帕利珠单抗生物类似药的细胞培养工艺优化及纯化工艺考察

杨鸿山，韩　姝，张　伟，胡又佳，谢丽萍*
（上海医药工业研究院，上海 201203）

摘要：帕利珠单抗（Synagis）是用于预防呼吸道合胞病毒的经典药物，但由于价格昂贵，限制了其应用范围。该研究采用中国仓鼠卵巢细胞（CHO 细胞）表达帕利珠单抗类似药，并以响应面设计法对培养关键参数进行优化，筛选培养基组合以提高产量。研究结果显示，优化工艺参数为以 AM01-AF02 为基础 - 补料培养基，每 1 mL 含 5.0×10^6 个细胞的密度接种，37 ℃培养 7 d 后，降温至 33.0 ℃，培养至 d16。该工艺条件下，可将帕利珠单抗类似药的产量在摇瓶和 3 L 生物反应器中分别提升 69.3%和 30.0%。随后，对生物反应器上发酵生产的抗体进行了纯化工艺研究，为帕利珠单抗类似药的后续工艺开发提供了参考。

关键词：帕利珠单抗；中国仓鼠卵巢细胞；细胞培养；响应面法；纯化
中图分类号：Q815　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2023)12-1724-07
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.12.006

Investigation on Optimization of Cell Culture Process and Purification Process of Palivizumab Biosimilars

YANG Hongshan, HAN Shu, ZHANG Wei, HU Youjia, XIE Liping*
(*Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203*)

ABSTRACT: Palivizumab (Synagis) is a classic drug used to prevent respiratory syncytial virus (RSV). Its application is limited due to its high price. In this study, a Chinese hamster ovary cell line (CHO cells) was engineered to produce palivizumab biosimilars. The key parameters of cell culture were optimized by response surface methodology, and media combinations were screened to increase yield. The results showed that a 16-days cell culture process using AM01-AF02 medium as the basal-feed combination, seeding at 5.0×10^6 cells per milliliter, and temperature shift from 37 ℃ to 33.0 ℃ on day 7 improved palivizumab production by 69.3% in shake flask and 30.0% in 3 L bioreactor. The purification process at a 3 L bioreactor scale was also studied, which provided a reference for the subsequent process development of palivizumab biosimilars.

Key Words: palivizumab; Chinese hamster ovary cell; cell culture; response surface methodology; purification

呼吸道合胞病毒（respiratory syncytial virus，RSV）是导致婴儿和老人呼吸道疾病的一个重要原因，也是导致婴儿死亡的重要原因之一[1]。目前市场上尚无特效药和疫苗上市。帕利珠单抗（palivizumab，Synagis）是靶向 RSV 病毒 F 蛋白的一种人源化的鼠单克隆抗体[2]，可预防由 RSV 引起的严重下呼吸道感染（lower respiratory tract infection，LTRI），有效降低儿童住院率和死亡率[3]。由于该药品价格昂贵，其应用范围受限，尤其在不发达地区，很少人使用[4]。自 1998 年帕利珠单抗被 FDA 批准上市以来，20 年间无同类药品获批；直到 2022 年 11 月，由阿斯利康和赛诺菲联合研制的尼塞韦单抗（nirsevimab）被欧盟批准上市，使该治疗领域再次焕发生机。

帕利珠单抗由美国 MedImmune 公司研发，采

收稿日期：2023-04-22
作者简介：杨鸿山(1997—)，男，硕士研究生，专业方向：抗体药物的工艺开发。
通信作者：谢丽萍(1977—)，女，研究员，从事生物大分子药物的研究。
E-mail：xieliping@sinopharm.com

用小鼠骨髓瘤细胞系（NSO 细胞）表达[5]，培养基中加入了牛血清白蛋白等蛋白质成分，经搅拌槽补料分批培养后，从培养液获得。该工艺的细胞培养时间长达 22 d，抗体产量约为 1 g/L。中国仓鼠卵巢细胞（Chinese hamster ovary cells，CHO 细胞）具有稳定的遗传特性、可高效进行糖基化修饰[6]、环境适应性强、产率高，且适宜于大规模培养，被广泛应用于生物药开发领域[7]，如作为宿主细胞被用于抗体生产[8]。

本研究采用 CHO 细胞构建帕利珠单抗类似药的生产细胞，对培养关键参数采用响应面法优化，得到了优化培养基配比和发酵工艺，以提升帕利珠单抗类似药产量，并探究了所得抗体的纯化工艺，以期为帕利珠单抗类似药的后续工艺开发提供参考。

1 仪器与材料

1300 SERIES A2 型生物安全柜、Countess3 型细胞计数仪（美国 Thermo Fisher 公司）；Multitron Pro 型振荡培养箱（瑞士 INFORS 公司）；Bioprofile400 型生化分析仪（美国 Nova Biomedical 公司）；Applikon 型生物反应器（瑞典 Getinge 公司，规格 3 L）；AKTA Pure 型蛋白纯化仪（美国 Cytiva 公司）。

OPM-CHO CD07 化学成分确定培养基（批号 15092401A）、OPM-AM01 化学成分确定培养基（批号 15101501A）、OPM-AM02 化学成分确定培养基（批号 15062211A）、OPM-CHO PFF06 无蛋白质补料培养基（批号 15091301A）、OPM-AF01 化学成分确定补料培养基（批号 15071411A）、OPM-AF02 化学成分确定补料培养基（批号 15090813A）均购自上海奥浦迈生物科技股份有限公司，Synagis 原研药（100 mg/mL）由 Medimune 公司提供。

适应于无血清培养基培养的、表达帕利珠单抗的 DG44-CHO 细胞株 101-71S 细胞由中国医药工业研究总院保存。

2 方法与结果

2.1 种子细胞培养及接种

将冻存的 101-71S 细胞（每 1 mL 含 1×10^7 个细胞）约 1.5 mL，复融后转移至种子培养基（CD07 培养基，添加 10 mmol/L 甲氨蝶呤）8.5 mL 中，离心（200×*g*）5 min，沉淀用种子培养基 45 mL 重悬，置 250 mL 摇瓶中，于 37 ℃、110 r/min 条件下培养。当生长密度达到每 1 mL 含 2×10^6 个细胞时传代，传代后保持细胞密度为每 1 mL 含 0.5×10^6 个细胞。取存活率达到 95%以上的对数生长期细胞进行接种。

摇瓶培养：以一定的细胞密度接种至摇瓶中，于普通培养基、37 ℃、110 r/min 条件下培养，培养一段时间后降低培养温度，继续培养至 d16，摇瓶放瓶。

生物反应器培养：以一定的细胞密度接种至生物反应器中，生物反应器的初始条件设置为：搅拌速率 100 r/min，pH 7.0，溶解氧（DO）含量 50%。于普通培养基、37 ℃条件下培养，培养一段时间后降低培养温度，继续培养至 d16，生物反应器下罐。

将放瓶或下罐后的细胞培养液转移至离心管中，经离心（2 100×*g*）30 min 后取上清液，于 4 ℃冷藏保存，长期保存需于 －20 ℃冷冻保存。

2.2 产量测定

通过 Protein A-HPLC 法测定产量。

样品处理：取细胞培养上清液 1.5 mL，离心（2 100×*g*）30 min，过滤（0.22 μm 滤膜）去除样品杂质。

色谱条件：*色谱柱* MabPac ProteinA 分析柱（12 μm，4 mm×35 mm）；*流动相* A 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液（含 150 mmol/L 氯化钠，pH 7.5），B 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液（含 150 mmol/L 氯化钠，pH 2.5），梯度洗脱（0—4 min，A 100%；4—9 min，A 0；9—10 min，A 100%）；*柱温* 25 ℃；*检测波长* 214 nm；*流速* 1 mL/min；*进样量* 20 μL。

2.3 关键培养工艺参数的优化

前期试验结果表明，种子密度（即每 1 mL 所含细胞数，*A*）、降温温度（*B*）和降温时间（*C*）对抗体产量影响较大，且考虑到不同因素间可能存在的相互影响，采用 Box-Behnken 设计（BBD）- 响应面法[9]对关键工艺参数进行优化，以减少试验次数、降低成本。

使用 Design Expert 11.1.0.1 软件对选取的工艺

参数进行三因素三水平试验，各设计因素及水平值如表 1 所示，设计方案和结果如表 2 所示。

表 1　Box-Behnken 设计因素水平表

Tab.1　Factors and Levels for Box-Behnken Design

水平	因素		
	A/×10^{6}个细胞	B/℃	C/d
1	7	35.0	9
0	5	33.0	7
−1	3	31.0	5

表 2　试验方案及结果

Tab.2　Schemes and Results of the Experiment

编号	A/×10^{6}个细胞	B/℃	C/d	Y/(g·L^{-1})
1	7	33	9	1.54
2	5	33	7	2.18
3	5	31	5	1.40
4	7	31	7	1.62
5	7	35	7	1.54
6	5	35	5	1.27
7	3	35	7	1.57
8	5	33	7	2.11
9	5	35	9	1.13
10	5	33	7	2.14
11	7	33	5	1.67
12	5	31	9	1.22
13	3	33	9	1.57
14	3	31	7	1.66
15	5	33	7	2.13
16	3	33	5	1.66
17	5	33	7	2.10

将 17 组试验所得的相应抗体产量［Y/(g·L^{-1})］输入对应列，建立响应面设计模型。对试验结果进行显著性检验对比分析，确定二阶模型为试验模型，其回归方程为：Y= − 123.145 31+0.215 625A+7.293 37B+1.409 13C+0.000 625AB − 0.002 5AC+0.002 5BC − 0.022 437A^2 − 0.111 187B^2 − 0.108 063C^2。方差分析结果显示，该模型 P<0.001 且失拟项 P>0.05，说明拟合度较高，可用于产量优化工艺的分析；并且 B、C、A^2、B^2 和 C^2 对产量的影响显著（P<0.05）。

根据二阶回归模型分别作三维响应面图和等高线图。结果（图 1）显示，降温温度对抗体产量影响较大，且种子密度和降温温度的交互作用明显；降温时间对抗体产量影响较大，且种子密度和降温时间的交互作用也较明显；降温温度和降温时间交互作用不明显。

以产量高为目标，得优化条件为：种子密度为每 1 mL 含 5×10^6 个细胞，以每 1 mL 0.5×10^6 个细胞的密度接种，于 d7 降温至 33 ℃。

2.4　培养基筛选

本研究选取了部分化学成分限定的商业培养基进行组合筛选。除了前期筛选得到的 CD07-PFF06 组合，还选取了效果可能更好的基础培养基 AM01、AM02，以及补料培养基 AF01、AF02，两两搭配，共组成 5 种组合。通过测定在不同组合培养基、相同培养条件下的抗体产量，筛选出抗体产量有优势的组合培养基，每组试验 3 个批次。

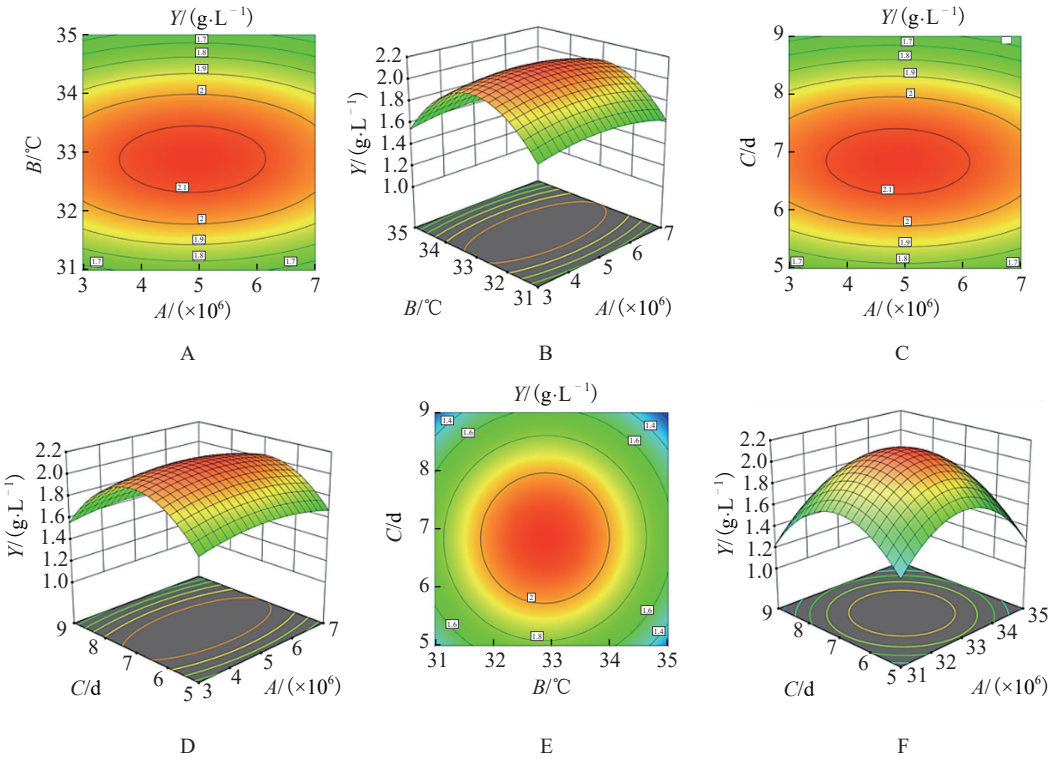
培养条件：初始培养温度为 37 ℃，转速为 110 r/min，CO_2 浓度为 5%；于 d7 降温至 33.5 ℃。d3 开始补糖 3%，之后隔天补糖 5%，保持糖浓度为 2 ～ 5 g/L。

补料分批发酵培养结果显示，AM01-AF02 组合产量较高，平均产量达到了 2.37 g/L，较 CD07-PFF06 组合的 1.90 g/L 提高了 24.7%。同时观察到 AM01-AF02 组合条件下的活细胞密度在进入平台期后普遍维持在一个较高水平，最大活细胞密度可以达到每 1 mL 含 24.3×10^6 个细胞。此外，AM02-AF01 组合的摇瓶补糖量也较高，这可能与该组的高细胞密度使耗糖量增加有关；但其细胞活存活率在 d16 突然下降，可能与乳酸大量堆积有关。

2.5　优化条件验证

以优化前培养条件，即培养基组合为 CD07-PFFO6，种子密度为每 1 mL 含 2×10^6 个细胞，以每 1 mL 含 0.5×10^6 个细胞的密度接种，不降温，其他条件与“**2.1**”及“**2.4**”项下的培养条件一致，培养细胞。各进行 3 个批次的试验，测得摇瓶平均产量为 1.5 g/L，反应器平均产量为 1.9 g/L。

以优化后的条件，即以 AM01-AF02 为基础培养基和补料培养基，响应面法优化的培养条件，按“**2.1**”项下方法分别在摇瓶和生物反应器中培养 101-71S 细胞，各进行 3 个批次的试验，并测定产量。结果显示，摇瓶平均产量 2.54 g/L，较初始摇瓶平



A、B—因素 *A* 和 *B* 对 *Y* 影响的等高线图和 3D 响应面图；C、D—因素 *A* 和 *C* 对 *Y* 影响的等高线图和 3D 响应面图；EF—因素 *B* 和 *C* 对 *Y* 影响的等高线图和 3D 响应面图。

图 1 种子密度、降温温度和降温时间对抗体产量的影响

Fig.1 Effects of Seed Density, Cooling Temperature and Cooling Time on Antibody Yield

均产量（1.5 g/L）提高了 69.3%；反应器平均产量 2.47 g/L，较件优化前产量提升了 30.0%，且优化后 CHO 细胞的生长密度和存活率得到了有效提升（图 3）。

2.6 抗体纯化

采用三步法纯化帕利珠单抗，protein A 亲和色谱高特异性捕获目标抗体，阴离子交换色谱去除多聚体，阳离子交换色谱去除宿主蛋白以及残留的 protein A。

protein A 亲和色谱条件：色谱柱 HiScreen Mabselect PrismA（预装柱，柱高 10 cm，体积 4.7 mL）；平衡缓冲液 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液（含 150 mmol/L 氯化钠，pH 7.4）；洗脱缓冲液 100 mmol/L 枸橼酸钠缓冲液（pH 3.5）；流速 1 mL/min。

阴离子交换色谱条件：色谱柱 HiScreen Capto Q ImpRes（预装柱，柱高 10 cm，体积 4.7 mL）；平衡缓冲液 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液（含 50 mmol/L 氯化钠，pH 7.0）；流速 1mL/min。采取流穿的方式收集抗体。

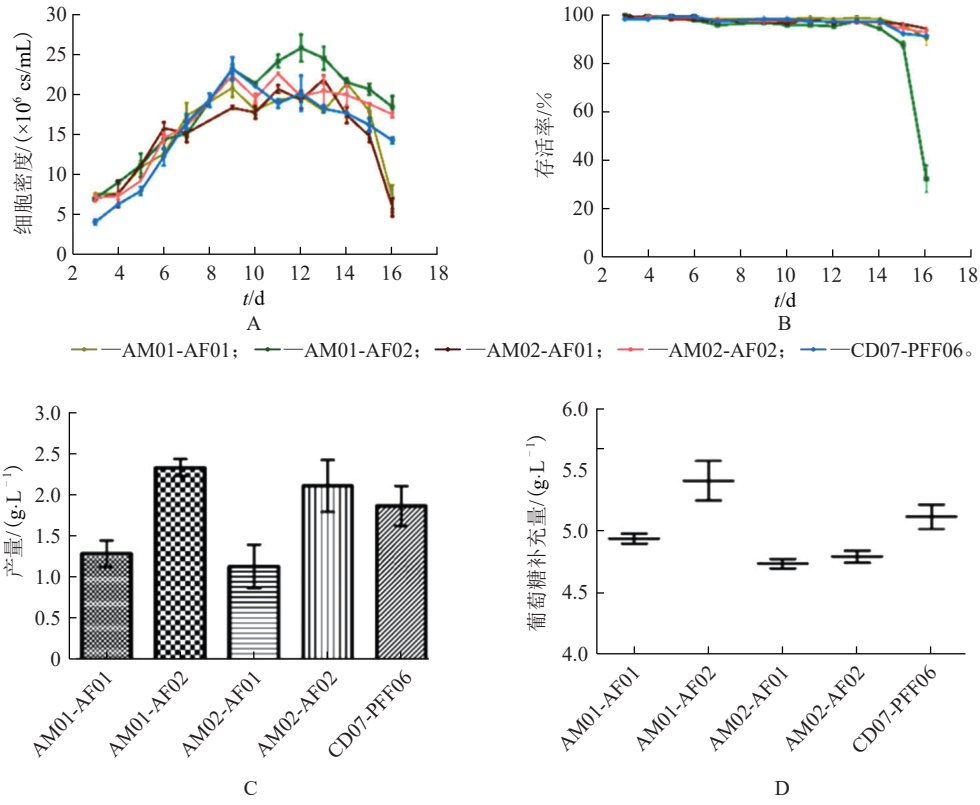
阳离子交换色谱条件：色谱柱 HiScreen Capto S ImpAct（预装柱，柱高 10 cm，体积 4.7 mL）；平衡缓冲液 20 mmol/L 枸橼酸钠缓冲液（含 20 mmol/L 氯化钠，pH 5.5）；洗脱缓冲液 20 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液（含 200 mmol/L 氯化钠，pH 6.5）；流速 1 mL/min。

经三步纯化后分别测定抗体纯度和回收率，结果如表 3 所示。

三步法可使抗体纯度达到与原研药近似的水平，纯化后的抗体平均纯度可达 99.7%，且样品 SDS-PAGE 电泳条带变性还原或非变性还原与原研药均无显著差别（如图 4 所示）。

3 讨论

本研究采用 DG44-CHO 细胞获得产量稳定的帕利珠单抗类似药产品。与原研帕利珠单抗生产



A—不同培养基组合对细胞生长密度的影响；B—不同培养基组合对细胞存活率的影响；
C—不同培养基组合对抗体产量的影响；D—不同培养基组合对葡萄糖补充量的影响。

图 2　不同培养基组合对细胞生长的影响（*n*=3）

Fig.2　Effects of Different Medium Combinations on Cell Growth（*n*=3）

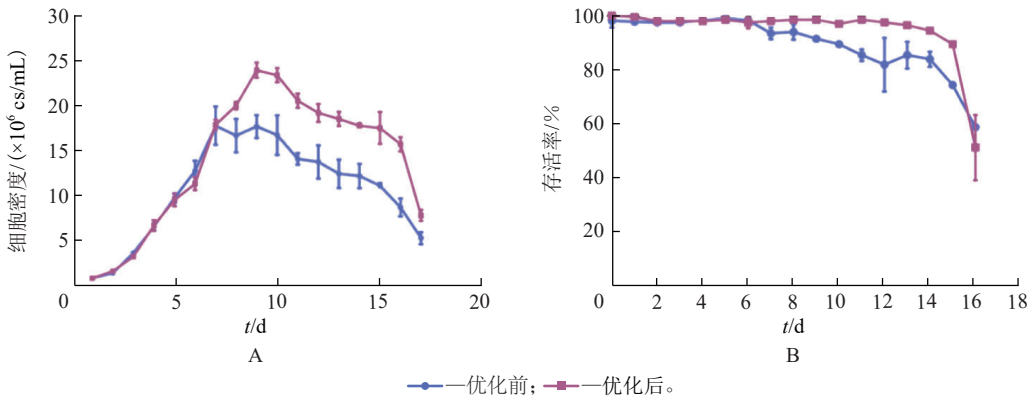
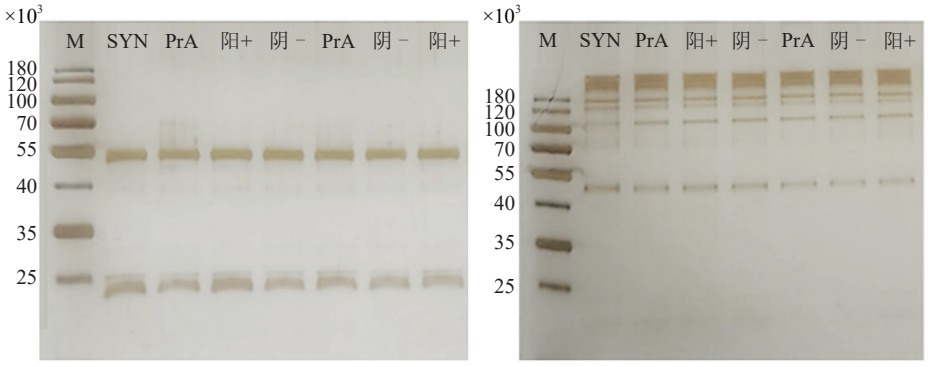


图 3　生物反应器发酵条件优化前后的细胞密度（A）与存活率（B）（*n*=3）

Fig.3　Cell Density（A）and Viability（B）before and after Optimization of Fermentation Parameters in a Bioreactor（*n*=3）

所用的 NSO 细胞系相比，DG44-CHO 细胞为非胆固醇营养缺陷型细胞，无需提供额外的胆固醇补充。此外，原研帕利珠单抗生产所用的 NSO 细胞培养基加入了牛血清蛋白，增加了批次间的不稳定



A B

M—蛋白标准品；SYN—原研帕利珠单抗；PrA—经 Protein A 亲和色谱纯化后的样品；
阳 +—经阳离子交换色谱纯化后的样品；阴－—经阴离子交换色谱纯化后的样品。
A—变性还原后的电泳条带；B—变性非还原后的电泳条带。

图 4 SDS-PAGE 抗体纯度鉴定

Fig.4 Purity of the Antibody determined by SDS-PAGE

表 3 纯化后抗体的纯度及回收率（*n*=2）

Tab.3 Purity and Recovery Rate of the Purified Antibodies (*n*=2)

纯化步骤	平均纯度/%	标准差/%	回收率/%	标准差
Protein A亲和色谱	99.5	0.005	85.2	0.005
阴离子交换色谱	99.6	0.050	94.1	0.010
阳离子交换色谱	99.6	0.030	72.8	0.015

性和分离纯化的难度；而本研究采用了成分明确且性质稳定的化学成分限定培养基，有效提升了工艺稳定性。通过关键培养工艺和培养基组合优化，帕利珠单抗类似药的产量明显提升（摇瓶水平提升了69.3%；反应器水平提升了 30.0%）。

在影响抗体产量表达的因素中，培养基具有显著作用，营养和能量的供给对细胞生长状态造成直接影响。以基础培养基 AM01 和补料培养基 AF02 为例，这两种培养基组合显著优于其他组合。这可能与其较高的葡萄糖含量有关，在细胞高速增殖的情况下维持了较高的能量供给。

抗体类药物最终都要通过大型的生物反应器进行规模化生产，由于生物反应器在规模、形态、细胞培养方式上等都与摇瓶存在差异，因此需要选择适用于反应器水平的工艺优化方向。本研究所选取的工艺参数均为温度、种子密度、培养基组合等相对独立的因素，受细胞培养工具的限制小，因此在 3 L 生物反应器规模上借鉴意义较大，与摇瓶采用同一工艺生产的帕利珠单抗类似药产量明显提高也佐证了这一点。目前生物反应器可在线监测细胞培养液的温度、pH 值、溶解氧浓度等变化，今后可进一步针对小规模生物反应器在补料策略、控糖策略、搅拌速率等方面进行精细优化，且由于反应器原理的一致性，借助相似放大可大幅加快工艺放大开发的速度。通过已有的生物反应器数据集，构建数字化工艺放大模型，也是一个潜力巨大的研究方向。此外，进一步探究产品的关键质量属性及其影响因素，引入质量源于设计（Quality by Design，QbD）原则，也可为工艺的进一步优化提供支持。

参考文献：

[1] BERGERON H C, TRIPP R A. Immunopathology of RSV: an updated review [J]. *Viruses*, 2021, **13**(12): 2478.

[2] RUSSELL A B. Palivizumab: an overview [J]. *Hosp Med*, 1999, **60**(12): 873-877.

[3] GAREGNANI L, STYRMISDÓTTIR L, ROSON RODRIGUEZ P, *et al*. Palivizumab for preventing severe respiratory syncytial virus (RSV) infection in children [J]. *Cochrane Db Syst Rev*, 2021, **11**(11): D13757.

[4] CARBONELL-ESTRANY X, RODGERS-GRAY B S, PAES B. Challenges in the prevention or treatment of RSV with emerging new agents in children from low- and middle-income countries [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2021, **19**(4): 419-441.

[5] DHARA V G, NAIK H M, MAJEWSKA N I, *et al*. Recombinant antibody production in CHO and NS0 cells: differences and similarities [J]. *BioDrugs*, 2018, **32**(6): 571-584.

[6] HUSSAIN H, PATEL T, OZANNE A M S, *et al*. A comparative analysis of recombinant Fab and full-length antibody production in Chinese hamster ovary cells [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2021, **118**(12): 4815-4828.

[7] DAHODWALA H, LEE K H. The fickle CHO: a review of the causes, implications, and potential alleviation of the CHO cell line instability problem [J]. *Curr Opin Biotech*, 2019, **60**: 128-137.

[8] LALONDE M E, DUROCHER Y. Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells [J]. *J Biotechnol*, 2017, **251**: 128-140.

[9] 李　莉, 张　赛, 何　强, 等. 响应面法在试验设计与优化中的应用[J]. 实验室研究与探索, 2015, **34**(8): 41-45.

