $<1\sim 100$ ng/mg HCP (顯示多對數清除)。當觀察到這些趨勢時，表示該純化過程與分析係為有效率之運作，且免疫分析使用之抗體具有合適品質屬性。如果未觀察到這些趨勢，可能不一定是抗體問題，可能是純化過程效率不佳。

(2)顯示較大範圍之 HCP 於校正標準中被識別 (意即涵蓋足夠之 HCP 族群)。覆蓋度 (coverage) 係透過至少對捕捉抗體使用二維凝膠西方墨點法或通過抗 HCP 抗體層析管柱總 HCP 族群之免疫親和分流 (fractionation) 進行評估。此外，如果使用不同包覆 (coating) 與偵測抗體，建議測試偵測抗體之覆蓋度。以下將更全面地討論使用二維凝膠法或免疫親和分流法之好處與限制。無論使用哪種方法，在驗證免疫化學試劑時都必須處理覆蓋範圍的問題。

HCP 覆蓋度評估有助於評估抗體識別校正標準中之 HCP 以及製程與原料藥檢品中存在 HCP 之能力。兩種方法 (二維凝膠接著進行西方墨點分析與免疫親和純化接著進行二維凝膠分析) 使用都相當普遍，且都有其限制—在免疫分析方法中低估真正結合之抗原；但對於將兩種製備 (或平台對商業試劑) 進行逐項比對 (head-to-head) 有其價值。上述兩種操作均使用還原性

二維凝膠電泳分離 HCP 標準品或早期製程檢品中 HCP 族群(例如：收集物 (harvest))。即使在同一實驗室使用相同試劑，由於許多方法變數與需要技術使結果有再現性，故應謹慎使用數字化之覆蓋度比較。由於這種可變性，結果最好以定性方式加以評估。抗體批次（或來源）比較應盡可能並排進行以確定抗體批次品質是否為相當或者優於另一抗體批次。SDS-PAGE/西方墨點法即為一種必要比較方法，以免疫染色膜上存在之墨點數量對比總蛋白質染色複製凝膠（或膜）上存在之蛋白質數量（例如：透過螢光染劑或銀，可參考（通則 4068）免疫試驗方法-免疫墨點分析）。每種抗體製劑之差異染色可以強化分析，因為此法可用於分析同一片二維凝膠。第二種方法，免疫親和性結合/SDS-PAGE，涉及對流過液與析出液（flow through and eluate）與裝載量進行比較，其為來自 HCP 校正標準品（或早期製程檢品）通過已經與捕捉抗體共價結合之樹脂。樹脂於裝載後析出前先進行潤洗以除去非專一性結合之 HCP。為了進行檢品比較，差異性凝膠電泳（DIGE）技術可能有所幫助。表 3 列出上述兩種覆蓋方法之優缺點。

表 3 覆蓋度分法比較

	利	弊

二維 SDS-PAGE/ 西方墨點法	分離完好之個別 HCP 允許單點計數。	HCP 抗原已變性，可能無法代表免疫學分析（例如：ELISA）結果。
		高可變性—以相同材料在單一實驗室與不同實驗室間測試，其所得到的數字化的“覆蓋率”差異很大。
		各種 HCP 轉漬效率難以最適化，由於分子量不同，對已經穿過膜之過度轉漬或無法從凝膠轉漬出來，都會導致低估。
		膜與凝膠間之墨點適配困難且未標準化。
免疫親和性結合	類似於三明治免疫分析，HCP 以其原始狀態	可能無法呈現某些結合得太緊以致無法析出的

或二維 SDS-PAGE	與溶液中之抗體樹脂結合。	HCP，導致覆蓋率低估。
	凝膠中墨點分析不需要免疫墨點，且因為無轉漬問題而變得更簡單。	抗 HCP 樹脂製備必須仔細進行，可能難有再現性。結果取決於樹脂裝載量與析出條件。
		將不會偵測到僅在西方墨點法中呈現之低濃度蛋白質。

有關 SDS-PAGE/西方墨點法正確使用以及降低上述缺點之方法資訊，請參見 5.2 西方墨點法注意事項部分。圖 3 顯示適當使用此方法範例。

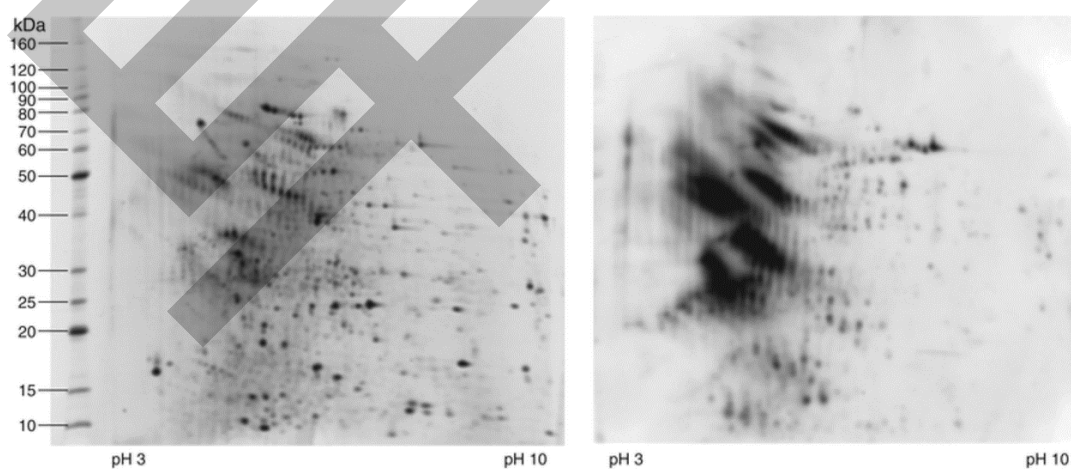


圖 3. 左圖：代表 CHO HCP 校正標準品之 2D IEF/SDS-PAGE 分析，

以高靈敏度螢光染料染色。右圖：與左圖所示相同凝膠之西方墨點法分析。

3.2.3. 替代試劑產生與驗證

當 HCP 試劑供應被耗盡或其性能下降時，可能就需要新試劑。

通常新 HCP 抗原與新 HCP 抗體為同時產生；理論上，新試劑組應該遵循與前一組試劑相同步驟，使新舊分析試劑之效能盡可能接近，並為既定程序產生具一致性的數據。然而，實際上並不總是可能（也不建議）以原先製造方式完全相同地去生產分析試劑。例如，如果製造過程隨著時間推移已經最適化，原本的平台分析試劑不再相關，則此時應進行仔細評估。當需要進行此類變更時，確認替代試劑品質的理想方式為進行抗體特性分析（見下文），使用從收集物（harvest）到原料藥（DS）的相同檢品，與原始分析試劑進行並排分析，證明其可以偵測相似或更高之 HCP 對數減少（log reduction），與。

當目前製程與舊製程基本相同而欲替換 HCP 抗原時，新 HCP 抗原製備應盡可能與舊版相似。新舊 HCP 抗原蛋白質濃度的並列比較非常重要，使用相同方法以正確訂出新抗原蛋白質濃度，確保新舊 HCP 校正標準中之蛋白質濃度具有可比性。應進行新舊 HCP 抗原（見上文）之一維與二維 SDS-PAGE 特性分析之

並列比較，以確保蛋白質組成無巨觀變化。

抗體替換應盡可能使用相同動物物種；如果希望有更好抗體反應，可以評估由不同物種所產生之抗體。物種選擇應考慮本章討論之所有要點，應包括以新舊抗體對製程檢品進行三明治形式免疫分析之並列比較結果，以證明替代抗體適用性。如上所述，建議利用正交方法進行額外特性分析，例如：使用一維與二維 SDS-PAGE 進行覆蓋率比較。更換試劑後，應考慮驗證與確效分析方法。

為了充分了解替換 HCP 關鍵試劑對分析結果的影響，在銜接性研究中需要進行製程檢品的測試，包括使用來自收集液(harvest)多個檢品、來自適當純化步驟製程中間物及最終原料藥。這些研究可能非常耗費資源，這強調了從一開始就製備足夠數量 HCP 關鍵試劑重要性（並減少替代）。

3.3. 免疫分析法開發與確認適用

如引言中所述，HCP 免疫分析在生物製藥製程開發與控制提供兩個重要功能。HCP 免疫分析用於測量產品純度，因此可能與患者安全性相關；也可用以衡量製程一致性，因此可反映製程控制。為了符合這些要求，HCP 分析通常被確效並併入 cGMP 控制系統，其中包括特定拒收標準（對原料藥而言為檢驗成績書（C

of A) 方法或做為製程中管制)。如果最終原料藥是複合蛋白質 (conjugated protein)，則應在蛋白質中間物階段 (結合前) 進行檢測。此外，HCP 分析被用為製程開發指引，且通常於正式製程確效活動中被用以證明製程性能的耐變性。

HCP 免疫分析通常被制式化為三明治 ELISA，並且可有多種抗體標記選項，參見 (通則 7020)。根據所選擇之標記，選擇合適複合物 (conjugates) 與受質。大多數蛋白質由於含有離胺酸而可以被生物素化，且由於生物素很小，不太可能影響蛋白質結合活性。由於抗體很大且具有許多離胺酸殘基，因此生物素與抗體複合比例高於較小的蛋白質。然而，切勿對抗體進行過度標記或標記不足 (例如：用生物素或 HRP 標記)，因為如此將分別導致較少抗原結合或較低訊號/靈敏度。控制與定義標記之化學計量 (例如：生物素對 IgG 之莫耳數比) 對穩定地製造未來批次很有用。任何抗體標記之多種比例都應被測試並針對免疫分析性能進行最適化。過量未複合試劑應藉由透析、親和性純化或使用合適之去鹽管柱予以移除。

通常，標準品會先被篩選以確知是否可以產生劑量-反應曲線；如果可以，則訂下分析物濃度範圍。此結果亦呈現初始試劑濃度起點可供進行最適化。如果已有多個抗體配對製備，則每個抗體

配對皆應受測試以找到最佳性能。每一個候選抗體所產生之訊號（低濃度校正標準品）與雜訊（背景）比值可用於選擇最佳抗體配對。通常，HCP 免疫分析並不總是具有兩個漸近線之完整劑量-反應曲線；因此，為了檢測殘留 HCP，原料藥放行分析應聚焦於曲線低端。

3.3.1. 使用平台 HCP 分析驗證新製程

如前所述，如果上游/分離步驟是相配的，則此系統生產之新產品可以從平台分析方法中受益，亦即此方法可減少驗證所需時間與精力。然而，如果在生產培養最適化時發生變異並且細胞培養設計空間未能完全定義的情況下，應該去了解這些變異是否足以造成平台分析不再適用。在這些情況下，平台分析應經由實驗驗證以證明其適用於測量來自新製程之 HCPs；分析準確度、精密度、靈敏度、線性、範圍及專一性都必須被評估（參見 4. HCP 免疫分析方法確效）。此外，平台 HCP 標準中 HCP 範圍應與新製程中 HCP 範圍進行比較；應使用來自新製程或產品之檢品以先前討論之方法進行抗體鑑別。

以下方法與概念可用於決定平台分析是否適用於來自新製程之產品：

(1)使用新培養製程條件，進行具代表性之小規模無表達細胞生

產，並決定無表達細胞生產細胞培養液之蛋白質濃度。以分析 HCP 標準品所用之相同標誌濃度，用 HCP 三明治免疫分析分析無表達細胞生產之細胞培養液，並比較無表達細胞生產之細胞培養液與分析中使用之標準品的稀釋曲線。如兩者的曲線相似（例如：形狀與幅度相似，並且計算所得 HCP 濃度在兩倍以內），則新製程被認為與平台無差別，且通常不需要特定製程的 HCP 分析。

(2)以二維凝膠電泳比較來自上述新製程的無表達細胞生產之細胞培養液與 HCP 校正標準品，這將比較兩種製程產生之蛋白質多樣性；惟應注意二維凝膠中可能出現新“點”，這些點可能無法反映分析中之免疫化學差異，例如，轉譯後修飾或有限之蛋白水解。因此，在特定製程特異之無表達細胞生產中如出現一些新斑點、強度上升或下降的斑點並非此平台分析適用性的判斷基準，建議進行定性評估（例如：與 Western 墨點相比）。

(3)比較在實際生產所收穫細胞培養液檢品中之 HCP 含量與原始製程對照“新”製程中生產相同產品也是有價值的。一般而言，免疫分析結果落在兩倍內通常被認為是相似的，從而確認了平台 HCP 試劑。

(4)來自生產培養物之細胞培養液中 HCP 亦可以根據總蛋白質量測進行估計，細胞培養液中總蛋白質為產品（使用產品特定效價分析法測量）與 HCP 總和。來自製程之細胞培養收集液檢品只要先被充分濃縮到膜損失可忽略不計之程度，即可進行透析以去除小肽與胺基酸，然後測定總蛋白質（例如：胺基酸分析）。從總蛋白質中減去產品濃度便可提供非產品蛋白質（也就是 HCP）的估計值，單位為 mg/mL。此數值可與來自免疫分析之 HCP 濃度相比較。數值相當（例如：在 2 倍內）則表示 HCP 平台被確認可用於新製程。

3.3.2. 製程變更後之新試劑需求

主要變化例如細胞培養條件之實質與明確變化（例如：從含血清製程轉變為無血清生產製程），通常需要生產新試劑以及開發與確效新 HCP 分析。此例中，使用舊製程所產生之 HCP 試劑可辨識許多血清蛋白，但可能無法辨識在無血清製程中的許多新 HCP 蛋白。由於製程變更與分析變更，當相同檢品以新、舊分析測量 HCP 時，將觀察到不同 HCP 含量（意即來自含血清製程之檢品以舊分析測量可能具有高 HCP 含量、以新分析測量只測得低 HCP 水平；而來自無血清製程的檢品以舊分析測量可能得到較低的 HCP 結果，但以新分析測量則為較多 HCP）。

如果將此分析法開發為下游製程特定之分析，則純化步驟變更可能也需要以與新下游製程相關之新分析取代，這是這類非常專業分析的最大問題，也說明為何以平台分析（platform-based assay）為基礎通常是首選，因為當下游步驟變更時，通常不需要新分析。

3.3.3. 檢品安定性

證明檢品處理程序不會影響分析結果很重要，尤其是在各種中間製程匯集物之分析結果比較。有時，在進入冷凍或當檢品酸鹼值從酸性調整至中性時，HCP 會沉澱；此外，在 2~8°下儲存或多次凍融可能導致反應性喪失。分析人員可能需要於檢品中添加特定穩定成分（例如：二價陽離子）以確保其安定性。

4. HCP 免疫分析方法確效

HCP 免疫分析用於產品純度評估通常是 cGMP 控制系統一部分——無論是做為製程中檢測或做為檢驗成績書中的檢測——且需要適當地進行確效。方法確效部分取決於檢品類型：當使用於最終原料藥時，則用以定量不純物的方法應確效所有參數；而對於製程中檢品，確效重點通常為稀釋線性、干擾及精密度。無論分析是製程中或是放行分析（原料藥），行動界限（action limits）做為整體控制策略一部分有其價值。讀者可參考 ICH Q2（R1）指引與（通

則 3068) 分析方法確效指引，以了解一般預期的分析確效，特別是 cGMP 分析確效要求，以及 (通則 7020) 免疫試驗方法-酵素結合免疫分析法。雖然本節主要重點是 cGMP 分析確效，但許多相同原則亦適用於某些用於證明製程純化步驟適合其預期目的之分析。

本節將重點介紹 HCP 免疫分析中獨特或需要特別關注與記錄的部分。HCP 免疫分析與傳統免疫分析不同處在於其為多分析物之分析。免疫原與標準品中可能存在數千種蛋白質，因此產生相應之多樣抗體組，但僅上游細胞培養液會包含接近 HCP 校正標準之多種蛋白質。存在於標準品中的 HCP 蛋白在中間匯集物與最終產品含量通常會逐漸減少，如前所述，這是 HCP 免疫分析法影響準確度的一個面向，以及為何質量單位比 (每 mg DS 所含 ng HCP) 不是字面上的“質量”關係。然而，以下是業界盡可能解決這些限制常用之方法。下述確效摘要針對最終原料藥 (DS) 或倒數第二個製程步驟，無論選擇哪個做為檢驗成績書中的方法。應注意對於製程中檢測，其重點為方法準確度 (加標回收率)、稀釋線性及精密度。就準確度來說，某些檢品可能含有更多潛在干擾物質 (其他製程不純物或添加劑)，而可能需要被釐清為非干擾 (例如：殘留 DNA、浸出蛋白 A、病毒滅活劑、離散劑 (chaotropes) 及低酸

鹼值緩衝液)。

4.1. 準確度

為了評估原料藥中 HCP 分析準確度，至少應將分析標準品添加到合適檢品中，並證明在分析範圍內有準確之加標回收率 (spike recovery)。基質干擾可能來自緩衝液組成與產品，必須確定每種檢品類型可接受之加標回收率（通常介於 70~130%之間）所需之最小稀釋度，通常會使用至少三個且可能多達五個不同量之加標以進行加標回收實驗。由於以多種稀釋度之檢品進行分析，研究者可以先加標然後稀釋檢品；或先稀釋檢品然後以稀釋檢品加標。接近定量極限 (QL) 之加標有助於評估此分析落於定量極限附近時之準確度與可重複性，定量極限通常是測量值呈現最多變異之處，對於定量極限或接近定量極限之加標，其回收率落於 50~200%是可接受的。

雖然這些是分析確效最低要求，但不應被解釋為證明可能與產品共純化之任何一種特定 HCP 之準確度。為達成此目標，需要與特定 HCP 種類之標準品進行比較；但由於對這種 HCP 所知無多，因此很難達到。下文在稀釋線性一節與 5. HCP 殘留之偵測、鑑定及測量之備援技術中提供了識別這些情況的提示。

4.2. 靈敏度與分析範圍 HCP

三明治免疫分析之標準曲線通常達到低個位數 ng/mL 之靈敏度。

對於檢品蛋白質濃度，其測試稀釋度為 10 mg/mL，意味著可能達到每 mg 產品約可測得 1ng HCP 之靈敏度。然而這種靈敏度對蛋白質濃度較低之產品可能難以達成，重要是要強調 HCP 比例（相對於每 mg 產品之殘餘 HCP ng）實際上並非單位 ng/mg 所指示之質量比，而是每 mg 產品的“免疫學等價物”（immunological equivalents）。

決定定量極限（QL）第一部分通常是通過實驗對每種產品以既定檢品緩衝液基質進行加標回收研究。原料藥之最小建議稀釋度（MRD）應透過加入 HCP 標準品於連續稀釋檢品而建立。例如，於一系列溶液-包含未稀釋（例如：10 mg/mL）蛋白質與連續稀釋之原料藥-加入 10 ng/mL HCP，其中加標回收率落於 70~130%（50~150% 亦常用於接近定量極限之加標）之稀釋溶液被認為是可接受的。通常，所提出之原料藥最小建議稀釋度會被進一步測試以確保穩定地達成加標回收率。

決定定量極限的第二部分，原料藥以最小建議稀釋度進行測試（如果原料藥檢品具有高含量可檢出之 HCP，則可以使用配方緩衝液）。通常經由分析所外加之 HCP 濃度，以具有可接受之準確度與精密度的 HCP 最低值為定量極限。此研究通常至少進行

三次，最好由不同分析人員或在不同日進行。例如，以 3 ng/mL HCP 加入蛋白質濃度為 5 mg/mL 之產品具有定量極限為 0.6 ng/mg 或 3 ng/mL，如果可達成加標回收率為：例如，六次測試中的至少四次或者符合平均加標回收標準。

通常，分析被設定測量從數個 ng/mL 到大於 100,000 ng/mL 的範圍。此範圍容許分析人員以多種稀釋度測試各種檢品（參見於 4.3. 檢品線性度章節），並可用以檢測 HCP 含量差異甚大的製程中匯集物。例如，上游檢品可能含有大於 100,000 ng/mL HCP，需要大量稀釋才能獲得標準曲線範圍內之結果。

對於常規商業原料藥製造，其蛋白質產品濃度為已知且充分掌握製程不純物，則放行測試可使用單一稀釋度。呈報結果為量測所得 HCP (ng/mL) 與產品濃度 (mg/mL) 比例，所得單位為 ng/mg。

當原料藥所含 HCP 為無法偵測的量時，結果報告為“小於”本分析定量極限 (ng/mL) 除以產品濃度 (mg/mL；如上例所述之 <0.6 ng/mg)。於設定用於檢測之目標濃度前，應充分了解檢品稀釋線性並建立穩定生產製程。如果 HCP 含量或種類有批次間的差異，則可能需要在多個稀釋度下測試每個檢品（見下文）。

4.3. 檢品線性

非線性 HCP 分析在某些檢品並不罕見，應針對既定檢品類型之

多重批次（例如：來自若干臨床原料藥批次或製程確效批次）進行評估，以確保結果一致性與正確報告。由於單一 HCP（或少數個別 HCP）可能與產物一起被純化，故可能存在特定 HCP 含量超過 HCP 免疫分析中之可用抗體。此種情形可能發生於多待測物分析中，當微量分析盤或微粒上僅有有限的表面積可用時，且由於需要數千種不同抗 HCP 抗體，因此針對任何一種 HCP 的抗體都將會受限。此外，對每種單獨 HCP，其抗體相對量無法控制，因此每種單獨 HCP 的結合量也不同。如檢品為上述情況，分析人員必須將檢品稀釋到分析範圍直至不再觀察到非線性，因此時 HCP 已被稀釋到不再超過可用抗體之濃度。在某些情況下，分析靈敏度變得很有限，並且無法達到分析結果與檢品稀釋度無關之稀釋點，此時報告應呈現已確效之分析範圍內最高 HCP 比例值（已對檢品稀釋度校正）。以下詳述如何處理因抗體不足造成非線性稀釋之實例。

表 4 與圖 4 顯示三種不同檢品透過範圍為 1~100 ng/mL 之 ELISA 的檢測數據。於此例中，所有檢品最初均被稀釋至 10 mg/mL（MRD，其加標回收已預先確認），然後以兩倍序列稀釋連續稀釋至低於 1 ng/mL 之分析定量極限。檢品 1（菱形）在整個測試範圍內呈線性稀釋，檢品 2（正方形）與檢品 3（三角形）

HCP 在較高濃度之檢品則呈現平線 (plateau)。抗體飽和反映了抗原過量，將檢品稀釋到線性稀釋範圍內以決定 HCP 值；目測估計檢品 2 為小於 2 mg/mL，檢品 3 則為小於 1 mg/mL。(注意：如果需要大量稀釋檢品以進入 HCP 分析範圍，可考慮進行中間稀釋以限制稀釋相關之失誤。)

表 4 用於繪製圖 4^a原始數據

產品	檢品 1			檢品 2			檢品 3		
濃度 (ng/mL)	HCP 濃度 (ng/mL)	HCP 比 (ng/mg)	% 最大 比值	HCP 濃度 (ng/mL)	HCP 比 (ng/mg)	% 最大 比值	HCP 濃度 (ng/mL)	HCP 比 (ng/mg)	% 最大 比值
10.00 (淨量)	49 (淨量)	4.90	83%	20 (淨量)	2.00	<20%	3.2 (淨量)	0.32	22%
5.00	28.5	5.70	96%	16.5	3.30	54%	2.5	0.50	35%
2.50	12	4.80	81%	10	4.00	66%	1.5	0.60	42%
1.25	7.4	5.92	100%	7.4	5.92	97%	1.1	0.88	61%
0.625	3.1	4.96	84%	3.3	5.28	87%	0.9	1.44	100%
0.3125	1.6	5.12	86%	1.9	6.08	100%	<1	<6	NA
0.15625	<1	<6	NA	<1	<6	NA	<1	<6	NA
HCP	Guide 1 = 5.2			Guide 1 = 5.8			Guide 1 = 1.2		

比 值、 guid e 及 檢品 數	(n=6) Guide 2 = 5.2 (n=6)	(n=3) Guide 2 = 5.3 (n=4)	(n=2) Guide 2 = 1.4 (n=1)
^a 三個檢品之數值（如圖 4 所示）顯示於較高濃度之產品（與 HCP 不純物）各有其不同的反應飽和度。關於如何解釋這些數據的指引 1 與指引 2 說明如何將分析的“線性範圍”限制在表 4 與圖 4 中所示最稀釋的數據點上。注意-檢品應稀釋至 HCP 濃度低於分析之定量極限（此例之定量極限為 1 ng/mL）。指引 1：對最大值的 20% 以內之所有數值求平均值。指引 2：將所有 CV 值小於 20% 之數值取其平均值，先去除較低稀釋之檢品。也可以使用 Guide 3，報告在定量極限之上測得的最高值，但是該方法適用性應經由方法確效得到良好之證明。			

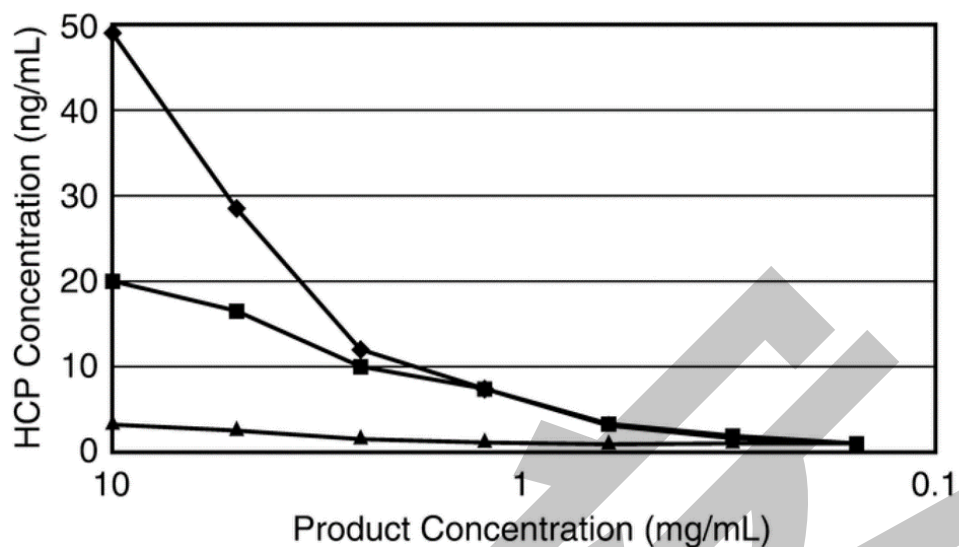


圖 4 表 4 中所列三個檢品進行兩倍序列稀釋後，將 HCP 濃度對檢品中之產品濃度做圖，以衡量檢品稀釋度。

由於相較遠離分析極限之測量值，在定量極限度近之測量值具有較高變異性與較低再現性，因此通常（如果可能）以落於檢品線性 HCP 濃度反應範圍內之數值取平均值。應於進行分析前指定用以取平均值的數據點，且通常被記載成為檢測程序的一部分。

在表 4 呈現的範例中，顯示兩個不同指引。指引 1 將落於最大 HCP 比例值 20~25%範圍內之所有數值平均；指引 2 僅對得到平均值 CV 小於 20~25%之數值求平均值。儘管這些數據組不相同，但基於 20~25%變異落在重複分析的變化內且反映免疫分析方法潛在再現性之論點，兩個規則皆合理。此例中兩種方法所得之結果非常相似；相反地，第三個可能指引報告高於定量極限之測量最高值，將產生至少高出 10%之結果。此外，第三個指

引之有效性高度依賴方法開發的品質。

均質（一步培養反應，試劑添加之間沒有潤洗步驟）三明治免疫分析更容易發生抗原過量並導致稀釋非線性問題，且可能呈現“高劑量鉤狀效應”，也就是其中具有大量抗原檢品卻因為抗原過量阻礙形成完整之三明治組合而得到不準確之低數值。這種分析形式應經由對每種檢品類型進行實驗以確認其適用性，如果檢品稀釋至分析定量極限仍未出現鉤狀效應則可接受。

從以往的經驗來看，有些製造商已使用於準確度確效中產生之加標回收數據來證明線性，儘管這個方法證明標準品之線性稀釋，卻無法證明檢品中 HCP 之線性稀釋。前段討論有關抗原過量之故，標準品線性稀釋是必要條件，但不足以證明不同檢品類型之分析線性。

最後，儘管抗體不足通常被認為是缺乏稀釋線性主因，但其他可能原因還包括：(1)抗體與產品蛋白之反應性；(2)非專一性抗體（如“粘著性”抗體）之存在；(3)抗體對檢品中存在之非 HCP 蛋白（如蛋白腴或 BSA）之反應性；(4)HCP 聚集；(5)HCP 標準品稀釋組成對製程中或終產品 HCP 不具代表性；(6)檢品基質干擾。

交叉反應性與基質干擾於以下討論。

4.4. 專一性

檢品中潛在基質干擾之評估在「4.1. 準確度」中討論，主要用於確定沒有配方干擾(在原料藥中)與普遍存在之其他不純物(對於上游製程檢品)。要評估另一個專一性問題是抗 HCP 抗體與產品本身潛在交叉反應性。儘管有此可能性，但很少觀察到與產品表位交叉反應之 HCP 抗體。

在觀察到交叉反應性例子中，更多偽陽性分析訊號是必須管理之風險；如果有懷疑，就應該仔細且科學地確定交叉反應是否存在。在絕大多數情況下，HCP 免疫分析訊號為真，表示存在 HCP 不純物；當 HCP 與產物非共價結合加上共純化時，就可能產生交叉反應性現象。然而，由於抗 HCP 匯集物之多株抗體種類繁多，於過量產品存在情況下測量殘留 HCP 時，某些抗體仍然可能與產物結合，而產生偽陽性訊號。在這種情況下，可能需要修改分析方法或抗 HCP 試劑。如果使用平台 HCP 分析對多個批次（以相同程序）進行測試，並且觀察到批次間具有不同 HCP 含量，此即 HCP 陽性訊號為真實且非來自交叉反應性的有力證據。

交叉反應性證據經常出現在已經過一系列步驟純化產品，其中 HCP 數值未因為經過典型純化製程而降低；此時應使用 HCP/產品比例(ng/mg)，以便比較純化製程中 HCP/產品比例之變化。

首先，通常會使用抗 HCP 抗體透過西方墨點法探測原料藥以確

定是否 HCP 與產品有非共價結合；如果偵測到與產物無關之區帶，則表示沒有發生交叉反應，如果欲達到低含量 HCP 之目標，則可能需要進一步製程開發。

或者，如果抗 HCP 抗體辨別出一個產品相關區帶，則表示交叉反應性。然而，應注意的是，由於產品處於變性狀態（經過 SDS-PAGE 之程序），此種結合可能發生於天然溶液相（意即免疫分析）時不可能觸及之表位。於此情況下，陽性西方墨點可能是一假象（相反地，陰性西方墨點也可能是遺漏之交叉反應，但這比較不可能發生）。無論如何，如果懷疑有交叉反應性，可通過以下方式進行確認與校正：(1)加入高純度產品（或相關結構，例如對單株抗體可加入不同來源之人類 IgG 以阻斷分析中的交叉反應抗體；或(2)使用由高度純化產品製備之產品親和性管柱去除試劑中抗 HCP。在任一情況下，須確保這些抗原在用於阻斷或去除血清時，其本身不含殘留 HCP。此資訊可透過使用抗 HCP 探測的西方墨點獲得。如果存在 HCP 區帶，則表明可能需要更高純度之產品且可以通過正交的、實驗室規模純化製備而得。有時逆相高效液態層析可有效地製備這類材料，儘管由於其變性特質而在產品生產時無法使用。

5. HCP 殘留之偵測、鑑定及測量備援技術

生物製藥製造商需要一個整合控制系統，以確保整體產品純度與製程一致性。通常經由使用組合方法來證明產品純度，HCP 情況更是如此。除了最常見三明治免疫分析形式外，其他分析類型亦提供了有價值的補充資訊。表 5、6 及 7 提供了常用於 HCP 偵測、定量及鑑別方法之概述。表 5 討論電泳法；表 6 討論了西方墨點法；表 7 討論了層析與蛋白質體學法。凝膠電泳與免疫墨點也在「3.2.2.2. HCP 抗體特性分析」中討論。

用於對純度與無 HCP 提供額外保證之正交分析方法可以於以下三種模式中任何一種使用：偵測、鑑定或定量。用於偵測時，正交分析回答此問題「免疫分析是否可能遺漏產品形式以外之其他蛋白質？」；於此情況下，隨著有關 HCP 辨識性之知識積累，進行特定蛋白質風險評估變得可行，並在必要時為該特定 HCP 不純物產生標準品與獨立檢測。藉由將產品檢品與適當 HCP 標準品（對已知 HCP）比對，該正交方法可以使用於「定量」模式。例如，根據監測來自分析級標準蛋白質與檢品之分解物中離子化肽來開發定量高效液態層析-質譜/質譜方法。

5.1. 電泳方法考慮因素

可用於不純物分析之三種電泳方法為一維、二維 SDS-PAGE 及使用非凝膠篩之 SDS-毛細管電泳（CE-SDS）。這些方法皆以過

量檢品加載來確保可偵測微量蛋白質不純物；缺點是過量產品會遮蔽移動到產品附近之不純物並造成干擾。然而，一維凝膠或 CE-SDS 可能已成為 GMP 控制系統一部分，被用於監測與產品相關之片段；因此，擴展這些方法用於 HCP 監測不涉及額外之測試。二維凝膠已經被用來研究最終產品純度與鑑定凝膠中與產品變異或 HCP 不純物相關之微量蛋白點。凝膠中新區帶之存在，或在 CE-SDS 電泳圖中之新波峰，可能代表新產品相關物質/不純物或反映 HCP 不純物之存在（與製程相關）。在任何一種情況下，都需要進行調查。即使非常規控制系統的一部分，一維凝膠仍為擴展特性分析重要批次（如註冊批次）與製造調查之優選方法。凝膠與 CE-SDS 可用於確認無大量 HCP 存在（假如它們存在且未被免疫分析偵測到）。凝膠通常以高靈敏度染色劑染色，例如螢光或銀；理想情況下，染色劑應與凝膠內蛋白水解及之後的蛋白質質譜分析程序相容。

蛋白質以銀或螢光染料染色的強度不同，因此只可能以半定量估計帶或點中的蛋白質量（例如：糖基化形式可能無法強烈地染色）。儘管如此，由於這些方法不依賴抗 HCP 抗體，因此提供了純度之重要正交測量。

某些蛋白質可能在凝膠中呈現轉譯後修飾或蛋白水解剪切後之

多個區帶或斑點。就單一基因產物在凝膠中多個位置的分佈程度，進一步降低凝膠偵測不純物之靈敏度。

如下表 7 所討論蛋白質體學方法，通常可以從凝膠中切出區帶或斑點，然後將這些切下之凝膠片段與蛋白酶一起作用，以原位方式將蛋白質消化成肽；接著使用液向層析質譜/質譜儀對這些肽進行分流與定序，並與數據庫比較以鑑定肽來源為產品相關或為 HCP。

表 5 用於 HCP 檢測分析與特性分析之電泳方法

方法	用法	優點	缺點	HCP 近似靈敏度與定量能力
一維凝膠，還原或未還原，銀染或高靈敏度螢光染料染色。	篩選大量檢品之一致性與非產品蛋白區帶之存在。可做為 GMP 控制系統一部分。	高解析度分離；提供大約分子量資訊；操作相對簡單。檢品並排分析可為製程一致性提供有	大量過量之產品蛋白可能會遮蔽 HCP 區帶。不同蛋白質之染色強度亦有差異，因此僅為半	100 ng/mg。 除非與已知 HCP 分析標準品一起使用，否則僅為半定量。

		力之比較。	定量。凝膠槽總蛋白載量有限。	
大型二維凝膠（例如：20 x 25 公分），銀染或高靈敏度螢光染料染色。	篩選少量檢品之一致性與未知蛋白斑點之存在。不適合在批次放行中常規使用，但可以用於特定批次或 HCP 標準品之。	對於將微量 HCP 不純物從產品中分離具高解析度。提供有關蛋白質斑點之大約分子量與等電點資訊。	大量過量之產品蛋白可能會遮蔽 HCP 斑點。不同蛋白質之染色強度亦有差異，因此僅為半定量。高度依賴技術導致需要熟練之技術人員與精密設備。	100 ng/mg 總蛋白載量。除非與已知 HCP 分析標準品一起使用，否則僅為半定量。
具有雷射誘導螢光	篩選大量檢品之一致性	快速、高解析度，用於	靈敏度可能不如使用高	1000 ng/mg（佔總蛋白

(LIF)偵測 功能之 CE-SDS。螢 光標記檢品 可為還原或 非還原檢品	與未知蛋白 質波峰之存 在。可做為 GMP 控制 系統一部 分。	分離螢光標 記之蛋白 質。	靈敏度染料 之一維凝 膠。螢光標 記不具 HCP 蛋白專一 性，因此無 法區別 HCP 與產品相關 肽。難以擴 展到其他測 量，例如西 方墨點法或 蛋白質波峰 鑑定。	載量 0.1%)。除非 與已知 HCP 分析標準品 一起使用， 否則僅為半 定量。
---	---	---------------------	--	---

5.2. 西方墨點法考慮事項

西方墨點技術與三明治免疫分析可互補用於證明產品純度與鑑別免疫分析中使用之免疫化學試劑（參見 3.2.2.2. HCP 抗體特性分析）。當抗 HCP 抗體做為探針時，可被使用於：(1)偵測與產物非共價結合且（可能）在免疫分析中未被偵測到之 HCP，

或(2)監測個別 HCP。在其他情況下，由於蛋白質變性後失去結構表位，在免疫分析中反應良好之蛋白質在西方墨點法中可能偵測不到。免疫墨點法僅需要一種針對指定蛋白質之抗體，而三明治免疫分析需要兩種。先前的實驗顯示與指定之 HCP 有高親和力之抗體比在凝膠中以銀或螢光染料染色有更好靈敏度。

最終產品之一維西方墨點法提供了可用於證明產品純度之一個簡單可靠的正交方法。儘管可以在免疫分析法與西方墨點法中使用相同抗體，但由於上述原因，墨點法可以提供關於微量蛋白質（及遺漏之其他蛋白質）之額外資訊，因此成為其正交法本質。

表 6 列出用於這些目的之一維與二維西方墨點法之優點與缺點。

以下是最適化 SDS-PAGE/西方墨點法之主要考慮因素：

(1)二維凝膠形式與尺寸：較大形式（18 cm 長度或更長）有更好之蛋白質解析度，並且具有各種等電聚焦（IEF）應用模式與分子量維度（例如：梯度）。各種形式之總蛋白質染色可被研究以最適化兩個維度之分離，從而找到分離大多數（或最大數量）HCP 之平衡點。

(2)應最適化二維凝膠上總蛋白質載量，以取得所需靈敏度（較高載量）與所需解析度（較低載量）之平衡。蛋白質載量、檢

品離子含量及分離速度都需要平衡以避免過熱並最適化解析度。使用之染料或受質會影響選擇；通常免疫墨點法（例如：200 μg ）可加載之蛋白質較總蛋白質染色凝膠或墨點（例如：50 μg 用於銀染）為多。載量差異可能會以某種程度干擾分離，因此需以實驗尋求適當平衡。

(3)總蛋白（凝膠或墨點）與西方墨點法之訊號研發需要相當的實驗（例如：染料類型、曝露時間及緩衝液條件）以進行最適化。例如，由於應偵測盡可能更多之蛋白質區帶，有時訊號被放大到含量最多之蛋白質會遮蔽其他蛋白質區帶，或是背景增加到失去對比度。相關問題是密度計或成像儀之標準化與校正，這些儀器必須進行精細調整以在實驗確定條件下達成一致性。試劑與儀器最佳化都需要相當時間以建立可再現之訊號最大化與背景最小化之最適化條件（另見通則 4068）。

(4)轉漬與阻斷劑需要進行實驗以確定最佳條件（例如：緩衝液、儀器功率/時間、溫度及阻斷劑）。

表 6 用於 HCP 測試分析與特性分析之西方墨點法

方法	用法	優點	缺點	HCP 大約靈敏度與量化能力
----	----	----	----	----------------

一維凝膠， 西方墨點法	篩選大量檢 品之一致性 與是否存在 與抗 HCP 抗體反應之 未知蛋白區 帶。可做為 GMP 控制 系統一部 分。	高解析度分 離；提供大 約分子量資 訊；操作相 對簡單。檢 品並排分析 可為製程一 致性提供有 力之比較。	需要高品質 之抗 HCP 抗體來源。 凝膠中大量 過量之產品 會導致產物 區帶非特異 性染色。 SDS 誘導之 蛋白質變性 導致構型表 位喪失。	除非使用特 定蛋白質標 準物，否則 無法定量偵 測 HCP。靈 敏度完全取 決於抗體品 質。
具有化學冷 光或類似高 靈敏度偵測 的大型二維 凝膠（例 如：20 x 25 cm）西方墨	篩選少量檢 品之一致性 與是否存在 與 HCP 抗 體反應之未 知蛋白斑 點。不適合	對於將微量 HCP 不純物 從產品中分 離具高解析 度。提供有 關蛋白質斑 點的大約分	需要高品質 之抗 HCP 抗體來源。 大量過量之 產品蛋白可 能會掩蓋 HCP 斑點。	除非使用特 定蛋白質標 準物，否則 無法定量偵 測 HCP。靈 敏度完全取 決於抗體品

點法	常規使用， 但可用於特 定批次產品 或抗體試劑 之特性分 析。	子量與等電 點資訊。	蛋白質經 SDS 變性導 致結構表位 喪失。高度 依賴技術導 致需要熟練 之技術人員 與複雜設 備。	質，但 100 ng/mg 是可 能的。
----	--	---------------	--	----------------------------

5.3 層析與蛋白質體學方法考慮因素

用於偵測、鑑定及定量各個 HCP 之質譜技術正快速發展，並運用蛋白質體開發之許多技術。此外，隨著新基因體數據庫的可取得性（例如：CHO 基因體），質譜方法更為有用。這些方法通常結合檢品製備（例如還原、烷基化及蛋白水解）、分離（例如：使用逆相層析 RP-HPLC），再進入質譜儀分析，此時所有蛋白質皆成為肽片段，從而獲得每一個片段之胺基酸序列。將得到之序列與產品序列進行比對以鑑定產品相關片段，同時亦與宿主（例如：大腸桿菌、CHO）相關之基因庫比對以鑑定 HCP。

質譜分析之挑戰源於產品衍生肽遠多於不純物肽。解決肽之競爭

性離子化問題的一個方法(也稱為產品肽對 HCP 肽之離子抑制)為將液相層析－質譜/質譜儀分析應用在已部分解析之 HCP 製備(例如：HPLC 分流)。這種純化可降低產品對質譜儀中總離子之影響。其他方法尚在開發，近期之技術改進，例如(1)利用質譜儀相容之移動相使層析樹脂能夠有效地解析，(2)改進與前端液態層析與/或等電點分離系統之介面，以及(3)具有更高質量解析度、準確度及更快速掃描之質譜儀，使得現在可以在原料藥中以高信賴度鑑別與定量特定之 HCP。在此技術可取代用於原料藥 HCP 管控之免疫分析前，仍需面臨對大量異質 HCP 之靈敏度與定量、成本及品管相關問題之主要挑戰。

做為與 HCP 免疫分析正交之特性分析方法，可以下述兩種方式應用液相層析－質譜/質譜儀數據。首先，如果以質譜儀方法未於檢品中發現在免疫分析中也低於定量極限之 HCP，則這些正交技術可增加 HCP ELISA 不會遺漏已經共純化 HCP 之信賴度。

目前許多液相層析－質譜/質譜儀方法偵測極限落於每 mg 產品約 10~100 ng HCP 範圍內，因此具有足夠靈敏度可排除高含量存在之單一 HCP，且比凝膠更為靈敏。其次，如果不純物被鑑定為高含量或具有安全疑慮，則可以評估是否需要改進純化製程以去除此不純物、目前控制系統是否足夠，以及是否必須開發針

對此不純物之分析。沒有訊號不能證明沒有 HCP，然而一旦鑑定為 HCP，便可以提高 LC-MS/MS 的靈敏度。LC-MS/MS 是對其他 HCP 之補充技術，亦為價值日增之正交方法。由於所有蛋白質體學領域之發展十分迅速，任何評論很快就過時，因此本章關於 HCP 分析之蛋白質體學方法不做詳細討論。

完整 HCPs 也可以使用具有 UV 偵測的 HPLC 分離出來，例如已被用於比對不同批次之無表達細胞生產。有關 HPLC 層析方法背後的核心科學，讀者可參考（通則 1010）。由於 HCPs 含量不同，且層析可能無法針對所有蛋白質提供獨特解析度，因此單一 HCP 必須佔總蛋白質群約 1%（具有良好解析度時或許可以更低）才可能被偵測到（即使如此，HCP 亦可能被產品遮蓋，取決於其滯留時間）。儘管如此，調查未知波峰之日常操作與比較無表達細胞生產 HCPs 之層析圖譜，兩者對於判斷不同培養條件下所產生 HCPs 的相似性可能有所助益。

與本章討論電泳方法一樣，以搭配紫外線偵測使用於蛋白水解切割產品之逆相分離法已經被納入 GMP 控制系統中，做為產品測試的一部分。UV 光譜圖中出現新的或意料外之波峰可能暗示存在 HCP 不純物，儘管這種方法不會太過靈敏（若未被其他波峰遮蔽，約為 1% 不純物）。然而，由於毋需新測試或檢品製備，

應是考慮使用正交方法決定純度之時機。

表 7 用於 HCP 檢測分析與特性分析之層析與蛋白質體學方法

方法	用法	優點	缺點	HCP 大約靈敏度與量化能力
質譜-HPLC /電噴霧電離 (ESI) -MS/MS 或 cIEF/ESI-M S/MS 或 MALDI TOF 之蛋白 質消化片段 分析	鑑定個別 HCP。可用 於純化產品 批次或無表 達細胞生產 之 HCP 標 準品的特性 分析。	可鑑定與監 控個別 HCP。可與 凝膠結合以 鑑定凝膠中 之個別蛋白 質。	低通量方 法，需要檢 品製備，熟 練之技術人 員與複雜儀 器。	100 ng/mg，如果 在發現模式 下用於未知 HCP，則為 半定量。10 ng/mg(可能 更好)，如果 與已知 HCP 分析標準品 一起使用， 則為定量。
RP-HPLC/U V 或 RP UHPLC/UV	如果蛋白質 分離良好，	高解析度， 根據疏水性	難以找到能 夠分離與析	10,000 ng/mg (1%)。除

。可應用於完整蛋白質或水解消化後之蛋白	則適合用於比較無表達細胞運作標準品。較大蛋白質可能需要一定限度之蛋白水解或還原才能提高解析度。	與大小分離 HCP；可藉由重疊方式直接比較無表達株與產品株。	出所有 HCP 之固定相與移動相組合。共析出可能會妨礙特定蛋白質定量。高濃度產品波峰可能會干擾微量 HCP 偵測。	非與已知 HCP 分析標準品一起使用，否則為半定量。
---------------------	---	--------------------------------	---	----------------------------

5.4. 關於 HCP 備援技術結論

多種複合分析技術已經被嘗試多年，例如，以離子交換分流 HCP 標準品，再接著進行逆相層析，然後對最終分流物中蛋白質進行免疫分析或質譜分析（二維質譜）；或者，在 LC-MS/MS 分析凝膠電泳之前，「產品扣除法」被評估用於從終產品檢品移除總蛋白質原液。這些用於確認覆蓋度之複合方法非常耗費人力，且本身可能引入人為失誤或偏差（例如：辨識產品之抗體通常無法去除所有數不清之異質形式），因此未被廣泛應用，儘管在個別情

況下它們可提供對產品不純物性質之深入了解。

由於具有耐變、靈敏、且可涵蓋大範圍之蛋白質不純物，電泳、西方墨點法（蛋白質墨點）及免疫分析仍然是最廣泛使用於 HCP 試劑特性分析與證明 HCP 經純化製程清除之方法。對監測檢品中殘留 HCP 含量以及確認最終原料藥中不存在 HCP，免疫分析與（越來越多）質譜是高度互補且最有效之方法。

6. 使用 HCP 免疫分析法進行製程開發、特性分析及確效

如前所述，雖然以 HCP 檢測做為定量分析有其限制，如果免疫分析能夠快速且穩健地偵測大部分 HCP，則其在製程開發、特性分析及確效將非常有價值。在各種條件下，每個中間製程階段 HCP 清除都是有價值之數據。應用於製程確效之分析需要證明其科學合理性、預期目的之適用性，且具有適當記錄。如前所述，製程匯集物就緩衝液成分、產品濃度及 HCP 組成各方面都可以有很大差異。至少，於製程中匯集物檢品加入 HCP 標準品必須符合允收之加標回收率，使各種匯集物之測試稀釋液在分析中皆符合要求。此外，在多個稀釋度下測試每種檢品類型於開發過程極有幫助，可確認：(1)結果在分析範圍內，(2)有考量檢品稀釋之非線性。如果製程顯示能強有力地清除 HCP，也可以使用製程確效來證明不需要常規 HCP 檢測做為 cGMP 控制系統一部分。

圖 5 呈現在製程開發與確效過程中收集之數據，並顯示許多製程中匯集物之稀釋依賴性(Pool 1 為第一個細胞培養液純化步驟之後，Pool 2 為下一個，依此類推)。圖 5 顯示 y 軸 HCP 比例 (ng/mg) 與 x 軸之測試微孔中產品稀釋度關係。每個檢品都經過三或四次二倍連續稀釋。起始稀釋度由以下兩個因素決定，其一為必須將含有高量 HCP 之檢品稀釋到分析範圍內，其二僅須測試加標回收率已被證明符合允收之稀釋度。在圖 5 中，細胞培養液每 mg 產品含有略高於 1,000,000 ng HCP，這表示細胞培養液中之產品占比不到總蛋白質一半。第一支管柱匯集物將 HCP 含量降低到接近 10,000 ng/mg。第二支管柱有最小 HCP 清除率；第三支管柱將 HCP 比例降低至 1,000 ng/mg。製程中最後一支管柱再額外降低 2 個對數之 HCP 含量，使得最終 HCP 比例為 10 ng/mg。所有中間匯集物顯示之 HCP 比例值皆與檢品稀釋度無關。

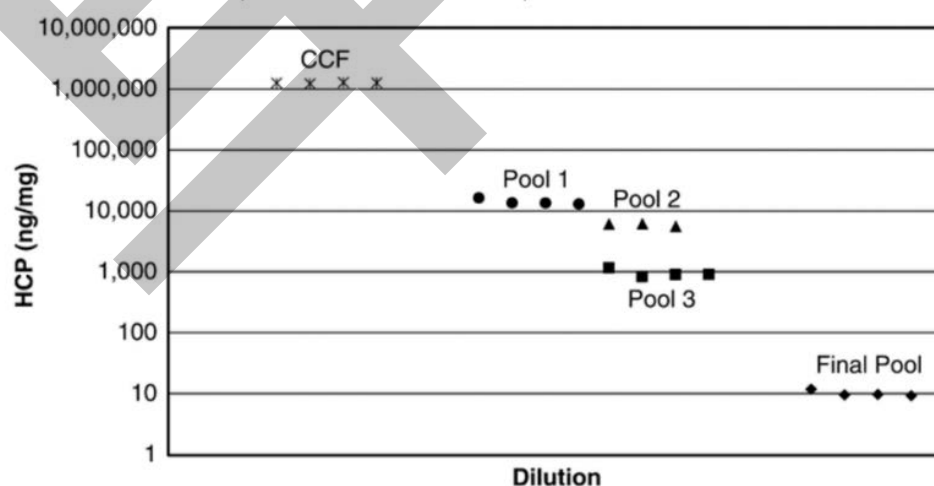


圖 5 於每個純化步驟進行 HCP 清除之範例。在檢品組中，第一個值

是其序列稀釋中稀釋度最高值。

對於細胞培養液、第 1 支及第 2 支管柱匯集物，HCP 比 (ng/mg) 與檢品稀釋度無關 (稀釋線性達成如圖 5 所示)。但是經第 3 支管柱處理後，在分析中明顯有不同稀釋依賴性。相對於檢品中特定 HCP 群組之可用抗體，此非線性稀釋可能與過量抗原相關 (即單一或有限數量的 HCP 種類與產品共純化)。產品經過純化後，必須將更多產品放入分析微孔以便在免疫分析中偵測到殘留 HCP。分析之產品濃度隨著每次純化步驟增加，因此共純化之 HCP 不純物濃度也相應增加。通過第 3 支管柱後，不純物含量可能超過可用抗體之結合量。這種現象在最終匯集物中重複出現，此步驟不涉及 HCP 清除，僅進行 UF/DF 緩衝液交換。這些匯集物報告值係由通過使用表 4 中描述方法將檢品稀釋至分析之定量極限附近 (連續稀釋中最稀釋之檢品) 所得，在這種情況下約為 300 ng/mg。關於分析非線性之其他討論可參見「4. HCP 免疫分析方法確效之 4.3. 檢品線性部分」。

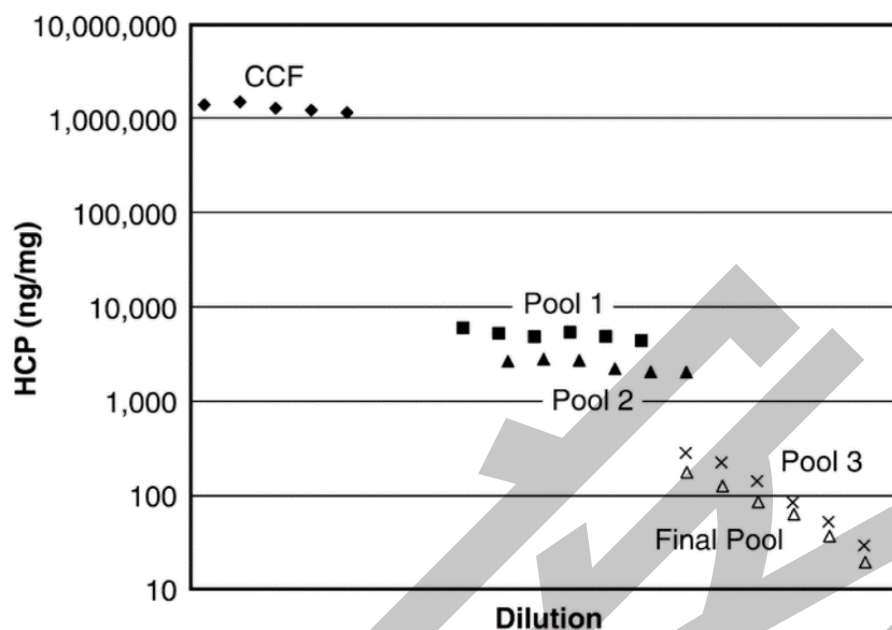


圖 6 於一個純化製程中進行 HCP 清除之範例。在檢品組中，第一個值是其序列稀釋中稀釋度最高值。

6.1. 個別 HCP 分析

在某些情況下，製程可能會導致產生相對較高含量之單一 HCP，從而導致報告結果出現偏差。如上所述，此情況下，總 HCP 分析中存在之抗體濃度可能不足以捕捉所有特定之 HCP。當存在單一已知 HCP 時，可能需要針對該單一 HCP 進行另一種分析。

以大腸桿菌生產培養為例，有助於折疊或形成雙硫構造之伴護蛋白或其他加工酶也會被大量表現。另外，這些伴護蛋白可能以一種不同於其出現在檢品中之蛋白質構型存在於用來開發 HCP 分析試劑之免疫原中。因此，針對未與產品結合之伴護蛋白生成之抗體遇到與產品結合之 HCPs 時可能無法辨識或辨識力極差，此

時可能需要開發使用適當抗體之獨立分析。存在高含量單一 HCP 的情形並非只發生在細菌細胞培養，而可能發生在任何細胞表現系統。另一個例子是當蛋白質為製程一部分而被有目的添加時，則視其為單一 HCP 處理，且特定分析將提供更好數據（相較總 HCP 免疫分析）。

6.2. 控制策略

6.2.1. 目標、警報界限及拒收界限

在美國與歐盟法規以及其他市場中，通常 HCP 被描述為與製程相關之不純物，且指引說明應藉由使用適當且良好控制之製程以減少不純物。美國 21 CFR 610.13 要求生物製品必須「.....不含外來物質，不可避免之物質除外.....」。ICH Q6B 明示生物製品製造商應評估可能存在之不純物，並根據其臨床前與臨床經驗制定不純物允收標準。然而，法規指引也意識到使用分析特定數據以及產品與特定製程試劑所涉及之既有挑戰。指引說明「生物技術與生物製品之絕對純度難以確定，且檢測結果與方法有關」（ICH Q6B），以及「同樣的，由於所使用之試劑與產品及生產系統有關，分析方法標準化將會有問題」（歐洲藥品評價機構（EMA）1997）。

雖然 FDA 指引陳述檢測 HCP 之必要性，但是一旦清除被證明

是一致的，FDA 亦允許透過確效可免除放行檢測之要求。在可能情況下，由製程引入並留在產品中之不純物應低於高靈敏度分析方法之可偵測量。做為製程確效一部分所進行適當之清除研究可接受為批次間（檢驗成績書）檢測之替代方式（FDA 1997），即使原料藥中存在低量 HCP 也是如此。此外，「如果不純物之定性及定量（即相對量與/或濃度）與原料藥相同，則不需要對藥品進行檢測」（ICH Q6B）。此為 HCPs 案例，其在藥品產品中之濃度可以從原料藥中推算出來，因為當原料要轉換為藥品時，其製程不會引入或清除 HCP。因此，在這些情況下，通常不需要檢測藥品 HCP。

總體目標為開發能將原料藥殘留 HCP 最少化的製程。當使用 HCP 免疫分析做為製造控制系統一部分時，亦需要建立允收限量。終產品中之殘留 HCP 提供純化開發群組一個製程目的。以具有高選擇性親和層析步驟（例如：使用蛋白 A）製備之抗體有時能夠達成每 mg 蛋白質 1 ng HCP 之靈敏度。目標 HCP 含量決定隨後用於開發製程之設計標準。

臨床前毒理學批次是首批應確定 HCP 值之正式批次，因此時之產品開發階段，研究者正在構建用於支持後續臨床研究之安全性數據。隨著此分子通過臨床開發而進展，前面研究被用以支

持與接下來研究相關之預期安全性（與風險）。理想情況下，HCP 含量與臨床暴露量應隨著產品之臨床開發而減少。

做為整體控制策略的一部分，「拒收限量」是只要超過就會使產品不再適用之限量值。在產品開發過程中，有關製程與產品知識隨之增加；因此可預期當一個產品從毒理學一路經過臨床 I / II 期、III 期，最後成為商業化產品時，拒收限量可以越來越緊縮。每個候選藥物與其臨床計劃都是獨一無二的，因此並無一體適用之限量標準。

拒收限量主要與患者的安全性有關。一般而言並無記錄 HCP「不安全」含量之具體數據，而是利用風險評估決定早期產品之允收量（包括非臨床數據、可得文獻，先前使用相同或類似細胞株所製造產品的經驗等）。對於商業產品，允收量也基於臨床試驗期間獲取之經驗。由於 HCP 不純物可能受純化製程影響，因此關鍵臨床試驗中使用之登記批次必須能代表將上市製程。應設定商業產品之拒收限量，以排除超出已評估風險/利益比之臨床經驗範圍的 HCP 數值。

警報界限、趨勢限量或行動界限（不同公司使用不同名稱）反映了製程一致性之考量。於商業製程中，應有足夠製造經驗能據以定義何謂不符趨勢。然而，在產品開發早期很少或根本沒

有製造經驗時，可根據類似產品之製造經驗或與目標值相比較，使用行動限量設定預期 HCP 之上限。超過這些限量應啟動調查以確定該批次是否可放行。產品純度之正交檢測在這些研究中極有價值。

隨著純度之正交檢測出現，任何非產品相關之非典型訊號皆應被評估。應盡力改良純化製程以去除任何不想要的、高於期望值的 HCP（例如：基於臨床、非臨床數據及可得文獻等），或者應提供其可被接受之具體理由，可藉由考量類似臨床暴露量的風險分析來達成。

如 HCP 分析因無法預期事件而改善或改變，可能需要修改拒收限量，即使在某些情況下此限量是增加的（如果新分析具有更廣覆蓋率）。然而應以銜接性研究對檢品進行檢測以確保新改良的分析方法可偵測到品質的變化。在某些情況下，改良之分析方法會得到較高數值，因此需要進行銜接性研究（與原始分析方法進行逐項比對）以合理說明新規格限量。

6.2.2. 設定限量之安全考量因素

通常以 ng/mg 為單位之 HCP 規格限量係以製程能力以及臨床經驗（即已知臨床試驗結果之批次含量）而設定。關於 HCP 不純物存在一些理論上的安全疑慮，不純物免疫原性是主要考量因

素。免疫反應可包括形成針對 HCP 或針對治療性蛋白質之抗體，其中 HCP 被認為具有佐劑效用。讀者可參考（通則 4069），其中更深入地討論影響免疫原性的因素。當患者接受一種以上含有相關不純物之治療性蛋白質時，免疫原性就成為更大的疑慮。雖然高劑量產品每劑量可能含有較高含量之殘留 HCP 而應於風險評估中加以考量，但其對於臨床結果之潛在影響不一定能加以預測。有時非常低含量之某些 HCP 已被證明具有臨床影響，然而其他 HCP 在高含量時不影響臨床結果。

可以設定不同的 HCP 限量，取決於產品是否僅具有一種或非常有限數量之共純化 HCP；或者具有多種 HCP，每種 HCP 僅為產品中總 HCP 含量的一小部分。如無法從製程中清除並且預期存在於原料藥中且可能具生物活性，可能導致必須針對個別 HCP 進行獨立分析與制定規格。

宿主細胞來源也是一個考量因素。由於序列同源性，來自人類細胞株（例如：HEK293 細胞）之 HCP 可能比來自遠距物種之 HCP 具有較低免疫原性風險；然而，若這些來自人類細胞株之蛋白質通常存在細胞內，則可能仍具有免疫原性，且會被患者之免疫系統視為“外來物”。如果此類抗體形成，則它們可能與內源性人類蛋白質交叉反應，中和該蛋白質或使一種或多種

必需生物系統變成無效。因此，源自生產細胞株（微生物相對於哺乳動物）之風險通常被認為是相同的，且無法預知實際可能發生狀況。

除了考量免疫原性外，HCP 還可能具有生物活性與風險。例如，在 CHO 細胞中所表現來自倉鼠之治療性蛋白質類似物可能以其與產品之相似性而被共純化出來。或者，在 CHO 細胞中表達抗人類細胞因子抗體產品，可能與倉鼠同源性細胞因子（homologous hamster cytokine）結合，且該複合物可與抗體產品共純化。上述兩種情況之產品用於患者時，倉鼠同源蛋白質可能具有生物學活性。

7. 總結與結論

生物製藥產品應盡可能不含殘留之 HCP。產業檢測 HCP 之標準方法係使用針對最廣泛潛在不純物蛋白質之多株抗體實施的三明治免疫分析。由於校正標準品中之 HCP 多樣性與比例從未與任何檢品中 HCP 完全符合，且由於免疫化學試劑中抗體範圍廣泛，不同 HCP 分析對個別 HCP 有不同程度的定量。因此，HCP 免疫分析單一數值是“免疫性加權”之讀數。相對於平均族群，高免疫原性蛋白質會被高估，而低免疫原性蛋白質則被低估。有些蛋白質可能不會在用於產生抗體之動物物種中誘導免疫反應，此時 HCP 免

疫分析將無法檢測出這些蛋白質的存在。由於此種可能性，用於判斷產品純度之正交方法亦應包括在管控系統中，最好策略是將 HCP 免疫分析與其他分析工具結合使用。

最後，在跨產品外推產品之安全 HCP 限量值時應特別謹慎，單一規格限量可能不夠充分。與產品共純化之特定 HCP 生物特性差異、給藥途徑、患者族群，以及產品/HCP 劑量都是影響患者風險之可能因素。在重組生物治療性藥品的經驗中，已經存在一些實例——個別共純化之蛋白質具有免疫原性、扮演佐劑導致增加患者對治療性蛋白之免疫反應，或者本身具有生物活性。儘管存在這些例子，但其實很少見，總體而言，生物製劑之安全記錄非常好。雖然 HCP 分析有其局限性與複雜度，謹慎努力開發與應用這些分析已經幫助確保達數百萬劑量之患者安全性。為確保產品能一致地符合可合理實現之低 HCP 不純物含量，HCP 分析仍然是一個需要時間、資源及生物製藥製造商審慎思考之複雜問題。