

附件： 生物制品生产和检定用动物细胞基质制备及质量控制公示稿

本通则适用于人用生物制品生产用动物细胞基质及检定用动物细胞，包括具有细胞库体系的细胞及原代细胞。本通则细胞基质系指可用于生物制品生产的所有动物或人源的连续传代细胞系、二倍体细胞株及原代细胞。

~~生产非重组制品所用的细胞基质，系指来源于未经修饰的用于制备其主细胞库的细胞系/株和原代细胞。生产重组制品的细胞基质，系指含所需序列的、从单个前体细胞克隆的转染细胞。生产杂交瘤制品的细胞基质，系指通过亲本骨髓瘤细胞系与另一亲本细胞融合的杂交瘤细胞系。~~

一、对生产用细胞基质总的要求

用于生物制品生产的细胞系/株均须通过全面检定，须具有如下相应资料，并经国家药品监督管理部门批准。

(一) 细胞系/株历史资料

1. 细胞系/株来源资料

应具有细胞系/株来源的相关资料，如细胞系/株制备机构的名称，细胞系/株来源的种属、年龄、性别和健康状况的资料。这些资料最好从细胞来源实验室获得，也可引用正式发表文献。

人源细胞系/株须具有细胞系/株的组织或器官来源、种族及地域来源、年龄、性别、健康状况及病原体检测结果的相关资料。

动物来源的细胞系/株须具有动物种属、种系、饲养条件、组织或器官来源、地域来源、年龄、性别、供体的一般健康状况及病原体检测结果的相关资料。

如采用已建株的细胞系/株，应具有细胞来源的证明资料。应从能够提供初始细胞历史及其溯源性书面证明材料的机构获得，且应提供该细胞在该机构的详细传代记录，包括培养过程中所使用的所有原材料的详细信息，如种类、来源、批号、生产日期及有效期、制备或使用方法、质量标准及检测结果等。

2. 细胞系/株培养历史的资料

应具有细胞分离方法、细胞体外培养过程及细胞系/株建立过程的相关资料，包括所使用的物理、化学或生物学手段，外源插入序列，筛选细胞所进行的任何遗传操作或筛选方法、在动物体内传代过程以及细胞生长特征、培养液成分等；同时还应具有细胞鉴别、内源及外源因子检查结果的相关资料。

应提供细胞传代历史过程中所用的细胞培养液的详细成分并应具有溯源性，如使用人或动物源性成分，如血清、胰蛋白酶、乳蛋白水解物或其他生物学活性的物质，应具有这些成分的来源、批号、制备方法、质量控制、检测结果和质量保证的相关资料。

（二）细胞培养操作要求

细胞取材、建库及制备全过程应具有可溯源性及操作的一致性，并对各个环节的风险进行充分的评估。

1. 细胞来源供体

所有类型细胞的供体应无传染性疾病或未知病原体的疾病。神经系统来源的细胞不得用于疫苗生产。

2. 原材料的选择

与细胞培养相关的所有材料，特别是人源或动物源性材料，应按照本版药典的相关要求进行风险评估，选择与生产相适应的原材料，必要时进行检测。所有生物源性材料均应无细菌、真菌、分枝杆菌、支原体及病毒等外源因子污染。细胞培养过程中所用的牛血清及胰酶应符合本版药典的相关要求。

细胞培养液中不得含有人血清。如果使用人血白蛋白，应使用获得国家药品监督管理部门批准的人用药品。

细胞制备过程中不得使用青霉素或其他β-内酰胺类抗生素。配制各种溶液的化学药品应符合本版药典（四二部）或其他相关国家标准的要求。

3. 细胞培养体系：

应控制对细胞生长有重大影响的、关键的已知可变因素，包括规定细胞培养液及其添加成分的化学组成及纯度；所有培养用试剂应有制备记录并经检定合格后使用，应规定细胞培养的理化参数（如 pH 值、温度、湿度、气体组成等）的变化范围并进行监测，以保证细胞培养条件的稳定性。

4. 细胞收获及传代

应结合生产工艺的特性，尽可能减少对细胞的操作。细胞收获及传代应采用可重复的方式，以保证收获时细胞的汇合率、孵育时间、温度、离心速度、离心时间以及传代后活细胞接种密度具有一致性。

传代细胞需根据细胞系的特点选择体外细胞龄计算方式。传代细胞的体外细胞龄可采用细胞群体倍增水平或传代水平计算。

二倍体细胞的细胞龄通常以群体倍增水平计算，也可以每个培养容器细胞群体细胞数为基础，每增加1倍作为1世代粗略估算，即1瓶细胞传2瓶(1:2分种率)，再长满瓶为1世代；1瓶细胞传4瓶(1:4分种率)为2世代；1瓶细胞传8瓶(1:8分种率)则为3世代。生产用细胞龄限制在细胞寿命期限的前2/3内。

连续传代细胞系的细胞龄可以群体倍增水平计算，也可以按照固定的方式传代，如固定比率进行传代，每传1次视为1代，或按固定培养天数计算。

5. 细胞系建立

细胞系建立过程中进行了对细胞特性有重要影响的操作，如导致细胞具有了成瘤性，或经细胞克隆及遗传修饰等操作的细胞，应被视为一个新的(或不同的)细胞系，应在原细胞名称后增加后缀或编号重新命名，并重新建立主细胞库。

在细胞克隆过程中，应选择单个细胞用于扩增，详细记录克隆过程，并根据整合的重组DNA的稳定性、细胞基因组及表型的稳定性、生长速率、目的产物表达水平和完整性及稳定性，筛选具有分泌目的蛋白最佳特性的候选克隆，用于建立细胞种子。

6. 细胞冻存

应在大多数细胞处于对数生长期时进行细胞冻存。应采用符合细胞培养物的最佳冻存方法；每一次冻存时均应采用相同的降温过程，并记录冻存过程。

每一个细胞库冻存时，应将同一次扩增的处于相同倍增水平的细胞培养物合并，混匀后分装。每支冻存管中的细胞数应足以保证细胞复苏后可获得有代表性的培养物。

对于一个新的细胞库，除早代培养物在组织采集时或重组细胞筛选时可能需要使用抗生素外，细胞建库培养时不应使用抗生素。

7. 人员

生产人员应定期检查身体，已知患有传染性疾病的人员不能进行细胞培养的操作。在生产区内不得进行非生产制品用细胞或微生物的操作；在同一工作日进行细胞培养前，不得接触动物或操作有感染性的微生物。

(三) 细胞库

细胞库的建立可为生物制品的生产提供检定合格、质量相同、能持续稳定传代的细胞。

细胞建库应在符合中国现行《药品生产质量管理规范》的条件下制备。

1. 细胞库的建立

~~三级细胞库管理包括细胞种子、主细胞库（MCB）及工作细胞库（WCB）的管理。在某些特殊情况下，也可采用细胞种子及 MCB 二级管理，但须得到国家药品监督管理部门的批准。生产用细胞库通常为二级库，包括主细胞库（MCB）和工作细胞库（WCB）。如有细胞种子，也应纳入管理。~~

（1）细胞种子（Cell seed）

由一个原始细胞群体发展成传代稳定的细胞群体，或经过克隆培养而形成的均一细胞群体，通过检定证明适用于生物制品生产或检定。在特定条件下，将一定数量、成分均一的细胞悬液，定量均匀分装于一定数量的安瓿或适宜的细胞冻存管，于液氮或-130℃以下冻存，即为细胞种子，供建立主细胞库用。

对于引进细胞，生产者获得细胞后，冻存少量细胞，经过验证可用于生物制品生产，此细胞可作为细胞种子，供建立主细胞库用。

（2）主细胞库（MCB）

取细胞种子通过规定的方式进行传代、增殖后，在特定倍增水平或传代水平同次均匀地混合成一批，定量分装于一定数量的安瓿或适宜的细胞冻存管，保存于液氮或-130℃以下，~~经全面检定合格后，~~即可作为主细胞库，用于工作细胞库的制备，生产企业的主细胞库应限定代次并检定合格。~~最多不得超过两个细胞代次。~~

（3）工作细胞库（WCB）

工作细胞库的细胞由 MCB 细胞传代扩增制成。由 MCB 的细胞经传代增殖，达到一定代次水平的细胞，合并后制成一批均质细胞悬液，定量分装于一定数量的安瓿或适宜的细胞冻存管中，保存于液氮或-130℃以下备用，即为工作细胞库。生产企业的工作细胞库必须限定为一个细胞代次。冻存时细胞的传代水平须确保细胞复苏后传代增殖的细胞数量能满足生产一批或一个亚批制品。复苏后细胞的传代水平应不超过批准用于生产的最高限定代次。所制备的 WCB 必须经检定合格[见本通则“一、（四）细胞检定”中有关规定]后，方可用于生产。

2. 细胞库的管理

主细胞库和工作细胞库应分别存放。每一个库应在生产设施内至少 2 个不同的地点或区域存放，可选择在生产设施内和/或与生产设施有一定距离的地点。当存放地点较远时，应使用有质量保障的容器运输，并监测运输温度。应监测并

维护细胞库冻存容器，以保证细胞库贮存在一个高度稳定的环境中。

非生产用细胞应与生产用细胞严格分开存放。

每种细胞库均应分别建立台帐，详细记录放置位置、容器编号、分装及冻存数量、取用情况等。细胞库中的每支细胞均应可追溯其具有细胞系/株名、代次、批号、编号、冻存日期，~~贮存容器的编号~~等信息。

为保证细胞冻存后仍具有良好的活力，~~冻存前的细胞活力应不低于 90%，冻存后应取一定量的可代表冻存全过程的冻存管复苏细胞，复苏后细胞的活力一般应不低于 80%。~~若复苏后细胞活力低于 80%，应进行充分评估并有验证数据支持。二倍体细胞冻存后，应至少做一次复苏培养并连续传代至衰老期，检查不同传代水平的细胞生长情况。细胞冻存后，可通过定期复苏细胞及复苏后细胞的活力数据确认验证细胞在冻存及贮存条件下的稳定性。

（四）细胞检定

细胞检定主要包括以下几个方面：细胞鉴别、外源因子和内源因子的检查、成瘤性/致瘤性检查等。必要时还须进行细胞生长特性、细胞染色体检查，细胞均一性及稳定性检查。这些检测内容对于 MCB 细胞和 WCB 细胞及生产限定代次细胞均适用。

~~细胞检定的基本要求见表 1。细胞库建立后应至少对 MCB 细胞及生产终末细胞（EOPC）进行一次全面检定。当生产工艺发生改变时，经变更应重新对 EOPC 进行检测。每次从 MCB 建立一个新的 WCB，均应按规定项目进行检定。~~

应对细胞来源、培养及建库过程进行风险评估，并制定检定策略。通常应至少对 MCB 细胞及生产终末细胞（EOPC）进行一次全面检定，工作库进行部分检定。如对主库不能进行全面检定，可对首个工作库进行全面检定，后续建立的工作库可通过评估后进行部分检定。当生产工艺发生变更时，需经评估，必要时应重新对 EOPC 进行检测。细胞检定的基本要求见表 1。

表 1 细胞检定项目的要求

检测项目	MCB	WCB	生产终末细胞 (EOPC) ^a	
细胞鉴别	+	+	+(+)	
细菌、真菌检查	+	+	+	
分枝杆菌检查	(+) ^b	(+) ^b	(+) ^b	
支原体检查	+	+	+	
	±	±	±	
内、外源病毒污染检查	体外不同细胞接种培养法	+	+	
	动物和鸡胚体内接种法	(+) ^c	-	(+) ^c
	逆转录病毒检查	+	-	+
	种属特异性病毒检查	(+)	-	-
	牛源性病毒检查	(+)	(+)	(+)
	猪源性病毒检查	(+)	(+)	(+)
	其他特定病毒检查	(+)	(+)	(+)
染色体检查	-(+)	-(+)	-(+)	
成瘤性检查* ^d	(+)	(+)	-	
致瘤性检查* ^d	(+)	(+)	-	
稳定性	<u>(+)</u>	<u>-</u>	<u>(+)</u>	

注：~~①表示生产终末细胞，是指在或超过生产末期时收获的细胞，尽可能取按生产规模制备的生产末期细胞。~~

“+”为必检项目，“-”为非强制检定项目。

(+)表示需要根据细胞特性、传代历史、培养过程等情况评估后进行的要求的检定项目。

a. 生产终末细胞，是指在或超过生产末期时收获的细胞，尽可能取按生产规模制备的生产末期细胞。

b. 对分枝杆菌易感的细胞进行该项检查。

c. 根据风险评估结果确定是否进行体内实验，如在建库或细胞培养过程中存在外源因子引入的风险，可保留动物实验或用经验证的二代测序技术(NGS)法替代。

d. 表示 MCB 或 WCB

1. 细胞鉴别试验

MCB 细胞、WCB 细胞新建细胞系/株、细胞库(MCB 和 WCB)和生产终末细胞应进行鉴别试验，以确认所用细胞正确为本细胞，且无其他细胞的交叉污染。重组细胞系的专属特性的鉴别，还应通过检测目的蛋白基因或目的蛋白进行鉴别试验。

细胞鉴别试验方法有多种，包括细胞形态、生物化学法(如同工酶试验)、免疫学检测(如组织相容性抗原、种特异性免疫血清)、细胞遗传学检测(如染色体核型、标记染色体检测)、遗传标志检测[如 DNA 指纹图谱, 包括短串联重复序列(STR)、限制性片段长度多态性 (RFLP-PCR) 和内含子多态性 (EPIC-PCR) 法等]以及其他方法(如杂交法、PCR 法、报告基因法等)。应至少选择上述一种或几种方法对细胞进行种属和细胞株间及专属特性的鉴别。种属鉴别可依法检查(通则 3430)。

2. 细菌、真菌无菌检查

取混合细胞培养上清液和或冻存细胞管样品，依法检查(通则 1101)，应符合规定。对于 MCB 及 WCB 培养物，至少取混合细胞培养上清液 10 ml，尽可能采用薄膜过滤法检测。对于冻存管细胞，至少取冻存管细胞总支数的 1%或至少 2 支冻存细胞管(取量大者)，可采用直接接种法检测。

3. 分枝杆菌检查

取至少 10^7 个活细胞用培养上清液制备细胞裂解物，~~按照无菌检查法(通则 1101)~~进行分枝杆菌检查。

取细胞裂解物接种于适宜的固体培养基(如罗氏培养基或 Middlebrook 7H10 培养基)，每个培养基接种 1mL 并做 3 个重复，并同时以不高于 100CFU 的草分枝杆菌菌液作为阳性对照。将接种后的培养基置于 37℃ 培养 56 天，阳性对照应有菌生长，接种供试品的培养基未见分枝杆菌生长，则判为合格。

~~用于外源病毒检测的豚鼠接种法也可检测分枝杆菌，按表 2 所列方法进行试验和观察。豚鼠在注射前应观察 4 周，结核菌素试验为阴性者方可用于试验，观察期末应进行结核菌素试验，并剖检观察主要脏器是否有结节形成。结核菌素试验为阴性，主要脏器无结节，则为符合要求。~~

也可采用经过验证的分枝杆菌核酸检测法替代培养法。

4. 支原体/螺原体检查

取细胞培养上清液或细胞悬液样品，依法进行支原体检查(通则 3301)，应符合规定。

如为昆虫细胞，或细胞培养过程中使用了植物源性材料，应进行螺原体检查，所用方法如培养法或核酸法应能检测中间原体属和虫原体属。

5. 细胞内、外源病毒因子检查

应注意检查细胞系/株中是否有来源物种中潜在的可传染的病毒，以及由于使用的原材料或操作带入的外源性病毒。细胞进行病毒检查的种类及方法，须对根据细胞的种属来源、组织来源、细胞特性、建株及传代历史、培养方法和及过程等进行风险评估后确定。如 MCB 进行了全面检定，WCB 需检测的外源病毒种类可主要考虑从 MCB 到 WCB 传代过程中可能引入的病毒，而仅存在于 MCB 建库前的病毒可不再重复检测。

—(1)细胞形态观察及血吸附试验

取混合瓶细胞样品，接种至少 6 个细胞培养瓶或培养皿，待细胞长成单层或至一定数量后换维持液，持续培养两周。如有必要，可以适当换液。逐目镜检细胞，细胞应保持正常形态特征。

如为贴壁细胞或半贴壁细胞，细胞至少培养 14 天后，分别取 1/3 细胞培养瓶或培养皿，用 0.2%~0.5% 豚鼠红细胞和鸡红细胞混合悬液进行血吸附试验。一半加入红细胞后置 2~8℃ 作用 30 分钟，一半置 20~25℃ 作用 30 分钟，分别进行镜检，观察红细胞吸附情况，结果应为阴性。

新鲜红细胞在 2~8℃ 保存不得超过 7 天，且溶液中不应含有钙或镁离子。

(2) 体外不同指示细胞接种培养法检测病毒因子

用待检细胞培养上清制备活细胞或细胞裂解物作为待测样本，分别接种至少下列三种单层指示细胞，包括猴源细胞、人二倍体细胞和同种属、同组织类型来源的细胞。对于昆虫细胞，还应至少增加两种敏感的指示细胞进行检测，一种为对虫媒病毒易感的蚊子细胞，也可使用 BHK21 细胞。另一种为对多种昆虫病毒易感的细胞，如果蝇胚胎来源细胞。细胞裂解物应采用细胞悬液或用培养细胞后的上清重悬细胞样本制备。待测样本检测前，可于-70℃或以下保存。

每种单层指示细胞至少接种 10^7 个活细胞或相当于 10^7 个活细胞的裂解物。接种量应占维持液的 1/4 以上，每种指示细胞至少接种 2 瓶。取培养 7 天的细胞各 1 瓶，取上清液或细胞裂解物再分别接种于新鲜制备的相应的指示细胞盲传一代，与初次接种的另一瓶细胞继续培养 7 天，接种细胞后应至少培养 28 天，期间可至少传代一次，可将细胞培养物裂解后再接种于新鲜制备的指示细胞，或直接传代。观察细胞病变，并在观察期末取细胞培养物进行血吸附试验；取细胞培养上清液进行红细胞凝集试验。

分别用 0.2%~0.5% 豚鼠红细胞、和鸡红细胞悬液或混合红细胞悬液混合悬液进行血吸附试验和红细胞凝集试验。将混合红细胞悬液加入细胞培养容器瓶，一半置于 2~8℃ 孵育 30 分钟，一半置于 20~25℃ 孵育 30 分钟，分别进行镜检，观察红细胞吸附情况。取细胞上清液从原倍起进行倍比稀释后，加入混合红细胞，先置 2~8℃ 孵育 30 分钟，然后置于 20~25℃ 孵育 30 分钟，分别观察红细胞凝集情况。新鲜红细胞在 2~8℃ 保存不得超过 7 天，且溶液中不应含有钙、镁离子。

接种的每种指示细胞不得出现细胞病变，血吸附试验及红细胞凝集试验均应为阴性。试验应设立病毒阳性对照，包括可观察细胞病变的病毒阳性对照、血吸附阳性对照及血凝阳性对照。如待检细胞裂解物对指示单层细胞有干扰，则应排除干扰因素。

~~若已知待检细胞可支持人或猴巨细胞病毒(CMV)的生长，则应在接种人二倍体细胞后至少观察 28 天，应无细胞病变，且血吸附试验及红细胞凝集试验应均为阴性。~~

(32) 动物体内接种法检测外源病毒因子

用待检细胞培养上清液制备活细胞（或适宜时采用相当量的细胞裂解物），接种动物体内进行外源病毒因子检测。待检细胞至少应接种乳鼠、成年小鼠和鸡胚（两组不同日龄）共计 4 组，~~如为新建细胞，还需接种豚鼠。原代猴肾细胞还需用家兔体内接种法或兔肾细胞培养法检查猴疱疹 B 病毒。~~按表 2 所列方法进行试验和观察。接种后 24 小时内动物死亡超过 20%，试验无效。

表 2 动物体内接种法检测外源病毒因子

动物组	要求	数量	接种途径	细胞浓度 (个活细胞/ ml)	接种细胞液量 (ml/只)	观察天数
乳鼠	24 小时内	至少 20 只 (2 窝)	脑内 腹腔	$>1 \times 10^7$	0.01 0.1	21 天
成年小鼠	15~20g	至少 10 只	脑内 腹腔	$>1 \times 10^7$	0.03 0.5	21 天
鸡胚 ^①	9~11 日龄	10 枚	尿囊腔 ^①	$>5 \times 10^6$	0.2	3~4 天
鸡胚	5~7 日龄	10 枚	卵黄囊	$>2 \times 10^6$	0.5	5 天
豚鼠	350~500g	5 只	腹腔	$>4 \times 10^5$	5.0	至少 42 天，观察期 未解剖所有动物
家兔	1.5~2.5kg	5 只	皮下 皮内 ^②	$>2 \times 10^5$	9.0 0.1×10	至少 21 天

①经尿囊腔接种的鸡胚，在观察末期，应用豚鼠和鸡红细胞混合悬液进行直接红细胞凝集试验。

① 每只家兔于皮内注射 10 处，每处 0.1ml。

观察期内，如被接种动物出现异常或疾病应进行原因分析，观察期内死亡的动物应进行大体解剖观察及组织学检查，以确定死亡原因。如动物显示有病毒感染，则应采用培养法或分子生物学方法对病毒进行鉴定~~（~~。如观察期内超过 20% 的动物出现死亡，且可明确判定为因动物撕咬所致~~）~~，试验判定为无效，应重试。

观察期末时，符合下列条件判为合格。

①乳鼠和成年小鼠接种组 至少应有 80%接种动物健存，且小鼠未显示有可传播性因子或其他病毒感染。

②鸡胚接种组 卵黄囊接种的鸡胚至少应有 80%存活，且未显示有病毒感染；尿囊腔接种的鸡胚至少应有 80%存活，且尿囊液红细胞凝集试验为阴性。

③豚鼠接种组 至少应有 80%接种动物健存，且动物未显示有可传播性因子或其他病毒感染。

④家兔接种组 至少应有 80%接种动物健存，且动物未显示有可传播性因子或其他病毒感染（包括接种部分损伤）。

(43) 逆转录病毒及其他内源性病毒或病毒核酸的检测

可采用下列方法对待检细胞进行逆转录病毒的检测。

①逆转录酶活性测定 采用敏感的方法,如产物增强的逆转录酶活性测定法(PERT 或 PBRT 法)(本通则附录 1 或其它适宜的方法,但灵敏度不得低于现行方法),但由于细胞中某些成份也具有逆转录酶活性~~+~~,因此,逆转录酶阳性的细胞,应进一步确认是否存在感染性逆转录病毒。除已知产生逆转录病毒的细胞外,均应进行逆转录酶活性测定。

②透射电镜检查法

取至少 1×10^7 个活细胞采用超薄切片法对至少 200 个活细胞进行透射电镜检查观察。

③PCR 法或其他特异性体外法 根据细胞的种属特异性,在逆转录酶活性结果不明确或不能采用逆转录酶活性测定时,可采用种属特异性的逆转录病毒检测法,如逆转录病毒 PCR 法、免疫荧光法、ELISA 法等,逆转录病毒的定量 PCR 法还可用于逆转录病毒颗粒的定量。

④感染性试验 将待检细胞感染逆转录病毒敏感细胞,培养后检测。根据待检细胞的种属来源,须使用不同的或多种的敏感细胞进行逆转录病毒感染性试验。

如 Mus dunni 细胞用于鼠逆转录病毒的检测，SC-1 细胞用于亲嗜性逆转录病毒的检测，人源细胞系用于昆虫逆转录病毒的检测等。终点检测方法可选择 PERT 试验、SL 实验或 XC 空斑试验等。

上述不同的方法具有不同的检测特性，逆转录酶活性提示可能有逆转录病毒存在，透射电镜检查及特异性 PCR 法可证明是否有病毒性颗粒存在并进行定量，感染性试验可证明是否有感染性的逆转录病毒颗粒存在，因此应采用不同的方法联合检测。若细胞逆转录酶活性检测为阳性，则需进行透射电镜检查或 PCR 法及感染性试验，以确证是否存在逆转录病毒颗粒及是否具有感染性逆转录病毒颗粒。可产生感染性逆转录病毒颗粒，且下游工艺不能证明病毒被清除的细胞基质不得用于生产。

已知产生逆转录病毒的细胞，如啮齿类动物来源的细胞、昆虫细胞及禽源性细胞，可不进行逆转录酶活性检测，但应进行逆转录病毒颗粒的类型、数量及感染性的检查。

对于已有丰富先验知识的细胞系，如 CHO、NSO、Sp2/0、Vero 等，不需要进行化学诱导试验。对于新的细胞基质，采用化学诱导试验有助于评估细胞中是否存在未知的可被诱导的内源性逆转录病毒。对潜在的 DNA 病毒（如人源细胞中的疱疹病毒）和 RNA 病毒（如昆虫细胞中的诺达病毒），基于风险评估结果，也可使用化学诱导试验进行检测。

~~含有逆转录病毒序列，常可产生缺陷型逆转录病毒颗粒，逆转录病毒活性为阳性，对这类细胞进行逆转录病毒检测时，可直接检测细胞基质中是否存在外源性逆转录病毒污染，如禽白血病病毒、禽网状内皮病肿瘤病毒、感染性内源性逆转录病毒。在某些情况下，也可通过监测鸡群，以保证无上述感染性逆转录病毒污染。~~

~~小鼠及其他啮齿类动物来源的细胞系含有逆转录病毒基因序列，可能会表达内源性逆转录病毒颗粒，因此，对于这类细胞系，应进行感染性试验，以确定所表达的逆转录病毒是否具有感染性。~~

对于特定啮齿类细胞（如 CHO、BHK-21、NSO 和 sp2/0）或昆虫细胞，还应确定其收获液中病毒颗粒的量及其是否具有感染性逆转录病毒，并应在生产工艺中增加病毒去除和（或）灭活工艺。仅有高度纯化且可证明终产品中逆转录病毒

被清除至低于现行检测方法的检测限以下时，方可使用这类细胞。

(54) 种属特异性外源病毒因子的检测

应根据细胞系/株种属来源、组织来源及供体健康状况等确定检测病毒的种类。若在 MCB 或 WCB 中未检测到种属特异性病毒，后续过程中如无引入风险，不再进行重复检测。

鼠源的细胞系，可采用小鼠、大鼠和仓鼠抗体产生试验（MAP、RAP 及 HAP）或经验证的分子生物学方法检测其种属特异性病毒。

人源的细胞系/株，应考虑检测如人肝炎病毒（HAV、HBV、HCV）、人逆转录病毒（HIV-1/2、HTLV-1/2）、人细小病毒 B19、人乳头瘤病毒、人多瘤病毒、人腺病毒、人 EB 病毒、人巨细胞病毒（HCMV）和人疱疹病毒-6/7/8 等。~~人 EB 病毒、人巨细胞病毒（HCMV）、人逆转录病毒（HIV-1/2、HTLV-1/2）、人肝炎病毒（HAV、HBV、HCV）、人细小病毒 B19、人乳头瘤病毒、人多瘤病毒、难培养的人腺病毒和人疱疹病毒-6/7/8 等。~~

猴源细胞系/株应考虑检测猴多瘤病毒（如 SV40）、猴泡沫病毒（SFV）、猴免疫缺陷病毒（SIV）、猴逆转录病毒（SRV）、猴 T 细胞嗜淋巴病毒（STLV）等。

昆虫细胞系，应考虑检测已报告污染的特定病毒（如诺达病毒），或可能持续存在于昆虫细胞系中并已知对人类具有传染性的病毒。

这类病毒的检测可采用适当的体外检测技术，如分子检测技术，但所用方法应具有足够的灵敏度，以保证制品的安全。

(65) 牛源性病毒检测

若在生产者建库之前，细胞基质在建立或传代历史中使用了牛源性材料，如牛血清或牛胰酶，则所建立的 MCB 或 WCB 和（或）生产终末细胞至少应按照通则 3604 的要求检测一次牛源性病毒。取待检细胞用培养上清液制备成至少相当于 10^7 个活细胞/ml 的裂解物，进行检测。如果在后续生产过程中不再使用牛血清，且 MCB 和（或）EOPC 检测显示无牛源性病毒污染，则后续工艺中可不再重复进行此项检测。

(76) 猪源性病毒的检测

如果在生产者建细胞库之前，细胞基质在建立或传代历史中使用了猪源性材料，如猪胰酶，则所建立的 MCB 或 WCB 和（或）超过生产限定水平的细胞至少应

检测一次与胰酶来源动物相关的外源性病毒，如包括猪细小病毒和猪圆环病毒或牛细小病毒等。如在后续生产过程中不再使用胰酶，且 MCB 和（或）EOPC 检测结果显示无相关动物源性病毒污染，则后续工艺中可不再重复进行此项检测。如使用重组胰酶，应根据胰酶生产工艺可能引入的外源性病毒评估需要检测的病毒种类及方法。

(87) 其他特定病毒的检测

根据细胞的特性、传代历史或生产培养工艺等确定检测病毒的种类。有些细胞仅对某些特定病毒易感，如 CHO 细胞可污染鼠细小病毒，采用上述检测方法无法检出，因此需要采用特定的方法检测，如特定感染试验或分子生物学方法对 CHO 细胞进行鼠细小病毒污染的检测等。

(8) 分子生物学方法

分子生物学方法包括核酸扩增（NAT）法和二代测序（NGS）法。NAT 法，如 PCR 法，可用于特定的病毒检测。NGS 法适用于广谱和特定的病毒检测。基于风险评估结果，广谱的 NGS 法可用于替代体内法，也可用于补充或替代体外法（如缺少病毒易感细胞或样品对检测存在干扰或毒性）。基于体内法和体外法在病毒检测种类上的局限性以及动物使用的 3R 原则，不建议将 NGS 法与体内法或体外法进行头对头的比较。

应使用合适的参考物质对 NGS 法进行方法验证或确认。病毒标准物质应由不同特性的病毒组成，包括不同物理特性（大小，有/无包膜）、不同化学特性（低、中和高抗性）及不同基因组特性（DNA 或 RNA，双链或单链，线性或环状）。NGS 的验证或确认应支持其预期用途，当作为替代方法时，包括方法验证及样本适用性确认。当作为补充方法时，包括方法的确认和样本适用性确认。方法验证参数至少应包括专属性、病毒检测范围及灵敏度，并预先设定可接受标准。

对 NGS 阳性结果应进一步确认检测到的核酸是否与感染性病毒相关。

6. 成瘤性检查

成瘤性检查是确定细胞基质在动物体内是否能够形成肿瘤，是对细胞特性的鉴定。

新建细胞系/株及新型细胞基质应进行成瘤性检查。

某些传代细胞系已证明在一定代次内不具有成瘤性，而超过一定代次则具有成瘤性，如 Vero 细胞，因此必须进行成瘤性检查。

用于疫苗生产的细胞系/株应进行成瘤性检查，但当未经遗传修饰的二倍体细胞被证明无成瘤性后，可不作为常规检查要求。

已证明具有成瘤性的传代细胞，如 BHK21、CHO、HEK293、C127、NS0 细胞等，或细胞类型属成瘤性细胞，如杂交瘤细胞，用于生产治疗性制品时可不再做成瘤性检查。

昆虫细胞或禽源细胞进行体内成瘤性检查时，需评估方法的适用性，如细胞生长温度是否与哺乳动物物种的体温相适应。

成瘤性检查的方法见本通则附录 2。具有成瘤性的新建细胞或新型细胞基质，需采用定量的方法进一步分析细胞成瘤性的大小，并计算该细胞的半数致瘤量（TPD₅₀），并根据生产工艺及制品的特性，评估成瘤性的风险。

体内法是成瘤性评价的标准，但对于某些细胞，也可采用软琼脂克隆形成试验或器官培养试验等体外法检测细胞的成瘤性，特别是对于低代次、在动物体内无成瘤性的传代细胞系。体外法的结果可作为细胞成瘤性评价的参考。

7、致瘤性检查：

致瘤性检查是保证细胞基质中不存在可使细胞永生化和或诱导肿瘤形成并具有形成肿瘤的因子。细胞基质致瘤性可能与细胞 DNA（或其它细胞成份）或细胞基质中含有致瘤性因子相关。来源于肿瘤的细胞或因未知机制形成肿瘤表型的细胞，含有致瘤性物质的理论风险性相对较高。

已建株的二倍体细胞，如 MRC-5、2BS、KMB₁₇、WI-38 及 FRhL-2 新建主细胞库不要求进行致瘤性检查。

已建株的或有充分应用经验的连续传代细胞，如 CHO、NS0、Sp2/0、低代次的 Vero 细胞不要求进行致瘤性检查。

新型细胞基质，特别是成瘤性为阳性的细胞，用于疫苗生产时，需进行致瘤性检查。

可采用待测细胞裂解物和（或）细胞 DNA 按照本通则附录 3 的方法进行致瘤性检查。如根据细胞基质的表型或来源疑似有致瘤性病毒，建议用细胞基质裂解物接种动物进行致瘤性检查；若细胞基质具有成瘤性表型，建议用细胞 DNA 接种动物进行致瘤性检查。

对致瘤性检查中出现进行性结节的细胞，应开展进一步的研究，鉴别致瘤性因子或致瘤性活性，并确定细胞的可适用性。

8. 稳定性

细胞稳定性通常包括生产稳定性和贮存稳定性。在生产稳定性上，应评估 MCB/WCB 与 EOPC 之间产品的产量和特性的一致性。对于重组细胞，还应确保 MCB/WCB 与 EOPC 之间插入基因的序列、插入基因拷贝数、插入位点(如适用)、目的蛋白序列及翻译后修饰的一致性。对于二倍体细胞，从 MCB/WCB 至 EOPC 还应确保细胞的二倍性。在贮存稳定性上，可通过生产中细胞复苏时的活力数据来评估。若长时间未生产，也可按照一定的时间间隔对贮存细胞的活力进行测定来评估。

(五) 生产用细胞培养及检定

生产用原材料的选择和细胞操作环境应符合本通则“一、(二) 细胞培养操作要求”及“一、(三) 1. 细胞库的建立”中有关规定。

从冻存的 WCB 或 MCB 中取出一支或多支安瓿，混合后培养，传至一定代次后供生产用。其代次不得超过该细胞用于批准生产的最高限定代次。生产用细胞的最高限定代次应根据研究结果确定，但不得超过国际认可的最高限定代次。从 WCB 或 MCB 取出的细胞经增殖后获得的细胞不得再回冻保存用于生产。

病毒类制品生产对照细胞是指取与生产同一批次的细胞，按一定比例留取细胞样品，不接种目标病毒，与接种目标病毒的细胞采用相同的生产条件，平行培养至规定的时间。如生产中设置对照细胞，在生产末期，应取对照细胞，按本通则“一、(四) 1. 细胞鉴别试验，2. 细菌、真菌检查，4. 支原体检查”以及病毒外源因子检查法(通则 3302)检查，应符合规定。

二、连续传代细胞系的特殊要求

传代细胞系一般是由人或动物肿瘤组织或正常组织传代或转化而来，可悬浮培养或采用微载体培养，能大规模生产。这些细胞可无限传代，但到一定代次后，成瘤性会增强。应按本通则“一、(四) 细胞检定”的规定进行细胞库的检查。对生产过程中细胞培养的要求如下：

1. 用于生产的细胞代次

用于生产的传代细胞系，代次应有一定限制。用于生物制品生产的细胞最高限定代次须经批准。

2. 生产过程中的细胞检查

除另有规定外，病毒类制品，在生产末期，取不接种病毒的对照细胞，

~~按本通则“一、(四) 1. 细胞鉴别试验, 2. 细菌、真菌无菌检查, 4. 支原体检查”以及病毒外源因子检查法(通则 3302), 应符合规定。~~

二三、新建人二倍体细胞株的特殊要求

新建的人二倍体细胞必须具有以下资料: 建立细胞株所用胎儿的胎龄和性别、终止妊娠的原因、所用胎儿父母的年龄、职业及健康良好的证明(医师出具的健康状态良好、无潜在性传染病和遗传性疾患等证明), 以及胎儿父系及母系三代应无明显遗传缺陷疾病史的书面资料。

人二倍体细胞株应在传代过程的早期, 选择适当世代水平(2~8 世代) 增殖出大量细胞, 定量分装后, 置液氮中或 -130℃ 下冻存, 供建立细胞种子之用, 待全部检定合格后, 即可正式定为细胞种子, 供制备 MCB 用。

1. 染色体检查及判定标准

新建人二倍体细胞株及其细胞库必须进行染色体检查。对于已建株的人二倍体细胞株, 如 WI-38、MRC-5、2BS、KMB17 等, 在建立 MCB 时可不必进行细胞染色体检查, 但如对细胞进行了遗传修饰, 则须按新建细胞株进行染色体检查。

(1) 染色体检查

新细胞建株过程中, 每 8~12 世代应做一次染色体检查, 在 1 株细胞整个生命期内的连续培养过程中, 应至少有 4 次染色体检查结果。每次染色体检查, 应从同一世代的不同培养瓶中取细胞, 混合后进行再培养, 制备染色体标本片。染色体标本片应长期保存或保存电子图像数据, 以备复查。应至少随机取 1000 个分裂中期细胞, 进行染色单体和染色体断裂、结构异常和染色体数目(包括超二倍体、亚二倍体和多倍体) 检查。其中至少选择 50 个分裂中期细胞, 利用 G 分带或 Q 分带技术进行核型分析, 并进行染色体结构检查, 记录缺失、插入、倒位、易位及环状染色体数目等。

~~每次染色体检查, 应至少随机取 1000 个分裂中期细胞, 进行染色体数目、形态和结构检查, 并作记录, 以备复查。其中至少选择 50 个分裂中期细胞进行显微照相, 作出核型分析, 并应粗数 500 个分裂中期细胞, 检查多倍体的发生率。~~

~~每次染色体检查, 应从同一世代的不同培养瓶中取细胞, 混合后进行再培养, 制备染色体标本片应长期保存以备复查。~~

~~可用 G 分带或 Q 分带技术检查 50 个中期细胞染色体带型, 并作出带型分析。~~

(2) 判定标准

对 1000 个和 500 个中期细胞标本异常率进行检查, 合格的上限(可信限 90% Poisson 法)见表 3。

表 3 人二倍体细胞染色体分析标准

染色体分析项目	染色体异常细胞数上限		
	1000(检查细胞数)	500(检查细胞数)	100(检查细胞数)
染色单体和染色体断裂	47	26	8
结构异常	17	10	2
超二倍体	8	5	2
亚二倍体 ^①	180	90	18
多倍体 ^②	30	17	4

注: ①亚二倍体如超过上限, 可能因制片过程人为丢失染色体, 应选同批号标本重新计数。

②一个分裂中期细胞内超过 53 条染色体, 即为一个多倍体。

2. 无菌检查

每 8~12 世代细胞培养物, 应进行无菌检查, 依法检查(通则 1101), 应符合规定。

3. 支原体检查

每 8~12 世代细胞培养物, 应进行支原体检查, 依法检查(通则 3301), 应符合规定。

4. 病毒检查

二倍体细胞株传代过程中, 至少对 2 个不同世代水平进行病毒包涵体及特定人源病毒检测[见本通则一、(四)5. (54) 种属特异性外源病毒因子的检测], 结果应均为阴性。

5. 成瘤性检查

每 8~12 世代应做一次成瘤性检查, [方法见本规程 一、(四)6. 成瘤性检查], 结果应无成瘤性。

6. 生产过程中的细胞检查

~~除另有规定外, 在生产末期, 取不接种病毒的细胞作为对照, 进行以下各项检定, 应符合规定。~~

~~(1) 染色体检查~~

可根据制品特性及生产工艺，确定是否进行生产过程中细胞的染色体检查。通常含有活细胞的制品或下游纯化工艺不足的制品，应对所用细胞进行染色体检查及评价[见本通则三、1. 染色体检查及判定标准]；但如采用已建株的人二倍体细胞生产，则不要求进行染色体核型检查。

~~（2）细胞鉴别试验~~

按本通则“一、（四）细胞的检定”项下细胞鉴别试验进行。生产用细胞每年应至少进行一次该项检定。

~~（3）无菌检查~~

依法检查（通则 1101），应符合规定。

~~（4）支原体检查~~

依法检查（通则 3301），应符合规定。

~~（5）对照细胞外源病毒因子检测~~

依法检查（通则 3302），应符合规定。

四、重组细胞的特殊要求

重组细胞系通过 DNA 重组技术获得的含有特定基因序列的细胞系，因此重组细胞系的建立应具有细胞基质构建方法的相关资料，如细胞融合、转染、筛选、集落分离、克隆、基因扩增及培养条件或培养液的适应性等方面的资料。细胞库细胞的检查除应按本通则“一、（四）细胞检定”的规定进行，还应进行下述检查。

1 细胞基质的稳定性

生产者须具有该细胞用于生产的目的基因的稳定性资料，稳定性检测的项目及方法依据产品的特性确定，对于细胞基质来说，稳定性的分析是保证 MCB/WCB 与 EOPC 之间的一致性，包括：重组细胞的遗传稳定性（如插入基因拷贝数、插入染色体的位点、插入基因的序列等）、目的基因表达稳定性、目的产品持续生产的稳定性，以及一定条件下保存时细胞生产目的产品能力的稳定性等资料。

2 细胞鉴别试验

除按本通则“一、（四）1. 细胞鉴别试验”进行外，还应通过检测目的蛋白基因或目的蛋白进行鉴别试验。

三五、原代细胞的要求

原代细胞应来源于健康的动物脏器组织或胚胎，包括猴肾、地鼠肾、沙鼠肾、家兔肾、犬肾等动物脏器或动物的胎儿和其他组织，以及鸡胚和鹌鹑胚等正常组织，以适当的消化液消化、分散组织细胞进行培养，原代细胞不能建立细胞库，只能限于原始培养的细胞或传代少数几代内（一般不超过 5 代）使用，无法事先确定细胞代次。因此，只能严格规范管理和操作措施，以保证以原代细胞为基质所生产的制品质量。

（一）动物组织来源和其他材料

1. 动物组织来源

应符合“凡例”的有关要求。对各种动物都应有明确健康状况和洁净级别要求。

2. 生产或检定用猴

多采用非洲绿猴、恒河猴等，中国以恒河猴为主。应为笼养或小群混养的正常健康猴。动物用于制备细胞前，应有 6 周以上的检疫期，检疫期中出现病猴或混入新猴，应重新检疫。从外面新引入猴群应做结核菌素试验及猴疱疹 I 型病毒(B 病毒)的检查。

胎猴肾可用于生产，对其母猴应进行检疫。

（二）原代细胞培养物的检查

用于细胞制备的动物剖检应正常，取留的器官组织亦应正常，如有异常，不能用于制备细胞。

1. 细胞培养原材料检查及细胞培养操作

按本通则“一、（二）细胞培养操作要求”项进行。

2. 细胞培养物的检查

（1）细胞形态检查

细胞在接种病毒或用于生产前，其培养物均应进行外观检查和镜检，应无任何可疑、异常和病变，否则不得用于生产。

（2）细菌、真菌检查

依法检查（通则 1101），应符合规定。

（3）支原体检查

依法检查（通则 3301），应符合规定。

（4）特定病毒检查

原代猴肾细胞培养应检查 SV40 病毒、猴免疫缺陷病毒和 B 病毒；应采用 Vero 或原代绿猴肾细胞、兔肾细胞检查。地鼠肾原代细胞应采用 BHK21 细胞培养检查。观察细胞形态，如有可疑应在同种细胞上盲传一代继续观察。

~~(35) 对照细胞外源病毒因子检查~~

~~依法检查（通则 3302），应符合规定。~~

~~六、检定用细胞的要求~~

~~检定用细胞是指用于生物制品检定的细胞，包括原代细胞、连续传代细胞或二倍体细胞，以及经特定基因修饰过的细胞。检定用细胞的质量对检定结果的判定具有重要的影响，为保证检定结果的有效性、可靠性及真实性，检定用细胞应符合下列要求。~~

~~（一）细胞资料~~

~~1. 检定用细胞应具有明确合法来源的证明资料。~~

~~2. 如使用传代细胞系/株，应建立细胞库体系，即主细胞库及工作细胞库，如细胞使用量较少，可建立单一主细胞库。应根据制品特性，在保证检测结果可靠性的基础上，通过验证确定该细胞允许使用的最高限定代次，在此基础上规定检定用细胞的代次范围。检定时从工作细胞库复苏细胞后，不能再回冻保存。~~

~~3. 应详细记录检定用细胞建库的过程，包括细胞培养所用原材料的来源、批号，细胞生长液的配制方法、使用浓度等，以及细胞的传代及冻存过程，并建立细胞冻存及使用台账。~~

~~（二）细胞检定~~

~~应至少进行以下 1-3 项检定，根据检定用细胞用途的不同，还应进行以下其他相关项目的检定。~~

~~1、细胞鉴别试验~~

~~按本规程“一（四）1. 细胞鉴别试验”项进行，或其他适宜的方法，应确认为本细胞，并且无其他细胞的交叉污染。~~

~~2、无菌检查~~

~~依法检查，应符合要求（通则 1101）。~~

~~3、支原体检测~~

~~依法检查，应符合要求（通则 3301）。~~

~~4. 外源病毒污染检查~~

~~采用本规程“一（四）5.（2）体外不同指示细胞接种培养法检测病毒因子”项及本规程“一（四）5.（3）动物和鸡胚体内接种法检测外源病毒因子”项检查，应无外源病毒污染。~~

~~5、其他检测：~~

~~（1）成瘤性检查~~

~~用于成瘤性检查的阳性对照细胞，应采用本规程“一（四）6.成瘤性检查”项进行检查，应具有成瘤性。~~

~~（2）病毒敏感性检查~~

~~用于检测活疫苗制品病毒滴度的细胞，应进行此项检查，证明所用细胞具有足够的相应病毒敏感性。~~

~~（3）细胞功能检查~~

~~用于生物学活性、效力或效价测定的细胞，应进行此项检查，证明所用细胞能够有效评价待检样品质量。~~

附录 1~3 略（无修订）

生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制修订说明

题目	生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制		
序号与位置	原文	修改	修订说明
1 (P11 通则名称)	生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制	生物制品生产用动物细胞基质制备及质量控制	检定用细胞单独成章
2 (P11 适用范围)	本通则适用于人用生物制品生产用动物细胞基质及检定用动物细胞,包括具有细胞库体系的细胞及原代细胞。	本通则适用于人用生物制品生产用动物细胞基质,包括具有细胞库体系的细胞及原代细胞。	1. 检定用细胞单独成章。 2. 适用范围增加昆虫细胞,在后续文本有相应要求;本通则适用范围不包括细胞治疗产品,但细胞治疗产品可参考本通则内容。
3 (P11 适用范围)	生产非重组制品所用的细胞基质,系指来源于未经修饰的用于制备其主细胞库的细胞系/株和原代细胞。生产重组制品的细胞基质,系指含所需序列的、从单个前体细胞克隆的转染细胞。生产杂交瘤制品的细胞基质,系指通过亲本骨髓瘤细胞系与另一亲本细胞融合的杂交瘤细胞系。	删除	细胞基质的分类及定义会造成理解歧义,故删除。
4. (P11 一、(二)2. 原材料的选择)	细胞制备过程中不得使用青霉素或内酰胺类抗生素。配制各种溶液的化学药品应符合本版药典(四部)或其他相关国家标准的要求。	细胞制备过程中不得使用青霉素等内酰胺类抗生素。配制各种溶液的化学药品应符合本版药典(二部)或其他相关国家标准的要求。	1. 青霉素属于内酰胺类抗生素。 2. “四部”修订为“二部”。
5. (P11 一、(二)4. 细胞收获及传代)	传代细胞的体外细胞龄可采用细胞群体倍增水平或传代水平计算。 连续传代细胞系的细胞龄可以群体倍增水平计算,也可以按照固定的传代比率进行传代,每传1次视为1代	传代细胞需根据细胞系的特点选择体外细胞龄计算方式。 连续传代细胞系的细胞龄可以群体倍增水平计算,也可以按照固定的方式传代,如固定比率进行传代,每传1次视为1代,或按固定培养天数计算。	参考国际要求,增加体外细胞龄的计算方式,即“按固定培养天数计算”。
6. (P12 一、(三)1. 细胞库的建立)	三级细胞库管理包括细胞种子、主细胞库(MCB)及工作细胞库(WCB)的管理。在某些特殊情况下,也可采用细胞种子及MCB二级管理,但须得到国家药品监督管理部门的	生产用细胞库通常为二级库,包括主细胞库(MCB)及工作细胞库(WCB)。如有细胞种子,也应纳入管理。	与国际要求相一致,由生产用细胞库由“三级库”修订为“二级库”。

	批准。		
7. (P12 一、(三) 1. (2) 主细胞库)	保存于液氮或-130℃以下,经全面检定合格后,即可作为主细胞库,用于工作细胞库的制备,生产企业的主细胞库最多不得超过两个细胞代次。	保存于液氮或-130℃以下,即可作为主细胞库,用于工作细胞库的制备,生产企业的主细胞库应限定代次并检定合格。	1. 考虑到存在主库建立后直接制备工作库的情况,删除“经全面检定合格后”。 2. 删除主细胞库“最多不得超过两个代次”的要求,但应限定细胞代次,应为一个固定的代次,或一个固定的代次范围。
8. (P12 一、(三) 1. (3) 工作细胞库)	生产企业的工作细胞库必须限定为一个细胞代次。	生产企业的工作细胞库必须限定代次。	工作细胞库不限定为一个细胞代次,但应为一个固定的代次,或一个固定的代次范围。不同产品还应遵循相应总论的要求。
9. (P12 一、(三) 2. 细胞库的管理)	主细胞库和工作细胞库应分别存放。每一个库应在生产设施内至少 2 个不同的地点或区域存放。	主细胞库和工作细胞库应分别存放。每一个库应在至少 2 个不同的地点或区域存放,可选择在生产设施内和/或与生产设施有一定距离的地点。当存放地点较远时,应使用有质量保障的容器运输,并监测运输温度。	与国际要求保持一致,细胞库不要求一定保存在生产设施内。
10. (P12 一、(三) 2. 细胞库的管理)	细胞库中的每支细胞均应具有细胞系/株名、代次、批号、编号、冻存日期和贮存容器的编号等信息。	细胞库中的每支细胞均应可追溯其细胞系/株名、代次、批号、编号、冻存日期等信息。	1. 允许使用条形码等方式追溯冻存细胞信息。 2. 删除“贮存容器的编号”,因为存在细胞储存容器发生变化的情况。
11. (P12 一、(三) 2. 细胞库的管理)	为保证细胞冻存后仍具有良好的活力,冻存前的细胞活力应不低于 90%,冻存后应取一定量的可代表冻存全过程的冻存管复苏细胞,复苏后细胞的活力应不低于 80%。	为保证细胞冻存后仍具有良好的活力,冻存后应取一定量的可代表冻存全过程的冻存管复苏细胞,复苏后细胞的活力一般应不低于 80%。若复苏后细胞活力低于 80%,应进行充分评估并有验证数据支持。	1. 考虑到不同类别制品并非所有细胞都需达到“细胞活力应不低于 90%的要求”,故删除。 2. 与 WHO 要求一致,允许复苏后细胞活力低于 80%,但应进行充分评估并有验证数据支持细胞可用于生产。
12. (P12 一、(三) 2. 细胞库的管理)	细胞冻存后,可通过定期复苏细胞及复苏后细胞的活力数据验证细胞在冻存及贮存条件下的稳定性。	细胞冻存后,可通过定期复苏细胞及复苏后细胞的活力数据确认细胞在冻存及贮存条件下的稳定性。	1. 修订后用词更加准确。
13. (P12 一、(四) 细胞检定)	细胞检定的基本要求见表 1。细胞库建立后应至少对 MCB 细胞及生产终末细胞 (EOPC) 进行一次全面检定。当生产工艺发生改变时,应重新对 EOPC 进行检测。每次从 MCB	应对细胞来源、培养及建库过程进行风险评估,并制定检定策略。通常应至少对 MCB 细胞及生产终末细胞 (EOPC) 进行一次全面检定,工作库进行部分	1. 检定策略制定中引入风险评估的理念。 2. 明确了主库、工作库的检定策略。 3. 不是所有的工艺变更都要复

	建立一个新的 WCB, 均应按规定项目进行检定。	检定。如对主库不能进行全面检定, 可对首个工作库进行全面检定, 后续建立的工作库可通过评估后进行部分检定。当生产工艺发生变更时, 需经评估, 必要时应重新对 EOPC 进行检测。细胞检定的基本要求见表 1。	检 EOPC, 需要经过评估后确定是否需要复检。
14. (P12 一、(四) 细胞检定)	表 1	<ol style="list-style-type: none"> 1. 删除“形态观察及血吸附试验” 2. 动物和鸡胚体内接种法: 主库和终末 (+) 3. 删除“染色体检查” 4. 增加“稳定性” 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 该项在对照细胞中进行, 参见通则 3302。 2. 参考国际要求, 增加根据风险评估结果确定是否进行体内实验的要求。 3. 染色体检查作为新建二倍体细胞的检测项目, 不放在细胞基质总的检定要求中。 4. 删除了“四、重组细胞的特殊要求”, 将其中的稳定性要求调整至“一、对生产用细胞基质总的要求”中。
15. (P13 一、(四) 1. 细胞鉴别试验)	新建细胞系/株、细胞库 (MCB 和 WCB) 和生产终末细胞应进行鉴别试验, 以确认为本细胞, 且无其他细胞的交叉污染。	MCB 细胞、WCB 细胞和生产终末细胞应进行鉴别试验, 以确认所用细胞正确, 且无其他细胞的交叉污染。重组细胞系的专属特性的鉴别, 还应通过检测目的蛋白基因或目的蛋白进行鉴别试验。	<ol style="list-style-type: none"> 1. 删除“新建细胞系/株”, 调整至“新建人二倍体细胞株的要求”中。 2. 删除了“四、重组细胞的特殊要求”, 将其中的鉴别要求调整至此。
16. (P13 一、(四) 2. 细菌、真菌无菌检查)	取混合细胞培养上清液或冻存细胞管样品	取混合细胞培养上清液和冻存细胞管样品	与国际要求一致, 细菌、真菌检查需要做细胞培养上清液和冻存细胞管两种样品。
17. (P13 一、(四) 3. 分枝杆菌检查)	取至少 10^7 个活细胞用培养上清液制备细胞裂解物, 按照无菌检查法 (通则 1101) 进行分枝杆菌检查。	<ol style="list-style-type: none"> 1. 取至少 10^7 个活细胞用培养上清液制备细胞裂解物进行分枝杆菌检查。 2. 用于外源病毒检测的豚鼠接种法也可检测分枝杆菌... 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 因无菌检查法 (通则 1101) 不适用于分枝杆菌检查, 故删除。如后续形成分枝杆菌检查通则, 则删除具体操作引用该通则。 2. 与国际要求一致, 减少动物使用, 删除豚鼠法整段。
18. (P12 一、(四) 4. 支原体检查)	4. 支原体检查 取细胞培养上清液样品, 依法检查 (通则 3301), 应符合规定。	4. 支原体/螺原体检查 取细胞培养上清液或细胞悬液样品, 依法进行支原体检查 (通则 3301), 应符	<ol style="list-style-type: none"> 1. 增加螺原体检查项 2. 增加支原体检测样本类型

		合规定。 如为昆虫细胞，或细胞培养过程中使用了植物源性材料，应进行螺原体检查，所用方法应能检测中间原体属和虫原体属，如培养法或核酸法。	
19. (P13 一、(四) 5. 细胞内、外源病毒因子检查	细胞进行病毒检查的种类及方法，须根据细胞的种属来源、组织来源、细胞特性、传代历史、培养方法及过程等确定。	细胞进行病毒检查的种类及方法，须对细胞的种属来源、组织来源、细胞特性、建株及传代历史、培养方法和过程等进行风险评估后确定。	引入风险评估理念
20. (P13 一、(四) 5. (1))	(1)细胞形态观察及血吸附试验 取混合瓶细胞样品…	删除(1)内容	该检项在生产对照细胞中检查，参照通则 3302
21. (P13 一、(四) 5. (2))	(2) 体外不同指示细胞接种培养法检测病毒因子 用待检细胞培养上清制备活细胞或细胞裂解物，分别接种至少下列三种单层指示细胞，包括猴源细胞、人二倍体细胞和同种属、同组织类型来源的细胞。待测样本检测前，可于-70℃或以下保存。	(1) 体外培养法检测病毒因子 用细胞培养上清制备活细胞或细胞裂解物作为待测样本，分别接种至少下列三种指示细胞，包括猴源细胞、人二倍体细胞和同种属来源的细胞。对于昆虫细胞，还应至少增加两种敏感的指示细胞进行检测，一种为对虫媒病毒易感的蚊子细胞，也可使用 BHK21 细胞。另一种为对多种昆虫病毒易感的细胞，如果蝇胚胎来源细胞。细胞裂解物应采用细胞悬液或用培养细胞后的上清重悬细胞样本制备。待测样本检测前，可于-70℃或以下保存。	1. 参考国际要求，第三种指示细胞由“同种属、同组织类型来源的细胞”修改为“同种属来源的细胞” 2. 增加昆虫细胞样本检测用指示细胞的特殊要求。 3. 明确对细胞裂解物制备方法的要求。
22. (P13 一、(四) 5. (2))	每种单层指示细胞至少接种 10^7 个活细胞或相当于 10^7 个活细胞的裂解物。接种量应占维持液的 1/4 以上，每种指示细胞至少接种 2 瓶。取培养 7 天的细胞各 1 瓶，取上清液或细胞裂解物再分别接种于新鲜制备的相应的指示细胞盲传一代，与初次接种的另一瓶细胞继续培养 7 天，观察细胞病变，并在观察期末取	每种指示细胞至少接种 10^7 个活细胞或相当于 10^7 个活细胞的裂解物。接种细胞后应至少培养 28 天，期间可至少传代一次，可将细胞培养物裂解后再接种于新鲜制备的指示细胞，或直接传代。观察细胞病变，并在观察期末取细胞培养物进行血吸附试验；取细胞培养上清液进行红细胞凝集试验。	1. 删除了细胞传代培养的细节描述。 2. 培养天数由 14 天修订为 28 天。

	细胞培养物进行血吸附试验；取细胞培养上清液进行红细胞凝集试验。		
23. (P13 一、(四) 5. (2))	用 0.2%~0.5% 豚鼠红细胞和鸡红细胞混合悬液进行血吸附试验和红细胞凝集试验。将混合红细胞加入细胞培养瓶，… 若已知待检细胞可支持人或猴巨细胞病毒(CMV)的生长，则应在接种人二倍体细胞后至少观察 28 天，应无细胞病变，且血吸附试验及红细胞凝集试验应均为阴性。	分别用 0.2%~0.5% 豚鼠红细胞、鸡红细胞悬液或混合红细胞悬液进行血吸附试验和红细胞凝集试验。将红细胞悬液加入细胞培养容器，…	1. 与国际要求保持一致，可使用单一红细胞分别检测。 2. 因所有指示细胞均培养 28 天，故删除人二倍体细胞培养 28 天的整段描述。
24. (P14) 一、(四)，5，(3)	(3) 动物和鸡胚体内接种法检测外源病毒因子 用待检细胞培养上清液制备活细胞(或适宜时采用相当量的细胞裂解物)，接种动物体内进行外源病毒因子检测。待检细胞至少应接种乳鼠、成年小鼠和鸡胚(两组不同日龄)共计 4 组，如为新建细胞，还需接种豚鼠。原代猴肾细胞还需用家兔体内接种法或兔肾细胞培养法检查猴疱疹 B 病毒。	(2) 动物和鸡胚体内接种法检测 用待检细胞培养上清液制备活细胞(或适宜时采用相当量的细胞裂解物)，接种动物体内进行外源病毒因子检测。待检细胞至少应接种乳鼠、成年小鼠和鸡胚(两组不同日龄)共计 4 组。	根据 3R 原则减少动物使用的要求，删除“如为新建细胞，还需接种豚鼠。原代猴肾细胞还需用家兔体内接种法或兔肾细胞培养法检查猴疱疹 B 病毒”的要求，但表格保持不变，应根据风险评估结果确定是否使用豚鼠和家兔进行外源病毒因子检查。
25. (P14) 一、(四)，5，(4) 逆转录病毒检测	①逆转录酶活性测定	在该项下增加“除已知产生逆转录病毒的细胞外，均应进行逆转录酶活性测定。”	明确需要进行逆转录酶活性测定的细胞范畴
26. (P14) 一、(四)，5，(4) 逆转录病毒检测	②透射电镜检查法 取至少 1×10^7 个活细胞采用超薄切片法进行透射电镜观察。	采用超薄切片法对至少 200 个活细胞进行透射电镜检查。	根据 WHO TRS 978，明确透射电镜法需要检查的细胞数量为至少 200 个
27. (P14) 一、(四)，5，(4) 逆转录病毒检测	④感染性试验 将待检细胞感染逆转录病毒敏感细胞，培养后检测。根据待检细胞的种属来源，须使用不同或多种的敏感细胞进行逆转录病毒感染性试验。	感染性试验应使用敏感细胞进行检测(如 Mus dunni 细胞用于鼠逆转录病毒的检测，SC-1 细胞用于同嗜性逆转录病毒的检测，人源细胞系用于昆虫逆转录病毒的检测)。检测方法可	根据企业意见，增加可选用敏感细胞的描述和感染性试验的方法举例

		选择 PERT 试验、S+L-实验或 XC 空斑试验等。	
28. (P14) 一, (四), 5, (4) 逆转录病毒检测	<p>含有逆转录病毒序列, 常可产生缺陷型逆转录病毒颗粒, 逆转录病毒活性为阳性, 对这类细胞进行逆转录病毒检测时, 可直接检测细胞基质中是否存在外源性逆转录病毒污染, 如禽白血病毒、禽网状内皮病肿瘤病毒、感染性内源性逆转录病毒。在某些情况下, 也可通过监测鸡群, 以保证无上述感染性逆转录病毒污染。</p> <p>小鼠及其他啮齿类动物来源的细胞系含有逆转录病毒基因序列, 可能会表达内源性逆转录病毒颗粒, 因此, 对于这类细胞系, 应进行感染性试验, 以确定所表达的逆转录病毒是否具有感染性。</p>	<p>已知产生逆转录病毒的细胞, 如啮齿类动物来源的细胞、昆虫细胞及禽源性细胞, 可不进行逆转录酶活性检测, 但应进行逆转录病毒颗粒的类型、数量及感染性的检查。</p>	合并已知产生逆转录病毒的细胞, 并提出相应检测要求
29. (P14) 一, (四), 5, (4) 逆转录病毒检测	(4) 逆转录病毒检测	<p>对于已有丰富先验知识的细胞系, 如 CHO、NSO、Sp2/0、Vero 等, 不需要进行化学诱导试验。对于新的细胞基质, 采用化学诱导试验有助于评估细胞中是否存在未知的可被诱导的内源性逆转录病毒。对潜在的 DNA 病毒 (如人源细胞中的疱疹病毒) 和 RNA 病毒 (如昆虫细胞中的诺达病毒), 基于风险评估结果, 也可使用化学诱导试验进行检测。</p>	与国际要求一致, 在逆转录病毒项下增加“化学诱导实验。”
30. (P15) 一, (四), 5, (5) 种属特异性外源病毒因子的检测	<p>鼠源的细胞系, 可采用小鼠、大鼠和仓鼠抗体产生试验 (MAP、RAP 及 HAP) 检测其种属特异性病毒。</p> <p>人源的细胞系/株, 应考虑检测如人 EB 病毒、人巨细胞病毒 (HCMV)、人逆转录病毒 (HIV-1/2、HTLV-1/2)、人</p>	<p>鼠源的细胞系, 可采用小鼠、大鼠和仓鼠抗体产生试验 (MAP、RAP 及 HAP) 或经验证的分子生物学方法检测其种属特异性病毒。</p> <p>人源的细胞系/株, 应考虑检测如人肝炎病毒</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 对于鼠源病毒的检测增加分子生物学方法 2. 调整了不同人源病毒的排序 3. 增加了 3 种猴源病毒的举例 4. 增加了昆虫细胞种属病毒的检测要求

	<p>肝炎病毒 (HAV、HBV、HCV)、人细小病毒 B19、人乳头瘤病毒、人多瘤病毒、难培养的人腺病毒和人疱疹病毒-6/7/8 等。</p> <p>猴源细胞系/株应考虑检测猴多瘤病毒 (如 SV40)、猴免疫缺陷病毒 (SIV) 等。</p>	<p>(HAV、HBV、HCV)、人逆转录病毒 (HIV-1/2、HTLV-1/2)、人细小病毒 B19、人乳头瘤病毒、人多瘤病毒、人腺病毒、人 EB 病毒、人巨细胞病毒 (HCMV) 和人疱疹病毒-6/7/8 等。</p> <p>猴源细胞系/株应考虑检测猴多瘤病毒 (如 SV40)、猴泡沫病毒 (SFV)、猴免疫缺陷病毒 (SIV)、猴逆转录病毒 (SRV)、猴 T 细胞嗜淋巴病毒 (STLV) 等。</p> <p>昆虫细胞系, 应考虑检测已报告污染的特定病毒 (如诺达病毒), 或可能持续存在于昆虫细胞系中并已知对人类具有传染性的病毒。</p>	
31. (P15) 一, (四), 5, (6) 牛源性病毒检测	细胞基质在建立或传代历史中使用了牛血清	细胞基质在建立或传代历史中使用了牛源性材料, 如牛血清或牛胰酶	扩大牛源性材料的范围
32. (P15) 一, (四), 5, (7) 猪源性病毒的检测	如果在生产者建细胞库之前, 细胞基质在建立或传代历史中使用了胰酶, 则所建立的 MCB 或 WCB 和 (或) 超过生产限定水平的细胞至少应检测一次与胰酶来源动物相关的外源性病毒, 包括猪细小病毒或牛细小病毒。	如果在生产者建细胞库之前, 细胞基质在建立或传代历史中使用了胰酶, 则所建立的 MCB 或 WCB 和 (或) 超过生产限定水平的细胞至少应检测一次与胰酶来源动物相关的外源性病毒, 包括猪细小病毒和猪圆环病毒等。	因已有猪圆环病毒在疫苗中检出的报道, 因此增加猪圆环病毒的举例
33. (P15) 一, (四), 5, (8) 其他特定病毒的检测	有些细胞仅对某些特定病毒易感, 采用上述检测方法无法检出, 因此需要采用特定的方法检测, 如对 CHO 细胞进行鼠细小病毒污染的检测等。	有些细胞对某些特定病毒易感, 如 CHO 细胞可污染鼠细小病毒, 采用上述检测方法无法检出, 因此需要采用特定的方法检测, 如特定感染试验或分子生物学方法等。	语言文字修订

34. (P15) 一, (四), 5. 细胞内、外源病毒因子检查		(8) 分子生物学方法 分子生物学方法包括核酸扩增 (NAT) 法和二代测序 (NGS) 法。 NATs 法, 如 PCR 法, 可用于特定的病毒检测。 NGS 法适用于广谱和特定的病毒检测。…	与国际要求一致, 在“5. 细胞内、外源病毒因子检查”项下增加分子生物学方法
35. (P15) 一, (四), 6. 成瘤性检查		昆虫细胞或禽源细胞进行体内成瘤性检查时, 需评估方法的适用性, 如细胞生长温度是否与哺乳动物物种的体温相适应。	在“6. 成瘤性检查”项下增加昆虫细胞成瘤性检查要求
36. (P15) 一, (四), 7. 致瘤性检查	致瘤性检查是保证细胞基质中不存在可使细胞永生化并具有形成肿瘤的因子。	致瘤性检查是保证细胞基质中不存在可使细胞永生化和诱导肿瘤形成的因子。	语言文字描述修订
37. (P15) 一, (四)		8. 稳定性 细胞稳定性通常包括生产稳定性和贮存稳定性。…	在“(四) 细胞检定”下增加“8. 稳定性”, 增加该部分内容主要是因为新修订版中删除了“四. 重组细胞的特殊要求”的内容, 因此将该部分内容中的“1. 细胞基质稳定性”的调整至此处并加以修订。
38. P16 (五) 生产用细胞培养		病毒类制品生产对照细胞是指取与生产同一批次的细胞, 按一定比例留取细胞样品, 不接种目标病毒, 与接种目标病毒的细胞采用相同的生产条件, 平行培养至规定的时间。如生产中设置对照细胞, 在生产末期, 应取对照细胞, 按本通则“一、(四) 1. 细胞鉴别试验, 2. 细菌、真菌检查, 4. 支原体检查”以及病毒外源因子检查法(通则 3302), 应符合规定。	在“(五) 生产用细胞培养”下增加“对照细胞的要求”, 增加该部分内容主要是因为新修订版中删除了“二. 连续传代细胞系的特殊要求”的内容, 因此将该部分内容中的“2. 生产过程中的细胞检查”的调整至此处并加以修订。

39. P16 二、连续传代细胞系的特殊要求	整部分	删除	该部分内容已融合至“一、对生产用细胞基质总的要求”中。
40. P16 三、	三、人二倍体细胞株的特殊要求	二、新建人二倍体细胞株的要求	该部分内容主要为新建人二倍体的特殊要求
41. P16 三、1. (1) 染色体检查	每次染色体检查,应至少随机取 1000 个分裂中期细胞,进行染色体数目、形态和结构检查,并作记录,以备复查。其中至少选择 50 个分裂中期细胞进行显微照相,作出核型分析,并应粗数 500 个分裂中期细胞,检查多倍体的发生率。每次染色体检查,应从同一世代的不同培养瓶中取细胞,混合后进行再培养,制备染色体标本片应长期保存以备复查。可用 G 分带或 Q 分带技术检查 50 个中期细胞染色体带型,并作出带型分析。	每次染色体检查,应从同一世代的不同培养瓶中取细胞,混合后进行再培养,制备染色体标本片。染色体标本片应长期保存或保存电子图像数据,以备复查。应至少随机取 1000 个分裂中期细胞,进行染色体单体和染色体断裂、结构异常和染色体数目(包括超二倍体、亚二倍体和多倍体)检查。其中至少选择 50 个分裂中期细胞,利用 G 分带或 Q 分带技术进行核型分析,并进行染色体结构检查,记录缺失、插入、倒位、易位及环状染色体数目等。	语言文字描述修订
42. P16 三、1. (1) 染色体检查	(6) 生产过程中的细胞检查	删除该部分内容	调整至“一、(五)生产用细胞培养”。
43. P16 四、重组细胞的特殊要求	整部分	删除	该部分内容已融合至“一、对生产用细胞基质总的要求”中。

44. P17 五, 原代细胞的要求 2. 细胞培养物的检查	2. 细胞培养物的检查	增加 (2) 细菌、真菌检查 依法检查(通则 1101), 应符合规定。 (3) 支原体检查 依法检查(通则 3301), 应符合规定。	补充细菌、真菌、支原体检查
45. P18 六, 检定用细胞的要求	整部分	生物制品检定用动物细胞制备及质量控制	检定用细胞单独成通则
46. P18 六, (二), 1. 细胞鉴别试验	1. 细胞鉴别试验	增加: “对于基因修饰的细胞, 应采用适宜的方法对基因修饰特征进行鉴别。”	增加基因修饰细胞的鉴别要求
47. P18 六, (二), 4. 外源病毒因子检查	采用本通则“一、(四) 5. (2) 体外不同指示细胞接种培养法检测病毒因子”项及本通则“一、(四) 5. (3) 动物体内接种法检测外源病毒因子”项检查, 应无外源病毒污染。	采用本通则“一、(四) 5. (1) 体外不同指示细胞接种培养法检测病毒因子”项, 应无外源病毒污染。	删除(3) 动物体内接种法
48. P18 六, (二), 5. 其他检测	(1) (2) (3)	(4) 稳定性检查 经特定基因修饰的细胞, 应进行稳定性检查, 证明基因修饰特性在使用代次内稳定。	增加(4) 稳定性检查

参考文献

1. WHO TRS_978_Annex_3, Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks.
2. Food and Drug Administration (2010), Guidance for Industry Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications.
3. ICH Q5A (R2), Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin.
4. ICH Q5D (1997), Derivation and characterization of cell substrates used for production of biotechnological/biological products.
5. EP 11.0, 5.2.3. Cell substrates for the production of vaccines for human use.
6. EP 11.0, 2.6.16. Tests for extraneous agents in viral vaccines for human use.
7. EP 11.0, 2.6.7. Mycoplasmas.
8. 国家药品监督管理局(2021). 已上市生物制品药学变更研究技术指导原则(试行) .

起草单位：中国食品药品检定研究院

联系电话：010-53851709