



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115074326 A

(43) 申请公布日 2022.09.20

(21) 申请号 202210794041.7

(22) 申请日 2022.07.07

(71) 申请人 广州希灵生物科技有限公司

地址 510000 广东省广州市黄埔区开源大道11号C6栋508房C6栋509房

(72) 发明人 梁仲恒 贾轲 吕玉静 杨弯

(74) 专利代理机构 北京权智天下知识产权代理事务所(普通合伙) 11638

专利代理师 吕梅

(51) Int. Cl.

G12N 5/0783 (2010.01)

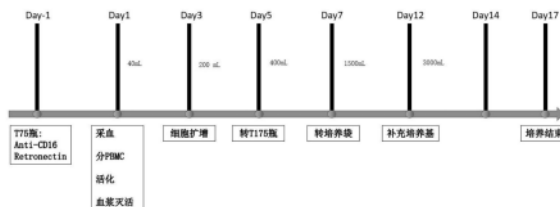
权利要求书1页 说明书3页 附图2页

(54) 发明名称

CD16抗体联合细胞因子体外扩增NK细胞的培养方法

(57) 摘要

本发明涉及体外扩增NK细胞的方法领域,尤其涉及CD16抗体联合细胞因子体外扩增NK细胞的培养方法。本发明将外周血单个核细胞接种到预包被的RetroNectin和鼠抗人CD16细胞培养瓶中,并添加含IL-2、IL-15、IL-21和自体血浆的培养基。其中抗CD16抗体通过结合NK细胞表胞的CD16位点,增强IL-15和IL-2对NK细胞的刺激,以及ADCC对肿瘤细胞的杀伤作用,进而诱导NK细胞活化,获得扩增的效率和纯度更高的NK细胞。上述技术不使用磁珠分选细胞,也不使用滋养层细胞活化方法,操作简单,成效快,制备成本低,安全性高。可高效扩增NK细胞,14天内细胞扩增148倍。NK细胞纯度高,具有很高的临床价值。



1. CD16抗体联合细胞因子体外扩增NK细胞的培养方法,其特征在于,方法步骤包括:

S1、从外周血中分离出单个核细胞;

S2、将外周血单个核细胞接种到预包被的RetroNectin和鼠抗人CD16细胞培养瓶中,并添加含IL-2、IL-15、IL-21和自体血浆的培养基;

S3、连续培养14-17天,获得高纯度高活性NK细胞。

2. 根据权利要求1所述的CD16抗体联合细胞因子体外扩增NK细胞的培养方法,其特征在于,培养前需要先制备包被液。

3. 根据权利要求1所述的CD16抗体联合细胞因子体外扩增NK细胞的培养方法,其特征在于,包被液的组成成分包括10mlPBS、35ugRetronectin和35ug CD16抗体,混合制备。

4. 根据权利要求1所述的CD16抗体联合细胞因子体外扩增NK细胞的培养方法,其特征在于,具体步骤包括:

A、包被:将包被液加入培养瓶,铺匀平放,在4℃条件下,避光过夜;

B、采血:采集外周血15ml,将其加入离心管一中备用;

C、淋巴细胞分离液分离:向离心管中加入等体积PBS至30ml,混匀后转移至提前添加15ml淋巴分离液的离心管二,在1800rpm/800g,室温条件下离心20min,升降速设为0;

D、洗涤PBMC:用吸管将离心后中间白色的PBMC层吸出,在离心管三中加入18-22ml的PBS清洗,在2000rpm条件下离心6min,弃上清;再次用20mlPBS清洗,在1800rpm条件下离心6min,弃上清;使用培养基重悬、混匀、取样,采用typanblue染色计数,1800rpm条件下离心6min,弃上清;

E、配制细胞悬液:用40ml培养基重悬细胞、沉淀、混匀;

F、接种细胞:取40ml上述的细胞悬液加入培养瓶,添加终浓度30ng/ml的IL-15、终浓度100ng/ml的IL-21、终浓度5%的自体血浆、终浓度6000U/ml的IL-2,将接种后的培养瓶置二氧化碳培养箱培养;

G、培养至4、6、8、11和14天时分瓶培养,期间检测,并在第17日回收细胞。

5. 根据权利要求1所述的CD16抗体联合细胞因子体外扩增NK细胞的培养方法,其特征在于,二氧化碳培养箱的培养条件:温度为37℃,CO₂浓度为5%。

CD16抗体联合细胞因子体外扩增NK细胞的培养方法

技术领域

[0001] 本发明涉及体外扩增NK细胞的方法领域,尤其涉及CD16抗体联合细胞因子体外扩增NK细胞的培养方法。

背景技术

[0002] 现有的体外扩增NK细胞技术中,细胞培养方法采用赫赛汀、Herceptin和PHA、RetroNectin+美罗华抗体+鼠抗人CD161抗体包板、透明质酸+CD16+

[0003] RetroNectin等等,还有经典的采用滋养细胞的方法。上述方法在操作过程中容易引入安全性问题(例如多种外源因子或试剂的引入均可能增加细胞质量控制的难度,进而增加临床应用的风险),且存在操作复杂,导致工艺不稳定及成本较高的问题。

发明内容

[0004] 针对背景技术中存在的问题,提出CD16抗体联合细胞因子体外扩增NK细胞的培养方法。本发明将外周血单个核细胞接种到预包被的RetroNectin和鼠抗人CD16细胞培养瓶中,并添加含IL-2、IL-15、IL-21和自体血浆的培养基。不使用磁珠分选细胞,也不使用滋养层细胞活化方法,操作简单,成效快,制备成本低,安全性高。可高效扩增NK细胞,14天内细胞扩增148倍。

[0005] 本发明提出CD16抗体联合细胞因子体外扩增NK细胞的培养方法,方法步骤包括:

[0006] S1、从外周血中分离出单个核细胞;

[0007] S2、将外周血单个核细胞接种到预包被的RetroNectin和鼠抗人CD16细胞培养瓶中,并添加含IL-2、IL-15、IL-21和自体血浆的培养基;

[0008] S3、连续培养14-17天,获得高纯度高活性NK细胞。

[0009] 优选的,培养前需要先制备包被液。

[0010] 优选的,包被液的组成成分包括10mlPBS、35ug Retronectin和35ug CD16,混合制备。

[0011] 优选的,具体步骤包括:

[0012] A、包被:将包被液加入培养瓶,铺匀平放,在4℃条件下,避光过夜;

[0013] B、采血:采集外周血15ml,将其加入离心管一中备用;

[0014] C、淋巴细胞分离液分离:向离心管中加入等体积PBS至30ml,混匀后转移至提前添加15ml淋巴分离液的离心管二,在1800rpm/800g,室温条件下离心20min,升降速设为0;

[0015] D、洗涤PBMC:用吸管将离心后中间白色的PBMC层吸出,在离心管三中加入18-22ml的PBS清洗,在2000rpm条件下离心6min,弃上清;再次用20mlPBS清洗,在1800rpm条件下离心6min,弃上清;使用培养基重悬、混匀、取样,采用typan blue染色计数,1800rpm条件下离心6min,弃上清;

[0016] E、配制细胞悬液:用40ml培养基重悬细胞、沉淀、混匀;

[0017] F、接种细胞:取40ml上述的细胞悬液加入培养瓶,添加终浓度30ng/ml的IL-15、终

浓度100ng/ml的IL-21、终浓度5%的自体血浆、终浓度6000U/ml的IL-2,将接种后的培养瓶置二氧化碳培养箱培养;

[0018] G、培养至4、6、8、11和14天时分瓶培养,期间检测,并在第17日回收细胞。

[0019] 优选的,二氧化碳培养箱的培养条件:温度为37℃,CO₂浓度为5%。

[0020] 与现有技术相比,本发明具有如下有益的技术效果:

[0021] 本发明将外周血单个核细胞接种到RetroNectin和鼠抗人CD16预包被的细胞培养瓶中,并添加含IL-2、IL-15、IL-21和自体血浆的培养基。其中抗CD16抗体通过结合NK细胞表位的CD16位点,增强IL-15和IL-2对NK细胞的刺激,以及ADCC对肿瘤细胞的杀伤作用,进而诱导NK细胞活化,获得扩增的效率和纯度更高的NK细胞。上述技术不使用磁珠分选细胞,也不使用滋养层细胞活化方法,操作简单,成效快,制备成本低,安全性高。可高效扩增NK细胞,14天内细胞扩增148倍。NK细胞纯度高,具有很高的临床价值。

附图说明

[0022] 图1为本发明一种实施例中方法流程示意图;

[0023] 图2为14天内NK细胞扩增示意图;

[0024] 图3为流式检测NK细胞的结果示意图。

具体实施方式

[0025] 实施例一

[0026] 本发明提出的CD16抗体联合细胞因子体外扩增NK细胞的培养方法,方法步骤包括:

[0027] S1、从外周血中分离出单个核细胞;

[0028] S2、将外周血单个核细胞接种到预包被的RetroNectin和鼠抗人CD16细胞培养瓶中,并添加含IL-2、IL-15、IL-21和自体血浆的培养基;

[0029] S3、连续培养14-17天,获得高纯度高活性NK细胞。

[0030] 实施例二

[0031] 本发明提出的CD16抗体联合细胞因子体外扩增NK细胞的培养方法,方法步骤包括:

[0032] S1、从外周血中分离出单个核细胞;

[0033] S2、将外周血单个核细胞接种到预包被的RetroNectin和鼠抗人CD16细胞培养瓶中,并添加含IL-2、IL-15、IL-21和自体血浆的培养基;

[0034] S3、连续培养14-17天,获得高纯度高活性NK细胞。

[0035] 进一步的,培养前需要先制备包被液。

[0036] 进一步的,包被液的组成成分包括10mlPBS、35ug Retronectin和35ug CD16,混合制备。

[0037] 实施例三

[0038] 如图1所示,本发明提出的CD16抗体联合细胞因子体外扩增NK细胞的培养方法,方法步骤包括:

[0039] A、包被:将包被液加入T75培养瓶,铺匀平放,在4℃条件下,避光过夜;

[0040] B、采血：采集外周血15ml，将其加入50ml的离心管一中备用；

[0041] C、淋巴细胞分离液分离：向离心管中加入等体积PBS至30ml，混匀后转移至提前添加15ml淋巴分离液的离心管二，在1800rpm/800g，室温条件下离心20min，升降速设为0；

[0042] D、洗涤PBMC：用巴斯德吸管将离心后中间白色的PBMC层吸出，在离心管三中加入18-22ml的PBS清洗，在2000rpm条件下离心6min，弃上清；再次用20mlPBS清洗，在1800rpm条件下离心6min，弃上清；使用20ml培养基重悬、混匀、取样，采用typan blue染色计数，1800rpm条件下离心6min，弃上清；

[0043] E、配制细胞悬液：用40mlGT-T551H3培养基重悬细胞、沉淀、混匀；

[0044] F、接种细胞：取40ml上述的细胞悬液加入培养瓶，添加终浓度30ng/ml的IL-15、终浓度100ng/ml的IL-21、终浓度5%的自体血浆、终浓度6000U/ml的IL-2，将接种后的培养瓶置二氧化碳培养箱培养；二氧化碳培养箱的培养条件：温度为37℃，CO₂浓度为5%；

[0045] G、培养至4、6、8、11和14天时分瓶培养，期间检测，并在第17日回收细胞；

[0046] H、采用流式检测手段，检测NK细胞表面markerCD3、CD56、CD16、CD45。结果见图3，由图3可知细胞培养14天后CD45为63.47%，CD3-CD56+为62.63%。

[0047] 本发明将外周血单个核细胞接种到预包被的RetroNectin和鼠抗人CD16细胞培养瓶中，并添加含IL-2、IL-15、IL-21和自体血浆的培养基。其中抗CD16抗体通过结合NK细胞表面的CD16位点，增强IL-15和IL-2对NK细胞的刺激，以及ADCC对肿瘤细胞的杀伤作用，进而诱导NK细胞活化，获得扩增的效率和纯度更高的NK细胞。上述技术不使用磁珠分选细胞，也不使用滋养层细胞活化方法，操作简单，成效快，制备成本低，安全性高。可高效扩增NK细胞，14天内细胞扩增148倍(图2所示)。没有CD16抗体刺激增殖不到100倍。因此本方法得到的NK细胞纯度高，具有很高的临床价值。

[0048] 上面结合附图对本发明的实施方式作了详细说明，但是本发明并不限于此，在所属技术领域的技术人员所具备的知识范围内，在不脱离本发明宗旨的前提下还可以作出各种变化。

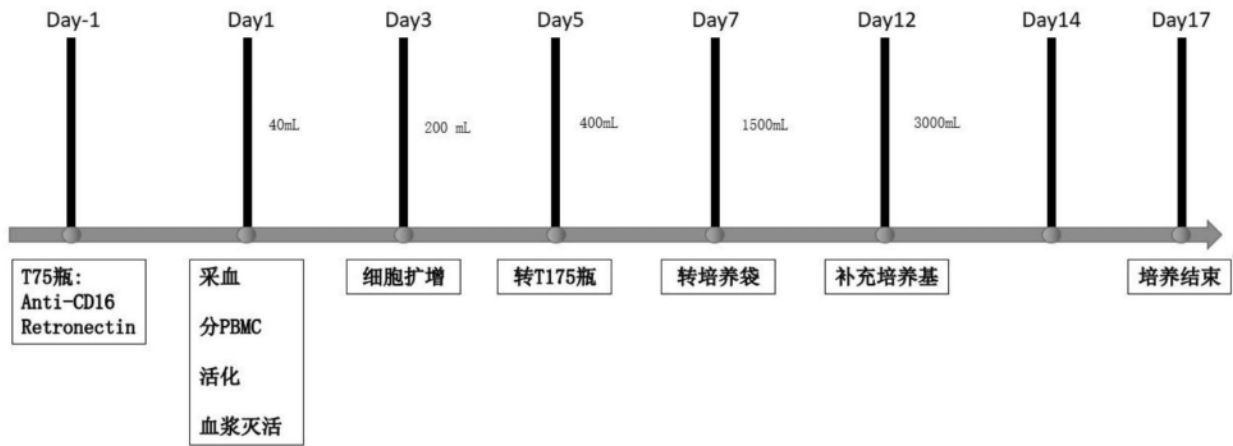


图1

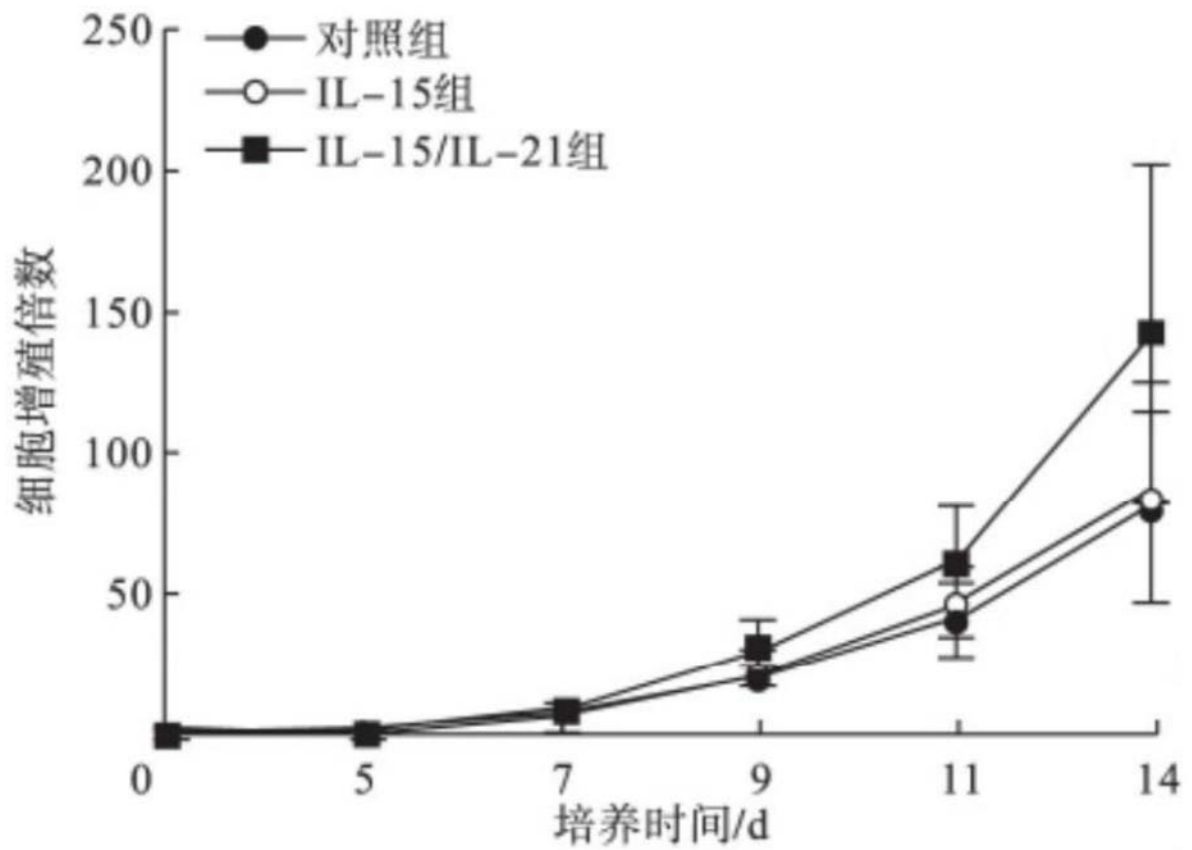


图2

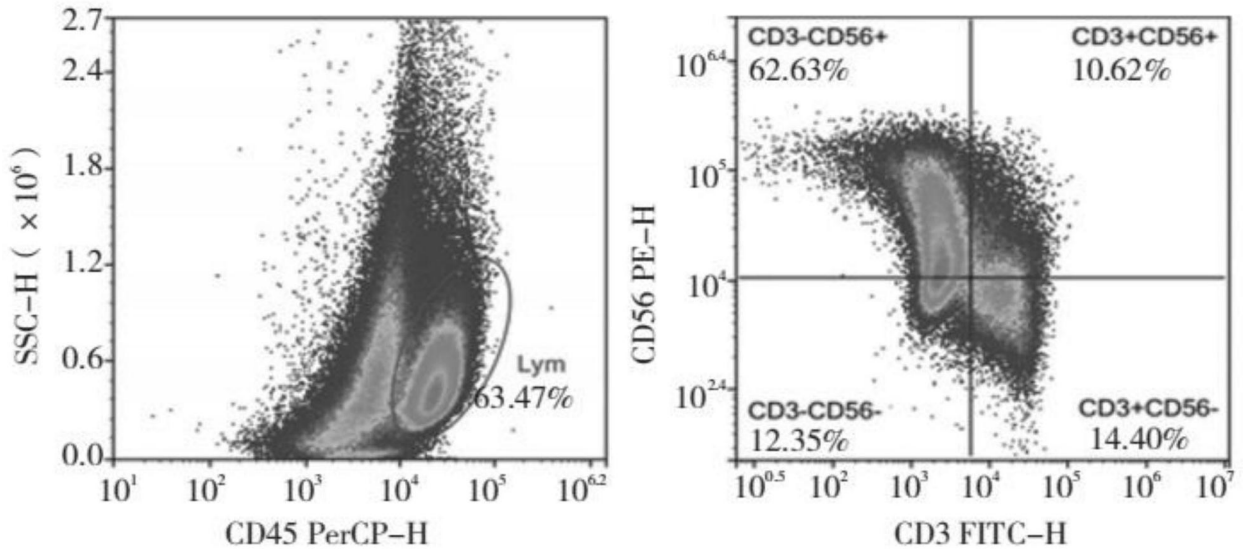


图3