

# 重组人淋巴细胞功能相关抗原 3 抗体融合蛋白质量控制方法与质量标准研究

高 凯<sup>1</sup>, 韩春梅<sup>1</sup>, 丁有学<sup>1</sup>, 侯 盛<sup>2</sup>, 饶春明<sup>1</sup>, 王军志<sup>1\*</sup>

(1. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050; 2. 第二军医大学 肿瘤研究所, 上海 200433)

**摘要:** 研究建立重组人淋巴细胞功能相关抗原 3 抗体融合蛋白 (rhLFA3-IgG1) 质量控制方法和质量标准。采用针对 Jurkat 细胞表面 CD2 分子的竞争结合试验测定融合蛋白的体外活性, 以分子筛和离子交换色谱分别确定制品纯度, 将制品还原、羧甲基化后再以胰蛋白酶裂解并经反相高效液相色谱进行肽图分析, 采用 ELISA 法分别测定蛋白 A 与 CHO 宿主细胞蛋白残留量。建立了重组人淋巴细胞功能相关抗原 3 抗体融合蛋白生物学活性、理化特性与残留杂质等质量控制方法和质量标准。所建立的质量控制方法和质量标准具有保证产品安全有效、质量可控的特点, 可用于重组人淋巴细胞功能相关抗原 3 抗体融合蛋白 (rhLFA3-IgG1) 的质量控制与产品检定。

**关键词:** 重组人淋巴细胞功能相关抗原 3 抗体融合蛋白; 质量控制; 自身免疫疾病

中图分类号: R917.796 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2007)07-0762-06

## Quality control methods and requirements for recombinant human lymphocyte function associated antigen 3 IgG1 fusion protein (rhLFA3-IgG1)

GAO Kai<sup>1</sup>, HAN Chun-mei<sup>1</sup>, DING You-xue<sup>1</sup>, HOU Sheng<sup>2</sup>, RAO Chun-ming<sup>1</sup>, WANG Jun-zhi<sup>1\*</sup>

(1. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China;

2. Institute of Cancer Research, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**Abstract:** To establish methods and requirements for quality control of rhLFA3-IgG1, biological potency of rhLFA3-IgG1 was determined by CD2 molecule competitive binding assay on Jurkat cell surface. Purity of rhLFA3-IgG1 was analyzed by SEC-HPLC and IEC-HPLC. Peptide mapping was performed by tryptic digestion and RP-HPLC after sample reduced and carboxymethylation by DTT and indoacetic acid, respectively. CHO host cell protein and Protein A residual were detected by ELISA separately. The quality control methods and requirements, such as biological potency, the physical-chemical characteristic of rhLFA3-IgG1 had been established. The methods and requirements for quality control of rhLFA3-IgG1 showed advantages of assuring the products safety and efficacy, which can be used for routine quality control of rhLFA3-IgG1.

**Key words:** recombinant human lymphocyte function associated antigen 3 IgG1 fusion protein (rhLFA3-IgG1); quality control; autoimmune disease

银屑病 (psoriasis) 又称牛皮癣, 是一种常见的自身免疫病, 因病变皮肤表面覆盖多层增厚、干燥的

银白色鳞屑得名, 发病率为世界人口的 2.5% 左右<sup>[1]</sup>。银屑病还可在关节、肌腱或韧带出现病变, 所引起的关节炎还可导致约 42% 患者残疾<sup>[2]</sup>, 并严重影响生活质量。目前该病病因不明, 常用的治疗手段主要包括局部紫外线照射, 或采用甲氨喋呤、环孢霉素 A 等化学免疫抑制药物系统给药以达到缓解临床症状的目的<sup>[3-5]</sup>, 但这些治疗方式复杂, 毒副

收稿日期: 2006-12-28.

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2003AA2Z3480)。

\* 通讯作者 Tel: 86-10-67095408, E-mail: wangjz@nicpbp.org.cn

作用大,并需要不断调整给药剂量,因此导致病程反复发作。近年来随着对银屑病免疫发病机制的不断了解,使通过更加安全有效的生物技术手段治疗银屑病成为可能。研究表明 T 细胞增殖活化、迁移过程在银屑病的发病机制中起着重要的作用。T 淋巴细胞活化首先需要 T 细胞抗原受体 (TCR) 和抗原提呈细胞 (APC) 表面 MHC 抗原肽复合物结合,其次需要 T 细胞表面的辅助分子与 APC 细胞表面相应配体结合产生的共刺激信号,如果 T 细胞仅受到第一信号刺激而无辅助信号刺激,则可造成 T 细胞凋亡或在体内造成无反应性克隆。CD2/LFA3 (CD58) 途径是目前公认的共刺激通路之一,而参与病变损伤的大多为记忆效应 T 细胞, rhLFA3-IgG1 即是基于可特异与 T 淋巴细胞抗原 CD2 结合后,通过阻断 CD2/LFA3 共刺激信号,抑制 T 细胞活化、参与炎症调节并实现治疗的目的<sup>[6-8]</sup>。rhLFA3-IgG1 系利用分子生物学技术将人 LFA3 的胞外区与人免疫球蛋白 IgG1 Fc 段基因融合,并通过真核体系表达的糖基化融合蛋白, rhLFA3-IgG1 除可与 CD2 特异结合外,还具有免疫球蛋白体内半衰期长、组织穿透力强等特性。目前美国 Biogen 公司研制的 rhLFA3-IgG 融合蛋白 Alefacept (商品名 Amevive), 已于 2003 年 2 月得到 FDA 批准上市,用于中重度慢性银屑病治疗,我国有多家单位正在研制,已有一家申报临床研究,本文是对我国自行研制的 rhLFA3-IgG1 产品质量控制方法和质量标准的研究。

## 材料和方法

**仪器** BD 公司 FACS Calibur 流式细胞仪, CellQuest 分析软件; Waters 2690 HPLC 系统, 2487 紫外检测, Waters 2010 数据管理系统, ProteinPak 300 分子筛柱、TSKgel SP-5PW 离子交换柱、Vydac 218 TP54 反相色谱柱; Molecular Devices 公司 Spectra MAX 250 多功能酶标仪及 SOFT MAX 分析软件。

**药品与试剂** 胎牛血清、RPMI 1640, DMEM 培养液购自 Hyclone 公司; 人 T 细胞淋巴瘤 Jurkat 细胞由本实验室传代保存,以含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640/DMEM (1:1) 培养液,于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 饱和湿度条件下培养,并于上次传代 48 h 后用于生物学活性测定。异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的抗 CD2 单克隆抗体购自 BD Pharmingen 公司; 含 1% 胎牛血清的磷酸盐缓冲液 (PBSS) 使用前临时配制; rhLFA3-IgG1 原液 (批号 20031101) 由上海张江生物技术有限公司制备提供; rhLFA3-IgG1 参考品由申

报单位按中国药品生物制品检定所有关参考品要求,以及 2005 年版《中国药典三部》中“生物制品国家标准物质制备和标定规程”等相关技术文件制备 (10 mg·mL<sup>-1</sup>, 0.1 mL/支, -80 °C 保存)。生物学活性测定同型融合蛋白对照品采用中国药品生物制品检定所制备的重组人 TNFR-Fc 融合蛋白参考品。TPCK 处理的胰蛋白酶 (TPCK treated trypsin), 分析纯三氟醋酸 (TFA) 为 Sigma 公司产品; 分析纯乙腈 (ACN) 为 Fisher Scientific 公司产品。Protein A 与 CHO 宿主细胞蛋白残留含量酶联免疫测定 (ELISA) 试剂盒分别购自美国 Repligen 和 Cygnus Technologies 公司。抗 LFA3 (CD58)、人 IgG1 Fc 段抗体购自 R&D 公司; PD-10 脱盐柱购自 Amersham Pharmacia 公司; N-(2-乙酰氨基)-2-氨基乙磺酸、盐酸胍、碘乙酸购自 Sigma 公司。

**生物学活性测定方法** 首先以磷酸盐缓冲液 (PBS) 将参考品与待测样品预稀释至 3 750 μg·mL<sup>-1</sup>, 注意每次稀释倍数不超过 10 倍,再以 PBS 对已预稀释的参考品与待测样品进行连续的 3 倍梯度稀释,共做 13 个稀释度,每个稀释度设 2 个复管,置于 4 °C 备用。将传代后处于对数生长期的 Jurkat 细胞离心收获后,以 PBS 调整细胞密度至 2 × 10<sup>6</sup>·mL<sup>-1</sup>,并在每个流式管中加入细胞悬液 100 μL, 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min 后弃上清液备用。其次将各梯度稀释的参考品与待测样品分别加入含有 Jurkat 细胞沉淀的备用流式管中,每管 100 μL。空白对照管加入 PBS 100 μL, 阴性对照加入 3 750 μg·mL<sup>-1</sup> TNFR-Fc 同型融合蛋白对照品 100 μL, 轻轻振荡使细胞重悬,冰浴避光 15 min。然后用 PBS 将 FITC 标记的抗 CD2 单克隆抗体稀释至 2 μg·mL<sup>-1</sup>, 每管加入 100 μL 后冰浴避光 45 min 进行反应。500 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min 后弃上清液,每管加入 PBS 2 mL 振荡、500 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min 后弃上清液洗涤细胞,重复两次,最后沉淀重悬于 PBS 300 μL 中,以流式细胞仪测定各管荧光强度,并计算荧光强度的几何均数,以蛋白浓度为横坐标,相对应的荧光强度的几何均数为纵坐标作图,选用四参数方程  $Y = (A - B) / [1 + (X/C)^D] + B$  回归拟合参考品与样品曲线 (拟合系数应大于 0.98)。根据该方程,  $X = +\infty$  时,  $Y = B$ , 即最低限; 当  $X = 0$  时,  $Y = A$ , 即最高限; 而当  $X = C$  时,  $Y = (A + B) / 2$ , 即 C 值为半数有效浓度 EC<sub>50</sub>; 在计算获得参考品与待测样品的 EC<sub>50</sub> 值后,按公式: 样品活性 (%) = 参考品 EC<sub>50</sub> (μg·mL<sup>-1</sup>) / 待测品 EC<sub>50</sub> (μg·mL<sup>-1</sup>) × 100%

计算样品相对生物学活性。

高效液相色谱法测定纯度

分子筛法 (SEC-HPLC) 采用 ProteinPak 300 分子筛色谱柱; 流动相为  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ,  $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ , pH 7.4; 流速  $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 上样量  $20 \mu\text{L}$ ; 柱温  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 检测波长  $280 \text{ nm}$ ; 用 HPLC 系统工作站对实验结果进行数据处理, 用面积归一化法算出其纯度。

离子交换法 (IEC-HPLC) 通过改变色谱条件, 如流动相组成、离子强度、pH 和流速等因素, 最终确定色谱条件为采用 TSKgel SP-5PW 离子交换色谱柱; 流动相 A 液:  $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $140 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 1% 异丙醇, pH 7.0; 流动相 B 液:  $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $140 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ,  $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ , 1% 异丙醇, pH 7.0; A 液充分对柱平衡, 洗脱梯度为: 0 ~ 20 min, B: 0 ~ 100%; 21 ~ 30 min, B: 100%; 流速  $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 上样量  $20 \mu\text{L}$ ; 柱温  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 检测波长  $280 \text{ nm}$ ; 用 HPLC 系统工作站对实验结果进行数据处理, 用面积归一化法算出其纯度。

肽图分析 将样品还原、羧甲基化后进行胰蛋白酶水解, 并以反相液相色谱 (RP-HPLC) 法进行肽图分析。首先取待检样品和参考品溶液各  $100 \mu\text{L}$ , 分别加入  $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸胍缓冲液  $750 \mu\text{L}$ , 混匀后加入  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DTT 溶液  $20 \mu\text{L}$ , 并以  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 TrisHCl (pH 7.5) 补充至  $1.0 \text{ mL}$ , 于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴中振荡  $30 \text{ min}$  以还原样品。在已还原样品溶液中加入  $2.9 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  碘乙酸溶液  $20 \mu\text{L}$ , 于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴中振荡  $30 \text{ min}$  并以  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DTT 溶液  $100 \mu\text{L}$  终止羧甲基化反应。将已羧甲基化的样品溶液加入 PD-10 脱盐柱, 以含有  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ N}$ -(2-乙酰氨基)-2-氨基乙磺酸,  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2$  的水解缓冲液洗脱后, 按 50:1 的比例加入 TPCK 处理的胰蛋白酶,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴消化  $4 \text{ h}$ , 最后以 10% 三氟醋酸溶液  $20 \mu\text{L}$  终止消化反应。色谱条件: 采用 Vydac 218TP54 色谱柱; 流动相 A 液: 含 0.1% 三氟醋酸的水溶液, 流动相 B 液: 含 0.1% 三氟醋酸的乙腈溶液; 流速:  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 洗脱梯度为: 0 ~ 65 min, B: 5% ~ 70%; 上样量:  $100 \mu\text{L}$ ; 柱温:  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 检测波长:  $214 \text{ nm}$ 。

其他项目检测 鉴别实验分别采用抗人 CD58 单抗和抗人 IgG 两种抗体进行免疫印迹测定, 结果均应为阳性; 紫外吸收光谱、分子量、等电点、唾液酸

含量、外源 DNA、细菌内毒素等实验按《中华人民共和国药典三部》<sup>[9]</sup> 收录相关方法测定, Protein A 与 CHO 宿主细胞蛋白残留含量按相应试剂盒说明书进行。

结果

1 rhLFA3-IgG1 生物学活性测定

rhLFA3-IgG1 生物学活性测定采用细胞竞争结合试验原理, 即由于 rhLFA3-IgG1 融合蛋白的 LFA3 部分与 FITC 荧光标记的抗 CD2 单克隆抗体均可与人 T 淋巴瘤细胞系 Jurkat 细胞膜表面表达的 CD2 分子特异结合, 当荧光标记的抗 CD2 单抗无竞争地单独与细胞作用时, 在该结合曲线中荧光强度随着标记抗体浓度的升高而增强, 直至达到饱和, 标记抗体与细胞结合的量效曲线呈“S”形。而当 rhLFA3-IgG1 融合蛋白与荧光标记的抗 CD2 单抗竞争结合 Jurkat 细胞膜表面的 CD2 分子时, 在荧光标记抗体浓度固定条件下, 其结合曲线中荧光强度随着 rhLFA3-IgG1 融合蛋白浓度的增加而降低, 即荧光标记的抗 CD2 单抗与细胞膜表面的 CD2 分子结合逐渐减少, 因此量效曲线呈“反 S”形, 如图 1 所示, 并可在该条件下计算参考品与待测样品的  $EC_{50}$  值, 并且  $EC_{50}$  值越小则说明 rhLFA3-IgG1 融合蛋白与标记抗体的竞争能力越强, 即与细胞膜表面 CD2 分子的结合能力越强, 融合蛋白的生物学活性越好。经测定, 所获得荧光强度信号经四参数方程  $Y = (A - B) / [1 + (X/C)^D] + B$  拟合, 曲线拟合相关系数大于 0.99, 参考品与待测样品的  $EC_{50}$  平均值分别为  $3.33 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $2.93 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 经计算, rhLFA3-IgG1 原液 (批号 20031101) 相对于参考品的生物学活性为 114%, 结合曲线见图 1。

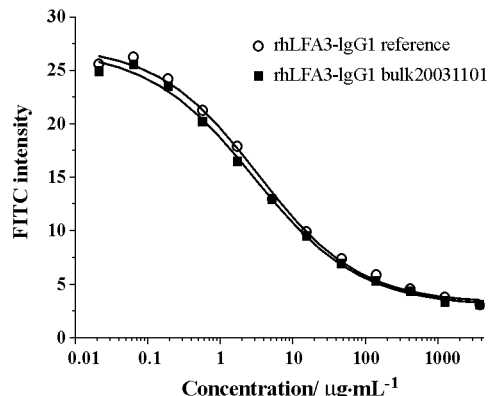
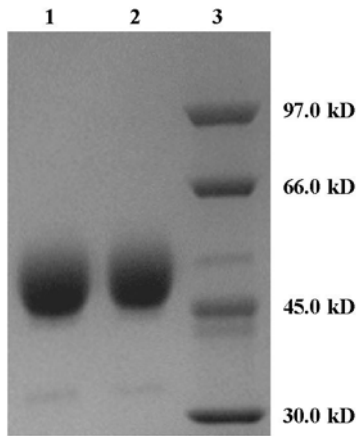


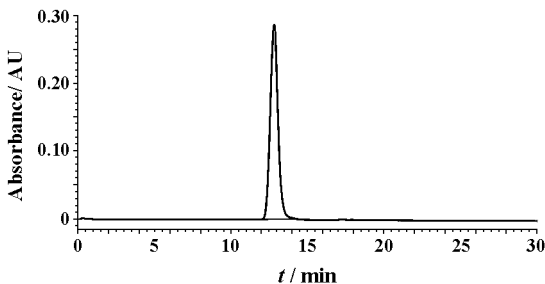
Figure 1 Jurkat cell competitive binding curve of rhLFA3-IgG1 against mAb CD2-FITC

## 2 rhLFA3-IgG1理化特性测定

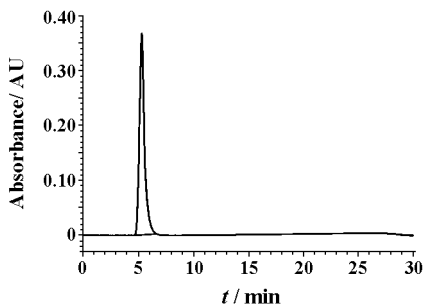
rhLFA3-IgG1 融合蛋白还原 SDS-PAGE 电泳纯度的测定结果为 98.2% (图 2); 经 SEC-HPLC 与 IEC-HPLC 分析, 纯度结果均为 99% 以上 (图 3、图 4); SDS-PAGE 电泳测定分子质量为 49.3 kD, 胰酶裂解法得到的 rhLFA3-IgG1 原液与其参考品的肽谱峰一致 (图 5); N 末端氨基酸序列测定中, 除 N 端第 12 个天冬酰胺残基参与形成 N 糖基化位点无法测出外, 其他氨基酸序列与理论值吻合。



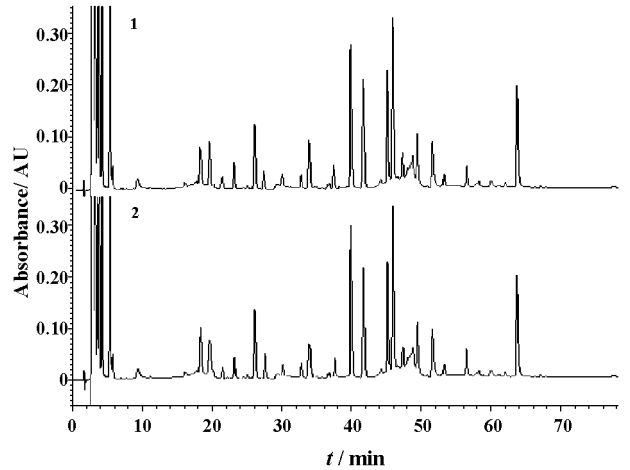
**Figure 2** rhLFA3-IgG1 purity and molecular weight analyzed by reduced SDS-PAGE. 1: Reference material; 2: rhLFA3-IgG1 bulk, batch No. 20031101; 3: Molecular weight marker



**Figure 3** rhLFA3-IgG1 purity analyzed by SEC-HPLC (rhLFA3-IgG1, bulk batch No. 20031101)



**Figure 4** rhLFA3-IgG1 purity analyzed by IEC-HPLC (rhLFA3-IgG1, bulk batch No. 20031101)



**Figure 5** Peptide mapping of rhLFA3-IgG1 by tryptic digestion analysis. 1: Reference material of rhLFA3-IgG1; 2: rhLFA3-IgG1, bulk batch No. 20031101

## 3 其他项目检测

样品经过免疫印迹法测定后, 与抗人 CD58 单抗和抗人 IgG 两种抗体均成阳性反应。原液 Protein A 与 CHO 宿主细胞蛋白残留含量经测定分别为小于总蛋白含量的 0.1% 和 0.02%。原液紫外吸收光谱、分子量、等电点、唾液酸含量、外源 DNA、细菌内毒素等实验及成品外观、pH、残留水分、无菌、异常毒性、热原质实验等检测均符合《中国药典三部》的相关要求。所制定原液质量标准与检测结果见表 1。

## 讨论

在质量控制研究中, 按 2005 年版《中国药典三部》中“生物制品国家标准物质制备和标定规程”, 以及 ICH (人用药品注册技术要求国际协调会) 和 WHO (世界卫生组织) 等相关技术文件<sup>[10]</sup>, 作者与申报单位联合制备了一批 rhLFA3-IgG1 质量控制参考品, 通过与 Biogen 公司上市的 Amevive (Alectept) 在生物学活性、HPLC 纯度、分子量、圆二色光谱、肽图、等电点指标比较, 结果显示参考品性质与国外同类产品基本一致, 符合质量控制参考品要求, 可用于该产品的常规质量控制。

在生物学活性测定研究中, 针对 rhLFA3-IgG1 融合蛋白的免疫作用机制, 采用表达 CD2 分子的 T 淋巴瘤细胞系 Jurkat 株作为靶细胞, 并通过与 FITC 标记的抗 CD2 单抗竞争结合间接反应 rhLFA3-IgG1 的生物学功能。所建立的生物学活性 Jurkat 细胞竞争法测定结果表明, 融合蛋白 rhLFA3-IgG1 能够特

**Table 1** Requirements for quality control of rhLFA3-IgG1 bulk ( batch No. 20031101)

Subject	Method	Specification	Result
Identity	Westem blot ( antiCD58, anti IgG)	Positive	Pass
Protein content/mg• mL <sup>-1</sup>	UV spectrophotometry	≥ 7.5	16.9
Relative activity ( compared to reference, % )	Competitive jurkat cell binding assay	70 - 150	114
Purity /%	Reduced SDS-PAGE	≥ 92.0	98.2
	SEC-HPLC	≥ 98.0	99.5
	IEC-HPLC	≥ 98.0	99.9
Molecular weight( kD)	Reduced SDS-PAGE	46.0 - 56.0	49.3
Ultraviolet Spectroscopy /nm	UV scan	277 - 283	280
Isoelectric point	Isoelectrofocusing	Conformed to reference	Pass
Peptide Map	Tryptic digestion /RP-HPLC	Conformed to reference	Pass
N-Acetylneuraminic acid	Resorcin assay	70 - 130	95
Host cell DNA residual/pg• dose <sup>-1</sup>	Dot hybridization	< 100	Pass
Host cell protein residual/%	ELISA	≤ 0.1	Pass
Protein A residual/%	Residual	< 0.02	Pass
Endotoxin /EU• mg <sup>-1</sup>	LAL	< 2	Pass
N-Terminal amino acid sequence	Edman degradation	Correspondence versus theoretical	FSQQIYGVVYGXVTF

异、有效结合 T细胞表面的 CD2分子。在方法建立过程中, rhLFA3-IgG1 梯度稀释浓度与 FITC 标记的抗 CD2单抗浓度是实验成功的关键,如配比不当则无法形成完整的“反 S”形活性曲线,经过研究并优化条件,确定了 mAb CD2-FITC的结合曲线亚饱和浓度为 2 μg• mL<sup>-1</sup>,并以 3 750 μg• mL<sup>-1</sup>作为 rhLFA3-IgG1 融合蛋白 3倍梯度稀释的起始浓度,在该条件基础上所测定样品的结合曲线拟合系数在 0.98 以上。

rhLFA3-IgG1 由人淋巴细胞功能相关抗原 3 的 CD2胞外区结合部分与人 IgG<sub>1</sub> 的 Fc 段(绞链区、CH<sub>2</sub> 区及 CH<sub>3</sub> 区)融合而成的糖基化融合蛋白。它是由 CHO 细胞分泌表达的同二聚体蛋白,理论分子质量约为 91.4 kD。该融合蛋白经 SEC-HPLC 与 IEC-HPLC 分析,纯度均为 98% 以上,但该制品电泳纯度分析较特殊,常用的非还原电泳较难分析,而采用还原电泳分析纯度可以打开二聚体成为单体,但电泳条带较宽,同时纯度测定结果与高效液相纯度分析存在一定矛盾,原因可能是由于 rhLFA3-IgG1 为大分子糖蛋白,在分泌表达过程中糖基化的不均一可造成样品分子结构的差异,同时由于在电泳处理过程可能引起了部分蛋白质聚合或解聚,所以在质量标准中对电泳纯度的单体要求为不低于 92%,同时考虑到 SDS-PAGE 电泳对表观分子量测定的误差,并确定 SDS-PAGE 分子量检测标准为 46.0 ~ 56.0 kD。肽图分析反映了重组蛋白质一级结构的完整性和批间稳定性, rhLFA3-IgG1 的结构特点为

由一对二硫键形成的等二聚体,在酶切方法中加入还原剂二硫苏糖醇(DTT)打开二硫键使其还原为单体,并通过碘乙酸羧甲基化后再进行胰蛋白酶切,使酶切反应更加完全,这种方法消除了由二硫键引起的空间构象变化对酶切效果的影响,酶切图谱更加真实的反映了重组蛋白结构完整性。

在质量控制的其他研究中,除对生物技术药物常规要求的宿主细胞蛋白、DNA 细菌内毒素等残留杂质进行控制外,还增加了对纯化过程中使用的亲和层析介质葡萄球菌蛋白 A( rProtein A)的残留质量控制。该申报单位的真核 CHO 细胞连续灌注发酵生产工艺采用了无血清、无蛋白的培养基,并且不添加抗生素,因此在标准中没有纳入抗生素、血清或免疫球蛋白残留质量控制环节。同时由于 rhLFA3-IgG1 与 CD2 结合后,其药理作用除了 LFA3 段可阻断 T 细胞的增殖活化,并抑制 IL-2, IFN 等炎症细胞因子的产生以外,还可通过 IgG<sub>1</sub> 的 Fc 段与细胞毒性细胞的免疫球蛋白 Fc 受体结合,并使单核细胞、NK 等细胞向 T 细胞聚集,通过抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用(ADCC),造成 T 细胞的凋亡,从而导致 CD2<sup>+</sup> 的 T 淋巴细胞的某些亚群(主要是 CD45RO<sup>+</sup>)的减少<sup>[6,11,12]</sup>。因此在 rhLFA3-IgG1 融合蛋白成品质量控制中,采用针对不同部分的抗体并以 Westem blotting 法对两个功能域分别进行了鉴别,以确认融合蛋白主药结构完整、保证成品活性。

综上所述,根据我国《人用重组 DNA 制品质量控制技术指导原则》与《中国药典三部》的要求,结

合本研究,作者建立了重组人淋巴细胞功能相关抗原 3 抗体融合蛋白的质量标准,并用于我国首次申报的该产品临床实验的质量控制,各项指标均符合相关规定,为保证该产品安全有效,质量可控打下了基础。

## References

- [ 1 ] Alice BG, Jan DB. Recombinantly engineered human proteins: transforming the treatment of psoriasis [ J ]. *Clinical Immunology*, 2002, 105: 105 - 116.
- [ 2 ] Gladman DD, Brockbank J. Psoriatic arthritis [ J ]. *Expert Opin Invest Drugs*, 2000, 9: 1511 - 1522.
- [ 3 ] Stern RS. The risk of melanoma in association with long term exposure to PUVA [ J ]. *J Am Acad Dermatol*, 2001, 44: 755 - 761.
- [ 4 ] Kono H, Inokuma S, Matsuzaki Y, et al. Two cases of methotrexate induced lymphomas in rheumatoid arthritis: an association with increased serum IgE [ J ]. *J Rheumatol*, 1999, 26: 2249 - 2253.
- [ 5 ] Zachariae H, Kragballe K, Hansen HE, et al. Renal biopsy finding in long term cyclosporin treatment of psoriasis [ J ]. *Br J Dermatol*, 1997, 136: 531 - 535.
- [ 6 ] Ellis CN, Krueger GG. Treatment of chronic plaque psoriasis by selective targeting of memory effector T lymphocytes [ J ]. *N Engl J Med*, 2001, 345: 248 - 255.
- [ 7 ] Griffiths CE, Voorhees JJ. Psoriasis, T cells and autoimmunity [ J ]. *J R Soc Med*, 1996, 89: 315 - 319.
- [ 8 ] Majeau GR, Meier W, Jimmo B, et al. Mechanism of lymphocyte function-associated molecule 3-Ig fusion proteins inhibition of T cell responses. Structure/function analysis *in vitro* and in human CD2 transgenic mice [ J ]. *J Immunol*, 1994, 152: 2753 - 2767.
- [ 9 ] State Pharmacopoeia Committee of the People's Republic of China. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [ S ]. Volume III. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005: Appendix I - IX.
- [ 10 ] Zhou HJ, Interpretation. Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use-Quality (药品注册的国际技术要求—质量部分) [ M ]. Beijing: People's Health Press, 2000: 143 - 149.
- [ 11 ] Friedrich M, Krammig S, Henze M, et al. Flow cytometric characterization of lesional T cells in psoriasis: Intracellular cytokine and surface antigen expression indicates an activated, memory/effector type lymphocyte phenotype [ J ]. *Arch Dermatol Res*, 2000, 292: 519 - 521.
- [ 12 ] Majeau GR, Whitty A, Yim K, et al. Low affinity binding of an LFA3/IgG1 fusion protein to CD2 + T cells is independent of cell activation [ J ]. *Cell Adhes Commun*, 1999, 7: 267 - 269.