

**ICH Q5B：生物技術產品品質：
用於生產重組 DNA (r-DNA) 衍生蛋
白質產品之細胞內表現構築體之分
析指引**

**(Quality of Biotechnological Products:
Analysis of The Expression Construct
in Cells Used for Production of r-DNA
Derived Protein Products)**

**衛生福利部食品藥物管理署
中華民國 111 年 4 月**

前言

國際醫藥法規協和會 (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH) 於 1995 年發布 ICH Q5B (Quality of Biotechnological Products: Analysis of The Expression Construct in Cells Used for Production of r-DNA Derived Protein Products) 指引，提供真核和原核細胞生產基因重組蛋白質產品時，表現構築體之特性分析指引，本指引並未涵蓋基因重組蛋白質產品之整體品質。

目錄

一、 引言	3
二、 分析表現構築體的合理性	3
三、 表現系統之特性分析	4
(一) 用於建置主細胞庫之表現構築體和細胞殖株	4
(二) 細胞庫系統	4
(三) 生產用體外細胞年齡之限制	5
四、 總結	6
五、 詞彙表	7

ICH Q5B：生物技術產品品質:用於生產重組 DNA (r-DNA)衍生蛋白質產品之細胞內表現構築體之分析指引

一、引言

本指引旨在提供以真核和原核細胞生產基因重組蛋白質產品 (recombinant DNA protein products)時，表現構築體之特性分析指引。本指引目的在提供評估生產基因重組蛋白質之表現構築體之要點，並未涵蓋基因重組蛋白質產品之整體品質。

表現構築體定義為含有重組蛋白質編碼序列的表現載體。應使用核酸技術對表現構築體進行分析，合併以其他分析方法分析純化後之重組蛋白質，以確保最終產品之品質與一致性。表現構築體於核酸層面之分析應僅視為整體品質評估的一環，因該分析只評估重組基因的編碼序列，並未包括重組蛋白質的轉譯正確性或其他特性，例如二級結構、三級結構和轉譯後修飾。

二、分析表現構築體的合理性

分析表現構築體之目的係為確定產物的正確編碼序列已被導入宿主細胞，且該序列能於培養過程中持續存在至製程結束。以活細胞生產重組蛋白質時，其基因序列可能會發生突變而改變重組蛋白質的特性，此改變對病人可能產生不良後果。沒有任何單一的實驗方法可檢測蛋白質所有可能之修飾。蛋白質分析技術可用於評估蛋白質的胺基酸序列及轉譯後修飾而形成之結構特性，例如蛋白水解、醣基化、磷酸化和乙醯化等作用。由於蛋白質分析方法可能無法檢測所有因核酸編碼序列突變而導致的蛋白質結構變化，因此核酸分析的數據仍相當重要。核酸分析與蛋白質分析的相對重要性因產品而異。

核酸分析可用於驗證編碼序列和表現構築體的物理狀態。進行核酸分析的目的是確保所表現的蛋白質具有正確的胺基酸序列，而不是用以檢測含量較少之變異序列。當生產細胞嵌入多個表現構築體時，並非所有的嵌入基因都具有轉錄活性，因此藉由分析傳訊 RNA (mRNA)或互補 DNA (cDNA)來檢視轉錄產物，會比分析基因體 DNA (genomic DNA)更為合適。

分析大量核酸的方法可替代個別 DNA 殖株 (clones) 之篩選，例如：以聚合酶鏈反應擴增混合殖株或產物以進行分析。其他可快速且靈敏地確認表現構築體中重組蛋白質編碼序列之方法也可考慮使用。

以下介紹生產系統於開發與確效期間所應提供之表現構築體的特性分析資料。用於確認序列之分析方法應進行確效。確效文件至少應包括對變異序列之偵測極限。核酸序列或蛋白質序列之檢測方法應進行確效。應定期審視確效文件所述之分析原理和建議，以利引進新穎的分析技術與科學資訊。

三、表現系統之特性分析

(一) 用於建置主細胞庫之表現構築體和細胞殖株

製造商應說明編碼該蛋白質之核苷酸序列來源。應包括最初取得核苷酸序列之細胞鑑定與來源。製備編碼蛋白質之 DNA 方法應加以描述。

應詳述表現構築體之建構步驟。無論是否成為融合蛋白，應描述表現構築體各部分之來源和功能，例如：複製起點 (origins of replication)、抗生素抗藥基因 (antibiotic resistance genes)、啟動子 (promoters)、強化子 (enhancers)。應提供詳細的質體 (plasmid) 圖譜和加以註釋的完整序列，並標示在建構過程中已經定序的區域和由文獻中得知的區域。質體所表現之其他蛋白質亦應標示。嵌入載體之目標基因及其兩側外緣區域 (包括嵌入連接點之核苷酸序列) 均應進行 DNA 定序。

應說明將表現構築體送入宿主細胞的方法。另外，應詳述用以擴增表現構築體的方法及用以篩選生產細胞殖株的標準。

(二) 細胞庫系統

重組蛋白質的生產應使用已有完整特性分析之主細胞庫和工作細胞庫。細胞庫係指一批貯存於特定條件下以等量分裝於保存容器的單一細胞群 (a single pool of cells)。主細胞庫 (Master Cell Bank, MCB) 衍生自經選定含有表現構築體之細胞殖株。工作細胞庫 (Working Cell Bank, WCB) 為自一管或多管主細胞庫擴增而得。應詳述細胞株 (cell line) 的歷史及細胞庫

的製備過程，包括培養過程使用之方法與試劑、體外細胞年齡 (*In vitro cell age*)和保存條件。所有細胞庫均應針對相關的表現型和基因型標記進行特性分析，其中包括重組蛋白質之表現或表現構築體之存在。

主細胞庫之表現構築體應依以下說明進行分析。如無法於主細胞庫進行分析，則應於每個工作細胞庫進行分析。

應使用限制性核酸內切酶圖譜分析法 (restriction endonuclease mapping) 或其他合適的方法，以分析表現構築體之拷貝數 (copy number)、插入 (insertion)或缺失 (deletion)、以及嵌入位點的數目。對於染色體外表現系統 (extrachromosomal expression systems)，應測定宿主細胞含有表現構築體所占的比例。

由表現構築體生產之重組蛋白質產物的編碼序列應加以驗證。就染色體外表現系統而言，應純化分離表現構築體並驗證編碼其產物之核苷酸序列，毋須經過進一步選殖。對於染色體具有表現構築體基因序列之細胞，可藉由染色體基因再選殖 (recloning)與定序以驗證編碼該產品的核苷酸序列。此外，亦可透過聚合酶鏈反應擴增混合 cDNA 或產物之定序以驗證核酸序列。在所使用方法學的偵測極限內，細胞庫之核酸序列應與三(一)用於建置主細胞庫之表現構築體和細胞植株所述之表現構築體序列相同，並應與預期之蛋白質序列一致。

(三) 生產用體外細胞年齡之限制

應根據在先導工廠規模 (pilot plant scale)或上市批量規模下，將生產細胞擴增至預計之體外細胞年齡或更長時間的分析數據以訂定生產用體外細胞年齡之限制。一般而言，生產細胞是以工作細胞庫擴增而得；如有適當的理由，主細胞庫亦可用以製備生產細胞。

除非生產細胞中表現構築體之蛋白質編碼序列可由核酸測試或最終產物分析加以驗證，否則如同三(二)細胞庫系統中所述，應於 MCB 對生產細胞的表現構築體進行一次分析。若欲延長既定之生產用體外細胞年齡限制，應以已擴增至新的體外細胞年齡限制或大於新的體外細胞年齡限制之數據支持。

四、總結

表現構築體和最終純化蛋白質的特性分析對於確保重組 DNA 衍生產品的穩定生產很重要。正如上所述，應評估源自核酸分析和最終純化蛋白質分析之數據，以確保重組蛋白質產品之品質。

五、詞彙表

- **表現構築體 (Expression Construct)**：包含重組蛋白的編碼序列及基因表現的必要元件之表現載體。
- **外緣控制區域 (Flanking Control Regions)**：外緣控制區域是與產品編碼序列的 5'和 3'端相鄰之非編碼核苷酸序列，包含影響編碼序列轉錄、轉譯或穩定性的重要元件。這些區域包括啟動子、增強子和剪接序列等，但不包括複製起始序列與抗生素抗藥基因。
- **嵌入位點 (Integration Site)**：一個或多個表現構築體嵌入至宿主細胞基因體的位點。
- **體外細胞年齡 (In vitro Cell Age)**：細胞由主細胞庫解凍至生產容器收穫之時間，可經由細胞於各階段之培養時間、細胞族群倍增程度或細胞以特定之稀釋程序進行繼代培養之繼代數來測量。
- **主細胞庫 (Master Cell Bank, MCB)**：主細胞庫係指於特定條件下以所選定之細胞殖株製備之單一細胞群，再等量分裝至多個容器而製成，並保存於限定條件下。主細胞庫用於製備所有工作細胞庫。除非有適當合理性說明，否則對於新的主細胞庫（來自先前之初始細胞殖株、主細胞庫或工作細胞庫）執行之檢測應與原有主細胞庫相同。
- **先導工廠規模 (Pilot Plant Scale)**：以可完全代表並模擬商業生產規模之程序生產重組蛋白質。除生產規模外，細胞擴增、收穫和產物純化的方法應相同。
- **相關基因型和表現型標記 (Relevant Genotypic and Phenotypic Markers)**：係指那些用以鑑定應包含重組蛋白質表現或表現構築體存在之細胞株的標記。
- **工作細胞庫 (Working Cell Bank, WCB)**：工作細胞庫係指以主細胞庫於特定培養條件下，製備之細胞懸浮液，再等量分裝而製成。