

技 術 報 告

臨床等級之 CIK2.0 體外培養擴增技術方法

研發單位：臺北醫學大學

發明人：吳友志、黃彥華

授權單位：宣捷幹細胞生技股份有限公司

摘要：

細胞激素誘導殺手細胞 (Cytokine-Induced Killer, CIK) 是一類經由體外培養、兼具 T 細胞與自然殺手細胞特徵的異質免疫細胞群，包含了 $CD3^+CD56^-$ T 細胞、 $CD3^-CD56^+$ NK 細胞以及 $CD3^+CD56^+$ NKT 細胞，能以非 MHC 限制方式殺傷腫瘤。自 1991 年建立以來，CIK 細胞已在多種癌症臨床試驗中展現延長存活期與改善生活品質的潛力。其培養方法的核心在於細胞激素的選擇，其中多數使用 IL-2 添加進行培養，能快速促進細胞增殖，但會導致具毒殺效果的細胞族群比例不高。而本技術額外添加 IL-15 進行共同培養，有效提升 $CD3^+CD4^-CD8^+CD56^-$ $TCR\gamma\delta^+$ T 細胞、NKT 與 NK 細胞數量，並確保其毒殺功能活性。兩者的協同作用能同時兼顧細胞數量與功能品質，成為本次建立臨床等級製備細胞品質的關鍵策略。本報告主要目標在於將前述培養方式，依循衛福部頒定「特定醫療技術檢查檢驗醫療儀器施行或使用管理辦法」的相關法律規定，完整建立臨床等級之 CIK 細胞體外培養擴增的操作流程與需求，並將其以技術轉移方式專屬授權於台灣生技業者，使之能降低開發之時間與成本，並後續由其與醫療機構申請臨床之使用。

一、研發理念

癌症治療長期以來主要依賴手術、放射線治療、化學治療與標靶藥物。雖然這些方法在早期腫瘤的控制上具有一定效果，但在晚期或轉移性腫瘤的治療上成效有限，且副作用顯著。隨著免疫學研究的進展，免疫治療逐漸成為癌症治療的新方向，其核心理念在於透過強化患者自身免疫系統，達到精準且持久的抗腫瘤效果 (1)。在眾多免疫細胞治療策略中，細胞激素誘導殺手細胞 (Cytokine-Induced Killer cell, CIK 細胞) 因兼具 T 細胞與自然殺手細胞 (Natural killer cell, NK 細胞) 特徵，能以非主要組織相容性複合體 (MHC) 限制的方式殺死腫瘤細胞，逐漸受到廣泛關注 (2, 3)。

CIK 細胞最早於 1991 年由 Schmidt 等人建立體外培養之異質免疫細胞群，主要包含了 $CD3^+CD56^-$ T 細胞、 $CD3^-CD56^+$ NK 細胞以及 $CD3^+CD56^+$ NKT (Natural killer T) 細胞，其認為 $CD3^+CD56^+$ NKT 細胞，兼具 T 細胞受體依賴性 (TCR-dependent) 與 NK 細胞的殺傷能力 (2)。與 TCR-dependent T 細胞相比，NKT 細胞不需特定抗原呈現即可發揮作用，且毒性低、副作用少，這使其在臨床應用上具有高度安全性與可行性，因此培養 CIK 時，如何有效提升最終細胞製劑中使用 MHC-independent 毒殺機制的細胞族群攸關重要。根據國際 CIK 登錄 (International Registry on CIK Cells, IRCC) 的統計，臨床數據顯示，CIK 治療能顯著延長無惡化存活期 (progression-free survival, PFS) 與總存活期 (overall survival, OS)，並改善生活品質 (4)。這些人體使用經驗奠定了 CIK 細胞作為臨床使用的契機。

在台灣，細胞治療於 2018 年以前需要以依循【藥事法】以藥物身分申請新藥臨床試驗(IND)，並取得藥證後方得上市使用。然因應科學進展與臨床需求，衛生福利部於 2018 年公告修訂「特定醫療技術檢查檢驗醫療儀器施行或使用管理辦法」(簡稱特管辦法)，有條件開放六項細胞治療技術，並建立雙軌管理制度：由醫事司管理細胞治療技術 (依循特管辦法)，食品藥物管理署則負責細胞治療產品 (依循藥事法)。此舉使細胞治療得以在臨床端以自費方式提供醫療技術使用，涵蓋自體免疫細胞治療癌症、自體脂肪幹細胞治療退化性關節炎等項目。2021 年再度修正特管辦法，進一步提升醫療服務品質，並確保細胞製品的安全性與療效。因此，自體使用之 CIK 細胞治療製劑在經過核准之後，得以在醫療院所合法地進行臨床使用。依據相關規定，

臨床等級的 CIK 細胞培養必須符合 GTP (Good Tissue Practice) 認可，強調組織與細胞製備的安全性、可追溯性與一致性，涵蓋細胞來源的篩檢、製程的無菌控制、以及最終產品的品質檢測。細胞製劑在輸注前需經過一系列測試，包括細胞存活率、表型分析、無菌檢測、內毒素測試以及功能性測試，確保其在臨床使用時具備安全性、有效性與一致性。這些規範使得建立臨床等級的 CIK 細胞培養技術，不僅是科學研究的延伸，更是制度環境與法規規範下的必然需求。秉持研發理念，本技術報告，不單需要建立更優化的 CIK 培養條件，並需要在符合規範下完整地、大量地於體外擴增細胞數量與確保品質，以達到臨床使用所需的條件。

二、學理基礎

臨床數據顯示，CIK 細胞已在肺癌、肝癌、胃癌、腎癌及淋巴瘤等多種腫瘤中展現治療潛力 (5)。其安全性亦獲得肯定，常見副作用多為輕度，如發燒與疲倦；僅少數異體輸注案例可能引發移植物抗宿主病 (graft-versus-host disease, GvHD) (4)。此外，CIK 細胞可與免疫檢查點抑制劑、化學治療或放射治療結合，形成多重攻擊策略，進一步提升臨床療效 (6)。

CIK 細胞的治療效果取決於培養後異質性免疫細胞族群的數量與功能活性，因此培養條件的優化是研發過程中的關鍵課題。IL-2 是最早被廣泛應用於免疫治療的細胞激素，其主要功能包括促進 T 細胞增殖，特別是 CD8⁺ 細胞毒殺性 T 細胞，並增強 NK 細胞活性 (7)。然而，IL-2 同時可促進 Treg 細胞增殖，可能削弱抗腫瘤免疫效應。在 CIK 細胞培養中，IL-2 能快速擴增細胞數量，提供基礎免疫效能，但單獨使用不足以維持長期抗腫瘤活性。文獻指出，IL-15 與 IL-2 在結構及受體使用上部分重疊，但在功能上更適合用於體外細胞擴增，以符合臨床需求 (8)。在治療癌症患者時，IL-15 能促進記憶型 T 細胞存活，延長免疫反應持續性，並增強 NK 細胞功能；同時不會誘導 Treg 細胞，避免免疫抑制問題 (9)。因此，在體外擴增培養時，IL-15 合理被推測可以協同 IL-2 做培養條件之優化，或可提升 CIK 細胞的品質與功能。亦有研究指出 CIK 細胞培養中，以 IL-15 替換 IL-2 進行 CIK 培養，在體外毒殺試驗中顯示出 IL-15-CIK 相較於 IL-2-CIK 的殺傷活性較高 (5, 10)。因此我們合理推測 IL-2 與 IL-15 的組合可產生協同效應：IL-2 提供初期的細胞數量擴增，而 IL-15 則確保細胞在長期培養及臨床輸注後仍具抗腫瘤效能。

為確保 CIK 細胞的療效，功能性蛋白表現或體外腫瘤細胞毒殺試驗是細胞製程中重要的品質管控步驟，用以確認 CIK 細胞的抗腫瘤功能，而非僅依賴標誌蛋白進行族群鑑定。舉例而言，CIK 細胞的抗腫瘤作用主要透過 NKG2D (Natural Killer Group 2 member D，又稱 CD314) 受體介導，識別腫瘤細胞表面的壓力誘導分子，並藉由穿孔素與顆粒酶的釋放直接破壞腫瘤細胞膜 (11)；此外，CIK 細胞亦能分泌干擾素- γ (IFN- γ)，進一步增強免疫微環境。因此這些具功能性的蛋白質，例如 NKG2D 或 IFN- γ ，其表現數據對於 CIK 細胞製劑的品質確效至關重要，而非僅依 CD3 與 CD56 表現作為族群鑑定依據。

綜合上述，本研究在傳統以 anti-CD3 抗體與 IL-2 為基礎的細胞製程上進行優化，於適當時間點額外補充 IL-15 以促進細胞擴增，建立完整的臨床等級 CIK 細胞體外培養流程，並施行相關品質檢驗，以確保臨床使用的有效性與安全性。此技術轉移模式可加速生技產業在 CIK 細胞治療之商業化進程，不僅有助於產業發展，更能提升患者的臨床療效。

三、主題內容

為確保技術落地於臨床治療之用，本計畫不單只著眼於 CIK 細胞培養條件之優化，更需導入 GTP 規範，建立標準操作流程與細胞品管與放行標準之建立。

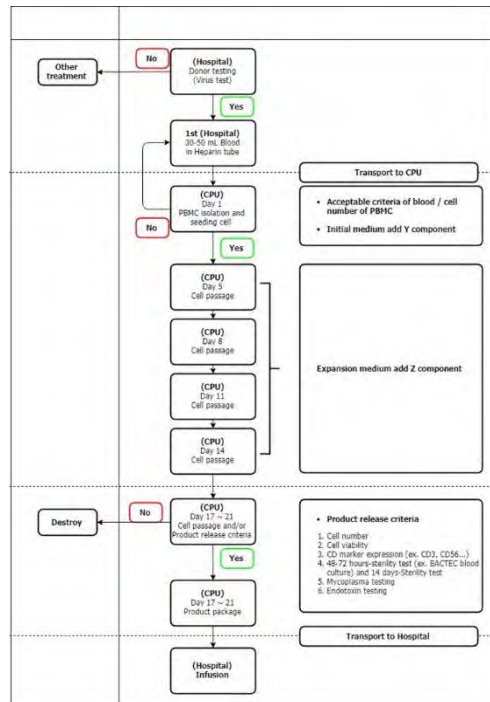
1. 優化 CIK 細胞製程
2. 建立標準操作流程：細胞製劑之製程與品管

四、方法技巧

1. 細胞製程建立

相較於傳統以 anti-CD3 抗體和 IL-2 作為基礎培養的模式，我們測試於不同時間點額外添加 IL-15 進行細胞培養，擇優選定特定時間點與 IL-15 濃度，並建立 TMU-CIK2.0 標準操作流程 (圖一)。患者於醫院接受採血 30~50 mL，並運送至符合 GTP 規範之細胞製備場所 (Cell Processing Unit, CPU)，隨之進行周邊血單核球 (Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMC) 的

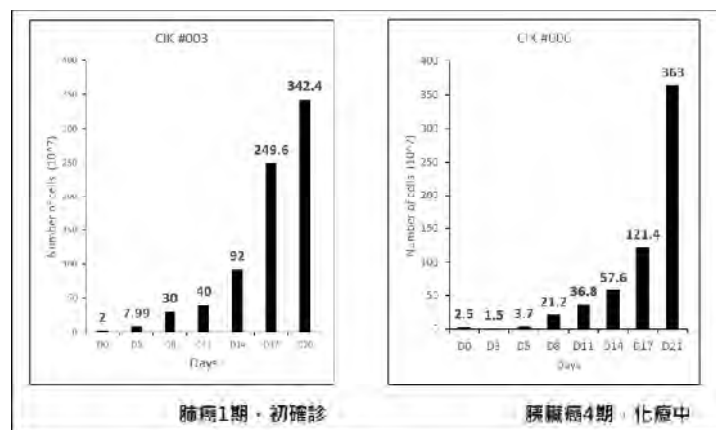
分離。依序添加不同成分的培養基進行 17-21 天的培養，並於 17 天時執行「CIK 細胞製劑放行標準」試驗。



圖一、TMU-CIK2.0 細胞製程 SOP 流程圖。

2. CIK 體外培養擴增

接受 CIK 治療之患者需由自體周邊血液進行體外 CIK 細胞培養後，回輸足量之細胞數方能達到治療之效果，因此有效的足量細胞是臨床使用的基本門檻。一般而言，每劑回輸的細胞數約 7.9×10^8 至 7.9×10^{10} 細胞數量 (4)。我們取得不同時期的癌症患者 30~50 mL 之周邊血液，進行培養試驗。結果顯示，無論是患者自身狀況較良好（肺癌一期，尚未接受任何治療）或是於正接受化療中（胰臟癌四期，化療中）的患者，皆能有效於體外擴增 CIK 細胞數量，達到放行之標準（圖二）。

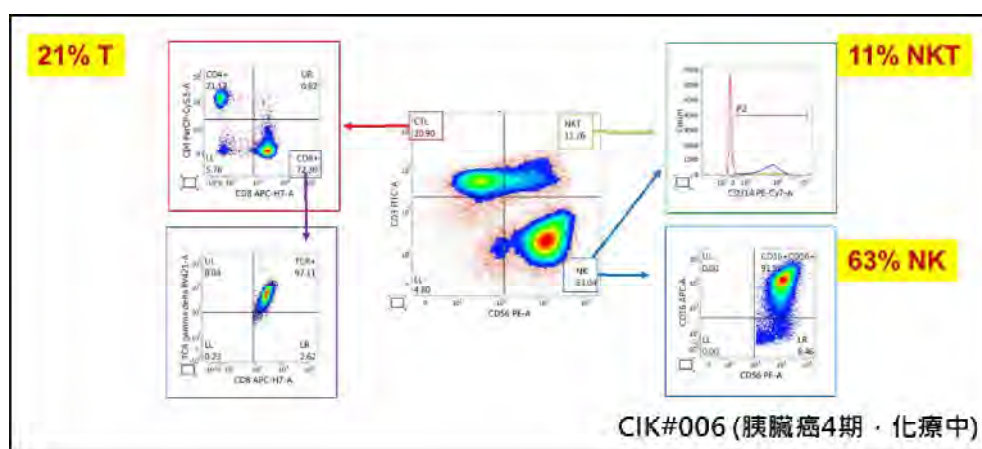


圖二、不同狀態之癌症患者周邊血液培養 TMU-CIK2.0 之細胞數量（代表性數據）。

3. CIK 細胞製劑有效細胞族群分析

由於 CIK 細胞製劑是一具高異質性的免疫細胞族群所構成，因此需鑑定其內含的細胞族群比例。在本技術所生產出的 TMU-CIK2.0 雖會因患者個體差異，細胞比例有所變動，但大致包含三大族群：(1) $CD3^+CD56^+$ NKT cell；(2) $CD3^+CD56^-$ NK cell；(3) $CD3^+CD56^-$ Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) (圖三)。

- (1) **$CD3^+CD56^+$ NKT**：為傳統 CIK 製劑之抗腫瘤之主要亞群。透過 NKG2D 受體識別腫瘤細胞表面的壓力誘導分子，並釋放穿孔素與顆粒酶造成腫瘤細胞裂解，因此 CIK-NKT 細胞並不依賴 MHC 抗原呈現進行細胞毒殺，相較於 T 細胞或天然 NKT，CIK-NKT 可以快速反應並毒殺癌細胞。
- (2) **$CD3^+CD56^+$ NK**：可透過 NKG2D、Nkp30、Nkp46 等受體，產生非 MHC 依賴之細胞毒殺效果。
- (3) **$CD3^+CD8^+CD56^-$ CTL**：在 $CD3^+$ T 細胞族群中，可進一步區分為 $CD4^+$ 與 $CD8^+$ 兩大類。其中， $CD8^+$ T 細胞具備細胞毒殺功能，又稱為細胞毒殺性 T 淋巴球 (Cytotoxic T Lymphocyte, CTL)。一般而言， $CD3^+CD8^+$ CTL 主要依賴 TCR 與 MHC 的結合，透過抗原特异性機制進行細胞毒殺。然而，TCR 又可分為 $TCR\alpha\beta$ 與 $TCR\gamma\delta$ 兩型，其中 $CD8^+TCR\gamma\delta^+$ CTL 並不依賴 TCR-MHC 進行抗原呈現，而是透過 $TCR\gamma\delta$ 辨識脂質、磷酸化分子或壓力誘導抗原。此特性使其與 CIK-NKT 細胞相似，能發揮非特异性之腫瘤細胞毒殺作用。

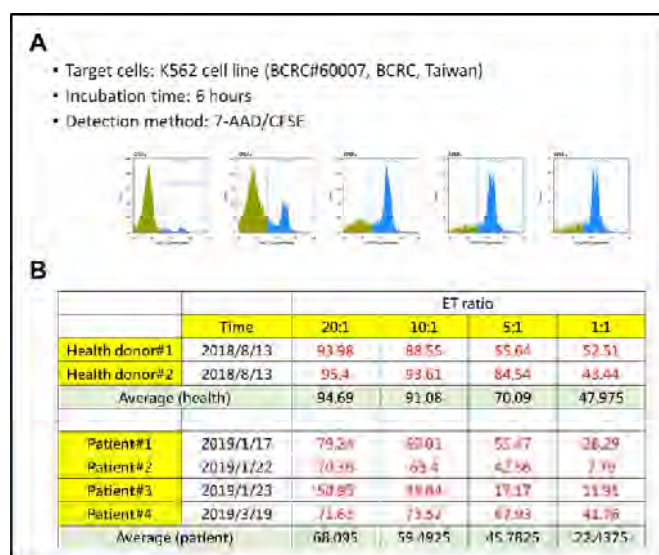


圖三、TMU-CIK2.0 細胞製劑免疫細胞組成成分 (代表性數據)

本技術所製備的 CIK 細胞製劑中，包含先天免疫 (Innate Immunity) 與後天免疫 (Adaptive Immunity) 類型之細胞，主要以 Innate Immunity 之 $CD56^+$ NK 和 NKT 為主，並具有 NKG2D 的表現 (合計約佔總體 74%)。另一部分以 $CD3^+CD8^+CD56^-TCR\gamma\delta^+$ CTL 為主 ($CD3^+T$ 約佔總體 21%；其中 $CD3^+CD8^+CD56^-TCR\gamma\delta^+$ CTL 佔 $CD3^+T$ 的 72%)

4. 細胞毒殺能力效價試驗

細胞體外毒殺能力是效價分析最直接之方法與證據。CIK 製劑藉由與標準化之癌細胞株共同培養，驗證 CIK 細胞與靶細胞比例 (Effector-to-Target ratio, ET ratio)。如圖四所呈現之 ET ratio，癌症患者血液所培養的 CIK 細胞，IC50 約落在 10:1 以下。相較於健康捐贈者之 CIK，仍具有相當不錯的效果。



圖四、TMU-CIK2.0 之 ET ratio 效價分析

5. 與傳統 CIK 細胞製程對比 TMU-CIK2.0 之優勢

為驗證本技術 TMU-CIK2.0 與傳統 CIK 製程之差異，我們與已獲特管辦法核准之生技業者合作，使用同一患者來源的血液進行對比。如圖四所示，該患者以傳統 CIK 培養方式抽取 200 mL 血液，經 19 天培養後僅在細胞總數 ($>10^9$) 達到放行標準，其餘細胞族群比例 ($CD56^+$ 、 $CD3^+CD56^+$ 、 $CD3^+CD56^-$ 及 Treg) 皆未符合規範。相較之下，本技術 (TMU-CIK 2.0) 僅需 50 mL 血液作為培養起始材料，即能在各項指標上顯著優於傳統方式。此外，我們亦將細胞功能

性蛋白的表達 (NKG2D 與 TCR $\gamma\delta$) 納入品質評估，結果顯示所產生之細胞均具備高品質與臨床應用價值 (圖五)。

TMU-CIK 2.0 培養數據 (50mL 全血)							CIK#006 (精製第4期, 化療中)				
Date	Day	Pre cells (10 ⁶) (Relative volume - 10%)	Spinal cells (Relative volume - 20%)	CD56 ⁺ (Relative volume - 20%)	NKT % (CD122 ⁺)	DEC % (CD135 ⁺)	NKG2D ⁺ % (CD135 ⁺)	CTL % (CD3 ⁺ CD8 ⁺)	TCR $\gamma\delta$ % (CD3 ⁺ TCR $\gamma\delta$)		
2020/3/10	D0	2.1	87%	3.45	1.1	3.33					
2020/3/12	D2	1.2	95%								
2020/3/14	D4	2.1	99%								
2020/3/16	D6	14.7	99%								
2020/3/19	D11	40.4	97%								
2020/3/22	D14	27%	97%	13.12	12.2%	30.7%	98%	24.9%	8.4%		
2020/3/25	D17	121%	95%	74.1%	10.8%	65.1%	99.8%	15%	17.1%		
2020/3/29	D21	362%	92%	74.2	11.2%	53.8%	99.4%	15.1%	9.1%		

特管標準之生技公司培養數據 (200mL 全血)						
日期	培養天數	細胞數	CD56%	CIK/CD3+CD56+NK/CD3-CD56+	Treg	
2020/1/9	PBMC		9.80%	1.40%	8.40%	3.70%
2020/2/10	12	1.30E+09	13.50%	5.00%	8.50%	30.90%
2020/2/12	14	2.04E+09	15.90%	6.30%	9.50%	24.60%
2020/2/14	16	4.05E+09	18.20%	7.50%	10.60%	17.50%
2020/2/17	19	4.30E+09	19.60%	9.20%	10.40%	4.40%

圖五、TMU-CIK2.0 與傳統 CIK 培養結果之對比

6. 法規符合性

製程所需儀器、試劑、耗材等皆具備 GTP 法規符合性，並於臺北醫學大學 GTP 核心實驗室進行試製成功，試製之 CIK 細胞製劑，依據美國藥典試驗方法 (United States Pharmacopeia, USP)，通過(1)無菌試驗-72 小時血瓶培養法；(2)無菌試驗-14 天直接培養法；(3)內毒素試驗-動力呈色法 LAL；(4)黴漿菌試驗-PCR 法；(5)抑菌試驗；(6)抑黴漿菌試驗。

五、成果貢獻

我們所發展的 TMU-CIK 2.0 技術在臨床級製程開發上展現顯著創新，成功克服傳統 CIK 培養方式需大量血液的限制。我們建立之平台僅需少量起始血液，即能在相同培養週期內產生具臨床品質的細胞，並在細胞族群比例與功能性蛋白表達 (如 NKG2D 與 TCR $\gamma\delta$) 方面均優於傳統製程。此成果不僅提升了細胞治療的可行性與效率，更為臨床應用提供高品質且具一致性的細胞來源，顯示本技術在腫瘤免疫治療之轉譯與臨床推進上具有重要價值。

進一步而言，本技術已經以新台幣 500 萬元授權金完成技術轉移，並由生技公司取得後續應用權利。我們不僅提供技術轉移，更協助該公司建立臨床等級製程平台，並完成試製驗證。此舉不僅確保技術能有效落實於產業端，亦促進國內細胞治療產業鏈的成熟與擴展。透過技術

轉移與臨床級製程的建立，本研究已成功進展「學術研究」、「臨床應用」至「產業推廣」的三方合作，展現了技術創新、臨床價值與商業化潛力的緊密結合。

參考資料

1. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. 2011;480(7378):480-9.
2. Schmidt-Wolf IG, Lefterova P, Mehta BA, Fernandez LP, Huhn D, Blume KG, et al. Phenotypic characterization and identification of effector cells involved in tumor cell recognition of cytokine-induced killer cells. *Exp Hematol*. 1993;21(13):1673-9.
3. Schmidt-Wolf IG, Negrin RS, Kiem HP, Blume KG, Weissman IL. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity. *J Exp Med*. 1991;174(1):139-49.
4. Zhang Y, Schmidt-Wolf IGH. Ten-year update of the international registry on cytokine-induced killer cells in cancer immunotherapy. *J Cell Physiol*. 2020;235(12):9291-303.
5. Linn YC, Hui KM. Cytokine-induced killer cells: NK-like T cells with cytolytic specificity against leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2003;44(9):1457-62.
6. Jiang J, Xu N, Wu C, Deng H, Lu M, Li M, et al. Treatment of advanced gastric cancer by chemotherapy combined with autologous cytokine-induced killer cells. *Anticancer Res*. 2006;26(3B):2237-42.
7. Rosenberg SA. IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. *J Immunol*. 2014;192(12):5451-8.
8. Rettinger E, Kuci S, Naumann I, Becker P, Kreyenberg H, Anzaghe M, et al. The cytotoxic potential of interleukin-15-stimulated cytokine-induced killer cells against leukemia cells. *Cytotherapy*. 2012;14(1):91-103.
9. Waldmann TA. Interleukin-15 in the treatment of cancer. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014;10(12):1689-701.
10. Iudicone P, Fioravanti D, Cicchetti E, Bonanno G, Pandolfi A, Scocchera R, et al. Cytotoxic potential of interleukin-15 stimulated cytokine induced killer (CIK) against epithelial cancer cell lines. *Cytotherapy*. 2014;16(4, Supplement):S23.
11. Sangiolo D. Cytokine induced killer cells as promising immunotherapy for solid tumors. *J Cancer*. 2011;2:363-8.