

· 综述 ·

干细胞来源细胞治疗产品非临床安全性评价概述

闫振龙¹,滕伊洋^{2,3},张亚群¹,钱庄²,李言川¹,胡文元¹,钟小群¹,胡静¹,陈晓俊¹,李一昊¹,
彭瑞楠¹,王娅¹,李慧¹,葛建雅¹,缪成贤¹,吕建军¹,大平东子²

(1 益诺思生物技术南通有限公司,南通 226133;2 上海益诺思生物技术股份有限公司,上海 200043;
3 中国医药工业研究总院,上海 201203)

[摘要] 随着细胞治疗产品研发的快速发展,新的干细胞治疗产品不断被开发,但帮助设计非临床安全性评价研究的相关指导性文件相对不足。干细胞治疗产品不仅来源不同,产品安全性因素也不同,存在异位组织形成、不可控生物分布、免疫原性和成瘤性等潜在风险。不同的干细胞治疗产品给非临床安全性研究带来极大挑战。本文简要概述干细胞的种类及干细胞来源细胞治疗产品非临床安全性评价一般原则,重点关注干细胞来源细胞治疗产品非临床安全性评价中动物选择、试验设计和成瘤性研究等方面,以期为我国干细胞来源细胞治疗产品的非临床安全性评价提供参考。

[关键词] 干细胞;细胞治疗产品;非临床;安全性;评价

[中图分类号] R99 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)06-0583-06

Overviews of non-clinical safety evaluation of stem cell-derived cellular therapy products

YAN Zhen-long¹, TENG Yi-yang^{2,3}, ZHANG Ya-qun¹, QIAN Zhuang², LI Yan-chuan¹, HU Wen-yuan¹,
ZHONG Xiao-qun¹, HU Jing¹, CHEN Xiao-jun¹, LI Yi-hao¹, PENG Rui-nan¹, WANG Ya¹, LI Hui¹,
GE Jian-ya¹, MIAO Cheng-xian¹, LV Jian-jun¹, OHIRA Toko²

(1 InnoStar Bio-Tech Nantong Co., Ltd., Nantong 226133, China; 2 Shanghai InnoStar Bio-Tech Co., Ltd.,
Shanghai 200043, China; 3 China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203, China)

[Abstract] With the rapid research and development of cellular therapy products, new stem cell-derived cellular therapy products are constantly being developed, but only few relevant guidance documents to assist the design of studies for non-clinical safety evaluation have been published. Stem cell-derived cellular therapy products not only come from different sources, but also have different safety factors and potential risks of ectopic tissue formation, uncontrolled biological distribution, immunogenicity and tumorigenicity, etc. Different stem cell-derived cellular therapy products bring great challenges to non-clinical studies. The paper gives a brief overview of the types of stem cells and general principles for the non-clinical safety evaluation of stem cell-derived cellular therapy products, focusing on the animal selection, experimental design and tumorigenicity study, in order to provide some references for non-clinical safety evaluation of stem cell-derived cellular therapy products in China.

[Key words] stem cell; cellular therapy products; non-clinical; safety; evaluation

[基金项目] 干细胞治疗产品的规范化与规模化生产及质量评价研究(G2021086002L)

[作者简介] 闫振龙,男,硕士,助理研究员,主要从事药物非临床安全性评价毒性病理学诊断工作。E-mail:zhenlong6h@126.com。滕伊洋,女,硕士研究生,主要从事药物非临床安全性评价工作。E-mail:tengyiyang0528@163.com。

[通讯作者] 吕建军,男,博士,主任药师,研究生导师,主要从事药物非临床安全性评价毒性病理学诊断工作。联系电话:(0513)80180668-80707,E-mail:jjlv@innostar.cn。大平东子,女,博士,主要从事药物非临床安全性评价毒性病理学诊断工作。联系电话:(021)60211999,E-mail:tohira@innostar.cn。

细胞治疗产品包括自体或同种异体的细胞,也包括经过基因修饰或与器械、支架或网状物等联合使用的细胞,其主要目的是修复、重建、替换或再生受损器官的结构和功能,以改善或治愈以前无法治疗的损伤或疾病。将活细胞直接或通过植入器械引入患病或受损组织,与受体或靶组织结合并成为其一部分,再通过分泌因子引导或促进再生,或协调细胞间信号传导和相互作用发挥其功能^[1-3]。干细胞可迁移和增殖对机体内生长因子进行反应,或释放促进血管生成和神经发生的生长因子和外泌体,以及调节炎症、纤维化和凋亡级联反应,这些级联反应通常起到干扰疾病发病的作用,同时促进自我修复和再生^[4-5]。干细胞治疗产品不仅来源不同,产品安全性因素也不同,存在异位组织形成、不可控生物分布、免疫原性和成瘤性等潜在风险。目前国际监管机构已批准近 30 个干细胞来源细胞治疗产品上市^[3,6],国家药品监督管理局(NMPA)目前已批准 30 多个干细胞来源细胞治疗产品进入临床试验。本文简要概述干细胞的种类及干细胞来源细胞治疗产品非临床安全性评价一般原则,重点关注干细胞来源细胞治疗产品非临床安全性评价中动物选择、试验设计和成瘤性研究等方面,以期为我国干细胞来源细胞治疗产品的非临床安全性评价提供参考。

1 干细胞种类

目前用于基于细胞治疗产品的干细胞主要有 4 种^[7-8]:① 人胚胎干细胞(human embryonic stem cell, hESC)。② 诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC),例如 OCT4 等因子诱导的人成纤维细胞^[9]。③ 成体干细胞(adult stem cells, ASC)又称组织源或定居干细胞,例如造血干细胞、肝卵圆细胞和肠隐窝深处的细胞。④ 基因编辑干细胞(gene-editing stem cell, GSC),例如利用 CRISPR/Cas9 基因编辑改造的人体造血干细胞^[10]。

hESC 是一种多能干细胞,具有很强的分化多能性,可分化为 3 个胚层(内胚层、中胚层和外胚层)衍生物,并有无限复制的潜能。iPSC 是通过强制表达对多能性表达至关重要的特定基因,从非多能的成人体细胞衍生而来。有多种方法可以使成熟细胞恢复多能性,包括病毒介导的转导、表观遗传重编程和蛋白质介导的转导^[11-15]。由此产生的细胞具有与胚胎干细胞相似的生物学功能和生长特性,包括长期自我更新和产生其他更成熟细胞类型。但是,这些细胞也可能保留一些不太理想的特性,如诱导

多能干细胞可发展成畸胎瘤。诱导多能干细胞可以是患者特异性的,因此可以解决一些潜在的细胞排斥问题,然而大规模诱导多能干细胞治疗可能是同种异体的,因此与人胚胎干细胞有类似的安全问题。随着时间的推移,这些细胞也有可能恢复到原来的细胞类型^[16]。多能成体干细胞自然存在于全身已分化的组织中,正常情况下成体干细胞处于静止休眠状态,当组织细胞异常时,成体干细胞通过替换受损或缺失的细胞维持组织的结构和功能。成体干细胞只能分化成其来源组织的细胞类型,并且自我更新能力有限。成体干细胞包括间充质干细胞、造血干细胞和内皮祖细胞。基因编辑干细胞(GSC)是通过各类干细胞进行基因编辑操作,使其带有修饰过的基因(如正确编码序列或治疗性基因)进一步分化为所需组织细胞,从而发挥其治疗作用。目前间充质干细胞因其来源丰富、制备简单、低免疫原性和成瘤性、多向分化能力和免疫调节作用使其呈现很大的临床潜在利用价值^[17-18]。

2 非临床安全性评价一般原则

2.1 评价内容 干细胞来源细胞治疗产品非临床研究有 7 个关键问题需要回答^[19],这些问题将指导研究和/或试验方案的设计,详见表 1。

表 1 干细胞来源细胞治疗产品非临床研究中需要回答的问题

问题	研究类型/内容
细胞治疗产品的特征	特征描述(干细胞来源、种类、生产过程、基因修饰/改造、纯度、活性、稳定性等)
细胞治疗产品的预期疗效	药效学研究
最佳评价试验系统	动物种属/模型选择
细胞治疗产品的去向	生物分布研究
细胞治疗产品的存活时间	生物分布研究
细胞治疗产品的安全性	毒性试验
细胞治疗产品的成瘤性	成瘤性试验

试验方案制定前非临床和研发科学家、病理学家和监管机构专家应进行讨论,以制定合理的试验和方法证明细胞治疗产品安全有效。非临床安全性评价研究的试验方案必须支持临床试验,受试物尽可能采用临床拟用产品,或充分代表临床拟用产品。每个毒性试验的试验方案都应该针对特定的细胞、预期作用和预期的临床用途进行设计。在研究开始前,如果需要,委托方应安排非临床安全评价机构或

合同研究组织的专题负责人等就非临床试验方案和动物种属/模型选择与监管机构进行沟通。

可以进行不遵循《药物非临床研究质量管理规范》的试验性研究,如生物分布研究来证明其存在与疗效相关,目前多采用定量聚合酶链反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)和核医学成像方法,如正电子发射断层成像(positron emission tomography, PET)、单光子发射计算机断层成像(single photon emission computed tomography, SPECT)和核磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)等^[20]。非临床研究质量管理规范试验还可确定剂量水平和时间点,确定给药时间与疾病进展的关系(如疾病模型的急性期或亚急性期)。主要的非临床研究应遵循《药物非临床研究质量管理规范》,受试物的生产应遵循药物生产质量管理规范(GMP)。非临床研究的给药方式和给药周期应最大限度模拟临床拟用给药方式,并使用预期的临床产品,采用预期的临床拟用给药方式和给药装置系统进行试验。

非临床研究需要评估注射/植入操作的风险以及注射/植入细胞产品的任何潜在炎症/免疫反应,并确定最小有效剂量和未观察到有害作用剂量(no-adverse-effect-level, NOAEL)。给予干细胞来源细胞治疗产品早期时间点,干细胞移植植入或分化有限,可以使用H&E染色的组织切片检测。但是在后期时间点,使用H&E染色的组织切片检测少量的迁移干细胞不可行。给予直接和重编程宿主细胞的细胞治疗产品,需要可以分析其安全性和有效性,以及任何与细胞植入物相关的脱靶细胞毒性的生物标志物。免疫组化染色可用于检测给予的细胞,并确定细胞是否增殖和/或持续存在。生物分布研究可以检查细胞是否迁移到非靶组织,因此稳定、可靠和敏感的细胞检测方法(如qPCR、免疫组化)在这一阶段至关重要。人类核抗原和人类线粒体抗原可用于证明给予的人源细胞的存在。植入部位需要评估是否存在不适当的细胞增殖(肿瘤形成)和不适当的细胞分化(异位组织形成),增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)或抗原Ki67(Ki-67 protein, Ki-67是一种核蛋白,与细胞增殖有关,在免疫组化中作为细胞增殖标志物被广泛应用)^[21]可用于寻找增殖证据,必要时还可使用转录激活、增殖和分化标志物等评估基因表达情况。

毒性研究应评价局部和长期毒性,包括组织反应性和脱靶作用,也可用于预测伴随治疗的相互作

用。标准的毒性研究评价指标包括临床症状、死亡率(死亡原因确定)、体重、一般检查、摄食量、饮水量(使用时)、临床病理学(血清化学、血液学、凝血、尿液分析)、器官重量、大体病理学和组织病理学。由于无法移除细胞,因此不需要设计恢复期,但应设计足够的持续时间点评估长期毒性和脱靶作用。

2.2 毒性病理学家的作用 细胞特征描述(特性、纯度、活性、无菌性和稳定性)应该在任何动物研究开始之前进行。最初的假设是基于细胞的治疗产品是细胞的异质性混合物。毒性病理学家可以通过评估形态学、表型特异性细胞表面抗原和经验证的细胞识别标志物帮助确定其特性和组成。纯度和无菌可以通过观察体外细胞爬片上感染源性致细胞病变效应和检测未分化干细胞的生物标志物进行评估。

在干细胞来源细胞治疗产品的非临床研究数据中,组织病理学评价占据了很大比例。毒性病理学家在评价干细胞在机体内的生物分布、确定在宿主内植入和/或存在、评估局部组织反应、安全性、毒性和药效等方面发挥重要作用。

因此,在试验设计的早期阶段,毒性病理学家的参与对于选择要收集取材和评价的组织非常重要。毒性病理学家可以协助试验用动物种属和品系的选择、特定细胞标志物的开发以及在特定时间点和组别的基础上进行组织病理学检查的分类^[22]。

2.3 监管问题 美国FDA下属的生物制品评价与研究(Center for Biologics Evaluation and Research, CBER)专门设立了组织和先进疗法办公室(Office of Tissues and Advanced Therapies, OTAT),对干细胞/干细胞来源细胞治疗产品进行监管。委托方可安排与CBER/OTAT进行非强制性、非正式的科学讨论,类似于开发早期沟通交流会(pre-pre-IND meeting)。

日本厚生劳动省(Ministry of Health, Labour and Welfare)将干细胞/干细胞来源细胞治疗产品作为第三类产品(非药物和医疗器械)单独管理,由专门的细胞和组织产品办公室(Office of Cellular and Tissue-based Products)进行审评。2012年发布了关于确保从不同来源的人类干细胞加工中获得药物和医疗器械的质量和安生指南,其中包括日文通告的英文译本。

在欧盟,根据欧洲议会和理事会2007年11月13日发布的第1394/2007号欧盟条例和第726/2004号欧盟条例,由欧洲EMA进行监管。EMA将

细胞治疗产品定义为先进医疗产品(advanced therapy medicinal product),是因为对临床应用的任何细胞类型进行最小限度的操作或者细胞的预期用途与其在体内的正常功能不同,申报所需的数据取决于产品的特性,申报材料可以包括 GLP 和 GMP 研究、发表文章的参考数据、类似产品的交叉参考和临床试验报告。

我国干细胞/干细胞来源细胞治疗产品由国务院卫生监管部门(作为生物学技术应用进行监管)和国务院药品监管部门(按照药品进行监管)实行“双轨制”监管,其中 NMPA 分别于 2015,2017 和 2021 年发布了《干细胞制剂质量控制及非临床研究指导原则(试行)》、《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)》和《基因修饰细胞治疗产品非临床研究及评价技术指导原则(试行)》,用于指导干细胞来源细胞治疗产品的非临床安全性评价研究^[23-25]。

3 非临床安全性评价研究的关注点

3.1 种属选择 目前没有默认的动物模型或种属,但是应该选择对干细胞来源治疗产品的生物反应与预期人体反应接近或相似的动物,优先考虑的种属是在生理和解剖学与人体具有相似的动物,委托方可为所使用的动物种属/模型提供一定的科学依据。由于干细胞治疗产品特殊性,必要时可采用“非标准”实验动物,如基因修饰动物(基因敲除或敲入动物)、大型动物(如绵羊、马、猪等)、多种动物种属和疾病动物模型。当动物实验不能完全反映人类疾病生理过程时,应考虑使用其他替代模型或体外试验。

毒理学研究的整体设计应尽可能模拟拟用的临床试验设计,因此动物实验系统应允许细胞治疗产品在其体内复制和生长,在选择啮齿动物或非啮齿动物种属时,需要考虑预期的临床给药器械和给药方式^[26]。可使用的动物模型包括大鼠(包括新生大鼠)、小鼠、非人类灵长类、猪、手术后啮齿动物和免疫缺陷动物模型。使用免疫缺陷动物模型可降低细胞排斥的可能性。细胞治疗产品可使用疾病动物模型,同时进行药效学研究和安全性评价。干细胞的作用受到局部微环境因素的强烈影响,准确地将干细胞给予预期的靶组织对于正确评估干细胞安全性至关重要^[27]。在使用预期临床拟用剂量的靶向给药器械、制剂体积和部位时,器官和组织的大小很重要。例如:用于人眼的视网膜色素上皮细胞支架植入物本身较大,因此,眼睛大小与人类相似的动物,

如猪将是最合适的动物模型。每一性别都有足够数量的动物,适当地随机分配到每一组,这对于结果的统计学分析是必要的。合适的对照组至关重要,如包括未经处理的动物、假手术组、溶剂对照组、佐剂对照组、空载体组或单独支架组等。应提供设计动物数量和特定类型对照组的理由,同时也要考虑到“3R”原则,即减少(reducing)、优化(refining)和替代(replacing)动物使用。

3.2 试验方案设计 安全性评估研究的持续时间取决于细胞治疗产品的预计存活时间,例如:短暂存活的细胞治疗产品研究的持续时间建议为 4~12 周以确认其清除情况;多次给药或者预期可植入的细胞治疗产品研究的持续时间建议为 3~12 个月,通常取决于细胞治疗产品和试验动物种属的寿命。例如:1 个月的急性疾病模型需要在疾病的早期阶段进行评价,而不是等动物开始变得虚弱后才进行。因此,第 1 个解剖时间点为给药后 48 h 或 1 周,第 2 个解剖时间点为给药后 2 周或 3 个月,第 3 个解剖时间点为给药后 4 周或 6 个月。毒性病理学家应在实验室处理下一个时间点组织样本前对第一个时间点取材样本进行全面评价,因为这样可以适当调整制片方案,避免过于极端。

生物分布和安全性评估研究的试验方案设计取决于所使用的动物种属^[7,24,28-30],其要点详见表 2。

表 2 生物分布和安全性评估研究的试验方案设计要点

生物分布研究	毒理学(安全性评估)研究
啮齿类动物:5~10/性别/组	啮齿类动物:至少 10/性别/组
非啮齿类动物:3~5/性别/组	非啮齿类动物:至少 3/性别/组
试验组别:	试验组别:
① 假处理组和/或未经处理对照组	① 假处理对照组和/或未经处理对照组
② 临床或最大可行剂量组	② 低剂量干细胞治疗产品组
	③ 中剂量干细胞治疗产品组
	④ 临床或最大可行剂量组
	⑤ 阳性对照组

药效学研究可以和毒理学研究相结合一起开展。组织病理学检查时不建议采用“盲检”,以便使毒性病理学家充分了解试验组别的相关信息以全面评估受试物,毒性病理学家对组织的盲检建议作为评估细微形态学改变时的次要步骤。

所有动物和剖检时取材的组织都应进行病理学

检查。应根据受试物的作用方式和可能的分布情况,对给药部位和相关引流淋巴结、主要器官(心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、脑、骨髓、性腺)、大体病变和其他治疗特异性靶器官或组织的 H&E 染色切片首先进行组织病理学检查。给药部位和相关引流淋巴结是最有可能表明有效性和安全性的组织。对肝脏、脾脏、肺脏和肾脏的评价有助于评估血源性转运的可能性。需要评估特定的相邻组织和周围组织,例如,视网膜应被视为视神经和大脑的延伸。如果生殖毒性是由干细胞释放因子引起,应对性腺进行评价。检查所有的大体病变尤其是肿块以排除可能的毒性和干细胞的成瘤性。干细胞来源治疗产品的全身性毒性不是太大的问题,如移植到视网膜的干细胞。

qPCR 可以检查大量非靶组织中是否存在干细胞,并减少对非靶组织免疫组化染色切片的检查。如果 qPCR 发现任何阳性结果,则应通过免疫组化或原位杂交进行确认。如果对照组没有注射细胞,则可以修改组织收集列表并将其最少化,使其仅包含证明背景病变和预期的免疫组化标志物染色阴性所需组织即可。或者多余的组织先以湿标本和组织块的形式保存,以节省空间和成本。

3.3 分期组织检查 建议使用多个剖检时间点检查潜在的急性、慢性和/或迟发性毒性以及毒性的恢复性。虽然在多个时间点处理和检查组织可能会产生额外的成本,但早期时间点的检查结果可用于指导方案变更以减少后续时间点的制片和阅片工作。因此,在第 1 个时间点检查非靶组织的 qPCR 阴性结果,可作为中间时间点减少非靶组织列表中组织的依据。

3.4 潜在成瘤性 成瘤性的定义是指细胞接种动物模型后在注射部位和(或)远处转移部位由接种细胞本身形成肿瘤的能力(即接种细胞自身形成肿瘤的能力)^[31]。未分化的干细胞可能有不受调控的生长和分化或去分化成畸胎瘤或其他肿瘤的风险^[32-33],这是因为生产过程中各种因素导致干细胞生长动力学改变,或因诱导和基因改造引起多种生长因子分泌异常等。根据美国 FDA 关于体内成瘤性研究指南^[34]的说明和/或 WHO 技术报告系列 878^[29]开展单独的成瘤性研究。截至目前,全球监管机构对成瘤性研究的策略尚未达成共识,常用的动物模型是无胸腺裸鼠(*Nu/Nu* 基因型)和缺乏功能性 T 和 B 淋巴细胞的严重联合免疫缺陷(severe

combined immune deficient, SCID)小鼠。至少需要 3 个剂量组通过单次皮下或其他拟用的临床给药方式接种,包括阳性细胞对照组细胞。建议使用 WHO 细胞组织库中的 HeLa 细胞。受试物细胞和阳性对照细胞分别将 10^7 个活细胞注射给予 4~7 周龄的无胸腺雌性小鼠,每组 10 只。阳性对照组的目的是通过证明动物模型可以通过接种 HeLa 细胞产生肿瘤来确保试验的有效性,不建议使用阴性对照组,因为裸鼠自发性肿瘤的发病率较低,而且少量阴性对照组动物不太可能提供有意义的的数据。接种后每周触诊小鼠至少 16 周,以确定接种部位是否存在肿块。如果出现肿块,则在 2 个垂直维度上进行测量,每周记录测量结果,以确定肿块随着时间推移是逐渐进展、保持不变还是消退。在观察期结束之前不应该处死肿块消退的动物。可产生肿块但不进行性生长的细胞不具有成瘤性。在观察期结束剖检动物或因动物死亡或其他正当理由的情况下可提前处死动物,在接种部位或其他部位(如心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、脑和引流淋巴结)检查接种细胞增殖的大体和组织学证据。一些细胞系可在远处产生肿瘤而接种部位没有肿瘤的迹象。组织固定于 10% 中性缓冲甲醛水溶液,切片用 H&E 染色。毒性病理学家需要评估任何肿瘤的解剖部位、大小、发生率、形态类型和细胞来源,也就是说发生在接种部位的肿瘤是否包含来自接种的细胞,如果在观察期结束时没有发现进行性生长的肿块,那该细胞系可能不具有成瘤性^[35]。

3.5 病理学报告 毒性病理学家的病理学报告应讨论以下问题:接种部位或远处部位是否有肿块,这种疾病模型是否相关,是否有任何可用的历史对照数据,是否有合格和充足的对照组动物,细胞表面抗原和/分泌产物能否诱导多克隆反应,干细胞在接种部位的免疫豁免状态,干细胞的成熟状态是否随时间点和/或炎症反应而改变,是否需要持续的免疫抑制以及衰老的免疫系统影响等。

4 结论和展望

干细胞来源细胞治疗产品是目前国内外研发热点,不仅种类繁多,而且不同的干细胞来源细胞治疗产品存在不同安全风险,加上干细胞特殊的作用方式,给其非临床安全性评价带来巨大挑战。干细胞来源细胞治疗产品安全性评价需要在分子、细胞和组织水平上采取全面和综合的方法,确保其结果的可靠性、完整性和合规性以及对产品安全性和有效

性的总体判断。毒性病理学家具有系统生物学、病理学机制和非临床安全性评价试验设计等方面的培训和专业背景,因此最适合帮助专题负责人和委托方进行非临床安全性评估研究的试验方案设计,并确保非临床安全性评估研究结果合理地外推至临床试验。毒性病理学家还可以在动物种属/模型的选择、生物标志物的选择、宿主免疫反应的评价以及安全性和药效学研究观察或检测项目选择等方面做出重要贡献。

[参 考 文 献]

- [1] 王全军,王庆利. 细胞和基因治疗产品的非临床评价研究[M]. 北京:清华大学出版社,2021:1-31.
- [2] 国家药品监督管理局. 药品生产质量管理规范-细胞治疗产品附录(征求意见稿)[S]. (2022). <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/zhqyj/zhqyjyp/20220106165600150.html>.
- [3] GOLCHIN A, FARAHANY TZ. Biological products: cellular therapy and FDA approved products[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2019, 15(2): 166-175.
- [4] 王明伟. 细胞治疗[M]. 北京:科学出版社,2021:109-180.
- [5] BASU J, ASSAF BT, BERTRAM TA, et al. Preclinical biosafety evaluation of cell-based therapies emerging global paradigms[J]. *Toxicol Pathol*, 2015, 43(1): 115-125.
- [6] SHUKLA V, SEOANE-VAZQUEZ E, FAWZZ S, et al. The landscape of cellular and gene therapy products: authorization, discontinuations, and cost[J]. *Hum Gene Ther Clin Dev*, 2019, 30(3): 102-113.
- [7] 王全军,王庆利. 细胞和基因治疗产品的非临床评价研究[M]. 北京:清华大学出版社,2021:227-275.
- [8] ZAKRZEWSKI W, DOBRZYNSKI M, SZYMONOWICZ M, et al. Stem cells: past, present, and future[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2019, 10(1): 1-22.
- [9] YU J, VODYANIK MA, SMUGA-OTTO K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. *Science*, 2007, 318(5858): 1917-1920.
- [10] XU L, WANG J, LIU Y, et al. CRISPR-edited stem cells in a patient with HIV and acute lymphocytic leukemia[J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(13): 1240-1247.
- [11] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-676.
- [12] TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. *Cell*, 2007, 131(5): 861-872.
- [13] YU J, VODYANIK MA, SMUGA-OTTO K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. *Science*, 2007, 318(5858): 1917-1920.
- [14] HOCKEMEYER D, SOLDNER F, COOK EG, et al. A drug-inducible system for direct reprogramming of human somatic cells to pluripotency[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(3): 346-353.
- [15] PARK IH, ZHAO R, WEST JA, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors[J]. *Nature*, 2008, 451(7175): 141-146.
- [16] HENG BC, RICHARDS M, SHU Y, et al. Induced pluripotent stem cells: a new tool for toxicology screening[J]. *Arch Toxicol*, 2009, 83(7): 641-644.
- [17] 毛开云,范月蕾,王跃,等. 间充质干细胞治疗产品开发发现状与趋势[J]. 中国生物工程杂志,2017,37(10):126-135.
- [18] 李清,唐笛,王莹,等. 间充质干细胞与免疫的相互作用:从基础研究到临床应用[J]. 生命科学,2016,28(8):933-940.
- [19] BRADLEY AE, BLACK L. Evaluation of stem cell-derived cellular therapy products[J]. *Toxicol Pathol*, 2021, 49(7):1288-1293.
- [20] KAMIYAMA Y, NARITOMI Y, MORIYA Y, et al. Biodistribution studies for cell therapy products: Current status and issues[J]. *Regener Ther*, 2021, 18: 202-216.
- [21] SUN X, KAUFMAN PD. Ki-67: more than a proliferation marker[J]. *Chromosoma*, 2018, 127(2): 175-186.
- [22] BAKER J, ASSAF BT. Preclinical Study Design for Evaluation of Stem Cell-derived Cellular Therapy Products: A Pathologist's Perspective[J]. *Toxicol Pathol*, 2014, 43(1): 126.
- [23] 国家药品监督管理局. 干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行)[S]. (2015). <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzjw/gzjwyp/20150731120001226.html>.
- [24] 国家药品监督管理局. 细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)[S]. 2017. <https://www.nmpa.gov.cn/directory/web/nmpa/xxgk/ggtg/qtgggt/20171222145101557.html>.
- [25] 国家药品监督管理局药品审评中心. 基因修饰细胞治疗产品非临床研究及评价技术指导原则(试行)[S]. (2021). <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/d26ae045f21823331a435bc48469fd3b>.
- [26] EMA. European Medicines Agency. Reflection paper on stem cell-based medicinal products[S]. 2010.
- [27] FDA. Cellular and gene therapy guidance document: guidance for industry: preclinical assessment of investigational cellular and gene therapy products[EB/OL]. (2013). <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatory-Information/Guidances/default.htm>. Accessed 2018.
- [28] 宋征,马璟. 干细胞制剂临床前安全评价方法[J]. 中国新药杂志,2013,22(22):2611-2615.
- [29] 范玉明,张舒. 毒理学安全性评价标准操作规程指南[M]. 成都:电子科技大学出版社,2009:42-78.
- [30] ICH. ICH S6(R1): Guidance for Industry: Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals[S]. (1997). <https://www.cde.org.cn/ichWeb/guideIch/toGuideIch/2/0>.
- [31] WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterisation of cell banks: Proposed replacement of technical report series, No. 878[S]. 2010.
- [32] 屈哲,林志,霍桂桃,等. 细胞治疗产品的成瘤性和致癌性风险评价[J]. 中国新药杂志,2021,30(19):1820-1824.
- [33] YASUDA S, SATO Y. Tumorigenicity assessment of human cell processed therapeutic products[J]. *Biologicals*, 2015, 43(5): 416-421.
- [34] FDA. Cellular and gene therapy guidance document: Guidance for industry: Preclinical assessment of investigational cellular and gene therapy products[EB/OL]. (2013). <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/preclinical-assessment-investigational-cellular-and-gene-therapy-products>.
- [35] 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,2020:19.

编辑:杨青/接受日期:2022-09-08