

(5148) 生物技術產品品質：生產重組 DNA 衍生蛋白質產品之細

胞中表現構築體之分析

本通則係提供利用真核與原核細胞生產重組 DNA(recombinant DNA, rDNA)蛋白質產品所使用表現構築體(expression construct)鑑定之指引，說明數種有助評估此種表現構築體結構之資訊。本通則並未涵蓋 rDNA 衍生藥品之所有品質面向。

表現構築體是含有重組蛋白質編碼序列之表現載體。表現構築體之片段須以核酸技術進行分析，結合針對純化之重組蛋白質所執行之其他檢驗，以確保最終產品之品質與一致性。表現構築體之核酸層面分析僅是整體品質評估一部分，因為本項檢驗僅評估重組基因編碼序列，而非轉譯準確度(fidelity)或重組蛋白質之其他特性(例如：二級結構、三級結構及轉譯後修飾)。

1. 表現構築體分析原理

表現構築體分析之目的係確認正確之產品編碼序列已被嵌入宿主細胞內，並在培養過程中維持至最終生產階段。以活細胞生產重組蛋白質過程中，其基因序列可能發生突變，造成蛋白質性質改變，對患者有潛在不良影響。沒有單一試驗得以偵測所有可能之蛋白質修飾。蛋白質分析技術可評估蛋白質之胺基酸序列，以及表現之蛋白質經過轉譯後修飾之結構特性(例如：蛋白質水解過程、糖化、磷酸化及乙醯化)。由於蛋白質分析法可能無法檢測出所有重組蛋白質基因序列突變所造成之蛋白質結構變化，核酸分析數據可有所助益。核酸分析與蛋白質分析的相對重要性因產品而異。

核酸分析可確認表現構築體之編碼序列與物理狀態，其可確認表現之蛋白質有正確胺基酸序列，但無法測出少量變異序列。當生產細胞內被嵌入數個表現構築體時，並非所有都能有效轉錄，利用

mRNA 或 cDNA 檢查轉錄產物本身，可能比分析基因體 DNA 更加適當。用於檢驗大量核酸之分析方法，例如：分析匯集殖株 (clones) 或聚合酶鏈反應後之物質，可作為取代選擇個別 DNA 殖株之方法；另外亦可考慮使用其他可快速且具有靈敏度之技術確認重組蛋白質之表現構築體序列編碼。

以下說明在開發與確效生產系統時所應提供之表現構築體特性資訊。分析方法須通過確效，以達確認序列之目的。確效文件至少須包含變異序列之偵測極限，應以核酸或蛋白質定序法執行。本通則所表達之分析原理與建議須定期檢討，以運用新技術與新科學資訊。

2. 表現系統之特性分析

2.1. 開發主細胞庫(master cell bank, MCB)所使用之表現構築體與細胞株

製造商應說明蛋白質編碼之核苷酸序列來源，包括其鑑定與最初取得核苷酸序列之細胞來源，並說明該蛋白質之 DNA 編碼的製備方法。

應詳述表現構築體之組裝步驟，包括表現構築體組成部分之來源與功能，例如：複製起點、抗生素抗性基因、啟動子、增強子及是否合成為融合蛋白質。提供質體之詳細組成圖與完整序列註釋，指出建構時已定序之區域與取自文獻之區域，並說明其他由該質體編碼所表現出之蛋白質。對於標的基因編碼區之核苷酸序列，以及被嵌入載體之相關外緣區域，直至並包含嵌入連接點，應進行構築體之 DNA 定序加以確定。

應描述表現構築體送入宿主細胞之方法，並詳述放大表現構築體之方法與選擇生產用細胞株之標準。

2.2. 細胞庫系統

生產重組蛋白質須有定義明確之 MCB 與工作細胞庫(working cell bank, WCB)。細胞庫是由單一細胞株培養匯集後等量分裝之安瓿小瓶，所有小瓶具有均一組成並儲存於特定條件下。MCB 通常來自選定之細胞株，其中含表現構築體。WCB 是由一或多支 MCB 之安瓿擴增而得，細胞株履歷與細胞庫之生產應詳加說明，包括培養使用之方法與試劑、體外細胞年齡(*in vitro* cell age)及儲存條件。所有細胞庫之相關基因型與表現型標記(relevant genotypic and phenotypic markers)皆須加以鑑定，其可能包括重組蛋白質之表現或表現構築體是否存在。

MCB 中之表現構築體應進行下列分析，如無法以 MCB 執行檢測，應對每個 WCB 進行檢測。

使用限制內切酶圖譜或其他適當技術分析表現構築體之拷貝數(copy number)、插入或刪除及嵌入位置(integration site)數目。如為染色體外表現系統，應測定保留表現構築體之宿主細胞比例。

應加以確認表現構築體中之重組蛋白質編碼序列。染色體外表現系統應分離出表現構築體，不做進一步選殖(cloning)，直接確認編碼蛋白質之核苷酸序列。對於染色體含有表現構築體之細胞，應將編碼蛋白質之核苷酸加以再選殖(recloning)與定序，以確認其序列。另可利用定序匯集之 cDNA 殖株(clones)或聚合酶鏈反應增量後之物質確認編碼蛋白質之核酸序列。在方法偵測極限內，核酸序列鑑定之結果應與表現構築體一致(描述於 2.1.)，且對應所預期之蛋白質序列。

2.3. 生產之體外細胞年齡限制

生產之體外細胞年齡限制，應以先導工廠規模(pilot plant-scale)或完整規模(full-scale)條件擴增至建議或更高體外細胞年齡之生產細胞所得數據為依據。生產所使用細胞通常是從 WCB 擴增而來；如有適當理由，亦得使用 MCB 製備生產細胞。

除了利用核酸檢驗或分析最終蛋白質產品來驗證生產細胞中表現構築體之蛋白質編碼序列，生產細胞之表現構築體應以 MCB 依 2.2. 細胞庫系統之方法進行分析。如欲放寬生產細胞之年齡限制，須有已生長至體外細胞之新年齡上限或更長時間之佐證數據。

3. 結論

表現構築體與最終純化蛋白質之鑑定對於確保 r-DNA 衍生產品之生產一致性皆很重要，前述核酸分析與最終純化蛋白質之分析數據皆應評估，以確保重組蛋白質產品之品質。

4. 詞彙表

表現構築體(expression construct)——含有重組蛋白質編碼序列與其表現所需要素之表現載體。

側翼外緣控制區(flanking control regions)——鄰近產品編碼序列 5' 與 3' 端之非編碼核苷酸序列，含有影響轉錄、轉譯或編碼序列穩定性之重要因素。該區域包括如啟動子、增強子及剪接序列，不包括複製起點與抗生素抗性基因。

嵌入位點(integration site)——一或多個表現構築體嵌入宿主細胞基因體的位點。

體外細胞年齡(*in vitro* cell age)——測量從 MCB(數)管解凍至生產容器細胞收穫所需之時間，可測量培養經過之時間、細胞數倍增

程度、或依特定稀釋培養步驟進行繼代培養之細胞繼代數。

主細胞庫(master cell bank, MCB)——為單一細胞株培養分裝而來，通常是在特定條件下從選定之細胞株製備，分裝至多個容器中，並儲存於特定條件。MCB 用於製得所有工作細胞庫，除非有其他理由，否則新 MCB(來自先前之初始細胞株、MCB 或 WCB)應與 MCB 執行相同之檢測。

先導工廠規模(pilot plant scale)——利用可充分代表與模擬完整量產規模之步驟生產重組蛋白質。除了生產規模有所不同外，所有細胞擴增、收集及產物純化方法皆應相同。

相關基因型與表現型標記(relevant genotypic and phenotypic markers)——這些標記可供鑑定細胞株，包括重組蛋白質表現或表現構築體之存在。

工作細胞庫(working cell bank, WCB)——MCB 依特定培養條件下培養，將所取得之均質細胞懸浮液等份分裝製得。