

人源干细胞产品药学研究与评价 技术指导原则（试行）

国家药品监督管理局药品审评中心

2023年4月

目 录

一、前言	3
二、适用范围	3
三、一般考虑	3
(一) 生物学活性	4
(二) 定向分化和非预期生物学效应	4
(三) 成瘤性和致瘤性	5
(四) 多能干细胞残留	5
(五) 遗传和表观遗传学研究	5
(六) 基因修饰细胞的研究	5
(七) 其他应关注的共性问题	6
四、生产用物料	7
(一) 原材料	7
(二) 辅料	12
(三) 接触性耗材、容器和药械组合	12
五、生产工艺	12
(一) 工艺开发	12
(二) 工艺变更	15
(三) 工艺验证	16
六、质量研究与质量标准	16
(一) 质量研究	17
(二) 质量标准	20
七、稳定性研究	21
八、包装及密封容器系统	22
九、名词解释	22
十、参考文献	23

一、前言

2017年，原国家食品药品监督管理总局发布《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)》，对按照药品管理相关法律法规进行研发的细胞治疗产品的技术要求进行了总体阐述。随着干细胞技术的发展、认知的深入和经验的积累，相关产品的技术要求亦随之逐步修订和完善。为进一步规范和指导干细胞产品的药学研发和申报，促进干细胞产业发展，制定本技术指导原则。

本指导原则是基于现有认识，对按照药品进行研发的干细胞产品药学研究的技术问题提供建议。此外，申请人/持有人亦可根据干细胞产品研发的实际情况，在符合药物研发的规律并提供科学合理的依据的前提下，采用其他有效的方法和手段。

二、适用范围

本指导原则主要为按照药品管理相关法规进行研发和注册申报的人源干细胞产品的上市申请阶段的药学研究提供技术指导。

本指导原则中的“人源干细胞产品”是指起源于人的成体(干)细胞(adult stem cells, ASCs or adult cells)、人胚干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)，经过一系列涉及干细胞的体外操作，一般包括扩增、基因修饰、诱导分化、转(分)化等，获得的干细胞及其衍生细胞，加入制剂辅料，分装至特定容器，并符合特定药品放行标准，可直接应用，也可与组织工程材料组合应用于临床的治疗产品。其中，由于涉及人类细胞，生产用细胞需符合国家伦理方面的相关规定。

由于人源干细胞产品可能涉及多方面的技术要求，在参考本指导原则的同时，也可同时参考其他药品、细胞治疗、基因治疗等方面的相关指导原则。本指导原则不涉及生殖细胞、造血干细胞移植等产品。

三、一般考虑

干细胞具备自我更新和多向分化潜能。干细胞产品的细胞类型多样，产品细胞本身具备体内生存、增殖和/或分化、细胞间相互作用等能力。干细胞产品的生产流程一般包括供者材料的获取、运输、接收，细胞系/库建立与检定，生产、检验、放行、储存和运输等环节。在干细胞产品的生产工艺设计与验证、质量研

究和控制、稳定性研究等研发过程中，应对以上各个环节的干细胞特性进行充分考虑。

干细胞产品应遵循药物研发的一般规律。临床试验申请阶段需满足安全性的要求，样品的制备应符合《药品生产质量管理规范-临床试验用药品附录》的要求；临床试验期间继续完善生产工艺和产品质量等相关研究；申请上市时提供支持产品安全、有效、质量可控的完整的研究数据。

（一）生物学活性

干细胞产品的生物学活性是产品的关键质量属性，涉及产品质量、效能、批次间质量一致性、可比性研究和稳定性等方面的评价，对其研究需贯穿于临床前、早期临床、关键性临床和上市及上市后研究的整个生命周期。对于不同来源的各类产品的生物学活性研究，应根据各类干细胞产品的特点，具体情况具体分析。比如，应考虑：特异性标志物在不断发现和更新；工艺中适用于大规模生产的筛选和鉴定方法在不断探索，变得日益高效和规范；产品批间的分化效率、均一性有待提高；功能性细胞的验证策略不尽相同，以致相应的产品放行验收标准缺乏可靠依据等。在设定产品生物学活性标准的过程中，应对产品属性进行广泛研究，收集足够的产品表征数据（即分子、生化、免疫学、表型、物理和生物学特性等），同时追踪科研进展和临床发现，积极努力探索哪些产品属性与效能最相关，确保符合确定的质量标准或验收限度产品批次均可为患者接受，保证产品的安全有效性。

（二）定向分化和非预期生物学效应

在体外采用定向分化策略进行干细胞产品生产时，诱导或抑制材料及其剂量、添加顺序、维持时间及终点残留量等都会显著影响分化效率，并带来质量和安全性风险，尤其是诱导分化过程中非目的细胞等杂质引起的风险，细胞在加工后发生非预期变化的风险，以及同时受迁移至体内局部微环境影响导致的非预期生物学效应的风险等。因此，在干细胞产品的研发和生产过程中，应重视关注产品的分化阶段的监测，如胚层的基因标志物，基因编辑造血干细胞中的干性维持的标志物等，确定合理的标志物检测体系，保证终产品的定向分化，预防控制由于非定向分化而产生的非预期生物学效应。

（三）成瘤性和致瘤性

干细胞产品可能具有较高的成瘤性和致瘤性风险,相关的风险因素比如:(1)干细胞复杂的制备工艺、长时间的细胞传代和离体操作;(2)干细胞产品中可能残留未分化细胞、非预期分化细胞、恶性转化细胞、突变;(3)细胞培养过程中的遗传和表观遗传变异/不稳定性;(4)基因修饰可能引入的高风险基因元件以及基因/病毒载体插入所导致的致癌基因活化或抑癌基因失活等。为了控制上述风险,应进行评估和控制干细胞产品的成瘤性、致瘤性。

（四）多能干细胞残留

ESCs/iPSCs 衍生细胞治疗产品可能因少量残留的多能干细胞以及持续增殖的分化子代细胞,导致出现畸胎瘤、其他错误模式肿瘤或癌前病变等风险。这些风险建议通过 ESCs/iPSCs 细胞系选择、高效定向分化、严格纯化等方式,并着力开发检测最终产品中未分化多能干细胞污染的敏感检测方法(特别是在提供局部高密度大剂量细胞时),进行有效控制。鼓励通过核型分析、全基因组和表观遗传组水平的综合分析及风险分析,评估肿瘤发生的潜在可能。

（五）遗传和表观遗传学研究

对于经过体外复杂操作的干细胞产品,以及多能干细胞衍生产品,建议结合细胞特性,在合适阶段对过程样品或终产品进行遗传和表观遗传的稳定性评估(如基因突变分析、去乙酰化检测等)。适用于干细胞产品的遗传和表观遗传学评估的分析方法和评价标准正在发展,可对任何这类检测的局限性进行评估,并与任何特定病例的风险/利益和患者人数进行权衡。某些情况下,干细胞产品的基因组突变以及遗传病有关的基因突变等风险可通过测序方法辅助分析和控制。

（六）基因修饰细胞的研究

基因修饰工艺开发应明确基因修饰方法、元件设计和操作条件,充分研究后明确基因物质的转导/转染方式和效率。对目的基因在基因组的整合情况/整合特征(插入位点、插入拷贝数、优势克隆异常生长等)、目的基因表达产物的功能进行评估。应充分研究基因编辑的靶向性、基因物质在目标细胞群中的表达效率。应对修饰细胞的染色体结构稳定性、基因组稳定性、目的基因的遗传和表达稳定性、脱靶编辑、转导/转染用载体的残留量以及病毒复制能力回复突变等进行深

入分析研究。还需考虑基因修饰的其他影响，如对细胞活性、干性、表型、功能、特性、工艺相关杂质和非目的细胞群变化等。

（七）其他应关注的共性问题

干细胞产品具备其他细胞治疗产品相关的共性质量风险因素，比如：（1）不同供者、同一供者不同组织来源的细胞具有较大的差异性，以及供者年龄、健康情况、组织来源与目标治疗组织的细胞谱系差异等，均有可能对产品质量有较大影响。（2）细胞培养过程中可能不得不添加人源/动物源材料，操作过程中可能引入的外源因子，均存在污染和交叉污染的风险。对于异体产品，更需关注外源因子引入或传播的风险。（3）自体产品批量有限，检测材料不足。（4）对于非冻存的新鲜制剂，产品有效期短。（5）产品批次数据积累有限，关键工艺参数（CPP）和关键质量属性（CQA）认知有限。（6）产品可能发生多轮工艺变更，产品质量无法完全精确表征等。针对上述的风险因素，控制策略应该考虑以下方面：

（1）生产环境方面，建立清场和隔离操作规范，并尽量采用连续、密闭式设备、设施，减少生产过程中的环境暴露环节。

（2）原材料方面，持续进行供者材料和细胞库的资格鉴定及适用性评估，进行科学合理的供者筛选，并关注替代细胞库的再生产，做好细胞库和工艺中间品的稳定性研究。对其他原材料供应商进行评估、审核，对不得不用的人源/动物源原材料严格质控。

（3）生产工艺和过程控制方面，建立完善的可追溯系统，同时关注生产过程中的细胞鉴别检测，做好上下游材料批号和标识管理，防止混淆和差错。加强对细胞库和未处理收获液的分析检测，在生产关键节点，对样品的有关检项，如无菌、内毒素、支原体、内外源病毒等均应符合要求。明确合理的过程控制指标和废弃指标，对工艺中间品进行检定或质量监测。

（4）质量研究和质量控制方面，质量源于设计的理念（quality by design）同样适用于干细胞产品，应尽早开展产品和工艺的表征，以及分析检测方法的开发，对产品进行全面的质量特性分析和数据收集，加强对产品关键质量属性的合理判

断，并结合适用可靠的分析方法制定全面有效的质量控制策略，确保产品质量稳定一致。由于这类产品往往难以精确表征，可通过加强原材料控制、过程控制和工艺中间品的检测来补充放行检测。在一些情况下，可以采用经过验证的快速、微量的新型放行检测方法辅助传统检测方法。进行规范的生产工艺开发、转移与验证。

在开发过程中甚至上市后，常常发生原材料和工艺的变更，在前期有关工艺与质量的关系的知识积累基础上，了解原材料和工艺的变更可能对产品质量的影响，应针对变更开展系统的可比性研究，结合产品和工艺特点持续进行质量特性研究，充分表征细胞形态、活性、遗传稳定性、成瘤性/致瘤性、细胞表型特征（包括预期和非预期细胞群等）和生物学活性等，尤其关注影响产品质量的干细胞特性检测（如适用）。

（5）稳定性方面，采用代表性批次和样品开展研究，稳定性研究中设置敏感的指标，如细胞活率和生物学活性。积累多批次数据，了解产品质量的变化趋势，为产品标准和效期的制定，以及可比性评价等提供依据。

四、生产用物料

生产用物料包括生产过程中使用的所有原材料、辅料、耗材等，其来源和质量应当清晰可靠。来自生产用物料的外源因子引入或传播的风险应该进行最大限度地控制。应对物料供应商及合同生产商进行评估、审核，分清责任主体，确保物料质量。

（一）原材料

原材料包括起始原材料（生产用细胞、生产辅助细胞、体外基因修饰系统等）和其他原材料（如培养基和细胞因子）。原材料的质量直接关系到终产品的质量，在基于科学和基于风险的原则下进行风险评估和质量控制，应符合现行版《中国药典》“生物制品生产用原材料及辅料质量控制”和“生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制”的要求。

1. 起始原材料

1.1 生产用细胞

生产用细胞可能直接来源于供者（自体或同种异体），也可能来源于细胞库，其来源应当稳定，且质量一致。

生产用细胞的来源和相关操作应符合国家相关法律法规和伦理的要求，应取得相关方的知情同意，建立“知情与保密”管理体系。

1.1.1 供者筛查

供者筛查是干细胞产品质量风险控制的重要手段。建立合理的供者筛查程序和标准对防范病毒污染、组织排异、相关疾病等风险十分必要。筛查时应尽量收集供者的相关特征，包括但不限于一般信息（如年龄、性别、血型、健康状况、生活习惯）、既往病史和家族史（尤其关注传染病和遗传病）、用药史和辐射暴露等。供者筛查还需区别自体供者和同种异体供者的风险差异，进行不同的考虑和要求。

供者的病原微生物感染筛查方面，尤其对于同种异体供者，可参考采供血的相关要求，如筛查供者是否存在 HBV、HCV、HIV、梅毒螺旋体等感染。实际研发应用中，还应根据供者细胞类型、供者健康/疾病史或区域流行病区旅居、细胞/组织特异性的易感病原体等具体情况适当增加相应的筛查项目，并列入验收标准。比如，对于富含白细胞的活细胞和组织的供者，建议筛查 HTLV-1 和 HTLV-2、CMV 等。对于自体供者，可根据来源的组织或器官、干细胞产品的特性以及临床适应症等，适当调整筛查项目和标准，应确定生产过程等是否会增加供者成为传染源的病原体传播风险，并说明采取的预防措施（为防止病毒或其他外源性因子传播给自体受者以外的其他人）。为了保证病原体筛查结果的可靠性，供者筛查应尽可能采用监管机构批准的血源筛查试剂盒检测病原体；对于无血源筛查试剂情况下，可采用已批准的体外诊断试剂，检测方法应经过适用性确认，关注检测方法灵敏度对病原微生物的检出能力；如无批准的检测方法或产品，可以采用经过全面方法学验证的自建方法。制备通用型干细胞产品时，必须考虑窗口期对供者病原微生物感染的筛查的影响。

组织排异方面的风险，可参考输血和器官移植供者的相关要求，比如收集供者的 ABO 血型、Rh 血型、HLA-I 类和 II 类分型信息等。建议根据产品类型和临床应用要求等考虑供者与受者的组织配型问题。存在组织排异风险、免疫原性高的情况下，应临床检测组织配型相容性。对于非国标方法，需应提供检测方法和依据。

建议结合先进的分析检测技术充分评估受者被引入疾病的潜在风险，如对异体供者进行致病基因方面的检测。

为了开发细胞库来源的干细胞产品，应延伸对该细胞库的供者进行筛查，比如脐带干细胞供者的检测对象建议扩展到包括适当时间间隔内的母亲外周血和组织采集当天胎儿的脐带血等。

1.1.2 供者组织和细胞

供者组织的获取需遵循与人体组织获取相关的规范指南，还要做好常规防护措施，以尽量防范和降低内外源因子引入或传播的风险。供者组织获取、储存、运输和入厂检验等步骤应经过充分研究，制定完善的追溯系统，明确标准操作规程和关键质量控制参数，并完成必要的验证。供者组织入厂时，根据工艺要求、产品特点，应进行组织类型、数量、微生物等方面的检测或确认。

供者组织中细胞的分离工艺可能对干细胞产品质量有影响。研究分离工艺时，建议采用具有代表性的供者来源组织，处理过程中关注细胞鉴别、活率及生长活性、外源致病微生物和干细胞特性检测（如细胞表面标志物群、表达产物和分化潜能等）等关键质量特性。供者组织分离获得的原代细胞和直接采集到的供者细胞入厂时，或经过初步扩增后，根据工艺要求、产品特点，应对细胞类型、数量、表型、活力、微生物、诱导分化潜能等方面进行相应的检测，如细胞类型可通过相关的生物标志物（蛋白、基因）进行鉴定和确认。标志物阳性（或阴性）的细胞比例可以作为预期细胞群或非目的细胞群指标评估的依据。

1.1.3 细胞建系与建库

为了保证产品批间一致性和稳定性，建议生产过程中尽量建库生产。建议参考 ICH《Q5D：用于生物技术产品及生物制品生产的细胞基质的来源和鉴定》、

中国药典《生物制品生产检定用动物细胞基质制备及检定规程》，并结合细胞特性和生产需求，对适合的生产用细胞和细胞种子（Cell Seed）进行建系、建库和检定等。对于人胚干细胞和诱导多能干细胞，尤其是基因修饰多能干细胞应筛选建立单克隆细胞株，并建立细胞库。

细胞建库应在符合现行《药品生产质量管理规范》的条件下制备。商业化生产规模的建库频率依据产品自身特性和批产量等确定。对于需要从多个供者取材建库的情形，如脐带间充质干细胞产品，为了保证细胞库内和细胞库间的质量均一性，应特别关注供者材料的质量一致性。对于需在多能干细胞阶段建库的情形，如异体 ESCs/iPSCs 来源干细胞产品，应对细胞库进行全面的检定。ESCs/iPSCs 细胞库检定内容一般包括细胞形态、鉴别、活性、标志物，细胞干性/多能性（如多能性基因 OCT4、SOX2、NANOG 等检测，三胚层方向的分化标志物检测、畸胎瘤试验）、分化潜能，微生物学安全性、杂质残留、遗传稳定性（染色体稳定性如核型或数字核型分析、全基因组测序、全外显子测序）和表观遗传学研究等。对于基因修饰多能干细胞单克隆库的情形，需结合全基因组测序等方法进行细胞库基因组稳定性评估，并对细胞库进行修饰基因的功能的验证和安全性分析。除基因物质的转导/转染方式和效率研究不适用外，其他相关要求可适当参考“三、一般考虑”章节中“（六）基因修饰细胞的研究”部分。对于不适合建库生产的情形，如自体基因修饰造血干细胞产品，应提供充分的依据，说明确保产品批间一致性的质量控制策略。

1.1.4 传代稳定性

干细胞在传代过程中可能不稳定，产生异质性细胞，且高代次干细胞可能具有安全性风险，因此无论是建库干细胞还是非建库干细胞，均须对传代稳定性进行充分、规范的研究。建议以群体倍增水平（PDL）定义细胞代次，或明确细胞传代过程中的群体倍增时间（PDT）以开展研究。

传代稳定性研究的条件应能代表实际临床/商业化生产工艺，重点关注遗传稳定性、成瘤/致瘤性、细胞干性、多能性、目的细胞分化能力等，并根据研究制定并明确体外生产限传代次和临床使用代次。传代稳定性的研究项目一般包括细胞形态、STR 鉴别、活率、活细胞数、群体倍增时间、表型等生长特性稳定性，

也包括染色体核型和组学测序等遗传稳定性，还包括多能性基因表达、畸胎瘤形成、定向诱导分化等干性的稳定性。

1.2 生产辅助细胞

生产过程中若使用辅助细胞（如病毒包装细胞、饲养层细胞），应充分说明其使用的必要性与合理性。辅助细胞应符合来源清晰可追溯、安全性风险可控、建立细胞库分级管理的基本原则。需对辅助细胞来源、培养和建系/库过程清楚溯源，对引入外源因子或免疫原性等的风险进行分析评估和检测控制。辅助细胞的添加量和残留量，应进行研究与验证，对于其中可能涉及细胞失活处理的工艺，如辐照或添加药物等，需证明不会对产品造成安全性和功能方面的影响。辅助细胞可进行建库管理，并按药典细胞库检验要求进行全面检验，建议特别关注对人源/动物源病毒的检验。应结合辅助细胞的特性和功能等，考察不同代次的辅助细胞库细胞的稳定性。

1.3 体外基因修饰系统

对于直接经体外基因修饰获得的干细胞产品，或者经重编程技术获得诱导多能干细胞（利用人成体细胞起始，通过外源基因表达、化合物诱导、表观遗传修饰等途径来获得人诱导多能干细胞）后再衍生所得的干细胞产品，其上游生产多涉及体外基因修饰系统，基因修饰系统（含病毒包装细胞）的设计、制备和质量控制等药学专业技术要求可参考《体外基因修饰系统药学研究与评价技术指导原则（试行）》。

2. 其他原材料

需充分考虑原材料使用的科学性和安全性，以及大规模生产时的持续可及性。生产中使用的原材料应有明确的来源、组成、用途、用量和质量控制等，具备原材料来源证明、检验报告书、包装说明书、TSE/BSE风险分析等文件。建议优先选择质量标准级别高、风险等级低的原材料，若生产中使用研究级试剂（如培养基、细胞因子、化学小分子等），为了确保产品一致性和纯度，应尽可能按照GMP要求生产。如果对未按照GMP生产的试剂是否具备足够高的质量应用于人体存在疑问，应有足够的研究资料去除这种疑问。细胞制备过程中不得使用青霉素等 β -内酰胺类抗生素。对于可能影响产品安全性的原材料，若经评估对产品安全性

无影响，需在最终产品或生产的合适阶段对残留进行评估和控制，并结合临床使用剂量确定需要控制的残留限度。有些高风险原材料可能需要单独开展动物体内的安全性评估。

（二）辅料

辅料相关要求请见“五、生产工艺”章节中“（一）工艺开发 2.2 辅料”部分。

（三）接触性耗材、容器和药械组合

接触性耗材、容器是指生产过程中与工艺中间品直接接触的耗材和容器（一次性管路、细胞工厂、生物反应袋、滤器等）。需结合产品特点开展适用性和生物安全性评估，并进行相关研究。药械组合产品需关注各组件与样品的相互作用和风险，以及组件对于细胞产品功能的影响。

五、生产工艺

干细胞产品类型多样，不同细胞类型，其制备工艺的内容和流程也有所不同。应尽量遵循药品生产工艺的一般规律，应用质量源于设计的理念，关注对生产工艺与产品质量关系的研究，加强对杂质去除的研究与验证，建立稳健可靠的生产工艺。

（一）工艺开发

干细胞产品生产工艺一般包括上游的原液工艺和下游的制剂工艺。工艺流程一般包括细胞的获取、复苏、传代或扩增、激活或预处理、基因修饰、诱导分化、纯化、收获、灌装、冻存、运输等多个工艺步骤。原液和制剂的界限有的时候可能并不清晰，需要根据产品情况适当划分。通过工艺开发和工艺表征，逐步明确生产工艺步骤、工艺参数及其限定范围（尤其是关键工艺参数 **CPP** 和主要工艺参数 **KPP**）、生产过程控制、可接受标准和废弃标准等，明确生产规模和批次、批量的定义，关注上下游工艺规模的匹配性，保证工艺相对稳定可靠。原则上按药品开发的人源干细胞产品不建议进行合批。若采用缩小模型用于工艺研究，应对缩小模型的代表性进行确认。

1. 原液工艺

原液工艺开发的重点可能在于细胞培养工艺、诱导分化工艺、基因修饰和其他工艺,以及纯化工艺。生产工艺的设计应能避免细胞发生非预期或异常的变化,并能满足去除相关杂质和具备相应功能的要求。

1.1 细胞培养工艺

干细胞产品的质量特性一般在细胞培养阶段形成,长期培养会面临一定的风险,比如:(1)体外培养细胞存在被病原体污染的风险。(2)细胞培养过程中,长时间传代可能会导致突变累积、基因组和表观遗传不稳定,从而改变细胞分化能力或功能,特别是因为变异的细胞可能会在培养中存在生长优势。因此,工艺开发过程中应严格选择合适的培养体系(培养基和添加因子)、培养方式,准确控制培养时间和培养代次。比如,开发非饲养层细胞扩增工艺,采用悬浮培养、基于微载体的三维培养法用于大规模扩增,以及采用有传代稳定性研究支持的传代代次内的干细胞制备终产品。

1.2 诱导分化工艺

通过诱导分化,细胞应具备相应的细胞生物学特征,以支持临床拟应用的功能。在定向诱导分化过程中,需结合干细胞的发育或分化进程,引导或调控干细胞变为功能细胞。为有效控制干细胞发生非目标分化,需采用合理的分化诱导剂或适当的分化抑制剂提高定向分化效率。生产工艺应能对不同分化阶段的细胞命运进行有效调控,控制终末细胞不再发生非预期的分化或转分化。对各阶段细胞群的组成、纯度、干性、多能性、分化潜能、标志物表达、生物学功能(分化能力和细胞因子分泌谱)等可选择在合理的分化节点进行监测。

1.3 基因修饰和其他工艺

一些工艺策略,如基因修饰、细胞激活或预处理,可能有助于增强干细胞终产品的期望的生物学活性。其中,通过基因修饰启动或过表达特定治疗活性蛋白,可增强特殊治疗功能。细胞因子刺激、化学物质诱导、物理方式干预(如低氧处理)等,可提高免疫调控功能。采取这些工艺策略时,应进行相关的细胞功能验证,并充分评估引入的安全性风险。

1.4 纯化工艺

纯化工艺的目的在于最大限度地提高纯度，即提高具有特定表型的细胞与总细胞的比值，减少最终细胞产品中的非目的细胞和其他杂质。应对纯化工艺进行开发研究和工艺表征，对各纯化步骤和纯化工艺参数的纯化效率和收率进行评估。

由于非目的细胞成分复杂，其可能是来自不同或同一谱系的细胞，分化不完全的细胞，或不需要的细胞，如未分化的干细胞，纯度分析时应加强对工艺中间品各组分分析鉴定，尽可能完整地明确各成分的性质，分析非目的细胞的特性。

2. 制剂工艺

2.1 制剂处方

剂型的选择需考虑产品的临床应用、储存和运输的稳定性和安全性等因素。处方的设计和筛选需与剂型相适应，并能有效维持产品的活性和稳定性。根据研究，确定最终制剂和使用方式，如确定是新鲜细胞还是冻存细胞，是游离细胞形式还是与基质结合，是冻存细胞复苏后直接给药还是经洗涤等工艺处理后再给予患者等。同时，还需明确处方组成，制剂规格、细胞浓度等。

2.2 辅料

通过风险评估，并经充分的处方筛选研究和验证，证明选用辅料的科学性和安全性，并明确辅料的来源、质量和用量。辅料的使用应符合药典要求。建议尽量选择低风险的辅料，尽量选用药用级辅料。当使用新型辅料时应参考相关指南开展适当的非临床安全性研究。

2.3 制剂生产工艺

制剂生产工艺需结合产品特点、处方、剂型等研究确定，工艺开发过程中，可应用质量源于设计的理念，关注处方的配制方式、工艺操作时间、灌装准确度、无菌条件控制等。如制剂需要冻存，应开展制剂的冻存和复苏工艺研究，鼓励采

用带有在线监测的程序降温先进设备开展不同降温程序研究。对于冷冻保存或以其他方式储存的产品，应确定短期或者长期储存对产品活性和稳定性的影响。

3. 工艺过程控制

干细胞产品复杂，产品质量难以完全精确表征，可应用质量源于设计的理念，加强工艺过程控制。为了控制产品的批间质量一致，可对干细胞产品生产的全过程进行合理的过程控制，包括明确的工艺参数和中控标准，以确保其质量（一致性、纯度和效力）和安全性。这些工艺参数包括特定步骤的培养条件（温度、溶氧、pH、CO₂）、工艺添加剂的用量、生产中每个环节的时间控制范围，等等。同时，可在合理的工艺节点进行工艺中间品检测，检测与产品质量相关的工艺性能指标，如细胞形态、活力、表型特征（包括预期和非预期细胞群）、生物负荷、回收率等，并设置可接受标准，为纠偏限度提供依据。由于干细胞产品一般无法进行终端除菌和除病毒工艺，外源因子污染风险高，生产过程中应在适当环节检测微生物安全性指标（包括无菌、支原体、内毒素等）。

（二）工艺变更

干细胞产品的变更，可参考一般生物制品的可比性研究的基本原则，但由于干细胞产品的复杂性和异质性，现有的药学表征方法很难全面反映变更前后产品质量（安全性、有效性）的差异。在干细胞产品的开发和上市后变更中，可能需要更多借助非临床和临床研究手段。

对于干细胞产品，不能仅靠终产品的检测来说明变更前后产品质量的可比性，变更研究的内容应该覆盖变更前后的原材料比对、工艺过程比对、工艺中间品与终产品的质量属性比对，以及稳定性比对等，其中质量属性比对应该着重关注鉴别、生物学活性以及纯度和杂质等。全面识别各类变更对产品安全性、有效性、质量可控性的潜在影响，科学合理地制定变更策略和研究方案。可以参考 ICH Q5E 的基本原则，设置合理的可比性研究取样点、检测指标及可接受标准，选用变更前后工艺生产的代表性批次进行可比性研究，关注检测项目的全面性、预设对比研究标准设置的合理性、检测方法的有效性和检测结果分析的客观性等。

随着研发的进展，研发过程中可能存在多个阶段不同的生产工艺，如非注册临床工艺、非临床工艺、临床工艺、商业化生产工艺、上市后变更的新工艺等，应具体分析各阶段工艺之间的差异，研究各工艺版本下的产品质量是否可桥接，如有必要，应进一步提供非临床或人体比对研究数据。一般情况下，在确证性临床试验开展前，建议完成所有预期变更。

（三）工艺验证

为了持续生产出质量一致的干细胞产品，进行切实可行的工艺验证十分关键。经过工艺验证后，生产中所有原材料和工艺严格遵循质量控制体系和标准操作规程。

工艺验证时，需采用商业化生产产能下的生产工艺，进行连续多个批次干细胞产品的生产，关注起始原材料等对产品质量的影响。商业化工艺验证自体产品时，应关注同时同阶段最大产能的挑战研究，考虑人员、设备、物料、环境、检测等整体运行能力对生产产能的支持能力，还应着重考虑干细胞的体外扩增能力、代次和分化效率、产品纯度对商业化生产产能的支持能力。应详细记录工艺验证中，不同批次工艺性能和产品质量的变化情况，全面确认生产工艺的稳健性和产品质量的一致性，验证关键生产阶段样品的鉴别、微生物安全性、纯度和生物学活性，评估基因组稳定性等，确保产品的安全性。

考虑到生产工艺对生产终末细胞的影响，需对可传代的终产品进行传代稳定性研究和验证，建议重点关注限传代次下的生长特性稳定性、遗传稳定性、成瘤/致瘤性考察以及终末细胞分化和去分化情况分析等。

在输入人体前，干细胞产品到达医疗机构的运输方式、在医院的使用方法（如复苏、洗涤等）、处理时间和储存条件、期限等也应进行验证。在临床回输操作中，重点关注防范不同类型细胞自身特点所引起的风险（如细胞失活、聚团、丧失干性等），以及临床使用过程中微生物污染的风险。对于新型给药装置和给药方式，需验证给药准确度。

六、质量研究与质量标准

（一）质量研究

由于干细胞产品具有多样性、异质性、复杂性、特殊性、进展性等特性，因此对干细胞产品的质量研究应全面且持续，建议选择代表性的生产批次（如非临床研究批次、临床试验批次、商业化生产批次）和合适的生产阶段样品（例如原代细胞或细胞种子、细胞库、工艺中间品、原液和制剂成品等）进行研究。质量研究内容可结合细胞特性进行选择，尽量覆盖细胞特性分析、理化特性分析、纯度和杂质分析、安全性分析和生物学活性分析等方面，尽可能采用一系列先进、正交的分析技术，且分析方法应经过研究确认，确保方法适用可靠。

1. 细胞特性分析

细胞形态：形态学分析可能对细胞的生长分化状态具有一定的指示作用，可结合各种成像技术进行细胞形态观察，帮助确定细胞的状态。

细胞鉴别：建议从细胞的表型或遗传型等多种维度，采用种属鉴别和细胞谱系等多种方法对细胞进行鉴别，鼓励开发能鉴别潜在污染细胞的方法，控制生产过程中细胞交叉污染的风险。

细胞活性：干细胞产品通常是活的细胞治疗产品，可通过细胞活率、活细胞数、群体倍增时间(PDT)、细胞周期等对细胞活性进行综合评价。

生物标志物：多种表面标志物可对细胞类型、多能性、谱系、终末分化和/或功能进行表征，常采用相关分析检测方法如蛋白免疫印迹(Western Blot, WB)、流式细胞术、免疫荧光等，进行细胞特性分析。mRNA 标记物与蛋白质标记物表达的有效相关性如果经验证，可使用基于 mRNA 的标记物辅助进行细胞表征。

2. 理化特性分析

一般理化特性分析需结合产品类型和制剂特征开展研究，常包括外观、颜色、pH 值、明显可见异物、渗透压摩尔浓度、装量等项目。

3. 纯度和杂质分析

干细胞产品在生产过程中，可能会引入或产生非细胞杂质（如理化杂质）、细胞碎片或非目的细胞，影响产品纯度，并可能带来安全性风险，因此需要根据产品类型和工艺特点，进行全面规范的纯度和杂质研究。

通常纯度分析的研究项目可能包括：活细胞比例、细胞群或亚群比例、目的细胞比例和非目的细胞比例等。经研究，当非目的细胞对产品安全性和有效性无不良影响时，需研究其组成和比例，尽量控制批间一致性。

杂质分析的研究项目包括工艺相关杂质和产品相关杂质。工艺相关杂质是指生产过程中引入的杂质，如残留的外源蛋白、抗生素、诱导试剂、微载体、病毒载体、DNA 等。产品相关杂质如非目的细胞、细胞非预期表达的产物、死细胞残留、细胞碎片和其他可能的降解产物等。对于这些影响产品安全性的杂质成分，应在工艺中予以去除，在质量研究中予以检测，并进行定性/定量控制。需要特别关注的是，产品中可能存在高风险杂质成分的情况下（如 ESC 或 iPSC 残留），应当建立和明确杂质去除方法及杂质残留的定量检测方法。如果杂质成分不能有效去除，则应当在动物模型或其他系统中进行安全性和毒性评估，并根据人体暴露最大剂量或体内安全性研究结果，设定安全合理的残留限度。

4. 安全性分析

4.1 生物学安全性：包括由干细胞产品自身生物学特性所决定的和诱发受者体内其他细胞生物学特性发生改变相关的安全性问题。在对干细胞生物学安全性进行评估时，应考虑相关细胞的临床适应症、给药途径、剂量等与临床治疗直接相关的因素，并利用合适的体内、体外试验模型对相关的生物学安全性进行有效评估。干细胞生物学安全性包括成瘤性和致瘤性、非预期分化、脱靶编辑等。

成瘤性 (Tumorigenicity)、致瘤性 (Oncogenicity)：药学方面应考虑干细胞产品的成瘤和致瘤风险，特别是高代次的，或经过体外复杂处理和基因修饰的干细胞产品。基于多能干细胞所具有的三胚层分化潜能及其潜在的致畸胎瘤特性，对于 ESCs 和 iPSCs 来源的干细胞衍生产品，应特别关注终产品成瘤性和致瘤性检测。软琼脂克隆形成试验、端粒酶活性检测可一定程度上体外表征产品的成瘤性。

非预期分化：干细胞在体外操作过程中可能分化为非目的细胞。建议开发特定的检测技术（比如高通量测序），研究、评估和监控干细胞产品非预期分化的可能性和影响，可结合目的细胞分化效率进行具体分析。

脱靶编辑：应用基因组编辑技术可能会带来不同程度的非目的基因组编辑风险，出现染色体不稳定和脱靶编辑（如 DNA 插入或删除）等情况。对干细胞进行基因组编辑的产品，应分析和研究基因修饰细胞中的脱靶编辑情况，建议使用包括无偏全基因组分析在内的多重正交方法（例如，计算机、生化、细胞分析方法）识别潜在的脱靶位点。

4.2 微生物学安全性：由于干细胞产品缺少灭菌工艺和去病毒步骤，应在原材料和生产工艺环节中对微生物安全性风险进行控制，具体可参考药典要求和其他有关药品的控制策略。微生物学安全性具体是指：干细胞产品应当不存在各种微生物（细菌、真菌、支原体和病毒等）、微生物代谢产物/衍生物（如细菌内毒素）等的污染。病毒污染包括种属特异性病毒（如人源/动物源病毒）、内外源逆转录病毒以及其他非特定病毒，应根据产品特性于工艺的适当阶段进行相关检测，综合生产全过程评估产品的病毒污染风险。对于逆转录病毒和非特定病毒因子检测，可参考《中国药典》三部通则“生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制”的相关要求进行。对于使用复制缺陷型等病毒载体获得的干细胞产品，应在产品设计和质量研究时充分考虑控制病毒载体回复突变的风险，复制型病毒（replication competent virus, RCV）的检测要求参考相关指导原则。

5. 生物学活性分析

干细胞产品是活细胞药物，其生物学作用可能是多靶点、多通路的，且不同类型的干细胞产品具有不同的生物学功能。因此，需要基于产品与临床相关的治疗活性或预期的生物学效应，开发能够代表产品作用机制的定量生物学活性/功能测定方法，多活性组分产品应当分别进行鉴定和活性测定。

有时还需开发干细胞生物学活性的替代指标，如在活体系统之外进行的理化分析测定法（physicochemical analytical assay），通过评估产品的免疫化学、生物化学和/或分子属性来提供广泛的产品表征数据。采用的分析测定法应开展替代方法与活性相关性研究，还应证明该测定法可以区分活性产品与非活性或降解形式的产品，并进行充分的对照研究和方法学验证。有些干细胞产品具有复杂的和/或不完全清晰的作用机理或具有多种生物学活性，细胞生物学功能表征须结合体外生物学效应和体内动物模型综合评价。

干细胞产品技术进展和认知更新较快，生物学活性分析需结合产品特点与时俱进。比如目前来看，间充质干细胞（MSCs）的生物学活性主要包括诱导分化功能、免疫调控功能和组织再生功能，其中诱导分化功能包括成骨、成脂、成软骨细胞的分化功能检测，而免疫调控功能可通过检测免疫调控因子等来表征。再如，ESCs/iPSCs衍生细胞的生物学活性是基于分化细胞特殊的生物学功能的检测，或与分化细胞功能相关的特定基因和蛋白质的检测。另外，干细胞生物学活性检测可能还涉及到细胞定向分化效率检测、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评估等等。

（二）质量标准

质量标准的建立主要包括以下过程：确定质量研究的内容、进行方法学研究、确定质量标准的项目及限度、制订及修订质量标准。干细胞产品的质量标准应采用经验证的分析方法，评估产品的鉴别、纯度、无菌性和活性，应体现干细胞产品的质量特点。

质量标准的项目及限度结合质量研究和产品特点确定，限度的设定应能确保产品的安全性、有效性和批间一致性。干细胞产品的质量标准项目一般包括：细胞鉴别、细胞活性（细胞活率、活细胞数、功能细胞数、群体倍增时间）、纯度（如目的细胞比例）、生物学活性（如分化效率、定量/半定量功能测定、标志物）、产品和工艺相关杂质、成瘤性/致瘤性（如适用）、非预期分化、微生物安全性（无菌、内毒素、支原体、内外源病毒）、一般检测（外观、pH值、明显可见异物、渗透压摩尔浓度、装量）等。如细胞产品曾接受基因修饰，应对每批终产品基因修饰目的细胞的百分比、单个细胞的平均载体或质粒拷贝数、目的基因及其表达产物的功能、脱靶编辑、转导/转染用载体的残留量等进行控制。对于使用复制缺陷型病毒转导的细胞，应证明不存在复制型载体（RCV）。对于运输到医院后需要进行给药前再操作（比如容器的转换、物理状态的转变、与其他结构材料的联合、过滤与清洗等）的干细胞产品，需模拟实际操作开展临床使用相关研究，根据研究结果明确给药前的操作步骤和注意事项，并向医院提供完善的产品信息和操作培训资料，包括针对操作步骤的复核和标签核对等。使用前检查必须至少包含外观、颜色、鉴别和包装完整性等检测。

方法学研究包括方法的选择和方法的验证。干细胞产品方法学研究中需关注的特殊要求，比如：（1）在细胞基质鉴定和检测中使用更先进方法和技术改进时，应开展新旧方法的全面对比验证和检测桥接研究，证明新方法的专属性、灵敏度和精密度至少与现有方法相当。（2）有关生物标志物的分析方法验证应规范开展，特别关注阳性对照的设计与验证。（3）需尽可能采取多种正交的分析检测方法进行生物学活性测定研究，并完成方法学验证。方法研究中还应考虑活性组分之间潜在的非累加效应，例如干扰效应或协同效应。（4）干细胞产品可能包含异质性的细胞群，需采用尽可能敏感的方法定量检测与生物学活性相关的目的细胞和非目的细胞群，方法研究时应特别关注对照的设置与验证。（5）原则上应依据现行版药典中的生物制品无菌和支原体检查法进行干细胞终产品的放行检测，必要时采用快速方法放行应进行方法学验证。快速方法验证时需参考相关指导原则，充分考虑选用代表性污染阳性对照品。在未能充分验证新型方法可以完全替代药典传统方法时，建议在使用新型检测方法进行放行检测的同时，开展药典传统方法的平行检测，同时对检测结果后置可能出现的非预期结果制定处置方案。快速方法应逐步完成与药典方法的比对，以证明检测能力不低于药典法。（6）对于经基因修饰的干细胞产品，如果从最终产品中去除了外源遗传物质，需开发相关的高灵敏检测方法进行确认。

分析检测方法中可能使用参比品/对照品，鼓励开发建立细胞参比品用于干细胞产品的质量控制。用于分析的参比品/对照品需具备代表性和可溯源性，应采用经验证的分析检测方法对其进行充分的特性分析，并鉴定合格。需完成参比品/对照品标定（含量标定和活性标定），并对产品开发各个阶段使用的参考品开展稳定性研究，确定复验期和有效期。

七、稳定性研究

在开展干细胞产品的稳定性研究时，可参考生物制品的稳定性研究的技术要求，如 ICH Q5C 和生物制品稳定性研究技术指导原则。

稳定性研究的目的是为干细胞产品的储存、运输和使用提供支持。研究内容一般包括影响因素试验（温度、光照、机械力等）、加速试验、长期试验、运输试验和临床使用中稳定性试验。试验样品一般包括代表性原液（如有）、成品和

需要临时或阶段性冻存的工艺中间品，研究用样品的生产、使用和质量（如总细胞密度和体积范围等）应可代表实际情况。试验条件应充分考虑新鲜细胞和冻存细胞的区别，考虑干细胞产品保存、包装、运输、临床配伍和实际给药的特殊要求，考虑各个环节样品累积的储存时间对最终产品稳定性的影响等。试验项目应能充分反映考察条件对质量的影响，如细胞活率和活细胞数等细胞特性、生物学活性、细胞纯度、理化特性、微生物安全性指标以及关键辅料含量等。

申报临床阶段的稳定性数据应能够支持临床试验开展，即稳定性研究的期限应至少能够涵盖所开展的临床试验的要求，证明产品从放行至患者给药的有效期是合理的。申报上市时需提供多个代表性批次的稳定性数据以支持和确定贮藏条件、使用条件和有效期，同时应明确产品的敏感条件、细胞状态或质量随时间的变化情况。

八、包装及密封容器系统

包装及密封容器系统的适用性评估对象是指直接接触产品的包装容器和密封系统。应结合产品给药途径（静脉给药、局部给药、眼用制剂等）、制剂性质（新鲜细胞、冻存制剂等）等，选择合适的内包材（冻存管、西林瓶、软袋等）。应对直接接触的包装材料和密封容器的功能性和相容性进行研究，功能性研究比如密封性、耐低温性，相容性研究可参考相关技术指导原则开展。

九、名词解释

成体干细胞（Adult stem cells, ASCs）：源自已经发育的胚胎组织、成人组织（如牙齿来源、脂肪来源等）或出生伴随的附件组织（如脐带、胎盘）的未分化细胞，可自我更新，并且具有向一种或多种终末功能细胞分化的潜能。如间充质干细胞（mesenchymal stem cell, MSC）、造血干细胞（hematopoietic stem cell, HSC）、神经干细胞（neural stem cell, NSC）、皮肤干细胞（keratinocyte stem cell, KSC）等。

人胚干细胞（Embryonic stem cells, ESCs）：源自人着床前胚胎中未分化的初始细胞，其体外培养期限自受精或核移植开始不得超过 14 天，可在体外无限制地自我更新，并且具有向三胚层细胞分化的潜能。

诱导多能干细胞 (Induced pluripotent stem cells, iPSCs) : 由人体细胞经重编程而获得的具有无限自我更新能力和向三胚层细胞分化潜能的一种干细胞, 具有类似于人胚干细胞的多能性。

转分化 (Transdifferentiation) : 体细胞或成体干细胞通过基因修饰、化学诱导等方法, 不经过多能干细胞状态, 直接转化为不同胚层或不同谱系其他体细胞或干细胞的过程。

畸胎瘤 (Teratoma) : 一种含有三胚层的分化组织和细胞的良性肿瘤。科学界常通过注射干细胞到免疫功能缺陷的小鼠体内的方法, 验证所产生的畸胎瘤包含三个胚层细胞。可用于确定是否建立了人胚干细胞系或人诱导多能干细胞系。

饲养层细胞 (Feeder layer cell) : 通过细胞-细胞相互作用或分泌一定营养物质, 用于支持其他细胞生长、扩增的细胞。

十、参考文献

- [1] 国家食品药品监督管理总局. 细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行). 2017.
- [2] 国家药典委员会. 《中华人民共和国药典》(2020年版)[M]. 2020.
- [3] 国家卫生和计划生育委员会与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). 2015.
- [4] 卫生部. 人的体细胞治疗及基因治疗临床研究质控要点. 1993.
- [5] 卫医发[2000] 184号《临床输血技术规范》.
- [6] 科技部和卫生部. 人胚胎干细胞研究伦理指导原则. 2003.
- [7] 卫生部. 涉及人的生物医学研究伦理审查办法. 2016.
- [8] 国家食品药品监督管理局. 药物临床试验伦理审查工作指导原则. 2010.
- [9] ISSCR Guidelines for Stem Cell Research and Clinical Translation. 2021.

[10] FDA. Guidance for FDA Reviewers and Sponsors. Content and Review of Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Somatic Cell Therapy Investigational New Drug Applications (INDs). 2008.

[11] FDA. Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs). 2020.

[12] FDA. Deviation Reporting for Human Cells, Tissues, and Cellular and Tissue-based Products Regulated Solely Under Section 361 of the Public Health Service Act and 21CFR Part 1271. 2017.

[13] FDA 《Guidance for Industry; Potency Tests for Cellular and Gene Therapy Products》. 2011.

[14] EMA. Reflection paper on stem cell-based medicinal products. 2011.

[15] PMDA. ヒト ES 細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について. 2012.

[16] ICH Guidance on Quality of Biotechnological/Biological Products: Derivation and Characterization of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products, (63 FR 50244, September 21, 1998).

[17] ICH. Q5E Comparability of Biotechnological/Biological Products Subject to Changes in Their Manufacturing Process. 2004.

[18] ICH. Q5C Stability Testing of Biotechnological and Biological Products. 1995.