

## 重组单抗药物亲和层析病毒去除工艺验证

程立均<sup>1\*</sup> 马翠卿<sup>2\*</sup> 杨建岭<sup>2</sup> 魏敬双<sup>1</sup> 张世雄<sup>1</sup> 刘俊乐<sup>1</sup> 魏林<sup>2</sup> 贾茜<sup>1</sup>

【摘要】目的 对重组单抗药物亲和层析病毒去除工艺进行验证。方法 以甲型流感病毒 H1N1 亚型、单纯疱疹病毒 1 型和腺病毒 5 型作为指示病毒,分别使用新、旧 rProtein A Sepharose Fast Flow(rProtein A SFF)层析介质考察重组抗狂犬病病毒单抗亲和层析步骤对病毒的去除效果。结果 经新、旧 rProtein A SFF 介质亲和层析后,3 种指示病毒的滴度均下降 4.0 log<sub>10</sub> 以上。结论 rProtein A SFF 亲和层析工艺能有效去除重组单抗药物的潜在病毒污染。

【关键词】重组单抗药物 亲和层析 病毒去除 工艺验证

【中国图书分类号】R392-33 【文献标识码】A 【文章编号】1004-5503(2011)07-0842-03

## Validation of Process for Virus Removal from Recombinant Monoclonal Antibody Product by Affinity Chromatography

CHENG Li-jun<sup>△</sup>, MA Cui-qing, YANG Jian-ling, WEI Jing-shuang, ZHANG Shi-xiong, LIU Jun-le, WEI Lin, JIA Qian (<sup>△</sup>New Drug R&D Center, North China Pharmaceutical Corporation, State Key Laboratory for Development of Antibody Drugs, Shijiazhuang 050015, China)

【Abstract】Objective To verify the process for virus removal from recombinant monoclonal antibody product by affinity chromatography. Methods The efficacies of virus removal from recombinant monoclonal antibody against rabies virus by novel and traditional rProtein A Sepharose Fast Flow (rProtein A SFF) chromatography were evaluated using influenza virus subtype H1N1, herpes simplex virus type 1 and adenovirus type 5 as model viruses. Results All the titers of three kinds of model viruses decreased by more than 4.0 log<sub>10</sub> after purification by novel and traditional rProtein A SFF chromatography. Conclusion The rProtein A SFF affinity chromatography is effective in removal of potential virus contamination from recombinant monoclonal antibody products.

【Key words】Recombinant monoclonal antibody product; Affinity chromatography; Virus removal; Process validation

重组单抗药物多由哺乳动物细胞培养生产,根据《药品注册管理办法》的相关要求,真核细胞表达的重组制品,需要进行分离纯化工艺去除/灭活病毒能力的验证。本文参照《生物组织提取制品和真核细胞表达制品的病毒安全性评价技术审评一般原则》的要求,选取甲型流感病毒 H1N1 亚型、单纯疱疹病毒 1 型和腺病毒 5 型 3 种有代表性的病毒作为指示病毒,分别使用新、旧 rProtein A Sepharose Fast Flow (rProtein A SFF)介质对重组抗狂犬病病毒单抗亲和层析去除病毒的效果进行了验证,实验以按比例缩小的规模在实验室进行。

### 1. 材料与方法

#### 1.1 病毒及细胞

单纯疱疹病毒 1 型、腺病毒 5 型、甲型流感病毒

基金项目:“十一五”863 计划生物和医药技术领域重大项目(2006AA02A247)。

作者单位:1 华北制药集团新药研究开发有限责任公司 抗体药物研制国家重点实验室(石家庄 050015) 2 河北医科大学基础医学院免疫教研室(石家庄 050017)。

通讯作者:程立均 E-mail kinclj@163.com;  
马翠卿 E-mail macuiqing@sina.com

\* 共享第一作者

H1N1 亚型(A/FM/1/47 株)及其敏感细胞 BHK-21、HeLa 和 MDCK(表 1)均由河北医科大学病原微生物教研室及免疫教研室保存。

#### 1.2 重组单抗

重组抗狂犬病病毒单抗细胞培养收液(IgG1, CHO 细胞生产)为华北制药集团新药研究开发有限责任公司制备。

#### 1.3 主要试剂及仪器

胎牛血清(FBS)、RPMI1640 培养液和胰酶购自美国 Hyclone 公司;Waters 10/30 层析柱为 Waters 公司产品;新、旧 rProtein A SFF 介质(旧介质为反复使用 200 次以上的介质)、P-50 层析泵、UV-1 检测器和 REC111 记录仪均为 GE Healthcare 公司产品;层析所用试剂均为分析纯。

#### 1.4 亲和层析

使用新、旧 rProtein A SFF 介质分别进行亲和层析。将指示病毒原液按 1:9(v/v)的比例加入重组抗狂犬病病毒单抗细胞培养收液中,混匀后取样作为层析前样品。亲和层析后,收集洗脱峰,取样作为层析后样品。层析缓冲液的组成、介质载量、层析柱

柱床高度以及线性流速等均保持与中试工艺一致。层析参数为 细胞培养收液 540 ml ,病毒原液 60 ml ,样品总量 300 mg ,pH 值 7. 0 ,电导率 10 ms / cm ,层析后样品体积 22 ml。

表 1 指示病毒及其敏感细胞

Tab 1. Model viruses and sensitive cells

指示病毒	基因组	包膜	物理/化学	大小 (nm)	敏感细胞
			抗性		
单纯疱疹病毒 1 型	DNA	有	弱	150 ~ 250	BHK-21
腺病毒 5 型	DNA	无	强	70 ~ 90	HeLa
甲型流感病毒 H1N1 亚型	RNA	有	弱	80 ~ 120	MDCK

1. 5 病毒检测

分别将 MDCK、BHK-21 和 HeLa 细胞制成 1 × 10<sup>5</sup> 个 / ml 的细胞悬液 ,接种于 96 孔细胞培养板 , 100 μl / 孔 ,37℃培养 24 h ,待细胞长成单层后 ,弃上清 ,PBS 洗涤 ,将分别加入 3 种指示病毒的层析前、后样品 10 倍系列稀释至 10<sup>-8</sup> ,每个稀释度接种 4 孔细胞 ,同时设阳性对照(病毒原液)、阴性对照(细胞培养收液)及细胞空白对照 ,以细胞病变作为判定病毒是否存在的指标 ,逐日观察细胞病变 ,72 h 初步判定病毒去除效果。

1. 6 病毒去除效果的判定

根据公式  $R = \log(V1C1 / V2C2)$  计算病毒去除效力(R) ,式中 V1、V2 分别为层析前、后样品体积 , C1、C2 分别为层析前、后病毒滴度。  $R \geq 4. 0 \log_{10}$  表示有效去除 / 灭活病毒 ,否则视为无效<sup>[1]</sup>。

2. 结果

2. 1 单纯疱疹病毒 1 型的去除效果

经新、旧 rProtein A SFF 介质亲和层析后 ,单纯疱疹病毒 1 型滴度分别下降了 6. 44 和 4. 44 log<sub>10</sub> ,均大于 4. 0 log<sub>10</sub> ,见表 2。阳性对照孔出现明显细胞病变 ,阴性对照和空白对照孔无细胞病变。表明使用新、旧 rProtein A SFF 介质亲和层析均能有效去除单纯疱疹病毒 1 型。

2. 2 腺病毒 5 型的去除效果

经新、旧 rProtein A SFF 介质亲和层析后 ,腺病毒 5 型滴度分别下降了 4. 44 和 6. 44 log<sub>10</sub> ,均大于 4. 0 log<sub>10</sub> ,见表 3。阳性对照孔出现明显细胞病变 ,阴性对照和空白对照孔无细胞病变。表明使用新、旧 rProtein A SFF 介质亲和层析均能有效去除腺病毒 5 型。

表 2 新、旧 rProtein A SFF 介质亲和层析对单纯疱疹病毒 1 型的去除效果

Tab 2. Removal of herpes simplex virus type 1 by novel and traditional rProtein A SFF affinity chromatography

介质	病毒滴度(CCID <sub>50</sub> )		样品体积(ml)		R(log <sub>10</sub> )
	层析前	层析后	层析前	层析后	
新介质	10 <sup>5</sup>	10 <sup>0</sup>	600	21. 6	6. 44
旧介质	10 <sup>4</sup>	10 <sup>1</sup>	600	22. 0	4. 44

表 3 新、旧 rProtein A SFF 介质亲和层析对腺病毒 5 型的去除效果

Tab 3. Removal of adenovirus type 5 by novel and traditional rProtein A SFF affinity chromatography

介质	病毒滴度(CCID <sub>50</sub> )		样品体积(ml)		R(log <sub>10</sub> )
	层析前	层析后	层析前	层析后	
新介质	10 <sup>3</sup>	10 <sup>0</sup>	600	21. 5	4. 44
旧介质	10 <sup>6</sup>	10 <sup>1</sup>	600	22. 0	6. 44

2. 3 甲型流感病毒 H1N1 亚型的去除效果

经新、旧 rProtein A SFF 介质亲和层析后 ,甲型流感病毒 H1N1 亚型滴度分别下降了 4. 44 和 5. 42 log<sub>10</sub> ,均大于 4. 0 log<sub>10</sub> ,见表 4。阳性对照孔出现明显细胞病变 ,阴性对照和空白对照孔无细胞病变。表明使用新、旧 rProtein A SFF 介质亲和层析均能有效去除甲型流感病毒 H1N1 亚型。

表 4 新、旧 rProtein A SFF 介质亲和层析对甲型流感病毒 H1N1 亚型的去除效果

Tab 4. Removal of influenza A virus subtype H1N1 by novel and traditional rProtein A SFF affinity chromatography

介质	病毒滴度(CCID <sub>50</sub> )		样品体积(ml)		R(log <sub>10</sub> )
	层析前	层析后	层析前	层析后	
新介质	10 <sup>3</sup>	10 <sup>0</sup>	600	21. 5	4. 44
旧介质	10 <sup>5</sup>	10 <sup>1</sup>	600	23. 0	5. 42

3. 讨论

哺乳动物细胞生产的重组蛋白药物存在被病毒污染的可能性 ,病毒污染可来自原始细胞系本身 ,也可来自生产过程中带入的外源病毒<sup>[2]</sup>。虽然细胞库全面检定已包含了对可能污染的病毒因子的详细检定 ,但目前检测手段不能发现的病毒仍有可能漏检 ,因此 ,在生产过程中必须设去除 / 灭活病毒的步骤。FDA 要求产品生产工艺中至少应包含两种基于不同原理的专门针对病毒去除 / 灭活的步骤 ,我国目前要求至少有一种去除 / 灭活病毒的有效步骤。

在重组单抗药物的纯化工艺中 ,Protein A 亲和层析是最常用的一种层析方法 ,能够有效去除病毒<sup>[3]</sup>。其去除病毒的原理为 :抗体与 Protein A 介质特异性

结合,而病毒可以无保留地从层析柱流穿,从而实现病毒与抗体的分离<sup>[4]</sup>。从理论上来说,Protein A 亲和层析能够有效去除各类病毒。

出于对生产成本的考虑,生产用层析介质会反复使用,直至其性能开始下降为止,一般需反复使用 100~250 次。反复使用的介质会不可避免地出现老化,性能的下降可能会导致其病毒去除能力的降低,因此,反复使用的旧介质可能存在安全隐患。由于各类介质去除病毒的原理及其老化机制各不相同,其病毒去除能力所受的影响也会有所不同。通常,介质在反复使用过程中会有部分蛋白质或脂类沉积,对于以结合-洗脱模式纯化蛋白的介质来说,其纯化能力会受到影响,同样,其去除病毒的效果也会下降。如阴离子交换介质,病毒比目的蛋白更紧密地与介质结合,沉积物会影响病毒与介质的亲和力,从而降低阴离子交换介质去除病毒的能力。对于 Protein A 介质,情况则不同,Protein A 介质是依靠抗体与介质结合,而病毒流穿的原理来去除病毒,因此,沉积物不会影响其去除病毒的效果。Protein A 介质在反复使用过程中老化的机制包括以下几方面:Protein A 配基的脱落导致结合抗体能力下降,产品收率降低;介质变形导致反压升高;对抗体的结合能力增强导致洗脱困难等<sup>[5-8]</sup>,但这些均不会影响 Protein A 亲和层析过程中病毒从介质中流穿,因此,反复使用的旧 Protein A 介质具有与新介质相当的病毒去除能力。Brorson 等<sup>[4]</sup>曾利用逆转录病毒得到了同样的结论,即寿命末期的 rProtein A SFF 亲和层析介质去除病毒的能力并未降低。Lute 等<sup>[9]</sup>的研究结果也表明,Protein A 亲和层析去除病毒的能力不受介质寿命的影响。本次验证结果也显示,重组单抗样品经新、旧 rProtein A SFF 介质亲和层析后,3 种指示病毒的滴度均下降 4.0 log<sub>10</sub> 以上,但由于所用病毒原

液滴度的限制,实验结果未能完全反映该步骤去除病毒的最大能力。

综上所述,rProtein A SFF 亲和层析是非常有效的病毒去除/灭活步骤,而且对新介质的病毒去除能力验证完全能够反映亲和层析介质在工艺寿命过程中对病毒的去除能力,不需要再对旧介质进行重复验证。

#### 参考文献

- [1] 药品审评中心. 生物组织提取制品和真核细胞表达制品的病毒安全性评价技术审评一般原则 [S]. 2005.
- [2] 王军志. 生物技术药物研究开发和质量控制 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 237-265.
- [3] Miesegaes G, Lute S, Brorson K. Analysis of viral clearance unit operations for monoclonal antibodies [J]. Biotechnol Bioeng, 2010, 106 (2): 238-246.
- [4] Brorson K, Brown J, Hamilton E, et al. Identification of protein A media performance attributes that can be monitored as surrogates for retrovirus clearance during extended re-use [J]. J Chromatogr A, 2003, 989 (1): 155-163.
- [5] Tharakan J, Highsmith F, Clark D, et al. Physical and biochemical characterization of five commercial resins for immunoaffinity purification of factor IX [J]. J Chromatogr, 1992, 595 (1-2): 103-111.
- [6] Bill E, Lutz U, Karlsson BM, et al. Optimization of protein G chromatography for biopharmaceutical monoclonal antibodies [J]. J Mol Recognit, 1995, 8 (1-2): 90-94.
- [7] Godfrey MA, Kwasowski P, Clift R, et al. Assessment of the suitability of commercially available SpA affinity solid phases for the purification of murine monoclonal antibodies at process scale [J]. J Immunol Methods, 1993, 160 (1): 97-105.
- [8] Jiang C, Liu J, Rubacha M, et al. A mechanistic study of Protein A chromatography resin lifetime [J]. J Chromatogr A, 2009, 1216 (31): 5849-5855.
- [9] Lute S, Norling L, Hanson M, et al. Robustness of virus removal by protein A chromatography is independent of media lifetime [J]. J Chromatogr A, 2008, 1205 (1-2): 17-25.

(收稿日期 2010-12-08)

#### 【消息】

### 征稿

《中国生物制品学杂志》为报道我国生物制品研究开发重大成果和国内外最新进展的国内唯一的生物制品专业学术期刊。由国家卫生部主管,中华预防医学会和中国生物技术集团公司长春生物制品研究所主办,是中华预防医学会系列杂志之一,月刊。

本刊主要刊载生物制品和生物技术产品相关领域,如预防医学、免疫学、微生物学、生物化学、流行病学、临床医学等方面的研究、生产、使用和质控等学术文章。在选择来稿时注

重学术性、前沿性和实用性。优先报道基金项目及各种基金赞助课题的文章,并适当照顾边远地区和基层单位。

本刊设有基础研究、预防制品、治疗制品、诊断制品、实验技术、临床观察、研究简报、综述、述评、会议快讯、消息动态等栏目。

征稿细则见本刊稿约或 <http://www.zgswj.com.cn>。