

## 人类诱导多能干细胞质量控制及测试方法

杨怡帆<sup>1,2</sup>, 杨艳伟<sup>1Δ</sup>, 张颀<sup>1</sup>, 谢寅<sup>1</sup>, 张勇<sup>1</sup>, 陈旭林<sup>1</sup>, 高苏涛<sup>1</sup>, 耿兴超<sup>3#</sup>, 屈哲<sup>1\*</sup> (<sup>1</sup>中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心, 药品监管科学全国重点实验室, 细胞及基因治疗药物质量和非临床研究及评价北京市重点实验室, 北京 100176; <sup>2</sup>中国药科大学多靶标天然药物全国重点实验室新药筛选与药效评价中心, 江苏 南京 210009; <sup>3</sup>中国食品药品检定研究院生物制品检定所, 北京 102629)

**摘要:** **目的** 探讨人类诱导多能干细胞 (Human Induced Pluripotent Stem Cells, hiPSC) 疗法临床转化面临的挑战及其质量控制要求, 为细胞治疗产品安全生产提供参考。**方法** 通过文献调研, 综述 hiPSC 疗法研发现状及生产流程各阶段的技术挑战, 参考最新法规指南概述其质量控制要求。**结果** hiPSC 展现出广阔的应用前景, 但尚无基于 hiPSC 的疗法获批上市, 主要障碍在于其复杂生产流程各环节的技术挑战。质量控制与产品表征是产品研发的核心要素, 虽无统一标准, 但对 hiPSC 关键质量属性已形成普遍共识。**结论** 明确并实施基于共识的质量控制要求对于克服 hiPSC 疗法转化瓶颈至关重要, 深入理解生产流程各环节的质量控制点, 将有助于推动 hiPSC 衍生细胞治疗产品的安全性和有效性评估, 加速其临床转化和监管审批。

**关键词:** 诱导多能干细胞; 生产过程; 质量控制; 测试方法

### Quality Control and Test Methods of Human Induced Pluripotent Stem Cells

YANG Yifan<sup>1,2</sup>, YANG Yanwei<sup>1Δ</sup>, ZHANG Di<sup>1</sup>, XIE Yin<sup>1</sup>, ZHANG Yong<sup>1</sup>, CHEN Xulin<sup>1</sup>, GAO Suta<sup>1</sup>, GENG Xingchao<sup>3#</sup>, QU Zhe<sup>1\*</sup> (<sup>1</sup>National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, State Key Laboratory of Drug Regulatory Science, Beijing Key Laboratory of Quality Control and Non-clinical Research and Evaluation for Cellular and Gene Therapy Medicinal Products, Beijing 100176, China; <sup>2</sup>New Drug Screening and Pharmacodynamics Evaluation Center, State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing Jiangsu 210009, China; <sup>3</sup>Institute for Biological Products Control, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

**Abstract: Objective** To explore the challenges to clinical translation of human induced pluripotent stem cell (hiPSC) therapies and define the quality control requirements in order to provide references to regulation of related products. **Methods** Based on literature review, the current R&D of hiPSC therapies was outlined and technical hurdles in each stage of production were identified. Quality control standards were summarized out of recent guidelines. **Results** While hiPSC-based therapies promised wide applications, no clinical-grade product had been approved for marketing. The major obstacles arose from technical challenges encountered in the complicated process of production. Quality control and product characterization were critical to the development and commercialization of these products. Despite the lack of a uniform standard, there was consensus regarding critical quality attributes of hiPSC-derived cell therapies. **Conclusion** A uniform quality control standard is essential to overcome translational barriers. Keen insights into each element of quality control during the process of production will facilitate the assessment of safety/efficacy of hiPSC-derived products, thus accelerating clinical translation and regulatory approval.

**Keywords:** Induced Pluripotent Stem Cells; Production Process; Quality Control; Testing Methods

2007年 TAKAHASHI 等<sup>[1]</sup>通过逆转录病毒将人类体细胞成功转化为具有与人类胚胎干细胞 (Human

Embryonic Stem Cells, hESC) 相似的基因表达谱和多能性的干细胞, 引领干细胞领域的重大技术突破, 这些细胞被称为人类诱导多能干细胞 (Human Induced Pluripotent Stem Cells, hiPSC)。与 hESC 相似, hiPSC 显示出无限自我更新和多能性的所有重要特性, 包括在人体内分化成大量不同类型细胞的能力。通过避免使用胚胎来提取干细胞, 人类诱导多能干细胞

**基金项目:** 国家重点研发计划 (2024YFA1107302)。

**作者简介:** 杨怡帆, 女, 在读硕士, 药物临床前安全性评价。

<sup>Δ</sup>为并列第一作者。

**\*通信作者:** 屈哲, 女, 博士, 研究员, 药物临床前安全性评价。

E-mail: quzhe@nifdc.org.cn

<sup>#</sup> 为共同通信作者。

可以克服与人类胚胎干细胞相关的现有伦理问题,为细胞治疗产品提供可定制化、无伦理争议的稳定细胞来源,其在干细胞生物学、新药筛选和测试、病理机制研究、体外疾病建模、个性化药物,特别是在再生医学领域<sup>[2]</sup>和肿瘤免疫治疗领域展现出显著价值,已成为推动基础研究与临床转化的优势平台。目前以 hiPSC 为基础诱导的各类衍生细胞(如神经前体细胞、心肌细胞、胰岛 $\beta$ 细胞<sup>[3]</sup>和 NK 细胞等)开始从实验室逐渐向临床转化<sup>[4]</sup>。hiPSC 的质量控制是相关下游产品研发成败的前提。然而在 hiPSC 充分发挥其临床潜力之前,仍有许多障碍需要克服,研究表明超 1/3 的 hiPSC 生产线达不到最低质量标准,其中核型异常占 61%、短串联重复序列(Short Tandem Repeats, STR)异常占 10%、活力异常占 25%,细菌、支原体污染占 4%。因此 hiPSC 的质量控制显得尤为重要,本文基于当前国内外对 hiPSC 的质量研究现状及相应的法律法规要求,总结 hiPSC 生产过程质量要求和关键属性质量控制及测试方法,为相关细胞治疗产品生产提供参考,以期达到药品监管要求。

### 1 hiPSC 质量控制相关指导原则

随着我国干细胞产业的发展,hiPSC 相关产品的质量控制逐渐得到规范化,2015 年,原国家卫生和计划生育委员会与原国家食品药品监督管理总局共同组织制定了《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行)》,提出适用于各类临床用干细胞(除造血干细胞移植外)在制备和临床前研究阶段的基本原则,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。此后,原国家食品药品监督管理总局药品审评中心逐步发布一系列补充技术文件,进一步为干细胞产品的药学研发、非临床与临床研究提供专项技术指导,其中包含对 hiPSC 等特定类型细胞的细化质量控制要求。在 hiPSC 生产的各个阶段都应遵守相应的法律法规要求进行质量控制,如 hiPSC 生产的原材料质量控制可参考《中华人民共和国药典》(2020 年版)(简称“《中国药典》”)“生物制品生产用原材料及辅料质量控制”要求,hiPSC 微生物污染检验可参照《中国药典》、ICH Q5A 和 ICH Q5D 相关要求等。除此之外 hiPSC 生物样本库的质量控制可参考 2023 年我国发布的首个人源干细胞国家标准《生物样本库多能干细胞管理技术规范》(GB/T 42466-2023),涵盖干细胞采集、复苏、

培养、冷冻及质控全流程。hiPSC 细胞治疗产品生产过程漫长,在整个过程的每一阶段,都需对所使用的干细胞制剂根据相应原则在细胞质量、安全性和生物学效应方面进行相关的研究和质量控制。

## 2 hiPSC 生产过程质量要求

### 2.1 hiPSC 的细胞起源和原材料

hiPSC 可以从毛囊中分离的角质形成细胞、牙齿和脂肪组织中的间充质干细胞、骨髓细胞和尿液中的肾上皮细胞、胚胎和胚胎外组织样脐带血和羊膜细胞、胃和肝细胞、神经干细胞和祖细胞以及黑色素细胞中重编程获得,血细胞和皮肤成纤维细胞是最常用于重编程的起始细胞类型。基于以下因素:①细胞容易获得;②这些细胞的初始培养条件已经建立;③这些细胞的重编程方法已经成功标准化;④ hiPSC 库已经与血液或皮肤活检/成纤维细胞库结合<sup>[5]</sup>。然而,由于 hiPSC 保留亲代体细胞的遗传信息,可能包含基因组畸变,并且似乎对起源组织具有表观遗传记忆,这可能影响 hiPSC 的谱系分化倾向,从而影响 hiPSC 的表型和移植结果。有研究表明 hiPSC 中的外显子突变随年龄线性增加,并且分析的所有 hiPSC 系都携带至少 1 种基因破坏突变,其中一些与癌症或功能障碍有关<sup>[6]</sup>。因此在应用于研究之前,应仔细考虑 hiPSC 的细胞起源并定期进行遗传完整性分析,建立相应的质量控制标准以应对潜在风险。在进行干细胞研究时,为确保捐献者的健康和捐献细胞的安全,捐献者的评估和筛选、细胞收集、运输和接收的过程应标准化。应对捐献者进行人类免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus, HIV)、乙型肝炎病毒(Hepatitis B Virus, HBV)、丙型肝炎病毒(Hepatitis C Virus, HCV)、人类逆转录病毒(Human T-Lymphotropic Virus, HTLV)、EB 病毒(EB Virus, EBV)、人巨细胞病毒(Human Cytomegalovirus, HCMV)、梅毒螺旋体(Treponema Pallidum, TP)筛查,并记录结果<sup>[7]</sup>。捐献者应签署书面有效的知情同意书,知情同意书的内容应包括但不限于研究目的、在适当条件下的潜在研究和临床应用、对意外发现的反馈、潜在商业价值和其他相关问题<sup>[8]</sup>。此外,还建议建立供者起始细胞的全基因组序列信息库,以便于在 hiPSC 细胞株可能发生基因组遗传变异时分析变异产生来源,评估变异造成的潜在风险<sup>[4]</sup>。

## 2.2 重编程过程

重编程是通过转基因表达、化学处理或表观遗传修饰等产生人类诱导多能干细胞的过程。重编程方法包括通过使用病毒方法,如腺病毒和仙台病毒或非病毒方法如游离载体、小环状 DNA 载体、piggyBac 转座子、合成 mRNAs 或重组细胞穿透蛋白来递送转基因<sup>[9]</sup>。这些方法在非整倍体率、重编程效率、可靠性和工作量方面存在显著差异,以表观遗传重编程 (Episomal Reprogramming) 为例,其在临床转化方面展现出独特优势:该技术不涉及基因组整合,与患者来源的成纤维细胞及外周血单核细胞均表现出良好的兼容性。此外,其核心重编程因子仅依赖于相对简单的质粒 DNA 载体,该载体可通过符合现行良好生产规范 (Current Good Manufacturing Practice, cGMP) 要求的工艺进行规模化生产<sup>[10]</sup>;仙台病毒重编程是有效的和高度可靠的,工作量低,并且在高代的大多数细胞系中完全没有病毒序列,可以保持基因组的完整性<sup>[11]</sup>,但缺点是依赖于商业供应商,测试其他重编程因子较为困难;而逆转录病毒和慢病毒以整合方式进入宿主细胞基因组,随机整合位点可能会对宿主细胞产生不可预料的影响,且由于稳定表达,会影响 hiPSC 诱导分化为目标细胞产品,现已很少应用于细胞产品开发<sup>[4]</sup>;除此之外,CRISPR 技术体系持续革新,基于瞬时或持久性基因组/转录组编辑的多样化调控系统不断涌现。通过对 Cas 蛋白的定向改造,已衍生出碱基编辑、先导编辑、位点特异性基因插入及表观遗传调控等多样化功能模块,形成覆盖基因操作全链条的工具集<sup>[12]</sup>。所以需要根据应用目的谨慎选择相应的重编程方法并且建立相应的质量控制措施来应对潜在风险。

## 2.3 细胞培养扩增

大多数目前的细胞治疗方案和正在开发中的方案要求每个患者需要 108 ~ 1 010 个临床级干细胞,这些干细胞是按照当前 cGMP 流程培养的<sup>[13]</sup>。然而,由于对支持基质的依赖和 hiPSC 的敏感多能状态,细胞培养扩增至必要的程度仍然是一个重大挑战<sup>[14]</sup>。培养期间的最终 hiPSC 质量取决于细胞是否能维持多能状态和自我更新。因此,检测细胞分化状态、发育状态和生存力的内在标记的方法对于大规模生产是最有用的。在扩增过程中控制 hiPSC 质量的关键初始步骤是细胞培养基和基质。开发用于

hiPSC 培养基的方法包括确定合适的基础培养基和促进细胞生长、保存多能性、诱导分化的附加信号因子。基础培养基如 DMEM 和 DMEM/F12 主要向细胞提供葡萄糖、维生素和盐。最新研究出的 CEPT Cocktail 是一种用于细胞保护和低应激细胞培养的小分子混合物(含 Chroman 1、Emricasan、Polyamines、Trans-ISRIB)可以通过抑制细胞应激和 DNA 损伤,显著提升传代存活率与基因组稳定性,已用于 hiPSC 单细胞克隆和类器官生成<sup>[15]</sup>。参与多能性依赖的信号转导途径的内在生长因子,传统上使用血清来代替已经确定的和未经鉴定的其他因子,有时也根据应用目的添加已确定的生长因子,如碱性成纤维细胞生长因子 (Basic Fibroblast Growth Factor, bFGF) 已被确定为体外维持人胚胎干细胞自我更新的关键补充剂,在无饲养层培养物中的浓度范围为 40 ~ 100 ng · mL<sup>-1</sup><sup>[16]</sup>。JEON 等<sup>[17]</sup>发现在 hiPSC 分化过程中使用 Notch 抑制剂 DAPT 延长处理可提升多巴胺神经元成熟度,多巴胺神经元 TH<sup>+</sup> 细胞率提高至 12%,且成功通过临床前安全性与有效性验证,获美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准启动自体细胞治疗临床试验。

如果培养基中使用人血成分,包括但不限于白蛋白、转铁蛋白和各种细胞因子,应提供来源、批号和质量验证报告<sup>[8]</sup>。另外选择基质时除要满足促进细胞粘附的要求之外,还要确定表面的基质对 hiPSC 的自我更新和分化不受阻碍,除细菌、支原体、内毒素等污染风险外,其中的人源成分和动物源成分也可能带来潜在污染风险,需要评估并采取质量控制措施。

## 2.4 建库、存储、运输过程

早期传代冷冻保存的 hiPSC 应建立初级细胞库 (Primary Cell Bank, PCB),其来源于单克隆筛选,是后续建库的基础;主细胞库 (Master Cell Bank, MCB) 由 PCB 细胞经全面鉴定后建立,作为细胞质量和一致性的参考标准;工作细胞库 (Working Cell Bank, WCB) 由 MCB 扩增而来,用于实验室研究或临床生产,其质量控制项目可依据用途调整<sup>[18]</sup>。细胞系的生物库对于确保科学研究的质量控制细胞的保存和可用性至关重要,应使用记录完整且不会对细胞质量和未来研究产生负面影响的标准方案化和程序,从可追踪且可靠的来源材料如细胞系、供体样本或主

要组织和优质试剂如培养基、基质和补充剂制备冷冻细胞储备。MCB应该从已建立的细胞系的最早可能传代或非贴壁培养物的发展中产生,并且应该在实验使用前解冻后进行表征。

冷冻过程应控制细胞密度、细胞活率、冷冻速率等,并选择适合的冷冻保护剂,对冷冻全程进行记录,包括细胞系名称、批号、培养条件、传代次数、冷冻保护剂名称或配方、操作者姓名和冷冻保存日期等。冷冻保存的细胞应具有在收获、分离和扩增等过程中使用的相同的唯一标识。

多能干细胞应以冻存状态或生长状态的方式运输,应考虑以下因素,包括但不限于细胞特性、容器、运输路线、运输条件、运输设备、运输方法、运输风险和风险缓解措施。运输条件的管理应包括但不限于温度范围、振动、污染、设备性能和包装。运输文件应包括但不限于关于运输方式和条件、路径、持续时间、人员、运输地址和干细胞系的信息。

### 3 hiPSC的关键质量属性和测试方法

#### 3.1 生物学特征

**3.1.1 细胞形态学** 形态学评估应确认细胞的形状、结构、形式和/或大小,细胞形态学的改变可能表明细胞功能的改变。hiPSC具有典型克隆团生长特性,克隆边缘清晰、光滑,克隆内细胞接触紧密,细胞小而圆,核质比高,核仁明显,形态均一,未见分化细胞。细胞形态学使用倒置相差显微镜观察体外2D条件下生长的细胞形态学<sup>[19]</sup>。

**3.1.2 遗传学** 遗传稳定性是人多能干细胞及其衍生产品重点关注的的核心安全问题之一<sup>[20]</sup>。hiPSC特别容易受到特定的周期性遗传变化,可能影响干细胞和分化下游细胞治疗产品的行为,从而带来严重的质量问题。在培养的hiPSC中观察到的遗传畸变包括大染色体畸变、亚染色体和拷贝数变异(Subchromosome and Copy Number Variation, CNV)以及核苷酸点突变,如常见的12号染色体短臂和17号染色体长臂的增加;1号染色体长臂增益、20号染色体长臂重复及X染色体缺失,这些变异可能通过激活癌基因或失活抑癌基因驱动克隆扩增;点突变以TP53突变最为关键,TP53作为基因组守护者,其失活会显著增加DNA损伤累积风险,加速染色体断裂和CNV形成<sup>[21]</sup>。hiPSC细胞系遗传表征最常用的方法是核型分析,其提供细胞培养物中整个染色体互补体的

概述,表明细胞系的状态,但分辨率有限,只能检测大于5~10 Mb的畸变<sup>[21]</sup>。基于芯片的DNA技术的出现,如芯片比较基因组杂交(Array-CGH)和单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphisms, SNP)芯片,已经克服核型分析的一些局限性,检测CNV的灵敏度在5%~20%<sup>[22]</sup>。新一代测序的WGS或WES方法提供高分辨率的基因组信息,可以检测一系列畸变,包括插入缺失、CNV和结构重排<sup>[23]</sup>。因此,需要根据应用目的选择相应的方法进行遗传稳定性的质量控制。

**3.1.3 基因表达生物标志物** 起始细胞的完全重编程以及随后对hiPSC克隆的适当扩增应产生高纯度的hiPSCs。可通过分析关键多能性标记物的表达来验证其多能性状态。必须使用至少2种来自标准hiPSC组的标记,应该使用1种细胞内如OCT4、SOX2或Nanog和1种细胞外如SSEA-4或TRA-1-60的组合,也可以包括附加标记<sup>[24-25]</sup>。随着单细胞测序技术发展,一些新的表面标志物也在不断被发现,YOU等<sup>[26]</sup>通过SISBAR技术鉴定出中脑多巴胺能神经前体细胞的特异性表面分子标记物APCDD1,这为更精准筛选和鉴定特定状态的hiPSC提供可能,未来或可纳入多能性标志物检测范畴,进一步提升hiPSC质量评估的准确性。标志物检测建议采用流式细胞术定量检测阳性细胞占群体的百分比,团体标准建议各标志物阳性细胞比例应不低于70%<sup>[4]</sup>。此外,除流式细胞术,还可以用免疫荧光染色法分析细胞表型,通过图像识别和计数来定量阳性表达相应标志物的细胞比例。

**3.1.4 分化潜能** hiPSC多能性的1个表征是能够分化成包括外胚层、中胚层和内胚层在内的3个胚层所有衍生物的能力。目前广泛使用的体外检测多能性和分化能力的方法是拟胚体形成实验,体内评估多能性则通过畸胎瘤试验:将hiPSC移植至免疫缺陷小鼠,若形成的自发肿瘤经显微病理检测显示含三胚层代表性组织(如内胚层肠腺上皮、中胚层软骨、外胚层神经上皮管<sup>[27]</sup>),则证明hiPSC具备体内三胚层分化能力(表1)。除此之外,体外分化实验中传统qPCR和免疫荧光染色方法在评估hiPSC多能性时面临标志物选择的主观性问题,2025年国际干细胞研究学会更新了《干细胞多能性评估指南》,明确规定各胚层最小标志物组合:外胚层:PAX6、TFA

P2C 双标记; 中胚层: BRACHYURY、CD31 共染; 内胚层: FOXA2/SOX17 共定位, 这些标志物组合的标准化解决不同实验室间结果可比性问题<sup>[28]</sup>。

表 1 畸胎瘤试验中 3 个胚层的代表性组织  
Table 1 Representative Tissues of Three Germ Layers in Teratoma Assay

胚层来源	典型组织学结构	特异性标志物
外胚层	神经上皮管、视网膜色素上皮	$\beta$ III-tubulin, GFAP
中胚层	软骨、横纹肌、骨组织	CollagenII, MyoD, Osteocalcin
内胚层	肠腺上皮、呼吸道上皮、甲状腺滤泡	AFP, Sox17, TTF-1

## 3.2 安全性评估

**3.2.1 微生物检测** hiPSC 制造过程漫长, 因此细胞无菌成为一个重要问题。细胞培养主要污染物是细菌、真菌、支原体。细菌与真菌污染通常可在 48 ~ 72 h 内通过培养基浊度变化或显微镜检被发现, 而支原体污染则具有高度隐蔽性, 这类直径仅 0.2 ~ 0.3  $\mu\text{m}$  的无细胞壁微生物可穿越常规 0.22  $\mu\text{m}$  除菌滤膜, 且不引发明显培养液浑浊<sup>[29]</sup>, 这些污染可在生产的任意环节被引入, 并且大量扩增, 造成产品质量问题。可参考《中国药典》和国际法规的相应规定进行检查, 尤其在细胞建库时要进行无菌和支原体污染检查。支原体感染对细胞培养物的影响是显著的, 损害宿主细胞的结构和功能, 这会影响细胞形态学和生理学的所有可测量参数, 使得受感染培养物获得的结果不可靠。所有传入的培养物, 无论其来源和检测证明如何, 在与现有培养物一起保存之前, 都应进行隔离和检测。使用新型或快速检测方法时应进行适用性评估, 参考相关指导原则(如《中国药典》9201 药品微生物检验替代方法验证指导原则)完成包括专属性、检出限、重现性和耐用性在内的方法学验证, 以证明检测能力不低于药典方法<sup>[4]</sup>。

病毒污染主要在人源性和动物源性成分、原材料方面被引入。因此, 在人源性细胞来源筛查时要对血液进行 HIV、HBV、HCV、HTLV、EBV、HCMV、TP 等常见人源性病毒进行筛查, 并记录结果。如果使用动物源性物质, 如牛血清, 也应当对其进行相应的动物病毒筛查。

**3.2.2 内毒素检测** 内毒素是来源于革兰阴性菌细胞壁的脂多糖, 虽然其对体外培养物的直接影响通常不如引入人体后显著, 但当随移植体一同进入患者体内时, 可在给药部位引发严重的炎症反应<sup>[30]</sup>。内毒

素的存在通常用比色测定法来检测, 现行检测方法并非仅提供“有”或“无”的定性结果, 而是定量测定其浓度; 若结果低于方法的检测限, 则报告为低于检测限。内毒素的可接受水平限值取决于给药途径: 如眼内注射的限值通常极为严格为 0.2  $\text{EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 而其他途径(如静脉注射)的限值则可能显著提高<sup>[31]</sup>。对于活体产品, 未经最终的内毒素测试不得放行, 而对于冷冻保存产品和中间库, 可在活体后进行内毒素测试。

**3.2.3 致瘤性评价** 致瘤性(Oncogenicity)系指细胞裂解物中的化学物质、病毒、病毒核酸或基因以及细胞成分接种动物后, 导致被接种动物的正常细胞形成肿瘤的能力, 即接种物(细胞和/或裂解物)促使正常细胞转变为肿瘤细胞的能力。hiPSC 的致瘤性可由多种原因引起, 如最终产品中残留的未分化 hiPSC、c-myc 等重编程因子的重新激活, 调节 p53 的风险, EBNA1 在游离重编程系统中的持久性, 或在重编程或分化过程中源自亲代细胞的体细胞突变等。《中国药典》对生物制品生产检定用动物细胞基质的致瘤性检查是考察细胞裂解物、细胞 DNA 等细胞成分诱导动物本身细胞形成肿瘤的特性。其实验方法规定将细胞裂解物、细胞 DNA 分别于肩胛骨处皮下接种新生裸鼠、新生仓鼠及新生大鼠。至少观察 4 个月接种部位是否有结节形成, 如有结节形成则每周进行双向测量, 以判定结节为进行性、稳定或消退<sup>[32]</sup>。

**3.2.4 重编程工具残留检测** 在重编程过程使用的工程病毒或载体转导的细胞不产生感染性病毒颗粒, 但其瞬时表达含有重编程因子的病毒序列。因此, 从细胞系中清除这些因子也至关重要, 因为重编程因子在 hiPSC 细胞中的持续表达会影响其增殖和分化潜能, 并增加小鼠模型中肿瘤形成的风险。国际 hiPSC 治疗联盟与英国国际干细胞库针对重编程工具残留检测方法的开发细节提出若干关键考虑因素。为提高检测准确度, 推荐在 Q-PCR 检测中使用 Taqman 探针法而非 SYBR green 染色法; 强制要求设计 2 个位于不同功能区域的检测靶点, 如分别位于 OriP、EBNA1、CAG 启动子序列上, 双靶点设计构成“正交验证”, 只有当 2 个靶点均未检出时才能判定为“零残留”; 方法的定量限(LOQ)应达到并优于检测出 1 个质粒拷贝存在于 100 个细胞中的水平<sup>[33]</sup>。除控制

重编程工具残留外, hiPSC 建株过程中若使用较高风险的特定添加因子, 影响诱导分化产品的质量或分化效率的, 也应当增加相应的去除工艺并对残留量加以控制。

### 3.3 稳定性评估

**3.3.1 纯度** hiPSC 的纯度提供关于特定克隆可能被重新编程的程度的信息, 并且是决定 hiPSC 产生高质量最终产品能力的关键特征。2022 年, HAN 等<sup>[34]</sup>报道第 1 例 hiPSC 来源细胞分化的  $\beta$  细胞治疗 2 型糖尿病后形成未成熟畸胎瘤的临床病例, 病理检测显示, 肿瘤细胞表达未分化标志物 OCT4 和 SOX2, 但未检测到胰岛素分泌功能, 表明 hiPSC 在体外未完全分化, 未严格筛选分化后的细胞纯度, 残留的多能性细胞在体内异常增殖形成肿瘤。纯度可以使用流式细胞术和 qPCR 来测试关键的多能性标记物, 如 OCT4、SSEA4 和 TRA1-81, 除此之外, scRNA-seq 和高内涵成像在检测 hiPSC 残留多能性细胞中展现出显著优势, 尤其在单细胞分辨率和多参数分析方面, 已成为传统技术的重要补充。LEMMENS 等<sup>[35]</sup>通过 scRNA-seq 筛选出的特异性标志物(如 ESRRG、LIN28A)在 qPCR 验证中显示出 0.001% ~ 0.1% 的灵敏度, 显著优于传统流式细胞术(灵敏度一般为 1%)。

**3.3.2 细胞活力** 细胞活力是指细胞群体中存活且维持正常代谢功能的细胞所占百分比, 该指标会随培养时间呈现动态变化。评估 hiPSC 细胞活力的方法多样, 主要包括检测代谢活性(如胞内酯酶活性、基于琥珀酸脱氢酶的 MTT 比色法、细胞氧化还原状态)、线粒体功能、细胞膜完整性、凋亡标志物表达水平, 以及细胞增殖状态等。对于常规培养的未冻存 hiPSC, 其细胞活力通常要求不低于 90%; 而对于经冻存和复苏后的细胞, 其活力可接受标准为不低于 60%。

## 4 小结

自从人类诱导多能干细胞被发现以来, 一些基于 hiPSC 的细胞治疗产品已经进入临床研究阶段, 如基于 hiPSC 分化的胰岛细胞疗法 VX-880 通过 FDA 快速审批, 其成功依赖于分化细胞的纯度、功能验证及长期安全性数据, FDA 基于哈佛团队自体 hiPSC 治疗帕金森病的临床前研究(2025 年获批临床试验), 明确要求 hiPSC 需通过基因组稳定性检测、无未分化细胞残留、分化后标志物(如 TH+ 纤

维密度)表达确认等核心质控点, 并针对个体疗效差异提出需筛选最佳 hiPSC 克隆或开发通用细胞库的策略, 同时要求长期安全性追踪。我国药品监督管理部门亦要求 hiPSC 衍生细胞产品需通过遗传、微生物污染及效力等多维度检测。为保证细胞治疗产品安全、有效和质量可控, 用于产品开发的 hiPSC 细胞株的建株、建库及其质量需满足药物研发的基本原则和要求。在这样一个快速发展的领域, 随着在分析和过程开发、制造和最终临床应用方面的科学理解和经验的提高, 这些质量控制标准必将不断发展。

### 参考文献

- [1] 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.
- [2] KIM JY, NAM Y, RIM YA, et al. Review of the Current Trends in Clinical Trials Involving Induced Pluripotent Stem Cells[J]. Stem Cell Reviews and Reports, 2022, 18(1): 142-154.
- [3] CHEN XY, CHEN L, WANG YJ, et al. Establishment of an *in vitro* Directed Differentiation Method for Functional Pancreatic Islet  $\beta$  Cells Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology(中国生物化学与分子生物学报), 2024, 40(5): 664-673.
- [4] ZHANG KH, NA T, MENG SF. Brief Discussion on the Establishment Requirements of Human Induced Pluripotent Stem Cell Lines for Cell Product Development[J]. Chinese Journal of New Drugs (中国新药杂志), 2022, 31(21): 2101-2108.
- [5] POETSCH MS, STRANO A, GUAN K. Human Induced Pluripotent Stem Cells: from Cell Origin, Genomic Stability, and Epigenetic Memory to Translational Medicine[J]. Stem Cells, 2022, 40(6): 546-555.
- [6] LO SARDO V, FERGUSON W, ERIKSON GA, et al. Influence of Donor Age on Induced Pluripotent Stem Cells[J]. Nature Biotechnology, 2017, 35(1): 69-74.
- [7] ZHANG Y, WEI J, CAO J, et al. Requirements for Human-Induced Pluripotent Stem Cells[J]. Cell Prolif, 2022, 55(4): e13182.
- [8] HAO J, MA A, WANG L, et al. General Requirements for Stem Cells[J]. Cell Prolif, 2020, 53(12): e12926.
- [9] SCESA G, ADAMI R, BOTTAI D. iPSC Preparation and Epigenetic Memory: Does the Tissue Origin Matter?[J]. Cells, 2021, 10(6): 1470.
- [10] SCHLAEGER TM, DAHERON L, BRICKLER TR, et al. A Comparison of Non-Integrating Reprogramming Methods[J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(1): 58-63.
- [11] SPERLICH D, BECKER K, MAU-HOLZMANN U, et al. Generation and Characterization of the iPSC line INDBi001-A from Human Keratinocytes of a Healthy male Using Sendai Virus Reprogramming[J]. Stem Cell Res, 2025, 85: 103709.
- [12] VILLIGER L, JOUNG J, KOBLAN L, et al. CRISPR Technologies

- for Genome, Epigenome and Transcriptome Editing[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2024, 25(6): 464–487.
- [13] FAN YJ, WU JC, ASHOK P, et al. Production of Human Pluripotent Stem Cell Therapeutics under Defined Xeno-Free Conditions: Progress and Challenges[J]. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2015, 11(1): 96–109.
- [14] POLANCO A, KUANG B, YOON S. Bioprocess Technologies that Preserve the Quality of iPSCs[J]. *Trends Biotechnol*, 2020, 38(10): 1128–1140.
- [15] XU C, HE S, ZHU Y, et al. Vascular Organoid Generation from Human-Induced Pluripotent Stem Cells[J]. *Jove-Journal of Visualized Experiments*, 2024, 13(214): 67125.
- [16] NIRO F, FERNANDES S, CASSANI M, et al. Fibrotic Extracellular Matrix Impacts Cardiomyocyte Phenotype and Function in an iPSC-Derived Isogenic Model of Cardiac Fibrosis[J]. *Translational Research*, 2024, 273: 58–77.
- [17] JEON J, CHA Y, HONG YJ, et al. Pre-Clinical Safety and Efficacy of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Products for Autologous Cell Therapy in Parkinson's Disease[J]. *Cell Stem Cell*, 2025, 32(3): 343–360. e7.
- [18] ISSCR Task Force for Basic Research Standards. SnapShot: Reporting Practices for Publishing Results with Human PSCs and Tissue Stem Cells[J]. *Stem Cell Reports*, 2023, 18(9): 1898. e1.
- [19] LIZ, DUAN H, JIA Y, et al. Long-Term Corneal Recovery by Simultaneous Delivery of hPSC-Derived Corneal Endothelial Precursors and Nicotinamide[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2022, 132(1): e146658.
- [20] KIM JH, ALDERTON A, CROOK JM, et al. A Report from a Workshop of the International Stem Cell Banking Initiative, Held in Collaboration of Global Alliance for iPSC Therapies and the Harvard Stem Cell Institute, Boston, 2017[J]. *Stem Cells*, 2019, 37(9): 1130–1135.
- [21] ANDREWS PW, BARBARIC I, BENVENISTY N, et al. The Consequences of Recurrent Genetic and Epigenetic Variants in Human Pluripotent Stem Cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2022, 29(12): 1624–1636.
- [22] TURINETTO V, ORLANDO L, GIACHINO C. Induced Pluripotent Stem Cells: Advances in the Quest for Genetic Stability during Reprogramming Process[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(9): 1952.
- [23] ASSOU S, BOUCKENHEIMER J, DE VOS J. Concise Review: Assessing the Genome Integrity of Human Induced Pluripotent Stem Cells: What Quality Control Metrics?[J]. *Stem Cells*, 2018, 36(6): 814–821.
- [24] Chinese Society for Cell Biology. Human Induced Pluripotent Stem Cells: T/CSCB 0005–2021[S]. Beijing: Standards Press of China, 2021.
- [25] SULLIVAN S, STACEY GN, AKAZAWA C, et al. Quality Control Guidelines for Clinical-Grade Human Induced Pluripotent Stem Cell Lines[J]. *Regenerative Medicine*, 2018, 13(7): 859–866.
- [26] YOU Z, WANG L, HE H, et al. Mapping of Clonal Lineages across Developmental Stages in Human Neural Differentiation[J]. *Cell Stem Cell*, 2023, 30(4): 473–487.e9.
- [27] HONGEN T, SAKAI K, ITO T, et al. Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Organoids as a Novel *in vitro* Platform for Developmental Neurotoxicity Assessment[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(23): 12523.
- [28] CLARK AT, COOK-ANDERSEN H, FRANKLIN S, et al. Stem Cell-Based Embryo Models: the 2021 ISSCR Stem Cell Guidelines Revisited[J]. *Stem Cell Reports*, 2025, 20(6): 102514.
- [29] XU ZY, WANG M, SHI JY, et al. Engineering a Dynamic Extracellular Matrix Using Thrombospondin-1 to Propel Hepatocyte Organoids Reprogramming and Improve Mouse Liver Regeneration Post-Transplantation[J]. *Materials Today Bio*, 2025, 32: 101700.
- [30] MADRID M, LAKSHMIPATHY U, ZHANG X, et al. Considerations for the Development of iPSC-Derived Cell Therapies: a Review of Key Challenges by the JSRM-ISCT iPSC Committee[J]. *Cytotherapy*, 2024, 26(11): 1382–1399.
- [31] JHA BS, FARNOODIAN M, BHARTI K. Regulatory Considerations for Developing a Phase I Investigational New Drug Application for Autologous Induced Pluripotent Stem Cells-Based therapy Product[J]. *Stem Cells Translational Medicine*, 2021, 10(2): 198–208.
- [32] QU Z, LIN Z, HUO GT, et al. Risk Assessment of Tumorigenicity and Tumorigenic Potential for Cell Therapy Products[J]. *Chinese Journal of New Drugs (中国新药杂志)*, 2021, 30(19): 1819–1824.
- [33] MARTINS F, RIBEIRO MHL. Quality and Regulatory Requirements for the Manufacture of Master Cell Banks of Clinical Grade iPSCs: The EU and USA Perspectives[J]. *Stem Cell Reviews And Reports*, 2025, 21(3): 645–679.
- [34] HAN L, HE H, YANG Y, 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 And Development*, 2022, 31(5–6): 97–101.
- [35] LEMMENS M, PERNER J, POTGETER L, et al. Identification of Marker Genes to Monitor Residual iPSCs in iPSC-Derived Products[J]. *Cytotherapy*, 2023, 25(1): 59–67.

( 收稿日期: 2025-04-27 编辑: 孔繁瑶 )