

团 体 标 准

T/CBPIA 0015—2025

重组溶瘤腺病毒生产质量管理标准

2025 - 12 - 29 发布

2026 - 01 - 28 实施

中国生化制药工业协会 发布

目 次

目 次.....	I
前 言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义、缩略语.....	1
4 一般要求.....	2
5 组织机构和人员.....	3
6 生产场地与设施设备规范.....	3
7 生产管理.....	3
8 质量控制.....	7
附录 A（规范性）生产用细胞库质量标准（以 293 细胞为例）.....	11
附录 B（规范性）生产用病毒种子批质量标准.....	14
附录 C（资料性）腺病毒感染滴度测定（CCID ₅₀ 法）.....	18
附录 D（资料性）腺病毒颗粒数测定.....	20

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本标准适用于重组溶瘤腺病毒的生产管理、质量控制及质量保证等活动。

值得注意的是，如涉及重组溶瘤腺病毒生产及质量相关变更的，应当按照现行法规和变更相关技术指导原则执行，不得依据本标准改变已经批准的注册生产工艺及质控规程

本标准由上海元宋生物技术有限公司提出。

本标准由中国生化制药工业协会归口管理。

本标准起草单位：上海元宋生物技术有限公司、上海三维生物技术有限公司、武汉凯德基诺生物技术有限公司、博瑞泰（天津）生物科技有限公司。

本标准主要起草人：杨圆圆、孙爱喜、章康健、刘建飞、吴丹、纪腾、胡宽、李海泉、郑秀玉、徐灿、马超、胡文言、周斌、范蕊萌、金燕京、李鑫。



重组溶瘤腺病毒生产质量管理标准

1 范围

本标准规定了通过基因工程技术进行重组修饰的腺病毒生产技术规范,以确保重组溶瘤腺病毒产品的质量。

本标准适用于人用重组溶瘤腺病毒原液及制剂的生产流程与质量控制。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过规范性引用构成本标准必不可少的条款。其中,标注日期的引用文件,仅标注日期对应的版本适用于本标准;不标注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修订)适用于本标准。

- 《药品生产质量管理规范》(2010版)及其无菌药品和生物制品附录
- 《中华人民共和国药典》
- 《体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》(2022年)
- 《溶瘤病毒产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》(2023年)
- ICH Q5: 生物技术产品的质量
- ICH Q6B: 质量标准——生物技术产品以及生物制品的检测方法和可接受标准
- ICH Q9: 质量风险管理

3 术语和定义、缩略语

3.1 术语及定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1.1 单次收获液 (Single Harvest)

指在一轮病毒生产或一个连续生产时段中,用同一病毒株接种于细胞基质培养和收获的一批病毒悬液。

3.1.2 原液 (Bulk)

指病毒收获液经纯化用于制造最终配制物 (Final Formulation) 的均一物质。

3.1.3 半成品 (Final Bulk)

指由原液经稀释和(或)配制成均一的用于分装至终容器的中间产物。

3.1.4 成品 (Final Products)

指半成品分装(或经冻干)、以适宜方式封闭于最终容器后,再经目检、贴签、包装后

的制品。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

GMP: 生产质量管理规范 (Good Manufacturing Practice)

MOI: 感染复数 (Multiplicity of Infection)

CCID₅₀: 半数组织细胞感染剂量 (Cell Culture Infectious Dose 50)

ELISA: 酶联免疫吸附试验 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

EU: 细菌内毒素单位 (Endotoxin Unit)

ATCC: 美国标准菌种保藏中心 (American Type Culture Collection)

EHS: 环境、健康与安全 (Environment, Health, and Safety)

4 一般要求

重组溶瘤腺病毒系经过基因修饰的针对肿瘤细胞、具有复制能力的腺病毒产品,其可特异性感染肿瘤细胞并在肿瘤细胞中复制,裂解肿瘤细胞而对正常细胞无显著毒性,表达外源基因以实现溶瘤病毒的生物学治疗功能,包括但不限于对肿瘤细胞的直接杀伤作用,及激发自身免疫系统发挥免疫调节的作用,从而发挥抗肿瘤的综合效应。

4.1 生物安全要求

重组溶瘤腺病毒通常可在生物安全二级的场所内进行操作,当新型载体引入时需进行全面生物学安全评估,确保 BSL2 满足生物安全相关法律法规与标准规范要求。

由于重组溶瘤腺病毒是具有条件复制能力的活病毒,在其基因修饰设计、生产工艺流程、质量监控体系构建、储存条件设定与运输方案规划,以及临床应用实践等多个维度,均需高度重视并系统评估其对人类健康、动植物生态、微生物群落平衡及自然环境的潜在风险,进而实施科学合理的风险控制措施。确保该病毒从最初的研发设计、生产制造、临床应用到最终的废弃处理,须全面遵循并严格符合生物安全领域的相关法律法规与标准规范。

4.2 环境要求

为了有效控制污染/交叉污染风险,溶瘤腺病毒生产所需物料应进行严格的供应链管理和质量控制。病毒种子批、生产细胞库的制备过程,以及用于人体的病毒制剂生产流程,均应在全面符合 GMP 及其附录文件中的基本原则与相关要求的环境下执行。

4.3 基本技术要求

溶瘤腺病毒的制造主要包括生产用起始材料、原材料和辅料的控制,载体的制备,目标成分的提取、病毒的纯化和制剂等过程。生产过程中使用的菌毒种和动物细胞基质应符合生

物制品生产检定用菌毒种管理及质量控制（通则 0233）和生物制品生产用动物细胞基质制备及质量控制（通则 0234）的相关要求。使用的原材料和辅料应符合生物制品生产用原材料及辅料质量控制（通则 0232）的相关要求。应采用经过验证的生产工艺进行生产，并对生产工艺全过程进行控制。

5 组织机构和人员

企业应当建立与药品生产相适应的管理机构，并有组织机构图。企业应当设立独立的质量管理部门，履行质量保证和质量控制的职责。质量管理部门应当参与所有与质量有关的活动，负责审核所有与 GMP 规范有关的文件。企业应当配备足够数量并具有适当资质（含学历、培训和实践经验）的管理和操作人员，应当明确规定每个部门和每个岗位的职责。岗位职责不得遗漏，交叉的职责应当有明确规定。

具体内容参见《药品生产质量管理规范》第三章。

6 生产场地与设施设备规范

厂房的选址、设计、布局、建造、改造和维护必须符合药品生产要求，应当能够最大限度地避免污染、交叉污染、混淆和差错，便于清洁、操作和维护。应当根据厂房及生产防护措施综合考虑选址，厂房所处的环境应当能够最大限度地降低物料或产品遭受污染的风险。

设备的设计、选型、安装、改造和维护必须符合预定用途，应当尽可能降低产生污染、交叉污染、混淆和差错的风险，便于操作、清洁、维护，以及必要时进行的消毒或灭菌。应当建立设备使用、清洁、维护和维修的操作规程，并保存相应的操作记录。应当建立并保存设备采购、安装、确认的文件和记录。

具体内容参见《药品生产质量管理规范》第四章以及第五章。

7 生产管理

7.1 病毒生产起始原材料管理

生产用细胞需建立完善的细胞库（细胞种子、主细胞库和工作细胞库）。细胞库系统的建立、维护和检定应当符合生物制品生产用动物细胞基质制备及质量控制（通则 0234）的要求。

生物制品生产用毒种应采用种子批系统，需建立完善的原始种子、主种子批和工作种子批。病毒种子批的建立、维护和检定应当符合生物制品生产检定用菌毒种管理及质量控制（通则 0233）的要求。

其他参考资料包括：《药品生产质量管理规范》-附录 3:生物制品 第六章生产管理 第三十四条至第四十三条。

7.2 原辅料管理

原辅料的管理参见《药品生产质量管理规范》第六章第二节。

7.3 生产工艺规程制定

为了确保病毒生产过程的科学性与规范性，应当制定合规的病毒生产工艺规程。清晰界定产品的关键质量属性，详细阐述生产工艺流程，明确标注关键工艺参数及其控制范围，同时规定中间品的质量控制项目及相应的接受标准。此外，还需制定标准生产操作程序，对每一步操作步骤进行详尽说明与规定，确保生产流程的有效执行与精确控制。

参见《药品生产质量管理规范》第八章第三节。

7.4 病毒生产工艺流程

病毒的生产过程通常以病毒种子批和生产细胞基质作为起始物料，整个工艺流程被划分为上游工艺与下游工艺两大阶段。上游工艺涵盖生产细胞的扩增、病毒接种与扩增、病毒释放与酶解处理等核心环节；而下游工艺通常包括澄清处理、超滤浓缩、层析纯化、半成品制备以及制剂灌装等关键步骤。质量检定合格后，产品被包装为符合规范的制剂成品。

在工艺层面，溶瘤腺病毒与野生型腺病毒的根本差异源于二者设计目标的不同。野生型腺病毒基于天然病毒株，基因组未经修饰，具有完整的感染性与复制能力，可通过 HEK293 等成熟细胞系进行高效扩增，整体工艺稳定、病毒滴度高，质量控制主要集中于纯度与感染性等基础指标。相比之下，溶瘤腺病毒经历复杂的基因工程改造，例如删除关键基因或插入肿瘤特异性启动子，这些改造显著增加基因组操作步骤与验证复杂度，或导致生产流程更为繁琐、病毒滴度受限，显著增加操作步骤与验证复杂度。野生型腺病毒的生产流程已高度标准化，依赖宿主细胞的常规培养与扩增体系，工艺成熟且易于规模化放大。而溶瘤腺病毒需根据基因改造的不同，分析基因改造对病毒本身诸如对常规生产细胞（比如 HEK293）的感染敏感性、整体带电性质、颗粒大小等是否有影响，根据性质的变化，在野生型成熟稳定的工艺基础上做相应的调整。通常改造后的溶瘤腺病毒对生产细胞（非肿瘤细胞）的感染敏感性降低，需要调整接毒比例及细胞密度以提高产量；改造野生型腺病毒的外壳蛋白，则需分析亲和填料是否适配，改造可能影响带电性质，进行离子层析时需调整电导，改变洗脱条件。总之，经基因改造的溶瘤腺病毒的生产，需分析改造对病毒产生的影响，进而对工艺进行筛选及优化。

以下是溶瘤腺病毒生产关键工艺步骤及工艺控制点的详细说明：

7.4.1 细胞复苏与扩增

从工作细胞库中取出细胞，进行复苏操作后，利用培养瓶、细胞工厂或生物反应器等设

备，按照既定的培养方案进行逐级扩增，直至达到适合病毒接种的细胞数量。在整个培养过程中，需对培养基的组分、培养条件（温度、溶氧、pH、搅拌转速等关键参数）、培养时长、细胞传代代次、传代比例、细胞密度等关键工艺参数实施严格的监控与管理，确保细胞培养过程的稳定性和可控性。

7.4.2 病毒接种及扩增培养

在病毒生产流程中，常采用生物反应器对细胞进行病毒接种前的扩增培养。当细胞密度达到适接种病毒的水平时，领取毒种进行无菌接种并继续培养。依据细胞的生长状况及病变发展情况，可适量添加新鲜培养液以维持细胞的生长环境，继续培养至细胞充分病变后结束培养过程。在病毒接种前，需采集对照细胞，按照批准的规定进行质量控制（按药典要求检测外源因子等）。病毒接种需对病毒感染复数（Multiplicity of Infection, MOI）、培养基成分、病毒培养条件（如温度、pH 值、溶氧以及搅拌转速等）关键参数进行严格的监控与记录。

7.4.3 病毒释放及收获

在病毒生产过程中，当细胞接种病毒并培养至完全病变状态后，通过适当方式（低渗裂解释放，或向培养体系中加入裂解液/酶，或将细胞收获后进行反复冻融等）将病毒颗粒从细胞中释放。对病毒液进行澄清处理，收集澄清液作为病毒收获液。病毒释放阶段，需对裂解液/酶的配比、酶切裂解时间、过滤澄清的相关参数进行严密的监控，以确保病毒的有效释放。

7.4.4 超滤浓缩

超滤即切向流过滤（Tangential Flow Filtration, TFF），选择合适孔径的超滤膜，对澄清过滤病毒液进行浓缩（如 10-20 倍），浓缩至需要的体积后进行超滤洗滤，去除小于滤膜孔径的杂质，提高纯度减轻后续纯化压力。

超滤还可进行产物浓缩、脱盐和缓冲液置换等，应根据病毒特性和产品工艺选择适配超滤浓缩工艺。

7.4.5 纯化层析

病毒液经层析纯化进一步清除残留的宿主蛋白、宿主 DNA、酶以及培养基组分。常采用凝胶层析、亲和层析及离子层析等多种填料介质，依据分子大小差异、特异性结合能力、电荷性质及疏水性等原理，实现对杂质的精确分离与去除。需对层析过程多个关键参数进行严格控制与监测，包括层析柱的柱效、上样载量、线性流速、淋洗与洗脱条件（如 pH 值、盐浓度等），病毒收集峰的起止点，以确保层析纯化的高效性与准确性，从而产出高纯度的

病毒制品。

7.4.6 溶液置换

层析所得的病毒溶液可能需进一步换液，将病毒颗粒置换至适宜的保存缓冲体系内，可借助浓缩技术将其调整至所需的浓度范围，最终制得病毒原液。

7.4.7 半成品配制及灌装

可按病毒原液的颗粒数（VP）、基因组滴度或感染滴度配制半成品，经除菌过滤后进行灌装。严格遵守无菌原则，有效防止污染及交叉污染的发生，并对此实施全面的监控。灌装的生产形式与方式需依据风险评估的结果进行科学确定，且必须经过严格的无菌工艺验证，以确保其符合生产要求与质量标准。

7.5 操作规程与记录

病毒生产现场应当配备与生产工序相关的标准操作规程（SOP），并且所有操作必须严格遵循工艺流程与操作规程，同时，所有操作过程及关键参数均需准确记录保存。

具体内容参见《药品生产质量管理规范》第八章第六节。

7.6 生产批次管理

应当建立划分产品生产批次的操作规程，生产批次的划分应当能够确保同一批次产品质量和特性的均一性。应当建立编制药品批号和确定生产日期的操作规程。每批药品均应当编制唯一的批号。

具体内容参见通则 0239 生物制品分包装及贮运管理。

7.7 存储条件与时限

基于稳定性研究与验证所得数据，应明确规定中间品在进入下一道工序前的存储条件及最长允许存储时间。同时，依据起始物料及工艺中间品的理化特性与贮存条件，需明确设定各生产阶段的时间限制。对于起始物料及中间品，必须实施严格的质量控制措施，以保障最终产品的质量不受任何不良影响。

具体内容参见通则 9402 生物制品稳定性试验指导原则。

7.8 中间品管理

制备完成的中间品应由专门指定的人员负责保管，并建立详细的台账管理制度以确保其可追溯性与管理规范性。

具体内容参见《药品生产质量管理规范》第六章第三节。

7.9 无菌操作规程

应制定并执行无菌操作规程，以确保生产流程中的每一阶段，产品及物料均得到有效的

无菌控制。同时，制造过程中产生的废料应当及时且妥善地处理后，从生产区域移出，以防止其对生产环境及生产设备造成潜在的污染风险。

8 质量控制

8.1 单次收获液和生产对照细胞

应在收获液阶段取样进行微生物限度或无菌、细菌内毒素（可选做）、外源病毒因子和支原体检测，需要中和的项目，如中和抗体难以获得，可采用对照细胞替代检测。

8.2 原液检定

8.2.1 鉴别

按照《溶瘤病毒产品药学研究与评价技术指导原则》的要求，采用 PCR 法和/或限制性内切酶法分别对插入基因、载体改造区段及整个基因组进行鉴别，结果应与对照品一致。

8.2.2 特定基因测序

针对插入基因、载体改造区进行定期测序，需与设计序列一致。

8.2.3 含量

8.2.3.1 病毒颗粒数

根据《溶瘤病毒产品药学研究与评价技术指导原则》，本项使用紫外分光光度法测定供试品 260 nm 处的吸收值，以病毒颗粒数（VP/mL）= $A_{260} \times \text{稀释倍数} \times 1.1 \times 10^{12}$ 计算病毒颗粒数。其中一个 OD_{260} 的光吸收单位相当于每毫升样品中含有 1.1×10^{12} 个腺病毒。

8.2.3.2 感染滴度

感染滴度通常采用半数组织细胞感染剂量法（ $CCID_{50}$ ）和壳蛋白免疫法（IFU），反映的是具有感染活性的腺病毒颗粒。 $CCID_{50}$ 法是将病毒悬液连续倍比稀释后接种于易感 HEK293 细胞中，培养足够时间后，观察细胞的病变，经统计学方法计算出 50% 组织细胞感染剂量。壳蛋白免疫法同样是将病毒悬液连续倍比稀释后接种于易感 HEK293 细胞中，培养 2 天后，利用针对腺病毒六联体蛋白的抗体，通过免疫细胞化学染色可视化感染细胞，使用光学显微镜对至少五个单独的视野计数阳性染色细胞（棕色），计算每孔平均阳性细胞数和病毒滴度（IFU/mL）。

8.2.3.3 基因组滴度（可选做）

基因组滴度是在病毒基因组上设计引物，通过 qPCR 定量的方式，测定携带有基因组的病毒颗粒数。

8.2.4 活性

8.2.4.1 插入基因表达产物

对插入基因表达产物选择合适的方法检测。

8.2.4.2 杀伤活性

通过检测本品对肿瘤细胞的杀伤作用来定量活性，肿瘤细胞杀伤结果应符合批准的规定。

8.2.5 纯度和杂质

8.2.5.1 纯度（HPLC）

本法按面积归一化法计算，主色谱峰面积应不低于总面积的 95.0%。

8.2.5.2 纯度（A260/A280）

用紫外/可见分光光度法在 260 nm 和 280 nm 处测定腺病毒颗粒纯度，A260/A280 比值应符合标准规定。

8.2.5.3 宿主蛋白质残留（可在成品检测）

采用经验证并批准的适宜方法进行测定，结果应不大于 100 ng/剂。

8.2.5.4 牛血清白蛋白检测（根据工艺确定是否检测；可在成品检测）

采用经验证并批准的适宜方法进行测定，结果应不大于 50 ng/剂或符合批准的规定。

8.2.5.5 外源性 DNA 残留（可在成品检测）

依照通则 3407“外源性 DNA 残留量测定法”第三法定量 PCR 法进行测定，结果应不大于 10 ng/剂。

8.2.5.6 核酸酶残留（可在成品检测）

采用经验证并批准的适宜方法进行测定，结果应不大于 2 ng/剂。

8.2.5.7 野生型腺病毒检测

293 细胞常作为溶瘤腺病毒的生产细胞，293 细胞基因组上整合了腺病毒 1-4344 bp 的序列，而大多数溶瘤腺病毒的改造位点也位于该区域，在生产过程中，容易同源重组，回复突变为野生型毒株，野生型毒株没有感染选择性，存在一定的安全性危害，需要控制其在成品制剂中的比例。按照《溶瘤病毒产品药学研究与评价技术指导原则》的要求，对生产过程中回复突变的野生型腺病毒进行检测，参考《重组复制型溶瘤病毒 P53 的质量控制方法》建议，采用 qPCR 法，分别定量野生型腺病毒基因组及总基因组，比值不能高于 $1/10^6$ 。即 10^6 个腺病毒基因组拷贝数中野生型腺病毒基因组拷贝数不能高于 1 个。

8.2.6 安全性

8.2.6.1 细菌内毒素检查

依照通则 1143“细菌内毒素检查法”进行检查，应 <10 EU/ml。

8.2.6.2 无菌检查（可选做）

依照通则 1101 “无菌检查法” 进行检查，应符合要求。

8.2.6.3 微生物限度检查（可选做）

依照通则 1105 “非无菌产品微生物限度检查：微生物计数法” 进行检查，应符合要求。

8.2.7 其他

8.2.7.1 pH 值

依照通则 0631 “pH 值测定法” 测定，应符合批准的规定。

8.2.7.2 外观

目视法，应符合批准的规定。

8.3 半成品检定（如有）

8.3.1 无菌检查

依照通则 1101 “无菌检查法” 进行检查，应符合要求。

8.3.2 细菌内毒素检查

依照通则 1143 “细菌内毒素检查法” 进行检查，应 <10 EU/ml。

8.4 成品检定

8.4.1 理化性质

8.4.1.1 外观

目视法，应符合批准的规定。

8.4.1.2 可见异物

依照通则 0904 “可见异物检查法” 检查，应符合规定。

8.4.1.3 不溶性微粒

依照通则 0903 “不溶性微粒检查法” 检查，应符合规定。

8.4.1.4 装量

依照通则 0102 “注射剂” 进行测定，应不低于标示量。

8.4.1.5 pH 值

依照通则 0631 “pH 值测定法” 测定，应符合批准的规定。

8.4.1.6 渗透压

依照通则 0632 “渗透压摩尔浓度测定法”，应符合批准的规定。

8.4.2 纯度和杂质

8.4.2.1 纯度（HPLC）

本法按面积归一化法计算，主色谱峰面积应不低于总面积的 95.0%。

8.4.2.2 纯度 (A260/A280)

用紫外/可见分光光度法在 260 nm 和 280 nm 处测定腺病毒颗粒纯度, A260/A280 比值应符合标准规定。

8.4.3 含量

同 8.2.3。

8.4.4 活性

同 8.2.4。

8.4.5 安全性

8.4.5.1 无菌检查

依照通则 1101 “无菌检查法”进行检查, 应符合要求。

8.4.5.2 细菌内毒素检查

依照通则 1143 “细菌内毒素检查法”进行检查, 应 <10 EU/ml。

8.4.5.3 支原体检查

依照通则 3301 “支原体检查法”进行检查, 应为阴性。



附录 A

(规范性)

生产用细胞库质量标准 (以 293 细胞为例)

A.1 范围

适用于生产用 293 细胞主细胞库、工作细胞库的检验与质量判定。

A.2 术语

A.2.1 主细胞库 (MCB, Master Cell Bank)

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°C 以下,即可作为主细胞库,用于工作细胞库的制备。

A.2.2 工作细胞库 (WCB, Work Cell Bank)

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,达到特定代次水平的细胞,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°C 以下,即可作为工作细胞库,用于生产。

A.2.3 生产终末细胞 (EOPC, End of Production Cell)

指在或超过生产末期时收获的细胞。

A.3 内容

A.3.1 细胞信息

A.3.1.1 细胞名称

适宜细胞 (标明名称)。

A.3.1.2 细胞代次

各级细胞库细胞代次应不超过批准的限定代次。

A.3.1.3 包装形式

适宜的细胞冻存管。

A.3.2 取样

细胞库取样:按照细胞库建库方案的规定取样。

A.3.3 主细胞库和工作细胞库检验

A.3.3.1 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 建立一个新的 WCB，均应按规定项目进行检定。检定项目按下表规定。

检测项目		MCB	WCB	生产终末细胞 (EOPC)
细胞鉴别		+	+	(+)
细菌、真菌检查		+	+	+
分歧杆菌检查		(+)	(+)	(+)
支原体检查		+	+	+
细胞内、外源 病毒因子检查	细胞形态观察及血吸附试验	+	+	+
	体外不同细胞接种培养法	+	+	+
	动物和鸡胚体内接种法	+	-	+
	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*		(+)	(+)	-
致瘤性检查*		(+)	(+)	-

备注：“+”为必检项目，“-”为非强制检验项目。（+）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检定项目。

A.3.3.2 细胞鉴别试验

依照通则 0234 “生物制品生产用动物细胞基质制备及质量控制”相关规定检查，应为本细胞且无其它细胞污染。

A.3.3.3 细菌、真菌无菌检查

取细胞培养上清液或冻存细胞管样品，（通则 1101），应符合规定。对于 MCB、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。对于冻存细胞，至少取冻存细胞总支数的 1%或至少 2 支冻存细胞管（取量大者），可采用直接接种法。

A. 3.3.4 分枝杆菌检查

取至少 10^7 个活细胞用基础培养基制备细胞裂解物进行分枝杆菌检查。

A. 3.3.5 支原体检查

取细胞培养上清液 20 ml，依照通则 3301“支原体检查法”进行检查，应无支原体生长。

A. 3.3.6 细胞内、外源病毒因子检查

依照通则 0234“生物制品生产用动物细胞基质制备及质量控制”相关规定检查，应符合规定。

A. 3.4 储存及管理

A. 3.4.1 储存位置

主细胞库和工作细胞库应分别存放。即每一个库应在至少 2 个不同地点或区域存放，可选择在生产设施内和（或）与生产设施有一定距离的地点。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。

A. 3.4.2 主细胞库应进行储存稳定性研究，以确定储存年限。

A. 4 注意事项

A. 4.1 细胞库冻存容器应有温度监测系统及报警系统。细胞库冻存容器的存放环境应控制温湿度、避免阳光直射。

A. 4.2 从冻存容器中取出细胞后，不可再放回。

附录 B

(规范性)

生产用病毒种子批质量标准

B.1 范围

适用于重组溶瘤腺病毒主种子批（主病毒库）和工作种子批（工作病毒库）的检定和质量判定。

B.2 术语

B.2.1 主种子批（MVB, Master Virus Bank）

由原始种子的病毒制备而成，分装于容器内，组成应均一，保存于-80℃以下或液氮中，用于制备工作种子批。

B.2.2 工作种子批（WVB, Working Virus Bank）

由有限传代水平的主种子批制备而来的均一性病毒悬液，分装于适宜容器中，保存于-80℃以下或液氮，用于生产。

B.2.3 未处理的收获液（UPB, Unprocessed Bulk）

指发酵终点收获的发酵液。

B.3 内容

B.3.1 病毒信息

B.3.1.1 病毒名称

重组溶瘤腺病毒。

B.3.1.2 病毒代次

各级种子批病毒代次应不超过批准的限定代次。

B.3.1.3 包装形式

按生产工艺要求，分装合适的病毒数量于可冷冻保存的无菌容器中，通常为冻存管或西林瓶。

B.3.1.4 病毒来源

对野生型毒株进行改造而得。

B.3.2 取样

病毒库取样：按照病毒种子批建库方案的规定取样。

B.3.3 主种子批和工作种子批检验

B.3.3.1 病毒种子批建立后对 MVB 及 WVB 按照下表进行全面检定，每次建库需设立对照细胞进行外源因子检定。

检测项目	可接受标准	MVB	WVB	对照细胞
病毒颗粒数	报告结果	+	+	-
细菌内毒素	企业内定	+	+	-
目的基因鉴别	目的基因扩增应为阳性	+	+	-
载体改造区鉴别	实测条带应与对照品条带一致	+	+	-
全基因组测序*	实测序列与理论序列一致	+	+	-
感染滴度	报告结果	+	+	-
插入基因蛋白表达量	报告结果	+	+	-
杀伤活性	报告结果	+	+	-
野生型腺病毒检查	报告结果	+	+	-
无菌检查	应无菌生长	+	+	-
支原体检测	应为阴性	+	+	-
分枝杆菌检测	应无分枝杆菌	+	+	-
体外不同指示细胞接种培养 法检测**	应为阴性	+	+	+
超薄切片电子显微镜检测病毒形态和逆转录病毒样颗粒	报告结果	+	-	-
体内检测病毒污染检测-成年小鼠、乳鼠体内接种	成活率应>80%，生长状态良好	+	-	-
鸡胚体内实验检测（尿囊腔接种实验、卵黄囊接种实验、血吸附实验及血凝实验）	应为阴性	+	-	-

检测项目	可接受标准	MVB	WVB	对照细胞
人源病毒检测	应为阴性	+	-	-
人多瘤病毒	应为阴性	+	-	-
定量荧光产物增强反转录酶(QFPERT)-逆转录病毒酶活性检测	应为阴性	+	-	-
牛源病毒	应为阴性	-	+	-
猪源病毒	应为阴性	+	-	-
腺相关病毒(AAV)	应为阴性	+	-	-
戊型肝炎病毒(HEV)	应为阴性	+	-	-

备注：“+”为必检项目，“-”为非强制检验项目，如从改造病毒开始未使用牛源、猪源物料，可考虑不检测猪源、牛源病毒。*此项亦可放于传代稳定性实验中实行。**如果不能对主种子批、工作种子批进行相应的检测，需采用对照细胞进行检测。

B.3.3.2 病毒鉴别试验

依照通则 0233 “生物制品生产检定用菌毒种管理及质量控制”相关规定检查，应为本病毒且无其它病毒污染。

B.3.3.3 细菌、真菌检查

取病毒培养上清液或冻存病毒管样品，（通则 1101），应符合规定。对于 MVB、WVB 培养物，至少取混合病毒培养上清液 10 ml，尽可能采用薄膜过滤法检测。对于冻存病毒，至少取冻存病毒总支数的 1%或至少 2 支冻存病毒管（取量大者），可采用直接接种法。

B.3.3.4 支原体检查

取病毒培养上清液 20 ml，依照通则 3301 “支原体检查法”进行检查，应无支原体生长。

B.3.3.5 内、外源病毒污染检查

依照通则 3302 “外源病毒因子检查法”相关规定检查，应符合规定。

B.3.4 储存及管理

B.3.4.1 储存位置

主种子批和工作种子批应分别存放。即每一个库应在至少 2 个不同地点或区域存放，可选择在生产设施内和（或）与生产设施有一定距离的地点。应监测并维护病毒库储存容器，以保证病毒库贮存在一个高度稳定的环境中。

B. 3. 4. 2 主种子批、工作种子批应进行传代稳定性研究，以确定储存年限。

B. 4 注意事项

B. 4. 1 病毒种子批储存容器应有温度监测系统及报警系统。病毒种子批储存容器的存放环境应控制温湿度、避免阳光直射。

B. 4. 2 从储存容器中取出病毒后，不可再放回。

B. 4. 3 如果病毒种子批冻存在超低温冰箱，建议有备用电源。

附录 C

(资料性)

腺病毒感染滴度测定 (CCID₅₀ 法)

C.1 材料

检定用 HEK293 细胞 (在限定代次内); 参比品 (内部质控品); DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS)、青霉素-链霉素 (可选)、0.25%胰酶-EDTA。

C.2 仪器设备

生物安全柜、CO₂ 培养箱、恒温水浴锅、细胞计数仪、倒置显微镜。

C.3 操作步骤

C.3.1 细胞准备

取形态正常且汇合度达到 80% 以上的 HEK293 细胞, 消化计数, 将细胞悬液稀释至 1×10^5 个/ml, 100 μ l/孔加入 96 孔板中, 置于 37°C、5%CO₂ 培养箱内培养 20 h \pm 2 h。

C.3.2 样品接种

于生物安全柜中, 用无血清 DMEM 培养基将样品及参比品进行适当稀释, 以参比品 (5.0×10^{11} VP/ml) 为例, 将参比品连续 10 倍稀释至 10^7 倍, 后作 2 倍稀释至 5.12×10^9 倍。弃去孔中旧培养基, 向 96 孔板中从低到高加入后 8 个稀释度的供试品/参比品, 200 μ l/孔, 每个稀释度接种 10 个平行孔, 第一列和最后一列作为阴性对照孔加无血清 DMEM, 在 37°C, 5%CO₂ 条件下孵育 60 分钟。吸出各孔内上清液, 加入 200 μ l/孔 5%FBS 的 DMEM 培养液, 在 37°C 5%CO₂ 条件下持续培养 10 天。

C.3.3 结果观察

从接种供试品起第 8 天至第 10 天, 每日逐行观察细胞病变的情况, 并计数最终细胞病变孔数。阴性对照无任何细胞病变且生长状态良好, 低稀释度细胞 100% 病变而最高稀释度细胞 100% 不病变, 则判定本次试验结果有效。

C.3.4 结果计算

将发生细胞病变孔的比率为 20%~80%（即在同一稀释度所发生细胞病变的孔数为 2~8 个）的稀释度代入下式进行计算。每毫升感染效价(IU/mL):

$$V = -[\ln(1 - P_w/n)] \times D / (A_w \times C_w \times I \times t^{1/2})$$

公式中 P_w/n 为阳性孔比率， D 为稀释度， A_w 为 96 孔板每孔面积 (cm^2)， 0.33 cm^2 ， C_w 为接种供试品前细胞汇合度， I 为扩散系数 $2.38 \times 10^{-4} \text{ cm/s}^{1/2}$ ， t 为病毒感染时间 (s)。将计算结果取平均值，即为供试品病毒滴度检测结果。

C. 3. 5 结果判定

C. 3. 5. 1 阴性对照

阳性孔比例为 0%

C. 3. 5. 2 参比品

最低稀释度阳性孔比例为 100%，最高稀释度阳性孔比例为 0%，滴度回收率应符合要求。

(回收率 = 实测值/理论值×100%，理论值为至少 15 次标定的结果。)

C. 3. 5. 3 供试品

最低稀释度阳性孔比例为 100%，最高稀释度阳性孔比例为 0%

C. 3. 5. 4 以上条件均符合则结果可输出。

附录 D

(资料性)

腺病毒颗粒数测定

D.1 材料

空白溶液（病毒稀释液等），十二烷基硫酸钠（SDS），0.22 μm 滤器，EP 管

D.2 仪器设备

紫外分光光度计，台式高速离心机，恒温金属浴

D.3 操作步骤

D.3.1 病毒裂解液

取 SDS 0.1 g，加入至 10 mL 空白溶液（病毒稀释液等）中，0.22 μm 滤器过滤，为含 1% SDS 病毒裂解液。

D.3.2 空白对照溶液制备

取空白溶液 900 μL ，加入病毒裂解液 100 μL ，振荡混匀。

D.3.3 待测品溶液制备

取待测样品 900 μL 加入病毒裂解液 100 μL ，振荡混匀。每个待测品制备 3 个平行样品（成品分别取 3 支）。

D.3.4 将空白对照溶液和待测品溶液置恒温金属浴 55 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 分钟，12,000 rpm 离心 5 分钟，取上清，置干净的 EP 管中，分别做好标记。

D.3.5 预热仪器，将空白溶液与待测样品分别放入对应比色皿中读取 260 nm, 280 nm 和 320 nm 值 3 次并记录。

D.4 数据分析

D.4.1 系统适用性要求

A260/A280 比值符合要求（通常为 1.2-1.4）。

D.4.2 计算公式

病毒颗粒数 (VP/mL) = A₂₆₀ × 稀释倍数 (样品稀释倍数 × 上样稀释倍数) × 1.1 × 10¹²,

平行试验 3 次, 取平均值。

全国团体标准信息平台



重组溶瘤腺病毒生产质量管理标准

T/CBPIA 0015—2025

*

中国生化制药工业协会秘书处

地址：北京市西城区广内大街广义街 5 号广益大厦 B 座 806

电话：010-67046276 传真：010-67046276

邮箱：chinabpia@163.com

网址：<http://www.cbpia.org.cn>

