

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR
REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE

ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE

생명 공학 제품의 품질: r-DNA 유래 단백질 제품 생산용
세포의 발현 구조물 분석

(Quality of Biotechnological Products: Analysis of the
Expression Construct In Cells Used For Production of r-
DNA Derived Protein Products)

Q5B

Current *Step 4* version
dated 30 November 1995

This Guideline has been developed by the appropriate ICH Expert Working Group and has been subject to consultation by the regulatory parties, in accordance with the ICH Process. At Step 4 of the Process the final draft is recommended for adoption to the regulatory bodies of the European Union, Japan and USA.

Q5B
Document History

First Codification	History	Date	New Codification
Q5B	Approval by the Steering Committee under Step 2 and release for public consultation	28 March 1995	Q5B

Current Step 4 version

Q5B	Approval by the Steering Committee under Step 4 and recommendation for adoption to the three ICH regulatory bodies.	30 November 1995	Q5B
-----	---	------------------	-----

ANALYSIS OF THE EXPRESSION CONSTRUCT IN CELLS USED FOR PRODUCTION OF R-DNA DERIVED PROTEIN PRODUCTS

ICH Harmonised Tripartite Guideline

Having reached *Step 4* of the ICH Process at the ICH Steering Committee meeting on 30 November 1995, this guideline is recommended for adoption to the three regulatory parties to ICH.

1. 서론(Introduction)

This document presents guidance regarding the characterisation of the expression construct for the production of recombinant DNA protein products in eukaryotic and prokaryotic cells. This document is intended to describe the types of information that are considered valuable in assessing the structure of the expression construct used to produce recombinant DNA derived proteins. This document is not intended to cover the whole quality aspect of rDNA derived medicinal products.

이 문서는 진핵 세포와 원핵 세포에서 재조합 DNA 단백질 제품을 생산하기 위한 발현 구조물의 특성 평가에 관한 가이드라인을 제시한다. 재조합 DNA 유래 단백질 생산에 사용되는 발현 구조물의 구조 평가에서 중요하다고 생각되는 정보의 종류를 기술하기 위한 것이다. rDNA 유래 의약품의 품질과 관련된 모든 부분을 다루지는 않는다.

The expression construct is defined as the expression vector containing the coding sequence of the recombinant protein. Segments of the expression construct should be analysed using nucleic acid techniques in conjunction with other tests performed on the purified recombinant protein for assuring the quality and consistency of the final product. Analysis of the expression construct at the nucleic acid level should be considered as part of the overall evaluation of quality, taking into account that this testing only evaluates the coding sequence of a recombinant gene and not the translational fidelity nor other characteristics of the recombinant protein, such as secondary structure, tertiary structure, and post-translational modifications.

발현 구조물은 재조합 단백질의 코딩 서열을 포함하는 발현 벡터이다. 발현 구조물의 부분들을 핵산 기법으로 분석하며, 이때 최종 제품의 품질과 일관성 보증을 위하여 정제 재조합 단백질에 대하여 다른 시험도 실시한다. 핵산 차원의 발현 구조물 분석을 전반적인 품질 평가의 한 부분으로 고려하며, 이 시험은 재조합 유전자의 코딩 서열만 평가하고

재조합 단백질의 번역 정확성이나 기타 특성(예, 이차 구조, 삼차 구조, 번역 이후 변형)은 평가하지 않는다는 것을 감안해야 한다.

II. 발현 구조물 분석의 근거(Rationale for Analysis of the Expression Construct)

The purpose of analysing the expression construct is to establish that the correct coding sequence of the product has been incorporated into the host cell and is maintained during culture to the end of production. The genetic sequence of recombinant proteins produced in living cells can undergo mutations that could alter the properties of the protein with potential adverse consequences to patients. No single experimental approach can be expected to detect all possible modifications to a protein. Protein analytical techniques can be used to assess the amino acid sequence of the protein and structural features of the expressed protein due to post-translational modifications such as proteolytic processing, glycosylation, phosphorylation, and acetylation. Data from nucleic acid analysis may be useful since protein analytical methods may not detect all changes in protein structure resulting from mutations in the sequence coding for the recombinant protein. The relative importance of nucleic acid analysis and protein analysis will vary from product to product.

발현 구조물 분석의 목적은 제품 코딩 서열이 정확하게 숙주 세포에 통합되었고 배양부터 생산 종료까지 유지되는지 확인하는 것이다. 살아 있는 세포에서 생산되는 재조합 단백질의 유전 서열에 돌연변이가 발생할 수 있으며, 이에 따라 단백질의 특성이 변하여 환자에게 부정적인 영향을 미칠 가능성이 있다. 한 가지 실험 방법으로 모든 단백질 변형을 검출할 수 없다. 단백질 분석 기법을 활용하여 단백질의 아미노산 서열과 번역 이후 변형(예, 단백질 가수 분해, 당화, 인산화, 아세틸화)에 따른 발현 단백질의 구조적 특징을 평가한다. 단백질 분석 방법으로는 재조합 단백질 코딩 서열의 돌연변이로 인한 단백질 구조 변화를 모두 검출할 수 없으므로, 핵산 분석 데이터가 유용할 수 있다. 핵산 분석과 단백질 분석의 상대적인 중요성은 제품에 따라 다르다.

Nucleic acid analysis can be used to verify the coding sequence and the physical state of the expression construct. The nucleic acid analysis is performed to ensure that the expressed protein will have the correct amino acid sequence but is not intended to detect low levels of variant sequences. Where the production cells have multiple integrated copies of the expression construct, not all of which may be transcriptionally active, examination of the transcription product itself by analysis of mRNA or cDNA may be more appropriate than analysis of genomic DNA. Analytical approaches that examine a bulk population of nucleic

acids, such as those performed on pooled clones or material amplified by the polymerase chain reaction, may be considered as an alternative to approaches that depend on selection of individual DNA clones. Other techniques could be considered that allow for rapid and sensitive confirmation of the sequence coding for the recombinant protein in the expression construct.

핵산 분석으로 발현 구조물의 코딩 서열과 물리적 상태를 확인할 수 있다. 핵산 분석을 실시해 발현 단백질의 아미노산 서열이 정확한지 확인할 수 있지만, 낮은 수준의 변이 서열까지 검출하지는 못한다. 생산 세포가 여러 카피의 통합된 발현 구조물을 가지며 모든 카피가 전사 활성을 갖지 않는다면, mRNA 또는 cDNA 분석에 의한 전사 산물 자체의 검사가 유전체 DNA 분석보다 더 적절할 수 있다. 핵산 벌크를 검사하는 분석 방법(예, PCR로 증폭한 것 또는 풀링한 클론의 분석)을, 각 DNA 클론의 선정을 바탕으로 하는 방법의 대안으로 고려할 수 있다. 발현 구조물의 재조합 단백질 코딩 서열을 신속하고 민감하게 확인할 수 있는 다른 기법도 검토할 수 있다.

The following sections describe information that should be supplied regarding the characterisation of the expression construct during the development and validation of the production system. Analytical methodologies should be validated for the intended purpose of confirmation of sequence. The validation documentation should at a minimum include estimates of the limits of detection for variant sequences. This should be performed for either nucleic acid or protein sequencing methods. The philosophy and recommendations for analysis expressed in this document should be periodically reviewed to take advantage of new advances in technology and scientific information.

생산 시스템의 개발과 밸리데이션 과정에서 실시하는 발현 구조물의 특성 평가와 관련하여 제공해야 할 정보를 아래에서 설명한다. 분석 방법이 서열 확인이라는 목적에 적합함을 밸리데이션해야 한다. 밸리데이션 문서에 적어도 변이 서열의 검출 한계 추정치가 포함되어야 한다. 핵산 또는 단백질 서열 분석 방법을 밸리데이션한다. 기술 발달과 최신 과학 정보를 감안하여, 이 문서의 분석 원칙과 권고 사항을 주기적으로 검토한다.

III. 발현 시스템의 특성 평가(Characterisation of the Expression System)

A. MCB 개발용 세포 클론과 발현 구조물(Expression Construct and Cell Clone Used to Develop the Master Cell Bank (MCB))

The manufacturer should describe the origin of the nucleotide sequence coding for the

protein. This should include identification and source of the cell from which the nucleotide sequence was originally obtained. Methods used to prepare the DNA coding for the protein should be described.

제조업체는 단백질 코딩 뉴클레오티드 서열의 기원을 기술해야 한다. 뉴클레오티드 서열을 처음에 확보했던 세포의 출처와 관련 확인 정보를 포함해 기술한다. 단백질 코딩 DNA 제조 방법을 기술한다.

The steps in the assembly of the expression construct should be described in detail. This description should include the source and function of the component parts of the expression construct, e.g., origins of replication, antibiotic resistance genes, promoters, enhancers, whether or not the protein is being synthesised as a fusion protein. A detailed component map and a complete annotated sequence of the plasmid should be given, indicating those regions that have been sequenced during the construction and those taken from the literature. Other expressed proteins encoded by the plasmid should be indicated. The nucleotide sequence of the coding region of the gene of interest and associated flanking regions that are inserted into the vector, up to and including the junctions of insertion, should be determined by DNA sequencing of the construct.

발현 구조물 제조 단계를 상세하게 기술한다. 해당 단백질이 융합 단백질로 합성되건 아니건, 발현 구조물 구성 부분(예, 복제 개시점, 항생제 저항성 유전자, 프로모터, 인핸서)의 출처와 기능도 기술한다. 구체적인 컴포넌트 맵과 완전한 플라스미드 서열 및 주석을 제시한다. 이때 제작 과정에서 서열을 분석한 지역과 참고 문헌에서 확보한 것을 표시한다. 플라스미드가 인코딩하는 다른 발현 단백질도 표시한다. 관심 대상 유전자 가운데 코딩 지역의 뉴클레오티드 서열과 벡터에 삽입되는 관련 플랭킹 지역(삽입 연결 부분 포함)에 대하여 구조물 DNA 서열 분석을 실시한다.

A description of the method of transfer of the expression construct into the host cell should be provided. In addition, methods used to amplify the expression construct and criteria used to select the cell clone for production should be described in detail.

발현 구조물을 숙주 세포에 이전하는 방법을 기술한다. 이외에도 발현 구조물의 증폭 방법과 생산용 세포 클론 선정 기준도 자세히 기술한다.

B. 세포 은행 시스템(Cell Bank System)

Production of the recombinant protein should be based on well-defined Master and

Working Cell Banks. A cell bank is a collection of ampoules of uniform composition stored under defined conditions each containing an aliquot of a single pool of cells. The Master Cell Bank (MCB) is generally derived from the selected cell clone containing the expression construct. The Working Cell Bank (WCB) is derived by expansion of one or more ampoules of the MCB. The cell line history and production of the cell banks should be described in detail, including methods and reagents used during culture, in vitro cell age, and storage conditions. All cell banks should be characterised for relevant phenotypic and genotypic markers which could include the expression of the recombinant protein or presence of the expression construct.

충분하게 규명된 마스터 세포 은행과 상용 세포 은행을 활용해 재조합 단백질을 생산한다. 세포 은행은 단일 세포 풀을 각 앰플에 분주하고 지정 조건에 보관한, 균일한 조성의 앰플을 의미한다. MCB는 일반적으로 발현 구조물을 갖고 있는 선정된 세포 클론에서 유래한다. WCB는 하나 이상의 MCB 앰플로 증식시켜 만든다. 배양 방법과 배양에 사용된 시약, 체외 세포 연령, 보관 조건을 포함하여, 세포주 이력과 세포 은행 생산 절차를 자세히 기술한다. 모든 세포 은행에 대하여 관련 표현형과 유전형 마커를 분석하며, 이때 재조합 단백질의 발현 또는 발현 구조물의 존재도 분석한다.

The expression construct in the MCB should be analysed as described below. If the testing cannot be carried out on the MCB, it should be carried out on each WCB.

MCB의 발현 구조물을 아래와 같이 분석한다. MCB를 시험할 수 없다면, 각 WCB를 시험한다.

Restriction endonuclease mapping or other suitable techniques should be used to analyse the expression construct for copy number, for insertions or deletions, and for the number of integration sites. For extrachromosomal expression systems, the percent of host cells retaining the expression construct should be determined.

제한 효소 매핑 또는 기타 적합한 방법으로 발현 구조물의 카피수, 삽입 또는 결실, 통합 부위의 수를 분석한다. 염색체외 발현 시스템인 경우에는 발현 구조물을 유지하는 숙주 세포의 비율을 분석한다.

The protein coding sequence for the recombinant protein product of the expression construct should be verified. For extrachromosomal expression systems, the expression construct should be isolated and the nucleotide sequence encoding the product should be verified without further cloning. For cells with chromosomal copies of the expression

construct, the nucleotide sequence encoding the product could be verified by recloning and sequencing of chromosomal copies. Alternatively, the nucleic acid sequence encoding the product could be verified by techniques such as sequencing of pooled cDNA clones or material amplified by the polymerase chain reaction. The nucleic acid sequence should be identical, within the limits of detection of the methodology, to that determined for the expression construct as described in Section III.A. and should correspond to that expected for the protein sequence.

발현 구조물의 재조합 단백질 코딩 서열을 확인해야 한다. 염색체외 발현 시스템인 경우에는 발현 구조물을 분리하고 제품 인코딩 뉴클레오티드 서열을 추가 클로닝 없이 확인한다. 발현 구조물 카피가 염색체에 있는 세포인 경우, 염색체 카피의 재클로닝 및 서열 분석으로 제품 인코딩 뉴클레오티드 서열을 확인할 수 있다. 또는 PCR 증폭 산물이나 cDNA 클론 풀의 서열 분석 같은 기법으로 제품 인코딩 핵산 서열을 확인할 수 있다. 해당 방법의 검출 한계 이내에서, 핵산 서열은 섹션 III.A에 기술된 발현 구조물과 동일하고, 해당 단백질의 예상 서열에 부합해야 한다.

C. 생산용 체외 세포 연령 한계(Limit for In Vitro Cell Age for Production)

The limit for in vitro cell age for production should be based on data derived from production cells expanded under pilot plant scale or full scale conditions to the proposed in vitro cell age or beyond. Generally, the production cells are obtained by expansion of the Working Cell Bank; the Master Cell Bank could be used to prepare the production cells with appropriate justification.

생산용 체외 세포 연령 한계는 파일럿 플랜트 스케일이나 실제 스케일 조건에서 예정 체외 세포 연령 또는 그 이상까지 증식시킨 생산 세포의 데이터에 근거해야 한다. 일반적으로 생산 세포는 WCB를 증식시켜 확보한다. 적절한 타당성이 있는 경우에는 MCB를 이용하여 생산 세포를 만들 수도 있다.

The expression construct of the production cells should be analysed once for the MCB as described in Section III.B., except that the protein coding sequence of the expression construct in the production cells could be verified by either nucleic acid testing or analysis of the final protein product. Increases in the defined limit for in vitro cell age for production should be supported by data from cells which have been expanded to an in vitro cell age which is equal to or greater than the new limit for in vitro cell age.

생산 세포 발현 구조물의 단백질 코딩 서열을 핵산 시험이나 최종 단백질 제품 분석으로

확인할 수 있는 경우를 제외하고, 섹션 III.B에 기술한 바와 같이 생산 세포의 발현 구조물을 MCB 단계에서 분석한다. 생산용 체외 세포 연령 한계의 연장 시에는, 새로운 체외 세포 연령과 동일하거나 그 이상의 체외 세포 연령까지 증식시킨 세포에서 확보된 데이터로 뒷받침을 해야 한다.

IV. 결론(Conclusion)

The characterisation of the expression construct and the final purified protein are both important to ensure the consistent production of a recombinant DNA derived product. As described above, it is considered that analytical data derived from both nucleic acid analysis and evaluation of the final purified protein should be evaluated to ensure the quality of a recombinant protein product.

발현 구조물과 최종 정제 단백질의 특성 평가는 재조합 DNA 유래 제품의 일관된 생산을 보증하는데 중요하다. 앞서 기술한 바와 같이, 핵산 분석과 최종 정제 단백질 평가에서 확보한 분석 데이터를 평가하여, 재조합 단백질 제품의 품질을 확인한다.

용어 정의(GLOSSARY OF TERMS)

발현 구조물(Expression Construct)

The expression vector which contains the coding sequence of the recombinant protein and the elements necessary for its expression.

재조합 단백질의 코딩 서열과 재조합 단백질 발현에 필요한 요소를 포함하는 발현 벡터.

플랭킹 제어 지역(Flanking Control Regions)

Non-coding nucleotide sequences that are adjacent to the 5' and 3' end of the coding sequence of the product which contain important elements that affect the transcription, translation, or stability of the coding sequence. These regions include, e.g., promoter, enhancer, and splicing sequences and do not include origins of replication and antibiotic resistance genes.

제품 코딩 서열의 5' 및 3' 말단에 인접하며 코딩 서열의 전사, 번역 또는 안정성에 영향을 주는 중요 요소를 포함하고 있는 비코딩 뉴클레오티드 서열. 예를 들어 프로모터, 인핸서, 스플라이싱 서열이 플랭킹 제어 지역에 포함될 수 있으나, 복제 개시점 및 항생제 저항 유전자는 포함되지 않는다.

통합 부위(Integration Site)

The site where one or more copies of the expression construct is integrated into the host cell genome.

하나 이상의 발현 구조물 카피가 숙주 세포의 유전체에 통합되는 부위.

체외 세포 연령(In vitro Cell Age)

Measure of time between thaw of the MCB vial(s) to harvest of the production vessel measured by elapsed chronological time in culture, by population doubling level of the cells, or by passage level of the cells when subcultivated by a defined procedure for dilution of the culture.

MCB 바이알 해동부터 생산 용기 수확까지 걸린 시간을 배양 경과 시간, 세포 집단 배증 시간, 지정 배양액 희석 절차로 계대 배양한 경우에는 세포 계대 횟수로 표시하는 시간 단위.

MCB(Master Cell Bank)

An aliquot of a single pool of cells which generally has been prepared from the selected cell

clone under defined conditions, dispensed into multiple containers and stored under defined conditions. The MCB is used to derive all working cell banks. The testing performed on a new MCB (from a previous initial cell clone, MCB or WCB) should be the same as for the MCB unless justified.

선정된 세포 클론을 이용해 지정 조건에서 제조하여 여러 용기에 분주하고 지정 조건에서 보관하는 단일 세포 풀의 분주물. MCB을 이용하여 상용 세포 은행을 제조한다. 타당성을 증명할 수 없으면, 신규 MCB(예전 초기 세포 클론, MCB 또는 WCB 유래)의 시험은 해당 MCB와 동일해야 한다.

파일럿 플랜트 스케일(Pilot Plant Scale)

The production of a recombinant protein by a procedure fully representative of and simulating that to be applied on a full commercial manufacturing scale. The methods of cell expansion, harvest, and product purification should be identical except for the scale of production.

실제 상업적 제조 스케일에 적용되는 절차를 시뮬레이션하여 그 절차를 충분히 대표할 수 있는 방법으로 재조합 단백질을 생산하는 것. 생산 스케일을 제외하고, 세포 증식, 수확, 제품 정제 방법이 동일해야 한다.

관련 유전형 및 표현형 마커(Relevant Genotypic and Phenotypic Markers)

Those markers permitting the identification of the strain of the cell line which should include the expression of the recombinant protein or presence of the expression construct.

재조합 단백질의 발현 또는 발현 구조물의 존재 여부를 포함하여, 세포주를 확인할 수 있는 마커.

WCB(Working Cell Bank)

The Working Cell Bank is prepared from aliquots of a homogeneous suspension of cells obtained from culturing the MCB under defined culture conditions.

WCB는 지정 배양 조건에서 MCB를 배양하여 확보한 균질한 세포 현탁액을 분주하여 만든다.