

一、单抗技术的发展、应用和市场前景

Kohler 和 Milstein 于 1975 年发明了被称之为“魔弹”的单克隆抗体技术，并在 1984 年获得了诺贝尔奖。单抗是 B 淋巴细胞和骨髓瘤细胞杂交形成的杂交瘤细胞产生的，其重链和轻链所形成的结构域可以识别和结合特异抗原。1987 年单抗技术被成功应用到诊断试剂当中，但由于 HAMA (人抗鼠抗体) 反应，没能有效应用在人类疾病的治疗上。90 年代，随着基因工程技术的迅速发展，治疗性单抗从早期 100% 的鼠源单抗 (Mab)，到嵌合抗体，人源化抗体 (Humanized Mab)，到近年的全人源性抗体 (图 1、2)，逐步消除了异源性抗体的免疫原性问题，在保持对抗原高亲和力的同时，改善了抗体的药代动力学。

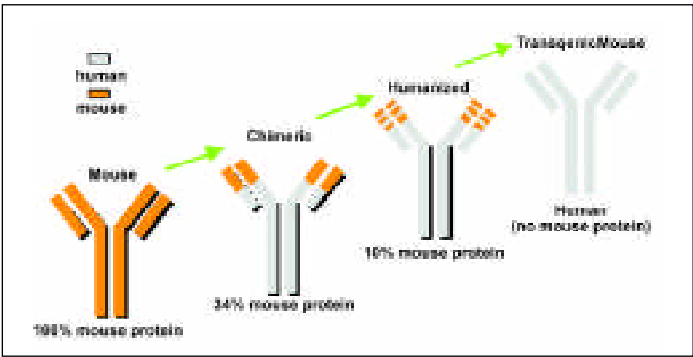


图 1. 治疗性单抗技术演化

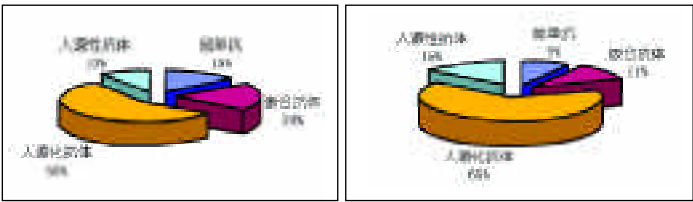


图 2. 上市单抗的分布图 正在临床试验的单抗分布

1997 年 FDA 批准第一个治疗淋巴瘤的嵌合单抗药物 Rituxan, Anti-CD20 抗体上市，并进入 56 个国家，由 IDEC/Genentech/Roche 三大药厂联合生产和销售，至今仍然供不应求¹。2001 年 5 月，《时代周刊》封面文章指出，治疗性单抗是人类与癌症战斗中的一次重大胜利²。



单抗药物的主要治疗机制是：

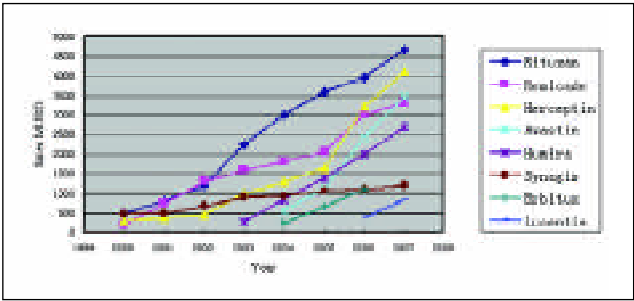
1. 直接诱导癌细胞凋亡或抑制癌细胞生长和代谢，或通过补体效应或 ADCC (抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用) 间接杀死癌细胞；
2. 癌症、心血管等疾病的导向治疗：以单抗荷载同位素、毒素蛋白、抗生素等药物制成生物导弹；
3. 应用抗体 T 细胞、抗 IL-2R 的单抗防治器官移植排斥反应等；
4. 以单抗制成避孕、传染病的预防药物。

至 2007 年，FDA 已批准了 20 多种治疗性单抗药物，约一半用于治疗癌症 (详见附录 1)，多个已成为年销售额超十亿美元的“炸弹药物” (Blockbuster Drug, 图 3)。全球抗体药物的市场增长十分迅猛，有约 200 多种单抗在临床实验，占整个临床生物技术药品总数的三分之一多，其中四分之一在临床三期或等候批准。预计单抗的全球销售额将从 2004 年的 50 多亿美金增至 2010 年的 300 多亿美金，年均复合增长达到 30%。整个抗体市场 (包括多抗) 2007 年即已经达到 210 多亿美金 (表 1)。2000 年人类基因组序列初稿的完成，近年蛋白质组和结构基因组技术的蓬勃发展，也给抗体研究带来更多机遇和挑战。而高细胞密度培养及表达技术、高表达细胞株构建技术以及大规模蛋白质纯化技术的发展则极大的推动了抗体产业化发展。

表 1. 全球治疗性抗体 (包括单抗与多抗) 市场预测 (单位：亿美元)

	2001	2002	2004	2007	2010E	01-10 年 年均复合增长率
治疗用抗体	29	40	105	210	300	26%

图 3. 全球主要单抗销售额趋势^{3,4}



注：2007 年有 7 个抗体品种进入“重磅炸弹”销售行列，有 5 个进入单一药品销售前十名。

二、单抗的结构、种类、性质及纯化策略概览

1. 单抗的结构和种类

传统单抗的 Y 型结构，由重链和轻链组成 (图 4)。

利用 DNA 重组技术，在全分子抗体向嵌合抗体及改型抗体发展的同时，小分子及单链等基因工程抗体 (Gab) 也得到了极大的发展 (表 2)。

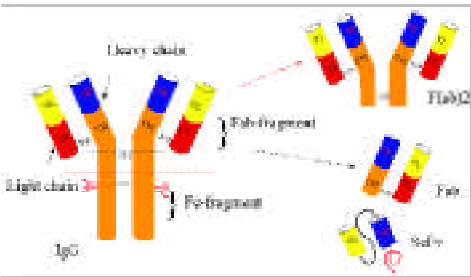


图 4. 全分子、小分子及单链抗体结构示意图

表 2. 基因工程抗体 (Genetically engineered antibody, Gab)

基因工程抗体	特 点
人 - 鼠嵌合抗体	在基因水平上将鼠源单抗的可变区和人抗体恒定区重构并在合适的宿主细胞中表达。其人源化低于 80%，但 HAMA 反应比鼠源单抗明显减少，人源的恒定区可更有效介导人体内的 CDC 和 ADCC 等免疫效应。如 Remicade (Centocor 公司) 抗 TNF- α 抗体，治疗风湿性关节炎和节段性回肠炎。
人源化抗体	将鼠单抗的 CDR 移植到人抗体的骨架区，保持了鼠单抗的抗原特异性，并最大限度地降低其异源性，形成改型抗体，HAMA 反应更低。如 Herceptin (Genentech 公司)，抗 HER2/neu 抗体，用于治疗乳腺癌。
人源性抗体	主要通过噬菌体显示技术和转基因动物制备人源性抗体，全人源抗体。如 Abbott 开发的 D2E7，抗 TNF- α 抗体 Humira，治疗关节炎。
F(ab) $_2$	用胃蛋白酶处理，分子量小，穿透力强。
Fab 片段及重组 Fab	用木瓜蛋白酶分解全分子抗体纯化得到 Fab 片段，如果恒定区片段是人源性的则称为重组 Fab。它具有与亲本全分子抗体相同的抗原特异性但组织穿透能力更强，结构稳定，制作简单。如抗 Crohn 病的 Cimzia。
Fv 和单链抗体 ScFv	将重链可变区 V _H 和轻链可变区 V _L 通过共价键结合得到完整抗原结合活性的最小功能片段即为 Fv。如用一段肽链将二者连接起来形成单一链分子即得到单链抗体 (scFv)。穿透力强但往往亲和力下降。
双体分子 Diabody	一条单链抗体分子上的 V _H 和 V _L 与另一条相同的单链抗体分子上的 V _L 和 V _H 分别配对形成双价的抗体分子。
单域抗体	比 Fv 更小的亚单位结构组成的具有抗原结合活性的分子，如重链可变区。
最小识别单位	抗体互补决定区 CDR 衍生的多肽小分子，该多肽具有亲本单抗的亲力和选择性，无免疫原性。
双 / 多特异性抗体	具有两种或多种抗原结合特异性。
抗体融合蛋白	导向抗体与毒素、免疫粘附素、酶或细胞因子联合或 Fc 段与功能蛋白融合等。
特殊类型抗体	细胞内抗体和抗原化抗体等。

2. 单抗特性及纯化策略

每个单抗等电点、电荷密度、疏水性、糖基化程度等生化性质各不相同。选择单抗的纯化方法，既要了解它们的共性，又要了解个性，从而制定相应的纯化策略 (表 3)。

表 3. 单抗的基本性质

	单 抗 特 性	纯 化 策 略
分子量	IgG 150-170KD (重链 50KDa，轻链 25KDa) IgM 约为 900KD (五聚体)	单抗样品浓缩一般选择 30KD 或 50KD 的超滤膜。分子筛层析 Superdex 200 或 Sephacryl S-300，能有效去除抗体聚集体。选择超滤膜和分子筛介质时除了分子量，还须考虑单抗不同亚型 (SubClass) 的空间结构和形状，如人 IgG ₁ 较细长，需要选分子量较小的超滤膜。 GE HC 新一代超滤膜孔径更均一，可以使用更大孔径 (50-100KD MWCO) 超滤膜进行抗体的浓缩而保持极高的收率，在浓缩单抗的同时，有效的去除大量蛋白酶 (多为 60-70KD) 和 BSA 等杂质，从而避免了纯化过程中蛋白酶对抗体的破坏，使终产品更均一，比活更好。
等电点	从 pH4.0 到 9.0 不等，大部分超过 pH6.0	大多数 IgG 等电点高于一般血清蛋白，建议用阳离子交换层析 ⁵ 捕获浓缩抗体或流穿模式的阴离子交换层析以除去大部分杂蛋白，DNA 和内毒素 (图 5)。 注意：CHO 细胞表达的基因工程抗体 (Gab) 由于细胞培养过程带来的糖基化的不均一以及后期的脱氨基脱酰胺等作用，存在着等电点不同的多种抗体变体 (见图 5)，离子交换层析根据带电性质的不同可以有效去除这些变体，使产品性质更均一。
疏水性	大多数 IgG 疏水性较强	大多数 IgG 可以在 0.5-1.0M 硫酸铵结合疏水介质，让大部分杂蛋白流穿。单抗在硫酸铵 30-50% 时会沉淀，可重溶后直接上疏水层析 ⁶ 。不同抗体疏水性程度也不相同，如用 Source 15PHE 可除去含血清培养基中的牛 IgG ⁷ 。
糖基化	IgG 含 2-3% 糖基，IgM 含 12% 糖基	主要在重链的 Fc 区产生 N-link 的糖基化。 注意：抗体糖基化不均一，所带电荷也不同，IEF 等点聚焦电泳呈多条带 (图 5)，会影响离子交换层析效果。
pH 稳定性	稳定性较好	IgG 在水溶液或一般的缓冲液中都比较稳定。但应避免较极端的 pH，如低 pH 促使蛋白聚集 ⁸ ；pH>8.5，脱酰胺酶可能降解单抗。
多聚体、复合物的形成	没有保护剂的情况下 IgG 浓度高于 2mg/ml 容易形成二、多聚体	pH、盐浓度、buffer 种类、温度等都会影响抗体的聚集动力学。如 pH<3，抗体会发生不可逆聚集；盐浓度过高增强疏水聚集；碱性单抗在多价阴离子缓冲液中易形成稳定的离子复合物，导致抗体之间的聚合；在 0.3M-1.0M NaCl 中，单抗与核酸可形成可逆的复合物，离子交换层析纯化时须留意。
溶解度	大多数 IgG 在中性偏碱和低电导的缓冲液中是稳定可溶的	有些单抗在温度低于 37℃ 时溶解度会降低，易结晶，纯化过程避免冷室操作。



图5. 抗体及主要杂蛋白等电点分布范围 (右下图为抗体等电聚焦结果图) 基因工程抗体 (Gab) 由于细胞培养过程带来的糖基化的不均一，等电点往往较分散而非单一条带

3. 针对不同抗体和其生产宿主的特性制定纯化策略 (表 4)

表 4. 不同宿主生产抗体纯化策略

抗体生产宿主	优 / 缺点	主要相关杂质	针对宿主特性的纯化策略
鼠 / 兔等动物 *	直接免疫动物，方法成熟，产量可达 1-15 g/L。单抗亲和力高，但生产周期长，难以大量生产	动物腹水各种生物大分子、脂类	由于 HAMA 反应，鼠源单抗大多仅用于诊断试剂，规模较小，产品纯度要求较低 (电泳纯 90-95%)。Protein A 或 G 亲和层析配合分子筛 Superdex 200 或 Sephacryl S-300 一般已可以达到所需纯度
杂交瘤细胞 *	5-10% 小牛血清培养表达量 10 g/L，但纯化困难，并有动物源污染风险。无血清培养表达量可达 1-4 g/L	培养基内的杂蛋白，如血清白蛋白、转铁蛋白、酶、小牛 IgG、脂类以及宿主蛋白和 DNA	用于诊断试剂和治疗性单抗，后者纯度要求较高 (95-99%)。需要多步、多维层析去除宿主杂质。转铁蛋白、牛 IgG 与目标抗体性质接近，污染问题十分显著。一般可通过优化疏水层析和离子交换层析去除。若白蛋白的量较多，可先用白蛋白 A、蛋白 G 等亲和层析法直接捕获抗体
CHO/NS0 等哺乳动物细胞 *	利用基因工程技术将抗体人源化。目前上万升发酵罐的单抗表达量可达 1-10 g/L	宿主、培养基内的杂蛋白、核酸、脂类等	主要为治疗性单抗。临床剂量大 (数十至几百毫克 /dose)，批产量达公斤级，纯度要求极高 (>99%)。约 80% 的下游工艺用 Protein A 亲和层析如 MabSelect Family 进行快速捕获，再配合离子交换、疏水层析等进行精纯，以达到治疗用要求
<i>E.coli</i>	利用基因工程技术表达人源化小分子抗体 (Fab, ScFv)、特殊抗体及抗体融合蛋白。相比动物细胞，生产周期短，成本较低，但与相应抗原结合靶点减少	宿主杂蛋白、核酸、脂类、内毒素等	对于 <i>E.coli</i> 表达的蛋白，可以使用中空纤维结合层析进行纯化。不同孔径的中空纤维膜广泛用于菌体收集、裂解液澄清和包涵体洗涤，完全代替离心机，收率高成本低。经过中空纤维洗涤的包涵体可考虑用 Sepharose 4FF 先纯化包涵体，再进行柱上复性，提高回收率 ^{9,10} 。也可用中空纤维膜做透析复性，不但容易放大，而且效率更高。融合蛋白可考虑 GST 或 HisTag 表达系统，用 GST Sepharose 或螯合了镍离子的 Chelating Sepharose 纯化 ¹¹ 。两者都可进行柱上酶切 ¹²
酵母 <i>Pichia pastoris</i>	表达量高，培养规模容易放大，相比动物细胞成本低；糖基化仍然存在问题影响比活，难以表达全分子抗体	宿主细胞蛋白及培养基中蛋白	用中空纤维膜做样品的澄清，之后用离子交换结合疏水层析进行纯化 ¹³
转基因动物 *	可表达全分子抗体，能正确糖基化；但转基因较困难，表达不稳定	动物蛋白及宿主抗体	转基因动物分泌表达如动物乳中，可采用中空纤维超滤技术进行分级分离，降低纯化难度，然后用高分辨率的疏水层析分离宿主抗体
转基因植物 *	降低了动物细胞污染的可能性，能够大规模低成本生产；破碎细胞及分离纯化难度加大	色素、植物细胞杂蛋白等	用亲和层析纯化植物表达抗体效果比较好，会有少量色素吸附在亲和胶上，但可用分子筛除去 ^{14,15}

* 需考虑不同宿主病毒灭活验证问题。

三、治疗用抗体生产策略：技术选择与工艺整合

一般用于检测等用途的抗体，一步亲和层析达到大于 90-95% 的纯度即可满足要求。而治疗用抗体一般使用动物细胞大规模高密度无血清悬浮培养进行生产，不仅对终产品的单体含量有严格的规定，还必须去除各种潜在的杂质以满足药品安全的要求，因此在蛋白 A 亲和层析之后还需要进行多维纯化。

2003 年初，中国 SFDA 下属的中国药品与生物制品检定所 (NICBP) 公布了《人用单克隆抗体质量控制技术指导原则》¹⁶。生产者除须保证最终抗体产品纯度，还需要验证所用的纯化

方法能有效对潜在的污染物，如宿主细胞蛋白 (HCP)、免疫球蛋白、宿主 DNA、用于生产腹水抗体的刺激物、内毒素、其它热原物质、培养液成分、层析凝胶析出成分 (脱落的蛋白 A 配基) 进行去除；并能有效的去除 / 灭活病毒。也就是说，在设计下游工艺时，需多角度充分综合考虑抗体本身的性质，抗体的来源，发酵培养技术，发酵液蛋白浓度，宿主杂质，抗体批间的差异，潜在污染及病毒灭活等问题。目前，用 CHO 细胞大规模生产 (超过一万升培养罐) 的单抗表达水平已在 1-10 g/L。

除上面所提到的各种杂质外，治疗用抗体在生产和纯化过程中还会由于糖基化程度不同、蛋白酶作用、以及脱氨基和脱酰胺等反应而产生带电性质不同的多种抗体变体；另外，抗体氧化、聚集和片段化也是常见的降解途径。针对这些变体，一方面，在表达和纯化过程中选择参数（如pH、盐浓度等）时要充分考虑到目标抗体的稳定性；另一方面，应控制细胞培养的条件（DO、渗透压等），同时加快下游分离纯化的速度，最大程度上避免抗体在纯化过程中产生变体，从而保证终产品的均一性和高的比活，也有利于控制终产品的内毒素水平。

3.1 治疗用抗体生产技术选择 (Wave细胞培养技术/膜分离技术/层析纯化技术)

3.1.1 Wave 细胞培养技术 (图6-7)：治疗用抗体的表达一般采用大规模悬浮动物细胞培养，常用的细胞系为CHO和NS0，可以选择批式流加或连续灌注的培养方式。连续灌注培养(perfusion)可以避免细胞代谢的废物在反应器中的累积，连续收获培养液的同时不断加入新鲜培养基以维持恒定的营养物质浓度，使得细胞密度大大增加，从而提高抗体滴度、减少反应器的体积，降低生产投资成本。批式流加(Fed Batch)的培养方式通过对培养基和培养条件的优化和严格控制，达到较高的细胞密度和较高的产量，同时操作也更简单。

Wave 反应器是兼容各种表达系统（细胞、酵母、细菌等）的新型生物反应器，它通过无介入的搅拌提供温和高效的混合，在极低的剪切力下大大提高传氧系数，尤其适合于高密度的细胞培养和酵母、细菌等的发酵，目前已经广泛用于悬浮细胞培养生产抗体、微载体细胞培养生产疫苗、腺病毒等各个生物制药领域。

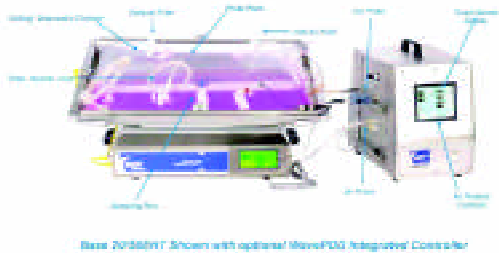


图 6. Wave 反应器的主要组件

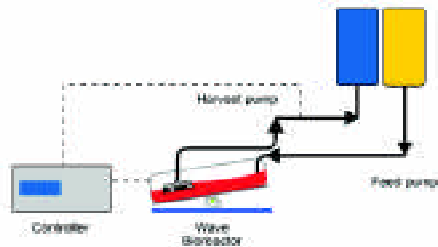


图 7. Wave 反应器成功用于连续灌注培养

Wave 反应器的优点¹⁷：

- 1. 经济、高效：相比搅拌罐式生物反应器，Wave生物反应器大大降低了前期的投资成本，同时对厂房要求低，可以节省厂房建设和验证的时间，加快生物制品上市的速度。
- 2. 高传氧系数：Wave反应器采用高效温和的无介入搅拌，大的气液表面积大大提高了传氧系数，同时剪切力远远低于搅拌式鼓泡反应器，易于规模放大。这对于大规模高密度细胞培养非常有益。
- 3. 操作方便、不易污染：Wave生物反应器采用预先灭菌的无菌无热原细胞培养袋（图23），材质完全符合USPVI标准，即开即用，避免了反应器日常清洗、灭菌和验证等操作。细胞培养袋有多种扩展接口，方便的进行DO、pH的在线监测和控制，还可以通过无菌焊接机实现全封闭可移动的生物制品生产。
- 4. 验证：提供完整的验证支持文件，符合GMP的生产要求。

Wave 反应器适合批式流加和连续细胞灌注培养（图 24）的方式。目前，Wave反应器进行抗体的生产已经成功放大到500L的规模¹⁸，抗体表达量和产品质量均与搅拌式反应器相当。

3.1.2 膜分离技术：下游的分离纯化单元操作包括一系列的膜分离技术和层析技术，膜分离技术通常用于培养液的固液分离（澄清，代替离心机），样品的浓缩、纯化中间产物的缓冲液置换以衔接不同的层析步骤，以及终产品的制剂和无菌过滤等；而层析技术则凭借高的分辨率去除特定杂质。因此，将膜分离技术和层析技术有效的结合成为下游分离纯化工艺开发的关键。

3.1.2.1 中空纤维膜：GE HC的中空纤维滤膜是近年来发展起来的新型切向流膜分离技术，与盒式膜包相比，中空纤维膜可以直接处理高固含量和高黏度的粗料液，具有容尘量高、速度快、剪切力小、成本低等优点。目前，中空纤维微滤膜已经广泛用于生物制药的各个领域¹⁹（图 8）。

对于动物细胞培养液，可以将高密度的培养液直接用中空纤维微滤膜（0.22或0.45μ）进行澄清，而无需事先经过离心和预过滤，步骤少，速度快，收率高，成本低。和离心机比较，具有极高的澄清度，因此中空纤维澄清后的细胞培养液可直接进入蛋白A亲和层析进行纯化。

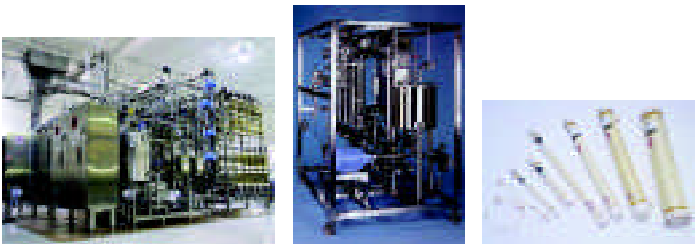


图 8. 中空纤维膜过滤生产系统和中空纤维滤柱

中空纤维膜澄清细胞培养液的优势：

1. 中空纤维澄清步骤少，速度快，收率更高(通过有效的洗滤可使样品收率稳定而且高于离心机)，同时最大程度上避免抗体降解而影响产品均一性。
2. 成本低：中空纤维膜澄清不仅省去了连续流高速离心机昂贵的前期投资和运转的日常维护成本，还节省了离心后死端过滤(NFF)的成本。中空纤维膜物理化学性质稳定，可以通过清洗而反复使用，成本低廉。
3. 有利于内毒素控制：中空纤维膜稳定的化学性质可以耐受1N NaOH 40-50°C和氧化剂NaClO的清洗，从而有效去除内毒素；封闭的系统，也更有利于生产过程中内毒素的控制。此外，大部分中空纤维滤柱还可以进行高压灭菌。
4. 低剪切力：中空纤维采用低剪切力 ($\text{Shear Rate} = 4q/\pi r^3$, q -crossflow in cm^3 (ml)/sec, r -fiber radius in cm) 的开放式流道，不仅可以处理含有高固含量的料液，还避免了蛋白质活性分子在高剪切力下的聚集变性,有利于抗体的稳定。
5. 工艺耐用性强：相比死端过滤，切向流中空纤维澄清具有很好的操作灵活性和耐用性，可以通过调整操作参数(流速，TMP)处理不同性质的细胞培养液。
6. 易于线性放大：通过维持切向流速、TMP等参数恒定，方便地进行线性放大，生产规模的Grandstand系统处理量可达几千升料液，目前国内销售最大的中空纤维膜过滤系统已达400 M²且生产稳定。

中空纤维微滤澄清一般主要受孔径、中空纤维膜长度、管径以及过程及样品条件等因素的影响^{20, 21}，样品澄清的操作方式一般采用透过端出口控制的操作方式²²，有利于降低TMP，增加处理量，根据细胞密度和细胞活率(viability)的不同，一般的操作条件为：选择1mm直径的中空纤维管，剪切力4000~8000/sec，透过端30~150LMH；处理载量达80~120L/m²膜面积(图9)。具体的参数需要根据不同的料液性质对膜孔径、剪切力、透过速度等参数进行优化。

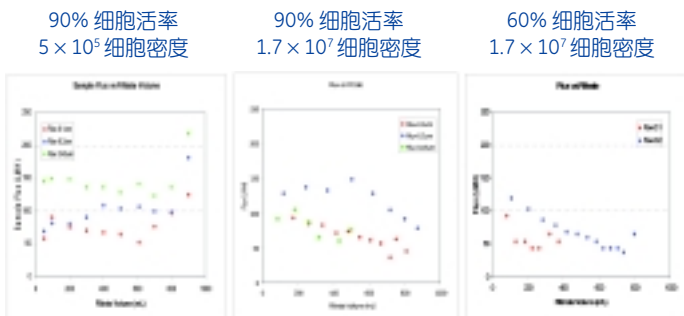


图9. 不同细胞密度和细胞活率条件下,不同孔径的中空纤维膜处理抗体培养上清

新推出的 RTP (Ready To Process) 中空纤维滤柱预先经过灭菌，除用于培养液澄清和浓缩外，还可以结合Wave反应器进行连续的细胞灌注培养²³，进一步增加细胞密度，提高产量，或直接用中空纤维膜做抗体表达的细胞培养²⁴。

3.1.2.2 Kwick 盒式膜包：多步层析纯化得到的洗脱峰可以使用GE HC的Kwick Lab/Process盒式膜包进行快速浓缩和缓冲液置换(图10)。



图10. 板式超滤系统及超滤膜包(左图为自动液压夹具系统，最大可夹7.5 m²膜包，中图为最大可夹0.55 m²的膜包系统)

Kwick 盒式膜包进行抗体浓缩 / 缓冲液置换的优点：

1. 无热原：高剂量抗体类药物的热原去除是非常关键的。很多时候，仅用0.5N NaOH清洗难以彻底去除膜表面的热原。Kwick 盒式膜包化学性质非常稳定，可以使用1N的NaOH在40-50度下进行彻底的SIP/CIP，避免最终超滤浓缩时引入热原而影响产品质量。
2. 孔径均一、速度快：Kwick盒式膜包孔径更均一，甚至可以使用50-100k的膜包(其它公司必须用30k膜包)进行抗体浓缩而不漏过，速度更快，大大节省了操作时间。
3. 易于线性放大：通过保持流速、TMP等参数恒定，可以直接线性放大到生产规模。通常样品浓缩的切向流速度控制在500-700ml/min/ft²，TMP可以控制在25-40psi(图11)，在防止形成凝胶层的条件下取得最佳的透过通量(FLUX，单位平米单位小时的透过速度LMH)并取得最优化的膜的载量。

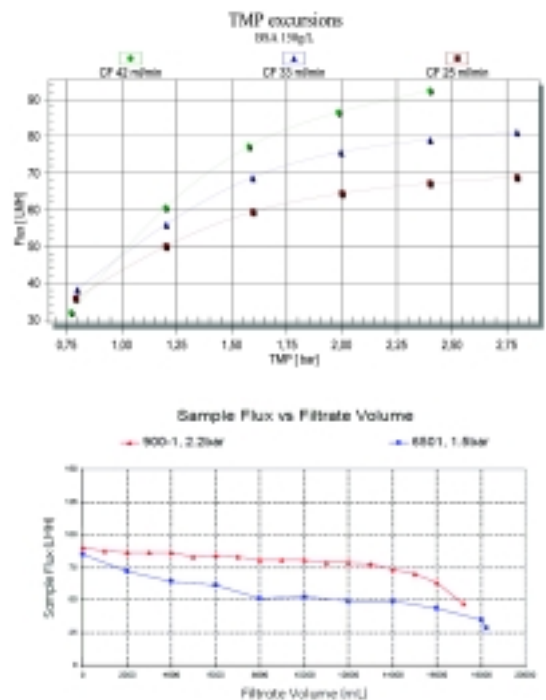


图11. FLUX-TMP条件优化(上)及膜载量优化²⁵(下)

浓缩样品的缓冲液更换通常用洗滤的方式完成,洗滤方式通常分为一次性加入置换缓冲液,分次加入置换缓冲液或连续加入置换缓冲液,连续加入置换缓冲液最为有效,缓冲液的消耗也最小(图12)。通常在层析步骤间的衔接进行缓冲液更换,连续方式洗滤5个体积就可以了,而在最后一步制剂时进行缓冲液更换则需要洗滤10个体积以进行彻底的缓冲液置换。

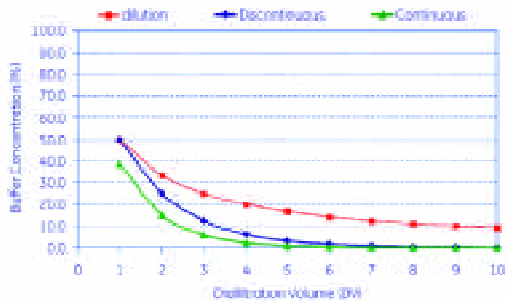


图 12. 洗滤方式与缓冲液的消耗

无论是中空纤维膜切向流,还是盒式膜包切向流工艺条件的开发与优化,都可以在 UNICORN 控制的全自动膜过滤系统 ÅKTAcrossflow (图 13 左) 上来进行,其得到的参数可以线性放大到生产,最优化的生产参数可以节省投资成本,提高膜使用与生产效率。对于使用全自动的 UNICORN 软件控制的 UNIFLUX 系统 (图 13 右) 进行抗体样品的澄清生产,其透过控制非常稳定,可以有效保证生产的稳定性和产品质量批间一致性。

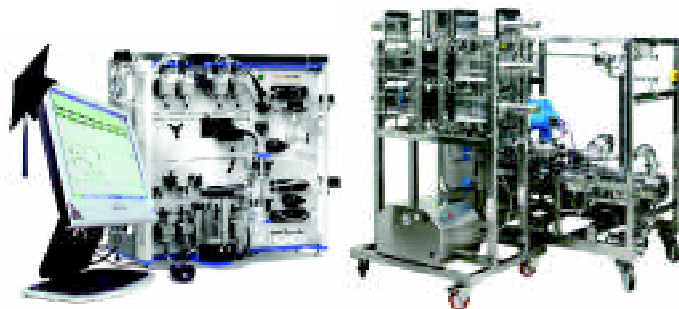


图13. 全自动膜过滤实验室工艺开发与优化系统(左)和自动化生产系统(右)

3.1.2.3 ULTA Pure SG²⁶ 和 ULTA Pure HC²⁷ 新型除菌滤器 (图 14): Kwick 盒式膜包浓缩后的样品,最终经过 ULTA Pure 0.22μm 无菌过滤器进行除菌过滤。ULTA SG 系列除菌过滤器具有过滤速度快、化学稳定性好、载量高和溶出物少等优点,细菌挑战实验表明其除菌能力大于7 log。除菌过滤过程的优化主要从三个方面入手:操作过程中过滤压差的控制、过滤速度以及单位膜载量控制,这三个参数优化以后,可以在同种类型、材质的NFF膜上进行线性放大,否则很容易影响收率(图 15)。



图 14. 除菌 NFF 过滤器

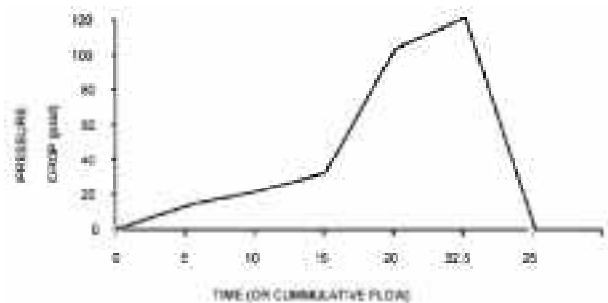


图 15. 操作压力降曲线

3.1.3 不同亲和层析介质捕获技术及优化策略

3.1.3.1 Protein A Sepharose、rProtein A Sepharose 亲和层析介质与抗体的结合

目前,约70-80%的抗体纯化使用 Protein A、Protein G 亲和层析²⁸。蛋白 A (Protein A) 来源于金黄色葡萄球菌的一个株系,它含有5个可以和抗体 IgG 分子的 Fc 段特异性结合的结构域。蛋白 A 作为亲和配基被偶联到琼脂糖基质上,可以特异性的和样品中的抗体分子结合,而使其他杂蛋白流穿,具有极高的选择性,一步亲和层析就可达到超过95%的纯度。1个蛋白 A 分子至少可以结合2个 IgG。蛋白 A 也可以结合另一些免疫球蛋白,如用于某些种属的 IgA、IgM 的纯化。

天然 (Native Protein A) 和重组的蛋白 A (rProtein A) 对于 IgG 的 Fc 段有着相似的特异结合。重组的蛋白 A 经改造后含有一个 C 末端半胱氨酸,可以单一位点偶联于琼脂糖上,降低了空间位阻,增加了与 IgG 的结合能力。蛋白 A 与 IgG 的结合强度很大程度上依赖于该抗体的种属和亚型,而其动态结合能力则决定于结合强度 (解离常数) 及传质阻力等多种因素 (例如上样时样品在柱内的停留时间)。

3.1.3.2 Protein G Sepharose 亲和层析介质与抗体的结合²⁹

蛋白 G 是一种源自链球菌 G 族的细胞表面蛋白,为三型 Fc 受体。其通过类似于蛋白 A 的非免疫机制与抗体的 Fc 段结合。像蛋白 A 一样,蛋白 G 可以与 IgG 的 Fc 区域特异性结合,不同的是,Protein G Sepharose 可以广泛、更强地结合更多类型的 IgG,多克隆 IgG 及人 IgG,同时血清蛋白结合水平更低,

纯度更高，配基脱落也相对更低。此外，蛋白G还可以和某些抗体的 Fab 和 F(ab)₂ 段结合。

3.1.3.3 Protein A、Protein G 亲和层析方法优化

由于不同抗体与蛋白A或蛋白G的亲合力不同，有必要单独优化结合和洗脱条件和层析柱载量，层析条件优化的过程可以通过用自动化层析系统如 AKTA 来自动快速完成。以下是一个杂交瘤细胞培养小鼠单抗的纯化条件探索 (表5，图 16-19)³⁰。

优化条件	优化过程	优化目的、结果
rProtein A 柱结合缓冲液中所需 NaCl 浓度	利用 AKTA 的自动探索功能 (scouting) 连续尝试不同浓度的 NaCl (0-3.5M) 下单抗的载量、收率和纯度。	尽量避免杂蛋白的结合，在载量与纯度间取得平衡。最佳条件为 NaCl 2.5M。
rProtein A 柱洗脱 pH	利用 AKTA 的自动缓冲液配置功能 (bufferprep) 在 pH 7-2.5 范围逐步降低 pH，找最佳的 pH 洗脱条件。使用精氨酸作为洗脱缓冲液，更利于保护抗体活性，提高回收率和防止抗体聚合 ³¹ 。	避免剧烈的洗脱条件 (如 pH<3.0) 易导致抗体失活。最佳条件为 pH 4.5。
Superdex 200 柱上样量	利用自动探索功能 (scouting) 尝试不同上样量 (1-5% 柱体积)，并探索连续自动进样的条件。	去除微量杂质和二、多聚体，达到最终所需纯度。

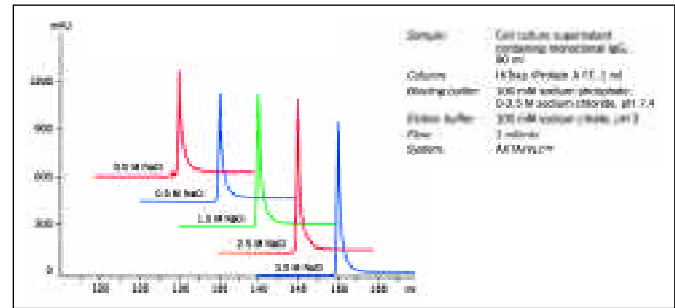


图 16. AKTA 自动摸索 HiTrap rProtein A FF 上样最佳盐浓度

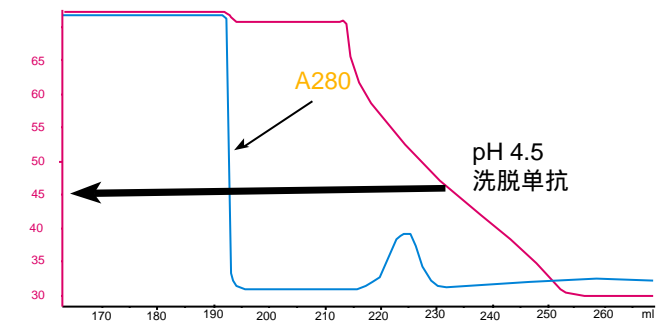


图 17. AKTA 自动摸索 HiTrap rProtein A FF 最优 pH 洗脱条件：pH 梯度从 pH 7.4 到 pH 3.0

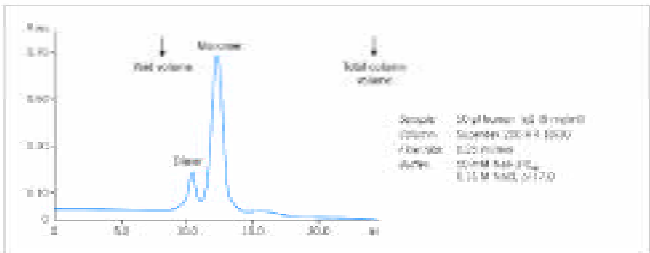


图 18. Superdex 200 精细纯化

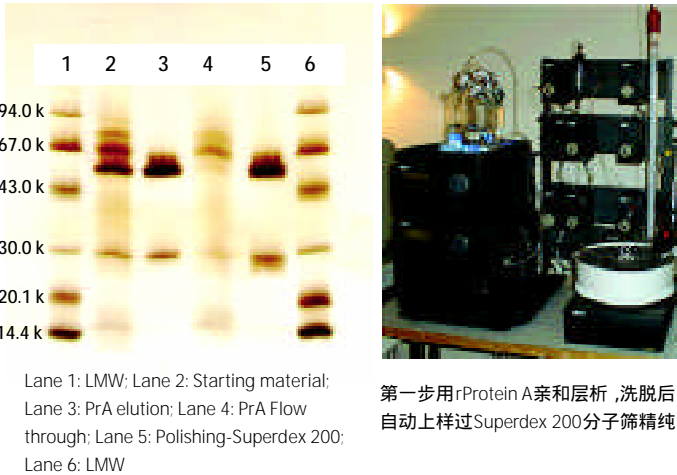


图 19. 全自动二维抗体纯化及纯化结果电泳图 (还原电泳)

3.1.3.4 MabSelect ——大规模抗体纯化新型蛋白A亲和层析介质^{32, 33}

MabSelect 是第一个使用高流速琼脂糖凝胶 (High flow Agarose) 作为骨架的新型蛋白A层析介质，专为大规模抗体纯化而设计，适合快速高效的进行抗体生产和放大，已经成为单抗纯化和放大的标准介质。

Mabselect 的特点包括：

1. 高流速琼脂糖作为骨架：介质的刚性和传质性能大大优于传统的 Sepharose 4FF 和 6FF 琼脂糖骨架，可以在大规模生产时，使用更高的流速而保持更高的载量，大大提高生产效率。
2. 更高的流速和动态载量：蛋白A 经基因工程改造，C 端含一个半胱氨酸，形成一个定向的硫酯键 (见图 21)，同时增加了对 IgG 的有效结合。蛋白A 和凝胶偶联时采用了全新的单点偶联工艺，降低了空间位阻，因此可以在使用更高流速的条件下增加动态载量：在线形流速为 500cm/hr 和柱床高度为 20cm (停留时间 2.4min) 的条件下，每毫升 MabSelect 的动态载量可以达到 >30mg IgG。在纯化特性 (杂蛋白去除、产品纯度等) 方面明显优于其它的蛋白A 亲和介质。图 20、22 是几种不同的蛋白A 介质纯化人 IgG 的动态载量与线形流速的比较。
3. 更低的非特异性吸附，抗体纯度更高：和传统的 rProteinA FF 介质相同，Mabselect 介质高度亲水性的琼脂糖骨架最大程度降低了非特异性吸附，使得洗脱峰中杂蛋白和 DNA 更少，有利于后期抗体的精细纯化。

著名的抗体生产商 IDEC 公司³⁴ 以及 R. Hahn⁴⁵ 的研究显示，Mabselect 对 CHO 细胞 CHOP (宿主蛋白) 的吸附比其它蛋白 A 介质如 Prosep A 低 7 倍³⁴。

Robert L. Fahrner 等对于多种商品化的 Protein A 介质的性能进行了研究比较，结果表明：以亲水的琼脂糖凝胶作为骨架的蛋白 A 介质所得抗体的 DNA 残留量比 Prosep A 低 30%³⁵。

- 4. 更低的蛋白 A 脱落：MabSelect 由于通过新型环氧共价交联技术，蛋白 A 的脱落比其它同类介质低，这不仅有利于抗体纯化，还延长了介质的使用寿命，降低生产成本。微量的脱落可以在后续的层析中，如凝胶过滤或离子交换层析有效去除。
- 5. 生产过程无动物血清成分：配基重组蛋白 A 在大肠杆菌中表达，通过多步柱层析纯化，完全适用于抗体药物纯化。
- 6. 更易于工艺的线性放大：通过实验室条件的优化，MabSelect 可以在保持线性流速和上样比例等参数不变的条件下，通过增加柱直径进行线性放大。装填在内径为 60-80 厘米层析柱时，可以在一个工作日处理超过上万升高表达的抗体培养液³⁶。

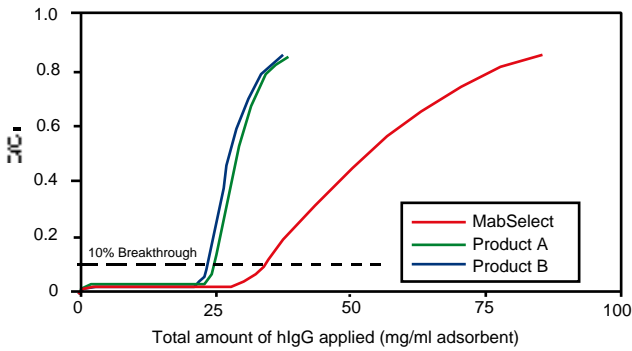


图 20. 蛋白 A 亲和凝胶载量测定

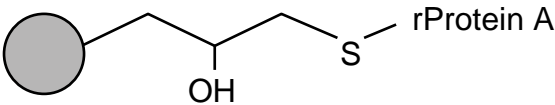


图 21. MabSelect 蛋白 A 的单点定向硫酯键偶联方式增加了对 IgG 的有效结合

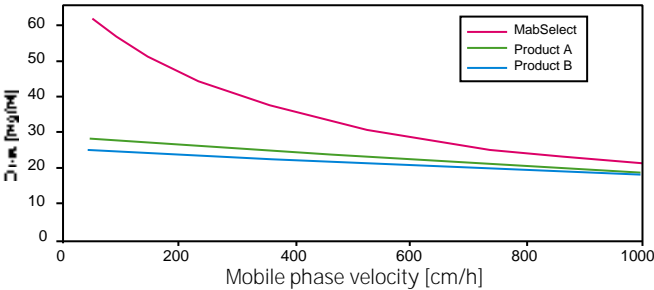


图 22. 不同凝胶动态载量受线性流速影响比较 (MabSelect 在柱床高度 20cm，线性流速 500 cm/h 时动态载量达 32 mg hlgG/ml)

- 7. MabSelect 易于清洗与除菌，寿命更长、更经济：在长期连续的生产中，介质寿命是成本效益的一项重要指标，有效的 CIP 有助于延长介质使用寿命，但蛋白 A 配基比一般层析介质的配基对苛刻的在位清洗 (CIP) 更加敏感，往往不能耐受 NaOH，只能使用高浓度的尿素或盐酸胍进行清洗。而 MabSelect 的 CIP 和除菌程序简单，一般用很常规和经济的试剂如 50 mM NaOH + 1M NaCl 或 50 mM NaOH + 0.5 M Na₂SO₄ 溶液就可以有效去除沉淀和变性物质；用非离子去污剂或酒精可以去除通过疏水作用结合的物质；用 0.1M 醋酸和 20% 酒精可以 SIP 除菌。由于 CIP 所使用的化学试剂不能被重复使用，CIP 试剂的成本对整个生产成本的影响不容忽视。使用尿素、盐酸胍等作为 CIP 试剂，长期的 CIP 成本甚至超过了蛋白 A 介质本身的价值 (图 23)。经测试，Mabselect 配合 CIP (50 mM NaOH + 1 M NaCl) 纯化三百次后，抗体产品纯度与回收率不变 (图 24)^{37, 38}。

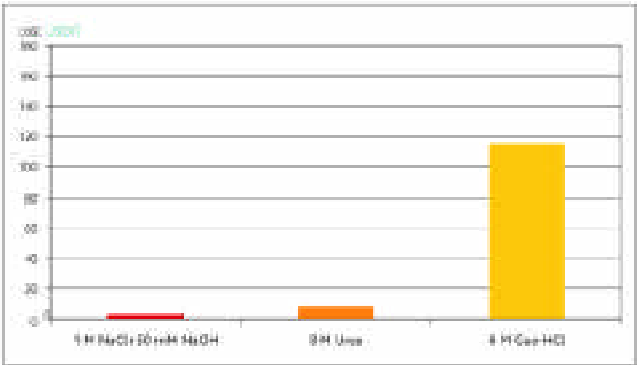


图 23. 使用不同试剂有效在位清洗 (CIP) 时的成本比较。物料来源：Sigma 2003, NaCl>99.5%, 5 kg; NaOH>98%, 1 kg; Urea>99.5%, 5 kg; Gua-HCl>99.5, 10 kg。³⁸

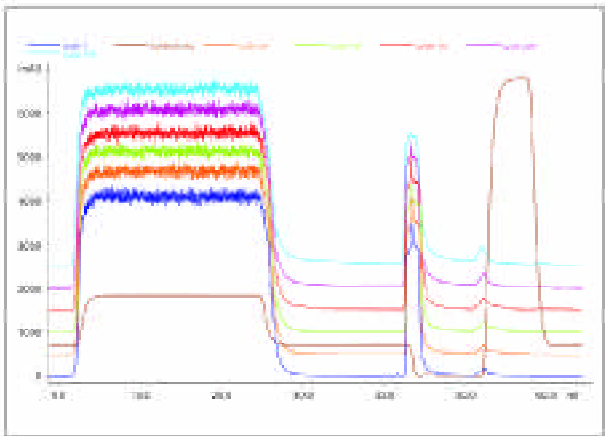


图 24. Mabselect 每使用 5 次进行一次 CIP (50 mM NaOH + 1 M NaCl)，第 1-299 次纯化的选择层析图谱，每次纯化回收率 95-100%³⁸。

3.1.3.5 MabSelect Xtra ——载量更高的商品化蛋白 A 亲和层析介质³⁹

Mabselect Xtra 介质是目前市场上所有的商品化蛋白 A 介质中载量最高的亲和层析介质，其动态载量超过 41mg/ml 介质 (停留时间 2.4 min)。在工艺生产过程中可以有效减少层析柱的体积，从而降低生产成本。

Mabselect Xtra 介质是在 Mabselect 介质的基础上优化而来，它使用孔径更大的多孔高流速琼脂糖 (high flow agarose) 作为骨架，同时减小介质粒径 (75u)。这样不仅增加了比表面积和配基密度，还降低了传质阻力，从而有效的增加动态载量 (图 25)。

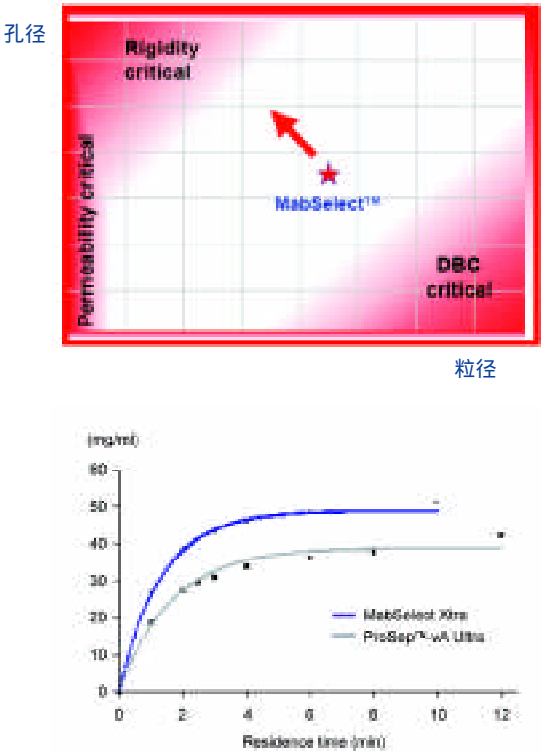


图 25. Mabselect Xtra 介质的设计及和其它类型蛋白 A 亲和胶动态载量比较⁴⁰

R.Hahn 等⁴¹的数据表明 Mabselect Xtra 的载量高于 Prosep vA Ultra 等其它蛋白 A 亲和介质。K. Swinnen 等⁴²也对近年来较新的蛋白 A 亲和介质进行了比较，结果显示：Mabselect 的动态载量几乎不受样品中抗体浓度的影响，因而 Mabselect 介质的工艺耐用性 (Robustness) 最好；而 Mabselect Xtra 的载量最高，Mabselect Xtra 对 CHO 细胞 HCP (宿主蛋白) 的吸附比其它蛋白 A 介质更是低了近 10 倍⁴³。

除载量更高外，Mabselect Xtra 的性质和 Mabselect 相似，比传统的 Sepharose 4FF 介质流速更快，刚性更好；可以使用 50mM NaOH + 1M NaCl 进行有效的 CIP；0.1M 醋酸 in 20% 乙醇用于 SIP 消毒；也具有极低的非特异性吸附，产品纯度高，介质寿命长⁴⁰。

3.1.3.6 Mabselect Sure ——唯一耐强碱的蛋白A亲和层析介质⁴⁴

在生物药物的生产过程中，为避免细菌、内毒素或病毒的污染，需要对层析系统、介质等进行在位消毒 (SIP)，以保证产品的质量。另外，变性的蛋白、脂类和 DNA 等分子会不可逆的沉淀在层析柱的顶部而降低柱效和传质速度，从而影响收率和产品质量。

0.1~1N 的氢氧化钠可以有效的除菌除热原以及灭活病毒，而且对于沉淀的蛋白、脂类和核酸具有很好的溶解作用，可以有效的对层析介质进行在位清洗 (CIP) 而延长使用寿命，因此使用氢氧化钠进行消毒和清洗成为生物制药生产中 SIP/CIP 的经典方法。这一点对于内毒素要求极为严格的抗体生产来说尤为重要。

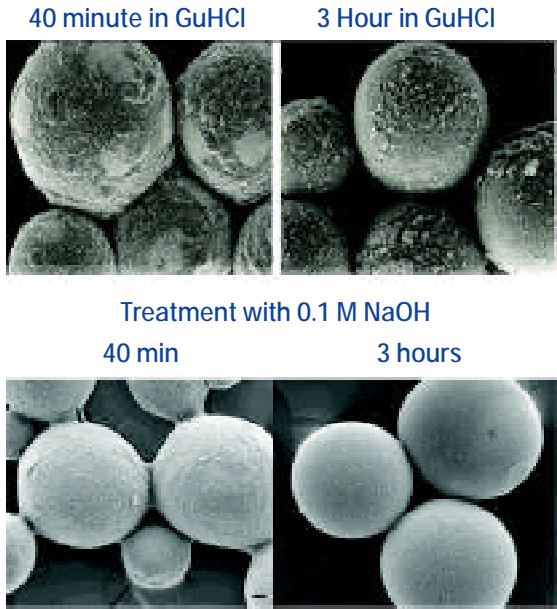


图 26. 盐酸胍和碱清洗效果的比较

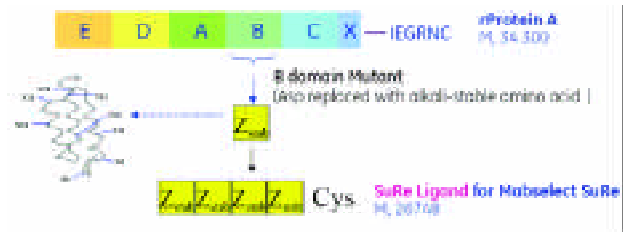


图 27. SuRe 配基的结构

但天然或重组的蛋白 A 配基对 NaOH 非常敏感，强碱性条件下易变性或脱落，因此只能选用高浓度的盐酸胍或尿素进行清洗，但清洗的效果远远不如 NaOH (图 26)，而且清洗成本非常高 (图 23)。

天然或重组的蛋白 A 配基具有 5 个不同的抗体 Fc 结合结构域，每个域均可以和 IgG 的 Fc 段结合，但不同的域结合强度略有差异。将其中的 B domain 中对碱敏感的 Asp 氨基酸突变为耐碱的氨基酸 (图 27)，得到新的四聚体配基 SuRe Ligand，将此新配基偶联到高流速琼脂糖基质上，成为耐碱的新型高流速 Mabselect SuRe 蛋白 A 层析介质。

Mabselect SuRe 的优点：

- 1. Mabselect Sure 可以耐受 0.1~0.5N 的氢氧化钠：使用高达 0.5N 的氢氧化钠进行在位清洗 / 消毒大大降低了抗体产品被内毒素污染和批间交叉污染的风险，清洗效果更好，有利于延长介质使用寿命，同时也大大降低了 CIP/SIP 的成本。

Mabselect SuRe 介质可使用 0.1N NaOH 15min/cycle 进行“纯化 - 清洗”循环200次以上仍保持稳定的载量(图28), 对碱的耐受性远远好于其它的蛋白 A 亲和层析介质⁴⁴。

MabSelect SuRe stability with NaOH

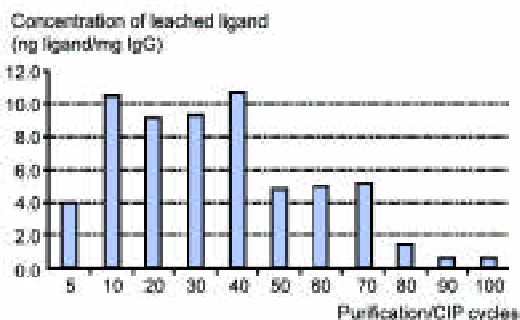
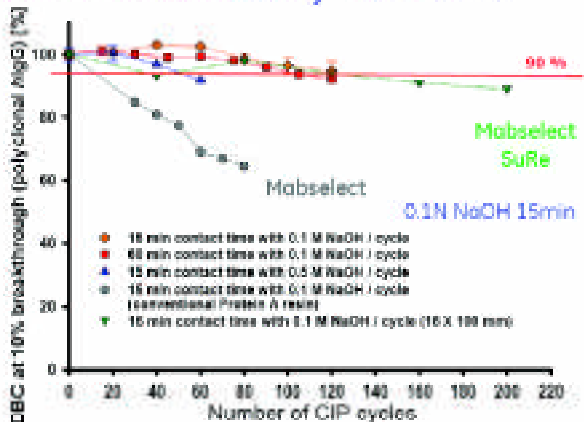


图28. Mabselect SuRe介质对碱的耐受性(上) 和0.1N NaOH 15min/ circle 处理低脱落(下)

R.Hahn 的研究也表明：与其他蛋白 A 亲和介质相比，Mabselect SuRe 具有无可比拟的稳定性，配基脱落最少，寿命最长，而且宿主蛋白HCP的残留比Prosep A低10倍以上⁴³。

2. 更温和的洗脱，避免抗体聚集，提高收率：新的 SuRe 配基是一个同型四聚体配基，避免了不同配基与抗体 Fc 段亲和性的差异，也消除了某些域对 Fab 段的亲和作用，使得洗脱条件更加均一而温和。相比以 rProtein A 为配基的介质，Mabselect SuRe 介质可以用更高的 pH 进行洗脱，有效的避免抗体在低 pH 下的聚集，产品纯度和均一性更高，纯度也更低⁴⁶。
3. 不同抗体洗脱所需 pH 差异小：由于消除了对抗体 Fab 段的亲和作用，使得同一种属亚型的不同抗体分子洗脱所需的条件更接近(图29)，有利于平台技术的建立，进一步降低了不同的抗体分离纯化工艺的研发成本。

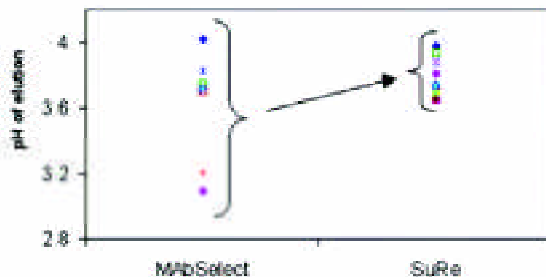


图 29. 不同抗体在 Mabselect 和 SuRe 介质的洗脱

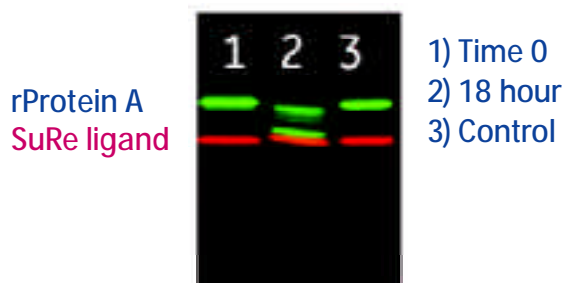


图 30. SuRe 配基的稳定性

4. SuRe 配基稳定性更好：新型的 SuRe 配基对碱和蛋白酶更稳定⁴⁷ (图 30)，纯化过程中脱落更少(<10 ppm)，有利于后期泄漏配基的进一步去除。甚至只有1-3ppm的脱落⁵⁵，无需在后续步骤中增加专门去除SuRe配基的步骤，即可达到 FDA 的蛋白 A 配基残留标准。

Mabselect SuRe 介质是市场上唯一耐碱的蛋白 A 亲和层析介质，寿命最长，稳定性最好，这一点已被文献所证实⁴⁵。纯化所得的抗体除蛋白 A 泄漏更少、纯度更高之外，其它产品性质(如 CHOP、电泳、IEF 等)和 Mabselect 介质相当⁴⁶。

3.1.3.7 MabSelect SuRe 介质成功案例⁴⁸

Lonza Biologics 是全球最大的抗体合同生产商(CMO)之一，为了开发一个稳定的 20,000L 的抗体生产工艺，其纯化开发部门对多个不同的抗体亲和层析凝胶进行了有效的比较，他们发现 Mabselect SuRe 的动态载量高(大于 26mg/ml，线性速度>500cm/hr，结合时间小于 2.4min 条件下)，使用寿命最长(每个 cycle 都用 0.1M NaOH 清洗 15mins，测试 100 个 Cycles 后宿主细胞蛋白和 DNA 的去除效果，蛋白 A 的脱落都无明显变化)、蛋白 A 脱落最低(平均 5.4ng Protein A/mg 抗体)，实验数据明确支持放大到 1.4M 直径的柱子用于 20000L 培养规模的经济生产。

目前，已有多家大规模抗体生产厂商，将其它蛋白 A 亲和胶转换为寿命更长、稳定性更好的 MabSelect SuRe 用于抗体生产。MabSelect SuRe 也成为市场上销量最大的抗体生产亲和凝胶。



图 31. Lonza Biologics 开发 Mabselect SuRe 于大规模治疗用单抗生产

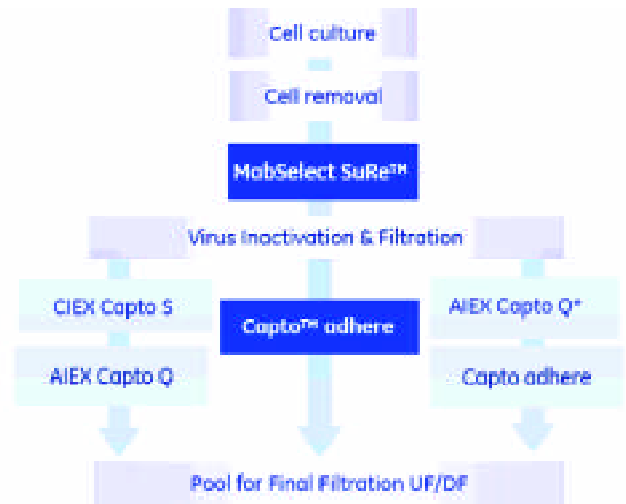


图 33. 抗体纯化中的三步层析工艺与最新两步层析工艺

3.1.4 层析精细纯化技术：

层析技术是抗体分离纯化的核心技术，一般采用经典的三步纯化策略：粗纯 - 中间纯化 - 精细纯化。其中，粗纯的主要目的是捕获、浓缩和稳定样品；粗纯一般使用蛋白A亲和层析一步即可达到95%以上的纯度；中间纯化和精细纯化去除特定的杂质，如HCP、DNA、聚集体和变体等，常用的层析技术有离子交换、疏水层析等，达到最终治疗用抗体所需的纯度(图32)。随着凝胶技术的发展，一些新型复合作用凝胶的出现：如Capto Adhere的上市，抗体层析纯化工艺也在向两步层析技术演变(图33)。

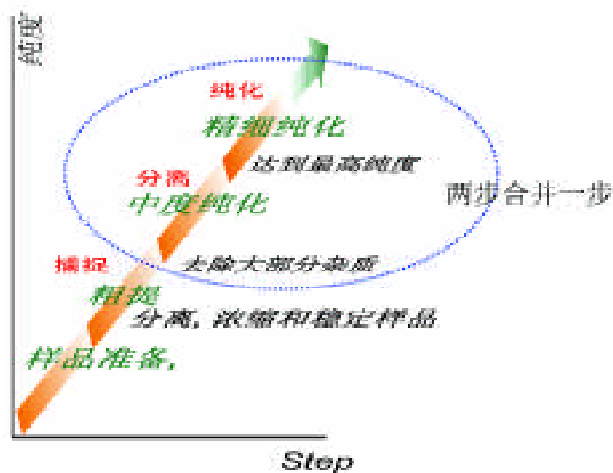


图 32. 一般的 Mab 下游层析纯化三步曲

3.1.4.1 新型高流速琼脂糖基质的离子交换介质：

Capto Family 系列

新型的Capto系列介质是以高流速琼脂糖(High Flow Agarose)为骨架，同时交联了非常“柔软”的葡聚糖链，这样不仅增加了比表面积，同时降低了传质阻力和空间位阻，使得介质在高流速下的动态载量大大增加，有利于提高生产效率，降低成本⁴⁹。

与传统的SP, Q Sepharose FF 介质相比，新型的Capto S, Q 系列离子交换介质刚性更好，流速更快，同时具有更高的载量(图34)。Capto 系列介质可以装填在直径60cm的工业层析柱中使用高达500cm/h的流速进行纯化(柱高30cm)。这样不仅有利于工艺放大后大规模层析柱的填装(图35, 300mm生产规模层析柱, 20cm柱高)，还大大提高了生产效率，每步层析更短的操作时间也有效避免了抗体分子在分离纯化过程中产生各种变体和聚集体，使得收率更好，终产品的活性更高、性质更均一。

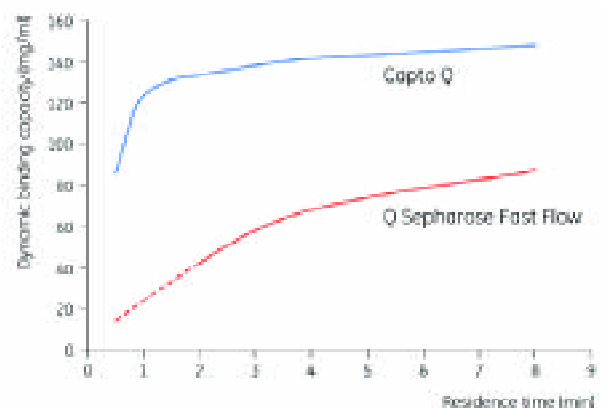


图 34. Capto Q 和 Q Sepharose FF 载量比较

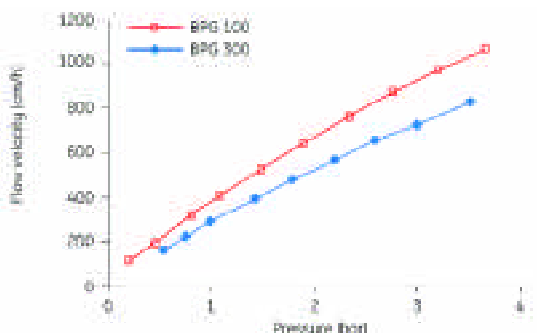


图 35. 制备层析柱中 Capto 介质的流速 - 压力曲线

3.1.4.2 Capto Adhere ——实验设计 (DoE) 与 HTPD 技术

为了进一步减少抗体分离纯化步骤,提高特定杂质的去除效率,以满足日益增长的治疗用抗体的生产需要,2007 年初,GE HC推出了新型混合作用模式的强阴离子交换介质: Capto Adhere 介质。

Capto Adhere 介质专为治疗用抗体的分离纯化而设计,其配基 (N-Benzyl-N-methylethanolamine) (图 36) 综合了阴离子交换、氢键和疏水等多种复杂的作用方式^{50,51}, 因此对于抗体的聚集体具有非常独特而高效的去除能力。此外,通过有效的实验设计 (Design of Experiment, DoE), Capto Adhere 介质还可以同时有效去除泄漏的蛋白 A 配基、宿主蛋白、核酸、内毒素和潜在的病毒,并使得结合 MabSelect SuRe 的抗体的两步层析纯化工艺成为现实⁵²。



图 36. Capto Adhere 基架和配基

首先,需要优化抗体在 Capto Adhere 上的结合条件,确定的实验目标为:产品收率>90%,终产品中二聚体和多聚体含量 1%,蛋白 A 残留量 A 5ppm, HCP 50ppm。确定的主要影响因素和实验设计范围为:电导:2-15mS/cm,每毫升凝胶上样载量为 75-300mg/ml (流穿模式),pH 范围需要做起始结合条件确定:通常在低电导条件下(如 2mS/cm 时)样品完全不结合到有少量样品结合的 pH 条件(以 pH 6-8 为例,图 37)⁵³。

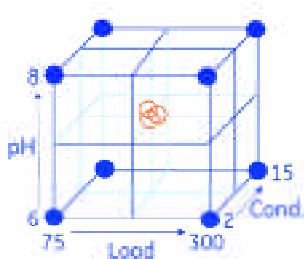


图 37. DoE 优化结合条件

Load (mg/ml)	pH	Cond (mS/cm)
75	6	2
75	8	2
300	6	2
300	8	2
75	6	15
75	8	15
300	6	15
300	8	15
187.5	7	8.5
187.5	7	8.5
187.5	7	8.5
75	7	8.5
300	7	8.5
187.5	6	8.5
187.5	8	8.5
187.5	7	2
187.5	7	15

确定好实验条件后,可以采用 HTPD Predictor 同时平行做所有不同的结合条件,将实验结果相应于响应因子进行统计学分析(如图 38 左上角中上样量 / pH / 电导对收率的影响分布),合并分析结果可以得到满足实验目标的操作范围,如图 38 图中的红色区域⁵³,对满足实验目标的实验条件用 AKTAdesign 系统进行验证和微调(图 39)⁵⁴。这样的实验过程,既可以节约样品、缩短工艺开发的时间,所开发的工艺还具有很好的稳定性和可验证性。

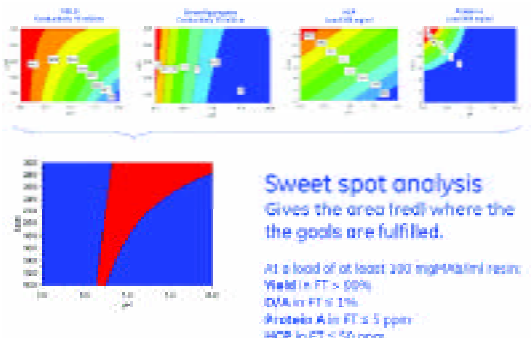


图 38. DoE 优化结合条件



图 39. HTPD 条件筛选 - AKTAdesign 验证与微调 - 线性放大

Capto Adhere 已经成功的用于多种抗体的精纯(表 6),对于不同的抗体,层析条件不同。流穿模式的 Capto Adhere 将宿主蛋白、脱落的蛋白 A 和聚集体降低到很低的水平,载量可达 100-200mg/ml 介质,单步收率>90%。

此外, Capto Adhere 还具有很强的病毒去除的能力,如 MVM 病毒的去除能力可达 5.9 个 Log⁵¹。目前,新型的两步法抗体层析纯化工艺已经被国内外诸多知名药企广泛用于多种抗体的分离纯化,各项指标均符合治疗级抗体的要求。Capto Adhere 层析纯化还可以和阴离子交换 (Capto Q) 和疏水层析等结合使用,以达到更高的质量要求。

3.1.4.3 全自动生产层析系统: AKTAProcess 系统

近年来,生物制品的质量标准和各种法规的要求越来越严格,需要生物制品生产厂家提供完整的工艺验证资料和法规支持文件,如清洗验证、管路材质生物相容性等相关文件。

AKTAProcess 层析系统是全自动的工业层析系统,该系统耐压高 (6-10bar)、流速范围广 (可达 1800L/h),精度高,使用 Unicorn 软件进行自动控制,保证了工艺放大后的重复性和稳定性,提高生产效率。同时,卫生级的流路设计和管路材质完全符合 USP Class VI 标准,通过了 FDA 21 CFR Part 11 认证(图 40),并可提供完整的法规支持文件,成为层析工艺放大的信心保证。



3.2 新型的两步层析技术与纯化工艺整合

MabSelect SuRe的卓越性能以及Capto Adhere的复合多除杂功能,使得抗体纯化工艺由经典的三步层析转变为两步层析得以实现。FDA前验证顾问Gail Sofer在接受采访时表示,两步层析在验证、内毒素的去除等问题上都不会存在障碍⁵⁵。两步层析的整个工艺该怎样设计才能够最大化我们的收率甚至产率呢?

在细胞培养表达以后,我们建议采用0.2-0.45 μ m的中空纤维膜技术进行澄清(Cell removal),然后用MabSelect SuRe捕获,酸性条件洗脱后直接pH 3.3-3.8病毒灭活,澄清过滤后穿透方式上Capto Adhere,这一步离子交换之前或之后可以考虑20nm纳滤去病毒,最后50K膜超滤浓缩和洗滤进行缓冲液置换。整个工艺如下图41,这一工艺平台已经尝试过多个不同的抗体(表6)并取得成功,同时很多实验表明这一工艺平台适合多数抗体的生产。有些抗体如果通过优化结果不甚满意,通过增加一步Capto Q也基本上可以达到要求或是采用Capto S - Capto Q的工艺步骤(图33)。

将Mabselect SuRe和Capto Adhere相结合进行两步层析纯化(图42-43)。Mabselect SuRe可以达到>99%的抗体纯度,亲和洗脱峰使用Capto adhere的流穿模式进行精纯:使抗体分子流穿而聚集体、宿主蛋白、脱落的蛋白A配基等杂质结合在Adhere柱上加以去除⁵⁶。这样仅用两步层析就可以得到符合药用级质量要求的高纯度抗体产品,大大缩短了工艺时间,提高生产效率,同时增加了收率,降低了生产成本。

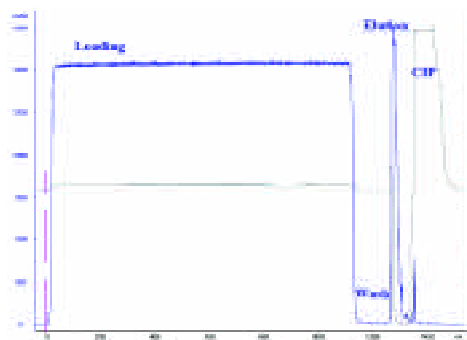


图42. Mabselect SuRe 进行快速捕获

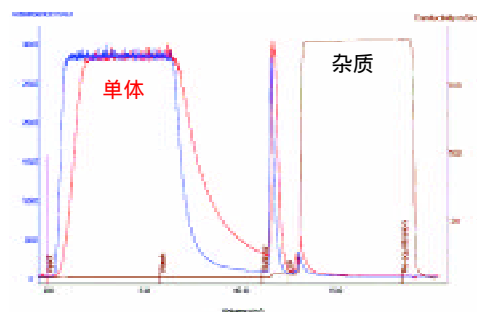


图43. Capto Adhere流穿模式精细纯化

3.3 完善工艺整合中的其它问题

3.3.1 核酸和内毒素的去除

按《中国药典》要求,DNA含量用DNA分子杂交法测定,每一剂量残余宿主DNA含量不高于100pg。热原检测主要采用家兔法及鲎试剂法,美国FDA规定注射用抗体药物每剂量内毒素含量必须少于5EU/Kg患者体重,但实际生产中内毒素的内控指标要远远低于此限,一般要低至少5-10倍。这对于每剂量数十、甚至几百毫克的治疗用抗体制品,仍颇具挑战。核酸、内毒素常以聚体存在,分子量、表面电荷等理化性质很不均一,难以用某一种手段一次性去除。但可以根据它们与抗体性质多方面的差异,在设计下游工艺纯化目标产品的同时,充分利用过滤、层析等步骤逐步加以去除(表7),尽量避免节外生枝地加入专门去除核酸、内毒素的步骤。



图41. 新型的抗体两步层析法纯化平台(左)与抗体纯化最新完整工艺(右)

表6. 两步法用于多种抗体的纯化的结果(括号内数值为纯化前)⁴⁴

MAb	Cell line	pI	Loading conditions			HCP <50 ppm	PrA <5 ppm	D/A <1%	Yield (Capto™ adhere)
			pH	Cond	Load				
1	CHO	~9	7	8	187.5	12 (206)	0 (36)	0.5 (3.3)	90
2	CHO	8.3-8.9	5.5	3	150	2 (10)	<2 (260)	0.6 (2.1)	95
3	NS0	7.5-8.4	6	2	150	9 (85)	0 (0)	0.8 (1.5)	95
4	SP2/O	7.7-8.0	7	20	100	30 (500-2000)	0 (<1)	0.15 (0.14)	91
5	CHO	8.8	7.5	20	200	7.5 (38)	0 (<1)	<0.1 (0.7)	92

Values within parenthesis correspond to the initial levels(Protein A pool)

方法	去除核酸、内毒素的原理和建议
膜过滤 / 超滤	常用的方法之一，一般使用 5-10 kD MWCO 的超滤膜。多用于无热原 WFI 的制备和无热原缓冲液的配制。
阴离子交换层析	常用的方法之一。速度快、载量高。原理是核酸、内毒素比蛋白质在阴离子交换介质上的结合强很多，而且分子量越小结合越强，多数要在柱再生 (1-2M 氯化钠) 或在位清洗 (1M 氢氧化钠) 时才被洗脱。但某些高聚体内毒素，特别是分子量过百万的，电荷不外露，不结合阴离子交换柱 ⁵⁷ 。
阳离子交换层析	核酸和内毒素带负电，大部分不结合阳离子交换层析。相反，不少单抗属于碱性蛋白质，可在合适的 pH 下结合阳离子交换层析，让核酸和内毒素穿透。
疏水层析	越来越多单抗纯化用到疏水层析。内毒素、核酸在疏水层析的高盐条件下会凝集，大部份内毒素、核酸会在上样时直接穿透 ⁵⁸ 。
凝胶过滤	小规模单抗纯化可在最后一步用凝胶过滤去除聚集体，同时去除残留的核酸、内毒素。
内毒素亲和介质	市面上有些偶联了内毒素底物或 polymyxin B 的亲合介质，但内毒素性质很不专一，因此不可能用一种亲和配基去除所有的内毒素；缓慢的结合动力学往往需要循环进样或长时间孵育，增加了抗体失活的危险；另外亲合介质非常昂贵，且不能耐受 NaOH 清洗去除热原，很难反复使用，影响回收率之余亦不符合经济效益 ⁵⁹ 。亲和介质的配基会脱落，加之使用 DOC 等物质，药审规定需要其它方法加以去除，并严格对去除效果进行验证以确保安全，因此不适合大规模生产使用。

3.3.2 脱落亲和配基 (蛋白 A) 的去除

药审当局严格规定生产者不仅须检测从蛋白 A 亲和层析脱落的配基 - 蛋白 A 的残留量 (商品化的蛋白 A ELISA 检测试剂盒)，还须验证其去除方法的有效性⁶⁰，如‘挑战性实验’ (spiking challenge)。

微量脱落的蛋白 A 常与目标抗体形成蛋白 A-IgG 复合物。阴离子交换层析是去除蛋白 A-IgG 复合物的最有效办法，蛋白 A-IgG 复合物具有很强的结合在阴离子交换介质上的倾向，但这些复合物通常不会形成独立的峰，而是时常显现出拖尾或肩峰。要确定此方法从抗体样品中去除蛋白 A 复合物的能力，可以用 20 mM Tris-HCl, pH 8.5 平衡柱，上样后以线性梯度洗脱，最后洗脱液的浓度达到 0.25 M NaCl (20 mM Tris-HCl, pH 8.5)，分部收集以确定蛋白 A 的去除效果。也可以采用抗体流穿的方式，使蛋白 A-IgG 复合物结合在柱子上，这样的最大好处是可以大大减小阴离子柱的体积。新型 Capto Adhere 阴离子交换介质也可以有效去除蛋白 A。

阳离子交换层析也可以去除蛋白 A 配基 (图 44)，可以在抗体与蛋白 A 解聚的 pH 条件下进行。酸性较强的蛋白 A 在一定条件下不结合阳离子交换介质或者在梯度早期洗脱，从而实现与抗体 IgG 的分离。阳离子交换层析纯化抗体可以采用线性 pH 梯度洗脱的方式，相比常用的盐浓度梯度而言，pH 梯度洗脱所得峰体积更小，也具有更低的电导，适合下一步的离子交换层析的衔接⁶¹。

凝胶过滤层析如 Superdex 200 或 Sephacryl 300 在合适的条件下，也可除去蛋白 A-IgG 复合物，该聚合物会率先从柱上洗脱下来，接下来是分子量约 150kD 的目标 IgG，最后是分子量约 34kd 的残留的游离重组蛋白 A。

Capto Adhere 也不失为一种良好的去蛋白 A 的选择。

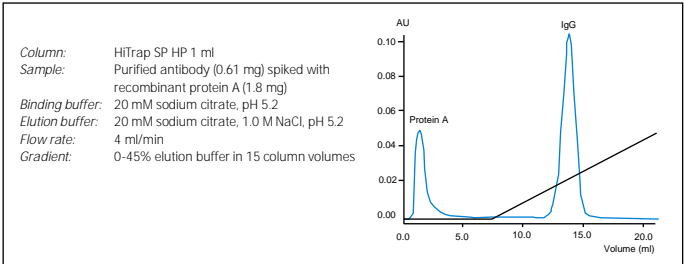


图 44. 用 HiTrap SP HP 阳离子交换柱去除鼠 IgG2b 中的 protein A。

3.3.3 抗体制品的病毒去除 / 灭活及验证

近年来，各种病毒的出现和传播日益受到关注。哺乳动物细胞或转基因动物培养的生物制品，其下游工艺须要能够有效地除去潜在的病毒污染物，SFDA 公布的《人用单克隆抗体质量控制技术指导原则》也建议加入病毒去除 / 灭活方法¹⁶。一般规定整个工艺总病毒去除能力至少 10 log 以上，并含有两个有效的病毒去除 / 灭活步骤 (每步病毒去除 / 灭活至少 4 log 以上)。常用的病毒去除 / 灭活方法包括：低 pH 孵育、加热、S/D (溶剂 / 去污剂)、纳滤等，如在蛋白 A 层析后用加热与 3M KSCN 共处理的办法去病毒效果非常理想，对不同的样本病毒的去除至少达到了 13 log 以上，但是要综合考虑目标抗体分子的稳定性⁶²。

一般抗体常用的低 pH 灭活病毒条件为：pH 3.3-3.8，室温下孵育 45-60 min⁶³。其中抗体浓度、pH 和温度对灭活效果影响显著。

非脂包膜病毒对低 pH / 去污剂等化学灭活方法有很强的耐受性，而且低 pH、加热、S/D 容易使一些抗体失活变性⁶⁴。

有时，仅低 pH 孵育、纳滤两步不能达到总去除 10 log 以上的要求。所以，还需要对每一步层析的病毒去除效果进行验证 (图 45)。一般的病毒去除 / 灭活验证采用 Scale-Down 的小规模实验进行，保持各关键参数 (介质种类、buffer 成分、停留时间、进样量等) 恒定，样品 Spike 不同的模型病毒，对每一步的特定病毒的去除能力进行评价。注意：验证层析和纳滤的病毒去除，必须考虑介质和膜的使用次数对病毒去除能力的影响。如 Protein A Sepharose 4FF 如果用 6 M 盐酸胍或尿素清洗，使用 300 次以上，去除病毒的效果仍然非常稳定³⁷。

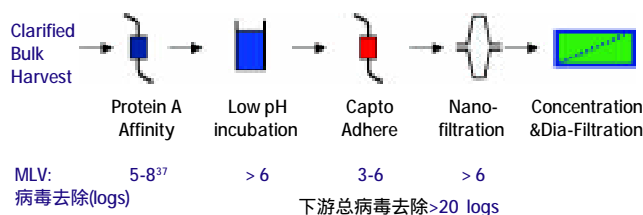


图 45. 一般单抗纯化工艺及病毒去除 / 灭活能力的评价

3.3.4 抗体检测方法

纯化后产品纯度的检测一般用电泳和分子筛 HPLC 的方法，对功能的检测则可用细胞活性实验，免疫电泳，表面核磁共振，动力学测试，ELISA 等，对于带电性质的均一性可以用等电聚焦电泳 (IEF) 和 HP-CIEX 进行检测。还可以根据需要分别对潜在的残留杂质如 DNA (Q-PCR 或杂交)、HCP (Elisa)、脱落的蛋白 A 配基 (Elisa, MabSelect SuRe 脱落配基推荐使用 Repligen 公司生产的 ELISA 试剂盒进行检测) 进行定量分析，从而计算产品纯度。对于批间产品的一致性 (Consistency) 可以用 Trypsin 酶切后使用 HP-RPC 进行肽图分析比较。生产中的质量检测参考 NICBP (中国药品与生物制品检定所) 公布的《人用单克隆抗体质量控制技术指导原则》¹⁶。

抗体表达浓度的测定由于收到酚红以及杂蛋白等的影响，无法直接用分光光度计的办法测得，通常可以选择用 ELISA (重复性与准确性经常受到挑战)、HiTrap MabSelect SuRe 纯化后测定或 Biacore 测定。抗体聚合体含量测定则可以使用 Superdex 200 10/300 GL。

目前，Biacore 系统在国外已经被广泛应用于抗体药物研发和生产过程的质量监控⁶⁵，包括抗体筛选、亲和力测定、抗体表达浓度检测、批生产之间的活性比较等，相较于其它方法，Biacore 具有更好的稳定性、灵敏度和实验结果可重复性。



图 46. Biacore T-100 从科研，抗体开发和安全评价到生产质控，为您提供最高精度的数据

四、其它抗体纯化技术

4.1 IgM 纯化

HiTrap IgM Purification HP 亲和预装柱使用嗜硫亲和介质 (将 2-巯基嘧啶偶联在琼脂糖凝胶上)，IgM 蛋白和配基的相互作用综合了电子的吸附和解吸的亲水 - 疏水相互作用模式⁶⁶ (IgM 纯化方法详见 Affinity Chromatography Handbook AC Page 38 和 Antibody Purification Handbook AC 18-1037-46 P40)。

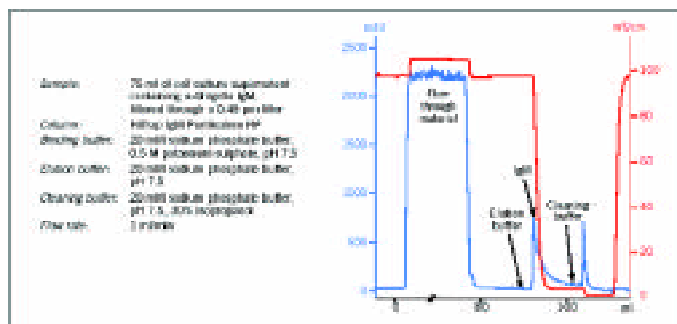


图 47. HiTrap IgM 纯化 IgM

HiTrap IgM 纯化注意事项：

- (1) 样品必须添加 0.8 M 的硫酸铵 (与结合缓冲液保持一致)，慢慢添加并慢慢搅拌，之后用 0.45 μ m 膜过滤；有些 IgM 如果结合效果仍然不够理想，可将硫酸铵浓度调到 1.0 M；
- (2) 有些 IgM 在 0.5 M 硫酸铵结合效果也较理想，低浓度的盐可以减少血清中 IgG 的污染，如果洗脱的 IgG 含量较高，可用 Protein A 介质除掉；
- (3) 如果 IgM 结合过强，可用含有 30% 异丙醇的清洗缓冲液洗脱，之后马上将洗脱液进行缓冲液置换或进行样品稀释以保证 IgM 的活性结构；
- (4) 有些种类或种属的 IgM 可以直接用 Protein A 纯化，如狗 IgM 抗体。

4.2 免疫共沉淀

免疫共沉淀能高度有效地从细胞裂解液中分析性提取微量抗原。通过将免疫共沉淀与电泳技术如 SDS-PAGE、免疫印迹等结合，能有效地识别和定性抗原，跟踪蛋白代谢和翻译后修饰，检测酶活性等。免疫共沉淀试剂主要是 Protein A Sepharose 4FF 和 Protein G Sepharose 4FF。注意：多抗具有不同的抗原位点结合性能，故会有较高的背景。单抗背景会轻些，但由于亲和力的差别，有些单抗抗原结合力差而不易筛到抗原，可用不同的单抗筛选同一抗原⁶⁶ (免疫共沉淀详细纯化方法见 Antibody Purification Handbook AC 18-1037-46 P51)。

五、抗体纯化应用实例

5.1 上万升大规模纯化产率与产量⁶⁷

治疗性单抗从早期的毫克级、克级产量到现今的上万升的发酵罐和批数十公斤级的生产规模，对单抗下游技术的挑战和要求越来越高，世界领先的单抗药物生产公司在这一领域积

累了许多成功经验。GE公司为了解决规模越来越大,批生产量越来越高的客户要求,不断推陈出新,研发出新的 High Flow 填料、更大规模的层析柱和层析系统(图 48, 49)。同时,GE Healthcare 在全球建立了多个 Fast Trak 中心,帮助客户培训以及解决抗体生产、验证等方面的问题(图 50 为 Fast Trak 中国)。

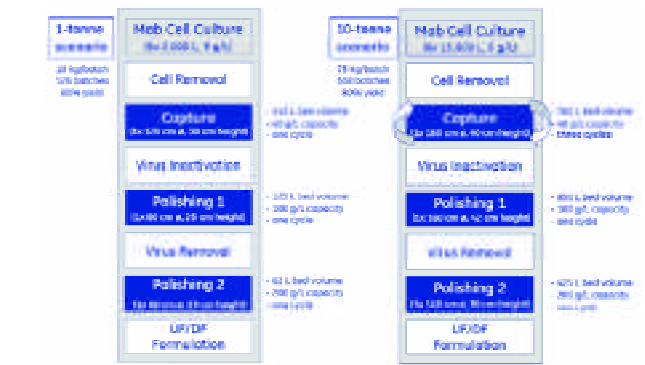


图 48. 六个细胞培养罐同时培养 vs 一条下游生产线——下游纯化所面临的挑战



图 49. 两米直径的层析柱装填 Capto Q



图 50. Fast Trak 中国

5.2 非亲和层析从血清培养的杂交瘤细胞上清中分离纯化鼠源性单抗⁶⁸

这是在从11种不同的鼠源性单抗的分离纯化中获得的经验,层析方法分三步(如图 51)。

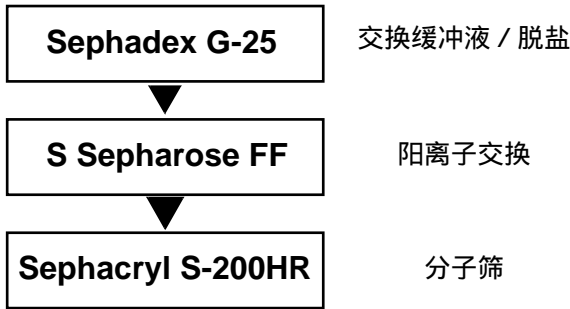


图 51. 层析工艺过程

交换缓冲液: Sephadex G-25, 柱高 60 cm, 上样量柱体积 25%, 线性流速 240 cm/h。
阳离子交换: 柱高 3-5 cm, 上样量 2-5 mg 单抗 / ml 胶, 平衡时线性流速 300 cm/h, 洗脱时流速 6-120 cm/h。
凝胶过滤: 上样量 2%, 线性流速 15 cm/h。

5.3 检测用小鼠单抗纯化

利用 Phenyl Sepharose HP 纯化单克隆抗体: 在中空纤维生物反应器中培养鼠的杂交瘤细胞, 将培养上清中所含有的单克隆化的 IgG1 抗 -IgE 作为原料, Mab 的浓度为 0.63 mg/ml。通过 Phenyl Sepharose HP 纯化, 纯度高于 95%, 产率为 78%。如果再加上分子筛层析 Superdex 200, 最终可以得到高于 99% 的纯度。纯化规模从柱体积 20 毫升的 XK 16/20 柱, 放大到 100 毫升的 BioPilot 柱 35/100; 然后到 300 毫升的 BioPilot 柱 60/100, 放大后纯化效率保持一致。

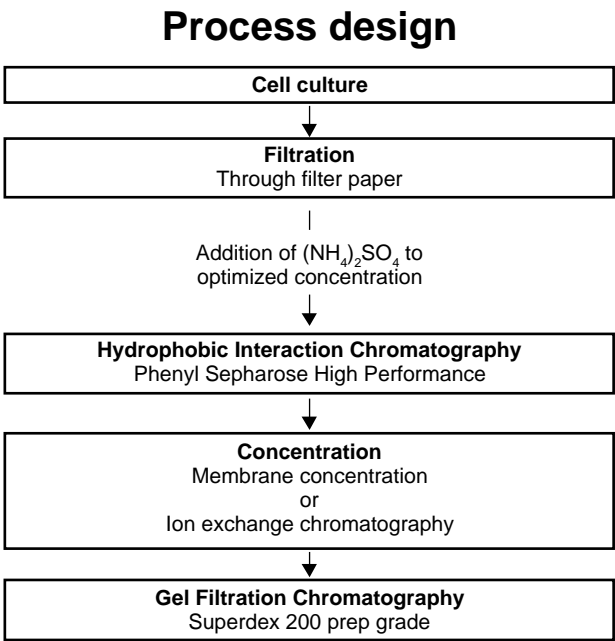


图 52. 大规模鼠抗 IgE 单抗 IgG1 单抗纯化工艺

Column: BioPilot Column 35/100
Gel: Phenyl Sepharose High Performance, 10 cm bed height
Sample: Hybridoma cell culture supernatant; mouse IgG₁, anti-IgE. Ammonium sulphate added to 0.5 M.
Sample volume: 735 ml
Sample load: 4.5 mg Mab/ml gel
Flow rate: 100 cm/h (16.7 ml/min)
Buffer A: 20 mM potassium phosphate, pH 7.0 + 0.5 M ammonium sulphate
Buffer B: 20 mM potassium phosphate pH 7.0
Gradient: 0-100% B; 10 column volumes

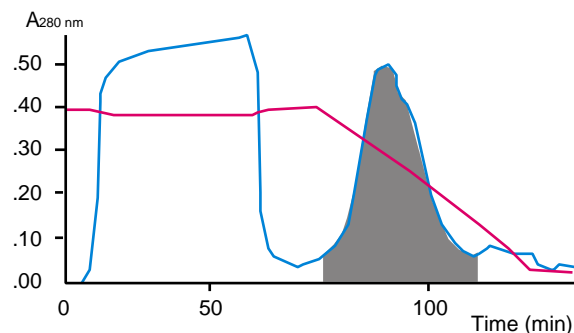


图 53. 大规模鼠抗 IgE 单抗 IgG1 纯化

References:

- Aldridge. 'Biomanufacturing Faces New Sets of Challenges'. *Genetic Engineering News*. Vol 24, No. 14, August 2004.
- Times Magazine, New York, 28 May 2001.
- 中国医药信息网 (<http://www.menet.com.cn>); 2007 年世界 10 大医药公司业绩点评。
- 生物技术世界 (<http://www.biotechworld.cn>); 单克隆抗体市场分析和展望。
- David Karlsson, Niklas Jakobsson, *et al.* Model-based optimization of a preparative ion-exchange step for antibody purification. *Journal of Chromatography A*, 1055(2004) 29-39.
- 余晓玲, 米力, 陈志南, 疏水作用 FPLC 一步法制备级纯化抗人肝癌单抗 HAb18 F (ab')₂ 片段. *第四军医大学学报* 21:1 (2000) s1-s3.
- Haya Grunfeld and Peter Moore, (1997) *J. of Immun. Methods*, 210 233-241.
- Eberhard Bill *et al.*, Optimization of Protein G Chromatography for Biopharmaceutical Monoclonal Antibodies, *Journal of Molecular Recognition*, 1995 (8) : 90-94.
- Zhenyu Gu, Jan-Christer Janson *et al.* Chromatographic Methods for the Isolation of, and Refolding of Proteins from, *Escherichia coli* Inclusion Bodies. *Protein Expression and Purification* 25, 174-179 (2002).
- Ming Li, Zhi-Guo Su, and Jan-Christer Janson. In vitro protein refolding by chromatographic procedures. *Protein Expression and Purification* 33(2004) 1-10.
- Maria Laura Gennaro. *et al.* Three-step purification of lipopolysaccharide-free, polyhistidine-tagged recombinant antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Chromatography B*, 714(1998) 223-235.
- Dian C *et al.* Strategies for the purification and on-column cleavage of Glutathione S-transferase fusion target proteins. *Journal of Chromatography B* 769.1(2002) :133-144.
- Leonardo M. Damasceno, Itzcoatl Pla, *et al.* An optimized fermentation process for high-level production of a single-chain Fv antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 37(2004) 18-26.
- Annika Bergenstr hle¹, Maria Storg rds¹, *et al.* Purification of a Murine IgG1 Antibody Expressed in the Leaves of *Arabidopsis Thaliana*.
- Rodolfo Valdes, a, *Biunayki Reyes, *et al.* Hepatitis B surface antigen immunopurification using a plant-derived specific antibody produced in large scale. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 310(2003) 742-747.
- 《人用单克隆抗体质量控制技术指导原则》; NICBP (中国药品与生物制品检定所) 2003-3.
- GE, Wave Brochure, 2007.10 (28-9224-86AA).
- Pierce LN, Shabram PW. Scalability of a disposable bioreactor from 25L - 500L run in perfusion mode with a CHO-based cell line: A tech review. *BioProcessing J*, 2004; 4:51-56.
- GE Healthcare, 中空纤维滤柱分离纯化应用集锦 2006-04-08-BJ.
- GE Healthcare, Upstream clarification- Key process factors for cross flow filtration, *Application Note 11-0014-02 AC*.
- GE Healthcare, Upstream cell harvesting - Factors for successful cross flow filtration, *Application Note 11-0013-64 AC*.
- GE Healthcare, Operation Handbook, hollow fibers cartridge for membrane separations. 18-1165-30 AB.
- GE Healthcare, Continuous perfusion: enabling maximum protein output, *Application Note 18-1177-29 AC*.
- GE Healthcare, Using an autoclavable ultrafiltration cartridge for the production of monoclonal antibodies. *Application Note 18-1177-27 AC*.
- GE Healthcare, CHO cell supernatant concentration with Kwick lab cassettes, *Application Note 11-0013-62 AC*.
- GE Healthcare, Datafile ULTA Pure SG 11-0012-06 AA.
- GE Healthcare, Datafile ULTA Pure HC 28-9094-70 AA.
- Deborah K. Follman., Robert L. Fahrner. Factorial screening of antibody purification processes using three chromatography steps without protein A. *Journal of Chromatography A*, 1024 (2004) 79-85.
- Amersham Biosciences, Protein G Sepharose 4FF, DataFile (18-1012-91).
- Amersham Biosciences, Rapid optimisation and development of automated two-step purification procedure for monoclonal IgG antibodies on  KTAFPLC (18112893).
- Tsutomu Arakawa, John S. Philo, *et al.* Elution of antibodies from a Protein-A column by aqueous arginine solutions. *Protein Expression and Purification* 36(2004) 244-248.
- Amersham Biosciences, Affinity Chromatography Datafile of Mabselect(18-1149-94).
- Amersham Biosciences MabSelect 实验操作指南详见 Mabselect instruction(71-5020-91).
- Amersham Biosciences. Downstream Gab' 02 Abstracts, *Extended Reports from the 2nd International Symposium on Downstream Processing of Genetically Engineered Antibodies and Related Molecules*, Porto, Portugal Oct 20-22, 2002. p12-14 (18-1172-74).
- Robert L. Fahrner, *et al.* Performance comparison of Protein A affinity-chromatography sorbents for purifying recombinant

- monoclonal antibodies, *Biotechnol. Appl. Biochem.*(1999) 30, 121-128.
36. Amersham Biosciences, Downstream 37, p9-10 (11-0008-46).
 37. Kurt Brorson , Janice Brown (FDA) *et al.*, Identification of protein A media performance attributes that can be monitored as surrogates for retrovirus clearance during extended re-use. *Journal of Chromatography A*,989 (2003) 155-163.
 38. Amersham Biosciences, Downstream 36, p12-14 (18-1171-05).
 39. GE Healthcare, Mabselect Xtra Instructions, (11-0026-02).
 40. GE Healthcare, Mabselect Xtra Datafile, (11-0011-57).
 41. R. Hahn, P. Bauerhansl, K. Shimahara, C. Wizniewski, A. Tscheliessnig, A. Jungbauer, *J. Chromatogr. A* 1093 (2005) 98.
 42. K. Swinnen *et al*, Performance comparison of protein A affinity resins for the purification of monoclonal antibodies, *Journal of Chromatography B*,848 (2007) 97-107.
 43. Rainer Hahn *et al*, Comparison of protein A affinity sorbents III. Life time study. *Journal of Chromatography A*, 1102 (2006) 224-231.
 44. Amersham Biosciences, Mabselect Sure Datafile, (11-0011-65).
 45. R. Hahn, R. Schlegel, A. Jungbauer, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*790 (2003) 35.
 46. Sanchayita Ghose, *et al*, Antibody Variable Region Interactions with Protein A: Implications for the Development of Generic Purification Processes, 2005.8.
 47. Hans J Johansson, Multi-modal chromatography for purification of monoclonal antibodies GE Data File (28-9179-13).
 48. Simon C.B. Jones and Martin P. Smith, Evaluation of an alkali-stable protein A matrix vs Protein A Sepharose Fast Flow and considerations on process scale-up to 20,000 L. *GE Healthcare Downstream Gab'04 Abstracts*, 2004 p20-22 (11-0027-25).
 49. GE Healthcare Application Note (28-9259-32 AA).
 50. GE Healthcare, Capto adhere Instructions (28-9063-51 AA).
 51. GE Healthcare, Capto adhere Datafile (28-9078-88 AA).
 52. GE Healthcare, Downstream 41, p3-5 (28-9179-38).
 53. GE Healthcare, Optimization of loading conditions on Capto adhere using design of experiments. *Application Note 28-9078-89 AA, Process-scale antibody purification*.
 54. GE Healthcare, Data File 28-9258-39 AA, PreDicator 96-well filter plates.
 55. GE Healthcare, Downstream 41, p6 (28-9179-38).
 56. Anders Ljunglöf, Selective removal of leached protein A, aggregates and host cell proteins from mAbs by multi-modal anion exchange chromatography, GE, (28-9179-14).
 57. So-Hee Lee, Jung-Soo Kim, *et al*. Optimization of buffer conditions for the removal of endotoxins using Q-sepharose. *Process Biochemistry* 38(2003) 1091_/1098.
 58. Mark J. Wilson *, Claire L. Haggart, *et al*. Removal of tightly bound endotoxin from biological products. *Journal of Biotechnology* 88(2001) 67-75.
 59. Friedrich Birger Anspach *et al*. Removal of endotoxins by affinity sorbents. *Journal of Chromatography A*711 (1995) 81-92.
 60. Points to Consider in Manufacturing and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use, Feb. 1997. Part II. b. 4. c.
 61. Zhou J *et al*, pH-gradient cation exchange chromatography for process-scale Antibody purification. *The 229th ACS national meeting*:2005 13-17, San Diego, CA.
 62. R. Valde's a, Neysi Ibarra *et. al*. Chromatographic removal combined with heat, acid and chaotropic inactivation of four model viruses. *Journal of Biotechnology*96 (2002) 251-258.
 63. Zhou J *et al*, Development of A Cost Effective, Robust Process for Recombinant Monoclonal Antibody Production, *Williamburg Bioprocessing 2nd Annual Europe Antibodies & Recombinant Proteins meeting*,2005 May 22-24.
 64. Guidelines on viral inactivation and removal procedures intended to assure the viral safety of human blood plasma products, *WHO Guideline*, Series No. 924, 2004.
 65. 快速发展中的利用符合药品生产质量管理规范 (GMP) 要求的 Biacore 系统测定抗体浓度的分析方法, *Downstream 41 中文版*, p20-24.
 66. Amersham Biosciences. Antibody Purification Handbook (18-1037-46).
 67. GE Healthcare 2007 Bioprocess seminar tour materials.
 68. A method suitable for the isolation of monoclonal antibodies from large volumes of serum-containing hybridoma cell culture supernatants. *Journal of Immunological Methods*,104 (1987) 103-109.

附录

附录一：FDA 批准上市的抗体药物

	单抗药物	生产公司	适应症	抗体类型	批准日期
1	Ortholone (OKT3)	Ortho Biotech	肾移植排斥	鼠源单抗	1986
2	Reopro (Abciximab)	Centocor	溶血栓，心绞痛	人-鼠嵌合抗 7E3 的 Fab 片段	11/05/1997
3	Rituxan (Rituximab)	IDEC & Genentech	复发性或难治的 B 细胞型非霍奇金淋巴瘤	嵌合抗体	11/26/1997
4	Zenapax (Daclizumab)	Roche	抗 CD25，抗肾移植排斥	人源化抗体	12/10/1997
5	Herceptin (Trastuzumab)	Genentech	乳腺癌	人源化抗体	1998
*	Enbrel (Etanercept)	IMMUNEX	类风湿性关节炎	抗体融合蛋白	11/02/1998
6	Simulect (Basiliximab)	Novartis	抗 CD25，抗器官移植排斥	嵌合抗体	05/12/1998
7	Synagis (Palivizumab)	MedImmune	婴幼儿呼吸道合胞病毒 (抗 RSV 病毒)	人源化抗体	6/19/1998
8	Remicade (Infliximab)	Centocor	局限性回肠炎，类风湿性关节炎	嵌合抗体	8/1998

	单抗药物	生产公司	适 应 症	抗体类型	批准日期
9	Mylotarg (Gemtuzumab Ozogamicin)	WYETH PHARMS INC	急性复发性髓性白血病	Calicheamicin 与人源化抗体的偶联物	4/6/2001
10	Campath (Alemtuzumab Campath-1H)	Millennium and Illex Oncology Inc.	抗 CD52, 治疗曾用烷化剂治疗的 B- 细胞慢性淋巴细胞性白血病和氟达拉滨治疗失败的病人	人源化抗体	5/7/2001
11	Zevalin (Ibritumomab Tiuxetan)	IDEC Pharmaceuticals	抗 CD20, 难治的 B 细胞型非霍奇金淋巴瘤	放射性核素 Indium (111In) 与鼠源性抗体偶连物	2/19/2002
12	Humira (Adalimumab)	Abbott Laboratories	抗 TNF Mab, 治疗关节炎	人源性抗体	12/30/2002
*	Amevive (Alefacept)	Biogen	LFA-3 单抗 (LFA-3/IgG1 融合蛋白) 银屑病、牛皮癣	抗体融合蛋白	1/30/2003
13	Xolair (Omalizumab)	Genentech, Inc	rhuMab-E25, 治疗哮喘	抗 IgE 人源化单抗	6/20/2003
14	Bexxar (Tositumomab and Iodine I-131)	Corixa Corp	CD20+, 滤泡性的, 转移或非转移的非霍奇金淋巴瘤	鼠单抗标记放射核素	6/27/2003
15	Raptiva (Efalizumab)	Genentech, Inc	牛皮癣	人源化抗体	10/27/2003
16	Erbixut (cetuximab)	Imclone	EGF-R	嵌合抗体	2/12/2004
17	Avastin (bevacizumab)	Genentech Inc	抑制 VEGF	人源化抗体	2/26/2004
18	Tysabri (Natalizumab)	BIOGEN IDEC	抗 4 整合素蛋白, 治疗复发的 MS (multiple sclerosis)	重组人源化 IgG4 抗体	11/23/2004
19	Lucentis (Ranibizumab)	CENENTECH	VEGF inhibitor, 治疗湿性老年性黄斑病变 (AMD)	重组人源化单抗片段	06/30/2006
20	Vectibix (Panitumumab)	Amgen	抗 EGFR, 治疗实体瘤	重组人源化单抗	09/27/2006
21	Soliris (Eculizumab)	ALEXION PHARM	通过结合 C5 补体蛋白而抑制补体诱导的细胞溶解, 来治疗阵发性睡眠性血红蛋白尿症	人源化单抗体	03/16/2007
22	Cimzia (Certolizumab)	UCB INC	人源化的抗 TNF 的 Fab' 片段, PEG 修饰延长半衰期, 治疗克罗恩病 (Crohn)	PEG 修饰的人源化的 Fab' 片段	04/22/2008

* 为抗体融合的重组融合蛋白。

二. 体内放射免疫显像抗体

1	CEA-Scan (Arcitumomab)	Immunomedics, Inc.	诊断复发或转移结直肠癌	99mTc 标记鼠单抗片段	6/28/1996
2	ProstaScint (Capromab Pentetide)	Cytogen Corp.	寻找附着或转移的前列腺癌	111In 标记鼠单抗	10/28/1996
3	Myoscint (Imciroimab Pentetate)	Centocor	心脏影像剂, 用于心电图不能确诊的病例	111In 标记	7/3/1996
4	Verluma (Nofetumomab)	Dr. Karl Thomae GmbH	诊断小细胞性肺癌晚期患者	99mTc 标记 Fab 片段	8/20/1996
5	Technetium (99mTc) Fanolesomab; Neutrospec	Palatin Technologies	抗 CD15 的鼠 IgM 单抗	99mTc 标记 IgM 单抗	07/02/2004

三. 其它抗体类治疗药物

1	Atgam	Pharmacia	急性移植排斥	马源型多抗	1981
2	CytoGam	MedImmune Inc.	CMV 感染 (Cytomegalovirus)	人血清多抗	5/6/1997
3	Thymogloblin	SangStat	急性移植排斥	兔多抗 (T 细胞上多种受体)	1999
4	Enbrel (Etanercept) rhTNFR-Fc	Immunex Corporation	中和体内外源性给予的 TNF 致死活性, 体内减轻 TNF 诱发的休克样综合症	重组抗体	11/02/1998
5	CroFab	Protherics	抗响尾蛇毒素	绵羊多抗小分子片段	2000

附录二：国内上市单抗一览表

	单 位	抗体名称	适 应 症	抗体类型
一. 自主生产单抗				
1	武汉生物制品研究所	WuT3 (OKT3)	武汉生物制品研究所抗肾移植单抗 OKT3 (注射用鼠源性抗人 T 淋巴细胞 CD3 抗原单克隆抗体)	鼠单抗
2	大连亚威公司	抗人白细胞介素 -8 单克隆抗体乳膏	乳膏剂，治疗银屑病，免疫抑制剂	鼠单抗
3	上海美恩生物技术有限公司	碘 [¹³¹ I] 肿瘤细胞核人鼠嵌合单克隆抗体注射液	上海美恩药业有限公司与美国南加大合作开发的碘 [¹³¹ I] 人鼠嵌合型肿瘤细胞核单克隆抗体注射液 (¹³¹ I-chTNT)	嵌合抗体
4	成都华神集团股份有限公司 / 第四军医大学	碘 [¹³¹ I] 美妥昔单抗注射液 [利卡汀]	第四军医大学的国家一类新药碘 [¹³¹ I] HAb-18 导向药物，肝癌单抗放免诊断剂和治疗剂，用于原发性肝癌的体内定向诊断及体内导向治疗	鼠单抗片段
5	上海中信国健药业有限公司	注射用重组人 II 型肿瘤坏死因子受体 - 抗体融合蛋白 [益赛普]	注射用重组人 II 型肿瘤坏死因子受体 - 抗体融合蛋白 (rhTNFR: Fc)，治疗类风湿关节炎	抗体融合蛋白
6	北京百泰生物药业有限公司	重组人源化抗人表皮生长因子受体单克隆抗体 [泰欣生]	注射用重组人源化抗人 EGFR 单抗，治疗鼻咽癌	人源化抗体
二. 进口单抗				
1	罗氏制药 / 基因泰克	美罗华 Rituximab	利妥昔单抗注射液，治疗复发或化疗耐药的惰性 B 细胞性非霍奇金淋巴瘤	嵌合抗体
2	罗氏制药 / 基因泰克	赛尼哌 Daclizumab	达利珠单抗，预防肾移植后急性排斥反应	人源化抗体
3	罗氏制药 / 基因泰克	赫斯汀 Trastuzumab	注射用曲妥珠单抗，用于治疗 HER2 过度表达的转移性乳腺癌	人源化抗体
4	北京诺华制药	舒莱 Simulect Basiliximab	巴利昔单抗 (basiliximab)，预防和降低器官移植后急性排斥反应	嵌合抗体
5	古巴分子免疫学中心	爱欧山 [鼠源 CD3 单克隆抗体]	器官移植的抗排斥治疗	鼠单抗
6	默克 / 英克隆	爱必妥 Cetuximab	结直肠癌	嵌合抗体
7	奥多生物技术 (Ortho Biotech)	Muromonab-CD3 (莫罗莫那 -CD3)	器官移植的抗排斥治疗	鼠单抗

通用电气(中国)医疗集团

网址：www.gelifesciences.com.cn

邮箱：lifesciences@ge.com

免费咨询热线：800-810-9118

详情请与通用电气 (中国) 医疗集团各办事处联系：

香港办事处 香港九龙旺角亚皆老街 8 号 朗豪坊办公大楼 12 楼 电话 : (852) 2100 6314 传真 : (852) 2100 6338	北京办事处 北京市经济技术开发区 永昌北路 1 号 电话 : (010) 5806 9689 传真 : (010) 6787 1162 邮编 : 100176	上海办事处 上海市浦东新区张江高科技园区 华佗路 1 号 电话 : (021) 3877-7888 传真 : (021) 3877-7449 邮编 : 201203	成都办事处 成都市新华大道文武路 42 号 新时代广场 12 层 A-C 单元 电话 : (028) 8678 2581 传真 : (028) 8678 2582 邮编 : 610017	广州办事处 广州市建设六马路 33 号 宜安广场 1212 室 电话 : (020) 8363 3828-67961, 67956 传真 : (020) 8363 4302 邮编 : 510060
---	--	---	--	---

通用电气 (中国) 医疗集团有权在任何时候，在不另行通知的情况下，不负有任何义务地改变上述规格和性能，并有权终止该产品的供应。如需要最新信息请与通用电气 (中国) 医疗集团在国内的销售代表联系。

