

团 体 标 准

T/FDSA XXXX—XXXX

外周血单个核细胞（PBMC）全封闭自动化分 离技术规范

Technical Specification for Automated Isolation of Peripheral Blood Mononuclear
Cells (PBMC)

（工作组讨论稿）

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

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 设备及物料	2
6 工艺流程	3
7 质量控制	5

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。

请注意本文件中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。

本文件由上海细胞治疗集团股份有限公司提出。

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：上海细胞治疗集团股份有限公司。

本文件主要起草人：

外周血单个核细胞（PBMC）全封闭自动化分离技术规范

1 范围

本文件规定了外周血单个核细胞（PBMC）全封闭自动化分离的原料、基本要求、设备及物料、工艺流程、质量控制。

本文件适用于全封闭自动化分离外周血单个核细胞（PBMC）的制备和存储操作。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

外周血单个核细胞（PBMC） Peripheral Blood Mononuclear Cells

外周血中具有单个核的细胞，主要包括淋巴细胞和单核细胞。

3.2

全密闭 Fully Enclosed

从外周血采集开始到分离终产品存储到液氮中全流程无开放操作，即全过程密闭化。

3.3

自动化 Automation

除简单的设备启动、耗材安装与拆卸、无菌接管与热合等辅助操作以外，分离过程关键操作无需人员介入。

4 原理

采用全封闭自动化细胞处理系统及一次性分离套件，基于 Ficoll 密度梯度离心原理，从新鲜外周血中分离出 PBMC。通过自动化设备及软件程序控制，实现全密闭自动化分离-分装成适宜的规格，经程序降温后，在气相液氮中长期保存，以构建健康人 PBMC 细胞库，可用于后期细胞治疗产品制备、细胞功能研究。

5 基本要求

5.1 组织结构及职责

5.1.1 应建立与 PBMC 生产相适应的管理机构，并有组织机构图。

5.1.2 应设立独立的质量管理部门，履行质量保证和质量控制的职责。质量管理部门可以分别设立质量保证部门和质量控制部门。

5.1.3 质量管理部门应当参与所有与质量有关的活动，负责审核所有与本文件有关的文件。

5.2 人员要求

5.2.1 应当配备足够数量并具有适当资质（含学历、培训和实践经验）的管理和操作人员，应当明确规定每个部门和每个岗位的职责。岗位职责不得遗漏，交叉的职责应当有明确规定。每个人所承担的职责不应当过多。

5.2.2 所有人员应当明确并理解自己的职责，熟悉与其职责相关的要求，并接受必要的培训，包括上岗前培训和继续培训。

5.2.3 职责不应委托给他人。确需委托的，其职责可委托给具有相当资质的指定人员。

5.3 环境要求

5.3.1 厂房的选址、设计、布局、建造、改造和维护应符合 PBMC 生产要求，应当能够最大限度地避免污染、交叉污染、混淆和差错，便于清洁、操作和维护。

5.3.2 应当根据厂房及生产防护措施综合考虑选址，厂房所处的环境应当能够最大限度地降低物料或产品遭受污染的风险。

5.3.3 应当有整洁的生产环境；厂区的地面、路面及运输等不应当对 PBMC 的生产造成污染；生产、行政、生活和辅助区的总体布局应当合理，不得互相妨碍；厂区和厂房内的人、物流走向应当合理。

5.3.4 应当对厂房进行适当维护，并确保维修活动不影响 PBMC 的质量。应当按照详细的书面操作规程对厂房进行清洁或必要的消毒。

5.3.5 厂房应当有适当的照明、温度、湿度和通风，确保生产和贮存的产品质量以及相关设备性能不会直接或间接地受到影响。

5.3.6 厂房、设施的设计和安装应当能够有效防止昆虫或其它动物进入。应当采取必要的措施，避免所使用的灭鼠药、杀虫剂、烟熏剂等对设备、物料、产品造成污染。

5.3.7 应当采取适当措施，防止未经批准人员的进入。生产、贮存和质量控制区不应当作为非本区工作人员的直接通道

6 设备及物料

6.1 设备

6.1.1 一般要求

关键设备首次使用前应开展 IQ、OQ 和 PQ 的验证，确保设备性能满足使用要求。

6.1.2 关键设备及性能

6.1.2.1 全封闭自动化细胞处理系统

应至少满足：离心杯容量应 ≥ 300 mL；180 mL 外周血回收 PBMC 数应 $\geq 1.5E8$ 、完成全部操作时长 ≤ 75 min、最小能满足 1 mL 小体积分装能力；全流程应密闭化操作，并按照工艺特点设置相应取样接口。

6.1.2.2 无菌接管机

一次性热熔片的使用及通过局部高温达到管路无菌连接；每年定期开展确认，如无菌接管机至少进行 1 次接管后压力和拉扯实验，以确认无菌接管效果。

6.1.2.3 热合仪

每年至少进行 1 次热合后压力实验，以确认设备热合效果。

6.1.2.4 自动转液仪

能够全密闭实现瓶转袋操作。

6.1.2.5 细胞计数仪

宜使用 AO/PI 计数。

6.1.2.6 程序降温设备

使用程序降温仪或同等功能的程序降温盒。

6.1.2.7 气相液氮罐

长期低温保存 PBMC。

6.2 关键物料

关键物料包括以下：

- a) 细胞冻存液：
- b) Ficoll：
- c) 一次性细胞处理套件：配套密闭自动化设备使用，实现全流程密闭化，能够灵活进行不同规格冻存袋连接，并能够实现一次分装多袋次，避免反复进行接管-热合操作；
- d) 一次性转液管：满足在 C 级环境中实现瓶转袋操作。

注：C 级环境指生产环境的一般区域，要求空气中的微生物数量每立方米不超过 1 000 个。

7 工艺流程

7.1 一般要求

使用新鲜外周血经过全密闭自动化细胞处理系统进行 PBMC 分离处理，添加标准冻存液作为细胞保护剂，然后分装入冻存袋，最后经程序降温后，转移至气相液氮中长期保存。工艺流程图如图 1 所示。

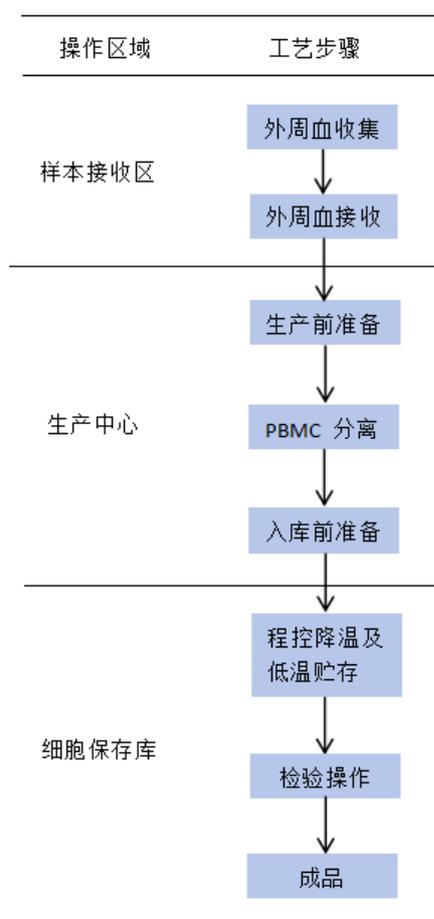


图1 全封闭自动化分离 PBMC 流程

7.2 外周血采集

外周血的采集应在二级及以上或专业采血机构进行；年龄在 18 周岁以上，若是患者建议在放化疗前采血，有利于分离存储活力较好的 PBMC，采集量 180 mL~200 mL 之间；人员采集前需进行体检，开展必要的病毒筛查。

7.3 外周血接收

7.3.1 外周血采集后，使用 2 °C~8 °C 低温转运箱运输至样本接收处。

7.3.2 接收人员核对血液样本标识信息（如患者姓名、样本编号、采集日期等）及采集时间。

7.3.3 生产人员在生产前再次确认样本信息及采集时间，确保血液采集时间至开始生产时间在规定的

时间以内（一般为 48 h 以内，24 h 以内更佳），避免血液样本放置时间过长影响细胞活性。

7.4 生产前准备

7.4.1 试剂配制

按照规定比例配制清洗液。

7.4.2 试剂转袋

7.4.2.1 手动转袋：分别将标准冻存液、Ficoll、清洗液手动转移至相应无菌液袋中，操作过程需在生物安全柜内进行，确保无菌操作。

7.4.2.2 自动转液仪转袋：使用自动转液仪将 Ficoll、清洗液转移至无菌液袋，提高转液效率和准确性，同时保证无菌环境。

7.5 PBMC 分离

7.5.1 打开高通量全封闭自动化细胞处理系统背面电源开关，点击开机按钮。

7.5.2 使用开机卡及登录密码，登录对应操作人员账号。

7.5.3 点击“选择工艺”进入工艺选择界面，选择工艺，设备自动进行压力传感器初始化检测，确保设备正常运行。

7.5.4 按照设备屏幕提示将一次性细胞处理套件等耗材安装在设备上，随后将耗材附带的耗材激活卡置于设备刷卡区进行耗材验证并激活程序，保证耗材与设备匹配且功能正常。

7.5.5 点击“开始”按钮，跳出“电子签名”框，手写签名后点击“确定”按钮，记录操作信息。

7.5.6 按照设备屏幕提示完成操作和信息录入。确保清洗液、细胞冻存液、Ficoll、外周血信息录入，至少包括名称、批号；设备应有必要的提示信息，可采用弹窗、蜂鸣或其他等同的方式单独或组合的形式进行，如管路的打开与关闭、耗材安装位置及必要的报警提示。

7.5.7 录入信息确认后，设备自动进入程序运行，开始分离 PBMC 操作。

7.5.8 设备运行过程中，根据冻存需求使用冻存袋标签专用打印纸打印冻存标签，标签内容包含产品名称、批号、规格、冻存日期等关键信息。

7.5.9 设备能够自动进行 PBMC 清洗，第二次清洗结束后自动从分离杯中抽取上清液至检测袋用于无菌及内毒素检测，取样结束后自动进入重悬及制剂步骤。

7.5.10 按照程序开始分装操作，设备自动按照设置规格分装，并记录开始分装时间。

7.5.11 待分装结束后，按照操作规程使用手持式热合机热合冻存袋，确保冻存袋密封良好。

7.6 入库前准备

7.6.1 程序降温盒入库准备：热合完成后，取下冻存袋，贴上产品标签，将产品放入提前准备的程序降温盒中，并在程序降温盒上贴上对应的产品标签。

7.6.2 程序降温仪入库准备：操作同程序降温盒入库准备，将冻存袋装入程序降温仪专用冻存盒（冰箱中取出），并在冻存盒上贴上产品标签。

7.6.3 完成包装后，再次确认样本信息（名称、规格及数量等），立即将产品及检测样本转移至 2-8℃ 低温转运箱中，防止样本温度变化影响细胞活性。

7.6.4 待产品处理完成后，热合取下检测袋，用于无菌、内毒素及支原体检测。

7.7 程控降温及低温贮存

7.7.1 完成生产后，立即通知保存库取走样品，由保存库人员确认样本信息（名称、规格及数量等）后，将样本通过低温转运箱（产品及冻存检测样本）转移至程序降温操作间，并即时开始降温操作，确保开始分装至开始程序降温时间在规定时间内。

7.7.2 根据实际情况选择程序降温盒降温或程序降温仪降温。

7.7.3 程序降温盒降温

将程序降温盒直接置于 -80℃ 冰箱中，第二天取出程序降温盒，将产品转入液氮中长期贮存，记录转移完成时间并登记台账。

7.7.4 程序降温仪降温

7.7.4.1 选择降温程序，确认参数，并录入“产品批次信息”和“数据标签”，程序降温仪参数应符合表 1 的规定。

表1 程序降温仪参数

步骤	参数设置
Step 0	等温至 20.0℃
Step 1	降温速度1.0℃/min, 降温至样品温度-6.0℃
Step 2	降温速度25.0℃/min, 降温至腔体温度-50.0℃
Step 3	降温速度10.0℃/min, 降温至腔体温度-14.0℃
Step 4	降温速度1.0℃/min, 降温至腔体温度-45.0℃
Step 5	降温速度10.0℃/min, 降温至腔体温度-90.0℃
End	NA

7.7.4.2 程序结束后，将产品放入液氮转运箱中，再次确认样本信息（规格及数量等）及标签完整性，并将样本依次尽快转移至气相液氮罐中，记录转移完成时间及登记台账。

7.7.4.3 收集纸质降温曲线，复印后进行将其附入生产记录。

7.7.5 冻存检测样本，可按照检测计划进行取样检测，由保存库于样本进入液氮贮存后不低于 2 个工作日提出请验，确保产品冻存达到稳定状态。检验项目应符合表 2 的规定。

表2 检验项目

样本名称	检测项目	取样量	检测部门
成品质检袋（冻存）	白细胞数（WBC）	质检袋，1 袋	QC
	细胞活率		
成品质检袋（冻存前）	无菌	质检袋，1 袋	QC
注：可根据需求增加细胞表型检测（CD14+、CD45+、CD3+CD4+、CD3+CD8+、CD3-CD56+、CD3+CD56+）。			

7.8 检验操作

7.8.1 拿到检验样品后，在 37℃ 水浴锅中进行解冻，解冻过程需轻柔晃动样品，确保受热均匀，避免细胞损伤。

7.8.2 解冻后，用吸水纸或酒精擦拭纸将表面残留水擦去，用注射器从蝴蝶取样口，取样进行检测，保证检测结果准确性。

7.9 关键工艺参数

关键工艺参数应符合表 3 的规定。

表3 关键工艺参数

工艺名称	工艺参数
血液采集时间至开始生产时间	≤48 h
产品转移条件	2℃~8℃
开始分装至开始程序降温时间	≤2 h
产品贮存条件	气相液氮，-120℃ 以下

8 质量控制

8.1 过程控制

8.1.1 应当配备适当的设施、设备、仪器和经过培训的人员，有效、可靠地完成所有质量控制的相关活动。

8.1.2 应当有批准的操作规程，用于原辅料、包装材料、中间产品、待包装产品和成品的取样、检查、

检验以及产品的稳定性考察,必要时进行环境监测,以确保符合本规范的要求。

8.1.3 由经授权的人员按照规定的方法对原辅料、包装材料、中间产品、待包装产品和成品取样。

8.1.4 检验方法应当经过验证或确认。

8.1.5 取样、检查、检验应当有记录,偏差应当经过调查并记录。

8.1.6 物料、中间产品、待包装产品和成品必须按照质量标准进行检查和检验,并有记录。

8.1.7 在生产过程中,各操作步骤需按照本文件执行,操作人员应及时记录关键操作信息,如设备运行参数、样本信息、操作时间等。

8.1.8 每批产品生产过程中,对中间产品进行无菌、内毒素检测,确保中间产品质量符合要求,避免不合格产品进入后续工序。

8.2 成品检验

成品应符合表 4 的规定。

表4 成品检验规定

项目	指标
无菌	阴性
细菌内毒素	<0.5 EU/mL
支原体	阴性
细胞数	$\geq 1.5 \times 10^8$ Cells/mL
细胞活率	$\geq 70\%$

8.3 不合格品处理

8.3.1 生产过程中发现的不合格中间产品应立即停止后续操作,标识并隔离,分析不合格原因,采取相应纠正措施,如重新处理或报废。

8.3.2 成品检测不合格时,对不合格产品进行标识、隔离和记录,追溯生产过程,分析原因,根据不合格情况决定是否报废或采取其他处理措施,并对同批次产品进行评估和处理。

8.4 记录管理

8.4.1 建立完善的记录管理制度,对生产过程中的所有操作、设备运行参数、样本信息、检测结果等进行详细记录,记录应真实、准确、完整、可追溯。

8.4.2 记录永久保存,以便在需要进行查阅和追溯,确保产品质量的可追溯性。