



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108699523 B

(45) 授权公告日 2022.04.19

(21) 申请号 201680081904.9

(72) 发明人 申东赫

(22) 申请日 2016.12.28

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 108699523 A

代理人 刘成春 安玉

(43) 申请公布日 2018.10.23

(51) Int.Cl.

(30) 优先权数据

C12N 5/0783 (2006.01)

10-2016-0017073 2016.02.15 KR

G07K 16/28 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2018.08.15

(56) 对比文件

CN 101603028 A, 2009.12.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2016/015392 2016.12.28

CN 101603029 A, 2009.12.16

CN 103080302 A, 2013.05.01

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2017/142187 KO 2017.08.24

US 2013295671 A1, 2013.11.07

KR 20090127973 A, 2009.12.15

CN 104928243 A, 2015.09.23

(73) 专利权人 申东赫

审查员 申延昊

地址 韩国京畿道

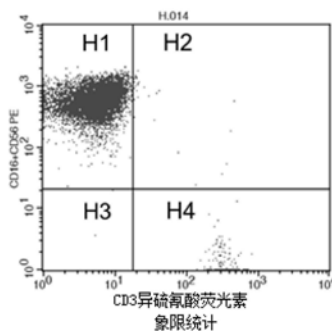
权利要求书2页 说明书12页 附图4页

(54) 发明名称

NK细胞培养用培养基添加试剂盒及利用所述试剂盒的NK细胞培养方法

(57) 摘要

本发明涉及一种适用于免疫疗法的自然杀伤细胞(Natural Killer cell;NK细胞)培养方法,更具体而言,涉及一种NK细胞培养用培养基添加试剂盒及利用所述试剂盒的NK细胞培养方法,通过培养来自人外周血的淋巴细胞,能够高效地扩增及激活在恶性肿瘤治疗中效果卓越的NK细胞,同时NK细胞所占比例能够得到显著增加。



文件: K 014 Log数据单元: 线性 V8  
样品编号: 病人编号:  
管: 无标题 面板: 无标题采样  
采样日: 15年8月11日 封闭: G1  
封闭项目: 8463 总项目: 10000  
X参数: CD3异硫氰酸荧光素 (Log) Y参数: CD16+CD5  
象限定位: 18, 21

象限	项目	%封闭	%总和
UL	8278	97.81	82.78
UR	31	0.37	0.31
LL	2	0.02	0.02
LR	152	1.80	1.52

1. 一种NK细胞培养用培养基添加试剂盒,其特征在于,包括:

B单元,由基础溶液构成,所述基础溶液包含IL-2、L-谷氨酰胺及培养细胞用培养基;

C1单元,由第一细胞因子溶液构成,所述第一细胞因子溶液通过将IL-12及IL-18溶解于所述基础溶液中,以使以0.5~5ng/mL的浓度包含所述IL-12,以2~50ng/mL的浓度包含所述IL-18来形成;

C2单元,由第二细胞因子溶液构成,所述第二细胞因子溶液通过将IL-15溶解于所述基础溶液中,以使以10~50ng/mL的浓度包含所述IL-15来形成;

A1单元,所述A1单元是第一抗体溶液,所述第一抗体溶液通过将抗CD16抗体及抗CD56抗体溶解于所述基础溶液中,以使分别以0.1~15ug/mL的浓度包含所述抗CD16抗体及抗CD56抗体来形成;

A2单元,所述A2单元是第二抗体溶液,所述第二抗体溶液以所述第一抗体溶液:所述基础溶液的容积比为1:6~10包含所述第一抗体溶液和所述基础溶液;以及

D单元,所述D单元是抗体-细胞因子混合溶液,所述抗体-细胞因子混合溶液通过将抗CD3抗体溶解于所述第一细胞因子溶液中,以使以1~12ug/mL浓度包含所述抗CD3抗体来形成。

2. 根据权利要求1所述的NK细胞培养用培养基添加试剂盒,其特征在于,

将所述A1单元中的所述抗CD16抗体、抗CD56抗体及所述基础溶液进行分开包装,在培养基添加步骤中进行混合来形成所述第一抗体溶液。

3. 根据权利要求1所述的NK细胞培养用培养基添加试剂盒,其特征在于,

分别将所述A2单元中的所述第一抗体溶液的抗CD16抗体、抗CD56抗体以及所述基础溶液与包含在所述A2单元中的所述第一抗体溶液的所述基础溶液进行分开包装,在培养基添加步骤中进行混合来形成所述第二抗体溶液。

4. 根据权利要求1所述的NK细胞培养用培养基添加试剂盒,其特征在于,

分别将所述D单元中的抗CD3抗体及所述第一细胞因子溶液进行分开包装,在培养基添加步骤中进行混合来形成所述抗体-细胞因子混合溶液。

5. 根据权利要求1所述的NK细胞培养用培养基添加试剂盒,其特征在于,

所述多个单元以A1单元、D单元、C1单元、A2单元、C2单元、A2单元及B单元的顺序添加至淋巴细胞培养基中。

6. 一种使用权利要求1-5中任一项所述的NK细胞培养用培养基添加试剂盒的NK细胞培养方法,其特征在于,包括:

第一步骤,在分离出的淋巴细胞中添加A1单元的第一抗体溶液之后,添加自身血浆;

第二步骤,在执行所述第一步骤的培养基中添加D单元的抗体-细胞因子混合溶液;

第三步骤,在执行所述第二步骤的培养基中添加C1单元的第一细胞因子溶液之后,添加自身血浆或FBS;

第四步骤,在执行所述第三步骤的培养基中添加A2单元的第二抗体溶液之后,添加自身血浆或FBS;

第五步骤,在执行所述第四步骤的培养基中添加C2单元的第二细胞因子溶液之后,添加自身血浆或FBS;

第六步骤,在执行所述第五步骤培养基中添加第三抗体溶液及自身血浆或FBS,其中所

述第三抗体溶液是所述第二抗体溶液的一部分;以及

第七步骤,在执行所述第六步骤的培养基中添加B单元的基础溶液及自身血浆或FBS;

其中所述B单元、所述C1单元、所述C2单元、所述A1单元、所述A2单元和所述D单元如权利要求1所限定;以及

其中所述D单元的所述抗CD3抗体在所述方法的步骤期间未固定化。

7. 根据权利要求6所述的NK细胞培养方法,其特征在于,

所述自身血浆每1ml血浆包含40usp unit以上的肝素。

8. 根据权利要求6所述的NK细胞培养方法,其特征在于,

所述添加的自身血浆或FBS的含量不到整个培养基的10容积%。

9. 根据权利要求6所述的NK细胞培养方法,其特征在于,

执行所述第一步骤之后到执行第二步骤为止隔着24小时以上的间隔。

10. 一种NK细胞培养液,其特征在于,使用由权利要求1至5中任一项所述的培养基添加试剂盒培养的NK细胞培养液或者通过权利要求6至9中任一项所述的培养方法进行培养。

11. 根据权利要求10所述的NK细胞培养液,其特征在于,

所述NK细胞培养液通过培养8日以下来获得,所述NK细胞培养液中所含的细胞数为 $5 \times 10^7$ 以上。

12. 根据权利要求10所述的NK细胞培养液,其特征在于,

所述NK细胞培养液中所含的细胞数为 $2 \times 10^9$ 以上,其中,NK细胞的比例为80%以上。

## NK细胞培养用培养基添加试剂盒及利用所述试剂盒的NK细胞培养方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种适用于免疫疗法的自然杀伤细胞 (Natural Killer cell; NK细胞) 培养方法, 更具体而言, 涉及一种NK细胞培养用培养基添加试剂盒及利用所述试剂盒的NK细胞培养方法, 通过培养来自人外周血的淋巴细胞, 能够高效地扩增及激活在恶性肿瘤治疗中效果卓越的NK细胞, 同时NK细胞所占比例能够得到显著增加。

### 背景技术

[0002] 免疫疗法, 作为从患者的血液中提取自然杀伤细胞 (NK细胞: Natural Killer cell)、树突状细胞 (DC)、B细胞及T细胞等癌症治疗中最重要的免疫细胞之后, 利用多种刺激剂, 培养强作用于癌症的免疫细胞后, 再次注射给患者的方法, 由于使用患者自身的血液, 因此与现有的化学疗法等相比, 副作用小、给药方法也简便, 因此近年来活跃地进行对此的研究。

[0003] 在免疫疗法中被激活的免疫细胞中, 尤其NK细胞作为淋巴细胞的一种特征性形态的大颗粒淋巴细胞 (LGL, Large granular lymphocytes), 具有杀死被感染的病毒及肿瘤细胞的能力卓越, 且不杀死大部分正常细胞的特性, 所述NK细胞的抗肿瘤作用通过坏死 (necrosis) 或细胞凋亡 (apoptosis), 或通过同时产生这两种作用机理来实现。NK细胞与IL-2、IL-12及干扰素 (Interferon) 等细胞因子 (cytokine) 反应, 由此提高细胞毒性 (cytotoxicity)、分泌性 (secretory) 及增殖性 (proliferative) 机能。在人体中, NK细胞的表现型 (phenotype) 为CD16 (Fc  $\gamma$  RIII) 及CD56, 由于细胞表面上没有T细胞受体复合物 (TRC, T-cell receptor complex), 因此CD16及CD56作为对于NK细胞的标志物 (marker) 来应用。

[0004] 已知这种NK细胞在早期生物防御机制及人体的肿瘤免疫中发挥重要的作用。即, NK细胞没有随主要组织相容性复合体 (MHC, Major Histocompatibility Complex) 表达的免疫获得过程也能够杀伤特定自体细胞、同种异体细胞、甚至异种癌症细胞, 尤其更能够杀死Class1 MHC的表达少或不表达的靶细胞。因此, NK细胞能够有效地杀死不表达MHC的大部分癌症细胞, 除此之外能够杀死被一些病毒感染的细胞及伤寒杆菌 (*salmonella typhi*) 等细菌。

[0005] 但是, 如此对癌症细胞的杀伤具有卓越作用的NK细胞, 即使在正常人体中仅占外周血淋巴细胞的5~15%, 尤其在癌症患者的情况下, 该比例降至不到1%, 因此若无通过免疫疗法的额外的扩增过程, 则有效攻击癌症细胞具有局限性。

[0006] 在激活并增殖免疫细胞, 尤其激活并增殖NK细胞的过程中, 使用IL-2等细胞因子及CD3等抗体。虽然CD3抗体在现有技术的免疫细胞增殖过程中发挥非常重要的作用, 但问题在于, 利用该抗体来激活免疫细胞非常苛刻。即, 培养免疫细胞时, 当前的通常技术主要使用使CD3抗体在烧瓶中固定化并刺激一定时间的方法。但是, 对于免疫细胞而言, 每个人的感受性不同, 且根据细胞培养条件或工作人员的熟练程度, 出现非常大的差异。例如, 若

CD3抗体的刺激少或几乎没有刺激,则免疫细胞不能很好地增殖。另外,若过多刺激,则NK细胞几乎不增殖,而NKT细胞或T细胞大量增殖。在该情况下,尤其T细胞大量增殖,因此很难大量增殖并获得NK细胞。

[0007] 尤其,若从一开始对CD3抗体施加强刺激,则未成熟祖细胞成熟为T细胞,因此通常实施的现有方法是使用一开始稍微刺激CD3抗体的方法,但多取决于个人差异等周边环境要件,因此难以获得被激活并大量增殖的NK细胞。

[0008] 因此,现状为,兴起开发免去在现有方法中必须使CD3抗体在烧瓶中固定化后反应一定时间的繁琐,且使NK细胞稳定地扩增,从而能够大量地增殖的新的培养基组合物及培养方法的必要性。

## 发明内容

[0009] 发明要解决的问题

[0010] 本发明人为了解决如上所述的课题而努力研究的结果,通过开发即使不实施抗CD3抗体固定并反应一定时间之后去除的工序,也能够使淋巴细胞培养液中稳定地扩增NK细胞的方法,从而完成了本发明。

[0011] 因此,本发明的目的在于提供一种NK细胞培养用培养基添加试剂盒,其具有如下组成:免去为了刺激淋巴细胞而使抗CD3抗体在培养容器中固定化,并以该状态将淋巴细胞(免疫细胞)培养一定时间的繁琐过程,且在最终获得的淋巴细胞培养液中使NK细胞稳定地扩增,从而能够大量地增殖。

[0012] 本发明的另一目的在于,提供一种NK细胞培养方法,通过依次使用构成培养基添加试剂盒中单元的添加剂,即通过对刺激淋巴细胞的顺序进行特定,从而在最终获得的淋巴细胞培养液中T细胞的比重低,NK细胞的比重显著地高且稳定。

[0013] 本发明的又一目的在于,提供一种NK细胞培养用培养基添加试剂盒及培养方法,通过对培养步骤中应添加,以便能够使NK细胞在淋巴细胞培养时进行显著高比例的增殖的培养基添加剂进行规格化,从而能够极其容易地培养NK细胞。

[0014] 本发明的目的不限于以上所提及的目的,并且本领域的技术人员根据以下的记载能够明确地理解未提及的其他目的。

[0015] 用于解决问题的手段

[0016] 为了实现上述的本发明的目的,本发明提供一种NK细胞培养用培养基添加试剂盒,包括:B单元(IL-2为约3600IU/mL,L-谷氨酰胺(L-glutamine)为5uM/mL),由基础溶液构成,所述基础溶液包含IL-2、L-谷氨酰胺及培养细胞用培养基;C1单元,由第一细胞因子溶液构成,所述第一细胞因子溶液通过将IL-12及IL-18溶解于所述基础溶液中,以使以0.5~5ng/mL浓度包含所述IL-12,以2~50ng/mL浓度包含所述IL-18来形成;C2单元,由第二细胞因子溶液构成,所述第二细胞因子溶液通过将IL-15溶解于所述基础溶液中,以使以10~50ng/mL浓度包含所述IL-15来形成;A1单元,由第一抗体溶液构成,所述第一抗体溶液通过将抗CD16及抗CD56溶解于所述基础溶液中,以使分别以0.1~15ug/mL浓度包含所述抗CD16及抗CD56来形成;A2单元,由第二抗体溶液构成,所述第二抗体溶液以所述第一抗体溶液:所述基础溶液为1:6~10的容积比包含所述第一抗体溶液和所述基础溶液;以及D单元,由抗体-细胞因子混合溶液构成,所述抗体-细胞因子混合溶液通过将抗CD3溶解于所述第一

细胞因子溶液中,以使以1~12ug/mL浓度包含所述抗CD3来形成。

[0017] 在优选的实施例中,所述A1单元比所述D单元淋巴细胞先添加至培养基中。

[0018] 在优选的实施例中,将所述A1单元中的所述抗CD16、抗CD56及所述基础溶液进行分开包装,在培养基添加步骤中进行混合来形成所述第一抗体溶液。

[0019] 在优选的实施例中,分别将所述A2单元中的所述第一抗体溶液的抗CD16、抗CD56及所述基础溶液与所述基础溶液进行分开包装,在培养基添加步骤中进行混合来形成所述第二抗体溶液。

[0020] 在优选的实施例中,分别将所述D单元中的抗CD3及所述第一细胞因子溶液进行分开包装,在培养基添加步骤中进行混合来形成所述抗体-细胞因子混合溶液。

[0021] 在优选的实施例中,所述多个单元以A1单元、D单元、C1单元、A2单元、C2单元、A2单元及B单元的顺序添加至淋巴细胞培养基中。

[0022] 另外,本发明提供一种NK细胞培养方法,包括:第一步骤,在分离出的淋巴细胞中添加A1单元的第一抗体溶液之后,添加自身血浆;第二步骤,在执行所述第一步骤的培养基中添加D单元的抗体-细胞因子混合溶液;第三步骤,在执行所述第二步骤的培养基中添加C1单元的第一细胞因子溶液之后,添加自身血浆;第四步骤,在执行所述第三步骤的培养基中添加A2单元的第二抗体溶液之后,添加自身血浆、FBS或与此类似的物质;第五步骤,在执行所述第四步骤的培养基中添加C2单元的第二细胞因子溶液之后,添加自身血浆、FBS或与此类似的物质;第六步骤,在执行所述第五步骤培养基添加第三抗体溶液及自身血、FBS或与此类似的物质;以及第七步骤,在执行所述第六步骤的培养基添加B单元的基础溶液及自身血浆、FBS或与此类似的物质。

[0023] 在优选的实施例中,所述第三抗体溶液使用构成所述A2单元的第二抗体溶液的一部分。

[0024] 在优选的实施例中,所述自身血浆每1ml血液包含40usp unit以上的肝素。

[0025] 在优选的实施例中,所述添加的自身血浆或FBS的含量不到整个培养基的10容积%。

[0026] 在优选的实施例中,执行第一步骤之后到执行第二步骤为止隔着24小时以上的间隔。

[0027] 在优选的实施例中,所述第四步骤及所述第六步骤分别在比之前步骤具有更大容积的培养容器中进行培养。

[0028] 另外,本发明提供一种NK细胞培养液,其使用由所述的任一培养基添加试剂盒培养的NK细胞培养液或者通过任一培养方法进行培养。

[0029] 在优选的实施例中,所述NK细胞培养液中所含的细胞数为 $3.1 \times 10^9$ 以上,其中,NK细胞的比例为80%以上。

[0030] 发明的效果

[0031] 本发明具有以下的优秀的效果。

[0032] 首先,本发明的NK细胞培养用培养基添加试剂盒具有如下组成:免去为了刺激淋巴细胞而使抗CD3抗体在培养容器中固定化,并以该状态将淋巴细胞(免疫细胞)培养一定时间的繁琐过程,且在最终获得的淋巴细胞培养液中使NK细胞稳定地扩增,从而能够大量地增殖。

[0033] 另外,本发明的NK细胞培养方法,通过依次使用构成培养基添加试剂盒中单元的添加剂,即通过对刺激淋巴细胞的顺序进行特定,从而能够提供在最终获得的淋巴细胞培养液中T细胞的比重低,NK细胞的比重显著地高的稳定的激活淋巴细胞。

[0034] 另外,根据本发明,通过对培养步骤中添加以便能够使NK细胞在淋巴细胞培养时进行显著高的比例的增殖的培养基添加剂进行规格化,从而能够极其容易地培养NK细胞。

### 附图说明

[0035] 图1是表示本发明实施例的通过利用NK细胞培养用培养基添加试剂盒的NK细胞培养方法获得的被激活淋巴细胞的表现型变化的图表。

[0036] 图2是表示本发明另一实施例的通过利用NK细胞培养用培养基添加试剂盒的NK细胞培养方法获得的被激活淋巴细胞的表现型变化的图表。

[0037] 图3是表示本发明又一实施例的通过利用NK细胞培养用培养基添加试剂盒的NK细胞培养方法获得的被激活淋巴细胞的表现型变化的图表。

[0038] 图4的(a)部分是表示通过现有技术的NK细胞培养方法培养之前的淋巴细胞的表现型的图表,图4的(b)部分是表示通过现有技术的NK细胞培养方法培养之后的淋巴细胞的表现型的图表。

### 具体实施方式

[0039] 在本发明中所使用的术语仅仅是为了说明特定的实施例而使用的,其意图并非限定本发明。关于单数的表述,除非在上下文中明确地另有说明,则包括复数的表述。在本申请中应理解“包括”或“具有”等术语用于指定有说明书中记载的特征、数字、步骤、动作、构成要件、配件或它们的组合,而并不事先排除一个或多个其他特征、数字、步骤、动作、构成要件、配件或它们的组合的存在或附加的可能性。

[0040] 虽然第一、第二等术语可用于说明多种构成要件,但是所述构成要件并非限定于所述术语。所述术语仅作为区分一个构成要件与其它构成要件的目的而使用。例如,在不超出本发明的权利范围内,第一构成要件可命名为第二构成要件,类似地,第二构成要件也可命名为第一构成要件。

[0041] 除非另有定义,包括技术性 or 科学性术语,在这里使用的所有术语具有与本发明所属领域的技术人员通常理解相同的含义。通常使用的词典中定义的术语应解释为具有与相关技术的上下文所具有的含义一致的含义,除非在本发明中明确定义,则不应理想性或过度地解释为形式性的含义。

[0042] 以下,参照附图及优选实施例,对本发明的技术构成进行详细说明。

[0043] 然而,本发明不限于这里所说明的实施例,并且可以以其他方式进行具体化。在整个说明书中,用于说明本发明的相同的附图标记表示相同的构成要件。

[0044] 本发明的技术性特征为一种NK细胞培养用培养基添加试剂盒及该利用该培养基添加试剂盒的培养方法,所述NK细胞培养用培养基添加试剂盒具有如下组成:免除为了刺激淋巴细胞而使抗CD3抗体在培养容器中固定化,并以该状态将淋巴细胞(免疫细胞)培养一定时间的繁琐过程,且在最终获得的淋巴细胞培养液中使NK细胞稳定地扩增,从而能够大量地增殖。

[0045] 即,因为在本发明中,利用抗CD16抗体及抗CD56抗体先进行刺激,并且在约24~48小时后,只是单纯地将抗CD3抗体添加至培养基内,也能够使NK细胞稳定地增殖最小500倍至最大5000倍以上。

[0046] 如此,根据本发明中研发的原理,用抗CD16抗体及抗CD56抗体刺激还没有成熟的未成熟祖细胞,从而诱导分化为NK细胞,若在激活已成熟的NK细胞之后,用抗CD3抗体刺激T细胞,从而被激活的T细胞激活NK细胞,则即使刺激直至抗CD3抗体在培养基内分解而消失为止,NK细胞也无任何问题地进行大量增殖,因此从确认到的该实验结果可知,在本发明的培养方法中,免去为了刺激淋巴细胞而使抗CD3抗体在培养容器中固定化,以该状态将淋巴细胞(免疫细胞)培养一定时间的繁琐过程,也能够培养NK细胞的比例非常高的淋巴细胞。

[0047] 因此,本发明的NK细胞培养用培养基添加试剂盒分别进行分开包装,以便能够在淋巴细胞培养的各步骤中添加至培养基中,所述NK细胞培养用培养基添加试剂盒包含内容物即组分不同的B单元、C1单元、C2单元、A1单元、A2单元及D单元。在这里,所述单元考虑对淋巴细胞培养基的影响来确定所述单元将包含的组分,以便能够在淋巴细胞培养时,培养的细胞的大部分是NK细胞,若以A1单元、D单元、C1单元、A2单元、C2单元、A2单元及B单元的顺序添加至淋巴细胞培养基中,则与现有培养方式相比,能够使NK细胞稳定地增殖最小500倍至最大5000倍以上。

[0048] 首先,B单元由基础溶液构成,基础溶液包含IL-2、L-谷氨酰胺及培养细胞用培养基。此时,IL-2的含量可以是100ng/mL~300ng/mL,优选可以以200~250ng/mL(3240IU/mL~4000IU/mL)的浓度包含。

[0049] 众所周知,IL-2作为T细胞识别抗原并被激活时生成的分子量14~17kDa的糖蛋白质(glycoprotein),分泌至T细胞外,之后与生成IL-2的T细胞自身反应,从而促进该T细胞的成长。且IL-2作用于NK细胞而促进成长,并强化NK细胞的杀伤能力,还作用于B细胞来促进B细胞的成长。L-谷氨酰胺是用于免疫细胞培养的营养成分作用的成分,培养细胞用培养基作为悬浮细胞培养用基本培养基,可使用公知状态的培养基。

[0050] 作为B单元的具体实施例,可将IL-2 2mg及500mM L-谷氨酰胺(L-glutamine)溶液100mL加入到悬浮细胞培养用基本培养基(市售的细胞培养基,若基本培养基中已有IL-2或L-谷氨酰胺(L-glutamine),则为了调配最终浓度而调整添加量)中并溶解,最终制得10L,能够制备基础溶液(B单元)。

[0051] C1单元由第一细胞因子溶液构成,第一细胞因子溶液包含IL-12、IL-18及基础溶液。在这里,在第一细胞因子溶液中,就IL-12而言,可以以0.5ng/mL~5ug/mL的浓度包含,优选为1-3ng/mL的浓度,更优选为1.5ug/mL~2.5ug/mL的浓度。就IL-18而言,可以以2ng/mL~50ng/mL的浓度包含,优选为8ng/mL~20ng/mL的浓度,更优选为11ng/mL~15ng/mL的浓度。

[0052] 众所周知,IL-12在树突状细胞(DC)、巨噬细胞及B细胞中生成。IL-12发挥在NK细胞及T淋巴细胞中诱导IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 的生成,并且减少阻碍IFN- $\gamma$ 的IL-4的生成的作用。另外,增加NK细胞及CD8+cytotoxic T淋巴细胞的细胞毒性。IL-12在NK细胞内,与IL-2信号传导体系具有密切的关系。另外,IL-2诱导在NK细胞内IL-12受体 $\beta$ 1和IL-12受体 $\beta$ 2的表达,使与IL-12信号传导体系相关的蛋白质表达并被激发。这样的机制在NK细胞的IFN- $\gamma$ 生成能力及靶细胞杀伤能力上被很好地证明。虽然看似IL-12受体 $\beta$ 2对IL-12机能发挥重要的作

用,但根据报告该IL-12受体 $\beta$ 2阻碍Th2的产生的同时进行Th1的产生。在T细胞及NK细胞中,IL-12的信号传导包括在信号转导及转录激活因子(JAK-STAT)信号传导体系中,并且IL-12受体 $\beta$ 2的活性对诱导作为转录因子的STAT4的磷酸化来激活该STAT4,发挥重要的作用。

[0053] 另外,IL-18从巨噬细胞中生成,是促炎性(proinflammatory)细胞因子遗传基因。IL-18通过与IL-18受体结合来与IL-12一同在被细菌或病毒感染的细胞中引起免疫反应,且增加NK细胞及T细胞中IFN- $\gamma$ 的生成。

[0054] 作为C1单元的具体实施例,将10ug的IL-12及50ug的IL-18溶于水,制得10mL,来制备细胞因子溶液(IL-12:1ug/mL的浓度,IL-18:5ug/mL的浓度)之后,将细胞因子溶液1mL溶于基础溶液500mL中,以2ng/mL的浓度包含IL-12,以10ng/mL的浓度包含IL-18,从而能够制备第一细胞因子溶液(C1单元)。

[0055] C2单元由第二细胞因子溶液构成,第二细胞因子溶液包含IL-15及基础溶液。在第二细胞因子溶液中,IL-15的含量可以为10~50ng/mL的浓度,优选可以为15ng/mL~25ng/mL。

[0056] 众所周知,IL-15作为属于4个螺旋束细胞因子家族(helix bundle cytokine family)的遗传多型性细胞因子,已知作用于多种细胞,对增殖、生存及分化发挥重要的作用。另外,由于IL-15在更多种类的细胞中表达,因此与IL-2相比,能够进行更宽、更多样的调节作用。尤其影响免疫反应的各阶段(phase),还作用于干预各步骤的免疫反应的多种细胞,一系列的研究结果论证IL-15直接干预记忆T细胞(memory T cell)的形成。

[0057] 作为C2单元的具体实施例,将IL-15溶于基础溶液中,制成20ng/mL的浓度,从而能够制备第二细胞因子溶液(C2单元)。

[0058] A1单元由第一抗体溶液构成,第一抗体溶液包含抗CD16、抗CD56及基础溶液。此时,在构成A1单元的第一抗体溶液中,抗CD16及抗CD56的含量可分别为0.1~2.0ug/mL,优选可分别为0.5~0.7ug/mL的浓度。

[0059] 众所周知,CD16及CD56作为NK细胞的表面蛋白质,若在抗CD16抗体或抗原抗体复合体的存在条件下培养淋巴细胞,则NK细胞中被添加CD16抗原而引起信号传导,因它们的刺激在NK细胞中IL-2受体的 $\alpha$ 链等转铁蛋白(transferrin)受体进行表达,或可生成肿瘤坏死因子(TNF,tumor necrosis factor)或IFN- $\gamma$ 。另外,抗CD56抗体也执行与抗CD16抗体相似的机能。

[0060] 作为A1单元的具体实施例,分别将6uL的抗CD16和抗CD56溶液(1mg/mL)溶于基础溶液10mL中,从而能够制备第一抗体溶液(A1单元)。

[0061] A2单元由第二抗体溶液构成,第二抗体溶液可以以第一抗体溶液:基础溶液的容积比为1:6~10包含第一抗体溶液和基础溶液,作为A2单元的具体实施例,混合第一抗体溶液6.5mL和基础溶液30mL,从而能够制备第二抗体溶液。在第二抗体溶液中,一部分可构成A2单元,一部分可构成A3单元。

[0062] 如此以抗体已添加至基础溶液的状态制备的A1单元至A3单元在冷藏保管时能够使用1~2个月左右,因此为了延长使用期限,可实施为,分别将构成A1单元至A3单元的抗CD16、抗CD56及基础溶液进行分开包装,在培养基添加步骤中进行混合,来分别形成第一抗体溶液、第二抗体溶液及第三抗体溶液。

[0063] D单元由抗体-细胞因子混合溶液构成,抗体-细胞因子混合溶液可包含抗CD3及第

一细胞因子溶液。此时,抗CD3的含量可以为1ug/mL~12ug/mL,优选可以为3ug/mL~8ug/mL,更优选可以为4ug/ml~5ug/mL。

[0064] 众所周知,若T细胞通过TCR接收信号,则被激活(activation),但TCR的 $\alpha$ 或 $\beta$ 链其自身不能传导激活信号(activation signal),通过在TCR周边的CD3链来传导信号(signal)。即,若TCR识别抗原,则CD3抗原发挥将该信号传导至细胞内的作用,例如TRC与MHC+抗原结合时,将已结合的信号传导至细胞内,TCR形成CD3抗原( $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\zeta$ 或 $\eta$ )及复合体。

[0065] 作为D单元的具体实施例,将抗CD3溶液(1mg/mL) 5uL溶于第一细胞因子溶液1mL中,从而能够制备抗体-细胞因子混合溶液(D单元)。

[0066] D单元,若以抗体已添加至基础溶液的状态制备,则在冷藏保管时同样也可使用1~2个月左右。因此,为了延长使用期限,可实施为,分别将构成D单元的抗CD3及第一细胞因子溶液进行分开包装,在培养基添加步骤中进行混合,来形成抗体-细胞因子混合溶液。在该情况下,使用期限能够延长至6个月以上。

[0067] 接着,本发明的利用NK细胞培养用培养基添加试剂盒的NK细胞培养方法包括:第一步骤,在分离出的淋巴细胞中添加A1单元的第一抗体溶液之后,添加自身血浆;第二步骤,在执行所述第一步骤的培养基中添加D单元的抗体-细胞因子混合溶液;第三步骤,在执行所述第二步骤的培养基中添加C1单元的第一细胞因子溶液之后,添加自身血浆;第四步骤,在执行所述第三步骤的培养基中添加A2单元的第二抗体溶液之后,添加自身血浆或FBS;第五步骤,在执行所述第四步骤的培养基中添加C2单元的第二细胞因子溶液之后,添加自身血浆或FBS;第六步骤,在执行所述第五步骤培养基中添加第三抗体溶液及自身血浆或FBS;以及第七步骤,在执行所述第六步骤的培养基中添加B单元的基础溶液及自身血浆或FBS。在这里,第三抗体溶液使用构成所述A2单元的第二抗体溶液的一部分,所添加的自身血浆或FBS的含量不到整个培养基的10容积%。第四步骤及第六步骤中可分别在比之前的步骤具有更大容积的培养容器中进行培养,以免妨碍增殖。

[0068] 另一方面,在本发明的培养步骤中添加的自身血浆,比肝素在公知的培养方法中使用的自身血浆中所含的肝素的量多最小3倍以上。即,因为通常采血时,即使以每10mL血液使用158usp unit的肝素,血液也不会凝固,但将约每5ml血浆158usp unit的肝素加入到细胞培养液中时,因凝固成果冻的现象而不能很好地进行细胞培养。然而,在本发明中确认,至少使用通常使用量的3倍以上的肝素的情况下,无凝固现象,能够很好地培养细胞,并且确认即使与已知相比使用3~4倍以上的肝素,在培养中也没有问题。另外,在通常使用的血浆灭活方法中,在摄氏56度条件下,加热30分钟来去除补体等蛋白质等时,细胞培养所需的有效成分也一同被去除,但如本发明那样,使用约3倍以上的肝素,不使用血浆灭活方法时,培养所需的有效成分无损失,因此可使用少量的血浆(plasma)。例如,虽然以往使用培养液的10容积%以上,但确认到在本发明中以不到10容积%量,仅使用3容积%至7容积%也培养得很好。因此,在本发明的培养方法中使用的自身血浆为每1ml血液包含40usp unit以上的肝素,优选包含50~60usp unit以上。

[0069] 另外,通过本发明确认到,在执行第一步骤之后到执行第二步骤为止隔着24小时以上的间隔,使用第一抗体溶液,即在IL-2存在的条件下通过抗CD16及抗CD56充分地刺激淋巴细胞之后,执行第二步骤,在D溶液中所含的抗CD3抗体未固定化而被添加至培养基中,

从而即使刺激到抗CD3抗体在培养基内分解直至消失,也完全不会产生特别的问题,且NK细胞增殖得很多。

[0070] 另一方面,免疫细胞培养通常培养14日至17日时,能够得到最多增殖的免疫细胞是众所周知的事实。在本发明中,也培养14日至17日的情况下,观察培养过程中细胞生长的特性,将免疫细胞转移至1L培养袋(bag)之后,不添加用于刺激免疫细胞的其他细胞因子(Cytokine)或抗体。即,因为免疫细胞已充分被刺激,因此在1L培养袋中继续增殖。由于免疫细胞在充分增殖之后有增殖次数的限制,因此达到极值之后会死灭。因此,虽然可以经过约14日,使免疫细胞数增加至最大之后向患者给药来期待抗癌效果,但也可以考虑在转移至1L培养袋之前收得并向患者给药的方法。在该情况下,向患者给药的免疫细胞数( $5 \times 10^7 \sim 25 \times 10^7$ )虽然比培养14日的数少,但由于有很多还未达到增殖极值的健壮免疫细胞,当向人体给药时在我们身体内存活更久,且能够继续增殖至达到极值,因此可期待与先前的方法不同的效果。因为抗癌效果或癌症预防效果根据癌的种类及时期或人的免疫体系特性的效果均有所不同,因此对于有些人而言,培养14日为更好,还有时在烧瓶中培养约7日至8日之后收得并给药或许更好。

[0071] 实施例1

[0072] 如下准备NK细胞培养用培养基添加试剂盒。

[0073] 1. B单元准备步骤

[0074] 将IL-2 2.2mg及500mM L-谷氨酸胺(L-glutamine)溶液100mL加入悬浮细胞培养用基本培养基(若在基本培养基中已有IL-2或L-谷氨酸胺,则为了调配最终浓度而调整添加量)并溶解,最终制成10L,制备基础溶液(B溶液)。利用该溶液3.8L,分别将36mL装入各容器中并堵住塞子,粘贴事先准备的“B溶液(solution),7日(day)”的标签来准备B单元,并进行冷藏保管。剩下的6.2L用于制备其他单元。

[0075] 2. C1单元准备步骤

[0076] 将IL-12 20ug及IL-18 125ug溶于蒸馏水中,制成10mL,来制备细胞因子溶液(C溶液)。将C溶液1mL溶于基础溶液(B溶液)500mL中来制备第一细胞因子溶液(C1溶液)。使用该C1溶液中的490mL,分别将4.5mL装入各容器中并堵住塞子,粘贴事先准备的“C1溶液(solution),3日(day)”的标签来准备C1单元,并进行冷藏保管。剩下的110mL用于制备D单元。

[0077] 3. C2单元准备步骤

[0078] 将IL-15 20ug加入B溶液1000ml中来制备了第二细胞因子溶液(C2溶液)。分别将9mL的C2溶液装入各容器中并堵住塞子,粘贴事先准备的“C2溶液(solution),5日(day)”的标签来制备C2单元,并进行冷藏保管。

[0079] 4. A1单元准备步骤

[0080] 分别将0.5mg的抗CD16及抗CD56抗体溶于B溶液830mL中,来制备了第一抗体溶液(A1溶液)。分别将3.5mL的第一抗体溶液装入容器中,粘贴事先准备的“A1溶液(solution),0日(day)”的标签来准备A1单元之后进行冷藏保管。剩下的溶液用于制备A2及A3单元。

[0081] 5. A2单元及A3单元准备步骤

[0082] 将约530mL的A1溶液和3000mL的B溶液进行混合,来制备了第二抗体溶液(A2溶液)。分别将9mL的第一抗体溶液装入容器中,粘贴事先准备的“A2溶液(solution),4日

(day)”的标签来准备A2单元之后进行冷藏保管。分别将27mL的A2溶液装入另外的容器,粘贴事先准备的“A3溶液(solution),6日(day)”的标签来准备A3单元之后进行冷藏保管。此时,A1溶液及A2溶液具有1个月以内的短暂的有效期间,因此也可如下制备来使用。

[0083] 将分别6uL的抗CD16 (1mg/mL) 抗体溶液、抗CD56 (1mg/mL) 抗体溶液6uL抗体溶液、10mL及30mL的B溶液分别包装于单独的容器,来准备A1至A3单元之后,使用时,可将这些溶液全部混合,从而能够制备A1至A3溶液。即,首先,分别将6uL的抗CD16抗体及抗CD56抗体溶解于B溶液10mL中来制成A1溶液,将所述A1溶液中3.5mL装入容器中,粘贴事先准备的“A1溶液(solution),0日(day)”的标签来制备A1单元之后进行冷藏保管。将剩下的约6.5mL溶液和B溶液30mL混合之后制成A2溶液,将A2溶液中9mL粘贴“A2溶液(solution),日(day)4”的标签来制成A2单元之后进行冷藏保管,并且将剩下的约37mL粘贴“A3溶液(solution),6日(day)”的标签来制备A3单元之后进行冷藏保管来使用。在该情况下,这些溶液的有效期间能够延长至6个月以上。

[0084] 6.D单元准备步骤

[0085] 将抗CD3抗体500ug加入C1溶液中来制备抗体-细胞因子混合溶液(D溶液)105mL之后,分别将1mL装入容器中,粘贴事先准备的“D溶液(solution),1日(day)”的标签来准备D单元之后进行冷藏保管。此时,由于D溶液具有1个月以内的短暂的有效期间,因此也可如下制备来使用。

[0086] 将抗CD3抗体溶液(1mg/mL)5uL及C1溶液1mL分别包装于单独的容器来准备D单元之后,使用时,将这些溶液进行混合,来制备D溶液。即,在使用前,将抗CD3抗体5uL加入C1溶液1mL中并溶解,粘贴“D1溶液(solution),1日(day)”的标签来制备D单元之后进行冷藏保管来使用。在该情况下,有效期间能够延长至6个月以上。

[0087] 7.NK细胞培养用培养基添加试剂盒的准备

[0088] 排列准备好的B单元、C1单元、C2单元、A1单元、A2单元(需要时可分离成A2单元及A3单元)以及D单元,从而能够制备NK细胞培养用培养基添加试剂盒。需要时,可根据使用顺序以A1单元、D单元、C1单元、A2单元、C2单元、A2单元(A3单元)及B单元的顺序配置来准备。

[0089] 实施例2

[0090] 从患者的血液,准备淋巴细胞及自身血浆之后,利用在实施例1中获得的NK细胞培养用培养基添加试剂盒来如下培养NK细胞。

[0091] 1.淋巴细胞提取及自身血浆准备步骤

[0092] 利用人体淋巴细胞或单核细胞等单核细胞具有低于1.077的比重的性质,使治疗对象患者的血液在1.077比重的淋巴细胞分离溶液(Ficoll-Paque Plus)中重叠并以一定的离心力使其离心沉淀,根据比重差,比重比1.077大的红血球及粒细胞层向下,而1.077以下的单核细胞层及血小板等向上而进行分离,从而获得包含淋巴细胞的单核细胞层,从分离的单核细胞层中仅提取淋巴细胞。

[0093] 更具体地观察,将30ml的患者A的外周血加入50ml锥形管(conical tube)中并进行离心分离之后,将上层的自身血浆加入肝素管中并进行处理之后,装入新的50ml锥形管中,再次进行离心分离之后,将上部部的血浆成分准备为自身血浆。

[0094] 然后,在已去除血浆的血液管中加入PBS并将容积调整为30ml之后混匀,转移至准备好的淋巴细胞分离溶液(Ficoll-Paque Plus)的管中,以800xg离心分离15分钟之后,分

离出第二层的包含淋巴细胞的血沉棕黄层(buffy coat layer),集于50ml的锥形管中,用PBS将容积调配至50ml之后进行混合。然后,通过2至3次的离心分离,扔掉上层液,分离出淋巴细胞。此时获得的淋巴细胞的细胞数为 $1.0\sim 2.0\times 10^7$ 。

[0095] 2.如下执行在分离出的淋巴细胞中添加A1单元的第一抗体溶液之后,添加自身血浆的第一步骤。

[0096] 利用A1溶液(solution)(0日)1小瓶(3.5mL)来混匀准备好的淋巴细胞,并将其加入T25烧瓶中之后,在其中加入0.25mL~0.5mL的准备好的自身血浆之后,装入培养器中来开始培养。

[0097] 3.如下执行在执行第一步骤的培养基中添加D单元的抗体-细胞因子混合溶液的第二步骤。

[0098] 使用显微镜观察细胞之后,在培养中的T25烧瓶中添加将D溶液(solution)(1日)1小瓶(1mL),轻轻晃动之后装入培养器中,继续进行培养。

[0099] 4.如下执行在执行第二步骤的培养基中添加C1单元的第一细胞因子溶液之后添加自身血浆的第三步骤。

[0100] 观察细胞状态之后,添加C1溶液(solution)(3日)1小瓶(4.5mL),添加0.25mL~0.5mL的自身血浆,并装入培养器,继续进行培养。

[0101] 5.如下执行在执行第三步骤的培养基中添加A2单元的第二抗体溶液之后添加自身血浆或FBS的第四步骤。

[0102] 使用刮刀(scraper)仔细刮培养中的T25烧瓶的底部,将收集的所有细胞转移至T75烧瓶中。在其中添加A2溶液(solution)(4日)1小瓶(9mL)及自身血浆或FBS(或与此类似的物质)0.5mL~1mL,并轻轻地晃动之后,装入培养器,继续进行培养。

[0103] 6.如下执行在执行第四步骤的培养基中添加C2单元的第二细胞因子溶液之后添加自身血浆或FBS的第五步骤。

[0104] 在培养中的T75烧瓶中添加C2溶液(solution)(5日)1小瓶(9mL)及自身血浆或FBS(或与此类似的)0.5mL~1m,并轻轻地晃动之后,装入培养器,继续进行培养。

[0105] 7.如下执行在进行第五步骤的培养基中添加第三抗体溶液及自身血浆或FBS的第六步骤。

[0106] 使用刮刀(scraper)仔细刮培养中的T75烧瓶的底部,将收集的所有细胞转移至T150烧瓶中。在其中添加A3溶液(solution)(4日)1小瓶(27mL)及自身血浆或FBS(或与此类似的)1.5mL~3mL,并轻轻地晃动之后,装入培养器,继续进行培养。

[0107] 8.如下执行在执行第六步骤的培养基中添加B单元的基础溶液及自身血浆或FBS的第七步骤。

[0108] 在培养中的T150烧瓶中添加B溶液(solution)(7日)1小瓶(36mL)及自身血浆或FBS(或与此类似的)2mL~4mL,并轻轻地晃动之后,装入培养器,继续进行培养。

[0109] 9.大量培养之后细胞收得步骤

[0110] 使用刮刀(scraper)搜刮培养中的T150烧瓶的底部,确认细胞后,立即在该细胞及培养液中添加剩下的所有自身血浆或FBS(或与此类似的物质)10ml,制备细胞悬浊液之后,在装有培养液的1L CO<sub>2</sub>渗透性培养袋中添加细胞悬浊液之后,进行揉捏使其与培养液充分混合之后,将其均匀地平铺于37℃,5%CO<sub>2</sub>培养器,再培养4日至5日左右,从而使细胞大量

地增殖。将结束培养的最终培养液装入离心分离管,通过几次离心分离来收得细胞之后,将收得的细胞包装于生理盐水袋并进行冷藏保管或冻结保管。最终,培养从患者A血液30mL中分离的淋巴细胞而获得的细胞数为 $3.14 \times 10^9$ 个。

[0111] 根据情况,在该步骤中可以不进行大量培养,而是立即收得细胞使用,但是培养8日之后获得的免疫细胞数为 $12.7 \times 10^7$ 个。

[0112] 实施例3

[0113] 除了使用的血液不是患者A而是患者B的血液以外,执行与实施例2相同的方法,培养8日之后获得的免疫细胞数为 $17.5 \times 10^7$ 个,最终培养从患者B血液30mL中分离的淋巴细胞而获得的细胞数为 $4.33 \times 10^9$ 个。

[0114] 实施例4

[0115] 除了使用的血液不是患者A而是患者C的血液以外,执行与实施例2相同的方法,培养8日之后获得的免疫细胞数为 $8.5 \times 10^7$ 个,最终培养从患者C血液30mL中分离的淋巴细胞而获得的细胞数为 $3.53 \times 10^9$ 个。

[0116] 实验例1

[0117] 在图1至图3中示出,利用流式细胞仪(floweytometry),对通过与实施例2至实施例4相同的方法培养的淋巴细胞进行分析表面抗原的结果。图1至图3作为示出实施例2至4中获得的培养前后淋巴细胞的表现型变化的图表,H1区域表示NK细胞的分布,H4区域表示T细胞的分布,H2区域表示NKT细胞的分布,H3区域表示其他免疫细胞的分布。

[0118] 如图1所示,可知使用患者A的血液,通过本发明的培养方法增殖的细胞数为 $3.14 \times 10^9$ ,其中,NK细胞比例为81.67%,NKT细胞比例为5.82%,gdT细胞比例为5.8%,由此可知大致增殖的细胞的94%以上是能够呈现治疗效果的杀伤活性细胞。

[0119] 从图2可知,使用患者B的血液,通过本发明的培养方法增殖的细胞数为 $4.33 \times 10^9$ ,其中,NK细胞比例为86.85%,NKT细胞比例为3.45%,gdT细胞比例为0.82%,由此可知大致增殖的细胞的92%以上是能够呈现治疗效果的杀伤活性细胞。

[0120] 从图3可知,使用患者C的血液,通过本发明的培养方法增殖的细胞数为 $3.53 \times 10^9$ ,其中,NK细胞比例为97.81%,NKT细胞比例为0.37%,gdT细胞比例为0.06%,由此可知大致增殖的细胞的98%以上是能够呈现治疗效果的杀伤活性细胞。

[0121] 如图1至图3所示,可知通过本发明的培养方法来培养淋巴细胞时,即使患者的遗传性特性改变,作为大致不变增殖的细胞的80%以上为NK细胞,若包含NKT细胞及gdT细胞,则能够均质地培养92%以上的杀伤活性细胞。

[0122] 相反,如图4所示,可知根据现有技术(专利第10-1039843号),培养之前,如图表(a)所示,表面抗原分布在H4区域最多分布,相反,在培养之后,如图表(b)所示,在H1区域最多分布,但明确可知与图1至图3相比增殖的细胞数更少。

[0123] 实验例2

[0124] 分别将通过与实施例2至实施例4相同的方法培养的淋巴细胞用作效应细胞(effector cell),将血液癌细胞株(K562)用作靶细胞(target cell),将相对于癌症细胞的激活淋巴细胞的比例设定为10:1,执行测定激活淋巴细胞对血液癌细胞株的杀伤能力的效能分析。

[0125] 通常,使用K562细胞系(cell line)测定效能的通常的方法,在效应细胞

(effector cell) 及靶细胞(target cell)的比为10:1的条件下,使两个细胞反应4小时来评价杀死癌症细胞的程度,但由于本实验例中,由于在本发明中培养的淋巴细胞的效能过高,几乎杀伤所有癌症细胞,因此为提高免疫力并缩短分析的时间,仅反应2小时来评价,并将该结果示于下述表1中。

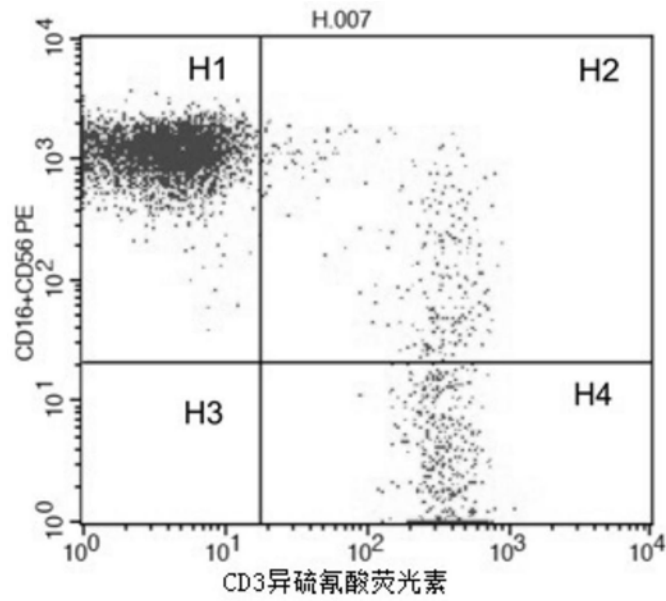
[0126] [表1]

[0127]	区分	实施例2	实施例3	实施例4
	效能(%)	68.2%	65.9%	71.4%

[0128] 如表1所示,对通过现有技术培养的淋巴细胞的效能分析结果值,在正常反应4小时时平均也不过是40~50%,与此相比,通过本发明的培养方法培养的淋巴细胞比通常的反应时间缩短50%,而只反应2小时的状态下也是65%以上,因此可知癌症细胞杀伤能力极其优异。

[0129] 如此,通过本发明培养的淋巴细胞的效能即使在短暂的反应时间内也非常高,在于淋巴细胞中NK细胞所占比例非常高,根据这些实验结果能够确认,若通过本发明的培养方法培养淋巴细胞,则能够得到NK细胞比重很高的淋巴细胞,并且癌症细胞杀伤能力也优异,因此治疗效果也理所当然地优异。

[0130] 虽然如上所述,以优选的实施例为例进行图示来对本发明进行了说明,但不限于所述的实施例,在不脱离本发明的主旨的范围内,本发明所属技术领域中具有通常技术的人员可进行变更及修改。



象限统计

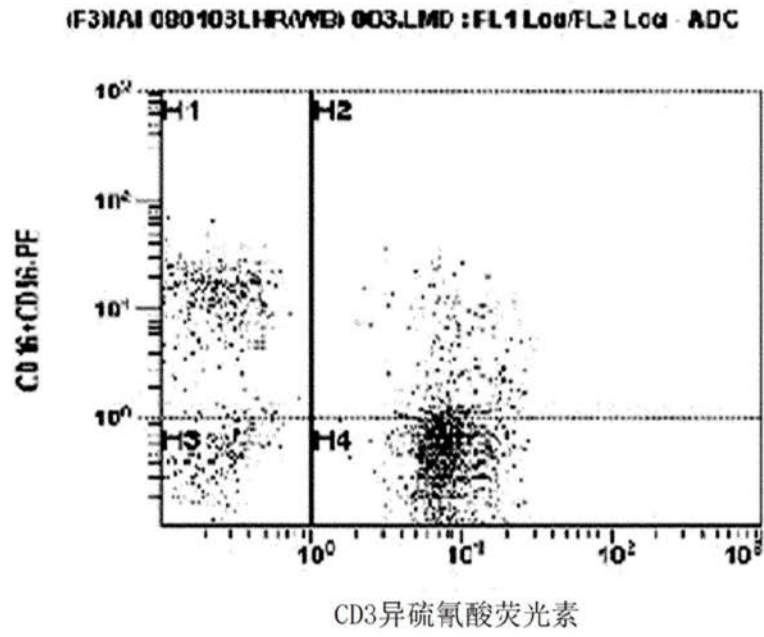
文件: H.007                      Log数据单元: 线性 V8  
 样品编号:                      病人编号:  
 管: 无标题                      面板: 无标题采样  
 采样日: 15年5月23日              封闭: G1  
 封闭项目: 4692                      总项目: 10000  
 X参数: CD3异硫氰酸荧光素(Log) Y参数: CD16+CD5  
 象限定位: 18.21

象限	项目	% 封闭	% 总和
UL	3832	81.67	38.32
UR	273	5.82	2.73
LL	0	0.00	0.00
LR	587	12.51	5.87

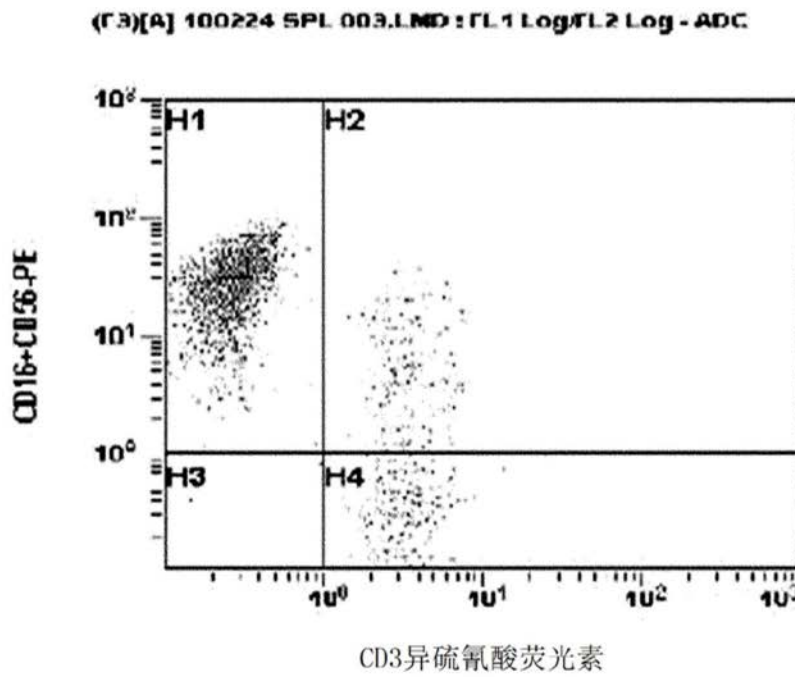
图1







(a)



(b)

图4