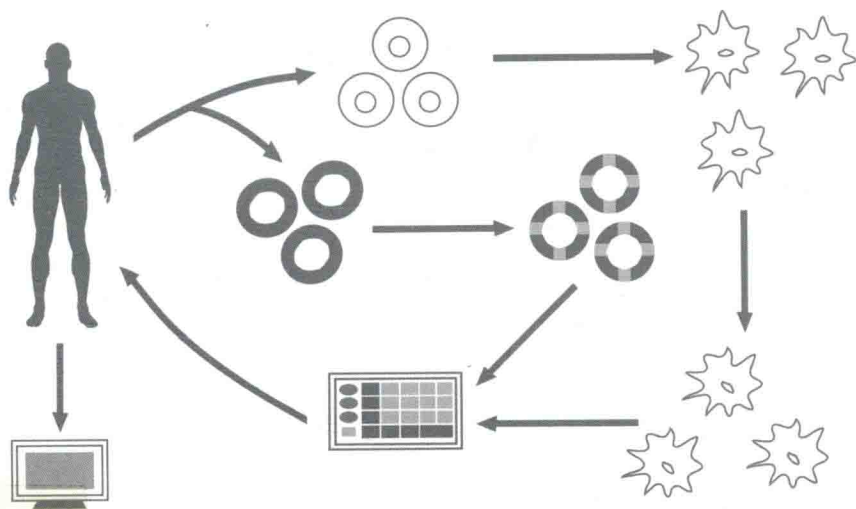


主编 任 军 H. Kim Lyerly(美)

Cancer Immunotherapy Cell Processing
Procedures and Clinical Application Updates

肿瘤免疫治疗

细胞制备操作规程及临床治疗进展



北京市科委 2013 年度科技创新基地培育与发展工程专项项目
肿瘤免疫治疗细胞制备技能培训教材

肿瘤免疫治疗细胞制备操作 规程及临床治疗进展

Cancer Immunotherapy — Cell Processing
Procedures and Clinical Advances

主 编 任 军 H. Kim Lyerly

副 主 编 杨化兵

编 者 (以姓氏笔画为序)

H. Kim Lyerly	马 博	王小利	
吉浩明	朱希山	伍江平	任 军
刘 娟	刘美生	闾冬梅	李文斌
李雨晨	杨 芳	杨化兵	杨东海
杨梦晗	余 靖	何彦辉	
宋清坤	张红梅	张春荣	
陈 峰	周 蕾	周心娟	
姜 妮	袁艳华	黄红艳	常 德



人民军医出版社

PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS

北 京

图书在版编目 (CIP) 数据

肿瘤免疫治疗细胞制备操作规程及临床治疗进展 / 任军, (美) 莱利 (Lyerly, H.K.) 主编.
— 北京: 人民军医出版社, 2015.6
ISBN 978-7-5091-8416-5

I. ①肿… II. ①任… ②莱… III. ①肿瘤免疫疗法 IV. ①R730.51

中国版本图书馆CIP数据核字(2015)第094921号

策划编辑: 杨 淮 文字编辑: 韩 志 责任审读: 王三荣
出版发行: 人民军医出版社 经销: 新华书店
通信地址: 北京市 100036 信箱 188 分箱 邮编: 100036
质量反馈电话: (010) 51927290; (010) 51927283
邮购电话: (010) 51927252
策划编辑电话: (010) 51927300-8027
网址: www.pmmp.com.cn

印、装: 三河市春园印刷有限公司
开本: 787mm×1092mm 1/16
印张: 13 字数: 281千字
版、印次: 2015年6月第1版第1次印刷
印数: 0001-2000
定价: 60.00元

版权所有 侵权必究
购买本社图书, 凡有缺、倒、脱页者, 本社负责调换

内容提要

肿瘤免疫治疗因其在临床治疗中的显著效果，已经在越来越多的肿瘤治疗中心开展。作者总结了与美国杜克大学肿瘤中心多年合作的经验并参照国际标准，联合国内多名专家共同编写而成。本书详细阐述了具备 GMP 基本条件的细胞制备中心要求及肿瘤免疫治疗标准操作流程等内容。全书内容权威、实用、先进，不仅适用于细胞免疫治疗平台建设的高级专业人员，也可为从事肿瘤免疫治疗临床医务人员及科研人员参考之用。

前 言

随着分子免疫学及相关学科的飞速发展，肿瘤免疫治疗已经步入了临床实践，越来越多的临床研究结果带给患者明确的临床获益。肿瘤细胞免疫治疗已经成为肿瘤综合治疗的一个重要补充。与国外先进的肿瘤免疫治疗中心相比，国内的细胞免疫研究及治疗中心蓬勃而起，逐渐在全国各省、市、地区分布。因此，需要建立标准的技术平台及操作规范，以进一步规范、完善国内的细胞免疫治疗。本书作为国内首部关于肿瘤免疫治疗平台建设及标准操作流程的专著，由首都医科大学附属北京世纪坛医院 / 首都医科大学肿瘤医学院、肿瘤治疗性疫苗北京市重点实验室组织专家共同编写，参照国际公认的、从事肿瘤细胞免疫治疗权威实验室的平台要求及肿瘤免疫治疗标准流程、国内外相关专著，并结合专业团队的经验，详细阐述了具备 GMP 基本条件的细胞制备中心要求及肿瘤免疫治疗标准操作流程。内容不仅包括建立细胞制备中心需遵循的基本原则，结合 GCP 的要求，对于实验室仪器、人员、数据的具体管理规范，还对包括非特异性细胞免疫治疗以及特异性细胞免疫治疗在内的各项标准操作流程进行了详细介绍。同时，还就肿瘤细胞生物治疗临床应用的最新技术及进展做了较全面的阐述。

本书不足之处，请同行批评指正。

任 军

首都医科大学附属北京世纪坛医院院长助理 / 肿瘤中心主任

首都医科大学肿瘤学系常务副主任

肿瘤治疗性疫苗北京市重点实验室主任

北京大学肿瘤学博士生导师

首都医科大学肿瘤学博士生导师

军事医学科学院免疫学博士生导师

美国杜克大学医学院研究员 (Faculty)

目 录

第一部分 肿瘤免疫治疗细胞制备平台建设及操作规程

第 1 章 具备 GMP 基本条件的细胞制备中心要求	3
第一节 具备 GMP 基本条件的细胞制备中心基本构成	3
一、基本实验室.....	3
二、辅助实验室.....	3
第二节 建立细胞制备中心的基本原则	4
第三节 细胞培养基的种类和储存使用要求	5
一、细胞培养基的种类.....	5
二、细胞培养基储存使用要求.....	6
第四节 实验室仪器及设备运行	6
一、细胞培养实验室的设置.....	6
二、细胞培养实验室的设备.....	8
第五节 细胞治疗从业人员基本要求	12
一、免疫细胞治疗临床医师.....	12
二、免疫细胞制备实验室人员.....	12
第六节 实验室清洁要求及流程	12
一、玻璃器皿的清洁要求及流程.....	12
二、胶塞的清洁要求及流程.....	16
三、塑料器皿的清洁要求及流程.....	16
四、消毒要求及流程.....	17
五、实验室医疗污物的处理.....	19
第七节 细胞免疫治疗细胞制备的质量保证和技术指标	19
一、细胞治疗质量控制要求.....	19
二、细胞制备技术指标.....	20
第八节 保持细胞制备中心清洁的操作管理要求	20
第九节 免疫治疗临床研究（试验）的数据和信息化管理	21
一、数据质量管理体系的建立和实施.....	21
二、细胞治疗数据管理系统的基本要求.....	22
三、数据管理的标准操作规程.....	23

第十节 免疫治疗临床研究(试验)的患者信息保密性管理	24
一、基本原则	24
二、报告制度	24
第十一节 肿瘤外周血标本收集及保存标准操作规程	25
一、适用范围	25
二、外周血标本收集要求	25
三、外周血分离	25
四、外周血单个核细胞冻存步骤	26
五、备注	27
第十二节 肿瘤组织标本处置标准操作规程(SOP)	27
一、适用范围	27
二、操作方法	27
三、石蜡包埋组织收集	27
四、冻存组织收集	28
第2章 肿瘤免疫治疗细胞采集标准操作流程	30
第一节 细胞采集前准备	30
一、患者知情同意书	30
二、采集外周血单个核细胞注意事项	31
三、非特异性细胞免疫治疗的临床基本流程	31
四、特异性细胞免疫治疗的临床基本流程	37
第二节 外周血单个核细胞采集	39
一、采集外周血单个核细胞的仪器、材料及试剂	39
二、临床申请流程及注意事项	40
三、开机前准备	40
四、血细胞分离全过程关键点	41
五、采集过程中血流不畅原因及解决办法	42
六、分离结束后的工作流程	43
七、医疗防护与院内感染	43
第三节 外周血单个核细胞分离的临床具体步骤	43
一、采集前两日	43
二、外周血单个核细胞采集第1天	43

三、外周血单个核细胞采集第 2 天	44
四、拔出静脉置管	45
五、相关数据回报、记录、录入	45
第四节 外周血细胞分离观察记录	45
第五节 外周血细胞分离护理流程	45
一、探访患者	47
二、血细胞分离日期确定	47
三、血细胞分离前准备	47
四、血细胞分离中的患者护理及相关工作	47
五、血细胞分离结束患者护理及相关工作	48
六、血细胞分离中的关键环节	48
七、血细胞分离应急流程图	48
第 3 章 肿瘤免疫治疗细胞冻存与复苏标准操作流程	50
第一节 外周血单个核细胞冻存与复苏所需材料及设备	50
第二节 外周血单个核细胞冻存与复苏操作步骤	50
第三节 外周血单个核细胞冻存与复苏操作过程管理规范	56
第四节 外周血单个核细胞冻存与复苏应急措施	56
第五节 细胞冻存与复苏的安全性保障	58
第 4 章 肿瘤免疫治疗细胞培养标准操作流程	59
第一节 非特异性细胞免疫治疗培养流程（以 DC-CIK 为例）	59
第二节 特异性细胞免疫治疗培养流程	60
一、重组腺相关病毒介导的特异性肿瘤抗原负载树突状细胞（AAV-DC）及其 CTL 细胞培养 SOP	60
二、特异性多肽负载树突状细胞培养标准操作流程	62
三、特异性多肽负载树突状细胞培养	71
第三节 细胞培养添加物配制操作流程	71
一、树突状细胞培养液的配制	71
二、细胞因子溶液的配制和分装	72
三、淋巴因子和多肽溶液的配制与分装	74
四、从全血和白细胞分离物中获取血浆	75

五、患者细胞冻存用自体血浆的处理及保存·····	77
第四节 细胞培养质量监测流程·····	78
一、内毒素及微生物检测（细菌、支原体及衣原体）·····	78
二、流式细胞仪检测用碘化丙啶的细胞染色步骤·····	78
三、树突状细胞表型监测·····	79
四、培养细胞回输·····	80
第5章 肿瘤免疫治疗细胞培养及临床回输的标准操作流程·····	95
第一节 细胞培养及回输流程·····	95
一、静脉回输 DC-CIK 或 AAV-DC 流程·····	95
二、浆膜腔（胸、腹、心包）回输 DC-CIK 或 CIK 流程·····	96
第二节 复苏冻存外周血单个核细胞培养 CIK 细胞流程·····	96
第三节 细胞回输不良反应的监测及处理·····	96
第6章 肿瘤细胞治疗的免疫学指标评价·····	98
第一节 细胞免疫治疗患者的免疫学指标监测·····	98
一、免疫功能监测·····	98
二、肿瘤评估·····	101
第二节 细胞治疗患者的随访·····	102
一、研究筛选访视·····	102
二、治疗和观察访视·····	102

第二部分 肿瘤免疫治疗的临床应用新进展

第7章 恶性黑色素瘤的免疫治疗·····	107
一、细胞因子·····	107
二、单克隆抗体·····	107
三、肿瘤疫苗·····	109
四、过继性免疫治疗·····	109

第8章 淋巴瘤的免疫治疗	113
一、单克隆抗体.....	113
二、放射免疫治疗.....	114
三、肿瘤疫苗.....	114
四、树突状细胞为基础的细胞免疫治疗.....	114
第9章 头颈部肿瘤的免疫治疗	117
一、单克隆抗体.....	117
二、细胞因子.....	120
三、过继性免疫治疗.....	121
四、肿瘤疫苗.....	121
五、小结.....	122
第10章 乳腺癌的免疫治疗	125
一、主动免疫治疗.....	126
二、被动免疫治疗.....	127
三、免疫调节剂治疗.....	128
第11章 肺癌的免疫治疗	133
一、单克隆抗体治疗.....	133
二、肿瘤疫苗治疗.....	133
三、过继性免疫治疗.....	135
四、细胞因子治疗.....	136
第12章 消化道肿瘤的免疫治疗	139
第一节 食管癌的免疫治疗	139
一、单克隆抗体治疗.....	139
二、肿瘤疫苗治疗.....	139
三、过继性免疫治疗.....	140
第二节 肝癌的免疫治疗	141
一、单克隆抗体治疗.....	141

二、肿瘤疫苗治疗	142
三、过继性免疫治疗	143
第三节 胃癌的免疫治疗	147
一、基于效应 T 细胞的免疫治疗	147
二、基于树突状细胞的免疫治疗	148
三、基于 DC 联合细胞因子诱导的杀伤细胞免疫治疗	151
四、基于调节性 T 细胞的免疫治疗	151
五、展望	151
第四节 结直肠癌的免疫治疗	155
一、肿瘤疫苗治疗	156
二、过继性细胞免疫治疗	156
三、单克隆抗体治疗	157
四、其他免疫治疗	157
第五节 胰腺癌免疫治疗现状及进展	159
一、单克隆抗体治疗	159
二、过继性细胞免疫治疗	159
三、肿瘤疫苗治疗	160
第 13 章 妇科肿瘤的免疫治疗	167
第一节 卵巢癌的免疫治疗	167
一、单克隆抗体免疫治疗	167
二、肽段 / 蛋白载体介导的免疫治疗	168
三、过继性细胞免疫治疗	169
四、树突状细胞介导的免疫治疗	169
第二节 宫颈癌的免疫治疗	170
一、肽段 / 蛋白载体介导的治疗性疫苗	170
二、树突状细胞介导的疫苗	171
第 14 章 脑胶质瘤的免疫治疗	174
一、树突状细胞疫苗	174
二、过继性细胞免疫治疗	175
三、其他免疫治疗方法	176

第 15 章 肾癌的免疫治疗	179
一、细胞因子治疗.....	179
二、肿瘤疫苗.....	180
三、树突状细胞 (DC) 为基础的细胞免疫治疗.....	180
四、分子靶向治疗.....	182
第 16 章 “化疗联合免疫治疗” 模式治疗转移性乳腺癌临床实践	185
一、化疗联合免疫治疗蒽环或紫杉类治疗失败的转移性乳腺癌.....	185
二、三阴性乳腺癌的特色治疗.....	185
三、小剂量环磷酰胺口服维持治疗及其免疫调节作用.....	186
四、乳腺癌肝转移的临床治疗.....	186
五、含健择方案治疗乳腺癌脊髓转移的临床探索.....	187
六、恶性浆膜腔积液的免疫治疗.....	187
附录 A 几种常见肿瘤的基因分型.....	192
附录 B 细胞治疗相关国际学术组织.....	193

第一部分
肿瘤免疫治疗细胞制备平台建设
及操作规程

第1章 具备 GMP 基本条件的细胞制备中心要求

树突状细胞调节的细胞因子诱导的杀伤细胞 (dendritic cell activated and cytokine induced killer cell, DC-CIK) 是指将人体外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMCs) 分别诱导培养 DC 和 CIK 细胞, DC 培养成熟后再与 CIK 细胞共培养而获得的异质性细胞群体。两者共培养时, T 淋巴细胞主要通过 CD40L/CD40 机制促使 DC 进一步成熟而大量释放 IL-12, IL-12 通过与 NKT 细胞表面 IL-12R 结合, 进一步提高 NKT 细胞活性和 IFN- γ 释放; 后者是重要细胞因子, 具有很强的抗肿瘤免疫调节活性, 从而使 DC-CIK 细胞获得比 CIK 细胞更强大的杀伤活性和增殖能力。

第一节 具备 GMP 基本条件的细胞制备中心基本构成

一、基本实验室

1. 细胞冻存间 细胞制备中心应设有细胞冻存间, 一般需要计算机、打印机各 1 台, 1 ~ 2 台 -20°C 冰箱, 1 ~ 2 台 -80°C 冰箱和液氮罐。应有专人负责管理。有条件时冰箱应和监视室联网, 有自动报警系统。

2. 细胞培养基储存间 根据开展细胞治疗的种类, 应选择不同的培养基。细胞培养基的质量是影响临床治疗的关键技术之一。目前有较多已经商品化的不同种类的培养基, 在国外市场, 同一名称的培养基分为实验室研究用和用于临床级别两类, 均经过严格的细菌、病毒及致热源检测, 培养基的均已性和稳定性好。

我们不建议各实验室自行配制细胞培养基, 因为细胞培养基如同临床输液一样, 未通过合格检测的培养基存在安全风险。

3. 物品消毒间 细胞培养扩增过程均应在严格的无菌条件下进行。用于人体治疗的物品均应严格执行无菌操作规范。应使用无菌口罩、手套、工作服、鞋套。如有统一配送的条件, 可以定期预定使用物品的数量。若需要自行准备消毒物品时, 应配有高压消毒设备。物品消毒间应配备实验台、高压灭菌锅、排风灭火设备、细菌过滤设备、干热消毒柜、电炉等。

灭菌锅的选择应根据不同的要求选择不同型号的灭菌锅。一般实验室可选用小

型的医用手提式高压灭菌锅，较大的实验室可选用立式自动控制压力和温度的灭菌锅。中试生产车间可选用大型的卧式灭菌锅。

一般情况应有传递窗，由于物品的简单转运，无菌传递窗不允许转运污物或非洁净物品。

4. 培养室 要保持培养室空气洁净度应为4级。

二、辅助实验室

1. 细胞形态学实验室 其功能是对培养材料进行细胞学观察。要求清洁、明亮、干燥，使各种光学仪器不受潮湿和灰尘污染。应配置各种显微镜、照相系统等。

2. 数据保存和溯源保存室 细胞培养过程，包括所用细胞因子批次、批号，细胞培养液的出厂日期、批次等均应该严格录入；对于患者的细胞数量、采集物的数量、体积、存放位置等均应该双人录入，核对。同时注意严格保护患者的隐私。应设置专用的计算机及打印机。

3. 流式细胞室 应配置用于细胞制备后分子表型的检测，判断细胞制备的质量和数量。

第二节 建立细胞制备中心的基本原则

1. 医疗机构开展自体免疫细胞（DC/CIK、T细胞、NK细胞）治疗技术，应当与其功能、任务相适应。

2. 三级甲等医院，具有卫生行政部门核准登记的与应用自体免疫细胞（T细胞、NK细胞）治疗技术有关的诊疗科目。

3. 具有与自体免疫细胞（DC/CIK、T细胞、NK细胞）治疗相关的科室，科室人员组成包括有与开展人体免疫细胞（T细胞、NK细胞）治疗技术相适应的执业医师、执业护士，具有免疫学专业背景的专家和自体免疫细胞（T细胞、NK细胞）制剂制备技术人员；具备开展自体免疫细胞（DC/CIK、T细胞、NK细胞）治疗技术的场地、设备和设施；具备从事自体免疫细胞（DC/CIK、T细胞、NK细胞）治疗质量控制的专业检验科室和人员。

4. 医院设有管理规范、运作正常的由医学、法学、伦理学等方面专家组成的自体免疫细胞（DC/CIK、T细胞、NK细胞）治疗技术临床应用与伦理委员会。

5. 有至少2名具备自体免疫细胞（DC/CIK、T细胞、NK细胞）治疗技术临床应用能力的本院在职医师，有经过自体免疫细胞（DC/CIK、T细胞、NK细胞）治疗相关知识和技能培训的、与开展的自体免疫细胞（DC/CIK、T细胞、NK细胞）治疗相适应的其他专业技术人员。

第三节 细胞培养基的种类和储存使用要求

一、细胞培养基的种类

培养基是培养细胞中供给细胞营养和促使细胞生长增殖的基础物质，也是培养细胞生长和繁殖的生存环境。培养基的种类很多，按其物质状态分为半固体培养基和液体培养基；按其来源分为天然培养基和合成培养基。

1. 天然培养基 使用最普遍的是血清，其中以小牛血清最普遍。血清由于含有多种细胞生长因子、促贴附因子及其他活性物质。与合成培养基合用，能使细胞顺利增殖生长。一般实验都选用小牛血清，常见使用浓度为5%~20%。但DC-CIK免疫治疗选用患者自体血浆或RH阳性AB型血浆作为天然培养基。

2. 合成培养基 合成培养基是根据细胞所需物质的种类和数量配制而成的。内含糖类、氨基酸、脂类、无机盐、维生素、微量元素和细胞生长因子等。单独使用细胞虽有生存但不能很好地生长增殖，需与天然培养基按一定比例混合。经典的合成培养基有很多种，其中MEM、DMEM、RPMI 1640、DMEM/F12都是应用最广泛的培养基。其他如M199、IMDM、L15、AIM-V等培养基也用于某些细胞的培养。

MEM是由Eagle基础培养基(BME)发展而来的，其中增加了组分的范围及浓度，是哺乳动物细胞的理想培养基。通常用于贴壁细胞的培养。通过对配方进行修正，也可用于其他类型细胞的培养，如无钙MEM培养基可以用于悬浮细胞的培养，含有Hank盐的MEM培养基可以用于二倍体细胞的培养。

Dulbecco改良的BEM(DMEM)培养基是为小鼠成纤维细胞设计的，现在常用于贴壁细胞的培养。DMEM的氨基酸浓度是MEM的2倍，维生素浓度是MEM的4倍，采用双倍的 HCO_3^- 和 CO_2 浓度起到更好的缓冲作用。最初的配方中葡萄糖含量为1000mg/L，后来为了某些细胞的生长需要，将葡萄糖含量又调整为4500mg/L，这就是大家常说的低糖和高糖。我们实验室实验用DC细胞的培养采用DMEM低糖培养基，但临床用DC细胞培养则采用德国Feriburg公司的GMP无血清DC培养基，该培养基除鸡蛋源性卵磷脂(此脂质是许可的供人类使用的医药产品)外不含动物源性成分，符合有关GMP准则。

aMEM含有附加的氨基酸、维生素以及核苷和脂肪酸，可广泛应用于各种细胞类型，包括对营养成分要求苛刻的细胞。

Ham's F12是为在低血清浓度下克隆CHO细胞(中国仓鼠卵巢细胞)设计的，现在也广泛应用于克隆形成率的分析及原代培养。F12可以与DMEM等体积混合使用，得到一种高浓度与成分多样化相结合的产物(DMEM/F12培养基)，这种培养基已应用于许多原代培养及更难养的细胞系的培养。

RPMI 1640培养基是专为淋巴细胞培养而设计的，广泛应用于悬浮细胞的培养。

AIM-V培养基是多数实验室实验和临床CIK细胞培养都选用的培养基，它是