

計畫名稱：以高免疫之馬血漿為製造原料，建立分子層析或膜過濾量產純化系統（20 公升/次以上），製造抗毒素和抗蛇毒血清

計畫編號：DOH92-DC-1059

執行機構：財團法人台灣動物科技研究所

計畫主持人：顏重河

計畫主持人服務單位：財團法人台灣動物科技研究所 生物科技組

計畫主持人職稱：副研究員

研究報告中文摘要：

本計畫主要目的是在解決以二階段硫酸銨鹽析法純化抗體時所發生的費時、多批次、產量/產率/品質不穩定的問題，以舊有製程為主軸，由產程與品管方面進行改良，其中包括：(1) 14% 硫酸銨鹽析法之固態物質的去除，(2) 36% 硫酸銨鹽析法沉澱物之收集，(3) 縮短抗體產物透析所需時間，(4) 最終產品之無菌過濾，(5) 確定並簡化製程中之不確定因素，(6) 建立純化製程程序中之查核點及品管方法。提升產品品質的穩定性與一致性，並建立更快速、可量化的抗血清製程。

製程研究是以 1.0kg 及 3.0kg 之馬血漿處理量為製程模式 (model)，並以此推論並建立 20kg 純化之製程條件。於 14% 硫酸銨鹽析法之固態物質去除製程改良方面：由原有的 TOYO 131 濾紙 (3um) 過濾，改採 10um 及 1um 的醫藥級材質濾袋進行快速粗濾，再以 1.2um 絕對孔徑之囊式過濾器進行後端過濾，如此可將流速有效提升至 2.0 L/min 以上；而於修正 36% 硫酸銨鹽析法沉澱收集方面：先以 1um 的醫藥級材質濾袋進行沉澱收集，流速可提升至 2.0 L/min 以上，沉澱以無菌超純水進行回溶後，再以 0.45 / 0.2um 深層囊式過濾器進行無菌過濾以降低產品污染之可能性；於抗體產物透析方面：由原有的透析袋於超純水中透析 7 天，改以切向流過濾 (Tangential flow filtration) 濃縮及透析 (Diafiltration) 法進行，期間以一支 30kd 的 6ft<sup>2</sup> 管柱進行半成品濃縮及 10 倍濃縮液體積之劑型液透析，於 3kg 之馬血漿製程研發中，可將製程期間之透析步驟有效地由 7 天縮短到 2-3 小時，若配合透析管柱並聯及更換較高流量的無脈衝幫浦，即可以線性方式進行產程的擴大；於無菌過濾方法修正方面：由原有 0.45um 過濾，改為

0.45/0.22um 深層式過濾器過濾，以確保產品的無菌性。

在純化製程中間產物與最終產物之活性、產量、產率及最終產品無菌度等均為製程設計與改良之指標，製程中均配合適當之品管方法作為指標，此計畫建立之品管方法包含：蛋白質定量方法建立、total IgG 定量方法建立、F(ab)2 定量方法建立、SDS-PAGE 方法建立、Western blot 方法建立、sterility 檢測方法建立等，僅針對中間產品或終產物進行定性、定量、純度分析及無菌分析等進行品管查核點設定與檢測 SOP 制定。

**關鍵詞：**馬血漿、純化、抗蛇毒血清

中文關鍵詞(至少三個)：

Research Data Archive, Center for Disease Control, The Executive Yuan, R.O.C.  
Readme file

Project Title: Development of the manufacture process for mass production of antiserum of toxins and snake venoms from high titer horse plasma by the gel filtration or ultrafiltration membrane system

Project Number: DOH92-DC-1059

Executing Institute: Animal Technology Institute Taiwan

Principal Investigator(P.I.): Chon-Ho Yen

P.I. Position Title: Associate Research Fellow

P.I. Institute: Division of Biotechnology, Animal Technology Institute Taiwan

Abstract:

The aim of this project is to solve the problems of time consuming, yield/ quality/ quantity various when using 2-stage ammonium sulfate precipitation on purification of horse IgG F(ab)<sub>2</sub>. Base on the present manufacture protocol, we reformed and improved some of the protocols, which include (1) removed the precipitate from 14% ammonium sulfate reacted mixture, (2) collected the precipitate from 36% ammonium sulfate reacted mixture, (3) shorten the dialysis period, (4) filtrated the drug substance, (5) clarified the manufactory parameter, and (6) established the check point. So as to standardize the batch manufacture.

In this project, we established the manufacture process as the scale in 1.0kg and 3.0kg and inferred to the scale in 20L. To improve the filtrate efficiency of precipitate removed from 14% ammonium sulfate reacted mixture, we change the material from TOYO 131 paper (3um) to medical grade filtrate bag (10um and 1um) followed by disposable capsule filter (1.2um). Flow rate greater than 2.0 L/min could be achieved in new process. Precipitate collecting from 36% ammonium sulfate reacted mixture was performed by medical grade filter bag (1um). After re-suspend the precipitate in DI water, sterilize the drug substance by filtrated with 0.45 / 0.2um disposable capsule filter. For dialysis process, we conjugated Tangential flow filtration (TFF) with diafiltration system to replace the traditional dialysis, to shorten the processing period from 7 days to 2-3 hours. Linear scale-up on manufacture can be easily achieved by parallel connection with several apparatus. To ensure the sterility of the drug

substance, 0.45um filter in original process was replaced with 0.45/0.22um sterilized disposable capsule filter.

Quality control check points, including activity, quantity, yield and sterility, were built in the manufacture process as the index of process change. To be aimed at intermediate and final product evaluation, several quality control methods were established, including protein quantitation, horse IgG activity quantity by ELISA, F(ab)2 activity quantity by ELISA, purity by SDS-PAGE, identification by Western blot and sterility test.

Key words: diafiltration, cGMP, tangential flow filtration

## (1)前言：

台灣地處溼熱，每年均有毒蛇咬傷事件發生，使用正確的抗毒蛇血清(量及種類)是毒蛇咬傷最決定性的治療。另外破傷風抗毒素血清亦為衛生單位必須有之產品，此兩類中和毒素之產品，為衛生單位之需求，國家衛生機關有負責供應各大醫院及毒物中心需求之責任。

台灣抗蛇毒血清全由疾病管制局生產及發售，目前疾病管制局提供抗百步蛇毒血清、抗雨傘節及飯匙倩蛇毒血清、抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒血清...等抗毒蛇血清之產品。預防醫學研究所、台北榮總毒藥物諮詢中心及台中榮總急診毒物科均使用作為第一線之治療。目前使用之抗蛇毒血清均來自於以蛇毒免疫馬匹所得到的高力價血清，含免疫球蛋白，用來治療毒蛇咬傷。台灣抗蛇毒血清是以胃蛋白酵素消畫法精製純化的血清，以 F(ab)<sub>2</sub> 形式使用，效價極高。

20 世紀初開始研究並應用至今的馬血清破傷風抗毒素（TAT），並為目前破傷風抗毒素血清、白喉抗毒素血清亦來自以破傷風毒素免疫馬匹所得之高力價血清，因其據免疫球蛋白，有中和毒素之能力，

中和上述需求，一個具安全性、無污染、高經濟及精確且符合 cGMP 之大量馬血清純化製程，是相當重要的。

目前國外之文獻均以大多先以胃蛋白酵素消畫法(pepsin

digestion), 直接處理抗體切割取 F(ab)<sub>2</sub>, 再經過不同方式精製純化的血清。大多以直接硫酸銨劃分沉澱方式進行, 亦有文獻指出以 caprylic acid 取代硫酸銨, 因為馬血清需求量大, 所需要處理隻體積相當驚人, 因此在製程上需以工業方法為考量, 無法以實驗室常用之傳統之親和式管柱 (affinity column) 或離子交換樹脂分離管柱 (ion exchange column) 方式進行。因此每一步驟之品質管控及相當重要, 據文獻指出, 在馬血清之純化之 QC 方法有酵素免疫分析 (ELISA)、電泳分析 (Electrophoresis)、中和力價試驗 (Neutralization ability)、西方免疫墨點分析 (Western blotting)。因為所生產之馬血清產品均為人體注射用製劑, 必須在 cGMP 的環境中生產, 過程中的每一種 QC 方式, 必須做確效, 產品更需要無菌測試。

本計畫綜合國內外方式, 將現有之方法做更簡便之修正, 且過程符合 cGMP 需求, 在製程過程中, 加入符合 cGMP 需求之品管方式, 確保產品品質, 將來可直接應用於疾病管制局生產抗蛇毒血清及抗破傷風血清等產品生產, 以更簡便之生產方式, 提昇產品品質, 使未來生產過程中更簡便且精確, 此類醫療產品更具品質保證, 醫療品質提昇, 為人民謀更大的福祉。

## (2) 材料與方法

1. 以 1.0 L 馬血漿處理量為製程模式( model ), 建立純化製程條件。

主要將以幾個方面進行產程開發與修正: 去除固態物質之製程

改良、修正沉澱收集方式、以新方法如: tangential flow filtration

( TFF ) 等替換原有透析方法、sterilization 方法修正。

2. 建立製程中之品管方法。

在純化製程中需要建立許多確認純化品質與含量之方法，且每一種類製程均需有適當之品管方法與規格，本計畫將建立之品管方法包含有: protein 定量方法建立、total IgG 定量方法建立、F(ab)2 定量方法建立 SDS-PAGE 方法建立 western blotting 方法建立、sterility 方法建立等。

### 3. 純化製程放大條件確立 (以處理 20 公升純化系統為目標)。

將改良後之 1 公升馬血漿純化製程進行放大設計，並確立 20 公升製程純化條件以符合品質要求。

此計畫之製程開發設計流程，將依 cGMP 之製造品質需求進行設計，期建立一達 cGMP 標準之純化製程。

## 2.0 工作項目與方法

改良傳統研發規模之馬血漿純化製程，本計畫以較新穎之方式建立新的製程及品管方法，使此馬血漿之純化製程可達到量產與 GMP 需求。

### 2.1 以 1.0 L 馬血漿處理量為製程模式 (model)，建立純化製程條件

計畫之第一部份將以 1L 馬血清量為製程模式 (model)，主要之純化條件、處理溫度或配方等將依疾病管制局之研發精神

與配方為主體，本計畫將不更改其重要研發條件。本計畫產程開發條件尋找目標與傳統研發製程比較整理表表列於表一。主要以下列方向進行製程改良與產程開發：

1. 修正沉澱收集方式：以幫浦（ pump ）抽取（步驟 9）ammonium sulfate 及 toluene 處理過之混合液，利用 depth filter 過濾方式去除沉澱物，收集濾出物（ filtrate ）。
2. 以 Tangential Flow Filtration（ TFF ）替換原有透析方法：在步驟 11-12 調整 pH 與再次 ammonium sulfate 處理後之沉澱物則利用 TFF 連續過濾系統進行稀釋溶解鹽分，去鹽分（ diafiltration ）， buffer exchange 成 2% glycine, 0.85% NaCl phosphate buffer, pH 7-7.2 並同時濃縮至 1/10 體積。
3. Sterilization 方法修正：將步驟 19 修正為將溶液通過 0.22  $\mu$ m 濾膜進行 sterilization。

以 1 公升馬血漿量為製程模式，利用產程開發所建立之條件將進行連續兩批製程，並收集數據及實驗資料作為製程放大時設計數據與品管檢測方法建立之依據。

## 2.2 建立製程之品管方法



本計畫除了縮減純化時程及簡化純化流程為目標外，純化製程中中間產物與最終產物之活性、產量、產率及最終產品無菌度等均為製程設計與改良之指標之一，因此建立適合此純化製程之品管方法亦為此計畫之主要項目之一。本純化製程需建立之標準品管方法如下：

1. Protein 定量方法建立
2. Total IgG 定量方法建立
3. F(ab)<sub>2</sub> 定量方法建立
4. SDS-PAGE 方法建立
5. Western blotting 方法建立
6. Sterility 方法建立

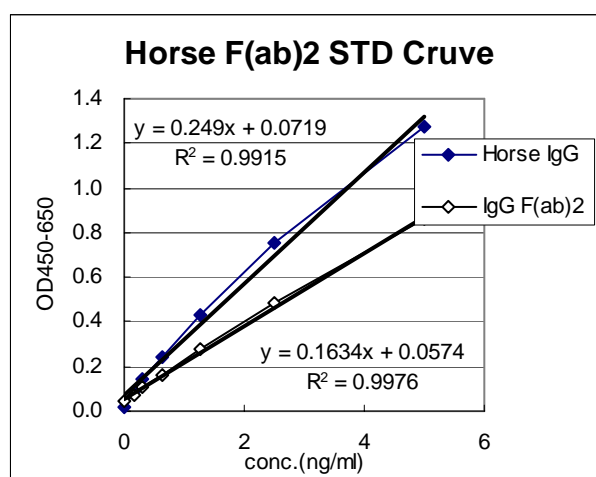
本計畫擬完成此六項品管方法，並完成純化製程中品管查核點設定與檢測 SOP。

### **(3)結果：**

本計畫主要分為兩個部分進行設計與討論，第一部分為製程中品管之查核點方法建立，第二部分為新、舊製程之純化製成比較與分析。今年的工作已確立六種品管方法之條件。製程方法與材料使用條件方面，已確立最終 3L 抗蛇毒馬血清純化之製程條件與程序，並依理論值推論 20L 抗蛇毒馬血清製程之所有製程條件及耗材。

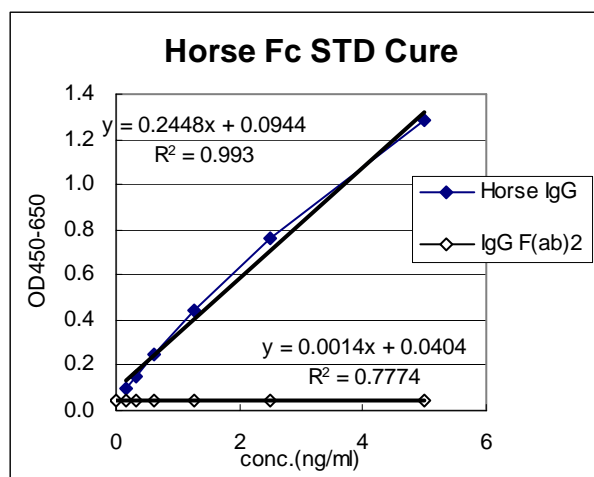
## 一、製程品管( QC)方法建立

1. F(ab)2 ELISA method 建立：作為純化製程中，F(ab)2 量之監測用。以建立之 F(ab)2 ELISA 方法測得之 horse IgG 及 pepsine 反應後純化之 F(ab)2 之標準曲線如下圖，由標準曲線可看出本系統對 uncut IgG 及 F(ab)2 之親合性不同。標準曲線中之線性檢測範圍為 0.3-5.0ng/ml，其中回歸線之  $R^2$  需大於 0.99 以上。



2. 蛋白質定量方法(Protein quantitation method)建立:本製程利用之蛋白質定量方法為: Bio-Rad protein dye binding 之方法，其檢測範圍: 0-500ug/ml，其中回歸線之  $R^2$  需大於 0.990 以上。
3. Fc ELISA method 建立:作為純化製程中，Fc 量(uncut IgG)之監測用。以建立之 Fc ELISA 方法測得 Horse IgG 標準

曲線如下圖，經 pepsine 反應純化後之 F(ab)2 則無法測得活性。檢測之線性範圍為 0.3-5.0ng/ml，其中回歸線之  $R^2$  需大於 0.99 以上。



4. DS PAGE 系統建立：使用 Reducing form 及 Non-reducing form 作為製程中 SDS-PAGE 分析型式。其建立方法分別為

- Horse Ig F(ab)2 Reducing form: 12% SDS PAGE
- Horse Ig F(ab)2 Non-reducing form: 8% SDS PAGE

5. Western Blotting 系統建立

Western blot 分別以 Reducing 及 Non-reducing 檢品作檢測，並分別以 Goat anti-horse IgFc-HRPO 及 Goat anti-horse IgF(ab)2-HRPO 分別進行免疫染色，其中 Goat anti-Fc-HRPO Ab 會與未被 pepsin 切割之 Horse total Ig 雜交而呈色；而 Goat anti-F(ab)2-HRPO Ab 則會與 F(ab)2 中

之 light chain 產生雜交的呈色反應。

6. Sterility 方法建立：利用濾膜過濾法將檢體進行過濾後，濾膜分別於 TSB (35 培養) / TGC (25 培養) 培養基中進行 14 天以上之培養，進而由培養基之混濁與否得知檢體是否為無菌狀態。

## 二、製程研發

1. 新舊製程於各純化階段之製程結果確認，共分五個主要部分進行比較討論

(1) **Pepsin 對 horse Ig 進行切除步驟：**觀察發現如下：

- 於調整馬血清 pH 值至 pH3.6 期間，血清會先變濁再變清澈。
- 於 pepsin 反應期間，pH 值會持續飄移：從 pH3.18 -> pH3.71。
- 由原製程所得資訊為：使用 NaOH 調整 pH 值至 pH4.2，目的用以終止 pepsin 反應；但由中華藥典第五版查得：Pepsin 於 pH4.2 應仍會繼續作用，此步驟之用途待確立。

(2) **14% 硫酸銨 cut / 沉澱去除步驟：**觀察發現如下：

原製程製程設計為加入使用加入固態硫酸銨方式，但加入總重量 14% 之固體硫酸銨時，會產生區域過度沉澱，並產生白色泡沫。因本計畫未進行次部份之改良，因此建議未來可使用液態方法，減少過度沉澱。

由原製程所得資訊為：加入 toluene 後用攪拌器混合後，toluene 會浮於上層，作為防腐劑，隔絕氧氣。於製程觀察得 toluene 的量並不足以覆蓋液面，無法隔絕氧氣。Toluene 似乎會與某些成分產生乳化作用。

由原製程所得資訊為：加溫至 55C 以殺死 pepsin，由 Sigma 原料商所提供之資料顯示，pepsin 於 60C 仍可保持安定數小時；但於鹼性條件下可導致 pepsin 永久失活。

再進行此步驟之製程時，發現沉澱極多，且呈乳黃色濃稠狀，約佔體積 15%。

由原製程之過濾方法為使用 TOYO 131 濾紙(3um)，由於濾紙過濾面積小，易阻塞，因此計畫則以尋找適用之 filter 使用作為改良目標，以加速製程時間。本計畫已進行的部分包含有 Depth filter (0.45 / 0.2um)、Prefilter (5um)。其分別優缺點如下：

- Depth filter (0.45 / 0.2um)- 遭沉澱物封死，流速慢

- Prefilter (5um)- 遭沉澱物封死 (0.1m<sup>2</sup> 約可過 1L)
- 未來將進行 Sheet filter / Filter bag 之測試

### **(3) 36% 硫酸銨 cut / 收集沉澱物方法評估**

同樣在此步驟亦為外加 22% 之固體酸銨，已發現會產生區域過度沉澱，並產生白色泡沫，其沉澱呈黃色膠狀顆粒。

原製程發法乃是使用 TOYO 131 濾紙 (3um) 進行過濾。發現過濾速度慢，但若常換濾片，過濾速度快(id:10cm 之 filter 過濾 1.8L 約 30mins)。濾餅呈黃色，質地緻密，不易刮取，亦不易回溶。濾液呈輕微混濁。

新改良之製程方法，目標為將收集的溶液濃縮 10 倍。本計畫使用 TFF (300k)進行過濾並且使用 36% A.S.連續去除剩餘不純物。在過濾階段中，由於沉澱呈膠狀顆粒，有阻塞膜孔的現象，濃縮之流速慢 (900->100ml 約 1hr)。在連續去除剩餘不純物部分則發現 TFF (300k) 有阻塞現象，change buffer 流速慢(change 700ml 約 2hr,膜內有沉澱物及殘液殘留)，濃縮後之回收液呈黃色，極易回溶於操超純水。

### **(4) Change formulation buffer 步驟**

原製程為外加 22% 之固體酸鉍，並用透析袋於超純水中透析 7 天，再加入 formula 配方。新改良製程方法則為將沉澱物回溶後，直接利用 TFF (30k) 濃縮至固定體積，再用 Continuous Dia-filtration 方式更換 7 倍體積的 formulation buffer，理論置換率為 99.9%。本計畫目前使用 0.1m<sup>2</sup>, 30k 之 TFF system，Change buffer 1000ml 約需 2hr。因有殘液滯留於 TFF 膜中，固小體積製程會有較大比例損失。

**(5) 0.22um filtration**

原有製程為設計為使用 0.45um 過濾。在使用原有製程進行純化後之產物再使用 dead end filter (0.22um)過濾 200ml 後發現會有阻塞之現象。但經過新改良之程序純化受之最終樣品使用 dead end filter (0.22um)過濾 200ml 量時，流速佳。

**(6) 設置製程查核點，共 6 點。**

1. Horse plasma
  2. After pepsin treatment
  3. 14% AS cut and 0.2um filtrated
  4. 36% AS ppt. 回溶
  5. Change formulation buffer
  6. 0.22um final filtration (final product)
- SDS PAGE (Reducing / Non-Reducing)
  - Western blot

所有查核點皆須測 protein 量及 F(ab)<sub>2</sub> 量, final bulk 則須加

做 SDS PAGE 已確認其純度, Western blot 確認產品為 F(ab)<sub>2</sub>,  
所有查核資料收集完成後將會製作一份製程純化表, 記錄製  
程中每一查核步驟之體積活性及蛋白質回收率等資料以利製  
程確認及確效

#### (7) 新製程純化表

Sample	Conc. (mg/ml)	Volume	Total (mg)	F(ab) <sub>2</sub> recover	Improve ratio
Horse serum	65.9	250	16476	-	
14% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> filtrate	4.6	800	3656	100%	1
36% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ppt	3.1	1000	3051	97%	1.2
TFF 30k 濾液	0.2	1000	158	0%	
Final product	12.8	100	1281	51%	1.5

本計畫主要分為兩個部分進行設計與討論, 第一部分為製程中品  
管之查核點方法建立, 第二部分為新、舊製程之純化製成比較與分  
析。目前的計畫成果包含有: 已將製程查核點及六種品管方法之條件  
確立。製程方法與材料使用條件方面, 已確立最終 3L 抗蛇毒馬血清  
純化之製程條件與程序, 並依理論值推論 20L 抗蛇毒馬血清製程之所  
有製程條件及耗材, 製程條件及耗材詳細列在附件 protocol: 抗蛇毒馬  
血清之純化(20L)。

#### (4) 討論:



1.上半年之結果經過與 CDC 討論之後決定：

製程部分僅於

- A. 14% 硫酸銨 cut / 沉澱去除步驟
- B. 36% 硫酸銨 cut / 沉澱回收步驟
- C. Change formulation buffer 步驟
- D. 0.2um 無菌過濾步驟

進行修正，以加速製程進行之時間，其餘部分因會涉及產品內部成分比例之改變，審慎考量後決定不做更動。

2. 新製程於各純化階段之製程結果確認，共分五個主要部分進行比較討論

A. Pepsin 對 horse Ig 進行切除步驟：

Pepsin 反應製程是依舊製程進行，於 Fc ELISA method 測試及 Western blot 測試中發現本單位進行之製程取樣檢體並無 Fc 殘留。

B. 14% 硫酸銨 cut / 沉澱去除步驟：

14% 硫酸銨沉澱與 toluene 處理部分依舊製程進行，製程中觀察到 toluen 會與某些成分作用進而產生沉澱，進而提高產品純度。進行此步驟之製程時，發現沉澱極多，呈乳黃色濃稠狀，約佔體積 10%，經 F(ab)2 ELISA 測試發

現活性回收率之損失極高，約 60-80%，但此部分製程於期中討論時確定，屬不可變更變更部分，因此本單位未繼續深入探討。

過濾方面原製程使用 TOYO 131 濾紙 (3um) 進行過濾，經測試後發現此方式不易操作、濾紙會吸收液體成分，導致濾液損失，且濾紙本身易破裂，因此本計畫改以 Filter bag 及 prefilter 進行沉澱物之去除製程，經測試後發現依序以 10um filter bag、1um filter bag、1.2um filter 進行定壓過濾(5 psi)之效果最佳，平均流速可達 2.0L/min 以上。而 0.2um 過濾部分，由於孔徑較小，為避免更多的 F(ab)<sub>2</sub> 之損失，因此不於此步驟進行。

C. 36% 硫酸銨 cut / 收集沉澱物步驟：

36% 硫酸銨沉澱部分依舊製程進行，但本單位之攪拌時間延長為 2 小時 沉澱物 harvest 方面，則改以 1um filter bag 進行定壓過濾(5 psi)，沉澱物並經 1L 之 38%硫酸銨 rinse 後，再逆沖回溶至超純水中，沉澱物經完全回溶後再經 0.2um filter 過濾，使保持無菌狀態，同時做 TFF Diafiltration 之前處理。

D. Change formulation buffer 步驟

以 3L 抗蛇毒馬血清製程為例，將上述之沉澱回溶液，接上 TFF 系統 (30k) 濃縮至固定體積，再用 Continuous Dia-filtration 方式更換 9 倍濃縮體積的 formulation buffer，同時除去 30kd 以下之雜質成份，理論去除率為 99.9% 以上。本計畫目前使用之 TFF system (6ft<sup>2</sup>, 30k, 流速 0.9L/min, 入口端壓力設定為 10 psi), 體積由 2.6L 濃縮為 1L, 耗時約為 7.5mins; Change formulation buffer 10L 耗時約為 55mins; elute product 耗時約為 10mins。

E. 0.2um filtration

TFF 系統回收之 F(ab)<sub>2</sub> 再經 0.2um filter 之無菌過濾則為最終產品 (final bulk)。

F. 設置製程查核點，共 5 點。

1. Horse plasma
2. After pepsin treatment
3. 14% AS cut and filtrated
4. 36% AS ppt. 回溶 and 0.2um filtrated
5. Change formulation buffer / 0.22um filtration (final product)

所有查核點皆須測 protein 量及 F(ab)<sub>2</sub> 量; final bulk 則須加做 SDS PAGE - 確認其純度; Western blot - 確認產品是否為 F(ab)<sub>2</sub>, 以及是否有 Fc 污染。查核資料收集完成後將會製作一份製程純化表，記錄製程中每一查核步驟之體積活性及蛋白質回收率等資料以利製程確認及確效。

G. 新製程純化各階段之 SDS PAGE( Figure 1,2 ) Western bolt ( Figure 3,4,5,6 ) 及純化表 ( Table 1. ) 分析顯示 14% 硫酸銨沉澱之離心沉澱物 ( lane 5 ) 中殘留的 F(ab)<sub>2</sub> 活性並不多 ; 14% 硫酸銨沉澱之離心上清液活性回收 ( 119% ) 很好 , 經 Toluene 處理後過濾之 14% 硫酸銨沉澱 ( lane7 ) 殘留的 F(ab)<sub>2</sub> 活性雖也不多 , 但靜置上清液 ( lane6 ) 及濾液 ( lane8 ) 之活性 ( 20-21% ) 及總蛋白量 ( Table 1. ) 則大幅下降 , 經分析極可能是 toluene 除了讓部分雜蛋白沉澱外 , 也導致大量的 F(ab)<sub>2</sub> denature 進而沉澱及失去活性。此外在馬血清開始進行硫酸銨沉澱製程後 ( lane4-14 )。

H. 新製程純化各階段之 SDS PAGE , Sample 排列依序為 :

MW (32.5kd, 47.5kd, 62kd, 83kd, 175kd)

1. CDC control sample
2. 原馬血清
3. 原馬血清 /pepsin
4. 原馬血清 /pepsin /14% A.S. 沉澱混合液經離心後之上清液
5. 原馬血清 /pepsin /14% A.S. 沉澱混合液經離心後之沉澱物回溶
6. 原馬血清/pepsin /14% A.S. 沉澱 /toluene 加熱靜置上清液
7. 原馬血清/pepsin /14% 沉澱 /toluene 加熱靜置沉澱物回溶
8. 原馬血清 /pepsin /14% A.S. 沉澱 /toluene 加熱靜置 /filtrate
9. 36% A.S. 沉澱混合液經過濾之廢液
10. 36% A.S. 沉澱 wash 之廢液
11. 36% A.S. 沉澱物回溶

12. 36% 沉澱物 /TFF product (final bulk)
13. 36% A.S.沉澱物 /TFF (濃縮製程之廢液)
14. 36% A.S.沉澱物 /TFF (Diafiltration 之廢液)

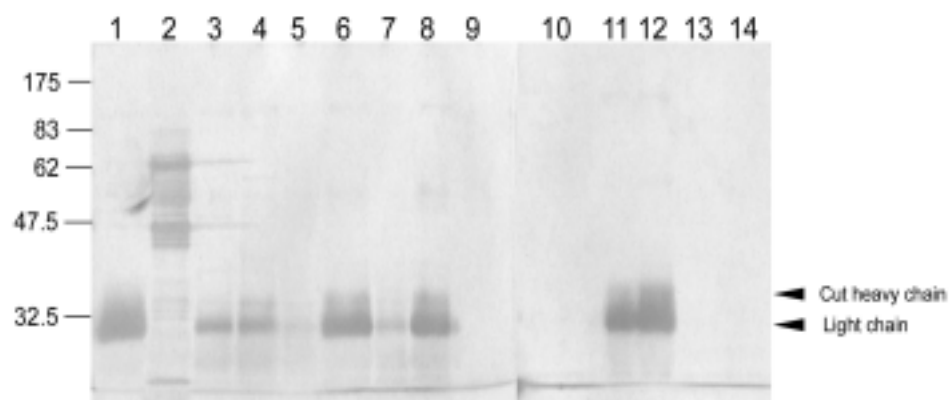


Figure 1. Reducing 12% PAGE (Silver stain : 3ug/lane)

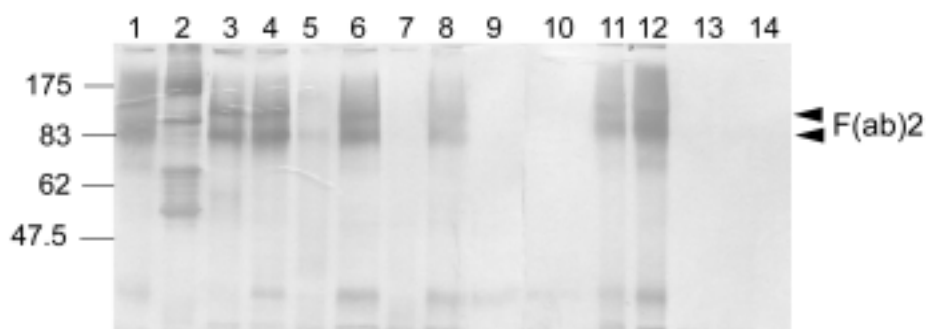


Figure 2. Non-Reducing 8% PAGE (Silver stain : 3ug/lane)

I. 新製程純化各階段之 Western blot , Sample 依序為 :

MW (32.5kd, 47.5kd, 62kd, 83kd, 175kd)

1. CDC control sample
2. 原馬血清
3. 原馬血清 /pepsin
4. 原馬血清 /pepsin /14% A.S.沉澱混合液經離心後之上清液
5. 原馬血清 /pepsin /14% A.S. 沉澱混合液經離心後之沉澱物回溶
6. 原馬血清/pepsin /14% A.S. 沉澱 /toluene 加熱靜置上清液
7. 原馬血清/pepsin /14% 沉澱 /toluene 加熱靜置沉澱物回溶
8. 原馬血清 /pepsin /14% A.S. 沉澱 /toluene 加熱靜置

/filtrate

9. 36% A.S. 沉澱混合液經過濾之廢液
10. 36% A.S. 沉澱 wash 之廢液
11. 36% A.S. 沉澱物回溶
12. 36% 沉澱物 /TFF product (final bulk)
13. 36% A.S. 沉澱物 /TFF (濃縮製程之廢液)
14. 36% A.S. 沉澱物 /TFF (Diafiltration 之廢液)



Figure 3. Reducing 12% PAGE for F(ab) detection

(Protein loading : 0.5ug/lane)

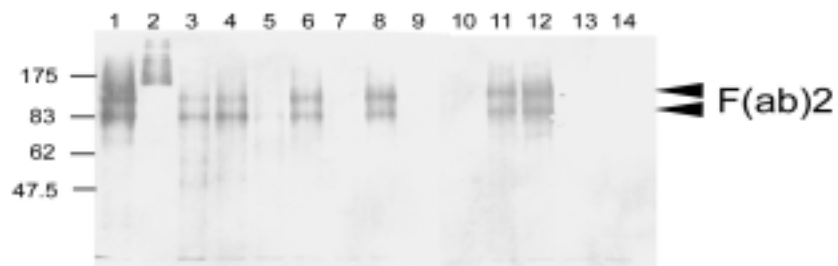


Figure 4. Non-Reducing 8% PAGE for F(ab)2 detection

(Protein loading : 0.5ug/lane)



Figure 5. Reducing 12% PAGE for Fc detection

(Protein loading : 0.5ug/lane)

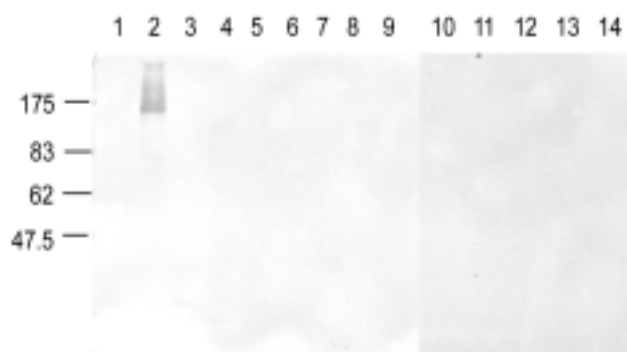


Figure 6. Non-Reducing 8% PAGE for Fc detection

(Protein loading : 0.5ug/lane)

J. Table 1. 新製程純化表 (3L Scale)

Sample	Conc. (mg/ml)	Volume (ml)	Protein recover	F(ab)2 recover	Improve ratio
Horse serum	17658	9000	-	-	-
Pepsin treatment	8872	9170	100%	100%	1.0
14% 硫酸銨混合液 (離心上清液) test	9686	9000	107%	119%	1.1
14% 硫酸銨混合液	3176	9000	35%	7%	-

(離心沉澱) test					
14% 硫酸銨+Toluene 加熱靜置之上清液	1960	9280	22%	20%	-
14% 硫酸銨+Toluene 過濾之濾液	1901	9280	22%	21%	0.9
14% 硫酸銨+Toluene 過濾之沉澱物	1010	2000	2%	0%	-
36% 硫酸銨過濾濾液	1086	10300	8%	0%	-
36% 硫酸銨沉澱洗液	698	680	4%	0%	-
36% 硫酸銨沉澱回溶	8327	2200	23%	23%	1.0
TFF / 0.2um filtration (Final bulk)	6297	1200	9%	22%	2.3

■ Process QC:

- (1) 方法已全部建立完成。
- (2) 已進行 Horse Ig F(ab)2 之純化，以提供 ELISA 參考標準品用。
- (3) 目前制定之 QC 方法僅適於供產程開發之比對用，如針對完整之製程，應配合整體製程作更完善之 QC 系統設計。
- (4) 目前之製程有許多無法符合品質管制精神之加工方式，雖最終產物經過 0.2um filter 過濾後分裝，應可達到無菌標準，但不符 cGMP 對製程管控之精神。

■ 製程部分:



- (1) 使用 Fc ELISA 應付更大的製程需求。經由 Fc ELISA kit 及 Western blot 來判斷 pepsin 切割 horse Ig，發現本單位之取樣檢體中並無 Fc 片段殘留。
- (2) 14% 硫酸銨沉澱製程損失約 70-80% 的 F(ab)<sub>2</sub>，由純化表( Table 1. )中之活性回收率顯示，Toluene 對 F(ab)<sub>2</sub> 之活性呈現造成極大的影響（由未加入 toluene 前的活性 119%，加入 toluene 後降至 21%）。
- (3) 14% AS cut 沉澱去除之新製程部分，使用 4” Filter bag（10um / 1um）進行粗濾後，用 absolute pore size filter (Pall / 1.2um)進行絕對過濾，已使流速有效提升至 2L/min 以上，未來加大濾袋尺寸，即可應付更大的製程需求；活性回收部分由純化表中顯示新製程之活性並無耗損。
- (4) 36% AS 沉澱回收部分，本單位目前已採用 1um 之 filter bag 進行回收，回收時流速有效提升至 2L/min 以上，未來若加大濾袋尺寸，即可應付更大的製程需求。另以 38%硫酸銨溶液 rinse 沉澱物後之濾液部分，再經 F(ab)<sub>2</sub> ELISA 及 Western bolt 測試發現，並無 F(ab)<sub>2</sub> 之殘留，顯示 1.2um filter bag 以足以截流極大部分的 F(ab)<sub>2</sub>；活

性回收部分由純化表中顯示新製程之活性並無耗損。

- (5) 在 change formulation buffer 部分，於 TFF 系統 (6ft<sup>2</sup>, 30kd)中進行順利，由清洗管柱到回收產品，所花費的時間約 2 小時內即可完成 (以 3L 抗蛇毒馬血清製程為例)，若增加膜面積或進行管柱並聯，將可應付更大的製程需求。

- (6) 預期新規劃之製程時間可大幅縮短為 3-4 天 (不包含 final bulk 稀釋為作用濃度及分裝、凍乾、產品包裝部分)。

A. Day(1) process

- 血清稀釋 / pepsin 處理 / 14% AS 鉍沉澱 / Toluene / 57C

B. Day(2) process

- 14% AS filtration / 36% AS 沉澱 / 36% ppt.回溶/  
0.2um 過濾

C. Day(3) process

- 36% ppt.回溶液 TFF 系統 change formulation buffer

(6) 未來該製程可修正與建議事項(非本計畫實施範圍)

- (1) 舊有製程產生許多粉塵，易污染環境；且產品於開放系統

操作，易受環境及操作污染，利用管柱進行密閉系統純化，可得到較符合 GMP 規範的產品。

- (2) Pepsin 可先溶於 Distill water-HCl，並經 0.2um 過濾後，再投入 Horse plasma，以免二度污染。
- (3) Horse plasma 經 pepsin 切割後, SDS PAGE 上幾乎只見 F(ab)2 及蛋白質碎片，未來應可考慮使用管柱進行純化，免除硫酸銨沉澱法產生的製程問題。
- (4) 本單位已進行管柱純化可行性評估，研究中發現經 pepsin 處理後的馬血清，大部分的蛋白質皆已被切割為 30kd 以下的小分子，若再經由 ion exchange column 純化，即可得到 F(ab)2 純度及活性極高的產物，可進行快速且大量的純化，如此也可以避免 toluene 對 F(ab)2 活性的傷害。預期若能於前端再配合 14% 硫酸銨沉澱法及 hydrophobic column 的純化方式並用，則純度方面將更加提升。
- (5) 使用測定 horse IgG F(ab)2 ELISA 作為活性定量依據，比較相同濃度之二檢品的抗體活性濃度。Figure 7.及 Figure 8.顯示使用管柱純化後之免疫蛋白活性與 CDC 原製程之終產品活性表現幾乎一致，Ion exchange 之活性比(測量之總 F(ab)2 活性 / 總蛋白質量)為 1.41；CDC 之 control sample 為 1.45，

表示使用管柱之純化方式可達相同之免疫蛋白活性成品。

Figure 9.顯示使用管柱純化後之免疫蛋白活性與 CDC 原製程之終產品的純度表現,二檢品於分子量 83 與 175kd marker 間均有一條明顯 minor bend ,評估可能是 denature 不完全的 F(ab)2(分子量 100) ;此外二檢品於分子量 83 與 47.5kd marker 間均有 minor bend 存在 ,但於此無法確知為何種不純物。

Figure 7. Ion exchange 純化之檢體與 CDC 檢體做活性比對

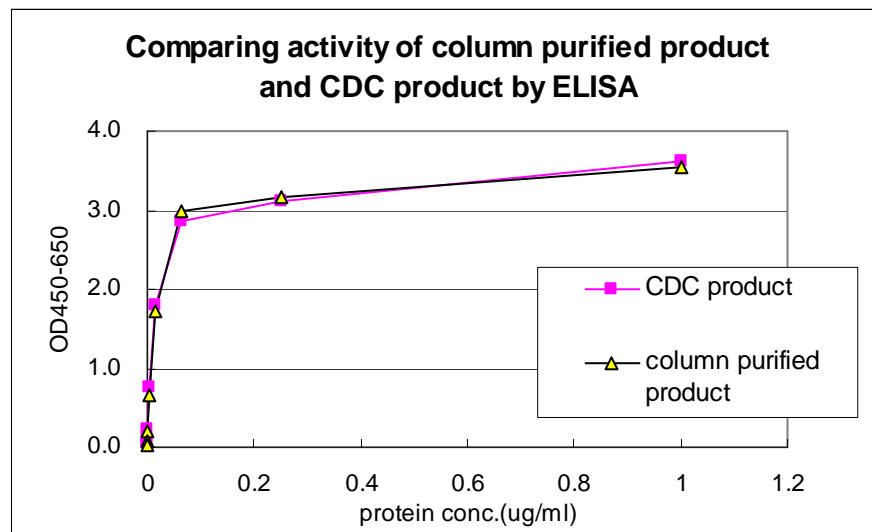
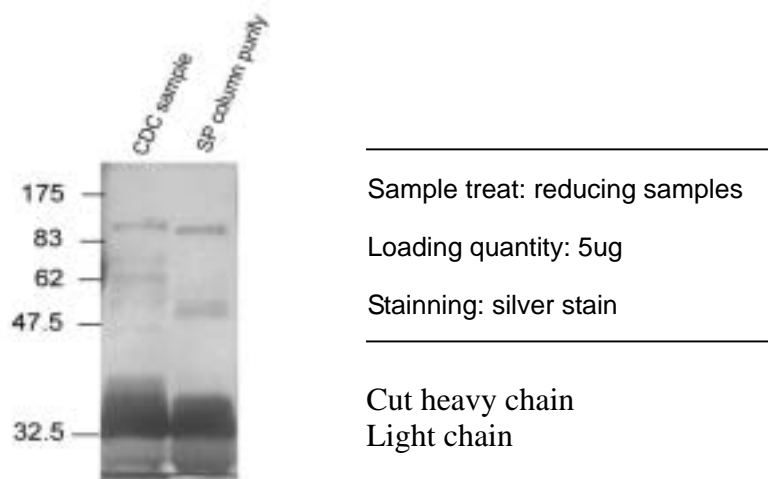
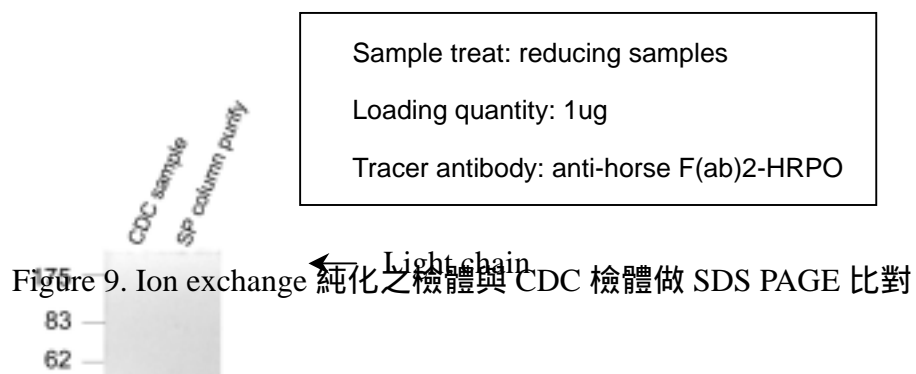


Figure 8. Ion exchange 純化之檢體與 CDC 檢體做 Western bolt 比對



##### (5)結論與建議：

1. 舊有製程產生許多粉塵，易污染環境；且產品於開放系統操

作，易受環境及操作污染。

2. Pepsin 可溶於 Distill water-HCl 後，再加入 Horse plasma。
3. Plasma 中直接加入固態硫酸銨，形成過度沉澱，最好以液態型式加入。
4. Pepsin cutting 未將 Horse Ig 完全切成 F(ab)2，應加長反應時間，或提高 pepsin 反應濃度
5. 確定加溫之目的，若為 kill pepsin，提高 pH 值至 pH8 即可。
6. 14% AS cut 製程損失大於 60% F(ab)2，未來應進行製程改良，提高產率。
7. 36% AS cut 製程 Horse plasma 經 pepsin 切割後，SDS PAGE 上幾乎只見 F(ab)2 及蛋白質碎片，未來應可考慮使用管柱進行純化，免除硫酸銨沉澱法產生的製程問題。

#### **(6)參考文獻：**

1. 洪東榮，台中榮總急診部毒物科 Chin Med J (Taipei) 1998;61:S9. 毒蛇咬傷與抗毒血清之應用
2. GUIDELINE ON GENERAL PRINCIPLES OF PROCESS VALIDATION, MAY, 1987, Prepared by: Center for Drug Evaluation and Research

3. Guidance for Industry for the submission of chemistry, Manufacturing and controls and establishment description information for therapeutic recombinant DNA-Derived product or a monoclonal antibody product for IN VIVO Use.
4. Quantitative comparison on the refinement of horse antivenom by salt fractionation and ion-exchange chromatography., J. Chromatogr B. Biomed Sci Appl 1997 Oct., 24; 700(1-2): 233-9.
5. Purification and stability studies of immunoglobulins from Lachesis muta muta antivenom.  
  
Toxicon. 1997 Aug;35(8):1229-38.
6. Purification of F(ab')<sub>2</sub> anti-snake venom by caprylic acid: a fast method for obtaining IgG fragments with high neutralization activity, purity and yield.  
  
Toxicon. 1989; 27(3):297-303.
7. Organic colloid separation in contrasting aquatic environments with tangential flow filtration. Water Res 2002 Apr; 36(7):1677-84.
8. Efficient and predictable recovery of viruses from water by small scale ultrafiltration systems. Can J Microbiol. 2001 Nov;47(11):1033-41.

9. Membrane separations in biotechnology. Curr Opin Biotechnol. 2001 Apr;12(2):208-11. Review.
10. Purification of plasmid DNA by tangential flow filtration. Biotechnol Bioeng. 2000 Jul 5;69(1):101-6.
11. Development and validation study for the chromatographic purification process for tetanus anatoxin on Sephacryl S-200 High Resolution. Boll Chim Farm. 1999 Jul-Aug;138(7):364-8.
12. Interaction of cell culture with downstream purification: a case study. Cytotechnology. 1994;15(1-3):229-42. Review.
13. Industrial perspective on validation of tangential flow filtration in biopharmaceutical applications. Technical Report No. 15. Parenteral Drug Association. Biotechnology Task Force on Purification and Scale-up. J Parenter Sci Technol. 1992;46 Suppl 1:S1-13.
14. Validation of tangential flow filtration (TFF) systems. J Parenter Sci Technol. 1991 Sep-Oct;45(5):218-23.
15. Tangential flow filtration. Adv Biotechnol Processes. 1988;8:97-125.

**(7)產程操作程序：**