



細胞治療中 輔助性材料概述

撰文：馮芝昕

細胞治療是指取自患者自體細胞(Autologous)或他人細胞(Allogeneic)，將細胞進行加工後，再以醫藥組成物或直接注入到患者體內的治療方式。這樣的治療方式為近十年來非常熱門的領域，為現今新興的醫療方式且受到全球高度重視，目前主流的細胞治療有兩種，分別為免疫細胞治療(Immunocellular Therapy)及幹細胞療法(Stem Cell Therapy)。而無論是何種細胞治療，其中最重要的一個過程便是細胞培養，也因此培養基是細胞治療不可或缺的輔助性材料(Ancillary Material, AM)之一。

細胞之所以能在體外存活並生長，主要是依靠培養液中的養分，培養液中可能包含血清(Serum)、生長因子(Growth Factor)、細胞激素(Cytokine)、單株抗體(Monoclonal Antibody)、抗生素(Antibiotic)及基礎培養基(Basal medium)等等。雖然研發細胞治療的公司通常有能力自行研發出專門用來培養幹細胞或免疫細胞的培養液，而這些培養液的成分及用量通常屬於機密，但為了避免培養液中含有不純物或是外來病原，進而影響最終產品的安全性(Safety)、效價(Potency)及純度(Purity)，廠商必須針對這部分提出證明已將各種添加物從最終產品移除。

1993年美國FDA在聯邦公報(Federal Register, FR)的Application of Current Statutory Authority to Human Somatic Cell Therapy Products and Gene Therapy Products中首次提到輔助性材料(Ancillary Material, AM)這個名詞，輔助性材料是指在產品的製程中會與細胞或組織直接接觸的材料，不會成為最終產品的一部分，但有殘留在最終產品的可能性；而細胞培養液中的所有成分，皆屬於輔助性材料的一種，另外還包含細胞培養耗材，例如塑膠吸管、離心管、Dish及Flask等等，亦皆屬於輔助性材料。輔助性材料的重要性為何？由於這些輔助性材料會與最終產品直接接觸，例如若培養液中有添加動物來源的因子，在最終產品打入人體後可能引起人體的免疫反應，會間接影響最終產品的安全性(Safety)、效價(Potency)及純度(Purity)；因此為了減少這些風險，必須嚴格實施輔助性材料的鑑定及審慎控管輔助性材料的製造過程。

要如何控管這些輔助性材料呢？在美國的公共衛生服務法(Public Health Service, PHSA)中針對銷售傳統生物製劑、人類細胞及組織為主的產品(Human Cells, Tissues, and Cellular and Tissue-Based Products, HCT/Ps)規定所有製程過程中所使用到的試劑、容器及相關設備都需符合cGMP(Current Good Manufacturing Practice)的規範。除了公共衛生服務法之外，美國藥典(United States Pharmacopeia, USP)在USP <1043> Ancillary materials for cell, gene, and tissue-engineered products中針對所有細胞治療的應用，包含生產細胞、基因及組織工程的等產品的輔助性材料都有詳細的規範，主要內容針對輔助性材料的定義、品管、風險評估、殘留物分析及移除、成分效果分析等說明。USP <1043>中將輔助性材料依照風險等級分成四個等級(Tier 1-4)(表一)，若該輔助性材料有註冊FDA Drug Master File (DMF)，則會被歸類於Tier 1，也就是風險最低、高品質的等級，非常適合應用於治療性生物製藥、醫療器材或移植性材料的生產；Tier 4的輔助性材料則是風險最高，且可能不遵守cGMP規範之等級。



表一、USP<1043> Ancillary materials for cell, gene, and tissue-engineered products對輔助性材料之規範

Risk Classification	Examples
Tier 1 Low-risk, highly qualified materials with intended use as therapeutic drug or biologic, medical device, or implantable material	HAS, insulin, WFI, implantable biomaterials (collagen, silicone...), antibiotics, monoclonal antibodies, cytokines for injection.
Tier 2 Low-risk, well characterized materials with intended use as AMs, produced in compliance with GMPs	Human AB serum, recombinant growth factors, cytokines, immunomagnetic beads, USP grade chemicals, culture medium-produced in compliance with GMP.
Tier 3 Moderate-risk materials not intended for use as AMs	For invitro diagnostic use or reagent grade materials. E.g. culture medium additive, novel polymers, enzymes.
Tier 4 High-risk materials, materials not produced in compliance with cGMPs and materials not intended to be used in cell manufacturing	Toxins, most animal derived materials. E.g. Feeder cells, FBS, methotrexate, cholera toxin.

對於細胞治療產品來說，必須使用遵循cGMP規範的產房所生產的輔助性材料，才能減少產品相關的風險，以免危及最終醫療產品。法規上要求輔助性材料需採用藥用或臨床等級，若有其限制才可採用研究等級，且需提供分析報告書(Certificate of Analysis, COA) (圖一)，以評估該材料是否符合需求或需要實施其他檢測及測試，例如瑞士TPP細胞耗材大廠，在產品中皆會附COA，且COA中詳細描述使用材料、工廠符合的規範及產品所經過的測試，如此詳細且完整的描述才可在臨床試驗中使用。

TPP Techno Plastic Products AG
 Schlieren 1 CH-8219 Truesdillingen, Switzerland
 Tel: +41 (0)52 667 01 85, Fax: +41 (0)52 667 01 77
 info@tpg.ch, www.tpp.ch

Scale of Your Culture

Certificate of Quality

Product number:	99010
Lot number:	20140016
Product description:	Cell spatula L= 20 cm
Expiry date:	01/2020

Processed Material

Granulate yellow

Highest grade, virgin raw material

- Free of stripping agents, softeners or heavy metals
- Does not contain substances of animal origin and is therefore free of TSE/BSE

Polyethylene (PE)

Highest grade, virgin raw material

- Free of stripping agents, softeners or heavy metals
- Does not contain substances of animal origin and is therefore free of TSE/BSE
- Material is tested and passes USP class VI requirements and guide lines 2007/47 EC

Quality Management System

Clean Room Conditions

GMP

ISO Certification

Manufactured in clean room conditions, in accordance with the valid specifications.

Production plant oriented

Certified ISO 9001:2008

Issue No. 1.4

Issued on: 2014-07-15

Validity date: 2017-07-17

Registration number: CH-12483

Biological Safety

Cytotoxicity

Non-cytotoxic, proven by representative test according to ISO 10993-5:1999 and USP chapter 87

DNA/RNA

Free of detectable DNA/RNA and ATP

Chase/Rhase

Free of detectable Chase/Rhase

Level of Endotoxins <0.06 EU/ml

Free of detectable endotoxins (pyrogens)

Representative product test with Limulus Amoebocyte Lysozyme test (LAL) according to the guidelines FDA 162.7, Ph. Eur. and USP. Detection limit: <0.06 EU/ml

Product was sterilized, process validated according to ISO 11171-1:2006

Sterility

Functional Attribute

Leak Tightness of Pouch

In accordance with the valid specifications

Lot Number

6-digit lot number printed on each product pouch and case label

Pre-CIP Joint

Tear off strength in accordance with the valid specifications

Spatula Blade

Specialty formed tip of spatula blade with sharp edge is in accordance with the valid specifications

Visual Attribute

Integrity

Product sampled passed visual inspection according to the valid specifications

Quantitative Quality

Packaging Quantity

Quantity in accordance with the specifications

Sterilization

Irradiation

Product has been irradiated in a validated sterilization cycle according to ISO 11171-1:2006

SAL-3

Certainty Assurance Level: SAL 10⁻⁶

Single Use

Product is intended for single use only

Further technical information: www.tpp.ch

1 | 2

TPP Techno Plastic Products AG
 Schlieren 1 CH-8219 Truesdillingen, Switzerland
 Tel: +41 (0)52 667 01 85, Fax: +41 (0)52 667 01 77
 info@tpg.ch, www.tpp.ch

Scale of Your Culture

Component Material	
Colourings	Free from heavy metals
Packaging Materials	Free from heavy metals
Clinging Packaging Pipettes	Paper/glass wrapping

Storage and Warehousing

Expiration Time

Product Packaging

Storage Recommendation

Expiration time (EXP): 6 years from date of manufacture

Quality and quantity checked passed at time of delivery ex work TPP

Relative humidity max.: up to 85%

Temperature: 10 - 30 °C (50 - 86 °F)

Do not expose to direct sunlight

If products are delivered on a TPP pallet: wooden pallet treated in accordance with the international phytosanitary regulations (ISPM 15-standard)

Wooden Pallet

TPP Techno Plastic Products AG

Rolf Tanner
 CEO

Markus Ciol
 Quality Manager

Printing date: 28.03.2017

Further technical information: www.tpp.ch

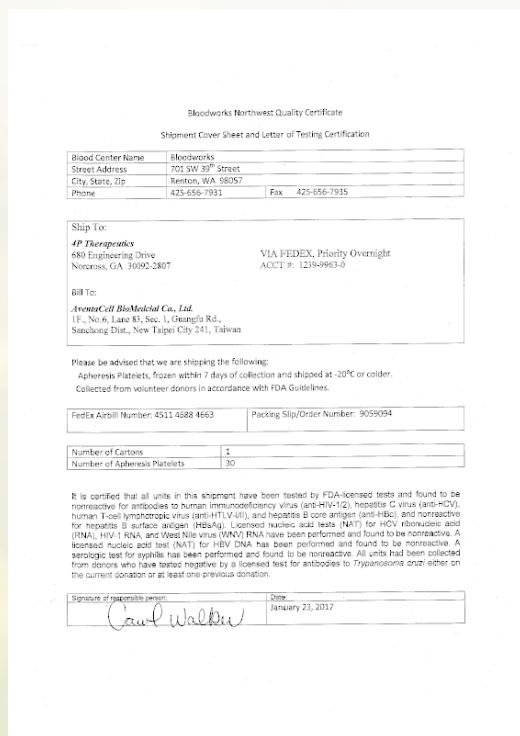
2 | 2

圖一、瑞士TPP細胞耗材廠所提供之產品COA，其中內容包含TPP符合cGMP及ISO規範，塑膠原料來源符合USP class VI，以及產品出廠時所做之檢測，包含內毒素檢測、細胞毒性檢測等等，另外也提到此產品不含動物性來源以及TSE/BSE free (Transmissible Spongiform Encephalopathy/Bovine Spongiform Encephalopathy)等字眼。

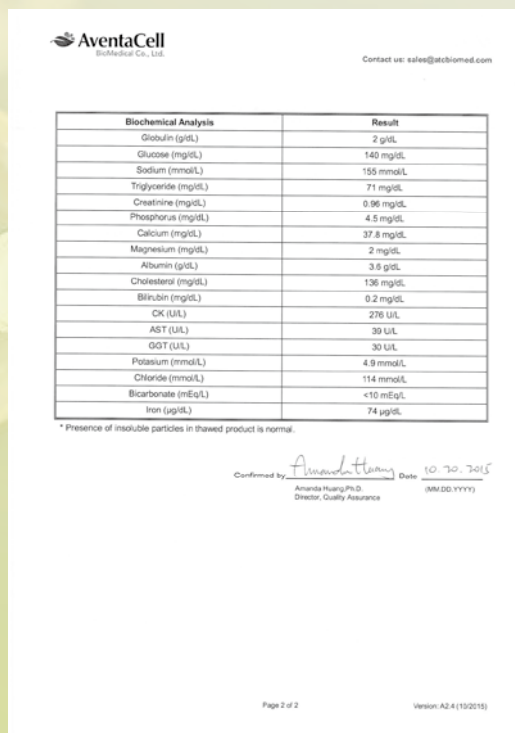


另外一種較令研究者頭痛的輔助性材料為培養基種類之選擇，現階段用於細胞治療中培養細胞的培養基大致可分成三種，分別為含血清培養基(Serum-based)、無血清培養基(Serum-Free)及無異種培養基(Xeno-Free)。目前國際上使用在含血清培養基中使用胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)的比例較高，主要是相較其他選擇其成本較低且養分較高，但若在臨床角度並參照USP <1043>，FBS是屬於風險最高的輔助性材料。由於FBS為異種來源且成分複雜，需考慮殘留問題以避免打入人體時引起免疫反應；再者FBS為動物性來源，每個批次的FBS成分皆有所差異，可能會導致細胞製劑的穩定性。Serum-Free & Xeno-Free培養基是目前較熱門的培養基，由於不含血清成分及任何異種來源之蛋白，因此在使用上也不需擔心殘留而導致的潛在風險。

現今還有另一種較新的培養方式---人類血小板裂解液(Human Platelet Lysate, hPL)當作血清替代物使用。目前已有許多實驗證明細胞治療所使用的細胞，如間質幹細胞、免疫細胞等，在含有hPL之培養液生長狀況比FBS更好，亦可維持該細胞之特徵。在hPL中包含許多生長因子可維持細胞生長，且hPL來源為人類，沒有異種之問題，相較於FBS可以避免異種來源導致的免疫反應；而依照USP <1034>之規範，hPL是屬於Human AB Serum，也就是Tier 2等級，風險程度較低。當然，雖然hPL的風險較FBS低，但還是要注意製造商的品管，並要提供完整的產品出廠證明及來源等資料，並確認產品製造商是否是遵循cGMP規範進行生產，例如台灣廠商艾瑞生醫所使用的血小板來源都是在美國且FDA認證的血液中心(圖二)，從血液中心所提供的COA中可看出這些血液做過的檢測包含一些常見的人類疾病等；除了血液中心所提供的COA，艾瑞生醫在製成產品時也會對產品做檢測，因此也需要提供產品的COA(圖三)，艾瑞生醫的產品全都在美國製造，COA中也有提到產品所做過的疾病檢測，還有其他的產品效能檢測結果。由於細胞治療的最終產品是要打回人體，所有與最終產品接觸的物品都要有如此詳細的說明才可確保最終產品的安全性。



圖二、艾瑞生醫之hPL來源證明以及所做過的相關檢測。



圖三、艾瑞生醫UltraGRO Advanced GMP等級產品之COA，其中血小板來源說明、相關病原檢測以及UltraGRO Advanced GMP的成分檢測；且UltraGRO Advanced GMP Grade之產品有註冊MDF，是屬於Tier 1，也就是風險程度最低的產品。



在細胞治療產品的開發過程中，最好於初期研發階段就使用臨床等級的輔助性材料，以避免切換不同等級的輔助性材料時細胞需要重新適應，這樣有可能導致細胞功效產生變化。綜觀全球各國對於輔助性材料的規範，其實並不一致，也沒有一個統一的規範，但輔助性材料這個規範主要是要降低細胞治療產品的風險，因此細胞治療公司在選擇產品時應該以風險最低的輔助性材料為主，才可避免最終產品打入人體後產生憾事。

相關產品：

艾瑞生醫 人類血小板裂解液

其產品皆為cGMP等級；除了幹細胞常用的血清替代品之外，艾瑞今年推出全新產品來培養NK cell
產品詳情請洽岑祥業務

Product Name	Heparin Use	Size	CAT#
UltraGRO	Add heparin	50 ml	HPCPLCGL05
		100 ml	HPCPLCGL10
		500 ml	HPCPLCGL50
UltraGRO Advanced DMF: BB-MF 16228	No heparin required	50 ml	HPCFDCGL05
		100 ml	HPCFDCGL10
		500 ml	HPCFDCGL50
UltraGRO PURE (Xeno-Free)	No heparin required	50 ml	HPCHXCGL05
		100 ml	HPCHXCGL10
		500 ml	HPCHXCGL50

TPP細胞培養相關耗材：

Culture Flask, Filter	25T Flask	90026
	75T Flask	90076
	150T Flask	90150
Culture Plate	6 well plate	92006
	12 well plate	96012
	24 well plate	92024
	96 well plate	92096
Culture Dish	4 cm dish	96040
	6 cm dish	93060
	10 cm dish	93100
	15 cm dish	93150

參考資料：

1. Karnieli O, Friendner OM et al. A consensus introduction to serum replacements and serum-free media for cellular therapies. Cryotherapy 2017 Feb; 19(2): 155-169.
2. BioMAP，臨床等級無血清培養基-人類間質幹細胞(hMSC)。
3. BioMAP，輔助性材料(Ancillary materials)之品質管理。
4. USP <1043> Ancillary materials for cell, gene, and tissue-engineered products。