

## 由基因轉殖動物乳汁生產重組蛋白的前處理方式

人類蛋白質藥物，已在臨床上使用多年，且藥效良好。近年來，由於生物技術之進步，已可利用基因重組技術，大量生產此類藥物，也因此人類蛋白質藥物之生產成本亦大幅降低。

在各種製造重組蛋白質藥物的系統中，基因轉殖動物具有高表現量，及對蛋白質具有較完整之轉譯後修飾能力。基因轉殖動物可將外來基因在乳腺細胞表現後，再分泌到乳汁中，由其乳汁大量生產目標蛋白質。然而，乳汁是一種複雜的生物膠質(bio-colloid)，其成分的複雜性相當於血漿的組成，因而造成純化處理上的困難。

報告指出，基因轉殖動物乳汁中之內源(endogenous)蛋白質成分，與非基因轉殖動物的組成差異不大，故在基因轉殖動物的乳汁中，所表現的重組目標蛋白質的量，會影響其純化的難易度。理論上，外來重組基因的表現量越大越好，但對一些構造較複雜的蛋白質，必須考慮到修飾的問題，其表現量也不能太高。

乳汁中的蛋白質成分，主要是酪蛋白(casein)，含量超過總蛋白質量 50%，成為純化過程中主要的不純物。酸性的目標蛋白質；如人類第九凝血因子(rhFIX)、重組水蛭素(rHirudin)、紅血球生成素(erythropoietin; EPO)，因其蛋白質等電點(pI 值)與酪蛋白相近，更會造成純化時最常用的離子交換層析法受到限制。

酪蛋白以微膠粒(micelle)的狀態存在乳汁中。以豬乳為例，酪蛋白和膠態磷酸鈣結合成平均直徑為 133 nm 的粒子懸浮在乳汁中；因為酪蛋白微膠粒是不溶性的物質，它會造成蛋白質純化常用的工具如過濾膜管及層析管柱的阻塞，使得純化工作無法進行下去。所以，自乳汁中分離重組蛋白質，最先要考慮的是除去酪蛋白微膠粒。酪蛋白微膠粒在不處理的狀態下，需要以超高速離心力(50,000 xg 或更高)才能將之沉澱，在工業化的大量操作時實不可行。工業上去除酪蛋白微膠的方法有四種，分述如下：

第一種方法：降低乳汁的 pH 值至 4.6 左右，或以凝酪酵素(chymosin)之類的水解破壞微膠粒構造，過程中可以加熱來幫助凝乳生成，再離心或過濾，使乳汁分離成凝乳沉澱以及可溶性乳清蛋白質。

這個方法常見於食品工業分離乳汁蛋白的成分並進行加工。但在基因轉殖動物乳汁純化蛋白質藥物的製程中並不適用，因為 pH 值的改變常會造成蛋白質構造的破壞，使其失去活性，如表現於乳汁中的組織型之胞漿素原活化子(tPA)，當乳汁以酸沉澱處理會使其失去 50% 的活性。另外，若重組蛋白本身是酸性蛋白質，也會在此 pH 值條件下沉澱而無法分離出來。報告指出，以酸沉澱進行去除酪蛋白的前處理，自基因轉殖羊乳汁中純化重組人類第九凝血因子，最後的總回收率只有 2-2.5%。再者，酸性條件會使唾液酸(sialic acid)殘基

從酪蛋白中被移除。

第二種方法：使用聚乙二醇(PEG)來使酪蛋白微膠粒沉澱，然其先決條件是做為標的物之重組蛋白不會被 PEG 沉澱，同時標的蛋白質的含量需要相當高才可克服沉澱操作的損失。

PPL 公司之基因轉殖綿羊的乳汁中  $\alpha 1$  蛋白酶抑制因子( $\alpha 1$ -AT)含量達 10-12mg/mL，其純化的前處理步驟為兩階段的 PEG 沉澱步驟，第一階段為在脫脂乳中加入 PEG 使酪蛋白產生沉澱，離心，將酪蛋白與含  $\alpha 1$ -AT 的可溶蛋白液分離，到此步驟  $\alpha 1$ -AT 的回收率為 68%，再加入更高濃度的 PEG 將  $\alpha 1$ -AT 與其他乳清蛋白沉澱，以此沉澱物進行五個層析管柱純化步驟後得到純化產物。

第三種方法：以 EDTA 或檸檬酸鹽與鈣離子形成螯合物，將酪蛋白微膠粒溶解，再以超過濾法進行過濾。

超過濾法是製造生物製劑（醫藥用蛋白、血清、抗體等）常用的步驟，主要的功能是除去生物製劑中的微生物及病毒，或是除去溶液的小分子鹽類。由於乳汁是一種複雜的生物膠質，在進行超過濾時很容易堵塞超過濾膜，所以需要以 EDTA 或檸檬酸鹽先行處理。GTC 公司在處理其含第三抗凝血因子（antithrombin III）的轉殖山羊乳汁（表現量約在 1-3.5 g/L）時，以加入 EDTA 或檸檬酸鹽來增加過濾液的通透速率，以大量的溶液去萃取乳汁中的蛋白質成分。然後將含有 antithrombin III 及其他蛋白的過濾液通過親和性管柱(affinity column)，吸附其中的 antithrombin III，經過其他的層析管柱加以純化，達到醫藥用蛋白的純度。

第四種方法：以人工的磷酸鈣粒子(calcium phosphate-based particle, CAP) 技術，來進行去除乳汁中酪蛋白微膠粒的工作。

Biosante 公司提出的專利中，說明其方法是先以 EDTA 將脫脂乳汁中酪蛋白微膠粒的構造破壞，再把得到的溶液以透析的方式除去其中的鹽類(EDTA、鈣離子、磷酸根離子等)，再加入該公司製造的磷酸鈣粒子，此時磷酸鈣粒子會與溶液中的酪蛋白或其他蛋白質結合產生人工的酪蛋白微膠粒，但因其粒子較大在較低的離心力(5,000-10,000 xg)就可被離心沉澱，目標蛋白質和其他的乳清蛋白則留在上清液，再進行進一步的層析純化。

目前，這四種方法的運用，第一種方法在乳製品或生產乳汁蛋白質的工業被廣泛的運用，但不用於生產醫藥用蛋白的產業。第二及第三已有製藥公司將它用於自基因轉殖動物乳汁生產醫藥用蛋白的產程。第四種較新的方法雖然尚未有製藥公司將它用在產程，某些研究報告中採用來做為前處理方式，不過它需要有 Biosante 公司的合成的人工的磷酸鈣粒子才能進行工作。

（顏重河撰/李守倫審）