# 利用 CHT™ 陶瓷羟基磷灰石解决双特异性抗体纯化难题

CHT 陶瓷羟基磷灰石


## 摘要

由于目标分子容易引起聚集和层析纯化方法存在局限性，导致双特异性抗体（bsAb) 的纯化面临很大的挑战。在 Ingavat et al 等人（2023 年）的研究中，研究人员使用三种模型分子，对比传统的阳离子交换 (CEX) 填料纯化策略，研究了 CHT 陶瓷羟基磷灰石在这一类重要疗法的下游纯化过程中的优势。对于非对称和对称 IgG 样 bsAb，使用 CHT 获得的纯度超过 97%，且高分子量杂质 (HMW) 含量较低。与阳离子交换层析（CEX）纯化比较，使用 CHT 可使层析诱导的聚集体降低八倍。此外，CHT 还通过上样后的清洗（PLW）条件优化，有效消除了低分子量杂质 (LMW)


## 简介

BsAb 属于新一代治疗药物，与传统的单克隆抗体 (mAb) 不同，BsAb 经过设计，含有一个以上的抗原或表位识别位点。这种额外的识别位点实现了双重靶向：两个不同的生物靶点被固定在一起，从而增强了新的治疗效果，而这是单一 mAb 无法实现的。美国食品药品管理局 (FDA) 于 2014 年批准了首个 bsAb，自此之后，大多数应用都是在肿瘤学领域（FDA 2023 年）。

根据其结构，BsAb 大致可分为三类，即片段型 bsAb（不含 Fc 融合结构）、非对称 bsAb 和对称 bsAbs（图 1）。

非对称 bsAb 源自不同的亲本 mAb，为了防止链的随机配对，人们开发了 KiH（knobs-into-holes)（图 1，分子 A 和 B）和 CrossMAb 等技术，在这些技术中，非对称 bsAb 的每一半都可以包含一个或两个抗原识别位点。对称 bsAb（图 1，分子 C）的每一半分子都有两个不同的抗原识别位点，因此通常为四价 (2+2)。

如图 1 所示，抗原识别位点可以是位于 CH1 结构域的传统形式（分子 A 左臂），也可以是单链可变片段（分子 A 右臂），从而在分子的两臂形成单价。也可通过两者的组合引入双价，如分子 B（右臂）或分子 C（双臂）所示

bsAb 的下游纯化面临许多挑战，其中包括聚集倾向，它被视为主要挑战。BsAb 往往不如其亲本 mAb 稳定，在层析过程中可观察到层析诱导的聚集现象（Chen 等人，2021 年）。CEX 是 mAb 纯化过程中去除聚集体的常用策略。在本文中，作者比较了 CEX 和 CHT 层析精纯步骤后的 bsAb 纯度和聚集情况。

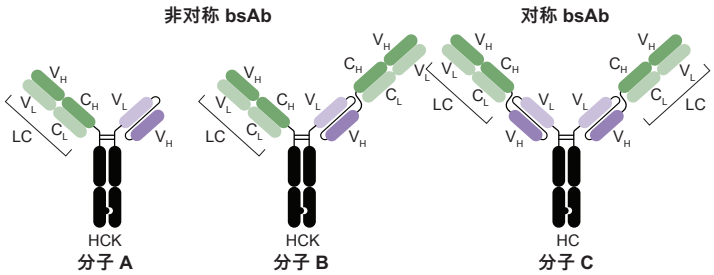



**图 1非对称和对称双特异性抗体 (bsAb)**。分子 A 和 B 是非对称 bsAb，分别代表 1+1 价和 1+2 价。分子 C 是对称 bsAb，代表 2+2 价。
LC，轻链；HC，重链；HCK，重链旋钮。



BIO-RAD

## 方法

Ingavat 等人（2023 年）通过在稳定转染的中国仓鼠卵巢 (CHO) K1 细胞中进行细胞培养，生产出了分子 A、B 和 C（图 1）。收获后，对培养上清液进行离心和过滤，以去除细胞和细胞碎片。用蛋白 A 层析法捕获收获液中的 BsAb，洗脱后将 pH 值调至 6.5。将样品等分，冷冻于 -20ºC 温度下，用于后续研究。在进行 CEX/CHT 纯化时，将冷冻的 bsAb 样品在室温下解冻，然后将pH 调至 5.5 用于 CEX 上样，将 pH 调至 6.8 用于 CHT 上样。所有电导率均保持在 ≤5 mS/cm。Capto SP ImpRes 离子交换层析填料 (Cytiva) 用作 CEX 填料，CHT 陶瓷羟基磷灰石 II 型 (40 µm) (Bio-Rad Laboratories, Inc.) 用作 CHT 混合模式层析填料。层析条件如表 1 所示，实验以 150 cm/hr 的流速进行。

采用尺寸排阻高效液相层析法 (HPLC-SEC) 测定 BsAb 的浓度和纯度。为确保准确定量 bsAb 单体，作者将细胞培养上清液主峰的积分与蛋白 A 捕获层析的积分相减，从而有效消除了计算 bsAb 浓度时的背景干扰。通过分析主峰前后洗脱的峰面积，分别确定了 HMW 和 LMW 成分的数量。宿主细胞蛋白 (HCP) 含量用第三代 CHO HCP ELISA 试剂盒 (Cygnus Technologies) 测定。宿主细胞 DNA (HCDNA) 含量采用 qPCR 测定法测定。

**表 1 实验条件。**

| 层析方法 | CEX 层析 | CHT 混合模式层析 |
|---|---|---|
| 填料 | Capto SP ImpRes (Cytiva) | CHT，II 型，40 µm (Bio-Rad) |
| NaP 梯度 | - | 10-400 mM 磷酸钠，pH 6.8 |
| NaCl 梯度 | 50 mM 乙酸钠<br>pH 5.5，0-400 mM<br>氯化钠 | 10 mM 磷酸钠<br>pH 6.8，0-400 mM<br>氯化钠 |

CEX，阳离子交换。

## 结果

### 聚集体去除

本研究比较了 CHT 层析与典型的 40 µm CEX 填料 Capto SP ImpRes (Cytiva) 对 bsAb 聚集体的去除效果。CHT层析通过氯化钠梯度或磷酸钠梯度进行洗脱，而 CEX 填料则使用氯化钠梯度进行洗脱（图 2）。

洗脱按 1 CV/管收集，把纯度高的洗脱液收集一起。收集液经过 HPLC-SEC 分析，计算产率。CHT™两种洗脱模式结果都比阳离子树脂具有更好的聚集体去除效果。（表 3）。另外还发现，使用 CHT™ 时，"色谱诱导聚集 "的发生率有所降低，这可能是由于 C 位点钙离子的存在（图 3）。

### 其他杂质去除

研究还发现，氯化钠梯度 CHT 的 HCP 清除率最高，而 LMW 和 HCDNA 的清除率与 CEX 相当。在 CHT 的氯化钠梯度中，需要增加磷酸盐浓度才能大量去除 LMW（表 2）。

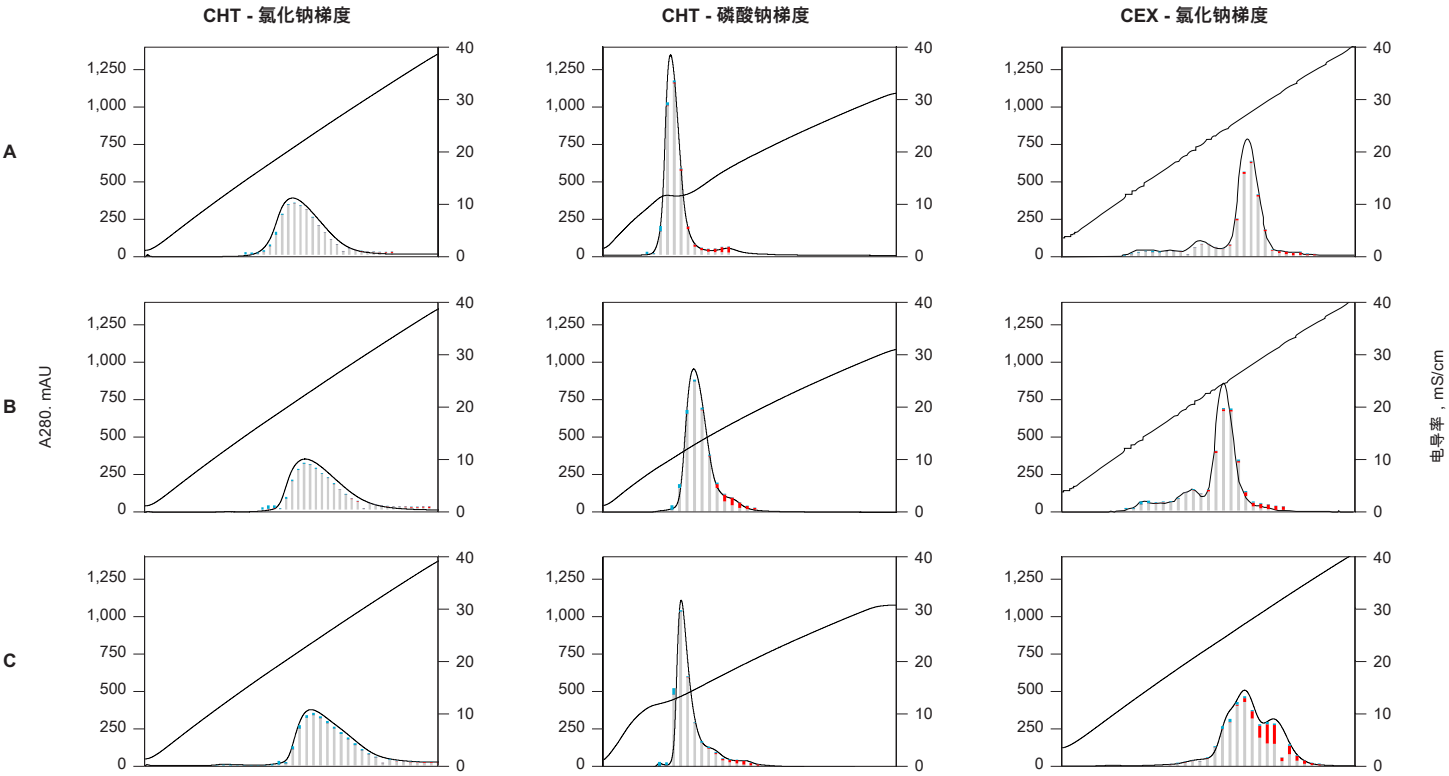
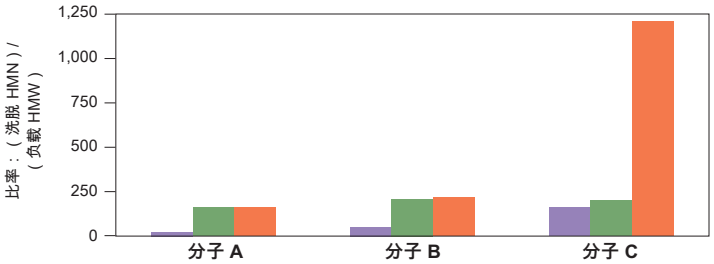



**图 2 使用 CHT 氯化钠梯度、CHT 磷酸钠梯度洗脱的分子 A、B 和 C 的洗脱曲线，以及使用 CEX 氯化钠梯度从 Capto SP ImpRes 洗脱的分子 A、B 和 C 的洗脱曲线。**每幅图都是 UV280 层析图 (mAU) 与每个洗脱组分的 HMW (■)、单体 (■) 和 LMW (■) 分布（柱状图）和电导率 (mS/cm) 在洗脱阶段 (40 CV) 的叠加图。CHT，陶瓷羟基磷灰石；CEX，阳离子交换；HMW，高分子量杂质；LMW，低分子量杂质。

## 讨论

CHT 是一种生物陶瓷、球形和大孔形式的羟基磷灰石，以其物理和化学稳定性而闻名。CHT 是配体和基质一体，其多模式表现为：金属螯合作用（C 位点）和阳离子交换作用（P 位点）。这些位点允许 CHT 可以独特而精准的分离各种治疗性药物。本研究使用的是 CHT II 型 (40 µm)，由 Bio-Rad 独家提供（表 3）。

Ingavat 等人（2023 年）的研究表明，CHT 能有效纯化非对称和对称 bsAb，其产物纯度至少为 97%，在氯化钠和磷酸钠洗脱过程中都能持续达到较高的聚集物去除率。值得注意的是，层析诱导聚集体在 CHT 后的产物中得到了缓解，但却出现在了 CEX 后的产物中。使用氯化钠洗脱的 CHT 对 HCP 的清除率最高，对 LMW 和 HCDNA 杂质的清除率与 CEX 相当。




| | 分子 A | 分子 B | 分子 C |
|---|---|---|---|
| CHT-NaCl | 0.21 | 0.43 | 1.10 |
| CHT-P | 1.05 | 1.30 | 1.36 |
| CEX | 1.11 | 1.44 | 7.63 |

**图 3 观察到的层析诱导聚集。**根据 HPLC-SEC 分析，层析诱导聚集是指所有洗脱组分中 HMW 含量与上样样品中 HMW 含量之比。HMW：高分子量杂质；CHT-NaCl：CHT：NaCl 梯度洗脱；CHT-P：CHT：磷酸钠梯度洗脱；CEX：阳离子交换层析洗脱。

**表 2protein A 亲和层析后样品及 CHT 和 CEX 梯度洗脱后样品的产率，纯度,HMW，HMW 清除率，LMW,HCP 和 HCDNA 实验结果**

| | 产率 | 纯度 | HMW | HMW 减少* | LMW | HCP，ppm | HCDNA，ppm |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 蛋白 A 后洗脱液 | | | |
| 分子 A | 不适用 | 93.6% | 4.7% | 不适用 | 1.7% | 5,839 | 39 |
| 分子 B | 不适用 | 91.7% | 4.1% | 不适用 | 4.2% | 4,578 | 17 |
| 分子 C | 不适用 | 91.5% | 2.3% | 不适用 | 6.3% | 1,304 | 7 |
| | | | | CHT 氯化钠梯度** | | | |
| 分子 A | 76.4% | 97.5% | 0.5% | 90.1% | 1.0% | 62 | 0.009 |
| 分子 B | 73.9% | 96.5% | 0.2% | 96.3% | 2.5% | 12 | 未检出 |
| 分子 C | 67.8% | 97.7% | 0.3% | 85.5% | 4.3% | 35 | 0.012 |
| | | | | CHT 磷酸钠梯度 | | | |
| 分子 A | 82.2% | 96.5% | 1.8% | 61.5% | 1.7% | 378 | 未检出 |
| 分子 B | 80.4% | 96.1% | 0.9% | 78.5% | 3.0% | 155 | 未检出 |
| 分子 C | 53.6% | 97.7% | 0.4% | 82.9% | 1.9% | 70 | 未检出 |
| | | | | CEX 氯化钠梯度 | | | |
| 分子 A | 80.3% | 95.7% | 3.2% | 31.7% | 1.0% | 301 | 0.008 |
| 分子 B | 69.4% | 94.8% | 2.9% | 30.5% | 2.3% | 43 | 0.006 |
| 分子 C | 31.4% | 92.9% | 2.0% | 10.5% | 5.1% | 243 | 0.026 |

HMW，高分子量杂质；LMW，低分子量杂质；HCP，宿主细胞蛋白；HCDNA，宿主细胞 DNA；CHT，陶瓷羟基磷灰石；CEX，阳离子交换
* HMW 减少 = (Δ HMW%)/(蛋白 A 后洗脱液 HMW%)
** 分子 A 和分子 B 是经过上样后优化的清洗步骤去除 LMW

## 参考资料

1. Ingavat N et al. (2023). Harnessing ceramic hydroxyapatite as an effective polishing strategy to remove product- and process-related impurities in bispecific antibody purification. Bioresour Bioprocess 10, 1.
2. FDA (2023). Bispecific Antibodies: An Area of Research and Clinical Applications. Published online: https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/bispecific-antibodies-area-research-and-clinical-applications
3. Chen S et al. (2021). Current trends and challenges in the downstream purification of bispecific antibodies. Antib Ther 4, 73-88.

**表 3CHT II 型填料特性**

| | |
|---|---|
| 官能团 | $Ca^{2+}$, $PO_4^{3-}$, $OH^-$ |
| 平均颗粒大小 | 40 ± 4 µm 和 80 ± 8 µm |
| 线性流速范围 | 50-400 cm/hr |
| 操作 pH 值范围 | 6.5–14 |
| 消毒 | 1-2 N NaOH |
| 高压灭菌 | 121ºC, 20 min, 磷酸盐缓冲盐水, pH 7 |
| 密度，g/ml 床 | 0.63 g/ml |

**致谢**

本研究和文章得到了 HOYA Technosurgical Corporation 的支持。

请访问 **bio-rad.com/CHT**，了解更多信息并索取样品。



***Bio-Rad Laboratories, Inc.***

*Life Science Group*

***Website*** *bio-rad.com* ***USA*** *1 800 424 6723* ***Australia*** *61 2 9914 2800* ***Austria*** *00 800 00 24 67 23* ***Belgium*** *00 800 00 24 67 23* ***Brazil*** *4003 0399*
***Canada*** *1 905 364 3435* ***China*** *86 21 6169 8500* ***Czech Republic*** *00 800 00 24 67 23* ***Denmark*** *00 800 00 24 67 23* ***Finland*** *00 800 00 24 67 23*
***France*** *00 800 00 24 67 23* ***Germany*** *00 800 00 24 67 23* ***Hong Kong*** *852 2789 3300* ***Hungary*** *00 800 00 24 67 23* ***India*** *91 124 4029300* ***Israel*** *0 3 9636050*
***Italy*** *00 800 00 24 67 23* ***Japan*** *81 3 6361 7000* ***Korea*** *82 080 007 7373* ***Luxembourg*** *00 800 00 24 67 23* ***Mexico*** *52 555 488 7670*
***The Netherlands*** *00 800 00 24 67 23* ***New Zealand*** *64 9 415 2280* ***Norway*** *00 800 00 24 67 23* ***Poland*** *00 800 00 24 67 23* ***Portugal*** *00 800 00 24 67 23*
***Russian Federation*** *00 800 00 24 67 23* ***Singapore*** *65 6415 3188* ***South Africa*** *00 800 00 24 67 23* ***Spain*** *00 800 00 24 67 23* ***Sweden*** *00 800 00 24 67 23*
***Switzerland*** *00 800 00 24 67 23* ***Taiwan*** *886 2 2578 7189* ***Thailand*** *66 2 651 8311* ***United Arab Emirates*** *36 1 459 6150* ***United Kingdom*** *00 800 00 24 67 23*

*Bulletin 3680 Ver A CN US/EG* *24-0353 0524 Sig 0124*