

人用重组 DNA 制品质量控制技术指导原则

二 00 三年三月

人用重组 DNA 制品质量控制技术指导原则

一、引言

由于分子遗传学、核酸化学及重组 DNA (rDNA) 技术的迅速发展, 现已能够确定和获得许多天然活性蛋白的编码基因, 将其插入表达载体或引入某种宿主细胞后, 能有效地表达该基因产物, 再经分离、纯化和检定, 可得到用于预防和治疗某些人类疾病的制品, 诸如现有的乙型肝炎疫苗、胰岛素、生长激素、干扰素等。

用不同于常规方法的 rDNA 技术生产的制品, 是近年来出现的新产品, 评价其安全性和有效性亦不同于常规方法。这一领域中的知识和技术还在不断发展, 为了有利于这类制品在我国的研究和发展, 并为这类制品的审评提供依据, 有必要制定一个原则性指导文件, 以保证在人群中试验或应用时安全有效。

本“人用重组 DNA 制品质量控制技术指导原则”(以下简称《指导原则》) 不可能面面俱到, 可能有许多专门技术问题会出现, 对于这类问题或某一特定制品, 则应视具体问题具体研究决定。本《指导原则》亦将随科学技术发展和经验积累而逐步完善。

二、总则

(一) 本《指导原则》适用于 rDNA 技术生产并在人体内应用的蛋白质、肽类制品。

(二) 凡属与一般生物制品有关的质量控制, 均按现行版《中国药典》有关规定执行。有关生产设施的要求应参照国家药品监督管理局《药品生产质量管理规范》执行。

三、质量控制要求

(一) 原材料的控制

1. 表达载体和宿主细胞

应提供有关表达载体详细资料, 包括基因的来源、克隆和鉴定, 表达载体的构建、结构和遗传特性。应说明载体组成各部分的来源和功能, 如复制子和启动子来源, 或抗生素抗性标志物。提供至少包括构建中所用位点的酶切图

谱。应提供宿主细胞的资料，包括细胞株（系）名称、来源、传代历史、检定结果及基本生物学特性等。

应详细说明载体引入宿主细胞的方法及载体在宿主细胞内的状态（是否整合到染色体内）及拷贝数。应提供宿主和载体结合后的遗传稳定性资料。

2. 克隆基因的序列

应提供插入基因和表达载体两侧端控制区的核苷酸序列。所有与表达有关的序列均应详细叙述。

3. 表达

应详细叙述在生产过程中，启动和控制克隆基因在宿主细胞中的表达所采用的方法及表达水平。

4. 原辅料

原辅料应按照国家药品监督管理局有关规定执行。动物源性原料的使用应提供来源及质控检测资料；发酵用培养基不能添加 β 内酰胺类抗生素。

（二）生产的控制

1. 主细胞库（MASTERCELLBANK）

rDNA 制品的生产应采用种子批（SEEDLOT）系统。从已建立的主细胞库中，再进一步建立生产细胞库（WCB）。

含表达载体的宿主细胞应经过克隆而建立主细胞库。在此过程中，在同一实验室工作区内，不得同时操作两种不同细胞（菌种）；一个工作人员亦不得同时操作两种不同细胞或菌种。

应详细记述种子材料的来源、方式、保存及预计使用寿命。应提供在保存和复苏条件下宿主载体表达系统的稳定性证据。采用新的种子批时，应重新作全面检定。

真核细胞用于生产时，细胞的鉴别标志，如特异性同工酶或免疫学或遗传学特征，对鉴别所建立的种子是有用的。有关所用传代细胞的致癌性应有详细报告。如采用微生物培养物为种子，则应叙述其特异表型特征。

一般情况下，在原始种子阶段应确证克隆基因的 DNA 序列。但在某些情况下，例如传代细胞基因组中插入多拷贝基因。在此阶段不适合对克隆基因作 DNA 序列分析。在此情况下，可采用总细胞 DNA 的杂交印染分析，或作 mRNA 的序列分析。对最终产品的特征鉴定应特别注意。

种子批不应含有外源致癌因子，不应含有感染性外源因子，如细菌、支原体、真菌及病毒。

有些细胞株含有某些内源病毒，例如逆转录病毒，且不易除去。但当已确知在原始细胞库或载体部分中污染此类特定内源因子时，则应能证明在生产纯化过程可使之灭活或清除。

2. 有限代次生产

用于培养和诱导基因产物的材料和方法应有详细资料。对培养过程及收获时，应有敏感的检测措施控制微生物污染。

应提供培养生长浓度和产量恒定性方面的数据，并应确立废弃一批培养物的指标。根据宿主细胞 / 载体系统的稳定性资料，确定在生产过程中允许的最高细胞倍增数或传代代次，并应提供最适培养条件的详细资料。

在生产周期结束时，应监测宿主细胞 / 载体系统的特性，例如质粒拷贝数、宿主细胞中表达载体存留程度、含插入基因的载体的酶切图谱。一般情况下，用来自一个原始细胞库的全量培养物进行监测，必要时应做一次目的基因的核苷酸序列分析。

3. 连续培养生产

基本要求同 2 项。

应提供经长期培养后所表达基因的分子完整性资料，以及宿主细胞的表型和基因型特征。每批培养的产量变化应在规定范围内。对可以进行后处理及应废弃的培养物，应确定指标。从培养开始至收获，应有敏感的检查微生物污染的措施。

根据宿主 / 载体稳定性及表达产物的恒定性资料，应规定连续培养的时间。如属长时间连续培养，应根据宿主 / 载体稳定性及产物特性的资料，在不同间隔时间作全面检定。

4. 纯化

对于收获、分离和纯化的方法应详细记述，应特别注意污染病毒、核酸以及有害抗原性物质的去除。

如采用亲和层析技术，例如用单克隆抗体，应有检测可能污染此类外源性物质的方法，不应含有可测出的异种免疫球蛋白。

对整个纯化工艺应进行全面研究，包括能够去除宿主细胞蛋白、核酸、

糖、病毒或其它杂质以及在纯化过程中加入的有害的化学物质等。

关于纯度的要求可视制品的用途和用法而确定，例如，仅使用一次或需反复多次使用；用于健康人群或用于重症患者；对纯度可有不同程度要求。

（三）最终产品的控制

应建立有关产品的鉴别、纯度、稳定性和活性等方面的试验方法。检测的必要性和纯度要求取决于多种因素：产品性质和用途、生产和纯化工艺及生产工艺的经验。一般说来下列试验对控制产品质量是可以采用的。新的分析及对现有技术的改进正在不断进行，适当时应使用这些新的技术。

1. 物理化学鉴定

（1）氨基酸组成

使用各种水解法和分析手段测定氨基酸的组成，并与目的蛋白基因序列推导的氨基酸组成或天然异构体比较。如需要时应考虑分子量的大小。多数情况下，氨基酸组成分析对肽段和小蛋白可提供有价值的结构资料，但对大蛋白一般意义较小。在多数情况下，氨基酸定量分析数据可用于确定蛋白含量。

（2）氨基酸末端序列

氨基酸末端分析用于鉴别 N-端和 C-端氨基酸的性质和同质性。若发现目的产品的末端氨基酸发生改变时，应使用适当的分析手段判定变异体的相应变异数量。应将这些氨基酸末端序列与来自目的产品基因序列推导的氨基酸末端序列进行比较。

（3）肽谱

应用合适的酶或化学试剂使所选的产品片段产生不连续多肽，应用 HPLC 或其他适当的方法分析该多肽片段。应尽量应用氨基酸组成分析技术，N-末端测序或质谱法鉴别多肽片段。对批签发来说，经验证的肽谱分析经常是确证目的产品结构/鉴别的适当方法。

（4）巯基和二硫键

如果依据目的产品基因序列存在半胱氨酸残基时，应尽可能确定巯基和/或二硫键的数量和位置。使用方法包括肽谱分析（还原和非还原条件下）、质谱测定法或其他适当的方法。

(5) 碳水化合物结构

应测定糖蛋白中碳水化合物含量（中性糖、氨基糖、唾液酸）。此外尽可能分析碳水化合物的结构、寡糖形态（长链状）和多肽的糖基化位点。

(6) 分子量

应用分子筛层析法、SDS-PAGE（还原和/或非还原条件下）、质谱测定法、和/或其他适当技术测定分子量。

(7) 等电点

通过等电聚焦电泳或其他适当的方法测定。

(8) 消光系数（或克分子吸光度）

多数情况下，可取目的产品于 UV/可见光波长处测定消光系数（或克分子吸光度）。消光系数的测定为使用 UV/可见光或分光光度计检测已知蛋白含量的溶液，蛋白含量应用氨基酸组成分析技术或定氮法等方法测定。

(9) 电泳图型

应用 PAGE 电泳、等电聚焦、SDS-PAGE 电泳、免疫印迹、毛细管电泳法或其他适当的方法，获得目的产品/药物的一致性、同一性和纯度的电泳图谱和数据。

(10) 液相层析图谱

应用分子筛层析、反相液相层析、离子交换液相层析、亲和层析或其他适当方法，获得目的产品/药物的一致性、同一性和纯度的层析图谱和数据。

(11) 光谱分析

适当时，应用紫外或可见光吸收光谱法测定，使用圆二色谱、核磁共振（NMR）、或其他适当的方法检测制品的高级结构。

2. 杂质检测

(1) 工艺相关杂质

工艺相关杂质来源于生产工艺，可分三大类：来源于细胞基质、培养基和下游工艺。

①来源于细胞基质的杂质包括源于宿主生物体的蛋白/多肽；核酸（宿主细胞/载体/总 DNA）；多糖及病毒。对于宿主细胞蛋白，一般应用能检测出较宽范围蛋白杂质的灵敏的免疫检测方法。应用不含目的基因的生物体粗提物，即不含产品编码基因的生产用细胞，制备上述试验使用的多克隆抗体。可

通过对产品的直接分析方法（如杂交技术法）检测宿主细胞的 DNA 水平，和/或通过标记实验（实验室规模）检测证实通过纯化工艺能去除核酸。对于有意导入的病毒，应验证生产工艺中去除/灭活病毒的能力。

②来源于培养基的杂质包括诱导剂（多核苷酸, 病毒）、抗生素、血清及其他培养基组分。

③来源于下游工艺产生的杂质包括酶、化学/生化处理试剂（如溴化氰、胍、氧化剂和还原剂）、无机盐（如重金属、砷、非有色金属离子）、溶剂、载体/配体（如单克隆抗体），及其他可滤过的物质。

（2）产品相关杂质

以下为最常见的目的产品的分子变异体，并列出了相应的检测方法：

①化学修饰类型：应考虑脱酰胺、异构化、错配 S-S 连接和氧化形式的分离和鉴别。对这些变异体的分离和鉴别，可应用层析法和/或电泳法（如 HPLC、毛细管电泳、质谱法、圆二色谱）。

②降解物和聚合体：聚合体包括二聚体和多聚体：可用分子筛层析法（如 SE-HPLC）进行定量；降解物：应建立降解物的判定标准，并对稳定性试验产生的降解产物进行监测。

3. 生物学测定

（1）鉴别试验

应用免疫印迹法，或者在可能情况下，应用参考品将 rDNA 制品与天然产品通过生物学比较试验，确定其与天然产品是一致的。

（2）效价测定

采用国际或国家参考品，或经过国家检定机构认可的参考品，以体内或体外法测定制品的生物学活性，并标明其活性单位。

（3）特异比活性测定

在测定生物学活性的基础上，对有些制品还应用适当方法测定主药蛋白含量，测定其特异比活性，以活性单位 / 重量表示。

（4）热原质试验

应采用家兔法或鲎试验法（LAL）作热原质检测，控制标准可参照天然制品的要求。

(5) 无菌试验

参照现行版《中国药典》有关规定进行，应证实最终制品无细菌污染。

(6) 抗原性物质检查

必要时，如制品属大剂量反复使用者，应测定最终制品中可能存在的抗原性物质，如宿主细胞、亚细胞组分及培养基成份等。患者反复接受大剂量的这类制品时，应密切监测由这些抗原可能产生的抗体或变态反应。

(7) 异常毒性试验

可参照现行版《中国药典》有关规定进行。

4. 其他

根据产品剂型，应有外观（如固体、液体、色泽、澄明度等方面的描述）、水分、PH 值、装量等方面的规定，可参照现行版《中国药典》相关规定执行。

四、临床前安全性评价

临床前安全性试验的目的主要是确定新制品是否会在人体引起未能预料的不良反应。但是，用于一般化学药物的传统安全性或毒性试验对 rDNA 产品不一定适用，用传统毒性试验来评价 rDNA 产品往往有困难，并受多种因素的影响。例如，某些蛋白质，如干扰素，具有高度种属特异性，这种人的蛋白质对人的药理学活性远高于对动物的活性，而且人的蛋白质氨基酸序列，常常与来自其它种系的蛋白质不同，例如糖基就不一样。因而由基因工程技术所制备的蛋白质或肽类往往会在人体以外的其它宿主中产生免疫应答，其生物学效应有所改变，并可能因形成免疫复合物而导致有毒性反应，而这样产生的毒性反应与人体安全性显然无关。

另外，由于产品效价、生产工艺或者产品稳定性等要求，对产品进行修饰或者改构，应提供与未修饰或者改构产品比较的研究资料。以简化生产工艺为目的在产品中引入的额外多肽片段如 His-tag，在最终产品中应尽可能去除。

综上所述，对 rDNA 产品的临床前安全性试验要求，难以一概而论，应采取较为灵活的处置方法。除了一般生物制品的毒性试验要求之外，其它如长期毒性试验、药代动力学试验、药理学试验、毒理学试验，以及致畸和致突变

等试验，应根据制品性质，与国家检定机构及药品审评中心商定所需进行的试验项目和方法，以及判定标准。