

人脐带间充质干细胞制剂大规模生产中稳定性研究

储王龙^{1#}, 李童婧^{1#}, 上官燕¹, 何方涛¹, 吴建福¹, 曾秀萍¹, 郭涛¹, 王清芳¹,
张芬¹, 钟振忠^{1,2}, 梁晓^{1,2}, 胡隽源^{1,2*}, 刘沐芸^{3,4*}

(1. 深圳市北科生物科技有限公司, 广东 深圳 518057; 2. 哈尔滨北科健康科技有限公司, 黑龙江 哈尔滨 150000;
3. 深圳科诺医学检验实验室, 广东 深圳 518000; 4. 细胞产业关键共性技术国家工程研究中心, 广东 深圳 518000)

摘要: 人脐带间充质干细胞在再生医学中应用广泛, 但较少有研究关注间充质干细胞制剂生产中的稳定性。本研究通过对生产过程中细胞原液、半成品稳定性研究及制剂复苏稳定性研究, 为生产过程提供依据, 为制剂复苏使用方法提供参考。采用3批次细胞制剂, 取生产过程中细胞原液、半成品分别静置在低温(2~8 °C)及室温(20~26 °C)条件下储存, 细胞原液储存时间间隔为0、2、4、6 h, 半成品储存时间间隔为0、1、2、3 h, 考察项目包括外观检查、活细胞浓度、细胞活率、细胞表面标记、淋巴细胞增殖抑制率及无菌检查。此外, 取细胞制剂复苏后分别进行稀释和培养稳定性探索, 复苏稀释液分别为0.9%氯化钠注射液、0.9%氯化钠注射液+1%人血白蛋白、0.9%氯化钠注射液+2%人血白蛋白, 稀释倍数包括10倍及40倍, 稀释后静置时间间隔为0、1、2、3、4 h。复苏培养液分别为DMEM培养基、DMEM+2%血小板裂解物、0.9%氯化钠注射液、0.9%氯化钠注射液+1%人血白蛋白, 培养时间为24 h。考察项目为活细胞浓度及细胞活率。实验结果表明, 细胞原液在低温(2~8 °C)及室温(20~26 °C)条件下静置6 h内均维持稳定, 细胞半成品在同样条件下静置3 h内维持稳定。制剂复苏后, 使用含1%或2%人血白蛋白的氯化钠注射液稀释, 在4 h内细胞活率维持在80%以上。不同稀释倍数对细胞活性存在影响。制剂复苏后, 使用含2%血小板裂解物的完全培养基培养24 h后, 细胞活率达到80%以上。综上表明, 细胞原液在6 h内、细胞半成品在3 h内稳定性均满足要求, 细胞制剂复苏后稀释液中添加1%或2%人血白蛋白更好保护细胞活性。

关键词: 间充质干细胞; 生产; 原液; 半成品; 制剂; 稳定性

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)03-0743-08

Stability study of umbilical cord mesenchymal stem cells formulation in large-scale production

CHU Wang-long^{1#}, LI Tong-jing^{1#}, SHANGGUAN Yan¹, HE Fang-tao¹, WU Jian-fu¹,
ZENG Xiu-ping¹, GUO Tao¹, WANG Qing-fang¹, ZHANG Fen¹, ZHONG Zhen-zhong^{1,2},
LIANG Xiao^{1,2}, HU Jun-yuan^{1,2*}, LIU Mu-yun^{3,4*}

(1. Shenzhen Beike Biotechnology Co., Ltd., Shenzhen 518057, China; 2. Harbin Beike Health Technology Co., Ltd., Harbin 150000, China; 3. Shenzhen Kenuo Medical Laboratory, Shenzhen 518000, China; 4. National Engineering Research Center of Foundational Technologies for CGT Industry, Shenzhen 518000, China)

Abstract: Umbilical cord mesenchymal stem cells (UC-MSCs) have been widely used in regenerative

收稿日期: 2023-09-13; 修回日期: 2024-01-02.

基金项目: 细胞产业关键共性技术国家工程研究中心创新能力建设项目 [发改高技(2023)447号]; 哈尔滨市细胞制剂数字化智能化生产线开发和推广应用项目 [哈松发改函(2023)79号].

[#]共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-755-86309200, E-mail: sean.hu@beike.cc;

Tel: 13538127480, E-mail: liumuyun@nlclpct.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1063

medicine, but there is limited research on the stability of UC-MSCs formulation during production. This study aims to assess the stability of the cell stock solution and intermediate product throughout the production process, as well as the final product following reconstitution, in order to offer guidance for the manufacturing process and serve as a reference for formulation reconstitution methods. Three batches of cell formulation were produced and stored under low temperature (2–8 °C) and room temperature (20–26 °C) during cell stock solution and intermediate product stages. The storage time intervals for cell stock solution were 0, 2, 4, and 6 h, while for intermediate products, the intervals were 0, 1, 2, and 3 h. The evaluation items included visual inspection, viable cell concentration, cell viability, cell surface markers, lymphocyte proliferation inhibition rate, and sterility. Additionally, dilution and culture stability studies were performed after reconstitution of the cell product. The reconstitution diluents included 0.9% sodium chloride injection, 0.9% sodium chloride injection + 1% human serum albumin, and 0.9% sodium chloride injection + 2% human serum albumin, with dilution ratios of 10-fold and 40-fold. The storage time intervals after dilution were 0, 1, 2, 3, and 4 h. The reconstitution culture media included DMEM medium, DMEM + 2% platelet lysate, 0.9% sodium chloride injection, and 0.9% sodium chloride injection + 1% human serum albumin, and the culture duration was 24 h. The evaluation items were viable cell concentration and cell viability. The results showed that the cell stock solution remained stable for up to 6 h under both low temperature (2–8 °C) and room temperature (20–26 °C) conditions, while the intermediate product remained stable for up to 3 h under the same conditions. After formulation reconstitution, using sodium chloride injection diluted with 1% or 2% human serum albumin maintained a viability of over 80% within 4 h. It was observed that different dilution factors had an impact on cell viability. After formulation reconstitution, cultivation in medium with 2% platelet lysate resulted in a cell viability of over 80% after 24 h. In conclusion, the stability of cell stock solution within 6 h and intermediate product within 3 h meets the requirements. The addition of 1% or 2% human serum albumin in the reconstitution diluent can better protect the post-reconstitution cell viability.

Key words: umbilical cord mesenchymal stem cell; production; cell stock solution; cell intermediate product; cell product; stability

间充质干细胞是一类具备免疫调节能力及再生潜能的干细胞,主要起源于中胚层,广泛存在于骨髓、脂肪、脐带、胎盘、乳牙等组织中^[1-4]。2006年由国际细胞治疗协会(International Society for Cell & Gene Therapy, ISCT)定义了间充质干细胞的最低标准,包括细胞培养特性、表面标记表达及分化潜能^[5]。新生儿废弃的脐带华通氏胶组织中含有丰富的间充质干细胞,其具有来源广泛、伦理争议小、扩增能力强等优势,被认为是异体治疗的重要来源^[6,7],目前在国内作为药品注册申报并获得临床批件的脐带间充质干细胞产品就有多达约40项,治疗的适应症包括移植物抗宿主病、膝骨关节炎、类风湿性关节炎、急性呼吸窘迫综合征、狼疮肾炎、慢加急性肝衰竭等,远超过其他组织来源的间充质干细胞产品^[8]。

依据国家药品监督管理局药品审评中心2023年发布的《人源干细胞产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》要求,对于间充质干细胞制剂,应开展相应稳定性研究,内容包括代表性原液(如有)、成品和需要临时或阶段性冻存的工艺中间品^[9]。通过在Pubmed(<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>)网站上以关键词进行检索,发现目前已发表的文献中主要集中在制剂运输及使用稳定性,及对各类保存介质的研究,很少有研究

关注制剂生产过程中稳定性^[10-14]。

本研究主要目的是探索间充质干细胞制剂大规模生产过程中稳定性。相较于实验室规模的生产,规模化生产过程中细胞处理时间增加,可能导致细胞特性发生变化,包括细胞活率、细胞表面标记及生物学活性等,进而可能影响最终制剂的质量。在间充质干细胞制剂生产中,一般将刚消化后的细胞称为细胞原液,将灌装之前的细胞称为半成品,最终包装完成的细胞称为制剂。从整个生产过程来看,原液、半成品及制剂是3个关键环节,对其充分研究有利于全面了解整个生产过程中细胞特性变化。因此,在本研究中,作者对原液、半成品及制剂进行了稳定性考察,考察其在不同温度下存放不同时间细胞特性的变化,基于“质量源于设计”的理念,可以为工艺制定合理的控制参数提供依据,以确保生产出的细胞满足临床应用的需求。同时,本研究也为同类产品的稳定性研究提供了有意义的参考。

材料与amp;方法

试剂及设备 人血白蛋白(批号:202209061)购自华兰生物工程股份有限公司;0.9%氯化钠注射液(批

号: S23053515) 购自四川科伦药业股份有限公司; CTS™ TrypLE™ Select 酶 (批号: 2495282)、DPBS (批号: 2562527) 购自美国 ThermoFisher 公司; DMSO (批号: USP21F1) 购自德国 WAK-Chemie Medical GmbH 公司; 自动细胞计数仪 (Vi-CELL XR Cell Viability Analyzer, 美国 Beckman 公司); 流式分析仪 (FACSCalibur™, 美国 BD Biosciences 公司)。

人脐带间充质干细胞制剂生产 本研究选用 2 份脐带来源的 3 支主细胞库细胞, 1 支细胞为 1 个生产批次。每支细胞经 37 °C 水浴复苏后, 进行接种培养并进行连续传代直至制剂代次。待细胞融合度达到 85%~95% 后, 往多个培养容器中加入重组胰酶同时消化, 并将消化后所有细胞悬液收集至 1 个储液袋中, 从而得到细胞原液。原液经过 DPBS 洗涤浓缩后, 按 1:1 比例添加冻存保护液, 获得半成品。半成品经过批量细胞灌装及程序降温, 形成一个批次的细胞制剂, 并储存在 -196 °C 液氮罐中。当需要进行临床使用时, 从液氮罐中取出细胞制剂, 并将其复苏处理成活细胞悬液, 形成最终的细胞制剂。具体生产流程详见图 1。

原液稳定性研究 从刚收集的细胞原液中立即取出 100 mL 分成两份, 分别置于低温 (2~8 °C) 及室温 (20~26 °C) 条件下, 静置 0、2、4、6 h 后取样检测, 检测项目包括: 外观检查、细胞数量、细胞活率、细胞表面标记、淋巴细胞增殖抑制率、无菌检测。

半成品稳定性研究 从刚获得的细胞半成品中立即取出 10 mL 置于低温 (2~8 °C) 及室温 (20~26 °C) 条件下, 分别静置 0、1、2、3 h 后取样检测, 检测项目同上。

制剂复苏后稳定性研究

复苏后稀释稳定性研究 从液氮罐中取出冻存一周以上的细胞制剂, 37 °C 水浴复苏后, 使用不同的稀

释液分别稀释 10 倍及 40 倍, 包括 0.9% 氯化钠注射液、0.9% 氯化钠注射液+ 1% (w/v) 人血白蛋白 (HSA) 及 0.9% 氯化钠注射液+ 2% (w/v) 人血白蛋白。稀释后的细胞在 2~8 °C 条件下静置 0、1、2、3 和 4 h 之后, 分别取样检测细胞数量和活率。

复苏后培养研究 从液氮罐中取出冻存一周以上的细胞制剂, 37 °C 水浴复苏后, 等分为 4 份。分别使用 DMEM 培养基、DMEM + 2% 血小板裂解物 (human platelet lysate, HPL)、0.9% 氯化钠注射液、0.9% 氯化钠注射液+ 1% (w/v) 人血白蛋白重悬细胞, 接种至 75 cm² 培养瓶中, 密度为 1.25×10⁷ 个/75 cm²。在 37 °C, 5.0% CO₂ 条件下培养 24 h 后, 使用显微镜观察并收集细胞。如果细胞为悬浮状态, 则直接取出培养细胞液; 如果细胞处于贴壁状态, 则需要使用胰蛋白酶消化后再收集。收集到的细胞检测细胞数量及活率, 计算活细胞回收率。计算公式为: 活细胞回收率 = 培养后收集活细胞数量/接种活细胞数量×100%。

检测方法

外观检查 采用目视法观察液体颜色、澄清晰度、有无细胞聚团。正常标准为澄清乳白色液体, 无明显可见细胞聚团, 与初始外观相比无明显变化。

细胞数量及活率 细胞数量及活率检测采用自动细胞计数仪, 使用台盼蓝染色法区分死活细胞。活率合格标准为不低于 80%。

细胞表面标记 将待检样品先使用 PBS 洗涤, 再加入抗体标记: CD73-PE、CD90-FITC、CD105-APC、CD166-PE, 2~8 °C 避光孵育 30 min 后, 再 PBS 洗涤后使用流式分析仪上机检测。阳性标记 CD73、CD90、CD105、CD166 表达应 ≥95%。

淋巴细胞增殖抑制率检测 取外周血单个核细

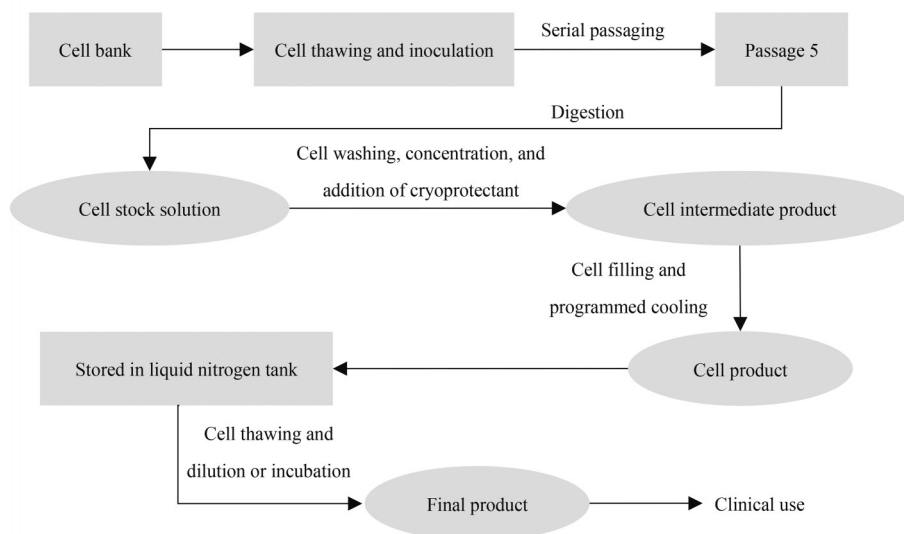


Figure 1 Process flow chart for the production of umbilical cord mesenchymal stem cells

胞 (PBMCs) 复苏解冻后, 悬浮于 PBS 中, 用羧基荧光素乙酯琥珀酰亚胺酯 (CFSE) 进行标记。标记后, 再使用 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 植物血凝素 (PHA) 刺激 CFSE 标记的 PBMCs, 并与人脐带间充质干细胞以 5:1 的比例在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 和 $5\% \text{ CO}_2$ 的条件下共培养 4~5 天。培养结束后, 收集所有淋巴细胞, 并通过使用流式分析仪检测 CFSE 荧光, 确定细胞增殖情况, 未进行共培养的 PBMCs 被用作阴性对照组。结果以人脐带间充质干细胞对 PBMCs 抑制率表示, 抑制率计算公式为: (对照组 PBMCs 增殖率 - 实验组 PBMCs 增殖率) \div 对照组 PBMCs 增殖率 $\times 100\%$, 抑制率应 $\geq 25\%$ 。

无菌检查 按《中华人民共和国药典》2020 年第三部“直接接种法”进行无菌检查。结果应为阴性。

统计学分析 使用 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析, 数据以平均值 \pm 标准差表示, 组间数据比较采用双尾 *t* 检验, $P < 0.05$ 被认为有统计学差异, $P < 0.01$ 被认为有显著统计学差异, $P < 0.001$ 被认为有极其显著统计学差异。

结果

1 人脐带间充质干细胞制剂生产

取 3 支工作细胞库中细胞复苏, 经连续传代后, 收集获得细胞原液、半成品及制剂, 批次信息见表 1。原液密度每毫升细胞数介于 $(1.08 \sim 1.42) \times 10^6$ 之间, 经过洗涤浓缩后, 半成品密度每毫升细胞数介于 $(9.54 \sim 10.56) \times 10^6$ 之间, 制剂密度与半成品密度几乎相等, 每

Table 1 Batch information for the production of umbilical cord mesenchymal stem cells

Batch No.	Cell stock solution		Intermediate product		Cell product	
	Density	Viability	Density	Viability	Density	Viability
UC-MSC1	1.27×10^6	96.0%	10.56×10^6	97.0%	10.17×10^6	97.2%
UC-MSC2	1.08×10^6	95.2%	9.54×10^6	98.6%	9.18×10^6	98.6%
UC-MSC3	1.42×10^6	97.1%	9.61×10^6	97.5%	9.52×10^6	98.0%

毫升细胞数介于 $(9.18 \sim 10.17) \times 10^6$ 之间, 细胞活率均高于 95%, 说明批次间工艺稳定。

2 原液稳定性

3 个批次细胞原液经过低温 ($2 \sim 8 \text{ }^\circ\text{C}$) 及室温 ($20 \sim 26 \text{ }^\circ\text{C}$) 条件静置后, 细胞数量呈现逐渐下降趋势, 在 $2 \sim 8 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下静置 6 h 后, 平均下降 6.35%; 而在 $20 \sim 26 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下静置 6 h 后, 平均下降 15.87%, 下降值高于 $2 \sim 8 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件, 说明 $2 \sim 8 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下细胞数量更加稳定 (表 2、3、图 2A)。细胞活率均稳定在 95% 以上 (表 2、3、图 2B), $20 \sim 26 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下的细胞活率略高于 $2 \sim 8 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件。细胞外观检查正常, 无菌检查为阴性, 细胞表面标记表达及对淋巴细胞增殖抑制率在以上两种条件下没有呈现下降趋势, 均符合设定的标准 (表 2、3、图 2C)。

3 半成品稳定性

3 个批次细胞半成品经过低温 ($2 \sim 8 \text{ }^\circ\text{C}$) 及室温 ($20 \sim 26 \text{ }^\circ\text{C}$) 条件储存后, 细胞活率及细胞数量呈现下降趋势, 但在 $2 \sim 8 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下更加稳定 (表 4、5、图 3A、B)。在 $2 \sim 8 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下静置 3 h 后, 细胞数量平均仅下降 3.13%, 而在 $20 \sim 26 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下静置 3 h 后, 细胞数量

Table 2 Stability study results of cell stock solution at $2 \sim 8 \text{ }^\circ\text{C}$ ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Quality control		$2 \sim 8 \text{ }^\circ\text{C}$			
		0 h	2 h	4 h	6 h
Visual inspection		Normal	Normal	Normal	Normal
Viable cell concentration $/\times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$		1.26 ± 0.17	1.16 ± 0.17	1.20 ± 0.17	1.18 ± 0.13
Cell viability /%		96.10 ± 0.95	95.80 ± 0.82	95.77 ± 0.85	96.17 ± 0.55
Cell surface marker /%	CD73	99.93 ± 0.09	99.76 ± 0.28	99.92 ± 0.08	99.95 ± 0.06
	CD90	99.94 ± 0.09	99.76 ± 0.24	99.85 ± 0.12	99.91 ± 0.04
	CD105	99.52 ± 0.48	99.07 ± 0.50	98.54 ± 1.04	98.58 ± 0.83
	CD166	99.99 ± 0.01	99.94 ± 0.08	99.98 ± 0.01	99.96 ± 0.03
Lymphocyte proliferation inhibition rate /%		45.77 ± 20.72	52.96 ± 17.00	45.40 ± 19.82	55.44 ± 21.04
Sterility		Negative	N/A	N/A	Negative

Table 3 Stability study results of cell stock solution at $20 \sim 26 \text{ }^\circ\text{C}$ ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Quality control		$20 \sim 26 \text{ }^\circ\text{C}$			
		0 h	2 h	4 h	6 h
Visual inspection		Normal	Normal	Normal	Normal
Viable cell concentration $/\times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$		1.26 ± 0.17	1.15 ± 0.16	1.08 ± 0.14	1.06 ± 0.18
Cell viability /%		96.10 ± 0.95	96.80 ± 1.30	97.80 ± 0.30	98.03 ± 0.32
Cell surface marker /%	CD73	99.93 ± 0.09	99.91 ± 0.08	99.95 ± 0.05	99.93 ± 0.08
	CD90	99.94 ± 0.09	99.87 ± 0.08	99.90 ± 0.09	99.93 ± 0.08
	CD105	99.52 ± 0.48	99.23 ± 0.72	99.51 ± 0.38	99.56 ± 0.48
	CD166	99.99 ± 0.01	99.93 ± 0.04	99.85 ± 0.21	99.77 ± 0.40
Lymphocyte proliferation inhibition rate /%		45.77 ± 20.72	54.12 ± 21.85	55.97 ± 20.84	57.40 ± 16.91
Sterility		Negative	N/A	N/A	Negative

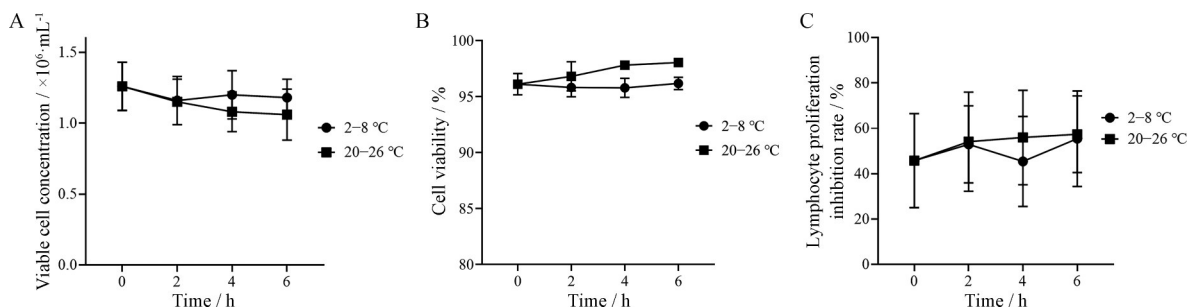


Figure 2 Stability study results of cell stock solution. A: Viable cell concentration changes with storage time; B: Cell viability changes with storage time; C: Lymphocyte proliferation inhibition rate changes with storage time

平均下降 8.99%。半成品细胞外观检查正常, 无菌检查为阴性, 细胞表面标记表达及对淋巴细胞增殖抑制率在以上两种条件下没有呈现下降趋势, 均符合设定的标准 (表 4、5、图 3C)。

4 制剂复苏后稳定性研究

4.1 复苏稀释 制剂复苏后, 活细胞浓度及细胞活率在静置 4 h 内维持稳定 (图 4A~D)。但经过稀释后, 细

胞活率随静置时间延长均呈现下降趋势 (图 4C、D)。在稀释液中添加 1% 或 2% 人血白蛋白, 活细胞浓度及细胞活率均高于未添加人血白蛋白的 0.9% 氯化钠注射液组, 说明人血白蛋白对于细胞有很好的保护作用。此外, 添加 2% 人血白蛋白组细胞活率高于添加 1% 人血白蛋白组, 说明随着白蛋白添加比例的增加, 对细胞活性的保护作用更好。作者还发现, 10 倍稀释后的细

Table 4 Stability study results of cell intermediate product at 2-8 °C ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Quality control	2-8 °C			
	0 h	1 h	2 h	3 h
Visual inspection	Normal	Normal	Normal	Normal
Viable cell concentration / ×10 ⁶ ·mL ⁻¹	9.90 ± 0.57	9.66 ± 0.14	9.71 ± 0.22	9.59 ± 0.28
Cell viability / %	97.70 ± 0.82	97.17 ± 1.27	97.13 ± 0.50	96.90 ± 0.52
Cell surface marker / %				
CD73	99.93 ± 0.06	99.89 ± 0.11	99.88 ± 0.07	99.89 ± 0.09
CD90	99.91 ± 0.02	99.85 ± 0.05	99.83 ± 0.02	99.89 ± 0.07
CD105	98.38 ± 0.92	99.13 ± 0.12	98.81 ± 0.44	99.15 ± 0.92
CD166	99.96 ± 0.03	99.91 ± 0.08	99.96 ± 0.02	99.98 ± 0.01
Lymphocyte proliferation inhibition rate / %	59.24 ± 11.50	54.08 ± 10.37	56.12 ± 13.12	65.26 ± 21.37
Sterility	Negative	N/A	N/A	Negative

Table 5 Stability study results of cell intermediate product at 20-26 °C ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Quality control	20-26 °C			
	0 h	1 h	2 h	3 h
Visual inspection	Normal	Normal	Normal	Normal
Viable cell concentration / ×10 ⁶ ·mL ⁻¹	9.90 ± 0.57	9.41 ± 0.41	9.26 ± 0.35	9.01 ± 0.44
Cell viability / %	97.70 ± 0.82	97.07 ± 0.50	94.00 ± 4.87	95.67 ± 1.05
Cell surface marker / %				
CD73	99.95 ± 0.07	99.90 ± 0.11	99.85 ± 0.11	99.89 ± 0.09
CD90	99.91 ± 0.07	99.80 ± 0.16	99.85 ± 0.11	99.89 ± 0.07
CD105	98.71 ± 0.61	98.49 ± 0.85	98.99 ± 0.19	99.15 ± 0.92
CD166	99.97 ± 0.05	99.94 ± 0.06	99.80 ± 0.15	99.98 ± 0.01
Lymphocyte proliferation inhibition rate / %	59.24 ± 11.50	61.48 ± 23.16	56.41 ± 15.27	59.22 ± 17.39
Sterility	Negative	N/A	N/A	Negative

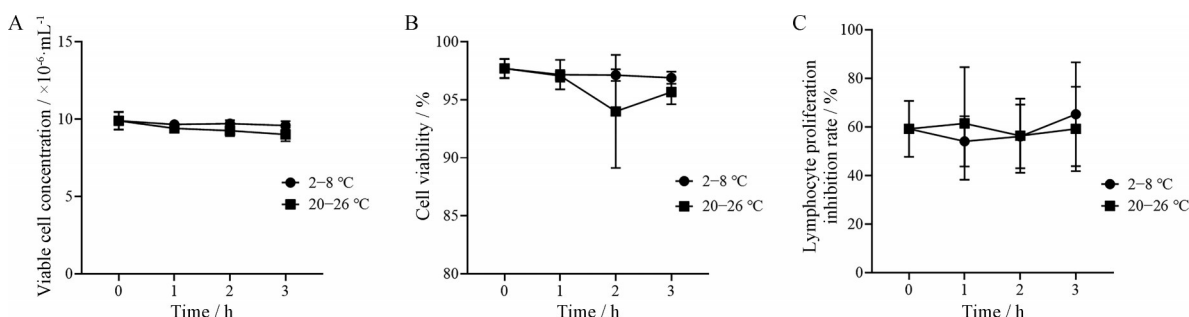


Figure 3 Stability study results of cell intermediate product. A: Viable cell concentration changes with storage time; B: Cell viability changes with storage time; C: Lymphocyte proliferation inhibition rate changes with storage time

胞活率高于40倍稀释的细胞活率,说明随着稀释倍数的增加,细胞活率会进一步下降(图4E)。总体来看,除了0.9%氯化钠注射液组稀释后细胞活率低于标准外,其他组细胞活率在静置4 h内均符合标准。

4.2 复苏培养 制剂复苏培养24 h后,在显微镜下观察到不同培养液下的细胞呈现不同的形态,DMEM培养基组细胞呈现聚团,而DMEM培养基+2%血小板裂解物组细胞呈梭形贴壁生长。0.9%氯化钠注射液组及0.9%氯化钠注射液+1%人血白蛋白组细胞均呈悬浮分散成单个细胞状,但0.9%氯化钠注射液+1%人血白蛋白组有少量细胞聚团(图5)。对各组收集到的细胞进行检测,发现DMEM培养基+2%血小板裂解物组及0.9%氯化钠注射液+1%人血白蛋白组活细胞回收率及活率较高,这与细胞的形态可能存在关联,DMEM培养基组细胞聚团后导致活性下降,DMEM培养基+2%血小板裂解物组细胞进入正常培养状态,使得细胞活性得以维持。而0.9%氯化钠注射液+1%人血白蛋白组相较于0.9%氯化钠注射液组结果较好是由于人血白蛋白对细胞发挥了很好的保护作用(图

6A、B)。

讨论

人脐带间充质干细胞在临床上应用广泛,具有低免疫原性、可大规模扩增的特性,使其成为一种异体通用治疗产品。虽然目前在国际上市的间充质干细胞产品主要来自骨髓、脂肪组织,但由于脐带组织来源在炎症及免疫调控方面有着独特优势,在治疗例如系统性红斑狼疮、糖尿病、类风湿性关节炎等疾病上有良好的应用前景^[15,16]。

稳定性研究为药品的储存条件及储存时间提供了依据,ICH Q1稳定性指南中规定了稳定性研究的基本要求。然而,细胞治疗产品是一类区别于传统化药的药品,2017年国家药品监督管理局颁布《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)》,将细胞治疗产品纳入药品范畴监管^[17]。对于此类产品的稳定性研究,在之前的文献^[10-14]报道中主要关注于制剂使用及运输过程中的稳定性,而在制剂生产过程中稳定性很少被研究。细胞原液、半成品、细胞制剂之间存在顺次

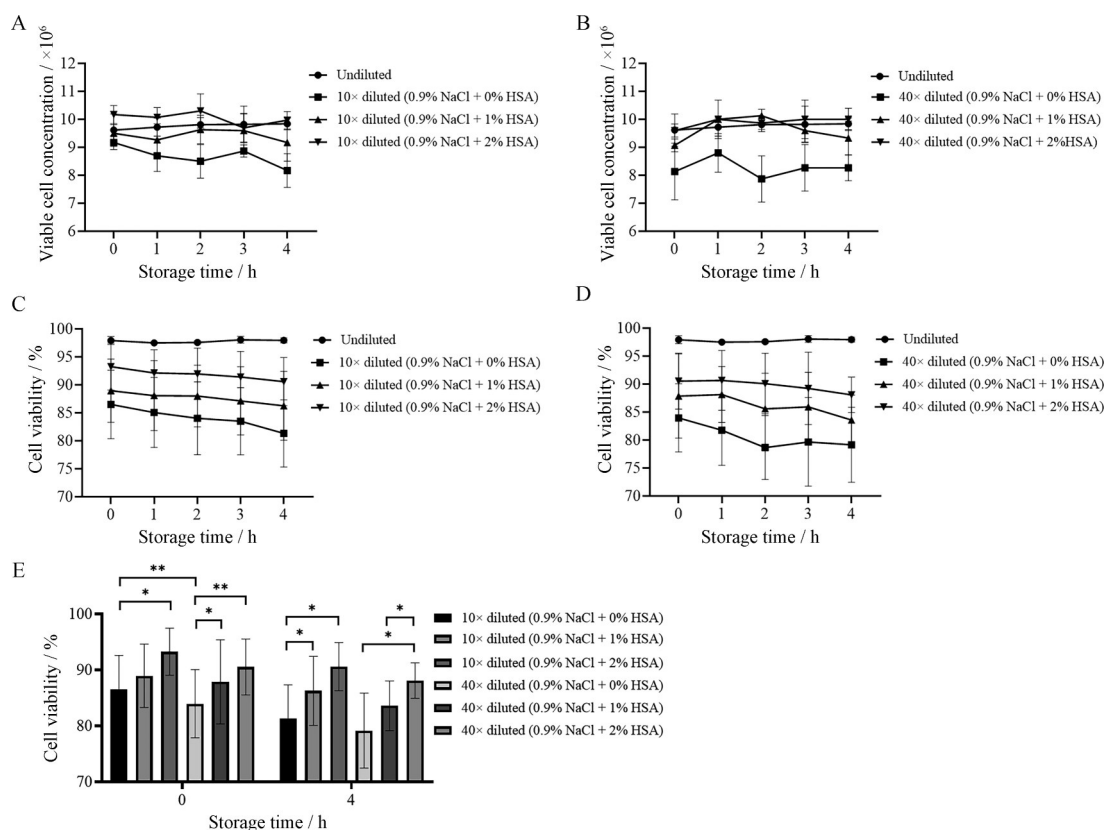


Figure 4 Stability study results of diluted cell product at 2–8 °C ($n = 3, \bar{x} \pm s$). A: Concentration of viable cells changes with storage time after a 10-fold dilution of the cell product; B: Concentration of viable cells changes with storage time after a 40-fold dilution of the cell product; C: Cell viability changes with storage time after a 10-fold dilution of the cell product; D: Cell viability changes with storage time after a 40-fold dilution of the cell product; E: Cell viability after cell product dilution and 4 hours of storage. HSA: Human serum albumin. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

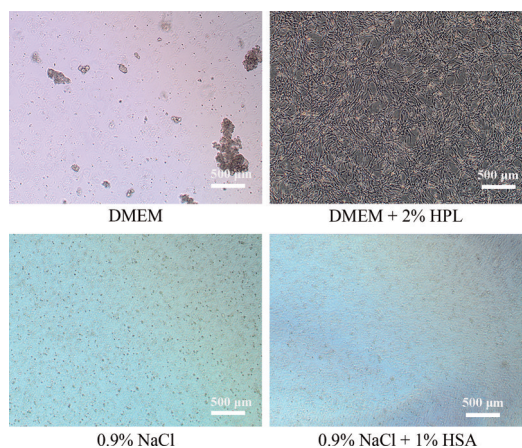


Figure 5 Cellular morphology of thawed cell product after 24 hours of incubation at 37 °C (40× magnification)

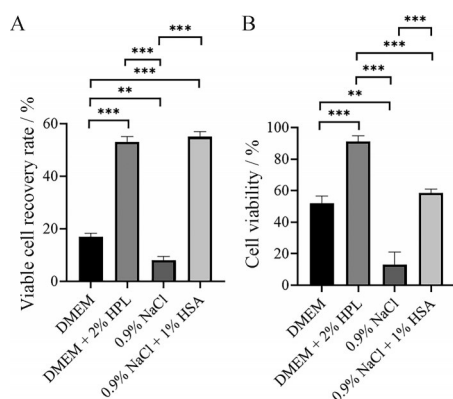


Figure 6 Cellular recovery rate and viability of thawed cell product after 24 hours of incubation at 37 °C ($n = 3, \bar{x} \pm s$). A: Viable cell recovery rate of thawed cell product after 24 hours incubation at 37 °C using different culture media; B: Cell viability of thawed cell product after 24 hours incubation at 37 °C using different culture media. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

的上下游关系, 细胞原液或半成品的活性下降必然会影 响细胞制剂的活性, 从而影 响产品的安全性及有效性。因此, 本研究首先验证了低温 (2~8 °C) 及室温 (20~26 °C) 条件下细胞原液及半成品的稳定性, 检测指标上包括了外观检查、活细胞浓度、细胞活率、细胞表面标记、淋巴细胞增殖抑制率及无菌检查, 涵盖了鉴别、活性及生物学功能的全面指标。研究结果显示, 原液在 6 h 内保持稳定, 细胞活率远高于 80% 的标准, 其他检测指标也维持稳定, 这为后续进一步加工提供了依据。半成品在 3 h 内保持稳定, 但可以观察到, 2~8 °C 条件下活细胞数量及细胞活率均优于 20~26 °C 条件下, 这可能的原因是: 一方面, 2~8 °C 条件下对细胞活性维持较好; 另一方面, 半成品中含有 DMSO, 在常温下对细胞毒性较大, 导致细胞活性下降。因此, 在大规模生产中, 应该控制半成品处理时间, 且尽量在 2~8 °C 条件下进行半成品灌装。

本研究同时也探索了制剂复苏后的稳定性, 考虑到临床使用上可能存在复苏后立即使用及复苏培养后使用两种可能方式^[18], 分别进行了研究。复苏后稀释或不稀释是目前较常见的使用方式, 研究结果显示, 复苏后不稀释方式细胞活性及活细胞浓度更加稳定, 但在静脉回输中, 这需要考虑 DMSO 回输浓度过高带来的可能不良反应问题。使用复苏后稀释的方式可避免回输浓度过高, 但可能会带来由于增加操作引起的细胞活性下降及污染风险增加的问题。本研究中, 作者发现稀释液类型对细胞活性存在显著的影响。一些研究表明, 白蛋白对复苏后细胞具有很好的保护作用^[19,20]。因此, 采用添加 1% 或 2% 浓度人血白蛋白的稀释液处理复苏后细胞, 结果表明, 在 4 h 内, 细胞活率均符合 80% 标准。相比之下, 未添加人血白蛋白处理组的细胞活率下降较快, 甚至低于 80% 的标准。同时, 还发现, 随着稀释倍数的增加, 细胞活性逐渐降低, 可能原因是细胞浓度对于细胞活性的维持有重要作用, 这与 Aabling 等^[20]研究结果一致。因此在临床应用中, 需要控制细胞制剂稀释倍数。

一些研究认为, 使用立即复苏后回输的间充质干细胞临床效果不佳, 复苏后短暂培养有助于对间充质干细胞生物学活性的恢复^[21,22]。本研究尝试使用 4 种不同的培养液培养复苏后的细胞制剂。结果显示, 在培养 24 h 后, 0.9% 氯化钠注射液组活细胞回收率及细胞活率最低, DMEM 组由于含有营养成分, 活细胞回收率及细胞活率相对有所提升, 但细胞呈现大量聚团。0.9% 氯化钠注射液+ 1% 浓度的人血白蛋白组细胞活性维持效果较好, 细胞呈分散状, 但仍无法达到 80% 的活率标准, 未来可进一步改良成分获得更好的活性。DMEM 组+ 2% 血小板裂解物组活细胞回收率较高, 细胞活性最高, 细胞活率超过 80%, 是一种可行的复苏后恢复细胞活性的方法。但这种方法也存在一些缺陷, 其引入了一些外源试剂成分, 包括血小板裂解物及消化用的胰蛋白酶, 增加了安全性风险, 在临床使用时需要有相应的风险控制方案。此外, 这种方式还有可能会改变整体稳定性研究的设计。

基于对复苏后的探索性研究, 采取了复苏后稀释的方式开展了进一步稳定性研究, 并增加了细胞表面标记及淋巴细胞抑制的检测。结果显示, 在使用 0.9% + 2% 人血白蛋白稀释 8 h 内, 所有结果均达到标准, 满足临床应用前的需求。此外, 还对细胞制剂在液氮中的长期储存稳定性、在 -80 °C 条件下的加速稳定性开展研究, 及在液氮低温运输中的稳定性进行了研究, 但这些结果并未在本文中详细呈现。

总之, 本研究首次对间充质干细胞制剂大规模生

产过程中的原液及半成品稳定性进行了全面考察, 研究设计符合药品稳定性试验要求, 为生产过程关键阶段提供了依据和指导。同时, 基于干细胞制剂的特殊性, 作者也探索了细胞制剂复苏后不同处理方式的稳定性, 为未来间充质干细胞大规模临床应用提供了极有意义的参考。

作者贡献: 储王龙负责论文方案设计及撰写; 梁晓、胡隽源、刘沐芸负责论文整体设计; 李童婧、上官燕、何方涛、吴建福、张芬、曾秀萍、郭涛、王清芳、钟振忠负责实验的开展和数据分析。所有作者均阅读并批准最终稿件。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

- [1] Zhou J, Shi YF. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): origin, immune regulation, and clinical applications [J]. *Cell Mol Immunol*, 2023, 20: 555-557.
- [2] Brown C, Mckee C, Bakshi S, et al. Mesenchymal stem cells: cell therapy and regeneration potential [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2019, 13: 1738-1755.
- [3] Wu XM, Jiang J, Gu ZK, et al. Mesenchymal stromal cell therapies: immunomodulatory properties and clinical progress [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11: 345.
- [4] Andrzejewska A, Lukomska B, Janowski M. Concise review: mesenchymal stem cells: from roots to boost [J]. *Stem Cells*, 2019, 37: 855-864.
- [5] Dominici M, Blanc KL, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. *Cytotherapy*, 2006, 8: 315-317.
- [6] Watson N, Divers R, Kedar R, et al. Discarded Wharton jelly of the human umbilical cord: a viable source for mesenchymal stromal cells [J]. *Cytotherapy*, 2015, 17: 18-24.
- [7] Davies JE, Walker JT, Keating A. Concise review: Wharton's jelly: the rich, but enigmatic, source of mesenchymal stromal cells [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6: 1620.
- [8] Clinical trial implied permission [EB/OL]. Beijing: Center for Drug Evaluation, NMPA, [2023-09-10]. <https://www.cde.org.cn/main/xxgk/listpage/4b5255eb0a84820cef4ca3e8b6bbe20c>.
- [9] Guiding principles for pharmaceutical research and evaluation of human derived stem cell products (Trial) [EB/OL]. Beijing: Center for Drug Evaluation, NMPA, (2023-06-21) [2023-09-10]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/f82a0fee1e625a1a3834a93cee3836c7>.
- [10] Mirabel C, Puente-Massaguer E, Del Mazo-Barbara A, et al. Stability enhancement of clinical grade multipotent mesenchymal stromal cell-based products [J]. *J Transl Med*, 2018, 16: 291.
- [11] Yu NH, Chun SY, Ha YS, et al. Optimal stem cell transporting conditions to maintain cell viability and characteristics [J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2018, 15: 639-647.
- [12] Chen Y, Yu BF, Xue GF, et al. Effects of storage solutions on the viability of human umbilical cord mesenchymal stem cells for transplantation [J]. *Cell Transplant*, 2013, 22: 1075-1086.
- [13] Ścieżyńska A, Soszyńska M, Szpak P, et al. Influence of hypothermic storage fluids on mesenchymal stem cell stability: a comprehensive review and personal experience [J]. *Cells*, 2021, 10: 1043.
- [14] Gálvez-Martín P, Hmadcha A, Soria B, et al. Study of the stability of packaging and storage conditions of human mesenchymal stem cell for intra-arterial clinical application in patient with critical limb ischemia [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2014, 86: 459-468.
- [15] Mebarki M, Abadie C, Larghero J, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem/stromal cells: a promising candidate for the development of advanced therapy medicinal products [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12: 152.
- [16] Stefańska K, Ożegowska K, Hutchings G, et al. Human Wharton's jelly-cellular specificity, stemness potency, animal models, and current application in human clinical trials [J]. *J Clin Med*, 2020, 9: 1102.
- [17] Guiding principles for research and evaluation of cell therapy products (Trial) [EB/OL]. Beijing: Center for Drug Evaluation, NMPA, (2017-12-22) [2023-09-10]. <https://www.cde.org.cn/zdyyz/domesticinfo?zdyzIdCODE=452c529b299638297210fe4a1294eb31>.
- [18] Levy O, Kuai R, Siren EMJ, et al. Shattering barriers toward clinically meaningful MSC therapies [J]. *Sci Adv*, 2020, 6: eaba6884.
- [19] Zhang FL, Ren HAJ, Shao XH, et al. Preservation media, durations and cell concentrations of short-term storage affect key features of human adipose-derived mesenchymal stem cells for therapeutic application [J]. *PeerJ*, 2017, 5: e3301.
- [20] Aabling RR, Alstrup T, Kjær EM, et al. Reconstitution and post-thaw storage of cryopreserved human mesenchymal stromal cells: pitfalls and optimizations for clinically compatible formulants [J]. *Regen Ther*, 2023, 23: 67-75.
- [21] Antebi B, Asher AM, Rodriguez LA 2nd, et al. Cryopreserved mesenchymal stem cells regain functional potency following a 24-h acclimation period [J]. *J Transl Med*, 2019, 17: 297.
- [22] François M, Copland IB, Yuan SL, et al. Cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunosuppressive properties as a result of heat-shock response and impaired interferon- γ licensing [J]. *Cytotherapy*, 2012, 14: 147-152.