

出國報告（出國類別：實習）

參加 2009 年美國 GE 公司的蛋白質製程 放大與技轉訓練

服務機關：台糖公司台糖研究所

姓名職稱：化學組組長黃怡仁

派赴國家：美國

出國期間：中華民國 98 年 10 月 26 日至 10 月 31 日

報告日期：中華民國 98 年 11 月 21 日

摘 要

蛋白質純化和量產一直是生技製藥企業的最大瓶頸之一，蛋白質純化和生產技術決定著產品的品質、安全性和穩定性。而這方面的訓練在一般的學研機構並不易習得，而業界也都將其視為機密，不對外公開。因此，要學習正確和有效率的做法，相當困難。本次參加的訓練為美國奇異公司(GE health Care)每年舉辦的 Fast Trak DEV4 Scale up and Technical Transfer 培訓。GE Health Care 在蛋白質純化方面有非常豐富的經驗和理論基礎，是蛋白質純化領域的先驅。GE Health Care 開發的設備、層析凝膠已經大量的使用於現代生物製藥，使大規模的蛋白質純化和生產成為可能。這個訓練在美國和歐洲已經有十餘年的歷史，在生技製藥領域的公司也均派人參加相關的課程，以提升其技術能力。為期三天的課程主要內容為如何將實驗室建立的蛋白質生產製程技轉到生產工廠，這技轉的過程必須平順放大和轉化，以將產品即時上市;另外本課程也涉及在實際生產中將可能面臨的一系列法規和驗證的問題。

內容目錄

摘要.....	1
一、目的.....	3
二、課程安排.....	5
三、課程內容重點.....	6
(一)製程設計(Process design).....	7
(二)製程最適化 (Process optimization).....	8
(三)放大與技轉(Scale up and technical transfer).....	9
(四)製程經濟(Process economy).....	9
(五)製程管理(Process management).....	10
(六)製程衛生與管柱維護(Process hygiene and column maintenance).....	10
(七)管柱層析製程確效(Chromatography process validation).....	11
(八)製程放大計算.....	12
四、心得與建議.....	13
五、製程放大計算附件.....	15

一、目的

生物技術是最重要的產業技術之一，因為生物技術不僅已經與化學、化工、電子、材料、機械與資訊等產業技術結合，並且廣泛地應用到農業、食品、醫藥、海洋、能源，甚至於環境保護等產業。生物技術產業發展受到全世界各先進已開發國家的重視。生技產品以醫藥品最受矚目，其研發比重高，競爭性與風險性大。醫藥產業與其他高科技產業最大不同之處是其攸關生命健康，產品研發的困難度高，經過臨床試驗及醫藥管理機構的認證，確認其藥效與安全性之後才能上市。雖然生技相關之技術與產品（尤其是醫藥產品）得到專利後，生技公司可享有多年的專利權，並於專利權期間可透過技術轉移收取權利金或將產品上市而獲得高報酬，但因設備與研發經費過高，資金運用速度太快，投資風險高而使資金募集不易，若無政府相關投資優惠與補助政策，一般中小企業很難獨立支撐到產品上市階段。

我國生物技術產業包括新興生技工業、製藥工業及醫療器材工業等，2006年總營業額約新台幣1,791億元，其中新興生技工業涵蓋基因、生技醫藥品、檢驗試劑、農業生技、環保生技、蛋白質藥物、生技研發服務、生物晶片及生物資訊等，營業額約新台幣434億元，廠商約268家。其中以生技醫藥廠商為大宗，約占我國新興生技產業總廠商數的28%，其次為食品生技的廠商，占21%(資料來源：財團法人醫藥工業技術發展中心及經濟部生物技術與醫藥工業發展推動小組，2007)。台灣生技製藥產業供應鏈中，由研發至生產均有廠商布局，其中生產部份為台灣產業較弱之一環，絕大多數生技廠商仍停留在中小型藥廠代工健康食品和學名藥等小分子藥物階段，供應鏈缺口為目前熱門及利潤較多之蛋白質藥物，此部份需要國外大廠的技術合作和投資來刺激，並擴大台灣廠商研發能量與基礎設施；台灣學術界有良好的基礎研究，如能吸收國外生技製藥廠商長期累積藥物由實驗室至商品化的經驗，亦有助台灣廠商加速商品化速度。

新藥探索期的藥物量只須實驗室合成就足夠供給，而新藥開發期的藥物需求量必須有工廠的生產線加入，依其製造的流程不同可以分成數個不同的階段；台灣的生技藥品代工廠如生技中心的蛋白質藥物 cGMP 工廠和永昕生物醫藥所提供的製造服務為「製程開發及放大」和「臨床 I/II 期試驗用藥製造」。雖然我國在生技藥物(主要為治療用蛋白質和單株

抗體)的基礎研發具有優秀的人才、設備和法規支持，不過在於量產(甚至小量生產)的能力尚嫌不足。主要原因為需投入的硬體設備金額高與具有這方面能力的人力尚需培養，一般的學術機構和小型生技公司根本無法負擔，甚至無法提供足夠高品質的成品供臨床前試驗，更不用提臨床試驗了，這將會限制我國在生技藥物的發展。另一方面，生技學名藥歷經多年的爭議，總算漸漸得到一些共識。由於許多生技藥品的專利陸續到期，同時各國政府受到醫療成本的沈重負擔，加以這些專利到期的藥品臨床療效明確，累積足夠的使用經驗，而仿製技術和分析設備也有大幅進展，故歐美兩大法規管理機構對生技學名藥的法規有了突破性的進展。由於生技學名藥的遊戲規則已漸明朗，印度的 Biocon、克羅埃西亞的 Pliva、大型學名藥公司 Teva、Sandoz、Dr. Reddy、Dragon Pharma 等，加上中國大陸公司，甚至大藥廠 BiogenIdec、GlaxoSmithKline 等，對於生技學名藥市場都虎視眈眈。有鑑於此，全球生技藥品代工需求量將會大增，韓國、新加坡、中國等鄰近國家均已積極投入，尤其是韓國 Celltrion 公司蛋白質藥物代工廠規模已達 50,000 公升，可供臨床三期及商業化量產之需求。由此可見，生技藥物的代工產能，於短期內就會有不足的現象產生。雖然本公司對於藥物研究與發展尚未有明確的目標或規劃，不過本公司目前多家轉投資公司的主要業務在於生技藥物研發，未來也有可能長期合作，為其生產生技藥物或開發生產(量產)製程。生技產業是我國政府兩兆雙星計畫之一，不論國家或民間企業均投入大量的研發能量，而這些研究終將變成產品。本公司應提早建立這些量產技術並取得各項認證，如此不但可為本公司生產高價及可行銷國際的產品，同時也可取得為國內外生技公司 OEM 的先機。本任務的目的為將世界級的下游純化技術(down stream)理論和技術帶回本公司，以期提升本公司在生技產業的能力，並開啓另一產業契機。

二、課程安排

日期	課程內容
10月27日	<ul style="list-style-type: none">• Introduction• Lecture: Process design• Lecture: Process optimization• Lecture: Scale-up & technical transfer• Practical: Optimization experiments• Results and discussion
10月28日	<ul style="list-style-type: none">• Practical: Lab and pilot scale verification runs• Lecture: Process economy• Lecture: Process hygiene• Lecture: Process management• Results and discussion
10月29日	<ul style="list-style-type: none">• Lecture: Qualification• Validation (Parts 1, 2, and 3)• Practical: Final scale runs• Group work: Scale-up exercise• Results and discussion

課程講師:

Lucia Dinehart	Senior Scientist, Fast Trak Biopharma Service
Deborah Cohen	Senior Scientist, Fast Trak Biopharma Service
Umay Saplakoglu	Senior Scientist, Fast Trak Biopharma Service
Tina Pitarresi	Staff Scientist, Fast Trak Biopharma Service
Darcy Birse	Director, Americas Global Head, Training & Education Fast Trak Biopharma Service

三、課程內容重點

GE health care (GE 醫療)有一系列的產品和服務，其中包括醫療成像(medical imaging)和信息技術(information technologies)，含醫療診斷、病人監護系統、藥物研發和生物製藥技術等。GE health care 分為兩個主要業務部門：GE Healthcare Technologies 和 GE Healthcare Bio-Sciences; 其中 Bio-Sciences 主要是併購 Amersham，而 Amersham 的前身正是 Pharmacia，因其在蛋白質純化方面有非常豐富的理論和經驗，使得 GE 公司成為蛋白質純化領域的領導者。蛋白質純化和生產一直是生物製藥的最大瓶頸之一，其製程決定產品的品質、安全性和穩定性。GE health care 研發的裝置、層析凝膠已經使用於生技製藥多年，使大規模的蛋白質純化和生產成為可能。其所舉辦的 Fast Trak 技術開發和培訓服務在美國和歐洲已經有十多年的歷史，所有的訓練課程都包括理論和實驗兩部分內容，這兩部分內容在整個訓練過程中穿插進行，以提高實際作業經驗的目的。不同課程時間不同，通常在三到五天。課程包括:

DEV1 (Chromatographic Techniques)：層析技術

介紹五大層析技術的理論基礎和關鍵參數的最適化；蛋白質下游純化的策略和技術最適化；在蛋白質純化過程中常用的解析技術和清潔等方面的知識。

DEV2 (Process Development)：製程開發

DEV2 課程介紹如何策略性的選取最佳層析凝膠及參數最適化，在設計製程時如何考慮技術的可放大性、穩定性和成本的經濟性，以及生產過程中的清潔和管柱維護等。以便設計和發展既經濟又實用的製程，從而減少開發成本和加快產品上市。

DEV4 (Scale up and Technical Transfer)：放大和技術移轉

為期三天的 DEV4 介紹如何順利實現從實驗室技術到實際生產製程之順利放大和轉化，以及在實際生產中將可能面臨的法規和驗證的問題。

MEM1 (Downstream Processing using Membrane Separation)：膜分離技術在下游純化技術中的應用

膜分離是一種用於細胞澄清、細胞收集、樣品前處理和濃縮的強大工具。該課程的內容包括膜的基本性質、相關技術的基本理論、如何選取膜、最適化以及膜的清洗和維護等。

SYS3 (Crossflow Filtration System control using UNICORN™)：應用 UNICORN™ 控制切向流技術

在了解膜分離技術的基礎上，兩天的本課程詳細介紹如何應用自動化的切向流系統，快速實現膜技術的最適化。

COL1 (Large Scale Column Packing)：工業用層析管柱的裝填

法規要求生產用層析管柱需遵循特定裝填和管柱效(column efficiency)測試的程序，COL1 介紹不同類別工業用層析柱的裝填方法和管柱效(column efficiency)測試方法，管柱的各種參數與製程設計和純化策略的關係，不同類別層析柱的清潔、維護和儲存方法。

MAB1 (Downstream Porcessing of Antibody Molecules)：抗體純化技術

此課程介紹通用的抗體純化策略，具體的層析技術，不同抗體來源如何影響製程的選取。

本人參加的訓練課程為 DEV4 (Scale up and Technical Transfer)：放大和技技術移轉，在美國紐澤西州舉辦，為期三天。以下為課程的重點。

(一)製程設計(Process design)

生技產品製造大多經過一連串經過規劃的流程以純化產物，而這些產物大多由生物體生產而來(包括微生物和其醱酵液、植物組織、動物組織、體液和細胞培養液等)。因此在設計製程時，首先要考慮的是啓始材料(starting materials)的來源和特性。例如醱化與否並不影響蛋白質活性時，可以利用原核生物為生產此蛋白質的宿主，而需醱基修飾時，則需使用真核生物為宿主;例如哺乳動物細胞、昆蟲細胞和酵母菌等。除了產物活性之外，宿主的選擇也會影響的層面包括:產品產量、污染物的含量和種類、目標產物的區域(location of product)、生產成本和法規問題。當然，目標產物於細胞內的區域也是需經過精確的設計，因為蛋白質產物的結構會因其在細胞內的位置而有所不同，這也會影響樣品處理的程序設計。如何在樣品進入管柱前將不純物(impurity)儘量去除，並將含有目標產物

的溶液濃縮，是管柱層析前(pre-chromatography)的重要步驟。好的規畫和程序，將可使管柱層析的效率提高，並得到較高純度的產物。除此之外，需要通盤考量和深入了解的內容涵蓋:產物的穩定性、產品生產時的產率和純度、純化策略、製程最適化的重要因子和非重要因子、可放大性、工作環境(人員安全和經濟性)、專利和授權問題、產品上市時間、製程成本(單元操作和原料成本)及品保(quality assurance)。文件管理是生產製程中的一項重大議題，需製訂主要確效計畫(master validation plan, MVP)，其內容應包括設備、維修、訓練、儀器和整個計畫的系統性分析。確效方法(validation protocol)則需依這個 MVP 的內容應做詳細說明。這包括特定步驟中需做確效的原因、需做那些項目、如何做、呈現什麼樣的結果、誰需負責。所需的文件需含:產品規格、實驗紀錄簿、製程開發報告(development report)、log book、校正報告書、標準作業程序及批次紀錄(batch record)等，當然每一步驟的風險評估也不可少。製程重新設計(process redesign)是相當耗成本和時間的，應儘量避免，如果無法避免時，應結合 upstream 和 downstream 人員和改變，並詳實記錄任何的變異。如果有法規 issue 時，應在一開始時，即向法規單位報告並一同執行，以降低法規面的衝擊。

(二)製程最適化 (Process optimization)

一般而言，在實驗室所開發的製程，往往是不計成本，只在意產物的純度和回收率，因此在放大製程時，仍需將其最適化。其目的簡單而言，就是要能夠在最高產率、最低成本和最少時間時內得到產品設定的純度。首先應將每個單元最適化，再將各單元間的連結最適化，而達到整個製程最適化的目標。至於最適化過程所的要求，則依據產品特性、需求量(市場大小)、生產難易等而設定。執行製程開發研究時，務必考量放大後的規模所需的軟硬體條件。同時，一個可放大和可確效的製程，不論在產率、生產時程、耐變性和經濟性均應能夠符合要求，以生產設定之純度和品質的產品。其步驟為:(1)篩選最重要的影響因子;(2)將些重要因子最適化;(3)了解這些因子是否有高耐變性和探討操作範圍及產物受影響程度。一般需探討的因子包括:目標產品的穩定範圍(stability window)、dynamic binding capacity、elution 方式、各步驟流速、凝膠高度、凝膠顆粒大小、溫度效應和緩衝液系統等。目前在層析技術上有新的探討條件方式--Design of Experiment，其執行的過程和方式極像目前用於醱酵的「回應曲面法(Response surface methodology, RSM)」。對於整個製程特性(process characterization)最需深入了解的一般都集中於重要影響品質因子

(critical quality attributes, CQA)分析，因為這些因子有偏離時，往往在產品的品質、安全性、有效性造成極大的影響。另外一些重要的製程參數，稱為 critical process parameters (CCP);CCP 是在製程中，如果沒有嚴格控制的話，將會使一個或多個 CQA 受到有害的影響。了解這個參數的重要性後，就可以設定所謂的 action range，當有偏離時，就需執行例如 CIP 的工作，以確保批次間的再現性和產品的品質。

(三)放大與技轉(Scale up and technical transfer)

成功的製程放大需能夠達成符合量產目標的要求，能夠及時完成和具有經濟效益(控制成本)。至於最終生產規模的設定，以藥物而言，需考慮病患數量和劑量、生產的時程、批次產量的回收率、未來的藥價和市場佔有率。以開發一個蛋白質藥物製程而言，小量至 100-L 規模的製程約需 2 年 9 個月，再將其放大至 500-L 規模時，需約 2 年 3 個月。這個過程所需完成的項目，除了純化技術之外，也需進行多項的確效(例如病毒清除)和文件。由於生產工廠有時會因為設備因數，而導入新的製程變數，例如產量大小(scale)、設備設計和程序，所以好的規劃和能夠預見未來的問題是非常重要的。在製藥產業發展上早已導入風險評估(Risk assessment)概念，而使藥物製造品質更安全。因此技轉過程中，每個步驟的風險評估都需徹底執行，包括影響的原因、程度、機率…等。以層析而言，製程放大所進行的步驟包括:放大製程參數、選擇適當設備、確認或微調後的結果、定義最終的參數和設定可接受的操作範圍。

(四)製程經濟(Process economy)

這個議題，我們最先想到的是如何降低生產成本。不過，講師確是先引用 McKinsey 的研究報告;其指出，當製程開發的預算超過了 50%，可是即時的將產品上市時，只降低獲利 4%;如果維持製程開發的預算，但是延後上市時間 6 個月，則將降低獲利 33%。這應是因藥物別而有差異，不過也指出了，能即時完成計畫的重要性。當在探討 process economy 時，應集中在各重要因數:

1. 時程控制，不可影響臨床試驗或藥品上市時程。
2. 設備使用率
3. 製程產量和產能規劃
4. 儘量減少製程的步驟

(五)製程管理(Process management)

由於一個藥物研發至上市所需的費用需約 4 億美元和 8-10 年的時間，以後段的量產而言，需約 3000 萬至 2 億美元(費時 12-24 個月)，所以在生產製程的管理非常重要，如果失敗的話，就讓它早點失敗，以減少損失。製程管理的活動順序如下：

1. 建立任務組織
2. 文獻和專利搜尋
3. 策略報告
4. 藥品規格設定
5. 設定品管相關事項
6. 產品特性探討策略
7. 藥品劑型和配方規劃
8. 製程模擬(可配合電腦軟體)
9. 制訂流程圖
10. 設計實驗
11. 完成結論報告(毫克生產規模)
12. 連續 3 批次的生產報告
13. 製制定參考物質
14. 完成單元操作、品質和產品特性報告
15. 完整的製程開發報告
16. 申請 IND
17. 製程放大與最適化
18. 建立批次報告
19. 連續 3 批次的 cGMP 生產報告
20. 製程確效
21. 申請 NDA

(六)製程衛生與管柱維護(Process hygiene and column maintenance)

製程衛生(process hygiene)是一種預防的工作，以延長管柱內凝膠(以蛋白質純化為例)的使用壽命，以降低生產成本和避免產品受到污染，影響產品的品質。經常被執行的工作如 cleaning-in-place (CIP)，以達到降低微生物污染、交叉污染、延長凝膠壽命和減少

重新裝填管柱(repacking)的頻率。至於執行 CIP 的頻率則和產品與製程有關，也需要以不同的方法探討。不過，如果是注射用的藥品，則需於每批次生產後執行 CIP。常用的 CIP 藥品包括 guandine-HCl，可以破壞疏水性作用力、溶解沈澱和變性的蛋白質;異丙醇，可以去除脂質和疏水性的污染物質，但是無法去除沈澱的物質;NaOH，可以溶解沈澱的蛋白質和脂質，去除核酸等。至於如何使用，則也需設計各種實驗以證明可達到 FDA 滿意的標準。因此，如同製程開發中所執行的項目，需保留所有的實驗設計、結果和文件，以供審查。

(七)管柱層析製程確效(Chromatography process validation)

製程確效的定義是以建立的文件來證明在特定的製程中，能夠穩定(有再現性)的提供符合制定的產品規格和品質屬性。依據 21 CFR, part 211.110 的規定，需要設定一個控制程序，以監督產出的產物(含中間物)和確效製程中可能造成產品變異的部分。為了能夠確保產品品質，一定要將確效設計入製程純化 scheme。確效的活動首先要制訂 validation master plan (VMP)，以設定整個確效的中心思想和標準，並規劃整個程序中可追溯的執行方式，定義每個單元和整體之間的執行方式。一個好的確效規畫文件，並非是一層不變，而是所謂 living document，如果有明確的理由和驗證結果，可視需要調整。

關鍵設備和附加系統均需經過確效驗證，所需的項目包括:Design qualification (DQ), Installation qualification (IQ)(設備或系統鑑別、設備基本資料查驗、設備主要組件查驗、相關零件查驗、安裝規格查驗、現場安裝測試、安裝驗證結果評定), Operational qualification (OQ)(在 IQ 驗證合格後執行，其主要目的在驗證儀器設備各項操作配備之個別性能，包括機器各部分的開關是否正常、各控制器的基本性能操作，如系統壓力極限，Pump 流量準確性及線性驗證，溶媒梯度準確度與線性驗證，UV detector 驗證、軟體的操作、儀器的清潔及例行保養…等等)和 Performance qualification (PQ)(主要在利用空轉或負載模擬用藥品來測試製造用設備或設施能持續穩定的表現其應有之性能，以確認關鍵性製程參數之操作範圍是否合適)。

產品的品質以往是依品管制度而達成，不過目前則是強調 Quality by design (QbD)。QbD 強調的是「品質是設計出來的」，不是靠成品檢驗或是製造來的。QbD 是產品開發與製造的一個系統性規劃。經由產品設計(Product design)，接著是製程設計

(Process design)，再來是製程最佳化(Process optimization)，才能使得產品最佳化，這4個步驟持續循環以提升產品品質。Design Space(設計空間)是 QbD 的一部分，是產品製程設計時，經由研究結果而訂定出來可以確保產品品質的操作參數之範圍。以往廠商製程變更時，需在檢送技術文件給主管機關審核才可執行，不過經由 Design space 觀念做法，在此參數範圍內製造的產品(藥品)，不會被視為製程變更。應用 Design Space 的概念，在批次大小的變更或製程中之小變更均不為重大變更，無需送審，可以減少文件送審時間，增加效率。另外一個重要項為「關鍵品質因子 (critical quality attribute)」評估，類似風險評估的概念，在產品設計開發階段，找出產品在化學上、物理上、微生物上的最重要因子進行控管，評估重要(critical)、主要(key)或不重要(non-critical)的因子，並建立產品規格及產品品質的管制。以蛋白質藥物而言，CQA 常分析的包括 potency、轉譯後修飾、等電點、aggregation、無菌性、外加物質和不純物(例如 DNA 和 HCP)。一個製程確效作法可以簡化如下:(1)說明為何這個步驟會在製程中;(2)說明這個步驟的目的和內容;(3)說明如何測定其結果?(4)並以行動證明其對所生產產品的品質具穩定性。以管柱層析而言，需要確效的 performance determination(關鑑的決定因子)為產物純度 profile，不純物 profile 和產物回收率。而影響這些因子的則有所用凝膠的特性(大小、分布、官能基)、管柱充填(管柱設計、填充效率)、和操作條件(流速範圍、注樣範圍、dynamic binding)。

(八)製程放大計算

由於本課程的主要內容是製程放大，因此也包含了一實例計算。將由實驗室所得到結果，而設計其放大後所需的設備和工作時程安排。相關的資料如附件。

四、心得與建議

- (1) 生技藥物自 1982 年問世以來，每年平均有 3-4 個新藥或疫苗問世，開發成功的藥品已廣泛應用於治療癌症、肝炎、發育不良、糖尿病、囊纖維變性和一些遺傳疫病上，在很多領域上，解決了傳統化學藥物難以達到的作用。由於生技藥物的生產技術層次極高，產品的需求又是全球性，因此如何穩定、快速的生產是一重要的關鍵。以單株抗體而言，單項的產品每年的需求可達 1500 公斤。由於目前的動物細胞培養技術，可以生產抗體達到高於 5 g/L，因此如何解決下游的回收與純化技術是類似產品的瓶頸。由於奇異公司是這個領域的龍頭，因此已經開發了多項能夠解決相關問題的產品，並具有能力舉辦這類的訓練課程，其講師也都能夠解答各種和製程相關的問題和提供相關資料。
- (2) 生技藥物，尤其是蛋白質類藥物的生產過程和化學藥物不同，生技藥物的生產製造要利用細胞培養技術，其生產成本高，產品上市週期長，其產能一直被認為是影響快速上市的關鍵。生技藥物的量產問題已經成為此產業快速擴張的關鍵，經過三天的研習，改變了本人對於生技藥物產品生產技術的看法。一般的觀念是，這類產品的價值非常高，因此可以投入極高的成本(包括人力、時間)來生產，不用考慮生產成本。這個觀念顯然是錯的，因為如果不能於最短的時間將其大量生產與上市，就算是再好的藥物，也會被取代和淘汰。就如 McKinsey 的研究報告指出，當製程開發的時間過長，延後上市時間 6 個月，則將降低獲利 33%。
- (3) 本次訓練的 5 個學員中，除了本人之外，均是生技藥廠和生技 CMO 公司的製程開發人員，因此討論的內容也大都與生技製藥相關，講師授課的內容也偏向於製藥。雖然於法規面本人並無法完全了解，但也吸收了一些新的觀念，和美國 FDA 在查廠時可能提出的問題。因此，雖然本次的訓練在技術面的內容大都已經熟悉，也不虛此行。本人認為本次的訓練內容大都以講課的方式進行，在實作方面略嫌不足，沒有足夠的實驗結果可以討論，很多重要的議題(如確效)，也沒有足夠實際例子可以練習，因而無法深入。

(4) 生技藥物的量產問題已經成爲此產業快速擴張的關鍵。在藥物開發成本日漸高漲的情況下，降低藥物生產成本與加快藥物上市是新藥開發公司尋求的策略之一。生物技術藥生產外包的委託企業有兩類，一類是大型製藥公司，外包的目的是獲得專業性的製造服務，降低生產成本；另外一類是小型生物技術公司，它們的產品結構往往單一，而且更加專注於研發工作。由於生物反應器與下游純化設備的投放資相當大，不少公司在效益考量下不會投資於此。因此，生技藥物產能不足的問題，使得生產製造的專業外包商機無限。市調資料顯示目前全球生物技術藥的產能需提高 4 倍才能滿足生產的實際需求，全球蛋白質藥物生產外包市場規模的年增率達到 20%。目前我國具有此能力的單位只有生技中心、永昕和聯亞，但其設備利用率已經滿載，不足以增加服務的對象。而本所已有大部分的相關設備和一些成功的研究，可以考慮評估切入此進入門檻相當高的產業。



Scale Up Case Study

Group work

Scale up of a purification process for a recombinant protein originating from mammalian cell culture material.



imagination at work



Back ground

A small Slovenian Biotech company entered the Biotechnology field in 1999 by starting up a project for development of a recombinant mammalian cell line, for production of a small molecular weight protein (44 000 dalton) for pharmaceutical use.

This company has now developed a downstream purification scheme at lab scale. The process contains three chromatographic steps. Their engineering department is now working with scaling up of the lab process and is consulting to you for advice and help.

The final production unit is planned to have a production capacity of 5 kg product per year. The production and engineering departments calculate with 40 working weeks per year available due to the standard maintenance intervals in the plant.

A new batch of clarified cell culture supernatant will be available each Monday morning at 09.00 which should be subjected to downstream processing in such a way that purified material from the last chromatographic step is available for ultrafiltration, sterile filling on Thursday 16.00 at the latest.

Aim and Goals

Your task is to calculate the final suitable production scale for all purification steps in order to have one batch processed from Monday 09.00 to Thursday 16.00. Please define the equipment specifications; column dimensions and sizes including flow rate capacity of purification system(s).

Consider to whether it is preferable to run one or several cycles per step. Also, consider if multi use of purification system(s) could be a solution to save equipment costs.

1 cycle capture → 1 cycle intermediate purification → 1 cycle polishing

1 cycle capture → 2 cycles intermediate purification → 1 cycle polishing

1 cycle capture → 1 cycle intermediate purification → 10 cycles polishing

Think about the extent of QC work and the validation efforts needed in the various alternatives

Please also describe the working schedule, the detailed working times during the days for each purification step.



Overall process lab scale procedure

Cell culture

Centrifugation

Microfiltration

pH adjustment

Product concentration: 0.060 g/l

Total protein concentration: 0.90 g/l

Capture step: Q Sepharose Fast Flow

Addition of salt /pH adjustment

Intermediate purification: Phenyl Sepharose High Performance

Polishing: Superdex 75 prep grade

Ultrafiltration

Formulation

Sterile filtration

Bottling



imagination at work



Capture step - Chromatographic details from lab scale

Medium: Q Sepharose Fast Flow

Column: 16 mm diameter, 10 cm bed height
 $CV = \frac{20}{20} mL$
 $\frac{\pi}{4} D^2 = 200 \text{ cm}^2$

Equilibration: 20 mM Na-phosphate, pH 6.5 (5 CV)
Flow rate, 150 cm/h 1.5 ml/min

Sample load: 3.47 l of sample (clarified supernatant)
Flow rate, 100 cm/h 1 ml/min

Washing: 20 mM Na-phosphate pH, 6.5 (2 CV)
Flow rate, 100 cm/h

Elution, Step 1: 20 mM Na-phosphate pH 6.5 + 0.1 M NaCl (3 CV)
Flow rate, 70 cm/h 0.7 ml/min

Elution, Step 2: 20 mM Na-phosphate pH 6.5 + 0.25 M NaCl (2 CV)
Flow rate, 70 cm/h

Regeneration: 2 M NaCl in water (1 CV)
Flow rate, 150 cm/h

CIP: 1 M NaOH in water (2 CV)
Flow rate, 40 cm/h 0.4 ml/min

Storage buffer: 10 mM NaOH in water (2 CV)
Flow rate, 150 cm/h

Product volume: 30 ml

Product concentration: 4.8 mg/ml



imagination at work



Intermediate purification - Chromatographic details from lab scale

Medium: Phenyl Sepharose High Performance

Column: 16 mm diameter, 10 cm bed height $K = 28 \text{ cm}^2$
 $C_v = 200 \text{ ml}$

Equilibration: 20 mM Na-phosphate, pH 7.0 + 0.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2 CV.)
Flow rate, 150 cm/h

Sample load: (50 ml of sample (from Capture step))
Flow rate, 100 cm/h

Washing: 20 mM Na-phosphate pH, 7.0 + 0.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3 CV)
Flow rate, 100 cm/h

Elution: Buffer A; 20 mM Na-phosphate, pH 7.0 + 0.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Buffer B; 20 mM Na-phosphate, pH 7.0
Gradient 0-100% B, 10 column volumes
Flow rate, 70 cm/h

Regeneration: Water (1 CV)
Flow rate, 150 cm/h

CIP: 1 M NaOH in water (2 CV)
Flow rate, 40 cm/h

Storage buffer: 10 mM NaOH in water (2 CV)
Flow rate, 150 cm/h

Product volume: (36 ml)

Product concentration: 5.5 mg/ml



Polishing step - Chromatographic details from lab scale

Medium: Superdex 75 prep grade

Column: 16 mm diameter, 60 cm bed height *CV = 1.5 CV*

Equilibration: 20 mM Na-phosphate, pH 7.0 (1.5 CV)
Flow rate, 30 cm/h

Sample load: 6% of V_t (sample from Intermediate purification step)
Flow rate, 30 cm/h

Elution: 20 mM Na-phosphate, pH 7.0 (1 CV)
flow rate, 30 cm/h

CIP: 1 M NaOH in water (1 CV)
Flow rate, 30 cm/h
Note: Only required after each production week

Storage buffer: 10 mM NaOH in water (2 CV)
Flow rate, 30 cm/h

Product volume: 18 ml

Product concentration: 2.0 mg/ml



Case Study

Scale up calculations

Note: all necessary information to complete this exercise can be found in the lab scale process data. Pooling two batches together, in this exercise, is fine if you need more material to load onto a column. Round up your column diameter to the nearest 5 or 0 cm size i.e. 42→45, 57→60

Standard column diameters:

10, 20, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 100

1. Keep bed level constant.

Annual need in Kg:

5

Overall recovery in lab scale:

Step 1 = 69%

2 = 83%

3 = 92%

over all yield = 52%

Working weeks available:

40

Amount of starting material needed:

9.6 Kg

Amount to be processed per week:

$9.6/40 = 2.4 \text{ Kg/week}$

Concentration in start material:

0.069/L

Volume to be processed per week:

4000 L/week



imagination at work



$$\frac{V}{A \text{ cm}^2} = \frac{\text{mL/min}}{\text{cm}^2} = \frac{\text{cm}^3/\text{h}}{\text{cm}^2} = \frac{\text{hr}}{60 \text{ min}}$$

Capture step

Feed material: 4000 L/week

Media capacity, lab scale:

$$\begin{aligned} \text{CV} &= 20 \text{ mL} \\ \text{load} & 3.47 \text{ L} \\ 3.47 \text{ L} / 20 \text{ mL} &= 0.17 \text{ L/mL gel} \end{aligned}$$

Bed volume required:

$$\frac{4000 \text{ L}}{0.17 \text{ L}} = 23530 \text{ mL}$$

Column diameter:

$$23530 = \frac{\pi}{4} \times D^2 \times 10 \text{ cm}$$

$$D = 54.7 \text{ cm} \rightarrow 60 \text{ cm}$$

Column selection:

Column diameter: 60 cm

$$\begin{aligned} \text{Column volume: } \frac{\pi}{4} \times 60^2 \times 10 &= 28260 \text{ mL} \\ &= 28.26 \text{ L} \end{aligned}$$

Yield: 69%

$$\text{Product: } 28.26 \text{ L} \times 0.069 \text{ g/L} \times 4000 \text{ L} \times 69\% = 165.6 \text{ g}$$

$$\text{Product volume: } 28.26 \times 1.5 = 42.4 \text{ L}$$

$$\text{Product concentration: } \frac{165.6}{42.4} = 3.9 \text{ g/L}$$

$$\text{Max pumping capacity needed: } 150 \text{ cm/hr} \Rightarrow \frac{150}{60} \times \frac{60^2}{4} \times \pi = \frac{17065}{4} \text{ mL/min} \rightarrow 4266.25 \text{ mL/min} \rightarrow 256 \text{ L/hr}$$

$$\text{Min pumping capacity needed: } 40 \text{ cm/h} \Rightarrow \frac{40}{60} \times \frac{60^2}{4} \times \pi = 1884 \text{ mL/min} \rightarrow 113 \text{ L/hr}$$



imagination at work



Intermediate purification step (1 cycle)

Feed material: $3.9 \text{ g/L} \times 42.4 \text{ L} = 165.6 \text{ g}$

Media capacity, lab scale:

$$\begin{aligned} & CV = 20 \text{ mL} \\ & \text{load } 50 \text{ mL} \times 4.8 \text{ mg/mL} = 240 \text{ mg} \end{aligned} \rightarrow \frac{240}{20} = 12 \text{ mg/mL gel}$$

Bed volume required:

$$\frac{165.6 \text{ g}}{12 \text{ mg/mL}} = 13800 \text{ mL}$$

Column diameter:

$$13800 \text{ mL} = \frac{\pi D^2}{4} \times 10 \text{ cm}$$

$$D = 42 \text{ cm}$$

Column selection:

Column diameter: $42 \text{ cm} \rightarrow 45 \text{ cm}$

Column volume:

$$\frac{\pi}{4} \times 45^2 \times 10 = 15896 \text{ mL}$$

Yield: 83%

Product: $165.6 \text{ g} \times 83\% = 137.4 \text{ g}$

Product volume: $15.9 \text{ L} \times \left(\frac{36}{20}\right) = 28.6 \text{ L}$

Product concentration:

$$\frac{137.4}{28.6} = 4.8 \text{ g/L}$$

Max pumping capacity needed: $150 \text{ cm/h} \rightarrow \frac{150}{60} \times \frac{\pi \times 45^2}{4} = 4 \text{ L/min} = 240 \text{ L/hr}$

Min pumping capacity needed: $40 \text{ cm/h} \rightarrow \frac{40}{60} \times \frac{\pi \times 45^2}{4} = 1.06 \text{ L/min} = 63.6 \text{ L/hr}$



imagination at work



Intermediate purification step (2 cycles)

Feed material: $165.6 \text{ g} / 2 = 82.8 \text{ g}$

Media capacity, lab scale:

$$12 \text{ mg} / \text{mL gel}$$

Bed volume required: 6900 mL

Cycling mode - 2 cycles:

Column diameter:

$$6900 = \frac{\pi D^2}{4} \times 10 \quad D = 29.6 \text{ cm}$$

Column selection:

Column diameter: $\rightarrow 30 \text{ cm}$

Column volume:

$$\frac{\pi}{4} \times 30^2 \times 10 = 7065 \text{ mL}$$

Yield: 83%

Product: $(166.3/2=83.2) \quad 82.8 \times 83\% = 68.7 \text{ g}$

Product volume: $7065 \times \frac{36}{20} = 12717 \text{ mL}$

Product concentration:

$$\frac{68.7 \text{ g}}{12.7 \text{ L}} = \frac{54}{100} \text{ g/L}$$

Max pumping capacity needed: $150 \text{ cm}^3/\text{h} \rightarrow$

$$\frac{150}{60} \times \frac{\pi}{4} \times 30^2 = 1.96 \text{ L/min} = 106 \text{ L/hr}$$

Min pumping capacity needed: $40 \text{ cm}^3/\text{h}$

$$\frac{40}{60} \times \frac{\pi}{4} \times 30^2 = 471 \text{ mL/min} = 28 \text{ L/hr}$$



imagination at work



Polishing step (1 cycle)

Feed material: ~~166.3g~~ (28.6L) $68.7 \times 2 = 137.4g$

Media capacity, lab scale: $\frac{240mg}{120ml} = 2mg/ml$ || 6% CV

Bed volume required:

$$\frac{166.3g}{0.002g} = 83.15L \quad || \quad \frac{28.6}{6\%} = 477L$$

Column diameter:

$$83150 = \frac{\pi}{4} D^2 \times 60 \quad D = 74.5cm \quad || \quad 477000 = \frac{\pi}{4} D^2 \times 60$$

$$D = 100cm$$

Column selection: $\rightarrow \frac{100}{80}cm$

Column diameter: $\rightarrow \frac{100}{80}cm$

Column volume, 60 cm bed:

$$\frac{\pi}{4} \times 80^2 \times 60 = 301L \quad || \quad \frac{\pi}{4} \times 100^2 \times 60 = 471L$$

Yield: 92%

Product: $\frac{166.3 \times 0.92}{137.4} = \frac{153}{137.4}g$

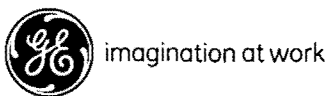
Product volume: ~~$\frac{153}{301} \times \frac{18}{120} = 45.15L$~~ || $471 \times \frac{18}{120} = 70.6L$

Product concentration:

$$\frac{153}{45.15} = 3.4g/L \quad || \quad \frac{153}{70.6} = \frac{1.8}{2.1}g/L$$

Pumping capacity needed:

$$30cm/h \Rightarrow \frac{30}{60} \times \frac{\pi}{4} \times 80^2 = 2512ml/min$$



$$30cm/h \Rightarrow \frac{30}{60} \times \frac{\pi}{4} \times 100^2 = 3125ml/min = 235L/hr$$



Polishing step (10 cycles)

Feed material: $153/10 = 15.3 \text{ g}$ || $28 \text{ L}/10 = 2.8 \text{ L}$

Media capacity, lab scale: 2 mg/mL || 6%

Bed volume required: 8.3 L || 47.7 L

Cycling mode, 10 cycles

Column diameter:

$$8300 = \frac{\pi}{4} \times D^2 \times 60 \quad D = 7/3.5 \text{ cm} \quad || \quad 47700 \pm \frac{\pi}{4} \times D^2 \times 60$$
$$D = 31.8 \text{ cm}$$

Column selection: $\rightarrow 35 \text{ cm}$

Column diameter: $\rightarrow 35 \text{ cm}$

Column volume, 60 cm bed:

$$\frac{\pi}{4} \times 30^2 \times 60 = 42390 \text{ mL} \quad || \quad \frac{\pi}{4} \times 35^2 \times 60 = 62475 \text{ mL} = 62.5 \text{ L}$$

Yield: 92%

Product:

$$15.3 \times 0.92 = 14 \text{ g}$$

Product volume:

$$4.2 \text{ L} \times \frac{18}{120} = 0.63 \text{ L} \quad || \quad 62.5 \times \frac{18}{120} = 9.4 \text{ L}$$

Product concentration:

$$\frac{14}{0.63} = 22.2 \text{ g/L} \quad || \quad \frac{14}{9.4 \text{ L}} = 1.5 \text{ g/L}$$

Pumping capacity needed:

$$30 \text{ cm/h} \rightarrow \frac{30}{60} \times \frac{\pi}{4} \times 35^2 = 480 \text{ mL/min} = 28.8 \text{ L/hr}$$



Polishing step (10 cycles) (from intermediate 2 cycles)

Feed material: $12717 \text{ ml} \times 2 = 25.4 \text{ L}$

Media capacity, lab scale: 6% V_r

Bed volume required: $25.4 / 6\% = 423 \text{ L}$

Cycling mode, 10 cycles $423 \rightarrow 25.4 \text{ L} / 10 = 2.54 \text{ L/cycle}$ $\rightarrow 2.54 / 6\% = 42.3 \text{ L/cycle}$

Column diameter:
 $423 = \frac{\pi}{4} D^2 \times 60$ $D = \frac{53.1}{1.7} \text{ cm}$
 4230

Column selection:

Column diameter: 55 cm

Column volume, 60 cm bed:
 $CV = \frac{\pi}{4} \times 55^2 \times 60 = 143 \text{ L}$

Yield:

Product:

Product volume:

Product concentration:

Pumping capacity needed: