



——生产及检定用细胞

谢忠平 李琦涵 孙茂盛 **主编**



化学工业出版社
生物·医药出版分社

生物制品检定手册

——生产及检定用细胞

本书根据国家有关规范和要求，对生物制品研究和生产中所涉及的几乎所有平台技术进行了阐述。书中对每项技术的基本原理，所涉及的设备与试剂，培养基配方及其制作，操作方法，注意事项等技术细节进行了详尽的说明。

内容包括：

细胞鉴别试验

细菌真菌培养法检查

支原体检查

病毒性外源因子检查

逆转录病毒的检查

特殊病毒外源因子检查

细胞致肿瘤试验

本书所涉及方法经过充分验证，采取 Step-by-Step 方式进行说明，方法可行度高并易于掌握。

ISBN 978-7-122-01977-6



销售分类建议：药学

定价：45.00 元

9 787122 019776 >

生物制品检定手册

——生产及检定用细胞

谢忠平 李琦涵 孙茂盛 主编

种类	细胞名称	细胞来源	使用浓度	作用机理	备注
大环内酯类抗生素	青霉素	10000 IU/ml	100 IU/ml	抑制细胞膜及蛋白质合成	
	红霉素	5~10 μg/ml	50~100 μg/ml	与核糖体的核蛋白体结合改变其形态,产生错误的信息,从而合成出异常的蛋白质,以致细菌不能生长繁殖	
氨基糖苷类抗生素	庆大霉素	mg/ml	50 μg/ml	与细菌核蛋白体 30S 亚基在 A 位特异结合,阻止 mRNA 在该位上的移动,从而阻止肽链延伸及蛋白质合成	
	卡那霉素	mg/ml	50 μg/ml		
	新霉素	mg/ml	50 μg/ml		
四环素类抗生素	四环素	mg/ml	50 μg/ml	大环内酯类与 70S 核蛋白体 50S 亚基结合,抑制肽基转移酶的活性,阻止肽链延伸,与 G ⁻ 菌核蛋白体结合,阻止 mRNA 在该位上的移动,从而阻止肽链延伸及蛋白质合成	
	多西环素	mg/ml	50 μg/ml		
	米诺环素	mg/ml	50~100 μg/ml		
大环内酯类	红霉素	mg/ml	100 μg/ml	大环内酯类与 70S 核蛋白体 50S 亚基结合,抑制肽基转移酶的活性,阻止肽链延伸,与 G ⁻ 菌核蛋白体结合,阻止 mRNA 在该位上的移动,从而阻止肽链延伸及蛋白质合成	
氨基糖苷类	庆大霉素	mg/ml	50 μg/ml	氨基糖苷类与细菌核蛋白体 30S 亚基在 A 位特异结合,阻止 mRNA 在该位上的移动,从而阻止肽链延伸及蛋白质合成	
四环素类	四环素	mg/ml	50 μg/ml	大环内酯类与 70S 核蛋白体 50S 亚基结合,抑制肽基转移酶的活性,阻止肽链延伸,与 G ⁻ 菌核蛋白体结合,阻止 mRNA 在该位上的移动,从而阻止肽链延伸及蛋白质合成	



化学工业出版社
生物·医药出版社

北京

图书在版编目 (CIP) 数据

生物制品检定手册——生产及检定用细胞/谢忠平, 李琦涵, 孙茂盛主编. —北京: 化学工业出版社, 2008. 4

ISBN 978-7-122-01977-6

I. 生… II. ①谢…②李…③孙… III. 生物制品—
检定-技术手册 IV. TQ464-62

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 010974 号

责任编辑: 杨燕玲

装帧设计: 关 飞

责任校对: 战河红

出版发行: 化学工业出版社 生物·医药出版分社

(北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷: 北京云浩印刷有限责任公司

装 订: 三河市前程装订厂

720mm×1000mm 1/16 印张 19 字数 354 千字 2008 年 4 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 45.00 元

版权所有 违者必究

编写人员名单

主 编：谢忠平 李琦涵 孙茂盛

编写人员：

谢忠平	中国医学科学院医学生物学研究所	主任技师/硕士生导师
李琦涵	中国医学科学院医学生物学研究所	研究员/博士生导师
孙茂盛	中国医学科学院医学生物学研究所	研究员/博士生导师
杨净思	中国医学科学院医学生物学研究所	副主任技师
车艳春	中国医学科学院医学生物学研究所	副主任技师
龙润乡	中国医学科学院医学生物学研究所	副主任技师
姜 莉	中国医学科学院医学生物学研究所	研究员
李平忠	中国医学科学院医学生物学研究所	副主任技师
董承红	中国医学科学院医学生物学研究所	副主任技师
易红昆	中国医学科学院医学生物学研究所	主管技师
李 华	中国医学科学院医学生物学研究所	副主任技师
张丽旌	中国医学科学院医学生物学研究所	副主任技师
李映波	中国医学科学院医学生物学研究所	主任技师
董荫良	中国医学科学院医学生物学研究所	副主任技师

前 言

生物制品是人类用于预防、治疗和诊断疾病的有力武器，这些由微生物（细菌、噬菌体、立克次体、病毒等）或微生物代谢产物、动物毒素、人或动物主要组织经纯化或现代生物技术加工制成的产品，在预防人类各种传染性疾病、治疗或者辅助治疗数种疾病方面发挥了重要作用，取得了良好的效果，提高了人类的健康水平。随着时代变迁、经济发展，人类赖以生存的大环境和微环境逐步恶化，近 30 多年来，全球新发现的致病性病原体有 40 余种，其中一些病原体仍在人间传播，肆虐人类健康，如人类免疫缺陷病毒 HIV、变异冠状病毒、高死亡率埃博拉病毒等；还有一些在不同物种间相互传播的病原体，如高致病性禽流感 H5N1 病毒、引起动物和人脑疾病的朊病毒等都对当今和未来人类的健康构成了严重威胁。目前对这些主要的病原体及其造成的疾病，尚未寻找到有效的预防和治疗方法。

尽管如此，人们仍在不断探索解决这些问题的办法。人类都寄希望于用生物制品来预防和治疗某些疾病。疫苗是目前人类可以彻底控制某一传染性疾病的唯一武器，预防接种不但保护了个体免受传染病病原体的侵袭，而且在群体中也限制了病原微生物的传播；同样，诊断试剂的应用也在疾病预防中发挥重要作用。疫苗在消灭天花和控制脊髓灰质炎等传染病中所起到的关键性作用有力地证明了这一点。因此，生物制品的研究开发成为了疾病（特别是传染性疾病）预防及控制的重要内容。

几乎所有的疫苗和绝大多数生物制品在研究、生产及检定过程中都离不开细胞培养，由于组织细胞，特别是来源于动物的原代细胞，可能带有外源性的微生物，会给研究结果的可靠性、生产产品的安全性等带来影响，因此必须对用于生产及检定用的细胞进行检测，确定其达到相关技术标准的要求，保障所生产制品的安全。因此，建立准确、灵敏、可靠、重复性好的检测方法及标准，对于保障产品的质量至关重要。我国已发布了相关的法律法规和药典，对不同环节的检测项目、控制标准都制定了基本要求。鉴于目前国外检测技术的不断完善，国内生物制品企业日趋增多，编写一部有关生物制品的质量检定手册非常有必要。本书邀请了一批具有扎实理论基础并在生物制品工

作中积累了丰富经验的专家学者,根据《中华人民共和国药典》[●](三部)中《生物制品生产用动物细胞基质制备及检定规程》的基本要求,结合一些工作经验,编写了《生物制品检定手册——生产及检定用细胞》一书供同行参考。本书较全面地描述了生物制品生产及检定用细胞的种类、生长特性、培养方法、检测内容、操作程序、判断标准等内容。希望能对同行有所帮助,也希望通过本书的出版,加强生物制品界的交流与合作,为研究新生物制品、检定制品的质量共同努力。

由于科技发展日新月异,我们掌握的资料和撰写的水平都还有待提高,另外该书编写时间紧,不妥和疏漏之处在所难免。衷心希望广大专家、读者给予谅解,批评指正。

谢忠平
2008年1月

● 本书后文简称《中国药典》。

目 录

第 1 章 基础知识	1
1.1 生物制品的分类	1
1.2 《中国药典》对生物制品生产及检定用细胞总的要求	1
1.3 细胞培养基础知识	10
1.4 细胞培养主要原材料的质量控制	44
参考文献	54
第 2 章 细胞鉴别试验	55
2.1 引言	55
2.2 染色体检查	57
2.3 DNA 指纹图谱	67
2.4 特殊染色体检查	78
2.5 细胞同工酶检测	84
参考文献	91
第 3 章 细菌真菌培养法检查	93
3.1 细菌及真菌的生物学特性	93
3.2 细菌培养法检查	99
3.3 真菌培养法检查	116
3.4 常用培养基的制备及质量要求	119
参考文献	135
第 4 章 支原体检查	137
4.1 支原体的基本特性	137
4.2 支原体污染来源及对细胞的影响	140
4.3 支原体的检查方法及比较	143
4.4 支原体培养法检查	144
4.5 支原体指示细胞培养检查法 (DNA 荧光染色法)	148
4.6 支原体 PCR 法检查法	153
4.7 支原体的 ELISA 检测	158
参考文献	163
第 5 章 病毒性外源因子检查	165
5.1 病毒基础知识	165
5.2 传代细胞病毒污染情况分析	173
5.3 细胞被病毒感染后产生的变化	174
5.4 常见病毒及感染细胞后细胞生物学改变特点	176
5.5 血细胞吸附试验检查血细胞吸附病毒	183
5.6 血细胞凝集试验检查血细胞吸附病毒	185

5.7	多种细胞传代检查非血细胞吸附病毒	187
5.8	免疫荧光法检测细胞污染病毒	192
5.9	动物接种法检查污染细胞病毒	195
	参考文献	198
第6章	逆转录病毒 的检查	199
6.1	概述	199
6.2	敏感细胞培养法检查逆转录病毒	205
6.3	逆转录酶活性测定法检测逆转录病毒	209
6.4	透射电子显微镜检查法	213
	参考文献	224
第7章	特殊病毒外源因子 检查	227
7.1	概述	227
7.2	人源细胞特殊外源因子检测	228
7.3	猴源细胞特殊病毒外源因子检查	237
7.4	鼠源细胞特殊病毒外源因子检查	241
	参考文献	245
第8章	细胞致肿瘤 试验	247
8.1	肿瘤细胞的特性	247
8.2	动物接种法检查细胞致肿瘤性	256
8.3	软琼脂细胞克隆生长法检查细胞致肿瘤性	263
8.4	细胞浸润试验法检查细胞致肿瘤性	270
	参考文献	272
附录1	国内已建人和动物的主要细胞系/株	275
附录2	小牛血清质量检测要求 [2005年版《中国药典》(三部)]	279
附录3	常用实验动物采血方法	281
附录4	生物制品常用名词解释	283
附录5	细胞培养常用抗生素及使用浓度	295

第1章 基础知识

1.1 生物制品的分类

(1) 预防类生物制品

① 细菌类疫苗。系指由有关细菌、螺旋体或其组分、代谢物制成的灭活或活的疫苗。

② 病毒类疫苗。系指由有关病毒、立克次体或其组分制成的灭活或活的疫苗。

③ 联合疫苗。系指由两种或两种以上疫苗原液配制成的具有相应免疫原性的疫苗。

(2) 治疗类生物制品

① 抗毒素及免疫血清。系指由特定抗原免疫动物所得的血浆、血清精制的抗毒素或免疫血清。

② 血液制品。系指由健康人的血液分离、提纯或由重组技术制成的血液组分制品。

③ 细胞因子及 DNA 重组技术制品。系由人血细胞分离、培育、提取的或由 DNA 重组技术制备的多肽类或蛋白质类制剂。

④ 单克隆抗体。系指采用杂交瘤技术制备的鼠源或人源抗体或用基因工程技术制备的人源化抗体。

(3) 诊断类 按现行法规分类，体内诊断制品归为生物制品，按生物制品管理。体内诊断制品系指由变态反应原、抗原或抗体制成的诊断制品。

1.2 《中国药典》对生物制品生产及检定用细胞总的要求

1.2.1 细胞基质及其种类

细胞基质系指可用于生物制品生产和检定的所有动物或人源的连续传

代细胞系、二倍体细胞及原代细胞。

(1) 原代细胞 动物组织经胰酶消化培养成单层细胞,用于病毒的培养,如地鼠肾细胞、沙鼠肾细胞、猴肾细胞、兔肾细胞、鸡胚细胞等,在生物制品的生产中使用了40多年,证明是安全有效的。

原代细胞的优点是细胞结构相对简单,具有广泛的病毒敏感性。其缺点是:①某些来源的动物原代细胞可能有潜在的病毒污染问题,因为这些来源的动物饲养级别很难达到SPF级;②来自不同动物的细胞质量及其对病毒的敏感性可能会有所差异;③一些大批量用于生物制品生产的动物来源已变得日益紧缺,尤其是灵长类动物;④人们在长期的工作中也认识到,一些与人类遗传学种属差异较大的动物细胞由于其成分的异源抗原性,可能会引起机体的非正常免疫反应。

(2) 二倍体细胞 来源于人体正常细胞,具有一定的传代寿命,如KMB17细胞、2BS细胞、MRC-5细胞等。二倍体细胞已在生物制品的生产中使用了30多年,大量使用资料证明这类细胞用于生物制品的生产是安全有效的。

二倍体细胞的优点是因其能使用种子库系统进行规模化制备,因此可对其加以全面的鉴定,并在人为条件下标准化。其缺点是不易大规模生产,目前仍不能使用微载体生物反应器进行生产,对培养基及牛血清的要求较高。

(3) 传代细胞 这类细胞理论上具有无限传代的寿命,如Vero细胞、BHK-21细胞等。

传代细胞的优点是和二倍体细胞一样,能使用种子库系统生产,因此可加以全面鉴定和标准化控制;其最大的特点是可以利用微载体生物反应器进行大规模生产;对培养基及牛血清的要求不高。其缺点是尚未在理论上明确证实其不具有致肿瘤的危险。

1.2.2 《中国药典》对细胞库细胞基质总的要求

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

(1) 细胞系/株的历史资料

① 细胞系/株来源资料。应具有与细胞系/株来源相关的资料,如其制备机构的名称,来源的种属、年龄、性别和健康状况方面的资料。这些资料最好从细胞来源实验室获得,也可引用正式发表的文献。人源细胞系/株须具有与其组织或器官来源、种属及地域来源、年龄、性别及生理状况相关的资料。动物来源的细胞系/株须具有与动物种属、种系、饲养条件、组织或器官来源、地域来源、年龄、性别、病原体检测结果及供体的一般生理状况相关的资料。

② 细胞系/株培养历史的资料。应具有与细胞分离方法、细胞体外培养及建立细胞系/株过程相关的资料,包括所使用的物理、化学或生物学手段、是否有外源添加序列以及有关细胞生长特征、生长液成分、选择细胞所进行的任何遗传操作或选择方法等方面的资料。同时还应具有与细胞鉴别、检定、内源及外源因子检测结果相关的资料。应提供细胞培养液的详细成分。如使用人或动物源成分(血清、胰蛋白酶、水解蛋白或其他生物学活性的物质),应具有与这些成分的来源、制备方法、质量控制、检测结果和质量保证相关的资料。

(2) 细胞库的建立 细胞库的建立可为生物制品的生产和检定提供已标定好的、细胞质量相同的并能进行持续稳定传代的细胞种子。

① 原材料的选择。建立细胞库的各类细胞供体均应符合 1.2.2 (3)“细胞库细胞的检定要求”中的相关规定。来源于神经系统的细胞不得用于生物制品生产。培养细胞用牛血清应来源于无牛海绵体脑病流行地区的健康牛群,其质量标准应符合“小牛血清检测要求”的规定。不得使用人血清作为细胞培养液的成分。如需使用人血白蛋白,则须使用有批准文号且经批签发的合格制品。应对消化细胞用胰蛋白酶进行检测,以证明其无细菌、真菌、支原体或病毒污染。应特别检测胰蛋白酶来源的动物可能携带的病毒,如细小病毒等。用于生物制品生产的培养物中不得使用青霉素或 β -内酰胺(β -Lactam)类抗生素。配制各种溶液的化学药品均应符合《中国药典》(二部)或其他相关国家标准的要求。

② 细胞培养操作的要求。细胞培养的操作应符合中国《药品生产质量管理规范》的要求。生产人员应定期检查身体。生产区内不得进行非生产制品用细胞或微生物的操作,同一工作日开始细胞操作前,不得操作或接触有感染性的微生物或动物。

③ 建立细胞库。对细胞库实行三级管理,即原始细胞库、主细胞库及工作细胞库。如为引进的细胞,可采用主细胞库和工作细胞库组成的二级细胞库管理。在某些特殊情况下,也可使用主细胞库一级库,但须得到国家药品监督管理部门的批准。

a. 原始细胞库(PCB)。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,通过检定证明其适用于生物制品的生产或检定。在特定条件下,将一定数量、成分均一的细胞悬液,定量均匀分装于安瓿或细胞冻存管,于液氮或 -130°C 以下冻存,即为原始细胞库,供建立主细胞库用。

b. 主细胞库(MCB)。取原始细胞库细胞,通过一定方式进行传代、增殖后均匀混合成一批,定量分装,于液氮或 -130°C 以下保存,并按这些细胞特定的质控要求对其进行全面检定,合格后即为主细胞库,供建立工作细胞库用。

c. 工作细胞库 (WCB)。工作细胞库的细胞由 MCB 细胞传代扩增制成。MCB 的细胞经传代增殖, 达到一定的代次水平, 合格后制成一批均质细胞悬液, 定量分装于安瓿, 于液氮或 -130°C 以下保存备用, 即为工作细胞库。冻存时细胞的传代水平须确保其复苏后传代增殖的数量能满足生产一批或一个亚批制品的需要。复苏后的传代水平应不超过批准该细胞用于生产的最高限定代次。所制备的 WCB 必须经检定合格后方可用于生产。

④ 细胞库的管理。对每种细胞库均应分别建立台账, 记录放置位置、容器编号、分装及贮存安瓿数量, 取用记录等。应在细胞库中的每支细胞安瓿上注明细胞系/株名称、代次、安瓿号、冻存日期、贮存容器的编号等。冻存的细胞存活率应在 90% 以上。对冻存后的细胞应至少做一次复苏培养并连续传代至衰老期, 以检查不同传代水平的细胞生长情况。原始细胞库、主细胞库和工作细胞库应分别存放, 各级细胞库的细胞须分两份分别存放于不同地点。非生产用细胞应与生产用细胞严格分开存放。

(3) 细胞库细胞的检定要求 细胞检定主要包括细胞鉴别、外源因子污染和内源因子检测、致癌性检测等。必要时还需进行细胞染色体核型检查。以上检测内容均对 MCB 细胞和 WCB 细胞适用。建立细胞库的实验室应对 MCB 细胞进行至少一次的全面检定, 其内容应包括细菌、真菌、支原体, 外源病毒因子的检查。每次建立 WCB 后, 均应按规定进行相应项目的检定。

① 细胞鉴别试验。对新建细胞系/株、细胞库 (MCB 和 WCB) 和生产结束时的细胞均应进行鉴别试验, 以确认为本细胞且无其他细胞的交叉污染。细胞鉴别试验方法有多种, 包括细胞遗传检测 (如特征染色体标志)、遗传标志检测 (如 DNA 指纹图谱、STR 图谱、基因组二核苷重复序列)、免疫学检测 (如组织相容性抗原、种特异性抗血清) 和生物化学鉴别 (如同工酶试验) 等。可从中选取一种或几种方法, 但均须经国家药品检定机构认可。结合细胞表型特征与遗传学特征来判断, 更有利于细胞的鉴别。

② 细菌、真菌检查。取混合细胞培养上清液样品, 按《中国药典》(三部) 附录中“无菌检查法”进行, 其结果应符合规定。

③ 支原体检查。取细胞培养上清液样品, 按《中国药典》(三部) 附录中“支原体检查法”进行, 其结果应为阴性。

④ 细胞内源、外源病毒因子检查。应注意检查细胞系/株中是否有细胞来源物种中潜在的传染性病毒以及因操作而带入的外源性病毒。对细胞进行病毒检查的种类及方法, 需根据细胞的种属来源、组织来源及细胞特性确定。应进行以下检测:

a. 细胞形态观察及细胞吸附试验 (简称血吸附试验)。取混合瓶细胞样品, 接种至少 6 个细胞培养瓶或培养皿, 待细胞长成单层后更换维持液, 持续培养两周。每日镜检细胞, 细胞应保持正常形态特

征。培养至少 14d 后, 分别取 1/3 细胞培养瓶或培养皿中的细胞, 用 0.2%~0.5% 豚鼠红细胞和鸡红细胞混合悬液 (新鲜红细胞在 2~8°C 保存不得超过 7d, 且溶液中不应含有钙离子或镁离子) 进行血吸试验。加入红细胞后置 4~8°C 30min, 然后置 20~25°C 30min, 再分别进行镜检, 观察红细胞吸附情况, 其结果应为阴性。

b. 不同细胞传代培养法检测病毒因子。取来源于 MCB 或 WCB 的细胞, 分别接种长成单层的猴源细胞、人源二倍体细胞和同种不同批的细胞。每种单层细胞接种至少 10^7 个活细胞或裂解细胞及其培养上清液, 每种细胞至少接种 2 瓶。接种样品量应占维持液的 1/4 以上, 培养至少 14d。取培养 7d 的上清各一瓶, 分别接种于同种细胞培养, 盲传一代, 继续培养 7d, 观察细胞病变并进行细胞形态及红细胞吸附试验。如已知待检细胞可支持人巨细胞病毒 (HCMV) 的生长, 则应在接种人二倍体细胞后至少观察 28d, 应无细胞病变出现。同时, 应进行血吸附病毒检测, 其结果应为阴性。

c. 接种动物和鸡胚法检测病毒因子。对 MCB 细胞或 WCB 细胞以及增殖到或超过生产用体外细胞龄限制代次的细胞, 均须采用动物体内接种法对其进行外源病毒因子的检测。选用乳鼠、成鼠和两组不同日龄的鸡胚共计 4 组, 按表 1-1 所列方法进行试验和观察。试验结束后应有 80% 以上的动物或鸡胚健存, 同时结合其他检测方法以确定最终结果。对于新建细胞系/株, 还应用其接种豚鼠和家兔 (或采用家兔肾细胞培养法), 以检查细胞内结核分枝杆菌和猴源细胞中是否存在 B 病毒 (表 1-1)。

表 1-1 动物体内接种法检测外源病毒因子

动物组	要求	数量 /只	接种 途径	细胞浓度 /(个/ml)	接种细 胞液量 /(ml/只)	观察 天数 /d	结果判定
乳鼠	24h 内	10	脑内 腹腔	$>10^7$	0.01 0.1	21	应健存
成鼠	15~20g	10	脑内 腹腔	$>2 \times 10^6$	0.03 0.5	21	应健存
鸡胚 ^①	9~11 日龄	10	尿囊腔	$>5 \times 10^6$	0.2	3~4	尿液血凝 试验阴性
鸡胚	5~6 日龄	10	卵黄囊	$>2 \times 10^6$	0.5	5	应存活
豚鼠 ^②	350~500g	5	腹腔	$>4 \times 10^5$	5.0	42	应健存, 解剖 无结核病变
家兔	1.5~2.5kg	5	皮下 皮内 ^③	$>2 \times 10^5$	9.0 0.1 × 10	21	无异常, 健存

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

② 试验前观察 4 周, 结核菌素试验为阴性者方可用于试验。

③ 每只家兔于皮内注射 10 个部位, 每个部位 0.1ml。

d. 逆转录病毒及其他内源性病毒或病毒核酸的检测。可采用逆转录酶活性测定、透射电镜检查、感染性试验 3 种方法, 对 MCB 细胞或 WCB 细胞以及增殖到或超过生产用体外细胞限制代次的细胞进行逆转录病毒的检测。3 种方法具有不同的检测特性及灵敏度, 因此应采用不同的方法联合检测。如逆转录酶活性检测结果为阳性时, 建议进行透射电镜检查或感染性试验, 以确证其是否存在感染性逆转录病毒颗粒。小鼠来源和其他啮齿类来源的细胞系或其杂交瘤细胞系有可能携带潜在的逆转录病毒。因此, 对于人-鼠杂交瘤细胞系则应进行特异性逆转录病毒检测。如用于单克隆抗体生产的小鼠细胞系, 则可不对其进行特异性逆转录病毒的检测, 但在生产工艺中应增加病毒灭活程序。

e. 特殊外源病毒因子的检测。应对 MCB 细胞或 WCB 细胞进行特殊病毒的检测, 检测的种类应根据细胞系/株种属、组织来源等确定。如对于鼠源细胞系, 可采用小鼠、大鼠和仓鼠抗体产生试验, 以检测其中的特异性病毒。对于人源细胞系/株, 则应检测如人鼻咽癌病毒、人巨细胞病毒、人逆转录病毒、人乙型肝炎病毒、人丙型肝炎病毒。在某些情况下, 也可采用适当的体外检测技术对转化病毒如人乳头瘤病毒、腺病毒及人单纯疱疹病毒进行检测。

⑤ 致瘤性检查。致瘤性检查可选用裸鼠或新生小鼠 (3~5 日龄) 进行体内致肿瘤性试验检查, 也可采用软琼脂克隆形成试验或器官培养试验等体外方法检测, 后者尤其适用于动物体内无致瘤性的低代次传代细胞系。将来源于 MCB 细胞或 WCB 细胞增殖到或超过生产用体外细胞龄限制代次, 方可进行致瘤性试验。对于某些已被证明具有致瘤性的传代细胞系, 如来源于啮齿类的细胞系 BHK21、CHO、C127 细胞等或细胞类型属致瘤性细胞如杂交瘤细胞的, 则可不进行致瘤性检查。对于某些已被证明在一定代次内不具有致瘤性, 而超过某一代次则具有致瘤性的传代细胞系, 如 Vero 细胞, 则必须对其进行致瘤性检查。对人上皮细胞系、人二倍体细胞株及所有用于活病毒疫苗生产的细胞系/株均应进行致瘤性检查。另外, 对新建细胞系/株必须进行致瘤性检查。在某些情况下, 对用于人体细胞治疗及基因治疗的细胞也必须进行致瘤性检查。

(4) 生产用细胞培养 生产用原材料的选择和细胞操作环境, 应符合 1.2.2 (2) “细胞库的建立” 的相关规定。从冻存的 WCB 中取出一只或多只安瓿, 混合后培养, 传代至一定代次后供生产用, 其代次不得超过该细胞用于生产的最高限定代次, 而且从 WCB 取出的细胞种子中增殖的细胞不得再回冻保存或用于生产。

体外培养细胞龄的计算方法: 二倍体细胞以细胞群体倍增 (population doubling) 计算, 以每个培养容器群体细胞数为基础, 每增加一倍作为一代, 即一瓶细胞传二瓶 (1:2 分种率), 再长满瓶为一世代; 一瓶传四瓶 (1:4 分种率) 为二世代; 一瓶传八瓶 (1:8 分种

率)则为三代。生产用细胞龄限制在细胞寿命期限的前2/3内。传代细胞系则以一定稀释倍数进行传代,每传一次为一代。

1.2.3 《中国药典》对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,但传到一定代次后,其致瘤性会增强。所以对生产用传代细胞系应按1.2.2(3)“细胞库细胞的检定要求”的规定进行严格检查。生产过程中对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,对其代次均有一定限制。用于生物制品生产的细胞最高限定代次,须经批准。

(2) 在生产末期进行外源病毒因子检测 对于病毒类制品,在其生产末期,应按1.2.2(3)④a.“细胞形态观察及细胞吸附试验”的规定对对照细胞进行血吸附病毒检查。对于在不同时间收集合并的培养物,应在每次收集时对其对照细胞培养物进行检测。

1.2.4 《中国药典》对人二倍体细胞株的特殊要求

1.2.4.1 新建的人二倍体细胞株的要求

新建的人二倍体细胞株必须具有以下资料: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病等证明)以及胎儿父系及母系三代均应无明显遗传缺陷疾病历史的书面调查资料。

人二倍体细胞株应在其传代过程的早期,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℃以下冻存,供建立PCB之用,待其全部检定合格后,即可正式确定为PCB,供制备MCB用。

(1) 染色体检查 对新建立的人二倍体细胞株及其细胞库必须进行染色体检查。对于已建立的人二倍体细胞株,如WI-38、MRC-5、2BS、KMB17等,在建立MCB时可不必要对其进行细胞染色体检查。但如对细胞进行过遗传修饰,则须按新建细胞株对其进行染色体检查。

染色体检查。新细胞株在其建株过程中,应对每8~12世代进行一次染色体检查,一株细胞在其整个生命期的连续培养过程中,至少应进行4次染色体检查。每次检查时,应至少随机取出1000个分裂中期细胞,对其进行染色体数目、形态和结构检查,并做好记录以备复查。而且,其中应至少选择50个分裂中期细胞,对其进行显微照相,作出核型分析,并应观察500个分裂中期细胞,检查多倍体的发生率。每次染色体检查时,应从同一世代的不同培养瓶中取出细胞,混合后

进行再培养,制备染色体标本片。染色体片应长期保存,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,并用照相图片作出带型分析。

(2) 无菌检查 对每8~12世代的细胞培养物,应按《中国药典》(三部)附录中“无菌检查法”进行无菌检查。

(3) 支原体检查 对每8~12世代的细胞培养物,应按《中国药典》(三部)附录中“支原体检查法”进行支原体检查。

(4) 病毒检查 二倍体细胞株在其传代过程中,至少应对2个不同世代水平进行病毒包涵体、乙型肝炎、丙型肝炎、EB病毒、艾滋病病毒等检查,其结果均应为阴性。

(5) 致瘤性检查 对每8~12世代应进行一次致瘤性检查,其结果应无致瘤性。

1.2.4.2 生产过程细胞培养物的检查

(1) 染色体检查 可根据制品特性及生产工艺,确定是否对其生产过程中的细胞培养物进行染色体检查。对于含有活细胞的制品或纯度不足的制品,一般应对其所用细胞培养物进行染色体检查及评价。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1.2.2(3)①“细胞鉴别试验”进行。

(3) 无菌检查 按《中国药典》(三部)附录中“无菌检查法”进行无菌检查,其结果应符合规定。

(4) 支原体检查 按《中国药典》(三部)附录中“支原体检查法”进行支原体检查,其结果应为阴性。

(5) 正常细胞外源病毒因子检测 制备病毒类制品时,于接种病毒的当天或在连续传代的最后一次接种病毒时,应留取此批细胞的2%~5%,更换维持液作为正常细胞对照,并与接种病毒的细胞在相同条件下培养,按1.2.2(3)④a.“细胞形态观察及细胞吸附试验”和1.2.2(3)④b.“不同细胞传代培养法检测病毒因子”的相关规定对其进行外源病毒污染检查。

1.2.5 《中国药典》对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组序列的细胞系,因此,重组细胞系的建立应具有与细胞基质构建方法相关的资料,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。对细胞库细胞的检查,除应按1.2.2(3)“细胞库细胞的检定要求”的相关规定完成外,还应进行以下检查。

(1) 细胞基质的稳定性 生产者需具有关于该细胞系用于生产的目的基因的稳定性资料,包括重组细胞系的遗传稳定性、目的基因表