

干细胞药物产业化研究进展及存在问题

陆 晓¹, 王兴如¹, 戚雪勇^{1,2}, 廖联明³, 廉云飞^{1*}

(¹ 江苏拓弘康恒医药有限公司, 南京 211100; ² 江苏大学药学院, 镇江 210023;

³ 福建医科大学附属协和医院中心实验室, 福州 350001)

摘要 干细胞是一类具有多向分化潜能和自我更新能力的原始未分化细胞, 有再生人体各种组织和器官的潜在功能。干细胞药物开发是生命科学的前沿研究领域。干细胞在不同重大疑难性疾病的治疗上开展了广泛的临床试验, 在某些适应证上作为药物获得批准上市, 有着广阔的产业化前景。本综述通过介绍干细胞药物在全球及国内产业化方面的进展, 及产业化存在的主要问题, 如干细胞药物的有效性、质量控制、安全性等, 为干细胞药物的开发提供参考和思路, 以加快干细胞药物的产业化进程。

关键词 干细胞; 产业化; 有效性; 质量控制

中图分类号 R95 文献标志码 A

文章编号 1000-5048(2024)02-0270-11

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2023111604

引用本文 陆晓, 王兴如, 戚雪勇, 等. 干细胞药物产业化研究进展及存在问题 [J]. 中国药科大学学报, 2024, 55(2): 270–280.

Cite this article as: LU Xiao, WANG Xingru, QI Xueyong, et al. Research progress and existing problems in the industrialization of stem cell drugs[J]. J China Pharm Univ, 2024, 55(2): 270–280.

Research progress and existing problems in the industrialization of stem cell drugs

LU Xiao¹, WANG Xingru¹, QI Xueyong^{1,2}, LIAO Lianming³, LIAN Yunfei^{1*}

¹Jiangsu Topcel-KH Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing 211100; ²School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 210023;

³Central Laboratory, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China

Abstract Stem cells, which are a type of primitive cells with multipotent differentiation potential and self-renewal ability, have the potential to regenerate various tissues and organs. Stem cell drug development is a frontier research field in life sciences. Extensive clinical trials involving stem cells have been conducted for different complicated diseases. Some stem cells have been approved as drugs for some indications, indicating their broad industrial prospects. This review introduces the progress of stem cell drugs around the world, especially in China, and discusses the main problems in the industrialization of stem cell drugs, such as their effectiveness, quality control and safety, so as to provide some reference and insight for the development and rapid industrialization of stem cell drugs.

Key words stem cell; industrialization; effectiveness; quality control

干细胞是一类具有多向分化潜能和自我更新能力的原始未分化细胞, 具有再生人体各种组织和器官的潜在功能。根据分化潜能和来源不同, 可将干细胞大致分为成体干细胞(adult stem cells, ASCs)、胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)^[1]。

全球干细胞研究无论是干细胞药物的上市数量, 还是各个阶段的临床研究均呈增加的趋势。由于间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)来源广泛, 扩增培养相对容易, 有多向分化、免疫调节和组织修复等功能, 而且可以直接异体使用, 故真正意义上的干细胞药物开发大部分基于MSC进行研究。

1 全球干细胞产业研发进展

干细胞治疗一直是生命科学最受重视的前沿领域之一,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。目前全球每年有大量新增临床研究项目,整体呈上升趋势。

截至 2023 年 10 月 25 日,用“stem cell”作为关键词,在 ClinicalTrials.gov 网站检索到 9988 项登记注册的干细胞临床试验研究,主要分布在北美、欧洲和东亚等地区,全球干细胞临床研究呈现出明显的“一超多强”格局。按国家和地区统计,全球干细胞临床研究排名前 3 的国家或地区分别是美国(4614 项)、欧洲(2410 项)和中国(1219 项),加拿大、韩国、日本等国家的临床研究也比较活跃。全球干细胞临床试验进展情况显示,目前 32.9% 干细胞临床试验处于早期阶段,Ⅱ期临床试验比例为 42.3%,Ⅲ期临床试验占 9.4%,Ⅳ期临床试验仅占 2.6%。

随着干细胞基础科研与临床转化的突破,国际上干细胞产品的监管经验逐渐丰富,至今已有 10 余个干细胞产品按照药品上市^[2](表 1)。适应证包括膝关节软骨缺损、移植植物抗宿主病(GVHD)、克罗恩病并发肛瘘、遗传性或获得性造血系统疾病、退行性关节炎和膝关节软骨损伤等疾病。在获批上市的干细胞药物中,一半以上是 MSC 治疗产品。

由于研发技术因素及伦理学和安全性因素,目前 ESC 和 iPSC 的临床研究数量仍很少。根据“ClinicalTrials.gov”数据库的检索结果,截至 2023

表 1 全球已上市干细胞产品

序号	获批国家/地区	获批时间	商品名	公司	细胞来源	适应证
1	澳大利亚	2010	MPC	Mesoblast	自体间质前体细胞产品	骨修复
2	韩国	2010	Queencell	Anterogen	脂肪来源间充质干细胞	皮下组织缺损
3	韩国	2011	Cellgram	Pharmicell	骨髓来源间充质干细胞	急性心肌梗死
4	加拿大	2012	Prochymal	Osiris Therapeutics/Mesoblast	人异体骨髓来源间充质干细胞	移植植物抗宿主病
5	韩国	2012	Cupistem	Anterogen	脂肪来源间充质干细胞	克罗恩病并发肛瘘
6	韩国	2012	Cartistem	Medipost	脐带血间充质干细胞	退行性关节炎
7	美国	2012	MultiStem	Athersys	骨髓等来源的多能成体祖细胞	赫尔勒综合征
8	韩国	2014	Neuronata-R	Corestem	骨髓来源间充质干细胞	肌萎缩侧索硬化
9	欧盟	2015	Holoclar	Chiesi Farmaceutici	人类自体角膜干细胞	中重度角膜缘干细胞缺乏症
10	印度	2016	Stempeucel	Stempeutics Research PVT	骨髓来源间充质干细胞	严重肢体缺血
11	日本	2016	Temcell	JCR Pharmaceuticals	异体骨髓来源间充质干细胞	移植植物抗宿主病
12	欧盟 日本	2018 2021	Alofisel	TiGenix/Takeda	异体脂肪间充质干细胞	复杂性克罗恩病并发肛瘘
13	日本	2018	Stemirac	Nipro	骨髓来源间充质干细胞	脊髓损伤

年 3 月底,有关 iPSC 的临床试验有 137 项(按注册号)。自 2015 年开始, iPSC 相关临床试验数量有显著提升,于 2018 年达到峰值并有所回落,到 2022 年临床试验数量再度增长,为 15 个,2023 年以来,已有 6 个 iPSC 相关临床试验注册。

全球 iPSC 相关临床试验大部分处于 I 期临床及临床前阶段,进展最快的是由 Cynata Therapeutics 开发的用于骨关节炎治疗的 iPSC 诱导的 MSC,该产品已经进入 III 期临床试验。

2 国内干细胞产业的研发进展

我国细胞治疗的监管思路几经变化,干细胞治疗经历了在“药品”和“医疗技术”两种监管归口之间转换的过程,阻碍了我国干细胞的发展进程。目前,我国现行的干细胞产品采用双轨制进行风险管理^[3]: (1) 临床研究: 以医疗机构为主体, 实行干细胞临床研究机构和项目的双备案; (2) 临床试验: 以上市销售为目的的干细胞产品, 则需向国家药品监督管理局药品审评中心申请注册临床试验, 申请时可将已获得的临床研究结果作为技术性申报资料提交用于支持药品评价, 完成注册临床试验的探索性和确证性试验后, 再提交上市申请。

近年来国家政府认识到细胞治疗产业的广阔应用前景,将其纳入生物医药领域重点支持和发展的方向。2019 年 4 月,国家药品监督管理局启动中国药品监管科学行动计划,将细胞和基因治疗纳入监管科学的研究重点领域^[4]。2021 年“干细胞研究

与器官修复”被列为“十四五”国家重点研发计划首批启动重点专项任务。进入“十四五”时期以来,我国干细胞新药研发以全新的速度前进。

截至 2023 年 11 月,根据 CDE 最新数据,我国干细胞新药临床试验申请 (investigational new drug application, IND) 获批共计 69 项,其中 58 项间充质干细胞、7 项 iPSC 和 4 项胚胎干细胞。

IND 涉及适应证包括骨关节炎、缺血性脑卒中、移植植物抗宿主病、炎症性肠病、糖尿病足溃疡、克罗恩病并发肛瘘、特发性肺纤维化、急性呼吸窘迫综合征、强直性脊柱炎、烧伤、重度狼疮性肾炎和肿瘤等适应证。目前国内尚无干细胞产品批准上市。国内干细胞临床研究备案机构已达 130 多家,备案项目 100 多项。

参与临床研究的干细胞类型包括间充质干细胞(包括 iPSC 来源)、神经干细胞、多能干细胞、诱导分化细胞以及单能干细胞,在各类免疫失调性疾病、组织退行性疾病、移植排斥反应、肝硬化和糖尿病等多种适应证开展临床研究。

分别对干细胞国内 IND 获批项目的适应证、细胞来源和获批研究单位的地区分布进行分析,更全面了解国内干细胞药物的研发热点、临床开发方向和研发的优势地区,指导干细胞药物特别是间充质干细胞药物的开发。

间充质干细胞 IND 获批项目已采用的组织来源有脐带、脂肪、骨髓和胎盘等,脐带来源占比最大,达 78%;脂肪来源占 9%;骨髓来源占 7%,其余为胎盘、羊膜、宫血和牙髓来源。

从干细胞 IND 获批适应证分布(图 1)来看,疾病类型分布占比排名前 3 位的分别为呼吸系统疾病(15 项)、骨关节系统疾病(12 项)和免疫系统疾病(12 项),分别占比为 22%、17% 和 17%。

从干细胞 IND 获批项目的地区分布图(图 2)可以看出,前 3 位的地区分别为上海、北京和江苏,也意味着这 3 个地区的干细胞研究水平处于国内前列。

3 干细胞药物产业化存在问题

目前国内无干细胞药物上市,均处在临床试验阶段,且大多在临床 I 期阶段,少数处在临床 II 期阶段,公开信息显示有 3 个产品处于临床 III 期阶段。

干细胞药物作为一项新的活细胞药物类型,从干细胞的基础研究到药物的研发存在着诸多困难

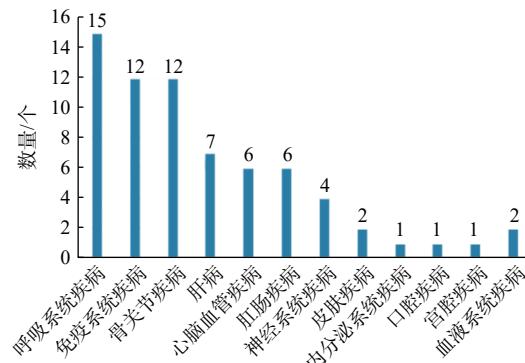


图 1 干细胞新药临床试验申请 (investigational new drug application, IND) 获批项目适应证分布

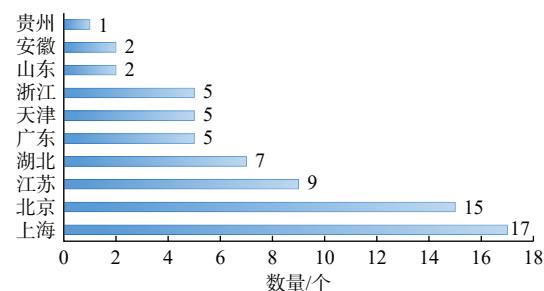


图 2 干细胞 IND 获批项目地区分布

和不确定性,影响了干细胞药物的产业化进程。但干细胞药物离不开药物“安全、有效、质量可控”的基本属性,本文从干细胞药物功能与有效性、干细胞药物的质量控制、干细胞的安全性等方面对干细胞药物产业化存在的问题进行了论述。

3.1 干细胞药物的有效性

已有干细胞药物批准用于治疗某些疾病,如膝关节软骨缺损、GVHD 和克罗恩病并发肛瘘等,说明了干细胞药物在某些疾病中的有效性得到了明确和监管机构的认可。但大部分的干细胞药物往往在临床试验阶段由于缺乏有效性而终止,导致无法上市。干细胞药物在临床使用中的疗效不确定,一方面适应证临床疗效相关的生物学有效性指标 (potency) 难以确定,进而导致难以对产品进行质量控制;另一方面也与临床研发方案的制定相关,未能有效挖掘潜在的临床获益或受益人群。

3.1.1 干细胞药物的生物活性与有效性指标 MSC 的生物活性及功能标志物的选择与确定需根据细胞的作用机制和适应证而定。MSC 主要是通过表达或分泌各类因子、外泌体等发挥免疫调节、抗凋亡、抗氧化和修复的作用。适应证主要有自身免疫性疾病、退行性疾病和损伤性疾病等。由 MSC

表达或分泌, 并在疾病治疗中发挥作用的蛋白主要有免疫调节类蛋白(如 TNFR1 和 IDO1)、抗凋亡类蛋白(如 HGF、IGF-1、FGF2 和 VEGF)和修复类蛋白(如 TGF- β 等)。部分蛋白在免疫调节和修复方面均发挥重要的作用。

Mesoblast 公司的 MSC 药物 Remestemcel-L 治疗移植植物抗宿主病(GVHD), 研究发现 MSC 通过 TNF- α 介导活化 NF- κ B 而发挥免疫抑制作用^[5], 并通过 siRNA 干扰技术验证了降低或敲除 TNFR1 会降低 MSC 的淋巴细胞抑制能力, 不同表达水平的 TNFR1 与细胞的淋巴细胞抑制能力呈一定的相关性, 因此将 TNFR1 作为 Remestemcel-L 生物功能的放行指标, 并且在临床试验中也观察到了 TNFR1 表达水平与临床治疗效果的相关性^[6]。

MSC 治疗卵巢早衰的研究表明, MSC 通过分泌 HGF, IGF-1, FGF2 和 VEGF 等生长因子, 参与调节卵巢颗粒细胞生长、凋亡, 抑制凋亡蛋白 Bax 的表达, 提高抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 从而减少卵巢颗粒细胞的凋亡, 调节卵泡的生成, 改善了卵巢的功能^[7]。

系统性红斑狼疮(SLE)也是 MSC 治疗的适应证之一。Wang 等^[8-9]研究发现 MSC 通过 TGF- β 和 PGE2 上调 Treg 细胞, 下调 Th17 细胞, 来发挥对 SLE 患者的治疗作用。MSC 也能通过 TGF- β 发挥促进修复的作用, 将 MSC 用于创口的治疗, TGF- β 可以通过促进肌成纤维细胞的 α SMA(平滑肌肌动蛋白)的表达而促进创口的愈合^[10]。

上述研究表明, MSC 表达和分泌多种蛋白, 可作为相关治疗蛋白的载体在体内发挥作用。可以根据干细胞药物在适应证中的主要作用机制, 同时结合临床疗效, 选择 MSC 表达或分泌的蛋白作为合适且有效的生物有效性指标。但 MSC 的作用机制复杂且多样, 针对不同适应证需研究不同的生物有效性指标, 可采用转录组学、蛋白组学等方法, 筛选与适应证治疗效果成正比的分子或蛋白标志物, 用以评价干细胞治疗特定适应证的潜能。

人多能干细胞来源的干细胞药物更多的是将多能干细胞分化为目的细胞进行替代治疗, 需要明确目的细胞的标志物并进行有效鉴定, 使细胞达到一定纯度满足临床治疗的需要。

3.1.2 干细胞药物的赋能

目前开展的干细胞药物在临幊上显示了一定的安全性, 但所用的细胞均

为未经修饰的原始分离传代扩增获得的细胞。临床前和临幊数据已显示其效果最多中等并且经常是无效的。分析其原因, 原始未经修饰的 MSC 具有异质性, 输入的细胞有不同的亚群(并且各亚群的比例并不稳定), 导致其功能也不稳定; 另外原始未经修饰的 MSC 针对某个疾病的生物功能不够强大, 不能持续表达生物功能分子, 并且表达水平较低, 也导致了治疗效果的差异。修饰的 MSC 能将与疾病相关的蛋白、因子等转入 MSC, 使 MSC 能持续高水平表达, 使其成为均一化、稳定、生物功能强的 MSC 药物, 提高疾病的治疗效果。

Zong 等^[11]用血管内皮生长因子(VEGF)基因通过腺病毒修饰 MSC, 结合 VEGF 的调控新生血管、改善组织缺血缺氧功能与 MSC 组织修复及再生能力, 治疗宫腔黏连模型小鼠, 结果表明 MSC 组及 VEGF-MSC 组子宫病理学与模型组相比不同程度改善, 均有连续上皮样细胞覆盖宫腔, VEGF-MSC 组上皮层褶皱更多, 且 MSC 组及 VEGF-MSC 组子宫内膜厚度、小血管数量、腺体数量和纤维化程度均较模型组显著改善, VEGF-MSC 组改善更为显著($P<0.05$), 提示 VEGF 基因修饰的 MSC 可促进子宫内膜再生修复, 预防宫腔黏连。

Reagan 等^[12]用 TRAIL(肿瘤坏死因子诱导凋亡配体)基因通过慢病毒修饰 MSC, 结合 TRAIL 的抗肿瘤活性和 MSC 的肿瘤归巢能力, 制备了表达 TRAIL 的 MSC, 治疗乳腺癌荷瘤老鼠, 结果表明治疗后 3 周, 6 周能观察到肿瘤负荷的显著减少, 骨转移和肺转移病灶也显著减小, 显示了良好的抗肿瘤活性。目前该基因修饰的 MSC 正在开展非小细胞肺癌的临床试验(注册号 NCT03298763)。

军事医学科学院的吴祖泽院士团队用肝细胞生长因子(HGF)基因通过腺病毒修饰 MSC^[13], 将 HGF 的促血管新生功能和 MSC 的成骨功能结合起来治疗 1 例股骨头坏死患者, 治疗后 9 个月, CT 扫描显示出现重建性骨修复、低密度区范围缩小、密度增高、骨小梁和新骨生成、股骨头局部塌陷重新隆起、消失的关节面大部分恢复, Harris 髋关节功能评分(HHS)分值提高, ARCO 分期由ⅢB 改善至ⅢA, 这证实了 HGF 基因修饰的 MSC 的骨修复能力。

Baloh 等^[14]用慢病毒将 GDNF 转染 MSC 治疗肌萎缩侧索硬化症患者, 临幊结果显示细胞移植治疗未对腿的肌肉力量产生负面影响; ALSFRS-R 评

价无变化; 18 例患者治疗后生存期为 14~42 个月。

可见修饰的赋能干细胞药物在临幊上已得到一定的应用, 并显示出独特且良好的治疗效果。修饰型的赋能干细胞药物还多处在动物实验阶段, 较少进入临幊试验阶段, 其有效性还有待进一步的验证, 但为干细胞药物的有效性的保证和提高提供了一条可行的途径。

3.1.3 临幊适应证筛选及入组筛选标准建立 Mesoblast 公司的干细胞产品 Rexlemestrocel-L 在治疗心衰的Ⅲ期临幊试验中, 入组了 537 例慢性心衰患者, 经过治疗后并没有减少复发的非致命失代偿性心力衰竭事件, 未达到临幊研究的终点; 但进一步的分析发现治疗后的患者心脏病发作或卒中的发生率降低了 60%, 这些患者在进行性疾病过程的早期阶段接受治疗时, 死于心脏原因的比例也下降了 60%。

2020 年 11 月 17 日, Brainstorm 公司宣布, 其干细胞产品 NurOwn 在治疗肌萎缩侧索硬化症的Ⅲ期临幊试验中, 未能达到主要终点(安全性评估和首次治疗后 28 周, 参与者的 ALSFRS-R 治疗后与治疗前的对比)和关键次要终点(包括无疾病进展的患者比例、总 ALSFRS-R 下降以及患者功能和生存的综合分析), 但临幊数据显示, 该产品在病情较轻的患者组中产生了部分临幊效果。

许多研究表明, 干细胞治疗股骨头坏死(osteonecrosis of the femoral head, ONFH)的疗效与患者选择有关, 取决于股骨头坏死的分期^[15]。疗效良好的报道多集中在Ⅰ期和Ⅱ期患者, 而对Ⅲ期和Ⅳ期患者, 特别是股骨头塌陷患者的疗效较差^[16]。此外, 股骨头坏死的病因是影响临幊结果的另一个重要因素。据报道, 干细胞治疗在创伤后股骨头坏死患者中的效果优于非创伤后股骨头坏死患者。值得注意的是, 与股骨头塌陷相关的改良 Kerboul 角是股骨头坏死患者干细胞治疗失败的危险因素^[17]。鉴于这些认识, 如何提高 ONFH 早期诊断的准确性, 选择合适的病例, 确定最佳适应证仍然是 ONFH 干细胞治疗的主要挑战。

2009 年, 美国 Osiris 公司开发的 Prochymal 产品, 在治疗难治性 GvHD 的Ⅲ期临幊试验宣告失败, 3 级急性患者的 5 年生存率仅为 25%, 而 4 级急性患者仅为 5%。2022 年 5 月 20 日, 美国 Athersys 公司宣布, 在日本开展的干细胞治疗缺血性卒中的临

床试验(MultiStem), 未能达到Ⅱ/Ⅲ期试验的主要终点, 但数据显示, 在治疗的 1 年后, 患者生活质量得到了持续改善。

以上研究表明, 对于干细胞药物的临幊适应证需进行进一步的细分, 精确瞄准特定阶段的疾病可能会更加突出显示干细胞药物的有效性; 严格并合理制定入组标准, 须全方位考虑入组患者的整体状态(疾病的早期还是晚期阶段), 细分治疗人群, 精准治疗, 满足临幊需求。

3.2 干细胞药物的“质量可控”

“质量可控”是药物的基本属性, 做到不同批次药物的可重复生成和质量稳定是实现药物上市的基本要求。在干细胞药物的开发过程中, 需研究并优化关键工艺参数(CPP)使干细胞药物达到需要的质量属性目标, 但由于干细胞的组织来源不同、供者来源不同和工艺控制等因素导致 CPP 研究不充分; 同时需识别干细胞药物的关键质量属性(CQA), 但由于对干细胞的作用机制和特性研究和认识不足, 导致对干细胞药物的 CQA 无法被有效识别, 最终未能建立稳定的生产工艺和质控手段, 生产出质量一致和可控的干细胞药物。

3.2.1 干细胞的异质性 首先, 干细胞的不同来源会导致细胞的异质性。干细胞来源广泛, 不同组织来源的细胞, 其生物学特性存在差异。Nakao 等^[18]对骨髓、脂肪和脐带来源的 MSC 进行的研究表明, 3 种类型 MSC 在温度响应培养皿中的黏附和增殖率不同。MSC 的体外扩增能力可能受到细胞传代次数和组织来源的影响。即使同一组织采集和扩增获得的干细胞, 仍是一个复杂的细胞群体, 而干细胞群体的异质性(同一批次干细胞群体的复杂集群、不同批次干细胞之间的差异)是导致干细胞临幊疗效不稳定的重要因素之一。

其次, 干细胞同一来源的不同供者也会导致细胞的异质性。供者个体差异受年龄、性别、既往病史和遗传病, 甚至近期的饮食、作息和精神状态等影响, 无法进行精准控制, 使细胞质量难以控制, 异质性大。Turinetto 等^[19]研究发现骨髓来源的 MSC 的数量、寿命、分化及增殖潜能与个体年龄呈负相关。Wu 等^[20]进行的免疫调节功能的差异性研究结果表明, 不同供体来源的 P5 代人脐带来源 MSC 实验组中淋巴细胞增殖比例显著低于对照组; 实验组中 Th1 细胞亚群和 Th17 细胞亚群的增殖比例显著

低于对照组; 实验组中 BV2 细胞的存活率显著低于对照组; 实验组中 Treg 细胞增殖比例和对 TNF- α 分泌量的抑制效果显著高于对照组。不同供体来源的 P5 代次人脐带来源 MSC 均有分化潜能, 但免疫调节能力存在差异。

另外, Zhou 等^[21]研究结果还表明, 不同年龄来源的骨髓 MSC, 其增殖和成骨能力有差异。MSC 的 p53 及其通路基因 p21 和 BAX 的表达与年龄相关。在 STRO-1⁺细胞和贴壁 MSC 中, 成骨细胞的生成随着年龄增加显著减少; MSC 的增殖和成骨细胞分化呈年龄依赖性下降, 指示细胞衰老的 β -半乳糖苷酶阳性细胞增加。这些研究显示供体年龄是一个很重要因素, 来自年轻供体的 MSC 似乎具有更大的活力、增殖潜力和抗氧化能力, 而年龄较大的成年来源的 MSC 具有较低的增殖能力。

最后, 干细胞制备工艺的差异也会导致细胞的异质性。自 1974 年 Friedenstein 发现 MSC 以来, 干细胞的分离和制备技术发展较为缓慢, 直至 2000 年, Erices 等^[22]从脐带血中成功分离 MSC; 2003 年, 由 Romanov 等^[23]建立了脐带来源 MSC 的华通胶分离方法。

不同的细胞制备方法影响细胞活性和导致异质性。以脐带来源 MSC 为例, 目前常用的分离方法主要有酶消化法和组织块贴壁法, 而酶消化法又分为胶原酶法 (I 型、II 型和 IV 型等)、胰酶法和混合酶消化法等。虽然酶消化法的制备时间更短, 但其引入的外源性杂质更多, 且所分离细胞的增殖能力和细胞活性均低于组织块贴壁法, 质量稳定性较差^[24]。

MSC 的增殖是有限的, 长期培养很可能引起 MSC 的持续变化。衰老的 MSC 的表型特征及其可能的功能将会发生改变。衰老的 MSC 在分化潜能、迁移和归巢能力上表现出明显的损伤。衰老 MSC 的分泌产物中存在的许多因素能够在全身性水平上加剧炎症反应, 降低 MSC 的免疫调节活性, 促进癌细胞的增殖或迁移^[19]。

针对干细胞药物供者来源的个体差异, 须加强对来源的筛选, 建立供者和组织的筛选标准; 同时, 针对供者差异导致的在同一培养工艺下, 细胞产量和生物功能的差异, 采用 QbD 理念进行创新工艺开发, 研究 CPP 的设计空间, 工艺随着供者的差异在一定合理的范围内进行调整。例如, 为了实现不同供者来源干细胞数量和某个生物功能指标的平

衡, 应对接种密度、培养时间和添加物浓度分别进行研究, 开发能够平衡两种指标的 3 个工艺参数的最优变化范围, 针对不同供者在此工艺参数范围内进行生产都可满足质量控制要求。

由于干细胞培养是一个动态的过程, 须对整个工艺过程进行控制, 可采用过程分析技术 (process analytical technology, PAT), PAT 是非断点、连续且实时的监测, 可对培养过程参数包括 pH、溶解氧、温度、细胞密度、营养水平 (如葡萄糖) 和代谢物水平等进行监测, 从而实现对细胞生长状态和密度的实时掌控, 确定最佳制备时间, 从而实现不同来源不同批次产品的一致性。

3.2.2 干细胞的质量控制

对于干细胞的质量控制, 首先在 2006 年国际细胞治疗协会 (ISCT) 对 MSC 的基本特性进行了定义^[25]: (1) 塑料黏附性, 即细胞可在塑料表面贴附生长, 是一种贴壁细胞; (2) 细胞表面标志物: 表达 CD105、CD90 和 CD73, 不表达 CD11b、CD14、CD19、CD34、CD45、CD79a 和 HLA-DR; (3) 具有多向分化能力, 可被诱导分化为软骨细胞、脂肪细胞和骨细胞。后续 ISCT 又对 MSC 的功能性指标如免疫调节能力等进行了指导性的规范^[26]。

2015 年 CDE 发布的《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则》中, 对于异体来源的干细胞, 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, 要求进行细胞鉴别、细胞活性、生长活性、全面的内外源致病微生物, 以及详细的干细胞特性检测 (包括特定细胞表面标志物群、表达产物和分化潜能等) 和细胞纯度分析。在众多质量检验项目中, 尤其对干细胞的生物学效力试验提出了要求: 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 MSC, 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 iPSC, 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, 应进行与其治疗适应证相关的生物学效应检

验。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。

2023 年 4 月,CDE 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)》中对干细胞药学研究进行了详细的指导和论述。其中明确规定了干细胞生物学效力应包含相关生物活性物质的分泌(如重组蛋白、糖蛋白或脂蛋白、生长因子、酶及细胞因子等)、细胞及细胞外基质/结构的形成、细胞相互作用(如免疫激活或抑制)、细胞的迁移分化或自我更新潜能。指导原则还对体外评价指标的研究方法进行了论述,强调了研发者应明确产品与临床治疗相关的生物学效应和作用机制,开发能够代表产品作用机制的定量/半定量生物学活性测定方法,尽可能采取多种互补的分析检测方法进行研究并完成方法学验证。

2021 年 11 月,CDE 发布的《基因修饰细胞治疗产品非临床研究技术指导原则(试行)》中,对于诱导多能干细胞来源的细胞产品进行了相关规定,明确要求应在首次临床试验前完成致瘤性试验,应在体内试验中确认/验证自杀机制的功能(如有)。对于采用基因编辑技术制备的基因修饰细胞产品,应进行体外在靶和脱靶活性评估,以确认修饰酶或向导 RNA 对靶基因序列的特异性,必要时,还应分析基因编辑对细胞表型和生理功能的潜在影响。在进行体外非临床有效性研究时,应考察包括:(1)对细胞基因组修饰的特异性;(2)引入的外源调控序列对内源基因表达的影响,或转基因的表达及功能活性;(3)基因修饰对细胞生物学特性和生理功能的影响。

可以说,国内监管机构对于干细胞药物的质量控制提出了明确且清晰的要求,为干细胞的质量控制明确了方向,为干细胞的产业化提供了监管保障。干细胞药物研发公司可遵循相关指导原则,但仍需要根据适应证开展充分的质量研究,识别出对应的关键质量属性(CQA),制定干细胞药物的质量标准,开发适应药物的质量检测及控制方法,快速推进干细胞药物的临床研究及上市。

3.3 干细胞药物的安全性

“安全”处在药物基本属性第一位,对于一类新型的细胞药物尤其重要,干细胞药物的安全性除了常规药物的微生物的安全性外,由于细胞来源及体

外修饰的原因导致的生物安全性需格外重视。

3.3.1 微生物安全性 微生物的安全性项目主要包括对病毒、细菌、真菌和支原体等进行控制,对于无法进行终端过滤除菌或灭菌的干细胞药物显得尤为重要。

现行的无菌检查方法需要 14 d,而干细胞药物特别是采用新鲜制剂的药物,有效期短,传统的无菌检查方法无法满足药物的放行。目前无菌快速检测的方法主要有对微生物代谢产物的自动化监测系统、核酸扩增技术^[27]等,自动化监测培养系统可将无菌检查的时间缩短至 3~7 d^[28]。

《欧洲药典》、《日本药典》和《美国药典》都已收录核酸扩增方法(nucleic acid amplification technology, NAT)作为支原体检测方法,但需要对该方法进行方法学验证,与传统方法(培养法和细胞指示法)进行对比^[29],要求 NAT 法验证的灵敏度不低于传统方法的灵敏度才可以使用。因此,支原体的 NAT 方法在经过充分验证的前提下,可用于干细胞产品的中间产品和成品的质量控制及放行。

但鉴于快速放行方法技术较新,在细胞治疗产品中有待充分验证,在细胞药物的最终放行时,在采用快速放行方法的同时需与药典方法进行同步检测验证。

3.3.2 生物安全性 干细胞药物的生物安全性研究主要考虑细胞的成瘤性和致瘤性问题。成瘤性是指接种细胞在注射部位和/或转移部位由接种细胞本身形成肿瘤的能力;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正常细胞形成肿瘤的能力^[30]。

人多能干细胞(包括 ESC 和 iPSC)由于具有无限的自我更新、分化潜能和多能性,细胞培养过程中遗传和表观遗传变异以及终产品中的残留未分化细胞等因素均可导致较高的成瘤性风险,阻碍了其临床的大规模应用^[31]。而 MSC 的临床应用未见成瘤性的报道^[32-33]。

人多能干细胞出现成瘤的大致有 3 种情况^[34]:(1)最终的细胞药物中残留有未分化和/或未成熟的多能干细胞;(2)iPSC 中的重编程因子仍保持活性;(3)人多能干细胞体外培养过程中发生的基因突变。

云南省肿瘤医院报告了 1 例 iPSC 来源细胞治疗 2 型糖尿病后形成未成熟畸胎瘤的临床病例。该病例移植了由自体 iPSC 分化而来的 β 细胞,在

扩增后通过左上臂的三角肌注射到患者体内。到治疗后 2 个月, 在注射位置出现肿块以及腋窝淋巴结肿大; 手术后病理显示为未成熟畸胎瘤, 免疫荧光检测显示诱导 iPSC 的关键基因 *OCT4* 和 *SOX2* 表达阳性, 而胰岛素的免疫组织化学染色呈阴性, 表明注射后的细胞并未完全分化, 仍保持了重编程因子的活性, 导致了畸胎瘤的发生^[35]。

降低成瘤性风险可以从细胞的制备工艺进行控制, 需要建立有效的体外定向分化方法, 获得高纯度的分化目的细胞。第 1 个 iPSC 来源的视网膜色素上皮细胞被用于年龄相关性黄斑变性患者的临床试验中, 目的细胞的纯度大于 95%, 剩余的非目的细胞几乎没有未分化细胞^[36]。纯化工艺也可以通过去除未分化细胞和非目的细胞来进行纯化。Hayashi 等^[37] 将 CD200 作为角膜上皮细胞的阴性标志物, 通过流式分选去除 iPSC 来源的 CD200 阳性的未分化和非目的细胞, 再通过 TGB4 和 SSEA-4 阳性标志物分选获得最终分化细胞。但流式分选并不适合大规模细胞制备, 无法满足药物工艺开发需要。Tsujisaka 等^[38] 将 miRNA 和磁珠分选相结合, 先把 miR208a-CD4 (miR-208a-CD4 switch) 序列转入 iPSC, 未分化的细胞不表达 miR208a 从而有 CD4 的表达, 再通过 CD4 磁珠将未分化的细胞筛选去除, 同时通过抗生素标记筛选去除未转染的细胞, 最终的心肌细胞的纯度能达到 95% 以上。mRNA 的转染不涉及基因组的插入, 结合磁珠大规模分选, 为细胞药物的安全性和规模化的开发提供了一条路线。另外, 利用人多能干细胞对于 DNA 损伤的敏感性, 可利用小分子化合物来诱导人多能干细胞的凋亡或死亡来去除未分化细胞, 提高分化细胞的纯度^[39]。

对于人多能干细胞(包括 ESC 和 iPSC)成瘤性的控制常用的检测方法有体内的畸胎瘤形成分析、体外的软琼脂克隆形成试验、染色体核型分析、未分化细胞标志物及基因表达情况、测序等, 不同方法的检测时间、灵敏度、复杂程度和成本不一^[40], 须根据干细胞的不同工艺阶段, 不同产品阶段, 选择多个方法进行控制。Shi 等^[41] 筛选出两个基因 (*ESRG* 和 *ZSCAN10*) 作为通用 RNA 靶点用于残留人 iPSC 细胞的检测, 通过将 2、20、200、2000 和 20 000 个 iPSC 与 293T 细胞混合, 通过数字 PCR (ddPCR) 可有效检测到 0.000 1% 的未分化 iPSC 残留; 同时 *ESRG*

mRNA 的拷贝数与 iPSC 的数量相关, 能够对残留 iPSC 进行定量。

对于人多能干细胞扩增的过程是否伴随基因突变的发生, 研究人员也进行了探索。Merkle 等^[42] 对 140 种不同的人多能干细胞(包括了 26 种准备用于临床治疗研究的干细胞)进行转录组测序 (RNA-Seq), 发现抑癌基因 *P53* 的编码区带有 6 种突变, 这 6 种突变都造成 *P53* 表达的缺失; 并且随着干细胞的长期体外培养与传代, 突变的发生概率也显著上升; Avior 等^[43] 对原始态和始发态两种状态人多能干细胞系中进行 RNA-seq 分析, 发现多个 *tier 1* 癌症基因(癌症相关基因集)反复出现非同义的 SNPs, 这些突变出现在原始态多能干细胞中的概率比始发态高出 4 倍; 由于 Avior 等^[43] 的研究使用了 Ge Guo 和 Austin Smith 团队^[44] 发表的数据集, 观察到原始态细胞系中出现 *TP53* 和其他基因的突变, 而他们自己团队并未观察到, 所以对该数据进行了重新分析, 将 Avior 等^[43] 发现的 SNPs 与鼠饲养层细胞 (MEFs) 基因组进行比对, 发现其与小鼠基因组具有超过 99% 的相似, 而与人类基因组相似度较低, 分析原始态干细胞检测出癌症相关突变的原因是小鼠基因序列的污染, 而实际细胞的癌症突变的概率很低。这些研究虽然提示了人多能干细胞的癌症突变概率较低, 但提示将人多能干细胞作为药物进行临床应用时, 仍需对人多能干细胞的突变情况进行监测, 充分保证安全性。

对于 MSC 的成瘤性控制主要的检测方法主要有免疫缺陷动物的成瘤试验、体外的软琼脂克隆形成试验和端粒酶活性。虽然 MSC 临床应用未见成瘤性的报道, 但仍需对 MSC 进行传代稳定性研究, 必要时也须进行组学测序, 对不同代次的细胞的成瘤性进行控制, 选择合适代次的细胞进行临床治疗。

干细胞药物的致瘤性试验主要是进行动物体内试验, 致瘤性试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^[45]。在观察到肿瘤形成的情况下, 首先排除自发肿瘤, 并可进行基因/遗传分析, 进一步鉴别诊断其来源于接种细胞还是宿主细胞^[46]。

3.3.3 临床治疗的安全性 干细胞的临床给药方式主要有局部给药和静脉给药, 两种方式出现的不良反应不同。在欧盟和日本已经上市的用于克罗恩病并发肛瘘的异体脂肪来源的 MSC 产品 (Alofisel),

其采用肛周局部注射,Ⅲ期临床研究表明不良反应主要是肛周的脓肿和疼痛,试验组发现需要治疗的不良反应比例低于对照组,只有约 6% 的患者经历了严重的需要治疗的不良反应^[47]。Mesoblast 公司的 MSC 药物 Remestemcel-L 治疗 1114 名儿童 GVHD 患者,不良反应发生率与对照组相比无显著差异,试验组有 2.9% 的患者出现急性输液反应(对照组为 1.7%),未出现异位的组织,也无血液毒性^[6]。Riordan 等^[48]采用脐带来源 MSC 静脉给药的方式治疗 20 例多发性硬化症的患者,未报告严重的不良反应,与治疗相关的不良反应主要有头痛和疲劳。

已开展的干细胞药物临床试验未报告严重的不良反应,表明干细胞的临床使用总体上是安全的,但干细胞药物的临床使用安全性也不能被认为

是理所当然的,仍需对不良反应进行持续的监测,保证临床受试对象的安全,同时也保障临床试验的安全顺利开展。

4 结语

干细胞药物的开发及上市是干细胞产业化的主要方向,而干细胞药物的开发应遵循质量源于设计(QbD)的原则,充分了解干细胞的关键质量属性,从源头上对干细胞的工艺开发、质量控制进行规划,制定一个清晰明确的目标,提前预测可能出现的问题。

本文综述了干细胞药物产业化存在的主要问题,也对相应的解决方案进行了初步的探讨,主要问题及解决方案见表 2。

表 2 干细胞药物产业化存在的问题及解决方案

存在问题类别	存在问题内容	解决方案
干细胞药物的有效性	缺少生物有效性指标	进行转录组学、蛋白组学研究,筛选针对适应证的生物有效性指标
	干细胞功能不强	通过基因修饰增加功能
	临床适应证和入组标准不合适	对适应证进行细分;严格合理制定入组标准
干细胞药物的质量可控	干细胞的异质性	制定供者及组织筛选标准;确定合理的关键工艺参数(CPP)范围
	干细胞的关键质量属性(CQA)认识不足	建立PAT在线、动态分析过程
	缺乏可靠的微生物检测快速放行方法	针对适应证开展机制和质量研究,充分了解和确认关键质量属性,尤其是生物效力的质量属性
干细胞药物的安全性	生物安全性控制不足	开发新的快速放行方法并进行药典方法的替代验证
		优化工艺减少残留未分化细胞及非细胞致瘤性因素
		开发灵敏度高的未分化细胞的检测方法
		监测细胞分化过程中的基因突变

干细胞药物的产业化还面临中规模化生产的问题。当临床需要大剂量的 MSC 时,规模化工艺开发尤为重要。研发人员必须开发干细胞规模化生产的工艺,在规模化生成的同时还要兼顾安全性。质量控制标准共识的缺失,也阻碍了细胞制备工艺的标准化进程,评估产品的安全性和有效性仍然任重而道远。

前期大量临床试验表明,在干细胞药物的临床有效性方面仍面临着巨大的挑战。MSC 产品的异质性(不同供体和组织来源、不同的工艺、不同的制剂等),不同给药途径(局部、静脉还是鞘内),适应证的充分了解,患者疾病微环境的影响(对给药后治疗的反应和效果)等技术壁垒和难题都可能造成干细胞药物临床试验的失败,成为干细胞药物产业化的障碍。

干细胞药物作为新兴的药物类型,是国家大力

支持的新兴产业类型,是药物产业转型和提升的重要一环,具有同步甚至领先世界的潜力。相信干细胞药物的产业化随着基础研究的深入,工业界研发人员的不懈努力,在未来 3~5 年内会有干细胞药物的批准上市。

References

- [1] Yuan BZ. The Law-Regulation-Guidance regulatory system for stem cell-based medicinal products[J]. *Chin Bull Life Sci (生命科学)*, 2016, 28(8): 949-957.
- [2] Cheng HY, Chang XH, Liu CX, et al. Current status and future of stem cell clinical research and management[J]. *Drug Eval Res (药物评价研究)*, 2021, 44(2): 243-249.
- [3] Wang J, Huang YH, Gao CY. Current application and registration status of mesenchymal stem cell products and considerations on its clinical review[J]. *Chin J N Drugs (中国新药杂志)*, 2022, 31(15): 1468-1473.

- [4] Gao JC, Wei W, Zhang M, et al. Progress and prospect of regulatory science in cell and gene therapy products[J]. *Chin J N Drugs* (中国新药杂志), 2022, **31**(2): 105-108.
- [5] Dorronsoro A, Ferrin I, Salcedo JM, et al. Human mesenchymal stromal cells modulate T-cell responses through TNF- α -mediated activation of NF- κ B[J]. *Eur J Immunol*, 2014, **44**(2): 480-488.
- [6] Murata M, Teshima T. Treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease using commercial mesenchymal stem cell products[J]. *Front Immunol*, 2021, **12**: 724380.
- [7] Ling L, Feng XS, Wei TQ, et al. Human amnion-derived mesenchymal stem cell (hAD-MSC) transplantation improves ovarian function in rats with premature ovarian insufficiency (POI) at least partly through a paracrine mechanism[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, **10**(1): 46.
- [8] Wang DD, Huang SS, Yuan XR, et al. The regulation of the Treg/Th17 balance by mesenchymal stem cells in human systemic lupus erythematosus[J]. *Cell Mol Immunol*, 2017, **14**(5): 423-431.
- [9] Wang DD, Li J, Zhang Y, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in active and refractory systemic lupus erythematosus: a multicenter clinical study[J]. *Arthritis Res Ther*, 2014, **16**(2): R79.
- [10] Putra A, Alif I, Hamra N, et al. MSC-released TGF- β regulate α -SMA expression of myofibroblast during wound healing[J]. *J Stem Cells Regen Med*, 2020, **16**(2): 73-79.
- [11] Zong S, Liang CB. Evaluation of VEGF gene modified MSC in preventing intrauterine adhesion and promoting endometrial regeneration and repair[J]. *Chin J Birth Health Hered* (中国优生与遗传杂志), 2022, **30**(1): 20-24.
- [12] Reagan MR, Seib FP, McMillin DW, et al. Stem cell implants for cancer therapy: trail-expressing mesenchymal stem cells target cancer cells in situ[J]. *J Breast Cancer*, 2012, **15**(3): 273-282.
- [13] Lou X, Gong EN, Shang FY, et al. Exploratory research for hepatocyte growth factor gene-modified mesenchymal stem cells on femoral head osteonecrosis[J]. *J Tissue Eng Reconstr Surg* (组织工程与重建外科杂志), 2009, **5**(2): 83-85,107.
- [14] Baloh RH, Johnson JP, Avalos P, et al. Transplantation of human neural progenitor cells secreting GDNF into the spinal cord of patients with ALS: a phase 1/2a trial[J]. *Nat Med*, 2022, **28**(9): 1813-1822.
- [15] Ma YC, Wang T, Liao JX, et al. Efficacy of autologous bone marrow buffy coat grafting combined with core decompression in patients with avascular necrosis of femoral head: a prospective, double-blinded, randomized, controlled study[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2014, **5**(5): 115.
- [16] Hauzeur JP, De Maertelaer V, Baudoux E, et al. Inefficacy of autologous bone marrow concentrate in stage three osteonecrosis: a randomized controlled double-blind trial[J]. *Int Orthop*, 2018, **42**(7): 1429-1435.
- [17] Houdek MT, Wyles CC, Collins MS, et al. Stem cells combined with platelet-rich plasma effectively treat corticosteroid-induced osteonecrosis of the hip: a prospective study[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2018, **476**(2): 388-397.
- [18] Nakao M, Inanaga D, Nagase K, et al. Characteristic differences of cell sheets composed of mesenchymal stem cells with different tissue origins[J]. *Regen Ther*, 2019, **11**: 34-40.
- [19] Turinetto V, Vitale E, Giachino C. Senescence in human mesenchymal stem cells: functional changes and implications in stem cell-based therapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, **17**(7): 1164.
- [20] Wu TY, Xing ZG, Xie HX, et al. Difference in immune regulation ability of p5 human umbilical cord mesenchymal stem cells from different donor sources[J]. *Chin J Exp Surg* (中华实验外科杂志), 2022, **39**(4): 3.
- [21] Zhou SH, Greenberger JS, Epperly MW, et al. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts[J]. *Aging Cell*, 2008, **7**(3): 335-343.
- [22] Erices A, Conget P, Minguez JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood[J]. *Br J Haematol*, 2000, **109**(1): 235-242.
- [23] Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord[J]. *Stem Cells*, 2003, **21**(1): 105-110.
- [24] Salehinejad P, Alitheen NB, Ali AM, et al. Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2012, **48**(2): 75-83.
- [25] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement[J]. *Cytotherapy*, 2006, **8**(4): 315-317.
- [26] Krampera M, Galipeau J, Shi YF, et al. Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells: the International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal[J]. *Cytotherapy*, 2013, **15**(9): 1054-1061.
- [27] Liu HX, Yang Q, Xie H, et al. EP 9.2 2.6. 27. Microbiological examination of cell-based preparations[J]. *Drug Stand China* (中国药品标准), 2019, **20**(2): 115-118.
- [28] CP "9406 Guiding Principles for Microbial Examination of Cellular Products", *Chinese Pharmacopoeia*, 2020.
- [29] Zhao X, Feng JP, Meng SF. Considerations on mycoplasma detection by nucleic acid detection method and the methodological validation[J]. *Chin Pharm Aff* (中国药事), 2018, **32**(8): 1020-1027.
- [30] 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 biologi-

- cal medicinal products and for the characterization of cell bank.
- [31] Lee AS, Tang C, Rao MS, et al. Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies[J]. *Nat Med*, 2013, **19**(8): 998-1004.
- [32] Klopp AH, Gupta A, Spaeth E, et al. Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth?[J]. *Stem Cells*, 2011, **29**(1): 11-19.
- [33] Lu JQ, Wei W, Liu BN, et al. Research progress, chemistry, manufacturing and controls considerations of mesenchymal stem cell products[J]. *Acta Pharm Sin (药学学报)*, 2019, **54**(7): 1317-1324.
- [34] Yamanaka S. Pluripotent stem cell-based cell therapy-promise and challenges[J]. *Cell Stem Cell*, 2020, **27**(4): 523-531.
- [35] Han L, He H, Yang YH, et al. Distinctive clinical and pathologic features of immature teratomas arising from induced pluripotent stem cell-derived beta cell injection in a diabetes patient[J]. *Stem Cells Dev*, 2022, **31**(5/6): 97-101.
- [36] Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, et al. Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration[J]. *N Engl J Med*, 2017, **376**(11): 1038-1046.
- [37] Hayashi R, Ishikawa Y, Katayama T, et al. CD200 facilitates the isolation of corneal epithelial cells derived from human pluripotent stem cells[J]. *Sci Rep*, 2018, **8**(1): 16550.
- [38] Tsujisaka Y, Hatani T, Okubo C, et al. Purification of human iPSC-derived cells at large scale using microRNA switch and magnetic-activated cell sorting[J]. *Stem Cell Reports*, 2022, **17**(7): 1772-1785.
- [39] Jeong HC, Cho SJ, Lee MO, et al. Technical approaches to in-
- duce selective cell death of pluripotent stem cells[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, **74**(14): 2601-2611.
- [40] Kuroda T, Yasuda S, Sato Y. Tumorigenicity studies for human pluripotent stem cell-derived products[J]. *Biol Pharm Bull*, 2013, **36**(2): 189-192.
- [41] Shi H, Feng TJ, Wang R, et al. Universal markers for hiPSCs residue detection[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2022, **27**(8): 239.
- [42] Merkle FT, Ghosh S, Kamitaki N, et al. Human pluripotent stem cells recurrently acquire and expand dominant negative P53 mutations[J]. *Nature*, 2017, **545**(7653): 229-233.
- [43] Aviñor Y, Lezmi E, Eggan K, et al. Cancer-related mutations identified in primed human pluripotent stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2021, **28**(1): 10-11.
- [44] Guo G, von Meyenn F, Austin S. Epigenetic resetting of human pluripotency[J]. *Development*, 2017, **144**(15): 2748-2763.
- [45] Qu Z, Lin Z, Huo GT, et al. Risk assessment of tumorigenicity and oncogenicity of cell therapy products[J]. *Chin J New Drugs (中国新药杂志)*, 2021, **30**(19): 1819-1824.
- [46] Stirparo GG, Smith A, Guo G. Cancer-related mutations are not enriched in naive human pluripotent stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2021, **28**(1): 164-169. e2.
- [47] Panés J, García-Olmo D, Van Assche G, et al. Long-term efficacy and safety of stem cell therapy (Cx601) for complex perianal fistulas in patients with Crohn's disease[J]. *Gastroenterology*, 2018, **154**(5): 1334-1342. e4.
- [48] Riordan NH, Morales I, Fernández G, et al. Clinical feasibility of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells in the treatment of multiple sclerosis[J]. *J Transl Med*, 2018, **16**(1): 57.



[专家介绍] 廉云飞, 博士, 江苏拓弘康恒医药有限公司总经理, 中国药科大学药物制剂专业毕业。2017年度上海市优秀技术带头人, 2012–2013年度“上海市科技标兵”称号。历任上海医药集团股份有限公司信谊药物研究所、山东达因海洋生物制药股份有限公司、上海昊海生物科技股份有限公司研发负责人。专业从事生物制品、干细胞药物、免疫细胞药物的药学研究和GMP管理研究, 以及药物新剂型、新技术的开发。主持各类生物制品、干细胞和化药创新制剂研发项目25项, 涉及4项干细胞制剂、6种创新制剂的研发, 累计获批生产批文5项、临床批文9项, 获得国内第一张干细胞和NK细胞制剂的“药品生产许可证”。作为课题负责人主持3项省级科研项目, 参与3项国家级科研项目, 申请专利9项, 授权4项。