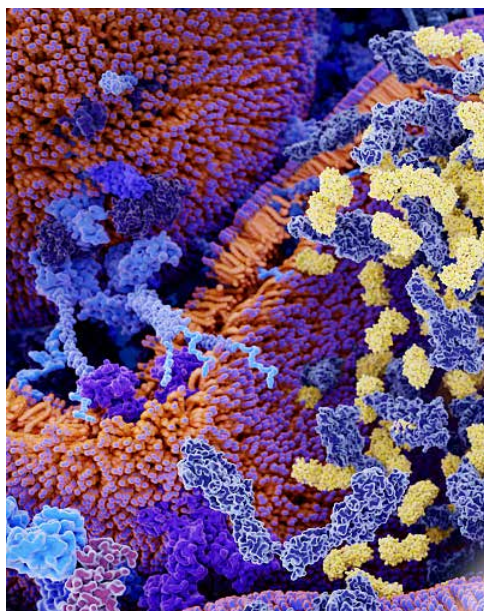




多特异性抗体与重组蛋白 CMC 开发思路与案例分享



Development Strategy
And Case Study



多特异性抗体与重组蛋白 CMC 开发思路与案例分享

金斯瑞蓬勃生物 CMC 项目经验

>45 个 CMC 项目，52% 难度项目比例
10 个 IND 批件，最快进入临床三期

目前单抗项目工艺开发越来越趋向平台化，但是对于一些特殊设计的分子，如重组蛋白或多特异性抗体，却没有普适的工艺，需要根据分子特点进行工艺开发，无论是工作量还是开发难度都是一种挑战。这不仅需要针对特定难度分子进行定制化开发，而且需要经验丰富的团队和强大的 CMC 开发能力。选择经验丰富的 CDMO 公司，其可以利用多个相似项目的开发经验，在突破 CMC 开发瓶颈同时加快重组蛋白或多特异性抗体的开发周期。

金斯瑞蓬勃生物拥有完善的抗体蛋白药工艺开发平台，至今已承接 >45 个完整 CMC 项目，其中 52% 是重组蛋白、双抗、三抗类难度分子，最快项目已进入临床三期，帮助客户获得了 10 个全球 IND 批件*。

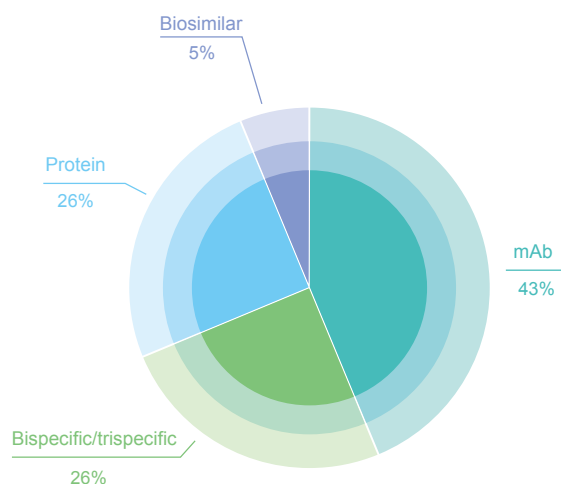


图 1：金斯瑞蓬勃生物承接 CMC 项目分子类型分布

部分难度分子 CMC 项目进度

客户	分子类型	开发阶段
广东某大型制药企业	重组蛋白疫苗	临床三期
康立泰	细胞因子	临床二期
上海某生物技术公司	三抗	中美 IND 申报中
庄亚生物	凝血因子	已交付中试生产
韩国某生物技术公司	细胞因子	已交付中试生产
深圳某生物技术公司	双抗	进入中试生产

* 数据统计截至 2021 年 11 月 18 日

多特异性抗体 CMC 项目开发

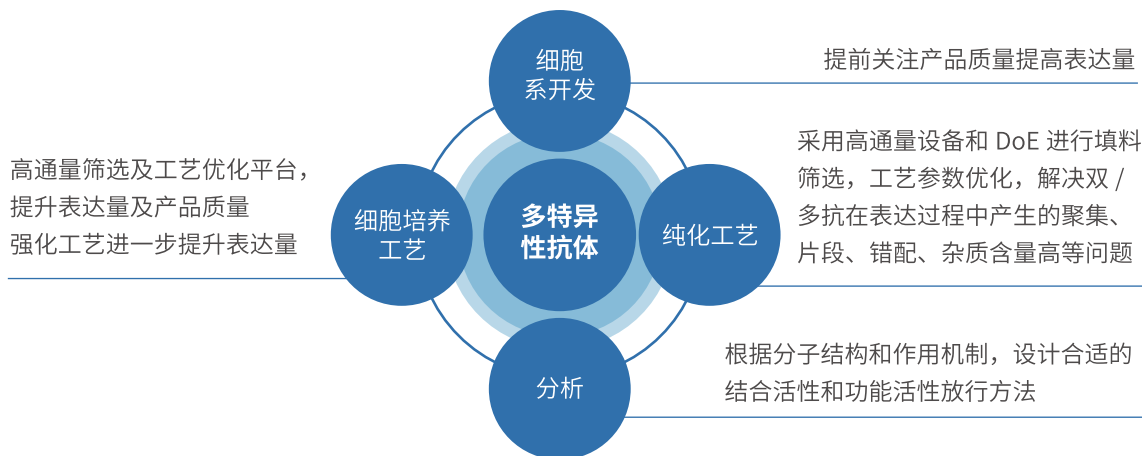


图 2：多特异性抗体 CMC 开发思路

细胞系开发——关注产品质量，提升表达量

金斯瑞蓬勃生物细胞系开发基于自主开发的 CHOK1-GenS 系统，产量高，稳定性好，符合法规要求。单抗表达量平均达到 4.35g/L，双抗平均 2.3g/L。从基因合成到 PCB 仅需 3.5 个月。

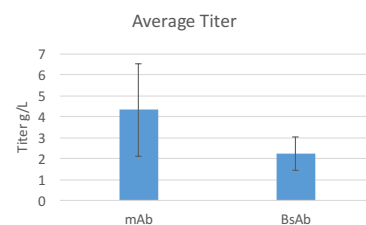


图 3：CHOK1-GenS 细胞系表达量数据

上游工艺开发

1. 适当添加物提升产品质量

在某双抗案例中，在补料中加入修饰性氨基酸，提高表达量至 150%

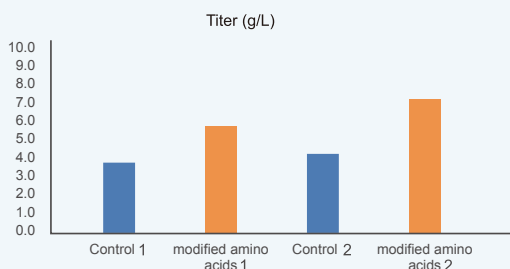


图 4：加入修饰性氨基酸提升双抗表达量

2. 工艺调节提升多特异性抗体产量

在某双抗案例中，通过优化 pH 和温度等培养条件提升表达量

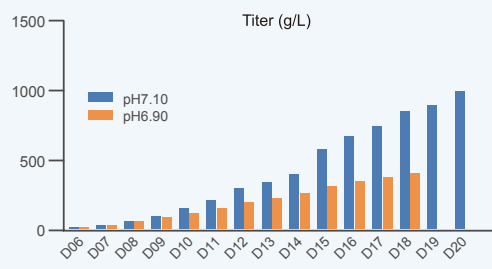


图 5：通过调节 pH 提升双抗表达量

3. 强化工艺提升产量和质量

除传统 fed-batch 工艺外，金斯瑞蓬勃生物还提供高密度接种和强化补料等工艺强化方案，帮助提升表达量

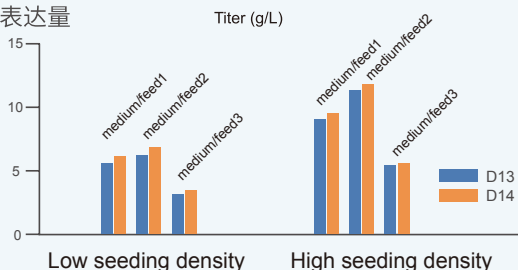


图 6：通过高密度接种技术提升表达量

4. 灌流培养提升产品质量

通过切换灌流培养工艺，可以减少产品蛋白的酶切断裂，提高全长比例和纯度

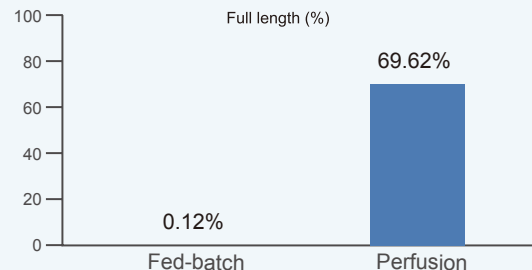


图 7：通过灌流培养提升产品全长比例

下游工艺开发

1. 高通量下游工艺筛选平台

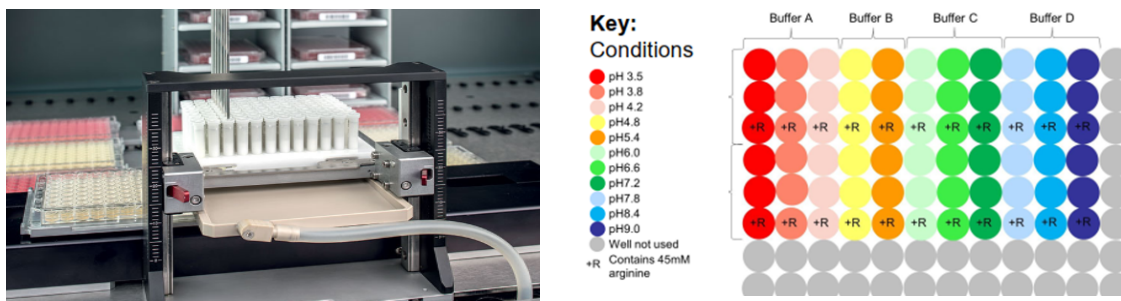


图 8：金斯瑞蓬勃生物高通量下游平台

2.S/D 灭活替代低 pH，可以提升产品纯度

VI Method	Sample ID	Conc.(mg/ml)	SEC-HPLC(%)			CE-SDS-N (%)
			HMW	Main	LMW	
Control	AC Eluate	12.44	1.65	98.35	ND	99.61
S/D	AC Eluate	12.60	1.47	98.54	ND	99.54
Low pH	pH3.8, 1hr	10.73	3.33	96.42	0.24	99.11
	pH3.7, 1hr	10.39	14.61	85.40	ND	99.18

表 1：S/D 与低 pH 法产品纯度对比

3. 多聚体的去除

复合填料展现了强大多聚体去除能力，更适用于双 / 多特异性抗体等项目。在某三抗项目中，经工艺优化纯化从 84.7% 提升至 96.1%，且产品相关杂质和工艺相关杂质均达到申报要求。

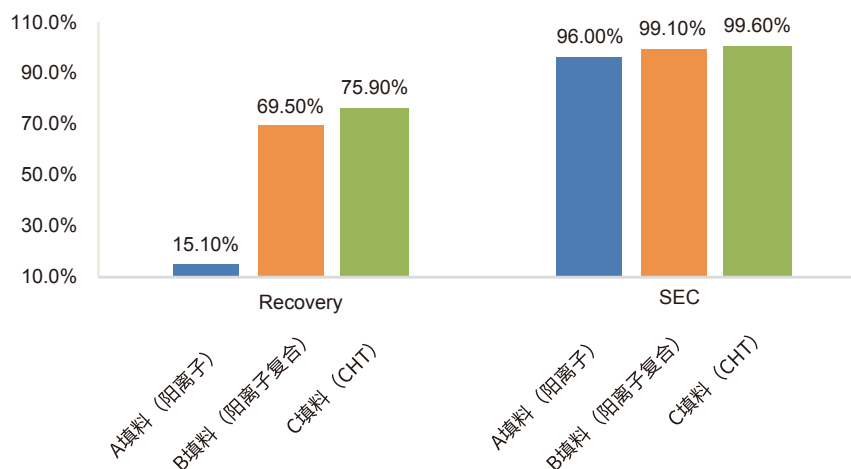


图 9：采用复合填料去除多聚体

分析方法开发

非对称型的多特异性抗体有发生错配的可能，是工艺开发中需要监控的重点。使用合适的、能够有效区分错配分子的分析方法则尤为重要。金斯瑞蓬勃生物也有强大的分析开发能力和完整的平台检测技术，包括质谱、液相等技术，再结合错配分子与正确配对分子的差异分析，通过多维度的检测手段来全面表征多特异性抗体分子。金斯瑞蓬勃生物采用 LC-MS 法检测分子量可以灵敏地识别出错配分子，是监控错配分子的重要手段。

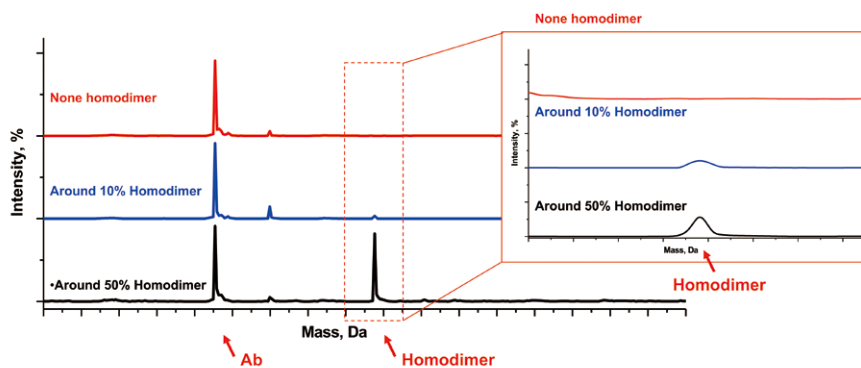


图 10: LC-MS 法识别错配分子

案例分享——某三抗项目

非对称三抗是公认的难开发的难度分子，在表达量、稳定性、活性开发等诸多方面存在巨大挑战。金斯瑞蓬勃生物基于强大的工艺开发能力，帮助上海某客户成功完成了某非对称三抗项目的完整 CMC 工作，**目前该项目已经进入中美 IND 申报阶段。**

金斯瑞蓬勃生物首先对比了多种细胞系和载体搭配，确认金斯瑞蓬勃生物自主开发的 CHOK1-GenS 系统拥有最高的表达量，经过 batch 培养表达量较转染提升了数十倍。在细胞培养工艺开发阶段，通过优化补料量和添加剂，将该三抗的表达量水平提升近一倍。针对糖型异常问题，通过金属离子添加使 Man5 水平降低了 70%，从而显著降低了免疫原性风险。在下游开发中，基于平台工艺的亲和层析洗脱纯度只有 84%。经过填料筛选、洗脱条件优化、载量优化等，纯度提升到了 96%。

在活性开发阶段，由于该分子同时靶向三个靶点，难以确定用于体现分子真实体内活性的分析方法。分析团队进行了详细的靶点背景调研，根据靶点和分子类型确定可能的分析方法，排除了 ADCC/CDC 为主要作用机制的可能性，然后通过构建带有荧光素酶报告基因的 Jurkat 功能细胞系，最终成功建立反映靶点间 T cell engaging 作用机制的放行方法，并顺利通过方法学验证，应用于产品的质量控制在。

重组蛋白 CMC 项目开发



图 11: 重组蛋白 CMC 开发思路

细胞系开发——关注产品质量，提升表达量

金斯瑞蓬勃生物细胞系开发基于自主开发的 CHOK1-GenS 系统，产量高，稳定性好，符合法规要求。平均达到 4.35g/L，兼容不同的分子类型，如双抗、重组蛋白等。从基因合成到 PCB 仅需 3.5 个月。

对于重组蛋白，金斯瑞蓬勃生物尤其关注产品质量、纯度等，通过扩大筛选量以提升产量。

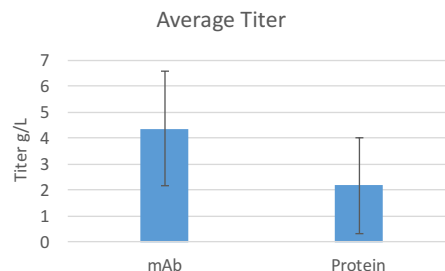


图 12: CHOK1-GenS 细胞系表达量数据

上游工艺开发

1. 通过使用 Ambr15 等高通量平台进行工艺开发，高效完成克隆筛选、培养基筛选、pH、温度、补料策略等优化，根据分子特点优化产品质量



图 13: Ambr15 微型生物反应器

2. 适当添加物提升产品质量

在某重组蛋白案例中，通过添加金属离子，可显著提高单体纯度

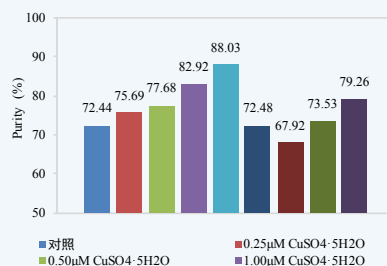


图 14: 添加金属离子可以提高产品纯度

3. 确定最佳收获时机

通过延长培养周期，分析细胞活率与蛋白活性的变化趋势，确定 D11 为最佳收获时间

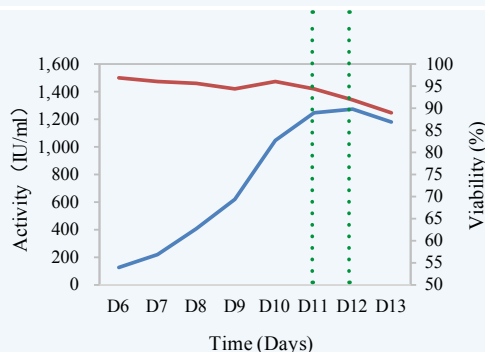


图 15: 确定最佳收获时间

下游工艺开发

1. 关注膜包的相容性和吸附

重组蛋白不同膜包吸附性差异较大，C 深层膜包展现了最佳的低吸附性特点

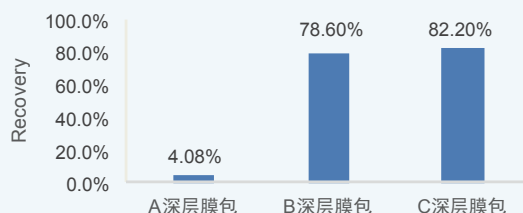


图 16：比较不同深层膜包的吸附性

2.S/D 灭活替代低 pH

低 pH 条件下部分蛋白会全部沉淀，所以选用 S/D 灭活方法作为替代

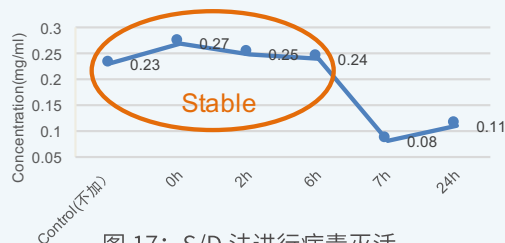


图 17：S/D 法进行病毒灭活

3. 非 Protein A 捕获填料的选择

许多重组蛋白并不适用 protein A 捕获平台技术，经过多个项目测试，阳离子复合填料能够满足收率及纯度的要求

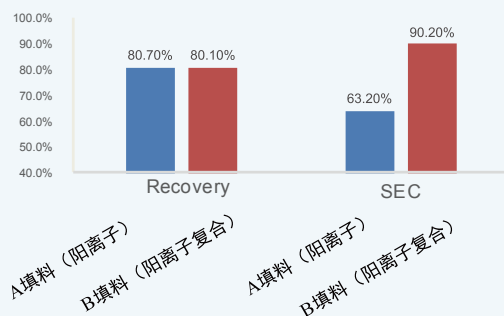


图 18：选择最佳捕获填料

4. 精纯填料选择

复合填料在精纯步骤展现了强大除多聚体能力，更适用于重组蛋白等复杂分子项目

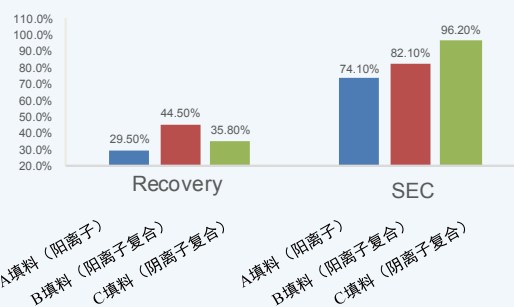


图 19：选择最佳精纯填料

分析方法开发

重组蛋白性质特殊，平台化的分析方法无法满足项目需求。对于重组蛋白项目，需要强大的分析方法开发能力支撑，尤其是结构、工艺残留杂质、活性方法开发能力。以下展示部分项目中的挑战和解决方案。

挑战	解决方案
重组蛋白在流动相中不稳定，常规抗体 SEC 方法不适用	优化流动相，筛选重组蛋白分子稳定的流动相
重组蛋白分子在前处理中沉淀，抗体糖型分析方法不适用	优化前处理的置换缓冲液；增大置换上样量；浓缩洗脱液
O 糖位点鉴定：ETD-MS 方法不适用；ESI-MS 糖肽检测方法，若同一肽段出现 2 个及以上 S/T 氨基酸，无法确认具体 O 糖基化位点	在含 O 糖位点 N 端酶切，LC-MSMS 鉴定的方法进行 O 糖位点鉴定
O 糖定量：β 消除方法不稳定，不能保证 100% 释放所有 O 糖链	采用 LC-MSMS 糖肽定量
无成熟的商用 Chaperon 蛋白试剂盒，没有平台方法	开发 Chaperon 蛋白残留 ELISA 检测方法和试剂盒

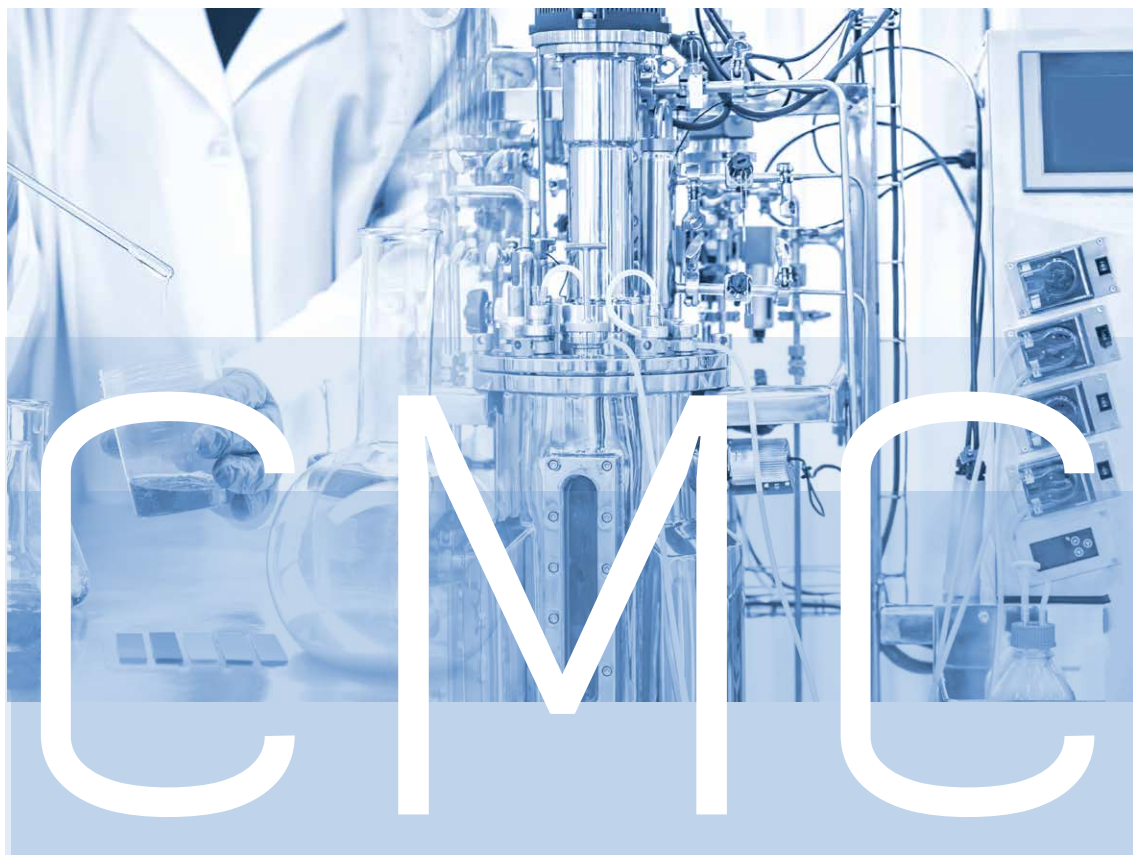
表 2：重组蛋白项目分析方法开发的挑战和金斯瑞蓬勃生物解决方案

案例分享——某重组蛋白项目（该项目已进入临床 II 期）

2017 年 10 月，金斯瑞蓬勃生物助力康立泰 KLT-1101 获得 IND 批件，获批针对癌症患者放化疗后产生白细胞和血小板减少症进行临床研究。金斯瑞蓬勃生物帮助这一创新生物药完成了从 DNA 到 IND 的整个研发过程。

KLT-1101 是康立泰开发的一种重组人白介素 -12。白介素 -12 分子是复杂的多域蛋白，不仅表达量受限，对于游离的单域蛋白碎片的表征和去除也是纯化工艺的重大难点。金斯瑞蓬勃生物凭借多年的蛋白表达和纯化经验，以及专业的工艺设计能力，从无到有完整开发了本项目临床前药学研究，表达量比客户预期高出 15 倍，大幅降低了生产成本，聚集体、杂质控制在极低水平。

2019 年 12 月，双方针对 KLT-1101 项目研究达成全面战略合作，金斯瑞蓬勃生物承担该项目临床阶段 CMC 开发及商业化规模生产，借助其国际一流标准的研发生产平台和完善的产品质量体系，加速推进 KLT-1101 的上市进程。





金斯瑞生物



蓬勃生物

联系我们

网址：www.genscriptprobio.cn

邮箱：cdmo@genscript.com

电话：400-025-8686-3172

地址：江苏省南京市江宁科学园雍熙路 28 号