

干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则（试行）（征求意见稿）

一、前言

二、干细胞制剂的质量控制

（一）干细胞的采集、分离及干细胞（系）的建立

（二）干细胞制剂的制备

（三）干细胞制剂的检验

（四）干细胞制剂的质量研究

三、干细胞制剂的临床前研究

（一）安全性评价

（二）有效性评价

名词解释

参考文献

一、前言

干细胞是一类具有不同分化潜能，并在非分化状态下自我更新的细胞。干细胞治疗是指应用人自体或异体来源的干细胞经体外操作后输入（或植入）人体，用于疾病治疗的过程。这种体外操作包括干细胞的分离、纯化、扩增、修饰、干细胞（系）的建立、诱导分化、冻存和冻存后的复苏等过程。用于细胞治疗的干细胞主要包括成体干细胞、胚胎干细胞及诱导的多能性干细胞（iPSC）。成体干细胞包括自体或异体、胎儿或成人不同分化组织，以及发育相伴随的组织（如脐带、羊膜、胎盘等）来源的造血干细胞、间充质干细胞、各种类型的祖细胞或前体细胞等。

目前国内外已开展了多项干细胞（指非造血干细胞）临床应用研究，涉及多种干细胞类型及多种疾病类型。主要疾病类型包括骨关节疾病、肝硬化、移植物宿主排斥反应（GVHD）、脊髓损伤及退行性神经系统疾病和糖尿病等。其中许多干细胞类型，是从骨髓、脂肪组织、脐带血、脐带或胎盘组织来源的间充质干细胞，它们具有一定的多向分化潜能及抗炎和免疫调控能力等。

用于干细胞治疗的细胞制备技术和治疗方案，具有多样性、复杂性和特殊性。但作为一种新型的生物治疗产品，所有干细胞制剂都可遵循一个共同的研发过程，即从干细胞制剂的制备、体外试验、体内动物试验，到植入人体的临床研究及临

床治疗的过程。整个过程的每一阶段，都须对所使用的干细胞制剂在细胞质量、安全性和生物学效应方面进行相关的研究和质量控制。

本指导原则提出了适用于各类可能应用到临床的干细胞（除已有规定的造血干细胞移植外）在制备和临床前研究阶段的基本原则。每个具体干细胞制剂的制备和使用过程，必须有严格的标准操作程序并按其执行，以确保干细胞制剂的质量可控性以及治疗的安全性和有效性。每一研究项目所涉及的具体干细胞制剂，应根据本指导原则对不同阶段的基本要求，结合各自干细胞制剂及适应症的特殊性，准备、申请并实施相关的干细胞临床前研究。

二、干细胞制剂的质量控制

（一）干细胞的采集、分离及干细胞（系）的建立

1. 对干细胞供者的要求

每一干细胞制剂都须具有包括供者信息在内的、明确的细胞制备及生物学性状信息。作为细胞制备信息中的重要内容之一，需提供干细胞的获取方式和途径以及相关的临床资料，包括供者的一般信息、既往病史、家族史等。既往史和家族史要对遗传病（单基因和多基因疾病，包括心血管疾病和肿瘤等）相关信息进行详细采集。对于用于异体干细胞临床研究的供者，必须经过检验筛选证明无人源特定病毒（包括 HIV、HBV、HCV、HTLV、EBV、CMV 等）的感染，无梅毒螺旋体感染。必要时需要收集供者的 ABO 血型、HLA-I 类和 II 类分型资料，以备追溯性查询。如使用体外授精术产生的多余胚胎作为建立人类胚胎干细胞系的主要来源，须能追溯配子的供体，并接受筛选和检测。不得使用既往史中患有严重的传染性疾病和家族史中有明确遗传性疾病的供者作为异体干细胞来源。

自体来源的干细胞供者，根据干细胞制剂的特性、来源的组织或器官，以及临床适应症，可对供体的质量要求和筛查标准及项目进行调整。

2. 干细胞采集、分离及干细胞（系）建立阶段质量控制的基本要求。

应制定干细胞采集、分离和干细胞（系）建立的标准操作及管理程序，并在符合 GMP 要求基础上严格执行。标准操作程序应包括操作人员培训；材料、仪器、设备的使用和管理；干细胞的采集、分离、纯化、扩增和细胞（系）的建立；细胞保存、运输及相关保障措施，以及清洁环境的标准及常规维护和检测等。

为尽量减少不同批次细胞在研究过程中的变异性，研究者在干细胞制剂的制备阶段应对来源丰富的同一批特定代次的细胞建立多级的细胞库，如主细胞库（Master Cell Bank）和工作细胞库（Working Cell Bank）。细胞库中细胞基本的质量要求，是需有明确的细胞鉴别特征，无外源微生物污染。

在干细胞的采集、分离及干细胞（系）建立阶段，应对自体来源的、未经体外复杂操作的干细胞，进行细胞鉴别、成活率及生长活性、外源致病微生物，以及基本的干细胞特性检测。而对异体来源的干细胞，或经过复杂的体外培养和操作后

的自体来源的干细胞，以及直接用于临床前及临床研究的细胞库（如工作库）中的细胞，除进行上述检测外，还应进行全面的内外源致病微生物、详细的干细胞特性检测，以及细胞纯度分析。干细胞特性包括特定细胞表面标志物群、表达产物和分化潜能等。

（二）干细胞制剂的制备

1. 培养基

干细胞制剂制备所用的培养基成分应有足够的纯度并符合无菌、无致病微生物及内毒素的质量标准，残留的培养基对受者应无不良影响；在满足干细胞正常生长的情况下，不影响干细胞的生物学活性，即干细胞的“干性”及分化能力。在干细胞制剂制备过程中，应尽量避免使用抗生素。

若使用商业来源培养基，应选择有资质的生产商并由其提供培养基的组成成分资料及相关质量合格证明。必要时，应由专业检定机构对每批培养基进行质量检验，并出具检验报告。

除特殊情况外，应尽可能避免在干细胞培养过程中使用人源或动物源性血清，不得使用同种异体人血清或血浆。如必须使用动物血清，应确保其无特定动物源性病毒污染。严禁使用海绵体状脑病流行区来源的牛血清。

若培养基中含有人的血液成份，如白蛋白、转铁蛋白和各种细胞因子等，应明确其来源、批号、质量检定合格报告，并尽量采用国家已批准的可临床应用的产品。

2. 滋养层细胞

用于体外培养和建立胚胎干细胞及 iPS 细胞的人源或动物源的滋养层细胞，需根据外源性细胞在人体中使用所存在的相关风险因素，对细胞来源的供体、细胞建立过程引入外源致病微生物的风险等进行相关的检验和质量控制。建议建立滋养层细胞的细胞库，并按细胞库检验要求进行全面检验，特别是对人源或动物源特异病毒的检验。

3. 干细胞制剂的制备工艺

应制定干细胞制剂制备工艺的标准操作流程及每一过程的标准操作程序（SOP）并定期审核和修订；干细胞制剂的制备工艺包括干细胞的采集、分离、纯化、扩增和传代，干细胞（系）的建立、向功能性细胞定向分化，培养基、辅料和包材的选择标准及使用，细胞冻存、复苏、分装和标记，以及残余物去除等。从整个制剂的制备过程到输入（或植入）到受试者体内全过程，需要追踪观察并详细记录。对不合格并需要丢弃的干细胞制剂，需对丢弃过程进行标准管理和记录。对于剩余的干细胞制剂必须进行合法和符合伦理要求的处理，包括制定相关的 SOP 并严格执行。干细胞制剂的相关资料需建档并长期保存。

应对制剂制备的全过程，包括细胞收获、传代、操作、分装等，进行全面的工艺研究和验证，制定合适的工艺参数和质量标准，确保对每一过程的有效控制。

（三）干细胞制剂的检验

1. 干细胞制剂质量检验的基本要求

为确保干细胞治疗的安全性和有效性，每批干细胞制剂均须符合现有干细胞知识和技术条件下全面的质量要求。制剂的检验内容，须在本指导原则的基础上，参考国内外有关细胞基质和干细胞制剂的质量控制指导原则，从生物技术产品、细胞制品和治疗性干细胞产品三个层次综合考虑，进行全面的细胞质量、安全性和有效性的检验。同时，根据细胞来源及特点、体外处理程度和临床适应症等不同情况，对所需的检验内容做必要调整。另外，随着对干细胞知识和技术认识的不断增加，细胞检验内容也应随之不断更新。

针对不同类型的干细胞制剂，根据对输入或植入人体前诱导分化的需求，须对未分化细胞和终末分化细胞分别进行必要的检验。对胚胎干细胞和 iPS 细胞制剂制备过程中所使用的滋养细胞，根据其细胞来源，也需进行针对相关风险因素的质量控制和检验。

为确保制剂的质量及其可控性，干细胞制剂的检验可分为质量检验和放行检验。质量检验是为保证干细胞经特定体外处理后的安全性、有效性和质量可控性而进行的较全面质量检验。放行检验是在完成质量检验的基础上，对每一类型的每一批次干细胞制剂，在临床应用前所应进行的相对快速和简化的细胞检验。

为确保制剂工艺和质量稳定性，须对多批次干细胞制剂进行质量检验；在制备工艺、场地或规模等发生变化时，需重新对多批次干细胞制剂进行质量检验。制剂的批次是指由同一供体、同一组织来源、同一时间、使用同一工艺采集和分离或建立的干细胞。对胚胎干细胞或 iPS 细胞制剂，应视一次诱导分化所获得的可供移植的细胞为同一批次制剂。对需要由多个供体混合使用的干细胞制剂，混合前应视每一独立供体或组织来源在相同时间采集的细胞为同一批次细胞。

对于由不同供体或组织来源的、需要混合使用的干细胞制剂，必须提供所有独立来源的细胞，在细胞质量、免疫原性和生物学活性等方面均一性资料，以尽可能避免混合细胞制剂可能具有的危险因素。

2. 细胞检验

2.1 质量检验

（1）细胞鉴别

应通过细胞形态、遗传学、代谢酶亚型谱分析、表面标志物及特定基因表达产物等检测，对不同供体及不同类型的干细胞进行综合的细胞鉴别。

（2）存活率及生长活性

采用不同的细胞生物学活性检测方法，如活细胞计数、细胞倍增时间、细胞周期、软琼脂糖胶内克隆形成率、端粒酶活性等，判断细胞活性及生长状况。

（3）纯度和均一性

通过检测细胞表面标志物、遗传多态性及特定生物学活性等，对制剂进行细胞纯度或均一性的检测。对胚胎干细胞及 iPS 细胞植入人体前的终末诱导分化产物，必须进行细胞纯度和/或分化均一性的检测。

对于需要混合使用的干细胞制剂，需提供各独立细胞来源之间细胞表面标志物、细胞活性、装量、纯度和生物学活性均一性的证据及标准。

（4）无菌试验和支原体检测

应依据现行版《中华人民共和国药典》中的生物制品无菌试验和支原体检测规程，对细菌、真菌及支原体污染进行检测。

（5）细胞内外源致病因子的检测

应结合体内和体外方法，根据每一细胞制剂的特性进行人源及动物源性特定致病因子的检测。人源特定病毒包括 HIV、HBV、HCV、EBV、CMV 等；如使用过牛血清，须进行牛源特定病毒的检测；如使用胰酶等猪源材料，应至少检测猪源细小病毒；如胚胎干细胞和 iPS 细胞在制备过程中使用动物源性滋养细胞，需进行细胞来源相关特定动物源性病毒的全面检测。另外还应检测逆转录病毒。

（6）内毒素检测

应依据现行版《中华人民共和国药典》中的内毒素检测规程，对内毒素进行检测。

（7）异常免疫学反应

检测异体来源干细胞制剂对人总淋巴细胞增殖和/或对不同淋巴细胞亚群增殖能力的影响，或对相关细胞因子分泌的影响，以检测干细胞制剂可能引起的异常免疫反应。

（8）致瘤性

对于异体来源的干细胞制剂或经体外复杂操作的自体干细胞制剂，须通过免疫缺陷动物体内致瘤试验，检验细胞的致瘤性。

（9）生物学效力试验

可通过检测干细胞分化潜能、诱导分化细胞的结构和生理功能、对免疫细胞的调节能力、分泌特定细胞因子、表达特定基因和/或蛋白等功能，判断干细胞制剂与治疗相关的生物学有效性。

对间充质干细胞，无论何种来源，应进行体外多种类型细胞（如成脂肪细胞、成软骨细胞、成骨细胞等）分化能力的检测，以判断其细胞分化的多能性（multipotency）。对未分化的胚胎干细胞和 iPS 细胞，须通过体外拟胚胎体形成能力，或在 SCID 鼠体内形成畸胎瘤的能力，检测其细胞分化的多能性（pluripotency）。除此以外，作为特定生物学效应试验，项目申请者应提供与其治疗适应症相关的生物学效应检验内容及结果。

（10）培养基及其他添加成分残余量的检测

应对制剂制备过程中残余的、影响干细胞制剂质量和安全性的成分，如牛血清蛋白、抗生素、细胞因子等进行检测。

2.2 放行检验

项目申请者应根据上述质量检验各项目中所明确的检验内容及标准，针对每一类型干细胞制剂的特性，制定放行检验项目及标准。放行检验项目应能在相对短的时间内，反映细胞制剂的质量及安全信息。

3. 干细胞制剂的质量复核

细胞制剂的质量复核包括细胞检验和质量标准复核。由中国食品药品检定研究院进行细胞制剂的质量复核，并出具检验报告。为便于质量复核，项目申请者应向质量复核单位提供临床前干细胞制剂研究的综合报告，报告内容包括详细的干细胞制剂制备工艺、治疗适应症、所用辅料、包材，以及制备工艺各环节的质量标准。在进行放行检验时，项目申请者需提供以往质量检验的检验报告复印件。

（四）干细胞制剂的质量研究

在满足上述干细胞制剂质量检验要求的基础上，建议项目申请者在申报临床应用前的各阶段，利用不同的体外实验方法对干细胞制剂进行全面的安全性、有效性及稳定性研究。

1. 干细胞制剂的质量及特性研究

1.1 生长活性和状态

生长因子依赖性的检测：在培养生长因子依赖性的干细胞时，需对细胞生长行为进行连续检测，以判断不同代次的细胞对生长因子的依赖性。若细胞在传代过程中，特别是在接近高代次时，失去对生长因子的依赖，则不能再继续将其视为合格的干细胞而继续培养和使用。

1.2 致瘤性和促瘤性

由于大多数间充质干细胞制剂具有相对的弱致瘤性，建议项目申请者在动物致瘤性试验中，针对不同类型的干细胞，选择必要数量的细胞和必要长的观察期。

建议在动物致瘤性试验不能有效判断致瘤性时，有必要检测与致瘤性相关的生物学性状的变化，如细胞对生长因子依赖性的改变、基因组稳定性的改变、与致瘤性密切相关的蛋白(如癌变信号通路中的关键调控蛋白)表达水平或活性的改变、对凋亡诱导敏感性的改变等，以此来间接判断干细胞恶性转化的可能性。

目前，普遍认为间充质干细胞“不致瘤”或具有“弱致瘤性”，但不排除其对已存在肿瘤的“促瘤性”作用。因此，建议项目申请者根据各自间充质干细胞制剂的组织来源和临床适应症的不同，设计相应的试验方法，以判断其制剂的“促瘤性”。

1.3 生物学效应

随着研究的进展，建议项目申请者针对临床治疗的适应症，不断研究更新生物学效应检测方法。如研究介导临床治疗效应的关键基因或蛋白的表达，并以此为基础提出与预期的生物学效应相关的替代性生物标志物(surrogate biomarker)。

2. 干细胞制剂稳定性研究及有效期的确定

应进行干细胞制剂在储存(液氮冻存和细胞植入前的临时存放)和运输过程中的稳定性研究。检测项目应包括细胞活性、密度、纯度、无菌性等。

根据干细胞制剂稳定性试验结果，确定其制剂的保存液成份与配方、保存及运输条件、有效期，同时确定与有效期相适应的运输容器和工具，以及合格的细胞冻存设施和条件。

3. 快速检验方法的研发

项目申请者应根据新的干细胞基础及实验技术研究成果，针对各自干细胞制剂的特性、特定的临床适应症，研发新的反映干细胞制剂质量、安全性和有效性的快速检验方法。

三、干细胞制剂的临床前研究

应进行干细胞制剂的临床前研究，为治疗方案的安全性和有效性提供支持和依据。

在临床前研究方案中，项目申请者应设计和提出与适应症相关的疾病动物模型，用于预测干细胞在人体内可能的治疗效果、作用机制、不良反应、合理的输入或植入途径和剂量等临床研究所需的信息。

项目申请者应在合适的动物模型基础上，研究和建立干细胞有效标记技术和动物体内干细胞示踪技术，以便于研究上述内容，特别是干细胞的体内存活、分布、归巢、分化和组织整合等功能的研究。在综合动物模型研究基础上，项目申请者应对干细胞制剂的安全性和生物学效应进行合理评价。

（一）安全性评价

1. 毒性试验

可通过合适的动物试验模型观察干细胞制剂各种可能的毒性反应，如细胞植入时和植入后的局部和整体的毒性反应。

如难以采用相关动物评价人干细胞的毒性，可考虑尽可能模拟临床应用方式，采用动物来源相应的干细胞制剂，以高于临床应用剂量回输动物体内，观察其毒性反应。

2. 异常免疫反应

对干细胞制剂特别是异体来源、经体外传代培养和特殊处理的自体或异体来源的制剂，应通过体外及动物试验评价其异常免疫反应，包括对不同免疫细胞亚型及相关细胞因子的影响。对胚胎干细胞及 iPS 细胞，在体外诱导分化后重新表达供体的 HLA 抗原分子，植入体内后可能形成的免疫排斥反应，需进行有效评价。

3. 致瘤性

对高代次的或经过体外复杂处理和修饰的自体来源以及各种异体来源的干细胞制剂，应进行临床前研究阶段动物致瘤性评估。建议项目申请者选择合适的动物模型，使用合适数量的干细胞、合理的植入途径和足够长的观察期，以有效评价制剂的致瘤性。

4. 非预期分化

非预期分化包括非靶细胞分化或非靶部位分化。建议项目申请者利用特定的检测技术，在体内动物试验中研究、评估和监控干细胞非预期分化的可能性。

（二）有效性评价

1. 细胞模型（见前述—干细胞制剂的质量研究）

2. 动物模型

用于观察植入的干细胞或其分化产物改变模型中疾病的病理进程；研究干细胞的归巢能力和免疫调节功能；通过分析干细胞植入后，特定细胞因子和/或特定基因表达情况，提出替代性生物学效应标志物。

若所申请的研究方案，因目前国际上干细胞生物学知识和技术方面的局限性，无法提出有效的体内动物模型研究内容，则应在立项依据中进行全面细致的说明。

名词解释：

干细胞制剂 (Stem cell-based medicinal products)：是指用于治疗疾病或改善健康状况的、以不同类型干细胞为主要成分、符合相应质量及安全标准，且具有明确生物学效应的细胞制剂。

胚胎干细胞 (Embryonic stem cell)：源自第 5-7 天的胚胎中内细胞团的初始（未分化）细胞，可在体外非分化状态下“无限制地”自我更新，并且具有向三个胚层所有细胞分化的潜力，但不具有形成胚外组织（如胎盘）的能力。

成体干细胞 (Somatic stem cell)：位于各种分化组织中未分化的干细胞，这类干细胞具有有限的自我更新和分化潜力。

间充质干细胞 (Mesenchymal stromal/stem cell, MSC)：一类存在于多种组织(如骨髓、脐带血和脐带组织、胎盘组织、脂肪组织等)，具有多向分化潜力，非造血干细胞的成体干细胞。这类干细胞具有向多种间充质系列细胞（如成骨、成软骨及成脂肪细胞等）或非间充质系列细胞分化的潜能，并具有独特的细胞因子分泌功能。

祖细胞 (Progenitors)：一类只能向特定细胞系列分化，并且只具备有限的分裂增殖能力的成体细胞。

前体细胞 (Precursors)：一类只能向特定终末分化细胞分化的，较祖细胞更有限的增殖能力的成体细胞。

造血干细胞 (Hematopoietic stem cell)：具有高度自我更新能力和多向分化潜能的造血前体细胞，可分化成红细胞、白细胞、血小板和淋巴细胞。

诱导的多能性干细胞 (Induced pluripotent stem cell, iPS)：一类通过基因转染等细胞重编程技术人工诱导获得的，具有类似于胚胎干细胞多能性分化潜力的干细胞。

胚胎干细胞系 (Embryonic stem cell line)：在体外培养的条件下，可保持未分化状态连续增殖的胚胎干细胞。

全能性 (Totipotent)：是早期数天胚胎中，具有分化成机体所有类型细胞和形成完全胚胎能力的干细胞。

亚全能性 (Pluripotent)：是具有形成机体各种类型细胞，即所有三胚层来源细胞的能力，但不具有形成胚外组织细胞的能力。

多能性 (Multipotent)：是指具有形成机体内超过一种类型细胞的能力，但往往是针对特定细胞系列的。

滋养层细胞 (Feeder layer)：是指通过细胞-细胞相互作用，或分泌蛋白或其他物质，位于胚胎干细胞和 iPS 细胞的培养底层，以支持这些干细胞生长的动物源性或人源性细胞。

畸胎瘤 (Teratoma)：一种含有三个胚层组织细胞和分化的组织的良性肿瘤。