

一种 PD-1 单克隆抗体亲和纯化工艺的开发研究

丁秀艳
苏州大学药学院制药工程

[摘 要] 治疗性单克隆抗体药物当前已经成为了生物医药中的一种最主要的类别。蛋白 A 亲和层析作为捕获抗体蛋白的第一步,也是最为有效的手段,在现有的单克隆抗体纯化中仍然起着主导地位。本次研究中对一种单克隆抗体亲和纯化技术进行了研究,并探讨了相应的技术条件,旨在建立一种高效可工业化放大的亲和纯化工艺。

[关键词] 单克隆抗体; 蛋白 A 亲和层析; 生产工艺

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

[文章编号] 1674-9561 (2018) 06-030-02

1 引言

目前,全球医药产业正在快速地向精准医疗时代,靶向药物单抗正是其中最为成熟的领域,亦是生物制药发展中最重要驱动力,随着单抗生产上游基因改造、发酵条件的不断优化,使单抗药物的产量不断提升。作为生物药品,对单抗终产品的纯度和产量有严格要求,单抗目前多采用三部纯化策略,其中通常使用 Protein A (蛋白 A) 亲和层析作为初步纯化步骤。Protein A 层析介质具有高载量,高回收率的优点,并且洗脱产品纯度高达 95% 以上,是单抗纯化捕获阶段的理想介质;同时,Protein A 层析中使用低 pH 洗脱条件,可以方便衔接低 pH 孵育病毒灭活步骤。为了确定合理的亲和层析工艺条件,我们分别对亲和介质的上样条件、洗脱条件和载量进行了系统的研究。

2 纯化工艺研究

2.1 凝胶介质的选择

Mabselect LX 采用多孔高流速琼脂糖作为骨架,介质粒径约 75 微米,孔径大、具有比表面积和配基密度大,传质阻力小的优点,从而有效的增加动态载量。除载量更高外,Mabselect LX 较传统的 rProtein A 介质刚性更好,具有更高的特异性,更强的耐碱性,更长的产品寿命,和相对更好的工业生产优势,因此我们选用 Mabselect LX 作为亲和层析介质。

2.2 平衡条件和淋洗条件的确定

不同的平衡液及淋洗液对于亲和层析的回收率有较大的影响。通过比较不同 pH 的平衡及淋洗液的回收率,使用 20mM PB6.8 和 20mM PB6.8, 1M NaCl 样品的回收率最高。相应结果见表 1

表 1: PD-1 单抗平衡条件和淋洗条件研究

平衡液	20mM PB											
	pH6.5			pH6.8			pH7.2			pH7.6		
淋洗液	20mM PB, 1M NaCl											
	pH6.5			pH6.8			pH7.2			pH7.6		
洗脱液	20mM 柠檬酸钠缓冲液 (pH3.4)											
洗脱蛋白浓度 (mg/ml)	2.939	2.973	2.977	2.914	2.848	2.966	3.001	2.946	2.911	2.877	2.901	2.929
洗脱总蛋白量 (mg)	34.945	35.200	35.099	35.259	35.201	35.592	36.462	35.470	35.543	34.812	35.537	35.587
回收率 (mg)	89.2	89.8	89.6	90.0	89.8	90.8	88.9	90.5	90.7	88.8	90.7	90.8
	89.53			90.2			90.03			90.1		

2.3 载量的确定

增加凝胶对产品的载量可以减少凝胶和缓冲液的使用量,从而降低生产成本;还可缩短工艺操作时间,有利于目的蛋白的稳定。合适的上样量通过以下载量试验来确定。

细胞液经深层过滤后,取其上清液上样于 Mabselect LX

层析柱 (VL11X250, 6.5 mL 柱体积),通过上样过量的发酵上清,采用 2.2 确定的平衡淋洗条件纯化,然后 HPLC-ProA 检测穿透液中抗体的量,重复 3 次后确定 Mabselect LX 亲和介质的 DBC_{10%} 为 56g/L,为保证实际操作过程的适用性,选择 45g/L 为实际操作中的凝胶载量,相应结果见表 2。

表 2: PD-1 亲和层析载量研究

上样样品中目的蛋白浓度 (mg/mL)	0.718	0.684	0.745
穿透液中目的蛋白含量为 10% 上样样品中目的蛋白浓度时上样体积 (mL)	重复实验 1	重复实验 2	重复实验 3
	515.2	496.0	518.4
DBC _{10%} (g/L)	56.9	52.2	59.4

2.4 洗脱 buffer 种类的确定

亲和层析洗脱一般采用低 pH (3-4) 洗脱的方式,甘氨酸缓冲体系、柠檬酸缓冲体系和醋酸缓冲体系在该 pH 范围内均

有良好的缓冲能力。采用 2.1、2.2、2.3 项下的亲和纯化参数,使用 pH3.4 的上述 3 种 buffer 洗脱目的蛋白,分别考察洗脱样品的纯度、回收率及室温下的稳定性,具体结果见下表 3。从回收率来看,3 种 buffer 基本一致;从纯度来看,甘氨酸洗脱样品纯度较高,但洗脱体积过大,因此选择柠檬酸钠缓

通讯作者: 章良。

冲液或者醋酸钠缓冲液。

样品在柠檬酸缓冲体系中室温静置 22h，发现纯度及浓度均明显下降，而在醋酸钠缓冲体系中室温静置 48h，纯度

和浓度均无明显变化，因此选择醋酸钠缓冲体系作为洗脱 buffer。见表 4。

表 3：不同洗脱液洗脱样品的纯度及回收率

洗脱液	20mM 柠檬酸钠缓冲液 (pH 3.4)	20mM 醋酸钠缓冲液 (pH3.4)	20mM 甘氨酸盐缓冲液 (pH3.4)
洗脱峰总蛋白量 (mg/mL)	17.428	14.135	17.670
洗脱峰纯度 (SEC-HPLC, %)	97.36	97.62	98.19
回收率 (%)	92.08	92.55	92.08

表 4：不同洗脱液洗脱样品的稳定性

检测项	Buffer	20mM 柠檬酸钠缓冲液 (pH 3.4)					20mM 醋酸钠缓冲液 (pH3.4)				
		0h	3h	6h	22h	48h	0h	3h	4.5h	19.5h	48h
浓度 (ProsG) mg/mL		1.866	1.855	1.823	1.697	1.661	1.650	1.637	1.670	1.688	1.510
纯度 (SEC-HPLC, %)		97.30	97.55	97.11	92.37	84.78	97.53	97.30	97.58	97.50	97.58

2.5 洗脱 pH 值的确定

为了获得最高的回收率，对 pH 的范围进行了优化，结果显示 pH3.4 时回收率最高，具体数据见下表 5。

2.6 亲和层析工艺的确定

层析介质：Mabselect LX；操作载量：45g/L；柱高：25±2cm；保留时间：≥ 5min；缓冲液体系：平衡缓冲液：20mM PB (pH 6.8)；淋洗缓冲液：1M NaCl，20mM PB (pH 6.1)；洗脱缓冲液：20mM 醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH 3.4)。

3 结果与结论

经过本工艺的亲和纯化操作，7L 原液纯化后 CHO 细胞蛋白残留量 <2000ppm，CHO 细胞 DNA 残留量 <0.3pg/mg，蛋白 A 残留量 <1ppm，同时分子排阻成分 >90% 离子色谱主峰、酸

性主峰与碱性主峰比例符合预期，该亲和纯化工艺实现了目标蛋白高纯度分离。见表 6。

表 5：洗脱 pH 值的确定

洗脱	20mM 柠檬酸钠缓冲液			
	pH3.6	pH3.4	pH3.2	pH3.0
目标峰体积 (mL)	16.47	9.27	8.65	8.49
目标峰蛋白浓度 (mg/mL)	0.967	1.852	1.955	2.007
目标峰中总蛋白含量 (mg)	16.80	17.80	17.54	17.64
回收率 %	82.8	87.7	86.5	87.0

表 6：7L 小试工艺亲和纯化质量指标及回收率测试结果

工 艺 步 骤	SEC-HP 主 峰 (%)	产 物									
		CEX-HPLC (%)			CE-R (%)	CE-N (%)	HCP ppm	r-DNA pg/100ppm	r-ptotein-A ppm	pI	回收率 (%)
		主峰	酸峰	碱峰							
cycle 1	94.52	50.35	20.0	29.65	98.37	96.68	882.71	NA	0.97	7.16	93.1
cycle 2	96.60	51.82	18.27	29.91	98.81	96.48	1609.03	NA	0.72	7.15	94.0

通过纯化体系的研究，我们确定了合理的亲和层析工艺条件，包括亲和介质的上样条件、洗脱条件和载量等。试验结果显示，该亲和纯化工艺实现了目标蛋白高纯度分离，在实际生产中具有显著的价值。

【参考文献】

[1] 魏建玲，张波，刘颖，等. 人源化抗人 TNF α 单克隆

抗体纯化工艺的优化 [J]. 沈阳药科大学学报，2017，(1):79-83.

[2] 陈泉，卓燕玲，许爱娜，等. 蛋白 A 亲和层析法纯化单克隆抗体工艺的优化 [J]. 生物工程学报，2016，32(6):807-818.

[3] 何凌冰，李乐，邓义熹，等. 几种 ProteinA 亲和层析填料纯化重组单克隆抗体效果的比较 [J]. 中国生物工程杂志，2015，35(12):72-77.

(上接第 29 页)

心理健康教育、饮食健康教育、生活健康教育等都是阴道炎患者健康教育时不可缺少的内容，通过贯彻以患者为中心的理念，坚持全心全意为患者服务的原则，可以最大限度地提升健康教育的有效性。本文研究结果显示，观察组在疾病知识知晓率、依从性、满意度等护理指标方面，均要明显高于对照组，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，充分说明了健康教育应用在阴道炎患者护理中的作用，并且相较于常规护理干预作用更加明显。

综上所述，阴道炎作为一种常见的妇科疾病，在其治疗的过程中实施健康教育，可以有效提升治疗效果，提升患者

对疾病认识，获得患者的广泛认可，具有较高的应用及推广价值。

【参考文献】

[1] 倪静，王玉慧. 健康教育干预在阴道炎护理中的临床价值分析 [J]. 中国农村卫生，2018，10(04):74-74.

[2] 杨叶青. 健康教育干预在阴道炎护理中的临床价值分析 [J]. 中国社区医师，2017，33(30):148-149.

[3] 谭海杰. 健康教育干预在阴道炎护理中的临床价值分析 [J]. 实用妇科内分泌电子杂志，2015，2(10):155-156.

[4] 胡燕红. 健康教育干预在阴道炎护理中的临床价值分析 [J]. 齐齐哈尔医学院学报，2014，35(08):1240-1241.