

《软琼脂克隆形成试验》简要编制说明

一、标准起草的基本情况

软琼脂克隆形成试验是细胞成瘤性检验的体外实验方法。目前我国已有一款干细胞治疗产品通过附条件上市许可；截至 2024 年 12 月 25 日，共有 142 个干细胞新药申请临床试验；此外，作为药品早期研究的干细胞治疗产品有大量项目处于 IIT 阶段。随着干细胞治疗产品的快速发展，成瘤性作为安全性评价的核心指标之一，其检测方法的研究和标准化显得尤为重要。《中国药典》要求成瘤性检测方法以动物体内接种法为标准，对于低代次、在动物体内无成瘤性的细胞可以采用软琼脂克隆形成试验结果作为细胞成瘤性评价的参考。动物体内接种法检测成瘤性，实验周期长，需要实验动物，实验条件往往是检测单位不具备的。以细胞克隆培养为基础的软琼脂克隆形成试验，实验周期短，灵敏度高，更便于开展。《中国药典》虽然提出可以用软琼脂克隆形成试验进行细胞成瘤性评价，但未给出具体操作过程。目前国内外还没有软琼脂克隆形成试验操作过程标准。

建立此标准，旨在为干细胞治疗产品成瘤性体外实验提供科学、可靠的检验方法，减少使用单位对该方法的探索投入，便于行业内方法统一，利于同类产品不同单位检测结果认可接受。

本项目于 2021 年 12 月至 2023 年 5 月开展前期研究及多批样本测试；2023 年 9 月通过立项评审；2023 年 9 月至 2024 年 11 月针对不同组织来源的人间充质干细胞进一步开展研究、优化方法，在不同实验室开展方法测试；2025 年 1 月形成草案。

二、重要内容及主要工作情况

标准包含范围、规范性引用文件、术语和定义、符号和缩略语、实验环境、仪器与耗材、试剂、实验用细胞、实验分组、操作步骤、方法说明。

标准适用于人源间充质干细胞软琼脂克隆形成试验检测。

本标准由深圳市茵冠生物科技有限公司开展方法研究、方法学验证及多批样本测试；深圳市药品检验研究院针对此方法开展不同实验室的测试。

2021 年 12 月至 2023 年 5 月，开展方法前期研究、方法学验证及多批样本测试。

2023 年 8 月，在深圳市生物医药促进会申请标准立项。

2023 年 9 月，通过标准立项评审。

2023 年 9 月至 2024 年 10 月，针对不同组织来源的人间充质干细胞开展检测方法的深入研究、方法优化。

2024 年 10 月至 2024 年 11 月，深圳市药品检验研究院针对此方法开展不同实验室的测试。

2025 年 1 月，形成标准草案。

三、国内外相关标准概况

软琼脂克隆形成试验技术起源于细胞克隆实验，基于应用目的改良后的各种不同实验操作方法，广泛应用于药品研发、药品质量评价、毒理学及微生物领域相关研究等。

软琼脂克隆形成试验采用双层琼脂培养法，底层琼脂作为支撑，上层琼脂接种细胞，转化细胞系、肿瘤细胞系等永生化细胞可以在上层琼脂中增殖形成细胞集落，提示成瘤风险。FDA 有关使用动物细胞生产的生物制品的相关法规中指出，体外软琼脂克隆形成试验可为细胞成瘤性评价提供更多的信息。有研究比较软琼脂克隆形成试验与裸鼠体内接种法的检测结果，发现两者相关性较好，且前者更为灵敏。由于软琼脂克隆形成试验的实验周期短、操作简便，对于药品检验具有更强的可操作性，因此，建立此方法的标准操作有助于推动细胞治疗领域的方法统一。

经检索确认，国内外尚无软琼脂克隆形成试验的标准操作方法。

四、其他需要说明的事项

1. 培养基选择

人间充质干细胞领域初期研究中，很多实验采用类似“1640 培养基+FBS”等比较通用的培养基进行细胞培养。随着技术不断迭代以及对动物源物料潜在风险的考量，目前的研究单位或企业会采用专门开发的、性能更优的人间充质干细胞培养基及添加物（不含动物源成分）。此类配制后的完全培养基含物质种类更多、成分更复杂。现有市场上类似的人间充质干细胞培养基品牌众多，在软琼脂克隆形成试验方法开发研究中，我们也比较了通用培养基和专用培养基在细胞培养质量上的差异，为了使细胞在双层琼脂培养基生长时获得充分营养、保持细胞最佳生长状态，最终确定，软琼脂克隆形成试验细胞培养基选择为供试品在生产阶段使用的细胞培养基，这样既能保证细胞有充分的营养条件，又能避免生产阶段培养基和检测用培养基不同而导致细胞质量发生变化，从而影响软琼脂克隆形成试验的检测结果。

2. 双层琼脂配制

双层琼脂配制过程需要用琼脂糖和细胞培养基按照一定比例混合，商用细胞培养基多为 1× 的溶液，和琼脂糖混合后会降低细胞培养基营养成分的浓度，可能影响细胞生长。此外，高浓度的培养基粘稠度较高，会导致实验操作过程的不便。因此，为尽量减少细胞培养基浓度下降的比例及培养基粘稠度的影响，我们选择高浓度琼脂糖和 1× 细胞培养基混合的策略。经实验探索，确定最终采用 5% 琼脂糖和细胞培养基混合。

3. 检测限验证

检测限验证依据细胞计数结果对细胞样本梯度稀释、取样接种培养、观察克隆形成。方法早研阶段检测限探索到阳性 HeLa 细胞在 25cells/孔可检出阳性，本次拓展研究接种量设置为 10cells/孔、25cells/孔、50cells/孔，最终实验确认 10cells/孔可检出阳性。考虑到细胞计数方法本身的变异系数及样本多级梯度稀释的影响，评估后决定不再进行 10cells/孔以下检测限的探索。

4. 结果判定

按照《中国药典》规定，软琼脂克隆形成试验是细胞治疗产品体外成瘤性评价的辅助检测方法，在对多种组织来源的细胞进行测试研究后，我们认为可以按照本研究提供的方法操作进行检测实验。鉴于商用间充质干细胞培养基品牌众多，无法穷尽研究，因此使用方可以按照本方法开展测试及验证后再行常规的样本检测。本法采用定性评价进行结果判定。当结果有异常时，应开展动物实验并以体内试验结论为最终细胞成瘤性评价标准，动物实验具体方法见《中国药典》现行版三部通则《生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制》。