

ICS
B

T/CVDA

团体标准

T/CVDA XX-XXXX

治疗犬猫肠道炎症干细胞外泌体（炎性肠炎）的制备技术规范

Preparation technology standard of stem cell exosomes for the treatment of
canine and feline intestinal inflammation (inflammatory bowel disease)

（征求意见稿）

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

中国兽药协会 发布

目录

治疗犬猫肠道炎症干细胞外泌体（炎性肠炎）的制备技术规范.....	1
目 录.....	2
前 言.....	4
1. 范围.....	5
2. 规范性引用文件.....	5
3. 术语和定义.....	5
3.1 炎性肠炎 Inflammatory bowel disease.....	5
3.2 肠溶 Enteric.....	5
3.3 外泌体 Exosome.....	6
4. 缩略语.....	6
5. 间充质干细胞要求.....	6
5.1 原材料和辅料.....	6
5.2 关键质量属性.....	6
5.2.1 细胞形态.....	6
5.2.2 染色体核型.....	6
5.2.3 细胞存活率.....	7
5.2.4 细胞表面标志物.....	7
5.2.5 免疫调节.....	7
5.2.6 三系分化.....	7
5.2.7 成瘤性.....	7
5.2.8 微生物.....	7
5.3 外泌体的技术要求.....	7
5.3.1 关键质量属性.....	7
5.3.1.1 形态.....	7
5.3.1.2 粒径.....	7
5.3.1.3 标志蛋白.....	8
5.3.1.4 颗粒蛋白比.....	8
5.3.1.5 内毒素.....	8

5.3.1.6 无菌	8
6. 间充质干细胞检验方法	8
6.1 供体犬/猫筛选	8
6.2 细胞形态	8
6.3 染色体核型	8
6.4 细胞存活率	8
6.5 细胞表面标志物	8
6.6 免疫调节	8
6.6.1 诱导 ID0 表达	8
6.6.2 抑制 T 细胞增殖	8
6.6.3 抑制 T 细胞分泌 $\text{INF-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$	9
6.7 三系分化	9
6.7.1 成骨分化	9
6.7.2 成脂分化	9
6.7.3 成软骨分化	9
6.8 成瘤性	9
6.9 微生物	9
6.9.1 真菌	9
6.9.2 细菌	9
6.9.3 支原体	9
6.9.4 内毒素	9
6.9.5 CDV	9
6.9.6 CPV	10
6.9.7 RV	10
6.9.8 FCV	10
6.9.9 FPV	10
6.9.10 FHV-1	10
6.10 外泌体的检验方法	10
6.10.1 关键质量属性的检验	10

6. 10. 1. 1 形态.....	10
6. 10. 1. 2 粒径.....	10
6. 10. 1. 3 标志蛋白.....	10
6. 10. 1. 4 颗粒蛋白比.....	10
6. 10. 1. 5 内毒素.....	10
6. 10. 1. 6 无菌.....	10
7. 检验规则.....	10
7. 1 抽样方法和数量.....	10
7. 2 出厂检验.....	11
7. 3 复核检查.....	11
7. 4 判定规则.....	11
8. 使用说明.....	11
9. 标签.....	12
10. 包装, 储存和运输.....	12
10. 1 包装.....	12
10. 2 储存.....	12
10. 3 运输.....	12
11. 犬猫间充质干细胞治疗犬炎性肠炎.....	12
11. 1 犬猫炎性肠炎的诊断.....	12

前言

本标准按照 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。

本标准由中国兽药协会提出并归口管理。

本标准起草单位：苏州修宝生物科技有限公司、西北农林科技大学干细胞工程中心、陕西佰奥德生物科技有限公司。

本标准主要起草人：华进联、吕长荣、补亚忠、杜宝吉、李海龙、杨震、赵峰。

本标准名称：治疗犬猫肠道炎症干细胞外泌体（炎性肠炎）的制备技术规范

治疗犬猫肠道炎症干细胞外泌体（炎性肠炎）的制备技术规范

1. 范围

本文件规定了治疗用犬间充质干细胞的技术要求、检验方法、检验规则、使用说明、标签、包装、储存、运输、废弃物处理要求、犬猫炎性肠炎诊断标准和犬猫炎性肠炎间充质干细胞治疗方案。

本文件适用于治疗用犬间充质干细胞的生产、检测、质控和犬猫炎性肠炎的间充质干细胞治疗。

2. 规范性引用文件

下列文件中的内容通过本文件的规范性引用而成为本文件必不可少的条款。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

T/CSCB 0001 干细胞通用要求

中华人民共和国兽药典（2020 年版）

GB/T 27532-2011 犬瘟热诊断技术

GB/T 27533-2011 犬细小病毒病诊断技术

WS281-2008 狂犬病诊断标准

DB33/T 2268-2020 猫细小病毒 PCR 检测方法

T/CVMA 42-2020 猫疱疹病毒荧光定量 PCR 检测方法

DB22/T 3111-2020 猫杯状病毒检测 实时荧光 RT-PCR 法

T/CVMA 199.3-2024 犬猫临床营养管理指南 第 3 部分：胃肠道疾病

3. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 炎性肠炎 Inflammatory bowel disease

炎性肠炎，简称 IBD，是一种特殊的慢性肠道炎症性疾病，主要包括克罗恩病(CD)和溃疡性结肠炎(UC)。临床上，性肠病患者会表现为反复的腹痛、腹泻、粘液血便，甚至出现各种全身并发症如视物模糊、关节疼痛、皮疹等。

3.2 肠溶 Enteric

肠溶”通常和药物剂型联系在一起，常见表述为肠溶片。肠溶片是指在胃液中不崩解，而在肠液中能够崩解和吸收的一种片剂，它通常是在普通片剂外面包裹一层肠溶包衣。

3.3 外泌体 Exosome

由活细胞经过“内吞、融合、释放”的一类具有磷脂双分子层，直径在 30-150nm 之间的细胞外囊泡。注：外泌体携带多种蛋白质、mRNA、miRNA 和脂质类物质等，广泛参与细胞间物质运输与信息传递，调控生理和病理过程。

4. 缩略语

CD——分化簇 (Cluster of Differentiation)

CDV——犬瘟热 (Canine distemper)

CPV——犬细小病毒 (Canine Parvovirus)

FCV——猫杯状病毒 (Feline Calicivirus)

FPV——猫细小病毒 (Feline Parvovirus)

FHV-1——猫疱疹病毒 I 型 (Feline Herpesvirus I)

IDO——吲哚胺 2,3-双加氧酶 (Indoleamine 2,3 Dioxygenase)

INF- γ ——干扰素 γ (Interferon gamma)

MSC——间充质干细胞 (Canine mesenchymal stem cell)

RV——狂犬病毒 (Rabies virus)

IBD——炎性肠炎 (Inflammatory bowel disease)

5. 间充质干细胞要求

5.1 原材料和辅料

5.1.1 应符合 T/CSCB 0001 要求。

5.1.2 应建立供体细胞采集的供体犬评估与筛选标准、采集方法、运输标准和交接标准，保证动物福利和细胞的安全。

5.1.3 犬：供体应筛查 CDV, CPV 和 RV，确保为阴性，并记录结果。

猫：供体应筛查 FVC, FPV 和 FHV-1，确保为阴性，并记录结果。

5.2 关键质量属性

5.2.1 细胞形态

细胞贴壁培养时呈纺锤形或梭形的成纤维细胞态，形态均一。

5.2.2 染色体核型

犬：正常核型应为 78, XX 或 78, XY。

猫：正常核型应为 38, XX 或 38, XY。

5.2.3 细胞存活率

未冻存细胞存活率 $\geq 95\%$ ，且冻存复苏后细胞存活率 $\geq 90\%$ 。

5.2.4 细胞表面标志物

犬：在体外培养条件下，CD29、CD44、CD90 阳性率 $\geq 95\%$ ；CD34、CD45 阳性率 $\leq 2\%$ 。

猫：在体外培养条件下，CD44、CD90、CD105 阳性率 $\geq 95\%$ ；CD34、CD45 阳性率 $\leq 2\%$ 。

5.2.5 免疫调节

经炎症因子 IFN- γ 诱导后显著增强犬 MSC 表达吡哆胺 2,3-双加氧酶(IDO)。与活化的 T 淋巴

细胞共培养，能抑制 T 淋巴细胞增殖及分泌 INF- γ 和 TNF- α 。

5.2.6 三系分化

具有成骨、成脂、成软骨的分化潜能。

5.2.7 成瘤性

免疫缺陷动物(如裸鼠)体内成瘤试验结果为阴性。

5.2.8 微生物

犬：真菌、细菌、支原体、内毒素、犬瘟热(CDV)、犬细小病毒(CPV)、狂犬病(RV)应为阴性。

猫：真菌、细菌、支原体、内毒素、猫杯状病毒(FCV)、内毒素、猫细小病毒(FPV)和猫疱疹病毒 I 型(FHV-1)应为阴性。

5.3 外泌体的技术要求

外泌体应从培养干细胞的条件培养基中获得。条件培养基应避免外源性外泌体的干扰，不包含相应添加物，例如胎牛血清(FBS 或 FCS)、血小板裂解物、垂体提取物、胆汁盐等其他复合产品。否则应建立方法，以评估培养基中干扰物所产生的影响。

可采用超速离心、切向流过滤、层析、超滤等方法实现外泌体的提取分离。

5.3.1 关键质量属性

5.3.1.1 形态

透射电镜下多呈杯状圆形或类圆形的膜性小囊泡，可见囊泡的双膜性结构，中央为低电子密度成分分布较集中且边界清晰。

5.3.1.2 粒径

应分布在 30-150nm 范围内，且在该范围内存在粒径峰值。

5.3.1.3 标志蛋白

需同时满足以下条件。CD9、CD63 以及 CD81 任意两个表达阳性；Alix、Tsg101 任意一个表达阳性；Calnexin、histone 3 以及 GM130 任意两个表达阴性。

5.3.1.4 颗粒蛋白比

外泌体颗粒数与蛋白量比值不低于 1×10^8 particles/ μ g。

5.3.1.5 内毒素

应小于 0.5EU/mL。

5.3.1.6 无菌

注射用外泌体应无菌。

6. 间充质干细胞检验方法

6.1 供体犬/猫筛选

按照 T/CVDA1-2024《治疗用犬间充质干细胞》或 T/CVDA2-2024《治疗用猫间充质干细胞》附录 A 的方法进行筛选

6.2 细胞形态

二维培养条件下，用明视场细胞显微镜进行观察。

6.3 染色体核型

按照《中华人民共和国兽药典（2020 年版）》检验。

6.4 细胞存活率

按照 T/CVDA1-2024《治疗用犬间充质干细胞》或 T/CVDA2-2024《治疗用猫间充质干细胞》附录 B 的方法检验。

6.5 细胞表面标志物

按照 T/CVDA1-2024《治疗用犬间充质干细胞》或 T/CVDA2-2024《治疗用猫间充质干细胞》附录 C 的方法检验。

6.6 免疫调节

6.6.1 诱导 IDO 表达

按照 T/CVDA1-2024《治疗用犬间充质干细胞》或 T/CVDA2-2024《治疗用猫间充质干细胞》附录 D 的方法检验。

6.6.2 抑制 T 细胞增殖

按照 T/CVDA1-2024《治疗用犬间充质干细胞》或 T/CVDA2-2024《治疗用猫间充质干细胞》附录 E 的方法检验。

6.6.3 抑制 T 细胞分泌 $\text{INF-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$

按照 T/CVDA1-2024《治疗用犬间充质干细胞》或 T/CVDA2-2024《治疗用猫间充质干细胞》附录

F 的方法检验。

6.7 三系分化

6.7.1 成骨分化

按照 T/CVDA1-2024《治疗用犬间充质干细胞》或 T/CVDA2-2024《治疗用猫间充质干细胞》附录 G 的方法检验。

6.7.2 成脂分化

按照 T/CVDA1-2024《治疗用犬间充质干细胞》或 T/CVDA2-2024《治疗用猫间充质干细胞》附录 H 的方法检验。

6.7.3 成软骨分化

按照 T/CVDA1-2024《治疗用犬间充质干细胞》或 T/CVDA2-2024《治疗用猫间充质干细胞》附录 I 的方法检验。

6.8 成瘤性

按照 T/CVDA1-2024《治疗用犬间充质干细胞》或 T/CVDA2-2024《治疗用猫间充质干细胞》附录 J 的方法检验。

6.9 微生物

6.9.1 真菌

按照《中国兽药典（2020 年版）》三部中“3306 无菌检验或纯粹检验法”项检测。

6.9.2 细菌

按照《中国兽药典（2020 年版）》三部中“3306 无菌检验或纯粹检验法”项检测。

6.9.3 支原体

按照《中国兽药典（2020 年版）》三部中“3308 支原体检验法”项检测。

6.9.4 内毒素

按照《中国兽药典（2020 年版）》一部中“1143 细菌内毒素检验法”检测。

6.9.5 CDV

按照国家标准 GB/T 27532-2011《犬瘟热诊断技术》检测。

6.9.6 CPV

按照国家标准 GB/T 27533-2011《犬细小病毒病诊断技术》检测。

6.9.7 RV

按照国家标准 WS281-2008《狂犬病诊断标准》检测。

6.9.8 FCV

按照吉林省地方标准 DB22/T 3111-2020《猫杯状病毒检测 实时荧光 RT-PCR 法》检测。

6.9.9 FPV

按照浙江省地方标准 DB33/T 2268-2020《猫细小病毒 PCR 检测方法》检测。

6.9.10 FHV-1

按照 T/CVMA 42-2020《猫疱疹病毒荧光定量 PCR 检测方法》检测。

6.10 外泌体的检验方法

6.10.1 关键质量属性的检验

6.10.1.1 形态

按照 T/FDSA 0049—2024《人源间充质干细胞外泌体制备与检验规范》中附录 A 透射电镜观察法进行检测。

6.10.1.2 粒径

按照 GB2019《细胞计数方法—流式细胞测定法》—纳米流式检测法、纳米颗粒跟踪分析仪或纳米库尔特粒度仪等分析。

6.10.1.3 标志蛋白

按照《中华人民共和国药典》通则“免疫印迹法”检测。

6.10.1.4 颗粒蛋白比

按照蛋白质定量试剂盒(BCA)检测。

6.10.1.5 内毒素

按《中华人民共和国兽药典》（2020 年版）一部 1143 细菌内毒素检查法的方法检测。

6.10.1.6 无菌

按《中华人民共和国兽药典》（2020 年版）三部 3306 无菌检验或纯粹检验法的方法检测。

7. 检验规则

7.1 抽样方法和数量

7.1.1 在同一个生产周期中，同一生产线，同一来源，同一代次，同一方法制备出来的产品为一批。

7.1.2 在同一批的产品中随机抽取 3 个最小包装单元。

7.2 出厂检验

7.2.1 每批产品应进行出厂检验,并附检验报告。

7.2.2 出厂检验项目应包括 5.3 规定的所有项目。

7.3 复核检查

根据需要，应由专业细胞检验机构实验室进行复核检验。

7.4 判定规则

7.4.1 出厂检验项目全部符合 5.3 规定，判为合格品；有 1 项及以上不符合本文件规定，则判为不合格品。

7.4.2 复核检验项目全部符合 5.3 规定，判为合格品；有 1 项及以上不符合本文件规定，则判为不合格品。

8. 使用说明

应至少包括以下内容：

- a) 产品名称；
- b) 外泌体含量；
- c) 外泌体的保存温度；
- d) 生产日期；
- e) 生产批号；
- f) 生产组织；
- g) 储存条件及使用期限；
- h) 运输条件；
- i) 使用方法；
- j) 执行标准号；
- k) 生产地址；
- l) 联系方式；
- m) 邮政编码；
- n) 注意事项。

9. 标签

应至少包括以下内容：

- a) 产品名称；
- b) 外泌体含量；
- c) 外泌体装量；
- d) 储存条件及使用期限；
- e) 生产日期；
- f) 生产批号；
- g) 生产组织。

10. 包装, 储存和运输

10.1 包装

应选择对外泌体关键质量属性无影响的材料和容器。

10.2 储存

10.2.1 应符合 T/SZJCH003-2022《细胞外泌体通用技术要求》要求。

10.2.2 应在低于-80℃ 环境下储存。

10.3 运输

10.3.1 应符合 T/SZJCH003-2022《细胞外泌体通用技术要求》要求。

10.3.2 冻干外泌体应在 2℃~8℃条件下运输，非冻干外泌体应在干冰或低于-80℃条件下运输。

11. 犬猫间充质干细胞治疗犬炎性肠炎

11.1 犬猫炎性肠病的诊断

T/CVMA 199.3-2024 犬猫临床营养管理指南 第3部分：胃肠道疾病