国际人用药品注册技术协调会

ICH 三方协调指导原则

源自重组 DNA 技术的蛋白质产品的表达载体分析

Q5B

现行第 4 阶段版本

1995 年 11 月 30 日

根据 ICH 进程，本指导原则由相应的 ICH 专家工作组制定，并已向监管机构征求意见。在进程的第 4 阶段，建议欧盟、日本和美国的监管机构采纳最终草案。

Q5B 文件历史

第一次汇编	历史	日期	新汇编 2005 年 11 月
Q5B	在第 2 步基础上由指导委员会批准，并向公众征求意见	1995 年 3 月 28 日	Q5B

现行第四版

Q5B	在第 4 步基础上由指导委员会批准，并推荐给三方 ICH 监管机构采纳	1995 年 11 月 30 日	Q5B

源自重组 DNA 技术的蛋白质产品的表达载体分析

ICH 三方协调指导原则

1995 年 11 月 30 日在 ICH 指导委员会会议上完成第 4 步并推荐给三方 ICH 监管机构采纳。

I 引言

本文件旨在为用真核和原核细胞生产重组 DNA 蛋白产品的表达载体的鉴定提供指导，内容仅与评估重组 DNA 蛋白表达构建载体时的相关信息有关，不涵盖重组 DNA 来源的医药产品的所有质量的内容。

表达载体的定义为含有重组蛋白的编码序列的表达载体。为保证终产品的质量和一致性，应使用核酸技术并结合其他用于纯化重组蛋白的方法来分析表达载体。由于这部分的分析的内容是评价重组基因的编码序列，而不包括翻译的忠实性以及重组蛋白的其他特征如二级结构、三级结构和翻译后修饰，所以对表达载体在核酸水平上的分析只能视为产品整体质量评价的一部分。

II 表达构建体分析的基本原理

表达载体分析的目的是确保产品的正确编码序列被导入到宿主细胞，并从培养开始到生产结束保持不变。在活细胞中产生的重组蛋白，其基因序列可能发生突变而改变蛋白质的性质，从而对病人产生潜在的副作用。目前没有一种单独的试验方法能检测蛋白质分子中所有可能发生的修饰。蛋白质分析技术是用于估测蛋白质的氨基酸序列和由于翻译

后修饰如蛋白水解、糖基化、磷酸化、乙酰化等作用形成的结构特征。因为蛋白质分析方法有时不能检测到所有重组蛋白编码序列突变造成的蛋白质结构变化，所以从核酸分析中得到的资料对确定蛋白质结构也是有用的。对于不同的产品，核酸分析和蛋白分析的相对重要性各有不同。

核酸分析可用于验证表达载体的编码序列和物理状态。核酸分析的目的不是为了检测少量变异序列，而是为了能确保被表达的蛋白有正确的氨基酸序列。当生产细胞有多个整合的表达构建体拷贝时，并非所有的拷贝都具有转录活性，因此通过对 mRNA 或 cDNA 的分析测定转录产物本身，会比对基因组 DNA 的分析更合适。测定成批核酸的分析方法，如对混合克隆或聚合酶链反应扩增产物进行测定，可能替代依靠选择单一 DNA 克隆的方法。以上方法之外，当然也可考虑其他能快速、灵敏地确证表达载体中重组蛋白的编码序列的方法。

以下介绍在生产体系开发和确认期间，对于表达载体的鉴定应提供的资料。为确认序列的目的所使用的各种分析方法，应予以验证，验证文件至少应包括对各变异序列的检测限度的估测。对核酸或蛋白测序方法都应作这样的验证评价。要运用在科技情报方面的新进展，并对先进的新技术和科技信息加以应用。

III 表达系统的鉴定

A 用以制备主细胞库（MCB）的表达载体和细胞克隆

生产者应说明蛋白质的核酸编码序列的来源，包括最初从中获得核酸序列的细胞的鉴别和来源，及用于制备蛋白质DNA编码序列的方法。

应详细说明表达载体构建的步骤，不论蛋白质是否是作为融合蛋白表达的，都应说明表达构建体组成成分，如复制起点、抗生素耐药基因、启动子、增强子的来源和功能，还应提供质粒的详细组成图并完整标明其顺序，指出哪些区域是在质粒构建时测序的，哪些是从文献得来的。对质粒编码的其他表达蛋白也应予以说明。从插入载体的目的基因编码区和相关的侧翼区的核苷酸顺序，至插入的接头顺序，都应进行DNA序列测定。

应提供表达载体转移到宿主细胞的方法，还应详细说明用于扩增表达载体的方法和用于选择生产细胞克隆的标准。

B 细胞库系统

重组蛋白的生产应建立在经过检定研究并确定的主细胞库和工作细胞库基础上。细胞库是装有均一细胞成分并在规定条件下储存的安瓿集合，每个安瓿含有同样构成的等份的单批细胞。主细胞库通常来自选定的含有表达载体的细胞克隆。工作细胞库（WCB）是通过扩增一个或多个MCB的安瓿制得。应详尽表述细胞系的历史和细胞库的生产过程，

包括培养和体外细胞传代时用的方法和试剂，以及其储存条件。所有细胞库都应对有关的表型和基因型的标记进行鉴定，这些标记应包括重组蛋白的表达或表达载体的存在。

应按下述方法对 MCB 中的表达构建体进行分析，如果不能用 MCB 检测，应对每个 WCB 进行检测。

应采用限制性内切酶图谱或其他适宜的技术分析表达载体的拷贝数、插入或缺失情况以及整合位点的数目。对染色体外的表达系统，应测定保留有表达载体的宿主细胞所占的百分数。

应确证表达载体的重组蛋白产物的蛋白编码序列。对染色体外的表达系统，在进一步克隆前应分离表达载体，测定编码产品的核苷酸序列；对于含有嵌入染色体内的表达载体的细胞，其编码产品的核苷酸序列可通过染色体拷贝的再克隆和测序来确认。其他可替代测定编码产品的核酸序列的方法可采用对 cDNA 混合克隆或聚合酶链反应扩增产物进行测序。在方法学的检测限度内，核苷酸顺序应与在IIIA 部分中描述的表达载体测定结果相同， 并与预期的蛋白质氨基酸序列顺序相吻合。

C 生产细胞体外传代的限度

生产细胞体外传代的限度，应根据试生产规模生产或全规模生产时生产细胞扩增至建议的细胞体外传代期限或更长期限的数据而定。一般说来，生产细胞是由工作细胞库扩

增而得，如有适当理由，主细胞库也可用于制备生产细胞。

除了通过核酸试验或对蛋白质终产品的分析确认生产细胞表达构建体的蛋白编码序列外，对于在IIIB 中所叙述的MCB，应分析其生产细胞的表达载体。要增加已确定的生产细胞体外传代限度必须有数据支持，就是说，得出这一数据的细胞所增殖到的体外传代数要等于或大于这个新的体外细胞传代限度。

IV 结语

为保证重组 DNA 来源产品生产的一致性，对表达载体和最终纯化蛋白的鉴定都是很重要的。正如以上所述，应对通过核酸分析和纯化蛋白终产物的分析所得到的资料进行评价，以确保重组蛋白产品的质量。

术语表

表达载体：是含有重组蛋白的编码序列和它表达所需元件的表达载体。

侧翼控制区：是与产品编码序列的 5'和 3'末端相邻的非编码核苷酸序列，含有影响编码序列转录、翻译和稳定性的重要元件，包括启动子、增强子和剪接序列等区域，但不包括复制起点和抗生素耐药基因区域。

整合位点：是表达载体的一个或多个拷贝被整合进宿主细胞基因组的位点。

体外细胞龄：是指从 MCB 小瓶细胞融化至生产容器收

获产品的这一段时间，它可用培养所耗的时间来量度，或者用细胞数倍增水平来量度；当细胞是以一定的程序稀释培养物质进行传代培养时，也可用细胞的传代次数来表示。

主细胞库：是在指定条件下从选定的细胞克隆制备的单批细胞，它被分装到多个容器中并在规定条件下储存。MCB通常用于制备所有的工作细胞库，对一个新的MCB（克隆一个起始细胞而成的MCB或WCB）进行的试验应与原有MCB相同。

试生产规模：一种能代表和模拟生产规模生产重组蛋白的生产，除生产规模外，细胞扩增、收获和产品纯化的方法均应与生产规模一致。

相关基因型和表型的标记：这些标记可用于对表达重组蛋白或存在表达载体的细胞系进行鉴定。

工作细胞库：工作细胞库是在规定培养条件下培养MCB并经等量分装获得的来源和构成相同的匀质细胞悬液的容器集合。