

計畫名稱：建立新的純化量產系統(20 公升-次以上)，製造抗台灣蛇毒血清
計畫編號：DOH93-DC-1001
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：生物科技組
計畫主持人職稱：副研究員

研究報告中文摘要：

本計畫主要目的為使用抗蛇毒馬血漿為原料，以層析管柱純化方法，取代傳統以硫酸銨鹽析法純化抗體方式，以減低鹽析法純化所流失之抗體蛋白量，作為一具明確之生產控制之純化方法，建立穩定、快速且符合 cGMP 的控管精神之製程。

製程研究是以 100mL 及 1L 之馬血漿處理量為製程模式 (model)，並以此推論並建立 20L 純化之製程條件。先以 pepsin 在 37℃、pH 3.2 下作用三小時，可將 horse IgG 水解成為 F(ab)₂ 及 Fc；接著以 14% 硫酸銨鹽析法萃取 F(ab)₂，中間產品以 10μm 及 1μm 的醫藥級材質濾袋進行快速粗濾，再以 0.2μm 絕對孔徑之囊式過濾器進行無菌過濾以降低產品污染之可能性；之後以切向流過濾 (Tangential flow filtration) 濃縮及透析 (Diafiltration) 法進行，期間以一支 30kd 的 6ft² 管柱進行去鹽、半成品濃縮及 10 倍濃縮液體積之劑型液透析；將所得半成品以 SP 陽離子交換管柱進行純化，於洗脫峰可收集大部分之 F(ab)₂；最後再以切向流過濾 (Tangential flow filtration) 濃縮及透析 (Diafiltration) 法將半成品置換於 Formulation buffer 中，並用 0.2μm 絕對孔徑之囊式過濾器進行無菌過濾。製程最終可得到純度與 CDC 所提供樣品相當純度及純化效率之 F(ab)₂。於 1L 之馬血漿製程研發中，可將製程期間縮短為兩天。

在製程研發中，發現取得之馬血清原料有分離不完全及儲存過久之問題，造成製程研發之困難。若能解決此一問題，加上以減少污染、減少製程中無法管控的部份、縮短製程時間、提高純度及產率的原則，本計畫提出以 14% 硫酸銨沉澱配合 SP 陽離子交換純化管柱為值得進一步開發研究的新馬血清抗蛇毒蛋白純化製程方案。

中文關鍵詞(至少三個)：

純化、抗蛇毒血清、抗體

研究報告中文摘要：

本計畫主要目的為使用抗蛇毒馬血漿為原料，以層析管柱純化方法，取代傳統以硫酸銨鹽析法純化抗體方式，以減低鹽析法純化所流失之抗體蛋白量，作為一具明確之生產控制之純化方法，建立穩定、快速且符合 cGMP 的控管精神之製程。

製程研究是以 100mL 及 1L 之馬血漿處理量為製程模式 (model)，並以此推論並建立 20L 純化之製程條件。先以 pepsin 在 37℃、pH 3.2 下作用三小時，可將 horse IgG 水解成為 F(ab)₂ 及 Fc；接著以 14% 硫酸銨鹽析法萃取 F(ab)₂，中間產品以 10 μ m 及 1 μ m 的醫藥級材質濾袋進行快速粗濾，再以 0.2 μ m 絕對孔徑之囊式過濾器進行無菌過濾以降低產品污染之可能性；之後以切向流過濾 (Tangential flow filtration) 濃縮及透析 (Diafiltration) 法進行，期間以一支 30kd 的 6ft² 管柱進行去鹽、半成品濃縮及 10 倍濃縮液體積之劑型液透析；將所得半成品以 SP 陽離子交換管柱進行純化，於洗脫峰可收集大部分之 F(ab)₂；最後再以切向流過濾 (Tangential flow filtration) 濃縮及透析 (Diafiltration) 法將半成品置換於 Formulation buffer 中，並用 0.2 μ m 絕對孔徑之囊式過濾器進行無菌過濾。製程最終可得到純度與 CDC 所提供樣品相當純度及純化效率之 F(ab)₂。於 1L 之馬血漿製程研發中，可將製程期間縮短為兩天。

在製程研發中，發現取得之馬血清原料有分離不完全及儲存過久之問題，造成製程研發之困難。若能解決此一問題，加上以減少污染、減少製程中無法管控的部份、縮短製程時間、提高純度及產率的原則，本計畫提出以 14% 硫酸銨沉澱配合 SP 陽離子交換純化管柱為值得進一步開發研究的新馬血清抗蛇毒蛋白純化製程方案。

中文關鍵詞(至少三個)：

純化、抗蛇毒血清、超過濾、離子交換

Abstract:

The goal of this project is using chromatographic process to substitute the conventional ammonium sulfate salting –out procedure in the purification from anti-venom horse plasma. This project is to establish a stable and fast process to meet the cGMP compliance.

In this project, we employed 100 ml and 1L horse sera as the study model and then to apply the experience in a 20L purification process in ratiocination. In the first step, pepsin was added for 3 hours at 37 and the pH was stayed at 3.2. Horse IgG was then digested into F(ab)₂ and Fc regions. The F(ab)₂ was then extracted by 14% ammonium sulfate. The intermediate product was then filtered with a 10µm and a 1µm pharma-grade filter bags. It was then filtered with a 0.2 µm filter for aseptic filtration to eliminate the contamination. After the above steps, tangential flow filtration and diafiltration were employed. In the process, a 30 Kd 6 ft² column was conducted for de-salting, concentration and 10 fold quantity of the formulation buffer exchange. The intermediated product was then purified with a SP cation exchange chromatography. Most of the product was collected in the elution peak. The elution peak was then conducted with the tangential flow for formulation buffer exchange, concentration and diafiltration. The product was then filtered with a 0.2 µm filter for aseptic filtration. The product from the new process was compared with the one from CDC traditional process and it showed equal effectiveness and purity. The whole process can be shortened into 2 days in a 1L horse plasma origin.

Some problems were in the process development, such as the incompleteness and storage too long in the raw material. Once the

problems were solved, the newly developed process which used 14% ammonium sulfate precipitation and followed by a SP cation exchange chromatography is worthy for application in the anti-venom product for the reasons of less contamination, more controllable, a shorter process time, higher purity and yield.

Keyword: purification, antiserum, diafiltration,cGMP, and ion exchange

(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酶消畫法精製純化的血清，以 F(ab)2 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酶消畫法(pepsin digestion)，直接處理抗體切割取 F(ab)2，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。為作為覺適當之製程管控，因此可設計親和式管柱 (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可更精準，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，將改變現有之方法，利用離子交換樹脂分離管柱 (ion exchange column)方式取代大部分之硫酸銨劃分沉澱方式，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：

本計畫主要目的為利用抗蛇毒馬血漿為原料，應用管柱液相層析法及限外超過濾法建立全新純化處理馬血漿之純化系統，並利用抗蛇毒血清效價之檢測作為活性測試方法與傳統之硫酸銨鹽析純化作為比較。利用 cGMP 產程開發觀念、製程與品管控制查核精神作為實驗設計之一環。本方法主要目的為取代傳統以硫酸銨鹽析法純化抗體方式，減低鹽析法純化所流失之抗體蛋白量，並利用層析管柱純化方

法，作為一具明確之生產控制之純化方法，建立穩定、快速且符合 cGMP 的控管精神之製程。

本計畫實施純化設計程序為(1)馬血漿原料處理，包括：利用 pepsin 處理將抗體切成 F(ab)₂、溫度等條件建立，(2)原料處理完成後，調整適當之管柱使用(loading)條件，如：pH、salt 濃度等，並同時進行初步之過濾程序，(3)利用離子交換管柱進行純化，(4)收集適當 elute 條件下之純化產物後，立刻將收集後之產物利用限外超過濾法(TFF)進行 formulation 緩衝液更換程序(buffer exchange)，使產物存在於最終之注射或凍乾配方中，(5)隨即利用 0.22 um 過濾器過濾滅菌。

本計畫之每一個純化查核將利用 reducing SDS-PAGE、non-reducing SDS-PAGE、蛋白質定量、F(ab)₂ ELISA 測試量、western blot 等品管方法進行監測，以做為純化效能之證據與監測依據，並於製程條件確認後，進行一次完整之少量製程程序，並於該程序中之適當查核點利用抗蛇毒血清效價之檢測進行活性測試方法，其結果將作為純化條件確認或需再修正之依據。

(3) 結果及討論：

(I) 製程研發

(1) 實驗進行的程序，首先是針對所設計之三種純化程序進行純化測試，分別為：

A. Horse Ig 經 pepsin 處理後，直接進行 SP 陽離子交換管柱純化

B. Horse Ig 經 pepsin 處理後，直接進行 Q 陰離子交換管柱純化

C. Horse Ig 經 pepsin 處理後，以 14% AS 沉澱處理後進行 SP 陽離子交換管柱純化。

其純化效果分別於下面說明之。

(2) **Pepsin 對 horse Ig 進行切除步驟：**

- 於調整馬血清 pH 值至 pH3.2 期間，血清會先變濁再變清澈。
- 將 pepsin 先以 0.1N HCl 溶解，再加入馬血清中反應。
- 於 pepsin 反應期間，pH 值會持續飄移：從 pH3.20
pH3.60。
- 進行 pepsin 作用條件實驗，以 anti-Fc 作為偵測殘餘 Ig 方式，在作用 3 小時後，大部份 Ig 被切除掉，作用六

小時後，horse Ig 完全被切除掉；而作用溫度選擇方面，室溫反應和 37 反應 15 小時後皆未看到有 Ig 殘餘。

(3) 以 SP 陽離子交換管柱進行初步純化步驟 (A 製程)：

- 依文獻報導，horse (Fab)₂ pI 約在 6 左右，故選擇 SP 陽離子交換管柱，先選用較低 pH 值之緩衝液使 horse (Fab)₂ 帶正電荷，使其可結合至 SP 管柱上，再使用 pH 梯度分離純化蛋白。
- 層析結果發現，管柱洗脫部份以電泳結果顯示皆為與 CDC 的 (Fab)₂ 樣品相同分子量大小之蛋白，以 anti-(Fab)₂ 偵測確認為 (Fab)₂。此外在較低分子量處同樣也有不明蛋白出現。

(4) 以 Q 陰離子交換管柱進行初步純化步驟 (B 製程)：

- 依文獻報導，horse (Fab)₂ pI 約在 6 左右，可用 Q 陰離子交換管柱，horse (Fab)₂ 無法結合至管柱上，其它蛋白會結合至管柱上，依此方式分離純化。
- 實驗結果顯示，以 WB 確認發現，仍有部份 horse (Fab)₂ 會吸附於管柱上，電泳結果顯示經過 Q 管柱純化之 (Fab)₂ 仍未分離掉其他雜質蛋白。

(5) 以 14% AS 沉澱配合 SP 陽離子交換管柱純化(C 製程):

- 依文獻報導及原製程設計可使用 14% 硫酸銨來去除雜質蛋白。
- 將硫酸銨以水溶液狀態配製，再加入經 pepsin 處理後之馬血清內，使其最終濃度達 14%。
- 離心 (10000rpm , 10mins) 去除沉澱後，以 TFF/50k 去除鹽類及進行緩衝液交換，再經 SP 管柱純化，洗脫部份分別以 0.5M 及 1.0M NaCl 洗脫。
- 電泳結果顯示，大部份 horse (Fab)₂ 於 0.5M NaCl 被洗脫下來，並伴隨部份未被 pepsin 作用之 Ig 出現。而較低分子量處仍有與 CDC 樣品相同位置之不明蛋白。

(6) 電泳-銀染色

Lane	1	2	3	4	5
Sample	14%AS-SP 洗脫收集液 1 (C 製程) (peak 1 major 波峰位置)	14%AS-SP 洗脫收集液 2 (C 製程) (peak 1 後端位置)	14%AS-SP 洗脫收集液 3 (C 製程) (peak 2 major 波峰位置)	SP 洗脫收集液 1 (A 製程) (peak 1)	SP 洗脫收集液 2 (A 製程) (peak 2)
Lane	6	7	8	9	
Sample	SP 洗脫收集液 3 (A 製程) (peak 3)	SP 洗脫收集液 4 (A 製程) (peak 4)	CDC	Horse Ig	

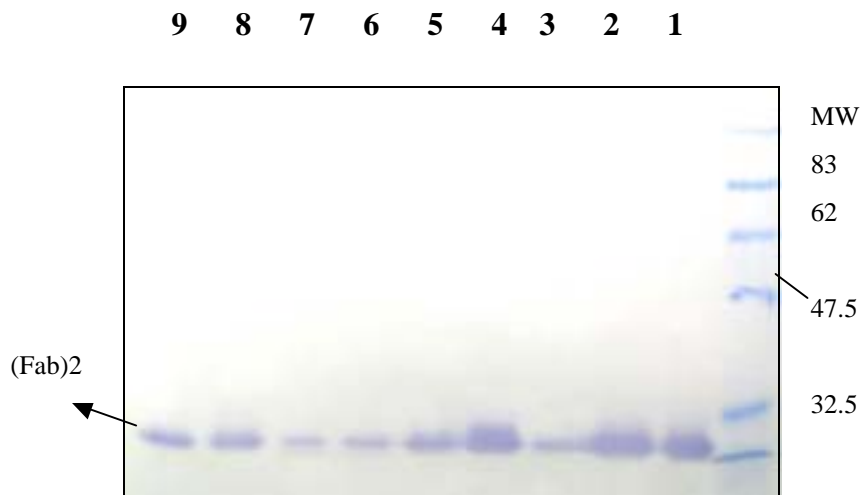
a. 12% Reducing SDS-PAGE



protein loading 2~3 ug

(7) Western Blot

a. 12% Reducing SDS-PAGE anti-(Fab)2



protein loading 1~1.5 ug

b. 12% Non-reducing SDS-PAGE anti-(Fab)2

1 2 3 4 5 6 7 8 9



protein loading 1~1.5 ug

c. 12% Reducing SDS-PAGE anti-Fc

1 2 3 4 5 6 7 8 9



protein loading 1~1.5 ug

(II) 結果討論

- (1) 在幾次實驗及製程 C 之結果發現，pepsin 未能在 1 至 2 小時內將馬血清中之 Ig 完全作用掉，進行作用

條件確認實驗後，在作用二到三小時以上，pepsin 方能將 horse Ig 完全作用掉，故之後實驗條件可選擇 37 °C 下 2 或 3 小時。另外對於作用溫度條件上，15 小時的處理在室溫或 37 °C 皆無差別，後續可再進行 2~6 小時兩種不同溫度的影響。

- (2) Horse serum 經 pepsin 作用後，再以 14% AS 處理後，經過 SP 管柱純化，由電泳結果可見除了未被 pepsin 作用完全之殘餘 Ig，(Fab)₂ 純度與 CDC 樣品比較相似，也在同樣位置出現低分子雜質蛋白。會有殘餘 Ig，因為本次實驗 pepsin 作用時間僅 1 小時，pepsin 未能完全將 horse Ig 作用掉，若去除 Ig 的影響，SP 應可用作純化 14% AS 處理過後之馬血清樣品。
- (3) 在 A 製程裡，馬血清經 pepsin 處理後，以 SP 管柱進行純化，在洗脫部份僅有(Fab)₂ 及低分子量之蛋白，與 CDC 樣品的電泳分佈相同。由此可見，就純化製程上 SP 管柱應可考慮作為取代傳統 AS 沉澱的抗體純化方式，當馬血清以 pepsin 處理後，不必再進行 pH 值調整或去鹽，直接以 SP 管柱進行純化，由於 pepsin pI 值在 2.2 左右，不會結合至管柱上，

不需擔心在製程中 pepsin 的殘餘作用，不僅可縮短純化製程時間為一至兩天，且符合 cGMP 之製造精神。

- (4) 由目前為止的實驗結果看來，SP 管柱層析是一個可以考慮用來取代傳統製程的方法，接下去的課題便是確認純化條件，並建立 250mL、1L 和 20L 大量馬血清之純化製程、純化表及純化此製程之標準品。

(III) 製程研發

考慮純化效果後，選擇以 C 案之 14% AS 沉澱配合 SP 陽離子交換管柱進行純化，並著手進行純化條件之修正及確認。

(1) 以 14% AS 沉澱配合 SP 陽離子交換管柱純化:

A. Pepsin 對 horse Ig 進行切除步驟

1. 經參考文獻及之前實驗所得，pepsin 在 pH 3.2 下，與馬血清於 37 反應二小時可將大部分 IgG 切除為 F(ab)₂，為減少 IgG 殘餘，選擇以 37、3 小時，加入 0.3% 馬血清量之 pepsin 為作用條件（如 100g 馬血清則需要 0.3g pepsin）。pepsin 則先溶於 0.1N

HCl , 0.1g 之 pepsin 約需 1mL 之 0.1N HCl 才能完全溶解。

2. 調整 pepsin 作用條件後，經由 SDS-PAGE 及 WB 結果顯示，無任何明顯 IgG 存在，表示 IgG 幾乎被水解為 F(ab)₂，以 14% AS 沉澱配合 SP 管柱之純化程序，經電泳及 Western blot 結果顯示可純化得到高純度之 F(ab)₂，無 IgG 殘餘。
3. 確認本程序有效。

B. 14% 硫酸銨沉澱去除步驟

1. 依文獻報導及原製程設計可使用 14% 硫酸銨來去除雜質蛋白。
2. 配製 21% 之硫酸銨水溶液，將適當量之硫酸銨水溶液加入欲處理樣品內，使其終濃度為 14%，加入過程中持續攪拌，加入完畢後再進行攪拌約 30 分鐘至 1 小時。
3. 攪拌過程中會產生乳黃色混濁物，約佔 10% 體積。
4. 攪拌完畢後，依序以 10 μ m bag、1 μ m filter bag 及 0.22 μ m filter 進行過濾，主要目的在於去除沉澱物，可使用 0.45 μ m filter 取代 0.22 μ m filter。

C. 濃縮及去鹽步驟

本步驟主要在於去鹽，將上一步驟之上清液接上

TFF(30k)系統

濃縮至固定體積，再用 continuous Dia-filtration 方式更換 7~9 倍濃縮後體積的 SP 陽離子交換管柱平衡緩衝液，理論去除率為 98% 以上。以導電度計測量去鹽後溶液導電度為 6~8 ms/cm，SP 陽離子交換管柱平衡緩衝液之導電度約為 1~2 ms/cm。

D. SP 陽離子交換管柱純化步驟

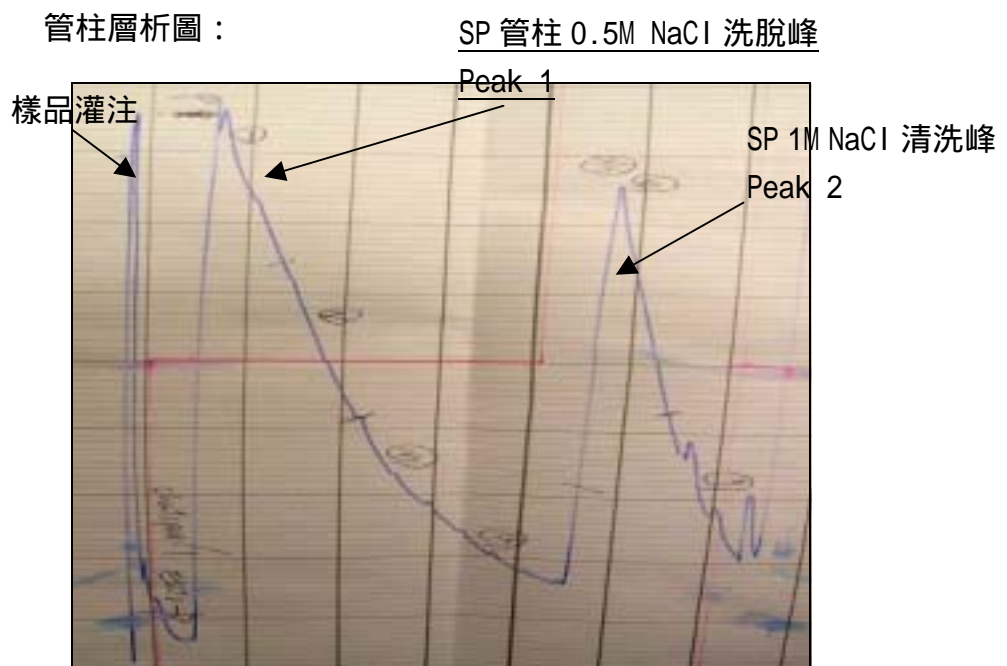
1. 設計原則：Pepsin 等電點約為 2.2，而 F(ab)₂ 之等電點為 6 左右，根據 SP 陽離子交換管柱的性質，選擇工作 pH 值為 4.0，利用 pepsin 與 F(ab)₂ 帶正負相反離子性質，可將其分離。

在上半年度已知 SP 管柱可純化得到純度較高之 F(ab)₂，下半年度主要針對洗脫條件確認。

2. 利用 NaCl 鹽濃度選擇適當之純化洗脫條件：以純化圖形及電泳來確認 F(ab)₂ 位置，首先改變鹽梯度範圍，由 0 至 1M NaCl 鹽梯度調整為階梯式 0.4M 及 0.6M 兩個鹽度後，純化分布主要分為兩個洗脫峰，

洗脫峰 1 出現於 0.4M NaCl 洗脫，主要為 F(ab)₂ 及 50kDa 以下雜質，洗脫峰 2 出現於 0.6M NaCl 洗脫，仍有小量 F(ab)₂ 及 30kDa 以下雜質；再次改變鹽梯度為 0.5M 及 1M，80~90% 之 F(ab)₂ 可在洗脫峰 1 被收集到。由此選擇以 0.5M NaCl 作為純化 F(ab)₂ 之洗脫液條件。

3. 由電泳及 WB 確認 F(ab)₂ 之純度，蛋白分布上主要以 F(ab)₂ 為主，與 CDC 提供之樣品相似，在較低分子量處仍有少量雜質蛋白存在；WB 結果上也顯示，經過 SP 管柱純化之 F(ab)₂ 並無殘餘 IgG。而經由此純化流程所得到之 F(ab)₂ 純度可提高為原來的 2~3 倍。



純化表：

Purification Step	Protein mg/mL	Total protein mg	Recovery %	Activity Recovery	Improve ratio
pepsin digested	18.58	3716.00	100	100	1
pepsin digested, 14% A.S. Sup	7.70	2079.00	55.95	57.30	1.03
pepsin digested, 14% A.S. Sup, UF/Dia	12.74	1274.00	34.28	56.19	1.65
pepsin digested, 14% A.S. Sup, SP Peak 1-1	5.83	524.70	14.12	43.35	3.12
pepsin digested, 14% A.S. Sup, SP Peak 1-2	0.47	42.30	1.14	-	-
pepsin digested, 14% A.S. Sup, SP peak 2	1.66	83.00	2.23	-	-
SP #1, Dialysis	7.72	579.00	15.58	30.44	-

電泳及 Western blot：

Sample 1 Pepsin digested

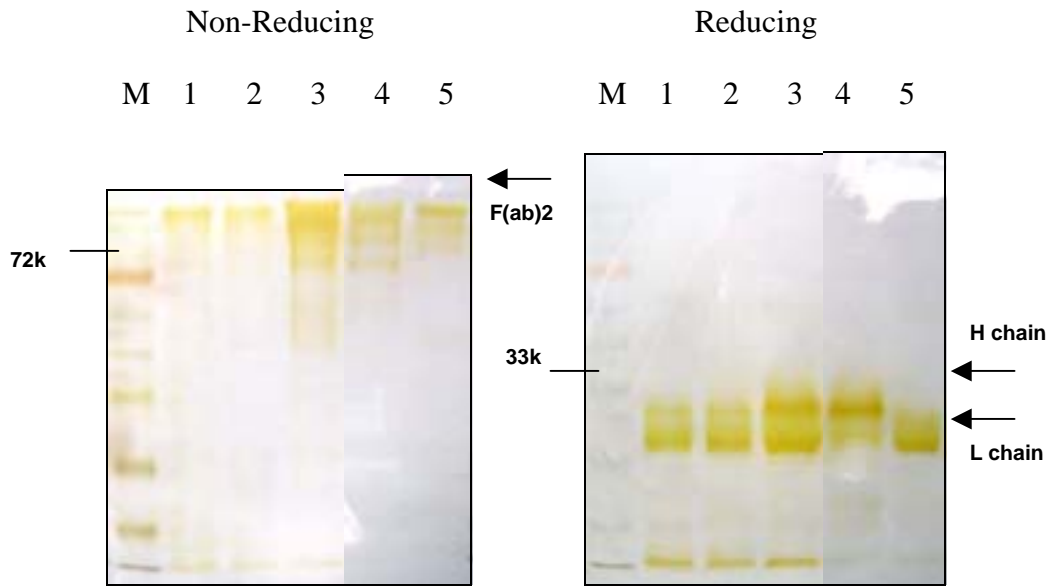
Sample 2 Pepsin digested, 14% 硫酸銨沉澱上清液,濃縮去鹽

Sample 3 Pepsin digested, 14% 硫酸銨沉澱上清液, SP Peak 1-1

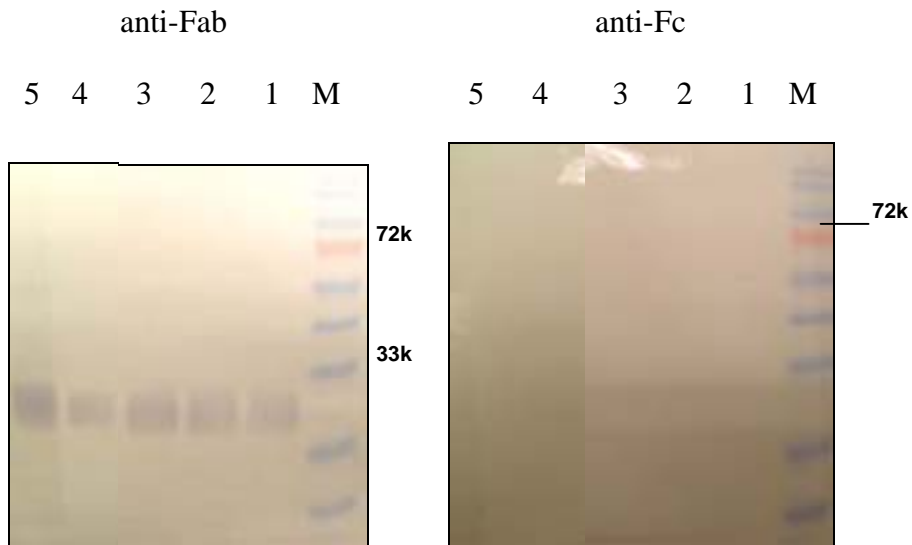
Sample 4 CDC 提供樣品

Sample 5 Commmerical F(ab)₂

20% SDSPAGE - Silver staining (load 5ug)



20% Reducing SDS-PAGE - Western Blot (Load 5ug)



4. 確認管柱層析條件後，以 1mL 小型管柱進行管柱 capacity 實驗：將處理後之馬血清過量注入小型管柱，將結合至管柱上之蛋白質洗脫下來，計算蛋白質量，依相同製程實驗估算每次洗脫之蛋白回收率，可

得其 capacity。實驗結果顯示，1mL SP FF 可結合約 100mg 蛋白質，而每次純化後洗脫蛋白質回收率為 15~20%，計算後 1mL SP FF 可結合約 550~600mg 經 pepsin 處理後之馬血清，約為 30~50mL pepsin 處理後之馬血清。

E. Formulation buffer 交換步驟

將經管柱純化後的收集樣品-Elution peak1 利用 TFF 系統(30k)，濃縮至固定體積，再用 continuous Dia-filtration 更換 10 倍體積的 formulation buffer(0.85% NaCl / 2% glycine / 0.02% Thimersol)，理論去除率為 99% 以上，並同時去除 30k 以下雜質成份。

F. 0.2um filtration

將 TFF 系統回收之樣品利用 0.22 μ m filter 之無菌過濾後，則為最

終產品(final bulk)。

G. 設置製程查核點，作為 1L 放大製程之流程，如下：

1. After pepsin treated
2. 14% AS cut and filtrated
3. 14% AS Sup. Concertrated and desalted
4. SP elution
5. formulation buffer changed and 0.22um filtration

(2) 1L 製程：使用年度初期 CDC 所提供之馬血清樣本(4
保存)，純化 程序如上述之製程查核點。

A. 純化表

Purification Step	Volume mL	Total protein mg	Recovery %	Activity Recovery	purity ratio
Horse plasma, 2X dilution	2000	62306.0	-	-	-
pepsin digested	2000.0	39504.0	100.00	100	1
pepsin digested, 14% A.S. Sup	2550.0	24077.1	60.95	99.01	1.62
pepsin digested, 14% A.S. Sup, 30k UF/Dia	520.0	6889.5	17.44	33.71	1.94
pepsin digested, 14% A.S. Sup, SP #1	120.0	1028.0	2.60	0.24	0.11
pepsin digested, 14% A.S. Sup, SP #2	100.0	103.6	0.26	-	-
pepsin digested, 14% A.S. Sup, SP peak 2	120.0	344.3	0.87	-	-
SP FF, FT	500.0	4060.5	10.28	-	-
SP E1, formulated	130.0	728.0	1.84	-	-
SP E1, formulated filtrated	125.0	635.9	1.61	1.87	1.16
formulation waste	3500.0	1064.0	2.69	-	-

B. 1L scale 製程

1. 1L 製程依照小量製程放大進行，整個製程共需兩個工作
日。

2. SP 陽離子純化管柱層析條件：

2.1 管柱尺寸：直徑 1.6cm，高 10cm

2.2 膠體體積：20mL

2.3線性流速：2.5cm/min (5mL/min)

2.4平衡緩衝液：20mM sodium citrate, pH 4.0

2.5洗脫緩衝液：20mM sodium citrate, 0.5M NaCl, pH 4.0

2.6清洗緩衝液：20mM sodium citrate , 1M NaCl, pH 4.0

2.7清潔液：0.1N NaOH

2.8馬血清樣本量：1kg

3. 製程誤失狀況：

3.1製程進行硫酸銨沉澱及過濾後，在以 Millipore spiral TFF/30K 系統進行脫鹽濃縮後，蛋白質有損失的情況發生，由於濃縮後體積接近透析膜工作體積，在將樣品排出透析膜後，仍有部份樣品殘餘於透析膜中，應是透析膜沖洗體積不足，若在樣品排空後加大沖洗體積應可降低這部份製程造成的損失。

3.2進行管柱層析時，發生有過度灌注的情況，應以 500~600mL 馬血清原料為上限，管柱上黏附的蛋白質由之前實驗所得之 15~20%降至 3.7%，應是過度灌

注而造成蛋白較不易黏附於管柱上

4. 以 ELISA 檢測純度，發現 SP 管柱純化收集的樣品活性下降，經 formulation 後活性回復約 10 倍，經以電泳及 WB 比較，管柱洗脫之 F(ab)₂ 與進行 formulation 後之 F(ab)₂ 於電泳圖及 WB 結果並無不同，這點原因需再進一步查證。

(IV) 結果討論：

1. 由結果看來，經硫酸銨沉澱後之(Fab)₂ 純度與沉澱處理前相當，再進行濃縮去鹽後，純度馬上提升為硫酸銨沉澱處理前的 1.6 倍；再以 SP 管柱純化收集所得之 F(ab)₂ 純度總共提高為硫酸銨沉澱處理前的 2~3 倍，與舊製程之純度總提高率 2.3 相比較下，新製程條件純度提高效率不低於舊製程。
2. 由於本研究僅取得一批馬血清作為原料，作為為期一年之研究原料，不足以成為馬血清原料生產之代表性，未來仍須針對各式來源血清進行原料來源研究，始可將製程及其條件確認。研發過程中發現，所使用之馬血清原料在 4 冰箱儲存時，血清中漸漸有膠狀物出現，且於

容器底部亦發現有紅色沉澱物約佔十分之一量，推論應該是血清分離時所殘餘之血球、脂質及其他物質，血清分離不完全所殘餘之血球團塊，易造成過濾器阻塞，其細胞死亡後釋放之酵素也有可能影響蛋白質安定性，進而水解蛋白質，造成其失活或水解為蛋白碎片，影響後端純化分離製程。1L 製程乃使用儲存情況最長之原料，故是否對結果造成影響須再查證；但由小量純化其結果是具備有一致性的。

3. 在製程中，我們將硫酸銨先配製為溶液狀態，之後再依使用量加入反應。這樣一來，既減少舊製程中粉塵污染的情況，也減少硫酸銨發生溶解不均勻的情況發生。
4. 從整個時程安排上來看，第一天從馬血清收集後，進行 pepsin 反應約需三到四小時（包含調整血清酸鹼度及水浴設備升溫），再來進行硫酸銨沉澱約需一小時，過濾約一小時，最後進行濃縮去鹽約需兩小時，於 4 過夜保存；第二天進行 SP 陽離子交換管柱純化，約需 4~5 小時，收集產物進行 formulation buffer 透析交換約 2 小時，最後進行無菌過濾約半小時。整個製程從收集後到凍乾前約需兩個工作日，大幅縮短舊製程時間；而自硫

酸銨沉澱過濾後，馬血清樣品即在無菌下進行操作，既減少了因製程暴露過久而產生污染的情形，也減少因為時間拉長而造成產品活性衰變的影響。

5. 對於人體注射用藥，cGMP 製程管控是必須的，其要求也是最為嚴格的。本計畫針對馬血清中抗蛇毒蛋白的純化，採用 cGMP 中管控的概念，以減少污染、減少製程中無法管控的部份、縮短製程時間、提高純度及產率的原則，修正原有製程，在可行的範圍內，提出以 14% 硫酸銨沉澱配合 SP 陽離子交換純化管柱作為一可行的製程方案。

(5) 結論與建議：

利用放大理論計算，對 20L / 次純化規模之純化進行數值計算設計與製程設備（包括管柱大小，TFF 裝置型式與大小，純化建議流速等）。結果如附件抗蛇毒馬血清之純化 (20L) 中的產程說明。

(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')₂ 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.