

细胞治疗产品药学研究中流式细胞术的方法开发关注点及验证

王靖宇¹, 吴雪伶², 韦 薇^{1*}

(1 国家药品监督管理局药品审评中心, 北京 100076; 2 中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

[摘要] 由于研究手段的有限性和研究对象的特殊性,流式细胞术成为细胞治疗产品研发中的重要工具,在细胞产品药学研究的多方面发挥着重要作用。本文就细胞治疗产品药学研究中流式细胞术方法开发的质控要求、样品处理、荧光偶联抗体的选择、抗体滴定、门控策略等关注点以及流式细胞术目前可参考的方法学验证一般原则进行论述,以供研究者参考。

[关键词] 流式细胞术;细胞治疗产品;荧光偶联抗体;荧光补偿;门控;方法学验证

[中图分类号] R965.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2025)06-0614-05

Development concerns and validation of flow cytometry method in CMC research of cell therapy products

WANG Jing-yu¹, Wu Xue-ling², WEI Wei^{1*}

(1 Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing 100076, China;

2 National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

[Abstract] Due to the limited research methods and the particularity of the research samples, flow cytometry has become an important tool in the development of cell therapy products and plays an important role in many aspects of the CMC research of cell products. This paper discusses the concerns of quality control requirements, sample processing, the selection of fluorescence conjugated antibody, antibody titration, gating strategy in the development of flow cytometry method in the CMC research of cell therapy products, and the general principles of method validation for reference.

[Key words] flow cytometry; cell therapy product; fluorescence conjugated antibody; fluorescence compensation; gating control; method validation

流式细胞术是一种提供溶液中单个细胞快速多参数分析的技术,主要利用流式细胞仪进行样品检测。流式细胞仪利用激光作为光源来产生散射和荧光信号,这些信号由光电二极管或光电倍增管等检测器读取。这些光信号被转换成电子信号,由计算机进行分析,并被写成标准化格式数据文件。细胞群可以根据其荧光或光散射特性进行分析和/或

纯化^[1]。经典的流式细胞仪由三部分组成:液流系统、光学系统、检测分析系统,随着技术的发展,流式细胞仪从最初的单激光器、单荧光通道发展到目前大多为多激光器、多通道,可同时进行多色分析,对一个样品一次进样可获得多个细胞标志物信息,对于样品的分析更加全面。除经典的流式细胞仪外,近些年来还出现了更多融合新技术的流式细胞仪,如声聚焦细胞仪、成像流式细胞仪、质谱细胞仪、光谱流式细胞仪^[1-2]。

流式细胞术是一个强大的工具,在临床检验、免疫学、分子生物学、微生物学等领域均有较为广泛的应用^[1,3-6]。在生物制药领域的工程细胞株构建和筛选、质量研究、药动学/药效学研究等方面也有较

[作者简介] 王靖宇,女,主管药师,主要从事生物制品药学技术审评工作。E-mail:wangjy@cde.org.cn。吴雪伶,女,副研究员,主要从事细胞检定及研究工作。E-mail:wuxueling46@nifdc.org.cn。

[通讯作者] * 韦薇,女,主任药师,主要从事生物制品药学评价工作。联系电话:(010)80996186, E-mail:weiw@cde.org.cn。

[DOI] 10.20251/j.cnki.1003-3734.2025.06.010

广泛的应用^[7-9]。自2017年全球首个自体嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T cell, CAR-T)注射液 Kymriah(诺华公司)产品上市以来,细胞治疗产品出现了研发热潮,流式细胞术也成为细胞治疗研发质控中最重要的工具,如用于原材料的质量控制、评估复杂体外培养过程中细胞生长的速率、分化状态以及最终产品的表征、活力和产品的稳定性等^[7,10]。现阶段在细胞产品中应用较多的仍为经典的分析型多激光、多色流式细胞仪,新兴流式细胞术目前应用还较少。现结合经典流式细胞术自身的技术特点和作为药物研发的细胞产品的特点,对细胞治疗产品中流式检测方法开发的关注点和方法学论证进行论述。

1 细胞治疗产品中流式检测方法开发的关注点

流式细胞术是一个复杂的方法,需要详细了解流式细胞仪、荧光色素、光谱重叠、细胞谱系标记、细胞内过程 and 数据分析。一般来说流式细胞术检测包括样品处理、进样、数据处理三部分,通常需要优化的参数包括但不限于样品的处理条件、抗体的克隆株选择、荧光配色选择、抗体滴度、门控策略等。研究者在方法开发的早期,应充分考虑方法中关键因素的影响,以降低方法不适用的风险^[8]。

1.1 设备状态与质控 在流式进样阶段之前,应完成设备的状态确认。临床与实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)建议开机即应当对仪器的光学系统、荧光分辨率及荧光强度进行监测^[11]。流式细胞术的仪器及试剂供应商一般可提供质控微球用来确认设备测定参数的稳定性和均一性。在每次进样前,可采用荧光微球光路质控品设置和调整仪器光学检测通道的电压和增益,确保其处于所设定的可接受范围内,然而由于质控微球与真实分析物具有较大不同,因此质控微球可提供信息的价值也相对有限^[8]。除商品化质控微球外,在受监管的实验室还建议使用适当的质控样品进行设备状态确认。可用的质控样品包括商业化的全血制剂、冻干细胞(外周血单个核细胞、全血细胞、细胞系)、低温保存的外周血单个核细胞、内部制备的对照品、患者或健康供体样本以及各种新型产品。即使在非监管的实验室,如研究实验室,一般也推荐进行质控样品检测^[12]。

1.2 样品处理 细胞产品通常为分离、纯化后的细胞,一般直接取样进行样本处理即可。取样时需关注所取样品的代表性、取样时样品的均匀度等,避免

取样带来的检测数据偏差。由于细胞产品的待检样品均为活细胞,如不能立即检测,需在方法建立之初对取样后待检样品的贮存条件如暂存时间、温度、光照以及运输条件(如运输距离、运输温度、振摇情况)等敏感因素进行考察,评估样本的稳定性,以保证检测数据的准确性和可靠性。同时研究人员在进行流式分析时还应关注不同批次样品中细胞碎片和死细胞的影响,避免因样品质量差异导致检测数据的偏差。由于细胞治疗产品起始原材料中潜在的病原微生物风险,对于流式实验人员的防护、实验室环境和设备的清洁、废弃物的处理等,均需要符合生物安全的相关规定。

1.3 荧光偶联抗体的选择及用量优化 荧光偶联抗体是流式检测中的关键试剂之一。不同细胞产品在流式配色的设计上有所不同,研究者一般会结合样品来源、产品设计、目标标志物的表达情况以及设备配置情况等进行目标细胞群的染色设计。在临床外周血检测中,一般使用多色方案进行淋巴细胞亚群分析^[13],如在淋巴细胞亚群检测中,可采用CD45和/或CD3作为设门抗体,并利用CD4、CD8、CD16和CD56等单抗特异性标记淋巴细胞某一亚群。在细胞治疗产品中,除了放行检测的少量关键指标外,流式分析还应该补充使用其他检测组(panel)进行更进一步非放行目的的表型和功能分析(如趋化因子受体、激活或衰老标记物、细胞内因子等),这些补充研究在确定产品更广泛的表型和功能方面非常有用,也可能是产品未来变更中重要的预判指标^[10]。

对于荧光偶联抗体的选择,应结合产品特性和检测方法,将有文献报道、权威网站已提供信息或产品说明书中有验证信息的克隆株作为首选,其他的免疫分析技术,如酶联免疫吸附分析、免疫印迹等,也可帮助评估抗体试剂的特异性^[8]。同时需关注其来源、克隆、荧光染料等信息。来源不同的抗体,如鼠抗、兔抗等,其非特异性结合情况可能不同。对于常用的免疫细胞表型分析来说,即使是相同的抗分化抗原(cluster of differentiation, CD)抗体,不同的克隆其抗原结合特性也可能不同。同样,同一CD抗体,使用不同荧光染料标记,其荧光强度和可能存在的荧光重叠也可能不同。多色荧光分析时,实验室不仅要验证每一种单抗的性能,还需要证实其性能不会受抗原封闭处理、荧光猝灭或荧光能量转移的影响。一般抗体单独使用和作为组合成分使用时,检测结果(包括平均荧光强度和阳性率)之间的变

化幅度不得超出 2 倍标准差范围^[11]。对于研究周期长、批次多的项目,荧光偶联抗体批次间差异的影响也需要予以充分评估^[8,12]。

荧光抗体的用量和孵育条件也是流式检测的关键参数。对于市售荧光抗体,试剂生产商一般会建议相应的抗体用量和孵育条件,实际使用中一般会以实际样品进行抗体用量的优化,确保达到最优的抗体/细胞用量比。对于染色温度、时间也应基于不同产品进行优化以确定最佳方法参数。

除了荧光抗体,对于流式细胞术使用的其他试剂,都需充分评估其非特异性结合情况,必要时可使用 Fc γ 受体作为阻断剂^[12]。

细胞治疗产品在开发周期内,随着新的、更优的商业化试剂的出现,存在流式检测抗体进行变更的情况。方法发生变更后应及时开展方法桥接研究,明确变更对于检测数据的影响,以确认历史批次数据是否可桥接。不能桥接的数据应考虑变更后方法的数据量是否足够支持产品质量标准的拟定。自体细胞产品方法桥接时应考虑个体差异的影响,对研究使用细胞批次数的合理性应进行说明。

1.4 荧光补偿 荧光偶联抗体荧光素被激发后的发射波长范围可能较宽,此种情况下其光信号可能被多个通道检测到。因此,当采用双色或多色分析时需评估不同检测通道之间的荧光信号干扰,必要时需进行荧光补偿调节,以确保一种荧光素的光信号来自对应的一个检测通道,同时也要避免过度补偿,以防将双阳性细胞错误地识别为单阳性细胞。一般流式检测方法和设备固定后,针对该方法所建立的补偿矩阵也随之固定下来,由于检测样品的异质性,在数据分析时可能还需要手动进行补偿的微调。荧光补偿除了受荧光素和样本特异性影响外,还与仪器相关,因此当光学检测通道的电压及增益发生变动时,或当仪器维修保养后,都需要进行荧光补偿调整^[13]。

1.5 残留干扰 作为药物进行开发的细胞产品,在研究阶段会出现大量样品同时检测的情况。研究者方法建立时需考虑连续进样中样品的残留问题,尤其是在进行低水平抗原检测时,评估样品间的残留对于样本检测数据的准确性至关重要。应使用实际样品明确检测过程是否有残留,并设置合理的清洁程序,同时在方法标准操作规范中应增加相应要求。

1.6 门控策略 在流式的多参数分析中门是最重

要的参数,流式数据一般以散点图、直方图和等高线图的形式呈现,分析人员可选择不同的呈现方式以帮助正确设门。当细胞表面标志物区分非常明显时,细胞群边界较容易区分,如淋巴细胞亚群分析中 CD3, CD4 和 CD8 阳性细胞独立成群。当细胞群较难区分时,设门就会非常具有挑战性,在不同的情况下可能会额外增加阳性和阴性对照、荧光减一对照 (fluorescence minus one, FMO)、同型对照 (isotype control)、同克隆对照 (isoclonic control) 等^[12,14]。门控策略直接影响流式分析的结果,即使是同一个采集数据,在不同实验人员进行设门处理后得到的结果也很难完全一致。因此,在良好实验规范 (Good Laboratory Practice, GLP) 实验室中,建议在开发过程中尽可能定义并标准化门控策略和分析模板,以减小数据的可变性。同时采用如规定最小或最大门控边界、采用对照等策略,既能给予操作人员一定的灵活度又可以防止有意识或无意识的数据操作^[8],该要求对于药物研发实验室也可借鉴。对于细胞治疗产品,流式分析的门控策略应作为方法标准操作规范的重要内容,在实验人员培训、方法转移等过程中进行详细的培训和说明。避免出现同一方法因不同操作人员或不同场地之间的门控策略差异而造成数据偏差,从而影响临床给药剂量等关键指标。

2 流式细胞术的方法学验证

分析方法的验证是为了证明该分析方法与其预期目的相适应。尽管在药物研发早期并无方法学验证的具体要求,但是有效的、高质量的分析方法对于获得可靠数据进行下游决策必不可少^[14]。由于分析方法缺陷导致的不同研究阶段数据的差异或缺失,会影响研究过程中产品的可比性评价甚至影响临床给药量,因此建议研究者尽量在研究早期开展关键分析方法的验证。

在 ICH Q2(R2) 分析方法论证和 2020 年版《中华人民共和国药典》9101 分析方法验证指导原则中,明确了不同类型分析方法典型的验证指标供研究者参考。目前在细胞产品中常见的流式分析方法类型主要包括鉴别、含量、纯度、杂质控制和生物学活性检测等。由于流式细胞术的预期用途很广泛,因此目前还没有一个单一的验证策略可以使用,建议研究者根据先验知识制定符合目的的验证计划^[12]。同时流式细胞术不同于经典的药物分析方法,样品和试剂的复杂性、缺少细胞标准品以及设备技术的复杂性等给流式方法学验证带来了很多挑

战,因此并非每个典型的验证参数都可以用于流式细胞术^[14]。对于使用流式细胞术进行的细胞因子分泌检测一般可获得检测标准品,研究者可参考酶联免疫检测方法要求开展验证,对于细胞产品质量控制中使用流式细胞术进行的细胞表型、残留等检测尚无明确的验证指南,现结合临床检测和药物药动学/药效学检测中对流式验证的要求,对流式方法学验证进行简要论述,供研究者参考。

2.1 专属性 流式细胞术的专属性主要是考察抗体试剂对目标细胞群识别的特异性。试剂和抗体的特异性可通过检测包含目的细胞群和非目的细胞群的合适样本来进行确认^[14-15]。专属性的确认一般在方法开发和优化过程中即已完成。

2.2 准确度 准确度是测量结果与真实值之间的接近程度。由于缺少标准品,准确度验证对于流式细胞术的表型分析具有较大挑战^[14,16]。临床检验中,国际血液学标准理事会(ICSH)和国际临床细胞术学会(ICCS)工作组建议可采用准确度替代验证方法,如实验室间检测结果的比较、与临床检验其他技术方法的结果进行比较,但由于缺少标准品以及技术的差异,替代方法的价值还有待商榷^[11,16]。在药效学检测中,也有研究者认为将验证的数据与文献参考值进行比对,或采用市售质控品进行检测并比对参考值,可在一定程度上评估方法的准确性^[8]。在药物研发中,可使用阳性细胞系制备高水平和低水平的对照^[14],用于评估生物标志物检测的准确度。但对于临床检测来说,由于阳性细胞系与临床实际样本有较大差异,因此并不鼓励使用阳性细胞系。而对于低阳性样本,可以通过添加少量阳性细胞至阴性样本中来构建^[15]。目前对于细胞产品,研究者可结合方法设计、产品特点以及对对照品的获得情况选择性开展适用的准确度验证。

2.3 精密度 精密度分为重复性和中间精密度。重复性是指在相同条件下重复测试同一样品时结果的接近程度。一般建议使用3~6个样品来进行批内精密度验证,进行1次或多次运行,使用3~6个重复。一般细胞分析的重复性验收标准为10%~25% CV,对于稀有细胞群或表达水平较低的抗原放宽至30%~35% CV^[16]。对于免疫表型分析的检测方法,ICSH认为一般需控制CV在10%以内,较低丰度(1:1 000及以下)的细胞群可以放宽至20%^[8]。重复性较差可以通过更换单克隆抗体克隆、改变荧光标记或增加采集事件数来提高精密度。中间精密

度主要考察人员、设备、时间以及实验室之间等因素的可变性。一般建议中间精密度使用2~6个样品来验证,进行3~6次运行,使用3~6个重复,可接受标准为一般<10%,最多<25%[在定量下限(LLOQ)水平或者罕见事件检测时为30%~35%]^[14,16]。

2.4 灵敏度 灵敏度是指样品中可检测到的分析物的最低水平。在标准的生物分析方法验证中,定量方法的灵敏度通过准确性和精确度进行评估。对于流式细胞术,因缺少标准品,评估准确性更具挑战性,可仅使用精度指标来评估方法的灵敏度^[12,16]。流式细胞术灵敏度一般考察空白限(LOB)、检测限(LOD)和LLOQ。

LOB是无目标检测物的最高检测信号,通常使用10个阴性样本进行1次或多次运行的检测数据进行计算,公式为平均值(空白)+1.645 SD(空白),95%的阴性样本低于此限值。LOD是指高于空白的低水平样本能够被95%检出的水平(假设有5%的假阳性和假阴性率),可以通过重复测定低水平样品计算SD来确定,LOD与LOB密切相关,通常定义为LOB+1.645 SD(低阳性样本)或平均值(空白)+3 SD(空白)^[15-16]。

LLOQ是能可靠检测的最低测量水平(如果准确度无法验证,则使用精密度进行判定),其检测值不低于LOD。可使用未染色或部分染色的样本对染色的样本进行连续稀释至LLOQ附近进行测定,还有一种类似方法是将阳性样品添加至阴性样品中来制备样品。对于LLOQ一般要求使用3~6个样本,每个样本做5个稀释度,每个稀释度每个样本3~6个重复,进行1次或多次实验,检测信号>LOD并且CV≤35%的稀释度对应的分析物水平作为LLOQ^[12,14-16]。另外,有研究者认为LLOQ除考虑精密度外,还应满足门控中的最小采集事件数(至少20~50),但每个实验室应根据验证数据和数据的预期用途设定自己的限值^[12]。目前在多发性骨髓瘤、慢性淋巴细胞白血病和其他淋巴增生性疾病中,流式细胞术在检测少数肿瘤细胞群体时,LLOQ可达到0.01%水平^[17]。

2.5 线性和范围 线性是指标准曲线接近直线的程度。线性范围是指呈线性的待分析物水平的范围,范围内的点应呈现一定的线性关系,且满足准确度和精密度要求。由于可用于流式检测方法的商业化标准品还较少^[14],并且很难获取极值样品,因此,流式检测方法较难开展线性和检测范围的验证。研究者可结合可用的对照品情况以及自身产品特点进

行验证设计。对于一些淋巴细胞表型检测方法,可使用经含量标定的商业化质控细胞,通过检测在一定范围区间内的精密度,对线性及范围进行评估。对于细胞群阳性率检测的线性,可以将已知阳性的样本连续稀释添加到阴性样本中来制备线性验证样本^[17],采用理论值与检测值进行线性拟合,评估方法线性及范围。

2.6 耐用性 除了一般的耐用性考虑外,流式分析应特别关注样本稳定性对试验的影响,如样品取样后和样品染色后的放置稳定性,一般认为放置后样品与基线样品检测结果相比变化在 20% 范围内或精密度满足 $CV < 30\%$ 要求的放置时间可接受^[17]。

3 结语

流式细胞术作为单细胞研究的重要工具已有多年的应用经验,而在新兴细胞治疗产品药学研究中的应用积累还较少,如何开发先进的、合规的流式分析方法也是众多研究者所关心的问题。随着越来越多的细胞治疗产品进入上市阶段,细胞产品药学研究对流式细胞术的需求也越来越明确,期望业界和监管机构在积累更多细胞治疗产品药学研究中流式细胞术的应用经验后,能逐步形成较明确的流式方法开发和验证的规范性文件以指导实际的细胞药物研发工作。

[参 考 文 献]

- [1] MCKINNON KM. Flow cytometry: an overview[J]. *Curr Protoc Immunol*, 2018, 120: 5.1.1 – 5.1.11.
- [2] J Paul Robinson. Flow cytometry: past and future[J]. *BioTechniques*, 72: 159 – 169(13).
- [3] RAWSTRON AC, ORFAO A, BEKSAC M, *et al.* Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders[J]. *Haematologica*, 2008, 93(3): 431 – 438.
- [4] RIMAC V, BOJANIĆ I. Role of flow cytometry in evaluation of

the cellular therapy products used in haematopoietic stem cell transplantation[J]. *Int J Lab Hematol*, 2022, 44(3): 446 – 453.

- [5] COSSARIZZA A, CHANG HD, RADBRUCH A, *et al.* Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (third edition)[J]. *Eur J Immunol*, 2021, 51(12): 2708 – 3145.
- [6] MANOHAR SM, SHAH P, NAIR A. Flow cytometry: principles, applications and recent advances[J]. *Bioanalysis*, 2021, 13(3): 181 – 198.
- [7] TANTALO DG, OLIVER AJ, VON SCHEIDT B, *et al.* Understanding T cell phenotype for the design of effective chimeric antigen receptor T cell therapies[J]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(5): e002555.
- [8] 高恩惠, 陈探, 马璟, 等. 药效动力学研究中流式细胞术方法学验证概述[J]. 中国医药工业杂志, 2020, 51(7): 815 – 822.
- [9] KAKKANAIH VN, LANG KR, BENNETT PK. Flow cytometry in cell-based pharmacokinetics or cellular kinetics in adoptive cell therapy[J]. *Bioanalysis*, 2018, 10(18): 1457 – 1459.
- [10] CAMPBELL JDM, FRASER AR. Flow cytometric assays for identity, safety and potency of cellular therapies[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2018, 94(5): 569 – 579.
- [11] 吴丽娟, 许东升. 流式细胞术表型分析的质量控制[J]. 中华检验医学杂志, 2011, 34(5): 389 – 394.
- [12] SPITZ S, ZHANG Y, FISCHER S, *et al.* 2020 white paper on recent issues in bioanalysis: BAV guidance, CLSI H62, biotherapeutics stability, parallelism testing, CyTOF and regulatory feedback (part 2A-recommendations on biotherapeutics stability, PK LBA regulated bioanalysis, biomarkers assays, cytometry validation & innovation part 2B-regulatory agencies' inputs on bioanalysis, biomarkers, immunogenicity, gene & cell therapy and vaccine)[J]. *Bioanalysis*, 2021, 13(5): 295 – 361.
- [13] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群指南[EB/OL]. (2024 – 04 – 23). <http://www.nhc.gov.cn/wjw/s9492/202404/4ea0d963281343bab8886d9cde140f15.shtml>.
- [14] O'HARA DM, XU YX, LIANG ZY, *et al.* Recommendations for the validation of flow cytometric testing during drug development: II assays[J]. *J Immunol Methods*, 2011, 363(2): 120 – 134.
- [15] DAVIS BH, WOOD B, OLDAKER T, *et al.* Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS-part I-rationale and aims[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2013, 84(5): 282 – 285.
- [16] SELLIAH N, ECK S, GREEN C, *et al.* Flow cytometry method validation protocols[J]. *Curr Protoc Cytom*, 2019, 87(1): e53.
- [17] HEDLEY BD, KEENEY M. Technical issues: flow cytometry and rare event analysis[J]. *Int J Lab Hematol*, 2013, 35(3): 344 – 350.

编辑:蒋欣欣/接受日期:2025 – 02 – 17