



团 体 标 准

T/CSCB 0015—2022

人干细胞来源细胞外囊泡制备通用要求

General requirements for production of extracellular vesicles derived from
human stem cells

中国细胞生物学学会
CHINESE SOCIETY FOR CELL BIOLOGY

2022-08-30 发布

2022-10-31 实施

中国细胞生物学学会 发布
中国标准出版社 出版



中国细胞生物学学会
CHINESE SOCIETY FOR CELL BIOLOGY

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。

本文件由中国细胞生物学学会干细胞生物学分会提出。

本文件由中国细胞生物学学会归口。

本文件起草单位：中山大学、空军军医大学、海军军医大学、中国科学院动物研究所、北京干细胞与再生医学研究院、国家干细胞资源库、北京工商大学、复旦大学附属中山医院、中国标准化研究院、中山大学中山医学院、西北工业大学、国家干细胞资源转化库、海门生原干细胞科技有限公司、广西大学、复旦大学、中国干细胞与再生医学协同创新平台、中国合格评定国家认可中心、中国医学科学院血液学研究所血液病医院、北京泽辉辰星生物科技有限公司、中国食品药品检定研究院、上海干细胞转化医学工程技术研究中心、上海交通大学、陆军军医大学、国家呼吸系统疾病临床医学研究中心（广州医科大学附属第一医院）、中国科学技术信息研究所、中国计量科学研究院、中国科学院苏州生物医学工程技术研究所、广州复能基因有限公司、西比曼生物科技集团、江苏易诺维生物医学研究院、上海金卫医学检验技术有限公司、上海赛立维生物科技有限公司、原能细胞集团、广东博溪生物科技有限公司、生物角（厦门）科技有限公司。

本文件主要起草人：柳夏林、金岩、王越、赵同标、郝捷、马爱进、李卡、王长林、曹楠、王灵、赵云鹏、刘世宇、胡成虎、贾文文、项鹏、刘厚奇、齐忠权、朱宁文、梁灵敏、曹佳妮、王磊、翟培军、周家喜、魏军、纳涛、吴骏、何志颖、周广东、俞卫锋、吴金燕、曾文、张勇、朱礼军、傅博强、张京钟、杨淑伟、戴成祥、崔恒苾、经建中、鄢和新、何晓文、卢永波、全彩玲。

CHINESE SOCIETY FOR CELL BIOLOGY



中国细胞生物学学会
CHINESE SOCIETY FOR CELL BIOLOGY

人干细胞来源细胞外囊泡制备通用要求

1 范围

本文件规定了人干细胞来源细胞外囊泡制备的一般要求、过程要求、包装和标识要求、储存要求,描述了相应的证实方法。

本文件适用于人胚干细胞、人间充质干细胞、人诱导多能干细胞等人干细胞来源的细胞外囊泡的研究和生产。

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。

T/CSCB 0001—2020 干细胞通用要求

T/CSCB 0002—2020 人胚干细胞

T/CSCB 0003—2020 人间充质干细胞

T/CSCB 0005—2020 人诱导多能干细胞

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

细胞外囊泡 **extracellular vesicle**

细胞(自发或诱导)分泌的具有脂质双层膜结构且不能进行自我复制的颗粒。

注:包括外泌体、微囊泡、凋亡小体等。

3.2

原液 **bulk**

干细胞经特定培养后,用作制备细胞外囊泡的培养上清液。

注:原液可由一次或多次收集而得。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

EBV:人类疱疹病毒(Epstein-Barr Virus)

HBV:乙型肝炎病毒(Hepatitis B Virus)

HCMV:人巨细胞病毒(Human Cytomegalovirus)

HCV:丙型肝炎病毒(Hepatitis C Virus)

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

HTLV:人类嗜T细胞病毒(Human T-lymphotropic Virus)

TP:梅毒螺旋体(Treponema Pallidum)

5 一般要求

5.1 人干细胞来源细胞外囊泡制备全程应通过伦理委员会审查并符合生物安全操作规范。

注：干细胞来源细胞外囊泡的制备过程主要包括干细胞的采集与接收、干细胞的扩增与诱导、原液收获、细胞外囊泡的分离与浓缩和细胞外囊泡的收获。

5.2 人干细胞来源细胞外囊泡制备所需要的基础设施和环境条件应符合生物安全的要求，应满足产品质量控制需要的洁净条件并避免微生物污染和交叉污染。

5.3 根据细胞外囊泡的制备流程，宜分别设立所用干细胞的初级细胞库、主细胞库和工作细胞库。

注 1：初级细胞库贮存性质均一旦适用于细胞外囊泡制备的分装细胞群体。

注 2：主细胞库贮存由初级细胞库细胞培养至特定倍增水平的分装细胞群体。

注 3：工作细胞库贮存由主细胞库细胞培养至特定倍增水平的分装细胞群体。

5.4 干细胞来源细胞外囊泡制备全程应确保所用的试剂和耗材，如培养液、消化液、重悬液、洗脱液、离心管、冻存管等，均符合无菌、无病毒、无支原体及低内毒素的要求，如有需要，应采用经过验证的工艺进行消毒处理，并建立相关的质量保证程序。

5.5 干细胞来源细胞外囊泡制备过程结束后应及时进行包装、标识及储存。

6 过程要求

6.1 干细胞的采集与接收

6.1.1 干细胞的采集

采集干细胞用于细胞外囊泡制备之前，应获得伦理批件和知情同意书，完成既往病史、家族史和当前健康报告。其中传染病检测内容包括但不限于 HBV、HCV、HIV、HTLV、EBV、HCMV 和 TP，必要时还应包括出入疫区等其他情况的报告。

6.1.2 干细胞的接收

接收干细胞用于细胞外囊泡制备前，应查验伦理批件、知情同意书、细胞系来源、分离方法等资料。

6.2 干细胞的扩增与诱导

6.2.1 干细胞的扩增应在 A 级洁净级别的环境(参见附录 A)中进行，拟用于制备细胞外囊泡的人干细胞应检测真菌、细菌、支原体、HBV、HCV、HIV、HTLV、EBV、HCMV 和 TP。异体生产用途的干细胞应保证无上述病原微生物污染，自体生产用途的干细胞应保证无真菌、细菌、支原体污染，涉及传染性病毒检测阳性的自体用途干细胞应在感染性样本操作区进行操作，在操作完毕后彻底清场，并确认无该次操作残留感染风险物后方可进行后续其他操作。

6.2.2 拟用于制备细胞外囊泡的人干细胞在扩增后应根据细胞类型不同，按照 T/CSCB 0001—2020、T/CSCB 0002—2020、T/CSCB 0003—2020、T/CSCB 0005—2020 等标准进行关键质量属性的测定。

6.2.3 用于细胞外囊泡制备的干细胞应按照经过验证的标准操作程序进行培养扩增。

6.3 原液收获

6.3.1 在干细胞培养至稳定生长阶段后，通过清洗和更换专用培养基，并根据细胞生长状态定期收获原液。操作规程可参见附录 B。

6.3.2 原液收获过程宜使用成分明确的培养基,不宜使用动物血清、血小板裂解液等成分尚不明确的物质,临床试验用途的细胞外囊泡在原液收获阶段不得使用成分尚不明确的物质。如在原液收获阶段的培养基中使用成分没有完全明确的试剂(如动物血清、血小板裂解液、垂体提取物等)时,应考虑相关试剂可能造成的影响,宜提前去除相关试剂中存在的细胞外囊泡。

6.3.3 原液应在无菌条件下分装到无菌、无病毒、无支原体及低内毒素的容器中,在 4 °C 环境下保存时间不应超过 48 h,长期保存应在低于-80 °C 环境下进行储存,并且避免反复冻融。

6.4 细胞外囊泡的分离与浓缩

6.4.1 对原液进行分离、浓缩获取细胞外囊泡的方法包括但不限于差速离心法、聚乙二醇沉淀法、密度梯度离心法、尺寸排阻色谱法、超滤法、免疫亲和法、阴离子交换法等方法,操作过程中应当尽量避免引入异源性物质。

6.4.2 细胞外囊泡的分离与浓缩应建立有明确的过程控制参数,以保证细胞外囊泡制剂安全有效和稳定可控。其中,使用差速离心法分离细胞外囊泡操作规程可参见附录 B。

6.4.3 细胞外囊泡的分离与浓缩过程应对微生物及其他可能的污染进行控制。

6.5 细胞外囊泡的收获

应建立经验证的操作程序,使用的试剂应成分明确。

7 包装和标识要求

7.1 应在与制备环境相同的条件下进行包装,包装材料和容器应对干细胞来源细胞外囊泡关键质量无影响,并建立经验证的操作程序。

7.2 每个最小包装应有唯一标识,并保证可追溯性,标识应至少包括以下内容:

- a) 产品名称;
- b) 来源细胞名称、代次;
- c) 产品体积,细胞外囊泡浓度;
- d) 生产组织;
- e) 生产日期;
- f) 生产批号;
- g) 储存条件。

8 储存要求

包装后的干细胞来源细胞外囊泡制备产品在 4 °C 环境下保存时间不应超过 48 h,长期保存宜在-80 °C 环境下进行,避免反复冻融。

9 信息和数据管理

9.1 应建立全程可追溯的信息系统,记录干细胞以及细胞外囊泡的制备、包装、标识和储存全过程,保存时间不少于 10 年。

9.2 当采用基因转染等细胞重编程技术诱导的干细胞用于细胞外囊泡制备时,应记录构建及筛选手段、克隆基因序列、插入基因组位置,并明确载体引入细胞的方法及载体的状态和拷贝数。

9.3 干细胞来源细胞外囊泡的制备过程中应予以记录,记录的要素包括但不限于以下内容:

- a) 批次编号；
 - b) 来源于细胞的背景资料,如供者信息、细胞系来源、分离方法、培养历史等；
 - c) 干细胞的关键质量属性,如微生物检测结果、细胞形态、染色体核型、细胞存活率、细胞标志蛋白等；
 - d) 操作人员与仪器设备；
 - e) 制备过程中涉及试剂耗材的关键信息,如名称、货号、批号等；
 - f) 主要制备工序与制备参数；
 - g) 环境参数,如温度、湿度、洁净程度等；
 - h) 制备工序实施日期。
- 9.4 干细胞来源细胞外囊泡的包装和标识应及时记录,相关信息应双人复核。
- 9.5 干细胞来源细胞外囊泡制备产品的入库和出库应建立台账,进行记录留档。



附 录 A

(资料性)

A 级洁净区主要参数

- A.1 洁净操作区的空气温度应为 20℃~24℃。
- A.2 洁净操作区的空气相对湿度应为 45%~60%。
- A.3 操作区的风速:水平风速 ≥ 0.54 m/s;垂直风速 ≥ 0.36 m/s。
- A.4 高效过滤器的检漏 $> 99.97\%$ 。
- A.5 照度: > 300 lx~600 lx。
- A.6 噪声: ≤ 75 db(动态测试)。



附 录 B

(资料性)

人干细胞来源细胞外囊泡的制备操作规程示例

示例：

文件名称	人干细胞来源细胞外囊泡的 制备标准操作规程			编号			
起草人		日期		审核人		日期	
批准人		日期		生效日期		1/4 页	
分发部门							
<p>一、目的:保证细胞外囊泡制备安全有效进行</p> <p>二、责任人:实验室细胞培养人员</p> <p>三、范围:细胞外囊泡的制备</p> <p>四、内容:</p> <p>1. 前期准备</p> <p>1.1 准备工作:打开净化工作台紫外灯照射 30 min 后关闭紫外灯,打开风机,风吹 10 min。</p> <p>1.2 试剂:α-MEM、生理盐水、胎牛血清、无血清专用培养基。</p> <p>1.3 耗材:15 mL 离心管、50 mL 离心管、离心管架、T75 细胞培养瓶、十层工厂、10 mL 刻度吸管、移液器、10 μL 移液枪、20 μL 移液枪、200 μL 移液枪、500 mL 无菌瓶、打火机、酒精灯、试剂瓶架、污缸、记号笔、棉球缸、酒精喷壶、手推车。</p> <p>2. 原液收获</p> <p>细胞生长 3 d~4 d 融合至 80%~90%时,将培养细胞用 500 mL 的磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗涤 2 次,洗涤过程轻微晃动,细胞不能漂浮,后加入 500 mL 的专用培养基(洗涤、加液操作需在 6 min 内完成),置于细胞培养箱内,接入通气装置后继续培养 48 h,收集培养液上清。</p> <p>3. 细胞外囊泡的分离与纯化</p> <p>收集上述细胞上清液;4 $^{\circ}$C 环境下 300g 离心 10 min,取离心后的上清液;4 $^{\circ}$C 环境下 2 000g 离心 10 min,取离心后的上清液;4 $^{\circ}$C 环境下 10 000g 离心 30 min,取离心后的上清液;4 $^{\circ}$C 环境下 100 000g 离心 70 min;弃上清,取沉淀,使用 PBS 进行重悬,4 $^{\circ}$C 环境下 100 000g 离心 70 min,取沉淀。</p> <p>4. 细胞外囊泡的收获</p> <p>4.1 使用 PBS 进行重悬收获细胞外囊泡。</p> <p>4.2 从中取出 1 mL 液体,检测蛋白浓度、颗粒浓度、粒径分布等关键质量参数。</p> <p>5. 包装和标识</p> <p>收获的细胞外囊泡用无菌瓶进行分装,标记批次、代次、日期等关键信息。</p> <p>6. 储存</p> <p>产品暂存于 4 $^{\circ}$C 冰箱中(不超过 48 h)或 -80 $^{\circ}$C 冰箱。</p> <p>7. 信息储存</p> <p>干细胞来源细胞外囊泡制备的记录内容应保存不少于 10 年。</p>							

参 考 文 献

- [1] 中国医药生物技术协会.干细胞制剂制备质量管理自律规范
- [2] Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines
-

