

团 体 标 准

T/XXX XXXX—XXXX

人类血来源的自然杀伤细胞（NK 细胞）制 剂制备质量管理规范

Specification for quality management of human-blood originated natural killer
cell(NK cell) reagent preparation

征求意见稿

（在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上）

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

中国食品药品企业质量安全促进会 发 布

目 次

前 言 II

1 范围 3

2 规范性引用文件 3

3 术语和定义、缩略语 3

4 基本原则 4

5 NK 细胞制备 5

6 质量控制的检验方法 7

7 质量控制的检验分类 8

8 NK 细胞冻存、运输与复苏 8

9 NK 细胞制剂的放行 8

10 追溯 8

11 保密 8

参 考 文 献 10

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。

本文件由深圳市中佳生物医疗科技有限公司提出。

本文件由中国食品药品企业质量安全促进会归口。

本文件起草单位：深圳市中佳生物医疗科技有限公司，珠海贝索细胞科学技术有限公司，天津灏洋华科生物科技有限公司，深圳中旭细胞再生医学研究有限公司，湖南华科生物科技有限公司，中山大学，深圳理工大学，湖南中医药大学，深圳市第二人民医院，深圳市第三人民医院，中国检验检疫科学研究院粤港澳大湾区研究院，广州瑞铂茵健康科技有限公司，广州市天河诺亚生物工程有限公司，紫程瑞生会（北京）生物技术有限公司，深圳华大基因细胞科技有限责任公司，中检陆桥（中山市）科技有限公司，炳盛荣（深圳）生物科技有限公司，深圳中佳生华生物科技有限公司，深圳市国重生物科技有限公司，深圳官芯生物科技有限公司，深圳市中安康华生物科技有限公司，朗天生物科技（深圳）有限公司，深圳市佳科生物科技有限公司。

本文件主要起草人：刘佳、肖亮、王云帆、孔伟圣、蓝欣、高旭、张嫣、张翠坤、李石英、沈晓军、黄建华、段福宇、魏玲、白晓勇、吴芬芳、魏伟、许超、黄豪英、张诗超、段晓兵、费锡华、陈建勋、徐凤萍、龚秀丽、龚卓、马德龙、李雁飞、张苹、林志明、王得中、徐晓娟、杨志华。

人类血来源的自然杀伤细胞（NK 细胞）制剂制备质量管理规范

1 范围

本文件规定了人类血来源的自然杀伤细胞（NK细胞）制剂制备机构在制备过程中NK细胞的采集和分离、NK细胞制备、NK细胞制剂的质量控制、NK细胞冻存、运输与复苏、NK细胞制剂的放行等过程中的基本要求和原则，保证NK细胞制剂的安全性和生物学效应。

本文件适用于NK细胞制剂制备的所有阶段。

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/T 38576-2020 人类血液样本采集与处理
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

自然杀伤细胞 nature killer cell

具有直接杀伤功能的天然免疫效应细胞，能够抵御病毒感染、对肿瘤细胞进行免疫监视和清除。

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

外周血单个核细胞 peripheral blood mononuclear cell

血液中具有单个核的细胞，主要包括淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞和少量其他细胞类型。

3.1.4

淋巴分离液 lymphocyte separation medium

一种密度介于 1.075 ~ 1.090 g/ml 之间而近似于等渗的溶液，用做密度梯度离心，使一定密度的细胞按相应密度梯度分布，从而将各种血细胞加以分离。

3.1.5

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。

3.1.6

台盼蓝 trypan blue

也称台盼兰、锥虫蓝、曲利苯蓝，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。活细胞不会被染成蓝色，而死细胞会被染成淡蓝色。台盼蓝可被巨噬细胞吞噬，故可用于巨噬细胞的活体染色剂。

3.1.7

知情同意 cryoprotectant

供体对生物样本（本文件中为“外周血”）捐赠的目的和研究用途等明了和认可。以生物样本供体自愿同意参与为原则，以当事双方共同签署知情同意书为具体体现。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。

3.1.8

冻存液 release testing

能保护细胞在冷冻和复苏过程不受损害的溶液或试剂。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ACD：枸橼酸葡萄糖溶液（Acid Citrate Dextrose）

CMV：巨细胞病毒（cytomegalo virus）

EBV：人类疱疹病毒（Epstein-barr Virus）

EDTA：乙二胺四乙酸（Ethylene Diamine Tetraacetic Acid）

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）

NK细胞：自然杀伤细胞（nature killer cell）

PBMC：外周血单个核细胞（peripheral blood mononuclear cell）

4 基本原则

4.1 总体要求

NK细胞制剂的制备包括NK细胞的采集和分离，NK细胞制备，NK细胞制剂的质量控制，NK细胞冻存、运输与复苏，NK细胞制剂的放行等全过程。制备机构应建立健全NK细胞制剂制备的质量管理体系，结合NK细胞制剂制备的特殊工艺，对各个操作环节以及环境和人员等严格要求并实施，最终产品应符合质量标准。

4.2 人员

4.2.1 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。

4.2.2 制备机构应配备与其规模相适应的NK细胞制剂制备人员和质量检测人员，操作人员应具备基本的专业知识，并接受特定的专业技术培训后方可上岗，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。细胞制备技术人员身体健康无传染性疾病，能熟练掌握无菌操作技能，并具备病毒制备或人免疫细胞培养经验，其职称、学历、经历、资格证书、继续教育与健康记录，应建档保存。

4.2.3 建立人员卫生操作规程和自我防护规程，最大限度地降低人员对细胞制备造成污染以及操作人员自我感染的风险。操作规程应包括与健康、卫生习惯及人员着装相关的内容，以及操作过程中避免交叉污染和污物正确处理方法等内容。

4.2.4 维修人员或其他非专业人员进入制备区和质控区应经过培训和批准。

4.3 物料

4.3.1 NK 细胞制剂制备所用的物料是指制备中所使用的试剂耗材、生物活性因子以及与细胞制剂直接接触的包装材料及外包装材料等。

4.3.2 NK 细胞制剂制备所用的样本及物料应符合相应的质量标准。进口物料应符合国家相关的进口管理规定。细胞制剂制备中使用的物料管理应参照《中华人民共和国药典》中的《生物制品生产用原材料及辅料质量控制规程》实行管理。物料供应商应有相应的资质，并提供证明文件。

4.3.3 培养过程中对培养基、活性因子等外源蛋白的要求如下：

- a) 所有使用的培养基、活性因子等外源蛋白应有明确的来源及批号，应有质量检定合格报告；
- b) NK 细胞体外扩增培养应尽量避免动物或人源物质如血清等制品的使用，若必须使用，需要开展相关研究，证明使用的必要性和合理性；严禁使用疫病流行区来源和未经过安全性验证的动物血清等制品。NK 细胞制剂制备所用的物料是指制备中所使用的试剂耗材、生物活性因子以及与细胞制剂直接接触的包装材料及外包装材料等。

4.3.4 NK 细胞制备过程中所使用的培养皿或培养袋等耗材和细胞因子等均需符合相应的质量标准。

4.3.5 制备机构应建立物料检验和放行质量标准，对生物活性试剂，制备机构应有相应措施确定有效期和保存条件，并在有效期内使用。

4.3.6 制备机构自制的试剂(如血浆、抗原等)，应建立质量标准、编号及批号的编制操作规程，并经检验合格后使用，每种物料均应编制唯一的编号，并有制备记录。

4.4 场地与设施设备

4.4.1 NK 细胞制剂制备机构的场地设计建造应满足以下要求：

- a) 选址应符合《药品生产质量管理规范》的要求，空气质量标准应符合 GB 3095 标准分级二级标准；
- b) 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；
- c) 各功能区应按 NK 细胞制剂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》的要求。
- d) 应配备独立质量检测实验室，并符合 GB 19489 和 GB 50346 的规定。

4.4.2 NK 细胞制剂制备场所按照不同工艺应至少包括细胞制备区，质控区(支原体测定、内毒素测定、流式细胞仪检测和分子生物学等相关检测)和细胞储存区，各个区域应相对独立。细胞制备区、质控区应具有独立的空调系统。制备机构可根据实际情况合理分配和增加所需区域(留样室、办公室、资料档案室、物料储存室、气体储存室等)。

4.4.3 制备机构应根据工艺要求，对各功能区合理设计、布局和使用，应设立洁净区，洁净区的设计、建设、管理、进出、使用、清洁、消毒、环境检测等见药品 GMP 规范无菌药品附录。

4.4.4 NK 细胞的制备应在符合《药品生产质量管理规范》GMP 车间洁净度要求的 B 级背景下 A 级洁净度级别的环境中进行，NK 细胞制剂制备过程中与细胞有关的操作，如细胞分离、扩增、收获等应在非密闭条件下的操作应在 C 级背景下 A 级洁净度级别的环境中进行。

4.4.5 制备机构应设置用于制备感染性样本的独立物理空间，设立独立的空调系统。使用后的器具和相关物品应经过灭活处理后再移出该区域。感染性样本与非感染性样本的处理及制备不得使用同一设备。

5 NK 细胞制备

5.1 NK 细胞的采集和分离

5.1.1 制备机构应建立供者采集标准，进行细胞采集应具备相应的资质，建议使用静脉血采集方案。根据制备要求对采集的外周血进行单个核细胞的分离。

5.1.2 获得供体知情同意后，按照 GB/T 38576-2020 常规无菌抽取新鲜外周血至 ACD/EDTA/肝素抗凝管中。将采集到的血液尽快分离 PBMC，在采集、处理和运输过程中避免冷冻和冷藏。

5.1.3 在符合洁净级别要求的操作间分离 PBMC，种瓶前进行细胞计数及细胞存活率测定。

5.1.4 传染性病毒检测阳性患者的 NK 细胞应在感染性样本制备区进行细胞分离、培养、收集，完成制备过程。操作完毕应彻底清场、并应验证确认无该次操作残留感染风险物后方可进行后续供者的样品制备。

5.1.5 样本送达时应附细胞制备申请单，内容包括但不限于：

- a) 患者姓名缩写、筛选号或入组编号或其他唯一识别码；
- b) 患者临床诊断，肿瘤特异性靶点信息；
- c) 实验室检测的结果：血常规及分类、HIV、HCV、HBV、EBV、CMV，HTLV，梅毒、肝肾功能、凝血检测；如果是异体治疗回输，应做 ABO 血型、Rh 血型配型以及 HLA 配型检测；
- d) 治疗方案：细胞的种类、治疗次数、回输方式等；
- e) 知情同意书。

5.2 NK 细胞制剂的制备要求

5.2.1 NK 细胞制备应按照经过验证后批准的操作规程的要求进行，并有相关记录。

5.2.2 在感染性样本操作区内，操作人员应穿戴该区域专用的防护服。

5.2.3 在细胞培养耗材及培养箱上进行标识，并采取措施避免交叉污染。

5.2.4 操作前应检查所领用的包装材料正确无误，核对包装产品和所用包装材料的名称、规格、数量、质量状态，且与操作规程相符。

5.2.5 淋巴分离液、培养基等试剂应符合相关质量要求。

5.2.6 细胞扩增过程中每更换一次培养体系应准确计数，应根据质量要求对细胞浓度及培养时间进行调整。

5.2.7 NK 制剂的收获分为新鲜剂型和冻存剂型，冻存宜采用全封闭冻存袋的方式，在气相液氮储存环境下储存。

5.2.8 每批次细胞培养结束后，应进行清场，制备场所和设备应没有与本次制备有关的物料、产品、记录等遗留。

5.2.9 应建立 NK 细胞制剂批号编制规程。每批细胞制剂应编制唯一的批号，并建立出入登记记录制度。

5.2.10 应避免出现任何偏离工艺规程或操作规程的偏差，如出现偏差，应按照偏差处理操作规程执行。

5.3 NK 细胞制剂的质量控制

5.3.1 制备机构应具有 NK 细胞制剂的检测能力，并配备相关专业技术人员和设备，建立制剂质量标准，确立制剂质量检验操作规程，所有检测方法应经过验证。

5.3.2 对于培养后不经冻存，直接回输的 NK 制剂，应加强培养的全过程质量控制，设置合理的取样点，并采用合理的快速检测方法进行质量控制。

5.3.3 如果细胞培养基内添加成分可能会对细胞制剂质量或安全性产生影响，应对培养基及其他添加成分残余量进行检测，如细胞因子等。

5.3.4 制备机构应在 NK 细胞制剂制备过程中开展质量检测，制剂的检验应由制备机构负责人指定有资质

的人员进行。制备机构可以委托有资质的第三方开展相关质量检测。检测结果应有质量负责人或质量授权人签字审核。

5.3.5 制备机构应建立 NK 细胞制剂留样操作规程，留样应至少保存至使用结束后三个月。

5.3.6 质量控制的技术要求

5.3.6.1 细胞形态

体外培养呈悬浮状，活化后体积变大或形状变为不规则。

5.3.6.2 回输数量

收集之前，每毫升 NK 细胞密度须在 3×10^6 以上，单次回输数量 50 亿数量以上。

5.3.6.3 终产品中 NK 细胞免疫表型

外周血来源终产品中 NK 细胞免疫表型 $CD3-CD16+CD56+ \geq 80\%$ ，脐带血来源终产品中 NK 细胞免疫表型 $CD3-CD16+CD56+ \geq 80\%$ 。

5.3.6.4 细胞活率

新鲜制备未冻存 NK 细胞活率 $\geq 95\%$ ；冻存 NK 细胞复苏后应用前 $\geq 90\%$ 。

5.3.6.5 无菌试验和支原体检测

真菌、细菌、支原体、衣原体、病毒等均应为阴性。

5.3.6.6 内毒素

内毒素应 $\leq 0.5 \text{ EU/mL}$ 。

5.3.6.7 杀伤作用

NK 细胞制剂对特异性肿瘤细胞的杀伤作用。

6 质量控制的检验方法

6.1 细胞形态

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 回输数量

使用全自动细胞计数仪精确计数

6.3 终产品中 NK 细胞免疫表型

按流式细胞仪应用手册上机检测，CD3、CD16、CD56 均为胞外染色，圈出 NK 细胞群 $CD3-CD16+CD56+$ ，得到的检测结果用软件综合分析，具体参考其软件使用说明。

6.4 细胞活率

使用台盼蓝检测 NK 细胞是否存活。活细胞不会被染成蓝色，而死细胞会被染成淡蓝色。

6.5 无菌试验和支原体检测

真菌、细菌和支原体按照《中华人民共和国药典(2020 年版)》检验。人类免疫缺陷病毒按照 WS 293 检验。乙型肝炎病毒、人类嗜 T 细胞病毒、人类疱疹病毒、人巨细胞病毒按照《全国临床检验操作规程》检验。丙型肝炎病毒按照 WS213 检验。梅毒螺旋体按照 WS273 检验。

6.6 内毒素

内毒素按照《中华人民共和国药典(2020 年版)》检验。

6.7 杀伤作用

按照流式细胞术的检测规程，流式细胞仪检测共孵育细胞中 CFSE 阳性靶细胞中 7-AAD 阳性细胞比例，得到的检测结果用软件综合分析，具体参考其软件使用说明。

7 质量控制的检验分类

7.1 批

在一个生产周期中，同一生产线、同一来源、同一代次、同一工艺制备出来的产品为一批。

7.2 抽样

在同一批的产品中随机抽取 3 个最小包装单元。

8 NK 细胞冻存、运输与复苏

8.1 制备机构应建立 NK 细胞的冻存和复苏操作规程，在规定的温度范围内储存细胞。应对冻存工艺（包括冻存液和冻存容器等）和复苏工艺进行验证，验证项目宜包括生物学效力、细胞免疫表型、活细胞数及比率、功能细胞数和安全性相关的内容等。

8.2 应建立 NK 细胞制剂运输的标准操作规程，运输方式等应经过验证。

9 NK 细胞制剂的放行

9.1 制备机构应建立 NK 细胞制剂放行的操作规程，符合质量标准的 NK 细胞制剂由质量管理负责人或质量授权人批准后方可放行。

9.2 NK 细胞制剂经放行后方可进行回输。

9.3 每批次的 NK 细胞制剂放行检测项目应至少包括：无菌检测、支原体检测、内毒素检测、细胞存活率、细胞数量、NK 细胞表型以及可能的毒性物质残留等。

9.4 NK 细胞制剂制备后需立即进行回输，可采用经过验证的快速检测方法。但应建立规程，规定采用快速检测方法放行后，使用现行通用检测方法检验出现不合格结果时采取的措施。

10 追溯

10.1 应建立完整的细胞制备记录系统、标识标签系统和免疫细胞制剂编码系统，以便于 NK 细胞制剂的辨识并防止制剂混杂。记录和标识应遵循相关法律和规范的要求。

10.2 细胞制备记录包括每天的细胞状况，细胞数量，细胞因子浓度等具体信息。标识系统应记录患者信息、细胞制剂名称、批号、收获日期及时间、规格（细胞数量/体积）、储存条件、有效期等。

10.3 每个患者的信息和操作全过程应双人复核。

10.4 每份 NK 细胞制剂应编制唯一的编码。编码应能追溯到患者信息以及该细胞制剂操作和最终处理的所有记录。应建立相关程序保证新旧编码能够关联。

10.5 转移和运输记录应能追溯 NK 细胞制剂从一个机构到另一个机构的流转过程。转移和运输记录应包括：NK 细胞制剂发放和接收的日期和时间、运输过程中的任何延误或其他突发状况引起的问题及相应的处置记录。

10.6 制备机构应建立不良反应报告和收集制度，在对不良反应进行分析时，应能追溯到所使用 NK 细胞制剂制备的相关记录。

11 保密

应采取措施，防止病人的隐私信息被泄露。

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国药典(2020年版)
 - [2] 药品生产质量管理规范
 - [3] 干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则
 - [4] 药品GMP规范无菌药品附录
 - [5] 全国临床检验操作规程
-