·生物医药前沿·

干细胞临床研究质量复核中发现的问题及初步分析

张可华,纳　涛,韩晓燕,吴婷婷,张丽霞,贾春翠,袁翔鹤,冯建萍,项　楠,孟淑芳
(中国食品药品检定研究院生物制品检定所细胞资源保藏研究中心,卫生部生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室,北京 102629)

[摘要]　自2015年《干细胞临床研究管理办法(试行)》颁布以来,中国食品药品检定研究院生物制品检定所细胞资源保藏研究中心承接了大量的干细胞临床研究细胞制剂质量复核工作,在与干细胞制剂研发机构技术沟通、资料审阅过程中发现了若干在细胞制备工艺、制剂质量标准中存在的问题,在质量复核中也发现在干细胞安全性和干细胞特性检测方面存在多项不符合规定或异常的情况。本文总结了当前本中心在干细胞质量复核中发现的各种情况并进行了简要分析,为干细胞制剂研发生产、质量控制以及临床使用提供参考。

[关键词]　干细胞;干细胞临床研究;质量复核
[中图分类号]　R969.4　　[文献标志码]　A　　[文章编号]　1003-3734(2021)19-1746-06

The quality issues in quality review for stem cell clinical research and its primary analysis

ZHANG Ke-hua, NA Tao, HAN Xiao-yan, WU Ting-ting, ZHANG Li-xia, JIA Chun-cui, YUAN Xiang-he, FENG Jian-ping, XIANG Nan, MENG Shu-fang
(*Cell Collection and Research Center, Key Laboratory of the Ministry of Health for Research on Quality and Standardization of Biotech Products, Institutes for Biological Products Control, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing* 102629, *China*)

[**Abstract**]　Since the administration of "Measures for the Administration of Stem Cell Clinical Research (for Trial Implementation)" in 2015, Cell Collection and Research Center of Institutes for Biological Products Control, National Institutes for Food and Drug Control has undertaken the task of reviewing the quality of stem cell preparations used in clinical research. During the technical communication with stem cell preparation developers and data reviewprocess, some problems were found in cell preparation technique and quality standards of formulation. It was also found that there were a number of non-compliance with the safety and effectiveness test of stem cells. This paper briefly summarizes and analyzes the problems found in the stem cell quality review in our center, so as to provide valuable insights into the research, manufacture, quality control and clinical use of stem cell products.

[**Key words**]　stem cell; stem cell clinical research; quality control

近年来干细胞治疗研究发展迅速,为组织器官修复与再生、解决重大难治性疾病带来了希望。为了促进和规范干细胞研究的临床转化,原国家卫生计划生育委员会和原国家食品药品监督管理总局于2015年7月联合发布了《干细胞临床研究管理办法(试行)》[1],明确了以医疗机构为责任主体、并以干细胞临床研究机构和临床研究项目双备案的方式,开展干细胞临床研究,获得的临床数据可为干细胞

[基金项目]　中国科学院战略性先导科技专项资助项目(XDA16040502);中国药品监管科学行动计划细胞和基因治疗产品技术评价与监管体系研究资助项目
[作者简介]　张可华,男,副研究员,主要从事干细胞质量研究。联系电话:(010)53851708,E-mail:zhangkehua@nifdc.org.cn。
[通讯作者]　孟淑芳,女,研究员,主要从事治疗性细胞产品及生产用细胞基质的质量研究。联系电话:(010)53851735,E-mail:mengsf@nifdc.org.cn。

药物的临床试验申请提供参考。自该管理办法发布以来至2021年9月,干细胞临床研究备案机构已达110多家,备案项目100余项,参与临床研究的干细胞类型包括间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSC)、神经干细胞(neural stem cells,NSC)、多能干细胞(pluripotent stem cells,PSC)诱导分化细胞以及体内的组织单能干细胞,在各类免疫失调性疾病、组织退行性疾病、移植物排斥反应、肝硬化和糖尿病等多种适应证开展临床研究。

干细胞产品质量是临床研究安全性和有效性的决定因素,与产品研发和制备的全过程密切相关。为大力支持干细胞临床研究项目备案,我们以《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行)》[2]为指导、以实验室坚实的细胞基质质量控制技术为基石、以干细胞质量控制方法研究为技术支撑,承接了大量的干细胞临床研究细胞制剂的质量复核任务。自2015年至2021年上半年,已经收检了500多批干细胞(包括细胞库和制剂)并发布检验报告400余份。在同干细胞生产单位技术沟通与干细胞检验当中,发现干细胞制剂的生产和质控中存在许多质量相关共性问题。本文初步总结了目前发现的问题并做简要分析,以期引起干细胞制剂生产单位和使用者对细胞质量的关注,对干细胞临床研究制剂(或干细胞药物)研发提供参考。

1 干细胞制剂生产工艺相关问题

1.1 原材料和辅料 干细胞研发机构在生产用原材料和辅料方面普遍存在的问题主要包括以下几个方面:① 大部分干细胞研发机构特别是医疗机构,对原材料和辅料概念尚存在误区,将原材料与辅料混为一谈。② 所列原材料及辅料清单不全面,缺少质量控制标准或不能根据风险等级设立合理的质量标准[3]。③ 部分干细胞生产企业和原辅料生产供应商可能出于信息保密考虑,关键性原材料常常不能提供,比如未详细说明细胞培养基及添加剂、iPSC重编程及诱导分化试剂的成分和来源,导致无法判断其产品是否存在一定的安全隐患,无法在干细胞质量评估时重点关注。

细胞培养基和添加剂、细胞消化液以及其他与干细胞制剂接触的原材料应参照《中华人民共和国药典》生物制品生产用原材料及辅料质量控制的要求尽量选用低风险等级材料[4],如已有获得上市许可的无菌注射剂,如人血白蛋白,不应再使用更高风险级别的材料。对中高风险材料除了提供生产商提供的成分清单及质量合格证明外,还应合理设立质控标准,开展企业内部质控检测。非必要的人源或动物源性成分,应尽可能研究和使用替代品,如部分企业使用了猪源性胰酶,而非使用重组胰酶。基因修饰载体尽可能避免使用病毒载体,尤其是具有逆转录活性的病毒载体。部分企业在组织采集和运输阶段为防止细菌污染,会短暂使用含抗生素的缓冲液清洗和浸泡组织,但不得使用青链霉素等易致敏的抗生素,也不要将多种抗生素混合使用,在细胞培养扩增过程中不要再使用抗生素。

在使用成分明确的干细胞无血清培养基时,不能说明细胞培养的添加剂成分组成、来源、含量以及杂质等情况,也未建立合理的质量控制措施,比如建立添加剂成分的清除工艺,开展残留量的安全范围研究。细胞培养基成分作为主要的生产用原材料,如不能充分地研究和质控,将存在较大的安全风险。

有些企业对原材料、辅料、包装材料和细胞质检的实验材料等概念理解不清,也未设立合理的质量标准。个别干细胞生产企业使用非密闭性的细胞冻存管或细胞培养瓶作为成品制剂的包装材料。

1.2 产品制备条件和制备工艺 干细胞制剂制备条件方面遇到的问题,包括制备条件不符合GMP要求,例如操作环境洁净度不符合B级背景下局部A级的要求,常见为C级洁净度。没有提供由有资质的第三方机构出具的洁净度检测报告。

细胞制备工艺方面,突出问题是许多生产企业仅有生产过程描述,缺少工艺研究内容和工艺验证研究。细胞采集分离、培养传代、建库冻存、质粒或病毒载体制备、体外诱导分化、成品制备及材料组合等关键性生产工艺环节需要提供研究数据,结合产品的关键质量属性(CQA)研究确定关键工艺参数(CPP)和设计空间。

建立合理的细胞库是保障产品质量一致性与质量合格的重要措施。是否建立细胞库,建立几级细胞库,每一级细胞库、原液和成品的代次等工艺问题,要根据干细胞特性、长期储存稳定性、预期临床使用量等因素综合研究确定。干细胞特性研究要对比和评价细胞传代稳定性,重点考察细胞鉴别和纯度、干细胞生长增殖特性、干性和分化特性、体内外有效性、遗传稳定性和成瘤性等因素。细胞库要经过充分检定。细胞扩增传代需使用培养瓶、多层培养瓶等开放性小的容器,不要使用培养皿和多孔板这种开放性强的培养方式。企业在细胞库建库方面

存在问题主要表现在:细胞库代次不唯一,或用多个代次细胞混合后制备细胞库;高级细胞库未从低级细胞库复苏制备而是直接从更原始细胞直接连续传代制备;为追求更多细胞数量而随意调整细胞传代比例等情形。

许多企业未提供干细胞制剂原液和成品制备工艺。需要以与生物材料一起组合的形式应用的干细胞需要说明其组合方式,在输注或植入前需要进一步处理和加工的细胞制剂要提供在医院内操作规程以及人员、设施和环境等质量控制措施。

2 干细胞制剂质量标准相关问题

干细胞制剂质量标准方面普遍存在的问题有:干细胞制剂质量研究数据不充分,用质量检验结果替代质量研究数据;质量标准中缺少必要的安全性和有效性检测指标;质量检测方法未经过适用性评价和方法学验证;质量控制项目取样点不考虑最适样本点等。

微生物污染安全性方面,目前很少干细胞生产单位能够按照《中华人民共和国药典》要求全面开展无菌、支原体和内外源病毒因子检查。无菌检查多采用全自动细菌检查仪器检测,少部分采用涂板培养法,观察时间为 3 ~ 7 d,不满足《中华人民共和国药典》无菌检查法的培养观察 14 d 的要求。支原体检查大多数干细胞生产企业采用 PCR 法或生物发光法等快速支原体检测试剂盒,未采用培养法和 DNA 染色法相结合的检查方法。病毒因子检查常采用 PCR 法或 ELISA 法等临床检验方法,部分企业仅对供体的血液样本做过检测,对生产过程关键环节细胞库和制剂则未设立病毒因子的质量检测标准。另外,微生物检测替代性方法缺少必要的专属性、检测限、重复性和耐用性等方法学验证内容。一些检验方法甚至没有经过适用性评估,例如采用临床检验中常用的 ELISA 法检测血液中病毒 IgM 抗体的方法检测细胞培养上清中病毒,以及采用解脲脲原体检测方法替代支原体污染检查。

产品有效性方面,普遍缺乏能反映产品特性的或与临床适应证治疗相关的质量研究,按照“细胞模型-动物模型-临床疗效”途径开展的有效性研究较少,适用于产品放行检验的快速有效性分子标志物检测方法的开发和应用尚缺乏[5-6]。一方面是由于干细胞制剂的临床适应证具有发病机理不清、病理特征复杂的特点,另一方面也反映了干细胞研发企业对产品有效性研究重视程度不足。另外,稳定性研究项目设置欠合理,稳定性检测项目不能反映产品质量的变化。

近年来一些创新性基因修饰或基因编辑细胞也即将进入临床研究阶段。对于这类细胞,需要针对存在的风险特征建立相应的质量控制措施。然而从目前一些产品的资料看,基因修饰的干细胞缺少对修饰工具生产工艺的描述及质量要求,缺少修饰细胞的特异性质量评价项目,如整合拷贝数、整合位点分析、病毒复制恢复性突变检测、编辑效率及脱靶效率检测、编辑工具残留、特定添加因子残留控制等。

另外还存在的问题包括:一些制剂产品的质量标准未按照《中华人民共和国药典》注射剂通则要求进行外观、装量、渗透压等物理检查;制剂标签不合理,干细胞制剂有效期大多为 12 ~ 24 h,标签上出厂时间未精确到时;第三方复核检验只有一批细胞,未能显示工艺稳定性。

3 干细胞产品复核检验中遇到的问题

本中心从 2015 年起开展干细胞产品复核检验,共收检 500 余批干细胞检品,已发报告 400 余份,存在质量问题检品有 44 批,约占 10% 。其中有明确的质量标准而不符合规定的有 13 批。常见不合格原因有细胞发生交叉污染或混淆、支原体污染、软琼脂克隆阳性以及 MSC 表面标志物不合格等,见图 1。

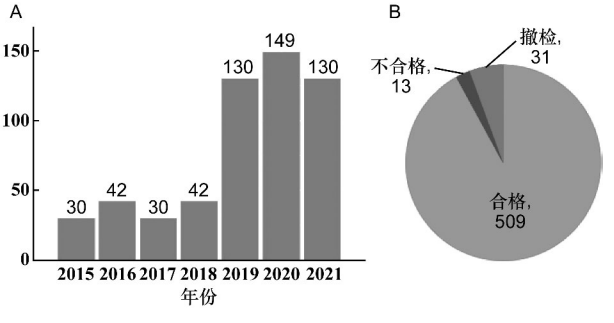
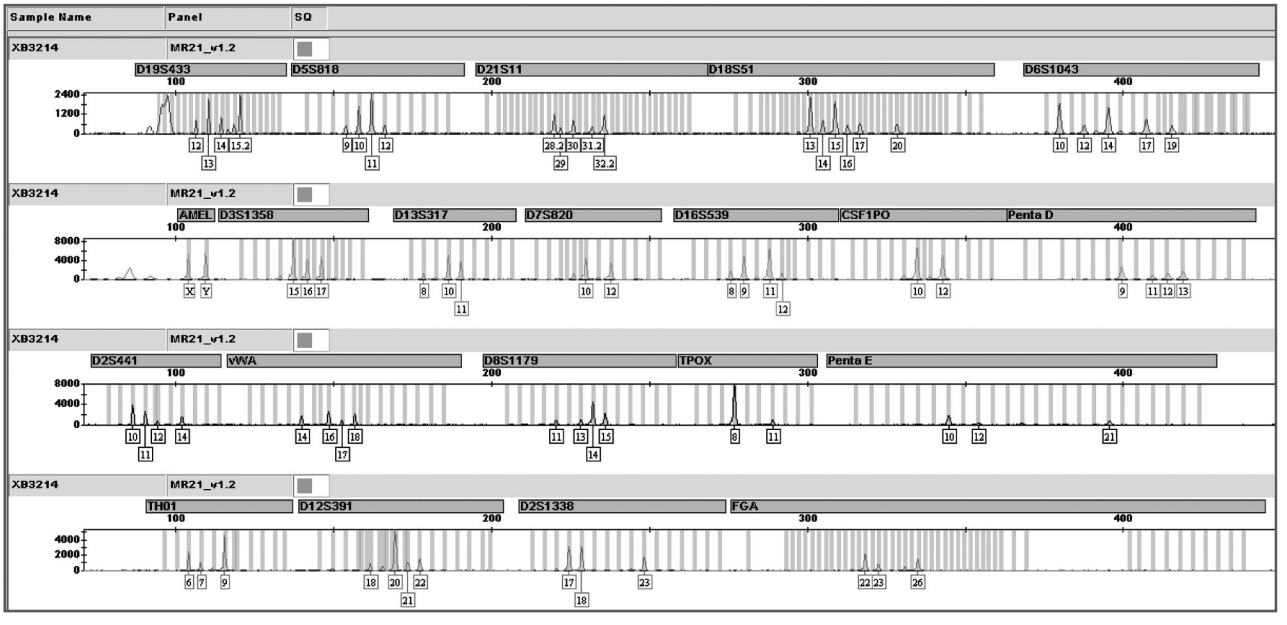


图 1 干细胞产品复核检验数量统计

3.1 细胞鉴别和纯度 人源 STR 图谱分析结果异常所致检品不合格最为常见,不合格发生率为 4.2% 。不合格原因包括检品细胞存在细胞间的交叉污染,表现为每个 STR 位点出现 3 ~ 4 个等位基因峰;检品细胞与相同个体来源的其他代次细胞 STR 图谱不一致;新鲜检品细胞与冻存状态细胞 STR 图谱不一致;首次送检细胞与后期补送的同一株细胞 STR 图谱不一致等情况,见图 2。MSC 表面标志物普遍接受的标准应满足 CD73,CD90,CD105 阳性率不低

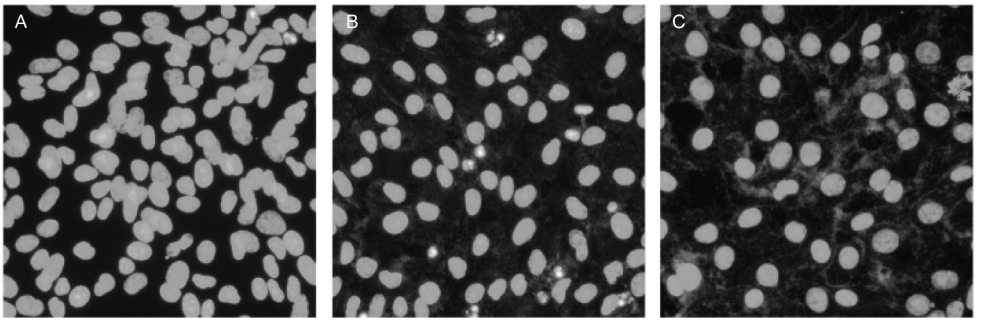
于 95%，CD11b 或 CD14，CD19 或 CD79a，CD34，CD45 和 HLA-DR 阳性率应不高于 2%。MSC 表面标志物不合格率约为 2.2%，不合格的情况主要集中 CD105，CD45 和 CD90 不符合规定。我们对 MSC 表面标志物不合格做进一步分析，将细胞培养基中 FBS 更换成另外一种品牌的 FBS，培养 1 代后发现，细胞形态和生长性状发生了改变，CD105 和 CD45 阳性率也发生了改变，并满足了标准要求。这个研究提示 MSC 表面标志物与细胞培养条件导致的细胞性状发生改变有关。



上图显示每个位点存在多个等位基因峰，提示存在交叉污染

图 2　STR 图谱鉴别结果

3.2　微生物污染检查　支原体污染是微生物污染中最常见的因素，支原体污染发生率为 1.5%。以药典中规定的培养法和指示细胞感染法（或称 DNA 染色法）对送检细胞进行质量复核，检出支原体阳性。支原体检查复核阳性提示生产企业在微生物污染控制和检出方面均存在不足，多数企业内部支原体检查方法没有进行专属性和检测限验证，导致检测支原体种类偏少，检测灵敏度较低，见图 3。

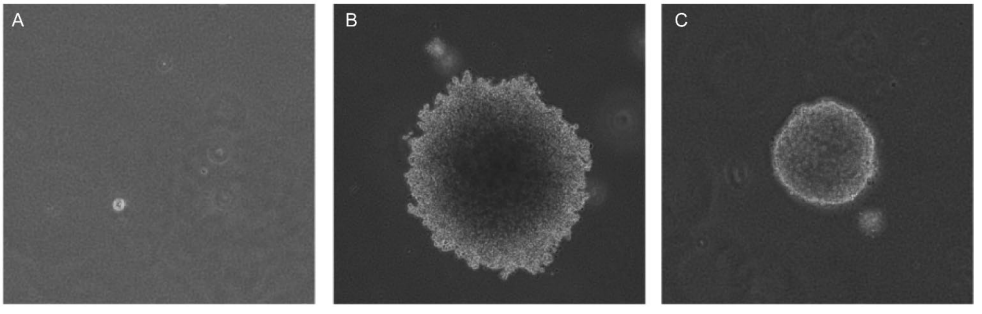


A：阴性对照；B：阳性对照；C：待检 MSC 结果为阳性

图 3　支原体检查结果

3.3　成瘤性检查　成瘤性检查适用于 MSC 和 NSC 等成体干细胞以及 PSC 终末分化细胞等成瘤性为阴性的细胞。以接种到免疫缺陷动物体内观察肿瘤形成为主要检查方法，检测肿瘤细胞非锚定性生长能力的体外软琼脂克隆形成实验，以及细胞端粒酶活性升高的评价方法作为体内法的补充。开展干细胞质量复核检验以来，通过裸鼠体内接种实验未检测到各类干细胞产品在动物体内原发瘤和转移瘤发

生,然而软琼脂克隆形成实验检测到一些无血清培养基工艺下的 MSC 在琼脂糖凝胶中出现克隆性生长的结果,甚至部分克隆生长较快,提示具有较高成瘤性风险。通过对诱导软琼脂克隆阳性的培养基成分进行分析发现,表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)和血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor,PDGF)等细胞因子水平较高。往培养基中添加 EGF,FGF,PDGF 可促使原本阴性的 MSC 出现阳性克隆,这提示无血清培养基成分对 MSC 细胞生物学特性有非常大的影响,选择无血清培养基时不仅要考察细胞的增殖、老化、凋亡等活性因素,促使分化、免疫调控等干性和生物学有效性因素,同样要关注细胞成瘤性风险,见图 4。



A:阴性对照;B:阳性对照 Hela-S3;C:部分无血清培养工艺的 MSC 呈克隆阳性

图 4 软琼脂克隆形成试验

3.4 染色体核型检查 染色体核型检查是检测细胞遗传背景是否存在异常以及评价体外传代和操作过程是否引起遗传变异的重要手段。干细胞质量复核中发现其中有 1 株细胞 8 号和 14 号染色体部分片段发生易位,这是由于该细胞在供体筛查时没有做核型检查导致。另外还检测到某些 iPSC 细胞株在体外传代到一定阶段后部分细胞出现染色体三体、基因拷贝数变异和染色体片段易位等异常,见图 5。

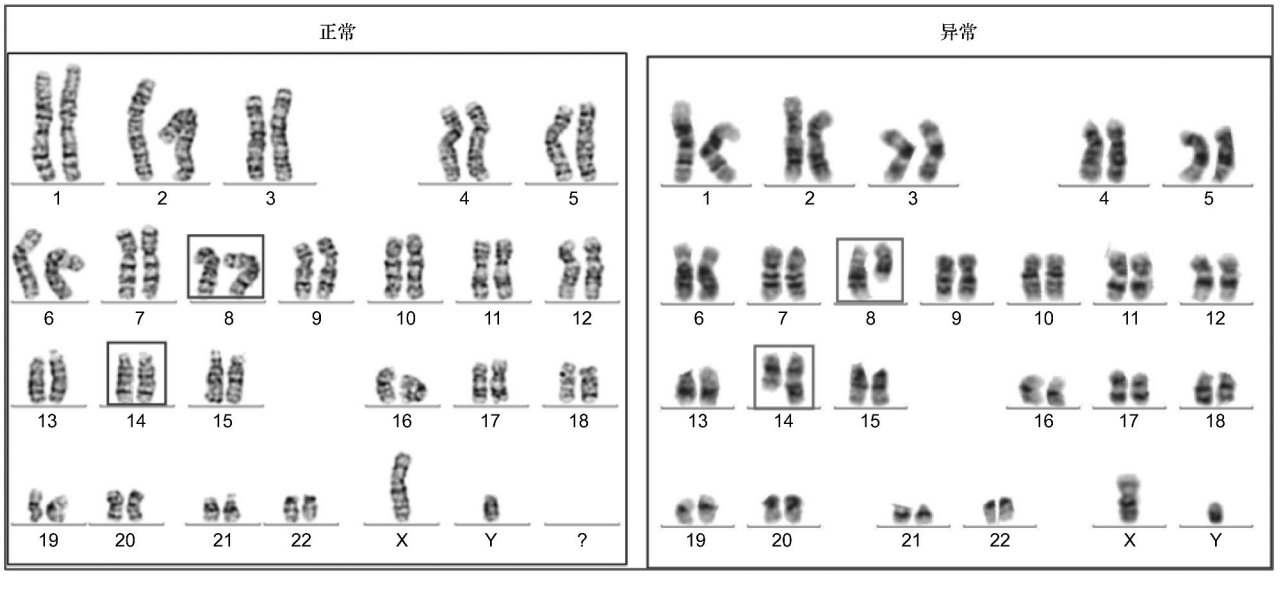
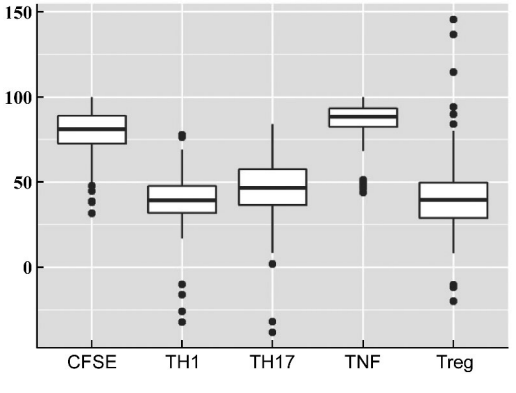


图 5 染色体核型分析显示 8 号染色体和 14 号染色体易位

3.5 MSC 诱导分化能力检测 MSC 成脂、成骨和成软骨三系诱导分化能力反映了 MSC 的干性,同时也反映了 MSC 治疗某些疾病的有效性。在三系诱导分化检测当中,成骨诱导分化能力为阴性较为常见,占 4%(只报告结果,未算作不合格)。从组织来源上看,无成骨诱导分化能力的多为脐带来源,少数为胎盘来源。另外也同个体来源差异和培养体系有关。成软骨分化能力和成脂分化能力为阴性的细胞

较为少见。MSC 诱导分化能力的部分丢失可能反映了细胞干性下降或呈现部分分化状态,然而细胞对淋巴细胞的免疫调控能力并未检测到明显下降。

MSC 具备免疫调控功能是调节体内免疫稳态、治疗自身免疫病和多种原因导致炎症过激的重要生物学基础。体外评价免疫调控功能是 MSC 有效性检测的重要内容之一。MSC 各产品均可不同程度抑制有丝分裂原刺激的淋巴细胞增殖,抑制率 30% ~100% 不等,平均值为 79.5%,抑制淋巴细胞分泌炎症因子 TNF-α,抑制率 43.9% ~100%,平均值为 86%。然而,MSC 产品抑制 Th1,Th17 淋巴细胞亚群增殖能力相差较大,其中 Th1 增殖抑制率在 -32% ~77.9% 之间,平均值为 38%,Th17 抑制率范围为 -38% ~84%,平均值为 45%。抑制率为负值代表 MSC 可活化 Th1 和 Th17。MSC 促进 Treg 增殖能力相差同样较大,增殖促进率范围为 -20% ~145.5%,增殖促进率为负值表明该 MSC 可抑制 Treg 淋巴细胞亚群增殖。值得注意的是,促进 Th1 和 Th17 增殖、抑制 Treg 增殖这 3 种情况通常会在同一株 MSC 中出现,提示该细胞已经不具备免疫抑制功能,见图 6。



CFSE,Th1,Th17,TNF 和 Treg 分别表示 MSC 抑制淋巴细胞增殖抑制率,Th1 和 Th17 亚群抑制率,淋巴细胞分泌炎症因子 TNF-α 抑制率以及淋巴细胞亚群 Treg 促进率

图 6 MSC 免疫调控功能

3.6 制剂装量、细胞数和活率 装量和细胞数不符合规定是干细胞成品注射液不合格的主要因素。《中华人民共和国药典》制剂通则规定注射液装量应不低于标示量,生产企业灌装时往往忽略附加量问题,导致实际吸出的装量不足。细胞数和活率不符合规定往往是由于细胞计数方法未经过验证引起,这一点在使用细胞全自动计数仪时尤为突出,由于细胞悬浮液不适合、细胞计数参数设置不合理、细胞计数仪未经校准等因素导致细胞活率与实际相差较大。另外,部分企业细胞数和活率的内控标准的最低值和最高值范围相差过大,且没有数据支持细胞数差异对安全性和有效性带来的影响,增大临床应用时的无效性和安全性风险。

4 结语

干细胞制剂质量复核当中发现的以上各种问题,提示我国干细胞研发和生产企业要充分考虑当前发布的细胞制剂或细胞药物的指导原则(如《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行)》以及《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)》[7])的要求,根据干细胞产品的质量特性和潜在风险,加强产品的质量设计和质量管理,充分做好细胞产品工艺研究和工艺验证,不断完善产品的质量研究和质量标准研究。同时建议干细胞制剂研发、质控等全过程尽量遵循药品研发的标准和要求,在临床研究中获得安全性有效性数据,以期能够与药物临床试验申报更好衔接。

[参 考 文 献]

[1] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局. 干细胞临床研究管理办法(试行)[EB/OL]. http://samr.cfda.gov.cn/WS01/CL1031/127243.html.

[2] 国家食品药品监督管理总局. 干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行)[EB/OL]. [2021 - 08 - 07]. http://samr.cfda.gov.cn/WS01/CL1616/127242.html.

[3] 中国医药生物技术协会. 干细胞临床研究项目备案材料审核要点(试行)[EB/OL]. [2021 - 08 - 07]. http://www.cmba.org.cn/common/index.aspx-nodeid=281&page=ContentPage&contentid=4387.htm.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2020 年版. 三部. 北京:中国医药科技出版社,2020.

[5] 韩晓燕, 纳涛, 张可华, 等. 人间充质干细胞生物学有效性的质量评价[J]. 中国新药杂志, 2018, 27(21): 2511 - 2518.

[6] 张可华, 纳涛, 韩晓燕, 等. 基于免疫调控功能的间充质干细胞生物学有效性质量评价策略[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(3): 50 - 58.

[7] 国家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)[EB/OL]. [2021 - 08 - 07]. https://www.cde.org.cn/zdyz/domesticinfopage?zdyzIdCODE=452c529b299638297210fe4a1294eb31.

编辑:杨青/接受日期:2021 - 08 - 31