



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103756964 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 30

(21) 申请号 201310755088. 3

(22) 申请日 2013. 12. 30

(71) 申请人 天津斯坦姆生物科技有限公司

地址 300384 天津市滨海新区华苑产业区海泰发展六道6号海泰绿色产业基地C座201C

(72) 发明人 李迺昶 任峰

(74) 专利代理机构 天津盛理知识产权代理有限公司 12209

代理人 董一宁

(51) Int. Cl.

C12N 5/0783(2010. 01)

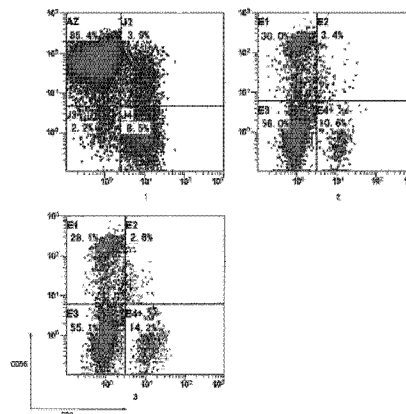
权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54) 发明名称

一种高效扩增 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 的自然杀伤细胞培养系统的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种高效扩增 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 的自然杀伤细胞培养系统的构建方法,经抗 HER2 单抗包被、NK 细胞的活化和 NK 细胞的扩增,培养 14 天后即得 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 的自然杀伤细胞培养系统。本发明构建方法采用的抗 HER2 单抗在 1998 年已被美国 FDA 认证的可用于临床的药物, IL-2、IL-15 和 IL-21 均为临床用药,原料来源广泛,成本低廉,方法简单,易于操作,扩增效率高,易于推广。



1. 一种高效扩增 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> 的自然杀伤细胞培养系统的构建方法,其特征在于:步骤如下:

(1)抗 HER2 单抗包被

用 PBS 稀释抗 HER2 单抗,包被 T75 培养瓶,抗 HER2 单抗的浓度为 10-50ug/cm<sup>2</sup>,置 4℃ 冰箱过夜,吸弃培养瓶中的稀释液待用;

(2)自体血清的制备

采外周血经 Ficoll 分离,获得正常血浆,56℃ 灭活、离心后得到血清,置 4℃ 冰箱储存待用;

(3)NK 细胞的活化

采外周血经 Ficoll 分离获得外周血单个核细胞,用无血清培养基 AIM-V 调整外周血单个核细胞的浓度至少 1×10<sup>6</sup> 个/ml,然后加入 AIM-V20ml, AIM-V 中内含细胞因子 IL-2500-1000u/ml、IL-15 10-20ng/ml 和 IL-21 5-10ng/ml,再加入体积百分数 5-10% 的血清,记为第 0 天;

(4)NK 细胞的扩增

培养的第 3、5、7 天补充无血清培养基 AIM-V,依次加入 40ml、140ml、400ml,并同时添加细胞因子 IL-2 500-1000u/ml、IL-15 10-20ng/ml 和 IL-21 5-10ng/ml 和 5-10%(体积百分数)血清,进行扩增培养,培养 14 天后,即得 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> 的自然杀伤细胞。

2. 根据权利要求 1 所述的高效扩增 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> 的自然杀伤细胞培养系统的构建方法,其特征在于:所述步骤(1)中抗 HER2 单抗为重组 DNA 衍生的人源化单克隆抗体。

3. 根据权利要求 2 所述的高效扩增 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> 的自然杀伤细胞培养系统的构建方法,其特征在于:所述重组 DNA 衍生的人源化单克隆抗体是由悬养于无菌培养基中的哺乳动物细胞产生,经亲和色谱法、离子交换法纯化和病毒灭活的去除程序获得的。

4. 根据权利要求 3 所述的高效扩增 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> 的自然杀伤细胞培养系统的构建方法,其特征在于:所述哺乳动物细胞为中国仓鼠卵巢细胞。

5. 根据权利要求 1 所述的高效扩增 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> 的自然杀伤细胞培养系统的构建方法,其特征在于:所述步骤(1)中抗 HER2 单抗的浓度为 30ug/cm<sup>2</sup>。

6. 根据权利要求 1 所述的高效扩增 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> 的自然杀伤细胞培养系统的构建方法,其特征在于:所述步骤(2)中外周血为人的外周血。

7. 根据权利要求 6 所述的高效扩增 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> 的自然杀伤细胞培养系统的构建方法,其特征在于:所述步骤(3)中外周血为人的外周血。

8. 根据权利要求 1 所述的高效扩增 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> 的自然杀伤细胞培养系统的构建方法,其特征在于:所述步骤(2)和(3)中细胞因子 IL-2、IL15 和 IL-21 的添加量为 IL-2 1000u/ml、IL-1520ng/ml 和 IL-21 10ng/ml。

9. 根据权利要求 1 所述的高效扩增 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> 的自然杀伤细胞培养系统的构建方法,其特征在于:所述步骤(3)或(4)中血清为人自体血清。

10. 根据权利要求 1 所述的高效扩增 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> 的自然杀伤细胞培养系统的构建方法,其特征在于:所述步骤(2)中血清为人自体血清。

## 一种高效扩增 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> 的自然杀伤细胞培养系统的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫学与分子生物学技术领域,涉及生物制品的扩增方法,尤其是一种高效扩增 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> 的自然杀伤细胞培养系统的方法。

### 背景技术

[0002] NK 细胞 1975 年被发现,在形态上属于大颗粒淋巴细胞,来源于骨髓,占外周血淋巴细胞总数的 5%-10%。它具有广谱抗肿瘤细胞作用,特别是对淋巴细胞瘤和白血病细胞作用更为明显,是抗肿瘤免疫的第一道防线,针对 NK 敏感靶细胞(如 K562 细胞)的杀伤效应,该杀伤功能不受靶细胞是否表达 MHC 的影响;NK 细胞还是连接天然免疫和获得性免疫的重要环节。在 DC 激发 CTL 反应的过程中,NK 细胞能发挥类似 TH 细胞的辅助功能(Mailliard RB, et al. J. Immunol, 2003, 171 :2366)。近期的研究表明,NK 细胞和树突状细胞(DC)相互作用,能够提高 DC 激发 CD4<sup>+</sup>TH1 反应及 CTL 反应的能力(Adam C, et al. Blood, 2005, 106:338)。甚至 NK 细胞还有直接激活 T 细胞的能力。

[0003] 由于 NK 细胞在免疫应答中的独特作用,其在肿瘤细胞治疗中应用越来越受到重视。然而,NK 细胞在体内的数量越少,如何获得足够数量的 NK 细胞成为制约其临床应用的瓶颈,而且目前的方法扩增的 NK 对实体瘤的杀伤作用仍非常有限。另外,研究发现在肿瘤患者体内 NK 细胞数量增多其功能反而下降,NK 细胞最多的人往往正是易患癌症的人,这说明肿瘤患者体内的 NK 细胞可能存在缺陷。因此,如何提高 NK 细胞的数量及增强其功能成为困扰医疗界的难题。

[0004] HER2 蛋白是一种由原癌基因 Her2 / neu 编码的具有酪氨酸激酶 (tyrosine kinase, TPK) 活性的跨膜糖蛋白,由胞外区、跨膜区及胞内区构成,分子量 185kDa,是表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 家族成员之一。HER2 在调节肿瘤细胞生长、分化及存活起着重要作用,HER2 的过表达是由原癌基因扩增或转录异常,或基因突变激活所致。所以在人类肿瘤中,特别是许多恶性肿瘤中存在 HER2 不同程度的过表达。HER2 主要通过多种途径促进细胞的增殖、分化以及抑制凋亡 HER2 还可通过促进 Fn14 (fibroblast growth factor inducible 14) 的表达和增强肿瘤细胞对乙醇的敏感性等途径增强肿瘤细胞的浸润作用。Willis 等发现在乳腺癌中 HER2 可促进 Fn14 的表达, Ma 等<sup>31</sup> 发现在体外实验中过表达的 HER2 可使肿瘤细胞对乙醇的敏感性增强。随着肿瘤细胞中 HER2 相关的分子研究的深入,作用于新靶点的肿瘤治疗药物逐渐被研发,即出现了如抗 HER2 抗体、肽疫苗、DNA 疫苗、HER2 信号转导抑制剂等。靶向 HER2 相关分子的药物也取得一定抑制肿瘤的效果。

[0005] 我们采用的抗 HER2 单抗是一种重组 DNA 衍生的人源化单克隆抗体,选择性地作用于人表皮生长因子受体-2 (HER2) 的细胞外部位。此抗体属 IgG1 型,含人的框架区,及能与 HER-2 结合的鼠抗 -p185 HER2 抗体的互补决定区。人源化的抗 HER2 抗体是由悬养于无菌培养基中的哺乳动物细胞(中国仓鼠卵巢细胞 CHO)产生的,用亲和色谱法和离子交换法纯化,包括特殊的病毒灭活的去除程序。

[0006] HER2 过表达细胞对于肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的细胞毒作用常有抗性, 抗 HER2 单抗处理细胞后, 使其对 TNF- $\alpha$  的敏感性增强。HER2 过度表达的肿瘤患者较无过度表达的无病生存期短。HER2 的过度表达可通过以下方法诊断: 对肿瘤组织块以免疫组化为基础的评价法, 组织或血浆样品的 ELISA 法或荧光原位杂交 (FISH)。因此抗 HER2 单抗在体外及动物实验中均显示可抑制 HER2 过度表达的肿瘤细胞的增殖。另外, 抗 HER2 单抗是抗体依赖的细胞介导的细胞毒反应 (ADCC) 的潜在介质。在体外研究中, 抗 HER2 单抗介导的 ADCC 被证明在 HER2 过度表达的癌细胞中比 HER2 非过度表达的癌细胞中更优先产生。抗 HER2 单抗可以刺激机体产生针对肿瘤的特异性免疫反应诱导免疫记忆, 打破免疫耐受从而有效的减少肿瘤复发、转移, 提高患者的生存期提供了可能。

[0007] 最近的研究表明, 共刺激分子抗 HER2 单抗在 NK 细胞增殖及功能调解中发挥了极其重要的作用。抗 HER2 单抗与 IL-2、IL-15、IL-21 协同刺激细胞, 并表达在 NK 细胞的表面参与 NK 细胞的功能调节, 能够促进细胞增殖和 IFN- $\gamma$  的分泌, 这种激活的 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NK 细胞通过和 CTL 的相互作用增强 CTL 的杀伤活性。抗 HER2 单抗协同 IL-2、IL-15、IL-21 细胞刺激因子激活 NK 细胞的途径有助于解决 NK 细胞在肿瘤生物治疗中的临床应用的难题。

[0008] 通过检索, 发现如下几篇与本发明专利申请相关的专利公开文献:

[0009] 1、NK 细胞的扩增 (CN102428173A), 提供在封闭的细胞培养系统中将 NK 细胞和 NK 样 T 细胞大规模扩增并同时激活的方法, 其中该扩增的细胞表现为细胞毒性增强

[0010] 2、一种体外扩增 NK 细胞的方法 (CN102994449A), 具体涉及一种体外大量扩增 NK 细胞的方法, a. 将外周血单个核细胞接种在 CD3McAb 和 CD226McAb 预包被的培养瓶中共培养, b. 加入 IL-2 和 IL-18 共培养 72 小时以刺激扩增 NK 细胞, c. 将 NK 细胞与经致死处理的 K562 细胞和含有 IL-2 和 IL-18 的无血清培养基转入细胞培养袋中共培养, d. 收获 NK 细胞, 本发明将 CD3McAb 和 CD226McAb 两种抗体同时包被, 促进细胞因子合成和 ADCC 作用, 显著提高了 NK 细胞的杀伤毒性, 仅仅通过 IL-2 和 IL-18 两种细胞因子就实现了对 NK 细胞的激活和扩增, 即保证了 NK 细胞的扩增倍数和细胞毒性, 又降低了细胞培养的成本。

[0011] 3、一种体外培养条件下扩增人 NK 细胞的方法 (CN101684456), 以人外周血单个核细胞 (PBMC) 为原始培养材料, 与采用基因工程的方法构建的刺激 NK 细胞生长的工程细胞一起共同培养。构建的刺激 NK 细胞生长的工程细胞是把具有促进 NK 细胞生长的几种细胞因子 (IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、4-1BB) 表达在 K562 细胞的表面。该工程细胞经过  $\gamma$  射线照射灭活后与 PBMC 在体外进行共培养, 结果这种刺激方法比目前通用的单纯向培养液中加入可溶性的细胞因子的扩增效果要强几百倍; 经过 3 周的培养, PBMC 中的非 NK 细胞基本上死亡消失, NK 细胞大量增殖, NK 细胞的纯度达到了 96% 以上, NK 细胞总数扩增了 1500 倍以上。

[0012] 4、A-NK 细胞分离培养方法 (CN1706938), 用苯丙氨酸甲酯 (PME) 去除单核巨噬细胞而不改变淋巴细胞的表型和细胞毒性; 在 A-NK 细胞培养方法的改进中, 无血清培养基可替代含血清的完全培养基, 二者所得培养物的数目和功能相当, 发展无血清培养基用于 A-NK 细胞的临床生物治疗, 即不减少 A-NK 细胞的数量和活性, 又能增加其临床应用的安全性; IL-4 可联合 IL-2 对 A-NK 细胞的生长有较强的刺激或成熟作用; IL-2 和 IL-12 联合应用可提高活化免疫细胞的杀伤活性。

[0013] 通过对比, 本发明专利申请与上述专利公开文献存在本质的不同。

## 发明内容

[0014] 本发明的目的在于克服现有技术的不足之处,提供一种利用抗 HER2 单抗协同 IL-2、IL-15 和 IL-21 激活 NK 细胞的途径,构造简单,易于操作,扩增效率高,对白血病 K562 细胞的杀伤明显提高,对 NK 细胞应用于临床免疫治疗具有重要意义的高效扩增 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> 的自然杀伤细胞培养系统的构建方法。

[0015] 为了实现上述目的,本发明所采用的的技术方案如下:

[0016] 一种高效扩增 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> 的自然杀伤细胞培养系统的构建方法,步骤如下:

[0017] (1)抗 HER2 单抗包被

[0018] 用 PBS 稀释抗 HER2 单抗,包被 T75 培养瓶,抗 HER2 单抗的浓度为 10-50ug/cm<sup>2</sup>,置 4℃ 冰箱过夜,吸弃培养瓶中的稀释液待用;

[0019] (2)自体血清的制备

[0020] 采外周血经 Ficoll 分离,获得正常血浆,56℃ 灭活、离心后得到血清,置 4℃ 冰箱储存待用;

[0021] (3)NK 细胞的活化

[0022] 采外周血经 Ficoll 分离获得外周血单个核细胞,用无血清培养基 AIM-V 调整外周血单个核细胞的浓度至少 1×10<sup>6</sup> 个 /ml,然后加入 AIM-V20ml, AIM-V 中内含细胞因子 IL-2500-1000u/ml、IL-15 10-20ng/ml 和 IL-21 5-10ng/ml,再加入体积百分数 5-10% 的血清,记为第 0 天;

[0023] (4)NK 细胞的扩增

[0024] 培养的第 3、5、7 天补充无血清培养基 AIM-V,依次加入 40ml、140ml、400ml,并同时添加细胞因子 IL-2 500-1000u/ml、IL-15 10-20ng/ml 和 IL-21 5-10ng/ml 和 5-10%(体积百分数)血清,进行扩增培养,培养 14 天后,即得 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> 的自然杀伤细胞。

[0025] 而且,所述步骤(1)中抗 HER2 单抗为重组 DNA 衍生的人源化单克隆抗体。

[0026] 而且,所述重组 DNA 衍生的人源化单克隆抗体是由悬养于无菌培养基中的哺乳动物细胞产生,经亲和层析法、离子交换法纯化和病毒灭活的去除程序获得的。

[0027] 而且,所述哺乳动物细胞为中国仓鼠卵巢细胞。

[0028] 而且,所述步骤(1)中抗 HER2 单抗的浓度为 30ug/cm<sup>2</sup>。

[0029] 而且,所述步骤(2)中外周血为人的外周血。

[0030] 而且,所述步骤(3)中外周血为人的外周血。

[0031] 而且,所述步骤(2)和(3)中细胞因子 IL-2、IL15 和 IL-21 的添加量为 IL-21000u/ml、IL-1520ng/ml 和 IL-21 10ng/ml。

[0032] 而且,所述步骤(3)或(4)中血清为人自体血清。

[0033] 而且,所述步骤(2)中血清为人自体血清。

[0034] 本发明的优点和积极效果是:

[0035] 1、本发明构建方法采用的抗 HER2 单抗在 1998 年已被美国 FDA 认证的可用于临床的药物,IL-2、IL-15 和 IL-21 均为临床用药,原料来源广泛,成本低廉,方法简单,易于操作,扩增效率高,易于推广。

[0036] 2、本发明构建方法所扩增得到的 NK 细胞与其他已知的细胞因子或细胞因子组合

扩增效果相比,具有更高的扩增效率;该构建方法所扩增得到的NK细胞与其他已知的细胞因子或细胞因子组合扩增的NK细胞相比,在相同的细胞浓度下,本发明扩增的NK细胞对K562细胞的杀伤效率提高一倍以上,该系统可用于进行肿瘤病人的生物治疗。

[0037] 3、本发明扩增方法培养的PBMC(外周血单个核细胞)不仅细胞数量有明显提高,流式细胞仪检测结果证明,CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>的NK细胞的百分比明显上升;加抗HER2单抗包被组对K562细胞的杀伤能力比未加抗HER2单抗包被组和同型单抗IgG1包被组有明显的提高,因此抗HER2单抗一种重要的NK细胞调节因子,可以促进NK细胞的增殖、活化、杀伤及分泌等功能;该方法获得的NK细胞活性好(86.6%杀伤率)、纯度高(85.4%),且该方法简便实用,有望成为探索NK细胞过继免疫治疗的一重要平台。

#### 附图说明

[0038] 图1为本发明采用3种不同组分培养的人外周血PBMC增殖分析图;

[0039] 其中,1为Anti-Her2 mAb+IL-2+IL-15+IL-21组;2为IgG1 mAb+IL-2+IL-15+IL-21组;3为IL-2+IL-15+IL-21组;

[0040] 图2采用3组不同组分培养的人外周血PBMC14天后CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NK细胞免疫表型测定的分析图;

[0041] 其中,1为Anti-Her2 mAb+IL-2+IL-15+IL-21组;2为IgG1 mAb+IL-2+IL-15+IL-21组;3为IL-2+IL-15+IL-21组;

[0042] 图3采用四唑盐(MTT)方法测定NK细胞对K562细胞的杀伤活性分析图;

[0043] 其中,1为Anti-Her2 mAb+IL-2+IL-15+IL-21组;2为IgG1 mAb+IL-2+IL-15+IL-21组;3为IL-2+IL-15+IL-21组。

#### 具体实施方式

[0044] 下面结合实施例,对本发明进一步说明;下述实施例是说明性的,不是限定性的,不能以下述实施例来限定本发明的保护范围。

[0045] 本发明中所使用的方法,如无特殊说明,均为本领域的常规方法;本发明中所使用的试剂,如无特殊说明,均为本领域的常规试剂。

[0046] 本发明采用抗HER2单抗及IL-15、IL-2和IL-21组成NK细胞扩增系统的构建方法。

[0047] 本发明中“抗HER2”单抗是抗HER2单抗是一种重组DNA衍生的人源化单克隆抗体。

[0048] 根据本发明的优选实施方案,采用商品化抗HER2单抗、IL-2、IL-15、IL-21、培养板、培养瓶,血清为自体的,本实验采健康志愿者为正常人自体血清。

[0049] 用无菌PBS稀释包被抗HER2单抗,用处理过的培养瓶培养PBMC,扩增并富集NK细胞。

[0050] 为了鉴定本发明的扩增系统扩增的NK细胞的生物学功能,本发明进行了扩增NK细胞对人白血病K562细胞进行体外杀伤实验。

[0051] 本发明中所使用的PBS和无血清培养基AIM-V均购于GIBCO公司。

[0052] 本发明中构建方法可以通过从个体中获得的外周血单个核细胞制备得到自然杀

伤细胞培养系统,当需要使用时,再将该自然杀伤细胞培养系统应用到相应的个体中。

[0053] 实施例 1

[0054] 一种高效扩增 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> 的自然杀伤细胞培养系统的构建方法,步骤如下:

[0055] (1) 抗 HER2 单抗包被培养瓶

[0056] 用 PBS 稀释抗 HER2 单抗,包被 T75 培养瓶,抗 HER2 单抗的浓度为 10-50ug/cm<sup>2</sup>,置 4℃ 冰箱过夜,吸弃培养瓶中的稀释液待用;

[0057] (2) 自体血清的制备

[0058] 采健康志愿者外周血经 Ficol1 分离,获得正常人血浆,56℃ 灭活、离心后得到血清,置 4℃ 冰箱储存待用;

[0059] (3) NK 细胞的活化

[0060] 采健康志愿者外周血经 Ficol1 分离获得外周血单个核细胞,用无血清培养基 AIM-V 调整外周血单个核细胞的浓度至少 1×10<sup>6</sup> 个 /ml,然后加入 AIM-V 20ml 内含细胞因子 IL-2500-1000U/ml、IL-15 10-20ng/ml 和 IL-21 5-10ng/ml,5-10% (体积百分数) 自体血清,记为第 0 天;

[0061] (4) NK 细胞的扩增及富集

[0062] 培养的第 3、5、7 天补充 AIM-V 依次为 40ml、140ml、400ml,此时总体积为 600ml 左右,并添加细胞因子 IL-2 500-1000u/ml、IL-15 10-20ng/ml 和 IL-21 5-10ng/ml 和 5-10% (体积百分数) 自体血清,进行细胞扩增培养,在培养 14 天后可收获 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> 的自然杀伤细胞。

[0063] 实施例 2

[0064] 一种高效扩增 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> 的自然杀伤细胞培养系统的构建方法,步骤如下:

[0065] (1) 抗 HER2 单抗包被

[0066] 用 PBS 稀释抗 HER2 单抗,包被 T75 培养瓶,抗 HER2 单抗的浓度为 10-50ug/cm<sup>2</sup>,置 4℃ 冰箱过夜,吸弃培养瓶中的稀释液待用;

[0067] (2) 自体血清的制备

[0068] 采健康志愿者外周血经 Ficol1 分离,获得正常人血浆,56℃ 灭活、离心后得到血清,置 4℃ 冰箱储存待用;

[0069] (3) NK 细胞的活化

[0070] 采健康志愿者外周血经 Ficol1 分离获得外周血单个核细胞,用无血清培养基 AIM-V 调整外周血单个核细胞的浓度至少 1×10<sup>6</sup> 个 /ml,然后加入 AIM-V 20ml 内含细胞因子 IL-2500-1000u/ml、IL-15 10-20ng/ml 和 IL-21 5-10ng/ml,再加入 5-10% (体积百分数) 自体血清,记为第 0 天;

[0071] (4) NK 细胞的扩增

[0072] 培养的第 3、5、7 天补充无血清培养基 AIM-V 依次加入 40ml、140ml、400ml 此时总体积为 600ml 并同时添加细胞因子 IL-2 500-1000u/ml、IL-15 10-20ng/ml 和 IL-21 5-10ng/ml 和 5-10% (体积百分数) 自体血清,进行扩增培养,在培养 14 天后即得 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> 的自然杀伤细胞。

[0073] 本发明相关的检测结果:

[0074] 一、采用 3 种不同组分培养的人外周血 PBMC 增殖分析检测

[0075] 抗 HER2 单抗预包瓶, PBMC 采用无血清培养基 AIM-V 调整至浓度为  $1 \times 10^6$  个 /ml, 然后加入培养瓶中, 同时加入 IL-2 500-1000U/ml, IL-15 10-20ng/ml 和 IL-21 5-10ng/ml。同时设以下几组对照组: 预包瓶同型对照小鼠 IgG1 并同时加入 IL-2 500-1000U/ml, IL-15 10-20ng/ml 和 IL-21 5-10ng/ml 组、不包被培养瓶只加 IL-2 500-1000U/ml, IL-15 10-20ng/ml 和 IL-21 5-10ng/ml 组, 每 7 天计数观察细胞形态。

[0076] 分析结果见图 1, 从图 1 中可以看出, 同型单抗 IgG1 包被组、细胞因子刺激组细胞这两组增殖相差无几, 而用抗 HER2 单抗包被组细胞增殖数明显高于其他两组, 说明经过抗 HER2 单抗包被后, 可特异性的刺激 NK 细胞增殖, 回输患者体内以达到治疗肿瘤目的。

[0077] 二、采用 3 组不同组分培养的人外周血 PBMC14 天后 CD3-CD56+NK 细胞免疫表型测定的分析检测

[0078] 利用 CD3、CD56 单克隆抗体, 取每管细胞总数为  $5 \times 10^6$  个加入不同组分的抗体充分混匀, 4°C 放置 30min, PBS 洗涤 2 次, 1500rpm, 离心 5min, 流式细胞仪检测各实验组的细胞免疫表型。

[0079] 分析结果见图 2, 从图 2 中可以看出, 同型单抗 IgG1 包被组 CD56<sup>+</sup> 阳性率为 28.1%, 细胞因子刺激组 CD56<sup>+</sup> 阳性率为 30%, 而用抗 HER2 单抗包被组 CD56<sup>+</sup> 阳性率可达到 85.4%, 通过此实验表明抗 HER2 单抗是一种 NK 细胞重要的刺激因子。

[0080] 三、本发明构建方法制备得到的 NK 细胞对肿瘤细胞的杀伤实验:

[0081] 采用四唑盐 (MTT) 方法测定 NK 细胞对 K562 细胞的杀伤活性分析图

[0082] 将培养至第 14 天的 NK 细胞作为效应细胞, 进行体外杀伤实验, 调整 K562 细胞浓度为  $5 \times 10^3$  个 /ml, 每孔 100  $\mu$  l, 加入 96 孔培养板中, 放置在 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中, 放置 2h, 按效应细胞与靶细胞的比例为 20:1、10:1、5:1 加入培养板中, 同时另设单独靶细胞 (靶细胞 + 培养液) 和单独效应细胞 (效应细胞 + 培养液) 为阴性对照组, 每组做 6 个复孔。放置在 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中作用 48h 后, 加入 MTT (5g/L), 20  $\mu$  l/ 孔, 继续放置在培养箱中培养 4h, 2000rpm/min, 离心 5min, 翻板弃上清, 加入 DMSO 150  $\mu$  l/ 孔, 震荡, 待沉淀溶解, 放入酶标仪中, 492nm 测光密度 (OD) 值, 按如下公式计算杀伤活性。杀伤活性 =  $\{1 - [( \text{实验组 OD 值} - \text{单独效应细胞组 OD 值}) / \text{单独靶细胞组 OD 值}]\} \times 100\%$ 。

[0083] 分析结果见图 3, 从图 3 中可以看出, 同型单抗 IgG1 包被组在效靶比 10:1、5:1 杀伤活性分别为 32%、12.1%, 细胞因子刺激组在效靶比 10:1、5:1 杀伤活性分别为 29.3%、12%, 而抗 HER2 单抗包被组在效靶比 10:1、5:1 杀伤活性分别为 86.6%、82.3%, 实验结果证明在培养过程中加入抗 HER2 单抗不仅能使 NK 细胞增殖, 并使 NK 细胞的纯度得到提高 (85.4%), NK 细胞杀伤活性也可大幅提高, NK 细胞表面能够稳定表达 TNF, 与肿瘤细胞表面的 TNF-R1 结合, 通过 Fas-FasL 途径选择性的细胞毒作用, 特异性的抑制肿瘤细胞凋亡, 而不诱导正常细胞凋亡。这最重要的生物学特点。

[0084] NK 细胞在抗病毒、抗肿瘤上扮演着重要的角色, 因其作用不需初次免疫活化, 因而在过继免疫治疗上有其独特的应用前景。由于不能获得数量大、纯度高的人 NK 细胞, 使 NK 细胞在免疫治疗中的应用受到了限制。采用体外扩增的方法获得足够数量和较高纯度的人 NK 细胞, 是近年来研究 NK 细胞功能特别是探讨过继免疫治疗的一个重要基础平台。目前国内学者在扩增的方法上进行了各种的探索, 如采用磁珠分选的方法先从人 PBMC 中分离 NK 细胞, 获得的 NK 细胞在体外培养条件下, 用可溶性 IL-2、IL-12、IL-15 等细胞因子共同



刺激,能使NK细胞得到扩增。采用照射致死的K562细胞或HFWT细胞与PBMC共培养,也能使PBMC中的NK细胞得到一定的扩增。在数量上,上述这些扩增方法操作步骤复杂并且容易导致细胞污染,获得的NK细胞似乎还不能满足过继免疫治疗的需要,仅仅靠可溶性细胞因子的刺激还很难使NK细胞得到大量的扩增。所以我们用抗HER2单抗包被培养瓶,可以使NK细胞在体外大量扩增,实验结果表明,本发明培养的PBMC(外周血单个核细胞)不仅细胞数量有明显提高,流式细胞仪检测结果证明,CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>的NK细胞的百分率明显上升;我们同时做了加抗HER2单抗包被组、同型单抗IgG1包被组和细胞因子刺激组的杀伤活性实验,在相同效靶比下,加抗HER2单抗包被组对K562细胞的杀伤能力比同型单抗IgG1包被组和细胞因子刺激组有明显的提高,由此我们认为抗HER2单抗一种重要的NK细胞调节因子,可以促进NK细胞的增殖、活化、杀伤及分泌等功能。

[0085] 本发明的扩增方法获得NK细胞活性好(86.6%杀伤率)、纯度高(85.4%),且方法简便实用,有望成为探索NK细胞过继免疫治疗的一重要平台。

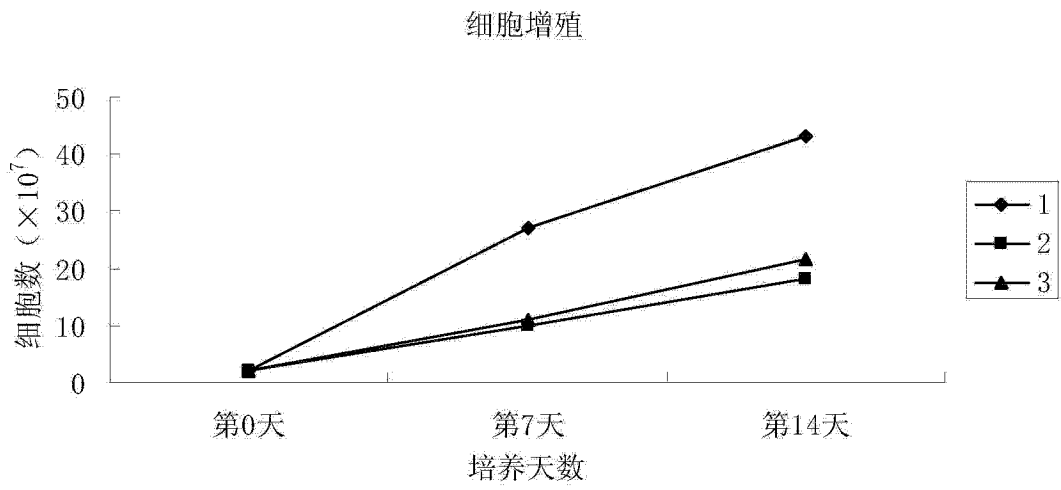


图 1

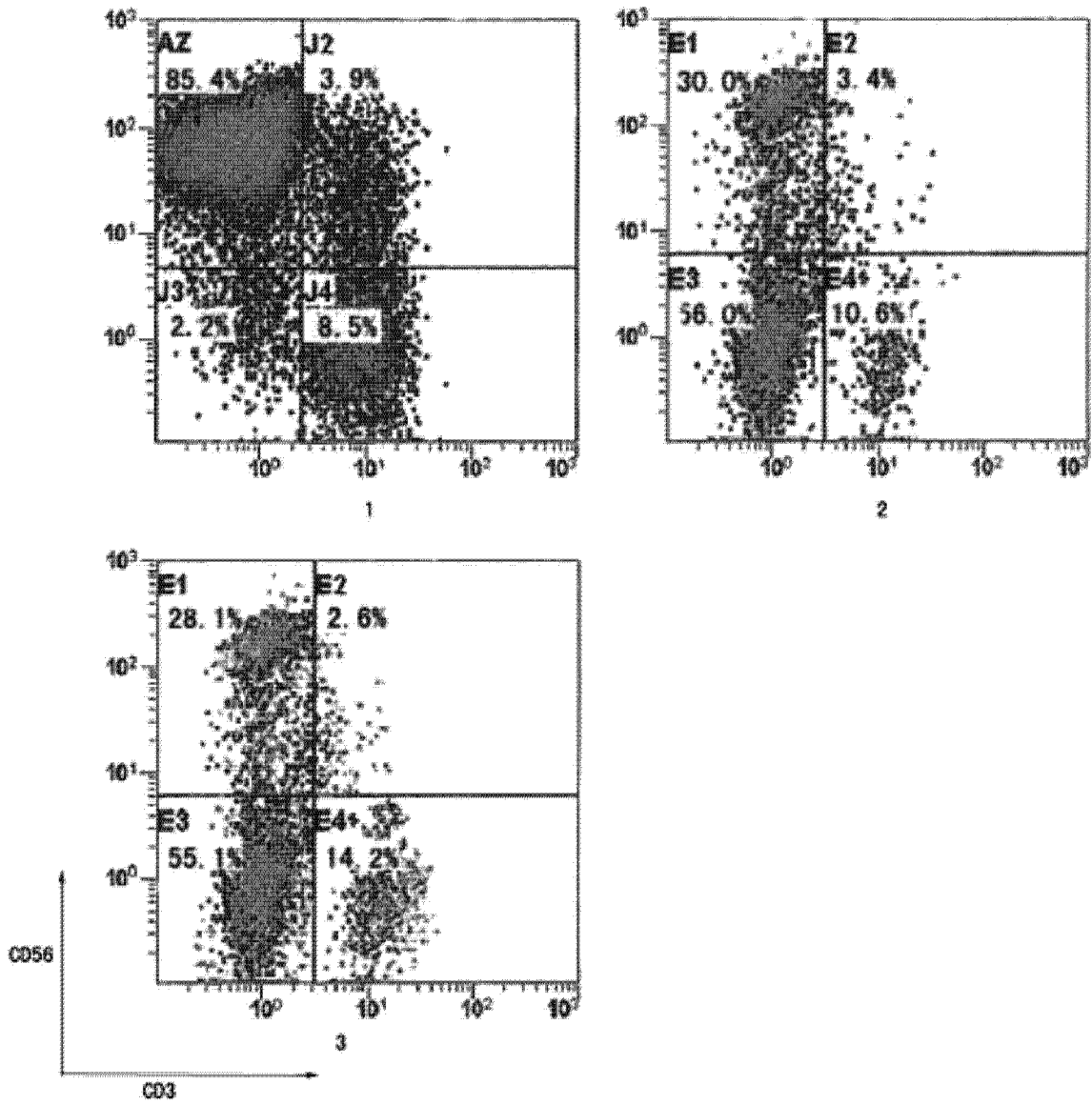


图 2

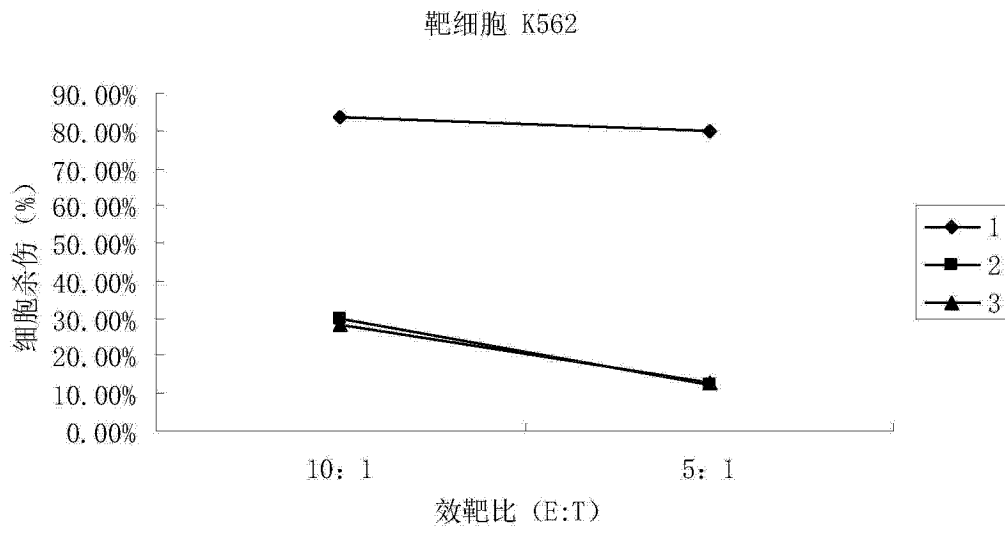


图 3