



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112410294 A

(43) 申请公布日 2021.02.26

(21) 申请号 202011252392.2

(22) 申请日 2020.11.11

(71) 申请人 海南优尼科尔生物科技有限公司  
地址 570311 海南省海口市秀英区南海大道192号

(72) 发明人 王晓宇 林冠妃 郭康合 李崑  
蔡开婷 吴清毅 陈多峰

(74) 专利代理机构 北京盛凡智荣知识产权代理有限公司 11616

代理人 叶培辉

(51) Int. Cl.

C12N 5/0783 (2010.01)

C12N 5/078 (2010.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

一种外周血CIK细胞的扩增培养方法

(57) 摘要

本发明公开了一种外周血CIK细胞的扩增培养方法,包括以下步骤:外周血通过离心提取制备获得外周血单个核细胞,并取单个核细胞,加入到含有IFN- $\gamma$ 、IL-2、抗CD3单克隆抗体的完全初始培养液中诱导培养,其中,完全初始培养基为GT-T551H3细胞培养液;在细胞培养3天后,加入完全补液培养基继续扩增培养,其中,每隔2~3天添加补液培养基一次,整个诱导培养的时间为15~21天,得到所述CIK细胞。本发明属于细胞培养技术领域,具体是提供了一种增殖效果较好,有效提高该细胞的增殖活性和杀伤活性的外周血CIK细胞的扩增培养方法。

1. 一种外周血CIK细胞的扩增培养方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 制备外周血单个核细胞:外周血在初步离心得到血浆后,血细胞成份与生理盐水等量混匀加入到Ficoll细胞分离液上,经过离心,收集白膜层,再清洗离心收集,得到单个核细胞;

2) 单个核细胞培养:取步骤1)所得的单个核细胞加入到含有IFN- $\gamma$ 、IL-2、抗CD3单克隆抗体的完全初始培养液中诱导培养,完全初始培养基为GT-T551 H3细胞培养液;在细胞培养3天后,向培养体系中加入完全补液培养基继续扩增培养,每隔2~3天向培养体系中添加补液培养基一次,整个培养体系诱导培养的时间为15~21天,得到所述CIK细胞。

2. 根据权利要求1所述的一种外周血CIK细胞的扩增培养方法,其特征在于,所述单个核细胞以 $(0.5\sim 1.5)\times 10^6$ 个/mL的密度加入到完全初始培养液中培养。

3. 根据权利要求1所述的一种外周血CIK细胞的扩增培养方法,其特征在于,所述诱导培养体系中包括自体血浆。

4. 根据权利要求3所述的一种外周血CIK细胞的扩增培养方法,其特征在于,所述自体血浆在培养体系中的体积百分比为0%~20%。

5. 根据权利要求1所述的一种外周血CIK细胞的扩增培养方法,其特征在于,所述IFN- $\gamma$ 在细胞培养中的含量为100~1500U/mL;所述IL-2在细胞培养中的含量为100~1200U/mL;所述抗CD3单克隆抗体在细胞培养中的含量为10~100ng/mL。

6. 根据权利要求1所述的一种外周血CIK细胞的扩增培养方法,其特征在于,所述完全补液培养基还包括IL-2,IL-2的终浓度为100~1200U/mL。

7. 根据权利要求1所述的一种外周血CIK细胞的扩增培养方法,其特征在于,所述添加补液培养基根据细胞生长密度为 $(0.5\sim 1.5)\times 10^6$ 个/mL添加培养基。

8. 根据权利要求1所述的一种外周血CIK细胞的扩增培养方法,其特征在于,所述培养基可为免疫细胞培养基、GT-T551 H3培养基、GT-T551培养基、LONZA培养基、DKW培养基、RPMI-1640培养基。

9. 根据权利要求1所述的一种外周血CIK细胞的扩增培养方法,其特征在于,所述诱导培养细胞在细胞培养箱中进行。

10. 根据权利要求9所述的一种外周血CIK细胞的扩增培养方法,其特征在于,所述培养箱的培养温度为37 $^{\circ}$ C,培养箱内CO<sub>2</sub>的体积浓度为5%,所述培养时间为15~18天。

## 一种外周血CIK细胞的扩增培养方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于细胞培养技术领域,具体是指一种外周血CIK细胞的扩增培养方法。

### 背景技术

[0002] 近年来,随着免疫学及分子生物学对肿瘤治疗决策的深入研究,免疫效应细胞已成为治疗肿瘤疾病的第四大技术,受到医学界的广泛关注,其已成为肿瘤治疗领域的研究热点及突破口。CIK细胞是介导细胞毒活性最强的免疫效应细胞,也是最具发展前景的免疫细胞,在临床应用上被广泛发展。

[0003] CIK细胞即细胞因子诱导的杀伤细胞,同时具有NK细胞的非主要组织相容性复合物的限制性杀伤肿瘤效应及T细胞的高度杀伤肿瘤活性,并且可同时表达CD3和CD56两种膜蛋白分子。CIK细胞具有杀瘤活性高、增殖速度快及杀瘤谱广等优点,被现代医学认为是过继免疫治疗肿瘤的希望。CIK细胞免疫疗法可有效杀死肿瘤细胞,抑制肿瘤生长及转移,并且具有效果明显、不良反应小等特点。

[0004] 目前,CIK细胞的培养应用多是抽取患者外周血提取单个核细胞,经过细胞因子的诱导培养、扩增从而得到所述的CIK细胞。细胞因子诱导培养CIK细胞的方法是目前应用的最广泛也是最便捷的培养方法,但是各个因子的配伍以及因子的具体含量使用不一所获得的CIK细胞的数目、扩增效率及杀伤率也有很大的不同,现有技术中的外周血CIK培养方法,普遍存在扩增倍率低、细胞活性差等问题。

### 发明内容

[0005] 为解决上述现有难题,本发明提供了一种增殖效果较好,有效提高该细胞的增殖活性和杀伤活性的外周血CIK细胞的扩增培养方法。

[0006] 本发明采用的技术方案如下:一种外周血CIK细胞的扩增培养方法,包括以下步骤:

[0007] 1) 制备外周血单个核细胞:外周血在初步离心得到血浆后,血细胞成份与生理盐水等量混匀加入到Ficoll细胞分离液上,经过离心,收集白膜层,再清洗离心收集,得到单个核细胞;

[0008] 2) 单个核细胞培养:取步骤1)所得的单个核细胞加入到含有IFN- $\gamma$ 、IL-2、抗CD3单克隆抗体的完全初始培养液中诱导培养,完全初始培养基为GT-T551H3细胞培养液;在细胞培养3天后,向培养体系中加入完全补液培养基继续扩增培养,每隔2~3天向培养体系中添加补液培养基一次,整个培养体系诱导培养的时间为15~21天,得到所述CIK细胞。

[0009] 其中,IFN- $\gamma$ 、IL-2、抗CD3单克隆抗体均可从市场上购买得到,也可以自行制备。

[0010] 进一步地,所述单个核细胞以 $(0.5\sim 1.5)\times 10^6$ 个/mL的密度加入到完全初始培养液中培养,具体可以取密度为: $0.5\times 10^6$ 个/mL、 $0.6\times 10^6$ 个/mL、 $0.7\times 10^6$ 个/mL、 $0.8\times 10^6$ 个/mL、 $0.9\times 10^6$ 个/mL、 $1.0\times 10^6$ 个/mL、 $1.2\times 10^6$ 个/mL、 $1.3\times 10^6$ 个/mL、 $1.5\times 10^6$ 个/mL加入到培养液中进行培养。

- [0011] 进一步地,所述诱导培养体系中包括自体血浆。
- [0012] 进一步地,所述自体血浆在培养体系中的体积百分比为0%~20%。
- [0013] 进一步地,所述IFN- $\gamma$ 在细胞培养中的含量为100~1500U/mL;所述IL-2在细胞培养中的含量为100~1200U/mL;所述抗CD3单克隆抗体在细胞培养中的含量为10~100ng/mL。
- [0014] 进一步地,所述完全补液培养基还包括IL-2,IL-2的终浓度为100~1200U/mL。
- [0015] 进一步地,所述添加补液培养基根据细胞生长密度为 $(0.5\sim 1.5)\times 10^6$ 个/mL添加培养基,具体可以取密度为: $0.5\times 10^6$ 个/mL、 $0.6\times 10^6$ 个/mL、 $0.7\times 10^6$ 个/mL、 $0.8\times 10^6$ 个/mL、 $0.9\times 10^6$ 个/mL、 $1.0\times 10^6$ 个/mL、 $1.2\times 10^6$ 个/mL、 $1.3\times 10^6$ 个/mL、 $1.5\times 10^6$ 个/mL补充培养液进行培养。
- [0016] 进一步地,所述培养基可为免疫细胞培养基、GT-T551H3培养基、GT-T551培养基、LONZA培养基、DKW培养基、RPMI-1640培养基;该细胞培养基可以从市场上购买得到。
- [0017] 进一步地,所述诱导培养细胞在细胞培养箱中进行。
- [0018] 进一步地,所述培养箱的培养温度为37 $^{\circ}$ C,培养箱内CO<sub>2</sub>的体积浓度为5%,所述培养时间为15~18天。
- [0019] 采用上述方案本发明取得有益效果如下:本发明外周血CIK细胞的扩增培养方法,采用外周血单个核细胞作为原始细胞进行培养,获取方便简捷,操作简单,通过引入相关的细胞因子,成功获得杀伤活性更强,双阳细胞占比及增殖性更高的CIK细胞,是一种值得临床推荐的大量扩增外周血CIK的培养方法。

### 具体实施方式

[0020] 下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅是本发明的一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其它实施例,都属于本发明保护的范围。

#### [0021] 实施例1

[0022] 一种外周血CIK细胞的扩增培养方法,包括以下步骤:

[0023] 1) 外周血在初步离心得到血浆后,血细胞成份与生理盐水等量混匀加入到Ficoll细胞分离液上,经过离心,收集白膜层,再清洗离心收集,得到单个核细胞;

[0024] 2) 取步骤1)所得的单个核细胞培养,将单个核细胞以 $1.0\times 10^6$ 个/mL的密度加入到初始培养液中培养得细胞悬液;初始培养基为含有10%血浆的GT-T551H3培养基,所述初始培养液还包括IFN- $\gamma$ 、抗CD3单克隆抗体和IL-2,其中,IFN- $\gamma$ 、抗CD3单克隆抗体和IL-2为市售产品,IFN- $\gamma$ 、抗CD3单克隆抗体、IL-2的工作浓度分别为:1000U/mL、50ng/mL、1000U/mL;

[0025] 3) 将步骤2)所得细胞悬液放置于37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>条件下的培养箱中培养;

[0026] 4) 每天观察生长状况,在第3天开始补加补液培养基,使细胞密度保持在 $1.0\times 10^6$ 个/mL;补液培养基为含有10%血浆的GT-T551培养基,所述补液培养基还包括工作浓度为1000U/mL的IL-2;

[0027] 5) 隔天收集细胞计数,根据细胞密度 $(0.5\sim 1.5)\times 10^6$ 个/mL添加步骤4)的补液培

培养基,也可根据细胞的生长情况确定培养液补加的时间间隔,补液前保证细胞的密度不大 $4.5 \times 10^6$ /mL,补液后保证细胞密度为 $(0.5-1.5) \times 10^6$ 个/mL,直至补完3L的补液培养基;培养到16天收集细胞得到所述CIK细胞。

[0028] 实施例2

[0029] 一种外周血CIK细胞的扩增培养方法,包括以下步骤:

[0030] 1) 外周血在初步离心得到血浆后,血细胞成份与生理盐水等量混匀加入到Ficoll细胞分离液上,经过离心,收集白膜层,再清洗离心收集,得到单个核细胞;

[0031] 2) 取步骤1)所得的单个核细胞培养,将单个核细胞以 $0.5 \times 10^6$ 个/mL的密度加入到初始培养液中培养得细胞悬液;初始培养基为含有5%血浆的GT-T551H3培养基,所述初始培养液内还包括IFN- $\gamma$ 、抗CD3单克隆抗体和IL-2,其中,IFN- $\gamma$ 、抗CD3单克隆抗体和IL-2为市售产品,IFN- $\gamma$ 、抗CD3单克隆抗体、IL-2的工作浓度分别为:800U/mL、80ng/mL、1200U/mL;

[0032] 3) 将步骤2)所得细胞悬液放置于37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下的培养箱中培养;

[0033] 4) 每天观察生长状况,在第3天开始补加补液培养基,使细胞密度保持在 $0.5 \times 10^6$ 个/mL,补液培养基为含有5%血浆的GT-T551培养基,所述补液培养基还包括工作浓度为1200U/mL的IL-2;

[0034] 5) 隔天收集细胞计数,根据细胞密度 $(0.5-1.5) \times 10^6$ 个/mL添加步骤4)的补液培养基,也可根据细胞的生长情况确定培养液补加的时间间隔,补液前保证细胞的密度不大 $4.5 \times 10^6$ /mL,补液后保证细胞密度为 $(0.5-1.5) \times 10^6$ 个/mL,直至补完3L的补液培养基;培养到16天收集细胞得到所述CIK细胞。

[0035] 实施例3

[0036] 一种外周血CIK细胞的扩增培养方法,包括以下步骤:

[0037] 1) 外周血在初步离心得到血浆后,血细胞成份与生理盐水等量混匀加入到Ficoll细胞分离液上,经过离心,收集白膜层,再清洗离心收集,得到单个核细胞;

[0038] 2) 取步骤1)所得的单个核细胞培养,将单个核细胞以 $1.2 \times 10^6$ 个/mL的密度加入到初始培养液中培养得细胞悬液;初始培养基为含有12%血浆的GT-T551H3培养基,所述初始培养液还包括IFN- $\gamma$ 、抗CD3单克隆抗体和IL-2,其中,IFN- $\gamma$ 、抗CD3单克隆抗体和IL-2为市售产品,IFN- $\gamma$ 、抗CD3单克隆抗体、IL-2的工作浓度分别为:600U/mL、50ng/mL、800U/mL。

[0039] 3) 将步骤2)所得细胞悬液放置于37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下的培养箱中培养;

[0040] 4) 每天观察生长状况,在第3天开始补加补液培养基,使细胞密度保持在 $1.2 \times 10^6$ 个/mL;补液培养基为含有12%血浆的GT-T551培养基,所述补液培养基还包括工作浓度为800U/mL的IL-2;

[0041] 5) 隔天收集细胞计数,根据细胞密度 $(0.5-1.5) \times 10^6$ 个/mL添加步骤4)的补液培养基,也可根据细胞的生长情况确定培养液补加的时间间隔,补液前保证细胞的密度不大 $4.5 \times 10^6$ /mL,补液后保证细胞密度为 $(0.5-1.5) \times 10^6$ 个/mL,直至补完3L的补液培养基;培养到16天收集细胞得到所述CIK细胞。

[0042] 对比例

[0043] 一种外周血CIK细胞的扩增培养方法,包括以下步骤:

[0044] 1) 外周血在初步离心得到血浆后,血细胞成份与生理盐水等量混匀加入到Ficoll细胞分离液上,经过离心,收集白膜层,再清洗离心收集,得到单个核细胞;

[0045] 2) 取步骤1) 所得的单个核细胞培养,将单个核细胞以 $1.0 \times 10^6$ 个/mL的密度加入到初始培养液中培养得细胞悬液,初始培养基为GT-T551H3培养基;所述初始培养液还包括IFN- $\gamma$ 、抗CD3单克隆抗体和IL-2,IFN- $\gamma$ 、抗CD3单克隆抗体和IL-2为市售产品,其中IFN- $\gamma$ 、抗CD3单克隆抗体、IL-2的工作浓度分别为:500U/mL、20ng/mL、500U/mL;

[0046] 3) 将步骤2) 所得细胞悬液放置于37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下的培养箱中培养;

[0047] 4) 每天观察生长状况,在第3天开始补加补液培养基,使细胞密度保持在 $1.0 \times 10^6$ 个/mL;补液培养基为含有12%血浆的GT-T551培养基,所述补液培养基还包括工作浓度为500U/mL的IL-2;

[0048] 5) 隔天收集细胞计数,根据细胞密度 $(0.5-1.5) \times 10^6$ 个/mL添加步骤4) 的补液培养基,也可根据细胞的生长情况确定培养液补加的时间间隔,补液前保证细胞的密度不大 $4.5 \times 10^6$ /mL,补液后保证细胞密度为 $(0.5-1.5) \times 10^6$ 个/mL,直至补完3L的补液培养基,培养到16天收集细胞得所述CIK细胞。

[0049] 实施例1~3和对比例培养过程中,记录细胞增殖的数目,对实施例1~3和对比例培养得到的CIK细胞进行细胞表面抗原的检测,主要将细胞进行CD3和CD56标记通过流式细胞仪检测查看CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>双阳性表达率,将实施例1-3和对比例的细胞进行台盼蓝染色后,用血细胞计数板进行计数,计算细胞活率,细胞数则通过全自动血细胞计数仪X-100检测得到,结果显示如下表1;

[0050] 表1细胞数和细胞活率表

检测项 组别	培养前 PBMC 细胞数/ $\times 10^8$	培养后 CIK 细胞数/ $\times 10^8$	细胞活率%
[0051] 实施例 1	1.48	108.57	97.8
实施例 2	1.80	103.19	96.9
实施例 3	0.99	101.53	97.2
对比例	1.00	60.29	82.3

[0052] 从上述表格中可以得出实施例1-3组的细胞数远高于对比例,也就标明实施例的扩增倍数相较于对比例高,细胞的活率也高,其中实施例1的结果最佳,说明采用本发明实施例提供的培养方法进行CIK细胞培养扩增效果明显。

[0053] 以上所述仅仅只是本发明的优选的实施方式,应当表明的是,对于本技术领域的普通技术人员来说在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出许多种的改进方法,这些改进也应视作本发明的保护范围。