

## · 新药论坛 ·

## 关于人多能干细胞来源细胞治疗产品药学评价的思考

卢加琪\*

(国家药品监督管理局药品审评中心, 北京 100022)

**摘要:** 近年来, 按照药品研发并申报临床试验的干细胞治疗产品数量增加, 其研发技术与评价体系快速发展。国际上人多能干细胞 (human pluripotent stem cell, hPSC) 来源的干细胞治疗产品正处于 I/II 期临床试验阶段, 相关产品包括 hPSC 分化产生的神经元、视网膜色素上皮细胞、胰岛 beta 细胞等, 给药途径多为局部移植, 一般用于退行性疾病、遗传病相关功能细胞的修复和替换, 目前尚无同类产品上市。由于多能干细胞具有多向分化潜能, 兼具在体内形成畸胎瘤的能力, hPSC 来源的细胞产品与其他干细胞产品相比, 其成瘤性风险相对高、诱导分化周期长、生产工艺复杂、质量表征手段仍在快速更新中, 对其人体应用的科学评价构成了挑战。结合近期干细胞治疗产品临床试验申报资料审评和沟通交流过程中出现的问题, 参考相关技术指导原则, 本文围绕 hPSC 来源的细胞治疗产品的生产工艺和质量研究, 提出现阶段的药学审评考虑点, 以期增进研发者和监管方的交流。

**关键词:** 人多能干细胞; 细胞治疗产品; 生产工艺; 质量研究; 药学评价

中图分类号: R963 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)10-2478-08

## Chemistry, manufacturing, and controls regulatory considerations for human pluripotent stem cell-derived cellular products

LU Jia-qi\*

(Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing 100022, China)

**Abstract:** In recent years, the number of clinical trials of stem cell products has increased, and the research and development technology and evaluation system have developed rapidly. Human pluripotent stem cell (hPSC)-derived cellular products are in the phase I/II stage of clinical trials. Related products include hPSC-derived neurons, retinal pigment epithelial cells, pancreatic beta cells, etc. They are generally used for the repair and replacement of functional cells related to degenerative diseases and genetic diseases *via* local transplantation. So far, no similar products have been officially approved on market. As hPSC possesses multi-directional differentiation potential and the ability to form teratoma *in vivo*, compared with other stem cell products, hPSC-derived cellular products have relatively higher risk of tumorigenicity, longer differentiation induction cycle, more complex production process, together with the rapidly updating quality characterization methods, which pose challenges to the scientific evaluation of their human applications. Based on the problems in the recent review and communication of clinical trial applications of stem cell products, and with reference to the relevant technical guidelines, this paper proposes the chemistry, manufacturing, and controls review considerations on the manufacturing process and quality study of hPSC-derived cellular products. We hope to improve the communications between developers and regulators.

**Key words:** human pluripotent stem cell; cellular product; manufacturing process; quality study; pharmaceutical evaluation

收稿日期: 2020-02-24; 修回日期: 2020-03-28.

\*通讯作者 Tel: 86-10-85243055, E-mail: lujq@cde.org.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0171

近年来,干细胞药物的研发和临床转化不断获得突破性进展。目前正在开展临床研究的干细胞产品包括来源于人胚胎干细胞 (human embryonic stem cell, hESC) 和人诱导多能干细胞 (human induced pluripotent stem cell, hiPSC) 的细胞产品,也包括具有组织特异性分化能力的成体干细胞产品,其中 hESC 和 hiPSC 均属于人多能干细胞 (human pluripotent stem cell, hPSC) 产品。欧盟药品监督管理局 (European Medicines Agency, EMA) 自 2009 年至今已批准了 Holoclar 等自体干细胞治疗产品开展临床研究及上市<sup>[1]</sup>。2010 年,国际首个 hESC 来源的少突胶质前体细胞产品开始 I 期临床试验,并于 2019 年公布了其对脊髓损伤患者的潜在疗效<sup>[2]</sup>。2014 年,日本完成了首例自体 hiPSC 来源的视网膜色素上皮细胞移植治疗黄斑变性的手术,并于 2017 年进行了首例异体 hiPSC 细胞的移植<sup>[3]</sup>。2018~2019 年,hiPSC 来源的自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK) 经美国食品药品监督管理局 (The Food and Drug Administration, FDA) 同意进入临床试验,用于白血病和淋巴瘤的治疗<sup>[4]</sup>,日本厚生劳动省批准了 hiPSC 来源的神经前体细胞等开展临床试验<sup>[5]</sup>。截至 2020 年 2 月,在 clinicaltrials.gov 网站可查询到 63 个 hESC 来源和 97 个 hiPSC 来源的细胞产品正在或已经完成临床研究,多数用于治疗遗传病、罕见病等。

迄今我国有上百个干细胞治疗产品经国家卫健委备案开展了研究者发起的临床研究,取得了初步的人体安全性和有效性研究数据,部分产品已按药品申报临床试验。本文结合 hPSC 来源细胞产品研发单位与监管机构的沟通交流和审评实践,重点讨论相关药学研究评价要点,以供研发者与监管界讨论和交流。

## 1 药学研发特点与评价一般考虑

### 1.1 hPSC 来源细胞治疗产品的药学研发特点

1998 年, Thomson 等<sup>[6]</sup>首次在体外建立了 hESC, 并证明其具备向 3 个胚层分化的能力; 2006 年, Takahashi 等<sup>[7]</sup>发现了 4 个转录因子诱导小鼠成纤维细胞重编程为诱导多能干细胞的新方法。hPSC 包括 hESC 和 hiPSC, 具有较强的多向分化潜能及自我更新能力, 为再生医学产品研发和发育生物学研究提供了理想的研究材料<sup>[8]</sup>。

理论上, 各成体组织来源的干细胞也具有分化为功能细胞的能力, 可用于多种疾病的细胞替代治疗, 但相对于 hPSC, 成体干细胞分化增殖能力有限, 难以大量制备及生产, 且不同供者细胞的特性差异大, 难于确定适用的生产工艺及质量标准。胎儿组织来源的干细胞增殖能力高于成体干细胞, 但存在来源不稳定性与伦理问题, 其产业化发展及广泛使用受限。hPSC 的体外培养和诱导分化技术的发展实现了可调控 hPSC 定

向分化为各种功能细胞, 并能够维持细胞处于特定分化阶段 (如早期前体细胞、成熟功能细胞等), 从而使其按照药品研发及规模化生产成为可能<sup>[2]</sup>。根据现有科学认知和临床经验, 来源不同且分化程度、成熟度不同的细胞性质差异大, 相应的风险等级也不同。hPSC 来源细胞产品的临床应用劣势在于其理论上的成瘤性风险显著高于其他干细胞产品, 需加强相关研究<sup>[9, 10]</sup>。

hPSC 来源细胞产品的生产工艺和质量控制存在较多难点。在生产工艺方面, 不同类型的干细胞生产周期长短不一, 通常 hESC 或 hiPSC 建系建库需数月时间, 采用细胞库生产终产品的过程也需数十天的细胞增殖和诱导培养时间以形成终末分化细胞, 由于生产时间整体相对长, 因此需设置合理的贯穿整个生产周期的控制策略。采用自体细胞制备 hiPSC 用于自体移植时, 不同个体的细胞重编程能力和增殖分化能力差异较大, 固定的生产工艺参数对细胞命运的控制能力有限, 故探索较优的生产工艺参数范围面临着较大挑战。在细胞原材料选择方面, 对于异体干细胞治疗, 需考虑到免疫排斥的风险, 需选择免疫表型合适的供者或对供者细胞进行基因改造<sup>[11]</sup>。在产品质量标准方面, 由于 hPSC 来源细胞产品中的细胞类型多样, 虽然多能干细胞的鉴定和特性研究指标已经形成初步共识, 但分化功能细胞鉴定尚缺乏公认的分子标志物, 导致生物学活性的研究方法难以标准化。在临床使用方面, 由于给药途径、剂量和载药方式等不同, 不同产品间临床使用的安全性风险也具有较大差异。

### 1.2 药学评价一般考虑

2003 年, 我国药监局发布了《人体细胞治疗研究和制剂质量控制技术指导原则》。2015 年, 卫计委和药监局制定了《干细胞临床研究管理办法》和《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则》, 对干细胞临床研究和质量控制进行了规范<sup>[12]</sup>。2017 年 12 月, 国家食品药品监督管理总局颁布了《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则》, 提出了细胞药品注册申报的技术要求。国际上, FDA 颁布的《人体细胞组织良好操作规范》<sup>[13]</sup>和 EMA 颁布的组织和细胞指令《Directive 2004/23/EC》等为细胞制品生产提供了参考。2005 年, 国际上干细胞行业首个《良好细胞培养管理规范》出台, 该文件提出了体外细胞培养的操作要求、工艺开发、生产检定方法等参考标准, 并处于持续修订中<sup>[14]</sup>, 为细胞制品的药学研究提供了指南。

虽然 hESC 和 hiPSC 有潜力产生所有类型的成体细胞, 包括罕见的或难以获得的人类细胞群体, 但其生产过程中的诸多问题, 如培养基种类多、分化操作流程复杂和培养时间长, 使得细胞污染防控和工艺及批间

产品质量可控等因素得到关注。类器官<sup>[15]</sup>、三维培养技术<sup>[15]</sup>、器官芯片<sup>[16]</sup>等新型细胞组织产品和培养技术也影响着生产操作的标准化。对hPSC来源细胞产品的药学评价需综合考虑供体细胞或组织的获取、生产工艺、制剂贮存运输、临床给药操作和器械联用等诸多方面可能引入的风险,确保产品全生命周期的有效监管(图1)。

综上,hPSC来源细胞治疗产品的原材料多样、生产工艺复杂且质量变异性强,目前仍处于人体应用的安全性和有效性探索期。目前对干细胞产品风险评估的认知有限,一些特殊的细胞产品可能会突破现有标准体系,相关药学评价还需不断探索。下面主要针对hPSC来源细胞产品的生产工艺和质量控制提出药学评价的一般考虑点。

## 2 生产工艺研究

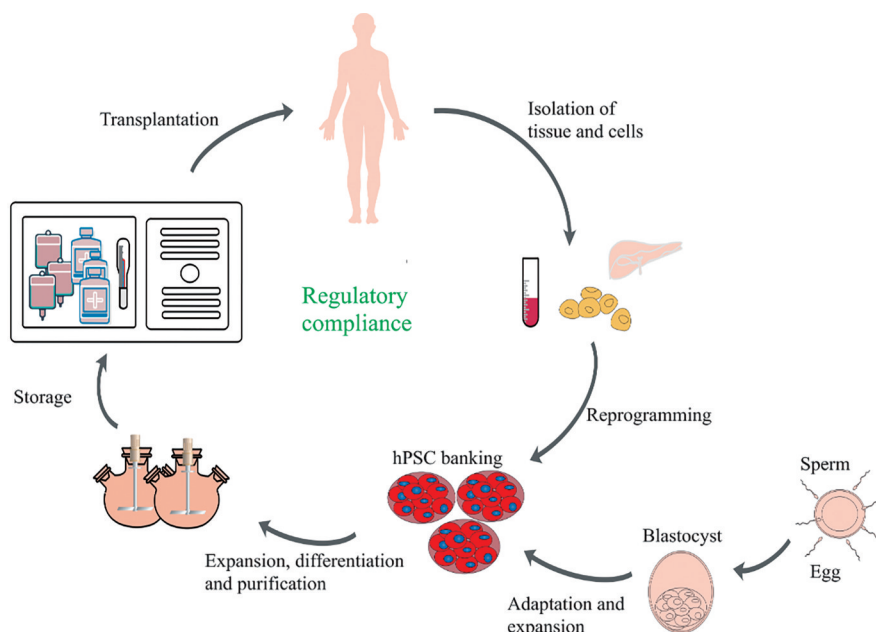
### 2.1 供者组织或细胞

细胞的合法来源及科学鉴定是干细胞药物生产的基础。供者细胞的获得需符合伦理,经供者知情同意。一般药物研发者在医疗机构获得供者组织后,运输至制备车间分离特定组织和细胞。申请人需要明确供者细胞的筛查标准,包括病原体筛查、遗传病检查等,申报时提供供者基本情况、健康状况的全面检查(如一般信息、既往病史和家族性遗传病等)结果,提供采集工艺流程、采集标准、质量控制、医院资质、手术环境、组织或细胞稳定性研究数据等。对于异体hiPSC细胞

产品,可根据供者、受试者人类白细胞抗原分型筛选匹配的供者<sup>[17]</sup>。细胞治疗产品的应用历史上曾出现过多例细胞污染、错误标记等导致的细胞系误用案例,相关统计数据表明,约18%~36%的细胞系存在错误鉴定的情况<sup>[18]</sup>。因此供者组织或细胞在获取、运输、生产全过程均应做好批号和标识管理,建立可追溯系统,同时建议在生产过程中开展细胞鉴别检测。细胞鉴别的方法包括核型分析、同工酶检测、短串联重复序列(short tandem repeat, STR)法等。目前国际上权威的细胞保存机构,如美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)、德国微生物及细胞典藏中心(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH)、日本理化研究所细胞库(RIKEN BRC Cell Bank)等均推荐采用STR法进行细胞鉴别。

### 2.2 生产用原材料

生产过程中使用的原材料,应严格进行供应商审计,根据《中国药典》建立原材料的内控标准。对于与细胞直接接触的细胞因子、抗体等,建议首选药用级别的产品。对于非药用研究级试剂,包括磁珠、抗体、重组蛋白等,应确定无外源因子污染且纯度和效价合格。供者细胞采集、分离和早期培养阶段常见加入抗生素,建议对供者细胞可能污染的微生物种类进行分析,说明所选抗生素种类的依据和添加量,同时考虑到过敏风险,建议尽量减少抗生素的合并使用和用量。对于以多能干细胞为起始物料的产品,应建立多能干细胞



**Figure 1** The lifecycle management of human pluripotent stem cell (hPSC)-derived cellular products. The lifecycle chain involves multiple steps of hPSC manufacture, including isolation of raw materials, *in vitro* reprogramming, hPSC line establishment, hPSC expansion, differentiation, cell banking, storage, and transplantation. Each step should be performed according to standard operation procedures under the supervision of regional drug administration



库,明确传代代次,并参考《中国药典》和国际标准进行全面检定,同时应开展传代稳定性研究,限定生产中使用的细胞代次。

虽然近年来无滋养层细胞培养工艺逐步成熟,但多能干细胞仍经常需要在滋养层细胞或细胞外基质上进行培养。常见的滋养层细胞包括鼠胚成纤维细胞和人成纤维细胞,细胞培养基质包括 Matrigel、Geltrex 和 Vitronectin 等。在基质的选择上,建议考虑基质的来源,有些滋养层细胞或基质(如 Matrigel)来自于小鼠肿瘤细胞,可能引入鼠源病毒等外源因子,并具有潜在致瘤性等安全性风险,需对其开展完整的病毒检测。建议尽可能避免使用动物来源的滋养层细胞,如必需使用,应建立细胞库并全面检定,对辐照等细胞灭活工艺进行合理的验证。

另外,在血清使用方面,应对血清添加的必要性和用量合理性等进行研究,建立血清残留检测方法并对其残留量进行研究和控制,制定相应的风险控制措施。鼓励采用无血清或成分明确的血清替代物进行细胞培养,尽可能减少动物源性成分引入的风险。

### 2.3 细胞培养工艺

人体临床试验用细胞需在符合《药品生产质量管理规范》的条件下生产。对于多能干细胞分化而成的干细胞产品,生产工艺中对不同分化阶段(胚层阶段、前体细胞阶段、中间分化阶段和终末分化阶段)细胞命运的精准调控是较大的挑战。对终末分化的细胞,在其扩增的同时如何控制其不再进一步分化或转分化,也是干细胞生产面临的难题之一。考虑到安全性,生产过程中还应关注细胞的遗传稳定性、外源因子或外源细胞可能的污染等因素。

在临床级多能干细胞的培养方面,细胞克隆的筛选和分化细胞的去除工艺是维持 hPSC 干性状态的关键工艺。筛选克隆时应识别嵌合克隆和异常增殖的克隆,否则可能导致细胞培养体系中出现大量异常增生的细胞。同时应加强对细胞密度、克隆形状、边缘光滑程度等的监控,尽量维持 hPSC 未分化状态。传代时,应对传代比例开展研究,系统分析 hPSC 随代次增加而出现的变化。hPSC 细胞在长期(数月)培养中极易积累基因突变,而具有特定突变的细胞的快速生长可能导致克隆的异质性乃至优势克隆的形成<sup>[19]</sup>。因此通常建议尽量缩短 hPSC 细胞培养的时间和传代代次,并在细胞培养状态稳定后及时冻存建库。世界卫生组织相关指导原则规定动物来源细胞基质建库时最长培养时间不得超过 3 个月,建议研发者建库时参考<sup>[20]</sup>。

由 hPSC 起始的分化工艺过程往往伴随较多的分化阶段、频繁的培养基更换操作和长期的培养时间。

在传代操作方面,针对 hPSC 可应用克隆机械分离法、化学/酶消化法等。hPSC 消化前一般需要将分化的细胞从培养皿中剔除,或者将克隆挑取后进行消化传代。不同大小的克隆所需的消化时间、操作过程等均不同,如对于较大的克隆,通常需延长化学消化时间。消化后的细胞团的大小、传代比例、机械力的强度、消化酶的浓度都可能是消化过程的关键工艺参数。临床级的 hPSC 在消化时应采用成分确定的消化液,尽量选择人工合成的消化酶,以减少动物来源物料的使用。在 hPSC 消化时常加入 Rho 相关蛋白激酶(Rho-associated protein kinase, ROCK)抑制剂用于减少细胞死亡,鉴于目前在长时间传代过程中加入 ROCK 抑制剂对细胞的影响仍不清晰,建议申请人开展研究,以说明其使用的合理性。

生产过程常见的细胞培养设备包括平底多层培养瓶、灌流生物反应器、搅拌式生物反应器等<sup>[21]</sup>。大规模平底多层培养瓶和搅拌式生物反应器最高约制备  $1 \times 10^{12}$  数量级的细胞,而灌流式生物反应器的培养面积有限,约能制备得到  $1 \times 10^8$  数量级的细胞。多层培养瓶成本低,但操作耗时长,且不能实时监控细胞代谢产物;而灌流/搅拌生物反应器均可持续给细胞提供生长空间,且可实时监测细胞培养体系的变化,缺点是成本高,培养过程中细胞可能受剪切力影响<sup>[22,23]</sup>。在工艺开发中,建议结合细胞制剂的生产规模、中控项目、剂量和细胞体内分布等特点选择培养仪器设备。

对于处在研发早期的细胞治疗产品,审评过程中常见实验室成果直接转化的生产工艺。在细胞治疗产品申请药品临床试验前,建议根据临床试验需要开展必要的工艺研究和开发,以明确工艺参数,并尽可能提高不同批次产品间质量的一致性。临床试验期间需对生产工艺稳健性和产品质量批间一致性开展深入研究。建议尽量避免在生产过程中出现多个小规模细胞培养皿/瓶同步培养后混合的过程,并应增强生产过程中的控制,以免发生污染或交叉污染。对于体外多次传代的细胞产品,建议开展细胞体外限传代次的研究,随着传代次数或培养时间的增加,分析细胞形态、增殖特性、染色体、成瘤/致瘤性的变化,以及是否发生癌基因突变,明确细胞制品的限传时间或限传代次。另外,建议申请人在细胞产品的生产过程中对细胞分化阶段进行控制,以使各阶段细胞的分化潜能、标志物表达等处于受控状态,并根据工艺过程确定细胞组成、纯度、功能分析的合理时间点。例如可以在细胞分离后、收获前,对细胞标志物、克隆形成能力和生物学功能(如分化能力和细胞因子分泌活性)等指标进行检测,确保细胞产品的质量符合要求。

## 2.4 制剂工艺

制剂工艺方面,干细胞制剂常使用冷冻制剂,如二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)或商业化的冷冻保护剂。研究者应对DMSO或冻存液的来源和级别进行严格审核,其中如含有动物源性成分应开展安全性评估。在制剂处方研究中,应对DMSO的冻存保护效果进行评估,包括贮存稳定性、临床使用稳定性、冻融稳定性等,同时关注制剂辅料和内包材的相容性。由于DMSO具有一定刺激作用,申报资料中应包括DMSO添加量的研究数据,对于直接输注的细胞产品,建议尽量降低处方中DMSO的用量。

在细胞制剂研发初期,制剂灌装常采用手动灌装工艺,应关注手动灌装时的装量一致性和含量均匀度,应开展充分的验证研究并加强生产过程控制,确保生产过程得到监控,并且保证不同批次间的一致性。另外,应结合生产工艺、生产设备、人员操作与管理规范等,制定防控不同批次产品的混淆、污染及交叉污染的措施,确保拟用于人体临床试验的批次无外源因子等污染,保证产品的安全性和质量的可控性。在进行规模化生产时,鼓励开发自动化灌装工艺,以提高产品的安全性和质量可控性。

## 3 质量研究与质量控制

### 3.1 质量研究

干细胞治疗产品的质量研究涉及分子标志物、分化潜能、纯度和杂质、微生物安全性等多个方面,对于hPSC来源细胞产品,还应关注产品中残留的多能干细胞的分析。下面针对审评中常见的补充资料内容进行论述。

**3.1.1 微生物安全性** 安全性一直是干细胞产品开展临床试验的首要关注点。国内外常有因干细胞产品污染而导致临床受试者出现严重不良反应的报道,常见的污染包括细菌、真菌和支原体的污染。干细胞给药前的无菌检测是控制细胞产品质量和保证患者安全的重要措施。按照药品标准申报的干细胞产品在临床试验前的安全性检测方法应经过完整验证。快速无菌检测方法通常包括微生物检定方法和自动化培养系统,如基于厌氧菌需氧菌指示培养的全自动微生物检测系统。快速支原体检测方法包括核酸扩增技术和支原体代谢酶活性检测等。当采用快速放行方法进行人用细胞终产品的检测放行时,建议与药典方法同步验证,说明快速方法是否可替换药典方法。对于生产过程中加入抗生素的产品,应考虑到抗生素对无菌检测的干扰作用。对于药品研发经验相对少的干细胞研究者,需注意对药典中涉及无菌和支原体等的验证方法,并需采用多种阳性对照菌株等进行全面研究,也可考虑委

托第三方检测机构开展系统研究。

**3.1.2 分子标志物和分化潜能** 目前大部分干细胞治疗产品处于研发早期阶段,相关基础性研究仍在不断开展。产品分子标志物的表达受到细胞内分布、分离培养操作、培养基成分、细胞分化阶段、衰老程度不同等因素的影响而不断变化<sup>[24]</sup>。例如:不同的干性基因[如阶段特异性胚胎表面抗原4(stage-specific embryonic antigen 4, *SSEA4*)基因和*NANOG*基因等]在不同重编程方法应用条件下,其在hiPSC细胞中的表达量可能不同<sup>[25]</sup>;在加入特定生长因子或在缺氧等培养条件下,部分干细胞的分子标志物可发生改变<sup>[26]</sup>。审评过程中,常见申请人选择文献资料报道的特定种类细胞的分子标志物,而忽略了对代表性细胞批次的质量研究。基于上述问题,建议申请人对申报工艺生产的临床试验样品进行分子标志物的研究,并选择与工艺阶段相对应且能反映产品质量的分子标志物。分子标志物的分析通常可使用流式细胞法、免疫荧光法等。检测方法应说明标志物在细胞中的分布、待测细胞的分离培养情况、抗体来源及类型等,并纳入合理的阴性和阳性对照,以便申报时可提供清晰的检测结果。

**3.1.3 成瘤性分析** hPSC来源细胞制品的成瘤性是阻碍其临床广泛使用的主要因素。多种途径均可能导致成瘤,一方面是hPSC细胞增殖传代及分化过程出现的恶性转化,另一方面是细胞成品中残留的hPSC导致了畸胎瘤的形成,尤其对于hiPSC还存在基因重编程导致的基因突变和染色体变异等问题<sup>[27]</sup>。来自1700株hiPSC和hESC细胞的核型分析数据表明<sup>[25]</sup>,核型异常的部分hiPSC和hESC细胞具有相似的染色体变异特征,如12号染色体重复。因此,用于人体的hPSC制品,建议在hPSC建库阶段采用染色体拷贝数变异分析、原位杂交技术(*fluorescence in situ hybridization*, FISH)、外显子测序、单核苷酸多态性阵列或单细胞测序技术等,进行染色体分析和基因测序,以选择基因变异少的克隆用于细胞制品制备。对于hPSC细胞分化过程中出现的恶性转化问题,建议针对生产过程和产品质量控制方面开展深入研究,持续监测细胞的染色体稳定性。

hPSC与肿瘤细胞具有多种相同的肿瘤分子标志物,最典型的是Myc,其对维持成瘤性和多能性具有重要作用,且其相关信号通路在hPSC分化后仍处于激活状态<sup>[27]</sup>。为了最大程度降低hPSC来源细胞制品的成瘤性风险,需研究者对生产过程中的诱导分化工艺和细胞增殖情况等进行研究,通过控制细胞的分化过程,尽可能去除成品中未分化的多潜能细胞,并去除发生染色体变异的细胞。目前已报道去除hPSC的方法包



括加入化学小分子抑制剂特异性诱导 hPSC 死亡/凋亡<sup>[28]</sup>, 或采用有利于终末分化细胞存活和培养条件(如缺氧、低糖等)以提高目标细胞纯度等<sup>[29]</sup>。对于 hiPSC 产品, 在导入转录因子重编程过程中引入安全性开关(如在转录因子基因中融合自杀基因)也是避免转录因子持续表达从而降低成瘤性风险的可能措施。然而, 引入安全开关同时也增加了外源基因整合的风险, 需谨慎评估风险-获益比, 判断其必要性<sup>[30]</sup>。

常见成瘤性检测方法包括畸胎瘤形成分析、软琼脂分析、核型分析或 FISH 等, 各种方法检测原理不同, 检测用时差异较大, 建议根据细胞培养阶段、细胞数量、放行时间等采用不同的方法互补检测。染色体分析方面, 建议尽可能增加分析细胞的个数, 可参考《中国药典》方法开展细胞染色体分析, 如至少选择 50 个分裂中期细胞进行显微照相核型分析, 或粗数 500 个分裂中期细胞检查多倍体发生率。可根据 G 带技术进行带型分析, 并结合国际人类细胞遗传学命名系统确定倒置、删除或易位断点。对于 hPSC 来源产品, 在质量控制中建议纳入多能干细胞的残留量检测, 检测方法包括标志物的流式分析、免疫组化分析或定量聚合酶链式反应分析等。对于体外多次传代的细胞, 应尽量选取低、中、高不同代次的细胞进行成瘤性和 hPSC 残留量分析, 以确保其在限定代次内的产品质量可控。

**3.1.4 纯度和杂质** 干细胞治疗产品的杂质通常包括生产用原材料残留和非目标细胞等, 杂质含量影响着产品的安全性和有效性, 应进行合理控制。由于不同细胞治疗产品的来源、制备工艺、给药方式和临床需求有差异, 对于杂质残留目前难以设定统一要求。拟定质量标准时, 建议提供多批次产品的杂质研究数据, 并根据除杂生产工艺参数(如洗涤次数、稀释倍数等确定理论残留量, 并针对工艺相关杂质(包括培养基组分、生长因子、消化酶等)的残留量和风险进行评估, 必要时纳入放行控制。细胞终产品中的非目标细胞通常包括生产过程中使用的滋养层细胞、成纤维细胞、死细胞、无生物学活性的细胞等。若无法精确检测各杂质细胞的含量, 则应对细胞的种类进行鉴定, 并结合杂细胞的生物学特性进行安全性评估。在申请临床试验时应初步完成杂质残留检测方法的验证, 以支持细胞产品的安全性。

**3.1.5 生物学活性** 常见的干细胞制品生物学活性检测包括体外分化能力检测、功能蛋白表达检测、细胞因子分泌检测、生理学活性测试等。由于检测方法多为免疫荧光染色、形态观察、流式细胞分析、电生理分析等, 方法的变异性大, 故建议全面设置阳性和阴性对照实验, 明确试验过程中对待测细胞进行的处理措施。

尽量使用图片扫描及定量软件进行数据统计和分析, 避免肉眼观察。对于心肌细胞和神经细胞, 其所需的电生理活性测试难以拟定统一标准, 故建议申报时提供完整的特征谱图。部分产品还需应用可以衡量特定组织修复/再生能力的免疫缺陷动物模型进行体内生物学活性的评价。建议在临床前研究阶段, 结合体外药效学研究等方法建立拟用于临床作用机制的生物活性质控方法。

### 3.2 质量标准

干细胞制品制备工艺复杂, 生产使用过程涉及多能干细胞建库、中间体细胞(建库)、细胞培养物收获、冻存制剂、临床给药等不同阶段, 全过程各阶段均需进行必要的质量控制<sup>[31]</sup>。对于多能干细胞库的质量标准, 可参考我国国家干细胞资源库<sup>[32]</sup>、国际干细胞协会(International Society for Stem Cell Research, ISSCR)、国际干细胞保藏协会(International Stem Cell Banking Initiative, ISCBI)的相关标准<sup>[33-35]</sup>。建议尽可能全面设置质量控制指标, 包括细胞形态、细胞鉴别、多能标志物和干性分析(特定阶段胚胎抗原 3/4、TRA-1-60、TRA-1-81、碱性磷酸酶等)、体外分化能力分析(如拟胚体形成和定向分化能力)、畸胎瘤形成实验、染色体核型、端粒酶活性等。采用 STR 鉴别时, 建议对受检细胞和原始细胞(或衍生细胞)在尽可能多的 STR 位点处进行基因分型结果比对, 如 ISCBI 推荐至少比对关键的 13 个位点(目前商用的试剂盒中一般含有 16 个位点的引物对)<sup>[36]</sup>。

对于生产过程中中间体产品的质量控制, 安全性项目(如无菌、支原体和内毒素)建议在不同阶段全面设置。另外, 建议对细胞分化潜能、分化方向、染色体等进行密切的监控。如果在生产过程中出现细胞库和中间体细胞的放置, 应开展细胞库、中间体细胞的贮存、传代稳定性研究, 确保质量可控。成品质量标准方面, 建议纳入无菌、支原体、内毒素、外源因子、细胞数量、细胞活率、渗透压、生物学活性、关键杂质残留量、非目标细胞检测、可见异物<sup>[37]</sup>等项目。多能干细胞来源的产品临床使用风险较高, 如果给药途径为全身给药, 建议将成瘤性检测纳入质量标准。

### 4 药效学和毒理学评价一般考虑

hPSC 源细胞制品的安全性研究评价应遵从《药物非临床试验质量管理规范》。毒理学试验方面, 应考虑结合临床试验的给药方案(剂量、周期), 开展单次给药毒性试验、重复给药毒性试验、免疫原性和免疫毒性试验、致瘤性/致癌性试验、异常分化等研究。对于采用病毒载体等基因转导系统进行重编程、基因修饰/改造的细胞产品, 需关注可复制型病毒、插入突变、致癌基

因的活化等安全性风险。静脉注射的产品,建议特别关注细胞在肺脏等部位形成栓子的情况,并观察全身有无异位组织形成。根据《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则》,目前,如何选择致瘤性/致癌性研究的动物模型尚未达成科学共识。致瘤性/致癌性试验需确保细胞可在体内长期存活以考察是否有潜在肿瘤形成。试验设计需注意设置合适的对照组,每组需有足够的动物数量,使肿瘤发生率的分析满足统计学要求。

药效学研究方面,应尽可能使用生产工艺和质量控制与临床拟用药物一致的受试物。值得注意的是,细胞产品在进行动物给药前可能经过了传代和换液等一系列操作,故建议在完成操作后对受试物进行质量检测,检测指标包括细胞形态、存活率和杂质等,以明确药效学受试物与临床拟用药物的异同。动物模型的选择方面,应考虑所选动物的生理学、解剖学、与人类具有的可比性、对人体细胞产品的免疫耐受性、给药途径的可行性、免疫缺陷动物的适用性、疾病动物模型的合理性等。不同类型产品的治疗原理存在差异,有些产品拟用功能细胞直接替换受损细胞或组织发挥作用,有些产品通过目标细胞成分分泌活性因子等进行功能调节。因此不同产品的研究评价需遵循“具体问题具体分析”的原则。有临床试验数据的产品,也可结合临床数据评价产品的有效性。建议申请人结合细胞产品的作用机制、疾病周期、给药方式等,同时考虑细胞的质量特性及体内存活时间,采用合适的体内、外模型完成药效学研究,验证产品的治疗机制。

## 5 总结与展望

hPSC来源细胞治疗产品的风险很大程度上取决于细胞的来源、类型、性质和生产工艺,细胞的增殖、分化和迁移的能力以及生物学活性持续时间均是细胞产品的风险因素<sup>[38]</sup>。细胞产品的免疫原性、剂量和给药前的细胞状态也影响着细胞产品的安全性和疗效。目前的安全性评价多集中于所用细胞或组织的体内分布、免疫原性、毒性和致瘤性。在临床应用上,局部分布的、可随时移除的和低免疫原性的移植产品是安全性相对较高的细胞治疗产品。另外,利用病毒递送基因的重编程方法可能具有潜在的致癌风险,而使用非病毒载体、小分子化合物和蛋白质代替病毒进行重编程可有效避免病毒在宿主细胞中整合的风险,是未来诱导多能干细胞技术发展的方向<sup>[39,40]</sup>。随着我国药品监管科学的不断发展<sup>[41,42]</sup>,再生医学研究机构、产业界和监管机构的国际化,沟通交流的顺畅开展,以及有效的合作机制,相信hPSC来源细胞治疗产品将逐步进入临床治疗并惠及病患。

作者贡献: 卢加琪负责本文全文撰写、参考文献引用和图片制作。

利益冲突: 本人声明本稿件无利益冲突。

## References

- [1] Corbett MS, Webster A, Hawkins R, et al. Innovative regenerative medicines in the EU: a better future in evidence? [J]. *BMC Med*, 2017, 15: 49.
- [2] Desgres M, Menasché P. Clinical translation of pluripotent stem cell therapies: challenges and considerations [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 25: 594-606.
- [3] Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, et al. Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration [J]. *N Engl J Med*, 2017, 376: 1038-1046.
- [4] Sugimoto N, Eto K. Reconstitution of the hematopoietic system and clinical applications of iPS cells [J]. *Rinsho Ketsueki*, 2019, 60: 1046-1055.
- [5] Cyranoski D. 'Reprogrammed' stem cells implanted into patient with Parkinson's disease [J]. *Nature*, 2018. DOI: 10.1038/d41586-018-07407-9.
- [6] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. *Science*, 1998, 282: 1145-1147.
- [7] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, 126: 663-676.
- [8] Chari S, Mao S. Timeline: iPSCs—the first decade [J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 18: 294.
- [9] Konishi A, Sakushima K, Isobe S, et al. First approval of regenerative medical products under the PMD Act in Japan [J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 18: 434-435.
- [10] Konomi K, Tobita M, Kimura K, et al. New Japanese initiatives on stem cell therapies [J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 16: 350-352.
- [11] Xu H, Wang B, Ono M, et al. Targeted disruption of HLA genes via CRISPR-Cas9 generates iPSCs with enhanced immune compatibility [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 24: 566-578.
- [12] NMPA: Guidelines for Quality Control and Pre-clinical Studies of Human Stem Cell Products (干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则) [EB/OL]. Beijing: NMPA, 2015 [2020-03-28]. <http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2196/324124.html>.
- [13] FDA: Current Good Tissue Practice (CGTP) and additional requirements for manufactures of human cells, tissues, and cellular and tissue-based products (HCT/Ps) [EB/OL]. Silver Spring: FDA, 2011 [2020-03-28]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/current-good-tissue-practice-cgtp-and-additional-requirements-manufacturers-human-cells-tissues-and>.
- [14] Pamies D, Bal-Price A, Simeonov A, et al. Good cell culture practice for stem cells and stem-cell-derived models [J]. *ALTEX*,

- 2017, 34: 95-132.
- [15] Huh D, Hamilton GA, Ingber DE. From 3D cell culture to organs-on-chips [J]. *Trends Cell Biol*, 2011, 21: 745-754.
- [16] Esch EW, Bahinski A, Huh D. Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14: 248-260.
- [17] Taylor CJ, Peacock S, Chaudhry AN, et al. Generating an iPSC bank for HLA-matched tissue transplantation based on known donor and recipient HLA types [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 11: 147-152.
- [18] Hughes P, Marshall D, Reid Y, et al. The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need? [J]. *Biotechniques*, 2007, 43: 575, 577-578, 581-582, 584.
- [19] Baker DE, Harrison NJ, Maltby E, et al. Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis *in vivo* [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25: 207-215.
- [20] WHO: Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks [EB/OL]. Geneva: WHO Press, 2010 [2020-03-28]. [https://www.who.int/biologicals/Cell\\_Substrates\\_clean\\_version\\_18\\_April.pdf](https://www.who.int/biologicals/Cell_Substrates_clean_version_18_April.pdf).
- [21] Wuchter P, Bieback K, Schrezenmeier H, et al. Standardization of Good Manufacturing Practice-compliant production of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells for immunotherapeutic applications [J]. *Cytotherapy*, 2015, 17: 128-139.
- [22] Codinach M, Blanco M, Ortega I, et al. Design and validation of a consistent and reproducible manufacture process for the production of clinical-grade bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells [J]. *Cytotherapy*, 2016, 18: 1197-1208.
- [23] Lipsitz YY, Timmins NE, Zandstra PW. Quality cell therapy manufacturing by design [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 393-400.
- [24] Singh D, Dromel PC, Young M. Low-oxygen and knock-out serum maintain stemness in human retinal progenitor cells [J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47: 1613-1623.
- [25] Tapia N, Schöler HR. Molecular obstacles to clinical translation of iPSCs [J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 19: 298-309.
- [26] Hagmann S, Moradi B, Frank S, et al. FGF-2 addition during expansion of human bone marrow-derived stromal cells alters MSC surface marker distribution and chondrogenic differentiation potential [J]. *Cell Prolif*, 2013, 46: 396-407.
- [27] Lee AS, Tang C, Rao MS, et al. Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies [J]. *Nat Med*, 2013, 19: 998-1004.
- [28] Ben-David U, Gan QF, Golan-Lev T, et al. Selective elimination of human pluripotent stem cells by an oleate synthesis inhibitor discovered in a high-throughput screen [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 12: 167-179.
- [29] Tohyama S, Hattori F, Sano M, et al. Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 12: 127-137.
- [30] Itakura G, Kawabata S, Ando M, et al. Fail-safe system against potential tumorigenicity after transplantation of iPSC derivatives [J]. *Stem Cell Reports*, 2017, 8: 673-684.
- [31] Lu JQ, Liu BN, Luo JH. Research progress and regulatory perspectives for stem cell-based regenerative medicine products [J]. *Sci Sin Vitae (中国科学: 生命科学)*, 2019, 49: 18-27.
- [32] Zhu H, Hao J, Zhou Q, et al. Clinical-grade stem cell bank and stem cell products [J]. *Chin Bull Life Sci (生命科学)*, 2016, 28: 895-901.
- [33] Crook JM, Hei D, Stacey G. The International Stem Cell Banking Initiative (ISCBI): raising standards to bank on [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2010, 46: 169-172.
- [34] Andrews PW, Baker D, Benvenisty N, et al. Points to consider in the development of seed stocks of pluripotent stem cells for clinical applications: International Stem Cell Banking Initiative (ISCBI) [J]. *Regen Med*, 2015, 10: 1-44.
- [35] Na T, Hao J, Zhang KH, et al. Quality assessment of 'seed cells' of human embryonic stem cells to be used in clinical studies [J]. *Chin Bull Life Sci (生命科学)*, 2016, 28: 731-742.
- [36] Healy LE, Ludwig TE, Choo A. International banking: checks, deposits, and withdrawals [J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2: 305-306.
- [37] Clarke D, Harati D, Martin J, et al. Managing particulates in cellular therapy [J]. *Cytotherapy*, 2012, 14: 1032-1040.
- [38] Neofytou E, O'Brien CG, Couture LA, et al. Hurdles to clinical translation of human induced pluripotent stem cells [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125: 2551-2557.
- [39] Zhou H, Wu S, Joo JY, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4: 381-384.
- [40] Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences [J]. *Science*, 2009, 324: 797-801.
- [41] Liu BN, Cao Y, Lu JQ, et al. Regulatory perspective for chemistry manufacturing and controls considerations in chimeric antigen receptor-modified T cell therapy [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 1637-1644.
- [42] Lu JQ, Wei W, Liu BN, et al. Research progress, chemistry, manufacturing and controls considerations of mesenchymal stem cell products [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 1317-1324.