

การพัฒนากระบวนการเตรียม DMSc Stem Pro: Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells สำหรับการศึกษาวิจัยทางคลินิก

อจรรย์พร คำบัว¹ สิริภากร แสงกิจพร² ละอองศรี อชฌนียะสกุล³ อาริรัตน์ ขอไชย⁴ อติศักดิ์ ตรีนวรัตน์³
สาวิตรี ตัวเรือง⁵ ศุภลักษณ์ บัวศรีแก้ว¹ อภิชาติ โชติชูศรี¹ พชรภรณ์ บุญชู¹ ชลลดา ยอดทัพ¹
พชรภรณ์ นพปรังค์¹ ปัญญกมล จันทรสาขา⁶ และ สมชาย แสงกิจพร⁷

¹สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์²สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

³คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร 10700

⁴โรงพยาบาลสุรินทร์ สุรินทร์ 32000

⁵สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

⁶โรงพยาบาลสัตว์ประจวบฯ มหาวิทยาลัยมหิดล นครปฐม 73170

⁷โรงพยาบาลเพื่อโรคมะเร็งขนาดเล็ก กรุงเทพมหานคร 10530

บทคัดย่อ mesenchymal stem cells (MSC) เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่มีศักยภาพในการเจริญเติบโตเป็นเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ ได้เกือบทุกชนิดในร่างกายเมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ในการวิจัยและพัฒนากระบวนการเตรียม DMSc Stem Pro ซึ่งเป็น MSC จากไขกระดูกสำหรับพัฒนาวิธีการรักษาผู้ป่วย retinitis pigmentosa (RP) โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง MSC รวมถึงการตรวจสอบความถูกต้องของกระบวนการผลิต (process validation) ก่อนเข้าสู่การวิจัยทางคลินิก การเพาะเลี้ยง DMSc Stem Pro ทำในห้องสะอาด (clean room) ระดับ class 100 โดยใช้ DMEM ร่วมกับ 10% FBS เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ บ่มที่ 37°C, 5% CO₂ นาน 36±4.69 วัน (ค่าพิสัยเท่ากับ 31–42) เซลล์ที่ได้มีรูปร่างปลายเรียวแหลม เจริญเติบโต ยึดเกาะพื้นผิวพลาสติก มีจำนวน 8.67±2.23 ล้านเซลล์ (ค่าพิสัยเท่ากับ 6.00–10.62) อัตราการมีชีวิตมากกว่าร้อยละ 90 ผิวเซลล์ มีการแสดงออกของ CD90, CD105 และ CD73 แต่ไม่มีการแสดงออกของ CD34, CD45 และ HLA-DR สามารถเจริญเติบโต เป็นเซลล์ไขมัน เซลล์กระดูก และเซลล์กระดูกอ่อนได้ ปราศจากการปนเปื้อน endotoxin และจุลชีพ ทั้งแบคทีเรีย เชื้อรา และ ไมโคพลาสมา กระบวนการทั้งหมดดำเนินการตามหลักเกณฑ์และวิธีการในการผลิตยาแผนปัจจุบัน (GMP) และข้อกำหนดสากลสำหรับการพัฒนายาใหม่ (INDs) อย่างเคร่งครัด DMSc Stem Pro ที่เตรียมจากห้องปฏิบัติการเซลล์ต้นกำเนิดของ

Corresponding author E-mail: acharaporn.d@dmsc.mail.go.th

Received: 18 February 2022

Revised: 19 May 2022

Accepted: 31 May 2022

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นับว่ามีคุณภาพ มีคุณสมบัติสอดคล้องตามข้อกำหนดสากล International Society for Cellular Therapy (ISCT) และปราศจากการปนเปื้อนจุลชีพ สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาวิธีการรักษาผู้ป่วยโรคจอตามีสารสีที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้อย่างมั่นใจ

คำสำคัญ: ไชกระดุก, Mesenchymal stem cells, การตรวจสอบความถูกต้องของกระบวนการผลิต

บทนำ

เซลล์ต้นกำเนิดมีคุณสมบัติในการสร้างเซลล์ทดแทนตนเอง โดยคงสภาพความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด และสามารถเจริญเติบโตเป็นเซลล์จำเพาะชนิดต่างๆ ได้ในสภาวะที่เหมาะสม นำไปสู่ความหวังที่จะนำเซลล์ต้นกำเนิดมาใช้ประโยชน์ในการรักษาหรือซ่อมแซมเนื้อเยื่อและอวัยวะที่ผิดปกติจากการเป็นโรค ความเสื่อม ความสูงอายุ และจากสาเหตุอื่นๆ ได้⁽¹⁾

mesenchymal stem cells (MSC) เป็นเซลล์ต้นกำเนิดสำหรับเนื้อเยื่อชั้นกลาง ที่มีศักยภาพในการเจริญเติบโตเป็นเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ ได้เกือบทุกชนิดในร่างกายมนุษย์เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม รวมถึงเนื้อเยื่อชั้นกลางและเนื้อเยื่อชั้นนอก MSC สามารถเพาะเลี้ยงได้จากไขกระดูก และมีคุณสมบัติตามข้อกำหนด International Society for Cellular Therapy (ISCT)⁽²⁾ ได้แก่ 1) สามารถยึดเกาะพื้นผิวพลาสติก ภาชนะเพาะเลี้ยง 2) ผิวเซลล์มีการแสดงออกของ CD105, CD90 และ CD73 แต่ไม่มีการแสดงออกของ CD34, CD45, CD11b, CD14, CD19 และ HLA-DR 3) สามารถเจริญเติบโตเป็นเซลล์ไขมัน เซลล์กระดูก และเซลล์กระดูกอ่อน (trilineage in vitro differentiation) MSC มีข้อดีทั้งทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยา สามารถลดภูมิคุ้มกันและลดการอักเสบ รวมถึงการมีคุณสมบัติทาง paracrine effect ที่สามารถหลั่งกลุ่มของสารเคมีที่เป็นประโยชน์ในการสื่อสารและส่งเสริมการทำงานของเซลล์ต่างๆ หลายชนิด จากข้อดีหลายประการของ MSC ทำให้นักวิจัยจำนวนมากให้ความสนใจนำ MSC ไปพัฒนาวิธีการรักษาแนวใหม่โดยใช้เซลล์ต้นกำเนิด (stem cell therapy) ในหลายกลุ่มโรค นับตั้งแต่โรคกระดูกและข้อ กลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือด กลุ่มโรคทางระบบภูมิคุ้มกัน ทั้ง autoimmune disease

และ graft versus host disease (GVHD) เบาหวาน โรคตับ โรคเอดส์ โรคทางระบบประสาท โรคทางจิตเวช บาดแผลเรื้อรัง และแผลจากการถูกไฟไหม้ เซลล์ต้นกำเนิดชนิด MSC จึงเป็นหนึ่งในกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดที่คาดว่าจะสามารถพัฒนาสู่ทางเลือกใหม่ในการรักษาโรค และฟื้นฟูสภาวะเสื่อมของมนุษยชาติได้^(1,2)

retinitis pigmentosa (RP) หรือโรคจอตามีสารสีที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม เป็นโรคทางพันธุกรรม ที่มีอุบัติการณ์การเกิดโรคของประชากรทั่วโลก ประมาณ 1 ต่อ 3,000 ถึง 4,000⁽³⁾ โดยเกิดจากความผิดปกติของยีนที่ส่งผลให้เซลล์รับแสงในจอตา (photoreceptor cells) ได้แก่ เซลล์ rod และ cone เสื่อมสภาพ ทำให้ผู้ป่วยมีอาการมองเห็นไม่ชัดในเวลากลางคืนและในที่สว่าง ร่วมกับลานสายตาแคบลงเรื่อยๆ จนเหลือเพียงลานสายตาเฉพาะตรงกลาง (tunnel vision) และนำไปสู่ภาวะตาบอดได้ ความผิดปกตินี้อาจเริ่มแสดงอาการตั้งแต่วัยเด็กเล็กหรือวัยอื่นๆ ได้ทุกระยะ ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการใดที่ประสบความสำเร็จในการรักษาโรคนี้ ทำให้ผู้ป่วยและครอบครัวได้รับผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตอย่างมากจากความบกพร่องหรือการสูญเสียการมองเห็น

จากการศึกษาในสัตว์ทดลองที่เป็นโรค RP โดยใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกของสัตว์เองฉีดเข้าในวุ้นตา พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกมีแนวโน้มช่วยคงสภาพการทำงานของเซลล์รับแสงในที่สว่างหรือ cone cell ได้⁽³⁾ จึงเป็นที่มาของการศึกษานี้ ซึ่งคณะผู้วิจัยได้วิจัยและพัฒนากระบวนการเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดชนิด DMSc Stem Pro ซึ่งเป็น MSC จากไขกระดูกของผู้ป่วยเอง สำหรับนำไปใช้ในการศึกษาความเป็นไปได้และความปลอดภัยของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก เมื่อฉีดเข้าวุ้นตาแก่ผู้ป่วยโรคจอตามีสารสีที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม⁽⁴⁾ โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง MSC

รวมถึงการตรวจสอบความถูกต้องของกระบวนการผลิต (process validation) ก่อนเข้าสู่การวิจัยทางคลินิก กระบวนการทั้งหมดดำเนินการตามหลักเกณฑ์และวิธีการในการผลิตยาแผนปัจจุบัน (Good Manufacturing Practice: GMP)⁽⁵⁾ และข้อกำหนดสากลสำหรับการพัฒนายาใหม่ (Investigational New Drug Applications: INDs)⁽⁶⁾

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงและตรวจสอบความถูกต้องของกระบวนการผลิต เป็นตัวอย่างไขกระดูกที่ได้รับความอนุเคราะห์จากคณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล โดยไม่สามารถสืบค้นกลับไปยังตัวบุคคลผู้ให้ไขกระดูกได้ จำนวน 4 ราย ซึ่งผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล เลขที่ Si126/2010 วันที่ 12 กันยายน 2561

ตัวอย่างที่ใช้ในกระบวนการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิด MSC เป็นตัวอย่างเซลล์มาตรฐาน human mesenchymal stem cells: HMSC (cell applications, Canada)

การแยกและการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด

นำตัวอย่างไขกระดูกมาเจือจางด้วย sterile PBS pH 7.4 (Invitrogen, USA) แล้วนำไปปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Hitachi, Japan) เพื่อเก็บส่วนของ buffy coat นำมาเพาะเลี้ยงในภาชนะเพาะเลี้ยงชนิด T75cm² (Corning, USA) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ประกอบด้วย Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen, USA) fetal bovine serum (Lonza, USA) antibiotic/antimycotic (Sigma, USA) นำไปบ่มด้วย CO₂ incubator รุ่น NU-5100E (NuAire, Inc, USA) เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3-4 วัน จนกว่าเซลล์จะมีความหนาแน่นประมาณ 90% ของพื้นที่เพาะเลี้ยง จากนั้นทำการย่อยเซลล์ออกจากพื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยงด้วย 0.25% trypsin/EDTA (Invitrogen, USA) และนำ

เซลล์ที่ได้เพาะเลี้ยงต่อไปใน passage ต่อไป ซึ่งดำเนินการภายใต้ laminar air flow biological safety cabinets รุ่น NU-430 (NuAire, Inc., USA)

สถานที่เพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด เป็นห้องสะอาดระดับ class 100 ณ อาคารปฏิบัติการเซลล์ต้นกำเนิด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีการตรวจติดตามสถานะแวดล้อมทั้งด้านกายภาพและด้านชีวภาพ โดยการติดตามระดับความสะอาดของสถานะแวดล้อมในสถานะไม่มีการปฏิบัติงานและสถานะกำลังปฏิบัติงาน ครอบคลุมการติดตามการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ การติดตามจำนวนอนุภาคในอากาศ ความดัน อุณหภูมิ และการตรวจสอบพารามิเตอร์เหล่านี้โดยช่างเทคนิคเฉพาะด้าน เป็นประจำสม่ำเสมอ ตามมาตรฐานสากล ISO 14644⁽⁷⁾

การตรวจสอบคุณภาพ

การตรวจสอบคุณภาพและคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิด ตามข้อกำหนดสากล ISCT ประกอบด้วย การพิสูจน์เอกลักษณ์เซลล์ต้นกำเนิด (identity) การทดสอบความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิด (potency) การทดสอบความบริสุทธิ์ของเซลล์ต้นกำเนิด (purity) การตรวจการปนเปื้อนจุลชีพ (sterility) และการตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์ (viability) ดังนี้

การพิสูจน์เอกลักษณ์เซลล์ต้นกำเนิด โดยเทคนิค flow cytometry⁽⁸⁾ อาศัยการตรวจติดตามชนิดแอนติเจนที่จำเพาะบนผิวเซลล์ MSC และตรวจวัดจำนวนเซลล์โดยใช้แสงเลเซอร์กระตุ้น fluorescent ที่ติดฉลากไว้ที่ antibody ให้เกิดการเรืองแสง โดยใช้ anti-CD90 APC (BD Bioscience, USA) anti-CD105 PE (Miltenyi Biotec, USA) anti-CD73 APC (Biolegend®, Canada) anti-CD34 PE (Biolegend®, Canada) anti-CD45 PE (Biolegend®, Canada) anti-HLA-DR APC (Biolegend®, Canada) 7-AAD (BD Pharmingen™, USA) ทำการตรวจวิเคราะห์โดยเครื่อง FACSCanto II (BD Bioscience, USA)

การทดสอบความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิดในการเจริญเติบโตเป็นเซลล์อื่นๆ ได้อย่างน้อย 3 ชนิด (trilineage in vitro differentiation) คือ เซลล์ไขมัน

เซลล์กระดูก และเซลล์กระดูกอ่อน โดยเฉพาะเลี้ยง MSC ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความจำเพาะ สามารถกระตุ้นให้เจริญเติบโตเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ ได้ในสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้ชุดน้ำยา mesenchymal stem cell adipogenesis kit (Chemicon, Canada) ประกอบด้วย adipogenesis medium oil red o solution ชุดน้ำยา mesenchymal stem cell osteogenesis kit (Chemicon, Canada) ประกอบด้วย osteogenesis medium alizarin red solution และชุดน้ำยา NH chondrodiff (Miltenyi, Germany) ประกอบด้วย chondrodiff medium

การทดสอบความบริสุทธิ์ของเซลล์ต้นกำเนิด ดำเนินการตรวจหาปริมาณ endotoxin โดยวิธี limulus amoebocyte lysate (LAL) แบบ kinetic turbidimetric method⁽⁹⁾ อาศัยหลักการทำปฏิกิริยาระหว่างสารสกัดของเลือดแมงดาทะเลกับสาร bacterial endotoxin หากตัวอย่างมี bacterial endotoxin ปนเปื้อนอยู่จะกระตุ้นให้ proenzyme เปลี่ยนแปลงเป็น coagulase ที่สามารถ hydrolyses coagulin ซึ่งมีลักษณะคล้ายเจล การติดตามความขุ่นของการเกิดเจล จึงบ่งบอกถึงปริมาณการปนเปื้อน bacterial endotoxin ได้ โดยใช้ชุดน้ำยา Pyrogen[®] 5000 test kit (Lonza, USA) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง microplate reader model ELX808 TM (Bio Tek[®] Instrument, USA)

การตรวจการปนเปื้อนจุลชีพ⁽¹⁰⁾ ดำเนินการตรวจการปนเปื้อนของแบคทีเรียและเชื้อรา โดยวิธี micro-organism culture ในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soybean broth medium (soybean-casein digest medium) (Difco, USA) สำหรับเชื้อแบคทีเรีย และ fluid thioglycolate medium (Difco, USA) สำหรับเชื้อรา ส่วนการตรวจการปนเปื้อนไมโคพลาสมา⁽¹¹⁾ ด้วยวิธี PCR โดยใช้ชุดน้ำยา Venor Gem OneStep (Minerva Biolabs, Germany) เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม GeneAmp 5700 (Applied Biosystems, USA) จากนั้นนำไปตรวจสอบ PCR product โดยใช้ 2% agarose gel electrophoresis ภายใต้เครื่องถ่ายภาพเจลภายใต้แสงยูวีรุ่น Bio-Doc-ItTM System (UVP Laboratory Products, USA)

การตรวจสอบอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยการย้อมด้วย trypan blue stain (Invitrogen, USA) สังเกตการติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ รุ่น TE2000S (Nikon, Japan) โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะไม่ติดสีน้ำเงิน ในขณะที่เซลล์ที่ไม่มีชีวิตจะติดสีย้อม เนื่องจากเซลล์เมมเบรนเกิดการเสื่อมสภาพจึงสามารถติดสีย้อมของ trypan blue ได้

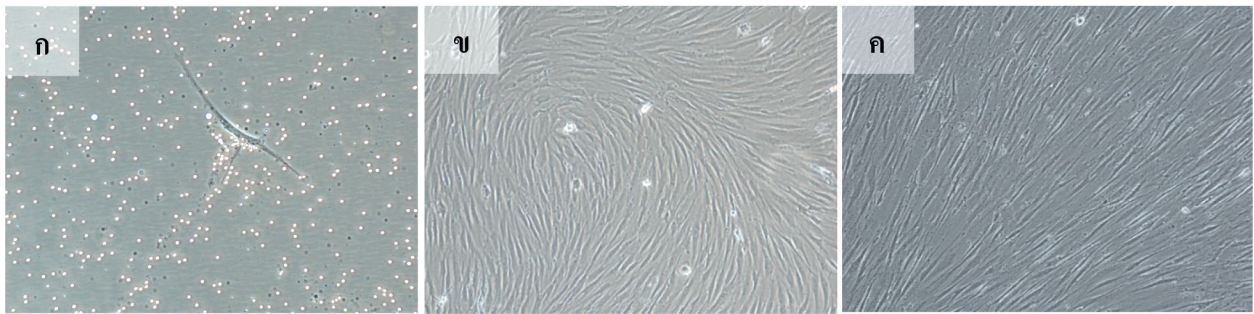
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย (mean) $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation: SD)

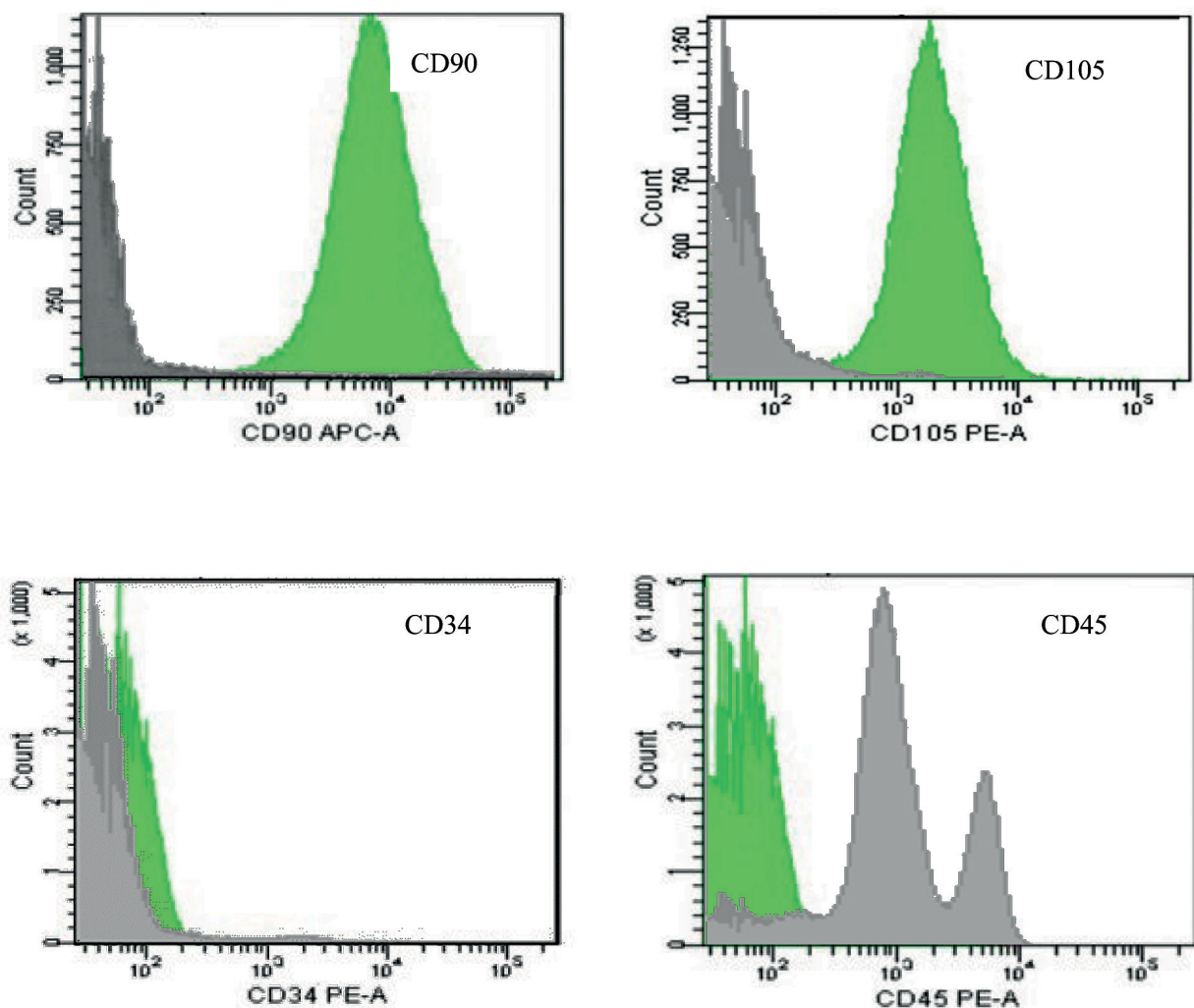
ผล

จากการนำตัวอย่างไขกระดูก จำนวน 4 ราย (20.25 ± 1.71 มิลลิลิตร) มาปั่นแยก buffy coat พบว่าได้ผล mononuclear cell (MNC) เฉลี่ย 26.16 ± 13.45 ล้านเซลล์ ซึ่งมีค่าระหว่าง 7.35–39.15 ล้านเซลล์ เมื่อเพาะเลี้ยง MSC ใน DMEM ร่วมกับ 10% FBS บ่มที่ 37°C , 5% CO_2 และติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์ใน 2 วันแรก พบเซลล์ MSC สามารถยึดเกาะที่พื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยง ดังแสดงในภาพที่ 1 ก และเมื่อเพาะเลี้ยงได้ 5 วัน ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ พบว่าเซลล์ที่ไม่ใช่ MSC จะไม่สามารถเกาะพื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยง หลังจากเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจะเหลือเฉพาะเซลล์ MSC เท่านั้น และเมื่อเพาะเลี้ยง MSC เป็นระยะเวลา 36 ± 4.69 วัน (ค่าพิสัยเท่ากับ 31–42) พบว่ามีอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ร้อยละ 96.37 ± 2.68 (ค่าพิสัยเท่ากับ 93.64–98.75) เซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้มีรูปร่างปลายเรียวแหลม เจริญเติบโตยึดเกาะพื้นผิวพลาสติก ดังแสดงในภาพที่ 1 ข (passage no. 2) เปรียบเทียบกับเซลล์ MSC ที่เพาะเลี้ยงจากตัวอย่างเซลล์มาตรฐาน ดังแสดงในภาพที่ 1 ค

การพิสูจน์เอกลักษณ์เซลล์ต้นกำเนิด โดยเทคนิค flow cytometry พบว่าผิวเซลล์จากไขกระดูกมีการแสดงออกของ CD34 และ CD45 แต่ไม่พบการแสดงออกของ CD90 และ CD105 หลังจากเพาะเลี้ยงไปเป็น MSC พบว่าผิวเซลล์มีการแสดงออกของ CD90 และ CD105 แต่ไม่พบการแสดงออกของ CD34 และ CD45 ดังแสดงในภาพที่ 2

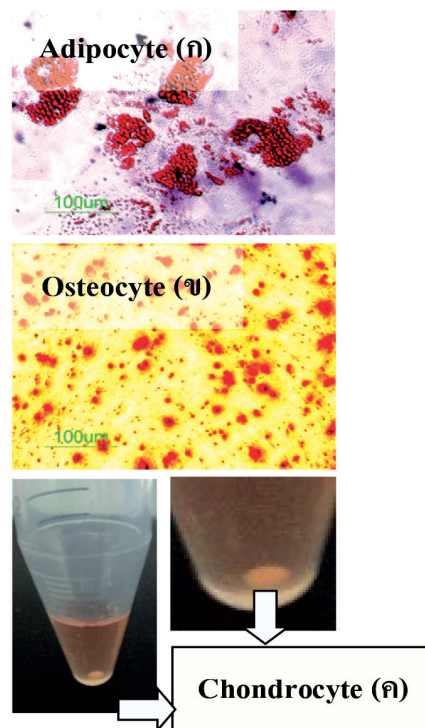
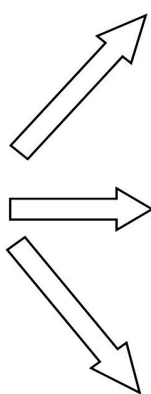
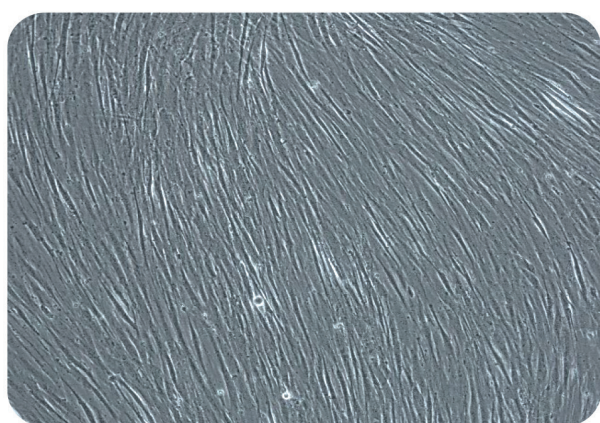


ภาพที่ 1 MSC ที่เพาะเลี้ยงจากตัวอย่างไขกระดูก มีลักษณะรูปร่างปลายเรียวแหลมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตั้งแต่เริ่มเพาะเลี้ยงจากไขกระดูก (ก) passage no. 2 (ข) เปรียบเทียบกับเซลล์ MSC ที่เพาะเลี้ยงจากตัวอย่างเซลล์มาตรฐาน (ค)



ภาพที่ 2 การแสดงออกของแอนติเจนที่จำเพาะบนผิวเซลล์จากไขกระดูก (สีเทา) เปรียบเทียบกับของเซลล์ MSC passage no. 2 (สีเขียว)

การทดสอบความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิดในการเจริญเติบโตเป็นเซลล์อื่น 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์ไขมัน เซลล์กระดูก และเซลล์กระดูกอ่อน ผลการศึกษาพบว่าเมื่อนำตัวอย่าง MSC มาเพาะเลี้ยงใน adipogenesis medium มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์จาก MSC เป็นเซลล์ไขมัน เมื่อย้อมด้วย oil red o solution จะพบ lipid vacuole ในเซลล์ไขมันติดสีแดง มีลักษณะเหมือนฟององุ่น ในขณะที่นิวเคลียสติดสีน้ำเงินเข้ม ดังแสดง



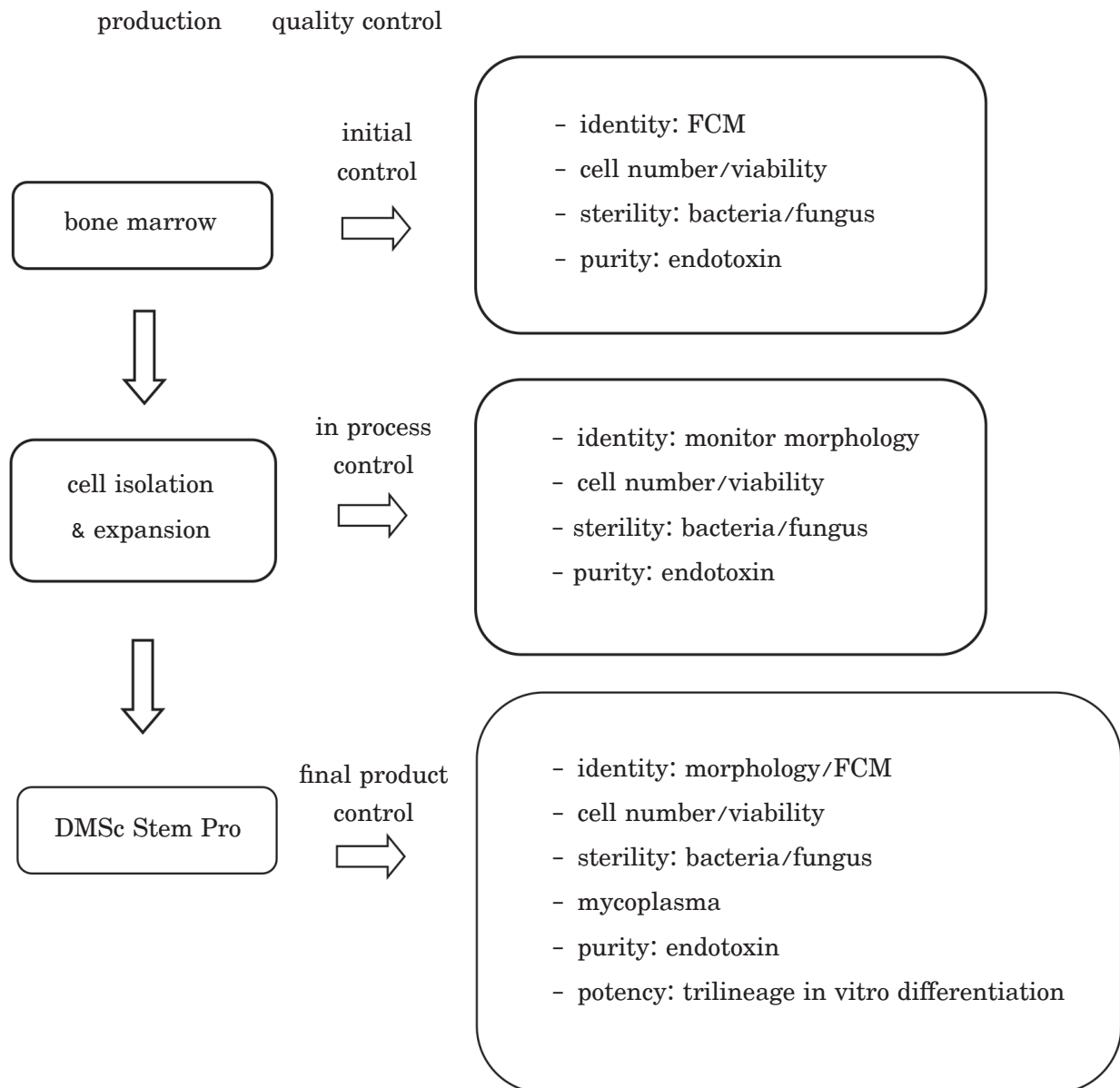
ภาพที่ 3 เซลล์ MSC สามารถเจริญเติบโตไปเป็นเซลล์ไขมัน (ก) เซลล์กระดูก (ข) และเซลล์กระดูกอ่อน (ค)

การเตรียมความพร้อมในการพัฒนากระบวนการเตรียมเซลล์ เพื่อนำไปใช้สำหรับผู้ป่วยประกอบด้วย ด้านบุคลากร โดยบุคลากรได้รับการฝึกอบรมให้มีความรู้ความสามารถ และได้รับการตรวจสุขภาพและฉีดวัคซีนเพื่อให้มีสุขอนามัยที่ดีเป็นประจำทุกปี ด้านสถานที่เตรียมเซลล์ เป็นห้องสะอาดแรงดันบวกที่มีการควบคุมติดตาม และบันทึกคุณภาพอากาศและการปนเปื้อนพื้นผิวปฏิบัติงานในบริเวณสะอาดอย่างต่อเนื่อง โดยมีอนุภาคขนาด 0.5 ไมครอน จำนวน 789.14 ± 71.53 อนุภาค (ค่าพิสัยเท่ากับ 703.66–867.80) ความดัน 80.68 ± 4.37 ปาสคาล (ค่าพิสัยเท่ากับ 77–87) อุณหภูมิ 21.53 ± 1.12 องศาเซลเซียส (ค่าพิสัยเท่ากับ 20.20–22.50) ความชื้นสัมพัทธ์ ร้อยละ 59.98 ± 2.48 (ค่าพิสัยเท่ากับ

56.70 – 62.70) และการตรวจติดตามจุลชีพอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด รวมถึงมีการสอบเทียบสภาวะแวดล้อมห้องคลีนรูม ตามมาตรฐานสากล ISO 14644 เป็นประจำทุกปี ด้านการปฏิบัติงาน มีการจัดทำมาตรฐานการปฏิบัติงานและแบบบันทึก จำนวน 60 ฉบับ ครอบคลุมทุกขั้นตอนที่มีความสำคัญในการเตรียมและตรวจสอบคุณภาพเซลล์ รวมถึงการดำเนินการจำลองกระบวนการมีเดียฟิลล์จำนวน 4 ครั้ง เพื่อประเมินกระบวนการปราศจากเชื้อโดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาใช้ในกระบวนการผลิตให้ใกล้เคียงกับการปฏิบัติงานประจำ และติดตามความปราศจากเชื้อ ผลการศึกษาพบว่าอาหารเลี้ยงเซลล์มีลักษณะใสไม่พบตะกอน มีสีส้มแดง ปราศจากการปนเปื้อน endotoxin และจุลชีพ

การศึกษาความถูกต้องของกระบวนการผลิต (process validation) ผู้วิจัยได้ออกแบบกระบวนการผลิตและการควบคุมคุณภาพ ครอบคลุมตั้งแต่การรับตัวอย่างไขกระดูก (initial control) ระหว่างกระบวนการ

ผลิต (in process control) และผลิตภัณฑ์สุดท้าย (final product control) ดังแสดงในภาพที่ 4 และกำหนดเกณฑ์การปล่อยผ่านผลิตภัณฑ์ ดังแสดงในตารางที่ 1



ภาพที่ 4 กระบวนการผลิตและการควบคุมคุณภาพ DMSc Stem Pro

ตารางที่ 1 เกณฑ์การปล่อยผ่านผลิตภัณฑ์เซลล์ต้นกำเนิด DMSc Stem Pro

quality control test	product release criteria	reference
cell dose	10 ล้านเซลล์	ตามที่ตกลงกับแพทย์
viability	> 70%	INDs, U.S. FDA 2020 ⁽⁶⁾
sterility		
- bacteria/fungus	no growth	INDs, U.S. FDA 2020 ⁽⁶⁾
- mycoplasma	negative	INDs, U.S. FDA 2020 ⁽⁶⁾
endotoxin	< 0.2 EU/kg	USP 41. Biological test. (85) ⁽¹²⁾
flow cytometry	positive: CD90, CD105, CD73 negative: CD34, CD45, HLA-DR	ISCT 2006 ⁽²⁾
trilineage in vitro differentiation	adipose, osteocyte และ chondrocyte	ISCT 2006 ⁽²⁾

จากการศึกษาความถูกต้องของกระบวนการผลิต (process validation) จำนวน 4 รอบ เพื่อเตรียมความพร้อมก่อนเข้าสู่การวิจัยทางคลินิก พบว่า MSC ที่เพาะเลี้ยงได้มีปริมาณค่าเฉลี่ย $\pm$ SD เท่ากับ 8.67 ± 2.23 ล้านเซลล์ (ค่าพิสัยเท่ากับ 6.00–10.62 ล้านเซลล์) อัตราการมีชีวิตค่าเฉลี่ย $\pm$ SD คิดเป็นร้อยละ 96.37 ± 2.68 (ค่าพิสัยเท่ากับ 93.64–98.75) MSC ที่ได้รูปร่างปลายเรียวยาวแหลม มีคุณสมบัติในการแสดงออกของ CD90, CD105 และ CD73 แต่ไม่มีการแสดงออก

ของ CD34, CD45 และ HLA-DR สามารถเจริญเติบโตเป็นเซลล์ไขมัน เซลล์กระดูก และเซลล์กระดูกอ่อนได้ ปราศจากการปนเปื้อน endotoxin และจุลชีพทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยกระบวนการทั้งหมดดำเนินการตามหลักเกณฑ์และวิธีการในการผลิตยาแผนปัจจุบัน (GMP) และข้อกำหนดสากลสำหรับการพัฒนายาใหม่ (INDs) อย่างเคร่งครัด ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความสะอาด ปลอดภัย ไม่พบการปนเปื้อนของจุลชีพ

ตารางที่ 2 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของกระบวนการผลิตเซลล์ต้นกำเนิดชนิด DMSc Stem Pro จำนวน 4 ราย

ตัวอย่างลำดับที่	ปริมาณไซกระดุก (มิลลิลิตร)	ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง (วัน)	identity (FCM)	sterility (microorganism culture; bacteria and fungus)	mycoplasma (PCR)	endotoxin (LAL)	trilineage in vitro differentiation	%viability (%)
1	22	34	negative: CD34, CD45 positive: CD90, CD105	no growth	negative	< 0.25 EU/ml	✓	93.64
2	20	37	negative: CD34, CD45, HLA-DR positive: CD90, CD105, CD73	no growth	negative	< 0.25 EU/ml	✓	98.60
3	21	42	negative: CD34, CD45, HLA-DR positive: CD90, CD105, CD73	no growth	negative	< 0.25 EU/ml	✓	98.75
4	18	31	negative: CD34, CD45, HLA-DR positive: CD90, CD105, CD73	no growth	negative	< 0.25 EU/ml	✓	94.49

วิจารณ์

โดยทั่วไปกระบวนการเตรียมเซลล์เพื่อนำไปใช้สำหรับผู้ป่วย ทั้งเพื่อการศึกษาวิจัยทางคลินิกและเพื่อการรักษามาตรฐาน จะต้องผ่านการวิจัยต่อยอด (translational research) เพื่อให้มั่นใจว่าผลิตภัณฑ์เซลล์ที่

เตรียมได้มีคุณภาพและปลอดภัยสำหรับผู้ป่วย⁽¹³⁾ ในทางปฏิบัตินักวิจัยควรดำเนินการให้สอดคล้องตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง การกำหนดรายละเอียดเกี่ยวกับหลักเกณฑ์และวิธีการในการผลิตยาแผนปัจจุบัน ตามกฎหมายว่าด้วยยา พ.ศ. 2559 รวมถึงมาตรฐานและ

ข้อกำหนดสากลที่เกี่ยวข้อง^(2,5-7) โดยห้องปฏิบัติการต้องจัดให้มีบุคลากร อาคาร สถานที่ สภาวะแวดล้อม เครื่องมือ วัสดุ สารเคมี และน้ำยา ที่จำเป็นในการปฏิบัติงานของห้องปฏิบัติการอย่างเหมาะสม บุคลากรต้องมีสุขอนามัยที่ดี มีคุณสมบัติ ความรู้ และความสามารถอย่างเพียงพอ การออกแบบสถานที่และสภาวะแวดล้อมในการผลิตต้องเป็นไปตามหลักการและข้อกำหนดที่ระบุในหลักเกณฑ์และวิธีการในการผลิตยาฯ ตามกฎหมายว่าด้วยยา พ.ศ. 2559⁽⁵⁾ ภาคผนวก 1 การผลิตยาปราศจากเชื้อ เพื่อเลือกระดับชั้นให้มีความลดหลั่นของสิ่งแวดล้อมในการทำงาน และมาตรการในการควบคุมที่เกี่ยวข้องอย่างเหมาะสม ต้องใช้บริเวณที่มีแรงดันเป็นบวกในขั้นตอนการผลิต มีการควบคุม ติดตาม และบันทึกคุณภาพอากาศและการปนเปื้อนพื้นผิวปฏิบัติงานในบริเวณสะอาดเป็นประจำ เครื่องมือที่ใช้ต้องได้รับการบำรุงรักษาให้สะอาดและมีการสอบเทียบอย่างต่อเนื่อง วัสดุ สารเคมี และน้ำยาในกระบวนการผลิตและการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ ต้องมีระดับการผลิตที่เหมาะสมสำหรับใช้ทางคลินิก (clinical grade) หรือเทียบเท่า หากไม่สามารถจัดหาได้ วัสดุ สารเคมี และน้ำยาที่นำมาใช้จะต้องผ่านการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ เพื่อยืนยันว่ามีคุณลักษณะตามที่ห้องปฏิบัติการกำหนด ก่อนนำไปใช้ในกระบวนการผลิตและเก็บรักษาผลิตภัณฑ์^(6,7) และที่สำคัญการพัฒนาระบบการใหม่หรือการเปลี่ยนแปลงกระบวนการเดิม ต้องมีการตรวจสอบความถูกต้องของกระบวนการผลิต (process validation) ก่อนให้บริการตามใบสั่งของผู้ประกอบวิชาชีพเสมอ⁽⁵⁾

สำหรับการศึกษานี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง MSC โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ร่วมกับ 10% FBS บ่มที่ 37°C, 5% CO₂ เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3-4 วัน เป็นเวลา 31-42 วัน เซลล์ที่ได้มีคุณสมบัติสอดคล้องตามข้อกำหนดสากล ISCT⁽²⁾ ทั้งในด้านรูปร่างลักษณะ การแสดงออกของแอนติเจน และศักยภาพในการเจริญเติบโตเป็นเซลล์อื่น 3 ชนิด ปราศจากการปนเปื้อน endotoxin และจุลชีพ จากนั้นจึงเข้าสู่การวิจัยต่อยอดเริ่มตั้งแต่การเตรียมความพร้อมด้านสถานที่ บุคลากร

เครื่องมือ สารเคมี และน้ำยาที่ใช้ในการเตรียมเซลล์ต้นกำเนิด รวมถึงการออกแบบกระบวนการที่มีการควบคุมคุณภาพทุกขั้นตอนอย่างครบวงจร ตั้งแต่การรับไขกระดูก ต้องมีการตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบตั้งต้น (initial control) ระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยงในห้องสะอาด ต้องมีการตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์ระหว่างผลิต (in process control) และในวันที่ต้องเตรียมผลิตภัณฑ์ส่งให้แพทย์ ต้องควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ (final product control) ดังแสดงในภาพที่ 4 ทุกกระบวนการที่มีความสำคัญต้องจัดทำมาตรฐานสำหรับใช้ในการปฏิบัติงานอย่างเคร่งครัด จากนั้นจึงทำการศึกษา media fill เพื่อให้มั่นใจว่ากระบวนการผลิตปราศจากการปนเปื้อนจุลชีพก่อนเข้าสู่การตรวจสอบความถูกต้องของกระบวนการผลิต⁽¹⁴⁾

การตรวจสอบความถูกต้องของกระบวนการผลิตเป็นการจำลองกระบวนการปฏิบัติงานตามที่ได้ออกแบบไว้ โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้ต้องผ่านเกณฑ์การปล่อยผ่านผลิตภัณฑ์ตามที่แพทย์เห็นชอบ (release criteria) ดังแสดงในตารางที่ 1 ผ่านการขนส่งและส่งมอบให้แพทย์ เช่นเดียวกับการปฏิบัติงานจริง เพียงแต่ผลิตภัณฑ์เซลล์ที่ได้จะไม่ได้นำไปใช้กับผู้ป่วย จะต้องนำกลับมาตรวจสอบคุณภาพโดยละเอียด รวมถึงการศึกษาคงทน (stability) เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานก่อนเข้าสู่การวิจัยทางคลินิกต่อไป

การศึกษาคงทนของกระบวนการผลิตต้องดำเนินการให้ผ่านตามคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์อย่างน้อย 3 รอบการผลิตที่ติดต่อกัน⁽⁵⁾ การศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยดำเนินการรวม 4 รอบการผลิต ผลการศึกษาพบว่าผลิตภัณฑ์เซลล์ต้นกำเนิดที่เตรียมได้ผ่านตามข้อกำหนดสากล ISCT ทั้งในด้านรูปร่างลักษณะ การแสดงออกของแอนติเจน และศักยภาพในการเจริญเติบโตเป็นเซลล์อื่น 3 ชนิด ปราศจากการปนเปื้อนของจุลชีพและการตรวจสอบ endotoxin ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด มั่นใจว่ากระบวนการผลิตมีความคงที่ ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความสะอาด ปลอดภัย พร้อมเข้าสู่การศึกษาวิจัยทางคลินิกต่อไปได้

การตรวจสอบคุณภาพเซลล์ต้นกำเนิด สามารถตรวจสอบได้ครอบคลุมทั้ง 4 ด้าน ได้แก่ การพิสูจน์เอกลักษณ์เซลล์ต้นกำเนิด การทดสอบความสามารถ

ของเซลล์ต้นกำเนิด การทดสอบความบริสุทธิ์ของเซลล์ต้นกำเนิด และการตรวจการปนเปื้อนจุลชีพ รวมถึงการตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์ อย่างไรก็ตามควมมีการพัฒนาการทดสอบเพิ่มเติมในด้านอื่นๆ เช่น การพัฒนาวิธีการตรวจสอบความปลอดภัยของเซลล์ เพื่อทดสอบความเสี่ยงในการพัฒนาเปลี่ยนแปลงเซลล์ต้นกำเนิดชนิด MSC เป็นเซลล์มะเร็ง การทดสอบความเสื่อมสภาพของเซลล์⁽¹⁵⁾ การพัฒนาวิธีการตรวจการปนเปื้อน โดยวิธี PCR ที่ได้ผลเร็วขึ้น การตรวจสอบ colony forming unit fibroblast assay (CFU-F) ในการติดตามความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิด⁽¹¹⁾ รวมถึงการพัฒนาวิธีการตรวจสอบ marker โดยการพัฒนาวิธีเพื่อให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง MSC และ fibroblast ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีคุณลักษณะที่คล้ายกัน⁽¹⁶⁾

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเซลล์ ในการศึกษา process validation รายที่ 1 คณะผู้วิจัยได้ศึกษาการแสดงออกของแอนติเจนบนผิวเซลล์โดยเลือกใช้ positive marker 2 ชนิด คือ CD90 และ CD105 ส่วน negative marker 2 ชนิด คือ CD34 และ CD45 เนื่องจากมีข้อจำกัดในเรื่องงบประมาณและเครื่องมือที่ใช้ อย่างไรก็ตามในรายที่ 2, 3 และ 4 คณะผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีการทดสอบการแสดงออกของ CD73 และ HLA-DR บนผิวเซลล์เพิ่มเติม ผลการศึกษาพบว่า DMSc Stem Pro มีการแสดงออกของ CD73, CD90 และ CD105 และไม่พบการแสดงออกของ CD34, CD45 และ HLA-DR ทั้งนี้กระบวนการจากการศึกษาได้ขยายผลสู่การศึกษาวิจัยทางคลินิก เพื่อนำ mesenchymal stem cells จากไขกระดูกของผู้ป่วยเอง นำไปฉีดเข้าวุ้นตาของผู้ป่วย retinitis pigmentosa ซึ่งรายงานโดย Tuekprakhon A. และคณะ⁽⁴⁾ พบว่า MSC ที่ได้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมตามข้อกำหนด ISCT 2006 ปราศจากการปนเปื้อนจุลชีพ และ endotoxin สามารถนำไปใช้ในการวิจัยได้อย่างปลอดภัย

การศึกษาต่อยอดสำหรับ MSC ในครั้งนี้ นอกจากเป็นกระบวนการทางห้องปฏิบัติการ เพื่อให้เกิดความมั่นใจในคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์เซลล์ต้นกำเนิดชนิด MSC ก่อนเข้าสู่การวิจัยทางคลินิกแล้วยังจัดเป็นต้นแบบกระบวนการสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์

เซลล์ต้นกำเนิด รวมถึงผลิตภัณฑ์เซลล์บำบัดอื่นๆ เพื่อให้ นักวิจัยด้านเซลล์ต้นกำเนิดและผลิตภัณฑ์การแพทย์ขั้นสูงของประเทศ สามารถดำเนินงานสอดคล้องตามข้อกำหนดสากลได้อย่างเหมาะสม

สรุป

DMSc Stem Pro ที่เตรียมโดยห้องปฏิบัติการเซลล์ต้นกำเนิดของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีคุณสมบัติสอดคล้องตามข้อกำหนดสากล ISCT ทั้งในด้านรูปร่างลักษณะ การแสดงออกของแอนติเจน และศักยภาพในการเจริญเติบโตเป็นเซลล์อื่น 3 ชนิด ปราศจากการปนเปื้อน endotoxin และจุลชีพ กระบวนการทั้งหมดดำเนินงานตามข้อกำหนดคุณภาพสากล ทำให้นักวิจัยมีความมั่นใจในคุณภาพและความปลอดภัยของเซลล์ต้นกำเนิดที่เตรียมได้ พร้อมนำไปใช้พัฒนาวิธีรักษาผู้ป่วยโรคจอตามีสารสีที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้งบประมาณสนับสนุน ขอขอบคุณภาควิชาจุฬารัตนวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล และสถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ที่ให้การสนับสนุนการวิจัยตลอดการดำเนินโครงการ ขอขอบคุณงานเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ฝ่ายสนับสนุนห้องปฏิบัติการ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ที่ให้ความอนุเคราะห์ทดสอบความปราศจากเชื้อ โดยวิธี microorganism culture และขอขอบคุณงานควบคุมคุณภาพเซลล์ต้นกำเนิด ศูนย์เซลล์ต้นกำเนิด และเวชศาสตร์ฟื้นฟูสภาวะเสื่อม ในการตรวจยืนยันและตรวจสอบคุณภาพของเซลล์ต้นกำเนิดและให้ความร่วมมือเป็นอย่างดีตลอดการดำเนินงาน

เอกสารอ้างอิง

1. สิริภกร แสงกิจพร, สมชาย แสงกิจพร. DMSc stem cell research: จากห้องทดลองสู่การวิจัยทางคลินิก. นนทบุรี: สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2558.

2. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4): 315-7.
3. Delyfer MN, Léveillard T, Mohand-Saïd S, Hicks D, Picaud S, Sahel JA. Inherited retinal degenerations: therapeutic prospects. *Biol Cell* 2004; 96(4): 261-9.
4. Tuekprakhon A, Sangkitporn S, Trinavarat A, Pawestri AR, Vamvanij V, Ruangchainikom M, et al. Intravitreal autologous mesenchymal stem cell transplantation: a non-randomized phase I clinical trial in patients with retinitis pigmentosa. *Stem Cell Res Ther* 2021; 12(1): 52. (15 pages).
5. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง การกำหนดรายละเอียดเกี่ยวกับหลักเกณฑ์และวิธีการในการผลิตยาแผนปัจจุบัน และแก้ไขเพิ่มเติมหลักเกณฑ์และวิธีการในการผลิตยาแผนโบราณ ตามกฎหมายว่าด้วยยา พ.ศ. 2559. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 133 ตอนพิเศษ 206 ง (วันที่ 14 กันยายน 2559). หน้า 4.
6. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). Chemistry, manufacturing, and control (CMC) information for human gene therapy investigational new drug applications (INDs). January 2020.
7. คณะทำงานจัดเตรียมข้อมูลเพื่อจัดทำมาตรฐานห้องปฏิบัติการเซลล์. มาตรฐานห้องปฏิบัติการเซลล์ทางการแพทย์. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข: 2563.
8. Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KP, et al. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci* 2003; 10(2): 228-41.
9. Williams KL, editor. Endotoxins: pyrogens, LAL testing and depyrogenation. 3rd ed. New York: Informa Healthcare USA, Inc.; 2007.
10. Department of Health and Ageing, Therapeutic Goods Administration. TGA guidelines for sterility testing of therapeutic goods. Australia: Commonwealth of Australia; 2006.
11. van Kuppeveld FJ, van der Logt JT, Angulo AF, van Zoest MJ, Quint WG, Niesters HG, et al. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58(8): 2606-15.
12. The United States Pharmacopeia USP41 NF36 Volume 2. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 2018.
13. ลีรภักร แสงกิจพร, สมชาย แสงกิจพร. Regulation of cell therapy: international standard system for cell therapy manufacturing. ใน: เวชศาสตร์ร่วมสมัย 2559. กรุงเทพฯ: คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย; 2559. หน้า 414-421.
14. Sangkitporn S, Atchaneeyasakul L, Trinavarat A, Khorchai A, Dambua A, Sangkitporn S. Stem cell: therapy and laboratory testing the DMSc stem cell manufacturing process and quality control experience. *J Med Tech Assoc Thailand*. 2019; 47(Supple 1): 105-12.
15. Medeiros Tavares Marques JC, Cornélio DA, Nogueira Silbiger V, Ducati Luchessi A, de Souza S, Batistuzzo de Medeiros SR. Identification of new genes associated to senescent and tumorigenic phenotypes in mesenchymal stem cells. *Sci Rep* 2017; 7: 17837. (13 pages).
16. Denu RA, Nemcek S, Bloom DD, Goodrich AD, Kim J, Mosher DF, et al. Fibroblasts and mesenchymal stromal/stem cells are phenotypically indistinguishable. *Acta Haematol* 2016; 136(2): 85-97.

Manufacturing Process Development of DMSc Stem Pro: Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells for Clinical Research

Acharaporn Dambua¹, Siripakorn Sangkitporn², La-ongsri Atchaneeyasakul³, Areerat Khorchai⁴, Adisak Trinavarat³, Sawitree Duangrueng⁵, Suppaluk Buasrikeaw¹, Apichat Chotichusree¹, Patcharaporn Boonchu¹, Chonlada Yodtup¹, Phatcharaphon Nopprang¹, Panyakamol Chandrasakha⁶, and Somchai Sangkitporn⁷

¹Medical Life Sciences Institute, ²Medical Sciences Technical Office, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

³Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University 10700, Thailand

⁴Surin Hospital, Surin 32000, Thailand

⁵National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

⁶Prasu-arthorn Veterinary Teaching Hospital, Mahidol University, Nakhon Pathom 73170, Thailand

⁷Pink Park Village, Bangkok 10530, Thailand

ABSTRACT Mesenchymal stem cells (MSC) are multipotent stem cells with the potential to differentiate into various tissue lineages. This study aimed to research and develop a manufacturing process for DMSc Stem Pro, a clinical grade bone marrow MSC for the development of a treatment for retinitis pigmentosa (RP) patients. Optimal conditions for MSC and process validation were studied prior to clinical trials. MSC were isolated and then cultured under GMP conditions with the classical media composition consisting of basal medium DMEM and 10% FBS, and incubated at 37°C with 5% CO₂. The resulting MSC “DMSc Stem Pro” showed fibroblast-like cells which adhered to plastic culture flask. After expansion for 36±4.69 days (range = 31–42), cell numbers were 8.67±2.23 million (range = 6.00–10.62) with more than 90% cell viability. Cell surface antigen test revealed positive expression of CD90, CD105 and CD73, but negative for CD34, CD45 and HLA-DR. Expanded cells revealed multilineage differentiation into adipocyte, osteocyte and chondrocyte. Microbiological assays were demonstrated the absence of bacteria, fungus and

mycoplasma. Endotoxin level was under the critical limit. All the manufacturing processes of DMSc Stem Pro prepared from Stem cell facility of the Department of Medical Sciences were in compliance with the GMP, INDs and ISCT standards. The DMSc Stem Pro prepared by the stem cells laboratory, the Department of Medical Sciences, is of high quality as per the regulations of the International Society for Cellular Therapy (ISCT) and pathogens free. The clinical grade DMSc Stem Pro can be used for clinical study in retinitis pigmentosa patients.

Keywords: Bone marrow, Mesenchymal stem cells, Process validation