

团 体 标 准

T/XXX XXXX—XXXX

IPSC 来源间充质干细胞制备及质量鉴定规范

Specification for preparation and quality identification of IPSC derived mesenchymal stem cells

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义、缩略语 1

4 基本要求 1

5 制备过程 2

6 质量鉴定 4

参考文献 6

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由XXX提出。

本文件由中国国际经济技术合作促进会归口。

本文件起草单位：XXX、XXX、XXX。

本文件主要起草人：XXX、XXX、XXX。

IPSC 来源间充质干细胞制备及质量鉴定规范

1 范围

本文件规定了IPSC来源间充质干细胞的术语和定义、基本要求、制备过程、质量鉴定。
本文件适用于IPSC来源间充质干细胞的制备与质量鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 3095 环境空气质量标准
GB 19489 实验室 生物安全通用要求
GB 50073 洁净厂房设计规范
GB 50346 生物安全实验室建筑技术规范
GB 50591 洁净室施工及验收规范

3 术语和定义、缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

诱导多能干细胞 induced pluripotent stem cell; IPSC

由人体细胞经重编程而获得的具有自我更新能力和向三胚层细胞分化潜能的一种干细胞。

3.1.2

冻存 cryopreservation

经过程序降温冷冻，并利用深低温冷冻储存技术，以减少细胞代谢活动，保存细胞生物学活性。

3.1.3

复苏 thawing

细胞从脱离生长状态重新获得生长活力的过程。

3.1.4

细胞活率 cell viability

能够增值、保持正常代谢活性的细胞占全部细胞的百分比。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

HAV: 甲型肝炎病毒 (Hepatitis A Virus)

HBV: 乙型肝炎病毒 (Hepatitis B Virus)

HCV: 丙型肝炎病毒 (Hepatitis C Virus)

HIV: 人类免疫缺陷病毒 (Human Immunodeficiency Virus)

IPSC: 诱导多能干细胞 (Induced Pluripotent Stem Cell)

4 基本要求

4.1 场地与设施

4.1.1 IPSC 来源间充质干细胞制备机构选址应符合《药品生产质量管理规范》要求，空气质量标准应符合 GB 3095 标准分级二级标准。

4.1.2 IPSC 来源间充质干细胞制备机构实验室或厂房应由具有洁净实验室设计建设资质的工程公司设计与建造，并应符合 GB 19489、GB 50073、GB 50346 和 GB 50591 的规定。建设完成后，各功能区域的洁净级别应由专业机构进行检测并出具合格证明。

4.1.3 干细胞制备功能区应按 IPSC 来源间充质干细胞制备工艺进行各区域设计，符合《药品生产质量管理规范》和《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则》要求。干细胞制备机构应配备独立质量检测实验室，并符合 GB 19489 和 GB 50346 的规定。

4.2 设备和耗材

4.2.1 IPSC 来源间充质干细胞的制备机构应优先选用符合《药品生产质量管理规范》和《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则》要求，获得国家资质认证的设备、仪器、耗材和试剂。

4.2.2 IPSC 来源间充质干细胞的制备机构应对设备、仪器、耗材和试剂供应商进行资质审核认证，要求供应商提供产品质量报告和批次检验报告，并对耗材及试剂进行质量抽检，避免采购质量不合格的产品。

4.2.3 IPSC 来源间充质干细胞的制备机构设备和仪器正式使用前应做安装确认(IQ)、运行确认(OQ)和性能确认(PQ)，并定期进行第三方校准，不得使用有安全隐患的仪器操作样本及细胞制品。

4.2.4 IPSC 来源间充质干细胞的制备机构应对设备与仪器进行编号建档，并建立标准操作流程(SOP)，确保使用、运行、保养、维修记录完整可追溯，对于关键工艺相关设备参数应进行实时监测，及时对状态异常的设备进行校对和维修。

4.3 人员管理

4.3.1 IPSC 来源间充质干细胞制备机构应分别设立干细胞制备负责人、质量管理负责人和质量授权人岗位。由法人授权任命，任职资质应符合《药品生产质量管理规范》和《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则》要求，定期接受岗位专业培训，制备技术负责人与质量管理负责人、质量授权人不得相互兼任。

4.3.2 IPSC 来源间充质干细胞制备和质控技术人员应具备的健康要求：HAV、HBV、HCV、HIV 及梅毒的抗体检测应为阴性，并且(矫正)视力正常，无色盲、色弱。

4.3.3 IPSC 来源间充质干细胞制备和质控技术人员应半年接受体检一次，有呼吸道感染或发热等疾病状态下不得进入洁净操作区，需完全康复后方可恢复岗位操作。

4.3.4 IPSC 来源间充质干细胞制备和质控技术人员上岗前应经过专业培训，内容包括但不限于干细胞理论与实践、生命伦理、干细胞法律法规、GMP 管理、GCP 资质、制剂基本知识、细胞培养基础、生物安全、仪器设备使用与维护方法、物料管理与清洁卫生、岗位职责、操作规范等内容。

5 制备过程

5.1 样本采集

5.1.1 基本原则

5.1.1.1 样本采集与处理应符合 GB/T 37864 的要求。

5.1.1.2 采集和处理程序可供样本采集人员使用。

5.1.1.3 应具备相关的资质和设施环境。

5.1.1.4 应通过伦理审查批准并履行知情同意程序。

5.1.1.5 应建立适当的质量管理体系确保符合用户需求并持续改进。

5.1.2 供者健康

5.1.2.1 间充质干细胞采集制备方应对干细胞供者的基本信息与健康信息进行详细采集与记录，同时做好对供者的隐私保护，相关记录入档保留至少 30 年。

5.1.2.2 干细胞供者应无血液系统疾病、内分泌系统疾病、恶性肿瘤史、性传播疾病及高危人群史、吸毒史，不应具有包括但不限于以下疾病或健康状况：

- a) 一般传染性疾病或其他遗传疾病：HIV、HBV、HCV、梅毒、HTLV、EBV 与 CMV 抗体与核酸检测应为阴性；
- b) 传染性皮肤病(未治愈的)；
- c) 大面积皮肤损伤(未治愈的)；
- d) 鼻/咽喉传染病(未治愈的)。
- e) 采集前 12 个小时内用过酒精，镇静药等。

5.1.3 采集场所

采集场所应达到III级洁净手术室要求。

5.1.4 采集人员

采集人员应具有医师职业证，且经过相应的技术培训。

5.1.5 采集流程

- 5.1.5.1 采集人员应按要求填写个人信息，个人信息表应包括但不限于：姓名、性别、有效身份证件、联系方式、紧急联络人、住址等。
- 5.1.5.2 采集人员在采集前填写健康调查表。
- 5.1.5.3 样本采集过程应采取措施保护供者的健康和安全，并通过无菌技术最大限度降低污染、感染和病原传播的风险。采集用的接触采集物的试剂和物料应无菌、符合临床安全标准，且在有效期内使用。

5.2 分离与培养

- 5.2.1 选取的成年细胞在细胞培养基中进行培养，以确保它们的生长和健康状态
- 5.2.2 取组织细胞进行 STR 检测。
- 5.2.3 可采用组织贴块法或酶消化法等方法分离间充质干细胞，分离方法应经过验证。
- 5.2.4 培养需符合无菌操作要求，保证无外源微生物污染。

5.3 病毒载体传递和细胞转化

使用病毒载体来引导诱导因子进入成年细胞中。这些诱导因子通常包括Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc 等。成年细胞在诱导因子的作用下开始重编程。

5.4 细胞传代

- 5.4.1 IPSC 来源间充质干细胞传代操作应严格遵照《药品生产质量管理规范》和《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则》要求，保证无外源微生物污染，相关操作均进行记录并存档保存至少 30 年。
- 5.4.2 IPSC 来源间充质干细胞一般在达到 80%~90%融合度可进行传代操作，传代操作应密度适宜、及时，迅速。
- 5.4.3 传代所使用消化酶应符合 IPSC 来源间充质干细胞分离与培养的基本要求，尽量采用国家已批准的临床级产品。如必须使用动物源性消化酶，应确保其无特定动物源性病毒污染。

5.5 细胞冻存

- 5.5.1 IPSC 来源间充质干细胞冻存操作应严格遵照《药品生产质量管理规范》和《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则》要求，保证无外源微生物污染，相关操作均进行记录并存档保存至少 30 年。
- 5.5.2 经制备数量达到冻存要求的 IPSC 来源间充质干细胞系可进行冻存操作，冻存细胞应加入适当的冻存保护液，遵循程序降温原则，并在液氮中进行保存。
- 5.5.3 冻存液成分应符合 IPSC 来源间充质干细胞分离与培养的基本要求，尽量采用国家已批准的临床级产品或药品辅料，二甲基亚砷含量不得超过 10%，如必须使用动物源性血清，应确保其无特定动物源性病毒污染，严禁使用海绵状脑病流行区来源的牛血清。
- 5.5.4 冻存细胞应标明干细胞名称、培养条件、代次、批次、操作人员、冻存日期等信息，并具有唯一标识。
- 5.5.5 液氮冻存应使用符合要求的液氮容器，气相冻存，由专人负责，保证液氮充足，温度恒定。

5.6 细胞复苏

5.6.1 将冻存管从冷冻罐中取出后, 尽快放入 37℃~42℃水浴锅中, 轻摇冻存管使其内容物在 3min 内融化。用 75%酒精擦拭冻存管外部后, 将其移入无菌操作台内。

5.6.2 将干细胞悬液转移至含有培养基的离心管中进行离心, 去除冷冻保护剂。离心后用完全培养基重悬干细胞, 并将细胞按密度接种于培养瓶中, 放入 CO₂培养箱培养。

5.6.3 复苏后细胞的活率应不低于 75%。复苏后细胞的接种密度应适宜。

5.7 制剂制备

5.7.1 复苏检测合格的工作库细胞, 按规定的接种密度进行接种、培养; 融合度达到 70%~90%时, 按规定的制剂类型制备成 iPSC 来源间充质干细胞制剂。

5.7.2 按制剂质量标准进行检验, 检验合格后进行制剂放行。

6 质量鉴定

6.1 鉴定内容

6.1.1 间充质干细胞安全性

6.1.1.1 微生物检测

参照《中华人民共和国药典》2020年版四部通则1101无菌检测法执行, 对间充质干细胞样本采集、运输、分离、培养、冻存、复苏等生产制备环节进行留样(保存液、清洗液、培养基上清、冻存液等)检测。细菌和真菌检测结果都应为阴性。

6.1.1.2 支原体检测

参照《中华人民共和国药典》2020年版四部通则3301支原体检测法执行, 对间充质干细胞样本采集、运输、分离、培养、冻存、复苏等生产制备环节进行留样(保存液、清洗液、培养基上清、冻存液等)检测。支原体检测结果都应为阴性。

6.1.1.3 细胞内外源致病因子检测

采用血清ELISA检测法或核酸检测法, 对间充质干细胞样本采集、运输、分离、培养、冻存、复苏等生产制备环节进行留样(保存液、清洗液、培养基上清、冻存液、细胞等)检测。HIV抗体、HBsAg、HCV抗体、TP抗体、CMV-IgM、HTLV抗体、HPV抗体、HHV抗体、EBV抗体检测应为阴性; HCV、HBV、HIV病毒核酸检测应为阴性。

6.1.1.4 内毒素检测

参照《中华人民共和国药典》2020年版四部通则1143细菌内毒素检测法执行, 对间充质干细胞样本采集、运输、分离、培养、冻存、复苏等生产制备环节进行留样(保存液、清洗液、培养基上清、冻存液等)检测。各类样本中的内毒素检测值应 ≤ 0.5 EU/mL。

6.1.1.5 异常免疫学反应检测

采用流式细胞术以及ELISA技术测定间充质干细胞对于活化的人总淋巴细胞的增殖和对不同淋巴细胞亚群增殖能力的影响, 以及对淋巴细胞相关细胞因子分泌的影响。淋巴细胞亚群应无异常增殖, 细胞因子表达水平应无异常增加。

6.1.1.6 致瘤性检测

采用免疫缺陷动物(裸鼠或SCID鼠), 通过局部或静脉方式接种间充质干细胞, 评价间充质干细胞致瘤性。体内致瘤试验严格遵照动物伦理要求执行, 单只小鼠接种间充质干细胞数量 $\geq 10^6$ 细胞/kg, 观察期 ≥ 12 周。间充质干细胞应无致瘤性。

6.1.2 间充质干细胞稳定性

6.1.2.1 细胞数量和活率检测

选用血球细胞计数板或细胞计数仪进行细胞计数, 将待检测细胞使用台盼蓝或 AO/PI 荧光染料染

色，读取细胞数并计算活率。各代数及批次间充质干细胞活细胞比例 $\geq 90\%$ 。

6.1.2.2 生长活性检测

通过检测细胞倍增时间、细胞周期、克隆形成率以及端粒酶活性对间充质干细胞生长活性进行测定，各代数及批次间充质干细胞应处于指数生长期，G0 期细胞数 $\leq 10\%$ ，具有端粒酶活性。

6.1.2.3 细胞纯度和均一性检测

采用间充质干细胞表面标志物流式检测以及人基因组 DNA 短片段重复序列 (STR) 测序进行检定。各代数及批次间充质干细胞表面标志物表达应符合流式检测比例要求，单一细胞系的间充质干细胞各代数及批次细胞 STR 检测结果应保持一致。

6.1.3 间充质干细胞生物学特征

6.1.3.1 细胞形态检测

显微镜下观察，间充质干细胞贴壁生长，呈梭形或星状外观，形态均一。

6.1.3.2 细胞表面标志物检测

采用流式细胞术进行测定，间充质干细胞表面标志物 CD73、CD90、CD105 阳性率不低于 95%；CD14、CD31、CD34、CD45、HLA-DR 阳性率不高于 5%。

6.1.3.3 染色体核型检测

采用 G 带分析法进行测定，间充质干细胞染色体数量为 46 (含 XX/XY)，无染色体缺失、异位和重排现象。

6.1.3.4 免疫调节功能检测

采用 ELISA 技术和流式细胞术测定经炎症因子 (IFN- γ 与 TNF- α) 诱导后间充质干细胞中吲哚胺 2,3-双加氧酶 (IDO) 的表达和功能，以及对于活化的人总淋巴细胞的增殖和对不同淋巴细胞亚群增殖能力的影响。间充质干细胞经诱导应表达 IDO，并可抑制人淋巴细胞增殖。

6.2 检验分类

6.2.1 批次质量检验

IPSC 来源间充质干细胞制备机构应对同一生产周期、同一生产线、同一来源、同一代数、同一方法制备出来的产品为一批，在同一批产品中随机抽取 3 个最小包装单元。制备机构应对每批次产品进行质量检验，确保工艺和质量稳定合格。

6.2.2 复核质量检验

IPSC 来源间充质干细胞制备机构应对每一批次干细胞制剂单独留样保存，详细记录批号、代数、生产日期、来源等信息。定期由国家或地方相关部门授权的专业细胞检验机构或实验室进行 IPSC 来源间充质干细胞制剂的质量复核检验，并出具检验报告。复核质量检验报告出具时间应在该批次 IPSC 来源间充质干细胞制剂提出放行申请之前，并作为放行检验参考。

6.3 评价结论

6.3.1 批次检验结果全部符合 6.1 的规定，判定为合格品；有 1 项及以上不符合本文件规定，则判为不合格品。

6.3.2 复核检验结果全部符合 6.1 的规定，判定为合格品；有 1 项及以上不符合本文件规定，则判为不合格品。

参 考 文 献

- [1] 干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则（试行）（国卫办科教发〔2015〕46号）
 - [2] WHO 实验室生物安全手册(第三版)
 - [3] 药品生产质量管理规范（卫生部令第79号）
 - [4] 中华人民共和国药典（2020年版）
-