



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107922925 A

(43)申请公布日 2018.04.17

(21)申请号 201680049224.9

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256

(22)申请日 2016.08.31

代理人 陈文平

(30)优先权数据

15183968.5 2015.09.04 EP

(51)Int.Cl.

G12N 5/0783(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.02.24

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/070455 2016.08.31

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/037083 EN 2017.03.09

(71)申请人 美天旎生物技术有限公司

地址 德国贝尔吉施格拉德巴赫

(72)发明人 M·格兰青 V·胡珀特

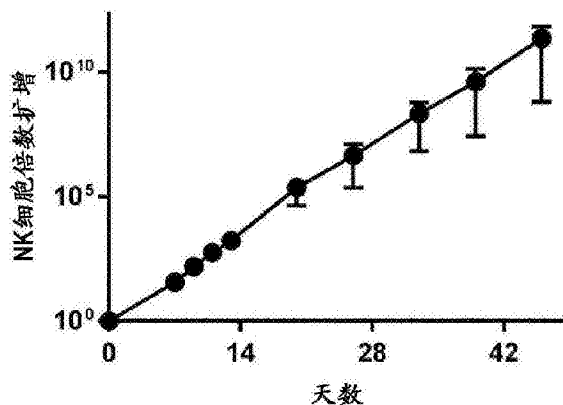
权利要求书1页 说明书14页 附图4页

(54)发明名称

用于自然杀伤细胞扩增的方法

(57)摘要

本发明提供了一种用于在包含自然杀伤(NK)细胞群体的细胞培养基中体外培养和扩增NK细胞的方法,所述方法包括a)在培养过程开始时将有效浓度的白细胞介素-21(IL-21)加入至所述培养基中,b)将有效浓度的白细胞介素-2(IL-2)和/或白细胞介素-15(IL-15)反复地加入至所述培养基中,和c)将饲养细胞或其膜颗粒反复地加入至所述培养基中,其中所述饲养细胞是B细胞衍生的,其是EBV永生化的;和其中所述细胞培养基中NK细胞的所述扩增维持至少3周。



1. 一种用于在包含自然杀伤(NK)细胞群体的细胞培养基中体外培养和扩增NK细胞的方法,所述方法包括:

a) 在培养过程开始时将有效浓度的白细胞介素-21(IL-21)加入至所述培养基中;

b) 将有效浓度的白细胞介素-2(IL-2)和/或白细胞介素-15(IL-15)反复地加入至所述培养基中;

c) 将饲养细胞或其膜颗粒反复地加入至所述培养基中,其中所述饲养细胞是B细胞衍生的,其是EBV永生化的;和

其中所述细胞培养基中NK细胞的所述扩增维持至少3周。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述细胞培养基中IL-21的所述有效浓度在0.1和1000ng/mL之间。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述细胞培养系统中IL-2的所述有效浓度在1U/mL和5000U/mL之间,和/或所述细胞培养系统中IL-15的所述有效浓度在0.1和1000ng/mL之间。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述将饲养细胞反复地加入至所述培养基中是在先前的饲养细胞添加之后的第5天和第16天之间进行。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述细胞培养基中NK细胞的所述扩增维持至少5周。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中包含NK细胞群体的细胞培养基中的所述NK细胞是纯化的NK细胞。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中包含NK细胞群体的细胞培养基中的所述NK细胞的起始浓度在20个细胞/mL和 2×10^7 个细胞/mL之间。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中包含NK细胞群体的细胞培养基中的所述NK细胞的起始浓度在20个细胞/mL和 2.5×10^4 个细胞/mL之间。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述饲养细胞是除了EBV基因组整合以外的遗传未修饰细胞。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法,其中包含NK细胞群体的细胞培养基中的所述NK细胞是遗传修饰的。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述遗传修饰NK细胞表达嵌合抗原受体(CAR)。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法,其中所述方法在自动化过程中进行。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述过程在封闭系统中进行。

14. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1-13所述的方法制备的NK细胞群体。

用于自然杀伤细胞扩增的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及离体培养中自然杀伤细胞(“NK细胞”)数量的有效增加,并且更具体地,但不是排他地,通过用饲养细胞和细胞因子处理细胞。

背景技术

[0002] 自然杀伤细胞(以下也简称为“NK细胞”)是独特的淋巴细胞群体,其能够检测和破坏病毒感染的细胞和恶性地退化的细胞(也称为肿瘤细胞)。此外,NK细胞在与肿瘤细胞接触时产生并分泌细胞因子。这些功能特征使得NK细胞成为用于癌症治疗的有吸引力的药物。临床试验已经突出了NK细胞的临床使用的潜力(Miller 2005,Rubnitz2010,Miller 2013,Childs,Berg 2013)。

[0003] 将供体NK细胞用于患者(“同种异基因使用”)需要细胞分离方法以将想要的NK细胞效应与非NK细胞(例如T细胞)的不想要的、禁忌效应分离。这些方法被完善地建立(Leung 2014)并且可以在封闭的无菌系统中自动化(Apel 2013)。

[0004] 可以从供体的白细胞分离术收获物获得的最大NK细胞剂量被限制为约 2×10^8 个纯化的NK细胞。NK细胞输注到患者中的有益效果是剂量依赖性的,预期接受更高NK细胞数量的患者的更好临床结果。目标细胞数量是 2×10^9 至 1×10^{11} 个NK细胞以最大化NK细胞输注的有益效果。

[0005] 嵌合抗原受体(以下简称“CAR”)可以将细胞毒性免疫效应细胞导向肿瘤细胞。进行临床试验以评估患者衍生(“自体”)CAR T细胞的临床安全性和功效。用CAR修饰NK细胞而不是T细胞允许健康供体衍生的(“同种异基因的”)免疫效应细胞的使用(Glienke 2015)。来自患者或供体的原代细胞的使用允许制造用于单个患者的临床细胞剂量。用于多个患者的细胞产品的制造需要使用可以不受限制地增殖的细胞,例如肿瘤衍生的细胞系。用CAR修饰的NK细胞系可用于临床方案(NK-92,Klingemann,2014)。使用细胞系治疗患者需要通过照射停止生长以避免在转移到患者后细胞系继续生长。这也降低了效应细胞的存活和功能性。此外,细胞系具有同质的表型和功能,没有像原代免疫效应细胞那样提供针对肿瘤细胞的广泛反应性。

[0006] 已经描述了多种方案以诱导体外NK细胞增殖以增加NK细胞数量,在下文中也被描述为“NK细胞扩增”,在其他来源也被描述为“NK细胞增加”。

[0007] NK细胞可以通过与细胞因子组合培养、通过用小分子(例如烟酰胺)补充细胞培养基以及通过细胞因子、抗体和饲养细胞的组合而体外扩增。基于细胞因子的NK细胞培养导致细胞数量仅少量增加,其不足以制造用于多个患者的NK细胞产物,或从小NK细胞亚群制造NK细胞产物。在这些方案中NK细胞在3周后停止生长,延长的培养不导致更高的NK细胞数量。基于饲养细胞的NK细胞扩增方案产生更高的NK细胞数量。有效的方案需要遗传修饰饲养细胞(K562)或通过用爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr Virus)感染而自然地永生化的B细胞系的使用。在与遗传修饰K562细胞(膜结合IL-15)的共培养中扩增的NK细胞在4周时变得衰老,继续被遗传工程化以表达膜结合IL-21的K562细胞的使用以扩增至多6周。B细胞

可以通过用爱泼斯坦-巴尔病毒自然感染B细胞而永生化。这些EBV-LCL可用于有效扩增NK细胞,而没有饲养细胞的进一步遗传修饰(Childs, Berg 2013, Denman 2012)。

[0008] 与EBV-LCL共培养的NK细胞的长期培养只可以在NK细胞的非常小的亚组中维持至多6个月的持续生长(Hercend, 1982),不保持起始NK细胞群体的表型和功能的初始异质性并且仅提供有限数量的NK细胞。

[0009] 因此需要用于扩增NK细胞的改进的体外方法,其允许扩增NK细胞至非常高的数量,优选地扩增至足以符合扩增的NK细胞在患者中的临床应用的临床试验需要的数量。

发明内容

[0010] 令人惊奇地,发现NK细胞可以在培养数周内在细胞培养系统中扩增(增殖)至非常高的数量,例如在包含 2.5×10^4 个NK细胞/mL或 5.25×10^5 个总细胞/mL(包括饲养细胞)的群体的细胞培养基中使用标准起始浓度的NK细胞在7周内扩增至NK细胞的 1×10^{11} 倍扩增。通过这种NK细胞的 1×10^{11} 倍扩增达到的细胞数量足以用于临床应用,例如细胞治疗,例如用于白血病和其他癌症的过继免疫治疗。预料不到地,在NK细胞的培养过程开始时,将有效浓度的白细胞介素-21(IL-21)加入至适合于扩增NK细胞的细胞培养基中,结合饲养细胞(其是B细胞衍生的和EBV转化的,例如爱泼斯坦-巴尔病毒转化的类淋巴母细胞细胞系(EBV-LCL))的存在,并在整个NK细胞培养期间反复地加入B细胞衍生的和EBV转化的新鲜饲养细胞(例如EBV-LCL),导致非常高数量的扩增的NK细胞。优选地,在先前的所述饲养细胞添加之后每5至16天一次,将新鲜的饲养细胞加入到培养基中,更优选地在先前的所述饲养细胞添加之后每6至14天一次,最优选地在先前的所述饲养细胞添加之后每13天。在培养过程在所述细胞培养基中在后期时间点反复添加IL-21或甚至永久存在IL-21对于NK细胞扩增过程是起反作用的。

[0011] 令人惊讶的是在本文公开的条件下,NK细胞的扩增可以在数周内进行而不损失NK细胞数量的增加(存在NK细胞数量在持续时间上的相关性)。扩增的持续可以进行(维持)超过例如5、10、15、20、25、30或更多周。

[0012] 在包含NK细胞群体的细胞培养基中NK的起始浓度可以在1个细胞/mL和 2×10^7 个细胞/mL之间,优选地20个细胞/mL和 2×10^7 个细胞/mL之间。更令人惊讶的是,发现当包含NK细胞群体的细胞培养基中NK细胞/mL的起始浓度在1个细胞/mL和 2.5×10^4 个细胞/mL之间时,优选地在20个细胞/mL和 2.5×10^4 个细胞/mL之间,即NK细胞的起始浓度低于NK细胞的标准起始浓度,其在常见的NK细胞扩增方案中通常高于 7×10^4 个NK细胞/mL,本文公开的方法导致NK细胞的特别高的扩增。这是预料不到的,因为通常需要临界细胞密度以使NK细胞能够体外扩增,因为NK对NK的相互作用确保NK细胞的存活、活化和增殖(Kim 2014)。

[0013] 如本文公开的用于NK细胞扩增的方法可以完全地作为自动化过程实施,优选地在GMP条件下的封闭系统中。

附图说明

[0014] 图1:EBV-LCL存在下NK细胞起始浓度对NK细胞扩增的影响

[0015] 图2:在取决于饲养细胞与NK细胞的比率的不同IL-2浓度下饲养细胞介导的NK细胞扩增:显示在不同IL-2浓度下实现在与EBV-LCL共培养中的NK细胞扩增。此外,更高的

EBV-LCL与NK细胞的比率导致更高的NK细胞扩增,证明EBV-LCL以剂量依赖性方式诱导NK细胞扩增。

[0016] 图3:不同细胞因子组合对饲养细胞介导的NK细胞扩增的影响:显示IL-2和/或IL-15可以用于扩增在与EBV-LCL共培养中的NK细胞。此外,EBV-LCL介导的NK细胞扩增可以通过另外地使用IL-21而显著增加。

[0017] 图4:在不同浓度的IL-21下饲养细胞介导的NK细胞扩增:EBV-LCL介导的NK细胞扩增可以通过IL-21以剂量依赖性方式增加。

[0018] 图5:在B细胞衍生的饲养细胞存在下永久添加相对于短期添加IL-21对NK细胞扩增的影响:为了通过使用IL-21增加NK细胞扩增,只要在培养过程开始时加入IL-21就足够。令人惊讶的是,IL-21的永久添加甚至起反作用,因为它导致抑制的长期NK细胞扩增。

[0019] 图6:通过在第0天加入IL-21和用B细胞衍生的饲养细胞反复刺激而进行的恒定的长期NK细胞扩增:通过仅在培养开始时加入IL-21结合用B细胞衍生的饲养细胞反复刺激NK细胞,可以长时间维持非常高水平的NK细胞的恒定扩增。

[0020] 图7:使用用于自动化细胞处理的装置在封闭系统内的NK细胞的扩增:通过应用于NK细胞扩增的优化方法,其特征在于仅在培养开始时加入IL-21,并用B细胞衍生的饲养细胞刺激NK细胞,可以在用于细胞处理的封闭且自动化的系统内实现NK细胞的高效生产。

具体实施方式

[0021] 在第一方面,本发明提供了用于在包含自然杀伤(NK)细胞群体的细胞培养基中体外培养和扩增NK细胞的方法,所述方法包括:

[0022] a) 在培养过程开始时将有效浓度的白细胞介素-21(IL-21)加入至所述培养基中

[0023] b) 将有效浓度的白细胞介素-2(IL-2)和/或白细胞介素-15(IL-15)反复地加入至所述培养基中

[0024] c) 将饲养细胞或其膜颗粒反复地加入至所述培养基中,其中所述饲养细胞是B细胞衍生的,其是EBV永生化的;和

[0025] 其中所述细胞培养基中NK细胞的所述扩增维持至少3周。

[0026] 在培养过程开始时有效浓度的IL-21的添加具有NK细胞的长持续时间的扩增是可能的,导致非常高的NK细胞数量的效果。相比之下,在培养过程中在细胞培养基中在后期时间点反复添加IL-21或甚至永久存在IL-21导致扩增速率的降低(参见实施例5和图5)。

[0027] 如本文公开的长期NK细胞扩增是基于如下令人惊讶的效果:在培养过程的开始时添加所述IL-21以及使用B细胞衍生的、EBV永生化的饲养细胞例如SMI-EBV-LCL(其被反复添加至所述培养基中)导致非常高的扩增速率。反复添加饲养细胞是需要的,因为饲养细胞由于它们是例如通过照射而生长失活的而快速消失。也可以使用饲养细胞的膜颗粒代替饲养细胞。

[0028] IL-2和/或IL-15是已知的细胞因子,其刺激细胞培养中的NK细胞扩增。它们必须存在于培养基中,但可以被能够在体外细胞培养中刺激NK细胞至基本扩增水平(例如在两周内10倍至50倍扩增)的其他细胞因子或生长因子代替。细胞培养基(其否则只能将NK细胞扩增至基本水平)中IL-21的加入和B细胞衍生的饲养细胞的存在仅仅是与本文公开的长期NK细胞扩增的作用主要地相关。因此,本文公开的方法也应该与负责基本NK细胞扩增的用

于NK细胞扩增的除IL-2和/或IL-15以外的其他兴奋剂一起使用。

[0029] 在本发明的一个实施方式中,所述细胞培养基中的IL-21的有效浓度可以在0.1和1000ng/mL之间,优选地在1和200ng/mL之间,更优选地在10和100ng/mL之间。

[0030] 在本发明的一个实施方式中,所述IL-21是可溶性IL-21或与底物结合的IL-21。在本发明的一个实施方式中,所述细胞培养基中的IL-2的有效浓度可以在1U/mL和5000U/mL之间,优选地在10U/mL和1000U/mL之间,更优选地在50和500U/mL之间。

[0031] 在本发明的另一个实施方式中,所述细胞培养基中的IL-15的有效浓度可以在0.1和1000ng/mL之间,优选地在1和200ng/mL之间,更优选地在10和100ng/mL之间。

[0032] 在本发明的另一个实施方式中,所述IL-2和IL-15两者以所述有效浓度加入到所述细胞培养基中。

[0033] 在本发明的一个实施方式中,所述将饲养细胞反复地加入至所述培养基中可以在先前的饲养细胞添加之后的第5天和第16天之间进行的,优选地第6天和第14天之间,更优选地培养过程的每13天。饲养细胞的浓度可以在 1×10^4 /mL至 1×10^7 /mL之间。

[0034] 优选地,NK细胞与所述饲养细胞的比率在1:100和1:1之间,更优选地在1:30和1:10之间,最优选地1:20。

[0035] 在本发明的一个实施方式中,所述细胞培养基中NK细胞的所述扩增可以维持至少5周,优选地至少7周。

[0036] 在本发明的一个实施方式中,包含NK细胞群体的细胞培养基中的所述NK细胞可以是纯化的NK细胞。NK细胞可以通过磁性细胞分离方法如MACS[®] (Miltenyi Biotec)或流式细胞法如FACS[™],从包含NK细胞和其他细胞的样品纯化,例如PMBC或全血。用于细胞例如NK细胞的纯化的这些和其他方法是本领域公知的。

[0037] 在本发明的一个实施方式中,包含NK细胞群体的细胞培养基中的所述NK细胞的起始浓度可以在20个细胞/mL和 2×10^7 个细胞/mL之间。

[0038] 在本发明的一个实施方式中,包含NK细胞群体的细胞培养基中的所述NK细胞的起始浓度可以在20个细胞/mL和 2.5×10^4 个细胞/mL之间。

[0039] 在本发明的一个实施方式中,所述饲养细胞是除了作为所述饲养细胞的永生化的结果的EBV基因组引入以外的遗传未修饰细胞。

[0040] 在本发明的一个实施方式中,包含NK细胞群体的细胞培养基中的所述NK细胞可以是遗传修饰的。所述遗传修饰NK细胞可以表达嵌合抗原受体(CAR)。

[0041] 在本发明的一个实施方式中,所述方法在自动化过程中进行。所述过程可以在封闭的系统中进行。

[0042] 在另一方面,本发明提供了药物组合物,其包含根据本文公开的方法制备的NK细胞群体。

[0043] 所述组合物在表型和功能方面可以是同质的。期望的表型和功能特征可以通过预选或克隆方法从异质起始群体中选择。

[0044] 一般来说,用本发明的方法获得的扩增的NK细胞可以用于随后的治疗或非治疗应用。

[0045] 靶细胞群体,例如通过本公开获得的NK细胞群体,可以单独施用,或与稀释剂和/或其他组分例如IL-2或其他细胞因子或细胞群体组合作为药物组合物施用。

[0046] 简而言之,本公开的药物组合物可以包含与一种或多种药学上或生理学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂组合的本文所述的靶细胞群体。药物组合物可以包含

[0047] a) NK细胞群体,其中所述NK细胞根据本发明被增殖至治疗有效量;和b) 一种或多种药学上或生理学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0048] 本公开的组合物优选地被配制用于静脉内施用。

[0049] 本公开的药物组合物可以以适合于待治疗(或预防)的疾病的方式施用。尽管适合的剂量可以通过临床试验确定,但是施用的量和频率将通过患者的状态、患者的疾病的类型和严重程度等因素确定。

[0050] 定义

[0051] 除非另外定义,否则本文使用的技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。

[0052] 术语“自然杀伤细胞(NK细胞)”被定义为大颗粒淋巴细胞(LGL),并且构成从产生B和T淋巴细胞的共同淋巴样祖细胞分化的第三种细胞。已知NK细胞在骨髓、淋巴结、脾、扁桃体和胸腺中分化并成熟,然后它们在那里进入循环。按照起源和按照各自的效应功能,NK细胞表型地不同于自然杀伤T细胞(NKT);通常,NKT细胞活性通过分泌IFN γ 促进NK细胞活性。与NKT细胞相比,NK细胞不表达T细胞抗原受体(TCR)或泛T标志物(pan T marker) CD3或表面免疫球蛋白(Ig) B细胞受体,但它们通常在人中表达表面标志物CD16 (Fc γ RIII) 和CD56,在C57BL/6小鼠中表达NK1.1或NK1.2。至多80%的人NK细胞还表达CD8。

[0053] 如本文所使用的术语“培养”包括提供NK细胞维持所需的化学和物理条件(例如温度、气体),以及生长因子。通常培养NK细胞包括为NK细胞提供用于扩增(增殖)的条件。可以支持NK细胞扩增的化学条件的实例包括但不限于缓冲液、血清、营养素、维生素、抗生素、细胞因子和其他生长因子,其被定期地提供在(或可以被手动地给予)适用于NK细胞扩增的细胞培养基中。在一个实施方式中,NK细胞培养基包括补充有5%人血清AB型(Life Technologies)和500U/mL的IL-2(Proleukin S,Novartis)的TexMACS研究培养基(Miltenyi Biotec GmbH)。在另一个实施方式中,NK细胞培养基包括补充有5%人血清AB型(Life Technologies)和500U/mL的IL-2(Proleukin S,Novartis)的干细胞生长培养基SCGM(Cell Genix)。适用于扩增NK细胞的其他培养基是本领域公知的。

[0054] 如本文所用的术语“细胞培养基”包括提供NK细胞维持所需的化学条件的液体。可以支持NK细胞扩增的化学条件的实例包括但不限于溶液、缓冲液、血清、血清组分、营养素、维生素、细胞因子和其他生长因子,其被定期地提供在(或可以被手动地给予)细胞培养基中。如本领域已知的适用于培养NK细胞的培养基包括TexMACS(Miltenyi)、CellGro SCGM(CellGenix)、X-Vivo 10、X-Vivo 15、BINKIT NK细胞初始培养基(Cosmo Bio USA)、AIM-V(Invitrogen)、DMEM/F12、NK细胞培养基(upcyte technologies)。

[0055] 如本文所用的术语“IL-21的有效浓度”被定义为IL-21或其衍生物在细胞培养基中的最终浓度,其在被提供给细胞培养中的NK细胞群体时,优选地在培养过程的第0天,与在相同条件下但不向NK细胞群体提供IL-21所培养的NK细胞相比,导致NK细胞的更大扩增。适用于本发明的一些实施方式的IL-21浓度通常在0.1和1000ng/mL之间,优选地1和200ng/mL之间,优选地10和100ng/mL之间的范围内。下文实施例显示IL-21的示例性有效浓度。优选地,IL-21是可溶的或与底物结合的。如果IL-21是在饲养细胞上膜结合的(例如在在细胞

表面上表达IL-21的遗传修饰饲养细胞上),则是不利的,因为IL-21和饲养细胞组分两者不可以被分别地加入到细胞培养中,而这是进行如本文所公开的扩增方法的先决条件。

[0056] 如本文所用的术语“IL-2”和“IL-15”指细胞因子白细胞介素-2和白细胞介素-15及其衍生物,例如IL-2superkine、IL-2白喉毒素融合蛋白或IL-15R α sushi。

[0057] 术语IL-2和/或IL-15通常指与共有共同 γ 链和IL2/IL15R β (也称为IL2R β 、CD122)的IL2和IL15的异源三聚体受体结合的细胞因子的4 α -螺旋束家族的成员。

[0058] 如本文所用的术语“将有效浓度的IL-2和/或IL-15反复地加入”指所述细胞培养基中IL-2的浓度在1U/mL和5000U/mL之间,优选地在10U/mL和1000U/mL之间,更优选地在50和500U/mL之间,和/或指所述细胞培养基中IL-15的浓度在0.1和1000ng/mL之间,优选地在1和200ng/mL之间,更优选地在10和100ng/mL之间。下文实施例显示IL-2和/或IL-15的示例性有效浓度。通常,在培养过程期间IL-2和/或IL-15的浓度随时间降低,因此将IL-2和/或IL-15反复地加入至细胞培养基中以将细胞因子的水平维持在有效浓度。定期地,通过细胞培养基更换将IL-2和/或IL-15再次加入至细胞培养基中。在这种上下文下,“反复地”指在整个培养过程中至少一次重复。在培养过程开始时加入IL-2和/或IL-15不是必要的,但至少在第一培养基更换时加入,即在7天之后。但是,尽管如此,在培养过程开始时加入IL2和/或IL-15是有利的。

[0059] 如本文所用,术语“扩增”或“增殖”指细胞生长和细胞数量增加。如本文所用的扩增或增殖涉及在培养过程中发生的增加的NK细胞数量,例如在本文公开的。

[0060] 如本文所用的术语“培养过程”或“培养”指本文公开的NK细胞的培养和扩增,其中培养过程(即NK细胞的扩增)的起始日(起点)被定义为第0天。培养过程可以持续长达操作者所期望的,并且只要细胞培养基具有允许细胞存活和/或生长和/或增殖的条件就可以进行。

[0061] 如本文所用的术语“培养过程的开始”指通过向细胞培养基添加生长因子例如IL-2和/或IL-15的扩增过程的开始,即启动细胞以开始其增殖过程。培养过程的开始阶段包括从NK细胞暴露于这样的生长因子开始的前三天。在这段时间内,即在前三天内,将有效浓度的IL-21加入至所述培养基中是有利的。与在早期时间点添加相比,在后期时间点添加IL-21至所述培养基中不具有有益效果。因此,在培养过程开始时将有效浓度的白细胞介素-21(IL-21)加入至所述培养基指在培养过程的前三天内添加所述IL-21,优选地在培养过程的第0天。

[0062] 优选地,仅将有效浓度的IL-21加入至细胞培养基中一次。或者,将有效浓度的IL-21反复地加入(例如两次或更频繁)至所述细胞培养基中,但是是在培养过程的前三天内(“在开始时”)。所述两次或更频繁地添加IL-21至培养基也可以以使得细胞培养基中IL-21的有效浓度不在所述多次添加之和之前达到有效浓度的方式组织。如上所述,在培养过程的开始阶段之后将IL-21添加至所述细胞培养基中相对于通过本发明的方法在7周内可获得的 10^{11} 倍NK细胞扩增的结果起反作用。特别起反作用的是培养过程中在细胞培养基中IL-21的永久存在。

[0063] 术语“饲养细胞”指被添加到靶细胞(即这里指自然杀伤细胞)培养物以支持它们的生存和/或生长的细胞。饲养细胞提供完整的和功能性的细胞外基质和基质相关因子,并分泌已知和未知的细胞因子到条件培养基中。饲养细胞通常是生长停滞的,以防止它们在

培养物中增殖,但是维持它们的存活。生长停滞可以通过用有效剂量照射或用有效剂量的化学品如丝裂霉素C处理而实现。存在多个种类的饲养细胞,其包括照射的外周血单核细胞(以下也简称为“PBMC”)、PBMC耗尽的NK细胞、癌细胞系、遗传工程化癌细胞系和通过用爱泼斯坦-巴尔病毒自然感染而永生化的淋巴细胞(以下也简称为“EBV”)。

[0064] 如本文所用的术语“饲养细胞的膜颗粒”指饲养细胞的膜制剂,其含有饲养细胞的NK细胞刺激性表面分子。饲养细胞的膜颗粒可用于避免活的饲养细胞的可能缺点。饲养细胞的膜颗粒可以通过使用氮空化裂解和破坏细胞然后通过密度梯度离心分离和纯化细胞膜部分而制备,由Oyer等示例性描述(Oyer 2015)。通常,在本文公开的方法中,饲养细胞可以用所述饲养细胞的膜颗粒代替。优选地,膜颗粒应该以使得与可以通过所用的活饲养细胞获得的这些量相当的量使用。优选地,所用膜颗粒的浓度可以在100和400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间,更优选地在150和250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间。膜颗粒的添加可以像活饲养细胞的添加一样频繁地进行。

[0065] 如本文所用的EBV-LCL可以例如通过EBV使B细胞永生化的制备。PBMC与环孢菌素A和EBV实验室菌株B95-8一起培养。将细胞培养直至可以观察到明显的增殖。在将细胞维持在含有阿昔洛韦的培养基中以防止感染性病毒的释放之后,EBV转化的淋巴样母细胞细胞系的产生完成。用于产生爱泼斯坦-巴尔病毒转化的淋巴样母细胞细胞系(EBV-LCL)的另外的方案是本领域公知的并且公开于例如Sili等,2012,Cytotherapy,14(1):7-11(补充材料中的SOP 3)。

[0066] 如本文所用的术语“工程化细胞”和“遗传修饰细胞”可以互换使用。该术语指含有和/或表达外源基因或核酸序列,其进而修饰细胞或其后代的基因型或表型。特别地,术语指细胞可以通过本领域公知的重组方法操纵以稳定地或瞬时地表达肽或蛋白质,所述肽或蛋白质不在天然状态的这些细胞中表达。细胞的遗传修饰可以包括但不限于转染,电穿孔,核转染,使用逆转录病毒载体、慢病毒载体、非整合的逆转录病毒或慢病毒载体的转导,转座子,包括锌指核酸酶、TALENs或CRISPR/Cas的设计核酸酶。

[0067] 如本文所用的术语“所述饲养细胞是除了作为所述饲养细胞的永生化的结果的EBV基因组引入以外的遗传未修饰细胞”指饲养细胞仅仅已经通过天然EBV感染而被操纵以变得永生化的,但不涉及进一步的遗传工程化(遗传修饰),导致饲养细胞除了饲养细胞本身的内源性遗传物质和天然爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)的遗传信息以外不携带额外的遗传信息。

[0068] 如本文所用的术语“封闭系统”指任何封闭系统,其在进行培养过程例如新材料的引入和进行细胞培养步骤例如增殖、分化、活化和/或细胞分离时降低了细胞培养污染的风险。这样的系统允许在GMP或GMP样条件(“无菌”)下操作,产生临床上可应用的细胞组合物。本文示例性地将CliniMACS Prodigy[®](Miltenyi Biotec GmbH,Germany)用作封闭系统。这个系统公开于W02009/072003中。但是并不预期将本发明的方法的使用限制于CliniMACS[®] Prodigy。

[0069] 本文所用的术语“自动化方法”或“自动化过程”指通过设备和/或计算机和计算机软件的使用而自动化的任何过程,否则其将由或可由操作员手动进行。已经被自动化的方法(过程)需要较少的人工干预和较少的人员交付时间。在一些情况下,如果本方法的至少一个步骤在没有任何人支持或干预的情况下进行,则本发明的方法是自动化的。优选地,如果本文公开的方法的所有步骤在没有人支持或干预的情况下进行,本发明的方法是自动化

的。优选地自动化过程是在封闭系统例如CliniMACS® Prodigy上实施。

[0070] CAR包含对某个靶抗原特异性的抗体的单链片段可变区(scFv),其通过铰链和跨膜区与细胞信号传导分子的胞质结构域偶联。最常见的淋巴细胞激活部分包括与细胞触发(例如CD3ζ)部分串联的细胞共刺激(例如CD28、CD137、OX40、ICOS和CD27)结构域。CAR介导的过继性免疫治疗允许CAR移植的细胞以非HLA限制的方式直接地识别靶细胞上的期望抗原。

[0071] 实施方式

[0072] 在本发明的一个实施方式中,NK细胞通过正磁性细胞分离被从人血液样品例如PBMC纯化。NK细胞通过与抗CD56抗体或其片段偶联的磁珠的使用被分离。包含富集的NK细胞群体的阳性部分然后被加入到适用于NK细胞扩增的细胞培养基中,即培养基包含IL-2和/或IL-15和B细胞衍生的饲养细胞例如EBV-LCL。为了开始培养过程,在第0天将IL-21加入到培养基中。细胞在37℃和5%CO₂下培养。5天或7天后,第一次加入包含IL-2和/或IL-15的新鲜培养基。此后,每二至五天加入包含IL-2和/或IL-15的新鲜培养基。培养过程的每13天,将新鲜的B细胞衍生的饲养细胞加入到培养基中。

[0073] 只要需要达到期望量的扩增的NK细胞,就进行上述这个过程,并且可以收获所产生的NK细胞。

[0074] 在本发明的一个实施方式中,包含NK细胞群体的细胞培养基中的所述NK细胞可以是通过使用偶联至抗CD3抗体或其片段的磁珠除去T细胞而从人血液样品纯化,并通过CD56富集进一步纯化的NK细胞。

[0075] 在本发明的一个实施方式中,包含NK细胞群体的细胞培养基中的所述NK细胞可以是通过使用临床标度细胞分离器(CliniMACS plus,Miltenyi Biotec,Germany)的CD3耗竭和CD56富集而纯化的NK细胞。在本发明的一个实施方式中,包含NK细胞群体的细胞培养基中的所述NK细胞可以是通过在完全封闭的系统(CliniMACS Prodigy®,Miltenyi Biotec,Germany)中的CD3耗竭和CD56富集(包括所有磁性标记步骤)而纯化。

[0076] 在本发明的一个实施方式中,包含NK细胞群体的细胞培养基中的所述NK细胞可以是NK细胞,其是通过负磁性细胞分离从人血液样品例如PBMC纯化。NK细胞是通过与非NK细胞结合的抗体或其片段的混合物偶联的磁珠的使用而分离。包含富集的NK细胞群体的阴性部分然后被加入到适用于NK细胞扩增的细胞培养基中,即培养基包含IL-2和/或IL-15和B细胞衍生的饲养细胞例如EBV-LCL。

[0077] 在本发明的一个实施方式中,包含NK细胞群体的细胞培养基中的所述NK细胞可以是NK细胞,其是通过负磁性细胞分离和如例如W02013076070A1(MACSxpress® NK细胞分离试剂盒,Miltenyi Biotec)中公开的红细胞沉降从全人血纯化。

[0078] 在本发明的一个实施方式中,包含NK细胞群体的细胞培养基中的所述NK细胞可以是NK细胞,其是来自阴性选择的NK细胞的纯化亚群。

[0079] 在本发明的一个实施方式中,包含NK细胞群体的细胞培养基中的所述NK细胞可以是NK细胞,其是纯化的NKG2C阳性NK细胞亚群。

[0080] 在本发明的一个实施方式中,包含NK细胞群体的细胞培养基中的所述NK细胞可以是NK细胞,其是纯化的CD57阳性和NKG2C阳性适应性NK细胞亚群。

[0081] 在本发明的一个实施方式中,包含NK细胞群体的细胞培养基中的所述NK细胞可以是NK细胞,其是对单个KIR分子阳性的纯化NK细胞亚群。

[0082] 在本发明的一个实施方式中,包含NK细胞群体的细胞培养基中的所述NK细胞可以是NK细胞,其是对病毒肽特异性的纯化NK细胞亚群。

[0083] 在本发明的一个实施方式中,包含NK细胞群体的细胞培养基中的所述NK细胞可以是NK细胞,其被针对细胞因子分泌亚群进行富集。

[0084] 在本发明的一个实施方式中,包含NK细胞群体的细胞培养基中的所述NK细胞可以是NK细胞,其是使用荧光激活细胞分选仪分离的亚群。

[0085] 在本发明的一个实施方式中,包含NK细胞群体的细胞培养基中的所述NK细胞可以是NK细胞,其是使用基于微芯片的细胞分选仪例如MACSQuant **Tyto**[®] (Miltenyi Biotec GmbH) 分离的亚群。

[0086] 在本发明的一个实施方式中,包含NK细胞群体的细胞培养基中的所述NK细胞可以是NK细胞,其是遗传修饰的。所述遗传修饰NK细胞可以表达嵌合抗原受体 (CAR)。

[0087] 在本发明的一个实施方式中,包含NK细胞群体的细胞培养基中的所述NK细胞可以是NK细胞,其是遗传修饰的。所述遗传修饰NK细胞可以过表达一种或多种趋化因子受体。

[0088] 在本发明的一个实施方式中,包含NK细胞群体的细胞培养基中的所述NK细胞可以是NK细胞,其是遗传修饰的。所述遗传修饰NK细胞可以表达比天然存在的更高亲和力版本的NK细胞受体。所述NK细胞受体可以选自CD16、CD314/NKG2D、CD335/NKp46、NKp44、NKp30、CD226/DNAM-1或激活杀伤免疫球蛋白样受体。

[0089] 在本发明的一个实施方式中,由NK细胞分离和NK细胞培养构成的方法是在本领域技术人员已知的封闭系统中进行。在另一个实施方式中,封闭系统是附接到细胞处理装置的一次性管道组。在另一个实施方式中,所述细胞处理装置是CliniMACS **Prodigy**[®] (Miltenyi Biotec)。

[0090] 在本发明的一个实施方式中,所述培养过程被用于大型生物反应器中NK细胞的工业生产。在本发明的另一个实施方式中,将NK细胞从单采 (apheresis) 产品中分离,并且用所述培养过程将这些所述约 2×10^8 个供体NK细胞培养3周,产生在约200至1000升的体积中约 2×10^{13} 个NK细胞。在本发明的另一个实施方式中,将这些约 2×10^{13} 个NK细胞分成每份 1×10^{11} 个NK细胞的部分,为约200名患者提供临床NK细胞产品。

[0091] 在本发明的另一个实施方式中,将NK细胞从100mL的人全血捐赠物中分离,并且用所述培养过程将这些所述约 2×10^7 个供体NK细胞培养4周,产生在约2000至10000升的体积中约 2×10^{14} 个NK细胞。在本发明的另一个实施方式中,将这些约 2×10^{14} 个NK细胞分成每份 1×10^{11} 个NK细胞的部分,为约2000名患者提供临床NK细胞产品。

[0092] 在本发明的另一个实施方式中,将NK细胞从1mL的人全血捐赠物中分离,并且用所述培养过程将这些所述约 2×10^5 个供体NK细胞培养6周,产生在约3000至15000升的体积中约 2×10^{14} 个NK细胞。在本发明的另一个实施方式中,将这些约 2×10^{14} 个NK细胞分成每份 1×10^{11} 个NK细胞的部分,为约2000名患者提供临床NK细胞产品。

[0093] 在本发明的另一个实施方式中,将单个NK细胞从人全血捐赠物中分离,并用所述培养过程将该所述NK细胞培养11周,产生在约10000至50000升的体积中约 1×10^{15} 个NK细

胞。在本发明的另一个实施方式中,将这些约 1×10^{15} 个NK细胞分成每份 1×10^{11} 个NK细胞的部分,为约10000名患者提供临床NK细胞产品。

[0094] 在本发明的一个实施方式中,将所述NK细胞在所述培养过程中培养13天,收获99.9%的培养体积,并且在所述培养过程中进一步引入0.1%的体积。收获的NK细胞可用于期望目的,并且所述培养过程每两周提供约 1×10^9 个NK细胞的连续供应。

[0095] 在本发明的另一个实施方式中,所述培养的NK细胞在两周后被冷冻保存。将冷冻保存的NK细胞的等分试样解冻并在所述培养过程中进一步培养,允许从冷冻保存的细胞库开始生产NK细胞。

[0096] 在本发明的一个实施方式中,所述NK细胞通过有限稀释克隆,由Morris等(Morris 2005) 示例性描述,以分离所述NK细胞的期望表型,用于引入至所述培养过程。

[0097] 在本发明的一个实施方式中,针对期望的HLA表型选择所述饲养细胞,用于在所述培养过程中调节NK细胞的KIR库(KIR repertoire)。

[0098] 实施例

[0099] 实施例1:在B细胞衍生的饲养细胞存在下,NK细胞起始浓度对NK细胞扩增的影响

[0100] 需要用于NK细胞扩增的有效的方法以产生足够的NK细胞用于基于NK细胞的免疫疗法。在这种情况下,已知出于最佳的存活、活化和增殖,NK细胞需要培养物中的同型NK对NK相互作用(Kim2014),并且根据这一观察,公知NK细胞的最佳体外扩增需要维持临界细胞密度。

[0101] 令人惊讶地,发现非常低的NK细胞密度在B细胞衍生的饲养细胞存在下引起改善的NK细胞扩增。人外周血单核细胞(PBMC)是从人全血的血沉棕黄层制备物制备。通过EBV使B细胞永生被用于产生B细胞衍生的饲养细胞。PBMC与环孢菌素A和EBV实验室菌株B95-8一起培养。将细胞培养直至可以观察到明显的增殖。在将细胞维持在含有阿昔洛韦的培养物中以防止感染性病毒的释放之后,EBV转化的淋巴样母细胞细胞系(EBV-LCL)的产生完成。所有实施例中使用的EBV-LCL系是SMI-EBV-LCL。NK细胞是使用NK细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec)从PBMC中分离。将来自三个不同供体的NK细胞,以1:20的比率与100Gy照射的EBV-LCL(SMI-EBV-LCL)一起,在补充有5%人血清AB型(Life Technologies)和500U/mL的IL-2(Proleukin S,Novartis)的TexMACS研究培养基(Miltenyi Biotec)中培养。研究不同的NK细胞浓度以开始培养,同时通过并不单独改变NK细胞的浓度而是改变总细胞的浓度而使NK与饲养细胞的比率保持不变。细胞在37°C和5%CO₂下培养,并在7天后测定NK细胞的扩增。NK细胞倍数扩增被计算为第7天的NK细胞数量除以培养开始时的NK细胞数量。如图1所示, 2.8×10^4 个NK细胞/mL、 4.0×10^4 个NK细胞/mL和 7.0×10^4 个NK细胞/mL的NK细胞起始浓度分别导致26.4、20.9和10.3的平均NK细胞倍数扩增。图1中的误差线是针对不同供体的标准偏差。

[0102] 可以清楚地显示,如果在非常低的NK细胞浓度下开始培养,则NK细胞在与B细胞衍生的饲养细胞的共培养中有效地扩增,并且令人惊讶的是,更低的起始NK细胞浓度导致显著更高的NK细胞扩增。

[0103] 实施例2:在不同IL-2浓度下饲养细胞介导的NK细胞扩增和不同饲养细胞与NK细胞比率的使用

[0104] 为了研究NK细胞与饲养细胞比率和不同IL-2浓度对NK细胞扩增的影响,将来自三

个不同供体的人NK细胞,连同100Gy照射的EBV-LCL (SMI-EBV-LCL),在补充有5%人血清AB型的TexMACS研究培养基中培养。所用总细胞浓度为 5.25×10^5 /mL,包括NK细胞和EBV-LCL。测试了NK细胞与EBV-LCL的不同比率,并且1:2和1:20的比率显示在图2中。对于每个NK细胞与饲养细胞比率,在培养基中使用不同浓度的IL-2,并且50U/mL和500U/mL显示在图2中。细胞在37°C和5%CO₂下培养。在第5、7、10和12天测定NK细胞浓度,并且通过加入含有IL-2的新鲜培养基将NK细胞浓度稀释至 5×10^5 /mL。NK细胞倍数扩增被计算为在感兴趣的那天的NK细胞数量除以在培养开始时NK细胞数量。显示第7天(图2A)和第15天(图2B)的NK细胞倍数扩增的平均值。图2中的误差线是针对不同供体的标准偏差。在培养的第7天,50U/mL IL-2的使用导致对于1:2和1:20的NK细胞与饲养细胞比率,4.0和7.9的平均NK细胞倍数扩增,而500U/mL IL-2的使用导致对于1:2和1:20的NK细胞与饲养细胞比率,1.9和5.9的平均倍数扩增。在培养的第15天,50U/mL IL-2的使用导致对于1:2和1:20的NK细胞与饲养细胞比率,93.6和535.6的平均NK细胞倍数扩增,而500U/mL IL-2的使用导致对于1:2和1:20的NK细胞与饲养细胞比率,94.4和726.1平均倍数扩增。总之,对于饲养细胞介导的NK细胞扩增,使用不同IL-2浓度是可能的,可以应用不同NK与EBV-LCL细胞比率,并且更高数量的EBV-LCL/NK细胞导致增强的NK细胞扩增,显示增加的NK细胞扩增的诱导是以剂量依赖性方式基于EBV-LCL。

[0105] 实施例3:不同细胞因子组合对饲养细胞介导的NK细胞扩增的影响

[0106] 将人供体衍生的NK细胞,以1:20的比率和 5.25×10^5 /mL总细胞的起始浓度,与或不与100Gy照射的EBV-LCL (SMI-EBV-LCL)一起,在补充有5%人血清AB型的TexMACS研究培养基中培养。此外,将500U/mL IL-2或10ng/mL IL-15 (Miltenyi),与或不与加入100ng/mL IL-21 (Miltenyi)一起,作为培养基补充物进行测试。细胞在37°C和5%CO₂下培养,并在7天后测定NK细胞的扩增。对于不同细胞因子组合,NK细胞倍数扩增的平均值显示在图3中。NK细胞倍数扩增被计算为在第7天的NK细胞数量除以培养开始时的NK细胞数量。图3中的误差线是针对不同供体的标准偏差。来自八个不同供体的结果可以见于图3A中。

[0107] 独立于IL-2和IL-21的使用,在没有EBV-LCL的情况下,NK细胞不明显扩增。相比之下,由7天后21.8的平均NK细胞倍数扩增显示,在EBV-LCL和IL-2的存在下,NK细胞显著地扩增。令人惊讶地,在IL-2存在下,额外添加IL-21进一步增强EBV-LCL介导的NK细胞扩增,并且在7天后导致53.2的平均NK细胞倍数扩增。图3B中显示来自六个不同供体的数据,并且NK细胞与EBV-LCL共培养和使用IL-2、IL-15或IL-2和IL-15的组合分别导致11.0、6.9和12.6的平均NK细胞倍数扩增。证实来自图3A的观察结果,IL-21的添加进一步增强EBV-LCL介导的NK细胞扩增,并且在IL-2、IL-15或IL-2和IL-15的组合存在下,导致41.4、32.6和28.1的平均NK细胞倍数扩增。总之,IL-2和IL-15或细胞因子两者的组合使在B细胞衍生的饲养细胞的存在下NK细胞能够扩增。令人惊讶地,IL-21的补充进一步增加基于EBV-LCL的NK细胞的扩增,而IL-21对于没有饲养细胞的NK细胞扩增没有影响。

[0108] 实施例4:在不同浓度的IL-21下饲养细胞介导的NK细胞扩增

[0109] 将来自三个不同供体的NK细胞,以1:20的比率和 5.25×10^5 /mL总细胞的起始浓度与100Gy照射的EBV-LCL (SMI-EBV-LCL)一起,在补充有5%人血清AB型和500U/mL IL-2的TexMACS研究培养基中培养。在第0天加入不同浓度的IL-21。细胞在37°C和5%CO₂下培养,并在7天后测定NK细胞的扩增。NK细胞倍数扩增被计算为在第7天的NK细胞数量除以培养开

始时的NK细胞数量。在图4中,描绘了来自三个不同供体的NK细胞的平均NK细胞倍数扩增,并且误差线是针对标准偏差。使用0、10、25、50和100ng/mL IL-21分别导致10.1、26.8、34.9、41.4和47.7的平均NK细胞倍数扩增,显示存在基于EBV-LCL的NK细胞扩增与应用的IL-21浓度的正相关。

[0110] 实施例5:在B细胞衍生的饲养细胞存在下,永久添加相对于短期添加IL-21对NK细胞扩增的影响

[0111] 测试保持恒定的IL-21浓度是否是确保对NK细胞扩增的持续阳性作用所需要的。

[0112] 将来自三个不同供体的人NK细胞,以1:20的比率和 5.25×10^5 /mL总细胞的起始浓度与100Gy照射的EBV-LCL (SMI-EBV-LCL) 一起,在补充有5%人血清AB型和500U/mL IL-2的TexMACS研究培养基中培养。细胞在37°C和5%CO₂下培养。在第7、9、11、13、16、18、20、26和28天,测定NK细胞浓度,并且通过加入含有IL-2的新鲜培养基将NK细胞浓度稀释至 5×10^5 /mL。IL-21 (100ng/mL) 或者仅在培养过程开始时加入,或者作为培养基的组分永久地补充,意思是在开始时和每当添加新鲜培养基时。在不同时间点的来自三个不同供体的NK细胞倍数扩增的平均值显示在图5中,并且图5中的误差线是针对标准偏差。NK细胞倍数扩增被计算为在感兴趣的那天的NK细胞数量除以在培养开始时的NK细胞数量。仅在培养开始时加入IL-21 (黑点) 或永久地加入IL-21 (空心方块) 导致在28天后18383或3473的平均NK细胞倍数扩增。总之,仅在培养过程开始时添加IL-21足以实现增强的饲养细胞介导的NK细胞扩增,而IL-21的永久添加预料不到地具有由减少的长期NK细胞扩增证实的负面效果。

[0113] 实施例6:通过在第0天加入IL-21和用B细胞衍生的饲养细胞反复刺激的持续长期NK细胞扩增

[0114] 总的来说,在实施例1-5中显示与B细胞衍生的饲养细胞一起培养的NK细胞,结合仅在培养开始时加入IL-21,允许具有出色功效的NK细胞扩增。然而,由于如图5所示通常原代NK细胞只可以扩增有限的时间段,因此测试了如何使高水平维持较长时间段。

[0115] 将来自六个不同供体的NK细胞在补充有5%人血清AB型和500U/mL IL-2的TexMACS研究培养基中培养。IL-21 (100ng/mL) 仅在第0天补充。为了用B细胞衍生的饲养细胞反复刺激NK细胞,将100Gy照射的EBV-LCL (SMI-EBV-LCL) 在几天后再次加入。图6中显示的是在第0、13、26和39天以20:1的比率将EBV-LCL加入至NK细胞中,而通过加入含有IL-2的新鲜培养基将总细胞浓度调节至 5.25×10^5 /mL。细胞在37°C和5%CO₂下培养46天,并在第7、9、11、18、20、23、32和/或33和36天,通过加入含有IL-2的新鲜培养基将NK细胞浓度稀释至 5×10^5 /mL。NK细胞倍数扩增被计算为在感兴趣的那天的NK细胞数量除以在培养开始时的NK细胞数量。在不同时间点的不同供体的NK细胞倍数扩增的平均值显示在图6中。值得注意的是,图6所示的误差线显示不同供体的范围,而不是针对标准偏差。实现了长时间的NK细胞的高效和恒定扩增,并且在46天后,达到 2.7×10^{11} 的平均NK细胞倍数扩增。总之,在培养开始时加入IL-21并用B细胞衍生的饲养细胞反复刺激,使原代NK细胞能够以出色功效永久扩增。

[0116] 实施例7:通过使用用于NK细胞扩增的优化方法,应用于NK细胞扩增的自动化细胞处理系统

[0117] 为了测试以临床可应用方式生产NK细胞,在CliniMACS Prodigy (Miltenyi) (用于自动细胞化处理的封闭系统(W02009072003A2) 中进行NK细胞扩增。

[0118] 将NK细胞,以1:20的比率与100Gy照射的EBV-LCL (SMI-EBV-LCL) 一起,在补充有5%人血清AB型和500U/mL IL-2的TexMACS研究培养基中培养。IL-21 (100ng/mL) 仅在第0天补充。使用三个不同CliniMACS Prodigy[®]装置对三个不同供体进行扩增过程。培养开始时的平均NK细胞数量是 1.08×10^6 个NK细胞,并且NK细胞悬浮在CliniMACS Prodigy[®]仪器的CentriCult Unit内的60mL中。CentriCult Unit被用于培养细胞,并且该装置的程序将培养条件维持在37°C和5%CO₂。在第7天通过添加60或120mL新鲜培养基,将细胞浓度稀释至 $3-5 \times 10^5$ 个NK细胞/mL。在第9天再次将新鲜培养基加入至CentriCult Unit直至达到300mL的最大培养体积。在第12天将230mL的旧培养基移除并用230mL的新鲜培养基更换。在第14天,由于达到通过使用仪器可获得的最大细胞浓度(约 1×10^7 /mL),培养被终止。在第0、7、9、12和14天,测量NK细胞浓度,并计算CentriCult Unit内的NK细胞总数。不同时间点的平均NK细胞数量显示在图7中。图7中的误差线是针对标准偏差。通过CliniMACS Prodigy[®]装置的使用,可以在两周内产生 3.2×10^9 个NK细胞的平均数量。

[0119] 总之,通过细胞处理装置的使用,可以用低数量的NK细胞开始并在两周内产生治疗剂量的NK细胞。此外,基于实施例6中所示的结果,通过每当达到最大细胞密度时反复收获大部分细胞和使用EBV-LCL饲养细胞再刺激剩余NK细胞,可以使用所用仪器进行自动化的且连续运行的NK细胞生产过程。

[0120] 参考文献

[0121] Apel M等."Integrated Clinical Scale Manufacturing System for Cellular Products Derived by Magnetic Cell Separation,Centrifugation and Cell Culture" *Chemie Ing Tech* 2013.85:103e10.

[0122] Childs RW,Berg R"Bringing natural killer cells to the clinic:ex vivo manipulation." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013.2013:234-46

[0123] Denman CJ等,2012:"Membrane-Bound IL-21Promotes Sustained Ex Vivo Proliferation of Human Natural Killer Cells",*PLoS ONE*

[0124] Glienke W等."Advantages and applications of CAR-expressing natural killer cells." *Front Pharmacol* 2015.Feb 12;6:21

[0125] Hercend T等."Generation of a cloned NK cell line derived from the "null cell"fraction of human peripheral blood" *J Immunol* 1982.129 (3) :1299-1305

[0126] Kim TJ等."Homotypic NK cell-to-cell communication controls cytokine responsiveness of innate immune NK cells." *Sci Rep* 2014.Dec5;4:7157

[0127] Klingemann H"Are natural killer cells superior CAR drivers?" *Oncoimmunology* 2014.Apr 15;3:e28147

[0128] Leung W,"Infusions of allogeneic natural killer cells as cancer therapy" *Clin Cancer Res* 2014.Jul 1;20 (13) :3390-400

[0129] Miller JS"Therapeutic applications:natural killer cells in the clinic" *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013.2013:247-53

[0130] Miller JS等."Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidenticalNKcells in patients with cancer" *Blood* 2005.Apr 15;105 (8) :

3051-7

[0131] Morris RJ等."A high-efficiency system of natural killer cell cloning."J Immunol Methods 2005.Dec 20;307(1-2):24-33

[0132] Oyer JL等."Generation of highly cytotoxic natural killer cells for treatment of acute myelogenous leukemia using a feeder-free,particle-based approach"Biol Blood Marrow Transplant 2015.Apr;21(4):632-9

[0133] Rubnitz JE等."NKAML:a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell trans-plantation in childhood acute myeloid leukemia"J Clin Oncol 2010.28:955e9.

[0134] Sili U等."Production of good manufacturing practice-grade cytotoxic T lymphocytes specific for Epstein-Barr virus,cytomegalovirus and adenovirus to prevent or treat viral infections post-allogeneic hematopoietic stem cell transplant."Cytotherapy 2012Jan;14(1):7-11

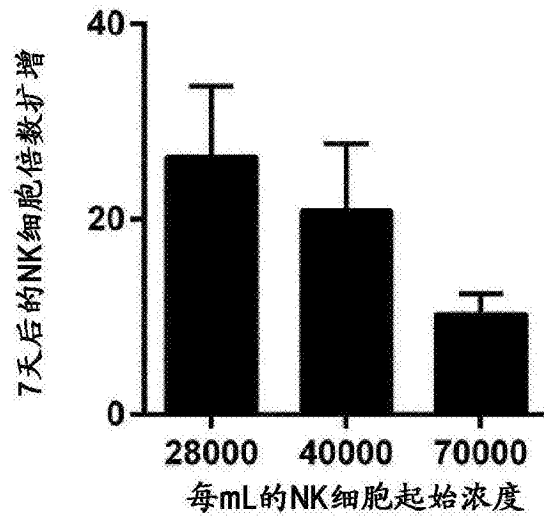


图1

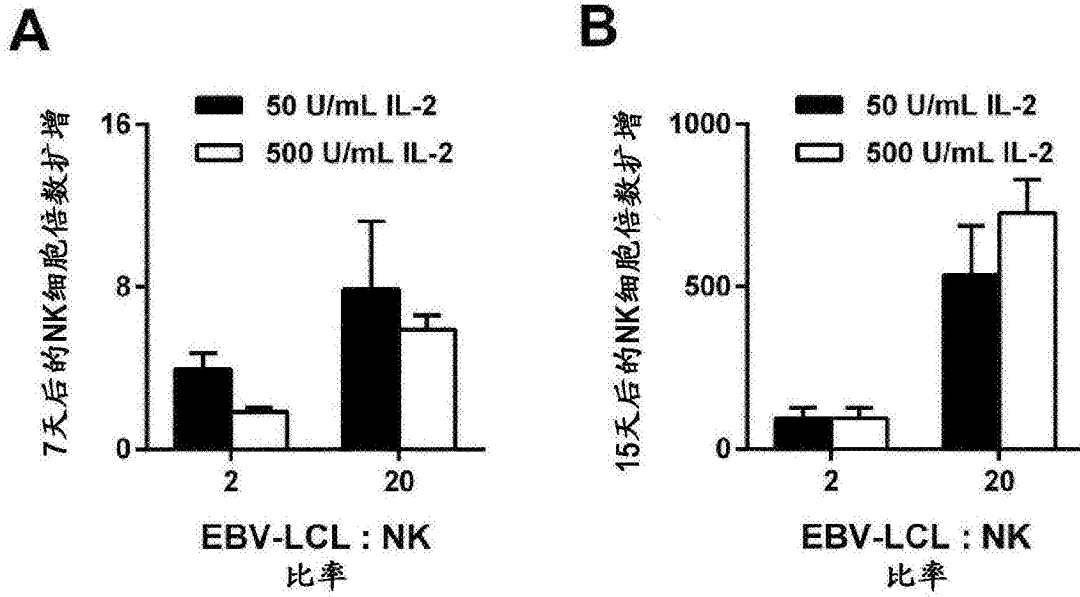


图2

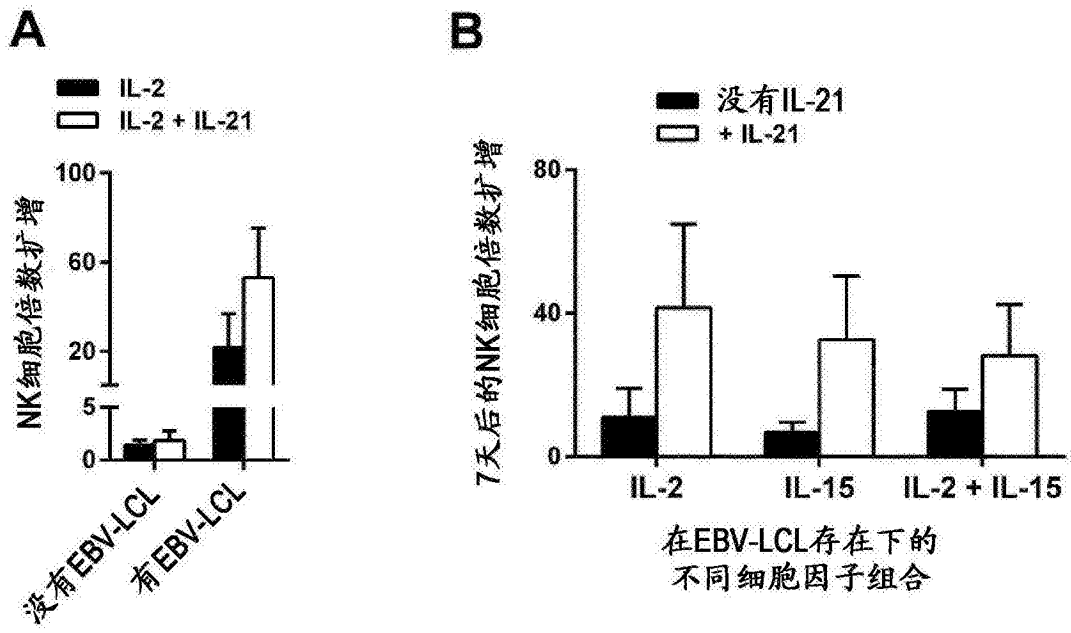


图3

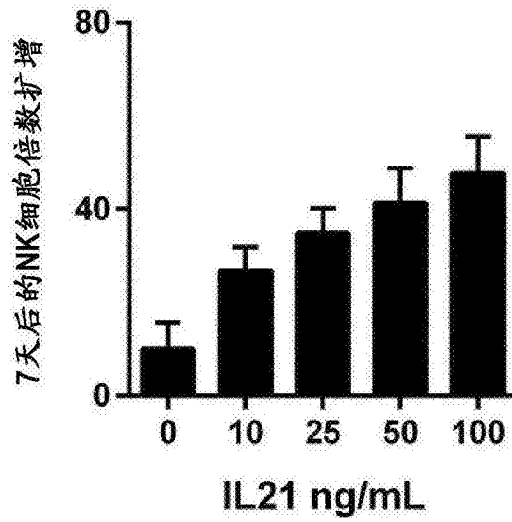


图4

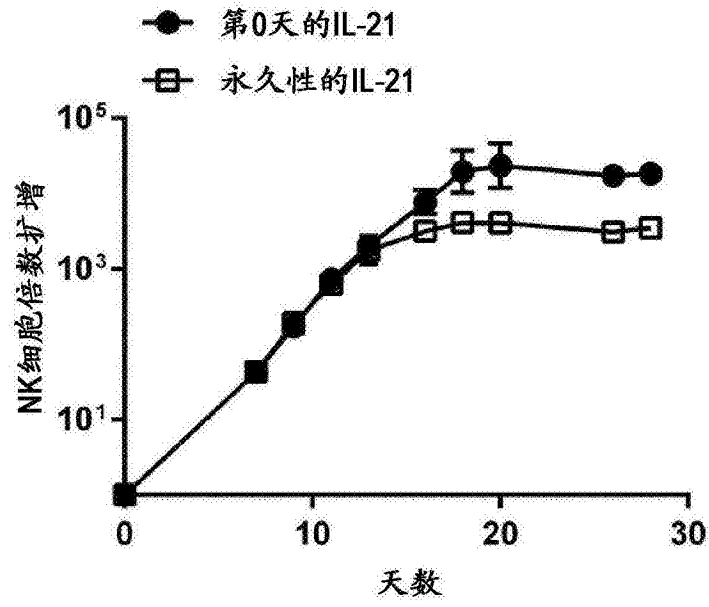


图5

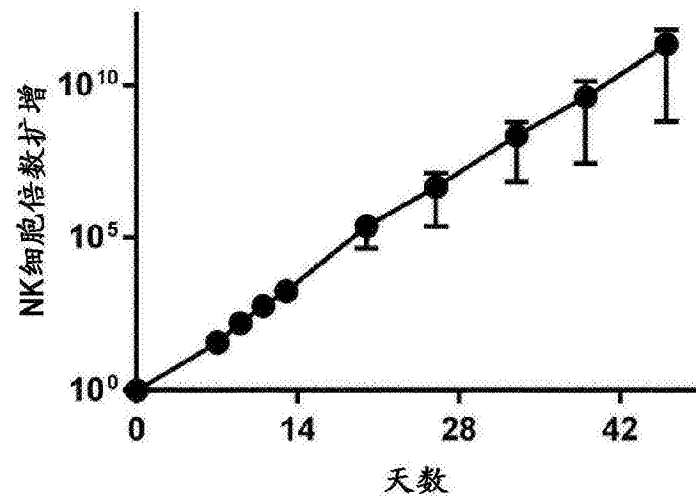


图6

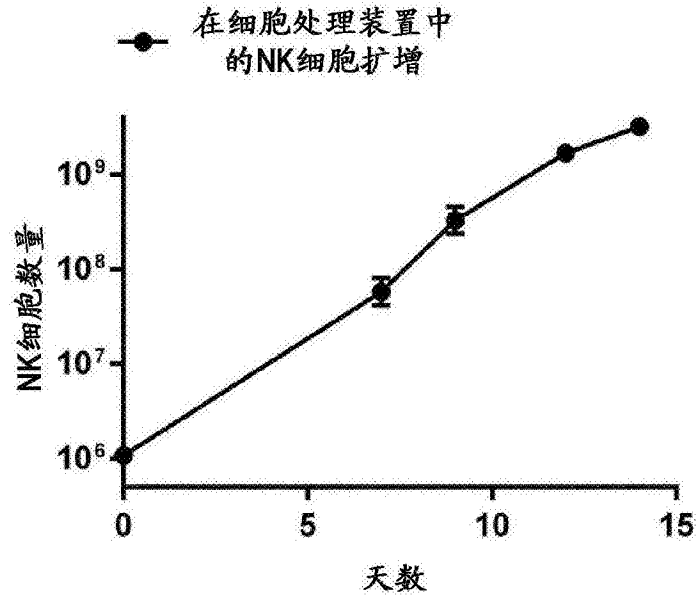


图7