

冻存复苏工艺对免疫细胞质量的影响及质控标准的制定

刘红卫

河北北科生物科技有限公司, 河北 石家庄 050000

[摘要]近年来,以嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)及自然杀伤细胞(NK)为代表的免疫细胞治疗在恶性肿瘤及自身免疫性疾病领域取得了突破性进展。然而,免疫细胞产品从制备端到临床使用端往往存在时空分离,冷冻保存与复苏工艺成为连接生产与临床应用的必经桥梁。冻存复苏过程中的冰晶形成、渗透压休克、氧化应激及冷冻保护剂毒性等因素多重刺激会持续损伤细胞,影响细胞治疗的临床效果。梳理细胞冻融全过程的热力学基础机制,剖析降温速率、冻存保护剂等关键工艺参数对细胞产生损伤的多重作用途径,基于质量源于设计(QbD)思路搭建细胞冻存复苏全流程质量控制框架,制定一套标准化工艺验证方案,以此解决规模化生产中不同批次细胞品质参差不齐、细胞活性与功能持续衰减等产业化痛点。

[关键词]免疫细胞治疗;冻存复苏;冷冻保护剂;细胞质量;质量控制

DOI: 10.33142/nsr.v3i3.20395

中图分类号: R392

文献标识码: A

The Impact of Cryopreservation and Resuscitation Process on the Quality of Immune Cells and The Establishment of Quality Control Standards

LIU Hongwei

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

Abstract: In recent years, immune cell therapy represented by chimeric antigen receptor T cells (CAR-T), tumor infiltrating lymphocytes (TIL), and natural killer cells (NK) has made breakthrough progress in the field of malignant tumors and autoimmune diseases. However, immune cell products often have temporal and spatial separation from preparation to clinical use, and cryopreservation and resuscitation processes have become a necessary bridge connecting production and clinical applications. Multiple stimuli such as ice crystal formation, osmotic shock, oxidative stress, and cryoprotectant toxicity during cryopreservation and resuscitation can continuously damage cells and affect the clinical efficacy of cell therapy. Sort out the thermodynamic basic mechanism of the entire process of cell freezing and thawing, analyze the multiple pathways through which key process parameters such as cooling rate and cryoprotectants cause damage to cells, and build a quality control framework for the entire process of cell freezing and thawing recovery based on the Quality by Design (QbD) concept. Develop a standardized process validation plan to solve the industrial pain points of uneven cell quality and continuous decline in cell activity and function in different batches of large-scale production.

Keywords: immune cell therapy; cryopreservation recovery; cryoprotectant; cell quality; quality control

引言

免疫细胞治疗是继手术、放疗化疗、靶向治疗之后,新一代抗肿瘤核心治疗方式,也是当下生物学领域的重点发展方向。在产业发展初期,临床使用的免疫细胞制剂大多为新鲜制备、即刻输注的模式。这种模式存在明显短板,不仅要求细胞生产基地与医院近距离配套,还需要严格匹配患者的治疗时间窗口。而细胞冻存与复苏技术能够实现免疫细胞药物的集中规模化生产、跨区域冷链配送,

同时支撑通用型现货免疫细胞产品的研发落地,是推动免疫细胞治疗产业升级的核心关键技术。但目前该工艺仍存在诸多技术难点。经过基因修饰、体外扩增培养的T细胞、NK细胞,对外界环境变化十分敏感,对温度波动、渗透压改变的耐受能力极差。在冻存、复苏的操作过程中,若工艺参数不合理、操作不规范,会直接破坏细胞结构,诱导细胞发生凋亡,大幅削弱细胞的抗肿瘤治疗效果。除此之外,冻存保护剂残留、冷链运输过程中的温度异常等

问题,也会给临床治疗带来安全风险。因此,深入厘清冻存、复苏全过程对免疫细胞活性与质量的影响机制,建立一套可量化、标准化、规范化的质量控制体系,是保障免疫细胞治疗产品安全、有效、质量稳定可控的核心前提。

1 冻存与复苏工艺的核心原理及关键参数

1.1 冷冻保护剂的选择与毒性机制

冷冻保护剂(Cryoprotective Agents,CPAs)为细胞冻存液的核心组分,适配免疫细胞低温冻存需求。渗透性冷冻保护剂以二甲基亚砜(DMSO)、甘油为典型代表,该类物质分子量小、脂溶性较强,其能够下调细胞内溶液冰点,阻止胞内冰晶形成。目前,DMSO(通常浓度为5%~10%)仍是免疫细胞冻存的“金标准”。然而,DMSO具有浓度和时间依赖性的细胞毒性。在室温下,DMSO会干扰细胞膜的脂质双分子层结构,诱导组蛋白修饰改变,甚至引发细胞异常分化。因此,在冻存前添加DMSO及复苏后去除DMSO的时间窗口必须被严格控制。近年来,开发基于海藻糖、右旋糖酐及人血白蛋白(HSA)的无血清、低DMSO或无DMSO冻存液已成为行业趋势。

1.2 降温速率与热力学动力学

降温速率直接决定了细胞内外冰晶的形成模式。若降温过快,胞内水分来不及渗出,会在胞内形成致命的机械性冰晶,刺破细胞器;若降温过慢,细胞长时间暴露在高浓度的胞外溶质环境中,会遭受严重的“溶液效应”损伤(即渗透压休克和化学毒性)。多数免疫细胞采用经典慢冻方案,程序降温仪以 $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 降至 -80°C 后入液氮保存,此速率可充分脱水,避免胞内冰晶生成。近年来,玻璃化冷冻(Vitrification)技术通过极高浓度的CPA和超快速降温,使水分子直接进入无定形的玻璃态,避免了冰晶的形成,但在大体积免疫细胞制剂的产业化应用中仍面临传热不均的挑战。

1.3 复苏工艺与重结晶损伤

复苏为冻存的逆向工序,直接决定免疫细胞成品质量,是生产核心步骤,操作遵循速融、温和缓冲、梯度洗脱三大准则,规避冰晶重结晶温区,降低渗透压骤变引发的细胞损伤。免疫细胞复温阶段, $-50^{\circ}\text{C}\sim 0^{\circ}\text{C}$ 极易发生冰晶融合;升温迟缓会让细小冰晶聚合膨大,二次损伤细胞。标准方案采用 37°C 水浴或干式复苏设备,1~2min完成 $-196^{\circ}\text{C}\sim 0^{\circ}\text{C}$ 以上升温;干式复苏无交叉水污染风险,温控均一、易标准化,适配GMP工业化批量生产。复苏后梯度洗涤极易被操作人员忽视,低温会抑制细胞渗透压调节功能,若直接接触培养基,细胞极易吸水破裂。生产采

用添加蔗糖、甘露醇的缓冲液梯度稀释,循序渐进平衡细胞内外渗透压、洗脱DMSO残留,缓解渗透压休克。离心参数、稀释配比、缓冲液配方均需标准化管控,稳定细胞回收率与存活率。

1.4 冻存介质与包装系统

包装容器的材质与几何形状直接影响热传导效率。传统的冻存管(Cryovial)仅适用于实验室小规模试验,在商业化生产中,采用EVA(乙烯-醋酸乙烯酯)或FEP(氟化乙烯丙烯)材质的封闭式冻存袋(Cryobag)更符合GMP要求。这类容器换热均匀、耐超低温、密封防渗性能优异,配合无菌焊接设备可实现全流程密闭操作,不仅能减轻温差波动造成的细胞损伤,而且降低外源污染风险。

2 冻存复苏工艺对免疫细胞质量的多维影响

2.1 细胞膜完整性与渗透压休克

细胞膜是抵御外界环境变化的第一道屏障,主要由脂质双分子层与膜蛋白共同构成。梯度降温、快速复苏产生的剧烈温差,会诱导膜脂质发生液晶相与凝胶相之间的可逆相变,进而打乱脂质有序排布,破坏细胞膜屏障结构。温度波动还会同步造成细胞内外渗透压急剧失衡,诱发渗透压休克加剧细胞损伤:降温阶段胞外溶质浓度升高,细胞脱水皱缩,伴随细胞骨架解聚、细胞膜囊泡化;复苏阶段大量水分快速内流,受损细胞膜失去渗透调控能力,细胞过度膨胀,严重时发生破裂裂解。破损细胞会释放游离DNA、细胞碎片及炎症介质,不仅降低细胞制剂的有效细胞占比与纯度,还会增加临床输注后不良反应的发生概率。同时细胞膜表面黏附分子、功能受体大量脱落,会抑制细胞增殖贴附、信号传导及靶向识别功能。

2.2 细胞器损伤与氧化应激

线粒体、内质网、溶酶体是细胞代谢、蛋白合成与信号调控的核心细胞器,冻存、复苏操作不当会同步造成三类细胞器整体性损伤,形成肉眼、即时检测看不出的隐性细胞伤害,其中线粒体是受损最严重的核心靶点。冻融带来的剧烈温差会拉低线粒体膜电位,破坏供能的电子传递链,大幅减少ATP能量产出,同时细胞内大量活性氧堆积,持续攻击脂肪、蛋白、遗传物质,诱发长时间氧化损伤。冻存带来的应激压力还会引发内质网功能紊乱,溶酶体膜通透性升高,导致细胞在复苏后24~48h内发生延迟性凋亡。这种“隐性损伤”在刚复苏时的台盼蓝染色中难以被察觉,但会严重影响细胞后续的扩增能力。

2.3 免疫表型漂移与效应功能衰减

免疫细胞杀伤肿瘤,主要依靠细胞表面受体与胞内杀

伤蛋白协同发挥作用。细胞经冻存、复苏处理后,各类 T 细胞亚群的比例配比会发生紊乱;冷冻应激会诱导长效记忆 T 细胞向短效耗竭型杀伤细胞转化,同时细胞表面大量表达 PD-1、TIM-3、LAG-3 等细胞耗竭标志物,致使细胞回输至体内后存活周期显著缩短。冷冻对 CAR-T 细胞的损伤效应更为显著:其一,介导肿瘤识别的胞外 CAR 蛋白易发生胞内内化或空间构象改变,直接削弱细胞靶向结合肿瘤的能力;其二,胞内执行溶瘤功能的穿孔素、颗粒酶储存量在复苏初期大幅下降,回输后无法即刻发挥高效杀瘤作用。通常,细胞需要经历一个“延迟期(Lag phase)”以恢复代谢和蛋白合成能力。

2.4 表观遗传学与基因组稳定性

虽然目前的共识认为,规范的液氮冻存(-196℃)能够暂停细胞全部代谢活动,完整保留细胞原有基因序列,冷冻本身不会直接诱发 DNA 突变。但细胞冷冻与复苏全过程会遭受多重理化刺激,破坏基因组稳定与表观遗传修饰,给基因改造免疫细胞埋下长期安全风险,也是质量管控的核心环节。冷冻时二甲基亚砷接触、复苏后氧化压力均会引发 DNA 双链断裂、碱基氧化损伤,大部分损伤可自我修复,少量未修复残留损伤会增加细胞异常增殖、癌变可能性。经病毒载体修饰的 CAR-T、CAR-NK 细胞,外源基因插入位点表观结构不耐低温刺激,易出现甲基化、组蛋白修饰紊乱,导致 CAR 表达不稳定、沉默或异常激活,造成批次功能不均、细胞分化失常及致癌隐患。因此,基因完整程度、表观遗传稳定性、潜在致癌风险,是冻存工艺验证与产品放行的核心安全评判标准。

3 免疫细胞冻存复苏质控标准的制定与验证

3.1 基于 QbD 理念的关键质量属性(CQA)确立

针对冻存复苏后的免疫细胞制剂,其核心关键质量属性(CQA)及放行标准建议如下:

(1) 细胞存活率与计数:采用自动细胞计数仪结合荧光染料(如 AO/PI)进行检测,复苏后细胞活率通常要求 $\geq 70\%$ 或 80% (视具体细胞类型及临床阶段而定)。

(2) 生物学效力(Potency):是衡量冻存是否损伤细胞功能的核心指标,需建立与临床作用机制(MoA)相关的体外效价检测方法。

(3) 免疫表型与纯度:通过多色流式细胞术检测关键表面标志物,确保冻存未引起严重的表型漂移。

(4) 安全性指标:包括无菌检查、支原体检测、细菌内毒素、外源因子污染等。

3.2 过程控制与工艺验证标准

冻存复苏工艺验证(Process Validation)是细胞类产

品生产的关键质控环节。第一,冻存液及原料质控,传统含 DMSO 冻存液需严控纯度、内毒素与重金属;无血清冻存液要核验成分稳定、批次差异可控,从源头规避原料风险。第二,降温与腔体温度验证,借助带测温探头的模拟冻存管检测设备内部温差,保证全部样品按设定速率降温,记录冰晶相变升温情况,确认设备可自动补偿温度波动。第三,复苏洗涤流程验证,水浴温度稳定控制 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 并固定解冻时长,充分洗脱降低 DMSO 残留至 1% 以内,减少输注后恶心、溶血等毒副反应,同时以细胞回收率作为评判整套工艺是否稳定可靠的核心标准。

3.3 检测方法的开发与验证

质控标准的落地依赖于可靠的分析方法。所有用于放行检测的方法均需按照 ICH Q2 指南进行方法学验证,包括准确度、精密性、专属性、检测限、定量限及耐用性。

3.4 稳定性研究与冷链物流验证

免疫细胞产品的低温冻存与冷链运输稳定程度,直接决定产品能否实现跨地区配送、长期存放以及临床随取随用,因此必须建立一套完整的稳定性评价与冷链合规验证体系。

细胞长期冻存稳定性研究需挑选具备代表性的生产批次,放置在 $-150^{\circ}\text{C}\sim -190^{\circ}\text{C}$ 液氮气相低温环境中开展为期 36 个月的持续性质量监测,分别在储存第 3、6、12、24、36 个月设定取样检测时点,完整核查细胞存活率、免疫分子表型、肿瘤杀伤活性、微生物无菌状态等核心质量指标,依据检测结果明确产品有效存放期限与低温存储规范。相较于液氮液相保存模式,气相储存能够有效杜绝冻存袋破裂、样本交叉污染等安全风险,产品保存稳定性与使用安全性更有优势,也是目前行业普遍采用的存储手段,整套试验所得数据可充分证明现有冻存制备工艺稳定可靠。

冷链运输环节验证工作,需对干式液氮转运罐、超低温专业运输设备开展全域温度分布检测,在设备内部多处放置温度记录装置,复现高温、严寒、气压变化、长途颠簸等各类极端运输场景,全程保障产品所处环境温度稳定维持在 -130°C 以下,避免温度回升生成冰晶对细胞造成不可逆损伤。同时同步核验运输包装的密封防护、承压、抗震能力,编制标准化冷链操作流程与突发状况处置预案,做到细胞运输全过程温度可控、流转信息全程可追溯。

4 产业化挑战与未来展望

当下免疫细胞冻存复苏工艺基本能满足常规临床应用,但大批量制备与跨区域冷链运输环节仍存在突出缺陷。传统水浴复苏易带入水中杂菌造成污染,人工操作重复性差,很难实现标准化作业。目前业内普遍采用干式全自动

复苏装置与一体化细胞洗涤浓缩设备,通过密闭无菌管路实现从冻存袋到输液袋不间断处理,大幅减少污染风险,保证操作稳定一致。为减轻二甲基亚砜的细胞毒性,抗冻蛋白、聚乙烯醇等高分子与纳米防冻材料成为研发重点,能抑制冰晶生成,有望研制少/无保护剂玻璃化冻存方案。各国监管机构、药典委员会及行业协会(如 ISPE、AABB)需加强合作,建立涵盖冻存液配方指南、冷链物流规范及效价检测标准化的行业共识,为细胞治疗产品的跨国多中心临床试验及商业化上市扫清障碍。

5 结论

依托 QbD 质量源于设计理念搭建细胞产品全生命周期质量管控体系,精准锁定各类关键质量属性,对生产工艺参数、全程冷链运输开展全方位严格验证,是守住细胞产品安全、疗效底线的核心保障。往后自动化生产设备、新一代冻存保护试剂与行业监管标准持续完善,免疫细胞冻存复苏技术会更安全高效、流程统一规范,从而为全球

更多患者带来触手可及的治愈希望。

[参考文献]

- [1]吴雪伶,孟淑芳,张可华.免疫细胞治疗产品的质量研究现状分析[J].药物分析杂志,2026,46(4):582-590.
 - [2]祁柯君.基于质膜修复剂的新型自然杀伤细胞冷冻保存技术的开发及作用研究[D].河南:郑州大学,2025.
 - [3]马洁,刘彩霞,谭琴,等.细胞产品质量控制与质量管理[J].药物评价研究,2021,44(2):273-292.
 - [4]王垒,彭娜,胡晓燕,等.冻存复苏制备自体来源的细胞毒性 T 淋巴细胞[J].细胞与分子免疫学杂志,2016,32(11):1453-1457.
 - [5]李树波,李德懿,葛锡锐.人结合上皮细胞体外培养与冻存方法的改良[J].上海口腔医学,2007,11(3):263-267.
- 作者简介:刘红卫(1984—),女,河北石家庄人,细胞质量工程师(中级职称),河北科技大学药学专业毕业,现就职于河北北科生物科技有限公司,从事质量管理工作。