·重大新药创制专项巡礼·

细胞治疗产品的成瘤性和致瘤性风险评价

屈　哲,林　志,霍桂桃,侯田田,杨艳伟,张　峭,耿兴超,李　波,霍　艳
(中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心,药物非临床安全评价研究北京市重点实验室,北京 100176)

[摘要] 细胞治疗产品(cell therapy products, CTPs)具有潜在的肿瘤形成风险,即成瘤性、致瘤性和促瘤性。来自于人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)和人诱导多能干细胞(human induced pluripotent stem cells, hiPSCs)的干细胞终产品中,由于可能存在未分化的干细胞残留、恶性转化细胞/突变和遗传不稳定性,其成瘤性风险最高。通过基因修饰的干细胞由于表达外源基因(如各种生长因子)以及基因修饰病毒载体(如逆转录病毒和慢病毒)的插入突变造成的致癌基因活化,也会增加 CTPs 的成瘤性和致瘤性风险。而终末分化的体细胞产品成瘤性风险相对较低。近年来,越来越多种类的细胞治疗产品进入临床应用,其肿瘤形成风险是产品研发者和监管当局都十分关注的安全性问题。本文介绍了细胞治疗产品可能存在的成瘤性、致瘤性和促瘤性风险概念,较全面地概述了目前对细胞治疗产品潜在肿瘤形成风险的体内外评价方法和对产品成瘤性和致瘤性风险评价的一般考虑。

[关键词] 细胞治疗产品;成瘤性;致瘤性;促瘤性;风险评价
[中图分类号] R965　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003－3734(2021)19－1819－06

Risk assessment of tumorigenicity and oncogenicity of cell therapy products

QU Zhe, LIN Zhi, HUO Gui-tao, HOU Tian-tian, YANG Yan-wei, ZHANG Di, GENG Xing-chao, LI Bo, HUO Yan
(*Beijing Key Laboratory for Safety Evaluation of Drugs*, *National Center for Safety Evaluation of Drugs*, *National Institutes for Food and Drug Control*, *Beijing* 100176, *China*)

[**Abstract**] Cell therapy products (CTPs) have the potential of tumor formation risks, i.e., tumorigenicity, oncogenicity and tumor-enhancement. Since the final stem cell therapy products derived from human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells may contain undifferentiated hPSCs, malignant transformed cells/mutations and genetic instability, they have the highest risk of tumorigenicity. Tumorigenicity and oncogenicity risk of CTPs may be largely increased in genetically modified stem cells, that express foreign genes (such as various growth factors), as well as the oncogene activated by insertion mutations of genetically modified viral vectors (such as retroviruses and lentiviruses). While terminally differentiated somatic cell products have lower risk of tumorigenicity. During recent years, increasing number of cell therapy products have entered the clinical application, the tumor formation risk of which is a safety issue that is concerned by product developers and regulatory authorities. This article introduces the concepts of tumorigenicity, oncogenicity and tumor-enhancement of CTPs, providing a comprehensive overview of the current evaluation methods *in vitro* and *in vivo*, as well as the general considerations for risk assessment of tumorigenicity and oncogenicity of CTPs.

[**Key words**] cell therapy products; tumorigenicity; oncogenicity; tumor-enhancement; risk assessment

---

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目(2018ZX09201017):创新药物非临床安全性评价研究关键技术
[作者简介] 屈哲,女,副研究员,主要从事药物非临床安全性评价研究工作。联系电话:(010)67872233－8210,E-mail: quzhe@nifdc.org.cn。
[通讯作者] 霍艳,女,研究员,主要从事药物非临床安全性评价研究工作。联系电话:(010)67876255,E-mail: huoyan_bj@126.com。

近年来基于细胞的再生医学领域快速发展,越来越多的细胞治疗产品(cell therapy products,CTPs)进入临床,用以治疗各种严重疾病。CTPs 依据分化潜能分为干细胞、体细胞和成体干细胞。来源于人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)、人诱导多能干细胞(human induced pluripotent stem cells, hiPSCs)的干细胞产品以及体细胞中的免疫细胞治疗产品,例如嵌合抗原受体 T 细胞(chimeric antigen receptor T cell, CAR-T)、T 细胞抗原受体 T 细胞(T cell receptor T cell, TCR-T),是目前全球开发进程较快、品种较多的 CTPs。自 2010 年在美国进行全球首例源自 hESCs 的 CTPs 治疗脊髓损伤患者的临床试验以来,已在不同的国家进行了多项源自 hESCs 的 CTPs 的临床试验。2016 年在中国开展了 hESCs 衍生的视网膜色素上皮细胞治疗年龄相关性黄斑变性患者的临床研究[1]。2017 年在英国开始同种异体 hiPSCs 衍生的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)治疗类固醇抵抗性急性移植物抗宿主病的临床试验。2017 年,美国 FDA 相继批准了 2 款治疗恶性淋巴瘤的 CAR-T 细胞产品上市,即诺华(Novatis)公司的 Kymriah 和凯特(Kite)制药公司的 Yescarta[2]。2020 年,FDA 又批准了一种治疗套细胞淋巴瘤(mantle cell lymphoma, MCL)的 CAR-T 细胞疗法 Tecartus。

鉴于 CTPs 固有的复杂性和异质性,在开发过程中对产品的安全性考虑和监管策略都存在独特的挑战。在这些关键的安全性问题中,了解和评估各类型 CTPs 与肿瘤形成的相关性至关重要[3-4]。干细胞产品的制造工艺、离体操作以及长时间的细胞传代等因素都可能导致最终产品被污染(如残留未分化的干细胞),或培养过程中产生恶性转化细胞/突变以及遗传不稳定性。这些因素使得干细胞产品的成瘤性(tumorigenicity)风险增高,其中胚胎干细胞和诱导多能干细胞成瘤性风险最高,其次为成体干细胞,体细胞产品风险较低[5]。相对于非基因修饰干细胞,基因修饰干细胞表达外源基因(如各种生长因子)以及基因修饰病毒载体(如逆转录病毒和慢病毒)的插入突变造成的致癌基因活化等因素,增加了 CTPs 的致瘤性(oncogenicity)风险[6]。目前,全球监管机构对 CTPs 成瘤性/致瘤性的风险评估策略尚未达成共识,建议对每种细胞治疗产品进行逐案评估。本文针对细胞治疗产品可能存在的成瘤性、致瘤性和促瘤性(tumor-enhancement)风险,较全面地概述了目前细胞治疗产品潜在肿瘤形成风险的评价策略和体内外评价方法。

1 成瘤性和致瘤性相关概念

2017 年,原国家食品药品监督管理总局发布的《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)》中将细胞治疗产品肿瘤形成风险的相关术语定义为“致瘤性”,致瘤性相关风险是细胞治疗产品的一个关键的安全性问题。实际上,与之相关的概念还包括成瘤性和促瘤性。世界卫生组织(World Health Organization, WHO)定义致瘤性为非细胞因素如化学物质、病毒、病毒核酸、病毒基因或亚细胞成分等引起动物正常细胞形成肿瘤的能力[7]。与人用药品注册技术要求国际协调会(ICH)准则 S1 中使用的致癌性(carcinogenicity)同义[8]。成瘤性是指接种细胞(包括植入自体细胞)在注射部位和/或转移部位由接种细胞本身形成肿瘤的能力。也可以说,在致瘤性/致癌性实验中鉴定出的肿瘤是宿主起源的,而在成瘤性实验中鉴定出的肿瘤来源于接种细胞。“促瘤性”概念是指干细胞对体内已存在的肿瘤细胞的生长和扩增可能产生的影响。

对于生物制品中使用的宿主细胞,成瘤性检查是看细胞基质在动物体内是否能形成肿瘤,是对细胞特性的一个鉴定。致瘤性检查是鉴定细胞里是否存在可以使细胞永生化或者具有形成肿瘤的因子,这 2 个概念不同。成瘤性高的细胞 DNA 的致瘤性似乎高于非成瘤性细胞的 DNA,但是目前还不清楚细胞的成瘤性和其 DNA 的致瘤性之间的关系。虽然有规定要求成瘤性为阳性的细胞需要做致瘤性检查,但《中华人民共和国药典》中也明确说明对已建株或者有充分经验证实无致瘤性的一些连续传代细胞,如中国仓鼠卵巢(Chinese hamsters ovary, CHO)细胞、小鼠骨髓瘤细胞(NS0 细胞)、低代次非洲绿猴肾细胞(Vero 细胞)等,不要求进行致瘤性检查。有研究证实仓鼠肾细胞(BHK21 细胞)和 CHO 细胞具有成瘤性,但并不具有致瘤性[9]。

2 成瘤性和致瘤性相关风险评价策略

2.1 国内外评价指导原则

目前,原国家药品监督管理总局、原国家卫生和计划生育委员会及国家药品监督管理局药品审评中

心(Center for Drug Evaluation, CDE)相继发布了一系列关于细胞治疗产品的质量控制、安全性评价和临床研究的指导原则,使得我国细胞治疗领域的开发和应用逐步规范化[10-11]。在国际上,欧洲 EMA、美国 FDA 及 WHO 等针对干细胞(人诱导多能干细胞和人胚胎干细胞)、体细胞、成体干细胞、转基因细胞、基因治疗产品以及生产用动物细胞培养物等发布了多项指导原则[12-13]。目前认为,每个 CTPs 对治疗患者产生的风险情况可能各具特性,其风险性评价的最佳策略也不尽相同,但这些指南中并未提供评估成瘤性/致瘤性相关风险的实验方法的详细信息。

《中华人民共和国药典》生物制品通则中《生产用动物细胞基质制备及检定规程》对细胞基质质量要求检测其成瘤性/致瘤性。有资料显示如果 CTPs 的病毒载体细胞是稳转细胞或者病毒载体不直接进入患者体内,可不进行成瘤性/致瘤性检测[6],但如果使用新的细胞,则要考虑进行成瘤性/致瘤性检测。EMA 发布的《人体细胞医疗产品的指导原则》(EMEA/CHMP/410869/2006)中表示"如果可以预见细胞转化风险则应开展成瘤性研究,重点检测其增殖能力以及染色体完整性"。EMA 在《干细胞医疗产品的反思文件》(EMA/CAT/571134/2009)中提到多能干细胞和体干细胞都存在肿瘤形成风险,培养条件可能会严重影响干细胞的基因组不稳定,延长细胞培养有助于评估成瘤性和染色体稳定性。形成畸胎瘤是 hiPSC 和 hESC 的固有风险,与成体干细胞[如 MSC 和造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)]成瘤性的考虑点有所不同。FDA 指导原则认为控制 hESC 衍生的细胞产品中未分化的 ESC 或其他细胞杂质的水平是成瘤性风险评价的主要方面,采用流式细胞术和逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)方法测定产品中残留未分化的 ESC,采用细胞增殖测定法[14-15]和软琼脂集落形成法测定恶性转化细胞[16],以检测最终产品中的杂质细胞是否超过相应测定法的检测限(limit of detection, LOD)或最小肿瘤产生剂量(minimal tumor producing doses, TPDmin)。FDA 指导原则中还重点讨论了临床前动物实验物种的选择和动物模型的预测能力,以评估植入细胞到达移植部位微环境中是否形成肿瘤,以及引起宿主细胞和植入细胞在各组织器官发生肿瘤转化的风险。

2.2 干细胞产品评价策略

依据分化潜能 CTPs 分为干细胞、体细胞、成体干细胞等,其成瘤性、致瘤性相关风险由细胞固有的生物学特征以及细胞的制造方法和质量控制决定。干细胞产品的成瘤因素多种多样,例如,来源于人多能干细胞(human pluripotent stem cells, hPSC)即 hESCs 和 hiPSCs 的 CTPs,具有无限的自我更新、分化潜能和多能性,其成瘤性风险较高,研究表明未分化的 hiPSC 可在免疫缺陷动物中形成畸胎瘤[17]。残留未分化细胞、细胞培养过程中的遗传和表观遗传变异等因素均可导致较高的成瘤性风险,在对高风险的干细胞产品进行开发时,应采用减少潜在肿瘤发生的策略,根据候选 CTPs 的质量和安全属性建立相应的成瘤性测试方法,同时考虑预期的患者人群,对其进行成瘤性风险评估。

2.3 体细胞产品评价策略

终末分化的体细胞产品在理论上成瘤性和致瘤性风险最低。成体干细胞如 MSCs 由于扩增能力有限,其成瘤性风险也较低。但有注射胎儿神经干细胞形成脑瘤的报道[18]。CAR-T 细胞产品由于引入外源基因以及病毒载体插入位点突变,使其可能具有致瘤性风险[19]。在申报体细胞和成体干细胞产品时,首先需要考虑细胞类型及其特征对肿瘤(良性和/或恶性)形成的可能影响,再决定是否进行成瘤性和致瘤性研究。对于成瘤性风险较低的体细胞产品可能无需开展体内成瘤性和致瘤性评价,仅需考虑在生产过程中最终产品被成瘤细胞污染的情况,以及非同源植入对移植部位微环境的影响。可先通过体外研究初步探讨其成瘤性风险。

3 成瘤性和致瘤性风险评价方法

3.1 体外评价方法

迄今为止,国内外尚未发布关于 CTPs 及其衍生产品的成瘤性评价的详细指导原则。降低成瘤性风险的基本策略是使 CTPs 中残留的未分化细胞和转化细胞最小化。而体外测试方法检测残留未分化的 hPSC 或转化细胞可能比体内动物实验更敏感,但仍需进一步验证和标准化。表 1 例举了细胞治疗产品体外成瘤性检测方法。

表 1 细胞治疗产品成瘤性的体外检测方法

目标	方法	指标	特点	案例
未分化的 hPSC	流式细胞仪 qRT-PCR	标记 hPSC 蛋白 hPSC 基因表达	快速测定,可分离收集单个细胞 测定简单快速	抗 TRA1-60 抗体标记检测原代视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞中 0.1% 未分化 hPSC Lin28 mRNA 特异性探针和引物检测 RPE 细胞中 0.002% 未分化 hPSC[20]
转化细胞	数字化分析/软琼脂集落形成实验(soft-agar colony formation,SACF)	恶性转化细胞集落形成	高灵敏度,但不适用于检测非凋亡的悬浮细胞	高内涵图像分析 SACF,人间充质干细胞含 0.000 01% 个 Hela 细胞[21]
永生化细胞	连续传代细胞生长特性分析	细胞增值率	比用裸鼠检测永生化和非成瘤细胞更敏感	细胞生长分析含 0.000 1% Hela 的骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSC)比单独 BMSC 生长速率显著增加[22];ASC/TERT1 永生化脂肪来源的间充质干细胞比单独人脂肪来源的干细胞生长速率显著增加
培养细胞基因组不稳定性	G 带核型分析 阵列比较基因组杂交(CGH)阵列 荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)	染色体数量、大小和结构 基因拷贝数变异 染色体上特定 DNA 序列的定位和定量	这些技术已用于化学物质的遗传毒性评价	源自 iPSCs 皮肤成纤维细胞传代早期、晚期对大量 hESC 系进行高分辨率基因组分析[23]

3.2 体内评价方法

动物实验是传统药物开发中临床前安全性评价的主要方法。但现有的动物模型用于 CTPs 的成瘤性和致瘤性评价存在一定的局限性。例如,无法完全复制人体疾病状态或模拟人类肿瘤微环境;与人类相比动物的寿命较短(尤其免疫缺陷动物),从而限制了其纵向致瘤性评估;对各类动物模型的背景性数据以及免疫缺陷对植入细胞致瘤性的影响(免疫监测能力降低会增加 CTPs 依赖性或非依赖性肿瘤形成的风险)尚不完全了解。然而,即便存在诸多局限性,由于目前尚无更好的选择,监管指南要求在某些情况下进行体内成瘤性和致瘤性测定[24]。

免疫系统正常动物对植入的人类细胞可能产生免疫排斥反应,因此免疫缺陷动物是开展 CTPs 成瘤性和致瘤性研究的较好模型。目前常用的免疫缺陷动物模型包括裸鼠、NOG 小鼠、NSG 小鼠等重度联合免疫缺陷型(severe combined immuno deficiency disease, SCID)小鼠。在选择最合适、最敏感的模型进行成瘤性和致瘤性研究时,除了考虑 CTPs 的生物学特性、体外操作条件、细胞分化持久性、给药途径以及预期临床用途,最重要的是保证植入细胞在该种属体内有足够的存活时间,以观察肿瘤形成的可能性。在临床前研究中,通常使用裸鼠进行成瘤性研究,使用 SCID 小鼠开展更长时间的致瘤性研究。

3.2.1 生物制品生产用细胞的成瘤性和致瘤性评价方法 依据《中华人民共和国药典》中生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制[13],细胞产品成瘤性研究的一般方法是将细胞接种于皮下或肌内注射,至少观察 16 周注射部位是否形成结节,如有结节形成则每周进行双向测量,以判定结节为进行性、稳定或消退。通常设定 Hela 细胞为阳性对照,至少 9 只阳性对照组动物有进行性肿瘤生长时实验视为有效。对结节开始消退的动物进行处死,不能形成进行性结节的细胞视为无成瘤性。对注射部位及其他组织器官(心脏、肺脏、肝脏、脾脏、肾脏、脑及局部淋巴结)进行肉眼和组织病理学检查,以判断接种细胞是否形成肿瘤或转移瘤。

《中华人民共和国药典》对生物制品生产检定用动物细胞基质的致瘤性检查是考察细胞裂解物、细胞 DNA 等细胞成分诱导动物本身细胞形成肿瘤的特性。其实验方法规定将细胞裂解物、细胞 DNA 分别于肩胛骨处皮下接种新生裸鼠、新生仓鼠及新生大鼠。至少观察 4 个月接种部位是否有结节形成,如有结节形成则每周进行双向测量,以判定结节为进行性、稳定或消退。当进行性结节达到 2 cm 或

观察期末处死动物,对肉眼观察和显微观察疑似肿瘤的组织以及肝脏、心脏、肺脏、脾脏及局部淋巴结进行组织病理学检查,对检查的各脏器中出现的肿瘤要分析与接种部位原发肿瘤的关系,排除自发肿瘤的情况。对于接种部分和各脏器无肿瘤生长应判断为无致瘤性;分析形成的肿瘤的基因组 DNA 是细胞基质 DNA 还是接种宿主来源的 DNA,若为宿主来源的 DNA 则判定为致瘤性;对细胞基质 DNA 引起的进行性结节,应鉴别致瘤性因子或致瘤性活性,从而确定细胞的可适用性。

3.2.2 CTPs 致瘤性评价方法 CTPs 致瘤性研究的目的是评价因宿主细胞和 CTPs 发生肿瘤转化而引起的致瘤性风险。传统的致癌性研究方法不可行。CTPs 的体内致瘤性实验可与较长周期的动物毒理学研究伴随开展,以此评价细胞和/或裂解物促进正常细胞转变为肿瘤细胞的能力[14]。应使用拟用于临床的最终产品,不建议使用替代产品进行研究。

使用动物疾病模型开展 CTPs 体内长毒伴随致瘤性实验,其实验设计应关注以下几点:① 给药途径,实验中应选择临床预期的给药途径(route of administration, ROA)或临床预期 ROA 附加皮下途径。可伴随开展移植细胞局部刺激实验。② 动物数量,逐案设计所需的无致瘤性动物数量;每组足够的动物数量以确保肿瘤发生率(包括背景性的肿瘤)的分析满足统计学要求。③ 选择适当的对照品,包括阳性对照、溶媒对照以及可能产生的未分化细胞、部分分化细胞对照。④ 给药剂量,CTPs 的给药剂量应与实际患者所用剂量相同或最大可行剂量/最大耐受剂量。如果难以将相同数量的细胞植入到小型动物模型中,则可以将细胞数量按比例缩小到最大可行剂量。或者当 CTPs 直接注射到特定的靶部位(如大脑、脊髓、心脏或眼睛的特定区域)时,可以考虑根据器官重量或靶区域的体积来调整剂量。保持移植细胞与植入区域的比例类似于人体模式。设定的高剂量水平为给予最大的绝对细胞数量。⑤ 实验周期,以药动学研究所显示的细胞存续时间或者荷瘤动物在受试物作用后的最长存活时间,作为致瘤性研究时间点,通常进行 6 或 9 个月的致瘤性研究。⑥ 临床观察和病理学检查,观察与肿瘤发生有关的临床症状。剖检及组织病理学检查细胞在植入部位、靶部位和非靶部位分布、增殖和扩散情况。在观察到肿瘤形成的情况下,首先排除自发肿瘤,进一步鉴别诊断其来源于接种细胞还是宿主细胞。此外,应用成像技术荧光探针标记各类型细胞,可以可视化追踪各组织器官潜在的肿瘤细胞。在生物分布研究中,对于含有植入细胞或其表达产物的组织,在致瘤性研究中也应特别加以分析。在观察到肿瘤形成的情况下,还可进行基因/遗传分析,用以调查是给药产物还是内源性肿瘤形成的结果。

4 结语

成瘤性、致瘤性和促瘤性是细胞治疗产品固有的潜在风险。鉴于 CTPs 的复杂性和异质性,研发者和监管当局在其开发过程中提出了特殊的考虑和要求,包括对成瘤性和致瘤性相关的监管和风险管理提出了一些建议:① 在开发过程中及早发现风险,建立有效减轻患者不良反应的框架。当将新型 CTPs 的初始数据提交给监管机构审核或批准时,通常认为一定数量的临床治疗患者以及治疗后的长时间随访可能减少产品成瘤性和致瘤性相关风险形成的机会。但在新药申报时,则需要提供足够的有关成瘤性和致瘤性相关风险的临床及临床前数据。② 设计适当的上市后研究,以跟进这些药物的安全性和有效性。包括观察性研究、随访患者肿瘤的发生情况以及通过基因分析鉴别患者体内肿瘤的起源等。总之,收集和共享尽可能多的数据,对开发安全有效的 CTP 至关重要。

[参 考 文 献]

[1] Clinical Trials. gov. Subretinal Transplantation of Retinal Pigment Epitheliums in Treatment of Age-related Macular Degeneration Diseases[EB/OL]. (2020 - 10 - 14). https://clinicaltrials. gov/ct2/show/NCT02755428? term = retinal + pigment + epithelial + cells&cond = age-related + macular + degeneration&draw = 2&rank = 5.

[2] 屈哲, 林志, 吕建军, 等. CAR-T 细胞产品毒性评价概述[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(21): 2646 - 2650.

[3] PRIEST CA, MANLEY NC, DENHAM J, *et al*. Preclinical safety of human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors supporting clinical trials in spinal cord injury[J]. *Regen Med*, 2015, 10(8): 939 - 958.

[4] KANEMURA H, GO MJ, SHIKAMURA M, *et al*. Tumorigenicity studies of induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived retinal pigment epithelium (RPE) for the treatment of age-related macular degeneration[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85336.

[5] 雕钰惟, 梁毅. 日本细胞治疗产品管理及对我国的启示[J]. 药学进展, 2019, 43(12): 908 - 913.

[6] 孟淑芳, 王佑春, 吴雪伶, 等. CAR-T 细胞治疗产品质量控制检测研究及非临床研究考虑要点[J]. 中国药事, 2018, 32(6): 831 - 852.

[7] WHO. World Health Organization Technical Report Series No. 987 Annex 3. 2013. In: Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell bank; 2013

[EB/OL]. [2018 - 09 - 24]. http://www.who.int/biologicals/vaccines/TRS_978_Annex_3.pdf.

[8] In: International Conference on Harmonization. Guideline S1: Rodent carcinogenicity studies for human pharmaceuticals; 2012 [EB/OL]. [2019 - 02 - 07]. https://www.ich.org/fifileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S1/S1_Concept_Paper_14_November_2012.pdf.

[9] 于义娟, 秦涛, 闵娟娟, 等. BHK-21 细胞不同处理方式对裸鼠致瘤性的影响[J]. 中国兽药杂志, 2017, 51(11): 28 - 35.

[10] 国家食品药品监督管理局药品审评中心. 细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)[S]. 2017.

[11] 国家卫生和计划生育委员会. 干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行)[S]. 2015.

[12] EMA. EMA/CAT/GTWP/671639/2008Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells[EB/OL]. (2012)[2019 - 02 - 07]. https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-medicinal-products-containinggenetically-modified_en.pdf.

[13] US FDA. Guidance for Industry: Preclinical assessment of investigational cellular and genetherapy products[S]. (2013)[2019 - 02 - 07]. https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/CellularandGeneTherapy/UCM376521.pdf.

[14] KONO K, TAKADA N, YASUDA S, *et al*. Characterization of the cell growth analysis for detection of immortal cellular impurities in human mesenchymal stem cells[J]. *Biologicals*, 2015, 43(2): 146 - 149.

[15] HASEBE-TAKADA N, KONO K, YASUDA S, *et al*. Application of cell growth analysis to the quality assessment of human cell-processed therapeutic products as a testing method for immortalized cellular impurities[J]. *Regen Ther*, 2016, 5: 49 - 54.

[16] KUSAKAWA S, YASUDA S, KURODA T, *et al*. Ultra-sensitive detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed therapeutic products by digital analysis of soft agar colony formation[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 17892.

[17] YASUDA S, SATO Y. Tumorigenicity assessment of human cell-processed therapeutic products[J]. *Biologicals*, 2015, 43(5): 416 - 421.

[18] ABBOT S, AGBANYO F, AHLFORS JE, *et al*. Report of the international conference on manufacturing and testing of pluripotent stem cells[J]. *Biologicals*, 2018, 56: 67 - 83.

[19] LI YH, HUO Y, YU L, *et al*. Quality control and nonclinical research on CAR-T cell products: general principles and key issues [J]. *Engineering*, 2019, 5(1): 122 - 131.

[20] KURODA T, YASUDA S, SATO Y. *In vitro* detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human induced pluripotent stem cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1210: 183 - 192.

[21] KUSAKAWA S, YASUDA S, KURODA T, *et al*. Ultra-sensitive detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed therapeutic products by digital analysis of soft agar colony formation[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 17892.

[22] HASEBE-TAKADA N, KONO K, YASUDA S, *et al*. Application of cell growth analysis to the quality assessment of human cell-processed therapeutic products as a testing method for immortalized cellular impurities[J]. *Regen Ther*, 2016, 5: 49 - 54.

[23] ABBOT S, AGBANYO F, AHLFORS JE, *et al*. Report of the international conference on manufacturing and testing of pluripotent stem cells[J]. *Biologicals*, 2018, 56: 67 - 83.

[24] SATO Y, BANDO H, DI PIAZZA M, *et al*. Tumorigenicity assessment of cell therapy products: The need for global consensus and points to consider[J]. *Cytotherapy*, 2019, 21(11): 1095 - 1111.

编辑:刘卓越/接受日期:2021 - 05 - 21