
分类号:Q81

单位代码: 10363

密 级: 公开

学 号: 2210530145

基于 QbD 理念构建商业化质粒工艺体系

Commercial plasmid process system is constructed based on
the QbD concept

学生姓名: _____ 陆宏辉

指导教师: _____ 陶玉贵

专 业: _____ 生物与医药

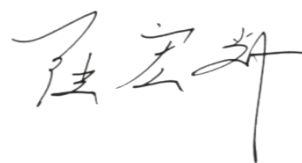
研究方向: _____ 生物载体

论文答辩日期: 2024 年 05 月 30日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确和隐含的内容外，本论文不包含其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学术论文作者签名：



日期： 年 月 日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

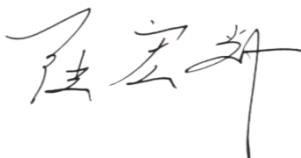
学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密，在_____年解密后使用本版权书

本学位论文属于

不保密

学位论文作者签名：



指导教师签名：

日期： 年 月 日

日期： 年 月 日

基于 QbD 理念构建商业化质粒工艺体系

摘要

随着细胞与基因疗法的市场愈发火热，基因治疗领域中最常用的载体 AAV、慢病毒和 mRNA 疫苗的生产都需要质粒作为重要的制药原材料，其市场需求日益强劲。因此需要对商业化质粒生产工艺进一步的优化，以满足临床与商业端的质粒需求。本文主要从商业实际问题出发，基于 QbD 理念重新梳理了质粒商业化生产整个流程和控制，以大肠杆菌为宿主菌株，通过生产工艺的研发和优化，制备出符合各项要求的标准质粒。主要研究内容和结果如下：

(1) 在上游发酵工艺中以 LB 为种子培养基，改进 LB 培养基为发酵培养基；一级种子扩培， $4 \pm 1\%$ 接种比进行发酵，以甘油为碳源，采用连续补料方式进行补料。从发酵 3.5 h 时开始补料，补料流速为 $4 \sim 5 \text{ g/kg/H}$ ，发酵 5.5 h 时调整补料速度为 $8 \sim 10 \text{ g/kg/H}$ 至发酵结束；采取以 $37.0 \pm 1.0 \text{ }^\circ\text{C}$ 为发酵温度；pH 控制范围为 7.2 ± 0.5 ； $\text{DO} \geq 20\%$ ；发酵 $14 \pm 2 \text{ h}$ 时停止补料。

(2) 下游纯化工艺中，菌体收集采用切向流超滤工艺，选用 500Kda PES 材质的中空纤维对菌体进行浓缩，通过洗滤工艺将菌体置换到裂解液 I 中，控制固液比为 $60\text{-}240 \text{ g/L}$ ，然后加入 2 倍体积裂解液 II 和 1.5 倍体积裂解液 III，控制碱裂解搅拌转速在 $100\text{-}150 \text{ rpm}$ ；裂解结束后采用 $50 \text{ }\mu\text{m}$ 和 $0.6 \text{ }\mu\text{m}$ 两级滤器对碱裂解液进行澄清。

(3) 下游纯化工艺采用经典三步层析法，分子筛层析选用 6FastFlow 填料，上样 20-35% 柱体积以去除 RNA 并进行彻底换液；在 2M 硫酸铵条

件下超螺旋质粒结合到 Plasmidselect亲和填料上，去除线性和开环质粒，提高超螺旋比例；最后选用 Source30Q 阴离子交换层析，进行精纯，进一步提高质粒质量，并降低内毒素、宿主蛋白及宿主 DNA 残留水平。

综上所述，本研究通过对上游发酵工艺控制，尽可能使生物量与质粒拷贝数乘积最大化，从而给后续工序提供充足的输入原料。通过碱裂解工艺各条件的控制，提高超螺旋质粒产率，同时尽可能减少其他杂质含量。最后通过三步层析，锁定工艺参数，得到了符合质量要求的的质粒载体。

关键词：QbD、商业化质粒、工艺优化、发酵纯化

Commercial plasmid process system is constructed based on the QbD concept

ABSTRACT

With the market of cell and gene therapy becoming more and more hot, the production of the most commonly used plasmids in the field of gene therapy, AAV, lentivirus and mRNA vaccine, all require plasmids as important pharmaceutical raw materials, and their market demand is increasingly strong. Therefore, it is necessary to further optimize the production process of commercial plasmids to meet the needs of clinical and commercial plasmids. Based on the concept of QbD, the whole process and control of plasmid commercial production were reviewed in this paper. *Escherichia coli* was used as the host strain, and standard plasmids that met various requirements were prepared through the development and optimization of production processes. The main research contents and results are as follows:

(1) In the upstream fermentation process, LB was used as seed medium, and the improved LB medium was used as fermentation medium. First stage seed expansion culture, $4\pm1\%$ inoculation ratio for fermentation, glycerol as carbon source, using continuous fed-feeding method. The feed flow rate was 4-5 g/kg/H from 3.5 h of fermentation, and 8-10 g/kg/h from 5.5 h of fermentation to the end of fermentation. The fermentation temperature was 37.0 ± 1.0 °C. The pH control range was 7.2 ± 0.5 . $DO \geq 20\%$; Fed-feeding was stopped at 14 ± 2 h of

fermentation.

(2) In the downstream purification process, the cells were collected by tangential flow ultrafiltration process, and the cells were concentrated by hollow fiber made of 500Kda PES material. The cells were replaced into lysate I by washing and filtration process, and the solid-liquid ratio was controlled to 60-240 g/L, and then 2 times volume lysate II and 1.5 times volume lysate III were added. Control the alkali cracking stirring speed at 100-150 rpm; At the end of lysis, the alkaline lysate was clarified using a two-stage filter of 50 μm and 0.6 μm .

(3) The downstream purification process was performed by classical three-step chromatography. The 6FastFlow filler was used for molecular sieve chromatography, and 20-35% column volume was loaded to remove RNA and complete liquid exchange was performed. In the presence of 2M ammonium sulfate, the supercoiled plasmids were bound to the Plasmidselect affinity packing to remove the linear and open-loop plasmids and increase the supercoiling ratio. Finally, Source30Q anion-exchange chromatography was used to purify the plasmid to further improve the quality of the plasmid and reduce the residual levels of endotoxin, host protein and host DNA.

In summary, in this study, by controlling the upstream fermentation process, the product of biomass and plasmid copy number was maximized as much as possible, so as to provide sufficient input materials for the subsequent process. The yield of supercoiled plasmid was increased and the content of other

impurities was reduced as much as possible by controlling the conditions of alkaline lysis process. Finally, through three steps of chromatography and locking the process parameters, the plasmid vector that met the quality requirements was obtained.

KEYWORDS: QbD, Commercial plasmid, Process optimization, Fermentation and purification

目录

摘 要.....	I
ABSTRACT	III
第 1 章 绪论.....	1
1.1 引言.....	1
1.2 QbD 理念.....	1
1.2.1 QbD 理念的产生及发展.....	1
1.2.2 基于 QbD 理念的方法学.....	3
1.2.3 基于 QbD 理念的重要意义.....	7
1.3 商业化质粒生产工艺研究进展.....	8
1.3.1 商业化质粒生产研究进展.....	8
1.3.2 质粒生产工艺研究.....	9
1.3.3 商业化质粒的质量要求.....	14
1.4 本论文的研究目的和内容.....	15
1.4.1 研究目的.....	15
1.4.2 研究内容.....	15
1.4.3 创新点.....	16
第 2 章 基于 QbD 理念的商业化质粒工艺研究策略.....	17
2.1 引言.....	17
2.2 质粒产品的目标质量概况.....	17
2.3 关键材料及关键工艺参数风险评估.....	18
2.3.1 失败模式与风险分析(FMEA)	18
2.3.2 风险评估标准.....	19
2.4 关键材料属性风险评估.....	19
2.4.1 关键物料风险评估表.....	19
2.4.2 关键材料属性风险控制.....	21

2.5 关键工艺参数风险评估.....	21
2.5.1 关键工艺参数风险评估表.....	21
2.5.2 关键工艺参数风险控制.....	23
2.6 本章小结.....	24
第 3 章 基于 QbD 理念的商业化质粒上游发酵工艺条件的优化开发..	25
3.1 引言.....	25
3.2 实验材料与实验方法.....	25
3.2.1 实验试剂.....	25
3.2.2 仪器设备.....	26
3.2.3 培养基配方.....	26
3.2.4 发酵种子.....	26
3.2.5 DH5 α 与 JM109 生长曲线的测定.....	27
3.2.6 单位湿菌体质粒含量的测定方法.....	27
3.2.7 补料策略.....	27
3.2.8 发酵终点及饥饿处理.....	27
3.2.9 条件优化实验设计.....	28
3.2.10 响应面设计.....	29
3.3 结果及讨论.....	30
3.3.1 培养基的优化结果.....	30
3.3.2 DH5 α 与 JM109 生长曲线测定结果.....	30
3.3.3 单位湿菌体质粒含量的测定结果.....	31
3.3.4 补料策略工艺优化结果.....	31
3.3.5 发酵终点实验结果.....	33
3.3.6 条件优化实验设计结果.....	34
3.3.7 模型拟合与方差分析.....	34
3.3.8 响应面分析.....	35
3.4 本章小结.....	37
第 4 章 基于 QbD 理念的商业化质粒下游发酵工艺开发.....	38
4.1 引言.....	38

4.2 实验材料与实验方法.....	39
4.2.1 实验试剂.....	39
4.2.2 实验设备.....	39
4.2.3 裂解阶段超滤工艺研究方法.....	40
4.2.4 剪切力和裂解时间的测定.....	40
4.2.5 超滤 1	40
4.2.6 碱裂解.....	40
4.2.7 澄清.....	40
4.2.8 分子筛层析.....	41
4.2.9 亲和层析.....	41
4.2.10 阴离子交换层析.....	41
4.3 结果及讨论.....	41
4.3.1 超滤 1 优化结果.....	41
4.3.2 碱裂解效率.....	43
4.3.3 澄清回收效率.....	44
4.3.4 分子筛层析结果.....	44
4.3.5 亲和层析结果.....	45
4.3.6 阴离子层析结果.....	46
4.4 本章小结.....	46
第 4 章 结论及展望.....	48
4.1 结论.....	48
4.2 展望.....	49
参考文献.....	50
攻读硕士学位期间研究成果.....	57
致谢.....	58

第 1 章 绪论

1.1 引言

近年来，制药工业有了重要的发展。现代系统已经发展到保证产品质量的制造信息、质量管理体系和风险管理^[1-3]。这些工具使药品生产企业能够发现、分析、纠正和预防问题，同时不断改进药品生产工艺^[4-6]。为了支持用于管理药品生产和产品质量的规则现代化，2002 年，美国食品及药物管理局(FDA)引入了现行良好生产规范(cGMP)的监管环境^[7]。

在人用药品注册技术要求国际协调会议(ICH)指南 Q8 (R2)药物发展、Q9 质量风险管理、Q10 药品质量管理体系和 Q11 开发和制造药物^[8, 9]发布后，监管机构(食品及药物管理局：FDA 和欧洲药品管理局：EMA)批准了质量源于设计(QbD)方法。ICH Q8 指南更是建议将“质量源于设计”理念融入制药行业。

开发安全有效的新药是一个漫长、困难和昂贵的过程。使用新的 QbD 方法，确保质量是由制造而不是副产品测试提供的，降低了产品优化的成本。QbD 研究可以为药品制造商提供更多经济效应的同时为患者安全带来更多受益，确保他们在更短的时间内获得更高质量的药物。

1.2 QbD 理念

1.2.1 QbD 理念的产生及发展

在生物医药行业的新药研发过程中，尽管药品监管机构是通过审查药品申请和检查是否符合现行药品生产质量管理规范(cGMP)来对药品质量进行监管。但是在质量保证方面仍有一些缺点，例如：产品和工艺设计的固有缺陷、生产工艺放大和常规生产的实施失败、过时的设备、产品召回、药品短缺、缺乏有效的质量管理体系或监管审查和检查实践等等^[10]。药品成品质量评价是药品研发的重要组成部分，对增强患者对药品安全性和有效性的信心起着至关重要的作用^[11]。因此，应在整个产品生命周期和批准后期间进行产品质量监控，以确保产品质量一致性、治疗有效性和患者安全性。

因此，美国食品药品监督管理局（FDA）发布了一项名为“21 世纪制药cGMP 倡议——基于风险的方法”（2002）的重大倡议，以加强药品生产和产品质量监管并使之现代化^[12]。正如 Janet Woodcock（FDA CDER，2004）所提到的，该倡议旨在促进“一个最大限度地高效、敏捷、灵活的制造部门，在没有广泛监管的情况下可靠地生产高质量的药品”^[13]。此外，药品评价和研究中心（CDER）成立了药品质量办公室（OPQ）（2015 年），以确保所有生产场所和人类药品领域的高质量药品的可获得性，如品牌药、仿制药、生物制剂、生物仿制药、非处方药和复合药品^[10]。OPQ 负责通过整合审查、检查、监督、政策和研究，引入全面的质量监督方法，以加强并确保药品生命周期内的药品质量一致。这个“One Quality Voice”战略促进了该机构和制药行业之间的透明度和沟通，简化了监管程序，提高了质量标准，并在 CDER 中建立了质量监督功能^[14-17]。

接着，国际人用药品技术要求协调委员会（ICH）和监管机构引入了最初由 Joseph M. Juran（1970）提出的设计质量（QbD）概念^[18]，通过发布药物指导文件 ICH Q8（药物开发），Q9（质量风险管理），Q10（药物质量体系），Q11（原料药的开发和制造），和 Q12（药品生命周期管理）将 QbD 概念融入制药行业。

QbD 在 ICH Q8 指南中被定义为“基于可靠的科学和质量风险管理，从预定义的目标开始，强调产品和过程理解和过程控制的开发系统方法”^[17, 19]。QbD 理念是使用基于可靠科学和质量风险管理的更全面和系统的方法引入了一个新的质量概念，它不同于传统的“通过测试的质量”监管体系，因为这种方法允许从设计过程的一开始就建立质量和安全^[19-21]。传统上，制造商确定目标产品，定义过程，并根据他们的质量期望测试结果产品。如果产品质量是可接受的，那么制造商锁定过程，并在非常窄的操作范围内进行生产，并遵循“如果过程是一致的，得到的产品也应该是一致的”的基本原则。在过去 30 年里，大多数生物制药公司成功地遵循了这一方法。因此，代替直接测试最终产品的质量(通过测试进行质量测试)，QbD 方法用于从开发过程的非常早期就稳健地将质量构建到产品中^[3]。通过改进对产品和工艺的控制，包括工艺设计中变异性的基础来源，QbD 原则旨在预测设计空间中的关键质量属性，并改进最终药品的质量目标轮廓^[22-24]。

用于开发和制造生物治疗药物的 QbD 方法显著偏离上述的传统方法^[3, 25-28]，如图 1-1 所示。关键内容总结是：(1) 确定对其安全性和/或有效性具有重要意义的产品属性

(即质量目标产品概况 (QTPP) 和关键质量属性 (CQA)) [24, 29]; (2) 流程设计以交付这些属性^[30-33]; (3) 稳健的控制策略以确保过程性能的一致性^[33, 34]; (4) 验证和存档过程, 以证明控制策略的有效性^[35, 36]; (5) 持续监控, 以确保产品生命周期中稳健的过程性能^[37, 38]。此外, 知识管理^[39]、风险评估和管理^[40]、原材料管理^[41, 42]、使用统计方法^[43]和过程分析技术 (PAT) 为 QbD 的实施提供了坚实的基础^[44-46]。

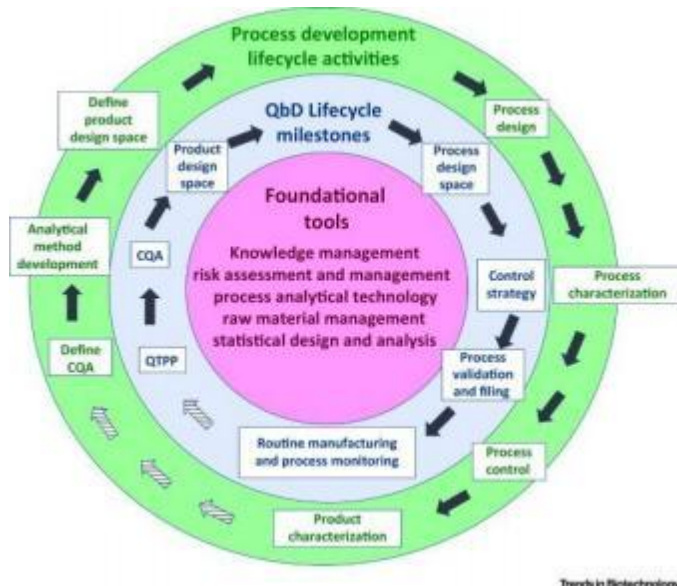
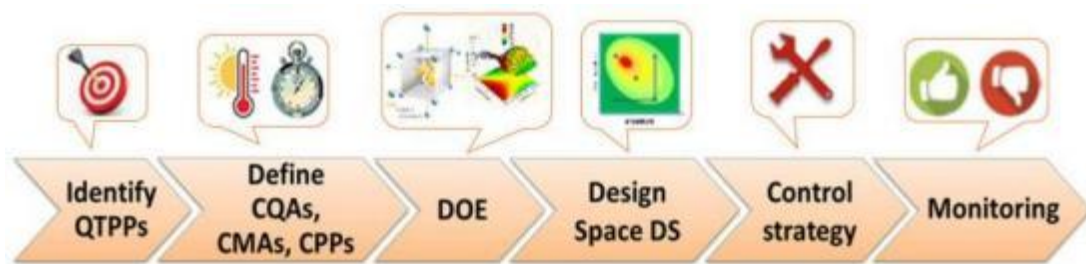


图 1-1 生物技术产品设计实现质量 (QbD) 路线图的说明, 包括风险评估和管理、原材料管理、统计方法和过程分析技术等为一些提供基础支持的元素^[47]

Figure 1-1 Illustration of the Roadmap for Implementation of Quality by Design (QbD) for a Biotechnology Product. Underpinning the steps shown, risk assessment and management, raw material management, statistical approaches, and process analytical technology (PAT) are some of the elements that provide foundational support to the implementation^[47]

1.2.2 基于 QbD 理念的方法学

一般来说, 在药品开发中实施 QbD 的步骤是相似的, 包括使用风险评估来识别风险参数, 定义主要质量目标产品概况 (QTPP), 识别影响工艺性能的参数, 进行 DOE 和定义关键质量属性 (CQA) 对关键材料属性 (CMAs) 和关键工艺参数 (CPPs) 的依赖性, 定义一个过程设计空间, 以产生具有期望的 QTPP 的最终产品, 开发一个风险控制策略来识别变异性的原因, 并持续监控和改进制造过程^[48, 49]。基于 QbD 理念的方法学和流程主要如图 1-2 所示, 具体的方法步骤如下:

图 1-2 开发药品产品设计质量方案^[50]Figure 1-2 Scheme of quality by design for a development pharmaceutical product^[50]

(1) 识别 QTPP

QTPP 包括对临床安全性和有效性的量化支持，并且是设计和优化制剂或生产工艺的基础。QTPP 是一组决定产品质量的属性和特征。根据 FDA 的说法，QTPP 更侧重于化学、制造和控制发展阶段^[51, 52]。QTPP 定义了药品的定量特性，并涉及剂型、应用方式、包装、外观和诊断等规格。QTPP 的实例包括临床使用、给药途径、治疗剂量、药物剂型、药物释放系统、包装容器、影响药代动力学参数的因素以及最终产品的质量标准，如储存期间的稳定性、无菌性和药物释放等。QTPP 仅包括与患者相关的产品属性。QTPP 作为配方和工艺参数优化的指导，以确保 CQA 在期望范围内^[53]。

(2) 识别 CQA

CQA 被定义为“物理、化学、生物或微生物性质或特征，应在适当的限度、范围或分布范围内，以确保所需的产品质量”。在过程开发开始之前，了解产品的 CQA 是很有必要的，因为过程开发应该集中于交付 CQA 所定义的所需产品质量以及所需的一致性^[49, 50]。随着正在进行的非临床、稳定性测试和临床研究的数据的获得和积累，预计将在产品开发的所有关键阶段重新审视 CQA 清单。当发生这种情况时，还需要对过程能力进行评估。

(3) 识别 CPP

CPP 是影响 CQA 的生产参数，应加以控制。例如，在生产过程中，应该对影响最终产品质量的参数进行监控。参数代表一个系统或进程的测量或计算特征。这些是制造系统的参数，通常是影响生产的材料或过程的属性，如温度和组成^[54, 55]。

(4) 识别 CMAs

CMAs 是指必须达到足够限度的材料属性，以保证工艺过程中使用的辅料、药物和其他材料的质量。在开发过程中，理解 CQA(输出数据)和 CMAs(输入数据)之间的差异是很重要的。例如，中间体的 CQA 可能成为下一个生产步骤中中间体的 CMA。

此外，基于 QbD 方法，CMAs 和 CPPs 可能在定义的设计空间中存在差异，而不会显著干扰 CQA。此外，遵循 ICH 指南“质量风险管理”（ICH Q9），识别过程变异性的可能原因并进行有效的风险分析是过程优化的关键。这个过程可以在最初或最后的步骤中执行，根据需要重复或重新定义。因此，最终产品的质量通过之前 CQA、CPPs 和风险评估的确定经验来验证^[18]。

(5) 风险评估

风险评估用于确定什么可能出错，出错的可能性和后果。根据 ICH Q9，风险控制与降低风险应采取的程序有关。本指南提供了常用风险管理工具的示例。在这个阶段，有必要决定哪些风险可以接受，哪些应该最小化。根据实验数据采用方差分析（ANOVA）或多元回归分析进行风险评估。用多元回归分析可以推导出变量之间关系的数学方程。同时使用方差分析，评估各因素的影响和交互作用的统计显著性。在最后阶段，应利用风险评估对结果进行监测，并考虑到以前的知识和经验。识别 QTPP、CQA 和 CPP 需要有经验和知识的积累，通过包括风险过滤、鱼骨图、失效模式和效应分析等各种风险评估工具来进行评估^[35, 36]。

(6) 界定产品设计空间

“设计空间”的概念已经成为医药产品实施 QbD 的工具，在制药行业中占有重要地位。ICH Q8 将设计空间定义为“输入变量（例如，材料属性）和工艺参数的多维组合和交互，这些已被证明可以提供质量保证。在设计空间内工作不被视为变更，移出设计空间被认为是一种变更，通常会启动一个监管的批准后变更流程。设计空间由申请人提出，并接受监管机构的评估和批准^[17, 36]。

设计空间特定于单元操作或单一制造工艺，并定义已知影响产品质量的操作工艺参数。设计空间也可以被认为是 CQA 和 CPP 之间的链接。这是一种展示对过程理解的发展方式，创建一个设计空间的好处是显而易见的。不过，开发设计空间的最重要的一点是证明或确定从 DOE 中排除的未分类参数是非关键的过程参数。因此，实验设计（DoE）筛选可以用来识别工艺参数之间的相互作用。在没有交互的情况下，单变量间隔可以作为非关键参数直接添加到设计空间中。

一旦确定了 CQA，下一步就是定义可接受的 CQA 级别的可变性。此窗口的大小将直接影响流程开发。如果产品设计空间很小（严格的规格），过程也需要控制在非常窄的操作范围内，以确保产品符合规格。相比之下，如果产品设计空间明显较大

（规格较宽），则工艺可以相对灵活。因此，定义产品设计空间可以被认为是过程开发的目标设置。

(7) 界定工艺设计空间

在定义了 CQA 及其可接受的可变性之后，可以进行工艺表征研究，将 CQA 与每个工艺步骤的工艺变量、原料属性和辅料属性联系起来。在 QbD 设计中，这些研究必须使用 DoE 方法进行，这样不仅可以了解各种因素的主要影响，而且还可以了解它们之间的相互作用。这些研究的结果通常是复杂、多维、经验模型的形式，这些模型将不同的 CQA 与各种因素联系起来^[19, 50]。

(8) 界定控制策略

控制策略被定义为“一套有计划的控制，源自对当前产品和过程的理解，以确保过程性能和产品质量”^[22, 29]。控制策略是保证工艺性能和产品质量的重要步骤。应根据产品和工艺信息仔细规划。在 QbD 方法中，在产品开发期间执行控制策略，并允许对产品和过程有更深入的理解。通过提供比标准方法更多的信息，QbD 的控制策略选项更容易用于需要更多时间和专业知识的领域。在这种新颖的药品质量方法中，通过识别和控制配方和生产变量的最佳范围来建立成品质量。最终对成品进行测试，以确认产品质量。制定有效的控制策略应以风险为基础，以确保满足产品质量要求。控制策略的制定从 QTPP 开始。最初的研究集中于活性成分的表征以及调配物的重要物理、化学、生物和微生物性质。此阶段还定义了流程的开发。例如，如果活性成分在水中溶解度低，则立即释放片剂形式必须确保药物有足够的溶解。在早期阶段进行的毒性研究提供了活性成分杂质谱的基线评估。了解杂质的产生和去除，控制策略的要素将在哪个阶段发生，以及制定验收标准和纳入规范的方法将提供一个重要的观点。虽然应使用这些步骤来制定控制策略，但也可以使用 ICH Q9 中定义的质量风险管理原则来制定控制策略。在生产过程中，连续控制策略有助于理解和稳定过程。为了支持在控制策略中使用 QbD 方法，修改药品质量体系是非常重要的。在商业化生产过程中，应使控制策略的更新、修改或持续改进成为可能。当产品信息、文件和操作程序必须更改时，药品质量体系应提供所需的适当的技术和行政审核，以获得必要的审查和批准^[31, 32, 34]。

一旦控制策略被定义和实施，就需要对产品质量进行适当的监控，以证明所设计的过程能够始终如一地交付可接受质量的产品。

1.2.3 基于 QbD 理念的重要意义

随着 2004 年 PAT 指南的发布，QbD 被引入生物技术制造业。在过去的十年中，生物技术行业及其监管机构共同努力，有效地阐明了 QbD 实施的路线图。基于 QbD 的概念已经被广泛接受，并且大多数主要的制造商正处于将 QbD 集成到各种工作流程的高级阶段。

QbD 的实现有几个驱动因素^[18, 50-53]。第一，因为已确定的关键工艺参数（CPP）会影响 CQA，更广泛的操作范围（OR）会被设计在 QbD 中。这与传统制造相反，在传统制造中，所有工艺参数的 OR 值都很窄，因为从业者不知道哪些是关键。第二，在 QbD 中更可能有更广泛的产品规格，因为它们是基于过程和产品知识设置的，从而以更广泛的 OR 形式产生更大的操作灵活性。第三，基于 PAT 的动态控制策略可以创建一个更稳健的过程，能够始终如一地交付期望的产品质量。第四，在 QbD 中按照 PAT 模式进行实时或接近实时的产品质量测试可能会显著减少批次失败。第五，QbD 的监管文件是基于知识的，重点是阐明过程和 CQA 之间的联系，以及 CQA 和产品的安全性和/或有效性之间的联系。这与传统的归档不同，在传统的归档中，所有 CPP、非 CPP、CQA 和非 CQA 都被列出，因此，如果需要任何工艺变更，则需要在归档中进行变更。这种传统归档一直是生物技术行业的一个巨大负担，也是该行业往往过于保守和普遍抵制采用新技术和实践的原因。第六，由于制造偏差更少(因为有着更广泛的 OR 和规格)，QbD 可以实现整个产品生命周期的高效制造。因为制造商已经有了说明偏差对产品质量影响的数据，所以在生产过程中遇到的任何不符合情况都可以相对快速地解决。最后，从生产力和经济方面，QbD 有望产生一个更优的过程。这是由于在实验期间广泛使用 DoE，从而确保选择的最优是全局最优，而不仅仅是局部最优，而且过程是稳健的，不需要非常昂贵的返工。

1.3 商业化质粒生产工艺研究进展

1.3.1 商业化质粒生产研究进展

随着日益增长的需求，细胞与基因疗法药物研发已进入快车道，而质粒 DNA (pDNA) 可以说是细胞与基因疗法的基础^[56]。自 20 世纪 50 年代发现质粒以来，质粒已经影响了分子生物学的许多领域，成为一个重要的基因工程工具。pDNA 可用于克隆、扩增和表达目的蛋白；病毒载体和 mRNA 的生产也需要 pDNA；GMP 级别的 pDNA 还可用于 DNA 疫苗、基因治疗和细胞治疗等领域^[57, 58]。

质粒 DNA (pDNA) 是一类存在于古生菌、细菌以及部分酵母宿主细胞内独立于染色体外自主复制并稳定遗传的环状双链 DNA 分子，其包含至少一个复制起点，可独立自主复制，一个细胞可以包含单个质粒的多个拷贝^[59]。经过基因工程改造后可以接入外源 DNA 作为基因载体，转入宿主细胞^[60]。

在过去的几十年中，质粒 DNA (pDNA) 成为了遗传学和分子生物学以及最近的基因治疗和核酸疫苗中最重要的工具之一^[61]。裸质粒 DNA (pDNA) 疫苗更是在 20 世纪 90 年代首次受到关注，这是生物治疗市场出现的特定趋势的结果，即寻找内在安全的疫苗，可以在大流行危机的情况下经济生产。它们在预防和治疗方面的潜力很快得到了确认，所有临床研究都表明它们是安全的^[62]。在制药应用中，质粒的使用包括直接和间接两种方式，如质粒直接给药给患者，即患者体内将含有 DNA 本身，对于此类应用，如 DNA 疫苗，完整良好的生产规范 (GMP) 是绝对必要的，因为 DNA 本身就是活性药物成分 (API) ^[63]。另一种方式是间接方式，即 pDNA 不直接用于患者给药，而用于生产转染细胞的病毒载体或治疗性蛋白质，或用作模板以生产 mRNA，即其不是 API，而作为 API 生产的原材料或起始物料，但即使在这种情况下，质粒产品也需按照特定监管要求（在质量控制和过程记录方面），符合适用的标准^[64, 65]。对于质粒 DNA (pDNA) 在临床中的应用，无论是作为活性药物成分 (API) 还是作为工艺中间体，都具有三大要求：纯度高、稳定性好、完整性高^[66]。

科研实验室的质粒制备常使用市售提取试剂盒，但这种方式不适用于需要数毫克或数克规模的工业化质粒生产^[65, 67]，而且更重要的是，实验室方法制备的质粒在纯度和安全性等质量方面的可重现性较低，而这对于制药应用是一个先决条件。

鉴于 pDNA 在当前先进疗法开发中的广泛应用，其已成为下一代生物制药应用中的关键物料，行业对高质量 pDNA 的需求也在不断增加，所以，其生产必须实现更高的效率和生产力。

1.3.2 质粒生产工艺研究

对于医药行业而言，高质量 pDNA 即要求有着稳定性高的生产工艺、流程方法、监管机制等到，其生产过程也是有着严格的步骤和严谨的流程。图 1-3 是典型生产过程中的工艺步骤示例^[68]。该工艺主要包括试运行，大肠杆菌细胞库建立，大规模发酵应用，细胞收获和碱裂解，下游纯化和灌装，每个工艺步骤都伴随着全面的过程控制。整个生产工艺有个多个关键步骤和因素影响，这些都与 pDNA 最终的产量和质量息息相关。详细方面如下列举：



图 1-3 质粒 DNA 制造过程流程图。该工艺包括试运行，大肠杆菌细胞库，大规模发酵，细胞收获和碱裂解，色谱和填充整理，每个工艺步骤都伴随着全面的过程控制^[68]

Figure 1-3 Flow chart of a plasmid DNA manufacturing process. The process comprises a pilot run, *E.coli* cell bank, large scale fermentation, cell harvest and alkaline lysis, chromatography and fill and finish. Each process step is accompanied by comprehensive in-process controls^[68]

(1) 宿主细胞的选择

宿主细胞的选择是生物药生物工艺的决定性因素之一，而质粒的产生是菌株/质粒依赖性的，因此为特定目的质粒选择合适的菌株至关重要，合适的宿主菌株的特性包括被质粒转化的能力以及其培养至高生物量的可行性。由于大肠杆菌（*E.Coli*）有大量可用的生物信息以及在 pDNA 生产中的用途，根据实验室用途和商业可用性，已经有多种菌株被选择用于生产 pDNA，可用的商业化菌株包括 JM108、DH5 α 、GALG20、BL21(DE3)、SCS1-L 和 DH10B 等^[69]。

拷贝数表示存在于细菌细胞中的质粒的平均数量，主要由 pDNA 复制起点决定，但也受生长条件下温度的影响^[70]。拷贝数可分为低等：15-20、中等：20-100 或高等 500-700。表面上，pDNA 生产需要高拷贝数，事实上，高质粒拷贝数的优点在于两方面：（1）随机分区时 pDNA 的稳定性更高；（2）促进下游纯化，因为 pDNA 通常只占大肠杆菌细胞裂解物大分子的不到 3% 的大分子。连接到非常大的 DNA 插入片段时，高拷贝数质粒可能会以中等或低拷贝水平复制，从而导致 pDNA 产量低于预期。这种产量下降是因为质粒复制是宿主细胞的代谢负担，最终，培养物将由现有的无质粒细胞主导，导致质粒产量低。如果是这种情况，则可以使用较低拷贝数的质粒骨架。

此外，由于将 pDNA 引入 *E.Coli* 会导致代谢负担，通常反映为生长速率和生物量的降低，以及乙酸产量的增加^[71, 72]。在整体生理水平上了解质粒生产的影响机制是一项不小的挑战，但这些知识可以为进一步的细胞工程提供有用的信息，如已有研究通过基因敲除或基因过表达，来减轻宿主生物的代谢负担或指导宿主机制进行 pDNA 的复制，从而提高 pDNA 产量。然而，对宿主细胞的工程处理也可能导致过度修饰，从而难以控制和预测宿主中发生的生理活动^[73]。控制宿主细胞的能力在大规模生物工艺操作中非常重要。

对于 GMP 生产，需建立主细胞库（MCB）和工作细胞库（WCB），以确保可重复的细菌生物的大规模培养，细胞库需经过全面的表征，满足充分的质量标准，包括宿主一致性、质量产量一致性、细胞库的纯度以及容器的检测等，并适当储存，以用于后续生产^[66, 74]。

(2) 培养工艺和发酵策略

用于重组蛋白生产的成熟培养技术也可同样适用于生产 pDNA^[75]。然而，由于各种治疗用途需要大量的质粒，因此需要提高 pDNA 的生产效率。已有多种方法已被提出用来提高 pDNA 的生产能力，包括单位体积 pDNA 产量以及细菌细胞特异性生产力。

多个参数会影响细菌生产力，如主细胞库选择、生长速率、培养基、补料速率以及适当的生长条件和参数，如 pH、渗透压和温度^[76, 77]。

培养基是细胞生长和细胞中物质合成的营养来源，因此，行业一直在尝试优化用于 pDNA 生产的培养基的配方^[78]。一般培养基成分由碳源、氮源、硫酸镁以及矿物质

等组成。可以使用基础培养基或半组分培养基。使用基础培养基，可以获得高度可重复的批次，而半组分培养基可以支持更高的细胞密度，因为其成分更为复杂，如酵母提取物，可提供生长因子、氨基酸、嘌呤和嘧啶。培养基中的碳氮比（C:N）会影响 pDNA 产量，在特定的碳氮比下，质粒产量增加。也有报道称，添加优化浓度的谷氨酸和氯化铵可以提高 pDNA 的产量。而添加酪蛋白氨基酸的半组分培养基有助于获得高产量和 pDNA 稳定性^[79, 80]。

提高 pDNA 产量的方法之一是诱导性扩增，对此，已经研究了多种物理和化学方法。长期以来，氯霉素一直用于诱导质粒扩增，因为它会阻止蛋白质合成。在培养物中加入氯霉素可使质粒拷贝数增加 50 倍。然而，由于监管原因以及这种方法的具体实施较为困难，正被避免使用。虽然氨基酸是细胞生长的必需营养素，但氨基酸剥夺和限制可诱导质粒扩增，如在组氨酸存在的情况下，亮氨酸剥夺会诱导质粒扩增，而组氨酸和甘氨酸则与生物量增加有关。另一种有效策略是温度调节，研究显示，对于特定的质粒，温度调节可使拷贝数提高约 20 倍^[81]。

提高 pDNA 产量的另一种基本方法是提高与其直接相关的细胞生物量，即高细胞密度是生产 pDNA 所必需的^[82]。已经尝试了多种方法来提高生物制药生产的生物量浓度，例如采用补料分批发酵模式、灌流培养发酵策略以及宿主细胞修饰。

高碳源的批次培养已被尝试用于在发酵过程中提高生物量，然而，当以高浓度葡萄糖作为碳源时，会导致溢出代谢，致使细胞内乙酸和其它代谢物的累积，而进一步抑制细胞生长，限制了可达到的生物量^[83]。有研究尝试使用甘油替代葡萄糖作为碳源，以试图降低溢出代谢，这会导致生长速率降低，但有利于质粒产量。补料分批培养已被研究作为一种通过提高生物量而增加质粒产量的策略。一些研究已经成功地实施了用于 pDNA 生产的补料分批培养。观察到的生物量的增加是由于在几个小时内控制了碳源摄入，从而为质粒复制和细胞生长留出了时间。灌流培养已成熟用于基于重组蛋白的生物药生产，对于质粒生产可能也是一种极具吸引力的替代模式，有研究使用开发的指数-补液灌流（EFP）策略，获得了 3.0mg/L/h 的质粒产量，以此性能指标衡量，生产力提高 1.5 倍，进一步优化有潜力在资本投入和运营成本方面突显经济性优势^[84, 85]。

目前优化的 *E.Coli* 发酵通常可达到 40-60g/L 生物量, pDNA 产量可达到 0.5-1g/L, 结合宿主细胞和载体工程, 并进一步优化发酵策略^[86, 87], 可能可达到>2g/L。

发酵规模放大需保持最佳且均质的反应条件, 以最大限度地减少 *E.Coli* 应激条件暴露并提高代谢准确性, 从而提高产量并确保一致的产物质量^[88]。需要通过全面且详细的工艺表征, 鉴定影响产物产量和质量的最相关的过程参数, 并将其作为规模放大参数而尽可能保持恒定, 从而制定合适的策略。工艺表征可通过在线或近线检测收集的实时或近实时数据, 并结合支持性方法和工具来进行, 例如化学计量学数据分析和建模, 以及通过计算流体动力学和规模缩小模型阐明混合和液流条件。为了确保直接且成功的规模放大, 发酵设施需严格按照放大标准设计, 以降低不同培养罐中工艺条件的差异性, 同时充分考虑发酵参数之间高度复杂的相互依赖和相互作用^[89, 90]。

(3) 细胞收获和裂解

离心是最为常见的 *E.Coli* 发酵液收获方式, 在实验室规模条件下, 其可实现简单、快速的料液处理, 对于生产规模, 可选择大型碟片式离心机或连续流离心机, 其挑战在于较高的固定资产成本投入、较高的能耗以及可能涉及较为繁琐且需开放式处理的手动操作步骤。切向流过滤技术是另一种可简单规模放大且可实现连续封闭式操作的策略, 在此过程中, 也可将培养基置换至后续裂解步骤所需的缓冲液体系^[91, 92]。

在重组蛋白生产中使用的机械裂解方法可用于核酸的分离。但是, 蛋白质工艺中使用的高剪切条件可能会导致核酸降解。所以, 目前常用的方法是传统的碱裂解方式^[93], 利用酶、表面活性剂、碱液等使细胞膜、细菌胞壁等破裂, 或是改变细胞壁或细胞膜的通透性, 最终使大部分细胞壁及细胞膜成分裂解, 适合较大规模生产。通常使用 pH12、0.1-0.5 NNaOH 溶液进行, 结合使用 0.1-0.2% SDS 或 TritonX100 形成碱性条件, 大肠杆菌的蛋白质、RNA、宿主 DNA 和质粒释放至溶液中并变性。加入中和液后, 质粒 DNA 可以复性并保持溶解性, 大量变性的蛋白质和宿主 DNA 通过疏水作用结合在一起而沉淀下来。这种方法的规模放大会有一定的挑战, 因为粘度增加可能会在混合过程中导致对 pDNA 的剪切。此外, 在大规模条件下可能存在 pH 梯度, 需保证充分但不过于强烈的混合。而裂解过程的时间也可直接影响 pDNA 的质量和数量, 如时间过长, 可能导致 pDNA 不可逆地变性。所以, 良好设计的混合设备和仔细控制的裂解参数是成功的关键。

(4) 澄清

细胞裂解后，将需要除去固体。由于裂解液的粘性，这将是一个非常关键的步骤。可使用离心或特定孔径规格的深层过滤器去除杂质。最近，絮凝被报导用于过滤操作的预处理步骤。还有一些策略通过使用高盐缓冲液和离液剂进行沉淀来去除污染物^[94, 95]。通常，澄清后的细菌细胞碱裂解液中，仅约 3%的内容物为 pDNA，而剩余的 97% 为其它杂质，包括蛋白质 65%、RNA 25%、内毒素 4% 以及基因组 DNA 3%^[6]，这种复杂性也是 pDNA 下游工艺的挑战所在，其它挑战还包括其本身较大的粒径、高粘度、剪切敏感性以及与杂质的相似性。

(5) 切向流过滤

切向流过滤是一种可简单规模放大且经济高效的 pDNA 浓缩以及缓冲液置换技术，并可通过合适膜 MWCO 的选择，部分去除线性 DNA、RNA 以及内毒素等杂质，截留 pDNA。切向流过滤操作的一个挑战是该步骤过程中料液不断增加的粘度以及 pDNA 的剪切敏感性^[90, 91]。且在某些情况下，由于 pDNA 的结构特性或由于更高的离子强度所导致的有效粒径的较低，pDNA 可能会穿过比其粒径更小的膜孔而导致损失。因此，鉴于 3-5X 的膜孔选择经验法则，为保证收率，可选择该范围的低值^[96]。

(6) 层析

最终的 pDNA 必需符合预先确定的质量要求，如无宿主细胞蛋白质、基因组 DNA、RNA 以及内毒素，且针对特定应用，可能要求超螺旋 pDNA 百分比>90%，所以，pDNA 工艺流程中包含层析步骤被认为是生产高效且安全的 pDNA 的基本要求。鉴于杂质的复杂性及其与目标 pDNA 的相似性，可选择不同模式层析策略的组合^[97, 98]。

阴离子交换层析（AEX）利用带负电荷的质粒和带正电荷的固定相之间的静电相互作用，能够从开环 pDNA 和裂解液的其它成分中选择性分离超螺旋 pDNA，但电荷和结构与 pDNA 相似的生物分子，如 gDNA、内毒素和一些 RNA 会共纯化，且 pDNA 的结合载量低^[99]。常与 AEX 组合使用的策略是疏水作用层析（HIC），其利用单链核酸杂质(RNA、变性 gDNA 和变性 pDNA)和内毒素的疏水性，促进结合，并通过疏水性支撑物阻碍这些杂质的流动，其可从内毒素和单链核酸中分离 pDNA，但需要在高盐浓度下进行洗脱。亲和层析（AC）可在单个纯化步骤中获得高纯度的超螺旋 pDNA，

并可确保产品在监管机构的标准之内，其利用基于分子识别的自然生物过程，选择性纯超螺旋 pDNA，但其使用的生物性配基可能不稳定，且通常结合载量较低^[100]。另一种可良好去除 RNA 和蛋白质的方法是尺寸排阻层析（SEC），其利用了 pDNA 与其它杂质之间不同的流体动力学粒径，但较难去除 gDNA。

(7) 除菌过滤

除菌过滤旨在截留细菌，确保无菌性。pDNA 较大的粒径、纯化后的纯度以及缓冲液的组成，可能影响过滤器的处理量，导致较低的流速，并降低步骤收率。选择合适规格的过滤器前，需综合考虑这些因素，以实现除菌级过滤性能的最大化^[101]。

(8) 储存

用于制药应用中直接或间接用途的 pDNA 产品需要适当的储存系统，其需可监测和报告储存条件，以符合完整的 GMP 要求。需进行特定的评估研究，以确定最佳储存条件。对于在 -20°C 受控条件下储存的 pDNA，分析表明，开环和超螺旋或共价闭环环状形式的比例保持不变，没有 pDNA 的线性化或降解，DNA 的转染显示表达性能不变，即该储存条件有效地保持了 DNA 的完整性^[102, 103]。

1.3.3 商业化质粒的质量要求

鉴于 pDNA 的不同用途，如在药物开发中是用作原材料/关键起始物料、中间体、药物底物还是药物产品，监管机构和/或 pDNA 采购方会有不同的质量标准和预期，但包括 DNA 浓度、生物负荷、无菌性、内毒素（如 <0.1 EU/ug 质粒或 <5 EU/kg 体重）、纯度-残留宿主细胞蛋白质（如不可检测或 <0.01 μg/剂）、基因组 DNA（如 <0.05 μg/ug 质粒或 <0.01 μg/剂）、RNA（如不可检测）和一致性等放行检测是普遍要求^[104, 105]。

1.4 本论文的研究目的和内容

1.4.1 研究目的

细胞与基因疗法的市场愈发火热，已经迈入快速增长的黄金时代。面对如此逐步庞大的市场，基因治疗领域中最常用的载体 AAV、慢病毒和 mRNA 疫苗的生产都需要质粒作为重要的制药原材料，因此每年需要大量符合质量要求的质粒来满足基因治疗领域中的市场需求，由此可见质粒在工艺生产的市场中需求强劲。面对日益增长的产能需求，国内企业纷纷扩大产能，但基于市场大小和发展历史的不同，眼下与国外的整体生产工艺水平存在差距。若想在该领域内实现弯道超车，要不断取其精华，不断总结宝贵的经验，以此加速国内质粒的生产发展。

本文主要从商业实际问题出发，基于 QbD 理念重新梳理了 pDNA 质粒商业化生产整个流程和控制，以大肠杆菌为宿主菌株，期待通过生产工艺的研发和优化，制备大批量符合各项要求的标准 pDNA，以满足临床与商业端的质粒需求。通过对上游发酵工艺控制，尽可能使生物量与质粒拷贝数最大化，从而给后续工序提供充足的输入原料。通过碱裂解工艺各条件的控制，提高超螺旋质粒产率，同时尽可能减少其他杂质含量。最后通过三步层析，得到了符合质量要求的质粒载体。

1.4.2 研究内容

本文立足于目前商业实际需求，拟从以下几个方面为主要研究内容来解决 pDNA 质粒在工艺生产的市场中需求强劲问题：

研究内容 1：以质量源于设计（QbD）的理念进行工艺开发，首先列出质粒载体产品的目标产品质量概况（QTPP），评估得出产品的关键质量属性（CQA），采用失效模式与影响分析（FMEA）进行风险评估，并列出影响质粒载体产品质量的关键材料属性（CMA）、关键工艺参数（CPP），对高风险项材料进行相应控制，并通过实验设计，进行工艺研究及优化，最终确认质粒载体关键工艺参数(CPP)。

研究内容 2：以 QbD 理念确定的 CPP 为基础，通过培养基的优化、补料方式的优化和发酵参数的优化来进行上游发酵工艺的整体优化，以达到生物量与质粒拷贝数最大化，从而给后续工序提供充足的输入原料。

研究内容 3：在菌体收集与破碎工艺过程中，采用切向流超滤工艺，通过浓缩参

数、裂解参数、搅拌参数的优化实现超螺旋质粒产率的提高目的。

研究内容 4：通过优化经典的三步层析法，达到有效去除 RNA、去除线性和开环质粒、提高超螺旋质粒比例、与降低内毒素、宿主蛋白及宿主 DNA 残留水平的目的，
得到符合质量要求的质粒载体。

1.4.3 创新点

在质量源于设计（QbD）理念的指导下，本研究将商业化质粒生产工艺与设计实验方法（DoE）相结合，为高质量的商业化质粒研发提供了科学的理论依据。这种方法不仅与当前工业界的倡导理念相符，还能够把握行业发展的脉搏，并具备一定的前瞻性。通过将商业化质粒生产工艺与 QbD 理念相结合，我们能够更加有效地探索如何提高质粒生产的质量，并为相关产业的发展提供持续的动力。

第 2 章 基于 QbD 理念的商业化质粒工艺研究策略

2.1 引言

随着细胞和基因疗法药物研发领域的迅猛发展，pDNA 作为其基础之一，正越来越受到重视。符合 GMP 标准的 pDNA 在病毒载体、mRNA、DNA 疫苗、基因治疗和细胞治疗等重要领域也起到关键作用。随之面临的问题即是制备大批量符合各项要求的标准 pDNA，以满足临床与商业端的质粒需求。因此，本章基于 QbD 的理念对质粒工艺开发进行全盘梳理，首先罗列出质粒载体产品的 QTPP，评估得出产品的 CQA，然后采用 FMEA 模式进行风险评估，得到影响质粒载体产品质量的 CMA 和 CPP，对高风险项材料进行相应控制措施，以此进行工艺研究及优化。

2.2 质粒产品的目标质量概况

本工艺开发产品的为基因工程质粒载体无菌溶液，用于将目标基因导入哺乳动物细胞中最终形成无菌细胞制剂注射入人体，或用于转染到哺乳动物细胞中包装成携带目标基因的基因工程病毒，再通过该病毒导入哺乳动物细胞中最终形成无菌细胞制剂注射入人体，从而产生药效，是基因、细胞治疗生产过程中重要的无菌原材料。因该产品并非药物，也不是原料药，无法制定适应症、禁忌、相互作用等药学指标。，包装形式为冻存管或西林瓶。因此，本质粒产品的目标质量概况如下表 2-1 所示。

表 2-1 质粒产品的目标质量概况

Table 2- 1 Target quality profile of plasmid products

项目	分类	标准
超螺旋	有效性	>80%
基因一级结构	有效性	一级序列与原质粒设计一致
支原体污染	安全性	不得检出
微生物污染	安全性	应无菌生长
内毒素含量	安全性	<100EU/mg1
HCD、HCP、RNA 等杂质项	安全性	具体情况具体分析

2.3 关键材料及关键工艺参数风险评估

2.3.1 失败模式与风险分析(FMEA)

应用 FMEA 模型识别潜在的失败模型，用于识别、分析和评价潜在的风险。从风险严重性（表 2-2）、发生的频率（表 2-3）及可检测性（表 2-4）进行评分。

表 2-2 严重程度评估表

Table 2-2 Severity assessment form

严重程度描述	定量评估
对产品质量、效力和安全有重大影响，将导致产品召回	5
对产品质量、效力和安全有影响，将导致产一个关键的偏差	4
对产品质量、效力和安全有轻微影响，将导致产一个主要的 的偏差	3
对产品质量、效力和安全有微不足道影响，将导致产一个轻 微偏差	2
对产品或工艺没有明显的影响	1

表 2-3 危害发生可能性评估表

Table 2-3 Hazard probability assessment table

发生可能性描述	定量评估
发生几乎是不可避免的	5
偶尔发生	3
基本不会发生	1

表 2-4 危害的可检测性评估表

Table 2-4 Hazard detectability assessment form

可检测性描述	定量评估
现场无检测	5
明显的缺陷且可能被检测到	3
很容易被发现	1

2.3.2 风险评估标准

根据上述的风险严重性、发生的频率及可检测性对失败模型进行评分，以此来评估风险优先值，风险优先值（RPN）=严重性×发生率×可检测性。最后根据表 2-5 的风险评估标准进行风险接受评估及采取措施评估。

表 2-5 风险评估标准

Table 2-5 Risk assessment criteria

风险	风险水平	风险接受	是否采取措施
低	$1 \leq RPN \leq 24$	可以接受	无需采取行动，但可以考虑
中	$25 \leq RPN \leq 74$	不可接受	考虑采取相应的行动
高	$75 \leq RPN \leq 125$	不可接受	必须采取相应的行动

2.4 关键材料属性风险评估

2.4.1 关键物料风险评估表

根据 FMEA 风险评估方法，对风险水平为中、高的材料的评分，整合成表 2-6。

种子会直接影响产品的产量和质量，一旦存有安全性风险必将影响整个工艺，因此种子有效性和安全性评估均为中。胰蛋白胨是微生物发酵常用氮源成分，动物源蛋白胨可能引入外源病毒，因此为高风险项。三羟甲基氨基甲烷、乙二胺四乙酸二钠、盐酸作为终产品溶液成份，会进入到质粒产品的终端应用，因此具有较高风险，需要通过风险控制来降低风险。

表 2-6 关键材料风险评估表

Table 2-6 Risk assessment form for critical materials

阶段 分类	评估内 容	有效性评估		安全性评估		影响 CQA
		风险值	风险	风险值	风险	
		RPN	水平	RPN	水平	
种子	种子	45	中	45	中	一级序列、支原体和微生物污染
WCB						
培养	蛋白胨	45	中	75	高	外源病毒

基成分	酵母粉	15	低	15	低	NA
	氯化钠	9	低	9	低	NA
	七水合磷酸氢二钠	9	低	9	低	NA
	磷酸二氢钾	9	低	9	低	NA
	甘油	9	低	9	低	NA
	无水硫酸镁	9	低	9	低	NA
	消泡剂	9	低	9	低	NA
	三羟甲基氨基甲烷	9	低	9	低	NA
	乙二胺					
	四乙酸二钠	9	低	9	低	NA
	葡萄糖	9	低	9	低	NA
	氢氧化钠	9	低	9	低	NA
	十二烷基硫酸钠	9	低	9	低	NA
	乙酸钾	9	低	9	低	NA
	冰醋酸	9	低	9	低	NA
	盐酸	9	低	9	低	NA
	硫酸铵	9	低	9	低	NA
	三羟甲基氨基甲烷	15	低	45	中	内毒素
	烷					

成分	乙二胺					
	四乙酸二	15	低	45	中	内毒素
	钠					
	盐酸	15	低	45	中	内毒素

2.4.2 关键材料属性风险控制

通过物料属性风险评估表，可以判断在质粒生产工艺中，工作种子、蛋白胨及三种终端产品成分的风险较高，需要进行风险控制。

工作种子作为工艺的关键起始物料非常重要，对质粒载体产品的有效性和安全性都有影响，故要求对使用的 WCB 建立完善的质量控制及放行标准。蛋白胨作为发酵氮源，主要关注其安全性风险，这里可以选用无动物源成份的蛋白胨，以降低外源病毒污染的风险。而作为终产品成分的三种试剂，应选用尽可能高安全级别的物料以降低风险。

通过以上措施有效降低风险值，降低关键材料对产品 CQA 产生负面影响。

2.5 关键工艺参数风险评估

2.5.1 关键工艺参数风险评估表

根据风险评估中有效性和安全性打分评估，结果整合成表 2-7。确定了工艺过程的风险水平，其中任一评分为高和中的项目暂定为关键工艺步骤，会在工艺开发过程中对控制参数进行系统研究，通过工艺控制来降低风险，力求工艺的稳健和可放大。

表 2-7 有效性及安全性评估表

Table 2-7 Efficacy and safety evaluation form

工艺 段	评估内容	有效性评估		安全性评估		影响的 CQA
		风险 值 RPN	风险水 平	风险值 RPN	风险 水平	
一级	解冻温度	3	低	1	低	NA
	接种比例	3	低	1	低	NA

工艺	评估内容	有效性评估		安全性评估		
种子制备	培养条件	3	低	1	低	影响NA
	培养终点	9	低	3	低	NA
	培养基配方	3	低	1	低	NA
发酵	接种比例	3	低	1	低	NA
	发酵条件	8	低	1	低	NA
	补料策略	27	中	3	低	NA
	发酵终点	27	中	3	低	NA
超滤 1	剪切力	9	低	1	低	NA
	洗滤倍数	9	低	3	低	NA
	浓缩倍数	9	低	1	低	NA
碱裂解	菌处理浓度	45	中	75	高	超螺旋比例
	裂解温度	27	中	45	中	超螺旋比例
	剪切力	75	高	75	高	超螺旋比例
	裂解时间	15	低	25	中	超螺旋比例
GF 层析	上样量	5	低	25	中	超螺旋比例
	溶液电导	5	低	5	低	NA
	线性流速	5	低	3	低	NA
	柱压	9	低	9	低	NA
AC-层析	上样量	5	低	5	低	NA
	溶液 pH 及电导	25	中	25	中	超螺旋比例
	线性流速	5	低	5	低	NA
	柱压	15	低	9	低	NA
IEX-层析	上样量	5	低	5	低	NA
	样品 pH 及电导	15	低	15	低	NA

	评估内容	有效性评估		安全性评估		
工艺 段	溶液 pH	5	低	25	中	内影毒响素的、HCD
	及电导					
	线性流速	5	低	5	低	NA
	柱压	9	低	5	低	NA
	浓缩倍数	5	低	9	低	NA
超滤 2	洗滤倍数	15	低	9	低	NA
	浓缩终点	5	低	3	低	NA
	制剂	5	低	5	低	NA
无菌	过滤压力	3	低	5	中	微生物污染
分装	分装规格	3	低	3	低	NA
冻存	保存条件	3	低	3	低	NA

2.5.2 关键工艺参数风险控制

一级种子的解冻、接种以及培养条件等评分为低，制备一级种子主要是通过活化菌种提供足够的菌体支持发酵步骤，文献报道种子质量主要影响发酵产量，但未见文献报道与杂质、质粒质量相关，因而在工艺过程中并未做非常详细的研究，参照大肠杆菌常用的解冻及培养方法。上游发酵工艺开发主要目的为提供足量质粒输入至下游工艺，主要将研究菌重和超螺旋质粒的关系，需要通过研究补料策略等发酵条件优化找到最佳的发酵策略以支持产量相关的工艺指标。

其中质粒生产工艺中，FEMA 分析评分最高为碱裂解工序，根据评估表裂解效率受到裂解工艺段的多个工艺参数的影响，是一个综合了多个工艺参数效果的 CPP，如剪切力、裂解温度和时间等。通过工艺优化，控制裂解参数，以达到裂解充分且产生尽可能高比例超螺旋比例输出至后续工艺中，减轻下游纯化工艺难度。在裂解过程中，无法避免产生基因组 DNA 及开环质粒等杂质，通过工艺优化仅能优化杂质的比例。在此工艺中引入亲和层析用于不同 DNA 构型的分离效率以保证终产品纯度合格，由于亲和层析的高特异性，能特异性吸附超螺旋质粒，综合分析碱裂解一步进行工艺控制后为风险较低。

层析主要采用 GE 三步法层析，本工艺开发过程中主要测试工艺的稳健性，通过使用不同分子量大小的质粒测试该工艺的稳健性，以终产品达到既定质量指标为接受标准。在此下游工艺中，离子交换层析中电导和 pH 风险评估为中度，我们通过多批试验确定其电导和 pH 范围，从而控制工艺稳健。

过滤除菌选用 0.22 μm 孔径通过除菌验证的滤器，A 级环境进行除菌以降低染菌风险。

2.6 本章小结

在本章节中以 QbD 的理念进行工艺开发，通过列出质粒载体产品的 QTPP，评估得出产品的 CQA，采用 FMEA 模型进行风险评估，并列出影响质粒载体产品质量的 CMA 与 CPP。最后通过分析评估得出发酵上游的补料策略、发酵终点，碱裂解中的剪切力、裂解温度和时间，下游纯化工艺中的电导和 pH 皆为关键工艺参数，需要在后续工艺优化中重点关注和控制。

第 3 章 基于 QbD 理念的商业化质粒上游发酵工艺条件的优化开发

3.1 引言

质粒一级序列是本工艺目标产品至关重要的质量指标，而质粒在菌株内扩增是可能引入突变导致一级序列变化。常用的质粒扩增菌株为大肠杆菌，大肠杆菌的基因型背景非常清晰，且大多数均进行了基因修饰，其中 *endA1* 突变使内源核酸内切酶失活，有助于提高质粒的产量与质量；*recA1* 与 *hsdR17* 突变则可避免不期望的基因重组以及目的质粒 DNA 修饰、切割的发生。从原理上，质粒在这些经过基因修饰的菌株中扩增一级序列稳定性很高。

本工艺涉及的目的质粒均含有 ColE1/pBR322 复制起始位点（ORI），该复制起点为高效复制起点，是质粒在大肠杆菌内高效复制的关键因素，保障质粒在大肠杆菌里维持在较高拷贝数，但由于目的质粒在大肠杆菌中复制时仅由一个复制起点双向起始，因此不同大小、不同序列的目的质粒在 JM109 中的复制可能存在差异（如不同发酵时间下拷贝数的变化），发酵菌液中目的质粒产量也存在差异。

根据该工艺既定目标，期望最终获得至少 200 mg 质粒，下游纯化保守收率按照 35% 计算，则上游发酵至少要 570 mg 质粒，碱裂解法测定每克湿菌体质粒浓度为 0.78 mg/g WCW，以 0.78 mg/g WCW 保守计算上游发酵所需菌体量为 730 g 湿菌体。以至少发酵得到 730 g 湿菌体为工艺开发目标，优化上游工艺发酵参数。

3.2 实验材料与实验方法

3.2.1 实验试剂

表 3-1 实验试剂

Table 3-1 The main reagents of the experiment

药品名称	货号	公司
大豆蛋白胨	BD-212488	麦克林有限公司
酵母粉	Oxoid-LP0021	OXOID LIMITED

氯化钠	10019318	国药集团化学试剂有限公司
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	国药-10017632	国药集团化学试剂有限公司
KH ₂ PO ₄	国药-10017618	国药集团化学试剂有限公司
甘油	国药-10010618	国药集团化学试剂有限公司
泡敌	SIGMA-A6426	Sigma-Aldrich, Inc.
MgSO ₄	CAS:7487-88-9	上海实验试剂有限公司

3.2.2 仪器设备

表 3-2 实验仪器与设备

Table 3-2 Experimental instrunlents and equipments

设备	型号	公司
生物安全柜	A2	Thermo
生物反应器	Bioflo 120	德国艾本德股份公司
冷冻离心机	eppendorf 5430R	德国艾本德股份公司
微量紫外分光光度计	BioSpectr	德国艾本德股份公司
冰箱	TSG505 SC	Thermo
EXPLORER 精密天平系统	EX4202 ZH	奥豪斯
自动超滤系统	pilot I	仕必纯贸易（上海）有限公司

3.2.3 培养基配方

LB 培养基：称取大豆蛋白胨 1.2 g，酵母粉 0.6 g，氯化钠 1.2 g，加入 120 mL 蒸馏水后调整 pH 为 7.2，；

BM 培养基：称取大豆蛋白胨 30 g，酵母粉 15 g，NaCl 15 g，Na₂HPO₄·7H₂O 16.08 g，，KH₂PO₄ 8.16 g，甘油 47.55 g，泡敌 0.9 g，3 L 纯化水，3.6 g MgSO₄ 溶于 200 mL 纯化水单独灭菌后接种时加入发酵罐；

FM 培养基：称取大豆蛋白胨 100 g，酵母粉 50 g，甘油 158.5 g，泡敌 0.3 g，溶于 1L 纯化水单独灭菌后待用。

3.2.4 发酵种子

在发酵时可采用培养至对数生长期时作为种子[9-10]，也可采用生长饱和种子以保

证接种菌体均一性。本工艺中选用对数生长时期菌体长速率最快，代谢旺盛，酶系活跃，可以很快到新的环境生长，以降低迟缓期。本研究选取具有一定代表性的大肠杆菌菌株 pCgpV/DH5 α 和 JA2/JM109 两个菌株进行了一级种子工艺研究。

3.2.5 DH5 α 与 JM109 生长曲线的测定

采用 LB 培养基作为种子培养基，一级种子在 $37.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 解冻 $3.0 \pm 1.0 \text{ min}$ ，按照 1:1500-1:1000 将解冻的冻存管菌接入 LB 种子培养基中，进行种子活化，活化后转移至恒温摇床， $37.0 \pm 1^\circ\text{C}$ ，200 rpm 培养，在特定时间点取样检测菌液 OD600 的值，绘制 pCgpV/DH5 α 和 JA2/JM109 两个菌株的生长曲线。

3.2.6 单位湿菌体质粒含量的测定方法

将含有目的质粒的大肠杆菌 JM109 以 0.1% 的接种量接种到装有 50 mL LB 液体培养基的 250mL 的摇瓶中， 37.0°C ，200 rpm 培养过夜。采用 Kit 和碱裂解法小量抽提质粒以测定单位湿菌体质粒浓度，采用琼脂糖凝胶电泳，光密度分析超螺旋质粒浓度；同时采用 UV260 法估算碱裂解上清的核酸含量。在培养结束后 10000 g 离心 20 min，测定湿菌体的量。

3.2.7 补料策略

在本发酵工艺中，DO 关联搅拌转速始终控制在 20% 以上，则补料策略决定了菌体的生产速率，由于菌体和质粒复制速率有一定差异，所以在整个发酵过程中通过控制补料速率来控制菌体增殖速率；本次发酵拟定一个两阶段恒速补料策略：发酵 3.5 h 时开始补料，补料速率为 4~5 g/kg/h 或者在发酵 5.5 h 时调整补料速率至 8~10 g/kg/h。

3.2.8 发酵终点及饥饿处理

发酵过程中菌体量不断增加，而单位菌体所含质粒拷贝数在不同的发酵时间可能不一致。通过实验摸索出生物量与质粒拷贝数的乘积最大时间点，从而达到目的质粒 DNA 产量最大化。采用 qPCR 法检测发酵过程中菌体的质粒拷贝数，测定游离质粒拷贝数所用的引物见表 3-3。按照说明，在引物的干粉中加入 ddH₂O 水，稀释至终浓度为 10 μM ，然后分装并置于 -20°C 冰箱中保存。

表 3-3 测定质粒拷贝数时所用引物

Table 3-3 Primers used in the determination of plasmid copy number

引物名称	5'→3'序列
General-F1	CTGACTCCCCGTCGTGTAGA
General-R1	GCTGGCTGGTTTATTGCTGA
Ecoli-F	GCGAGCGATCCAGAAGATCT
Ecoli-R	GGGTAAAGGATGCCACAGACA

qPCR 法检测主要使用 ChamQ Universal SYBR qPCRMaster Mix 试剂盒，将待测 pDNA、引物、还有使用到的试剂置于冰上待用，随后配置如下表 3-4 的反应液。

表 3-4 反应液配置

Table 3-4 Reaction solution configuration

试剂名称	体积
ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix(2x)	10uL
Primer Forward(10uM)	0.4uL
Primer Reverse (10uM)	0.4uL
cDNA	2uL
ddH20(RNase-free)	加水至总体积 20uL

配置完成后即可上机进行 qPCR 法检测，反应程序的设置如下：预变性温度为 95℃， 30s，1 个循环；随后进行循环扩增阶段，温度为 95℃， 10s，40 个循环；最后进行检测，温度为 60℃， 30s，40 个循环。

3.2.9 条件优化实验设计

采用 Box-Behnken 的中心组合试验方法，主要的指标为生物反应器发酵过程中主要的工艺参数变量，即 pH、溶氧（%）、接种量（%），主要考察的质量属性包括质粒产量（mg/L）。依此设计 DoE 实验，因素水平及具体实验方案见表 3-5 与表 3-6。

表 3-5 部分因子试验因子与水平设计

Table 3-5 Factors and levels of the fractional factorial design

水平	A pH	B 溶氧	C 接种量
----	------	------	-------

-1	6.30	20	3
0	6.80	30	4
1	7.30	40	5

表 3-6 部分因子试验组合安排

Table 3-6 The fractional factorial design

组别	A pH	B 溶氧	C 接种量
1	6.8	40	3
2	7.3	30	5
3	6.8	20	5
4	6.8	40	5
5	6.8	30	4
6	7.3	40	4
7	7.3	20	4
8	6.3	40	4
9	6.8	20	3
10	6.3	30	5
11	6.3	20	4
12	6.3	30	3
13	7.3	30	3

质粒产量计算采用 Hassan 方法对指标进行转换,按照公式 (1) 求得归一值 d_i , d_i 取值越大越好。对各指标的归一值求几何平均数,即得质粒产量。

$$d_i = (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min}) \quad (1)$$

其中, Y_i 为实测值, $Y_{\min}$ 和 $Y_{\max}$ 指每一指标在不同次试验中测得的所有值中的最小值和最大值。计算出各指标的 d_i 。最后由公式 (2) 计算质粒产量。

$$\text{质粒产量} = (d_1 \times d_2 \times \cdots \times d_n)^{1/n} \quad (2)$$

3.2.10 响应面设计

本研究根据找到的关键工艺参数 CPP (pH、溶氧及接种量)。在此基础上进行响应面设计, 采用 Design-Expert 11 软件绘制各因素对质粒产量交互影响的三维响应曲

面图和等高线图。

3.3 结果及讨论

3.3.1 培养基的优化结果

培养基各组分的浓度和比例要恰当，过量的营养物质会造成溶液渗透压过高，细胞脱水死亡，会抑制菌体的生长，特别是碳源和氮源的比例，如果碳氮比偏小，会导致菌体生长旺盛，造成菌体提前衰老自溶；碳氮比过大，菌体繁殖数量少，细菌代谢不平衡不利于产物的积累^[3]。

碳源和氮源作为培养基中的最主要营养成分，对质粒生产有较大影响。大肠杆菌发酵的碳源一般有葡萄糖和甘油，葡萄糖因细菌利用快且价廉易得，已广泛用作重组菌高密度发酵的碳源，但大肠杆菌在过量葡萄糖或缺氧的条件下会发生“葡萄糖效应^[4]”，积累大量有机酸而影响目的菌种的生长和质粒扩增，以甘油为碳源时，在发酵过程不会产酸，而且甘油作为碳源会增加菌体质粒 DNA 浓度。

为了使发酵过程中 pH 的稳定控制，一般选择磷酸二氢钾、磷酸氢二钾及磷酸氢二钠混合的磷酸盐作为缓冲液体系，同时其中的 Na^+ 、 K^+ 及磷酸根浓度可以维持一定的渗透压，同时添加一定浓度的 Mg^{2+} ，因为 Mg^{2+} 是 DNA 聚合酶的辅助因子，是核酸酶的激活剂，保证质粒高效扩增， Mg^{2+} 影响 DNA 的扩增效率和错配概率^[6]。 Mg^{2+} 是细胞内 300 多个代谢酶类的辅因子，与 ATP 结合，参与能量代谢过程，稳定生物膜，介导细胞内一些信号转导，与细胞生长、增殖等密切相关。

本工艺以 LB 培养基为种子培养基；发酵培养基以甘油为碳源，非动物源蛋白胨和酵母粉为氮源，磷酸二氢钠、磷酸氢二钾为缓冲体系，添加适量的 Mg^{2+} 和 NaCl 为发酵培养基；补料培养基补碳氮源，以大豆蛋白胨、酵母粉为氮源，以甘油为碳源。

3.3.2 DH5 α 与 JM109 生长曲线测定结果

DH5 α 与 JM109 的生长曲线见图 3-1，可以看出两个菌株从 4 h 后开始进入对数生长期，4~10 h 均处于为指数生长期，两个菌株培养 6 h 的 OD_{600} 大于 2.0。

因种子液菌体浓度对发酵影响不明显，故本工艺定义为：种子培养 5.5 h 后测定 OD_{600} ，种子液 OD_{600} 为大于 1.0 后可作为一级种子种子液接种至发酵罐。

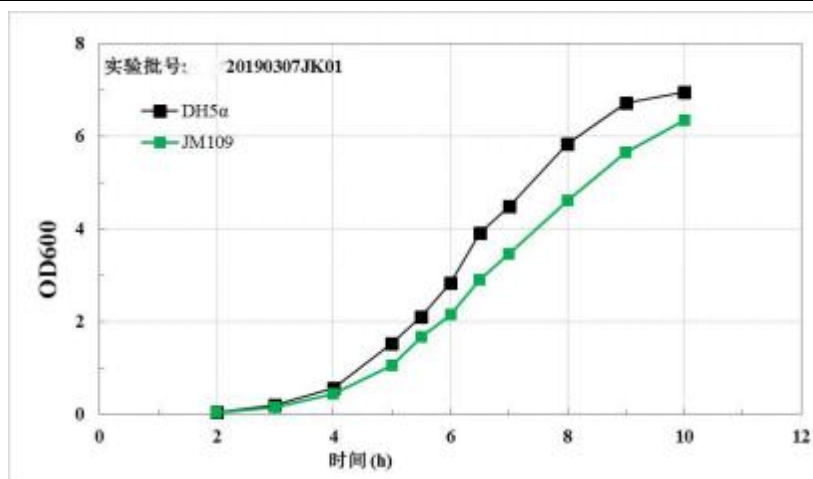


图 3-1 DH5α与 JM109 菌株生长曲线

Figure 3-1 Growth curves of DH5α and JM109 strains

3.3.3 单位湿菌体质粒含量的测定结果

单位湿菌体质粒含量的测定结果如表 3-7 所示，为 0.78mg 质粒/g 湿菌重，因在生产工艺中将采用碱裂解法，所以随后的工艺开发种将暂时采用 0.78mg 质粒/g 湿菌重作为经验常数来估算批产量。

表 3-7 菌株单位湿菌体质粒浓度的测定结果

Table 3-7 Results of determination of plasmid concentration per unit wet bacteria of strains

方法	单位湿菌体质粒含量(mg/g)
碱裂解法	0.78
Kit 法	1.04

3.3.4 补料策略工艺优化结果

质粒发酵工艺一方面要求获得较高的菌体密度，另一方面要求有较高的质粒拷贝数。要实现较高的菌体密度一般采用阶段式补料策略进行工艺发酵，而高密度发酵成功的关键是补料策略的选择，常用的补料方式有：恒速流加补料、变速补料和指数流加补料。但菌体密度最高和单位菌体质粒拷贝数最高可能出现在发酵的不同时间点，两者乘积最大时为最佳发酵时间点，既为发酵终点。

在大肠杆菌进入发酵阶段后，随着发酵的进行菌体浓度不断增加，发酵培养基中的营养物质不断消耗，氧需求量不断上升，在初始 200 rpm 搅拌条件下，DO 不断下降，直到 DO 控制值后转速不断升高，当发酵培养基营养耗尽时会出现 DO 快速反弹，转

速开始下降，当这个点出现时要开始补料。

本生产工艺优化中以甘油为碳源，发酵 3.5 h 时 DO 回升后开始补料，补料速率为 4 g/kg/h，在发酵 5.5 h 时调整补料速率至 9 g/kg/h，搅拌与补料速率结果如图 3-2 所示，DO 与补料速率曲线如图 3-3 所示，从 DO 与补料速率发酵曲线结果可知，在发酵 3.5 h 出现了溶氧反弹，补料后溶氧下降，从图 3-2 可知搅拌转速也出现了小幅度下降。按照发酵 3.5 h 时速率为 4 g/kg/h，在发酵 5.5 h 时调整补料速率至 9 g/kg/h 的补料策略，在发酵前 16 h，工艺过程中控制参数稳定，是一个比较优的补料策略，在发酵至 16 h 时以 9 g/kg/h 的补料速率已经不能维持菌体的快速生长所需要的营养，故作补料速率的调整，继续发酵，为后期工艺继续优化积累数据，同时也为测定质粒拷贝数积累数据。

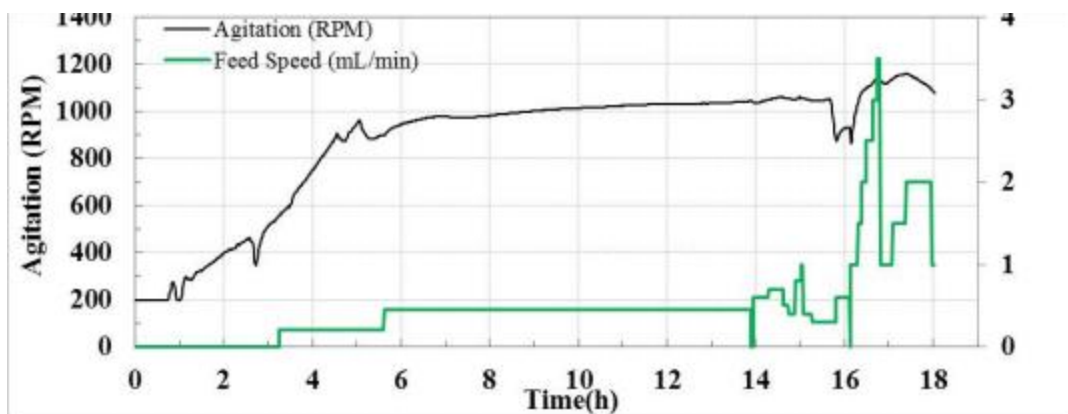


图 3-2 搅拌与补料速率曲线图

Figure 3-2 Plot of stirring and feeding rate

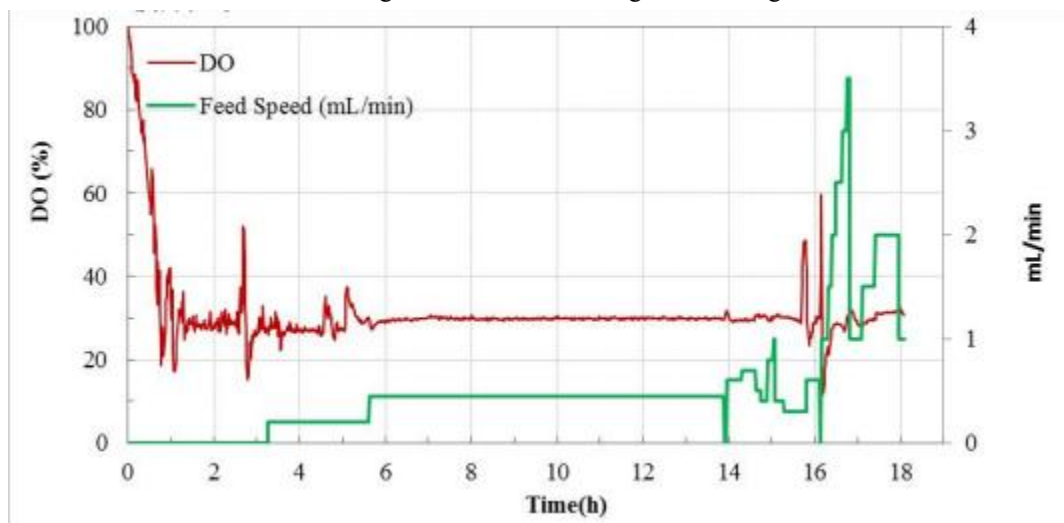


图 3-3 DO 与补料速率曲线图

Figure 3-3 Plot of DO and feed rate

3.3.5 发酵终点实验结果

进行第二轮工艺优化菌体生长和质粒拷贝数结果见图 3-4，可以看出，在发酵前 16 h 菌体的 OD_{600} 不断增长，单位菌体的质粒拷贝数也不断增加，生物量与 OD_{600} 的乘积也不断增加，发酵 16 h 时 OD_{600} 到达 29.5，质粒拷贝数为 624。

质粒拷贝数与 OD_{600} 乘积结果见图 3-5，从两者结果可以看出，在发酵 16 h 时质粒拷贝数与 OD_{600} 乘积最大。

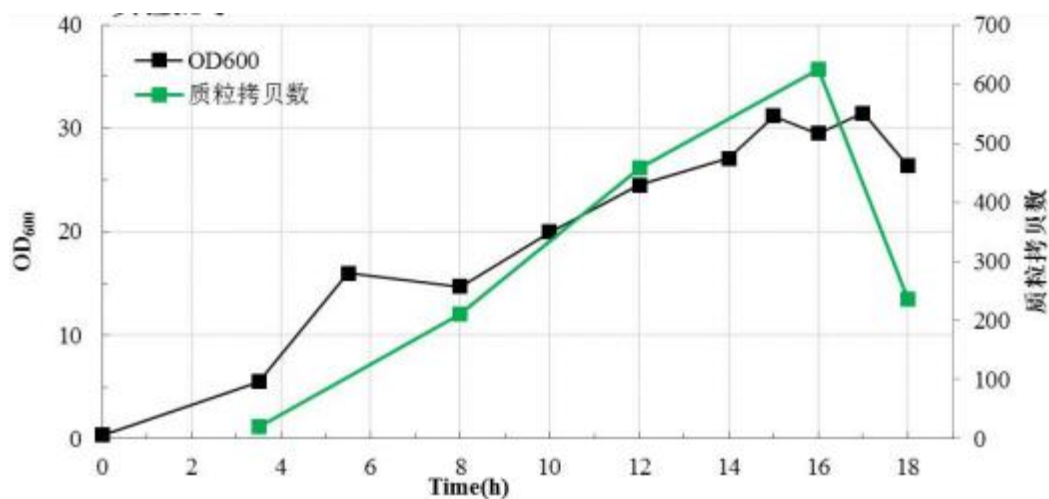


图 3-4 质粒拷贝数的曲线图

Figure 3-4 Graph of plasmid copy number

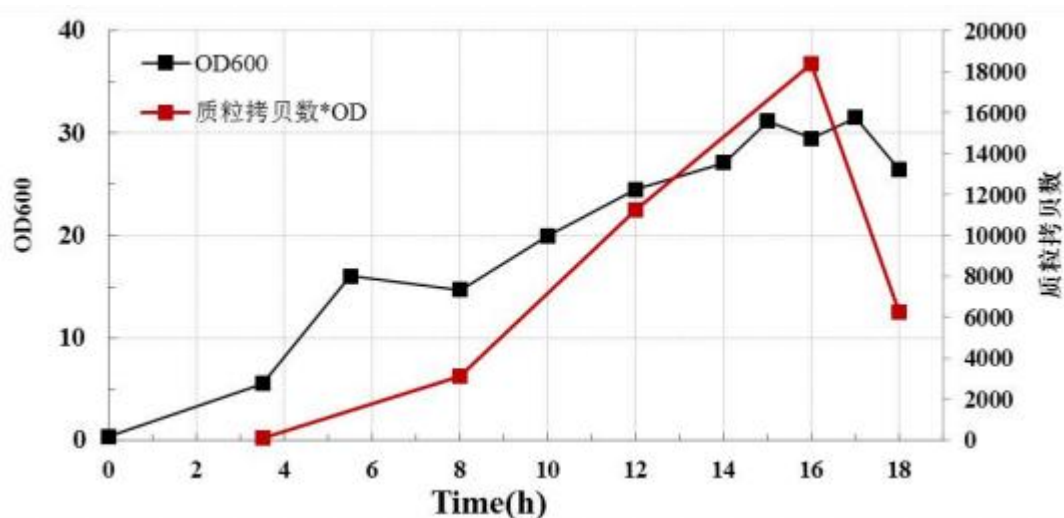


图 3-5 质粒拷贝数与 OD600 乘积曲线图

Figure 3-5 Graph of plasmid copy number multiplied by OD600

3.3.6 条件优化实验设计结果

根据 FMEA 模型分析结果,确定 pH、溶氧和接种量为影响质粒产量的 3 个显著因素。采用 Box-Behnken 统计学试验设计方法,对上述 3 个显著因素进行优化,试验结果见表 3-8。

表 3-8 试验组合安排与结果

Table 3-8 The fractional factorial design and results

组别	pH	溶氧	接种量	质粒产量
1	6.8	40	3	586.4
2	7.3	30	5	373.6
3	6.8	20	5	317.4
4	6.8	40	5	597.5
5	6.8	30	4	313.2
6	7.3	40	4	536.8
7	7.3	20	4	363.2
8	6.3	40	4	504.5
9	6.8	20	3	374.9
10	6.3	30	5	376.8
11	6.3	20	4	319.5
12	6.3	30	3	317.6
13	7.3	30	3	385.2

3.3.7 模型拟合与方差分析

将表 3 -8 数据导入 Design-Expert 11 软件进行模型拟合,得到回归方程质粒产量= $313.20+17.55A+106.27B+0.1500C-2.85AB-17.70AC+17.15BC+6.03A^2+111.78B^2+44.07C^2$ 。该模型的显著性检验 $P = 0.0294 < 0.05$,表明模型显著模型的 $R^2 = 0.9748$, $R_{adj}^2 = 0.8993$,说明该模型的拟合度较好,见表 3-9。因此,该回归方程拟合的模型可用于质粒生产的最优工艺参数。

表 3-9 Box-Behnken 设计方差分析

Table 3-9 Analysis of variance of Box-Behnken

来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	1.290E+05	9	14331.52	12.90	0.0294	显著
A-pH	2464.02	1	2464.02	2.22	0.2332	
B-DO	90355.00	1	90355.00	81.34	0.0029	
C-接种量	0.1800	1	0.1800	0.0002	0.9906	
AB	32.49	1	32.49	0.0292	0.8751	
AC	1253.16	1	1253.16	1.13	0.3661	
BC	1176.49	1	1176.49	1.06	0.3791	
A ²	82.97	1	82.97	0.0747	0.8024	
B ²	28556.92	1	28556.92	25.71	0.0148	
C ²	4440.24	1	4440.24	4.00	0.1394	
残差	3332.45	3	1110.82			
总和	1.323E+05	12				

3.3.8 响应面分析

根据回归方程,采用 Design-Expert 11 软件绘制各因素对质粒产量交互影响的等高线图,见图 3-6, 3-7 和 3-8。

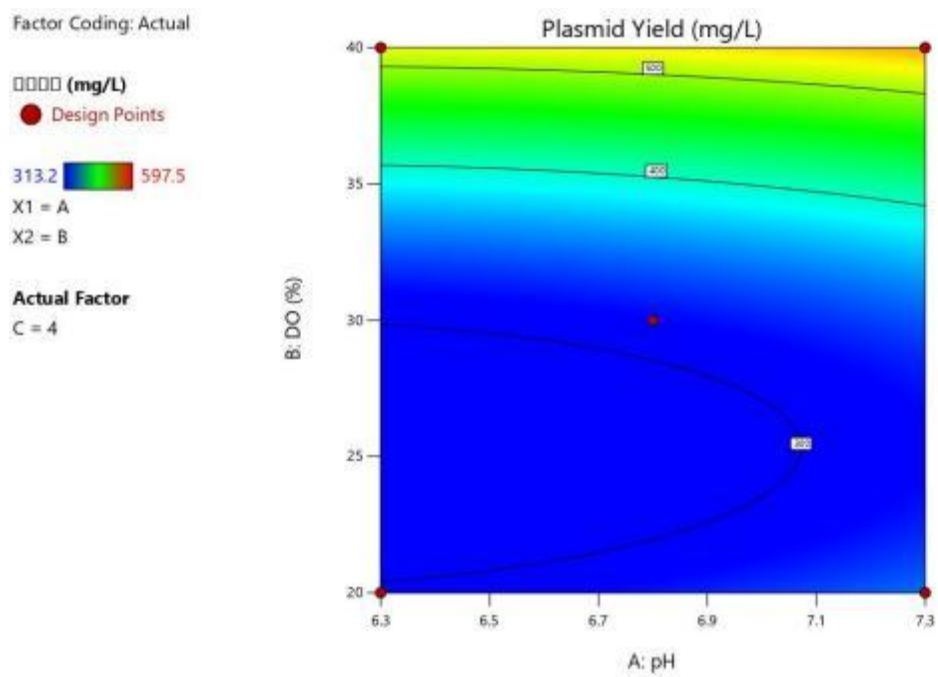


图 3-6 pH 与 DO 交互影响的等高线图

Figure 3-6 Contour plot of the interaction effect between pH and DO

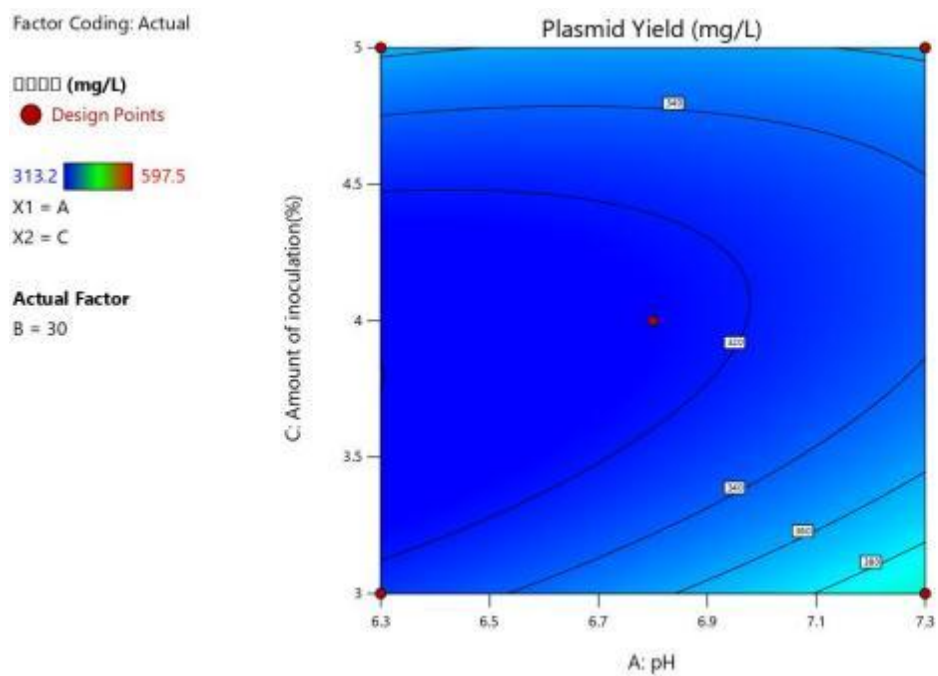


图 3-7 pH 与接种量交互影响的等高线图

Figure 3-7 Contour plot of the interaction effect between pH and inoculum size

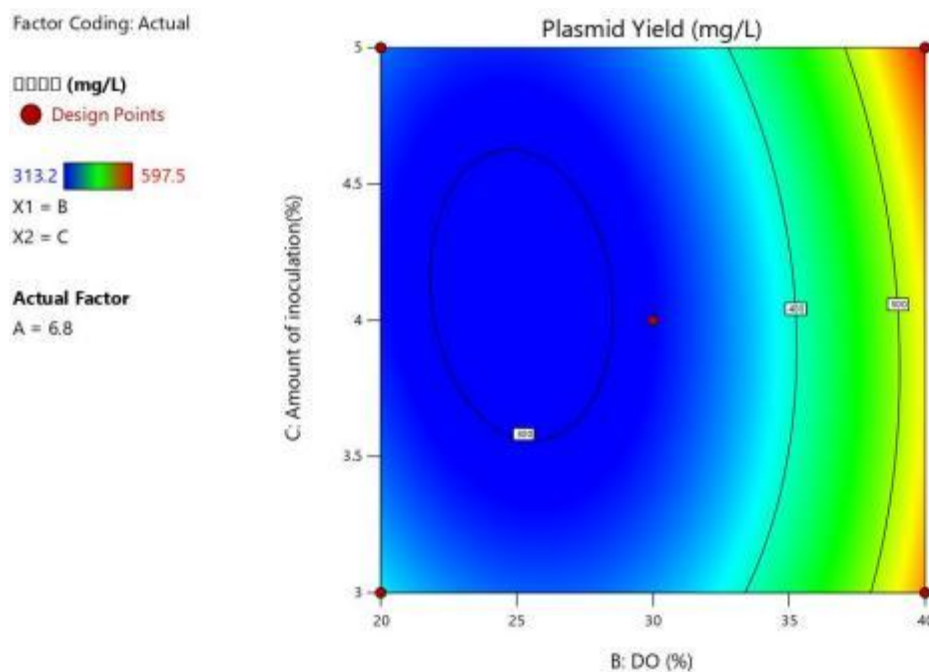


图 3-8 DO 与接种量交互影响的等高线图

Figure 3-8 Contour plot of the interaction effect of DO and inoculum

3.4 本章小结

本章中，我们对第二章 QbD 理念的指导下的各项工艺参数进行工艺优化，通过本章的工艺优化，暂定上游发酵工艺如下：以 LB 为种子培养基，按照 1:1000 活化菌株进行一级种子扩培，4%(V/V) 接种比进行发酵；以 BM 为发酵培养基，以 FM 为补料培养基，以甘油为碳源；采用两段恒速补料策略连续补料策略，发酵 3.5 h 时以 4 g/kg/h，发酵 5.5 h 时调整补料速度至 9 g/kg/h；采取以 37.0 ± 1.0 °C 为发酵温度；pH 控制范围为 7.2 ± 0.5 ；DO 控制大于等于 20%；停止补料后饥饿处理 20 min 后收获，总发酵时间为 14 ± 2 h。

第 4 章 基于 QbD 理念的商业化质粒下游发酵工艺开发

4.1 引言

碱裂解方法参考《分子克隆实验指南》，本工艺步骤中碱裂解工艺会对超螺旋比例及宿主 DNA 产生影响，影响 CQA，需要通过实验设计确定工艺参数范围。工艺开发的主要目的是为了保证充分裂解效率的前提下尽可能获得最高的超螺旋质粒 DNA，主要通过控制剪切力、裂解时间和温度来提高碱裂解的效率，并尽量除去杂蛋白和基因组。大肠杆菌裂解产物中，其中质粒 DNA 约占 3%，绝大多数为 RNA 及蛋白，因此选用合适的工艺获得最多的超螺旋质粒 DNA 是裂解的最终目标。超滤工艺及澄清工艺不影响 CQA，故未做深入研究，参照供应商对具体设备的建议参数执行。

超滤 1 工艺的主要目的是：一是收集大肠杆菌菌体，二是对菌体进行缓冲液置换，置换到裂解缓冲液 I 中。为有效避免交叉污染，选用一次性封闭系统，选用超滤技术（切向流技术），更进一步优选中空纤维而非膜包，因为中空纤维相比膜包有开放式的通道，能够处理高固含量、高粘度和剪切力敏感样品，并且具有良好的线性放大能力。超滤 1 另一目的为缓冲液置换，将菌体置换到含有高浓度葡萄糖的裂解液 I 中，减少培养基成分对裂解效率的影响，裂解液 I 提供高浓度的葡萄糖，提高菌体渗透压，防止在超滤过程中造成细菌裂解，质粒丢失，且由于高葡萄糖浓度产生的粘性，可以使菌体充分悬浮，有助于进行充分均匀的碱裂解。

裂解液 II 中含有的 SDS 和 NaOH 可以促进细胞膜破裂，变性蛋白和 DNA，然后用 3M 醋酸钾裂解液 III 进行中加，钾离子与 SDS 反应生产十二烷基硫酸钾溶解度降低，将结合在 SDS 上的蛋白及基因组 DNA 沉淀下来，而质粒可以在该条件下复性。三种裂解缓冲液的比例为 1:2:1.5。裂解过程需要注意以下三个方面^[12]：(1)碱裂解时间：裂解时间过长会导致质粒 DNA 不可逆变性；(2)混匀效率：低混匀效率会造成裂解体系不均一，裂解效率下降，提高混匀效率需要提高剪切力，但过高的剪切力使宿主 DNA 断裂成小片段或造成质粒 DNA 不可逆性变性，使分离纯化难度增加；(3)裂解的菌体的固含量。

质粒下游纯化采用 GE 的三步法质粒纯化工艺，通过风险评估发现亲和层析和离子交换层析的电导和 pH 数据属于中风险项，需要重点关注和研究。超滤 2 工艺不影

响 CQA，浓缩过程注意控制入口和回流的压力不超过系统和管路要求压力，其它参数仅作一般工艺参数控制，不做详细研究。

4.2 实验材料与实验方法

4.2.1 实验试剂

表 4-1 实验试剂

Table 3-1 The main reagents of the experiment

药品名称	货号	公司
三羟甲基氨基甲烷	J.T.Baker-4102-05	湖南尔康制药股份有限公司
乙二醇四乙酸二钠	J.T.Baker-B8995-01	湖南尔康制药股份有限公司
十二烷基硫酸钠	W410053	安徽泽升科技有限公司
乙酸钾	国药-30154518	国药集团化学试剂有限公司
冰醋酸	国药-10000218	国药集团化学试剂有限公司
无水氯化钙	10005861	国药集团化学试剂有限公司
硫酸铵	1.28218.8029	默克生命科学技术有限公司
盐酸	7647-01-0	湖南尔康制药股份有限公司

4.2.2 实验设备

表 4-2 实验仪器与设备

Table 3-2 Experimental instruments and equipments

设备	型号	公司
生物安全柜	A2	Thermo
生物反应器	Bioflo 120	德国艾本德股份公司
台面配液系统	wand mixer	Pall 公司
微量紫外分光光度计	BioSpectr	德国艾本德股份公司
冰箱	TSG505 SC	Thermo 公司
50L 温控搅拌器	IND331 Harsh	默克公司
自动超滤系统	pilot I	仕必纯贸易（上海）有限公司

4.2.3 裂解阶段超滤工艺研究方法

选用孔径 500KDa 改良聚醚砜 (mPES) 中空纤维膜进行菌体收集。选用 790cm² 的 500KDa 的中空纤维 (S02-E500-05-N) 进行超滤, 根据细菌特性, 选择较大剪切力进行超滤浓缩, 我们初步设定剪切力不超过 6500S⁻¹。开启自动切向流设备, 初步设定 inlet 流速为 1200mL/min, 系统平稳运行后控制剪切力不超过 6500S⁻¹, 开始超滤浓缩, 当 3L 大肠杆菌发酵液浓缩至 1L 时停止浓缩, 开始洗滤换液, 使用预冷的裂解液 I 进行 3±1CV 连续流洗滤。

4.2.4 剪切力和裂解时间的测定

实验时首先研究较低剪切力的搅拌转速的裂解效率, 搅拌转速设定为 23rpm 和 50rpm, 裂解时裂解液 II 和 III 导入时间小于 5 分钟, 观察裂解现象并检测裂解上清中超螺旋质粒含量。接下来低剪切力的结果, 对裂解搅拌转速进行调整, 提高至 100rpm 时, 裂解液 II 和 III 导入时间控制在 5min 之内, 观察裂解现象并检测将裂解上清中超螺旋质粒含量。

4.2.5 超滤 1

超滤 1 工艺步骤中选定 N06-E500-05-S (8500cm²) 中空纤维进行超滤, 通过流速控制剪切力不超过 6500S⁻¹, 将约 12L 大肠杆菌发酵液进行浓缩, 浓缩至 (6±2) kg 体积, 然后使用裂解液 I 进行洗滤 5±1CV, 后通过控制重量将菌体悬液浓缩至 (8±1) kg。

4.2.6 碱裂解

裂解缓冲液比例为 1:2:1.5, 裂解液 I 和裂解液 III 需要经过 2-8℃ 预冷, 裂解液 II 加入过程控制在 5 分钟以内, 搅拌转速控制在 100-150rpm, 裂解液 II 导入结束 1 分钟内开始导入裂解液 III, 维持搅拌转速不变, 裂解液 III 导入结束后停止搅拌, 裂解结束。澄清后将样品放置到 2-8℃ 放置过夜。

4.2.7 澄清

将 50μm 和 0.6μm 进行串联, 设定蠕动泵转速在 100rpm 开始澄清, 当压力升高至 1.5Bar 时停止澄清, 如料液没有澄清完成, 采用三通接头方式替换成新的澄清滤器,

直到澄清结束，澄清前后的样品进行检测并分析数据。

4.2.8 分子筛层析

生产规模的分子筛层析柱为 6FastFlow (300/500, 体积 $21\pm 2\text{L}$, (200mg 工艺)), 分子筛层析载量按照体积计算, 上样体积为柱体积 20%-35%CV; 我们将进样体积设定为 6L (28%CV) 和 8 L (38%), 线速度 $\leq 60\text{cm/h}$, 首先用 2.1M 硫酸铵平衡缓冲液平衡 6FastFlow层析柱 $3\pm 1\text{CV}$, 然后将澄清后质粒溶液进样到层析柱, 并进行平衡液洗脱, 收集 UV254 的第一个吸收峰, 观察层析图谱并将收集样品进行琼脂糖凝胶电泳检测。

4.2.9 亲和层析

在生产中, 使用 2M 硫酸铵平衡缓冲液平衡层析柱 $3\pm 1\text{CV}$, 将分子筛洗脱峰全部上样, 线速度 $\leq 120\text{cm/h}$, 控制压力 $\leq 3\text{bar}$, 用平衡液洗脱线性及开环质粒后, 采用 1.7M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 0.3\text{M NaCl}$ 进行洗脱, 收集 UV254 的吸收峰并进行检测和分析。

4.2.10 阴离子交换层析

首先用含有 0.4MNaCl 的平衡液进行 $3\pm 1\text{CV}$ 平衡, 线性流速为 $\leq 120\text{cm/h}$, 对亲和洗脱样品进行 1: 3 稀释, 稀释缓冲液为 100mMTris-HCl ($\text{pH}7.5\pm 0.2$), 然后将稀释后质粒溶液进样到层析柱, 之后用平衡液洗涤去掉未吸附或吸附较弱的杂质, 最后在 1M NaCl 下洗脱质粒 DNA, 收集 UV254 的吸收峰并进行检测和分析。

4.3 结果及讨论

4.3.1 超滤 1 优化结果

将 3L 大肠杆菌发酵液浓缩至约 1L, 进行 3CV 洗滤。超滤结果如表 4-3 所示, 称取浓缩前湿菌重为 34.3mg/mL, 称取浓缩后湿菌重为 96.7mg/mL, 根据公式计算回收, 超滤浓缩菌体回收率为 94.0%。

表 4-3 超滤 1 菌体收集

Table 4-3 Ultrafiltration 1 bacterial body collection

类别	超滤 1 浓缩前数据	超滤 1 浓缩后数据
发酵液体积	3L	1L
湿菌重	34.3g/L	96.7g/L
总菌重	102.9g	96.7g
超滤浓缩菌体回收率	94.0%	

洗滤工艺包括连续洗滤和不连续滤，由图 4-1 所示，连续洗滤 5 倍体积后，洗滤效率可达 99.3%，为确保菌体充分置换到裂解缓冲液 I 中，最终选用 5 ± 1 CV 洗滤。

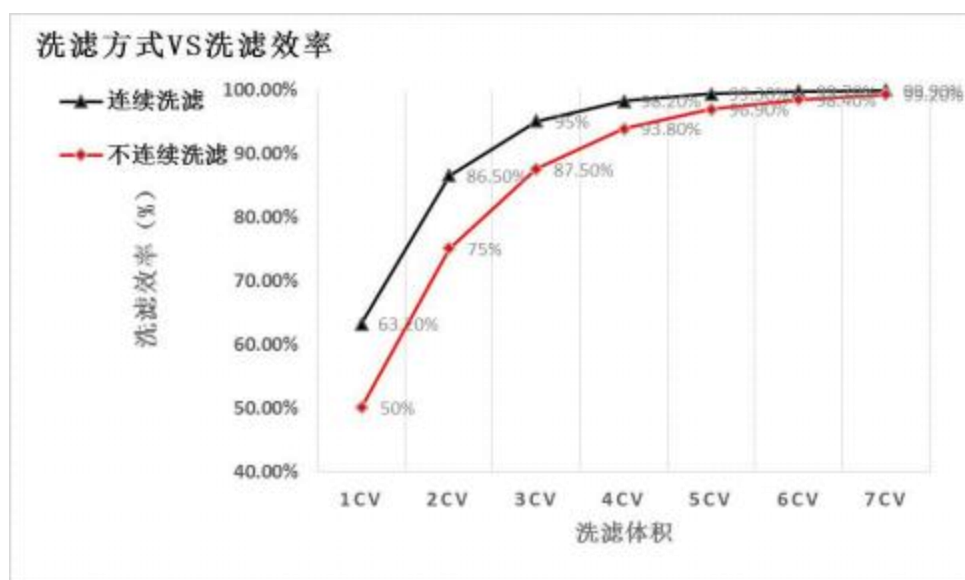


图 4-1 洗滤方式和洗滤效率曲线

Figure 4-1 Washing method and washing efficiency curve

将超滤 1 收集到的菌体进行碱裂解工艺中的菌体固含量研究。结果如表 4-4 所示，发现在固含量为 240g/L 以下，超螺旋质粒 DNA 与菌体浓度可形成良好的线性关系，即裂解菌体浓度不影响裂解效率。以菌体固含量为横坐标，超螺旋质粒产量为纵坐标绘制曲线，结果见 4-2，说明菌处理浓度在 60g/L-240g/L 范围内，碱裂解法抽提获得的质粒含量与固含量呈正相关，当固液比为 480g/L 时，抽提质粒效率下降。

表 4-4 不同固含量菌体质粒抽提结果

Table 4-4 Results of plasmid extraction of bacteria with different solid contents				
名称	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4
菌体固液比（g/L）	480	240	120	60
质粒含量（ng）	168.1	142	77.2	45

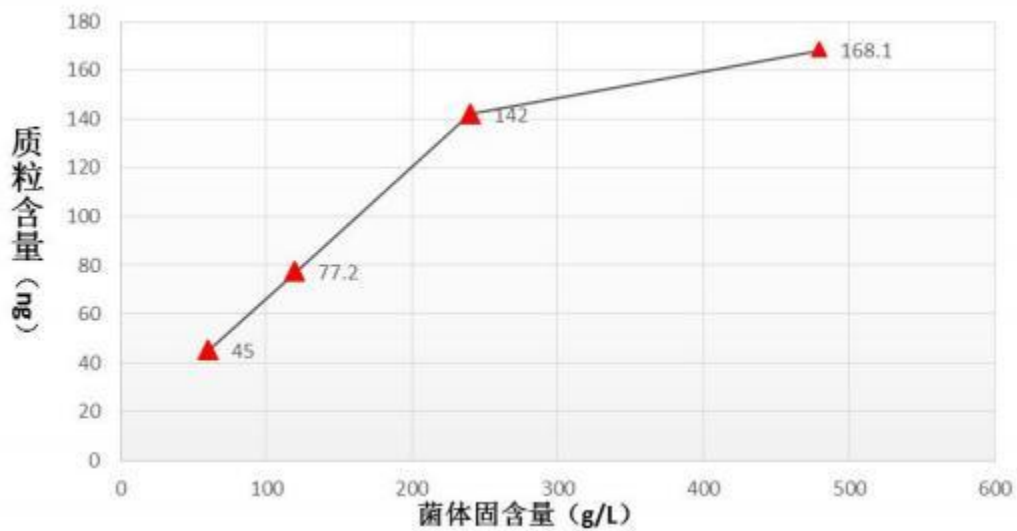


图 4-2 不同固含量菌体的质粒抽提结果

Figure 4-2 Results of plasmid extraction from bacteria with different solid contents

4.3.2 碱裂解效率

进行两批次实验比较碱裂解效率，结果如图 4-3 所示，控制碱裂解搅拌转速参数在 100-150rpm，计算超螺旋质粒回收率发现，两批实验的裂解过夜样品的回收率分别为 86.61%和 106.37%, 裂解中和样品过夜放置到 2-8℃不会造成超螺旋质粒产量下降。

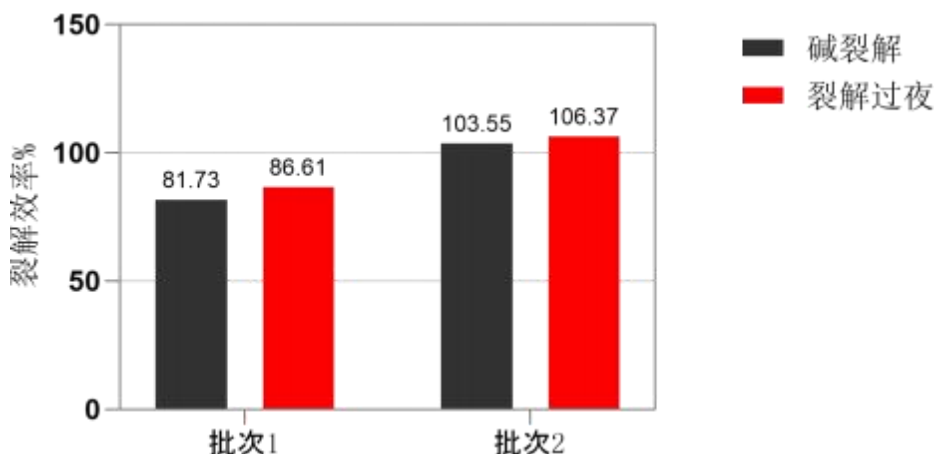


图 4-3 碱裂解效率比较

Figure 4-3 Comparison of alkali lysis efficiency

4.3.3 澄清回收效率

澄清过后的质粒上清液目测澄清度较高，进行分子筛层析时，层析过程正常，并未造成超压现象，由此判定澄清工艺满足要求。统计并分析其超螺旋质粒的回收率，结果如图 4-4 所示，发现回收率在 113.65%和 118.73%，说明裂解质粒经过澄清步骤基本无损失，工艺参数锁定。

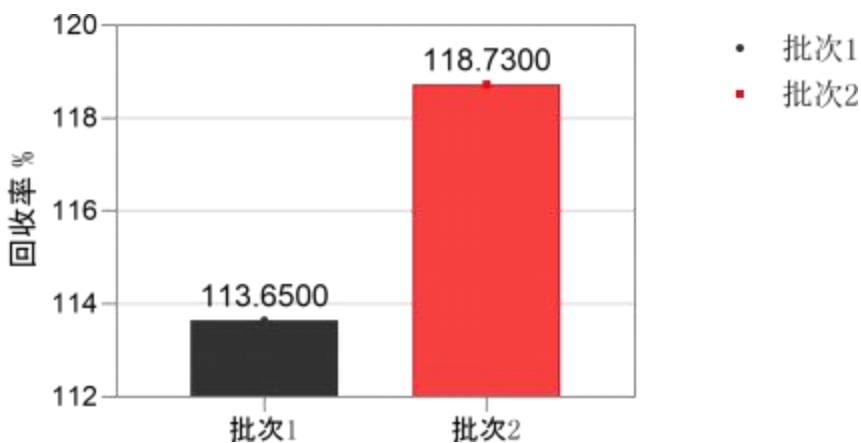


图 4-4 澄清回收效率比较

Figure 4-4 To clarify the recovery efficiency comparison

4.3.4 分子筛层析结果

在载量研究中，根据图 4-5 显示上样量为 8L 时，质粒峰和 RNA 检测峰可以分开，且质粒峰电导仍在 225ms/cm 附近波动，说明 RNA 可以除去且缓冲液置换彻底。为了

控制工艺的稳健性，将进样体积操作范围调整为 20-35%柱体积。

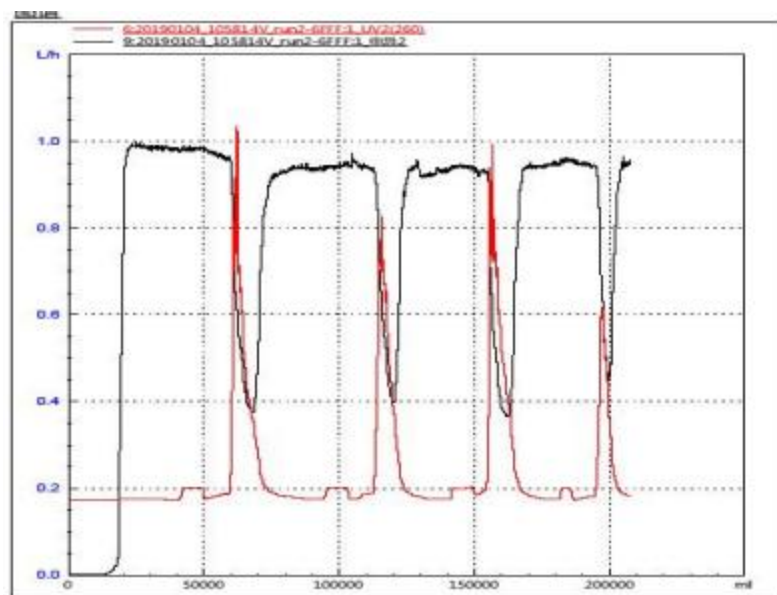


图 4-5 分子筛层析图谱

Figure 4-5 Molecular sieve chromatography profile

4.3.5 亲和层析结果

亲和层析工艺研究的主要是适用性和稳健性，如图 4-6 所示，通过两批发酵实验亲和层析回收效率及超螺旋比例的比较，发现质粒可以在平衡液电导为 $215 \pm 20 \text{ ms/cm}$ 时有效吸附在层析柱上，并在电导为 $205 \pm 20 \text{ ms/cm}$ 时洗脱下来，检测后发现两批质粒回收率为 $86 \pm 2\%$ ；经过亲和层析纯化后的质粒超螺旋比例为 94.88% 和 88.76%，螺旋比例高于 85%，满足工艺需求。

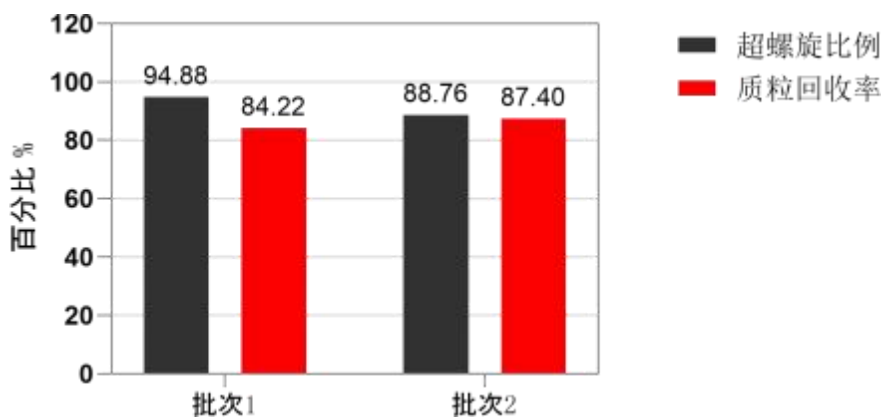


图 4-6 亲和层析回收效率及超螺旋比例

Figure 4-6 Recovery efficiency of affinity chromatography and proportion of supercoiling

4.3.6 阴离子层析结果

阴离子层析结果如图 4-7 显示，当平衡液 pH 范围为 7.5 ± 0.2 、电导为 $45\pm5\text{ms/cm}$ 时，亲和洗脱样品在 1: 3 稀释后进行洗脱，回收率为 $78\pm7\%$ ，产出高于 300mg 超螺旋质粒，满足工艺需求。

另外，本步骤作为质粒生产工艺中的精纯一步，可有效降低宿主 DNA 和内毒素，数据显示 HCD 的除去效率为 $48\pm8\%$ ，半定量法内毒素结果显示，经过阴离子交换层析后，内毒素降低到可接受水平，详见表 4-5。

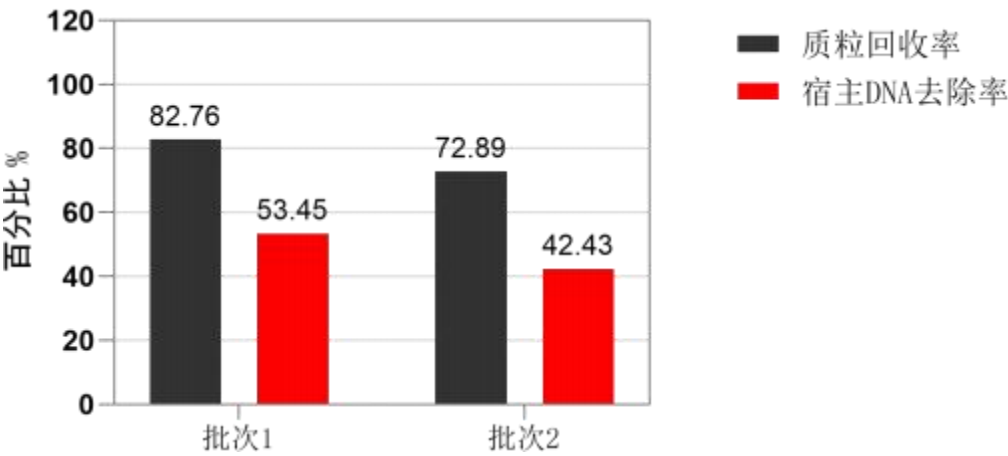


图 4-7 离子交换层析回收率与宿主 DNA 去除率

Figure 4-7 Ion exchange chromatography recovery and host DNA removal

表 4-5 内毒素检测结果

Table 4-5 Results of the endotoxin test

批次	样品	体积 (L)	内毒素
批次 1	AC 样品	1.64	>250 EU/ml
	IEX 样品	2.21	<2.5 EU/ml
批次 2	AC 样品	2.13	<250 EU/ml
	IEX 样品	2.76	<2.5 EU/ml

4.4 本章小结

本章中，通过光密度分析法进行回收率的分析，超滤 1 菌体湿重回收率为 102%，碱裂解步骤超螺旋质粒回收率为 $97\pm14\%$ ，澄清步骤超螺旋质粒回收率为 $116\pm4\%$ 。由

此可以判断裂解工段的总回收率大于 85%，回收率较高且工艺稳定。在分子筛收集中，超螺旋质粒的回收率为 $(100\pm 23)\%$ ；经过亲和层析，质粒超螺旋比例高于 85%，且该步骤质粒回收率为 $(86\pm 2)\%$ ；Source30Q 阴离子交换层析可以显著降低宿主 DNA 的杂质含量，步骤除去率可达 $(48\pm 8)\%$ ，且可将内毒素含量大幅度降低。综合分析，质粒下游纯化工艺的回收率为 50%。

第 4 章 结论及展望

4.1 结论

本文主要从商业实际问题出发，基于 QbD 理念重新梳理了 pDNA 质粒商业化生产整个流程和控制，以大肠杆菌为宿主菌株，通过生产工艺的研发和优化，制备大批量符合各项要求的标准 pDNA，以满足临床与商业端的质粒需求。首先列出质粒载体产品的 QTPP，评估得出产品的 CQA，采用 FMEA 模式分析进行风险评估，并列出影响质粒载体产品质量的 CMA 与 CPP，对高风险项材料进行相应控制，并通过实验设计，进行工艺研究及优化，最终确认质粒载体的 CPP，最终得到如下工艺：

在上游发酵工艺中以 LB 为种子培养基，改进 LB 培养基为发酵培养基；一级种子扩培， $4 \pm 1\%$ 接种比进行发酵，以甘油为碳源，采用连续补料方式进行补料。从发酵 3.5 h 时开始补料，补料流速为 $4 \sim 5 \text{ g/kg} \cdot \text{H}$ ，发酵 5.5 h 时调整补料速度为 $8 \sim 10 \text{ g/kg} \cdot \text{H}$ 至发酵结束；采取以 $37.0 \pm 1.0 \text{ } ^\circ\text{C}$ 为发酵温度；pH 控制范围为 7.2 ± 0.5 ； $\text{DO} \geq 20\%$ ；发酵 $14 \pm 2 \text{ h}$ 时停止补料。

下游纯化工艺中，菌体收集采用切向流超滤工艺，选用 500Kda PES 材质的中空纤维对菌体进行浓缩，通过洗滤工艺将菌体置换到裂解液 I 中，控制固液比为 60-240 g/L，然后加入 2 倍体积裂解液 II 和 1.5 倍体积裂解液 III，控制碱裂解搅拌转速在 100-150 rpm；裂解结束后采用 $50 \mu\text{m} + 0.6 \mu\text{m}$ 两级滤器对碱裂解液进行澄清。

下游纯化工艺采用经典三步层析法。分子筛层析选用 6FastFlow 填料，上样 20-35% 柱体积以去除 RNA 并进行彻底换液；在 2M 硫酸铵条件下超螺旋质粒结合到 Plasmidselect 亲和填料上，去除线性和开环质粒，提高超螺旋比例；最后选用 Source30Q 阴离子交换层析，进行精纯，进一步提高质粒质量，并降低内毒素、宿主蛋白及宿主 DNA 残留水平。

通过对上游发酵工艺控制，尽可能使生物量与质粒拷贝数乘积最大化，从而给后续工序提供充足的输入原料。通过碱裂解工艺各条件的控制，提高超螺旋质粒产率，同时尽可能减少其他杂质含量。最后通过三步层析，得到了符合质量要求的的质粒载体，最终锁定工艺参数。

4.2 展望

本文依然有很多问题值得深入研究，具体可以考虑从以下方面进行：

（1）除了考虑本课题研究的关键工艺参数之外还应考虑发酵过程中进一步放大中发酵罐几何体积的变化、发酵氧体积传递系数、单位体积功率输入等相关参数的影响，为更大规模发酵体系提供指导；

（2）应结合更多的模型更多的动力学实验来评估和反馈质粒载体产品的 QTPP 与 CPP 优化情况，从而实现 QbD 理念的循环改进；

（3）可以将基于 QbD 理念进行工艺优化的思路辐射至其他开发工艺，如 CAR-T 细胞治疗等领域。

参考文献

- [1] DEIDDAR, ORLANDINI S, HUBERT P, et al. Risk-based approach for method development in pharmaceutical quality control context: A critical review [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 161: 110-21.
- [2] RATHORE A S, WINKLE H. Quality by design for biopharmaceuticals [J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(1): 26-34.
- [3] RATHORE A S. Roadmap for implementation of quality by design (QbD) for biotechnology products [J]. *Trends Biotechnol*, 2009, 27(9): 546-53.
- [4] YU L X, AMIDON G, KHAN MA, et al. Understanding pharmaceutical quality by design [J]. *AAPS J*, 2014, 16(4): 771-83.
- [5] YU L X. Pharmaceutical quality by design: product and process development, understanding, and control [J]. *Pharm Res*, 2008, 25(4): 781-91.
- [6] CSOKAI, PALLAGI E, PAAL T L. Extension of quality-by-design concept to the early development phase of pharmaceutical R&D processes [J]. *Drug Discov Today*, 2018, 23(7): 1340-3.
- [7] ZHANG L, MAO S. Application of quality by design in the current drug development [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2017, 12(1): 1-8.
- [8] ICH . Q8(2R) , Pharmaceutical Development: International Conference on Harmonization: [S]. 2009:
- [9] ICH . Q9, Quality Risk Management: International Conference on Harmonization: [S]. London: 2005:
- [10] GASPAR R S, SILVA-LIMA B, MAGRO F, et al. Non-biological Complex Drugs (NBCDs): Complex Pharmaceuticals in Need of Individual Robust Clinical Assessment Before Any Therapeutic Equivalence Decision [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2020, 7: 590527.
- [11] CROMMELIN D J, SHAH V P, KLEBOVICH I, et al. The similarity question for biologicals and non-biological complex drugs [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2015, 76: 10-7.
- [12] HOLLOWAY C, MUELLER-BERGHHAUS J, LIMA B S, et al. Scientific considerations for complex drugs in light of established and emerging regulatory guidance [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2012, 1276: 26-36.
- [13] KLEIN K, STOLK P, DE BRUIN M L, et al. The EU regulatory landscape of non-biological complex drugs (NBCDs) follow-on products: Observations and recommendations [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2019, 133: 228-35.
- [14] ONER Z G, MICHEL S L J, POLLI J E. Equivalence and regulatory approaches of nonbiological complex drug products across the United States, the European Union, and Turkey [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2017, 1407(1): 26-38.
- [15] LUNAWAT S, BHAT K. Complex Generic Products: Insight of Current Regulatory Frameworks in US, EU and Canada and the Need of Harmonisation [J]. *Ther Innov Regul Sci*, 2020, 54(5): 991-1000.
- [16] SOARES S, SOUSA J, PAISA, et al. Nanomedicine: Principles, Properties, and Regulatory Issues [J]. *Front Chem*, 2018, 6: 360.
- [17] ZAGALO D M, SOUSA J, SIMOES S. Quality by design (QbD) approach in marketing authorization procedures of Non-Biological Complex Drugs: A critical evaluation [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2022, 178: 1-24.

- [18] CUNHA S, COSTA C P, MOREIRA J N, et al. Using the quality by design (QbD) approach to optimize formulations of lipid nanoparticles and nanoemulsions: A review [J]. *Nanomedicine*, 2020, 28: 102206.
- [19] BASTOGNE T. Quality-by-design of nanopharmaceuticals - a state of the art [J]. *Nanomedicine*, 2017, 13(7): 2151-7.
- [20] BATE R, MATHURA, LEVER H M, et al. Generics Substitution, Bioequivalence Standards, and International Oversight: Complex Issues Facing the FDA [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2016, 37(3): 184-91.
- [21] YU L X, RAW A, WU L, et al. FDA's new pharmaceutical quality initiative: Knowledge-aided assessment & structured applications [J]. *Int J Pharm X*, 2019, 1: 100010.
- [22] KORAKIANITI E, REKKAS D. Statistical thinking and knowledge management for quality-driven design and manufacturing in pharmaceuticals [J]. *Pharm Res*, 2011, 28(7): 1465-79.
- [23] MANDENIUS C F, GRAUMANN K, SCHULTZ T W, et al. Quality-by-design for biotechnology-related pharmaceuticals [J]. *Biotechnol J*, 2009, 4(5): 600-9.
- [24] ALBADRY MA, KHAN I A. Roadmap for Quality by Design Implementation for Dietary Supplements [J]. *JAOAC Int*, 2020, 103(1): 103-16.
- [25] AUCAMP J P, DAVIES R, HALLET D, et al. Integration of host strain bioengineering and bioprocess development using ultra-scale down studies to select the optimum combination: an antibody fragment primary recovery case study [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2014, 111(10): 1971-81.
- [26] SUAREZ-ZULUAGAD A, BORCHERT D, DRIESSEN N N, et al. Accelerating bioprocess development by analysis of all available data: A USP case study [J]. *Vaccine*, 2019, 37(47): 7081-9.
- [27] WOOD B, BOHONIS H, ROSS B, et al. Comparing and using prominent social accountability frameworks in medical education: moving from theory to implementation in Northern Ontario, Canada [J]. *Can Med Educ J*, 2022, 13(5): 45-68.
- [28] AWOTWE-OTOO D, AGARABI C, FAUSTINO P J, et al. Application of quality by design elements for the development and optimization of an analytical method for protamine sulfate [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 62: 61-7.
- [29] ALLEN LV, JR. Compounding with Biotechnology Products, Part 2: Product-specific Considerations [J]. *Int J Pharm Compd*, 2022, 26(6): 446-66.
- [30] HARMS J, WANG X, KIM T, et al. Defining process design space for biotech products: case study of *Pichia pastoris* fermentation [J]. *Biotechnol Prog*, 2008, 24(3): 655-62.
- [31] CHAVEZ P F, STAUFFER F, EECKMAN F, et al. Control strategy definition for a drug product continuous wet granulation process: Industrial case study [J]. *Int J Pharm*, 2022, 624: 121970.
- [32] AMBS P, FAINMAN Y, ESENER S, et al. Computerized design and generation of space-variant holographic filters: 2: Applications of space-variant filters to optical computing [J]. *Appl Opt*, 1988, 27(22): 4761-5.
- [33] MARSHALL E. DOE's Way-Out Reactors: The Department of Energy wants to spend \$72 million next year to design and build reactors for military space applications; nothing like them has been built before [J]. *Science*, 1986, 231(4744): 1357-9.
- [34] JENKE D. Application of Quality by Design (QbD) Principles to Extractables/Leachables Assessment. Establishing a Design Space for Terminally Sterilized Aqueous Drug Products Stored in a Plastic Packaging System [J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2010, 64(6): 527-35.
- [35] STEGEMANN S, CONNOLLY P, MATTHEWS W, et al. Application of QbD principles for the evaluation of empty hard capsules as an input parameter in formulation development and

- hr/>
- manufacturing [J]. AAPS PharmSciTech, 2014, 15(3): 542-9.
- [36] PRAJAPATI PB, JAYSWALK, SHAH S A. Application of Quality Risk Assessment and DoE-Based Enhanced Analytical Quality by Design Approach to Development of Chromatography Method for Estimation of Combined Pharmaceutical Dosage Form of Five Drugs [J]. J Chromatogr Sci, 2021, 59(8): 714-29.
- [37] ISAACS J T, ALMETER PJ, HENDERSON B S, et al. Levothyroxine Variations by Process Analytical Technology [J]. Contact Context, 2022, 2022.
- [38] NAGY B, GALATA D L, FARKAS A, et al. Application of Artificial Neural Networks in the Process Analytical Technology of Pharmaceutical Manufacturing-a Review [J]. AAPS J, 2022, 24(4): 74.
- [39] ALENEZI M M, BOHULAIGAH Z H, ALDAJANI N F, et al. Assessment of Knowledge, Attitude, and Practice of First Aid Management of Choking Among Primary School Teachers in Riyadh, Saudi Arabia: A Cross-Sectional Study [J]. Cureus, 2024, 16(1): e51519.
- [40] VALE M, LEITE F, MADEIRA C. Risk Management in Clinical Trials: Assessment of Current Practices at Portuguese Clinical Trial Sites [J]. Risk Manag Healthc Policy, 2023, 16: 2187-96.
- [41] CECILIO L C. [Can conflict be used as the "raw material" for health services management?] [J]. Cad Saude Publica, 2005, 21(2): 508-16.
- [42] JARIA G, SILVA C P, FERREIRA C I, et al. Sludge from paper mill effluent treatment as raw material to produce carbon adsorbents: An alternative waste management strategy [J]. J Environ Manage, 2017, 188: 203-11.
- [43] KILARU R, AMODIO S, LI Y, et al. An Overview of Current Statistical Methods for Implementing Quality Tolerance Limits [J]. Ther Innov Regul Sci, 2024, 58(2): 273-84.
- [44] READ E K, SHAH R B, RILEY B S, et al. Process analytical technology (PAT) for biopharmaceutical products: Part II. Concepts and applications [J]. Biotechnol Bioeng, 2010, 105(2): 285-95.
- [45] KOVACEVIC J, IBRIC S, DJURIS J, et al. Application of the design of experiments in optimization of drug layering of pellets with an insight into drug polymer interactions [J]. Int J Pharm, 2016, 506(1-2): 312-9.
- [46] POURAN B, ARBABI V, WEINANS H, et al. Application of multiphysics models to efficient design of experiments of solute transport across articular cartilage [J]. Comput Biol Med, 2016, 78: 91-6.
- [47] RATHORE A S. Quality by Design (QbD)-Based Process Development for Purification of a Biotherapeutic [J]. Trends Biotechnol, 2016, 34(5): 358-70.
- [48] OZDENEROL E, BINGHAM-BYRNE R M, SEBOLYJ D. The Effects of Lifestyle on the Risk of Lyme Disease in the United States: Evaluation of Market Segmentation Systems in Prevention and Control Strategies [J]. Int J Environ Res Public Health, 2021, 18(24).
- [49] POTHEN L, BALLIGAND J L. Legacy in Cardiovascular Risk Factors Control: From Theory to Future Therapeutic Strategies? [J]. Antioxidants (Basel), 2021, 10(11).
- [50] GURBA-BRYSKIEWICZ L, MARUSZAK W, SMUGADA, et al. Quality by Design (QbD) and Design of Experiments (DOE) as a Strategy for Tuning Lipid Nanoparticle Formulations for RNA Delivery [J]. Biomedicines, 2023, 11(10).
- [51] NAG K, SARKER E H, KUMAR S, et al. Satisfying QTPP of Erythropoietin Biosimilar by QbD through DoE-Derived Downstream Process Engineering [J]. Pharmaceutics, 2023, 15(8).
- [52] NAMJOSHI S, DABBAGHI M, ROBERTS M S, et al. Quality by Design: Development of the

- Quality Target Product Profile (QTPP) for Semisolid Topical Products [J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(3).
- [53] LANG AE, RILEY D E, VACHON L, et al. CQA 206-291 in Parkinson's disease: an acute single escalating dosage study [J]. *Can JNeurol Sci*, 1990, 17(4): 416-9.
- [54] SVEDUNG WETTERVIK T, VELLE F, HANELLA, et al. ICP, PRx, CPP, and Δ CPPopt in pediatric traumatic brain injury: the combined effect of insult intensity and duration on outcome [J]. *Childs Nerv Syst*, 2023, 39(9): 2459-66.
- [55] TAKEUCHI Y, YOSHIKAWA R, MITSUI Y, et al. Differences in the Optical Response of MSU and CPP Crystals During Magnetic Orientation: Possibility of Diagnosing Gout and Pseudogout [J]. *Bioelectromagnetics*, 2023, 44(7-8): 204-10.
- [56] SUN M, DANG U J, YUAN Y, et al. Optimization of DOTAP/chol Cationic Lipid Nanoparticles for mRNA, pDNA, and Oligonucleotide Delivery [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2022, 23(5): 135.
- [57] YOKOO H, DIRISALA A, UCHIDA S, et al. Oligosarcosine Conjugation of Arginine-Rich Peptides Improves the Intracellular Delivery of Peptide/pDNA Complexes [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2024, 10(2): 890-6.
- [58] ZHANG C, LU L, OUYANG R, et al. Polyurethane/Liquid Crystal Microfibers with pDNA Polyplex Loadings for the Optimal Release and Promotion of HUVEC Proliferation [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(11).
- [59] ZHU K, JIN H, HE Z, et al. A continuous method for the large-scale extraction of plasmid DNA by modified boiling lysis [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(6): 3088-93.
- [60] VOGLT, AHMAD M, KRAINER F W, et al. Restriction site free cloning (RSFC) plasmid family for seamless, sequence independent cloning in *Pichia pastoris* [J]. *Microb Cell Fact*, 2015, 14: 103.
- [61] WILLIAMS PD, KINGSTON PA. Plasmid-mediated gene therapy for cardiovascular disease [J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 91(4): 565-76.
- [62] SCHMEER M, SCHLEEF M, SHANKAR R, et al. Capillary Gel Electrophoresis (CGE) for Quality Control of Plasmid DNA in Gene Therapy: Quality Control of 20 Years Stored GMP-Grade Plasmid DNA [J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2521: 317-28.
- [63] BAKKER NAM, DE BOER R, MARIE C, et al. Small-scale GMP production of plasmid DNA using a simplified and fully disposable production method [J]. *J Biotechnol*, 2019, 306S: 100007.
- [64] SEDEGAH M, CHAROENVIT Y, AGUIAR J, et al. Effect on antibody and T-cell responses of mixing five GMP-produced DNA plasmids and administration with plasmid expressing GM-CSF [J]. *Genes Immun*, 2004, 5(7): 553-61.
- [65] SCHMID G, SCHLAEGER E J, WIPF B. Non-GMP plasmid production for transient transfection in bioreactors [J]. *Cytotechnology*, 2001, 35(3): 157-64.
- [66] XENOPOULOSA, PATTNAIK P. Production and purification of plasmid DNA vaccines: is there scope for further innovation? [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2014, 13(12): 1537-51.
- [67] MATSUBARA K, OTSUJI Y. Preparation of plasmids from lambdoid phages and studies on their incompatibilities [J]. *Plasmid*, 1978, 1(3): 284-96.
- [68] SCHMEER M, BUCHHOLZ T, SCHLEEF M. Plasmid DNA Manufacturing for Indirect and Direct Clinical Applications [J]. *Hum Gene Ther*, 2017, 28(10): 856-61.
- [69] XIONG Y, XU N, HUANG J, et al. [Optimization of the medium and fermentation condition for the *Penicillium aurantiocandidum* Z12 strain with molluscicidal actions against *Oncomelania hupensis*] [J]. *Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi*, 2023, 35(2): 137-46.
- [70] BAUMSTARK B R, LOWERYK, SCOTT J R. Location by DNA sequence analysis of cop

- mutations affecting the number of plasmid copies of prophage P1 [J]. *Mol Gen Genet*, 1984, 194(3): 513-6.
- [71] STADLER J, LEMMENS R, NYHAMMAR T. Plasmid DNA purification [J]. *J Gene Med*, 2004, 6 Suppl 1: S54-66.
- [72] TRINDADE I P, DIOGO M M, PRAZERES D M, et al. Purification of plasmid DNA vectors by aqueous two-phase extraction and hydrophobic interaction chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1082(2): 176-84.
- [73] WUNDERLICH M, TAYMAZ-NIKEREL H, GOSSET G, et al. Effect of growth rate on plasmid DNA production and metabolic performance of engineered *Escherichia coli* strains [J]. *J Biosci Bioeng*, 2014, 117(3): 336-42.
- [74] GASPAR V M, MAIA C J, QUEIROZ JA, et al. Improved minicircle DNA biosynthesis for gene therapy applications [J]. *Hum Gene Ther Methods*, 2014, 25(2): 93-105.
- [75] VECCHIO R, GENTILE L, TAFURI S, et al. Exploring future perspectives and pipeline progression in vaccine research and development [J]. *Ann Ig*, 2024.
- [76] JI J, ZHAO Y, BAI Z, et al. Robustness of the synergistic partial-denitrification, anammox, and fermentation process for treating domestic and nitrate wastewaters under fluctuating C/N ratios [J]. *J Environ Manage*, 2024, 355: 120547.
- [77] LOJANANAN N, CHEIRSILP B, INTASIT R, et al. Successive process for efficient biovalorization of Brewers' spent grain to lignocellulolytic enzymes and lactic acid production through simultaneous saccharification and fermentation [J]. *Bioresour Technol*, 2024, 397: 130490.
- [78] CHEN Y H, ZHU Q, LI J, et al. Optimization of Fermentation Process for New Anti-Inflammatory Glycosylceramide Metabolite from *Aspergillus* sp [J]. *Metabolites*, 2024, 14(2).
- [79] KORDJAZI T, MARINIELLO L, GIOSAFATTO C V L, et al. Streptomycetes as Microbial Cell Factories for the Biotechnological Production of Melanin [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(5).
- [80] YUPANQUI-MENDOZA S L, SANCHEZ-MONCADAB J, LAS-CASAS B, et al. Simple one-step treatment for saccharification of mango peels using an optimized enzyme cocktail of *Aspergillus niger* ATCC 9642 [J]. *Braz J Microbiol*, 2024.
- [81] GANTIER M, RISPAL R, FOURRIERA, et al. Cryopreserved cGMP-compliant human pluripotent stem cell-derived hepatic progenitors rescue mice from acute liver failure through rapid paracrine effects on liver cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2024, 15(1): 71.
- [82] HORNER M, GERHARDT K, SALAVEI P, et al. Production of Phytochromes by High-Cell-Density *E. coli* Fermentation [J]. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(10): 2442-50.
- [83] LIU W C, INWOOD S, GONG T, et al. Fed-batch high-cell-density fermentation strategies for *Pichia pastoris* growth and production [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2019, 39(2): 258-71.
- [84] TANGY, XU J, XU M, et al. Fed-batch performance profiles for mAb production using different intensified N - 1 seed strategies are CHO cell-line dependent [J]. *Biotechnol Prog*, 2024: e3446.
- [85] ROMANN P, VUILLEMIN T, PAVONE S, et al. Maduramycin, a novel glycosylation modulator for mammalian fed-batch and steady-state perfusion processes [J]. *J Biotechnol*, 2024, 383: 73-85.
- [86] FERNANDEZ H N, KRETSCHAM, KUNAKOM S, et al. High-Yield Lasso Peptide Production in a *Burkholderia* Bacterial Host by Plasmid Copy Number Engineering [J]. *ACS Synth Biol*, 2024, 13(1): 337-50.
- [87] GOTSMY M, STROBL F, WEISS F, et al. Sulfate limitation increases specific plasmid DNA yield and productivity in *E. coli* fed-batch processes [J]. *Microb Cell Fact*, 2023, 22(1): 242.
- [88] BALAKRISHNAN M, JEEVARATHINAM G, KUMAR S K S, et al. Optimization and scale-up

- hr/>
- of alpha-amylase production by *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation of edible oil cakes [J]. BMC Biotechnol, 2021, 21(1): 33.
- [89] DUY H, WANG MY, YANG LH, et al. Optimization and Scale-Up of Fermentation Processes Driven by Models [J]. Bioengineering (Basel), 2022, 9(9).
- [90] XIA J, LIU J, ZHUANG Y. [Opportunities and challenges for fermentation optimization and scale-up technology in the artificial intelligence era] [J]. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao, 2022, 38(11): 4180-99.
- [91] MOTEVALIAN S P, STEEN J, DE LEON J, et al. Evaluation of single-use tangential flow filtration technology for purification of activated polysaccharides used in conjugate vaccine manufacturing [J]. Biotechnol Prog, 2021, 37(6): e3204.
- [92] SUNDARAN B, PALANIAPPAN C, RAO YU, et al. Tangential flow filtration technology applicable to large scale recovery of diphtheria toxin [J]. J Biosci Bioeng, 2002, 94(2): 93-8.
- [93] LI X, YANG G, ZHANG Q, et al. Alkali Metal Cation-Sulfate Anion Ion Pairs Promoted the Cleavage of C-C Bond During Ethanol Electrooxidation [J]. J Phys Chem Lett, 2023, 14(49): 11177-82.
- [94] BEKATOROU A, DIMA A, TSAFRAKIDOU P, et al. Downstream extraction process development for recovery of organic acids from a fermentation broth [J]. Bioresour Technol, 2016, 220: 34-7.
- [95] FRIEDL A. Downstream process options for the ABE fermentation [J]. FEMS Microbiol Lett, 2016, 363(9).
- [96] CARNES AE, HODGSON C P, LUKE J M, et al. Plasmid DNA production combining antibiotic-free selection, inducible high yield fermentation, and novel autolytic purification [J]. Biotechnol Bioeng, 2009, 104(3): 505-15.
- [97] SINGHAK, ATHMARAM TN, SHRIVASTAVA S, et al. Fermentation and downstream process for high yield production of *Plasmodium falciparum* recombinant HRP II protein and its application in diagnosis [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2013, 40(7): 687-95.
- [98] ZHANG C, SHARMA S, WANG W, et al. A novel downstream process for highly pure 1,3-propanediol from an efficient fed-batch fermentation of raw glycerol by *Clostridium pasteurianum* [J]. Eng Life Sci, 2021, 21(6): 351-63.
- [99] MITSUI Y, HASHIGAMIA, ANDO R, et al. Development of a method for the simultaneous determination of ionic nutrients in hydroponic solutions using cation-/anion-exchange chromatography with a neutral eluent [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2024.
- [100] HEYDARI M, HOSSEINZADEH COLAGARA, SABOUR D. Optimization of Affinity Chromatography Based on Sepharose 4B- chitin for Rapid Purification of *Urtica dioica* Agglutinin [J]. Iran J Biotechnol, 2023, 21(3): e3364.
- [101] FERREIRA G N, MONTEIRO GA, PRAZERES D M, et al. Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications [J]. Trends Biotechnol, 2000, 18(9): 380-8.
- [102] FUKUMOTO Y, OBATAY, ISHIBASHI K, et al. Cost-effective gene transfection by DNA compaction at pH 4.0 using acidified, long shelf-life polyethylenimine [J]. Cytotechnology, 2010, 62(1): 73-82.
- [103] SHEN N L, HARTIKKAJ, HORN NA, et al. Development and characterization of lyophilized DNA vaccine formulations [J]. Methods Mol Med, 2000, 29: 23-34.
- [104] LEE J, ARUN KUMAR S, JHAN YY, et al. Engineering DNA vaccines against infectious diseases [J]. Acta Biomater, 2018, 80: 31-47.

- [105] SILVA F, QUEIROZ JA, DOMINGUES F C. Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli* [J]. *BiotechnolAdv*, 2012, 30(3): 691-708.

攻读硕士学位期间研究成果

- 1, 参与了中国首款全自主研发的CAR-T药物纳基奥仑赛注射液（CNCT19细胞注射液）产品的细胞、质粒、病毒工艺开发；并作为主要的工艺开发的参与者以及生产的负责人，深度参与了质粒和病毒的工艺开发至商业化使用的全流程。助力了纳基奥仑赛注射液的成功上市。
- 2, 学生所在的联合培养单位上海药明生基医药科技有限公司作为行业的先行者与领跑者，参与了上海医药行业协会、上海药品审评核查中心主导的制定了《免疫细胞治疗产品生产用质粒生产质量管理指南》，此行业指南已经在23年06月01日正式实施；生基医药负责指南草案的起草，学生承担了指南草案的生产管理、物料、工艺控制等模块的制度起草任务，助力了此指南的颁布和实施。

致谢

当写到致谢这一章节时，意味着三年的研究生生涯即将结束。此刻内心是激动的，更多也是不舍的，在职攻读硕士学位的学习就要结束了，毕业十年，还能获得这样的学习机会，倍感珍惜。十余年的工作经历，我一度感觉到自身知识储备的不足，很多问题都没有研究思路，所以当我再次接受老师们知识的传授时，我深知自己需要做的就是努力努力努力。

在完成这篇硕士论文的过程中，我得到了许多人的支持和帮助，在此我要向他们表示衷心的感谢。

首先，我要感谢我的导师陶玉贵教授、葛飞教授和张伟伟老师。在我的研究生学习期间，老师们以其渊博的学识、严谨的治学态度和耐心的指导，使我在学术道路上不断前进。他/她不仅在论文选题、研究方法等方面给予了我悉心的指导，还在我遇到困难和挫折时给予了我鼓励和支持；不仅在学术上对我谆谆指导，也教会了我为人处世之道，这些对我以后的生活和工作影响深远。在此，我向陶老师、葛飞老师、张伟伟老师表示最诚挚的敬意和感谢。

同时，我也要感谢我的同学和朋友们。在学习和研究的过程中，我们互相交流、互相启发，共同进步。他们的陪伴和鼓励让我在研究生生涯中度过许多美好的时光。

我还要感谢我的家人。他们一直是我坚强的后盾，在我面临困难和压力时，给予我无尽的关爱和支持。他们的理解和付出让我能够全心全意地投入到学习和研究中。

最后，我要感谢学校和学院为我提供了良好的学习和研究环境，使我能够顺利地完成学业。

在此，我再次向所有关心和帮助过我的人表示衷心的感谢。我将铭记这份感恩之情，以更加努力和坚定的步伐迈向未来。