



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106554942 A

(43)申请公布日 2017.04.05

(21)申请号 201611028882.8

(22)申请日 2016.11.18

(71)申请人 吉林省拓华生物科技有限公司

地址 136000 吉林省四平市铁东区石岭镇  
塔子沟村

(72)发明人 姜丽君

(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟

(51)Int.Cl.

C12N 5/0783(2010.01)

A61K 35/17(2015.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 37/02(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

一种高效的临床级CD56<sup>+</sup>群免疫细胞的制备方法

(57)摘要

本发明提供了一种高效的临床级CD56<sup>+</sup>群免疫细胞的制备方法,其包括:a)从外周血或脐带血中分离出单个核细胞;b)将a)中获得的单个核细胞接种到用抗CD16抗体包被的培养器皿中;c)在培养基中添加兔抗人胸腺细胞免疫球蛋白、力尔凡及无动物源性细胞因子诱导、刺激在b)中接种的单个核细胞;d)每2-3天根据细胞计数结果补充培养基和无动物源性细胞因子;e)获得CD56<sup>+</sup>群免疫细胞。本发明提供的临床级CD56<sup>+</sup>群免疫细胞的制备方法不仅降低了成本,更符合临床级制备要求,在体内外均显现出良好的杀伤活性。

1. 一种临床级CD56<sup>+</sup>群免疫细胞的制备方法,其包括:
  - a) 从外周血或脐带血中分离出单个核细胞;
  - b) 将a)中获得的单个核细胞接种到用抗CD16抗体包被的培养器皿中;
  - c) 在培养基中添加兔抗人胸腺细胞免疫球蛋白、力尔凡及无动物源性细胞因子培养、诱导、刺激在b)中接种的单个核细胞;
  - d) 每2-3天细胞计数,并补充培养基和无动物源性细胞因子;
  - e) 获得CD56<sup>+</sup>群免疫细胞。
2. 根据权利要求1所述的临床级CD56<sup>+</sup>群免疫细胞的制备方法,其中所述培养基是AIM-V无血清培养基。
3. 根据权利要求1或2所述的临床级CD56<sup>+</sup>群免疫细胞的制备方法,其中在a)中分离出单个核细胞后,使用AIM-V无血清培养基将所述单个核细胞重悬,调整细胞密度至 $1 \times 10^6$ 个细胞/ml。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的临床级CD56<sup>+</sup>群免疫细胞的制备方法,其中所述兔抗人胸腺细胞免疫球蛋白的使用剂量为50-500ng/ml。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的临床级CD56<sup>+</sup>群免疫细胞的制备方法,其中所述力尔凡的使用剂量为1-100 $\mu$ g/ml。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的临床级CD56<sup>+</sup>群免疫细胞的制备方法,其中所述无动物源性细胞因子包括:100-1000U/mL的IL-2、10-100ng/mL的IL-15和10-100ng/mL的IL-21。
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的临床级CD56<sup>+</sup>群免疫细胞的制备方法,其中在d)中,细胞计数后,补充培养基至细胞密度为 $2 \times 10^6$ 个细胞/ml,按补充培养基后的培养基的总体积添加100-1000U/mL的IL-2、10-100ng/mL的IL-15和10-100ng/mL的IL-21。
8. 根据权利要求1至7中任一项所述的临床级CD56<sup>+</sup>群免疫细胞的制备方法,其中培养时间为14天-21天。
9. 根据权利要求1至8中任一项所述的临床级CD56<sup>+</sup>群免疫细胞的制备方法,其中所述外周血和所述脐带血来自哺乳动物,优选来自人。
10. 一种细胞制品,其包括:

根据权利要求1至9中任一项所述的临床级CD56<sup>+</sup>群免疫细胞的制备方法生产的临床级CD56<sup>+</sup>群免疫细胞;和

药学上可接受的载体。

## 一种高效的临床级CD56<sup>+</sup>群免疫细胞的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种高效的临床级CD56<sup>+</sup>群免疫细胞的制备方法。

### 背景技术

[0002] 细胞治疗是继手术、放疗和化疗之后的又一种肿瘤治疗方法,它一般作为手术、放化疗的辅助手段,延长患者的寿命,清除体内手术后残余的癌细胞。细胞治疗主要包括自然杀伤细胞(natural killer cell,NK)治疗、NKT细胞治疗、CIK细胞治疗等。这些细胞以CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>或CD8<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>为主要效应细胞(图1)。

[0003] NK细胞是一类无主要组织相容性复合物(MHC)限制性,能直接杀伤靶细胞的特殊淋巴细胞群体,被认为是肿瘤免疫治疗的重要效应细胞。这两类CD56<sup>+</sup>淋巴细胞均对肿瘤细胞的杀伤具有不需免疫致敏、无组织相容性复合物(MHC)限制性等特点。自然杀伤细胞是机体重要的免疫细胞,不仅与抗肿瘤、抗病毒感染和免疫调节有关,而且在某些情况下参与过敏反应和自身免疫性疾病的发生。NKT细胞也是体内重要的免疫细胞,其共表达T细胞受体和NK细胞受体,主要起到免疫调节和细胞毒作用。激活的NKT细胞可产生大量的IL-4及INF- $\gamma$ ,对肿瘤细胞有细胞伤害作用;另一方面,NKT细胞活化后具有NK细胞样细胞毒活性,通过穿孔素途径溶解肿瘤细胞。

[0004] 临床上采用NK、CIK或NKT等CD56<sup>+</sup>群免疫细胞治疗肿瘤时,需要细胞的数量较高,而普通的细胞诱导培养方法扩增的数量有限,很难达到临床回输的要求,因此必需寻找用另一种同时能增强CD56<sup>+</sup>群免疫细胞的增殖活性,并能同时增强细胞的杀伤能力的免疫细胞培养方法。

### 发明内容

[0005] 基于上述目的,本发明提供了一种临床级CD56<sup>+</sup>群免疫细胞的制备方法,其包括:

[0006] a) 从外周血或脐带血中分离出单个核细胞;

[0007] b) 将a)中获得的单个核细胞接种到用抗CD16抗体包被的培养器皿中;

[0008] c) 在培养基中添加兔抗人胸腺细胞免疫球蛋白、力尔凡及无动物源性细胞因子诱导、刺激在b)中接种的单个核细胞;

[0009] d) 每2-3天根据细胞计数结果补充培养基和无动物源性细胞因子;

[0010] e) 获得CD56<sup>+</sup>群免疫细胞。

[0011] 在一个具体的实施方式中,所述培养基是AIM-V无血清培养基。

[0012] 在一个具体的实施方式中,其中在a)中分离出单个核细胞后,使用AIM-V无血清培养基将所述单个核细胞重悬,调整细胞密度至 $1 \times 10^6$ 个细胞/ml。

[0013] 在一个可选的实施方式中,其中所述兔抗人胸腺细胞免疫球蛋白的使用剂量为50-500ng/ml,优选为200ng/ml。

[0014] 在一个可选的实施方式中,其中所述力尔凡的使用剂量为1-100 $\mu$ g/ml,优选为10 $\mu$

g/ml。

[0015] 在一个可选的实施方式中,其中所述无动物源性细胞因子包括:100-1000U/mL的IL-2、10-100ng/mL的IL-15和10-100ng/mL的IL-21。

[0016] 优选地,所述无动物源性细胞因子包括1000U/ml的IL-2、50ng/ml的IL-15和50ng/ml的IL-21。

[0017] 在一个具体的实施方式中,其中在d)中,细胞计数后,补充培养基至细胞密度为 $2 \times 10^6$ 个细胞/ml;按补充培养基后的培养基的总体积添加100-1000U/mL的IL-2、10-100ng/mL的IL-15、10-100ng/mL的IL-21。

[0018] 在一个可选的实施方式中,其中培养时间为14天-21天。

[0019] 具体地,所述培养时间是指从a)中分离单个核细胞到e)中获得CD56<sup>+</sup>群免疫细胞所需要的时间。

[0020] 在一个可选的实施方式中,包被培养器皿时,所述抗CD16抗体的终浓度为50ng-1mg/ml,优选为1μg/ml。

[0021] 在一些实施方式中,外周血和脐带血来自哺乳动物。哺乳动物包括但不限于猴、小鼠、大鼠、豚鼠、兔、狗、人。在一些具体实施方式中,外周血和脐带血来自人。

[0022] 本发明另一方面还提供了一种细胞制品,其包括:上述临床级CD56<sup>+</sup>群免疫细胞的制备方法生产的CD56<sup>+</sup>群免疫细胞;和药学上可接受的载体。

[0023] 术语的定义

[0024] CD56<sup>+</sup>群免疫细胞:一群表面标志物CD56蛋白分子为阳性的免疫细胞。

[0025] 无动物源性细胞因子也称AF级,指产品整个生产过程中培养基或涉及到的中间过程培养条件都没有动物源性的细胞因子。

[0026] 临床级指能从体外培养应用到临床疾病治疗。

[0027] NK细胞:自然杀伤细胞(Natural killer cell,简称NK)被认为是机体抗感染、抗肿瘤的第一道天然防线,是机体重要的免疫细胞。

[0028] NKT细胞:自然杀伤性T细胞(Natural killer T,简称NKT)是一群细胞表面既有T细胞受体TCR,又有NK细胞受体的特殊T细胞亚群。

[0029] CIK细胞:细胞因子诱导的杀伤细胞(Cytokine-induced killer cells,简称CIK),是将人外周血单个核细胞在体外用多种细胞因子(如抗CD3单克隆抗体、IL-2和IFN-γ等)共同培养一段时间后获得的一群异质细胞。

[0030] 在具体的实施方式中,也可以采用细胞的表面标志物来表示细胞,如:CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>:NKT细胞主要表面标志物;CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>:NK细胞主要表面标志物;CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>:此细胞群主要为NKT细胞和CIK细胞;CD8<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>:此细胞群主要为NK细胞;CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>群:主要包括CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NKT和CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NK细胞;CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>:一般作为检测鉴定CIK细胞的表面标志物。

[0031] 本发明的有益效果是:刺激试剂力尔凡、即复宁(兔抗人胸腺细胞免疫球蛋白)为临床用药,相对与实验级试剂更安全、更符合GMP要求。其中即复宁是(一种临床上用于预防和治疗肾移植排斥反应的免疫抑制药物)可以选择性地扩增生物治疗中免疫效应性细胞(CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>细胞和CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>细胞),上调NK细胞活化/抑制受体的表达,促进其分化成熟和体外抗肿瘤活性的提高;力尔凡主要成分为α-甘露聚糖肽,属于免疫调节剂,能活

化巨噬细胞及淋巴细胞,此两种药物合用可以大大增加CD56<sup>+</sup>群细胞的数量,与白介素类细胞因子共同刺激培养免疫细胞具有数量大,纯度高、细胞毒性强等特点,从而能够满足临床的需要。同时与免疫磁珠分选法相比较培养成本大大降低,与饲养层细胞刺激法相比较风险大大降低,技术操作简单易行。所用本发明从临床实际应用可行性出发,对刺激剂种类、细胞因子组合、制备成本、细胞毒活性等进行了综合衡量,以期为实现CD56<sup>+</sup>群免疫细胞在临床过继免疫治疗中的大规模应用。

### 附图说明

[0032] 图1为健康人外周血T细胞亚群分析:人体内具有肿瘤杀伤活性的免疫细胞图示,其中CD8-CD56<sup>+</sup>细胞群主要为NK细胞,CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>细胞群主要包括NKT细胞和CIK细胞,其中CIK细胞CD8分子荧光强度较NKT细胞强,在本说明书中作为区别将其标记为CD8<sup>++</sup>CD56<sup>+</sup>。

[0033] 图2A至图2B是采用本发明的方法培养细胞的镜检图,其中图2A为第14天100倍下镜检图;图2B为第21天100倍下镜检图。

[0034] 图3A至图3C是采用本发明的方法培养细胞第0天、第14天、第21天的流式表型图。

### 具体实施方式

[0035] 以下结合附图,通过实施例进一步说明本发明,但不作为对本发明的限制。以下提供了本发明实施方式中所使用的具体材料及其来源。但是,应当理解的是,这些仅仅是示例性的,并不意图限制本发明,与如下试剂和仪器的类型、型号、品质、性质或功能相同或相似的材料均可以用于实施本发明。下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0036] 临床级CD56<sup>+</sup>群免疫细胞的制备方法:

[0037] 实施例1:从外周血或脐带血中分离出单个核细胞

[0038] 1、无菌采集患者抗凝外周血50ml(男,17周岁,急性髓性白血病,经患者同意采自中国医科大学四平医院血液科);

[0039] 2、将采集的血样转至50ml离心管(康宁,货号:430828),室温下用Thermo 4KR离心机调至800g转速,离心分离10min;

[0040] 3、吸取上层血浆于培养时备用;按0.9%生理盐水:剩余血液=1:1的比例稀释血液,取2支50ml离心管中分别加入15ml淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品科技有限责任公司,货号:LTS1077006),缓慢的按稀释血:淋巴细胞分离液=2:1加在淋巴细胞分离液之上;

[0041] 4、将加好稀释血的离心管进行密度梯度离心,室温下将Thermo4KR离心机调至800g升1降1离心20min,离心后分层由上至下分别为血浆、淋巴细胞分离液、红细胞;

[0042] 5、吸取上层血浆至50ml离心管中,56℃水浴灭活10min,离心取上清留用;

[0043] 6、离心完毕后吸取外周血单个核细胞,用大于外周血单个核细胞10倍体积的0.9%生理盐水充分混匀、洗涤,450g离心10min,弃上清,重复三次后,进行细胞计数。取2×10<sup>6</sup>个外周血单个核细胞加入冻存液(DMSO:FBS:AIM-V=1:3:6,其中DMSO为sigma公司产品,货号:D5879;FBS为HyClone公司产品,货号:SH300.84.03;AIM-V无血清培养基为GIBCO公司产品,货号:0870112-DK)中置于-80℃冰箱冻存,用于流式表型分析。

[0044] 实施例2:抗CD16抗体包被培养器皿

[0045] 预先在细胞培养瓶(康宁,75cm<sup>2</sup>,货号:3275)中加入含有抗CD16抗体(Biolegend,货号:302013)的包被液(将5μg抗体加入5ml PBS缓冲溶液中获得),室温孵育4h,抗体终浓度为1μg/ml。

[0046] 实施例3:接种单个核细胞

[0047] 用0.9%生理盐水缓慢冲洗2次在实施例2中包被抗体的培养瓶,用AIM-V无血清培养基(GIBCO,货号:0870112-DK)45ml重悬实施例1获得的细胞,调整细胞密度至1×10<sup>6</sup>个细胞/ml,接种到培养瓶中。

[0048] 实施例4:添加兔抗人胸腺细胞免疫球蛋白、力尔凡及无动物源性细胞因子培养、诱导、刺激单个核细胞

[0049] 在实施例3中接种的细胞中加入力尔凡(国药一心制药有限公司,货号:H10970426)终浓度为10μg/ml,即复宁(兔抗人胸腺细胞免疫球蛋白,法国赛达公司,货号:S20090067)终浓度200ng/ml,IL-2(沈阳三生制药有限公司,货号:S10970083)终浓度1000U/ml,IL-15(PeproTech,货号:AF-200-15-10)终浓度50ng/ml,IL-21(PeproTech,货号:AF-200-21-10)终浓度50ng/ml,放置在37℃、5%CO<sub>2</sub>恒温培养箱中诱导培养CD56<sup>+</sup>群免疫细胞,每天观察细胞生长状况。

[0050] 实施例5:细胞计数,并补充培养基和无动物源性细胞因子

[0051] 每隔2-3天对细胞进行计数,并调整维持细胞数为2×10<sup>6</sup>个细胞/ml并按上述因子浓度补加含有IL-2、IL-15、IL-21的AIM-V无血清培养基。

[0052] 具体在细胞计数后,根据细胞计数结果,直接添加AIM-V无血清培养基,将细胞密度调整为2×10<sup>6</sup>个细胞/ml,添加的细胞因子浓度按调整细胞密度之后的总的培养基体积添加,即IL-2终浓度1000U/ml、IL-15终浓度50ng/ml,IL-21终浓度50ng/ml。

[0053] 实施例6:获得CD56<sup>+</sup>群免疫细胞

[0054] 培养第14天、第21天倒置显微镜下拍照。培养21天后离心收获CD56<sup>+</sup>群免疫细胞。

[0055] 实施例7:细胞扩增后细胞量、扩增倍数及活率

[0056] 总细胞扩增倍数:将上述实施例中扩增第7、14、21天获得的细胞用台盼蓝染色后再用血细胞计数器进行计数,将当前的总细胞除以培养前的单个核细胞总数,数值即为细胞的扩增倍数,细胞活率(%)=未染色的细胞数/观察的细胞总数×100。结果参见表1和图2A和图2B,图2A为培养第14天倒置显微镜下图片,可以看到细胞透亮、状态佳,增殖球散在,细胞呈不规则长地瓜型;图2B为培养第21天倒置显微镜下图片,较14天细胞密度明显变大,增殖球减少。

[0057] 表1:扩增前后细胞数量、扩增倍数、活率对照表

[0058]

	第7天	第14天	第21天
细胞数 (起始为5×10 <sup>7</sup> )	7.5×10 <sup>8</sup>	2.1×10 <sup>9</sup>	5.2×10 <sup>9</sup>
扩增倍数	15倍	42倍	104倍
活率	98%	98%	97%

[0059] 实施例8:流式细胞仪检测细胞扩增前后CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NKT和CIK细胞、CD8<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NK细胞比例

[0060] 流式细胞术检测方法:取实施例1中第0天冻存的外周血单个核细胞以及实施例6中培养14天、21天后所获得的细胞样本 $5 \times 10^5$ 细胞/管, PBS洗涤2次。分别加入流式检测抗体进行双标记流式表型检测: FITC标记的鼠抗人CD8抗体 (BioLegend, 货号344704) 和APC标记的鼠抗人CD56抗体 (BioLegend, 货号304610); 室温下孵育20min, PBS洗涤2次, 细胞通过流式细胞仪进行分析。

[0061] 结果如图3A至图3C所示, 经过14天的诱导培养 $CD8^+CD56^+$ 与 $CD8^-CD56^+$ 的 $CD56^+$ 群免疫细胞 (Q1+Q2区) 从第0天的约9.7% (图3A) 升高至约66% (图3B), 培养21天后流式检测 $CD8^+CD56^+$ 与 $CD8^-CD56^+$ 的 $CD56^+$ 群免疫细胞 (Q1+Q2区) 升至78% (图3C)。

[0062] 实施例9: 细胞杀伤活性检测

[0063] 取对数生长期的K562细胞株 (购于上海艾研生物科技有限公司) 作为靶细胞, 并调整细胞密度为 $8 \times 10^5$ 个/ml, 每孔取 $50 \mu\text{l}$ 铺于96孔培养板中。取本发明实施例6中获得的第14天和第21天的 $CD56^+$ 群免疫细胞调整密度为 $8 \times 10^5$ 个/ml、 $4 \times 10^6$ 个/ml、 $8 \times 10^6$ 个/ml、 $1.6 \times 10^7$ 个/ml, 加入96孔培养板中, 每孔 $50 \mu\text{l}$ , 使效靶比分别为1:1、5:1、10:1、20:1, 每组设三个复孔。接种方式如下:

[0064] 空白组 (a值): AIM-V ( $100 \mu\text{l}$ )

[0065] (b值):  $CD56^+$ 群免疫细胞 ( $50 \mu\text{l}$ ) + AIM-V ( $50 \mu\text{l}$ )

[0066] 对照组 (c值): k562 ( $50 \mu\text{l}$ ) + AIM-V ( $50 \mu\text{l}$ )

[0067] 实验组 (d值): k562 ( $50 \mu\text{l}$ ) +  $CD56^+$ 群免疫细胞 ( $50 \mu\text{l}$ )

[0068] 将接种好的细胞, 置于 $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 条件下共培养24小时后, 每孔加 $10 \mu\text{l}$  CCK-8试剂, 摇匀,  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 条件下继续培养3小时, 酶标仪波长450nm测定吸光度。按下式计算杀伤活性: 杀瘤效率 =  $[1 - (d值 - b值 - a值) / (c值 - a值)] \times 100\%$ 。结果显示本发明制备的 $CD56^+$ 群免疫细胞对肿瘤K562细胞株具有较高的杀伤活性, 在10:1、20:1的效靶比下第14天杀伤率即可达到100%; 在5:1的效靶比下第14天杀伤率可达到85%以上, 第21天杀伤率可达到100%; 在1:1的效靶比下第14天和21天的杀伤率均低于40%, 但第21天的杀伤率显著高于第14天 (如表2所示)。

[0069] 表2: 本发明 $CD56^+$ 群免疫细胞对肿瘤K562细胞的杀伤活性

[0070]

效靶比	1:1	5:1	10:1	20:1
第 14 天	23%	87%	100%	100%
第 21 天	39%	100%	100%	100%

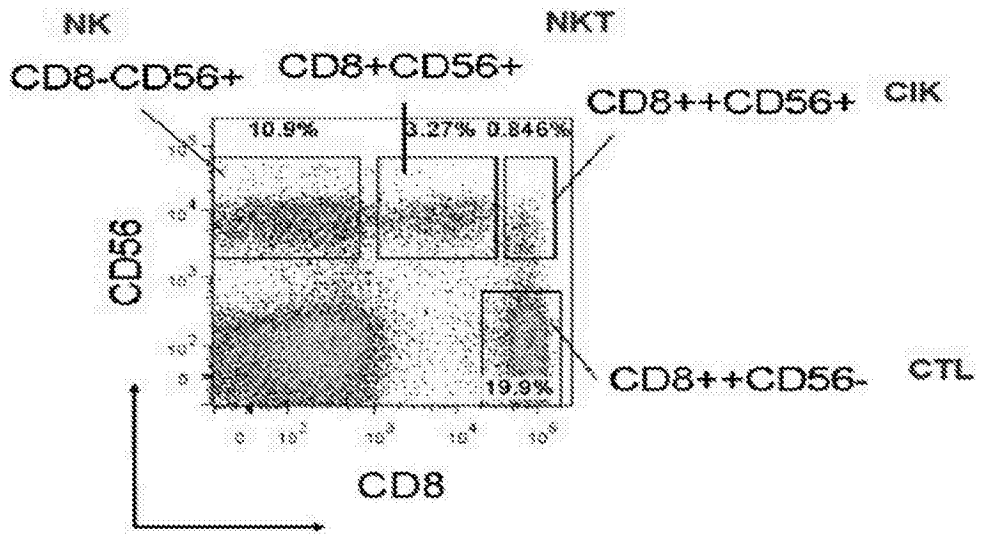


图1

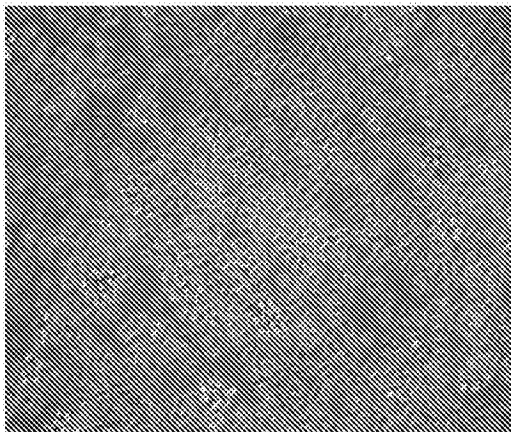


图2A

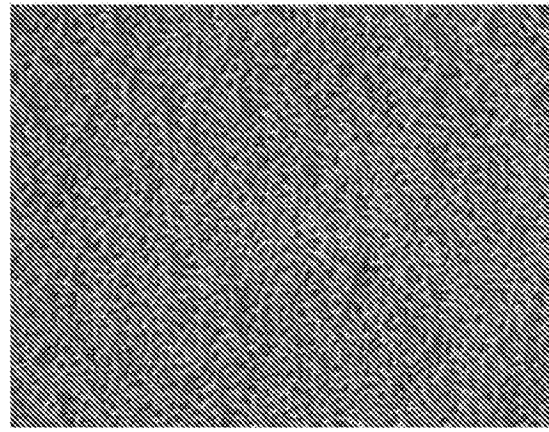


图2B



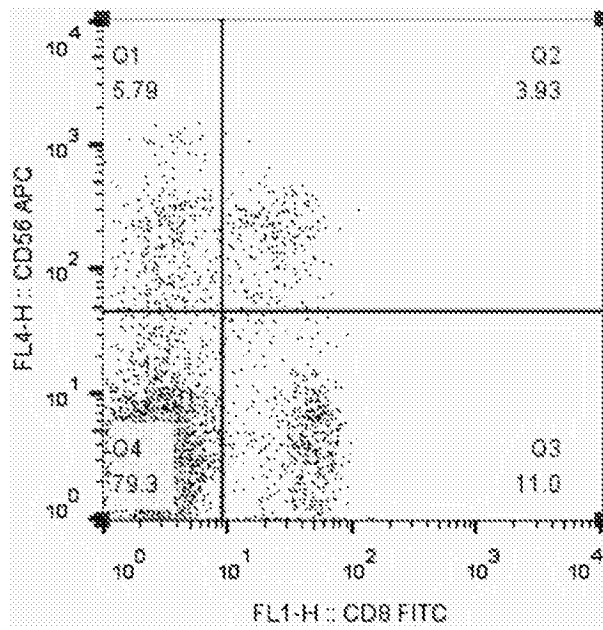


图3A

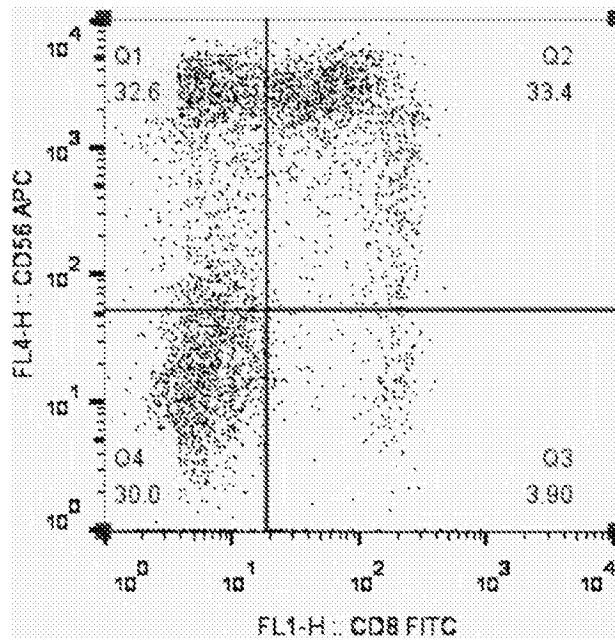


图3B

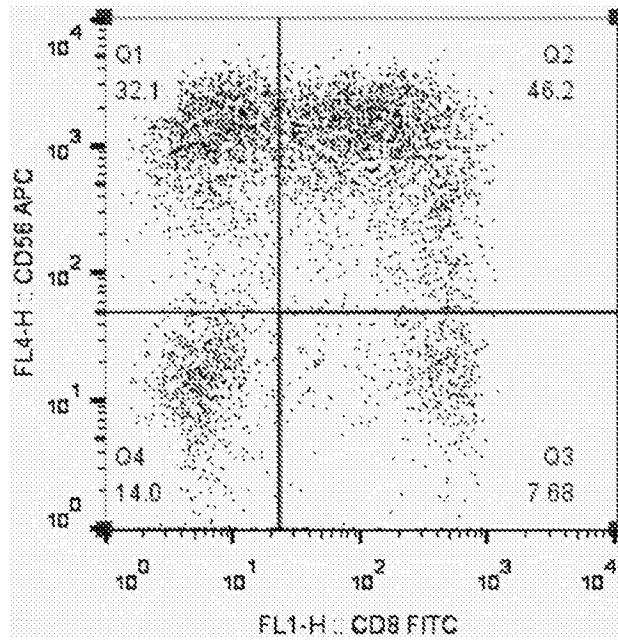


图3C