



# 细胞系检定

Cell Line Characterization Services

*Biologics*

*Solutions*

*Build your biologic with help from the experts*

  
charles river | every step  
of the way.

# 细胞系 / 株检定

Charles River致力于为全球制药企业、生物技术公司、政府机构及科研院所提供必要产品及服务，加速其研究和药物开发进程。

我们在全球超过20个国家拥有110+个服务设施，在开发的每个阶段都注重及时性和准确性。2021年，Charles River成功支持了86%的FDA 批准上市新药的开发。

We currently operate

**110+**  
Facilities



**20+**  
Countries

We supported the development of

**86%**



of the novel FDA-approved drugs in 2021

## 细胞系/株检定

### 概述

对于用作生产生物药物的哺乳动物、微生物和昆虫细胞，需要进行广泛的细胞检定。这包括表型或基因型鉴定检测以及各种外源因子检测。

主细胞库和工作细胞库的建立以及这些细胞库的后续检定对未来生物制品的生产奠定了基础。正确的表征及检测至关重要，因为它们提供了证据，证明细胞库中没有污染物，并且能够为未来数年的生产过程提供坚实、稳定的基础。

具体的检测建议将根据细胞系的物种（例如仓鼠、人、鸡、大肠杆菌、巴斯德毕赤酵母）及其预期用途（例如重组蛋白生产、疫苗生产、基因治疗）而有区别。此外，有关细胞系的来源和开发历史以及细胞生物学特性的文件内容，决定了应进行何种检测。进行测定时，指南建议使用经过验证的检测程序，以表明其对预期目的的适用性。考虑到所有这些因素，与经验丰富的公司合作以确定有效且高效的细胞系检定计划非常重要。





# 细胞系 / 株检定： 微生物细胞库

## 微生物细胞库检定

### 纯度和鉴别检测

监管指南建议进行纯度检测，以确定细胞库中是否存在污染物。微生物细胞库的纯度检测包括在各种孵育条件下在多种类型的营养琼脂平板上筛选多种可能的污染物。确保微生物细胞库中不含噬菌体也很重要。通过丝裂霉素C诱导或暴露于紫外线照射来检测污染的噬菌体。如果细胞库使用任何植物来源的材料制成，建议进行螺原体（*Spiroplasma*）检测。

为了进行准确的物种鉴别，可以使用基因型和蛋白质型鉴定方法。此外，在基因型方面，可使用多位点DNA测序和检测菌株特异性重组元件进行菌株分型，在表型方面，通过营养突变、抗生素抗性因子分析和DNA片段分析进行菌株分型。



### 活力（Viability）检测

在预定条件下，细胞库稳定性的证据是下游生产的重要标准。细胞活力检测证明所保藏的细胞是否具有于保藏过程中存活的能力，并通过在营养琼脂平板上对保藏的细胞进行连续稀释而对菌落形成单位（CFU）进行定量来进行该检测。某些细胞类型不适合CFU分析，将需要其他方法以测定活力。

### 质粒稳定性分析

重组微生物细胞库需要稳定的宿主-载体表达系统，以连续生产蛋白质。应通过质粒和转录组测序、拷贝数分析、重组构建体的保留、选择标记的保留以及限制性内切酶分析来评估稳定性。分析表达载体的目的是确定产品的正确编码序列已被包含在宿主细胞中，并在培养过程中保持至生产结束。

## 微生物细胞系检定——推荐的检测计划

检测	MCB/WCB/EPC
噬菌体检测	•
纯度	•
鉴别	•
活性	•
拷贝数	•
DNA 测序	•
选择标记的保留	•
重组构建体的保留	•
限制性内切酶分析	•

# 细胞系 / 株检定： 哺乳动物、昆虫、禽类和其他细胞系 / 株检定

## 哺乳动物、昆虫、禽类和其他细胞系/株检定

### 鉴别检测

可以在种属级别或更深入的细胞株特异性级别对用作生物制药生产、疫苗生产或细胞治疗所用的基质细胞系进行鉴别检测。侧重于基因型分析的方法包括条形码DNA序列分析、多位点序列分析、DNA指纹图谱、STR分析和细胞核学分析。细胞系鉴别方法也可检测错误鉴定或被其他细胞系污染的情况。

### 纯度检测

#### 无菌

使用两种不同培养基的直接接种方法，检测细胞库和收获液材料中是否存在细菌和真菌污染物。人用药品注册技术国际协调会议（ICH）建议对来自细胞库的至少1%或至少两支冻存细胞进行检测。通常在检测之前进行抑制细菌/抑制真菌试验，以确定检测材料对微生物生长的任何抑制作用。

### 遗传稳定性检测

根据ICH指南，应在至少两个时间点检查生产培养过程中细胞基质稳定性。遗传稳定性的指标主要包括：基因组和转录组测序、以及限制性图谱和拷贝数的确定。我们的检测团队会依据ICH指南对生物制药和医药产品在注册过程的所有阶段（包括细胞储存）进行稳定性研究，并可以提供有关适当检测程序的指南，以满足法规要求。

### 体内生物安全性检测服务

Charles River在美国和欧洲均设有经相关法规标准认可的机构，可以进行in vivo biosafety testing。隐性病毒试验用于生产生物制品的细胞系所必需的检测，以确保它们不含外源病毒因子，该检测可以筛选细胞系中不引起细胞培养物中任何细胞病变或其他细胞学效应的外源病毒。

试验常用的动物系统是鸡胚以及成年鼠和乳鼠，必要时也可以使用豚鼠。此外，Charles River检测团队可进行细胞基质的致瘤性研究。同时，也可进行定制化研究。

#### 柔膜细菌（mollicutes）

柔膜细菌的污染，包括支原体、无胆甾原体和螺原体物种，是与细胞培养相关的常见问题，不易识别。根据规定，应使用多种方法来检测最广泛的支原体物种。传统的细胞培养方法涉及通过在支原体肉汤中孵育来测试可培养的支原体种类，并使用营养琼脂平板进行平行测试。肉汤和琼脂培养方法通常无法检测到的支原体物种，可以通过将样品与哺乳动物细胞（例如Vero）共培养来扩展，并可以通过DNA荧光染料（Hoechst染色）进行检测。Charles River还可针对各种柔膜细菌（包括支原体、螺原体和无胆甾原体物种）进行快速、灵敏特异性NAT检测分析。根据《欧洲药典》第2.6.7章的指南，这些测定方法可与传统方法相媲美，可直接检测样品是否存在柔膜细菌核酸，或者进行生长富集步骤以提高灵敏度并从非活菌中识别活菌。





# 细胞系 / 株检定： 哺乳动物、昆虫、禽类和其他细胞系 / 株检定

## 病毒安全性检测

### 外源病毒

体外外源因子检测所需的多种指示细胞系需要根据生产用细胞系的历史和物种进行选择。

根据ICH和EU指南，测试中所用指示细胞需根据待试细胞库的物种来源而定，但必须包括对人病毒敏感的人和/或非人灵长目动物细胞系，以确保能较为广泛的检测到人和有关动物的病毒。我们可以为所需指示细胞系提供相应指导。

### 人源和猴源病毒

根据ICH指南，如果用于生产的细胞系为人类或非人类灵长类动物来源，除非另有说明，否则应对人类病毒（例如引起免疫缺陷性疾病和肝炎的病毒）进行检测。Charles River提供了适合检测这些病毒序列的实时PCR方法。

### 牛源性病毒

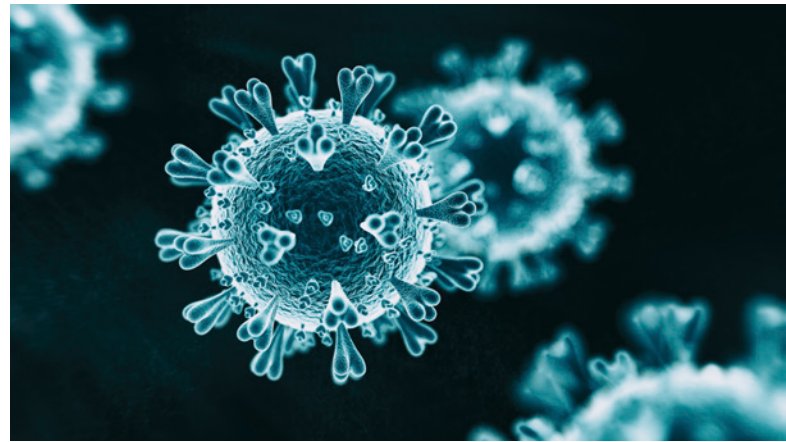
当细胞已经或可能已经暴露于牛源性材料（例如胎牛血清[FCS]或牛血清白蛋白[BSA]）时，需要进行牛源性病毒检测。我们的测定基于CFR指南的第9条，利用细胞裂解物与牛来源细胞一起孵育，并根据细胞病变效应和荧光抗体染色技术检测牛源性病毒。此外，我们提供针对牛源性病毒的特异性PCR检测。

### 猪源性病毒

当细胞已经或可能已经暴露于猪源性材料（例如胰蛋白酶）时，需要进行猪源性病毒检测。我们的测定基于CFR指南的第9条，利用细胞裂解物与猪来源细胞一起孵育，并使用荧光抗体染色分析检查细胞病变效应和反应性。此外，我们提供针对猪源性病毒的特异性PCR检测。

### 其他特定病毒检测

Charles River根据正在使用的细胞类型，也开发了许多其他病毒特异性测定方法。这包括针对使用禽细胞系的禽白血病病毒检测。我们的专家团队将推荐适合客户的病毒检测用细胞系。



## 逆转录病毒

细胞培养产生逆转录病毒可能是内源性逆转录病毒基因组表达（例如啮齿动物和禽类细胞）和/或实验室污染的结果。

在具有复制能力的逆转录病毒充当辅助病毒的检测细胞中看到蚀斑或斑点形成的细胞培养方法通常用于检测逆转录病毒。

S+L灶点分析（S+L-focus assay）可检测能够感染鼠和非鼠细胞的异嗜性和兼嗜性鼠逆转录病毒。XC空斑实验（XC plaque assay）能够检测仅感染鼠细胞的单嗜性鼠逆转录病毒。

大多数内源性和外源性逆转录病毒在细胞培养物中不会产生形态转化或细胞病变发生，因此通常不会在细胞培养物中检测到这些病毒的产生。在这些情况下，检测逆转录酶的存在可以用作检测逆转录病毒的可靠方法。可以使用产物增强性反转录酶活性测定法（PERT或PBRT）完成逆转录酶的检测。

透射电子显微镜（TEM）用于通过可视化和量化生物体液或细胞内的病毒颗粒来确定病毒载量。此外，它是根据病毒样颗粒的大小和形态特征对其进行表征的有用工具。

# 细胞系 / 株检定： 哺乳动物、昆虫、禽类和其他细胞系 / 株检定

## 特定的啮齿动物病毒

小鼠、仓鼠和大鼠抗体产生试验（分别为MAP、HAP和RAP）是通过在小鼠、仓鼠和大鼠中接种检测物品来检测病毒污染物的间接方法。采用免疫荧光和ELISA技术检测这些动物的血清中是否存在与种属特异的病毒组有反应性的抗体。此外，还建议通过PCR或使用基于细胞的体外试验检测CHO细胞系中是否存在小鼠细小病毒（MVM）。

### 哺乳动物细胞系检定——推荐的检测方案

检测		MCB	WCB	EPC/CAL
微生物污染 <sup>1</sup>	无菌	•	•	•
	支原体	•	•	•
细胞系稳定性 / 鉴别	DNA 指纹图谱 / 条形码	•	•	•
	核型分析	•		•
遗传稳定性	DNA 测序	•		•
	基因拷贝数	•		•
	限制性内切酶分析	•		•
病毒检测	内源性和非内源性逆转录病毒：逆转录酶和逆转录病毒感染性测定	•		•
	体内外源病毒（体外不同细胞接种培养）	•	•	•
	体内外源病毒（体内接种法）	•		•
	通过 PCR 检测病毒（例如人、猴、牛、鼠和猪源病毒）	•		•
	小鼠、大鼠和仓鼠抗体产生试验（MAP、RAP 和 HAP）	•		
	透射电子显微镜检查	•		•

<sup>1</sup> 在适用情况下也可以进行分枝杆菌和螺原体检测

MCB: 主细胞库

WCB: 工作细胞库

EPC(EOPC): 生产终末细胞

CAL: 传代限次细胞



charles river



关注查士生物制品服务

[www.criver.com](http://www.criver.com)

查士利华实验室 | 生物制品检测解决方案

上海市青浦区华隆路1777号G幢一层