

附件： 生物制品生产用动物细胞基质制备及质量控制

本通则适用于人用生物制品生产用动物细胞基质，包括具有细胞库体系的细胞及原代细胞。细胞基质系指可用于生物制品生产的所有动物或人源的连续传代细胞系、二倍体细胞株及原代细胞。

一、对生产用细胞基质总的要求

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

（一）细胞系/株历史资料

1. 细胞系/株来源资料

应具有细胞系/株来源的相关资料，如细胞系/株制备机构的名称，细胞系/株来源的种属、年龄、性别和健康状况的资料。这些资料最好从细胞来源实验室获得，也可引用正式发表文献。

人源细胞系/株须具有细胞系/株的组织或器官来源、种族及地域来源、年龄、性别、健康状况及病原体检测结果的相关资料。

动物来源的细胞系/株须具有动物种属、种系、饲养条件、组织或器官来源、地域来源、年龄、性别、供体的一般健康状况及病原体检测结果的相关资料。

如采用已建株的细胞系/株，应具有细胞来源的证明资料。应从能够提供初始细胞历史及其溯源性书面证明材料的机构获得，且应提供该细胞在该机构的详细传代记录，包括培养过程中所使用的所有原材料的详细信息，如种类、来源、批号、生产日期及有效期、制备或使用方法、质量标准及检测结果等。

2. 细胞系/株培养历史的资料

应具有细胞分离方法、细胞体外培养过程及细胞系/株建立过程的相关资料，包括所使用的物理、化学或生物学手段，外源插入序列，筛选细胞所进行的任何遗传操作或筛选方法、在动物体内传代过程以及细胞生长特征、培养液成分等；同时还应具有细胞鉴别、内源及外源因子检查结果的相关资料。

应提供细胞传代历史过程中所用的细胞培养液的详细成分并应具有溯源性，如使用人或动物源性成分，如血清、胰蛋白酶、乳蛋白水解物或其他生物学活性的物质，应具有这些成分的来源、批号、制备方法、质量控制、检测结果和质量保证的相关资料。

（二）细胞培养操作要求

细胞取材、建库及制备全过程应具有可溯源性及操作的一致性，并对各个环节的风险进行充分的评估。

1. 细胞来源供体

所有类型细胞的供体应无传染性疾病或未知病原体的疾病。神经系统来源的细胞不得用于疫苗生产。

2. 原材料的选择

与细胞培养相关的所有材料，特别是人源或动物源性材料，应按照本版药典的相关要求进行风险评估，选择与生产相适应的原材料，必要时进行检测。所有生物源性材料均应无细菌、真菌、分枝杆菌、支原体及病毒等外源因子污染。细胞培养过程中所用的牛血清及胰酶应符合本版药典的相关要求。

细胞培养液中不得含有人血清。如果使用人血白蛋白，应使用获得国家药品监督管理部门批准的人用药品。

细胞制备过程中不得使用青霉素或其他 β -内酰胺(β -Lactam)类抗生素。配制各种溶液的化学药品应符合本版药典（二部）或其他相关国家标准的要求。

3. 细胞培养体系

应控制对细胞生长有重大影响的、关键的已知可变因素，包括规定细胞培养液及其添加成分的化学组成及纯度；所有培养用试剂应有制备记录并经检定合格后使用，应规定细胞培养的理化参数（如 pH 值、温度、湿度、气体组成等）的变化范围并进行监测，以保证细胞培养条件的稳定性。

4. 细胞收获及传代

应结合生产工艺的特性，尽可能减少对细胞的操作。细胞收获及传代应采用可重复的方式，以保证收获时细胞的汇合率、孵育时间、温度、离心速度、离心时间以及传代后活细胞接种密度具有一致性。

传代细胞需根据细胞系的特点选择体外细胞龄计算方式。

二倍体细胞的细胞龄通常以群体倍增水平计算，也可以每个培养容器细胞群体细胞数为基础，每增加 1 倍作为 1 世代粗略估算，即 1 瓶细胞传 2 瓶(1:2 分种率)，再长满瓶为 1 世代；1 瓶细胞传 4 瓶(1:4 分种率)为 2 世代；1 瓶细胞传 8 瓶(1:8 分种率)则为 3 世代。根据稳定性研究数据确定生产用细胞龄。限制在细胞寿命期限的前 2/3 内。

连续传代细胞系的细胞龄可以群体倍增水平计算，也可以按照固定的方式传代，如固定比率进行传代，每传 1 次视为 1 代，或按固定培养天数计算。

5. 细胞系建立

细胞系建立过程中进行了对细胞特性有重要影响的操作，如导致细胞具有了成瘤性，或经细胞克隆及遗传修饰等操作的细胞，应被视为一个新的（或不同的）细胞系，应在原细胞名称后增加后缀或编号重新命名，并重新建立主细胞库。

在细胞克隆过程中，应选择单个细胞用于扩增，详细记录克隆过程，并根据整合的重组 DNA 的稳定性、细胞基因组及表型的稳定性、生长速率、目的产物表达水平和完整性及稳定性，筛选具有分泌目的蛋白最佳特性的候选克隆，用于建立细胞种子。

6. 细胞冻存

应在大多数细胞处于对数生长期时进行细胞冻存。应采用符合细胞培养物的最佳冻存方法；每一次冻存时均应采用相同的降温过程，并记录冻存过程。

每一个细胞库冻存时，应将同一次扩增的处于相同倍增水平的细胞培养物合并，混匀后分装。每支冻存管中的细胞数应足以保证细胞复苏后可获得有代表性的培养物。

对于一个新的细胞库，除早代培养物在组织采集时或重组细胞筛选时可能需要使用抗生素外，细胞建库培养时不应使用抗生素。

7. 人员

生产人员应定期检查身体，已知患有传染性疾病的人员不能进行细胞培养的操作。在生产区内不得进行非生产制品用细胞或微生物的操作；在同一工作日进行细胞培养前，不得操作接触动物或操作有感染性的微生物。

（三）细胞库

细胞库的建立可为生物制品的生产提供检定合格、质量相同、能持续稳定传代的细胞。

细胞建库应在符合中国现行《药品生产质量管理规范》的条件下制备。

1. 细胞库的建立

生产用细胞库通常为二级库，包括主细胞库（MCB）和工作细胞库（WCB）。如有细胞种子，也应纳入管理。

（1）细胞种子（Cell seed）

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，通过检定证明适用于生物制品生产。在特定条件下，将一定数量、成分均一的细胞悬液，定量均匀分装于一定数量的安瓿或适宜的细胞冻存管，于液氮或-130℃以下冻存，即为细胞种子，供建立主细胞库用。

对于引进细胞，生产者获得细胞后，冻存少量细胞，经过验证可用于生物制品生产，此细胞可作为细胞种子，供建立主细胞库用。

（2）主细胞库(MCB)

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同次均匀地混合成一批，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℃以下，即可作为主细胞库，用于工作细胞库的制备，生产企业的主细胞库应限定代次并检定合格。

（3）工作细胞库(WCB)

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，达到一定代次水平的细胞，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℃以下，即为工作细胞库。生产企业的工作细胞库必须限定代次。冻存时细胞的传代水平须确保细胞复苏后传代增殖的细胞数量能满足生产一批或一个亚批制品。复苏后细胞的传代水平应不超过批准用于生产的最高限定代次。所制备的 WCB 必须经检定合格[见本通则“一、（四）细胞检定”中有关规定]后，方可用于生产。

2. 细胞库的管理

主细胞库和工作细胞库应分别存放。每一个库应在至少 2 个不同的地点或区域存放，可选择在生产设施内和/或与生产设施有一定距离的地点。当存放地点较远时，应使用有质量保障的容器运输，并监测运输温度。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。

非生产用细胞应与生产用细胞严格分开存放。

每种细胞库均应分别建立台帐，详细记录放置位置、容器编号、分装及冻存数量、取用情况等。细胞库中的每支细胞均应可追溯其细胞系/株名、代次、批号、编号、冻存日期等信息。

为保证细胞冻存后仍具有良好的活力，冻存后应取一定量的可代表冻存全过程的冻存管复苏细胞，复苏后细胞的活力一般应不低于 80%。若复苏后细胞活力

低于 80%，应进行充分评估并有验证数据支持。~~二倍体细胞冻存后，应至少做一次复苏培养并连续传代至衰老期，检查不同传代水平的细胞生长情况。~~细胞冻存后，可通过定期复苏细胞及复苏~~后~~细胞的活力数据确认细胞在冻存及贮存条件下的稳定性。

（四）细胞检定

细胞检定主要包括以下几个方面：细胞鉴别、外源因子和内源因子的检查、成瘤性/致瘤性检查等。必要时还须进行细胞生长特性、细胞染色体检查，细胞均一性及稳定性检查。这些检测内容对于 MCB 细胞、WCB 细胞、生产终末细胞(EOPC)或生产限定代次细胞均适用。

应对细胞来源、培养及建库过程进行风险评估，并制定检定策略。通常应至少对 MCB 细胞及 EOPC 细胞或生产限定代次细胞进行一次全面检定，WCB 细胞进行部分检定。如对 MCB 细胞不能进行全面检定，可对首个 WCB 细胞进行全面检定，后续建立的 WCB 细胞可通过评估后进行部分检定。当生产工艺发生变更时，需经评估，必要时应重新对 EOPC 细胞或生产限定代次细胞进行检测。细胞检定的基本要求见表 1。

表 1、 细胞检定项目的要求

检测项目		MCB	WCB	<u>生产终末细胞</u> <u>-(EOPC)-</u> ^a / <u>生产限定代次细胞</u>
细胞鉴别		+	+	+
细菌、真菌检查		+	+	+
分枝杆菌检查		(+) ^b	(+) ^b	(+) ^b
支原体检查		+	+	+
<u>螺原体检查</u>		<u>(+)</u>	<u>(+)</u>	<u>(+)</u>
内、外 源病 毒污 染检 查	体外不同细胞接种培养法	+	+	+
	动物和鸡胚体内接种法	(+) ^c	-	(+) ^c
	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	(+)	(+)	(+)
成瘤性检查 ^d		(+)	(+)	<u>(+)</u> =
致瘤性检查 ^d		(+)	(+)	-
稳定性		(+)	<u>(+)</u> =	<u>-(+)-</u>

- “+”为必检项目，“-”为非强制检定项目。

(+)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. 生产终末细胞-EOPC，是指达到在或超过生产末期时收获的细胞，尽可能取按生产规模制备的生产末期细胞。b.对分枝杆菌易感的细胞进行该项检查。

c.根据风险评估结果确定是否进行体内实验，如在建库或细胞培养过程中存在外源因子引入的风险，可保留动物进行体内实验或用经验证的NGS法替代。

d. 表示MCB或WCB，从MCB或WCB复苏细胞，扩增至或超过生产用细胞龄限制代次作为待检样本。

1. 细胞鉴别试验

MCB细胞、WCB细胞和生产终末细胞或生产限定代次细胞应进行鉴别试验，以确认所用细胞正确，且无其他细胞的交叉污染。重组细胞系的专属特性的鉴别，还应通过检测目的蛋白基因或目的蛋白进行鉴别试验。细胞鉴别试验方法有多种，包括细胞形态、生物化学法(如同工酶试验)、免疫学检测(如组织相容性抗原、种特异性免疫血清)、细胞遗传学检测(如染色体核型、标记染色体检测)、遗传

标志检测[如 DNA 指纹图谱, 包括短串联重复序列 (STR)、限制片段长度多态性 (RFLP-PCR) 和内含子多态性 (EPIC-PCR) 法等]以及其他方法 (如杂交法、PCR 法、报告基因法等)。应至少选择上述一种或几种方法对细胞进行种属和细胞株间及专属特性的鉴别。种属鉴别可依法检查 (通则 3430)。

2. 细菌、真菌检查

分别取混合细胞培养上清液和冻存细胞管样品, 依法检查 (通则 1101), 应符合规定。对于 MCB 及 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。对于冻存管细胞, 至少取冻存管细胞总支数的 1%或至少 2 支冻存细胞管 (取量大者), 可采用直接接种法检测。

3. 分枝杆菌检查

取至少 10^7 个活细胞用培养上清液制备细胞裂解物进行分枝杆菌检查。

取细胞裂解物接种于适宜的固体培养基 (如罗氏培养基或 Middlebrook 7H10 培养基), 每个培养基接种 1mL 并做 3 个重复, 并同时以不高于 100CFU 的草分枝杆菌菌液作为阳性对照。将接种后的培养基置于 37℃ 培养 56 天, 阳性对照应有菌生长, 接种供试品的培养基未见分枝杆菌生长, 则判为合格。

也可采用经过验证的分枝杆菌核酸检测法替代培养法。

4. 支原体/螺原体检查

取细胞培养上清液或细胞悬液样品, 依法进行支原体检查 (通则 3301), 应符合规定。

如为昆虫细胞, 或细胞培养过程中使用了植物源性材料, 应进行螺原体检查, 所用方法如培养法或核酸法应能检测中间原体属和虫原体属。

5. 细胞内、外源病毒因子检查

应注意检查细胞系/株中是否有来源物种中潜在的可传染的病毒, 以及由于使用的原材料或操作带入的外源性病毒。细胞进行病毒检查的种类及方法, 须对细胞的种属来源、组织来源、细胞特性、建株及传代历史、培养方法和过程等进行风险评估后确定。如 MCB 进行了全面检定, WCB 需检测的外源病毒种类可主要考虑从 MCB 到 WCB 传代过程中可能引入的病毒, 而仅存在于 MCB 建库前的病毒可不再重复检测。

(1) 体外培养法检测病毒因子

用细胞培养上清制备活细胞或细胞裂解物作为待测样本, 分别接种至少下

列三种指示细胞，包括猴源细胞、人二倍体细胞和同种属来源的细胞。对于昆虫细胞，还应至少增加两种敏感的指示细胞进行检测，一种为对虫媒病毒易感的蚊子细胞，也可使用 BHK21 细胞。另一种为对多种昆虫病毒易感的细胞，如果蝇胚胎来源细胞。细胞裂解物应采用细胞悬液或用培养细胞后的上清重悬细胞样本制备。待测样本检测前，可于-70℃或以下保存。

每种指示细胞至少接种 10^7 个活细胞或相当于 10^7 个活细胞的裂解物。接种细胞后应至少培养 28 天，期间可至少传代一次，可将细胞培养物裂解后再接种于新鲜制备的指示细胞，或直接传代。观察细胞病变，并在观察期末取细胞培养物进行血吸附试验；取细胞培养上清液进行红细胞凝集试验。

分别用 0.2%~0.5% 豚鼠红细胞、鸡红细胞悬液或混合红细胞悬液进行血吸附试验和红细胞凝集试验。将红细胞悬液加入细胞培养容器，一半置于 2~8℃ 孵育 30 分钟，一半置于 20~25℃ 孵育 30 分钟，分别进行镜检，观察红细胞吸附情况。取细胞上清液从原倍起进行倍比稀释后，加入混合红细胞，先置 2~8℃ 孵育 30 分钟，然后置于 20~25℃ 孵育 30 分钟，分别观察红细胞凝集情况。新鲜红细胞在 2~8℃ 保存不得超过 7 天，且溶液中不应含有钙、镁离子。

接种的每种指示细胞不得出现细胞病变，血吸附试验及红细胞凝集试验均应为阴性。试验应设立病毒阳性对照，包括可观察细胞病变的病毒阳性对照、血吸附阳性对照及血凝阳性对照。如待检细胞裂解物对指示细胞有干扰，则应排除干扰因素。

(2) 动物体内接种法检测外源病毒因子

用待检细胞培养上清液制备活细胞（或适宜时采用相当量的细胞裂解物），接种动物体内进行外源病毒因子检测。待检细胞至少应接种乳鼠、成年小鼠和鸡胚(两组不同日龄)共计 4 组。按表 2 所列方法进行试验和观察。接种后 24 小时内动物死亡超过 20%，试验无效。

表 2 动物体内接种法检测外源病毒因子

动物组	要求	数量	接种途径	细胞浓度 (个活细胞/ml)	接种细胞液量 (ml/只)	观察天数
乳鼠	24 小时内	至少 20 只 (2 窝)	脑内 腹腔	$>1 \times 10^7$	0.01 0.1	21 天
成年小鼠	15~20g	至少 10 只	脑内 腹腔	$>1 \times 10^7$	0.03 0.5	21 天
鸡胚 ^①	9~11 日龄	10 枚	尿囊腔 ^①	$>5 \times 10^6$	0.2	3~4 天
鸡胚	5~7 日龄	10 枚	卵黄囊	$>2 \times 10^6$	0.5	5 天

豚鼠	350~500g	5 只	腹腔	$>4 \times 10^5$	5.0	至少 42 天, 观察期 未解剖所有动物
家兔	1.5~2.5kg	5 只	皮下 皮内 [®]	$>2 \times 10^5$	9.0 0.1 $\times 10$	至少 21 天

①经尿囊腔接种的鸡胚, 在观察末期, 应用豚鼠和鸡红细胞悬液或混合红细胞悬液进行直接红细胞凝集试验。

②每只家兔于皮内注射 10 处, 每处 0.1ml。

观察期内, 如被接种动物出现异常或疾病应进行原因分析, 观察期内死亡的动物应进行大体解剖观察及组织学检查, 以确定死亡原因。如动物显示有病毒感染, 则应采用培养法或分子生物学方法对病毒进行鉴定。如观察期内超过 20% 的动物出现死亡, 且可明确判定为因动物撕咬所致, 试验判定为无效, 应重试。

观察期末时, 符合下列条件判为合格。

①乳鼠和成年小鼠接种组 至少应有 80% 接种动物健存, 且小鼠未显示有可传播性因子或其他病毒感染。

②鸡胚接种组 卵黄囊接种的鸡胚至少应有 80% 存活, 且未显示有病毒感染; 尿囊腔接种的鸡胚至少应有 80% 存活, 且尿囊液红细胞凝集试验为阴性。③豚鼠接种组 至少应有 80% 接种动物健存, 且动物未显示有可传播性因子或其他病毒感染。

④家兔接种组 至少应有 80% 接种动物健存, 且动物未显示有可传播性因子或其他病毒感染 (包括接种部分损伤)。

(3) 逆转录病毒检测

可采用下列方法对待检细胞进行逆转录病毒的检测。

①逆转录酶活性测定 采用敏感的方法, 如产物增强的逆转录酶活性测定法 (PERT 或 PBRT 法) (本通则附录 1 或其它适宜的方法, 但灵敏度不得低于现行方法), 但由于细胞中某些成份也具有逆转录酶活性, 因此, 逆转录酶阳性的细胞, 应进一步确认是否存在感染性逆转录病毒。除已知产生逆转录病毒的细胞外, 均应进行逆转录酶活性测定。

②透射电镜检查法

采用超薄切片法对至少 200 个活细胞进行透射电镜检查。

③PCR 法或其他特异性体外法 根据细胞的种属特异性, 在逆转录酶活性结果不明确或不能采用逆转录酶活性测定时, 可采用种属特异性的逆转录病毒检测法, 如逆转录病毒 PCR 法、免疫荧光法、ELISA 法等, 逆转录病毒的定量 PCR 法还可

用于逆转录病毒颗粒的定量。

④感染性试验 将待检细胞感染逆转录病毒敏感细胞，培养后检测。根据待检细胞的种属来源，须使用不同的或多种敏感细胞进行逆转录病毒感染性试验。如 Mus dunni 细胞用于鼠逆转录病毒的检测，SC-1 细胞用于亲嗜性逆转录病毒的检测，人源细胞系用于昆虫逆转录病毒的检测等。终点检测方法可选择 PERT 试验、S⁺L 实验或 XC 空斑试验等。

上述方法具有不同的检测特性，逆转录酶活性提示可能有逆转录病毒存在，透射电镜检查及特异性 PCR 法可证明是否有病毒性颗粒存在并进行定量，感染性试验可证明是否有感染性的逆转录病毒颗粒存在，因此应采用不同的方法联合检测。若细胞逆转录酶活性检测为阳性，则需进行透射电镜检查或 PCR 法及感染性试验，以确证是否存在逆转录病毒颗粒及是否具有感染性。可产生感染性逆转录病毒颗粒，且下游工艺不能证明病毒被清除的细胞基质不得用于生产。

已知产生逆转录病毒的细胞，如啮齿类动物来源的细胞、昆虫细胞及禽源性细胞，可不进行逆转录酶活性检测，但应进行逆转录病毒颗粒的类型、数量及感染性的检查。

对于已有丰富先验知识的细胞系，如 CHO、NS0、Sp2/0、Vero 等，不需要进行化学诱导试验。对于新的细胞基质，采用化学诱导试验有助于评估细胞中是否存在未知的可被诱导的内源性逆转录病毒。对潜在的 DNA 病毒（如人源细胞中的疱疹病毒）和 RNA 病毒（如昆虫细胞中的诺达病毒），基于风险评估结果，也可使用化学诱导试验进行检测。

对于特定啮齿类细胞（如 CHO、BHK-21、NS0 和 sp2/0）或昆虫细胞，还应确定其收获液中病毒颗粒的量及其是否具有感染性，并应在生产工艺中增加病毒去除和（或）灭活工艺。仅有高度纯化且可证明终产品中逆转录病毒被清除至低于现行检测方法的检测限以下时，方可使用这类细胞。

（4）种属特异性外源病毒因子的检测

应根据细胞系/株种属来源、组织来源及供体健康状况等确定检测病毒的种类。若在 MCB 或 WCB 中未检测到种属特异性病毒，后续过程中如无引入风险，不再进行重复检测。

鼠源的细胞系，可采用小鼠、大鼠和仓鼠抗体产生试验（MAP、RAP 及 HAP）或经验证的分子生物学方法检测其种属特异性病毒。

人源的细胞系/株，应考虑检测如人肝炎病毒（HAV、HBV、HCV）、人逆转录病毒（HIV-1/2、HTLV-1/2）、人细小病毒 B19、人乳头瘤病毒、人多瘤病毒、人腺病毒、人 EB 病毒、人巨细胞病毒（HCMV）和人疱疹病毒-6/7/8 等。

猴源细胞系/株应考虑检测猴多瘤病毒（如 SV40）、猴泡沫病毒（SFV）、猴免疫缺陷病毒（SIV）、猴逆转录病毒（SRV）、猴 T 细胞嗜淋巴病毒（STLV）等。

昆虫细胞系，应考虑检测已报告污染的特定病毒（如诺达病毒），或可能持续存在于昆虫细胞系中并已知对人类具有传染性的病毒。

这类病毒的检测可采用适当的体外检测技术，如分子检测技术，但所用方法应具有足够的灵敏度，以保证制品的安全。

（5）牛源性病毒检测

若在生产者建库之前，细胞基质在建立或传代历史中使用了牛源性材料，如牛血清或牛胰酶，则所建立的 MCB 或 WCB 和（或）EOPC/生产限定代次细胞生产终末细胞至少应按照通则 3604 的要求检测一次牛源性病毒。取待检细胞用培养上清液制备成至少相当于 10^7 个活细胞/ml 的裂解物，进行检测。如果在后续生产过程中不再使用牛血清，且 MCB 或 WCB 和（或）EOPC/生产限定代次细胞检测显示无牛源性病毒污染，则后续工艺中可不再重复进行此项检测。

（6）猪源性病毒的检测

如果在生产者建细胞库之前，细胞基质在建立或传代历史中使用了猪源性材料，如猪胰酶，则所建立的 MCB 或 WCB 和（或）EOPC/生产限定代次细胞超过生产限定水平的细胞至少应检测一次与胰酶来源动物相关的外源性病毒，如猪细小病毒和猪圆环病毒等。如在后续生产过程中不再使用胰酶，且 MCB 或 WCB 和（或）EOPC/生产限定代次细胞检测结果显示无相关动物源性病毒污染，则后续工艺中可不再重复进行此项检测。如使用重组胰酶，应根据胰酶生产工艺可能引入的外源性病毒评估需要检测的病毒种类及方法。

（7）其他特定病毒的检测

根据细胞的特性、传代历史或生产工艺等确定检测病毒的种类。有些细胞对某些特定病毒易感，如 CHO 细胞可污染鼠细小病毒，采用上述检测方法无法检出，因此需要采用特定的方法检测，如特定感染试验或分子生物学方法等。

（8）分子生物学方法

分子生物学方法包括核酸扩增（NAT）法和二代测序（NGS）法。NAT 法，如

PCR 法，可用于特定的病毒检测。NGS 法适用于广谱和特定的病毒检测。基于风险评估结果，广谱的 NGS 法可用于替代体内法，也可用于补充或替代体外法（如缺少病毒易感细胞或样品对检测存在干扰或毒性）。

应使用合适的参考物质对 NGS 法进行方法验证或确认。病毒标准物质应由不同特性的病毒组成，包括不同物理特性（大小，有/无包膜）、不同化学特性（低、中和和高抗性）及不同基因组特性（DNA 或 RNA，双链或单链，线性或环状）。NGS 的验证或确认应支持其预期用途，当作为替代方法时，包括方法验证及样本适用性确认。当作为补充方法时，包括方法的确认和样本适用性确认。方法验证参数至少应包括专属性、病毒检测范围及灵敏度，并预先设定可接受标准。

对 NGS 阳性结果应进一步确认检测到的核酸是否与感染性病毒相关。

6. 成瘤性检查

成瘤性检查是确定细胞基质在动物体内是否能够形成肿瘤，是对细胞特性的鉴定。

新建细胞系/株及新型细胞基质应进行成瘤性检查。

某些传代细胞系已证明在一定代次内不具有成瘤性，而超过一定代次则具有成瘤性，如 Vero 细胞，因此必须进行成瘤性检查。

用于疫苗生产的细胞系/株应进行成瘤性检查，但当未经遗传修饰的二倍体细胞被证明无成瘤性后，可不作为常规检查要求。

已证明具有成瘤性的传代细胞，如 BHK21、CHO、HEK293、C127、NS0 细胞等，或细胞类型属成瘤性细胞，如杂交瘤细胞，用于生产治疗性制品时可不再做成瘤性检查。

昆虫细胞或禽源细胞进行体内成瘤性检查时，需评估方法的适用性，如细胞生长温度是否与哺乳动物物种的体温相适应。

成瘤性检查的方法见本通则附录 2。具有成瘤性的新建细胞或新型细胞基质，需采用定量的方法进一步分析细胞成瘤性的大小，并计算该细胞的半数致瘤量（TPD₅₀），并根据生产工艺及制品的特性，评估成瘤性的风险。

体内法是成瘤性评价的标准，但对于某些细胞，也可采用软琼脂克隆形成试验或器官培养试验等体外法检测细胞的成瘤性，特别是对于低代次、在动物体内无成瘤性的传代细胞系。体外法的结果可作为细胞成瘤性评价的参考。

7. 致瘤性检查：

致瘤性检查是保证细胞基质中不存在可使细胞永生化或诱导肿瘤形成的因子。细胞基质致瘤性可能与细胞 DNA（或其它细胞成份）或细胞基质中含有致瘤性因子相关。来源于肿瘤的细胞或因未知机制形成肿瘤表型的细胞，含有致瘤性物质的理论风险性相对较高。

已建株的二倍体细胞，如 MRC-5、2BS、KMB₁₇、WI-38 及 FRhL-2 新建主细胞库不要求进行致瘤性检查。

已建株的或有充分应用经验的连续传代细胞，如 CHO₇、NSO、Sp2/0、低代次的 Vero 细胞不要求进行致瘤性检查。

新型细胞基质，特别是成瘤性为阳性的细胞，用于疫苗生产时，需进行致瘤性检查。

可采用待测细胞裂解物和（或）细胞 DNA 按照本通则附录 3 的方法进行致瘤性检查。如根据细胞基质的表型或来源疑似有致瘤性病毒，建议用细胞基质裂解物接种动物进行致瘤性检查；若细胞基质具有成瘤性表型，建议用细胞 DNA 接种动物进行致瘤性检查。

对致瘤性检查中出现进行性结节的细胞，应开展进一步的研究，鉴别致瘤性因子或致瘤性活性，并确定细胞的可适用性。

8. 稳定性

细胞稳定性通常包括生产稳定性和贮存稳定性。在生产稳定性上，应评估 MCB/WCB 与 EOPC/生产限定代次细胞之间产品的产量和特性的一致性。对于重组细胞，还应确保评估 MCB/WCB 与 EOPC/生产限定代次细胞之间插入基因的序列、~~插入基因拷贝数~~、插入位点（如适用）、目的蛋白序列及翻译后修饰的一致性。对于二倍体细胞，从 MCB/WCB 至 EOPC/生产限定代次细胞还应确保细胞的二倍性。在贮存稳定性上，可通过生产中细胞复苏时的活力数据来评估。若长时间未生产，也可按照一定的时间间隔对贮存细胞的活力进行测定来评估。

（五）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本通则“一、（二）细胞培养操作要求”及“一、（三）1. 细胞库的建立”中有关规定。

从冻存的 WCB 或 MCB 中取出一支或多支安瓿，混合后培养，传至一定代次后供生产用。其代次不得超过该细胞用手批准用于生产的最高限定代次。生产用细胞的最高限定代次应根据研究结果确定，但不得超过国际认可的最高限定代次。

从 WCB 或 MCB 取出的细胞经增殖后获得的细胞不得再回冻保存用于生产。

病毒类制品生产对照细胞是指取与生产同一批次的细胞，按一定比例留取细胞样品，不接种目标病毒，与接种目标病毒的细胞采用相同的生产条件，平行培养至规定的时间。如生产中设置对照细胞，在生产末期，应取对照细胞，按本通则“一、（四）1. 细胞鉴别试验，2. 细菌、真菌检查，4. 支原体检查”以及病毒外源因子检查法（通则 3302）检查，应符合规定。

二、新建人二倍体细胞株的要求

新建的人二倍体细胞必须具有以下资料：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患等证明），以及胎儿父系及母系三代应无明显遗传缺陷疾病史的书面资料。

人二倍体细胞株应在传代过程的早期，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°C 下冻存，供建立细胞种子之用，待全部检定合格后，即可正式定为细胞种子，供制备 MCB 用。

1. 染色体检查及判定标准

新建人二倍体细胞株及其细胞库必须进行染色体检查。对于已建株的人二倍体细胞株，如 WI-38、MRC-5、2BS、KMB17 等，在建立 MCB 时可不必进行细胞染色体检查，但如对细胞进行了遗传修饰，则须按新建细胞株进行染色体检查。

（1）染色体检查

新细胞建株过程中，每 8~12 世代应做一次染色体检查，在 1 株细胞整个生命期内的连续培养过程中，应至少有 4 次染色体检查结果。每次染色体检查，应从同一世代的不同培养瓶中取细胞，混合后进行再培养，制备染色体标本片。染色体标本片应长期保存或保存电子图像数据，以备复查。应至少随机取 1000 个分裂中期细胞，进行染色单体和染色体断裂、结构异常和染色体数目（包括超二倍体、亚二倍体和多倍体）检查。其中至少选择 50 个分裂中期细胞，利用 G 分带或 Q 分带技术进行核型分析，并进行染色体结构检查，记录缺失、插入、倒位、易位及环状染色体数目等。

（2）判定标准

对 1000 个和 500 个中期细胞标本异常率进行检查，合格的上限（可信限 90% Poison 法）见表 3。

表 3 人二倍体细胞染色体分析标准

染色体分析项目	染色体异常细胞数上限		100（检查细胞数）
	1000（检查细胞数）	500（检查细胞数）	
染色单体和染色体断裂	47	26	8
结构异常	17	10	2
超二倍体	8	5	2
亚二倍体 ^①	180	90	18
多倍体 ^②	30	17	4

注：①亚二倍体如超过上限，可能因制片过程人为丢失染色体，应选同批号标本重新计数。

②一个分裂中期细胞内超过 53 条染色体，即为一个多倍体。

2. 无菌检查

每 8~12 世代细胞培养物，应进行无菌检查，依法检查（通则 1101），应符合规定。

3. 支原体检查

每 8~12 世代细胞培养物，应进行支原体检查，依法检查（通则 3301），应符合规定。

4. 病毒检查

二倍体细胞株传代过程中，至少对 2 个不同世代水平进行病毒包涵体及特定人源病毒检测[见本通则一、（四）5.（4）种属特异性外源病毒因子的检测]，结果应均为阴性。

5. 成瘤性检查

每 8~12 世代应做一次成瘤性检查，[方法见本规程 一、（四）6. 成瘤性检查]，结果应无成瘤性。

三、原代细胞的要求

原代细胞应来源于健康的动物脏器组织或胚胎，包括猴肾、地鼠肾、沙鼠肾、家兔肾、犬肾等动物脏器或动物的胎儿和其他组织，以及鸡胚和鹌鹑胚等正常组织，以适当的消化液消化、分散组织细胞进行培养，原代细胞不能建立细胞库，只能限于原始培养的细胞或传代少数几代内（一般不超过 5 代）使用，无法事先确定细胞代次。因此，只能严格规范管理和操作措施，以保证以原代细胞为

基质所生产的制品质量。

（一）动物组织来源和其他材料

1. 动物组织来源

应符合“凡例”的有关要求。对各种动物都应有明确健康状况和洁净级别要求。

2. 生产用猴

多采用非洲绿猴、恒河猴等，中国以恒河猴为主。应为笼养或小群混养的正常健康猴。动物用于制备细胞前，应有 6 周以上的检疫期，检疫期中出现病猴或混入新猴，应重新检疫。从外面新引入猴群应做结核菌素试验及猴疱疹 I 型病毒(B 病毒)的检查。

胎猴肾可用于生产，对其母猴应进行检疫。

（二）原代细胞培养物的检查

用于细胞制备的动物剖检应正常，取留的器官组织亦应正常，如有异常，不能用于制备细胞。

1. 细胞培养原材料检查及细胞培养操作

按本通则“一、（二）细胞培养操作要求”项进行。

2. 细胞培养物的检查

（1）细胞形态检查

细胞在接种病毒或用于生产前，其培养物均应进行外观检查和镜检，应无任何可疑、异常和病变，否则不得用于生产。

（2）细菌、真菌检查

依法检查（通则 1101），应符合规定。

（3）支原体检查

依法检查（通则 3301），应符合规定。（4）特定病毒检查

原代猴肾细胞培养应检查 SV40 病毒、猴免疫缺陷病毒和 B 病毒；应采用 Vero 或原代绿猴肾细胞、兔肾细胞检查。地鼠肾原代细胞应采用 BHK21 细胞培养检查。观察细胞形态，如有可疑应在同种细胞上盲传一代继续观察。

（5）对照细胞外源病毒因子检查

依法检查（通则 3302），应符合规定。

附录 1 逆转录酶活性检查法

本法系以噬菌体 MS2 RNA 为模板,经反转录后再采用实时荧光定量 PCR 法检测特异性扩增信号,从而测定供试品中的逆转录酶活性。

试剂

(1)供试品稀释液(A 液) 每 1LA 液含三羟甲基氨基甲烷—盐酸 (Tris-HCl,pH7.5) 25mmol,氯化钾 50mmol,二硫苏糖醇(DTT) 5mmol,乙二胺四乙酸二钠 (EDTA- Na_2) 0.25mmol, TritonX-100 25ml,甘油 500ml。配制时,最后添加 DTT,混合后分装, -20 保存,备用。

(2)供试品保存液(B 液) 每 1LA 液中含 1mg 亮抑蛋白酶肽、0.7mg 抑胃肽及 1mg 抑蛋白酶肽。

(3)引物及探针序列

上游引物: 5'-AAC ATG CTC GAG GGC CTT A-3'

反转录及下游引物: 5'-GCC TTA GCA GTG CCC TGT CT-3'

探针: 5'-(FAM)-CCC GTG GGA TGC TCC TAC ATG TCA- (TAMRA) -3'

(4)模板 噬菌体 MS2RNA

(5)反转录缓冲液 每 1L 反转录缓冲液含 Tris-HCl(pH8.3) 50mmol, 氯化钾 40mmol, 氯化镁 6mmol, DTT 2mmol, 脱氧核糖核苷酸 200 μmol ,下游引物 0.8×10^{-3} mmol。

(6)扩增缓冲液 可采用市售荧光定量 PCR 混合液 (Mix), 每 30 μl 反应体系中,加入上、下游引物各 2×10^{-8} mmol, 探针 6×10^{-9} mmol, 核糖核酸酶 A 10 μg 。若 Mix 中不含有 Taq DNA 聚合酶,可加入 2U 的 Taq DNA 聚合酶。

供试品、阳性对照及灵敏度样品的制备

(1)取供试品 200 μl ,每分钟 5000 转离心 5 分钟,取上清液 100 μl ,加入 B 液 100 μl 和焦炭酸二乙醇 (DEPC) 处理的 5%Triton X-100 2 μl ,混匀后,置冰浴 15 分钟后,置-70 保存备用。

(2)阳性对照 用 SP2/0 细胞培养上清液作阳性对照,同 (1) 处理后,按单次使用量分装, -70 保存备用。

(3)标准曲线及灵敏度供试品制备

取 0.5 μ l 莫洛尼氏鼠白血病病毒逆转录酶(M-MLVRT)(200U/ μ l)加至 99.5 μ l A 液中,上下吹打 10 次并涡旋混匀,即将 M-MLVRT 稀释为 10^{12} pU/ μ l(1U/ μ l)。以此样本为初始样本,取 5 μ l 至 45 μ lA 液中,上下吹打 10 次并涡旋混匀,如此方法进行 10 倍系列稀释至 10^3 pU/ μ l,每次稀释时均采用新吸头吸取样本。

取 $10^4\sim 10^9$ pU/ μ l 稀释度的 M-MLVRT 作标准曲线各点。 10^4 pU/ μ l 稀释度样本作为灵敏度供试品。置冰浴备用。

检查法

(1) 反转录

将已处理的供试品及阳性对照用 A 液做 10 倍稀释。

反转录反应管中加入反转录缓冲液 19.7 μ l, 800ng/ μ lMS2RNA 0.3 μ l,混匀后,标记, 70 放置 10 分钟,置冰浴。

在相应的反转录反应管中分别加入 5 μ l 已稀释的标准曲线样品、供试品、阳性对照及灵敏度供试品,以 A 液作阴性对照。反转录反应体系为 25 μ l。37 反应 4 小时。

(2) 实时荧光 PCR 扩增

取反转录产物 5 μ l 加至实时荧光 PCR 扩增缓冲液 25 μ l 中,反应总体系为 30 μ l。混匀后,按下列条件进行扩增: 37 7 分钟,预变性 95 5 分钟,然后 95 20 秒, 57 60 秒, 72 10 秒,进行 50 个循环,在 57 时采集信号,最后 72 延伸 2 分钟。

结果判定

(1) 实验方法灵敏度认可标准

灵敏度分析: 分别检测 10^4 pU/ μ l、 10^3 pU/ μ l 供试品各 10 个重复。至少 10^4 pU/ μ l 的供试品应全部检出 (10/10),实验方法的灵敏度为合格。

(2) 试验有效性

标准曲线 R 应不低于 0.960,阳性对照应为阳性, Ct 值应 ≤ 28 ;灵敏度对照应为阳性, Ct 值应 ≤ 38 ;视为试验有效。

(3) 待测样本结果判定

①如果待测样本无 Ct 值结果,或 Ct 值 ≥ 40 ,且无明显的扩增曲线,则判定

待测样本中逆转录酶活性为阴性。

②如果待测样本的 Ct 值结果<40, 且有明显的扩增曲线, 则按照下式计算样本中逆转录酶活性单位: 待测样本中逆转录酶活性单位 (pU/ml) = $A \cdot D \cdot 1000$

其中 A 为测定值, pU/μl; D 为样本稀释倍数, D=20。

注意事项

(1) 如供试品为培养细胞, 则将细胞传代后, 培养 3-4 天长成单层, 取上清液检测, 取供试品前不得换液。

(2) 试验中所有试剂及吸头均需灭菌。与 RNA 操作有关的试剂及材料均需经过 DEPC 处理。

(3) 标准品稀释时, 用新吸头吸取上一个稀释度样本加至下一个稀释管中, 反复吹吸 10 次, 并涡旋混合均匀, 然后换新吸头进行下一个稀释。

(4) 与样本相关的操作建议使用带滤芯吸头, 并注意实验分区。

(5) 定期对各区进行消毒, PCR 产物及其加供试品吸头应及时进行有效处理。

附录 2 成瘤性检查法

成瘤性是指待检细胞接种动物后, 接种细胞在动物体内形成 (肿) 瘤的过程, 成瘤性检查的目的是确定细胞接种动物后形成 (肿) 瘤的能力。

待检细胞制备

从 MCB 或 WCB 复苏细胞, 扩增至或超过生产用细胞龄限制代次 10 代以上, 收获细胞并悬于无血清液体中 (如 PBS), 制备成浓度为每 1ml 含 5×10^7 个活细胞的待检细胞悬液, 细胞活力应不低于 90%, 用于成瘤性检测。

阳性对照细胞

用 HeLa 或 HeLa S3 细胞或其它已知成瘤性为阳性的细胞, 扩增至所需细胞量, 用与待检细胞相同的液体悬浮细胞, 并制备成浓度为每 1ml 含 5×10^6 个活细胞的悬液, 细胞活力应不低于 90%, 作为阳性对照细胞。

阴性对照细胞

如需要, 可用人二倍体细胞作为阴性对照, 扩增至所需细胞量, 用与待检细胞相同的液体悬浮细胞, 制备成浓度为每 1ml 含 5×10^7 个活细胞的待检细胞悬液, 细胞活力应不低于 90%, 作为阴性对照细胞。

动物

下述两种动物可任选其一：

- ① 裸鼠 4~7 周龄，尽量用雌鼠，每组至少 10 只。如使用新生裸鼠，则为 3~5 日龄。
- ② 新生小鼠 3~5 日龄，体重 8~10g 小鼠，每组 10 只，在出生后第 0 天、第 2 天、第 7 天和第 14 天，分别用 0.1ml 抗胸腺血清 (ATS) 或球蛋白处理后用于试验。

动物接种

待检细胞组每只裸鼠皮下或肌肉注射待检细胞 0.2ml (即每只裸鼠接种 10^7 个活细胞)；阳性对照组每只注射阳性对照细胞 0.2ml，含 10^6 个活细胞。皮下接种时细胞应接种于裸鼠背部区域，肌肉接种时细胞应接种于裸鼠大腿部位。对于弱成瘤性表型的细胞或新建细胞，最好再使用新生裸鼠进行成瘤性试验，每只接种 0.1ml 含 10^7 个活细胞。

观察

应定期观察及触摸所有动物在注射部位是否有结节形成，至少观察 16 周 (至少 4 个月)，前 3~6 周，每周观察 2 次，之后每周观察一次，并记录结果。

结果分析及判定

- ① 如注射部位有结节形成，应对结节进行双向测量，并记录每周的测量结果以判定结节是否为进行性、稳定还是消退。
- ② 阳性对照组应至少有 9 只动物有进行性肿瘤生长时，试验才视为有效。
- ③ 对出现的结节开始消退的动物，应在观察期末处死。不能形成进行性结节的细胞，不视为具有成瘤性。

细胞在动物体内没有形成进行性结节，但结节在观察期内始终存留，且具有瘤的组织病理学形态时，则需考虑是否需要开展进一步的检测，如延长观察时间或采用新生裸鼠或其它动物模型分析细胞是否具有成瘤性。

- ④ 在观察期末，处死所有动物，包括对照组动物，肉眼及显微观察注射部位及其他部位 (如心脏、肺、肝、脾、肾、脑及局部淋巴结) 是否有接种细胞增生。将这些组织用 3.7%-4.0% 甲醛溶液固定、切片，并用苏木精和伊红染色后进行组织病理学检查，判定接种细胞是否形成肿瘤或有转移瘤。如果有转移瘤形成，则需进一步分析转移瘤的性质及与原发瘤的相关性，并深入分析转移瘤形成的原

因。

⑤ 如待检细胞接种组 10 只动物中至少有 2 只在注射部位或转移部位形成瘤，并且组织病理学及基因型分析显示形成瘤的细胞性质与接种的细胞一致时，则可判定为待检细胞具有成瘤性。

⑥ 如待检细胞接种组 10 只动物中仅有 1 只形成瘤且满足⑤的条件，则待测细胞可能具有成瘤性，需要做一步的分析。

附录 3 致瘤性检查法

致瘤性是指将待检细胞的细胞成分接种动物后，诱导动物本身细胞形成肿瘤的特性，可参照下列方法进行检查。

接种动物及数量

采用新生（出生 3 日龄内）裸鼠、新生仓鼠及新生大鼠进行致瘤性检查，动物接种数量应多于成瘤性检查用量。

待检细胞

来源于 MCB 或 WCB 的细胞扩增至或超过生产用体外细胞龄至少 3~10 个细胞倍增水平，用于致瘤性检查。

对照

细胞裂解物阳性对照尚不明确，DNA 阳性对照可采用含有致瘤性基因的在动物体内可引起致瘤的 DNA 质粒。设置阴性对照可监测接种动物的自发肿瘤发生频率。设置阴性对照可根据具体情况而定，可采用 PBS 作为阴性对照。

供试品制备及接种

（1）细胞裂解物

采用对病毒破坏最小且能最大释放病毒的方法制备细胞裂解物，如可采用 3 次冻融及低速离心法，将样本悬浮于 PBS 中，取含 10^7 个细胞的裂解物 50~100 μ l 于肩胛骨处皮下接种新生裸鼠、新生仓鼠及新生大鼠。接种前应确认样本中无活细胞存在，以免影响结果的有效性。

（2）细胞 DNA

提取细胞基质全细胞 DNA 悬浮于 PBS 中，可适度进行超声波等剪切外理，

取 50~100 μ l 含不低于 100 μ g 的 DNA 样本分别于肩胛骨处皮下接种新生裸鼠、新生仓鼠及新生大鼠。阳性对照组应将阳性对照质粒与待测细胞 DNA 混合后接种，以确认待测样本无抑制效应。

结果观察、分析

(1) 每周观察并触摸接种部位是否有结节形成，应至少观察 4 个月。

(2) 观察期内如有 1 个或多个结节出现，则应每周双向测量结节大小并记录结果，以确定结节是进行性生长、保持稳定还是随时间而消退。有进行性结节生长的动物，当结节达到直径约 2cm 或国家规定的大小时应处死。

(3) 观察期末，所有动物均应处死，肉眼及显微观察接种部位或其他部位是否有瘤形成。任何疑似瘤均应采用适宜浓度甲醛溶液固定后进行组织学检查。如可行，建立细胞系并冻存后，以备进行后续的分子技术分析。

(4) 显微检查肝、心、肺、脾及局部淋巴结是否存在转移性损伤。如有肿瘤形成，则要分析与接种部位原发瘤的相关性；如组织学检查显示与原发瘤不同，则要考虑可能有自发瘤形成，这种情况需跟踪结果。

结果判定

(1) 观察期末，如接种部位或其他远端部位未观察到进行性生长肿瘤，可判定细胞为无致瘤性。

(2) 在致瘤性检查中形成的所有肿瘤均应检查其基因组 DNA，分析是否有细胞基质物种来源的 DNA 及接种动物来源的 DNA，致瘤性试验中形成的肿瘤应为接种动物宿主 DNA。保存所有的肿瘤样本，以备必要时开展深入研究。

(3) 对致瘤性检查中出现进行性结节的细胞基质，应考虑开展进一步的研究，鉴别致瘤性因子或致瘤性活性，并确定细胞的可适用性。

修订说明

- 1、二倍体细胞删除“生产用细胞龄限制在细胞寿命期限的前 2/3”内容，增加“应根据稳定性数据确定生产用细胞龄”。
- 2、补充完善生产终末细胞（EOPC）及生产限定代次细胞两种表述。
- 3、细胞检定表 1 增加螺原体检查条目，由于分子生物学方法涉及项目较多，正文已经表述，表格内不再增加此条目。
- 4、细胞检定表 1 成瘤性检查增加 EOPC 可选项，稳定性增加工作库可选检项，去掉 EOPC 可选检项。
- 5、动物体内接种法检测外源病毒因子表格继续保留豚鼠、家兔方法供参考使用。
- 6、生产稳定性的评估对象，由“确保”修改为“还应评估”翻译后修饰等的一致性。