



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104789527 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 22

(21) 申请号 201510246516. 9

(22) 申请日 2015. 05. 15

(71) 申请人 江苏杰晟生物科技有限公司  
地址 225300 江苏省泰州市 (中国医药城)  
经济开发区寺巷镇富野村、帅于村 G14  
幢一层厂区西

(72) 发明人 王俊荣 宋现让

(51) Int. Cl.  
C12N 5/0783(2010. 01)  
A61K 35/17(2015. 01)  
A61P 35/00(2006. 01)  
A61P 35/02(2006. 01)

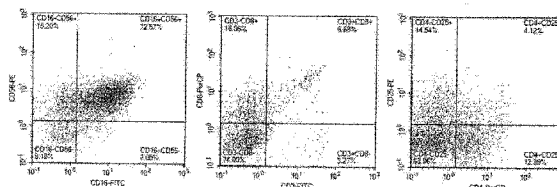
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

一种自体自然杀伤细胞鸡尾酒式培养的制备方法及其试剂盒产品

(57) 摘要

本发明提供了一种自体自然杀伤细胞鸡尾酒式培养的制备方法,其中包括如下特征:来自于癌症患者自身的外周血单个核细胞,在重组人白介素 15、重组人白介素 18、重组人白介素 21、重组人白介素 12、重组人白介素 7 以及重组人 MHC-I 类链相关分子 A 共同作用下激活了自然杀伤细胞增殖,并增强了自然杀伤细胞杀伤潜能;本发明还提供了一种含通过上述方法而得到的自体自然杀伤细胞鸡尾酒式培养的试剂盒,可用于临床大量获得自然杀伤细胞并进行抗肿瘤和抗病毒的治疗。



1. 一种自体自然杀伤细胞鸡尾酒式培养的制备方法,其特征在于,其包括如下步骤:来自于癌症患者 30ml 外周血的单个核细胞,在含有重组人白介素 15、重组人白介素 18、重组人白介素 21、重组人白介素 12、重组人白介素 7 以及重组人 MHC-I 类链相关分子 A 中三种以上细胞因子共同作用下激活自然杀伤细胞大量增殖,培养到 21 天细胞增殖倍数达到 1000 倍以上,所述 NK 细胞经流式细胞仪检测后 CD56<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> 表型均大于 80%, CD3<sup>+</sup> 细胞低于 10%,并增强自然杀伤细胞的杀伤活性;优选同时含有上述六种细胞因子。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述方法中患者自体外周血单个核细胞的鸡尾酒式培养体系,为细胞培养基中含有 1ng-500ng/ml 重组人白介素 15、1ng-500ng/ml 重组人白介素 18、1ng-500ng/ml 重组人白介素 21、1ng-500ng/ml 重组人白介素 12、1ng-500ng/ml 重组人白介素 7 以及 1ng-500ng/ml 重组人 MHC-I 类链相关分子 A 中三种以上细胞因子。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其特征在于,所述方法中患者自体外周血单个核细胞的鸡尾酒式培养体系,优选为细胞培养基中含有 10ng-50ng/ml 重组人白介素 15、10ng-50ng/ml 重组人白介素 18、10ng-50ng/ml 重组人白介素 21、10ng-50ng/ml 重组人白介素 12、10ng-50ng/ml 重组人白介素 7 以及 10ng-50ng/ml 重组人 MHC-I 类链相关分子 A 中三种以上细胞因子。

4. 根据权利要求 1-3 任一项所述的方法,其特征在于,所述制备自体杀伤细胞鸡尾酒式培养方法为:采集癌症患者 30ml 外周血,经淋巴细胞分离液密度梯度离心获得单个核细胞,将其在 32ml 的细胞培养基中,加入到细胞培养板中,在 37°C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养 5 天以上;其中,所述细胞培养基含有 5% 自体血浆、50ng/ml 重组人白介素 15、20ng/ml 重组人白介素 18、20ng/ml 重组人白介素 21、20ng/ml 重组人白介素 12、20ng/ml 重组人白介素 7 和 50ng/ml 重组人 MHC-I 类链相关分子 A 中三种以上细胞因子;

鸡尾酒式激活培养 5 天后,将自然杀伤细胞用 5mL 移液管吹打后,吸取至新的细胞培养瓶中,并补充 10-20mL 新鲜细胞培养基;在 37°C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养 2-3 天;将 NK 细胞转移到细胞培养袋中,并继续补充一倍体积的新鲜细胞培养基;在 37°C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养 2-3 天;然后自然杀伤细胞连续增殖培养到 21 天,使得细胞数达到 30×10<sup>9</sup> 以上;所述新鲜细胞培养基含 50-500 活性单位 /mL 重组人白介素 2。

5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的方法,其特征在于,所述细胞培养基为淋巴细胞无血清培养基或 RPMI1640 培养基加入 50-500 活性单位 /mL 重组人白介素 2 和体积比为 10% 的自体血清或胎牛血清;其含有 500 活性单位 /mL 重组人白介素 2。

6. 根据权利要求 1-5 任一项所述的方法,其特征在于,所述细胞培养基为淋巴细胞无血清培养基;优选,所述细胞培养基为 RPMI1640、CellGro@SCGM、Tex@MACS、KOHJIN@GT-T502、X-VIVO 或 GT-H551;其含有 500 活性单位 /mL 重组人白介素 2。

7. 一种自体自然杀伤细胞鸡尾酒式培养的制备方法,其特征在于,其包括如下步骤:分别采集肾细胞癌、肝癌、前列腺癌、乳腺癌和脑胶质母细胞瘤患者 30ml 外周血,经淋巴细胞分离液密度梯度离心获得 36×10<sup>6</sup> 单个核细胞,用 1.6ml 自体血浆重悬后,加入 32ml 的 CellGro@SCGM 细胞培养基,混匀后加入到 12 孔细胞培养板中,在 37°C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养 5 天以上;所述 CellGro@SCGM 细胞培养基含有 50ng/ml 重组人白介素 15、20ng/ml 重组人白介素 18、20ng/ml 重组人白介素 21 和 50ng/ml 重组人 MHC-I 类链相关分子 A;

鸡尾酒式激活培养 5 天后,将自然杀伤细胞用 5mL 移液管吹打后,吸取至新的细胞培养瓶中,并补充 20mL 新鲜细胞培养基,在 37°C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养 2-3 天;将 NK 细胞转移到细胞培养袋中,并继续补充一倍体积的新鲜细胞培养基,在 37°C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养 2-3 天;然后自然杀伤细胞连续增殖培养到 21 天,使得细胞数达到 30×10<sup>9</sup>以上;所述新鲜细胞培养基含 500 活性单位/mL 重组人白介素 2;

取 10uL NK 细胞液用 1×PBS 稀释 10 倍,稀释液加入 1 倍体积的苔盼兰溶液,混匀后加入到细胞计数板,于倒置显微镜下观察计数,蓝色染色的为死细胞,不染色的为活细胞,细胞活率均达到 98%以上;上述癌症患者的 NK 细胞培养到 21 天,细胞扩增倍数均高于 1000 倍,NK 细胞数均高于 30×10<sup>9</sup>;

取苔盼兰染色计数后的 0.6×10<sup>6</sup>NK 细胞,分三组,第一组分别添加到有 20 μL FITC 标记鼠抗人 CD8 单抗、20 μL PE 标记鼠抗人 CD56 单抗和 20 μL PerCP 标记鼠抗人 CD16 单抗;第二组分别添加 20 μL FITC 标记鼠抗人 CD3 单抗、20 μL PE 标记鼠抗人 CD4 单抗和 20 μL PerCP 标记鼠抗人 CD25 单抗;第三组为同型对照,分别添加到有 20 μL FITC 标记鼠 IgG1、20 μL PE 标记鼠 IgG1 和 20 μL PerCP 标记鼠 IgG1;置于 4°C 冰箱染色 30 分钟,然后用 1mL 的 1×磷酸盐缓冲液洗涤三次,最后用 0.5mL 的 1×PBS 重悬洗涤后的细胞,所得洗涤后的细胞用 FACS Calibur 流式细胞仪检测;肾细胞癌患者鸡尾酒式培养的 NK 细胞表型为 CD56+/CD16+ 细胞为 90.82%,而 CD3+ 细胞为 9.95%、CD3+/CD8+ 细胞为 6.68%和 CD4+/CD25+ 细胞为 4.12%;其他四位癌症患者的外周血单个核细胞经鸡尾酒式培养获得的 NK 细胞,同样流式细胞仪检测后 CD56+/CD16+ 表型均大于 80%,CD3+ 细胞低于 10%。

8. 一种鸡尾酒式制备自体自然杀伤细胞的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:

(1) 200ml 淋巴细胞分离液;

(2) 500ml 淋巴细胞无血清培养基;

(3) 鸡尾酒式培养试剂:权利要求 1-7 任一项所述的细胞因子;优选,10ng-50ng/ml 重组人白介素 15、10ng-50ng/ml 重组人白介素 18、10ng-50ng/ml 重组人白介素 21、10ng-50ng/ml 重组人白介素 12、10ng-50ng/ml 重组人白介素 7 以及 10ng-50ng/ml 重组人 MHC-I 类链相关分子 A 中三种以上细胞因子;

(4) 50-500 活性单位/mL 重组人白介素 2;

(5) 100ml 生理盐水;

(6) 使用说明书;

其中,所述使用说明书包括权利要求 1-7 任一项所述的方法。

9. 根据权利要求 8 所述的试剂盒,其中,所述鸡尾酒式培养试剂,优选地,自然杀伤细胞在 24 孔细胞培养板、12 孔细胞培养板或 6 孔细胞培养板中连续培养 5 天以上。

10. 权利要求 1-9 中任一项所述的自体自然杀伤细胞的应用。

## 一种自体自然杀伤细胞鸡尾酒式培养的制备方法及其试剂盒产品

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种鸡尾酒式制备自体自然杀伤细胞的方法,其中包括如下特征:其中包括如下特征:来自于癌症患者自身的外周血单个核细胞,在重组人白介素 15、重组人白介素 18、重组人白介素 21、重组人白介素 12、重组人白介素 7 以及重组人 MHC-I 类链相关分子 A 共同作用下激活自然杀伤细胞增殖,并增强自然杀伤细胞杀伤潜能;本发明还提供了一种含通过上述方法而得到的自体自然杀伤细胞鸡尾酒式培养的试剂盒,可在体外大量增殖获得自然杀伤细胞并具有杀伤活性,可用于各类癌症包括实体瘤和血液肿瘤在内的多个疗程的免疫治疗。

### 背景技术

[0002] 自然杀伤细胞 (Natural Killer cells, NK) 主要表达 CD16+/CD56+ 表型,是先天性免疫系统的重要组成部分,是机体抗感染免疫、抗肿瘤免疫及清除非己细胞的第一道防线。与 T 淋巴细胞不同,NK 细胞无需肿瘤特异性抗原识别便可以直接杀伤肿瘤细胞和病毒感染的细胞。NK 细胞功能的发挥由其细胞表面活化性受体和抑制性受体所传递的信号共同决定,但在癌症患者体内肿瘤细胞通过机体炎症分子抑制 NK 细胞表面活化性受体表达,表达抑制性受体从而逃避 NK 细胞杀伤。因而,激活 NK 细胞高表达活化性受体而活化其杀伤活性就至关重要了,NK 细胞对黑素瘤、肺癌、肾癌、结肠癌、乳腺癌、膀胱癌、肝癌和白血病等肿瘤治疗有明显疗效。

[0003] NK 细胞数量和杀伤功能与疗效直接相关,治疗中存在的问题在于获得大量 NK 细胞有限和培养时间过长。传统使用的白介素 2 激活生长倍数有限,端粒长度缩短,培养时间过长引起了 NK 细胞杀伤功能低下。目前,临床治疗用的 NK 细胞培养技术也有采用基因工程化和病毒转染的滋养细胞与 NK 细胞共培养后,激活 NK 细胞增殖和活化其杀伤功能。

[0004] 本发明提供了 NK 细胞鸡尾酒式培养方法,即在含有重组人白介素 15、重组人白介素 18、重组人白介素 21、重组人白介素 12、重组人白介素 7 以及重组人 MHC-I 类链相关分子 A 共同作用下大量扩增 NK 细胞,30ml 外周血来源单个核细胞培养至 21 天细胞增殖到  $30 \times 10^9$  以上,增殖倍数达到 1000 倍以上,NK 细胞杀瘤活性在 14-16 天达到最佳,培养过程中不需要基因工程化的滋养层细胞,简单快速,为患者临床治疗大大节约了时间,并发挥出最好的抗肿瘤作用,有助于提高临床疗效和延长患者生存期,而且可以大大降低细胞培养成本。

### 发明内容

[0005] 本发明针对能更好地从癌症患者自体的单个核细胞扩增获得 NK 细胞,逆转患者体内 NK 细胞免疫抑制而增强其杀伤活性。本发明通过前期研究实验发现鸡尾酒式培养方法,即在含有重组人白介素 15、重组人白介素 18、重组人白介素 21、重组人白介素 12、重组人白介素 7 以及重组人 MHC-I 类链相关分子 A 中三种以上细胞因子共同作用下诱导激活产

生 NK 细胞,培养至 21 天细胞增殖倍数达到 1000 倍以上,所述 NK 细胞经流式细胞仪检测后 CD56<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> 表型均大于 80%, CD3<sup>+</sup> 细胞低于 10%, 并具有很强杀伤活性。

[0006] NK 细胞发育依赖于白介素 15 (Interleukin-15, IL-15), 并促使组织中休眠的 NK 细胞达到效应阶段, 具有促进淋巴细胞和 NK 细胞增殖和增强它们生物活性的功能; IL-18、IL-21、IL-12、IL-7 和 MHC-I 类链相关分子 A 是与其受体结合后可以显著诱导了 NK 细胞的产生, 调节 NK 细胞的增殖、分化并能提高 NK 细胞杀伤活性对肿瘤完全排斥, 这些细胞因子联合作用对活化前的 NK 细胞功能是有效的诱导剂, 并协同 IL-15 促进骨髓前体细胞增殖和 NK 细胞增殖、分化和细胞毒活性, 使其能杀死 NK 敏感的和 NK 抗性的肿瘤细胞。本发明通过发挥这些细胞因子的协同作用机制, 激活 NK 细胞增殖和增强其杀伤活性, 抑制 NK 细胞中调节性 T 淋巴细胞的增殖和产生, 延长 NK 细胞端粒酶活性, 可产生对肿瘤细胞最佳的杀伤活性。

[0007] 本发明涉及体自然杀伤细胞鸡尾酒式培养的制备方法, 其中包括如下特征: 来自于癌症患者 30ml 外周血的单个核细胞, 在含有重组人白介素 15、重组人白介素 18、重组人白介素 21、重组人白介素 12、重组人白介素 7 以及重组人 MHC-I 类链相关分子 A 中三种以上细胞因子 (优选同时含有上述细胞因子) 共同作用下激活自然杀伤细胞大量增殖, 培养到 21 天细胞增殖倍数达到 1000 倍以上, 并增强自然杀伤细胞的杀伤活性。

[0008] 本发明所述的鸡尾酒式培养体系, 为细胞培养基中含有 1ng-500ng/ml 重组人白介素 15、1ng-500ng/ml 重组人白介素 18、1ng-500ng/ml 重组人白介素 21、1ng-500ng/ml 重组人白介素 12、1ng-500ng/ml 重组人白介素 7 以及 1ng-500ng/ml 重组人 MHC-I 类链相关分子 A 中三种以上细胞因子。鸡尾酒式培养体系优选为细胞培养基中含有 10ng-50ng/ml 重组人白介素 15、10ng-50ng/ml 重组人白介素 18、10ng-50ng/ml 重组人白介素 21、10ng-50ng/ml 重组人白介素 12、10ng-50ng/ml 重组人白介素 7 以及 10ng-50ng/ml 重组人 MHC-I 类链相关分子 A 中三种以上细胞因子。

[0009] 本发明所述制备自体杀伤细胞鸡尾酒式培养方法为: 采集癌症患者 30ml 外周血, 经淋巴细胞分离液密度梯度离心获得单个核细胞, 将其在 32ml 的细胞培养基 (含有 5% 自体血浆、50ng/ml 重组人白介素 15、20ng/ml 重组人白介素 18、20ng/ml 重组人白介素 21、20ng/ml 重组人白介素 12、20ng/ml 重组人白介素 7 和 50ng/ml 重组人 MHC-I 类链相关分子 A 中三种以上细胞因子) 中, 加入到细胞培养板中, 在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 5 天以上。

[0010] 鸡尾酒式激活培养 5 天后, 将自然杀伤细胞用 5mL 移液管吹打后, 吸取至新的细胞培养瓶中, 并补充 10-20mL 新鲜细胞培养基 (含 50-500 活性单位 /mL 重组人白介素 2), 在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 2-3 天; 将 NK 细胞转移到细胞培养袋中, 并继续补充一倍体积的新鲜细胞培养基 (含 50-500 活性单位 /mL 重组人白介素 2), 在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 2-3 天; 然后自然杀伤细胞连续增殖培养到 21 天, 使得细胞数达到 30×10<sup>9</sup> 以上。

[0011] 所述鸡尾酒式培养试剂, 优选地, 外周血单个核细胞在 24 孔细胞培养板、12 孔细胞培养板或 6 孔细胞培养板中连续培养 5 天以上, 诱导激活 NK 细胞。

[0012] 自然杀伤细胞优选地, 来源于癌症患者手术一个月后、放化疗一个月后采集的新鲜外周血。NK 细胞临床治疗中采取 1 个疗程 4-8 次的回输治疗, 即每周采集外周血 1 次, 应

用于 1 次 NK 细胞的回输,共完成 1 个疗程的 4-8 次的治疗。

[0013] 本发明使用的细胞培养基为淋巴细胞无血清培养基或 RPMI 1640 培养基加入 50-500 活性单位/mL 重组人白介素 2 和 10% (体积比) 自体血清或胎牛血清,优选地,细胞培养基为淋巴细胞无血清培养基,如 RPMI1640、CellGro<sup>®</sup>SCGM、Tex<sup>®</sup>MACS、KOHJIN<sup>®</sup>GT-T502、X-VIVO 和 GT-H551 等,含有 500 活性单位/mL 重组人白介素 2,该低浓度白介素 2 可促进 NK 细胞的增殖,维持 NK 细胞长期生长。

[0014] 本发明还提供了鸡尾酒式制备自体自然杀伤细胞的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:

[0015] (1) 200ml 淋巴细胞分离液;

[0016] (2) 500ml 淋巴细胞无血清培养基;

[0017] (3) 鸡尾酒式培养试剂:重组人白介素 15、重组人白介素 18、重组人白介素 21、重组人白介素 12、重组人白介素 7 以及重组人 MHC-I 类链相关分子 A 中三种以上细胞因子;优选,10ng-50ng/ml 重组人白介素 15、10ng-50ng/ml 重组人白介素 18、10ng-50ng/ml 重组人白介素 21、10ng-50ng/ml 重组人白介素 12、10ng-50ng/ml 重组人白介素 7 以及 10ng-50ng/ml 重组人 MHC-I 类链相关分子 A 中三种以上细胞因子;更优选,同时含有上述细胞因子;

[0018] (4) 50-500 活性单位/mL 重组人白介素 2;

[0019] (5) 100ml 生理盐水;

[0020] (6) 使用说明书;

[0021] 所述鸡尾酒式培养试剂,优选地,外周血单个核细胞在 24 孔细胞培养板、12 孔细胞培养板或 6 孔细胞培养板中连续培养 5 天以上,诱导激活 NK 细胞。

[0022] 本发明还提供了上述方法及其试剂盒制备 NK 细胞,可用于各类癌症包括实体瘤和血液肿瘤在内的临床免疫治疗。

## 附图说明

[0023] 图 1 表示本发明实施例一中鸡尾酒式培养 NK 细胞体外增殖倍数变化曲线图;

[0024] 图 2 表示流式细胞仪检测本发明实施例一中鸡尾酒式培养 NK 细胞表型结果图;

[0025] 图 3 表示本发明实施例一鸡尾酒式培养获得的 NK 细胞对肾细胞癌 (RCC925) 和脑胶质瘤 (U87MG) 体外杀伤毒性结果图;

[0026] 图 4 表示本发明制备的 NK 细胞对荷肝癌 SCID 裸鼠模型治疗完之后肿瘤大小变化曲线图。

## 具体实施方式

[0027] 本发明发现通过鸡尾酒式培养的制备方法,即在含有重组人白介素 15、重组人白介素 18、重组人白介素 21、重组人白介素 12、重组人白介素 7 以及重组人 MHC-I 类链相关分子 A 中三种以上细胞因子共同作用下能激活自然杀伤细胞大量增殖,并增强其杀伤活性;来源于患者 30ml 自体外周血单个核细胞,鸡尾酒式培养 NK 细胞至 21 天细胞增殖倍数达到 1000 倍以上,NK 细胞数达到  $30 \times 10^9$  以上满足临床治疗需要,并扩增后的 NK 细胞端粒酶活性增强,端粒长度增长,保持一个年轻状态的杀伤活性。

[0028] 对本发明涉及的一种自体自然杀伤细胞鸡尾酒式培养的制备方法进行具体说明。

本发明涉及采用含有重组人白介素 15、重组人白介素 18、重组人白介素 21、重组人白介素 12、重组人白介素 7 以及重组人 MHC-I 类链相关分子 A 中三种以上细胞因子（优选同时含有上述细胞因子）共同作用扩增激活自然杀伤细胞，使得 NK 细胞大量扩增，获得具有抗肿瘤作用的 NK 细胞。

[0029] 本发明涉及一种自体自然杀伤细胞增殖的制备方法，其特征在于，使用含有重组人白介素 15、重组人白介素 18、重组人白介素 21、重组人白介素 12、重组人白介素 7 以及重组人 MHC-I 类链相关分子 A 中三种以上细胞因子共同作用，扩增激活自然杀伤细胞，使自然杀伤细胞得以大量增殖。

[0030] 本发明所述鸡尾酒式培养体系，优选为细胞培养基中含有 1ng-500ng/ml 重组人白介素 15、1ng-500ng/ml 重组人白介素 18、1ng-500ng/ml 重组人白介素 21、1ng-500ng/ml 重组人白介素 12、1ng-500ng/ml 重组人白介素 7 以及 1ng-500ng/ml 重组人 MHC-I 类链相关分子 A 中三种以上细胞因子。鸡尾酒式培养体系优选为细胞培养基中含有 10ng-50ng/ml 重组人白介素 15、10ng-50ng/ml 重组人白介素 18、10ng-50ng/ml 重组人白介素 21、10ng-50ng/ml 重组人白介素 12、10ng-50ng/ml 重组人白介素 7 以及 10ng-50ng/ml 重组人 MHC-I 类链相关分子 A 中三种以上细胞因子。

[0031] 自然杀伤细胞优选地，来源于癌症患者手术一个月后、放化疗一个月后采集的新鲜外周血。

[0032] 本发明所述制备自体杀伤细胞鸡尾酒式培养方法为：采集癌症患者 30ml 外周血，经淋巴细胞分离液密度梯度离心获得单个核细胞，将其在 32ml 的细胞培养基（含有 5% 自体血浆、50ng/ml 重组人白介素 15、20ng/ml 重组人白介素 18、20ng/ml 重组人白介素 21、20ng/ml 重组人白介素 12、20ng/ml 重组人白介素 7 和 50ng/ml 重组人 MHC-I 类链相关分子 A 中三种以上细胞因子）中，加入到细胞培养板中，在 37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养 5 天以上。

[0033] 鸡尾酒式激活培养 5 天后，将自然杀伤细胞用 5ml 移液管吹打后，吸取至新的细胞培养瓶中，并补充 10-20ml 新鲜细胞培养基（含 50-500 活性单位 /ml 重组人白介素 2），在 37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养 2-3 天；将 NK 细胞转移到细胞培养袋中，并继续补充一倍体积的新鲜细胞培养基（含 50-500 活性单位 /ml 重组人白介素 2），在 37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养 2-3 天；然后自然杀伤细胞连续增殖培养到 21 天，使得细胞数达到 30×10<sup>9</sup>以上。

[0034] 所述鸡尾酒式培养试剂，优选地，外周血单个核细胞在 24 孔细胞培养板、12 孔细胞培养板或 6 孔细胞培养板中连续培养 5 天以上，诱导激活 NK 细胞。

[0035] 本发明使用的细胞培养基为淋巴细胞无血清培养基或 RPMI 1640 培养基加入 50-500 活性单位 /ml 重组人白介素 2 和 10%（体积比）自体血清或胎牛血清，优选地，细胞培养基为淋巴细胞无血清培养基，如 RPMI1640、CellGro<sup>®</sup>SCGM、Tex<sup>®</sup>MACS、KOHJIN<sup>®</sup>GT-T502、X-VIVO 和 GT-H551 等，含有 500 活性单位 /ml 重组人白介素 2。

[0036] 本发明还提供了鸡尾酒式制备自体自然杀伤细胞的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒包括：

[0037] (1) 200ml 淋巴细胞分离液；

[0038] (2) 500ml 淋巴细胞无血清培养基；

[0039] (3) 鸡尾酒式培养试剂:重组人白介素 15、重组人白介素 18、重组人白介素 21、重组人白介素 12、重组人白介素 7 以及重组人 MHC-I 类链相关分子 A 中三种以上细胞因子;优选,10ng-50ng/ml 重组人白介素 15、10ng-50ng/ml 重组人白介素 18、10ng-50ng/ml 重组人白介素 21、10ng-50ng/ml 重组人白介素 12、10ng-50ng/ml 重组人白介素 7 以及 10ng-50ng/ml 重组人 MHC-I 类链相关分子 A 中三种以上细胞因子;更优选同时含有上述细胞因子;

[0040] (4) 50-500 活性单位 /ml 重组人白介素 2;

[0041] (5) 100ml 生理盐水;

[0042] (6) 使用说明书;

[0043] 其中,所述使用说明书如上所述的方法。

[0044] 所述鸡尾酒式培养试剂,优选地,外周血单个核细胞在 24 孔细胞培养板、12 孔细胞培养板或 6 孔细胞培养板中连续培养 5 天以上,诱导激活 NK 细胞。

[0045] 作为本发明 NK 细胞扩增培养中使用的细胞培养板、细胞培养皿、培养瓶、细胞培养袋,可例举,为 75cm<sup>2</sup>细胞培养瓶、175cm<sup>2</sup>细胞培养瓶、250mL 细胞培养袋等细胞培养用器材(容器),均可用于本发明,优选细胞培养袋。

[0046] 本发明的制造方法中对 NK 细胞进行冻存,对冻存液无特殊限制,但优选例如为 50%小牛血清、40%细胞培养液和 10%二甲基亚砷,其中细胞培养液更优选为 NK 细胞培养液。

[0047] 在培养基中可以添加血清或血浆进行培养。它们在培养基中的添加量不受特殊限制,如大于 0 容量%至 20 容量%,且可以根据不同的培养阶段而改变血清或血浆的用量,优选为 5%(体积比)。例如,可以阶段性减少血清或血浆浓度来使用。另外,作为血清或血浆的来源,可以是自己(意味着与所培养的细胞来源相同)或非自己(意味着与所培养的细胞的来源不同)中的任一种,从安全性的观点出发,优选自己来源的血清或血浆。

[0048] 本发明的自体 NK 细胞增殖的制备使用上述各种成分及培养基来实施。本发明中使用的培养培养条件也没有特殊限制,可以使用通常的细胞培养中使用的条件。例如,可在 37℃、5% CO<sub>2</sub>等条件下培养。还可以实施如下等操作:间隔适当的时间添加新鲜培养基来稀释细胞培养液,或更换培养基,或更换细胞培养用器材等。

[0049] 本发明还提供 NK 细胞在临床应用中多次的抗肿瘤治疗,NK 细胞临床治疗中采取 1 个疗程 4-8 次的回输治疗,即每周采集外周血 1 次,应用于 1 次 NK 细胞的回输,共完成 1 个疗程的 4-8 次的治疗,将更好地在生物体内发挥抗肿瘤免疫应答,达到很好的治疗效果。此外,上述 NK 细胞还具有如下优点,多次 NK 细胞治疗将更好地引发 NK 细胞直接杀瘤活性和抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用,并分泌细胞因子发挥调节免疫和造血作用,产生高效、长期地抗肿瘤免疫效应,因此非常利于患者疗效的提高和生存期的延长。

[0050] 以下,结合实施例对本发明做更具体的描述,但本发明不限于此。

[0051] 实施例一

[0052] 鸡尾酒式培养自体自然杀伤细胞

[0053] 采集肾细胞癌、肝癌、前列腺癌、乳腺癌和脑胶质母细胞瘤患者 30ml 外周血(与其签署知情同意书),经淋巴细胞分离液密度梯度离心获得  $36 \times 10^6$  单个核细胞,用 1.6ml 自体血浆重悬后,加入 32ml 的 CellGro<sup>®</sup>SCGM 细胞培养基(含有 50ng/ml 重组人白介素 15、20ng/ml 重组人白介素 18、20ng/ml 重组人白介素 21 和 50ng/ml 重组人 MHC-I 类链相关分



子 A), 混匀后加入到 12 孔细胞培养板中, 在 37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养 5 天以上。

[0054] 鸡尾酒式激活培养 5 天后, 将自然杀伤细胞用 5mL 移液管吹打后, 吸取至新的细胞培养瓶中, 并补充 20mL 新鲜细胞培养基 (含 500 活性单位 /mL 重组人白介素 2), 在 37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养 2-3 天; 将 NK 细胞转移到细胞培养袋中, 并继续补充一倍体积的新鲜细胞培养基 (含 500 活性单位 /mL 重组人白介素 2), 在 37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养 2-3 天; 然后自然杀伤细胞连续增殖培养到 21 天, 使得细胞数达到  $30 \times 10^9$  以上。

[0055] 取 10 $\mu$ l NK 细胞液用 1 $\times$ PBS (pH7.4) 稀释 10 倍, 稀释液加入 1 倍体积的苔盼兰溶液, 混匀后加入到细胞计数板, 于倒置显微镜下观察计数, 蓝色染色的为死细胞, 不染色的为活细胞, 细胞活率均达到 98% 以上。图 1 结果显示, 随着 NK 细胞体外培养时间增加, 扩增倍数也不断增加, 五名癌症患者 NK 细胞培养到 21 天, 细胞扩增倍数均高于 1000 倍, 每位患者的 NK 细胞数均高于  $30 \times 10^9$ 。

[0056] 取苔盼兰染色计数后的  $0.6 \times 10^6$  NK 细胞, 分三组, 第一组分别添加到有 20  $\mu$  L FITC 标记鼠抗人 CD8 单抗、20  $\mu$  L PE 标记鼠抗人 CD56 单抗和 20  $\mu$  L PerCP 标记鼠抗人 CD16 单抗; 第二组分别添加 20  $\mu$  L FITC 标记鼠抗人 CD3 单抗、20  $\mu$  L PE 标记鼠抗人 CD4 单抗和 20  $\mu$  L PerCP 标记鼠抗人 CD25 单抗; 第三组为同型对照, 分别添加到有 20  $\mu$  L FITC 标记鼠 IgG1、20  $\mu$  L PE 标记鼠 IgG1 和 20  $\mu$  L PerCP 标记鼠 IgG1。置于 4℃ 冰箱染色 30 分钟, 然后用 1mL 的 1 $\times$  磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤三次, 最后用 0.5mL 的 1 $\times$ PBS 重悬洗涤后的细胞, 所得洗涤后的细胞用 FACS Calibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司) 检测。图 2 结果显示, 肾细胞癌患者鸡尾酒式培养的 NK 细胞表型为 CD56<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> 细胞为 90.82%, 而 CD3<sup>+</sup> 细胞为 9.95%、CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 细胞为 6.68% 和 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 细胞为 4.12%, 表明自体外周血单个核细胞经鸡尾酒式激活培养后获得 NK 细胞 CD56<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> 含量很高。

[0057] 其他四位癌症患者的外周血单个核细胞经鸡尾酒式培养获得的 NK 细胞, 同样流式细胞仪检测后 CD56<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> 表型均大于 80%, CD3<sup>+</sup> 细胞低于 10%。

[0058] 实施例二

[0059] 鸡尾酒式培养自体自然杀伤细胞的试剂盒

[0060] (1) 200ml 淋巴细胞分离液;

[0061] (2) 500ml 淋巴细胞无血清培养基;

[0062] (3) 鸡尾酒式培养试剂: 10ng-50ng/ml 重组人白介素 15、10ng-50ng/ml 重组人白介素 18、10ng-50ng/ml 重组人白介素 21、10ng-50ng/ml 重组人白介素 12、10ng-50ng/ml 重组人白介素 7 以及 10ng-50ng/ml 重组人 MHC-I 类链相关分子 A 中三种以上细胞因子;

[0063] (4) 50-500 活性单位 /mL 重组人白介素 2;

[0064] (5) 100ml 生理盐水;

[0065] (6) 使用说明书;

[0066] 其中, 所述使用说明书包括实施例 1 所述的方法。

[0067] 分装后进行包装, 得到鸡尾酒式培养自体自然杀伤细胞的试剂盒。

[0068] 实施例三

[0069] NK 细胞体外杀瘤试验

[0070] 选择相应的肾细胞癌 (RCC925) 和脑胶质瘤 (U87MG) 作为靶细胞, 靶细胞用 RPMI 1640 (含 10% 小牛血清) 重悬到  $2 \times 10^5$  的浓度, 以每孔  $2 \times 10^4$  个标记的靶细胞 (0.1mL) 添

加到 96 孔板的孔中。

[0071] 根据细胞免疫学杂志报道的共表达 4-1BBL 和鼠 MICA 的工程化 K562 细胞联合可溶性 IL-21 增殖 NK 细胞培养 (Bo Jiang, Xuan Wu, Xi-ning Li, et al. Expansion of NK cells by engineered K562 cells co-expressing 4-1BBL and mMICA, combined with soluble IL-21. Cellular Immunology 290(2014) :10-20) 中的现有技术, 制备 NK 细胞作为对比例。

[0072] 将实施例一中制备的 NK 细胞和现有技术制备的 NK 细胞作为效应细胞, 分别以 2.5 : 1, 5 : 1, 10 : 1, 20 : 1 和 40 : 1 的效靶比加入对应的孔中, 在 37℃ 孵育 4 小时。孵育后, 用通过 CytoTox 96 非放射性细胞毒性试剂盒检测乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 释放分析的 (美国 Promega 公司)。效应细胞和靶细胞比例为 2.5 : 1, 5 : 1, 10 : 1, 20 : 1 与 40 : 1, 依据下面公式进行计算细胞毒性活性的。

[0073]

$$\% \text{ 细胞毒性} = \frac{\text{实验组 OD 值} - \text{效应细胞自发 OD 值} - \text{靶细胞自发 OD 值}}{\text{靶细胞最大 OD 值} - \text{靶细胞自发 OD 值}} \times 100\%$$

[0074] 图 3 显示了由实施例一获得的 NK 细胞, 对肾细胞癌 (RCC925) 和脑胶质瘤 (U87MG) 产生抗肿瘤免疫应答, 随着效靶比不断提高, 对肿瘤细胞产生的 CTL 应答也特异升高。并且由本发明制备的 NK 细胞毒性活性与现有技术制备的 NK 细胞无明显差异, 均具有很强杀伤肿瘤细胞的活性。

[0075] 实施例五

[0076] NK 细胞体内杀瘤实验中的作用

[0077] 肝癌细胞系 SMMC-7721 建立荷肝癌鼠模型, 随机分为 A、B 和 C3 组, 每组 6 只 : A 组为使用实施例一制备的 NK 细胞治疗组 ; B 组为现有技术制备的 NK 细胞治疗组 ; C 组为同体积生理盐水空白组。A、B 和 C3 组在第 0 天荷瘤鼠模型尾静脉注射  $1 \times 10^6$  个 /kg NK 细胞, 各 1mL, 间隔 7 天后再同样剂量免疫 3 次。注射后分别于 7、14、21、28、35d 计算鼠模型荷瘤大小, C 组于相同时间点在皮下注射 1mL 生理盐水并计算鼠模型荷瘤大小。

[0078] 治疗完之后分别于 7d、14d、21d、28d 和 35d 拉颈处死, 取肝癌细胞系 SMMC-7721 SCID 裸鼠模型肿瘤组织, 计算鼠模型荷瘤大小 ( $\text{mm}^3, \bar{x} \pm \bar{s}$ )。图 4 中荷肝癌 SCID 裸鼠模型治疗完之后肿瘤大小变化曲线, 结果显示空白组和治疗组 A 与治疗组 B 相比, 治疗组 A 与治疗组 B 中肝癌肿瘤大小大大缩小, 明显地抑制肝癌的生长, 因而有关实施例一所得 NK 细胞引发了良好的体内杀瘤活性, 与现行技术制备的 NK 细胞的杀伤活性无差异。

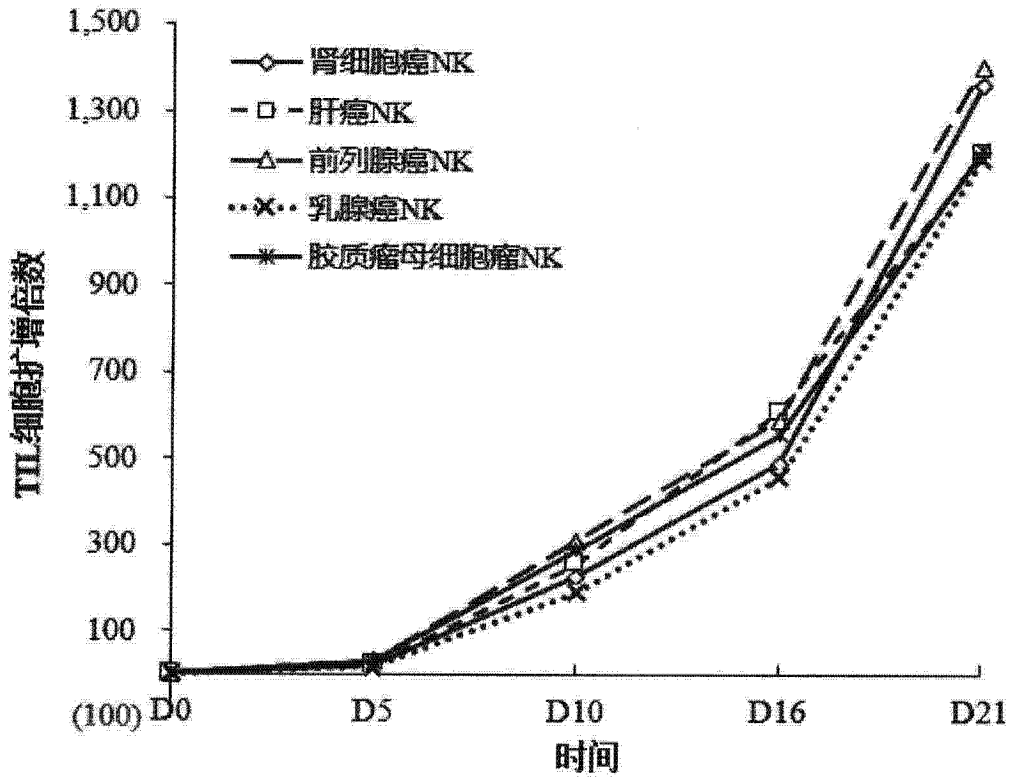


图 1

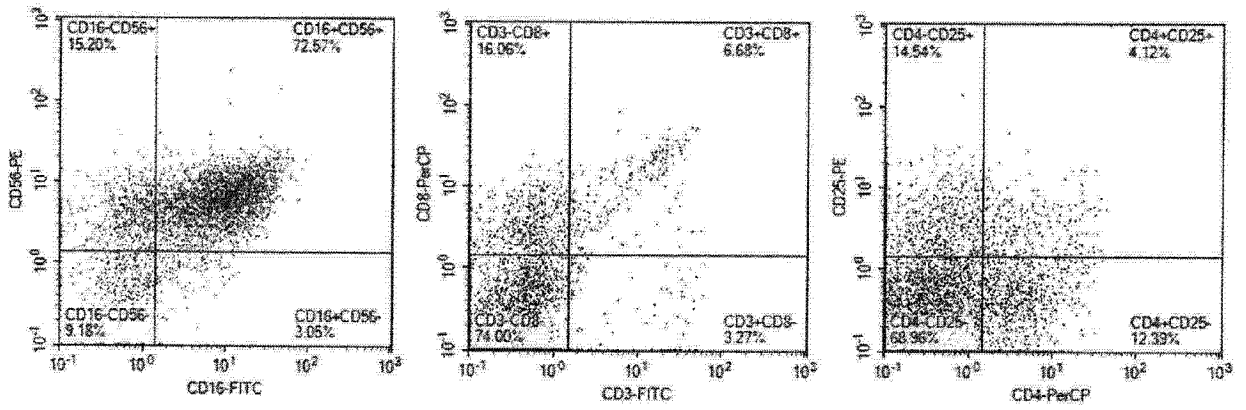


图 2

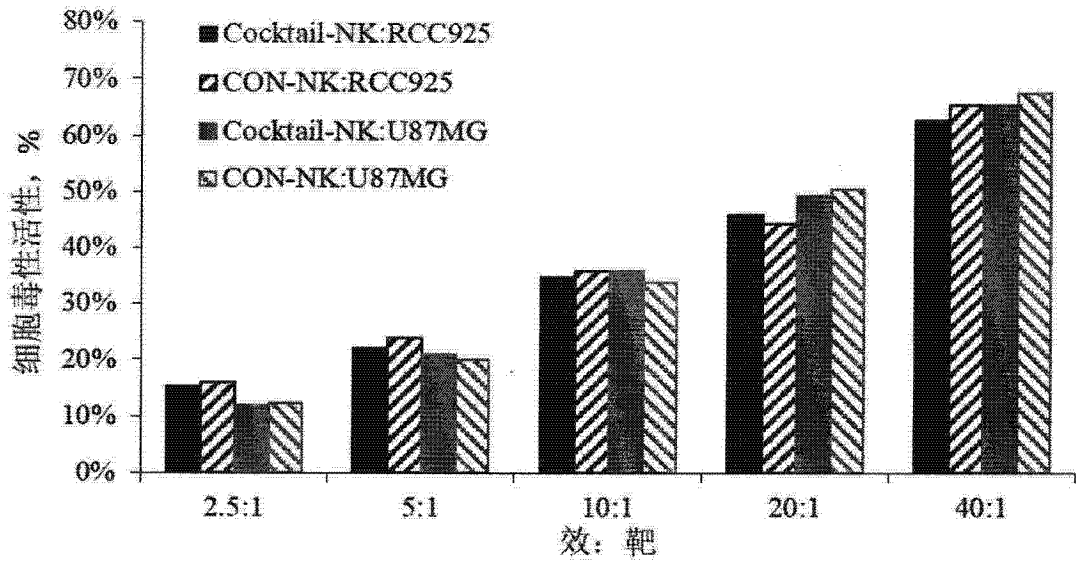


图 3

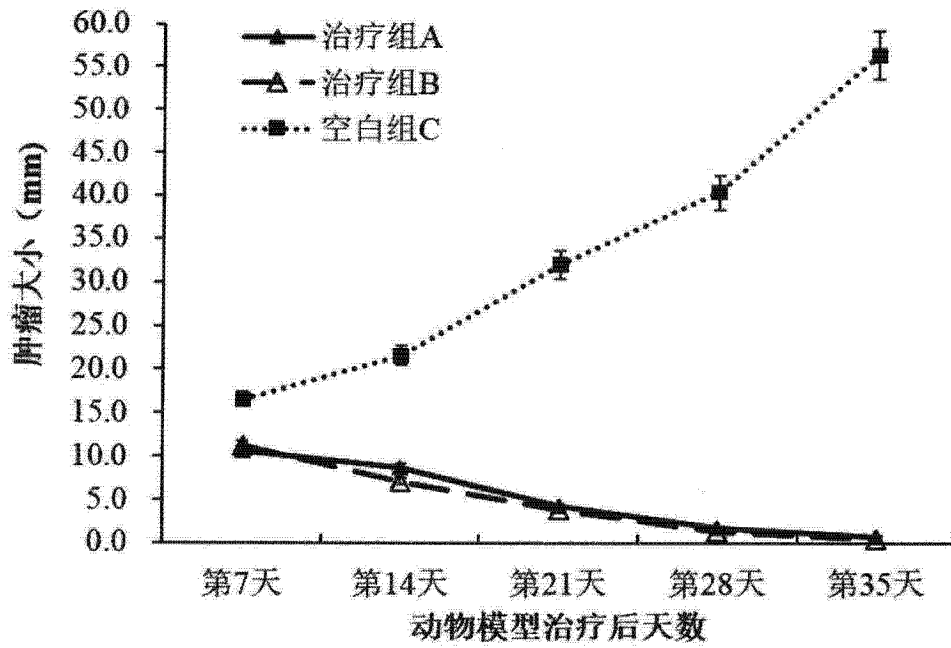


图 4