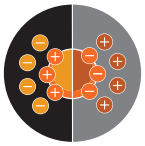
用非亲和层析工艺纯化重组单克隆抗体 — 利妥昔单抗生物类似药

Anton Posch,[1] Franziska Kollmann,[1] Chelsea Pratt,[2] Laura Moriarty,[2] 和 Elizabeth Dreskin[2]
[1]Bio-Rad Laboratories GmbH, Kapellenstraße 12, 85622 Feldkirchen, Germany
[2]Bio-Rad Laboratories, Inc., 6000 James Watson Drive, Hercules, CA 94547



离子交换

混合模式

摘要

虽然蛋白 A 填料能够产生高选择性和高纯度，但也存在成本较高和需要使用低 pH 进行洗脱的缺点，这可能导致抗体聚集和减少填料使用寿命。为了解决这些问题，我们使用两种非蛋白 A 纯化方案对重组单克隆抗体 (mAb)（利妥昔单抗生物类似药）的纯化进行了评估。它们是用于捕获阳离子交换 (CEX) 填料和用于中间纯化的阴离子交换 (AEX) 填料以及用于精纯的两种混合模式填料（CHT™ 陶瓷羟基磷灰石 XT 填料；疏水和阳离子混合基质填料，Nuvia cPrime ）。采用蛋白 A 工艺同时进行纯化。CEX–AEX–CHT XT 工艺流程产生的利妥昔单抗纯度 > 96%，产率约为 86%，表明该流程更为经济实惠。经过最后的纯化步骤后，宿主细胞蛋白 (HCP) 水平降低了 4 个对数，宿主细胞 DNA (hcDNA) 水平降低了 5 个对数。药代动力学 (PK) 桥接试验表明，纯化的单克隆抗体与利妥昔单抗标准品的表现相似，在整个纯化过程中没有出现可定量的结构或功能损失。因此，我们建议利妥昔单抗生物类似药采用非亲和纯化工作流程，这种流程具有更好的工艺经济性，并有可能促进不受影响的结果。

简介

基于蛋白 A 的层析工艺通常用于纯化抗体，因为蛋白 A 能选择性地、高效地与复杂细胞培养上清液中的抗体结合，并能在一个步骤中去除大部分产品杂质。以蛋白 A 为捕获步骤的层析工艺的主要缺点包括蛋白聚集、成本高、填料稳定性差、交付前置时间长。从工艺经济学考虑，可以采用的方案是使用阳离子交换化学品等非亲和填料。根据 Follman 和 Fahrner（2004 年）的研究，基于非亲和填料的三步纯化方案是可行的，可以与以蛋白 A 为起点的三步层析工艺流程相媲美。本研究结果有力地表明，工艺步骤的顺序对于成功建立高性能抗体纯化方案非常重要。

在此，我们评估了经充分证实的正交实验填料组合（图 1）用于利妥昔单抗生物类似药 (144 kD) 非亲和纯化的性能，利妥昔单抗生物类似药是一种基因工程嵌合鼠/人单克隆抗体，靶向在正常和恶性 B 淋巴细胞表面发现的 CD20 抗原。由于高载量阳离子交换填料 (Nuvia S) 在各种操作条件下都具有很高的捕获性能，因此被选作用于初始纯化步骤。此外，众所周知，它还能有效去除产品相关污染物，如 HCP 和单克隆抗体 (mAb) 聚集体和片段。对于中间纯化，通常在阳离子交换步骤后进行阴离子交换步骤，以流穿模式进行，以进一步降低剩余杂质，如 hcDNA。在最终精纯步骤中，混合模式填料如 CHT XT（一种陶瓷羟基磷灰石）或 Nuvia cPrime（一种疏水和阳离子交换填料）具有独特的选择性，可最终去除与产品和工艺相关的杂质。为了与基于蛋白 A 的层析工艺流程竞争，确定关键步骤填料（如 Nuvia S 和 Nuvia cPrime）的最佳操作条件至关重要。通过在离心柱中进行简单筛选实验来确定操作条件。为评定单个层析步骤的成功率，测定了重要的工艺性能参数，如 mAb 纯度和产率。通过抗独特型抗体药代动力学桥接试验评估抗体完整性。

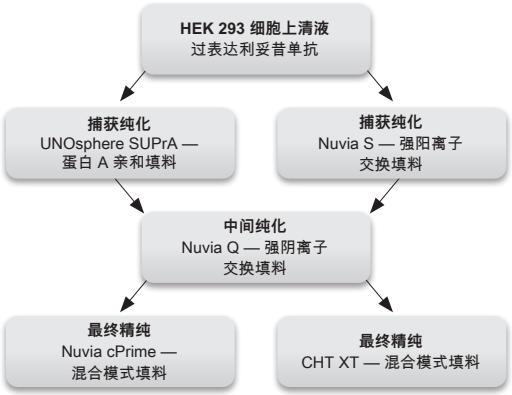


图 1采用 3 步层析步骤纯化利妥昔单抗生物类似药的不同工艺

材料和方法

生物材料和样本制备

将含有利妥昔单抗生物类似药（Absolute Antibody，目录号 Ab00126-10.0）的 HEK 293 细胞培养物上清液进行离心以除去细胞碎片，并在蛋白 A 或 Nuvia S 填料的相应结合缓冲液中透析（20 kD 截留膜）一整夜（表 1）。透析后的蛋白浓度约为 0.35 mg/ml，其中含有 6-8% 的单克隆抗体。或者，将含有利妥昔单抗生物类似药的细胞培养上清液与磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 按 1:1 (v/v) 的比例稀释，用于蛋白 A 层析；或将 pH 值调至 6.0，再与 1x 结合缓冲液按 1:1 (v/v) 的比例稀释，用于 Nuvia S 层析。使用类似 Spin column 柱形式的超滤装置（截留分子量 10 kD）进行不同层析步骤之间缓冲液交换。

层析

所有设备和填料均来自 Bio-Rad Laboratories, Inc.（表 1）。使用中压层析系统 NGC 10,室温，采用 280 nm 监测层析过程。四层层析系统配置有样本泵，包括样本进样阀、两个缓冲液进样阀、层析柱切换阀、多波长紫外 (UV) 检测器、pH 和电导率仪、出口阀和带有台式 Peltier 冷却选项的组分收集器。层析操作条件参见表 1。缓冲液经脱气处理并用 0.45 µm 滤膜过滤后方可使用。使用细胞培养上清液 (50 mL) 进行层析纯化。

离心柱中 Nuvia S 和 cPrime 填料的纯化条件筛选

Nuvia S 填料的层析条件是通过简单的 pH 值筛选实验分析得出的（表 2），而对于 Nuvia cPrime 填料，则采用了更为复杂的方法（表 3）。在Bulletin 7128 中描述了相应的实验方案。简言之，用 100 µl 层析填料上样离心柱，并用待测结合缓冲液进行平衡。加入 500µl 细胞上清液 (0.25 µg/µl)（缓冲液交换为其相应的结合缓冲液），并在室温下与填料孵育 10 分钟，同时搅拌（翻转混合器）。以 1,000 x g 的转速离心 1 分钟，去除未结合的物质。填料用结合缓冲液冲洗两次，洗脱两次。为估算产率，用 2%SDS 溶液剥离填料，以检测填料上残留的蛋白质物质。在非还原条件下，通过 SDS-PAGE 定性分析从离心柱实验中采集的样本。

表 1利妥昔单抗生物类似药层析纯化的所有层析柱及其操作条件概述

层析柱类型	填料类型	操作模式	工作流程位置	缓冲液 A	缓冲液 B	流速，cm/hr
Bio-Scale Mini UNOsphere SUPrA (5 ml)	蛋白 A	结合和洗脱	捕获步骤	10 mM PB，27 mM KCl, 140 mM NaCl, pH 7.4	100 mM 枸橼酸盐 (pH 3.3)；阶段洗脱	240–480
Nuvia S (1 ml)	强阳离子交换	结合和洗脱	捕获步骤	25 mM MES, 10 mM NaCl, pH 6.0	缓冲液 A 含 1 M NaCl；10 倍柱体积 (CV) 线性洗脱至 1M NaCl 或阶段洗脱	240
Nuvia Q (1 ml)	强阴离子交换	流穿	中间步骤	50 mM Tris, pH 8.5	含 1 M NaCl 的缓冲液 A；10 CV 线性洗脱至 1M NaCl 或阶段洗脱	120
Nuvia cPrime (1 ml)	疏水和阳离子交换（混合模式）	结合和洗脱	精纯步骤	50 mM Tris, pH 8.5	含 1 M NaCl 的缓冲液 A；10 CV 线性洗脱至 1M NaCl	240
CHT XT (1 ml)	陶瓷羟基磷灰石（混合模式）	结合和洗脱	精纯步骤	10 mM PB，pH 7.0	含 2 M NaCl 的缓冲液 A；20 CV 线性洗脱至 2M NaCl 或阶段洗脱	240

© 2024 Bio-Rad Laboratories, Inc.

对于 Nuvia cPrime 填料，通过 JMP 软件评估缓冲液 pH 值和电导率的影响，以预测最佳结合和洗脱条件。

表 2. 用于利妥昔单抗生物类似药纯化的 Nuvia S 填料离心柱 pH 筛选实验 缓冲液摩尔浓度：25 mM。条件 #3 用于层析（捕获步骤）。

	结合		洗脱	
条件	pH	NaCl, mM	pH	NaCl, mM
1	4.5	10	4.5	1,000
2	5.5	10	5.5	1,000
3	**6**	**10**	**6**	**1,000**
4	6.5	10	6.5	1,000
5	7	10	7	1,000

分析测定

使用 DC 蛋白浓度测定试剂盒 I（Bio-Rad，目录号 5000111）测定蛋白浓度。

采用尺寸排阻层析法 (SEC) 和预填充的高分辨率 ENrich SEC 650 尺寸排阻层析柱 (10 x 300 mm，24 mL；Bio-Rad，#7801650)，在 NGC 层析系统上以 1 mL/min 的流速进行抗体聚集体检测。使用过滤的 PBS 作为平衡缓冲液，UV215nm 为层析图谱。将 200 µL 样本（根据蛋白量调整）进样至层析系统中，前面洗脱峰为聚合体。收集组分 (1 mL)，并在非还原条件下用 SDS-PAGE 进行分析。

采用 HEK 293 HCP ELISA 试剂盒 (Cygnus Technologies，#F650R) 分析 HCP 水平。该试剂盒的检测下限约为 1–2 ng/ml。

使用 Droplet Digital™ PCR (ddPCR™) 测定层析组分中的 hcDNA 水平。使用在 TE 缓冲液和 ddPCR Supermix（用于残留 DNA 定量）（Bio-Rad，#1864038）中以 1:25 至 1:200 稀释的样本进行反应。使用了一种针对多拷贝人类基因的专有探针测定法。使用 BamH1 酶切的人基因组 DNA 生成标准曲线，以验证在试验的线性范围内分析了样本。根据说明，使用自动液滴发生器 (Bio-Rad，#1864101) 生成液滴。扩增后，在 QX200 Droplet Reader (Bio-Rad，#1864003) 中读取液滴，并使用 QuantaSoft™ 软件 (Bio-Rad，#1864011) 进行分析。

根据提供的方案进行药代动力学桥接酶联免疫吸附试验 (ELISA)：bio-rad-antibodies.com/protocol-pk-bridging-elisa-rituximab-antibodies.html。

电泳

采用 Criterion TGX 无染色预制凝胶（4-20% midi 凝胶；Bio-Rad，#5678093），通过 SDS-PAGE 监测离心柱中纯化条件筛选和层析纯化步骤中样本的纯度和产率。用二维 (2-D) 电泳表征含利妥昔单抗生物类似药的 HEK 293 细胞培养物上清液（Posch 等人，2013 年）。简言之，按照 Ambort 等人（2008 年）的方法制备样本后，将 100 µg 蛋白上样至 11 cm ReadyStrip IPG 试纸 (pH 3-10) (Bio-Rad，#1632014) 上，并根据电荷分离 40 kVh。对于第二维度，使用任何 kD 标准 TGX 无染色预制凝胶 (Bio-Rad，#5678121)。SDS-PAGE 凝胶和 2-D 凝胶分别在运行 2.5 和 5 分钟后进行紫外线活化。采用 ChemiDoc™ MP 成像系统 (Bio-Rad，#12003154) 记录相应的无染色图像。成像后，使用 Oriole 荧光凝胶染色剂 (Bio-Rad，#1610495) 对凝胶进行复染，随后使用 QC 胶体考马斯亮蓝染色剂 (Bio-Rad，#1610803) 进行复染。使用 Bio-Rad Laboratories 的 Image Lab 软件 6.01 和 PDQuest 2-D 分析软件进行凝胶分析。

表 3为使用 Nuvia cPrime 填料进行离心柱实验（用于利妥昔单抗生物类似药纯化）提供广泛的定制设计包括采用 SDS-PAGE 进行的数据分析。缓冲液摩尔浓度：50 mM。条件 #9 用于层析（最终精纯）。

	结合			洗脱			
条件	pH	NaCl, mM	结合目标，%	pH	NaCl, mM	目标产率 (%)	目标纯度 (%)
1	5.5	0	96	5.5	0	0	不适用
2	5.5	0	99	8.5	0	0	不适用
3	5.5	400	68	5.5	1,000	45	38
4	5.5	400	70	8.5	1,000	42	32
5	7	200	1	7	500	0	不适用
6	7	200	1	7	500	0	不适用
7	7	200	1	7	500	0	不适用
8	8.5	0	99	5.5	1,000	82	65
9	**8.5**	**0**	**98**	**8.5**	**1,000**	**91**	**68**
10	8.5	400	0	5.5	0	0	不适用
11	8.5	400	0	8.5	0	0	不适用
12	8.5	400	0	8.5	0	0	不适用

© 2024 Bio-Rad Laboratories, Inc.

结果与讨论

含利妥昔单抗生物类似药的 HEK 293 细胞培养物上清液的二维电泳二维电泳是一种用于表征复杂蛋白质混合物的高分辨率技术。该技术通常在变性和还原条件下进行，因此 2-D 凝胶上只能显示蛋白质亚基。图 2 显示了含有利妥昔单抗的细胞上清液的典型 2-D 凝胶（pH 范围 3-10），其理论 pI 约为 8.6。通过与不含利妥昔单抗的细胞上清液样本进行比较，利妥昔单抗的轻链和重链定位在 2-D

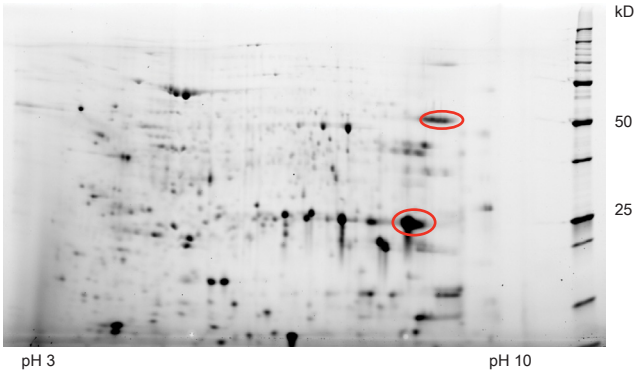


图 2使用无染色凝胶对上清液进行 2-D 电泳表达利妥昔单抗生物类似药的 HEK 293 上清液通过首先使用 11 cm IPG 条带根据其 pI 分离蛋白，然后使用 SDS-PAGE 进行大小分离以进行分析。重链和轻链用红色圈出。利妥昔单抗生物类似药含量约为 8%。

图上（数据未显示）。使用 PDQuest 软件进行了图像分析，计算出利妥昔单抗重链和轻链的 pI 值分别约为 8.9 和 8.5。这些数值与 8.7 和 8.4 的理论值一致。一般来说，在开发基于电荷分离分子的层析方法（如离子交换层析法）时，关于目标蛋白的 pI 信息很有帮助。

图 2 所示的 2-D 图可以很好地概括污染蛋白质的性质。总共检测到约 550 个污染蛋白质点，其中大部分位于 pH 值 3.5 至 8 之间。与大多数污染性蛋白质相比，利妥昔单抗表现出正净电荷特征。因此，在三步纯化方案中成功应用阳离子交换层析法作为捕获步骤，同时仍有大量 HCP 保持未结合。

半定量 2-D 凝胶分析也能够提供复杂样本中目标蛋白相对丰度的信息。在此，与产生工业 mAb 的细胞系相比，细胞上清液中利妥昔单抗生物类似药的表达异常低（占总蛋白含量的 8%）。要想大规模生产这种抗体，还需要额外的上游工作来提高表达量。

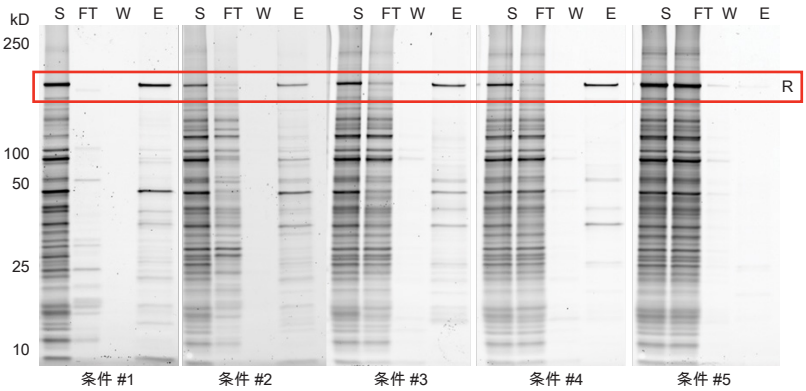
纯化条件筛选

Nuvia S 强阳离子交换填料

在离心柱中进行这一简单的 pH 值筛选实验的目的是找到利妥昔单抗生物类似药与填料结合良好且流穿液组分中含有大量 HCP 的层析条件。变化的唯一变量是结合缓冲液的 pH 值 (pH 4.5-7)。通过非还原型 SDS-PAGE 分析蛋白样本（图 3），定性凝胶分析显示利妥昔单抗在 pH 4.5 至约 6.5 之间与填料结合力很强。在 pH 值为 7 时，利妥昔单抗生物类似药与填料的结合可忽略不计，在流穿样本中可发现大多数目标蛋白。在 pH 值为 6 和 6.5 时，流穿样本中检测到的污染蛋白质数量最多。因此，使用 Nuvia S 填料作为捕获步骤的所有层析条件为 25 mM MES，10 mM NaCl，pH 6.0 的条件下进行。与更高的 pH 值相比，在 pH 值为 6.0 的条件下还能更稳定地处理电导率更高的起始样本。

Nuvia cPrime 填料

混合模式层析正在成为下游工艺纯化的重要工具，这是因为填料在结合和洗脱方面有很大的设计空间，可以在商业生产环境中开发高度稳健的方法。但是，由于配体上存在的多种官能团的共同作用，混合模式层析纯化期间抗体的行为通常不可预测。考虑到混合模式填料的具体特征（包括高耐盐性），我们采用广泛的定制设计来阐



	结合		洗脱	
条件	pH	NaCl, mM	pH	NaCl, mM
1	4.5	10	4.5	1,000
2	5.5	10	5.5	1,000
3	6	10	6	1,000
4	6.5	10	6.5	1,000
5	7	10	7	1,000

图 3使用 pH 值进行筛选实验采用离心柱中的 Nuvia S 填料寻找利妥昔单抗生物类似药
(R) 与填料结合良好且流穿液组分中含有大量 HCP 的层析条件。在非还原条件下，采用无染色技术通过 SDS-PAGE 评估样本。
S，含利妥昔单抗生物类似药的 HEK 293 上清液；**FT**，流穿液；**W**，结合缓冲液中的清洗组分；**E**，洗脱液。

明 Nuvia cPrime 填料上利妥昔单抗生物类似药的初始结合和洗脱条件。在非还原性 SDS-PAGE 上分析了离心柱试验样本，并定量评价了结合能力和产率（表 3）。然后还进行了纯度计算，获得的数据用于预测结合和洗脱条件（图 4）。结果表明，在所探讨的条件下，利妥昔单抗生物类似药与 Nuvia cPrime 填料的作用模式截然不同。虽然还可以进行更广泛的实验设计，以完善和确定层析缓冲液条件的失效边缘，但 9 号缓冲液条件代表了在利妥昔单抗生物类似药的产率和纯度方面可以接受的折衷方案。

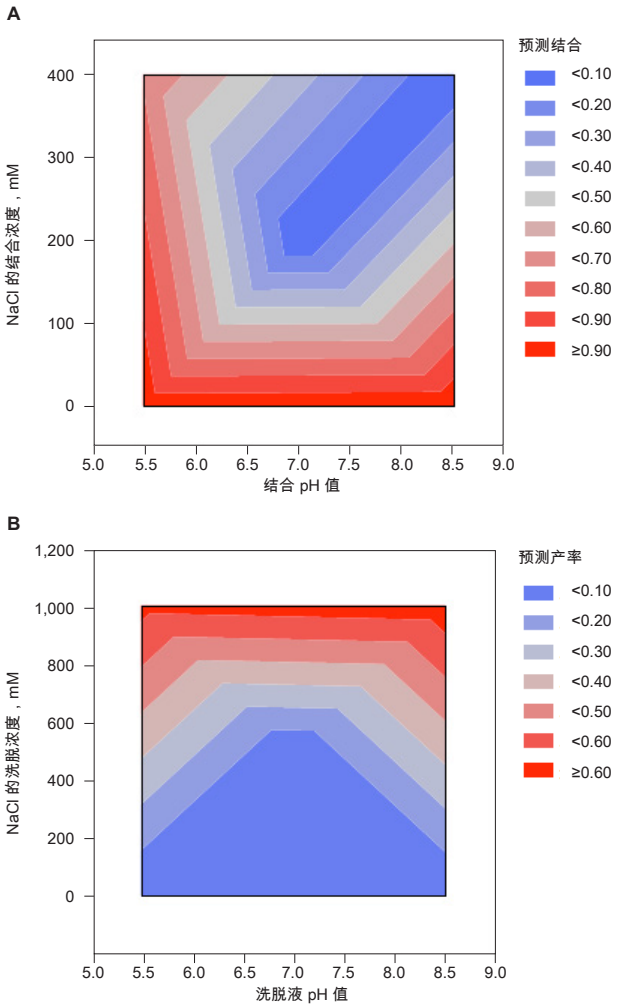


图 4使用 Nuvia cPrime 填料预测的利妥昔单抗生物类似药的纯化条件A，缓冲液 pH 值和 NaCl 浓度对结合力的影响；**B**，缓冲液 pH 值和 NaCl 浓度对产率的影响。

四种不同三步层析工作流程的性能比较

典型的纯化过程包括将蛋白质 A 层析作为强捕获步骤，然后再进行两个纯化步骤。对于随后的中间步骤和精纯步骤，文献中介绍了各种填料组合。例如，这些填料有阳离子交换、阴离子交换、混合模式离子交换、陶瓷羟基磷灰石和疏水相互作用。

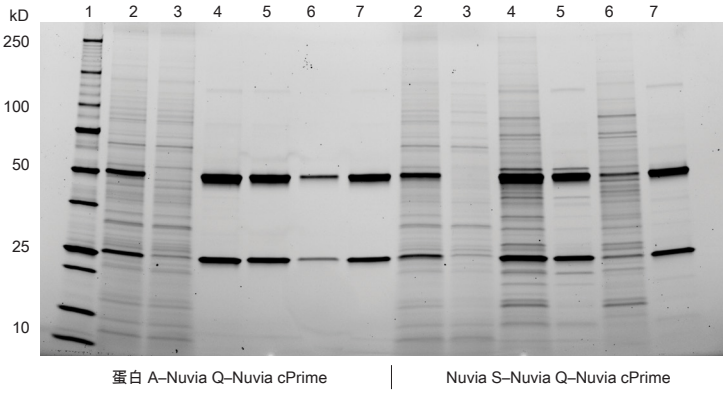
在这里，我们关注的是，图 1 所示的两种非亲和工艺与以蛋白 A 为起点的纯化方案相比，能否达到类似的纯化水平。在两个非亲和工作流程中，蛋白 A 被 Nuvia S 填料取代，作为结合步骤。Nuvia S 是一种超高载量的创新型阳离子交换填料，基于业界公认的 UNOsphere 基质技术。在所有工作流程中，使用 Nuvia Q 阴离子交换填料以流穿模式进行中间精纯。最后使用 Nuvia cPrime 或 CHT XT 两种混合模式填料之一进行精纯。

对所有样本池中的宿主细胞蛋白水平进行了测定，并将其作为目标蛋白纯度的主要指标（表 4）。除 HEK 293 HCP ELISA 外，通过无染色的 SDS-PAGE 技术分析所有工艺流程中的蛋白组分，以监测各纯化步骤是否成功和进展情况（图 5 和图 6），检测污染性蛋白，并测定纯度和产率。采用蛋白 A 亲和层析随后进行阴离子交换层析的抗体捕获步骤可除去超过 99% 的 HEK 293 HCP。采用 Nuvia cPrime 填料或 CHT XT 填料进行最终精纯步骤后，经测定，宿主细胞蛋白水平低于 HEK 293 HCP ELISA 的检测限。对各样本池进行的 SDS-PAGE 分析证实了 HEK 293 HCP ELISA 的高纯度结果，因为在两种最终样本中均未观察到明显的污染蛋白带。

在这两种非亲和层析工艺流程中，Nuvia S 填料在 pH 值为 6 时与利妥昔单抗的结合亲和力均可接受，如图 5 和图 6 所示，进样、流穿和洗脱组分的泳道比较结果表明了这一点。Nuvia S 和 Nuvia Q 填料的组合能够去除大部分污染的 HEK 293 蛋白，并将 HCP 含量降低至约 450 ppm。对于最终的精纯步骤，将 Nuvia Q 填料作为中间步骤，然后将 Nuvia cPrime 填料作为精纯步骤的纯化工艺是有吸引力的，因为两个层析步骤之间不需要缓冲液交换。不过，经过 Nuvia cPrime 层析后，仍能看到一些明显的蛋白带，最终 HCP 值为 250 ppm。另一方面，与 Nuvia cPrime 填料相比，使用 CHT XT 填料对利妥昔单抗进行最后精纯步骤似乎更有效，HCP 水平可低至 20 ppm。图 7A-C 显示了 Nuvia S-Nuvia Q-CHT XT 工艺流程的典型层析图。通过定量 SDS-PAGE 图像分析评估了后一种工艺流程中利妥昔单抗的纯度，其纯度在 96-98% 之间。此外，在两个层析工作流程（蛋白 A 或 Nuvia S–Nuvia Q–CHT XT）中用 Droplet Digital PCR 测定 hcDNA 清除率，相应水平降低了 5 个对数值（表 5）。

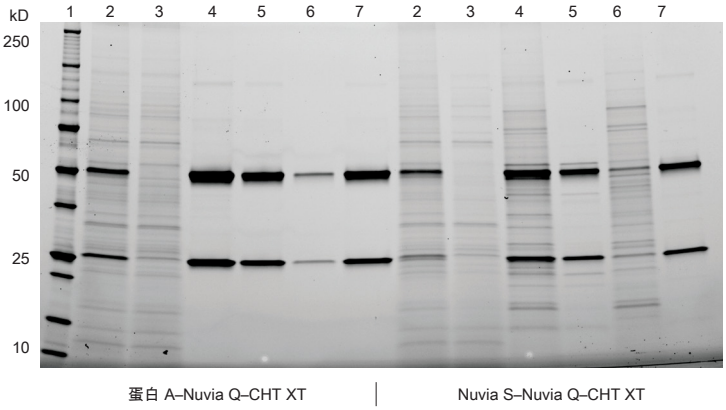
表 4通过不同的工作流程去除利妥昔单抗生物类似药纯化过程中的 HCP

步骤	→	捕获	中间		精纯	
蛋白 A 工艺流程	细胞上清液	蛋白 A 洗脱液	Nuvia Q 流穿液	Nuvia cPrime 洗脱液	或	CHT XT 洗脱液
HCP，ppm	1,100,000	200 40,000	60 450	<2 250		<2 20
Nuvia S 工艺流程	细胞上清液	Nuvia S 洗脱液	Nuvia Q 流穿液	Nuvia cPrime 洗脱液	或	CHT XT 洗脱液



泳道	样本
1	标记
2	细胞培养补料
3	流穿液
4	蛋白 A/Nuvia S 洗脱液
5	Nuvia Q 流穿液
6	Nuvia Q 洗脱液
7	Nuvia cPrime 洗脱液

图 5对蛋白 A 或 Nuvia S-Nuvia Q-Nuvia cPrime 工作流程中的层析样本进行 SDS-PAGE 分析



泳道	样本
1	标记
2	细胞培养补料
3	流穿液
4	蛋白 A/Nuvia S 洗脱液
5	Nuvia Q 流穿液
6	Nuvia Q 洗脱液
7	CHT XT 洗脱液

图 6对蛋白 A 或 Nuvia S-Nuvia Q-CHT XT 工艺流程中的层析样本进行 SDS-PAGE 分析

在本项目过程中，测量了工艺性能参数，如抗体聚集体和抗体完整性。然而，使用 Nuvia cPrime 的工艺流程将不考虑进一步的分析。

定性、定量和功能测定

采用无染色技术对利妥昔单抗进行定量分析

为了计算细胞培养液和层析过程中产生的样本池中抗体浓度的产率和回收率，通常采用蛋白 A 或 G 高效液相层析法 (HPLC)。层析柱的选择取决于蛋白 A 和 G 与不同人和小鼠 IgG 亚类的结合亲和力。这些检测的周期为 2-4 分钟，能够定量检测 0.01-5 mg/ml 范围内的 mAbs。在此，我们评估了 无染 SDS-PAGE 用于抗体浓度测定作为蛋白 A/G HPLC 测定法的低成本替代方法的适用性。无染色技术采用了预制 SDS-PAGE 凝胶中的凝胶化学成分。凝胶制剂含有三卤化合物，当暴露于紫外线辐照时，可催化与色氨酸残基的共价反应。由此产生的活化蛋白在紫外线激发下会发出荧光，通过适当的成像系统可以很容易地在凝胶内检测到。

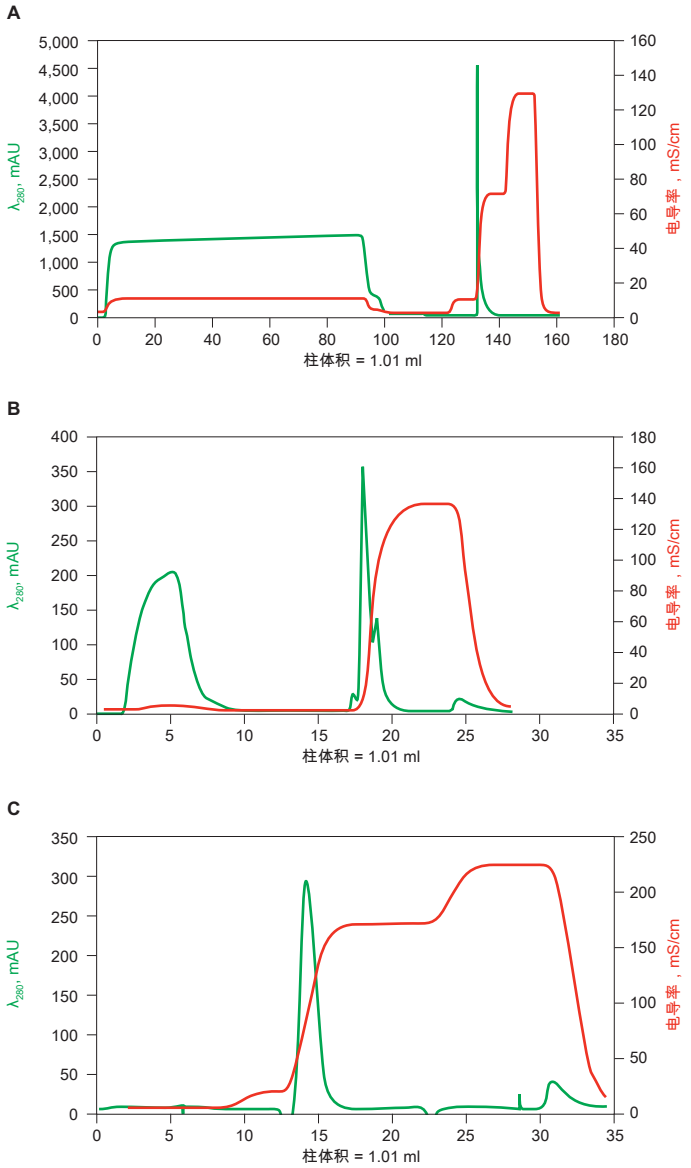


图 7利妥昔单抗生物类似药纯化的层析图
A，使用 Nuvia S 填料进行捕获步骤；**B**，使用 Nuvia Q 填料进行中间精纯；**C**，使用 CHT XT 填料进行最终精纯。

通过在非还原条件下运行市售利妥昔单抗生物类似药（纯化蛋白 A）的系列稀释液，评估无染色方法的灵敏度和线性度。采用 Image Lab 软件中的自动分析工具自动计算带强度，相应的校准曲线（范围为 125-4,000 ng/泳道）参见图 8。该图表明两个样本上样极值之间具有良好的线性，决定系数为 0.99。

A

泳道编号	利妥昔单抗，ng/泳道
1	4,000
2	2,000
3	1,000
4	500
5	250
6	125

B

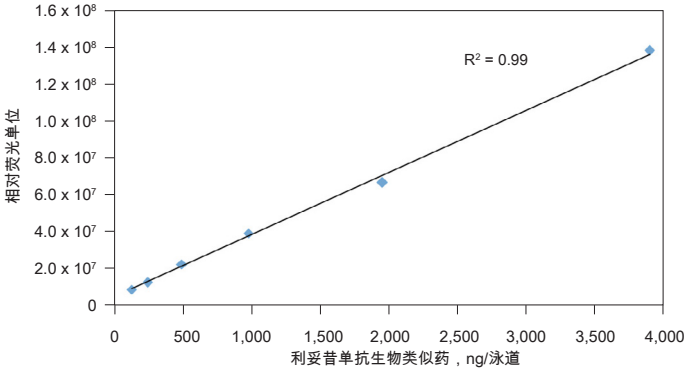


图 8用于层析样本中利妥昔单抗生物类似药半定量分析的电泳无染色试验A，利妥昔单抗生物类似药的 SDS-PAGE 分析；**B**，无染色与利妥昔单抗生物类似药的强度，ng/泳道。

表 5. 利妥昔单抗生物类似药纯化的 2 个主要工艺流程对 hcDNA 的去除情况

样本	蛋白 A 工艺流程 hcDNA 去除率 (%)	Nuvia S 工艺流程 hcDNA 去除率 (%)
捕获洗脱液	99.97	75.06
Nuvia Q 流穿液	100.00	99.53
CHT XT 洗脱液	100.00	100.00

表 6计算利妥昔单抗生物类似药纯化的 2 个主要工作流程的步骤和工艺产率

	产率，%			
层析工艺	捕获	中间	精纯	整体
蛋白 A —> Nuvia Q —> CHT XT	97	98	95	90
Nuvia S —> Nuvia Q —> CHT XT	93	98	95	86

计算所有单个层析步骤的产率，结果表明蛋白 A 的步骤产率 (97%) 略高于 Nuvia S 填料 (93%) 的产率。Nuvia Q 填料 (98%) 几乎无蛋白损失，CHT XT 填料的产率为 95%。因此，我们观察到非亲和工艺的总产率为 86%，而对照蛋白 A 工艺的产率为 90%（表 6）。在这些计算中未考虑由于缓冲液交换导致的单个 NGC 运行之间可能的蛋白损失，并且可能使每个步骤的总产率降低 5%。根据技术说明，这些离心柱的理论回收率为 90-95%。

采用尺寸排阻层析法分析利妥昔单抗聚集体

检测和去除聚集体是 mAb 纯化的重要组成部分（Xu 等人，2012 年）。抗体聚集体水平升高往往与 mAbs 过高表达有关。此外，蛋白 A 层析所需的强酸性洗脱条件可能导致不必要的寡聚化。在本研究中，对使用蛋白 A 或 Nuvia S 填料进行捕获步骤后以及使用 CHT XT 填料进行最终精纯步骤后获得的样本中可能存在的利妥昔单抗聚集体进行了分析。图 9 概述了通过定量 SDS-PAGE 分析评估的相应 SEC 图谱。蛋白 A 纯化后的聚集体测量数据（图 9A，红色箭头）显示聚集体水平为 5.5%，而 Nuvia S 纯化后的数据（图 9A，蓝色箭头）显示聚集体水平仅为 1%。然而，在这两个纯化工艺流程中，CHT XT 填料将最终聚集体含量降低至 0.7% 以下（图 9B，绿色箭头，表 7）。

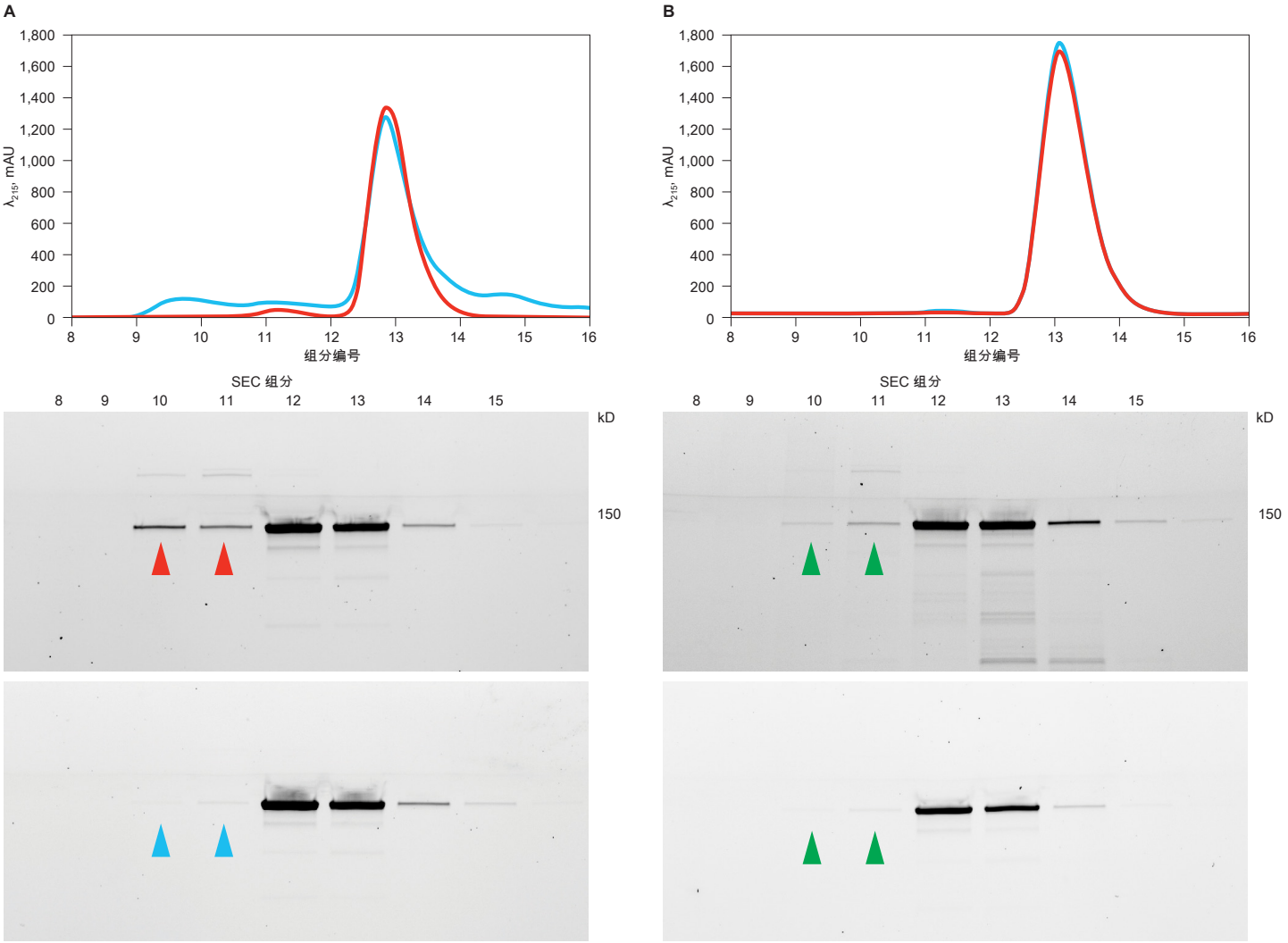


图 9采用 SEC 和 SDS-PAGE 无染色技术进行利妥昔单抗聚集体分析箭头表示用于评估聚集体水平的样本，如表 7 所示。**A**,Nuvia S (—) 后的 SEC，蛋白 A (—) 后的 SEC；**B**，Nuvia S-Nuvia Q–CHT XT (—) 后的 SEC，蛋白 A–Nuvia Q–CHT XT (—) 后的 SEC。

表 7利妥昔单抗生物类似药纯化的两个主要工作流程的聚集体百分比

	聚集体，%	
层析工艺	**捕获后**	**最终**
蛋白 A —> Nuvia Q —> CHT XT	5.5	0.5
Nuvia S —> Nuvia Q —> CHT XT	1	0.7

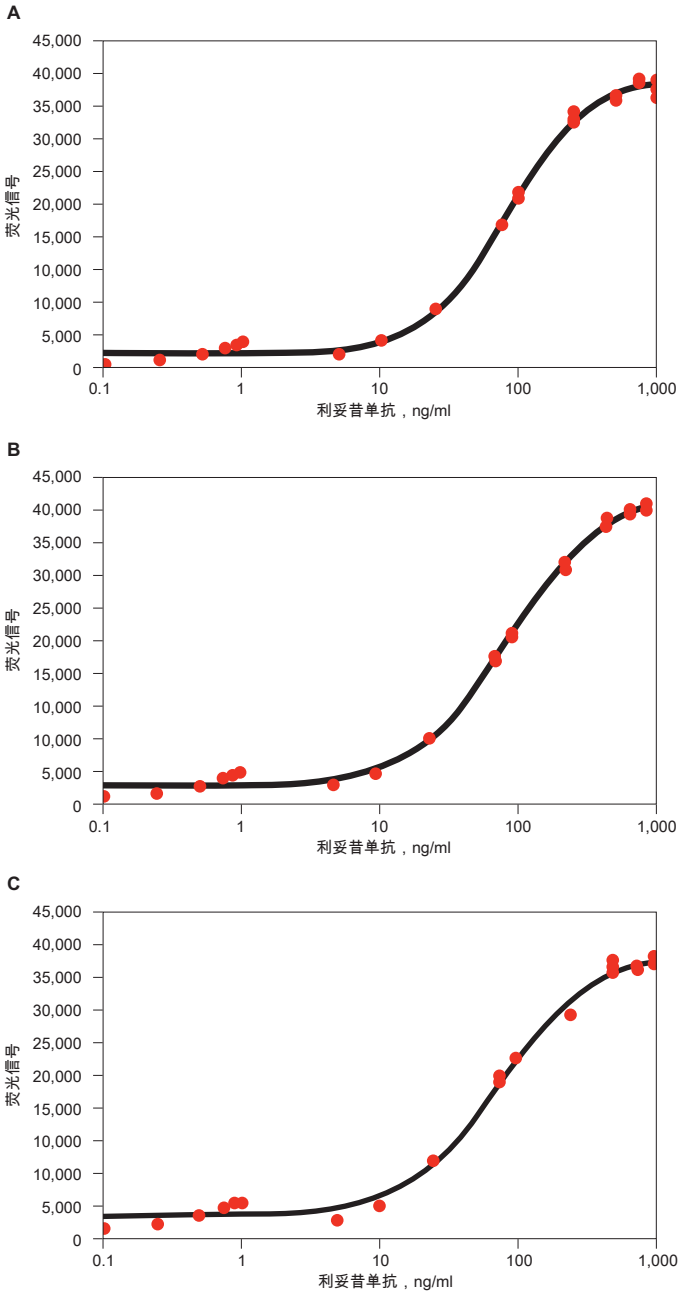


图 10标准和纯化利妥昔单抗生物类似药的 PK 桥接 ELISA
A，利妥昔单抗标准品；**B**，蛋白 A–Nuvia Q–CHT XT 工作流程；**C**，Nuvia S–Nuvia Q–CHT XT 工作流程。

PK 桥接 ELISA

PK 桥接试验可用于定量生物基质（如血清）中的治疗性蛋白。该药物同时结合两个位点，一个结合位点与固定化抗独特型抗体结合，另一个结合位点与标记的第二抗独特型抗体结合。此处，与利妥昔单抗生物类似药标准品相比，使用体外试验作为层析纯化后抗体完整性/完好性的指标。从图 10 中可以看出，经过 Nuvia S-Nuvia Q-CHT 和蛋白 A-Nuvia Q-CHT 纯化后的两种 mAbs 与标准抗体的表现类似，在纯化过程中没有出现明显的结构或功能损失。

结论

开发用于生物类似药生产的高效非亲和纯化工艺非常具有挑战性。但是，一旦获得成功，将会获得很多好处，如提高工艺经济性、更好地耐受氢氧化钠清洗以及消除配体脱落。在这里，我们展示了将两种离子交换填料与混合模式填料相结合的工艺流程，在利妥昔单抗生物类似药单克隆抗体的纯度、回收率和活性方面，可提供与基于蛋白 A 的工艺流程相似的结果。几乎不需要进行工艺开发就可建立最大 HCP 蛋白清除率所需的操作条件。本研究采用了利妥昔单抗生物类似药滴度较低（因此 HCP 污染水平特别高）的细胞培养上清液。

由 Nuvia S-Nuvia Q-CHT XT 组合而成的非亲和工艺在抗体滴度相对于宿主细胞蛋白更为明显的应用中取得了非常令人鼓舞的结果。因此，由于非亲和工艺可降低生产成本，在纯化抗体介导的治疗药物（特别是生物类似药）时，应考虑使用非亲和工艺。

参考文献

Ambort D et al. (2008). Sample preparation of culture medium from Madin-Darby canine kidney cells.Methods Mol Biol 425, 113–130.

Follman DK and Fahrner RL (2004). Factorial screening of antibody purification processes using three chromatography steps without protein A. J Chromatogr A 1024, 79–85.

Posch A et al. (2013). 2D-ToGo workflow: Increasing feasibility and reproducibility of 2-dimensional gel electrophoresis.Arch Physiol Biochem 119, 108–113.

Xu Z et al. (2012). Process development for robust removal of aggregates using cation exchange chromatography in monoclonal antibody purification with implementation of quality by design.Prep Biochem Biotechnol 42, 183–202.

请访问 **bio-rad.com/Resins**，了解更多信息并索取样品。

BIO-RAD, CHEMIDOC, CHT, DDPCR, DROPLET DIGITAL, DROPLET DIGITAL PCR 和 QUANTASOFT 是 Bio-Rad Laboratories, Inc. 在某些司法管辖区的商标。本文使用的所有商标均为其各自所有者的财产。
© 2024 Bio-Rad Laboratories, Inc.

TGX 无染色预制凝胶受美国专利号 7,569,130 和 8,007,646 的保护。

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 7382 Ver B CN US/EG *24-0356 0524 Sig 0124*