(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118633595 A
(43)申请公布日 2024.09.13

(21)申请号 202411124712.4

(22)申请日 2024.08.16

(71)申请人 青岛宝迈得生物科技有限公司
地址 266000 山东省青岛市即墨区滨海路169号1号楼2002户

(72)发明人 陈志华

(74)专利代理机构 郑州启晖知识产权代理事务所(普通合伙) 41250
专利代理师 徐鹏

(51)Int.Cl.
A01N 1/02(2006.01)

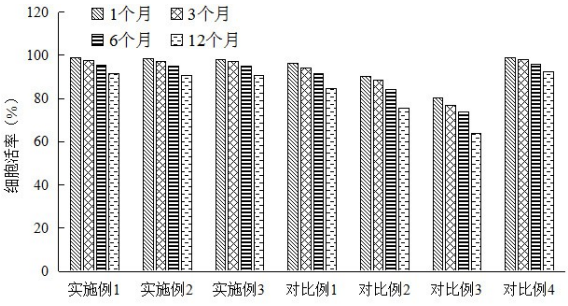
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

CAR-T细胞冻存液及其应用

(57)摘要

本发明涉及免疫细胞领域,尤其涉及CAR-T细胞冻存液及其应用。本发明的CAR-T细胞冻存液包括培养基和添加在培养基中的二甲酸钾、吡格列酮等成分。其中,二甲酸钾能够显著抑制冻存过程中冰晶生成尺寸,从而能够减少由于冰晶的生成对CAR-T细胞造成的损伤;吡格列酮则能够更好地保护CAR-T细胞的活率。CAR-T细胞增殖试验、杀伤试验说明了本发明的冻存液对细胞增殖速度的影响小、冻存12个月CAR-T细胞仍具有高杀伤活性。因此本发明的冻存液适用于CAR-T细胞的冻存。



CN 118633595 A

1.一种CAR-T细胞冻存液,其特征在于,包括培养基和添加在培养基中的以下成分:二甲酸钾、吡格列酮、精氨酸、肝素钠、右旋糖酐。

2.如权利要求1所述的CAR-T细胞冻存液,其特征在于,所述二甲酸钾、吡格列酮、精氨酸、肝素钠、右旋糖酐在培养基中的添加量为:二甲酸钾25~38μg/mL,吡格列酮7~15ng/mL,精氨酸20~35μg/mL,肝素钠3~17μg/mL,右旋糖酐30~50μg/mL。

3.如权利要求1所述的CAR-T细胞冻存液,其特征在于,所述培养基为RPMI1640培养基。

4.一种CAR-T细胞冻存液的应用,其特征在于,所述应用具体为,将待冻存的CAR-T细胞加入权利要求1~3任一项所述的冻存液中,获得细胞悬液,分装至冻存管中,将装有细胞悬液的冻存管进行程序性降温,降温至-75~-80℃后将冻存管转移至液氮中保存。

5.如权利要求4所述的CAR-T细胞冻存液的应用,其特征在于,细胞悬液中细胞的浓度为1×10^{6}~2×10^{7}个/mL。

CAR-T细胞冻存液及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫细胞领域,尤其涉及CAR-T细胞冻存液及其应用。

背景技术

[0002] 免疫细胞治疗是一种通过激活患者自身的免疫系统来打败肿瘤的方法。CAR-T疗法是嵌合抗原受体T细胞免疫疗法,是一种治疗肿瘤的新型精准靶向疗法。

[0003] T细胞也称T淋巴细胞,是一种免疫细胞,它可以通过识别和攻击入侵的病原体和异常细胞来保护人体免受疾病的侵害。在免疫细胞治疗中,通过提取患者自身的T细胞并将其改造成能够攻击肿瘤细胞的细胞,这些改造后的T细胞成为CAR-T细胞,它能够专门识别体内肿瘤细胞,并通过免疫作用释放大量的多种效应因子,高效地杀灭肿瘤细胞,从而达到治疗恶性肿瘤的目的。CAR-T疗法具有治疗更精准、多靶向更精准、杀瘤范围更广、杀瘤效果更持久等技术优势,从而备受关注。

[0004] CAR-T疗法需要对CAR-T细胞进行体外培养并大量扩增,然后将扩增好的CAR-T细胞输回肿瘤患者体内。因此,常需要将CAR-T细胞进行冻存以实现细胞的保存。专利202310441867.X公开了一种CAR-T细胞的冻存液及冻存方法,在冻存液中添加了10~30%的人血白蛋白注射液和5~15%的二甲基亚砜,增加了冻存液的成本以及安全隐患。因此,为解决临床试验对于CAR-T细胞的需求,亟需一种既安全又能够降低成本的CAR-T细胞冻存液,这对于免疫细胞治疗领域意义重大。

发明内容

[0005] 为了克服现有技术的不足,本发明的目的之一在于提供一种CAR-T细胞冻存液,该冻存液中未添加二甲基亚砜,且能够显著降低冻存过程中对CAR-T细胞的损伤。

[0006] 本发明的目的之一采用如下技术方案实现:

一种CAR-T细胞冻存液,包括培养基和添加在培养基中的以下成分:二甲酸钾、吡格列酮、精氨酸、肝素钠、右旋糖酐。团队前期研究发现,二甲酸钾具有抑制冰晶生成的效果,能够抑制冻存过程中对细胞的损伤,因此在冻存液中添加了二甲酸钾成分。

[0007] 优选地,所述二甲酸钾、吡格列酮、精氨酸、肝素钠、右旋糖酐在培养基中的添加量为:二甲酸钾25~38μg/mL,吡格列酮7~15ng/mL,精氨酸20~35μg/mL,肝素钠3~17μg/mL,右旋糖酐30~50μg/mL。

[0008] 优选地,所述培养基为RPMI1640培养基。

[0009] 本发明的目的之二在于提供一种CAR-T细胞冻存液的应用。

[0010] 本发明的目的之二采用如下技术方案实现:

一种CAR-T细胞冻存液的应用,所述应用具体为,将待冻存的CAR-T细胞加入上述冻存液中,获得细胞悬液,分装至冻存管中,将装有细胞悬液的冻存管进行程序性降温,降温至-75~-80℃后将冻存管转移至液氮中保存。

[0011] 优选地,细胞悬液中细胞的浓度为1×10^6~2×10^7个/mL。

[0012] 相比现有技术,本发明的有益效果在于:

本发明的CAR-T细胞冻存液包括培养基和添加在培养基中的二甲酸钾、吡格列酮等成分。其中,二甲酸钾能够显著抑制冻存过程中冰晶生成尺寸,从而能够减少由于冰晶的生成对CAR-T细胞造成的损伤;吡格列酮则能够更好地保护CAR-T细胞的活率。CAR-T细胞增殖试验、杀伤试验说明了本发明的冻存液对细胞增殖速度的影响小、冻存12个月CAR-T细胞仍具有高杀伤活性。因此本发明的冻存液适用于CAR-T细胞的冻存。

附图说明

[0013] 图1为实施例1~3、对比例1~4冻存液冻存的CAR-T细胞复苏后的细胞活率情况图;

图2为实施例1~3、对比例1~4冻存液冻存6个月CAR-T细胞复苏后的增殖情况图;

图3为实施例1~3、对比例1~4冻存液冻存12个月CAR-T细胞复苏后的杀伤率情况图。

具体实施方式

[0014] 下面结合附图以及具体实施方式,对本发明做进一步描述,需要说明的是,在不相冲突的前提下,以下描述的各实施例之间或各技术特征之间可以任意组合形成新的实施例。

[0015] 实施例中的CAR-T细胞的制备方法参考现有技术,徐永前《共表达GITRL的嵌合抗原受体T(CAR-T)细胞的构建及其功能研究》制备得到。

[0016] 实施例1

实施例1提供一种CAR-T细胞冻存液,该冻存液由RPMI1640培养基和添加在培养基中的以下成分:二甲酸钾、吡格列酮、精氨酸、肝素钠、右旋糖酐组成。其中,二甲酸钾、吡格列酮、精氨酸、肝素钠、右旋糖酐在RPMI1640培养基中的添加量为:二甲酸钾30μg/mL,吡格列酮10ng/mL,精氨酸27μg/mL,肝素钠12μg/mL,右旋糖酐40μg/mL。

[0017] 一种CAR-T细胞冻存液的应用,具体应用过程如下:

将待冻存的CAR-T细胞加入上述培养基中,获得细胞悬液,细胞悬液中细胞的浓度为2×10^6个/mL,分装至冻存管中,将装有细胞悬液的冻存管进行程序性降温(于-25℃冻存2h,再以3℃/h的速率降温至-45℃冻存3h,再以5℃/h的速率降温至-78℃冻存4h),降温至-78℃后将冻存管移至液氮中保存。

[0018] 实施例2

实施例2提供一种CAR-T细胞冻存液,该冻存液由RPMI1640培养基和添加在培养基中的以下成分:二甲酸钾、吡格列酮、精氨酸、肝素钠、右旋糖酐组成。其中,二甲酸钾、吡格列酮、精氨酸、肝素钠、右旋糖酐在RPMI1640培养基中的添加量为:二甲酸钾25μg/mL,吡格列酮7ng/mL,精氨酸20μg/mL,肝素钠3μg/mL,右旋糖酐30μg/mL。

[0019] 一种CAR-T细胞冻存液的应用,具体应用过程如下:

将待冻存的CAR-T细胞加入上述培养基中,获得细胞悬液,细胞悬液中细胞的浓度为1×10^6个/mL,分装至冻存管中,将装有细胞悬液的冻存管进行程序性降温(于-25℃冻存2h,再以3℃/h的速率降温至-45℃冻存3h,再以5℃/h的速率降温至-75℃冻存4h),降温至-75℃后将冻存管移至液氮中保存。

[0020] 实施例3

实施例3提供一种CAR-T细胞冻存液,该冻存液由RPMI1640培养基和添加在培养基中的以下成分:二甲酸钾、吡格列酮、精氨酸、肝素钠、右旋糖酐组成。其中,二甲酸钾、吡格列酮、精氨酸、肝素钠、右旋糖酐在RPMI1640培养基中的添加量为:二甲酸钾38μg/mL,吡格列酮15ng/mL,精氨酸35μg/mL,肝素钠17μg/mL,右旋糖酐50μg/mL。

[0021] 一种CAR-T细胞冻存液的应用,具体应用过程如下:

将待冻存的CAR-T细胞加入上述培养基中,获得细胞悬液,细胞悬液中细胞的浓度为2×10^7个/mL,分装至冻存管中,将装有细胞悬液的冻存管进行程序性降温(于-25℃冻存2h,再以3℃/h的速率降温至-45℃冻存3h,再以5℃/h的速率降温至-80℃冻存4h),降温至-80℃后将冻存管移至液氮中保存。

[0022] 对比例1

对比例1提供一种CAR-T细胞冻存液,该冻存液由RPMI1640培养基和添加在培养基中的以下成分:吡格列酮、精氨酸、肝素钠、右旋糖酐组成。其中,吡格列酮、精氨酸、肝素钠、右旋糖酐在RPMI1640培养基中的添加量为:吡格列酮10ng/mL,精氨酸27μg/mL,肝素钠12μg/mL,右旋糖酐40μg/mL,其余与实施例1相同。

[0023] 对比例2

对比例2提供一种CAR-T细胞冻存液,该冻存液由RPMI1640培养基和添加在培养基中的以下成分:二甲酸钾、精氨酸、肝素钠、右旋糖酐组成。其中,二甲酸钾、精氨酸、肝素钠、右旋糖酐在RPMI1640培养基中的添加量为:二甲酸钾30μg/mL,精氨酸27μg/mL,肝素钠12μg/mL,右旋糖酐40μg/mL,其余与实施例1相同。

[0024] 对比例3

对比例3提供一种CAR-T细胞冻存液,该冻存液由RPMI1640培养基和添加在培养基中的以下成分:精氨酸、肝素钠、右旋糖酐组成。其中,精氨酸、肝素钠、右旋糖酐在RPMI1640培养基中的添加量为:精氨酸27μg/mL,肝素钠12μg/mL,右旋糖酐40μg/mL,其余与实施例1相同。

[0025] 对比例4

对比例4提供一种CAR-T细胞冻存液,与实施例1的不同之处是:未添加二甲酸钾、吡格列酮两种成分,添加了体积分数为10%的DMSO,其余与实施例1相同。

[0026] 试验例1

试验例1探究实施例1~3、对比例1~3冻存液对冰晶生长尺寸的影响,具体如下:

取20μL实施例1~3、对比例1~3的冻存液在扫描探针显微镜的冷却台上冻结,并用光学显微镜进行观察,采用图像分析软件(Olynpus cellSens Standard)分析观察到的图像,记录冰晶尺寸,结果如表1所示。

[0027] 表1 实施例1~3、对比例1~3冻存液冰晶生长尺寸情况

冻存液	冰晶尺寸（μm）
实施例 1	135
实施例 2	142
实施例 3	148
对比例 1	697
对比例 2	140
对比例 3	713

分析表1可知,实施例1~3冻存液冰晶生长尺寸与与对比例1、对比例3冻存液冰晶生长尺寸差异显著。进一步地分析知,对比例1、对比例3的冻存液中由于未添加二甲酸钾成分,冰晶生长的尺寸均较大。上述内容说明,二甲酸钾的加入能够显著抑制冻存过程中冰晶生长的尺寸。

[0028] 试验例2

试验例2探究实施例1~3、对比例1~4经冻存后的CAR-T细胞的活率情况,具体如下:

CAR-T细胞复苏:将实施例1~3、对比例1~4分别冻存1个月、3个月、6个月、12个月的1mL的细胞冻存管于37℃恒温水浴解冻,至细胞悬液完全融化,转移至15mL的离心管中,向离心管中添加10mL RPMI1640培养基,1500rpm离心8min,弃上清,添加1~2mL RPMI1640培养基重悬细胞,细胞浓度为1×10^4个/mL,获得复苏后的CAR-T细胞。

[0029] 细胞活率检测:将复苏后的细胞与浓度0.4%的台盼蓝染液以9:1的比例混合均匀,染色2min,显微镜下统计复苏后CAR-T细胞的细胞活率(结果如表2、图1所示),细胞活率=(总细胞数—死细胞数)/总细胞数×100%,活细胞无染色,死细胞被染上颜色。其中,冻存前CAR-T细胞活率为99.36%。

[0030] 表2 实施例1~3、对比例1~4冻存液冻存的CAR-T细胞复苏后的细胞活率情况

冻存液	1个月	3个月	6个月	12个月
实施例1	98.88	97.73	95.60	91.67
实施例2	98.46	97.22	95.07	90.91
实施例3	98.05	97.01	94.89	90.74
对比例1	96.47	94.13	91.66	84.85
对比例2	90.25	88.58	84.36	75.62
对比例3	80.51	76.98	73.87	64.08
对比例4	98.94	97.95	96.08	92.44

分析表2、图1可知,采用实施例1~3冻存液冻存的CAR-T细胞复苏后细胞活率显著高于对比例2~3,略高于对比例1的细胞活率,与对比例4细胞活率无显著差异。

[0031] 进一步地分析知,采用对比例1的冻存液冻存后CAR-T细胞活率略有降低,是由于对比例1的冻存液未添加二甲酸钾成分。采用对比例2~3冻存液冻存后CAR-T细胞复苏后细胞活率显著降低,是由于对比例2的冻存液未添加吡格列酮成分,对比例3的冻存液未添加二甲酸钾、吡格列酮成分。分析上述内容可知,冻存液中缺少吡格列酮成分会显著影响细胞活率。上述试验结果也说明了本发明冻存液中由于添加了吡格列酮成分,进而能够更好地保护细胞的活率。

[0032] 试验例3

试验例3探究实施例1~3、对比例1~4冻存6个月复苏后CAR-T细胞的增殖情况,具体如下:

将复苏后的CAR-T细胞接种至96孔培养板中,接种密度为1×10^5/mL,100μL/孔,加入20μL/孔的MTS染液,于37℃、5%CO_2培养箱中培养。采用酶标仪检测492nm处的吸光度OD值,每次随机收集计算3个重复,连续3天绘制细胞增殖曲线,结果如图2所示。其中,对照组为未冻存的CAR-T细胞。

[0033] 分析图2可知,采用实施例1~3冻存液冻存6个月后CAR-T细胞的增殖速度明显优于对比例1~3,与对比例4冻存液无显著差异。由此可见,本发明提供的保存液对复苏后CAR-T细胞的增殖速度的影响较小。

[0034] 试验例4

试验例4探究实施例1~3、对比例1~4冻存12个月复苏后CAR-T细胞的杀伤活性情况,具体如下:

①靶细胞:以人淋巴瘤细胞Raji细胞(采用1μM的Calcein-AM进行预染)为靶细胞,细胞密度为2×10^4/mL;

②效应细胞:实施例1~3、对比例1~4冻存12个月复苏后CAR-T细胞为效应细胞,使用RPMI1640培养基调整细胞密度;

③检测杀伤活性:按照效靶比2:1、5:1将靶细胞和效应细胞各150μL接种于96孔板中,每组设置三个复孔,37℃、5%CO_2的培养箱中培养24h,以1200rpm/min,离心3min,采用酶标仪进行检测,结果如表3、图3所示。其中,最大释放孔加入2.5%的TritonX-100,自发释放孔加入PBS。杀伤率(%)=(试验组荧光值-自发释放组荧光值)/(最大释放孔荧光值-自发释放组荧光值)×100%。

[0035] 表3 实施例1~3、对比例1~4冻存液冻存12个月CAR-T细胞复苏后的杀伤率情况

冻存液/杀伤率（%）	2：1	5：1
实施例 1	42.27	65.03
实施例 2	41.80	64.56
实施例 3	41.05	63.18
对比例 1	26.36	48.84
对比例 2	27.43	53.75
对比例 3	15.68	30.97
对比例 4	44.32	66.21

分析表3、图3知,采用实施例1~3冻存液冻存12个月复苏后CAR-T细胞的杀伤率明显优于对比例1~3,与对比例4冻存液冻存后的细胞杀伤率无显著差异。上述试验结果说明,本发明的冻存液能够使冻存后CAR-T细胞仍具有高杀伤活性。可见,本发明提供的的冻存液适用于CAR-T细胞的冻存。

[0036] 综上,本发明的CAR-T细胞冻存液包括培养基和添加在培养基中的二甲酸钾、吡格列酮等成分。其中,二甲酸钾能够显著抑制冻存过程中冰晶生成尺寸,从而能够减少由于冰晶的生成对CAR-T细胞造成的损伤;吡格列酮则能够更好地保护CAR-T细胞的活率。CAR-T细胞增殖试验、杀伤试验说明了本发明的冻存液对细胞增殖速度的影响小、冻存12个月CAR-T细胞仍具有高杀伤活性。因此本发明的冻存液适用于CAR-T细胞的冻存。

[0037] 上述实施方式仅为本发明的优选实施方式,不能以此来限定本发明保护的范围,本领域的技术人员在本发明的基础上所做的任何非实质性的变化及替换均属于本发明所要求保护的范围。

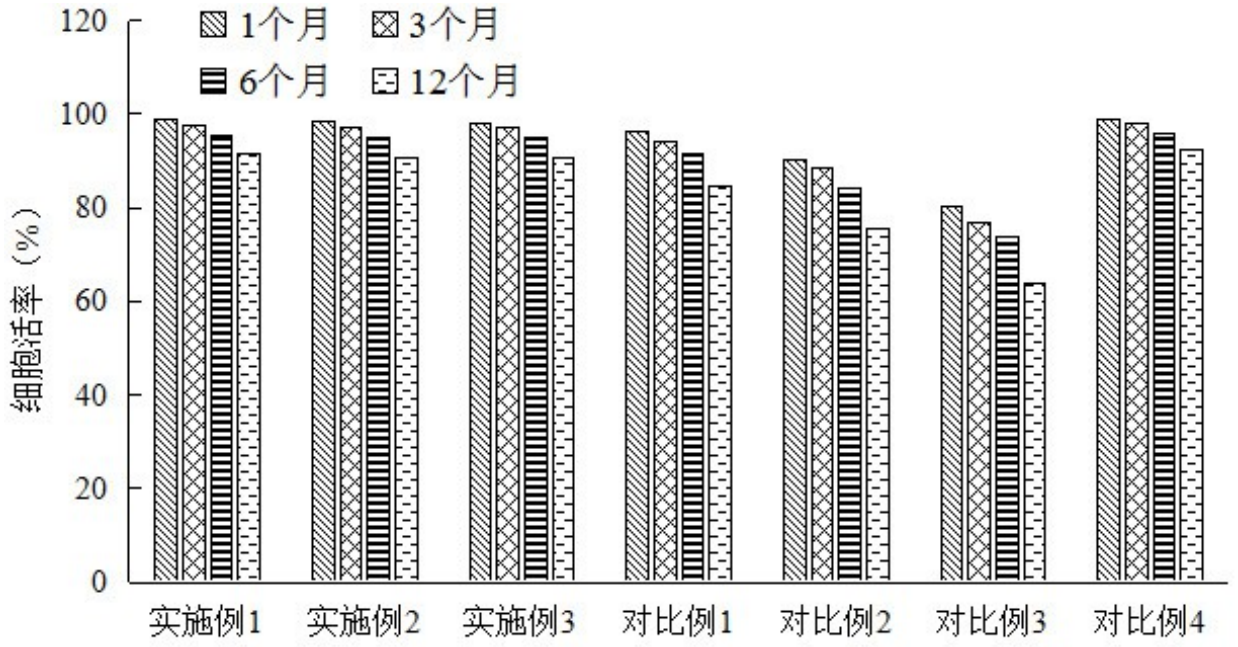

120
100
80
60
40
20
0
细胞活率（%）
1个月
3个月
6个月
12个月
实施例1
实施例2
实施例3
对比例1
对比例2
对比例3
对比例4

图 1

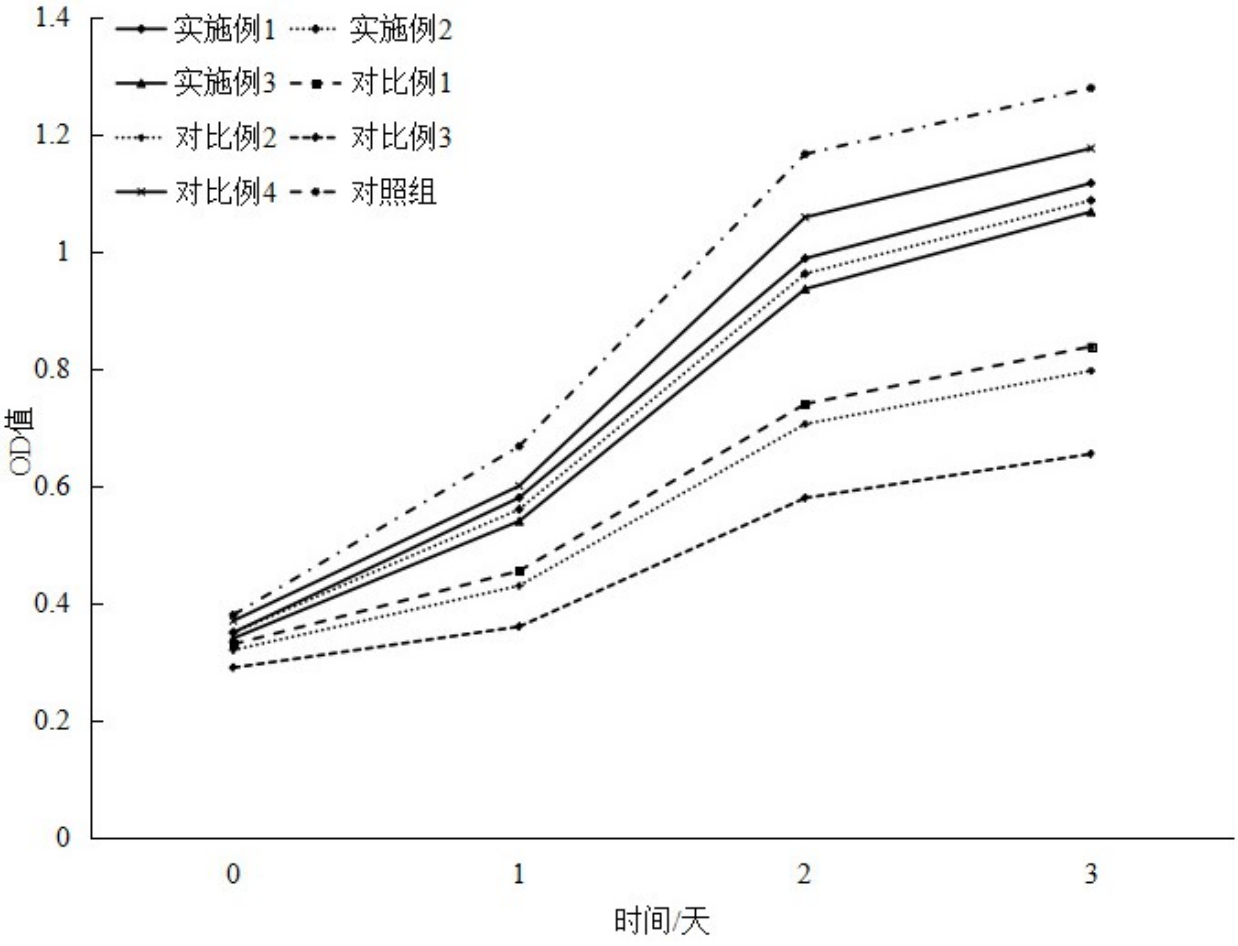

1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
OD值
实施例1
实施例2
实施例3
对比例1
对比例2
对比例3
对比例4
对照组
0
1
2
3
时间/天

图 2

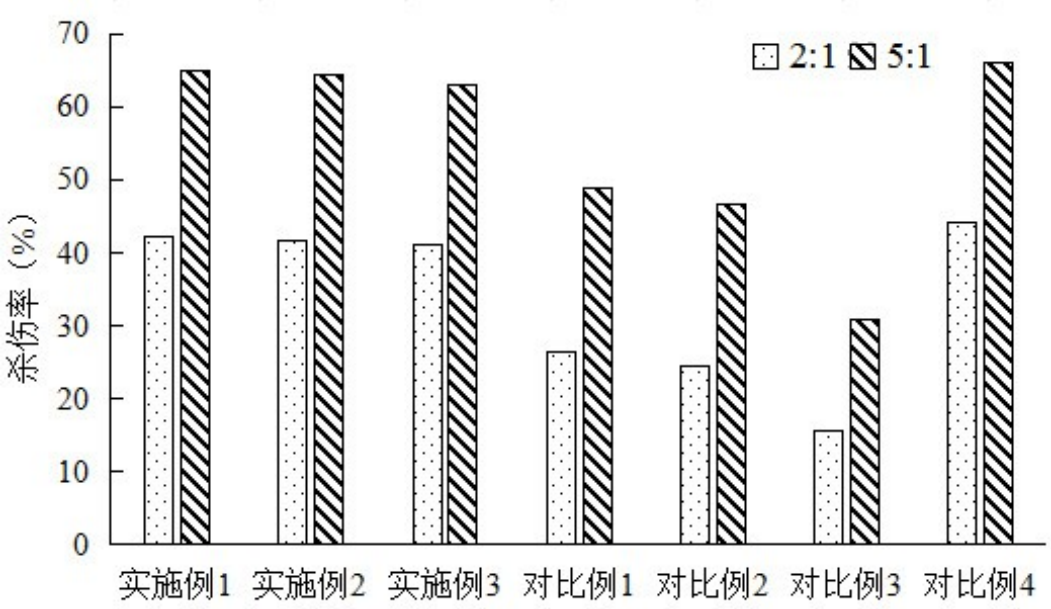

70
60
50
40
30
20
10
0
杀伤率（%）
2:1
5:1
实施例1
实施例2
实施例3
对比例1
对比例2
对比例3
对比例4

图 3