

1. 一种验证免疫学检测试剂的方法,所述免疫学检测试剂包含多克隆抗体混合物,所述多克隆抗体混合物用于检测生物样品中的污染性宿主细胞蛋白(HCP),所述方法包括:

提供包含 HCP 的生物样品;

通过尺寸和等电点分离所述 HCP;

将已分离的 HCP 转移至膜,由此产生结合至膜的 HCP;

采用非干扰性总蛋白质染剂对结合至膜的 HCP 染色,由此,用所述非干扰性总蛋白质染剂检测所述膜上的宿主细胞蛋白(HCP)位置;

观察并记录所述非干扰性总蛋白质染剂测得的该膜上的 HCP 位置;

将该膜与所述多克隆抗体混合物接触,由此,使来自多克隆抗体混合物的抗体与结合至该膜的 HCP 结合;

检测与该膜结合的来自所述多克隆抗体混合物的抗体,由此采用所述多克隆抗体混合物检测该膜上的 HCP 位置;

观察并记录所述多克隆抗体混合物测得的该膜上的 HCP 位置;和

将所述非干扰性总蛋白质染剂测得的 HCP 位置与所述多克隆抗体混合物测得的位置做比较,由此验证用于检测生物样品中的污染性宿主细胞蛋白 HCP 的所述多克隆抗体混合物。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,在使所述膜与所述多克隆抗体混合物接触之前,从所述膜基本移除所述非干扰性总蛋白质染剂。

3. 如权利要求 2 所述的方法,其特征在于,通过使所述膜与封闭溶液接触,来从所述膜基本移除所述非干扰性总蛋白质染剂。

4. 如权利要求 3 所述的方法,其特征在于,所述封闭溶液包含血清白蛋白、明胶或酪蛋白的缓冲溶液;血清或脱脂奶;或包含亲水性或两亲性合成聚合物的无蛋白封闭溶液。

5. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述非干扰性总蛋白质染剂检测 western 印迹膜上包含至少约 0.25ng 到至少约 1ng 蛋白质的 HCP 位置。

6. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述非干扰性总蛋白质染剂包括金属有机螯合物。

7. 如权利要求 6 所述的方法,其特征在于,所述金属有机螯合物包含钆。

8. 如权利要求 7 所述的方法,其特征在于,该包含钆的金属有机螯合物是三(红菲绕啉)钆 II 的磺化衍生物。

9. 如权利要求 8 所述的方法,其特征在于,所述三(红菲绕啉)钆 II 的磺化衍生物是三(红菲绕啉二磺酸)钆 II。

10. 如权利要求 7 所述的方法,其特征在于,该包含钆的金属有机螯合物是 SYPRORuby 蛋白质染剂。

11. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述非干扰性总蛋白质染剂包含阿扎菲酮,该阿扎菲酮与伯胺反应产生荧光化合物。

12. 如权利要求 11 所述的方法,其特征在于,所述阿扎菲酮是黑附球菌酮。

13. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,观察该膜上的所述非干扰性总蛋白质染剂测得的 HCP 位置通过用电磁辐射照射该膜并检测荧光来进行。

14. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,检测与该膜结合的来自所述多克隆抗体混

合物的抗体包括：使所述膜与第二检测试剂接触，以检测结合的抗体。

15. 如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，所述第二检测试剂是二抗。

16. 如权利要求 15 所述的方法，其特征在于，所述二抗是带标记的。

17. 如权利要求 15 所述的方法，其特征在于，所述二抗标记有酶、荧光团、放射性同位素、生物素、亲和素或链酶亲和素。

18. 如权利要求 17 所述的方法，其特征在于，所述酶是辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶。

19. 如权利要求 17 所述的方法，其特征在于，所述荧光团是花青染料、DyLight 染料、Alexa Fluor 染料、荧光纳米颗粒或荧光蛋白。

20. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，观察该膜上的所述多克隆抗体混合物测得的 HCP 位置通过使所述膜与化学发光底物接触并记录化学发光来进行。

21. 如权利要求 20 所述的方法，其特征在于，所述膜还与化学发光增强剂接触。

22. 如权利要求 21 所述的方法，其特征在于，所述增强剂是 3-(吩噻嗪-10-基)丙烷-1-磺酸盐)。

23. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述非干扰性总蛋白质染剂或所述多克隆抗体混合物测得的 HCP 位置采用基于电荷耦合装置 (CCD) 或基于互补性金属氧化物半导体 (CMOS) 的相机观察。

24. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述非干扰性总蛋白质染剂和所述多克隆抗体混合物测得的 HCP 位置采用成像系统观察并记录。

25. 如前述权利要求中任一项所述的方法，其特征在于，所述比较包括：

将所述非干扰性总蛋白质染剂测得的 HCP 位置与所述多克隆抗体混合物测得的 HCP 位置相匹配，其中，当它们处于所述 western 印迹膜上的相同位置时，HCP 位置是匹配的；和

确定匹配率，其中，所述匹配率是所述多克隆抗体混合物测得的 HCP 位置的数量除以通过所述多克隆抗体混合物或所述非干扰性总蛋白质染剂可测得的 HCP 位置的总数。

26. 如权利要求 25 所述的方法，其特征在于，如果所述匹配率是至少约 0.2、0.47、0.5 或 0.75 或是约 1，则所述多克隆抗体混合物通过验证。

27. 如权利要求 24 所述的方法，其特征在于，所述成像系统包括用于观察并记录所述非干扰性总蛋白质染剂和所述多克隆抗体混合物测得的 HCP 位置的计算机、CCD 或 CMOS 相机，以及软件。

28. 如权利要求 24 所述的方法，其特征在于，所述成像系统包含将所述非干扰性总蛋白质染剂测得的 HCP 位置与所述多克隆抗体混合物测得的 HCP 位置做比较的装置。

29. 如权利要求 24 所述的方法，其特征在于，所述成像系统包含将非干扰性总蛋白质染剂测得的 HCP 位置与所述多克隆抗体混合物测得的 HCP 位置相匹配的装置，由此确定匹配的 HCP 位置的数量。

30. 如权利要求 29 所述的方法，其特征在于，所述成像系统还包含用于将匹配的 HCP 位置的数量与所述非干扰性总蛋白质染剂测得的 HCP 位置做比较的装置。

31. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，如果所述多克隆抗体混合物测得的 HCP 位置与所述非干扰性总蛋白质染剂或所述多克隆抗体混合物测得的总 HCP 位置的比率是至少约 0.2、0.47、0.5 或 0.75 或是约 1，则所述多克隆抗体混合物通过验证。

采用非干扰性蛋白质染剂的 HCP 抗血清验证

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2013 年 11 月 12 日提交的 61/903, 234 号美国临时专利申请的优先权, 该文的全部内容通过引用纳入本文用于所有目的。

背景技术

[0003] 生物物质药物或生物物质, 例如治疗性蛋白质, 一般源自宿主细胞。例如, 可以通过遗传学方式工程改造宿主细胞, 以生成治疗性重组蛋白。又如, 所述生物物质可以是内源性非重组蛋白。所述宿主细胞可经收获并裂解, 然后可通过多种方法从污染性宿主细胞组分纯化所述生物物质。或者, 该生物物质可由宿主细胞分泌进入条件培养基, 收取该培养基, 并从条件培养基中的污染物质纯化所述生物物质。宿主细胞污染物包括宿主细胞蛋白 (HCP)。

[0004] HCP 污染物可能会具有不希望的作用, 即便在极低的浓度下也是如此。例如, 它们会干扰所述生物物质的功能。又如, HCP 污染物会诱导免疫系统对该生物物质的过敏反应或排斥。因此, 相信将全部、基本全部或大部分 HCP 污染移除, 能够减少不希望的作用。

[0005] 因此, 生物物质的质量控制测试通常包括: 用以显示 HCP 污染物已被充分移除的测试, 足以使 HCP 污染处于较低、允许的水平。低水平污染物的检测可采用免疫化学试验来进行, 其一般具有低检测限制。例如, ELISA 可联合多克隆抗体混合物使用, 该抗体混合物开发成对多种可能 HCP 具有反应性。多克隆抗体混合物的开发需要对识别的可能靶标的数量, 以及所述试验的灵敏度和特异度进行优化。因此, 在采用多克隆抗体混合物之前, 需要通过证明其能以可接受的灵敏度和特异度检测足够数量的 HCP 来对其进行验证。

[0006] HCP 试验验证可通过二维 (2-D) 电泳和 western 印迹来进行。例如, 两等份的样品可在两个不同的 2-D 电泳凝胶上通过尺寸和等电点各自分离。一个凝胶可用高灵敏总蛋白质染剂 (例如银、锌、铜或考马斯 G-250 染剂) 染色, 并观察染色斑点的数量, 以确定样品中总蛋白的大致数量。第二个凝胶可转移至 western 印迹膜, 并用候选多克隆抗体混合物探测。总蛋白质染剂和 western 印迹所检测蛋白质之间的比较能够确定该抗体混合物的特异度和灵敏度。

[0007] 因此, 该技术需要能够以合理的信心确认凝胶图像和印迹图像之间鉴定的特征/斑点是否对应相同的蛋白质。具体而言, 当凝胶和印迹图像中的相同对应位置上存在某一特征时, 拟为匹配。然而, 当所述多个图像或图像内多个个体特征彼此不配准时, 对于匹配的指定会变得复杂。如下原因可能造成凝胶图像和印迹图像或其中的特征之间缺乏配准: 电泳、转移和染色中的不一致, 并且, 所述图像可能因为凝胶的收缩和膨胀而具有不同尺寸。这些不一致的原因等等会造成不正确或模糊的匹配。

发明内容

[0008] 本发明提供一种验证多克隆抗体混合物的改进的方法, 所述多克隆抗体混合物用于检测生物样品中的污染性宿主细胞蛋白 (HCP)。在一些实施方式中, 所述方法对于总蛋白

质染色和 western 印迹检测无需分别的 2-D 凝胶。

[0009] 在一些实施方式中,本发明提供用于验证包含多克隆抗体混合物的免疫学检测试剂的方法,所述多克隆抗体混合物用于检测生物样品中的污染性宿主细胞蛋白 (HCP),所述方法包括:提供包含 HCP 的生物样品;通过表观分子量和等电点来分离 HCP;将分离的 HCP 转移至膜,由此产生结合至膜的 HCP;采用非干扰性总蛋白质染剂对结合至膜的 HCP 染色,由此用所述非干扰性总蛋白质染剂检测所述膜上的宿主细胞蛋白 (HCP) 位置;观察并记录非干扰性总蛋白质染剂测得的该膜上的 HCP 位置;使该膜与所述多克隆抗体混合物接触,由此使来自多克隆抗体混合物的抗体与结合至膜的 HCP 相结合;检测与该膜结合的来自所述多克隆抗体混合物的抗体,由此采用所述多克隆抗体混合物检测该膜上的 HCP 位置;观察并记录所述多克隆抗体混合物测得的该膜上的 HCP 位置;和,比较非干扰性总蛋白质染剂测得的 HCP 位置和所述多克隆抗体混合物测得的位置,由此验证用于检测生物样品中污染性宿主细胞蛋白 HCP 的多克隆抗体混合物。

[0010] 在一些方面中,在使所述膜与多克隆抗体混合物接触之前,所述非干扰性总蛋白质染剂从所述膜基本移除。例如,可通过将膜接触封闭溶液来使所述非干扰性总蛋白质染剂从所述膜基本移除。在一些情况中,所述封闭溶液包含血清白蛋白、明胶或酪蛋白的缓冲溶液;血清或脱脂奶;或含有亲水性或两亲性合成聚合物的无蛋白封闭溶液。

[0011] 在一些方面中,所述非干扰性总蛋白质染剂检测 western 印迹膜上包含至少约 0.25ng- 至少约 1、2、5 或 10ng 的蛋白质的 HCP 位置。在一些情况中,所述非干扰性总蛋白质染剂包含金属有机螯合物。例如,所述金属有机螯合物可包含钌。在一些情况中,包含钌的金属有机螯合物是 SYPRO Ruby 蛋白质染剂。在一些情况中,包含钌的金属有机螯合物是三(红菲绕啉)钌 II(ruthenium II tris(bathophenanthroline)) 的磺化的衍生物。例如,三(红菲绕啉)钌 II 的磺化的衍生物可以是三(红菲绕啉二磺酸)钌 II(ruthenium II tris(bathophenanthroline disulfonate))。

[0012] 在一些方面中,所述非干扰性总蛋白质染剂包含阿扎菲酮 (azaphilone),该阿扎菲酮与伯胺反应产生荧光化合物。例如,该阿扎菲酮可以是黑附球菌酮 (epicocconone)。

[0013] 在一些方面中,对通过非干扰性总蛋白质染剂测得的该膜上 HCP 位置的观察如下进行:用电磁辐射(例如,紫外光、可见光或红外光)照射膜,并检测荧光。

[0014] 在一些方面中,对与该膜结合的来自所述多克隆抗体混合物的抗体的检测包括:使膜接触第二检测试剂以检测结合的抗体。在一些情况中,所述第二检测试剂是二抗。在一些情况中,所述二抗带有标记,例如,所述二抗可用酶、荧光团、放射性同位素、生物素、亲和素或链酶亲和素标记。所述酶可以是,例如,辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶。所述荧光团可以是,例如,花青染料、DyLight 染料、Alexa Fluor 染料、荧光纳米颗粒或荧光蛋白。

[0015] 在一些方面中,对所述多克隆抗体混合物测得的该膜上的 HCP 位置的观察如下进行:使膜接触化学发光基质,并记录化学发光。在一些情况中,所述膜进一步与化学发光增强剂接触,例如,所述增强剂可以是 3-(吩噻嗪-10-基)丙烷-1-磺酸盐)。

[0016] 在一些方面中,非干扰性总蛋白质染剂或多克隆抗体混合物测得的 HCP 位置采用基于电荷耦合装置 (CCD) 或基于互补性金属氧化物半导体 (CMOS) 的相机观察。

[0017] 在一些方面中,非干扰性总蛋白质染剂和多克隆抗体混合物测得的 HCP 位置采用成像系统观察并记录。例如,所述成像系统可包含计算机、CCD 或 CMOS 相机以及软件,用于

观察并记录非干扰性总蛋白质染剂和多克隆抗体混合物测得的 HCP 位置。

[0018] 在任何前述实施方式、方面、情况或示例中,所述比较可包括:将非干扰性总蛋白质染剂测得的 HCP 位置与所述多克隆抗体混合物测得的 HCP 位置进行匹配并确定匹配率,其中,当 HCP 位置在 western 印迹膜上处于相同或等同的位置上时,这样的 HCP 位置是匹配的。在一些情况中,所述匹配率是:多克隆抗体混合物测得的 HCP 位置的数量除以所述多克隆抗体混合物或所述非干扰性总蛋白质染剂可测得的 HCP 位置的总数。在一些情况中,如果匹配率是至少约 0.2、0.47、0.5 或 0.75 或是约 1,则所述多克隆抗体混合物通过验证。

[0019] 在一些情况中,所述成像系统包含将所述非干扰性总蛋白质染剂测得的 HCP 位置与所述多克隆抗体混合物测得的 HCP 位置做比较的装置。

[0020] 在一些情况中,所述成像系统包含如下装置:该装置将非干扰性总蛋白质染剂测得的 HCP 位置与所述多克隆抗体混合物测得的 HCP 位置匹配,由此确定匹配的 HCP 位置的数量。在一些情况中,所述成像系统还包括如下装置:该装置用于将匹配的 HCP 位置的数量与非干扰性总蛋白质染剂测得的 HCP 位置做比较。

[0021] 在任何前述实施方式、方面、情况或示例中,如果所述多克隆抗体混合物测得的 HCP 位置与所述非干扰性总蛋白质染剂或所述多克隆抗体混合物测得的总 HCP 位置的比率是至少约 0.2、0.47、0.5 或 0.75 或是约 1,则所述多克隆抗体混合物可通过验证。

[0022] 附图的简要说明

[0023] 图 1 描述重复 2DE 凝胶之间可能的变异性。采用相同的条件,通过进行平行 2DE 来解析 CHO 分泌蛋白样品,然后采用 Oriole™ 荧光凝胶染剂进行总蛋白质染色(左图)。采用 PDQuest™ 2-D 分析软件进行斑点计数,并将 2DE 重复凝胶与参比‘主凝胶’相匹配,以及将 2DE 重复凝胶彼此匹配(右图和下方表格)。

[0024] 图 2 描述 SDS-PAGE 凝胶化学条件对于 2DE 之后的蛋白质转移效率的影响。通过第一向 IEF 进行大鼠肝脏裂解物的相同、平行分离之后,样品在含有指定凝胶化学条件的第二向 SDS-PAGE 中进一步解析。之后,所有 2DE 凝胶经处理供于蛋白质转移,蛋白质转移采用 Trans-Blot® Turbo™ 系统进行。转移至膜的蛋白质通过 SYPRO® Ruby 染色观察,而未转移的蛋白质通过对转移后的 2DE 凝胶进行考马斯染色来观察。

[0025] 图 3 描述采用相同膜方法对开发用于检测宿主细胞蛋白(HCP)的抗体进行评估的工作流。

[0026] 图 4 描述采用相同膜 2DE 和 western 印迹分析针对 CHO 总蛋白(图 A)和 CHO 分泌蛋白(图 B)进行的抗 CHO 抗体评价。通过就各样品比较转移后的 Oriole™ 染色的 2DE 凝胶与类似染色的重复 2DE 凝胶,来监测总蛋白质染色和 western 印迹的蛋白质向 PVDF 膜的转移效率。

[0027] 图 5 描述重叠分析来产生总蛋白质染色和 western 印迹图像之间的匹配率。CHO 分泌蛋白(左图)和 CHO 总蛋白(右图)的匹配率采用上文指示的公式和 PDQuest™ 软件产生。

[0028] 发明详述

[0029] I. 定义

[0030] 在本说明书和所附权利要求书中所用的单数形式“一个”,“一种”和“该”、“所述”包含复数指示物,除非上下文中有明确的另外说明。

[0031] 除非另外定义,本文中使用的所有技术和科学术语具有本领域普通技术人员通常所理解的同样含义。参见例如Lackie, DICTIONARY OF CELL AND MOLECULAR BIOLOGY(《细胞分子生物学词典》), 埃尔斯威尔出版社(Elsevier)(第4版2007); Sambrook等, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL(《分子克隆, 实验室手册》), 冷泉港实验室出版社(冷泉港, 纽约1989)。本发明的实践中可以使用与本文所述类似或等价的任何方法、装置和材料。本文提供的定义是用来帮助理解本文经常用到的某些术语, 不对本发明的范围构成限制。

[0032] 本文中所述的短语一种或多种“宿主细胞蛋白”(HCP)等, 指的是存在于生物物质制备物中的污染性宿主细胞组分(例如, 蛋白质)。HCP可通过多种方法检测, 包括但不限于, 免疫学检测或采用总蛋白质染剂。

[0033] 本文中所述的“宿主细胞蛋白位置”或“HCP位置”指在凝胶中或膜上测得的宿主细胞蛋白的物理位置, 其中, 蛋白质基于一种或多种物理化学性质, 例如表观分子量(例如, 尺寸)和/或等电点被物理分离。

[0034] 若在两份不同的分离(例如, 两块不同的聚丙烯酰胺凝胶, 两张不同的膜, 或凝胶和膜)中在相同位置处检测到某HCP, 或者根据两种或不同的检测方案在相同位置处检测到某HCP(例如, 通过总蛋白质染剂和免疫学检测在相同位置均检测到蛋白质), 则两种不同的分析物之间的HCP位置是“匹配的”。

[0035] 本文中所述的术语“匹配率”指通过免疫学检测在膜上检测到的HCP位置相对通过总蛋白质染剂或免疫学检测测得的HCP位置的比率。通常而言, 总蛋白质染剂和免疫学检测测得到的匹配的HCP位置在分母中计数一次。若某一HCP位置在膜上占据相同的位置, 则该HCP位置是匹配的。在一个示例性的实施方式中, 匹配率计算为: 通过免疫学方式检测到的位置除以通过总蛋白质染剂检测到的位置和通过免疫学方式检测到的位置(即, 免疫检测到的特征数量除以检测到的全部特征的数量)。在一些情况中, 检测到的全部特征的数量中, 通过免疫检测和总蛋白质染剂都检测到的匹配的特征在分母中仅计数一次。或者, 该匹配率可如下计算: 将通过免疫学方式检测到的HCP位置的总数除以通过总蛋白质染剂检测到的HCP位置的总数。又或者, 该匹配率可如下计算: 通过总蛋白质染剂测得的HCP位置的总数除以通过免疫学方式测得的HCP位置的总数。

[0036] 本文中所述的短语“免疫学检测”指采用抗体检测靶抗原, 或采用多种抗体或抗体片段检测多种靶抗原。免疫学检测可包括但不限于, ELISA或western印迹检测方法。

[0037] 本文中所述的短语“非干扰性总蛋白质染剂”指非抗体检测试剂, 其结合至蛋白质, 以允许蛋白质的检测, 而不干扰或基本不干扰后续的免疫学检测试剂。在一些情况中, 在用所述染剂检测蛋白质之后且在免疫学检测之前, 所述非干扰性总蛋白质染剂可被移除或基本移除。例如, 在一些情况中, 在用所述染剂检测蛋白质之后且在免疫学检测之前, 可移除至少约50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多的非干扰性总蛋白质染剂。在其它情况中, 在用所述染剂检测蛋白质之后且在免疫学检测之前, 所述非干扰性总蛋白质染剂可以是失活或基本失活的。而在其它情况中, 所述非干扰性总蛋白质染剂可保持与所检测的蛋白质的结合, 而仍不干扰后续免疫学检测。例如, 在一些情况中, 在与总蛋白质染剂接触之后, 所述非干扰性总蛋白质染剂对于抗体与所检测蛋白质的结合不显示或几乎不显示作用, 对所结合抗体的检测不显示或几乎不显示作用, 或者对凝胶或膜上免疫学测得的蛋白质的荧光、化学发光、发色或放射性成像而言不显示或几乎不显示作

用。示例性的非干扰性蛋白质染剂是 SYPRO Ruby。不同地,干扰性的总蛋白质染剂的示例是考马斯亮蓝(例如,考马斯亮蓝 R-250 或考马斯亮蓝 G-250)。

[0038] 非干扰性总蛋白质染剂可通过本领域已知的方法鉴定。例如,宿主细胞蛋白或合适的替代物(例如复合蛋白混合物,例如,大鼠肝脏裂解物),可例如通过二维凝胶电泳在凝胶上分离,并印迹到膜上。然后,与膜结合的宿主细胞蛋白或替代物可通过使该膜与候选总蛋白质染剂接触来检测。在使该膜与总蛋白质染剂接触,并检测与膜结合的蛋白质之后,所述与膜结合的蛋白质可采用多克隆抗体混合物通过免疫学方式检测。在一些情况中,所述与膜结合的蛋白质可采用已知检测基本全部或本质上全部的膜所结合蛋白质的多克隆抗体混合物通过免疫学方式检测。然后,鉴定为非干扰性总蛋白质染剂是:使通过总蛋白质染剂测得的膜所结合蛋白质中的至少约 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、基本全部或全部蛋白质通过后续免疫学检测也被检测到的那些染剂。

[0039] 或者,可通过将以下两者做比较来鉴定非干扰性总蛋白质染剂:(1) 先前未被候选总蛋白质染剂染色的印迹的免疫学检测结果,(2) 先前已被总蛋白质染剂染色的印迹的免疫学检测结果。例如,可使两个等份的复合蛋白混合物在两个不同的凝胶上平行分离(例如,通过 2D- 电泳分离),然后将蛋白质印迹到两张不同的膜上。在一张膜上,可通过用候选总蛋白质染剂对该膜进行染色,然后进行免疫学检测来检测与膜结合的蛋白质。在另一张膜上,可通过免疫学检测来检测与膜结合的蛋白质。然后,被鉴定为非干扰性总蛋白质染剂的是:使(1) 测得的与膜结合的蛋白质中至少约 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、基本全部或全部也被(2) 检测出的那些染剂。在一些情况中,所述比较在(2) 和预期数量的所测蛋白质之间进行,并且鉴定为非干扰性总蛋白质染剂的是如下染剂:在先前已被候选总蛋白质染剂染色的印迹上,通过免疫学方式测出至少约 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、基本全部或全部的预期与膜结合的蛋白质。

[0040] 本文中所述的短语“抗体”指的是基本上由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因的片段编码的一种或多种多肽。公认的免疫球蛋白基因包含 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因,以及无数的免疫球蛋白可变区基因。轻链被归类为 κ 或 λ 。重链分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,它们进而分别定义免疫球蛋白类型 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。”抗体”的作用是结合性蛋白质,并且其结构上定义为包含来自或源自产抗体动物的免疫球蛋白编码基因的构架区的氨基酸序列。

[0041] 已知典型的免疫球蛋白(抗体)的结构单位包含四聚体。各四聚体由两个相同的多肽链对组成,各对有一条“轻链”(约 25kD) 和一条“重链”(约 50-70kD)。每条链的 N 末端确定约 100 至 110 个或更多个氨基酸构成的可变区,所述可变区主要负责抗原识别。术语轻链可变区(V_L) 和重链可变区(V_H) 分别指这些轻链和重链。

[0042] 本文使用的术语“抗体”包含保持结合特异性的抗体片段。例如,存在许多充分鉴定的抗体片段。因此,例如胃蛋白酶消化抗体 C 末端至铰链区中的二硫连接,产生 $F(ab)'_2$, Fab 的二聚体,其本身是由二硫键与 V_H - C_H1 连接的轻链。可在温和条件下还原 $F(ab)'_2$ 以打断铰链区中的二硫连接,从而将 $F(ab)'_2$ 二聚体转化为 Fab' 单体。Fab' 单体实质上是具有部分铰链区的 Fab(对其它抗体片段的更详细描述参见,《基础免疫学》(Fundamental Immunology), W. E. Paul 编,雷文出版社(Raven Press), N. Y. (1993))。虽然根据完整抗体的消化

来定义了不同的抗体片段,但是本领域技术人员应理解,也能用化学方法或通过利用重组 DNA 方法从头合成片段。因此,本文中术语抗体,也包含通过全抗体修饰产生或用重组 DNA 方法合成的抗体片段。

[0043] “同种型”是由重链恒定区确定的一类抗体。免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因。轻链被归类为 κ 或 λ 。重链被归类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,这进而确定了同种型类别,分别为 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。

[0044] 抗体包括 V_H - V_L 二聚体,包括单链抗体(以一条多肽链形式存在的抗体),例如其中重链可变区和轻链可变区连接在一起(直接连接或通过肽接头连接)以形成连续多肽的单链 Fv 抗体(sFv 或 scFv)。所述单链 Fv 抗体是共价连接的 V_H - V_L ,其可由包括 V_H 编码序列和 V_L 编码序列(直接连接或通过肽编码接头连接)的核酸表达(例如,Huston 等 .Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883, 1988)。虽然 V_H 和 V_L 彼此连接成单条多肽链,但 V_H 和 V_L 结构域是非共价结合的。另外,所述抗体能够是另一种片段。例如,使用重组技术也能够产生其他片段,作为可溶蛋白或作为从展示方法得到的片段。抗体还可包括双抗体(diantibody)和微型抗体(miniantibody)。本发明的抗体还包括重链二聚体,例如来自驼科的抗体。

[0045] “多克隆抗体”指的是抗体的制备物,其针对单一抗原产生,具有不同的结合特异性和亲和性。“多克隆抗体混合物”指的是多克隆抗体的混合物,这些抗体各自针对单一抗原产生。或者,“多克隆抗体混合物”可指源自接种了抗原混合物的动物血清的多克隆抗体的混合物。例如,“多克隆抗体混合物”可指从已用包含宿主细胞蛋白的制备物接种的动物血清获得的多克隆抗体的混合物。

[0046] “标记物”或“可检测部分”是可通过分光镜、光化学、生物化学、免疫化学、化学或其它物理手段检测到的成分。例如,可用的标记物包括 ^{32}P 、荧光染料、高电子密度试剂、酶(例如,ELISA 中常用)、生物素、地高辛或半抗原以及做成可检测的蛋白质或其他实体,例如通过将放射性标记物整合至与靶标肽特异性反应的肽或抗体中使之可测。可以采用本领域已知的用于使抗体偶联所述标记物的任何方法,例如,使用如下文献中所述的方法:Hermanson,《生物结合技术》(Bioconjugate Techniques)1996,圣迭戈的学术出版社有限公司(Academic Press, Inc.)。

[0047] “带标记的”分子(例如,核酸、蛋白质或抗体)是共价(通过接头或化学键)或非共价(通过离子、范德华力、静电或氢键)地结合标记物的分子,从而可通过检测与该分子结合的标记物来检测是否存在该分子。

[0048] II. 方法

[0049] 本文所述的是用于验证免疫学检测试剂的方法,所述免疫学检测试剂包含用于检测污染性 HCP 的多克隆抗体混合物。所述方法包括:分离样品中的 HCP(例如,通过凝胶电泳或凝胶电泳和膜印迹分离),采用不干扰后续免疫学检测的总蛋白质染剂检测 HCP,和,采用多克隆抗体混合物对 HCP 进行免疫学检测。

[0050] 所述方法还可包括:将通过总蛋白质染剂测得的 HCP 与通过多克隆抗体混合物测得的那些做比较。所述比较可通过确定匹配率来进行。在一些情况中,所述比较可通过如下方式进行:观察通过总蛋白质染剂获得的 HCP 位置,并将这些位置与通过免疫学方式测得的 HCP 位置做比较。在一些情况中,当获得高匹配率(例如,至少约 0.2、0.3、0.4、0.47、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 或更高)时,包含多克隆抗体混合物的免疫学检测试剂通过验证。在

一些情况中,当通过免疫学方式测得的 HCP 位置的数量在总 HCP 位置(例如,总 HCP 位置是通过总蛋白质染剂或免疫学方法测得的那些,其中匹配的位置计数一次)中占显著比例(例如,至少约 0.2、0.3、0.4、0.47、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 或更高)时,所述免疫学检测试剂通过验证。在一些情况中,当通过免疫学方式测得的 HCP 位置的数量在总蛋白质染剂测得的 HCP 位置中占显著比例(例如,至少约 0.2、0.3、0.4、0.47、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 或更高)时,所述免疫学检测试剂通过验证。

[0051] 在一些实施方式中,所述方法包括:提供包含 HCP 的生物样品;基于表观分子量和等电点来分离 HCP;将分离的 HCP 转移至膜,由此产生结合至膜的 HCP;采用非干扰性总蛋白质染剂对结合至膜的 HCP 染色,由此检测 HCP 位置;观察并记录通过非干扰性总蛋白质染剂测得的该膜上的 HCP 位置;使该膜与多克隆抗体混合物接触,由此使来自多克隆抗体混合物的抗体与结合至膜的 HCP 结合;检测结合至该膜的来自多克隆抗体混合物的抗体,由此用所述多克隆抗体混合物检测该膜上的 HCP 位置;观察并记录通过所述多克隆抗体混合物测得的该膜上的 HCP 位置;和,将非干扰性总蛋白质染剂测得的 HCP 位置与多克隆抗体混合物测得的位置做比较,由此验证用于检测生物样品中的污染性宿主细胞蛋白的多克隆抗体混合物。在一些情况中,当多克隆抗体混合物测得至少约 20%、25%、30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5% 或 99% 或更多的非干扰性总蛋白质染剂测得的总蛋白质时,所述多克隆抗体混合物通过验证。

[0052] 或者,所述比较可通过如下方式进行:确定所述多克隆抗体混合物测得的 HCP 位置与测得的总 HCP 位置(例如,通过多克隆抗体混合物或总蛋白质染剂测得的 HCP 位置,其中由两种方法均检测到的位置仅计数一次)的比率。又或者,可确定通过多克隆抗体混合物测得的位置的数量与通过总蛋白检测到的位置的数量的比率。例如,可观察并记录位置的数量,并对其进行比较而无需考虑确定不同检测方法之间匹配的是哪些位置。又或者,可确定多克隆抗体混合物测得的位置的数量与任一方法测得的位置的数量(例如,由总蛋白质染剂或免疫学检测法所测得位置的数量)的比率。例如,可观察并记录位置的数量,并对其进行比较而无需考虑确定不同检测方法之间匹配的是哪些位置。在一些情况中,当确定的比率是至少约 0.2、0.3、0.4、0.47、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、0.95 或更高时,所述多克隆抗体混合物通过验证。

[0053] 提供的包含 HCP 的生物样品可通过本领域已知的任何方法获得。在一些情况中,所述生物样品是来自宿主细胞来源生物体的血液、组织或血清。例如,所述生物样品可以是人、牛、大鼠、小鼠、兔、仓鼠或鸡的血液、组织或血清。在其它情况中,所述生物样品是宿主细胞。在一些情况中,所述生物样品经提取、浓缩或纯化以获得纯化的或富集的 HCP 样品。

[0054] 在一些情况中,所述包含 HCP 的生物样品可作为条件培养基形式获得。例如,所述生物样品可不含细胞或基本不含细胞、培养物上清液或滤液。在一些情况中,生物物质可被分泌入转化有重组表达盒的细胞的培养物上清液。例如,用于检测污染性 HCP 的多克隆抗体混合物继而可以采用包含或源自未转化该重组表达盒的细胞的培养物上清液的生物样品来验证。在一些情况中,培养物上清液可经提取、浓缩或纯化以获得纯化的或富集的 HCP 样品。

[0055] 用于从生物样品纯化宿主细胞蛋白或富集生物样品的宿主细胞蛋白的方法是本领域中熟知的。例如,所述生物样品可经处理以分离、降解或移除核酸。此外或或者,示例

性的方法可包括但不限于：使该生物样品与核酸内切酶或核酸外切酶接触，对该样品离心，过滤该样品，透析该样品，浓缩该样品，使该样品中的 HCP 沉淀，例如通过三氯乙酸法和 / 或丙酮沉淀法，或其组合。在一些情况中，所述生物样品由对应于生物物质的纯化加工的纯化或富集步骤处理，使产生的蛋白质群代表具体加工步骤中存在的 HCP。

[0056] 在一些情况中，在分离 HCP 之前获得并提供新鲜的生物样品。例如，所述生物样品可在分离 HCP 之前数秒、数分钟、数小时或 1 或 2 天之前获得并提供。在其它情况中，所述生物样品经获得并贮存一段时间（例如，数天、一周、数周、一个月或更久）。在一些情况中，所述生物样品在贮存之前或期间经稳定化，以防止 HCP 的降解或损失。稳定化方法是本领域熟知的。示例性的稳定化方法包括但不限于将所述样品贮存于低于室温的条件（例如，约 4℃），冷冻该样品，提取、抑制或灭活样品中的蛋白酶，纯化样品中的 HCP 以将其从增加 HCP 降解或损失的组分纯化出来，或其组合。

[0057] HCP 可按本领域中熟知的多种方法分离。例如，HCP 可通过 2-D 凝胶电泳分离。2-D 凝胶电泳可包括：通过在凝胶如聚丙烯酰胺凝胶中的等电点和表观分子量（即，尺寸）来分离蛋白质。在一些情况中，所述蛋白质首先通过等电点，然后通过尺寸分离。在其它情况中，所述蛋白质通过尺寸，然后通过等电点分离。

[0058] 可采用本领域已知的任何方法将已分离的 HCP 转移至膜。例如，可将 HCP 印迹至膜上。印迹可通过使分离的蛋白质接触膜来进行。例如，HCP 可在凝胶（例如，聚丙烯酰胺凝胶，例如 SDS 或 LDS 聚丙烯酰胺凝胶）中分离，然后使该凝胶与膜接触。在一些情况中，印迹还包括利用毛细作用、真空、压力或电磁力来将 HCP 从凝胶移动至膜。例如，可使凝胶与膜接触，并施加电场，以将 HCP 从凝胶移动至膜。在一些情况中，当采用电磁力来使 HCP 从凝胶移动至膜时，使用缓冲剂以确保该蛋白质带有合适的电荷，从而其在施加的电场的存在下向所述膜移动。例如，所述凝胶可包含一定 pH 的缓冲剂，从而大多数蛋白质带正电或带负电。

[0059] 可通过采用总蛋白质染料来检测所述膜上的转移的蛋白质。在一些实施方式中，例如，在所述膜将被用于所转移蛋白质的后续免疫学检测时，优选采用非干扰性总蛋白质染料。总蛋白质染料是本领域已知的，并且包括本文所述的那些。在一些情况中，所述总蛋白质染料提供荧光信号，并且利用总蛋白质染料，通过用特定波长的光照射膜，并检测以更长的波长发出的荧光信号来检测 HCP 位置。在一些情况中，荧光信号采用成像装置或扫描仪检测。所述成像装置或扫描仪可装配有一个或多个光源，例如氙灯、LED（例如，多色 LED）或一个或多个激光器。所述成像装置或扫描仪可包括一个或多个激发和 / 或发射滤波器、衍射光栅等，用于提供合适的激发源和发射检测器。所述成像装置可装配有一个或多个光敏检测器，包括但不限于：CCD 检测器、CMOS 检测器、光电倍增管、光电二极管、雪崩光电二极管、薄膜等。所述成像装置可包含计算机系统，例如，本文所述的计算机系统。

[0060] 在一些实施方式中，可通过使膜与合适的封闭剂接触合适的时间长度来封闭膜。膜与封闭剂接触的合适时间长度包括如下任何时间：至少约 1 分钟，优选至少 10 分钟、15 分钟或 30 分钟，更优选至少约 1 或 2 小时或更久。一般而言，封闭在总蛋白质染料检测之后进行。在一些实施方式中，所述封闭步骤用于封闭和移除全部、基本全部或足够量的总蛋白质染料，从而减小、基本减小或消除对于后续免疫学检测的干扰。在一些情况中，所述封闭以多个步骤进行，例如，可使膜与封闭剂接触一段时间，可任选地清洗或漂洗该膜，然后

使该膜与补充封闭剂接触。

[0061] 在一些实施方式中,然后,可使封闭的膜与免疫学检测试剂(例如多克隆抗体混合物)孵育,并由此检测 HCP 位置。一般而言,所述孵育进行合适的时间长度,以允许多克隆抗体混合物的组分与靶标蛋白质结合。膜与免疫学检测试剂孵育的合适时间长度包括如下任何时间:至少约 1 分钟,优选至少 10 分钟、15 分钟或 30 分钟,更优选至少约 1 或 2 小时或更久。在一些情况中,孵育过夜。在其它情况中,孵育过夜可能会导致背景水平较高,因而优选避免孵育过夜。用免疫学检测试剂来检测固定于已封闭膜上的蛋白质的方法是本领域熟知的,并且本领域技术人员也可容易地确定其它变化形式。

[0062] 本文还提供用于将未结合的免疫学检测试剂洗除的方法。在一些实施方式中,在将所述免疫学检测试剂与封闭的膜孵育之后,通过清洗来移除未结合的检测试剂。清洗可通过本领域熟知的多种方法进行。例如,可将该膜在磷酸盐缓冲盐水中孵育,该孵育可任选在非变性去污剂的存在下进行约 15 分钟。在一些情况中,所述清洗可进行 1、2、3、4 或更多次。

[0063] 在一些情况中,随后可检测结合的免疫学检测试剂。例如,如果所述免疫学检测试剂已被标记有可检测的酶或荧光团,则可检测所述酶或荧光团的存在,由此观察 HCP 位置。或者,可采用第二免疫学检测试剂(例如,二抗)来检测第一免疫学检测试剂的存在与否。例如,如果第一免疫学检测试剂是小鼠多克隆抗体混合物,则二抗可以是抗小鼠抗体或抗小鼠抗体混合物。一般而言,二抗标记有可检测标记物,例如荧光团、配体或酶。用于二抗的示例性的标记物包括生物素、亲和素、链酶亲和素、荧光素或辣根过氧化物酶。

[0064] 在一些实施方式中,二抗用辣根过氧化物酶标记,并采用化学发光底物检测。本领域中熟知的化学发光底物包括但不限于,鲁米诺。在一些情况中,所述化学发光信号通过添加增强剂来增强。示例性的化学发光增强剂是对碘苯酚。或例如,可采用化学发光增强剂:3-(吩噻嗪-10-基)丙烷-1-磺酸盐)。其它化学发光增强剂是本领域已知的,例如美国专利号 7,855,287 ;5,171,668 ;4,729,950 ;6,432,662 和 8,123,136 中所述的那些。

[0065] 用于检测结合的免疫学检测试剂的合适荧光团包括本领域已知用于检测免疫学检测试剂(例如抗体)的任何荧光团。例如,所述荧光团可以是花青染料(例如,Cy2、Cy3、Cy3B、Cy3.5、Cy5、Cy5.5 或 Cy7),DyLight 染料(例如,DyLight350、DyLight 405、DyLight 488、DyLight 550、DyLight 594、DyLight 633、DyLight 650、DyLight 680、DyLight 755、DyLight 880),Alexa Fluor 染料(例如,Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor514、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 610、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750 或 Alexa Fluor 790),咕吨染料(例如,荧光素、TAMRA 或德州红),荧光纳米颗粒或荧光蛋白(例如,绿色、黄色、蓝色或红色荧光蛋白,mCherry 或藻红蛋白)。

[0066] 可使二抗与膜孵育,清洗以去除未结合的二抗,然后观察以由此检测 HCP 位置。如上所述,所述位置可采用扫描或成像装置观察。在一些情况中,所述扫描或成像装置装配有光敏检测器(例如,CCD、CMOS、光电二极管、光电倍增管、薄膜等),以及一个或多个发射或激发滤波器。

[0067] 在一些情况中,通过总蛋白质染剂和/或免疫学检测试剂测得的 HCP 位置用自动

化或半自动化软件观察并记录。在一些情况中,所述软件可用于通过尺寸、形状、绝对或相对位置或信号强度中的一项或多项来鉴定位置。在一些情况中,将所述位置记录到计算机可读介质上,用于与其它方法如采用总蛋白质染剂检测到的 HCP 位置做比较。在一些情况中,所述软件可用于通过尺寸、形状、绝对或相对位置或者绝对或相对强度中的一项或多项来观察并记录“匹配的”HCP 位置。在一些情况中,所述软件可以额外或者替代性用于观察并记录通过所述检测方法(例如,总蛋白质染剂和/或免疫学检测法)检测到的总 HCP 位置。

[0068] 在一些情况中,软件(例如上述软件)以计算机系统的形式提供,该计算机系统检测和/或记录 HCP 位置。在一些情况中,所述计算机系统是成像装置的组件。在其它情况中,所述计算机系统是与所述成像装置分离的组件。在一些情况中,所述计算机系统将总蛋白质染剂测得的 HCP 位置与免疫学方式测得的 HCP 位置做比较。在一些情况中,所述计算机系统确定总蛋白质染剂测得的 HCP 位置与免疫学方式测得的 HCP 位置之间的匹配率。在一些情况中,所述计算机系统指示免疫学检测试剂是否通过检测生物物质中污染性 HCP 的验证。

[0069] 本文提供用于验证免疫学检测试剂的组合物。在一些情况中,所述免疫学检测试剂就用作生物药物测试试剂的适用性来被验证。例如,所述免疫学检测试剂可被验证为:适用于测试生物药物中是否存在污染性宿主细胞蛋白或其它替代物。在一些情况中,所述免疫学检测试剂是多克隆抗体混合物。

[0070] 在一些实施方式中,免疫学检测试剂的验证采用总蛋白质染剂进行。在一些情况中,可采用任何总蛋白质染剂,只要其不干扰后续免疫学分析即可。例如,在一些情况中,可采用不遮盖或干扰后续免疫学检测步骤过程中产生的荧光或化学发光信号的总蛋白质染剂。又例如,在一些情况中,可采用不干扰后续免疫学检测步骤过程中免疫学检测试剂(例如,多克隆抗体混合物)结合的总蛋白质染剂。在一些情况中,可采用在后续免疫学检测之前能够被移除或基本移除的任何总蛋白质染剂。

[0071] 在一些情况中,可采用任何总蛋白质染剂,只要其具有足够的灵敏度,并且满足上文关于不干扰后续免疫学检测的总蛋白质染剂的描述之一即可。当总蛋白染剂能够检测单一斑点、条带或位置中的至少约 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.75、0.8、0.9、1.0、1.25、1.5、2、2.5、3、3.5、4、5、6、7、7.5、8、9、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45 或 50ng 或更多蛋白质时,认为总蛋白质染剂足够敏感。

[0072] 总蛋白质染剂的示例性实施方式包括但不限于:包含如下试剂中一种或多种的总蛋白质染剂:考马斯亮蓝 R-250 或 G-250、银染剂、胶体金染剂、咪唑锌或锌铜染剂,或荧光染料染剂。荧光染料染剂包括 Sypro Ruby、考马斯 Fluor Orange、Krypton 荧光蛋白染剂, Krypton 红外蛋白质染剂, Deep Purple 染剂或 Flamingo 染剂。荧光染料总蛋白质染剂还包括金属有机螯合物,例如有机金属钌螯合物,包括但不限于:三(红菲绕啉)钌 II、碘化的三(红菲绕啉)钌 II 或三(红菲绕啉二磺酸)钌 II。荧光染料总蛋白质染剂还包括与伯胺反应以产生荧光化合物的阿扎菲酮或黑附球菌酮。

[0073] 在一些实施方式中,所述膜与封闭剂接触。合适的封闭剂包括但不限于如下一种或多种:血清白蛋白、明胶或酪蛋白。在一些情况中,所述血清白蛋白、明胶或酪蛋白在缓冲溶液中提供。在一些情况中,所述封闭剂包括血清或奶,例如,脱脂奶。在其它情况中,所述

封闭剂是包含亲水性或两亲性合成聚合物的无蛋白封闭溶液。其它合适的封闭剂是本领域已知的,并且其它合适的封闭剂可通过如下方式凭经验确定:使膜与候选封闭剂接触,进行免疫学检测,并将由采用该候选封闭剂的免疫学检测方法提供的信噪比与其它已知封闭剂做比较。

[0074] III. 系统

[0075] 本文提供可用于上述系统和方法的装置、装置组件,和系统(例如,计算机系统)的描述。例如,这些装置可用于传输(通信)、处理,和/或存储与上述任何功能相关的数据。本领域普通技术人员应理解,下文所述的装置可以仅具有下文所述的一些组件,或可具有额外的组件。

[0076] 在一些实施方式中,可至少部分通过使用管理系统来验证免疫学检测试剂,所述管理系统设置以检测并记录利用总蛋白质染剂和免疫学检测试剂测得的 HCP 位置。在一些情况中,所述系统包括与成像装置耦合的计算机系统。在一些情况中,所述系统包括联网的计算机系统。本文所述的技术不限于任何具体类型的计算机系统或计算机网络。例如,网络可以是局域网(LAN)、广域网(WAN)、无线网络、总线连接、互联网或跨电子系统中的一根或多根传输线或轨迹传输数据或控制信息的任何其它方式。例如,可在与计算机系统直接连接的用户接口接收数据源。也可能采用其他实施方式。

[0077] 所述计算机系统可包括通过互联总线耦合在一起的处理器和系统存储器。在其它实施方式中,处理器和系统存储器可直接互联,或可通过一个或多个中间组件或单元间接互联。处理器和系统存储器可以是本领域已知的任何通用或专用组件,并且不限于任何具体类型的处理器或存储系统。系统存储器可被设置以储存系统和控制数据,以供在本文所述的实施方式中使用。计算机系统也可与成像装置、数据库或文件系统(内部或外部)耦合,以获得数据。

[0078] 在一些实施方式中,计算机系统在通信接口处自不同来源接收输入数据。计算机系统处理接收到的数据,并通过输出模块在其输出端(output)提供结果数据。在一个优选实施方式中,计算机系统接收非干扰性总蛋白质染剂测得的代表 HCP 位置的第一组数据值,并将这些值提供给比较引擎。计算机系统可接收免疫学检测试剂测得的代表 HCP 位置的第二组数据值,并将这些值提供给比较引擎。所述比较引擎可设置以比较第一组值和第二组值,以确定所述免疫学检测试剂是否检测足够数量的 HCP。

[0079] 特定地,该比较引擎可设置以将第一组数据值中收到的各 HCP 位置与第二组数据值的对应值做比较,以确定其是否存在。在一个实施方式中,如果通过比较引擎确定了两个值之间的差异,该比较引擎可发出指示该结果的信号。类似地,在另一个实施方式中,如果确定两个值等同(例如,均存在或均不存在),该比较引擎可发出指示该结果的信号。在一些情况中,也比较各 HCP 位置处的相对信号强度。

[0080] 该比较引擎可采用专门设计的计算机硬件或电路或由专门设计的软件模块或组件编程的通用计算硬件;或硬件与软件的任何组合来运行。本文所述的技术不限于硬件电路或软件的任何特定组合。例如,比较引擎可包括现成比较电路组件或定制比较器电路。比较器电路设置以比较两个或更多个值,并输出指示这两个值是否等同或不等同(如技术人员所理解的那样)的结果。或者,该比较功能可在存储于存储器中的软件中实现,并由处理器执行。计算机系统的示例性实施方式包括但不限于,设置以运行 Progenesis SameSpot

和 / 或 Bio-Rad PDQuest 软件的计算机系统。

[0081] 通过引用将本文引用的所有专利、专利申请和其它公开文献包括 GenBank 登录号全文纳入本文用于所有目的。

[0082] IV. 实施例

[0083] 仅以说明的形式而非限制的形式提供以下实施例。本领域技术人员不难了解,可改变或调整各种非关键参数而获得基本相似的结果。

[0084] 实施例 1

[0085] 引言

[0086] 生物物质药物因其在遗传工程改造的宿主细胞中的起源 / 表达、其潜在的理化性质,以及在其生产中应用的复杂纯化工艺,而面临特别的监督和技术要求。这些要求之一是:准确监测并有效移除加工衍生的杂质,例如宿主细胞蛋白 (HCP)、宿主细胞源性的 DNA/RNA、病毒、细胞培养基、色谱沥出物,等。(1). 在不同的杂质中,准确监测 HCP 可能是最为困难的,因为表达系统的蛋白质组由数千种不同的蛋白质组成,其中有一些能够与所述生物物质药物共纯化 (copurify)。因此,HCP 监测方法必须是多重分析物试验,具有检测可能存在于任何批次药物物质中的大多数蛋白质杂质的能力 (2, 3)。

[0087] 鉴于其高灵敏度 (低 ppm) 以及其针对 HCP 群体的广泛特异度的潜力,酶联免疫吸附试验 (ELISA) 是最广泛用于监测 HCP 的方法之一 (1-4)。HCP ELISA 采用多克隆抗体试剂 (抗 HCP 抗体),该多克隆抗体试剂在动物中针对来自产物表达系统的宿主细胞蛋白制备物产生。免疫测定的准确性取决于抗体试剂检测基本全部或本质上全部的潜在 HCP 杂质的能力。因此,该抗体试剂在用于 HCP ELISA 之前必须验证其是否合适特定用于其所需用途,所述验证通过测试其对 HCP 的总群体的免疫检测百分比来进行。

[0088] 在用于评价抗体试剂的多种技术手段中,2-D 电泳和 western 印迹是目前用于观察总 HCP 群体并评估抗 HCP 多克隆抗体试剂的免疫覆盖 (immunocoverage) 百分比的金标准 (5, 6)。该评价的标准工作流由如下四个步骤组成。首先,在重复凝胶中进行宿主细胞蛋白制备物的 2-D 电泳 (2DE)。第二,进行了 2DE 之后的一块凝胶经处理用于通过敏感蛋白质染料进行总蛋白检测。第三,将来自重复的 2DE 凝胶的蛋白质转移至固体支持膜如硝化纤维素或 PVDF,以供采用所评价的多克隆抗 HCP 抗体进行 western 印迹。第四,将来自 2-D 电泳和 western 印迹膜的图像重叠来获得匹配率,以确定通过抗 HCP 抗体可测得的宿主细胞蛋白的百分比。尽管广泛使用,该工作流的费时费力的特点,以及在重复的 2DE 分析之间进行比较的固有实验变异性会影响最终结果的整体可靠性。后者进而会使对纯化的生物物质进行有效 HCP 杂质分析的下游决策复杂化,包括对抗 HCP 抗体漏检的潜在蛋白质杂质的鉴定,以及用于监测这些杂质的正交方法的开发。

[0089] 为了提高抗 HCP 抗体评价的可靠性,并且促进对于有效 HCP 杂质分析的下游决策,我们在此提供对标准 2-D 电泳和 western 印迹工作流的强化。此外,我们将这些强化作为模型示例应用,以评价市售可得的抗 HCP 抗体试剂。

[0090] 材料与方法

[0091] 材料

[0092] 以下材料购自伯乐公司 (Bio-Rad Laboratories): ReadyPrep™2-D 清理试剂盒、ReadyPrep™再水合 / 样品缓冲剂、ReadyStrip™IPG 试条、Criterion™凝胶、Trans-Blot®

Turbo™PVDF 转移包、Bio-Safe™考马斯、Oriole™荧光凝胶染剂、SYPRO® Ruby 蛋白质印迹染料、印迹级封闭剂,以及 Clarity™Western ECL 底物。NuPage®凝胶购自生命技术公司 (Life Technologies)。超滤蛋白质浓缩物 / 缓冲剂交换柱购自萨托瑞斯公司 (Sartorius)。细胞培养基购自 GIBCO 公司。购自天鹅技术公司 (Cygnus Technologies) 的针对 CHO 蛋白质的抗 HCP 抗体 (3G-0016-PA) 用作一抗;购自圣克鲁兹生物技术公司 (Santa Cruz Biotechnology) 的偶联有 HRP 的牛抗山羊抗体用作二抗。

[0093] 样品制备

[0094] 冷冻大鼠肝脏 (Pel-Freez Biological) 提取在组成为 8M 尿素、4% CHAPS、40mM DTT、0.2% Bio-Lyte®两性电解质 3-10 的溶液中。提取之后,样品以 14,000g 离心 15 分钟,并收集上清液用于 2-D 电泳。这些样品用于确定凝胶化学条件对采用 Trans-Blot® Turbo™系统跨等电点 (pI) 和分子量的转移效率的影响。

[0095] 使 CHO-K1 细胞的贴壁培养物适应由 95% 的无蛋白限定培养基 (GIBCO) 和 5% 的补充有 10% PBS 的汉氏培养基组成的培养基。处理细胞以收集总蛋白 (通过在 7M 尿素 / 2M 硫脲中超声处理,然后通过离心使其澄清) 或分泌蛋白 (通过将细胞转移至 100% 无蛋白限定培养基)。分泌的蛋白质通过 100- 倍离心浓缩 (10,000MWC) 来制备,用 ReadyPrep™2-D 清理试剂盒处理,然后在 8M 尿素中重悬。CHO-K1 源性的样品用于开发 2DE&WB workflow,并评价抗 CHO HCP 抗体。

[0096] 2-D 电泳,蛋白质转移,总蛋白质染色,和 western 印迹

[0097] 对于大鼠肝脏样品,采用 11cm pH 5-8ReadyStrip™IPG 试条,利用标准 IEF 条件,进行第一向分离。第二向分离采用 Novex® Bis-Tris (4-12) %、Novex® Tris-甘氨酸 (4-12) %、Criterion® TGX™Any kD™或 Criterion® Tris-HCl (8-16) % 凝胶进行,并采用 Trans-Blot® Turbo™系统转移至 PVDF 膜。在蛋白质转移之后,印迹用 SYPRO® Ruby 印迹染料染色,并采用 VersaDoc™4000 成像系统观察。为了观察留在 2D 凝胶 (即,未转移的) 蛋白质,凝胶用 Biosafe™考马斯染料染色,并在 Molecular Imager® GS-800™校准的光密度器上扫描。

[0098] 对于中国仓鼠卵巢 (CHO-K1) 细胞源性的样品,采用“凝胶侧向上 (gel-side up)”模式的 PROTEAN® i12™IEF 试槽,用 150 μg 总蛋白在 11cm ReadyStrip™pH3-10NL 试条上进行第一向分离。CHO 分泌样品溶液为 8M 尿素、4% CHAPS、40mM DTT 和 0.2% Bio-Lyte 3/10 载体两性电解质;对于 CHO 细胞裂解物,前述样品溶液中的 8M 尿素用 7M 尿素、2M 硫脲替代。第二向分离采用 Criterion® TGX™Any kD™凝胶进行。

[0099] 在 CHO-K1 样品的 2DE 之后,凝胶用 Oriole™荧光凝胶染料染色,或采用 Trans-Blot® Turbo™系统转移至 PVDF。转移之后,凝胶用 Oriole™荧光凝胶染料染色 (以观察留在凝胶上的蛋白质)。印迹用 SYPRO® Ruby (用于总蛋白质染料) 染色,并成像。之后,对其直接进行封闭处理 [采用 5% 印迹级封闭剂,即,脱脂干燥奶粉溶于补充有 0.05% 吐温 20 的 Tris- 缓冲的盐水 (TTBS) 中],然后在抗 HCP 抗体 (一抗在 TTBS 中以 1:150 稀释) 和偶联有 HRP 的二抗 (在 TTBS 中以 1:3000 稀释) 的优化条件下进行免疫检测。清洗多次 (6 次,每次 5 分钟) 之后,采用 Clarity™Western ECL 底物对 western 印迹进行化学

发光显色。

[0100] 图像捕捉和重叠分析

[0101] 采用 ChemiDoc™MP 成像器观察通过 2-D 电泳（染色凝胶和印迹的荧光图像）和 western 印迹（化学发光图像）处理的 CHO-K1 样品。对于图像重叠分析或斑点计数，采用 PDQuest™2-D 分析软件。在 PDQuest™上生成‘主凝胶’，其包括在 2-D 电泳和 western 印迹分析上检测到的全部斑点，而‘匹配率’表达为采用下式确定的百分数：

[0102] 匹配率百分数 = $[100 * (\text{在 western 印迹上检测到的斑点}) / (\text{在‘主凝胶’上检测到的斑点})]$ 。

[0103] 结果和讨论

[0104] 影响标准 2-D 电泳和 western 印迹 workflow 可靠性的因素

[0105] 在对用于评价抗 HCP 抗体的 2-D 电泳 (2DE) 和 western 印迹的工作流改进方案的设计中，我们初始确定了标准工作流中的误差可能，其中宿主细胞蛋白 (HCP) 制备物的重复 2DE 凝胶经处理用于平行进行的两种分析：i) 一块 2DE 凝胶上宿主细胞蛋白的总蛋白质染色，和 ii) 从重复 2DE 凝胶转移至固体支持膜的 HCP 的 western 印迹（采用抗 HCP 抗体）。将两种分析的图像重叠，以获得“匹配率”- 定义为通过抗 HCP 抗体可检测到的 HCP 的百分数。然而，如果在两个重复 2DE 分析之间存在显著变异性，或者 2DE 之后的蛋白质向 western 印迹膜的转移不够有效，则其会造成错误的匹配率估值。因此，这些因素 - 2DE 重复分析之间的变异性 and 蛋白质转移效率，均会影响采用标准 2-D 电泳和 western 印迹 workflow 获得的最终结果的可靠性。

[0106] 为了测试重复 2DE 凝胶之间的可能的变异性的程度，我们最初对等同含量的相同数量 (150 μ g) 的 CHO 细胞分泌蛋白进行了三个重复 2DE 分析，并对其进一步处理（图 1）。在 2DE 之后，凝胶同样用 Oriole 荧光染剂染色并处理用于斑点计数，并采用 PDQuest™ 软件在相同设置下进行匹配。如图 1（左图和底部表格）所示，2DE 重复物看来在定量上相似，并且斑点数量在各重复之间大致相同（分别为 435、449 和 454 个斑点）。

[0107] 为了更严密地测定各个 2DE 重复之间的变异性，我们产生了‘主凝胶’，即虚拟参比凝胶，其包含来自三个重复的全部检测的斑点，并进行各个重复与该主凝胶之间的重叠分析（图 1，右图）。为保持一致，全部图像在相同设定下分析，并且不进行手动斑点修改。我们推断，如果 2DE 重复彼此近似相同（按各自的可检测斑点数量相对相似所提示），则 2DE 重复和主凝胶之间的重叠应得到近乎 100% 的匹配率。然而，如图 1（右图和底部表格）所示，各重复上有显著数量的所测得斑点与主凝胶不匹配，导致各比较的‘匹配率’为 70%、72% 和 73%。此外，全部三块 2DE 重复分析胶之间共有的斑点数量甚至更少（289 个斑点；图 1 底部），指示重复 2DE 分析胶之间的显著变异性。这些结果强调了 2-D 电泳和 western 印迹的标准工作流中的匹配率测定存在显著误差可能，所述标准工作流中重复 2DE 分析胶分别就总蛋白质染色和 western 印迹作处理。因此，应避免采用两个不同的（即便是重复的）2D 凝胶，以使凝胶与凝胶之间的斑点计数差异最小化。为使最终结果可靠，希望进行 2DE 之后的总蛋白质染色，以及在确保从 2-DE 凝胶有效转移蛋白质之后在相同膜上进行 western 印迹。

[0108] 如上所述，2DE 分析之后的蛋白质转移效率是 2-D 电泳和 western 印迹结果的可靠性的另一个重点考虑方面。蛋白质转移效率可能会被如下因素影响：a) 所用的转

移系统 / 方法 [例如 : 湿法转移系统 (tank transfer system) 对比更快速的半干转移 / **Trans-Blot® Turbo** 系统, 以及所用的相关缓冲剂] 和 b) SDS-PAGE 凝胶化学条件。半干转移系统的速度使其成为具有吸引力的选择 ; 然而, 重要的是这些不会影响跨越整个蛋白质等电点 (pI) 和分子量范围的转移效率。此外, 该评价需要在 SDS-PAGE 化学条件可能影响的环境下进行。因此, 我们采用 **Trans-Blot® Turbo™** 系统评价四种不同的 SDS-PAGE 化学条件对转移效率的影响。鉴于我们手头的 CHO 源性材料的量有限, 我们采用大鼠肝脏裂解物 (作为具有宽范围等电点和分子量的蛋白质的模型复杂混合物) 用于接下来描述的这些实验。

[0109] 采用 pH 5-8IPG 试条, 通过等电聚焦 (第 1 向), 进行相同量的大鼠肝脏裂解物的平行解析 (图 2)。随后, 其各自采用待评价对转移效率的影响的四种 SDS-PAGE 化学条件之一进行第二向的解析 : **Novex® Bis-Tris (4-12) %**、**Novex® Tris-甘氨酸 (4-12) %**、**Criterion® TGX™ Any kD™**, 和 **Criterion® Tris-HCl (8-16) %** 凝胶。2DE 之后, 采用 **Trans-Blot® Turbo™** 系统以 25V/2.5A 用时 7 分钟将蛋白质转移至 PVDF 膜。为了观察转移至 PVDF 的蛋白质, 膜采用 **SYPRO® Ruby** 染色, 而为了观察留在各凝胶上 (即, 未转移至 PVDF) 的蛋白质, 凝胶用 **Bio-Safe™** 考马斯染色。如图 2 所示, 在与其它凝胶化学条件相比较时, 转移后 **Criterion® TGX™** 凝胶基本不具有考马斯反应性斑点, 指示跨越 pI 和分子量的高度有效的蛋白质转移效率。

[0110] 前述结果证明, 为了 2-D 电泳和 western 印迹 workflow 最终结果的可靠性, 希望进行 2DE 后的总蛋白检测, 并在相同膜上进行 western 印迹分析, 并且描述供于 ‘相同膜’ 分析的高度有效的 2-DE 后蛋白质转移所需的 SDS-PAGE 凝胶化学条件和蛋白质转移系统的最佳组合。

[0111] 供于 ‘相同膜’ 2-D 电泳和 western 印迹分析的相容方案

[0112] 接着, 我们考虑可能与相同膜 2DE 总蛋白检测和后续 western 印迹相容的方案。考虑了两种方案 : (1) 对 HCP 混合物进行最少的荧光染料标记 (例如电中性 Quasar/Cye 染料或等同物), 然后进行化学发光或荧光 western 印迹, 和 (2) 进行可逆的敏感、非共价的蛋白质染色 (例如 **SYPRO® Ruby** 荧光染料), 从而与 western 印迹应用相容 (7)。

[0113] 在这两种方案中, 对 HCP 混合物进行荧光最少染料标记的灵敏度可能是 **SYPRO® Ruby** 染色的约 5 倍 (8)。然而, 前一种方案也产生两个蛋白质混合物群 : 带染料标记 (和导致蛋白质的分子量和 / 或 pI 的小幅变化的共价修饰) 的那些和未标记 (从而 pI 和分子量上均未改变) 的那些。蛋白质复杂性上这一 2 倍增加使 2DE 凝胶的总体解析度有效降低到原来的约 1/2, 促使采用较大尺寸的 2DE 凝胶。采用较大尺寸的凝胶将总体 2-D 电泳和 western 印迹 workflow 延长至约 4-5 天, 这需要为有效蛋白质转移作大量优化, 且需要更小心的手工操作。此外, 蛋白质的共价修饰 (通过荧光染料标记) 可能会影响其针对抗 HCP 抗体的免疫原性, 这有可能影响实验所确定的匹配率的准确性。

[0114] 鉴于上文概述的染料标记的种种限制, 我们优选第二种方案 : 转移至 PVDF 膜的 HCP 用 **SYPRO® Ruby** 非共价、可逆染色, 然后采用抗 HCP 抗体进行 western 印迹。我们推断, **SYPRO® Ruby** 的预期的较低灵敏度可通过起始采用较高量的 HCP 混合物进行 2DE

来克服（相较采用最少的荧光染料标记方案的蛋白质用量或 11cm IPG 试条约 150 μg 蛋白质的用量增加约 5 倍）。此外，由于采用该方案，2DE 解析度未见有效降低，于是我们能够采用中等尺寸的 2DE 凝胶构造，其经优化用于快速、有效的蛋白质转移（11cm IPG 试条，**Criterion®** TGX Any kD™凝胶和 **Trans-Blot®** Turbo™；图 2），以及理顺的 2-D 电泳和 western 印迹 workflow（总计约 2 天）。最后，由于 **SYPRO®** Ruby 是可逆的（即，不共价修饰蛋白质（7），与染料标记不同），其不会影响在研蛋白质的免疫原性，因此允许准确的匹配率确定。

[0115] 用于评价抗 CHO HCP 抗体的‘相同膜’ 2-D 电泳和 western 印迹分析的应用

[0116] 接着，我们采用上文所述且在图 3 中概述的我们的 2-D 电泳和 western 印迹 workflow，用于评价市售可得的针对两种 CHO 源性的样品（CHO 总蛋白和分泌的蛋白质）的抗 CHO 抗体试剂。简言之，采用用于第一向 IEF（11cm pH3-10NL ReadyStrip™IPG 试条）和第二向电泳（**Criterion®** TGX™Any kD™凝胶）的优化条件对各样品进行单一 2DE 分析。2DE 之后，采用 **Trans-Blot®** Turbo™在 <10 分钟的时间内将蛋白质转移至 PVDF 膜。为了监测转移的效率，转移后的凝胶用 Oriole 荧光凝胶染剂染色（9），并与相同染色的各样品的重复 2DE 凝胶做比较。转移至 PVDF 的蛋白质通过 **SYPRO®** Ruby 荧光蛋白染色观察，随后处理以采用抗 CHO 抗体和偶联有 HRP 的二抗进行化学发光 western 印迹。图像在多功能 ChemiDoc™MP 成像器上获得；斑点匹配和图像比对用 PDQuest™2-D 分析软件完成。图 4 显示 CHO 总蛋白（图 4A）和 CHO 分泌蛋白（图 4B）样品来自上述 2-D 电泳和 western 印迹的工作流中各步骤的图像。

[0117] 相对于用于抗 HCP 抗体评价的标准 2-D 电泳和 western 印迹过程而言，本文所述的工作流的关键益处可包括但不限于如下一项或多项：首先，相同膜分析不仅克服了 2DE 重复之间的再现性问题，还允许通过 2-D 分析软件进行具有高置信度的斑点匹配和图像比对。其次，快速（<10 分钟）高效的蛋白质转移，在转移后凝胶上不残留可检测的蛋白质（图 4A、4B；将 Oriole 荧光凝胶染色的重复 2DE 凝胶与转移后凝胶做比较），提高了下游分析的完全性。第三，荧光非共价的蛋白质染色和化学发光 western 印迹分析获得了高灵敏度蛋白质检测，同时不损失 2DE 解析度，或者排除了错误匹配率估值（因为用荧光染料共价标记可能会出现改变的 HCP 免疫原性）的可能。第四，采用相同成像器用于两种分析产生了直接可比的高分辨图像。第五，整个 workflow 在 <2 天的时间内产生高置信度结果。

[0118] 如图 5 所示，采用针对 CHO 分泌蛋白的抗 CHO HCP 抗体获得 47% 的匹配率，相比之下，对于总蛋白获得 20% 的匹配率，匹配率采用下式获得：

[0119] 匹配率百分数 = $[100 * (\text{在 western 印迹上检测到的斑点}) / (\text{在‘主凝胶’上检测到的斑点})]$

[0120] ‘主凝胶’包括在 2DE 和 western 印迹分析上检测到的全部斑点，并且采用我们的 2-D 分析软件自动生成。理论上，如果将分子（即，western 印迹上检测到的斑点）仅除以在 2DE **SYPRO®** Ruby 印迹上检测到的斑点总数，可获得较高匹配率（尤其对于 CHO 分泌的蛋白质样品）。然而，由于存在这样一些斑点：其在总蛋白印迹中不可见，而仅在 western 印迹上检测到（例如，对于 CHO 分泌的样品，有 76 个额外斑点；参见图 5 左图），所以希望在分母中考虑这些仅在免疫方法测得的斑点，以代表样品中存在的总蛋白质。因此，在一些

实施方式中,可避免通过将 western 印迹上的斑点总数除以仅在 2DE 中所见的总斑点(即,图 5 中的 SYPRO® Ruby/总蛋白质印迹)来估计匹配率,而是采用上文所述的公式。

[0121] 鉴于由供应商生产的抗体针对释放进入生长培养基的蛋白质,可预期 CHO 分泌蛋白样品对比 CHO 总蛋白样品具有较高匹配率。采用与供应商所用来产生抗体的那些或免疫纯化的那些更为类似的样品有可能进一步提高匹配率,但本文中并没有这样做,因为我们首要关注的是开发需要的改善方案以用于抗 HCP 抗体的可靠评价。以速度和置信度进行这些评价对于研究者而言是重要的,因为其允许对如何最优地监测在生物物质的杂质分析过程中被其抗 HCP 抗体/HCP ELISA 漏检的可能的蛋白质杂质做出下游决定。

[0122] 结论

[0123] 本文提供了用于对抗 HCP 抗体进行高度可靠评价的理顺的 2-D 电泳和 western 印迹 workflow,其能够在 <2 天的时间内完成。在该 workflow 中实现的提高的置信度和速度归因于:避免了重复 2DE 分析,采用中等尺寸的 IPG 试条和 SDS-PAGE 凝胶,2-DE 之后快速并高效的蛋白质转移,和为了斑点匹配的可靠性在相同膜上进行高灵敏的(荧光)总蛋白质染色以及化学发光 western 印迹。此外,因为蛋白质维持在未经化学修饰的状态(不像其它替代性方案,例如荧光染料标记),所以蛋白质对于抗 HCP 抗体的免疫原性没有损失,也没有与最少共价标记策略相关联的样品解析度的任何损失。后者(即,没有解析度损失)也有利于采用中等尺寸的 2DE 凝胶,其进一步加速了整个 workflow。作为概念验证,我们的 workflow 被用于可靠地评价了针对 CHO 总蛋白和分泌蛋白样品的市售可得的抗 CHO HCP 抗体。

[0124] 参考文献

[0125] 1. ICH Q6B: Specifications-Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products(《ICH Q6B: 说明-用于生物技术/生物产品的测试程序和验收标准》)。

[0126] 2. Leslie C. Eaton, (1995) Host cell contaminant protein assay development for recombinant biopharmaceuticals(用于重组生物药物的宿主细胞污染物蛋白试验开发). Journal of Chromatography A 705, 第 105-114 页。

[0127] 3. Xin Wang, Alan K. Hunter, Ned M. Mozier (2009) Host Cell Proteins in Biologics Development(生物物质开发中的宿主细胞蛋白质). Biotechnology and Bioengineering 103, 第 446-458 页。

[0128] 4. Jane C Robinson (2013) Host cell protein workshop at the 2012 annual bioassay meeting of the biopharmaceutical emerging best practices association (BEBPA) (生物制药学新兴最佳实践协会 2012 年度生物试验会议宿主细胞研讨会). Bioanalysis 5, 第 407-410 页。

[0129] 5. Edward Savino, B. H., Jason Sellers, Andrea Sobjak, Nathan Majewski, Sandra Fenton 和 Tong-Yuan Yang (2011) Development of an in-house process-specific ELISA for detecting HCP in a therapeutic antibody(用于检测治疗抗体中 HCP 的内部处理专用 ELISA 的开发). Bioprocess International, 第 38-47 页。

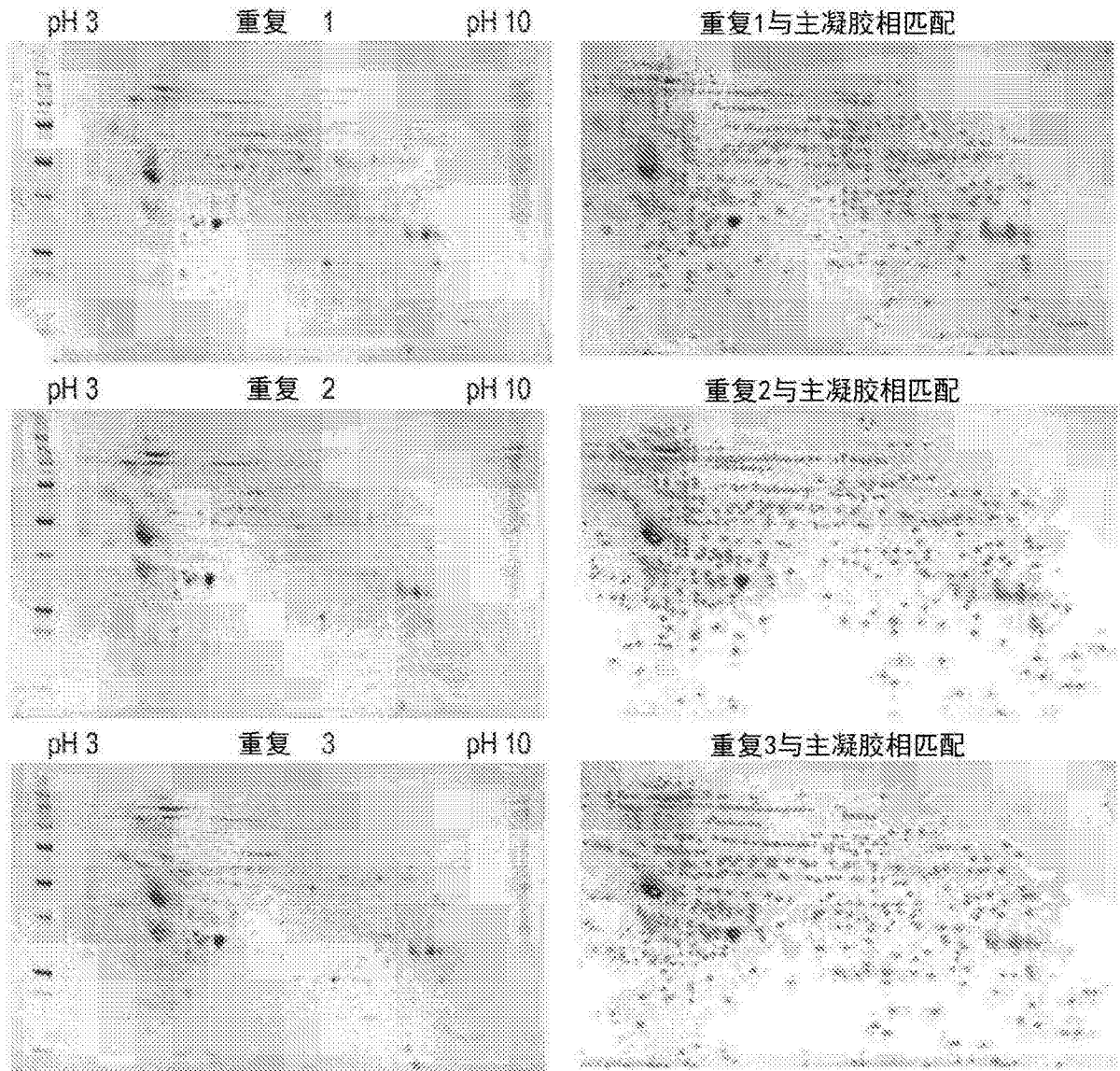
[0130] 6. Rellahan, B. (2013) Process related impurities and their impact on product quality-an FDA perspective and recommendations(加工相关的杂质及其对产品质量的影响-FDA 观点与推荐). WCBP 2013, CASSS, Washington DC ; <http://www.casss>.

org/associations/9165/files/Barbara%20Rellahan%20%20%20Impurities%204.pdf.

[0131] 7. Kiera Berggren, T. H. S., Wendy M. Lauber, James A. Carroll, Mary F. Lopez, Elena Chernokalskaya, Lynn Zieske, Zhenjun Diwu, Richard P. Haugland 和 Wayne F. Patton(1999)A luminescent Ruthenium complex for ultrasensitive detection of proteins immobilized on membrane supports(用于固定在膜支持物上的蛋白质的超敏检测的发光钌络合物). Analytical Biochemistry 276, 第 129-143 页.

[0132] 8. Anne Luise Tscheliessnig, J. K., Ron Bates 和 Alois Junbauer(2013) Host cell protein analysis in therapeutic protein bioprocessing-methods and applications(治疗性蛋白质生物处理中的宿主细胞蛋白质分析-方法与应用). Biotechnology Journal 8, 第 1-16 页.

[0133] 9. Tom Berkelman and John Walker. (2010) Oriole fluorescent gel stain: characterization and comparison with SYPRO Ruby gel stain (Oriole 荧光凝胶染料: 表征并与 SYPRO Ruby 凝胶染料做比较). Bio-Rad Laboratories, Technote5921Rev A.



+检测的斑点 (与主凝胶) 匹配的斑点

	检测到的 斑点计数	(与主凝胶) 匹配的斑点计数	匹配率 (%)
重复1	435	305	70%
重复2	449	323	72%
重复3	454	331	73%

全部三个重复共有的斑点=289

图 1

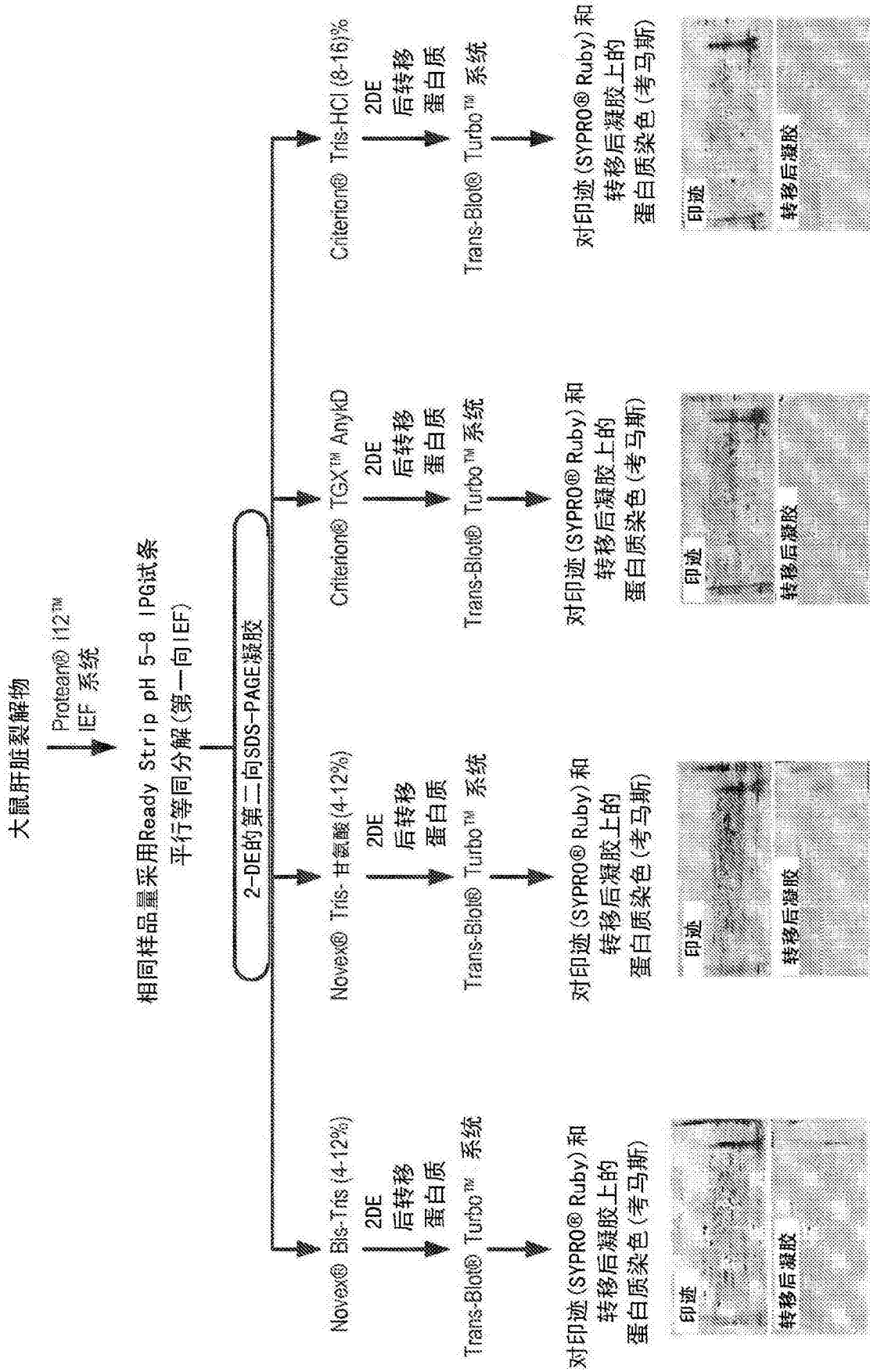


图 2

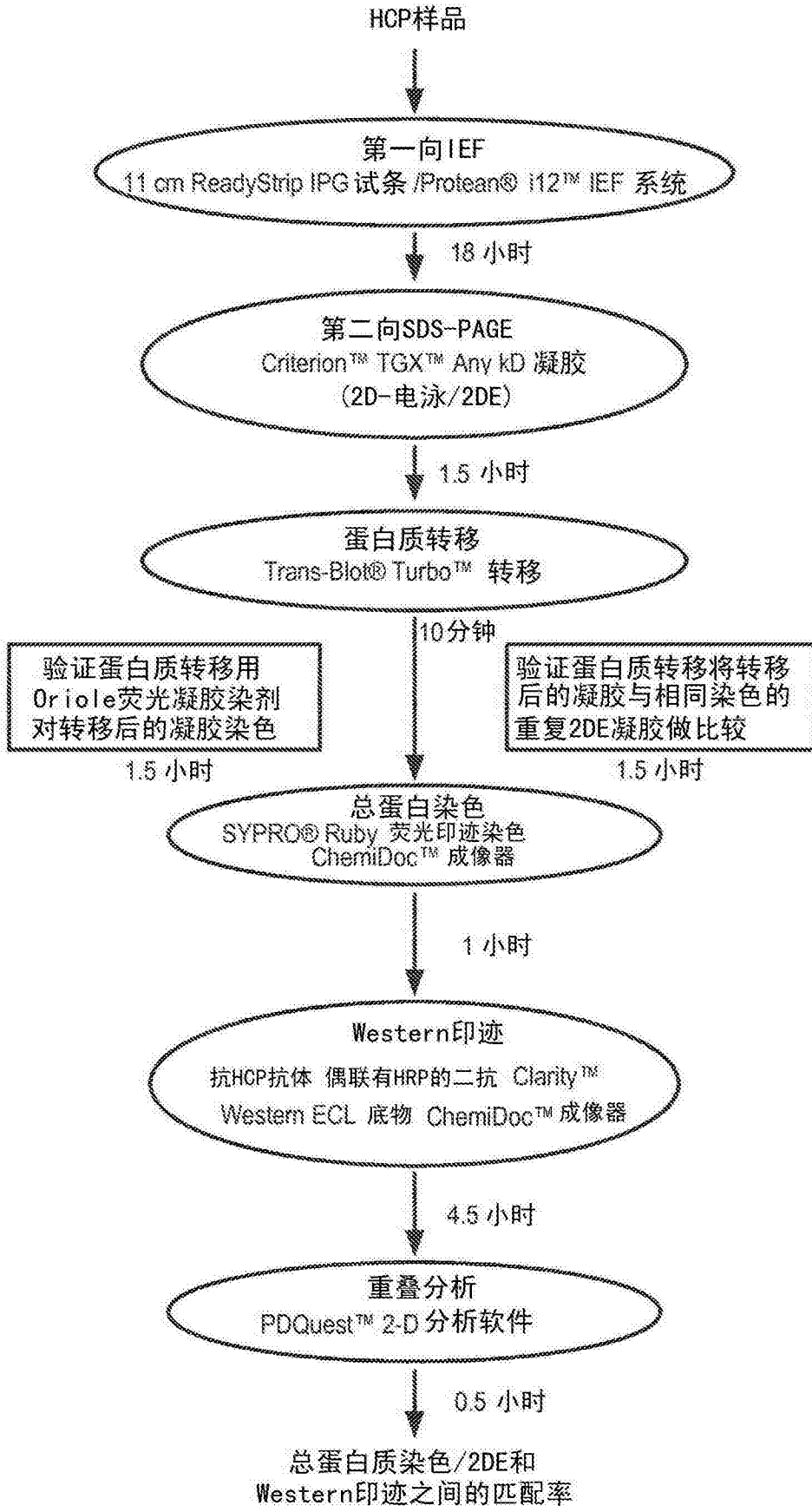


图 3

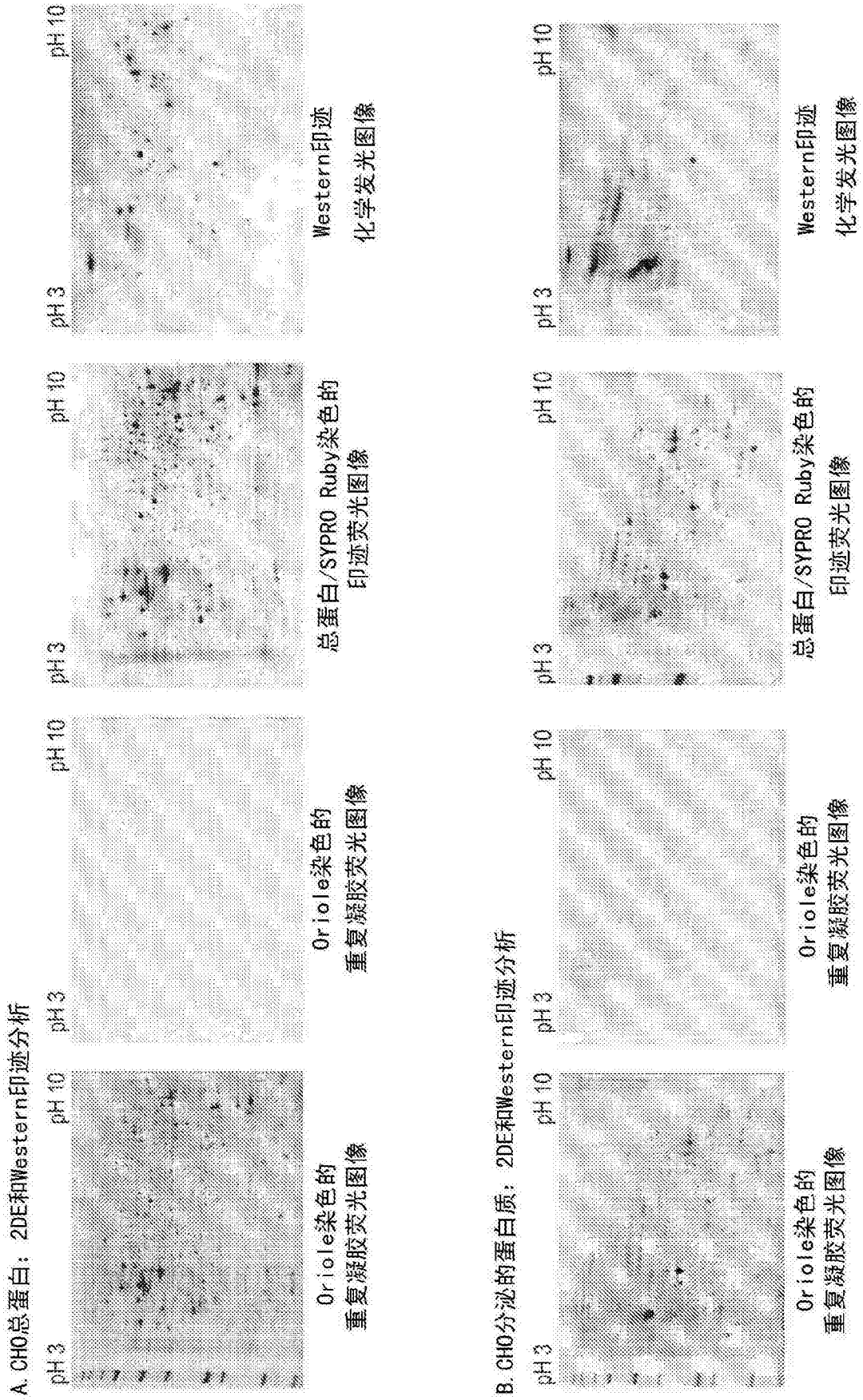
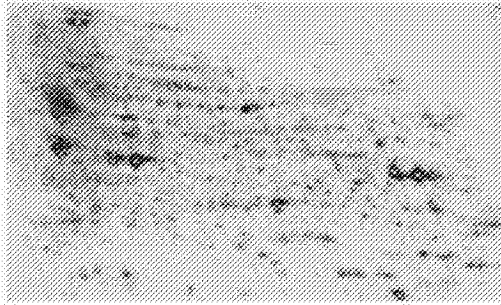
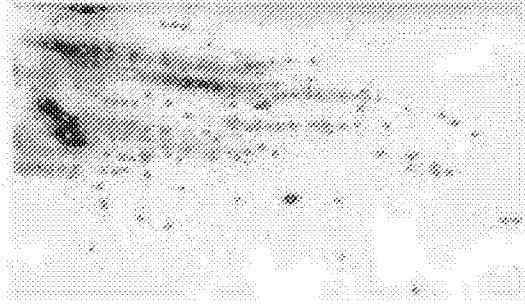


图 4

CHO分泌的
蛋白质Sypro Ruby印迹



CHO分泌的蛋
白质Western印迹



+检测的斑点 X匹配的斑点

与CHO分泌的蛋白质的匹配率

采用SYPRO Ruby检测的斑点(总蛋白质印迹)=354

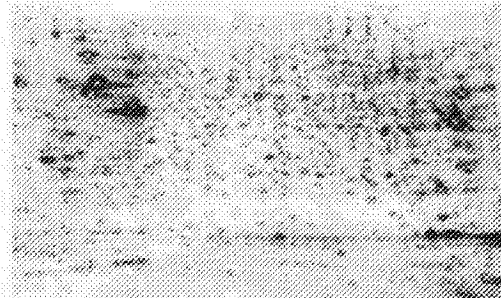
采用抗HCP抗体检测的斑点(Western印迹)=204

两种方法之间匹配的斑点=128

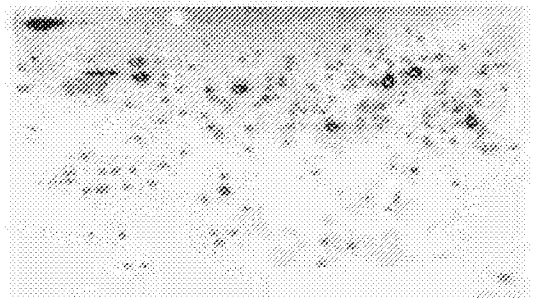
两种方法中检测的斑点(即,主凝胶)=430

匹配率%=[100*(在Western印迹上检测的斑点)/(在主凝胶上检测的斑点)]
=100*(204/430)=47%

CHO总蛋白质Sypro Ruby印迹



CHO总蛋白质Western印迹



+检测的斑点 X匹配的斑点

与CHO总蛋白质的匹配率

采用SYPRO Ruby检测的斑点(总蛋白质印迹)=826

采用抗HCP抗体检测的斑点(Western印迹)=173

两种方法之间匹配的斑点=154

两种方法中检测的斑点(即,主凝胶)=845

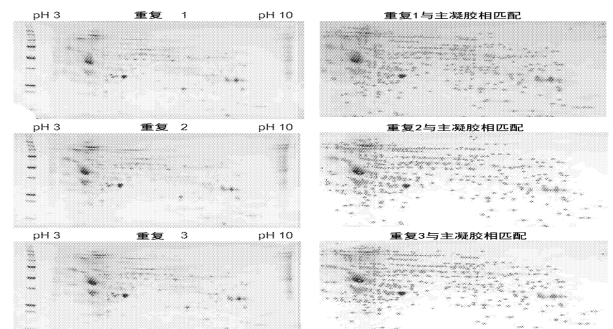
匹配率%=[(在Western印迹上检测的斑点)/(在主凝胶上检测的斑点)]
=100*(173/845)=20%

图 5

专利名称(译)	采用非干扰性蛋白质染剂的HCP抗血清验证		
公开(公告)号	CN105339796A	公开(公告)日	2016-02-17
申请号	CN201480036585.0	申请日	2014-11-12
[标]申请(专利权)人(译)	比奥-雷德实验室股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	生物辐射实验室股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	生物辐射实验室股份有限公司		
[标]发明人	T伯克曼		
发明人	T·伯克曼		
IPC分类号	G01N33/566 G01N33/53 G01N33/00		
CPC分类号	G01N33/6842 G01N1/30 G01N33/15 G01N33/6803 G01N2001/302 G06T7/337		
代理人(译)	杨昀		
优先权	61/903234 2013-11-12 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供用于验证检测生物制备物中的污染性宿主细胞组分的免疫学检测试剂的方法和组合物。



	检测到的斑点计数	(与主凝胶)匹配的斑点计数	匹配率 (%)
重复 1	435	305	70%
重复 2	449	323	72%
重复 3	454	331	73%

全部三个重复共有的斑点=289