

重组制品生产用哺乳动物细胞质量控制
技术评价一般原则

二00六年十月

目 录

1 前言	1
1.1 目的和意义	
1.2 适用范围	
1.3 局限性	
2 宿主细胞的选择	1
2.1 宿主细胞来源、历史和一般特性	
2.1.1 宿主细胞来源和历史	
2.1.2 宿主细胞一般特性	
3 重组工程细胞克隆构建过程、筛选及鉴定	2
3.1 目的基因来源	
3.2 表达载体的具体构建步骤	
3.3 载体引入宿主细胞的方法及重组工程细胞的筛选	
3.4 重组工程细胞的初步鉴定	
4 重组工程细胞库的建立	3
4.1 细胞库建立	
4.2 建库细胞的管理	
5 细胞库检定	3
5.1 细胞鉴定	
5.1.1 细胞种属的鉴定	
5.1.2 致瘤性试验	
5.1.3 目的基因和表达框架分析	
5.1.4 表达产物检测	
5.2 微生物污染检测	
5.2.1 细菌、真菌和支原体检查	
5.2.2 病毒因子的检查	
5.2.2.1 体外试验	
5.2.2.2 体内试验	
5.2.2.3 种属特异性病毒的检定	

5.2.2.4 逆转录病毒的检测	
5.2.2.4.1 感染性试验	
5.2.2.4.2 逆转录酶检测	
5.2.2.4.3 透射电镜检查	
6 细胞稳定性研究	6
6.1 贮存条件下的稳定性	
6.2 传代/扩增过程中的稳定性	
6.2.1 基因水平的比较	
6.2.2 目的产物表达水平的比较	
6.2.3 细胞自身的稳定性	
6.2.4 内源因子检查	
6.2.5 致瘤性监测	
7 生产过程细胞质量控制	7
7.1 常规生产过程监控	
7.2 细胞增殖限度	
7.3 其它风险性因素控制	
8 小结	8
9、名词解释	9
10、参考文献	10

1 前言

对于结构复杂、带有糖基化修饰基团的抗体、凝血因子、酶、激素等生物大分子，通常需要借助哺乳动物细胞才能正确表达和修饰成具有预期生物活性的重组制品。随着生物工程技术的进步和发展，目前这些细胞应用不断增多。

在宿主细胞选择、重组工程细胞构建以及生产细胞的培养扩增和监控过程中，不仅要关注细胞的适用性、目的产物表达生产能力，同时还应当重视伴随细胞培养产生的内源性病毒、宿主细胞残余蛋白和 DNA、致肿瘤成分等潜在的风险性因素对重组产品带来的安全性影响，在早期研究阶段，同步开展库细胞、生产培养过程细胞、生产终末细胞的全面检定和控制以及病毒和/或致瘤性成分的去活/灭活工艺的验证。

1.1 目的和意义

经过全面检测的种子细胞是实现重组基因工程产品生产的前提和基础，使生产用种子细胞具有共同的始祖细胞，保持相同的遗传和生物学特征，在特定的培养环境和条件下持续稳定表达携带的外源目的基因；经过研究确定细胞在扩增培养和生产过程中的变化，才能够有效控制风险性因素，满足生产的持续需求，使产品质量保持一致。

本技术评价一般原则重在阐述重组制品生产用哺乳动物细胞质量控制的基本内容和相关要求，以期引导开展全面完整的细胞质量试验研究、生产细胞培养工艺验证，建立系统规范的重组工程细胞库及实现生产过程细胞质量的有效监控。

1.2 适用范围

本技术评价一般原则仅适用于生产前述的抗体等治疗用重组制品的哺乳动物细胞，不包括细菌、酵母等重组工程菌，也不包括治疗用体细胞、疫苗生产用细胞基质、杂交瘤细胞等。相关内容可参见国家局已颁布的指导原则和药品审评中心公布的药品技术评价一般原则。重组制品生产用哺乳动物细胞亦须符合这些已有文件的相关要求。

1.3 局限性

本技术评价一般原则主要结合目前对于重组工程细胞结构、功能，细胞致瘤性和内源性病毒对重组产品带来的风险及微生物污染因子的危害性共识，提出技术审评关注的重点问题和基本原则，需要结合具体细胞和实际培养控制条件考虑和选择。

2 宿主细胞的选择

应选择来源、背景十分清楚的适宜宿主细胞，明确存在的内源性病毒和/或致瘤性等影响制品安全性的因素，并结合制品纯化的程度、细胞培养和生产过程中风险性成分的去除/灭活能力及残留量控制水平，以及临床应用适应症和用法用量等特点综合分析，经利弊权衡后确定与特定制品相适应的宿主细胞。尽可能选择致瘤性试验阴性和低增殖代次水平的宿主细胞。

对于改良的传代细胞、全新构建的转化细胞，甚至肿瘤细胞等，由于前期研究、背景资料和致瘤性风险等积累的认识十分有限，其开发应用将引入新的安全性隐患，需要慎重权衡利弊，在开展充分研究的基础上严格控制潜在的风险性。

2.1 宿主细胞来源、历史和一般特性

用于构建重组工程细胞的宿主细胞其来源和培养历史应清楚，可溯源有关背景资料，例如最初分离建立株/系的机构，在不同机构内引进和传代经过，既往进行过的检测分析项目和确证研究结果，细胞保存状态，经体外传代培养已达到的增殖代次/水平及传代过程中所用过的人源或动物源性材料等。

2.1.1 宿主细胞来源和历史

应提供宿主细胞来源的相关资料和证明性文件，说明是否曾进行过遗传操作引入了外源基因序列，描述已进行过的研究检定项目例如细胞鉴定、内源和外源性因子检测等的结果及引进时进行的复核检定结果。

2.1.2 宿主细胞一般特性

需阐述宿主细胞的基本特征，如形态、培养和生长一般特征、培养条件和培养液要求。新构建的细胞系应检测致瘤性特征。

3 重组工程细胞克隆构建过程、筛选及鉴定

目前可采用多种表达载体、宿主细胞、基因导入方法和筛选标记等进行工程细胞的构建和筛选，构建成功的标志是工程细胞能够稳定、高效地表达结构正确且具有生物活性的目的产物。应尽可能提供关于重组工程细胞构建和鉴定的详细资料并重点描述：

3.1 目的基因来源

应包括最初获得目的基因序列的来源和背景方面的资料，用于制备目的基因 cDNA 的方法，以及必要的初步序列分析。

3.2 表达载体的具体构建步骤

需说明表达载体组成成分以及主要元件的来源和功能，包括插入基因和侧翼区序列、复制子、启动子、增强子、抗性标记以及主要的酶切位点等。应详述表达载体构建或改建的过程。对构建成功的表达载体应进行必要的鉴定，并提供相关试验资料如构建中所用位点的酶切图谱等。

3.3 载体引入宿主细胞的方法及重组工程细胞的筛选

应详细说明载体引入宿主细胞的方法和操作过程，重组工程细胞的筛选原理、条件和标准，以及采用何种方法增加基因拷贝数等。阐述外源基因引入宿主细胞后产生的变化，符合筛选标准的候选细胞可能为多个细胞株，但拟用于建库的细胞株应为经研究比较后确定的单一细胞克隆。

3.4 重组工程细胞的初步鉴定

应检测重组后细胞基本性状的改变，比较研究插入外源基因后细胞致瘤性特征的改变。应说明表达载体在宿主细胞内的状态（是否整合到染色体）并采用适宜的方法测定其拷贝数。说明启动和控制目的基因在宿主细胞中表达所采用的方法，并进行初步的表达产物鉴别和表达水平检测。

对于选定的工程细胞株应进行充分的的目的基因全序列确认，以保证用于编码和表达目的产物的基因在初始核酸序列上的正确性。

4 重组工程细胞库的建立

连续传代细胞生产重组制品的最大优点是使每批产品都有一个经过检定的共同起源细胞，因此建立细胞库的目的就是为了保证生产的可持续性和产品质量的稳定。重组制品的生产必须建立在良好的细胞库管理基础上。

4.1 细胞库建立

细胞库可为三级即原始细胞库、主细胞库(MCB)和工作细胞库(WCB);也可采用主细胞库和工作细胞库组成的两级细胞库;在某些特殊情况下,也可使用主细胞库一级库。用于建库的初始工程细胞株应为经过克隆选择而形成的均一细胞群体,必要时须经与实际生产过程采用的无血清培养基和培养条件相一致的适应性培养。

4.2 建库细胞的管理

在制备 WCB 过程中不得进行单克隆筛选,以避免由于个别基因突变引起 WCB 中细胞群体性的遗传特性改变;为了保证细胞库中每个容器中的内容物完全一致,如培养细胞采用几个器皿的,应将所有培养皿中的细胞混合成单批后再分装。

在细胞库的建库期间应采取适宜的预防措施,以确保细胞不被污染(包括微生物污染和实验室中其他类型细胞的交叉污染等)。

上述各级种子库的细胞应按照特定的要求经过全面检定合格后方可使用(具体要求参见本文细胞库检定)。

对于细胞库建库的具体过程、方法和管理的要 求,参见参考文献[1]。

5 细胞库检定

正确的起始细胞是实现良好生产的前提和基础。检定的目的是为了确认经过初步筛选建库的细胞符合预期设计要求,携带有稳定的目的基因,能够持续表达有功能活性的目的产物,没有微生物污染和混杂其它细胞,能够直接扩增储备或者应用于生产。

对于原始库细胞和/或主库细胞,通常需要进行一次全面系统的研究检定,包括遗传学、生物学和微生物学,以便从源头开始严格控制起始细胞

的一致性和防止污染。经过传代稳定性研究的主细胞到工作细胞，只经过简单的传代、扩增，可以适当简化检定项目，重点检测外源因子污染和防止混入了其它细胞。保存的数目和传代水平应保证生产用细胞的持续稳定供应。

5.1 细胞鉴定

5.1.1 细胞种属的鉴定

应验明细胞的种属来源，分析细胞的同一性，排除与其它细胞的交叉污染。

目前常用的方法有细胞生长特征和培养形态学检查、种属特异性抗原检测、染色体核型分析、同工酶分析、限制性内切酶分析、基因多态性分析等。应结合具体细胞固有的特性进行适宜的组合和选择，以实现正确鉴别为目的。

5.1.2 致瘤性试验

应检测分析目的基因引入细胞后的致瘤性特征，对于阳性细胞，应研究确定致瘤性改变对产品带来的安全性风险。

5.1.3 目的基因和表达框架分析

目的基因和表达框架的确证是种子库细胞检定的重要组成部分，对于表达正确的目的产物具有先决性意义。常用的方法包括：通过 PCR 扩增样本 DNA 或用从细胞基质中分离的 RNA 制备的 cDNA 来进行 DNA 序列分析；通过限制性内切酶谱和 Southern 杂交来检测基因的完整性，确定目的基因的拷贝数，并检测是否有任何序列插入或缺失等。

基因序列分析资料应包括试验方案和步骤、原始的测序图、测得序列

以及翻译后的氨基酸序列，同时应将实际测得序列与理论序列进行对比。清楚标注两者之间的异同。

为保证产品结构的正确和稳定，基因序列分析应贯穿于重组工程细胞的筛选和鉴定、细胞库的建立和检定以及生产细胞培养监控的全过程。

5.1.4 表达产物检测

应检测分析目的产物的表达量和生物活性。活性测定应选择与其治疗机理相对应并能够定量的方法。活性测定方法学研究可贯穿于药品研究的始终，并经相关验证分析。

5.2 微生物污染检测

5.2.1 细菌、真菌和支原体检查

应对 MCB、WCB 和 EPC（生产终末期细胞）进行全面检查，对生产培养过程中的细胞进行监测。具体方法见参考文献[1]。在进行支原体检查时，应注意同时进行培养法和指示细胞法两种方法。必要时可采用扫描电镜法检查细胞是否受到特殊微生物的污染。

5.2.2 病毒因子的检查

包括细胞来源宿主动物潜在的内源性病毒和由于操作带入的外源性病毒的检查。对细胞进行病毒检查的种类和方法，应根据细胞的种属和组织来源、传代历史和细胞特性选择。

5.2.2.1 体外试验

应将 MCB、WCB 和 EPC 细胞活细胞或细胞裂解产物接种到尽可能多的病毒易感的指示细胞上。可以根据细胞来源，传代史和细胞培养基的原料使用情况来选择适宜的指示细胞。检测结果应为阴性。具体方法见参考文

献[1]。

5.2.2.2 体内试验

通过接种乳鼠、成年小鼠、鸡胚、豚鼠、家兔或其它敏感动物来检测细胞培养物中潜伏性病毒。通常要对MCB、EPC进行体内试验。具体方法见参考文献[1]

5.2.2.3 种属特异性病毒的检定

通过抗体产生试验来检测可能存在于MCB细胞中的种属特异性病毒，如啮齿类动物来源的细胞应进行小鼠、仓鼠或大鼠的抗体生成试验。严格控制对于人类有危害的鼠源性病毒。

5.2.2.4 逆转录病毒的检测

逆转录病毒的试验应包括感染性试验、逆转录酶(RT)检测和电镜技术检查。应采用上述方法对MCB和EPC细胞进行逆转录病毒的检测。

5.2.2.4.1 感染性试验

应根据细胞的特性及可能存在的逆转录病毒种类选择适宜的检测方法，如XC空斑试验(XC plaque)、延时XC空斑试验、S⁺L⁻灶点分析(S⁺L⁻ Focus)等。试验时应注意设立恰当的阴/阳性对照。

5.2.2.4.2 逆转录酶检测

为提高检测的敏感性，通常需要将受试细胞经适当的化学诱导剂诱导后，收集上清液分别与检测细胞联合培养，再检测逆转录酶的活性，注意设立恰当的阴/阳性对照。

5.2.2.4.3 透射电镜检查

透射电镜下可观察细胞基质超微结构的形态学特征以及逆转录病毒

和病毒样颗粒的存在，应比较未经和经过化学诱导剂诱导的细胞。另外，需要对细胞培养液超速离心后所得的沉淀物经负染后进行检查。观察有无逆转录病毒颗粒以及颗粒的类型。

上述三种方法具有不同的检测特性和灵敏度。因此，应采用不同的方法联合检测。若逆转录酶活性检测阳性时，建议进行透射电镜检查或感染性试验，如果确证对人或者其它灵长类动物细胞有感染性的逆转录病毒颗粒，该细胞不可用于生产。

6 细胞稳定性研究

应包括库细胞、生产过程中细胞、生产终末期和/或超过生产终末期等不同培养时期的细胞。库细胞应重点考察贮存、复苏等操作处理因素的影响和传代过程中的遗传稳定性，在此基础上确定库细胞传代限度；生产过程中细胞、生产终末期和/或超过生产终末期细胞应考察模拟生产工艺和培养条件对细胞生长状况、表达能力等的影响，并确定生产细胞增殖限度和/或连续培养时间；使细胞始终能够持续、稳定地表达重组制品，并将对终产品产生安全性影响的风险因素严格控制在最低限度。

6.1 贮存条件下的稳定性

当储存的细胞复苏后用于生产制品时，应进行细胞存活率 and 功能活性等与细胞质量密切关联项目的研究测定，以证实复苏细胞表达能力的稳定性。应有对建库细胞贮存条件下稳定性监测的方案。这种监测应在一支或多支冷冻保藏的 WCB 复苏后制备生产用细胞时进行，或当一支或多支冷冻保藏的 MCB 复苏并用于制备新 WCB 时进行。如果长时间未进行生产时，应按上市申请时所述的间隔时间对生产用细胞库进行活力测试。如果细胞的

活力没有明显的减退，一般不需对 MCB 或 WCB 作进一步检定。

6.2 传代/扩增过程中的稳定性

应对库细胞和生产过程细胞进行传代/扩增的稳定性研究，可将复苏的库细胞连续传代培养至一定的代次和将工作库细胞在模拟实际生产条件下连续培养、扩增（逐级放大扩增过程），直至预期培养时间以及超过预期时间之外的延长时间点，收获后进行检测分析。通过考察目的基因、表达框架等在重组工程细胞中的传代稳定性和目的产物表达的稳定性，制定库细胞的限传代次和生产细胞的增殖限度以保证实际生产过程中细胞整体扩增水平以及伴随的内源性病毒和/或致瘤性风险等的抑制状态在预期限度范围内。至少应包括以下方面的试验研究：

6.2.1 基因水平的比较

目的基因编码序列和表达框架不应有错误，包括突变、缺失、插入。并注意比较基因拷贝数的变化。

6.2.2 目的产物表达水平的比较

目的产物的表达量和表达活性不应有明显降低，根据不同的产品和具体研究结果确定适宜的可接受标准。

6.2.3 细胞自身的稳定性

应重点检测细胞在传代/扩增过程中的形态、生长、代谢等基本状况，遗传特征和致肿瘤特性的变化。

6.2.4 内源因子检查

应动态考察内源因子的复制是否得到有效抑制。重点检测由细胞来源动物和宿主细胞特性所决定的易染病毒如内源性逆转录病毒，分析其对于

人类的致病性和重要性，严格控制其产生的条件。

6.2.5 致瘤性监测

对于致瘤性试验阳性的细胞，应通过比较研究考察细胞培养传代过程中致瘤性特征的改变，例如试验阳性时的细胞代次、最低接种量、肿瘤转移扩散、肿瘤增殖时间、瘤组织病理特征等。

7 生产过程细胞质量控制

种子库细胞应在全面质量研究和检测分析基础上，模拟实际生产过程进行扩增培养，并检测分析目的基因表达的稳定性、细胞生长状况、污染控制、致肿瘤风险性等；规模化生产后须建立细胞生产培养过程的监控标准，产品生产细胞培养终末期应符合质量控制相关要求。

对于内源性逆转录病毒和/或致瘤性试验阳性的细胞，应依据工艺处理能力制定风险性成分的控制条件，并根据模拟生产状态下取得的试验研究数据制定废弃收获液的标准；生产工艺须包括有效的病毒和/或致瘤性成分的灭活/去除方法并经过充分验证。

如果整个培养过程中的关键环节例如培养基、培养条件、培养时间和/或限制代次、培养方式等发生重大改进，细胞培养工艺进行了放大，影响了原已确定的监控标准，应重复进行一次全面的检测验证。

7.1 常规生产过程监控

经研究确定了生产工艺条件之后，常规生产过程中可重点监测微生物污染和细胞生长状况，例如活细胞数目和形态、代谢和功能状态、目的蛋白表达状况、潜伏性逆转录病毒基因组激活状况、细菌和支原体污染以及其它要求[1]等，在比较分析的基础上确定批次或者连续培养生产的终末

细胞的检测项目及可接受标准。

7.2 细胞增殖限度

在细胞稳定性试验研究的基础上，应结合细胞培养、维持等工艺过程中实际采用的生产方式如批式培养(batch culture)、流加培养(fed-batch culture)、灌注培养(perfusion culture)等各自特点，考察细胞体外连续扩增、培养过程中发生的变化，例如细胞的生长状态、内源性病毒抑制状态、目的蛋白表达的下降程度以及致瘤性改变等确定适宜的收获方式、收获时间、细胞终止培养时间和/或增殖代次，并预留充分的安全储备。实际生产过程中细胞不得超过预先设定的培养时间和/或增殖限度。

7.3 其它风险性因素控制

培养基对细胞的质量有直接的影响，也是细胞污染的可能来源之一。应明确培养基的组成、来源及质量标准。对于动物源性添加成分，应尽可能控制并减少其使用；如确需使用，应阐明选择的理由，并说明该成分的来源和病毒安全性控制方法。目前提倡采用无血清培养基，并尽可能减少用于处理细胞（例如从贴壁状态中游离或者分散）的动物来源的蛋白酶。各种培养基的来源和质量检测数据均应有可追溯的文件记录。如培养中使用了牛源性物质，应明确其来自非 BSE 疫区，并应按照国家食品药品监督管理局的相关规定提供必要的证明性文件。

细胞培养条件的研究中，应考察使内源性逆转录病毒复制和癌基因相关序列激活或者复制受抑制的控制条件，对模拟生产条件下的状况进行分析，确定可实际控制的程度。生产中应严格执行研究确定的控制条件。

8 小结

宿主细胞来源应明确，其建立、传代和培养历史清楚，鉴定结果可靠，遗传、生物学背景可追溯；

工程细胞的克隆构建、筛选过程应规范，克隆原始细胞在比较优化的基础上经过确认检测；起始细胞稳定、均一和同质，建立了规范的细胞库（以下简称库细胞）并经过充分检定，保存的数目和传代水平应保证生产用细胞的持续稳定供应；

对于原始库和/或主库细胞，应进行过至少一次全面系统的研究检定；工作库细胞经过简化项目的检定和外源因子污染检测，没有混入其它细胞；

生产用 WCB 细胞每次复苏后应经过有代表性意义的常规质控项目的检测分析，以证实库细胞在复苏时仍保持原冻存时预期的细胞特征。

在细胞培养工艺研究阶段，对生产终末细胞和/或超过培养限定代次的细胞应进行过一次全面系统的检测分析研究，包括一般检定、遗传和生物学特征检测分析、目的基因和表达框架的稳定性分析、外源因子污染状况分析、内源性病毒激活或复制抑制状态检测、致瘤性改变以及其它需要严格限制的因素等；

细胞应经过全面的稳定性研究考察，以确定库细胞的限传代次和生产细胞适宜的扩增控制水平，并在生产过程中严格执行限定的要求。重组工程细胞在整个培养生产过程中其遗传学和生物学特征应保持稳定；

生产中设立了适宜的监控指标，动态跟踪监测细胞的增殖、生长、污染等状况，并控制在警戒范围内。对于内源性逆转录病毒和/或致瘤性试验阳性的细胞，病毒和/或癌基因相关序列的激活或者复制应受到严格控

制，制定废弃收获液的标准，生产工艺包含有效的病毒和/或致瘤性成分的灭活/去除方法并经过充分验证，纯化步骤能够使病毒和/或致瘤性成分得到有效去除，并严格执行研究确定的控制条件；

细胞培养基的来源和质量标准应明确，动物源性添加成分须符合国家有关规定；

总之，细胞质量研究、检测和监控应包括从起始的库细胞至生产终末的整个扩增培养全过程，使细胞始终能够正常表达、分泌具有生物活性的目的产物，微生物污染、致瘤性等风险性因素得到有效控制。

9、名词解释

宿主细胞：系指用以载纳和表达外源目的基因的细胞系或者细胞株。

重组工程细胞：系指携带有外源目的基因并能够持续稳定表达重组目的产物的工程化细胞。

细胞增殖限度：在既定培养条件下，库细胞从复苏开始至生产终末期为止的整个培养过程中，为有效控制细胞生长状态或者变异的程度，使其始终处于持续、稳定的表达状态所界定的相关要求，包括库细胞限传代次和生产细胞培养限度。通常采用固定条件下细胞培养和维持时间、细胞群体倍增水平或者限传代次等指标加以限制。

细胞库、原始细胞库、主细胞库、工作细胞库的概念和定义见参考文献[1]。

10、参考文献

- 1、中华人民共和国药典 2005 年版三部. 生物制品生产用动物细胞基质制备及检定规程, 2005
- 2、FDA. Points to consider in characterization of cell lines used to produce biological products, 1989
- 3、FDA. Points to consider for the characterization of cell lines used to produce biologicals and for the manufacturing and testing of monoclonal antibody for human use, 1997
- 4、ICH. Guideline for viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human and animal origin, 1996
- 5、EMA. Position statement on the use of tumourigenic cells of human origin for the production of biological and biotechnological medicinal products, 2001

重组制品生产用哺乳动物细胞质量控制

技术评价一般原则起草说明

哺乳动物细胞用于生产治疗性重组制品，特别是单克隆抗体药物的临床应用近年来呈现上升的趋势，国内相应的研究、开发和进入临床试验的项目也逐渐增多。但目前仅根据文献报道和可获得的有限背景资料，未经全面系统的试验研究和检测分析就直接引进和使用能够获取的宿主细胞现象比较普遍。对于重组工程细胞的质量分析只有零碎、不完整的试验研究。而关于细胞质量控制已有的指导原则和技术评价一般原则，主要针对生产疫苗的细胞基质、腹水法生产抗体的杂交瘤细胞以及体细胞治疗等，其中相关的内容虽具有普遍的指导意义，但对于重组制品生产用哺乳动物细胞质量控制特殊问题的考虑尚不够充分和具体，亟需单独起草具有实际针对性的技术评价一般原则，以完整、全面阐述技术评价的基本内容和相关要求，引导用于重组产品的哺乳动物细胞质量控制的相关研究工作。

1、起草指导思想

细胞质量的研究和控制是生产重组制品的核心组成部分，维持良好的培养细胞和表达状态需要从库细胞到生产过程的全面质量研究。基于国内外该领域目前存在的实际差距，并考虑国内今后发展的趋势和要求，为从研发的起始阶段对于细胞质量控制研究方案提供参考依据，设计和规划科学的研究项目，规范技术审评和研究开发所面临的共同问题，中心成立了本课题研究小组。根据目前在技术审评中发现的细胞质量控制方面的共性突出问题，结合现有指导原则和技术评价一般原则适用的部分，国外指导原则的一般考虑，起草了本技术评价一般原则。期望能够引导和促进细胞质量控制工作的全面性、系统性和完整性，加强重组制品生产用哺乳动物细胞质量控制的研究工作。

2、与其它指导原则的关系

关于细胞质量研究、控制及重组制品的技术要求，国家局已颁布《人体细胞治疗研究和制剂质量控制技术指导原则》、《人用重组DNA制品质量控制技术指导原则》、《人用单克隆抗体质量控制技术指导原则》；药品审评中心已公布《疫苗生产用细胞基质技术审评一般原则》、《生物组织提取制品和真核细胞表达制品的病毒安全性评价技术审评一般原则》；特别是《中华人民共和国药典》（2005年版）三部通则，对于“生物制品生产用动物细胞基质制备及检定规程”已有明确要求。本文的起草中参考了相关的内容，在与上述文件的相关要求保持一致的基础上，针对重组哺乳动物细胞的质量控制特点，补充提出更加具体化的技术评价基本原则，相同的部分以参见的方式直接引用，不再重复有关内容。

3、重点内容和基本原则

在明确筛选宿主细胞的一般原则基础上，严格控制致瘤性、内源性病毒等风险性因素；对于建库后的重组工程细胞强调必须经过全面的检定，增加了针对目的基因和表达框架的具体要求；库细胞的传代和生产细胞的扩增培养须建立限定要求，稳定性研究应包括库细胞、生产过程中细胞、培养终末期和/或超过终末期等不同培养时期的细胞，阐述了需要重点考察的主要内容和检测项目，并严格要求生产中不得超出研究确定的许可代次；对于致瘤性阳性细胞系风险性因素的控制必须在早期阶段同步重视，研究确定内源性病毒/癌基因抑制的条件并应用于实际生产过程中；生产工艺中采用的病毒灭活/去除方法和纯化工艺中去除宿主细胞的DNA及其它致肿瘤成分的效果须经充分验证，严格控制风险性成分的残留量；细胞培养相关的技术条件和工艺参数变更或者培养工艺放大后等，需要重新对细胞质量进行全面检测分析等。

通过上述技术评价内容的阐释，提出本技术审评的一般原则，以引导细胞质量控制研究工作包括从库细胞、生产过程细胞至培养终末细胞的全过程，在各个阶段进行完整系统的检测分析。

4、细节性技术问题说明

4.1 关于名称含义

哺乳动物细胞可以泛指各种哺乳动物来源的真核细胞，包括原代细胞、二倍体细胞、传代细胞及肿瘤细胞。目前已成功用于生产重组制品的细胞主要有啮齿类传代细胞系如 CHO、BHK、C127 等。具有体外长期传代和生存能力的宿主细胞是满足产业化生产实际需要的基本前提。因此，本

文中阐述的内容主要与传代细胞有关。鉴于国内外有关技术指导原则已将“生产重组制品用哺乳动物细胞”赋予了特定的含义，为便于理解和保持既有的概念，本文仍沿用业界已惯用的习语，暂拟订“生产重组制品用哺乳动物细胞”名称。

4.2 关于细胞的来源

由于该方面的资料仅与溯源性有关，主要用于佐证细胞的构建历史过程。因此，在正文中对于建株/系细胞来源动物的种属、年龄、性别和健康检疫状态，最初来源实验室的研究资料或者引用正式发表的文献资料，引进细胞的制备和分发机构等未提出强制性要求，建议尽可能提供宿主细胞的特征如鉴别标志，种属鉴定如鼠源、人源和其它动物来源的确证资料；关于传代历史，研究机构应对于细胞在不同试验室或者研究机构引进、保存、传代培养等周转过程中所经历事件有详细记录和说明，用于建档和备查，不须在申报资料中提供。但应有说明性材料，包括传代过程所用的人源或动物源性材料。

4.3 表达载体构建过程和重组工程细胞的筛选

此部分研究工作系指将含有重组产物基因编码序列的表达载体导入宿主细胞，从而构建成可表达目的产物的工程细胞。正文未对此过程详细解释和说明，没有要求提供具体资料，而是直接阐述需要关注的重点内容。但研究机构应有对应建档资料备查，如质粒载体系外购，应明确其来源并备有相关证明；如系研制单位自己构建或在商品化质粒载体的基础上进行了改造，则应详述构建或改建的过程，并附图示说明。筛选方案中应有采用了何种筛选标记（如抗性及其它营养缺陷选择性等）、何种特定的培养

条件的详细资料。

上述关于重组工程细胞的构建、筛选和鉴定的资料，从评价的角度主要关注其资料的完整性和翔实性。此部分资料作为工程细胞的背景资料不但反映了生产用细胞的可溯源性，也可为后续细胞库的管理和质量评估以及细胞培养条件控制等提供必要的基础信息。但属于研究单位自身应重视的基本问题，是获取正确重组工程细胞的基础，由于后续种子库细胞的具体检定将提供直接的证据，因此未在正文中提出具体要求。

4.4 目的基因和表达框架的检测分析

正文没有解释和强调测序工作的重要性和实际意义，仅提出测序确证应贯穿于重组工程细胞的研究建立和生产应用整个过程。对于选定的工程细胞株应进行充分的目的基因序列确认，以保证用于编码和表达目的产物的基因在初始核酸序列上的正确性。鉴于目前对于大分子蛋白质进行全序列分析尚有相当大的难度，即使尝试进行全序列分析也难以检测到所有基因编码序列突变造成的蛋白质结构变化，所以进行核酸水平的序列确认是非常必要的。核酸分析的目的不是为了检测少量的变异序列，而是为了保证所表达的蛋白有正确的氨基酸顺序。当工程细胞包含有多个整合拷贝时，并非所有的拷贝均有转录活性，因此对 mRNA 或 cDNA 进行序列分析，即测定转录产物本身，也许比对基因组 DNA 的分析更合适。对混合克隆细胞或聚合酶链反应产物进行测定，也许可替代依靠选择单一 DNA 克隆的方法（适宜对细胞库和培养过程中的细胞进行序列分析）。也可考虑采用其他快速、灵敏和准确的核酸序列分析方法。

关于目的基因存在形式和功能状态的分析研究，由于目前国内检测

的技术手段和具体方法有所不同，考虑到应用的普遍性和分析难度，如提出统一具体的强制性要求，则缺乏支持的基础。因此，正文中未对整合位点检测（South Blot），mRNA 大小分析（Northern Blot），编码序列的完整性（cDNA 测序）检测等提出具体要求，有条件的情况下建议在 MCB 细胞和生产终末期细胞进行这些试验，WCB 可以进行 mRNA 分析及拷贝数检测。

4.5 关于外源因子检查

中国药典三部有具体的要求，可使用人二倍体细胞系（MRC-5）、猴肾细胞系（Vero）以及在种属和组织类型上与用于生产完全相同的细胞，并选择合适的阳性对照。一般培养14天，观察有无细胞病变，检测红细胞吸附和血细胞凝集（这些现象提示有病毒污染）。在特定条件下，为了鉴别某些病毒，如人巨细胞病毒，可以延长观察期至28天。红细胞吸附和血细胞凝集检测也是检定是否有病毒污染的常规指示试验。上述内容未纳入正文，只是提出可以根据细胞来源，传代史和细胞培养基的原料使用情况来选择敏感的多种指示细胞。具体方法参见中国药典。

4.6 关于病毒颗粒的电镜检查

根据文献研究报道，透射电镜下可观察细胞基质超微结构的形态学特征以及逆转录病毒和病毒样颗粒（A，B，C，D 和 R 型）的存在。多数啮齿动物细胞（如小鼠杂交瘤、NS0、Sp2/0 和 CHO）可以表达由细胞膜芽生或者处于细胞外的 C 型颗粒以及囊泡内 A 型颗粒；而 BHK 细胞可以表达低水平的囊泡内 R 型颗粒。这些情况我们认为从事细胞质量研究和控制的专业机构的分析评价意见将更加深入。因此，未在正文中纳入，只是要求在细胞

中如果只检出非感染性的病毒颗粒，须在后期生产中应用灭活/去除工艺并严格控制 DNA 和宿主蛋白残留量。

4.7 关于无菌试验和支原体检查

应当采取混合细胞培养的上清液样品，按照现行中国药典的无菌检查方法进行检定，结果须符合规定要求。使用的培养基应适合需氧菌、厌氧菌和真菌的生长，并且培养基的灵敏度要满足要求。无菌检查法包括直接接种法和薄膜过滤法，如供试品允许，应优先采用后种方法。对于直接接种法，若制品中含有防腐剂，应先行增菌培养。在进行支原体检查时，应注意同时进行培养法和指示细胞法两种方法。上述基本要求十分重要，也是审评中经常发现的主要问题。但在正文中没有详述，主要是为了简化正文的篇幅。

5、课题研讨会后修订的意见

5.1 关于致瘤性试验

目前生产重组制品使用的啮齿类细胞系CHO、BHK、C127等已证明具有致瘤性，国外指导原则通常不再要求进行致瘤性检查，只是要求对于致瘤性阳性细胞系来源的重组制品，必须加强致瘤风险性因素的控制，建立和应用纯化/去除工艺，严格限制致瘤性成分如宿主残余DNA在成品中的含量。但对于新建立的细胞则要求进行致瘤性实验。结合目前的发展和认识，经过会议讨论，认为插入了外源基因后的重组工程细胞应作为全新的细胞对待，应强调进行传代/扩增过程中的对比试验，观察致瘤性特征的改变，制定后续处理工艺条件和限制性要求。

由于在宿主细胞选择、重组细胞的初步鉴定、库细胞的检定、细胞稳

定性研究、生产过程中细胞的质控等多个环节均涉及到致瘤性试验的问题。但关注的重点和要求有所区别，如将该内容统一到独立的标题下论述，则难以找到适宜的插入位置。因此，仅在库细胞的检定中增加了致瘤性试验检测项目。但为从不同的角度提出要求，相关内容同时分解到不同的部分加以阐述。例如在宿主细胞选择阶段，仅提出对构建的全新细胞应检测致瘤性特征；在重组工程细胞初步鉴定和库细胞检定部分，强调检测分析目的基因引入细胞后的致瘤性特征，对于阳性细胞，应研究确定致瘤性改变对产品带来的安全性风险；细胞稳定性试验中增加了致瘤性监测小标题，强调对比试验，考察细胞培养传代过程中致瘤性特征的改变等。

5.2 宿主细胞的选择原则

基本保留原文的意见，但考虑到致肿瘤性阳性细胞的安全性风险，增加了在选择时的额外要求，即其它方面相同的条件下，应首先选择致瘤性试验阴性和低增殖代次水平的宿主细胞。

5.3 生产过程中细胞质量控制研究

在前期的细胞培养工艺研究中，应对模拟生产终末细胞或超过生产用限制代次细胞进行一次全面系统的检测分析研究，包括一般鉴定、遗传生物学检测分析、目的基因和表达框架的稳定性分析、外源因子污染状况分析、内源性病毒复制状态及细胞增殖水平检测、致瘤性改变等，以了解在整个培养期间细胞是否始终处于良好状态，能够持续、稳定表达目的蛋白，为后续纯化工艺提供波动小、相对均匀和一致的收获液，以及在整个培养过程结束后，细胞是否仍然处于预期的可接受状态下。这些内容原本放在生产过程中细胞质量控制研究中，鉴于该内容在细胞稳定性研究中也有阐

述，因此将细胞稳定性试验研究和生产过程中细胞质控相同部分的内容进行了简并。

细胞稳定性研究中，着重强调了内源性逆转录病毒和/或致瘤性试验阳性的细胞其抑制条件的研究和建立；而生产过程中细胞质量的控制，突出了对于内源性逆转录病毒和/或致瘤性试验阳性的细胞，应依据工艺处理能力制定风险性成分的控制条件，并根据模拟生产状态下取得的试验研究数据制定废弃收获液的标准；生产工艺须包括有效的病毒和/或致瘤性成分的灭活/去除方法并经过充分验证等配套要求。

5.4 关于BSE的检测和控制

目前，对于细胞最初培养和建库阶段由于使用BSE疫区牛源性物质（例如牛血清、牛源性胰蛋白酶等）所带来的细胞污染问题，涉及的技术评价问题比较复杂，尚在研究讨论之中。因此，暂未纳入本技术评价原则的相关要求之中，我们将密切关注生物制品生产用细胞库有关BSE污染的检测和控制的研究进展，与国家相关要求保持一致。