

团 体 标 准

T/XXX XXXX—XXXX

干细胞外泌体载药技术规范

Technical specifications for drug delivery of stem cell exosomes

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 制备工艺流程 1

5 技术要求 2

6 检验方法 3

7 质量控制 4

8 安全与环保要求 5

参考文献 6

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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由××××提出。

本文件由中国商业经济学会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

干细胞外泌体载药技术规范

1 范围

本文件规定了干细胞外泌体及载药技术的术语和定义、制备工艺流程、技术要求、检测方法、质量控制、安全与环保要求。

本文件适用于干细胞外泌体载药技术的研发及检测。

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。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

干细胞外泌体 stem cell exosomes

由干细胞分泌的小囊泡，直径通常在30~150纳米之间，携带多种生物活性分子，包括蛋白质、核酸和脂质等，可在细胞间传递信息和影响靶细胞的功能。

3.2

载药技术 drug loading technology

一种将药物分子装载到干细胞外泌体中的技术，目的是利用干细胞外泌体的天然传递机制，将药物有效、安全地输送到靶组织或细胞，以实现治疗或预防疾病的效果。

3.3

药物释放 drug release

在达到靶组织或细胞后，干细胞外泌体中的药物分子从载体中释放出来，发挥其治疗作用的过程。

4 制备工艺流程

4.1 干细胞培养与扩增

选取适合的干细胞来源，如胚胎干细胞或诱导多能干细胞，进行体外培养。利用适当的培养基和培养条件，如控制温度、湿度、气体组成等，使干细胞增殖扩增。

4.2 干细胞分化与外泌体收集

通过添加特定的生长因子或培养条件，促使干细胞向特定细胞类型分化。在分化过程中，干细胞会释放出外泌体，通过离心、超滤或其他分离技术收集这些外泌体。

4.3 外泌体纯化与鉴定

通过进一步离心、过滤或色谱等方法纯化收集到的外泌体，去除杂质和细胞碎片，随后对外泌体进行鉴定，包括形态观察、粒径分析、蛋白质标志物检测等，确保其符合外泌体的特征。

4.4 药物装载

将所需药物与外泌体混合，在一定的条件下进行孵育，使药物被外泌体有效装载。装载过程中需控制药物的浓度、孵育时间和温度等参数。

4.5 装载后处理与储存

药物装载完成后，对外泌体进行必要的后处理，如清洗、离心等，以去除未装载的药物和杂质，随后将装载药物的外泌体储存于适当的条件下，确保其稳定性和生物活性。

5 技术要求

5.1 干细胞外泌体的质量要求

5.1.1 来源与鉴定

干细胞外泌体应来源于经过认证的、健康的、无疾病的干细胞培养物。外泌体的来源应进行严格的筛选和鉴定，确保其安全性和有效性。

5.1.2 形态与大小

干细胞外泌体应呈现典型的囊泡结构，直径应在一定的范围内（如30~150纳米），且分布均匀，无明显的形态异常。

5.1.3 纯度

干细胞外泌体应具有较高的纯度，不应含有明显的细胞碎片、杂质或其他污染物。外泌体的纯度应通过适当的方法进行验证，如密度梯度离心、超滤等。

5.1.4 生物活性

干细胞外泌体应具有一定的生物活性，能够传递生物信息并影响靶细胞的功能，其生物活性应通过体外或体内实验进行验证，如细胞增殖实验、迁移实验等。

5.1.5 稳定性

干细胞外泌体应具有良好的稳定性，在储存和运输过程中应保持其形态、大小和生物活性的稳定。稳定性的评估应包括在不同条件下的储存实验和加速稳定性实验。

5.1.6 安全性

干细胞外泌体应无毒性、无感染性，应符合GB 19489及其他国家相关生物安全标准的要求。外泌体的安全性应通过无菌性检查、内毒素检测、过敏性试验等方法进行验证。

5.2 载药过程的技术要求

5.2.1 药物选择与适配性

所选药物应与干细胞外泌体具有良好的相容性，不影响外泌体的稳定性和生物活性。同时，药物应能够有效载入外泌体中，且在载入过程中不发生化学变化。

5.2.2 载药方法与效率

应明确描述载药的具体方法，包括药物的溶解、与外泌体的混合方式、孵育时间和温度等条件。载药效率应达到预定标准，确保足够量的药物被成功载入外泌体中。

5.2.3 药物释放性能

载有药物的外泌体应具有良好的药物释放性能，能够在预定的时间内释放药物，且释放速率应符合治疗要求。

5.2.4 载药过程的可重复性

载药过程应具有良好的可重复性，确保不同批次间药物载入量和释放性能的稳定性，应建立标准化的操作流程，并对关键参数进行严格监控。

5.2.5 无菌操作与安全性

载药过程应在无菌条件下进行，以避免微生物污染。操作完成后，应对载有药物的外泌体进行安全性评估，包括但不限于无菌性检查、内毒素检测和生物相容性测试。

5.3 药物释放的控制要求

5.3.1 释放速率

应明确干细胞外泌体载药在体外和/或体内的药物释放速率，释放速率应根据治疗需求和药物性质进行精确控制，确保药物在预期的时间内以适当的速度释放。

5.3.2 释放稳定性

药物从干细胞外泌体中释放的过程应具有稳定性，即在相同的条件下，不同批次的外泌体载药应表现出相似的释放行为。对药物与外泌体的结合方式、外泌体的储存条件以及释放介质等进行严格控制。

5.3.3 靶向释放

如预期药物需要在特定组织或细胞中释放，应提供证据表明干细胞外泌体载药能够实现靶向释放。

5.3.4 触发释放机制

如药物释放是通过特定刺激（如pH变化、温度变化或酶解等）来触发的，应明确触发条件，并提供实验数据支持触发机制的有效性和可靠性。

5.3.5 药物残留检测

在药物释放后，应对残留的药物进行检测，以确保药物已经完全释放或残留量在可接受的范围内。

6 检验方法

6.1 干细胞外泌体的鉴定方法

6.1.1 形态学鉴定

利用透射电子显微镜（TEM）观察干细胞外泌体的形态。样品经过适当的固定和染色后，在电子显微镜下应能观察到典型的茶托型或一侧凹陷的半球形双层囊膜结构，且直径在30~150nm之间。

6.1.2 粒径分布分析

采用纳米颗粒跟踪分析（Nanoparticle Tracking Analysis, NTA）技术测定干细胞外泌体的粒径分布，该方法可追踪纳米颗粒的布朗运动轨迹，从而得到颗粒的粒径大小和浓度信息。外泌体的粒径主峰应在30~150nm范围内。

6.1.3 蛋白质标志物检测

通过蛋白质印迹法（Western Blot, WB）检测干细胞外泌体的特征性蛋白质标志物，如CD9、CD63、CD81等。这些蛋白质是外泌体膜上的常见成分，可作为外泌体存在的依据。

6.1.4 综合鉴定

为确保鉴定的准确性，宜综合采用形态学鉴定、粒径分布分析、蛋白质标志物检测等方法进行干细胞外泌体的鉴定。

6.2 载药量的测定方法

6.2.1 直接测定法

如药物本身具有特定的光谱吸收、荧光发射或其他可直接检测的物理化学性质，可直接利用这些性质对载入外泌体的药物进行定量测定，如使用紫外-可见分光光度法、荧光光谱法等来测定载药量。

6.2.2 间接测定法

对于无法直接测定的药物，可以采用间接方法来推算载药量，常用的方法是利用放射性同位素或荧光标记的药物作为示踪剂，通过测定标记物的量来推算出载药量。

6.2.3 色谱分析法

利用高效液相色谱法（HPLC）、气相色谱法（GC）等色谱分析技术，可分离并定量测定载入外泌体中的药物成分。

6.2.4 质谱分析法

如液质联用（LC-MS）或气质联用（GC-MS），可提供更高的灵敏度和选择性，用于精确测定载入外泌体中的药物量。

6.2.5 标准曲线法

通过建立药物浓度与检测信号之间的标准曲线，可根据检测信号推算出载入外泌体中的药物量，需要事先制备一系列已知浓度的药物标准溶液，并建立相应的检测信号与浓度的关系曲线。

6.3 药物释放速率的测定方法

6.3.1 体外释放实验

体外释放实验可以用来模拟药物从干细胞外泌体中释放的过程。实验方法通常包括将载有药物的外泌体置于模拟生理条件的释放介质中，在一定的时间点取样并测定释放出的药物量，通过绘制药物释放曲线，可以计算药物的释放速率。

a) 释放介质的准备

应选择与体内环境相近的释放介质，如磷酸盐缓冲液（PBS）或模拟体液等，以模拟药物在体内的释放环境；

b) 取样和时间点

在预定的时间点（如每隔一段时间）取样，测定释放介质中的药物浓度，时间点应足够密集，以便准确描述药物释放曲线；

c) 药物浓度的测定

可以使用适当的方法（如分光光度法、色谱法等）测定释放介质中的药物浓度。

6.3.2 药物释放曲线的绘制与分析

根据测定的药物浓度数据，绘制药物释放曲线，通过分析曲线的形状和斜率，可以计算药物的释放速率，并评估药物的控释性能。

6.3.3 体内释放实验（可选）

对于需要更准确模拟体内释放情况，可以采用动物模型进行体内释放实验，能够更真实地反映药物在体内的释放过程和药效。

6.3.4 注意事项

在进行药物释放速率测定时，应确保实验条件的稳定性和可重复性。同时，应详细记录实验过程中的所有条件和操作步骤，以便后续的数据分析和比对。

7 质量控制

7.1 原材料质量控制

应确保所使用的干细胞来源清晰、无污染，并经过适当的筛选和鉴定。对培养基、生长因子和其他辅助材料进行严格的质量控制，确保其符合相关标准和规定。

7.2 过程控制

在制备工艺流程的各个环节中，应严格控制温度、湿度、气体组成等关键参数，确保干细胞的正常扩增、分化和外泌体的产生，同时，对药物装载过程进行严密监控，确保药物的有效装载和稳定性。

7.3 成品质量控制

对制备好的干细胞外泌体载药产品进行全面的质量检测，包括但不限于形态观察、粒径分析、蛋白质标志物检测、药物装载量测定、药物释放速率测定等，确保产品符合相关质量标准 and 规定。

7.4 储存与运输控制

制定适当的储存和运输条件，如温度、湿度等，以确保干细胞外泌体载药产品在储存和运输过程中的稳定性和生物活性，同时，对产品进行定期的质量检测和评估，确保其在使用过程中始终保持优良的性能。

8 安全与环保要求

8.1 安全要求

8.1.1 生物安全性

应确保干细胞外泌体的来源安全、无污染，并经过严格筛选和检测，以防止病原体、毒素或其他有害物质的污染。在制备、储存和运输过程中，应采取必要的生物安全防护措施，避免交叉污染。

8.1.2 产品质量与安全

干细胞外泌体载药产品应符合国家相关药品质量标准和安全要求。在产品的制备、检验、储存和运输过程中，应严格遵守《药品生产质量管理规范》（GMP）和其他相关法律法规，确保产品的质量和安全性。

8.1.3 操作人员安全

操作人员应接受专业培训，熟悉干细胞外泌体载药技术的操作流程和安全规范。在实验过程中，应穿戴适当的防护装备，如实验服、手套、护目镜等，以确保个人安全。

8.2 环保要求

8.2.1 废弃物处理

在干细胞外泌体载药技术的制备、检验和使用过程中产生的废弃物，应按照相关环保法规进行妥善处理。废弃物应分类收集、存放，并定期交由专业机构进行无害化处理。

8.2.2 环境监测与评估

应定期对制备环境进行监测和评估，确保环境质量符合相关标准和要求。如发现环境问题，应及时采取措施进行整改。

参 考 文 献

- [1] 干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则（试行）（国卫办科教发〔2015〕46号）
 - [2] 人源干细胞产品药学研究与评价技术指导原则（试行）（国家药监局药审中心〔2023〕33号）
 - [3] WHO实验室生物安全手册(第三版)
 - [4] 细胞治疗产品生产质量管理指南（试行）（国家药监局核查中心〔2022〕4号）
 - [5] 药品生产质量管理规范（卫生部令第79号）
 - [6] 中华人民共和国药典（2020年版）
-