



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 202020141 A

(43) 公開日：中華民國 109 (2020) 年 06 月 01 日

(21) 申請案號：108111717

(22) 申請日：中華民國 108 (2019) 年 04 月 02 日

(51) Int. Cl. : C12N5/02 (2006.01)

C12N5/0783 (2010.01)

(30) 優先權：2018/10/25 中國大陸

201811250648.9

(71) 申請人：香港商普瑞康（香港）生物醫藥科技有限公司（香港地區）PURECELL  
BIOMEDICAL TECHNOLOGY COMPANY LIMITED (HK)

香港

(72) 發明人：孫振華 SUN, ZHENHUA (CN)；曹暉 CAO, HUI (CN)

(74) 代理人：劉法正；尹重君

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：17 項 圖式數：4 共 22 頁

(54) 名稱

一種用於 NK 細胞體外擴增的培養基體系及 NK 細胞體外擴增的方法

(57) 摘要

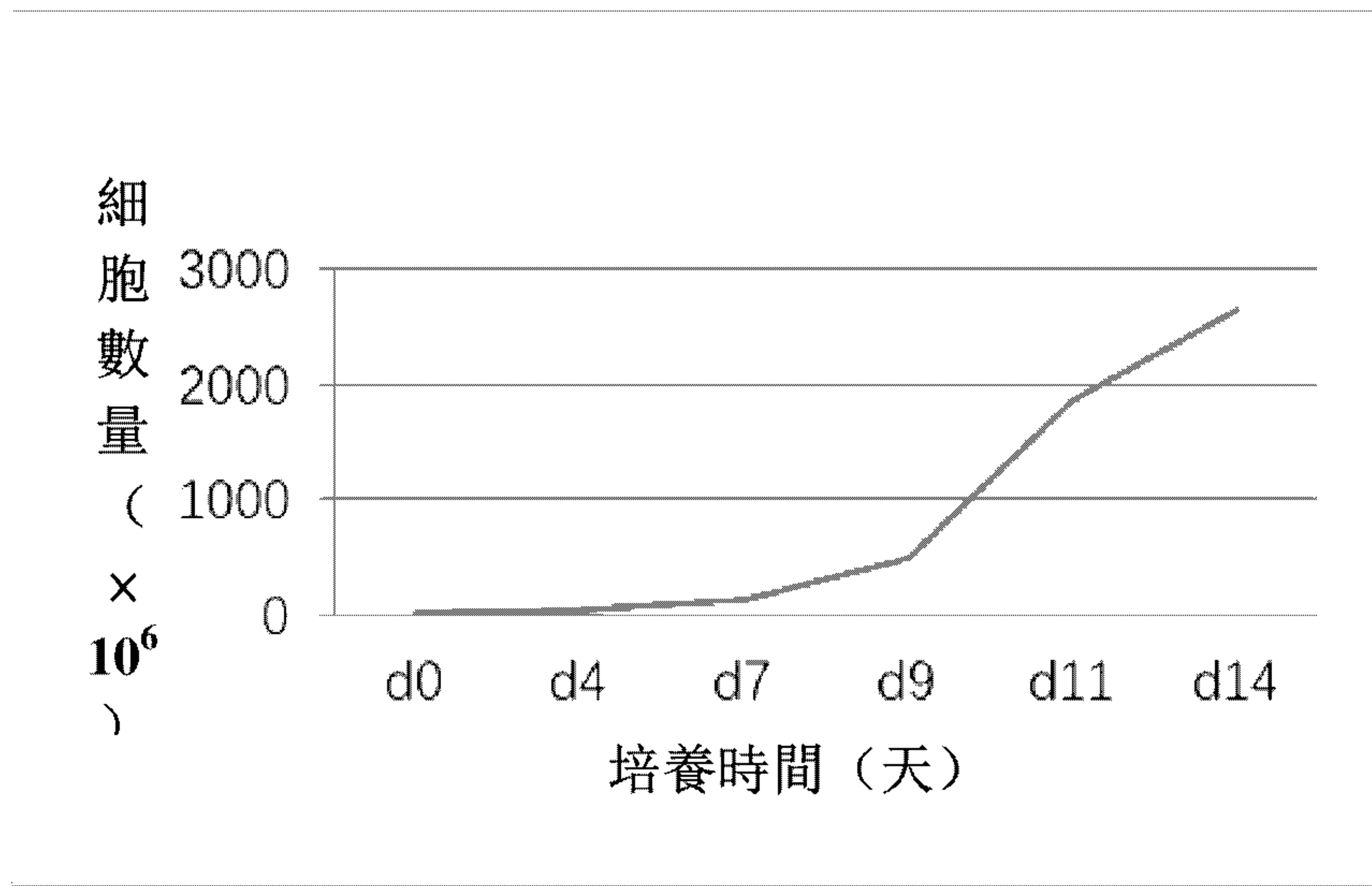
本發明涉及一種用於 NK 細胞體外擴增的培養基體系及 NK 細胞體外擴增的方法。本發明利用固化的 anti-CD137 和 RetroNectin 直接培養 Ficoll 分離的 PBMC，採用 OK-432 作為生物效應劑，在 GM-CSF、IL-4、IL-2、IL-15、IL-21 共同作用下體外活化和擴增自然殺傷細胞，創建了一種高效的 NK 細胞體外擴增方法；該方法製備的 NK 細胞 CD3-CD16+/CD56+ 細胞表達率高達 92.5% 以上，經過 14 天培養，NK 細胞可擴增 1000~2000 倍，體外殺瘤活性強。

This invention relates to a medium system and a method for ex vivo expansion of natural killer (NK) cells. This invention directly cultures Ficoll-separated PBMC by using immobilized anti-CD137 and RetroNectin, and uses OK-432 as a biological effector under the co-existence of GM-CSF, IL-4, IL-2, IL-15, and IL-21 for ex vivo activation and proliferation of NK cells, creating an efficient method for ex vivo expansion of NK cells. The expression rate of NK cells CD3-CD16+/CD56+ prepared by the method is as high as 92.5% or more. After 14 days of culture, NK cells can be expanded 1000 to 2000 times and have strong in vitro cytotoxic activity.

指定代表圖：

符號簡單說明：

(無)



【圖 1】



202020141

## 【發明摘要】

### 【中文發明名稱】

一種用於NK細胞體外擴增的培養基體系及NK細胞體外擴增的方法

### 【英文發明名稱】

MEDIUM SYSTEM AND METHOD FOR EX VIVO EXPANSION OF NK CELLS

### 【中文】

本發明涉及一種用於NK細胞體外擴增的培養基體系及NK細胞體外擴增的方法。本發明利用固化的 anti-CD137 和 RetroNectin 直接培養 Ficoll 分離的 PBMC，採用 OK-432 作為生物效應劑，在 GM-CSF、IL-4、IL-2、IL-15、IL-21 共同作用下體外活化和擴增自然殺傷細胞，創建了一種高效的 NK 細胞體外擴增方法；該方法製備的 NK 細胞 CD3-CD16+/CD56+細胞表達率高達 92.5%以上，經過 14 天培養，NK 細胞可擴增 1000~2000 倍，體外殺瘤活性強。

### 【英文】

This invention relates to a medium system and a method for ex vivo expansion of natural killer (NK) cells. This invention directly cultures Ficoll-separated PBMC by using immobilized anti-CD137 and RetroNectin, and uses OK-432 as a biological effector under the co-existence of GM-CSF, IL-4, IL-2, IL-15, and IL-21 for ex vivo activation and proliferation of NK cells, creating an efficient method for ex vivo expansion of NK cells. The expression rate of NK cells CD3-CD16+/CD56+ prepared by the method is as high as 92.5% or more. After 14 days of culture, NK cells can be expanded 1000 to 2000 times and have strong in vitro cytotoxic activity.

### 【指定代表圖】 圖 1

### 【代表圖之符號簡單說明】

(無)

### 【特徵化學式】

(無)

## 【發明說明書】

### 【中文發明名稱】

一種用於NK細胞體外擴增的培養基體系及NK細胞體外擴增的方法

### 【英文發明名稱】

MEDIUM SYSTEM AND METHOD FOR EX VIVO EXPANSION OF NK CELLS

### 【技術領域】

#### 【0001】 相關申請

本申請主張2018年10月25日提交的中國專利申請號201811250648.9的優先權，該專利申請之全部內容以引用之方式併入本申請案中。本申請案亦引用多個公開出版物，該等公開出版物的全部內容以引用之方式併入本申請案中以更充分地描述本發明所涉及的工藝狀況。

【0002】 本發明涉及免疫學領域，尤其涉及一種用於NK細胞體外擴增的培養基體系及NK細胞體外擴增的方法。

### 【先前技術】

【0003】 長期以來，手術、放療和化療作為傳統三大方法，對惡性腫瘤的治療取得了較好的療效，但這些治療手段並非對所有的腫瘤都有效，且有的伴有明顯的副反應。因此，尋找損傷小又能有效控制腫瘤生長和轉移的治療方法，成為臨床腫瘤治療的迫切需要。隨著腫瘤學、免疫學以及分子生物學等相關學科的迅速發展和交叉滲透，腫瘤免疫治療的研究突飛猛進，以免疫學原理為基礎、以細胞生物學技術為方法而建立起來的腫瘤免疫細胞治療，已經從實驗室研究逐漸向有效、安全的臨床應用過渡。

【0004】 NK細胞是除T、B細胞之外的第三類淋巴細胞，具有獨特功能的

細胞亞群。NK細胞是機體重要的免疫效應細胞，在抵抗腫瘤和病毒感染等方面起著非常重要的作用。近年來，關於NK細胞及其抗腫瘤功能的研究已經成為免疫學和腫瘤學研究的熱點內容之一。NK細胞抗腫瘤已經在美國和日本等國家進行了大量的臨床試驗，顯示了良好的應用前景。NK細胞能夠臨床治療的腫瘤類型包括但不限於：腎上腺皮質癌、艾滋病相關的癌症、黑色素瘤、膀胱癌、腦腫瘤、中樞神經系統腫瘤、子宮癌、慢性淋巴細胞白血病、結腸癌、大腸癌、乳腺癌、子宮內膜癌、食管癌、口腔癌、垂體瘤、T細胞淋巴瘤、腎母細胞瘤、甲狀腺癌等等。

**【0005】** 在外周血淋巴細胞中NK細胞含量只是10%左右，體外擴增常規方法採用高劑量IL-2擴增NK細胞，只能擴增幾十倍，並且需要抽取患者大量的外周血（大於500ml），才能夠達到治療所需要的細胞數量。所以說NK細胞臨床應用的主要障礙在於如何獲得足夠數量的NK細胞，實現高效的體外擴增效率。國內外科學家進行了卓有成效的研究，已經取得了一定的結果。據報導，研究人員採用逆轉錄病毒將CD137L和IL-15轉染到K562細胞中，獲得了膜型表達的CD137L和IL-15分子，利用該細胞與人外周血PBMC共培養，得到了大量的NK細胞。但該方法的缺陷在於逆轉錄病毒轉染的方法操作較為繁瑣，不容易推廣，並且需要伽馬射線對轉染腺病毒的細胞進行滅活，一旦滅活不充分本身為癌細胞的K652細胞就會在體內擴增，相當於人為引入了癌細胞。並且採用逆轉錄病毒有一定風險，培養體系中引入的轉基因細胞也將最終混入到NK細胞製劑中。

### **【發明內容】**

**【0006】** 本發明的目的在於為了克服繁瑣且有風險的轉基因方法，單獨採

用細胞因子進行NK細胞的激活和擴增，提供了一種操作簡單、成本較低、擴增效率高的NK細胞培養體系，對NK細胞在臨床上的應用提供了強有力的支持。

【0007】 為達此目的，本發明採用以下技術方案：

【0008】 第一方面，本發明提供了一種用於NK細胞體外擴增的培養基體系，其包括誘導培養基和增殖培養基。

所述誘導培養基包括基礎培養基和誘導因子組合；

所述誘導因子組合包含OK-432、IL-2、IL-15和IL-21；

所述增殖培養基包括基礎培養基和增殖因子組合；

所述增殖因子組合包含rhGM-CSF和rhIL-4。

【0009】 根據本發明，所述OK-432可增強NK細胞、淋巴細胞等細胞的細胞毒作用，並促進IFN- $\gamma$ 、IL-2、TNF- $\alpha$  等的分泌，調節機體的抗腫瘤免疫反應。在本發明中OK-432作為一種生物效應劑在細胞培養的初期加入到培養基中，可激活NK細胞；另外，IL-2、IL-15和IL-21能夠維持NK細胞的增殖和存活；OK-432與IL-2、IL-15和IL-21同時存在於細胞培養初期的培養基中，能夠有效提高NK細胞的表達率，使其高達92.5%以上，同時大大提高了NK細胞的擴增倍數，增強體外殺瘤活性。

【0010】 根據本發明，所述GM-CSF和IL-4可以維持DC細胞的存活，可進一步促進NK細胞的體外增殖。

【0011】 根據本發明，所述誘導因子組合中，OK-432的濃度為1~1.5 $\mu$ g/ml，例如1 $\mu$ g/ml、1.05 $\mu$ g/ml、1.1 $\mu$ g/ml、1.15 $\mu$ g/ml、1.2 $\mu$ g/ml、1.25 $\mu$ g/ml、1.3 $\mu$ g/ml、1.35 $\mu$ g/ml、1.4 $\mu$ g/ml、1.45 $\mu$ g/ml或1.5 $\mu$ g/ml，優選OK-432的濃度為1 $\mu$ g/ml。

【0012】 根據本發明，所述誘導因子組合中，IL-2的濃度為500~750IU/ml，例如500IU/ml、520IU/ml、550IU/ml、580IU/ml、600IU/ml、620IU/ml、650IU/ml、680IU/ml、700IU/ml、720IU/ml或750IU/ml，優選IL-2的濃度為500IU/ml。

【0013】 根據本發明，所述誘導因子組合中，IL-15的濃度為15~30ng/ml，例如15ng/ml、16ng/ml、18ng/ml、20ng/ml、22ng/ml、25ng/ml、28ng/ml或30ng/ml，優選IL-15的濃度為20ng/ml。

【0014】 根據本發明，所述誘導因子組合中，IL-21的濃度為45~60ng/ml，例如45ng/ml、48ng/ml、50ng/ml、52ng/ml、54ng/ml、56ng/ml、58ng/ml或60ng/ml，優選IL-21的濃度為50ng/ml。

【0015】 根據本發明，所述增殖因子組合中，rhGM-CSF的濃度為900~1200U/ml，例如900U/ml、920U/ml、950U/ml、1000U/ml、1050U/ml、1080U/ml、1100U/ml、1120U/ml、1150U/ml、1180U/ml或1200U/ml，優選rhGM-CSF的濃度為1000U/ml。

【0016】 根據本發明，所述增殖因子組合中，rhIL-4的濃度為400~500U/ml，例如400U/ml、420U/ml、440U/ml、450U/ml、480U/ml、490U/ml或500U/ml，優選rhIL-4的濃度為500U/ml。

【0017】 根據本發明，所述培養基體系還包括5%自體血清、1%谷氨酰胺和1%非必需氨基酸。

【0018】 具體地，本發明所述誘導培養基可以由如下組分組成：基礎培養基，5%自體血清，1%谷氨酰胺，1%非必需氨基酸，1~1.5 $\mu$ g/ml OK-432，500~750IU/ml IL-2，15~30ng/ml IL-15，45~60ng/ml IL-21。

【0019】 示例性地，本發明所述誘導培養基採用由如下組分組成：  
Cellgro基礎培養基，5%自體血清，1%谷氨酰胺，1%非必需氨基酸，1 $\mu$ g/ml  
OK-432，500IU/ml IL-2，20ng/ml IL-15，50ng/ml IL-21。

【0020】 具體地，本發明所述增殖培養基可以由如下組分組成：  
基礎培養基，5%自體血清，1%谷氨酰胺，1%非必需氨基酸，900~1200U/ml U/ml  
rhGM-CSF，400~500U/ml rhIL-4。

【0021】 示例性地，本發明所述增殖培養基採用由如下組分組成：  
Cellgro基礎培養基，5%自體血清，1%谷氨酰胺，1%非必需氨基酸，1000U/ml  
rhGM-CSF，500U/ml rhIL-4。

【0022】 本發明中，所述基礎培養基可以採用本領域公知的基礎培養基，  
例如RPMI-1640培養基等，本發明不做特殊限定。

【0023】 本發明中所提及的“自體血清”、“谷氨酰胺”、“非必需氨基酸”  
以及OK-432、IL-2、IL-15、IL-21、rhGM-CSF和rhIL-4，均採用本領域公知  
的含義，本領域技術人員可以根據實際需要採用其市售商品，對其來源不做特  
殊限定。

【0024】 本發明通過在誘導培養基和增殖培養基中添加組合因子，其能夠  
有效提高NK細胞的表達率，使其高達92.5%以上，同時大大提高NK細胞的擴增  
倍數，達到1000~2000倍，有效增強體外殺瘤活性。

【0025】 第二方面，本發明還提供了一種NK細胞體外擴增的方法，所述  
方法包括分階段依次使用本發明第一方面所述的誘導培養基和增殖培養基。

【0026】 根據本發明，所述NK細胞體外擴增的方法還包括利用固化的  
anti-CD137和RetroNectin直接培養Ficoll分離的PBMC。

【0027】 本發明採用固化的CD137單克隆抗體與NK細胞的CD137分子結合，激活了CD137共刺激信號通路，能夠促進NK細胞的活化和增殖；RetroNectin能夠有力地促進免疫細胞在體外的擴增，其作用機制是：促進細胞之間的黏附，增強信號傳導；誘導細胞活化和擴增；抵抗活化的細胞凋亡；促使細胞由G1期進入S期。本發明用固定化的RetroNectin進行NK細胞的培養，在促進NK細胞增殖的同時又避免了因細胞擴增而引起的細胞凋亡；綜合來看，本發明利用固化的anti-CD137和RetroNectin對培養瓶進行預包被，直接培養Ficoll分離的PBMC，anti-CD137和RetroNectin的組合不僅能夠促進NK細胞的活化和增殖，還可有效避免因細胞擴增而引起的細胞凋亡，二者俱有協同增效作用。

【0028】 本發明中所述anti-CD137和RetroNectin均採用本領域公知的含義，本領域技術人員可以根據實際需要採用其市售商品，對其來源不做特殊限定。

【0029】 根據本發明，所述利用固化的anti-CD137和RetroNectin直接培養Ficoll分離的PBMC的過程可以採用如下操作：

【0030】 取T75培養瓶2個，各加入5ml DPBS，培養瓶1加入濃度為5 $\mu$ g/ml的anti-CD137，培養瓶2加入濃度為5 $\mu$ g/ml的RetroNectin，4 $^{\circ}$ C過夜，使用前棄去包被液，用DPBS洗滌3次，待用；

【0031】 分離獲得外周血單個核細胞，將得到的PBMC按照 $5 \times 10^5$ /ml的濃度用誘導培養基進行重懸，接種到培養瓶1；2小時後將培養瓶1中的懸浮細胞轉移到培養瓶2；培養瓶1中的貼壁DC細胞用增殖培養基繼續培養24小時。

【0032】 根據本發明，所述NK細胞體外擴增的方法，具體包括以下步驟

(1) 利用anti-CD137和RetroNectin分別對培養瓶1和2進行預包被；

(2) 分離獲得外周血單個核細胞；

(3) 將得到的外周血單個核細胞用權利要求1~3之一所述的誘導培養基進行重懸，接種到培養瓶1；然後將培養瓶1中的懸浮細胞轉移到培養瓶2，培養瓶1中的貼壁DC細胞用權利要求1~3之一所述的增殖培養基繼續培養；

(4) 培養瓶1中貼壁的DC細胞成熟後重懸添加到培養瓶2中，補加rhGM-CSF和hIL-4；

(5) 繼續培養到第4天，補加IL-2、IL-15和IL-21；

(6) 培養直至收穫。

**【0033】** 根據本發明，步驟(1)所述預包被的方法包括：

**【0034】** 取培養瓶2個，各加入5ml DPBS，培養瓶1中加入濃度為5 $\mu$  g/ml的anti-CD137，培養瓶2中加入濃度為5 $\mu$  g/ml的RetroNectin，4 $^{\circ}$ C過夜，使用前棄去包被液，用DPBS洗滌3次，待用。

**【0035】** 示例性地，本發明所述NK細胞體外擴增的方法，包括以下步驟：

(1) 取培養瓶2個，各加入5ml DPBS，培養瓶1加入濃度為5 $\mu$  g/ml的anti-CD137，培養瓶2加入濃度為5 $\mu$  g/ml RetroNectin，4 $^{\circ}$ C過夜，使用前棄去包被液，用DPBS洗滌3次，待用；

(2) 無菌採外周血50ml，用DPBS按照1:2的比例稀釋外周血，共得稀釋後的血液150ml，取5支50ml離心管，每管加入15ml密度為1.077的Ficoll分離液，每管加入30ml稀釋後的外周血，800g，30min離心，洗滌得到PBMC；

(3) 將得到的PBMC按照5 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml的濃度用誘導培養基進行重懸，接種

到培養瓶1；2h後將培養瓶1中的懸浮細胞轉移到培養瓶2；培養瓶1中的貼壁DC細胞用增殖培養基繼續培養24h；

其中，誘導培養基的組成為：基礎培養基，5%自體血清，1%谷氨酰胺，1%非必需氨基酸，1 $\mu$ g/ml OK-432，500IU/ml IL-2，20ng/ml IL-15，50ng/ml IL-21；增殖培養基的組成為：基礎培養基，5%自體血清，1%谷氨酰胺，1%非必需氨基酸，1000U/ml rhGM-CSF，500U/ml rhIL-4；

(4) 24h之後，培養瓶1中貼壁的DC細胞成熟，並懸浮；將培養瓶1中的DC細胞轉移到50ml離心管，1000rpm，10min離心，重懸後添加到培養瓶2中，加入rhGM-CSF 1000U/ml和rhIL-4 500U/ml；

(5) 繼續培養到第4天，補加IL-2 500IU/ml，IL-15 20ng/ml，IL-21 50ng/ml；

(6) 培養到第7天，擴瓶培養；培養細胞到第14天進行收穫。

**【0036】** 本發明所述NK細胞體外擴增的方法，是利用固化的anti-CD137、RetroNectin直接培養Ficoll分離的PBMC，採用OK-432作為生物效應劑，在GM-CSF、IL-4、IL-2、IL-15、IL-21共同作用下體外活化和擴增自然殺傷細胞（NK）的方法，該方法製備的NK細胞CD3-CD16+/CD56+細胞表達率高達92.5%以上，經過14天培養，NK細胞可擴增1000~2000倍。

**【0037】** 與現有技術方案相比，本發明至少具有以下有益效果：

(1) 本發明採用固定化的抗人CD137單克隆抗體誘導和促進了NK細胞的體外擴增，OK-432作為生物效應劑提供了NK細胞初始活化的環境，RetroNectin增強了NK細胞的擴增效率，並且避免了因細胞增殖而引起的凋亡；

(2) 本發明創建了一種高效的NK細胞體外擴增的方法，該方法製備的NK細胞CD3-CD16+/CD56+細胞表達率高達92.5%以上，經過14天培養，NK細胞可擴增1000~ 2000倍。

#### 【圖式簡單說明】

【0038】 圖1是實施例1培養的NK細胞的增殖曲線；

【0039】 圖2-1、圖2-2和圖2-3是實施例1培養的NK細胞的流式細胞儀檢測結果圖；

【0040】 圖3是利用MTT法檢測實施例1培養的NK細胞對K562的殺傷活性；

【0041】 圖4是利用Calcein-AM法檢測實施例1培養的NK細胞對K562的殺傷活性。

#### 【實施方式】

【0042】 在下面的描述中，描述了本發明的幾個實施例。為解釋起見，提出了具體的配置和細節，以便對實施例提供透徹的理解。對於本領域的技術人員來說，本發明可以在沒有具體細節的情況下被實踐。以下的實施例讓本發明更容易理解，本領域技術人員將很容易明白，具體的例子只是為了說明目的，而不應被隨後的申請專利範圍所限制。應當指出的是，“包含”或“包括”這一過渡性術語是“包容性的”或“具有特性的”，是包容性的或開放式的，並且不排除額外的、未列舉的元素或方法步驟。

【0043】 本發明涉及一種用於NK細胞體外擴增的培養基體系及NK細胞體外擴增的方法。

【0044】 在整個申請過程中，過渡性術語“包含”與“包含”“含有”或

“特點是”是同義詞，是包容性的或開放式的，並且不排除額外的、未列舉的元素或方法步驟。

**【0045】** 通過參考下面的實施例可以更好地理解本發明。本領域技術人員將很容易理解，所提供的例子僅僅是為了說明目的，而不意味著限制本發明的範圍。本發明由隨後的申請專利範圍作界定。

## 具體實施例

### 實施例 1

**【0046】** (1) 培養瓶預包被：

取 T75 培養瓶 2 個，各加入 5ml DPBS，培養瓶 1 中加入濃度為 5 $\mu$ g/ml 的 anti-CD137，培養瓶 2 中加入濃度為 5 $\mu$ g/ml 的 RetroNectin，4 $^{\circ}$ C 過夜；培養瓶 1 用於促進 DC 細胞成熟，培養瓶 2 用於 NK 細胞活化擴增；

**【0047】** (2) 誘導培養基和增殖培養基的配製：

誘導培養基：Cellgro 基礎培養基，加 5% 自體血清，1% 谷氨酰胺，1% 非必需氨基酸，1 $\mu$ g/ml OK-432，500IU/ml IL-2，IL-15 20ng/ml，IL-21 50ng/ml；

增殖培養基：Cellgro 基礎培養基，加 5% 自體血清，1% 谷氨酰胺，1% 非必需氨基酸，1000U/ml rhGM-CSF，500U/ml rhIL-4；

**【0048】** (3) Ficoll 分離液的預處理

取 250ml 1.077 的 Ficoll 分離液，加入 1ml DPBS，搖勻，待用；

**【0049】** (4) 無菌採外周血 50ml，用 DPBS 按照 1:2 的比例稀釋外周血，共得稀釋後的血液 150ml，取 5 支 50ml 離心管，每管加入 15ml 密度為 1.077 的 Ficoll 分離液，每管加入 30ml 稀釋後的外周血，800g，30min 離心，洗滌得到 PBMC；

**【0050】** (5) 將得到的 PBMC 按照  $5 \times 10^5$ /ml 的濃度用誘導培養基進行重

懸，接種到培養瓶1；2h後將培養瓶1中的懸浮細胞轉移到培養瓶2；培養瓶1中的貼壁DC細胞用增殖培養基繼續培養24h；

【0051】 24h之後，培養瓶1中貼壁的DC細胞成熟，並懸浮；將培養瓶1中的DC細胞轉移到50ml離心管，1000rpm，10min離心，重懸後添加到培養瓶2中，加入rhGM-CSF 1000U/ml和rhIL-4 500U/ml；

【0052】 (6)繼續培養到第4天，補加IL-2 500IU/ml，IL-15 20ng/ml，IL-21 50ng/ml；

【0053】 (7)培養到第7天，擴瓶培養；培養細胞到第14天進行收穫。通過參考下面的實施例可以更好地理解本發明。本領域技術人員將很容易理解，所提供的例子僅僅是為了說明目的，而不意味著限制本發明的範圍。本發明由隨後的申請專利範圍作界定。

## 實施例 2

【0054】 與實施例1相比，除了步驟(2)中的培養基配製如下：

誘導培養基：Cellgro基礎培養基，加5%自體血清，1%谷氨酰胺，1%非必需氨基酸，1.5 $\mu$ g/ml OK-432，750IU/ml IL-2，IL-15 30ng/ml，IL-21 60ng/ml；

增殖培養基：Cellgro基礎培養基，加5%自體血清，1%谷氨酰胺，1%非必需氨基酸，1200U/ml rhGM-CSF，500U/ml rhIL-4；

其他步驟與條件與實施例1相同。

## 實施例 3

【0055】 與實施例1相比，除了步驟(2)中的培養基配製如下：

誘導培養基：Cellgro基礎培養基，加5%自體血清，1%谷氨酰胺，1%非必需氨基酸

基酸， $1\mu\text{g/ml}$  OK-432， $500\text{IU/ml}$  IL-2，IL-15  $15\text{ng/ml}$ ，IL-21  $45\text{ng/ml}$ ；

增殖培養基：Cellgro基礎培養基，加5%自體血清，1%谷氨酰胺，1%非必需氨基酸， $900\text{U/ml}$  rhGM-CSF， $400\text{U/ml}$  rhIL-4；

其他步驟與條件與實施例1相同。

#### 實施例 4

【0056】 由於實施例2-3培養的NK細胞的情況與實施例1類似，後續採用實施例1培養的細胞進行後續試驗。

【0057】 配製0.4%的台盼藍溶液，調節其pH值至7.0~7.2，分別取實施例1第0天、第4天，第7天，第9天、第11天、第14天培養的細胞，取 $50\mu\text{l}$  NK細胞懸液，加入 $50\mu\text{l}$  台盼藍混合，細胞染色4min，細胞計數板計數細胞總數量。

【0058】 由圖1可以看出，在培養至第9天時，NK細胞的增殖開始表現為對數生長，其在第14天時，細胞數量可達到 $2700\times 10^6$ 。

#### 實施例 5 - NK細胞的表面標誌物表達（流式檢測）

【0059】 取實施例1培養至第14天的NK細胞懸液0.2ml，DPBS洗滌2次，用直接免疫熒光法，加入FITC-CD3 CD16/CD56-PE  $20\mu\text{l}$ ，於 $4^{\circ}\text{C}$ 放置30min，通過流式細胞儀檢測NK的純度。

【0060】 由圖2-1、圖2-2和圖2-3可以看出，經培養至第14天，NK細胞的含量大幅上升，表達率，即純度可達到92.59%。

#### 實施例 6 - NK細胞的體外殺瘤實驗（MTT法）

【0061】 用96孔平底培養板，設實驗孔、單純效應細胞孔、單純靶細胞孔

各3個，並設空白孔。於實驗孔及單純靶細胞孔，加入K562。在實驗孔及單純效應細胞孔中各加入實施例1的培養14天的NK細胞，效靶比設為5:1、10:1、20:1和40:1四組，培養24h。加入WST 20 $\mu$  l，繼續培養4h，酶標儀檢測OD值。

**【0062】** 殺傷活性(%)=[1-(實驗組OD值-單純效應細胞組OD值) $\times$ 單純靶細胞OD值] $\times$ 100%。

**【0063】** 由圖3可以看出，在5:1~40:1效靶比範圍內NK細胞與K562細胞和PC-3細胞分別共培養24h後，NK細胞發揮了較強的殺瘤活性；並且效靶比越高，其體外殺瘤活性越強。

#### 實施例 7 - NK細胞的體外殺瘤實驗（Calcein-AM法）

**【0064】** 用96孔平底培養板，設實驗孔、單純效應細胞孔、單純靶細胞孔各3個，並設空白孔。於實驗孔及單純靶細胞孔，加入標記Calcein-AM的K562（綠色熒光標記活細胞）。在實驗孔及單純效應細胞孔中各加入實施例1經培養21天的NK細胞，效靶比設為500:1、400:1、300:1、200:1及100:1五組，4h後熒光顯微鏡觀察結果並拍照。

**【0065】** 由圖4可以看出，PBMC在培養前的細胞毒活性較低，隨著培養時間的增加，細胞毒活性逐漸增強。以K562為靶細胞，在100:1~500:1效靶比範圍內，NK細胞在體外較短時間內就發揮了其殺瘤活性；2h後，大量NK細胞向靶細胞進行遷移，圍繞在腫瘤細胞周圍，釋放殺傷介質、細胞因子或通過ADCC作用，開始對腫瘤細胞進行殺傷，少部分腫瘤細胞已經發生凋亡（熒光減弱）；4h後，大部分腫瘤細胞處於凋亡的狀態（熒光減弱或沒有）；並且效靶比越高，其殺傷活性越強。

【0066】 通過上述結果可以得出，本發明創建了一種高效的NK細胞體外擴增的方法，該方法製備的NK細胞CD3-CD16+/CD56+細胞表達率高達92.5%以上，經過14天培養，NK細胞可擴增1000~2000倍，並且體外殺瘤活性強。

【0067】 申請人聲明，本發明通過上述實施例來說明本發明的詳細結構特徵，但本發明並不局限於上述詳細結構特徵，即不意味著本發明必須依賴上述詳細結構特徵才能實施。所屬技術領域的技術人員應該明了，對本發明的任何改進，對本發明所選用部件的等效替換以及輔助部件的增加、具體方式的選擇等，均落在本發明的保護範圍和公開範圍之內。

【0068】 以上詳細描述了本發明的優選實施方式，但是，本發明並不限於上述實施方式中的具體細節，在本發明的技術構思範圍內，可以對本發明的技術方案進行多種簡單變型，這些簡單變型均屬於本發明的保護範圍。

【0069】 另外需要說明的是，在上述具體實施方式中所描述各個具體技術特徵，在不矛盾的情況下，可以通過任何合適的方式進行組合，為了避免不必要的重複，本發明對各種可能的組合方式不再另行說明。

【0070】 此外，本發明的各種不同的實施方式之間也可以進行任意組合，只要其不違背本發明的思想，其同樣應當視為本發明所公開的內容。

## 【發明申請專利範圍】

【第1項】一種用於NK細胞體外擴增的培養基體系，其包括誘導培養基和增殖培養基，其中：

所述誘導培養基包含基礎培養基和誘導因子組合；

所述誘導因子組合包含OK-432、IL-2、IL-15和IL-21；

所述增殖培養基包含基礎培養基和增殖因子組合；

所述增殖因子組合包含rhGM-CSF和rhIL-4。

【第2項】如請求項1所述的培養基體系，其中所述誘導培養基含有濃度為1~1.5 $\mu$ g/ml的OK-432，濃度為500~750IU/ml的IL-2，濃度為15~30 ng/ml的IL-15，和濃度為45~60 ng/ml的IL-21。

【第3項】如請求項1所述的培養基體系，其中所述增殖培養基含有濃度為900~1200 U/ml的rhGM-CSF和濃度為400~500 U/ml的rhIL-4。

【第4項】如請求項1所述的培養基體系，其中所述誘導培養基含有濃度為1 $\mu$ g/ml的OK-432，濃度為500 IU/ml的IL-2，濃度為20 ng/ml的IL-15，和濃度為50 ng/ml的IL-21。

【第5項】如請求項1所述的培養基體系，其中所述增殖培養基含有濃度為1000 U/ml的rhGM-CSF和濃度為500 U/ml的rhIL-4。

【第6項】如請求項1所述的培養基體系，其中所述誘導培養基、增殖培養基或兩者進一步含有5% (v/v) 自體血清，1% (v/v) 穀氨酰胺和1% (v/v) 非必需氨基酸。

【第7項】一種NK細胞體外擴增的方法，其包括在培養基體系中培養一群外周血單核細胞(PBMC)以獲取NK細胞群，所述體系含有誘導培養基和增殖培養基，其中

所述誘導培養基包含基礎培養基和含有OK-432、IL-2、IL-15和IL-21的誘導因子組合；和

所述增殖培養基包含基礎培養基和含有rhGM-CSF和rhIL-4的增殖因子組合。

【第8項】如請求項7所述的方法，包含以下步驟：

- (a) 使用所述誘導培養基在被 anti-CD137 預包被的培養瓶 1 中培養 PBMC；
- (b) 將培養瓶 1 中的懸浮細胞轉移到被 RetroNectin 預包被的培養瓶 2 中；
- (c) 使用所述增殖培養基在培養瓶 1 中培養貼壁的樹突狀 (DC) 細胞；
- (d) 將培養瓶 1 中非貼壁的樹突狀 (DC) 細胞收集並轉移至培養瓶 2 中，並使用所述增殖培養基在培養瓶 2 中培養一段時間細胞，從而獲得所述 NK 細胞群。

【第9項】如請求項7所述的方法，包含以下步驟：

- (a) 向被 anti-CD137 預包被的培養瓶 1 中添加外周血單核細胞(PBMC)，並使用所述誘導培養基培養所述 PBMC；
- (b) 將培養瓶 1 中的懸浮細胞轉移到被 RetroNectin 預包被的培養瓶 2 中；
- (c) 使用所述增殖培養基在培養瓶 1 中培養貼壁的樹突狀 (DC) 細胞；
- (d) 在步驟 c)后，收集培養瓶 1 中的非貼壁樹突狀 (DC) 細胞，並將收集到的細胞轉移至培養瓶 2 中；
- (e) 使用所述增殖培養基在培養瓶 2 中按照第一段時長培養細胞；和

(f) 向所述培養瓶 2 中加入 IL-2、IL-15 和 IL-21，并按照第二段時長培養細胞，從而獲得所述 NK 細胞群。

【第10項】 如請求項9所述的方法，其中培養瓶1被濃度為5 $\mu$  g/ml的 anti-CD137預包被。

【第11項】 如請求項9所述的方法，其中培養瓶2被濃度為5 $\mu$  g/ml的 RetroNectin預包被。

【第12項】 如請求項9所述的方法，其中第一段時長為4到6天。

【第13項】 如請求項9所述的方法，其中第二段時長為三天或更長時間。

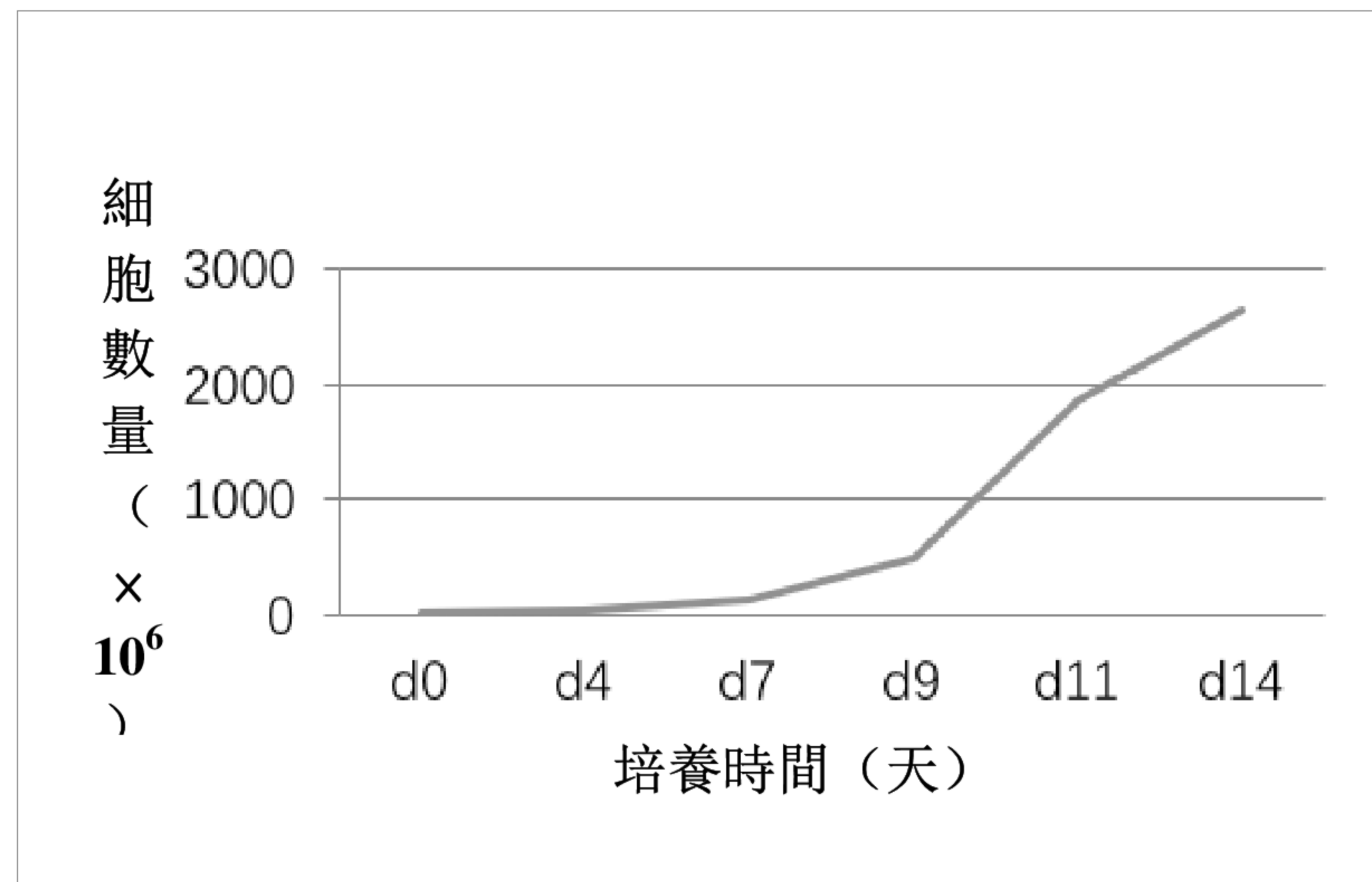
【第14項】 如請求項9所述的方法，其中NK細胞群在步驟e)開始后至少14天后獲得。

【第15項】 如請求項9所述的方法，其中NK細胞群在步驟e)開始后至少21天后獲得。

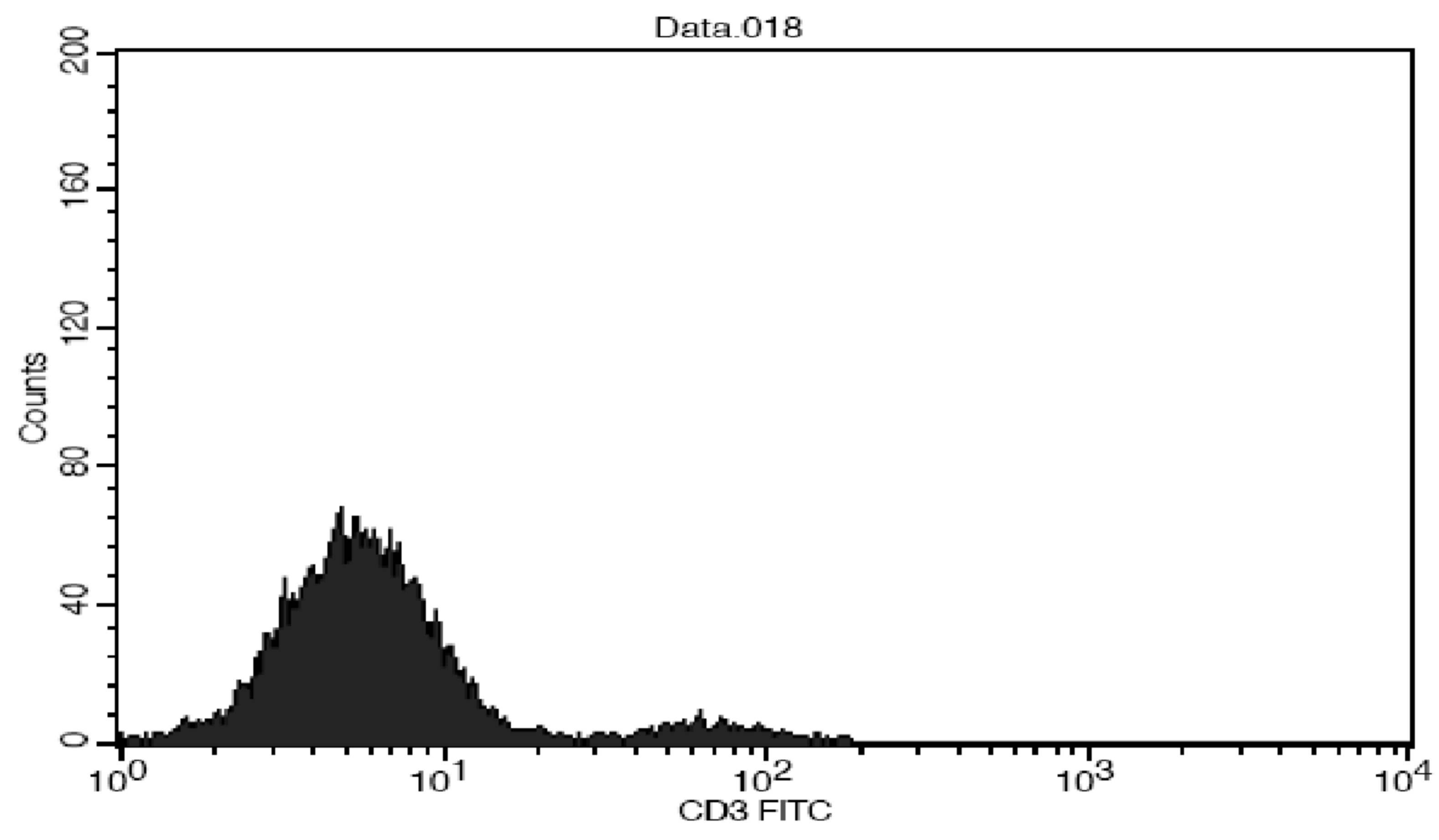
【第16項】 如請求項7所述的方法，產生NK細胞群，其中至少90%的NK細胞為CD3-CD16+/CD56+。

【第17項】 一種由請求項7所述的方法獲得的天然殺傷(NK)細胞群，其中至少90%的NK細胞為CD3-CD16+/CD56+。

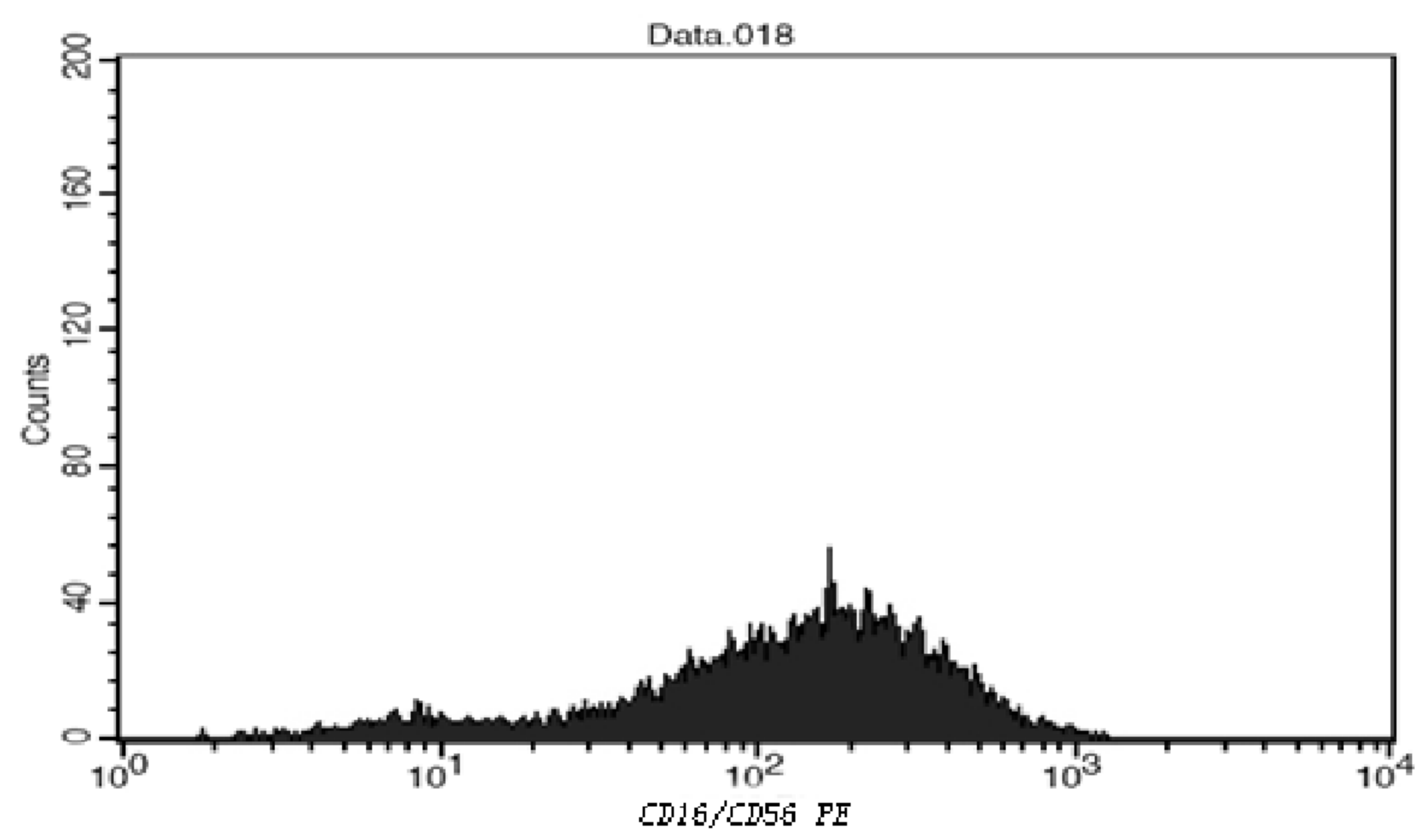
## 【發明圖式】



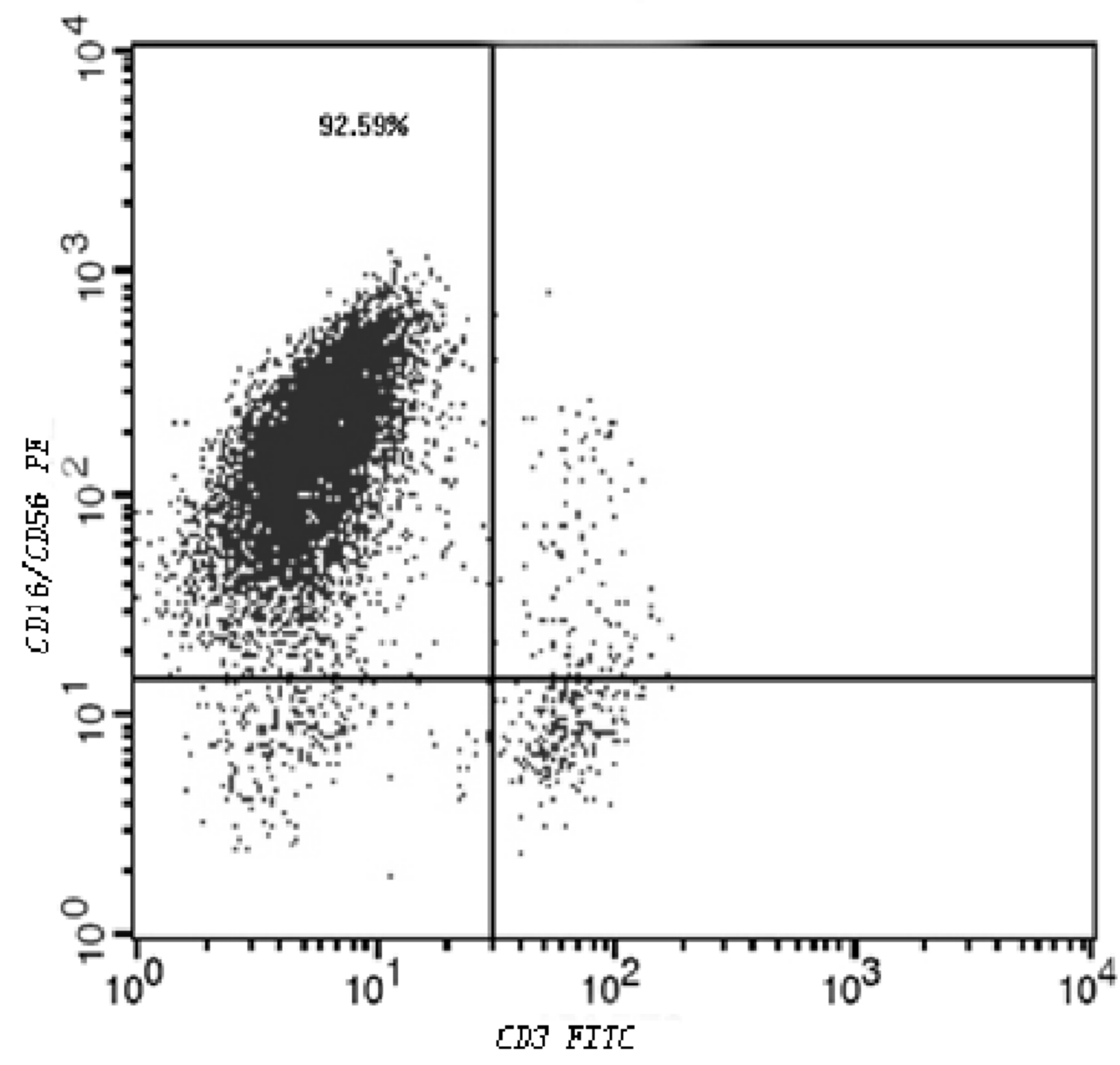
【圖 1】



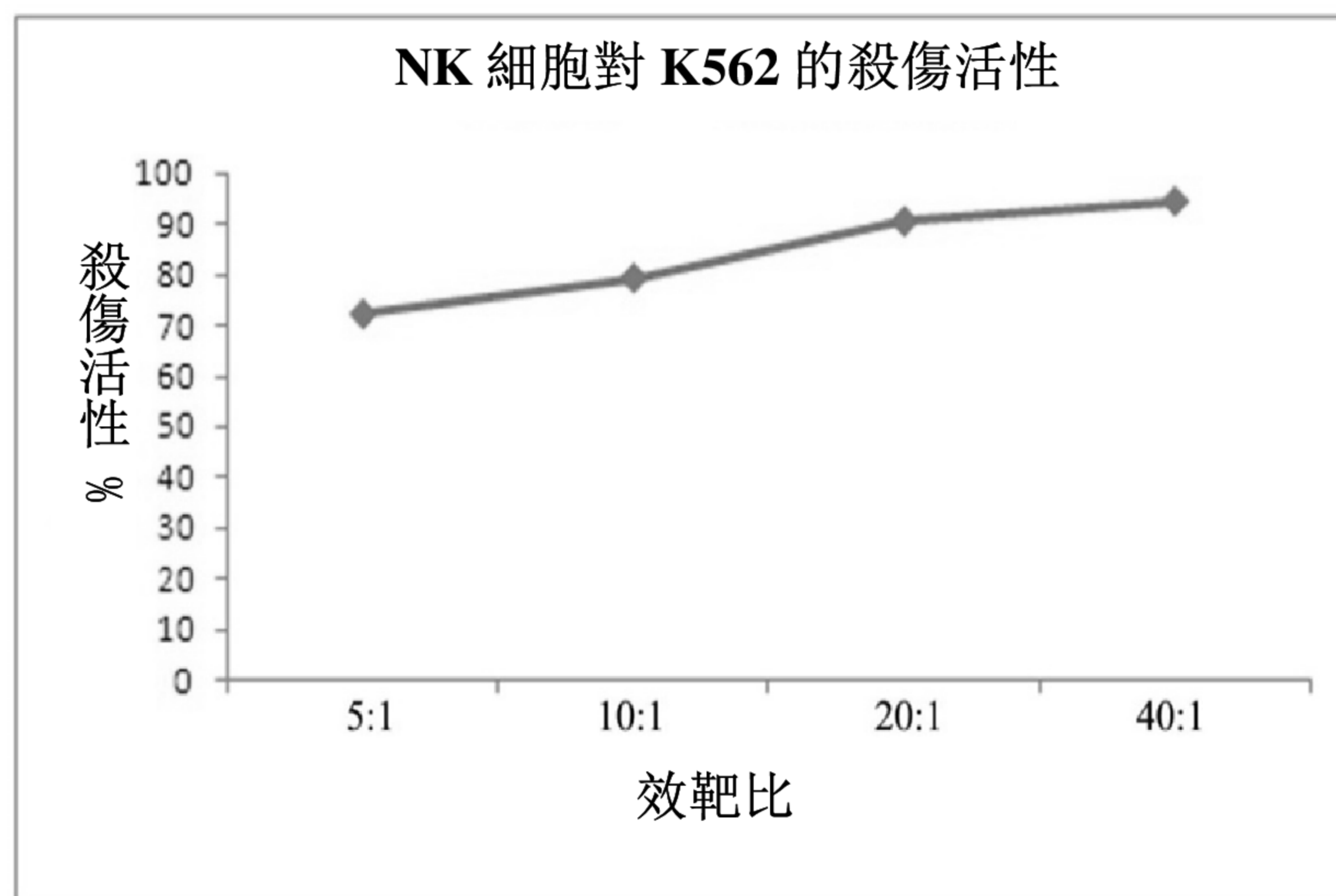
【圖 2-1】



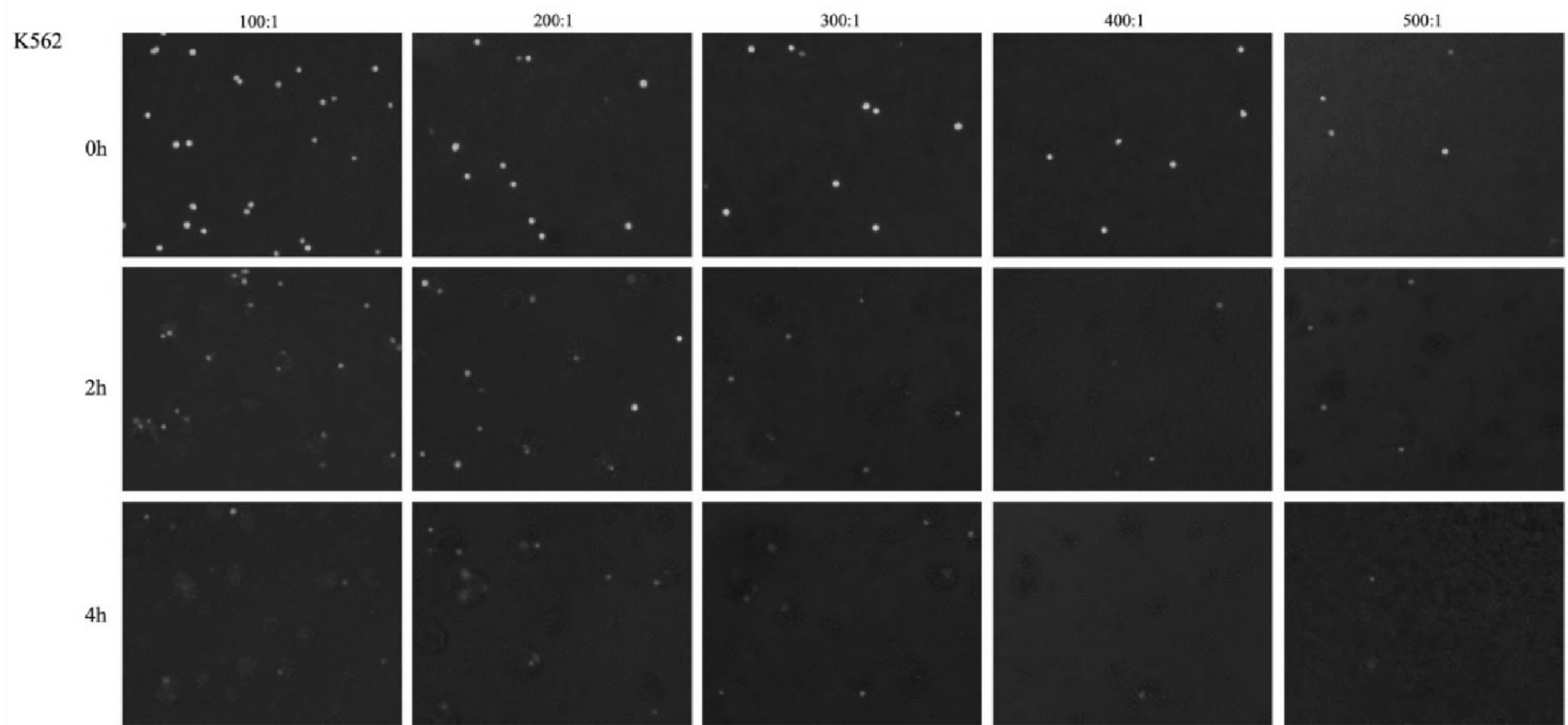
【圖 2-2】



【圖 2-3】



【圖 3】



【圖 4】