

团 体 标 准

T/LTIA 10—2020

人脐带间充质干细胞冻干粉 制备规范

Regulations for Preparation of Lyophilized Powder from Human Umbilical Cord
Mesenchymal Stem Cell

2020 - 07 - 27 发布

2020 - 08 - 27 实施

深圳市生命科技产学研资联盟

目 录

目 录.....	I
前 言.....	II
脐带间充质干细胞冻干粉制备技术规范.....	1
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语、定义和缩略语.....	1
3.1 术语和定义.....	1
4. 缩略语.....	2
5. 质量要求.....	3
5.1 脐带来源.....	3
5.1.1 供者筛查.....	3
5.1.2 签署知情同意.....	3
5.1.3 隐私保护措施.....	4
5.1.4 人员资质.....	4
5.1.5 供者样本检测.....	4
5.2 脐带间充质干细胞生产质量控制.....	4
5.2.1 生产制备中质控点.....	4
5.2.2 冻存.....	5
5.2.3 复苏.....	5
5.3 脐带间充质干细胞检测指标.....	5
5.4 脐带间充质干细胞冻干粉制备.....	6
5.4.1 原料的准备工作.....	6
5.4.2 胶塞的洗涤灭菌与干燥.....	6
5.4.3 西林瓶的清洗和灭菌.....	7
5.4.4 铝盖的准备.....	7
5.4.5 冻干要求.....	8
5.4.6 冻干粉制备.....	8
5.5 脐带间充质干细胞冻干粉放行标准.....	9
参考文献.....	10

前 言

本标准编写格式遵循了 GB/T 1.1-2020 给出的规则编写。

本标准由深圳市新一仓生物科技有限公司提出。

本标准由深圳市生命科技产学研资联盟归口。

本标准主要起草单位：深圳新一仓生物科技有限公司、湖北省中枢神经系统肿瘤发生与干预重点实验室、湖北圣惠康生物科技有限公司、河南圣德生物科技有限公司。

本标准主要起草人：刁波、刘跃平、刘莹、杨前、陈力、林虹、罗青云。

本标准属首次发布。

人脐带间充质干细胞冻干粉制备技术规范

1 范围

本标准规定了脐带间充质干细胞冻干粉生产制备、保存和检验、放行各个环节的技术质量要求。

本标准适用于培养人脐带间充质干细胞培养制备及临床科学研究等方面。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 18467-2011 《献血者健康检查要求》

DB33/T 2030-2017 《人间充质干细胞库建设与管理规范》

SZTT/SSCT 002-2018 《人脐带来源间充质干细胞制剂规范》

T11/CSSCR 001-2017 《干细胞通用要求》

《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)》

《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则》

《药品生产质量管理规范》

《中华人民共和国药典》

《中国药品检验标准操作规程》(2010版)

3 术语与定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

间充质干细胞(mesenchymal stem cells)

一类存在于多种组织（脐带，胎盘，骨髓，脂肪等）具有多向分化潜力，非造血干细胞的成体干细胞。这类干细胞具有多种间充质系列细胞（如成骨、成软骨及成脂肪细胞等）或非间充质系列细胞分化的潜能，并具有独特的细胞因子分泌功能。

3.2

冻干粉(lyophilized powder)

是指在无菌环境下将溶液冷冻成固态，抽真空将水分升华干燥而成的无菌粉末状固体。

3.3

病原体(pathogens)

可造成人体或动植物感染疾病的微生物（包括细菌、病毒、立克次氏体、真菌、寄生虫等）。

3.4

分化(differentiation)

指干细胞逐渐产生出形态结构、功能特征各不相同的细胞类群（如软骨细胞、脂肪细胞等）的过程。

3.5

程控降温 (programmed cooling)

用电脑程序控制液氮对样本进行程序性降温冷冻的仪器称之为程控降温仪。

3.6

GMP实验室 (GMP laboratory)

指根据GMP（药品生产管理质量规范）要求去运营和约束的洁净实验室。

4 缩略词

本文件中的缩略词见表1。

表 1. 适用于本文件的缩略语

缩写	英文全称	名称
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附剂测定方法
CD	Cluster of Differentiation	细胞膜表面分化抗原簇
MSC	Mesenchymal stem cells	间充质干细胞

HBsAg	Hepatitis B surface antigen	乙型肝炎表面抗原
HBsAb	Hepatitis B surface antibody	乙型肝炎表面抗体
HBeAg	Hepatitis B e antigen	乙型肝炎e抗原
HBeAb	Hepatitis B e antibody	乙型肝炎e抗体
HBcAb	Hepatitis B core antibody	乙型肝炎核心抗体
TP-Ab	Treponema pallidum antibody	梅毒螺旋体抗体
HIV	Human Immunodeficiency Virus	人类免疫缺陷病毒
HBV	Hepatitis type B virus	乙型肝炎病毒
HCV	Hepatitis type C virus	丙型肝炎病毒
HTLV	Human T-lymphotropic virus	人类嗜T细胞病毒
EBV	Epstein-Bar virus	EB病毒
CMV-IgM	Cytomegaoviyns-immunogloblin M	巨细胞病毒IgM抗体
HLA-DR	Human leukocyte antigen DR isotype	人类白细胞抗原-DR
IgM-Ab	IgM antibody	IgM抗体
IgG-Ab	IgG antibody	IgG抗体
NMPA	National Medical Products Administration	国家药品监督管理局

5. 质量要求

5.1 脐带来源

5.1.1 供者筛查

应依据GB 18467-2011《献血者健康检查要求》中第六章《献血者健康征询》中的相关规定进行来源组织的供者筛查，对供者的疾病史、家族遗传病史、疫苗接种史、疫区居住史等进行问询，并签署知情同意书及供者筛查表做好初步筛查工作。

5.1.2 签署知情同意

实验室工作人员应当对风险及收益进行有效评估，确保样本提供者或其近亲属对项目信息充分知情、形成全面和准确的认识，自愿做出是否同意放弃脐带样本的决定，并签署知情同意书。

5.1.3 隐私保护措施

研究人员、医务人员、应当对样本提供者的个人信息采取保密措施，防止有意或意外泄露，若确需提供信息，需要经有关申请程序并提交伦理委员会批准同意后方可实施。

5.1.4 人员资质

该标准所涉及对样品及相关产品的负责人员应在本领域工作5-10年，取得中级及以上职称。相关操作技术人员需经负责人授权并经过相关操作培训，考核合格后方可操作。

5.1.5 供者样本检测

应依据《人间充质干细胞库建设与管理规范》中参考标准的要求，完成以下病原体检测项目，结果均应符合表2要求：

表 2 供者样本病原体检测项目

乙型肝炎表面抗原：HBsAg	阴性
乙型肝炎 e 抗原：HBeAg	阴性
乙型肝炎 e 抗体；HBeAb	阴性
乙型肝炎核心抗体：HBcAb	阴性
丙型肝炎核酸 RNA 检测；HCV	阴性
梅毒螺旋体抗体：TP-Ab	阴性
艾滋病病毒抗体及抗原初筛：HIV Ag/Ab	阴性
巨细胞病毒：CMV-IgM	阴性
新冠肺炎核酸检测	阴性
新冠肺炎 IgM-Ab	阴性
新冠肺炎 IgG-Ab	阴性

5.2 脐带间充质干细胞生产质量控制

5.2.1 生产制备中质控点

5.2.1.1 脐带采集

5.2.1.1.1 胎儿分娩后，在距胎儿脐部（5-8）cm 处，用止血钳分别夹住脐带上下两端，消毒剂消毒脐带。

5.2.1.1.2 用消毒剪刀于两钳中间断脐，截取至少 15 cm 无针孔的脐带置于无菌采集瓶中，同时加入保存液以浸没脐带组织。贴条码作为唯一标识。

5.2.1.1.3 脐带的两端需要用手术线结扎。

5.2.1.2. **脐带运输：**新鲜脐带组织应来源于妇产科健康孕妇产后采集，采集时间不能超过 30 分钟（2-8）℃保存在采集套装中。

5.2.1.3 **制备环境：**脐带的所有处理过程均需在生物制药级别 GMP 实验室中进行。

5.2.1.4 **物料及试剂要求：**实验前应检查所用试剂，抽检应符合表 3 要求。

表 3. 本文件适用的检测项目及其对应要求

检查项目	要求
细胞培养系列产品效期	开封之后尽快使用完毕
细胞培养系列产品资质	NMPA 认证
pH 变化	pH 值浮动应小于 5%

5.2.2 冻存

使用的脐带间充干细胞冷冻保护剂具有 CFDA 认证的临床资质标准的试剂，对人体无毒副作用和不损伤细胞自身机能。细胞经程控降温仪按照程序降温的原则进行降温完成后，需转入液氮罐中长久保存。

5.2.3 复苏

细胞复苏时需在 37℃ 水浴中快速复苏，复苏时间应控制在一分钟之内且细胞存活率应不低于 95%。

5.3 脐带间充质干细胞检测指标

表 4 脐带间充质干细胞检测指标

质量指标	最低标准	检验方法
细胞形态	悬浮状态下, 细胞大小均一, 形态规则, 胞膜完整, 透光度好	显微镜观察
细胞冻存	冻存细胞数 1×10^8 , 细胞存活率不低于 90%	台盼蓝拒染法
三系分化能力	在体外条件培养基诱导培养下, 能够分化成脂肪、成骨和软骨细胞	采用国际惯用 (条件培养基) 方法
微生物检测	细菌和真菌应为阴性	参照《中华人民共和国药典》四部通则 无菌检查法进行
细胞表型	CD90、CD73 +、CD105 +、CD29 + 阳性率不 低于 95% CD45 -、CD34 -、CD79a、HLA-DR、CD31 阳 性率不高于 2%	采用流式细胞术测定
支原体	结果应为阴性	参照《中华人民共和国药典》四部通则 3301 支原体检查法执行
内毒素	$\leq 0.5 \text{ EU/ml}$	参照《中国药品检验标准操作规程》 (2010 版) 细菌内毒素检查法执行
病毒检测	抗原检测应为阴性: HBsAg 抗体检测应为阴性: HIV 抗体、HCV 抗体、 TP 抗体、CMV-IgM、EBV、IgM、IgG; 病毒核酸检测应为阴性: HCV、HBV、新冠核 酸病毒。	血清 ELISA 检测法 PCR 检测
染色体	染色体数量为 46, XX/XY, 无染色体缺失、 异位或重排现象	G 带分析法

5.4 脐带间充质干细胞冻干粉制备

5.4.1 原料的准备工作

在无菌分装操作前一天，无菌原物料从仓库领取后，由技术员依据申领单审核原物料名称，规格，批号，是否有质量破损问题等，审核合格后，在缓冲间用 75%酒精擦拭外表面，放到物料传递间，经传递窗紫外灯照射 30 分钟后传入 C 级 GMP 实验室，做好标识摆放后待用。

5.4.2 胶塞的洗涤灭菌与干燥

- (1) 粗洗：经过滤的纯水进行粗洗（3-5）分钟。
- (2) 精洗：粗洗后的胶塞经超纯水进行（15-30）分钟漂洗。
- (3) 中间控制：漂洗结束后，取样检查可见异物，如果不合格，则继续用超纯水进行洗涤至合格。
- (4) 灭菌：用无菌包布包裹后，蒸汽湿热灭菌，温度大于 121℃，时间大于 15 分钟；
- (5) 干燥：将灭菌后包有胶塞的包裹，放置烘箱中烘干。
- (6) 出料：将洁净胶塞盛于洁净不锈钢桶内并贴上标签，标明品名、清洗编号、数量、时间、有效期。

5.4.3 西林瓶的清洗和灭菌

- (1) 理瓶：将西林瓶拆袋后慢慢放入分瓶区。
- (2) 粗洗：瓶子首先经超声波清洗。
- (3) 精洗：用纯水进行西林瓶内、外壁的清洗，然后用超纯水进行三次瓶浸泡内壁冲洗，后再用注射用水再进行浸泡冲洗，2-3 次。
- (4) 检查：操作过程中，一定要控制以下项目
 - 检查各喷水、气的喷针管有无阻塞情况，如有及时用 1mm 钢针通透。
 - 检查西林瓶内外所有冲洗部件是否正常。
 - 检查纯化水和注射用水的过滤器应符合要求。
- (5) 洗瓶中间控制：在洗瓶开始时，取洗净后 10 个西林瓶目检洁净度符合要求，无颗粒无杂质，残留水分不挂壁，并将检查结果记录于批生产记录中。

洗净的西林瓶快速送至灭菌烘箱进行干燥灭菌，灭菌温度 200℃，灭菌时间 1 小时以上，灭菌完毕后出瓶。

- (6) 查看：灭菌过程中不断查看

——预热段，灭菌段，冷却段的温度是否正常。

——各段过滤器的性能，风速和风压有无变化。

(7) 检测：灭菌后的西林瓶抽检进行内毒素检测，合格率不能低于 95%；

5.4.4 铝盖的准备

(1) 工作区已清洁，不存在任何与现场操作无关的包装材料，残留物与记录，同时审查该批生产记录及物料标签。

(2) 根据批生产指令领取铝盖，并检查其是否有检验合格证，包装完整，在 D 级 GMP 环境下，检查铝盖，将已变形，破损，边缘不齐等铝盖拣出存放在指定地点。

(3) 将铝塑清洗烘干后置于灭菌锅中，高压湿热灭菌 121℃，30 分钟。灭菌结束后将铝盖放入带盖容器中，贴上标签，标明品名，灭菌日期，有效期待用。

5.4.5 冻干要求

5.4.5.1 冻干设备及工艺

(1) 冻干机所有零部件均使用医用消毒药片水擦拭；

(2) 冻干条件根据制品的不同特性，制定并选择不同的的冻干工艺参数，真空度不高于 15Pa, 低温冻干时间建议维持 (15-20) 小时，冻干温度不高于 35℃，大量升华时隔板温度保持在 (-10±10)℃ 之间；

(3) 随时观察冻干曲线，按实际冻干批量进行验证，冻干全过程应严格无菌操作。

(4) 冻干完成后机器内部真空状态下，手动压盖完成后再转至生物安全柜中。

(5) 质检：观察冻干粉状态，有无破损现象，胶塞压盖是否紧密。

5.4.6 冻干粉制备

5.4.6 冻干粉制备

5.4.6.1 配制

将检定合格的间充质干细胞上清原液，按成品规格以注射用水稀释，调整效价、蛋白质的浓度、pH 值等，除菌过滤。

5.4.6.2 分批

将同一批次做好入库记录，统一批号产品，来源一致、质量均一，按规定要求抽样检测后，对整批制品做出评定。

5.4.6.3 分装及冻干

(1) 将分装无菌离心管种的间充质干细胞上清液，75%酒精擦拭消毒后放入 B 级生物安全柜中，加入按比例调试好的辅料及保护剂海藻糖、甘露醇；

(2) 调试装量，每 3 毫升西林瓶中用移液枪分批次加入 2 毫升液体。

(3) 目视检查将污瓶破瓶检出，倒瓶用镊子扶正。

(4) 然后放入原位冷冻干燥机中，冻干过程中制品温度应不高于 35℃，真空状态下手动压盖。

(5) 在分装过程，发现分装后的产品是有落塞和装量不合格等现象，及时挑出，作为不合格品处理。

(6) 分装期间，操作人员要求每 30 分钟用 75%酒精手消毒一次。

(7) 完成制备的成品冻干粉需-20℃下密封保存，长期保存在则需放置在-80℃冰箱中密封保存。

5.4.6.4 轧盖

(1) 已灌粉盖塞的合格的产品传递窗传出无菌间，在轧盖间轧盖，要求轧盖要平滑，无皱褶、无缺口，并用三手指直立捻不松动为合格，若发现轧口松动、歪盖、破盖应立即停机调整。

(2) 逐瓶检查产品，将不合格品挑出，每 1 小时将情况记录于批生产记录中，质检必须查出破瓶、轧坏、异物、色点、松口、量差等不合格品。

5.4.6.5 包装

(1) 贴签：将标签装上机，调整高度，开始贴签，将已打码合格标签贴于瓶表面；在贴签过程中，随时检查贴签质量，标签是否平整、字体是否清晰。

(2) 装盒：盒打印：按批包装指令在小盒（或中盒）上打印产品批号、生产日期和有效期至，并经 QA 核对签名的小盒（或中盒）附于批记录中。然后在每个小盒（或中盒）上手工盖箱号，并装好说明书。

5.5 脐带间充质干细胞冻干粉放行标准

5.5.1 冻干粉包装应密封完整，外观无破损。

5.5.2 放行前应通过表 5 放行标准。

表 5 脐带间充质干细胞冻干粉放行标准

质量指标	最低标准	检验方法
汞, mg/kg	不得检出	参照《中华人民共和国药典》
砷, mg/kg	不得检出	参照《中华人民共和国药典》
铅, mg/kg	不得检出	参照《中华人民共和国药典》
镉, mg/kg	不得检出	参照《中华人民共和国药典》
细菌、真菌, CFU/g	<10	参照《中华人民共和国药典》
耐热大肠杆菌	不得检出	参照《中华人民共和国药典》
铜绿假单胞菌	不得检出	参照《中华人民共和国药典》
金黄色葡萄球菌	不得检出	参照《中华人民共和国药典》
溶血性链球菌	不得检出	参照《中华人民共和国药典》
甲醇、甲醛	不得检出	参照《中华人民共和国药典》
抗生素	不得检出	参照《中华人民共和国药典》
胰酶	不得检出	参照《中华人民共和国药典》

参考文献

相关引用文献

- 《中国生物制品规程（2015）》
- 《人间充质干细胞库建设与管理规范》
- 《化妆品安全技术规范 2015》
- 《科研用脐带来源间充质干细胞》
- 《中华人民共和国药典》
- 《深圳市团体标准管理办法》