



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116368221 A

(43) 申请公布日 2023. 06. 30

(21) 申请号 202180043507.3

(22) 申请日 2021.04.21

(30) 优先权数据

63/014,056 2020.04.22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.12.14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/028504 2021.04.21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/216790 EN 2021.10.28

(71) 申请人 因达普塔治疗公司

地址 美国得克萨斯州

(72) 发明人 A·比格利 G·迪皮耶罗

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

C12N 5/0783 (2006.01)

权利要求书10页 说明书133页

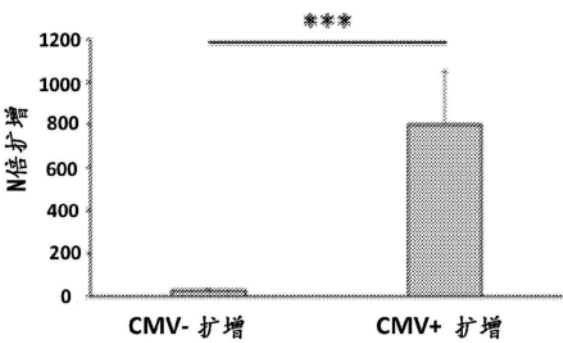
序列表6页 附图140页

(54) 发明名称

自然杀伤(NK)细胞组合物及其生成方法

(57) 摘要

本文提供用于自然杀伤(NK)细胞的特化子集的离体扩增的方法,以及含有这样的NK细胞的组合物。还提供用于鉴定或检测NK细胞的特化子集的方法。还提供用于使用所提供的组合物治疗疾病和病症如癌症的方法,包括与能够与疾病相关组织或细胞、如肿瘤细胞或感染的细胞结合的抗体组合。



1. 一种用于扩增FcR γ 缺陷性NK细胞(g-NK)的方法,所述方法包括:

(a) 获得富集自然杀伤(NK)细胞的原代人细胞群体,其中所述富集NK细胞的群体是从来自人受试者的生物样品选择的;以及

(b) 在具有以下的培养基中培养富集的NK细胞的所述群体:(i) 辐照的HLA-E+饲养细胞,其中所述饲养细胞缺乏HLA I类和HLA II类并且其中辐照的HLA-E+饲养细胞与富集的NK细胞的比率为1:10至10:1;以及(ii) 用于扩增所述NK细胞的有效量的两种或更多种重组细胞因子,其中至少一种重组细胞因子是白介素(IL)-2并且至少一种重组细胞因子是IL-21;

其中所述方法产生富含g-NK细胞的NK细胞的扩增群体。

2. 一种用于扩增FcR γ 缺陷性NK细胞(g-NK)的方法,所述方法包括:

(a) 选择如下受试者,其中来自所述受试者的外周血样品中至少或至少约20%的自然杀伤(NK)细胞对NKG2C呈阳性(NKG2C^{pos}),并且所述外周血样品中至少70%的NK细胞对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A(NKG2A^{neg});

(b) 从所述受试者获得富集自然杀伤(NK)细胞的原代人细胞群体,其中所述富集NK细胞的群体是从来自所述受试者的生物样品选择的如下细胞:(i) 对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD57呈阳性(CD3^{neg}CD57^{pos})或者(ii) 对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD56呈阳性(CD3^{neg}CD56^{pos});以及

(c) 在具有辐照的HLA-E+饲养细胞的培养基中培养富集的NK细胞的所述群体,其中所述饲养细胞缺乏HLA I类和HLA II类并且其中辐照的HLA-E+饲养细胞与富集的NK细胞的比率为1:10至10:1,其中所述培养在用于扩增所述NK细胞的条件下进行;

其中所述方法产生富含g-NK细胞的NK细胞的扩增群体。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,所述方法还包括从NK细胞的所述扩增群体选择如下细胞:对NKG2C呈阳性(NKG2C^{pos})和/或对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A(NKG2A^{neg})。

4. 一种用于扩增FcR γ 缺陷性NK细胞(g-NK)的方法,所述方法包括:

(a) 获得富集自然杀伤(NK)细胞的原代人细胞群体,其中所述富集NK细胞的群体是从来自人受试者的生物样品选择的如下细胞:(i) 对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD57呈阳性(CD3^{neg}CD57^{pos})或者(ii) 对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD56呈阳性(CD3^{neg}CD56^{pos});

(b) 在具有辐照的HLA-E+饲养细胞的培养基中培养富集的NK细胞的所述群体,其中所述饲养细胞缺乏HLA I类和HLA II类并且其中辐照的HAL-E+饲养细胞与富集的NK细胞的比率为1:10至10:1,其中所述培养在用于扩增所述NK细胞的条件下进行;以及

(c) 从所述扩增群体选择如下NK细胞:对NKG2C呈阳性并且对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A(NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}),

其中所述方法产生富含g-NK细胞的NK细胞的扩增群体。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中:

所述富集NK细胞的群体是针对对NKG2C呈阳性(NKG2C^{pos})的细胞进一步选择的细胞;

所述富集NK细胞的群体是针对对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A(NKG2A^{neg})的细胞进一步选择的细胞;或者

所述富集NK细胞的群体是针对对NKG2C呈阳性并且对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A(NKG2C^{pos}NKG2A^{neg})的细胞进一步选择的细胞。

6. 一种用于扩增(g-NK)的方法,所述方法包括:

(a) 获得富集自然杀伤(NK)细胞的原代人细胞群体,其中所述富集NK细胞的群体是从来自人受试者的生物样品选择的如下细胞:对NKG2C呈阳性(NKG2C^{pos})和/或对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A(NKG2A^{neg}),并且(i)对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD57呈阳性(CD3^{neg}CD57^{pos})或者(ii)对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD56呈阳性(CD3^{neg}CD56^{pos});以及

(b) 在具有辐照的HLA-E+饲养细胞的培养基中培养富集的NK细胞的所述群体,其中所述饲养细胞缺乏HLA I类和HLA II类并且其中辐照的HLA-E+饲养细胞与富集的NK细胞的比率为1:10至10:1,其中所述培养在用于扩增所述NK细胞的条件下进行;

其中所述方法产生富含g-NK细胞的NK细胞的扩增群体。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述富集NK细胞的群体是从所述生物样品选择的如下细胞:对NKG2C呈阳性并且对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A(NKG2C^{pos}NKG2A^{neg})。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述受试者是CMV血清阳性的。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的方法,其中来自所述受试者的生物样品中NK细胞中g-NK细胞的百分比是大于或大于约5%、大于或大于约10%或大于或大于约30%。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中富集的NK细胞的所述群体中g-NK细胞的百分比是在为或约20%与为或约90%之间,是在为或约40%与为或约90%之间,或者是在为或约60%与为或约90%之间。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中所述富集NK细胞的群体是从所述生物样品选择的如下细胞:对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD57呈阳性(CD3^{neg}CD57^{pos})。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述富集NK细胞的群体是通过如下方法从所述生物样品选择的,所述方法包括:

(a) 从所述生物样品选择(1)对CD3呈阴性或具有低CD3(CD3^{neg})的细胞或(2)对CD57呈阳性(CD57^{pos})的细胞,从而富集第一选择群体;以及

(b) 从所述第一选择群体选择以下中的另一种细胞:(1)对CD3呈阴性或具有低CD3(CD3^{neg})的细胞或(2)对CD57呈阳性(CD57^{pos})的细胞,从而富集对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD57呈阳性(CD3^{neg}CD57^{pos})的细胞,

任选地其中所述方法包括从所述生物样品选择对CD3呈阴性或具有低CD3(CD3^{neg})的细胞,从而富集第一选择群体,以及从所述第一选择群体选择对CD57呈阳性(CD57^{pos})的细胞。

13. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中所述富集NK细胞的群体是从所述生物样品选择的如下细胞:对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD56呈阳性(CD3^{neg}CD56^{pos})。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述富集NK细胞的群体是通过如下方法从所述生物样品选择的,所述方法包括:

(a) 从所述生物样品选择(1)对CD3呈阴性或具有低CD3(CD3^{neg})的细胞或(2)对CD56呈阳性(CD56^{pos})的细胞,从而富集第一选择群体;以及

(b) 从所述第一选择群体选择以下中的另一种细胞:(1)对CD3呈阴性或具有低CD3(CD3^{neg})的细胞或(2)对CD56呈阳性(CD56^{pos})的细胞,从而富集对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD56呈阳性(CD3^{neg}CD56^{pos})的细胞,

任选地其中所述方法包括从所述生物样品选择对CD3呈阴性或具有低CD3(CD3^{neg})的细胞,从而富集第一选择群体,以及从所述第一选择群体选择对CD56呈阳性(CD56^{pos})的细胞。

15. 根据权利要求1和3-14中任一项所述的方法,其中所述受试者是针对来自所述受试者的外周血样品中至少或至少约20%的NK细胞对NKG2C呈阳性(NKG2C^{pos})选择的受试者,和/或所述受试者是针对来自所述受试者的外周血样品中至少或至少约70%的NK细胞对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A(NKG2A^{neg})选择的受试者。

16. 根据权利要求1-15中任一项所述的方法,其中所获得的富集的NK细胞的群体是被冷冻的低温保存的样品,并且在所述培养之前将所述低温保存的样品解冻。

17. 根据权利要求1-15中任一项所述的方法,其中在所述培养之前不对所获得的富集的NK细胞的群体进行冷冻或低温保存。

18. 根据权利要求2-17中任一项所述的方法,其中用于扩增的条件包括有效量的一种或多种重组细胞因子。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述一种或多种重组细胞因子包括有效量的SCF、GSK3i、FLT3、IL-2、IL-6、IL-7、IL-15、IL-12、IL-18、IL-21、IL-27或其组合。

20. 根据权利要求18或权利要求19所述的方法,其中所述一种或多种重组细胞因子包括有效量的IL-2、IL-7、IL-15、IL-12、IL-18、IL-21、IL-27或其组合。

21. 根据权利要求18-20中任一项所述的方法,其中所述一种或多种重组细胞因子中的至少一种是IL-21。

22. 根据权利要求18-21中任一项所述的方法,其中所述一种或多种重组细胞因子中的至少一种是IL-2。

23. 根据权利要求1、权利要求21或权利要求22所述的方法,其中所述一种或多种重组细胞因子还包括IL-7、IL-15、IL-12、IL-18或IL-27或其组合。

24. 根据权利要求1和21-23中任一项所述的方法,其中所述重组细胞因子是IL-21和IL-2。

25. 根据权利要求1和21-23中任一项所述的方法,其中所述重组细胞因子是IL-21、IL-2和IL-15。

26. 根据权利要求1和21-25中任一项所述的方法,其中在所述培养的至少一部分期间将重组IL-21以为或约10ng/mL至为或约100ng/mL的浓度添加至所述培养基。

27. 根据权利要求1和21-26中任一项所述的方法,其中在所述培养的至少一部分期间将重组IL-21以为或约25ng/mL的浓度添加至所述培养基。

28. 根据权利要求1和22-27中任一项所述的方法,其中在所述培养的至少一部分期间将重组IL-2以为或约10IU/mL至为或约500IU/mL的浓度添加至所述培养基。

29. 根据权利要求1和22-28中任一项所述的方法,其中在所述培养的至少一部分期间将重组IL-2以为或约100IU/mL的浓度添加至所述培养基。

30. 根据权利要求1和22-28中任一项所述的方法,其中在所述培养的至少一部分期间将重组IL-2以为或约500IU/mL的浓度添加至所述培养基。

31. 根据权利要求23和25-30中任一项所述的方法,其中在所述培养的至少一部分期间将重组IL-15以为或约1ng/mL至50ng/mL的浓度添加至所述培养基。

32. 根据权利要求23和25-31中任一项所述的方法,其中在所述培养的至少一部分期间将重组IL-15以为或约10ng/mL的浓度添加至所述培养基。

33. 根据权利要求1和18-32中任一项所述的方法,其中在为或约所述培养开始时开始

将所述重组细胞因子添加至所述培养基。

34. 根据权利要求1和18-33中任一项所述的方法,其中所述方法还包括在所述培养期间一次或多次更换所述培养基,其中在所述培养基的每次更换时,添加含有所述重组细胞因子的新鲜培养基。

35. 根据权利要求34所述的方法,其中在所述培养的持续时间中每两或三天进行所述培养基更换。

36. 根据权利要求34或权利要求35所述的方法,其中在长达5天不进行培养基更换的初始扩增之后,任选地在长达5天不进行培养基更换的初始扩增之后,更换所述培养基。

37. 根据权利要求1和18-36中任一项所述的方法,其中所述重组细胞因子包括IL-21并且在所述培养的至少一部分期间作为与抗IL-21抗体的复合物来添加所述IL-21,任选地在为或约所述培养开始时和/或所述培养期间一次或多次添加。

38. 根据权利要求37所述的方法,其中所述抗IL-21抗体的浓度是为或约100ng/mL至500ng/mL,和/或所述重组IL-21的浓度是为或约10ng/mL至100ng/mL。

39. 根据权利要求37或权利要求38所述的方法,其中所述抗IL-21抗体的浓度为或为约250ng/mL,和/或所述重组IL-21的浓度是为或约25ng/mL。

40. 根据权利要求1-38中任一项所述的方法,其中所述人受试者具有CD16 158V/V NK细胞基因型或CD16 158V/F NK细胞基因型,任选地其中所述生物样品来自针对所述CD16 158V/V NK细胞基因型或所述CD16 158V/F NK细胞基因型选择的人受试者。

41. 根据权利要求1-40中任一项所述的方法,其中所述生物样品是或包含外周血单个核细胞(PBMC)。

42. 根据权利要求1-41中任一项所述的方法,其中所述生物样品是血液样品。

43. 根据权利要求1-42中任一项所述的方法,其中所述生物样品是单采术或白细胞单采术样品。

44. 根据权利要求1-43中任一项所述的方法,其中所述生物样品是被冷冻的低温保存的样品,并且在所述培养之前将所述低温保存的样品解冻。

45. 根据权利要求1-43中任一项所述的方法,其中在所述培养之前不对所述生物样品进行冷冻或低温保存。

46. 根据权利要求1-45中任一项所述的方法,其中所述HLA-E+饲养细胞是K562细胞。

47. 根据权利要求46所述的方法,其中所述K562细胞表达膜结合的IL-15(K562-mb15)或膜结合的IL-21(K562-mb21)。

48. 根据权利要求1-45中任一项所述的方法,其中所述HLA-E+饲养细胞是221.AEH细胞。

49. 根据权利要求1-48中任一项所述的方法,其中辐照的HLA-E+饲养细胞与NK细胞的比率在1:1与5:1之间,包含端值,或者在1:1与3:1之间,包含端值。

50. 根据权利要求1-49中任一项所述的方法,其中辐照的HLA-E+饲养细胞与富集的NK细胞的比率为或为约2.5:1或者为或为约2:1。

51. 根据权利要求50中任一项所述的方法,其中富集的NK细胞的所述群体是新近分离的或者先前尚未进行冷冻和解冻。

52. 根据权利要求1-49中任一项所述的方法,其中辐照的HLA-E+饲养细胞与富集的NK

细胞的比率为或为约1:1。

53. 根据权利要求52所述的方法, 其中在冷冻用于低温保存之后, 已经将富集的NK细胞的所述群体解冻。

54. 根据权利要求1和18-53中任一项所述的方法, 其中在所述培养的至少一部分期间添加至所述培养基的所述重组细胞因子为500IU/mL IL-2、10ng/mL IL-15和25ng/mL IL-21。

55. 根据权利要求1-54中任一项所述的方法, 其中富集的NK细胞的所述群体包含在为或约 2.0×10^5 个富集的NK细胞与为或约 5.0×10^7 个富集的NK细胞之间、在为或约 1.0×10^6 个富集的NK细胞与为或约 1.0×10^8 个富集的NK细胞之间、在为或约 1.0×10^7 个富集的NK细胞与为或约 5.0×10^8 个富集的NK细胞之间或者在为或约 1.0×10^7 个富集的NK细胞与为或约 1.0×10^9 个富集的NK细胞之间, 每个都包含端值, 任选地其中富集的NK细胞的所述群体包含为或约 1.0×10^6 个富集的NK细胞。

56. 根据权利要求1-55中任一项所述的方法, 其中在所述培养开始时的富集的NK细胞的所述群体的浓度为在或在约 0.05×10^6 个富集的NK细胞/mL与 1.0×10^6 个富集的NK细胞/mL之间或者在或在约 0.05×10^6 个富集的NK细胞/mL与 0.5×10^6 个富集的NK细胞/mL之间, 任选地其中在所述培养开始时的富集的NK细胞的所述群体包含为或约 0.2×10^6 个富集的NK细胞/mL的浓度。

57. 根据权利要求1-56中任一项所述的方法, 其中所述培养是在封闭系统中进行。

58. 根据权利要求1-57中任一项所述的方法, 其中所述培养是在无菌培养袋中进行。

59. 根据权利要求1-58中任一项所述的方法, 其中所述培养是使用透气性培养器皿来进行。

60. 根据权利要求1-59中任一项所述的方法, 其中所述培养是使用生物反应器来进行。

61. 根据权利要求1-60中任一项所述的方法, 其中进行所述培养直至所述方法实现至少或至少约 2.50×10^8 个g-NK细胞、至少或至少约 5.00×10^8 个g-NK细胞、至少或至少约 1.0×10^9 个g-NK细胞或者至少或至少约 5.0×10^9 个g-NK细胞的扩增的时间。

62. 根据权利要求1-61中任一项所述的方法, 其中所述培养进行为或约或至少或至少约5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天或25天。

63. 根据权利要求1-62中任一项所述的方法, 其中所述培养进行为或约或至少或至少约14天。

64. 根据权利要求1-62中任一项所述的方法, 其中所述培养进行为或约或至少或至少约21天。

65. 根据权利要求1-64中任一项所述的方法, 其中与所述培养开始时相比, 所述方法在所述培养结束时产生数量增加的g-NK细胞, 其中所述增加是大于或大于约1000倍或更大。

66. 根据权利要求1-65中任一项所述的方法, 所述方法还包括收集通过所述方法产生的富含g-NK细胞的所述扩增群体。

67. 根据权利要求1-66中任一项所述的方法, 其中, 在富含g-NK细胞的所述扩增群体中, 大于50%的所述群体是FcR γ ^{neg}, 大于60%的所述群体是FcR γ ^{neg}, 大于70%的所述群体是FcR γ ^{neg}, 大于80%的所述群体是FcR γ ^{neg}, 大于90%的所述群体是FcR γ ^{neg}或者大于95%

的所述群体是FcR γ^{neg} 。

68. 根据权利要求1-67中任一项所述的方法, 其中, 在富含g-NK细胞的所述扩增群体中, (i) 大于或大于约30%对NKG2C呈阳性 (NKG2C^{pos}) 和/或大于或大于约50%对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A (NKG2A^{neg}); (ii) 大于或大于约35%对NKG2C呈阳性 (NKG2C^{pos}) 和/或大于或大于约60%对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A (NKG2A^{neg}); (iii) 大于或大于约40%对NKG2C呈阳性 (NKG2C^{pos}) 和/或大于或大于约70%对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A (NKG2A^{neg}); (iv) 大于或大于约45%对NKG2C呈阳性 (NKG2C^{pos}) 和/或大于或大于约80%对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A (NKG2A^{neg}); (v) 大于或大于约50%对NKG2C呈阳性 (NKG2C^{pos}) 和/或大于或大于约85%对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A (NKG2A^{neg}); (vi) 大于或大于约55%对NKG2C呈阳性 (NKG2C^{pos}) 和/或大于或大于约90%对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A (NKG2A^{neg}); 或者 (vii) 大于或大于约60%对NKG2C呈阳性 (NKG2C^{pos}) 和/或大于或大于约95%对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A (NKG2A^{neg})。

69. 根据权利要求1-68中任一项所述的方法, 其中所述人受试者具有CD16 158V/V NK细胞基因型并且所述g-NK细胞为CD16 158V/V (V158), 或者所述人受试者具有CD16158V/F NK细胞基因型并且所述g-NK细胞为CD16 158V/F (V158)。

70. 根据权利要求1-69中任一项所述的方法, 所述方法还包括基于一种或多种表面标记物NKG2C^{pos}、NKG2C^{neg}、CD16^{pos}、CD57^{pos}、CD7^{dim/neg}、CD161^{neg}、CD38^{neg}或前述任一项的组合, 从富含g-NK细胞的所述扩增群体纯化细胞群体。

71. 根据权利要求1-70中任一项所述的方法, 其中, 在富含g-NK细胞的所述扩增群体中, 大于为或为约70%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性, 大于为或为约80%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性, 大于为或为约85%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性, 或者大于为或为约90%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性。

72. 根据权利要求1-71中任一项所述的方法, 其中, 在富含g-NK细胞的所述扩增群体中, 大于为或为约70%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性, 大于为或为约80%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性, 大于为或为约85%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性, 或者大于为或为约90%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。

73. 根据权利要求1-72中任一项所述的方法, 其中, 在富含g-NK细胞的所述扩增群体中, 大于10%的细胞能够针对肿瘤靶细胞脱颗粒, 任选地如按照CD107a所测量, 任选地其中所述脱颗粒是在不存在针对所述肿瘤靶细胞的抗体的情况下测量的。

74. 根据权利要求1-73中任一项所述的方法, 其中, 在表达靶抗原的细胞 (靶细胞) 和针对所述靶抗原的抗体 (抗靶标抗体) 的存在下, 在富含g-NK细胞的所述扩增群体中, 大于或大于约15%、大于或大于约20%、大于或大于约30%、大于或大于约40%或大于或大于约50%展现脱颗粒, 任选地如按照CD107a表达所测量。

75. 根据权利要求1-74中任一项所述的方法, 其中, 在富含g-NK细胞的所述扩增群体中, 大于10%的细胞能够针对肿瘤靶细胞产生干扰素- γ 或TNF- α , 任选地其中所述干扰素- γ 或TNF- α 是在不存在针对所述肿瘤靶细胞的抗体的情况下测量的。

76. 根据权利要求1-75中任一项所述的方法, 其中, 在表达靶抗原的细胞 (靶细胞) 和针对所述靶抗原的抗体 (抗靶标抗体) 的存在下, 在富含g-NK细胞的所述扩增群体中, 大于或大于约15%、大于或大于约20%、大于或大于约30%、大于或大于约40%或大于或大于约

50%产生效应细胞因子,任选地其中所述效应细胞因子是IFN- γ 或TNF- α 。

77.根据权利要求1-76中任一项所述的方法,所述方法还包括在药学上可接受的赋形剂中配制富集的g-NK细胞的所述扩增群体。

78.根据权利要求77所述的方法,所述方法还包括用包含低温保护剂的无血清低温保存介质配制富集的g-NK细胞的所述扩增群体。

79.根据权利要求78所述的方法,其中所述低温保护剂是DMSO,任选地其中所述低温保护剂是DMSO,并且所述低温保存介质是5%至10%DMSO(v/v),任选地为或为约10%DMSO(v/v)。

80.一种组合物,所述组合物包含通过根据权利要求1-79中任一项所述的方法产生的g-NK细胞。

81.一种扩增的自然杀伤(NK)细胞的组合物,其中所述组合物中至少或至少约50%的细胞是FcR γ 缺陷性(FcR γ^{neg})NK细胞(g-NK),其中大于或大于约70%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性,并且大于或大于约70%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。

82.根据权利要求80或权利要求81所述的组合物,其中(i)大于或大于约80%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性,并且大于或大于约80%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性,(ii)大于或大于约90%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性,并且大于或大于约90%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性,或者(iii)大于或大于约95%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性,并且大于或大于约95%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。

83.根据权利要求80-82中任一项所述的组合物,其中:

在所述对穿孔蛋白呈阳性的细胞中,如通过细胞内流式细胞术所测量,基于平均荧光强度(MFI),所述细胞表达的穿孔蛋白的平均水平是FcR γ^{pos} 的细胞表达的穿孔蛋白的平均水平的至少或至少约两倍;和/或

在所述对颗粒酶B呈阳性的细胞中,如通过细胞内流式细胞术所测量,基于平均荧光强度(MFI),所述细胞表达的颗粒酶B的平均水平是FcR γ^{pos} 的细胞表达的颗粒酶B的平均水平的至少或至少约两倍。

84.根据权利要求80-83中任一项所述的组合物,其中所述组合物中大于10%的细胞能够针对肿瘤靶细胞脱颗粒,任选地如按照CD107a表达所测量,任选地其中所述脱颗粒是在不存在针对所述肿瘤靶细胞的抗体的情况下测量的。

85.根据权利要求80-84中任一项所述的组合物,其中,在表达靶抗原的细胞(靶细胞)和针对所述靶抗原的抗体(抗靶标抗体)的存在下,在所述组合物中的细胞中,大于或大于约15%、大于或大于约20%、大于或大于约30%、大于或大于约40%或大于或大于约50%展现脱颗粒,任选地如按照CD107a表达所测量。

86.根据80-85中任一项所述的组合物,其中所述组合物中大于10%的细胞能够针对肿瘤靶细胞产生干扰素- γ 或TNF- α ,任选地其中所述干扰素- γ 或TNF- α 是在不存在针对所述肿瘤靶细胞的抗体的情况下测量的。

87.根据权利要求80-86中任一项所述的组合物,其中,在表达靶抗原的细胞(靶细胞)和针对所述靶抗原的抗体(抗靶标抗体)的存在下,在所述组合物中的细胞中,大于或大于约15%、大于或大于约20%、大于或大于约30%、大于或大于约40%或大于或大于约50%产生效应细胞因子。

88. 一种扩增的自然杀伤(NK)细胞的组合物,其中所述组合物中至少或至少约50%的细胞是FcR γ 缺陷性(FcR γ^{neg})NK细胞(g-NK),并且其中在表达靶抗原的细胞(靶细胞)和针对所述靶抗原的抗体(抗靶标抗体)的存在下,所述组合物中大于或大于约15%的细胞产生效应细胞因子。

89. 根据权利要求88所述的组合物,其中在表达靶抗原的细胞(靶细胞)和针对所述靶抗原的抗体(抗靶标抗体)的存在下,大于或大于约20%、大于或大于约30%、大于或大于约40%或大于或大于约50%产生效应细胞因子。

90. 根据权利要求87-89中任一项所述的组合物,其中所述效应细胞因子是IFN- γ 或TNF- α 。

91. 根据权利要求87-90中任一项所述的组合物,其中所述效应细胞因子是IFN- γ 和TNF- α 。

92. 根据权利要求87-91中任一项所述的组合物,其中,在表达靶抗原的细胞(靶细胞)和针对所述靶抗原的抗体(抗靶标抗体)的存在下,在所述组合物中的细胞中,大于或大于约15%、大于或大于约20%、大于或大于约30%、大于或大于约40%或大于或大于约50%展现脱颗粒,任选地如按照CD107a表达所测量。

93. 一种扩增的自然杀伤(NK)细胞的组合物,其中所述组合物中至少或至少约50%的细胞是FcR γ 缺陷性(FcR γ^{neg})NK细胞(g-NK),并且其中在表达靶抗原的细胞(靶细胞)和针对所述靶抗原的抗体(抗靶标抗体)的存在下,所述组合物中大于或大于约15%的细胞展现脱颗粒,任选地如按照CD107a表达所测量。

94. 根据权利要求93所述的组合物,其中在表达靶抗原的细胞(靶细胞)和针对所述靶抗原的抗体(抗靶标抗体)的存在下,大于或大于约20%、大于或大于约30%、大于或大于约40%或大于或大于约50%展现脱颗粒,任选地如按照CD107a表达所测量。

95. 根据权利要求80-94中任一项所述的组合物,其中大于或大于约60%的细胞是g-NK细胞,大于或大于约70%的细胞是g-NK细胞,大于或大于约80%的细胞是g-NK细胞,大于或大于约90%的细胞是g-NK细胞,或者大于或大于约95%的细胞是g-NK细胞。

96. 根据权利要求80-95中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含至少或约至少 10^8 个细胞。

97. 根据权利要求80-96中任一项所述的组合物,其中所述组合物中g-NK细胞的数量是为或约 10^8 至为或约 10^{12} 个细胞、为或约 10^8 至为或约 10^{11} 个细胞、为或约 10^8 至为或约 10^{10} 个细胞、为或约 10^8 至为或约 10^9 个细胞、为或约 10^9 至为或约 10^{12} 个细胞、为或约 10^9 至为或约 10^{11} 个细胞、为或约 10^9 至为或约 10^{10} 个细胞、为或约 10^{10} 至为或约 10^{12} 个细胞、为或约 10^{10} 至为或约 10^{11} 个细胞或者为或约 10^{11} 至为或约 10^{12} 个细胞。

98. 根据权利要求80-97中任一项所述的组合物,其中所述组合物中g-NK细胞的数量为或为约 5×10^8 个细胞,为或为约 1×10^9 个细胞,为或为约 5×10^9 个细胞,或者为或为约 1×10^{10} 个细胞。

99. 根据权利要求80-98中任一项所述的组合物,其中所述组合物的体积是在为或约50mL与为或约500mL之间,任选地为或约200mL。

100. 根据权利要求80-99中任一项所述的组合物,其中所述组合物中的细胞来自单一供体受试者,所述细胞已经从相同的生物样品扩增。

101. 根据权利要求80-100中任一项所述的组合物,其中所述组合物是药物组合物。
102. 根据权利要求80-101中任一项所述的组合物,所述组合物包含药学上可接受的赋形剂。
103. 根据权利要求80-102中任一项所述的组合物,其中在包含低温保护剂的无血清低温保存介质中配制所述组合物,任选地其中所述低温保护剂是DMSO,并且所述低温保存介质是5%至10%DMSO(v/v)。
104. 根据权利要求80-103中任一项所述的组合物,所述组合物是无菌的。
105. 一种无菌袋,所述无菌袋包含根据权利要求80-104中任一项所述的组合物。
106. 根据权利要求105所述的无菌袋,其中所述袋是适合低温保存的袋。
107. 一种试剂盒,所述试剂盒包含根据权利要求80-104中任一项所述的组合物。
108. 根据权利要求107所述的试剂盒,所述试剂盒还包含用于施用作为单一疗法的所述组合物用于治疗疾病或病症的说明书。
109. 根据权利要求108所述的试剂盒,所述试剂盒还包含用于治疗疾病或病症的另外的药剂。
110. 一种制品,所述制品包含根据权利要求107-109中任一项所述的试剂盒。
111. 一种治疗疾病或病症的方法,所述方法包括将根据权利要求80-104中任一项所述的组合物施用至有需要的个体。
112. 根据权利要求111所述的方法,其中所述疾病或病症选自炎症病症、感染和癌症。
113. 根据权利要求111或权利要求112所述的方法,其中所述疾病或病症是癌症,并且所述癌症是白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。
114. 根据权利要求111-113中任一项所述的方法,其中所述组合物是作为单一疗法来施用。
115. 根据权利要求111-113中任一项所述的方法,所述方法还包括将另外的药剂施用至所述个体用于治疗所述疾病或病症。
116. 根据权利要求115所述的方法,其中所述另外的药剂是抗体或Fc-融合蛋白。
117. 根据权利要求116所述的方法,其中所述疾病或病症是癌症,并且所述抗体识别与所述癌症相关的肿瘤抗原。
118. 根据权利要求111-117中任一项所述的方法,所述方法还包括将癌症药物或细胞毒性剂施用至所述受试者用于治疗所述疾病或病症。
119. 根据权利要求111-118中任一项所述的方法,所述方法包括将为或约 1×10^5 个NK细胞/kg至为或约 1×10^7 个NK细胞/kg施用至所述个体。
120. 根据权利要求111-119中任一项所述的方法,所述方法包括将为或约 5×10^7 个NK细胞至为或约 10×10^9 个NK细胞施用至所述个体。
121. 根据权利要求111-120中任一项所述的方法,其中所述个体是人。
122. 根据权利要求111-121中任一项所述的方法,其中所述组合物中的NK细胞对于所述个体是同种异体的。
123. 根据权利要求111-122中任一项所述的方法,其中所述组合物中的NK细胞对于所述受试者是自体的。
124. 根据权利要求80-104中任一项所述的药物组合物,其用于治疗受试者的疾病或病

症。

125. 根据权利要求80-104中任一项所述的药物组合物在制造用于治疗受试者的疾病或病症的药物中的用途。

126. 根据权利要求124所述的用于所述用途的药物组合物或根据权利要求125所述的用途, 其中所述疾病或病症选自炎性病症、感染和癌症。

127. 根据权利要求124-126中任一项所述的用于所述用途的药物组合物或根据权利要求124-126中任一项所述的用途, 其中所述组合物作为单一疗法用于施用。

128. 根据权利要求124-126中任一项所述的用于所述用途的药物组合物或根据权利要求124-126中任一项所述的用途, 其中所述组合物用于将另外的药剂施用至所述个体用于治疗所述疾病或病症。

129. 根据权利要求128所述的用于所述用途的药物组合物或根据权利要求128所述的用途, 其中所述另外的药剂是抗体或Fc-融合蛋白。

130. 根据权利要求128或权利要求129所述的用于所述用途的药物组合物或根据权利要求128或权利要求129所述的用途, 其中所述疾病或病症是癌症, 并且所述抗体识别与所述癌症相关的肿瘤抗原。

自然杀伤(NK)细胞组合物及其生成方法

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2020年4月22日提交的标题为“自然杀伤(NK)细胞组合物及其生成方法(NATURAL KILLER(NK)CELL COMPOSITIONS AND METHODS FOR GENERATING SAME)”的美国临时申请号63/014,056的优先权,其内容出于所有目的通过引用以其整体并入。

通过引用并入序列列表

[0002] 本申请连同电子格式的序列列表一起提交。序列列表以2021年4月21日创建的名称为776032000740SeqList.Txt的文件提供,其大小为7,850字节。将电子格式的序列列表中的信息通过引用以其整体并入。

技术领域

[0003] 本公开文本提供用于自然杀伤(NK)细胞的特化子集的离体扩增的方法,以及含有这样的NK细胞的组合物。还提供用于使用本公开文本的组合物治疗疾病和病症如癌症或病毒感染的方法,包括与能够与疾病相关组织或细胞、如肿瘤细胞或感染的细胞结合的抗体组合。

背景技术

[0004] 基于抗体的疗法已经变得常用于治疗癌症和其他疾病。对抗体疗法的反应通常集中于这些抗体对肿瘤细胞的直接抑制作用(例如抑制生长因子受体且随后诱导细胞凋亡),但是这些抗体的体内作用可能更复杂并且可能涉及宿主免疫系统。自然杀伤(NK)细胞是免疫效应细胞,其在Fc受体(CD16;Fc γ RIII)与结合至带有抗原的细胞的抗体的Fc部分结合时介导抗体依赖性细胞毒性。NK细胞(包括其特定特化子集)可以用于治疗方法中,包括用于改进对抗体疗法的反应。然而,在细胞疗法如过继细胞疗法中应用NK细胞的主要障碍是其在人外周血中的相对低丰度以及特定特化子集的表面表型特征的缺乏。需要改进的方法用于获得用于治疗性用途的NK细胞组合物。本文提供满足这样的需要的实施方案。

发明内容

[0005] 本文提供一种用于扩增FcR γ 缺陷性NK细胞(g-NK)的方法,所述方法包括:(a)获得富集自然杀伤(NK)细胞的原代人细胞群体,其中所述富集NK细胞的群体是从来自人受试者的生物样品选择的;以及(b)在具有以下的培养基中培养富集的NK细胞的所述群体:(i)辐照的HLA-E⁺饲养细胞,其中所述饲养细胞缺乏HLA I类和HLA II类并且其中辐照的HLA-E⁺饲养细胞与富集的NK细胞的比率为1:10至10:1;以及(ii)有效量的用于NK细胞扩增的两种或更多种重组细胞因子,其中至少一种重组细胞因子是白介素(IL)-2并且至少一种重组细胞因子是IL-21;其中所述方法产生富含g-NK细胞的NK细胞的扩增群体。

[0006] 本文提供一种用于扩增FcR γ 缺陷性NK细胞(g-NK)的方法,所述方法包括:(a)获得富集自然杀伤(NK)细胞的原代人细胞群体,其中所述富集NK细胞的群体是从来自人受试者的生物样品选择的;以及(b)在具有以下的培养基中培养富集的NK细胞的所述群体:(i)

辐照的HLA-E+饲养细胞,其中所述饲养细胞缺乏HLA I类和HLA II类并且其中辐照的HLA-E+饲养细胞与富集的NK细胞的比率为1:10至10:1;以及(ii)有效量的一种或多种重组细胞因子,其中至少一种重组细胞因子是白介素(IL)-21;其中所述方法产生富含g-NK细胞的NK细胞的扩增群体。

[0007] 在一些任何所提供的实施方案中,所述受试者是CMV血清阳性的。

[0008] 在一些实施方案中,来自所述受试者的生物样品中NK细胞中g-NK细胞的百分比是大于或大于约5%,任选地其中所述受试者是针对所述生物样品中NK细胞中g-NK细胞的百分比大于或大于约5%选择的受试者。在一些实施方案中,来自所述受试者的生物样品中NK细胞中g-NK细胞的百分比是大于或大于约10%,任选地其中所述受试者是针对所述生物样品中NK细胞中g-NK细胞的百分比大于或大于约10%选择的受试者。在一些实施方案中,来自所述受试者的生物样品中NK细胞中g-NK细胞的百分比是大于或大于约30%,任选地其中所述受试者是针对所述生物样品中NK细胞中g-NK细胞的百分比大于或大于约30%选择的受试者。

[0009] 本文还提供一种用于扩增FcR γ 缺陷性NK细胞(g-NK)的方法,所述方法包括:(a)选择如下受试者,其中来自所述受试者的外周血样品中至少或至少约20%的自然杀伤(NK)细胞对NKG2C呈阳性(NKG2C^{pos}),并且所述外周血样品中至少70%的NK细胞对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A(NKG2A^{neg});(b)从所述受试者获得富集自然杀伤(NK)细胞的原代人细胞群体,其中所述富集NK细胞的群体是从来自所述受试者的生物样品选择的如下细胞:(i)对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD57呈阳性(CD3^{neg}CD57^{pos})或者(ii)对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD56呈阳性(CD3^{neg}CD56^{pos});以及(c)在具有辐照的HLA-E+饲养细胞的培养基中培养富集的NK细胞的所述群体,其中所述饲养细胞缺乏HLA I类和HLA II类并且其中辐照的HLA-E+饲养细胞与富集的NK细胞的比率为1:10至10:1,其中所述培养在用于扩增所述NK细胞的条件下进行;其中所述方法产生富含g-NK细胞的NK细胞的扩增群体。在一些任何前述实施方案中,所述富集NK细胞的群体是从所述生物样品选择的如下细胞:对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD57呈阳性(CD3^{neg}CD57^{pos})。在一些任何前述实施方案中,所述富集NK细胞的群体是从所述生物样品选择的如下细胞:对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD56呈阳性(CD3^{neg}CD56^{pos})。在一些任何前述实施方案中,所述方法包括further从NK细胞的所述扩增群体选择如下细胞:对NKG2C呈阳性(NKG2C^{pos})和/或对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A(NKG2A^{neg})。

[0010] 本文还提供一种用于扩增FcR γ 缺陷性NK细胞(g-NK)的方法,所述方法包括:(a)获得富集自然杀伤(NK)细胞的原代人细胞群体,其中所述富集NK细胞的群体是从来自人受试者的生物样品选择的如下细胞:(i)对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD57呈阳性(CD3^{neg}CD57^{pos})或者(ii)对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD56呈阳性(CD3^{neg}CD56^{pos});(b)在具有辐照的HLA-E+饲养细胞的培养基中培养富集的NK细胞的所述群体,其中所述饲养细胞缺乏HLA I类和HLA II类并且其中辐照的HAL-E+饲养细胞与富集的NK细胞的比率为1:10至10:1,其中所述培养在用于扩增所述NK细胞的条件下进行;以及(c)从所述扩增群体选择如下NK细胞:对NKG2C呈阳性并且对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A(NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}),其中所述方法产生富含g-NK细胞的NK细胞的扩增群体。在一些任何前述实施方案中,所述富集NK细胞的群体是针对对NKG2C呈阳性(NKG2C^{pos})的细胞进一步选择的细胞。在一些任何前述实

施方案中,所述富集NK细胞的群体是针对对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A (NKG2A^{neg}) 的细胞进一步选择的细胞。在一些任何前述实施方案中,所述富集NK细胞的群体是针对对NKG2C呈阳性并且对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A (NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}) 的细胞进一步选择的细胞。

[0011] 本文还提供一种用于扩增FcR γ 缺陷性NK细胞 (g-NK) 的方法,所述方法包括:(a) 获得富集自然杀伤(NK)细胞的原代人细胞群体,其中所述富集NK细胞的群体是从来自人受试者的生物样品选择的如下细胞:对NKG2C呈阳性 (NKG2C^{pos}) 和/或对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A (NKG2A^{neg}), 并且(i) 对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD57呈阳性 (CD3^{neg}CD57^{pos}) 或者(ii) 对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD56呈阳性 (CD3^{neg}CD56^{pos}); 以及(b) 在具有辐照的HLA-E+饲养细胞的培养基中培养富集的NK细胞的所述群体,其中所述饲养细胞缺乏HLA I类和HLA II类并且其中辐照的HLA-E+饲养细胞与富集的NK细胞的比率为1:10至10:1,其中所述培养在用于扩增所述NK细胞的条件下进行;其中所述方法产生富含g-NK细胞的NK细胞的扩增群体。在一些实施方案中,所述富集NK细胞的群体是从所述生物样品选择的如下细胞:对NKG2C呈阳性并且对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A (NKG2C^{pos}NKG2A^{neg})。在一些任何前述实施方案中,所述受试者是CMV血清阳性的。

[0012] 在一些任何前述实施方案中,来自所述受试者的生物样品中NK细胞中g-NK细胞的百分比是大于或大于约5%,任选地其中所述受试者是针对所述生物样品中NK细胞中g-NK细胞的百分比大于或大于约5%选择的受试者。在一些任何前述实施方案中,来自所述受试者的生物样品中NK细胞中g-NK细胞的百分比是大于或大于约10%,任选地其中所述受试者是针对所述生物样品中NK细胞中g-NK细胞的百分比大于或大于约10%选择的受试者。在一些任何前述实施方案中,来自所述受试者的生物样品中NK细胞中g-NK细胞的百分比是大于或大于约30%,任选地其中所述受试者是针对所述生物样品中NK细胞中g-NK细胞的百分比大于或大于约30%选择的受试者。

[0013] 在一些任何前述实施方案中,富集的NK细胞的所述群体中g-NK细胞的百分比是在为或约20%与为或约90%之间。在一些任何前述实施方案中,富集的NK细胞的所述群体中g-NK细胞的百分比是在为或约40%与为或约90%之间。在一些任何前述实施方案中,富集的NK细胞的所述群体中g-NK细胞的百分比是在为或约60%与为或约90%之间。

[0014] 在一些任何前述实施方案中,所述富集NK细胞的群体是从所述生物样品选择的如下细胞:对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD57呈阳性 (CD3^{neg}CD57^{pos})。在一些任何前述实施方案中,所述富集NK细胞的群体是通过如下方法从所述生物样品选择的,所述方法包括:(a) 从所述生物样品选择(1) 对CD3呈阴性或具有低CD3 (CD3^{neg}) 的细胞或(2) 对CD57呈阳性 (CD57^{pos}) 的细胞,从而富集第一选择群体;以及(b) 从所述第一选择群体选择以下中的另一种细胞:(1) 对CD3呈阴性或具有低CD3 (CD3^{neg}) 的细胞或(2) 对CD57呈阳性 (CD57^{pos}) 的细胞,从而富集对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD57呈阳性 (CD3^{neg}CD57^{pos}) 的细胞,任选地其中所述方法包括从所述生物样品选择对CD3呈阴性或具有低CD3 (CD3^{neg}) 的细胞,从而富集第一选择群体,以及从所述第一选择群体选择对CD57呈阳性 (CD57^{pos}) 的细胞。

[0015] 在一些任何前述实施方案中,所述富集NK细胞的群体是从所述生物样品选择的如下细胞:对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD56呈阳性 (CD3^{neg}CD56^{pos})。在一些任何前述实施方案中,所述富集NK细胞的群体是通过如下方法从所述生物样品选择的,所述方法包括:(a) 从所述生物样品选择(1) 对CD3呈阴性或具有低CD3 (CD3^{neg}) 的细胞或(2) 对CD56呈阳性

(CD56^{pos})的细胞,从而富集第一选择群体;以及(b)从所述第一选择群体选择以下中的另一种细胞:(1)对CD3呈阴性或具有低CD3(CD3^{neg})的细胞或(2)对CD56呈阳性(CD56^{pos})的细胞,从而富集对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD56呈阳性(CD3^{neg}CD56^{pos})的细胞,任选地其中所述方法包括从所述生物样品选择对CD3呈阴性或具有低CD3(CD3^{neg})的细胞,从而富集第一选择群体,以及从所述第一选择群体选择对CD56呈阳性(CD56^{pos})的细胞。

[0016] 在一些任何前述实施方案中,所述受试者是针对来自所述受试者的外周血样品中至少或至少约20%的NK细胞对NKG2C呈阳性(NKG2C^{pos})选择的受试者。在一些任何前述实施方案中,所述受试者是针对来自所述受试者的外周血样品中至少或至少约70%的NK细胞对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A(NKG2A^{neg})选择的受试者。

[0017] 在一些任何前述实施方案中,所获得的富集的NK细胞的群体是被冷冻的低温保存的生物样品,并且在所述培养之前将所述低温保存的生物样品解冻。在一些任何前述实施方案中,在所述培养之前不对所获得的富集的NK细胞的群体进行冷冻或低温保存。

[0018] 在一些任何前述实施方案中,用于扩增的条件包括有效量的一种或多种重组细胞因子。在一些实施方案中,所述一种或多种重组细胞因子包括有效量的SCF、GSK3i、FLT3、IL-2、IL-6、IL-7、IL-15、IL-12、IL-18、IL-21、IL-27或其组合。在一些实施方案中,所述一种或多种重组细胞因子包括有效量的IL-2、IL-7、IL-15、IL-12、IL-18、IL-21、IL-27或其组合。

[0019] 在一些任何前述实施方案中,所述一种或多种重组细胞因子中的至少一种是IL-21。在一些任何前述实施方案中,所述重组细胞因子还包括IL-2、IL-7、IL-15、IL-12、IL-18或IL-27或其组合。在一些任何前述实施方案中,所述重组细胞因子中的至少一种是IL-2。在一些任何前述实施方案中,所述重组细胞因子是IL-21和IL-2。在一些任何前述实施方案中,所述重组细胞因子是IL-21、IL-2和IL-15。在一些任何前述实施方案中,所述重组细胞因子是IL-21、IL-12、IL-15和IL-18。在一些任何前述实施方案中,所述重组细胞因子是IL-21、IL-2、IL-12、IL-15和IL-18。在一些任何前述实施方案中,所述重组细胞因子是IL-21、IL-15、IL-18和IL-27。在一些任何前述实施方案中,所述重组细胞因子是IL-21、IL-2、IL-15、IL-18和IL-27。在一些任何前述实施方案中,所述重组细胞因子是IL-2和IL-15。

[0020] 在一些任何前述实施方案中,在所述培养的至少一部分期间将重组IL-21添加至所述培养基,任选地在为或约所述培养开始时和/或所述培养期间一次或多次添加,添加浓度是为或约10ng/mL至为或约100ng/mL。在一些任何前述实施方案中,在所述培养的至少一部分期间将重组IL-21添加至所述培养基,任选地在为或约所述培养开始时和/或所述培养期间一次或多次添加,添加浓度是为或约25ng/mL。

[0021] 在一些任何前述实施方案中,在所述培养的至少一部分期间将重组IL-2添加至所述培养基,任选地在为或约所述培养开始时和/或所述培养期间一次或多次添加,添加浓度是为或约10IU/mL至为或约500IU/mL。在一些任何前述实施方案中,在所述培养的至少一部分期间将重组IL-2添加至所述培养基,任选地在为或约所述培养开始时和/或所述培养期间一次或多次添加,添加浓度是为或约100IU/mL。在一些任何前述实施方案中,在所述培养的至少一部分期间将重组IL-2添加至所述培养基,任选地在为或约所述培养开始时和/或所述培养期间一次或多次添加,添加浓度是为或约500IU/mL。

[0022] 在一些任何前述实施方案中,在所述培养的至少一部分期间将重组IL-15添加至

所述培养基,任选地在为或约所述培养开始时和/或所述培养期间一次或多次添加,添加浓度是为或约1ng/mL至50ng/mL。在一些任何前述实施方案中,在所述培养的至少一部分期间将重组IL-15添加至所述培养基,任选地在为或约所述培养开始时和/或所述培养期间一次或多次添加,添加浓度是为或约10ng/mL。

[0023] 在一些任何前述实施方案中,在所述培养的至少一部分期间将重组IL-12添加至所述培养基,任选地在为或约所述培养开始时和/或所述培养期间一次或多次添加,添加浓度是为或约1ng/mL至50ng/mL。在一些任何前述实施方案中,在所述培养的至少一部分期间将重组IL-12添加至所述培养基,任选地在为或约所述培养开始时和/或所述培养期间一次或多次添加,添加浓度是为或约10ng/mL。

[0024] 在一些任何前述实施方案中,在所述培养的至少一部分期间将重组IL-18添加至所述培养基,任选地在为或约所述培养开始时和/或所述培养期间一次或多次添加,添加浓度是为或约1ng/mL至50ng/mL。在一些任何前述实施方案中,在所述培养的至少一部分期间将重组IL-18添加至所述培养基,任选地在为或约所述培养开始时和/或所述培养期间一次或多次添加,添加浓度是为或约10ng/mL。

[0025] 在一些任何前述实施方案中,在所述培养的至少一部分期间将重组IL-27添加至所述培养基,任选地在为或约所述培养开始时和/或所述培养期间一次或多次添加,添加浓度是为或约1ng/mL至50ng/mL。在一些任何前述实施方案中,在所述培养的至少一部分期间将重组IL-27添加至所述培养基,任选地在为或约所述培养开始时和/或所述培养期间一次或多次添加,添加浓度是为或约10ng/mL。

[0026] 在一些任何前述实施方案中,在为或约所述培养开始时开始将所述重组细胞因子添加至所述培养基。在一些实施方案中,在所述培养期间的一个或多个另外的时间将所述重组细胞因子添加至所述培养基。

[0027] 在一些任何前述实施方案中,所述方法还包括在所述培养期间一次或多次更换所述培养基。在一些实施方案中,在所述培养的持续时间中,任选地在长达5天不进行培养基更换的初始扩增之后,每两或三天进行所述培养基更换。在一些实施方案中,在所述培养基的每次更换时,添加含有所述重组细胞因子的新鲜培养基。

[0028] 在一些任何前述实施方案中,所述重组细胞因子包括IL-21并且在所述培养的至少一部分期间作为与抗IL-21抗体的复合物来添加所述IL-21,任选地在为或约所述培养开始时和/或所述培养期间一次或多次添加。在一些实施方案中,在所述培养之前,将所述抗IL-21抗体和所述重组IL-21孵育以形成所述IL-21/抗IL-21复合物;并且将所述IL-21/抗IL-21复合物添加至所述培养基。在一些实施方案中,所述抗IL-21抗体的浓度是为或约100ng/mL至500ng/mL。在一些任何前述实施方案中,所述抗IL-21抗体的浓度为或为约250ng/mL。在一些任何前述实施方案中,所述重组IL-21的浓度是为或约10ng/mL至100ng/mL。在一些任何前述实施方案中,所述重组IL-21的浓度是为或约25ng/mL。

[0029] 在一些任何前述实施方案中,所述人受试者具有CD16 158V/V NK细胞基因型或CD16 158V/F NK细胞基因型,任选地其中所述生物样品来自针对所述CD16 158V/VNK细胞基因型或所述CD16 158V/F NK细胞基因型选择的人受试者。在一些任何前述实施方案中,所述生物样品是或包含外周血单个核细胞(PBMC)。在一些任何前述实施方案中,所述生物样品是血液样品。在一些任何前述实施方案中,所述生物样品是单采术或白细胞单采术样

品。

[0030] 在一些任何前述实施方案中,所述生物样品是被冷冻的低温保存的样品,并且在所述培养之前将所述低温保存的样品解冻。在一些任何前述实施方案中,在所述培养之前不对所述生物样品进行冷冻或低温保存。

[0031] 在一些任何前述实施方案中,所述选择包括基于免疫亲和力的选择。

[0032] 在一些任何前述实施方案中,所述HLA-E+饲养细胞是K562细胞。在一些实施方案中,所述K562细胞表达膜结合的IL-15(K562-mb15)或膜结合的IL-21(K562-mb21)。在一些任何前述实施方案中,所述HLA-E+饲养细胞是221.AEH细胞。

[0033] 在一些任何前述实施方案中,辐照的HLA-E+饲养细胞与NK细胞的比率是为或约1:1或更大。在一些任何前述实施方案中,辐照的HLA-E+饲养细胞与NK细胞的比率在1:1与5:1之间,包含端值。在一些任何前述实施方案中,辐照的HLA-E+饲养细胞与富集的NK细胞的比率在1:1与3:1之间,包含端值。在一些任何前述实施方案中,辐照的HLA-E+饲养细胞与富集的NK细胞的比率为为或约2.5:1。在一些任何前述实施方案中,辐照的HLA-E+饲养细胞与富集的NK细胞的比率为为或约2:1。在一些任何前述实施方案中,辐照的HLA-E+饲养细胞与富集的NK细胞的比率为为或约1:1。

[0034] 在一些任何前述实施方案中,在冷冻用于低温保存之后,已经将富集的NK细胞的所述群体解冻。在一些任何前述实施方案中,富集的NK细胞的所述群体是新近分离的或者先前尚未进行冷冻和解冻。

[0035] 在一些任何前述实施方案中,在所述培养的至少一部分期间添加至所述培养基的所述重组细胞因子为500IU/mL IL-2、10ng/mL IL-15和25ng/mL IL-21。

[0036] 在一些任何前述实施方案中,富集的NK细胞的所述群体包含至少或至少约 2.0×10^5 个富集的NK细胞、至少或至少约 1.0×10^6 个富集的NK细胞或者至少或至少约 1.0×10^7 个富集的NK细胞。

[0037] 在一些任何前述实施方案中,富集的NK细胞的所述群体包含在为或约 2.0×10^5 个富集的NK细胞与为或约 5.0×10^7 个富集的NK细胞之间、在为或约 1.0×10^6 个富集的NK细胞与为或约 1.0×10^8 个富集的NK细胞之间、在为或约 1.0×10^7 个富集的NK细胞与为或约 5.0×10^8 个富集的NK细胞之间或者在为或约 1.0×10^7 个富集的NK细胞与为或约 1.0×10^9 个富集的NK细胞之间。在一些任何前述实施方案中,在所述培养开始时的富集的NK细胞的所述群体的浓度为在或在约 0.05×10^6 个富集的NK细胞/mL与 1.0×10^6 个富集的NK细胞/mL之间。在一些任何前述实施方案中,在所述培养开始时的富集的NK细胞的所述群体的浓度为在或在约 0.05×10^6 个富集的NK细胞/mL与 0.5×10^6 个富集的NK细胞/mL之间。在一些任何前述实施方案中,在所述培养开始时的富集的NK细胞的所述群体包含为或约 0.2×10^6 个富集的NK细胞/mL的浓度。

[0038] 在一些任何前述实施方案中,所述培养是在封闭系统中进行。在一些任何前述实施方案中,所述培养是在无菌培养袋中进行。在一些任何前述实施方案中,所述培养是使用透气性培养器皿来进行。在一些任何前述实施方案中,所述培养是使用生物反应器来进行。

[0039] 在一些任何前述实施方案中,进行所述培养直至所述方法实现至少或至少约 2.50×10^8 个g-NK细胞的扩增的时间。在一些任何前述实施方案中,进行所述培养直至所述方法实现至少或至少约 5.00×10^8 个g-NK细胞的扩增的时间。在一些任何前述实施方案中,进行所述培养直至所述方法实现至少或至少约 1.0×10^9 个g-NK细胞的扩增。在一些任何前

述实施方案中,进行所述培养直至所述方法实现至少或至少约 5.0×10^9 个g-NK细胞的扩增的时间。

[0040] 在一些任何前述实施方案中,所述培养进行为或约或至少或至少约5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天或25天。在一些任何前述实施方案中,所述培养进行为或约或至少或至少约14天。在一些任何前述实施方案中,所述培养进行为或约或至少或至少约21天。

[0041] 在一些任何前述实施方案中,与所述培养开始时相比,所述方法在所述培养结束时产生数量增加的g-NK细胞。在一些实施方案中,所述增加是大于或大于约100倍、大于或大于约200倍、大于或大于约300倍、大于或大于约400倍、大于或大于约500倍、大于或大于约600倍、大于或大于约700倍或者大于或大于约800倍。在一些实施方案中,所述增加是为或约1000倍或更大。在一些实施方案中,所述增加是为或约2000倍或更大、为或约3000倍或更大或者为或约3500倍或更大。

[0042] 在一些任何前述实施方案中,所述方法还包括收集通过所述方法产生的富含g-NK细胞的所述扩增群体。在一些任何前述实施方案中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于50%的所述群体是FcR γ^{neg} 。在一些任何前述实施方案中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于60%的所述群体是FcR γ^{neg} 。在一些任何前述实施方案中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于70%的所述群体是FcR γ^{neg} 。在一些任何前述实施方案中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于80%的所述群体是FcR γ^{neg} 。在一些任何前述实施方案中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于90%的所述群体是FcR γ^{neg} 。在一些任何前述实施方案中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于95%的所述群体是FcR γ^{neg} 。

[0043] 在一些任何前述实施方案中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于或大于约30%对NKG2C呈阳性(NKG2C^{pos})和/或大于或大于约50%对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A(NKG2A^{neg})。在一些任何前述实施方案中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于或大于约35%对NKG2C呈阳性(NKG2C^{pos})和/或大于或大于约60%对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A(NKG2A^{neg})。在一些任何前述实施方案中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于或大于约40%对NKG2C呈阳性(NKG2C^{pos})和/或大于或大于约70%对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A(NKG2A^{neg})。在一些任何前述实施方案中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于或大于约45%对NKG2C呈阳性(NKG2C^{pos})和/或大于或大于约80%对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A(NKG2A^{neg})。在一些任何前述实施方案中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于或大于约50%对NKG2C呈阳性(NKG2C^{pos})和/或大于或大于约85%对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A(NKG2A^{neg})。在一些任何前述实施方案中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于或大于约55%对NKG2C呈阳性(NKG2C^{pos})和/或大于或大于约90%对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A(NKG2A^{neg})。在一些任何前述实施方案中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于或大于约60%对NKG2C呈阳性(NKG2C^{pos})和/或大于或大于约95%对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A(NKG2A^{neg})。

[0044] 在一些任何前述实施方案中,所述人受试者具有CD16 158V/V NK细胞基因型并且所述g-NK细胞为CD16 158V/V(V158),或者所述人受试者具有CD16 158V/F NK细胞基因型并且所述g-NK细胞为CD16 158V/F(V158)。

[0045] 在一些任何前述实施方案中,所述方法还包括基于一种或多种表面标记物

NKG2C^{pos}、NKG2C^{neg}、CD16^{pos}、CD57^{pos}、CD7^{dim/neg}、CD161^{neg}、CD38^{neg}或前述任一项的组合,从富含g-NK细胞的所述扩增群体纯化细胞群体。在一些实施方案中,所述纯化包括选择呈NKG2C^{pos}和NKG2A^{neg}的细胞。在一些实施方案中,所述纯化包括选择呈CD16^{pos}/CD57^{pos}/CD7^{dim/neg}/CD161^{neg}的细胞。在一些实施方案中,所述纯化包括选择呈NKG2A^{neg}/CD161^{neg}的细胞。在一些实施方案中,所述纯化包括选择呈CD38^{neg}的细胞。

[0046] 在一些任何前述实施方案中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于为或为约70%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性。在一些任何前述实施方案中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于为或为约80%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性。在一些任何前述实施方案中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于为或为约85%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性。在一些任何前述实施方案中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于为或为约90%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性。在一些任何前述实施方案中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于为或为约70%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些任何前述实施方案中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于为或为约80%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些任何前述实施方案中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于为或为约85%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些任何前述实施方案中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于为或为约90%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。

[0047] 在一些任何前述实施方案中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于10%的细胞能够针对肿瘤靶细胞脱颗粒,任选地如按照CD107a所测量。在一些任何前述实施方案中,所述脱颗粒是在不存在针对所述肿瘤靶细胞的抗体的情况下测量的。在一些任何实施方案中,在表达靶抗原的细胞(靶细胞)和针对所述靶抗原的抗体(抗靶标抗体)的存在下,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于或大于约15%、大于或大于约20%、大于或大于约30%、大于或大于约40%或大于或大于约50%展现脱颗粒,任选地如按照CD107a表达所测量。例如,所述靶细胞可以是表达CD38的肿瘤细胞系并且所述抗体是抗CD38抗体(例如达雷木单抗)。

[0048] 在一些任何前述实施方案中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于10%的细胞能够针对肿瘤靶细胞产生干扰素- γ 或TNF- α 。在一些任何前述实施方案中,所述干扰素- γ 或TNF- α 是在不存在针对所述肿瘤靶细胞的抗体的情况下测量的。在一些任何前述实施方案中,在表达靶抗原的细胞(靶细胞)和针对所述靶抗原的抗体(抗靶标抗体)的存在下,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于或大于约15%、大于或大于约20%、大于或大于约30%、大于或大于约40%或大于或大于约50%产生效应细胞因子。在一些实施方案中,所述效应细胞因子是IFN- γ 或TNF- α 。在一些实施方案中,所述效应细胞因子是IFN- γ 和TNF- α 。在一些实施方案中,例如,所述靶细胞可以是表达CD38的肿瘤细胞系并且所述抗体是抗CD38抗体(例如达雷木单抗)。

[0049] 在一些任何前述实施方案中,所述方法还包括在药学上可接受的赋形剂中配制富集的g-NK细胞的所述扩增群体。在一些实施方案中,所述方法包括用包含低温保护剂的无血清低温保存介质配制富集的g-NK细胞的所述扩增群体。在一些实施方案中,所述低温保护剂是DMSO。在一些实施方案中,所述低温保护剂是DMSO,并且所述低温保存介质是5%至10% DMSO(v/v),任选地为或为约10% DMSO(v/v)。

[0050] 本文还提供一种包含通过任何前述实施方案的方法产生的g-NK细胞的组合物。

[0051] 本文提供一种扩增的自然杀伤(NK)细胞的组合物,其中所述组合物中至少或至少约50%的细胞是FcR γ 缺陷性NK细胞(g-NK),其中大于或大于约70%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性,并且大于或大于约70%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,大于或大于约80%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性,并且大于或大于约80%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,大于或大于约90%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性,并且大于或大于约90%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,大于或大于约95%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性,并且大于或大于约95%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,所述g-NK细胞为FcR γ^{neg} 。

[0052] 在一些任何实施方案中,在所述对穿孔蛋白呈阳性的细胞中,如通过细胞内流式细胞术所测量,基于平均荧光强度(MFI),所述细胞表达的穿孔蛋白的平均水平是FcR γ^{pos} 的细胞表达的穿孔蛋白的平均水平的至少或至少约两倍。在一些任何实施方案中,在所述对颗粒酶B呈阳性的细胞中,如通过细胞内流式细胞术所测量,基于平均荧光强度(MFI),所述细胞表达的颗粒酶B的平均水平是FcR γ^{pos} 的细胞表达的颗粒酶B的平均水平的至少或至少约两倍。

[0053] 在一些任何实施方案中,所述组合物中大于10%的细胞能够针对肿瘤靶细胞脱颗粒,任选地如按照CD107a表达所测量,任选地其中所述脱颗粒是在不存在针对所述肿瘤靶细胞的抗体的情况下测量的。在一些任何实施方案中,在表达靶抗原的细胞(靶细胞)和针对所述靶抗原的抗体(抗靶标抗体)的存在下,在所述组合物中的细胞中,大于或大于约15%、大于或大于约20%、大于或大于约30%、大于或大于约40%或大于或大于约50%展现脱颗粒,任选地如按照CD107a表达所测量。在一些任何这样的实施方案中,所述组合物中大于10%的细胞能够针对肿瘤靶细胞产生干扰素- γ 或TNF- α ,任选地其中所述干扰素- γ 或TNF- α 是在不存在针对所述肿瘤靶细胞的抗体的情况下测量的。在一些实施方案中,在表达靶抗原的细胞(靶细胞)和针对所述靶抗原的抗体(抗靶标抗体)的存在下,在所述组合物中的细胞中,大于或大于约15%、大于或大于约20%、大于或大于约30%、大于或大于约40%或大于或大于约50%产生效应细胞因子。在一些实施方案中,例如,所述靶细胞可以是表达CD38的肿瘤细胞系并且所述抗体是抗CD38抗体(例如达雷木单抗)。

[0054] 本文提供一种扩增的自然杀伤(NK)细胞的组合物,其中所述组合物中至少或至少约50%的细胞是FcR γ 缺陷性(FcR γ^{neg})NK细胞(g-NK),并且其中在表达靶抗原的细胞(靶细胞)和针对所述靶抗原的抗体(抗靶标抗体)的存在下,所述组合物中大于或大于约15%的细胞产生效应细胞因子。在一些实施方案中,在表达靶抗原的细胞(靶细胞)和针对所述靶抗原的抗体(抗靶标抗体)的存在下,大于或大于约20%、大于或大于约30%、大于或大于约40%或大于或大于约50%产生效应细胞因子。在一些实施方案中,例如,所述靶细胞可以是表达CD38的肿瘤细胞系并且所述抗体是抗CD38抗体(例如达雷木单抗)。

[0055] 在一些任何实施方案中,所述效应细胞因子是IFN- γ 或TNF- α 。在一些任何实施方案中,所述效应细胞因子是IFN- γ 和TNF- α 。

[0056] 在一些任何实施方案中,在表达靶抗原的细胞(靶细胞)和针对所述靶抗原的抗体(抗靶标抗体)的存在下,在所述组合物中的细胞中,大于或大于约15%、大于或大于约20%、大于或大于约30%、大于或大于约40%或大于或大于约50%展现脱颗粒,任选地如按照CD107a表达所测量。在一些实施方案中,例如,所述靶细胞可以是表达CD38的肿瘤细胞系

并且所述抗体是抗CD38抗体(例如达雷木单抗)。

[0057] 本文提供一种扩增的自然杀伤(NK)细胞的组合物,其中所述组合物中至少或至少约50%的细胞是FcR γ 缺陷性(FcR γ^{neg})NK细胞(g-NK),并且其中在表达靶抗原的细胞(靶细胞)和针对所述靶抗原的抗体(抗靶标抗体)的存在下,所述组合物中大于或大于约15%的细胞展现脱颗粒,任选地如按照CD107a表达所测量。在一些实施方案中,在表达靶抗原的细胞(靶细胞)和针对所述靶抗原的抗体(抗靶标抗体)的存在下,大于或大于约20%、大于或大于约30%、大于或大于约40%或大于或大于约50%展现脱颗粒,任选地如按照CD107a表达所测量。在一些实施方案中,例如,所述靶细胞可以是表达CD38的肿瘤细胞系并且所述抗体是抗CD38抗体(例如达雷木单抗)。

[0058] 在一些任何所提供的实施方案中,所述组合物中大于或大于约60%的细胞是g-NK细胞。在一些任何所提供的实施方案中,所述组合物中大于或大于约70%的细胞是g-NK细胞。在一些任何所提供的实施方案中,所述组合物中大于或大于约80%的细胞是g-NK细胞。在一些任何所提供的实施方案中,所述组合物中大于或大于约90%的细胞是g-NK细胞。在一些任何所提供的实施方案中,所述组合物中大于或大于约95%的细胞是g-NK细胞。

[0059] 在一些实施方案中,所述g-NK细胞展现g-NK细胞替代标记物谱。在一些实施方案中,所述g-NK细胞替代标记物谱是CD16^{pos}/CD57^{pos}/CD7^{dim/neg}/CD161^{neg}。在一些实施方案中,所述g-NK细胞替代标记物谱是NKG2A^{neg}/CD161^{neg}。在一些实施方案中,所述g-NK细胞替代标记物谱是CD38^{neg}。在一些实施方案中,所述g-NK细胞替代表面标记物谱进一步为CD45^{pos}/CD3^{neg}/CD56^{pos}。

[0060] 在一些任何前述实施方案中,大于或大于约60%的细胞是g-NK细胞。在一些任何前述实施方案中,大于或大于约70%的细胞是g-NK细胞。在一些任何前述实施方案中,大于或大于约80%的细胞是g-NK细胞。在一些任何前述实施方案中,大于或大于约90%的细胞是g-NK细胞。在一些任何前述实施方案中,大于或大于约95%的细胞是g-NK细胞。

[0061] 在一些任何前述实施方案中,大于为或为约80%的细胞对穿孔蛋白呈阳性。在一些任何前述实施方案中,大于为或为约90%的细胞对穿孔蛋白呈阳性。在一些任何前述实施方案中,在所述对穿孔蛋白呈阳性的细胞中,如通过细胞内流式细胞术所测量,基于平均荧光强度(MFI),所述细胞表达的穿孔蛋白的平均水平是FcR γ^{pos} 的细胞表达的穿孔蛋白的平均水平的至少或至少约两倍。

[0062] 在一些任何前述实施方案中,大于为或为约80%的细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些任何前述实施方案中,大于为或为约90%的细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些任何前述实施方案中,在所述对颗粒酶B呈阳性的细胞中,如通过细胞内流式细胞术所测量,基于平均荧光强度(MFI),所述细胞表达的颗粒酶B的平均水平是FcR γ^{pos} 的细胞表达的颗粒酶B的平均水平的至少或至少约两倍。

[0063] 在一些任何前述实施方案中,所述组合物包含至少或约至少 10^8 个细胞。在一些任何前述实施方案中,所述组合物中g-NK细胞的数量是为或约 10^8 至为或约 10^{12} 个细胞、为或约 10^8 至为或约 10^{11} 个细胞、为或约 10^8 至为或约 10^{10} 个细胞、为或约 10^8 至为或约 10^9 个细胞、为或约 10^9 至为或约 10^{12} 个细胞、为或约 10^9 至为或约 10^{11} 个细胞、为或约 10^9 至为或约 10^{10} 个细胞、为或约 10^{10} 至为或约 10^{12} 个细胞、为或约 10^{10} 至为或约 10^{11} 个细胞或者为或约 10^{11} 至为或约 10^{12} 个细胞。在一些任何前述实施方案中,所述组合物中g-NK细胞的数量为或为约

5×10^8 个细胞, 为或为约 1×10^9 个细胞, 为或为约 5×10^9 个细胞, 或者为或为约 1×10^{10} 个细胞。在一些任何前述实施方案中, 所述组合物的体积是在为或约 50mL 与为或约 500mL 之间, 任选地为或约 200mL。

[0064] 在一些任何前述实施方案中, 所述组合物中的所述细胞来自单一供体受试者, 所述细胞已经从相同的生物样品扩增。

[0065] 在一些任何前述实施方案中, 所述组合物是药物组合物。在一些任何前述实施方案中, 所述组合物包含药学上可接受的赋形剂。在一些任何前述实施方案中, 在包含低温保护剂的无血清低温保存介质中配制所述组合物。在一些实施方案中, 所述低温保护剂是 DMSO, 并且所述低温保存介质是 5% 至 10% DMSO (v/v)。在一些实施方案中, 所述低温保护剂为或为约 10% DMSO (v/v)。在一些任何前述实施方案中, 所述组合物是无菌的。

[0066] 本文提供一种无菌袋, 其包含任何前述实施方案的组合物。在一些实施方案中, 所述袋是适合低温保存的袋。

[0067] 本文提供一种试剂盒, 其包含任何前述实施方案的组合物。在一些实施方案中, 所述试剂盒还包含用于施用作为单一疗法的所述组合物用于治疗疾病或病症的说明书。在一些实施方案中, 所述试剂盒还包含用于治疗疾病或病症的另外的药剂。

[0068] 在一些任何前述实施方案中, 所述疾病或病症选自炎性病症、感染和癌症。在一些任何前述实施方案中, 所述疾病或病症是感染, 并且所述感染是由病毒或细菌引起的。在一些实施方案中, 所述感染是由病毒引起的。在一些实施方案中, 所述病毒是 RNA 病毒, 任选地冠状病毒。在一些实施方案中, 所述病毒是 DNA 病毒。在一些实施方案中, 所述病毒是 SARS-CoV-2, 并且所述感染是 COVID-19。

[0069] 在一些任何前述实施方案中, 所述另外的药剂是含有针对所述病毒的抗体的血清。在一些任何前述实施方案中, 所述血清是来自从所述病毒引起的感染恢复的患者的恢复期血清。在一些任何前述实施方案中, 所述另外的药剂是抗体或 Fc-融合蛋白, 任选地重组 ACE2-Fc 融合蛋白。

[0070] 在一些任何前述实施方案中, 所述疾病或病症是癌症, 并且所述癌症是白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。在一些任何前述实施方案中, 所述疾病或病症是癌症, 并且所述癌症包括实体瘤。在一些实施方案中, 所述癌症选自胃或食管胃结合部的腺癌、膀胱癌、乳腺癌、脑癌、子宫颈癌、结直肠癌、内分泌/神经内分泌癌症、头颈癌、胃肠间质瘤、骨巨细胞瘤、肾癌、肝癌、肺癌、神经母细胞瘤、卵巢上皮癌/输卵管癌/原发性腹膜癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌和软组织癌。

[0071] 在一些实施方案中, 所述另外的药剂是抗体或 Fc-融合蛋白。在一些任何前述实施方案中, 所述另外的药剂是识别或特异性结合肿瘤相关抗原的抗体。在一些任何前述实施方案中, 所述抗体识别或结合 CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD52、CD56、CD70、CD74、CD140、EpCAM、CEA、gpA33、间皮素、甲胎蛋白、黏蛋白、PDGFR- α 、TAG-72、CAIX、PSMA、叶酸结合蛋白、散射因子受体激酶、神经节苷脂、细胞角蛋白、卷曲受体、VEGF、VEGFR、整联蛋白 $\alpha V \beta 3$ 、整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ 、EGFR、EGFL7、ERBB2 (HER2)、ERBB3、纤连蛋白、HGF、HER3、LOXL2、MET、IGF1R、IGLF2、EPHA3、FR- α 、磷脂酰丝氨酸、黏结蛋白聚糖 1、SLAMF7 (CD319)、TRAILR1、TRAILR2、RANKL、FAP、波形蛋白或生腱蛋白。在一些任何前述实施方案中, 所述试剂盒还包含细胞毒性剂或癌症药物。

[0072] 在一些任何前述实施方案中,所述另外的药剂是细胞毒性剂或癌症药物。在一些任何前述实施方案中,所述另外的药剂是溶瘤病毒。在一些任何前述实施方案中,所述另外的药剂是双特异性抗体,其包含与免疫细胞上的激活受体特异性结合的至少一个结合结构域和与肿瘤相关抗原特异性结合的至少一个结合结构域。在一些实施方案中,所述免疫细胞是NK细胞。在一些任何前述实施方案中,所述激活受体是CD16 (CD16a)。在一些任何前述实施方案中,所述肿瘤相关抗原是CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD52、CD56、CD70、CD74、CD140、EpCAM、CEA、gpA33、间皮素、甲胎蛋白、黏蛋白、PDGFR- α 、TAG-72、CAIX、PSMA、叶酸结合蛋白、散射因子受体激酶、神经节苷脂、细胞角蛋白、卷曲受体、VEGF、VEGFR、整联蛋白 α V β 3、整联蛋白 α 5 β 1、EGFR、EGFL7、ERBB2 (HER2)、ERBB3、纤连蛋白、HGF、HER3、LOXL2、MET、IGF1R、IGLF2、EPHA3、FR- α 、磷脂酰丝氨酸、黏结蛋白聚糖1、SLAMF7 (CD319)、TRAILR1、TRAILR2、RANKL、FAP、波形蛋白或生腱蛋白。

[0073] 本文提供一种制品,其包含任何前述实施方案的试剂盒。

[0074] 本文提供一种治疗疾病或病症的方法,所述方法包括将任何前述实施方案的组合物施用至有需要的个体。本文还提供任何本文提供的药物组合物,其用于治疗受试者的疾病或病症。本文还提供任何本文提供的药物组合物在制造用于治疗受试者的疾病或病症的药物中的用途。

[0075] 在一些实施方案中,所述疾病或病症选自炎症病症、感染和癌症。在一些实施方案中,所述疾病或病症是感染,并且所述感染是由病毒或细菌引起的。在一些实施方案中,所述感染是由病毒引起的。在一些实施方案中,t所述病毒是DNA病毒。在一些实施方案中,所述病毒是RNA病毒。在一些实施方案中,所述病毒是冠状病毒。在一些实施方案中,所述冠状病毒是SARS-CoV-2,并且所述感染是COVID-19。

[0076] 在一些实施方案中,所述疾病或病症是癌症,并且所述癌症是白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。在一些实施方案中,所述疾病或病症是癌症,并且所述癌症包括实体瘤。在一些实施方案中,所述癌症选自胃或食管胃结合部的腺癌、膀胱癌、乳腺癌、脑癌、子宫颈癌、结直肠癌、内分泌/神经内分泌癌症、头颈癌、胃肠间质瘤、骨巨细胞瘤、肾癌、肝癌、肺癌、神经母细胞瘤、卵巢上皮癌/输卵管癌/原发性腹膜癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌和软组织癌。

[0077] 在一些任何前述实施方案中,所述组合物是作为单一疗法来施用。在一些任何前述实施方案中,所述方法还包括将另外的药剂施用至所述个体用于治疗所述疾病或病症。

[0078] 在一些实施方案中,所述疾病或病症是病毒,并且所述另外的药剂是含有针对所述病毒的抗体的血清。在一些实施方案中,所述血清是来自从所述病毒引起的感染恢复的患者的恢复期血清。

[0079] 在一些实施方案中,所述另外的药剂是抗体或Fc-融合蛋白。在一些实施方案中,所述抗体包含Fc结构域和/或是全长抗体。在一些实施方案中,所述疾病或病症是病毒,并且所述另外的药剂是重组ACE2-Fc融合蛋白。在一些实施方案中,所述疾病或病症是癌症,并且所述抗体识别与所述癌症相关的肿瘤抗原。在一些实施方案中,所述抗体识别或特异性结合CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD52、CD56、CD70、CD74、CD140、EpCAM、CEA、gpA33、间皮素、甲胎蛋白、黏蛋白、PDGFR- α 、TAG-72、CAIX、PSMA、叶酸结合蛋白、散射因子受体激酶、神经节苷脂、细胞角蛋白、卷曲受体、VEGF、VEGFR、整联蛋白 α V β 3、整联蛋白 α 5 β 1、EGFR、EGFL7、ERBB2 (HER2)、ERBB3、纤连蛋白、HGF、HER3、LOXL2、MET、IGF1R、

IGLF2、EPA3、FR- α 、磷脂酰丝氨酸、黏结蛋白聚糖1、SLAMF7 (CD319)、TRAILR1、TRAILR2、RANKL、FAP、波形蛋白或生腱蛋白。

[0080] 在一些实施方案中,所述另外的药剂是溶瘤病毒。在一些实施方案中,所述另外的药剂是双特异性抗体,其包含与免疫细胞上的激活受体特异性结合的至少一个结合结构域和与肿瘤相关抗原特异性结合的至少一个结合结构域。在一些实施方案中,所述免疫细胞是巨噬细胞。在一些实施方案中,所述免疫细胞是NK细胞。在一些任何前述实施方案中,所述激活受体是CD16 (CD16a)。在一些任何前述实施方案中,所述肿瘤相关抗原是CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD52、CD56、CD70、CD74、CD140、EpCAM、CEA、gpA33、间皮素、甲胎蛋白、黏蛋白、PDGFR- α 、TAG-72、CAIX、PSMA、叶酸结合蛋白、散射因子受体激酶、神经节苷脂、细胞角蛋白、卷曲受体、VEGF、VEGFR、整联蛋白 α V β 3、整联蛋白 α 5 β 1、EGFR、EGFL7、ERBB2 (HER2)、ERBB3、纤连蛋白、HGF、HER3、LOXL2、MET、IGF1R、IGLF2、EPA3、FR- α 、磷脂酰丝氨酸、黏结蛋白聚糖1、SLAMF7 (CD319)、TRAILR1、TRAILR2、RANKL、FAP、波形蛋白或生腱蛋白。在一些任何前述实施方案中,所述方法还包括将癌症药物或细胞毒性剂施用至所述受试者用于治疗所述疾病或病症。

[0081] 在一些任何前述实施方案中,所述方法包括将为或约 1×10^5 个NK细胞/kg至为或约 1×10^7 个NK细胞/kg施用至所述个体。在一些任何前述实施方案中,所述方法包括将为或约 5×10^7 个NK细胞至为或约 10×10^9 个NK细胞施用至所述个体。在一些任何前述实施方案中,所述个体是人。在一些任何前述实施方案中,所述组合物中的NK细胞对于所述个体是同种异体的。在一些任何前述实施方案中,所述组合物中的NK细胞对于所述受试者是自体的。

附图说明

[0082] 图1描绘在具有CD45^{pos}/CD3^{neg}/CD56^{pos}/CD16^{pos}/CD57^{pos}/CD7^{dim/neg}/CD161^{neg}或CD45^{pos}/CD3^{neg}/CD56^{pos}/NKG2A^{neg}/CD161^{neg}的替代细胞外表面表型的细胞子集内,g-NK (CD45^{pos}/CD3^{neg}/CD56^{pos}/FcR γ ^{neg})的百分比。值是平均值 $\pm$ 标准误差。

[0083] 图2A描绘示例性扩增方案的流程图,所述扩增方案涉及CD3耗尽和之后的CD57富集,如实施例2中所描述。在此示意图中,在扩增期期间,除了辐照的221.AEH细胞,还可以包括辐照的PBMC作为饲养细胞。

[0084] 图2B和图2C描绘来自从CMV^{pos}供体外周血单个核细胞分离的富集的NK细胞的g-NK的扩增。所显示的所有结果都来自通过各种方法富集的新鲜NK细胞的14天扩增,但是对通过CD3耗尽富集的解冻的NK细胞进行21天扩增。图2B描绘在通过如实施例2中所述的各种方法扩增后,g-NK细胞的总数。图2C描绘在通过如实施例2中所述的各种方法扩增之前和之后,g-NK细胞的百分比。值是平均值 $\pm$ 标准误差。 $\#p < 0.001$,对于CMV^{pos} CD3^{neg}/CD57^{pos} 14天扩增与其他扩增的比较。 $*p < 0.05$,对于CMV^{pos}扩增与CMV^{neg} CD3^{neg} 14天扩增的比较。 $^{\wedge}p < 0.001$,对于扩增后值相比于扩增前值。

[0085] 图2D和图2E描绘来自从CMV^{pos}供体外周血单个核细胞分离的富集的NK细胞的g-NK的扩增。所显示的所有结果都来自通过各种方法富集的新鲜NK细胞或通过CD3耗尽富集的解冻的NK细胞的14天扩增。图2D描绘在通过如实施例2中所述的各种方法扩增后,g-NK细胞的总数。图2E描绘在通过如实施例2中所述的各种方法扩增之前和之后,g-NK细胞的百分比。值是平均值 $\pm$ 标准误差。 $\#p < 0.001$,对于CMV^{pos} CD3^{neg}/CD57^{pos} 14天扩增与其他扩增的

比较。 $*p<0.05$,对于CMV^{pos}扩增与CMV^{neg} CD3^{neg} 14天扩增的比较。 $\hat{p}<0.001$,对于扩增后值相比于扩增前值。

[0086] 图3描绘对于通过实施例2中所述涉及富集CD3^{neg}CD57^{pos} NK细胞的方法或通过替代性方法扩增的NK细胞,NK细胞针对221.AEH和K562细胞系的细胞毒性活性(5:1NK细胞与靶标的比率)($n=8$)。值是平均值 $\pm$ 标准误差。 $\#p<0.001$,对于CD3^{neg}/CD57^{pos}扩增与所述替代性方法的比较。

[0087] 图4A和图4B描绘与抗CD20抗体(利妥昔单抗)组合,g-NK细胞相比于常规NK细胞针对淋巴瘤细胞系RAJI的ADCC活性。图4A显示在具有高g-NK比例的供体相比于具有低g-NK比例的供体中($n=4$),通过始于富集的CD3^{neg}CD57^{pos}细胞的方法扩增的g-NK细胞的ADCC活性。图4B显示从新鲜的或先前冷冻的(并解冻的)NK细胞扩增的g-NK细胞、常规NK细胞(cNK)和NKG2C^{pos}(适应性)NK细胞的ADCC(1:1NK细胞与靶标的比率)活性,所述新鲜的或先前冷冻的(并解冻的)NK细胞是从相同供体($n=4$)富集的。值是平均值 $\pm$ 标准误差。 $*p<0.05$, $**p<0.01$,并且 $***p<0.001$,对于g-NK与cNK细胞的比较。

[0088] 图5A和图5B描绘g-NK细胞相比于常规(cNK)NK细胞的ADCC活性。图5A显示与抗HER2(曲妥珠单抗)组合,g-NK和cNK细胞针对乳腺癌细胞系SKBR3的ADCC活性。图5B显示与抗EGFR(西妥昔单抗)组合,g-NK和cNK细胞针对头颈癌细胞系CAL27的ADCC活性。值是平均值 $\pm$ SE。 $*p<0.05$ 并且 $***p<0.001$,对于g-NK与cNK细胞的比较。

[0089] 图6A-图6C描绘g-NK细胞相比于常规NK细胞(cNK)的ADCC活性。图6A显示与抗EGFR(西妥昔单抗)组合,g-NK和cNK细胞针对结直肠癌细胞系HT29的ADCC活性。图6B显示与抗EGFR(西妥昔单抗)组合,g-NK和cNK细胞针对结直肠癌细胞系SW480的ADCC活性。图6C显示与抗EGFR(西妥昔单抗)组合,g-NK和cNK细胞针对肺癌细胞系A549的ADCC活性。值是平均值 $\pm$ SE。 $*p<0.05$, $**p<0.01$,并且 $***p<0.001$,对于g-NK与cNK细胞的比较。 $*p<0.05$, $**p<0.01$,并且 $***p<0.001$,对于g-NK与cNK细胞的比较。

[0090] 图7A-图7C描绘在输注 1×10^7 个g-NK或cNK细胞之后,g-NK(新鲜的或冷冻的)和cNK(冷冻的)在NSG小鼠中的持久性。图7A显示在输注后第5天、第8天、第14天、第15天和第22天,在NSG小鼠的全血中存在的人NK细胞的数量。图7B显示在NK细胞输注后22天,在NSG小鼠的脾中存在的人NK细胞的数量。图7C显示在NK细胞输注后22天,在NSG小鼠的骨髓中存在的人NK细胞的数量。对于所有3组, $N=3$ 。值是平均值 $\pm$ SE。 $\#p<0.001$ 并且 $*p<0.05$,对于g-NK与cNK细胞的比较。

[0091] 图8A和图8B描绘在淋巴瘤的异种移植模型中,g-NK和利妥昔单抗对肿瘤负荷和存活率的作用。图8A显示相对于未治疗的小鼠或仅用利妥昔单抗治疗的小鼠,在NSG小鼠中,用g-NK和利妥昔单抗(利妥昔单抗+g-NK)治疗对Raji肿瘤负荷的作用,如通过生物发光(BLI)所测量。值是平均值 $\pm$ SE。图8B显示相对于未治疗的小鼠或仅用利妥昔单抗治疗的小鼠,在接种Raji的NSG小鼠中,用g-NK和利妥昔单抗(利妥昔单抗+g-NK)治疗对存活率的作用。对于所有组, $N=8$ 。 $*p<0.05$,对于g-NK+利妥昔单抗组与无治疗组的比较;以及 $\#p<0.05$,对于g-NK+利妥昔单抗组与仅利妥昔单抗组的比较。

[0092] 图9A和图9B描绘g-NK细胞相比于常规NK细胞(cNK)的ADCC活性。图9A显示与抗CD38(达雷木单抗;Dara)或抗SLAMF7(埃罗妥珠单抗;Elo)组合,新近分离的g-NK和cNK细胞针对多发性骨髓瘤细胞系MM.1S($n=16$)的ADCC活性。图9B显示与抗CD38(达雷木单抗;

Dara)或抗SLAMF7(埃罗妥珠单抗;Elo)组合,扩增的g-NK和cNK细胞针对多发性骨髓瘤细胞系MM.1S(n=5)的ADCC活性。值是平均值±SE。 $\#p<0.001$,对于g-NK与cNK细胞的比较。 $**p<0.01$ 并且 $***p<0.001$,对于g-NK与cNK细胞的比较。

[0093] 图10A和图10B描绘在多发性骨髓瘤的异种移植模型中,g-NK分别对达雷木单抗(Dara)和埃罗妥珠单抗(Elo)的体内功效的作用。图10A显示相对于未治疗的小鼠或用cNK和达雷木单抗(Dara+cNK)、仅Dara、媒介物或仅g-NK治疗的小鼠,在NSG小鼠中,用g-NK和达雷木单抗(Dara+g-NK)治疗对MM.1S肿瘤负荷(BLI)的作用。图10B显示相对于未治疗的小鼠或用cNK和埃罗妥珠单抗(Elo+cNK)、仅Elo、媒介物或仅g-NK治疗的小鼠,在NSG小鼠中,用g-NK和埃罗妥珠单抗(Elo+g-NK)治疗对MM.1S肿瘤负荷(BLI)的作用。对于所有组,N=6。值是平均值±SE。 $*p<0.05$ 并且 $***p<0.001$,对于g-NK+达雷木单抗或g-NK+埃罗妥珠单抗以及所有其他组。

[0094] 图11A和图11B描绘g-NK对用达雷木单抗(Dara)或埃罗妥珠单抗(Elo)治疗的接种MM.1S的NSG小鼠的存活率的作用。图11A显示相对于未治疗的小鼠或用cNK和达雷木单抗(Dara+cNK)、仅Dara、媒介物或仅g-NK治疗的小鼠,在接种MM.1S的NSG小鼠中,用g-NK和达雷木单抗(Dara+g-NK)治疗对存活率的作用。图11B显示相对于未治疗的小鼠或用cNK和埃罗妥珠单抗(Elo+cNK)、仅Elo、媒介物或仅g-NK治疗的小鼠,在接种MM.1S的NSG小鼠中,用g-NK和埃罗妥珠单抗(Elo+g-NK)治疗对存活率的作用。对于所有组,N=6。

[0095] 图12A-图12C描绘在多发性骨髓瘤的异种移植模型中,在与达雷木单抗(dara)或埃罗妥珠单抗(ele)组合时,g-NK和cNK的持久性以及向骨髓和脾的归巢。图12A显示在用达雷木单抗或埃罗妥珠单抗治疗的接种MM.1S的NSG小鼠的脾中,g-NK和cNK的数量。图12B显示在用达雷木单抗或埃罗妥珠单抗治疗的接种MM.1S的NSG小鼠的骨髓中,g-NK和cNK的数量。图12C显示在用达雷木单抗或埃罗妥珠单抗治疗的接种MM.1S的NSG小鼠的血液中,g-NK和cNK的数量。对于所有组,N=6。值是平均值±SE。 $\#p<0.001$,对于g-NK+达雷木单抗组与所有其他组的比较。 $*p<0.05$,对于与cNK+埃罗妥珠单抗组的比较。 $^{\wedge}p<0.001$,对于仅g-NK组与所有其他组的比较。

[0096] 图13A-图13D描绘在g-NK和cNK上,CD20(利妥昔单抗的靶标)、CD38(达雷木单抗的靶标)和SLAMF7(埃罗妥珠单抗的靶标)的表达。图13A显示表达CD20的扩增的g-NK细胞、未扩增的NK细胞($CD3^{neg}/CD56^{pos}$)和MM.1S细胞的百分比。图13B显示表达CD38的扩增的g-NK细胞、未扩增的NK细胞($CD3^{neg}/CD56^{pos}$)和MM.1S细胞的百分比。图13C显示表达SLAMF7的扩增的g-NK细胞、未扩增的NK细胞($CD3^{neg}/CD56^{pos}$)和MM.1S细胞的百分比。图13D显示在扩增之前和之后,表达CD38的cNK和g-NK的百分比。对于所有组,N=3。图13E描绘在扩增之前和之后,CD38^{pos} NK细胞的平均荧光强度(MFI)(n=4)。图13F提供代表性直方图,其描绘相对于cNK和MM.1S细胞,g-NK细胞的减少的CD38表达。值是平均值±SE。 $\#p<0.001$,对于g-NK细胞与所有其他细胞的比较。

[0097] 图14A-图14C描绘g-NK细胞相比于常规NK细胞(cNK)的ADCC活性。图14A显示与抗Her2(曲妥珠单抗;Tras)组合,新近分离的g-NK和cNK细胞针对卵巢癌细胞系SKOV3的ADCC活性(n=16)。图14B显示与抗Her2(曲妥珠单抗;Tras)组合,扩增的g-NK和cNK细胞针对卵巢癌细胞系SKOV3的ADCC活性(n=5)。图14C显示与抗EGFR(西妥昔单抗)组合,扩增的g-NK和cNK细胞针对卵巢癌细胞系SKOV3的ADCC活性(n=4)。值是平均值±SE。 $*p<0.05$ 并且 $***p$

<0.001 , 对于g-NK+曲妥珠单抗或g-NK+西妥昔单抗与所有其他组的比较。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, 并且 $***p<0.001$, 对于g-NK与cNK的比较。

[0098] 图15A-图15C描绘在卵巢癌的异种移植模型中,g-NK对曲妥珠单抗(Tras)的体内功效的作用。图15A显示相对于仅用曲妥珠单抗(仅Tras)治疗的小鼠,在NSG小鼠中,用g-NK和曲妥珠单抗(Tras+g-NK)治疗对SKOV3肿瘤负荷的作用。图15B显示相对于用cNK和曲妥珠单抗(Tras+cNK)治疗的小鼠,在接种SKOV3的NSG小鼠中,用g-NK和曲妥珠单抗(Tras+g-NK)治疗对存活率的作用。对于所有组, $N=10$ 。图15C显示相对于用cNK和曲妥珠单抗(Tras+cNK)、仅Tras或媒介物治疗的小鼠,在接种SKOV3的NSG小鼠中,用g-NK和曲妥珠单抗(Tras+g-NK)治疗对存活率的作用。

[0099] 图16A-图16C描绘在卵巢癌的异种移植模型中,在与曲妥珠单抗组合时,g-NK和cNK的持久性。图16A显示在用曲妥珠单抗治疗的接种SKOV3的NSG小鼠的血液中,g-NK和cNK的数量。图16B显示在用曲妥珠单抗治疗的接种SKOV3的NSG小鼠的脾中,g-NK和cNK的数量。图16C显示在用曲妥珠单抗治疗的接种SKOV3的NSG小鼠的骨髓中,g-NK和cNK的数量。对于所有组, $N=6$ 。值是平均值 $\pm$ SE。 $\#p<0.05$, 对于g-NK与cNK细胞的比较。

[0100] 图17A和图17B描绘g-NK细胞相比于常规NK细胞(cNK)的ADCC活性。图17A显示与抗CD38(达雷木单抗;Dara)组合,扩增的g-NK和cNK细胞针对多发性骨髓瘤细胞系ARH-77的ADCC活性($n=4$)。图17B显示与抗CD38(达雷木单抗;Dara)组合,扩增的g-NK和cNK细胞针对多发性骨髓瘤细胞系MM.1R的ADCC活性($n=4$)。值是平均值 $\pm$ SE。 $*p<0.05$ 并且 $***p<0.001$, 对于g-NK与cNK细胞的比较。

[0101] 图18A和图18B描绘g-NK细胞相比于常规NK细胞(cNK)的ADCC活性。图18A显示与抗EGFR(西妥昔单抗;Cet)组合,新近分离的g-NK和cNK细胞针对结直肠癌细胞系SW-480的ADCC活性($n=16$)。图18B显示与抗EGFR(西妥昔单抗)组合,扩增的g-NK和cNK细胞针对结直肠癌细胞系SW-480的ADCC活性($n=5$)。值是平均值 $\pm$ SE。 $\#p<0.05$, 对于g-NK与cNK细胞的比较。

[0102] 图19比较在cNK($n=4$)、g-NK($n=7$)与CD16⁺158V⁺g-NK细胞($n=5$)之间,针对SW-480(使用西妥昔单抗;Cet)、SKOV3(使用曲妥珠单抗、Tras或西妥昔单抗Cet)和MM.1S细胞(使用达雷木单抗、Dara或埃罗妥珠单抗Elo)的ADCC。值是平均值 $\pm$ SE。 $\#p<0.05$, 对于g-NK或158V⁺g-NK细胞与cNK细胞的比较。 $^{\wedge}p<0.05$, 对于158V⁺g-NK与g-NK细胞的比较。

[0103] 图20A-图20D描绘在CD16基因的g-NK细胞表达与针对多发性骨髓瘤和实体瘤细胞系的ADCC之间的关系。图20A显示在g-NK CD16表达与针对MM.1S细胞(使用达雷木单抗,Dara)的ADCC之间的正相关。图20B显示在g-NK CD16表达与针对MM.1S细胞(使用埃罗妥珠单抗,Elo)的ADCC之间的正相关。图20C显示在g-NK CD16表达与针对卵巢癌SKOV3(使用曲妥珠单抗,Tras)的ADCC之间的正相关。图20D显示在g-NK CD16表达与针对结直肠癌SW-480(使用西妥昔单抗,Cet)细胞系的ADCC之间的正相关。 $N=4$ g-NK细胞系。

[0104] 图21A和图21B描绘在六种多发性骨髓瘤(MM)细胞系(AM01、KMS11、KMS18、KMS34、LP1和MM.1S)中的CD38(图21A)和SLAMF(图21B)表达水平。

[0105] 图22A-图22E描绘g-NK细胞相比于常规NK细胞针对六种MM细胞系的细胞毒性活性。图22A显示与达雷木单抗组合,g-NK和常规NK细胞针对按CD38表达增加的顺序分选的MM细胞系的细胞毒性活性。图22B显示与埃罗妥珠单抗组合,g-NK和常规NK细胞针对按SLAMF7

表达增加的顺序分选的MM细胞系的细胞毒性活性。图22C显示在MM细胞系CD38表达与g-NK细胞中达雷木单抗介导的细胞毒性活性之间的关系。图22D显示在MM细胞系SLAMF7表达与g-NK细胞中埃罗妥珠单抗介导的细胞毒性活性之间的关系。图22E比较g-NK细胞中达雷木单抗介导的与埃罗妥珠单抗介导的细胞毒性活性。值是平均值 $\pm$ SE。 $\#p<0.001$,对于g-NK与cNK细胞的比较。 $\hat{p}<0.001$,对于g-NK+达雷木单抗或g-NK+埃罗妥珠单抗与仅g-NK的比较;并且 $\&p<0.05$,对于g-NK+达雷木单抗与g-NK+埃罗妥珠单抗的比较。

[0106] 图22F-图22G描绘在与达雷木单抗(图22F)或埃罗妥珠单抗(图22G)组合时,扩增的g-NK细胞相比于cNK细胞针对患者来源的骨髓瘤细胞的细胞毒性。图23A-图23E描绘g-NK细胞相比于常规NK细胞针对六种MM细胞系的脱颗粒水平(CD107a^{pos})。值是平均值 $\pm$ SE。 $\#p<0.01$,对于g-NK与cNK细胞的比较。 $\hat{p}<0.01$,对于g-NK+达雷木单抗或g-NK+埃罗妥珠单抗与仅g-NK的比较。 $\&p<0.05$,对于g-NK+达雷木单抗与g-NK+埃罗妥珠单抗的比较。图23A显示与达雷木单抗组合,g-NK和常规NK细胞针对按CD38表达增加的顺序分选的MM细胞系的脱颗粒水平。图23B显示与埃罗妥珠单抗组合,g-NK和常规NK细胞针对按SLAMF7表达增加的顺序分选的MM细胞系的脱颗粒水平。图23C显示在MM细胞系CD38表达与g-NK细胞中达雷木单抗介导的脱颗粒水平之间的关系。图23D显示在MM细胞系SLAMF7表达与g-NK细胞中埃罗妥珠单抗介导的脱颗粒水平之间的关系。图23E比较g-NK细胞中达雷木单抗介导的与埃罗妥珠单抗介导的脱颗粒水平。

[0107] 图23F和图23G描绘NKG2C^{pos}/NKG2A^{neg} g-NK细胞相比于NKG2C^{neg}/NKG2A^{pos} g-NK细胞的脱颗粒水平(CD107a^{pos})。值是平均值 $\pm$ SE。 $\#p<0.05$,对于NKG2C^{pos}/NKG2A^{neg} g-NK细胞与NKG2C^{neg}/NKG2A^{pos} g-NK细胞的比较。图23F显示与达雷木单抗组合的g-NK细胞针对按CD38表达增加的顺序分选的MM细胞系的脱颗粒水平。图23G显示与埃罗妥珠单抗组合的g-NK细胞针对按SLAMF7表达增加的顺序分选的MM细胞系的脱颗粒水平。

[0108] 图24A和图24B描绘g-NK细胞相比于常规NK细胞中穿孔蛋白和颗粒酶B的表达水平。值是平均值 $\pm$ SE。 $\#p<0.05$,对于g-NK与cNK细胞的比较。图24A显示作为NK细胞的百分比的穿孔蛋白和颗粒酶B表达。图24B显示总穿孔蛋白和颗粒酶B表达。

[0109] 图25A-图25E描绘g-NK细胞相比于常规NK细胞针对六种MM细胞系的干扰素- γ 表达水平。值是平均值 $\pm$ SE。 $\#p<0.05$,对于g-NK与cNK细胞的比较。 $\hat{p}<0.05$,对于g-NK+达雷木单抗或g-NK+埃罗妥珠单抗与仅g-NK的比较。 $\&p<0.05$,对于g-NK+达雷木单抗与g-NK+埃罗妥珠单抗的比较。图25A显示与达雷木单抗组合,g-NK和常规NK细胞针对按CD38表达增加的顺序分选的MM细胞系的干扰素- γ 表达水平。图25B显示与埃罗妥珠单抗组合,g-NK和常规NK细胞针对按SLAMF7表达增加的顺序分选的MM细胞系的干扰素- γ 表达水平。图25C显示在MM细胞系CD38表达与g-NK细胞中达雷木单抗介导的干扰素- γ 表达水平之间的关系。图25D显示在MM细胞系SLAMF7表达与g-NK细胞中埃罗妥珠单抗介导的干扰素- γ 表达水平之间的关系。图25E比较g-NK细胞中达雷木单抗介导的与埃罗妥珠单抗介导的干扰素- γ 表达水平。

[0110] 图25F提供对于6小时孵育后的g-NK和cNK细胞,在1 μ g/mL达雷木单抗(1:1E:T)的存在下,干扰素- γ 表达响应于LP1细胞系的代表性流式图。

[0111] 图25G和图25H描绘NKG2C^{pos}/NKG2A^{neg} g-NK细胞相比于NKG2C^{neg}/NKG2A^{pos} g-NK细胞的干扰素- γ 表达水平。值是平均值 $\pm$ SE。 $\#p<0.05$,对于NKG2C^{pos}/NKG2A^{neg} g-NK细胞与

NKG2C^{neg}/NKG2A^{pos} g-NK细胞的比较。图25G显示与达雷木单抗组合的g-NK细胞针对按CD38表达增加的顺序分选的MM细胞系的干扰素- γ 表达水平。图25H显示与埃罗妥珠单抗组合的g-NK细胞针对按SLAMF7表达增加的顺序分选的MM细胞系的干扰素- γ 表达水平。图26A-图26E描绘g-NK细胞相比于常规NK细胞针对六种MM细胞系的TNF- α 表达水平。值是平均值 $\pm$ SE。 $\#p<0.05$,对于g-NK与cNK细胞的比较。 $\hat{p}<0.05$,对于g-NK+达雷木单抗或g-NK+埃罗妥珠单抗与仅g-NK的比较。 $\&p<0.05$,对于g-NK+达雷木单抗与g-NK+埃罗妥珠单抗的比较。图26A显示与达雷木单抗组合,g-NK和常规NK细胞针对按CD38表达增加的顺序分选的MM细胞系的TNF- α 表达水平。图26B显示与埃罗妥珠单抗组合,g-NK和常规NK细胞针对按SLAMF7表达增加的顺序分选的MM细胞系的TNF- α 表达水平。图26C显示在MM细胞系CD38表达与g-NK细胞中达雷木单抗介导的TNF- α 表达水平之间的关系。图26D显示在MM细胞系SLAMF7表达与g-NK细胞中埃罗妥珠单抗介导的TNF- α 表达水平之间的关系。图26E比较g-NK细胞中达雷木单抗介导的与埃罗妥珠单抗介导的TNF- α 表达水平。

[0112] 图26F提供对于6小时孵育后的g-NK和cNK细胞,在存在或不存在1 μ g/mL达雷木单抗(1:1E:T)的情况下,TNF- α 表达响应于LP1的代表性流式图。

[0113] 图26G和图26H描绘NKG2C^{pos}/NKG2A^{neg} g-NK细胞相比于NKG2C^{neg}/NKG2A^{pos} g-NK细胞的TNF- α 表达水平。值是平均值 $\pm$ SE。 $\#p<0.05$,对于NKG2C^{pos}/NKG2A^{neg} g-NK细胞与NKG2C^{neg}/NKG2A^{pos} g-NK细胞的比较。图26G显示与达雷木单抗组合的g-NK细胞针对按CD38表达增加的顺序分选的MM细胞系的TNF- α 表达水平。图26H显示与埃罗妥珠单抗组合的g-NK细胞针对按SLAMF7表达增加的顺序分选的MM细胞系的TNF- α 表达水平。

[0114] 图27A和图27B描绘在NK细胞培养基中包括或不包括IL-21的情况下,在221.AEH或K562-mbIL15-41BBL饲养细胞的存在下扩增的g-NK细胞的扩增。图27A显示总NK细胞计数。图27B显示在21天扩增后的g-NK细胞计数。

[0115] 图28A和图28B描绘在NK细胞培养基中包括或不包括IL-21的情况下,在221.AEH或K562-mbIL15-41BBL饲养细胞的存在下扩增的g-NK细胞在扩增后21天的达雷木单抗介导的与埃罗妥珠单抗介导的细胞毒性活性。图28A显示g-NK细胞针对LP1细胞系的细胞毒性。图28B显示g-NK细胞针对MM.1S细胞系的细胞毒性。

[0116] 图29A-图29D描绘在NK细胞培养基中包括或不包括IL-21的情况下,在221.AEH或K562-mbIL15-41BBL饲养细胞的存在下扩增的g-NK细胞的达雷木单抗介导的与埃罗妥珠单抗介导的脱颗粒水平(CD107a^{pos})。图29A显示g-NK细胞在扩增后13天针对LP1细胞系的脱颗粒水平。图29B显示g-NK细胞在扩增后13天针对MM.1S细胞系的脱颗粒水平。图29C显示g-NK细胞在扩增后21天针对LP1细胞系的脱颗粒水平。图29D显示g-NK细胞在扩增后21天针对MM.1S细胞系的脱颗粒水平。

[0117] 图30A-图30D描绘在NK细胞培养基中包括或不包括IL-21的情况下,在221.AEH或K562-mbIL15-41BBL饲养细胞的存在下扩增的g-NK细胞中穿孔蛋白和颗粒酶B的表达水平。图30A显示在扩增后13天作为g-NK细胞的百分比的穿孔蛋白和颗粒酶B表达。图30B显示在扩增后13天的总穿孔蛋白和颗粒酶B表达。图30C显示在扩增后21天作为g-NK细胞的百分比的穿孔蛋白和颗粒酶B表达。图30D显示在扩增后21天的总穿孔蛋白和颗粒酶B表达。

[0118] 图31A-图31D描绘在NK细胞培养基中包括或不包括IL-21的情况下,在221.AEH或K562-mbIL15-41BBL饲养细胞的存在下扩增的g-NK细胞的达雷木单抗介导的与埃罗妥珠单

抗介导的干扰素- γ 表达水平。图31A显示g-NK细胞在扩增后13天针对LP1细胞系的干扰素- γ 表达水平。图31B显示g-NK细胞在扩增后13天针对MM.1S细胞系的干扰素- γ 表达水平。图31C显示g-NK细胞在扩增后21天针对LP1细胞系的干扰素- γ 表达水平。图31D显示g-NK细胞在扩增后21天针对MM.1S细胞系的干扰素- γ 表达水平。

[0119] 图32A-图32D描绘在NK细胞培养基中包括或不包括IL-21的情况下,在221.AEH或K562-mbIL15-41BBL饲养细胞的存在下扩增的g-NK细胞的达雷木单抗介导的与埃罗妥珠单抗介导的TNF- α 表达水平。图32A显示g-NK细胞在扩增后13天针对LP1细胞系的TNF- α 表达水平。图32B显示g-NK细胞在扩增后13天针对MM.1S细胞系的TNF- α 表达水平。图32C显示g-NK细胞在扩增后21天针对LP1细胞系的TNF- α 表达水平。图32D显示g-NK细胞在扩增后21天针对MM.1S细胞系的TNF- α 表达水平。

[0120] 图33描绘在多种细胞因子混合物和浓度的存在下扩增15天的NK细胞的g-NK细胞扩增。

[0121] 图34A-图34J显示在多种细胞因子混合物和浓度的存在下扩增的g-NK细胞的细胞效应子功能。

[0122] 图34A和图34B描绘在多种细胞因子混合物和浓度的存在下扩增的g-NK细胞的达雷木单抗介导的与埃罗妥珠单抗介导的细胞毒性活性。图34A显示g-NK细胞针对LP1细胞系的细胞毒性。图34B显示g-NK细胞针对MM.1S细胞系的细胞毒性。

[0123] 图34C和图34D描绘在多种细胞因子混合物和浓度的存在下扩增的g-NK细胞的达雷木单抗介导的与埃罗妥珠单抗介导的脱颗粒水平(CD107a^{pos})。图34C显示g-NK细胞针对LP1细胞系的脱颗粒水平。图34D显示g-NK细胞针对MM.1S细胞系的脱颗粒水平。

[0124] 图34E和图34F描绘在多种细胞因子混合物和浓度的存在下扩增的g-NK细胞中穿孔蛋白和颗粒酶B的表达水平。图34E显示作为g-NK细胞的百分比的穿孔蛋白和颗粒酶B表达。图34F显示总穿孔蛋白和颗粒酶B表达。

[0125] 图34G和图34H描绘在多种细胞因子混合物和浓度的存在下扩增的g-NK细胞的达雷木单抗介导的与埃罗妥珠单抗介导的干扰素- γ 表达水平。图34G显示g-NK细胞针对LP1细胞系的干扰素- γ 表达水平。图34H显示g-NK细胞针对MM.1S细胞系的干扰素- γ 表达水平。

[0126] 图34I和图34J描绘在多种细胞因子混合物和浓度的存在下扩增的g-NK细胞的达雷木单抗介导的与埃罗妥珠单抗介导的TNF- α 表达水平。图34I显示g-NK细胞针对LP1细胞系的TNF- α 表达水平。图34J显示g-NK细胞针对MM.1S细胞系的TNF- α 表达水平。

[0127] 图35A-图35L显示与在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞相比,在IL-21的存在下扩增14天的g-NK细胞的扩增和细胞效应子功能(n=6)。

[0128] 图35A和图35B描绘与在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞相比,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞的扩增。图35A显示在扩增之前和之后的g-NK细胞百分比。图35B显示每1000万个NK细胞扩增的g-NK细胞的数量。值是平均值 $\pm$ SE。#p<0.001,对于CD3^{neg}/CD57^{pos}+IL-21扩增与在没有IL-21的情况下的CD3^{neg}/CD57^{pos}扩增的比较。^p<0.05,对于CD3^{neg}/CD57^{pos}扩增与其他CMV^{pos}扩增的比较。*p<0.001,对于CMV^{pos}扩增与CMV^{neg} CD3^{neg}扩增的比较。

[0129] 图35C描绘在扩增之前和之后的g-NK比例(来自CMV+(n=8)和CMV-供体(n=6)的

总NK细胞的%)的比较。图35D描绘来自CMV+和CMV-供体的g-NK的n倍扩增率。图35E提供对于CMV+供体, FcεR1 γ 与CD56的代表性流式图。图35F提供对于CMV+和CMV-供体, CD3-/CD56+ NK细胞上的FcεR1 γ 表达的代表性直方图。使用独立样品t检验来确定在扩增之前和之后CMV+与CMV-供体之间的差异(图35C和图35D)。值是平均值±SE。*p<0.05, **p<0.01, 并且***p<0.001。

[0130] 图35G和图35H描绘与在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞相比, 在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞在扩增后14天的达雷木单抗介导的与埃罗妥珠单抗介导的细胞毒性活性。图35G显示g-NK细胞针对LP1细胞系的细胞毒性。图35H显示g-NK细胞针对MM.1S细胞系的细胞毒性。值是平均值±SE。*p<0.05, **p<0.01, 并且***p<0.001, 对于CD3^{neg}/CD57^{pos}+IL-21扩增与在没有IL-21的情况下的CD3^{neg}/CD57^{pos}扩增的比较。

[0131] 图35I和图35J描绘与在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞相比, 在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞的达雷木单抗介导的与埃罗妥珠单抗介导的脱颗粒水平(CD107a^{pos})。图35I显示g-NK细胞在扩增后14天针对LP1细胞系的脱颗粒水平。图35J显示g-NK细胞在扩增后14天针对MM.1S细胞系的脱颗粒水平。值是平均值±SE。*p<0.05, **p<0.01, 并且***p<0.001, 对于CD3^{neg}/CD57^{pos}+IL-21扩增与在没有IL-21的情况下的CD3^{neg}/CD57^{pos}扩增的比较。

[0132] 图35K和图35L描绘与在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞相比, 在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞中穿孔蛋白和颗粒酶B的表达水平。图35K显示在扩增后14天作为NK细胞的百分比的穿孔蛋白和颗粒酶B表达。图35L显示在扩增后14天的总穿孔蛋白和颗粒酶B表达。值是平均值±SE。*p<0.05, **p<0.01, 并且***p<0.001, 对于CD3^{neg}/CD57^{pos}+IL-21扩增与在没有IL-21的情况下的CD3^{neg}/CD57^{pos}扩增的比较。

[0133] 图35M描绘与cNK细胞相比, 在扩增的g-NK细胞中, 穿孔蛋白(左图)和颗粒酶B(右图)的基线表达(n=5)。为了比较在g-NK与cNK之间的效应子穿孔蛋白和颗粒酶B表达, 使用独立样品t检验。值是平均值±SE。与cNK细胞的统计学上显著的差异指示为***p<0.001。

[0134] 图35N描绘g-NK和cNK细胞穿孔蛋白和颗粒酶B表达的代表性直方图。

[0135] 图35O和图35P描绘与在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞相比, 在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞的达雷木单抗介导的与埃罗妥珠单抗介导的干扰素-γ表达水平。图35O显示g-NK细胞在扩增后14天针对LP1细胞系的干扰素-γ表达水平。图35P显示g-NK细胞在扩增后14天针对MM.1S细胞系的干扰素-γ表达水平。值是平均值±SE。*p<0.05, **p<0.01, 并且***p<0.001, 对于CD3^{neg}/CD57^{pos}+IL-21扩增与在没有IL-21的情况下的CD3^{neg}/CD57^{pos}扩增的比较。

[0136] 图35Q和图35R描绘与在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞相比, 在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞的达雷木单抗介导的与埃罗妥珠单抗介导的TNF-α表达水平。图35Q显示g-NK细胞在扩增后14天针对LP1细胞系的TNF-α表达水平。图35R显示g-NK细胞在扩增后14天针对MM.1S细胞系的TNF-α表达水平。值是平均值±SE。*p<0.05, **p<0.01, 并且***p<0.001, 对于CD3^{neg}/CD57^{pos}+IL-21扩增与在没有IL-21的情况下的CD3^{neg}/CD57^{pos}扩增的比较。

[0137] 图35S描绘在不同供体中, 扩增的g-NK细胞相比于cNK细胞针对MM.1S细胞系的达雷木单抗介导的与埃罗妥珠单抗介导的干扰素-γ表达水平。图35T描绘在不同供体中, 扩

增的g-NK细胞相比于cNK细胞针对MM.1S细胞系的达雷木单抗介导的与埃罗妥珠单抗介导的TNF- α 表达水平。

[0138] 图36描绘在IL-21/抗IL-21复合物的存在下扩增的g-NK的扩增($n=4$)。值是平均值 $\pm$ SE。 $\#p<0.001$,对于使用IL-21的扩增与使用IL-21/抗IL-21复合物的扩增的比较。

[0139] 图37A-图37H显示与新近富集的g-NK细胞的NK细胞效应子功能相比,先前低温保存的g-NK细胞的NK细胞效应子功能($n=4$)。值是平均值 $\pm$ SE。 $\#p<0.05$,对于新近富集的g-NK细胞与先前低温保存的g-NK细胞的比较。

[0140] 图37A和图37B描绘先前低温保存的g-NK细胞相比于新近富集的g-NK细胞的达雷木单抗介导的与埃罗妥珠单抗介导的脱颗粒水平(CD107a^{pos})。图37A显示g-NK细胞针对LP1细胞系的脱颗粒水平。图37B显示g-NK细胞针对MM.1S细胞系的脱颗粒水平。

[0141] 图37C和图37D描绘先前低温保存的g-NK细胞相比于新近富集的g-NK细胞中穿孔蛋白和颗粒酶B的表达水平。图37C显示g-NK细胞的总穿孔蛋白表达。图37D显示g-NK细胞的总颗粒酶B表达。

[0142] 图37E和图37F描绘先前低温保存的g-NK细胞相比于新近富集的g-NK细胞的达雷木单抗介导的与埃罗妥珠单抗介导的干扰素- γ 表达水平。图37E显示g-NK细胞针对LP1细胞系的干扰素- γ 表达水平。图37F显示g-NK细胞针对MM.1S细胞系的干扰素- γ 表达水平。

[0143] 图37G和图37H描绘先前低温保存的g-NK细胞相比于新近富集的g-NK细胞的达雷木单抗介导的与埃罗妥珠单抗介导的TNF- α 表达水平。图37G显示g-NK细胞针对LP1细胞系的TNF- α 表达水平。图37H显示g-NK细胞针对MM.1S细胞系的TNF- α 表达水平。

[0144] 图38A-图38C描绘在输注单一剂量的 1×10^7 个扩增的细胞之后,cNK(低温保存的)和g-NK(低温保存的或新鲜的)细胞在NSG小鼠中的持久性。图38A显示在输注后第6天、第16天、第26天和第31天收集的外周血中,cNK和g-NK细胞的数量。图38B显示在输注后第31天(即处死的时间),脾中存在的NK细胞的数量。图38C显示在处死的时间,骨髓中存在的NK细胞的数量。对于所有3组, $N=3$ 。值是平均值 $\pm$ SE。 $*p<0.05$ 并且 $***p<0.001$,对于低温保存的cNK细胞与新鲜的或低温保存的g-NK细胞的比较。

[0145] 图39描绘扩增的g-NK与cNK细胞的达雷木单抗诱导的自相残杀(fratricide)的比较。

[0146] 图40A-图40F显示在多发性骨髓瘤的小鼠模型中,用cNK和达雷木单抗(cNK+Dara)或g-NK和达雷木单抗(g-NK+Dara)治疗对肿瘤负荷和存活率的作用。将 5×10^5 个萤光素酶标记的MM.1S人骨髓瘤细胞静脉内(I.V.)注射至雌性NSG小鼠的尾静脉中。在五周的持续时间内,每周向NSG小鼠I.V.施用扩增的NK细胞(6.0×10^6 个细胞/小鼠)并I.P.注射达雷木单抗($10 \mu\text{g}$ /小鼠)。图40A显示在肿瘤接种后第20天、第27天、第37天、第41天、第48天和第57天,每周两次对小鼠进行的BLI成像(左侧)。在图的右侧显示治疗后的对应天数。颜色指示BLI的强度(蓝色,最低;红色,最高)。图40B显示相对于对照和cNK+Dara组,在g-NK+Dara组中随时间变化的肿瘤BLI(光子/秒)。 $*p<0.05$,对于g-NK与对照或cNK组的比较。图40C显示随时间变化的存活率百分比,并且箭头指示使用cNK+Dara或g-NK+Dara的疗法的施用。图40D呈现在对照、cNK+Dara和g-NK+Dara组中,小鼠的体重随时间的变化。图40E描绘在处死cNK+Dara治疗的小鼠和g-NK+Dara治疗的小鼠的时间,骨髓中存在的CD138⁺肿瘤细胞的数量。 $***p<0.001$,对于g-NK与cNK细胞的比较。值是平均值 $\pm$ SE。图40F显示在对照组中以及

在用cNK+Dara或g-NK+Dara治疗的小鼠中,使用设门策略解析NK细胞和肿瘤细胞的存在性的代表性流式图。对于对照组,N=8,并且对于g-NK或cNK组,N=7。图40G呈现在整个研究期间针对所有对照、cNK+Dara和g-NK+Dara治疗的小鼠收集的所有BLI图像。颜色指示BLI的强度(蓝色,最低;红色,最高)。图40H描绘在处死前针对对照、cNK+Dara和g-NK+Dara组中的所有小鼠获得的X射线图像。箭头指示骨折和变形。在每只小鼠下指示处死天数。

[0147] 图41A-图41C呈现在用cNK+Dara或g-NK+Dara治疗后,NSG小鼠中的持久性NK细胞的比较数据。所有数据呈现在处死时使用流式细胞术检测的细胞的量。图41A显示血液中cNK和g-NK细胞的数量。图41B显示脾中存在的NK细胞的数量。图41C显示骨髓中存在的NK细胞的数量。值是平均值 $\pm$ SE。*** $p < 0.001$,对于g-NK与cNK细胞的比较。

具体实施方式

[0148] 本文提供用于NK细胞的离体扩增的方法,所述NK细胞包括自然杀伤(NK)细胞的特化子集,其缺少或缺乏Fc ϵ RI γ (FcR γ) 链(称为g-NK细胞)。在本公开文本中提及g-NK细胞时包括缺乏FcR γ 链的NK细胞或具有这样的细胞的替代表面标记物谱的细胞。在一些实施方案中,g-NK细胞是缺乏FcR γ 链的NK细胞。在一些实施方案中,可以基于如本文所述的某些替代标记物的表面表达来鉴定g-NK细胞。

[0149] 自然杀伤(NK)细胞是对于通过细胞因子和趋化因子分泌以及通过释放细胞毒性颗粒介导抗病毒和抗癌免疫力重要的先天淋巴细胞(Vivier等人Science331(6013):44-49(2011);Caligiuri,Blood 112(3):461-469(2008);Roda等人,Cancer Res.66(1):517-526(2006))。NK细胞是效应细胞,其包括第三大淋巴细胞群体并且对于针对肿瘤和病原体感染的细胞的宿主免疫监视是重要的。然而,与T和B淋巴细胞不同,NK细胞使用种系编码的激活受体并且被认为仅具有有限的靶标识别能力(Bottino等人,Curr Top Microbiol Immunol.298:175-182(2006);Stewart等人,Curr Top Microbiol Immunol.298:1-21(2006))。

[0150] NK细胞的激活可以通过NK细胞受体与靶细胞上的配体的直接结合来进行,如根据直接肿瘤细胞杀伤可见,或者通过Fc受体(CD16;也称为CD16a或Fc γ RIIIa)的交联通过结合至与带有抗原的细胞结合的抗体Fc部分来进行。在激活后,NK细胞大量产生细胞因子和趋化因子,同时展现强效溶细胞活性。NK细胞能够通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)来杀伤肿瘤细胞。在一些情形中,在NK细胞表面上的受体(如CD16)识别与细胞表面结合的IgG1或IgG3抗体时,触发ADCC。这触发含有穿孔蛋白和颗粒酶的胞质颗粒的释放,从而导致靶细胞死亡。因为NK细胞表达识别IgG包被的靶细胞的激活Fc受体CD16,靶标识别被加宽(Ravetch和Bolland,Annu Rev Immunol.19:275-290(2001);Lanier Nat.Immunol.9(5):495-502(2008);Bryceson和Long,Curr Opin Immunol.20(3):344-352(2008))。ADCC和抗体依赖性细胞因子/趋化因子产生主要由NK细胞介导。

[0151] CD16还以糖基磷脂酰肌醇锚定的形式(也称为Fc γ RIIIB或CD16B)存在。应理解,本文中提及CD16是关于在NK细胞上表达并且参与抗体依赖性反应(如NK细胞介导的ADCC)的CD16a形式,并且其不意欲指代糖基磷脂酰肌醇锚定的形式。

[0152] CD16受体能够与衔接子(即TCR-CD3复合物的 ζ 链(CD3 ζ)和/或FcR γ 链)缔合,以转导经由免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM)的信号。在一些方面,CD16接合(CD16交联)经由细

胞内信号启动NK细胞应答,所述信号是通过CD16缔合的衔接子链FcR γ 或CD3 ζ 中的一种或两种生成的。CD16的触发导致 γ 或 ζ 链的磷酸化,继而募集酪氨酸激酶syk和ZAP-70,从而启动信号转导级联,导致快速且强效的效应子功能。最熟知的效应子功能是释放携带毒性蛋白的胞质颗粒,以通过抗体依赖性细胞毒性过程杀伤附近的靶细胞。CD16交联还导致产生细胞因子和趋化因子,它们继而激活并协调一系列免疫应答。

[0153] 细胞因子和趋化因子的该释放可以在NK细胞的体内抗癌活性中发挥作用。NK细胞还在其胞质中具有含有穿孔蛋白和蛋白酶(颗粒酶)的小颗粒。在从NK细胞释放后,穿孔蛋白在所靶向细胞的细胞膜中形成孔,颗粒酶和相关分子可以穿过所述孔而进入,从而诱导细胞凋亡。NK细胞诱导靶细胞的细胞凋亡而非坏死的事实是重要的,因为病毒感染的细胞的坏死会释放病毒粒子,而细胞凋亡导致对细胞内病毒的破坏。

[0154] 缺少FcR γ 衔接子蛋白的NK细胞(也称为g-NK细胞)的特化子集能够介导稳健的ADCC反应(参见例如,公开的专利申请号US2013/0295044)。反应增加的机制可能是由于表观遗传修饰的变化所致,其影响FcR γ 的表达。g-NK细胞大量表达信号传导衔接子 ζ 链,但是缺乏信号传导衔接子 γ 链的表达。与常规NK细胞相比,这些 γ 缺陷性g-NK细胞在被抗体激活时展现显著增强的活性。例如,g-NK细胞可以通过抗体介导的CD16交联或者由抗体包被的肿瘤细胞激活。在一些方面,与表达所述 γ 链的常规NK细胞相比,g-NK细胞产生更大量的细胞因子(例如IFN- γ 或TNF- α)和趋化因子(例如MIP-1 α 、MIP-1 β 和RANTES)和/或展示更高的脱颗粒反应。g-NK细胞提供颗粒酶B(自然杀伤细胞的细胞毒性机构的组分)的高表达。此外,g-NK细胞具有与常规NK细胞相比延长的寿命,并且其存在被长时间维持。在一些实施方案中,g-NK细胞在功能上和表型上是稳定的。

[0155] 在一些实施方案中,g-NK细胞在引发ADCC反应方面比常规NK细胞(例如不缺乏 γ 链的NK细胞)更有效。在一些实施方案中,g-NK细胞在引发细胞介导的细胞毒性方面比常规NK细胞更有效,即使在不存在抗体的情况下。在一些情形中,ADCC是治疗性抗体(包括抗癌抗体)的作用机制。在一些方面,通过施用NK细胞进行的细胞疗法可以与用于治疗目的和相关目的的抗体配合使用。

[0156] 例如,某些治疗性单克隆抗体(如靶向CD38的达雷木单抗和靶向SLAMF7的埃罗妥珠单抗)被FDA批准用于治疗疾病,如多发性骨髓瘤(MM)。尽管治疗性抗体的临床反应是有前景的,但它们通常是不理想的。例如,尽管初始临床反应通常是鼓舞人心的,特别是对于达雷木单抗,但基本上所有患者最终都会发生病情进展。因此,非常需要新的策略来驱使更深程度的缓解或克服对这些药剂的抗性。包括组合物在内的所提供的实施方案解决了这些需求。

[0157] 本文提供涉及含有g-NK细胞的组合物(例如如通过所提供的方法产生的)与抗体(例如抗癌抗体)的组合施用的方法。在一些实施方案中,抗体引导的对g-NK细胞的靶向导致患者的结局有所改进,这是由于改进了g-NK细胞子集的亲和力、细胞毒性和/或细胞因子介导的效应功能所致。

[0158] 在一些实施方案中,作为治疗药的单克隆抗体的潜在作用机制是通过由于补体依赖性细胞毒性、抗体依赖性细胞吞噬作用和/或抗体依赖性细胞毒性所致的抗肿瘤作用。在一些情形中,考虑由NK细胞介导的ADCC可以强效地消除抗体结合的肿瘤细胞,特别是在多发性骨髓瘤(MM)肿瘤的情形中。

[0159] 在抗体Fc部分结合其Fc受体(Fc γ RIIIa或CD16a)并经由涉及衔接子蛋白CD3 ζ 和Fc ϵ R1 γ 的过程触发激活和脱颗粒时,NK细胞被激活。增强对抗体(包括MM抗体)的临床ADCC反应的努力具有挑战性,因为NK细胞还表达CD38和SLAMF7(例如,分别为达雷木单抗和埃罗妥珠单抗的靶标)。高CD38表达特别地在达雷木单抗治疗过程的早期导致NK细胞的快速耗尽,从而在很大程度上消除可能潜在地驱使甚至更完全的肿瘤根除的先天免疫细胞的该来源。

[0160] 所提供的g-NK细胞和含有它的组合物(如通过所提供的方法产生的)展现克服这些问题的多种特征。g-NK细胞是相对罕见的子集,因为g-NK细胞仅在25-30%的CMV血清阳性个体中,仅在约3-10%水平的总NK细胞中是可检测的。所提供的方法涉及在扩增和富集g-NK细胞的能力方面特别稳健,从而允许体内应用所需的足够扩增的方法。

[0161] 在一些实施方案中,与确实表达FcR γ 的自然杀伤细胞相比,g⁻NK细胞产生显著更大量的细胞因子。在另一个实施方案中,所述细胞因子是干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)或其组合。在一个实施方案中,g⁻NK细胞产生显著更大量的趋化因子。在一个实施方案中,所述趋化因子是MIP-1 α 、MIP-1 β 或其组合。在另一个实施方案中,g⁻NK细胞在经由Fc受体CD16刺激后产生细胞因子或趋化因子。

[0162] g-NK细胞代表外周血中相对较小百分比的NK细胞,从而限制在治疗方法中使用这些细胞的能力。特定地,为了在临床学中利用g-NK细胞,高优先扩增率是必需的,因为g-NK细胞通常是罕见群体。用于扩增NK细胞的其他方法能够实现千倍的14天NK细胞扩增率,但是它们产生低分化、NKG2C^{neg}、Fc ϵ RI γ ^{pos}(FcR γ ^{pos})NK细胞(Fujisaki等人(2009)Cancer Res.,69:4010-4017;Shah等人(2013)PLoS One,8:e76781)。此外,本文中发现,针对扩增在表型上与g-NK细胞重叠的NK细胞优化的扩增并不优先扩增g-NK细胞至将支持治疗性用途的量。特定地,先前已经报道,展现与g-NK细胞的表型重叠的NKG2C^{pos} NK细胞可以使用HLA-E转染的221.AEH细胞以及在培养基中包括IL-15来优先扩增(Bigley等人(2016)Clin.Exp.Immunol.,185:239-251)。与组成型表达HLA-E的这样的表达HLA的细胞一起培养在NKG2C^{pos}/NKG2A^{neg}表型的方向上推动NK细胞(NKG2C是HLA-E的激活受体,而NKG2A是HLA-E的抑制性受体)。人们认为,因为这样的细胞包括g-NK在内,所以这样的方法将足以扩增g-NK细胞。然而,如本文实施例中所示,该方法没有实现g-NK细胞的稳健扩增。

[0163] 所提供的方法克服这些限制。与先前方法相比,所提供的方法利用更大比率的缺乏HLA I类和HLA II类的HLA-E+饲养细胞(例如221.AEH细胞)与NK细胞。特定地,先前方法使用更低比率的221.AEH细胞,如10:1比率的NK细胞与221.AEH比率。本文中发现,更大比率的表达HLA-E的饲养细胞(如221.AEH细胞)导致总体扩增更大且更偏向g-NK表型。在一些实施方案中,更大比率的HLA-E+饲养细胞(例如221.AEH细胞)通过辐照饲养细胞是可能的。在一些方面,辐照的饲养细胞系的使用也是有利的,因为其提供GMP兼容的方法。还发现在扩增期间包括重组IL-2、IL-7、IL-15、IL-12、IL-18、IL-21、IL-27或其组合中的任一种支持稳健扩增。在所提供的方法的特定实施方案中,至少一种重组细胞因子是IL-2。在一些实施方案中,存在两种或更多种重组细胞因子,其中至少一种重组细胞因子是IL-2并且至少一种重组细胞因子是IL-21。

[0164] 本文提供的方法是基于如下发现:在IL-21的存在下培养NK细胞用于扩增使NK细胞超负荷产生细胞因子或效应分子,如穿孔蛋白和颗粒酶B。含有通过本文扩增方法产生的

NK细胞的组合物具有高功能性,展现稳健的增殖,并且即使在没有挽救的情况下被低温冷冻后也作用良好。例如,当在IL-21的存在下扩增时,通过所提供的方法产生的NK细胞不仅展现强ADCC活性,它们还展现非抗体依赖性细胞毒性活性。例如,效应分子(例如穿孔蛋白和颗粒酶)自发存在于通过所提供的方法扩增的NK细胞中,从而提供展现高细胞毒性潜力的细胞。如本文所示,与通过仅包括IL-2但不添加IL-21的方法产生的NK细胞组合物相比,通过包括IL-21(例如IL-2、IL-15和IL-21)的所提供方法产生的NK细胞组合物不仅展现更高百分比的对穿孔蛋白或颗粒酶B呈阳性的NK细胞,其还展现细胞中更高平均水平或程度的所述分子的表达。此外,通过包括IL-21(例如IL-2、IL-15和IL-12)的本文所提供方法产生的NK细胞组合物还产生如下g-NK细胞组合物,在与针对靶抗原(例如CD38)的抗体(例如达雷木单抗)组合时,所述g-NK细胞组合物响应于靶细胞展现实质性效应子活性(包括脱颗粒和表达更多IFN- γ 和TNF- α 的能力)。这种功能活性即使在扩增的NK细胞的低温保存和解冻后也高度保存。溶细胞酶的显著增加以及更稳健的激活表型支持扩增的g-NK细胞在经由CD16交联与抗体接合时增强的诱导肿瘤靶标的细胞凋亡的能力。显著非抗体依赖性效应表型也支持g-NK细胞作为单一疗法的潜在实用性。

[0165] 此外,本文中的发现还证实在IL-21的存在下扩增的所提供NK细胞在延长时间段中持续存在且良好增殖的潜力,其大于例如在仅存在IL-2而不添加IL-21的情况下扩增的细胞。此外,结果显示,低温保存的g-NK细胞以与新鲜g-NK细胞相当的水平持续存在。这种显著改进的持久性强调新鲜的或低温保存的g-NK作为现成的细胞疗法增强抗体介导的ADCC的潜在实用性。此改进的持久性的发现是有利的,因为许多NK细胞疗法的临床实用性受到有限的NK细胞持久性的妨碍。

[0166] 此外,本文结果证实如下惊人发现:g-NK细胞表达低水平的CD38,CD38是治疗性抗体如达雷木单抗的靶标。针对某些靶抗原(如CD38)的许多现有NK细胞疗法的问题在于,NK细胞可能表达所述靶抗原,从而导致“自相残杀”,ADCC活性借此导致除肿瘤外还消除NK细胞。事实上,据报道,其他报道的NK细胞组合物表达高百分比(例如>90%)的CD38高NK细胞。相比之下,本文的发现证实,与在常规NK细胞或MM靶细胞系上相比,在供体分离的g-NK细胞上以及在从其扩增的g-NK细胞上,CD38pos细胞的百分比显著更低。较低CD38表达导致g-NK细胞相对于常规NK细胞显著减少的抗CD38(例如达雷木单抗)介导的自相残杀。这些结果支持所提供的g-NK细胞组合物在MM中赋予增强的抗体抗肿瘤活性而不经历与自相残杀相关的耗尽的实用性。结果还表明,g-NK细胞组合物对于达雷木单抗难治性患者可能是最佳的,因为扩增的g-NK细胞抵抗达雷木单抗诱导的自相残杀并增强针对即使不清楚地表达CD38的骨髓瘤细胞的达雷木单抗特异性细胞毒性。

[0167] 此外,可以实现如g-NK细胞所显示的上文活性而无需进一步工程化细胞以增强抗体功效。例如,已经产生CD38敲除的NK细胞系以避免达雷木单抗自相残杀,并且已经开发出具有不可切割的CD16的NK细胞系以增强抗肿瘤ADCC。然而,用于临床应用的潜在缺点包括需要永生化细胞系的基因工程化和辐照。

[0168] 在评价g-NK细胞的体内活性的研究中进一步证实所提供的g-NK细胞组合物(包括通过所提供的方法产生的那些)的优越性。MM的示例性小鼠模型中的活性显示,与抗体(例如达雷木单抗)组合的g-NK细胞在大多数小鼠中消除骨髓瘤肿瘤负荷,且具有持续且显著的肿瘤消退。这些结果强调g-NK细胞用于增强体内抗体作用和支持此NK细胞疗法的治疗潜

力的优越性,特别是与呈FcεR1 γ +的常规NK细胞相比。NK细胞在此模型中的高持久性和提高的存活率及其对自相残杀的抗性可以支持g-NK细胞的优越抗肿瘤作用和持久性。

[0169] 还发现,与最初仅基于CD3耗尽来富集NK细胞的方法相比,在扩增方法之前从细胞样品富集NK细胞(如在扩增之前富集CD16或CD57细胞)进一步显著增加可以实现的g-NK细胞扩增的量。在另一个实施方案中,可以在扩增之前进行的另一富集是通过针对CD56的阳性选择和针对CD38的阴性选择或耗尽来富集NK细胞。在另一实施方案中,可以在扩增之前进行的另一富集是通过针对CD56的阳性选择和之后针对NKG2A^{neg}的阴性选择或耗尽以及针对CD161^{neg}的阴性选择或耗尽来富集NK细胞。在另一个实施方案中,可以在扩增之前进行的另一富集是通过针对CD57的阳性选择和之后针对NKG2A的阴性选择或耗尽和/或针对NKG2C的阳性选择来富集NK细胞。在另一个实施方案中,可以在扩增之前进行的另一富集是通过针对CD56的阳性选择和之后针对NKG2A的阴性选择或耗尽和/或针对NKG2C的阳性选择来富集NK细胞。在任何这样的实施方案中,富集NKG2C^{pos}和/或NKG2A^{neg} NK细胞可以在扩增之后进行。

[0170] 在任何这样的实施方案中,富集的NK细胞可以是来自含有NK细胞的细胞样品富集,如从外周血单个核细胞(PBMC)富集。在一些实施方案中,在从细胞样品富集NK细胞之前,可以通过针对CD3的阴性选择或耗尽来去除T细胞。在任何这样的实施方案中,富集的NK细胞可以是来自人受试者的含有NK细胞(例如PBMC)且具有相对高比例g-NK细胞的生物样品富集,例如从针对在NK细胞中具有高百分比g-NK细胞选择的人受试者富集。在任何这样的实施方案中,富集的NK细胞可以是来自人受试者的含有NK细胞(例如PBMC)的生物样品富集,其中所述样品含有相对高比例的NKG2C^{pos} NK细胞(例如为或约或大于20% NKG2C^{pos} NK细胞)和/或NKG2A^{neg} NK细胞(例如为或约或大于70% NKG2A^{neg} NK细胞)。在任何这样的实施方案中,富集的NK细胞可以是来自人受试者的含有NK细胞(例如PBMC)的生物样品富集,其中所述样品含有相对高比例的NKG2C^{pos} NK细胞(例如为或约或大于20% NKG2C^{pos} NK细胞)和NKG2A^{neg} NK细胞(例如为或约或大于70% NKG2A^{neg} NK细胞)。

[0171] 总之,用于扩增g-NK细胞的所提供方法可以实现从在培养开始时的初始1000万个富集的NK细胞,超过10亿个细胞、并且在一些情形中多达80亿或更多的NK细胞扩增。特定地,所提供的方法可以导致高产率(>1000倍)扩增率以及在扩增后维持的或(在一些情形中)增加的g-NK细胞功能性。在一些实施方案中,所提供的方法可以产生表达高水平的穿孔蛋白和颗粒酶B的g-NK细胞群体。此外,发现所提供的方法足以扩增先前冷冻的NK细胞,这一般无法通过涉及挽救解冻的NK细胞的许多现有方法来实现。在一些实施方案中,这是通过增加扩增方案的持续时间来实现。在一些实施方案中,这是通过减小HLA-E+饲养细胞与NK细胞的比率(例如减小至约1:1的221.AEH与NK细胞)来实现。在一些实施方案中,这是通过在扩增期间包括重组IL-2、IL-7、IL-15、IL-12、IL-18、IL-21、IL-27或其组合中的任一种来实现。在特定实施方案中,至少一种重组细胞因子是IL-2。在一些实施方案中,在两种或更多种重组细胞因子的存在下进行扩增,其中至少一种重组细胞因子是重组IL-21并且至少一种是重组IL-2。如本文所示,所提供的方法产生展现强效抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)以及非抗体依赖性细胞介导的细胞毒性的g-NK细胞,从而支持这样的细胞用于治疗性应用的实用性。

[0172] 如本文所示,所提供的g-NK细胞和含有其的组合物(如通过所提供方法产生的)可

以用于癌症疗法。在一些方面,所提供的研究证实,在与针对肿瘤抗原靶标抗体(例如抗骨髓瘤)组合时,g-NK细胞具有显著增强的ADCC/效应子功能,并且在与治疗性抗体(例如达雷木单抗)组合时,扩增的g-NK细胞的过继转移消除体内的肿瘤负荷。重要的是,同种异体的NK细胞的过继转移不导致严重的移植物抗宿主病(GVHD),并且因此这样的细胞疗法(包括与抗体组合作为抗体引导的NK细胞疗法)可以以“现成的”方式给予用于临床应用。

[0173] 本文引用的所有参考文献,包括专利申请案、专利公开案以及科学文献和数据库,都是出于所有目的通过引用以其整体并入本文,并入程度如同每个单独参考文献被具体地且单独地指示为通过引用并入一般。

[0174] 为了公开文本的清晰性,且不通过限制,将详细说明分为以下几个子章节。本文使用的章节标题仅用于组织目的,并且不应被视为限制所述主题。

I. 定义

[0175] 除非另外定义,否则本文所用的所有领域术语、符号以及其他技术和科学术语或命名都旨在具有与所要求保护的主体所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。在一些情形中,为了清楚和/或为了便于参考而在本文中定义具有通常理解的含义的术语,并且在本文中包括此类定义不一定应当被解释为表示与本领域通常理解的实质性差异。

[0176] 如在本说明书和所附权利要求中所用,单数形式“一个/一种”(“a”)、“一个/一种”(“an”)和“所述”(“the”)包括复数指示物,除非上下文另外明确规定。因此,例如,提及“一种分子”任选地包括两种或更多种此类分子的组合等。

[0177] 如本文所用的术语“约”是指本技术领域的技术人员容易知晓的对应值的通常误差范围。本文提及“约”某一值或参数时包括(并描述)涉及该值或参数本身的实施方案。

[0178] 应理解,本文描述的本发明的方面和实施方案包括“包含方面和实施方案”、“由方面和实施方案组成”和/或“基本上由方面和实施方案组成”。

[0179] 如本文所用,“任选的”或“任选地”意指随后描述的事件或情形发生或不发生,并且所述描述包括所述事件或情形发生的情况和所述事件或情形不发生的情况。例如,任选地取代的基团意指基团未被取代或被取代。

[0180] 如本文所用,“抗体”是指免疫球蛋白和免疫球蛋白片段,不论是天然的还是部分或完全合成(如重组)产生的,包括其含有免疫球蛋白分子的可变重链和/或轻链区的至少一部分的任何片段,其足以形成抗原结合位点并且在组装时足以特异性结合抗原。因此,抗体包括具有结合结构域的任何蛋白质,所述结合结构域与免疫球蛋白抗原结合结构域(抗体组合位点)同源或基本上同源。通常,抗体最少包括可变重(V_H)链和/或可变轻(V_L)链的全部或至少一部分。通常, V_H 与 V_L 的配对一起形成抗原结合位点,但是在一些情形中,单一 V_H 或 V_L 结构域对于抗原结合是足够的。抗体还可以包括恒定区的全部或一部分。本文中提及抗体时包括全长抗体和抗原结合片段。在本文中,术语“免疫球蛋白”(Ig)可与“抗体”互换使用。

[0181] 术语“全长抗体”、“完整抗体”或“全抗体”可互换使用,用于指代呈其基本上完整形式的抗体,与抗体片段相反。全长抗体是通常具有两条全长重链(例如, $VH-CH1-CH2-CH3$ 或 $VH-CH1-CH2-CH3-CH4$)和两条全长轻链($VL-CL$)和铰链区的抗体,如从哺乳动物物种(例如人、小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物等)由分泌抗体的B细胞产生的抗体以及具有合成产

生的相同结构域的抗体。具体地,全抗体包括具有重链和轻链(包括Fc区的)的那些。恒定结构域可以是天然序列恒定结构域(例如,人天然序列恒定结构域)或其氨基酸序列变体。在一些情形中,完整抗体可以具有一种或多种效应子功能。

[0182] “抗体片段”包含完整抗体的一部分、完整抗体的抗原结合区和/或可变区。抗体片段包括但不限于Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、Fv片段、二硫键连接的Fv(dsFv)、Fd片段、Fd'片段;双抗体;线性抗体(参见美国专利号5,641,870,实施例2;Zapata等人,Protein Eng. 8(10):1057-1062[1995]);单链抗体分子,包括单链Fv(scFv)或单链Fab(scFab);上文任一种的抗原结合片段以及来自抗体片段的多特异性抗体。出于本文的目的,抗体片段通常包括足以接合或交联NK细胞表面上的CD16的片段。

[0183] 术语“自体的”是指源于个体自身组织内或取自个体自身组织的细胞或组织。例如,在NK细胞的自体转移或移植中,供体和受体是同一人。

[0184] 术语“同种异体的”是指属于或得自同一物种,但在遗传上不同的细胞或组织,并且其在一些情形中因此是免疫不相容的。通常,术语“同种异体的”用于限定从供体移植至同一物种的受体的细胞。

[0185] 关于细胞组合物的术语“富集”是指如下组合物,其中如与相同体积的起始组合物(如从受试者直接获得或分离的起始组合物)中所述细胞类型的数量或百分比相比,存在细胞类型或群体的数量或百分比的增加。所述术语不需要从组合物完全去除其他细胞、细胞类型或群体,并且不需要如此富集的细胞在富集的组合物中以等于或甚至接近100%存在。

[0186] 术语“表达”是指多核苷酸从DNA模板被转录(如转录为mRNA或其他RNA转录物)的过程,和/或转录的mRNA随后被翻译为肽、多肽或蛋白质的过程。转录物和编码的多肽可以被统称为“基因产物”。如果多核苷酸源自基因组DNA,表达可以包括真核细胞中mRNA的剪接。

[0187] 关于蛋白质或核酸的术语“异源的”是指源自不同遗传来源的蛋白质或核酸。例如,对于细胞为异源的蛋白质或核酸源自与表达其的细胞不同的生物体或个体。

[0188] 如本文所用,术语“引入”涵盖在体外或在体内将DNA引入细胞中的多种方法,这样的方法包括转化、转导、转染(例如电穿孔)和感染。载体可用于将编码分子的DNA引入细胞中。可能的载体包括质粒载体和病毒载体。病毒载体可逆转录病毒载体、慢病毒载体或其他载体,如腺病毒载体或腺相关载体。

[0189] 术语“组合物”是指两种或更多种产物、物质或化合物(包括细胞或抗体)的任何混合物。其可以是溶液、悬浮液、液体、粉末、糊剂、水性的、非水性的或其任何组合。制剂通常呈例如允许活性成分(例如抗体)的生物活性有效的形式。

[0190] “药学上可接受的载体”是指药物配制品中除了活性成分之外对受试者无毒的成分。药学上可接受的载体包括但不限于缓冲液、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0191] 如本文所用,组合是指两项或更多项之间的任何结合。组合可以是两个或更多个单独项,如两种组合物或两种集合,可以是其混合物,如两项或更多项的单一混合物,或其任何变化形式。组合的要素通常是功能上关联的或相关的。

[0192] 如本文所用,试剂盒是包装的组合,其任选地包括其他要素,如另外的药剂,以及所述组合或其要素的使用说明书,所述试剂盒用于包括但不限于治疗性用途的目的。

[0193] 如本文所用,术语“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”是指设计用于在临床

病理学的过程期间改变所治疗个体或细胞的自然进程的临床干预。所需治疗效果包括降低疾病进展速率、改善或缓和疾病状态、以及消退或改进的预后。例如,如果与障碍(例如,嗜酸性粒细胞介导的疾病)相关的一种或多种症状被减轻或消除,则个体被成功“治疗”。例如,如果治疗导致提高患有疾病的那些人的生活质量、减少治疗疾病所需的其他药物的剂量、降低疾病复发的频率、减轻疾病的严重程度、延迟疾病的发展或进展和/或延长个体的存活时间,则个体被成功“治疗”。

[0194] “有效量”是指至少在必需的剂量和时间段下,有效实现所需的或指示的效果(包括治疗或预防结果)的量。有效量可以在一次或多次施用中提供。“治疗有效量”是至少实现特定障碍的可测量改进所需的最小细胞剂量。在一些实施方案中,治疗有效量是组合物降低动物中与癌症、病毒感染、微生物感染或脓毒症休克相关的严重性、持续时间和/或症状的量。本文的治疗有效量可以根据多种因素而变化,所述因素如患者的疾病状态、年龄、性别和体重。治疗有效量还可以是其中治疗上有益的效果超过抗体的任何毒性或有害影响的量。“预防有效量”是指在必需的剂量和时间段下,有效实现所需预防结果的量。通常但不是必需地,因为预防剂量是在疾病之前或在疾病的较早期阶段用于受试者,所以预防有效量可以小于治疗有效量。

[0195] 如本文所用,“个体”或“受试者”是哺乳动物。用于治疗目的的“哺乳动物”包括人、家畜和农场动物,以及动物园、运动或宠物动物,如狗、马、兔、牛、猪、仓鼠、沙鼠、小鼠、雪貂、大鼠、猫等。在一些实施方案中,个体或受试者是人。

II. 用于扩增自然杀伤细胞子集的方法

[0196] 本文提供一种用于从来自人受试者的生物样品扩增NK细胞子集的方法。在一些实施方案中,所述方法可以包括从来自人受试者的生物样品扩增细胞子集,所述细胞是FcR γ 缺陷性NK细胞(g⁻NK)。在一些实施方案中,所述方法可以包括从来自人受试者的生物样品扩增NK细胞子集,所述NK细胞为NKG2C^{pos}。在一些实施方案中,所述方法可以包括从来自人受试者的生物样品扩增NK细胞子集,所述NK细胞为NKG2A^{neg}。在一些实施方案中,所述方法包括从来自人受试者的生物样品分离富集自然杀伤(NK)细胞的细胞群体,以及在如下条件下培养所述细胞:其中优先生长和/或扩增g⁻NK细胞对象和/或与所述g⁻NK细胞子集重叠或共享细胞外表面标记物的NK细胞子集。例如,NK细胞可以使用饲养细胞或在细胞因子的存在下培养,以增强g⁻NK细胞对象和/或与所述g⁻NK细胞子集重叠或共享细胞外表面标记物的NK细胞子集的生长和/或扩增。在一些方面,所提供的方法还可以扩增NK细胞的其他子集,如呈NKG2C^{pos}和/或NKG2A^{neg}的任何NK细胞。

[0197] 在一些实施方案中,样品(例如生物样品)是含有包括NK细胞群体的多个细胞群体的样品。在一些实施方案中,生物样品是或包含血细胞,例如外周血单个核细胞。在一些方面,生物样品是全血样品、单采术产物或白细胞单采术产物。在一些实施方案中,样品是外周血单个核细胞(PBMC)的样品。因此,在所提供的方法的一些实施方案中,可以获得外周血单个核细胞(PBMC)群体。含有包括NK细胞群体在内的多个细胞群体的样品可以用作用于根据所提供的方法富集或选择用于扩增的NK细胞子集的细胞。

[0198] 在一些实施方案中,所述生物样品来自作为健康受试者的受试者。在一些实施方案中,所述生物样品来自患有疾病或病症(例如癌症)的受试者。

[0199] 在一些实施方案中,所述细胞是从样品分离或选择,所述样品如生物样品,例如,

获自或源自受试者的生物样品,所述受试者如患有特定疾病或病症或者需要细胞疗法或者将被施用细胞疗法的受试者。在一些方面,所述受试者是人,如作为需要特定治疗干预的患者的受试者,所述特定治疗干预如针对其分离、处理和/或工程化细胞的过继细胞疗法。因此,在一些实施方案中,细胞是原代细胞,例如,原代人细胞。样品包括直接取自受试者的组织、流体和其他样品。所述生物样品可以是直接从生物来源获得的样品或经过处理的样品。生物样品包括但不限于体液(如血液、血浆、血清、脑脊液、滑液、尿液和汗液)、组织和器官样品,包括源自其的处理样品。在一些方面,样品是血液或血液源样品,或者是或源自单采术或白细胞单采术产物。

[0200] 在一些例子中,获得来自受试者的循环血液的细胞。在一些方面,样品含有淋巴细胞(包括NK细胞、T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞)、其他有核白细胞、红细胞和/或血小板,并且在一些方面含有除了红细胞和血小板以外的细胞。在一些实施方案中,洗涤从受试者收集的血细胞以例如去除血浆级分,并将细胞置于适当缓冲液或介质中以用于后续的处理步骤。在一些实施方案中,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤细胞。在一些实施方案中,洗涤溶液缺少钙和/或镁和/或多种或全部二价阳离子。在某些实施方案中,去除血细胞样品的组分并将所述细胞直接重悬于培养基中。在一些实施方案中,所述方法包括基于密度的细胞分离方法,如通过溶解红细胞并通过Percoll或Ficoll梯度离心(如通过使用Histopaque®密度离心)从外周血制备白细胞。

[0201] 在一些实施方案中,所述生物样品来自从正常外周血收集的富集的白细胞单采术产物。在一些实施方案中,所述富集的白细胞单采术产物可能含有新鲜细胞。在一些实施方案中,所述富集的白细胞单采术产物是低温保存的样品,其被解冻用于所提供的方法中。

[0202] 在一些实施方案中,生物细胞的来源含有为或约 5×10^5 至为或约 5×10^8 个NK细胞或者g-NK细胞子集或者与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集。在一些实施方案中,生物样品中NK细胞或者g-NK细胞子集或者与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集的数量是为或约 5×10^5 至为或约 1×10^8 、为或约 5×10^5 至为或约 5×10^7 、为或约 5×10^5 至为或约 1×10^7 、为或约 5×10^5 至为或约 5×10^6 、为或约 5×10^5 至为或约 1×10^6 、为或约 1×10^6 至为或约 1×10^8 、为或约 1×10^6 至为或约 5×10^7 、为或约 1×10^6 至为或约 1×10^7 、为或约 1×10^6 至为或约 5×10^6 、为或约 5×10^6 至为或约 1×10^8 、为或约 5×10^6 至为或约 5×10^7 、为或约 5×10^6 至为或约 1×10^7 、为或约 1×10^7 至为或约 1×10^8 、为或约 1×10^7 至为或约 5×10^7 或者为或约 5×10^7 至为或约 1×10^8 。

[0203] 在一些实施方案中,生物样品中的NK细胞中g-NK细胞或者与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集的百分比是大于或大于约3%。在一些实施方案中,生物样品中的NK细胞中g-NK细胞或者与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集的百分比是大于或大于约5%。在一些实施方案中,生物样品中的NK细胞中g-NK细胞或者与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集的百分比是大于或大于约10%。在一些实施方案中,生物样品中的NK细胞中g-NK细胞或者与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集的百分比是大于或大于约12%。在一些实施方案中,生物样品中的NK细胞中g-NK细胞或者与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集的百分比是大于或大于约14%。在一些实施方案中,生物样品中的NK细胞中g-NK细胞或者与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集的百分比是大于或

大于约16%。在一些实施方案中,生物样品中的NK细胞中g-NK细胞或者与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集的百分比是大于或大于约18%。在一些实施方案中,生物样品中的NK细胞中g-NK细胞或者与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集的百分比是大于或大于约20%。在一些实施方案中,生物样品中的NK细胞中g-NK细胞或者与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集的百分比是大于或大于约22%。在一些实施方案中,生物样品中的NK细胞中g-NK细胞或者与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集的百分比是大于或大于约24%。在一些实施方案中,生物样品中的NK细胞中g-NK细胞或者与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集的百分比是大于或大于约26%。在一些实施方案中,生物样品中的NK细胞中g-NK细胞或者与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集的百分比是大于或大于约28%。在一些实施方案中,生物样品中的NK细胞中g-NK细胞或者与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集的百分比是大于或大于约30%。

[0204] 在一些实施方案中,如果生物样品中的NK细胞中g-NK细胞或者与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集的百分比是大于或大于约3%,则选择受试者。在一些实施方案中,如果生物样品中的NK细胞中g-NK细胞或者与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集的百分比是大于或大于约5%,则选择受试者。在一些实施方案中,如果生物样品中的NK细胞中g-NK细胞或者与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集的百分比是大于或大于约10%,则选择受试者。在一些实施方案中,如果生物样品中的NK细胞中g-NK细胞或者与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集的百分比是大于或大于约12%,则选择受试者。在一些实施方案中,如果生物样品中的NK细胞中g-NK细胞或者与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集的百分比是大于或大于约14%,则选择受试者。在一些实施方案中,如果生物样品中的NK细胞中g-NK细胞或者与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集的百分比是大于或大于约16%,则选择受试者。在一些实施方案中,如果生物样品中的NK细胞中g-NK细胞或者与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集的百分比是大于或大于约18%,则选择受试者。在一些实施方案中,如果生物样品中的NK细胞中g-NK细胞或者与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集的百分比是大于或大于约20%,则选择受试者。在一些实施方案中,如果生物样品中的NK细胞中g-NK细胞或者与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集的百分比是大于或大于约22%,则选择受试者。在一些实施方案中,如果生物样品中的NK细胞中g-NK细胞或者与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集的百分比是大于或大于约24%,则选择受试者。在一些实施方案中,如果生物样品中的NK细胞中g-NK细胞或者与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集的百分比是大于或大于约26%,则选择受试者。在一些实施方案中,如果生物样品中的NK细胞中g-NK细胞或者与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集的百分比是大于或大于约28%,则选择受试者。在一些实施方案中,如果生物样品中的NK细胞中g-NK细胞或者与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集的百分比是大于或大于约30%,则选择受试者。

[0205] 在一些实施方案中,所述生物样品来自呈CMV血清阳性的受试者。CMV感染可以导致NK细胞的表型和功能分化,包括高分率的展现增强的抗病毒活性的表达NKG2C的NK细胞

的发育。表达NKG2C的CMV相关NK细胞展示改变的DNA甲基化模式和减少的信号传导分子(如FcR γ)表达(Schlums等人, Immunity (2015) 42:443-56)。这些NK细胞与相对于常规NK细胞子集更强效的抗体依赖性激活、扩增和功能相关。在一些情形中,生物样品可以来自呈CMV血清阴性的受试者,因为也可以在CMV血清阴性个体中检测到具有降低的FcR γ 表达的NK细胞,纵使通常水平较低。在一些情形中,生物样品可以来自CMV血清阳性个体。

[0206] 在一些实施方案中,基于外周血样品中对NKG2C呈阳性的NK细胞的百分比来选择受试者。在一些实施方案中,如果外周血样品中至少或至少约20%的NK细胞对NKG2C呈阳性,则选择受试者。在一些实施方案中,如果外周血样品中至少或至少约25%的NK细胞对NKG2C呈阳性,则选择受试者。在一些实施方案中,如果外周血样品中至少或至少约30%的NK细胞对NKG2C呈阳性,则选择受试者。在一些实施方案中,如果外周血样品中至少或至少约35%的NK细胞对NKG2C呈阳性,则选择受试者。在一些实施方案中,如果外周血样品中至少或至少约40%的NK细胞对NKG2C呈阳性,则选择受试者。在一些实施方案中,如果外周血样品中至少或至少约45%的NK细胞对NKG2C呈阳性,则选择受试者。在一些实施方案中,如果外周血样品中至少或至少约50%的NK细胞对NKG2C呈阳性,则选择受试者。在一些实施方案中,如果外周血样品中至少或至少约55%的NK细胞对NKG2C呈阳性,则选择受试者。在一些实施方案中,如果外周血样品中至少或至少约60%的NK细胞对NKG2C呈阳性,则选择受试者。

[0207] 在一些实施方案中,基于外周血样品中对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A的NK细胞的百分比来选择受试者。在一些实施方案中,如果外周血样品中至少或至少约70%的NK细胞对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A,则选择受试者。在一些实施方案中,如果外周血样品中至少或至少约75%的NK细胞对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A,则选择受试者。在一些实施方案中,如果外周血样品中至少或至少约80%的NK细胞对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A,则选择受试者。在一些实施方案中,如果外周血样品中至少或至少约85%的NK细胞对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A,则选择受试者。在一些实施方案中,如果外周血样品中至少或至少约90%的NK细胞对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A,则选择受试者。

[0208] 在一些实施方案中,基于外周血样品中对NKG2C呈阳性的NK细胞的百分比以及外周血样品中对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A的NK细胞的百分比二者来选择受试者。在一些实施方案中,如果外周血样品中至少或至少约20%的NK细胞对NKG2C呈阳性并且外周血样品中至少或至少约70%的NK细胞对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A,则选择受试者。在一些实施方案中,如果外周血样品中至少或至少约30%的NK细胞对NKG2C呈阳性并且外周血样品中至少或至少约75%的NK细胞对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A,则选择受试者。在一些实施方案中,如果外周血样品中至少或至少约40%的NK细胞对NKG2C呈阳性并且外周血样品中至少或至少约80%的NK细胞对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A,则选择受试者。在一些实施方案中,如果外周血样品中至少或至少约50%的NK细胞对NKG2C呈阳性并且外周血样品中至少或至少约85%的NK细胞对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A,则选择受试者。在一些实施方案中,如果外周血样品中至少或至少约60%的NK细胞对NKG2C呈阳性并且外周血样品中至少或至少约90%的NK细胞对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A,则选择受试者。在一些实施方案中,如果外周血样品中至少或至少约60%的NK细胞对NKG2C呈阳性并且外周血样品中至少或至少约95%的NK细胞对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A,则选择受试者。

[0209] 在一些实施方案中,如果受试者为CMV血清阳性,并且如果在来自受试者的外周血样品中的NK细胞中,g-NK细胞的百分比是大于或大于约30%,NKG2C^{pos}细胞的百分比是大于或大于约20%,并且NKG2A^{neg}细胞的百分比是大于或大于约70%,则选择所述受试者用于根据所提供的方法扩增细胞。

[0210] 在一些实施方案中,来自受试者的NK细胞在CD16基因中带有单核苷酸多态性(SNP rs396991),即核苷酸526[胸苷(T)→鸟嘌呤(G)],其导致在蛋白质的成熟(处理的)形式中的位置158处缬氨酸(V)代替苯丙氨酸(F)的氨基酸(aa)取代(F158V)。在一些实施方案中,NK细胞在两个等位基因中带有CD16 158V多态性(本文中称为158V/V)。在一些实施方案中,NK细胞在单一等位基因中带有CD16 158V多态性(本文中称为158V/F)。应理解,本文中提及158V+基因型时是指158V/V基因型和158V/F基因型二者。已经发现,CD16 F158V多态性与对IgG1抗体显著更高的亲和力相关,并且具有发动更稳健的NK细胞介导的ADCC反应的能力(Mellor等人(2013)Journal of Hematology&Oncology,6:1;Musolino等人(2008)Journal of Clinical Oncology,26:1789-1796;以及Hatjiharissi等人(2007)Blood,110:2561-2564)。在一些实施方案中,CD16 158V+/g-NK细胞的抗体引导的靶向导致患者的改进的结局,这是由于改进了CD16 158V+/g-NK细胞子集的亲和力、细胞毒性和/或细胞因子介导的效应功能所致。

[0211] 在一些实施方案中,所提供的方法包括从受试者的生物样品富集或分离被鉴定为具有CD16 158V+NK细胞基因型的NK细胞或其子集。在一些实施方案中,所述方法包括和针对CD16 158V+NK细胞基因型的存在筛选受试者。在一些实施方案中,来自受试者的样品提取基因组DNA,所述样品是或包括NK细胞,如血液样品或骨髓样品。在一些实施方案中,所述样品是或包含血细胞,例如外周血单个核细胞。在一些实施方案中,所述样品是或包含分离的NK细胞。在一些实施方案中,所述样品是来自健康供体受试者的样品。可以采用用于从样品提取DNA的任何方法。例如,可以使用标准技术(如硫氰酸胍-苯酚-氯仿提取)从样品(例如细胞)容易地分离核酸(Chomocyznski等人(1987)Anal.Biochem.162:156)。市售试剂盒也可容易地用于提取基因组DNA,如Wizard基因组DNA纯化试剂盒(Promega,麦迪逊,威斯康星州)。

[0212] 可以对任何合适的样品进行基因分型。在任何本文所述的实施方案中,基因分型反应可以是例如焦磷酸测序反应、DNA测序反应、MassARRAY MALDI-TOF、RFLP、等位基因特异性PCR、实时等位基因分型或微阵列。在一些实施方案中,使用针对多态性的等位基因特异性引物对基因组DNA进行基于PCR的技术(如RT-PCR)。用于扩增样品中的靶核酸序列的PCR方法是本领域中熟知的,并且已经描述于以下文献中:Innis等人(编辑)PCR Protocols (Academic Press,NY 1990);Taylor(1991)Polymerase chain reaction:basic principles and automation,PCR:A Practical Approach,McPherson等人(编辑)IRL Press,Oxford;Saiki等人(1986)Nature 324:163;以及美国专利号4,683,195、4,683,202和4,889,818,所述文献都是通过引用以其整体并入本文。

[0213] 用于检测158V+多态性的引物是已知的,或者可以由技术人员容易地设计。参见例如,国际公开的PCT申请号W0 2012/061814;Kim等人(2006)Blood,108:2720-2725;Cartron等人(2002)Blood,99:754-758;Koene等人(1997)Blood,90:1109-1114;Hatjiharissi等人(2007)Blood,110:2561-2564;Somboonyosdech等人(2012)Asian Biomedicine,6:883-

889)。在一些实施方案中,可以使用巢式引物进行PCR,之后进行等位基因特异性限制酶消化。在一些实施方案中,第一PCR引物包含核酸序列5'-ATA TTT ACA GAA TGG CAC AGG-3'(SEQ ID NO:2)和5'-GAC TTG GTA CCC AGG TTG AA-3'(SEQ ID NO:3),而第二PCR引物是5'-ATC AGA TTC GAT CCT ACT TCT GCA GGG GGC AT-3'(SEQ ID NO:4)和5'-ACG TGC TGA GCT TGA GTG ATG GTG ATG TTC AC-3'(SEQ ID NO:5),其在一些情形中生成94bp片段,根据等位基因的性质而定。在一些实施方案中,所述引物对包含SEQ ID NO:6(CCCA ACTCAA CTTCC CAGTG TGAT)和SEQ ID NO:7(GAAATCTACC TTTTCCTCTA ATAGGGCAAT)中所示的核酸序列。在一些实施方案中,所述引物对包含SEQ ID NO:6(CCCA ACTCAA CTTCC CAGTG TGAT)和SEQ ID NO:8(GAAATCTACC TTTTCCTCTA ATAGGGCAA)中所示的核酸序列。在一些实施方案中,所述引物对包含SEQ ID NO:6(CCCA ACTCAA CTTCC CAGTG TGAT)和SEQ ID NO:9(GAAATCTACC TTTTCCTCTA ATAGGGCA)中所示的核酸序列。在一些实施方案中,可以在提取RNA后使用如下引入序列通过定量的实时RT-PCR进行基因分型:SEQ ID NO:10(5'-CCAAAAGCCACACTCAAAGAC-3')中所示的CD16有义链和SEQ ID NO:11(5'-ACCCAGGTGGAAAGAATGATG-3')中所示的反义链以及SEQ ID NO:12(5'-AACATCACCATCACTCAAGGTTTGG-3')中所示的TaqMan探针。

[0214] 为了确认基因分型,可以用一组V等位基因特异性引物(例如SEQ ID NO:13中所示的正向引物,5'-CTG AAG ACA CAT TTT TAC TCC CAAA-3';以及SEQ ID NO:14中所示的反向引物,5'-TCC AAA AGC CAC ACT CAA AGA C-3')或一组F等位基因特异性引物(例如,SEQ ID NO:15中所示的正向引物,5'-CTG AAG ACA CAT TTT TAC TCC CAAC-3';以及SEQ ID NO:14中所示的反向引物,5'-TCC AAA AGC CAC ACT CAA AGA C-3')使用等位基因特异性扩增。

[0215] CD16a的基因组序列可在NCBI数据库中以NG_009066.1获得。CD16A的基因ID为2214。CD16的序列信息(包括基因多态性)可以UniProt登录号P08637获得。CD16(F158)的序列示于SEQ ID NO:16中(残基F158为粗体且加下划线)。在一些实施方案中,CD16(F158)还包含示为MWQLLLPTALLLVSA(SEQ ID NO:17)的信号肽。

GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKQCQAYSPEDNSTQWFHNESLISSQAS
SYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRC
HSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLFGSKNVSS
ETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVD TGLYFSVKTNIRSSTRDWK
DHKFKWRKDPQDK (SEQ ID NO:16)

[0216] CD16 158V+(导致F158V的多态性)的序列被称为VAR_003960并且具有SEQ ID NO:18中所示的序列(158V+多态性为粗体且加下划线)。在一些实施方案中,CD16(158V+)还包含示为MWQLLLPTALLLVSA(SEQ ID NO:17)的信号肽。

GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKQCQAYSPEDNSTQWFHNESLISSQAS
SYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRC
HSWKNTALHKV TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSS
ETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVD TGLYFSVKTNIRSSTRDWK
DHKFKWRKDPQDK (SEQ ID NO:18)

[0217] 在一些实施方案中,对基因组脱氧核糖核酸(DNA)样品采用单核苷酸多态性(SNP)分析,其使用含有5'端上的荧光染料标记(例如FAM或VIC)和小沟结合剂(MGB)和3'端上的

非荧光猝灭剂(NFQ)的等位基因特异性探针以及未标记的PCR引物,以检测特定SNP靶标。在一些实施方案中,所述测定通过与探针结合的染料的荧光变化来测量或检测SNP的存在。在这样的实施方案中,探针与两个未标记的引物之间的靶DNA杂交,并且来自5'端上的荧光染料的信号通过荧光共振能量转移(FRET)被其3'端上的NFQ猝灭。在PCR期间,Taq聚合酶使用模板作为指导延长未标记的引物,并且在聚合物到达标记的探针时,其切割所述分子,将染料与猝灭剂分离。在一些方面,qPCR仪器可以检测来自未猝灭标记的荧光。示例性试剂是市售的SNP测定,例如rs396991的代码C_25815666_10(Applied Biosystems,目录号4351379,用于CD16中的F158V的SNP基因分型)。

[0218] 在一些实施方案中,鉴定对CD16 158V (F158V) 多态性呈杂合或纯合的受试者。在一些实施方案中,鉴定对CD16 158V (F158V) 多态性呈纯合的受试者。在一些实施方案中,从来自被鉴定为对CD16 158V多态性呈杂合或纯合的受试者的生物样品分离或富集NK细胞或NK细胞子集。在一些实施方案中,从来自被鉴定为对CD16 158V多态性呈纯合的受试者的生物样品分离或富集NK细胞或NK细胞子集。

[0219] 在一些实施方案中,所述方法包括从生物样品富集NK细胞,如从自受试者分离或获得的PBMC群体富集。在一些实施方案中,富集NK细胞的细胞群体是通过基于一种或多种自然杀伤细胞特异性标记物的分离或选择来富集。技术人员可以熟练地选择特定标记物或表面标记物的组合。在一些实施方案中,一种或多种表面标记物是来自以下表面抗原的任何一种或多种:CD11a、CD3、CD7、CD14、CD16、CD19、CD25、CD27、CD56、CD57、CD161、CD226、NKB1、CD62L;CD244、NKG2D、NKP30、NKP44、NKP46、NKG2A、NKG2C、KIR2DL1和/或KIR2DL3。在一些实施方案中,一种或多种表面标记物是来自以下表面抗原的任何一种或多种:CD11a、CD3、CD7、CD14、CD16、CD19、CD25、CD27、CD38、CD56、CD57、CD161、CD226、NKB1、CD62L;CD244、NKG2D、NKP30、NKP44、NKP46、NKG2A、NKG2C、SLAMF7 (CD319)、KIR2DL1和/或KIR2DL3。在特定实施方案中,一种或多种表面抗原包括CD3以及以下表面抗原中的一种或多种:CD16、CD56或CD57。在一些实施方案中,一种或多种表面抗原是CD3和CD57。在一些实施方案中,一种或多种表面抗原是CD3、CD56和CD16。在其他实施方案中,一种或多种表面抗原是CD3、CD56和CD38。在其他实施方案中,一种或多种表面抗原是CD3、CD56、NKG2A和CD161。在一些实施方案中,一种或多种表面抗原是CD3、CD57和NKG2C。在一些实施方案中,一种或多种表面抗原是CD3、CD57和NKG2A。在一些实施方案中,一种或多种表面抗原是CD3、CD57、NKG2C和NKG2A。在一些实施方案中,一种或多种表面抗原是CD3和CD56。在一些实施方案中,一种或多种表面抗原是CD3、CD56和NKG2C。在一些实施方案中,一种或多种表面抗原是CD3、CD56和NKG2A。在一些实施方案中,一种或多种表面抗原是CD3、CD56、NKG2C和NKG2A。用于检测这样的表面抗原的试剂(包括荧光色素缀合的抗体)是技术人员熟知且可获得的。

[0220] 在一些实施方案中,通过所提供的方法从样品富集(如通过分离或选择)的NK细胞群体是如下细胞:对一种或多种特定标记物(如表面标记物)呈阳性(标记物^{pos})或表达高水平(标记物^高)的所述标记物,或者对一种或多种标记物呈阴性或者表达相对低水平(标记物⁻或标记物^{neg})的所述标记物。因此,应理解,关于在细胞上或细胞中表达的标记物或蛋白质,术语阳性、pos或+在本文中可互换使用。同样,应理解,关于在细胞上或细胞中表达的标记物或蛋白质,术语阴性、neg或-在本文中可互换使用。此外,应理解,本文中提及呈标记物^{neg}的细胞可以指代对所述标记物呈阴性的细胞以及表达相对低水平(如与对照

或背景水平相比无法容易地检测到的低水平)的所述标记物的细胞。在一些情形中,这样的标记物是在某些NK细胞群体上不存在或以相对低水平表达,但是在淋巴细胞(如T细胞)的某些其他群体上存在或以相对较高水平表达的那些。在一些情形中,这样的标记物是在某些NK细胞群体上存在或以相对较高水平表达,但是在淋巴细胞(如T细胞或其子集)的某些其他群体上不存在或以相对低水平表达的那些。

[0221] 在一些实施方案中,可以使用用于基于这样的标记物进行分离的任何已知方法。在一些实施方案中,所述分离是基于亲和力或免疫亲和力的分离。例如,在一些方面,所述分离包括基于一种或多种标记物(通常为细胞表面标记物)的表达或表达水平来分离细胞和细胞群体,例如,通过与特异性结合至这样的标记物的抗体或结合配偶体一起孵育,之后通常进行洗涤步骤并将已经结合所述抗体或结合配偶体的细胞与尚未结合至所述抗体或结合配偶体的那些细胞分离。在一些实施方案中,孵育是静态的(不进行混合)。在一些实施方案中,孵育是动态的(伴随混合)。

[0222] 这样的分离步骤可以基于阳性选择,其中保留已经结合试剂的细胞以供进一步使用,和/或基于阴性选择,其中保留上未结合至抗体或结合配偶体的细胞。在一些例子中,保留两种级分以供进一步使用。所述分离无需导致特定细胞群体或表达特定标记物的细胞的100%富集或去除。例如,特定类型的细胞(如表达标记物的那些)的阳性选择或富集是指增加这样的细胞的数量或百分比,但是无需导致不表达所述标记物的细胞完全不存在。同样,特定类型的细胞(如表达标记物的那些)的阴性选择、去除或耗尽是指减少这样的细胞的数量或百分比,但是无需导致所有这样的细胞的完全去除。例如,在一些方面,针对CD3的阴性选择富集呈CD3^{neg}的细胞群体,但是也可以含有一些残留或小部分的其他非选择细胞,它们在一些情形中可以包括富集群体中仍存在的呈CD3^{pos}的小部分细胞。在一些例子中,对CD57^{pos}或CD16^{pos}群体中的一种的阳性选择富集所述群体(即CD57^{pos}或CD16^{pos}群体),但是也可以含有一些残留或小部分的其他非选择细胞,它们在一些情形中可以包括富集群体中仍存在的CD57或CD16群体中的另一种。

[0223] 在一些例子中,进行多轮分离步骤,其中使一个步骤中阳性或阴性选择的级分经历另一个分离步骤,如后续的阳性或阴性选择。在一些例子中,单一分离步骤可以耗尽同时表达多种标记物的细胞,如通过将细胞与多种抗体或结合配偶体一起孵育,每种抗体或结合配偶体对阴性选择靶向的标记物具有特异性。同样,可以通过将细胞与在多种细胞类型上表达的多种抗体或结合配偶体一起孵育,同时对多个细胞类型进行阳性选择。

[0224] 在一些方面,所述选择包括基于一种或多种表面抗原的表达(如在来自PBMC样品的细胞中)的阳性和/或阴性选择步骤。在一些实施方案中,所述分离包括对表达CD56的细胞、表达CD16的细胞或表达CD57的细胞的阳性选择,和/或对表达CD38的细胞的阴性选择和/或对表达非NK细胞标记物(如T细胞标记物)的细胞的阴性选择,例如,对表达CD3的细胞的阴性选择(CD3^{neg})。例如,在一些实施方案中,所述分离包括对表达CD56的细胞、表达CD16的细胞或表达CD57的细胞的阳性选择,和/或对表达非NK细胞标记物(如T细胞标记物)的细胞的阴性选择,例如,对表达CD3的细胞的阴性选择(CD3^{neg})。在一些实施方案中,所述分离包括对表达CD56的细胞、表达CD16的细胞或表达CD57的细胞的阳性选择,和/或对表达CD38(CD38^{neg})、CD161(CD161^{neg})、NKG2A(NKG2A^{neg})的细胞的阴性选择,和/或对表达CD3的细胞的阴性选择(CD3^{neg})。在一些实施方案中,所述选择包括分离对CD3呈阴性(CD3^{neg})的细胞。

[0225] 在一些实施方案中,所述分离包括对表达CD3的细胞的阴性选择(CD3^{neg})和对表达CD56的细胞的阳性选择(CD56^{pos})。在一些实施方案中,所述选择还可以包括对表达CD38的细胞的阴性选择(CD38^{neg})。在具体实施方案中,分离或选择的细胞为CD3^{neg}CD56^{pos}CD38^{neg}。

[0226] 在一些实施方案中,所述选择包括对表达CD3的细胞的阴性选择(CD3^{neg})、对表达CD56的细胞的阳性选择(CD56^{pos}),和之后对表达NKG2A(NKG2A^{neg})和CD161(CD161^{neg})的细胞的阴性选择。在具体实施方案中,分离或选择的细胞为CD3^{neg}CD56^{pos}NKG2A^{neg}CD161^{neg}。

[0227] 在一些实施方案中,所述选择包括对表达CD3的细胞的阴性选择(CD3^{neg})和对表达CD57的细胞的阳性选择(CD57^{pos})。在具体实施方案中,分离或选择的细胞为CD3^{neg}CD57^{pos}。

[0228] 在一些实施方案中,所述选择包括对表达CD3的细胞的阴性选择(CD3^{neg})和对表达CD16的细胞的阳性选择(CD16^{pos})。在具体实施方案中,分离或选择的细胞为CD3^{neg}CD16^{pos}。

[0229] 在一些实施方案中,所述选择包括对表达CD3的细胞的阴性选择(CD3^{neg})和对表达CD57的细胞的阳性选择(CD57^{pos})。在具体实施方案中,分离或选择的细胞为CD3^{neg}CD57^{pos}。例如,可以通过以下方式来富集NK细胞:耗尽CD3^{pos}细胞(对CD3^{pos}细胞的阴性选择),之后进行CD57^{pos}细胞选择,从而分离并富集CD57^{pos} NK细胞。所述分离可以通过基于免疫亲和力的方法来进行,如使用MACSTM微珠。例如,CD3微珠可以用于在针对CD3^{neg}细胞的阴性选择中耗尽CD3^{pos}细胞。随后,CD57微珠可以用于CD3细胞耗尽的PBMC的CD57富集。然后可以将CD3^{neg}/CD57^{pos}富集的NK细胞用于所提供方法的扩增中。

[0230] 在一些实施方案中,所述选择还可以包括对表达NKG2C的细胞的阳性选择(NKG2C^{pos})和/或对细胞NKG2A的阴性选择(NKG2A^{neg})。在一些实施方案中,所述选择包括对表达CD3的细胞的阴性选择(CD3^{neg})、对表达CD57的细胞的阳性选择(CD57^{pos})以及对表达NKG2C的细胞的阳性选择(NKG2C^{pos})。在具体实施方案中,分离或选择的细胞为CD3^{neg}CD57^{pos}NKG2C^{pos}。在一些实施方案中,所述选择包括对表达CD3的细胞的阴性选择(CD3^{neg})、对表达CD57的细胞的阳性选择(CD57^{pos})以及对表达NKG2A的细胞的阴性选择(NKG2A^{neg})。在具体实施方案中,分离或选择的细胞为CD3^{neg}CD57^{pos}NKG2A^{neg}。在一些实施方案中,所述选择包括对表达CD3的细胞的阴性选择(CD3^{neg})、对表达CD57的细胞的阳性选择(CD57^{pos})、对表达NKG2C的细胞的阳性选择(NKG2C^{pos})以及对表达NKG2A的细胞的阴性选择(NKG2A^{neg})。在具体实施方案中,分离或选择的细胞为CD3^{neg}CD57^{pos}NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}。

[0231] 在一些任何所提供的实施方案中,所述选择还可以包括对表达CD38的细胞的阴性选择(CD38^{neg})。在具体实施方案中,分离或选择的细胞为CD3^{neg}CD57^{pos}CD38^{neg}。在具体实施方案中,分离或选择的细胞为CD3^{neg}CD57^{pos}CD38^{neg}NKG2C^{pos}。在具体实施方案中,分离或选择的细胞为CD3^{neg}CD57^{pos}CD38^{neg}NKG2A^{neg}。在具体实施方案中,分离或选择的细胞为CD3^{neg}CD57^{pos}CD38^{neg}NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}。

[0232] 在一些实施方案中,所述选择包括对表达CD3的细胞的阴性选择(CD3^{neg})和对表达CD56的细胞的阳性选择(CD56^{pos})。在具体实施方案中,分离或选择的细胞为CD3^{neg}CD56^{pos}。在一些实施方案中,所述选择包括对表达CD3的细胞的阴性选择(CD3^{neg})、对表达CD56的细胞的阳性选择(CD56^{pos})以及对表达NKG2C的细胞的阳性选择(NKG2C^{pos})。在具体实施方案中,分离或选择的细胞为CD3^{neg}CD56^{pos}NKG2C^{pos}。在一些实施方案中,所述选择包括对表达CD3的细胞的阴性选择(CD3^{neg})、对表达CD56的细胞的阳性选择(CD56^{pos})以及对表达NKG2A的细胞的阴性选择(NKG2A^{neg})。在具体实施方案中,分离或选择的细胞为

CD3^{neg}CD56^{pos}NKG2A^{neg}。在一些实施方案中,所述选择包括对表达CD3的细胞的阴性选择(CD3^{neg})、对表达CD56的细胞的阳性选择(CD56^{pos})、对表达NKG2C的细胞的阳性选择(NKG2C^{pos})以及对表达NKG2A的细胞的阴性选择(NKG2A^{neg})。在具体实施方案中,分离或选择的细胞为CD3^{neg}CD56^{pos}NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}。

[0233] 在一些任何所提供的实施方案中,所述选择还可以包括对表达CD38的细胞的阴性选择(CD38^{neg})。在具体实施方案中,分离或选择的细胞为CD3^{neg}CD56^{pos}CD38^{neg}。在具体实施方案中,分离或选择的细胞为CD3^{neg}CD56^{pos}CD38^{neg}NKG2C^{pos}。在具体实施方案中,分离或选择的细胞为CD3^{neg}CD56^{pos}CD38^{neg}NKG2A^{neg}。在具体实施方案中,分离或选择的细胞为CD3^{neg}CD56^{pos}CD38^{neg}NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}。

[0234] 在一些任何所提供的实施方案中,所述g-NK细胞为具有g-NK替代表面标记物谱的细胞。在一些实施方案中,所述g-NK细胞替代表面标记物谱为CD16^{pos}/CD57^{pos}/CD7^{dim/neg}/CD161^{neg}。在一些实施方案中,所述g-NK细胞替代表面标记物谱为NKG2A^{neg}/CD161^{neg}。在一些任何这样的实施方案中,所述g-NK细胞替代表面标记物谱为CD38^{neg}。在一些任何这样的实施方案中,CD45^{pos}/CD3^{neg}/CD56^{pos}用作NK细胞的替代表面标记物谱。在一些任何这样的实施方案中,所述g-NK细胞替代表面标记物谱还包括NK细胞替代表面标记物谱。在一些任何这样的实施方案中,所述g-NK细胞替代表面标记物谱还包括CD45^{pos}/CD3^{neg}/CD56^{pos}。在特定实施方案中,所述g-NK细胞替代表面标记物谱包括CD45^{pos}/CD3^{neg}/CD56^{pos}/CD16^{pos}/CD57^{pos}/CD7^{dim/neg}/CD161^{neg}。在其他特定实施方案中,所述g-NK细胞替代表面标记物谱包括CD45^{pos}/CD3^{neg}/CD56^{pos}/NKG2A^{neg}/CD161^{neg}。在其他特定实施方案中,所述g-NK细胞替代表面标记物谱包括CD45^{pos}/CD3^{neg}/CD56^{pos}/CD38^{neg}。

[0235] 在一些实施方案中,分离、选择和/或富集细胞的方法(如通过基于一种或多种细胞表面标记物的表达的阳性或阴性选择)可以包括基于免疫亲和力的选择。在一些实施方案中,所述基于免疫亲和力的选择包括使含有细胞(如PBMC)的样品与特异性结合至一种或多种细胞表面标记物的抗体或结合配偶体接触。在一些实施方案中,所述抗体或结合配偶体与固体支持物或基质结合,以允许分离细胞用于阳性和/或阴性选择,所述固体支持物或基质例如球或珠,例如微珠、纳米珠,包括琼脂糖、磁珠或顺磁珠。在一些实施方案中,可以将所述球或珠填充至柱中以实现免疫亲和色谱,其中使含有细胞(如PBMC)的样品与柱的基质接触,之后从柱洗脱或释放。

[0236] 孵育通常在如下条件下进行,借助所述条件,与这样的抗体或结合配偶体(其附着至磁性颗粒或磁珠)特异性结合的抗体或结合配偶体与细胞表面分子(如果存在于样品内的细胞上)特异性结合。

[0237] 在一些方面,将样品置于磁场中,并且附着有磁反应性或可磁化颗粒的那些细胞将被吸引至磁体并与未标记的细胞分离。对于阳性选择,保留被吸引至磁体的细胞;对于阴性选择,保留未被吸引的细胞(未标记的细胞)。在一些方面,在同一选择步骤期间进行阳性和阴性选择的组合,其中保留阳性和阴性级分并且进一步处理或经历进一步分离步骤。

[0238] 在一些实施方案中,使磁反应性颗粒保持附着于随后要进行孵育和/或培养的细胞;在一些方面,使所述颗粒保持附着于用于施用至患者的细胞。在一些实施方案中,从细胞去除可磁化或磁反应性颗粒。用于从细胞去除可磁化颗粒的方法是已知的,并且包括例如使用竞争性非标记抗体、可磁化颗粒或与可切割接头缀合的抗体等。在一些实施方案中,

可磁化颗粒是可生物降解的。

[0239] 在一些实施方案中,基于亲和力的选择是通过磁激活细胞分选(MACS)来进行(Miltenyi Biotech,奥本,加利福尼亚州)。磁激活细胞分选(MACS)系统能够对附着有磁化颗粒的细胞进行高纯度选择。在某些实施方案中,MACS以如下模式操作,其中在施加外部磁场之后依序洗脱非靶标和靶标种类。也就是说,附着于磁化颗粒的细胞保持在适当的位置,而未附着的种类被洗脱。然后,在完成第一次洗脱步骤之后,以某种方式释放被捕获在磁场中并被阻止洗脱的种类,使得它们可以被洗脱和回收。在某些实施方案中,非靶细胞被标记并从异质细胞群中耗尽。

[0240] 在一些任何这样的实施方案中,所述方法包括在富集(如选择和/或分离)NK细胞或其子集之前,将IL-12、IL-15、IL-18、IL-2和/或CCL5施用至受试者。

[0241] 在所提供的方法的实施方案中,将富集的NK细胞在饲养细胞的存在下孵育或培养,如在支持NK细胞子集且特别是g-NK细胞子集的增殖和扩增的条件下孵育或培养。

[0242] 在特定方面,饲养细胞包括刺激或促进NKG2C^{pos}细胞的扩增和/或抑制NKG2A^{pos}细胞的扩增的细胞。在一些实施方案中,饲养细胞是表达HLA-E或含有HLA-A2信号序列的杂合HLA-E或者用其转染的细胞。例如,这样的杂合体的例子是含有MHC I类(如HLA-A2)启动子和信号序列和HLA-E成熟蛋白质序列的AEH杂合基因,其在一些情形中可以产生与由HLA-E基因编码的蛋白质相同但可以在细胞表面上稳定表达的成熟蛋白质(参见例如, Lee等人(1998) Journal of Immunology, 160:4951-4960)。在一些实施方案中,所述细胞是LCL 721.221、K562细胞或RMA-S细胞,其被转染以表达在MHC I类(如HLA-A2)前导序列的存在下稳定化的MHC-E分子。被工程化以表达在MHC I类(如HLA-A2)前导序列肽的存在下稳定化的细胞表面HLA-E的细胞系是本领域中已知的(Lee等人(1998) Journal of Immunology, 160:4951-4960; Zhongguo等人(2005) 13:464-467; Garcia等人(2002) Eur J. Immunol., 32:936-944)。在一些实施方案中,221.AEH细胞(如辐照的221.AEH细胞)可以用作饲养细胞,或者任何其他表达HLA-E的细胞系或原本为HLA阴性的辐照的表达HLA-E的细胞系(如K562)。在一些实施方案中,所述细胞系可以被转染以表达HLA-E。在一些实施方案中,表达膜结合IL-15(K562-mb15)或膜结合IL-21(K562-mb21)的K562细胞可以用作饲养细胞。用于本文提供的方法中的这样的细胞系的例子是221-AEH细胞。

[0243] 在实施方案中,将表达HLA的饲养细胞低温保存并在使用前解冻。在一些实施方案中,如果已经转染细胞以表达HLA-E(如221.AEH细胞),则在将其用于所述方法中之前可以使所述细胞在适当营养素(例如包括血清或其他适当的血清替代物)以及选择剂的存在下生长。例如,在221.AEH细胞的情形中,可以将所述细胞在补充有潮霉素B(例如0.1%至10%,如为或约1%)的细胞培养基中培养,以维持对所述细胞的选择压力,以维持高水平的质粒HLA-E。可以将所述细胞维持在 1×10^5 个细胞/mL至 1×10^6 个细胞/mL的密度直至使用。

[0244] 在特定实施方案中,添加至培养的表达HLA-E的饲养细胞(例如221.AEH细胞)是非分裂的,如通过X射线辐照或 γ 辐照。表达HLA-E的饲养细胞(例如221.AEH)可以在将其用于所提供的方法中当天或紧接在之前进行辐照。在一些实施方案中,将表达HLA-E的饲养细胞用范围为约1000至10000拉德(如1000-5000拉德)的 γ 射线辐照,以防止细胞分裂。在一些实施方案中,将表达HLA-E的饲养细胞用范围为约10Gy至100Gy(如10-50Gy)的 γ 射线辐照,以防止细胞分裂。在一些实施方案中,以100Gy辐照所述细胞。在其他实施方案中,辐照通过

x射线辐照来进行。在一些实施方案中,将表达HLA-E的饲养细胞用范围为约10Gy至100Gy(如10-50Gy)的x射线辐照,以防止细胞分裂。在一些实施方案中,可以使用A Rad-Sure™血液辐照指示器来提供辐照的正面视觉验证。在所提供方法的方面,从未去除饲养细胞;由于辐照,NK细胞将对饲养细胞具有直接细胞毒性,并且饲养细胞将在培养期间死亡。

[0245] 在一些实施方案中,将富集、选择和/或分离的NK细胞在表达HLA-E的饲养细胞(例如221.AEH细胞)(如其辐照群体)的存在下进行孵育或培养,饲养细胞与富集的NK细胞的比率为大于或约1:10HLA-E饲养细胞(例如221.AEH细胞)(如其辐照群体)与富集的NK细胞,如为或约1:10与为或约10:1的这样的饲养细胞与富集的NK细胞。

[0246] 在一些实施方案中,表达HLA-E的饲养细胞(例如221.AEH细胞)(如其辐照群体)的比率为如下的这样的饲养细胞与富集的NK细胞的比率:在为或约1:10与为或约10:1之间、在为或约1:10与为或约5:1之间、在为或约1:10与为或约2.5:1之间、在为或约1:10与为或约1:1之间、在为或约1:10与为或约1:2.5之间、在为或约1:10与为或约1:5之间、在为或约1:5与为或约10:1之间、在为或约1:5与为或约5:1之间、在为或约1:5与为或约2.5:1之间、在为或约1:5与为或约1:1之间、在为或约1:5与为或约1:2.5之间、在为或约1:2.5与为或约10:1之间、在为或约1:2.5与为或约5:1之间、在为或约1:2.5与为或约2.5:1之间、在为或约1:2.5与为或约1:1之间、在为或约1:1与为或约10:1之间、在为或约1:1与为或约5:1之间、在为或约1:1与为或约3:1之间、在为或约1:1与为或约2.5:1之间、在为或约2.5:1与为或约10:1之间、在为或约2.5:1与为或约5:1之间或者在为或约5:1与为或约10:1之间,每个都包含端值。

[0247] 在一些实施方案中,表达HLA的饲养细胞(例如221.AEH细胞)(如其辐照群体)的比率为如下的这样的饲养细胞与富集的NK细胞的比率:为或约1.25:1、1.5:1、1.75:1、2.0:1、2.25:1、2.5:1、2.75:1、3.0:1、3.25:1、3.5:1、3.75:1、4.0:1、4.25:1、4.5:1、4.75:1或5:1,或者前述任一项之间的任何值。在一些实施方案中,表达HLA的饲养细胞(例如221.AEH细胞)(如其辐照群体)的比率是小于或小于约5:1的这样的饲养细胞与富集的细胞的比率。在一些实施方案中,表达HLA的饲养细胞(例如221.AEH细胞)(如其辐照群体)的比率是在为或约1:1与2.5:1之间的比率,包含端值。在一些实施方案中,表达HLA的饲养细胞(例如221.AEH细胞)(如其辐照群体)的比率是为或约2.5:1的比率。在一些实施方案中,表达HLA的饲养细胞(例如221.AEH细胞)(如其辐照群体)的比率是为或约2:1的比率。

[0248] 在一些情形中,如果起始NK细胞群体已经在扩增前被低温保存(即,经历冷冻/解冻),则可以采用比使用新鲜NK细胞的方法更低的221.AEH与NK细胞的比率。此处发现,1:1的221.AEH与冷冻/解冻的NK细胞的比率导致与含有2.5:1的221.AEH与新鲜NK细胞的比率的培养中相当的扩增。在一些方面,较低比率确保培养中较高的NK细胞数量,以允许更多的细胞间接触,这可以在促进初始生长和扩增方面起作用。在一些实施方案中,如果已经使来自样品的NK细胞的初始富集群体经历冷冻/解冻,则使用为或约2:1至1:2的221.AEH与冷冻/解冻的NK细胞的比率。在特定实施方案中,所述比率为1:1。应理解,可以使用221.AEH与冷冻/解冻的NK细胞的较高比率(如2.5:1),但是这可能需要更长培养,例如为或约21天,才能达到所需的阈值密度或数量。

[0249] 在一些实施方案中,通过向培养进一步添加非分裂外周血单个核细胞(PBMC)来扩增NK细胞。在一些方面,所述非分裂饲养细胞可以包含X射线辐照的PBMC饲养细胞。在一些

方面,所述非分裂饲养细胞可以包含 γ 辐照的PBMC饲养细胞。在一些实施方案中,将PBMC用范围为约1000至10000拉德(如1000-5000拉德)的 γ 射线辐照,以防止细胞分裂。在一些实施方案中,将PBMC用范围为约10Gy至100Gy(如10-50Gy)的 γ 射线辐照,以防止细胞分裂。在一些方面,在至少一部分孵育期间,辐照的饲养细胞与非分裂(例如辐照的)表达HLA-E的饲养细胞同时存在于培养基中。在一些方面,将非分裂(例如辐照的)PBMC饲养细胞、表达HLA-E的饲养细胞和富集的NK细胞在同一天添加至培养,如在孵育开始当天,例如在或约或接近同一时间添加。

[0250] 在一些实施方案中,在作为饲养细胞的辐照的PBMC的存在下进一步进行孵育或培养。在一些实施方案中,所述辐照的PBMC饲养细胞对于分离或选择出富集的NK细胞的受试者是自体的,或者来自同一受试者。在特定实施方案中,所述PBMC是从用于富集NK细胞的相同生物样品(例如全血或白细胞单采术或单采术产物)获得的。一旦获得,在如上所述富集NK细胞之前,保留所述PBMC的一部分用于辐照。

[0251] 在一些实施方案中,辐照的PBMC是作为饲养细胞存在,这样的饲养细胞与富集的NK细胞的比率是为或约1:10至为或约10:1、为或约1:10至为或约5:1、为或约1:10至为或约2.5:1、为或约1:10至为或约1:1、为或约1:10至为或约1:2.5、为或约1:10至为或约1:5、为或约1:5至为或约10:1、为或约1:5至为或约5:1、为或约1:5至为或约2.5:1、为或约1:5至为或约1:1、为或约1:5至为或约1:2.5、为或约1:2.5至为或约10:1、为或约1:2.5至为或约5:1、为或约1:2.5至为或约2.5:1、为或约1:2.5至为或约1:1、为或约1:1至为或约10:1、为或约1:1至为或约5:1、为或约1:1至为或约2.5:1、为或约2.5:1至为或约10:1、为或约2.5:1至为或约5:1或者为或约5:1至为或约10:1。

[0252] 在一些实施方案中,辐照的PBMC是作为饲养细胞存在,这样的饲养细胞与富集的NK细胞的比率是在为或约1:1与为或约5:1之间,如为或约1.25:1、1.5:1、1.75:1、2.0:1、2.25:1、2.5:1、2.75:1、3.0:1、3.25:1、3.5:1、3.75:1、4.0:1、4.25:1、4.5:1、4.75:1或5:1,或者前述任一项之间的任何值。在一些实施方案中,辐照的PBMC是以为或为约5:1的这样的饲养细胞与富集的细胞的比率存在。

[0253] 在特定实施方案中,在至少一部分孵育或培养期间,辐照的PBMC的一种或多种细胞或细胞类型(如T细胞)被激活,和/或所述孵育或培养是在至少一种刺激剂的存在下进行,所述刺激剂能够刺激所述PBMC饲养细胞中一种或多种T细胞的激活。在一些实施方案中,至少一种刺激剂与TCR复合物的成员特异性结合。在一些实施方案中,至少一种刺激剂与CD3、任选地CD3 ϵ 特异性结合。在一些方面,至少一种刺激剂是抗CD3抗体或抗原结合片段。示例性抗CD3抗体包括小鼠抗人CD3(OKT3)。

[0254] 在一些实施方案中,所述抗CD3抗体或抗原结合片段在包括辐照的PBMC饲养细胞的孵育的至少一部分期间存在。在一些实施方案中,在与辐照的PBMC为或约相同的时间将所述抗CD3抗体或抗原结合片段添加至培养或孵育。例如,所述抗CD3抗体或抗原结合片段是在为或约孵育或培养开始时添加。在特定方面,可以在培养或孵育的过程期间去除所述抗CD3抗体或抗原结合片段,或者降低其浓度,如通过更换或洗除培养基。在特定实施方案中,在更换或洗涤后,所述方法不包括加回或补充具有抗CD3抗体或抗原结合片段的培养基。

[0255] 在一些实施方案中,所述抗CD3抗体或抗原结合片段以如下浓度添加,或者在培养

或孵育的至少一部分期间存在:在为或约10ng/mL与为或约5 μ g/mL之间,如在为或约10ng/mL与为或约2 μ g/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约1 μ g/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约5 μ g/mL之间,如在为或约50ng/mL与为或约2 μ g/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约1 μ g/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约5 μ g/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约2 μ g/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约1 μ g/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约500ng/mL与为或约5 μ g/mL之间、在为或约500ng/mL与为或约2 μ g/mL之间、在为或约500ng/mL与为或约1 μ g/mL之间、在为或约1 μ g/mL与为或约5 μ g/mL之间、在为或约1 μ g/mL与为或约2 μ g/mL之间或者在为或约2 μ g/mL与为或约5 μ g/mL之间,每个都包含端值。在一些实施方案中,所述抗CD3抗体或抗原结合片段的浓度是为或约10ng/mL、20ng/mL、30ng/mL、40ng/mL、50ng/mL、60ng/mL、70ng/mL、80ng/mL、90ng/mL或100ng/mL,或者前述任一项之间的任何值。在一些实施方案中,所述抗CD3抗体或抗原结合片段的浓度为为或约50ng/mL。

[0256] 在一些实施方案中,术语“抗体”是指免疫球蛋白分子以及免疫球蛋白(Ig)分子的抗原结合部分或片段,所述分子即含有特异性结合抗原(与其发生免疫反应)的抗原结合位点的分子。术语抗体不仅涵盖完整多克隆或单克隆抗体,还涵盖其片段,如dAb、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、单链(scFv)或单结构域抗体(sdAb)。通常,“抗原结合片段”含有免疫球蛋白重链和/或轻链的至少一个CDR,其与目的抗原的至少一个表位结合。就此而言,抗原结合片段可以包含来自结合抗原的抗体的可变重链(VH)和可变轻链(VL)序列的1、2、3、4、5或所有6个CDR,如对于含有VH和VL的抗体通常为六个CDR(对于重链和轻链中的每一个,“CDR1”、“CDR2”和“CDR3”),或者对于含有单一可变结构域的抗体为三个CDR。

[0257] “抗体片段”是指不同于完整抗体的分子,其包含完整抗体的结合完整抗体所结合的抗原的一部分。抗体片段的例子包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双抗体;线性抗体;可变重链(V_H)区、单链抗体分子(如scFv)和单结构域V_H单一抗体;以及由抗体片段形成的多特异性抗体。在特定实施方案中,抗体是包含可变重链区和/或可变轻链区的单链抗体片段,如scFv。

[0258] 在一些实施方案中,所述孵育或培养在这样的富集的NK细胞(如选择的和/或分离的NK细胞)的存在下开始,所述细胞的浓度是为或约或者至少或至少约0.05x10⁶个富集的NK细胞/mL、为或约0.1x10⁶个富集的NK细胞/mL、为或约0.2x10⁶个富集的NK细胞/mL、为或约0.5x10⁶个富集的NK细胞/mL或者为或约1.0x10⁶个富集的NK细胞/mL。在所提供的方法的实施方案中,所述孵育或培养在这样的富集的NK细胞(如选择的和/或分离的NK细胞)的存在下开始,所述细胞的浓度是在为或约0.05x10⁶个富集的NK细胞/mL与为或约1.0x10⁶个富集的NK细胞/mL之间,如在为或约0.05x10⁶个富集的NK细胞/mL与为或约0.75x10⁶之间、在为或约0.05x10⁶个富集的NK细胞/mL与为或约0.5x10⁶之间、在为或约0.05x10⁶个富集的NK细胞/mL与为或约0.2x10⁶个富集的NK细胞/mL之间、在为或约0.05x10⁶个富集的NK细胞/mL与为或约0.1x10⁶个富集的NK细胞/mL之间、在为或约0.1x10⁶个富集的NK细胞/mL与为或约1.0x10⁶个富集的NK细胞/mL之间、在为或约0.1x10⁶个富集的NK细胞/mL与为或约0.75x10⁶之间、在为或约0.1x10⁶个富集的NK细胞/mL与为或约0.5x10⁶之间、在为或约0.1x10⁶个富集

的NK细胞/mL与为或约 0.20×10^6 个富集的NK细胞/mL之间、在为或约 0.20×10^6 个富集的NK细胞/mL与为或约 1.0×10^6 个富集的NK细胞/mL之间、在为或约 0.20×10^6 个富集的NK细胞/mL与为或约 0.75×10^6 之间、在为或约 0.20×10^6 个富集的NK细胞/mL与为或约 0.5×10^6 之间、在为或约 0.5×10^6 个富集的NK细胞/mL与为或约 1.0×10^6 个富集的NK细胞/mL之间、在为或约 0.5×10^6 个富集的NK细胞/mL与为或约 0.75×10^6 之间、在为或约 0.75×10^6 个富集的NK细胞/mL与为或约 1.0×10^6 个富集的NK细胞/mL之间,每个都包含端值。在一些实施方案中,所述孵育或培养在这样的富集的NK细胞(如选择的和/或分离的NK细胞)的存在下开始,所述细胞的浓度是为或约 0.2×10^6 个富集的NK细胞/mL。

[0259] 在一些任何这样的实施方案中,在所述孵育或培养开始时添加或存在的富集的NK细胞(例如如上所述从PBMC选择或分离)的量至少或至少约 1×10^5 个细胞、至少或至少约 2×10^5 个细胞、至少或至少约 3×10^5 个细胞、至少或至少约 4×10^5 个细胞、至少或至少约 5×10^5 个细胞、至少或至少约 6×10^5 个细胞、至少或至少约 7×10^5 个细胞、至少或至少约 8×10^5 个细胞、至少或至少约 9×10^5 个细胞、至少或至少约 1×10^6 个细胞或更多。在特定实施方案中,富集的NK细胞(例如如上所述从PBMC选择或分离)的量至少或约至少或者为或为约 1×10^6 个细胞。

[0260] 在一些实施方案中,富集的NK细胞的所述群体包含至少或至少约 2.0×10^6 个富集的NK细胞、至少或至少约 3.0×10^6 个富集的NK细胞、至少或至少约 4.0×10^6 个富集的NK细胞、至少或至少约 5.0×10^6 个富集的NK细胞、至少或至少约 6.0×10^6 个富集的NK细胞、至少或至少约 7.0×10^6 个富集的NK细胞、至少或至少约 8.0×10^6 个富集的NK细胞、至少或至少约 9.0×10^6 个富集的NK细胞、至少或至少约 1.0×10^7 个富集的NK细胞、至少或至少约 5.0×10^7 个富集的NK细胞、至少或至少约 1.0×10^8 个富集的NK细胞、至少或至少约 5.0×10^8 个富集的NK细胞或者至少或至少约 1.0×10^9 个富集的NK细胞。在一些实施方案中,富集的NK细胞的所述群体包含至少或至少约 2.0×10^5 个富集的NK细胞。在一些实施方案中,富集的NK细胞的所述群体包含至少或至少约 1.0×10^6 个富集的NK细胞。在一些实施方案中,富集的NK细胞的所述群体包含至少或至少约 1.0×10^7 个富集的NK细胞。

[0261] 在一些实施方案中,富集的NK细胞的所述群体包含在为或约 2.0×10^5 个富集的NK细胞与为或约 1.0×10^9 个富集的NK细胞之间、在为或约 2.0×10^5 个富集的NK细胞与为或约 5.0×10^8 个富集的NK细胞之间、在为或约 2.0×10^5 个富集的NK细胞与为或约 1.0×10^8 个富集的NK细胞之间、在为或约 2.0×10^5 个富集的NK细胞与为或约 5.0×10^7 个富集的NK细胞之间、在为或约 2.0×10^5 个富集的NK细胞与为或约 1.0×10^7 个富集的NK细胞之间、在为或约 2.0×10^5 个富集的NK细胞与为或约 5.0×10^6 个富集的NK细胞之间、在为或约 2.0×10^5 个富集的NK细胞与为或约 1.0×10^6 个富集的NK细胞之间、在为或约 1.0×10^6 个富集的NK细胞与为或约 1.0×10^9 个富集的NK细胞之间、在为或约 1.0×10^6 个富集的NK细胞与为或约 5.0×10^8 个富集的NK细胞之间、在为或约 1.0×10^6 个富集的NK细胞与为或约 1.0×10^8 个富集的NK细胞之间、在为或约 1.0×10^6 个富集的NK细胞与为或约 5.0×10^7 个富集的NK细胞之间、在为或约 1.0×10^6 个富集的NK细胞与为或约 5.0×10^6 个富集的NK细胞之间、在为或约 5.0×10^6 个富集的NK细胞与为或约 1.0×10^9 个富集的NK细胞之间、在为或约 5.0×10^6 个富集的NK细胞与为或约 5.0×10^8 个富集的NK细胞之间、在为或约 5.0×10^6 个富集的NK细胞与为或约 1.0×10^8 个富集的NK细胞之间、在为或约 5.0×10^6 个富集的

NK细胞与为或约 5.0×10^7 个富集的NK细胞之间、在为或约 5.0×10^6 个富集的NK细胞与为或约 1.0×10^7 个富集的NK细胞之间、在为或约 1.0×10^7 个富集的NK细胞与为或约 1.0×10^9 个富集的NK细胞之间、在为或约 1.0×10^7 个富集的NK细胞与为或约 5.0×10^8 个富集的NK细胞之间、在为或约 1.0×10^7 个富集的NK细胞与为或约 1.0×10^8 个富集的NK细胞之间、在为或约 1.0×10^7 个富集的NK细胞与为或约 5.0×10^7 个富集的NK细胞之间、在为或约 5.0×10^7 个富集的NK细胞与为或约 5.0×10^8 个富集的NK细胞之间、在为或约 5.0×10^7 个富集的NK细胞与为或约 1.0×10^8 个富集的NK细胞之间、在为或约 1.0×10^8 个富集的NK细胞与为或约 1.0×10^9 个富集的NK细胞之间、在为或约 1.0×10^8 个富集的NK细胞与为或约 5.0×10^8 个富集的NK细胞之间或者在为或约 5.0×10^8 个富集的NK细胞与为或约 1.0×10^9 个富集的NK细胞之间。在一些实施方案中,富集的NK细胞的所述群体包含在为或约 2.0×10^5 个富集的NK细胞与为或约 5.0×10^7 个富集的NK细胞之间。在一些实施方案中,富集的NK细胞的所述群体包含在为或约 1.0×10^6 个富集的NK细胞与为或约 1.0×10^8 个富集的NK细胞之间。在一些实施方案中,富集的NK细胞的所述群体包含在为或约 1.0×10^7 个富集的NK细胞与为或约 5.0×10^8 个富集的NK细胞之间。在一些实施方案中,富集的NK细胞的所述群体包含在为或约 1.0×10^7 个富集的NK细胞与为或约 1.0×10^9 个富集的NK细胞之间。

[0262] 在一些实施方案中,富集的NK细胞的所述群体中g-NK细胞的百分比是在为或约20%与为或约90%之间、在为或约20%与为或约80%之间、在为或约20%与为或约70%之间、在为或约20%与为或约60%之间、在为或约20%与为或约50%之间、在为或约20%与为或约40%之间、在为或约20%与为或约30%之间、在为或约30%与为或约90%之间、在为或约30%与为或约80%之间、在为或约30%与为或约70%之间、在为或约30%与为或约60%之间、在为或约30%与为或约50%之间、在为或约30%与为或约40%之间、在为或约40%与为或约90%之间、在为或约40%与为或约80%之间、在为或约40%与为或约70%之间、在为或约40%与为或约60%之间、在为或约40%与为或约50%之间、在为或约50%与为或约90%之间、在为或约50%与为或约80%之间、在为或约50%与为或约70%之间、在为或约50%与为或约60%之间、在为或约60%与为或约90%之间、在为或约60%与为或约80%之间、在为或约60%与为或约70%之间、在为或约70%与为或约90%之间、在为或约70%与为或约80%之间或者在为或约80%与为或约90%之间。在一些实施方案中,富集的NK细胞的所述群体中g-NK细胞的百分比是在为或约20%与为或约90%之间。在一些实施方案中,富集的NK细胞的所述群体中g-NK细胞的百分比是在为或约40%与为或约90%之间。在一些实施方案中,富集的NK细胞的所述群体中g-NK细胞的百分比是在为或约60%与为或约90%之间。

[0263] 在这些实施方案的一些中,可以将NK细胞与生长因子一起培养。根据一些实施方案,至少一种生长因子包括选自以下的生长因子:SCF、GSK3i、FLT3、IL-2、IL-6、IL-7、IL-15、IL-12、IL-18和IL-21。根据一些实施方案,至少一种生长因子是IL-2或IL-7和IL-15。根据一些实施方案,至少一种生长因子是IL-2、IL-21或IL-7和IL-15。在一些实施方案中,生长因子是重组细胞因子,如重组IL-2、重组IL-7、重组IL-21或重组IL-15。

[0264] 在一些实施方案中,在一种或多种重组细胞因子的存在下培养NK细胞。在一些实施方案中,所述一种或多种重组细胞因子包括以下中的任一种:SCF、GSK3i、FLT3、IL-2、IL-6、IL-7、IL-15、IL-12、IL-18、IL-21、IL-27或其组合。在一些实施方案中,所述一种或多种

重组细胞因子包括以下中的任一种:IL-2、IL-7、IL-15、IL-12、IL-18、IL-21、IL-27或其组合。在一些实施方案中,所述一种或多种重组细胞因子中的至少一种是IL-21。在一些实施方案中,所述一种或多种重组细胞因子还包括IL-2、IL-7、IL-15、IL-12、IL-18或IL-27或其组合。在一些实施方案中,所述一种或多种重组细胞因子中的至少一种是IL-2。在一些实施方案中,所述一种或多种重组细胞因子是至少IL-2和IL-21。在一些实施方案中,所述一种或多种重组细胞因子是IL-21和IL-2。在一些实施方案中,所述一种或多种重组细胞因子是IL-21、IL-2和IL-15。在一些实施方案中,所述一种或多种重组细胞因子是IL-21、IL-12、IL-15和IL-18。在一些实施方案中,所述一种或多种重组细胞因子是IL-21、IL-2、IL-12、IL-15和IL-18。在一些实施方案中,所述一种或多种重组细胞因子是IL-21、IL-15、IL-18和IL-27。在一些实施方案中,所述一种或多种重组细胞因子是IL-21、IL-2、IL-15、IL-18和IL-27。在一些实施方案中,所述一种或多种重组细胞因子是IL-2和IL-15。

[0265] 在特定实施方案中,所提供的方法包括在重组IL-2的存在下孵育或培养富集的NK细胞和饲养细胞。在一些实施方案中,在所述孵育的至少一部分期间,例如在所述培养开始时以及任选地在所述培养期间一次或多次添加,重组IL-2以如下浓度存在:在为或约1IU/mL与为或约500IU/mL之间,如在为或约1IU/mL与为或约250IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约50IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约250IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约250IU/mL之间或者在为或约250IU/mL与为或约500IU/mL之间,每个都包含端值。在一些实施方案中,在所述孵育的至少一部分期间,例如在所述培养开始时以及任选地在所述培养期间一次或多次添加,IL-2的浓度是为或约50IU/mL、60IU/mL、70IU/mL、80IU/mL、90IU/mL、100IU/mL、125IU/mL、150IU/mL、200IU/mL,或者前述任一项之间的任何值。在特定实施方案中,在所述培养开始时以及任选地在所述培养期间一次或多次添加的重组IL-2的浓度为为或约100IU/mL。在特定实施方案中,在所述培养开始时以及任选地在所述培养期间一次或多次添加的重组IL-2的浓度为为或约500IU/mL。

[0266] 在特定实施方案中,所提供的方法包括在重组IL-21的存在下孵育或培养富集的NK细胞和饲养细胞。在一些实施方案中,在所述孵育的至少一部分期间,例如在所述培养开始时以及任选地在所述培养期间一次或多次添加,重组IL-21以如下浓度存在:在为或约1IU/mL与为或约500IU/mL之间,如在为或约1IU/mL与为或约250IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约50IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约250IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约250IU/mL之间或者在为或约250IU/mL与为或约500IU/mL之间,每个都包含端值。在一些实施方案中,在所述孵育的至少一部分期间,例如在所述培养开始时以及任选地在所述培养期间一次或多次添加,IL-21的浓度是为或约50IU/mL、60IU/mL、70IU/mL、80IU/mL、90IU/mL、100IU/mL、125IU/mL、150IU/mL、200IU/mL,或者前述任一项之间的任何值。在特定实施方案中,在所述培养开始时以及任选地在所述培养期间一次或多次添加的重组IL-21的浓度为为或约100IU/mL。

[0267] 在特定实施方案中,所提供的方法包括在重组IL-21的存在下孵育或培养富集的

NK细胞和饲养细胞。在特定实施方案中,在所述培养的至少一部分期间,例如在所述培养开始时以及任选地在所述培养期间一次或多次添加的重组IL-21的浓度是在约10ng/mL与约100ng/mL之间、在约10ng/mL与约90ng/mL之间、在约10ng/mL与约80ng/mL之间、在约10ng/mL与约70ng/mL之间、在约10ng/mL与约60ng/mL之间、在约10ng/mL与约50ng/mL之间、在约10ng/mL与约40ng/mL之间、在约10ng/mL与约30ng/mL之间、在约10ng/mL与约20ng/mL之间、在约20ng/mL与约100ng/mL之间、在约20ng/mL与约90ng/mL之间、在约20ng/mL与约80ng/mL之间、在约20ng/mL与约70ng/mL之间、在约20ng/mL与约60ng/mL之间、在约20ng/mL与约50ng/mL之间、在约20ng/mL与约40ng/mL之间、在约20ng/mL与约30ng/mL之间、在约30ng/mL与约100ng/mL之间、在约30ng/mL与约90ng/mL之间、在约30ng/mL与约80ng/mL之间、在约30ng/mL与约70ng/mL之间、在约30ng/mL与约60ng/mL之间、在约30ng/mL与约50ng/mL之间、在约30ng/mL与约40ng/mL之间、在约40ng/mL与约100ng/mL之间、在约40ng/mL与约90ng/mL之间、在约40ng/mL与约80ng/mL之间、在约40ng/mL与约70ng/mL之间、在约40ng/mL与约60ng/mL之间、在约40ng/mL与约50ng/mL之间、在约50ng/mL与约100ng/mL之间、在约50ng/mL与约90ng/mL之间、在约50ng/mL与约80ng/mL之间、在约50ng/mL与约70ng/mL之间、在约50ng/mL与约60ng/mL之间、在约60ng/mL与约100ng/mL之间、在约60ng/mL与约90ng/mL之间、在约60ng/mL与约80ng/mL之间、在约60ng/mL与约70ng/mL之间、在约70ng/mL与约100ng/mL之间、在约70ng/mL与约90ng/mL之间、在约70ng/mL与约80ng/mL之间、在约80ng/mL与约100ng/mL之间、在约80ng/mL与约90ng/mL之间或者在约90ng/mL与约100ng/mL之间,包含端值。在特定实施方案中,在所述培养的至少一部分期间,例如在所述培养开始时以及任选地在所述培养期间一次或多次添加的重组IL-21的浓度是在约10ng/mL与约100ng/mL之间,包含端值。在特定实施方案中,在所述培养的至少一部分期间,例如在所述培养开始时以及任选地在所述培养期间一次或多次添加的重组IL-21的浓度是为或约25ng/mL。

[0268] 在特定实施方案中,在所述培养的至少一部分期间,例如在所述培养开始时以及任选地在所述培养期间一次或多次添加的重组IL-15的浓度是在约1ng/mL与约50ng/mL之间、在约1ng/mL与约40ng/mL之间、在约1ng/mL与约30ng/mL之间、在约1ng/mL与约20ng/mL之间、在约1ng/mL与约10ng/mL之间、在约1ng/mL与约5ng/mL之间、在约5ng/mL与约50ng/mL之间、在约5ng/mL与约40ng/mL之间、在约5ng/mL与约30ng/mL之间、在约5ng/mL与约20ng/mL之间、在约5ng/mL与约10ng/mL之间、在约10ng/mL与约50ng/mL之间、在约10ng/mL与约40ng/mL之间、在约10ng/mL与约30ng/mL之间、在约10ng/mL与约20ng/mL之间、在约20ng/mL与约50ng/mL之间、在约20ng/mL与约40ng/mL之间、在约20ng/mL与约30ng/mL之间、在约30ng/mL与约50ng/mL之间、在约30ng/mL与约40ng/mL之间或者在约40ng/mL与约50ng/mL之间。在特定实施方案中,在所述培养的至少一部分期间,例如在所述培养开始时以及任选地在所述培养期间一次或多次添加的重组IL-15的浓度是在约1ng/mL与约50ng/mL之间。在特定实施方案中,在所述培养的至少一部分期间,例如在所述培养开始时以及任选地在所述培养期间一次或多次添加的重组IL-15的浓度是为或约10ng/mL。

[0269] 在特定实施方案中,所述方法包括在IL-2、IL-15和IL-21的存在下培养。在所提供的方法的实施方案中,例如在所述培养开始时以及任选地在所述培养期间一次或多次添加至所述培养的重组细胞因子的浓度是在为或约50IU/mL与为或约500IU/mL IL-2之间,如为或约100IU/mL或500IU/mL IL-2;在为或约1ng/mL与50ng/mL之间的IL-15,如为或约10ng/

mL;以及在为或约10ng/mL与为或约100ng/mL之间的IL-21,如为或约25ng/mL。在特定实施方案中,在所述培养的至少一部分期间添加500IU/mL的IL-2、10ng/mL的IL-15和25ng/mL的IL-21,如在所述培养开始时以及任选地在所述培养期间一次或多次添加。在特定实施方案中,在所述培养的至少一部分期间添加100IU/mL的IL-2、10ng/mL的IL-15和25ng/mL的IL-21,如在所述培养开始时以及任选地在所述培养期间一次或多次添加。

[0270] 在一些实施方案中,所提供的方法包括在重组IL-21的存在下孵育或培养富集的NK细胞和饲养细胞,并且所述重组IL-21是作为与抗IL-21抗体的复合物来添加。在一些实施方案中,在所述培养之前,使抗IL-21抗体与重组IL-21接触,从而形成IL-21/抗IL-21复合物,并且将所述IL-21/抗IL-21复合物添加至所述培养基。在一些实施方案中,使重组IL-21与抗IL-21抗体接触以形成IL-21/抗IL-21复合物是在包括适合于形成所述复合物的温度和时间条件下进行。在一些实施方案中,所述培养在 $37^{\circ}\text{C} \pm 2$ 下进行30分钟。

[0271] 在一些实施方案中,以如下浓度添加抗IL-21抗体:在为或约100ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约400ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约300ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约200ng/mL之间、在为或约200ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约200ng/mL与为或约400ng/mL之间、在为或约200ng/mL与为或约300ng/mL之间、在为或约300ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约300ng/mL与为或约400ng/mL之间或者在为或约400ng/mL与为或约500ng/mL之间。在一些实施方案中,以在为或约100ng/mL与为或约500ng/mL之间的浓度添加抗IL-21抗体。在一些实施方案中,以250ng/mL的浓度添加抗IL-21抗体。

[0272] 在特定实施方案中,用于与抗IL-21抗体形成复合物的重组IL-21的浓度是在约10ng/mL与约100ng/mL之间、在约10ng/mL与约90ng/mL之间、在约10ng/mL与约80ng/mL之间、在约10ng/mL与约70ng/mL之间、在约10ng/mL与约60ng/mL之间、在约10ng/mL与约50ng/mL之间、在约10ng/mL与约40ng/mL之间、在约10ng/mL与约30ng/mL之间、在约10ng/mL与约20ng/mL之间、在约20ng/mL与约100ng/mL之间、在约20ng/mL与约90ng/mL之间、在约20ng/mL与约80ng/mL之间、在约20ng/mL与约70ng/mL之间、在约20ng/mL与约60ng/mL之间、在约20ng/mL与约50ng/mL之间、在约20ng/mL与约40ng/mL之间、在约20ng/mL与约30ng/mL之间、在约30ng/mL与约100ng/mL之间、在约30ng/mL与约90ng/mL之间、在约30ng/mL与约80ng/mL之间、在约30ng/mL与约70ng/mL之间、在约30ng/mL与约60ng/mL之间、在约30ng/mL与约50ng/mL之间、在约30ng/mL与约40ng/mL之间、在约40ng/mL与约100ng/mL之间、在约40ng/mL与约90ng/mL之间、在约40ng/mL与约80ng/mL之间、在约40ng/mL与约70ng/mL之间、在约40ng/mL与约60ng/mL之间、在约40ng/mL与约50ng/mL之间、在约50ng/mL与约100ng/mL之间、在约50ng/mL与约90ng/mL之间、在约50ng/mL与约80ng/mL之间、在约50ng/mL与约70ng/mL之间、在约50ng/mL与约60ng/mL之间、在约60ng/mL与约100ng/mL之间、在约60ng/mL与约90ng/mL之间、在约60ng/mL与约80ng/mL之间、在约60ng/mL与约70ng/mL之间、在约70ng/mL与约100ng/mL之间、在约70ng/mL与约90ng/mL之间、在约70ng/mL与约80ng/mL之间、在约80ng/mL与约100ng/mL之间、在约80ng/mL与约90ng/mL之间或者在约90ng/mL与约100ng/mL之间,包含端值。在特定实施方案中,用于与抗IL-21抗体形成复合物的重组IL-21的浓度是在约10ng/mL与约100ng/mL之间,包含端值。在特定实施方案中,用于与抗IL-21抗体形成复合物的重组IL-21的浓度为为或约25ng/mL。

[0276] 在一些实施方案中,所述方法包括更换培养基,其在一些方面包括洗涤细胞。例如,在培养或孵育的至少一部分期间,可以间歇地更换或洗除培养基,如每天、每隔一天、每三天或一周一次。在特定实施方案中,在培养开始后为或为约3天至7天内,如在为或约第3天、第4天、第5天、第6天或第7天,开始更换或洗除培养基。在特定实施方案中,在为或约第5天开始更换或洗除培养基。例如,在第5天以及之后每2-3天更换培养基。

[0277] 一旦去除或洗除培养基,补充培养基。在一些实施方案中,补充的培养基包括一种或多种生长因子或细胞因子,例如如上所述的任一种。因此,在一些实施方案中,在孵育或培养期间间歇地添加一种或多种生长因子或细胞因子,如重组IL-2、IL-15和/或IL-21。在一些这样的方面,所述一种或多种生长因子或细胞因子(如重组IL-2、IL-15和/或IL-21)在为或约所述培养或孵育开始时添加,然后在所述培养或孵育期间间歇地添加,如在每次更换或洗除培养基时添加。在一些实施方案中,将一种或多种生长因子或细胞因子(如重组IL-2、IL-15和/或IL-21)添加至所述培养或孵育,在第0天(所述孵育开始)开始添加,并且在每次更换或洗除培养基时,将其进一步添加以用一种或多种生长因子或细胞因子(如重组IL-2、IL-15和/或IL-21)补充所述培养或孵育。在一些实施方案中,所述方法包括在所述孵育开始时(第0天),以及在所述孵育的持续时间中每两或三天在每次洗涤或更换培养基时,例如在所述培养或孵育的为或约第5天、第7天、第9天、第11天和第14天,添加一种或多种生长因子或细胞因子(例如重组IL-2、IL-15和/或IL-21)。

[0278] 在特定实施方案中,所述培养在IL-2、IL-15和IL-21中的至少一种的存在下进行,并且补充培养基以包括IL-2、IL-15和IL-21中的至少一种。在一些实施方案中,所述培养在IL-2和IL-21的存在下进行,并且补充培养基以包括IL-2和IL-21。在一些实施方案中,所述培养在IL-2和IL-15的存在下进行,并且补充培养基以包括IL-2和IL-15。在一些实施方案中,所述培养在IL-15和IL-21的存在下进行,并且补充培养基以包括IL-15和IL-21。在一些实施方案中,所述培养在IL-2、IL-15和IL-21的存在下进行,并且补充培养基以包括IL-2、IL-15和IL-21。在一些实施方案中,可以在NK细胞的扩增中利用一种或多种另外的细胞因子,包括但不限于重组IL-18、重组IL-7和/或重组IL-12。

[0279] 在一些实施方案中,补充的培养基包括一种或多种生长因子或细胞因子,如重组IL-2。因此,在一些实施方案中,在所述孵育或培养期间间歇地添加所述生长因子或细胞因子(如重组IL-2)。在一些这样的方面,所述生长因子或细胞因子(如重组IL-2)在为或约所述培养或孵育开始时添加,然后在所述培养或孵育期间间歇地添加,如在每次更换或洗除培养基时添加。在一些实施方案中,将所述生长因子或细胞因子(如重组IL-2)添加至所述培养或孵育,在第0天(所述孵育开始)开始添加,并且在每次更换或洗除培养基时,将其进一步添加以用所述生长因子或细胞因子(如重组IL-2)补充所述培养或孵育。在一些实施方案中,所述方法包括在所述孵育开始时(第0天),以及在所述孵育的持续时间中每两或三天在每次洗涤或更换培养基时,例如在所述培养或孵育的为或约第5天、第7天、第9天、第11天和第14天,添加重组IL-2。在任何这样的实施方案中,重组IL-2是以如下浓度添加至所述培养或孵育:在为或约1IU/mL与为或约500IU/mL之间,如在为或约1IU/mL与为或约250IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约50IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约250IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约

100IU/mL与为或约250IU/mL之间或者在为或约250IU/mL与为或约500IU/mL之间,每个都包含端值。在一些实施方案中,重组IL-2是以如下浓度添加至所述培养或孵育:为或约50IU/mL、60IU/mL、70IU/mL、80IU/mL、90IU/mL、100IU/mL、125IU/mL、150IU/mL、200IU/mL,或者前述任一项之间的任何值。在特定实施方案中,重组IL-2的浓度为或为约100IU/mL。在特定实施方案中,重组IL-2的浓度为或为约500IU/mL。

[0280] 在一些实施方案中,补充的培养基包括一种或多种生长因子或细胞因子,如重组IL-21。因此,在一些实施方案中,在所述孵育或培养期间间歇地添加所述生长因子或细胞因子(如重组IL-21)。在一些这样的方面,所述生长因子或细胞因子(如重组IL-21)在为或约所述培养或孵育开始时添加,然后在所述培养或孵育期间间歇地添加,如在每次更换或洗除培养基时添加。在一些实施方案中,将所述生长因子或细胞因子(如重组IL-21)添加至所述培养或孵育,在第0天(所述孵育开始)开始添加,并且在每次更换或洗除培养基时,将其进一步添加以用所述生长因子或细胞因子(如重组IL-21)补充所述培养或孵育。在一些实施方案中,所述方法包括在所述孵育开始时(第0天),以及在所述孵育的持续时间中每两或三天在每次洗涤或更换培养基时,例如在所述培养或孵育的为或约第5天、第7天、第9天、第11天和第14天,添加重组IL-21。在任何这样的实施方案中,重组IL-21是以如下浓度添加至所述培养或孵育:在约10ng/mL与约100ng/mL之间、在约10ng/mL与约90ng/mL之间、在约10ng/mL与约80ng/mL之间、在约10ng/mL与约70ng/mL之间、在约10ng/mL与约60ng/mL之间、在约10ng/mL与约50ng/mL之间、在约10ng/mL与约40ng/mL之间、在约10ng/mL与约30ng/mL之间、在约10ng/mL与约20ng/mL之间、在约20ng/mL与约100ng/mL之间、在约20ng/mL与约90ng/mL之间、在约20ng/mL与约80ng/mL之间、在约20ng/mL与约70ng/mL之间、在约20ng/mL与约60ng/mL之间、在约20ng/mL与约50ng/mL之间、在约20ng/mL与约40ng/mL之间、在约20ng/mL与约30ng/mL之间、在约30ng/mL与约100ng/mL之间、在约30ng/mL与约90ng/mL之间、在约30ng/mL与约80ng/mL之间、在约30ng/mL与约70ng/mL之间、在约30ng/mL与约60ng/mL之间、在约30ng/mL与约50ng/mL之间、在约30ng/mL与约40ng/mL之间、在约40ng/mL与约100ng/mL之间、在约40ng/mL与约90ng/mL之间、在约40ng/mL与约80ng/mL之间、在约40ng/mL与约70ng/mL之间、在约40ng/mL与约60ng/mL之间、在约40ng/mL与约50ng/mL之间、在约50ng/mL与约100ng/mL之间、在约50ng/mL与约90ng/mL之间、在约50ng/mL与约80ng/mL之间、在约50ng/mL与约70ng/mL之间、在约50ng/mL与约60ng/mL之间、在约60ng/mL与约100ng/mL之间、在约60ng/mL与约90ng/mL之间、在约60ng/mL与约80ng/mL之间、在约60ng/mL与约70ng/mL之间、在约70ng/mL与约100ng/mL之间、在约70ng/mL与约90ng/mL之间、在约70ng/mL与约80ng/mL之间、在约80ng/mL与约100ng/mL之间、在约80ng/mL与约90ng/mL之间或者在约90ng/mL与约100ng/mL之间,包含端值。在特定实施方案中,重组IL-21是以如下浓度添加至所述培养或孵育:在约10ng/mL与约100ng/mL之间,包含端值。重组IL-21是以为或约25ng/mL的浓度添加至所述培养或孵育。

[0281] 在一些实施方案中,补充的培养基包括一种或多种生长因子或细胞因子(如重组IL-21),其作为与抗体(如抗IL-21抗体)的复合物来添加。因此,在一些实施方案中,在所述孵育或培养期间间歇地添加所述复合物(如IL-21/抗IL-21抗体复合物)。在一些这样的方面,所述复合物(如IL-21/抗IL-21抗体复合物)在为或约所述培养或孵育开始时添加,然后在所述培养或孵育期间间歇地添加,如在每次更换或洗除培养基时添加。在一些实施方案

中,将所述复合物(如IL-21/抗IL-21抗体复合物)添加至所述培养或孵育,在第0天(所述孵育开始)开始添加,并且在每次更换或洗除培养基时,将其进一步添加以用所述复合物(如IL-21/抗IL-21抗体复合物)补充所述培养或孵育。在一些实施方案中,所述方法包括在所述孵育开始时(第0天),以及在所述孵育的持续时间中每两或三天在每次洗涤或更换培养基时,例如在所述培养或孵育的为或约第5天、第7天、第9天、第11天和第14天,添加所述复合物(如IL-21/抗IL-21抗体复合物)。在任何这样的实施方案中,使抗IL-21抗体与重组IL-21接触,从而形成IL-21/抗IL-21复合物,并且将所述IL-21/抗IL-21复合物添加至所述培养基。在任何这样的实施方案中,使重组IL-21与抗IL-21抗体接触以形成IL-21/抗IL-21复合物是在包括适合于形成所述复合物的温度和时间的条件下进行。在任何这样的实施方案中,所述培养在 $37^{\circ}\text{C} \pm 2$ 下进行30分钟。在任何这样的实施方案中,抗IL-21抗体是以如下浓度来添加:在为或约100ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约400ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约300ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约200ng/mL之间、在为或约200ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约200ng/mL与为或约400ng/mL之间、在为或约200ng/mL与为或约300ng/mL之间、在为或约300ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约300ng/mL与为或约400ng/mL之间或者在为或约400ng/mL与为或约500ng/mL之间。在一些实施方案中,以在为或约100ng/mL与为或约500ng/mL之间的浓度添加抗IL-21抗体。在一些实施方案中,以250ng/mL的浓度添加抗IL-21抗体。在任何这样的实施方案中,用于与抗IL-21抗体形成复合物的重组IL-21的浓度是在约10ng/mL与约100ng/mL之间、在约10ng/mL与约90ng/mL之间、在约10ng/mL与约80ng/mL之间、在约10ng/mL与约70ng/mL之间、在约10ng/mL与约60ng/mL之间、在约10ng/mL与约50ng/mL之间、在约10ng/mL与约40ng/mL之间、在约10ng/mL与约30ng/mL之间、在约10ng/mL与约20ng/mL之间、在约20ng/mL与约100ng/mL之间、在约20ng/mL与约90ng/mL之间、在约20ng/mL与约80ng/mL之间、在约20ng/mL与约70ng/mL之间、在约20ng/mL与约60ng/mL之间、在约20ng/mL与约50ng/mL之间、在约20ng/mL与约40ng/mL之间、在约20ng/mL与约30ng/mL之间、在约30ng/mL与约100ng/mL之间、在约30ng/mL与约90ng/mL之间、在约30ng/mL与约80ng/mL之间、在约30ng/mL与约70ng/mL之间、在约30ng/mL与约60ng/mL之间、在约30ng/mL与约50ng/mL之间、在约30ng/mL与约40ng/mL之间、在约40ng/mL与约100ng/mL之间、在约40ng/mL与约90ng/mL之间、在约40ng/mL与约80ng/mL之间、在约40ng/mL与约70ng/mL之间、在约40ng/mL与约60ng/mL之间、在约40ng/mL与约50ng/mL之间、在约50ng/mL与约100ng/mL之间、在约50ng/mL与约90ng/mL之间、在约50ng/mL与约80ng/mL之间、在约50ng/mL与约70ng/mL之间、在约50ng/mL与约60ng/mL之间、在约60ng/mL与约100ng/mL之间、在约60ng/mL与约90ng/mL之间、在约60ng/mL与约80ng/mL之间、在约60ng/mL与约70ng/mL之间、在约70ng/mL与约100ng/mL之间、在约70ng/mL与约90ng/mL之间、在约70ng/mL与约80ng/mL之间、在约80ng/mL与约100ng/mL之间、在约80ng/mL与约90ng/mL之间或者在约90ng/mL与约100ng/mL之间,包含端值。在特定实施方案中,用于与抗IL-21抗体形成复合物的重组IL-21的浓度是在约10ng/mL与约100ng/mL之间,包含端值。在特定实施方案中,用于与抗IL-21抗体形成复合物的重组IL-21的浓度为为或约25ng/mL。

[0282] 在一些实施方案中,补充的培养基包括一种或多种生长因子或细胞因子,如重组IL-15。因此,在一些实施方案中,在所述孵育或培养期间间歇地添加所述生长因子或细胞

因子(如重组IL-15)。在一些这样的方面,所述生长因子或细胞因子(如重组IL-15)在为或约所述培养或孵育开始时添加,然后在所述培养或孵育期间间歇地添加,如在每次更换或洗除培养基时添加。在一些实施方案中,将所述生长因子或细胞因子(如重组IL-15)添加至所述培养或孵育,在第0天(所述孵育开始)开始添加,并且在每次更换或洗除培养基时,将其进一步添加以用所述生长因子或细胞因子(如重组IL-15)补充所述培养或孵育。在一些实施方案中,所述方法包括在所述孵育开始时(第0天),以及在所述孵育的持续时间中每两或三天在每次洗涤或更换培养基时,例如在所述培养或孵育的为或约第5天、第7天、第9天、第11天和第14天,添加重组IL-15。在任何这样的实施方案中,重组IL-15是以如下浓度添加至所述培养或孵育:在约1ng/mL与约50ng/mL之间、在约1ng/mL与约40ng/mL之间、在约1ng/mL与约30ng/mL之间、在约1ng/mL与约20ng/mL之间、在约1ng/mL与约10ng/mL之间、在约1ng/mL与约5ng/mL之间、在约5ng/mL与约50ng/mL之间、在约5ng/mL与约40ng/mL之间、在约5ng/mL与约30ng/mL之间、在约5ng/mL与约20ng/mL之间、在约5ng/mL与约10ng/mL之间、在约10ng/mL与约50ng/mL之间、在约10ng/mL与约40ng/mL之间、在约10ng/mL与约30ng/mL之间、在约10ng/mL与约20ng/mL之间、在约20ng/mL与约50ng/mL之间、在约20ng/mL与约40ng/mL之间、在约20ng/mL与约30ng/mL之间、在约30ng/mL与约50ng/mL之间、在约30ng/mL与约40ng/mL之间或者在约40ng/mL与约50ng/mL之间。在任何这样的实施方案中,重组IL-15是以在约1ng/mL与约50ng/mL之间的浓度添加至所述培养或孵育。在任何这样的实施方案中,重组IL-15是以为或约10ng/mL的浓度添加至所述培养或孵育。在特定实施方案中,将500IU/mL的IL-2、10ng/mL的IL-15和25ng/mL的IL-21添加至所述培养或孵育。

[0283] 在一些实施方案中,补充的培养基包括一种或多种生长因子或细胞因子,如重组IL-12。因此,在一些实施方案中,在所述孵育或培养期间间歇地添加所述生长因子或细胞因子(如重组IL-12)。在一些这样的方面,所述生长因子或细胞因子(如重组IL-12)在为或约所述培养或孵育开始时添加,然后在所述培养或孵育期间间歇地添加,如在每次更换或洗除培养基时添加。在一些实施方案中,将所述生长因子或细胞因子(如重组IL-12)添加至所述培养或孵育,在第0天(所述孵育开始)开始添加,并且在每次更换或洗除培养基时,将其进一步添加以用所述生长因子或细胞因子(如重组IL-12)补充所述培养或孵育。在一些实施方案中,所述方法包括在所述孵育开始时(第0天),以及在所述孵育的持续时间中每两或三天在每次洗涤或更换培养基时,例如在所述培养或孵育的为或约第5天、第7天、第9天、第11天和第14天,添加重组IL-12。在任何这样的实施方案中,重组IL-12是以如下浓度添加至所述培养或孵育:在约1ng/mL与约50ng/mL之间、在约1ng/mL与约40ng/mL之间、在约1ng/mL与约30ng/mL之间、在约1ng/mL与约20ng/mL之间、在约1ng/mL与约10ng/mL之间、在约1ng/mL与约5ng/mL之间、在约5ng/mL与约50ng/mL之间、在约5ng/mL与约40ng/mL之间、在约5ng/mL与约30ng/mL之间、在约5ng/mL与约20ng/mL之间、在约5ng/mL与约10ng/mL之间、在约10ng/mL与约50ng/mL之间、在约10ng/mL与约40ng/mL之间、在约10ng/mL与约30ng/mL之间、在约10ng/mL与约20ng/mL之间、在约20ng/mL与约50ng/mL之间、在约20ng/mL与约40ng/mL之间、在约20ng/mL与约30ng/mL之间、在约30ng/mL与约50ng/mL之间、在约30ng/mL与约40ng/mL之间或者在约40ng/mL与约50ng/mL之间。在任何这样的实施方案中,重组IL-12是以在约1ng/mL与约50ng/mL之间的浓度添加至所述培养或孵育。在任何这样的实施方案中,重组IL-12是以为或约10ng/mL的浓度添加至所述培养或孵育。

[0284] 在一些实施方案中,补充的培养基包括一种或多种生长因子或细胞因子,如重组IL-18。因此,在一些实施方案中,在所述孵育或培养期间间歇地添加所述生长因子或细胞因子(如重组IL-18)。在一些这样的方面,所述生长因子或细胞因子(如重组IL-18)在为或约所述培养或孵育开始时添加,然后在所述培养或孵育期间间歇地添加,如在每次更换或洗除培养基时添加。在一些实施方案中,将所述生长因子或细胞因子(如重组IL-18)添加至所述培养或孵育,在第0天(所述孵育开始)开始添加,并且在每次更换或洗除培养基时,将其进一步添加以用所述生长因子或细胞因子(如重组IL-18)补充所述培养或孵育。在一些实施方案中,所述方法包括在所述孵育开始时(第0天),以及在所述孵育的持续时间中每两或三天在每次洗涤或更换培养基时,例如在所述培养或孵育的为或约第5天、第7天、第9天、第11天和第14天,添加重组IL-18。在任何这样的实施方案中,重组IL-18是以如下浓度添加至所述培养或孵育:在约1ng/mL与约50ng/mL之间、在约1ng/mL与约40ng/mL之间、在约1ng/mL与约30ng/mL之间、在约1ng/mL与约20ng/mL之间、在约1ng/mL与约10ng/mL之间、在约1ng/mL与约5ng/mL之间、在约5ng/mL与约50ng/mL之间、在约5ng/mL与约40ng/mL之间、在约5ng/mL与约30ng/mL之间、在约5ng/mL与约20ng/mL之间、在约5ng/mL与约10ng/mL之间、在约10ng/mL与约50ng/mL之间、在约10ng/mL与约40ng/mL之间、在约10ng/mL与约30ng/mL之间、在约10ng/mL与约20ng/mL之间、在约20ng/mL与约50ng/mL之间、在约20ng/mL与约40ng/mL之间、在约20ng/mL与约30ng/mL之间、在约30ng/mL与约50ng/mL之间、在约30ng/mL与约40ng/mL之间或者在约40ng/mL与约50ng/mL之间。在任何这样的实施方案中,重组IL-18是以在约1ng/mL与约50ng/mL之间的浓度添加至所述培养或孵育。在任何这样的实施方案中,重组IL-18是以为或约10ng/mL的浓度添加至所述培养或孵育。

[0285] 在一些实施方案中,补充的培养基包括一种或多种生长因子或细胞因子,如重组IL-27。因此,在一些实施方案中,在所述孵育或培养期间间歇地添加所述生长因子或细胞因子(如重组IL-27)。在一些这样的方面,所述生长因子或细胞因子(如重组IL-27)在为或约所述培养或孵育开始时添加,然后在所述培养或孵育期间间歇地添加,如在每次更换或洗除培养基时添加。在一些实施方案中,将所述生长因子或细胞因子(如重组IL-27)添加至所述培养或孵育,在第0天(所述孵育开始)开始添加,并且在每次更换或洗除培养基时,将其进一步添加以用所述生长因子或细胞因子(如重组IL-27)补充所述培养或孵育。在一些实施方案中,所述方法包括在所述孵育开始时(第0天),以及在所述孵育的持续时间中每两或三天在每次洗涤或更换培养基时,例如在所述培养或孵育的为或约第5天、第7天、第9天、第11天和第14天,添加重组IL-27。在任何这样的实施方案中,重组IL-27是以如下浓度添加至所述培养或孵育:在约1ng/mL与约50ng/mL之间、在约1ng/mL与约40ng/mL之间、在约1ng/mL与约30ng/mL之间、在约1ng/mL与约20ng/mL之间、在约1ng/mL与约10ng/mL之间、在约1ng/mL与约5ng/mL之间、在约5ng/mL与约50ng/mL之间、在约5ng/mL与约40ng/mL之间、在约5ng/mL与约30ng/mL之间、在约5ng/mL与约20ng/mL之间、在约5ng/mL与约10ng/mL之间、在约10ng/mL与约50ng/mL之间、在约10ng/mL与约40ng/mL之间、在约10ng/mL与约30ng/mL之间、在约10ng/mL与约20ng/mL之间、在约20ng/mL与约50ng/mL之间、在约20ng/mL与约40ng/mL之间、在约20ng/mL与约30ng/mL之间、在约30ng/mL与约50ng/mL之间、在约30ng/mL与约40ng/mL之间或者在约40ng/mL与约50ng/mL之间。在任何这样的实施方案中,重组IL-27是以在约1ng/mL与约50ng/mL之间的浓度添加至所述培养或孵育。在任何这样的实施方案中,

重组IL-27是以为或约10ng/mL的浓度添加至所述培养或孵育。

[0286] 在所提供的方法的实施方案中,培养或孵育包括提供为NK细胞维持所需或有用的化学和物理条件(例如,温度、气体)。可以支持NK细胞增殖或扩增的化学条件的例子包括但不限于通常在生长(即,培养)培养基中提供的缓冲液、营养素、血清、维生素和抗生素。在一个实施方案中,NK培养基包括包含10% FCS的MEM α 或包含5%人血清/LiforCell®FBS替代物(Lifeblood Products)的CellGro SCGM(Cell Genix)。适用于本发明的其他培养基包括但不限于Glasgow培养基(Gibco,卡尔斯巴德,加利福尼亚州)、RPMI培养基(Sigma-Aldrich,圣路易斯,密苏里州)或DMEM(Sigma-Aldrich,圣路易斯,密苏里州)。应注意,许多培养基含有烟酰胺作为维生素补充物,例如,MEM α (8.19 μ M烟酰胺)、RPMI (8.19 μ M烟酰胺)、DMEM (32.78 μ M烟酰胺)和Glasgow培养基(16.39 μ M烟酰胺)。

[0287] 在一些实施方案中,如对于将细胞引入(或再引入)人受试者体内的应用,使用无血清配制品进行培养,如用于淋巴细胞培养的AIM VTm无血清培养基、MARROWMAXTm骨髓培养基或无血清干细胞生长培养基(SCGM) (例如CellGenix®GMP SCGM)。这样的培养基配制品和补充物可从商业来源获得。培养可补充有如所述的氨基酸、抗生素和/或其他生长因子细胞因子以促进最佳活力、增殖、功能性和/或存活率。在一些实施方案中,无血清培养基也可以补充有低百分比的人血清,如0.5%至10%人血清,如为或约5%人血清。在这样的实施方案中,所述人血清可以是来自人AB血浆的人血清(人AB血清)或自体血清。

[0288] 在一些实施方案中,与饲养细胞以及任选地细胞因子(例如重组IL-2或IL-21)一起培养在包括适合于人NK细胞生长或扩增的温度的条件下进行,所述温度例如至少约25摄氏度,通常至少约30度,并且通常为或约37摄氏度。在一些实施方案中,所述培养在37°C $\pm$ 2下在5% CO₂中进行。

[0289] 在所提供的方法的实施方案中,所述培养包括在GMP条件下进行的孵育。在一些实施方案中,所述孵育在封闭系统中,所述封闭系统在一些方面可以是封闭的自动化系统。在一些实施方案中,含有一种或多种重组细胞因子或生长因子的培养基是无血清培养基。在一些实施方案中,所述孵育在封闭的自动化系统中用无血清培养基进行。

[0290] 在一些实施方案中,NK细胞的扩增在适合于细胞扩增的培养器皿中进行。在一些实施方案中,所述培养器皿是透气性培养器皿,如G-Rex系统(例如G-Rex 10、G-Rex 10M、G-Rex 100M/100M-CS或G-Rex 500M/500M-CS)。在一些实施方案中,所述培养器皿是适合于细胞在封闭系统中扩增的微量板、烧瓶、袋或其他培养器皿。在一些实施方案中,扩增可以在生物反应器中进行。在一些实施方案中,所述扩增使用细胞扩增系统通过将细胞转移至透气性袋中进行,如与生物反应器(例如Xuri细胞扩增系统W25(GE Healthcare))结合。在实施方案中,所述细胞扩增系统包括培养器皿,如袋,例如透气性细胞袋,其容积为约50mL、约100mL、约200mL、约300mL、约400mL、约500mL、约600mL、约700mL、约800mL、约900mL、约1L、约2L、约3L、约4L、约5L、约6L、约7L、约8L、约9L和约10L,或者前述任一项之间的任何值。在一些实施方案中,所述过程是自动化的或半自动化的。在一些方面,所述扩增培养在静态条件下进行。在一些实施方案中,所述扩增培养在摇摆条件下进行。培养基可以推注添加或者可以按灌注时间表来添加。在一些实施方案中,生物反应器以如下稳定通气量将温度维持在为或接近37°C并将CO₂水平维持在为或接近5%:为、为约或至少0.01L/min、0.05L/min、0.1L/min、0.2L/min、0.3L/min、0.4L/min、0.5L/min、1.0L/min、1.5L/min或2.0L/min或大

于2.0L/min。在某些实施方案中,所述培养的至少一部分用灌注来进行,如速率为290ml/天、580ml/天和/或1160ml/天。

[0291] 在一些方面,在允许灌注的自动化封闭扩增系统中扩增细胞。灌注可以将培养基连续添加至细胞,以确保实现最佳生长速率。

[0292] 扩增方法可以在GMP条件下进行,包括在封闭的自动化系统中和使用无血清培养基。在一些实施方案中,所述方法的任何一个或多个步骤可以在封闭系统中或在GMP条件下进行。在某些实施方案中,所有过程操作在GMP套件中进行。在一些实施方案中,使用封闭系统进行用于制造、生成或产生细胞疗法的方法的一个或多个其他处理步骤。在一些实施方案中,一个或多个或者所有处理步骤(例如,分离、选择和/或富集、处理、培养步骤,包括与细胞扩增结合的孵育)以及配制步骤使用集成式或自容式系统中的系统、装置或设备,和/或以自动化或可编程方式来进行。在一些方面,所述系统或设备包括与所述系统或设备通信的计算机和/或计算机程序,其允许用户对处理、分离、工程化和配制步骤的各个方面进行编程、控制、结果评估和/或调整。

[0293] 在一些任何所提供的实施方案中,进行所述培养直至所述方法实现至少或至少约 2.50×10^8 个g-NK细胞的扩增的时间。在一些任何所提供的实施方案中,进行所述培养直至所述方法实现至少或至少约 5.0×10^8 个g-NK细胞的扩增的时间。在一些任何所提供的实施方案中,进行所述培养直至所述方法实现至少或至少约 1.0×10^9 个g-NK细胞的扩增。在一些任何所提供的实施方案中,进行所述培养直至所述方法实现至少或至少约 5.0×10^9 个g-NK细胞的扩增的时间。

[0294] 在一些任何所提供的实施方案中,所述培养进行为或约或至少或至少约5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天或25天。在一些实施方案中,所述培养进行为或约或者至少或至少约14天。在一些实施方案中,所述培养进行为或约或者至少或至少约21天。

[0295] 在一些任何所提供的实施方案中,根据任何所提供方法的培养或孵育进行为或约或至少或至少约5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天或25天。在一些实施方案中,所述培养进行为或约或者至少或至少约14天。在一些实施方案中,所述培养进行为或约或者至少或至少约21天。在某些实施方案中,如果在培养开始时已经将富集的NK细胞在先前冷冻或低温保存后解冻,则通常需要更长的培养持续时间。技术人员可以熟练地凭经验确定培养所述细胞的最佳天数,根据如下因素而定:如培养开始时细胞的状态、在培养开始时或在培养期间细胞的健康或活力和/或在培养结束时阈值细胞的所需数量,根据例如所述细胞的期望应用而定,如出于治疗目的要施用至受试者的细胞的剂量。

[0296] 在培养结束时,收获细胞。细胞的收集或收获可以通过在培养结束后从培养器皿离心细胞来实现。例如,在大约14天的培养后通过离心收获细胞。在收获细胞后,洗涤所述细胞。可以收集细胞样品用于功能或表型测试。可以单独配制不用于功能或表型测试的任何其他细胞。在一些情形中,将所述细胞用低温保护剂配制用于细胞的低温保存。

[0297] 在一些实施方案中,所提供的方法包括在分离、选择和/或富集之前或之后用于冷冻(例如,低温保存)细胞的步骤。在一些实施方案中,所提供的方法包括在孵育和/或培养之前或之后用于冷冻(例如,低温保存)细胞的步骤。在一些实施方案中,所述方法包括在低

温保护剂的存在下低温保存细胞,从而产生低温保存的组合物。在一些方面,在孵育之前和/或在施用至受试者之前,所述方法包括在一定条件下洗涤低温保存的组合物以减少或去除低温保护剂。在一些方面,可以使用多种已知的冷冻溶液和参数中的任一种。在一些实施方案中,将细胞冷冻(例如,低温冷冻或低温保存)于介质和/或溶液中,所述介质和/或溶液具有终浓度为或为约12.5%、12.0%、11.5%、11.0%、10.5%、10.0%、9.5%、9.0%、8.5%、8.0%、7.5%、7.0%、6.5%、6.0%、5.5%或5.0%的DMSO,或者在1%与15%之间、在6%与12%之间、在5%与10%之间或者在6%与8%之间的DMSO。在特定实施方案中,将细胞冷冻(例如,低温冷冻或低温保存)于介质和/或溶液中,所述介质和/或溶液具有终浓度为或为约5.0%、4.5%、4.0%、3.5%、3.0%、2.5%、2.0%、1.5%、1.25%、1.0%、0.75%、0.5%或0.25%的HSA,或者在0.1%与-5%之间、在0.25%与4%之间、在0.5%与2%之间或者在1%与2%之间的HSA。一个例子涉及使用含有20%DMSO和8%人血清白蛋白(HSA)的PBS或其他合适的细胞冷冻介质。然后将其用介质1:1稀释,使得DMSO和HSA的终浓度分别为10%和4%。然后通常将细胞以或以约1°/分钟的速率冷冻至-80℃或约-80℃,并储存在液氮储罐的气相中。在一些实施方案中,将细胞冷冻于包含低温保护剂的无血清低温保存介质中。在一些实施方案中,所述低温保护剂是DMSO。在一些实施方案中,所述低温保存介质是在为或约5%与为或约10%之间的DMSO(v/v)。在一些实施方案中,所述低温保存介质是为或约5% DMSO(v/v)。在一些实施方案中,所述低温保存介质是为或约6% DMSO(v/v)。在一些实施方案中,所述低温保存介质是为或约7% DMSO(v/v)。在一些实施方案中,所述低温保存介质是为或约8% DMSO(v/v)。在一些实施方案中,所述低温保存介质是为或约9% DMSO(v/v)。在一些实施方案中,所述低温保存介质是为或约10% DMSO(v/v)。在一些实施方案中,所述低温保存介质含有市售低温保存溶液(CryoStorTMCS10或CS5)。CryoStorTMCS10是含有10%二甲亚砜(DMSO)的低温保存介质。CryoStorTMCS5是含有5%二甲亚砜(DMSO)的低温保存介质。在一些实施方案中,所述低温保存介质含有一种或多种另外的赋形剂,如plasmalyte A或人血清白蛋白(HSA)。

[0298] 在一些实施方案中,将细胞以 5×10^6 至 1×10^8 个细胞/mL的密度低温保存。例如,将细胞以如下密度低温保存:为或约 5×10^6 个细胞/mL、为或约 10×10^6 个细胞/mL、为或约 15×10^6 个细胞/mL、为或约 20×10^6 个细胞/mL、为或约 25×10^6 个细胞/mL、为或约 30×10^6 个细胞/mL、为或约 40×10^6 个细胞/mL、为或约 50×10^6 个细胞/mL、为或约 60×10^6 个细胞/mL、为或约 70×10^6 个细胞/mL、为或约 80×10^6 个细胞/mL或者为或约 90×10^6 个细胞/mL,或者前述任一项之间的任何值。可以将细胞以对于低温保存器皿合适的任何体积低温保存。在一些实施方案中,将细胞低温保存于小瓶中。低温保存介质的体积可以是在为或约1mL与为或约50mL之间,如为或约1mL和5mL。在一些实施方案中,将细胞低温保存于袋中。低温保存介质的体积可以在为或约10mL与为或约500mL之间,如在为或约100mL或为或约200mL之间。可以将收获并扩增的细胞低温保存于低温环境中,如-80℃至-196℃的温度下。在一些任何所提供方法中,与所述培养开始时相比,所述方法在所述培养结束时产生数量增加的NKG2C^{pos}细胞。例如,与培养开始时相比,NKG2C^{pos}细胞在培养结束时的增加可以是大于或大于约100倍、大于或大于约200倍、大于或大于约300倍、大于或大于约400倍、大于或大于约500倍、大于或大于约600倍、大于或大于约700倍或者大于或大于约800倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约1000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约2000倍。在一些任何实施方案中,所

述增加是大为或约2500倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约3000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约5000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约10000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约15000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约20000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约25000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约30000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约35000倍。在一些实施方案中,根据任何所提供方法的培养或孵育进行直至所述方法实现如下扩增的时间:至少或至少约 2.50×10^8 个NKG2C^{pos}细胞、至少或至少约 3.0×10^8 个NKG2C^{pos}细胞、至少或至少约 4.0×10^8 个NKG2C^{pos}细胞、至少或至少约 5.0×10^8 个NKG2C^{pos}细胞、至少或至少约 6.0×10^8 个NKG2C^{pos}细胞、至少或至少约 7.0×10^8 个NKG2C^{pos}细胞、至少或至少约 8.0×10^8 个NKG2C^{pos}细胞、至少或至少约 9.0×10^8 个NKG2C^{pos}细胞、至少或至少约 1.0×10^9 个NKG2C^{pos}细胞、至少或至少约 1.5×10^9 个NKG2C^{pos}细胞、至少或至少约 2.0×10^9 个NKG2C^{pos}细胞、至少或至少约 3.0×10^9 个NKG2C^{pos}细胞、至少或至少约 4.0×10^9 个NKG2C^{pos}细胞、至少或至少约 5.0×10^9 个NKG2C^{pos}细胞、至少或至少约 1.0×10^{10} 个NKG2C^{pos}细胞、至少或至少约 1.5×10^{10} 个NKG2C^{pos}细胞、至少或至少约 2.0×10^{10} 个NKG2C^{pos}细胞、至少或至少约 2.5×10^{10} 个NKG2C^{pos}细胞或更多。

[0299] 在一些任何所提供方法中,与所述培养开始时相比,所述方法在所述培养结束时产生数量增加的NKG2A^{neg}细胞。例如,与培养开始时相比,NKG2A^{neg}细胞在培养结束时的增加可以是大于或大于约100倍、大于或大于约200倍、大于或大于约300倍、大于或大于约400倍、大于或大于约500倍、大于或大于约600倍、大于或大于约700倍或者大于或大于约800倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约1000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约2000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约3000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约2500倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约5000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约10000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约15000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约20000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约25000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约30000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约35000倍。在一些实施方案中,根据任何所提供方法的培养或孵育进行直至所述方法实现如下扩增的时间:至少或至少约 2.50×10^8 个NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 3.0×10^8 个NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 4.0×10^8 个NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 5.0×10^8 个NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 6.0×10^8 个NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 7.0×10^8 个NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 8.0×10^8 个NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 9.0×10^8 个NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 1.0×10^9 个NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 1.5×10^9 个NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 2.0×10^9 个NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 3.0×10^9 个NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 4.0×10^9 个NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 5.0×10^9 个NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 1.0×10^{10} 个NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 1.5×10^{10} 个NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 2.0×10^{10} 个NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 2.5×10^{10} 个NKG2A^{neg}细胞或更多。

[0300] 在一些任何所提供方法中,与所述培养开始时相比,所述方法在所述培养结束时产生数量增加的NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞。例如,与培养开始时相比,NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞在培养结束时的增加可以是大于或大于约100倍、大于或大于约200倍、大于或大于约300倍、大于或大于约400倍、大于或大于约500倍、大于或大于约600倍、大于或大于约700倍或者大于

或大于约800倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约1000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约2000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约2500倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约3000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约5000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约10000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约15000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约20000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约25000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约30000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约35000倍。在一些实施方案中,根据任何所提供方法的培养或孵育进行直至所述方法实现如下扩增的时间:至少或至少约 2.5×10^8 个NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 3.0×10^8 个NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 4.0×10^8 个NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 5.0×10^8 个NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 6.0×10^8 个NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 7.0×10^8 个NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 8.0×10^8 个NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 9.0×10^8 个NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 1.0×10^9 个NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 1.5×10^9 个NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 2.0×10^9 个NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 3.0×10^9 个NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 4.0×10^9 个NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 5.0×10^9 个NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 1.0×10^{10} 个NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 1.5×10^{10} 个NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 2.0×10^{10} 个NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞、至少或至少约 2.5×10^{10} 个NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞或更多。

[0301] 在一些任何所提供方法中,与所述培养开始时相比,所述方法在所述培养结束时产生数量增加的g-NK细胞。例如,与培养开始时相比,g-NK细胞在培养结束时的增加可以是大于或大于约100倍、大于或大于约200倍、大于或大于约300倍、大于或大于约400倍、大于或大于约500倍、大于或大于约600倍、大于或大于约700倍或者大于或大于约800倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约1000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约2000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约2500倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约3000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约5000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约10000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约15000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约20000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约25000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约30000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约35000倍。在一些实施方案中,根据任何所提供方法的培养或孵育进行直至所述方法实现如下扩增的时间:至少或至少约 2.5×10^8 个g-NK细胞、至少或至少约 3.0×10^8 个g-NK细胞、至少或至少约 4.0×10^8 个g-NK细胞、至少或至少约 5.0×10^8 个g-NK细胞、至少或至少约 6.0×10^8 个g-NK细胞、至少或至少约 7.0×10^8 个g-NK细胞、至少或至少约 8.0×10^8 个g-NK细胞、至少或至少约 9.0×10^8 个g-NK细胞、至少或至少约 1.0×10^9 个g-NK细胞、至少或至少约 1.5×10^9 个g-NK细胞、至少或至少约 2.0×10^9 个g-NK细胞、至少或至少约 3.0×10^9 个g-NK细胞、至少或至少约 4.0×10^9 个g-NK细胞、至少或至少约 5.0×10^9 个g-NK细胞或更多、至少或至少约 1.0×10^{10} 个g-NK细胞或更多、至少或至少约 1.5×10^{10} 个g-NK细胞或更多、至少或至少约 2.0×10^{10} 个g-NK细胞或更多、或者至少或至少约 2.5×10^{10} 个g-NK细胞或更多。

[0302] 在一些实施方案中,所提供的方法导致g-NK细胞的优先扩增。在一些方面,g-NK细

胞通过一种或多种不同标记物的表面表达的存在、不存在或水平来鉴定,所述标记物区分NK细胞与其他淋巴细胞或免疫细胞并且区分g-NK细胞与常规NK细胞。在实施方案中,表面表达可以通过流式细胞术来确定,例如,通过用与所述标记物特异性结合的抗体染色并检测所述抗体与所述标记物的结合。可以进行类似方法以评估细胞内标记物的表达,但是这样的方法通常包括在染色以通过流式细胞术检测细胞内蛋白质之前进行用于固定和渗透化处理的方法。在一些实施方案中,固定是使用甲醛(例如0.01%)来实现,之后使用洗涤剂(例如0.1%至1%洗涤剂,例如为或约0.5%)破坏膜,所述洗涤剂如Triton、NP-50、Tween 20、皂苷、毛地黄皂苷或Leucoperm。

[0303] 抗体和其他结合实体可以用于检测标记物蛋白的表达水平,以鉴定、检测、富集和/或分离g⁻NK细胞。合适的抗体可以包括多克隆、单克隆、片段(如Fab片段)、单链抗体和其他形式的特异性结合分子。

[0304] 在一些实施方案中,如果在细胞上或细胞中存在特定标记物(其可以是细胞内标记物或表面标记物)的可检测存在,则细胞(例如NK细胞子集)对特定标记物呈阳性(pos)。在实施方案中,如果染色以显著高于在其他都相同的条件下用同种型匹配的对照进行相同程序检测的染色的水平可检测,和/或以基本上类似于或在一些情形中高于已知对所述标记物呈阳性的细胞的水平可检测,和/或以高于已知对所述标记物呈阴性的细胞的水平的水平可检测,则表面表达为阳性。

[0305] 在一些实施方案中,如果在细胞上或细胞中不存在特定标记物(其可以是细胞内标记物或表面标记物)的可检测存在,则细胞(例如NK细胞子集)对于特定标记物呈阴性(neg)。在实施方案中,如果染色不以显著高于在其他都相同的条件下用同种型匹配的对照进行相同程序检测的染色的水平可检测,和/或以显著低于已知对所述标记物呈阳性的细胞的水平可检测,和/或以基本上类似于已知对所述标记物呈阴性的细胞的水平可检测,则表面表达为阴性。

[0306] 在一些实施方案中,如果在细胞上或细胞中存在与已知对所述标记物呈阳性的细胞相比更低水平的特定标记物的可检测存在,则细胞(例如NK细胞子集)具有低(lo或min)特定标记物。在实施方案中,表面表达可以通过流式细胞术来确定,例如,通过用与所述标记物特异性结合的抗体染色并检测所述抗体与所述标记物的结合,其中如果染色水平低于已知对所述标记物呈阳性的细胞,则表达(表面表达或细胞内表达,根据所用方法而定)是低的。

[0307] 在一些实施方案中,g-NK细胞是具有NK细胞表型(例如CD45^{pos}、CD3^{neg}和/或CD56^{pos})的细胞,并且表达标识g-NK细胞子集或与其相关的一种或多种标记物。

[0308] 在一些实施方案中,如以下文献中所述来鉴定g-NK细胞:公开的专利申请号US2013/0295044;或Zhang等人(2013)J. Immunol., 190:1402-1406。

[0309] 在一些实施方案中,g-NK细胞是不表达大量FcR γ 但是确实表达自然杀伤细胞的至少一种标记物的细胞。FcR γ 链(智人(Homo sapiens),也称为高亲和力免疫球蛋白 γ Fc受体I)的氨基酸序列可在NCBI数据库中以登录号NP—004097.1(GI:4758344)获得,并且作为SEQ ID NO:1再现于下文中。

MIPAVVLLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFLYGIVLT LLYCRLKIQVRKAAITSYEK
SDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ(SEQ ID NO:1)

[0310] 在一些实施方案中, NK细胞的g-NK细胞子集可以通过观察NK细胞群体或NK细胞子群体是否表达FcR γ 来检测。在一些情形中, g-NK细胞被鉴定为不表达FcR γ 的细胞。FcR γ 蛋白是细胞内蛋白质。因此, 在一些方面, 可以在处理(例如, 通过固定和渗透化处理, 以允许检测细胞内蛋白质)细胞后检测FcR γ 的存在或不存在。在一些实施方案中, 在细胞内检测之前, 如在固定细胞之前, 针对一种或多种表面标记物(CD45、CD3和/或CD56)进一步评估细胞。在一些实施方案中, g-NK细胞是作为呈CD45^{pos}/CD3^{neg}/CD56^{pos}/FcR γ ^{neg}的细胞来鉴定、检测、富集和/或分离。

[0311] 在一些实施方案中, 扩增群体中大于或大于约50%的NK细胞为FcR γ ^{neg}。在一些实施方案中, 扩增群体中大于或大于约60%的NK细胞为FcR γ ^{neg}。在一些实施方案中, 扩增群体中大于或大于约70%的NK细胞为FcR γ ^{neg}。在一些实施方案中, 扩增群体中大于或大于约80%的NK细胞为FcR γ ^{neg}。在一些实施方案中, 扩增群体中大于或大于约90%的NK细胞为FcR γ ^{neg}。在一些实施方案中, 扩增群体中大于或大于约95%的NK细胞为FcR γ ^{neg}。例如, 本文方法通常得到高纯度(例如70-90%)的g-NK细胞产物。

[0312] 在一些实施方案中, 在不采用细胞内染色的情况下检测g-NK细胞的表达可能是有用的, 如例如, 如果样品的细胞要经历细胞分选或功能测定的话。尽管处理(例如固定和渗透化处理)以允许FcR γ 的细胞内染色可以用于确认基本上纯的细胞群体的身份, 但是在许多情形中, 可以在鉴定、检测或分离g-NK细胞时采用可以在不损伤细胞的情况下检测的细胞表面标记物。因此, 在一些实施方案中, 使用替代标记物谱在NK细胞子集中鉴定g-NK细胞, 所述替代标记物谱与FcR γ 的缺少相关联。在一些实施方案中, 当根据细胞的特定应用, 细胞内蛋白质(如FcR γ)的存在或不存在难以评估或不可能评估时, 替代标记物谱特别有用。

[0313] 本文中发现, 细胞表面标记物的某些组合与g-NK细胞表型(即缺少或缺乏FcR γ 的细胞内表达的细胞)相关联, 从而提供替代标记物谱以用不损伤细胞的方式鉴定或检测g-NK细胞。在一些实施方案中, 本文提供的g-NK细胞的替代标记物谱是基于一种或多种标记物CD16(CD16^{pos})、NKG2C(NKG2C^{pos})或CD57(CD57^{pos})的阳性表面表达, 和/或基于一种或多种标记物CD7(CD7^{dim/neg})、CD161(CD161^{neg})和/或NKG2A(NKG2A^{neg})的低或阴性表面表达。在一些实施方案中, 针对NK细胞的一种或多种表面标记物, 如CD45、CD3和/或CD56, 进一步评估细胞。在一些实施方案中, 可以用替代标记物谱CD45^{pos}/CD3^{neg}/CD56^{pos}/CD16^{pos}/CD57^{pos}/CD7^{dim/neg}/CD161^{neg}鉴定、检测、富集和/或分离g-NK细胞。在一些实施方案中, 用替代标记物谱CD45^{pos}/CD3^{neg}/CD56^{pos}/NKG2A^{neg}/CD161^{neg}鉴定、检测、富集和/或分离g-NK细胞。在一些实施方案中, 鉴定、检测、富集和/或分离呈NKG2C^{pos}和/或NKG2A^{neg}的g-NK细胞。

[0314] 在一些实施方案中, 扩增群体中大于或大于约30%的NK细胞对NKG2C呈阳性, 和/或扩增群体中大于或大于约50%的NK细胞对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A。在一些实施方案中, 扩增群体中大于或大于约35%的NK细胞对NKG2C呈阳性, 和/或扩增群体中大于或大于约60%的NK细胞对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A。在一些实施方案中, 扩增群体中大于或大于约40%的NK细胞对NKG2C呈阳性, 和/或扩增群体中大于或大于约70%的NK细胞对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A。在一些实施方案中, 扩增群体中大于或大于约45%的NK细胞对NKG2C呈阳性, 和/或扩增群体中大于或大于约80%的NK细胞对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A。在一些实施方案中, 扩增群体中大于或大于约50%的NK细胞对NKG2C呈阳性, 和/或

扩增群体中大于或大于约85%的NK细胞对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A。在一些实施方案中,扩增群体中大于或大于约55%的NK细胞对NKG2C呈阳性,和/或扩增群体中大于或大于约90%的NK细胞对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A。在一些实施方案中,扩增群体中大于或大于约60%的NK细胞对NKG2C呈阳性,和/或扩增群体中大于或大于约95%的NK细胞对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A。

[0315] 在一些实施方案中,扩增群体中大于或大于约70%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性,并且扩增群体中大于或大于约70%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,扩增群体中大于或大于约75%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性,并且扩增群体中大于或大于约75%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,扩增群体中大于或大于约80%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性,并且扩增群体中大于或大于约80%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,扩增群体中大于或大于约85%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性,并且扩增群体中大于或大于约85%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,扩增群体中大于或大于约90%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性,并且扩增群体中大于或大于约90%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,扩增群体中大于或大于约95%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性,并且扩增群体中大于或大于约95%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。

[0316] 可以针对多种功能或表型活性中的任一种来评估通过所提供方法扩增的细胞,所述活性包括但不限于细胞毒性活性、脱颗粒、产生或分泌细胞因子的能力以及一种或多种细胞内或表面表型标记物的表达。评估这样的活性的方法是已知的并且例示于本文中和工作例子中。

[0317] 在一些实施方案中,针对靶细胞的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)细胞毒性活性可以用作功能性的量度。对于ADCC细胞毒性测定,可以将来自扩增的细胞与适当的靶细胞在存在或不存在对靶细胞上的靶抗原具有特异性的抗体的情况下共培养。例如,对于抗骨髓瘤细胞毒性,可以使用多种多发性骨髓瘤(MM)靶细胞中的任一种(例如AM01、KMS11、KMS18、KMS34、LP1或MM.1S),并且用抗CD38(例如达雷木单抗)或抗CD319抗体(例如埃罗妥珠单抗)进行所述测定。细胞杀伤可以通过任何数量的方法来确定。例如,可以将细胞用碘化丙啶(PI)染色,并且可以解析NK细胞、活靶细胞和死靶细胞的数量,如通过流式细胞术来解析。

[0318] 在一些实施方案中,扩增群体中大于或大于约10%的g-NK细胞能够针对肿瘤细胞脱颗粒。脱颗粒可以通过评估CD107A的表达来测量。例如,在一些实施方案中,扩增群体中大于或大于约20%的g-NK细胞能够针对肿瘤细胞脱颗粒。在一些实施方案中,扩增群体中大于或大于约30%的g-NK细胞能够针对肿瘤细胞脱颗粒。在一些实施方案中,扩增群体中大于或大于约40%的g-NK细胞能够针对肿瘤细胞脱颗粒。在一些实施方案中,脱颗粒的能力是在不存在针对肿瘤细胞的抗体的情况下测量的。

[0319] 在一些实施方案中,扩增群体中大于或大于约10%的g-NK细胞能够产生针对肿瘤细胞的效应细胞因子,如干扰素- γ 或TNF- α 。在一些实施方案中,扩增群体中大于或大于约20%的g-NK细胞能够产生针对肿瘤细胞的效应细胞因子,例如干扰素- γ 或TNF- α 。在一些实施方案中,扩增群体中大于或大于约30%的g-NK细胞能够产生针对肿瘤细胞的效应细胞因子,例如干扰素- γ 或TNF- α 。在一些实施方案中,扩增群体中大于或大于约40%的g-NK细胞能够产生针对肿瘤细胞的效应细胞因子,例如干扰素- γ 或TNF- α 。在一些实施方案中,产生干扰素- γ 或TNF- α 的能力是在不存在针对肿瘤细胞的抗体的情况下测量的。

[0320] 本文提供用于通过采用g-NK细胞的替代标记物谱来鉴定或检测含有细胞群体的样品中的g-NK细胞的方法。在一些实施方案中,所述方法包括使细胞样品与对一种或多种标记物CD16、CD57、CD7、CD161、NKG2C和/或NKG2A具有特异性的结合分子(如抗体或抗原结合片段)接触。在一些实施方案中,所述方法还包括使细胞样品与对CD45、CD3和/或CD56具有特异性的结合分子(如抗体或抗原结合片段)接触。在所述方法的一些实施方案中,可以使一种或多种结合分子同时与样品接触。在所述方法的一些实施方案中,可以使一种或多种结合分子依序与样品接触。在一些实施方案中,在所述接触后,所述方法可以包括在一定条件下进行一次或多次洗涤,以保留已经与一种或多种结合分子结合的细胞和/或从样品分离出未结合的结合分子。

[0321] 在一些实施方案中,一种或多种结合分子(例如抗体)中的每一种可以直接或间接附着至标记,用于检测对标记物呈阳性或阴性的细胞。例如,结合分子(例如抗体)可以与标记缀合、偶联或连接。标记是本领域技术人员熟知的。本文考虑的标记包括但不限于荧光染料、荧光蛋白、放射性同位素、发色团、金属离子、金颗粒(例如,胶体金颗粒)、银颗粒、具有强光散射特性的颗粒、磁性颗粒(例如,磁珠颗粒,如Dynabeads®磁珠)、多肽(例如,FLAG™标签、人流感血凝素(HA)标签等)、酶(如过氧化物酶(例如,辣根过氧化物酶)或磷酸酶(例如,碱性磷酸酶)、链霉亲和素、生物素、发光化合物(例如,化学发光底物)、寡核苷酸、特异性结合对(例如,配体及其受体)的成员以及本领域中熟知的用于在直接或间接附着至结合分子(例如抗体)时可视化或检测所述抗体的其他标记。

[0322] 可以使用用于评估表面标记物或蛋白的表达水平的多种熟知方法,如通过基于亲和力的方法(例如,基于免疫亲和力的方法)来检测,例如,在表面标记物的情况下,如通过流式细胞术来检测。在一些实施方案中,所述标记是荧光团并且用于检测或鉴定g-NK细胞的方法是通过流式细胞术。在一些实施方案中,对于不同标记物中的每一种,通过多色流式细胞术使用不同标记。

[0323] 在一些实施方案中,所述方法包括使样品与对CD45、CD3、CD56、CD57、CD7和CD161具有特异性的结合分子接触。在一些这样的实施方案中,将g-NK细胞鉴定或检测为具有g-NK细胞替代标记物谱CD45^{pos}/CD3^{neg}/CD56^{pos}/CD16^{pos}/CD57^{pos}/CD7^{dim/neg}/CD161^{neg}的细胞。

[0324] 在一些实施方案中,所述方法包括使样品与对CD45、CD3、CD56、NKG2A和CD161具有特异性的结合分子接触。在一些这样的实施方案中,将g-NK细胞鉴定或检测为具有g-NK细胞替代标记物谱CD45^{pos}/CD3^{neg}/CD56^{pos}/NKG2A^{neg}/CD161^{neg}的细胞。

[0325] 在一些实施方案中,所提供的方法还可以包括分离或富集g-NK,如根据任何所提供方法优先扩增的g-NK细胞。在一些这样的实施方案中,可以获得g-NK细胞的基本上纯的群体,如含有大于或大于约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多g-NK细胞的细胞群体,如使用所述标记物的组或组合中的任一种所确定。抗体和其他结合分子可以用于检测标记物蛋白的表达水平的存在或不存在,用于分离或富集g-NK细胞。在一些实施方案中,分离或富集是通过荧光激活的细胞分选(FACs)来进行。在这样的方法的例子中,通过流式细胞术使用如上所述用于针对多种细胞表面标记物对细胞进行染色的方法来鉴定或检测g-NK细胞,并且染色的细胞携带于流体流中用于收集对与g-NK细胞相关的标记物呈阳性或阴性的细胞。

III. 组合物和药物配制品

[0326] 本文提供含有如通过任何所提供方法产生的扩增的NK细胞的组合物。在一些实施方案中,所述组合物含有NKG2C^{pos}细胞或其子集。在一些实施方案中,所述组合物含有NKG2A^{neg}细胞或其子集。在一些实施方案中,所述组合物含有NKG2C^{pos}/NKG2A^{neg}细胞或其子集。在一些实施方案中,所述组合物含有g-NK细胞。特定地,所提供的组合物包括富集g-NK细胞的细胞组合物。

[0327] 在一些实施方案中,所述组合物包含约5-99% NKG2C^{pos}细胞或其子集,或者在5%与99%之间且包含端值的任何百分比的NKG2C^{pos}细胞或其子集。在一些实施方案中,所述组合物可以包括与分离出所述细胞的受试者中天然存在的NKG2C^{pos}细胞或其子集相对于总NK细胞或总细胞的百分比相比,增加或更大的NKG2C^{pos}细胞或其子集相对于总NK细胞或总细胞的百分比。在一些实施方案中,所述百分比增加至少或至少约2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、150倍、200倍或更多。

[0328] 在一些实施方案中,所述组合物可以包括至少或至少约20%、至少或至少约30%、至少或至少约40%、至少或至少约50%、至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约81%、至少或至少约82%、至少或至少约83%、至少或至少约84%、至少或至少约85%、至少或至少约86%、至少或至少约87%、至少或至少约88%、至少或至少约89%、至少或至少约90%、至少或至少约91%、至少或至少约92%、至少或至少约93%、至少或至少约94%、至少或至少约95%、至少或至少约96%、至少或至少约97%、至少或至少约98%、至少或至少约99%或基本上100% NKG2C^{pos}细胞或其子集。在一些实施方案中,所述组合物包含超过50% NKG2C^{pos}细胞或其子集。在另一个实施方案中,所述组合物包含超过60% NKG2C^{pos}细胞或其子集。在另一个实施方案中,所述组合物包含超过70% NKG2C^{pos}细胞或其子集。在另一个实施方案中,所述组合物包含超过80% NKG2C^{pos}细胞或其子集。在一些实施方案中,所提供的组合物包括其中NKG2C^{pos}细胞或其子集构成组合物中的细胞或组合物中的NK细胞的至少或至少约60%、至少或至少约70%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%或更多的那些。

[0329] 在一些实施方案中,所述组合物包含约5-99% NKG2A^{neg}细胞或其子集或者在5%与99%之间且包含端值的任何百分比的NKG2A^{neg}细胞或其子集。在一些实施方案中,所述组合物可以包括与分离出所述细胞的受试者中天然存在的NKG2A^{neg}细胞或其子集相对于总NK细胞或总细胞的百分比相比,增加或更大的NKG2A^{neg}细胞或其子集相对于总NK细胞或总细胞百分比。在一些实施方案中,所述百分比增加至少或至少约2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、150倍、200倍或更多。

[0330] 在一些实施方案中,所述组合物可以包括至少或至少约20%、至少或至少约30%、至少或至少约40%、至少或至少约50%、至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约81%、至少或至少约82%、至少或至少约83%、至少或至少约84%、至少或至少约85%、至少或至少约86%、至少或至少约87%、至少或至少约88%、至少或至少约89%、至少或至少约90%、至少或至少约91%、至少或至少约92%、至少或至少约93%、至少或至少约94%、至少或至少约95%、至少或至少约96%、至少或至少约97%、至少或至少约98%、至少或至少约99%或基本上100% NKG2A^{neg}细胞或其子集。在一些实施方案中,所述组合物包含超过50% NKG2A^{neg}细胞或其子

集。在另一个实施方案中,所述组合物包含超过60% NKG2A^{neg}细胞或其子集。在另一个实施方案中,所述组合物包含超过70% NKG2A^{neg}细胞或其子集。在另一个实施方案中,所述组合物包含超过80% NKG2A^{neg}细胞或其子集。在一些实施方案中,所提供的组合物包括其中NKG2A^{neg}细胞或其子集构成组合物中的细胞或组合物中的NK细胞的至少或至少约60%、至少或至少约70%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%或更多的那些。

[0331] 在一些实施方案中,所述组合物包含约5-99% NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞或其子集或者在5%与99%之间且包含端值的任何百分比的NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞或其子集。在一些实施方案中,所述组合物可以包括与分离出所述细胞的受试者中天然存在的NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞或其子集相对于总NK细胞或总细胞的百分比相比,增加或更大的NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞或其子集相对于总NK细胞或总细胞的百分比。在一些实施方案中,所述百分比增加至少或至少约2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、150倍、200倍或更多。

[0332] 在一些实施方案中,所述组合物可以包括至少或至少约20%、至少或至少约30%、至少或至少约40%、至少或至少约50%、至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约81%、至少或至少约82%、至少或至少约83%、至少或至少约84%、至少或至少约85%、至少或至少约86%、至少或至少约87%、至少或至少约88%、至少或至少约89%、至少或至少约90%、至少或至少约91%、至少或至少约92%、至少或至少约93%、至少或至少约94%、至少或至少约95%、至少或至少约96%、至少或至少约97%、至少或至少约98%、至少或至少约99%或基本上100% NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞或其子集。在一些实施方案中,所述组合物包含超过50% NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞或其子集。在另一个实施方案中,所述组合物包含超过60% NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞或其子集。在另一个实施方案中,所述组合物包含超过70% NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞或其子集。在另一个实施方案中,所述组合物包含超过80% NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞或其子集。在一些实施方案中,所提供的组合物包括其中NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞或其子集构成组合物中的细胞或组合物中的NK细胞的至少或至少约60%、至少或至少约70%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%或更多的那些。

[0333] 在一些实施方案中,所述组合物包含约5-99% g-NK细胞或者在5%与99%之间且包含端值的任何百分比的g-NK细胞。在一些实施方案中,所述组合物可以包括与分离出所述细胞的受试者中天然存在的g-NK相对于总NK细胞或总细胞的百分比相比,增加或更大的g-NK细胞相对于总NK细胞或总细胞的百分比。在一些实施方案中,所述百分比增加至少或至少约2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、150倍、200倍或更多。

[0334] 在一些实施方案中,所述组合物可以包括至少或至少约20%、至少或至少约30%、至少或至少约40%、至少或至少约50%、至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约81%、至少或至少约82%、至少或至少约83%、至少或至少约84%、至少或至少约85%、至少或至少约86%、至少或至少约87%、至少或至少约88%、至少或至少约89%、至少或至少约90%、至少或至少约91%、

至少或至少约92%、至少或至少约93%、至少或至少约94%、至少或至少约95%、至少或至少约96%、至少或至少约97%、至少或至少约98%、至少或至少约99%或基本上100%g-NK细胞。在一些实施方案中,所述组合物包含超过50%g-NK细胞。在另一个实施方案中,所述组合物包含超过70%g-NK细胞。在另一个实施方案中,所述组合物包含超过80%g-NK细胞。在一些实施方案中,所提供的组合物包括其中g-NK细胞构成组合物中的细胞或组合物中的NK细胞的至少或至少约60%、至少或至少约70%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%或更多的那些。

[0335] 在一些实施方案中,所述组合物包括自然杀伤(NK)细胞子集的群体,其中所述组合物中至少或至少约40%、至少或至少约50%、至少或至少约55%、至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%或者至少或至少约95%的细胞具有呈CD57^{pos}的g-NK细胞替代标记物谱。在一些实施方案中,所述组合物中从或从约70%至为或约90%的细胞具有表型CD57^{pos}。在一些实施方案中,所述组合物中至少或至少约72%、至少或至少约74%、至少或至少约76%、至少或至少约78%、至少或至少约80%、至少或至少约82%、至少或至少约84%、至少或至少约86%、至少或至少约88%、至少或至少约90%、至少或至少约92%、至少或至少约94%、至少或至少约96%或者至少或至少约98%的细胞具有表型CD57^{pos}。在一些任何所提供的实施方案中,所述组合物中至少或至少约60%的细胞包含表型CD57^{pos}。在一些任何所提供的实施方案中,所述组合物中至少或至少约70%的细胞包含表型CD57^{pos}。在一些实施方案中,所述表型还包括表面表型CD3^{neg}。在一些实施方案中,所述表型还包括表面表型CD45^{pos}/CD3^{neg}/CD56^{pos}。在一些任何所提供的实施方案中,在具有这样的表型的细胞中,大于50%为FcR γ ^{neg},任选地在为或约50%与90%之间为FcR γ ^{neg}。在一些任何所提供的实施方案中,在具有这样的表型的细胞中,大于70%为FcR γ ^{neg},任选地在为或约70%与90%之间为FcR γ ^{neg}。

[0336] 在一些实施方案中,所述组合物包括自然杀伤(NK)细胞子集的群体,其中所述组合物中至少或至少约40%、至少或至少约50%、至少或至少约55%、至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%或者至少或至少约95%的细胞具有呈CD16^{pos}/CD57^{pos}/CD7^{dim/neg}/CD161^{neg}的g-NK细胞替代标记物谱。在一些实施方案中,所述组合物中从或从约70%至为或约90%的细胞具有表型CD16^{pos}/CD57^{pos}/CD7^{dim/neg}/CD161^{neg}。在一些实施方案中,所述组合物中至少或至少约72%、至少或至少约74%、至少或至少约76%、至少或至少约78%、至少或至少约80%、至少或至少约82%、至少或至少约84%、至少或至少约86%、至少或至少约88%、至少或至少约90%、至少或至少约92%、至少或至少约94%、至少或至少约96%或者至少或至少约98%的细胞具有表型CD16^{pos}/CD57^{pos}/CD7^{dim/neg}/CD161^{neg}。在一些任何所提供的实施方案中,所述组合物中至少或至少约60%的细胞包含表型CD16^{pos}/CD57^{pos}/CD7^{dim/neg}/CD161^{neg}。在一些任何所提供的实施方案中,所述组合物中至少或至少约70%的细胞包含表型CD16^{pos}/CD57^{pos}/CD7^{dim/neg}/CD161^{neg}。在一些实施方案中,所述表型还包括表面表型CD3^{neg}。在一些实施方案中,所述表型还包括表面表型CD45^{pos}/CD3^{neg}/CD56^{pos}。在一些任何所提供的实施方案中,在具有这样的表型的细胞中,大于50%为FcR γ ^{neg},任选地在为或约50%与90%之间为FcR γ ^{neg}。在一些任何所提供的实施方案中,在具有这样的表型的细

胞中,大于70%为FcR γ^{neg} ,任选地在为或约70%与90%之间为FcR γ^{neg} 。

[0337] 在一些实施方案中,所述组合物包括自然杀伤(NK)细胞子集的群体,其中所述组合物中至少或至少约40%、至少或至少约50%、至少或至少约55%、至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%或者至少或至少约95%的细胞具有呈CD38^{neg}的表型。在一些实施方案中,所述组合物中从或从约70%至为或约90%的细胞具有表型CD38^{neg}。在一些实施方案中,所述组合物中至少或至少约72%、至少或至少约74%、至少或至少约76%、至少或至少约78%、至少或至少约80%、至少或至少约82%、至少或至少约84%、至少或至少约86%、至少或至少约88%、至少或至少约90%、至少或至少约92%、至少或至少约94%、至少或至少约96%或者至少或至少约98%的细胞具有表型CD38^{neg}。在一些任何所提供的实施方案中,所述组合物中至少或至少约60%的细胞包含表型CD38^{neg}。在一些任何所提供的实施方案中,所述组合物中至少或至少约70%的细胞包含表型CD38^{neg}。在一些实施方案中,所述表型还包括表面表型CD3^{neg}。在一些实施方案中,所述表型还包括表面表型CD45^{pos}/CD3^{neg}/CD56^{pos}。在一些任何所提供的实施方案中,在具有这样的表型的细胞中,大于50%为FcR γ^{neg} ,任选地在为或约50%与90%之间为FcR γ^{neg} 。在一些任何所提供的实施方案中,在具有这样的表型的细胞中,大于70%为FcR γ^{neg} ,任选地在为或约70%与90%之间为FcR γ^{neg} 。

[0338] 在一些实施方案中,所述组合物包括自然杀伤(NK)细胞子集的群体,其中所述组合物中至少或至少约40%、至少或至少约50%、至少或至少约55%、至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%或者至少或至少约95%的细胞具有呈CD16^{pos}的表型。在一些实施方案中,所述组合物中从或从约70%至为或约90%的细胞具有表型CD16^{pos}。在一些实施方案中,所述组合物中至少或至少约72%、至少或至少约74%、至少或至少约76%、至少或至少约78%、至少或至少约80%、至少或至少约82%、至少或至少约84%、至少或至少约86%、至少或至少约88%、至少或至少约90%、至少或至少约92%、至少或至少约94%、至少或至少约96%或者至少或至少约98%的细胞具有表型CD16^{pos}。在一些任何所提供的实施方案中,所述组合物中至少或至少约60%的细胞包含表型CD16^{pos}。在一些任何所提供的实施方案中,所述组合物中至少或至少约70%的细胞包含表型CD16^{pos}。在一些实施方案中,所述表型还包括表面表型CD3^{neg}。在一些实施方案中,所述表型还包括表面表型CD45^{pos}/CD3^{neg}/CD56^{pos}。在一些任何所提供的实施方案中,在具有这样的表型的细胞中,大于50%为FcR γ^{neg} ,任选地在为或约50%与90%之间为FcR γ^{neg} 。在一些任何所提供的实施方案中,在具有这样的表型的细胞中,大于70%为FcR γ^{neg} ,任选地在为或约70%与90%之间为FcR γ^{neg} 。

[0339] 在一些实施方案中,所述组合物包括自然杀伤(NK)细胞子集的群体,其中所述组合物中至少或至少约40%、至少或至少约50%、至少或至少约55%、至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%或者至少或至少约95%的细胞具有呈NKG2A^{neg}/CD161^{neg}的g-NK细胞替代标记物谱。在一些实施方案中,所述组合物中从或从约70%至为或约90%的细胞具有表型NKG2A^{neg}/CD161^{neg}。在一些实施方案中,所述组合物中至少或至少约72%、至少或至少约74%、至少或至少约76%、至少或至少约78%、至少或至少约80%、至少或至少约82%、至少或至少约84%、至少或至少约86%、至少或至少约88%、至少或至少约90%、至少

或至少约92%、至少或至少约94%、至少或至少约96%或者至少或至少约98%的细胞具有表型NKG2A^{neg}/CD161^{neg}。在一些任何所提供的实施方案中,所述组合物中至少或至少约60%的细胞包含表型NKG2A^{neg}/CD161^{neg}。在一些任何所提供的实施方案中,所述组合物中至少或至少约70%的细胞包含表型NKG2A^{neg}/CD161^{neg}。在一些实施方案中,所述表型还包括表面表型CD3^{neg}。在一些实施方案中,所述表型还包括表面表型CD45^{pos}/CD3^{neg}/CD56^{pos}。在一些任何所提供的实施方案中,在具有这样的表型的细胞中,大于50%为FcR γ ^{neg},任选地在为或约50%与90%之间为FcR γ ^{neg}。在一些任何所提供的实施方案中,在具有这样的表型的细胞中,大于70%为FcR γ ^{neg},任选地在为或约70%与90%之间为FcR γ ^{neg}。

[0340] 在一些实施方案中,所述组合物包括NK细胞群体,其中所述组合物中大于或大于约50%的NK细胞为g-NK细胞(FcR γ ^{neg})或表达其替代标记物谱的NK细胞。在一些实施方案中,所述组合物包括NK细胞群体,其中所述组合物中大于或大于约55%的NK细胞为g-NK细胞(FcR γ ^{neg})或表达其替代标记物谱的NK细胞。在一些实施方案中,所述组合物包括NK细胞群体,其中所述组合物中大于或大于约60%的NK细胞为g-NK细胞(FcR γ ^{neg})或表达其替代标记物谱的NK细胞。在一些实施方案中,所述组合物包括NK细胞群体,其中所述组合物中大于或大于约65%的NK细胞为g-NK细胞(FcR γ ^{neg})或表达其替代标记物谱的NK细胞。在一些实施方案中,所述组合物包括NK细胞群体,其中所述组合物中大于或大于约70%的NK细胞为g-NK细胞(FcR γ ^{neg})或表达其替代标记物谱的NK细胞。在一些实施方案中,所述组合物包括NK细胞群体,其中所述组合物中大于或大于约75%的NK细胞为g-NK细胞(FcR γ ^{neg})或表达其替代标记物谱的NK细胞。在一些实施方案中,所述组合物包括NK细胞群体,其中所述组合物中大于或大于约80%的NK细胞为g-NK细胞(FcR γ ^{neg})或表达其替代标记物谱的NK细胞。在一些实施方案中,所述组合物包括NK细胞群体,其中所述组合物中大于或大于约85%的NK细胞为g-NK细胞(FcR γ ^{neg})或表达其替代标记物谱的NK细胞。在一些实施方案中,所述组合物包括NK细胞群体,其中所述组合物中大于或大于约90%的NK细胞为g-NK细胞(FcR γ ^{neg})或表达其替代标记物谱的NK细胞。在一些实施方案中,所述组合物包括NK细胞群体,其中所述组合物中大于或大于约95%的NK细胞为g-NK细胞(FcR γ ^{neg})或表达其替代标记物谱的NK细胞。所述替代标记物谱可以是如本文所述的任一种。例如,所述替代标记物谱可以是CD16^{pos}/CD57^{pos}/CD7^{dim/neg}/CD161^{neg}。在其他例子中,所述替代标记物谱可以是NKG2A^{neg}/CD161^{neg}。在另一例子中,所述g-NK细胞替代标记物谱是CD38^{neg}。替代表面标记物谱还可以包括表型CD45^{pos}/CD3^{neg}/CD56^{pos}。

[0341] 在一些实施方案中,所述组合物的g-NK细胞或其某一百分比(例如大于约70%)对穿孔蛋白和/或颗粒酶B呈阳性。用于测量对穿孔蛋白或颗粒酶B呈阳性的细胞的数量方法是技术人员已知的。方法包括例如细胞内流式细胞术。在例子中,在用针对穿孔蛋白和颗粒酶B的抗体染色之前,可以通过细胞的渗透化处理(例如使用来自Miltenyi Biotec的内部染色套件)来确定对穿孔蛋白或颗粒酶B呈阳性的细胞的百分比或数量。然后可以解析细胞染色,例如使用流式细胞术来解析。

[0342] 在一些实施方案中,所述组合物中大于或大于约70%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性,并且所述组合物中大于或大于约70%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,所述组合物中大于或大于约75%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性,并且所述组合物中大于或大于约75%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,所述组合物中大于或大

于约80%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性,并且所述组合物中大于或大于约80%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,所述组合物中大于或大于约85%g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性,并且所述组合物中大于或大于约85%g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,所述组合物中大于或大于约90%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性,并且所述组合物中大于或大于约90%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。在一些实施方案中,所述组合物中大于或大于约95%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性,并且所述组合物中大于或大于约95%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。

[0343] 在一些实施方案中,NK细胞(例如g-NK细胞)的穿孔蛋白和颗粒酶B表达水平可以通过细胞内流式细胞术来测量,并且基于平均荧光强度(MFI)水平测量水平。在一些实施方案中,基于MFI的穿孔蛋白和颗粒酶B表达水平将在g-NK细胞与呈FcR γ^{pos} 的细胞之间不同。在一些实施方案中,所述组合物中对穿孔蛋白呈阳性的g-NK细胞表达的穿孔蛋白的平均水平(基于MFI水平)是FcR γ^{pos} NK细胞表达的穿孔蛋白的平均水平的至少或至少约两倍。在一些实施方案中,所述组合物中对穿孔蛋白呈阳性的g-NK细胞表达的穿孔蛋白的平均水平(基于MFI水平)是FcR γ^{pos} NK细胞表达的穿孔蛋白的平均水平的至少或至少约三倍。在一些实施方案中,所述组合物中对穿孔蛋白呈阳性的g-NK细胞表达的穿孔蛋白的平均水平(基于MFI水平)是FcR γ^{pos} NK细胞表达的穿孔蛋白的平均水平的至少或至少约四倍。在一些实施方案中,所述组合物中对颗粒酶B呈阳性的g-NK细胞表达的颗粒酶B的平均水平(基于MFI水平)是FcR γ^{pos} NK细胞表达的颗粒酶B的平均水平的至少或至少约两倍。在一些实施方案中,所述组合物中对颗粒酶B呈阳性的g-NK细胞表达的颗粒酶B的平均水平(基于MFI水平)是FcR γ^{pos} NK细胞表达的颗粒酶B的平均水平的至少或至少约三倍。在一些实施方案中,所述组合物中对颗粒酶B呈阳性的g-NK细胞表达的颗粒酶B的平均水平(基于MFI水平)是FcR γ^{pos} NK细胞表达的颗粒酶B的平均水平的至少或至少约四倍。

[0344] 在一些任何所提供的实施方案中,所述组合物包含为或约 10^6 个细胞至为或约 10^{12} 个细胞。在一些任何所提供的实施方案中,所述组合物包含为或约 10^6 至为或约 10^{11} 个细胞、为或约 10^6 至为或约 10^{10} 个细胞、为或约 10^6 至为或约 10^9 个细胞、为或约 10^6 至为或约 10^8 个细胞、为或约 10^6 至为或约 10^7 个细胞、为或约 10^7 至为或约 10^{12} 个细胞、为或约 10^7 至为或约 10^{11} 个细胞、为或约 10^7 至为或约 10^{10} 个细胞、为或约 10^7 至为或约 10^9 个细胞或者为或约 10^7 至为或约 10^8 个细胞、为或约 10^8 至为或约 10^{12} 个细胞、为或约 10^8 至为或约 10^{11} 个细胞、为或约 10^8 至为或约 10^{10} 个细胞、为或约 10^8 至为或约 10^9 个细胞、为或约 10^9 至为或约 10^{12} 个细胞、为或约 10^9 至为或约 10^{11} 个细胞、为或约 10^9 至为或约 10^{10} 个细胞、为或约 10^{10} 至为或约 10^{12} 个细胞、为或约 10^{10} 至为或约 10^{11} 个细胞或者为或约 10^{11} 至为或约 10^{12} 个细胞。

[0345] 在一些任何所提供的实施方案中,所述组合物包含至少或约至少 10^6 个细胞。在一些任何所提供的实施方案中,所述组合物包含为或约 10^6 至为或约 10^{10} 个细胞、为或约 10^6 至为或约 10^9 个细胞、为或约 10^6 至为或约 10^8 个细胞、为或约 10^6 至为或约 10^7 个细胞、为或约 10^7 至为或约 10^{10} 个细胞、为或约 10^7 至为或约 10^9 个细胞、为或约 10^7 至为或约 10^8 个细胞、为或约 10^8 至为或约 10^{10} 个细胞、为或约 10^8 至为或约 10^9 个细胞或者为或约 10^9 至为或约 10^{10} 个细胞。

[0346] 在一些任何所提供的实施方案中,所述组合物包含至少或约至少 10^8 个细胞。在一些任何所提供的实施方案中,所述组合物包含至少或至少约 10^9 个细胞。在一些任何所提供的实施方案中,所述组合物包含至少或至少约 10^{10} 个细胞。在一些任何所提供的实施方案

中,所述组合物包含至少或至少约 10^{11} 个细胞。在一些任何所提供的实施方案中,所述组合物包含为或约 10^8 至为或约 10^{11} 个细胞。在一些任何所提供的实施方案中,所述组合物包含为或约 10^8 至为或约 10^{10} 个细胞。在一些任何所提供的实施方案中,所述组合物包含为或约 10^8 至为或约 10^9 个细胞。在一些任何所提供的实施方案中,所述组合物包含为或约 10^9 至为或约 10^{10} 个细胞。在一些任何所提供的实施方案中,所述组合物包含为或约 10^9 至为或约 10^{11} 个细胞。在一些任何所提供的实施方案中,所述组合物包含为或约 10^{10} 至为或约 10^{11} 个细胞。

[0347] 在一些任何所提供的实施方案中,所述组合物包含至少或至少约 10^6 个g-NK细胞。在一些任何所提供的实施方案中,所述组合物包含为或约 10^6 至为或约 10^{10} 个g-NK细胞、为或约 10^6 至为或约 10^9 个g-NK细胞、为或约 10^6 至为或约 10^8 个g-NK细胞、为或约 10^6 至为或约 10^7 个g-NK细胞、为或约 10^7 至为或约 10^{10} 个g-NK细胞、为或约 10^7 至为或约 10^9 个g-NK细胞、为或约 10^7 至为或约 10^8 个g-NK细胞、为或约 10^8 至为或约 10^{10} 个g-NK细胞、为或约 10^8 至为或约 10^9 个g-NK细胞或者为或约 10^9 至为或约 10^{10} 个g-NK细胞。在一些任何所提供的实施方案中,所述g-NK细胞为FcR γ^{neg} 。在一些任何所提供的实施方案中,所述g-NK细胞为具有g-NK替代表面标记物谱的细胞。在一些实施方案中,所述g-NK细胞替代表面标记物谱为CD16^{pos}/CD57^{pos}/CD7^{dim/neg}/CD161^{neg}。在一些实施方案中,所述g-NK细胞替代表面标记物谱为NKG2A^{neg}/CD161^{neg}。在一些任何所提供的实施方案中,所述g-NK细胞或具有g-NK替代标记物谱的细胞还包括表面表型CD45^{pos}/CD3^{neg}/CD56^{pos}。在一些任何所提供的实施方案中,所述g-NK细胞或具有g-NK替代标记物谱的细胞还包括表面表型CD38^{neg}。

[0348] 在任何所提供组合物的特定实施方案中,所述组合物中的细胞来自同一供体。因此,所述组合物不包括来自一个或多个不同供体的细胞的混合群体。如本文所提供,所述扩增方法导致某些NK细胞子集、特别是g-NK细胞子集或者与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集(如任何上述NK细胞子集)的为或大于500倍、为或大于600倍、为或大于700倍、为或大于800倍、为或大于900倍、为或大于1000倍或更多的高产率扩增。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约1000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约2000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约2500倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约3000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约5000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约10000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约15000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约20000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约25000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约30000倍。在一些任何实施方案中,所述增加是大为或约35000倍。在特定实施方案中,扩增导致某些NK细胞子集、特别是g-NK细胞子集或者与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集(如任何上述NK细胞子集)的数量的为或约1,000倍增加。在特定实施方案中,扩增导致某些NK细胞子集、特别是g-NK细胞子集或者与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集(如任何上述NK细胞子集)的数量的为或约3,000倍增加。在特定实施方案中,扩增导致某些NK细胞子集、特别是g-NK细胞子集或者与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集(如任何上述NK细胞子集)的数量的为或约35,000倍增加。

[0349] 在一些情形中,通过所提供方法从获自单一供体的NK细胞初始来源实现的扩增可以产生细胞组合物以提供用于施用至有需要的受试者的多个单独剂量。因此,所提供的方

法特别适合于同种异体方法。在一些情形中,根据所提供方法从分离自一名供体的NK细胞的起始群体的单一扩增可以得到用于施用至有需要的受试者的大于或大于约20个单独剂量,如为或约30个单独剂量、40个单独剂量、50个单独剂量、60个单独剂量、70个单独剂量、80个单独剂量、90个单独剂量、100个单独剂量或者为前述任一项之间的值的单独剂量。在一些实施方案中,所述单独剂量是为或约 1×10^5 个细胞/kg至为或约 1×10^7 个细胞/kg,如为或约 1×10^5 个细胞/kg至为或约 7.5×10^6 个细胞/kg、为或约 1×10^5 个细胞/kg至为或约 5×10^6 个细胞/kg、为或约 1×10^5 个细胞/kg至为或约 2.5×10^6 个细胞/kg、为或约 1×10^5 个细胞/kg至为或约 1×10^6 个细胞/kg、为或约 1×10^5 个细胞/kg至为或约 7.5×10^5 个细胞/kg、为或约 1×10^5 个细胞/kg至为或约 5×10^5 个细胞/kg、为或约 1×10^5 个细胞/kg至为或约 2.5×10^5 个细胞/kg、为或约 1×10^5 个细胞/kg至为或约 2.5×10^5 个细胞/kg、为或约 1×10^7 个细胞/kg、为或约 2.5×10^5 个细胞/kg至为或约 7.5×10^6 个细胞/kg、为或约 2.5×10^5 个细胞/kg至为或约 5×10^6 个细胞/kg、为或约 2.5×10^5 个细胞/kg至为或约 2.5×10^6 个细胞/kg、为或约 2.5×10^5 个细胞/kg至为或约 1×10^6 个细胞/kg、为或约 2.5×10^5 个细胞/kg至为或约 7.5×10^5 个细胞/kg、为或约 2.5×10^5 个细胞/kg至为或约 5×10^5 个细胞/kg、为或约 5×10^5 个细胞/kg至为或约 1×10^7 个细胞/kg、为或约 5×10^5 个细胞/kg至为或约 7.5×10^6 个细胞/kg、为或约 5×10^5 个细胞/kg至为或约 5×10^6 个细胞/kg、为或约 5×10^5 个细胞/kg至为或约 2.5×10^6 个细胞/kg、为或约 5×10^5 个细胞/kg至为或约 1×10^6 个细胞/kg、为或约 5×10^5 个细胞/kg至为或约 7.5×10^5 个细胞/kg、为或约 1×10^6 个细胞/kg至为或约 1×10^7 个细胞/kg、为或约 1×10^6 个细胞/kg至为或约 7.5×10^6 个细胞/kg、为或约 1×10^6 个细胞/kg至为或约 5×10^6 个细胞/kg、为或约 1×10^6 个细胞/kg至为或约 2.5×10^6 个细胞/kg、为或约 1×10^7 个细胞/kg、为或约 2.5×10^6 个细胞/kg至为或约 7.5×10^6 个细胞/kg、为或约 2.5×10^6 个细胞/kg至为或约 5×10^6 个细胞/kg、为或约 5×10^6 个细胞/kg至为或约 1×10^7 个细胞/kg、为或约 5×10^6 个细胞/kg至为或约 7.5×10^6 个细胞/kg或者为或约 7.5×10^6 个细胞/kg至为或约 1×10^7 个细胞/kg。在一些实施方案中,所述单独剂量是为或约 1×10^5 个细胞/kg至为或约 1×10^8 个细胞/kg,如为或约 2.5×10^5 个细胞/kg至为或约 1×10^8 个细胞/kg、为或约 5×10^5 个细胞/kg至为或约 1×10^8 个细胞/kg、为或约 7.5×10^5 个细胞/kg至为或约 1×10^8 个细胞/kg、为或约 1×10^6 个细胞/kg至为或约 1×10^8 个细胞/kg、为或约 2.5×10^6 个细胞/kg至为或约 1×10^8 个细胞/kg、为或约 5×10^6 个细胞/kg至为或约 1×10^8 个细胞/kg、为或约 7.5×10^6 个细胞/kg至为或约 1×10^8 个细胞/kg、为或约 1×10^7 个细胞/kg至为或约 1×10^8 个细胞/kg、为或约 2.5×10^7 个细胞/kg至为或约 1×10^8 个细胞/kg、为或约 5×10^7 个细胞/kg至为或约 1×10^8 个细胞/kg或者为或约 7.5×10^7 个细胞/kg至为或约 1×10^8 个细胞/kg。在一些实施方案中,所述单独剂量是为或约 5×10^7 至为或约 10×10^9 ,如为或约 5×10^7 至为或约 5×10^9 、约或约 5×10^7 至为或约 1×10^9 、为或约 5×10^7 至为或约 5×10^8 、约或约 5×10^7 至为或约 1×10^8 、 1×10^8 至为或约 10×10^9 、为或约 1×10^8 至为或约 5×10^9 、约或约 1×10^8 至为或约 1×10^9 、为或约 1×10^8 至为或约 5×10^8 、为或约 5×10^8 至为或约 10×10^9 、为或约 5×10^8 至为或约 5×10^9 、约或约 5×10^8 至为或约 1×10^9 、为或约 1×10^9 至为或约 10×10^9 、为或约 1×10^9 至为或约 5×10^9 或者为或约 5×10^9 至为或约 10×10^9 。在一些实施方案中,所述单独剂量为或为约 5×10^8 个细胞。在一些实施方案中,所述单独剂量为或为约 1×10^9 个细胞。在一些实施方案中,所述单独剂量为或为约 5×10^9 个细胞。在一些实施方案中,所述单独剂量为或为约 1×10^{10} 个细胞。在任何上文实施方案中,剂量以如下细胞的数量给出:g-NK细胞或与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集,如任

何上述NK细胞子集,或者前述任一项的活细胞的数量。在任何上文实施方案中,剂量以如下形式给出:通过所述方法产生的扩增细胞的组合物中的细胞数量,或者前述任一项的活细胞的数量。

[0350] 所述组合物包括用于施用、如用于过继细胞疗法的药物组合物和配制品。在一些实施方案中,用药学上可接受的载体配制工程化的细胞。

[0351] 药学上可接受的载体可以包括与药物施用相容的所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等 (Gennaro, 2000, Remington: The science and practice of pharmacy, Lippincott, Williams & Wilkins, 费城, 宾夕法尼亚州)。这样的载体或稀释剂的例子包括但不限于水、盐水、林格氏溶液、右旋糖溶液和5%人血清白蛋白。也可使用脂质体和非水性媒介物,如不挥发油。还可以将补充性活性化合物掺入组合物中。药学载体应当是适合于NK细胞的载体,如盐水溶液、右旋糖溶液或包含人血清白蛋白的溶液。

[0352] 在一些实施方案中,用于此类组合物的药学上可接受的载体或媒介物是任何无毒的水溶液,其中NK细胞可以维持或保持存活足够长时间,以允许施用活的NK细胞。例如,所述药学上可接受的载体或媒介物可以是盐溶液或缓冲盐溶液。所述药学上可接受的载体或媒介物还可以包括可以增加NK细胞的效率的各种生物材料。细胞媒介物和载体可以例如包括多糖(如甲基纤维素) (M.C. Tate, D.A. Shear, S.W. Hoffman, D.G. Stein, M.C. LaPlaca, *Biomaterials* 22, 1113, 2001, 其通过引用以其整体并入本文)、壳聚糖 (Suh J K F, Matthew H W T. *Biomaterials*, 21, 2589, 2000; Lahiji A, Sohrabi A, Hungerford D S, 等人, *J Biomed Mater Res*, 51, 586, 2000, 其各自通过引用以其整体并入本文)、N-异丙基丙烯酰胺共聚物P(NIPAM-共-AA) (Y.H. Bae, B. Vernon, C.K. Han, S.W. Kim, *J. Control. Release* 53, 249, 1998; H. Gappa, M. Baudys, J.J. Koh, S.W. Kim, Y.H. Bae, *Tissue Eng.* 7, 35, 2001, 其各自通过引用以其整体并入本文), 以及聚(氧乙烯)/聚(D,L-乳酸-共-乙醇酸) (B. Jeong, K.M. Lee, A. Gutowska, Y.H. An, *Biomacromolecules* 3, 865, 2002, 其通过引用以其整体并入本文)、P(PF-共-EG) (Suggs L J, Mikos A G. *Cell Trans*, 8, 345, 1999, 其通过引用以其整体并入本文)、PEO/PEG (Mann B K, Gobin A S, Tsai A T, Schmedlen R H, West J L., *Biomaterials*, 22, 3045, 2001; Bryant S J, Anseth K S. *Biomaterials*, 22, 619, 2001, 其各自通过引用以其整体并入本文)、PVA (Chih-Ta Lee, Po-Han Kung 和 Yu-Der Lee, *Carbohydrate Polymers*, 61, 348, 2005, 其通过引用以其整体并入本文)、胶原蛋白 (Lee CR, Grodzinsky A J, Spector M., *Biomaterials* 22, 3145, 2001, 其通过引用以其整体并入本文)、藻酸盐 (Bouhadir K H, Lee K Y, Alsberg E, Damm K L, Anderson K W, Mooney D J. *Biotech Prog* 17, 945, 2001; Smidsrd O, Skjak-Braek G., *Trends Biotech*, 8, 71, 1990, 其各自通过引用以其整体并入本文)。

[0353] 在一些实施方案中,NK细胞如NKG2C^{pos}细胞或其子集可以以有效量存在于所述组合物中。在一些实施方案中,所述组合物含有有效量的g-NK细胞,如FcR γ ^{neg}细胞或具有其g-NK替代标记物谱的细胞。细胞的有效量可以根据患者以及疾病的类型、严重程度和范围而变化。因此,医师可以在考虑受试者的健康、疾病的范围和严重程度以及其他变量后确定有效量。

[0354] 在某些实施方案中,这样的细胞在所述组合物中的数量是治疗有效量。在一些实施方案中,所述量是降低动物中与癌症、病毒感染、微生物感染或脓毒性休克相关的严重程

度、持续时间和/或症状的量。在一些实施方案中,治疗有效量是细胞的如下剂量,所述剂量导致相对于未施用本文所述的组合物的患者(或动物)或患者(或动物)组中癌症的生长或扩散,施用所述组合物的患者或动物中癌症的生长或扩散减少至少2.5%、至少5%、至少10%、至少15%、至少25%、至少35%、至少45%、至少50%、至少75%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%。在一些实施方案中,治疗有效量是导致细胞毒性活性从而产生抑制或减少癌症、病毒和微生物细胞生长的活性的量。

[0355] 在一些实施方案中,所述组合物包含如下量的NKG2C^{pos}细胞或其子集:为或约 10^5 与为或约 10^{12} 个NKG2C^{pos}细胞或其子集、或者为或约 10^5 至为或约 10^8 个NKG2C^{pos}细胞或其子集、或者为或约 10^6 与为或约 10^{12} 个NKG2C^{pos}细胞或其子集、或者为或约 10^8 与为或约 10^{11} 个NKG2C^{pos}细胞或其子集、或者为或约 10^9 与为或约 10^{10} 个NKG2C^{pos}细胞或其子集。在一些实施方案中,所述组合物包含大于或大于或大于约 10^5 个NKG2C^{pos}细胞或其子集、为或约 10^6 个NKG2C^{pos}细胞或其子集、为或约 10^7 个NKG2C^{pos}细胞或其子集、为或约 10^8 个NKG2C^{pos}细胞或其子集、为或约 10^9 个NKG2C^{pos}细胞或其子集、为或约 10^{10} 个NKG2C^{pos}细胞或其子集、为或约 10^{11} 个NKG2C^{pos}细胞或其子集或者为或约 10^{12} 个NKG2C^{pos}细胞或其子集。在一些实施方案中,可以将这样的量施用至患有疾病或病症的受试者,如施用至癌症患者。

[0356] 在一些实施方案中,所述组合物包含如下量的g-NK细胞:为或约 10^5 与为或约 10^{12} 个g-NK细胞、或者为或约 10^5 至为或约 10^8 个g-NK细胞、或者为或约 10^6 与为或约 10^{12} 个g-NK细胞、或者为或约 10^8 与为或约 10^{11} 个g-NK细胞、或者为或约 10^9 与为或约 10^{10} 个g-NK细胞。在一些实施方案中,所述组合物包含大于或大于或大于约 10^5 个g-NK细胞、为或约 10^6 个g-NK细胞、为或约 10^7 个g-NK细胞、为或约 10^8 个g-NK细胞、为或约 10^9 个g-NK细胞、为或约 10^{10} 个g-NK细胞、为或约 10^{11} 个g-NK细胞或者为或约 10^{12} 个g-NK细胞。在一些实施方案中,可以将这样的量施用至患有疾病或病症的受试者,如施用至癌症患者。

[0357] 在一些实施方案中,所述组合物的体积是至少或至少约10mL、50mL、100mL、200mL、300mL、400mL或500mL,如是从或从约10mL至500mL、10mL至200mL、10mL至100mL、10mL至50mL、50mL至500mL、50mL至200mL、50mL至100mL、100mL至500mL、100mL至200mL或者200mL至500mL,每个都包含端值。在一些实施方案中,所述组合物的细胞密度为至少或至少约 1×10^5 个细胞/mL、 5×10^5 个细胞/mL、 1×10^6 个细胞/mL、 5×10^6 个细胞/mL、 1×10^7 个细胞/mL、 5×10^7 个细胞/mL或 1×10^8 个细胞/mL。在一些实施方案中,所述组合物的细胞密度是在或在约 1×10^5 个细胞/mL至 1×10^8 个细胞/mL之间、 1×10^5 个细胞/mL至 1×10^7 个细胞/mL之间、 1×10^5 个细胞/mL至 1×10^6 个细胞/mL之间、 1×10^6 个细胞/mL至 1×10^7 个细胞/mL之间、 1×10^6 个细胞/mL至 1×10^8 个细胞/mL之间、 1×10^6 个细胞/mL至 1×10^7 个细胞/mL之间或 1×10^7 个细胞/mL至 1×10^8 个细胞/mL之间,每个都包含端值。

[0358] 在一些实施方案中,包括药物组合物在内的所述组合物是无菌的。在一些实施方案中,细胞的分离、富集或培养是在封闭或无菌环境中进行,例如且举例而言在无菌培养袋中进行,以使误差、用户操作和/或污染降至最低。在一些实施方案中,可以容易地实现无菌性,例如,通过经无菌滤膜过滤来实现。在一些实施方案中,培养是使用透气性培养器皿来进行。在一些实施方案中,培养是使用生物反应器来进行。

[0359] 本文还提供适合于低温保存所提供的NK细胞的组合物。在一些实施方案中,将NK细胞低温保存于无血清低温保存介质中。在一些实施方案中,所述组合物包含低温保护剂。

在一些实施方案中,所述低温保护剂是或包含DMSO和/或甘油。在一些实施方案中,所述低温保存介质是在为或约5%与为或约10%之间的DMSO (v/v)。在一些实施方案中,所述低温保存介质是为或约5% DMSO (v/v)。在一些实施方案中,所述低温保存介质是为或约6% DMSO (v/v)。在一些实施方案中,所述低温保存介质是为或约7% DMSO (v/v)。在一些实施方案中,所述低温保存介质是为或约8% DMSO (v/v)。在一些实施方案中,所述低温保存介质是为或约9% DMSO (v/v)。在一些实施方案中,所述低温保存介质是为或约10% DMSO (v/v)。在一些实施方案中,所述低温保存介质含有市售低温保存溶液(CryoStorTMCS10)。CryoStorTMCS10是含有10%二甲亚砜(DMSO)的低温保存介质。在一些实施方案中,可以将配制用于低温保存的组合物储存在低温(如超低温)下,例如,储存的温度范围为-40℃至-150℃,如为或约80℃±6.0℃。

[0360] 在一些实施方案中,在施用至患者之前,可以将所述组合物保存在超低温下。在一些方面,在施用至受试者之前,可以分离、处理和扩增(如根据所提供方法)NK细胞子集(如g-NK细胞),然后将其储存在超低温下。

[0361] 用于以小规模保存在超低温下的典型方法描述于例如美国专利号6,0168,991中。对于小规模,可以将细胞通过低密度悬浮(例如,以约 $200 \times 10^6/\text{ml}$ 的浓度)于预先冷却的5%人白蛋白血清(HAS)中而保存在超低温下。可以将等效量的20% DMSO添加至HAS溶液中。可以将混合物的等分样品置于小瓶中并在约-80℃的超低温室内冷冻过夜。

[0362] 在一些实施方案中,制备低温保存的NK细胞用于通过解冻来施用。在一些情形中,可以在解冻后立即将NK细胞施用至受试者。在这样的实施方案中,所述组合物无需任何进一步处理即随时可用。在其他情形中,在解冻后进一步处理NK细胞,如通过用药学上可接受的载体重悬,与激活或刺激剂一起孵育,或者在施用至受试者之前激活、洗涤并重悬于药学上可接受的缓冲液中。

IV. 治疗方法

[0363] 本文提供涉及本文所述的包含g-NK细胞的所提供细胞组合物的组合物和方法,其用于治疗受试者的疾病或病症。在一些实施方案中,本文提供一种治疗个体的病症的方法,所述方法包括将任何所提供组合物(如包含g-NK细胞的组合物)施用至有需要的个体。在特定实施方案中,所述组合物是通过本文所提供的方法产生的。这样的方法和用途包括治疗性方法和用途,例如,其涉及将治疗性细胞或含有所述治疗性细胞的组合物施用至患有疾病、病症或障碍的受试者。在一些情形中,所述疾病或障碍是肿瘤或癌症。在一些实施方案中,所述疾病或障碍是病毒感染。在一些实施方案中,以有效量施用细胞或其药物组合物以实现疾病或障碍的治疗。用途包括细胞或其药物组合物在这样的方法和治疗中,以及在用于进行这样的治疗方法的药物的制备中的用途。在一些实施方案中,所述方法由此治疗所述受试者的疾病或病症或障碍。

[0364] 在一些实施方案中,所述治疗方法或用途涉及将有效量的含有通过所提供方法产生的扩增的NK细胞的组合物的组合物施用至个体。在一些实施方案中,将为或约 10^5 至为约 10^{12} 、或者为或约 10^5 与为或约 10^8 、或者为或约 10^6 与为或约 10^{12} 、或者为或约 10^8 与为或约 10^{11} 或者为或约 10^9 与为或约 10^{10} 的这样的扩增的NK细胞施用至单独受试者。在一些实施方案中,将含有为或大于或大于约 10^5 、为或大于或大于约 10^6 、为或大于或大于约 10^7 、为或大于或大于约 10^8 、为或大于或大于约 10^9 、为或大于或大于约 10^{10} 、为或大于或大于约 10^{11} 或者

为或大于或大于约 10^{12} 的这样的扩增的NK细胞的细胞剂量施用至个体。在一些实施方案中,将从或从约 10^6 至 10^{10} 的这样的扩增的NK细胞/kg施用至受试者。

[0365] 在一些实施方案中,所述治疗方法或用途涉及将有效量的任何所提供的NK细胞组合物(包括如章节III中所述的任一种)施用至个体。在一些实施方案中,将为或约 10^5 至为约 10^{12} 、或者为或约 10^5 与为或约 10^8 、或者为或约 10^6 与为或约 10^{12} 、或者为或约 10^8 与为或约 10^{11} 、或者为或约 10^9 与为或约 10^{10} 的来自任何所提供组合物的NK细胞施用至单独受试者。在一些实施方案中,将含有为或大于或大于约 10^5 、为或大于或大于约 10^6 、为或大于或大于约 10^7 、为或大于或大于约 10^8 、为或大于或大于约 10^9 、为或大于或大于约 10^{10} 、为或大于或大于约 10^{11} 或者为或大于或大于约 10^{12} 的来自任何所提供组合物的NK细胞的细胞剂量施用至个体。在一些实施方案中,将从或从约 10^6 至 10^{10} 的任何所提供组合物的NK细胞/kg施用至受试者。

[0366] 在一些实施方案中,所述治疗方法或用途涉及将有效量的含有NKG2C^{pos}细胞或其子集的群体的组合物施用至个体。在一些实施方案中,为或约 10^5 至为约 10^{12} 个NKG2C^{pos}细胞或其子集、或者为或约 10^5 与为或约 10^8 个NKG2C^{pos}细胞或其子集、或者为或约 10^6 与为或约 10^{12} 个NKG2C^{pos}细胞或其子集、或者为或约 10^8 与为或约 10^{11} 个NKG2C^{pos}细胞或其子集、或者为或约 10^9 与为或约 10^{10} 个NKG2C^{pos}细胞或其子集。在一些实施方案中,将含有为或大于或大于约 10^5 个NKG2C^{pos}细胞或其子集、为或大于或大于约 10^6 个NKG2C^{pos}细胞或其子集、为或大于或大于约 10^7 个NKG2C^{pos}细胞或其子集、为或大于或大于约 10^8 个NKG2C^{pos}细胞或其子集、为或大于或大于约 10^9 个NKG2C^{pos}细胞或其子集、为或大于或大于约 10^{10} 个NKG2C^{pos}细胞或其子集、为或大于或大于约 10^{11} 个NKG2C^{pos}细胞或其子集、或者为或大于或大于约 10^{12} 个NKG2C^{pos}细胞或其子集的细胞剂量施用至个体。在一些实施方案中,将从或从约 10^6 至 10^{10} 个g NKG2C^{pos}细胞或其子集/公斤受试者体重施用至受试者。

[0367] 在一些实施方案中,所述治疗方法或用途涉及将有效量的含有NKG2A^{neg}细胞或其子集的群体的组合物施用至个体。在一些实施方案中,为或约 10^5 至为约 10^{12} 个NKG2A^{neg}细胞或其子集、或者为或约 10^5 与为或约 10^8 个NKG2A^{neg}细胞或其子集、或者为或约 10^6 与为或约 10^{12} 个NKG2A^{neg}细胞或其子集、或者为或约 10^8 与为或约 10^{11} 个NKG2A^{neg}细胞或其子集、或者为或约 10^9 与为或约 10^{10} 个NKG2A^{neg}细胞或其子集。在一些实施方案中,将含有为或大于或大于约 10^5 个NKG2A^{neg}细胞或其子集、为或大于或大于约 10^6 个NKG2A^{neg}细胞或其子集、为或大于或大于约 10^7 个NKG2A^{neg}细胞或其子集、为或大于或大于约 10^8 个NKG2A^{neg}细胞或其子集、为或大于或大于约 10^9 个NKG2A^{neg}细胞或其子集、为或大于或大于约 10^{10} 个NKG2A^{neg}细胞或其子集、为或大于或大于约 10^{11} 个NKG2A^{neg}细胞或其子集、或者为或大于或大于约 10^{12} 个NKG2A^{neg}细胞或其子集的细胞剂量施用至个体。在一些实施方案中,将从或从约 10^6 至 10^{10} 个g NKG2A^{neg}细胞或其子集/公斤受试者体重施用至受试者。

[0368] 在一些实施方案中,所述治疗方法或用途涉及将有效量的含有NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞或其子集的群体的组合物施用至个体。在一些实施方案中,为或约 10^5 至为约 10^{12} 个NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞或其子集、或者为或约 10^5 与为或约 10^8 个NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞或其子集、或者为或约 10^6 与为或约 10^{12} 个NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞或其子集、或者为或约 10^8 与为或约 10^{11} 个NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞或其子集、或者为或约 10^9 与为或约 10^{10} 个NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞或其子集。在一些实施方案中,将含有为或大于或大于约 10^5 个NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞或其子

集、为或大于或大于约 10^6 个NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞或其子集、为或大于或大于约 10^7 个NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞或其子集、为或大于或大于约 10^8 个NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞或其子集、为或大于或大于约 10^9 个NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞或其子集、为或大于或大于约 10^{10} 个NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞或其子集、为或大于或大于约 10^{11} 个NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞或其子集、或者为或大于或大于约 10^{12} 个NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞或其子集的细胞剂量施用至个体。在一些实施方案中,将从或从约 10^6 至 10^{10} 个g NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}细胞或其子集/公斤受试者体重施用至受试者。

[0369] 在一些实施方案中,所述治疗方法包括将有效量的含有g-NK细胞的组合物施用至个体。在一些实施方案中,为或约 10^5 至为或约 10^{12} 个g-NK细胞、或者为或约 10^5 与为或约 10^8 个g-NK细胞、或者为或约 10^6 与为或约 10^{12} 个g-NK细胞、或者为或约 10^8 与为或约 10^{11} 个g-NK细胞、或者为或约 10^9 与为或约 10^{10} 个g-NK细胞。在一些实施方案中,将含有为或大于或大于约 10^5 个g-NK细胞、为或大于或大于约 10^6 个g-NK细胞、为或大于或大于约 10^7 个g-NK细胞、为或大于或大于约 10^8 个g-NK细胞、为或大于或大于约 10^9 个g-NK细胞、为或大于或大于约 10^{10} 个g-NK细胞、为或大于或大于约 10^{11} 个g-NK细胞、或者为或大于或大于约 10^{12} 个g-NK细胞的细胞剂量施用至个体。在一些实施方案中,将从或从约 10^6 至 10^{10} 个g-NK细胞/kg施用至受试者。

[0370] 在一些实施方案中,用于根据任何所提供的治疗方法或用途施用的剂量是为或约 1×10^5 个细胞/kg至为或约 1×10^7 个细胞/kg,如为或约 1×10^5 个细胞/kg至为或约 7.5×10^6 个细胞/kg、为或约 1×10^5 个细胞/kg至为或约 5×10^6 个细胞/kg、为或约 1×10^5 个细胞/kg至为或约 2.5×10^6 个细胞/kg、为或约 1×10^5 个细胞/kg至为或约 1×10^6 个细胞/kg、为或约 1×10^5 个细胞/kg至为或约 7.5×10^5 个细胞/kg、为或约 1×10^5 个细胞/kg至为或约 5×10^5 个细胞/kg、为或约 1×10^5 个细胞/kg至为或约 2.5×10^5 个细胞/kg、为或约 2.5×10^5 个细胞/kg至为或约 1×10^7 个细胞/kg、为或约 2.5×10^5 个细胞/kg至为或约 7.5×10^6 个细胞/kg、为或约 2.5×10^5 个细胞/kg至为或约 5×10^6 个细胞/kg、为或约 2.5×10^5 个细胞/kg至为或约 2.5×10^6 个细胞/kg、为或约 2.5×10^5 个细胞/kg至为或约 1×10^6 个细胞/kg、为或约 2.5×10^5 个细胞/kg至为或约 7.5×10^5 个细胞/kg、为或约 2.5×10^5 个细胞/kg至为或约 5×10^5 个细胞/kg、为或约 5×10^5 个细胞/kg至为或约 1×10^7 个细胞/kg、为或约 5×10^5 个细胞/kg至为或约 7.5×10^6 个细胞/kg、为或约 5×10^5 个细胞/kg至为或约 5×10^6 个细胞/kg、为或约 5×10^5 个细胞/kg至为或约 2.5×10^6 个细胞/kg、为或约 5×10^5 个细胞/kg至为或约 1×10^6 个细胞/kg、为或约 5×10^5 个细胞/kg至为或约 7.5×10^5 个细胞/kg、为或约 1×10^6 个细胞/kg至为或约 1×10^7 个细胞/kg、为或约 1×10^6 个细胞/kg至为或约 7.5×10^6 个细胞/kg、为或约 1×10^6 个细胞/kg至为或约 5×10^6 个细胞/kg、为或约 1×10^6 个细胞/kg至为或约 2.5×10^6 个细胞/kg、为或约 2.5×10^6 个细胞/kg至为或约 1×10^7 个细胞/kg、为或约 2.5×10^6 个细胞/kg至为或约 7.5×10^6 个细胞/kg、为或约 2.5×10^6 个细胞/kg至为或约 5×10^6 个细胞/kg、为或约 5×10^6 个细胞/kg至为或约 1×10^7 个细胞/kg、为或约 5×10^6 个细胞/kg至为或约 7.5×10^6 个细胞/kg或者为或约 7.5×10^6 个细胞/kg至为或约 1×10^7 个细胞/kg。在一些实施方案中,用于施用的剂量是为或约 1×10^5 个细胞/kg至为或约 1×10^8 个细胞/kg,如为或约 2.5×10^5 个细胞/kg至为或约 1×10^8 个细胞/kg、为或约 5×10^5 个细胞/kg至为或约 1×10^8 个细胞/kg、为或约 7.5×10^5 个细胞/kg至为或约 1×10^8 个细胞/kg、为或约 1×10^6 个细胞/kg至为或约 1×10^8 个细胞/kg、为或约 2.5×10^6 个细胞/kg至为或约 1×10^8 个细胞/kg、为或约 5×10^6 个细胞/kg至为或约 1×10^8 个细胞/kg、为或约 7.5×10^6 个细胞/kg至为或约 1×10^8 个细胞/kg、为或约 1×10^7 个细胞/kg至为或约 1×10^8 个细胞/kg、为或约 2.5×10^7 个细胞/kg至为或约 1×10^8 个细胞/kg、为或约 5×10^7 个细胞/kg至为或约 1×10^8 个细胞/kg、为或约 7.5×10^7 个细胞/kg至为或约 1×10^8 个细胞/kg、为或约 1×10^8 个细胞/kg至为或约 1×10^8 个细胞/kg。

胞/kg至为或约 1×10^8 个细胞/kg、为或约 7.5×10^6 个细胞/kg至为或约 1×10^8 个细胞/kg、为或约 1×10^7 个细胞/kg至为或约 1×10^8 个细胞/kg、为或约 2.5×10^7 个细胞/kg至为或约 1×10^8 个细胞/kg、为或约 5×10^7 个细胞/kg至为或约 1×10^8 个细胞/kg或者为或约 7.5×10^7 个细胞/kg至为或约 1×10^8 个细胞/kg。

[0371] 在一些实施方案中,剂量以如下形式给出:g-NK细胞或与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集(如任何本文所述的NK细胞子集)的数量,或者前述任一项的活细胞的数量。在任何上文实施方案中,剂量以如下形式给出:通过所提供方法产生的扩增的细胞的组合物中的细胞数量,或者前述任一项的活细胞的数量。

[0372] 在一些实施方案中,用于根据任何治疗方法或用途施用的剂量是为或约 5×10^7 至为或约 10×10^9 ,如为或约 5×10^7 至为或约 5×10^9 、约或约 5×10^7 至为或约 1×10^9 、为或约 5×10^7 至为或约 5×10^8 、约或约 5×10^7 至为或约 1×10^8 、 1×10^8 至为或约 10×10^9 、为或约 1×10^8 至为或约 5×10^9 、约或约 1×10^8 至为或约 1×10^9 、为或约 1×10^8 至为或约 5×10^8 、为或约 5×10^8 至为或约 10×10^9 、为或约 5×10^8 至为或约 5×10^9 、约或约 5×10^8 至为或约 1×10^9 、为或约 1×10^9 至为或约 10×10^9 、为或约 1×10^9 至为或约 5×10^9 或者为或约 5×10^9 至为或约 10×10^9 。在一些实施方案中,用于施用的剂量是为或约 5×10^8 个细胞。在一些实施方案中,用于施用的剂量是为或约 1×10^9 个细胞。在一些实施方案中,用于施用的剂量是为或约 5×10^9 个细胞。在一些实施方案中,用于施用的剂量是为或约 1×10^{10} 个细胞。在一些实施方案中,剂量以如下形式给出:g-NK细胞或与g-NK细胞相关或包括g-NK细胞的替代标记物的NK细胞子集(如任何本文所述的NK细胞子集)的数量,或者前述任一项的活细胞的数量。在任何上文实施方案中,剂量以如下形式给出:通过所提供方法产生的扩增的细胞的组合物中的细胞数量,或者前述任一项的活细胞的数量。

[0373] 在一些实施方案中,在根据所提供的方法扩增后不久,将含有扩增的NK细胞的组合物施用至个体。在其他实施方案中,在施用之前通过在培养中生长来储存或扩增所述扩增的NK细胞,如通过上述方法来进行。例如,在施用至个体之前,可以将所述NK细胞储存大于6、12、18或24个月。

[0374] 在一些实施方案中,可以将含有NK细胞及其子集(如g-NK细胞)的所提供组合物通过任何便捷途径施用至受试者,所述途径包括肠胃外途径,如皮下、肌内、静脉内和/或硬膜外施途径。

[0375] 在特定实施方案中,所提供的组合物是通过静脉内输注来施用。在一些实施方案中,通过静脉内输注以1mL至100mL的体积施用为或约 10×10^6 个细胞至 10×10^9 个细胞。在一些实施方案中,施用为或约 50×10^6 个细胞。在一些实施方案中,施用为或约 1×10^9 个细胞。在一些实施方案中,施用为或约 5×10^9 个细胞。在一些实施方案中,施用为或约 10×10^9 个细胞。技术人员可以熟练地确定用于输注的细胞体积以施用所述数量的细胞。在一个例子中,通过静脉内输注约20mL体积从组合物(如解冻的低温保存的组合物)施用 0.5×10^9 个细胞,所述组合物以为或约 2.5×10^7 个细胞/mL的浓度(例如200mL中的为或约 5×10^9 个细胞)配制。

[0376] 所提供的NK细胞及其子集(如g-NK细胞)及组合物可以用于治疗患有肿瘤或过度增殖性障碍或微生物感染(如病毒感染、酵母感染、真菌感染、原生动物感染和/或细菌感染)的个体的方法中。用所提供的NK细胞及其子集(如g-NK细胞)和组合物治疗受试者的所公开方法可以与治疗性单克隆抗体(如抗肿瘤抗原或抗癌抗体、抗病毒抗体或抗细菌抗体)

组合。可以施用所提供的NK细胞及其子集(如g-NK细胞)和组合物用于治疗动物,如哺乳动物,例如人受试者。

[0377] 在一些例子中,所述方法包括治疗过度增殖性障碍,如血液恶性肿瘤或实体瘤。可以用本文所述组合物治疗的癌症和增殖性障碍的类型的例子包括但不限于多发性骨髓瘤、白血病(例如,原始粒细胞性白血病、早幼粒细胞白血病、粒-单核细胞白血病、单核细胞白血病、红白血病、慢性髓细胞(粒细胞)白血病以及慢性淋巴细胞白血病)、淋巴瘤(例如,霍奇金病和非霍奇金病)、纤维肉瘤、黏液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨性肉瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、尤因肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、肾细胞癌、肝细胞癌、肾母细胞瘤、子宫颈癌、子宫癌、睾丸肿瘤、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、胶质瘤、星形细胞瘤、少突神经胶质瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、发育异常以及增生。癌症的治疗和/或预防包括但不限于减轻与癌症相关的一种或多种症状、抑制或降低癌症进展、促进癌症消退和/或促进免疫应答。

[0378] 在一些例子中,所述方法包括治疗病毒感染,如因体内病毒的存在引起的感染。病毒感染可能由DNA或RNA病毒引起,并且包括慢性或持久性病毒感染,其为在证实致命前,能够感染宿主并在延长时间段(通常数周、数月或数年)中在宿主的细胞内繁殖的病毒感染。产生可以根据本发明治疗的慢性感染的病毒包括例如人乳头状瘤病毒(HPV)、单纯疱疹和其他疱疹病毒;乙型肝炎和丙型肝炎病毒以及其他肝炎病毒;人免疫缺陷病毒;以及麻疹病毒,它们都可能产生重要的临床疾病。延长的感染可能最终导致引发疾病,所述疾病可能(例如,在丙型肝炎病毒肝癌的情形中)对患者是致命的。可以根据本发明治疗的其他慢性病毒感染包括EB病毒(EBV)以及其他病毒,如可能与肿瘤相关的那些。

[0379] 可以用本文所述的组合物和方法治疗或预防的病毒感染的例子包括但不限于由以下病毒引起的病毒感染:冠状病毒(例如,SARS-CoV-2,其中感染是COVID-19)、逆转录病毒(例如,人T细胞淋巴营养性病毒(HTLV) I型和II型以及人免疫缺陷病毒(HIV))、疱疹病毒(例如,单纯疱疹病毒(HSV) I型和II型、EB病毒和巨细胞病毒)、沙粒病毒(例如,拉沙热病毒)、富黏病毒(例如,麻疹病毒、人呼吸合胞病毒和肺炎病毒)、腺病毒、布尼亚病毒(例如,汉坦病毒)、冠状病毒、丝状病毒(例如,埃博拉病毒)、黄病毒(例如,丙型肝炎病毒(HCV)、黄热病度和日本脑炎病毒)、嗜肝性DNA病毒(例如,乙型肝炎病毒(HBV))、正黏病毒(例如,仙台病毒和流感病毒A、B和C)、乳多泡病毒(例如,乳头状瘤病毒)、小RNA病毒(例如,鼻病毒、肠道病毒和甲型肝炎病毒)、痘病毒、呼肠孤病毒(例如,轮状病毒)、披膜病毒(例如,风疹病毒)和弹状病毒(例如,狂犬病毒)。病毒感染的治疗和/或预防包括但不限于减轻与所述感染相关的一种或多种症状、抑制、减少或压制病毒复制和/或增强免疫应答。

[0380] 在一些实施方案中,所提供的NK细胞及其子集(如g-NK细胞)和组合物用于治疗酵母或细菌感染的方法中。例如,本文所述的所提供的g-NK细胞和组合物和方法可以治疗与以下有关的感染:酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、淋病奈瑟球菌(*Neisseria gonorrhoea*)、脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)、白喉棒杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)、肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)、流感嗜血菌(*Haemophilus influenzae*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、臭鼻克雷伯菌(*Klebsiella ozaenae*)、鼻硬结克雷伯菌(*Klebsiella*

rhinoscleromotis)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、胎儿弯曲杆菌(弧菌)(*Campylobacter(Vibrio) fetus*)、空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、蜡状芽孢杆菌(*Edwardsiella tarda*)、小肠结肠炎耶尔森菌(*Yersinia enterocolitica*)、鼠疫耶尔森菌(*Yersinia pestis*)、假结核耶尔森菌(*Yersinia pseudotuberculosis*)、痢疾志贺菌(*Shigella dysenteriae*)、弗氏志贺菌(*Shigella flexneri*)、宋氏志贺菌(*Shigella sonnei*)、鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*)、苍白密螺旋体(*Treponema pallidum*)、细弱密螺旋体(*Treponema pertenuis*)、卡氏密螺旋体(*Treponema caratense*)、奋森疏螺旋体(*Borrelia vincentii*)、伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)、出血性黄疸钩端螺旋体(*Leptospira icterohemorrhagiae*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、鼠弓形虫(*Toxoplasma gondii*)、卡氏肺囊虫(*Pneumocystis carinii*)、土拉热弗朗西丝菌(*Francisella tularensis*)、流产布氏杆菌(*Brucella abortus*)、猪布氏杆菌(*Brucella suis*)、羊布氏杆菌(*Brucella melitensis*)、支原体属物种(*Mycoplasma spp.*)、普氏立克次体(*Rickettsia prowazekii*)、恙虫病立克次体(*Rickettsia tsutsugumushi*)、衣原体属物种(*Chlamydia spp.*)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)或其组合。

[0381] 在任何前述实施方案中,所提供的g-NK细胞及其组合物可以用作单一疗法用于治疗疾病或障碍。

A. 组合疗法

[0382] 在一些实施方案中,如本文所提供的含有g-NK细胞的组合物可以在与用于治疗受试者的疾病或病症的一种或多种其他药剂的组合疗法中施用。在这样的实施方案中,如本文所提供的含有g-NK细胞的组合物可以在施用一种或多种其他药剂之前、同时或随后(之后)施用。例如,g-NK细胞可以与抗微生物、抗病毒和其他治疗剂同时或依序施用。示例性组合疗法描述于以下小节中。

1. 抗体组合

[0383] 在一些实施方案中,如本文所提供的含有g-NK细胞的组合物在通过抗体或含Fc蛋白质激活或与其接触时展现增强的活性,如与常规NK细胞相比。例如,g-NK细胞可以通过抗体介导的CD16的交联或通过抗体包被的肿瘤细胞来激活。

[0384] 在一些实施方案中,本文提供一种治疗个体的病症的方法,所述方法包括将g-NK细胞或其组合物和抗体施用至受试者。本领域技术人员可以选择适当的治疗性(例如,抗癌)单克隆抗体以与本文所述的所提供的g-NK细胞和组合物一起施用至受试者,如根据个体的特定疾病或病症而定。合适的抗体可以包括多克隆、单克隆、片段(如Fab片段)、单链抗体和其他形式的特异性结合分子。

[0385] 在一些实施方案中,抗体还可以包括人源化或人抗体。非人抗体的人源化形式是含有源自非人Ig的最小序列的嵌合Ig、Ig链或片段(如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其他抗原结合子序列)。在一些实施方案中,抗体包含Fc结构域。

[0386] 通常,人源化抗体具有从非人来源引入的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常被称为“输入”残基,其通常取自“输入”可变结构域。人源化是通过用啮齿动物CDR或CDR序列取代人抗体的相应序列来完成(Jones等人,1986;Riechmann等人,1988;

Verhoeyen等人,1988)。这样的“人源化”抗体是嵌合抗体(1989),其中显著小于完整的人可变结构域被来自非人物种的相应序列取代。在实践中,人源化抗体通常是如下人抗体,其中一些CDR残基和可能的一些Fc残基被来自啮齿动物抗体的类似位点的残基取代。人源化抗体包括人抗体(受体抗体),其中来自受体的互补决定区(CDR)的残基被具有所需特异性、亲和力和能力的来自非人物种(供体抗体)(如小鼠、大鼠或兔)的CDR的残基替代。在一些情况下,相应非人残基替代人抗体的Fv框架残基。人源化抗体可以包含在受体抗体或在输入的CDR或框架序列中都未发现的残基。通常,人源化抗体包含至少一个(且通常两个)可变结构域中的基本上全部,其中大多数(如果并非全部)CDR区对应于非人Ig的那些CDR区,并且大多数(如果并非全部)FR区是人抗体共有序列的那些FR区。人源化抗体最佳还包含抗体恒定区(Fc)(通常为人抗体恒定区)的至少一部分(Jones等人,1986;Presta,1992;Riechmann等人,1988)。

[0387] 人抗体也可以使用多种技术来产生,所述技术包括噬菌体展示文库(Hoogenboom等人,1991;Marks等人,1991)和人mAb的制备(Boerner等人,1991;Reisfeld和Sell,1985)。类似地,可以利用将人Ig基因引入转基因动物(其中内源抗体基因已经被部分或完全失活)中来合成人Ab。在激发后,观察到人抗体产生,其在所有方面与在人体中见到的非常类似,包括基因重组、装配和抗体库(1997a;1997b;1997c;1997d;1997;1997;Fishwild等人,1996;1997;1997;2001;1996;1997;1997;1997;Lonberg和Huszar,1995;Lonberg等人,1994;Marks等人,1992;1997;1997;1997)。

[0388] 具体而言,可以通过与识别肿瘤相关抗原的抗体一起施用使本发明的细胞靶向肿瘤。本领域技术人员将认识到,本发明的g-NK细胞适合与识别肿瘤相关抗原的众多种抗体一起使用。肿瘤相关抗原的非限制性例子包括CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD52、CD56、CD70、CD74、CD140、EpCAM、CEA、gpA33、间皮素、甲胎蛋白、黏蛋白、PDGFR- α 、TAG-72、CAIX、PSMA、叶酸结合蛋白、散射因子受体激酶、神经节苷脂、细胞角蛋白、卷曲受体、VEGF、VEGFR、整联蛋白 α V β 3、整联蛋白 α 5 β 1、EGFR、EGFL7、ERBB2 (HER2)、ERBB3、纤连蛋白、HGF、HER3、LOXL2、MET、IGF1R、IGLF2、EPHA3、FR- α 、磷脂酰丝氨酸、黏结蛋白聚糖1、SLAMF7 (CD319)、TRAILR1、TRAILR2、RANKL、FAP、波形蛋白或生腱蛋白。在一些情形中,所述抗体是抗CD20抗体(例如利妥昔单抗)、抗HER2抗体(例如西妥昔单抗)、抗CD52抗体、抗EGFR抗体和抗CD38抗体(例如达雷木单抗)、抗SLAMF7抗体(例如埃罗妥珠单抗)。

[0389] 可以用于所提供方法中与包括g-NK细胞的细胞组合物的组合疗法中的非限制性抗体包括曲妥珠单抗(Herceptin®)、雷莫芦单抗(Cyramza®)、阿特殊单抗(Tecentriq™)、纳武单抗(Opdivo®)、德瓦鲁单抗(Imfinzi™)、阿维单抗(Bavencio®)、帕博利珠单抗(Keytruda®)、贝伐珠单抗(Avastin®)、依维莫司(Afinitor®)、帕妥珠单抗(Perjeta®)、恩美曲妥珠单抗(Kadcyla®)、西妥昔单抗(Erbitux®)、地诺单抗(Xgeva®)、利妥昔单抗(Rituxan®)、阿仑单抗(Campath®)、奥法木单抗(Arzerra®)、奥比妥珠单抗(Gazyva®)、耐昔妥珠单抗(Portrazza™)、替伊莫单抗(Zevalin®)、本妥昔单抗(Adcetris®)、司妥昔单抗(Sylvant®)、硼替佐米(Velcade®)、达雷木单抗(Darzalex™)、埃罗妥珠单抗(Empliciti™)、地努妥昔单抗(Unituxin™)、奥拉单抗(Lartruvo™)、奥瑞珠单抗、艾萨妥昔单抗、Truxima、Blitzima、Ritemvia、Rituzena、Herzuma、Ruxience、ABP

798、Kanjinti、Ogivry、BI 695500、Novex (RTXM83)、托西莫单抗或Ontruzant或其生物类似物。示例性抗体包括利妥昔单抗、曲妥珠单抗、阿仑单抗、西妥昔单抗、达雷木单抗、维妥珠单抗、奥法木单抗、乌妥昔单抗、奥那妥珠单抗或埃罗妥珠单抗。

[0390] 在一些实施方案中,抗体可以使抗PD-1或抗PD-L1抗体。靶向PD-1或PD-L1的抗体包括但不限于纳武单抗、帕博利珠单抗或阿特殊单抗。

[0391] 可以选择对所选癌症类型具有特异性的抗体,并且其包括批准用于癌症治疗的任何抗体。例子包括用于乳腺癌的曲妥珠单抗(Herceptin)、用于淋巴瘤的利妥昔单抗(Rituxan)和用于头颈鳞状细胞癌的西妥昔单抗(Erbix)。技术人员熟悉FDA批准的能够结合特定肿瘤或疾病抗原的单克隆抗体,其中任一种可以根据所提供方法用于治疗肿瘤或疾病。

[0392] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗胃或食管胃结合部的腺癌并且所述抗体为曲妥珠单抗(Herceptin®)或雷莫芦单抗(Cyramza®)。

[0393] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗膀胱癌并且所述抗体为阿特殊单抗(Tecentriq™)、纳武单抗(Opdivo®)、德瓦鲁单抗(Imfinzi™)、阿维单抗(Bavencio®)或帕博利珠单抗(Keytruda®)。

[0394] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗脑癌并且所述抗体为贝伐珠单抗(Avastin®)。

[0395] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗乳腺癌并且所述抗体为曲妥珠单抗(Herceptin®)。

[0396] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗宫颈癌并且所述抗体为贝伐珠单抗(Avastin®)。

[0397] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗结直肠癌并且所述抗体为西妥昔单抗(Erbix®)、帕尼单抗(Vectibix®)、贝伐珠单抗(Avastin®)或雷莫芦单抗(Cyramza®)。

[0398] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗内分泌/神经内分泌肿瘤并且所述抗体为阿维单抗(Bavencio®)。

[0399] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗头颈癌并且所述抗体为西妥昔单抗(Erbix®)、帕博利珠单抗(Keytruda®)、纳武单抗(Opdivo®)、曲妥珠单抗或雷莫芦单抗。

[0400] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗骨癌并且所述抗体为地诺单抗(Xgeva®)。

[0401] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗肾癌并且所述抗体为贝伐珠单抗(Avastin®)或纳武单抗(Opdivo®)。

[0402] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗白血病并且所述抗体为利妥昔单抗(Rituxan®)、阿仑单抗(Campath®)、奥法木单抗(Arzerra®)、奥比妥珠单抗(Gazyva®)或博纳吐单抗(Blinicyto®)。

[0403] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗肺癌并且所述抗体为贝伐珠单抗(Avastin®)、雷莫芦单抗(Cyramza®)、纳武单抗(Opdivo®)、耐昔妥珠单抗(Portrazza™)、

帕博利珠单抗(Keytruda®)或阿特殊单抗(Tecentriq™)。

[0404] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗淋巴瘤并且所述抗体为替伊莫单抗(Zevalin®)、本妥昔单抗(Adcetris®)、利妥昔单抗(Rituxan®)、司妥昔单抗(Sylvant®)、奥比妥珠单抗(Gazyva®)、纳武单抗(Opdivo®)或帕博利珠单抗(Keytruda®)。

[0405] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗多发性骨髓瘤并且所述抗体为硼替佐米(Velcade®)、达雷木单抗(Darzalex™)或埃罗妥珠单抗(Empliciti™)。

[0406] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗神经母细胞瘤并且所述抗体为地努妥昔单抗(Unituxin™)。

[0407] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗卵巢上皮癌/输卵管癌/原发性腹膜癌并且所述抗体为贝伐珠单抗(Avastin®)。

[0408] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗胰腺癌并且所述抗体为西妥昔单抗(Erbitux®)或贝伐珠单抗(Avastin®)。

[0409] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗皮肤癌并且所述抗体为伊匹单抗(Yervoy®)、帕博利珠单抗(Keytruda®)、阿维单抗(Bavencio®)或纳武单抗(Opdivo®)。

[0410] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗软组织肉瘤并且所述抗体为奥拉单抗(Lartruvo™)。

[0411] 在一些实施方案中,向受试者施用本文所述的g-NK细胞的群体和有效剂量的双特异性抗体。在一些实施方案中,所述双特异性抗体包含第一结合结构域和第二结合结构域,所述第一结合结构域与免疫细胞(例如NK细胞或巨噬细胞)上的表面抗原特异性结合。在一些实施方案中,所述第一结合结构域与NK细胞或巨噬细胞上的激活受体(例如CD16(CD16a))特异性结合。在一些实施方案中,所述第二结合结构域与肿瘤相关抗原特异性结合。要靶向的肿瘤相关抗原可以基于癌症类型来选择,并且包括但不限于CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD52、CD56、CD70、CD74、CD140、EpCAM、CEA、gpA33、间皮素、甲胎蛋白、黏蛋白、PDGFR- α 、TAG-72、CAIX、PSMA、叶酸结合蛋白、散射因子受体激酶、神经节苷脂、细胞角蛋白、卷曲受体、VEGF、VEGFR、整联蛋白 α V β 3、整联蛋白 α 5 β 1、EGFR、EGFL7、ERBB2(HER2)、ERBB3、纤连蛋白、HGF、HER3、LOXL2、MET、IGF1R、IGLF2、EPHA3、FR- α 、磷脂酰丝氨酸、黏结蛋白聚糖1、SLAMF7(CD319)、TRAILR1、TRAILR2、RANKL、FAP、波形蛋白或生腱蛋白。在一些实施方案中,所述第一结合结构域与CD16特异性结合,并且所述第二结合结构域与CD30特异性结合。

[0412] g-NK细胞和另外的药剂可以依序或同时施用。在一些实施方案中,另外的药剂可以在施用g-NK细胞之前施用。在一些实施方案中,另外的药剂可以在施用g-NK细胞之后施用。例如,g-NK细胞可以与对所选癌症类型具有特异性的抗体同时施用。可替代地,g-NK细胞可以在所选时间施用,所述所选时间与施用对所选癌症类型具有特异性的抗体的时间不同。

[0413] 在特定例子中,在g-NK细胞群体之前、之后或基本上同时向受试者施用有效剂量的抗体。在一些例子中,向受试者施用约0.1mg/kg至约100mg/kg的抗体(如约0.5-10mg/kg、约1-20mg/kg、约10-50mg/kg、约20-100mg/kg,例如,约0.5mg/kg、约1mg/kg、约2mg/kg、约3mg/kg、约4mg/kg、约5mg/kg、约8mg/kg、约10mg/kg、约16mg/kg、约20mg/kg、约24mg/kg、约

36mg/kg、约48mg/kg、约60mg/kg、约75mg/kg或约100mg/kg)。熟练的临床医师可以选择抗体的有效量,其考虑到特定抗体、特定疾病或病症(例如肿瘤或其他障碍)、受试者的一般健康状况、受试者正在接受或先前已经接受的任何另外的治疗和其他相关因素。还向受试者施用本文所述的g-NK细胞的群体。抗体和g-NK细胞群体二者通常肠胃外施用,例如静脉内;然而,也可以使用注射或输注至肿瘤或肿瘤附近(局部施用)或者施用至腹腔。本领域技术人员可以确定适当的施用途径。

[0414] 在一些实施方案中,向治疗病毒的受试者施用有效剂量的针对所述病毒的一种或多种抗体以及本文所述的g-NK细胞的群体。在一些实施方案中,所述一种或多种抗体是与刺突糖蛋白(例如SARS-Cov-2的刺突糖蛋白)结合的抗体。在一些实施方案中,向受试者施用本文所述的g-NK细胞的群体以及有效剂量的Fc-融合蛋白(例如重组ACE2-Fc融合蛋白)。在一些实施方案中,向受试者施用本文所述的g-NK细胞的群体和含有针对所述病毒的抗体(例如针对SARS-Cov-2的抗体)的血清。在一些实施方案中,所述血清是从患者收集的恢复期血清,所述患者正在从相同病毒引起的感染恢复。在一些实施方案中,收集来自多名从相同病毒引起的感染恢复的患者的恢复期血清,将其合并,并与本文所述的g-NK细胞的群体一起施用至有需要的受试者。

2. 细胞因子或生长因子

[0415] 在本文提供的一些实施方案中,可以将g-NK细胞与细胞因子和/或生长因子组合施用至个体。根据一些实施方案,至少一种生长因子包括选自以下的生长因子:SCF、FLT3、IL-2、IL-7、IL-15、IL-12、IL-21和IL-27。在特定实施方案中,将重组IL-2施用至受试者。在其他特定实施方案中,将重组IL-15施用至受试者。在其他特定实施方案中,将重组IL-21施用至受试者。在一些实施方案中,g-NK细胞和细胞因子或生长因子是依序施用。例如,可以首先施用g-NK细胞,之后施用细胞因子和/或生长因子。在一些实施方案中,g-NK细胞与细胞因子或生长因子是同时施用。

[0416] 在一些实施方案中,向受试者施用一种或多种细胞因子(如IL-2、IL-15、IL-21、IL-27和/或IL-12)以支持NK细胞的存活和/或生长。一种或多种细胞因子可以在NK细胞之前、之后或基本上同时施用。在一些例子中,一种或多种细胞因子可以在NK细胞之后施用。在一个具体例子中,在施用NK细胞的约1-8小时内(如在约1-4小时、约2-6小时、约4-6小时或约5-8小时内),将一种或多种细胞因子施用至受试者。

3. 化学治疗剂和多模态组合疗法

[0417] 在一些实施方案中,所提供的方法还可以包括将g-NK细胞与癌症药物或治疗一起施用,如与化学治疗剂或细胞毒性剂或其他治疗一起施用。

[0418] 在一些实施方案中,所提供的方法还可以包括将g-NK细胞与化学治疗剂组合施用至个体。在一些实施方案中,化学治疗剂可以包括环磷酰胺、氟达拉滨、甲基泼尼松。在一些实施方案中,化学治疗剂选自:沙利度胺、顺铂(顺-DDP)、奥沙利铂、卡铂、蒽二酮、米托蒽醌;羟基脲、甲基胍衍生物、丙卡巴肼(N-甲基胍,MM)、肾上腺皮质抑制剂、米托坦(.o..p.'-DDD)、氨鲁米特、RXR激动剂、贝沙罗汀、酪氨酸激酶抑制剂、伊马替尼、氮芥、环磷酰胺、异环磷酰胺、美法仑(L-沙可来新)、苯丁酸氮芥、乙烯亚胺、甲基三聚氰胺、六甲基三聚氰胺、塞替派、白消安、卡莫司汀(BCNU)、司莫司汀(甲基-CCNTJ)、洛莫司汀(CCNU)、链脲佐菌素(链脲霉素)、DNA合成拮抗剂、磷酸雌莫司汀、三嗪、达卡巴嗪(OTIC、二甲基-三氮烯咪唑甲酰

胺)、替莫唑胺、叶酸类似物、甲氨蝶呤(氨甲蝶呤)、嘧啶类似物、氟尿嘧啶(5-氟尿嘧啶、5-FU、5FTJ)、氟尿苷(氟代脱氧尿苷、FUdR)、阿糖胞苷(胞嘧啶阿拉伯糖苷)、吉西他滨、嘌呤类似物、巯嘌呤(6-巯嘌呤、6-MP)、硫鸟嘌呤(6-硫鸟嘌呤、TG)、喷司他丁(2'-脱氧助间型霉素、脱氧助间型霉素)、克拉屈滨和氟达拉滨、拓扑异构酶抑制剂、安吡啶、长春花生物碱、长春花碱(VLB)、长春花新碱、紫杉烷、紫杉醇、nab-紫杉醇(Abraxane)、蛋白质结合型紫杉醇(Abraxane(R))、多西他赛(Taxotere(R));表鬼臼毒素、依托泊苷、替尼泊苷、喜树碱、托泊替康、伊立替康、放线菌素D(dactinomycin)(放线菌素(actinomycin)D)、柔红霉素(道诺霉素、红比霉素)、多柔比星、脂质体多柔比星(Doxil)、博来霉素、丝裂霉素(丝裂霉素C)、伊达比星、表柔比星、布舍瑞林、肾上腺皮质类固醇、泼尼松、孕激素、己酸羟孕酮、醋酸甲羟孕酮、醋酸甲地孕酮、乙萘酚、炔雌醇、他莫昔芬、阿那曲唑;丙酸睾酮、氟甲睾酮、氟他胺、比卡鲁胺和亮丙瑞林。

[0419] 在一些实施方案中,癌症药物是细胞毒性剂,如细胞毒性小分子。在一些实施方案中,癌症药物是免疫调节剂、Bcl2抑制剂、P13K抑制剂、小分子蛋白酶体抑制剂、小分子酪氨酸、小分子细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂、烷化剂、抗代谢物、蒽环素、抗肿瘤抗生素、拓扑异构酶抑制剂、有丝分裂抑制剂、皮质类固醇或分化剂。

[0420] 在一些实施方案中,癌症药物是免疫调节剂。在一些实施方案中,癌症药物是沙利度胺或其衍生物。例如,在一些情形中,癌症药物是来那度胺或泊马度胺。在一些情形中,癌症药物是来那度胺。

[0421] 在一些实施方案中,癌症药物是Bcl-2抑制剂。例如,癌症药物可以是维奈托克。

[0422] 在一些实施方案中,癌症药物是P13K抑制剂。例如,癌症药物可以是艾代西布(Idelaisib)。

[0423] 在一些实施方案中,癌症药物是小分子酪氨酸。例如,癌症药物可以是甲磺酸伊马替尼。

[0424] 在一些实施方案中,癌症药物是细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂。例如,癌症药物可以是赛克西利(Sekiciclib)。

[0425] 在一些实施方案中,癌症药物是烷化剂。烷化剂的例子包括但不限于六甲蜜胺、白消安、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺、达卡巴嗪、洛莫司汀、美法仑、奥沙利铂、替莫唑胺或塞替派。

[0426] 在一些实施方案中,癌症药物是抗代谢物。抗代谢物通过取代RNA和DNA的正常构建块来干扰DNA和RNA生长。这些药剂在细胞的染色体进行复制的阶段期间损伤细胞。它们通常用于治疗白血病、乳房、卵巢和肠道癌症,以及其他类型的癌症。抗代谢物的例子包括但不限于5-氟尿嘧啶(5-FU)、6-巯嘌呤(6-MP)、卡培他滨(Xeloda®)、阿糖胞苷(Ara-C®)、氟尿苷、氟达拉滨、吉西他滨(Gemzar®)、羟基脲、甲氨蝶呤或培美曲塞(Alimta®)。

[0427] 在一些实施方案中,癌症药物是蒽环类药。蒽环素药物通过改变癌细胞内部的DNA来起作用,以阻止所述癌细胞生长和繁殖。蒽环素是抗肿瘤抗生素干扰在细胞周期期间复制DNA所涉及的酶。它们广泛用于多种癌症。在给予蒽环素药物时的主要问题在于,它们如果以高剂量给予,会永久性地损伤心脏。因此,通常对蒽环素药物设置终生剂量限度。在一些情形中,在与FcεRI γ 缺陷性NK细胞(G-NK)组合施用,可以减小这些药物的剂量和时间

表。可以用于所提供的组合疗法中的蒽环类药的例子包括但不限于柔红霉素、多柔比星(Adriamycin®)、表柔比星或伊达比星。

[0428] 在一些实施方案中,癌症药物是抗肿瘤抗生素。抗肿瘤抗生素的例子包括但不限于放线菌素-D、博来霉素、丝裂霉素-C或米托蒽醌。

[0429] 在一些实施方案中,癌症药物是拓扑异构酶抑制剂。拓扑异构酶药物干扰称为拓扑异构酶的酶,所述酶帮助分离DNA链以使得可以复制DNA。拓扑异构酶抑制剂根据它们所影响的酶的类型加以分组。拓扑异构酶抑制剂用于治疗某些白血病,以及肺癌、卵巢癌、胃肠癌和其他癌症。拓扑异构酶抑制剂可以是拓扑异构酶I抑制剂或拓扑异构酶II抑制剂。拓扑异构酶I抑制剂的例子包括但不限于托泊替康或伊立替康(CPT-11)。拓扑异构酶II抑制剂的例子包括但不限于依托泊苷(VP-16)、替尼泊苷或米托蒽醌。

[0430] 在一些实施方案中,癌症药物是有丝分裂抑制剂。有丝分裂抑制剂是如下化合物:通过阻止细胞分裂形成新细胞来起作用,但是可能在所有阶段因阻止酶制造细胞繁殖所需的蛋白质而损伤细胞。它们用于治疗许多不同类型的癌症,包括乳腺癌、肺癌、骨髓瘤、淋巴瘤和白血病。这些药物可能引起神经损伤,从而可能限制可以给予的量。在一些情形中,在与FcεRI γ 缺陷性NK细胞(G-NK)组合施用,可以减小这些药物的剂量和时间表。有丝分裂抑制剂的非限制性例子包括但不限于多西他赛、雌莫司汀、伊沙匹隆、紫杉醇、长春花碱、长春花新碱或长春瑞滨。

[0431] 在一些实施方案中,癌症药物是皮质类固醇。皮质类固醇(通常简称为类固醇)是天然激素和激素类药物,其可用于治疗许多类型的癌症以及其他疾病。在这些药物作为癌症治疗的部分使用时,将它们视为化学治疗药物。皮质类固醇的非限制性例子包括但不限于泼尼松、甲泼尼龙(Solumedrol®)或地塞米松(Decadron®)。

[0432] 在一些实施方案中,癌症药物是分化剂。分化剂的非限制性例子包括但不限于类视黄醇、维A酸(ATRA或Atralin®)、贝沙罗汀(Targretin®)或三氧化二砷(Arsenox®)。

[0433] 在一些实施方案中,癌症药物选自顺铂、卡铂和奥沙利铂。在某些实施方案中,癌症药物选自紫杉醇、Abraxane(R)和Taxotere(R)。在一个实施方案中,化学治疗剂选自天冬酰胺酶、贝伐珠单抗、博来霉素、多柔比星、表柔比星、依托泊苷、5-氟尿嘧啶、羟基脲、链脲佐菌素、和6-巯嘌呤、环磷酰胺、紫杉醇和吉西他滨。

[0434] 用于与g-NK细胞组合使用的癌症药物的其他非限制性例子包括但不限于依维莫司(Afinitor®)、托瑞米芬(Fareston®)、氟维司群(Faslodex®)、阿那曲唑(Arimidex®)、依西美坦(Aromasin®)、拉帕替尼(Tykerb®)、来曲唑(Femara®)、帕妥珠单抗(Perjeta®)、恩美曲妥珠单抗(Kadcyla®)、帕博西尼(Ibrance®)、瑞博西尼(Kisqali®)、阿柏西普(Zaltrap®)、瑞戈非尼(Stivarga®)、醋酸兰瑞肽(Somatuline® 储库)、索拉非尼(Nexavar®)、舒尼替尼(Sutent®)、帕唑帕尼(Votrient®)、西罗莫司(Torisel®)、阿昔替尼(Inlyta®)、卡博替尼(Cabometyx™)、甲磺酸乐伐替尼(Lenvima®)、甲磺酸伊马替尼(Gleevec®)、达沙替尼(Sprycel®)、尼罗替尼(Tasigna®)、博舒替尼(Bosulif®)、维A酸(Vesanoid®)、依鲁替尼(Imbruvica®)、艾代拉里斯(Zydelig®)、维奈托克(Venclexta™)、盐酸帕纳替尼(Iclusig®)、米喹妥林(Rydapt®)、克唑替尼(Xalkori®)、埃罗替尼

(Tarceva®)、吉非替尼(Iressa®)、马来酸阿法替尼(Gilotrif®)、色瑞替尼(LDK378/Zykadia™)、奥斯替尼(Tagrisso™)、阿来替尼(Alecensa®)、布加替尼(Alunbrig™)、Cyramza、地尼白介素(Ontak®)、伏立诺他(Zolinza®)、罗米地辛(Istodax®)、贝沙罗汀(Targretin®)、硼替佐米(Velcade®)、普拉曲沙(Folotyn®)、艾代拉里斯(Zydelig®)、贝利司他(Beleodaq®)、苯达莫司汀、卡非佐米(Kyphosis®)、帕比司他(Farydak®)、柠檬酸伊沙佐米(Ninlaro®)、奥拉帕尼(Lynparza™)、芦卡帕尼樟脑磺酸盐(Rubraca™)、尼拉帕尼甲苯磺酸盐一水合物(Zejula™)、长春瑞滨(Navelbine®)、埃罗替尼(Tarceva®)、舒尼替尼(Sutent®)、维莫地尼(Erivedge®)、索尼德吉(Odomzo®)、维莫非尼(Zelboraf®)、曲美替尼(Mekinist®)、达拉菲尼(Tafinlar®)、考比替尼(Cotellic™)、阿利维A酸(Panretin®)、帕唑帕尼(Votrient®)、阿利维A酸(Panretin®)、曲贝替定(Yondelis®)或艾瑞布林(Halaven®)。

[0435] 在一些实施方案中,含有g-NK细胞的组合物与放射疗法一起施用。

[0436] 在一些实施方案中,组合疗法是多模态癌症疗法,其涉及如本文所提供的含有g-NK细胞的组合物、抗体(如上述任一种)加上细胞毒性小分子或细胞毒性放射疗法的组合。在一些实施方案中,将细胞毒性小分子或放射疗法单独施用至受试者,如在施用含有g-NK细胞的组合物之前或之后施用。在一些实施方案中,将细胞毒性小分子或放射疗法与含有g-NK细胞的组合物并行施用至受试者,如为或约同时施用。在一些情形中,多模态癌症疗法还可以包括施用一种或多种细胞因子或生长因子(如IL-2或IL-15),以提供进一步细胞因子支持。

[0437] 多模态癌症疗法是组合超过一种治疗方法的疗法。多模态疗法也称为组合疗法。不同且有效的模态可用于多种癌症。肿瘤的不同生物学和各种模态的功效可以决定各自的具体方法。基于抗体的疗法已经变得常用于治疗癌症和其他疾病适应症。对抗体疗法的反应集中于这些抗体对肿瘤细胞的直接抑制作用,但是已经显示这些抗体对宿主免疫系统有影响。FcεRI γ 缺陷性NK细胞(G-NK)是在与抗体的Fc受体(CD16)结合时介导ADCC的免疫效应细胞。所提供的实施方案设计为证实抗体疗法在与FcεRI γ 缺陷性NK细胞(G-NK)加上小分子和/或放射疗法的添加组合使用时改进的功效。

[0438] 在一些实施方案中,胃或食管胃结合部的腺癌的多模态治疗包括施用与以下组合的如本文所提供的g-NK细胞的组合物:(1)单克隆抗体,其为曲妥珠单抗(Herceptin®)或雷莫芦单抗(Cyramza®),以及(2)癌症药物或细胞毒性剂,其为放射疗法、卡培他滨或顺铂。在特定实施方案中,胃或食管胃结合部的腺癌的多模态治疗包括施用与曲妥珠单抗(Herceptin®)+顺铂组合的如本文所提供的g-NK细胞的组合物。

[0439] 在一些实施方案中,膀胱癌的多模态治疗包括施用与以下组合的如本文所提供的g-NK细胞的组合物:(1)单克隆抗体,其为阿特珠单抗(Tecentriq™)、纳武单抗(Opdivo®)、德瓦鲁单抗(Imfinzi™)、阿维单抗(Bavencio®)或帕博利珠单抗(Keytruda®),以及(2)癌症药物或细胞毒性剂,其为放射疗法或顺铂加上氟尿嘧啶。在特定实施方案中,膀胱癌的多模态治疗包括施用与阿特珠单抗(Tecentriq™)+顺铂+5-FU组合的如本文所提供的g-NK细胞的组合物。

[0440] 在一些实施方案中,脑癌的多模态治疗包括施用与以下组合的如本文所提供的g-NK细胞的组合物:(1)单克隆抗体,其为贝伐珠单抗(Avastin®),以及(2)癌症药物或细胞毒性剂,其为依维莫司(Afinitor®)、放射疗法、卡铂、依托泊苷或替莫唑胺。在特定实施方案中,脑癌的多模态治疗包括施用与贝伐珠单抗(Avastin®)+放射疗法组合的如本文所提供的g-NK细胞的组合物。

[0441] 在一些实施方案中,乳腺癌的多模态治疗包括施用与以下组合的如本文所提供的g-NK细胞的组合物:(1)单克隆抗体,其为曲妥珠单抗(Herceptin®),以及(2)癌症药物或细胞毒性剂,其为他莫昔芬(Nolvadex)、托瑞米芬(Fareston®)、依维莫司(Afinitor®)、氟维司群(Faslodex®)、阿那曲唑(Arimidex®)、依西美坦(Aromasin®)、拉帕替尼(Tykerb®)、来曲唑(Femara®)、帕妥珠单抗(Perjeta®)、恩美曲妥珠单抗(Kadcyla®)、帕博西尼(Ibrance®)、瑞博西尼(Kisqali®)、顺铂/Paraplatin、紫杉醇、多柔比星或放射疗法。在特定实施方案中,乳腺癌的多模态治疗包括施用与曲妥珠单抗(Herceptin®)+顺铂组合的如本文所提供的g-NK细胞的组合物。

[0442] 在一些实施方案中,结直肠癌的多模态治疗包括施用与以下组合的如本文所提供的g-NK细胞的组合物:(1)单克隆抗体,其为西妥昔单抗(Erbitux®)、帕尼单抗(Vectibix®)、贝伐珠单抗(Avastin®)或雷莫芦单抗(Cyramza®),以及(2)癌症药物或细胞毒性剂,其为阿柏西普(Zaltrap®)、瑞戈非尼(Stivarga®)、放射疗法、5-氟尿嘧啶(5-FU)、卡培他滨、伊立替康或奥沙利铂。在特定实施方案中,结直肠癌的多模态治疗包括施用与西妥昔单抗(Erbitux®)+奥沙利铂组合的如本文所提供的g-NK细胞的组合物。

[0443] 在一些实施方案中,内分泌/神经内分泌肿瘤的多模态治疗包括施用与以下组合的如本文所提供的g-NK细胞的组合物:(1)单克隆抗体,其为阿维单抗(Bavencio®),以及(2)癌症药物或细胞毒性剂,其为醋酸兰瑞肽(Somatuline®储库)。在特定实施方案中,内分泌/神经内分泌肿瘤的多模态治疗包括施用与阿维单抗(Bavencio®)+奥沙利铂组合的如本文所提供的g-NK细胞的组合物。

[0444] 在一些实施方案中,头颈癌的多模态治疗包括施用与以下组合的如本文所提供的g-NK细胞的组合物:(1)单克隆抗体,其为西妥昔单抗(Erbitux®)、帕博利珠单抗(Keytruda®)、纳武单抗(Opdivo®)、曲妥珠单抗或雷莫芦单抗,以及(2)癌症药物或细胞毒性剂,其为放射疗法、卡铂、顺铂、卡培他滨、伊立替康、5-氟尿嘧啶或紫杉醇。在特定实施方案中,头颈癌的多模态治疗包括施用与西妥昔单抗(Erbitux®)+顺铂组合的如本文所提供的g-NK细胞的组合物。

[0445] 在一些实施方案中,骨巨细胞瘤的多模态治疗包括施用与以下组合的如本文所提供的g-NK细胞的组合物:(1)单克隆抗体,其为地诺单抗(Xgeva®),以及(2)癌症药物或细胞毒性剂,其为放射疗法、多柔比星、顺铂、依托泊苷、环磷酰胺或甲氨蝶呤。在特定实施方案中,骨巨细胞瘤的多模态治疗包括施用与地诺单抗(Xgeva®)+多柔比星组合的如本文所提供的g-NK细胞的组合物。

[0446] 在一些实施方案中,肾癌的多模态治疗包括施用与以下组合的如本文所提供的g-

NK细胞的组合物：(1) 单克隆抗体，其为贝伐珠单抗(Avastin®)或纳武单抗(Opdivo®)，以及(2) 癌症药物或细胞毒性剂，其为索拉非尼(Nexavar®)、舒尼替尼(Sutent®)、帕唑帕尼(Votrient®)、西罗莫司(Torisel®)、依维莫司(Afinitor®)、阿昔替尼(Inlyta®)、卡博替尼(Cabometyx™)、甲磺酸乐伐替尼(Lenvima®)、长春花碱、5-氟尿嘧啶(5-FU)、卡培他滨或吉西他滨。在特定实施方案中，肾癌的多模态治疗包括施用与贝伐珠单抗(Avastin®)+索拉非尼(Nexavar®)组合的如本文所提供的g-NK细胞的组合物。

[0447] 在一些实施方案中，白血病的多模态治疗包括施用与以下组合的如本文所提供的g-NK细胞的组合物：(1) 单克隆抗体，其为利妥昔单抗(Rituxan®)、阿仑单抗(Campath®)、奥法木单抗(Arzerra®)、奥比妥珠单抗(Gazyva®)或博纳吐单抗(Blincyto®)，以及(2) 癌症药物或细胞毒性剂，其为甲磺酸伊马替尼(Gleevec®)、达沙替尼(Sprycel®)、尼罗替尼(Tasigna®)、博舒替尼(Bosulif®)、维A酸(Vesanoid®)、依鲁替尼(Imbruvica®)、艾代拉里斯(Zydelig®)、维奈托克(Venclexta™)、盐酸帕纳替尼(Iclusig®)、米哌妥林(Rydapt®)、甲氨蝶呤、阿糖胞苷、长春花新碱、多柔比星、柔红霉素或环磷酰胺。在特定实施方案中，白血病的多模态治疗包括施用与利妥昔单抗(Rituxan®)+环磷酰胺组合的如本文所提供的g-NK细胞的组合物。

[0448] 在一些实施方案中，肺癌的多模态治疗包括施用与以下组合的如本文所提供的g-NK细胞的组合物：(1) 单克隆抗体，其为贝伐珠单抗(Avastin®)、雷莫芦单抗(Cyramza®)、纳武单抗(Opdivo®)、耐昔妥珠单抗(Portrazza™)、帕博利珠单抗(Keytruda®)、阿特珠单抗(Tecentriq™)，以及(2) 癌症药物或细胞毒性剂，其为克唑替尼(Xalkori®)、埃罗替尼(Tarceva®)、吉非替尼(Iressa®)、马来酸阿法替尼(Gilotrif®)、色瑞替尼(LDK378/Zykadia™)、奥斯替尼(Tagrisso™)、阿来替尼(Alecensa®)、布加替尼(Alunbrig™)、Cyramza、放射疗法、顺铂、卡铂、紫杉醇(Taxol)、nab-紫杉醇(Abraxane)、多西他赛(Taxotere)、吉西他滨(Gemzar)、长春瑞滨(Navelbine)、伊立替康(Camptosar)、依托泊苷(VP-16)、长春花碱或培美曲塞(Alimta)。在特定实施方案中，肺癌的多模态治疗包括施用与耐昔妥珠单抗(Portrazza™)+卡铂组合的如本文所提供的g-NK细胞的组合物。

[0449] 在一些实施方案中，淋巴瘤的多模态治疗包括施用与以下组合的如本文所提供的g-NK细胞的组合物：(1) 单克隆抗体，其为替伊莫单抗(Zevalin®)、本妥昔单抗(Adcetris®)、利妥昔单抗(Rituxan®)、司妥昔单抗(Sylvant®)、奥比妥珠单抗(Gazyva®)、纳武单抗(Opdivo®)或帕博利珠单抗(Keytruda®)，以及(2) 癌症药物或细胞毒性剂，其为地尼白介素(Ontak®)、伏立诺他(Zolinza®)、罗米地辛(Istodax®)、贝沙罗汀(Targretin®)、硼替佐米(Velcade®)、普拉曲沙(Folotyn®)、依鲁替尼(Imbruvica®)、艾代拉里斯(Zydelig®)、贝利司他(Belcodaq®)、环磷酰胺、苯丁酸氮芥、苯达莫司汀、异环磷酰胺、顺铂、卡铂、奥沙利铂、氟达拉滨、吉西他滨、甲氨蝶呤、多柔比星、长春花新碱或依托泊苷(VP-16)。在特定实施方案中，淋巴瘤的多模态治疗包括施用与利妥昔单抗(Rituxan®)+环磷酰胺组合的如本文所提供的g-NK细胞的组合物。

[0450] 在一些实施方案中，多发性骨髓瘤的多模态治疗包括施用与以下组合的如本文所

提供的g-NK细胞的组合物：(1) 单克隆抗体，其为硼替佐米(Velcade®)、达雷木单抗(Darzalex™)或埃罗妥珠单抗(Empliciti™)，以及(2) 癌症药物或细胞毒性剂，其为卡非佐米(Kyphosis®)、帕比司他(Farydak®)、柠檬酸伊沙佐米(Ninlaro®)、美法仑、长春花新碱(Oncovin)、环磷酰胺(Cytosan)、依托泊苷(VP-16)、多柔比星(Adriamycin)、脂质体多柔比星(Doxil)、苯达莫司汀(Treanda)。在特定实施方案中，多发性骨髓瘤的多模态治疗包括施用与达雷木单抗(Darzalex™)+环磷酰胺组合的如本文所提供的g-NK细胞的组合物。

[0451] 在一些实施方案中，神经母细胞瘤的多模态治疗包括施用与以下组合的如本文所提供的g-NK细胞的组合物：(1) 单克隆抗体，其为地努妥昔单抗(Unituxin™)，以及(2) 癌症药物或细胞毒性剂，其为放射疗法、环磷酰胺、顺铂或卡铂、长春花新碱、多柔比星(Adriamycin)、依托泊苷、托泊替康、白消安或塞替派。在特定实施方案中，神经母细胞瘤的多模态治疗包括施用与地努妥昔单抗(Unituxin™)+多柔比星(Adriamycin)组合的如本文所提供的g-NK细胞的组合物。

[0452] 在一些实施方案中，卵巢上皮癌/输卵管癌/原发性腹膜癌的多模态治疗包括施用与以下组合的如本文所提供的g-NK细胞的组合物：(1) 单克隆抗体，其为贝伐珠单抗(Avastin®)，以及(2) 癌症药物或细胞毒性剂，其为奥拉帕尼(Lynparza™)、芦卡帕尼樟脑磺酸盐(Rubraca™)、尼拉帕尼甲苯磺酸盐一水合物(Zejula™)、顺铂、卡铂、紫杉醇(Taxol®)、多西他赛(Taxotere®)、卡培他滨(Xeloda®)、环磷酰胺(Cytosan®)、依托泊苷(VP-16)、吉西他滨(Gemzar®)、异环磷酰胺(Ifex®)、伊立替康(CPT-11、Camptosar®)、脂质体多柔比星(Doxil®)、美法仑、培美曲塞(Alimta®)、托泊替康或长春瑞滨(Navelbine®)。在特定实施方案中，卵巢上皮癌/输卵管癌/原发性腹膜癌的多模态治疗包括施用与贝伐珠单抗(Avastin®)+紫杉醇(Taxol®)组合的如本文所提供的g-NK细胞的组合物。

[0453] 在一些实施方案中，胰腺癌的多模态治疗包括施用与以下组合的如本文所提供的g-NK细胞的组合物：(1) 单克隆抗体，其为西妥昔单抗(Erbix®)或贝伐珠单抗(Avastin®)，以及(2) 癌症药物或细胞毒性剂，其为埃罗替尼(Tarceva®)、依维莫司(Afinitor®)、舒尼替尼(Sutent®)、吉西他滨(Gemzar)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、奥沙利铂(Eloxatin)、白蛋白结合型紫杉醇(Abraxane)、卡培他滨(Xeloda)、顺铂、伊立替康(Camptosar)、紫杉醇(Taxol)、多西他赛(Taxotere)或白蛋白结合型紫杉醇(Abraxane)。在特定实施方案中，胰腺癌的多模态治疗包括施用与埃罗替尼(Tarceva®)+奥沙利铂(Eloxatin)组合的如本文所提供的g-NK细胞的组合物。

[0454] 在一些实施方案中，皮肤癌的多模态治疗包括施用与以下组合的如本文所提供的g-NK细胞的组合物：(1) 单克隆抗体，其为伊匹单抗(Yervoy®)、帕博利珠单抗(Keytruda®)、阿维单抗(Bavencio®)或纳武单抗(Opdivo®)，以及(2) 癌症药物或细胞毒性剂，其为维莫地尼(Erivedge®)、索尼德吉(Odomzo®)、维莫非尼(Zelboraf®)、曲美替尼(Mekinist®)、达拉菲尼(Tafinlar®)、考比替尼(Cotellic™)、阿利维A酸(Panretin®)、放射疗法、达卡巴嗪、替莫唑胺、Nab-紫杉醇、紫杉醇、顺铂、卡铂或长春花碱。在特定实施方案中，皮肤癌的多模态治疗包括施用与阿维单抗(Bavencio®)+顺铂组合的如本文所提供的g-

NK细胞的组合物。

[0455] 在一些实施方案中,软组织肉瘤的多模态治疗包括施用与以下组合的如本文所提供的g-NK细胞的组合物:(1)单克隆抗体,其为奥拉单抗(Lartruvo™),以及(2)癌症药物或细胞毒性剂,其为帕唑帕尼(Votrient®)、阿利维A酸(Panretin®)、放射疗法、异环磷酰胺(Ifex®)、多柔比星(Adriamycin®)、达卡巴嗪、表柔比星、替莫唑胺(Temodar®)、多西他赛(Taxotere®)、吉西他滨(Gemzar®)、长春瑞滨(Navelbine®)、曲贝替定(Yondelis®)或艾瑞布林(Halaven®)。在特定实施方案中,软组织肉瘤的多模态治疗包括施用与奥拉单抗(Lartruvo™)+多西他赛(Taxotere®)组合的如本文所提供的g-NK细胞的组合物。

4. 溶瘤病毒

[0456] 在一些实施方案中,所提供的方法还可以包括将g-NK细胞与溶瘤病毒一起施用。g-NK细胞与溶瘤病毒的组合治疗还可以包括使用如所述的一种或多种其他药剂,如抗体。

[0457] 考虑g-NK细胞与溶瘤病毒的组合可以促进或增加一种或两种疗法的活性。在一些实施方案中,溶瘤病毒的施用可以使肿瘤细胞对NK细胞敏感。来自溶瘤病毒疗法的证据表明,在转移性黑色素瘤、卵巢癌和乳腺癌模型中,溶瘤病毒激活NK细胞($\uparrow$ IFN- γ)并促进NK细胞迁移至肿瘤(Miller等人,2003Mol Ther 7:741:747;Benencia等人,2005Mol Ther 12:789-802;Zhao等人,2014PLoS One 9:e93103)。在一期临床试验中,发现溶瘤呼肠孤病毒增加NK细胞的循环水平(White等人,2008Gene Ther 15:911-920),并且发现在前列腺癌和A549肺癌的动物模型中,NK细胞介导溶瘤呼肠孤病毒和副痘病毒的抗肿瘤功效(Gujar等人,2011Mol Ther 19:797-804;Rintoul等人,2012Mol. Ther. 20:1148-1157)。在腺癌和胶质母细胞瘤的动物模型中使用溶瘤柯萨奇病毒和麻疹病毒也观察到NK细胞的增加的肿瘤浸润,其中NK细胞的瘤内浓度与存活率呈正相关(Miyamoto等人,2012Cancer Res. 72:2609-2621;Allen等人,2006Cancer res. 66:11840-11850)。将溶瘤病毒活性与NK细胞介导的肿瘤细胞清除相关联的机制是增强的肿瘤免疫原性。具体而言,被溶瘤病毒感染的肿瘤更易于被NK细胞识别和杀伤,如通过天然细胞毒性受体NKp30和NKp44介导的细胞毒性增加以及细胞毒性细胞因子IFN- γ 、TNF- α 和MIP1 α/β 的表达增强所证实(Bhat等人,2011Int J Cancer 128:908-919;Dempe等人,2012Cancer Immunol Res 61:2113-2123;Bhat等人,2013BMC Cancer 13:367)。已经显示在体内吸引并激活NK细胞的其他溶瘤病毒包括流感病毒(Ogbomo等人,2010Med Microbiol Immunol 199:93-101)、水疱性口炎病毒(Heiber等人,2011J Virol. 85:10440-10450)和鸡新城疫病毒(Jarahian等人,2009J Virol. 83:810-821)。在对术后癌症手术患者的研究中,发现溶瘤牛痘病毒逆转术后免疫抑制并预防转移形成(Tai等人,2014Front Oncol 4:217)。因此,溶瘤病毒可能能够增强NK细胞在原本免疫低下的个体中的抗肿瘤免疫力。

[0458] 在一些实施方案中,溶瘤病毒靶向特定细胞,例如,免疫细胞。在一些实施方案中,溶瘤病毒靶向受试者的肿瘤细胞和/或癌细胞。溶瘤病毒是在肿瘤细胞中积累并在肿瘤细胞中复制的病毒。由于在细胞中复制,肿瘤细胞被溶解,并且肿瘤缩小且可以被消除。溶瘤病毒还可以具有宽的宿主和细胞类型范围。例如,溶瘤病毒可以在免疫豁免细胞或免疫后面组织中积累,包括肿瘤和/或转移,并且还包括受伤组织和细胞,从而允许异源蛋白质在宽范围的细胞类型中的递送和表达。溶瘤病毒还可以以肿瘤细胞特异性方式复制,从而导致肿瘤细胞溶解和有效的肿瘤消退。

[0459] 示例性溶瘤病毒包括腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒、单纯疱疹病毒、呼肠弧病毒、鸡新城疫病毒、细小病毒、麻疹病毒、水疱性口炎病毒(VSV)、柯萨奇病毒和牛痘病毒。在一些实施方案中,溶瘤病毒可以特异性地定殖实体瘤,而不感染其他器官。在一些情形中,溶瘤病毒可以用作感染原以将异源蛋白质核酸递送至实体瘤。

[0460] 溶瘤病毒可以是本领域技术人员已知的那些中的任一种,并且包括例如水疱性口炎病毒,参见例如,美国专利号7,731,974、7,153,510、6,653,103以及美国专利公开号2010/0178684、2010/0172877、2010/0113567、2007/0098743、20050260601、20050220818以及欧洲专利号1385466、1606411和1520175;单纯疱疹病毒,参见例如,美国专利号7,897,146、7,731,952、7,550,296、7,537,924、6,723,316、6,428,968以及美国专利公开号2014/0154216、2011/0177032、2011/0158948、2010/0092515、2009/0274728、2009/0285860、2009/0215147、2009/0010889、2007/0110720、2006/0039894、2004/0009604、2004/0063094、国际专利公开号W0 2007/052029、W0 1999/038955;逆转录病毒,参见例如,美国专利号6,689,871、6,635,472、5,851,529、5,716,826、5,716,613以及美国专利公开号20110212530;牛痘病毒,参见例如,2016/0339066;以及腺相关病毒,参见例如,美国专利号8,007,780、7,968,340、7,943,374、7,906,111、7,927,585、7,811,814、7,662,627、7,241,447、7,238,526、7,172,893、7,033,826、7,001,765、6,897,045和6,632,670。

[0461] 溶瘤病毒还包括已经遗传改变以减弱其毒力、改良其安全性特征、增强其肿瘤特异性的病毒,并且其还已配备有其他基因,例如细胞毒素、细胞因子、前药转化酶,以改良该病毒的整体功效(参见例如Kirn等人,(2009) Nat Rev Cancer 9:64-71;Garcia-Aragoncillo等人,(2010) Curr Opin Mol Ther 12:403-411;参见美国专利第7,588,767号、第7,588,771号、第7,662,398号和第7,754,221号,和美国专利公开案第2007/0202572号、第2007/0212727号、第2010/0062016号、第2009/0098529号、第2009/0053244号、第2009/0155287号、第2009/0117034号、第2010/0233078号、第2009/0162288号、第2010/0196325号、第2009/0136917号和第2011/0064650号)。在一些实施方案中,溶瘤病毒可为已经修饰使得其在癌性细胞中选择性复制,并且因此是溶瘤的那些溶瘤病毒。例如,溶瘤病毒是腺病毒,其已经工程化以具有针对肿瘤疗法以及也作为基因疗法载体的改变的向性。所述溶瘤病毒的例子为ONYX-015、H101和Ad5 Δ CR (Hallden和Portella (2012) Expert Opin Ther Targets, 16:945-58) 以及TNFerade (McLoughlin等人 (2005) Ann. Surg. Oncol., 12: 825-30), 或条件复制型腺病毒Oncorine®。

[0462] 在一些实施方案中,溶瘤病毒是修饰的单纯疱疹病毒。在一些实施方案中,溶瘤病毒是塔利拉维(Talimogene laherparepvec) (也称为T-Vec、Imlygic或OncoVex GM-CSF)。在一些实施方案中,感染原是描述于例如W0 2007/052029、W0 1999/038955、US 2004/0063094、US 2014/0154216中的修饰的单纯疱疹病毒或其变体。

V. 试剂盒和制品

[0463] 本文提供制品和试剂盒,其包含含有富集特定子集(如g-NK细胞)的NK细胞的所提供组合物。在一些实施方案中,所述组合物是通过任何所提供的方法产生的。在一些实施方案中,所述试剂盒包含任何所提供组合物以及用于施用所述组合物作为单一疗法的说明书。在一些实施方案中,本文提供一种试剂盒,其包含任何所提供组合物和另外的药剂。在一些实施方案中,所述另外的药剂是包含针对病毒的抗体的血清,例如,恢复期血清。在一

些实施方案中,所述另外的药剂包含Fc结构域。在一些实施方案中,所述另外的药剂是Fc融合蛋白或抗体。在一些实施方案中,所述另外的药剂是人、人源化或嵌合抗体。在这些实施方案的一些中,所述另外的药剂是全长抗体。示例性抗体包括如所述的任一种。

[0464] 本文还提供制品或试剂盒,其包含多种试剂用于检测g-NK替代表面标记物谱,如本文所述。在一些实施方案中,所述试剂包括用于检测选自CD16、CD38、CD57、CD7、CD161、NKG2C和/或NKG2A的一组表面标记物(如2、3、4或5种表面标记物)的试剂。在一些实施方案中,所述试剂包括用于检测包括CD16、CD57、CD7和CD161的一组表面标记物的试剂。在一些实施方案中,所述试剂包括用于检测包括CD161和NKG2A的一组表面标记物的试剂。

[0465] 在一些实施方案中,所述试剂盒还可以包括用于检测一种或多种其他NK细胞表面标记物的一种或多种另外的试剂。例如,所述试剂盒可以包括用于检测一种或多种其他表面标记物CD45、CD3和/或CD56的一种或多种另外的试剂(如1、2或3种另外的试剂)。在一些实施方案中,所述试剂包括用于检测包括CD3、CD56和CD38的一组表面标记物的试剂。在一些实施方案中,每种所述试剂是用于检测所述组的特定表面标记物的结合分子。

[0466] 在特定实施方案中,所述试剂包括对所述组的一种或多种表面标记物具有特异性的抗体或其抗原结合片段。在一些情形中,所述结合分子(如抗体或抗原结合片段)可以与能够检测的部分直接或间接缀合。在一些例子中,所述抗体中的一种或多种被修饰以允许检测结合。例如,可以使抗体与可检测分子缀合,从而允许直接检测或经由第二药剂检测。在一些实施方案中,将抗体直接标记,如用荧光团标记。在一些例子中,可以使用第二试剂检测抗体,如通过与一抗结合并与可检测蛋白(如荧光探针或可检测的酶,如辣根过氧化物酶)偶联的二抗试剂来检测。在一些这样的例子中,所述试剂盒还可以包括二抗。

[0467] 试剂盒可以任选地包括一个或多个组件,如使用说明书、装置和另外的试剂(例如,用于稀释组合物和/或重构冻干的蛋白质的无菌水或盐水溶液)以及用于实践所述方法的组件(如管、容器和注射器)。在一些实施方案中,试剂盒还可以含有用于样品的收集、样品的制备和处理的试剂,和/或用于对样品中的一种或多种表面标记物的量进行定量的试剂(如但不限于检测试剂,如抗体、缓冲液、酶染色底物、色原或其他材料(如载玻片、容器、微量滴定板)),以及任选地用于进行所述方法的说明书。本领域技术人员将认识到可以根据所提供的方法使用的许多其他可能的容器和板以及试剂。

[0468] 在一些实施方案中,试剂盒可以作为制品来提供,所述制品包括用于包装细胞、抗体或试剂或其组合物或者一种或多种其他组分的包装材料。例如,所述试剂盒可以含有容器、瓶子、管、小瓶以及适合用于分离或组织试剂盒的组件的任何包装材料。一个或多个容器可以由多种材料(如玻璃或塑料)形成。在一些实施方案中,一个或多个容器容纳包含细胞或抗体或用于在所述方法中使用的其他试剂的组合物。本文的制品或试剂盒可以在单独的容器中或是在同一容器中包含细胞、抗体或试剂。

[0469] 在一些实施方案中,容纳组合物的一个或多个容器可以是一次性使用的小瓶或多次使用的小瓶,后者在一些情形中可以允许重复使用组合物。在一些实施方案中,所述制品或试剂盒还可以包含第二容器,所述第二容器包含合适的稀释剂。所述制品或试剂盒还可以包含从商业、治疗 and 用户角度来看希望的其他材料,包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针、注射筒、治疗剂和/或印有使用说明书的包装插页。

[0470] 在一些实施方案中,所述试剂盒可以任选地包含说明书。说明书通常包括描述细

胞组合物、试剂和/或抗体以及任选地所述试剂盒中包括的其他组分及其使用方法的明确表达。在一些实施方案中,说明书指示用于使用细胞组合物和抗体施用至受试者用于治疗疾病或病症的方法,如根据任何所提供的实施方案。在一些实施方案中,说明书指示用于使用试剂(如抗体)作为组用于检测g-NK替代标记物表型的方法,如根据任何所提供的实施方案。在一些实施方案中,说明书作为标签或包装插页来提供,所述标签或包装插页位于容器上或与容器相关联。在一些实施方案中,说明书可以指示重构和/或使用组合物的指导。

VI. 示例性实施方案

[0471] 所提供的实施方案包括:

1. 一种用于扩增FcR γ 缺陷性NK细胞(g-NK)的方法,所述方法包括:

(a) 获得富集自然杀伤(NK)细胞的原代人细胞群体,其中所述富集NK细胞的群体是从来自人受试者的生物样品选择的;以及

(b) 在具有以下的培养基中培养富集的NK细胞的所述群体:(i) 辐照的HLA-E+饲养细胞,其中所述饲养细胞缺乏HLA I类和HLA II类并且其中辐照的HLA-E+饲养细胞与富集的NK细胞的比率为1:10至10:1;以及(ii) 有效量的两种或更多种重组细胞因子,其中至少一种重组细胞因子是白介素(IL)-2并且至少一种重组细胞因子是IL-21;

其中所述方法产生富含g-NK细胞的NK细胞的扩增群体。

2. 根据实施方案1所述的方法,其中所述受试者是CMV血清阳性的。

3. 根据实施方案1或实施方案2所述的方法,其中来自所述受试者的生物样品中NK细胞中g-NK细胞的百分比是大于或大于约5%,任选地其中所述受试者是针对所述生物样品中NK细胞中g-NK细胞的百分比大于或大于约5%选择的受试者。

4. 根据实施方案1或实施方案2所述的方法,其中来自所述受试者的生物样品中NK细胞中g-NK细胞的百分比是大于或大于约10%,任选地其中所述受试者是针对所述生物样品中NK细胞中g-NK细胞的百分比大于或大于约10%选择的受试者。

5. 根据实施方案1或实施方案2所述的方法,其中来自所述受试者的生物样品中NK细胞中g-NK细胞的百分比是大于或大于约30%,任选地其中所述受试者是针对所述生物样品中NK细胞中g-NK细胞的百分比大于或大于约30%选择的受试者。

6. 一种用于扩增FcR γ 缺陷性NK细胞(g-NK)的方法,所述方法包括:

(a) 选择如下受试者,其中来自所述受试者的外周血样品中至少或至少约20%的自然杀伤(NK)细胞对NKG2C呈阳性(NKG2C^{pos}),并且所述外周血样品中至少70%的NK细胞对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A(NKG2A^{neg});

(b) 获得原代人细胞群体,其中所述富集NK细胞的群体是从来自所述受试者的生物样品选择的如下细胞:(i) 对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD57呈阳性(CD3^{neg}CD57^{pos})或者(ii) 对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD56呈阳性(CD3^{neg}CD56^{pos});以及

(c) 在具有辐照的HLA-E+饲养细胞的培养基中培养富集的NK细胞的所述群体,其中所述饲养细胞缺乏HLA I类和HLA II类并且其中辐照的HLA-E+饲养细胞与富集的NK细胞的比率为1:10至10:1,其中所述培养在用于扩增所述NK细胞的条件下进行;

其中所述方法产生富含g-NK细胞的NK细胞的扩增群体。

7. 根据实施方案1-6中任一项所述的方法,其中所述富集NK细胞的群体是从所述生物样品选择的如下细胞:对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD57呈阳性(CD3^{neg}CD57^{pos})。

8. 根据实施方案1-6中任一项所述的方法,其中所述富集NK细胞的群体是从所述生物样品选择的如下细胞:对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD56呈阳性($CD3^{neg}CD56^{pos}$)。

9. 根据实施方案1-8中任一项所述的方法,所述方法还包括从NK细胞的所述扩增群体选择如下细胞:对NKG2C呈阳性($NKG2C^{pos}$)和/或对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A($NKG2A^{neg}$)。

10. 一种用于扩增FcR γ 缺陷性NK细胞(g-NK)的方法,所述方法包括:

(a) 获得富集自然杀伤(NK)细胞的原代人细胞群体,其中所述富集NK细胞的群体是从来自人受试者的生物样品选择的如下细胞:(i) 对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD57呈阳性($CD3^{neg}CD57^{pos}$)或者(ii) 对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD56呈阳性($CD3^{neg}CD56^{pos}$);

(b) 在具有辐照的HLA-E+饲养细胞的培养基中培养富集的NK细胞的所述群体,其中所述饲养细胞缺乏HLA I类和HLA II类并且其中辐照的HLA-E+饲养细胞与富集的NK细胞的比率为1:10至10:1,其中所述培养在用于扩增所述NK细胞的条件下进行;以及

(c) 从所述扩增群体选择如下NK细胞:对NKG2C呈阳性并且对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A($NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}$),

其中所述方法产生富含g-NK细胞的NK细胞的扩增群体。

11. 根据实施方案7-8和10中任一项所述的方法,其中所述富集NK细胞的群体是针对对NKG2C呈阳性($NKG2C^{pos}$)的细胞进一步选择的细胞。

12. 根据实施方案7-8和10中任一项所述的方法,其中所述富集NK细胞的群体是针对对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A($NKG2A^{neg}$)的细胞进一步选择的细胞。

13. 根据实施方案7-8和10中任一项所述的方法,其中所述富集NK细胞的群体是针对对NKG2C呈阳性并且对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A($NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}$)的细胞进一步选择的细胞。

14. 一种用于扩增FcR γ 缺陷性NK细胞(g-NK)的方法,所述方法包括:

(a) 获得富集自然杀伤(NK)细胞的原代人细胞群体,其中所述富集NK细胞的群体是从来自人受试者的生物样品选择的如下细胞:对NKG2C呈阳性($NKG2C^{pos}$)和/或对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A($NKG2A^{neg}$),并且(i) 对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD57呈阳性($CD3^{neg}CD57^{pos}$)或者(ii) 对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD56呈阳性($CD3^{neg}CD56^{pos}$);以及

(b) 在具有辐照的HLA-E+饲养细胞的培养基中培养富集的NK细胞的所述群体,其中所述饲养细胞缺乏HLA I类和HLA II类并且其中辐照的HLA-E+饲养细胞与富集的NK细胞的比率为1:10至10:1,其中所述培养在用于扩增所述NK细胞的条件下进行;

其中所述方法产生富含g-NK细胞的NK细胞的扩增群体。

15. 根据实施方案14所述的方法,其中所述富集NK细胞的群体是从所述生物样品选择的如下细胞:对NKG2C呈阳性并且对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A($NKG2C^{pos}NKG2A^{neg}$)。

16. 根据实施方案10-15中任一项所述的方法,其中所述受试者是CMV血清阳性的。

17. 根据实施方案10-16中任一项所述的方法,其中来自所述受试者的生物样品中NK细胞中g-NK细胞的百分比是大于或大于约5%,任选地其中所述受试者是针对所述生物样品中NK细胞中g-NK细胞的百分比大于或大于约5%选择的受试者。

18. 根据实施方案10-16中任一项所述的方法,其中来自所述受试者的生物样品中

NK细胞中g-NK细胞的百分比是大于或大于约10%，任选地其中所述受试者是针对所述生物样品中NK细胞中g-NK细胞的百分比大于或大于约10%选择的受试者。

19. 根据实施方案10-16中任一项所述的方法，其中来自所述受试者的生物样品中NK细胞中g-NK细胞的百分比是大于或大于约30%，任选地其中所述受试者是针对所述生物样品中NK细胞中g-NK细胞的百分比大于或大于约30%选择的受试者。

20. 根据实施方案1-19中任一项所述的方法，其中富集的NK细胞的所述群体中g-NK细胞的百分比是在为或约20%与为或约90%之间。

21. 根据实施方案1-19中任一项所述的方法，其中富集的NK细胞的所述群体中g-NK细胞的百分比是在为或约40%与为或约90%之间。

22. 根据实施方案1-19中任一项所述的方法，其中富集的NK细胞的所述群体中g-NK细胞的百分比是在为或约60%与为或约90%之间。

23. 根据实施方案10-22中任一项所述的方法，其中所述富集NK细胞的群体是从所述生物样品选择的如下细胞：对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD57呈阳性(CD3^{neg}CD57^{pos})。

24. 根据实施方案7或实施方案23所述的方法，其中所述富集NK细胞的群体是通过如下方法从所述生物样品选择的，所述方法包括：

(a) 从所述生物样品选择(1) 对CD3呈阴性或具有低CD3(CD3^{neg})的细胞或(2) 对CD57呈阳性(CD57^{pos})的细胞，从而富集第一选择群体；以及

(b) 从所述第一选择群体选择以下中的另一种细胞：(1) 对CD3呈阴性或具有低CD3(CD3^{neg})的细胞或(2) 对CD57呈阳性(CD57^{pos})的细胞，从而富集对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD57呈阳性(CD3^{neg}CD57^{pos})的细胞，

任选地其中所述方法包括从所述生物样品选择对CD3呈阴性或具有低CD3(CD3^{neg})的细胞，从而富集第一选择群体，以及从所述第一选择群体选择对CD57呈阳性(CD57^{pos})的细胞。

25. 根据实施方案10-22中任一项所述的方法，其中所述富集NK细胞的群体是从所述生物样品选择的如下细胞：对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD56呈阳性(CD3^{neg}CD56^{pos})。

26. 根据实施方案8或实施方案26所述的方法，其中所述富集NK细胞的群体是通过如下方法从所述生物样品选择的，所述方法包括：

(a) 从所述生物样品选择(1) 对CD3呈阴性或具有低CD3(CD3^{neg})的细胞或(2) 对CD56呈阳性(CD56^{pos})的细胞，从而富集第一选择群体；以及

(b) 从所述第一选择群体选择以下中的另一种细胞：(1) 对CD3呈阴性或具有低CD3(CD3^{neg})的细胞或(2) 对CD56呈阳性(CD56^{pos})的细胞，从而富集对CD3呈阴性或具有低CD3并且对CD56呈阳性(CD3^{neg}CD56^{pos})的细胞，

任选地其中所述方法包括从所述生物样品选择对CD3呈阴性或具有低CD3(CD3^{neg})的细胞，从而富集第一选择群体，以及从所述第一选择群体选择对CD56呈阳性(CD56^{pos})的细胞。

27. 根据实施方案1-5和7-26中任一项所述的方法，其中所述受试者是针对来自所述受试者的外周血样品中至少或至少约20%的NK细胞对NKG2C呈阳性(NKG2C^{pos})选择的受试者。

28. 根据实施方案1-5和7-27中任一项所述的方法，其中所述受试者是针对来自所

述受试者的外周血样品中至少或至少约70%的NK细胞对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A (NKG2A^{neg})选择的受试者。

29. 根据实施方案1-28中任一项所述的方法,其中所获得的富集的NK细胞的群体是被冷冻的低温保存的生物样品,并且在所述培养之前将所述低温保存的生物样品解冻。

30. 根据实施方案1-28中任一项所述的方法,其中在所述培养之前不对所获得的富集的NK细胞的群体进行冷冻或低温保存。

31. 根据实施方案10-30中任一项所述的方法,其中用于扩增的条件包括有效量的一种或多种重组细胞因子。

32. 根据实施方案31所述的方法,其中所述一种或多种重组细胞因子包括有效量的SCF、GSK3i、FLT3、IL-2、IL-6、IL-7、IL-15、IL-12、IL-18、IL-21、IL-27或其组合。

33. 根据实施方案31或实施方案32所述的方法,其中所述一种或多种重组细胞因子包括有效量的IL-2、IL-7、IL-15、IL-12、IL-18、IL-21、IL-27或其组合。

34. 根据实施方案31-33中任一项所述的方法,其中所述一种或多种重组细胞因子中的至少一种是IL-21。

35. 根据实施方案1-10和34中任一项所述的方法,其中所述重组细胞因子还包括IL-2、IL-7、IL-15、IL-12、IL-18或IL-27或其组合。

36. 根据实施方案1-10和31-35中任一项所述的方法,其中所述重组细胞因子中的至少一种是IL-2。

37. 根据实施方案1-10和31-36中任一项所述的方法,其中所述重组细胞因子是IL-21和IL-2。

38. 根据实施方案1-10和31-37中任一项所述的方法,其中所述重组细胞因子是IL-21、IL-2和IL-15。

39. 根据实施方案1-10和31-35中任一项所述的方法,其中所述重组细胞因子是IL-21、IL-12、IL-15和IL-18。

40. 根据实施方案1-10和31-39中任一项所述的方法,其中所述重组细胞因子是IL-21、IL-2、IL-12、IL-15和IL-18。

41. 根据实施方案1-10和31-35中任一项所述的方法,其中所述重组细胞因子是IL-21、IL-15、IL-18和IL-27。

42. 根据实施方案1-10和31-40中任一项所述的方法,其中所述重组细胞因子是IL-21、IL-2、IL-15、IL-18和IL-27。

43. 根据实施方案31-36中任一项所述的方法,其中所述重组细胞因子是IL-2和IL-15。

44. 根据实施方案1-10和34-42中任一项所述的方法,其中在所述培养的至少一部分期间将重组IL-21添加至所述培养基,任选地在为或约所述培养开始时和/或所述培养期间一次或多次添加,添加浓度是为或约10ng/mL至为或约100ng/mL。

45. 根据实施方案1-10、34-42和44中任一项所述的方法,其中在所述培养的至少一部分期间将重组IL-21添加至所述培养基,任选地在为或约所述培养开始时和/或所述培养期间一次或多次添加,添加浓度是为或约25ng/mL。

46. 根据实施方案32、33、35-38、40、42和43中任一项所述的方法,其中在所述培养

的至少一部分期间将重组IL-2添加至所述培养基,任选地在或约在所述培养开始时和/或所述培养期间一次或多次添加,添加浓度是为或约10IU/mL至为或约500IU/mL。

47. 根据实施方案32、33、35-38、40、42、43和46中任一项所述的方法,其中在所述培养的至少一部分期间将重组IL-2添加至所述培养基,任选地在为或约所述培养开始时和/或所述培养期间一次或多次添加,添加浓度是为或约100IU/mL。

48. 根据实施方案32、33、35-38、40、42、43和46中任一项所述的方法,其中在所述培养的至少一部分期间将重组IL-2添加至所述培养基,任选地在为或约所述培养开始时和/或所述培养期间一次或多次添加,添加浓度是为或约500IU/mL。

49. 根据实施方案32、33、35和38-43中任一项所述的方法,其中在所述培养的至少一部分期间将重组IL-15添加至所述培养基,任选地在为或约所述培养开始时和/或所述培养期间一次或多次添加,添加浓度是为或约1ng/mL至50ng/mL。

50. 根据实施方案32、33、35、39-43和49中任一项所述的方法,其中在所述培养的至少一部分期间将重组IL-15添加至所述培养基,任选地在为或约所述培养开始时和/或所述培养期间一次或多次添加,添加浓度是为或约10ng/mL。

51. 根据实施方案32、33、35、39、40和42中任一项所述的方法,其中在所述培养的至少一部分期间将重组IL-12添加至所述培养基,任选地在为或约所述培养开始时和/或所述培养期间一次或多次添加,添加浓度是为或约1ng/mL至50ng/mL。

52. 根据实施方案32、33、35、39、40、42和51中任一项所述的方法,其中在所述培养的至少一部分期间将重组IL-12添加至所述培养基,任选地在为或约所述培养开始时和/或所述培养期间一次或多次添加,添加浓度是为或约10ng/mL。

53. 根据实施方案32、33、35和39-42中任一项所述的方法,其中在所述培养的至少一部分期间将重组IL-18添加至所述培养基,任选地在为或约所述培养开始时和/或所述培养期间一次或多次添加,添加浓度是为或约1ng/mL至50ng/mL。

54. 根据实施方案32、33、35、39-42和53中任一项所述的方法,其中在所述培养的至少一部分期间将重组IL-18添加至所述培养基,任选地在为或约所述培养开始时和/或所述培养期间的一次或多次添加,添加浓度是为或约10ng/mL。

55. 根据实施方案32、33、35和41-42中任一项所述的方法,其中在所述培养的至少一部分期间将重组IL-27添加至所述培养基,任选地在为或约所述培养开始时和/或所述培养期间一次或多次添加,添加浓度是为或约1ng/mL至50ng/mL。

56. 根据实施方案32、33、35、41-42和55中任一项所述的方法,其中在所述培养的至少一部分期间将重组IL-27添加至所述培养基,任选地在为或约所述培养开始时和/或所述培养期间一次或多次添加,添加浓度是为或约10ng/mL。

57. 根据实施方案1-10和31-56中任一项所述的方法,其中在为或约所述培养开始时开始将所述重组细胞因子添加至所述培养基。

58. 根据实施方案57所述的方法,其中在所述培养期间的一个或多个另外的时间将所述重组细胞因子添加至所述培养基。

59. 根据实施方案1-58中任一项所述的方法,其中所述方法还包括在所述培养期间一次或多次更换所述培养基。

60. 根据实施方案59所述的方法,其中在所述培养的持续时间中,任选地在长达5

天不进行培养基更换的初始扩增之后,每两或三天进行所述培养基更换。

61. 根据实施方案59或实施方案60所述的方法,其中在所述培养基的每次更换时,添加含有所述重组细胞因子的新鲜培养基。

62. 根据实施方案1-10和31-61中任一项所述的方法,其中所述重组细胞因子包括IL-21并且在所述培养的至少一部分期间作为与抗IL-21抗体的复合物来添加所述IL-21,任选地在为或约所述培养开始时和/或所述培养期间一次或多次添加。

63. 根据实施方案62所述的方法,其中:

在所述培养之前,将所述抗IL-21抗体和所述重组IL-21孵育以形成所述IL-21/抗IL-21复合物;并且

将所述IL-21/抗IL-21复合物添加至所述培养基。

64. 根据实施方案62或实施方案63所述的方法,其中所述抗IL-21抗体的浓度是为或约100ng/mL至500ng/mL。

65. 根据实施方案62-64中任一项所述的方法,其中所述抗IL-21抗体的浓度为或为约250ng/mL。

66. 根据实施方案62-65中任一项所述的方法,其中所述重组IL-21的浓度是为或约10ng/mL至100ng/mL。

67. 根据实施方案62-66中任一项所述的方法,其中所述重组IL-21的浓度是为或约25ng/mL。

68. 根据实施方案1-67中任一项所述的方法,其中所述人受试者具有CD16 158V/V NK细胞基因型或CD16 158V/F NK细胞基因型,任选地其中所述生物样品来自针对所述CD16 158V/V NK细胞基因型或所述CD16 158V/F NK细胞基因型选择的人受试者。

69. 根据实施方案1-68中任一项所述的方法,其中所述生物样品是或包含外周血单个核细胞(PBMC)。

70. 根据实施方案1-69中任一项所述的方法,其中所述生物样品是血液样品。

71. 根据实施方案1-69中任一项所述的方法,其中所述生物样品是单采术或白细胞单采术样品。

72. 根据实施方案1-71中任一项所述的方法,其中所述生物样品是被冷冻的低温保存的样品,并且在所述培养之前将所述低温保存的样品解冻。

73. 根据实施方案1-71中任一项所述的方法,其中在所述培养之前不对所述生物样品进行冷冻或低温保存。

74. 根据实施方案1-73中任一项所述的方法,其中所述选择包括基于免疫亲和力的选择。

75. 根据实施方案1-74中任一项所述的方法,其中所述HLA-E+饲养细胞是K562细胞。

76. 根据实施方案75所述的方法,其中所述K562细胞表达膜结合的IL-15 (K562-mb15)或膜结合的IL-21 (K562-mb21)。

77. 根据实施方案1-74中任一项所述的方法,其中所述HLA-E+饲养细胞是221.AEH细胞。

78. 根据实施方案1-77中任一项所述的方法,其中辐照的HLA-E+饲养细胞与NK细

胞的比率是为或约1:1或更大。

79. 根据实施方案1-78中任一项所述的方法, 其中辐照的HLA-E+饲养细胞与NK细胞的比率在1:1与5:1之间, 包含端值。

80. 根据实施方案1-79中任一项所述的方法, 其中辐照的HLA-E+饲养细胞与富集的NK细胞的比率在1:1与3:1之间, 包含端值。

81. 根据实施方案1-80中任一项所述的方法, 其中辐照的HLA-E+饲养细胞与富集的NK细胞的比率为或为约2.5:1。

82. 根据实施方案1-80中任一项所述的方法, 其中辐照的HLA-E+饲养细胞与富集的NK细胞的比率为或为约2:1。

83. 根据实施方案1-80中任一项所述的方法, 其中辐照的HLA-E+饲养细胞与富集的NK细胞的比率为或为约1:1。

84. 根据实施方案83所述的方法, 其中在冷冻用于低温保存之后, 已经将富集的NK细胞的所述群体解冻。

85. 根据实施方案78-82中任一项所述的方法, 其中富集的NK细胞的所述群体是新近分离的或者先前尚未进行冷冻和解冻。

86. 根据实施方案1-85中任一项所述的方法, 其中在所述培养的至少一部分期间添加至所述培养基的所述重组细胞因子为500IU/mL IL-2、10ng/mL IL-15和25ng/mL IL-21。

87. 根据实施方案1-86中任一项所述的方法, 其中富集的NK细胞的所述群体包含至少或至少约 2.0×10^5 个富集的NK细胞、至少或至少约 1.0×10^6 个富集的NK细胞或者至少或至少约 1.0×10^7 个富集的NK细胞。

88. 根据实施方案1-86中任一项所述的方法, 其中富集的NK细胞的所述群体包含在为或约 2.0×10^5 个富集的NK细胞与为或约 5.0×10^7 个富集的NK细胞之间、在为或约 1.0×10^6 个富集的NK细胞与为或约 1.0×10^8 个富集的NK细胞之间、在为或约 1.0×10^7 个富集的NK细胞与为或约 5.0×10^8 个富集的NK细胞之间或者在为或约 1.0×10^7 个富集的NK细胞与为或约 1.0×10^9 个富集的NK细胞之间。

89. 根据实施方案1-88中任一项所述的方法, 其中在所述培养开始时的富集的NK细胞的所述群体的浓度为在或在约 0.05×10^6 个富集的NK细胞/mL与 1.0×10^6 个富集的NK细胞/mL之间。

90. 根据实施方案1-89中任一项所述的方法, 其中在所述培养开始时的富集的NK细胞的所述群体的浓度为在或在约 0.05×10^6 个富集的NK细胞/mL与 0.5×10^6 个富集的NK细胞/mL之间。

91. 根据实施方案1-90中任一项所述的方法, 其中在所述培养开始时的富集的NK细胞的所述群体包含为或约 0.2×10^6 个富集的NK细胞/mL的浓度。

92. 根据实施方案1-91中任一项所述的方法, 其中所述培养是在封闭系统中进行。

93. 根据实施方案1-92中任一项所述的方法, 其中所述培养是在无菌培养袋中进行。

94. 根据实施方案1-93中任一项所述的方法, 其中所述培养是使用透气性培养器皿来进行。

95. 根据实施方案1-94中任一项所述的方法,其中所述培养是使用生物反应器来进行。

96. 根据实施方案1-95中任一项所述的方法,其中进行所述培养直至所述方法实现至少或至少约 2.50×10^8 个g-NK细胞的扩增的时间。

97. 根据实施方案1-96中任一项所述的方法,其中进行所述培养直至所述方法实现至少或至少约 5.00×10^8 个g-NK细胞的扩增的时间。

98. 根据实施方案1-97中任一项所述的方法,其中进行所述培养直至所述方法实现至少或至少约 1.0×10^9 个g-NK细胞的扩增。

99. 根据实施方案1-97中任一项所述的方法,其中进行所述培养直至所述方法实现至少或至少约 5.0×10^9 个g-NK细胞的扩增的时间。

100. 根据实施方案1-99中任一项所述的方法,其中所述培养进行为或约或至少或至少约5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天或25天。

101. 根据实施方案1-100中任一项所述的方法,其中所述培养进行为或约或至少或至少约14天。

102. 根据实施方案1-100中任一项所述的方法,其中所述培养进行为或约或至少或至少约21天。

103. 根据实施方案1-102中任一项所述的方法,其中与所述培养开始时相比,所述方法在所述培养结束时产生数量增加的g-NK细胞。

104. 根据实施方案103所述的方法,其中所述增加是大于或大于约100倍、大于或大于约200倍、大于或大于约300倍、大于或大于约400倍、大于或大于约500倍、大于或大于约600倍、大于或大于约700倍或者大于或大于约800倍。

105. 根据实施方案103或实施方案104所述的方法,其中所述增加是为或约1000倍或更大。

106. 根据实施方案103或实施方案104所述的方法,其中所述增加是为或约2000倍或更大、为或约3000倍或更大或者为或约35000倍或更大。

107. 根据实施方案1-106中任一项所述的方法,所述方法还包括收集通过所述方法产生的富含g-NK细胞的所述扩增群体。

108. 根据实施方案1-107中任一项所述的方法,其中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于50%的所述群体是FcR γ^{neg} 。

109. 根据实施方案1-107中任一项所述的方法,其中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于60%的所述群体是FcR γ^{neg} 。

110. 根据实施方案1-107中任一项所述的方法,其中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于70%的所述群体是FcR γ^{neg} 。

111. 根据实施方案1-107中任一项所述的方法,其中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于80%的所述群体是FcR γ^{neg} 。

112. 根据实施方案1-107中任一项所述的方法,其中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于90%的所述群体是FcR γ^{neg} 。

113. 根据实施方案1-107中任一项所述的方法,其中,在富含g-NK细胞的所述扩增

群体中,大于95%的所述群体是FcR γ^{neg} 。

114.根据实施方案1-113中任一项所述的方法,其中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于或大于约30%对NKG2C呈阳性(NKG2C^{pos})和/或大于或大于约50%对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A(NKG2A^{neg})。

115.根据实施方案1-113中任一项所述的方法,其中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于或大于约35%对NKG2C呈阳性(NKG2C^{pos})和/或大于或大于约60%对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A(NKG2A^{neg})。

116.根据实施方案1-113中任一项所述的方法,其中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于或大于约40%对NKG2C呈阳性(NKG2C^{pos})和/或大于或大于约70%对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A(NKG2A^{neg})。

117.根据实施方案1-113中任一项所述的方法,其中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于或大于约45%对NKG2C呈阳性(NKG2C^{pos})和/或大于或大于约80%对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A(NKG2A^{neg})。

118.根据实施方案1-113中任一项所述的方法,其中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于或大于约50%对NKG2C呈阳性(NKG2C^{pos})和/或大于或大于约85%对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A(NKG2A^{neg})。

119.根据实施方案1-113中任一项所述的方法,其中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于或大于约55%对NKG2C呈阳性(NKG2C^{pos})和/或大于或大于约90%对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A(NKG2A^{neg})。

120.根据实施方案1-113中任一项所述的方法,其中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于或大于约60%对NKG2C呈阳性(NKG2C^{pos})和/或大于或大于约95%对NKG2A呈阴性或具有低NKG2A(NKG2A^{neg})。

121.根据实施方案1-120中任一项所述的方法,其中所述人受试者具有CD16158V/V NK细胞基因型并且所述g-NK细胞为CD16 158V/V(V158),或者所述人受试者具有CD16 158V/F NK细胞基因型并且所述g-NK细胞为CD16 158V/F(V158)。

122.根据实施方案1-121中任一项所述的方法,所述方法还包括基于一种或多种表面标记物NKG2C^{pos}、NKG2C^{neg}、CD16^{pos}、CD57^{pos}、CD7^{dim/neg}、CD161^{neg}、CD38^{neg}或前述任一项的组合,从富含g-NK细胞的所述扩增群体纯化细胞群体。

123.根据实施方案122所述的方法,其中所述纯化包括选择呈NKG2C^{pos}和NKG2A^{neg}的细胞。

124.根据实施方案122所述的方法,其中所述纯化包括选择呈CD16^{pos}/CD57^{pos}/CD7^{dim/neg}/CD161^{neg}的细胞。

125.根据实施方案122所述的方法,其中所述纯化包括选择呈NKG2A^{neg}/CD161^{neg}的细胞。

126.根据实施方案122所述的方法,其中所述纯化包括选择呈CD38^{neg}的细胞。

127.根据实施方案1-126中任一项所述的方法,其中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于为或为约70%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性。

128.根据实施方案1-126中任一项所述的方法,其中,在富含g-NK细胞的所述扩增群体中,大于为或为约80%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性。

129. 根据实施方案1-126中任一项所述的方法, 其中, 在富含g-NK细胞的所述扩增群体中, 大于为或为约85%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性。

130. 根据实施方案1-126中任一项所述的方法, 其中, 在富含g-NK细胞的所述扩增群体中, 大于为或为约90%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性。

131. 根据实施方案1-130中任一项所述的方法, 其中, 在富含g-NK细胞的所述扩增群体中, 大于为或为约70%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。

132. 根据实施方案1-130中任一项所述的方法, 其中, 在富含g-NK细胞的所述扩增群体中, 大于为或为约80%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。

133. 根据实施方案1-130中任一项所述的方法, 其中, 在富含g-NK细胞的所述扩增群体中, 大于为或为约85%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。

134. 根据实施方案1-130中任一项所述的方法, 其中, 在富含g-NK细胞的所述扩增群体中, 大于为或为约90%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。

135. 根据实施方案1-134中任一项所述的方法, 其中, 在富含g-NK细胞的所述扩增群体中, 大于10%的细胞能够针对肿瘤靶细胞脱颗粒, 任选地如按照CD107a所测量。

136. 根据实施方案135所述的方法, 其中所述脱颗粒是在不存在针对所述肿瘤靶细胞的抗体的情况下测量的。

137. 根据实施方案1-136中任一项所述的方法, 其中, 在富含g-NK细胞的所述扩增群体中, 大于10%的细胞能够针对肿瘤靶细胞产生干扰素- γ 或TNF- α 。

138. 根据实施方案137所述的方法, 其中所述干扰素- γ 或TNF- α 是在不存在针对所述肿瘤靶细胞的抗体的情况下测量的。

139. 根据实施方案1-138中任一项所述的方法, 所述方法还包括在药学上可接受的赋形剂中配制富集的g-NK细胞的所述扩增群体。

140. 根据实施方案139所述的方法, 所述方法还包括用包含低温保护剂的无血清低温保存介质配制富集的g-NK细胞的所述扩增群体。

141. 根据实施方案140所述的方法, 其中所述低温保护剂是DMSO。

142. 根据实施方案140所述的方法, 其中所述低温保护剂是DMSO, 并且所述低温保存介质是5%至10% DMSO(v/v), 任选地为或为约10% DMSO(v/v)。

143. 一种组合物, 所述组合物包含通过根据实施方案1-142中任一项所述的方法产生的g-NK细胞。

144. 一种扩增的自然杀伤(NK)细胞的组合物, 其中所述组合物中至少或至少约50%的细胞是FcR γ 缺陷性NK细胞(g-NK), 其中大于或大于约70%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性, 并且大于或大于约70%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。

145. 根据实施方案144所述的组合物, 其中大于或大于约80%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性, 并且大于或大于约80%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。

146. 根据实施方案144所述的组合物, 其中大于或大于约90%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性, 并且大于或大于约90%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。

147. 根据实施方案144所述的组合物, 其中大于或大于约95%的g-NK细胞对穿孔蛋白呈阳性, 并且大于或大于约95%的g-NK细胞对颗粒酶B呈阳性。

148. 根据实施方案144所述的组合物, 其中所述g-NK细胞为FcR γ^{neg} 。

149. 根据实施方案144所述的组合物,其中所述g-NK细胞展现g-NK细胞替代标记物谱。

150. 根据实施方案149所述的组合物,其中所述g-NK细胞替代标记物谱为CD16^{pos}/CD57^{pos}/CD7^{dim/neg}/CD161^{neg}。

151. 根据实施方案149所述的组合物,其中所述g-NK细胞替代标记物谱为NKG2A^{neg}/CD161^{neg}。

152. 根据实施方案129所述的组合物,其中所述g-NK细胞替代标记物谱为CD38^{neg}。

153. 根据实施方案150-152中任一项所述的组合物,其中所述g-NK细胞替代表面标记物谱进一步为CD45^{pos}/CD3^{neg}/CD56^{pos}。

154. 根据实施方案144-153中任一项所述的组合物,其中大于或大于约60%的细胞是g-NK细胞。

155. 根据实施方案144-153中任一项所述的组合物,其中大于或大于约70%的细胞是g-NK细胞。

156. 根据实施方案144-153中任一项所述的组合物,其中大于或大于约80%的细胞是g-NK细胞。

157. 根据实施方案144-153中任一项所述的组合物,其中大于或大于约90%的细胞是g-NK细胞。

158. 根据实施方案144-153中任一项所述的组合物,其中大于或大于约95%的细胞是g-NK细胞。

159. 根据实施方案144-158中任一项所述的组合物,其中大于为或为约80%的细胞对穿孔蛋白呈阳性。

160. 根据实施方案144-158中任一项所述的组合物,其中大于为或为约90%的细胞对穿孔蛋白呈阳性。

161. 根据实施方案144-160中任一项所述的组合物,其中在所述对穿孔蛋白呈阳性的细胞中,如通过细胞内流式细胞术所测量,基于平均荧光强度(MFI),所述细胞表达的穿孔蛋白的平均水平是FcR γ ^{pos}的细胞表达的穿孔蛋白的平均水平的至少或至少约两倍。

162. 根据实施方案144-161中任一项所述的组合物,其中大于为或为约80%的细胞对颗粒酶B呈阳性。

163. 根据实施方案144-161中任一项所述的组合物,其中大于为或为约90%的细胞对颗粒酶B呈阳性。

164. 根据实施方案144-163中任一项所述的组合物,其中在所述对颗粒酶B呈阳性的细胞中,如通过细胞内流式细胞术所测量,基于平均荧光强度(MFI),所述细胞表达的颗粒酶B的平均水平是FcR γ ^{pos}的细胞表达的颗粒酶B的平均水平的至少或至少约两倍。

165. 根据实施方案144-164中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含至少或约至少10⁸个细胞。

166. 根据实施方案144-165中任一项所述的组合物,其中所述组合物中g-NK细胞的数量是为或约10⁸至为或约10¹²个细胞、为或约10⁸至为或约10¹¹个细胞、为或约10⁸至为或约10¹⁰个细胞、为或约10⁸至为或约10⁹个细胞、为或约10⁹至为或约10¹²个细胞、为或约10⁹至为或约10¹¹个细胞、为或约10⁹至为或约10¹⁰个细胞、为或约10¹⁰至为或约10¹²个细胞、为或约

10^{10} 至为或约 10^{11} 个细胞或者为或约 10^{11} 至为或约 10^{12} 个细胞。

167. 根据实施方案144-166中任一项所述的组合物,其中所述组合物中g-NK细胞的数量为或为约 5×10^8 个细胞,为或为约 1×10^9 个细胞,为或为约 5×10^9 个细胞,或者为或为约 1×10^{10} 个细胞。

168. 根据实施方案144-167中任一项所述的组合物,其中所述组合物的体积是在为或约50mL与为或约500mL之间,任选地为或约200mL。

169. 根据实施方案144-168中任一项所述的组合物,其中所述组合物中的所述细胞来自单一供体受试者,所述细胞已经从相同的生物样品扩增。

170. 根据实施方案144-169中任一项所述的组合物,其中所述组合物是药物组合物。

171. 根据实施方案144-170中任一项所述的组合物,所述组合物包含药学上可接受的赋形剂。

172. 根据实施方案144-171中任一项所述的组合物,其中在包含低温保护剂的无血清低温保存介质中配制所述组合物。

173. 根据实施方案172所述的组合物,其中所述低温保护剂是DMSO,并且所述低温保存介质是5%至10% DMSO(v/v)。

174. 根据实施方案173所述的组合物,其中所述低温保护剂为或为约10% DMSO(v/v)。

175. 根据实施方案144-174中任一项所述的组合物,所述组合物是无菌的。

176. 一种无菌袋,所述无菌袋包含根据实施方案166-175中任一项所述的组合物。

177. 根据实施方案176所述的无菌袋,其中所述袋是适合低温保存的袋。

178. 一种试剂盒,所述试剂盒包含根据实施方案143-177中任一项所述的组合物。

179. 根据实施方案178所述的试剂盒,所述试剂盒还包含用于施用作为单一疗法的所述组合物用于治疗疾病或病症的说明书。

180. 根据实施方案178所述的试剂盒,所述试剂盒还包含用于治疗疾病或病症的另外的药剂。

181. 根据实施方案179或实施方案180所述的试剂盒,其中所述疾病或病症选自炎症病症、感染和癌症。

182. 根据实施方案179-181中任一项所述的试剂盒,其中所述疾病或病症是感染,并且所述感染是由病毒或细菌引起的。

183. 根据实施方案182所述的试剂盒,其中所述感染是由病毒引起的。

184. 根据实施方案183所述的试剂盒,其中所述病毒是RNA病毒,任选地冠状病毒。

185. 根据实施方案183所述的试剂盒,其中所述病毒是DNA病毒。

186. 根据实施方案183或实施方案184所述的试剂盒,其中所述病毒是SARS-CoV-2,并且所述感染是COVID-19。

187. 根据实施方案183-186中任一项所述的试剂盒,其中所述另外的药剂是含有针对所述病毒的抗体的血清。

188. 根据实施方案187所述的试剂盒,其中所述血清是来自从所述病毒引起的感染恢复的患者的恢复期血清。

189. 根据实施方案183-186中任一项所述的试剂盒,其中所述另外的药剂是抗体或Fc-融合蛋白,任选地重组ACE2-Fc融合蛋白。

190. 根据实施方案179-181中任一项所述的试剂盒,其中所述疾病或病症是癌症,并且所述癌症是白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。

191. 根据实施方案179-181中任一项所述的试剂盒,其中所述疾病或病症是癌症,并且所述癌症包括实体瘤。

192. 根据实施方案191所述的试剂盒,其中所述癌症选自胃或食管胃结合部的腺癌、膀胱癌、乳腺癌、脑癌、子宫颈癌、结直肠癌、内分泌/神经内分泌癌症、头颈癌、胃肠间质瘤、骨巨细胞瘤、肾癌、肝癌、肺癌、神经母细胞瘤、卵巢上皮癌/输卵管癌/原发性腹膜癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌和软组织癌。

193. 根据实施方案191或实施方案192所述的试剂盒,其中所述另外的药剂是抗体或Fc-融合蛋白。

194. 根据实施方案191-193中任一项所述的试剂盒,其中所述另外的药剂是识别或特异性结合肿瘤相关抗原的抗体。

195. 根据实施方案194所述的试剂盒,其中所述抗体识别或结合CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD52、CD56、CD70、CD74、CD140、EpCAM、CEA、gpA33、间皮素、甲胎蛋白、黏蛋白、PDGFR- α 、TAG-72、CAIX、PSMA、叶酸结合蛋白、散射因子受体激酶、神经节苷脂、细胞角蛋白、卷曲受体、VEGF、VEGFR、整联蛋白 α V β 3、整联蛋白 α 5 β 1、EGFR、EGFL7、ERBB2 (HER2)、ERBB3、纤连蛋白、HGF、HER3、LOXL2、MET、IGF1R、IGLF2、EPHA3、FR- α 、磷脂酰丝氨酸、黏结蛋白聚糖1、SLAMF7 (CD319)、TRAILR1、TRAILR2、RANKL、FAP、波形蛋白或生腱蛋白。

196. 根据实施方案190-195中任一项所述的试剂盒,所述试剂盒还包含细胞毒性剂或癌症药物。

197. 根据实施方案190-195中任一项所述的试剂盒,其中所述另外的药剂是细胞毒性剂或癌症药物。

198. 根据实施方案190-192中任一项所述的试剂盒,其中所述另外的药剂是溶瘤病毒。

199. 根据实施方案190-192中任一项所述的试剂盒,其中所述另外的药剂是双特异性抗体,其包含与免疫细胞上的激活受体特异性结合的至少一个结合结构域和与肿瘤相关抗原特异性结合的至少一个结合结构域。

200. 根据实施方案199所述的试剂盒,其中所述免疫细胞是NK细胞。

201. 根据实施方案199或实施方案200所述的试剂盒,其中所述激活受体是CD16 (CD16a)。

202. 根据实施方案199-201中任一项所述的试剂盒,其中所述肿瘤相关抗原是CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD52、CD56、CD70、CD74、CD140、EpCAM、CEA、gpA33、间皮素、甲胎蛋白、黏蛋白、PDGFR- α 、TAG-72、CAIX、PSMA、叶酸结合蛋白、散射因子受体激酶、神经节苷脂、细胞角蛋白、卷曲受体、VEGF、VEGFR、整联蛋白 α V β 3、整联蛋白 α 5 β 1、EGFR、EGFL7、ERBB2 (HER2)、ERBB3、纤连蛋白、HGF、HER3、LOXL2、MET、IGF1R、IGLF2、EPHA3、FR- α 、磷脂酰丝氨酸、黏结蛋白聚糖1、SLAMF7 (CD319)、TRAILR1、TRAILR2、RANKL、FAP、波形蛋白或生腱蛋白。

203. 一种制品, 所述制品包含根据实施方案178-202中任一项所述的试剂盒。

204. 一种治疗疾病或病症的方法, 所述方法包括将根据实施方案143-175中任一项所述的组合物施用至有需要的个体。

205. 根据实施方案204所述的方法, 其中所述疾病或病症选自炎性病症、感染和癌症。

206. 根据实施方案204或实施方案205所述的方法, 其中所述疾病或病症是感染, 并且所述感染是由病毒或细菌引起的。

207. 根据实施方案206所述的方法, 其中所述感染是由病毒引起的。

208. 根据实施方案207所述的方法, 其中所述病毒是DNA病毒。

209. 根据实施方案207所述的方法, 其中所述病毒是RNA病毒。

210. 根据实施方案207或实施方案209所述的方法, 其中所述病毒是冠状病毒。

211. 根据实施方案210所述的方法, 其中所述冠状病毒是SARS-CoV-2, 并且所述感染是COVID-19。

212. 根据实施方案204或实施方案205所述的方法, 其中所述疾病或病症是癌症, 并且所述癌症是白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。

213. 根据实施方案204或实施方案205所述的方法, 其中所述疾病或病症是癌症, 并且所述癌症包括实体瘤。

214. 根据实施方案213所述的方法, 其中所述癌症选自胃或食管胃结合部的腺癌、膀胱癌、乳腺癌、脑癌、子宫颈癌、结直肠癌、内分泌/神经内分泌癌症、头颈癌、胃肠间质瘤、骨巨细胞瘤、肾癌、肝癌、肺癌、神经母细胞瘤、卵巢上皮癌/输卵管癌/原发性腹膜癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌和软组织癌。

215. 根据实施方案204-214中任一项所述的方法, 其中所述组合物是作为单一疗法来施用。

216. 根据实施方案204-214中任一项所述的方法, 所述方法还包括将另外的药剂施用至所述个体用于治疗所述疾病或病症。

217. 根据实施方案216所述的方法, 其中所述疾病或病症是病毒, 并且所述另外的药剂是含有针对所述病毒的抗体的血清。

218. 根据实施方案217所述的方法, 其中所述血清是来自从所述病毒引起的感染恢复的患者的恢复期血清。

219. 根据实施方案216所述的方法, 其中所述另外的药剂是抗体或Fc-融合蛋白。

220. 根据实施方案219所述的方法, 其中所述抗体包含Fc结构域和/或是全长抗体。

221. 根据实施方案219所述的方法, 其中所述疾病或病症是病毒, 并且所述另外的药剂是重组ACE2-Fc融合蛋白。

222. 根据实施方案219或实施方案220所述的方法, 其中所述疾病或病症是癌症, 并且所述抗体识别与所述癌症相关的肿瘤抗原。

223. 根据实施方案222所述的方法, 其中所述抗体识别或特异性结合CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD52、CD56、CD70、CD74、CD140、EpCAM、CEA、gpA33、间皮素、甲胎蛋白、黏蛋白、PDGFR- α 、TAG-72、CAIX、PSMA、叶酸结合蛋白、散射因子受体激酶、神

神经节苷脂、细胞角蛋白、卷曲受体、VEGF、VEGFR、整联蛋白 α V β 3、整联蛋白 α 5 β 1、EGFR、EGFL7、ERBB2 (HER2)、ERBB3、纤连蛋白、HGF、HER3、LOXL2、MET、IGF1R、IGLF2、EPA3、FR- α 、磷脂酰丝氨酸、黏结蛋白聚糖1、SLAMF7 (CD319)、TRAILR1、TRAILR2、RANKL、FAP、波形蛋白或生腱蛋白。

224. 根据实施方案216所述的方法, 其中所述另外的药剂是溶瘤病毒。

225. 根据实施方案216所述的方法, 其中所述另外的药剂是双特异性抗体, 其包含与免疫细胞上的激活受体特异性结合的至少一个结合结构域和与肿瘤相关抗原特异性结合的至少一个结合结构域。

226. 根据实施方案225所述的方法, 其中所述免疫细胞是巨噬细胞。

227. 根据实施方案225所述的方法, 其中所述免疫细胞是NK细胞。

228. 根据实施方案225-227中任一项所述的方法, 其中所述激活受体是CD16 (CD16a)。

229. 根据实施方案225-228中任一项所述的方法, 其中所述肿瘤相关抗原是CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD52、CD56、CD70、CD74、CD140、EpCAM、CEA、gpA33、间皮素、甲胎蛋白、黏蛋白、PDGFR- α 、TAG-72、CAIX、PSMA、叶酸结合蛋白、散射因子受体激酶、神经节苷脂、细胞角蛋白、卷曲受体、VEGF、VEGFR、整联蛋白 α V β 3、整联蛋白 α 5 β 1、EGFR、EGFL7、ERBB2 (HER2)、ERBB3、纤连蛋白、HGF、HER3、LOXL2、MET、IGF1R、IGLF2、EPA3、FR- α 、磷脂酰丝氨酸、黏结蛋白聚糖1、SLAMF7 (CD319)、TRAILR1、TRAILR2、RANKL、FAP、波形蛋白或生腱蛋白。

230. 根据实施方案222-229中任一项所述的方法, 所述方法还包括将癌症药物或细胞毒性剂施用至所述受试者用于治疗所述疾病或病症。

231. 根据实施方案204-230中任一项所述的方法, 所述方法包括将为或约 1×10^5 个NK细胞/kg至为或约 1×10^7 个NK细胞/kg施用至所述个体。

232. 根据实施方案204-231中任一项所述的方法, 所述方法包括将为或约 5×10^7 个NK细胞至为或约 10×10^9 个NK细胞施用至所述个体。

233. 根据实施方案204-232中任一项所述的方法, 其中所述个体是人。

234. 根据实施方案204-233中任一项所述的方法, 其中所述组合物中的NK细胞对于所述个体是同种异体的。

235. 根据实施方案204-233中任一项所述的方法, 其中所述组合物中的NK细胞对于所述受试者是自体的。

VII. 实施例

[0472] 以下实施例仅出于说明性目的而被包括, 并且不意图限制本发明的范围。

实施例1: g-NK替代表面标记物的鉴定

[0473] 进行研究以鉴定可以作为替代表面标记物用于鉴定g-NK细胞的细胞外表面标记物的组合, 所述g-NK细胞对细胞内标记物Fc ϵ RI γ 呈阴性 (FcR γ ^{neg})。在人外周血样品中通过流式细胞术通过针对Fc ϵ RI γ 的细胞内染色以及通过针对CD45、CD3和CD56的细胞外染色来确定g-NK细胞的百分比, 以鉴定g-NK细胞子集CD45^{pos}/CD3^{neg}/CD56^{pos}/FcR γ ^{neg}。如图1中所示, 在样品中的g-NK细胞中, 具有NK细胞表型CD45^{pos}/CD3^{neg}/CD56^{pos}的细胞和具有CD16^{pos}/CD57^{pos}/CD7^{dim/neg}/CD161^{neg}或NKG2A^{neg}/CD161^{neg}的细胞外表面表型的细胞与样品中

g-NK细胞的存在高度相关。具体而言,CD16^{pos}/CD57^{pos}/CD7^{dim/neg}/CD161^{neg}或NKG2A^{neg}/CD161^{neg} NK细胞子集内g-NK细胞的百分比都大于80%。

实施例2:用于优先扩增FcR γ 缺陷性NK细胞(g⁻NK)的方法

[0474] 根据制造商的说明书,通过Histopaque®密度离心从来自CMV阳性人供体的全血分离人外周血单个核细胞(PBMC),或者从CMV血清阴性供体的全血分离用于比较。从血沉棕黄层收获PBMC,将其洗涤并通过流式细胞术评估活CD45^{pos}细胞(以分辨PBMC与残留红细胞)。大约2/3的自体PBMC用于通过基于免疫亲和力的磁珠分离使用Miltenyi MACS™微珠通过以下方式来富集自然杀伤(NK)细胞:通过耗尽CD3^{pos}细胞以去除T细胞(CD3耗尽),通过CD3耗尽和之后的(1)针对CD57进行阳性选择以富集CD57^{pos} NK细胞,或者(2)针对CD16进行阳性选择(富集CD16^{pos} NK细胞和单核细胞)。作为替代方案,NK富集可以通过CD3耗尽和之后的CD56富集(去除T细胞并富集NK细胞)来进行。

[0475] 通过将细胞用细胞外表面标记物CD45、CD3、CD56、CD16、CD57、CD7和CD161的组合染色或使用抗FcεRI抗体进行细胞内染色来确定分离的g⁻NK细胞的百分比。将g⁻NK细胞的百分比鉴定为呈CD45^{pos}/CD3^{neg}/CD56^{pos}/FcεRI^{neg} (FcR γ ^{neg})的活细胞。如果在扩增或功能测定之前(或之后)进行细胞分选,则仅可以使用细胞外表面染色,并且使用替代表面标记物谱如CD45^{pos}/CD3^{neg}/CD56^{pos}/CD16^{pos}/CD57^{pos}/CD7^{dim/neg}/CD161^{neg}淋巴细胞或CD45^{pos}/CD3^{neg}/CD56^{pos}/NKG2A^{neg}/CD161^{neg}或其活细胞来鉴定g⁻NK细胞的百分比。

[0476] 将新近分离的NK细胞立即用于NK细胞扩增,或者在扩增之前将其低温保存并解冻。NK细胞扩增方案既可以用于已经冷冻/解冻的富集的NK细胞,也可以用于从冷冻/解冻的PBMC富集的NK细胞。

[0477] 在扩增之前,通过确定活CD71^{pos}(靶细胞标记物)细胞的数量来制备HLA-E^亮221.AEH淋巴瘤细胞作为饲养细胞。221.AEH是源自高表达HLA-E(HLA-E^亮)的721.221细胞系的转染子(Lee等人1998,J Immunol 160:4951-60)。将数量为在如上所述PBMC的磁珠分离后富集的NK细胞的数量约2.5倍的221.AEH靶细胞在RPMI-1640+10%胎牛血清(FBS)中重悬至1x10⁶个细胞/mL。将重悬的221.AEH细胞以100Gy辐照。另外,也辐照(100Gy)上文分离的其余1/3自体PBMC用于扩增的饲养细胞。不需要在扩增期间使用辐照的PBMC作为饲养细胞,但是研究表明其改进NK细胞扩增的功效。

[0478] 将新鲜的或解冻的磁性富集的NK细胞以约10x10⁶个NK细胞以0.2x10⁶个NK细胞/mL的浓度接种于由95%无血清培养基(例如CellGenix GMP干细胞生长培养基(SCGM))构成的培养基中,所述培养基补充有5%人AB(或自体的)血清和100IU/mL重组IL-2。在第0天开始,将接种的NK细胞与辐照的自体PBMC以5:1的PBMC与NK细胞的比率以及与辐照的221.AEH饲养细胞以2.5:1的221.AEH与NK细胞的比率共培养。任选地,可以在没有辐照的PBMC饲养细胞的情况下进行扩增。将共培养的细胞在37℃和5%CO₂下培育14天(新鲜细胞)或21天(解冻的细胞)。在类似研究中,将解冻的NK细胞如上文共培养,但是所述共培养以1:1的AEH与NK细胞的比率包括辐照的221.AEH饲养细胞,并且共培养14天而非21天。

[0479] 对于扩增的最初5天,通过以50ng/mL添加抗CD3单克隆抗体(OKT3)来激活用作饲养细胞的PBMC。对于新鲜的或解冻的细胞,在5天后洗除抗CD3抗体,并且此后每2-3天补充100IU/mL重组IL-2(对于经历14天扩增的新鲜细胞或解冻的细胞,d5、d7、d9、d11和d14;对于经历21天扩增的解冻的细胞,d5、d7、d9、d11、d14、d16、d18和d21)。在一些情形中,对于14

天扩增,在第5天、第7天和第10天补充含有新鲜重组IL-2的培养基。每次更换或补充培养基时计数细胞。在d7和d14通过流式细胞术评估g-NK的百分比。

[0480] 14天扩增过程的示例性总结显示于图2A中。

[0481] 对于比较,通过设计为扩增NKG2C^{pos} NK细胞的替代性方法扩增NK细胞(描述于Bigley等人2016,Clin Exp Immunol 185:239-251中)。在所述替代性方法中,通过CD3耗尽和之后使用CD56微珠(Miltenyi Biotec)的阳性选择来富集NK细胞(但是在如上所述的扩增之前,不包括CD16或CD57磁性富集)。将富集的NK细胞在37℃下与30ng/ml重组IL-15和未辐照的饲养细胞(721.221(HLA-E^{neg}淋巴瘤)或221.AEH(HLA-E^{high}淋巴瘤)靶细胞)以10:1的NK细胞与靶细胞比率一起培养14天。所述替代性方法不包括抗CD3激活的自体PBMC作为饲养细胞。所述替代性方法还包括含有胎牛血清的培养基。

[0482] 在第0天以及在扩增结束时(第14天或第21天)通过流式细胞术确定g-NK(CD45^{pos}/CD3^{neg}/CD56^{pos}/FceRI^{neg})的百分比。具体而言,通过细胞内流式细胞术使用购自Millipore(伯灵顿,马萨诸塞州,美国)的FcR γ 抗体来确定g-NK百分比。

[0483] 图2B和图2C描绘对于14天扩增(新鲜细胞)和解冻的细胞的21天扩增,通过上文方法在扩增结束时观察到的NK细胞扩增。图2D和图2E描绘类似结果,但是其还描绘涉及CD3耗尽和之后的CD16富集(CD3^{neg}CD16^{pos})的过程的结果,并且还描绘解冻的细胞的14天扩增的结果。在通过所提供方法以仅通过CD3耗尽富集的NK细胞(CD3^{neg})开始进行扩增时,在14天后实现来自1000万个NK细胞的12亿个g-NK细胞的平均扩增,其代表通过该方法扩增的21亿个NKG2C^{pos}的子集。所观察到的扩增是类似的,不论是用新近富集的NK细胞(14天)还是用先前已经冷冻并解冻的NK细胞进行所述方法,对于21天扩增如图2B中所示(比较CMV^{pos}CD3^{neg} 14d与CMV^{pos}CD3^{neg}解冻21d),或者对于14天扩增如图2D中所示(比较CMV^{pos}CD3^{neg} 14d与CMV^{pos}CD3^{neg}解冻14d)。对于图2D中描绘的数据集,解冻的NK细胞的扩增更优越,因为使用更低的221.AEH与NK细胞的比率(1:1相比于图2B中解冻的NK细胞的扩增的2.5:1)。具体而言,在一项实验中,对于最初仅通过CD3耗尽富集的NK细胞,从新鲜NK细胞扩增约12亿个g-NK,相比之下从冷冻的NK细胞扩增7亿个g-NK。如图2D中所示,当通过在扩增之前最初富集CD3^{neg}CD16^{pos}细胞来进行所提供方法时,与仅CD3耗尽相比,平均产率略有增加。当通过在扩增之前最初富集CD3^{neg}/CD57^{pos}细胞来进行所提供方法时,平均产率显著增加至从最初1000万个富集的NK细胞在14天后约80亿个g-NK细胞。相比之下,替代性方法(Bigley等人2016)从相同的起始群体仅产生约2300万个g-NK(或约4500万个NKG2C^{pos} NK细胞)。

[0484] 如图2C和图2E中所示,与扩增之前富集的NK细胞群体中g-NK细胞的百分比相比,从CMV^{pos}供体扩增后g-NK细胞的百分比有所增加。在用2.5:1 221.AEH与NK细胞的相同比率进行共培养后,先前未经冷冻和扩增的新鲜NK细胞培养14天的富集大于先前已经冷冻和扩增的NK细胞培养21天的富集(图2C,比较CMV^{pos}CD3^{neg} 14d与CMV^{pos}CD3^{neg}解冻21d)。如图2E中所示,在用更高比率的已经冷冻的NK细胞(1:1比率的221.AEH与NK细胞)进行共培养时,扩增结束时g-NK细胞的百分比在起始NK细胞之间是类似的,不论它们是新鲜的还是已经冷冻的。这些结果表明,平均来说,在14天后,解冻的PBMC可以实现与新鲜样品类似的扩增。

[0485] 在扩增前通过CD3耗尽富集的NK细胞中,g-NK的百分比从最初的6%NK细胞增加至

扩增后的28%。在最初通过CD3耗尽和之后的CD16选择富集NK细胞的细胞中观察到更大的增加。然而,与仅通过CD3耗尽富集NK细胞或富集CD16^{pos}细胞相反,当在扩增之前使初始NK细胞富集CD3^{neg}/CD57^{pos}细胞时,成比例增加特别大。具体而言,在通过CD3耗尽和之后的CD57阳性选择富集NK细胞时,观察到从最初28%的NK细胞至扩增后的82%的g-NK百分比增加。这些结果支持,所提供方法可以导致大于1000倍扩增率的高产率。

[0486] 在此项研究中,鉴定g-NK产率显著高于其他供体的“超级供体(super donor)”。在此“超级供体”中,在14天后,1000万个NK细胞产生276亿个g-NK,并且当在扩增前通过CD3耗尽和之后的CD57阳性选择富集NK细胞时,g-NK百分比从静息时的31%增加至扩增后的85%。

[0487] 在CMV血清阴性供体中,观察到显著更小的g-NK扩增,其中以来自CMV血清阴性供体的1000万个NK细胞开始,平均产率为2600万个g-NK(图2B和图2D)。在CMV血清阴性供体中,对于g-NK子集未观察到优先扩增(第0天的2.1%相比于第14天的1.7%)(图2C和图2E)。这些结果表明,g-NK在被CMV感染的那些中具有记忆样特性,并且这种特性被221.AEH细胞激活。如同221.AEH细胞,CMV感染的细胞具有上调的HLA-E(Tomassec等人(2000) Science, 287:1031)。此外,这些发现与如下先前研究一致,所述先前研究显示g-NK为“记忆样”NK细胞(Zhang等人,2013, J Immunol 190:1402-1406),以及NKG2C^{pos} NK细胞(来自CMV血清阳性供体)响应于同种异体HSCT受体中的CMV再激活而扩增,但是来自CMV血清阴性供体的那些NK细胞不会如此(Foley等人,2012, Blood 119:2665-2674)。

[0488] 通过如下所述的基因组分析来确定EBV的存在。简言之,使细胞在37℃水浴中解冻并将其转移至5ml温热介质中,然后离心并重悬于新鲜介质中。将来自每个样品的4x10⁶个细胞等分至2ml管中,并将剩余细胞在90% FBS+10% DMSO中冷冻且储存于-80℃。使用Pure Link基因组DNA微型试剂盒(Cat#K1820-00 Invitrogen)从细胞提取基因组DNA(gDNA),并使用Qubit(DNA BR)进行定量,并且使用TapeStation(gDNA带)确认质量。在qPCR中每个反应使用50ng gDNA(Brilliant III Ultra-Fast SYBR®Green mastermix, Cat# 600883, Agilent)。使用用于EBNA1和GAPDH(IDT)的引物对EBV进行检测和定量。结果显示,在用辐照的221.AEH饲养细胞扩增的细胞中未发现EBV。

实施例3:扩增的NK细胞的细胞毒性活性的评估

[0489] 通过评价靶特异性细胞毒性活性来评估与替代性方法相比,通过实施例2中所述的方法扩增的NK细胞的功能活性。

[0490] 使来自实施例2中所述扩增的冷冻的NK细胞解冻,并且通过将第14天扩增的NK细胞与HLA缺陷性K562和HLA-E^亮221.AEH细胞系以1:1的效应子与靶细胞比率共培养来评价NK细胞的细胞毒性。在37℃的4-h孵育后,添加碘化丙啶(PI)并使用四色流式细胞术解析NK细胞、活靶细胞和死靶细胞的数量。将NK细胞的细胞毒性定量为特异性溶解的百分比(总溶解%-自发性细胞死亡%)。如图3中所示,通过实施例1中所述的替代性方法扩增的NK细胞能够增强(相比于未扩增的细胞)HLA缺陷性K562和HLA-E^亮221.AEH细胞系的NK细胞杀伤,分别从15%增加至40%以及从5%增加至20%。然而,实施例1中所述的从富集的CD3^{neg}CD57^{pos} NK细胞开始的方法得到扩增的NK细胞,所述NK细胞分别能够杀伤80%(相比于替代性方法的40%)和53%(相比于替代性方法的20%)的K562和221.AEH细胞(参见图3)。

实施例4:扩增的NK细胞与抗CD20抗体组合的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性

(ADCC)的评估

[0491] 通过评价与抗CD20抗体组合的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)来评估通过实施例2中所述的方法扩增的NK细胞的功能活性。

[0492] 对于ADCC细胞毒性测定,将来自实施例2中所述扩增的冷冻的NK细胞解冻并在补充10% FBS的RPMI-1640培养基中在37℃孵育1小时。然后将NK细胞与RAJI靶细胞(1.0×10^4 个细胞,CD20^{pos} B细胞肿瘤细胞系)以0.5:1、1:1、2.5:1、5:1和10:1NK细胞与靶细胞比率在补充10% FBS的RPMI-1640培养基中在10μg/mL利妥昔单抗(抗CD20)的存在下一起孵育。通过流式细胞术基于用于鉴定肿瘤靶细胞的抗CD71抗体和作为细胞死亡标记物的碘化丙啶(PI)染色来确定ADCC(Bigley等人, (2014) Brain Behav Immun., 39:160-71)。如图4A中所示,在g⁻NK高受试者[扩增前g⁻NK平均值=24%, n=4]中,ADCC显著高(在10:1比率下,94%杀伤)于g⁻NK低受试者(在10:1比率下,31%杀伤)[扩增前, g⁻NK平均值=2%, n=4]。

[0493] 为了比较不同子集的活性,通过流式细胞术针对活NK细胞和细胞外表面标记物将扩增的NK细胞分选为3个类别:常规[cNK; CD45^{pos}/CD3^{neg}/CD56^{pos}/NKG2C^{neg}]、适应性(NKG2C^{pos}) [CD45^{pos}/CD3^{neg}/CD56^{pos}/NKG2C^{pos}/NKG2A^{neg}], 以及g-NK[CD45^{pos}/CD3^{neg}/CD56^{pos}/CD16^{pos}/CD57^{pos}/CD7^{neg}/CD161^{neg}]。还可以使用细胞外表型[CD45^{pos}/CD3^{neg}/CD56^{pos}/CD161^{neg}/NKG2A^{neg}]分选g-NK。在此实验中,常规、适应性(NKG2C^{pos})和g-NK是从具有最高g⁻NK细胞(g-NK_{平均值}=25.3±8.5%)的四名受试者获得。如图4B中所示,在1:1NK细胞靶细胞比率下,g⁻NK的ADCC杀伤(76%)显著高于NKG2C^{pos}或常规NK细胞(分别为30%或24%)。此外,g⁻NK的功能是类似的,不论它们源自新鲜的还是先前冷冻的NK细胞(图4B)。上述“超级供体”的扩增的g⁻NK在1:1NK细胞靶细胞比率下的杀伤(97%)显著高于其NKG2C^{pos}或常规NK细胞(分别为55%或38%)。

[0494] 这些结果证实,所提供方法能够仅在2周内生成数十亿个g⁻NK,它们是远优于NKG2C^{pos}或常规NK细胞的ADCC杀伤细胞。

实施例5:扩增的NK细胞与ERBB家族特异性抗体组合的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的评估

[0495] 通过评价与抗HER2抗体组合的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)来评估与替代性方法相比,通过实施例2中所述的方法扩增的NK细胞的功能活性。

[0496] 供体为CMV血清阳性(n=4),并且使用实施例2中所述的方法扩增磁性分选的NK细胞(扩增前g-NK百分比=18.3±2.9%)。然后使用CD57微珠将扩增的NK细胞磁性分选为CD57^{pos}“g-NK”和CD57^{neg}“cNK”级分,并将其低温保存以供后续ADCC测定。CD57^{pos}和CD57^{neg}级分的实际g-NK百分比分别为82.2±1.6%和2.4±0.7%。CD57^{pos}和CD57^{neg}级分内的g-NK百分比是通过细胞内流式细胞术使用购自Millipore(伯灵顿,马萨诸塞州,美国)的FcR γ 抗体确定的。对于ADCC细胞毒性测定,将来自先前扩增的冷冻的NK细胞解冻并在补充10% FBS的RPMI-1640培养基中在37℃下孵育1小时。使用乳腺癌细胞系SKBR3和头/颈癌细胞系CAL27作为靶标来进行ADCC测定。如先前已经描述(Bigley等人, 2014),将扩增的NK细胞与CD71标记的SKBR3和CAL27靶细胞(1.0×10^4 个细胞)以1:1、5:1、10:1和20:1NK细胞:靶细胞比率在终体积为2.2mL的靶细胞特异性培养基中共培养。用于SKBR3测定的培养基是含有2.5μg/mL曲妥珠单抗(抗HER2)的补充10% FBS的McCoy's 5A培养基,并且用于CAL27测定

的培养基是含有10 μ g/mL西妥昔单抗(抗EGFR)的补充10% FBS的DMEM。在每个情形中,还在不存在治疗抗体的情况下测量基础细胞毒性。使用仅靶细胞的管来控制自发性细胞死亡(对于所有测定,低于10%)。还存在靶细胞+抗体管(不添加NK细胞)来解释仅归因于抗体的细胞死亡。在37 $^{\circ}$ C下的4h孵育后,洗涤细胞并用抗CD3和CD56抗体染色,以对管中NK细胞的数量进行定量。在最终洗涤后,添加碘化丙啶(PI)并使用4色流式细胞术解析NK细胞、活靶细胞和死靶细胞的数量(Bigley等人,2018)。通过在每个NK细胞剂量下从总死亡%减去自发性细胞死亡%来确定细胞毒性(基础细胞毒性=总死亡%-自发性细胞死亡%)。SKBR3和CAL27细胞系购自ATCC(马纳萨斯,弗吉尼亚州,美国)。

[0497] 如图5A和图5B中所示,发现g-NK杀伤SKBR3和CAL27靶标远好于常规NK细胞。具体而言,g-NK当曲妥珠单抗存在时在20:1NK:靶标比率下杀伤46%的SKBR3细胞,远大于cNK在相同比率下杀伤的18%的SKBR3细胞(n=4)(图5A)。在20:1NK:靶标比率下,基础细胞毒性(没有曲妥珠单抗)对于g-NK为18%,并且对于cNK为14%。常规NK细胞的ADCC与g-NK细胞的基础细胞毒性相同。类似地,图5B描绘的结果显示,g-NK当西妥昔单抗存在时在20:1NK:靶标比率下杀伤80%的CAL27细胞,远大于cNK在相同比率下杀伤的50%的CAL27细胞(n=4)。在20:1NK:靶标比率下,基础细胞毒性(没有西妥昔单抗)对于g-NK和cNK二者为12%。

[0498] 在使用与上文相同的供体NK细胞的另一系列实验中,将NK细胞与结直肠癌细胞系HT-29和SW-480或肺癌细胞系A-549靶细胞以1:1、5:1、10:1和20:1NK细胞与靶细胞比率一起孵育。用于HT-29测定的培养基是含有5 μ g/mL西妥昔单抗的补充10% FBS的McCoy's 5A培养基;用于SW-480测定的培养基是含有5 μ g/mL西妥昔单抗的补充10%FBS的Leibovitz's L-15培养基;并且用于A-549测定的培养基是含有5 μ g/mL西妥昔单抗的补充10% FBS的F-12K培养基。通过流式细胞术基于用于鉴定肿瘤靶细胞的抗CD71抗体和作为细胞死亡标记物的PI来确定ADCC。还在不存在治疗抗体的情况下测量基础细胞毒性。

[0499] 图6A-图6C中的结果显示,发现g-NK杀伤HT-29、SW-480和A-549靶标远好于cNK(使用与上文相同的供体NK细胞)。具体而言,如图6A中所示,g-NK当西妥昔单抗存在时在20:1NK:靶标比率下杀伤35%的HT-29细胞,优于cNK在相同比率下杀伤的14%的HT-29细胞(n=4)。在20:1NK:靶标比率下,基础细胞毒性(没有西妥昔单抗)对于g-NK为14%,并且对于常规NK细胞为11%。类似地,图6B描绘的结果显示,g-NK当西妥昔单抗存在时在20:1NK:靶标比率下杀伤56%的SW-480细胞,远大于cNK在相同比率下杀伤的23%的SW-480细胞(n=4)。在20:1NK:靶标比率下,基础细胞毒性(没有西妥昔单抗)对于g-NK为24%,并且对cNK为18%。此外,图6C显示,g-NK当西妥昔单抗存在时在20:1NK:靶标比率下杀伤62%的A-549,显著优于cNK在相同比率下杀伤的23%的A-549细胞(n=4)。在20:1NK:靶标比率下,基础细胞毒性(没有西妥昔单抗)对于g-NK为23%,并且对于常规NK细胞为17%。对于所有3种细胞系,cNK的ADCC与g-NK细胞的基础细胞毒性相同。

[0500] 总之,所述结果显示,扩增的g-NK能够类似地增强针对液体瘤和实体瘤的ADCC,以及对NK细胞ADCC高度敏感或轻度敏感的肿瘤的ADCC。

实施例6:扩增的NK细胞的体内持久性的评估

[0501] 如实施例2中所述扩增NK细胞。在驯化1周后,将单一剂量的 1×10^7 个扩增的g-NK(新鲜的或冷冻/解冻的)或cNK(冷冻/解冻的)与IL-15补充物(每3天I.P. 2 μ g)一起注射至雌性NOD scid γ (NSG)小鼠中(参见表E1)。从单一CMV血清阳性供体扩增g-NK(g-NK的百分

比在扩增前为61%并且在扩增后为90%),而从单一CMV血清阴性供体扩增cNK(g-NK的百分比在扩增前和扩增后为0%)。使用细胞内流式细胞术确认g-NK的百分比。对于此研究中使用的已经在扩增后冷冻并解冻的细胞,用于冷冻的细胞的冷冻介质是90% FBS和10% DMSO。在被施用至小鼠之前,使冷冻的细胞产物在热水浴中快速解冻(37℃)。

从相应的小鼠收集血液样品以确定相应NK细胞的体内持久性。对于血液收集,在输注后第5天、第8天、第14天、第15天和第22天使用EDTA真空采血管获得50μL抽血并将其冷冻(添加10% DMSO)用于后续的流式细胞术(图7A)。在第22天,将所有小鼠处死并将骨髓和脾活体冷冻(90% FBS和10% DMSO)(分别为图7B、图7C)。

表E1.持久性研究设计

组编号	分组(arm)	小鼠数量	NK剂量日	采血日
1	IL-15+新鲜的g-NK	3	1	1、5、8、14、15、22(sac)
2	IL-15+冷冻的g-NK	3	1	1、5、8、14、15、22(sac)
3	IL-15+冷冻的cNK	3	1	1、5、8、14、15、22(sac)

[0502] 如图7A中所示,在NSG小鼠的血流中,新近分离的或冷冻-解冻的g-NK比冷冻-解冻的cNK显著更长的持续存在,如在所有时间点(第5天、第8天、第14天、第15天和第22天)所观察到的。特定地,发现在22天后几乎没有cNK在脾中持续存在,而大量g-NK被检测到(图7B)。在骨髓中,g-NK的持久性也优于cNK的持久性(图7C)。

实施例7:扩增NK细胞与抗CD20抗体组合的抗肿瘤活性的评估

[0503] 通过评价在与抗CD20抗体组合注射时在体内对肿瘤的抑制来评估通过实施例2中所述的方法扩增的NK细胞的功能活性。

将5x10⁵个萤光素酶标记的Raji人淋巴瘤细胞系静脉内注射至雌性NOD scid γ(NSG)小鼠中并使其生长2天。将单克隆抗体利妥昔单抗I.P.施用至小鼠,所述抗体是单独的或与I.V.施用的15x10⁶个扩增的g-NK细胞组合(实施例2),在21天中施用3个剂量(参见表E2)。每周使用生物发光成像来监测肿瘤负荷,并且每2或3天记录存活率。从单一CMV血清阳性供体扩增g-NK(g-NK的百分比在扩增前为61%并且在扩增后为90%),而从单一CMV血清阴性供体扩增cNK(g-NK的百分比在扩增前和扩增后为0%)。使用细胞内流式细胞术确认g-NK的百分比。

表E2.Raji功效研究设计

组编号	分组	小鼠数量	抗体施用日	NK细胞施用日
1	无治疗	8	N/A	N/A
2	利妥昔单抗200 μg I.P.	8	1、8、15	N/A
3	15e6个新鲜g- NK I.V.+ 200 μg利妥昔单抗I.P.	8	1、8、15	1、8、15

[0504] 在Raji淋巴瘤的异种移植模型中,g-NK的过继转移显著增强利妥昔单抗的功效,并且相对于未治疗小鼠或仅用利妥昔单抗治疗的小鼠,输注g-NK能够增强NSG小鼠的存活。如图8A和图8B中所示,不接受治疗的小鼠在注射后7天展现快速肿瘤生长,并且所有未治疗的小鼠在第25天之前死亡。仅接受利妥昔单抗的小鼠在第28天后显示延迟但仍快速的肿瘤生长,并且在第30天后存活率开始下降。接受g-NK与利妥昔单抗结合施用的小鼠在第28天后仅展现轻微的肿瘤生长,并且所有小鼠存活直至第35天。

[0505] 这些结果证实,在与单克隆抗体组合时,g-NK的抗淋巴瘤作用可以用于体内。

实施例8:扩增的NK细胞与抗CD38抗体或抗CD319抗体组合的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的评估

[0506] 通过评价与达雷妥单抗(抗CD38)或埃罗妥珠单抗(抗CD319)组合的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)来评估与替代性方法相比,通过实施例2中所述的方法扩增的NK细胞的功能活性。

[0507] 扩增前(新近分离的)ADCC:供体为CMV血清阳性($n=14$)和CMV血清阴性($n=2$)。针对g-NK细胞的百分比对所有供体进行预筛选,并基于g-NK细胞的比例将其分类为“g-NK”供体($n=10\text{CMV}^{\text{pos}}$)或“常规”供体($n=4\text{CMV}^{\text{pos}}$, $n=2\text{CMV}^{\text{neg}}$)。“g-NK”供体中g-NK的比例为 $30.0 \pm 2.1\%$,而“常规”供体中g-NK的比例仅为 $1.6 \pm 0.4\%$ 。 CD57^{pos} NK细胞是从“g-NK”供体磁性分选的,并且整体NK细胞($\text{CD3}^{\text{neg}}/\text{CD56}^{\text{pos}}$)是从“常规”供体磁性分选的。从“g-NK”和“常规”供体磁性分选的级分的实际g-NK百分比分别为 $84.3 \pm 2.4\%$ 和 $1.6 \pm 0.4\%$ 。因此,通常发现,对于来自常规供体的NK细胞(cNK),约98-99%的细胞为 $\text{Fc}\epsilon\text{R1}\gamma^{\text{pos}}$ 。每种级分内的g-NK百分比是通过细胞内流式细胞术使用购自Millipore(伯灵顿,马萨诸塞州,美国)的 $\text{Fc}\epsilon\text{R1}\gamma$ 抗体来确定。

[0508] 对于ADCC细胞毒性测定,使冷冻的PBMC解冻并在补充10% FBS的RPMI-1640培养基中在 37°C 下孵育1小时。然后进行磁珠分离以分别从“g-NK”和“常规”供体分离 CD57^{pos} NK细胞和整体NK细胞。使用多发性骨髓瘤细胞系MM.1S(ATCC,马纳萨斯,弗吉尼亚州)作为靶标进行ADCC测定。将NK细胞与CD71标记的MM.1S靶细胞(1.0×10^4 个细胞)以0.5:1、1:1、2.5:1和5:1NK细胞:靶细胞比率在终体积为2.2mL的靶细胞特异性培养基中共培养,类似于Bigley等人2014中所述的方法。用于ADCC测定的培养基是含有 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 达雷木单抗(抗CD38)或 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 埃罗妥珠单抗(抗CD319)的补充10% FBS的RPMI-1640培养基。在每个情形中,还在不存在治疗抗体的情况下测量基础细胞毒性。使用仅靶细胞的管来控制自发性细胞死亡(对于所有测定,低于10%)。在 37°C 下的4h孵育后,洗涤细胞并用抗CD3和CD56抗体染色,以对管中NK细胞的数量进行定量。在最终洗涤后,添加碘化丙啶(PI)并使用4色流式细胞术解析NK细胞、活靶细胞和死靶细胞的数量(Bigley等人,2018)。

[0509] 扩增后(扩增的)ADCC:针对g-NK细胞的百分比对五名供体进行预筛选,并基于g-NK细胞的比例将其分类为“g-NK”供体($n=3$)或“常规”供体($n=2$)。“g-NK”供体中g-NK的比例为 $30.3 \pm 2.0\%$,而“常规”供体中g-NK的比例仅为 $1.6 \pm 0.4\%$ 。 CD57^{pos} NK细胞是从“g-NK”供体磁性分选的,并且整体NK细胞($\text{CD3}^{\text{neg}}/\text{CD56}^{\text{pos}}$)是从“常规”供体磁性分选的。从“g-NK”和“常规”供体磁性分选的级分的实际g-NK百分比分别为 $84.0 \pm 2.5\%$ 和 $1.6 \pm 0.4\%$ 。然后如实施例2中所述对g-NK和cNK级分进行扩增并低温保存用于后续如上所述的ADCC测定。

[0510] 在三个不同的效应子:肿瘤比率(E:T 1:1、2.5:1和5:1)之间,在与达雷木单抗或埃罗妥珠单抗组合时,g-NK具有比cNK更大的针对MM.1S多发性骨髓瘤细胞的ADCC($p < 0.001$)。具体而言,当达雷木单抗或埃罗妥珠单抗存在时,在所有4个NK细胞剂量下,新近分离的g-NK具有比cNK显著更高的针对MM.1S细胞的细胞毒性(参见图9A)。类似地,当与达雷木单抗或埃罗妥珠单抗组合时,扩增的g-NK具有比扩增的cNK更高的抗骨髓瘤ADCC(参见图9B)。当抗体不存在时,在g-NK与cNK(未扩增的或扩增的)针对MM.1S细胞的细胞毒性之间不存在差异($p=0.3$;参见图9A和图9B)。总之,该数据显示,g-NK具有针对多发性骨髓瘤的强

抗体依赖性细胞毒性活性。

实施例9:扩增的NK细胞与抗CD38抗体或抗CD319抗体组合的抗肿瘤活性的评估

[0511] 通过评价在与抗CD38抗体或抗CD319抗体组合注射时在体内对肿瘤的抑制来评估通过实施例2中所述的方法扩增的NK细胞的功能活性。

[0512] 将 1×10^6 个萤光素酶标记的MM.1S人骨髓瘤细胞系静脉内注射至雌性NOD scid γ (NSG) 小鼠中并使其生长7天。将单克隆抗体达雷木单抗或埃罗妥珠单抗I.P.施用至小鼠,所述抗体是单独的或与I.V.施用的扩增的g-NK细胞或生理水平的比较cNK细胞组合,在31天中施用6个剂量(参见表E3)。每周使用生物发光成像来监测肿瘤负荷。在研究完成时,从各自在g-NK和cNK分组中的3只小鼠收获骨髓和脾样品并活体冷冻以供后续的流式细胞术分析,以确定相应NK群体的持久性。从单一CMV血清阳性供体扩增g-NK(g-NK的百分比在扩增前为61%并且在扩增后为90%),而从单一CMV血清阴性供体扩增cNK(g-NK的百分比在扩增前和扩增后为0%)。使用细胞内流式细胞术确认g-NK的百分比。

[0513] 将g-NK细胞如实施例2中所述进行扩增并在每个剂量下以 2×10^7 个细胞施用,而未扩增的cNK在每个剂量下以 3×10^5 个细胞施用。所述cNK剂量等效于人体中的NK细胞/kg的生理水平(Cooley等人,2019)。

表E3.MM功效研究设计

组编号	分组	小鼠数量	抗体施用日	NK细胞施用日
1	媒介物对照	6	N/A	N/A
2	达雷木单抗10 ug I.P.	6	1、7、13、19、25、31	N/A
3	2e7个新鲜g- NK I.V.+ 10 ug达雷木单抗I.P.	6	1、7、13、19、25、31	1、7、13、19、25、31
4	3e5个新鲜cNK I.V.+ 10 ug达雷木单抗I.P.	6	1、7、13、19、25、31	1、7、13、19、25、31
5	埃罗妥珠单抗10 ug I.P.	6	1、7、13、19、25、31	N/A
6	2e7个冷冻的g- NK I.V.+ 10 ug埃罗妥珠单抗I.P.	6	1、7、13、19、25、31	1、7、13、19、25、31
7	3e5个冷冻的cNK I.V.+ 10 ug埃罗妥珠单抗I.P.	6	1、7、13、19、25、31	1、7、13、19、25、31
8	单独的2e7个冷冻的g- NK I.V.	6	N/A	1、7、13、19、25、31

[0514] 过继转移的g-NK对用MM.1S接种并用达雷木单抗或埃罗妥珠单抗治疗的NSG小鼠中的肿瘤负荷和存活率的益处描述于图10和图11中。用达雷木单抗和g-NK治疗的小鼠的肿瘤负荷(BLI)显著低于仅用达雷木单抗或用达雷木单抗加上生理水平的cNK细胞治疗的小鼠(参见图10A)。另外,用埃罗妥珠单抗和g-NK治疗的小鼠的肿瘤负荷低于仅用埃罗妥珠单抗或用埃罗妥珠单抗加上生理水平的cNK细胞治疗的小鼠(参见图10B)。此外,在与用媒介物、单独的mAb、单独的g-NK或mAb加上生理水平的cNK治疗的小鼠相比时,g-NK与达雷木单

抗或埃罗妥珠单抗的组合导致更优的存活,如图11A(达雷木单抗)和图11B(埃罗妥珠单抗)中所示。总之,该数据显示,在与单克隆抗体组合时,g-NK的抗骨髓瘤作用可以用于体内。

[0515] g-NK在用MM.1S接种并用达雷木单抗或埃罗妥珠单抗治疗的NSG小鼠中优越的持久性描述于图12A-图12C中。g-NK在达雷木单抗治疗的小鼠的脾和骨髓中以高于cNK的水平持续存在(参见图12A和图12B),而在血液中的g-NK与cNK持久性之间不存在差异(参见图12C)。此外,达雷木单抗治疗的小鼠的骨髓和脾中g-NK的数量高于所有其他组(参见图12A和图12B)。g-NK在埃罗妥珠单抗治疗的小鼠的脾和血液中以高于cNK的水平持续存在(图12A和图12C),而在骨髓中的g-NK与cNK持久性之间不存在差异(参见图12B)。仅用g-NK(无达雷木单抗或埃罗妥珠单抗)治疗的小鼠的血液中g-NK的数量显著高于所有其他组(参见图12C)。

实施例10:g-NK细胞的细胞表面标记物的评估

[0516] 该实施例部分显示由于缺少靶表面标记物针对抗体对g-NK细胞的保护。

[0517] 将大约 2.0×10^5 个NK细胞和/或MM.1S或Raji细胞等分至流式管中并用以下染色:2 μ L的7-AAD活力染料和2 μ L的抗CD45、2 μ L的抗CD20、2 μ L的抗CD38、2 μ L的抗CD3、10 μ L的抗SLAMF7以及2 μ L的抗CD56抗体,如表E4中所述。在4°C下的10分钟孵育后,洗涤细胞并使用抗FceRI抗体(Millipore)进行细胞内染色。在完成染色过程后,通过8色流式细胞术(Miltenyi MACSQuant分析仪10)评估表达CD20、CD38和SLAMF7的g-NK、cNK和MM.1S或Raji细胞的百分比。

表E4.用于确定NK、MM和Raji细胞上的CD20、CD38和SLAMF7表达的流式细胞术组。

条件	V1	V2	B1	B2	B3	B4	R1	R2
仅NK	CD45	CD20	*FcRg	CD38	7-AAD	CD3	SLAMF7	CD56
仅NK CD20 FMO	CD45		*FcRg	CD38	7-AAD	CD3	SLAMF7	CD56
仅NK CD38 FMO	CD45	CD20	*FcRg		7-AAD	CD3	SLAMF7	CD56
仅NK SLAMF7 FMO	CD45	CD20	*FcRg	CD38	7-AAD	CD3		CD56
NK + MM	CD45	CD20	*FcRg	CD38	7-AAD	CD3	SLAMF7	CD56
NK + MM CD38 FMO	CD45	CD20	*FcRg		7-AAD	CD3	SLAMF7	CD56
NK + MM SLAMF7 FMO	CD45	CD20	*FcRg	CD38	7-AAD	CD3		CD56
仅MM	CD45	CD20		CD38	7-AAD		SLAMF7	
仅MM CD38 FMO	CD45	CD20			7-AAD		SLAMF7	
仅MM SLAMF7 FMO	CD45	CD20		CD38	7-AAD			
NK + Raji	CD45	CD20	*FcRg	CD38	7-AAD	CD3	SLAMF7	CD56
NK + Raji CD20 FMO	CD45		*FcRg	CD38	7-AAD	CD3	SLAMF7	CD56
仅Raji	CD45	CD20			7-AAD			
仅Raji CD20 FMO	CD45				7-AAD			

*FcRg是细胞内表位

[0518] g-NK、cNK和MM.1S细胞上的CD20、CD38和SLAMF7的表达呈现于图13A-图13D中。g-NK和cNK二者都缺少CD20表达,CD20在Raji淋巴瘤细胞上高表达(图13A)。g-NK的CD38表达远低于cNK和MM.1S细胞(参见图13B; $p < 0.001$,对于二者)。SLAMF7表达在g-NK与cNK之间没

有不同 ($p=0.9$), 但是g-NK和cNK二者都展现远低于MM.1S细胞的SLAMF7表达 (参见图13C; $p<0.001$, 对于二者)。在与扩增的cNK相比时, 在扩增的g-NK上也见到降低的CD38^{pos} NK细胞百分比 (参见图13D, $p<0.001$)。此外, 相对于CD38^{pos} cNK和MM1/S细胞, CD38表达的强度 (MFI) 在CD38^{pos} g-NK细胞上有所降低 (图13E, $p<0.001$)。描绘g-NK细胞相对于cNK和MM.1S细胞降低的CD38表达的代表性直方图显示于图13F中。

[0519] g-NK的CD20、CD38或SLAMF7表达的缺少提供针对通过利妥昔单抗 (抗CD20)、达雷木单抗 (抗CD38) 或埃罗妥珠单抗 (抗SLAMF7) 的mAb诱导的自相残杀的保护。总之, 该数据进一步说明在与cNK相比时, 尤其当在治疗性抗体如达雷妥尤单抗的存在下时, g-NK如何具有持久性优点。

[0520] 与常规NK细胞相比, CD38表达在g-NK细胞上降低或更低的观察支持如下策略, 其中可以使用CD38作为富集g-NK细胞的标记物。CD38与g-NK细胞表型的负相关与实施例2中所述的扩增方法中CD57富集的替代性策略一致。这些发现支持用于扩增g-NK细胞的方法, 其中NK细胞是通过基于免疫亲和力的分离通过以下方式从PBMC富集的: 耗尽CD3^{pos}细胞以去除T细胞 (CD3耗尽), 之后进行CD56选择以富集CD56^{pos} NK细胞, 之后进行针对CD38的阴性选择以去除或耗尽CD38^{pos}细胞, 即CD3^{neg}CD56^{pos}CD38^{neg}。在该NK细胞子集的分选和富集后, 可以将CD3^{neg}CD56^{pos}CD38^{neg} NK细胞子集冷冻或新鲜地使用, 然后根据实施例2或图2中所述的方法扩增, 例如通过与辐照的221.AEH靶细胞 (例如2.5:1或2:1 221.AEH与NK细胞) 以及任选地辐照的PBMC饲养细胞 (例如5:1PBMC与NK细胞) 在重组IL-2 (例如100IU/mL或500IU/mL) 的存在下一起培养约14天。下文实施例25中呈现的结果进一步支持, 另外包括IL-21 (例如IL-2 (500IU/mL)、IL-15 (10ng/mL) 和IL-21 (25ng/mL)) 的类似的扩增方法也得到具有降低的CD38表达的g-NK细胞, 同时还改进扩增和效应子功能。如果在所述扩增中使用辐照的PBMC饲养细胞, 则所述扩增的至少一部分包括与抗CD3单克隆抗体 (OKT3) 一起孵育以激活细胞, 如实施例2中所述。

实施例11: 扩增的NK细胞与曲妥珠单抗或西妥昔单抗组合对卵巢癌细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 的评估

[0521] 通过评价与曲妥珠单抗或西妥昔单抗组合的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 来评估与替代性方法相比, 通过实施例2中所述的方法扩增的NK细胞的功能活性。

[0522] 扩增前 (新近分离的) ADCC: 供体为CMV血清阳性 ($n=14$) 和CMV血清阴性 ($n=2$)。针对g-NK细胞的百分比对所有供体进行预筛选, 并基于g-NK细胞的比例将其分类为“g-NK”供体 ($n=10$ CMV^{pos}) 或“常规”供体 ($n=4$ CMV^{pos}, $n=2$ CMV^{neg})。“g-NK”供体中g-NK的比例为 $30.0 \pm 2.1\%$, 而“常规”供体中g-NK的比例仅为 $1.6 \pm 0.4\%$ 。CD57^{pos} NK细胞是从“g-NK”供体磁性分选的, 并且整体NK细胞 (CD3^{neg}/CD56^{pos}) 是从“常规”供体磁性分选的。从“g-NK”和“常规”供体磁性分选的级分的实际g-NK百分比分别为 $84.3 \pm 2.4\%$ 和 $1.6 \pm 0.4\%$ 。每种级分内的g-NK百分比是通过细胞内流式细胞术使用购自Millipore (伯灵顿, 马萨诸塞州, 美国) 的FcR γ 抗体来确定。

[0523] 对于ADCC细胞毒性测定, 使冷冻的PBMC解冻并在补充10% FBS的RPMI-1640培养基中在37°C下孵育1小时。然后进行磁珠分离以分别从“g-NK”和“常规”供体分离CD57^{pos} NK细胞和整体NK细胞。使用卵巢癌细胞系SKOV3 (ATCC) 作为靶标进行ADCC测定。使用如Bigley等人2014中所述的方法, 将NK细胞与CD71标记的SKOV3靶细胞 (1.0×10^4 个细胞) 以0.5:1、1:1:

1、2.5:1和5:1NK细胞:靶细胞比率在终体积为2.2mL的靶细胞特异性培养基中共培养。用于ADCC测定的培养基是含有1 μ g/mL曲妥珠单抗(抗Her2)的10% McCoy's 5A培养基。在每个情形中,还在不存在治疗抗体的情况下测量基础细胞毒性。使用仅靶细胞的管来控制自发性细胞死亡(对于所有测定,低于10%)。在37°C下的4h孵育后,洗涤细胞并用抗CD3和CD56抗体染色,以对管中NK细胞的数量进行定量。在最终洗涤后,添加碘化丙啶(PI)并使用4色流式细胞术解析NK细胞、活靶细胞和死靶细胞的数量(Bigley等人,2018)。

[0524] 扩增后(扩增的)ADCC:针对g-NK细胞的百分比对5名供体进行预筛选,并基于g-NK细胞的比例将其分类为“g-NK”供体(n=3)或“常规”供体(n=2)。“g-NK”供体中g-NK的比例为30.3 $\pm$ 2.0%,而“常规”供体中g-NK的比例仅为1.6 $\pm$ 0.4%。CD57^{pos} NK细胞是从“g-NK”供体磁性分选的,并且整体NK细胞(CD3^{neg}/CD56^{pos})是从“常规”供体磁性分选的。从“g-NK”和“常规”供体磁性分选的级分的实际g-NK百分比分别为84.0 $\pm$ 2.5%和1.6 $\pm$ 0.4%。然后如实施例2中所述对g-NK和cNK级分进行扩增并低温保存用于后续如上所述的ADCC测定。

[0525] 在与曲妥珠单抗或西妥昔单抗组合时,g-NK针对SKOV3卵巢癌细胞的ADCC高于cNK。具体而言,当曲妥珠单抗存在时,在所有4个NK细胞剂量下,新近分离的g-NK针对SKOV3细胞的细胞毒性显著高于cNK(参见图14A)。类似地,在与曲妥珠单抗或西妥昔单抗组合时,扩增的g-NK的抗SKOV3 ADCC远大于扩增的cNK(参见图14B和图14C)。当抗体不存在时,在g-NK与cNK(未扩增的或扩增的)针对SKOV3细胞的细胞毒性之间不存在差异(参见图14A和图14B)。总之,该数据显示,g-NK具有针对实体瘤恶性病像卵巢癌的强抗体依赖性细胞毒性活性。

实施例12:扩增的NK细胞与抗HER2抗体组合的抗肿瘤活性和持久性的评估

[0526] 通过评价在与抗HER2抗体(曲妥珠单抗)组合注射时在体内对肿瘤的抑制来评估通过实施例2中所述的方法扩增的NK细胞的功能活性。

[0527] 将5 $\times$ 10⁶个SKOV3人卵巢癌细胞系静脉内注射至雌性NOD scid γ (NSG)小鼠中并使其生长30天。将单克隆抗体曲妥珠单抗I.P.施用至小鼠,所述抗体是单独的或与I.V.施用的扩增的g-NK或cNK细胞组合,在72天中施用3-6个剂量(参见表E5)。每周使用卡尺测量来监测肿瘤负荷。在研究完成时,从g-NK和cNK分组中的小鼠收获骨髓和脾样品并活体冷冻以供后续的流式细胞术分析。从单一CMV血清阳性供体扩增g-NK(g-NK的百分比在扩增前为61%并且在扩增后为90%),而从单一CMV血清阴性供体扩增cNK(g-NK的百分比在扩增前和扩增后为0%)。使用细胞内流式细胞术确认g-NK的百分比。

表E5. SKOV3功效研究设计

组编号	分组	小鼠数量	抗体施用日	NK细胞施用日
1	媒介物对照	6	N/A	N/A
2	曲妥珠单抗10 mg/kg I.P.	6	1、7、13、19	N/A
3	2e7个新鲜g-NK I.V.+ 曲妥珠单抗10 mg/kg I.P.	6	1、7、13、19	1、7、13、19、22、25、28、31、34、37、43、46、52、55、61、64、70
4	2e7个新鲜cNK I.V.+ 曲妥珠单抗10 mg/kg I.P.	6	1、7、13、19	1、7、13、19、22、25、28、31、34、37、43、46、52、55、61、64、70

[0528] 过继转移的g-NK对用SKOV3接种并用曲妥珠单抗治疗的NSG小鼠中的肿瘤负荷和存活率的益处描述于图15A-图15B中。用曲妥珠单抗和g-NK治疗的小鼠的肿瘤大小小于仅用曲妥珠单抗或用曲妥珠单抗加上相等数量的cNK细胞治疗的小鼠(参见图15A)。另外,在与用以下治疗的小鼠相比时,g-NK与曲妥珠单抗的组合导致朝向增加的存活率的趋势:媒介物、单独的曲妥珠单抗或者曲妥珠单抗加上cNK(参见图15B)。总之,该数据显示,在与单克隆抗体组合时,g-NK的抗肿瘤作用可以用于体内对抗实体恶性病。

[0529] 血液样品、骨髓和脾样品显示g-NK在用SKOV3接种并用曲妥珠单抗治疗的NSG小鼠中优越的持久性。g-NK以比cNK更高的水平在曲妥珠单抗治疗的小鼠的血液(参见图16A)、脾(参见图16B)和骨髓(参见图16C)中持续存在。

实施例13:扩增的NK细胞与达雷妥单抗组合对多发性骨髓瘤细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的评估

[0530] 通过评价与达雷木单抗或埃罗妥珠单抗组合的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)来评估与替代性方法相比,通过实施例2中所述的方法扩增的NK细胞的功能活性。

[0531] 供体为CMV血清阳性($n=5$),并且使用实施例2中所述的方法扩增磁性分选的NK细胞(扩增前g-NK百分比 $=34.6\pm12.6\%$)。然后使用CD57微珠将扩增的NK细胞磁性分选为CD57^{pos}“g-NK”和CD57^{neg}“cNK”级分,并将其低温保存以供后续ADCC测定。CD57^{pos}和CD57^{neg}级分的实际g-NK百分比分别为 $83.1\pm1.6\%$ 和 $1.8\pm0.5\%$ 。CD57^{pos}和CD57^{neg}级分内的g-NK百分比是通过细胞内流式细胞术使用购自Millipore(伯灵顿,马萨诸塞州,美国)的FcR γ 抗体确定的。

[0532] 对于ADCC细胞毒性测定,将来自先前扩增的冷冻的NK细胞解冻并在补充10%FBS的RPMI-1640培养基中在37°C下孵育1小时。使用多发性骨髓瘤细胞系ARH-77和MM.1R作为靶标(各自来自ATCC)来进行ADCC测定。使用如Bigley等人2014中所述的方法,将扩增的NK细胞与CD71标记的ARH-77和MM.1R靶细胞(1.0×10^4 个细胞)以1:1、2.5:1、5:1和10:1NK细胞:靶细胞比率在终体积为2.2mL的靶细胞特异性培养基中共培养。用于所述测定的培养基是含有1 μ g/mL达雷木单抗(抗CD38)的补充10% FBS的RPMI-1640培养基。在每个情形中,还在不存在治疗抗体的情况下测量基础细胞毒性。使用仅靶细胞的管来控制自发性细胞死亡(对于所有测定,低于10%)。在37°C下的4h孵育后,洗涤细胞并用抗CD3和CD56抗体染色,以对管中NK细胞的数量进行定量。在最终洗涤后,添加碘化丙啶(PI)并使用4色流式细胞术解析NK细胞、活靶细胞和死靶细胞的数量(Bigley等人,2018)。

[0533] 在与达雷木单抗组合时,g-NK具有更高的针对多发性骨髓瘤细胞系的ADCC。具体而言,当达雷木单抗存在时,在所有4个NK细胞剂量下,扩增的g-NK针对ARH-77细胞的细胞毒性显著高于扩增的cNK(参见图17A)。当达雷木单抗存在时,在所有4个NK细胞剂量下,扩增的g-NK针对MM.1R细胞的细胞毒性也高于扩增的cNK(参见图17B)。总之,该数据显示,g-NK具有超过MM.1S的针对多发性骨髓瘤细胞系的强抗体依赖性细胞毒性活性。

实施例14:扩增的g-NK细胞与西妥昔单抗组合对多发性骨髓瘤细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的评估

[0534] 通过评价与西妥昔单抗组合的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)来评估与替代性方法相比,通过实施例2中所述的方法扩增的NK细胞的功能活性。

[0535] 扩增前(新近分离的)ADCC:供体为CMV血清阳性($n=14$)和CMV血清阴性($n=2$)。针

对g-NK细胞的百分比对所有供体进行预筛选,并基于g-NK细胞的比例将其分类为“g-NK”供体($n=10\text{CMV}^{\text{pos}}$)或“常规”供体($n=4\text{CMV}^{\text{pos}}, n=2\text{CMV}^{\text{neg}}$)。“g-NK”供体中g-NK的比例为 $30.0 \pm 2.1\%$,而“常规”供体中g-NK的比例仅为 $1.6 \pm 0.4\%$ 。 CD57^{pos} NK细胞是从“g-NK”供体磁性分选的,并且整体NK细胞($\text{CD3}^{\text{neg}}/\text{CD56}^{\text{pos}}$)是从“常规”供体磁性分选的。从“g-NK”和“常规”供体磁性分选的级分的实际g-NK百分比分别为 $82.2 \pm 1.6\%$ 和 $2.4 \pm 0.7\%$ 。每种级分内的g-NK百分比是通过细胞内流式细胞术使用购自Millipore(伯灵顿,马萨诸塞州,美国)的FcR γ 抗体来确定。

[0536] 对于ADCC细胞毒性测定,使冷冻的PBMC解冻并在补充10% FBS的RPMI-1640培养基中在37°C下孵育1小时。然后进行磁珠分离以分别从“g-NK”和“常规”供体分离 CD57^{pos} NK细胞和整体NK细胞。使用结直肠癌细胞系SW-480作为靶标来进行ADCC测定。使用如Bigley等人2014中所述的方法,将NK细胞与CD71标记的SW-480(ATCC)靶细胞(1.0×10^4 个细胞)以0.5:1、1:1、2.5:1和5:1NK细胞:靶细胞比率在终体积为2.2mL的靶细胞特异性培养基中共培养。用于SW-480测定的培养基是含有 $5\mu\text{g/mL}$ 西妥昔单抗(抗EGFR)的补充10% FBS的Leibovitz's L-15培养基。在每个情形中,还在不存在治疗抗体的情况下测量基础细胞毒性。使用仅靶细胞的管来控制自发性细胞死亡(对于所有测定,低于10%)。在37°C下的4h孵育后,洗涤细胞并用抗CD3和抗CD56抗体染色,以对管中NK细胞的数量进行定量。在最终洗涤后,添加碘化丙啶(PI)并使用4色流式细胞术解析NK细胞、活靶细胞和死靶细胞的数量(Bigley等人,2018)。

[0537] 扩增后(扩增的)ADCC:针对g-NK细胞的百分比对5名供体进行预筛选,并基于g-NK细胞的比例将其分类为“g-NK”供体($n=3$)或“常规”供体($n=2$)。“g-NK”供体中g-NK的比例为 $30.3 \pm 2.0\%$,而“常规”供体中g-NK的比例仅为 $1.6 \pm 0.4\%$ 。 CD57^{pos} NK细胞是从“g-NK”供体磁性分选的,并且整体NK细胞($\text{CD3}^{\text{neg}}/\text{CD56}^{\text{pos}}$)是从“常规”供体磁性分选的。从“g-NK”和“常规”供体磁性分选的级分的实际g-NK百分比分别为 $84.0 \pm 2.5\%$ 和 $1.6 \pm 0.4\%$ 。然后如实施例2中所述对g-NK和cNK级分进行扩增并低温保存用于后续如上所述的ADCC测定。

[0538] 在与西妥昔单抗组合时,g-NK针对SW-480结直肠癌细胞的ADCC大于cNK(参见图18A和图18B)。当西妥昔单抗存在时,在所有4个NK细胞剂量下,新近分离的g-NK针对SW-480细胞的细胞毒性显著高于cNK(参见图18A)。类似地,在与西妥昔单抗组合时,扩增的g-NK的抗SW480 ADCC远大于扩增的cNK(参见图18B)。当抗体不存在时,在g-NK与cNK(未扩增的或扩增的)针对SW-480细胞的细胞毒性之间不存在差异(参见图18A和图18B)。总之,该数据显示,g-NK具有针对实体瘤恶性病像结直肠癌的强抗体依赖性细胞毒性活性。

实施例15:关于g-NK介导的ADCC的功效的CD16158V多态性的评估

[0539] 158V是CD16的遗传多态性,其中氨基酸缬氨酸(V)代替更常见的苯丙氨酸(F)存在于蛋白质的第158个氨基酸位置处(Koene等人,1997)。这导致CD16更强的表达和抗体亲和力,从而导致增强的CD16 158V+NK细胞的ADCC(Hatjiharissi等人,2007)。已经观察到,来自158V/V和158V/F供体的NK细胞经由远高于158F/F供体的ADCC杀伤ARH-77骨髓瘤和Daudi淋巴瘤细胞,其中158V/V供体表现最好(Hatjiharissi等人,2007)。此实施例至少部分显示携带158V多态性的g-NK的ADCC功效的关联性。

[0540] 筛选40名CMV血清阳性供体以确定具有最高g-NK比例的12名供体。这些供体的g-NK是通过磁珠分离来富集($\text{CD3}^{\text{neg}}/\text{CD57}^{\text{pos}}$)并且针对对以下肿瘤/抗体组合的ADCC加以测

试:1)SW-480/西妥昔单抗;2)SKOV3/曲妥珠单抗;3)SKOV3/西妥昔单抗;4)MM.1S/达雷木单抗;以及5)MM.1S/埃罗妥珠单抗。将g-NK的ADCC与来自不具有g-NK的供体的常规NK细胞(cNK)相比较(n=4)。在这12名供体中,5名供体由于始终高的NK细胞的ADCC活性而被分类为“超级供体”。

[0541] 使来自所有供体的NK细胞经历多态性测试和分箱(bin)以确定关于CD16的158V多态性,每名供体属于哪个亚组(V/V、V/F和F/F)。预期分布为35% V/V、25%V/F和40% F/F(Hatjiharissi等人,2007;Somboonyosdech等人,2012),因此与此预期的任何偏差可能表明,158V多态性可能在使用这些供体时见到的高ADCC中发挥作用。对于多态性测试,将冷冻的NK细胞解冻并用PBS洗涤并以100g离心。将NK细胞悬浮液收集至流式管中,并用2 μ L针对CD45的荧光抗体(用于分辨白细胞与残留红细胞)和2 μ L的7-AAD(活力染料)染色。在室温下在暗中的10分钟孵育后,将细胞用500 μ L的PBS稀释,并通过流式细胞术对7-AAD^{neg}/CD45^{pos}白细胞的数量进行定量。在细胞计数后,进行磁珠分离(Miltenyi MACSTMCD16微珠)以分离CD16^{pos} NK细胞的群体。在磁珠分离后,使用10X Genomics单细胞RNA测序来确定每名供体属于哪个CD16多态性组(V/V、V/F或F/F)。对于ADCC测定,158V g-NK和缺少多态性的g-NK的实际g-NK百分比分别为82.2 $\pm$ 2.1%和82.8% $\pm$ 1.9%。g-NK的百分比是通过细胞内流式细胞术确定的。

[0542] 结果表明,所有5名具有展示始终高的ADCC活性的g-NK细胞的“超级供体”都展现CD16 158V多态性。此外,如图19中所示,在相应抗体存在时,158V g-NK还显示平均而言在一组代表性癌症(结直肠癌:SW-480;卵巢癌:SKOV3、SKOV3;以及多发性骨髓瘤:MM.1S)中显著更高的ADCC活性。另外,CD16基因的表达也与针对所测试的所有血液学和实体瘤细胞系的ADCC功效呈正相关(图20)。综上所述,这些结果与如下观察一致:由于CD16(g-NK细胞的ADCC的主要介导体)的增强的表达和亲和力,携带158V基因型的g-NK在消除血液学和实体瘤二者方面更有效。

实施例16:针对具有变化的CD38和SLAMF7表达水平的多发性骨髓瘤细胞系的NK细胞效应子功能

[0543] 在此项研究中,针对六种多发性骨髓瘤(MM)细胞系(AM01、KMS11、KMS18、KMS34、LP1和MM.1S)测量NK细胞效应子功能,通过流式细胞术评估所述细胞系的CD38或SLAMF7表面表达。AM01和LP1细胞系是从DSMZ德国微生物和细胞培养物收藏获得。KMS11、KMS18和KMS34细胞系是从日本癌症研究资源库(JCRB)获得。MM.1S细胞系是从ATCC获得。结果显示所评估的MM细胞上CD38(图21A)和SLAMF7(图21B)的可变表达水平。在来自具有高g-NK细胞百分比的供体(g-NK细胞供体)与具有低g-NK细胞百分比的供体(常规NK(cNK)细胞供体)的扩增的NK细胞之间比较效应子活性。还在NKG2C^{pos}/NKG2A^{neg}与NKG2C^{neg}/NKG2A^{pos} g-NK细胞之间比较效应子活性。

[0544] 从10名供体(年龄为38.3 $\pm$ 10.3岁,6名M,4名F)收获NK细胞,其中五名为CMV血清阳性并具有高g-NK细胞百分比(g-NK供体),并且其中五名为CMV血清阴性(常规供体)。对于g-NK供体,g-NK细胞的百分比为30.3% $\pm$ 2.0%,而对于常规供体,g-NK细胞的百分比为1.6% $\pm$ 0.4%。CD57^{pos} NK细胞是从g-NK供体分离(g-NK细胞),并且整体NK细胞(CD3^{neg}/CD56^{pos})是从常规供体分离(常规NK细胞)。在分离的级分中,对于g-NK和常规NK细胞,g-NK细胞百分比分别为84.0% $\pm$ 2.5%和1.6% $\pm$ 0.4%。g-NK和常规NK细胞二者都使用本文实

施例2中所述的方法以2:1 221.AEH与NK细胞的比率和500IU/ml添加至扩增培养基中的IL-2进行扩增和低温保存。

[0545] 还检查NKG2C^{pos}和NKG2A^{neg} NK细胞的百分比。扩增前,g-NK供体的NKG2C^{pos}百分比为29.1%±7.3%,并且NKG2A^{neg}百分比为54.7%±11.1%。扩增后,g-NK细胞的NKG2C^{pos}和NKG2A^{neg} NK细胞百分比分别上升至50.5%±7.9%和80.4%±13.0%。扩增前,常规NK供体的NKG2C^{pos} NK细胞百分比为1.9%±1.4%,并且NKG2A^{neg}百分比为22.7%±6.1%。扩增后,常规NK细胞的NKG2C^{pos}和NKG2A^{neg} NK细胞百分比分别为3.9%±1.0%和20.6%±2.6%。

A. 细胞介导的细胞毒性

[0546] 在使扩增的NK细胞解冻后,将10⁴个NK细胞与MM靶细胞以1:1NK细胞与MM细胞比率以及在1μg/mL达雷木单抗(抗CD38)或1μg/mL埃罗妥珠单抗(抗CD319)的存在下共培养。在37℃下于CO₂孵育器中的四小时孵育后,洗涤细胞并用抗CD3和CD56抗体染色,以对NK细胞的数量进行定量。在最终洗涤后,添加碘化丙啶(PI),并且使用4色流式细胞术解析NK细胞、活靶细胞和死靶细胞的数量(Bigley等人(2016),Clin.Exp.Immunol.,185:239-251)。

[0547] 如图22A-图22E中所示,在与达雷木单抗(图22A)或埃罗妥珠单抗(图22B)组合时,扩增的g-NK细胞针对所有六种MM细胞系的细胞介导的细胞毒性高于扩增的常规NK细胞。g-NK细胞介导的针对达雷木单抗治疗的MM细胞的细胞毒性的量值与MM细胞的CD38表达成正相关(图22C;R²=0.92)。g-NK细胞介导的针对埃罗妥珠单抗治疗的MM细胞的细胞毒性的量值与MM细胞的SLAMF7表达呈正相关(图22D;R²=0.96)。此外,针对SLAMF7^高MM细胞系KMS34和MM.1S的g-NK细胞毒性在使用埃罗妥珠单抗时大于使用达雷木单抗时(图22E)。相反,针对CD38^高多发性骨髓瘤细胞系LP1的g-NK细胞毒性在使用达雷木单抗时大于使用埃罗妥珠单抗时(图22E)。

[0548] 还针对来自复发性/难治性患者的原代骨髓瘤肿瘤细胞评估细胞毒性活性。获得骨髓穿刺液,溶解红细胞,并且将总骨髓单个核细胞与1μg/mL达雷木单抗或埃罗妥珠单抗在37℃下一起孵育30分钟,然后将其洗涤并以1x10⁶个细胞/mL的密度重悬于培养基中。对于每种条件(达雷木单抗或埃罗妥珠单抗),将2x10⁶个分离的单个核细胞与NK细胞(g-NK或cNK)以0:1(无NK细胞对照)、2:5:1和20:1(NK:原代)的比率在终体积为1mL的培养基中共孵育,然后在37℃、5% CO₂下孵育4小时。在开始共培养之前,在单独等分样品中通过流式细胞术评估用于确定E:T比率的样品中肿瘤细胞的百分比。在4小时共培养结束时使用流式细胞术评估活CD138^{pos}浆细胞。具体而言,将样品用荧光标记的针对CD138、CD38、SLAMF7和CD56的抗体染色。将肿瘤细胞溶解测量为与无NK细胞对照相比,在每个E:T下共培养后存在的活浆细胞(CD138^{pos})的分数。使用在每种条件下CD138^{pos}浆细胞相比于无NK细胞对照的损失来计算细胞毒性。如图22F(达雷木单抗,dara)和图22G(埃罗妥珠单抗,e1o)中所示,在此患者中,在以任一比率组合时,扩增的g-NK细胞针对患者来源的骨髓瘤细胞的细胞毒性大于cNK细胞。因此,与上文结果类似,这些结果与如下观察一致:在与mAb一起孵育后,与cNK细胞相比,g-NK细胞所致的溶解显著增强。特定地,在2:5:1E:T比率下,对于cNK细胞观察到零细胞毒性。

[0549] 总之,这些结果显示,扩增的g-NK细胞具有相对于扩增的常规NK细胞增强的细胞介导的细胞毒性,且达雷木单抗介导的细胞介导的细胞毒性程度与MM CD38表达成比例,并且埃罗妥珠单抗介导的细胞介导的细胞毒性程度与MM SLAMF7表达成比例。因此,结果证

实,g-NK细胞可以有效增强mAb在MM中的功效,并且显示相对于常规FcεR1 γ^{pos} NK细胞增加的活性。

B. 抗体依赖性脱颗粒和细胞因子表达

[0550] 在扩增的NK细胞解冻后,将 2.0×10^5 个NK细胞与MM靶细胞以1:1NK细胞与MM细胞比率以及在1μg/mL达雷木单抗或1μg/mL埃罗妥珠单抗的存在下共培养。对于脱颗粒测定,2μL的VioGreen缀合的抗CD107a添加至共培养用于在37℃下在CO₂孵育器中的一小时孵育,此后添加4μL的含有莫能霉素的BD GolgiStop。对于细胞因子表达测定,代之以添加6μL的含有布雷菲德菌素A的BD GolgiStop。然后将所述细胞在37℃下在CO₂孵育器中再孵育五小时。在孵育后,将细胞收获,洗涤,并用0.5μL的抗CD45抗体、0.5μL的抗CD3抗体和1μL的抗CD56抗体(所有抗体都购自Miltenyi Biotec)染色。然后使用来自Miltenyi Biotec的内部染色套件根据制造商的说明书将所述细胞固定并进行渗透化处理。然后将所述细胞用1μL的抗FcR γ、2μL的抗穿孔蛋白、2μL的抗颗粒酶B、2μL的干扰素-γ和2μL的TNF-α抗体染色,如表E6中所述。在最终洗涤后,使用八色流式细胞术解析所述细胞。

表E6. 用于功能测定的抗体组。

管	V1	V2	B1	B2	B3	B4	R1	R2
脱颗粒 (细胞毒性颗粒的释放)								
1	CD45	CD107a	FcRγ	穿孔蛋白		CD3	Granz B	CD56
细胞因子表达								
2	CD45	CD107a	FcRγ	IFN-γ		CD3	TNF-α	CD56

i. 脱颗粒

[0551] 如图23A-图23E中所示,在与达雷木单抗(图23A)或埃罗妥珠单抗(图23B)组合时,扩增的g-NK细胞展现比扩增的常规NK细胞更大的针对所有六种MM细胞系的脱颗粒(CD107a^{pos})。针对达雷木单抗治疗的MM细胞的g-NK脱颗粒的量值与MM细胞的CD38表达呈正相关(图23C)。针对埃罗妥珠单抗治疗的MM细胞的g-NK脱颗粒的量值与MM细胞的SLAMF7表达呈正相关(图23D)。此外,针对CD38^高MM细胞系LP1的g-NK脱颗粒在使用达雷木单抗时大于使用埃罗妥珠单抗时,并且针对SLAMF7^低MM细胞系KMS11的g-NK脱颗粒在使用达雷木单抗时也大于使用埃罗妥珠单抗时(图23E)。相反,针对SLAMF7^高MM细胞系MM.1S的g-NK脱颗粒在使用埃罗妥珠单抗时大于使用达雷木单抗时(图23E)。

[0552] 如图23F-图23G中所示,针对CD38^高MM细胞系LP1的达雷木单抗依赖性脱颗粒在NKG2C^{pos}/NKG2A^{neg} g-NK细胞中大于在NKG2C^{neg}/NKG2A^{pos} g-NK细胞中(图23F)。针对SLAMF7^高MM细胞系MM.1S,埃罗妥珠单抗依赖性脱颗粒在NKG2C^{pos}/NKG2A^{neg} g-NK细胞中大于在NKG2C^{neg}/NKG2A^{pos} g-NK细胞中(图23G)。

[0553] 总之,这些结果显示,扩增的g-NK细胞具有与扩增的常规NK细胞相比增强的脱颗粒,且达雷木单抗介导的脱颗粒程度与MM CD38表达成比例,并且埃罗妥珠单抗介导的脱颗粒程度与MM SLAMF7表达成比例。另外,针对CD38^高和SLAMF7^高MM细胞系,NKG2C^{pos}/NKG2A^{neg} g-NK细胞具有与NKG2C^{neg}/NKG2A^{pos} g-NK细胞相比增强的脱颗粒。ii. 穿孔蛋白和颗粒酶B表达

[0554] 如图24A-图24B中所示,扩增的g-NK细胞比扩增的常规NK细胞表达更多的溶细胞蛋白穿孔蛋白,如通过穿孔蛋白阳性细胞百分比(图24A)和总穿孔蛋白表达(GMFI)(图24B)

二者所测量。另外,扩增的g-NK细胞比扩增的常规NK细胞表达更多的促凋亡蛋白颗粒酶B,如通过颗粒酶B阳性细胞百分比(图24A)和总颗粒酶B表达(GMFI)(图24B)二者所测量。

[0555] 总之,这些结果显示,扩增的g-NK细胞展现与扩增的常规NK细胞相比增强的穿孔蛋白和颗粒酶B的表达。

iii. 干扰素- γ 表达

[0556] 如图25A-图25E中所示,在与达雷木单抗(图25A)或埃罗妥珠单抗(图25B)组合时,扩增的g-NK具有比扩增的常规NK更大的响应于所有六种MM细胞系的干扰素- γ 表达(干扰素- γ^{pos})。响应于达雷木单抗治疗的MM的g-NK干扰素- γ 表达的量值与MM细胞的CD38表达呈正相关(图25C)。响应于埃罗妥珠单抗治疗的MM细胞的g-NK干扰素- γ 表达的量值与MM细胞的SLAMF7表达呈正相关(图25D)。此外,响应于SLAMF7^高MM细胞系KMS34和MM.1S的g-NK干扰素- γ 表达在使用埃罗妥珠单抗时大于使用达雷木单抗时(图25E)。相反,响应于CD38^高MM细胞系LP1的g-NK干扰素- γ 表达在使用达雷木单抗时大于使用埃罗妥珠单抗时(图25E)。在达雷木单抗存在下与LP1细胞(E:T 1:1)一起培养后的代表性流式图显示对于g-NK(Fc ϵ R1 γ^{neg})和cNK细胞(Fc ϵ R1 γ^{pos})更多的响应于达雷木单抗的干扰素- γ 产生(图25F)。

[0557] 如图25G-图25H中所示,针对CD38^高MM细胞系LP1的达雷木单抗依赖性IFN- γ 表达在NKG2C^{pos}/NKG2A^{neg} g-NK细胞中大于在NKG2C^{neg}/NKG2A^{pos} g-NK中(图25G)。针对SLAMF7^高MM细胞系MM.1S,埃罗妥珠单抗依赖性IFN- γ 表达在NKG2C^{pos}/NKG2A^{neg} g-NK细胞中大于在NKG2C^{neg}/NKG2A^{pos} g-NK中(图25H)。

[0558] 总之,这些结果显示,扩增的g-NK细胞具有与扩增的常规NK细胞相比增强的抗体依赖性干扰素- γ 表达,且达雷木单抗介导的干扰素- γ 表达程度与MM CD38表达成比例,并且埃罗妥珠单抗介导的干扰素- γ 表达程度与MM SLAMF7表达成比例。另外,针对CD38^高和SLAMF7^高MM细胞系,NKG2C^{pos}/NKG2A^{neg} g-NK细胞具有与NKG2C^{neg}/NKG2A^{pos} g-NK细胞相比增强的IFN- γ 表达。

iv. TNF- α 表达

[0559] 如图26A-图26E中所示,在与达雷木单抗(图26A)或埃罗妥珠单抗(图26B)组合时,扩增的g-NK具有比扩增的常规NK更大的响应于所有六种MM细胞系的TNF- α 表达(TNF- α^{pos})。响应于达雷木单抗治疗的MM细胞的g-NK TNF- α 表达的量值与MM细胞的CD38表达呈正相关(图26C)。响应于埃罗妥珠单抗治疗的MM细胞的g-NK TNF- α 表达的量值与MM细胞的SLAMF7表达呈正相关(图26D)。此外,响应于SLAMF7^高MM细胞系KMS34和MM.1S的g-NK TNF- α 表达在使用埃罗妥珠单抗时大于使用达雷木单抗时(图26E)。相反,响应于CD38^高MM细胞系LP1和SLAMF7^低MM细胞系KMS11的g-NK TNF- α 表达在使用达雷木单抗时大于使用埃罗妥珠单抗时(图26E)。在达雷木单抗的存在下与LP1细胞(E:T 1:1)一起培养后的代表性流式图显示对于g-NK(Fc ϵ R1 γ^{neg})和cNK细胞(Fc ϵ R1 γ^{pos})更多的响应于达雷木单抗的TNF- α 产生(图26F)。

[0560] 如图26G-图26H中所示,针对CD38^高MM细胞系LP1的达雷木单抗依赖性TNF- α 表达在NKG2C^{pos}/NKG2A^{neg} g-NK细胞中大于在NKG2C^{neg}/NKG2A^{pos} g-NK细胞中(图26G)。针对SLAMF7^高MM细胞系MM.1S,埃罗妥珠单抗依赖性TNF- α 表达在NKG2C^{pos}/NKG2A^{neg} g-NK细胞中大于在NKG2C^{neg}/NKG2A^{pos} g-NK细胞中(图26H)。

[0561] 总之,这些结果显示,扩增的g-NK细胞具有与扩增的常规NK细胞相比增强的抗体

依赖性TNF- α 表达,且达雷木单抗介导的TNF- α 表达程度与MM CD38表达成比例,并且埃罗妥珠单抗介导的TNF- α 表达程度与MM SLAMF7表达成比例。另外,针对CD38^高和SLAMF7^高MM细胞系,NKG2C^{pos}/NKG2A^{neg} g-NK细胞具有与NKG2C^{neg}/NKG2A^{pos} g-NK细胞相比增强的TNF- α 表达。

实施例17:在不同细胞因子存在下g-NK细胞的扩增

[0562] 将来自CMV血清阳性供体(NKG2C^{pos}和NKG2A^{neg} NK细胞百分比分别为56.24%和11.68%)的50mL新鲜全血收集至ACD真空采血管中并用PBS 1:1稀释。通过Histopaque®密度离心根据制造商的说明书分离PBMC。在收获含有PBMC的血沉棕黄层后,将PBMC用PBS洗涤并计数。在细胞计数后,进行磁珠分离以增加g-NK细胞的频率。所述磁珠分离是CD3耗尽和之后的CD57^{pos} NK细胞。

[0563] 将转基因淋巴瘤细胞系221.AEH(Lee等人(1998) Journal of Immunology, 160: 4951-4960)和转基因白血病细胞系K562-mb15-41BBL(Fujisaki等人(2009) Cancer Research, 69(9): 4010-4017)制备为饲养细胞用于NK细胞扩增。饲养细胞取自新鲜培养物(即,未低温保存的原液)并在使用前进行辐照。将221.AEH和K562-mb15-41BBL细胞以 5×10^5 个细胞/mL的接种密度和 2×10^5 个细胞/mL的传代培养密度扩增。用于使221.AEH饲养细胞生长的培养基是含有10% FBS和200 μ g/mL的潮霉素B的RPMI-1640。用于使K562-mb15-41BBL饲养细胞生长的培养基是含有10% FBS的RPMI-1640。

[0564] 将未低温保存的NK细胞在四种不同条件下扩增:以2:1AEH与NK细胞比率用500IU/mL IL-2;以2:1K562-mb15-41BBL与NK细胞比率用500IU/mL IL-2;以1:1:1AEH与K562-mb15-41BBL与NK细胞比率用500IU/mL IL-2;以及以2:1AEH与NK细胞比率用500IU/mL IL-2、10ng/mL IL-15和25ng/mL IL-21。所有扩增都是在补充有5%人AB血清和相应细胞因子的CellGenix GMP SCGM培养基中进行。将共培养的细胞在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下培育21天。每次更换或补充培养基时(第5天、第7天、第10天、第13天、第16天、第19天和第21天)计数细胞,并在第0天、第13天和第21天通过流式细胞术评估g-NK的百分比。

[0565] 如图27A-图27B中所示,将IL-21添加至扩增培养基中导致g-NK细胞扩增的显著增加。对于在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞,总g-NK细胞计数最高(图27A)。对于在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞,截至第21天g-NK细胞的扩增倍数也是最高的(图27B)。

[0566] 总之,这些结果显示,IL-21的存在改进g-NK细胞扩增。

实施例18:在不同细胞因子存在下扩增的g-NK细胞的细胞效应子功能

[0567] 在此项研究中,测量在不同饲养细胞和细胞因子的存在下(包括在IL-21的存在下)扩增的g-NK细胞的NK细胞效应子功能,如实施例17中所述。如实施例16中所述使用靶细胞系LP1和MM.1S以0.5:1NK与MM细胞比率以及用抗体达雷木单抗和埃罗妥珠单抗进行测定。

A. 细胞介导的细胞毒性

[0568] 如图28A-图28B中所示,在IL-21的存在下扩增21天的g-NK细胞具有比在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞更大的针对CD38^高MM细胞系LP1(图28A)和SLAMF7^高MM细胞系MM.1S(图28B)的细胞介导的细胞毒性。在不存在抗体的情况下以及在达雷木单抗或埃罗妥珠单抗的存在下观察到对于IL-21扩增的g-NK细胞更大的细胞介导的细胞毒性。

[0569] 总之,这些结果显示,与在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞相比,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞具有增强的针对肿瘤细胞的细胞介导的细胞毒性。

B. 脱颗粒

[0570] 如图29A-图29D中所示,在13天(图29A-图29B)和21天(图29C-图29D)的扩增后,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞比在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞更多地针对CD38^高MM细胞系LP1(图29A和图29C)和SLAMF7^高MM细胞系MM.1S(图29B和图29D)脱颗粒。在不存在抗体的情况下以及在达雷木单抗或埃罗妥珠单抗的存在下观察到对于IL-21扩增的g-NK细胞更大的脱颗粒。

[0571] 总之,这些结果显示,与在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞相比,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞具有增强的针对肿瘤细胞的脱颗粒。

C. 穿孔蛋白和颗粒酶B表达

[0572] 如图30A-图30D中所示,在13天(图30A-图30B)和21天(图30C-图30D)的扩增后,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞比在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞表达更多的溶细胞蛋白穿孔蛋白,如通过穿孔蛋白阳性细胞百分比(图30A和图30C)和总穿孔蛋白表达(MFI)(图30B和图30D)二者所测量。另外,在13天和21天的扩增后,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞比在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞表达更多的促凋亡蛋白颗粒酶B,如通过颗粒酶B阳性细胞百分比(图30A和图30C)和总颗粒酶B表达(MFI)(图30B和图30D)二者所测量。

[0573] 总之,这些结果显示,与在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞相比,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞具有增强的穿孔蛋白和颗粒酶B的表达。

D. 干扰素- γ 表达

[0574] 如图31A-图31D中所示,在13天(图31A-图31B)和21天(图31C-图31D)的扩增后,针对CD38^高MM细胞系LP1(图31A和图31C)和SLAMF7^高MM细胞系MM.1S(图31B和图31D),在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞比在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞表达更多干扰素- γ 。在不存在抗体的情况下以及在达雷木单抗或埃罗妥珠单抗的存在下观察到对于IL-21扩增的g-NK细胞更大的干扰素- γ 表达。

[0575] 总之,这些结果显示,与在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞相比,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞具有增强的针对肿瘤细胞的干扰素- γ 表达。

E. TNF- α 表达

[0576] 如图32A-图32D中所示,在13天(图32A-图32B)和21天(图32C-图32D)的扩增后,针对CD38^高MM细胞系LP1(图32A和图32C)和SLAMF7^高MM细胞系MM.1S(图32B和图32D),在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞比在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞表达更多TNF- α 。在不存在抗体的情况下以及在达雷木单抗或埃罗妥珠单抗的存在下观察到对于IL-21扩增的g-NK细胞更大的TNF- α 表达。

[0577] 总之,这些结果显示,与在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞相比,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞具有增强的针对肿瘤细胞的TNF- α 表达。

实施例19:在另外的细胞因子存在下g-NK细胞的扩增

[0578] 在另一项研究中,比较在细胞因子混合物和浓度的不同组合的存在下扩增的NK细胞的扩增率。如实施例17中以及如上所述从相同供体收获NK细胞。将NK细胞以 2×10^5 个细胞/mL的密度和传代培养密度接种,并且将其与辐照的221.AEH饲养细胞以2:1221.AEH与NK细胞的比率共培养。对于NK细胞扩增,按以下浓度添加细胞因子:IL-2为100IU/mL(低IL-2)

或500IU/mL (IL-2); IL-15为10ng/mL; IL-21为25ng/mL; IL-12为10ng/mL; IL-18为10ng/mL; 和/或IL-27为10ng/mL。所有扩增都是在补充有5%人AB血清和相应细胞因子的CellGenix GMP SCGM培养基中进行。

[0579] 如图33中所示,在IL-21的存在下扩增的NK细胞具有比在单独的IL-2和IL-15; IL-12、IL-15和IL-18;以及IL-15、IL-18和IL-27的存在下扩增的NK细胞更高的g-NK细胞扩增率。导致最高g-NK细胞扩增率的细胞因子组合为IL-2和IL-21,在存在或不存在IL-15的情况下。

[0580] 总之,这些结果显示,IL-21的存在改进g-NK细胞扩增率,比其他细胞因子混合物改进更多。

实施例20:在另外的细胞因子的存在下扩增的g-NK细胞的细胞效应子功能

[0581] 测量在细胞因子存在下(包括在IL-21的存在下)扩增15天的g-NK细胞的NK细胞效应子功能,如实施例19中所述。如实施例16中所述使用靶细胞系LP1和MM.1S以0.5:1NK与MM细胞比率以及用抗体达雷木单抗和埃罗妥珠单抗进行测定。

A. 细胞介导的细胞毒性

[0582] 如图34A和图34B中所示,在IL-2、IL-15和IL-21的存在下扩增的g-NK细胞具有比在IL-2和IL-15的存在下扩增的g-NK细胞更大的针对CD38^高MM细胞系LP1(图34A)和SLAMF7^高MM细胞系MM.1S(图34B)的细胞介导的细胞毒性。在不存在抗体的情况下以及在达雷木单抗或埃罗妥珠单抗的存在下观察到对于在IL-2、IL-15和IL-21的存在下扩增的g-NK细胞更大的细胞介导的细胞毒性。

[0583] 总之,这些结果显示,与在IL-2和IL-15的存在下扩增的g-NK细胞相比,在IL-2、IL-15和IL-21的存在下扩增的g-NK细胞具有增强的针对肿瘤细胞的细胞介导的细胞毒性。

B. 脱颗粒

[0584] 如图34C和图34D中所示,在IL-2、IL-15和IL-21的存在下扩增的g-NK细胞比在IL-2和IL-15的存在下扩增的g-NK细胞更多地针对CD38^高MM细胞系LP1(图34C)和SLAMF7^高MM细胞系MM.1S(图34D)脱颗粒。在所有条件下(包括在不存在抗体的情况下)观察到对于在IL-2、IL-15和IL-21的存在下扩增的g-NK细胞更大的脱颗粒。

[0585] 总之,这些结果显示,与在IL-2和IL-15的存在下扩增的g-NK细胞相比,在IL-2、IL-15和IL-21的存在下扩增的g-NK细胞具有增强的针对肿瘤细胞的脱颗粒。

C. 穿孔蛋白和颗粒酶B表达

[0586] 如图34E和图34F中所示,在IL-2、IL-15和IL-21的存在下扩增的g-NK细胞比在IL-2和IL-15的存在下扩增的g-NK细胞表达更多的溶细胞蛋白穿孔蛋白,如通过穿孔蛋白阳性细胞百分比(图34E)和总穿孔蛋白表达(MFI)(图34F)二者所测量。另外,在IL-2、IL-15和IL-21的存在下扩增的g-NK细胞比在IL-2和IL-15的存在下扩增的g-NK细胞表达更多的促凋亡蛋白颗粒酶B,如通过颗粒酶B阳性细胞百分比(图34E)和总颗粒酶B表达(MFI)(图34F)二者所测量。将IL-2、IL-15、IL-18、IL-21和IL-27添加至扩增培养基增强g-NK细胞的颗粒酶B表达。

[0587] 总之,这些结果显示,与在IL-2和IL-15的存在下扩增的g-NK细胞相比,在IL-2、IL-15和IL-21的存在下扩增的g-NK细胞具有增强的穿孔蛋白和颗粒酶B的表达。

D. 干扰素- γ 表达

[0588] 如图34G-图34H中所示,针对CD38^高MM细胞系LP1(图34G)和SLAMF7^高MM细胞系MM.1S(图34H),在IL-2、IL-15和IL-21的存在下扩增的g-NK细胞比在IL-2和IL-15的存在下扩增的g-NK细胞表达更多干扰素- γ 。在所有条件下(包括在不存在抗体的情况下)观察到对于在IL-2、IL-15和IL-21的存在下扩增的g-NK细胞更大的干扰素- γ 表达。在所有条件下(包括在不存在抗体的情况下),将IL-2、IL-12、IL-15、IL-18和IL-21添加至扩增培养基增强g-NK细胞的干扰素- γ 表达。在所有条件下(包括在不存在抗体的情况下),将IL-2、IL-15、IL-18、IL-21和IL-27添加至扩增培养基增强g-NK细胞的干扰素- γ 表达。

[0589] 总之,这些结果显示,与在IL-2和IL-15的存在下扩增的g-NK细胞相比,在IL-2、IL-15和IL-21的存在下扩增的g-NK细胞具有增强的针对肿瘤细胞的干扰素- γ 表达。

E. TNF- α 表达

[0590] 如图34I-图34J中所示,针对CD38^高MM细胞系LP1(图34I)和SLAMF7^高MM细胞系MM.1S(图34J),在IL-2、IL-15和IL-21的存在下扩增的g-NK细胞比在IL-2和IL-15的存在下扩增的g-NK细胞表达更多TNF- α 。在所有条件下(包括在不存在抗体的情况下)观察到对于在IL-2、IL-15和IL-21的存在下扩增的g-NK细胞更大的TNF- α 表达。在所有条件下(包括在不存在抗体的情况下),将IL-2、IL-15、IL-18、IL-21和IL-27添加至扩增培养基增强g-NK细胞的抗体诱导的TNF- α 表达。

[0591] 总之,这些结果显示,与在IL-2和IL-15的存在下扩增的g-NK细胞相比,在IL-2、IL-15和IL-21的存在下扩增的g-NK细胞具有增强的针对肿瘤细胞的TNF- α 表达。

实施例21:在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞的扩增和细胞效应子功能

[0592] 在此项研究中,将在IL-21的存在下扩增的NK细胞的扩增率和NK细胞效应子功能与在不存在IL-21的情况下扩增的NK细胞相比较。根据制造商的说明书,通过Histopaque®密度离心从来自CMV阳性人供体的全血分离人外周血单个核细胞(PBMC),或者从CMV血清阴性供体的全血分离用于比较。供体为CMV血清阳性(n=8)和CMV血清阴性(n=6)(年龄为37.8±10.6岁;8名男性和6名女性)。

[0593] 从血沉棕黄层收获PBMC,洗涤,并通过流式细胞术评估活CD45^{pos}细胞。通过基于免疫亲和力的磁珠分离使用Miltenyi MACS™微珠通过以下方式富集NK细胞:耗尽CD3^{pos}细胞以去除T细胞(CD3耗尽,CD3^{neg}),或者CD3耗尽和之后针对CD57进行阳性选择以富集CD57^{pos} NK细胞(CD3^{neg}CD57^{pos})。在用于扩增g-NK细胞的后续实验中使用在扩增之前最初富集CD3^{neg}/CD57^{pos}细胞的后一种方法。作为进一步比较,通过CD3耗尽和之后针对CD16进行阳性选择来富集NK细胞(富集CD16^{pos} NK细胞和单核细胞(CD3^{neg}CD57^{pos}))。将NK细胞以2×10⁵个细胞/mL的密度和2×10⁵个细胞/mL的传代培养密度接种。将NK细胞与 γ 辐照(100Gy)的221.AEH饲养细胞以2:1 221.AEH与NK细胞的比率共培养,并且在IL-2(500IU/mL)、IL-15(10ng/mL)和IL-21(25ng/mL);或者仅IL-2(500IU/mL)的存在下扩增。如果已经在富集NK细胞之前将PBMC低温保存,则使用1:1比率的辐照的221.AEH饲养细胞与NK细胞,如实施例22中进一步描述。所有扩增都是在补充有5%人AB血清和相应细胞因子的CellGenix GMP SCGM培养基中进行。将NK细胞扩增2周并且每2-5天更换培养基。将扩增的NK细胞使用90% FBS和10% DMSO低温保存以供随后用于功能测定中。

[0594] 在14天的扩增后评估扩增和细胞效应子功能。如实施例16中所述使用靶细胞系LP1和MM.1S以0.5:1NK与MM细胞比率以及用抗体达雷木单抗和埃罗妥珠单抗进行测定。

[0595] 在后续实施例中描述的一些研究中,将g-NK细胞的表型和功能活性与cNK细胞相比较。由于使用上述方法时来自CMV血清阴性供体的cNK细胞的产率不足以及来自CMV血清阳性供体的g-NK细胞的优先扩增(结果描述于下文章节A中),使用替代性方法来扩增cNK细胞用于体外功能和体内研究。这种扩增方法使用K652-mbIL15-41BBL饲养细胞和500IU/mL IL-2在2周中将cNK细胞扩增 180 ± 89 倍($n=5$ CMV^{neg}) (Fujisaki等人,2009Cancer Res.,68(9):4010-4017)。5名CMV^{neg}供体(年龄为 38.9 ± 9.8 岁;3名男性和2名女性)中g-NK细胞的比例在扩增前为 $1.5 \pm 0.5\%$ 且在扩增后为 $1.6 \pm 0.4\%$ 。

A. g-NK细胞的扩增率

[0596] 在培养基更换时计数细胞,并且在第0天和第14天通过流式细胞术评估g-NK细胞的百分比。如图35A和图35B中所示,在扩增之前已经首先富集CD3^{neg}/CD57^{pos}细胞,然后在IL-21的存在下扩增的NK细胞具有比不具有IL-21的类似条件更高的g-NK细胞扩增率。如使用FcR γ 的细胞内染色和流式细胞术所测量,在测量g-NK细胞的百分比(图35A)和计数(图35B)时,观察到更高的g-NK细胞扩增率。

[0597] 在扩增之前,CMV血清阳性供体中g-NK细胞的比例为 $30.8 \pm 3.1\%$ (总NK细胞的%),而在CMV血清阴性供体中g-NK细胞的比例仅为 $1.8 \pm 0.3\%$ (总NK细胞的%)。在最初富集CD3^{neg}/CD57^{pos}细胞后的扩增后,CMV血清阳性供体中g-NK细胞的比例增加至 $84.0 \pm 1.4\%$,但是对于CMV血清阴性供体无变化($1.5 \pm 0.4\%$)(图35C)。描绘CMV血清阳性和血清阴性供体中g-NK细胞的比例的代表性流式细胞术点图和直方图显示于图35E和图35F中。所述g-NK子集内NKG2C^{pos}/NKG2A^{neg} NK细胞的百分比范围为 1.7% 至 51% ($26.8 \pm 13.9\%$)。因此,在g-NK与NKG2C^{pos}/NKG2C^{neg} NK细胞之间存在表型重叠,但是它们不相同。

[0598] g-NK细胞的代表性扩增显示于图35D中,其中显示所述扩增方法增加来自具有可检测的g-NK群体的CMV血清阳性供体的g-NK细胞的比例,总体NK细胞数量增加至少400倍。

[0599] 总之,这些结果显示,IL-21的存在改进g-NK细胞扩增。

B. 细胞介导的细胞毒性

[0600] 如图35G和图35H中所示,在IL-21的存在下扩增的NK细胞具有比在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞更大的针对CD38^高MM细胞系LP1(图35C)和SLAMF7^高MM细胞系MM.1S(图35H)的细胞介导的细胞毒性。在不存在抗体的情况下以及在达雷木单抗或埃罗妥珠单抗的存在下观察到对于IL-21扩增的g-NK细胞更大的细胞介导的细胞毒性。

[0601] 总之,这些结果显示,与在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞相比,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞具有增强的针对肿瘤细胞的细胞介导的细胞毒性。

C. 脱颗粒

[0602] 如图35I和图35J中所示,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞比在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞更多地针对CD38^高MM细胞系LP1(图35I)和SLAMF7^高MM细胞系MM.1S(图35J)脱颗粒。在不存在抗体的情况下以及在达雷木单抗或埃罗妥珠单抗的存在下观察到对于IL-21扩增的g-NK细胞更大的脱颗粒。

[0603] 总之,这些结果显示,与在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞相比,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞具有增强的针对肿瘤细胞的脱颗粒。

D. 穿孔蛋白和颗粒酶B表达

[0604] 如图35K和图35L中所示,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞比在没有IL-21的情况

下扩增的g-NK细胞表达更多的溶细胞蛋白穿孔蛋白,如通过总穿孔蛋白表达(GMFI)(图35L)而非穿孔蛋白阳性细胞百分比(图35K)所测量。另外,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞比在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞表达更多的促凋亡蛋白颗粒酶B,如通过颗粒酶B阳性细胞百分比(图35G)和总颗粒酶B表达(GMFI)(图35L)二者所测量。

[0605] 穿孔蛋白(图35M左图)和颗粒酶B(图35M,右图)的基线表达在扩增的g-NK细胞中也显著高于cNK细胞(n=5)。NK和cNK细胞的穿孔蛋白和颗粒酶B表达的代表性直方图显示于图35N中。

[0606] 总之,这些结果显示,与在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞相比,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞具有增强的针对肿瘤细胞的穿孔蛋白和颗粒酶B的表达。

E. 干扰素- γ 表达

[0607] 如图35O和图35P中所示,针对CD38^高MM细胞系LP1(图35O)和SLAMF7^高MM细胞系MM.1S(图35P),在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞比在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞表达更多干扰素- γ 。在不存在抗体的情况下以及在达雷木单抗或埃罗妥珠单抗的存在下观察到对于IL-21扩增的g-NK细胞更大的干扰素- γ 表达。

[0608] 总之,这些结果显示,与在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞相比,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞具有增强的针对肿瘤细胞的干扰素- γ 表达。

F. TNF- α 表达

[0609] 如图35Q和图35R中所示,针对CD38^高MM细胞系LP1(图35Q)和SLAMF7^高MM细胞系MM.1S(图35R),在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞比在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞表达更多TNF- α 。在不存在抗体的情况下以及在达雷木单抗或埃罗妥珠单抗的存在下观察到对于IL-21扩增的g-NK细胞更大的TNF- α 表达。

[0610] 总之,这些结果显示,与在没有IL-21的情况下扩增的g-NK细胞相比,在IL-21的存在下扩增的g-NK细胞具有增强的针对肿瘤细胞的TNF- α 表达。

G. g-NK供体之间的效应子功能的比较

[0611] 如所述扩增g-NK细胞和cNK细胞,并且在不同供体之间比较效应子活性。如实施例16中所述使用靶细胞系MM.1S以0.5:1NK与MM细胞比率以及用抗体达雷木单抗和埃罗妥珠单抗进行测定。在共培养后,将细胞固定并进行渗透化处理并通过针对干扰素- γ (IFN γ)和TNF- α (TNF α)的细胞内细胞因子染色加以分析。图35S(IFN γ)和图35T(TNF α)中描绘的结果显示,在g-NK供体之间的供体差异性低,其中对于mAb依赖性IFN γ 和TNF α 反应,标准误差小于5。针对其他效应子功能见到类似结果。结果显示,所有g-NK供体的效应子功能都优于所测试的所有cNK供体。

实施例22:在IL-21/抗IL-21复合物的存在下g-NK细胞的扩增

[0612] 将低温保存的PBMC解冻并通过磁性分选富集CD3^{neg}CD57^{pos} NK细胞。在这些NK细胞的扩增之前,通过组合IL-21与抗IL-21抗体来形成IL-21/抗IL-21复合物。将IL-21和抗IL-21抗体在37℃下以分别为25ng/mL和250ng/mL的浓度共孵育30分钟。然后将所述复合物以及500IU/mL IL-2和10ng/mL IL-15一起添加至NK细胞扩增培养基。将NK细胞与辐照的221.AEH饲养细胞以1:1NK与221.AEH饲养细胞比率共培养。对于比较,还在浓度分别为500IU/mL、10ng/mL和25ng/mL的IL-2、IL-15和IL-21的存在下扩增NK细胞。

[0613] 如图36中所示,在IL-2、IL-15和IL-21/抗IL-21复合物的存在下扩增的g-NK细胞

的扩增率高于在IL-2、IL-15和IL-21的存在下扩增的g-NK细胞。

实施例23:在低温保存后g-NK细胞效应子功能的维持

[0614] 将先前低温保存的g-NK细胞的NK细胞效应子功能与新近富集的(即,未低温保存的)g-NK细胞作比较(n=4)。将CD3^{neg}/CD57^{pos}富集的NK细胞与辐照的221.AEH饲养细胞以2:1 221.AEH与NK细胞的比率且在500IU/mL的IL-2、10ng/mL的IL-15和25ng/mL的IL-21的存在下共培养。在扩增后,将NK细胞新鲜地进行功能评估或者将其以2000万个细胞/1.8ml低温保存介质的浓度低温保存于90% FBS和10% DMSO中。在没有抗体的情况下以及在1μg/mL达雷木单抗或1μg/mL埃罗妥珠单抗的存在下评估针对LP1和MM.1S细胞系的NK细胞效应子功能。

A. 脱颗粒

[0615] 如图37A和图37B中所示,针对CD38^高MM细胞系LP1(图37A)和SLAMF7^高MM细胞系MM.1S(图37B),先前低温保存的g-NK细胞的脱颗粒水平与新鲜的g-NK细胞相当。在不存在抗体的情况下以及在达雷木单抗或埃罗妥珠单抗的存在下观察到相当的脱颗粒水平。

[0616] 总之,这些结果显示,在低温保存后维持响应于多发性骨髓瘤靶细胞的g-NK细胞脱颗粒。

B. 穿孔蛋白和颗粒酶B表达

[0617] 如图37C和图37D中所示,先前低温保存的g-NK细胞的穿孔蛋白(图37C)和颗粒酶B表达(图37D)与新鲜的g-NK细胞相当。总之,这些结果显示,在低温保存后维持g-NK细胞的穿孔蛋白和颗粒酶B表达。

C. 干扰素-γ 表达

[0618] 如图37E和图37F中所示,针对CD38^高MM细胞系LP1(图37E)和SLAMF7^高MM细胞系MM.1S(图37F),先前低温保存的g-NK细胞的干扰素-γ 表达水平与新鲜的g-NK细胞相当。在不存在抗体的情况下以及在达雷木单抗或埃罗妥珠单抗的存在下观察到相当的干扰素-γ 表达。

[0619] 总之,这些结果显示,在低温保存后维持响应于多发性骨髓瘤靶细胞g-NK细胞干扰素-γ 表达。

D. TNF-α 表达

[0620] 如图37G和图37H中所示,针对CD38^高MM细胞系LP1(图37G)和SLAMF7^高MM细胞系MM.1S(图37H),先前低温保存的g-NK细胞的TNF-α 表达水平与新鲜的g-NK细胞相比有所降低。在不存在抗体的情况下以及在达雷木单抗或埃罗妥珠单抗的存在下观察到降低的TNF-α 表达。

[0621] 总之,这些结果显示,响应于多发性骨髓瘤靶细胞的g-NK细胞TNF-α 表达在低温保存后降低。

实施例24:与cNK细胞相比,g-NK细胞在体内的持久性的评估

[0622] 将基本上如实施例21中所述扩增的NK细胞注射至小鼠中,并使生物样品经历使用流式细胞术的分析以评估其持久性。

[0623] 如实施例21中所述,在最初从低温保存的PBMC富集CD3^{neg}/CD57^{pos}细胞后扩增g-NK细胞,之后用辐照的221.AEH饲养细胞以1:1 221.AEH与NK细胞的比率且在IL-2(500IU/mL)、IL-15(10ng/mL)和IL-21(25ng/mL)刺激性细胞因子的存在下进行扩增。由于使用所述

方法用221.AEH饲养细胞在IL-2(500IU/mL)、IL-15(10ng/mL)和IL-21(25ng/mL)刺激性细胞因子的存在下来自CMV血清阴性供体的cNK细胞的产率不足,所以使用实施例21中所述的替代性方法来扩增cNK细胞。使用转基因白血病细胞系K562-mb15-41BBL和IL-2将cNK细胞扩增2周。从低温保存的PBMC和低温保存的饲养细胞扩增所有细胞。用于低温保存的细胞的冷冻培养基是CS-10(Biolife Solutions,博赛尔,华盛顿州,美国)。在被施用至小鼠之前,使低温保存的细胞产物在热水浴中快速解冻(37℃)。

[0624] 将单一剂量的 1×10^7 个扩增的NK细胞(新鲜的g-NK、低温保存的g-NK或低温保存的cNK细胞)经由尾静脉静脉内注射至雌性NOD.Cg-PrkDc^{scid}IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ(NSG)小鼠(n=9,每组3只)中。为了提供NK细胞支持,每三天经由I.P.途径施用约2μg/小鼠的人重组IL-15(参见表E7)。立即通过流式细胞术分析在输注后第6天、第16天、第26天和第31天收集的血液。在第31天处死小鼠,并且收获骨髓和脾用于立即进行流式细胞术分析。

表E7.持久性研究设计

组编号	分组	小鼠数量	NK剂量日	采血日
1	IL-15 + 新鲜的 第14天g-NK	3	1	6、16、26、31 (sac)
2	IL-15 + 低温保 存的 第14天g-NK	3	1	6、16、26、31 (sac)
3	IL-15 + 低温保 存的 第14天cNK	3	1	6、16、26、31 (sac)

[0625] 图38A-图38C显示在外周血(图38A)、脾(图38B)和骨髓(图38C)中,新鲜的和低温保存的g-NK细胞相对于cNK细胞增强的持久性。在外周血中在多个时间点($p < 0.001$) (图38A),以及在脾($p < 0.001$) (图38B)和骨髓($p < 0.05$) (图38C)中在第31天处死时($p < 0.001$),低温保存的g-NK细胞的持久性比使用低温保存的cNK细胞所见到的大>90%。图38A还显示,新鲜的和低温保存的g-NK细胞的水平以相当的水平持续存在直至研究的至少第26天。

[0626] 结果与如下观察一致:g-NK细胞展现显著改进的持久性。这些结果证实新鲜的或低温保存的g-NK作为可行的现成的细胞疗法增强mAb ADCC的实用性。

实施例25:g-NK细胞上的CD38和SLAMF7以及g-NK细胞的自相残杀活性的评估

[0627] 在此项研究中,扩增的g-NK细胞的自相残杀率与扩增的cNK细胞相当。如图13B和图13D-图13F在上文实施例10中所示,g-NK细胞上的CD38表达显著低于cNK细胞,并且如图13C中所示,在g-NK和cNK细胞上存在同等低水平的SLAMF7。通过实施例21中所述在IL-21的存在下进行的扩增方法观察到类似结果,表明在使用或不使用IL-21扩增的g-NK细胞之间,CD38或SLAMF7表达不存在差异。这些结果表明g-NK细胞针对这些靶标缺少自相残杀效应的可能性,因为如果NK细胞表达mAb靶标,则除了肿瘤外,ADCC活性可能导致通过自相残杀而消除NK细胞。cNK细胞表达高水平的CD38的发现与如下先前结果一致,所述先前结果表明,在患者中,在达雷木单抗治疗后,>90%的CD38^高NK细胞快速耗尽(Casneuf等人,2017Blood Adv,1(23):2105-2114)。

[0628] 使用基本上如实施例21中所述的方法,使用六(6)名独特供体生成扩增的g-NK(6名CMV+,3名M,3名F,年龄为 39 ± 7 岁),并且使用8名独特的供体扩增cNK(8名CMV-,4名M,4名

F, 年龄为38±9岁)。g-NK的比例为85±4% (对于g-NK供体) 和2±1% (对于cNK供体)。

[0629] 为了评估自相残杀, 在1μg/mL达雷木单抗 (抗CD38) 的存在下培养约1x10⁴个扩增的NK细胞 (g-NK或cNK)。在37℃下于5% CO₂孵育器中的四小时孵育后, 洗涤细胞并用抗CD3和抗CD56抗体染色以对NK细胞的数量进行定量。在最终洗涤后, 添加碘化丙啶 (PI), 并且使用3色流式细胞术解析活的和死的NK细胞的数量 (Bigley等人 (2016), Clin. Exp. Immunol., 185:239-251)。如图39中所示, g-NK细胞的自相残杀比cNK低13倍。用埃罗妥珠单抗进行的类似实验显示, 对于用埃罗妥珠单抗处理的g-NK或cNK未检测到自相残杀。

[0630] 与实施例10中的结果一起, 这些结果与g-NK细胞在不经受与自相残杀相关的耗尽的情况下在MM中赋予增强的mAb抗肿瘤活性的能力一致。

实施例26: 在多发性骨髓瘤的播散性原位异种移植MM.1S模型中的体内功效

[0631] 通过测量在多发性骨髓瘤的鼠模型中的肿瘤抑制和存活率来评价NK细胞 (扩增的g-NK细胞或cNK细胞) 与达雷木单抗组合的体内功效。在最初从低温保存的PBMC富集CD3^{neg}/CD57^{pos}细胞后, 如实施例21中所述扩增g-NK细胞, 之后用辐照的221.AEH饲养细胞以1:1 221.AEH与NK细胞的比率且在IL-2 (500IU/mL)、IL-15 (10ng/mL) 和IL-21 (25ng/mL) 刺激性细胞因子的存在下进行扩增。由于使用所述方法用221.AEH饲养细胞在IL-2 (500IU/mL)、IL-15 (10ng/mL) 和IL-21 (25ng/mL) 刺激性细胞因子的存在下来自CMV血清阴性供体的cNK细胞的产率不足, 所以使用实施例21中所述的替代性方法来扩增cNK细胞。使用转基因白血病细胞系K562-mb15-41BBL和IL-2将cNK细胞扩增2周。从低温保存的PBMC和低温保存的饲养细胞扩增所有细胞。

[0632] 将大约5x10⁵个萤光素酶标记的MM.1S人骨髓瘤细胞静脉内注射至雌性NSG小鼠的尾静脉中并使其生长14天。与6.0x10⁶个扩增的g-NK或cNK细胞的静脉内施用组合, 每周经由I.P.途径施用单克隆抗体达雷木单抗, 持续时间为五周。在肿瘤施用后两周开始, 每三天经由I.P.途径施用2μg/小鼠的人重组IL-15以提供NK细胞支持。表E8总结研究中治疗的小鼠组。

[0633] 每周两次进行生物发光成像 (BLI) 以监测肿瘤负荷。每天检查小鼠的不适体征和耐受性, 并且在肿瘤接种后一周开始每周两次测量体重。在皮下注射150mg/kg D-萤光素的15分钟后, 对小鼠进行成像。使用Living Image软件 (PerkinElmer) 对整个小鼠的总通量 (光子/秒) 进行定量。在出现症状性骨髓瘤 (如后肢瘫痪、修饰行为和/或嗜睡) 后, 处死带有肿瘤的小鼠。使用至处死的时间作为存活率的指标。在初始NK细胞剂量后43天将所有存活的小鼠处死用于组织收集。在研究完成时, 使用流式细胞术对来自生物样品的g-NK、cNK和MM.1S (CD138pos/CD45neg) 细胞进行定量, 以确定肿瘤负荷和NK细胞存活率。

表E8. MM功效研究设计

组编号	分组	小鼠数量	抗体施用日	NK细胞施用日
1	媒介物对照	8	N/A	N/A
2	g-NK I.V. + 10 ug达雷木单抗I.P. + IL-15 I.P.*	7	14、21、28、35、42	14、21、28、35、42
3	cNK I.V. + 10 ug达雷木单抗I.P. + IL-15 I.P.*	7	14、21、28、35、42	14、21、28、35、42

[0634] 与用cNK和达雷木单抗治疗相比, g-NK和达雷木单抗的共施用导致显著肿瘤抑制

和增强的存活。如图40A中所示,在5周的治疗后,g-NK细胞加上达雷木单抗在7只小鼠中的5只中消除骨髓瘤肿瘤负荷,通过BLI成像来证实。定量BLI分析显示,g-NK加上达雷木单抗诱导持续的且在统计学上显著的肿瘤消退(图40B)。Kaplan-Meier存活分析显示,g-NK加上达雷木单抗治疗的小鼠的总体存活概率显著高于用媒介物或用cNK和达雷木单抗治疗的那些小鼠($p < 0.0001$) (图40C)。在研究结束时,被给予g-NK细胞的所有小鼠都有活力,未观察到体重减轻或毒性,而所有对照小鼠或用cNK细胞和达雷木单抗治疗的小鼠都在研究结束之前发生严重的体重减轻并死于骨髓瘤(图40D)。有趣的是,用g-NK细胞治疗的小鼠中的一只由于所述小鼠中的一只的麻醉诱导的窒息而未被给药直至肿瘤接种后第21天,并且该小鼠在研究结束时没有可检测的肿瘤BLI,但是具有g-NK小鼠中最高的峰值BLI(图40A,小鼠标记为#)。在用g-NK细胞给药的7只小鼠中,只有2只具有最小可见测量的残留肿瘤BLI。

[0635] 对骨髓的流式细胞术分析确认,没有可检测的肿瘤BLI的5只g-NK治疗的小鼠实际上不含肿瘤(在骨髓中无CD138^{pos}细胞)。所有7只g-NK治疗的小鼠的平均肿瘤负荷相对于用cNK和达雷木单抗治疗的小鼠减小大于99% ($p < 0.001$; 图40E)。描绘骨髓中的肿瘤负荷和持久性NK细胞的代表性流式细胞术点图显示于图40F中。在研究过程期间采集的所有BLI图像都显示于图40G中。在处死之前从所有小鼠获得X射线图像并且确定,对照小鼠或用cNK细胞和达雷木单抗治疗的小鼠具有后肢骨的骨折和畸形,而用g-NK细胞和达雷木单抗治疗的小鼠中的一只具有任何骨变形(图40H)。

[0636] 对血液、脾和骨髓中的NK细胞的分析显示,在达雷木单抗治疗的小鼠中,相对于cNK细胞,g-NK细胞的持久性的显著增加(图41A-图41C)。值得注意,g-NK细胞数量在血液中的比cNK细胞高>90% (图41A),在脾中高>95% (图41B),并且在骨髓中高>99% (图41C)。

[0637] 综上所述,所述结果进一步支持g-NK细胞对于增强mAb体内作用的优越性(包括与cNK细胞相比),并且表明与达雷木单抗组合给予的g-NK细胞可能对于MM具有潜在的治愈性。此外,所述结果支持,增强的存活和对自相残杀的抗性导致g-NK细胞的更优越的抗肿瘤作用和持久性。

[0638] 本发明在范围上并不旨在限于具体公开的实施方案,提供所述具体公开的实施方案例如是为了说明本发明的各个方面。根据本文的描述和传授,对所述组合物和的各种修改将变得清楚。可以在不背离本公开文本的真实范围和精神的情况下实践这样的变化,并且所述变化意图落入本公开文本的范围内。

序列表

- <110> 因达普塔治疗公司
<120> 自然杀伤(NK)细胞组合物及其生成方法
<130> 77603-2000740
<140> 尚未分配
<141> 同时随同提交
<150> 63014056
<151> 2020-04-22
<160> 18
<170> 用于Windows的FastSEQ 4.0版
<210> 1
<211> 86
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<220>
<223> 人FcRγ链 (NP_004097.1 (GI:4758344))
<400> 1

```
Met Ile Pro Ala Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Val Glu Gln Ala
1             5             10             15
Ala Ala Leu Gly Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp Ala Ile Leu
20             25             30
Phe Leu Tyr Gly Ile Val Leu Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Leu Lys Ile
35             40             45
Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser Asp Gly Val
50             55             60
Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys
65             70             75             80
His Glu Lys Pro Pro Gln
85
```

- <210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 2
atatattacag aatggcacag g 21
<210> 3

<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 3
gacttggtac ccaggttgaa 20
<210> 4
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 4
atcagattcg atcctacttc tgcagggggc at 32
<210> 5
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 5
acgtgctgag cttgagtgat ggtgatgttc ac 32
<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 6
cccaactcaa cttcccagtg tgat 24
<210> 7
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 7
gaaatctacc ttttcctcta atagggaat 30

<210> 8
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 8
gaaatctacc ttttcctcta atagggcaa 29
<210> 9
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 9
gaaatctacc ttttcctcta atagggca 28
<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 10
ccaaaagcca cactcaaaga c 21
<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 11
acccaggtgg aaagaatgat g 21
<210> 12
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 探针
<400> 12

aacatcacca tcactcaagg tttgg 25

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 13

ctgaagacac attttttactc ccaaa 25

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 14

tccaaaagcc acactcaaag ac 22

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 15

ctgaagacac attttttactc ccaac 25

<210> 16

<211> 238

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD16 (F158)

<400> 16

Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro

1 5 10 15

Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln

20 25 30

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu

35 40 45

Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr

50	55	60
Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu		
65	70	75
Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln		
85	90	95
Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys		
100	105	110
His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn		
115	120	125
Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro		
130	135	140
Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Phe		
145	150	155
Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln		
165	170	175
Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln		
180	185	190
Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly		
195	200	205
Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp		
210	215	220
Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys		
225	230	235

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 信号肽

<400> 17

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala		
1	5	10

<210> 18

<211> 238

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD16 158V+ (VAR_003960)

<400> 18

Gly	Met	Arg	Thr	Glu	Asp	Leu	Pro	Lys	Ala	Val	Val	Phe	Leu	Glu	Pro
1				5					10					15	
Gln	Trp	Tyr	Arg	Val	Leu	Glu	Lys	Asp	Ser	Val	Thr	Leu	Lys	Cys	Gln
				20				25					30		
Gly	Ala	Tyr	Ser	Pro	Glu	Asp	Asn	Ser	Thr	Gln	Trp	Phe	His	Asn	Glu
				35				40					45		
Ser	Leu	Ile	Ser	Ser	Gln	Ala	Ser	Ser	Tyr	Phe	Ile	Asp	Ala	Ala	Thr
				50				55				60			
Val	Asp	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Arg	Cys	Gln	Thr	Asn	Leu	Ser	Thr	Leu
65					70					75					80
Ser	Asp	Pro	Val	Gln	Leu	Glu	Val	His	Ile	Gly	Trp	Leu	Leu	Leu	Gln
				85					90					95	
Ala	Pro	Arg	Trp	Val	Phe	Lys	Glu	Glu	Asp	Pro	Ile	His	Leu	Arg	Cys
				100					105				110		
His	Ser	Trp	Lys	Asn	Thr	Ala	Leu	His	Lys	Val	Thr	Tyr	Leu	Gln	Asn
				115					120				125		
Gly	Lys	Gly	Arg	Lys	Tyr	Phe	His	His	Asn	Ser	Asp	Phe	Tyr	Ile	Pro
				130					135				140		
Lys	Ala	Thr	Leu	Lys	Asp	Ser	Gly	Ser	Tyr	Phe	Cys	Arg	Gly	Leu	Val
145					150					155					160
Gly	Ser	Lys	Asn	Val	Ser	Ser	Glu	Thr	Val	Asn	Ile	Thr	Ile	Thr	Gln
				165					170					175	
Gly	Leu	Ala	Val	Ser	Thr	Ile	Ser	Ser	Phe	Phe	Pro	Pro	Gly	Tyr	Gln
				180					185				190		
Val	Ser	Phe	Cys	Leu	Val	Met	Val	Leu	Leu	Phe	Ala	Val	Asp	Thr	Gly
				195				200					205		
Leu	Tyr	Phe	Ser	Val	Lys	Thr	Asn	Ile	Arg	Ser	Ser	Thr	Arg	Asp	Trp
				210				215				220			
Lys	Asp	His	Lys	Phe	Lys	Trp	Arg	Lys	Asp	Pro	Gln	Asp	Lys		
225					230					235					

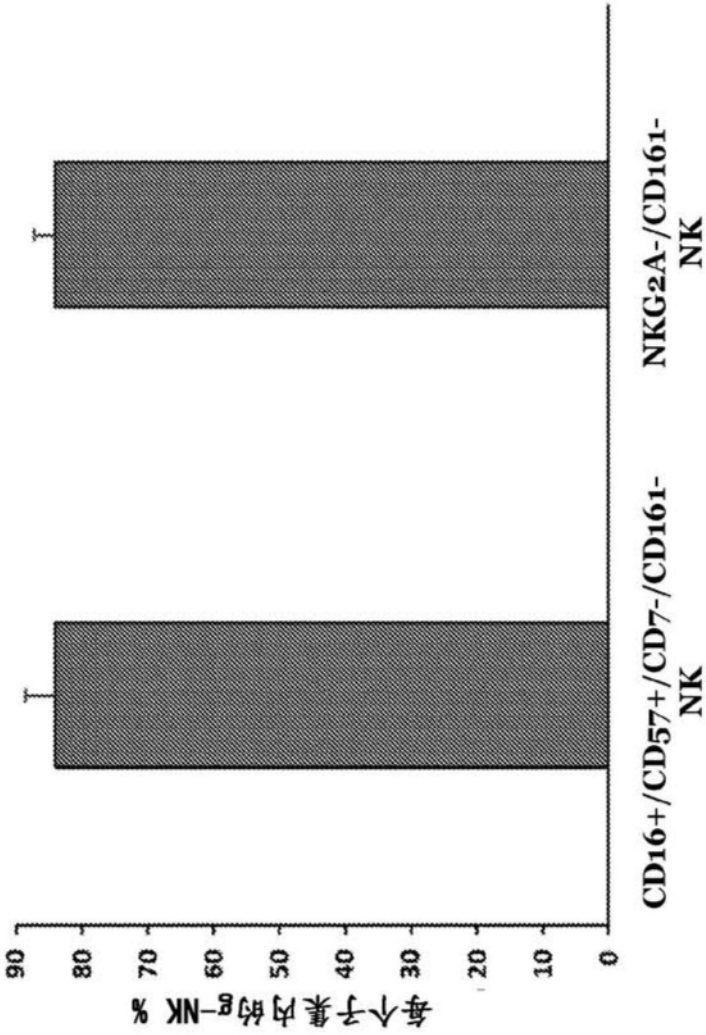


FIG.1

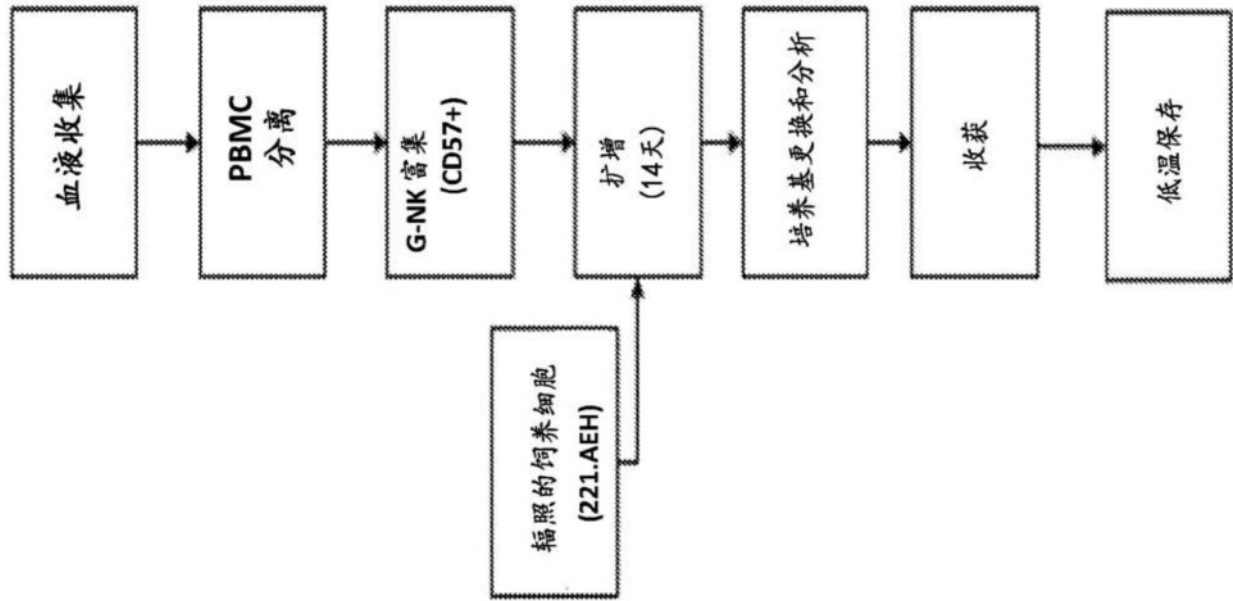


FIG. 2A

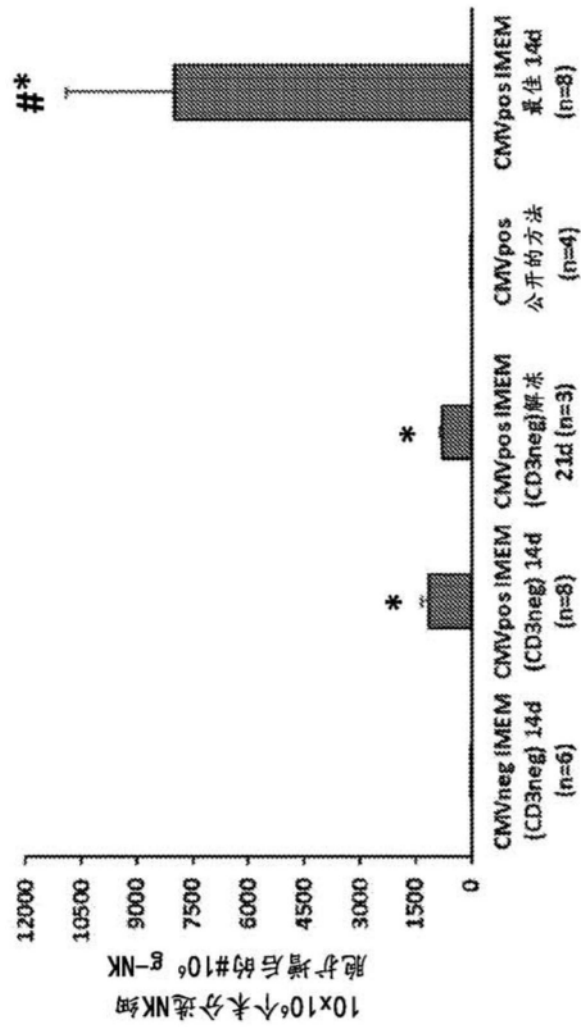


FIG. 2B

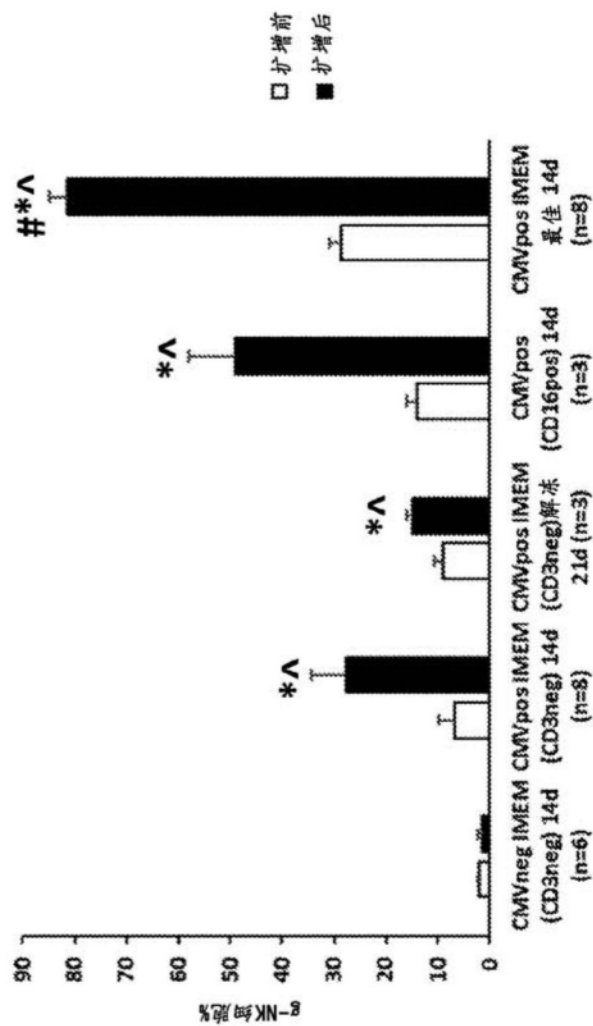


FIG.2C

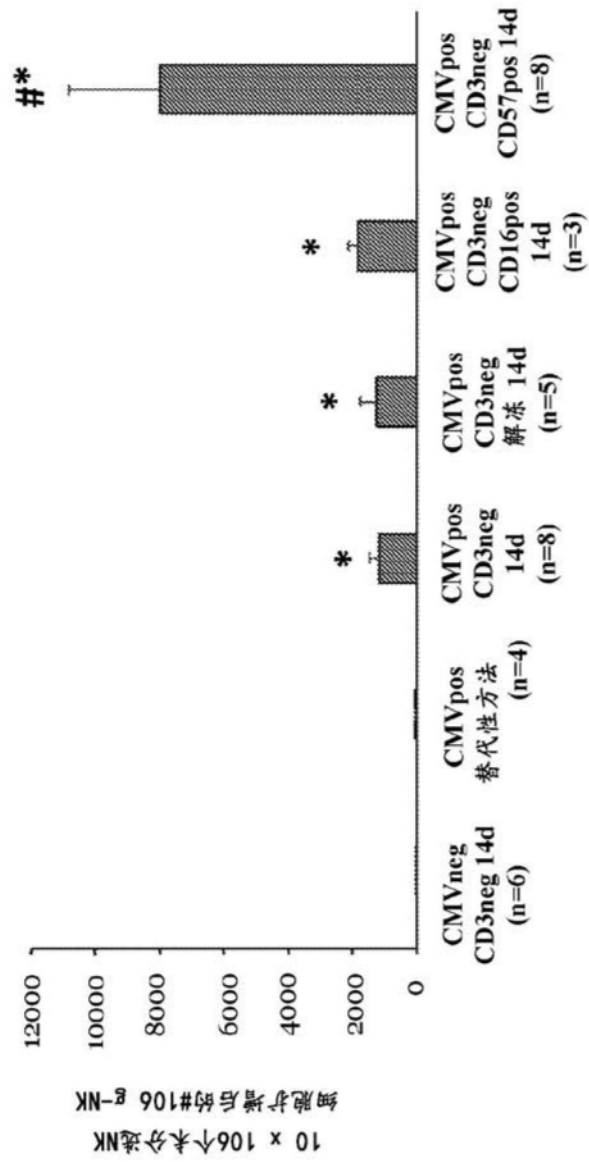


FIG. 2D

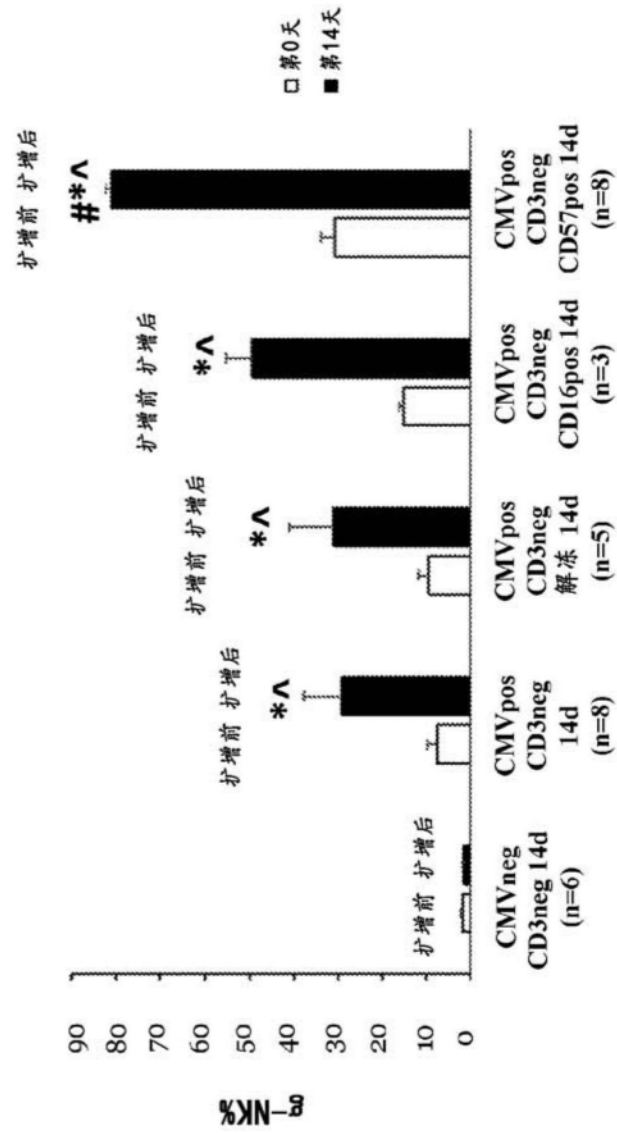


FIG.2E

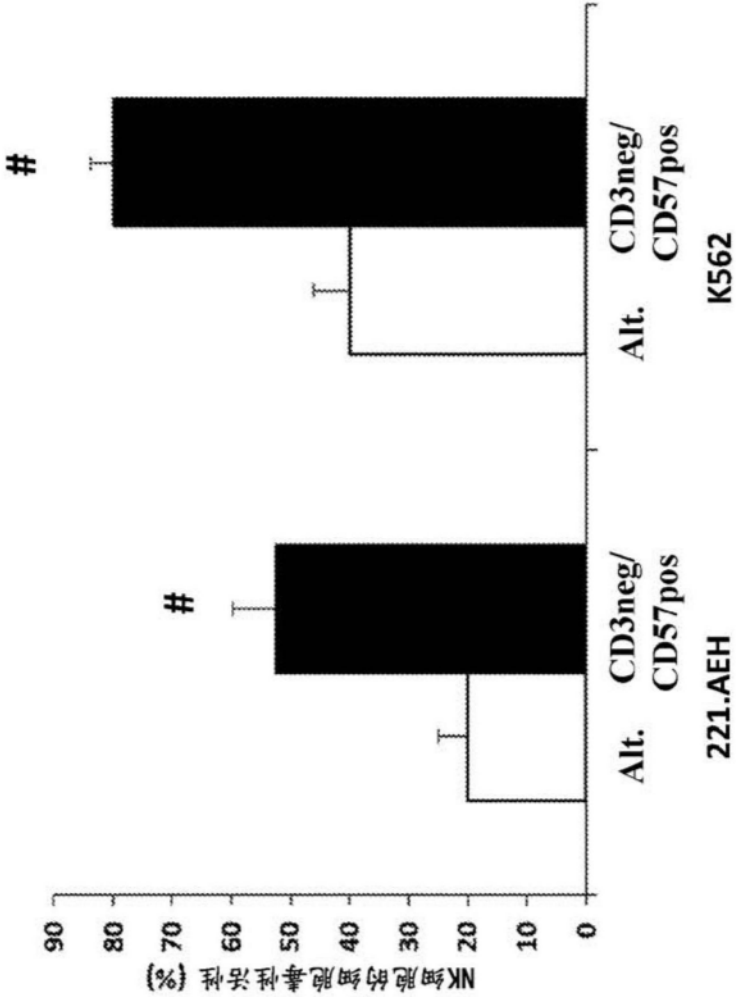


FIG.3

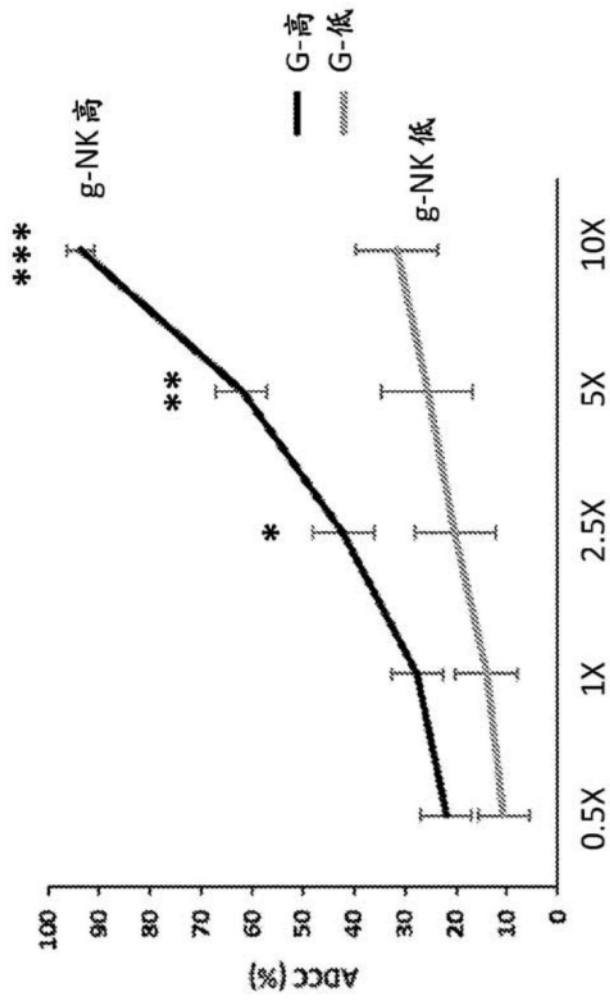


FIG. 4A

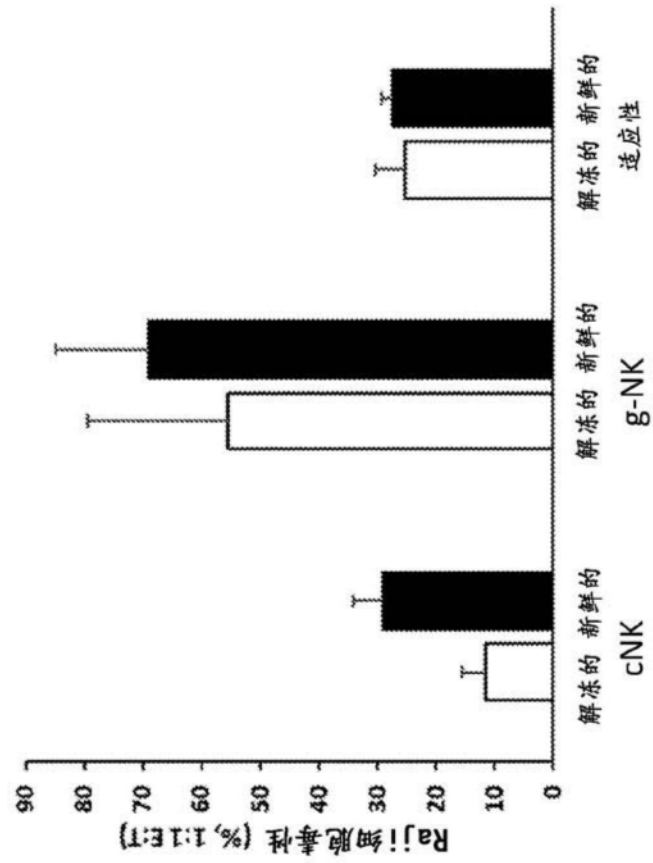


FIG.4B

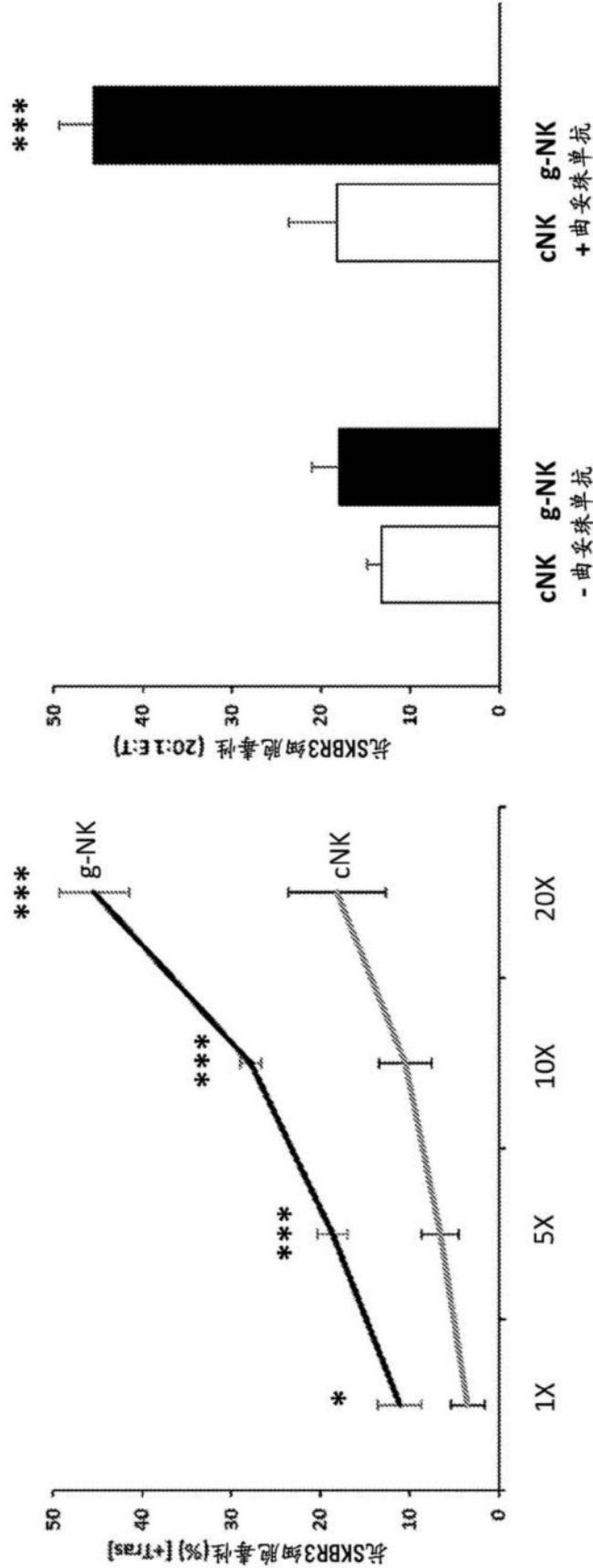


FIG.5A

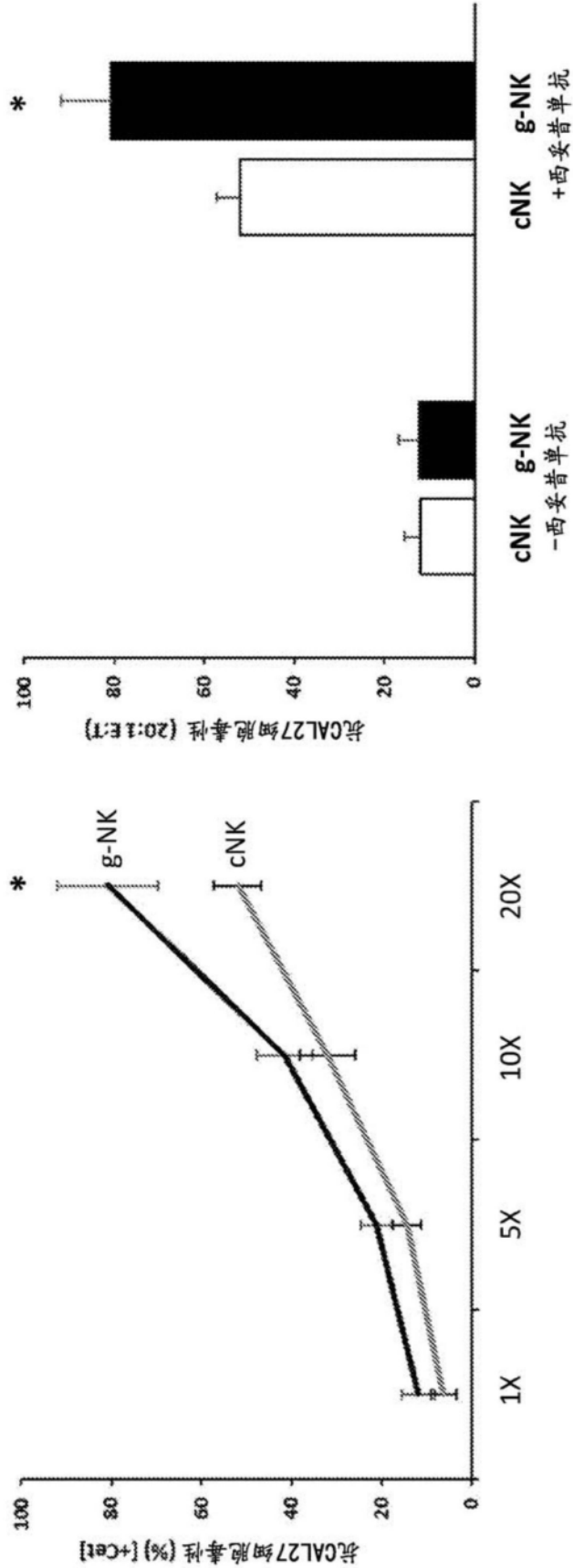


FIG.5B

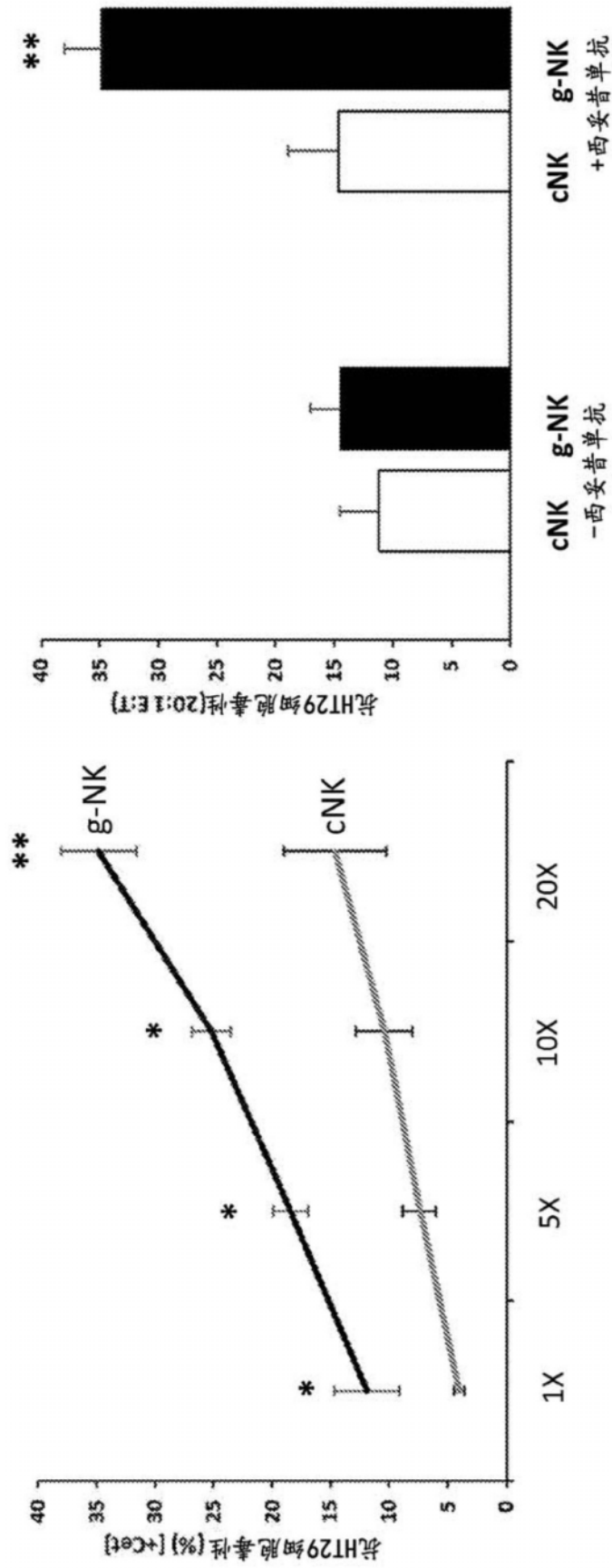


FIG.6A

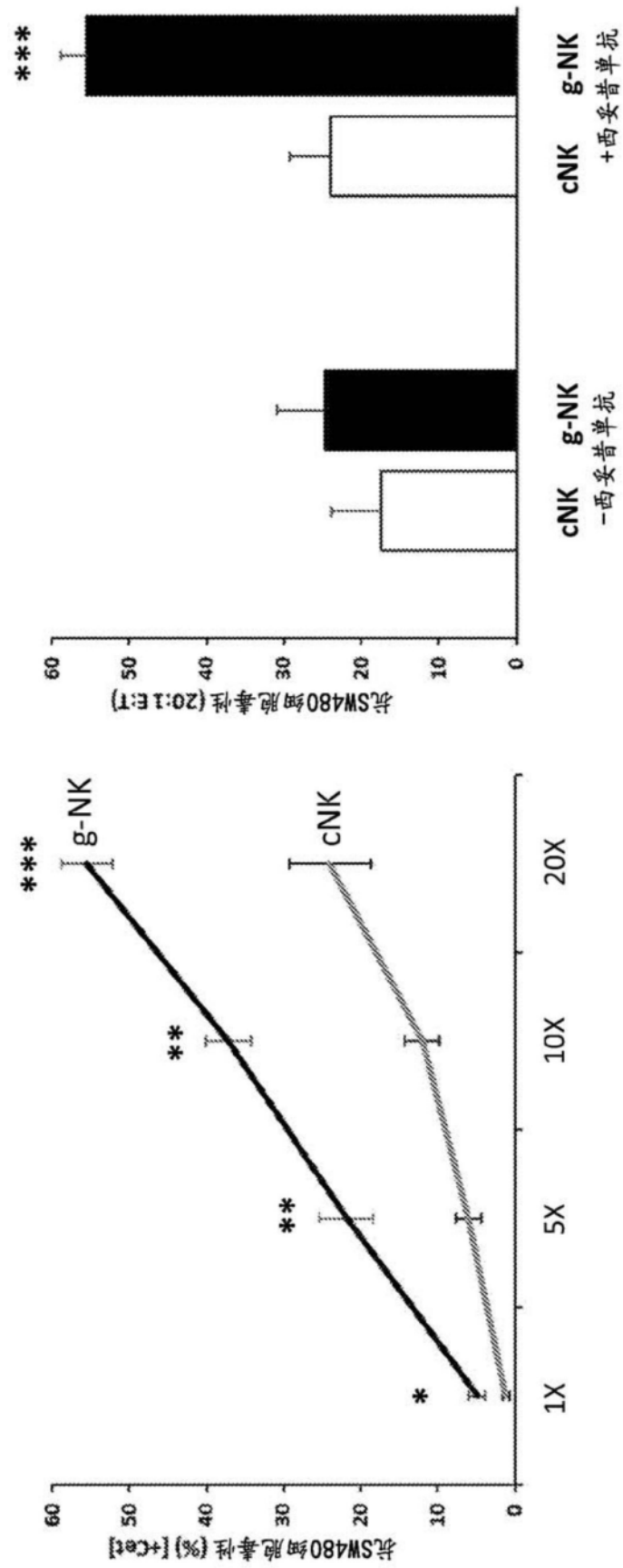


FIG.6B

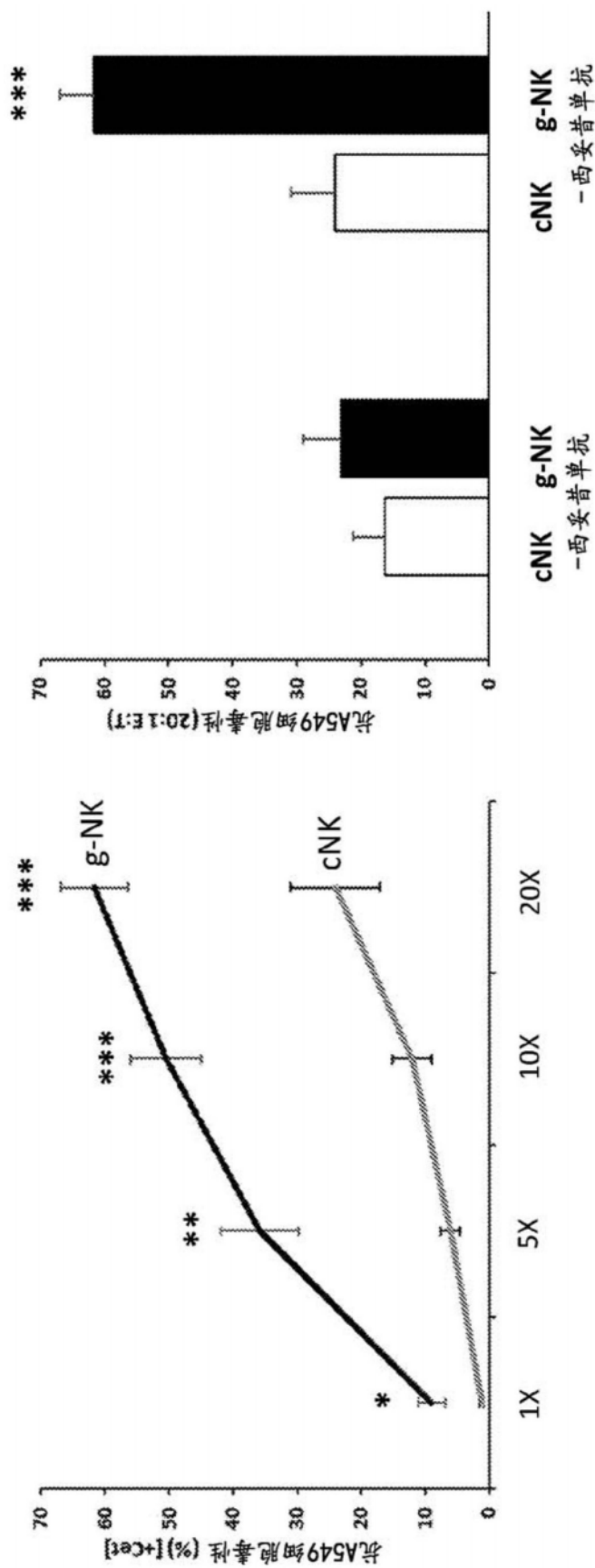


FIG.6C

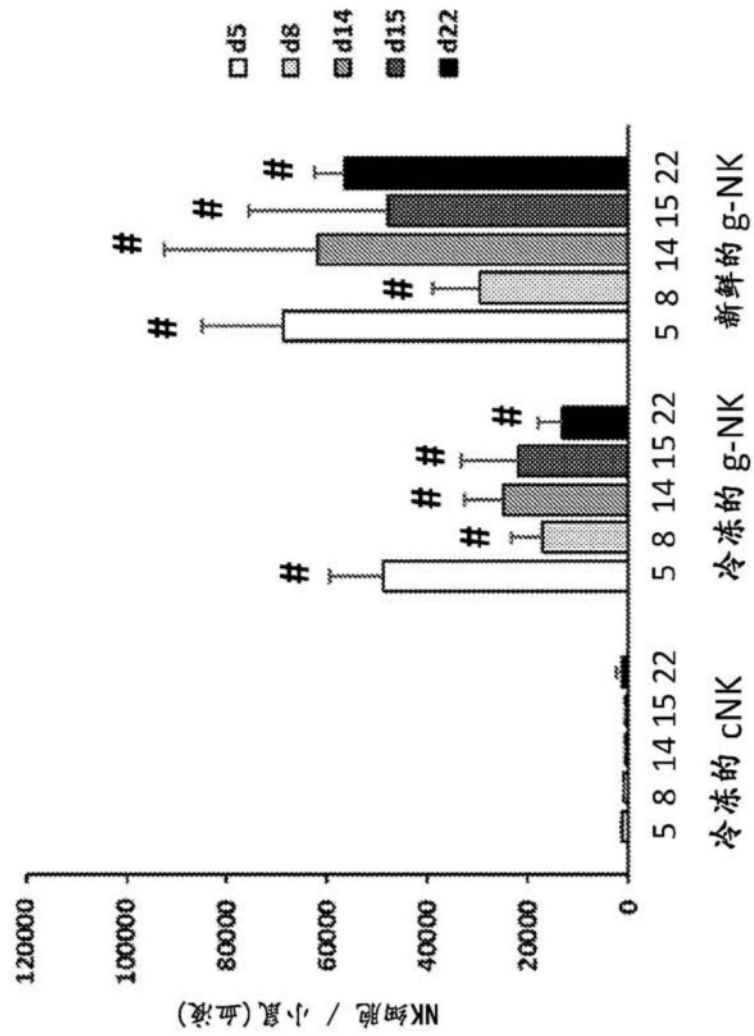


FIG.7A

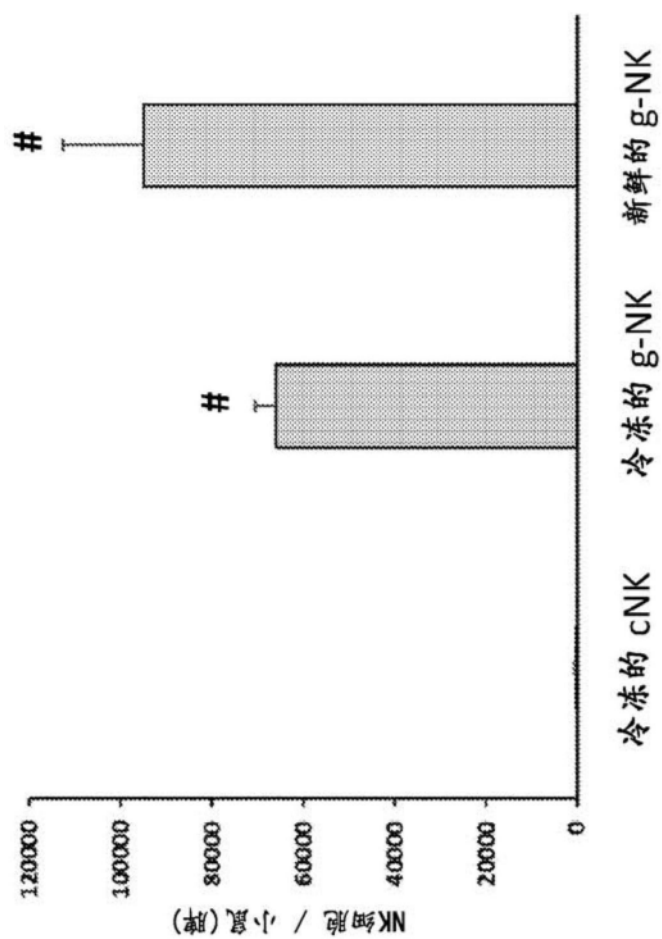


FIG. 7B

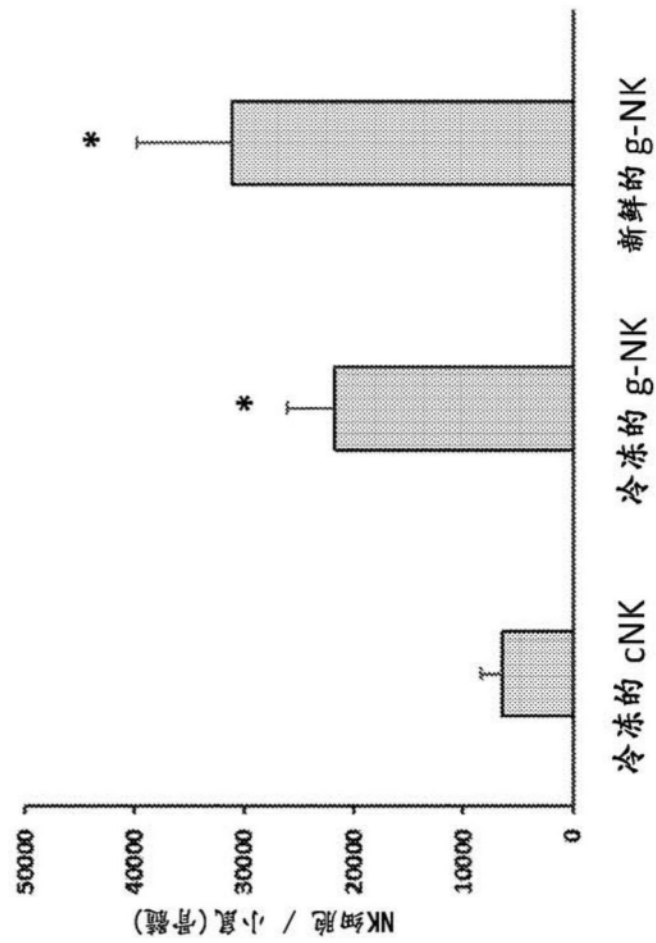


FIG.7C

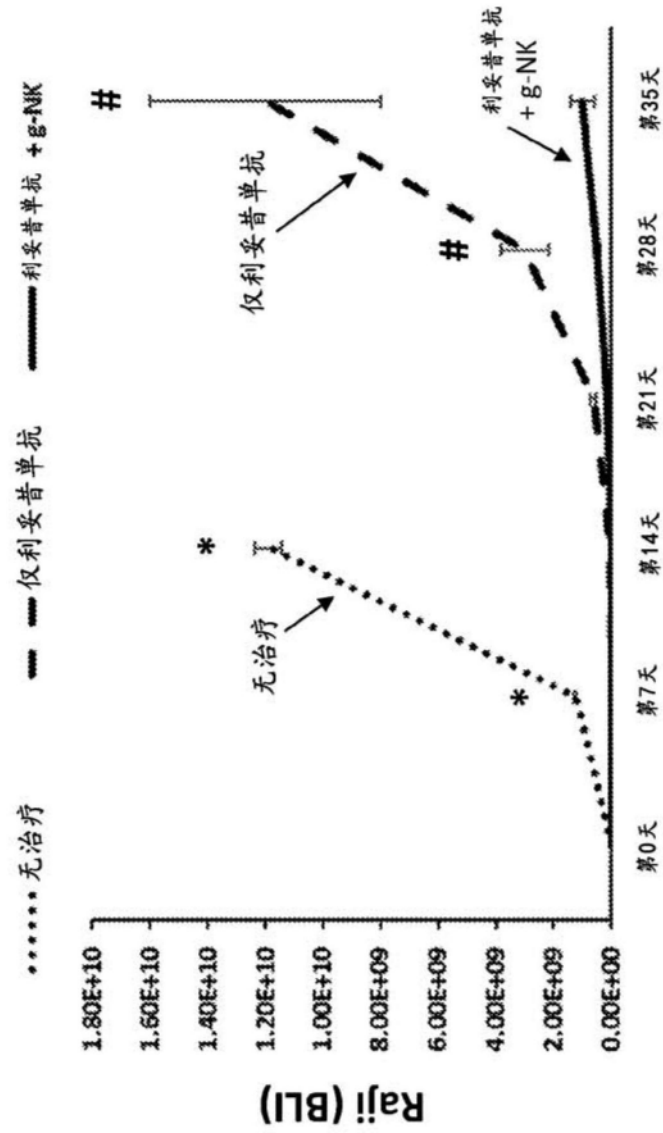


FIG. 8A

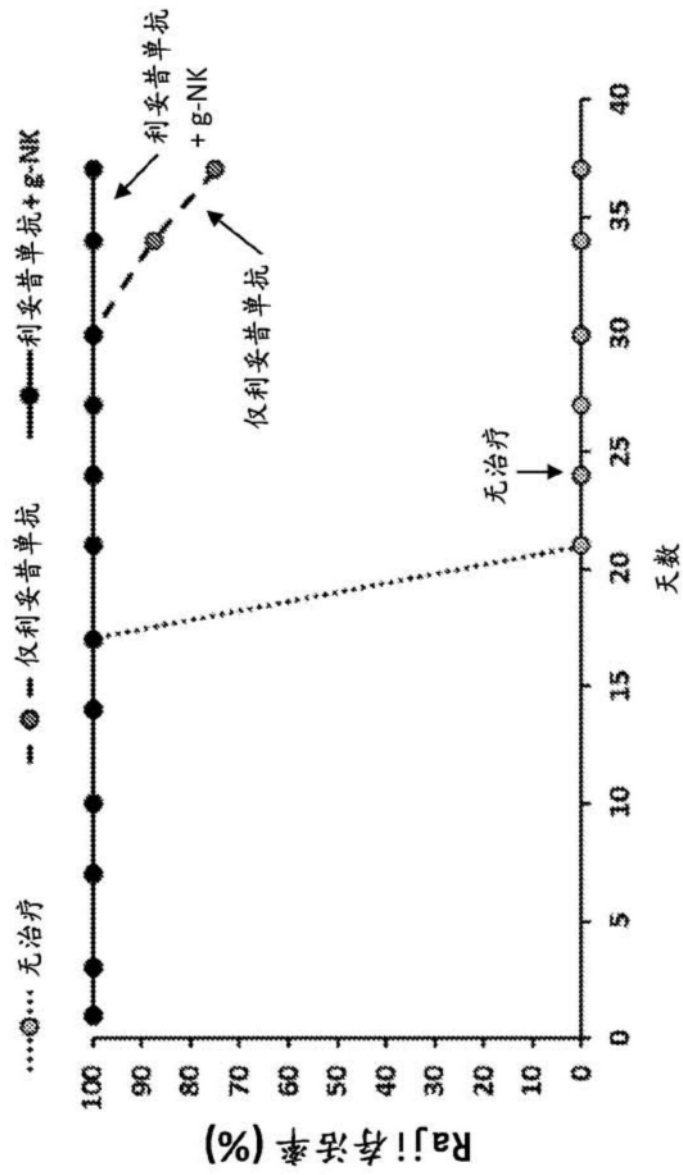


FIG.8B

新近分离的

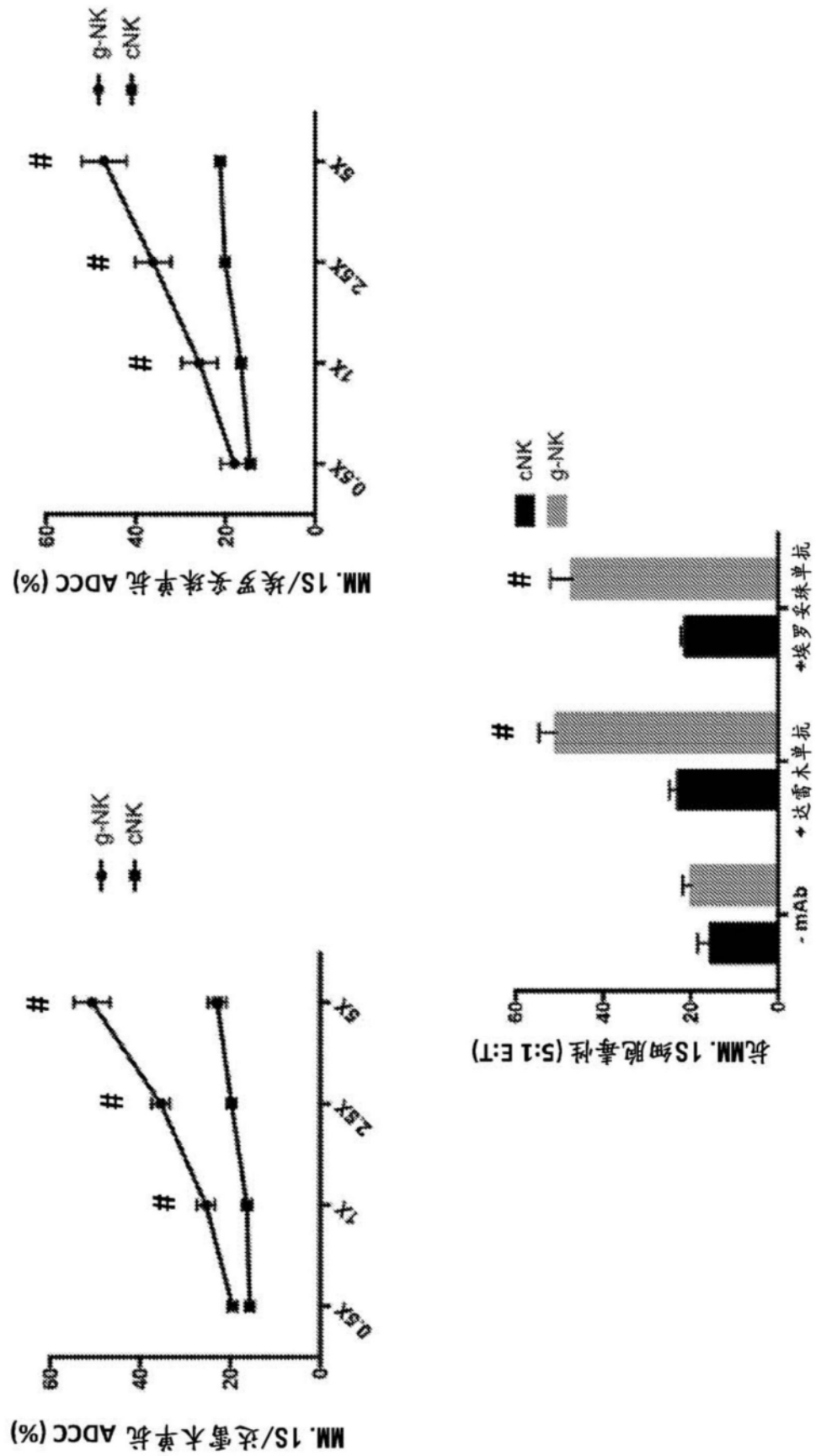


FIG.9A

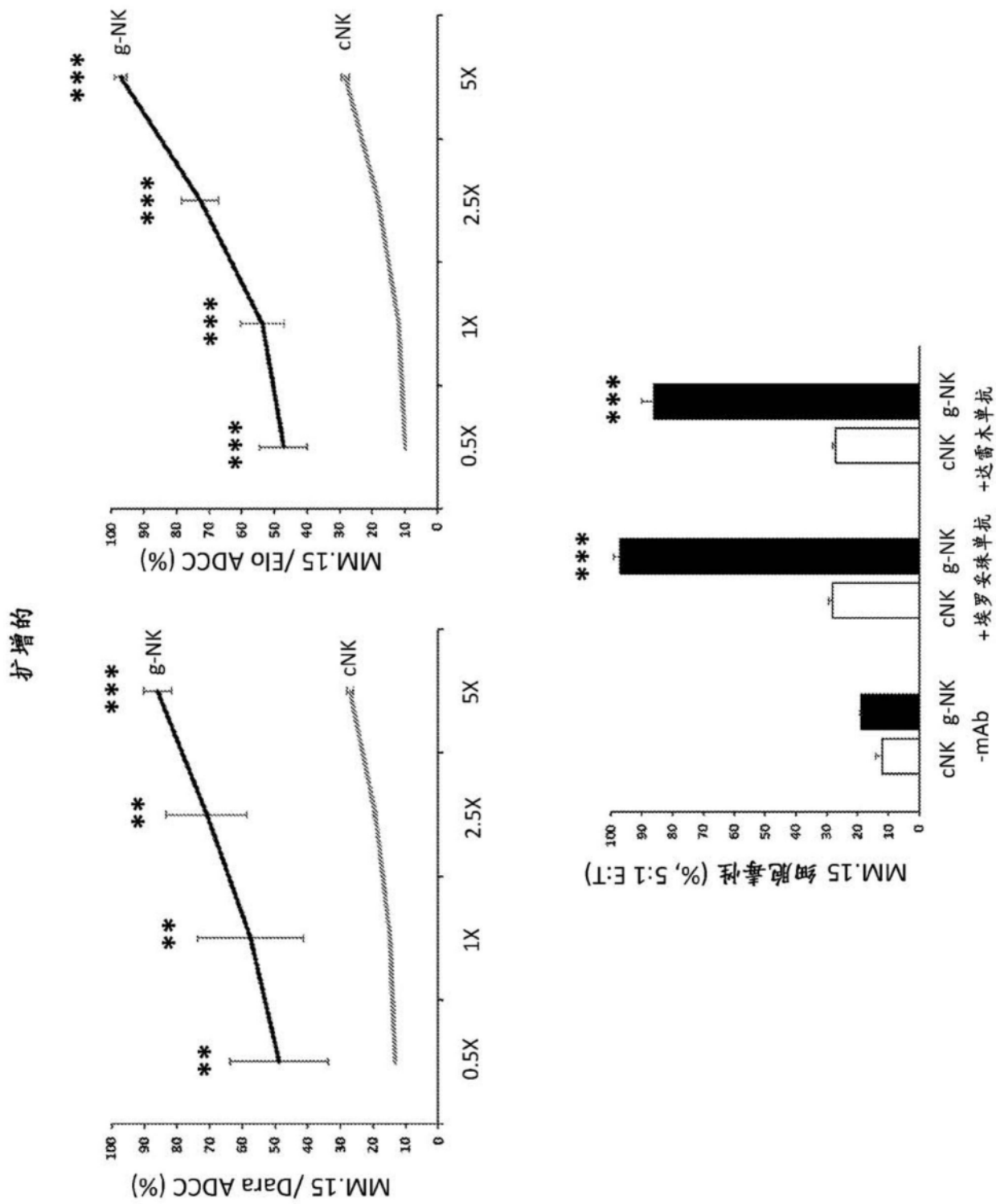


FIG.9B

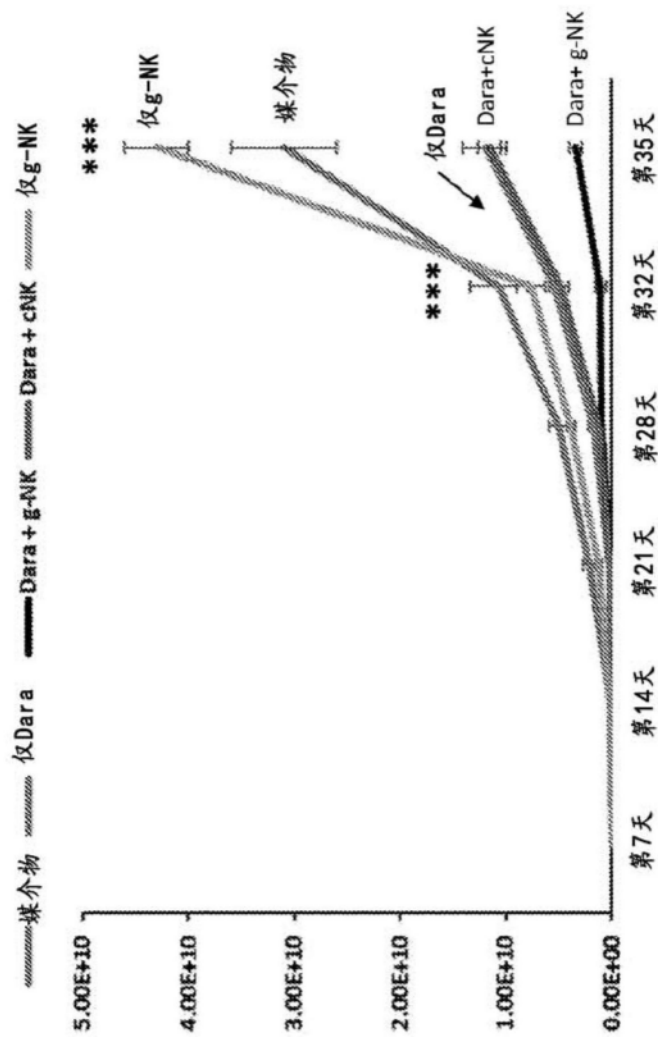


FIG.10A

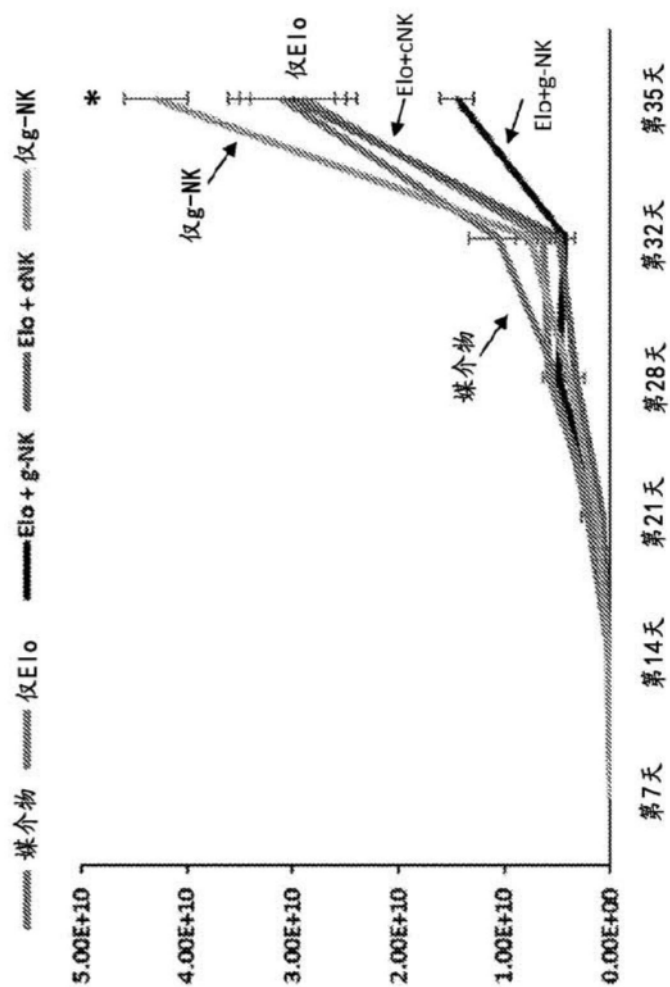


FIG. 10B

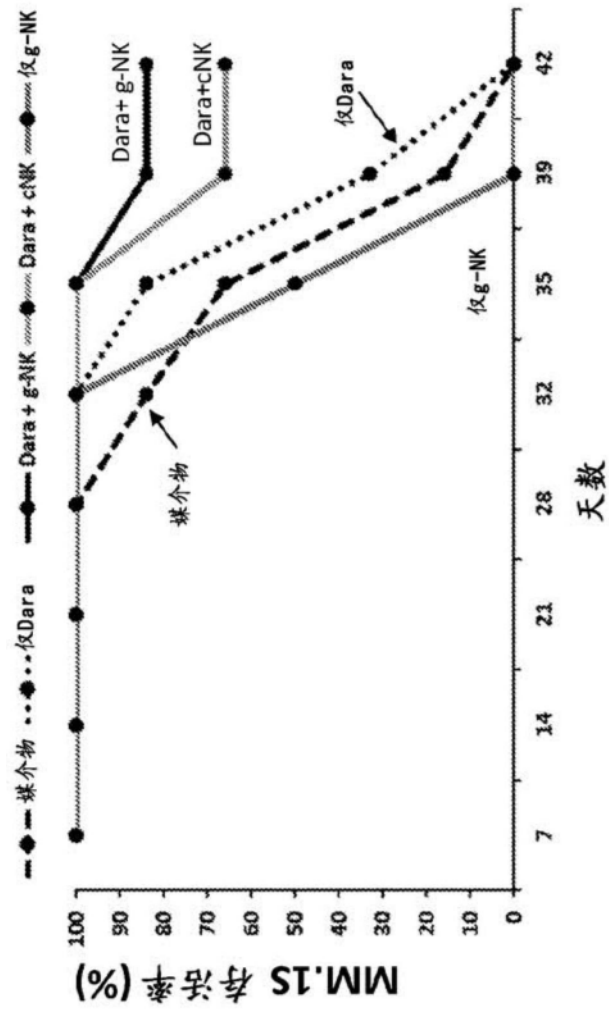


FIG. 11A

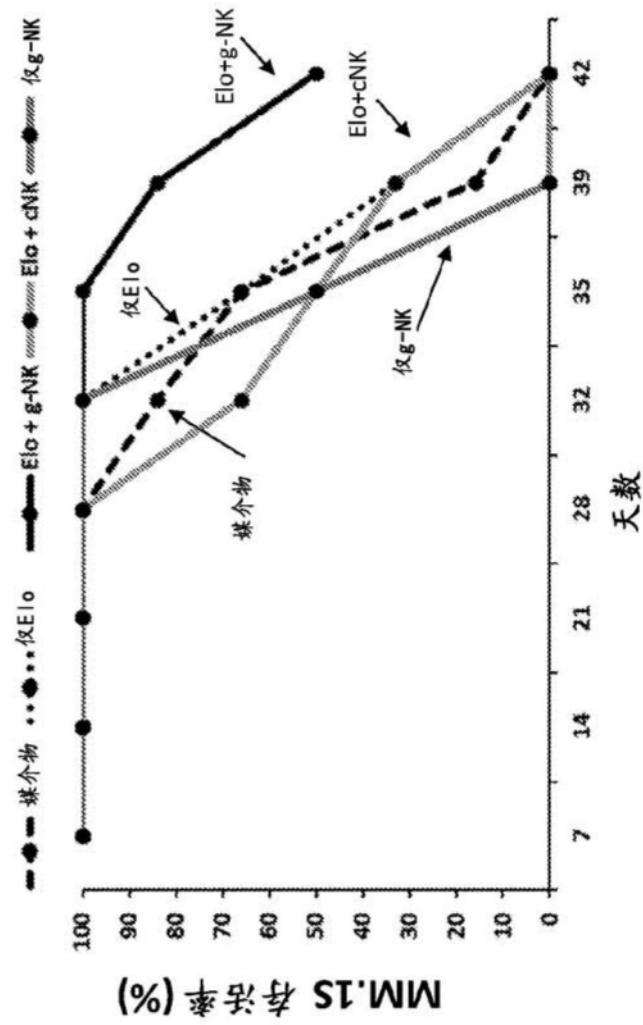


FIG.11B

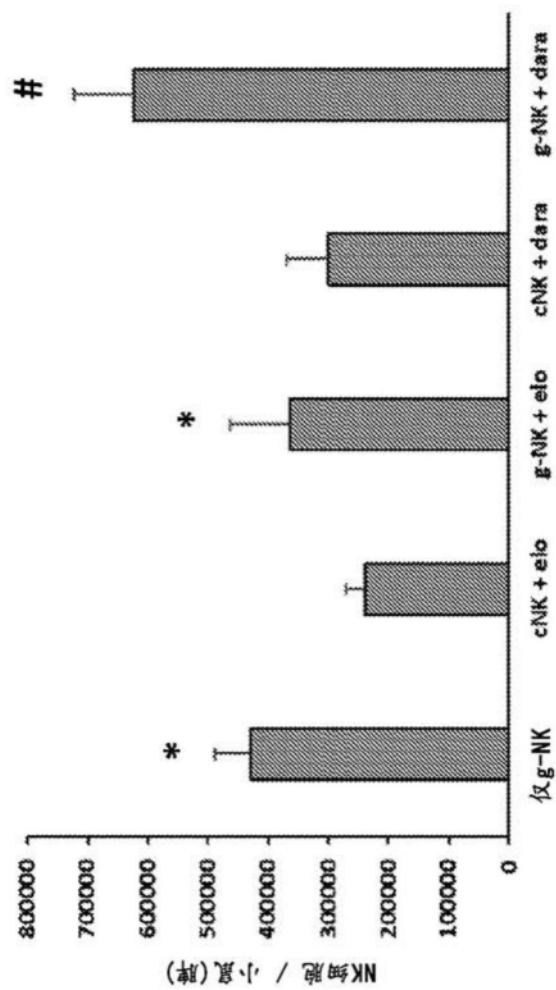


FIG.12A

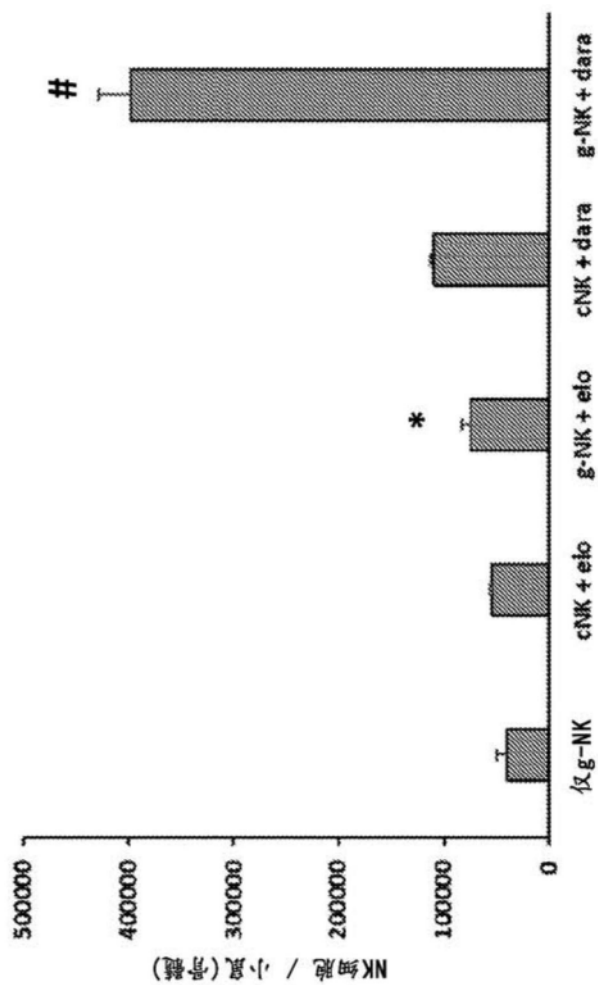


FIG.12B

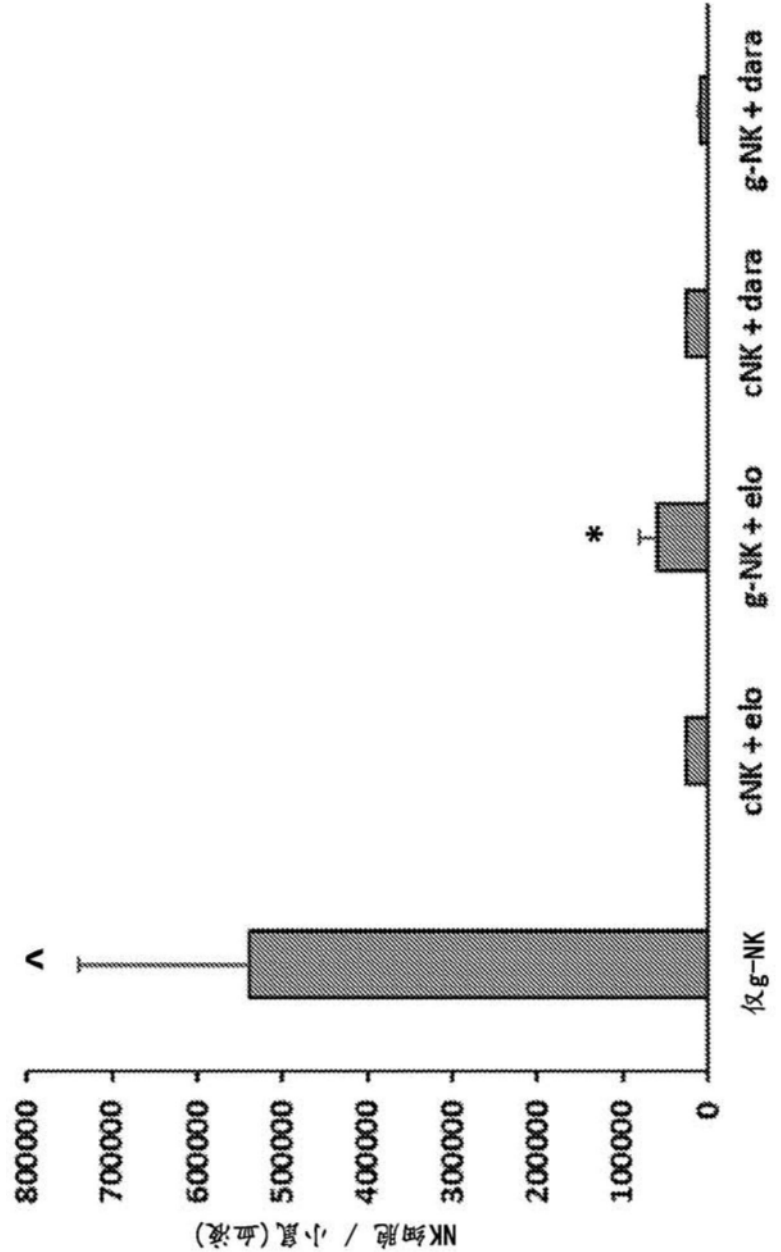


FIG.12C

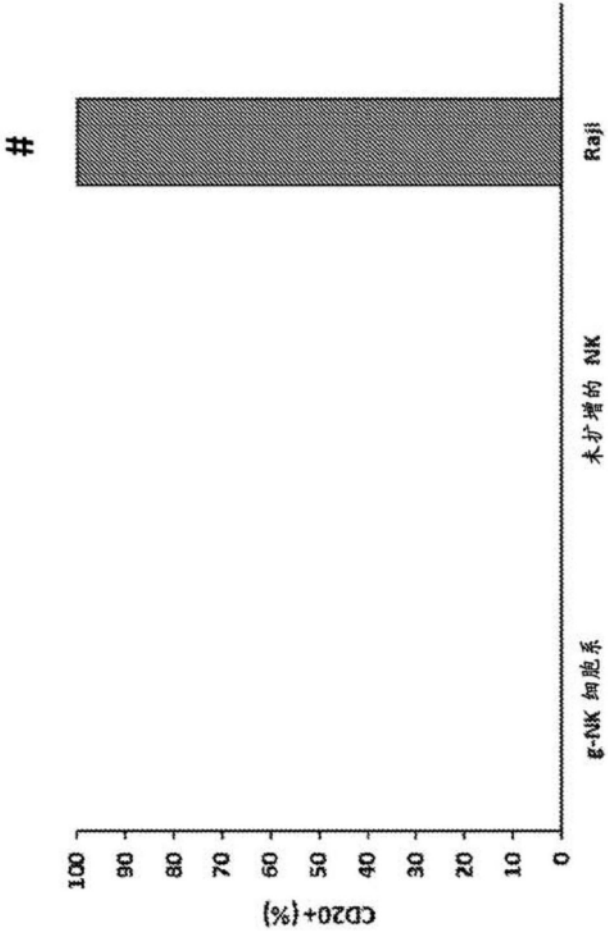


FIG.13A

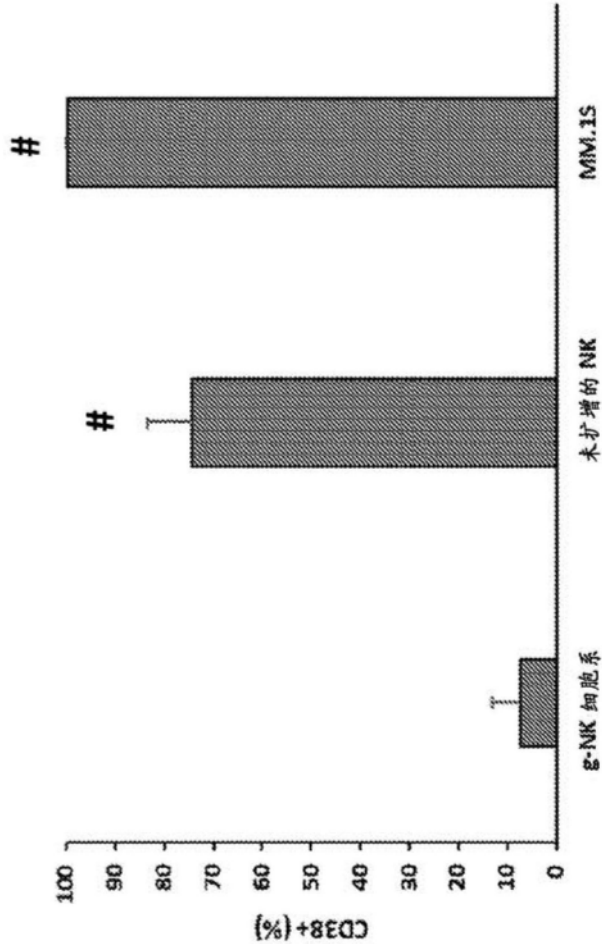


FIG.13B

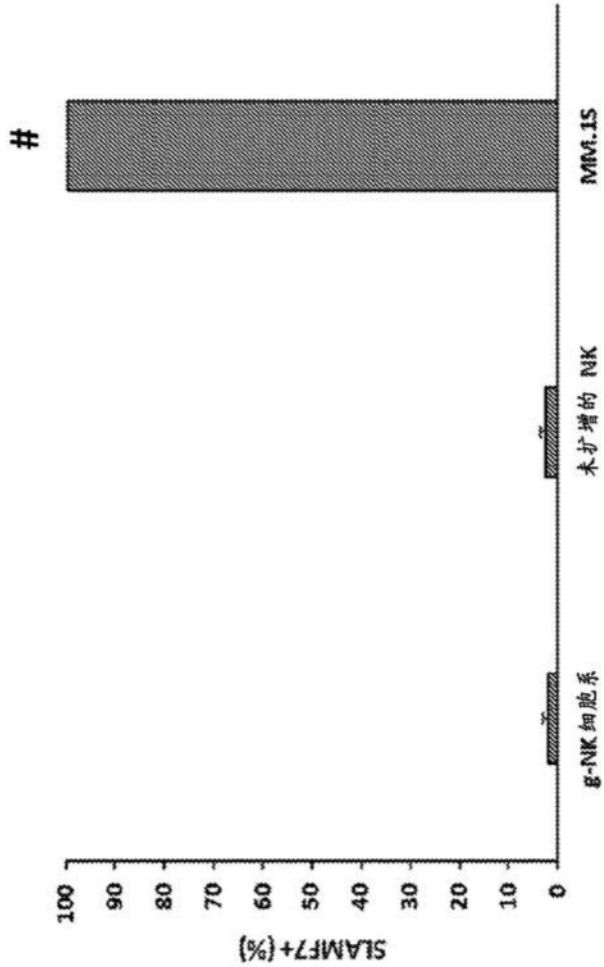


FIG.13C

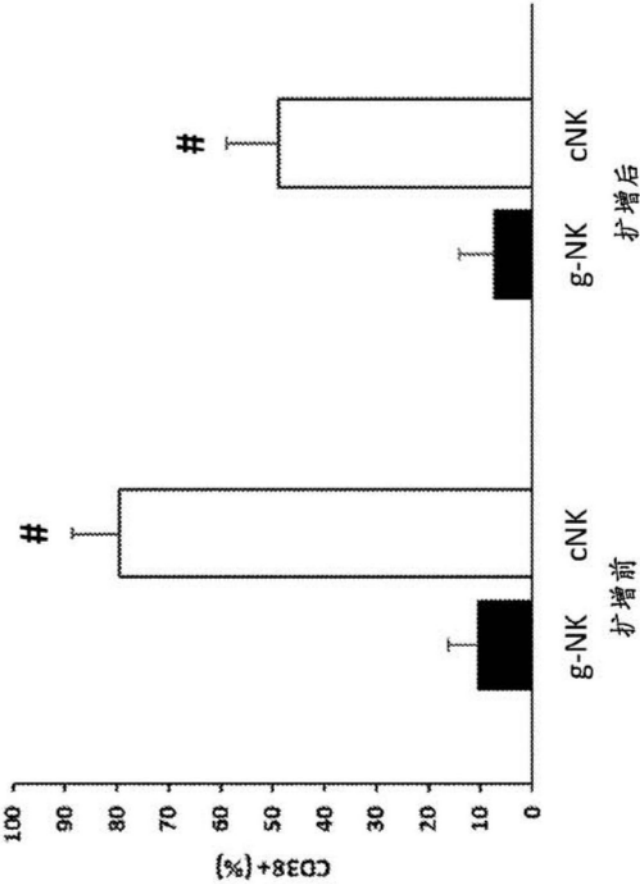


FIG.13D

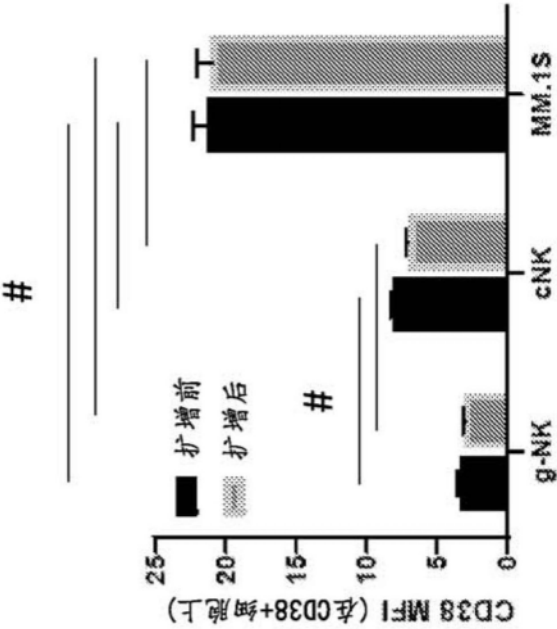


FIG.13E

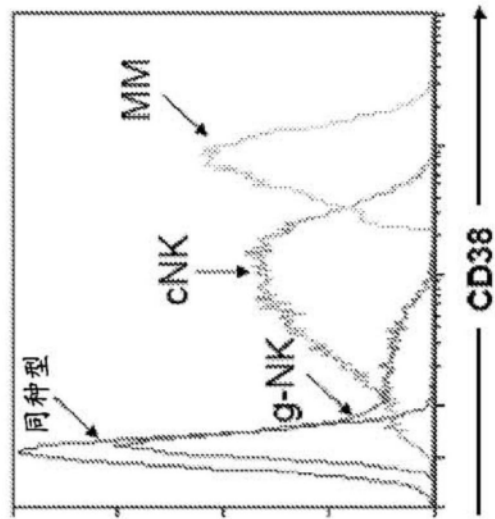


FIG.13F

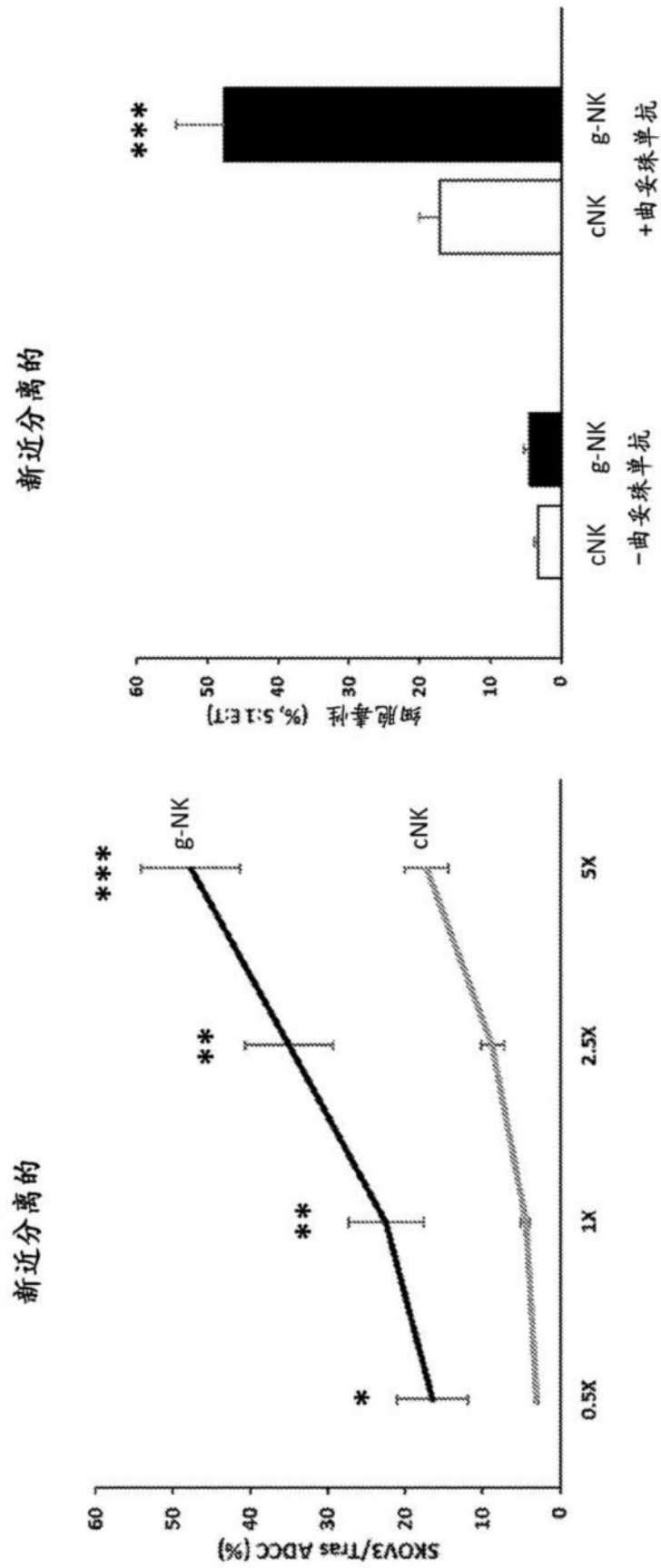


FIG.14A

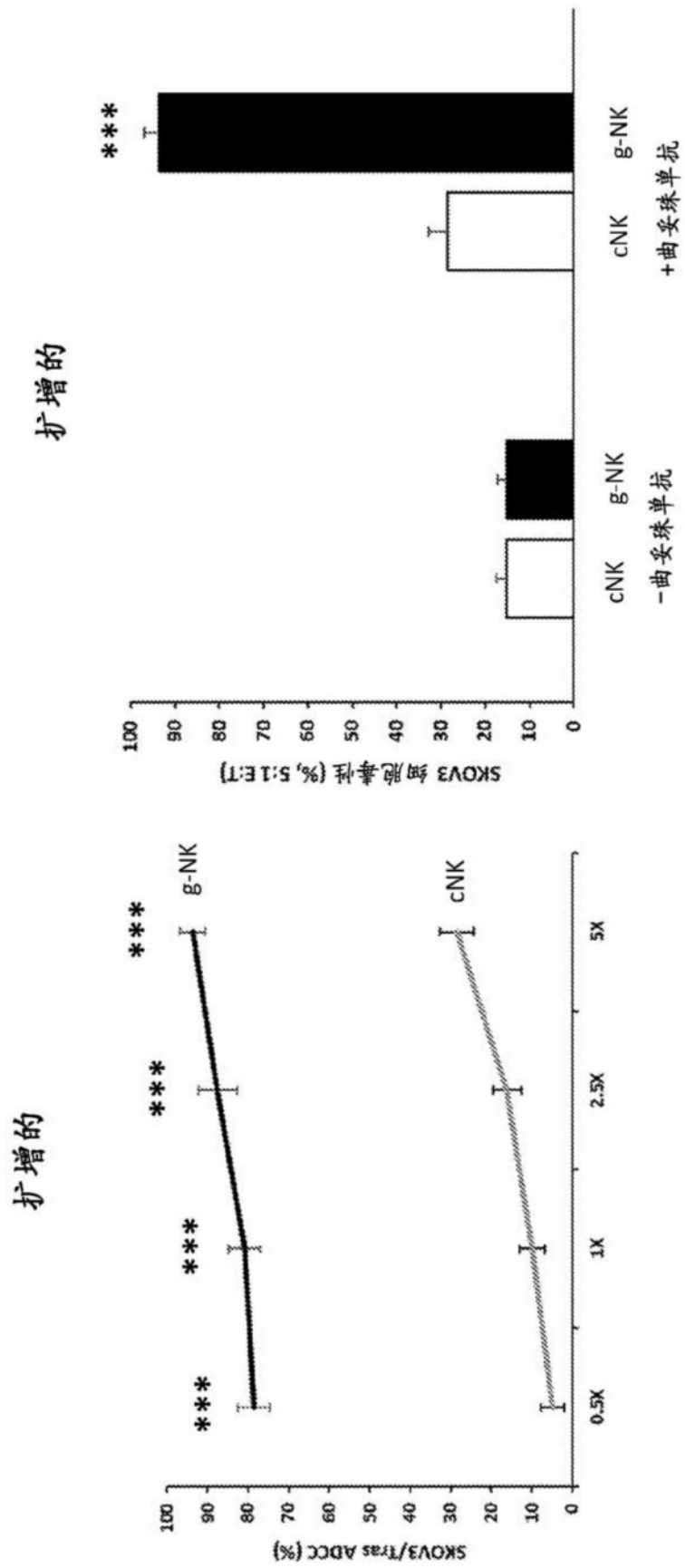


FIG.14B

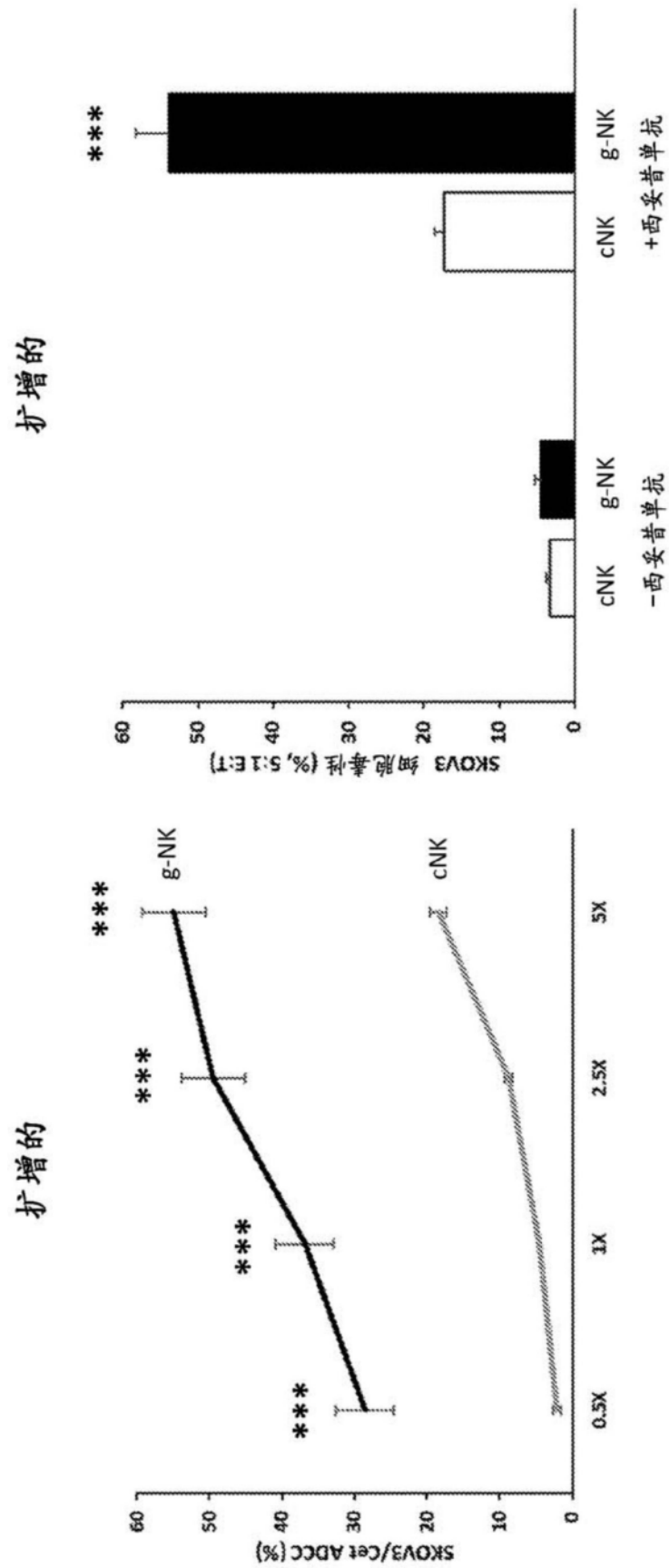


FIG.14C

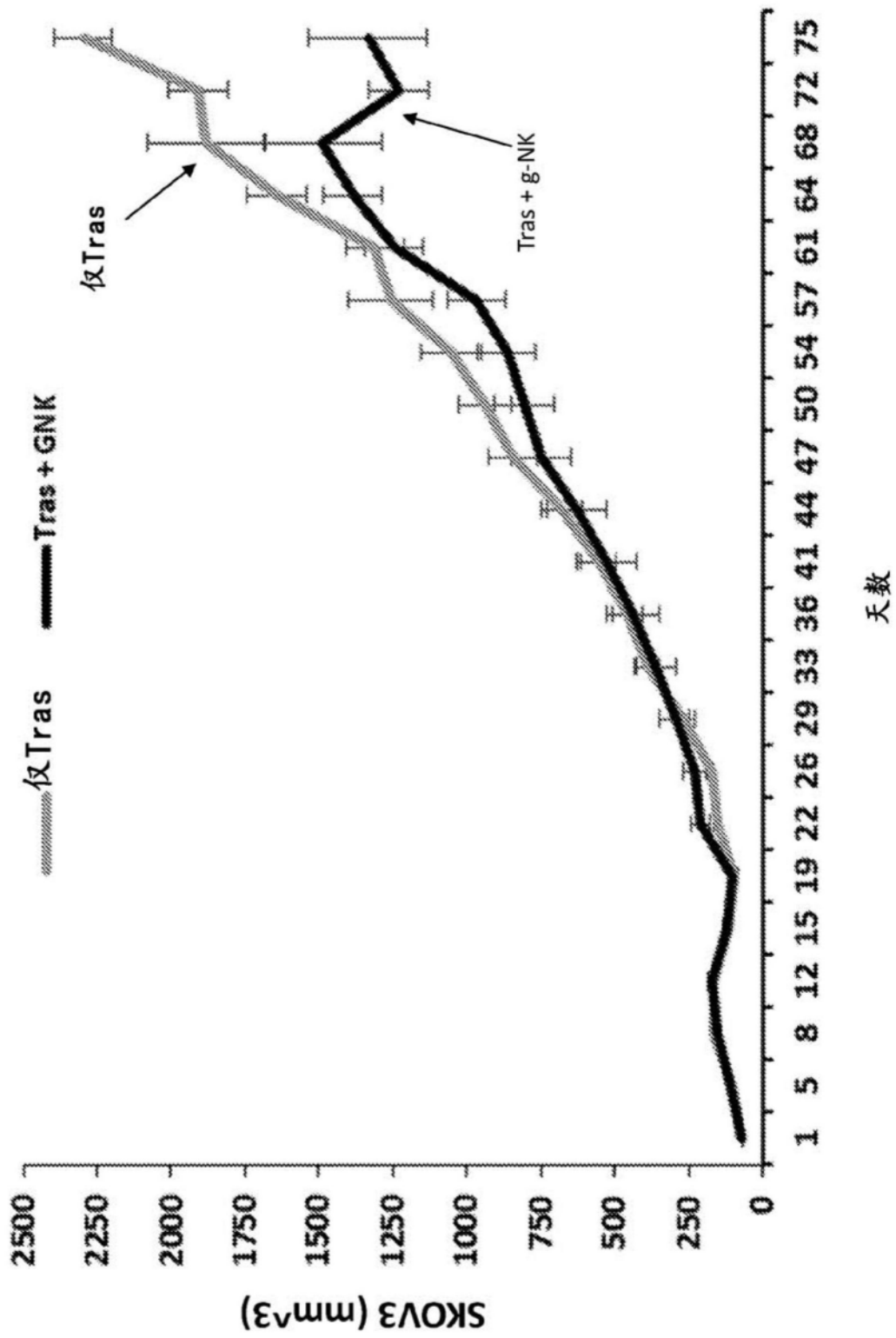


FIG.15A

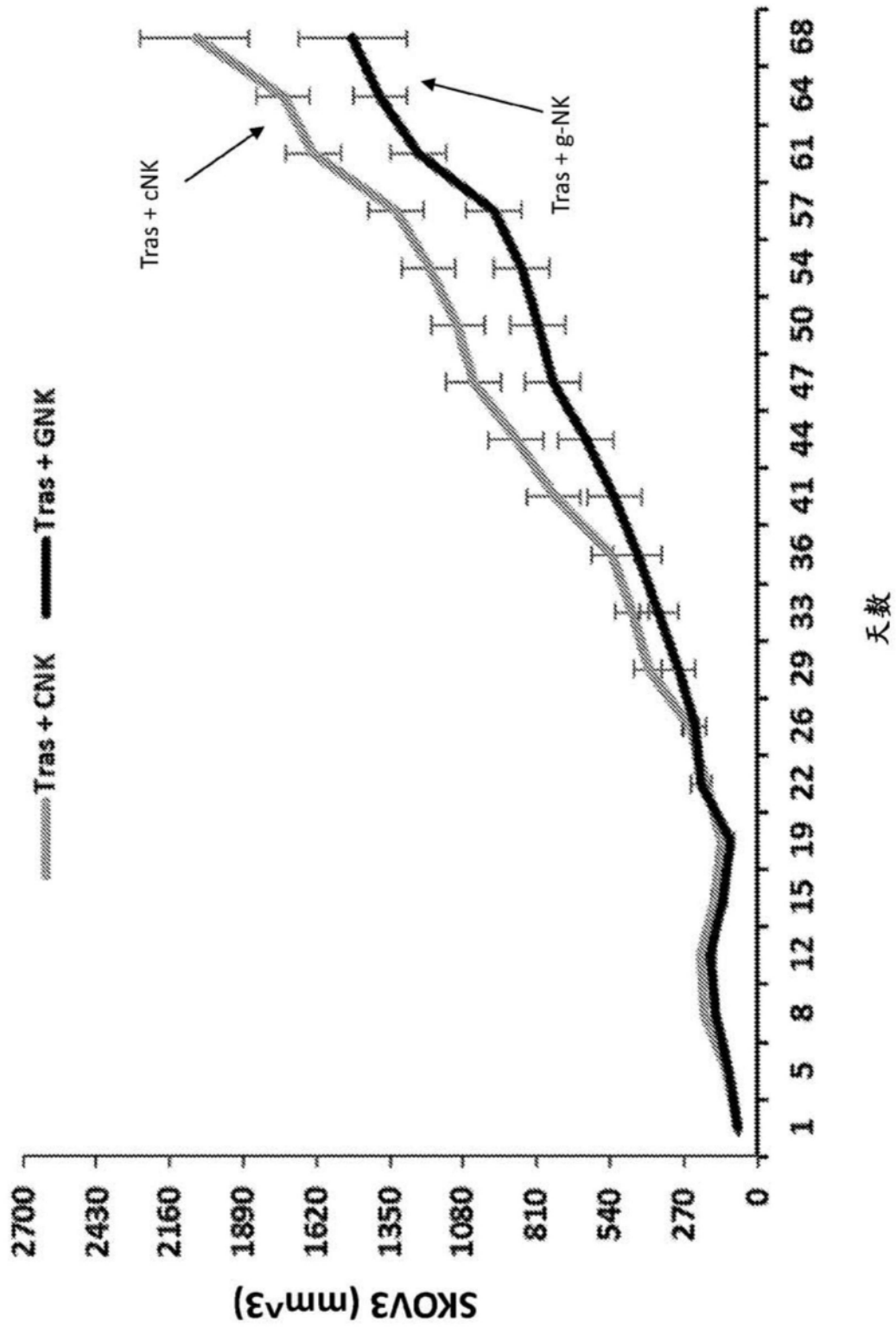


FIG.15B

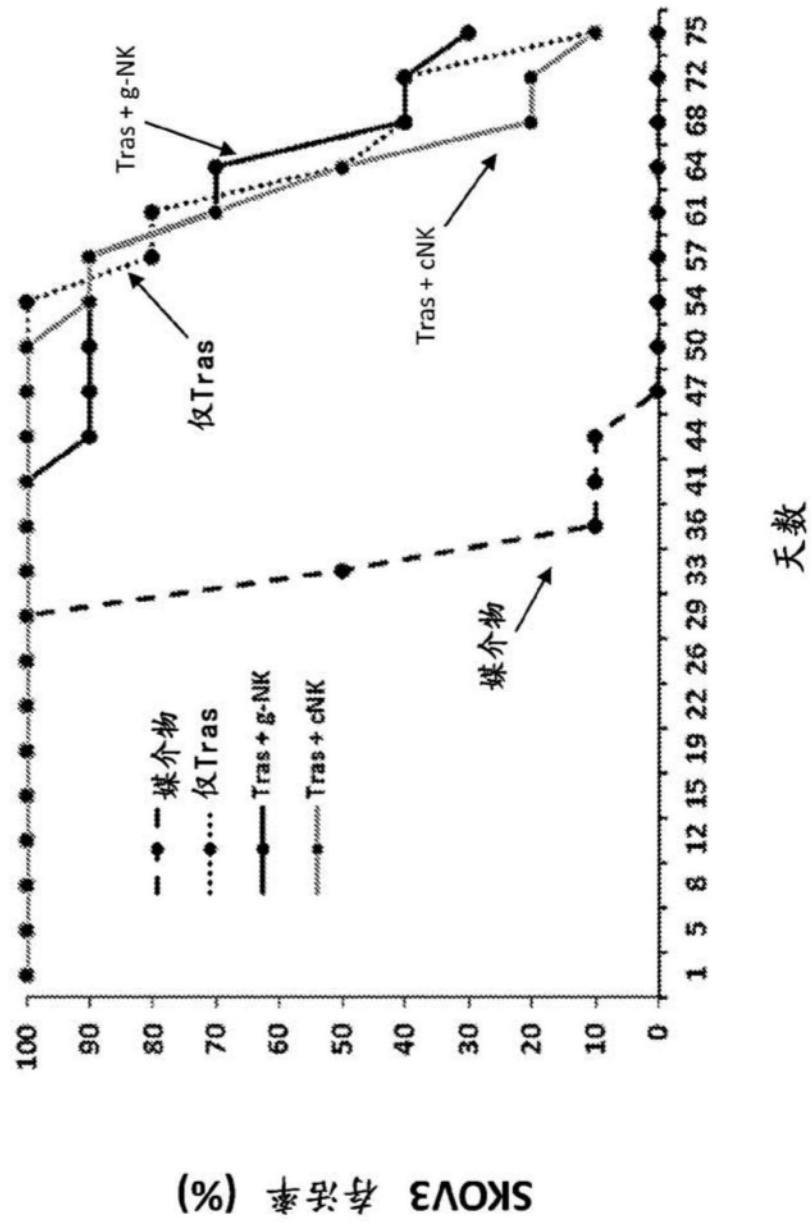


FIG.15C

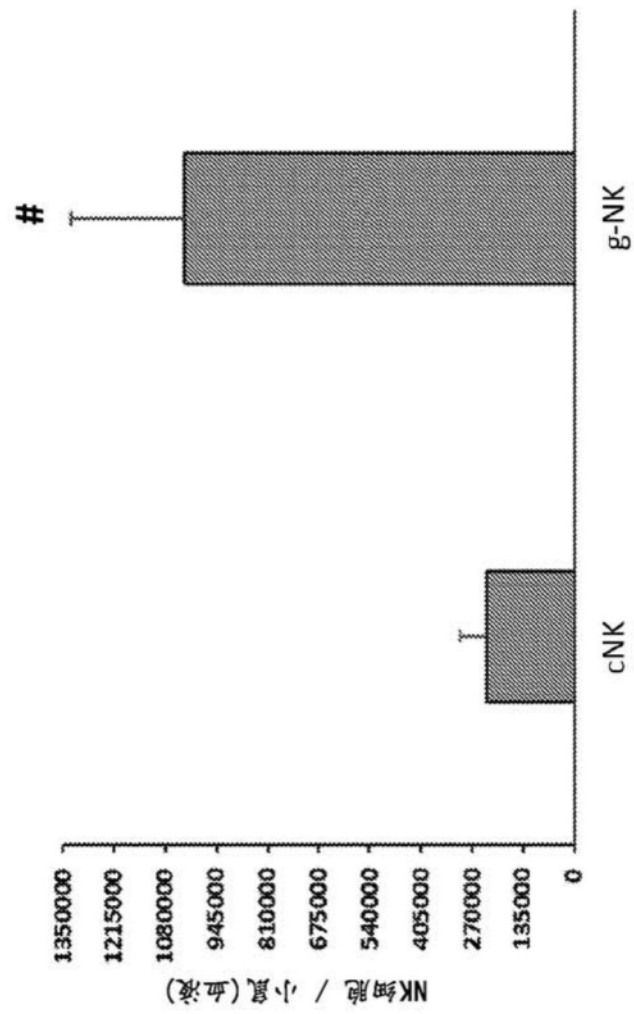


FIG.16A

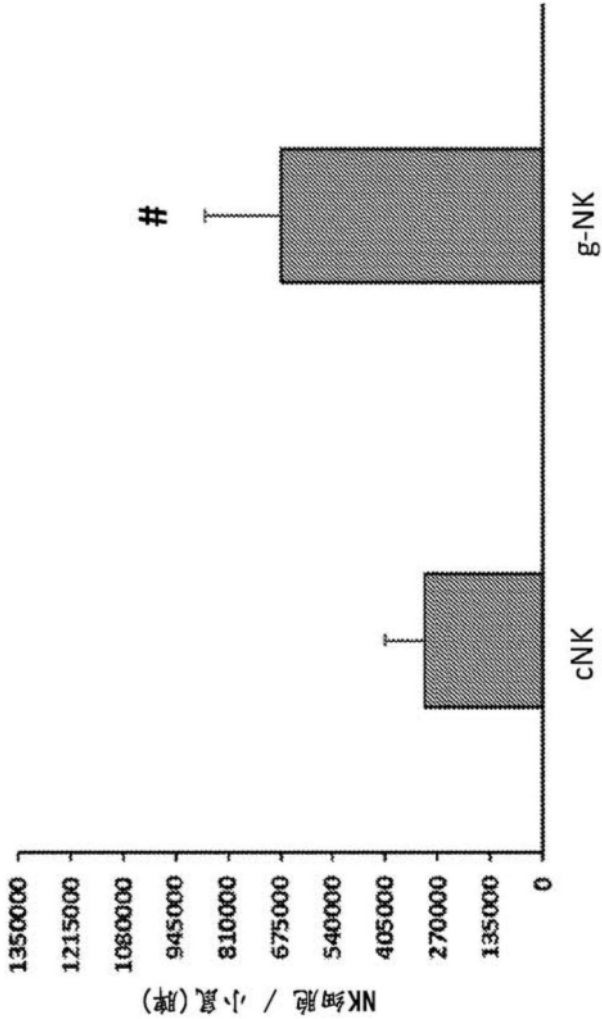


FIG.16B

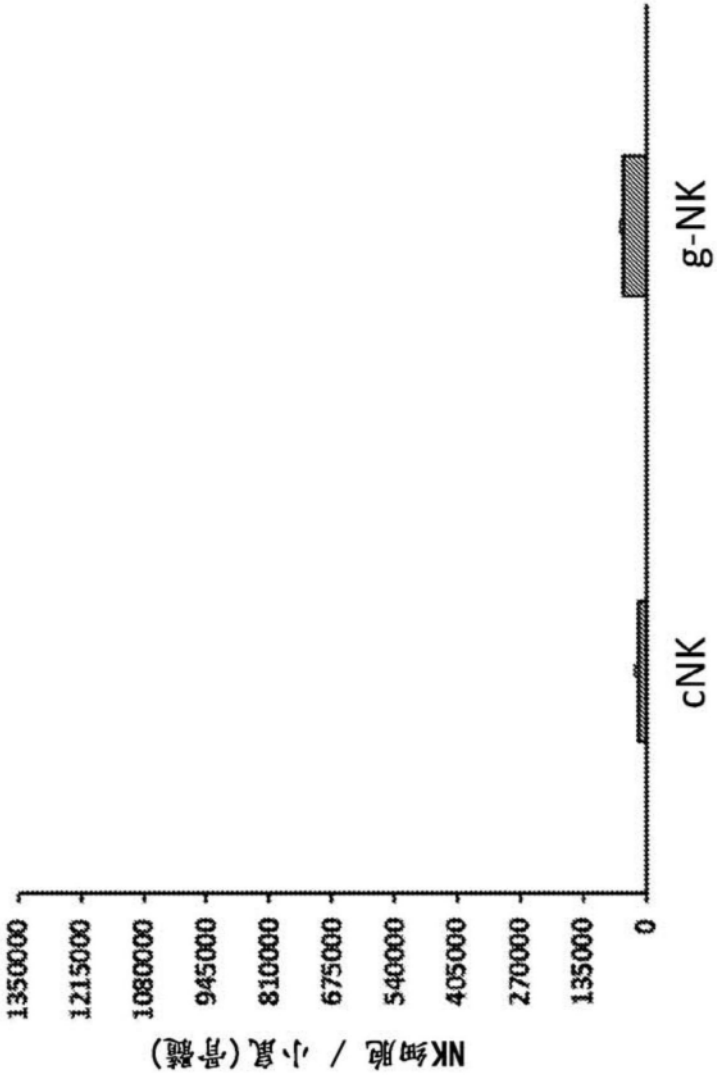


FIG.16C

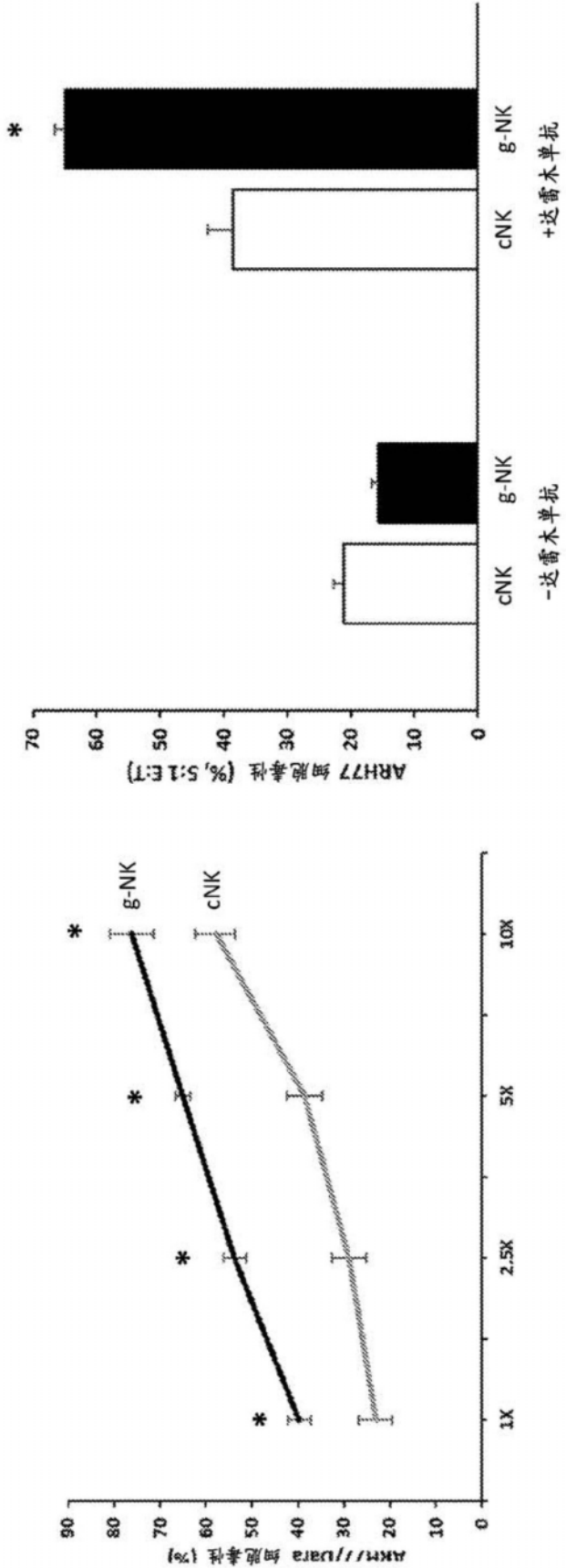


FIG.17A

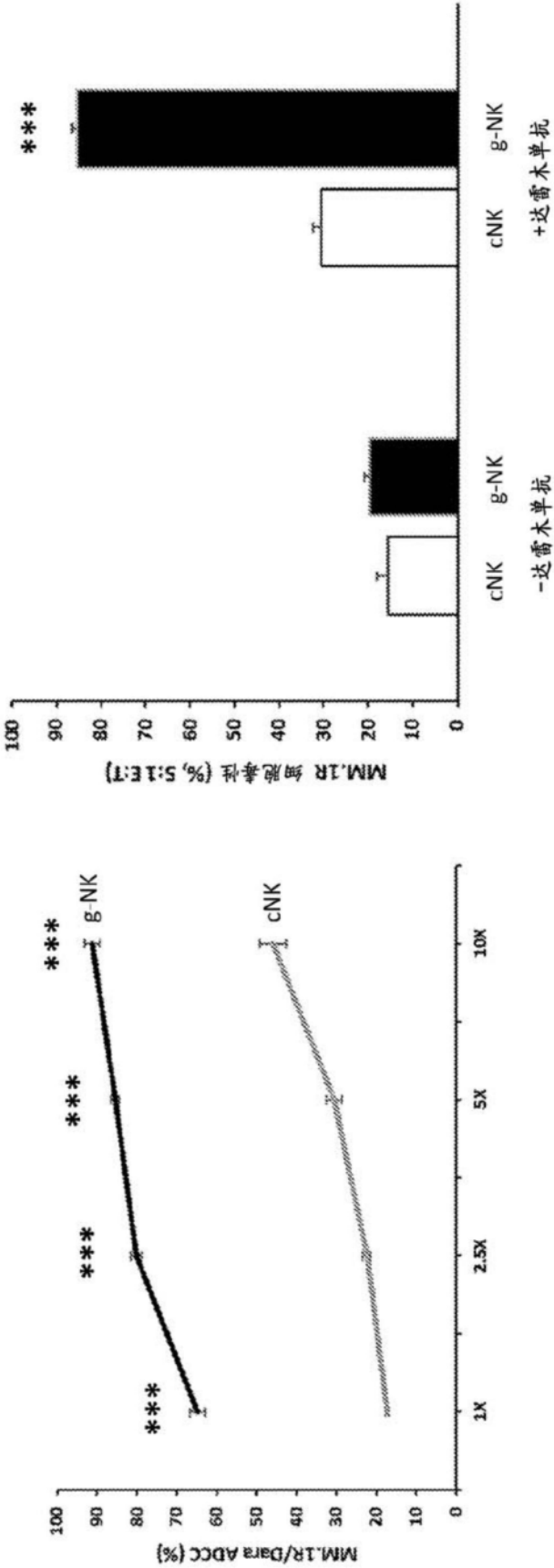


FIG. 17B

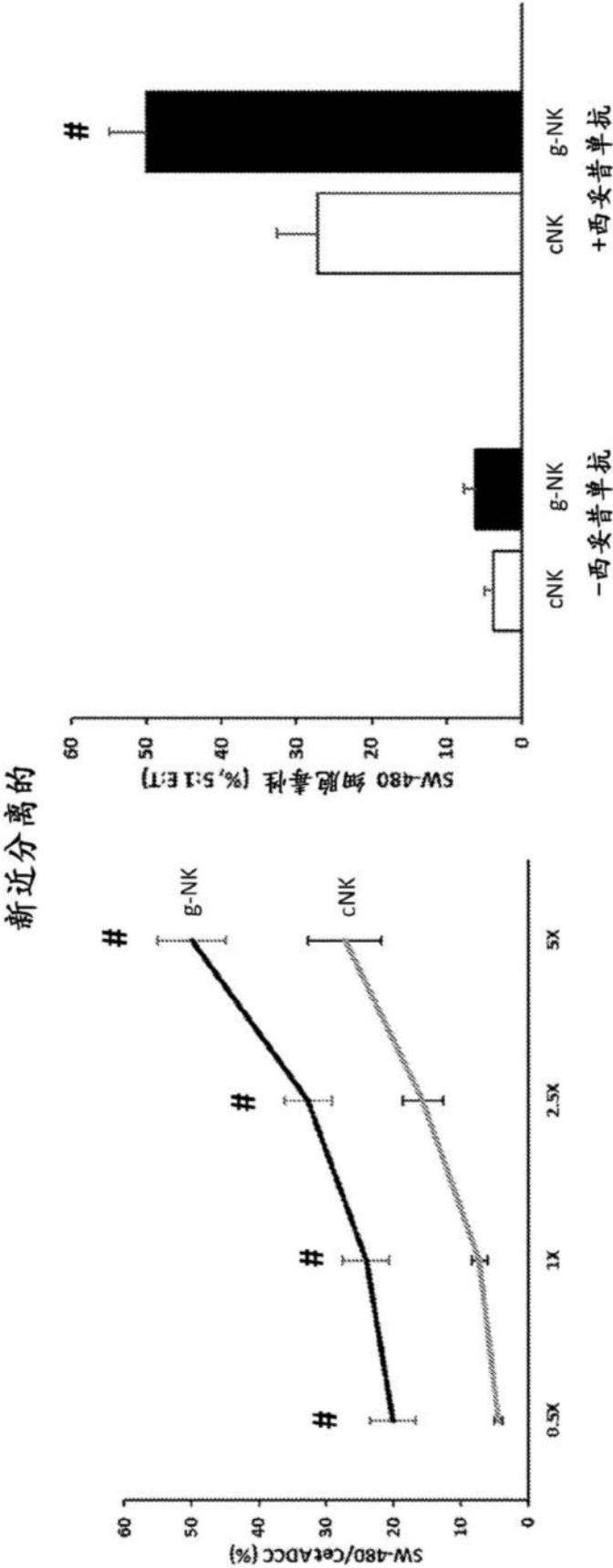


FIG.18A

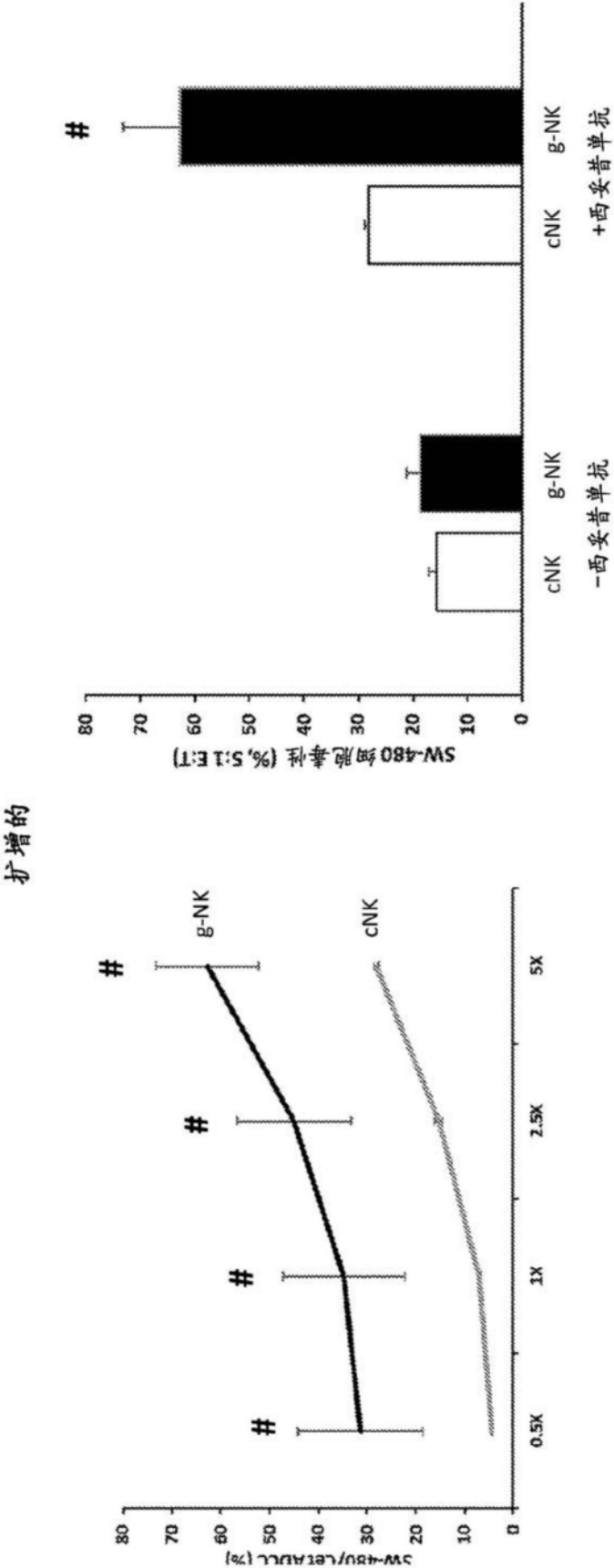


FIG.18B

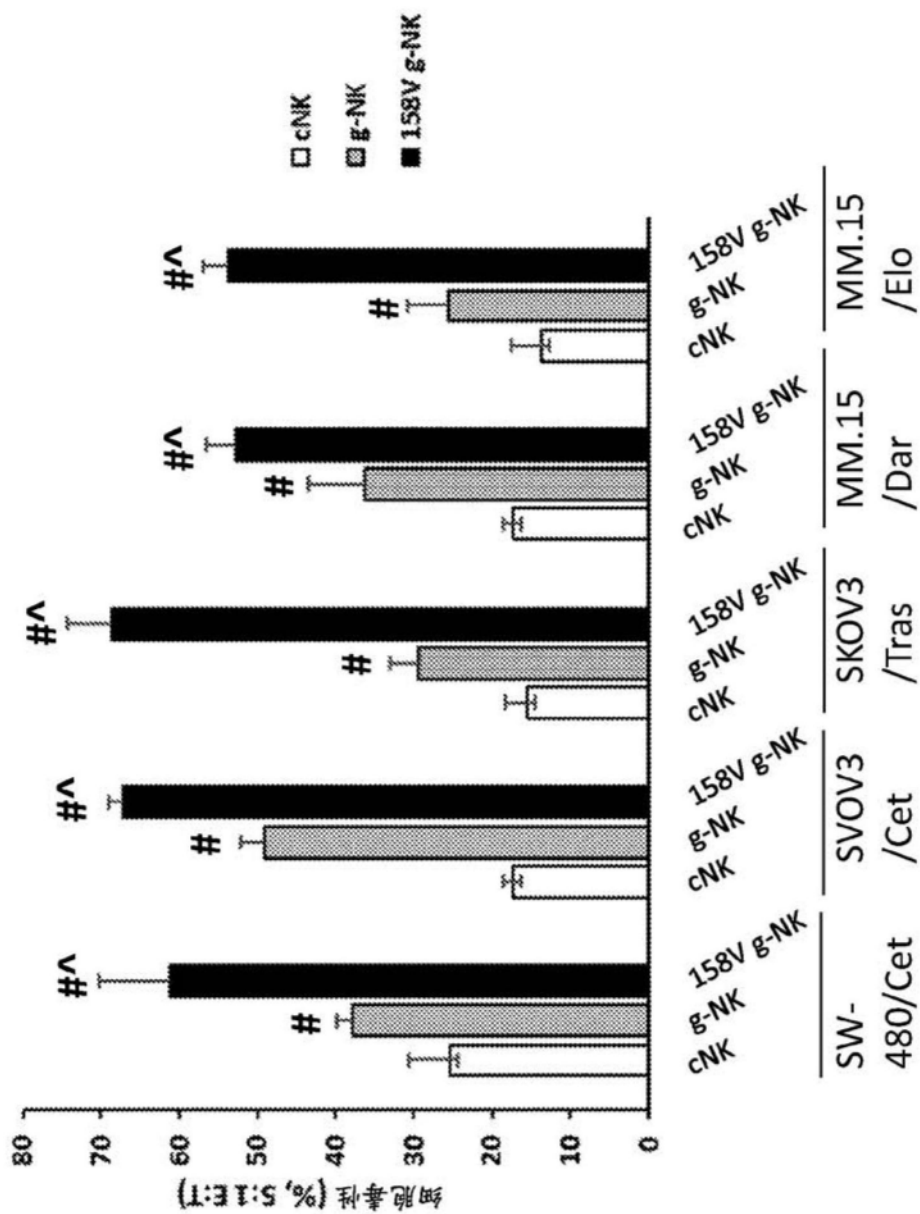


FIG.19

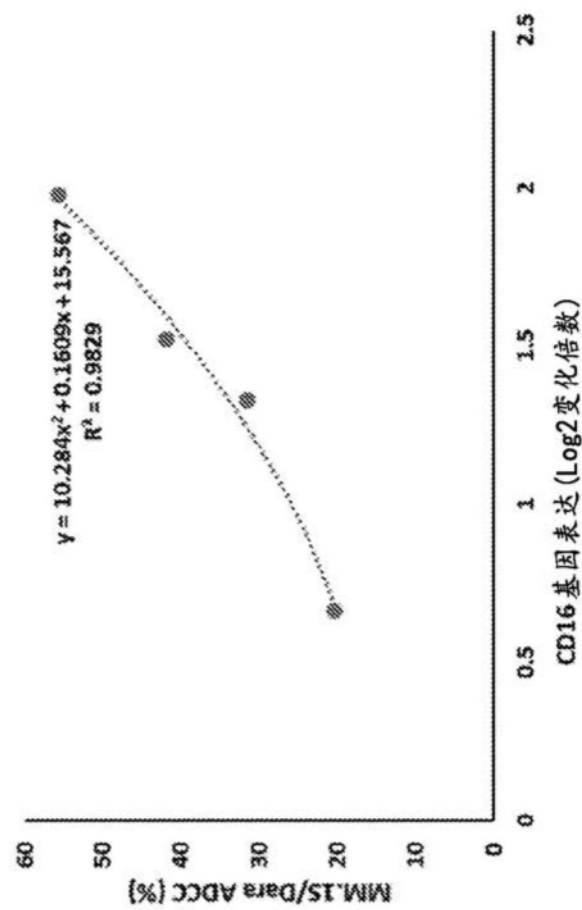


FIG. 20A

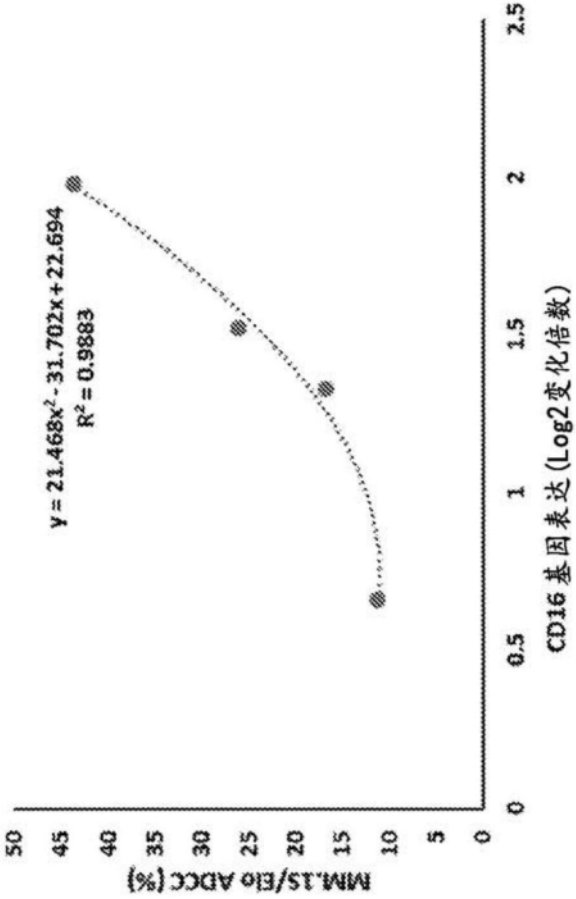


FIG.20B

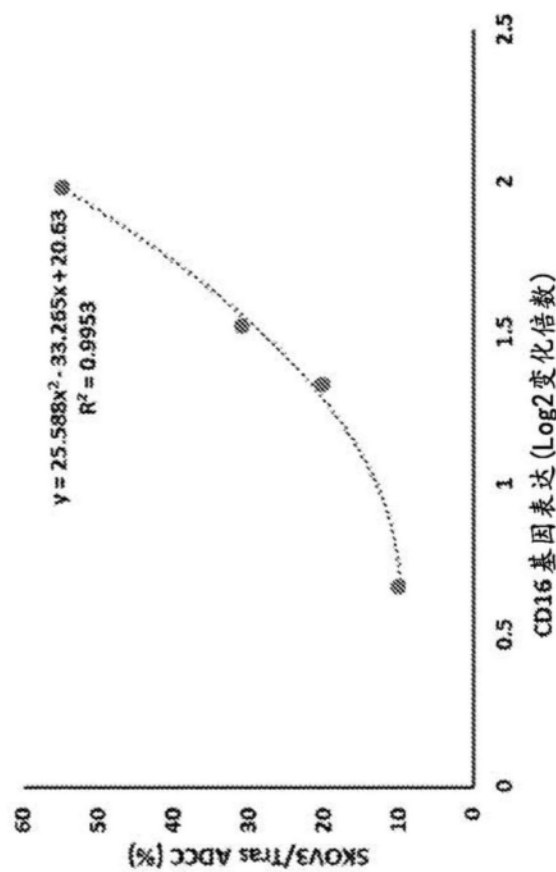


FIG. 20C

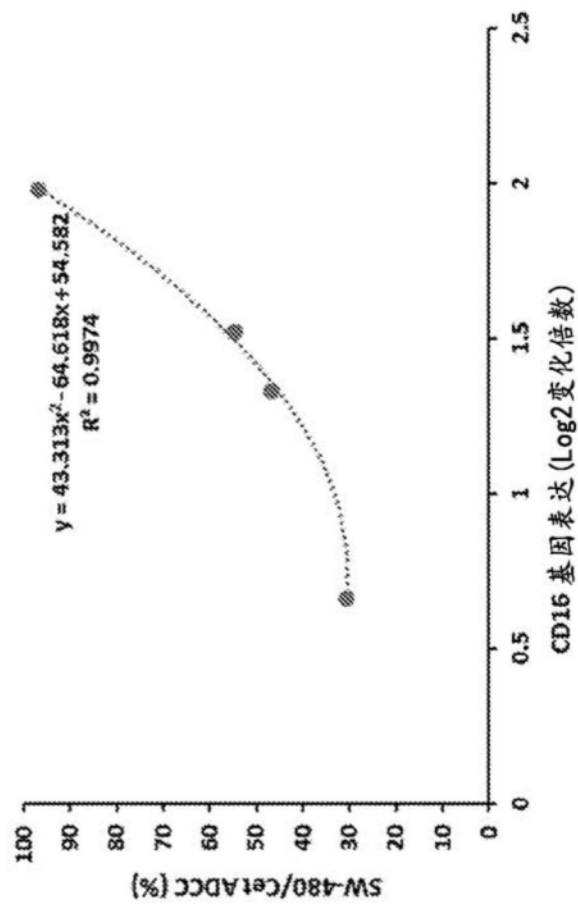


FIG.20D

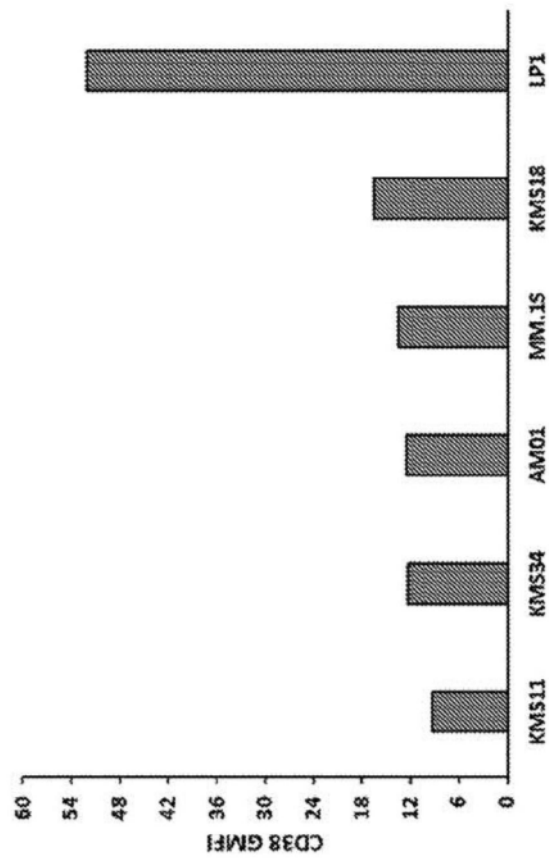


FIG.21A

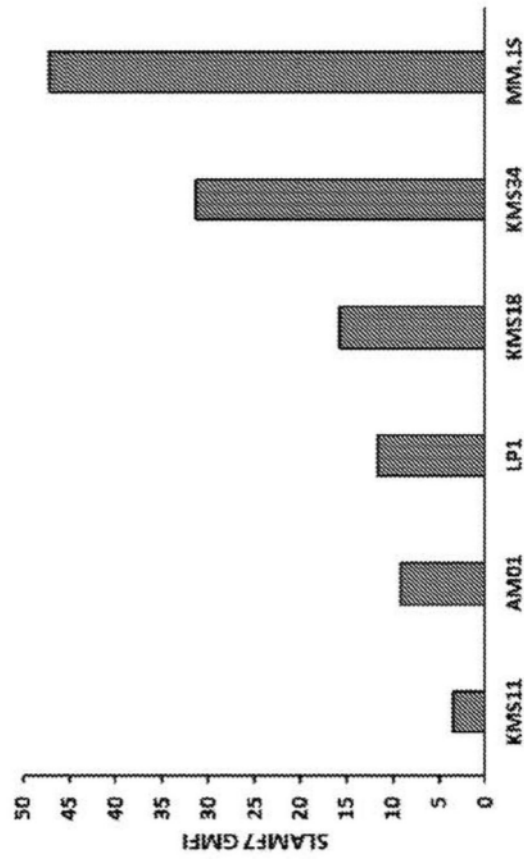


FIG.21B

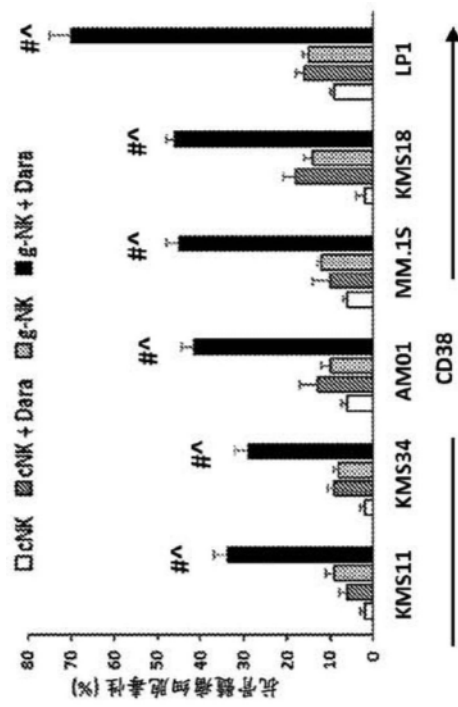


FIG.22A

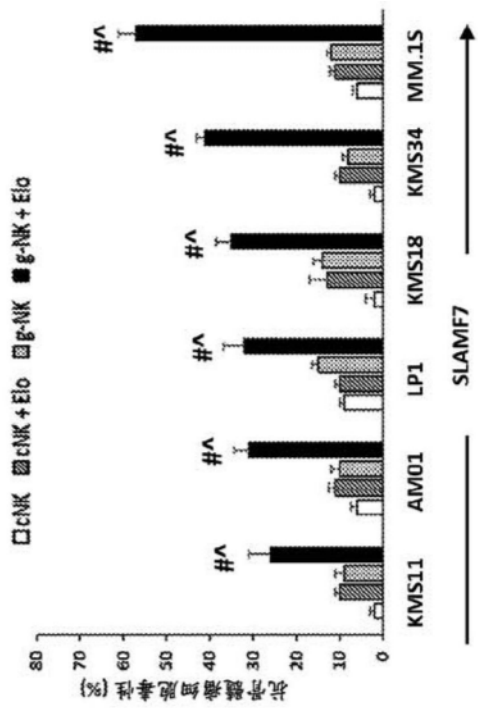


FIG. 22B

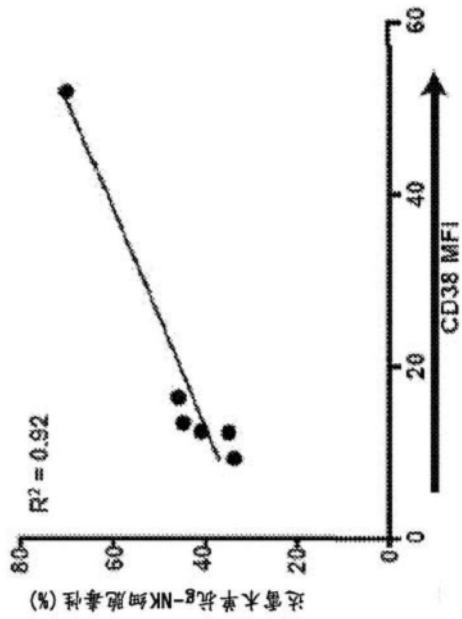


FIG. 22C

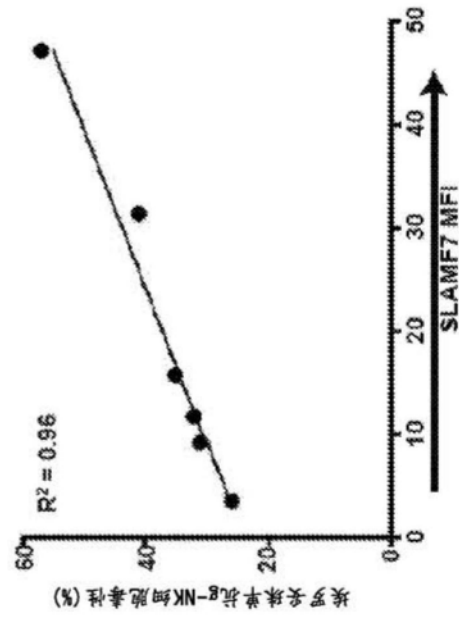


FIG. 22D

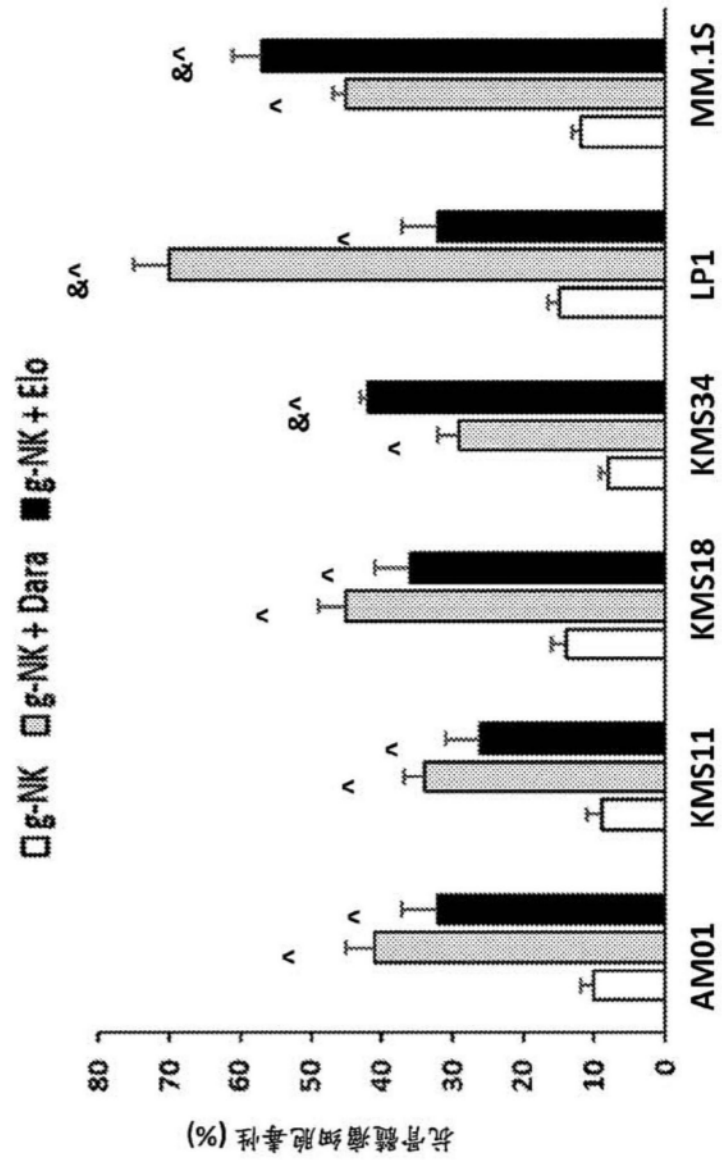


FIG. 22E

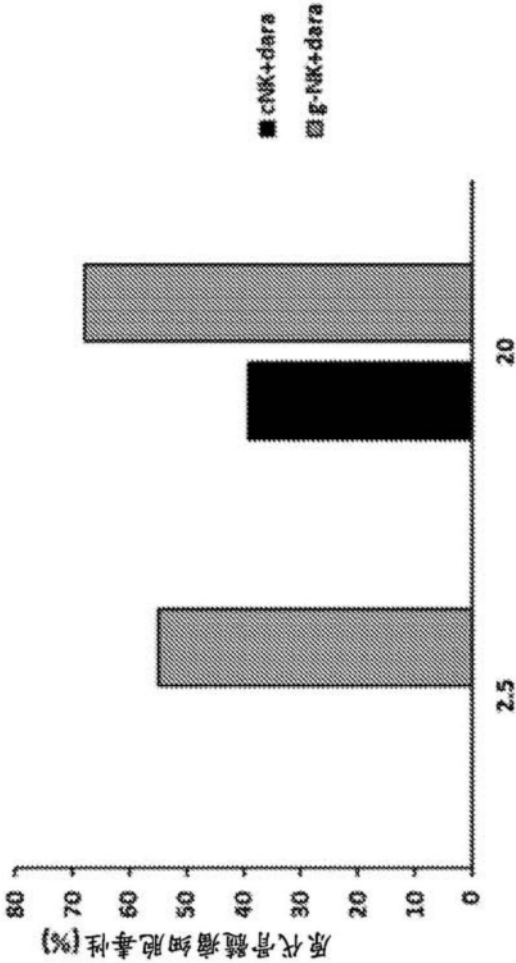


FIG. 22F

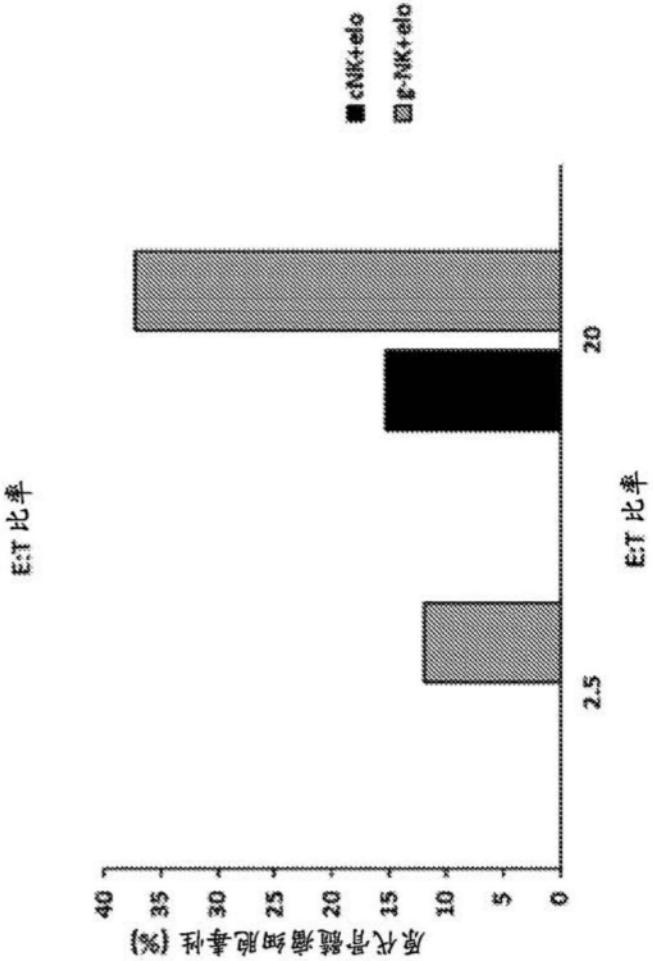


FIG. 22G

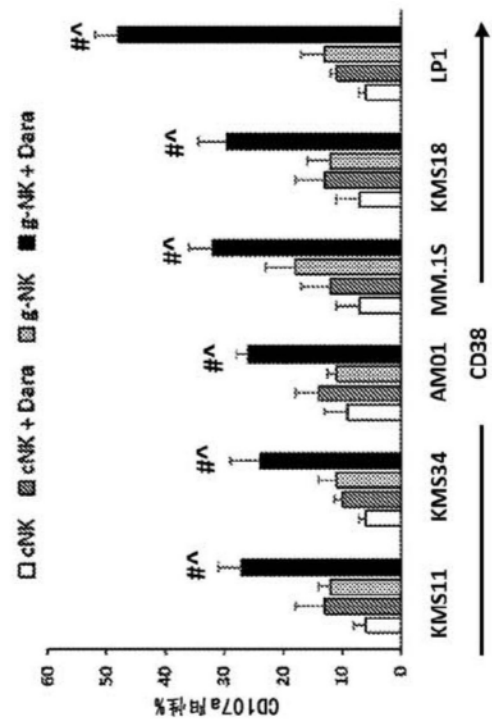


FIG. 23A

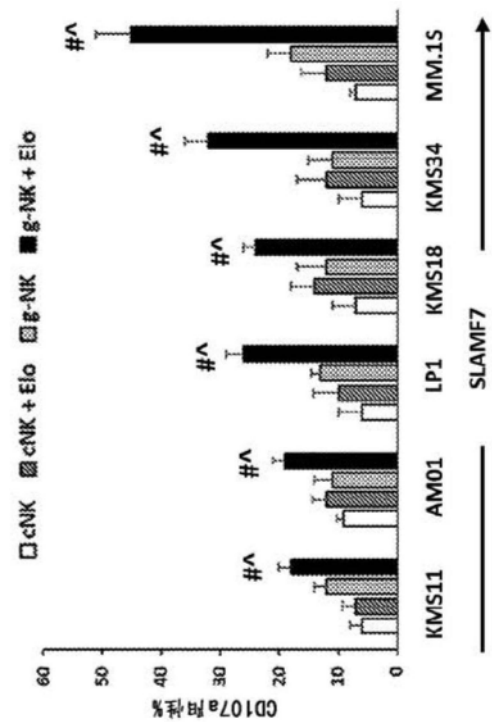


FIG. 23B

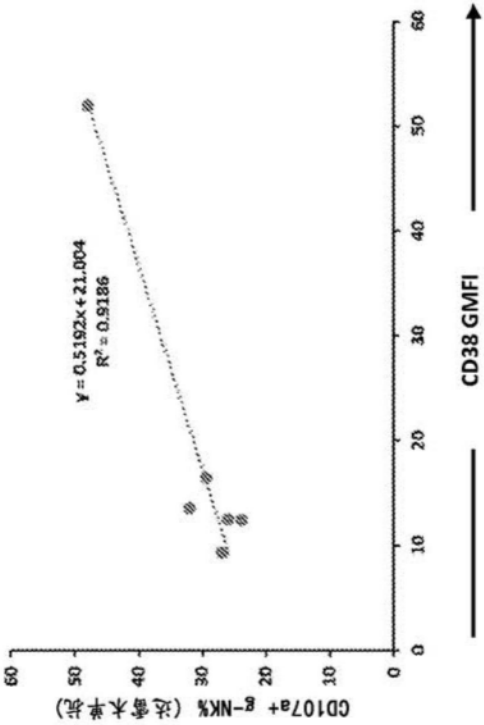


FIG.23C

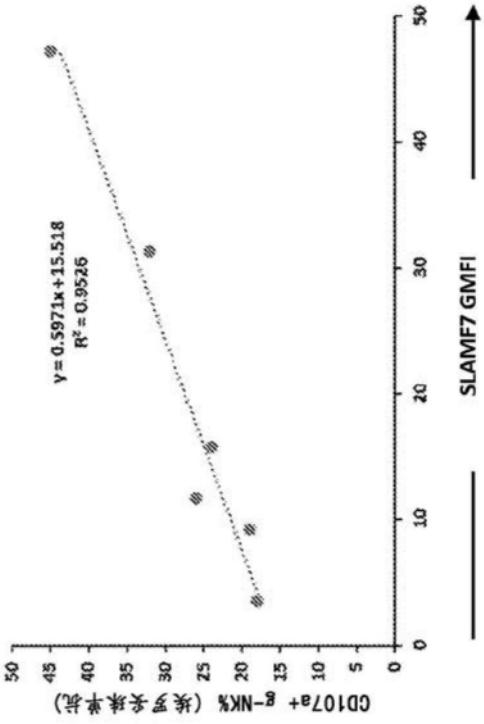


FIG.23D

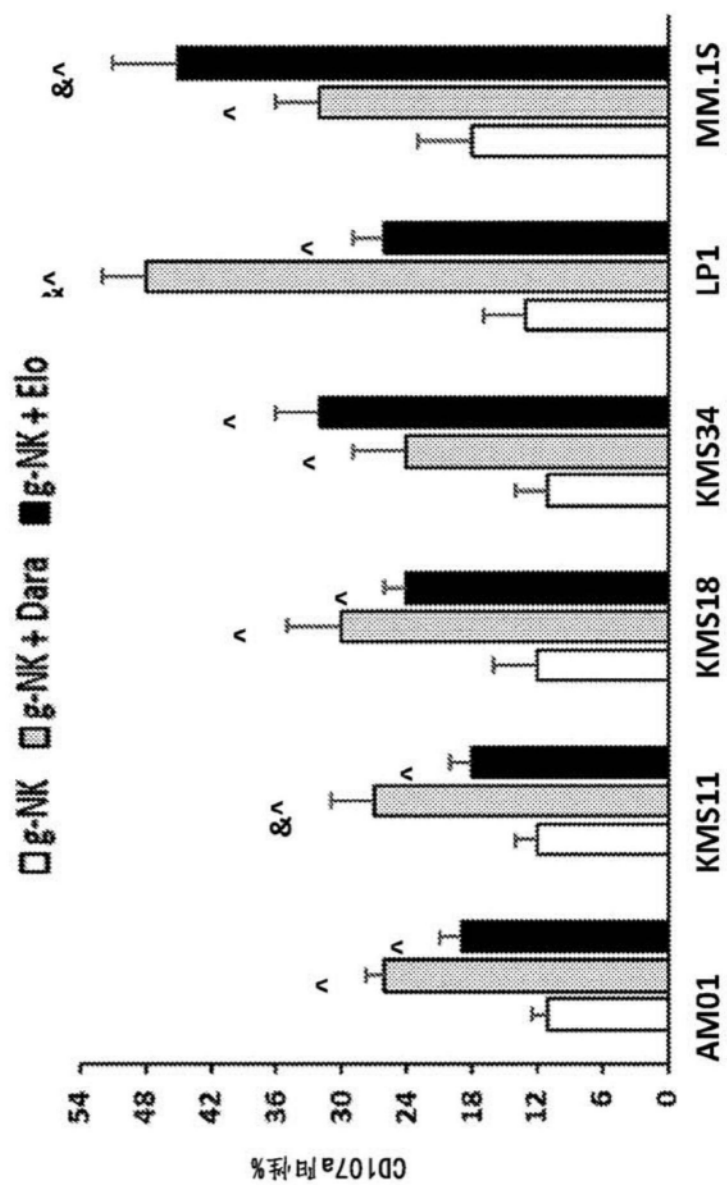


FIG. 23E

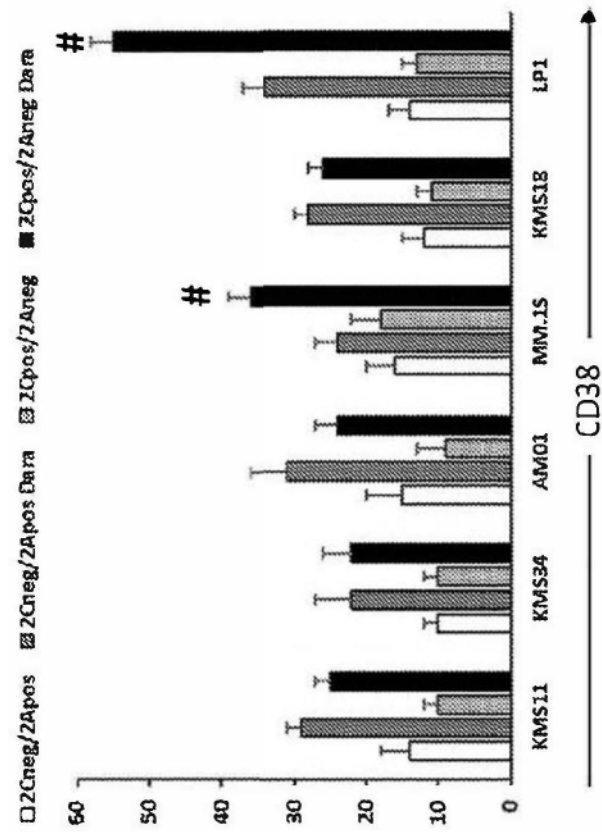


FIG. 23F

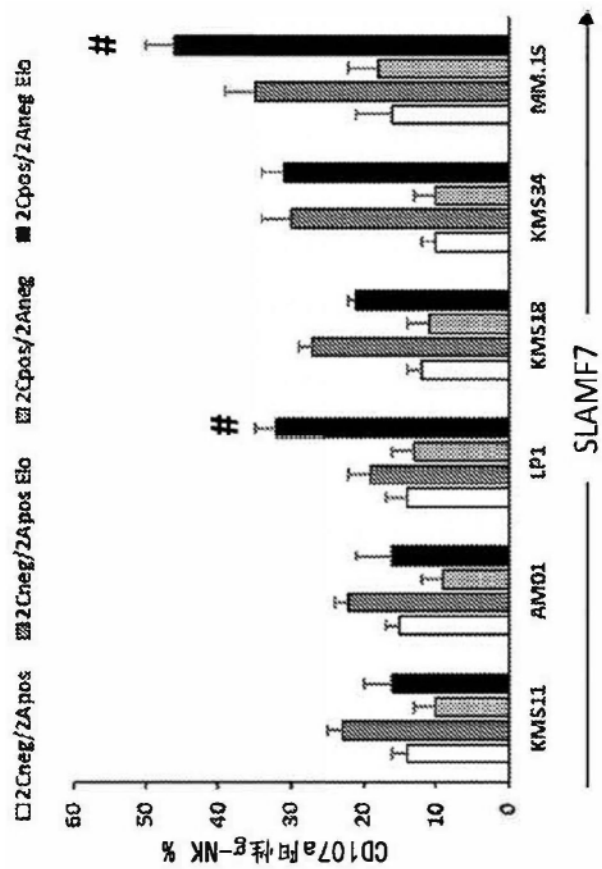


FIG.23G

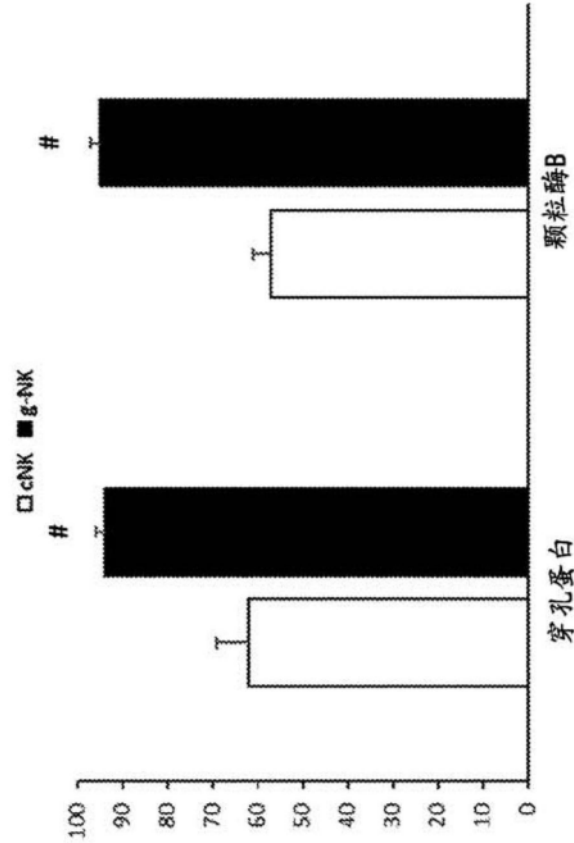


FIG. 24A

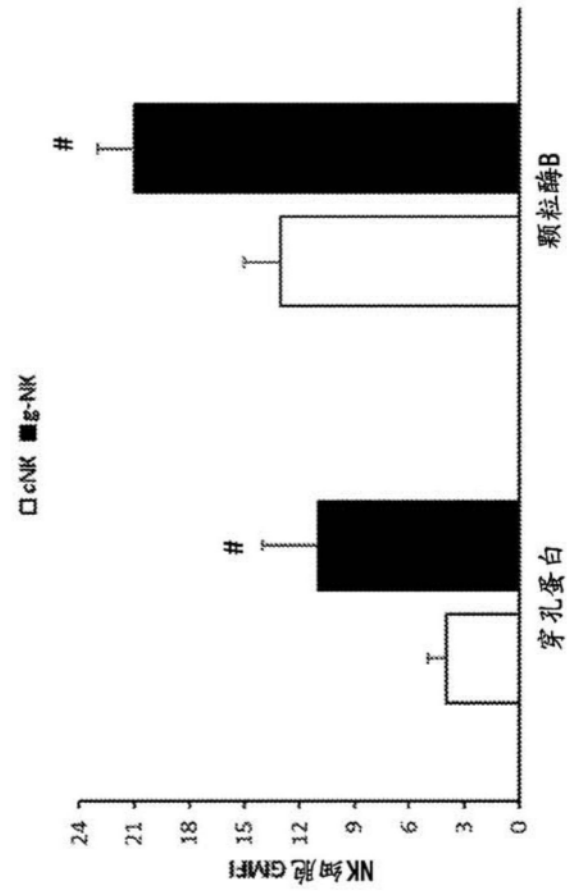


FIG.24B

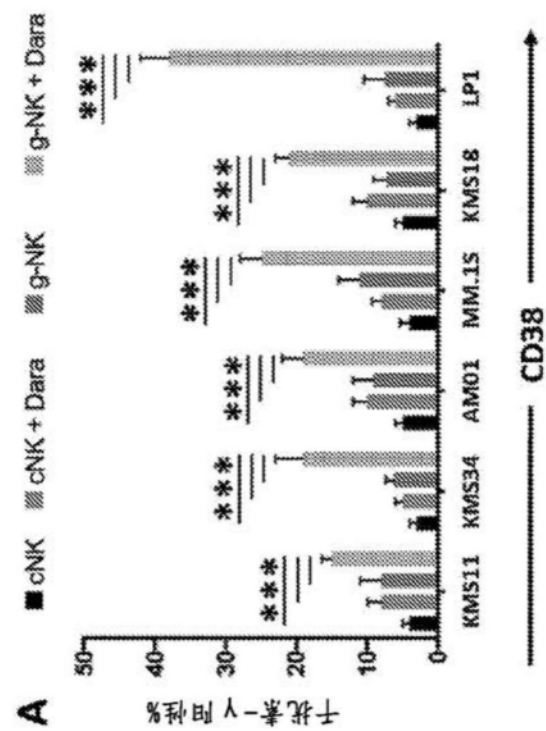


FIG. 25A

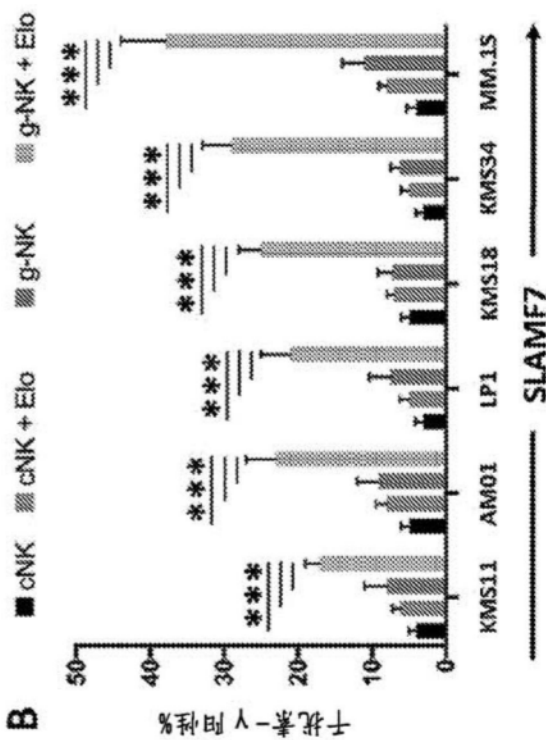


FIG. 25B

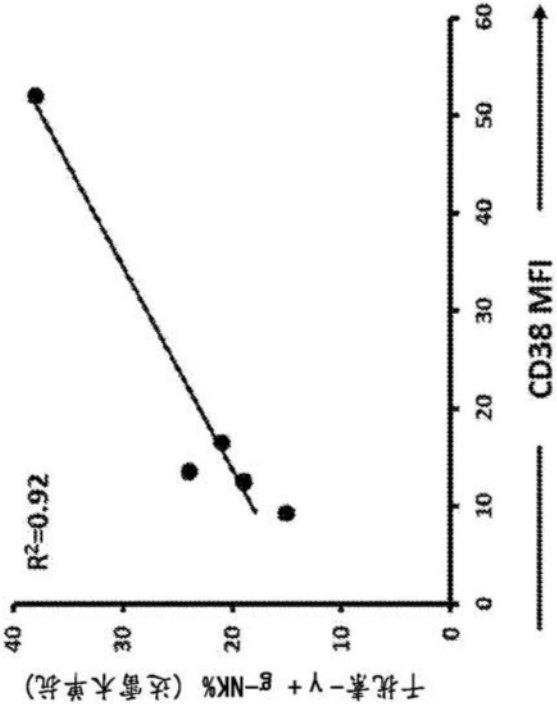


FIG.25C

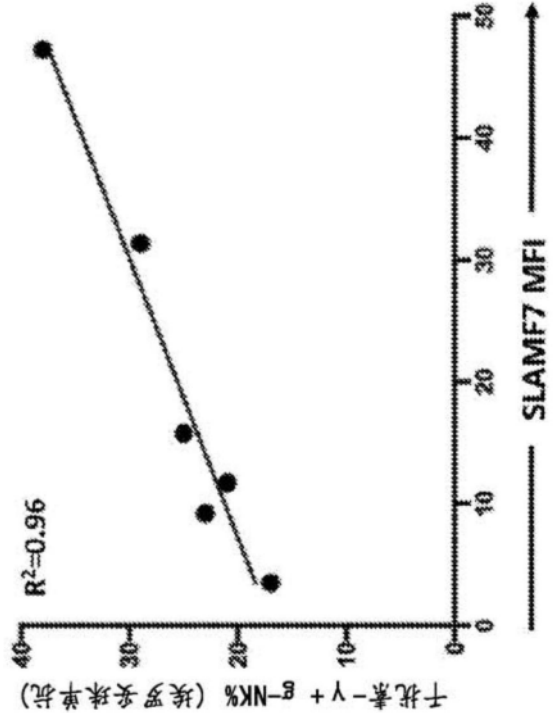


FIG.25D

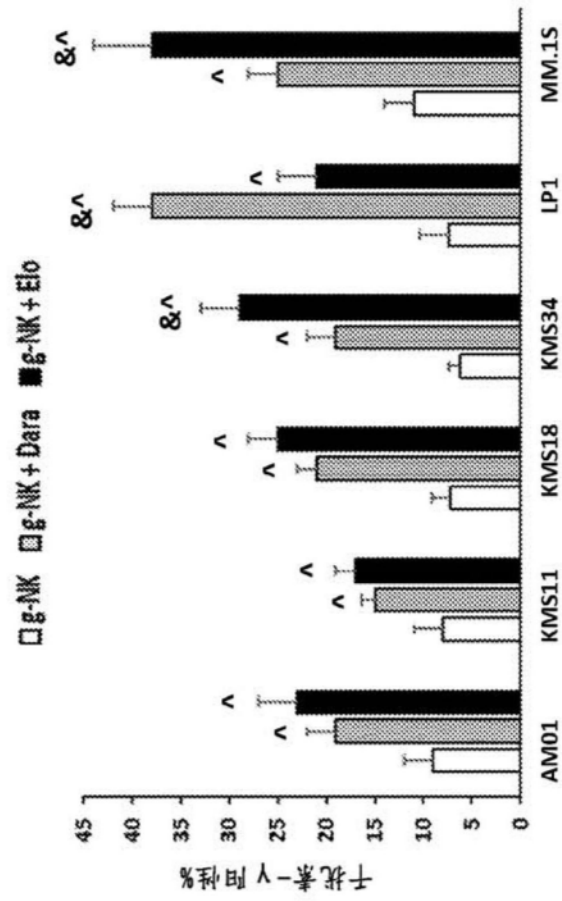


FIG.25E

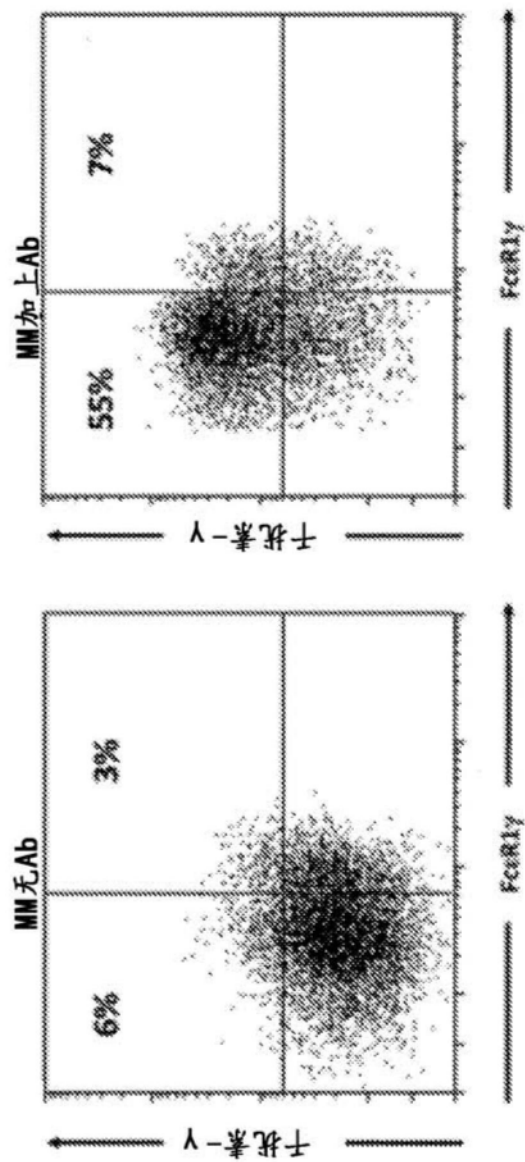


FIG.25F

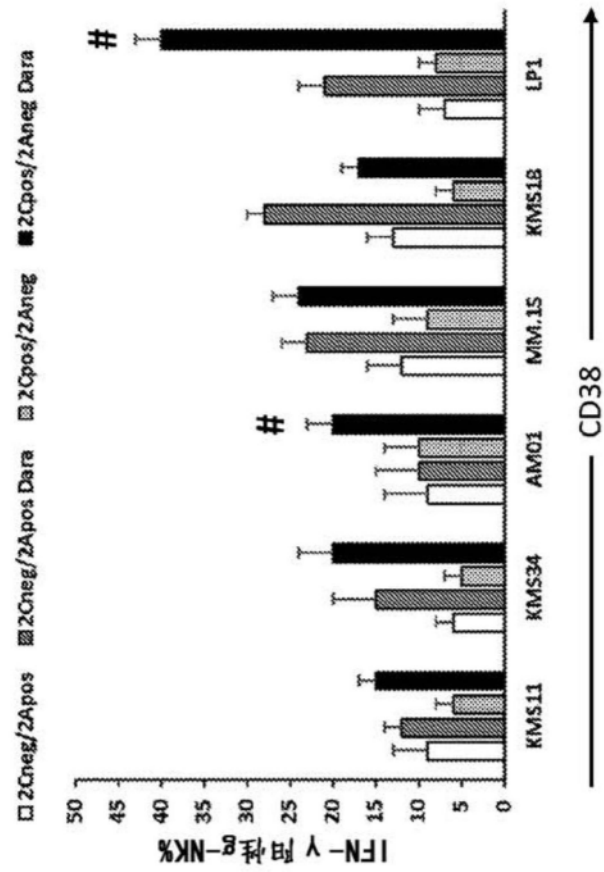


FIG.25G

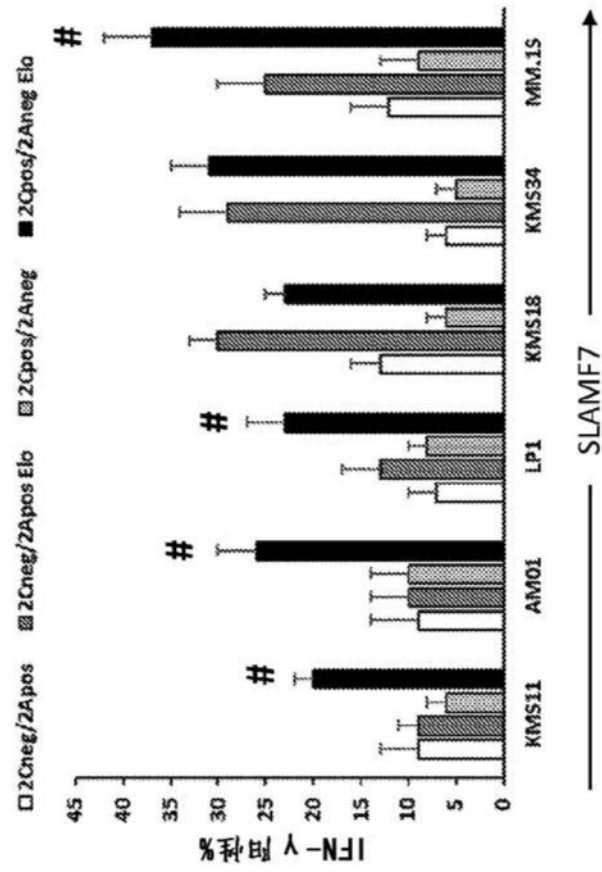


FIG.25H

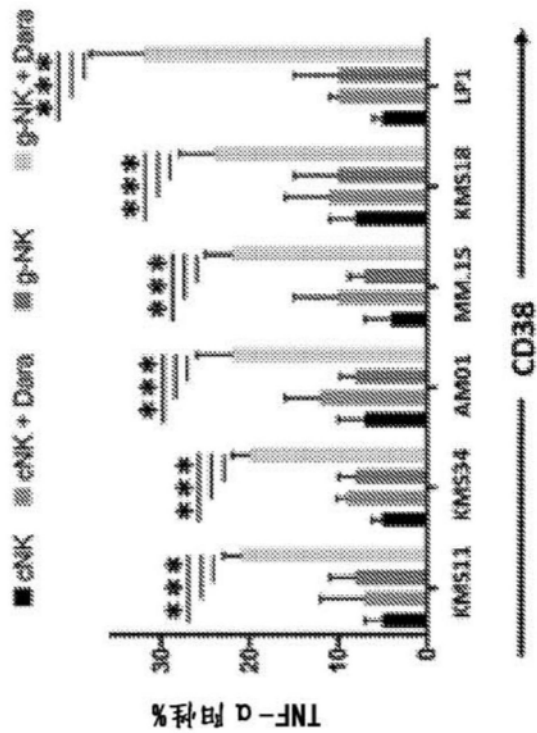


FIG. 26A

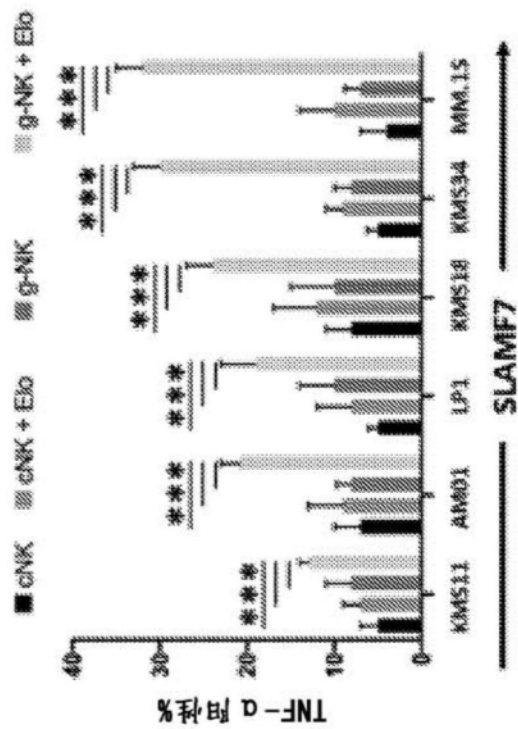


FIG. 26B

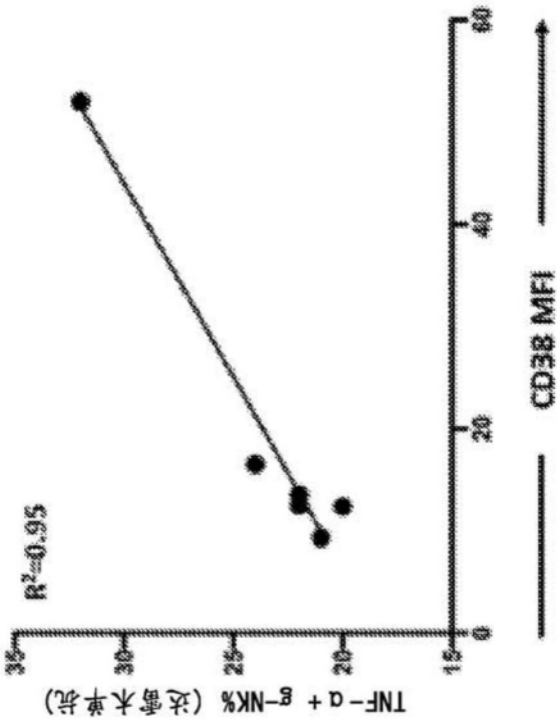


FIG.26C

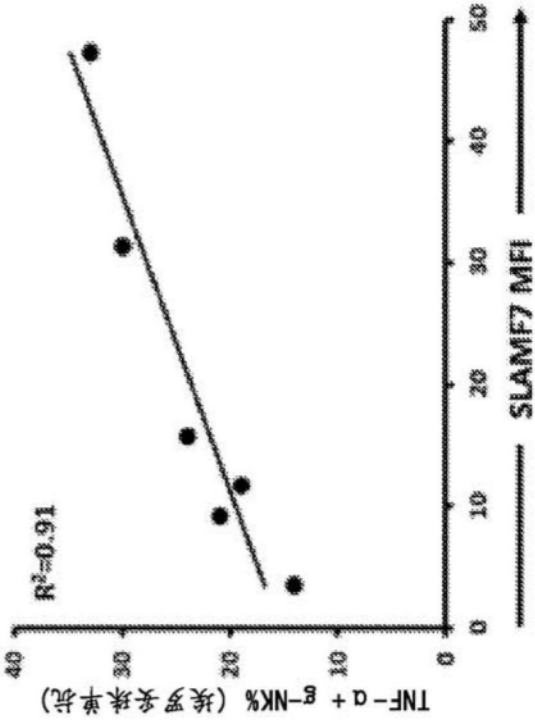


FIG.26D

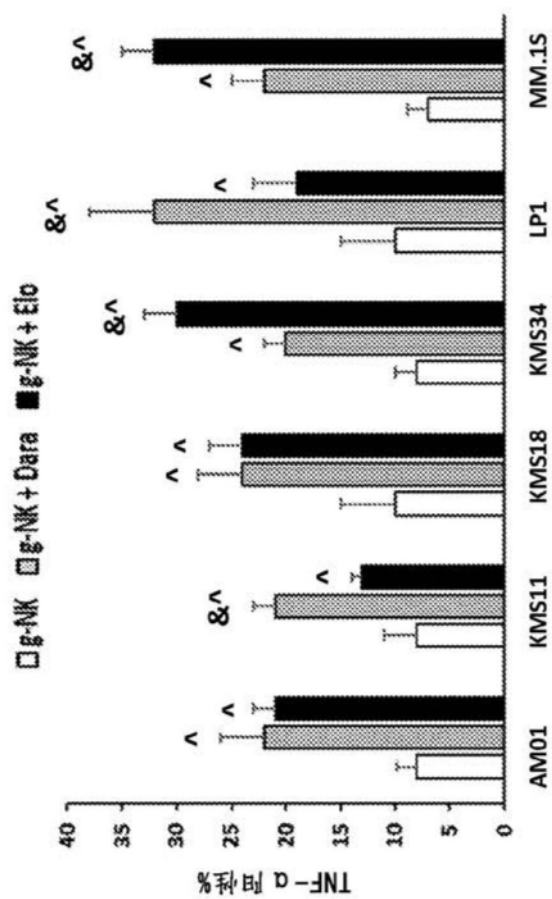


FIG. 26E

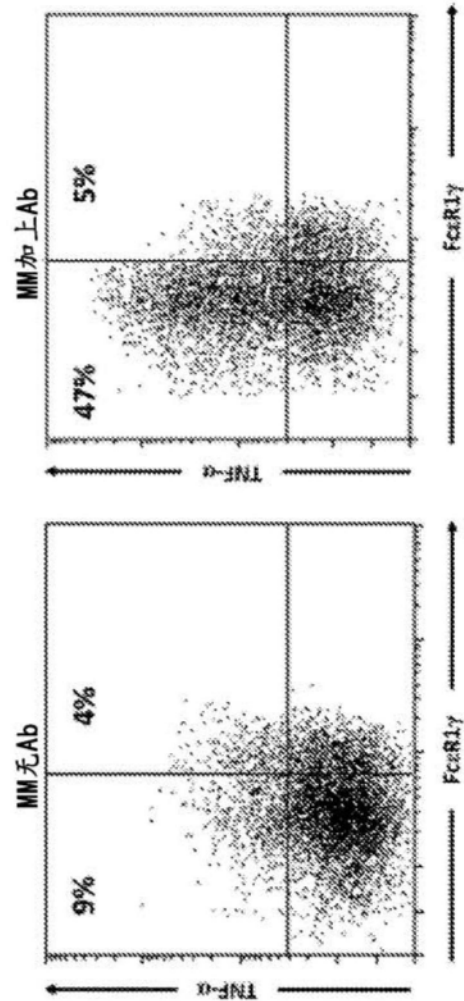


FIG. 26F

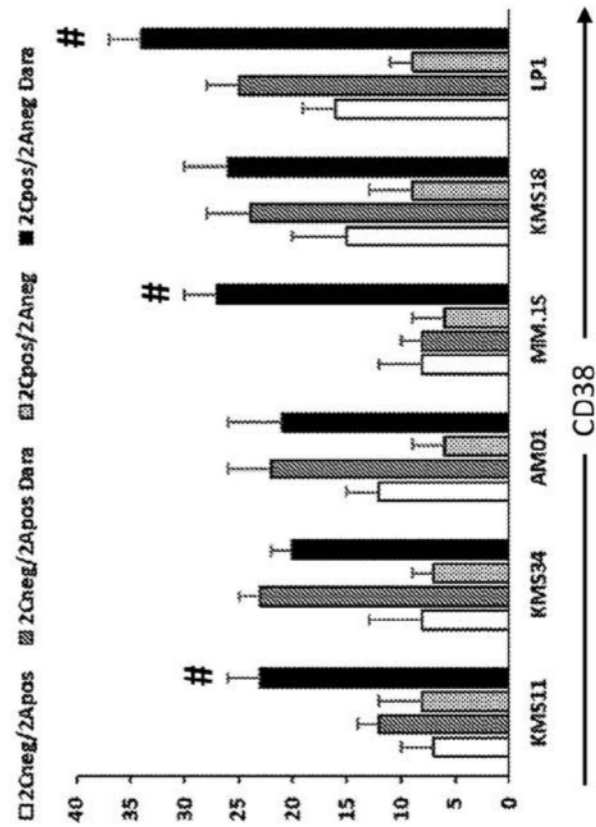


FIG.26G

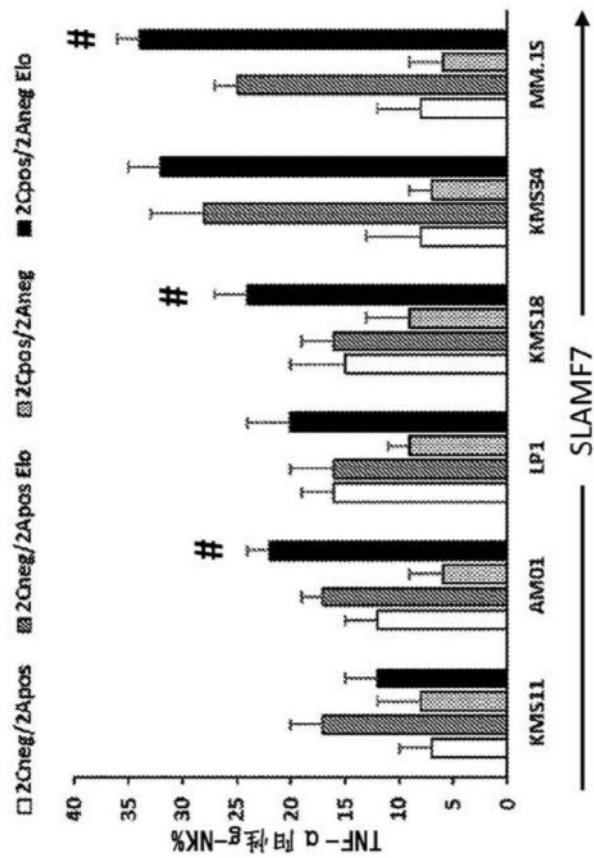


FIG.26H

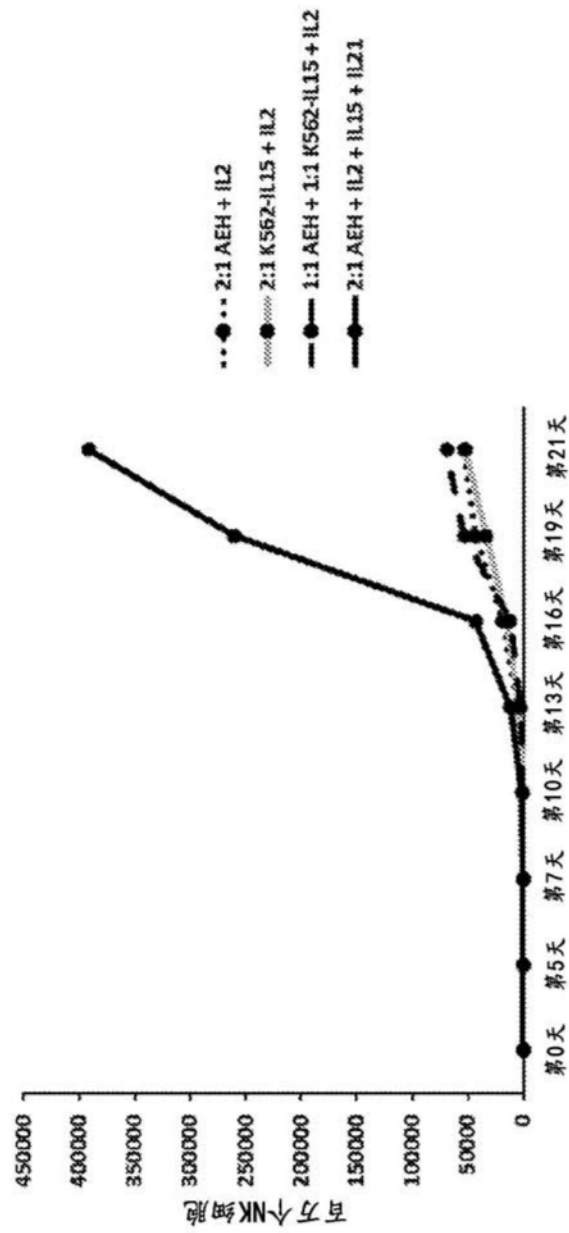


FIG.27A

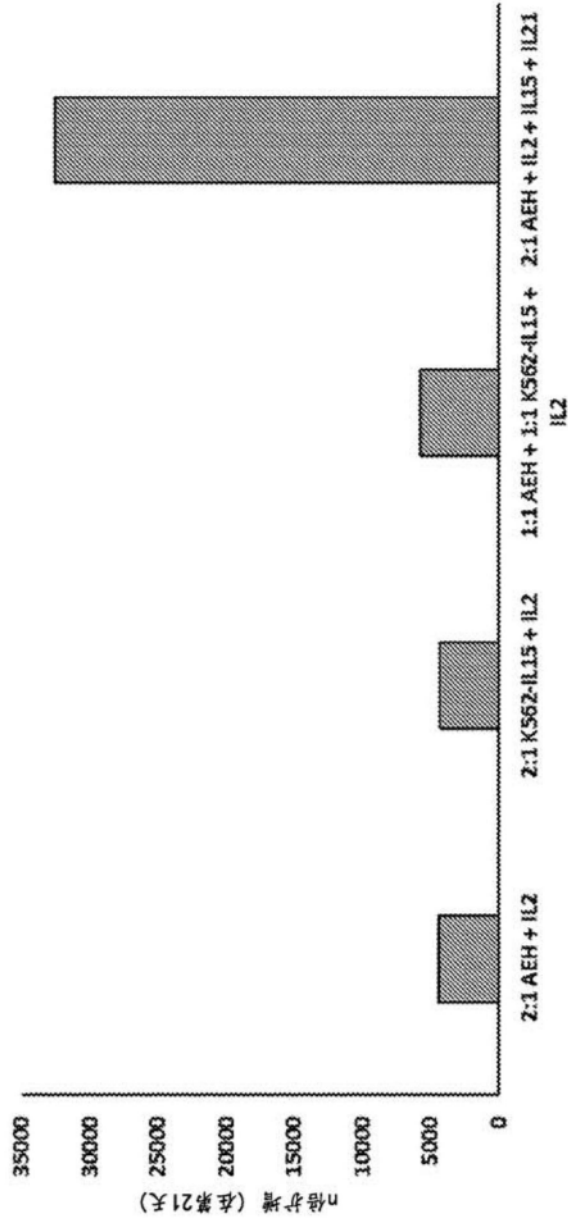


FIG.27B

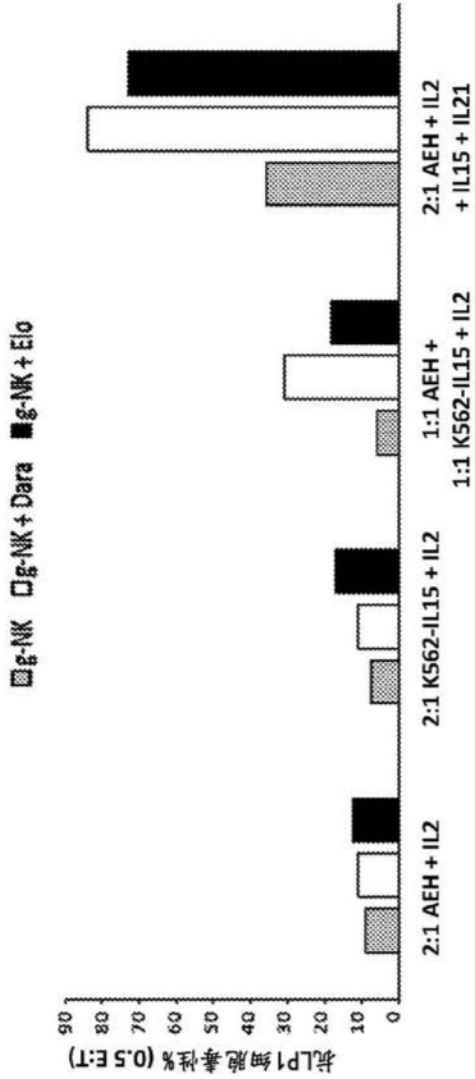


FIG. 28A

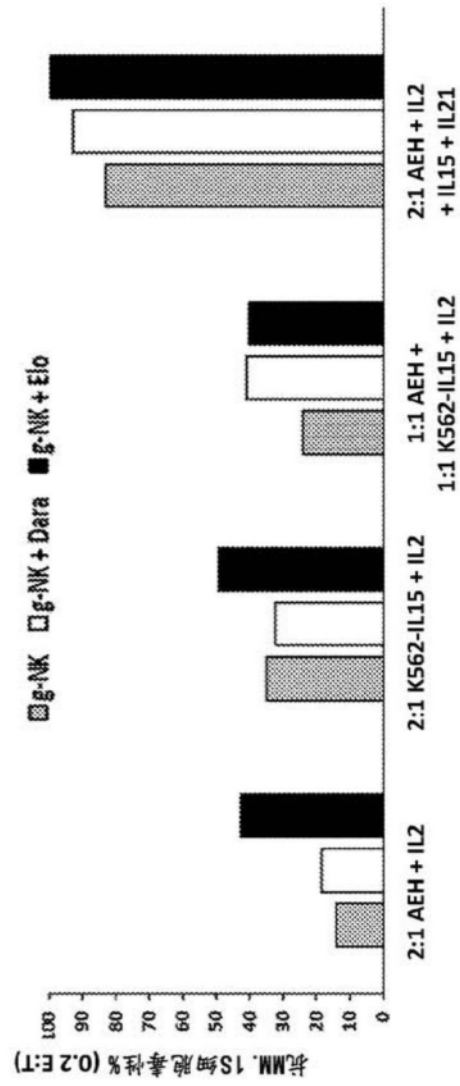


FIG. 28B

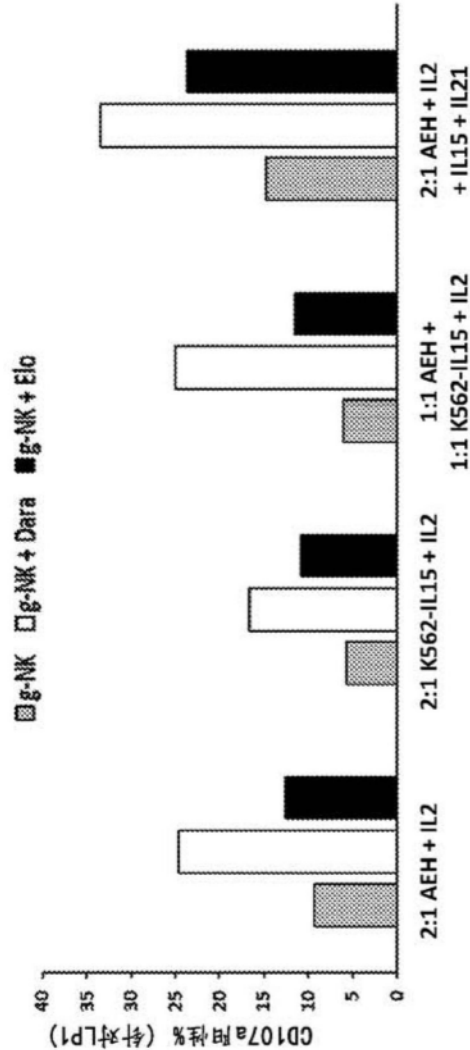


FIG. 29A

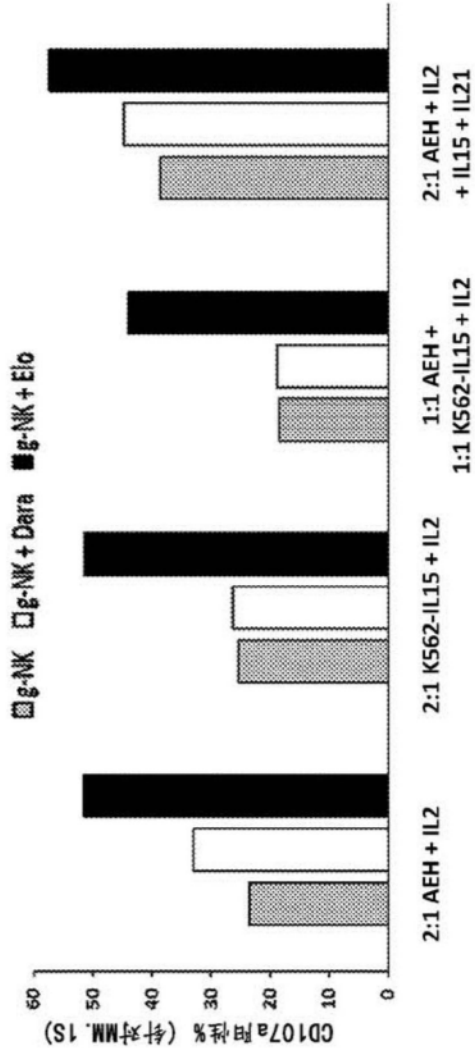


FIG. 29B

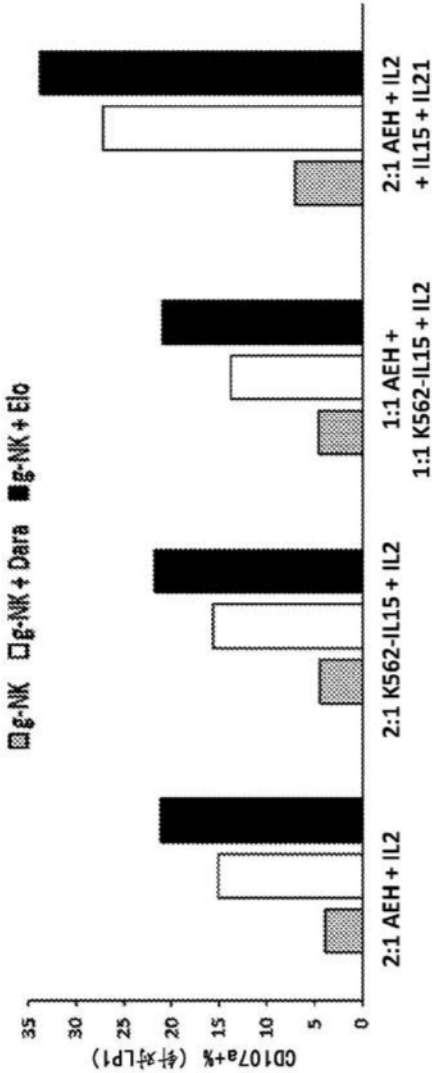


FIG. 29C

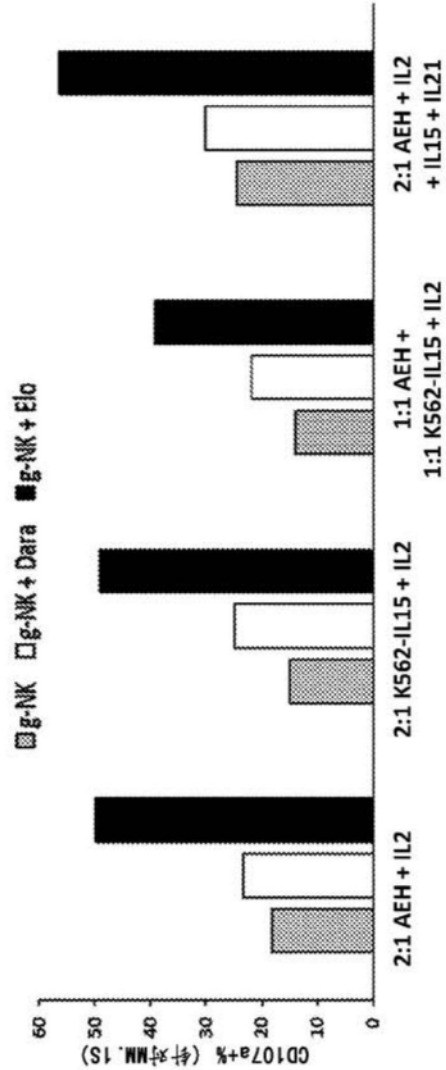


FIG. 29D

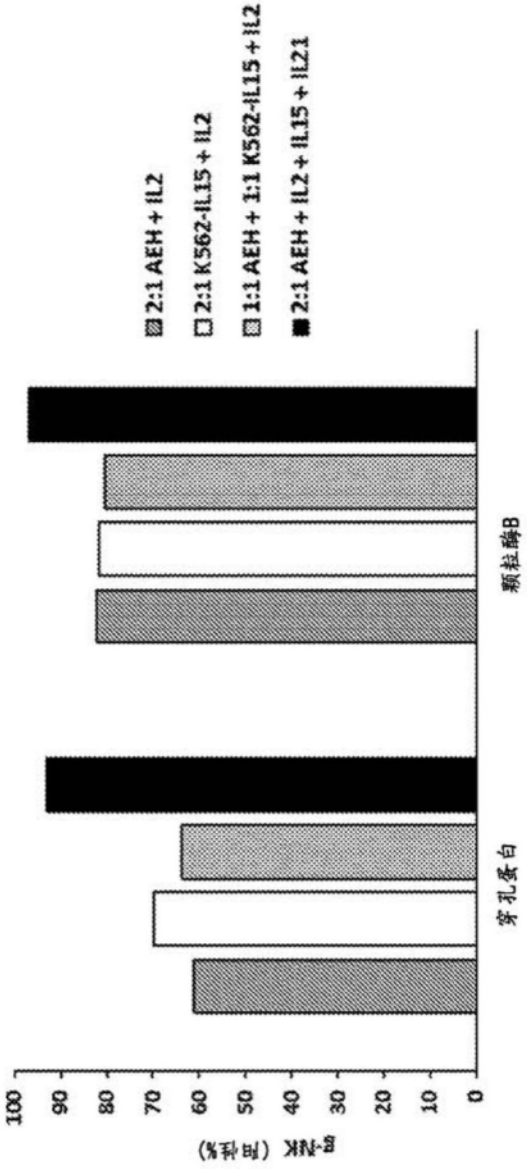


FIG. 30A

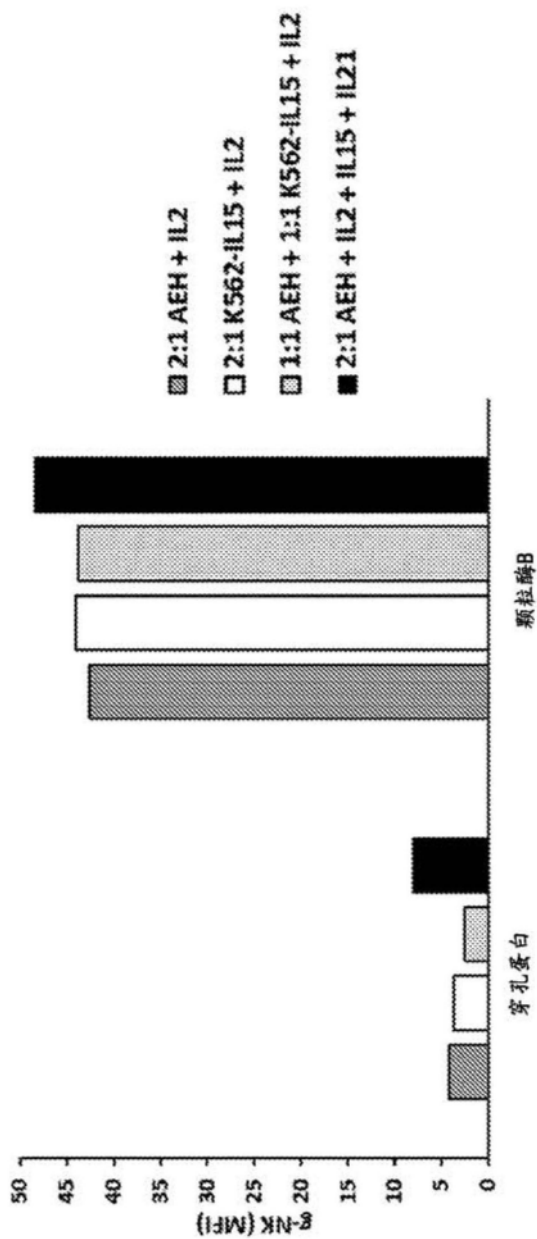


FIG.30B

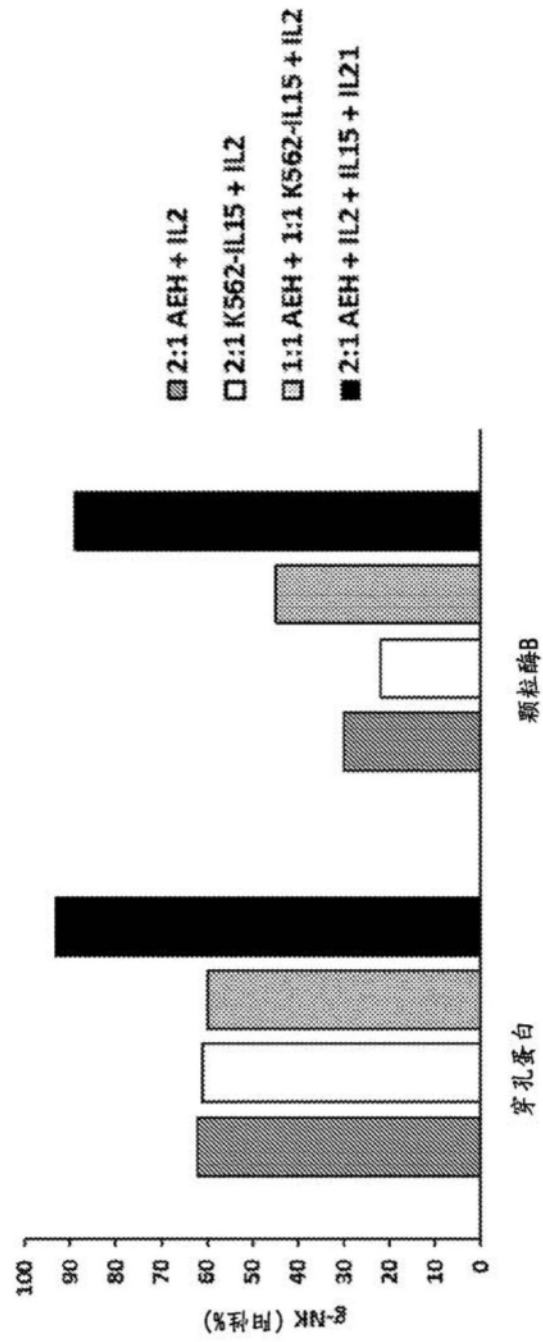


FIG.30C

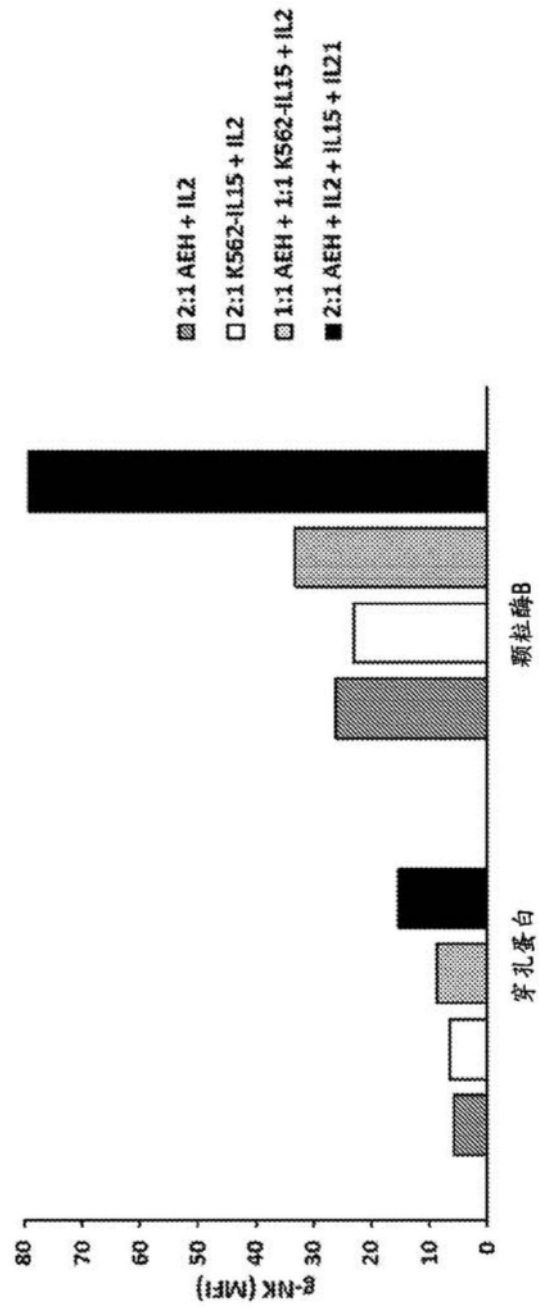


FIG.30D

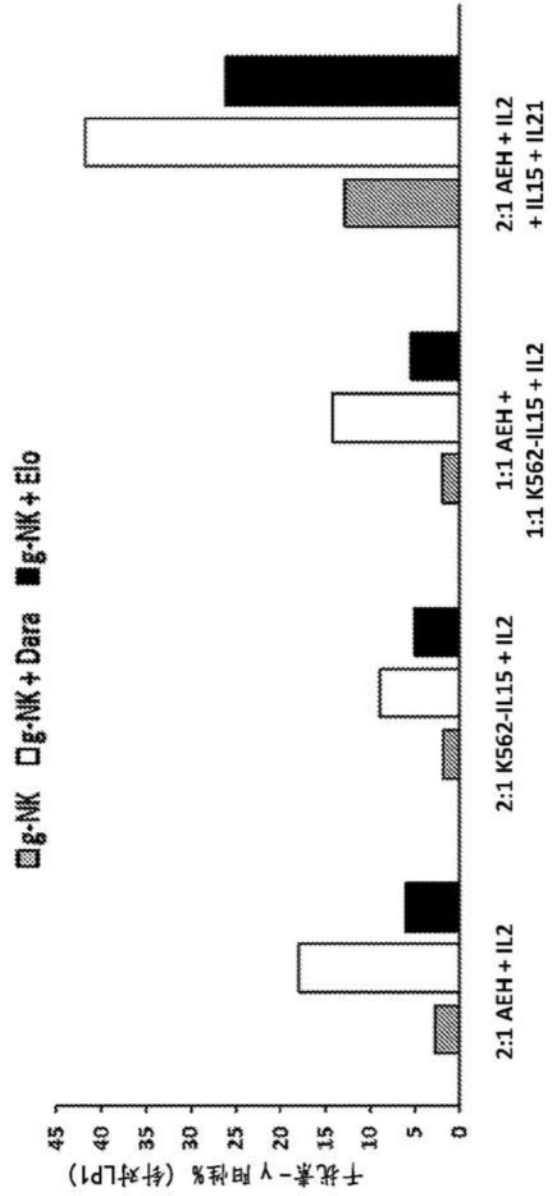


FIG.31A

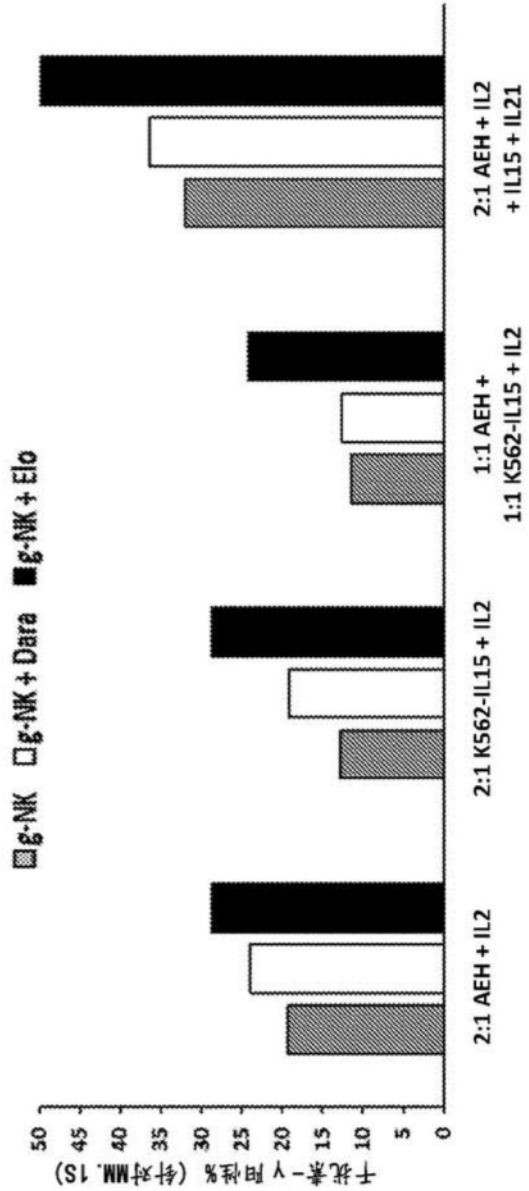


FIG.31B

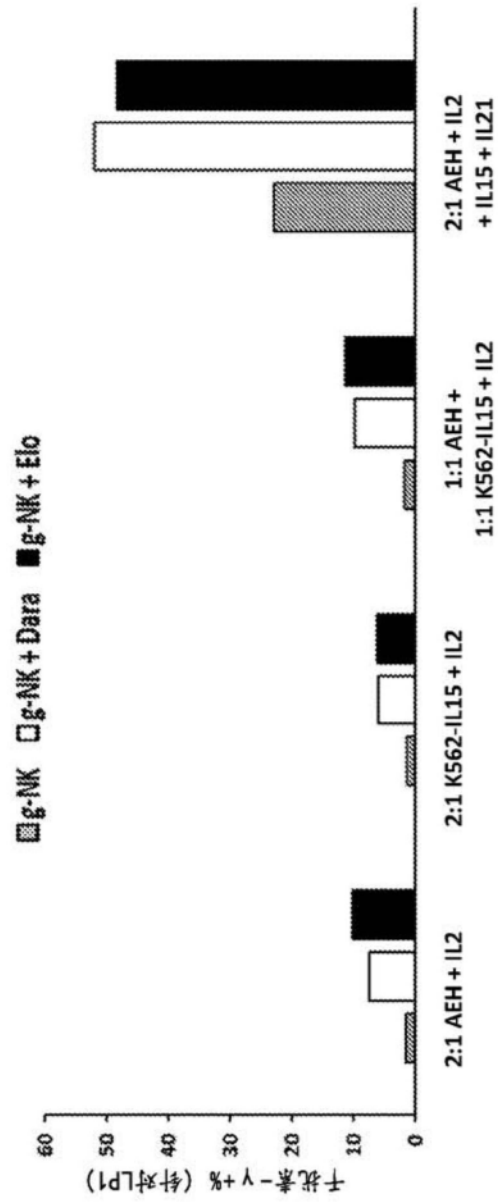


FIG.31C

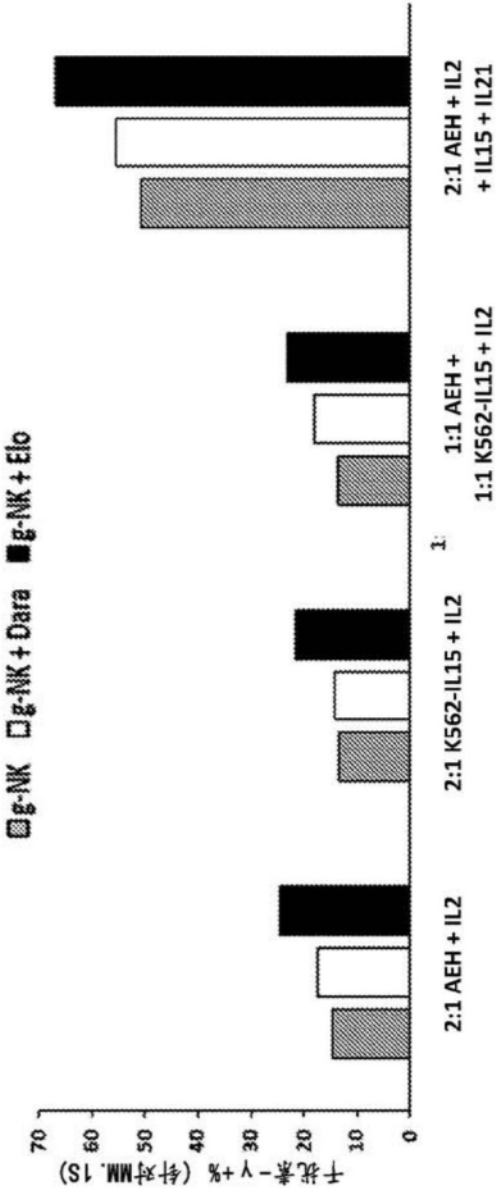


FIG.31D

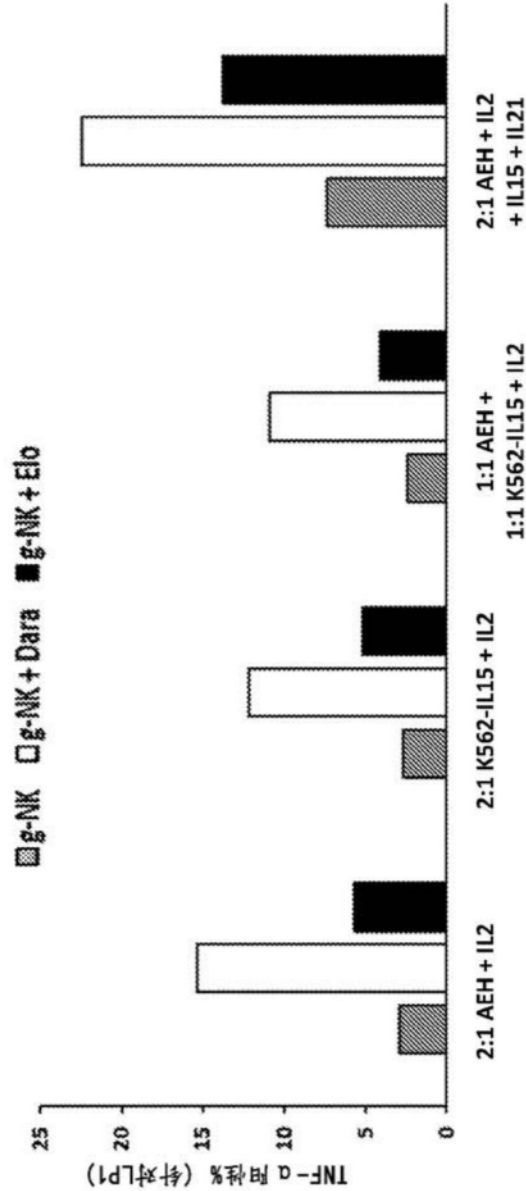


FIG.32A

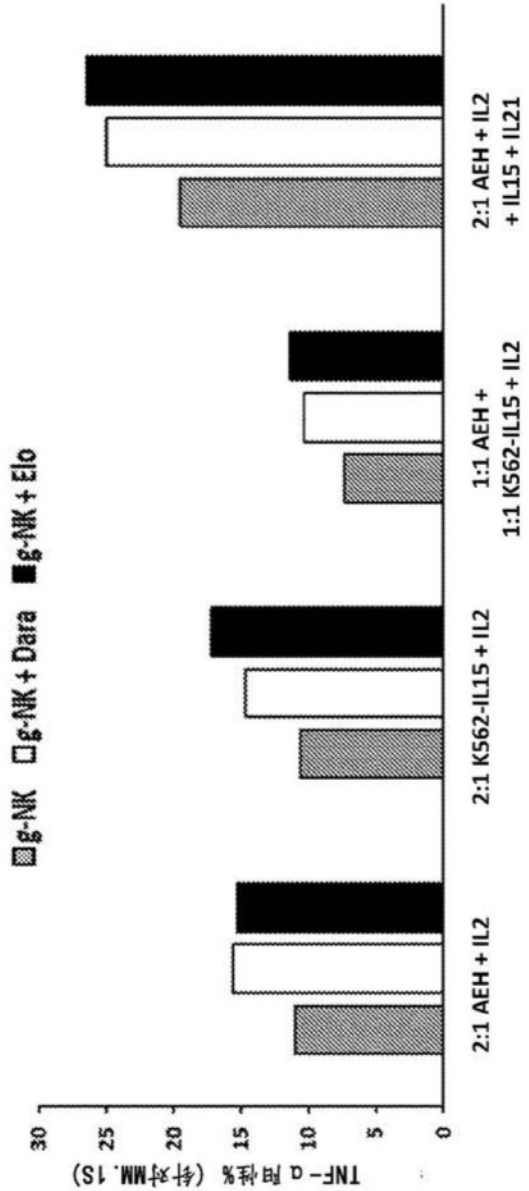


FIG.32B

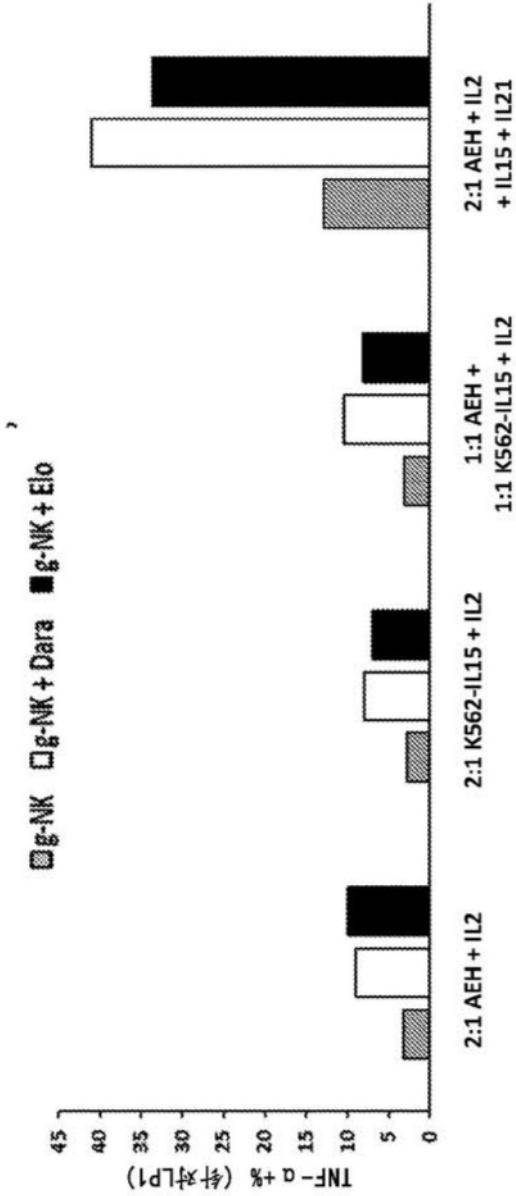


FIG.32C

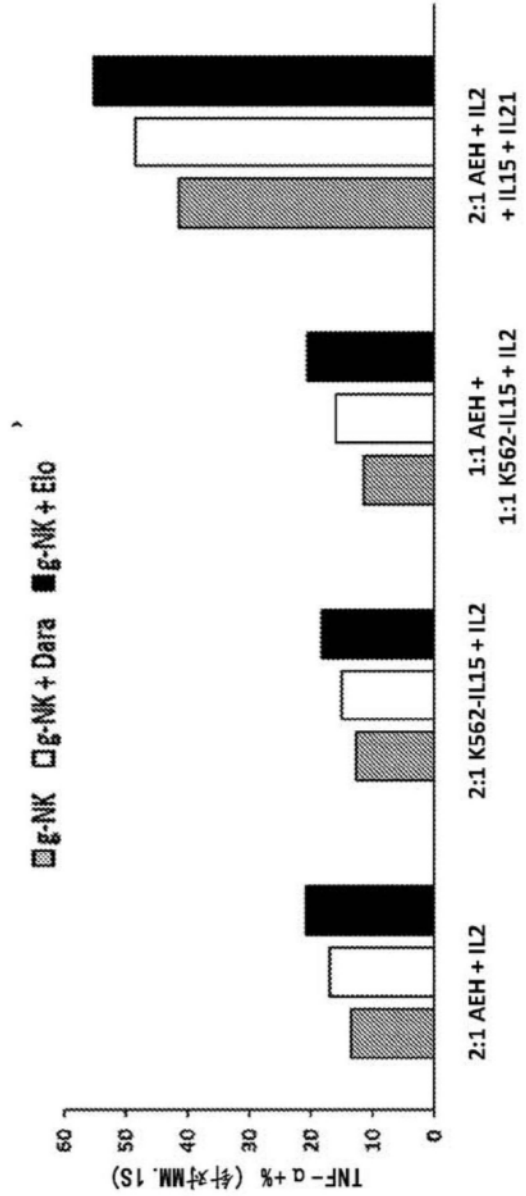


FIG.32D

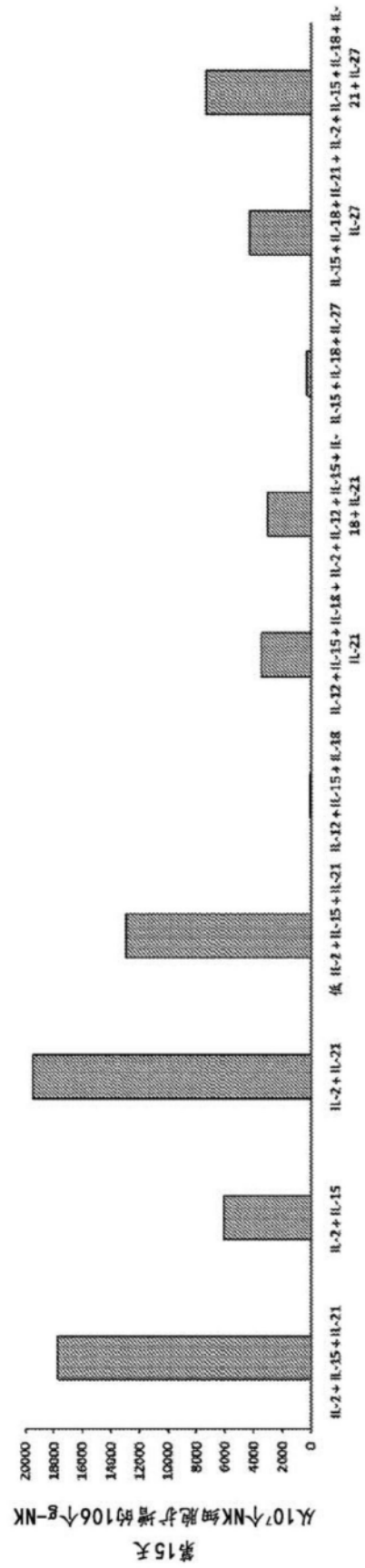


FIG.33

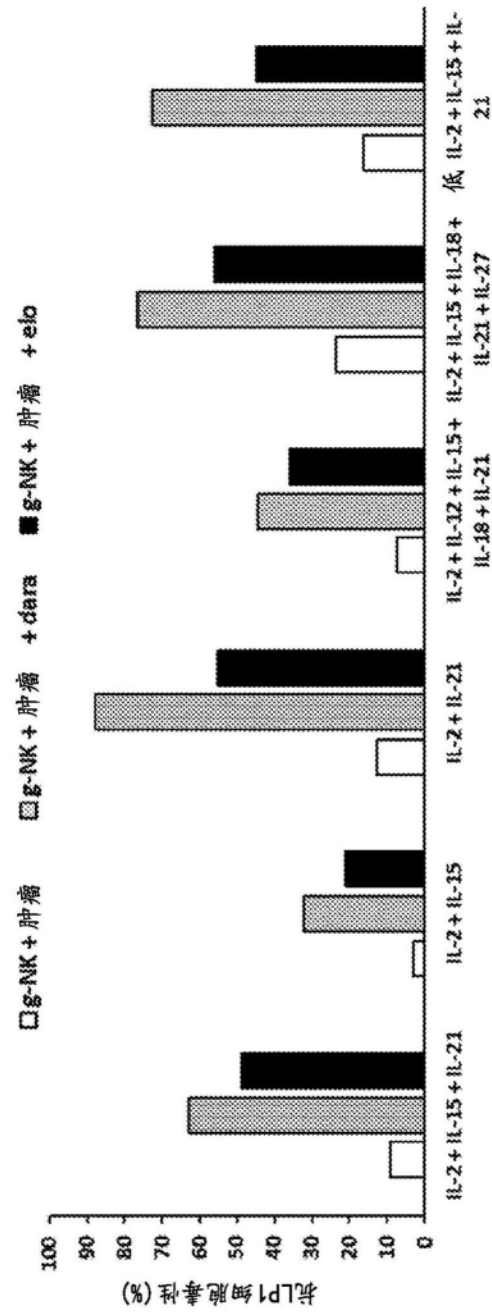


FIG.34A

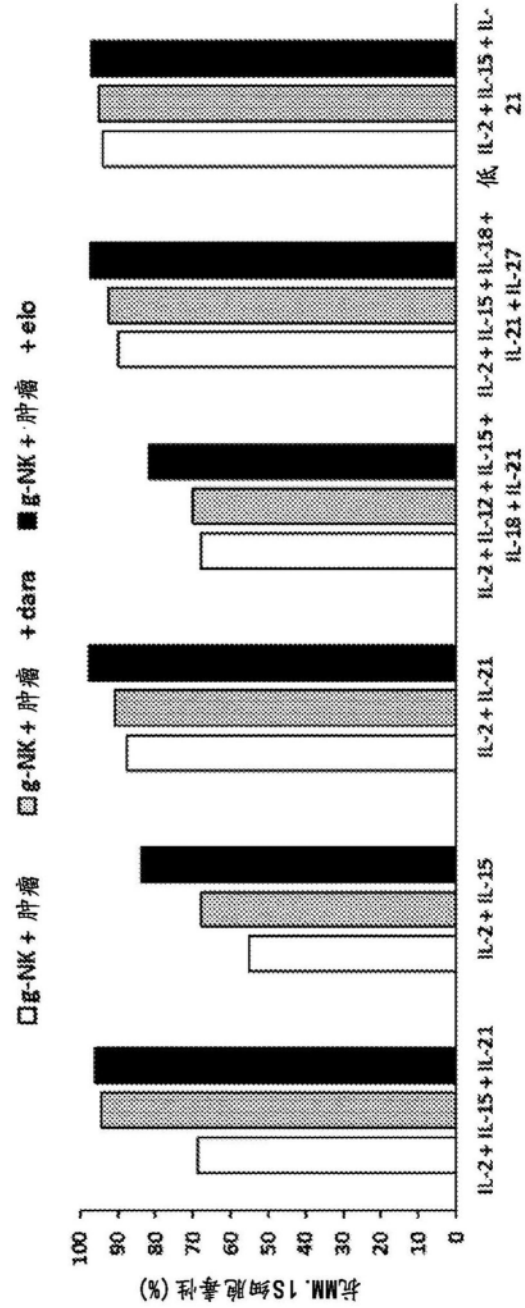


FIG.34B

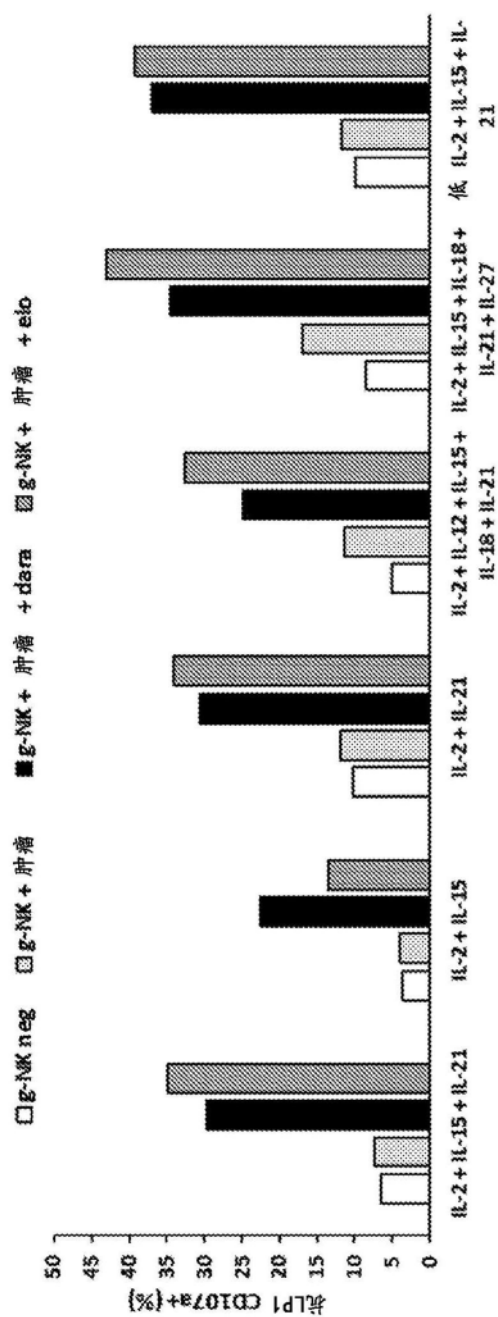


FIG. 34C

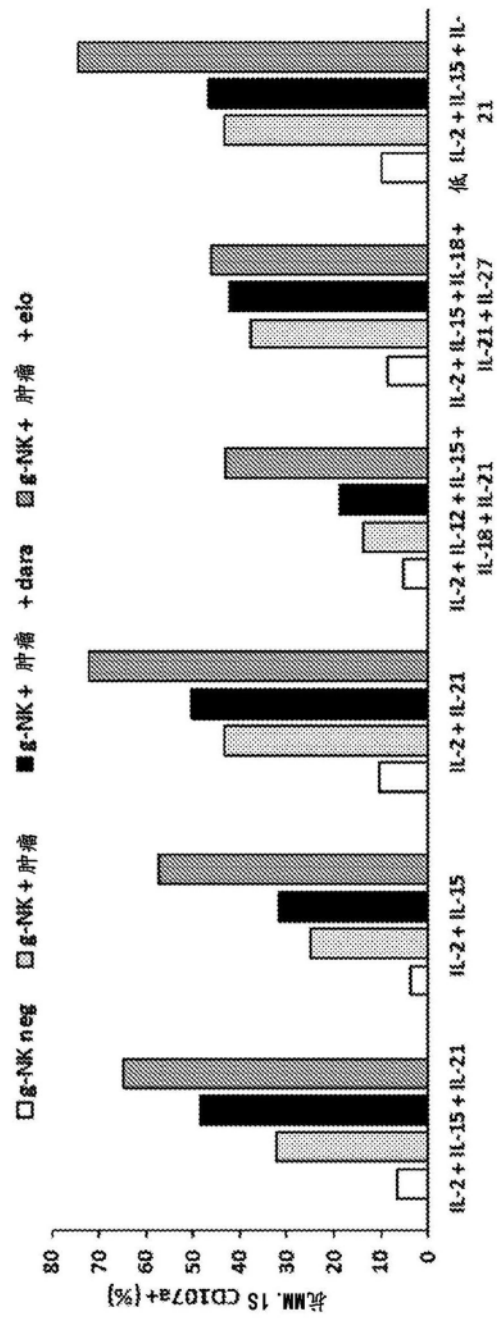


FIG. 34D

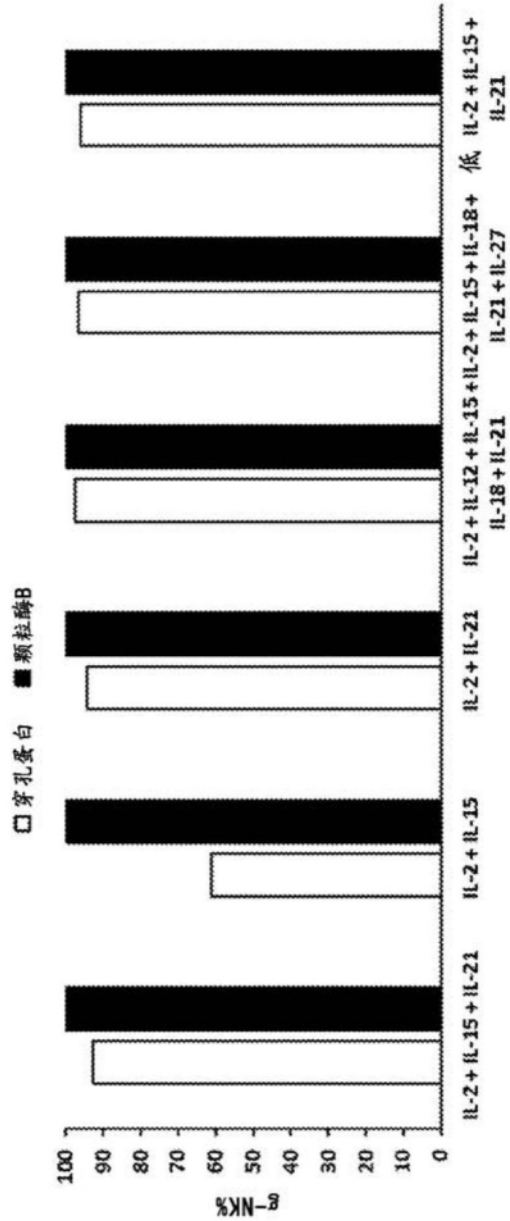


FIG.34E

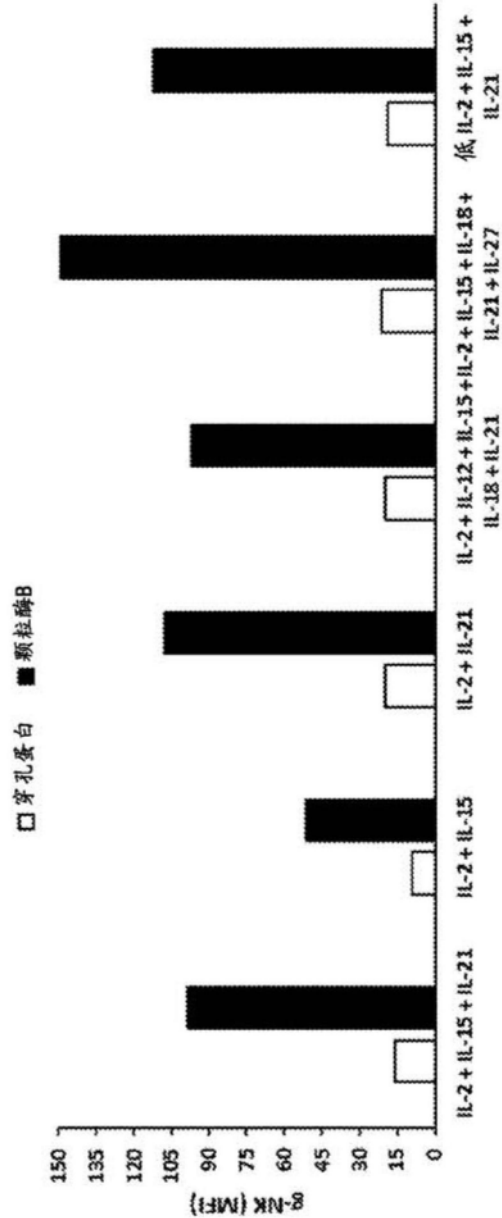


FIG.34F

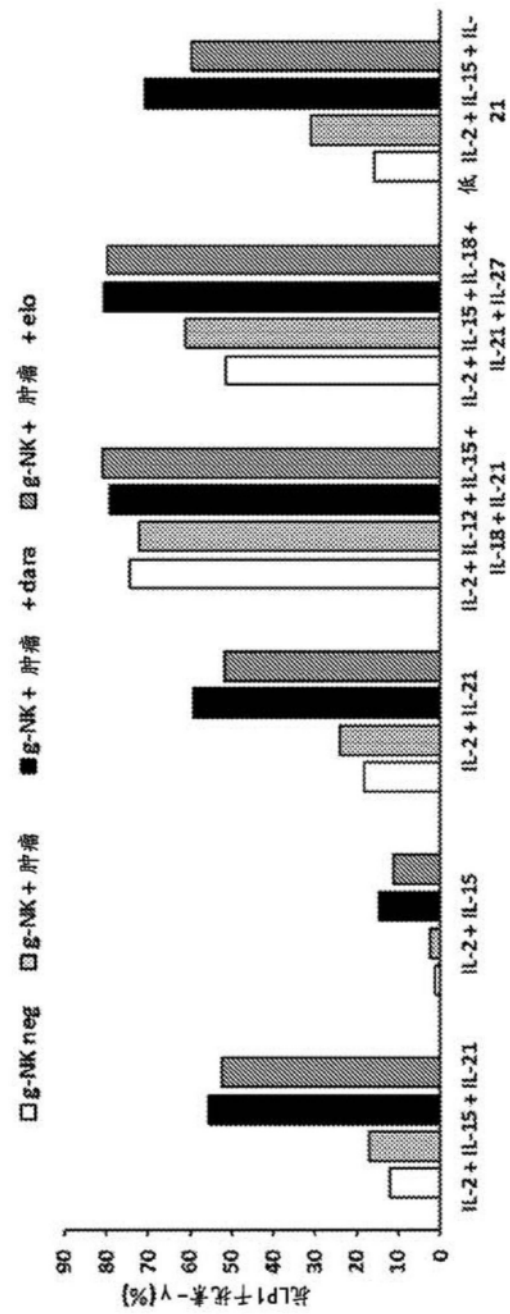


FIG.34G

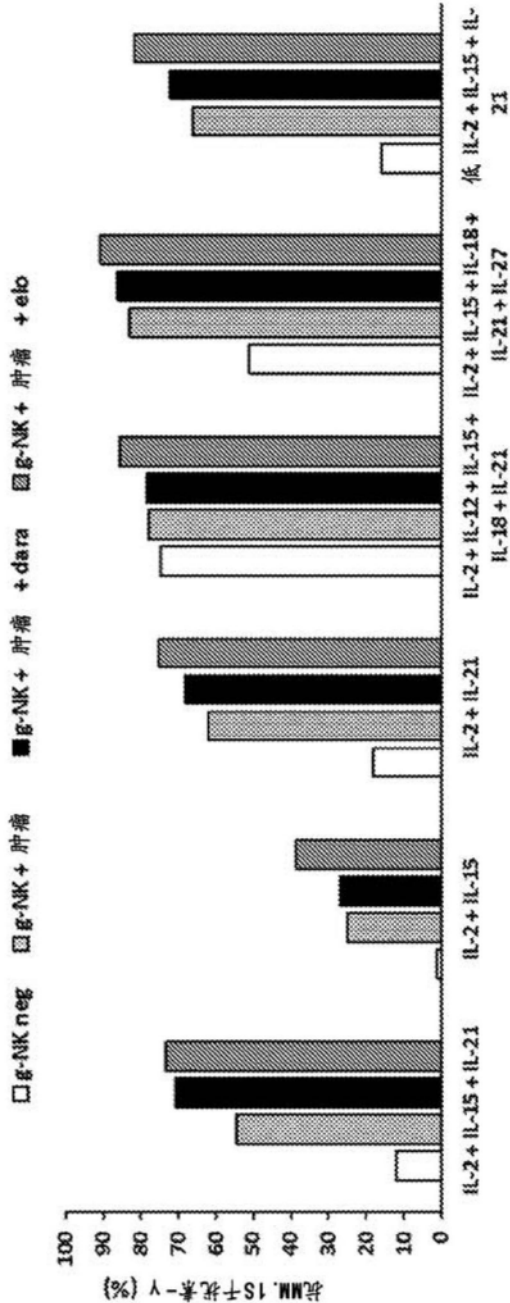


FIG.34H

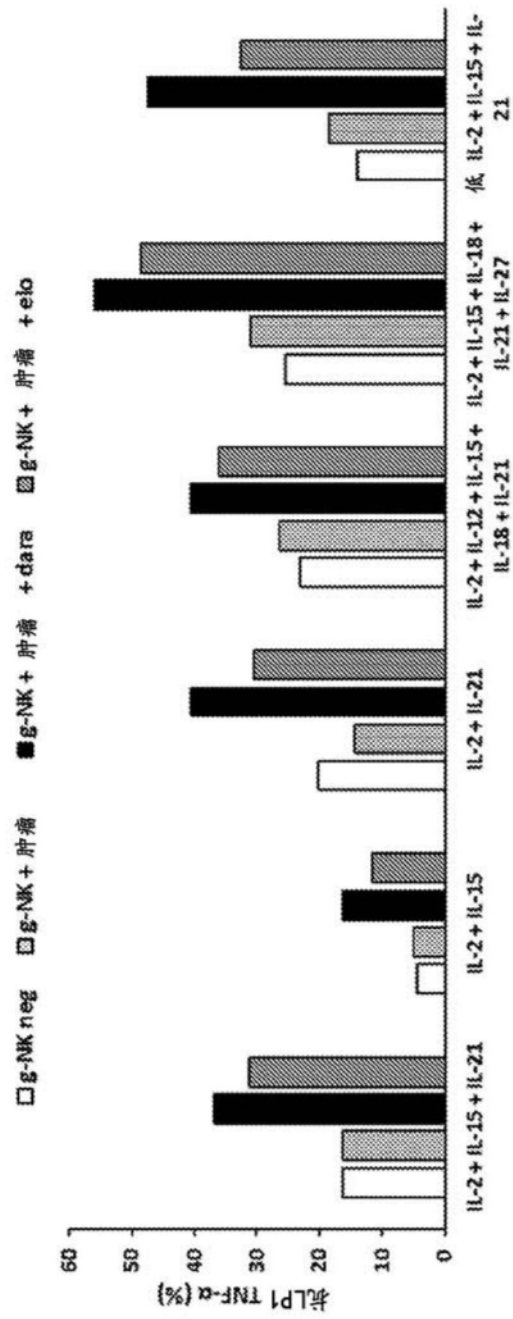


FIG. 34I

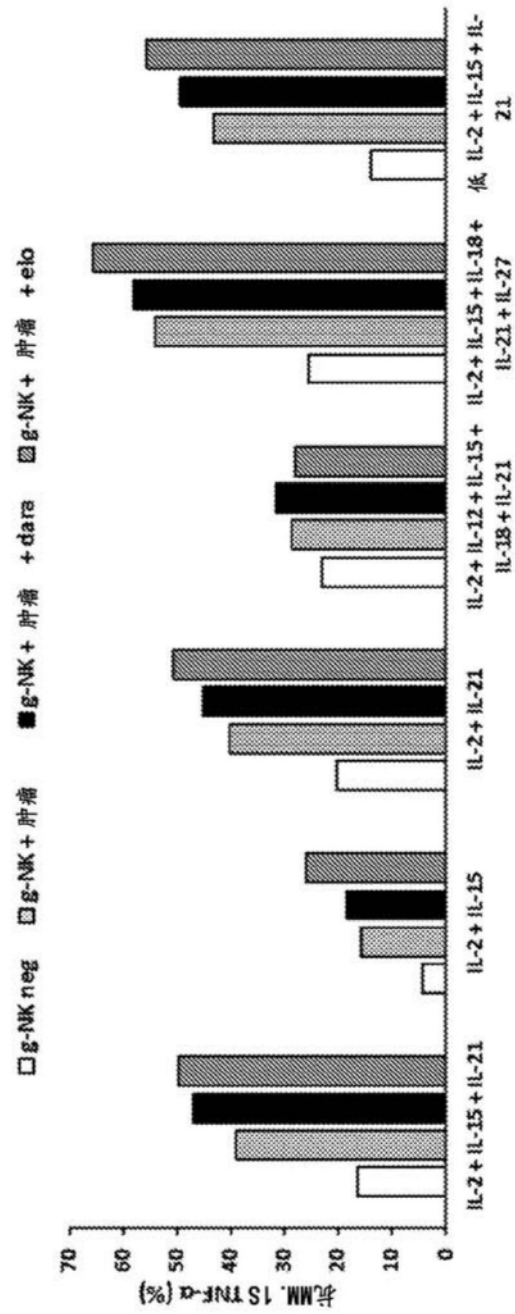


FIG.34J

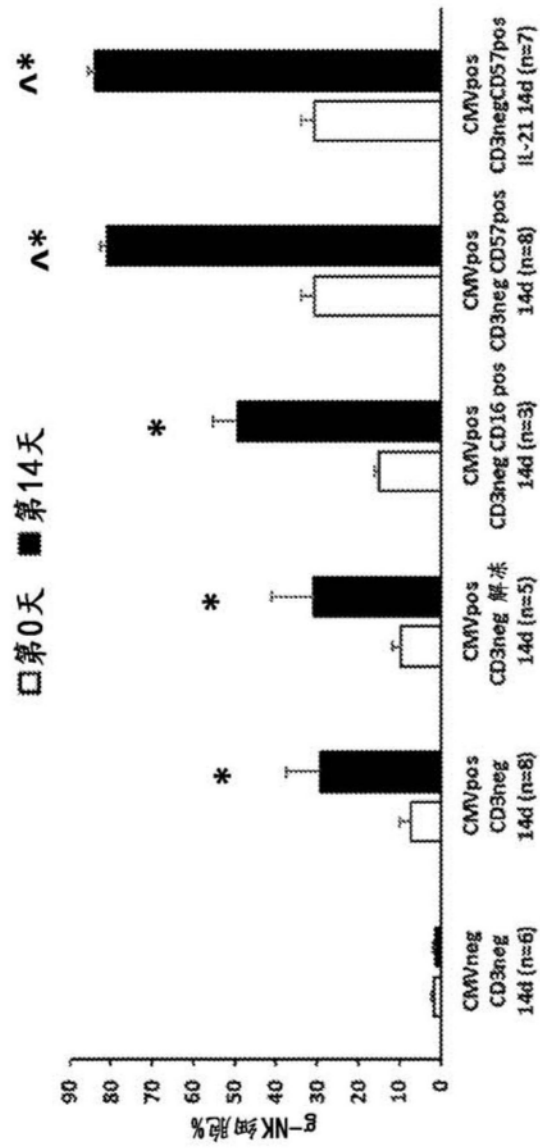


FIG.35A

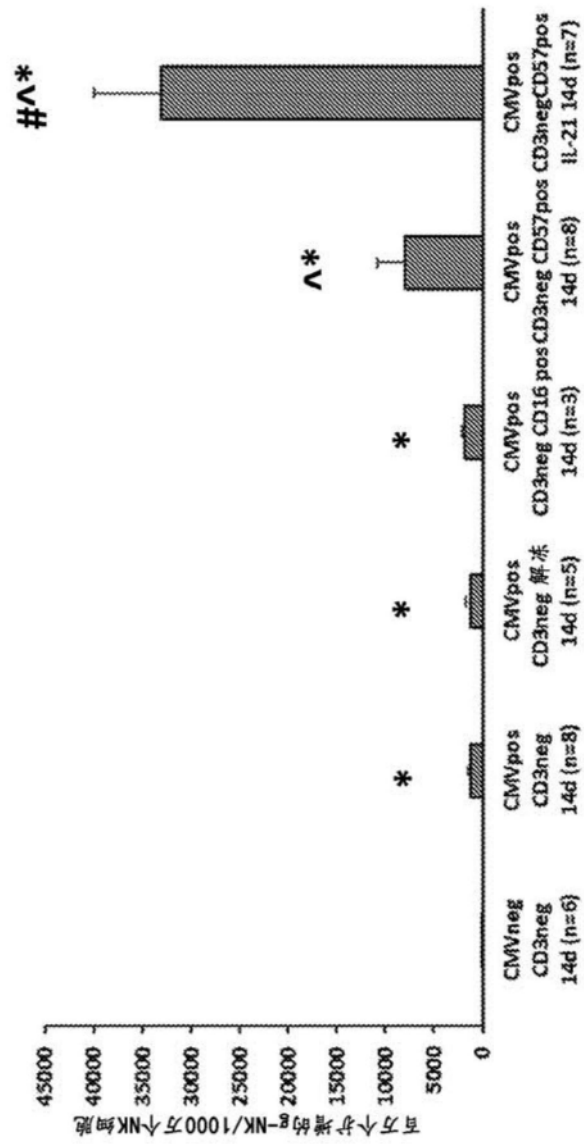


FIG.35B

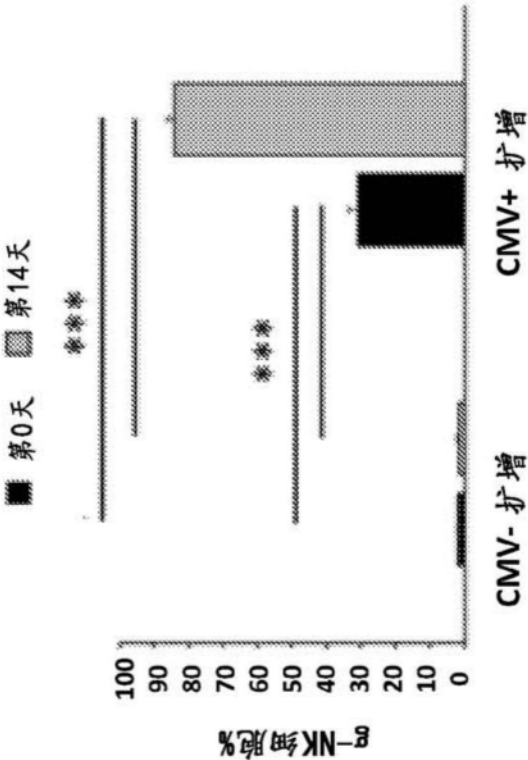


FIG. 35C

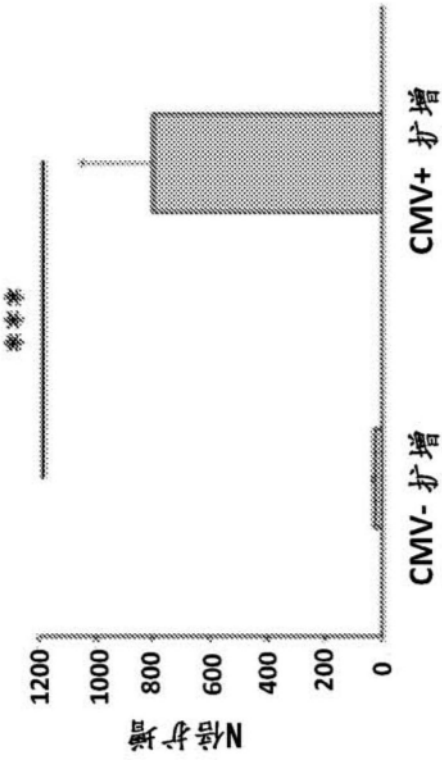


FIG. 35D

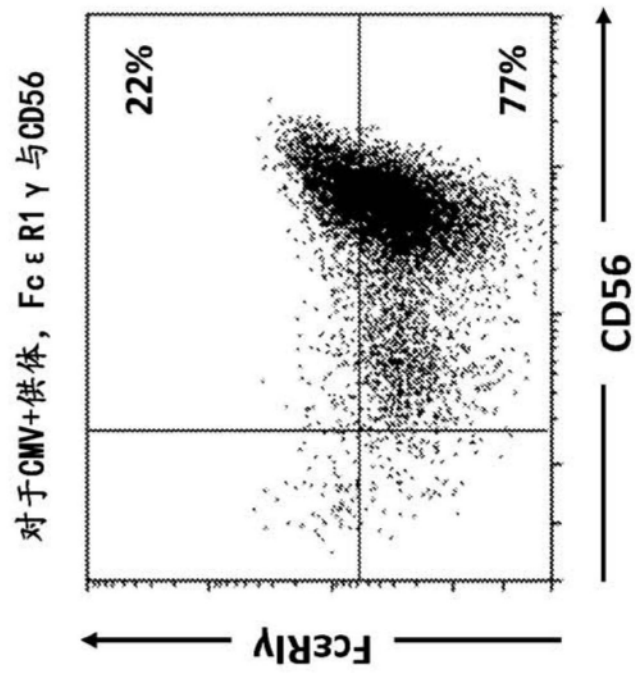


FIG. 35E

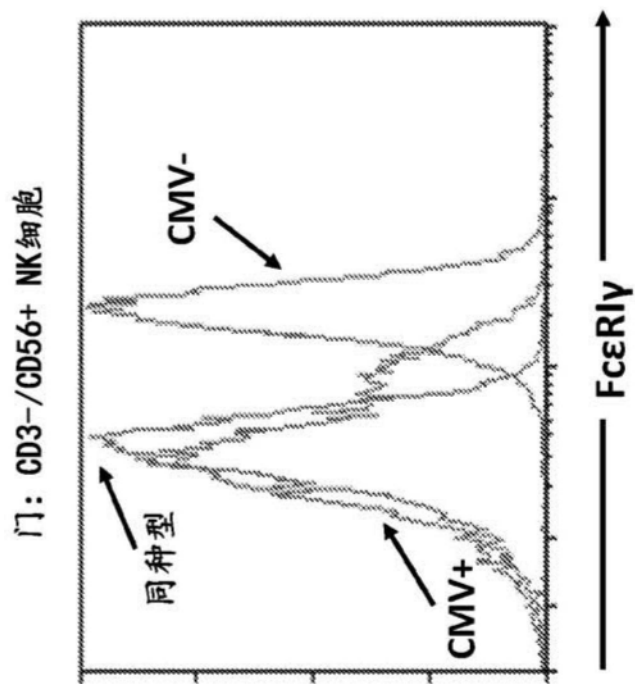


FIG. 35F

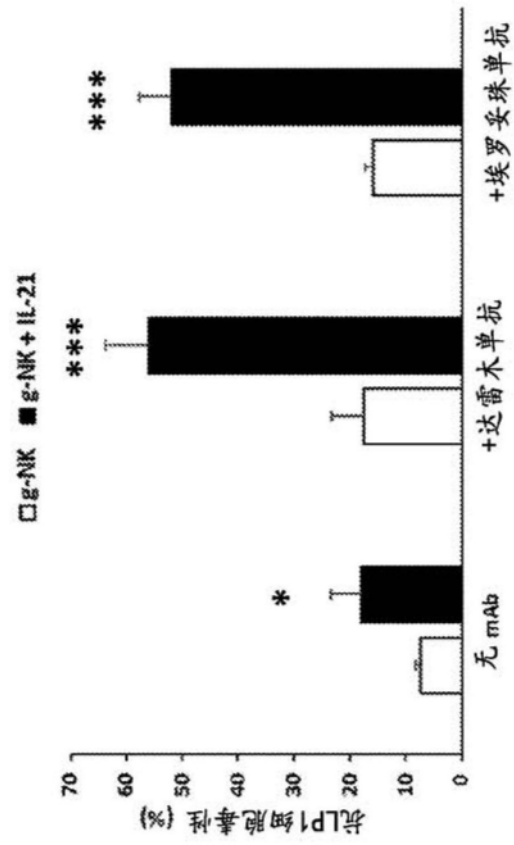


FIG.35G

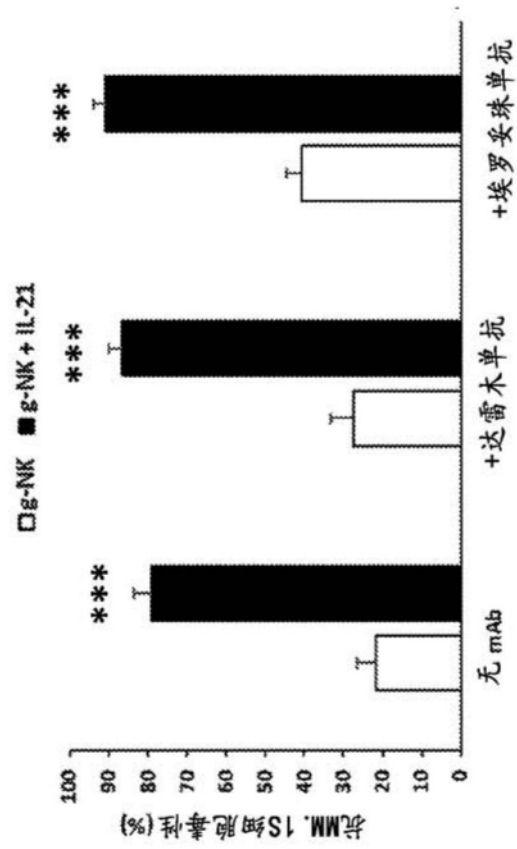


FIG. 35H

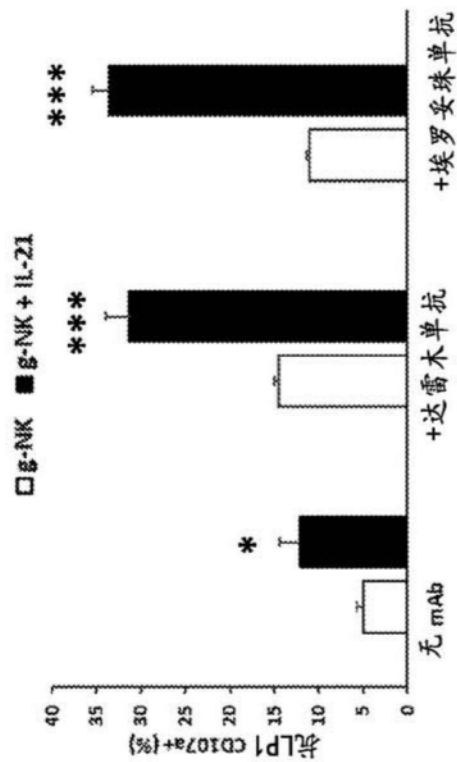


FIG. 35I

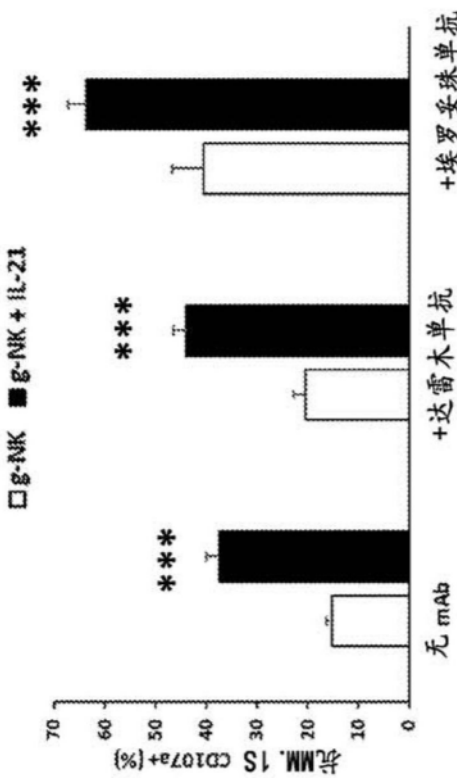


FIG. 35J

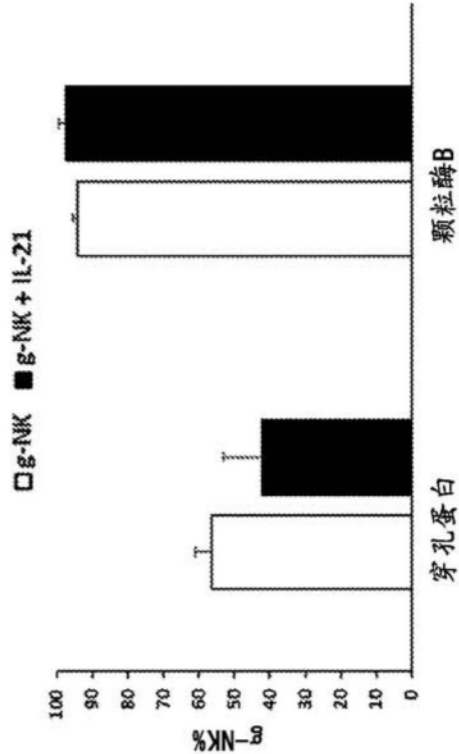


FIG.35K

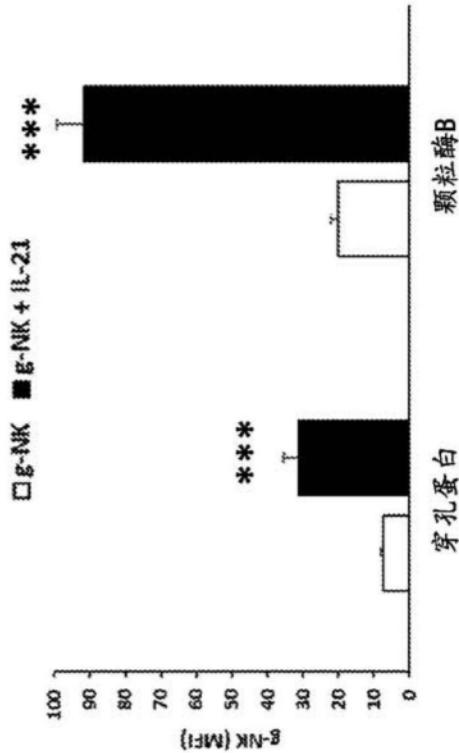


FIG.35L

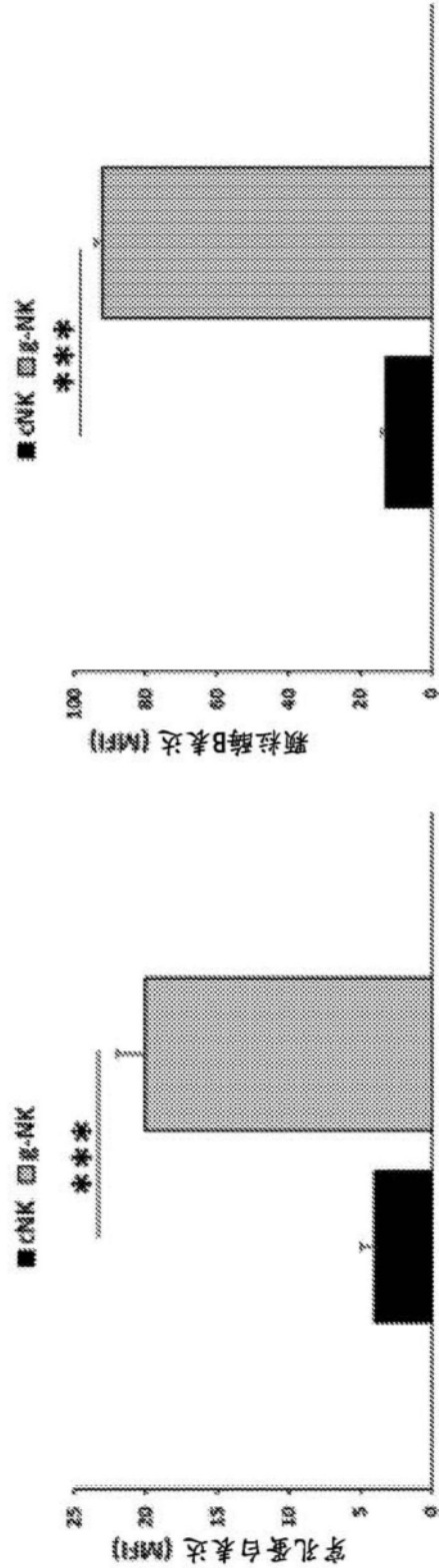


FIG.35M

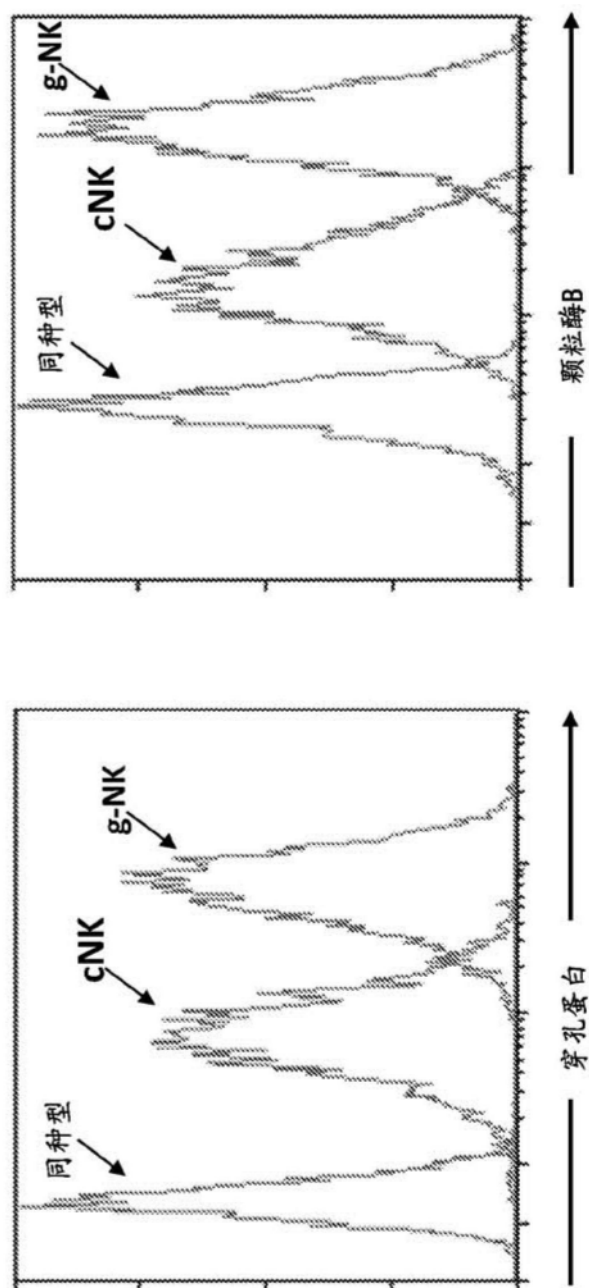


FIG.35N

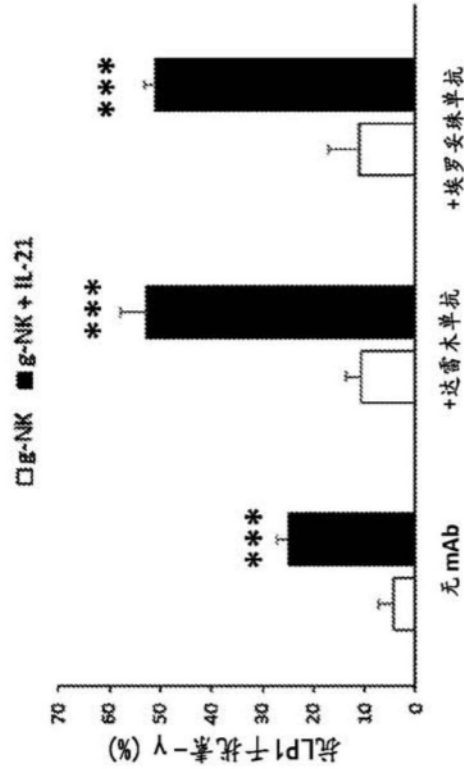


FIG.350

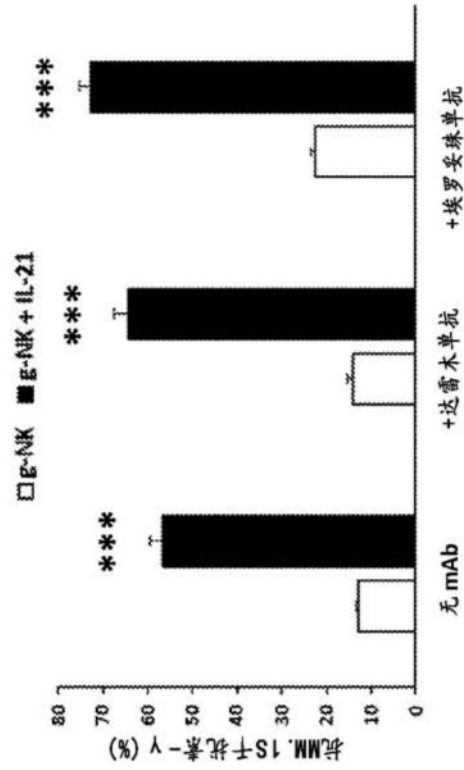


FIG.35P

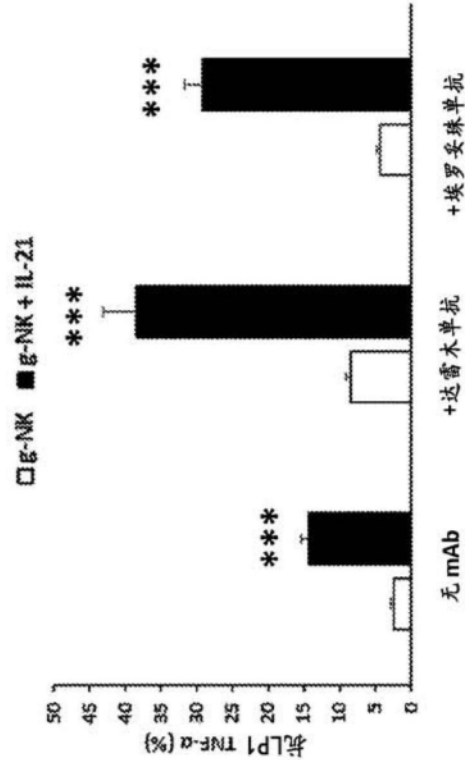


FIG. 35Q

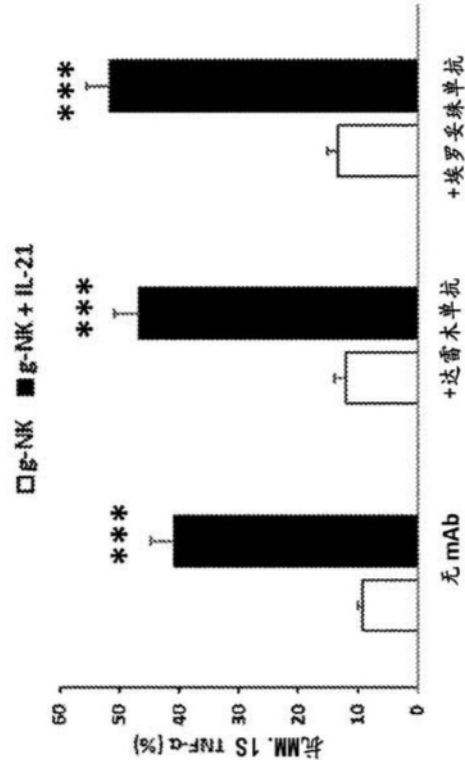


FIG. 35R

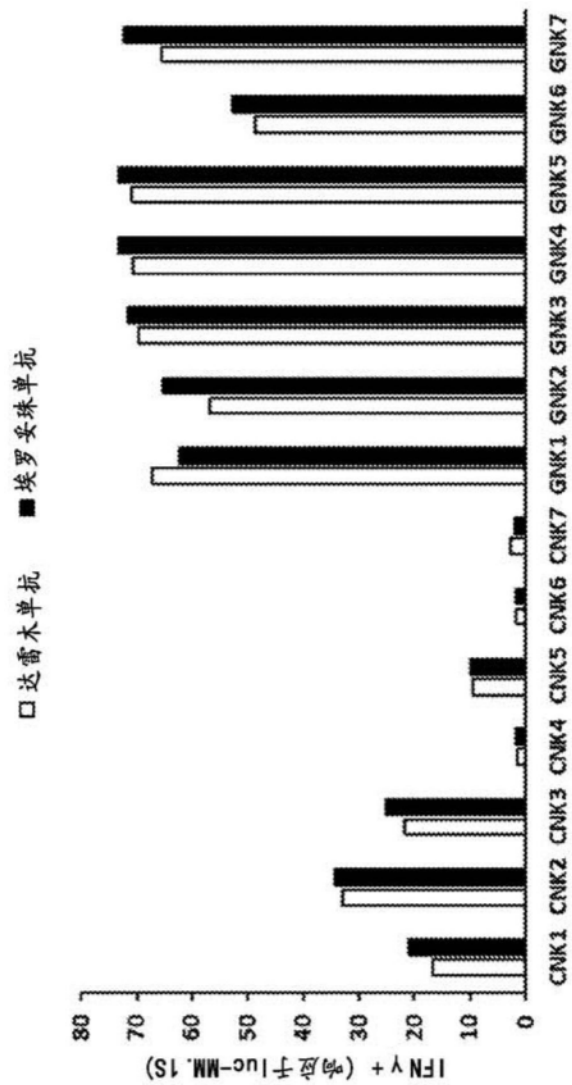


FIG.35S

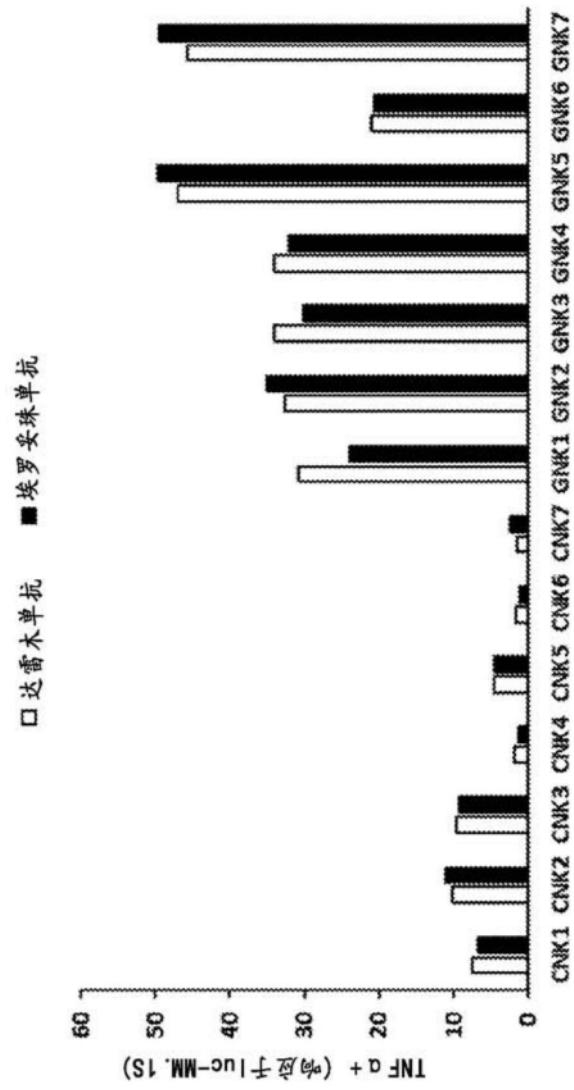


FIG.35T

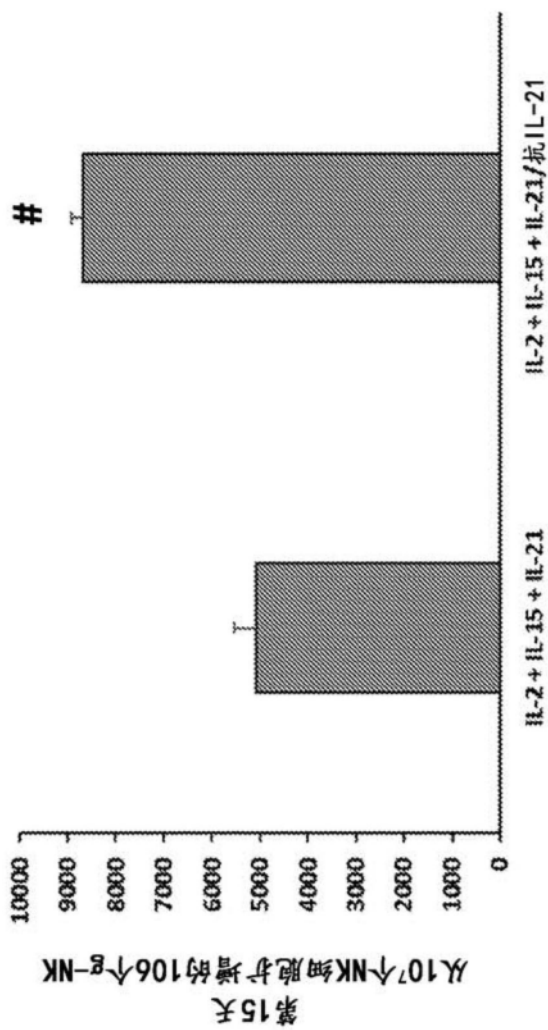


FIG.36

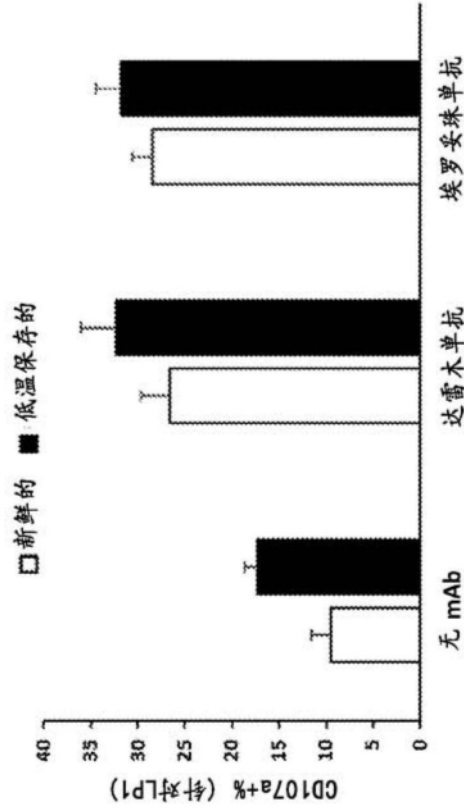


FIG.37A

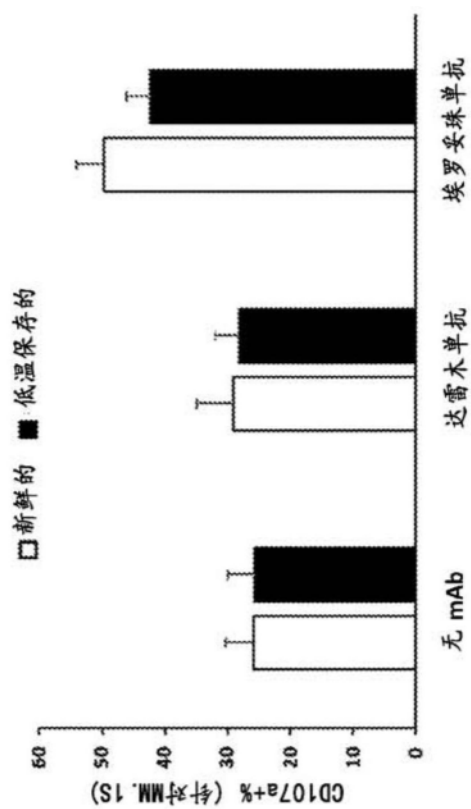


FIG. 37B

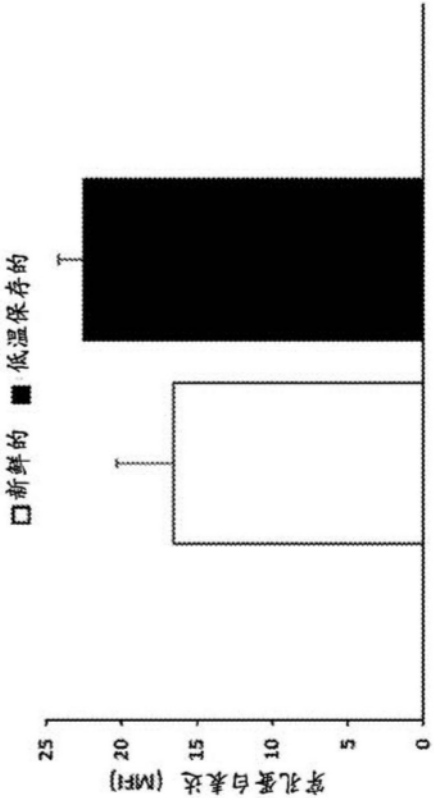


FIG.37C

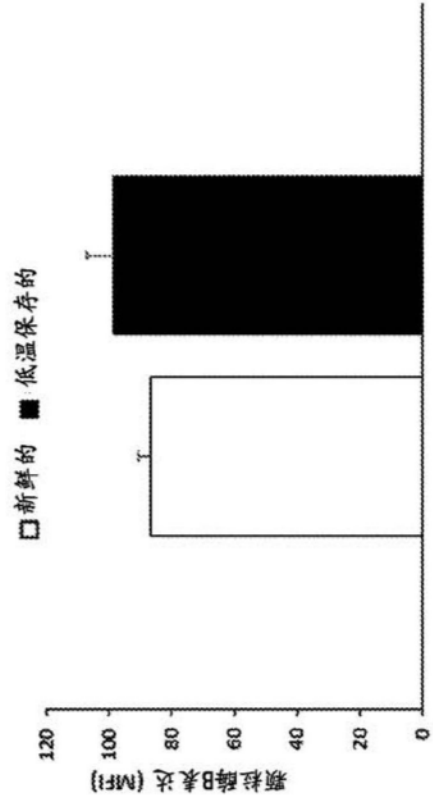


FIG.37D

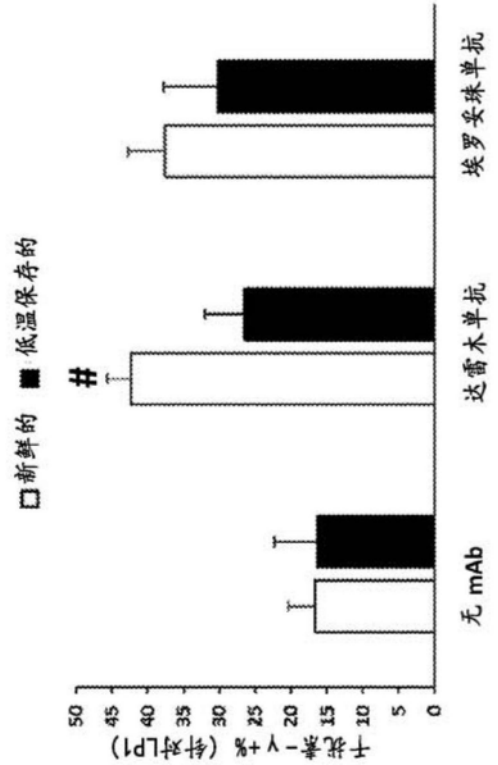


FIG.37E

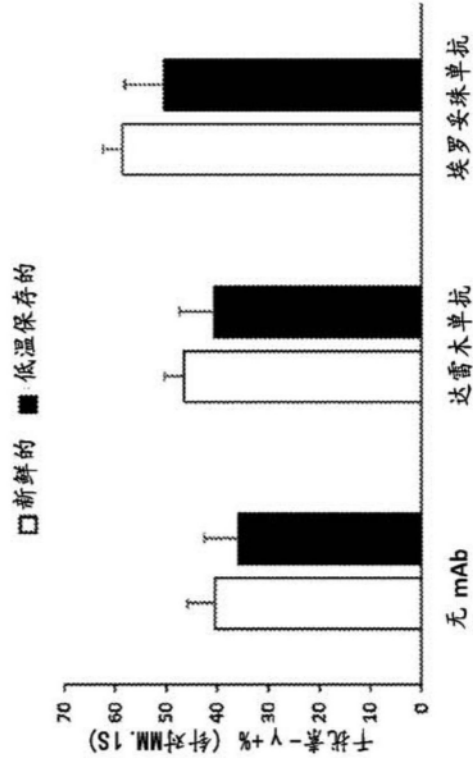


FIG.37F

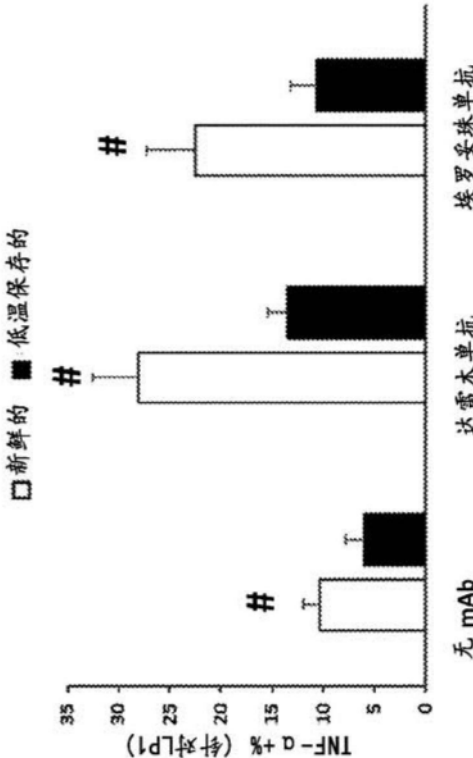


FIG.37G

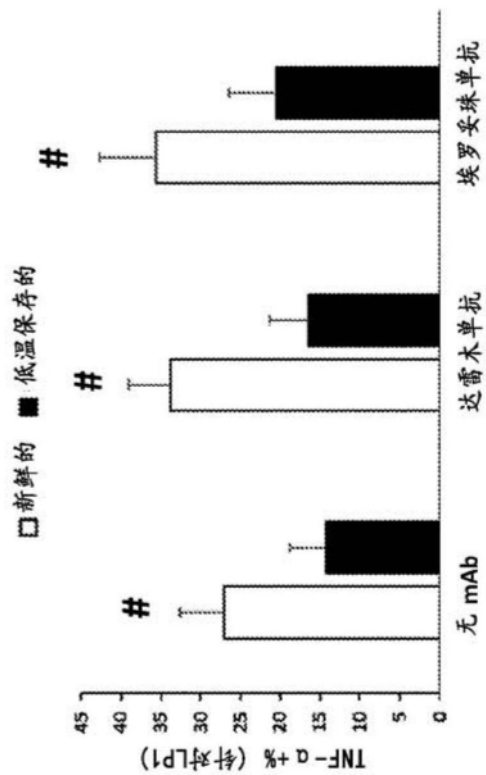


FIG.37H

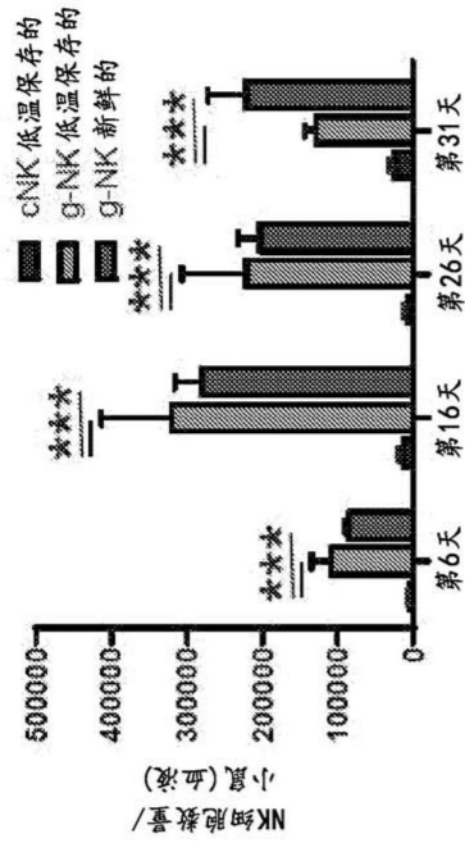


FIG.38A

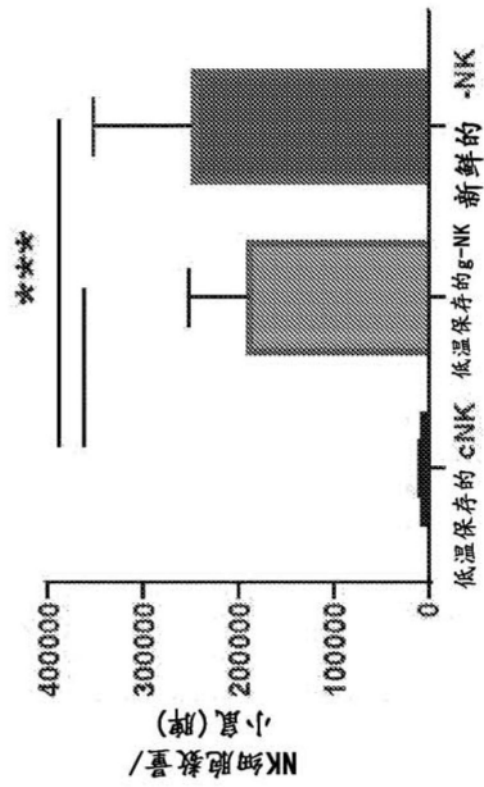


FIG. 38B

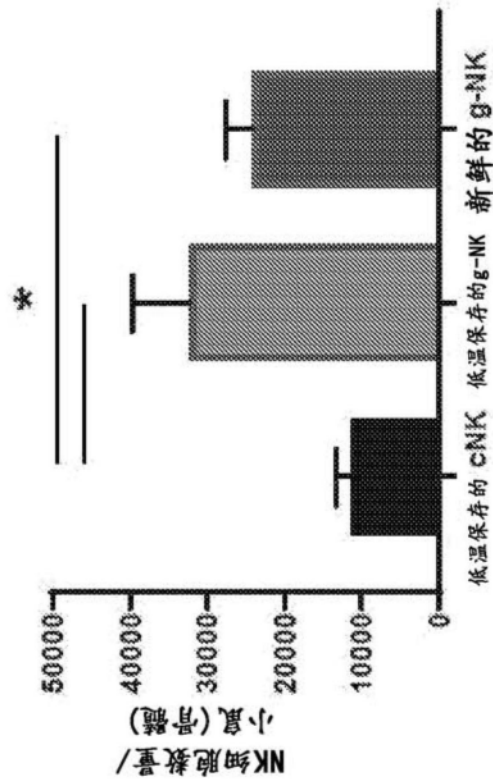


FIG. 38C

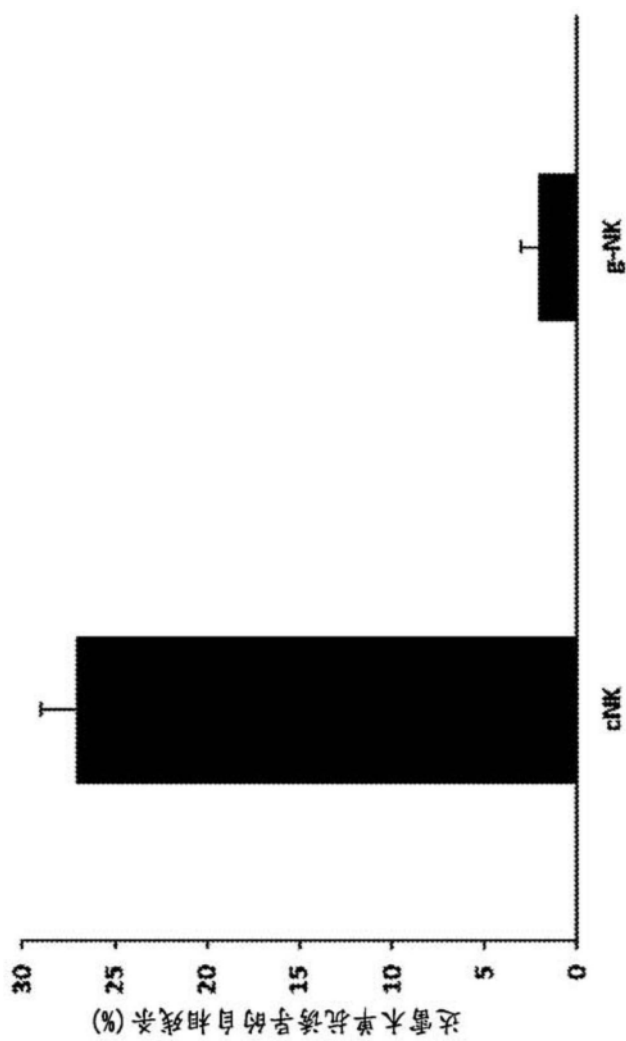


FIG.39

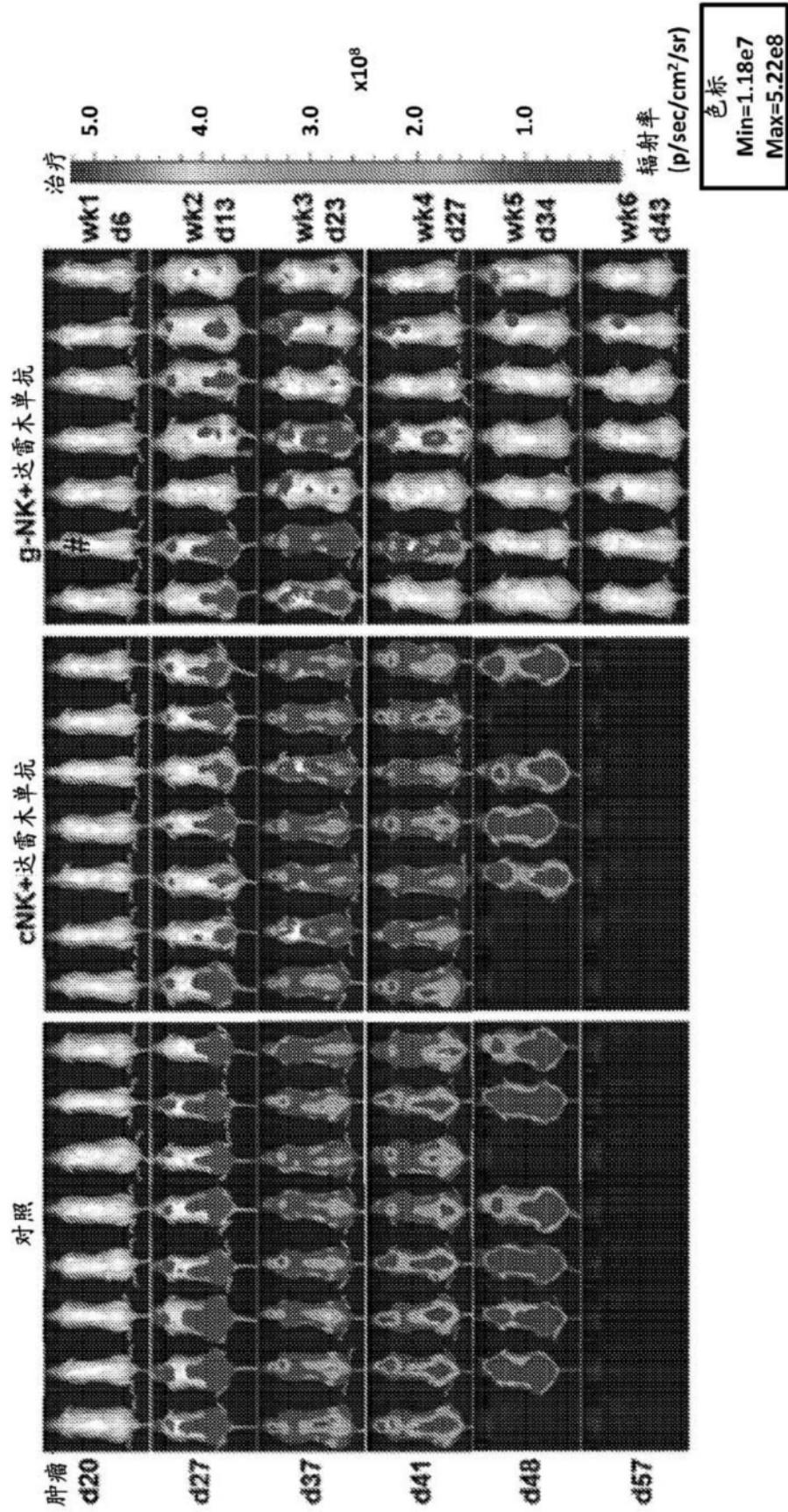


FIG. 40A

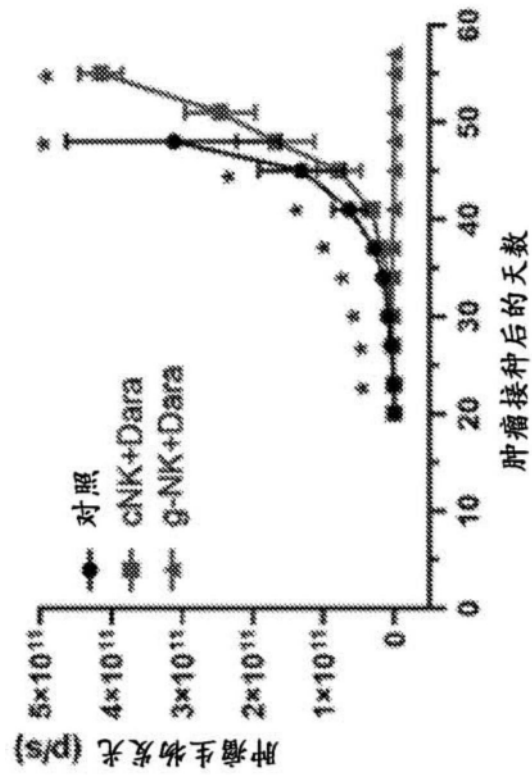


FIG. 40B

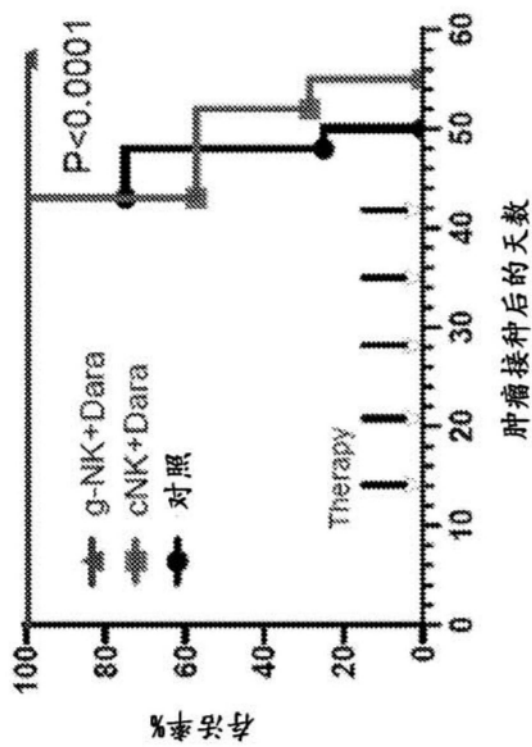


FIG. 40C

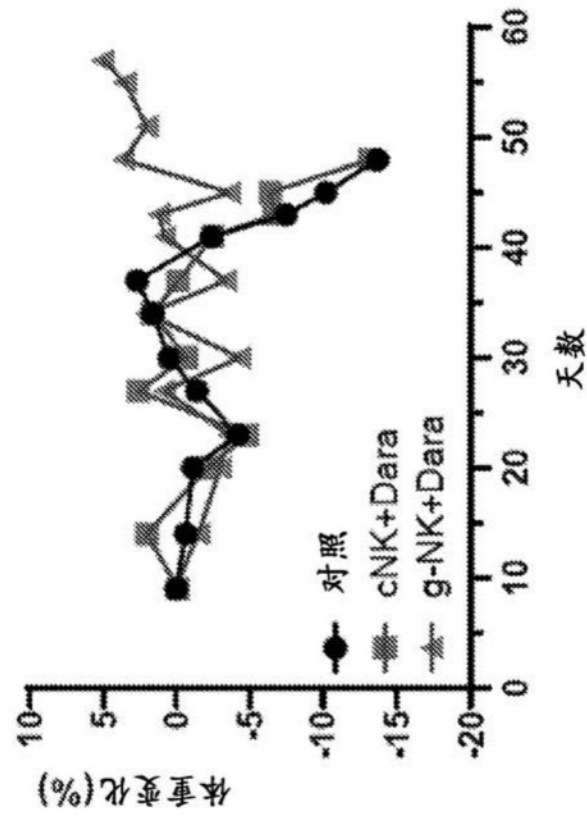


FIG. 40D

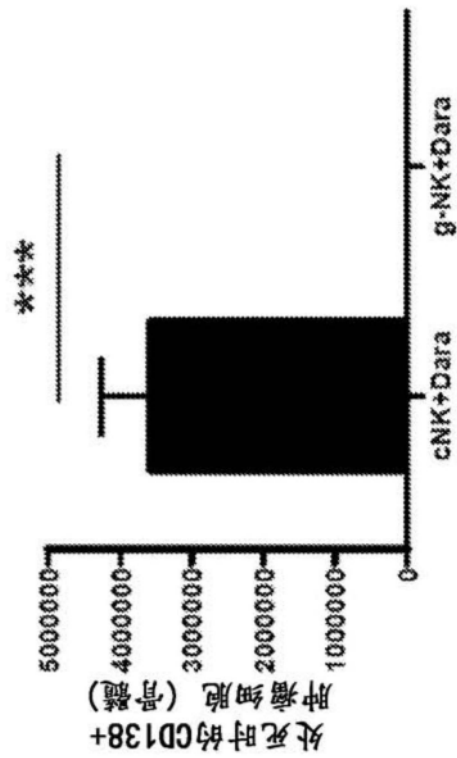


FIG. 40E

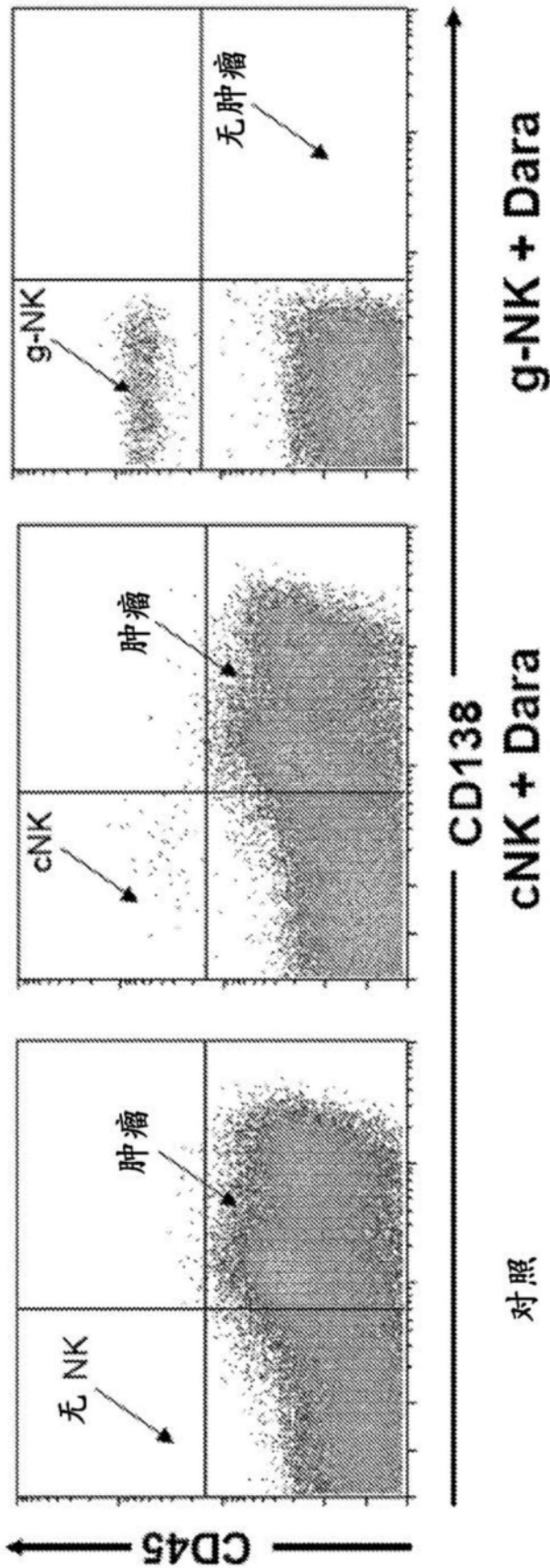


FIG. 40F

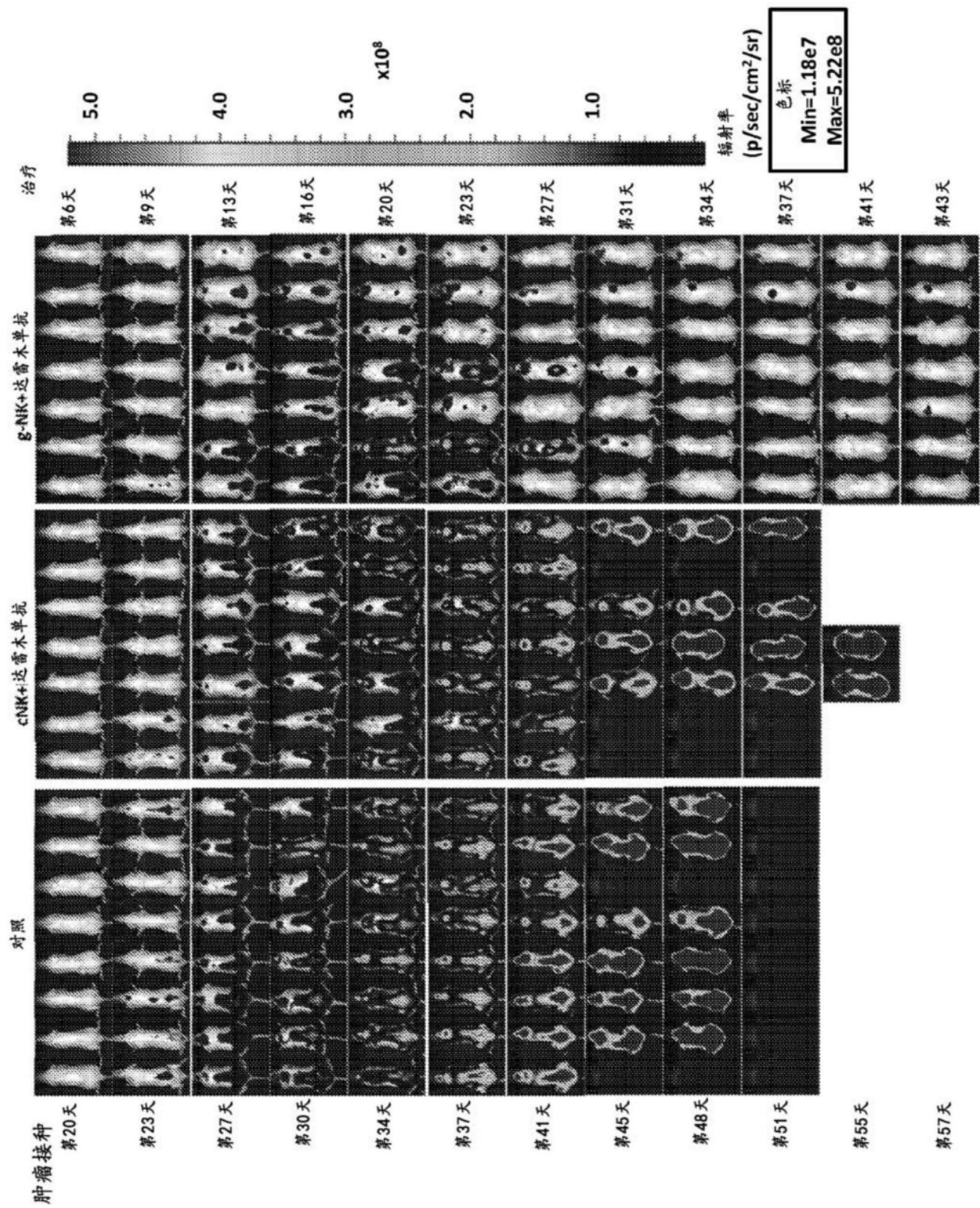


FIG. 40G

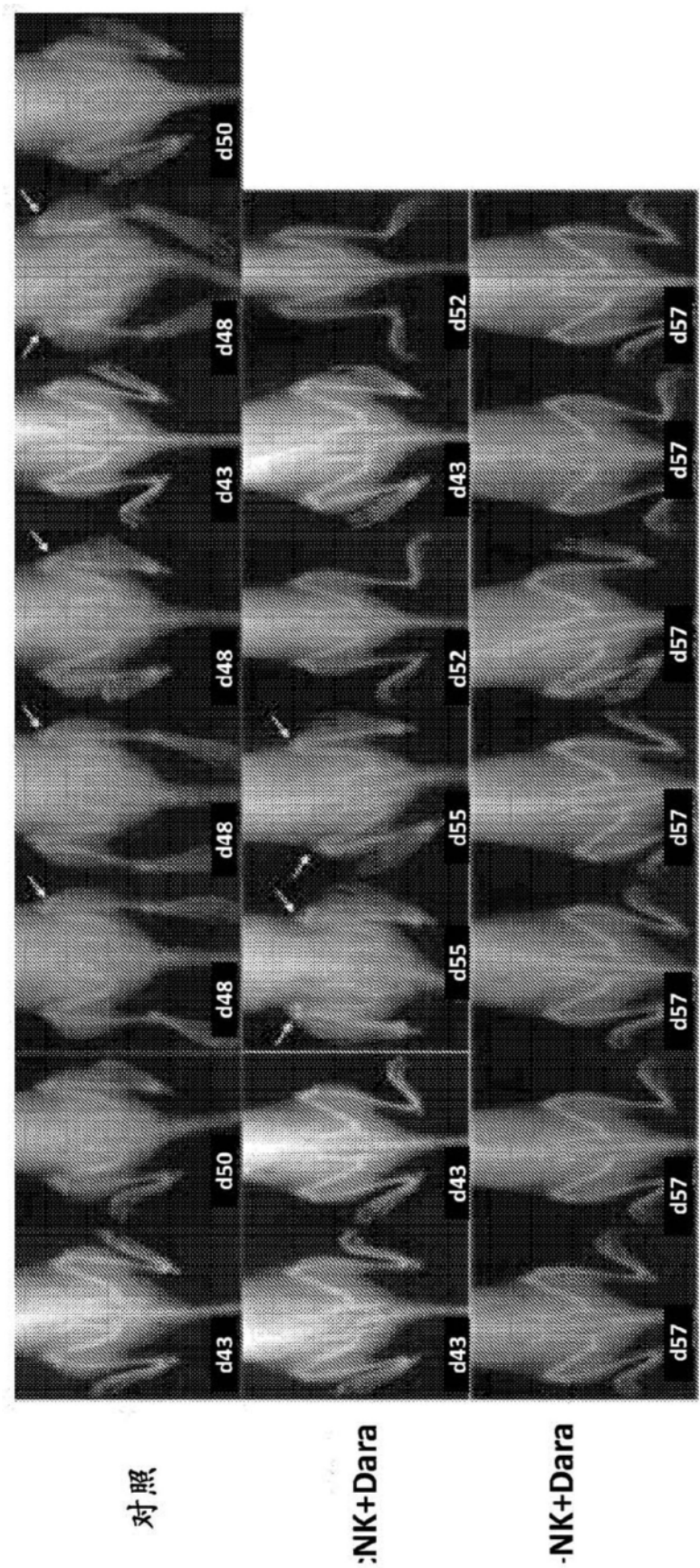


FIG. 40H

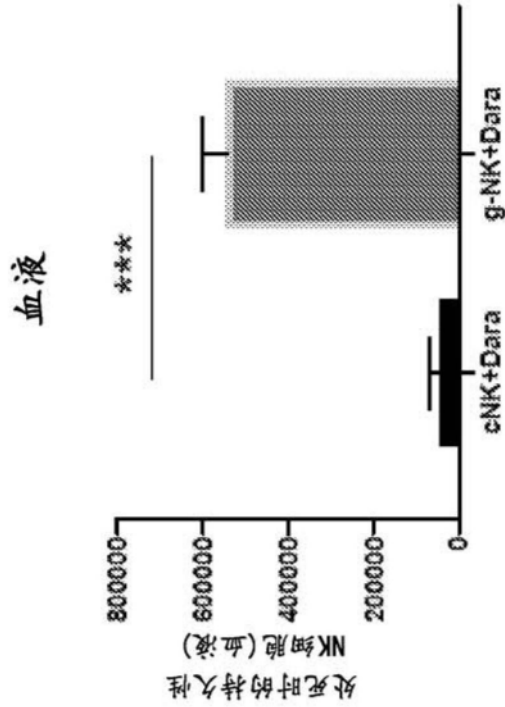


FIG.41A

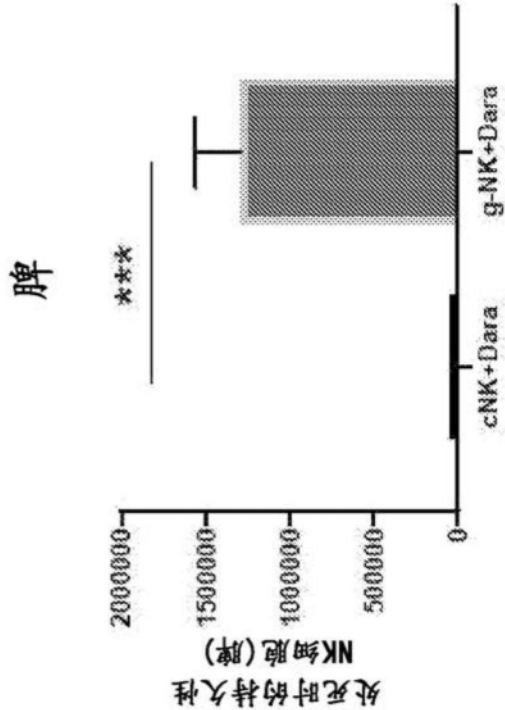


FIG.41B

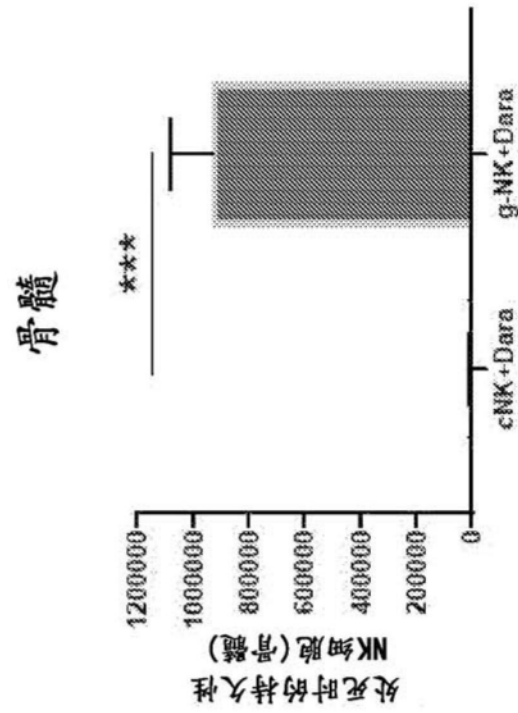


FIG.41C