(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년01월11일
(11) 등록번호 10-2350423
(24) 등록일자 2022년01월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 1/02 (2006.01) *C12N 5/0783* (2010.01)
(52) CPC특허분류
A01N 1/02 (2013.01)
C12N 5/0636 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7038096
(22) 출원일자(국제) 2018년05월24일
심사청구일자 2019년12월24일
(85) 번역문제출일자 2019년12월24일
(65) 공개번호 10-2020-0073171
(43) 공개일자 2020년06월23일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2018/088246
(87) 국제공개번호 WO 2018/214943
국제공개일자 2018년11월29일
(30) 우선권주장
201710375424.X 2017년05월24일 중국(CN)
(56) 선행기술조사문헌
CN105477017 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
셀룰라 바이오메디신 그룹 (상하이) 리미티드
중국 200233 상하이 쉬훼이 디스트릭트 케이핑 로드 333 빌딩 1 6층
셀룰라 바이오메디신 그룹 (우시) 리미티드
중국 214174 지앙수 우시 훼이샨 디스트릭트 훼이샨 로드 1619 빌딩 2 301호
(72) 발명자
장 리
중국 200233 상하이 쉬훼이 디스트릭트 케이핑 로드 333 빌딩 1 6층
왕 페이
중국 200233 상하이 쉬훼이 디스트릭트 케이핑 로드 333 빌딩 1 6층
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상영

전체 청구항 수 : 총 13 항 심사관 : 이경철

(54) 발명의 명칭 **세포 동결 보존 제제 및 세포 소생 방법**

(57) 요 약

본 발명은 임상 사용에 편리한 세포 동결 보존 제제의 제조 및 사용에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 (1) 세포; (2) 염화나트륨 수용액, 보호 단백질 및 디메틸 설폭사이드를 포함하는 동결 보존액을 포함하는 제제를 제공한다. 본 발명은 또한 대응되는 세포 소생 방법에 관한 것이며, 세척이 필요없는 동결 보존액을 사용하여 세포 동결 제제를 제조하고, 간단한 디스펜서 타입 조작으로 세포 소생 및 희석을 수행함으로써 임상적으로 사용할 수 있다.

(72) 발명자

허 지아핑

중국 200233 상하이 쉬훼이 디스트릭트 궤이핑 로드 333 빌딩 1 6층

린 난징

중국 200233 상하이 쉬훼이 디스트릭트 궤이핑 로드 333 빌딩 1 6층

리우 리핑

중국 200233 상하이 쉬훼이 디스트릭트 궤이핑 로드 333 빌딩 1 6층

리우 신

중국 200233 상하이 쉬훼이 디스트릭트 궤이핑 로드 333 빌딩 1 6층

리 차오

중국 200233 상하이 쉬훼이 디스트릭트 궤이핑 로드 333 빌딩 1 6층

위 슈치엔

중국 200233 상하이 쉬훼이 디스트릭트 궤이핑 로드 333 빌딩 1 6층

후 용라이

중국 200233 상하이 쉬훼이 디스트릭트 궤이핑 로드 333 빌딩 1 6층

자오 지아웨이

중국 200233 상하이 쉬훼이 디스트릭트 궤이핑 로드 333 빌딩 1 6층

순 저

중국 200233 상하이 쉬훼이 디스트릭트 궤이핑 로드 333 빌딩 1 6층

리우 시아오위

중국 200233 상하이 쉬훼이 디스트릭트 궤이핑 로드 333 빌딩 1 6층

명 세 서

청구범위

청구항 1

세포 동결 보존(냉동) 제제로서,

상기 제제는,

(1) 세포; 및

(2) 염화나트륨 수용액, 보호 단백질 및 디메틸 설폭사이드로 이루어지는 동결 보존액을 포함하며,

여기서 상기 제제 중 염화나트륨의 농도는 0.85 % 내지 0.95 %(w/v)이고,

상기 제제 중 보호 단백질의 농도는 15 % 내지 90 %(w/v)이고,

상기 제제 중 디메틸 설폭사이드의 농도는 8 % 내지 40 %(v/v)인 것인, 세포 동결 보존 제제.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 세포는 1차 T 세포, 증폭 배양된(amplicated) T 세포, 유전자 형질 도입된 T 세포, 줄기 세포 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 세포인 것인, 세포 동결 보존 제제.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 세포는 현탁 배양(suspension-cultured) 세포와 부착성 배양(monolayer-cultured) 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 세포인 것인, 세포 동결 보존 제제.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 제제 중 세포의 밀도 범위는 $1X10^{5}$ 내지 $5X10^{8}$/ml인 것인, 세포 동결 보존 제제.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 제제 중 보호 단백질의 농도는 15 % 내지 25 %(w/v)인 것인, 세포 동결 보존 제제.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 제제 중 디메틸 설폭사이드의 농도는 8 % 내지 12 %(v/v)인 것인, 세포 동결 보존 제제.

청구항 7

제1항에 따른 세포 동결 보존 제제의 제조 방법으로서,

상기 방법은,

(a) 동결 보존할 세포 및 동결 보존 희석액을 제공하고, 상기 동결 보존 희석액으로 상기 세포를 재현탁시켜 제1 동결 보존 혼합물을 얻는 단계로서, 이때 상기 동결 보존 희석액은 염화나트륨 수용액 및 보호 단백질을 포함하는, 단계;

(b) 상기 제1 동결 보존 혼합물에 상기 동결 보존액을 첨가하고 혼합하여 제2 동결 보존 혼합물을 얻는 단계; 및

(c) 상기 제2 동결 보존 혼합물을 용기로 옮기고 -80 ℃ 이하로 프로그램 동결시켜 상기 세포 동결 보존 제제를 얻는 단계

를 포함하는 것인, 세포 동결 보존 제제의 제조 방법.

청구항 8

동결 보존 세포의 소생 방법으로서,

(i) 제1항에 따른 세포 동결 보존 제제를 제공하는 단계;

(ii) 상기 세포 동결 보존 제제를 35 ~ 40 ℃의 소생용 항온 기기에 넣어 소생된 세포-동결 보존액 복합물을 얻는 단계; 및

(iii) 주사기(syringe) 또는 일회용 커넥터를 사용하여 상기 제제 내의 세포를 주사 담체(injection carrier)로 옮기는 단계

를 포함하는 것인, 동결 보존 세포의 소생 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 주사 담체는 정맥 주사가 가능한 용액인 것인, 동결 보존 세포의 소생 방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 주사 담체는 염화나트륨 주사액, 복합 전해질 주사액 및 아미노산 주사액으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 동결 보존 세포의 소생 방법.

청구항 11

염화나트륨 수용액, 보호 단백질 및 디메틸 설폭사이드로 이루어지는 세포 동결 보존액으로서,

여기서 상기 보존액 중 염화나트륨의 농도는 0.85 % 내지 0.95 %(w/v)이고,

상기 보존액 중 보호 단백질의 농도는 15 % 내지 90 %(w/v)이고,

상기 보존액 중 디메틸 설폭사이드의 농도는 8 % 내지 40 %(v/v)인 것인, 세포 동결 보존액.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 보존액 중 보호 단백질의 농도는 15 % 내지 25 %(w/v)인 것인, 세포 동결 보존액.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 보존액 중 디메틸 설폭사이드의 농도는 8 % 내지 12 %(v/v)인 것인, 세포 동결 보존액.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 세포 치료 분야에 속하는 것으로서, 구체적으로 세척이 필요없고 정맥 점적이 가능한 동결 세포 제제를 제공하며 상기 동결 세포 제제의 사용을 간소화시킨다.

배 경 기 술

[0002] 세포 치료 적용시에는 일반적으로 신선한 세포를 정맥 또는 국소 부위에 주입하거나 동결 보존된 세포를 세척하여 사용하게 되는데, 신선한 세포는 임상 사용전 일반적으로 8시간 미만의 유효기간을 가지므로 장거리 수송에

불리할 뿐만 아니라 임상 환자의 병세 변화에도 적응되지 못한다. 따라서 치료 분야에서 세포 적용이 필요한 경우 필연적으로 세포의 동결 보존 및 소생 과정이 수반된다.

[0003] 실험실에서 수행되는 동결 보존 및 소생 과정에서 동결 보존된 세포의 소생 및 세척 조작은 깨끗한 환경(예를 들어, 무균실)에서 전문적인 생명공학 기술자에 의해 수행되어야 하나, 실제 치료 과정에서 동결 보존 및 소생 과정은 일반 병원에서 수행되어 무균실 환경을 제공할 수 없으며 해당 실험 기술을 갖춘 인력도 부족하여 세포 치료의 보급 및 사용이 제한된다.

[0004] 상술한 바를 종합하면, 본 분야에서는 조작이 간단한 세포 동결 보존 소생 방법 및 대응되는 시약이 시급하다.

발명의 내용

[0005] 본 발명은 세척이 필요없는 동결 보존액을 사용하여 세포 동결 제제를 제조하고, 간단한 디스펜서 타입 조작으로 세포 소생 및 희석을 수행함으로써 임상적으로 사용할 수 있으며 세포 치료 분야의 상기 문제점을 효과적으로 해결할 수 있다.

[0006] 본 발명의 제1 양태에 따르면, 세포 동결 보존(냉동) 제제로서, 상기 제제는,

[0007] (1) 세포; 및

[0008] (2) 염화나트륨 수용액, 보호 단백질 및 디메틸 설폭사이드를 포함하는 동결 보존액

[0009] 을 포함하는 세포 동결 보존 제제를 제공한다.

[0010] 다른 바람직한 예에서, 상기 세포는 1차 T 세포, 증폭 배양된 T 세포, 유전자 형질 도입된 T 세포, 줄기 세포 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 세포이다.

[0011] 다른 바람직한 예에서, 상기 세포는 현탁 배양 세포와 부착성 배양 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 세포이다.

[0012] 다른 바람직한 예에서, 상기 부착성 배양 세포는 상기 동결 보존 제제를 제조하기 전에 미리 소화 및 현탁된다.

[0013] 다른 바람직한 예에서, 상기 제제 중 세포의 밀도 범위는 $1X10^{5}$ ~ $5X10^{8}$/ml이다.

[0014] 다른 바람직한 예에서, 상기 제제 중 염화나트륨의 농도는 0.85 % ~ 0.95 %(w/v)이다.

[0015] 다른 바람직한 예에서, 상기 제제 중 보호 단백질의 농도는 10 % ~ 90 %(w/v)이다.

[0016] 다른 바람직한 예에서, 상기 제제 중 보호 단백질의 농도는 10 % ~ 30 %(w/v)이다.

[0017] 다른 바람직한 예에서, 상기 제제 중 보호 단백질의 농도는 15 % ~ 25 %(w/v)이다.

[0018] 다른 바람직한 예에서, 상기 제제 중 디메틸 설폭사이드의 농도는 5 % ~ 40 %(v/v)이다.

[0019] 다른 바람직한 예에서, 상기 제제 중 디메틸 설폭사이드의 농도는 5 % ~ 20 %(v/v)이다.

[0020] 다른 바람직한 예에서, 상기 제제 중 디메틸 설폭사이드의 농도는 8 % ~ 12 %(v/v)이다.

[0021] 다른 바람직한 예에서, 상기 방법은,

[0022] (a) 동결 보존할 세포 및 동결 보존 희석액을 제공하고, 상기 동결 보존 희석액으로 상기 세포를 재현탁시켜 제1 동결 보존 혼합물을 얻는 단계로서, 이때 상기 동결 보존 희석액은 염화나트륨 수용액 및 보호 단백질을 포함하는, 단계;

[0023] (b) 상기 제1 동결 보존 혼합물에 상기 동결 보존액을 첨가하고 균일하게 혼합하여 제2 동결 보존 혼합물을 얻는 단계; 및

[0024] (c) 상기 제2 동결 보존 혼합물을 용기로 옮기고 -80 ℃ 이하로 프로그램 동결시켜 상기 세포 동결 보존 제제를 얻는 단계를 포함한다.

[0025] 다른 바람직한 예에서, 단계 (b)에서 상기 동결 보존액의 부피(Vb) 대 단계 (a)에서 상기 동결 보존 희석액의 부피(Va)의 비율은 Vb: Va = 1: 0.8 ~ 1.2이다.

[0026] 다른 바람직한 예에서, 상기 용기는 동결 보존 백 또는 동결 보존 튜브이다.

[0027] 다른 바람직한 예에서, 상기 동결 보존 희석액은 염화나트륨 수용액 및 보호 단백질을 포함한다.

[0028] 다른 바람직한 예에서, 상기 동결 보존 희석액 중 염화나트륨의 농도는 0.85 % ~ 0.95 %(w/v)이다.

[0029] 다른 바람직한 예에서, 상기 동결 보존 희석액 중 보호 단백질의 농도는 10 % ~ 90 %(w/v)이다.

[0030] 다른 바람직한 예에서, 상기 제제 중 보호 단백질의 농도는 10 % ~ 30 %(w/v)이다.

[0031] 다른 바람직한 예에서, 상기 제제 중 보호 단백질의 농도는 15 % ~ 25 %(w/v)이다.

[0032] 본 발명의 제2 양태에 따르면, 동결 보존 세포의 소생 방법으로서,

[0033] (i) 상기 세포 동결 보존 제제를 제공하는 단계;

[0034] (ii) 상기 세포 동결 보존 제제를 35 ~ 40 ℃의 소생용 항온 기기에 넣어 소생된 세포-동결 보존액 복합물을 얻는 단계; 및

[0035] (iii) 주사기 또는 일회용 커넥터를 사용하여 상기 제제 내의 세포를 주사 담체로 옮기는 단계를 포함하는 동결 보존 세포의 소생 방법을 제공한다.

[0036] 다른 바람직한 예에서, 상기 소생은 세포의 생존율을 검출하여 생존율이 사용 요구를 만족시키면 임상 용도로 사용하는 단계를 더 포함한다.

[0037] 다른 바람직한 예에서, 상기 항온 기기는 항온 수조이다.

[0038] 다른 바람직한 예에서, 상기 세포 해동 시간은 30초 내지 3분간이다.

[0039] 다른 바람직한 예에서, 상기 주사 담체는 정맥 주사가 가능한 용액이고, 바람직하게는 염화나트륨 주사액, 복합 전해질 주사액, 아미노산 주사액으로부터 선택된다.

[0040] 본 발명의 범위 내에서, 본 발명의 상기 각각의 기술특징 및 하기(예를 들어, 실시예)에서 구체적으로 설명될 각각의 기술특징은 서로 조합되어 새로운 또는 바람직한 기술적 해결수단을 형성할 수 있음을 이해해야 한다. 문장 길이 상 여기서 더 이상 일일이 설명하지 않는다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 실시예 1에 따른 동결 보존 전 및 소생 후 세포 생존율의 변화 비교도이다.

도 2는 실시예 1에 따른 동결 보존 및 소생 후 세포 증식 기능의 그래프이다.

도 3은 실시예 1에 따른 동결 보존 전 및 동결 보존 후 CAR-T 세포의 종양 항원 반응 기능 비교도이다.

도 4는 상이한 동결 보존 방법(프로그램)을 비교한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 본 발명인은 장기적이고 심층적인 연구를 거쳐 조작이 간단한 세포 동결 보존-소생 방법 및 이에 사용되는 대응되는 동결 보존액을 설계하였다. 상기 방법은 일반적인 실험실 환경에서 의료인원에 의해 편리하게 수행될 수 있어 세포 치료 과정에서 동결 보존-소생 방법으로 사용될 수 있다. 상기 발견에 기반하여 발명인은 본 발명을 완성시켰다.

[0043] 세포 동결 보존 제제

[0044] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "세포 동결 보존 제제" 및 "세포 냉동 제제"는 상호 교환적으로 사용 가능하며, 모두 저온(예를 들어, -80 ℃ 또는 액체 질소 환경) 상태에서 저장된 치료 활성 세포를 함유하는 제제를 지칭한다.

[0045] 본 발명의 세포 동결 보존(냉동) 제제는,

[0046] (1) 세포; 및

[0047] (2) 염화나트륨 수용액, 보호 단백질 및 디메틸 설폭사이드를 포함하는 동결 보존액

[0048] 을 포함한다.

[0049] 상기 세포는 세포 치료에 사용될 수 있는 활성 세포이면 그 유형은 특별히 한정되지 않는다. 본 발명의 바람직

한 실시예에서, 상기 세포는 1차 T 세포, 증폭 배양된 T 세포, 유전자 형질 도입된 T 세포, 줄기 세포 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 세포이다.

[0050] 본 발명의 세포 유형은 특별히 한정되지 않는 바, 다른 바람직한 예에서, 상기 세포는 현탁 배양 세포와 부착성 배양 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 세포이다. 비교적 바람직하게, 상기 부착성 배양 세포는 상기 동결 보존 제제를 제조하기 전에 미리 소화 및 현탁된다.

[0051] 상기 제제 중 상기 세포의 밀도 범위는 특별히 한정되지 않으며, 예를 들어 $1X10^5$ ~ $5X10^8$/ml일 수 있다.

[0052] 바람직하게는, 상기 제제 중 염화나트륨의 농도는 0.85 % ~ 0.95 %(w/v)이다.

[0053] 다른 바람직한 실시예에서, 상기 제제 중 보호 단백질의 농도는 10 % ~ 90 %(w/v)이다.

[0054] 다른 바람직한 실시예에서, 상기 제제 중 디메틸 설폭사이드의 농도는 5 % ~ 40 %(v/v)이다.

[0055] 세포 동결 보존 및 소생 방법

[0056] 본 발명은 또한 세포 동결 보존-소생 방법을 제공한다. 상기 방법은, (a) 동결 보존할 세포 및 동결 보존 희석액을 제공하고, 상기 동결 보존 희석액으로 상기 세포를 재현탁시켜 제1 동결 보존 혼합물을 얻는 단계로서, 이때 상기 동결 보존 희석액은 염화나트륨 수용액 및 보호 단백질을 포함하는, 단계;

[0057] (b) 상기 제1 동결 보존 혼합물에 상기 동결 보존액을 첨가하고 균일하게 혼합하여 제2 동결 보존 혼합물을 얻는 단계; 및

[0058] (c) 상기 제2 동결 보존 혼합물을 용기로 옮기고 -80 ℃ 이하로 프로그램 동결시켜 상기 세포 동결 보존 제제를 얻는 단계를 포함한다.

[0059] 여기서, 단계 (b)에서 상기 동결 보존액의 부피(Vb) 대 단계 (a)에서 상기 동결 보존 희석액의 부피(Va)의 비율은 Vb: Va = 1: 0.8 ~ 1.2이나 동결 보존할 세포의 종류, 동결 보존 온도 등 조건에 따라 상기 양자의 비율은 약간 다를 수 있음은 물론이다.

[0060] 상기 용기는 특별히 한정되지 않으며, 바람직하게는 주사기로 용기 표면을 관통하여 액체를 흡입 가능한 용기이다. 본 발명의 바람직한 실시예에서, 상기 용기는 동결 보존 백 또는 동결 보존 튜브이며 상기 장치를 적용함으로써 일반적인 실험실 환경에 의한 오염을 최대한도로 방지할 수 있다.

[0061] 상기 동결 보존된 세포는 통상적인 비 멸균 환경에서 소생될 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시예에서, 상기 소생 과정은,

[0062] (i) 상기 세포 동결 보존 제제를 제공하는 단계;

[0063] (ii) 상기 세포 동결 보존 제제를 35 ~ 40 ℃의 소생용 항온 기기에 넣어 소생된 세포-동결 보존액 복합물을 얻는 단계; 및

[0064] (iii) 주사기 또는 일회용 커넥터를 사용하여 상기 제제 내의 세포를 주사 담체로 옮기는 단계

[0065] 를 포함한다.

[0066] 다른 바람직한 예에서, 상기 소생은 세포의 생존율을 검출하여 생존율이 사용 요구를 만족시키면 임상 용도로 사용하는 단계를 더 포함한다.

[0067] 상기 항온 기기는 특별히 한정되지 않으며, 실험실에서 일반적으로 사용되는 항온 기기(예를 들어, 항온 수조)일 수 있다.

[0068] 다른 바람직한 예에서, 상기 세포 해동 시간은 30초 내지 3분간이다.

[0069] 상기 주사 담체는 특별히 한정되지 않으며, 바람직하게는 정맥 주사가 가능한 용액일 수 있고, 보다 바람직하게는 염화나트륨 주사액, 복합 전해질 주사액, 아미노산 주사액으로부터 선택된다.

[0070] 본 발명의 바람직한 실시예에서, 동결 보존전에 우선 생리 식염수로 수집된 세포를 세척하여 각 잔류물이 제품의 임상 사용 요구를 만족하도록 한다. 동결 보존 희석액은 디메틸 설폭사이드를 함유하지 않는 것을 제외하고 기타 성분은 동결 보존액의 성분과 동일하다. 동결 보존 사양에 따라 세포 농도가 최종 농도의 2배가 되도록 동결 보존 희석액으로 세포를 재현탁시킨 후, 동일한 부피의 동결 보존액을 천천히 첨가하고 충분히 혼합한다. 세포 현탁액을 동결 보존 백(또는 동결 보존 튜브)으로 옮기고 1 ~ 2 ℃/min의 강온 속도로 프로그램 동결을 수행

하여 온도가 -80 ℃ 이하로 떨어지면 액체 질소 냉장고로 옮겨 저장한다.

[0071] 사용시 액체 질소 냉장고에서 동결 제제를 꺼내여 37 ℃ 조건에서 빠르게 해동하고 해동 후 주사제 또는 일회용 커넥터를 이용하여 생리 식염수로 옮긴다. 희석된 세포 제제에 대해 생존율 검출을 수행하여 생존율이 사용 요구를 만족시키면 임상 용도로 사용한다.

[0072] 선행기술에 비해 본 발명은 주로 하기와 같은 이점을 갖는다.

[0073] (1) 본 발명을 이용하여 제조된 세포 제제는 장기 저장 후 여전히 높은 세포 생존율을 유지할 수 있어 제조사로부터 사용될 병원으로의 장거리 수송에 용이하다.

[0074] (2) 본 발명에 관련된 세포 동결 보존 제제는 모두 부형제 또는 약품 레벨의 시약을 사용하므로 임상에서 안전하게 사용할 수 있다.

[0075] (3) 본 발명의 사용 방법을 이용하여 세포 동결 보존 제제에 대해 소생 조작을 수행하면 세포 제제 조작을 위한 엄격한 멸균 환경 요구를 제거할 수 있어 훈련을 받지 않은 간호사가 동결 보존 세포의 소생을 쉽게 파악할 수 있으며 세포 생존율을 유지할 수 있다.

[0076] (4) 본 발명의 사용 방법을 이용하여 세포 동결 보존 제제에 대해 소생 조작을 수행함으로써 세포의 생물학적 활성을 유지할 수 있다.

[0077] 이하 구체적인 실시예를 결부하여 본 발명을 추가로 설명한다. 이러한 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위는 이에 한정되지 않음을 이해해야 한다. 하기 실시예에서 구체적인 조건이 명시되지 않은 실험 방법은 일반적으로 통상적인 조건 또는 제조사에서 권장하는 조건에 따르며 달리 언급되지 않은 한, 비율 및 부수는 중량에 따라 계산된다.

[0078] 실시예 1

[0079] 동결 세포 제제의 동결 보존 용기는 동결 보존 백이고, 세포 유형은 CAR-T 세포이며, 동결 보존 사양은 $2X10^7$/10 ml이고, 동결 세포 제제의 성분은 하기 표에 도시된 바와 같다. 상기 CAR-T 세포 100ml을 3개월 동안 동결 보존한 후, 37 ℃의 수조에서 2분간 해동하고 해동된 세포를 주사기를 이용하여 100 ml 생리 식염수에 희석하여 희석된 세포를 취하여 생존율 검출, 종양 항원 반응 검출 및 세포 증식 기능 검출을 수행하였다.

[0080]

순번	성분	함량
1	세포	$2X10^7$/ml
2	염화나트륨	0.9 %(w/v)
3	인간 혈청 알부민	20 %(w/v)
4	디메틸 설폭사이드	10 %(v/v)

[0081] 세포 생존율 변화: 트리판 블루 염색 방법을 사용하여 희석된 세포 현탁액에 대해 생존율 검출을 수행하였으며 결과는 도 1에 도시된 바와 같다. 결과는 소생 후 세포가 높은 생존율을 유지함을 나타내었다.

[0082] 동결 보존 후 세포의 증식 기능: 동결 보존 및 소생된 세포를 완전 배지에 넣고 계속 배양하였으며 매일 세포의 밀도를 기록하였다. 2 ~ 3일 간격으로 배지를 보충하고, 성장 곡선을 작성하였다(도 2에 도시된 바와 같음). 도면으로부터 동결 보존 및 소생 과정 후에도 세포가 여전히 우수한 증식 기능을 구비함을 보아낼 수 있다.

[0083] 동결 보존 전후 CAR-T 세포의 종양 항원 반응 기능: 동결 보존 및 소생된 세포 및 종양 항원을 갖는 종양 세포를 1:1로 하루밤 공동배양시켜 배양 상청액을 수집하고 CAR-T 세포에 의해 방출된 IFNr의 양을 검출하였으며; 세포를 수집하고 CD137을 발현하는 CD3 양성 세포의 비율을 검출하여 종양 항원 반응 기능을 평가하였다. 동결 보존전 데이터 및 동결 보존 후 7일간 계속 배양시킨 데이터를 비교로 사용하였으며 비교도를 도 3에 도시하였다. 결과는 동결 보존-소생 과정을 거친후 세포의 종양 항원 반응 기능이 크게 감소하지 않았음을 나타내었다.

[0084] 결론: 3개월 동안 동결 보존 후 소생된 동결 세포 제제의 생존율은 90 % 이상이고 소생된 동결 CAR-T 세포 제제는 여전히 증식 기능을 갖는다. 소생된 동결 CAR-T 세포 제제는 종양 항원 반응 기능의 가역적 감소가 발생되었고 계속 배양 후 회복되었다. 요컨대 상기 동결 세포 제제는 신선한 세포의 원래 효능을 유지하여 임상에 응용될 수 있다.

[0085] 실시예 2

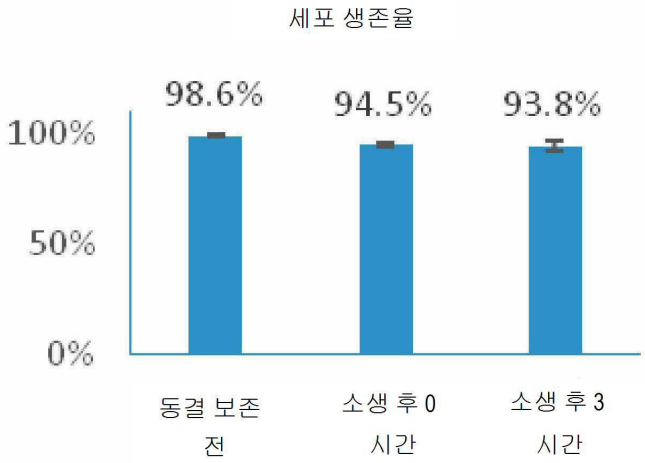
[0086] 상이한 동결 보존 프로그램에서 세포 소생율 비교

[0087] 세포를 상이한 동결 보존 프로그램에서 동결 보존 후, 37 ℃의 수조에서 빠르게 해동하고 37 ℃의 예열된 DMEM으로 옮겨 약 0.3 ml를 취해 생존율 검출을 수행하였다. 결과는 본원 발명의 방법을 사용하여 세포 동결 보존 및 소생 후, 소생율이 대조군의 동결 보존 및 소생 방법을 사용하여 동결 보존 및 소생된 소생율보다 높음을 나타낸다.

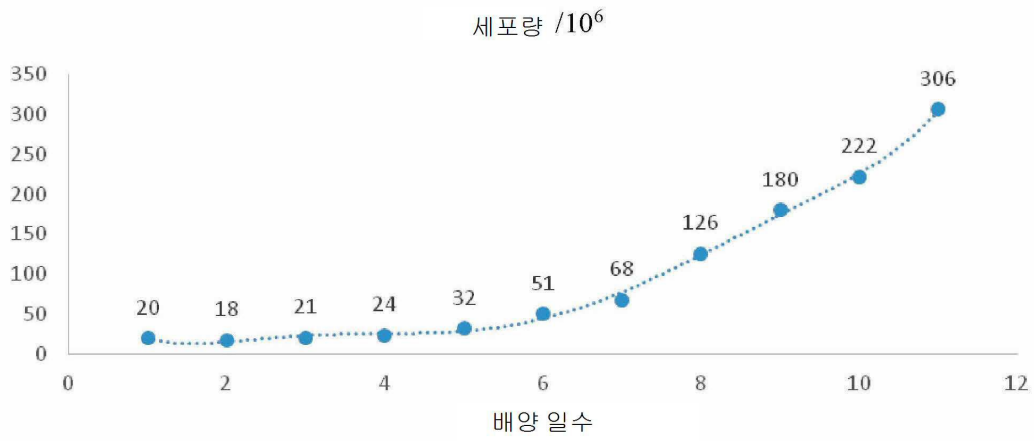
[0088] 본 발명에 언급된 모든 문헌은 각각의 문서가 참조로서 개별적으로 원용된 바와 같이 참조로서 본원 발명에 원용된다. 당업자는 본 발명의 상술된 내용을 열독한 후 본 발명을 다양하게 변경 또는 수정할 수 있으며 이러한 균등한 형태 역시 본원 발명에 첨부된 특허청구범위에 의해 한정된 범위 내에 속한다.

도면

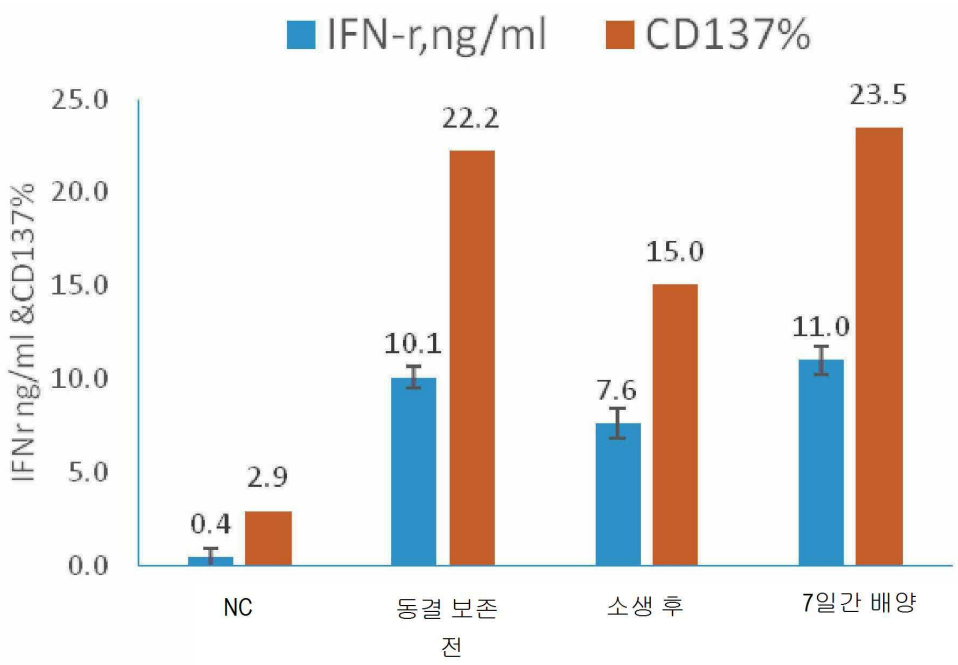
도면1



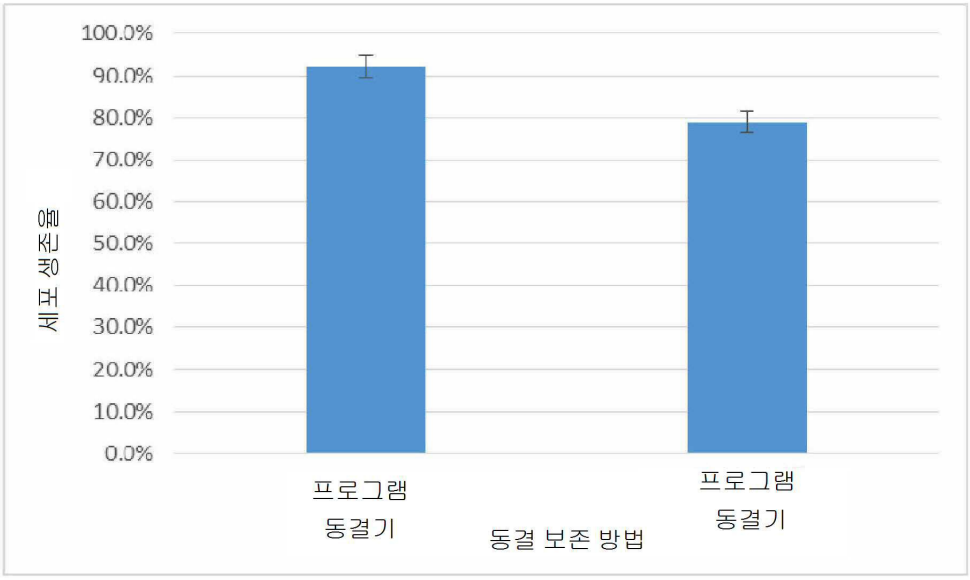
도면2



도면3


IFN-r,ng/ml
CD137%
IFNr ng/ml &CD137%
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
0.4
2.9
10.1
22.2
7.6
15.0
11.0
23.5
NC
동결 보존 전
소생 후
7일간 배양

도면4


100.0%
90.0%
80.0%
70.0%
60.0%
50.0%
40.0%
30.0%
20.0%
10.0%
0.0%
세포 생존율
프로그램 동결기
프로그램 동결기
동결 보존 방법