

团 体 标 准

T/CEAC XXXX—XXXX

自体 NK 细胞诱导活化培养方法及放行规范

Induction and activation culture method and release specification of autologous NK cells

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 基本要求 1

5 培养方法 2

6 细胞放行标准 3

7 安全管理 4

8 记录和报告 4

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。

本文件由广东赛尔生物科技有限公司提出。

本文件由中国商业经济学会归口。

本文件起草单位：广东赛尔生物科技有限公司、XXX。

本文件主要起草人：XXX。

自体 NK 细胞诱导活化培养方法及放行规范

1 范围

本文件规定了自体NK细胞的基本要求、培养方法、细胞放行标准、安全管理、记录和报告。
本文件适用于自体NK细胞诱导活化培养计放行。

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 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

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

自体NK细胞 autologous natural killer cell

从患者自身提取并用于治疗的自然杀伤细胞，在体外经过扩增和激活后，可以回输给患者，以增强免疫力、对抗肿瘤细胞或清除病毒感染细胞。

3.2

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。

4 基本要求

4.1 场地与设施

4.1.1 自体 NK 细胞的培养机构场地应符合《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 自体 NK 细胞的培养机构实验室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 功能区应按自体 NK 细胞的培养工艺进行各区域设计，符合《药品生产质量管理规范》要求。培养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 自体 NK 细胞的培养机构应优先选用符合《药品生产质量管理规范》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 自体 NK 细胞的培养机构应对设备、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 自体 NK 细胞的培养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 自体 NK 细胞的培养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 自体 NK 细胞的培养机构应分别设立细胞培养负责人、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》要求，定期接受岗位专业培训，培养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 自体 NK 细胞的培养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 自体 NK 细胞的培养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 自体 NK 细胞的培养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 培养方法

5.1 细胞采集与预处理

5.1.1 明确细胞的来源，确保来源合法、合规，并符合伦理标准。

5.1.2 明确供体健康状况，进行传染性疾病因子筛查与检测（包括 HIV、HBV、HCV、梅毒、HTLV、EBV 与 CMV）。

5.1.3 采集场所应达到III级洁净手术室要求。

5.1.4 采集人员应具有医师职业证，且经过相应的技术培训。

5.1.5 对采集的血液样本进行适当的预处理，如抗凝、离心等，以分离出血浆和细胞成分。

5.2 细胞分离与纯化

5.2.1 使用密度梯度离心法分离出外周血单个核细胞(PBMCs)或脐血中的单核细胞。

5.2.2 对分离出的细胞进行洗涤，去除杂质，并进行细胞计数，以确保获得足够数量和质量的细胞。

5.3 细胞培养与活化

5.3.1 根据标准配方制备适当的培养基，包括必要的生长因子、营养物质等。

5.3.2 将分离纯化的细胞接种到培养瓶中，调整细胞密度至适当范围。

5.3.3 将接种后的细胞置于适宜的培养条件下，如温度、湿度、二氧化碳浓度等。

5.3.4 在培养过程中，加入特定的诱导剂或刺激剂，以活化 NK 细胞并促进其增殖和分化。

5.4 细胞培养过程监控

5.4.1 定期观察细胞生长情况，包括细胞形态、密度、活性等。

5.4.2 根据细胞生长情况和培养基状况，定期更换新鲜培养基。

5.4.3 当细胞密度达到一定程度时，进行细胞传代，以保持细胞的良好生长状态。

5.5 细胞质量评估与放行

5.5.1 对培养后的细胞进行质量评估，包括细胞数量、活性、纯度、表型等指标。

5.5.2 根据细胞质量评估结果，决定是否放行细胞用于后续治疗或研究。

5.5.3 记录细胞放行的相关信息，包括细胞来源、培养过程、质量评估结果等。

5.6 细胞存储与运输

5.6.1 对符合放行标准的细胞进行适当的存储，以保持其活性和功能。

5.6.2 运输人员应现场与送检单位确认样本无误，确保满足收样要求的合格送检样本，由运输人员进行现场交接，包括样本信息登记、拍照、唯一标识（如条形码）、数量清点与统计、分类储存与运输。

6 细胞放行标准

6.1 一般要求

每批自体NK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。相关记录报告应入档保存至少30年。

6.2 检验内容

6.2.1 细胞安全性

6.2.1.1 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，对自体NK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。

6.2.1.2 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，对自体NK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。

6.2.1.3 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，对自体NK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。

6.2.1.4 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，对自体NK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。

6.2.1.5 异常免疫学反应检测

采用流式细胞术以及ELISA技术测定自体NK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。

6.2.1.6 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自体NK细胞，评价自体NK细胞致瘤性。体内致瘤试验严格遵照动物伦理要求执行，单只小鼠接种自体NK细胞数量 $\geq 10^6$ 细胞/kg，观察期 ≥ 12 周。自体NK细胞应无致瘤性。

6.2.2 细胞稳定性

6.2.2.1 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。各代数及批次自体 NK 细胞活细胞比例 $\geq 90\%$ 。

6.2.2.2 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自体 NK 细胞生长活性进行测定，各代数及批次自体 NK 细胞应处于指数生长期，G0 期细胞数 $\leq 10\%$ ，具有端粒酶活性。

6.2.2.3 细胞纯度和均一性检测

采用自体 NK 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。各代数及批次自体 NK 细胞表面标志物表达应符合流式检测比例要求，单一细胞系的自体 NK 细胞各代数及批次细胞 STR 检测结果应保持一致。

6.2.3 生物学特征

6.2.3.1 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。

6.2.3.2 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。

6.2.3.3 染色体核型检测

按照《中华人民共和国药典 (2020年版)》检验。

7 安全管理

7.1 生物安全

7.1.1 实验室应遵循生物安全指南，防止病原体传播和交叉污染。

7.1.2 使用适当的防护设备，如手套、实验服、护目镜等。

7.2 化学安全

7.2.1 确保所有化学品都妥善储存，并按照安全数据表 (SDS) 进行操作。

7.2.2 定期对化学品进行库存检查，确保其未过期或损坏。

7.3 物理安全

7.3.1 实验室应有适当的防火、防爆、防电击等安全措施。

7.3.2 严格限制未经授权的人员进入实验室。

7.4 废弃物处理

遵守相关法规，对实验室废弃物进行安全、合规的处理，避免对环境造成污染。

7.5 应急预案

7.5.1 制定针对可能发生的紧急情况的应急预案，如实验室事故、生物泄漏等。

7.5.2 定期对员工进行应急培训，确保他们知道如何正确应对。

8 记录和报告

8.1 记录

8.1.1 实验记录

8.1.1.1 实验过程中应详细记录所有关键步骤和操作，包括细胞采集、分离、培养、传代、质量评估等。

8.1.1.2 记录应包含实验日期、操作人员、实验条件、试剂使用等信息。

8.1.1.3 实验记录应清晰、准确，避免涂改或删除。

8.1.2 设备使用与维护记录

8.1.2.1 记录设备的使用情况，包括使用时间、操作人员、设备状态等。

8.1.2.2 定期对设备进行维护和校准，并记录维护日期、维护内容、校准结果等信息。

8.1.3 质量控制记录

8.1.3.1 记录试剂、培养基等的质量检查结果，包括生产日期、有效期、批次等。

8.1.3.2 记录细胞来源的鉴定结果和细胞培养过程中的监控数据。

8.1.4 安全性记录

8.1.4.1 记录实验室安全检查和事故处理情况，包括生物安全、化学安全、物理安全等方面。

8.1.4.2 记录废弃物处理情况，确保符合相关法规和标准。

8.2 报告

8.2.1 实验报告

8.2.1.1 实验完成后应编写详细的实验报告，包括实验目的、方法、结果和结论等。

8.2.1.2 报告中应包含实验数据的统计和分析，以及图表、图片等辅助材料。

8.2.2 质量评估报告

8.2.2.1 在细胞放行前，应编写质量评估报告，对细胞的质量进行全面评估。

8.2.2.2 报告中应包含细胞数量、活性、纯度、表型等指标的检测结果和分析。

8.2.3 安全性报告

8.2.3.1 定期编写实验室安全性报告，总结实验室安全管理和事故处理情况。

8.2.3.2 报告中应包含安全检查结果、事故原因分析、改进措施等内容。

8.2.4 放行报告

8.2.4.1 在细胞放行时，应编写放行报告，记录细胞放行的决策过程和依据。

8.2.4.2 报告中应包含细胞质量评估结果、放行标准符合情况、放行日期等信息。