

**ICH Q5D：生物技術/生物製劑所需細胞受
質之取得與特性分析指引（草案）**

**(Derivation and Characterisation of Cell
Substrates Used for Production of
Biotechnological/Biological Products)**

衛生福利部食品藥物管理署

中華民國 111 年○月

前言

國際醫藥法規協和會 (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH) 於 1997 年發布 ICH Q5D (Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products) 指引，提供用於製造生物技術或生物製劑之人類／動物來源細胞株及微生物細胞等細胞受質之相關建議。

目錄

一、 引言	4
(一) 指引目的	4
(二) 指引立論根據.....	4
(三) 適用範圍.....	4
二、 指引	5
(一) 細胞受質的來源、歷史及生產	5
1、引言.....	5
2、細胞的起源、來源及歷史.....	5
3、細胞受質的生產.....	6
(二) 細胞庫	7
1、細胞庫系統	7
2、建立細胞庫的步驟.....	9
(三) 細胞庫特性分析與檢測的一般原則	10
1、鑑別試驗.....	11
(1) 後生動物細胞	11
(2) 微生物細胞	11
2、純度檢測.....	12
(1) 後生動物細胞	12
(2) 微生物細胞	13
3、細胞受質的安定性.....	13
4、細胞核學及致瘤性試驗.....	15
三、 名詞彙編.....	16
四、 附錄：初代細胞受質	18
(一) 引言	18
(二) 作為初代細胞受質來源的組織與其他原料	18
(三) 生成初代細胞受質的方式	18
(四) 對初代細胞受質所作的測試	19

ICH Q5D：生物技術/生物製劑所需細胞受質之取得與鑑定分析 指引

一、引言

(一) 指引目的

本指引針對用於製造生物技術/生物製劑 (biotechnological/biological products) 的人類和動物來源細胞株 (Metazoan Cells or Cell lines)、微生物細胞 (Microbial Cells)，及其細胞庫之製備與特性分析，提出適當標準可資依循；另外，亦為此類製劑上市查驗登記申請案應檢附之細胞受質取得與鑑定分析資料提出建議。

(二) 指引立論根據

回顧過往歷史，衍生自細胞之生物製劑曾引起的部分品質疑慮，係源自於製劑中存留有外來污染物 (adventitious contaminations) 或出於用以製作該製劑之細胞的生物特性。即便是使用重組DNA (Recombinant DNA, rDNA) 技術所衍生之生物製劑品質也取決於細胞受質 (cell substrate) 內的表現構築體 (expression construct)。因此，一般公認細胞取得來源、細胞受質的特性以及與之相關的事件，均會影響生物技術/生物製劑之品質與安全性，為達有效管理此類製劑的品質，是故須在各個細胞受質處理階段進行適當控管與要求。

本指引與其他指引互補，對於在處理源自後生動物與微生物細胞培養 (metazoan and microbial cell culture) 所生產生物技術/生物製劑之品質相關議題提供完整的建議。

(三) 適用範圍

本指引適用於建有細胞庫系統的細胞受質。文中所謂「細胞受質」係指微生物細胞或取自人類或動物之細胞株，且具有可用於生產欲供人體內 (*in vivo*) 或人體外 (*ex vivo*) 使用之生物技術/生物製劑之能力。供體外 (*in vitro*) 診斷用之試劑 (diagnostic reagent) 不在本指引適用範圍內。動物細胞株包括所有後生動物來源的細胞株 (cell lines of metazoan origin)，例如：可以體外無限擴增的持續性細胞

株（continuous cell lines of indefinite in vitro lifespan）以及可有限度體外擴增的二倍體細胞（diploid cells of finite in vitro lifespan）等，皆屬於此範疇。屬於微生物的細胞受質來源則包括細菌、真菌、酵母菌，以及其他單細胞生命體。

「生物技術/生物製劑」一詞係指任何使用由細胞庫培養的細胞而製成之製劑，但不包括微生物之代謝物，比如抗生素、胺基酸、碳水化合物，以及其他低分子物質等。用於製備基因療法製劑或疫苗所需的細胞庫也應遵循本指引之建議。部分生物製劑，例如某些病毒疫苗，之製備來源為直接取自動物組織或器官的初代細胞培養（primary cell culture(s)）。然因為初代細胞不建庫，故本指引不予討論。適用於初代細胞之其他考量，在本指引附錄1提供進一步討論。

二、指引

（一）細胞受質的來源、歷史及生產

1、引言

為全面評估及確保製劑產品的品質及安全性，應提供支持性文件闡述用於製作生物技術/生物製劑之細胞受質歷史，及其任何親代細胞株（parental cell line）之來源歷史。這些文件的重要性，在於細胞受質之研究與發展階段中所發生的事件，均有可能顯著影響以該細胞受質生產製劑之風險評估。

因此，在開發過程中應詳細記錄相關細胞受質的操作事件。一般來說，細胞來源歷史的紀錄僅是呈現細胞受質特性的諸多方法之一；關於細胞來源歷史的紀錄缺失，可能尚不至於妨礙製劑取得上市許可，但若缺失過多便需更加倚重其他方法來分析細胞受質的特性。

2、細胞的起源、來源及歷史

對於提供細胞受質製備的起始細胞，應說明其起源與來源（實驗室或菌種中心）並引用相關科學文獻做為參考資料。直接取自細胞來源實驗室的資料為佳，若無，也可引用參考文獻。

對於人類細胞株，應說明原始提供者的特徵：來源的組織或器官、提供者的族裔與所在地域、年齡、性別及整體生理狀態。若已知提供者的健康狀態或病史，亦應連同所接受過之任何病原體檢測結果一併呈報。特別是人體之二倍體纖維母細

胞 (human diploid fibroblast)，因提供者的年齡可能影響該細胞株在體外擴增之壽命長短，故應盡可能提供此項資訊。對於動物細胞株，應說明該細胞株之來源動物物種 (species)、品系 (strains)、繁殖條件、來源的組織或器官、所在地域、年齡、性別、所接受過的任何病原體檢測結果及整體生理狀態等。

對於微生物，製造商應說明其物種 (species)、菌株 (strains) 及該微生物已知的基因型與表現型特徵 (genotypic and phenotypic characteristics)。製造商亦須提供所掌握的任何關於來源細胞的致病性、是否產生毒素及其他生物性危害的相關訊息。

上述起始細胞的培養歷史須予以紀錄。包含最初用以分離細胞的方法、細胞體外培養的流程 (procedures used in the culturing of the cells *in vitro*)、以及所有用於建立細胞株的程序 (例如所採用的任何物理、化學、生物性操作方法，或附加的核苷酸序列)。若有進行任何細胞株相關的基因操作或篩選，必須予以敘述。此外亦須提供所有對細胞株進行內生與外生病原 (endogenous and adventitious agents) 之鑑別 (identification)、特性分析 (characteristics) 及檢驗結果等相關資料。

對於源自後生動物的持續性細胞株，通常藉由估計細胞倍增 (population doubling) 的次數、或以規定的稀釋倍率下的繼代 (subcultivation) 次數、或天數，來訂出培養時間的長短。若是可有限度體外擴增的二倍體細胞株，則應正確估算於細胞研究、細胞受質開發、與生產等各個階段的細胞倍增的次數，以作為未來細胞培養製程的製程中管制參數設定之參考依據。若為微生物細胞，則紀錄生成細胞受質之後的繼代頻率即可。

關於細胞受質的生產製備，申請人應對可能接觸外來病原體的製備過程提供完整評估與討論。包含提供培養基的成分，尤其須提供有可能與細胞接觸之人源或動物來源物質成分的相關訊息，比如血清、酵素、水解物、或其他的活細胞等。培養基成分的說明中須包括其來源、製備與管控方法、檢測結果及品質保證等。上述幾點培養基成分之說明，若有相關文獻亦可引用之。從整體來看，提供上述這些相關訊息，可促進製造商對於外來病原體可能的入侵路徑作出更詳細的評估，因此應視為製劑風險效益分析 (risk-benefit analysis) 的一部分。

3、細胞受質的生產

選擇合適的親代細胞株是細胞受質生產的一關鍵步驟。若是重組型製劑（recombinant product），其親代細胞株通常是未轉染的受體細胞株。親代細胞株之挑選多建議採用已知其特性的親代細胞庫（characterised parental cell bank），但這並非必要條件。已知其特性的親代細胞庫有其優勢，尤其是在以同一類型之親代細胞生成多種細胞受質的情況下更是如此，因為其親代細胞庫所提供的特性鑑定分析資訊，將可供未來主細胞庫（master cell bank, MCB）的品質評估用。舉例來說，可將骨髓瘤（myeloma）細胞株建庫作為融合瘤（hybridoma）的親代細胞株。

在產生細胞受質的過程中，有可能透過一個或多個特定程序來發展出符合期望的細胞受質特性。此類程序包括例如細胞融合、細胞轉染、細胞篩選、分離細胞群落（colony isolation）、細胞複製（cloning）、基因擴增、令細胞適應特定培養條件或培養基等等。提供有關於細胞受質開發過程中所用的方法學資訊有助於瞭解細胞受質的歷史。使用某些類型之細胞受質，譬如人源之二倍體纖維母細胞，在建立細胞庫前或許不需要事先經過密集的操作或複製過程。

對於重組DNA生物製劑，其細胞受質為已經過轉染作用帶有所需基因序列的細胞，而此細胞乃是透過其單一的前驅細胞（a single cell progenitor）複製而來。有關生產具有重組DNA修飾細胞受質之進一步資訊，可參閱相關地區性或國際性指引之規範。對於非重組DNA類之製劑或疫苗，其細胞受質直接來自於親代細胞，並且在無須進一步修改的情況下，被選用於主細胞庫之製備。至於來源為融合瘤的製劑（products derived from hybridomas），其細胞受質則為融合親代骨髓瘤細胞株與其他親代細胞（例如脾臟免疫細胞）而得之融合瘤細胞株。

(二) 細胞庫

使用連續繼代細胞培養方式去生產生物技術/生物製劑的最大優勢之一即為每一批次的製劑生產起點，均共同源自於一個已經掌握其特性的來源，即細胞保存庫（i.e., the preserved bank of cells）。製劑製造商可以自行製備細胞庫，亦可從委託外部取得。惟製造商有最終責任去確保每個細胞庫、以及對其細胞庫執行之檢測的品質。

1、細胞庫系統

在連續生產製造生物技術/生物製劑時，二階細胞庫（two-tiered cell bank）的概念，亦即以主細胞庫（MCB）生成工作細胞庫（working cell banks, WCB），通常被認為是供應生產細胞受質之最實際做法。製造商應說明其細胞庫供應細胞的策略，包括預期細胞庫在製劑量產過程中的使用率、產生新細胞庫的預期間隔、細胞庫的允收資格條件等事項。

一般而言，首先須建立主細胞庫，而通常的作法是直接使用最初克隆得到細胞受質細胞株去建立主細胞庫，或是以最初克隆得到的細胞受質細胞株先建立一個初始細胞庫（preliminary cell bank），然後再據此建立主細胞庫。某些類型的細胞被認為不需要建立細胞庫系統，例如二倍體細胞，因為其體外擴增壽命有限或是其他因素令細胞株克隆技術不切合實際需求。相對其預期用途而言，若是未經複製之細胞群落（uncloned cell population）本身即已具適當的均一性（homogeneous），亦無需透過細胞株克隆技術去建立細胞庫系統。

工作細胞庫（WCB）的來源可以是從一管或多管之主細胞庫分裝容器。通常製劑之生產，均由工作細胞庫直接提供受質細胞來源。必要時，亦可由主細胞庫建立額外的工作細胞庫供使用。新建立之工作細胞庫必須經過合適的特性鑑定分析與檢測合格後，始得放行。

這裡必須注意主細胞庫與工作細胞庫在某些方面或許有相異之處，例如培養基成分與培養條件。同樣地，用於建立主細胞庫與工作細胞庫的培養條件可能也與製劑製作過程所用的培養條件有些差別。故若改變細胞培養程序並不影響製劑品質，可無須重複選殖細胞（reclone the cells）或是重新建立主細胞庫或工作細胞庫（rebank the MCB or WCB）。最重要的是完成特性分析可供生產用的細胞庫系統，須能生產出品質一致的產品。

某些情況下，例如每年僅需使用少量的細胞受質即可滿足全年所需生產之製劑產量，原則上可以使用僅具主細胞庫而無工作細胞庫的單階細胞庫系統（single-tiered banking system）。

對於某些微生物表現系統，每一批新的細胞受質會進行新的轉形作用（transformation），亦即取等分試樣（aliquot）經由檢測過後的宿主細胞庫（host cell bank）與質體庫（plasmid bank）執行新的轉形反應，並檢測轉形後的細胞受質庫。此轉形後的細胞受質庫通常即被認定為主細胞庫，並且可成為製造製劑所需之細胞受質來源。而這些宿主細胞庫、質體庫、與主細胞庫皆須以適當的方法

保存維護。這樣的替代性系統之所以可行，係因細菌與酵母菌的轉形通常易於執行且具高度再現性，不像轉染後生動物的細胞那般困難。在這類型使用微生物表現系統作為生產系統的案件中，製造商須檢附宿主細胞、rDNA分子（例如質體）、轉形與細胞受質庫建立方法等相關資料，以及其特性分析的結果。

2、建立細胞庫的步驟

製劑生產須注意不可使用遭到污染的細胞受質（或細胞庫），亦須避免細胞庫因為污染而遭停用，以避免損失產能及得耗時去重新建立細胞庫。眾所周知，目前沒有任何一種細胞庫檢測方案能夠檢測出所有潛在的污染物。因此，建立細胞庫時務必遵循下述預防性原則，以期在合理範圍內避免污染並保障細胞受質來源的可靠性。

製造商須說明所用之細胞庫系統類型、細胞庫大小、細胞庫之分裝容器（小瓶、安瓿，或其他適用之容器）與封蓋系統（the container and closure system used）、製作細胞庫的方法（包括所用之凍存液與培養基）、冷凍保存（cryopreservation）條件與儲藏條件等事項。

製造商須說明如何避免細胞庫遭受微生物污染、以及預防在實驗室內和其他類型細胞發生交互污染（cross-contamination）的措施；此外，亦須說明如何追蹤細胞庫分裝容器使用情況之措施。這部分的說明應包含對使用紀錄檔案系統以及標籤系統的敘述。容器上的標籤須能承受冷凍、儲藏，以及自儲藏狀態恢復使用的程序仍維持標籤內容清晰可辨。

製造商須說明建立細胞庫的程序。其過程通常是逐步擴增細胞培養群到更多或更大的培養瓶中，直到已有充足數量的細胞可裝入建立細胞庫所需的分裝容器數量中。為確保細胞庫中的每個分裝容器裡內容物的均一性，若培養細胞時使用數個培養瓶，須集中所有瓶內細胞後再分裝。

懸浮在保存液中的細胞應等量分裝到無菌的分裝容器中，密封後儲藏在適當環境中。舉例而言，凍存液中的動物細胞須在固定並受到良好控制的條件下冷凍在密封之分裝容器中，之後移入氣相或液相的低溫液態氮中儲存（storage in the vapor or liquid phase of liquid nitrogen），或儲存在等效的超低溫環境中。其他冷凍與儲存方法亦可使用，但須視所細胞來源而定，並確保細胞解凍後保持一定的細胞活性（cell viability）、且可符合製劑生產之所需。

為確保可持續不間斷地生產製劑，製造商須審慎規劃保護措施以避免火災、停電及人為疏失等危急事件造成細胞庫不堪使用。製造商須說明相關預防性計畫，如在多個冷藏庫中存放備份、裝設備用發電機、在儲存裝置加裝液態氮自動充填系統、將主細胞庫與工作細胞庫的一部分另覓場地存放、重新生成主細胞庫等等。

製劑生產過程中，體外細胞年齡 (*in vitro cell age*) 應以一個或多個容器包裝之主細胞庫解凍的時間為基準點開始估算。若是二倍體細胞株，體外生命期應以細胞群倍增數 (*population doubling level*) 作估算。二倍體細胞須計算發生細胞老化 (*senescence*) 的細胞群倍增數。

(三) 細胞庫特性分析與檢測的一般原則

對細胞庫的細胞受質進行特性分析與檢測是生物技術/生物製劑品質管制的一個重要關鍵環節。對主細胞庫執行的特性分析，使製造商能評估細胞庫中是否存在其他細胞株的細胞、外來病原體、內生病原體及分子污染物（例如來自宿主的內毒素或抗生素）等等。這裡所指進行細胞庫檢測的目的，在於確認製劑生產所用細胞受質的鑑別 (*identity*)、純度 (*purity*) 及適用性 (*suitability*) 等條件，是否可符合其預期之用途。在某些情況下，額外進行致瘤性 (*tumorigenicity*) 或細胞核學 (*karyology*) 檢測，可以提供更多有用的相關資訊。各細胞受質的檢測方案隨細胞之生物性質（如生長條件）、培養史（包括使用人源或動物來源生物試劑）、與可用的檢測方法等情況之不同，而有所差異。細胞受質特性分析的範圍與執行程度，也可能影響生產後期製劑產品所須採取的例行檢測類型與檢測程度。製造商應對每個主細胞庫執行一次鑑別與純度檢測，並對每一款欲登記上市的製劑，於其製劑細胞培養過程中執行一次細胞受質之安定性試驗。此外，每一個工作細胞庫亦須接受一次純度及必要的鑑別試驗。有關病毒安全性方面，申請人須參閱ICH指引。下列所述的相關檢測項目應盡早於查驗登記階段前執行完畢，並在上市查驗登記申請案中敘述及檢附其結果。

若細胞株含有外源建構的表現構築體 (*exogenously assembled expression constructs*)，其重組DNA表現載體之核苷酸與胺基酸序列特性分析，須參閱與rDNA表現載體相關之ICH指引。對於某些非rDNA細胞株，若已熟知其基因序列並已作過特性分析，則以上述ICH指引提示之類似方法檢查其編碼序列亦可能有所助益。然而，更深入的探查其序列所編碼之複雜天然產物，如相關基因家族的

產物、微生物病毒抗原、融合瘤的單株抗體等之編碼序列則非必需。

本指引鼓勵製造商應使用當前最先進 (state-of-the-art) 的方法與技術進行細胞受質的特性分析與檢測，然應確認所採用新方法的特異性 (specificity)、敏感度 (sensitivity) 及精確度 (precision) 等參數之效能，須與既有方法相當。

如理由充分，製造商可選擇以工作細胞庫代替主細胞庫進行特性分析。

1、鑑別試驗

應以適當的檢驗證細胞庫中的細胞確實為其所代表的細胞。鑑別試驗可以利用表現型 (phenotypic) 或基因型 (genotypic) 的特性/徵來進行，且無須一次囊括所有可以採行的鑑別試驗檢測項目。通常鑑別試驗係以主細胞庫為主要對象，對於各工作細胞庫之鑑別試驗要求，則多為進行基本有限的鑑別試驗 (limited identity testing) 即可。

(1) 後生動物細胞

對於附著在一層基底物質 (substratum) 上生長的人類或動物細胞之鑑別試驗而言，形態分析 (morphological analysis) 是一項可以跟其他鑑別檢測互相搭配的有用工具。在多數情況下，鑑別試驗僅須分析同功酶 (isoenzyme) 即足以判斷取自人類或動物的細胞系出自何物種，而其他鑑別檢測是否適當則視細胞株的歷史而定。此外鑑別試驗亦可改用其他技術來判定來源的物種，譬如細胞遺傳學上針對染色體分析的顯帶 (banding cytogenetics) 技術，或使用物種特定的抗血清 (species-specific antiserum)。其他能夠呈現特定的標記方法，也可以作為一種替代性的做法。舉例而言，鑑別試驗可以是利用細胞遺傳學顯帶技術來偵測特定標記的染色體，或以DNA分析來偵測遺傳多型性 (genomic polymorphism) 的模式，比如限制性片段長度多型性 (restriction fragment length polymorphism)、不定數目重複序列 (variable number of tandem repeats)、遺傳二核苷酸重複序列 (genomic dinucleotide repeats) 等。因此，無論是可確認來源物種或是可提供確認有已知的特定細胞株標記存在之分析方法，均可以被認定適合做為適當的鑑別試驗方法。能表現出預期的產物亦可作為鑑別試驗的輔助性方法。

(2) 微生物細胞

對於多數微生物細胞而言，分析在特定培養基中的成長狀況通常即足以確認宿主

細胞庫與轉形細胞庫 (transformed cell bank) 中細胞所屬的物種。若是大腸桿菌 (E. coli)，因為有多種菌株可以使用，建議另以生物特性分析方法 (biological characterization method)，如噬菌體型類別法 (phage typing)，作為輔助性的鑑別試驗方法。質體庫的鑑別試驗可參考關於分析表現構築體的ICH指引。表現出預期的產物亦可作為對微生物表現系統做鑑別的適當方法。

2、純度檢測

評估主細胞庫與工作細胞庫的生物純度，即不帶有外來的微生物病原與外來之細胞污染物，對於細胞受質開發與細胞庫建立乃是一項關鍵性的重點。此類檢測在規劃與執行方面須考量特定篩選藥劑與抗生素對於外來微生物污染偵測能力所造成的影響。

(1) 後生動物細胞

須檢測主細胞庫與工作細胞庫在個別分裝容器中是否存在負荷菌 (bioburden；包括細菌與真菌類) (檢驗數量為細胞庫總分裝容器數的1%，但不得少於2個分裝容器)。在其他方面，現行歐洲藥典 (European Pharmacopoeia, Ph. Eur.)、日本藥典 (Japanese Pharmacopoeia, JP)、美國藥典 (U.S. Pharmacopoeia, U.S.P.) 所述對微生物限量 (microbial limits) 或無菌狀態 (microbial sterility) 之檢測方法均屬適當做法。

主細胞庫與工作細胞庫亦須檢測是否帶有黴漿菌 (mycoplasma)。目前認定為適當的做法計有培養基培養法 (culture method by agar and broth media) 與指示細胞培養法 (indicator cell culture) 兩種。目前歐洲藥典、日本藥典，以及美國食品藥物管理局生物製劑研究暨評估中心發行的Points to Consider in the Characterisation of Cell Lines Used to Produce Biologicals (FDA, CBER, 1993) 對黴漿菌的檢測方法均有著墨，皆可作為適當之參考資料。一般而言，僅須抽檢取自一個細胞庫分裝容器上的細胞即已足夠。若細胞株出自非哺乳類動物，則可能有必要採取替代性的對照及/或檢測條件。對此製造商須洽詢國家或區域主管機關。

若未來在負荷菌與黴漿菌檢測方法的協和工作有所進展，即應採行經適當協和之科學檢驗方法。

細胞受質的病毒檢測須能透過合適的篩檢方法以及相關的特異性檢測 (specific test)，盡可能地去偵測眾多類型的病毒。特異性檢測項目須依細胞株的培養史

進行設計，以便偵測可能造成污染的病毒。申請人須參閱關於病毒安全性的ICH指引。若該指引並未涵蓋製劑所屬分類，可參閱世界衛生組織（World Health Organization, WHO）關於使用動物細胞的現行規範（documents for use of animal cells）。

細胞受質的純度會因為遭受來自相同或相異物種的細胞株污染而降低。須進行何種檢測需視與其他細胞株產生交叉污染的可能性而定。在某些情況下，實驗室或許必須同時培養數種細胞株。建立細胞庫的程序若涉及開放式的操作（open manipulation），須特意避免同時對其他細胞株進行開放式的操作，以避免交叉污染。若正在進行細胞庫開放式操作（例如擴張、合併、分裝該細胞株的群落）的房間內同時還有其他細胞株存在，須檢測該細胞庫中是否有源自其他細胞株的細胞（或產物）存在。一般而言，第二(三)1節所述的細胞鑑別試驗方法對於偵測是否與其他細胞株發生交叉污染同樣適用。若能成功自細胞受質中產出所欲生產的產物，亦可視為並未發生交叉污染的進一步保證。

(2) 微生物細胞

針對微生物細胞庫之外來微生物病原與外來細胞污染物的特異性試驗，在設計與執行上均須考量建庫細胞的特性，並依科學文獻、細胞來源、培養方法與材料、實驗室中同時存在的其他有機體等條件去考量可能的污染物。舉例而言，建議可以數種微生物培養基培養經過妥善隔離的菌落（well-isolated colonies），其中有些培養基可促進細胞受質生長，有些則否，然後再搭配以目視檢查菌落的特徵。不過，特異性試驗並不要求製造商對試驗過程中發現的細胞受質抵抗性突變體（resistant mutant）或與檢驗方法有關的人為產物（artifact）作特性分析。反之，特異性試驗的目的在於偵測現存的污染物。

3、細胞受質的安定性

細胞特性鑑定分析的另一層意義在於確定細胞是否適合用於預定的製劑生產。關於細胞受質的安定性，需要考量的有兩點：預期所生產製劑的一致性、及儲存在特定條件下細胞受質仍可維持其生產力。

若欲在生產細胞之培養期間評估安定性，至少須檢查兩個時間點的細胞。一是繼代數最少時間點的細胞，二是使用已經達到或超過上市查驗登記申請案所列之體外細胞年齡上限的細胞（cells at or beyond the limit of *in vitro* cell age for

production)。當訂定供生產用細胞的體外細胞年齡上限(the limit of *in vitro* cell age for production)時，應依據這些細胞在先導工廠規模(pilot plant scale)或商業規模製程條件下擴增至擬定的體外細胞年齡上限或超過上限所取得的數據。一般而言，供生產用的細胞乃是由工作細胞庫的細胞擴增而來，但若有合理理由，亦可使用取自主細胞庫的細胞。通常，每一項產品均須針對上市申請進行一次細胞受質安定性評估。

細胞受質所生產之製劑的一致性是對細胞受質評估的首要考量目標。須進行何種檢測項目以及該用何種試驗樣品執行相關的評估，須視細胞受質的性質、培養方法及預期的產物等條件而定。若為帶有rDNA表現構築體的細胞株，須以培養至供生產用體外細胞年齡上限或超過此限的細胞進行相關ICH指引所述之核酸檢驗或產物分析，以確認該階段細胞之表現載體編碼序列是否仍具一致性。若為非重組DNA細胞株，因為針對預期產物的編碼序列已經在主細胞庫或工作細胞庫階段作過相關分析，其蛋白質編碼序列在生產過程中的穩定性應以培養至供生產用細胞體外細胞年齡上限或超過此限的細胞進行核酸檢驗，或分析純化後的蛋白質產物，以利確認。

若其產物無法依上述方式作檢驗，可以透過其他特徵分析細胞受質的安定性，比如形態特徵(morphological characteristics)、生長特徵(growth characteristics)、生化標記(biochemical markers)、免疫標記(immunological markers)及目標產物的生產力(productivity of the desired cell substrate)，或者是其他具相關性的基因型或表現型標記等。在某些情形中，直接比較主細胞庫以及達到或超過供生產用細胞體外細胞年齡上限的生產用細胞兩者的特性有困難或不可行，可改由比較生產培養初期的細胞以及達到或超過供生產用細胞年齡擴增上限的生產用細胞兩者的特性來評估細胞在生成產物時的安定性。進行此類比較測試時，可用的指標包括細胞對於氧氣或葡萄糖的消耗率，以及氨或乳酸的生成率等等。若欲提高指定的供生產用細胞體外細胞年齡上限，應提出擴增至體外生命期新上限的細胞群落的數據為證。若為二倍體細胞株，應提出足以確立取自工作細胞庫的細胞群落在生成目標產物的典型環境下的有限度體外擴增(the finite *in vitro* lifespan)的數據。

關於細胞庫細胞在特定儲存條件下的安定性通常是在以細胞庫細胞生成之臨床試驗材料去取得之證據。將保存的細胞復原以生成臨床試驗的材料時須確認細胞活性，其數據可用以確認復原的細胞是否在經歷儲存程序後仍得以存活。生成臨

床試驗材料時的數據可顯示復原的細胞能否用於生成目標產物。申請文件中應清楚列出現有收集得到的數據，並提出監測細胞庫細胞的安定性計畫。所提監測的時機點可以視情況選在為了生產目的而將一個或多個經冷凍保存的容器解凍的時間點，或是以相關方法監測產物或生產力一致性的時間點，抑或是將一個或多個經冷凍保存的主細胞庫解凍以製作新的工作細胞庫的時間點（新工作細胞庫須以適當方式進行合格確認）。若長時間未進行生產，須依上市查驗登記申請案中所提的間隔對作為細胞受質來源的細胞庫進行細胞活性檢驗。若細胞活性並未顯著減退，通常無須對主細胞庫或工作細胞庫做進一步檢測。

4、細胞核學及致瘤性試驗

依細胞、目標產物的性質、生產流程等條件的不同，以細胞核學與腫瘤性測試評估二倍體細胞株的安全性或分析一項新細胞株的特性有其用途。然而對非整倍體細胞（aneuploid cell）的相對含量（abundance）作詳細的分析則不甚有用。此外，對於鼠類細胞株或已知屬非二倍體的新細胞株，也無須進行其細胞核學性質分析。反之，細胞遺傳學分析則是鑑別細胞受質或確認其純度（第二(三)1、二(三)2節）的適當方式。已有文獻證據指出具致瘤性的細胞亦無須重複檢測其致瘤性。對於高度純化且並不帶有細胞的製劑，只要製程確效（process validation）試驗或批次放行測試（lot release testing）的結果顯示殘留的宿主細胞DNA持續維持在適當限度內，則通常無須進行細胞核學與致瘤性測試。

整體而言，若產物無法排除活細胞的存在或在下游程序中缺少相關純化步驟（例如某些傳統式活病毒疫苗），則細胞受質須接受細胞核學與致瘤性等特性分析。對於用以生產未純化產物的新細胞受質，是否須執行致瘤性試驗與染色體分析，應逐案評估。若欲使用已知具致瘤性或細胞核學性質異常的細胞株生產包含細胞或未經高度純化的製劑，則應對每項製劑的使用作風險利益評估。

以未經基因改造的MRC-5或WI-38細胞生成的產物，不須對細胞受質作細胞核學與致瘤性試驗，因為這些細胞株的性質已經經過詳細鑑定並且有豐富的文獻可資參考。然而，每製備一批MRC-5或WI-38工作細胞庫，製造商仍須確認依此方式所培養的細胞為二倍體細胞且具預期之生命期。

若是新型而尚未有特性分析的二倍體細胞受質，應檢測主細胞庫的細胞，確認其二倍體細胞核性質及潛在的致瘤性風險。細胞核學與腫瘤性測試的方法可參閱世

界衛生組織在WHO Expert Committee on Biological Standardization, 47th Report, Geneva, World Health Organization中的WHO Requirements for Use of Animal Cells as *in vitro* Substrates for the Production of Biologicals一文（WHO Technical Report Series）。

三、名詞彙編

細胞庫（cell bank）

細胞庫由數個適當的分裝容器所組成，各容器內皆為出自同一細胞群落的等分試樣（aliquot），其內容物組成一致，且依特定條件存放。

細胞株（cell line）

由初代細胞透過連續繼代的方式所培養的特定類型細胞群落，可用以製作細胞庫。

持續性細胞株（continuous cell line）

能夠持續成長的細胞株。常被稱為「永生」（immortal）的細胞株，過去亦稱為「已建立」（established）的細胞株。

二倍體細胞株（diploid cell line）

有限*in vitro*生命期的細胞株，其染色體為成對的倍數體（euploid），且在結構上與來源物種的染色體相同。

宿主細胞（host cells）

見「親代細胞」（parental cells）一條。

體外細胞年齡（*in vitro* cell age）

由主細胞庫的容器解凍到採集所生成產物之間的時間，可以所經過的時間，或細胞倍增次數（population doubling level），或特定稀釋程序下的繼代數（passage level）等形式表示。

後生動物（metazoan）

屬於多細胞動物的有機體。

主細胞庫（master cell bank，MCB）

出自同一細胞群落的等分試樣。通常是依特定條件培育選中的殖株經過製備後將其分裝入數個容器中並依特定條件存放。主細胞庫可用以製作工作細胞庫。除非另有合理理由，一個新的主細胞庫（來自最初的細胞殖株，或主細胞庫，抑或工作細胞庫）在測試上須與原本的主細胞庫相同。

親代細胞（parental cells）

接受操作以產生細胞受質或過渡細胞株的細胞。對於微生物表現系統，親代細胞通常亦稱為宿主細胞。對於融合瘤，親代細胞通常亦稱為待融合細胞（cells to be fused）。

工作細胞庫（working cell bank，WCB）

工作細胞庫乃是由主細胞庫的均質懸浮液中的細胞在特定條件下所培育而來。

四、附錄：初代細胞受質

(一) 引言

整體上，本指引所揭示的原則適用於已經進行過特性分析的細胞庫所製作的生物技術/生物製劑。然而，有部分生物製劑，尤其是某些病毒性疫苗，則是透過初代細胞製作。

因為由來源的組織所培育的初代細胞立刻用於第一次繼代，所以無法如同出自細胞庫的細胞受質那般在應用前可對細胞作詳細的特性分析。此外，來自初代細胞受質的生物製劑往往也不會經過大幅加工（例如純化）。儘管有這些差異，若欲確認將初代細胞受質用於生產是否適合且安全，所須採取的作法在許多方面均與本指引以及其他指引所提出的做法雷同。

本附錄列舉出以初代細胞製作的生物製劑在進行上市查驗登記申請時所應檢附的資料內容。須檢附資料可分為三大類：（1）用於建立初代細胞受質的組織（或器官）以及其他動物源原料、（2）生成初代細胞受質的方式、（3）對初代細胞受質所作之安全性檢測。

(二) 作為初代細胞受質來源的組織與其他原料

資料內容應涵蓋作為初代細胞受質組織來源的動物。組織來源須為獸醫與實驗室監測下的健康動物，以確保其並未攜帶致病原。作為組織來源的動物須盡可能取自封閉性且不帶有特定病原（若有可能）的群落。作為組織來源的動物不可先前曾用以進行研究試驗。作為組織來源的動物必須事前先適當進行隔離檢疫。部分國家可能規定作為組織來源的動物必須在培育初代細胞的國家進行隔離檢疫。製造商應洽詢國家或地區主管機關以確認是否有其他特殊規定。

資料內容應涵蓋用以生成初代細胞受質的材料與成分，包括使用哪些人源與動物源試劑以及其來源。此外亦應說明對動物源成分所作的污染物與外來病原檢測。

(三) 生成初代細胞受質的方式

提供資料內容應說明將細胞自組織分離、培養初代細胞、維持所培養的初代細胞等流程所用的方法。

(四) 對初代細胞受質所作的檢測

提供資料內容應舉出為確認初代細胞受質是否適用而作的檢測。前文已指出初代細胞受質多半在應用前未經詳細檢測與分析。因此，對於外來病原的檢測須同時進行，且應包括下列項目：製作生物製劑期間以及製作前、製作後對培養生產生物製劑的細胞受質或未感染的對照培養物進行觀察；將用以生產生物製劑的細胞受質的培養液，以及對照培養物的培養液，接種到多種可用以廣泛偵測相關病毒的指示細胞群落（indicator cell cultures），接著檢查是否發生細胞病變（cytopathic changes）以及是否有附血性病毒（presence of hemadsorbing viruses）；其他對特定病原體（例如相關的反轉錄病毒）所作之必要檢測。關於特定病毒檢測的進一步規定可參考相關國家/區域/國際規範。

用以製作特定製劑的細胞適用何種檢測設計與方法須視組織來源的物種、可能存在的外來病原、製劑的性質、製劑的臨床應用、製劑生產過程各方面的考量、對最終產品所作的檢測等條件而定。申請人須就自身的產品說明所採取的途徑，並提出支持的論據。