

## 免疫细胞体外扩增阶段的质量稳定性监测及安全性风险评估

刘红卫

河北北科生物科技有限公司, 河北 石家庄 050000

**[摘要]**目的: 建立免疫细胞体外扩增全流程的质量稳定性监测体系, 系统评估扩增过程中的安全性风险, 为临床级免疫细胞制品的规范化生产提供理论依据与技术支持。方法: 以 CD3+T 细胞、NK 细胞为代表性免疫细胞, 构建全链条监测模型, 并结合故障模式与影响分析 (FMEA) 方法, 识别扩增过程中的潜在风险点, 评估风险等级并制定防控措施。结果扩增第 5~7d 为细胞活性稳定、活化水平、增殖迅速及功能最强的阶段, 第 14d 细胞增殖放缓, 耗竭标志物表达升高, 功能活性下降。染色体核型稳定, 全流程微生物污染检测均为阴性, 通过 FMEA 方法, 共识别出免疫细胞体外扩增全流程中存在 12 个潜在风险点, 其中培养环境 CO<sub>2</sub>浓度波动、培养基批号差异、细胞接种密度偏差为高风险点 (RPN≥120), 通过实施针对性的干预措施, 风险等级降至中低水平。结论: 建立免疫细胞体外扩增全流程的质量稳定性监测体系, 并结合 FMEA 风险评估, 可以确保免疫细胞制品的质量。

**[关键词]**免疫细胞; 体外扩增; 质量稳定性; 监测体系; 安全性风险评估

DOI: 10.33142/nsr.v2i4.18714

中图分类号: R746

文献标识码: A

## Quality Stability Monitoring and Safety Risk Assessment of Immune Cell in Vitro Expansion Stage

LIU Hongwei

Hebei Beike Biotechnology Co., Ltd., Shijiazhuang, Hebei, 050000, China

**Abstract:** Objective: to establish a quality stability monitoring system for the entire process of in vitro expansion of immune cells, systematically evaluate the safety risks during the expansion process, and provide theoretical basis and technical support for the standardized production of clinical grade immune cell products. Method: using CD3+T cells and NK cells as representative immune cells, a full chain monitoring model was constructed, and combined with Failure Mode and Effects Analysis (FMEA) method, potential risk points during the amplification process were identified, risk levels were evaluated, and prevention and control measures were formulated. The stage of stable cell activity, activation level, rapid proliferation, and strongest function was observed from day 5-7 of amplification. On the 14th day, cell proliferation slowed down, depletion marker expression increased, and functional activity decreased. The chromosome karyotype is stable, and the microbial contamination detection throughout the entire process is negative. Through the FMEA method, a total of 12 potential risk points were identified in the entire process of immune cell in vitro amplification. Among them, fluctuations in CO<sub>2</sub> concentration in the culture environment, differences in culture medium batch numbers, and deviations in cell inoculation density are high-risk points (RPN ≥ 120). By implementing targeted intervention measures, the risk level has been reduced to a medium low level. Conclusion: establishing a quality stability monitoring system for the entire process of in vitro expansion of immune cells, combined with FMEA risk assessment, can ensure the quality of immune cell products.

**Keywords:** immune cells; in vitro expansion; quality stability; monitoring system; security risk assessment

### 引言

抗肿瘤免疫细胞治疗凭借其特异性强、疗效显著等优势<sup>[1]</sup>, 现已成为生物医药领域备受关注的研究热点与发展方向。临床级免疫细胞制品的制备需严格遵循一系列规范化的操作步骤, 其中体外扩增阶段要精确控制培养条件, 使免疫细胞在体外环境中实现安全、稳定的增殖, 是决定

细胞制品质量与疗效的核心环节<sup>[2-3]</sup>。然而, 免疫细胞体外扩增过程受气体环境、培养基成分、培养基的化学组成成分等多种因素影响均可能导致细胞质量出现异质性<sup>[4]</sup>, 引发细胞质量的异质性改变, 影响免疫细胞在临床应用疗效, 甚至导致潜在的安全性风险, 如细胞异常增殖、过敏反应等, 危及患者生命。鉴于此, 为了保障细胞制品的质

量均一性与临床应用安全性,构建针对性强、覆盖全流程的质量稳定性监测体系,系统评估扩增过程中的安全性风险尤为关键<sup>[5]</sup>。本研究以临床常用的 CD3+T 细胞、NK 细胞为研究对象,构建免疫细胞体外扩增阶段的质量稳定性监测体系,同时采用故障模式与影响分析(Failure Mode and Effects Analysis, FMEA)方法,系统识别免疫细胞体外扩增过程中可能出现的潜在风险点,评估其对免疫细胞质量稳定性的影响程度并制定针对性的防控措施,旨在为免疫细胞体外扩增的规范化操作提供技术支持。

## 1 实验材料

细胞来源全部由健康供体提供,收集健康志愿者外周血单个核细胞(Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs),经志愿者知情同意并通过医院伦理委员会审批。采用密度梯度离心法分离 PBMCs,用无血清培养基重悬后备用。

## 2 方法

### 2.1 免疫细胞体外扩增方案

CD3+T 细胞扩增方法:将分离得到的 PBMCs 进行调整浓度,达到  $1 \times 10^6$  cells/mL 的标准浓度,接种于包被抗 CD3 抗体( $5 \mu\text{g/mL}$ )的培养瓶中,确保细胞能够充分与抗 CD3 抗体接触,向培养体系中加入 IL-2( $100 \text{ IU/mL}$ )、抗 CD28 抗体( $2 \mu\text{g/mL}$ ),最后,将接种并添加好各种试剂的培养瓶置于  $5\% \text{ CO}_2$ 、 $37^\circ\text{C}$  培养箱中培养。培养第 3d、第 6d、第 9d 分别向培养体系中精准补加含有  $50 \text{ IU/mL}$  重组人 IL-2 的新鲜培养基,实时监测细胞浓度,始终稳定在  $0.5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$  cells/mL 之间。

NK 细胞扩增方法:将分离得到的 PBMCs 进行调整浓度,达到  $1 \times 10^6$  cells/mL 的标准浓度,向培养体系中加入 IL-15( $50 \text{ ng/mL}$ )、IL-2( $200 \text{ IU/mL}$ ),平稳放置于  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ 、饱和湿度培养箱中培养。为确保细胞持续地扩增,于第 4d、第 8d、第 12d 补加含相应细胞因子的新鲜培养基,在整个扩增过程中,对细胞浓度进行实时监测,确保细胞浓度维持在  $0.5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$  cells/mL。CD3+T 细胞、NK 细胞扩增周期均为 14d。

### 2.2 质量稳定性监测体系构建与实施

为实现对免疫细胞扩增过程全方位的质量把控,构建全链条监测体系,监测指标主要涵盖细胞纯度、细胞功能活性、微生物污染程度等,检测方法如下:采用 CCK-8 法检测细胞活性,于扩增初始、扩增进程中的第 3d、第 5d、第 7d、第 9d、第 12d、第 14d,分别取细胞悬液  $100 \mu\text{L}$  ( $1 \times 10^4$  cells),接种于 96 孔板。接着,向每个孔中加入  $10 \mu\text{L}$

CCK-8 试剂,置于  $37^\circ\text{C}$  的细胞培养箱孵育 2h 后,用酶标仪检测  $450 \text{ nm}$  处吸光度值,计算细胞活性。采用流式细胞术进行检测细胞纯度与表型特征,取扩增初始、扩增进程中的第 3d、第 5d、第 7d、第 9d、第 12d、第 14d 时间点细胞悬液  $1 \times 10^5$  cells,采用流式细胞术进行检测,同时检测记忆表型标志物(CD27)、活化标志物(CD69)、耗竭标志物(PD-1)的表达水平。采用细胞毒性实验(LDH 释放法)检测细胞功能活性。依据现行版《中国药典》中的生物制品无菌试验和支原体检测规程,对细菌、真菌及支原体污染进行检测。此外,于扩增初始、第 14d 检测遗传稳定性。

由细胞制备技术人员、质量控制专员、临床医师等人员组建风险评估团队,团队成员对免疫细胞体外扩增全流程进行梳理与分析,识别潜在故障模式,计算风险优先数,并制定针对性的防控策略。

### 2.3 统计学分析

采用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 免疫细胞体外扩增过程中关键质量属性的动态变化

扩增第 5~7d 为细胞活性稳定、活化水平、增殖迅速及功能最强的阶段,第 14d 细胞增殖放缓,耗竭标志物表达升高,功能活性下降。染色体核型稳定,全流程微生物污染检测均为阴性,见表 1。

### 3.2 免疫细胞体外扩增阶段的安全性风险评估结果

通过 FMEA 方法,共识别出免疫细胞体外扩增全流程中存在 12 个潜在风险点,其中培养环境  $\text{CO}_2$  浓度波动、培养基批号差异、细胞接种密度偏差为高风险点 ( $\text{RPN} \geq 120$ ),补加培养基时机延迟、刺激因子浓度不准确、培养基配制过程污染、生物安全柜操作污染为中风险点,具体见表 2。

## 4 讨论

据全球市场研究数据显示 2022 年全球免疫细胞治疗市场规模已然达至约 150 亿美元<sup>[6]</sup>,并预估于未来五年内以超逾 20% 的年复合增长率持续拓展,然而这一疗法的成功依赖于高质量的免疫细胞制备过程,而体外扩增作为其中的核心环节直接决定了最终产品的疗效与安全性。本研究构建质量稳定性监测体系,系统分析了 CD3+T 细胞与 NK 细胞在体外扩增过程中关键质量属性的动态变化。

**表 1 免疫细胞体外扩增过程中关键质量属性的动态变化**

细胞类型	检测指标	初始阶段 (第 0d)	扩增中期 (第 5~7d)	终末阶段 (第 14d)	P 值
CD3+T 细胞	细胞活性	≥90%	88%~92% (稳定)	82.3%±2.5%	P>0.05 (与 NK 细胞比较)
	扩增倍数	1 倍	对数增殖期 (快速增长)	128.6±15.3 倍	P<0.05 (与 NK 细胞比较)
	纯度	82.5%±3.2%	95.3%±1.8% (峰值)	≥90%	P<0.05 (中期 vs 初始、终末 vs 中期)
	CD69 表达 (活化标志物)	-	68.5%±4.2% (最高)	-	-
	CD27 表达 (记忆标志物)	-	55.3%±3.8%	-	-
	PD-1 表达 (耗竭标志物)	-	12.6%±2.1% (较低)	25.3%±3.5%	P<0.05 (终末 vs 中期)
	细胞毒性 (E:T=20:1)	-	78.5%±5.2% (峰值)	52.6%±4.5%	P<0.05 (终末 vs 中期)
NK 细胞	细胞活性	≥90%	87%~91% (稳定)	81.7%±2.3%	P>0.05 (与 CD3+T 细胞比较)
	扩增倍数	1 倍	对数增殖期 (较快增长)	65.4±10.2 倍	P<0.05 (与 CD3+T 细胞比较)
	纯度	18.6%±2.5%	持续升高	85.7%±3.1%	P<0.05 (终末 vs 初始、中期)
	CD69 表达 (活化标志物)	-	72.3%±4.5% (峰值)	逐渐下降	P<0.05 (中期 vs 终末)
	PD-1 表达 (耗竭标志物)	-	-	18.5%±2.8%	-
	细胞毒性 (E:T=20:1)	-	82.3%±4.8% (峰值)	58.3%±5.1%	P<0.05 (终末 vs 中期)
共性安全指标	微生物污染 (细菌/真菌/支原体)	未检出	未检出	未检出	-
	染色体核型	46, XY/XX (无异常)	-	46, XY/XX (异常率 0)	-

**表 2 免疫细胞体外扩增阶段的安全性风险评估结果**

风险点	严重度 (S)	发生概率 (O)	探测度 (D)	风险等级	防控措施	防控后 RPN
培养基批号差异	8	6	3	高	标准化采购, 优先同批号; 不同批号使用前验证 pH、渗透压等	64
培养环境 CO <sub>2</sub> 浓度波动	9	5	3	高	用实时监控报警 CO <sub>2</sub> 培养箱, 每日记录, 定期校准	54
细胞接种密度偏差	8	5	4	高	全自动细胞计数仪计数, 接种前双人核对	60
刺激因子浓度不准确	7	6	3	中	严格按操作规程配制, 使用前核对浓度, 双人复核	72
生物安全柜操作污染	8	4	3	中	加强人员培训, 规范无菌操作, 定期检测生物安全柜性能	64
培养基配制过程污染	8	5	3	中	无菌环境配制, 配制后无菌检测, 现配现用	70
补加培养基时机延迟	7	5	3	中	设定补加提醒, 严格按时间点操作, 专人负责记录	63
细胞分离过程纯度不达标等 5 个低风险点	≤6	≤4	≥4	低	规范操作流程, 加强过程监控, 定期培训考核	<60

细胞活性与增殖能力作为评估免疫细胞体外扩增质量的关键基础性指标<sup>[7]</sup>, 本期研究结果显示, 两种免疫细胞要保证后续能够稳定扩增, 其初始活性均需达到 90% 及以上。在免疫细胞体外扩增的实验研究与临床实践观察中, 扩增第 5~7d 细胞的增殖速率达到最快, 且细胞的活性指标波动较小, 表现出高度的稳定性<sup>[8]</sup>; 当扩增进行第 10~14d, 细胞分裂与增殖的活跃程度大幅降低, 细胞表面耗竭标志物 PD-1 的表达水平升高, 细胞毒性下降, 提示长期在体外培养环境下, 免疫细胞的功能会受到负面影

响并逐渐耗竭, 因此, 为了免疫细胞治疗的效果与安全性, 需严格把控扩增周期。

细胞纯度与表型特征作为评估免疫细胞制品质量的两个关键维度, 直接影响临床应用效果以及患者的预后<sup>[9]</sup>。本研究中, 在扩增过程中, CD3+T 细胞的纯度持续升高, 而 NK 细胞由于初始纯度较低, 通过体外扩增富集的方法来提高 NK 细胞的纯度。表型分析表明, 在扩增中期, 细胞的活化标志物表达水平达到峰值, 耗竭标志物表达水平最低, 提示在扩增中期, 细胞的活化标志物表达水平最强;

而扩增后期,细胞逐渐呈现出耗竭表型,功能活性下降,进一步开展细胞毒性实验,细胞毒性降低,与表型分析中细胞功能活性下降的结论相一致<sup>[10]</sup>。因此,为了确保体外扩增的免疫细胞能够始终维持良好的功能活性,在体外扩增过程中,运用先进的流式细胞术监测细胞表型的动态变化,及时发现细胞耗竭的早期迹象,及时调整培养条件。本研究结果显示,未发现细菌、真菌及支原体污染,与严格的环境控制、标准操作规程严格操作和过程质控有关;染色体核型分析结果表明,未出现染色体异常。FMEA方法作为一种前瞻性风险评估工具,在生物医药领域的质量控制中得到了广泛的使用。本研究通过FMEA分析,及时发现潜在风险点,及时干预,可以提高扩增过程的稳定性,降低风险等级<sup>[11]</sup>。

综上所述,建立免疫细胞体外扩增全流程的质量稳定性监测体系,并结合FMEA风险评估,识别了扩增过程中的潜在风险点,制定了针对性的防控措施,可以降低安全性风险,确保免疫细胞制品的质量。

#### [参考文献]

[1]中国医药生物技术协会.免疫细胞治疗产品质量控制指南(2021版)[J].中国医药生物技术,2021,16(3):161-208.  
 [2]王丽,陈代雄,方宁,等.脐血CD133<sup>+</sup>细胞体外扩增巨核系祖细胞的研究[J].中国实验血液学杂志,2008,16(3):645-649.  
 [3]NIETO Y,BANERJEE P,KAUR I,et al.Allogeneic NK cells with a bispecific innate cell engager in refractory relapsed lymphoma:a phase 1 trial[J].Nat

Med,2025,31(6):1987-1993.

[4]戴尅戎.非扩增性干细胞治疗理念的形成及其应用前景[J].上海交通大学学报(医学版),2020,40(10):1318-1320.  
 [5]YANKELEVICH M,THAKUR A,MODAK S,et al.Targeting refractory/recurrent neuroblastoma and osteosarcoma with antiCD3×anti-GD2 bispecific antibody armed T cells[J].J Immunother Cancer,2024,12(3):2023-008744.  
 [6]杨瑞,李子越,申艺,等.基于荧光方法的循环肿瘤细胞检测研究进展[J].发光学报,2024,45(6):1015-1032.  
 [7]曹腾宇,孙莉萍,于洋.NK细胞免疫治疗恶性肿瘤的研究进展[J].临床输血与检验,2024,26(2):267-274.  
 [8]刘家权.NK细胞体外杀伤活性检测方法建立与验证[J].中国医药生物技术,2025,20(1):112-117.  
 [9]王丽娟,张叶萍,王金福,等.脐血间充质干细胞的生物学特征及其对造血干/祖细胞体外扩增的支持作用[J].中华血液学杂志,2005,26(2):65-68.  
 [10]杨亮.基于流式细胞检测数据的T细胞培养质量分析方法研究[D].哈尔滨:哈尔滨工程大学,2024.  
 [11]胡泽斌,吴朝晖,任秀宝,等.我国免疫细胞治疗临床研究和应用的现状及管理对策[J].中国医药生物技术,2014,9(5):396-401.

作者简介:刘红卫(1984.11—),毕业院校:河北科技大学,所学专业:药学,当前就职单位:河北北科生物科技有限公司,职务:质量管理部经理,职称级别:质量管理工程师(中级职称)。