



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105985931 A

(43)申请公布日 2016. 10. 05

(21)申请号 201610451780.0

C12N 7/01(2006.01)

(22)申请日 2016.06.21

(71)申请人 黑龙江天晴干细胞股份有限公司

地址 150028 黑龙江省哈尔滨市哈尔滨高新技术开发区科技创新城巨宝二路199号

(72)发明人 张怡 刘春香 芦慧颖 李琳

王浩宇 车彦川 刘艳青

(74)专利代理机构 哈尔滨市松花江专利商标事

务所 23109

代理人 侯静

(51)Int. Cl.

C12N 5/0783(2010.01)

C12N 5/10(2006.01)

C12N 15/867(2006.01)

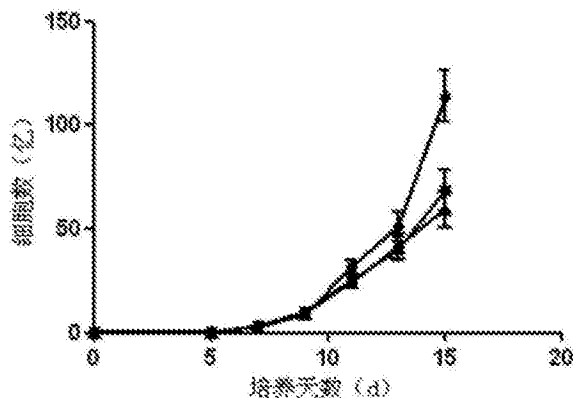
权利要求书2页 说明书9页 附图2页

## (54)发明名称

一种NK细胞体外扩增组合物及NK细胞扩增方法

## (57)摘要

一种NK细胞体外扩增组合物及NK细胞扩增方法,涉及一种NK细胞扩增组合物及扩增方法。本发明是要解决目前NK细胞扩增倍数低、纯度低、扩增周期长、成本高的问题。该组合物包括NK扩增滋养细胞、IL-2、灭活的自体血浆和GT-T551 H3培养基。扩增方法:用GT-T551 H3培养基将PBMCs重悬后,接入培养瓶,加入IL-2、NK扩增滋养细胞及自体血浆,体外共培养15天,其中培养第7天时补加一次NK扩增滋养细胞,培养过程中补充培养基,培养13和15天收集细胞进行检测。该组合物可显著促进NK细胞的大量扩增,满足临床应用需求,获得的NK细胞纯度较高,节省了成本,提高杀伤活性。本发明用于扩增NK细胞。



1. 一种NK细胞体外扩增组合物,其特征在于该组合物包括NK扩增滋养细胞、IL-2、灭活的自体血浆和GT-T551 H3培养基,其中每毫升GT-T551 H3培养基中加入 $0.65 \times 10^6$ 个~ $1 \times 10^6$ 个NK扩增滋养细胞,每毫升GT-T551 H3培养基中加入200-500IU的IL-2,灭活的自体血浆的体积为GT-T551 H3培养基体积的5%,所述NK扩增滋养细胞为K562-4-1BBL-IL-15-IL-21滋养细胞。

2. 根据权利要求1所述的一种NK细胞体外扩增组合物,其特征在于每毫升GT-T551 H3培养基中加入 $0.7 \times 10^6$ 个~ $0.9 \times 10^6$ 个NK扩增滋养细胞。

3. 根据权利要求1所述的一种NK细胞体外扩增组合物,其特征在于每毫升GT-T551 H3培养基中加入 $0.8 \times 10^6$ 个NK扩增滋养细胞。

4. 根据权利要求1所述的一种NK细胞体外扩增组合物,其特征在于每毫升GT-T551 H3培养基中加入300-400IU的IL-2。

5. 根据权利要求1所述的一种NK细胞体外扩增组合物,其特征在于每毫升GT-T551 H3培养基中加入350IU的IL-2。

6. 根据权利要求1所述的一种NK细胞体外扩增组合物,其特征在于所述K562-4-1BBL-IL-15-IL-21滋养细胞的获得方法为:

A、利用基因合成方法,获得4-1BBL基因与IL-15基因的融合基因4-1BBL-IL-15及IL-21基因的全长编码区序列,两条基因上游均加入CD8 $\alpha$ 信号肽,下游均加入CD8 $\alpha$ 跨膜区;与此同时,CD8 $\alpha$ 信号肽上游引入Nhe I酶切位点,CD8 $\alpha$ 跨膜区引入Not I酶切位点;

B、构建重组慢病毒表达质粒pCDH-CMV-MCS-4-1BBL-IL-15和pCDH-CMV-MCS-IL-21:

将pCDH-CMV-MCS-Vector和步骤A所获得的基因分别用限制性内切酶Nhe I和Not I双酶切,1%琼脂糖凝胶回收纯化后,分别利用T4DNALigase进行连接,获得的连接产物分别命名为pCDH-CMV-MCS-4-1BBL-IL-15和pCDH-CMV-MCS-IL-21,经酶切鉴定正确后,-20℃保存备用;

C、慢病毒包装:

a. 用235 $\mu$ L Opti-MEM稀释2.7 $\mu$ g步骤B获得的连接产物pCDH-CMV-MCS-4-1BBL-IL-15,再加入1.76 $\mu$ g pLp1、0.95 $\mu$ g pLpVSVG和0.68 $\mu$ g pLp2,得到a1溶液;用235 $\mu$ L Opti-MEM稀释2.7 $\mu$ g步骤B获得的连接产物pCDH-CMV-MCS-IL-21,再加入1.76 $\mu$ g pLp1、0.95 $\mu$ g pLpVSVG和0.68 $\mu$ g pLp2,得到a2溶液;

b. 用235 $\mu$ L Opti-MEM稀释15 $\mu$ L lipofectamine2000,得到b溶液;

c. 5min后,将a1溶液、a2溶液分别和b溶液混合,室温静止30min后分别滴加到接种293-T细胞的6孔板中;

d. 6-10h后,去掉培养基,加入含有10%(v/v)FBS的DMED培养基,于48h和72h各收病毒一次,最终获得pCDH-CMV-MCS-4-1BBL-IL-15慢病毒和pCDH-CMV-MCS-IL-21慢病毒。

D. 将收获的两种慢病毒浓缩到 $3E+8$ TU/ml后,病毒以滴度比1:1混匀,以1000的MOI值进行K562细胞系的感染,感染72h后通过流式细胞术和有限稀释法克隆出可以稳定遗传的K562-4-1BBL-IL-15-IL-21工程细胞。

E. 将工程细胞株进行100Gy放射线进行致死性照射,照射后混匀抽取 $1 \times 10^6$ 个进行培养,每2天计算一次细胞活率,统计15天后未发现有存活细胞存在。

F. 将灭活的K562-4-1BBL-IL-15-IL-21工程细胞株用冻存液进行冻存,每管1mL,浓度

为 $1 \times 10^7$ 个/mL,用前 $37^\circ\text{C}$ 复苏去冻存液。

7.根据权利要求6所述的一种NK细胞体外扩增组合物,其特征在于所述冻存液的配方为90%(v/v)FBS+10%(v/v)DMSO。

8.NK细胞扩增方法,其特征在于该方法按以下步骤进行:

用30mL GT-T551 H3培养基将 $2 \times 10^7$ 个~ $3 \times 10^7$ 个PBMCs重悬后,接入T75细胞培养瓶,然后加入的IL-2、NK扩增滋养细胞及占培养基体积5%的灭活的自体血浆,其中每毫升GT-T551 H3培养基加入200-500IU的IL-2,每毫升GT-T551 H3培养基加入 $0.65 \times 10^6$ 个~ $1 \times 10^6$ 个NK扩增滋养细胞,于 $37^\circ\text{C}$ 5% $\text{CO}_2$ 条件下体外共培养15天,其中培养第7天时补加一次NK扩增滋养细胞,补加前对培养液中的NK细胞进行计数,补加的NK扩增滋养细胞的数量为NK细胞数量的1/5-1/4,培养过程中每天对NK细胞观察计数,当NK细胞密度超过 $2.5 \times 10^6$ /mL必须补充培养基,补加的培养基为含有200-500IU/mL IL-2的GT-T551 H3培养基,补液后NK细胞密度维持在 $0.8 \times 10^6$ 个/mL~ $1.0 \times 10^6$ 个/mL,培养13和15天收集细胞进行检测。

9.根据权利要求1所述的NK细胞扩增方法,其特征在于用30mL GT-T551 H3培养基将 $2.5 \times 10^7$ 个PBMCs重悬。

10.根据权利要求1所述的NK细胞扩增方法,其特征在于每毫升GT-T551 H3培养基加入240IU的IL-2。

## 一种NK细胞体外扩增组合物及NK细胞扩增方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种NK细胞扩增组合物及扩增方法。

### 背景技术

[0002] 最新版的《世界癌症报告》对全球180多个国家的28种癌症的总体情况和流行趋势进行了全面的描述和分析,报告预测全球癌症病例将呈现迅猛增长态势,2012年全世界共新增1400万癌症病例并有820万人死亡。其中,中国新增307万癌症患者并造成约220万人死亡,分别占全球总量的21.9%和26.8%。其中,肺癌、胃癌、肝癌为发病率最高的癌症,而乳腺癌、结直肠癌、宫颈癌使女性健康受到威胁。

[0003] 肿瘤免疫治疗被国内外医学界公认为第四大肿瘤治疗法,其中自体免疫细胞(T细胞、NK细胞)治疗技术属国家卫生部首批允许临床应用的第三类医疗技术。近年来,自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)免疫治疗技术在世界范围内正在成为一种可靠的抗癌疗法,适用于多种恶性肿瘤的临床治疗且副作用小,不损伤正常组织。NK于20世纪70年代进入人们的视线,至今已有近40年的发展历史。NK细胞被定义为大颗粒淋巴细胞(LGL),是由淋巴祖细胞分化而来,并与B淋巴细胞和T淋巴细胞构成了三大类免疫细胞,仅占外周血淋巴细胞的5-10%。NK细胞无需预先接触抗原即可杀伤靶细胞(如病毒感染的宿主细胞和肿瘤细胞),由于NK细胞的杀伤活性无MHC限制,因此称为自然杀伤活性,其在免疫监视和早期抗感染免疫过程中起重要作用。NK细胞的肿瘤杀伤机制包括:(1)FasL与Fas相作用,最终启动了靶细胞凋亡系统。(2)穿孔素/颗粒酶作用,激发凋亡相关酶系统致细胞发生凋亡。(3)NK细胞表面表达的CD16分子与肿瘤特异性IgG抗体发生结合,从而识别、杀伤与IgG抗体发生特异性结合的肿瘤细胞。(4)TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 等与靶细胞表面相应受体的结合,启动靶细胞的凋亡系统。NK细胞除对靶细胞具有溶解杀伤作用外,NK细胞还在机体免疫反应中具有重要功能。NK细胞可通过对M $\Phi$ 、粒细胞、树突状细胞的调节作用而控制天然免疫力。NK细胞可以作用于CD4+T细胞和CD8+T细胞以强化获得性免疫。

[0004] 目前,体外获取人NK细胞主要通过以下途径进行:一、采用免疫磁珠的方法从PBMC中分离;二、采用刺激扩增培养的方法从PBMC中扩增NK细胞。前者可以快速获得NK细胞,但只能获得少量NK细胞共研究用。后者则是以PBMC为原始材料,通过特定细胞因子的刺激,使NK细胞在体外得到特异的扩增,通过体外的刺激培养可进行相对大规模的NK细胞制备,从而更好地应用于临床。但是现有的体外方法只能使NK细胞在体外扩增数十到百倍,且CD3-CD56+细胞比例较低。IL-2、IL-15、IL-18和IL-21等细胞因子对NK细胞的生长与扩增是非常重要的,同时,4-1BBL与NK细胞表面受体结合后可介导的共刺激信号促进NK细胞增殖、细胞因子的分泌等。研究证实IL-2等细胞因子是NK细胞扩增的必要条件,但是仅有细胞因子并不能保证NK细胞持续和高效的扩增,大规模NK细胞的扩增还需要有更多信号系统的支持。K562细胞系是从慢性髓细胞性白血病患者体内提取建立的细胞系,能激活NK细胞的扩增。

[0005] 目前,NK扩增的主要方法为单纯细胞因子刺激扩增法,其扩增效率及纯度较低,同时存在重复性差的缺点。近年来,出现一些用表达了IL-15和4-1BBL的滋养细胞刺激NK细胞

扩增方法,该方法扩增3周后细胞数可达277倍,纯度超过90%,杀伤活性可达80%(E:T=10:1)。但该扩增方法培养的NK细胞数量需较长时间才能达到临床治疗所需数量,同时对应的成本也相对较高。综上,现有NK细胞体外培养方法急需改进,同时也更有必要设计与之相符的规范的试剂组合来保证培养方法的及时、准确、顺利进行。

## 发明内容

[0006] 本发明是要解决目前NK细胞扩增倍数低、纯度低、扩增周期长、成本高的问题,提供一种NK细胞体外扩增组合物及NK细胞扩增方法。

[0007] 本发明NK细胞体外扩增组合物包括NK扩增滋养细胞、IL-2、灭活的自体血浆和GT-T551 H3培养基。其中每毫升GT-T551 H3培养基中加入 $0.65 \times 10^6$ 个~ $1 \times 10^6$ 个NK扩增滋养细胞,每毫升GT-T551 H3培养基中加入200-500IU的IL-2,灭活的自体血浆的体积为GT-T551 H3培养基体积的5%,所述NK扩增滋养细胞为K562-4-1BBL-IL-15-IL-21滋养细胞。

[0008] 本发明是将灭活的NK扩增滋养细胞先冻存,用的时候再进行复苏处理。

[0009] 所述K562-4-1BBL-IL-15-IL-21滋养细胞的获得方法为:

[0010] A、利用基因合成方法,获得4-1BBL-IL-15融合基因及IL-21基因的全长编码区序列,两条基因上游均加入CD8 $\alpha$ 信号肽,下游均加入CD8 $\alpha$ 跨膜区;与此同时,CD8 $\alpha$ 信号肽上游引入Nhe I酶切位点,CD8 $\alpha$ 跨膜区引入Not I酶切位点。

[0011] B、构建重组慢病毒表达质粒pCDH-CMV-MCS-4-1BBL-IL-15和pCDH-CMV-MCS-IL-21:

[0012] 将载体pCDH-CMV-MCS-Vector和步骤A所获得的基因分别用限制性内切酶Nhe I和Not I双酶切,1%琼脂糖凝胶回收纯化后,分别利用T4DNALigase进行连接,获得的连接产物分别命名为pCDH-CMV-MCS-4-1BBL-IL-15和pCDH-CMV-MCS-IL-21,经酶切鉴定正确后,-20℃保存备用。其中所述pCDH-CMV-MCS-Vector购买自上海吉然生物科技有限公司,载体名称为pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro(货号:CD510B-1)。

[0013] C、慢病毒包装:

[0014] a.用235 $\mu$ L Opti-MEM稀释2.7 $\mu$ g步骤B获得的连接产物pCDH-CMV-MCS-4-1BBL-IL-15,再加入1.76 $\mu$ g pLp1(Gal/Po1)、0.95 $\mu$ g pLpVSVG和0.68 $\mu$ g pLp2(pREV),得到a1溶液;用235 $\mu$ L Opti-MEM稀释2.7 $\mu$ g步骤B获得的连接产物pCDH-CMV-MCS-IL-21,再加入1.76 $\mu$ g pLp1(Gal/Po1)、0.95 $\mu$ g pLpVSVG和0.68 $\mu$ g pLp2(pREV),得到a2溶液;

[0015] b.用235 $\mu$ L Opti-MEM稀释15 $\mu$ L lipofectamine2000,得到b溶液;

[0016] c.5min后,将a1溶液、a2溶液分别和b溶液混合,室温静止30min后分别滴加到接种293-T细胞的6孔板中;

[0017] d.6-10h后,去掉培养基,加入含有10%(v/v)FBS的DMEM培养基,于48h和72h各收病毒一次,最终获得pCDH-CMV-MCS-4-1BBL-IL-15慢病毒和pCDH-CMV-MCS-IL-21慢病毒。

[0018] D.将收获的两种慢病毒浓缩到 $3E+8$  TU/ml后,病毒以滴度比1:1混匀,以1000的MOI值进行K562细胞系的感染,感染72h后通过流式细胞术和有限稀释法克隆出可以稳定遗传的K562-4-1BBL-IL-15-IL-21工程细胞。

[0019] E.将工程细胞株进行100Gy放射线进行致死性照射,照射后混匀抽取 $1 \times 10^6$ 个进行培养,每2天计算一次细胞活率,统计15天后未发现有存活细胞存在。

[0020] F.将灭活的K562-4-1BBL-IL-15-IL-21工程细胞株用冻存液进行冻存,每管1mL,浓度为 $1 \times 10^7$ 个/mL,用前37℃复苏去冻存液。所述冻存液的配方为90%(v/v)FBS+10%(v/v)DMSO。

[0021] 利用上述NK细胞体外扩增组合物进行NK细胞扩增的方法,按以下步骤进行:

[0022] 用30mL GT-T551 H3培养基将 $2 \times 10^7$ 个~ $3 \times 10^7$ 个PBMCs重悬后,接入T75细胞培养瓶,然后加入的IL-2、NK扩增滋养细胞及占培养基体积5%的灭活的自体血浆,其中每毫升GT-T551 H3培养基加入200-500IU的IL-2,每毫升GT-T551 H3培养基加入 $0.65 \times 10^6$ 个~ $1 \times 10^6$ 个NK扩增滋养细胞,于37℃ 5%CO<sub>2</sub>条件下体外共培养15天,其中培养第7天时补加一次NK扩增滋养细胞,补加前对培养液中的NK细胞进行计数,补加的NK扩增滋养细胞的数量为NK细胞数量的1/5-1/4。培养过程中每天对NK细胞观察计数,当NK细胞密度超过 $2.5 \times 10^6$ /mL必须补充培养基,补加的培养基为含有200-500IU/mL IL-2的GT-T551 H3培养基,补液后NK细胞密度维持在 $0.8 \times 10^6$ 个/mL~ $1.0 \times 10^6$ 个/mL,培养13和15天收集细胞进行检测。

[0023] 所述NK扩增滋养细胞为K562-4-1BBL-IL-15-IL-21滋养细胞。

[0024] 本发明的有益效果:

[0025] (1)本发明是通过慢病毒包装及感染K562细胞的方法进行4-1BBL、IL-15、IL-21基因的转导,悬浮的血液细胞及肿瘤细胞属难转染细胞,脂质体转染方法效果极低,电穿孔方法效率较高,但对细胞损伤较大,且死细胞很难去除,影响转染后的筛选工作。慢病毒感染方法是一种对细胞较温和且转染效率较高的一种方法,解决了悬浮细胞转染所面临的上述问题。

[0026] (2)本发明先用枣红素标记的IL-21抗体及IL-15抗体进行流式细胞仪分选,去除阴性K562细胞,再将筛选的双阳性细胞群进行有限稀释法克隆出可以稳定遗传的K562-4-1BBL-IL-15-IL-21工程细胞,两种方法结合可以缩短筛选周期,使整个过程在1个月以内即可以完成,同时节约了研发成本。

[0027] (3)本发明将工程细胞株进行100Gy放射线进行致死性照射,照射后混匀抽取 $1 \times 10^6$ 个进行培养,每2天计算一次细胞活率,统计15天后未发现有存活细胞存在,该方法可以保证工程细胞株用于NK扩增的安全性。

[0028] (4)本发明采用自体血浆来促进细胞的增殖,外源因子只加入较低剂量的IL-2,避免了外源性蛋白及病毒的污染的可能性,而且大大降低了生产成本;

[0029] (5)本发明NK细胞培养组合物可促进NK细胞的大量增殖,且纯度较高,可提高其细胞的杀伤活性。其不仅可以用于肿瘤患者的体内肿瘤细胞的杀伤及免疫系统的调节,同时可以应用于亚健康人群的保健。

[0030] 本发明在K562细胞膜表面表达IL-15与4-1BBL的同时,将IL-21也同时表达于K562细胞表面,同时可溶状态加入IL-2,本发明将IL-15与IL-21组合,二者协同作用,显著提高发明效果。该组合物可显著促进NK细胞的大量扩增,满足临床应用需求,K562细胞表达并镶嵌于其表面的蛋白可以使NK细胞聚集于其表面而得到充分刺激,获得的NK细胞纯度较高,同时该方法也避免了外源性蛋白及病毒的污染的可能性,节省了NK细胞制备成本,并且提高肿瘤细胞的杀伤活性。

[0031] 说明书附图

[0032] 图1为试验1扩增过程中的细胞增殖数量变化;

- [0033] 图2为试验1中实验组培养13天时的细胞纯度；  
[0034] 图3为试验1中实验组培养15天时的细胞纯度；  
[0035] 图4为试验1中对照组1培养13天时的细胞纯度；  
[0036] 图5为试验1中对照组1培养15天时的细胞纯度；  
[0037] 图6为试验1中对照组2培养13天时的细胞纯度；  
[0038] 图7为试验1中对照组2培养15天时的细胞纯度；  
[0039] 图8为试验1培养15天后对NK细胞A549的杀伤活性对比。

### 具体实施方式

[0040] 本发明技术方案不局限于以下所列举具体实施方式,还包括各具体实施方式间的任意组合。

[0041] 具体实施方式一:本实施方式NK细胞体外扩增组合物包括NK扩增滋养细胞、IL-2、灭活的自体血浆和GT-T551 H3培养基,其中每毫升GT-T551 H3培养基中加入 $0.65 \times 10^6$ 个 $\sim 1 \times 10^6$ 个NK扩增滋养细胞,每毫升GT-T551 H3培养基中加入200-500IU的IL-2,灭活的自体血浆的体积为GT-T551 H3培养基体积的5%,所述NK扩增滋养细胞为K562-4-1BBL-IL-15-IL-21滋养细胞。

[0042] 本发明所述NK细胞的体外扩增方法主要是将促进NK细胞活化增殖的因子镶嵌于本身对NK细胞具有诱导作用的K562细胞表面,使NK细胞可以更好的活化和扩增,使其具有更好的肿瘤细胞的杀伤活性;该方法花费时间短,安全性高,可以应用于临床细胞生物治疗,包括肾癌、恶性黑色素瘤、白血病、乳腺癌、直肠癌、胃癌、肺癌、食管癌、宫颈癌、卵巢癌、多发性骨髓瘤、恶性淋巴瘤(非T细胞淋巴瘤)等恶性肿瘤疾病,尤其可以应用于免疫系统研究和肿瘤杀伤作用的研究。

[0043] 具体实施方式二:本实施方式与具体实施方式一不同的是:每毫升GT-T551 H3培养基中加入 $0.7 \times 10^6$ 个 $\sim 0.9 \times 10^6$ 个NK扩增滋养细胞。其它与具体实施方式一相同。

[0044] 具体实施方式三:本实施方式与具体实施方式一或二不同的是:每毫升GT-T551 H3培养基中加入 $0.8 \times 10^6$ 个NK扩增滋养细胞。其它与具体实施方式一或二相同。

[0045] 具体实施方式四:本实施方式与具体实施方式一至三之一不同的是:每毫升GT-T551H3培养基中加入300-400IU的IL-2。其它与具体实施方式一至三之一相同。

[0046] 具体实施方式五:本实施方式与具体实施方式一至三之一不同的是:每毫升GT-T551H3培养基中加入350IU的IL-2。其它与具体实施方式一至三之一相同。

[0047] 具体实施方式六:本实施方式与具体实施方式一至五之一不同的是:所述K562-4-1BBL-IL-15-IL-21滋养细胞的获得方法为:

[0048] A、利用基因合成方法,获得4-1BBL基因与IL-15基因的融合基因4-1BBL-IL-15及IL-21基因的全长编码区序列,两条基因上游均加入CD8 $\alpha$ 信号肽,下游均加入CD8 $\alpha$ 跨膜区;与此同时,CD8 $\alpha$ 信号肽上游引入Nhe I酶切位点,CD8 $\alpha$ 跨膜区引入Not I酶切位点;

[0049] B、构建重组慢病毒表达质粒pCDH-CMV-MCS-4-1BBL-IL-15和pCDH-CMV-MCS-IL-21:

[0050] 将pCDH-CMV-MCS-Vector和步骤A所获得的基因分别用限制性内切酶Nhe I和Not I双酶切,1%琼脂糖凝胶回收纯化后,分别利用T4DNALigase进行连接,获得的连接产物分

别命名为pCDH-CMV-MCS-4-1BBL-IL-15和pCDH-CMV-MCS-IL-21,经酶切鉴定正确后,-20℃保存备用;

[0051] C、慢病毒包装:

[0052] a.用235μL Opti-MEM稀释2.7μg步骤B获得的连接产物pCDH-CMV-MCS-4-1BBL-IL-15,再加入1.76μg pLp1(Gal/Po1)、0.95μg pLpVSVG和0.68μg pLp2(pREV),得到a1溶液;用235μL Opti-MEM稀释2.7μg步骤B获得的连接产物pCDH-CMV-MCS-IL-21,再加入1.76μg pLp1(Gal/Po1)、0.95μg pLpVSVG和0.68μg pLp2(pREV),得到a2溶液;

[0053] b.用235μL Opti-MEM稀释15μL lipofectamine2000,得到b溶液;

[0054] c.5min后,将a1溶液、a2溶液分别和b溶液混合,室温静止30min后分别滴加到接种293-T细胞的6孔板中;

[0055] d.6-10h后,去掉培养基,加入含有10%(v/v)FBS的DMED培养基,于48h和72h各收病毒一次,最终获得pCDH-CMV-MCS-4-1BBL-IL-15慢病毒和pCDH-CMV-MCS-IL-21慢病毒。

[0056] D.将收获的两种慢病毒浓缩到 $3E+8$  TU/ml后,病毒以滴度比1:1混匀,以1000的MOI值进行K562细胞系的感染,感染72h后通过流式细胞术和有限稀释法克隆出可以稳定遗传的K562-4-1BBL-IL-15-IL-21工程细胞。

[0057] E.将工程细胞株进行100Gy放射线进行致死性照射,照射后混匀抽取 $1 \times 10^6$ 个进行培养,每2天计算一次细胞活率,统计15天后未发现有存活细胞存在。

[0058] F.将灭活的K562-4-1BBL-IL-15-IL-21工程细胞株用冻存液进行冻存,每管1mL,浓度为 $1 \times 10^7$ 个/mL,用前37℃复苏去冻存液。其它与具体实施方式一至五之一相同。

[0059] 具体实施方式七:本实施方式与具体实施方式六不同的是:所述冻存液的配方为90%(v/v)FBS+10%(v/v)DMSO。其它与具体实施方式六相同。

[0060] 具体实施方式八:本实施方式NK细胞扩增方法,按以下步骤进行:

[0061] 用30mL GT-T551 H3培养基将 $2 \times 10^7$ 个~ $3 \times 10^7$ 个PBMCs重悬后,接入T75细胞培养瓶,然后加入的IL-2、NK扩增滋养细胞及占培养基体积5%的灭活的自体血浆,其中每毫升GT-T551 H3培养基加入200-500IU的IL-2,每毫升GT-T551 H3培养基加入 $0.65 \times 10^6$ 个~ $1 \times 10^6$ 个NK扩增滋养细胞,于37℃ 5%CO<sub>2</sub>条件下体外共培养15天,其中培养第7天时补加一次NK扩增滋养细胞,补加前对培养液中的NK细胞进行计数,补加的NK扩增滋养细胞的数量为NK细胞数量的1/5-1/4。培养过程中每天对NK细胞观察计数,当NK细胞密度超过 $2.5 \times 10^6$ /mL必须补充培养基,补加的培养基为含有200-500IU/mL IL-2的GT-T551 H3培养基,补液后NK细胞密度维持在 $0.8 \times 10^6$ 个/mL~ $1.0 \times 10^6$ 个/mL,培养13和15天收集细胞进行检测。

[0062] 具体实施方式九:本实施方式与具体实施方式八不同的是:用30mL GT-T551 H3培养基将 $2.5 \times 10^7$ 个PBMCs重悬。其它与具体实施方式八相同。

[0063] 具体实施方式十:本实施方式与具体实施方式八不同的是:每毫升GT-T551 H3培养基加入300-400IU的IL-2。其它与具体实施方式八相同。

[0064] 具体实施方式十:本实施方式与具体实施方式八不同的是:每毫升GT-T551 H3培养基加入240IU的IL-2。其它与具体实施方式八相同。

[0065] 具体实施方式十一:本实施方式与具体实施方式八不同的是:每毫升GT-T551 H3培养基加入 $0.7 \times 10^6$ 个~ $0.9 \times 10^6$ 个NK扩增滋养细胞。其它与具体实施方式八相同。

[0066] 具体实施方式十二:本实施方式与具体实施方式八不同的是:每毫升GT-T551 H3



培养基加入 $0.8 \times 10^6$ 个NK扩增滋养细胞。其它与具体实施方式八相同。

[0067] 具体实施方式十三：本实施方式与具体实施方式八不同的是：所述NK扩增滋养细胞为K562-4-1BBL-IL-15-IL-21滋养细胞，所述K562-4-1BBL-IL-15-IL-21滋养细胞的获得方法为：

[0068] A、利用基因合成方法，获得4-1BBL基因与IL-15基因的融合基因4-1BBL-IL-15及IL-21基因的全长编码区序列，两条基因上游均加入CD8 $\alpha$ 信号肽，下游均加入CD8 $\alpha$ 跨膜区；与此同时，CD8 $\alpha$ 信号肽上游引入Nhe I酶切位点，CD8 $\alpha$ 跨膜区引入Not I酶切位点；

[0069] B、构建重组慢病毒表达质粒pCDH-CMV-MCS-4-1BBL-IL-15和pCDH-CMV-MCS-IL-21：

[0070] 将pCDH-CMV-MCS-Vector和步骤A所获得的基因分别用限制性内切酶Nhe I和Not I双酶切，1%琼脂糖凝胶回收纯化后，分别利用T4DNALigase进行连接，获得的连接产物分别命名为pCDH-CMV-MCS-4-1BBL-IL-15和pCDH-CMV-MCS-IL-21，经酶切鉴定正确后， $-20^{\circ}\text{C}$ 保存备用；

[0071] C、慢病毒包装：

[0072] a.用235 $\mu\text{L}$  Opti-MEM稀释2.7 $\mu\text{g}$ 步骤B获得的连接产物pCDH-CMV-MCS-4-1BBL-IL-15，再加入1.76 $\mu\text{g}$  pLp1(Gal/Pol)、0.95 $\mu\text{g}$  pLpVSVG和0.68 $\mu\text{g}$  pLp2(pREV)，得到a1溶液；用235 $\mu\text{L}$  Opti-MEM稀释2.7 $\mu\text{g}$ 步骤B获得的连接产物pCDH-CMV-MCS-IL-21，再加入1.76 $\mu\text{g}$  pLp1(Gal/Pol)、0.95 $\mu\text{g}$  pLpVSVG和0.68 $\mu\text{g}$  pLp2(pREV)，得到a2溶液；

[0073] b.用235 $\mu\text{L}$  Opti-MEM稀释15 $\mu\text{L}$  lipofectamine2000，得到b溶液；

[0074] c.5min后，将a1溶液、a2溶液分别和b溶液混合，室温静止30min后分别滴加到接种293-T细胞的6孔板中；

[0075] d.6-10h后，去掉培养基，加入含有10%(v/v)FBS的DMED培养基，于48h和72h各收病毒一次，最终获得pCDH-CMV-MCS-4-1BBL-IL-15慢病毒和pCDH-CMV-MCS-IL-21慢病毒。

[0076] D.将收获的两种慢病毒浓缩到 $3\text{E}+8$  TU/ml后，病毒以滴度比1:1混匀，以1000的MOI值进行K562细胞系的感染，感染72h后通过流式细胞术和有限稀释法克隆出可以稳定遗传的K562-4-1BBL-IL-15-IL-21工程细胞。

[0077] E.将工程细胞株进行100Gy放射线进行致死性照射，照射后混匀抽取 $1 \times 10^6$ 个进行培养，每2天计算一次细胞活率，统计15天后未发现有存活细胞存在。

[0078] F.将灭活的K562-4-1BBL-IL-15-IL-21工程细胞株用冻存液进行冻存，每管1mL，浓度为 $1 \times 10^7$ 个/mL，用前 $37^{\circ}\text{C}$ 复苏去冻存液，所述冻存液的配方为90%(v/v)FBS+10%(v/v)DMSO。其它与具体实施方式八相同。

[0079] 为验证本发明的有益效果，进行以下试验：

[0080] 试验1：本试验NK细胞体外扩增组合物及NK细胞扩增方法

[0081] 一、制备K562-4-1BBL-IL-15-IL-21滋养细胞

[0082] A、利用基因合成方法，获得4-1BBL基因与IL-15基因的融合基因4-1BBL-IL-15、4-1BBL基因与IL-21基因的融合基因4-1BBL-IL-21及IL-21基因的全长编码区序列，两条基因上游均加入CD8 $\alpha$ 信号肽，下游均加入CD8 $\alpha$ 跨膜区；与此同时，CD8 $\alpha$ 信号肽上游引入Nhe I酶切位点，CD8 $\alpha$ 跨膜区引入Not I酶切位点；

[0083] B、构建重组慢病毒表达质粒pCDH-CMV-MCS-4-1BBL-IL-15、pCDH-CMV-MCS-4-

1BBL-IL-21和pCDH-CMV-MCS-IL-21:

[0084] 将pCDH-CMV-MCS-Vector和步骤A所获得的基因分别用限制性内切酶Nhe I和Not I双酶切,1%琼脂糖凝胶回收纯化后,分别利用T4DNALigase进行连接,获得的连接产物分别命名为pCDH-CMV-MCS-4-1BBL-IL-15、pCDH-CMV-MCS-4-1BBL-IL-21和pCDH-CMV-MCS-IL-21,经酶切鉴定正确后,-20℃保存备用;

[0085] C、慢病毒包装:

[0086] a.用235μL Opti-MEM稀释2.7μg步骤B获得的连接产物pCDH-CMV-MCS-4-1BBL-IL-15,再加入1.76μg pLp1(Gal/Pol)、0.95μg pLpVSVG和0.68μg pLp2(pREV),得到a1溶液;用235μL Opti-MEM稀释2.7μg步骤B获得的连接产物pCDH-CMV-MCS-IL-21,再加入1.76μg pLp1(Gal/Pol)、0.95μg pLpVSVG和0.68μg pLp2(pREV),得到a2溶液;用235μL Opti-MEM稀释2.7μg步骤B获得的连接产物pCDH-CMV-MCS-4-1BBL-IL-21,再加入1.76μg pLp1(Gal/Pol)、0.95μg pLpVSVG和0.68μg pLp2(pREV),得到a3溶液;

[0087] b.用235μL Opti-MEM稀释15μL lipofectamine2000,得到b溶液;

[0088] c.5min后,将a1溶液、a2溶液、a3溶液分别和b溶液混合,室温静止30min后分别滴加到接种293-T细胞的6孔板中;

[0089] d.6-10h后,去掉培养基,加入含有10%(v/v)FBS的DMED培养基,于48h和72h各收病毒一次,最终获得pCDH-CMV-MCS-4-1BBL-IL-15慢病毒、pCDH-CMV-MCS-4-1BBL-IL-21慢病毒和pCDH-CMV-MCS-IL-21慢病毒。

[0090] D.实验组将收获的两种慢病毒浓缩到 $3E+8$  TU/ml后,将pCDH-CMV-MCS-4-1BBL-IL-15慢病毒和pCDH-CMV-MCS-IL-21慢病毒以滴度比1:1混匀,以1000的MOI值进行K562细胞系的感染,对照组1将pCDH-CMV-MCS-4-1BBL-IL-15慢病毒以500的MOI值进行K562细胞感染,对照组2将pCDH-CMV-MCS-4-1BBL-IL-21慢病毒以500的MOI值进行K562细胞感染,感染72h后通过流式细胞术和有限稀释法克隆出可以稳定遗传的K562-4-1BBL-IL-15(对照组1)、K562-4-1BBL-IL-21(对照组2)和K562-4-1BBL-IL-15-IL-21(实验组)工程细胞。

[0091] 本发明先用枣红素标记的IL-21抗体及IL-15抗体进行流式细胞仪分选,去除阴性K562细胞,再将筛选的双阳性细胞群进行有限稀释法克隆出可以稳定遗传的K562-4-1BBL-IL-15-IL-21工程细胞,两种方法结合可以缩短筛选周期,使整个过程在1个月以内即可以完成,同时节约了研发成本。

[0092] E.将工程细胞株进行100Gy放射线进行致死性照射,照射后混匀抽取 $1 \times 10^6$ 个进行培养,每2天计算一次细胞活率,统计15天后未发现有存活细胞存在。

[0093] F.将灭活的K562-4-1BBL-IL-15-IL-21工程细胞株进行冻存(冻存液配方为90%FBS+10%DMSO),每管 $1 \times 10^7$ 个/ml,用前37℃复苏去冻存液。

[0094] 二、实验组用30mL GT-T551 H3培养基将 $2 \times 10^7$ 个~ $3 \times 10^7$ 个PBMCs重悬后,接入T75细胞培养瓶,然后加入的IL-2、NK扩增滋养细胞及占培养基体积5%的灭活的自体血浆,其中每毫升GT-T551 H3培养基加入200-500IU的IL-2,每毫升GT-T551 H3培养基加入 $0.65 \times 10^6$ 个~ $1 \times 10^6$ 个NK扩增滋养细胞,于37℃ 5%CO<sub>2</sub>条件下体外共培养15天,其中培养第7天时补加一次NK扩增滋养细胞,补加前对培养液中的NK细胞进行计数,补加的NK扩增滋养细胞的数量为NK细胞数量的1/4。培养过程中每天对NK细胞观察计数,当NK细胞密度超过 $2.5 \times 10^6$ /mL必须补充培养基,补加的培养基为含有240IU/mLIL-2的GT-T551 H3培养基,补

液后NK细胞密度维持在 $1.0 \times 10^6$ 个/mL,分别于培养第5天、7天、9天、11天、13和15天收集细胞进行检测。

[0095] 对照组1、对照组2与实验组的操作相同,只是对照组1将滋养细胞更换为K562-4-1BBL-IL-15,对照组2将滋养细胞更换为K562-4-1BBL-IL-21。

[0096] 检测结果如下:

[0097] (一)扩增的NK细胞数量(亿)

[0098] 各组起始接种的PBMCs数量为 $3 \times 10^7$ cells,即第0天细胞数为 $0.30 \pm 0.00$ 亿

[0099] 表1

[0100]

	5d	7d	9d	11d	13d	15d
实验组	0.60±0.04	2.90±0.13	8.45±0.60	32.00±3.24	51.20±7.26	114.00±12.37
对照组 1	0.78±0.07	3.40±0.17	10.20±0.52	25.40±2.59	40.60±5.39	68.4±9.75
对照组 2	0.63±0.05	3.14±0.14	9.27±0.41	24.40±2.77	41.80±5.98	59.6±8.67

[0101] 图1为扩增过程中的细胞增殖数量变化,图1中●表示实验组,■表示对照组1,▲表示对照组2。细胞扩增15d时,实验组细胞数量为 $114.00 \pm 12.37$ ,对照组1细胞数量为 $68.4 \pm 9.75$ ,对照组2细胞数量为 $59.6 \pm 8.67$ 。实验组扩增的细胞数量显著高于对照组1及对照组2( $P_1 = 0.0037 < 0.01$ ,  $P_2 = 0.0034 < 0.01$ ),对照组1与对照组2扩增的细胞数量无显著差异( $P = 0.1538 > 0.05$ ),说明4-1BBL、IL-15及IL-21同时表达于细胞表面对NK细胞的扩增效果优于只含4-1BBL、IL-15或4-1BBL、IL-21的作用。

[0102] (二)活率、纯度:

[0103] 表2

[0104]

	活率 (%)					纯度 (CD3 <sup>-</sup> , CD56 <sup>+</sup> , %)	
	7d	9d	11d	13d	15d	13d	15d
实验组	92.2	91.8	94.5	93.2	97.6	91.86	95.21
对照组 1	90.3	88.6	96.1	94.9	95.4	68.16	70.87
对照组 2	91.6	89.3	94.5	93.7	96.2	64.77	70.85

[0105] 图2为实验组培养13天时的细胞纯度;图3为实验组培养15天时的细胞纯度;图4为对照组1培养13天时的细胞纯度;图5为对照组1培养15天时的细胞纯度;图6为对照组2培养13天时的细胞纯度;图7为对照组2培养15天时的细胞纯度。

[0106] 由图可知,实验组细胞中CD3<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>比例显著高于实验组1和实验组2,且对照组1和对照组2无显著差异,说明4-1BBL、IL-15及IL-21同时表达于细胞表面较只表达4-1BBL、IL-15或4-1BBL、IL-21对NK细胞的扩增纯度影响作用更为明显。各组细胞扩增13天和15天的CD3<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>细胞纯度变化不明显,说明13天时NK细胞已经成熟。

[0107] (三)收获的NK细胞对A549细胞的杀伤活性

[0108] A549细胞接种量为10000cells/孔,效靶比为10:1,时时观察NK细胞对A549细胞的杀伤效果。接种约19h时加入NK细胞,约90h时达到最大杀伤效果,实验组、对照组1及对照组2NK杀伤效率分别为:90.64%、82.61%、73.33%。

[0109] 图8为培养15天后对NK细胞A549的杀伤活性对比,图8中曲线1、2表示空白对照组

(即不添加免疫细胞),曲线3、4表示对照组1,曲线5、6表示对照组2,曲线7、8表示实验组。A549细胞接种量为10000cells/孔,效靶比为10:1,时时观察NK细胞对A549细胞的杀伤效果。接种约19h时加入NK细胞,约90h时达到最大杀伤效果,实验组、对照组1及对照组2NK杀伤效率均值分别为:90.64%、82.61%、73.33,各组均具有很好的肿瘤抑制活性,且实验组的肿瘤杀伤作用更为明显。

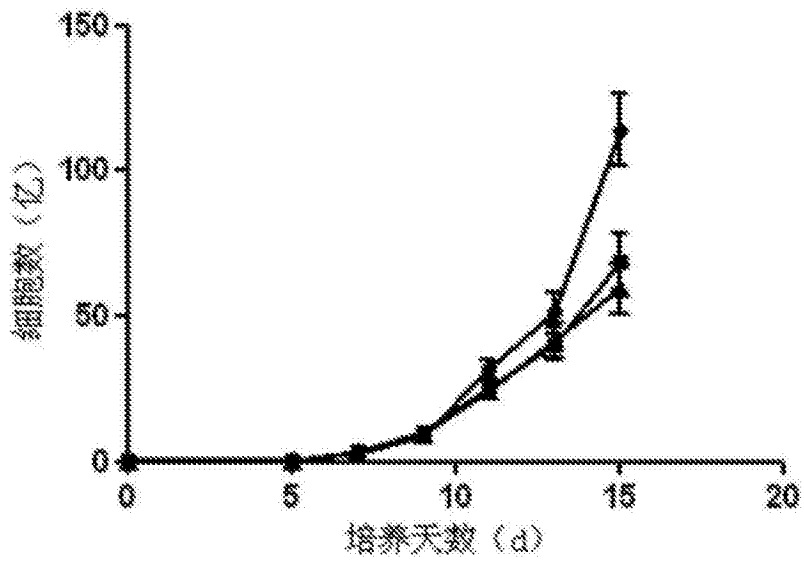


图1

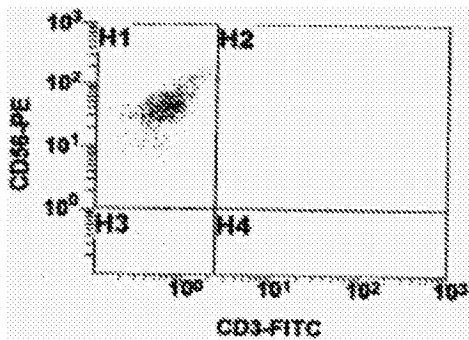


图2

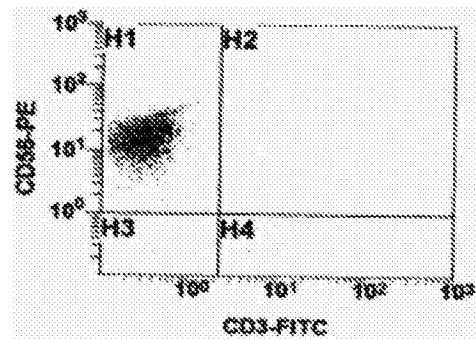


图3

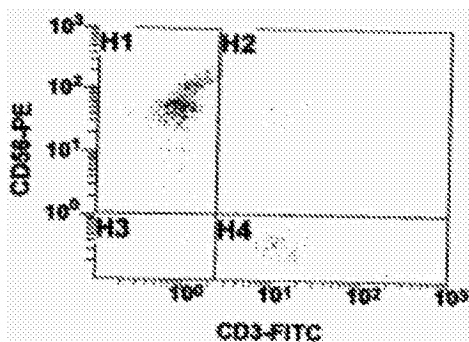


图4

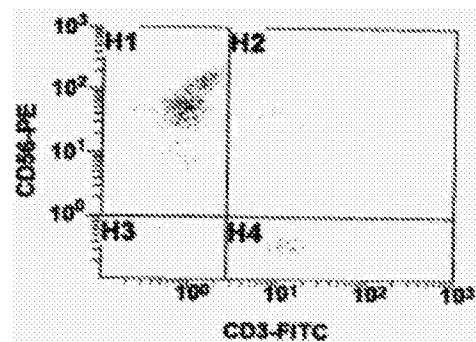


图5

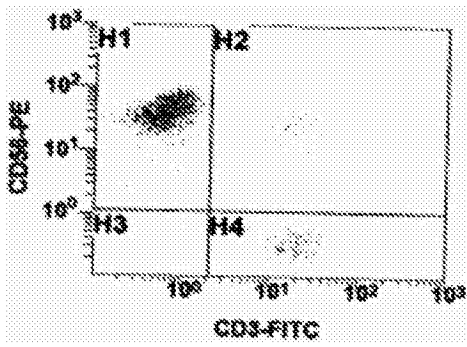


图6

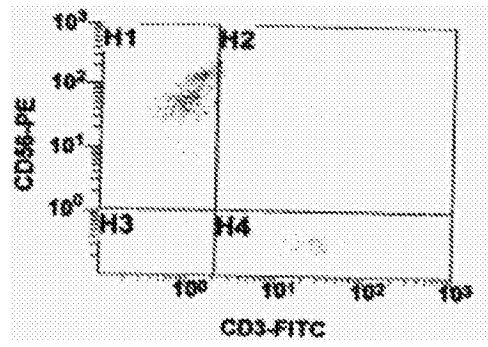


图7

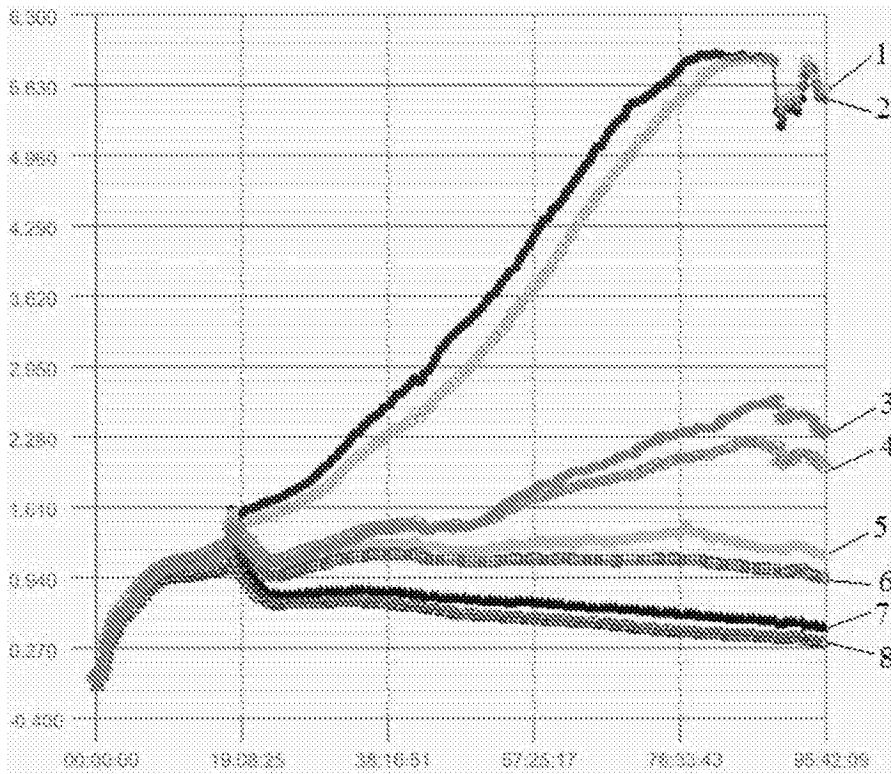


图8