



团 体 标 准

T/ZZB XXXX—XXXX

NK 细胞扩增试剂

NK cell amplification reagent

（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

浙江省品牌建设联合会 发 布

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 技术要求 1

6 试验方法 2

7 检验规则 6

8 标志、标签、运输、贮存 6

9 质量承诺 7

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。

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这些专利的责任

本文件由××××提出并归口管理。

本文件由××××牵头组织制订。

本文件起草单位：杭州中赢生物医疗科技有限公司。

本文件主要起草人：。

本文件评审专家组长：。

本文件由××××负责解释

NK 细胞扩增试剂

1 范围

本文件规定了自然杀伤细胞（NK）扩增试剂（滋养细胞法）的标准要求，包括术语和定义、基本要求、技术要求、试验方法、检验规则、标志、标签、使用说明书、包装、运输及贮存和质量承诺。

本文件适用于NK细胞的体外培养。

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/T 191—2008 包装储运图示标志

SN/T 2242 自然杀伤细胞活性试验

2020年版《中华人民共和国药典》三部、四部

3 术语和定义

SN/T 2242界定的术语和定义适用于本文件。

4 基本要求

4.1 设计研发

4.1.1 应具备 NK 细胞扩增试剂产品工艺设计能力。

4.1.2 应依托细胞转染技术，构建细胞库。

4.2 原材料

4.2.1 应采用细胞株终端溯源至 ATCC 或其他可靠来源的细胞库的细胞株。

4.2.2 胎牛血清应具备生物安全性说明。

4.3 工艺及装备

4.3.1 应具备纯化水制备系统。

4.3.2 应具备完善的超低温保存体系，通过程序降温，液氮储存设备，保证产品质量的稳定性。

4.3.3 具备空气净化系统，应不低于药品生产质量管理规范要求的 C+A 标准的洁净级别。

4.4 检测能力

4.4.1 应具备准确度、精密度、线性范围、稳定性等相关性能的检测能力。

4.4.2 应配备 CO₂ 培养箱、恒温水浴锅、离心机、细胞计数器、流式细胞仪、恒温培养箱等检测设备。

5 技术要求

5.1 外观

-130℃以下或液氮贮存条件中，试剂应为固体；包装外观清洁、无破损；标签字迹清晰。

5.2 装量

5.2.1 标准装量：[（4 ml±0.2）+（1 ml±0.1）]/套。

5.2.2 定制装量：供需双方商定。

5.3 无菌检查

应为阴性。

5.4 细菌内毒素检查

细菌内毒素 ≤ 1 EU/ml。

5.5 支原体检查

应为阴性。

5.6 NK 细胞扩增试剂扩增后 NK 细胞质量

5.6.1 培养的效应细胞纯度（第 12-14 天）

$\geq 86\%$ 。

5.6.2 培养的 NK 细胞扩增倍数（第 12-14 天）

≥ 1500 倍。

5.6.3 培养的 NK 细胞杀伤能力（第 12-14 天）

效靶比为20/1时，与A549或K562细胞共培养4小时，杀伤率不低于80%。

6 产品稳定性

6.1 批内精密度

$CV \leq 10.0\%$ ($n=10$)。

6.2 批间精密度（批间差）

$CV \leq 6.0\%$ 。

6.3 效期稳定性

按照8.9.3试验后，应符合5.1~5.6的要求。

7 产品安全性研究

7.1 体外成瘤性

7.1.1 阳性对照组形成明显的大量细胞集落，阴性对照组没有形成明显的细胞集落。

7.1.2 待检组应同阴性对照组结果。

7.2 体内成瘤性

经病理学检查，阳性对照组的接种动物至少有9只动物在注射部位或转移部位形成瘤，并且组织病理学及基因型分析显示形成瘤的细胞性质与接种的细胞一致，溶媒对照组和待检组的接种动物无体表结节生长，病理学检查给药部位无异常，受检组织/脏器无明显与待检品相关异常。

7.3 致瘤性

接种部位或其他远端部位无进行性生长肿瘤。

8 试验方法

8.1 测定器材

生物安全柜、生物显微镜、CO₂培养箱、恒温水浴锅、-20℃冰箱、-80℃冰箱、2℃~8℃冰箱、离心机、细胞计数仪、流式细胞仪、恒温培养箱等。

8.2 试剂的配制

药用级液体试剂可直接使用；其它试剂经配制后根据工艺需求可进行除菌过滤。

8.3 外观检测

在自然光下，以白色为背景，正视目测观察。

8.4 装量检测

用适用的量具量取。

8.5 无菌检查

根据2020版《中华人民共和国药典》四部通则1101无菌检查法检查。

8.6 细菌内毒素检测

根据2020版《中华人民共和国药典》四部通则1143细菌内毒素检查法检查。

8.7 支原体检查

根据2020版《中华人民共和国药典》四部通则3301支原体检查法检查。

8.8 NK 细胞扩增试剂扩增后 NK 细胞质量检测

8.8.1 细胞纯度检测

使用流式细胞仪检测细胞纯度。

8.8.2 培养的 NK 细胞扩增倍数

按照产品说明书进行细胞培养，培养到12~14天后，将混匀的细胞悬液使用血球计数板计数，计数结果与初始的NK细胞数量进行对比。

8.8.3 细胞杀伤能力检测

使用RTCA(Real Time Cellular Analysis)检测台观察NK细胞对A549细胞或K562细胞生长的影响。

8.9 精密度检测

8.9.1 批内精密度检测

取同一批号试剂各10套，测定同一份外周血标本，计算10套样品的测定结果的变异系数CV(%), 检测项目为使用试剂后的NK细胞细胞纯度、扩增倍数和细胞杀伤能力。

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

——S 为样本标准差；

—— $\bar{X}$ 为样本平均数。

8.9.2 批间精密度检测

取3个批号试剂，每个批号3套，分别测定同一份试剂标本，计算3批试剂的细胞纯度、扩增倍数和细胞杀伤能力测定总均值和总标准差，得到出变异系数CV(%)，检测项目为使用试剂后的NK细胞纯度、扩增倍数和细胞杀伤能力。

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：

——S 为样本标准差；

—— $\bar{X}$ 为样本平均数。

8.9.3 效期稳定性试验方法

参照2020版《中华人民共和国药典》三部，按市售包装，在-130℃或液氮条件下贮存，检测外观、装量、无菌、细菌内毒素、支原体、培养后NK细胞的质量指标变化情况等。其结果应符合规定。

8.10 产品安全性

8.10.1 体外成瘤性

使用低熔点琼脂模拟细胞在体内的微环境培养细胞，通常使用其它已知具有成瘤性的细胞作为阳性对照，对照组与实验组同步操作。常规培养3周左右，培养过程中可视情况适当地补充细胞培养液，直到阳性组在显微镜下明显观察到大量细胞集落，培养终止。使用4%多聚甲醛固定，结晶紫染色，在显微镜下观察并拍照记录。

8.10.2 体内成瘤性

8.10.2.1 本试验参照 2020 版《中华人民共和国药典》三部-生物制品通则-生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制-附录 2 成瘤性检查法。

8.10.2.2 成瘤性是指待检细胞接种动物后，接种细胞在动物体内形成（肿）瘤的过程，成瘤性检查的目的是确定细胞基质接种动物后形成（肿）瘤的能力。

8.10.2.3 待检细胞制备

从MCB或WCB复苏细胞，扩增至或超过生产用细胞龄限定代次10代以上，收获细胞并悬于无血清液体中（如PBS），制备成浓度为每1ml含 5×10^7 个活细胞的待检细胞悬液，细胞活力应不低于90%，用于成瘤性检测。

8.10.2.4 阳性对照细胞

用HeLa或HeLaS3细胞或其他已知成瘤性为阳性的细胞，扩增至所需细胞量，用与待检细胞相同的液体悬浮细胞，并制备成浓度为每1ml含 5×10^6 个活细胞的悬液，细胞活力应不低于90%，作为阳性对照细胞。

8.10.2.5 阴性对照细胞

如需要，可用人二倍体细胞作为阴性对照，扩增至所需细胞量，用与待检细胞相同的液体悬浮细胞，制备成浓度为每1ml含 5×10^7 个活细胞的待检细胞悬液，细胞活力应不低于90%，作为阴性对照细胞。

8.10.2.6 动物

下述两种动物可任选其一。

a) 裸鼠 4~7 周龄，尽量用雌鼠，每组至少 10 只。如使用新生裸鼠，则为 3~5 日龄。

b) 新生小鼠 3~5 日龄，体重 8~10g 小鼠，每组 10 只，在出生后第 0 天、第 2 天、第 7 天和第 14 天，分别用 0.1ml 抗胸腺血清（ATS）或球蛋白处理后用于试验。

8.10.2.7 动物接种

待检细胞组每只裸鼠皮下或肌内注射待检细胞0.2ml（即每只裸鼠接种 10^7 个活细胞）；阳性对照组每只注射阳性对照细胞0.2ml，含 10^6 个活细胞。皮下接种时细胞应接种于裸鼠背部区域，肌肉接种时细

胞应接种于裸鼠大腿部位。对于弱成瘤性表型的细胞或新建细胞，最好再使用新生裸鼠进行成瘤性试验，每只接种0.1ml，含 10^7 个活细胞。

8.10.2.8 观察

应定期观察及触摸所有动物在注射部位是否有结节形成，至少观察16周（至少4个月），前3~6周，每周观察2次，之后每周观察1次，并记录结果。

8.10.3 致瘤性

8.10.3.1 本试验参照2020版《中华人民共和国药典》三部-生物制品通则-生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制-附录3致瘤性检查法。

8.10.3.2 致瘤性是指将待检细胞的细胞成分接种动物后，诱导动物本身细胞形成肿瘤的特性，可参照下列方法进行检查。

8.10.3.3 接种动物及数量

采用新生（出生3日龄内）裸鼠、新生仓鼠及新生大鼠进行致瘤性检查，动物接种数量应多于成瘤性检查用量。

8.10.3.4 待检细胞

来源于MCB或WCB的细胞扩增至或超过生产用体外细胞龄至少3~10个细胞倍增水平，用于致瘤性检查。

8.10.3.5 对照

细胞裂解物阳性对照尚不明确，DNA阳性对照可采用含有致瘤性基因的在动物体内可引起致瘤的DNA质粒。设置阴性对照可监测接种动物的自发肿瘤发生频率。设置阴性对照可根据具体情况而定，可采用PBS作为阴性对照。

8.10.3.6 供试品制备及接种

a) 细胞裂解物

采用对病毒破坏最小且能最大释放病毒的方法制备细胞裂解物，如可采用3次冻融及低速离心法，将样本悬浮于PBS中，取含 10^7 个细胞的裂解物50~100 μ l分别于肩胛骨处皮下接种新生裸鼠、新生仓鼠及新生大鼠。接种前应确认样本中无活细胞存在，以免影响结果的有效性。

b) 细胞DNA

提取细胞基质全细胞DNA悬浮于PBS中，可适度进行超声波等剪切处理，取50~100 μ l含不低于100 μ g的DNA样本分别于肩胛骨处皮下接种新生裸鼠、新生仓鼠及新生大鼠。阳性对照组应将阳性对照质粒与待测细胞DNA混合后接种，以确认待测样本无抑制效应。

8.10.3.7 结果观察及分析

结果观察及分析步骤如下：

- 每周观察并触摸接种部位是否有结节形成，应至少观察4个月。
- 观察期内如有1个或多个结节出现，则应每周双向测量结节大小并记录结果，以确定结节是进行性生长、保持稳定还是随时间而消退。有进行性结节生长的动物，当结节达到直径约2cm或国家规定的大小时应处死。
- 观察期末，所有动物均应处死，肉眼及显微观察接种部位或其他部位是否有瘤形成。任何疑似瘤均应采用适宜浓度甲醛溶液固定后进行组织学检查。如可行，建立细胞系并冻存后，以备进行后续的分子技术分析。
- 显微检查肝、心、肺、脾及局部淋巴结是否存在转移性损伤。如有肿瘤形成，则要分析与接种部位原发瘤的相关性；如组织学检查显示与原发瘤不同，则要考虑可能有自发瘤形成，这种情况需跟踪结果。

9 检验规则

9.1 检验分类

产品检验分为出厂检验和型式检验。

9.2 出厂检验

9.2.1 出厂检验由质量管理部门检验，检验合格后方可出厂。

9.2.2 取样参照 2010 版药品生产质量管理规范附录。在本文件规定的限度内具有同一性质和质量，并在同一连续生产周期中生产出来的一定数量的试剂为一批。每批试剂均应编制唯一的生产批号，根据批生产数量，设每批产品的成品数为 n ，当 $n \leq 300$ 时，按 $\sqrt{n}+1$ 取样数随机取样（不少于一个包装）；当 $n > 300$ 时，按 $\sqrt{n/2}+1$ 取样数随机取样。

9.2.3 出厂检验项目为 5.1~5.6 条款，全部出厂检验项目检验合格判断为合格，否则就判断为不合格。

9.3 型式检验

9.3.1 有下列情况之一应进行型式检验：

- a) 新产品投产前；
- b) 正式生产后，如生产工艺发生较大改变，可能影响产品性能时；
- c) 停产 6 个月，恢复生产时；
- d) 主要原料改变、新建原始种子库时；
- e) 相关主管部门进行质量抽查时；
- f) 细胞库建库完成后每间隔 5 年时。

9.3.2 型式试验的样本从生产厂检验合格的成批产品中，随机抽取，抽取方法同 9.2.2 条。

9.3.3 型式检验项目为第 5 章技术要求全部项目。

9.3.4 检验判定：全部项目检验合格，判定合格，否则就判定不合格。

9.4 留样检验

9.4.1 每一生产批次均应留样，用作留样检验或稳定性检验。留样数量不低于出厂检验抽样数量的三分之一（不少于一个包装）且满足试验量。

9.4.2 留样检验适用于产品有效期内的质量跟踪或验证，检验项目与出厂检验相同，只有全部抽样样本的检验项目是合格的，才能判断合格，否则就判断不合格。

9.4.3 稳定性检验按 6.3 条项目测定，只有对全部抽样样本的判断是合格的，才能最终判断合格，否则就判断不合格。

10 标志、标签、使用说明书、运输及贮存

10.1 标志、标签和使用说明书

10.1.1 标志和标签

10.1.1.1 内包装瓶上应有下列标志：

- a) 产品名称、规格；
- b) 生产批号（生产日期）及有效期；
- c) 贮存条件；
- d) 其他内容详见说明书。

10.1.1.2 外包装盒上应有下列标志：

- a) 产品名称、包装规格、商标、执行标准；
- b) 生产企业名称、地址、联系方式、邮政编码；
- c) 生产批号（生产日期）、储存条件及有效期；
- d) 贮存条件。

10.1.2 使用说明书

使用说明书应包含以下内容：

- a) 产品名称和包装规格；
- b) 生产企业名称、住所、生产地址、联系方式；
- c) 主要组成成分、适用范围；
- d) 注意事项、警示以及提示的内容；
- e) 特殊储存、运输条件、方法；
- f) 生产批号（生产日期）、储存条件和有效期；
- g) 说明书的批准及修改日期。

10.2 包装

10.2.1 试剂内包装瓶上贴标签，外包装盒内放说明书。

10.2.2 试剂应有完好的外包装盒，盒内应附有产品使用说明书。

10.3 运输

产品应在 $-60^{\circ}\text{C}\sim 80^{\circ}\text{C}$ 条件下运输，运输时间不超过72小时。

10.4 贮存

产品应贮存于 -130°C 以下或液氮中，有效期不低于6个月。

11 质量承诺

11.1 在规定的包装、贮存条件下，自生产之日起，原包装产品有效期不低于6个月。

11.2 产品均能够保证每个最小包装的可追溯性。客户接收产品后，如对产品质量有异议，在3个工作日内予以答复和解决。设置专业的技术支持人员，负责解答客户相关问题，必要时，可派驻专业技术人员协助客户解决问题。
