

团 体 标 准

T/XXX XXXX—XXXX

人自然杀伤细胞制剂制备及放行检验规范

Specification for preparation and release inspection of human natural killer cell preparations

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、缩略语	1
4 基本要求	2
5 制备过程	2
6 记录	5
7 放行检验	5
8 质量评价	6
参考文献	8

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。

本文件由青岛海尔生物科技有限公司提出。

本文件由中国国际经济技术合作促进会归口。

本文件起草单位：青岛海尔生物科技有限公司、XXX、XXX、XXX。

本文件主要起草人：XXX、XXX、XXX。

人自然杀伤细胞制剂制备及放行检验规范

1 范围

本文件规定了人自然杀伤细胞的术语和定义、基本要求、制备过程、记录、放行检验以及质量评价。本文件适用于人自然杀伤细胞的制备与放行检验。

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 3095 环境空气质量标准
- GB 19489 实验室 生物安全通用要求
- GB/T 37864 生物样本库质量和能力通用要求
- GB 50073 洁净厂房设计规范
- GB 50346 生物安全实验室建筑技术规范
- GB 50591 洁净室施工及验收规范

3 术语和定义、缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

人自然杀伤细胞 human natural killer cells

人体组织分离的或干细胞分化或转分化获得的，具有非特异性杀伤、抗体依赖性细胞毒性、免疫调节功能的固有淋巴细胞。

3.1.2

供者 donor

提供用于细胞产品生产用细胞的个体。

3.1.3

样本 specimen

在特定时间从受试者或捐献者中采集的器官、组织等标本。

3.1.4

细胞活率 cell viability

能够增值、保持正常代谢活性的细胞占全部细胞的百分比。

3.1.5

台盼蓝 trypan blue

细胞活性染料，常用于检测细胞膜的完整性，检测细胞是否存活。

注：活细胞因细胞膜结构完整会排斥台盼蓝，而丧失活性或者细胞膜结构不完整的细胞则会被台盼蓝染成淡蓝色。

3.1.6

放行检验 release testing

在细胞已完成质量检验的基础上，对每种类型的每批次细胞，在冻存入库及出库前所进行的相对快速和简化的检验。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

HAV: 甲型肝炎病毒 (Hepatitis A Virus)
HBV: 乙型肝炎病毒 (Hepatitis B Virus)
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 Thymic Leukemia Virus)
EBV: 人类疱疹病毒 (Epstein-barr Virus)
CMV: 巨细胞病毒 (cytomegalo virus)

4 基本要求

4.1 场地与设施

4.1.1 人自然杀伤细胞制备机构场地应符合《药品生产质量管理规范》要求, 空气质量标准应符合 GB 3095 标准分级二级标准。

4.1.2 人自然杀伤细胞制备机构实验室或厂房应由具有洁净实验室设计建设资质的工程公司设计与建造, 并应符合 GB 19489、GB 50073、GB 50346 和 GB 50591 的规定。建设完成后, 各功能区域的洁净级别应由专业机构进行检测并出具合格证明。

4.1.3 细胞制备功能区应按人自然杀伤细胞制备工艺进行各区域设计, 符合《药品生产质量管理规范》和《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则》要求。制备机构应配备独立质量检测实验室, 并符合 GB 19489 和 GB 50346 的规定。

4.2 设备和耗材

4.2.1 人自然杀伤细胞的制备机构应优先选用符合《药品生产质量管理规范》和《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则》的要求, 并获得国家资质认证的设备、仪器、耗材和试剂。

4.2.2 人自然杀伤细胞的制备机构应对设备、仪器、耗材和试剂供应商进行资质审核认证, 要求供应商提供产品质量报告和批次检验报告, 并对耗材及试剂进行质量抽检, 避免采购质量不合格的产品。

4.2.3 人自然杀伤细胞的制备机构设备和仪器正式使用前应做安装确认 (IQ)、运行确认 (OQ) 和性能确认 (PQ), 并定期进行第三方校准, 不得使用有安全隐患的仪器操作样本及细胞制品。

4.2.4 人自然杀伤细胞的制备机构应对设备与仪器进行编号建档, 并建立标准操作流程 (SOP), 确保使用、运行、保养、维修记录完整可追溯, 对于关键工艺相关设备参数应进行实时监测, 及时对状态异常的设备进行校对和维修。

4.3 人员管理

4.3.1 人自然杀伤细胞制备机构应分别设立细胞制备负责人、质量管理负责人和质量授权人岗位。由法人授权任命, 任职资质应符合《药品生产质量管理规范》和《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则》要求, 定期接受岗位专业培训, 制备技术负责人与质量管理负责人、质量授权人不得相互兼任。

4.3.2 人自然杀伤细胞制备和质控技术人员应具备的健康要求: HAV、HBV、HCV、HIV 及梅毒的抗体检测应为阴性, 并且(矫正)视力正常, 无色盲、色弱。

4.3.3 人自然杀伤细胞制备和质控技术人员应半年接受体检一次, 有呼吸道感染或发热等疾病状态下不得进入洁净操作区, 需完全康复后方可恢复岗位操作。

4.3.4 人自然杀伤细胞制备和质控技术人员上岗前应经过专业培训, 内容包括但不限于干细胞理论与实践、生命伦理、干细胞法律法规、GMP 管理、GCP 资质、制剂基本知识、细胞培养基础、生物安全、仪器设备使用与维护方法、物料管理与清洁卫生、岗位职责、操作规范等内容。

5 制备过程

5.1 样本采集

5.1.1 基本原则

- 5.1.1.1 样本采集与处理应符合 GB/T 37864 的要求。
- 5.1.1.2 采集和处理程序可供样本采集人员使用。
- 5.1.1.3 应具备相关的资质和设施环境。
- 5.1.1.4 应通过伦理审查批准并履行知情同意程序。
- 5.1.1.5 应建立适当的质量管理体系确保符合用户需求并持续改进。

5.1.2 供者健康

- 5.1.2.1 样本采集制备方应对供者的基本信息与健康信息进行详细采集与记录，同时做好对供者的隐私保护，相关记录入档保留至少 30 年。
- 5.1.2.2 供者应无血液系统疾病、内分泌系统疾病、恶性肿瘤史、性传播疾病及高危人群史、吸毒史，不应具有包括但不限于以下疾病或健康状况：
 - a) 一般传染性疾病或其他遗传疾病：HIV、HBV、HCV、梅毒、HTLV、EBV 与 CMV 抗体与核酸检测应为阴性；
 - b) 传染性皮肤病(未治愈的)；
 - c) 大面积皮肤损伤(未治愈的)；
 - d) 鼻/咽喉传染病(未治愈的)。
 - e) 采集前 12 个小时内用过酒精，镇静药等。

5.1.3 采集场所及人员

采集场所应达到 III 级洁净手术室要求。采集人员应具有医师职业证，且经过相应的技术培训。

5.1.4 采集过程

由医师抽取人自然杀伤细胞组织，置于无菌采集瓶中，密封保存，并粘贴条形码作为唯一标识。

5.2 样本运输

- 5.2.1 运输人员应是经过专业培训合格的人员，对样本运输应制定规范及应急预案，并对样本运输全程做记录，包括但不限于运输的方式、条件、路径、时间、人员、地址及样本信息，相关记录入档保留至少 30 年。
- 5.2.2 样本运输应采用平稳、安全、快速的运输途径，宜采用冷藏运输车或专用标本冷藏运输箱运输。
- 5.2.3 运输过程中应防渗漏、防辐射、抗震动、耐压、耐热等，样本包装应贴上条形码作为唯一标识。
- 5.2.4 样本运输温度应维持在 2℃~8℃，运输时间不超过 12 小时。

5.3 样本接收

- 5.3.1 样本接收人员应是经过专业培训合格的人，应遵从安全与准确的原则对样本接收制定规范及应急预案，并对样本接收过程进行记录，相关记录入档保留至少 30 年。
- 5.3.2 样本接收时，接收人员应做好自我防护工作，接触样本之前应佩戴手套与口罩，并对接收场所进行消毒。
- 5.3.3 接收样本后应先观察样本容器外包装的外观，检查有无破损。
- 5.3.4 检查外观后，工作人员应检查样本采集信息记录表是否齐全，同时确认记录表上信息是否填写完整，检查信息记录表信息是否与样本信息一一对应，样本及记录表上应贴有一致对应的条形码，做到样本与供者信息相对应，确认无误后进行接收。
- 5.3.5 样本接收后，使用 75% 医用酒精消毒清理容器外表面，如不能及时对样本进行处理，需把样本保存在 2℃~8℃ 条件下，最长时间不超过 12 小时。
- 5.3.6 样本量应能够满足制备和检测的最低要求。
- 5.3.7 样本接收后应及时将信息反馈给样本发送方。
- 5.3.8 细胞制备方应制定样本拒收标准，按照样本拒收标准处理样本，并及时通知有关部门或负责人，同时做好相应记录。

5.4 分离与培养

- 5.4.1 人自然杀伤细胞分离与培养应符合《药品生产质量管理规范》和《干细胞制剂质量控制及临床

前研究指导原则》要求的车间内进行。

5.4.2 所有操作应事先制定标准规范，由经专业培训的技术人员严格遵照执行，并进行记录登记，相关记录入档保留至少 30 年。

5.4.3 分离与培养过程中应标识干细胞的名称、代次、批次、操作日期、培养条件、操作人员姓名等信息。

5.4.4 所使用试剂应采用符合《药品生产质量管理规范》、《中华人民共和国药典》和《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则》要求的药品辅料或已获批的药品，应出具产品质检合格报告，并对各批次试剂进行质量抽检。

5.4.5 应避免人源或动物源性血清及蛋白，不得使用同种异体人血清或血浆。如必须使用动物血清，应确保其无特定动物源性病毒污染。严禁使用海绵体状脑病流行区来源的牛血清。

5.5 细胞换液

5.5.1 人自然杀伤细胞换液操作应严格遵照《药品生产质量管理规范》和《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则》要求，保证无外源微生物污染，相关操作均进行记录并存档保存至少 30 年。

5.5.2 换液时间及频次应根据人自然杀伤细胞生长情况及培养基状态进行判断，以保障细胞生长所需营养物质水平，并消除代谢物毒害作用。

5.5.3 换液操作时吸弃培养瓶中原有的部分或全部培养液，再加入新鲜培养液。首次换液需要在镜下观察到原代细胞完全贴壁和延展后方可进行。

5.5.4 培养基成分应符合人自然杀伤细胞分离与培养基本要求，尽量采用已获国家批准的临床级产品或药品辅料。

5.6 细胞传代

5.6.1 人自然杀伤细胞传代操作应严格遵照《药品生产质量管理规范》和《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则》要求，保证无外源微生物污染，相关操作均进行记录并存档保存至少 30 年。

5.6.2 人自然杀伤细胞一般在达到 80%~90%融合度可讲行传代操作，传代操作应密度适宜、及时、迅速。

5.6.3 传代所使用消化酶应符合人自然杀伤细胞分离与培养的基本要求，尽量采用国家已批准的临床级产品。如必须使用动物源性消化酶，应确保其无特定动物源性病毒污染。

5.7 细胞冻存

5.7.1 人自然杀伤细胞冻存操作应严格遵照《药品生产质量管理规范》和《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则》要求，保证无外源微生物污染，相关操作均进行记录并存档保存至少 30 年。

5.7.2 经制备数量达到冻存要求的人自然杀伤细胞系可进行冻存操作，冻存细胞应加入适当的冻存保护液，遵循程序降温原则，并在液氮中进行保存。

5.7.3 冻存液成分应符合人自然杀伤细胞分离与培养的基本要求，尽量采用国家已批准的临床级产品或药品辅料，二甲基亚砷含量不得超过 10%，如必须使用动物源性血清，应确保其无特定动物源性病毒污染，严禁使用海绵状脑病流行区来源的牛血清。

5.7.4 冻存细胞应标明干细胞名称、培养条件、代次、批次、操作人员、冻存日期等信息，并具有唯一标识。

5.7.5 液氮冻存应使用符合要求的液氮容器，气相冻存，由专人负责，保证液氮充足，温度恒定。

5.8 稳定性考察

5.8.1 细胞库应依据储存的干细胞产品的特性，制定年度的储存细胞质量稳定性考察方案和计划，并制定稳定性考察的相关质量标准。

5.8.2 稳定性考察的相关质量标准包括但不限于以下内容：

- a) 冻存容器完整性和密闭性；
- b) 细胞活率；
- c) 微生物培养；
- d) 细胞冻存复苏回收率；
- e) 细胞表面标记物表达；

f) 细胞生物学效力。

5.8.3 人自然杀伤细胞干细胞在冻存后 1 周复苏存活率不应低于 80%，1 年复苏存活率不应低于 60%。

5.8.4 常规每年至少执行一次稳定性考察计划，如遇特殊情况（例如液相液氮罐故障）可临时性增加稳定性考察计划。

5.8.5 应对年度性的稳定性考察结果进行趋势分析，便于监测细胞储存的连续稳定性并改进细胞储存工艺。

6 记录

6.1 原始记录应确保其可追溯细胞分离、处理和储存操作所有环节，记录内容包含但不限于以下信息：

- a) 供者身份号码；
- b) 产品描述码、采集类型和分类码；
- c) 产品名称和组分；
- d) 供者唯一身份标识符，如果适用；
- e) 采集日期和时间；
- f) 生产制备机构的名称和地址；
- g) 制备、保存、冻存中关键步骤的细节及结果；
- h) 关键步骤的日期和时间，如果适用；
- i) 每一步骤的操作人员姓名；
- j) 在分离、处理、冻存、储存过程中使用的关键物料的名称、生产商、批号、有效期限；
- k) 使用试剂的数量；
- l) 使用设备编码。

6.2 记录的审核：应对记录的准确性和完整性以及标准、法律法规的符合性进行审核。

6.3 记录的保存：记录应归档于受控区域进行保存，确保整个保存期间记录的清晰和完整性，并应避免意外或非授权的调阅、丢失、损坏、破坏、混淆或篡改。

6.4 记录的修改：机构应建立并保持合适的记录修改程序。记录修改人的签名及日期应记录下来；修改前的记录内容应清晰可辨认。

6.5 隐私保护：应建立保密机制，确保供者、员工信息的保密性。

6.6 记录保存期限：文件记录是要保存至细胞应用或处理后 20 年。

7 放行检验

7.1 一般要求

每一批次人自然杀伤细胞制剂在临床使用前应在完成例行质量检验的基础上，由临床研究机构质检平台进行快速和简化的质量检测，应包括但不限于活率、细胞表型、细菌、病毒、支原体和内毒素含量等，确认细胞合格后方可申请临床放行使用。相关记录报告应存档保存至少30年。

7.2 检验内容

7.2.1 人自然杀伤细胞安全性

7.2.1.1 无菌检测

参照《中华人民共和国药典》2020年版四部通则1101无菌检测法执行，对人自然杀伤细胞样本采集、运输、分离、培养、冻存、复苏等生产制备环节进行留样（保存液、清洗液、培养基上清、冻存液等）检测。细菌和真菌检测结果都应为阴性。

7.2.1.2 支原体检测

参照《中华人民共和国药典》2020年版四部通则3301支原体检测法执行，对人自然杀伤细胞样本采集、运输、分离、培养、冻存、复苏等生产制备环节进行留样（保存液、清洗液、培养基上清、冻存液等）检测。支原体检测结果都应为阴性。

7.2.1.3 细胞内外源致病因子检测

采用血清ELISA检测法或核酸检测法，对人自然杀伤细胞样本采集、运输、分离、培养、冻存、复苏等生产制备环节进行留样（保存液、清洗液、培养基上清、冻存液、细胞等）检测。HIV抗体、HBsAg、HCV抗体、TP抗体、CMV-IgM、HTLV抗体、HPV抗体、HHV抗体、EBV抗体检测应为阴性；HCV、HBV、HIV病毒核酸检测应为阴性。

7.2.1.4 内毒素检测

参照《中华人民共和国药典》2020年版四部通则1143细菌内毒素检测法执行，对人自然杀伤细胞样本采集、运输、分离、培养、冻存、复苏等生产制备环节进行留样（保存液、清洗液、培养基上清、冻存液等）检测。各类样本中的内毒素检测值应 ≤ 0.5 EU/mL。

7.2.1.5 异常免疫学反应检测

采用流式细胞术以及ELISA技术测定人自然杀伤细胞对于活化的人总淋巴细胞的增殖和对不同淋巴细胞亚群增殖能力的影响，以及对淋巴细胞相关细胞因子分泌的影响。淋巴细胞亚群应无异常增殖，细胞因子表达水平应无异常增加。

7.2.1.6 致瘤性检测

采用免疫缺陷动物（裸鼠或SCID鼠），通过局部或静脉方式接种人自然杀伤细胞，评价人自然杀伤细胞致瘤性。体内致瘤试验严格遵照动物伦理要求执行，单只小鼠接种人自然杀伤细胞数量 $\geq 10^6$ 细胞/kg，观察期 ≥ 12 周。人自然杀伤细胞应无致瘤性。

7.2.2 人自然杀伤细胞稳定性

7.2.2.1 细胞数量和活率检测

选用血球细胞计数板或细胞计数仪进行细胞计数，将待检测细胞使用台盼蓝或AO/PI荧光染料染色，读取细胞数并计算活率。各代数及批次人自然杀伤细胞活细胞比例 $\geq 90\%$ 。

7.2.2.2 生长活性检测

通过检测细胞倍增时间、细胞周期、克隆形成率以及端粒酶活性对人自然杀伤细胞生长活性进行测定，各代数及批次人自然杀伤细胞应处于指数生长期，G0期细胞数 $\leq 10\%$ ，具有端粒酶活性。

7.2.2.3 细胞纯度和均一性检测

采用人自然杀伤细胞标志物流式检测以及人基因组DNA短片段重复序列(STR)测序进行检定。各代数及批次人自然杀伤细胞表面标志物表达应符合流式检测比例要求，单一细胞系的人自然杀伤细胞各代次及批次细胞STR检测结果应保持一致。

7.2.3 人自然杀伤细胞生物学特征

7.2.3.1 细胞形态检测

体外二维悬浮培养条件中，静息状态下呈不规则形悬浮生长；激活后形态变大变长，用倒置显微镜进行观察。

7.2.3.2 细胞标志物检测

采用《中华人民共和国药典(2020年版)》通则3429中流式细胞术进行测定。

7.2.3.3 染色体核型检测

按照《中华人民共和国药典(2020年版)》检验。

8 质量评价

8.1 质量评价内容

- 8.1.1 供者健康筛查结果应符合合格供者要求并签署了知情同意书。
- 8.1.2 人自然杀伤细胞及检测标本的采集和运输符合标准要求。
- 8.1.3 人自然杀伤细胞及检测标本的接收、标识以及暂存符合标准要求。
- 8.1.4 细胞分离、处理、检测区域应满足操作要求，有洁净要求的操作环境应满足相应级别环境要求，应有定期环境监控；细胞分离、处理各工序完毕后均应及时清场；现场应无污染及交叉污染，如有传染病原体或污染物，应得到有效隔离或清除。
- 8.1.5 细胞在分离、处理及检测等过程中所涉及的人员均已通过考核合格后上岗。
- 8.1.6 细胞分离、处理、检测等所使用的设备应符合设备管理要求（标识清晰正确，在合格计量校验期内定期维护保养等）；与细胞接触的器械应经消毒灭菌并在有效期内。
- 8.1.7 细胞制备、检测所用物料应经确认来自合格供应商，关键物料均应经抽样检测并确认其质量合格。试剂及耗材的有效期应在规定期限内，批号应按要求记录下来以便具有可追溯性。
- 8.1.8 应核对供者检测报告，其内容至少包括：乙型肝炎病毒表面抗原（HBsAg）、丙型肝炎病毒抗体（HCVAb）、梅毒螺旋体特异性抗体（Anti-TP）、人类免疫缺陷病毒 I/II 型抗体（HIV-I/II Ab）和丙氨酸氨基转移酶（ALT）等，其余检测项目全部符合质量标准要求。采集时间距制备时间在要求时限以内，无凝血现象，病原体检测及筛查标准按照产品质量标准执行。
- 8.1.9 细胞分离、处理、检测和过程监控程序应与机构批准的管理文件内容一致。记录填写应真实、完整、正确，关键计算结果应进行确认。
- 8.1.10 样本在采集、运输、制备、分离、冻存、发放过程中不存在任何重大偏差；若有偏差发生，均应通过合适的评价，并采取了有效的纠正措施。
- 8.1.11 数量及包装：装量细胞数量与临床需求一致；细胞包装满足运输要求，细胞的内、外包装标签内容与公司规定内容相符，经双人复核确认其准确性和完整性。
- 8.1.12 异常事件调查：过程中若出现异常，应进行调查处理，按调查处理意见执行。异常处理的有关记录应归入对应批次细胞制备档案中。
- 8.1.13 其他需要考虑的因素。

8.2 评价结论

- 8.2.1 如果细胞质量评价各项都符合第 7 章的要求，则视为合格品，可转为长期储存。
- 8.2.2 如果细胞质量评价未能满足第 7 章的要求，则应视为不合格品，不可使用。不合格品的处理应符合医疗废弃物处理管理的相关规定，涉及传染性病原体阳性、致病性微生物阳性的不合格品应进行灭活处理。

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] WHO 实验室生物安全手册（第三版）
 - [3] 药品生产质量管理规范（卫生部令第79号）
 - [4] 中华人民共和国药典（2020年版）
-