

用于多能干细胞产品质控的标准物质

赵翔^{1#} 张震华^{1#} 王健¹ 曾泰¹ 杨翔¹ 曹玉昊¹ 陆中州² 陆敏^{1*}

(¹浙江金时代生物技术有限公司, 湖州 313000; ²Biochemistry and Molecular Biology Department of Eberly College of Science of Pennsylvania State University, PA 16801, USA)

摘要 目前, 多能干细胞产品的临床应用存在缺乏可重复性的问题, 阻碍了多能干细胞研究和临床转化的进程。因此, 利用标准物质确保此类产品的可重复性, 鉴别随着时间推移出现的过程和方法的漂变十分必要, 但对于多能干细胞产品而言, 获得公认的标准物质存在很多困难, 因此, 作者建议首先关注内部的标准物质。该文概述了标准物质在多能干细胞产品研究和临床转化中的重要性, 并对多能干细胞产品的内部标准物质的建立方法进行了评估, 最后探讨了建立分析标准物质的潜在途径, 这可能为漂变的测量及解释提供有效工具。

关键词 标准物质; 多能干细胞; 标准; 临床应用

Reference Materials for Quality Control of Pluripotent Stem Cell-Derived Products

Zhao Xiang^{1#}, Zhang Zhenhua^{1#}, Wang Jian¹, Zeng Tai¹, Yang Xiang¹, Cao Yuhao¹, Lu Zhongzhou², Lu Min^{1*}

(¹Zhejiang Gene Stem Cell Biotech Co., Ltd, Huzhou 313000 China;

²Biochemistry and Molecular Biology Department of Eberly College of Science of Pennsylvania State University, PA 16801, USA)

Abstract Currently, the clinical use of human pluripotent stem cell-derived products (hPSC-derived products) suffers from lacking of reproducibility and consistency, which further impedes the research and clinical translation of such products. Thus, it becomes more necessary for the use of reference materials to ensure the reproducibility and consistency of hPSC-derived products and to identify the drift of process and method over time. Due to the challenge to achieve consensual reference materials, we firstly focused on in-house reference materials. Hereby we outlined the importance of reference materials to hPSC-derived products, assessed the approaches to generate in-house reference materials and discussed the potential routes to achieve reference materials, which might provide valuable tools to measure and interpret the drift of process and method over time.

Keywords reference materials; pluripotent stem cell; standards; clinical applications

干细胞研究是人类医学和生命科学的研究热点, 随着基础研究领域陆续取得突破性进展, 相关临床研究也迅速升温。美国国立卫生研究院管理的临床研究登记系统(<https://www.clinicaltrials.gov/>)数据

显示, 截至2015年7月15日, 全球登记在案的干细胞临床研究共5 069项。其中, 所涉及的疾病类型主要集中在神经系统疾病、心脏疾病、免疫系统疾病、糖尿病、关节炎、外周血管疾病、肝病、肺病等方

收稿日期: 2015-08-19 接受日期: 2015-10-08

国家高技术研究发展计划项目(863计划)(批准号: 2012AA020502)资助的课题

#共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0572-2758801, E-mail: minlu001@yahoo.com

Received: August 19, 2015 Accepted: October 8, 2015

This work was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (Grant No.2012AA020502)

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-572-2758801, E-mail: minlu001@yahoo.com

网络发表时间: 2015-12-14 10:37:49

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20151214.1037.002.html>

面。目前,全球通过严格安全性及有效性审查,并获得上市许可的干细胞产品已有12项。人体多能干细胞作为细胞治疗产品的主要细胞来源,不仅在疾病模拟和药物筛选中的应用越来越受重视,在疾病治疗领域更是备受关注^[1-2]。它在多种疾病损伤中表现出的巨大潜能让众多临床工作者为之振奋,而加快多能干细胞治疗产品临床转化的步伐已成为全人类的共同呼声。

在我国,自2009年5月1日起,干细胞治疗技术因涉及伦理问题,安全性、有效性尚需规范而被列入第三类医疗技术,由卫生部负责技术审定和临床应用管理。但由于相关政策法规及行业标准相对滞后,干细胞临床研究无章可循,影响了干细胞治疗技术的临床转化进程,我国至今尚无获得监管部门正式批准的干细胞产品。2013年3月1日,为进一步规范干细胞临床试验研究活动,加强干细胞临床试验研究管理,促进干细胞治疗技术健康发展,卫生部、国家食品药品监督管理局组织制定了《干细胞临床试验研究管理办法(试行)》、《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行)》和《干细胞临床试验研究基地管理办法(试行)》的征求意见稿。这套制度填补了国内干细胞产业监管的空白,分别针对干细胞临床研究、制剂制备、研究基地管理等不同方面,对干细胞的研究和应用进行了系统规范。截至2015年8月,《干细胞临床研究管理办法(试行)》和《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行)》均已正式发布。

在美国,干细胞产品主要由美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)的生物制品评估研究中心(Center for Biologics Evaluation and Research, CBER)负责审批和管理。在欧盟,干细胞产品属于先进技术治疗医学产品(Advanced Therapy Medicinal Product, ATMP)范围,由欧洲药品管理局(European Medicines Agency, EMA)负责审批和管理。目前,此类产品作为药品来管理,可遵循《药品生产质量管理规范》(Good Manufacturing Practice, GMP)和《药物临床实验质量管理规范》(Good Clinical Practice, GCP)这类标准质量体系的相关内容,以确保产品至少符合(例如卫生、文件的可追溯性、设备校准、终产品的安全性等)最低标准。此外,《药典》中的相关标准也为干细胞产品的管理提供了原材料的质量标准及检测方法以及标准物质的

范围等^[3]。但是,针对干细胞产品这类新兴领域的管制和要求,现有的规范往往无法完全覆盖,参考作用有限。因此,需要能够满足干细胞产品制备及应用要求的特定标准。但是,仅仅有这些书面标准还无法满足干细胞产品临床转化过程中的质量控制要求,特别是无法保证产品的一致性和可重复性。因此,必要的物质标准在质量控制方面扮演着十分重要的角色,它在诸如蛋白质组学、基因组学和代谢组学等快速发展的新兴领域中均必不可少,在干细胞领域亦然^[4]。然而,目前在该领域内对标准物质的关注和讨论较少,又由于多能干细胞产品及方法的多样性决定了不同的产品开发机构对标准物质会有不同的要求,因此,现阶段还没有广泛适用的标准物质。然而,公认的标准物质虽难以获得,但是内部的标准物质对于每一个产品开发机构而言仍是不可或缺的。

1 多能干细胞产品临床转化面临的挑战

多能干细胞产品由于其固有的特点,在临床转化过程中往往会受到很多特有的挑战,包括检测、生产工艺和监管等方面的挑战。首先,与成熟细胞相比,多能干细胞具有自我复制和多向分化的潜能。因此,在产品生产周期中,保持细胞的稳定性(包括遗传稳定性和生理稳定性)至关重要。第二,当终产品为多能干细胞分化后的次级子代细胞,则需要考虑多能干细胞分化为目标细胞的能力,由于多能干细胞的分化往往难以控制,分化后的细胞存在较大异质性^[5]。一些实验结果证明,混合群体来源的人体多能干细胞更有利于获得同一种细胞类型,因为通过多种细胞的相互作用有利于强化单一细胞类型的存活。但是混合群体来源的人体多能干细胞对于控制细胞特性、质量和一致性面临更大的挑战^[1]。第三,人体多能干细胞对外部的培养条件要求很高,不同的外部培养条件、培养时间和冻存条件都会导致细胞产生很大差异^[6-8]。第四,动物模型并不能准确地反映人类疾病。因此,动物的毒性试验结果有时难以用来预测人体的毒性反应^[9]。第五,将人的细胞植入动物体内的临床转化研究难以完全,也不能准确地预测人的细胞在患者身上可能引起的免疫或其他生物学反应。第六,干细胞及其衍生物可能作用于多个靶器官与组织,因此,同时具有好、坏两方面的效应,存在致瘤性等风险^[9]。第七,移植的细胞有

可能在患者体内持续存在很多年, 它们的作用有可能不可逆, 因此, 需要对患者进行长期细致的检查与随访^[9]。第八, 多能干细胞产品的定义和描述较为复杂。例如, 间充质干细胞可从脂肪、脐带、皮肤等多种组织或器官中分离得到, 另外, 即便是同一种来源的间充质干细胞, 若采用不同的方式进行分离和培养也会使其产生异质性, 出现一些功能上存在差异的亚型, 因此, 间充质干细胞目前还缺乏明确的定义和描述^[10]。此外, 正如前言中提及的, 人体多能干细胞产品从审批到监管都面临许多实际的挑战。

2 多能干细胞产品标准物质

2.1 标准的分类

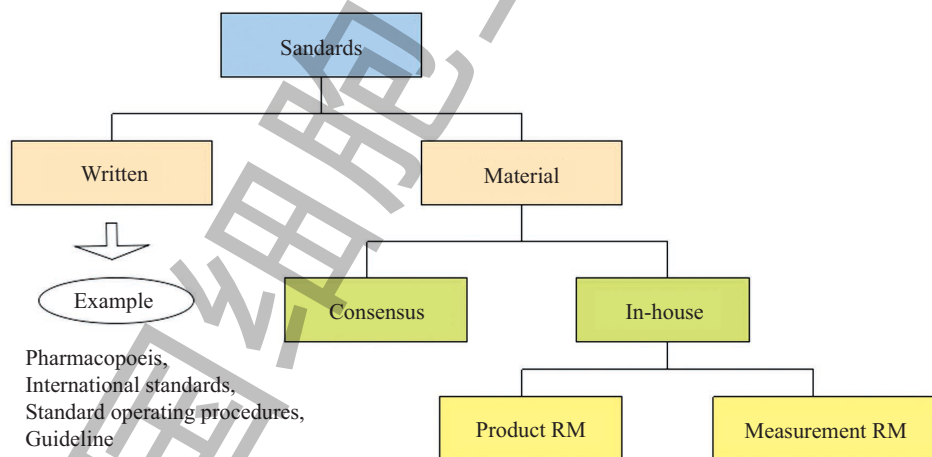
标准可分为两大类, 一类是书面标准, 一类是物质标准(图1)。而物质标准又分为公认的(如有证标准物质)和内部的。有证标准物质在许多生物制品中存在, 例如, 在分子领域中就有利用数字PCR技术对DNA进行绝对定量时使用的有证标准物质^[11]以及用于糖化白蛋白测定的有证标准物质JCCRM611^[12]。但是在多能干细胞产品中有证标准物质几乎不可能存在。国家标准和控制生物研究所

建立了高纯度的CD4⁺细胞的有证标准物质, 应用于临床诊断。这个标准物质由与CD4 FITC抗体结合的外周血单核细胞组成, 与细胞治疗相关^[1]。此类有证标准物质应用于具体的表征方法中, 但无法广泛应用, 特别是在个体化细胞治疗中。因此, 我们仅关注内部的标准物质。

2.2 内部标准物质对多能干细胞产品的重要性

产品的稳定性是产品质量关键所在, 因此关键质量参数的测定是必不可少的。生物制品中的标准物质主要用于生物制品效价、活性或含量的测定, 而由于其固有的特性导致生物制品的功效测定很少存在有证标准物质, 所以此类产品功效的测定主要依赖于内部的产品标准物质。而多能干细胞产品作为一类特殊的生物制品, 其标准物质的获得更加复杂, 因此在多能干细胞产品中几乎不可能存在有证标准物质^[3]。这就要求开发机构不仅要开发一个特定的生产过程, 还要开发特定的能够有效控制产品质量的分析方法。

生物制品中有极少数的有证标准物质可以用于生物功能的分析, 比如世界卫生组织批准了用于一些重组蛋白分析的有证标准物质^[3]。这类标准物



标准有书面形式和物理/物质形式。其中, 书面标准包括药典, 由国际标准组织、欧洲标准委员会等制定的国际标准, 行业或组织机构公认的标准操作规程, 政府机构(如欧洲药品管理局和美国食品药品监督管理局)的行业组发布的指南等。物质标准则包括得到世界卫生组织、美国药典等机构共识的物质标准以及开发机构特定的或地方性的内部物质标准。其中, 内部的物质标准还可以进一步分为用于质量比较目的的产品标准物质以及用于检验分析结果可靠性的分析标准物质。

There are written and physical/material standards. Written standards include pharmacopoeia, International Standards which produced by such as International Standards Organisation and European Committee for Standardization, standard operating procedures which agreed with industry or organizational, guideline from a government agency (European Medicines Agency, US Food and Drug Administration) industry group, and so on. Material standards can be divided into consensus agreed reference material (RM) produced by a recognized body (the World Health Organization, United States Pharmacopoeia) and in-house RM for developer-specific and local. These in-house material standards can be further divided into a product RM, which used for comparative quality purposes, or a measurement RM which used for facilitate the analysis of assay reliability.

图1 标准的分类概述(根据参考文献[1]修改)

Fig.1 Overview of standards (modified from reference [1])

质或许可以用于分析多能干细胞产品中的一些分泌因子或生长因子。但是, 此类分析有赖于校准, 并且无法避免细胞应答所产生的细胞因子对检测结果的干扰。因此, 即便是对多能干细胞产品中的一些非细胞成分进行测定, 内部的产品标准物质也比有证标准物质更可行。

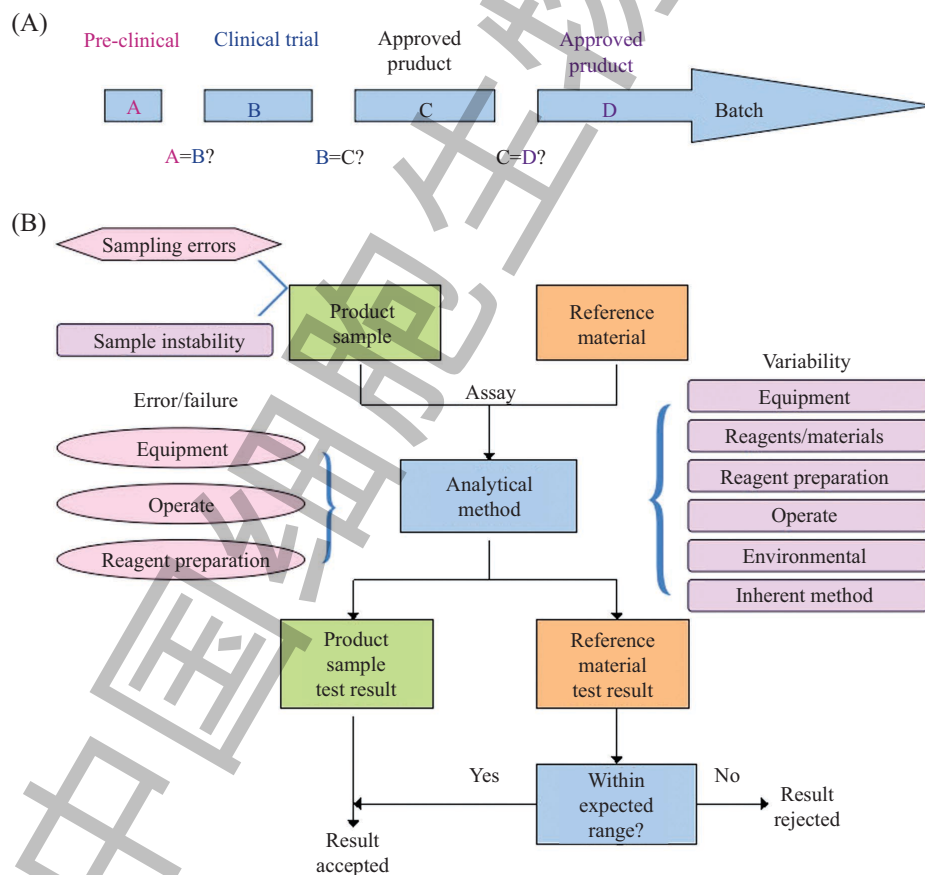
2.3 产品标准物质与分析标准物质

产品标准物质必须对产品具有代表性, 其用途主要包括产品生产过程中的比较评价, 包括工艺的改变和优化、产品稳定性测试、确保产品质量特性的追踪贯穿整个产品生命周期、为早期临床实验阶段到商业阶段建立连接、识别随着时间推移发生的质量工艺漂变等。产品标准物质是确定产品质量, 建立产品间可比性、一致性的关键(图2A), 所以特定的标准物质的设计必须满足产品特性或其生物学活性的需要。由于分析测量的过程具有不确定性和

出现错误的可能性, 因此需要分析标准物质来帮助验证分析结果是否可靠(图2B)。分析标准物质的用途主要包括对具体检测进行确认和验证、定义可接受的检测标准、校正检测方法和设备、系统适应性测试、识别方法漂变等。此类标准物质的选择需要综合考虑被测变量和被测物的性质。

2.3.1 建立产品标准物质的方法 对于多能干细胞产品这类复杂的医疗产品而言, 由于其结构、功能和质量等无法完全确定, 利用产品标准物质来建立产品间的可比性尤为重要。

在医药行业典型的方法是建立主要标准物质和使用产品批次的样品作为二次标准物质, 也叫工作标准物质。工作标准物质是产品生产过程中用于相关测试的样品。一旦某一产品批次的样品用完, 就需要使用其他产品批次的样品作为工作标准物质, 此时, 必须通过与主要标准物质直接比较获得^[1]。

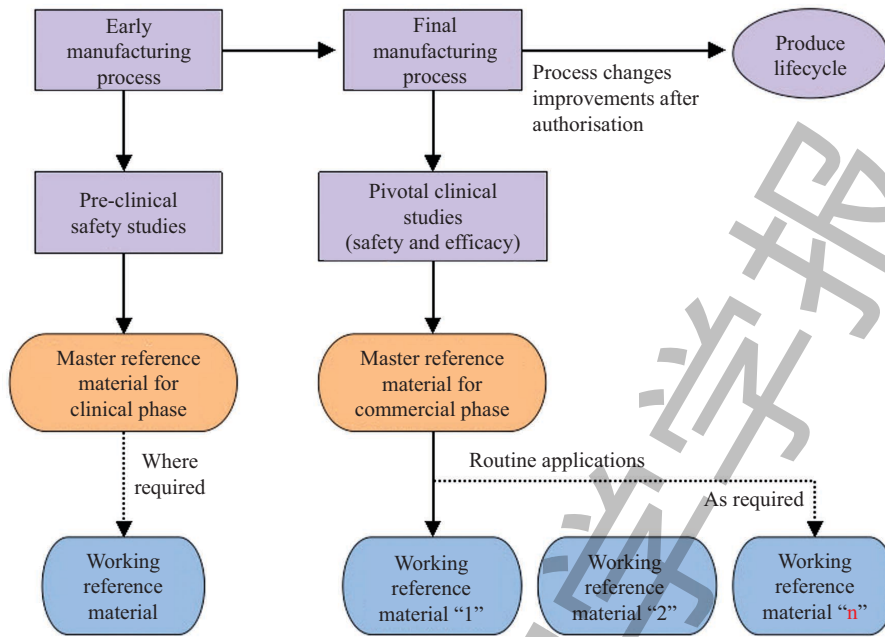


A: 产品标准物质对产品批次物具有代表性, 并能验证整个产品生命周期(包括工艺优化和过程漂变)的可比性评估。B: 分析标准物质是对特定的分析进行验证, 并确定可接受的标准, 进而对分析方法或设备进行校正, 并识别方法漂变。

A: product reference materials should be representative of the product batch material and are used to validate comparability assessments throughout the product's life cycle, including process optimization and drift. B: measurement reference materials are used to validate and define the acceptance criteria for specific assays, to calibrate methods and equipment, and to identify method drift over time.

图2 产品标准物质(A)和分析标准物质(B)(根据参考文献[1]修改)

Fig.2 Product reference materials (A) and measurement reference materials (B) (modified from reference [1])



在早期生产过程中,需从早期产品批次中建立一个主要标准物质用于临床前研究和早期临床安全性研究。在关键研究阶段,从产品批次中建立一个新的主要标准物质,用于证明产品的安全性和有效性,并通过相应的工作标准物质确保整个生产周期的产品质量。

During early manufacturing progress, a product master reference material is prepared from an early batch/es of product used for pre-clinical and early clinical safety studies. During pivotal studies, a new product master reference materials is prepared from batch/es used to demonstrate safety and efficacy. Then some working reference materials are prepared to ensure product quality throughout product life cycle.

图3 建立产品标准物质建的典型方法(根据参考文献[3]修改)

Fig.3 Typical approach taken for product reference materials (modified from reference [3])

理论上,主要标准物质的数量足够满足一个产品整个生产周期的使用(在一些例子中,超过20年)。然而,可能由于主要标准物质的数量不够或稳定性不够,其使用时间可能无法覆盖产品的整个生产周期,此时,就不得不准备新的主要标准物质。因此,可能需要一个早期的主要标准物质,该标准物质需足以用于最初的临床前安全性研究。由此,在最初的安全性数据和最终的商业化过程中建立联系。而在关键的临床研究阶段,需要建立一个新的主要标准物质以确定产品的安全性及有效性。此外,为了降低主要标准物质的需求量,需要建立工作标准物质用以替代主要标准物质,作为日常使用(图3)^[3]。

第二个获得产品标准物质的方法是集合法,即将不同批次的细胞产品集合起来。如果标准物质通过集合法获得,产品由于细胞异质性导致的差异就可被平均化,这类生物等效细胞群在很多情况下都可作为产品标准物质^[1]。例如,如果CD4⁺ T淋巴细胞来源于人体多能干细胞系,那么来源于健康捐赠者的CD4⁺ T淋巴细胞即可作为产品标准物质。尽管这种方法比较实用,但可能只适合从健康捐赠者中获得的细胞类型,此外,要认识到生物等效标准物质

的一致性尚需进一步分析和考虑^[1]。

判断这些方法获得标准物质是否适合,需要考虑稳定性、可行性以及所需费用等问题。比如制备细胞的培养基,使用无血清的比有血清的费用高出10倍左右^[10]。而稳定性则需要长期进行监控,从而建立稳定性文件,以便标准物质在用之前准备。由于人体多能干细胞产品每一批次产品数量比其他生物制剂少,用于储存为标准物质的数量受到限制。因此,标准物质的数量需要生产机构根据实际情况确定。而对于细胞标准物质而言,必须冷冻保存,但冷冻会影响细胞产品的功效和活性,这是使用时必须保持细胞活性的产品需要解决的另一个关键问题。

2.3.2 建立分析标准物质的方法 细胞系在一些情况下可作为有效的分析标准物质。例如胚胎癌细胞系2102Ep,尽管人体胚胎干细胞和胚胎癌细胞系之间存在一些生物学的差异,这个细胞系仍然被用于流式细胞术检测,以分析人体胚胎干细胞的特征^[13-15]。如果能获得合适的细胞系作为标准物质,这一方法可能同样适用于其他已分化的细胞类型。但由于细胞系的获得会影响细胞信号通路和表型特征,因此,细胞系作为分析标准物质是否适合需

要根据具体情况确定。同时,我们必须认识到细胞系作为分析标准物质还需要一系列的检查和验证。

非细胞的分析标准物质主要包括固定细胞、磁珠、DNA/RNA样品和细胞因子。固定细胞作为标准物质可用于比较细胞表面标记物的表达,如临床使用CD4⁺ T细胞进行人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)检测和异质性评价^[1]。然而,细胞固定的过程会改变细胞特性,从而对其作为分析标准物质产生不利影响。磁珠作为标准物质常用于流式检测的校正和荧光补偿的设定。但磁珠标准物质存在稳定性问题,需要与细胞类标准物质结合使用。分子标准物质稳定性好,容易保存,易于大量获得,一般情况下,用于分子评价的分析标准物质从产品的样品中就可获得。采用半定量方法检测基因表达时,由于常作为阳性对照的管家基因的表达量会随着人体多能干细胞分化状态发生变化^[16-17]。所以,对于多能干细胞而言,半定量方法缺少合适的阳性对照。而芯片分析又无法检测关键基因的拼接转录情况,因此,可以鉴定拼接转录和基因转录绝对量的RNA测序越来越受欢迎。这一方法存在的问题是不同实验室的测序结果差异较大,必须通过测序方法标准化来解决,这也证明需要建立标准物质来确保实验的可比性。目前,已有一些细胞因子的有证标准物质,比如用于校正酶联免疫吸附试验的细胞因子。虽然细胞因子标准物质可以用于制作标准曲线,从而获得实验细胞因子的浓度,但此类标准物质不能用于存在细胞因子释放的实验。

选择分析标准物质时必须清楚其使用目的,以及物质特性。例如,在进行酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)时,与一个糖基化的重组蛋白标准物质相比,一个糖基化的天然蛋白可能会影响它与抗体的结合,导致绝对定量不准确。但是如果把一个标准物质作为指定的生物活性单位,那么由于检测结果是一个相对值(相对于标准物质),无论检测蛋白是否被糖基化,都不会影响检测结果。因此,即便是内部标准物质,也应当有一个证书,说明它的计量学溯源以及预期用途。在使用时,任何一种分析标准物质,都能在内部作为“共同单位”用于相对测定,也可经过实验室之间的合作研究及认证后,在这些实验室中使用,但是使用时为了保证可比性,必须采用相同的测定方

式^[3]。韩国一项实验室之间的协作研究发现,相比琼脂覆盖法,菌斑染色法更适用于对水痘疫苗进行病毒检测,从而促进了这类病毒测定方式的标准化^[18]。而对于“生物活性”这样无法定义的检测中,如果测定方式改变,必须有大量数据证明两种方式是等价的,如果两种方法缺乏可比性,就认为检测无效。近期,日本的一项研究发现,由于缺乏明确的标准物质,不同实验室对于人类T淋巴细胞白血病-1型病毒(human T-lymphotropic virus 1, HTLV-1)的定量PCR结果相差可达5倍,最后,实验通过与其他两种不同检测方法相比较,证明了一种来自成人T细胞白血病的TL-Om1细胞可作为HTLV-1定量PCR的标准物质^[19]。

3 讨论

人体多能干细胞产品实现临床转化受到多方面因素的制约,其中,包括如何确保产品的稳定性和一致性;如何验证产品检测结果的可靠性;如何在产品之间以及分析检测结果之间建立可比性等。而建立产品标准物质和分析标准物质分别为解决这些问题提供了可行的办法。本文详细介绍了这两类标准物质在人体多能干细胞产品生产及检测过程中发挥的作用,并分别描述了建立产品标准物质和分析标准物质的一些方法,为进一步实施提供思路。

人体多能干细胞产品中含有活细胞,而由于活细胞的不稳定性和异质性以及细胞对环境的应答能力,使得建立此类产品的标准物质面临一些独特的挑战。非细胞的标准物质虽然存在一些优势,但也存在亟待解决的问题以及局限性。人体多能干细胞产品的生物功能分析依赖于活细胞的活动^[20],但是活细胞作为标准物质存在两个主要问题。首先,由于标准物质和产品都需要冷冻保存,因此会对这些细胞的稳定性产生影响。其次,需判断所需标准物质的数量,使其符合预期生产要求,特别是主要标准物质,否则可能出现重新建立的标准物质缺乏可比性的问题。因此,人体多能干细胞产品标准物质的建立需要更多的创新思维,而且适用的方法也需要根据具体的产品和临床应用目的确定,具有复杂性和独特性。

此外,一旦产品/分析标准物质建立后,还需考虑如何获取和处理数据。多能干细胞产品目前很难建立公认的标准物质,本文主要讨论内部标准物质。但是,通过公共出版物快速传播内部标准物质的相关研究,可以合理利用现有的数据资源建立一个公

共数据库, 供相关的研发及生产机构下载。而研发和生产机构也可以将内部数据与公共数据库的数据进行比较, 并提供对比数据。这将有利于促进不同利益相关者开展对话, 并不断丰富数据资源, 最终实现相关资源的集中与共享, 促进多能干细胞产品相关标准物质的进一步开发。

参考文献 (References)

- 1 French A, Bravery C, Smith J, Chandra A, Archibald P, Gold JD, *et al.* Enabling consistency in pluripotent stem cell-derived products for research and development and clinical applications through material standards. *Stem Cells Transl Med* 2015; 4(3): 217-23.
- 2 Engle SJ, Puppala D. Integrating human pluripotent stem cells into drug development. *Cell Stem Cell* 2013; 12(6): 669-77.
- 3 Bravery CA, French A. Reference materials for cellular therapeutics. *Cytotherapy* 2014; 16(9): 1187-96.
- 4 Kielbasa A, Gadzala-Kopciuch R, Buszewski B. Reference materials-significance, general requirements and demand. *Crit Rev Anal Chem* 2015.
- 5 Narsinh KH, Sun N, Sanchez-Freire V, Lee AS, Almeida P, Hu S, *et al.* Single cell transcriptional profiling reveals heterogeneity of human induced pluripotent stem cells. *J Clin Invest* 2011; 121(3): 1217-21.
- 6 Akopian V, Andrews PW, Beil S, Benvenisty N, Brehm J, Christie M, *et al.* Comparison of defined culture systems for feeder cell free propagation of human embryonic stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2010; 46(3/4): 247-58.
- 7 Ams K, Andrews PW, Anyfantis G, Armstrong L, Avery S, Baharvand H, *et al.* Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. *Nat Biotechnol* 2011; 29(12): 1132-44.
- 8 Enver T, Soneji S, Joshi C, Brown J, Iborra F, Orntoft T, *et al.* Cellular differentiation hierarchies in normal and culture adapted human embryonic stem cells. *Hum Mol Genet* 2005; 14(21): 3129-40.
- 9 Guidelines for the clinical translation of stem cells. International Society for Stem Cell Research 2008.
- 10 Viswanathan SL, Keating A, Deans R, Hematti P, Prockop D, Stroncek DF, *et al.* Soliciting strategies for developing cell-based reference materials to advance mesenchymal stromal cell research and clinical translation. *Stem Cells Dev* 2014; 23(11): 1157-67.
- 11 Corbisier P, Pinheiro L, Mazoua S, Kortekaas AM, Chung PY, Gerganova T, *et al.* DNA copy number concentration measured by digital and droplet digital quantitative PCR using certified reference materials. *Anal Bioanal Chem* 2015; 407(7): 1831-40.
- 12 Takei I, Hoshino T, Tominaga M, Ishibashi M, Kuwa K, Umemoto M, *et al.* Annals express: Committee on diabetes mellitus indices (DMI committee) of the Japan society of clinical chemistry (JSCC) recommended reference measurement procedure and reference materials for glycosylated albumin determination. *Ann Clin Biochem* 2015.
- 13 Loring JF, Rao MS. Establishing standards for the characterization of human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2006; 24(1): 145-50.
- 14 Adewumi O, Aflatoonian B, Ahrlund-Richter L, Amit M, Andrews PW, Beighton G, *et al.* Characterization of human embryonic stem cell lines by the international stem cell initiative. *Nat Biotechnol* 2007; 25: 803-16.
- 15 Josephson R, Ording CJ, Liu Y, Shin S, Lakshminpathy U, Toumadje A, *et al.* Qualification of embryonal carcinoma 2102Ep as a reference for human embryonic stem cell research. *Stem Cells* 2007; 25(2): 437-46.
- 16 Murphy CL, Polak JM. Differentiating embryonic stem cells: GAPDH, but neither HPRT nor beta tubulin is suitable as an internal standard for measuring RNA levels. *Tissue Eng* 2002; 8(4): 551-9.
- 17 Zhai Z, Yao Y, Wang Y. Importance of suitable reference gene selection for quantitative RT-PCR during ATDC5 cells chondrocyte differentiation. *PLoS One* 2013; 8(5): e64786.
- 18 Hong J, Oh HJ, Lee N, Kim DK, Yoon HS, Kim YT, *et al.* Standardization of the methods and reference materials used to assess virus content in varicella vaccines. *Virology* 2015; 12: 101.
- 19 Kuramitsu M, Okuma K, Yamagishi M, Yamochi T, Firouzi S, Momose H, *et al.* Identification of TL-Om1, an adult T-cell leukemia (ATL) cell line, as reference material for quantitative PCR for human T-lymphotropic virus 1. *J Clin Microbiol* 2015; 53(2): 587-96.
- 20 Bravery CA, Carmen J, Fong T, Oprea W, Hoogendoorn KH, Woda J, *et al.* Potency assay development for cellular therapy products: An ISCT review of the requirements and experiences in the industry. *Cytotherapy* 2013; 15(1): 9-19.