(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-527559
(P2024-527559A)
(43)公表日　令和6年7月25日(2024.7.25)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10	ＺＮＡ	４Ｂ０６４
Ｃ１２Ｎ	*5/0783(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0783		４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*15/62 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/62	Ｚ	４Ｃ０８４
Ｃ１２Ｐ	*21/02 (2006.01)*	Ｃ１２Ｐ	21/02	Ａ	４Ｃ０８７
Ｃ１２Ｎ	*15/867(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/867	Ｚ	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全265頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-581006(P2023-581006)
(86)(22)出願日　令和4年6月30日(2022.6.30)
(85)翻訳文提出日　令和6年2月13日(2024.2.13)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/035884
(87)国際公開番号　WO2023/278811
(87)国際公開日　令和5年1月5日(2023.1.5)
(31)優先権主張番号　63/217,718
(32)優先日　令和3年7月1日(2021.7.1)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/217,722
(32)優先日　令和3年7月1日(2021.7.1)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/217,726
最終頁に続く

(71)出願人　524002957
インダプタ セラピューティクス インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 ７７０２３ テキサス州 ヒューストン ガルフ フリーウェイ ５０００ ビルディング ５ ルーム １４２
(74)代理人　100102978
弁理士　清水 初志
(74)代理人　100205707
弁理士　小寺 秀紀
(74)代理人　100160923
弁理士　山口 裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部 俊
(74)代理人　100142929
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　操作されたナチュラルキラー（ＮＫ）細胞及び関連する方法

(57)【要約】
本明細書では、ＦｃＲγ鎖の発現が欠損しており（ｇ－ＮＫ細胞）、かつ組換えキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を更に含む、操作されたナチュラルキラー（ＮＫ）細胞及びその組成物が提供される。操作されたＮＫ細胞を含有する組成物、ならびに操作されたＮＫ細胞を作製及び使用する方法も、本明細書において提供される。

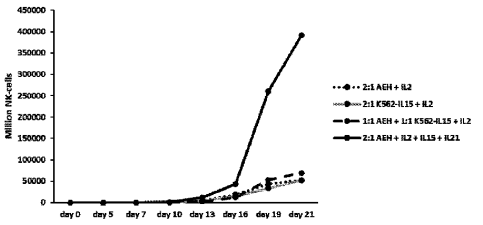
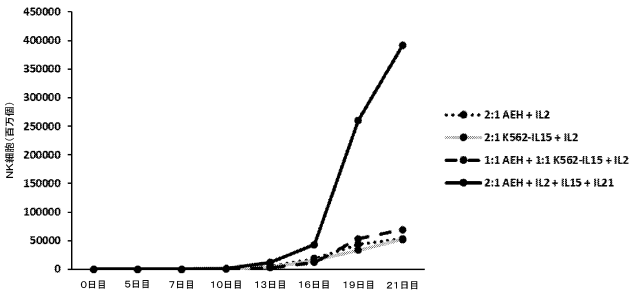


FIG. 1A



【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＦｃＲγ鎖の発現が欠損しており（ｇ－ＮＫ細胞）、かつキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする異種核酸を含む、操作されたナチュラルキラー（ＮＫ）細胞。
【請求項２】
ＦｃＲγ鎖の発現が欠損しており（ｇ－ＮＫ細胞）、かつ免疫調節物質をコードする異種核酸を含む、操作されたナチュラルキラー（ＮＫ）細胞。
【請求項３】
ＦｃＲγ鎖の発現が欠損しており（ｇ－ＮＫ細胞）、かつキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする異種核酸と、免疫調節物質をコードする異種核酸とを含む、操作されたナチュラルキラー（ＮＫ）細胞。
【請求項４】
前記ＣＡＲが、１）抗原結合ドメイン、２）可撓性リンカー、３）膜貫通領域、及び４）細胞内シグナル伝達ドメインを含む、請求項１又は請求項３に記載の操作されたＮＫ細胞。
【請求項５】
前記抗原結合ドメインが、腫瘍抗原を標的とする、請求項４に記載の操作されたＮＫ細胞。
【請求項６】
前記抗原結合ドメインが単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）である、請求項４又は請求項５に記載の操作されたＮＫ細胞。
【請求項７】
前記細胞内シグナル伝達ドメインが、一次シグナル伝達ドメイン及び共刺激シグナル伝達ドメインを含む、請求項４～６のいずれか一項に記載の操作されたＮＫ細胞。
【請求項８】
前記細胞内シグナル伝達ドメインが、ＣＤ３ζ、ＤＡＰ１０、ＤＡＰ１２、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、又はＯＸ４０のうちの１つ以上のシグナル伝達ドメインを含む、請求項４～７のいずれか一項に記載の操作されたＮＫ細胞。
【請求項９】
前記細胞内シグナル伝達ドメインが、ＣＤ３ζ、ＤＡＰ１０、ＤＡＰ１２、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、又はＯＸ４０のうちの２つ以上のシグナル伝達ドメインを含む、請求項４～７のいずれか一項に記載の操作されたＮＫ細胞。
【請求項１０】
前記細胞内シグナル伝達ドメインが、ＣＤ３ζのシグナル伝達ドメインを含む一次シグナル伝達ドメインと、共刺激シグナル伝達ドメインとを含む、請求項４～９のいずれか一項に記載の操作されたＮＫ細胞。
【請求項１１】
前記共刺激シグナル伝達ドメインが、ＣＤ２８又は４－１ＢＢのシグナル伝達ドメインである、請求項１０に記載の操作されたＮＫ細胞。
【請求項１２】
前記ＣＡＲをコードする前記異種核酸が、前記細胞のゲノムに安定に組み込まれている、請求項１又は３～１１のいずれか一項に記載の操作されたＮＫ細胞。
【請求項１３】
前記ＣＡＲをコードする前記異種核酸が、一過性に発現される、請求項１又は３～１１のいずれか一項に記載の操作されたＮＫ細胞。
【請求項１４】
前記免疫調節物質が免疫抑制物質である、請求項２又は請求項３に記載の操作されたＮＫ細胞。
【請求項１５】
前記免疫調節物質が免疫活性化物質である、請求項２又は請求項３に記載の操作された

ＮＫ細胞。
【請求項１６】
前記免疫調節物質がサイトカインである、請求項２、３、又は１５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７】
前記サイトカインが、前記操作されたＮＫ細胞から分泌可能である、請求項１６に記載の操作されたＮＫ細胞。
【請求項１８】
分泌可能な前記サイトカインが、ＩＬ－２もしくはその生物学的部分、ＩＬ－１５もしくはその生物学的部分、又はＩＬ－２１もしくはその生物学的部分、又はそれらの組み合わせである、請求項１７に記載の操作されたＮＫ細胞。
【請求項１９】
前記サイトカインが膜結合型である、請求項１６に記載の操作されたＮＫ細胞。
【請求項２０】
前記膜結合型サイトカインが膜結合型ＩＬ－２（ｍｂＩＬ－２）、膜結合型ＩＬ－１５（ｍｂＩＬ－１５）、膜結合型ＩＬ－２１（ｍｂＩＬ－２１）、又はそれらの組み合わせである、請求項１９に記載の操作されたＮＫ細胞。
【請求項２１】
前記免疫調節物質をコードする前記異種核酸が、前記細胞のゲノムに安定に組み込まれている、請求項２～２０のいずれか一項に記載の操作されたＮＫ細胞。
【請求項２２】
前記免疫調節物質をコードする前記異種核酸が、一過性に発現される、請求項２～２１のいずれか一項に記載の操作されたＮＫ細胞。
【請求項２３】
前記ｇ－ＮＫ細胞が、ＣＤ１６^{pos}／ＣＤ５７^{pos}／ＣＤ７^{dim}／^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である表面表現型を有する、請求項１～２２のいずれか一項に記載の操作されたＮＫ細胞。
【請求項２４】
前記ｇ－ＮＫ細胞が、ＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である表面表現型を更に有する、請求項１～２３のいずれか一項に記載の操作されたＮＫ細胞。
【請求項２５】
前記ｇ－ＮＫ細胞が、更にＣＤ３８^{neg}である、請求項１～２４のいずれか一項に記載の操作されたＮＫ細胞。
【請求項２６】
前記ｇ－ＮＫ細胞が、更にＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}である表面表現型を有する、請求項１～２５のいずれか一項記載の操作されたＮＫ細胞。
【請求項２７】
前記ｇ－ＮＫ細胞が、ＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｖ（Ｖ１５８）を含む、請求項１～２６のいずれか一項に記載の操作されたＮＫ細胞。
【請求項２８】
前記ｇ－ＮＫ細胞が、ＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｆである、請求項１～２６のいずれか一項に記載の操作されたＮＫ細胞。
【請求項２９】
請求項１、３～１３、又は２３～２８のいずれか一項に記載の操作されたｇ－ＮＫ細胞を複数含む、組成物。
【請求項３０】
請求項２又は１４～２８のいずれか一項に記載の操作されたｇ－ＮＫ細胞を複数含む、組成物。
【請求項３１】
請求項３～２８のいずれか一項に記載の操作されたｇ－ＮＫ細胞を複数含む、組成物。

【請求項３２】
前記組成物中のＮＫ細胞もしくは総細胞の５０％超又は約５０％超、又は前記ＮＫ細胞もしくは総細胞の６０％超又は約６０％超が、ｇ－ＮＫ細胞である、請求項２９～３１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３３】
前記組成物中のＮＫ細胞又は総細胞の７０％超又は約７０％超が、ｇ－ＮＫ細胞である、請求項２９～３１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３４】
前記組成物中のＮＫ細胞又は総細胞の８０％超又は約８０％超が、ｇ－ＮＫ細胞である、請求項２９～３１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３５】
前記組成物中のＮＫ細胞又は総細胞の９０％超又は約９０％超が、ｇ－ＮＫ細胞である、請求項２９～３１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３６】
前記組成物中のＮＫ細胞又は総細胞の９５％超又は約９５％超が、ｇ－ＮＫ細胞である、請求項２９～３１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３７】
前記複数の操作されたｇ－ＮＫ細胞が、２０％超又は約２０％超、３０％超又は約３０％超、４０％超又は約４０％超、５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、又は７０％超又は約７０％超の、前記ＣＡＲをコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を構成する、請求項２９又は３１～３６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３８】
総組成物が、前記ＣＡＲをコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を、２０％超又は約２０％超、３０％超又は約３０％超、４０％超又は約４０％超、５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、又は７０％超又は約７０％超含む、請求項２９又は３１～３７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３９】
前記複数の操作されたｇ－ＮＫ細胞が、２０％超又は約２０％超、３０％超又は約３０％超、４０％超又は約４０％超、５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、又は７０％超又は約７０％超の、前記免疫調節物質をコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を構成する、請求項３０～３６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４０】
総組成物が、前記免疫調節物質をコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を、２０％超又は約２０％超、３０％超又は約３０％超、４０％超又は約４０％超、５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、又は７０％超又は約７０％超含む、請求項３０～３６又は３９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４１】
前記複数の操作されたｇ－ＮＫ細胞が、２０％超又は約２０％超、３０％超又は約３０％超、４０％超又は約４０％超、５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、又は７０％超又は約７０％超の、前記ＣＡＲをコードする異種核酸及び前記免疫調節物質をコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を構成する、請求項３１～３６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４２】
総組成物が、前記ＣＡＲをコードする異種核酸及び前記免疫調節物質をコードする前記異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を、２０％超又は約２０％超、３０％超又は約３０％超、４０％超又は約４０％超、５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、又は７０％超又は約７０％超含む、請求項３１～３６又は４１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４３】
前記ｇ－ＮＫ細胞の７０％超又は約７０％超がパーフォリンについて陽性であり、前記ｇ－ＮＫ細胞の７０％超又は約７０％超がグランザイムＢについて陽性である、請求項２

９～４２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４４】
前記ｇ－ＮＫ細胞の８０％超又は約８０％超がパーフォリンについて陽性であり、前記ｇ－ＮＫ細胞の８０％超又は約８０％超がグランザイムＢについて陽性である、請求項２９～４３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４５】
前記ｇ－ＮＫ細胞の９０％超又は約９０％超がパーフォリンについて陽性であり、前記ｇ－ＮＫ細胞の９０％超又は約９０％超がグランザイムＢについて陽性である、請求項２９～４４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４６】
前記ｇ－ＮＫ細胞の９５％超又は約９５％超がパーフォリンについて陽性であり、前記ｇ－ＮＫ細胞の９５％超又は約９５％超がグランザイムＢについて陽性である、請求項２９～４５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４７】
パーフォリンについて陽性である前記細胞のうち、前記細胞は、細胞内フローサイトメトリーによって測定した場合、すなわち平均蛍光強度（ＭＦＩ）に基づいて、ＦｃＲγｐｏｓである細胞によって発現されるパーフォリンの平均レベルの少なくとも２倍又は約２倍である、平均レベルのパーフォリンを発現し、かつ／又は
グランザイムＢについて陽性である前記細胞のうち、前記細胞は、細胞内フローサイトメトリーによって測定した場合、すなわち平均蛍光強度（ＭＦＩ）に基づいて、ＦｃＲγｐｏｓである細胞によって発現されるグランザイムＢの平均レベルの少なくとも２倍又は約２倍である、グランザイムＢの平均レベルを発現する、請求項４３～４６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４８】
前記組成物中の細胞の１０％超が、任意選択でＣＤ１０７ａ発現によって測定される、腫瘍標的細胞に対する脱顆粒が可能であり、任意選択で前記脱顆粒が、前記腫瘍標的細胞に対する抗体の非存在下で測定される、請求項２９～４７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４９】
前記組成物中の細胞の１０％超が、腫瘍標的細胞に対してインターフェロン－γ又はＴＮＦ－αを産生することができ、任意選択で、前記インターフェロン－γ又はＴＮＦ－αが、前記腫瘍標的細胞に対する抗体の非存在下で測定される、請求項２９～４８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項５０】
前記組成物中の細胞のうち、１５％超又は約１５％超、２０％超又は約２０％超、３０％超又は約３０％超、４０％超又は約４０％超、又は５０％超又は約５０％超が、標的抗原を発現する細胞（標的細胞）及び前記標的抗原に対する抗体（抗標的抗体）の存在下でエフェクターサイトカインを産生する、請求項２９～４９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項５１】
前記組成物中の総細胞のうち、又は前記組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、３０％超又は約３０％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃｐｏｓ）、かつ／又は５０％超又は約５０％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａｎｅｇ）、請求項２９～５０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項５２】
前記組成物中の総細胞のうち、又は前記組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、３５％超又は約３５％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃｐｏｓ）、かつ／又は６０％超又は約６０％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａｎｅｇ）、請求項２９～５１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項５３】

前記組成物中の総細胞のうち、又は前記組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、４０％超又は約４０％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）、かつ／又は７０％超又は約７０％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａ^{neg}）、請求項２９～５２のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項５４】

前記組成物中の総細胞のうち、又は前記組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、４５％超又は約４５％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）、かつ／又は８０％超又は約８０％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａ^{neg}）、請求項２９～５２のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項５５】

前記組成物中の総細胞のうち、又は前記組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、５０％超又は約５０％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）、かつ／又は８５％超又は約８５％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａ^{neg}）、請求項２９～５２のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項５６】

前記組成物中の総細胞のうち、又は前記組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、５５％超又は約５５％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）、かつ／又は９０％超又は約９０％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａ^{neg}）、請求項２９～５２のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項５７】

前記組成物中の総細胞のうち、又は前記組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、６０％超又は約６０％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）、かつ／又は９５％超又は約９５％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａ^{neg}）、請求項２９～５２のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項５８】

前記組成物中の総細胞のうち、又は前記組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、又は９０％超又は約９０％超がＣＤ３８^{neg}である、請求項２９～５７のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項５９】

前記組成物中の総細胞のうち、又は前記組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、又は９０％超又は約９０％超が、ＣＤ１６^{pos}／ＣＤ５７^{pos}／ＣＤ７^{dim}／^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である、請求項２９～５７のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項６０】

前記組成物中の総細胞のうち、又は前記組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、又は９０％超又は約９０％超が、ＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である、請求項２９～５７のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項６１】

前記複数のｇ－ＮＫ細胞が、ＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｖ（Ｖ１５８）である、請求項２９～６０のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項６２】

前記複数のｇ－ＮＫ細胞がＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｆである、請求項２９～６０のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項６３】

少なくとも10^{8}個又は少なくとも約10^{8}個の細胞を含む、請求項２９～６２のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項６４】

前記組成物中のｇ－ＮＫ細胞の数が、10^{8}もしくは約10^{8}から、10^{12}もしくは

約10^{12}個の細胞、10^{8}もしくは約10^{8}から、10^{11}もしくは約10^{11}個の細胞、10^{8}もしくは約10^{8}から、10^{10}もしくは約10^{10}個の細胞、10^{8}もしくは約10^{8}から、10^{9}もしくは約10^{9}個の細胞、10^{9}もしくは約10^{9}から、10^{12}もしくは約10^{12}個の細胞、10^{9}もしくは約10^{9}から、10^{11}もしくは約10^{11}個の細胞、10^{9}もしくは約10^{9}から、10^{10}もしくは約10^{10}個の細胞、10^{10}もしくは約10^{10}から、10^{12}もしくは約10^{12}個の細胞、10^{10}もしくは約10^{10}から、10^{11}もしくは約10^{11}個の細胞、又は10^{11}もしくは約10^{11}から、10^{12}もしくは約10^{12}個の細胞である、請求項２９～６３のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項６５】

前記組成物中のｇ－ＮＫ細胞の数が、5×10^{8}もしくは約5×10^{8}個の細胞、1×10^{9}もしくは約1×10^{9}個の細胞、5×10^{10}もしくは約5×10^{10}個の細胞、又は1×10^{10}もしくは約1×10^{10}個の細胞である、請求項２９～６４のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項６６】

前記組成物の体積が、５０ｍＬ又は約５０ｍＬから、５００ｍＬ又は約５００ｍＬ、任意選択的に２００ｍＬ又は約２００ｍＬである、請求項２９～６５のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項６７】

前記組成物中の細胞が、同じ生体試料から増殖させた単一のドナー対象由来である、請求項２９～６６のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項６８】

前記組成物が医薬組成物である、請求項２９～６７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６９】

薬学的に許容される賦形剤を含む、請求項２９～６８のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項７０】

抗凍結剤を含む無血清凍結保存培地中に製剤化される、請求項２９～６９のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項７１】

前記抗凍結剤がＤＭＳＯであり、前記凍結保存培地が５％～１０％ＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）である、請求項７０に記載の組成物。

【請求項７２】

前記抗凍結剤が、１０％ＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）であるか、又は約１０％ＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）である、請求項７１に記載の組成物。

【請求項７３】

無菌である、請求項２９～７２のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項７４】

請求項２９～７３のいずれか一項に記載の組成物を含む、滅菌バッグ。

【請求項７５】

凍結保存適合性バッグである、請求項７４に記載の滅菌バッグ。

【請求項７６】

ＦｃＲγ鎖の発現が欠損したＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ細胞）に、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする異種核酸を導入することを含む、遺伝子操作されたｇ－ＮＫ細胞を産生する方法。

【請求項７７】

ｇ－ＮＫ細胞に、免疫調節物質をコードする異種核酸を導入することであって、それによって、遺伝子操作されたｇ－ＮＫ細胞を産生する、導入すること
を含む、遺伝子操作されたｇ－ＮＫ細胞を産生する方法。

【請求項７８】

（ａ）ＦｃＲγ鎖の発現が欠損しているＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ細胞）に、キメラ抗原受容

体（ＣＡＲ）をコードする異種核酸を導入することと、
（ｂ）ｇ－ＮＫ細胞に、免疫調節物質をコードする異種核酸を導入することであって、それによって、遺伝子操作されたｇ－ＮＫ細胞を産生する、導入することと
を含む、遺伝子操作されたｇ－ＮＫ細胞を産生する方法であって、
ステップ（ａ）及び（ｂ）が、同時に又は任意の順序で逐次的に行われる、
方法。
【請求項７９】
前記ＣＡＲが、１）抗原結合ドメイン、２）可撓性リンカー（スペーサー）、３）膜貫通領域、及び４）細胞内シグナル伝達ドメインを含む、請求項７６又は請求項７８に記載の方法。
【請求項８０】
前記抗原結合ドメインが腫瘍抗原を標的とする、請求項７９に記載の方法。
【請求項８１】
前記抗原結合ドメインが単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）である、請求項７９又は８０に記載の方法。
【請求項８２】
前記細胞内シグナル伝達ドメインが、ＣＤ３ζ、ＤＡＰ１０、ＤＡＰ１２、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、又はＯＸ４０由来の１つ以上のシグナル伝達ドメインを含む、請求項７９～８１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８３】
前記細胞内シグナル伝達ドメインが、ＣＤ３ζ、ＤＡＰ１０、ＤＡＰ１２、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、又はＯＸ４０由来の２つ以上のシグナル伝達ドメインを含む、請求項７９～８２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８４】
前記細胞内シグナル伝達ドメインが、ＣＤ３ζのシグナル伝達ドメインを含む一次シグナル伝達ドメインと、共刺激シグナル伝達ドメインとを含む、請求項７９～８３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８５】
前記共刺激シグナル伝達ドメインが、ＣＤ２８又は４－１ＢＢのシグナル伝達ドメインである、請求項８４に記載の方法。
【請求項８６】
前記ＣＡＲをコードする前記異種核酸が、前記ｇ－ＮＫ細胞のゲノムへの安定な組み込みのための条件下で導入される、請求項７６又は７８～８５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８７】
前記ＣＡＲをコードする前記異種核酸が、ウイルスベクターに含まれ、形質導入によって前記ｇ－ＮＫ細胞に導入される、請求項７６又は７８～８６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８８】
前記ウイルスベクターが、レンチウイルスベクターである、請求項８７に記載の方法。
【請求項８９】
前記ＣＡＲをコードする前記核酸が、前記ｇ－ＮＫ細胞における一過性発現のための条件下で導入される、請求項７６又は７８～８５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９０】
前記ＣＡＲをコードする前記核酸が、非ウイルス送達によって導入される、請求項７６、７８～８５、又は８９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９１】
前記ＣＡＲをコードする前記核酸が、脂質ナノ粒子を介して前記ｇ－ＮＫ細胞に導入される、請求項７６、７８～８５、又は８９～９０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９２】

前記ＣＡＲをコードする前記核酸がＤＮＡである、請求項７６又は７８～９１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９３】
前記ＣＡＲをコードする前記核酸がＲＮＡである、請求項７６、７８～８５、又は８９～９１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９４】
前記ＲＮＡがｍＲＮＡである、請求項９３に記載の方法。
【請求項９５】
前記ＲＮＡが自己増幅ｍＲＮＡである、請求項９４に記載の方法。
【請求項９６】
前記核酸が、エレクトロポレーションを介して前記ｇ－ＮＫ細胞に導入される、請求項７６、７８～８５、又は８９～９５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９７】
前記免疫調節物質が免疫抑制物質である、請求項７７又は請求項７８に記載の方法。
【請求項９８】
前記免疫調節物質が免疫活性化物質である、請求項７７又は請求項７８に記載の方法。
【請求項９９】
前記免疫調節物質がサイトカインである、請求項７７、７８、又は請求項９８に記載の方法。
【請求項１００】
前記サイトカインが、前記操作されたＮＫ細胞から分泌可能である、請求項９９に記載の方法。
【請求項１０１】
分泌可能な前記サイトカインが、ＩＬ－２もしくはその生物学的に活性な部分、ＩＬ－１５もしくはその生物学的に活性な部分、ＩＬ－２１もしくはその生物学的に活性な部分、又はそれらの組み合わせである、請求項１００に記載の方法。
【請求項１０２】
前記サイトカインが膜結合型である、請求項９９に記載の方法。
【請求項１０３】
膜結合型サイトカインが、膜結合型ＩＬ－２（ｍｂＩＬ－２）、膜結合型ＩＬ－１５（ｍｂＩＬ－１５）、又は膜結合型ＩＬ－２１（ｍｂＩＬ－２１）、又はそれらの組み合わせである、請求項１０２に記載の方法。
【請求項１０４】
前記免疫調節物質をコードする前記核酸が、前記ｇ－ＮＫ細胞のゲノムへの安定な組み込みのための条件下で導入される、請求項７７～１０３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０５】
免疫調節物質をコードする前記核酸が、ウイルスベクターに含まれ、形質導入によって前記ｇ－ＮＫ細胞に導入される、請求項７７～１０４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０６】
前記ウイルスベクターが、レンチウイルスベクターである、請求項１０５に記載の方法。
【請求項１０７】
前記免疫調節物質をコードする前記核酸が、前記ｇ－ＮＫ細胞における一過性発現のための条件下で導入される、請求項７７～１０３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０８】
前記免疫調節物質をコードする前記核酸が、非ウイルス送達によって導入される、請求項７７～８５、８９～９０、又は９７～１０７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０９】
前記免疫調節物質をコードする前記核酸が、脂質ナノ粒子を介して前記ｇ－ＮＫ細胞に導入される、請求項７７～８５、８９～９１、又は９７～１０８のいずれか一項に記載の

方法。
【請求項１１０】
前記免疫調節物質をコードする前記核酸がＤＮＡである、請求項７７～１０９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１１】
前記免疫調節物質をコードする前記核酸がＲＮＡである、請求項７７～８５、８９～９１、又は９７～１０９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１２】
前記ＲＮＡがｍＲＮＡである、請求項１１１に記載の方法。
【請求項１１３】
前記ＲＮＡが自己増幅ｍＲＮＡである、請求項１１２に記載の方法。
【請求項１１４】
前記免疫調節物質をコードする前記核酸が、エレクトロポレーションを介して前記ｇ－ＮＫ細胞に導入される、請求項７７～８５、８９～１０３、又は１０７～１１３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１５】
前記ＣＡＲをコードする前記核酸及び前記免疫調節物質をコードする前記核酸が、同じポリヌクレオチドからコードされ、一緒に導入される、請求項７８～１１４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１６】
前記ＣＡＲをコードする前記核酸及び前記免疫調節物質をコードする前記核酸が、前記ポリヌクレオチド配列のマルチシストロン性エレメントによって隔てられている、請求項１１５に記載の方法。
【請求項１１７】
前記マルチシストロン性エレメントが、Ｔ２Ａ、Ｐ２Ａ及びＦ２Ａからなる群から選択される自己切断ペプチドである、請求項１１６に記載の方法。
【請求項１１８】
前記ＣＡＲをコードする前記核酸及び前記免疫調節物質をコードする前記核酸が、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮された集団を増殖させるためのエクスビボプロセス中に同時に導入される、請求項７８～１１４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１９】
前記ｇ－ＮＫ細胞組成物が、
（ｉ）ＣＤ３について陰性もしくは低度かつＣＤ５７について陽性（ＣＤ３^{neg}ＣＤ５７^{pos}）又は（ｉｉ）ＣＤ３について陰性もしくは低度かつＣＤ５６について陽性（ＣＤ３^{neg}ＣＤ５６^{pos}）のいずれかである、対象由来の生体試料から濃縮されたＮＫ細胞
のエクスビボ増殖によって産生され、
前記濃縮されたＮＫ細胞が、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞及び１つ以上の組換えサイトカインと共に培養される、
請求項７６～１１８のいずれか一項記載の方法。７６．前記１つ以上の組換えサイトカインが、有効量のＳＣＦ、ＧＳＫ３ｉ、ＦＬＴ３、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－１２、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２７、又はそれらの組み合わせから選択される、請求項７５に記載の方法。
【請求項１２０】
前記１つ以上の組換えサイトカインが、ＩＬ－２１を含む、請求項１１９に記載の方法。
【請求項１２１】
前記培養が、２つ以上の組換えサイトカインの存在下で行われ、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、請求項１１９又は請求項１２０に記載の方法。

【請求項１２２】
前記導入することが、
ＦｃＲγ欠損ＮＫ（ｇ－ＮＫ）細胞を増殖させるための方法
の間に行われ、前記方法が、
（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された前記集団が、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、
（Ｂ）操作されたＮＫ細胞の前記集団を、
（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞対　濃縮されたＮＫ細胞の比は１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び
（２）前記ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、前記ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカイン
と共に、培養培地中で培養することと
を含み、
前記ＣＡＲをコードする前記核酸を導入することが、ステップ（Ａ）の後、かつステップ（Ｂ）の前、間、又は後に行われ、それによって、操作されたＮＫ細胞の集団を産生し、
前記方法が、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮され、かつＣＡＲで操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、
請求項７６、７９～９６、又は１１９～１２１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２３】
前記導入することが、
ＦｃＲγ欠損ＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ）を増殖させるための方法
の間に行われ、前記方法が、
（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された前記集団が、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、
（Ｂ）濃縮されたＮＫ細胞の前記集団に、ＣＡＲをコードする前記核酸を導入することであって、それによって、操作されたＮＫ細胞の集団を産生する、導入することと、
（Ｃ）操作されたＮＫ細胞の前記集団を、
（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞対　濃縮ＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び
（２）前記ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、前記ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカイン
と共に、培養培地中で培養することであって、それによって、ＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、培養することと
を含み、
前記方法が、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮され、かつＣＡＲで操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、
請求項７６、７９～９６、又は１１９～１２１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２４】
前記導入することが、

ＦｃＲγ欠損ＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ）を増殖させるための方法
の間に行われ、前記方法が、
（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された前記集団が、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、
（Ｂ）濃縮されたＮＫ細胞の前記集団を、
（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞対　濃縮されたＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び
（２）前記ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、前記ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカイン
と共に、培養培地中で培養することであって、それにより、ＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、培養することと、
（Ｃ）ＮＫ細胞の前記増殖させた集団のＮＫ細胞に、ＣＡＲをコードする前記核酸を導入することと
を含み、
前記方法が、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮され、かつＣＡＲで操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、
請求項７６、７９～９６、または１１９～１２１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２５】
前記導入することが、
ＦｃＲγ欠損ＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ）を増殖させるための方法
の間に行われ、前記方法が、
（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された前記集団が、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、
（Ｂ）濃縮されたＮＫ細胞の前記集団を、前記ＮＫ細胞を増殖させるための条件下で培養培地中で培養することを含む第１の増殖を実施することであって、第１の増殖させたＮＫ細胞集団を産生する、実施することと、
（Ｃ）前記第１の増殖させたＮＫ細胞集団のＮＫ細胞に、ＣＡＲをコードする前記核酸を導入することであって、それによって、操作されたＮＫ細胞の集団を産生する、導入することと、
（Ｄ）前記ＮＫ細胞の更なる増殖のための条件下で、操作されたＮＫ細胞の前記集団を培養することを含む第２の増殖を実施することと
を含み、
前記第１の増殖及び／又は第２の増殖が、濃縮されたＮＫ細胞の前記集団を、
（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞対　濃縮されたＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び
（２）前記ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、前記ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカイン
と共に、培養培地中で培養することを含み、
前記方法が、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮され、かつＣＡＲで操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、

請求項７６、７９～９６、又は１１９～１２１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２６】
前記導入することが、
ＦｃＲγ欠損ＮＫ（ｇ－ＮＫ）細胞を増殖させるための方法
の間に行われ、前記方法が、
（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された前記集団が、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、
（Ｂ）操作されたＮＫ細胞の前記集団を、
（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞対　濃縮されたＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び
（２）前記ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、前記ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカイン
と共に、培養培地中で培養することと
を含み、
前記免疫調節物質をコードする前記核酸を導入することが、ステップ（Ａ）の後、かつステップ（Ｂ）の前、間、又は後に行われ、それによって、操作されたＮＫ細胞の集団を産生し、
前記方法が、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮され、かつ免疫調節物質で操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、
請求項７７、９７～１１４、又は１１９～１２１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２７】
前記導入することが、
ＦｃＲγ欠損ＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ）を増殖させるための方法
の間に行われ、前記方法が、
（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された前記集団が、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、
（Ｂ）濃縮されたＮＫ細胞の前記集団に、免疫調節物質をコードする前記核酸を導入することであって、それによって、操作されたＮＫ細胞の集団を産生する、導入することと、
（Ｃ）操作されたＮＫ細胞の前記集団を、
（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞対　濃縮ＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び
（２）前記ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、前記ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカイン
と共に、培養培地中で培養することであって、それによって、ＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、培養することと
を含み、
前記方法が、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮され、かつ免疫調節物質で操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、
請求項７７、９７～１１４、又は１１９～１２１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１２８】
前記導入することが、
ＦｃＲγ欠損ＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ）を増殖させるための方法
の間に行われ、前記方法が、
（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された前記集団が、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、
（Ｂ）濃縮されたＮＫ細胞の前記集団を、
（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞対　濃縮されたＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び
（２）前記ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、前記ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカイン
と共に、培養培地中で培養することであって、それにより、ＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、培養することと、
（Ｃ）ＮＫ細胞の前記増殖させた集団のＮＫ細胞に、免疫調節物質をコードする前記核酸を導入することと
を含み、
前記方法が、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮され、かつ免疫調節物質で操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、
請求項７７、９７～１１４、又は１１９～１２１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２９】
前記導入することが、
ＦｃＲγ欠損ＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ）を増殖させるための方法
の間に行われ、前記方法が、
（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された前記集団が、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、
（Ｂ）濃縮されたＮＫ細胞の前記集団を、前記ＮＫ細胞を増殖させるための条件下で培養培地中で培養することを含む第１の増殖を実施することであって、第１の増殖させたＮＫ細胞集団を産生する、実施することと、
（Ｃ）前記第１の増殖させたＮＫ細胞集団（免疫調節物質をコードする前記核酸）をＮＫ細胞に導入することであって、それによって、操作されたＮＫ細胞の集団を産生する、導入することと、
（Ｄ）前記ＮＫ細胞の更なる増殖のための条件下で、操作されたＮＫ細胞の前記集団を培養することを含む第２の増殖を実施することと
を含み、
前記第１の増殖及び／又は第２の増殖が、濃縮されたＮＫ細胞の前記集団を、
（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞対　濃縮されたＮＫ細胞の比は１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び
（２）前記ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、前記ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカイン
と共に、培養培地中で培養することを含み、

前記方法が、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮され、かつ免疫調節物質で操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、
請求項７７、９７～１１４、又は１１９～１２１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３０】
前記導入することが、
ＦｃＲγ欠損ＮＫ（ｇ－ＮＫ）細胞を増殖させるための方法
の間に行われ、前記方法が、
（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された前記集団が、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、
（Ｂ）操作されたＮＫ細胞の前記集団を、
（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞　対　濃縮されたＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び
（２）前記ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、前記ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカイン
と共に、培養培地中で培養することと
を含み、
ここで、（ｉ）前記ＣＡＲをコードする前記核酸及び／又は（ｉｉ）前記免疫調節物質をコードする前記核酸を導入することが、ステップ（Ａ）の後、かつステップ（Ｂ）の前、間、又は後に行われ、ここで、ステップ（ｉ）及び（ｉｉ）は、同時に又は任意の順序で逐次的に行われ、それによって、操作されたＮＫ細胞の集団を産生し、
前記方法が、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮され、かつＣＡＲ及び免疫調節物質で操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、
請求項７８～１２１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３１】
前記導入することが、
ＦｃＲγ欠損ＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ）を増殖させるための方法
の間に行われ、前記方法が、
（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された前記集団が、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、
（Ｂ）濃縮されたＮＫ細胞の前記集団に、（ｉ）ＣＡＲをコードする前記核酸、及び（ｉｉ）免疫調節物質をコードする前記核酸を導入することであって、ステップ（ｉ）及び（ｉｉ）が同時に又は任意の順序で逐次的に行われ、それによって、操作されたＮＫ細胞の集団を産生する、導入することと、
（Ｃ）操作されたＮＫ細胞の前記集団を、
（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞　対　濃縮ＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び
（２）前記ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、前記ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカイン
と共に、培養培地中で培養することであって、それによって、ＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、培養することと

を含み、
前記方法が、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮され、かつＣＡＲ及び免疫調節物質で操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、
請求項７８～１２１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３２】
前記導入することが、
ＦｃＲγ欠損ＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ）を増殖させるための方法
の間に行われ、前記方法が、
（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された前記集団が、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、
（Ｂ）濃縮されたＮＫ細胞の前記集団を、
（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞対　濃縮されたＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び
（２）前記ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、前記ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカイン
と共に、培養培地中で培養することであって、それにより、ＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、培養することと、
（Ｃ）ＮＫ細胞の前記増殖させた集団のＮＫ細胞に、（ｉ）ＣＡＲをコードする前記核酸、及び（ｉｉ）免疫調節物質をコードする前記核酸を導入することであって、ステップ（ｉ）及び（ｉｉ）が同時に又は任意の順序で逐次的に行われる、導入することと
を含み、
前記方法が、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮され、かつＣＡＲ及び免疫調節物質で操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、
請求項７８～１２１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３３】
前記導入することが、
ＦｃＲγ欠損ＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ）を増殖させるための方法
の間に行われ、前記方法が、
（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された前記集団が、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、
（Ｂ）濃縮されたＮＫ細胞の前記集団を、前記ＮＫ細胞を増殖させるための条件下で培養培地中で培養することを含む第１の増殖を実施することであって、第１の増殖させたＮＫ細胞集団を産生する、実施することと、
（Ｃ）前記第１の増殖させたＮＫ細胞集団のＮＫ細胞に、（ｉ）ＣＡＲをコードする前記核酸、及び（ｉｉ）免疫調節物質をコードする前記核酸を導入することであって、ステップ（ｉ）及び（ｉｉ）が同時に又は任意の順序で逐次的に行われ、それによって、操作されたＮＫ細胞の集団を産生する、導入することと、
（Ｄ）前記ＮＫ細胞の更なる増殖のための条件下で、操作されたＮＫ細胞の前記集団を培養することを含む第２の増殖を実施することと
を含み、
前記第１の増殖及び／又は第２の増殖が、濃縮されたＮＫ細胞の前記集団を、
（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞対　濃縮されたＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィ

ーダー細胞、及び
（２）前記ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、前記ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカイン
と共に、培養培地中で培養することを含み、
前記方法が、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮され、かつＣＡＲ及び免疫調節物質で操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、
請求項７８～１２１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３４】
ＮＫ細胞について濃縮された初代ヒト細胞の前記集団が、ヒト対象由来の生体試料から、（ｉ）ＣＤ３について陰性もしくは低度かつＣＤ５７について陽性（ＣＤ３^{neg}ＣＤ５７^{pos}）又は（ｉｉ）ＣＤ３について陰性もしくは低度かつＣＤ５６について陽性（ＣＤ３^{neg}ＣＤ５６^{pos}）のいずれかである細胞を選択することによって得られる、請求項１１９～１３３のいずれか一項記載の方法。
【請求項１３５】
ＮＫ細胞について濃縮された前記集団が、ＮＫＧ２Ｃについて陽性である細胞（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）について更に選択された細胞である、
ＮＫ細胞について濃縮された前記集団が、ＮＫＧ２Ａについて陰性又は低度である細胞（ＮＫＧ２Ａ^{neg}）について更に選択された細胞である、又は
ＮＫ細胞について濃縮された前記集団が、ＮＫＧ２Ｃについて陽性かつＮＫＧ２Ａについて陰性又は低度である細胞（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}）について更に選択された細胞である、
請求項１３４に記載の方法。
【請求項１３６】
前記ヒト対象が、前記対象由来の末梢血試料中のナチュラルキラー（ＮＫ）細胞の少なくとも２０％又は約２０％がＮＫＧ２Ｃについて陽性（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）でありかつ前記末梢血試料中のＮＫ細胞の少なくとも７０％がＮＫＧ２Ａについて陰性又は低度（ＮＫＧ２Ａ^{neg}）である対象である、請求項１１９～１３５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３７】
前記対象がＣＭＶ血清陽性である、請求項１１９～１３６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３８】
前記対象由来の前記生体試料中のＮＫ細胞のうちのｇ－ＮＫ細胞の割合が、５％超又は約５％超、１０％超又は約１０％超、もしくは３０％超又は約３０％超である、請求項１１９～１３７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３９】
濃縮されたＮＫ細胞の前記集団中のｇ－ＮＫ細胞の割合が、２０％もしくは約２０％から、９０％もしくは約９０％、４０％もしくは約４０％から、９０％もしくは約９０％、又は６０％もしくは約６０％から、９０％もしくは約９０％である、請求項１１９～１３８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４０】
ＮＫ細胞について濃縮された前記集団が、ＣＤ３について陰性又は低度かつＣＤ５７について陽性（ＣＤ３^{neg}ＣＤ５７^{pos}）である、前記生体試料から選択された細胞である、請求項１１９～１３９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４１】
ＮＫ細胞について濃縮された前記集団が、ＣＤ３について陰性又は低度かつＣＤ５６について陽性（ＣＤ３^{neg}ＣＤ５６^{pos}）である、前記生体試料から選択された細胞である、請求項１１９～１４０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４２】

前記２つ以上の組換えサイトカインが、有効量のＳＣＦ、ＧＳＫ３ｉ、ＦＬＴ３、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－１２、ＩＬ－１８、ＩＬ－２７、又はそれらの組み合わせを更に含む、請求項１１９～１４１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４３】

前記組換えサイトカインが、ＩＬ－２１及びＩＬ－２である、請求項１１４～１４２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４４】

前記組換えサイトカインが、ＩＬ－２１、ＩＬ－２、及びＩＬ－１５である、請求項１１４～１４２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４５】

組換えＩＬ－２１が、前記培養の少なくとも一部の間に、１０ｎｇ／ｍＬ又は約１０ｎｇ／ｍＬから、１００ｎｇ／ｍＬ又は約１００ｎｇ／ｍＬの濃度で前記培養培地に添加される、請求項１１４～１４４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４６】

組換えＩＬ－２１が、前記培養の少なくとも一部の間に、２５ｎｇ／ｍＬ又は約２５ｎｇ／ｍＬの濃度で前記培養培地に添加される、請求項１１４～１４５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４７】

組換えＩＬ－２が、前記培養の少なくとも一部の間に、１０ＩＵ／ｍＬ又は約１０ＩＵ／ｍＬから、５００ＩＵ／ｍＬ又は約５００ＩＵ／ｍＬの濃度で前記培養培地に添加される、請求項１１４～１４６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４８】

組換えＩＬ－２が、前記培養の少なくとも一部の間に、１００ＩＵ／ｍＬ又は約１００ＩＵ／ｍＬの濃度で前記培養培地に添加される、請求項１１４～１４７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４９】

組換えＩＬ－２が、前記培養の少なくとも一部の間に、５００ＩＵ／ｍＬ又は約５００ＩＵ／ｍＬの濃度で前記培養培地に添加される、請求項１１４～１４８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１５０】

組換えＩＬ－１５が、前記培養の少なくとも一部の間に、１ｎｇ／ｍＬ又は約１／ｍＬから、５０ｎｇ／ｍＬ又は約５０ｎｇ／ｍＬの濃度で前記培養培地に添加される、請求項１１４～１４２及び１４４～１４９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１５１】

組換えＩＬ－１５が、前記培養の少なくとも一部の間に、１０ｎｇ／ｍＬ又は約１０ｎｇ／ｍＬの濃度で前記培養培地に添加される、請求項１１４～１４２及び１４４～１４８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１５２】

前記組換えサイトカインが、前記培養の開始時又はほぼ開始時に前記培養培地に添加される、請求項１１４～１５１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１５３】

前記培養中に前記培養培地を１回以上交換することを更に含み、前記培養培地の各交換時に、前記組換えサイトカインを含有する新鮮な培地が添加される、請求項１１４～１５２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１５４】

前記培養培地の前記交換が、前記培養の期間中、２又は３日毎に行われる、請求項１５３に記載の方法。

【請求項１５５】

前記培地の交換が、最大５日間の培地交換を伴わない第１の増殖の後に行われ、任意選択で、最大５日間の培地交換を伴わない第１の増殖の後に行われる、請求項１５３又は請

求項１５４に記載の方法。
【請求項１５６】
前記ヒト対象が、ＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｖ　ＮＫ細胞遺伝子型又はＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｆ　ＮＫ細胞遺伝子型を有し、任意選択で、前記生体試料が、ＣＤ１６　１５８Ｖ／ＶＮＫ細胞遺伝子型又はＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｆ　ＮＫ細胞遺伝子型について選択されたヒト対象に由来する、請求項１１４～１５５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５７】
前記生体試料が、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）であるか、又はそれを含み、任意選択で、血液試料、アフェレーシス試料又は白血球アフェレーシス試料である、請求項１１４～１５６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５８】
前記ＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞が、ＨＬＡ－Ｅで形質転換されたＫ５６２細胞（Ｋ５６２－ＨＬＡ－Ｅ）である、請求項１１４～１５７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５９】
前記ＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞が、２２１．ＡＥＨ細胞である、請求項１１４～１５８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６０】
照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞　対　濃縮されたＮＫ細胞の比が、１：１～５：１（両端を含む）、１：１～３：１（両端を含む）、任意選択で、２．５：１もしくは約２．５：１、又は２：１もしくは約２：１、又は約１：１である、請求項１１４～１５９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６１】
前記培養の少なくとも一部の間に前記培養培地に添加される前記組換えサイトカインが、５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、１０ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１５、及び２５ｎｇ／ｍＬのＩＬ－２１である、請求項１１４～１６０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６２】
濃縮されたＮＫ細胞の前記集団が、２．０×10^5個の濃縮ＮＫ細胞もしくは約２．０×10^5個の濃縮ＮＫ細胞から、５．０×10^7個の濃縮ＮＫ細胞もしくは約５．０×10^7個の濃縮ＮＫ細胞、１．０×10^6個の濃縮ＮＫ細胞もしくは約１．０×10^6個の濃縮ＮＫ細胞から、１．０×10^8個の濃縮ＮＫ細胞もしくは約１．０×10^8個の濃縮ＮＫ細胞、１．０×10^7個の濃縮ＮＫ細胞もしくは約１．０×10^7個の濃縮ＮＫ細胞から、５．０×10^8個の濃縮ＮＫ細胞もしくは約５．０×10^8個の濃縮ＮＫ細胞、又は１．０×10^7個の濃縮ＮＫ細胞もしくは約１．０×10^7個の濃縮ＮＫ細胞から、約１．０×10^9個の濃縮ＮＫ細胞もしくは約１．０×10^9個の濃縮ＮＫ細胞を含み（それぞれ両端を含む）、任意選択で、濃縮されたＮＫ細胞の前記集団が、１．０×10^6個の濃縮ＮＫ細胞又は約１．０×10^6個の濃縮ＮＫ細胞を含む、請求項１１４～１６１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６３】
前記培養開始時の濃縮されたＮＫ細胞の前記集団が、０．０５×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬもしくは約０．０５×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬから、１．０×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬもしくは約１．０×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ、又は０．０５×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬもしくは約０．０５×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬから、０．５×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬもしくは約０．５×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬの濃度であり、任意選択で、前記培養開始時の濃縮されたＮＫ細胞の前記集団が、０．２×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ又は約０．２×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬの濃度を含む、請求項１１４～１６２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６４】
少なくとも２．５０×10^8もしくは少なくとも約２．５０×10^8個のｇ－ＮＫ細胞、少なくとも５．００×10^8もしくは少なくとも約５．００×10^8個のｇ－ＮＫ細胞、少なくとも１．０×10^9もしくは少なくとも約１．０×10^9個のｇ－ＮＫ細胞、又

は少なくとも５．０×１０^{9}もしくは少なくとも約５．０×１０^{9}個のｇ－ＮＫ細胞の増殖を前記方法が達成する時点まで、前記培養が行われる、請求項１１４～１６３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１６５】

５日間、６日間、７日間、８日間、９日間、１０日間、１１日間、１２日間、１３日間、１４日間、１５日間、１６日間、１７日間、１８日間、１９日間、２０日間、２１日間、２２日間、２３日間、２４日間、もしくは２５日間、又は約５日間、６日間、７日間、８日間、９日間、１０日間、１１日間、１２日間、１３日間、１４日間、１５日間、１６日間、１７日間、１８日間、１９日間、２０日間、２１日間、２２日間、２３日間、２４日間、もしくは２５日間、又は少なくとも５日間、６日間、７日間、８日間、９日間、１０日間、１１日間、１２日間、１３日間、１４日間、１５日間、１６日間、１７日間、１８日間、１９日間、２０日間、２１日間、２２日間、２３日間、２４日間、もしくは２５日間、又は少なくとも約５日間、６日間、７日間、８日間、９日間、１０日間、１１日間、１２日間、１３日間、１４日間、１５日間、１６日間、１７日間、１８日間、１９日間、２０日間、２１日間、２２日間、２３日間、２４日間、もしくは２５日間、前記培養が行われる、請求項１１４～１６４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１６６】

前記方法によって産生された、操作されたＮＫ細胞の前記増殖させた集団を、収集することを更に含む、請求項１１４～１６５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１６７】

操作されたＮＫ細胞の前記増殖させた集団を、薬学的に許容される賦形剤中に製剤化することを更に含む、請求項１１４～１６６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１６８】

操作されたＮＫ細胞の前記増殖させた集団を、抗凍結剤を含む無血清凍結保存培地と共に製剤化することを更に含む、請求項１６７に記載の方法。

【請求項１６９】

前記抗凍結剤がＤＭＳＯであり、任意選択で前記抗凍結剤がＤＭＳＯであり、前記凍結保存培地が、５％～１０％ＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）であり、任意選択で１０％ＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）又は約１０％ＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）である、請求項１６８に記載の方法。

【請求項１７０】

前記方法によって産生された操作されたＮＫ細胞の前記増殖させた集団の中で、前記集団の５０％超がＦｃＲγ^{neg}である、前記集団の６０％超がＦｃＲγ^{neg}である、前記集団の７０％超がＦｃＲγ^{neg}，，である、前記集団の８０％超がＦｃＲγ^{neg}である、前記集団の９０％超がＦｃＲγ^{neg}である、又は前記集団の９５％超がＦｃＲγ^{neg}である、請求項１１４～１６９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１７１】

請求項７６、７８～９６、１１９～１２５、又は１３４～１７０のいずれか一項に記載の方法によって産生された操作されたｇ－ＮＫ細胞を複数含む、組成物。

【請求項１７２】

請求項７７、９７～１１４、１１９～１２１、１２６～１２９、又は１３４～１７０のいずれか一項に記載の方法によって産生された操作されたｇ－ＮＫ細胞を複数含む、組成物。

【請求項１７３】

請求項７７～１２１又は１３０～１７０のいずれか一項に記載の方法によって産生された操作されたｇ－ＮＫ細胞を複数含む、組成物。

【請求項１７４】

対象における疾患又は状態を処置する方法であって、請求項２９～７３又は１７１～１７３のいずれか一項に記載の組成物の細胞の有効量を、それを必要とする個体に投与することを含む、方法。

【請求項１７５】

前記疾患又は状態が、炎症状態、感染、又はがんからなる群から選択される、請求項１７４に記載の方法。
【請求項１７６】
前記疾患又は状態が、がんであり、前記がんが、白血病、リンパ腫、又は骨髄腫である、請求項１７４又は請求項１７５に記載の方法。
【請求項１７７】
前記疾患又は状態が、がんであり、前記がんが、固形腫瘍を含む、請求項１７４又は請求項１７５に記載の方法。
【請求項１７８】
前記がんが、胃又は食道胃接合部の腺がん、膀胱がん、乳がん、脳がん、子宮頸がん、結腸直腸がん、内分泌／神経内分泌がん、頭頸部がん、消化管間質がん、骨巨細胞腫瘍、腎臓がん、肝臓がん、肺がん、神経芽細胞腫、卵巣上皮／ファロピウス管／原発性腹膜がん、膵臓がん、前立腺がん、皮膚がん、及び軟部組織がんの中から選択される、請求項１７７に記載の方法。
【請求項１７９】
前記組成物が単剤療法として投与される、請求項１７４～１７８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８０】
前記疾患又は状態を治療するために前記個体に追加の薬剤を投与することを更に含む、請求項１７４～１７９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８１】
前記追加の薬剤が抗体又はＦｃ融合タンパク質である、請求項１８０に記載の方法。
【請求項１８２】
前記追加の薬剤が、モノクローナル抗体である、請求項１８０又は請求項１８１に記載の方法。
【請求項１８３】
前記抗体が全長抗体である、請求項１８１又は請求項１８２に記載の方法。
【請求項１８４】
前記抗体がＩｇＧ１抗体である、請求項１８１～１８３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８５】
前記疾患又は状態が、がんであり、前記追加の薬剤、任意選択で前記抗体が、前記がんに関連する腫瘍抗原を認識する、請求項１８０～１８４に記載の方法。
【請求項１８６】
前記ｇ－ＮＫ細胞組成物の、1×10^{5}又は約1×10^{5}から、50×10^{9}又は約50×10^{9}個の細胞を、前記個体に投与することを含む、請求項１７４～１８５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８７】
前記ｇ－ＮＫ細胞組成物の、1×10^{8}又は約1×10^{8}から、50×10^{9}又は約50×10^{9}個のＮＫ細胞、任意選択で、前記ｇ－ＮＫ細胞組成物の5×10^{8}もしくは約5×10^{8}個の細胞、前記ｇ－ＮＫ細胞組成物の5×10^{9}もしくは約5×10^{9}個の細胞、又は前記ｇ－ＮＫ細胞組成物の10×10^{9}もしくは約10×10^{9}個の細胞を、投与することを含む、請求項１７４～１８６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８８】
前記対象における前記投与されたＮＫ細胞のインビボでの増殖又は持続を促進するために外因性サイトカインサポートを投与することを更に含み、任意選択で、前記外因性サイトカインがＩＬ－１５であるか、又はＩＬ－１５を含む、請求項１７４～１８７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８９】
前記用量のｇ－ＮＫ細胞の前記投与前に、前記対象がリンパ球枯渇療法を受けている、請求項１７４～１８８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１９０】
前記リンパ球枯渇療法がフルダラビン及び／又はシクロホスファミドを含む、請求項１２９に記載の方法。
【請求項１９１】
前記リンパ球枯渇療法が、フルダラビンを、前記対象の体表面積で２０～４０ｍｇ／ｍ^{2}又は約２０～４０ｍｇ／ｍ^2、任意選択で３０ｍｇ／ｍ^{2}又は約３０ｍｇ／ｍ^{2}で、毎日、２～４日間にわたって投与し、かつ／又は、シクロホスファミドを、前記対象の体表面積で２００～４００ｍｇ／ｍ^{2}又は約２００～４００ｍｇ／ｍ^2、任意選択で３００ｍｇ／ｍ^{2}又は約３００ｍｇ／ｍ^{2}で、毎日、２～４日間にわたって投与することを含む、請求項１８９又は請求項１９０に記載の方法。
【請求項１９２】
前記リンパ球枯渇療法が、フルダラビン及びシクロホスファミドを含む、請求項１８９～１９１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９３】
前記リンパ球枯渇療法が、フルダラビンを前記対象の体表面積で３０ｍｇ／ｍ^{2}又は約３０ｍｇ／ｍ^{2}で毎日、及びシクロホスファミドを前記対象の体表面積で３００ｍｇ／ｍ^{2}又は約３００ｍｇ／ｍ^{2}で毎日、それぞれ２～４日間にわたって、任意選択で３日間にわたって投与することを含む、請求項１８９～１９２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９４】
前記細胞の投与が、前記リンパ球枯渇療法の開始後２週間以内に、又は２週間もしくは約２週間で開始される、請求項１８９～１９３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９５】
前記個体がヒトである、請求項１７４～１９４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９６】
前記組成物中のＮＫ細胞が、前記個体にとって同種異系である、請求項１７４～１９５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９７】
前記組成物中の前記ＮＫ細胞が、前記対象にとって自己由来である、請求項１８９～１９５のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、「ＥＮＧＩＮＥＥＲＥＤ　ＮＡＴＵＲＡＬ　ＫＩＬＬＥＲ（ＮＫ）ＣＥＬＬＳ　ＡＮＤ　ＲＥＬＡＴＥＤ　ＭＥＴＨＯＤＳ」と題する２０２１年７月１日出願の米国仮出願第６３／２１７，７１８号、「ＥＮＧＩＮＥＥＲＥＤ　ＮＡＴＵＲＡＬ　ＫＩＬＬＥＲ（ＮＫ）ＣＥＬＬＳ　ＡＮＤ　ＲＥＬＡＴＥＤ　ＭＥＴＨＯＤＳ」と題する２０２１年７月１日出願の米国仮出願第６３／２１７，７２２号、及び「ＥＮＧＩＮＥＥＲＥＤ　ＮＡＴＵＲＡＬ　ＫＩＬＬＥＲ（ＮＫ）ＣＥＬＬＳ　ＡＮＤ　ＲＥＬＡＴＥＤ　ＭＥＴＨＯＤＳ」と題する２０２１年７月１日出願の米国仮出願第６３／２１７，７２６号による優先権を主張する。それらの内容は、その全体が参照により組み込まれる。
【０００２】
配列表の参照による組み込み
本出願は、電子フォーマットの配列表と共に出願されている。配列表は、２０２２年６月３０日に作成された７７６０３＿２００１０４０＿ＳＥＱＬＩＳＴＩＮＧ．ｔｘｔというタイトルのファイルとして提供され、これは６９，３０７バイトのサイズである。配列表の電子形式の情報は、その全体が参照により組み込まれる。
【０００３】
分野
本開示は、ＦｃＲγ鎖の発現が欠損しており（ｇ－ＮＫ細胞）、組換えキメラ抗原受容

体（ＣＡＲ）を更に含む、操作されたナチュラルキラー（ＮＫ）細胞及びその組成物を提供する。本開示はまた、操作されたＮＫ細胞を含有する組成物ならびに操作されたＮＫ細胞を作製及び使用する方法を提供する。

【背景技術】

【０００４】

背景

抗体に基づく療法は、がん及び他の疾患を治療するために頻繁に使用されるようになっている。抗体療法に対する応答は、典型的には、腫瘍細胞に対するこれらの抗体の直接的な阻害効果（例えば、増殖因子受容体の阻害及びその後のアポトーシスの誘導）に焦点を当ててきたが、これらの抗体のインビボ効果は、より複雑であり得、宿主免疫系に関与し得る。ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞は、Ｆｃ受容体（ＣＤ１６；ＦｃγＲＩＩＩ）が抗原保有細胞に結合した抗体のＦｃ部分に結合すると抗体依存性の細胞傷害を媒介する免疫エフェクター細胞である。ＮＫ細胞（その特定の特殊化されたサブセットを含む）は、抗体療法に対する応答を改善することを含む治療方法において使用することができる。ＮＫ細胞を含む治療的使用のための改善された方法が必要とされている。本明細書では、そのような必要性を満たす実施形態が提供される。

【発明の概要】

【０００５】

概要

本明細書には、ＦｃＲγ鎖の発現が欠損しており（ｇ－ＮＫ細胞）、組換えキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を更に含む、操作されたナチュラルキラー（ＮＫ）細胞及びその組成物が記載される。操作されたＮＫ細胞を含有する組成物ならびに操作されたＮＫ細胞を作製及び使用する方法も本明細書に記載される。

【０００６】

いくつかの実施形態では、ＦｃＲγ鎖の発現が欠損しており（ｇ－ＮＫ細胞）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする異種核酸を含む、操作されたナチュラルキラー（ＮＫ）細胞が本明細書で提供される。

【０００７】

いくつかの態様では、ＦｃＲγ鎖の発現が欠損しており（ｇ－ＮＫ細胞）、かつ免疫調節物質をコードする異種核酸を含む、操作されたナチュラルキラー（ＮＫ）細胞が本明細書で提供される。

【０００８】

いくつかの態様では、ＦｃＲγ鎖の発現が欠損しており（ｇ－ＮＫ細胞）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする異種核酸と、免疫調節物質をコードする異種核酸とを含む、操作されたナチュラルキラー（ＮＫ）細胞が本明細書で提供される。

【０００９】

いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、１）標的リガンド結合ドメインと、２）可撓性リンカーと、３）膜貫通領域と、４）細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、腫瘍抗原を標的とする。他の実施形態では、抗原結合ドメインは、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）である。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメイン及び共刺激シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ３ζ、ＤＡＰ１０、ＤＡＰ１２、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、又はＯＸ４０のうちの１つ以上のシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ３ζ、ＤＡＰ１０、ＤＡＰ１２、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、又はＯＸ４０のうちの２つ以上のシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ３ζのシグナル伝達ドメインを含む一次シグナル伝達ドメインと、共刺激シグナル伝達ドメインとを含む。いくつかの実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、ＣＤ２８又は４－１ＢＢのシグナル伝達ドメインである。

【００１０】

いくつかの実施形態では、ＣＡＲをコードする異種核酸は、細胞のゲノムに安定に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＣＡＲをコードする異種核酸は一過性に発現される。

【００１１】

いくつかの実施形態では、免疫調節物質は免疫抑制物質である。いくつかの実施形態では、免疫調節物質は免疫活性化物質である。いくつかの実施形態では、免疫調節物質がサイトカインである。いくつかの実施形態では、サイトカインは、操作されたＮＫ細胞から分泌可能である。いくつかの実施形態では、分泌型サイトカインは、ＩＬ－２もしくはその生物学的部分、ＩＬ－１５もしくはその生物学的部分、又はＩＬ－２１もしくはその生物学的部分、又はそれらの組み合わせである。他の実施形態では、サイトカインは膜結合型である。いくつかの実施形態では、膜結合型サイトカインは、膜結合型ＩＬ－２（ｍｂＩＬ－２）、膜結合型ＩＬ－１５（ｍｂＩＬ－１５）、膜結合型ＩＬ－２１（ｍｂＩＬ－２１）、又はそれらの組み合わせである。

【００１２】

いくつかの実施形態では、免疫調節物質をコードする異種核酸は、細胞のゲノムに安定的に組み込まれる。いくつかの実施形態では、免疫調節物質をコードする異種核酸は一過性に発現される。

【００１３】

いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、ＣＤ１６^{pos}／ＣＤ５７^{pos}／ＣＤ７^{dim}／ＣＤ１６１^{neg}である表面表現型を有する。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、ＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である表面表現型を更に有する。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞表面抗原は更にＣＤ３８^{neg}である。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、更にＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}である表面表現型を有する。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、ＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｖ（Ｖ１５８）を含む。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、ＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｆである。

【００１４】

いくつかの実施形態では、上記実施形態のいずれかに由来する操作されたｇ－ＮＫ細胞を複数含む組成物がある。

【００１５】

いくつかの実施形態では、組成物中のＮＫ細胞又は総細胞の５０％超又は約５０％超が、ｇ－ＮＫ細胞である。いくつかの実施形態では、組成物中のＮＫ細胞又は総細胞の６０％超又は約６０％超が、ｇ－ＮＫ細胞である。いくつかの実施形態では、組成物中のＮＫ細胞又は総細胞の７０％超又は約７０％超が、ｇ－ＮＫ細胞である。いくつかの実施形態では、組成物中のＮＫ細胞又は総細胞の８０％超又は約８０％超が、ｇ－ＮＫ細胞である。いくつかの実施形態では、組成物中のＮＫ細胞又は総細胞の９０％超又は約９０％超が、ｇ－ＮＫ細胞である。いくつかの実施形態では、組成物中のＮＫ細胞又は総細胞の９５％超又は約９５％超が、ｇ－ＮＫ細胞である。

【００１６】

いくつかの実施形態では、複数の操作されたｇ－ＮＫ細胞は、２０％超又は約２０％超の、ＣＡＲをコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を構成する。いくつかの実施形態では、複数の操作されたｇ－ＮＫ細胞は、３０％超又は約３０％超の、ＣＡＲをコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を構成する。いくつかの実施形態では、複数の操作されたｇ－ＮＫ細胞は、４０％超又は約４０％超の、ＣＡＲをコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を構成する。いくつかの実施形態では、複数の操作されたｇ－ＮＫ細胞は、５０％超又は約５０％超の、ＣＡＲをコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を構成する。いくつかの実施形態では、複数の操作されたｇ－ＮＫ細胞は、６０％超又は約６０％超の、ＣＡＲをコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を構成する。いくつかの実施形態では、複数の操作されたｇ－ＮＫ細胞は、７０％超又は約７０％超の、ＣＡＲをコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を構成する。

【００１７】
いくつかの実施形態では、総組成物は、ＣＡＲをコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を２０％超又は約２０％超含む。いくつかの実施形態では、総組成物は、ＣＡＲをコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を３０％超又は約３０％超含む。いくつかの実施形態では、総組成物は、ＣＡＲをコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を４０％超又は約４０％超含む。いくつかの実施形態では、総組成物は、ＣＡＲをコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を５０％超又は約５０％超含む。いくつかの実施形態では、総組成物は、ＣＡＲをコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を６０％超又は約６０％超含む。いくつかの実施形態では、総組成物は、ＣＡＲをコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を７０％超又は約７０％超含む。

【００１８】
いくつかの実施形態では、複数の操作されたｇ－ＮＫ細胞は、２０％超又は約２０％超の、免疫調節物質をコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を構成する。いくつかの実施形態では、複数の操作されたｇ－ＮＫ細胞は、３０％超又は約３０％超の、免疫調節物質をコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を構成する。いくつかの実施形態では、複数の操作されたｇ－ＮＫ細胞は、４０％超又は約４０％超の、免疫調節物質をコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を構成する。いくつかの実施形態では、複数の操作されたｇ－ＮＫ細胞は、５０％超又は約５０％超の、免疫調節物質をコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を構成する。いくつかの実施形態では、複数の操作されたｇ－ＮＫ細胞は、６０％超又は約６０％超の、免疫調節物質をコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を構成する。いくつかの実施形態では、複数の操作されたｇ－ＮＫ細胞は、７０％超又は約７０％超の、免疫調節物質をコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を構成する。

【００１９】
いくつかの実施形態では、総組成物は、免疫調節物質をコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を２０％超又は約２０％超含む。いくつかの実施形態では、総組成物は、免疫調節物質をコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を３０％超又は約３０％超含む。いくつかの実施形態では、総組成物は、免疫調節物質をコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を４０％超又は約４０％超含む。いくつかの実施形態では、総組成物は、免疫調節物質をコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を５０％超又は約５０％超含む。いくつかの実施形態では、総組成物は、免疫調節物質をコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を６０％超又は約６０％超含む。いくつかの実施形態では、総組成物は、免疫調節物質をコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を７０％超又は約７０％超含む。

【００２０】
いくつかの実施形態では、複数の操作されたｇ－ＮＫ細胞は、２０％超又は約２０％超の、ＣＡＲをコードする異種核酸及び免疫調節物質をコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を構成する。いくつかの実施形態では、複数の操作されたｇ－ＮＫ細胞は、３０％超又は約３０％超の、ＣＡＲをコードする異種核酸及び免疫調節物質をコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を構成する。いくつかの実施形態では、複数の操作されたｇ－ＮＫ細胞は、４０％超又は約４０％超の、ＣＡＲをコードする異種核酸及び免疫調節物質をコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を構成する。いくつかの実施形態では、複数の操作されたｇ－ＮＫ細胞は、５０％超又は約５０％超の、ＣＡＲをコードする異種核酸及び免疫調節物質をコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を構成する。いくつかの実施形態では、複数の操作されたｇ－ＮＫ細胞は、６０％超又は約６０％超の、ＣＡＲをコードする異種核酸及び免疫調節物質をコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を構成する。いくつかの実施形態では、複数の操作されたｇ－ＮＫ細胞は、７０％超又は約７０％超の、ＣＡＲをコードする異種核酸構成する免疫調節物質をコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を構成する。

【００２１】
いくつかの実施形態では、総組成物は、ＣＡＲをコードする異種核酸及び免疫調節物質をコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を２０％超又は約２０％超含む。いくつかの実

施形態では、総組成物は、ＣＡＲをコードする異種核酸及び免疫調節物質をコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を３０％超又は約３０％超含む。いくつかの実施形態では、総組成物は、ＣＡＲをコードする異種核酸及び免疫調節物質をコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を４０％超又は約４０％超含む。いくつかの実施形態では、総組成物は、ＣＡＲをコードする異種核酸及び免疫調節物質をコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を５０％超又は約５０％超含む。いくつかの実施形態では、総組成物は、ＣＡＲをコードする異種核酸及び免疫調節物質をコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を６０％超又は約６０％超含む。いくつかの実施形態では、総組成物は、ＣＡＲをコードする異種核酸及び免疫調節物質をコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を７０％超又は約７０％超含む。

【００２２】

いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞の７０％超又は約７０％超がパーフォリンについて陽性であり、ｇ－ＮＫ細胞の７０％超又は約７０％超がグランザイムＢについて陽性である。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞の８０％超又は約８０％超がパーフォリンについて陽性であり、ｇ－ＮＫ細胞の８０％超又は約８０％超がグランザイムＢについて陽性である。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞の９０％超又は約９０％超がパーフォリンについて陽性であり、ｇ－ＮＫ細胞の９０％超又は約９０％超がグランザイムＢについて陽性である。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞の９５％超又は約９５％超がパーフォリンについて陽性であり、ｇ－ＮＫ細胞の９５％超又は約９５％超がグランザイムＢについて陽性である。

【００２３】

いくつかの実施形態では、パーフォリンについて陽性である細胞のうち、細胞は、細胞内フローサイトメトリーによって測定した場合、すなわち平均蛍光強度（ＭＦＩ）に基づいて、ＦｃＲγ^{pos}である細胞によって発現されるパーフォリンの平均レベルの少なくとも２倍又は約２倍である、パーフォリンの平均レベルを発現し、かつ／又はグランザイムＢについて陽性の細胞の中で、細胞は、細胞内フローサイトメトリーによって測定した場合、すなわち平均蛍光強度（ＭＦＩ）に基づいて、ＦｃＲγ^{pos}である細胞によって発現されるグランザイムＢの平均レベルの少なくとも２倍又は約２倍である、グランザイムＢの平均レベルを発現する。

【００２４】

いくつかの実施形態では、組成物中の細胞の１０％超が、任意選択でＣＤ１０７ａ発現によって測定される、腫瘍標的細胞に対する脱顆粒が可能であり、任意選択で、脱顆粒は、腫瘍標的細胞に対する抗体の非存在下で測定される。いくつかの実施形態では、組成物中の細胞の１０％超が、腫瘍標的細胞に対してインターフェロン－γ又はＴＮＦ－αを産生することができ、任意選択で、インターフェロン－γ又はＴＮＦ－αは、腫瘍標的細胞に対する抗体の非存在下で測定される。

【００２５】

いくつかの実施形態では、組成物中の細胞のうち、１５％超又は約１５％超が、標的抗原及び標的抗原に対する抗体（抗標的抗体）を発現する細胞（標的細胞）の存在下でエフェクターサイトカインを産生する。いくつかの実施形態では、組成物中の細胞のうち、２０％超又は約２０％超が、標的抗原及び標的抗原に対する抗体（抗標的抗体）を発現する細胞（標的細胞）の存在下でエフェクターサイトカインを産生する。いくつかの実施形態では、組成物中の細胞のうち、３０％超又は約３０％超が、標的抗原及び標的抗原に対する抗体（抗標的抗体）を発現する細胞（標的細胞）の存在下でエフェクターサイトカインを産生する。いくつかの実施形態では、組成物中の細胞のうち、４０％超又は約４０％超が、標的抗原及び標的抗原に対する抗体（抗標的抗体）を発現する細胞（標的細胞）の存在下でエフェクターサイトカインを産生する。いくつかの実施形態では、組成物中の細胞のうち、５０％超又は約５０％超が、標的抗原及び標的抗原に対する抗体（抗標的抗体）を発現する細胞（標的細胞）の存在下でエフェクターサイトカインを産生する。

【００２６】

いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のう

ち、３０％超又は約３０％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）、かつ／又は５０％超又は約５０％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａ^{neg}）。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、３５％超又は約３５％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）、かつ／又は６０％超又は約６０％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａ^{neg}）。組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、４０％超又は約４０％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）、かつ／又は７０％超又は約７０％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａ^{neg}）。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、４５％超又は約４５％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）、かつ／又は８０％超又は約８０％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａ^{neg}）。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、５０％超又は約５０％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）、かつ／又は８５％超又は約８５％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａ^{neg}）。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、５５％超又は約５５％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）、かつ／又は９０％超又は約９０％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａ^{neg}）。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、６０％超又は約６０％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）、かつ／又は９５％超又は約９５％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａ^{neg}）。

【００２７】

いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、５０％超又は約５０％超がＣＤ３８^{neg}である。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、６０％超又は約６０％超がＣＤ３８^{neg}である。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、７０％超又は約７０％超がＣＤ３８^{neg}である。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、８０％超又は約８０％超がＣＤ３８^{neg}である。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、９０％超又は約９０％超がＣＤ３８^{neg}である。

【００２８】

いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、５０％超又は約５０％超がＣＤ１６^{pos}／ＣＤ５７^{pos}／ＣＤ７^{dim}／^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、６０％超又は約６０％超がＣＤ１６^{pos}／ＣＤ５７^{pos}／ＣＤ７^{dim}／^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、７０％超又は約７０％超がＣＤ１６^{pos}／ＣＤ５７^{pos}／ＣＤ７^{dim}／^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、８０％超又は約８０％超がＣＤ１６^{pos}／ＣＤ５７^{pos}／ＣＤ７^{dim}／^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、９０％超又は約９０％超がＣＤ１６^{pos}／ＣＤ５７^{pos}／ＣＤ７^{dim}／^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である。

【００２９】

いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、５０％超又は約５０％超がＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、６０％超又は約６０％超がＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、７０％超又は約７０％

超がＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、８０％超又は約８０％超がＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、９０％超又は約９０％超がＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である。

【００３０】

いくつかの実施形態では、複数のｇ－ＮＫ細胞は、ＣＤ１６　１５８（Ｖ／Ｖ）（Ｖ１５８）である。いくつかの実施形態では、複数のｇ－ＮＫ細胞は、ＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｆである。

【００３１】

いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも又は少なくとも約10^8個の細胞を含む。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の数は、10^8又は約10^8から、10^{12}又は約10^{12}個の細胞である。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の数は、10^8又は約10^8から、10^{11}又は約10^{11}個の細胞である。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の数は、10^8又は約10^8から、10^{10}又は約10^{10}個の細胞である。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の数は、10^8又は約10^8から、10^9又は約10^9個の細胞である。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の数は、10^9又は約10^9から、10^{12}又は約10^{12}個の細胞である。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の数は、10^9又は約10^9から、10^{11}又は約10^{11}個の細胞である。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の数は、10^9又は約10^9から、10^{10}又は約10^{10}個の細胞である。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の数は、10^{10}又は約10^{10}から、10^{12}又は約10^{12}個の細胞である。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の数は、10^{10}又は約10^{10}から、10^{11}又は約10^{11}個の細胞である。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の数は、10^{11}又は約10^{11}から、10^{12}又は約10^{12}個の細胞である。

【００３２】

いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の数は、5×10^8又は約5×10^8個の細胞である。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の数は、1×10^9個の細胞であるか、又は約1×10^9個の細胞である。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の数は、5×10^{10}個の細胞であるか、又は約5×10^{10}個の細胞である。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の数は、1×10^{10}個の細胞であるか、又は約1×10^{10}個の細胞である。

【００３３】

いくつかの実施形態では、組成物の体積は、５０ｍＬ又は約５０ｍＬから、５００ｍＬ又は約５００ｍＬである。いくつかの実施形態では、組成物の体積は、任意選択で、２００ｍＬ又は約２００ｍＬである。

【００３４】

いくつかの実施形態では、組成物中の細胞は、同じ生体試料から増殖させた単一のドナー対象に由来する。

【００３５】

いくつかの実施形態では、組成物は医薬組成物である。いくつかの実施形態では、組成物は薬学的に許容される賦形剤を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、抗凍結剤を含む無血清凍結保存培地中に製剤化される。いくつかの実施形態では、抗凍結剤はＤＭＳＯであり、凍結保存培地は５％～１０％ＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）である。いくつかの実施形態では、抗凍結剤は、１０％ＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）もしくは約１０％ＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）である。

【００３６】

いくつかの実施形態では、組成物は、無菌である。いくつかの実施形態では、組成物は冷凍保存対応バッグである。いくつかの実施形態では、バッグは凍結保存適合性バッグで

ある。
【００３７】
ＦｃＲγ鎖の発現が欠損しているＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ細胞）に、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする異種核酸を導入することを含む、遺伝子操作されたｇ－ＮＫ細胞を産生する方法も本明細書で提供される。
【００３８】
いくつかの態様では、免疫調節物質をコードする異種核酸をｇ－ＮＫ細胞に導入し、それによって遺伝子操作されたｇ－ＮＫ細胞を産生することを含む、遺伝子操作されたｇ－ＮＫ細胞を産生する方法が本明細書で提供される。
【００３９】
いくつかの態様では、遺伝子操作されたｇ－ＮＫ細胞を産生する方法であって、（ａ）ＦｃＲγ鎖の発現が欠損しているＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ細胞）に、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする異種核酸を導入することと、（ｂ）ｇ－ＮＫ細胞に、免疫調節物質をコードする異種核酸を導入し、それによって遺伝子操作されたｇ－ＮＫ細胞を産生することとを含み、ステップ（ａ）及び（ｂ）が同時に又は任意の順序で逐次的に実施される方法が本明細書で提供される。
【００４０】
いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、１）標的リガンド結合ドメインと、２）可撓性リンカー（スペーサー）と、３）膜貫通領域と、４）細胞内シグナル伝達ドメインとを含む。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、腫瘍抗原を標的とする。他の実施形態では、抗原結合ドメインは、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）である。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ３ζ、ＤＡＰ１０、ＤＡＰ１２、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、又はＯＸ４０由来の１つ以上のシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ３ζ、ＤＡＰ１０、ＤＡＰ１２、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、又はＯＸ４０に由来する２つ以上のシグナル伝達ドメインを含む。
【００４１】
いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ３ζのシグナル伝達ドメインを含む一次シグナル伝達ドメインと、共刺激シグナル伝達ドメインとを含む。いくつかの実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、ＣＤ２８又は４－１ＢＢのシグナル伝達ドメインである。
【００４２】
いくつかの実施形態では、ＣＡＲをコードする異種核酸は、ｇ－ＮＫ細胞のゲノムへの安定な組み込みのための条件下で導入される。いくつかの実施形態では、ＣＡＲをコードする異種核酸は、ウイルスベクターに含まれ、形質導入によってｇ－ＮＫ細胞に導入される。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。
【００４３】
いくつかの実施形態では、ＣＡＲをコードする核酸は、ｇ－ＮＫ細胞における一過性発現のための条件下で導入される。いくつかの実施形態では、ＣＡＲをコードする核酸は、脂質ナノ粒子を介してｇ－ＮＫ細胞に導入される。いくつかの実施形態では、ＣＡＲをコードする核酸はＤＮＡである。いくつかの実施形態では、ＣＡＲをコードする核酸はＲＮＡである。いくつかの実施形態では、ＲＮＡはｍＲＮＡである。いくつかの実施形態では、ＲＮＡは自己増幅ｍＲＮＡである。いくつかの実施形態では、核酸は、エレクトロポレーションを介してｇ－ＮＫ細胞に導入される。
【００４４】
いくつかの実施形態では、免疫調節物質は免疫抑制物質である。いくつかの実施形態では、免疫調節物質は免疫活性化物質である。いくつかの実施形態では、免疫調節物質がサイトカインである。いくつかの実施形態では、サイトカインは、操作されたＮＫ細胞から分泌可能である。いくつかの実施形態では、分泌可能なサイトカインは、ＩＬ－２もしくはその生物学的に活性な部分、ＩＬ－１５もしくはその生物学的に活性な部分、ＩＬ－２１もしくはその生物学的に活性な部分、又はそれらの組み合わせである。他の実施形態で

は、サイトカインは膜結合型である。いくつかの実施形態では、膜結合型サイトカインは、膜結合型ＩＬ－２（ｍｂＩＬ－２）、膜結合型ＩＬ－１５（ｍｂＩＬ－１５）、又は膜結合型ＩＬ－２１（ｍｂＩＬ－２１）又はそれらの組み合わせである。

【００４５】

いくつかの実施形態では、免疫調節物質をコードする核酸は、ｇ－ＮＫ細胞のゲノムへの安定した組み込みのための条件下で導入される。いくつかの実施形態では、免疫調節物質をコードする核酸は、ウイルスベクターに含まれ、形質導入によってｇ－ＮＫ細胞に導入される。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、免疫調節物質をコードする核酸は、ｇ－ＮＫ細胞における一過性発現のための条件下で導入される。いくつかの実施形態では、免疫調節物質をコードする核酸は、非ウイルス送達によって導入される。いくつかの実施形態では、免疫調節物質をコードする核酸は、脂質ナノ粒子を介してｇ－ＮＫ細胞に導入される。いくつかの実施形態では、免疫調節物質をコードする核酸はＤＮＡである。いくつかの実施形態では、免疫調節物質をコードする核酸はＲＮＡである。いくつかの実施形態では、ＲＮＡはｍＲＮＡである。いくつかの実施形態では、ＲＮＡは自己増幅ＲＮＡである。いくつかの実施形態では、免疫調節物質をコードする核酸は、エレクトロポレーションを介してｇ－ＮＫ細胞に導入される。

【００４６】

いくつかの実施形態では、ＣＡＲをコードする核酸及び免疫調節物質をコードする核酸は、同じポリヌクレオチドからコードされ、一緒に導入される。いくつかの実施形態では、ＣＡＲをコードする核酸及び免疫調節物質をコードする核酸は、ポリヌクレオチド配列のマルチシストロン性エレメントによって隔てられている。いくつかの実施形態では、免疫調節物質は、Ｔ２Ａ、Ｐ２Ａ、及びＦ２Ａからなる群から選択される自己切断ペプチドである。いくつかの実施形態では、ＣＡＲをコードする核酸及び免疫調節物質をコードする核酸は、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮された集団を増殖させるためのエクスビボプロセス中に同時に導入される。

【００４７】

いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞組成物は、（ｉ）ＣＤ３について陰性もしくは低度かつＣＤ５７について陽性（ＣＤ３^{neg}ＣＤ５７^{pos}）又は（ｉｉ）ＣＤ３について陰性もしくは低度かつＣＤ５６について陽性（ＣＤ３^{neg}ＣＤ５６^{pos}）のいずれかである、対象由来の生体試料から濃縮されたＮＫ細胞のエクスビボ増殖によって産生されており、濃縮されたＮＫ細胞は、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞及び１つ以上の組換えサイトカインと共に培養される。いくつかの実施形態では、１つ以上の組換えサイトカインは、有効量のＳＣＦ、ＧＳＫ３ｉ、ＦＬＴ３、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－１２、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２７、又はそれらの組み合わせから選択される。いくつかの実施形態では、培養は、２つ以上の組換えサイトカインの存在下で行われ、少なくとも１つの組換えサイトカインはインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインはＩＬ－２１である。いくつかの実施形態では、１つ以上の組換えサイトカインは、ＩＬ－２１を含む。

【００４８】

いくつかの実施形態では、導入は、ＦｃＲγ欠損ＮＫ（ｇ－ＮＫ）細胞を増殖させるための方法の間に実施され、前記方法は、（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された集団は、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、（Ｂ）操作されたＮＫ細胞の集団を、（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞対　濃縮ＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び（２）ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、ＮＫ細胞の増殖のための有効量の

２つ以上の組換えサイトカインと共に、培養培地中で培養することと、を含み、ここで、ＣＡＲをコードする核酸を導入することは、ステップ（Ａ）の後、かつステップ（Ｂ）の前、間、又は後に行われ、それによって、操作されたＮＫ細胞の集団を産生し、ここで、該方法は、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮され、ＣＡＲで操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖集団を産生する。

【００４９】

いくつかの実施形態では、導入することは、ＦｃＲγ欠損ＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ）を増殖させるための方法の間に実施され、前記方法は、（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された集団が、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、（Ｂ）ＣＡＲをコードする核酸を濃縮ＮＫ細胞の集団に導入し、それによって、操作されたＮＫ細胞の集団を生成することと、（Ｃ）操作されたＮＫ細胞の集団を、（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞　対　濃縮されたＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び（２）ＮＫ細胞を増殖させるための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、ＮＫ細胞を増殖させるための有効量の２つ以上の組換えサイトカインと共に、培地中で培養し、それによって、増殖させたＮＫ細胞集団を産生することと、を含み、方法は、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮され、ＣＡＲで操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する。

【００５０】

いくつかの実施形態では、導入することは、ＦｃＲγ欠損ＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ）を増殖させるための方法の間に実施され、前記方法は、（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された集団は、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、（Ｂ）濃縮されたＮＫ細胞の集団を、（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞　対　濃縮ＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び（２）ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインと共に、培地中で培養し、それによって、増殖させたＮＫ細胞集団を産生することと、（Ｃ）ＣＡＲをコードする核酸を、ＮＫ細胞の増殖集団のＮＫ細胞に導入することと、を含み、方法が、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮され、ＣＡＲで操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖集団を産生する。

【００５１】

いくつかの実施形態では、導入することは、ＦｃＲγ欠損ＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ）を増殖させるための方法の間に行われ、前記方法は、（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された集団は、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、及び（Ｂ）濃縮されたＮＫ細胞の集団を、ＮＫ細胞を増殖させるための条件下で培養培地中で培養することを含む第１の増殖を実施して、第１の増殖させたＮＫ細胞集団を産生することと、（Ｃ）第１の増殖させたＮＫ細胞集団のＮＫ細胞に、ＣＡＲをコードする核酸を導入し、それによって、操作されたＮＫ細胞集団を産生することと、（Ｄ）ＮＫ細胞の更なる増殖のための条件下で、操作されたＮＫ細胞の集団を培養することを含む第２の増殖を実施することとを含み、第１の増殖及び／又は第２の増殖が、濃縮されたＮＫ細胞の集団を、（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞　対　濃縮ＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び（２）ＮＫ

細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインと共に、培養培地中で培養することを含み、方法は、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮されており、ＣＡＲで操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖集団を産生する。

【００５２】

いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞組成物は、（ｉ）ＣＤ３について陰性もしくは低度かつＣＤ５７について陽性（ＣＤ３^{neg}ＣＤ５７^{pos}）又は（ｉｉ）ＣＤ３について陰性もしくは低度かつＣＤ５６について陽性（ＣＤ３^{neg}ＣＤ５６^{pos}）のいずれかである、対象由来の生体試料から濃縮されたＮＫ細胞のエクスビボ増殖によって産生されており、濃縮されたＮＫ細胞は、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞及び１つ以上の組換えサイトカインと共に培養される。いくつかの実施形態では、１つ以上の組換えサイトカインは、有効量のＳＣＦ、ＧＳＫ３ｉ、ＦＬＴ３、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－１２、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２７、又はそれらの組み合わせから選択される。いくつかの実施形態では、培養は、２つ以上の組換えサイトカインの存在下で行われ、少なくとも１つの組換えサイトカインはインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインはＩＬ－２１である。

【００５３】

いくつかの実施形態では、導入は、ＦｃＲγ欠損ＮＫ（ｇ－ＮＫ）細胞を増殖させるための方法の間に実施され、前記方法は、（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された集団は、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、（Ｂ）操作されたＮＫ細胞の集団を、（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞　対　濃縮ＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞及び（２）ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインと共に、培養培地中で培養することと、を含み免疫調節物質を導入することが、ステップ（Ａ）の後、かつステップ（Ｂ）の前、間、又は後に実施され、それによって、操作されたＮＫ細胞の集団を産生し、前記方法が、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮され、かつ免疫調節物質で操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖集団を産生する。

【００５４】

いくつかの実施形態では、導入することは、ＦｃＲγ欠損ＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ）を増殖させるための方法の間に実施され、前記方法は、（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された集団が、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、（Ｂ）免疫調節物質をコードする核酸を濃縮ＮＫ細胞の集団に導入し、それによって、操作されたＮＫ細胞の集団を生成することと、（Ｃ）操作されたＮＫ細胞の集団を、（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞　対　濃縮されたＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び（２）ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインと共に、培養培地中で培養し、それによって、増殖させたＮＫ細胞集団を産生することと、を含み、方法は、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮され、免疫調節物質で操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する。

【００５５】
いくつかの実施形態では、導入は、ＦｃＲγ欠損ＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ）を増殖させるための方法の間に実施され、前記方法は、（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された集団は、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、（Ｂ）濃縮されたＮＫ細胞の集団を、（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞　対　濃縮されたＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び（２）ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインと共に、培養培地中で培養し、それによってＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、ことと、（Ｃ）増殖させたＮＫ細胞集団のＮＫ細胞に、免疫調節物質をコードする核酸を導入することと、を含み、方法は、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮され、免疫調節物質で操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する。

【００５６】
いくつかの実施形態では、導入は、ＦｃＲγ欠損ＮＫ（ｇ－ＮＫ）細胞を増殖させるための方法の間に実施され、前記方法は、（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された集団は、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、（Ｂ）操作されたＮＫ細胞の集団を、（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞　対　濃縮ＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び（２）ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインと共に、培養培地中で培養することとを含み、ここで、（ｉ）ＣＡＲをコードする核酸及び／又は（ｉｉ）免疫調節物質をコードする核酸の導入は、ステップ（Ａ）の後、かつステップ（Ｂ）の前、間、又は後に行われ、ここで、ステップ（ｉ）及び（ｉｉ）は、同時に又は任意の順序で連続して行われ、それによって、操作されたＮＫ細胞の集団を産生し、この方法は、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮され、かつＣＡＲ及び免疫調節物質で操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する。

【００５７】
いくつかの実施形態では、導入することは、ＦｃＲγ欠損ＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ）を増殖させるための方法の間に実施され、前記方法は、（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された集団が、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、（Ｂ）濃縮されたＮＫ細胞の集団に、（ｉ）ＣＡＲをコードする核酸、及び（ｉｉ）免疫調節物質をコードする核酸を導入することであって、ステップ（ｉ）及び（ｉｉ）が同時に又は任意の順序で逐次的に実施され、それによって、操作されたＮＫ細胞の集団を産生する、導入することと、ならびに（Ｃ）操作されたＮＫ細胞の集団を、（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞　対　濃縮されたＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、操作されたＮＫ細胞の集団、及び（２）ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインと共に、培養培地中で培養し、それによって、増殖させたＮＫ細胞集団を産生することと、を含み、方法は、ｇ

－ＮＫ細胞について濃縮され、ＣＡＲ及び免疫調節物質で操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する。

【００５８】

いくつかの実施形態では、導入は、ＦｃＲγ欠損ＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ）を増殖させるための方法の間に実施され、前記方法は、（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された集団は、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、（Ｂ）濃縮されたＮＫ細胞の集団を、（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞　対　濃縮されたＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び（２）ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインと共に、培養培地中で培養し、それによって、ＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、ことと、（Ｃ）増殖させたＮＫ細胞集団のＮＫ細胞に、（ｉ）ＣＡＲをコードする核酸、及び（ｉｉ）免疫調節物質をコードする核酸を導入することと、を含み、ステップ（ｉ）及び（ｉｉ）は同時に又は任意の順序で逐次的に行われ、方法は、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮され、ＣＡＲ及び免疫調節物質で操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する。

【００５９】

いくつかの実施形態では、導入は、ＦｃＲγ欠損ＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ）を増殖させるための方法の間に行われ、前記方法は、（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された集団は、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、及び（Ｂ）濃縮されたＮＫ細胞の集団を、ＮＫ細胞を増殖させるための条件下で培養培地中で培養することを含む第１の増殖を実施して、第１の増殖させたＮＫ細胞集団を産生することと、（Ｃ）第１の増殖させたＮＫ細胞集団のＮＫ細胞に、（ｉ）ＣＡＲをコードする核酸、及び（ｉｉ）免疫調節物質をコードする核酸を導入することであって、ステップ（ｉ）及び（ｉｉ）が同時に又は任意の順序で逐次的に行われ、それによって、操作されたＮＫ細胞集団を産生する、導入することと、ならびに（Ｄ）ＮＫ細胞の更なる増殖のための条件下で、操作されたＮＫ細胞集団を培養することを含む第２の増殖を実施することとを含み、第１の増殖及び／又は第２の増殖が、濃縮されたＮＫ細胞の集団を、（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞　対　濃縮ＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び（２）ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインと共に、培地中で培養することを含み、方法は、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮されており、ＣＡＲ及び免疫調節物質で操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖集団を産生する。

【００６０】

いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団は、ヒト対象由来の生体試料から、（ｉ）ＣＤ３について陰性もしくは低度かつＣＤ５７について陽性である細胞（ＣＤ３^{neg}ＣＤ５７^{pos}）、又は（ｉｉ）ＣＤ３について陰性もしくは低度かつＣＤ５６について陽性である細胞（ＣＤ３^{neg}ＣＤ５６^{pos}）のいずれかを選択することによって得られる。

【００６１】

いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞について濃縮された集団は、ＮＫＧ２Ｃについて陽性の細胞（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）について更に選択された細胞である。ＮＫ細胞について濃縮された集団は、ＮＫＧ２Ａについて陰性又は低発現性の細胞（ＮＫＧ２Ａ^{neg}）につ

いて更に選択された細胞であり、又は、ＮＫ細胞について濃縮された集団は、ＮＫＧ２Ｃについて陽性であり、ＮＫＧ２Ａについて陰性又は低度の細胞（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}）について更に選択された細胞である。

【００６２】

いくつかの実施形態では、ヒトは、対象由来の末梢血試料中のナチュラルキラー（ＮＫ）細胞の少なくとも２０％又は約２０％がＮＫＧ２Ｃについて陽性　（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）であり、末梢血試料中のＮＫ細胞の少なくとも７０％がＮＫＧ２Ａについて陰性又は低度の（ＮＫＧ２Ａ^{neg}）対象である。いくつかの実施形態では、対象がＣＭＶ血清陽性である。

【００６３】

いくつかの実施形態では、対象由来の生体試料中のＮＫ細胞のうちのｇ－ＮＫ細胞の割合は、５％超又は約５％超である。いくつかの実施形態では、対象由来の生体試料中のＮＫ細胞のうちのｇ－ＮＫ細胞の割合は、１０％超又は約１０％超である。いくつかの実施形態では、対象由来の生体試料中のＮＫ細胞のうちのｇ－ＮＫ細胞の割合は、３０％超又は約３０％超である。

【００６４】

いくつかの実施形態では、濃縮されたＮＫ細胞の集団中のｇ－ＮＫ細胞の割合は、２０％又は約２０％から、９０％又は約９０％である。いくつかの実施形態では、濃縮されたＮＫ細胞の集団中のｇ－ＮＫ細胞の割合は、４０％又は約４０％から、９０％又は約９０％である。いくつかの実施形態では、濃縮されたＮＫ細胞の集団中のｇ－ＮＫ細胞の割合は、６０％又は約６０％から、９０％又は約９０％である。

【００６５】

いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞について濃縮された集団は、ＣＤ３について陰性又は低度であり、ＣＤ５７について陽性である、生体試料から選択された細胞である（ＣＤ３^{neg}ＣＤ５７^{pos}）。いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞について濃縮された集団は、ＣＤ３について陰性又は低度であり、ＣＤ５６について陽性である、生体試料から選択された細胞である（ＣＤ３^{neg}ＣＤ５６^{pos}）。

【００６６】

いくつかの実施形態では、２つ以上の組換えサイトカインは、有効量のＳＣＦ、ＧＳＫ３ｉ、ＦＬＴ３、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－１２、ＩＬ－１８、ＩＬ－２７、又はそれらの組み合わせを更に含む。いくつかの実施形態では、組換えサイトカインは、ＩＬ－２１及びＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、組換えサイトカインは、ＩＬ－２１、ＩＬ－２、及びＩＬ－１５を含む。

【００６７】

いくつかの実施形態では、組換えＩＬ－２１は、培養の少なくとも一部の間に、１０ｎｇ／ｍＬ又は約１０ｎｇ／ｍＬから、１００ｎｇ／ｍＬ又は約１００ｎｇ／ｍＬの濃度で培養培地に添加される。いくつかの実施形態では、組換えＩＬ－２１は、培養の少なくとも一部の間に、２５ｎｇ／ｍＬ又は約２５ｎｇ／ｍＬの濃度で培養培地に添加される。いくつかの実施形態では、組換えＩＬ－２は、培養の少なくとも一部の間に、１０　ＩＵ／ｍＬ又は約１０　ＩＵ／ｍＬから、５００　ＩＵ／ｍＬ又は約５００　ＩＵ／ｍＬの濃度で培養培地に添加される。いくつかの実施形態では、組換えＩＬ－２は、培養の少なくとも一部の間に、１００　ＩＵ／ｍＬ又は約１００　ＩＵ／ｍＬの濃度で培養培地に添加される。いくつかの実施形態では、組換えＩＬ－２は、培養の少なくとも一部の間に、５００　ＩＵ／ｍＬ又は約５００　ＩＵ／ｍＬの濃度で培養培地に添加される。いくつかの実施形態では、組換えＩＬ－１５は、培養の少なくとも一部の間に、１ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬ又は約１ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬの濃度で培養培地に添加される。いくつかの実施形態では、組換えＩＬ－１５は、培養の少なくとも一部の間に、１０ｎｇ／ｍＬ又は約１０ｎｇ／ｍＬの濃度で培養培地に添加される。

【００６８】

いくつかの実施形態では、組換えサイトカインは、培養の開始時又はほぼ開始時に培養

培地に添加される。いくつかの実施形態では、本方法は、培養中に培養培地を１回以上交換することを更に含み、培養培地の各交換時に、組換えサイトカインを含有する新鮮な培地が添加される。いくつかの実施形態では、培養培地の交換は、培養期間の間、２日又は３日毎に行われる。いくつかの実施形態では、培地交換は、最大５日間の培地交換を伴わない第１の増殖の後に行われ、任意選択で、最大５日間の培地交換を伴わない第１の増殖の後に行われる。

【００６９】

いくつかの実施形態では、ヒト対象は、ＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｖ　ＮＫ細胞遺伝子型又はＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｆ　ＮＫ細胞遺伝子型を有し、任意選択で、生体試料は、ＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｖ　ＮＫ細胞遺伝子型又はＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｆ　ＮＫ細胞遺伝子型について選択されたヒト対象に由来する。

【００７０】

いくつかの実施形態では、生体試料は、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）であるか、又はそれを含み、任意選択で、血液試料、アフェレーシス試料又は白血球アフェレーシス試料である。いくつかの実施形態では、ＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞は、ＨＬＡ－Ｅで形質転換されたＫ５６２細胞（Ｋ５６２－ＨＬＡ－Ｅ）である。いくつかの実施形態では、ＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞は、２２１．ＡＥＨ細胞である。

【００７１】

いくつかの実施形態では、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞　対　濃縮ＮＫ細胞の比は、１：１～５：１（両端を含む）である。いくつかの実施形態では、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞　対　濃縮ＮＫ細胞の比は、１：１～３：１（両端を含む）である。いくつかの実施形態では、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞　対　濃縮されたＮＫ細胞の比は、任意選択で、２．５：１又は約２．５：１である。いくつかの実施形態では、照射ＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞　対　濃縮ＮＫ細胞の比は、任意選択で、２：１であるか、又は約２：１である。いくつかの実施形態では、照射ＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞　対　濃縮ＮＫ細胞の比は、任意選択で、約１：１である。

【００７２】

いくつかの実施形態では、培養の少なくとも一部の間に培養培地に添加される組換えサイトカインは、５００　ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、１０ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１５、及び２５ｎｇ／ｍＬのＩＬ－２１である。

【００７３】

いくつかの実施形態では、濃縮されたＮＫ細胞の集団は、両端を含めて、２．０×10^5個又は約２．０×10^5個の濃縮されたＮＫ細胞から、５．０×10^7個又は約５．０×10^7個の濃縮されたＮＫ細胞を含む。いくつかの実施形態では、濃縮ＮＫ細胞の集団は、両端を含めて、１．０×10^6個又は約１．０×10^6個の濃縮ＮＫ細胞から、１．０×10^8個又は約１．０×10^8個の濃縮ＮＫ細胞を含む。いくつかの実施形態では、濃縮されたＮＫ細胞の集団は、両端を含めて、１．０×10^7個又は約１．０×10^7個の濃縮されたＮＫ細胞から、５．０×10^8個又は約５．０×10^8個の濃縮されたＮＫ細胞を含む。いくつかの実施形態では、濃縮されたＮＫ細胞の集団は、両端を含めて、１．０×10^7個又は約１．０×10^7個の濃縮されたＮＫ細胞から、１．０×10^9個又は約１．０×10^9個の濃縮されたＮＫ細胞を含む。いくつかの実施形態では、濃縮されたＮＫ細胞の集団は、任意選択で、１．０×10^6個又は約１．０×10^6個の濃縮されたＮＫ細胞を含む。

【００７４】

いくつかの実施形態では、培養の開始時における濃縮されたＮＫ細胞の集団は、０．０５×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ～１．０×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ又は約０．０５×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ～１．０×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬの濃度であるいくつかの実施形態では、培養の開始時における濃縮されたＮＫ細胞の集団は、０．０５×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ～０．５×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ又は約０．０５×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ～０．５×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬの濃度

である。いくつかの実施形態では、培養開始時の濃縮ＮＫ細胞の集団は、任意選択で、０．２×１０^{6}個又は約０．２×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬの濃度である。

【００７５】

いくつかの実施形態では、培養は、本方法が少なくとも２．５０×１０^{8}又は少なくとも約２．５０×１０^{8}個のｇ－ＮＫ細胞の増殖を達成する時点まで実施される。いくつかの実施形態では、培養は、本方法が少なくとも５．００×１０^{8}又は少なくとも約５．００×１０^{8}個のｇ－ＮＫ細胞の増殖を達成する時点まで実施される。いくつかの実施形態では、培養することは、方法が少なくとも１．０×１０^{9}又は少なくとも約１．０×１０^{9}個のｇ－ＮＫ細胞の増殖を達成する時点まで実施される。いくつかの実施形態では、培養することは、方法が少なくとも５．０×１０^{9}又は少なくとも約５．０×１０^{9}個のｇ－ＮＫ細胞の増殖を達成する時点まで実施される。

【００７６】

いくつかの実施形態では、培養は、５日間又は約５日間又は少なくとも５日間又は少なくとも約５日間行われる。いくつかの実施形態では、培養は、６日間又は約６日間又は少なくとも６日間又は少なくとも約６日間行われる。いくつかの実施形態では、培養は、７日間又は約７日間又は少なくとも７日間又は少なくとも約７日間実施される。いくつかの実施形態では、培養は、８日間又は約８日間又は少なくとも８日間又は少なくとも約８日間行われる。いくつかの実施形態では、培養は、９日間又約９日間又は少なくとも９日間又は少なくとも約９日間行われる。いくつかの実施形態では、培養は、１０日間又は約１０日間又は少なくとも１０日間又は少なくとも約１０日間実施される。いくつかの実施形態では、培養は、１１日間又は約１１日間又は少なくとも１１日間又は少なくとも約１１日間行われる。いくつかの実施形態では、培養は、１２日間又は約１２日間又は少なくとも１２日間又は少なくとも約１２日間行われる。いくつかの実施形態では、培養は、１３日間又は約１３日間又は少なくとも１３日間又は少なくとも約１３日間行われる。いくつかの実施形態では、培養は、１４日間又は約１４日間又は少なくとも１４日間又は少なくとも約１４日間行われる。いくつかの実施形態では、培養は、１５日間又は約１５日間又は少なくとも１５日間又は少なくとも約１５日間行われる。いくつかの実施形態では、培養は、１６日間又は約１６日間又は少なくとも１６日間又は少なくとも約１６日間行われる。いくつかの実施形態では、培養は、１７日間又は約１７日間又は少なくとも１７日間又は少なくとも約１７日間行われる。いくつかの実施形態では、培養は、１８日間又は約１８日間又は少なくとも１８日間又は少なくとも約１８日間行われる。いくつかの実施形態では、培養は、１９日間又は約１９日間又は少なくとも１９日間又は少なくとも約１９日間行われる。いくつかの実施形態では、培養は、２０日間又は約２０日間又は少なくとも２０日間又は少なくとも約２０日間行われる。いくつかの実施形態では、培養は、２１日間又は約２１日間又は少なくとも２１日間又は少なくとも約２１日間行われる。いくつかの実施形態では、培養は、２２日間又は約２２日間又は少なくとも２２日間又は少なくとも約２２日間行われる。いくつかの実施形態では、培養は、２３日間又は約２３日間又は少なくとも２３日間又は少なくとも約２３日間行われる。いくつかの実施形態では、培養は、２４日間又は約２４日間又は少なくとも２４日間又は少なくとも約２４日間実施される。いくつかの実施形態では、培養は、２５日間又は約２５日間又は少なくとも２５日間又は少なくとも約２５日間行われる。

【００７７】

いくつかの実施形態では、本方法は、本方法によって産生された操作されたＮＫ細胞の増殖集団を収集することを更に含む。いくつかの実施形態では、方法は、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を、薬学的に許容される賦形剤中に製剤化することを更に含む。いくつかの実施形態では、本方法は、操作されたＮＫ細胞の増殖集団を、抗凍結剤を含む無血清凍結保存培地と共に製剤化することを更に含む。いくつかの実施形態では、がんは、ＤＭＳＯである。いくつかの実施形態では、抗凍結剤は任意選択でＤＭＳＯであり、凍結保存培地は５％～１０％ＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）であり、任意選択で、１０％ＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）又は約１０％ＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）である。

【００７８】
いくつかの実施形態では、本方法によって産生される操作されたＮＫ細胞の増殖集団のうち、集団の５０％超がＦｃＲγ^{neg}である。いくつかの実施形態では、本方法によって産生される操作されたＮＫ細胞の増殖集団のうち、集団の６０％超がＦｃＲγ^{neg}である。いくつかの実施形態では、本方法によって産生される操作されたＮＫ細胞の増殖集団のうち、集団の７０％超がＦｃＲγ^{neg}である。いくつかの実施形態では、本方法によって産生される操作されたＮＫ細胞の増殖集団のうち、集団の８０％超がＦｃＲγ^{neg}である。いくつかの実施形態では、本方法によって産生される操作されたＮＫ細胞の増殖集団のうち、集団の９０％超がＦｃＲγ^{neg}である。いくつかの実施形態では、本方法によって産生される操作されたＮＫ細胞の増殖集団のうち、集団の９５％超がＦｃＲγ^{neg}である。
【００７９】
いくつかの実施形態では、複数の操作されたＮＫ細胞が、上記実施形態のいずれかに記載の方法によって産生される。
【００８０】
対象における疾患又は状態を処置する方法も本明細書において提供される。いくつかの実施形態では、上記実施形態のいずれか１つの組成物の細胞の有効量が、それを必要とする個体に投与される。
【００８１】
いくつかの実施形態では、疾患又は状態は炎症状態である。いくつかの実施形態では、疾患又は障害は、感染症である。いくつかの実施形態では、疾患又は障害は、がんである。いくつかの実施形態では、疾患又は障害は、がんである。いくつかの実施形態では、がんは、白血病である。いくつかの実施形態では、がんは、リンパ腫である。いくつかの実施形態では、がんは、骨髄腫である。いくつかの実施形態では、疾患又は状態は、がんであり、がんは固形腫瘍を含む。
【００８２】
いくつかの実施形態では、がんは胃又は胃食道接合部の腺がんである。いくつかの実施形態では、疾患は膀胱がんである。いくつかの実施形態では、疾患は乳がんである。いくつかの実施形態では、疾患は脳がんである。いくつかの実施形態では、疾患は子宮頸がんである。いくつかの実施形態では、疾患は結腸直腸がんである。いくつかの実施形態では、がんは内分泌／神経内分泌直腸がんである。いくつかの実施形態では、がんは頭頸部がんである。いくつかの実施形態では、がんは消化管間質である。いくつかの実施形態では、がんは、骨巨細胞腫瘍である。いくつかの実施形態では、疾患は腎臓がんである。いくつかの実施形態では、疾患は肝臓がんである。いくつかの実施形態では、疾患は肺がんである。いくつかの実施形態では、がんは、神経芽細胞腫である。いくつかの実施形態では、がんは、卵巣上皮／卵管／原発性腹膜がんである。いくつかの実施形態では、がんは膵臓腺がんである。いくつかの実施形態では、がんは前立腺がんである。いくつかの実施形態では、がんは皮膚がんである。いくつかの実施形態では、がんは軟部組織がんである。
【００８３】
いくつかの実施形態では、組成物は単剤療法として投与される。いくつかの実施形態では、本方法は、疾患又は状態を処置するために個体に追加の薬剤を投与することを更に含む。いくつかの実施形態では、追加の薬剤は、抗体又はＦｃ融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、抗体はモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は完全長の抗体である。いくつかの実施形態では、抗体はＩｇＧ１抗体である。いくつかの実施形態では、疾患又は状態は、がんであり、追加の薬剤、任意選択で抗体は、がんに関連する腫瘍抗原を認識する。いくつかの実施形態では、抗体は、がんに関連する腫瘍抗原を認識する。
【００８４】
いくつかの実施形態では、本方法は、ｇ－ＮＫ細胞組成物の、1×10^{5}又は約1×10^{5}から、50×10^{9}又は約50×10^{9}個の細胞を、個体に投与することを含む。い

くつかの実施形態では、本方法は、１×１０^{8}又は約１×１０^{8}から、５０×１０^{9}又は約５０×１０^{9}個のＮＫ細胞のｇ－ＮＫ細胞組成物を個体に投与することを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、およそ５×１０^{8}もしくは約５×１０^{8}個の細胞のｇ－ＮＫ細胞組成物、５×１０^{9}もしくは約５×１０^{9}個の細胞のｇ－ＮＫ細胞組成物、又は１０×１０^{9}もしくは約１０×１０^{9}個の細胞のｇ－ＮＫ細胞組成物を個体に投与することを任意選択で含む。

【００８５】

いくつかの実施形態では、本方法は、外因性サイトカインサポートを投与して、対象における投与されたＮＫ細胞のインビボでの増殖又は持続を促進することを更に含む。いくつかの実施形態では、外因性サイトカインは、任意選択でＩＬ－１５であるか、又は任意選択でＩＬ－１５を含む。

【００８６】

いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞の用量の投与前に、対象はリンパ球枯渇療法を受けている。いくつかの実施形態では、療法は、フルダラビン及び／又はシクロホスファミドを含む。いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、対象の体表面積で２０～４０ｍｇ／ｍ^{2}又は約２０～４０ｍｇ／ｍ^{2}でのフルダラビンの投与を含む。いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、任意選択で、毎日、２～４日間、３０ｍｇ／ｍ^{2}又は約３０ｍｇ／ｍ^{2}、及び／又は対象の体表面積で２００～４００ｍｇ／ｍ^{2}又は約２００～４００ｍｇ／ｍ^{2}、任意選択で、毎日、２～４日間、３００ｍｇ／ｍ^{2}又は約３００ｍｇ／ｍ^{2}のシクロホスファミドを含む。いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇療法は、フルダラビン及びシクロホスファミドを含む。いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇療法は、フルダラビンを対象の体表面積で３０ｍｇ／ｍ^{2}又は約３０ｍｇ／ｍ２で毎日投与し、シクロホスファミドを対象の体表面積で３００ｍｇ／ｍ^{2}又は約３００ｍｇ／ｍ^{2}で毎日、それぞれ２～４日間、任意選択で３日間投与することを含む。

【００８７】

いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞の用量の投与は、リンパ球枯渇療法の開始後２週間以内に開始される。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞の用量の投与は、リンパ球枯渇療法の開始の２週間後又は約２週間後に開始される。

【００８８】

いくつかの実施形態では、個体はヒトである。いくつかの実施形態では、組成物中のＮＫ細胞は、個体にとって同種異系である。いくつかの実施形態では、組成物中のＮＫ細胞は、対象に対して自己由来である。

【図面の簡単な説明】

【００８９】

【図１Ａ】図１Ａ及び図１Ｂは、ＮＫ細胞培地中に含まれるＩＬ－２１あり又はなしで、２２１．ＡＥＨ又はＫ５６２－ｍｂＩＬ１５－４１ＢＢＬフィーダー細胞の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞の増殖を示す。図１Ａは、総ＮＫ細胞数を示す。図１Ｂは、増殖２１日後のｇ－ＮＫ細胞数を示す。

【図１Ｂ】図１Ａの説明を参照のこと。

【図２Ａ】図２Ａ及び図２Ｂは、２２１．ＡＥＨ又はＫ５６２－ｍｂＩＬ１５－４１ＢＢＬフィーダー細胞の存在中で増殖させたｇ－ＮＫ細胞の増殖２１日後のダラツムマブ及びエロツズマブ媒介性細胞傷害活性を、ＮＫ細胞培地中にＩＬ－２１を含めて又は含めずに示す。図２Ａは、ＬＰ１細胞株に対するｇ－ＮＫ細胞の細胞傷害性を示す。図２Ｂは、ＭＭ．１Ｓ細胞株に対するｇ－ＮＫ細胞の細胞傷害性を示す。

【図２Ｂ】図２Ａの説明を参照のこと。

【図３Ａ】図３Ａ～図３Ｄは、２２１．ＡＥＨ又はＫ５６２－ｍｂＩＬ１５－４１ＢＢＬフィーダー細胞の存在下で、ＮＫ細胞培地に含まれるＩＬ－２１が含まれる又は含まれない増殖させたｇ－ＮＫ細胞のダラツムマブ及びエロツズマブによって媒介される脱顆粒レベル（ＣＤ１０７ａ^{pos}）を示す。図３Ａは、ＬＰ１細胞株に対する増殖の１３日後のｇ－ＮＫ細胞脱顆粒レベルを示す。図３Ｂは、ＭＭ．１Ｓ細胞株に対する増殖の１３日後

のｇ－ＮＫ細胞脱顆粒レベルを示す。図３Ｃは、ＬＰ１細胞株に対する増殖２１日後のｇ－ＮＫ細胞脱顆粒レベルを示す。図３Ｄは、ＭＭ．１Ｓ細胞株に対する増殖２１日後のｇ－ＮＫ細胞脱顆粒レベルを示す。

【図３Ｂ】図３Ａの説明を参照のこと。

【図３Ｃ】図３Ａの説明を参照のこと。

【図３Ｄ】図３Ａの説明を参照のこと。

【図４Ａ】図４Ａ～図４Ｄは、ＮＫ細胞培地に含まれるＩＬ－２１あり又はなしで、２２１．ＡＥＨ又はＫ５６２－ｍｂＩＬ１５－４１ＢＢＬフィーダー細胞の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞におけるパーフォリン及びグランザイムＢ発現のレベルを示す。図４Ａは、ｇ－ＮＫ細胞の割合としての増殖１３日後のパーフォリン及びグランザイムＢ発現を示す。図４Ｂは、増殖１３日後の全パーフォリン及びグランザイムＢ発現を示す。図４Ｃは、ｇ－ＮＫ細胞の割合としての増殖２１日後のパーフォリン及びグランザイムＢ発現を示す。図４Ｄは、増殖２１日後の全パーフォリン及びグランザイムＢ発現を示す。

【図４Ｂ】図４Ａの説明を参照のこと。

【図４Ｃ】図４Ａの説明を参照のこと。

【図４Ｄ】図４Ａの説明を参照のこと。

【図５Ａ】図５Ａ～図５Ｄは、ＮＫ細胞培地に含まれるＩＬ－２１の有無にかかわらず、２２１．ＡＥＨ又はＫ５６２－ｍｂＩＬ１５－４１ＢＢＬフィーダー細胞の存在中で増殖させたｇ－ＮＫ細胞のダラツムマブ及びエロツズマブ媒介性インターフェロン－γ発現レベルを示す。図５Ａは、ＬＰ１細胞株に対する増殖１３日後のｇ－ＮＫ細胞インターフェロン－γ発現レベルを示す。図５Ｂは、ＭＭ．１Ｓ細胞株に対する増殖１３日後のｇ－ＮＫ細胞インターフェロン－γ発現レベルを示す。図５Ｃは、ＬＰ１細胞株に対する増殖２１日後のｇ－ＮＫ細胞インターフェロン－γ発現レベルを示す。図５Ｄは、ＭＭ．１Ｓ細胞株に対する増殖２１日後のｇ－ＮＫ細胞インターフェロン－γ発現レベルを示す。

【図５Ｂ】図５Ａの説明を参照のこと。

【図５Ｃ】図５Ａの説明を参照のこと。

【図５Ｄ】図５Ａの説明を参照のこと。

【図６Ａ】図６Ａ～図６Ｄは、ＮＫ細胞培地中に含まれるＩＬ－２１の有無にかかわらず、２２１．ＡＥＨ又はＫ５６２－ｍｂＩＬ１５－４１ＢＢＬフィーダー細胞の存在において増殖したｇ－ＮＫ細胞のダラツムマブ及びエロツズマブ媒介性ＴＮＦ－α発現レベルを示す。図６Ａは、ＬＰ１細胞株に対する増殖１３日後のｇ－ＮＫ細胞ＴＮＦ－α発現レベルを示す。図６Ｂは、ＭＭ．１Ｓ細胞株に対する増殖１３日後のｇ－ＮＫ細胞ＴＮＦ－α発現レベルを示す。図６Ｃは、ＬＰ１細胞株に対する増殖２１日後のｇ－ＮＫ細胞ＴＮＦ－α発現レベルを示す。図６Ｄは、ＭＭ．１Ｓ細胞株に対する増殖２１日後のｇ－ＮＫ細胞ＴＮＦ－α発現レベルを示す。

【図６Ｂ】図６Ａの説明を参照のこと。

【図６Ｃ】図６Ａの説明を参照のこと。

【図６Ｄ】図６Ａの説明を参照のこと。

【図７】種々のサイトカイン混合物及び濃度の存在下で１５日間増殖させたＮＫ細胞のｇ－ＮＫ細胞増殖を示す。

【図８Ａ】図８Ａ～図８Ｊは、様々なサイトカイン混合物及び濃度の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞の細胞エフェクター機能を示す。図８Ａ及び図８Ｂは、様々なサイトカイン混合物及び濃度の存在において増殖させたｇ－ＮＫ細胞のダラツムマブ及びエロツズマブ媒介細胞傷害活性を示す。図８Ａは、ＬＰ１細胞株に対するｇ－ＮＫ細胞の細胞傷害性を示す。図８Ｂは、ＭＭ．１Ｓ細胞株に対するｇ－ＮＫ細胞の細胞傷害性を示す。

【図８Ｂ】図８Ａの説明を参照のこと。

【図８Ｃ】図８Ａ～図８Ｊは、様々なサイトカイン混合物及び濃度の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞の細胞エフェクター機能を示す。図８Ｃ及び図８Ｄは、様々なサイトカイン混合物及び濃度の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞の、ダラツムマブ及びエロツズマブによって媒介される脱顆粒レベル（ＣＤ１０７ａ^{pos}）を示す。図８Ｃは、ＬＰ１細胞株

に対するｇ－ＮＫ細胞脱顆粒レベルを示す。図８Ｄは、ＭＭ．１Ｓ細胞株に対するｇ－ＮＫ細胞脱顆粒レベルを示す。
【図８Ｄ】図８Ｃの説明を参照のこと。
【図８Ｅ】図８Ａ～図８Ｊは、様々なサイトカイン混合物及び濃度の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞の細胞エフェクター機能を示す。図８Ｅ及び図８Ｆは、様々なサイトカイン混合物及び濃度の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞におけるパーフォリン及びグランザイムＢ発現のレベルを示す。図８Ｅは、ｇ－ＮＫ細胞の割合としてのパーフォリン及びグランザイムＢ発現を示す。図８Ｆは、全パーフォリン及びグランザイムＢ発現を示す。
【図８Ｆ】図８Ｅの説明を参照のこと。
【図８Ｇ】図８Ａ～図８Ｊは、様々なサイトカイン混合物及び濃度の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞の細胞エフェクター機能を示す。図８Ｇ及び図８Ｈは、様々なサイトカイン混合物及び濃度の存在において増殖したｇ－ＮＫ細胞のダラツムマブ及びエロツズマブ媒介性インターフェロン－γ発現レベルを示す。図８Ｇは、ＬＰ１細胞株に対するｇ－ＮＫ細胞インターフェロン－γ発現レベルを示す。図８Ｈは、ＭＭ．１Ｓ細胞株に対するｇ－ＮＫ細胞インターフェロン－γ発現レベルを示す。
【図８Ｈ】図８Ｇの説明を参照のこと。
【図８Ｉ】図８Ａ～図８Ｊは、様々なサイトカイン混合物及び濃度の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞の細胞エフェクター機能を示す。図８Ｉ及び図８Ｊは、様々なサイトカイン混合物及び濃度の存在において増殖したｇ－ＮＫ細胞のダラツムマブ及びエロツズマブ媒介性ＴＮＦ－α発現レベルを示す。図８Ｉは、ＬＰ１細胞株に対するｇ－ＮＫ細胞ＴＮＦ－α発現レベルを示す。図８Ｊは、ＭＭ．１Ｓ細胞株に対するｇ－ＮＫ細胞ＴＮＦ－α発現レベルを示す。
【図８Ｊ】図８Ｉの説明を参照のこと。
【図９Ａ】図９Ａ～図９Ｌは、ＩＬ－２１なしで増殖させたｇ－ＮＫ細胞と比較した、ＩＬ－２１の存在下で１４日間増殖させたｇ－ＮＫ細胞の増殖及び細胞エフェクター機能を示す（ｎ＝６）。図９Ａ及び図９Ｂは、ＩＬ－２１なしで増殖させたｇ－ＮＫ細胞と比較した、ＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞の増殖を示す。図９Ａは、増殖前後のｇ－ＮＫ細胞割合を示す。図９Ｂは、１千万個のＮＫ細胞当たりの増殖したｇ－ＮＫ細胞の数を示す。値は平均±ＳＥである。ＩＬ－２１なしでのＣＤ３^{neg}／ＣＤ５７^{pos}＋ＩＬ－２１増殖対ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５７^{pos}増殖の比較について＃ｐ＜０．００１。ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５７^{pos}増殖対他のＣＭＶ^{pos}増殖の比較について、＾ｐ＜０．０５。ＣＭＶ^{pos}増殖対ＣＭＶ^{neg}ＣＤ３^{neg}増殖の比較について＊ｐ＜０．００１。
【図９Ｂ】図９Ａの説明を参照のこと。
【図９Ｃ】図９Ａ～図９Ｌは、ＩＬ－２１なしで増殖させたｇ－ＮＫ細胞と比較した、ＩＬ－２１の存在下で１４日間増殖させたｇ－ＮＫ細胞の増殖及び細胞エフェクター機能を示す（ｎ＝６）。図９Ｃは、増殖前後のｇ－ＮＫの割合（ＣＭＶ＋ドナー（ｎ＝８）及びＣＭＶ－ドナー（ｎ＝６）からの総ＮＫ細胞の％）の比較を示す。図９Ｄは、ＣＭＶ＋及びＣＭＶドナーからのｇ－ＮＫのｎ倍増殖速度の比較を示す。図９Ｅは、ＣＭＶ＋ドナーについてのＦｃεＲ１γ対ＣＤ５６の代表的フロープロットを提供する。図９Ｆは、ＣＭＶ＋及びＣＭＶ－ドナーのＣＤ３－／ＣＤ５６＋ＮＫ細胞上のＦｃεＲ１γ発現の代表的なヒストグラムを提供する。独立試料ｔ検定を使用して、増殖前後のＣＭＶ＋ドナーとＣＭＶドナーとの間の差を決定した（図９Ｃ及び図９Ｄ）。値は平均±ＳＥ．＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．００１である。
【図９Ｄ】図９Ｃの説明を参照のこと。
【図９Ｅ】図９Ｃの説明を参照のこと。
【図９Ｆ】図９Ｃの説明を参照のこと。
【図９Ｇ】図９Ａ～図９Ｌは、ＩＬ－２１なしで増殖させたｇ－ＮＫ細胞と比較した、ＩＬ－２１の存在下で１４日間増殖させたｇ－ＮＫ細胞の増殖及び細胞エフェクター機能を示す（ｎ＝６）。図９Ｇ及び図９Ｈは、ＩＬ－２１なしで増殖させたｇ－ＮＫ細胞と比較

した、ＩＬ－２１の存在において増殖させたｇ－ＮＫ細胞の増殖の１４日後のダラツムマブ及びエロツズマブ媒介性細胞傷害活性を示す。図９Ｇは、ＬＰ１細胞株に対するｇ－ＮＫ細胞の細胞傷害性を示す。図９Ｈは、ＭＭ．１Ｓ細胞株に対するｇ－ＮＫ細胞の細胞傷害性を示す。値は平均±ＳＥである。ＩＬ－２１なしでのＣＤ３^{neg}／ＣＤ５７^{pos}＋ＩＬ－２１増殖対ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５７^{pos}増殖の比較について、＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、及び＊＊＊ｐ＜０．００１。

【図９Ｈ】図９Ｇの説明を参照のこと。

【図９Ｉ】図９Ａ～図９Ｌは、ＩＬ－２１なしで増殖させたｇ－ＮＫ細胞と比較した、ＩＬ－２１の存在下で１４日間増殖させたｇ－ＮＫ細胞の増殖及び細胞エフェクター機能を示す（ｎ＝６）。図９Ｉ及び図９Ｊは、ＩＬ－２１なしで増殖させたｇ－ＮＫ細胞と比較した、ＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞のダラツムマブ及びエロツズマブ媒介脱顆粒レベル（ＣＤ１０７ａ^{pos}）を示す。図９Ｉは、ＬＰ１細胞株に対する増殖１４日後のｇ－ＮＫ細胞脱顆粒レベルを示す。図９Ｊは、ＭＭ．１Ｓ細胞株に対する増殖１４日後のｇ－ＮＫ細胞脱顆粒レベルを示す。値は平均±ＳＥである。ＩＬ－２１なしでのＣＤ３^{neg}／ＣＤ５７^{pos}＋ＩＬ－２１増殖対ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５７^{pos}増殖の比較について、＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、及び＊＊＊ｐ＜０．００１。

【図９Ｊ】図９Ｉの説明を参照のこと。

【図９Ｋ】図９Ａ～図９Ｌは、ＩＬ－２１なしで増殖させたｇ－ＮＫ細胞と比較した、ＩＬ－２１の存在下で１４日間増殖させたｇ－ＮＫ細胞の増殖及び細胞エフェクター機能を示す（ｎ＝６）。図９Ｋ及び図９Ｌは、ＩＬ－２１なしで増殖させたｇ－ＮＫ細胞と比較した、ＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞におけるパーフォリン及びグランザイムＢ発現のレベルを示す。図９Ｋは、増殖の１４日後のパーフォリン及びグランザイムＢ発現をＮＫ細胞の割合として示す。図９Ｌは、増殖１４日後の全パーフォリン及びグランザイムＢ発現を示す。値は平均±ＳＥである。ＩＬ－２１なしでのＣＤ３^{neg}／ＣＤ５７^{pos}＋ＩＬ－２１増殖対ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５７^{pos}増殖の比較について、＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、及び＊＊＊ｐ＜０．００１。

【図９Ｌ】図９Ｋの説明を参照のこと。

【図９Ｍ】ｃＮＫ細胞よりも増殖したｇ－ＮＫ細胞におけるパーフォリン（左）及びグランザイムＢ（右）のベースライン発現を示す（ｎ＝５）。エフェクターパーフォリン及びグランザイムＢの発現をｇ－ＮＫとｃＮＫとの間で比較するために、独立試料ｔ検定を使用した。値は平均±ＳＥである。ｃＮＫ細胞との統計的有意差は、＊＊＊ｐ＜０．００１によって示される。

【図９Ｎ】ｇ－ＮＫ及びｃＮＫ細胞についてのパーフォリン及びグランザイムＢ発現の代表的なヒストグラムを示す。

【図９Ｏ】図９Ｏ及び図９Ｐは、ＩＬ－２１なしで増殖させたｇ－ＮＫ細胞と比較した、ＩＬ－２１の存在において増殖させたｇ－ＮＫ細胞のダラツムマブ及びエロツズマブ媒介性インターフェロン－γ発現レベルを示す。図９Ｏは、ＬＰ１細胞株に対する増殖１４日後のｇ－ＮＫ細胞インターフェロン－γ発現レベルを示す。図９Ｐは、ＭＭ．１Ｓ細胞株に対する増殖１４日後のｇ－ＮＫ細胞インターフェロン－γ発現レベルを示す。値は平均±ＳＥである。ＩＬ－２１なしでのＣＤ３^{neg}／ＣＤ５７^{pos}＋ＩＬ－２１増殖対ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５７^{pos}増殖の比較について、＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、及び＊＊＊ｐ＜０．００１。

【図９Ｐ】図９Ｏの説明を参照のこと。

【図９Ｑ】図９Ｑ及び図９Ｒは、ＩＬ－２１なしで増殖させたｇ－ＮＫ細胞と比較した、ＩＬ－２１の存在において増殖させたｇ－ＮＫ細胞のダラツムマブ及びエロツズマブ媒介性ＴＮＦ－α発現レベルを示す。図９Ｑは、ＬＰ１細胞株に対する増殖１４日後のｇ－ＮＫ細胞ＴＮＦ－α発現レベルを示す。図９Ｒは、ＭＭ．１Ｓ細胞株に対する増殖１４日後のｇ－ＮＫ細胞ＴＮＦ－α発現レベルを示す。値は平均±ＳＥである。ＩＬ－２１なしでのＣＤ３^{neg}／ＣＤ５７^{pos}＋ＩＬ－２１増殖対ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５７^{pos}増殖の比較について、＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、及び＊＊＊ｐ＜０．００１。

【図９Ｒ】図９Ｑの説明を参照のこと。
【図９Ｓ】異なるドナー間のＭＭ．１Ｓ細胞株に対するｃＮＫ細胞と比較した増殖ｇ－ＮＫ細胞のダラツムマブ及びエロツズマブインターフェロン－γ発現レベルを示す。
【図９Ｔ】異なるドナー間のＭＭ．１Ｓ細胞株に対するｃＮＫ細胞と比較した増殖ｇ－ＮＫ細胞のダラツムマブ及びエロツズマブ　ＴＮＦ－α発現レベルを示す。
【図１０】ＩＬ－２１／抗ＩＬ－２１複合体の存在下で増殖させたｇ－ＮＫの増殖を示す（ｎ＝４）。値は平均±ＳＥである。ＩＬ－２１による増殖対ＩＬ－２１／抗ＩＬ－２１複合体による増殖の比較について、＃ｐ＜０．００１。
【図１１Ａ】図１１Ａ～図１１Ｈは、新たに濃縮されたｇ－ＮＫ細胞のＮＫ細胞エフェクター機能と比較した、以前に凍結保存されたｇ－ＮＫ細胞のＮＫ細胞エフェクター機能を示す（ｎ＝４）。値は平均±ＳＥである。新たに濃縮されたｇ－ＮＫ細胞対以前に凍結保存されたｇ－ＮＫ細胞の比較について、＃ｐ＜０．０５。図１１Ａ及び図１１Ｂは、新たに濃縮されたｇ－ＮＫ細胞と比較した、以前に凍結保存されたｇ－ＮＫ細胞のダラツムマブ及びエロツズマブによって媒介される脱顆粒レベル（ＣＤ１０７ａｐｏｓ）を示す。図１１Ａは、ＬＰ１細胞株に対するｇ－ＮＫ細胞脱顆粒レベルを示す。図１１Ｂは、ＭＭ．１Ｓ細胞株に対するｇ－ＮＫ細胞脱顆粒レベルを示す。
【図１１Ｂ】図１１Ａの説明を参照のこと。
【図１１Ｃ】図１１Ａ～図１１Ｈは、新たに濃縮されたｇ－ＮＫ細胞のＮＫ細胞エフェクター機能と比較した、以前に凍結保存されたｇ－ＮＫ細胞のＮＫ細胞エフェクター機能を示す（ｎ＝４）。値は平均±ＳＥである。新たに濃縮されたｇ－ＮＫ細胞対以前に凍結保存されたｇ－ＮＫ細胞の比較について、＃ｐ＜０．０５。図１１Ｃ及び図１１Ｄは、新たに濃縮されたｇ－ＮＫ細胞と比較した、以前に凍結保存されたｇ－ＮＫ細胞におけるパーフォリン及びグランザイムＢ発現のレベルを示す。図１１Ｃは、ｇ－ＮＫ細胞の全パーフォリン発現を示す。図１１Ｄは、ｇ－ＮＫ細胞の総グランザイムＢ発現を示す。
【図１１Ｄ】図１１Ｃの説明を参照のこと。
【図１１Ｅ】図１１Ａ～図１１Ｈは、新たに濃縮されたｇ－ＮＫ細胞のＮＫ細胞エフェクター機能と比較した、以前に凍結保存されたｇ－ＮＫ細胞のＮＫ細胞エフェクター機能を示す（ｎ＝４）。値は平均±ＳＥである。新たに濃縮されたｇ－ＮＫ細胞対以前に凍結保存されたｇ－ＮＫ細胞の比較について、＃ｐ＜０．０５。図１１Ｅ及び図１１Ｆは、新たに濃縮されたｇ－ＮＫ細胞と比較した、以前に凍結保存されたｇ－ＮＫ細胞のダラツムマブ及びエロツズマブ媒介性インターフェロン－γ発現レベルを示す。図１１Ｅは、ＬＰ１細胞株に対するｇ－ＮＫ細胞インターフェロン－γ発現レベルを示す。図１１Ｆは、ＭＭ．１Ｓ細胞株に対するｇ－ＮＫ細胞インターフェロン－γ発現レベルを示す。
【図１１Ｆ】図１１Ｅの説明を参照のこと。
【図１１Ｇ】図１１Ａ～図１１Ｈは、新たに濃縮されたｇ－ＮＫ細胞のＮＫ細胞エフェクター機能と比較した、以前に凍結保存されたｇ－ＮＫ細胞のＮＫ細胞エフェクター機能を示す（ｎ＝４）。値は平均±ＳＥである。新たに濃縮されたｇ－ＮＫ細胞対以前に凍結保存されたｇ－ＮＫ細胞の比較について、＃ｐ＜０．０５。図１１Ｇ及び図１１Ｈは、新たに濃縮されたｇ－ＮＫ細胞と比較した、以前に凍結保存されたｇ－ＮＫ細胞のダラツムマブ及びエロツズマブ媒介性ＴＮＦ－α発現レベルを示す。図３７Ｇは、ＬＰ１細胞株に対するｇ－ＮＫ細胞ＴＮＦ－α発現レベルを示す。図１１Ｈは、ＭＭ．１Ｓ細胞株に対するｇ－ＮＫ細胞ＴＮＦ－α発現レベルを示す。
【図１１Ｈ】図１１Ｇの説明を参照のこと。
【図１２Ａ】図１２Ａ～図１２Ｃは、1×10^{7}の増殖細胞の単回用量の注入後のＮＳＧマウスにおけるｃＮＫ（凍結保存）及びｇ－ＮＫ（凍結保存又は新鮮）細胞の持続性を示す。図１２Ａは、注入後６、１６、２６、及び３１日目に収集された末梢血中のｃＮＫ及びｇ－ＮＫ細胞の数を示す。図１２Ｂは、注入後３１日目、　殺時の脾臓に存在するＮＫ細胞の数を示す。図１２Ｃは、　殺時の骨髄中に存在するＮＫ細胞の数を示す。３つ全てのアームについてＮ＝３。値は平均±ＳＥである。凍結保存ｃＮＫ細胞と新鮮又は凍結保存ｇ－ＮＫ細胞との比較について、＊ｐ＜０．０５及び＊＊＊ｐ＜０．００１。

【図１２Ｂ】図１２Ａの説明を参照のこと。
【図１２Ｃ】図１２Ａの説明を参照のこと。
【図１３Ａ】図１３Ａ～図１３Ｄは、ｇ－ＮＫ及びｃＮＫにおけるＣＤ２０（リツキシマブの標的）、ＣＤ３８（ダラツムマブの標的）、及びＳＬＡＭＦ７（エロツズマブの標的）の発現を示す。図１３Ａは、増殖ｇ－ＮＫ細胞、非増殖ＮＫ細胞（ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}）、及びＣＤ２０を発現するＭＭ．１Ｓ細胞の割合を示す。図１３Ｂは、増殖ｇ－ＮＫ細胞、非増殖ＮＫ細胞（ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}）、及びＣＤ３８を発現するＭＭ．１Ｓ細胞の割合を示す。図１３Ｃは、増殖ｇ－ＮＫ細胞、非増殖ＮＫ細胞（ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}）、及びＳＬＡＭＦ７を発現するＭＭ．１Ｓ細胞の割合を示す。図１３Ｄは、増殖前後のＣＤ３８を発現するｃＮＫ及びｇ－ＮＫの割合を示す。全てのアームについてＮ＝３。
【図１３Ｂ】図１３Ａの説明を参照のこと。
【図１３Ｃ】図１３Ａの説明を参照のこと。
【図１３Ｄ】図１３Ａの説明を参照のこと。
【図１３Ｅ】図１３Ｅは、増殖前後のＣＤ３８^{pos}ＮＫ細胞の平均蛍光強度（ＭＦＩ）を示す（ｎ＝４）。図１３Ｆは、ｃＮＫ及びＭＭ．１Ｓ細胞と比較したｇ－ＮＫ細胞のＣＤ３８発現の減少を示す代表的なヒストグラムを提供する。値は平均±ＳＥである。＃ｇ－ＮＫ細胞対全ての他の細胞の比較についてｐ＜０．００１。図１３Ｇは、増殖させたｇ－ＮＫ細胞及びｃＮＫ細胞によるダラツムマブ誘導性のフラトリサイドの比較を示す。
【図１３Ｆ】図１３Ｅの説明を参照のこと。
【図１３Ｇ】図１３Ｅの説明を参照のこと。
【図１４Ａ】図１４Ａ～図１４Ｆは、多発性骨髄腫のマウスモデルにおける腫瘍負荷及び生存に対するｃＮＫ及びダラツムマブ（ｃＮＫ＋Ｄａｒａ）又はｇ－ＮＫ及びダラツムマブ（ｇ－ＮＫ＋Ｄａｒａ）による処置の効果を示す。５×１０^{5}ルシフェラーゼ標識ＭＭ．１Ｓヒト骨髄腫細胞を、雌ＮＳＧマウスの尾静脈に静脈内（Ｉ．Ｖ．）注射した。週１回、５週間の期間、増殖させたＮＫ細胞をＮＳＧマウスにＩ．Ｖ．投与し（６．０×１０^{6}個の細胞／マウス）、ダラツムマブをＩ．Ｐ．注射した（１０μｇ／マウス）。図１４Ａは、腫瘍接種後２０、２７、３７、４１、４８、及び５７日目における週２回のマウスのＢＬＩ画像化を示す（左）。対応する処置後の日数を図の右側に示す。色は、ＢＬＩの強度を示す（青色、最低；赤色、最高）。図１４Ｂは、対照群及びｃＮＫ＋Ｄａｒａ群に対するｇ－ＮＫ＋Ｄａｒａ群における経時的な腫瘍ＢＬＩ（光子／秒）を示す。ｇ－ＮＫ及び対照又はｃＮＫ群の比較について、＊ｐ＜０．０５。図１４Ｃは、経時的な生存パーセントを示し、矢印は、ｃＮＫ＋Ｄａｒａ又はｇ－ＮＫ＋Ｄａｒａのいずれかによる治療の投与を示す。図１４Ｄは、対照群、ｃＮＫ＋Ｄａｒａ群、及びｇ－ＮＫ＋Ｄａｒａ群におけるマウスの経時的な体重変化を示す。図１４Ｅは、ｃＮＫ＋Ｄａｒａ及びｇ－ＮＫ＋Ｄａｒａ処置マウスにおける　殺時の骨髄内に存在するＣＤ１３８腫瘍細胞の数を示す。ｇ－ＮＫ及びｃＮＫ細胞の比較について＊＊＊ｐ＜０．００１。値は平均±ＳＥである。図１４Ｆは、対照群及びｃＮＫ＋Ｄａｒａ又はｇ－ＮＫ＋Ｄａｒａのいずれかで処置したマウスにおけるＮＫ細胞及び腫瘍細胞の存在を解明するためのゲーティング戦略を使用した代表的なフロープロットを示す。対照群についてはＮ＝８であり、ｇ－ＮＫ又はｃＮＫ群についてはＮ＝７である。
【図１４Ｂ】図１４Ａの説明を参照のこと。
【図１４Ｃ】図１４Ａの説明を参照のこと。
【図１４Ｄ】図１４Ａの説明を参照のこと。
【図１４Ｅ】図１４Ａの説明を参照のこと。
【図１４Ｆ】図１４Ａの説明を参照のこと。
【図１４Ｇ】全ての対照、ｃＮＫ＋Ｄａｒａ、及びｇ－ＮＫ＋Ｄａｒａ処置マウスについて研究全体にわたって収集された全てのＢＬＩ画像を提示する。色は、ＢＬＩの強度を示す（青色、最低；赤色、最高）。
【図１４Ｈ】　殺前の対照、ｃＮＫ＋Ｄａｒａ、及びｇ－ＮＫ＋Ｄａｒａ群における全て

のマウスについて得られたＸ線画像を示す。矢印は骨折及び変形を示す。　殺日を各マウスの下に示す。
【図１５Ａ】図１５Ａ～図１５Ｃは、ｃＮＫ＋Ｄａｒａ又はｇ－ＮＫ＋Ｄａｒａによる処置後のＮＳＧマウスにおける持続性ＮＫ細胞の比較データを示す。全てのデータは、　殺時にフローサイトメトリーを使用して検出された細胞の量を示す。図１５Ａは、血液中のｃＮＫ及びｇ－ＮＫ細胞の数を示す。図１５Ｂは、脾臓に存在するＮＫ細胞の数を示す。図１５Ｃは、骨髄中に存在するＮＫ細胞の数を示す。値は平均±ＳＥである。ｇ－ＮＫ及びｃＮＫ細胞の比較について＊＊＊ｐ＜０．００１。
【図１５Ｂ】図１５Ａの説明を参照のこと。
【図１５Ｃ】図１５Ａの説明を参照のこと。
【図１６】ＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}／ＣＤ１６^{pos}／ＣＤ５７^{pos}／ＣＤ７^{dim}／^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}又はＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}／ＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}のいずれかの代用細胞外表面表現型を有する細胞サブセット内のｇ－ＮＫ（ＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}／　ＦｃＲγ^{neg}）の割合を示す。値は平均±標準誤差である。
【図１７】それぞれ異なるドナーを使用する２つの別個の実験におけるｇ－ＮＫ細胞によるＧＦＰ及びＣＤ２０－ＣＡＲの形質導入後発現を示す。
【図１８】Ｒａｊｉリンパ腫細胞に対するリツキシマブ（抗ＣＤ２０モノクローナル抗体）の存在下又は非存在下における、ＣＤ２０－ＣＡＲを伴う又は伴わないｇ－ＮＫ細胞の効力を示す。
【発明を実施するための形態】
【００９０】
詳細な説明
本明細書では、ＦｃＲγ鎖の発現が欠損しており（ｇ－ＮＫ細胞）、組換えキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を更に含む、操作されたナチュラルキラー（ＮＫ）細胞及びその組成物が提供される。ＦｃＲγは、ＦｃεＲ１γとしても知られており、本明細書において互換的に使用される。遺伝子操作されたｇ－ＮＫ細胞を産生する方法であって、ｇ－ＮＫ細胞にＣＡＲをコードする核酸を導入し、それによって遺伝子操作されたｇ－ＮＫ細胞を産生することを含む方法も本明細書において提供される。いくつかの実施形態では、ＣＡＲを操作する方法は、操作されたＮＫ細胞におけるＣＡＲの一過性発現をもたらす。いくつかの実施形態では、ＣＡＲを操作する方法は、操作されたＮＫ細胞におけるＣＡＲの安定な発現をもたらす。
【００９１】
本明細書では、ＦｃＲγ鎖の発現が欠損しており（ｇ－ＮＫ細胞）、免疫調節物質をコードする異種核酸を更に含む、操作されたナチュラルキラー（ＮＫ）細胞及びその組成物が提供される。いくつかの実施形態では、免疫調節物質は、ＮＫ細胞の活性を増加又は改善し得る任意の薬剤であり得る。いくつかの実施形態では、免疫調節物質は、ＩＬ－１５などの外因性サイトカインである。免疫調節物質をコードする核酸をｇ－ＮＫ細胞に導入し、それによって遺伝子操作されたｇ－ＮＫ細胞を産生することを含む、遺伝子操作されたｇ－ＮＫ細胞を産生する方法も本明細書において提供される。いくつかの実施形態では、免疫調節物質（例えば、ＩＬ－１５などのサイトカイン）を操作する方法は、操作されたＮＫ細胞における免疫調節物質の一過性発現をもたらす。いくつかの実施形態では、免疫調節物質（例えば、ＩＬ－１５などのサイトカイン）を操作する方法は、操作されたＮＫ細胞における免疫調節物質の安定した発現をもたらす。
【００９２】
本明細書では、組換えキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）と、免疫調節物質をコードする異種核酸とを更に含む、ＦｃＲγ鎖の発現が欠損した操作されたナチュラルキラー（ＮＫ）細胞（ｇ－ＮＫ細胞）及びその組成物が提供される。遺伝子操作されたｇ－ＮＫ細胞を産生する方法であって、（ａ）ｇ－ＮＫ細胞に、ＣＡＲをコードする核酸を導入すること、及び（ｂ）ｇ－ＮＫ細胞に、免疫調節物質をコードする核酸を導入し、それによって、遺伝

子操作されたｇ－ＮＫ細胞を産生することを含み、ＣＡＲをコードする核酸を導入すること及び免疫調節物質をコードする核酸を導入することが、同時に又は任意の順序で逐次的に行われ得る、方法も本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、ＩＬ－１５などのサイトカイン）を操作する方法は、操作されたＮＫ細胞におけるＣＡＲ及び／又は免疫調節物質の一過性発現をもたらす。いくつかの実施形態では、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、ＩＬ－１５などのサイトカイン）を操作する方法は、操作されたＮＫ細胞におけるＣＡＲ及び免疫調節物質の安定した発現をもたらす。いくつかの実施形態では、ＣＡＲ又は免疫調節物質の一方は、操作された細胞において一過性に発現され、ＣＡＲ及び免疫調節物質の他方は、安定に発現される。

【００９３】

ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞は、サイトカイン及びケモカイン分泌を介して、ならびに細胞傷害性顆粒の放出を介して、抗ウイルス及び抗がん免疫を媒介するのに重要な自然リンパ球である（Ｖｉｖｉｅｒ ｅｔ ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ ３３１（６０１３）：４４－４９ （２０１１）；Ｃａｌｉｇｉｕｒｉ，Ｂｌｏｏｄ １１２（３）：４６１－４６９ （２００８）；Ｒｏｄａ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．６６（１）：５１７－５２６（２００６））。ＮＫ細胞は、リンパ球の３番目に大きな集団を構成するエフェクター細胞であり、腫瘍及び病原体感染細胞に対する宿主免疫監視にとって重要である。しかしながら、Ｔリンパ球及びＢリンパ球とは異なり、ＮＫ細胞は、生殖系列にコードされた活性化受容体を使用し、標的認識のための限られた能力のみを有すると考えられている（Ｂｏｔｔｉｎｏ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ Ｔｏｐ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２９８：１７５－１８２ （２００６））；Ｓｔｅｗａｒｔ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ Ｔｏｐ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２９８：１－２１（２００６））。

【００９４】

ＮＫ細胞の活性化は、直接的腫瘍細胞死滅で見られるように、抗原保有細胞に結合した抗体のＦｃ部分に結合することによって標的細胞上のリガンドへのＮＫ細胞受容体の直接的結合を介して、又はＦｃ受容体（ＣＤ１６；また、ＣＤ１６ａ又はＦｃγＲＩＩＩａとしても知られている）の架橋を介して起こり得る。活性化されると、ＮＫ細胞はサイトカイン及びケモカインを豊富に産生し、同時に強力な細胞溶解活性を示す。ＮＫ細胞は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ＡＤＣＣ）を介して腫瘍細胞を死滅させることができる。いくつかの場合において、ＡＤＣＣは、ＮＫ細胞表面上の受容体（ＣＤ１６など）が、細胞の表面に結合したＩｇＧ １又はＩｇＧ３抗体を認識するときに誘発される。これは、パーフォリン及びグランザイムを含有する細胞質顆粒の放出を誘発し、標的細胞死をもたらす。ＮＫ細胞は、ＩｇＧでコーティングされた標的細胞を認識する活性化Ｆｃ受容体ＣＤ１６を発現するため、標的認識は増殖される（Ｒａｖｅｔｃｈ＆Ｂｏｌｌａｎｄ，Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９：２７５－２９０（２００１）；Ｌａｎｉｅｒ Ｎａｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．９（５）：４９５－５０２（２００８）；Ｂｒｙｃｅｓｏｎ＆Ｌｏｎｇ，Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０（３）：３４４－３５２（２００８））。ＡＤＣＣ及び抗体依存性サイトカイン／ケモカイン産生は、主にＮＫ細胞によって媒介される。

【００９５】

ＣＤ１６はまた、グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー型（ＦｃγＲＩＩＩＢ又はＣＤ１６Ｂとしても知られている）で存在する。本明細書におけるＣＤ１６への言及は、ＮＫ細胞上で発現され、抗体依存性応答（ＮＫ細胞媒介性ＡＤＣＣなど）に関与するＣＤ１６ａ型への言及に関するものであり、グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー型を指すことを意味しないことが理解される。

【００９６】

ＣＤ１６受容体は、アダプター、ＴＣＲ－ＣＤ３複合体（ＣＤ３ζ）のζ鎖及び／又はＦｃＲγ鎖と会合して、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（ＩＴＡＭ）を介してシグナルを伝達することができる。いくつかの態様において、ＣＤ１６結合（ＣＤ１６架

橋）は、ＣＤ１６結合アダプター鎖、ＦｃＲγ又はＣＤ３ζの一方又は両方を通じて産生される細胞内シグナルを介してＮＫ細胞応答を開始する。ＣＤ１６の誘発は、γ又はζ鎖のリン酸化をもたらし、これが次にチロシンキナーゼ、ｓｙｋ及びＺＡＰ－７０を動員し、シグナル伝達のカスケードを開始して、迅速かつ強力なエフェクター機能をもたらす。最もよく知られているエフェクター機能は、抗体依存性細胞傷害性のプロセスを介して近くの標的細胞を殺すための毒性タンパク質を担持する細胞質顆粒の放出である。ＣＤ１６架橋はまた、サイトカイン及びケモカインの産生をもたらし、これは次に、一連の免疫応答を活性化し、組織化する。

【００９７】

このサイトカイン及びケモカインの放出は、インビボでのＮＫ細胞の抗がん活性において役割を果たし得る。ＮＫ細胞はまた、パーフォリン及びプロテアーゼ（グランザイム）を含有する小さな顆粒を細胞質中に有する。パーフォリンは、ＮＫ細胞から放出されると、標的細胞の細胞膜に孔を形成し、この孔を通じてグランザイム及び関連分子が侵入し、アポトーシスを誘導することができる。ＮＫ細胞が標的細胞の壊死ではなくアポトーシスを誘導するという事実は、ウイルス感染細胞の有意な壊死がビリオンを放出するのに対して、アポトーシスは細胞内のウイルスの破壊をもたらすことである。

【００９８】

ｇ－ＮＫ細胞としても知られる、ＦｃＲγアダプタータンパク質を欠くＮＫ細胞の特殊化されたサブセットは、強固なＡＤＣＣ応答を媒介することができる（例えば、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３／０２９５０４４号を参照）。増加した応答についての機構は、ＦｃＲγの発現に影響を及ぼすエピジェネティック改変における変化に起因し得る。ｇ－ＮＫ細胞は、シグナル伝達アダプターζ鎖を豊富に発現するが、シグナル伝達アダプターγ鎖の発現が欠損している。従来のＮＫ細胞と比較して、これらのγ欠損ｇ－ＮＫ細胞は、抗体によって活性化された場合に劇的に増強された活性を示す。例えば、ｇ－ＮＫ細胞は、ＣＤ１６の抗体媒介性架橋によって、又は抗体被覆腫瘍細胞によって活性化され得る。いくつかの態様では、ｇ－ＮＫ細胞は、γ鎖を発現する従来のＮＫ細胞よりも多量のサイトカイン（例えば、ＩＦＮ－γ又はＴＮＦ－α）及びケモカイン（例えば、ＭＩＰ－１α、ＭＩＰ－１β、及びＲＡＮＴＥＳ）を産生し、及び／又はより高い脱顆粒応答を示す。ｇ－ＮＫ細胞は、ナチュラルキラー細胞細胞傷害性機構の成分であるグランザイムＢの高発現を提供する。更に、ｇ－ＮＫ細胞は、従来のＮＫ細胞と比較して延長された寿命を有し、それらの存在は長期間維持される。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、機能的及び表現型的に安定である。

【００９９】

いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、従来のＮＫ細胞、例えば、γ鎖が欠損していないＮＫ細胞よりも、ＡＤＣＣ応答誘発するのに有効である。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、抗体の非存在下であっても従来のＮＫ細胞よりも細胞媒介性細胞傷害を誘発するのに有効である。いくつかの場合において、ＡＤＣＣは、抗がん抗体を含む治療抗体の作用機序である。いくつかの態様では、ＮＫ細胞を投与することによる細胞療法は、治療目的及び関連する目的のために抗体と併せて使用することができる。

【０１００】

例えば、ＣＤ３８を標的とするダラツムマブ及びＳＬＡＭＦ７を標的とするエロツズマブなどの特定の治療用モノクローナル抗体は、多発性骨髄腫（ＭＭ）などの疾患治療用に米国食品医薬品局によって承認されている。治療抗体の臨床応答は有望であるが、それらはしばしば理想的ではない。例えば、特にダラツムマブについては、初期臨床応答は一般的に有望であったが、本質的に全ての患者が最終的に進行性疾患を発症する。したがって、より深い寛解を推進するか、又はこれらの薬剤に対する耐性を克服するかのいずれかのための新たな戦略が大いに必要とされている。組成物を含む提供される実施形態は、これらの必要性に対処する。

【０１０１】

本明細書では、組換えキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を更に含む、ＦｃＲγ鎖の発現が欠

損している操作されたナチュラルキラー（ＮＫ）細胞（ｇ－ＮＫ細胞）及びそれを含有する組成物が提供される。本明細書では、免疫調節物質をコードする異種核酸を更に含む、ＦｃＲγ鎖の発現が欠損している操作されたナチュラルキラー（ＮＫ）細胞（ｇ－ＮＫ細胞）及びその組成物が提供される。本明細書では、組換えキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）及び免疫調節物質をコードする異種核酸を更に含む、ＦｃＲγ鎖の発現が欠損した操作されたナチュラルキラー（ＮＫ）細胞（ｇ－ＮＫ細胞）ならびにそれを含有する組成物が提供される。ｇ－ＮＫ細胞を操作する方法が更に提供される。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞の操作によるＣＡＲ依存抗原標的化又は操作されたｇ－ＮＫ細胞は、ｇ－ＮＫ細胞サブセットの改善された親和性、細胞傷害性及び／又はサイトカイン媒介効果機能に起因して、患者に対する改善された転帰をもたらす。いくつかの実施形態では、操作されたｇ－ＮＫ細胞は、腫瘍又は他の病原体もしくは疾患抗原に対する治療用抗体と組み合わせて対象に投与される。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞の抗体指向性標的化は、ｇ－ＮＫ細胞サブセットの改善された親和性、細胞傷害性及び／又はサイトカイン媒介効果機能に起因して、患者に対する改善された転帰をもたらす。

【０１０２】

ＮＫ細胞は、通常、抗体のＦｃ部分がそれらのＦｃ受容体（ＦｃγＲＩＩＩａ又はＣＤ１６ａ）に結合し、アダプタータンパク質ＣＤ３ζ及びＦｃεＲ１γが関与するプロセスを介して活性化及び脱顆粒を誘発する場合に活性化されるが、このような方法は、所望の標的に対する抗体の別々の投与及びＮＫ細胞の抗体への曝露を含む。更に、従来のＮＫ細胞上のＦｃ受容体ＣＤ１６の結合及び架橋は、ＣＤ３ζ及びＦｃεＲ１γの両方を介したシグナル伝達に関与し、これは、ＮＫ細胞におけるシグナル伝達アダプターの発現に応じたシグナル伝達の変動性をもたらし得る。最後に、ＮＫ細胞活性の活性は、細胞傷害活性を増強するために、ＩＬ－１５などによるサイトカイン支援を必要とすることが多い。したがって、十分な支持サイトカインが存在しないと、応答の耐久性が制限され得る。上記因子の各々は、単独で及び一緒になって、特定のＮＫ細胞療法の有用性を妨げてきた。

【０１０３】

提供される方法によって産生されるような、本明細書で提供される操作されたＮＫ細胞及びそれを含有する組成物は、いくつかの点で改善された細胞療法を提供する。第１に、提供される方法によって産生されるような、提供されるｇ－ＮＫ細胞及びそれを含有する組成物は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、共刺激サイトカインなどの免疫調節物質、又はキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）及び共刺激サイトカインなどの免疫調節物質を発現するように操作される。ＣＡＲの発現は、ｇ－ＮＫ細胞が、罹患した対象又は個体における標的細胞又は組織にｇ－ＮＫ細胞を標的化するために必要とされる別個のモノクローナル抗体なしで投与されることを可能にする。更に、サイトカインなどの外因性免疫調節物質を産生及び分泌するＮＫ細胞の能力は、ＮＫ細胞が活性をブーストするための支持を組み込んでいることを意味する。最後に、提供されるＮＫ細胞組成物は、従来のＮＫ細胞又は他のサブセットについて濃縮されたＮＫ細胞と比較して多くの利点を提供するｇ－ＮＫ細胞すなわち、ＦｃεＲ１γを欠損するＮＫ細胞について濃縮されている。ｇ－ＮＫ細胞は、ＣＭＶ血清陽性個体のわずか２５～３０％において全ＮＫ細胞の約３～１０％のレベルでしか検出可能でないので、ｇ－ＮＫ細胞は比較的稀なサブセットである。提供される方法は、ｇ－ＮＫ細胞を増殖及び濃縮する能力において特に強固であり、したがって、インビボ使用に必要とされる十分な増殖を可能にする一方で、それらの増殖の前、間、又は後に、ＣＡＲ、免疫調節物質（例えば、ＩＬ－１５などのサイトカイン）、又はＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、ＩＬ－１５などのサイトカイン）による濃縮ｇ－ＮＫ細胞の操作にも適している方法に関する。いくつかの実施形態では、操作されたｇ－ＮＫ細胞は、罹患した対象又は個体における標的細胞又は組織にｇ－ＮＫ細胞を標的化するためのモノクローナル抗体と組み合わせて対象に投与される。提供される細胞及びそのような方法によって産生される組成物は、対象又は個体における適切な位置にｇ－ＮＫ細胞を標的化するそれらの能力において特に強固である。

【０１０４】

ｇ－ＮＫ細胞は、末梢血中のＮＫ細胞の割合が比較的小さいため、治療方法においてこれらの細胞を使用する能力が制限される。特に、ｇ－ＮＫ細胞は一般的に希少な集団であるため、ｇ－ＮＫ細胞を臨床で利用するためには、高い優先的増殖速度が必要である。ＮＫ細胞を増殖させるための他の方法は、１０００倍の１４日ＮＫ細胞増殖速度を達成することができるが、それらは低分化、ＮＫＧ２Ｃ^{neg}、ＦｃεＲ１γ^{pos}（ＦｃＲγ^{pos}）ＮＫ細胞を生じる（Ｆｕｊｉｓａｋｉ ｅｔ ａｌ．（２００９）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，６９：４０１０－４０１７；Ｓｈａｈ ｅｔ ａｌ．（２０１３）ＰＬｏＳ Ｏｎｅ，８：ｅ７６７８１）。更に、本明細書において、ｇ－ＮＫ細胞と表現型的に重複するＮＫ細胞を増殖させるために最適化された増殖は、治療的使用を支持する量までｇ－ＮＫ細胞を優先的に増殖させないことが見出される。特に、ｇ－ＮＫ細胞との表現型の重複を示すＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫ細胞が、ＨＬＡ－Ｅトランスフェクト２２１．ＡＥＨ細胞及び培養培地中のＩＬ－１５の包含を使用して優先的に増殖され得ることが以前に報告されている（Ｂｉｇｌｅｙ ｅｔ ａｌ．（２０１６）Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１８５：２３９－２５１）。ＨＬＡ－Ｅを構成的に発現するそのようなＨＬＡ発現細胞との培養は、ＮＫ細胞をＮＫＧ２Ｃ^{pos}／ＮＫＧ２Ａ^{neg}表現型の方向に押し出す（ＮＫＧ２ＣはＨＬＡ－Ｅの活性化受容体であり、一方、ＮＫＧ２ＡはＨＬＡ－Ｅの阻害性受容体である）。このような細胞はその中にｇ－ＮＫを含むので、このような方法はｇ－ＮＫ細胞を増殖させるのに十分であると考えられた。しかしながら、この方法は、ｇ－ＮＫ細胞の強固な増殖を達成しない。

【０１０５】

本明細書に記載される方法は、これらの制限を克服する、ｇ－ＮＫ細胞が濃縮されたＮＫ細胞組成物を産生することができる。提供される方法は、以前の方法と比較して、ＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩが欠損しているＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、例えば２２１．ＡＥＨ細胞の、ＮＫ細胞に対するより大きな比を利用する。特に、以前の方法は、１０：１のＮＫ細胞対２２１．ＡＥＨ比の比など、２２１．ＡＥＨ細胞のより低い比を使用してきた。本明細書では、２２１．ＡＥＨ細胞などのＨＬＡ－Ｅ発現フィーダー細胞の比率が大きいほど、全体的な増殖が大きくなり、ｇ－ＮＫ表現型に向かってより歪められることが見出されている。いくつかの実施形態では、ＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞のより大きな比率、例えば２２１．ＡＥＨ細胞は、フィーダー細胞を照射することによって可能である。いくつかの態様では、照射されたフィーダー細胞株の使用はまた、ＧＭＰ適合性である方法を提供するので有利である。組換えＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－１２、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２７、又はそれらの組み合わせのいずれかの包含はまた、増殖の間、強固な増殖を支持することが見出される。提供される方法の特定の実施形態において、少なくとも１つの組換えサイトカインは、ＩＬ－２である。いくつかの実施形態では、２つ以上の組換えサイトカインが存在し、少なくとも１つの組換えサイトカインはＩＬ－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインはＩＬ－２１である。

【０１０６】

本明細書において提供される方法は、ＩＬ－２１の存在下での増殖のためのＮＫ細胞の培養が、ＮＫ細胞を超荷電して、サイトカイン又はパーフォリン及びグランザイムＢなどのエフェクター分子を産生するという知見に基づく。本明細書の増殖プロセスによって産生されるＮＫ細胞を含有する組成物は、高度に機能的であり、強固な増殖を示し、それらがレスキューなしで低温凍結された後であっても良好に機能する。例えば、提供されるプロセスによって産生されたＮＫ細胞は、ＩＬ－２１の存在下で増殖させた場合、強いＡＤＣＣ活性を示すだけでなく、抗体非依存性細胞傷害活性も示す。ＮＫ細胞は、標的抗原によるＣＡＲ又は標的抗原を認識した同時投与された抗体によるＦｃ受容体ＣＤ１６の結合後にプライミングされ、エフェクター活性の準備ができているので、抗体非依存性細胞傷害活性を含む強固な活性は、細胞がＣＡＲ、免疫調節物質、又はＣＡＲ及び免疫調節物質で更に操作される、本明細書に記載される戦略に特に適している。例えば、エフェクター分子（例えば、パーフォリン及びグランザイム）は、提供される方法によって増殖したＮＫ細胞中に自発的に存在し、それによって、高い細胞傷害能を示す細胞を提供する。本明

細書に示されるように、ＩＬ－２１（例えば、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１）を含む、提供されるプロセスによって産生されるＮＫ細胞組成物は、ＩＬ－２１を添加せずにＩＬ－２のみを含むプロセスによって産生されるＮＫ細胞組成物よりも高い割合のパーフォリン又はグランザイムＢについて陽性であるＮＫ細胞を示すだけでなく、それらはまた、細胞における分子の発現のより高い平均レベル又は程度を示す。更に、ＩＬ－２１（例えば、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－１２）を含む、本明細書で提供される方法によって産生されるＮＫ細胞組成物はまた、標的細胞に応答して、脱顆粒ならびにより多くのＩＦＮ－γ及びＴＮＦ－αを発現する能力を含む、実質的なエフェクター活性を示すｇ－ＮＫ細胞組成物をもたらす。この機能的活性は、増殖したＮＫ細胞の凍結保存及び解凍後であっても高度に保存される。細胞溶解酵素の顕著な増加、ならびにより強固な活性化表現型は、腫瘍標的のアポトーシスを誘導する増殖ｇ－ＮＫ細胞の増強された能力を裏付ける。これらの活性は、標的抗原に対する抗体とのＣＤ１６架橋を介した結合の際に本明細書の実施例において例示される。これらの活性の多くは、ＣＤ１６架橋を介した抗体との結合の際に本明細書の実施例において例示されるが、シグナル伝達もまたＣＤ３ζを介して媒介されるので、同様の活性が、ＣＡＲと標的抗原との結合の際に生じる。顕著な抗体非依存性エフェクター表現型は、ＣＡＲ、免疫調節物質（例えば、サイトカイン）又は免疫調節物質（例えば、サイトカイン）を有するＣＡＲによる細胞の操作と相まって、単剤療法としてのｇ－ＮＫ細胞の潜在的有用性も支持する。

【０１０７】

更に、いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、ＦｃＲγを発現するナチュラルキラー細胞よりも有意に多い量のサイトカインを産生する。別の実施形態において、サイトカインは、インターフェロン－ガンマ（ＩＦＮ－γ）、腫瘍壊死因子－α（ＴＮＦ－α）、又はそれらの組み合わせである。一実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、有意により多くの量のケモカインを産生する。一実施形態では、ケモカインはＭＩＰ－１α、ＭＩＰ－１β又はそれらの組み合わせである。別の実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、ＣＡＲの係合、又は場合によってはＦｃ受容体ＣＤ１６を介した刺激を介して起こり得るような、ＣＤ３ζを介したシグナル伝達時にサイトカイン又はケモカインを産生する。

【０１０８】

更に、本明細書における知見はまた、ＩＬ－２１の存在下で増殖させた提供されるＮＫ細胞が、例えば、ＩＬ－２１を添加せずにＩＬ－２の存在下のみで増殖させた細胞よりも長い期間にわたって良好に持続及び増殖する能力を示す。更に、結果は、凍結保存されたｇ－ＮＫ細胞が、新鮮なｇ－ＮＫ細胞に匹敵するレベルであったことを示した。この有意に改善された持続性は、標的指向性細胞傷害性又は抗体媒介性ＡＤＣＣを増強するための既製の細胞療法としての新鮮な又は凍結保存されたｇ－ＮＫの潜在的有用性を強調する。多くのＮＫ細胞療法の臨床的有用性は、限られたＮＫ細胞持続性によって妨げられてきたので、改善された持続性のこの発見は有利である。

【０１０９】

増殖方法の前の細胞試料からのＮＫ細胞の濃縮（例えば、増殖の前のＣＤ１６細胞又はＣＤ５７細胞についての濃縮による）は、ＣＤ３枯渇のみに基づいてＮＫ細胞を最初に濃縮する方法と比較して、達成され得るｇ－ＮＫ細胞増殖の量を更に実質的に増加させることもまた見出される。別の実施形態では、増殖の前に行うことができる別の濃縮は、ＣＤ５６についての陽性選択及びＣＤ３８についての陰性選択又は枯渇によるＮＫ細胞の濃縮である。更なる実施形態では、増殖の前に実施することができる別の濃縮は、ＣＤ５６についての陽性選択と、それに続くＮＫＧ２Ａ^{neg}についての陰性選択又は枯渇及びＣＤ１６１^{neg}についての陰性選択又は枯渇によるＮＫ細胞の濃縮である。別の実施形態では、増殖の前に実施することができる別の濃縮は、ＣＤ５７についての陽性選択、それに続くＮＫＧ２Ａについての陰性選択又は枯渇、及び／又はＮＫＧ２Ｃについての陽性選択によってＮＫ細胞を濃縮することである。別の実施形態では、増殖の前に実施することができる別の濃縮は、ＣＤ５６についての陽性選択、それに続くＮＫＧ２Ａについての陰性選択又は枯渇、及び／又はＮＫＧ２Ｃについての陽性選択によってＮＫ細胞を濃縮するこ

とである。そのような実施形態のいずれかにおいて、ＮＫＧ２Ｃ^{pos}及び／又はＮＫＧ２Ａ^{neg}ＮＫ細胞の濃縮は、増殖後に実施することができる。

【０１１０】

そのような実施形態のいずれかにおいて、濃縮されたＮＫ細胞は、ＮＫ細胞を含有する細胞試料から、例えば末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）から濃縮することができる。いくつかの実施形態では、細胞試料からのＮＫ細胞の濃縮の前に、Ｔ細胞は、ＣＤ３についての陰性選択又は枯渇によって除去することができる。そのような実施形態のいずれかにおいて、濃縮されたＮＫ細胞は、比較的高い割合のｇ－ＮＫ細胞を有するＮＫ細胞（例えば、ＰＢＭＣ）を含有するヒト対象由来の、例えば、ＮＫ細胞の中で高い割合のｇ－ＮＫ細胞を有するために選択されたヒト対象由来の生体試料から濃縮することができる。そのような実施形態のいずれかにおいて、濃縮されたＮＫ細胞は、ＮＫ細胞、例えば、ＰＢＭＣを含有するヒト対象由来の生体試料から濃縮することができ、試料は、比較的高い割合のＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫ細胞（例えば、２０％もしくは約２０％もしくは２０％超のＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫ細胞）及び／又はＮＫＧ２Ａ^{neg}ＮＫ細胞（例えば、７０％もしくは約７０％もしくは７０％超のＮＫＧ２Ａ^{neg}ＮＫ細胞）を含有する。そのような実施形態のいずれかにおいて、濃縮されたＮＫ細胞は、ＮＫ細胞、例えば、ＰＢＭＣを含有するヒト対象由来の生体試料から濃縮することができ、試料は、比較的高い割合のＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫ細胞（例えば、２０％又は約２０％又はそれを超えるＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫ細胞）及びＮＫＧ２Ａ^{neg}ＮＫ細胞（例えば、７０％又は約７０％又はそれを超えるＮＫＧ２Ａ^{neg}ＮＫ細胞）を含有する。特定の実施形態では、試料が由来する対象は、ＣＭＶ血清陽性であり、そのような対象は、その末梢血中により多くの検出可能なｇ－ＮＫ細胞を有する。

【０１１１】

まとめると、ｇ－ＮＫ細胞を増殖させるための提供されるアプローチは、培養開始時の最初の１０００万個の濃縮されたＮＫ細胞から、１０億個を超える細胞、場合によっては最大８０億個以上の細胞を超えるＮＫ細胞の増殖を達成することができる。特に、提供される方法は増殖後のｇ－ＮＫ細胞の機能性が維持された、又は場合によっては増加した高収率（＞１０００倍）増殖速度をもたらし得る。いくつかの実施形態では、提供される方法は、高レベルのパーフォリン及びグランザイムＢを発現するｇ－ＮＫ細胞集団をもたらすことができる。更に、提供される方法は、解凍されたＮＫ細胞のレスキューを伴う多くの既存の方法によって一般的に達成されない、以前に凍結されたＮＫ細胞を増殖させるのに十分であることが見出される。いくつかの実施形態では、これは、増殖プロトコルの持続時間を増加させることによって達成される。いくつかの実施形態では、これは、ＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞対ＮＫ細胞の比を、例えば約１：１　２２１．ＡＥＨ対ＮＫ細胞に減少させることによって達成される。いくつかの実施形態では、これは、増殖中に、組換えＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－１２、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２７、又はそれらの組み合わせのいずれかを含めることによって達成される。特定の実施形態では、少なくとも１つの組換えサイトカインはＩＬ－２である。いくつかの実施形態では、増殖は、少なくとも１つが組換えＩＬ－２１であり、少なくとも１つが組換えＩＬ－２である、２つ以上の組換えサイトカインの存在下で行われる。

【０１１２】

本明細書に示されるように、提供される遺伝子操作されたｇ－ＮＫ細胞及びそれを含有する組成物（例えば、提供される方法によって産生されるもの）は、がん療法に使用することができる。いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞の養子移入は、重度の移植片対宿主（ＧＶＨＤ）をもたらさず、したがって、抗体指向性ＮＫ細胞療法として抗体との組み合わせを含むそのような細胞療法は、臨床使用のために「既製の」様式で与えられ得る。いくつかの態様では、ＮＫ細胞を更に操作して、ＮＫ細胞中の個々のＨＬＡ分子を低減又は排除し、それによって、提供される細胞療法の同種異系の可能性を改善することができる。

【０１１３】

特許出願、特許公開、ならびに科学文献及びデータベースを含む、本明細書に引用され

る全ての参考文献は、各個別の参考文献が参照により組み込まれるように具体的かつ個別に示される場合と同程度に、全ての目的のために、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０１１４】

開示を明確にするために、限定としてではなく、詳細な説明を以下のサブセクションに分割する。本明細書で使用されるセクションの見出しは、構成上の目的のみのためであり、記載される主題を限定するものとして解釈されるべきではない。

【０１１５】

Ｉ．定義

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての専門用語、表記法、ならびに他の技術的及び科学的用語又は専門用語は、特許請求される主題が関係する当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有することが意図される。いくつかの場合において、一般的に理解される意味を有する用語は、明確さのために、及び／又は容易な参照のために本明細書において定義され、本明細書におけるそのような定義の包含は、必ずしも、当技術分野において一般的に理解されるものに対する実質的な差異を表すと解釈されるべきではない。

【０１１６】

本明細書及び添付の「特許請求の範囲」で使用するとき、単数形の「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」、及び「その（ｔｈｅ）」は、文脈から単数であることが明確に読み取れる場合を除き、対象の複数形も含まれるものとする。したがって、例えば、「分子（ａ　ｍｏｌｅｃｕｌｅ）」への言及は、任意選択で２つ以上のこのような分子の組み合わせなどを含む。

【０１１７】

本明細書で使用される「約」という用語は、当業者に容易に知られているそれぞれの値の通常の誤差範囲を指す。本明細書における値又はパラメータの「約」への言及は、その値又はパラメータ自体を対象とする実施形態を含む（かつ、記載する）。

【０１１８】

本明細書に記載の本発明の態様及び実施形態は、態様及び実施形態「からなる」及び／又は「から本質的になる」を含むことを理解されたい。

【０１１９】

本明細書で使用される場合、「任意選択の」又は「任意選択で」は、その後に記載される事象又は状況が起こる又は起こらないこと、ならびにその記載が、前記事象又は状況が起こる場合及び起こらない場合を含むことを意味する。例えば、任意選択で置換されていてもよい基は、その基が非置換であるか、又は置換されていることを意味する。

【０１２０】

本明細書中で使用される場合、「抗体」とは、天然であるか、あるいは部分的又は完全に合成的（例えば、組換え的）に産生されたかにかかわらず、免疫グロブリン及び免疫グロブリン断片をいい、抗原結合部位を形成するのに十分であり、そしてアセンブルされた場合に抗原に特異的に結合する、免疫グロブリン分子の可変重鎖及び／又は軽鎖領域の少なくとも一部を含む、その任意の断片を含む。したがって、抗体は、免疫グロブリン抗原結合ドメイン（抗体結合部位）と相同又は実質的に相同である結合ドメインを有する任意のタンパク質を含む。典型的には、抗体は、最小限に、可変重鎖（V_H）鎖及び／又は可変軽（V_L）鎖の全て又は少なくとも一部を含む。一般に、V_H及びV_Lの対合は一緒になって抗原結合部位を形成するが、場合によっては、単一のV_H又はV_Lドメインが抗原結合に十分である。抗体はまた、定常領域の全て又は一部を含み得る。本明細書における抗体への言及は、完全長抗体及び抗原結合フラグメントを含む。本明細書では、用語「免疫グロブリン」（Ｉｇ）は、「抗体」と互換的に使用される。

【０１２１】

「完全長抗体」「無傷抗体」又は「全抗体」は、互換的に使用され、抗体フラグメントに対して実質的に完全な形の抗体を指す。完全長抗体は、典型的には、２つの完全長重鎖

（例えば、ＶＨ－ＣＨ１－ＣＨ２－ＣＨ３又はＶＨ－ＣＨ１－ＣＨ２－ＣＨ３－ＣＨ４）及び２つの完全長軽鎖（ＶＬ－ＣＬ）及びヒンジ領域を有する抗体であり、例えば、抗体分泌Ｂ細胞によって哺乳動物種（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類など）から産生される抗体及び合成的に産生される同じドメインを有する抗体である。具体的には、全抗体は、Ｆｃ領域を含む重鎖及び軽鎖を有するものを含む。定常ドメインは、天然配列定常ドメイン（例えば、ヒト天然配列定常ドメイン）又はそのアミノ酸配列変異体であってよい。いくつかの場合において、無傷抗体は、１つ以上のエフェクター機能を有してよい。

【０１２２】

「抗体フラグメント」は、無傷抗体の一部、好ましくは無傷抗体の抗原結合及び／又は可変領域を含む。抗体フラグメントとしては、Ｆａｂフラグメント、Ｆａｂ’フラグメント、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント、Ｆｖフラグメント、ジスルフィド結合Ｆｖｓ（ｄｓＦｖ）、Ｆｄフラグメント、Ｆｄ’フラグメントダイアボディ、直鎖状抗体（米国特許第５，６４１，８７０号、実施例２、Ｚａｐａｔａｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇ．８（１０）：１０５７－１０６２［１９９５］を参照）、単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）又は単鎖Ｆａｂ（ｓｃＦａｂ）を含む単鎖抗体分子、上記のいずれかの抗原結合フラグメント及び抗体フラグメント由来の多重特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書における目的のために、抗体フラグメントは、典型的には、ＮＫ細胞の表面上のＣＤ１６に係合又は架橋するのに十分なものを含む。

【０１２３】

「自己」という用語は、個体自身の組織内に由来するか又は個体自身の組織から採取された細胞又は組織を指す。例えば、ＮＫ細胞の自己移入又は移植において、ドナー及びレシピエントは同じ人である。

【０１２４】

「同種異系」という用語は、同じ種に属するか、又は同じ種から得られるが、遺伝的に異なり、したがって場合によっては免疫学的に不適合である細胞又は組織を指す。典型的には、「同種異系」という用語は、ドナーから同じ種のレシピエントに移植される細胞を定義するために使用される。

【０１２５】

細胞組成物に関して「濃縮された」という用語は、対象から直接得られた又は単離された出発組成物などの同じ体積の出発組成物中の細胞型の数又は割合と比較して、細胞型又は集団の数又は割合が増加している組成物を指す。この用語は、組成物からの他の細胞、細胞型、又は集団の完全な除去を必要とせず、そのように濃縮された細胞が、濃縮された組成物中に１００％で、又は１００％近くでさえ存在することを必要としない。

【０１２６】

用語「発現」は、ポリヌクレオチドがＤＮＡ鋳型から（例えば、ｍＲＮＡ又は他のＲＮＡ転写物に）転写されるプロセス、及び／又は転写されたｍＲＮＡが続いてペプチド、ポリペプチド又はタンパク質に翻訳されるプロセスを指す。転写物及びコードされたポリペプチドは、集合的に「遺伝子産物」と称され得る。ポリヌクレオチドがゲノムＤＮＡに由来する場合、発現は、真核細胞におけるｍＲＮＡのスプライシングを含み得る。

【０１２７】

タンパク質又は核酸に関する「異種」という用語は、細胞に形質転換又は導入されたタンパク質又は核酸を指す。いくつかの場合において、異種タンパク質又は核酸は、例えば、それが発現される細胞以外の生物又は個体に由来するため、細胞にとって外因性である。「異種」への言及は、タンパク質又は核酸が、それが導入される細胞によって天然に発現され得ることを排除しないことが理解される。異種核酸又はコードされたタンパク質は、例えば、形質導入などのウイルスベースの方法又はエレクトロポレーションもしくは脂質ナノ粒子送達などの非ウイルス送達方法を含む、核酸（例えば、異種タンパク質をコードする）を細胞に導入又は形質転換することができる様々な方法のいずれかによって、ＮＫ細胞に導入され得る。導入又は形質転換されたＮＫ細胞は、外因性又は異種核酸を染色

体外に保有し得るか、又は染色体に組み込まれ得る。細胞ゲノム及び自己複製ベクターへの組み込みは、一般に、形質転換された核酸分子の遺伝的に安定な遺伝をもたらす。形質転換された核酸を含有するＮＫ細胞は、「遺伝子操作された」と称されるが、互換的に「組換え」又は「形質転換された」とも称され得る。

【０１２８】

本明細書中で使用される場合、用語「導入すること」は、インビトロ又はインビボのいずれかで細胞にＤＮＡを導入する種々の方法を包含し、このような方法としては、形質転換、形質導入、トランスフェクション（例えば、エレクトロポレーション）、脂質送達及び感染が挙げられる。ベクターは、分子をコードするＤＮＡを細胞に導入するのに有用である。可能なベクターとしては、プラスミドベクター及びウイルスベクターが挙げられる。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、又はアデノウイルスベクターもしくはアデノ随伴ベクターなどの他のベクターが挙げられる。脂質ナノ粒子はまた、核酸（ＤＮＡ又はｍＲＮＡのいずれか）を細胞に導入するために使用され得る。

【０１２９】

「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド配列」、「核酸」、「核酸分子」、「核酸配列」、及び「オリゴヌクレオチド」という用語は、ＤＮＡ及びＲＮＡ中の一連のヌクレオチド塩基（「ヌクレオチド」とも呼ばれる）を指し、２つ以上のヌクレオチドの任意の鎖を意味する。ポリヌクレオチド、ヌクレオチド配列、核酸などは、一本鎖又は二本鎖のキメラ混合物又はそれらの誘導体もしくは改変バージョンであり得る。例えば、分子の安定性やハイブリダイゼーションパラメータなどを改善するために、塩基部分、糖部分、又はリン酸骨格を改変することができる。ヌクレオチド配列は通常、タンパク質や酵素を作るために細胞機構によって使用される情報を含むがこれに限定されない遺伝情報を担っている。これらの用語は、二本鎖又は一本鎖ゲノムＤＮＡ、ＲＮＡ、任意の合成及び遺伝子操作されたポリヌクレオチド、ならびにセンス及びアンチセンスポリヌクレオチドの両方を含む。これらの用語は、改変塩基を含有する核酸も含む。

【０１３０】

「タンパク質」、「ペプチド」及び「ポリペプチド」という用語は、ペプチド結合を介して互いに連結されたアミノ酸の連続鎖を指すために互換的に使用される。この用語は、個々のタンパク質、一緒に会合するタンパク質の群又は複合体、ならびにこのようなタンパク質の断片又は部分、改変体、誘導体及びアナログを含む。ペプチド配列は、本明細書において、従来の表記法を使用して、左側のアミノ又はＮ末端から始まり、右側のカルボキシル又はＣ末端に進むように示される。標準的な１文字又は３文字略語を使用することができる。

【０１３１】

核酸（例えば、遺伝子、タンパク質をコードするゲノム領域、プロモータ）の文脈において本明細書で使用される「内因性」という用語は、その天然の位置、例えば、細胞のゲノム内にある天然の核酸又はタンパク質を指す。対照的に、核酸、例えば、発現構築物、ｃＤＮＡ、インデル、及び核酸ベクターの文脈において本明細書で使用される「外因性」という用語は、例えば、異種核酸の形質転換又は遺伝子編集、例えば、ＣＲＩＳＰＲベースの編集技術などの遺伝子操作技術を使用して、細胞のゲノムに人工的に導入された核酸を指す。

【０１３２】

「組成物」という用語は、細胞又は抗体を含む、２つ以上の産物、物質、又は化合物の任意の混合物を指す。それは、溶液、懸濁液、液体、粉末、ペースト、水性、非水性又はそれらの任意の組み合わせであってもよい。調製物は、一般に、活性成分（例えば、抗体）の生物学的活性が有効であることを可能にするような形態である。

【０１３３】

「薬学的に許容される担体」は、対象に対して非毒性である、有効成分以外の医薬製剤中の成分を指す。薬学的に許容される担体としては、緩衝剤、賦形剤、安定剤、又は保存

剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１３４】

本明細書で使用される場合、組み合わせは、２つ以上の項目間の任意の関連付けを指す。組み合わせは、２つ以上の別個の品目（例えば、２つの組成物又は２つの収集物）であり得るか、それらの混合物（例えば、２つ以上の品目の単一混合物）であり得るか、又はそれらの任意の変異であり得る。組み合わせの要素は、一般に、機能的に関連付けられるか、又は関係付けられる。

【０１３５】

本明細書で使用される場合、キットは、治療用途を含むがこれに限定されない目的のために、追加の薬剤などの他の要素、及び組み合わせ又はその要素の使用のための説明書を任意選択で含むパッケージ化された組み合わせである。

【０１３６】

本明細書で使用するとき、用語「治療」または「治療すること」は、臨床病理的過程で治療される個体又は細胞の自然経過を変更するように設計された臨床的介入を指す。治療の望ましい効果として、疾患進行率の低下、疾患状態の寛解又は緩和、及び寛解又は予後の改善が挙げられる。個体は、例えば、障害（例えば、好酸球媒介性疾患）に関連する１つ以上の症状が軽減又は排除される場合、首尾よく「処置」される。例えば、個体は、処置が、疾患に罹患している個体の生活の質の増加、疾患を処置するために必要とされる他の薬物の用量の減少、疾患の再発の頻度の減少、疾患の重症度の軽減、疾患の発症もしくは進行の遅延、及び／又は個体の生存の延長を生じる場合、首尾良く「処置」される。

【０１３７】

「有効量」とは、治療的又は予防的結果を含む所望の又は示された効果を達成するために必要な用量及び期間で少なくとも有効な量を指す。有効量は、１回以上の投与で投与され得る。「治療有効量」は、特定の障害の測定可能な改善をもたらすのに必要とされる細胞の少なくとも最小用量である。いくつかの実施形態では、治療有効量は、動物におけるがん、ウイルス感染、微生物感染、又は敗血症性ショックに関連する重症度、持続期間及び／又は症状を低減する組成物の量である。本明細書における治療有効量は、患者の疾患状態、年齢、性別、及び体重などの要因に応じて変動し得る。有効量はまた、治療の有益な影響が治療の毒性、つまり有害な影響を上回る量であり得る。「予防有効量」とは、所望の予防結果を達成するために必要な用量及び期間で有効な量を指す。典型的には、必ずしもそうではないが、予防的用量は、疾患の前又は疾患の初期段階で対象に使用されるので、予防的有効量は、治療的有効量未満であり得る。

【０１３８】

本明細書で使用される場合、「個体」又は「対象」は、哺乳動物である。処置の目的のための「哺乳動物」としては、ヒト、家畜及び農場動物、ならびに動物園、スポーツ、又はペット動物、例えばイヌ、ウマ、ウサギ、ウシ、ブタ、ハムスター、アレチネズミ、マウス、フェレット、ラット、ネコなどなどが挙げられる。いくつかの実施形態では、個体又は対象はヒトである。

【０１３９】

ＩＩ．操作されたＦｃ受容体ガンマ欠損ナチュラルキラー細胞（ｇ－ＮＫ細胞）

本明細書では、抗原受容体などの異種因子を発現する、ＦｃＲγの発現が欠損した操作されたナチュラルキラー（ＮＫ）細胞（ｇ－ＮＫ細胞）が提供され、例えば、ｇ－ＮＫ細胞に導入されたキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）である。

【０１４０】

本明細書では、サイトカインなどの免疫調節物質を含む、ｇ－ＮＫ細胞に導入された異種薬剤を発現する、ＦｃＲγの発現が欠損している操作されたナチュラルキラー（ＮＫ）細胞（ｇ－ＮＫ細胞）が提供される。

【０１４１】

本明細書では、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）などの抗原受容体、及びサイトカインなどの免疫調節物質を含む、ｇ－ＮＫ細胞に導入された異種薬剤を発現する、ＦｃＲγの発現

が欠損した操作されたナチュラルキラー（ＮＫ）細胞（ｇ－ＮＫ細胞）が提供される。

【０１４２】

いくつかの実施形態では、操作されたＮＫ細胞は、ＦｃＲγの発現が欠損しているｇ－ＮＫ細胞である。いくつかの形態では、ＮＫ細胞のｇ－ＮＫ細胞サブセットは、ＦｃＲγがＮＫ細胞又はＮＫ細胞の集団によって発現されるかどうかを観察することによって検出することができ、ＦｃＲγが存在しない場合、細胞はｇ－ＮＫである。ＦｃＲγタンパク質は細胞内タンパク質である。したがって、いくつかの態様において、ＦｃＲγの存在又は非存在は、例えば、細胞内タンパク質が検出されることを可能にするための固定及び透過処理によって、細胞の処理後に検出され得る。

【０１４３】

いくつかの場合において、ｇ－ＮＫ細胞はまた、ｇ－ＮＫ細胞の代用マーカーである表面マーカーによって同定され得る。以下に更に記載されるように、細胞表面マーカーの特定の組み合わせが、ｇ－ＮＫ細胞表現型（すなわち、ＦｃＲγの細胞内発現を欠くか又は欠損している細胞）と相関し、それによって、細胞を損傷しない様式でｇ－ＮＫ細胞を同定又は検出するための代用マーカープロフィールを提供することもまた見出される。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるｇ－ＮＫ細胞についての代替マーカープロファイルは、１つ以上のマーカーＣＤ１６　（ＣＤ１６^{pos}）、ＮＫＧ２Ｃ（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）もしくはＣＤ５７（ＣＤ５７ｐｏｓ）の陽性表面発現に基づき、ならびに／又は１つ以上のマーカーＣＤ７（ＣＤ７$^{dim/neg}$）、ＣＤ１６１（ＣＤ１６１^{neg}）及び／もしくはＮＫＧ２Ａ（ＮＫＧ２Ａ^{neg}）の低もしくは陰性表面発現に基づく。いくつかの実施形態では、細胞は、ＣＤ４５、ＣＤ３及び／又はＣＤ５６などのＮＫ細胞の１つ以上の表面マーカーについて更に評価される。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、代用マーカープロファイルＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}／ＣＤ１６^{pos}／ＣＤ５７^{pos}／ＣＤ７$^{dim/neg}$／ＣＤ１６１^{neg}を用いて同定、検出、濃縮及び／又は単離することができる。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、代用マーカープロファイルＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}／ＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}を用いて同定、検出、濃縮、及び／又は単離される。いくつかの実施形態では、ＮＫＧ２Ｃ^{pos}及び／又はＮＫＧ２Ａ^{neg}であるｇ－ＮＫ細胞は、同定され、検出され、濃縮され、及び／又は単離される。

【０１４４】

いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、ＣＤ１６^{pos}／ＣＤ５７^{pos}／ＣＤ７$^{dim/neg}$／ＣＤ１６１^{neg}である表面表現型を有する。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、ＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である表面表現型を更に有する。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、ＣＤ３８^{neg}である表面表現型を更に有する。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、更にＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}である表面表現型を有する。

【０１４５】

いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、ＣＡＲを発現するように操作される。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、免疫調節物質（例えば、外因性サイトカイン）を発現するように操作される。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、外因性サイトカイン）を発現するように操作される。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、抗原認識領域、膜貫通ドメイン、及びエンドドメインを含むエクトドメインを一般に含む融合タンパク質である。外部ドメイン（すなわち、抗原認識領域又は抗原結合ドメイン）及び膜貫通ドメインは、可撓性リンカーによって連結され得る。エンドドメインは、外部細胞刺激を細胞内に伝播する細胞内シグナル伝達ドメインを含み得る。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、１）標的リガンド結合ドメインと、２）可撓性リンカーと、３）膜貫通領域と、４）細胞内シグナル伝達ドメインとを含む。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、標的抗原に結合し、抗原結合時に細胞傷害性を誘導する。いくつかの実施形態では、免疫調節物質は、ＮＫ細胞の免疫機能を調節することができる薬剤である。いくつかの実施形態では、免疫調節物質は、免疫活性化物質であり得る。他の実

施形態では、免疫調節物質は免疫抑制物質であり得る。いくつかの実施形態では、免疫調節物質は、インターロイキン又はその機能的部分などの外因性サイトカインである。ＣＡＲ及び免疫調節物質の例示的な特徴は、以下のサブセクションにおいて更に記載される。

【０１４６】

いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、セクションＩＩＩに記載されるような遺伝子編集によって更に操作され得る。

【０１４７】

Ａ．抗原受容体、例えばキメラ抗原受容体

提供される実施形態において、ｇ－ＮＫ細胞は、目的の抗原に結合する抗原受容体を発現するように遺伝子操作される。特定の実施形態では、抗原受容体は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）である。特定の実施形態では、抗原受容体は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）である。抗原受容体は、例えば、腫瘍特異的もしくは腫瘍関連抗原又は病原体抗原に結合することができる。したがって、操作された抗原受容体、例えば、ＣＡＲは、特定の抗原特異性をＮＫ細胞に導入することが意図される組換え抗原受容体である。いくつかの実施形態では、ＣＡＲなどの抗原受容体は、ｇ－ＮＫ細胞に安定に組み込まれる。他の実施形態において、抗原受容体、例えば、ＣＡＲは、ｇ－ＮＫ細胞によって一過性に発現される。例えば、ｇ－ＮＫ細胞は、一過性に又はゲノムに組み込まれて免疫エフェクター細胞に導入された外因性ポリヌクレオチドから発現される定義されたポリペプチド配列を有するＣＡＲを含む。提供される実施形態では、抗原受容体（例えば、ＣＡＲ）を含む本明細書で提供される操作されたＮＫ細胞を免疫療法に使用して、抗原受容体（例えば、ＣＡＲ）によって認識される標的抗原を発現する疾患又は障害に関連する細胞、例えば、がん細胞を標的とし、破壊することができる。

【０１４８】

いくつかの実施形態では、抗原受容体はキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）である。ＣＡＲは、典型的には、リーダー配列、細胞外標的化ドメイン（エクトドメインとも呼ばれ、ｓｃＦｖなどの抗原結合ドメイン等）、膜貫通ドメイン、及び１つ又は複数の細胞内シグナル伝達ドメインを含む核酸配列（ポリヌクレオチド）によってコードされる。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、抗原認識ドメイン又は抗原結合、膜貫通ドメイン、及び細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞外標的化ドメイン（エクトドメイン）を含む融合タンパク質である。外部ドメイン及び膜貫通ドメインは、可撓性リンカー（スペーサーとも呼ばれる）によって連結され得る。いくつかの実施形態では、モノクローナル抗体由来の一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）などの抗原結合ドメインは、標的抗原を認識する。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメイン、例えばｓｃＦｖは、スペーサーを介して膜貫通ドメインに連結又は融合されている。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫受容体チロシン活性化モチーフ（ＩＴＡＭ）を含む。ＣＡＲ融合タンパク質の活性化は、その標的のｓｃＦｖ（又は他の抗原結合ドメイン）による認識に応答して細胞活性化をもたらす。細胞がそのようなＣＡＲを発現する場合、それは、標的抗原を発現する標的細胞を認識し、死滅させることができる。この特性により、ＣＡＲ発現細胞は、がん細胞を含むがこれに限定されない異常細胞への細胞活性の特異的標的化のための特に魅力的な薬剤となる。様々なＣＡＲが、Ｔリンパ球及びナチュラルキラー（ＮＫ）細胞を含む様々な免疫細胞における発現のために、腫瘍関連抗原を含む標的抗原に対して開発され、抗原を発現する標的細胞に対する細胞傷害活性を媒介しており、本明細書に開示される操作されたｇ－ＮＫ細胞であり得る。

【０１４９】

いくつかの実施形態では、リーダー配列は、本明細書に記載されるシグナルペプチド配列のいずれかであり得る。例示的なＣＤ８αシグナルペプチドは、配列番号１２に示される。例示的なＧＭ－ＣＳＦＲａシグナルペプチドを配列番号１３に記載する。例示的なＩｇＫシグナルペプチドは、配列番号１４に示される。例示的なＩｇＫシグナルペプチドは、配列番号４３に示される。

【０１５０】

国際ＰＣＴ出願ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０２４６５０、ＰＣＴ／ＩＢ２０１９／０００１４１、ＰＣＴ／ＩＢ２０１９／０００１８１、及び／又はＰＣＴ／ＵＳ２０２０／０２０８２４、ＰＣＴ／ＵＳ２０２０、０３５７５２に記載されているものを含む、任意の様々なキメラ抗原受容体を、操作されたＮＫ細胞において発現させることができる。

【０１５１】

いくつかの実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、抗原に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、細胞外抗原結合ドメイン又は標的化ドメインは、抗体分子に由来し、ＣＡＲに抗原特異性を付与する抗体分子由来の１以上の相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む。特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）である。いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖはヒトｓｃＦｖである。特定の実施形態において、ｓｃＦｖはヒト化ｓｃＦｖである。特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、任意選択で架橋されているＦａｂである。特定の実施形態において、細胞外結合ドメインは、Ｆ（ａｂ’）$_2$である。特定の実施形態において、前述の分子のいずれかは、細胞外抗原結合ドメインを形成するために、異種配列との融合タンパク質に含まれていてもよい。特定の実施形態において、ｓｃＦｖは、抗原－Ｆｃ融合タンパク質を用いてｓｃＦｖファージライブラリーをスクリーニングすることによって同定される。

【０１５２】

いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖは、可撓性リンカーポリペプチドによって隔てられた免疫グロブリン軽鎖及び免疫グロブリン重鎖分子の可変鎖部分を含む。重鎖及び軽鎖の順序は限定されず、逆であってもよい。可撓性ポリペプチドリンカーは、重鎖及び軽鎖が互いに会合し、免疫グロブリン抗原結合ドメインを再構成することを可能にする。いくつかの実施形態では、可撓性リンカーは、配列番号５６に示されるようなＧＳリンカーである。いくつかの実施形態では、可撓性リンカーは、配列番号５５に記載されるようなＷｈｉｔｌｏｗリンカーである。適切には、軽鎖可変領域は、３つのＣＤＲを含み、重鎖可変領域は、３つのＣＤＲを含む。好適には、抗原結合標的化ドメインにおいて使用するためのＣＤＲは、任意の種（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ）の抗体分子に由来し、ＣＤＲ間のフレームワーク領域はヒト化されているか、又はヒトフレームワーク領域と少なくとも８５％、９０％、９５もしくは９９％同一である配列を含む。

【０１５３】

ＣＡＲの標的化ドメインがｓｃＦｖを含む場合、免疫グロブリン軽鎖及び免疫グロブリン重鎖は、様々な長さのポリペプチドリンカーによって連結される。適切には、ポリペプチドリンカーは、１０アミノ酸以上の長さを含む。適切には、ポリペプチドリンカーは、１０、１５、２０、又は２５アミノ酸を超える長さを含む。適切には、ポリペプチドリンカーは、３０アミノ酸以下の長さを含む。適切には、ポリペプチドリンカーは、１５、２０、２５、又は３０アミノ酸未満の長さを含む。適切には、ポリペプチドリンカーは、１０～３０アミノ酸長を含む。適切には、ポリペプチドリンカーは、１０～２５アミノ酸長を含む。適切には、ポリペプチドリンカーは、１０～２０アミノ酸長を含む。適切には、ポリペプチドリンカーは、１０～１５アミノ酸長を含む。適切には、ポリペプチドリンカーは、１５～３０アミノ酸長を含む。適切には、ポリペプチドリンカーは、２０～３０アミノ酸長を含む。適切には、ポリペプチドリンカーは、２５～３０アミノ酸長を含む。適切には、ポリペプチドリンカーは親水性アミノ酸を含む。適切には、ポリペプチドリンカーは親水性アミノ酸からなる。適切には、ポリペプチドリンカーはG_4S配列（ＧＧＧＧＳ）を含む。G_4Sリンカーは、リンカーの可撓性及びプロテアーゼ耐性を可能にする。適切には、G_4Sリンカーは、ポリペプチドリンカーにおいて１、２、３、４、５、６、７、又は８回連続して反復される。

【０１５４】

いくつかの実施形態では、抗原は、腫瘍抗原である。特定の実施形態では、抗原は、例えば、ウイルス抗原又は細菌抗原を含む病原体抗原である。

【０１５５】

抗原標的化ＣＡＲの細胞外抗原結合ドメイン（例えば、ｓｃＦｖ又はその類似体）の結

合は、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、ＦＡＣＳ分析、バイオアッセイ（例えば、増殖阻害）、又はウェスタンブロットアッセイによって確認することができる。これらのアッセイの各々は、一般に、目的の複合体に特異的な標識試薬（例えば、抗体又はｓｃＦｖ）を使用することによって、特定の目的のタンパク質抗体複合体の存在を検出する。例えば、ｓｃＦｖは、放射性標識され得、そしてラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）において使用され得る（例えば、Ｗｅｉｎｔｒａｕｂ，Ｂ．，Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｒａｄｉｏｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙｓ，Ｓｅｖｅｎｔｈ Ｔｒａｉｎｉｎｇ Ｃｏｕｒｓｅ ｏｎ Ｒａｄｉｏｌｉｇａｎｄ Ａｓｓａｙ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，Ｔｈｅ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｅ Ｓｏｃｉｅｔｙ，Ｍａｒｃｈ １９８６ （この内容は、参照により本明細書に組み込まれる）を参照）。放射性同位体は、ガンマカウンターもしくはシンチレーションカウンターの使用などの手段によって、又はオートラジオグラフィーによって検出することができる。特定の実施形態では、ＣＡＲの細胞外抗原結合ドメインは、蛍光マーカーで標識される。蛍光マーカーの非限定的な例としては、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、青色蛍光タンパク（例えば、ＥＢＦＰ、ＥＢＦＰ２、藍銅鉱、及びｍＫａｌａｍａｌ）、シアン蛍光タンパク（例えば、ＥＣＦＰ、セルリアン、及びＣｙＰｅｔ）、及び黄色蛍光タンパク（例えば、ＹＦＰ、シトリン、ビーナス、及びＹＰｅｔ）が挙げられる。

【０１５６】

特定の実施形態において、抗原認識受容体は、腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原に結合する。任意の適切な腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原（例えば、抗原性ペプチド）が、本明細書に記載される実施形態において使用され得る。抗原は、タンパク質、非タンパク質、ネオ抗原、翻訳後改変抗原、ペプチドＭＨＣ抗原、及び／又は過剰発現抗原であり得るが、これらに限定されない。

【０１５７】

例えば、腫瘍標的としては、ＣＤ３８（多発性骨髄腫）、ＣＤ２０（リンパ腫）、上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ；非小細胞肺がん、上皮がん、及び神経膠腫）、上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲｖＩＩＩ；神経膠芽腫）のバリアントＩＩＩ、ヒト上皮成長因子受容体２（ＨＥＲ２；卵巣がん、乳がん、膠芽腫、結腸がん、骨肉腫、及び髄芽腫）、メソテリン（中皮腫、卵巣がん、及び膵臓腺がん）、前立腺特異的膜抗原（ＰＳＭＡ；前立腺がん）、がん胎児性抗原（ＣＥＡ；膵臓腺がん、乳がん、及び結腸直腸がん）、ジシアロガングリオシド ２（ＧＤ２；神経芽細胞腫及び黒色腫）、インターロイキン－１３ Ｒα２（神経膠腫）、グリピカン－３（肝細胞がん）、炭酸脱水酵素ＩＸ（ＣＡＩＸ；腎細胞がん）、Ｌ１細胞接着分子（Ｌ１－ＣＡＭ；神経芽細胞腫、黒色腫及び卵巣腺がん）、がん抗原１２５（ＣＡ １２５；上皮性卵巣がん）、ＣＤ１３３（膠芽腫及び胆管がん）、線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ；悪性胸膜中皮腫）、がん／精巣抗原１Ｂ（ＣＴＡＧ１Ｂ；黒色腫及び卵巣がん）、ムチン１（精嚢がん）、葉酸受容体－ａ（ＦＲ－ａ；卵巣がん）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１５８】

腫瘍抗原の更なる非限定的な例としては、限定されないが、腫瘍抗原の非限定的な例としては、カルボニックアンヒドラーゼＩＸ（ＣＡＩＸ）、がん胎児性抗原（ＣＥＡ）、ＣＤ８、ＣＤ７、ＣＤ１０、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ３０、ＣＤ３３、ＣＬＬ１、ＣＤ３４、ＣＤ３８、ＣＤ４１、ＣＤ４４、ＣＤ４９ｃ、ＣＤ４９ｆ、ＣＤ５６、ＣＤ６６ｃ、ＣＤ７３、ＣＤ７４、ＣＤ１０４、ＣＤ１３３、ＣＤ１３８、ＣＤ１２３、ＣＤ１４２、ＣＤ４４Ｖ６、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）感染細胞の抗原（例えば、細胞表面抗原）、皮膚リンパ球関連抗原（ＣＬＡ；Ｐ－セレクチングリコプロテインリガンド－１（ＰＳＧＬ－１））、上皮グリコプロテイン－２（ＥＧＰ－２）、上皮グリコプロテイン－４０（ＥＧＰ－４０）、上皮細胞接着因子（ＥｐＣＡＭ）、受容体チロシン－プロテインキナーゼｅｒｂ－Ｂ２，３，４（ｅｒｂ－Ｂ２，３，４）、葉酸結合プロテイン（ＥＢＰ）、胎児アセチルコリン受容体（ＡＣｈＲ）、葉酸受容体α、ガングリオシドＧ２（ＧＤ２）、ガングリオシドＧ３（ＧＤ３）、ヒト上皮増殖因子受容体２（ＨＥＲ２）

、ヒトテロメラーゼリバーストランスクリプターゼ（ｈＴＥＲＴ）、インターロイキン－１３受容体サブユニットα－２（ＩＬ－１３　Ｒα２）、κ－軽鎖、キナーゼ挿入ドメイン受容体（ＫＤＲ）、ルイスＹ（ＬｅＹ）、ＬＩ細胞接着分子（Ｌ１ＣＡＭ）、黒色腫抗原ファミリーＡ、１（ＭＡＧＥ－Ａ１）、ムチン１６（ＭＵＣ１６）、ムチン１（ＭＵＣ１）、メソテリン（ＭＳＬＮ）、ＥＲＢＢ２、ＭＡＧＥ　Ａ３、ｐ５３、マルティ、ＧＰ１００、プロテイナーゼ３（ＰＲ１）、チロシナーゼ、サバイビン、ｈＴＥＲＴ、ＥｐｈＡ２、ＮＫＧ２Ｄリガンド、がん－睾丸抗原ＮＹ－ＥＳＯ－１、がん胎児抗原（ｈ５Ｔ４）、前立腺がん細胞抗原（ＰＳＣＡ）、前立腺がん特異的膜抗原（ＰＳＭＡ）、ＲＯＲ１、テトラスパニン８（ＴＳＰＡＮ８）、腫瘍関連グリコプロテイン７２（ＴＡＧ－７２）、血管内皮増殖因子Ｒ２（ＶＥＧＦ－Ｒ２）、ウイルムス腫瘍タンパク（ＷＴ－１）、サイトカイン受容体様因子２（ＣＲＬＦ２）、ＢＣＭＡ、ＧＰＣ３、ＮＫＣＳ１、ＥＧＦＲ、ＥＧＦＲ－ＶＩＩＩ、及びＥＲＢＢの特殊なグリコフォーム）が含まれる。

【０１５９】

いくつかの実施形態では、腫瘍抗原は、ＣＤ１９、ＲＯＲ１、Ｈｅｒ２、ＰＳＭＡ、ＰＳＣＡ、メソテリン（ＭＳＬＮ）、又はＣＤ２０である。いくつかの実施形態では、腫瘍抗原は、白血病又はリンパ腫上で発現されるＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ３３、ＭＳＬＮ、又はサイトカイン受容体様因子２（ＣＲＬＦ２）である。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、Ｈｅｒ２、ＥＧＦＲ、アルファ葉酸受容体、ＣＥＡ、ｃＭｅｔ、ＭＵＣ２、メソテリン、又はＲＯＲ１から選択される標的抗原に結合する。特定の実施形態では、標的抗原は、ＣＤ３８、ＣＤ３１９／ＳＬＡＭＦ－７、ＴＮＦＲＳＦ　１７／ＢＣＭＡ、ＳＹＮＤ１／ＣＤ１３８、ＣＤ２２９、ＣＤ４７、Ｈｅｒ２／Ｎｅｕ、上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）、ＣＤ１２３／ＩＬ３－ＲＡ、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、メソテリン、ＥｐＣＡＭ、ＭＵＣ１、ＭＵＣ　１６、Ｔｎ抗原、ＮＥＵ５ＧＣ、ＮｅｕＧｃＧＭ３、ＧＤ２、ＣＬＬ－１、又はＨＥＲＶ－Ｋである。いくつかの実施形態では、標的抗原は血液がん関連抗原である。例えば、標的抗原は、ＣＤ３８、ＣＤ３１９／ＳＬＡＭＦ－７、ＴＮＦＲＳＦ　１７／ＢＣＭＡ、ＳＹＮＤ１／ＣＤ１３８、ＣＤ２２９、ＣＤ４７、ＣＤ１２３／ＩＬ３－ＲＡ、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、又はＣＬＬ－１であり得る。

【０１６０】

ＣＡＲに組み込むための様々な抗原結合ドメインが知られている。１つの非限定的な例において、ｇ－ＮＫ細胞は、ＣＤ３８特異的ＣＡＲで操作される（例えば、国際公開第２０１８／１０４５６２号を参照）。

【０１６１】

いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、二重特異性ＣＡＲ又は複数の異なるＣＡＲを用いて操作され、それらの親和性は、２つの異なるリガンド／抗原に対するものである。二重特異性ＣＡＲ－ＮＫは、がん細胞上の潜在的結合部位の数を増加させるために、あるいは、ＮＫ－ＣＡＲに特異的なリガンドを発現する他の免疫エフェクター細胞にがん細胞を局在化させるために使用することができる。がん治療における使用のために、二重特異性ＣＡＲは、標的腫瘍細胞及びエフェクター細胞、例えば、Ｔ細胞、ＮＫ細胞又はマクロファージに結合し得る。したがって、例えば、多発性骨髄腫の場合、二重特異性ＣＡＲは、Ｔ細胞抗原（例えば、ＣＤ３など）及び腫瘍細胞マーカー（例えば、ＣＤ３８など）に結合し得る。あるいは、二重特異性ＣＡＲは、２つの別個の腫瘍細胞マーカーに結合して、標的腫瘍細胞に対するＮＫ細胞の全体的な結合親和性を増加させ得る。これは、標的抗原の１つをダウンレギュレートすることによって、がん細胞が耐性を発達させるリスクを減少させ得る。多発性骨髄腫におけるこの場合の例は、ＣＤ３８及びＣＳ－１／ＳＬＡＭＦ７の両方に結合するＣＡＲであろう。ＣＡＲによって適切に標的化される別の腫瘍細胞マーカーは、腫瘍上の「ｄｏｎ’ｔ　ｅａｔ　ｍｅ」型マーカーであり、ＣＤ４７によって例示される。

【０１６２】

いくつかの実施形態では、操作されたｇ－ＮＫ細胞は、同じＮＫ細胞によって発現される二重特異性ＣＡＲ又は複数のＣＡＲを含み得る。これは、ＮＫ細胞が２つの異なる抗原

を同時に標的化することを可能にする。好適には、二重特異性ＣＡＲは、以下の抗原：ＣＤ３８、ＣＤ３１９／ＳＬＡＭＦ－７、ＴＮＦＲＳＦ　１７／ＢＣＭＡ、ＣＤ１２３／ＩＬ３－ＲＡ、ＳＹＮＤ１／ＣＤ１３８、ＣＤ２２９、ＣＤ４７、Ｈｅｒ２／Ｎｅｕ、上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、メソテリン、ＥｐＣＡＭ、ＭＵＣ１、ＭＵＣ１６、Ｔｎ抗原、ＮＥＵ５ＧＣ、ＮｅｕＧｃＧＭ３、ＧＤ２、ＣＬＬ－１、ＣＤ１２３、ＨＥＲＶ－Ｋのうちのいずれか２つに対する特異性を有する。好適には、ＣＡＲ　ＮＫ細胞の二重特異性の性質は、腫瘍抗原及び別の免疫細胞、例えばＴ細胞又は樹状細胞への結合を可能にし得る。好適には、ＣＡＲ　ＮＫ細胞の二重特異性の性質は、ＰＤＬ－１又はＣＤ４７などのチェックポイント阻害剤への結合を可能にし得る。好適には、第１のＣＡＲはＣＤ３８特異性を有し、第２のＣＡＲは、ＳＬＡＭＦ－７、ＢＣＭＡ、ＣＤ１３８、ＣＤ２２９、ＰＤＬ－１、又はＣＤ４７のいずれか１つに対する特異性を有する。好適には、第１のＣＡＲは、ＣＤ３８に対する特異性を有し、第２のＣＡＲは、ＳＬＡＭＦ－７、ＢＣＭＡ、ＣＤ１３８、ＣＤ２２９に対する特異性を有する。好適には、第１のＣＡＲはＣＤ３８に対する特異性を有し、第２のＣＡＲはＳＬＡＭＦ－７に対する特異性を有する。好適には、第１のＣＡＲはＣＤ３８に対する特異性を有し、第２のＣＡＲはＢＣＭＡに対する特異性を有する。好適には、第１のＣＡＲは、ＣＤ３８に対する特異性を有し、第２のＣＡＲは、ＣＤ１３８に対する特異性を有する。好適には、第１のＣＡＲはＣＤ３８に対する特異性を有し、第２のＣＡＲはＣＤ２２９に対する特異性を有する。

【０１６３】

いくつかの実施形態では、ＣＡＲの膜貫通ドメインは、疎水性アミノ酸残基を含み、ＣＡＲが操作されたＮＫ細胞の細胞膜に固定されることを可能にする。好適には、膜貫通ドメインは、膜貫通タンパク質に由来するアミノ酸配列を含む。適切には、膜貫通ドメインは、Ｔ細胞受容体のアルファ、ベータ、又はゼータ鎖、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ３イプシロン、ＣＤ４５、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ８、ＣＤ９、ＣＤ１６、ＣＤ２２、ＣＤ３３、ＣＤ３７、ＣＤ６４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ１３４、ＣＤ１３７、及びＣＤ１５４の膜貫通ドメインに由来するアミノ酸配列を含む。好適には、ＣＡＲは、ＣＤ８の膜貫通ドメインに由来するアミノ酸配列を有する膜貫通を含む。好適には、ＣＡＲは、ヒトＣＤ８αの膜貫通ドメインに由来するアミノ酸配列を有する膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、配列番号６１に記載のアミノ酸の配列又は配列番号６１に対して少なくとも８５％、９０％又は９５％配列同一性を示すアミノ酸の配列を有するＣＤ８αの膜貫通ドメインを含有する。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは配列番号６１に示されている。いくつかの実施形態では、好適には、ＣＡＲは、ＣＤ２８の膜貫通ドメインに由来するアミノ酸配列を有する膜貫通を含む。好適には、ＣＡＲは、ヒトＣＤ２８の膜貫通ドメインに由来するアミノ酸配列を有する膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、配列番号３９に記載のアミノ酸配列又は配列番号３９に対して少なくとも８５％、９０％又は９５％配列同一性を示すアミノ酸配列を有するＣＤ２８の膜貫通ドメインを含有する。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは配列番号３９に示されている。

【０１６４】

いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、抗原結合標的化ドメインと膜貫通ドメインとの間に位置するスペーサー領域も含むことができる。いくつかの実施形態では、スペーサー領域は親水性アミノ酸を含み、細胞表面に対する標的化ドメインの可撓性を可能にする。好適には、スペーサー領域は、５、１０、１５、２０、２５、又は３０個を超えるアミノ酸を含む。適切には、スペーサー領域は、１０、１５、２０、２５、３０、又は３５未満のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、スペーサー領域はヒンジ領域であり、ＣＤ８又は免疫グロブリン分子のヒンジ配列を含む。

【０１６５】

いくつかの実施形態では、スペーサー領域は、ＣＤ８ヒンジであるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、スペーサーはヒトＣＤ８のヒンジ領域である。いくつかの実

施形態では、ＣＡＲは、配列番号６０に示されるアミノ酸配列、又は配列番号６０に対して少なくとも８５％、９０％もしくは９５％の配列同一性を示すアミノ酸配列を有するＣＤ８ヒンジスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態では、スペーサーの配列は配列番号６０に記載されている。

【０１６６】

いくつかの実施形態では、スペーサー領域は、ＩｇＧ１　Ｆｃ又はＩｇＧ４　Ｆｃのヒンジドメインを含有する全部又は一部を含む。いくつかの実施形態では、スペーサーはＩｇＧ４　Ｆｃスペーサーである。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、配列番号３８に示されるアミノ酸配列、又は配列番号３８に対して少なくとも８５％、９０％もしくは９５％の配列同一性を示すアミノ酸配列を有するＩｇＧ４　Ｆｃスペーサーを含有する。いくつかの実施形態では、スペーサーの配列は配列番号３８に記載されている。いくつかの実施形態では、スペーサーの配列は、ＩｇＧ１　Ｆｃ又はＩｇＧ４　Ｆｃのヒンジ部分である。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、ＩｇＧ４ヒンジスペーサーを含有する。いくつかの実施形態では、ＩｇＧ４ヒンジスペーサーは、配列番号５９に示されるアミノ酸の配列、又は配列番号５９に対して少なくとも８５％、９０％もしくは９５％の配列同一性を示すアミノ酸の配列を有する。いくつかの実施形態では、スペーサーの配列は配列番号５９に示されている。

【０１６７】

いくつかの実施形態では、ＣＡＲの細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＡＲの効力を増加させ、免疫細胞シグナル伝達に関与するタンパク質に由来する細胞内シグナル伝達ドメインを含む。好適には、１つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ３ゼータ、ＣＤ２８、ＯＸ－４０、４－１　ＢＢ、ＤＡＰ１０、ＤＡＰ　１２、２Ｂ４（ＣＤ２４４）、又はそれらの任意の組み合わせに由来する細胞内シグナル伝達ドメインを含む。好適には、１つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ３ゼータ、ＣＤ２８、ＯＸ－４０、４－ｌＢＢ、ＤＡＰ１０、ＤＡＰ　１２、２Ｂ４（ＣＤ２４４）、又はそれらの任意の組み合わせのうちのいずれか２つに由来する細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【０１６８】

いくつかの実施形態では、ＣＡＲのエンドドメインは、更に２つのシグナル伝達ドメインを含み得る。例えば、ＣＡＲは、ＣＤ３ゼータ細胞内シグナル伝達ドメインなどの一次細胞内シグナル伝達ドメイン、及びＣＡＲ発現免疫細胞の効力を更に増強するためなど、細胞に更なるシグナルを提供するための共刺激分子由来の細胞内シグナル伝達ドメインを含み得る。したがって、いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）は、１）抗原結合ドメイン、２）可撓性リンカー、３）膜貫通領域、ならびに４）ＣＤ３ゼータ細胞内シグナル伝達ドメインなどの第１の一次細胞内シグナル伝達ドメイン及び第２の共刺激細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達領域を含む。いくつかの実施形態では、同時刺激ドメインは、ＣＤ２７、ＣＤ２８、４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）、０Ｘ４０（ＣＤ１３４）、ＣＤ３０、ＣＤ４０、リンパ球機能関連抗原－１（ＬＦＡ－１）、ＣＤ２、ＣＤ７、ＬＩＧＨＴ、ＮＫＧ２Ｃ、及び／又はＢ７－Ｈ３同時刺激ドメインであり得る。いくつかの実施形態では、共刺激ドメインは、ＣＤ２７、ＣＤ２８、４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）、０Ｘ４０（ＣＤ１３４）、ＤＡＰ１０、ＤＡＰ１２、ＩＣＯＳ、及び／又は２Ｂ４であり得る。いくつかの実施形態では、共刺激ドメインは、ＣＤ２７、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、２Ｂ４、ＤＡＰ１０、ＤＡＰ１２、０Ｘ４０、ＣＤ３０、ＣＤ４０、リンパ球機能関連抗原－１（ＬＦＡ－１）、ＣＤ２、ＣＤ７、ＬＩＧＨＴ、ＮＫＧ２Ｃ、及び／又はＢ７－Ｈ３共刺激ドメインであり得る。いくつかの実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインはＣＤ２８のシグナル伝達ドメインである。いくつかの実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、４－１ＢＢのシグナル伝達ドメインである。

【０１６９】

いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、配列番号４１に記載のアミノ酸配列又は配列番号４１に対して少なくとも８５％、９０％又は９５％配列同一性を示すアミノ酸配列を有するＣＤ３ゼータのシグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いく

つかの実施形態では、ＣＡＲは、配列番号４１に記載のアミノ酸配列を有するＣＤ３ゼータのシグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、配列番号５０に示すアミノ酸配列又は配列番号５０に対して少なくとも８５％、９０％又は９５％配列同一性を示すアミノ酸配列を有するＣＤ３ゼータのシグナル伝達ドメインを含有する細胞内シグナル伝達ドメインを含有する。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、配列番号５０に記載のアミノ酸配列を有するＣＤ３ゼータのシグナル伝達ドメインを含有する細胞内シグナル伝達ドメインを含有する。

【０１７０】

いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、配列番号４０に示すアミノ酸配列又は配列番号４０に対して少なくとも８５％、９０％又は９５％配列同一性を示すアミノ酸配列を有するＣＤ２８の共刺激シグナル伝達ドメインを含有する細胞内シグナル伝達ドメインを含有する。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、配列番号４０に記載のアミノ酸配列を有するＣＤ２８の共刺激シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、配列番号５２に示すアミノ酸配列又は配列番号５２に対して少なくとも８５％、９０％又は９５％配列同一性を示すアミノ酸配列を有するＣＤ２８の共刺激シグナル伝達ドメインを含有する細胞内シグナル伝達ドメインを含有する。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、配列番号５２に記載のアミノ酸配列を有するＣＤ２８の共刺激シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【０１７１】

いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、配列番号５１に記載のアミノ酸配列又は配列番号５１に対して少なくとも８５％、９０％又は９５％配列同一性を示すアミノ酸配列を有する４－１ＢＢの共刺激シグナル伝達ドメインを含有する細胞内シグナル伝達ドメインを含有する。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、配列番号５１に記載のアミノ酸配列を有する４－１ＢＢの共刺激シグナル伝達ドメインを含有する細胞内シグナル伝達ドメインを含有する。

【０１７２】

いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ３ゼータ、ＣＤ２８及び／又は４－１ＢＢのドメインであり得る。

【０１７３】

好適には、ＣＡＲは、ＣＤ３ゼータ及び４－１　ＢＢに由来する少なくとも２つの細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、配列番号４１及び配列番号５１に記載の配列を含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、配列番号５０及び配列番号５１に記載の配列を含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【０１７４】

他の実施形態において、好適には、ＣＡＲは、ＣＤ３ゼータ及びＣＤ２８に由来する少なくとも２つの細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、配列番号４１及び配列番号４０に記載の配列を含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、配列番号４１及び配列番号５２に記載の配列を含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、配列番号５０及び配列番号４０に記載の配列を含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、配列番号５０及び配列番号５２に記載の配列を含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【０１７５】

いくつかの実施形態では、抗原受容体（例えば、ＣＡＲ）は、NH_2末端リーダー配列を有するＣＡＲをコードするポリヌクレオチドによってコードされる。リーダー配列（シグナルペプチドとしても知られている）は、発現されたＣＡＲ構築物が小胞体（ＥＲ）に入り、細胞表面を標的とすることを可能にする。リーダー配列はＥＲにおいて切断され、成熟細胞表面ＣＡＲはリーダー配列を有さない。一般に、リーダー配列の長さは５～３０アミノ酸の範囲であり、疎水性アミノ酸のストレッチを含む。適切には、リーダー配列は

、長さが５、１０、１５、２０、又は２５以上のアミノ酸長さを含む。適切には、リーダー配列は、１０、１５、２０、２５、又は３０アミノ酸長未満を含む。適切には、リーダー配列は、任意の分泌タンパク質に由来する配列を含む。適切には、リーダー配列は、ＣＤ８αリーダー配列に由来する配列を含む。いくつかの実施形態では、好適には、リーダー配列は、ＩｇＫリーダー配列に由来する配列を含む。いくつかの実施形態では、リーダー配列は、配列番号４３に記載されている。

【０１７６】

いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、様々な公知の操作された細胞産物のいずれかに存在するＣＡＲである。ＣＡＲは、限定されないが、ＡＢＥＣＭＡ登録商標、ＪＣＡＲＨ１２５ＣＡＲＶＹＫＴＩ　ＴＭ（ＮＪ－６８２８４５２８；Ｊａｎｓｓｅｎ／Ｌｅｇｅｎｄ）、Ｐ－ＢＣＭＡ－１０１（Ｐｏｓｅｉｄａ）、ＰＢＣＡＲ２６９Ａ（Ｐｏｓｅｉｄａ）、Ｐ－ＢＣＭＡＡｌｌｏ１（Ｐｏｓｅｉｄａ）、Ａｌｌｏ－７１５（Ｐｆｉｚｅｒ／Ａｌｌｏｇｅｎｅ）、ＣＴ０５３（Ｃａｒｓｇｅｎ）、デカルト－０８（デカルト）、ＰＨＥ８８５（Ｎｏｖａｒｔｉｓ）、ＣＴＸ１２０（ＣＲＩＳＰＲ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ）、ＹＥＳＣＡＲＴＡ登録商標、ＫＹＭＲＩＡＨ登録商標、ＴＥＣＡＲＴＵＳ登録商標、又はＢＲＥＹＡＮＺＩ登録商標の細胞内に操作されたＣＡＲを含み得る。

【０１７７】

いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、市販のＣＡＲ細胞療法のＣＡＲを含む。市販のイデカビタゲンベースの療法におけるＣＡＲの非限定的な例としては、ブレクスカブタゲンオートロイセル（ＴＥＣＡＲＴＵＳ（登録商標））、アキシカブタゲンシロロイセル（ＹＥＳＣＡＲＴＡ（登録商標））、イデカビタゲン・ビクルーセル（ＡＢＥＣＭＡ（登録商標））、シルタカブタゲンオートロイセル（ＣＡＲＶＹＫＴＩ（商標））、リソカブタゲンマラロイセル（ＢＲＥＹＡＮＺＩ（登録商標））、チサゲナレキュセル（ＫＹＭＲＩＡＨ（登録商標））の細胞において操作されたＣＡＲが挙げられる。

【０１７８】

いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、ＣＤ１９に結合するＣＡＲで操作される。分化クラスター１９（ＣＤ１９）は、白血病前駆細胞上で検出可能な抗原決定基である。例えば、ヒトＣＤ１９のアミノ酸配列は、ＵｎｉＰｒｏｔ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ受託番号Ｐ１５３９１として見出すことができ、ヒトＣＤ１９をコードするヌクレオチド配列は、受託番号ＮＭ＿００１１７８０９８で見出すことができる。ＣＤ１９は、例えば、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ球性白血病及び非ホジキンリンパ腫を含むほとんどのＢ系統がん上で発現される。それはまた、Ｂ細胞前駆体の初期マーカーでもある。例えば、Ｎｉｃｈｏｌｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎ．３４（１６－１７）：１１５７－１１６５（１９９７）を参照。本明細書に開示されるＣＡＲポリペプチドにおける抗原結合細胞外ドメインは、ＣＤ１９（例えば、ヒトＣＤ１９）に特異的である。いくつかの例では、抗原結合細胞外ドメインは、ＣＤ１９に結合することができるｓｃＦｖ細胞外ドメインを含み得る。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ１９　ＣＡＲは、ＣＤ１９に特異的な抗ＣＤ１９一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、続いて、細胞内共シグナル伝達ドメイン（例えば、ＣＤ２８又は４－１ＢＢ）及びＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメインに融合したスペーサー及び膜貫通ドメインを含み得る。

【０１７９】

いくつかの実施形態では、ＣＤ１９　ＣＡＲの細胞外結合ドメインは、配列番号５４に記載の重鎖可変領域（V_H）及び配列番号５３に記載の軽鎖可変領域（V_L）を含み得る。いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖにおいてＶＨとＶＬとを隔てるリンカーは、配列番号５６に示されるようなＧＳリンカーである。いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖにおいてＶＨとＶＬとを隔てるリンカーは、配列番号５５に記載のＷｈｉｔｌｏｗリンカーである。いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖは、配列番号５７に示されるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖは、配列番号５８に示されるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、スペーサーは、配列番号６０に記載されるようなＣＤ８ヒンジである。いくつかの実施形態では、スペーサーは、配列番号５９に示されるようなＩ

ｇＧ４ヒンジである。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、４－１ＢＢ共刺激シグナル伝達ドメイン及びＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメイン、例えば、本明細書に記載するいずれかを含有する。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ２８共刺激シグナル伝達ドメイン及びＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメイン、例えば、本明細書に記載するいずれかを含有する。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、上記又は記載の配列番号のいずれかに対していくつかの配列変異、例えば、それに対して少なくとも８５％、９０％、９５％又はそれ以上の配列同一性を示し、かつＣＤ１９への結合ならびに細胞内シグナル伝達及び細胞傷害活性を保持する任意の配列を含むことが理解される。

【０１８０】

いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、市販のＣＡＲ細胞療法の抗ＣＤ１９　ＣＡＲを含む。市販の細胞ベースの治療における抗Ｃｄ１９　ＣＡＲの非限定的な例としては、ＹＥＳＣＡＲＴＡ登録商標、ＫＹＭＲＩＡＨ登録商標、ＴＥＣＡＲＴＵＳ登録商標、又はＢＲＥＹＡＮＺＩの細胞において操作された抗Ｃｄ１９　ＣＡＲが挙げられる。

【０１８１】

ＣＤ２０は、Ｂ－ＮＨＬなどの造血性悪性腫瘍に対する証明された治療標的であり、承認され広く使用されているモノクローナル抗体療法によって支持されている。更に、悪性Ｂ細胞上のＣＤ１９、ＣＤ２０及びＣＤ２２抗原の普遍的な存在は、それらを細胞療法のための完全な標的にする。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、ＣＤ２０に結合する細胞外抗原結合ドメインを含有する。特定の実施形態において、ＣＤ２０　ＣＡＲは、ＣＤ２０に向けられたＣＡＲを含み、ここで、ＣＤ２０に向けられたＣＡＲは、単鎖Ｆｖ抗体又は抗体フラグメント（ｓｃＦｖ）を含む。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ２０　ＣＡＲは、ＣＤ２０に特異的な抗ＣＤ２０一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、続いて、細胞内共シグナル伝達ドメイン（例えば、ＣＤ２８又は４－１ＢＢ）及びＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメインに融合したスペーサー及び膜貫通ドメインを含み得る。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、抗ＣＤ２０　ｓｃＦｖ、続いてＩｇＧ４－Ｆｃスペーサー、ＣＤ２８膜貫通ドメイン、４－１ＢＢ共刺激ドメイン及びＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメインを含有する。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、Ｒｕｆｅｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｓ．２０１６　４：５０９－５１９に記載されている　Ｌｅｕ１６　ＣＡＲである。ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＫＸ０５５８２８も参照）。

【０１８２】

いくつかの実施形態では、ＣＤ２０　ＣＡＲの細胞外結合ドメインは、配列番号３６に示される重鎖可変領域（V_H）及び配列番号３５に示される軽鎖可変領域（V_L）を含み得る。いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖにおいてＶＨとＶＬとを隔てるリンカーは、配列番号５６に示されるようなＧＳリンカーである。いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖにおいてＶＨとＶＬとを隔てるリンカーは、配列番号５５に記載のＷｈｉｔｌｏｗリンカーである。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ２０　ｓｃＦｖは、配列番号３７に記載されている。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、４－１ＢＢ共刺激シグナル伝達ドメイン及びＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメイン、例えば、本明細書に記載するいずれかを含有する。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ２８共刺激シグナル伝達ドメイン及びＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメイン、例えば、本明細書に記載するいずれかを含有する。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、上記又は記載の配列番号のいずれかに対していくつかの配列変異、例えば、それに対して少なくとも８５％、９０％、９５％又はそれ以上の配列同一性を示し、かつＣＤ３８への結合ならびに細胞内シグナル伝達及び細胞傷害活性を保持する任意の配列を含むことが理解される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ２０　ＣＡＲは、配列番号３７に記載のｓｃＦｖ及びＩｇＧ４　Ｆｃスペーサー（例えば、配列番号３８）、ＣＤ２８膜貫通ドメイン（例えば、配列番号３９）、ＣＤ２８共刺激シグナル伝達ドメイン（例えば、配列番号４０）及びＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメイン（例えば、配列番号４１）を含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ２０　ＣＡＲは、配列番号４２に記載のアミノ酸配列、配列番号４２に番号４２に

対して少なくとも８５％、少なくとも９０％又は少なくとも９５％配列同一性を示す配列を有する。いくつかの実施形態では、ＣＤ２０プロモータは、配列番号４２に示すヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、配列番号４５に示されるポリヌクレオチド（例えばｍＲＮＡ）によってコードされる。

【０１８３】

いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、ＢＣＭＡに結合するＣＡＲで操作される。ＢＣＭＡ　ＲＮＡは、複数の骨髄腫細胞及び他のリンパ腫において普遍的に検出されており、ＢＣＭＡタンパクは、数人の研究者によって、複数の骨髄腫患者からの形質細胞の表面上で検出されている（例えば、Ｎｏｖａｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，１０３（２）：６８９－６９４，２００４；Ｎｅｒｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｎｅｒｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，７３（１９）：５９０３－５９０９，２００７；Ｂｅｌｌｕｃｃｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，１０５（１０）：３９４５－３９５０，２００５；及びＭｏｒｅａｕｘ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，７０３（８）：３１４８－３１５７，２００４。ＢＣＭＡを標的化するためのＣＡＲは公知であり、米国特許第１０，９３４，３６３号又はＷＯ２０１８／０２８６４７に記載されているものが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、ＢＣＭＡに結合する細胞外抗原結合ドメインを含有する。特定の実施形態では、ＢＣＭＡ　ＣＡＲは、ＢＣＭＡに指向されるＣＡＲを含み、ＢＣＭＡに指向されるＣＡＲは、単鎖Ｆｖ抗体又は抗体フラグメント（ｓｃＦｖ）を含む。いくつかの実施形態では、抗ＢＣＭＡ　ＣＡＲは、ＢＣＭＡに特異的な抗ＢＣＭＡ単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）と、それに続く、細胞内共シグナル伝達ドメイン（例えば、ＣＤ２８又は４－１ＢＢ）及びＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメインに融合しているスペーサー及び膜貫通ドメインとを含み得る。

【０１８４】

いくつかの実施形態では、ＢＣＭＡ　ＣＡＲの細胞外結合ドメインは、Ｃａｒｐｅｎｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．１９（８）：２０４８－２０６０（２０１３）に記載されているＣ１１Ｄ５．３、マウスモノクローナル抗体由来のｓｃＦｖを含む。ＰＣＴ出願公開第ＷＯ２０１０／１０４９４９号も参照。Ｃ１１Ｄ５．３由来のｓｃＦｖは、Ｃ１１Ｄ５．３の重鎖可変領域（V_H）及び軽鎖可変領域（V_L）を含むことができる。いくつかの実施形態では、ＶＨは配列番号６３に示されるアミノ酸配列を有し、ＶＬは配列番号６２に示されるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖにおいてＶＨとＶＬとを隔てるリンカーは、配列番号５６に示されるようなＧＳリンカーである。いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖにおいてＶＨとＶＬとを隔てるリンカーは、配列番号５５に記載のＷｈｉｔｌｏｗリンカーである。いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖは、配列番号６４に記載のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、４－１ＢＢ共刺激シグナル伝達ドメイン及びＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメイン、例えば、本明細書に記載するいずれかを含有する。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ２８共刺激シグナル伝達ドメイン及びＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメイン、例えば、本明細書に記載するいずれかを含有する。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、上記又は記載の配列番号のいずれかに対していくつかの配列変異、例えば、それに対して少なくとも８５％、９０％、９５％又はそれ以上の配列同一性を示し、ＢＣＭＡへの結合ならびに細胞内シグナル伝達及び細胞傷害活性を保持する任意の配列を含むことが理解される。

【０１８５】

いくつかの実施形態では、ＢＣＭＡ　ＣＡＲの細胞外結合ドメインは、Ｃａｒｐｅｎｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．１９（８）：２０４８－２０６０（２０１３）及びＰＣＴ出願公開第ＷＯ２０１０／１０４９４９号に記載されている別のマウスモノクローナル抗体、Ｃ１２Ａ３．２　に由来する　ｓｃＦｖ　を含む。いくつかの実施形態では、ＶＨは配列番号６６に示されるアミノ酸配列を有し、ＶＬは配列番号６５に示されるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖにおいてＶＨ

とＶＬとを隔てるリンカーは、配列番号５６に示されるようなＧＳリンカーである。いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖにおいてＶＨとＶＬとを隔てるリンカーは、配列番号５５に記載のＷｈｉｔｌｏｗリンカーである。いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖは、配列番号６７に示されるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、４－１ＢＢ共刺激シグナル伝達ドメイン及びＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメイン、例えば、本明細書に記載するいずれかを含有する。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ２８共刺激シグナル伝達ドメイン及びＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメイン、例えば、本明細書に記載するいずれかを含有する。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、上記又は記載の配列番号のいずれかに対していくつかの配列変異、例えば、それに対して少なくとも８５％、９０％、９５％又はそれ以上の配列同一性を示し、ＢＣＭＡへの結合ならびに細胞内シグナル伝達及び細胞傷害活性を保持する任意の配列を含むことが理解される。

【０１８６】

いくつかの実施形態では、ＢＣＭＡ　ＣＡＲの細胞外結合ドメインは、ヒトＢＣＭＡに対して高い特異性を有するマウスモノクローナル抗体を含み、Ｆｒｉｅｄｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．２９（５）：５８５－６０１（２０１８））でＢＢ２１２１と称される。ＰＣＴ出願公開第ＷＯ２０１２１６３８０５号も参照。ＢＢ２１２１は、抗ＢＣＭＡ　０２　ＣＡＲとしても公知である。いくつかの実施形態では、ＶＨは配列番号６８に示されるアミノ酸配列を有し、ＶＬは配列番号６９に示されるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖにおいてＶＨとＶＬとを隔てるリンカーは、配列番号５６に示されるようなＧＳリンカーである。いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖにおいてＶＨとＶＬとを隔てるリンカーは、配列番号５５に記載のＷｈｉｔｌｏｗリンカーである。いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖは、配列番号７０に示されるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、４－１ＢＢ共刺激シグナル伝達ドメイン及びＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメイン、例えば、本明細書に記載するいずれかを含有する。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ２８共刺激シグナル伝達ドメイン及びＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメイン、例えば、本明細書に記載するいずれかを含有する。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、上記又は記載の配列番号のいずれかに対していくつかの配列変異、例えば、それに対して少なくとも８５％、９０％、９５％又はそれ以上の配列同一性を示し、ＢＣＭＡへの結合ならびに細胞内シグナル伝達及び細胞傷害活性を保持する任意の配列を含むことが理解される。

【０１８７】

いくつかの実施形態では、ＢＣＭＡ　ＣＡＲの細胞外結合ドメインは、ＢＣＭＡの２つのエピトープに結合できる２つの重鎖の単一可変断片（ＶＨＨ）を含み、Ｚｈａｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｈｅｍａｔｏｌ．Ｏｎｃｏｌ．１１（１）：１４１（２０１８）に記載されており、ＬＣＡＲ－Ｂ３８Ｍとも称される。ＰＣＴ出願公開番号ＷＯ２０１８／０２８６４７も参照。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、４－１ＢＢ共刺激シグナル伝達ドメイン及びＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメイン、例えば、本明細書に記載するいずれかを含有する。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ２８共刺激シグナル伝達ドメイン及びＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメイン、例えば、本明細書に記載するいずれかを含有する。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、上記又は記載の配列番号のいずれかに対していくつかの配列変異、例えば、それに対して少なくとも８５％、９０％、９５％又はそれ以上の配列同一性を示し、ＢＣＭＡへの結合ならびに細胞内シグナル伝達及び細胞傷害活性を保持する任意の配列を含むことが理解される。

【０１８８】

いくつかの実施形態では、ＢＣＭＡ　ＣＡＲの細胞外結合ドメインは、完全ヒト重鎖可変ドメイン（ＦＨＶＨ）を含み、Ｌａｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．ＦＨＶＨＣｏｍｍｕｎ．１１（１）：２８３（２０２０）に記載されており、ＦＨＶＨ３３とも称される。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、４－１ＢＢ共刺激シグナル伝達ド

メイン及びＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメイン、例えば、本明細書に記載するいずれかを含有する。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ２８共刺激シグナル伝達ドメイン及びＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメイン、例えば、本明細書に記載するいずれかを含有する。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、上記又は記載の配列番号のいずれかに対していくつかの配列変異、例えば、それに対して少なくとも８５％、９０％、９５％又はそれ以上の配列同一性を示し、ＢＣＭＡへの結合ならびに細胞内シグナル伝達及び細胞傷害活性を保持する任意の配列を含むことが理解される。

【０１８９】

いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、市販のＣＡＲ細胞療法の抗ＢＣＭＡ　ＣＡＲを含む。市販の細胞ベースの療法における抗ＢＣＭＡ　ＣＡＲの非限定的な例としては、イデカビタゲン・ビクルーセ（ＡＢＥＣＭＡ（登録商標））又はシルタキャブタゲンオートロイセル（ＣＡＲＶＹＫＴＩ（商標））の細胞において操作された抗ＢＣＭＡ　ＣＡＲが挙げられる。

【０１９０】

環状ＡＤＰリボースヒドロラーゼとしても知られているＣＤ３８（分化抗原群３８）は、多くの免疫細胞（白血球）、特にＣＤ４＋、ＣＤ８＋、Ｂリンパ球及びナチュラルキラー細胞を含むＴ細胞の表面上に見出される糖タンパク質である。ＣＤ３８はまた、細胞接着、シグナル伝達及びカルシウムシグナル伝達において機能する。このタンパク質についての構造情報は、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔデータベースにおいて参照番号Ｐ２８９０７で見出すことができる。ヒトにおいて、ＣＤ３８タンパク質は、第４染色体上に位置するＣＤ３８遺伝子によってコードされる。ＣＤ３８は、環状ＡＤＰ－リボース（ｃＡＤＰＲ）のＮＡＤ＋からＡＤＰ－リボースへの合成及び加水分解を触媒する多機能エクトエンザイムである。これらの反応産生物は、細胞内Ｃａ２＋の調節に必須であると考えられる。また、ＣＤ３８機能の喪失は、免疫応答障害及び代謝障害に関連していた（Ｍａｌａｖａｓｉ　Ｆ．，ｅｔ　ａｌ．（２００８）．「Ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ　ａｎｄ　ｆｕｎｃｔｉｏｎ　ｏｆ　ｔｈｅ　ＡＤＰ　ｒｉｂｏｓｙｌ　ｃｙｃｌａｓｅ／ＣＤ３８　ｇｅｎｅ　ｆａｍｉｌｙ　ｉｎ　ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　ｐａｔｈｏｌｏｇｙ」。Ｐｈｙｓｉｏｌ．Ｒｅｖ．８８（３）：８４１－８６）。ＣＤ３８タンパク質は、ＨＩＶ感染、白血病、骨髄腫、固形腫瘍、ＩＩ型糖尿病及び骨代謝のマーカーである。Ｂ細胞慢性リンパ性白血病における重要な予後因子としてのＣＤ３８発現。Ｂｌｏｏｄ　９８：１８１－１８６）。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３８　ＣＡＲは、ＣＤ３８に特異的な抗ＣＤ３８一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、続いて、細胞内共シグナル伝達ドメイン（例えば、ＣＤ２８又は４－１ＢＢ）及びＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメインに融合したスペーサー及び膜貫通ドメインを含み得る。

【０１９１】

いくつかの実施形態では、ＣＤ３８　ＣＡＲの細胞外結合ドメインは、配列番号４６又は配列番号４７に記載の重鎖可変領域（V_H）及び配列番号４８又は配列番号４９に記載の軽鎖可変領域（V_L）を含み得る。いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖにおいてＶＨとＶＬとを隔てるリンカーは、配列番号５６に示されるようなＧＳリンカーである。いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖにおいてＶＨとＶＬとを隔てるリンカーは、配列番号５５に記載のＷｈｉｔｌｏｗリンカーである。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、４－１ＢＢ共刺激シグナル伝達ドメイン及びＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメイン、例えば、本明細書に記載するいずれかを含有する。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ２８共刺激シグナル伝達ドメイン及びＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメイン、例えば、本明細書に記載するいずれかを含有する。いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、上記又は記載の配列番号のいずれかに対していくつかの配列変異、例えば、それに対して少なくとも８５％、９０％、９５％又はそれ以上の配列同一性を示し、かつＣＤ３８への結合ならびに細胞内シグナル伝達及び細胞傷害活性を保持する任意の配列を含むことが理解される。

【０１９２】

Ｂ．免疫調節物質（サイトカインなど）

提供される実施形態では、操作されたｇ－ＮＫ細胞又は複数のｇ－ＮＫ細胞は、外因性サイトカイン、例えばインターロイキンなどの異種免疫調節物質を発現するように操作される。いくつかの実施形態では、免疫調節物質をコードする異種核酸は、ｇ－ＮＫ細胞のゲノムに安定的に組み込まれる。他の実施形態では、免疫調節物質をコードする異種核酸は一過性に発現される。いくつかの実施形態では、免疫調節物質は免疫抑制物質である。いくつかの実施形態では、免疫調節物質は免疫活性化物質である。いくつかの実施形態では、免疫活性物質Ｃ１１Ｄ５．３Ｃ１１Ｄ５．３はサイトカインである。

【０１９３】

提供される実施形態では、操作されたＮＫ細胞は、異種サイトカイン又はその機能的部分を発現する。提供される実施形態によれば、ＮＫ細胞は、いくつかの実施形態では、分泌形態でサイトカインを発現するように操作され、一方、いくつかの実施形態では、サイトカインは膜結合している。いくつかの実施形態では、異種サイトカイン又はその機能的部分は、細胞から分泌可能である。いくつかの実施形態では、異種サイトカイン又はその機能的部分は、細胞の表面上の膜結合タンパク質として発現される。

【０１９４】

サイトカインは、細胞シグナル伝達において、特に免疫系との関連で重要な役割を果たす広範なクラスのタンパク質である。サイトカインは、免疫調節物質として、自己分泌、パラ分泌、及び内分泌シグナル伝達において役割を果たすことが示されている。サイトカインは、免疫媒介性応答を刺激する免疫活性化物質として、又は免疫媒介性応答を弱める免疫抑制物質として機能し得る。サイトカインには、ケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、リンフォンカイン、及び腫瘍壊死因子が含まれるが、一般にホルモン又は成長因子は含まれない。

【０１９５】

いくつかの実施形態では、サイトカインはインターロイキンである。インターロイキンは、一般に分泌タンパク質であり、広範囲の免疫応答を媒介するシグナル分子であるサイトカイン群である。例えば、インターロイキン（ＩＬ）－２は、白血球の活性の調節において役割を果たし、一方、インターロイキン（ＩＬ）－１５は、自然免疫系及び適応免疫系の両方の細胞の活性を調節することによって、微生物の侵入物及び寄生生物に対する炎症性免疫応答及び防御免疫応答の発生において主要な役割を果たす。いくつかの実施形態では、提供されるｇ－ＮＫ細胞を含むＮＫ細胞の１つ以上の活性は、ＩＬ－２、ＩＬ－２１及び／もしくはＩＬ－１５、又は記載される別のサイトカインによって調節される。

【０１９６】

サイトカインはＮＫ細胞活性に必要であるので、典型的な方法は、外因性サイトカインサポートとしてのＮＫ細胞療法と組み合わせて対象に外因性サイトカインを投与することを含む。しかしながら、いくつかの態様では、外因性サイトカインの投与は、特に特定のサイトカインの高用量投与で起こり得るような全身毒性のリスクをもたらし得る。提供される実施形態では、分泌可能なサイトカイン又は膜結合型サイトカインでＮＫ細胞を操作することは、全身毒性のリスクを回避又は低減しながら、ＮＫ細胞へのサイトカインの局所的供給源を提供する。

【０１９７】

提供される操作された細胞のいくつかの実施形態では、インターロイキン又はその機能的部分は、ｇ－ＮＫ細胞又はｇ－ＮＫ細胞の集団に導入される。いくつかの実施形態では、インターロイキンは、リンパ球、単球又はマクロファージなどの免疫細胞によって産生されるサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＮＫ細胞の生存、活性化及び／又は増殖の促進など、ＮＫ細胞を誘導するために使用することができる免疫活性化サイトカイン（免疫活性化物質とも呼ばれる）である。例えば、ＩＬ－１５又はＩＬ－２１などの特定のサイトカインは、エクスビボ又はインビボで増殖するそれらの能力を改善することなどによって、ＮＫ細胞が老化を受けるのを防止又は低減し得る。いくつかの実施形態では、インターロイキン又はその機能的部分は、ＩＬ－２、ＩＬ－４、Ｉ

Ｌ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、ＩＬ－１１、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、又はＩＬ－２１のうちの１つ以上の部分ペプチド又は完全ペプチドである。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、Ｆｌｔ３－Ｌ、ＳＣＦ、又はＩＬ－７である。いくつかの実施形態では、サイトカインはＩＬ－２又はその機能的部分である。いくつかの実施形態では、サイトカインはＩＬ－１２又はその機能的部分である。いくつかの実施形態では、サイトカインはＩＬ－１５又はその機能的部分である。いくつかの実施形態では、サイトカインはＩＬ－２１又はその機能的部分である。いくつかの実施形態では、サイトカインは、サイトカインに対するそれぞれの受容体と共に導入され得る。いくつかの実施形態では、操作された細胞に異種サイトカインを操作するステップは、サイトカインシグナル伝達を可能にし、それによって、ＮＫ細胞の細胞成長、増殖、増殖及び／又はエフェクター機能を維持又は改善するが、サイトカイン毒性のリスクは低減される。いくつかの実施形態では、導入されたサイトカイン、又は場合によってはそのそれぞれのサイトカイン受容体もまた、細胞表面上に発現される。いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達は、構成的に活性化される。いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達の活性化は誘導性である。いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達の活性化は一過性又は一時的である。

【０１９８】

例示的な分泌型及び膜結合型（ｍｂ）サイトカインは、例えば、米国特許出願公開番号ＵＳ２０１７／００７３６３８、ＵＳ２０２０／０１９９５３２、ＵＳ　２０２１／００２４９５９、及びＰＣＴ特許公開番号ＷＯ２０１５１７４９２８、ＷＯ　２０１９／１２６７４８、ＷＯ　２０１９／１９１４９５、ＷＯ２０２００５６０４５、ＷＯ２０２１０２１９０７、ＷＯ　２０２１／０１１９１９、ＷＯ　２０２１／０６２２８１に記載されているように公知であり、これらのいずれも、提供される操作された細胞で使用できる。

【０１９９】

いくつかの実施形態では、サイトカインはＩＬ－１５又はその機能的部分である。ＩＬ－１５は、ＮＫ細胞の活性化及び増殖を調節するサイトカインである。いくつかの場合において、ＩＬ－１５及びＩＬ－１２は、類似の生物学的活性を共有する。例えば、ＩＬ－１５及びＩＬ－２は、共通の受容体サブユニットに結合し、そして同じ受容体について競合し得る。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、ＪＡＫキナーゼの活性化、ならびに転写活性化因子ＳＴＡＴ３、ＳＴＡＴ５、及びＳＴＡＴ６のリン酸化及び活性化を誘導する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、ＮＫ細胞生存の促進、ＮＫ細胞及びＴ細胞の活性化及び増殖の調節、ならびに造血幹細胞からのＮＫ細胞発生の支持などの、ＮＫ細胞の１つ以上の機能的活性を促進又は調節する。いくつかの実施形態では、機能的部分は、ＮＫ細胞生存の促進、ＮＫ細胞及びＴ細胞の活性化及び増殖の調節、ならびに造血幹細胞からのＮＫ細胞発生の支持などの、全長又は成熟ＩＬ－１５の１つ以上の機能を保持するＩＬ－１５の一部分（例えば、全長ＩＬ－１５のアミノ酸の切断された連続配列を含有する）である。ＩＬ－１５の全て又は機能的部分は、膜結合ポリペプチド及び／又は分泌ポリペプチドとして発現され得る。

【０２００】

当業者によって理解されるように、種々のＩＬ－１５分子の配列は、当該分野で公知である。一態様では、ＩＬ－１５は野生型ＩＬ－１５である。いくつかの態様では、ＩＬ－１５は、哺乳動物ＩＬ－１５（例えば、ヒトインターロイキン１５（ＩＬ１５）、転写変異体３、ｍＲＮＡ、ＮＣＢＩ参照配列：ＮＭ＿０００５８５．４；Ｃａｎｉｓ　ｌｕｐｕｓ　ｆａｍｉｌｉａｒｉｓインターロイキン１５（ＩＬ１５）、ｍＲＮＡ、ＮＣＢＩ参照配列：ＮＭ＿００１１９７１８８．１、Ｆｅｌｉｓ　ｃａｔｕｓインターロイキン１５（ＩＬ１５）、ｍＲＮＡ、ＮＣＢＩ参照配列：ＮＭ＿００１００９２０７．１）。「哺乳動物」の例としては、霊長類（例えば、ヒト）、イヌ、ネコ、げっ歯類、ブタ、反芻動物などが挙げられる。具体例としては、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、モルモット、ラット及びマウスが挙げられる。特定の実施形態では、哺乳動物ＩＬ－

１５はヒトＩＬ－１５である。ヒトＩＬ－１５アミノ酸配列としては、例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＲ＿７５１９１５．１、ＮＰ＿０００５７６．１、ＡＡＩ００９６３．１、ＡＡＩ００９６４．１、ＡＡＩ００９６２．１、ＣＡＡ７１０４４．１、ＡＡＨ１８１４９．１、ＡＡＢ９７５１８．１、ＣＡＡ６３９１４．１、及びＣＡＡ６３９１３．１が挙げられる。

【０２０１】

いくつかの実施形態では、操作されたＮＫ細胞は、ＩＬ－１５をコードする異種ヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ヌクレオチド配列は、配列番号９に示されるか、又は配列番号９に対して少なくとも８５％もしくは少なくとも約８５％、少なくとも９０％もしくは少なくとも約９０％、少なくとも９５％もしくは少なくとも約９５％、又は少なくとも９８％もしくは少なくとも約９８％の配列同一性を有する配列である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、シグナルペプチド配列を欠き、場合によってはプロペプチド配列も欠く成熟形態で細胞によって発現される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、配列番号２に示されるアミノ酸の配列、又は配列番号２に対して少なくとも８５％又は少なくとも約８５％、少なくとも９０％又は少なくとも約９０％、少なくとも９５％又は少なくとも約９５％、もしくは少なくとも９８％又は少なくとも約９８％の配列同一性を有する配列を有する。

【０２０２】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５分子は、例えば、ヒトＩＬ－１５アミノ酸配列に対する１つ以上のアミノ酸改変、例えば置換を有する、ヒトＩＬ－５の変異体である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５変異体は、例えば、ＵＳ２０１６／０１８４３９９に記載されているように、４５位、５１位、５２位、又は７２位に突然変異を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５変異体は、Ｎ、Ｓ又はＬからＤ、Ｅ、Ａ、Ｙ又はＰのうちの１つへの置換を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、突然変異は、Ｌ４５Ｄ、Ｌ４５Ｅ、Ｓ５１Ｄ、Ｌ５２Ｄ、Ｎ７２Ｄ、Ｎ７２Ｅ、Ｎ７２Ａ、Ｎ７２Ｓ、Ｎ７２Ｙ、又はＮ７２Ｐ（ヒトＩＬ－１５の配列、配列番号２に関して）から選択される。

【０２０３】

実施形態において、ＩＬ－１５分子は、ＩＬ－１５変異体、例えば、１つ以上のアミノ酸置換を有するヒトＩＬ－１５ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５分子は、７２位に置換、例えば、ＮからＤへの置換を含む。一実施形態において、ＩＬ－１５分子は、アミノ酸置換Ｎ７２Ｄが含まれる配列番号２のＩＬ－１５ポリペプチドであるか、又はそれと少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、もしくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列であり、ＩＬ－１５　Ｒα結合活性を有する。

【０２０４】

いくつかの実施形態では、サイトカインはＩＬ－２又はその機能的部分である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－９、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１も含むサイトカインファミリーのメンバーである。ＩＬ－２は、アルファ、ベータ及びガンマと呼ばれる３つの鎖からなる受容体複合体を介してシグナル伝達する。γ鎖は、サイトカイン受容体のこのファミリーの全てのメンバーによって共有される。ＩＬ－２は、ＩＬ－１５と同様に、Ｂ細胞によって産生される免疫グロブリンの産生を促進し、ＮＫ細胞の分化及び増殖を誘導する。ＩＬ－２とＩＬ－１５との間の主な差異は、適応免疫応答において見出される。例えば、ＩＬ－２は、免疫記憶の発達の基礎であるため、外来病原体に対する適応免疫に必要である。一方、ＩＬ－１５は、ＣＤ８メモリーＴ細胞の生存を支持することによって高度に特異的なＴ細胞応答を維持するために必要である。ＩＬ－２の全て又は機能的部分は、膜結合ポリペプチド及び／又は分泌ポリペプチドとして発現され得る。当業者によって理解されるように、種々のＩＬ－２分子の配列は、当該分野で公知である。一態様では、ＩＬ－２は野生型ＩＬ－２である。いくつかの態様では、ＩＬ－２は哺乳動物ＩＬ－２である。いくつかの実施形態では、個体はヒトＩＬ－２である。

【０２０５】
いくつかの実施形態では、操作されたＮＫ細胞は、ＩＬ－２をコードする異種ヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、シグナルペプチド配列を欠き、場合によってはプロペプチド配列も欠く成熟形態で細胞によって発現される。いくつかの実施形態、ＩＬ－２は、配列番号１に示されるアミノ酸の配列、又は配列番号１に対して少なくとも８５％又は少なくとも約８５％、少なくとも９０％又は少なくとも約９０％、少なくとも９５％又は少なくとも約９５％、もしくは少なくとも９８％又は少なくとも約９８％の配列同一性を有する配列を有する。
【０２０６】
いくつかの実施形態では、サイトカインはＩＬ－２１又はその機能的部分である。ＩＬ－２１は、ＩＬ－２１受容体（ＩＬ－２１　Ｒ）及び共受容体、共通γ鎖（ＣＤ１３２）に結合する。ＩＬ－２１受容体は、ＮＫ細胞、Ｔ細胞及びＢ細胞上で同定されており、ＩＬ－２１が造血系細胞、特にリンパ系前駆細胞及びリンパ系細胞に作用することを示している。ＩＬ－２１は、細胞傷害性Ｔ細胞及びＮＫ細胞の強力なモジュレーターであることが示されている。（Ｐａｒｒｉｓｈ－Ｎｏｖａｋ，ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４０８：５７－６３，２０００；Ｐａｒｒｉｓｈ－Ｎｏｖａｋ，ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｌｅｕｋ．Ｂｉｏ．７２：８５６－８６３，２０２：Ｃｏｌｌｉｎｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｓ．２８：１３１－１４０，２００３；Ｂｒａｄｙ，ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１７２：２０４８－５８，２００４）。マウス研究において、ＩＬ－２１は、ＮＫ細胞の成熟及びエフェクター機能を増強する（Ｋａｓａｉａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　１６：５５９－５６９，２００２）。
【０２０７】
当業者によって理解されるように、種々のＩＬ－２１分子の配列は、当該分野で公知である。一態様では、ＩＬ－２１は野生型ＩＬ－２１である。いくつかの態様では、ＩＬ－２１は哺乳動物ＩＬ－２１である。一実施形態では、ＩＬ－２１配列はヒトＩＬ－２１配列である。ヒトＩＬ－２１アミノ酸配列には、例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＡＡＵ８８１８２．１、ＥＡＸ０５２２６．１、ＣＡＩ９４５００．１、ＣＡＪ４７５２４．１、ＣＡＬ８１２０３．１、ＣＡＮ８７３９９．１、ＣＡＳ０３５２２．１、ＣＡＶ３３２８８．１、ＣＢＥ７４７５２．１、ＣＢＩ７０４１８．１、ＣＢＩ８５４６９．１、ＣＢＩ８５４７２．１、ＣＢＬ９３９６２．１、ＣＣＡ６３９６２．１、ＡＡＧ２９３４８．１、ＡＡＨ６６２５８．１、ＡＡＨ６６２５９．１、ＡＡＨ６６２６０．１、ＡＡＨ６６２６１．１、ＡＡＨ６６２６２．１、ＡＡＨ６９１２４．１、及びＡＢＧ３６５２９．１が含まれる。
【０２０８】
いくつかの実施形態では、操作されたＮＫ細胞は、ＩＬ－２１をコードする異種ヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２１は、シグナルペプチド配列を欠き、場合によってはプロペプチド配列も欠く成熟形態で細胞によって発現される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２１は、配列番号３に示されるアミノ酸の配列、又は配列番号３に対して少なくとも８５％又は少なくとも約８５％、少なくとも９０％又は少なくとも約９０％、少なくとも９５％又は少なくとも約９５％、もしくは少なくとも９８％又は少なくとも約９８％の配列同一性を有する配列を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２１は、配列番号４に示されるアミノ酸の配列、又は配列番号４に対して少なくとも８５％又は少なくとも約８５％、少なくとも９０％又は少なくとも約９０％、少なくとも９５％又は少なくとも約９５％、もしくは少なくとも９８％又は少なくとも約９８％の配列同一性を有する配列を有する。
【０２０９】
サイトカイン（例えば、ＩＬ－２、ＩＬ１５、又はＩＬ－２１）アミノ酸配列は、成熟サイトカインの任意の機能的部分、例えば、成熟、ＩＬ－２、成熟、ＩＬ－１５、又は成熟ＩＬ－２１の任意の機能的部分を含み得る。機能的部分は、機能的部分がそれぞれのインターロイキン受容体に特異的に結合するという条件で、それが一部であるインターロイ

キンの隣接アミノ酸を含む任意の部分であり得る。用語「機能的部分」は、インターロイキンに関して使用される場合、インターロイキンの任意の部分又は断片をいい、この部分又は断片は、それがその一部であるインターロイキン（親インターロイキン）の生物学的活性を保持する。機能的部分は、例えば、それぞれのインターロイキン受容体に特異的に結合する能力を保持し、インターロイキンの下流標的を活性化し、及び／又は免疫細胞、例えば、ＮＫ細胞の分化、増殖（又は死）及び活性の１つ以上を親インターロイキンと同様の程度まで、同じ程度まで、もしくはより高い程度まで誘導するインターロイキンの部分を包含する。インターロイキンの機能的部分の生物学的活性は、当該分野で公知のアッセイを使用して測定され得る。親インターロイキンに関して、機能的部分は、例えば、親成熟インターロイキンのアミノ酸配列の約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、約９５％、又はそれ以上を含むことができる。

【０２１０】

提供される実施形態によるサイトカイン又は機能性部分の範囲に含まれるのは、本明細書に記載されるインターロイキンの機能性変異体である。本明細書で使用される「機能的変異体」という用語は、親インターロイキンに対して実質的又は有意な配列同一性又は類似性を有するインターロイキンを指し、この機能的変異体は、それが変異体であるインターロイキンの生物学的活性を保持する。機能的変異体は、例えば、それぞれのインターロイキン受容体に特異的に結合する能力を保持し、インターロイキンの下流標的を活性化し、及び／又は免疫細胞、例えば、ＮＫ細胞の分化、増殖（又は死）及び活性の１つ以上を親インターロイキンと同様の程度まで、同じ程度まで、もしくはより高い程度まで誘導する、本明細書に記載されるインターロイキン（親インターロイキン）の変異体を包含する。親インターロイキンに関して、機能的変異体は、例えば、アミノ酸配列において親インターロイキンと少なくとも約８０％、約９０％、約９５％、約９９％又はそれ以上同一であり得る。

【０２１１】

機能的変異体は、例えば、少なくとも１つの保存的アミノ酸置換を有する親インターロイキンのアミノ酸配列を含み得る。あるいは又は更に、機能的変異体は、少なくとも１つの非保存的アミノ酸置換を有する親インターロイキンのアミノ酸配列を含むことができる。いくつかの実施形態では、アミノ酸置換、例えば保存的又は非保存的アミノ酸置換は、親インターロイキン配列と比較して、機能的変異体の生物学的活性を妨害又は阻害しない。いくつかの実施形態では、アミノ酸置換、例えば保存的又は非保存的アミノ酸置換は、機能的変異体の生物学的活性が親インターロイキンと比較して増加するように、機能的変異体の生物学的活性を増強し得る。

【０２１２】

いくつかの実施形態では、インターロイキンのアミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換である。保存的アミノ酸置換は、当技術分野において公知であり、特定の物理的及び／又は化学的特性を有する１つのアミノ酸が、同じ又は類似の化学的又は物理的特性を有する別のアミノ酸と交換されるアミノ酸置換を含む。例えば、保存的アミノ酸置換は、別の酸性／負電荷極性アミノ酸（例えば、Ａｓｐ又はＧｌｕ）に置換された酸性／負電荷極性アミノ酸、非極性側鎖を有する別のアミノ酸に置換された非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、Ａｌａ、Ｇｌｙ、Ｖａｌ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、Ｐｒｏ、Ｔｒｐ、Ｃｙｓ、Ｖａｌなど）、別の塩基性／正電荷極性アミノ酸に置換された塩基性／正電荷極性アミノ酸（例えば、Ｌｙｓ、Ｈｉｓ、Ａｒｇなど）、別の極性側鎖を有する非荷電アミノ酸に置換された極性側鎖を有する非荷電アミノ酸（例えば、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｔｙｒなど）、別のβ分岐側鎖を有するアミノ酸に置換されたβ分岐側鎖を有するアミノ酸（例えば、Ｉｌｅ、Ｔｈｒ、及びＶａｌ）、別の芳香族側鎖を有するアミノ酸に置換された芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、Ｈｉｓ、Ｐｈｅ、Ｔｒｐ、及びＴｙｒ）などであってもよい。

【０２１３】

いくつかの実施形態では、サイトカイン（例えば、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１

又は前述のいずれかの機能的部分）の全て又は機能的部分は、様々な方法で分泌ポリペプチドとしてｇ－ＮＫ細胞によって発現され得る。例えば、サイトカインの全て又は機能的部分は、ＮＫ細胞内で発現され得、そしてＮＫ細胞から分泌され得る。いくつかの実施形態では、分泌可能なサイトカインは膜貫通ドメインを含まない。

【０２１４】

いくつかの実施形態では、サイトカインは、操作されたｇ－ＮＫ細胞から分泌可能である。いくつかの実施形態では、分泌型サイトカインは構成的に発現される。他の実施形態において、分泌可能なサイトカインは一過性に発現される。いくつかの実施形態では、分泌型サイトカインは、誘導可能なプロモータである。いくつかの実施形態では、分泌型サイトカインは、ＩＬ－２又はその機能的部分である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２のアミノ酸配列は、配列番号１であるか、又は配列番号１を含む。いくつかの実施形態では、分泌型サイトカインは、ＩＬ－１５又はその機能的部分である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５のアミノ酸配列は、配列番号２であるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、分泌型サイトカインは、ＩＬ－２１又はその機能的部分である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２１のアミノ酸配列は、配列番号３であるか、又は配列番号３を含む。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１のうちの２つ以上の組み合わせなどの、２つ以上の分泌可能なサイトカインで操作される。

【０２１５】

インターロイキン及び他のサイトカインは、一般に分泌されるが、それらはまた、膜結合され得る。ＣＡＲ融合タンパク質と共発現される場合、免疫細胞活性化サイトカイン及びＣＡＲ融合タンパク質を標的細胞に近接して濃縮することが可能である。ｇ－ＮＫ細胞においてＣＡＲ融合タンパク質と共発現される場合、ｇ－ＮＫ細胞は、標的化及び殺傷能力の増加を示し、したがって、魅力的かつ有効な治療剤を表す。いくつかの場合において、膜結合型サイトカインは、標的細胞、例えば、本明細書に記載されるようなｇ－ＮＫ細胞と組み合わせて投与されるモノクローナル抗体によって標的化される細胞接して免疫細胞活性化サイトカインを濃縮することを可能にする。

【０２１６】

他の実施形態では、サイトカインは膜結合型（ｍｂ）である。いくつかの実施形態では、膜結合型サイトカインは構成的に発現される。他の実施形態において、膜結合型サイトカインは一過性に発現される。いくつかの実施形態では、膜結合型サイトカインは誘導可能なプロモータ下である。いくつかの実施形態では、膜結合型サイトカインは、膜結合型ＩＬ－２（ｍｂＩＬ－２）である。いくつかの実施形態では、膜結合型サイトカインは、膜結合型ＩＬ－１５（ｍｂＩＬ－１５）である。いくつかの実施形態では、膜結合型サイトカインは、膜結合型ＩＬ－２１（ｍｂＩＬ－２１）である。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、ｍｂＩＬ－２、ｍｂＩＬ－１５、及びｍｂＩＬ－２１のうちの２つ以上の組み合わせなど、２つ以上の膜結合型サイトカインで操作される。膜結合型サイトカインは、本明細書に記載される任意のものなどの膜結合形態でフォーマットされたインターロイキンサイトカイン（例えば、ＩＬ－２、ＩＬ－１５又はＩＬ－２１）の任意のフォーマットを含み得る。

【０２１７】

いくつかの実施形態では、サイトカイン（例えば、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、又は前述のいずれかの機能的部分）の全て又は機能的部分は、ｇ－ＮＫ細胞によって膜結合型サイトカインとして様々な方法で発現され得る。いくつかの実施形態では、サイトカイン又はその機能的部分は、当技術分野で公知の様々なリンカーのいずれかを使用して、ｇ－ＮＫ細胞の表面（例えば、ＮＫ細胞の表面又は膜内）に直接又は間接的に（例えば、イオン性、非イオン性、共有結合）連結（例えば、コンジュゲート又は融合）することができる（Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ，Ｇ．，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ １９９６）。いくつかの態様において、サイトカインの全て又は機能的部分は、膜貫通タンパク質の全て又は一部に連結される。一態様では

、ＮＫ細胞は、膜貫通タンパク質の全部又は一部に融合したサイトカインの全部又は一部を含む融合タンパク質を発現する。いくつかの実施形態では、リンカーはは、ペプチドリンカー、例えば、可撓性リンカーであり得る。いくつかの実施形態では、可撓性リンカーは、主にグリシン及びセリン残基を含む。例えば、可撓性リンカーは、Ｇ４Ｓ及びＧ３Ｓの一方又は両方の１つ以上の反復（例えば、Ｇ４Ｓ及びＧ３Ｓの約３～約１５又は約５～約１２の反復）を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、フューリン切断可能配列などの切断可能リンカーである。例示的なフューリン切断配列は、Ｄｕｃｋｅｒｔ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，Ｄｅｓｉｇｎ＆Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ，１７（１）：１０７－１１２（２００４）及び米国特許第８，８７１，９０６号に記載されており、これらはそれぞれ参照により本明細書に組み込まれる。

【０２１８】

特定の態様では、膜貫通タンパク質の部分は、膜貫通タンパク質の膜貫通ドメインの全て又は一部を含む。いくつかの実施形態では、膜貫通タンパク質は、生体膜（例えば、細胞膜などの生体膜）のリン脂質二重層などの膜に、及び／又は膜内に位置する任意のタンパク質であってもよい。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、膜内に通常存在する膜貫通タンパク質のドメイン、特にチャネル及び孔を形成するドメインである。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、膜（例えば、細胞などの小胞の膜）中で熱力学的に安定である三次元タンパク質構造である。膜貫通ドメインの例としては、単一のαヘリックス、いくつかの膜貫通αヘリックスの安定な複合体、膜貫通βバレル、グラミシジンＡのβヘリックス、又は任意の他の構造が挙げられる。膜貫通ヘリックスは通常、約２０アミノ酸長である。

【０２１９】

膜貫通タンパク質の例としては、受容体、リガンド、免疫グロブリン、グリコホリン、又はそれらの組み合わせが挙げられる。膜貫通タンパク質の具体例としては、ＣＤ８α、ＣＤ４、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、ＣＤ３ζ、ＣＤ２８、ＣＤ１３７、ＦｃεＲＩγ、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲα及び／又はＴＣＲβなどのＴＣＲ）、ニコチン性アセチルコリン受容体、ＧＡＢＡ受容体、又はこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。免疫グロブリンの具体例としては、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、ＩｇＤ又はそれらの組み合わせが挙げられる。グリコホリンの具体例としては、グリコホリンＡ、グリコホリンＤ又はそれらの組み合わせが挙げられる。

【０２２０】

いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインはＣＤ２８膜貫通ドメインである。ＣＤ２８膜貫通ドメインの例示的な配列は、配列番号１０に記載される。

ＩＥＶＭＹＰＰＰＹＬＤＮＥＫＳＮＧＴＩＩＨＶＫＧＫＨＬＣＰＳＰＬＦＰＧＰＳＫＰＦＷＶＬＶＶＶＧＧＶＬＡＣＹＳＬＬＶＴＶＡＦＩＩＦＷＶＲ （配列番号１０）

【０２２１】

いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインはＣＤ８膜貫通ドメインである。ＣＤ８膜貫通ドメインの例示的な配列は、配列番号１１に記載される。

ＴＴＴＰＡＰＲＰＰＴＰＡＰＴＩＡＳＱＰＬＳＬＲＰＥＡＣＲＰＡＡＧＧＡＶＨＴＲＧＬＤＦＡＣＤＩＹＩＷＡＰＬＡＧＴＣＧＶＬＬＬＳＬＶＩＴＬＹＣ （配列番号１１）

【０２２２】

いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインはＣＤ４膜貫通ドメインである。ＣＤ４膜貫通ドメインの例示的な配列は、配列番号１５に記載される。

ＭＡＬＩＶＬＧＧＶＡＧＬＬＬＦＩＧＬＧＩＦＦ（配列番号１５）

【０２２３】

いくつかの実施形態では、サイトカイン（例えば、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、又は前述のいずれかの機能的部分）の全て又は機能的部分は、シグナルペプチド、リーダー配列、分泌シグナル、標識（例えば、レポーター遺伝子）、又はそれらの任意の組み合わせなどの他の成分に連結され得る。

【０２２４】

いくつかの実施形態では、サイトカイン（例えば、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、又は前述のいずれかの機能的部分）の全て又は機能的部分をコードする核酸配列は、異種タンパク質由来のシグナルペプチドをコードする核酸配列で置換される。異種タンパク質は、例えば、ＣＤ８α、ＣＤ２８、組織プラスミノーゲン活性化因子（ｔＰＡ）、成長ホルモン、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、ＧＭ－ＣＳＦ受容体（ＧＭ－ＣＳＦＲａ）、又は免疫グロブリン（例えば、ＩｇＥ又はＩｇＫ）であり得る。

【０２２５】

いくつかの実施形態では、サイトカイン（例えば、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１又は前述のいずれかの機能的部分）の全て又は機能的部分は、ＣＤ８αのシグナルペプチドに融合される。例示的なＣＤ８αシグナルペプチドは、配列番号１２に示される。いくつかの実施形態では、サイトカイン（例えば、ＩＬ－１５もしくはその機能的部分、ＩＬ－２もしくはその機能的部分、又はＩＬ－２１もしくはその機能的部分）の全て又は機能的部分は、ＧＭ－ＣＳＦＲαのシグナルペプチド（配列番号１３）に融合される。例示的なＧＭ－ＣＳＦＲａシグナルペプチドを配列番号１３に記載する。例示的なＩｇＫシグナルペプチドは、配列番号１４に示される。例示的なＩｇＫシグナルペプチドは、配列番号４３に示される。

【０２２６】

いくつかの実施形態では、サイトカイン（例えば、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１又は前述のいずれかの機能的部分）の全て又は機能的部分は、ＣＤ８αのシグナルペプチド及びＣＤ８αの膜貫通ドメインの全て又は一部に融合される。いくつかの実施形態では、異種サイトカインは、配列番号７に示される膜結合型ＩＬ－１５、又は配列番号７に対して少なくとも８５％又は少なくとも約８５％、少なくとも９０％又は少なくとも約９０％、少なくとも９５％又は少なくとも約９５％、もしくは少なくとも９８％又は少なくとも約９８％の配列同一性を有する配列である。いくつかの実施形態では、異種サイトカインは、配列番号８に示される膜結合型ＩＬ－１５、又は配列番号８に対して少なくとも８５％又は少なくとも約８５％、少なくとも９０％又は少なくとも約９０％、少なくとも９５％又は少なくとも約９５％、もしくは少なくとも９８％又は少なくとも約９８％の配列同一性を有する配列である。

【０２２７】

いくつかの実施形態では、サイトカイン（例えば、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１又は前述のいずれかの機能的部分）の全て又は機能的部分は、免疫グロブリンのＦｃ領域に融合されて、二価サイトカインを産生する。いくつかの実施形態では、サイトカイン－Ｆｃ融合タンパク質は、膜結合型サイトカインとして発現させるために膜貫通ドメインに更に連結されていてもよい。

【０２２８】

いくつかの実施形態では、異種サイトカインは、配列番号５に示される膜結合型ＩＬ－１５、又は配列番号５に対して少なくとも８５％又は少なくとも約８５％、少なくとも９０％又は少なくとも約９０％、少なくとも９５％又は少なくとも約９５％、もしくは少なくとも９８％又は少なくとも約９８％の配列同一性を有する配列である。

【０２２９】

いくつかの実施形態では、異種サイトカインは、配列番号６に示される膜結合型ＩＬ－２１、又は配列番号６に対して少なくとも８５％又は少なくとも約８５％、少なくとも９０％又は少なくとも約９０％、少なくとも９５％又は少なくとも約９５％、もしくは少なくとも９８％又は少なくとも約９８％の配列同一性を有する配列である。

【０２３０】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、ＩＬ－１５受容体アルファ（ＩＬ１５ＲＡ）と共に細胞内に操作される。ＩＬ１５ＲＡは、非常に高い親和性でＩＬ－１５に特異的に結合し、他のサブユニットから独立してＩＬ－１５に結合することができる。いくつかの態様では、この特性は、ＩＬ－１５が１つの細胞によって産生され、別の細胞によってエ

ンドサイトーシスされ、次いで第３の細胞に提示されることを可能にする。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、異種（例えば、外因性）ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒａを発現する。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒ融合タンパク質で操作される。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、単鎖ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒ融合タンパク質で操作される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒａは、膜結合型ＩＬ－１５．ＩＬ１５Ｒａ複合体として発現される（例えば、Ｉｍａｍｕｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，２０１４ １２４（７）：１０８及びＨｕｒｔｏｎ ＬＶ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ，２０１６）。いくつかの実施形態では、外因性ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒａは分泌可能であり、可溶性ＩＬ１５Ｒａ．ＩＬ１５複合体として発現される（例えば、Ｍｏｒｔｉｅｒ Ｅ ｅｔ ａｌ．，ＪＢＣ ２００６；Ｂｅｓｓａｒｄ Ａ，Ｍｏｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒ．，２００９、及びＤｅｓｂｏｉｓ Ｍ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，２０１６）。いくつかの実施形態では、提供される操作されたｇ－ＮＫ細胞は、膜結合型ＩＬ１５／ＩＬ１５Ｒα複合体及び可溶性（分泌可能）ＩＬ１５Ｒα／ＩＬ１５複合体を発現する。いくつかの実施形態では、操作されたｇ－ＮＫ細胞は、切断可能なリンカーを有するＩＬ１５．ＩＬ１５Ｒα複合体の膜結合形態を発現する。

【０２３１】

Ｃ．ポリヌクレオチド

いくつかの実施形態では、提供されるキメラ抗原受容体のいずれかを含む、キメラ抗原受容体などの抗原受容体をコードする核酸配列を有するポリヌクレオチドが本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、分泌型又は膜結合型サイトカインを含むサイトカインなどの、提供される免疫調節物質のいずれかをコードする核酸配列を有するポリヌクレオチドが本明細書で提供される。

【０２３２】

いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体などの抗原受容体をコードする核酸、及び分泌型又は膜結合型サイトカインを含むサイトカインなどの免疫調節物質をコードする核酸は、別々のポリヌクレオチドとして提供される。

【０２３３】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、キメラ抗原受容体などの抗原受容体をコードする核酸配列、及び分泌型又は膜結合型サイトカインを含むサイトカインなどの免疫調節物質をコードする核酸を含む。したがって、いくつかの態様において、核酸配列は、同じポリヌクレオチドの一部として提供される。例えば、提供される実施形態は、操作された成分が、１つ以上のプロテアーゼ切断部位、例えば、Ｔ２Ａ、Ｐ２Ａ、Ｅ２Ａ、又はＦ２Ａなどの自己切断ペプチドを含むポリヌクレオチドによってコードされるポリヌクレオチドを含む。このような部位は、プロテイナーゼによって認識及び切断され、これは、ＮＫ細胞中に操作されたポリヌクレオチドによってコードされる様々な構成部分（例えば、サイトカイン及びＣＡＲ）の分離（及び別々の発現）をもたらし得る。結果として、実施形態に応じて、操作された成分の様々な構成部分を、単一のベクター中で、又は複数のベクターによってＮＫ細胞に送達することができる。

【０２３４】

細胞、例えばｇ－ＮＫ細胞へのポリヌクレオチドの送達などのための、提供されるポリヌクレオチドのいずれかをコードするビヒクルも本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、ビヒクルは、ウイルスベクター又は非ウイルスベクターなどのベクターである。いくつかの実施形態では、ベクターは、ウイルスベクター（レンチウイルスベクター）である。いくつかの実施形態では、哺乳類は、ヒトである。いくつかの実施形態では、ビヒクルは脂質ナノ粒子である。ベクター又は非ベクター送達ビヒクルを含む他のビヒクルは、以下に記載される任意のものを含む当業者に公知のものを含む。

【０２３５】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、提供される方法に従って、ｇ－ＮＫ細胞、又は複数のｇ－ＮＫ細胞を含有する組成物へと操作される。ＮＫ細胞を操作する例示

的な方法を以下に記載する。

【０２３６】

Ｄ．異種薬剤の送達方法

遺伝子操作されたｇ－ＮＫ細胞を産生する方法であって、ＣＡＲをコードする核酸をｇ－ＮＫ細胞に導入し、それによって遺伝子操作されたｇ－ＮＫ細胞を産生することを含む方法が、本明細書に開示される。

【０２３７】

遺伝子操作されたｇ－ＮＫ細胞を産生する方法であって、免疫調節物質（例えば、分泌型もしくは可溶性サイトカイン又は膜結合型サイトカイン）をコードする核酸をｇ－ＮＫ細胞に導入し、それによって遺伝子操作されたｇ－ＮＫ細胞を産生することを含む方法が、本明細書に開示される。

【０２３８】

遺伝子操作されたｇ－ＮＫ細胞を産生する方法であって、（ａ）ｇ－ＮＫ細胞に、ＣＡＲをコードする核酸を導入することと、（ｂ）ｇ－ＮＫ細胞に、免疫調節物質（例えば、分泌可能もしくは可溶性サイトカイン又は膜結合型サイトカイン）をコードする核酸を導入し、それによって遺伝子操作されたｇ－ＮＫ細胞を産生することとを含み、ステップ（ａ）及び（ｂ）が、同時に又は任意の順序で逐次的に行われる、方法が、本明細書に開示される。

【０２３９】

ｇ－ＮＫ細胞に導入される核酸は、ゲノムへの安定な組み込みのために、又は一過性発現のために導入され得る。安定な組み込み対一過性発現は、宿主ゲノムに効率的に組み込まれる特定の核酸の能力又は核酸の含量及びその半減期を含むがこれらに限定されない種々の因子に基づいて選択され得る。

【０２４０】

いくつかの実施形態では、異種薬剤（例えば、ＣＡＲなどの抗原受容体及び／又は記載されるサイトカインなどの免疫調節物質）をｇ－ＮＫ細胞に導入することは、ＮＫ細胞の出発試料からｇ－ＮＫ細胞サブセットを濃縮する方法において実施され得る。いくつかの実施形態では、ＣＡＲなどの抗原受容体の導入は、ＮＫ細胞の出発試料からｇ－ＮＫ細胞サブセットを濃縮する方法において行われてもよい。いくつかの実施形態では、サイトカインなどの免疫調節物質を導入することは、ＮＫ細胞の出発試料からｇ－ＮＫ細胞サブセットを濃縮する方法において実施され得る。いくつかの実施形態では、ＣＡＲなどの抗原受容体、及びサイトカインなどの免疫調節物質を導入することは、ＮＫ細胞の出発試料からｇ－ＮＫ細胞サブセットを濃縮する方法において実施され得る。したがって、提供される方法は、ＦｃＲγ鎖が欠損しているＮＫ細胞について選択されたｇ－ＮＫ細胞のみ（又はｇ－ＮＫ代替マーカープロファイルによって選択又は同定されたもののみ）を特異的に操作することを必要としないが、ｇ－ＮＫ細胞が優先的に増殖又は濃縮される、又は増殖又は濃縮されたＮＫ細胞の組成物の細胞の操作を含み得ることが理解される。したがって、ｇ－ＮＫ細胞が濃縮された細胞の最終組成物は、異種抗原受容体（例えば、ＣＡＲ）、異種免疫調節物質（例えば、ＩＬ－１５もしくはＩＬ－２１などの分泌型もしくは膜結合型インターロイキン）、又は異種抗原受容体（例えば、ＣＡＲ）及びサイトカイン（例えば、ＩＬ－１５もしくはＩＬ－２１などの分泌型もしくは膜結合型インターロイキン）などの異種免疫調節物質が導入されたｇ－ＮＫ細胞を含む。ｇ－ＮＫ細胞が濃縮された組成物を調製及び増殖するための例示的な方法は、セクションＶに提供される。

【０２４１】

いくつかの実施形態では、異種薬剤（例えば、記載されるＣＡＲなどの抗原受容体及び／又はサイトカインなどの免疫調節物質）の導入は、セクションＶに記載されるものなどの、ｇ－ＮＫ細胞を増殖させる方法の間の任意の適切な時点で行われ得る。いくつかの実施形態では、ＣＡＲなどの抗原受容体の導入は、ｇ－ＮＫ細胞を増殖させる方法の間の任意の適切な時点で行われ得る。いくつかの実施形態では、サイトカインなどの免疫調節物質の導入は、ｇ－ＮＫ細胞を増殖させる方法の間の任意の好適な時点で行われ得る。いく

つかの実施形態では、ＣＡＲ及び免疫調節物質の導入は、ｇ－ＮＫ細胞を増殖させる方法の間の任意の好適な時点で行われ得る。いくつかの実施形態では、導入することは、対象からの細胞の選択（例えば、ＣＤ３^{neg}ＣＤ５７^{pos}である細胞を選択又は濃縮すること）の後、かつＮＫ細胞の増殖又は増殖のために選択又は濃縮された細胞をフィーダー細胞（例えば、ＨＬＡ－Ｅ発現フィーダー細胞）と共にインキュベート又は培養することの前に実施される。いくつかの実施形態では、導入は、フィーダー細胞（例えば、ＨＬＡ－Ｅ発現フィーダー細胞）とのインキュベーション又は培養の後、したがって、選択又は濃縮された細胞が増殖又は増殖した後に行われる。いくつかの実施形態では、導入することは、本明細書に記載される遺伝子編集のための方法を用いて、任意の順序で連続的に行われる。

【０２４２】

いくつかの実施形態では、セクションＶに記載されるような細胞の増殖のための期間は、第１の増殖及び第２の増殖に分割される。いくつかの実施形態では、導入（例えば、ウイルス形質導入）の前に、生体試料から選択された細胞は、第１の期間、例えば、約６時間、約１２時間、約１８時間、約２４時間、約２日間、約３日間、約４日間、約５日間、約６日間、約７日間、約８日間、約９日間、約１０日間、約１１日間、約１２日間、約１３日間、約１４日間、約１５日間、約１６日間、約１７日間、約１８日間、約１９日間、約２０日間、約２１日間、又はエンドポイントを含む列挙された時間の間の任意の時間、増殖のための条件下で培養される。いくつかの実施形態では、第１の増殖期間後、増殖細胞（例えば、ＮＫ細胞）に、キメラ抗原受容体などの１つ以上の異種薬剤及び／又は記載のサイトカインなどの免疫調節薬剤をコードする操作された構築物を導入する（例えば、形質導入する）。いくつかの実施形態では、第１の増殖期間の後、増殖させた細胞（例えば、ＮＫ細胞）に、キメラ抗原受容体などの１つ以上の異種薬剤をコードする操作された構築物を導入（例えば、形質導入）する。いくつかの実施形態では、第１の増殖期間の後、増殖した細胞（例えば、ＮＫ細胞）に、サイトカインなどの免疫調節物質などの１つ以上の異種薬剤をコードする操作された構築物を導入する（例えば、形質導入する）。いくつかの実施形態では、第１の増殖期間の後、増殖させた細胞（例えば、ＮＫ細胞）に、キメラ抗原受容体などの１つ以上の異種薬剤及びサイトカインなどの免疫調節物質をコードする操作された構築物を導入する（例えば、形質導入する）。導入（例えば、ウイルス形質導入）後、操作された細胞は、第２の期間、例えば、６時間又は約６時間、約１２時間、約１８時間、約２４時間、約２日間、約３日間、約４日間、約５日間、約６日間、約７日間、約８日間、約９日間、約１０日間、約１１日間、約１２日間、約１３日間、約１４日間、約１５日間、約１６日間、約１７日間、約１８日間、約１９日間、約２０日間、約２１日間以上、又はエンドポイントを含む列挙された時間の間の任意の時間培養される。

【０２４３】

ＨＬＡ－Ｅ発現フィーダー細胞ならびに／又はＩＬ１２及び／もしくはＩＬ２１などの１つ以上の刺激剤の培地への補充は、培養プロセス中の任意の時点で行うことができる。例えば、１つ以上の刺激剤は、培養開始時、例えば、時点０（例えば、培養開始時）に添加され得る。薬剤（単数又は複数）は、２回目、３回目、４回目、５回目、又はそれ以上の回数添加され得る。その後の添加は、先の添加と同じ濃度であっても、そうでなくてもよい。複数回の添加の間の間隔は、例えば、約１２時間、約２４時間、約３６時間、約４８時間、約７２時間、又はそれより長い時間間隔、及び終点を含むその間の任意の時間で変動し得る。刺激剤の複数回の添加が使用される場合、第１の補足的添加の濃度は、第２の（及び／又は任意の補足的添加）と同じ又は異なる濃度であり得る。例えば、いくつかの実施形態では、複数の時点にわたる刺激剤の添加は、複数の不等濃度にわたって、漸増、漸減、一定に留まる、又は変動し得る。

【０２４４】

いくつかの実施形態では、抗原受容体（例えば、ＣＡＲ）をコードする核酸は、ｇ－ＮＫ細胞における一過性発現のための条件下で導入される。いくつかの実施形態では、免疫調節物質（例えば、分泌型もしくは可溶性サイトカイン又は膜結合型サイトカインなどの

サイトカイン）をコードする核酸は、ｇ－ＮＫ細胞における一過性発現のための条件下で導入される。いくつかの実施形態では、抗原受容体（例えば、ＣＡＲ）をコードする核酸及び免疫調節物質（例えば、分泌型もしくは可溶性サイトカイン又は膜結合型サイトカインなどのサイトカイン）をコードする核酸は、ｇ－ＮＫ細胞における一過性発現のための条件下で導入される。いくつかの実施形態では、一過性発現のために核酸を導入するための方法は、分解される前に短期間、そのコードされた内容物を発現し得る核酸をもたらす任意の方法を含む。

【０２４５】

いくつかの実施形態では、抗原受容体（例えば、ＣＡＲ）をコードする核酸は、ｇ－ＮＫ細胞における安定な発現のための条件下で導入される。いくつかの実施形態では、免疫調節物質（例えば、分泌型もしくは可溶性サイトカイン又は膜結合型サイトカインなどのサイトカイン）をコードする核酸は、ｇ－ＮＫ細胞における安定発現のための条件下で導入される。いくつかの実施形態では、抗原受容体（例えば、ＣＡＲ）をコードする核酸及び免疫調節物質（例えば、分泌型もしくは可溶性サイトカイン又は膜結合型サイトカインなどのサイトカイン）をコードする核酸は、ｇ－ＮＫ細胞における安定発現のための条件下で導入される。いくつかの実施形態では、細胞における安定な発現のために核酸を導入するための方法は、細胞のゲノムへの核酸の安定な組み込みをもたらす任意の方法を含み、その結果、それが組み込まれた細胞が分裂する場合、それは増殖され得る。

【０２４６】

いくつかの実施形態では、異種薬剤のうちの１つ（例えば、ＣＡＲなどの抗原受容体をコードする核酸、又はサイトカインなどの免疫調節物質をコードする核酸のうちの１つ）は、細胞において一過性発現をもたらす方法によって細胞に導入され、他の異種薬剤（例えば、ＣＡＲなどの抗原受容体をコードする核酸、又はサイトカインなどの免疫調節物質をコードする核酸のうちの他のもの）は、細胞において安定発現をもたらす方法によって導入される。いくつかの実施形態では、異種薬剤の両方（例えば、ＣＡＲなどの抗原受容体をコードする核酸、及びサイトカインなどの免疫調節物質をコードする核酸の両方）は、細胞における一過性発現をもたらす方法によって細胞に導入される。いくつかの実施形態では、異種薬剤の両方（例えば、ＣＡＲなどの抗原受容体をコードする核酸、及びサイトカインなどの免疫調節物質をコードする核酸の両方）は、細胞において安定な発現をもたらす方法によって細胞に導入される。

【０２４７】

ポリヌクレオチド及びそれを含有する組成物の送達方法は、当業者に公知である。細胞における一過性又は安定な発現のための適切な方法を選択することは、当業者のレベルの範囲内である。

【０２４８】

いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞の操作は、細胞組成物に、異種薬剤（例えば、ＣＡＲ及び／もしくはサイトカインなどの免疫調節物質）をコードするポリヌクレオチド、又は前記ポリヌクレオチドを含むベクターを形質導入することによって達成することができる。いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞の操作は、細胞組成物に、ＣＡＲなどの抗原受容体をコードするポリヌクレオチド、又は前記ポリヌクレオチドを含むベクターを形質導入することによって達成することができる。いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞の操作は、サイトカインなどの免疫調節物質をコードするポリヌクレオチド、又は前記ポリヌクレオチドを含むベクターを細胞組成物に形質導入することによって達成することができる。いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞の操作は、細胞組成物に、ＣＡＲなどの抗原受容体及びサイトカインなどの免疫調節物質をコードするポリヌクレオチド、又は前記ポリヌクレオチドを含むベクターを形質導入することによって達成することができる。ベクターは、ウイルスベクター、例えば、レンチウイルスベクター、ガンマレトロウイルスベクター、組換えＡＡＶ、アデノウイルスベクター又は腫瘍溶解性ウイルスベクターであり得る。他の態様では、非ウイルスベクター、例えば、ナノ粒子及びリポソームもまた、異種薬剤（例えば、ＣＡＲ及び／又はサイトカインなどの免疫調節物質）をコードするポリヌクレオチ

ドのＮＫ細胞への導入及び送達のために使用され得る。他の態様では、非ウイルスベクター、例えば、ナノ粒子及びリポソームも、ＣＡＲなどの抗原受容体をコードするポリヌクレオチドをＮＫ細胞に導入及び送達するために使用することができる。他の態様では、サイトカインなどの免疫調節物質をコードするポリヌクレオチドをＮＫ細胞に導入及び送達するために、非ウイルスベクター、例えばナノ粒子及びリポソームを使用することもできる。他の態様では、ｃａｒなどの抗原受容体及びサイトカインなどの免疫調節物質をコードするポリヌクレオチドをＮＫ細胞に導入及び送達するために、非ウイルスベクター、例えば、ナノ粒子及びリポソームを使用することもできる。

【０２４９】

いくつかの実施形態では、異種薬剤（例えば、ＣＡＲ及び／又はサイトカインなどの免疫調節物質）をコードするポリヌクレオチドをパッケージングするベクターを使用して、パッケージングされたポリヌクレオチドを、ｇ－ＮＫ細胞又はｇ－ＮＫ細胞が濃縮された組成物もしくは細胞集団に送達することができる。いくつかの実施形態では、ＣＡＲなどの抗原受容体をコードするポリヌクレオチドをパッケージングするベクターを使用して、パッケージングされたポリヌクレオチドを、ｇ－ＮＫ細胞又はｇ－ＮＫ細胞が濃縮された組成物もしくは細胞集団に送達することができる。いくつかの実施形態では、サイトカインなどの免疫調節物質をコードするポリヌクレオチドをパッケージングするベクターを使用して、パッケージングされたポリヌクレオチドをｇ－ＮＫ細胞又はｇ－ＮＫ細胞が濃縮された組成物もしくは細胞集団に送達することができる。いくつかの実施形態では、ＣＡＲなどの抗原受容体及びサイトカインなどの免疫調節物質をコードするポリヌクレオチドをパッケージングするベクターを使用して、パッケージングされたポリヌクレオチドをｇ－ＮＫ細胞又はｇ－ＮＫ細胞が濃縮された組成物もしくは細胞集団に送達してもよい。これらのベクターは、ＤＮＡベクター、ＲＮＡベクター、プラスミド、ウイルスベクター及び粒子を含む任意の種類のものであり得る。ウイルスベクター技術は公知であり、Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．（２００１，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ）に記載されている。ベクターとして有用なウイルスとしては、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、レトロウイルスベクター、腫瘍溶解性ウイルスなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【０２５０】

一般に、ベクターは、少なくとも１つの生物で機能する複製起点、プロモータ配列、好都合な制限エンドヌクレアーゼ部位、及び１つ以上の選択可能なマーカーを含む（例えば、薬剤耐性遺伝子）。

【０２５１】

プロモータは、ポリヌクレオチド配列の特異的転写を開始するのに必要な、細胞の転写機構によって認識される任意のＤＮＡ配列を含んでもよい。ベクターは、ポリヌクレオチドに作動可能に連結されたネイティブ又は非ネイティブプロモータを含み得る。選択されたプロモータは、強い、弱い、構成的、誘導性、組織特異的、発生段階特異的、及び／又は生物特異的であり得る。好適なプロモータの一例は、最初期サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモータ配列である。このプロモータ配列は、動作可能に連結された任意のポリヌクレオチド配列の高レベルの発現を駆動することができる強力な構成的プロモータ配列である。プロモータの別の例は、伸長増殖因子－１α（ＥＦ－１α）である。しかしながら、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）、マウス乳がんウイルス（ＭＭＴＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）の長い末端反復配列（ＬＴＲ）、プロモータ、鳥白血病ウイルスプロモータ、エプスタイン・バールウイルス最初期プロモータ、ラウス肉腫ウイルスプロモータ、並びにホスホグリセリン酸キナーゼ（ＰＧＫ）プロモータ、アクチンプロモータ、ミオシンプロモータ、ヘモグロビンプロモータ、ユビキチンＣ（Ｕｂｃ）プロモータ、ヒトＵ６低分子核タンパク質プロモータ、及びクレアチンキナーゼプロモータなどであるがこれらに限定されないヒト遺伝子プロモータが挙げられるが、これらに限定されない、

他の構成的プロモータ配列を使用してもよい。場合によっては、限定されないが、メタロチオネインプロモータ、グルココルチコイドプロモータ、プロゲステロンプロモータ、及びテトラサイクリンプロモータなどの誘導性プロモータを使用することができる。

【０２５２】

例えば、エンハンサーなどの追加のプロモータエレメントは、転写開始の頻度を調節し得る。このような領域は、開始部位の１０～１００塩基対上流又は下流に位置し得る。いくつかの例において、２つ以上のプロモータエレメントを使用して、転写を協調的に又は独立して活性化することができる。

【０２５３】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、ウイルスベクターにパッケージングされ得るか、又はウイルスゲノムに組み込まれ得、ポリヌクレオチドの一過性発現又は安定発現を可能にする。ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターを含むレトロウイルスベクターを含んでもよい。レトロウイルスベクターを構築するために、異種薬剤（例えば、ＣＡＲ及び／又はサイトカインなどの免疫調節物質）をコードするポリヌクレオチド分子を、特定のウイルス配列の代わりにウイルスゲノムに挿入して、複製欠損であるウイルスを産生する。レトロウイルスベクターを構築するために、ＣＡＲなどの抗原受容体をコードするポリヌクレオチド分子を、特定のウイルス配列の代わりにウイルスゲノムに挿入して、複製欠損であるウイルスを産生する。レトロウイルスベクターを構築するために、サイトカインなどの免疫調節物質をコードするポリヌクレオチド分子を、特定のウイルス配列の代わりにウイルスゲノムに挿入して、複製欠損ウイルスを作製する。レトロウイルスベクターを構築するために、ＣＡＲなどの抗原受容体、及びサイトカインなどの免疫調節物質をコードするポリヌクレオチド分子を、特定のウイルス配列の代わりにウイルスゲノムに挿入して、複製欠損ウイルスを作製する。次いで、組換えウイルスベクターは、ｇａｇ、ｐｏｌ、及びｅｎｖ遺伝子を含むが、ＬＴＲ及びパッケージング成分を含まないパッケージング細胞株に導入される。組換えレトロウイルス粒子は、培養培地中に分泌され、次いで収集され、任意選択で濃縮され、そして遺伝子移入のために使用される。レンチウイルスベクターは、分裂細胞及び非分裂細胞の両方に感染することができるので、特に好ましい。

【０２５４】

いくつかの実施形態では、異種薬剤（例えば、ＣＡＲ及び／又はサイトカインなどの免疫調節物質）をコードするポリヌクレオチドは、形質導入による送達のためにウイルスベクターに組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＣＡＲなどの抗原受容体をコードするポリヌクレオチドは、形質導入による送達のためにウイルスベクターに組み込まれる。いくつかの実施形態では、サイトカインなどの免疫調節物質をコードするポリヌクレオチドは、形質導入による送達のためにウイルスベクターに組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＣＡＲなどの抗原受容体、及びサイトカインなどの免疫調節物質をコードするポリヌクレオチドは、形質導入による送達のためにウイルスベクターに組み込まれる。ウイルス形質導入は、核酸がウイルス媒介手段によって真核細胞に意図的に導入されるプロセスである。

【０２５５】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。レンチウイルスベクターは、送達された核酸転写物内に含まれる遺伝子の安定な発現を可能にするので、ウイルス形質導入を成功させるための特に有用な手段である。レンチウイルスベクターは、送達された核酸転写物内に含まれる遺伝子の安定な発現に必要な２つの酵素である逆転写酵素及びインテグラーゼを発現する。逆転写酵素はＲＮＡ転写物をＤＮＡに変換し、一方、インテグラーゼはＤＮＡを標的細胞のゲノムに挿入して組み込む。ＤＮＡがゲノムに安定に組み込まれると、それは宿主と共に分裂する。組み込まれたＤＮＡ内に含まれる目的の遺伝子は、構成的に発現され得るか、又は誘導性であり得る。宿主細胞ゲノムの一部として、それは、標的細胞における因子の宿主に依存して、活性化又は抑制を含む細胞調節に供され得る。

【０２５６】
レンチウイルスは、宿主ゲノムへの組込みの前にウイルスＲＮＡゲノムのＤＮＡへの逆転写が必要であるために名付けられた、レトロウイルス科のウイルスのサブグループである。したがって、レンチウイルスビヒクル／粒子の最も重要な特徴は、標的／宿主細胞のゲノムへのそれらの遺伝物質の組込みである。レンチウイルスのいくつかの例としては、ヒト免疫不全症ウイルス：ＨＩＶ－１及びＨＩＶ－２、サル免疫不全ウイルス（ＳＩＶ）、ネコ免疫不全ウイルス（ＦＩＶ）、ウシ免疫不全ウイルス（ＢＩＶ）、ジェンブラナ病ウイルス（ＪＤＶ）、ウマ伝染性貧血ウイルス（ＥＩＡＶ）、ウマ伝染性貧血ウイルス、ビスナ－マエディ及びヤギ関節炎脳炎ウイルス（ＣＡＥＶ）が挙げられる。

【０２５７】
典型的には、遺伝子送達ビヒクルを構成するレンチウイルス粒子は、それ自体が複製欠損である（「自己不活性化」とも呼ばれる）。レンチウイルスは、インタクトな宿主核膜を介した侵入機構によって、分裂細胞及び非分裂細胞の両方に感染することができる（Ｎａｌｄｉｎｉ Ｌ ｅｔ ａｌ．Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｉｅｃｋｎｏｌ，１９９８，９：４５７－４６３）。組換えレンチウイルスビヒクル／粒子は、ＨＩＶビルレンス遺伝子を複数回弱毒化することによって産生されており、例えば、遺伝子Ｅｎｖ、Ｖｉｆ、Ｖｐｒ、Ｖｐｕ、Ｎｅｆ及びＴａｔを欠失させて、ベクターを生物学的に安全にする。対応して、レンチウイルスビヒクル（例えば、ＨＩＶ１／ＨＩＶ－２由来）は、非分裂細胞への導入遺伝子の効率的な送達、組込み及び長期発現を媒介し得る。

【０２５８】
レンチウイルス粒子は、ヒトＨＥＫ２９３Ｔ細胞などのプロデューサー細胞においてウイルスパッケージングエレメント及びベクターゲノム自体を共発現させることによって産生され得る。これらのエレメントは、通常、３つ（第二世代レンチウイルス系において）又は４つの別々のプラスミド（第三世代レンチウイルス系において）において提供される。プロデューサー細胞は、ウイルスのコア（すなわち、構造タンパク質）及び酵素成分、ならびにエンベロープタンパク質（パッケージング系と呼ばれる）を含むレンチウイルス成分をコードするプラスミド、ならびに標的細胞に移入される外来導入遺伝子、ビヒクル自体（移入ベクターとも呼ばれる）を含むゲノムをコードするプラスミドで同時トランスフェクトされる。一般に、プラスミド又はベクターはプロデューサー細胞株に含まれる。プラスミド／ベクターは、トランスフェクション、形質導入又は感染を介してプロデューサー細胞株に導入される。トランスフェクション、形質導入又は感染の方法は、当業者に公知である。非限定的な例として、パッケージング構築物及び移入構築物は、リン酸カルシウムトランスフェクション、リポフェクション又はエレクトロポレーションによって、一般に、優性選択マーカー（例えば、ネオミオシン（ｎｅｏ）、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）、グルタミンシンテターゼ又はアデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡ））と一緒に、プロデューサー細胞株に導入され得、その後、適切な薬物の存在下での選択及びクローンの単離が続く。

【０２５９】
プロデューサー細胞は、外来遺伝子、例えば、異種薬剤（例えば、ＣＡＲ及び／又はサイトカインなどの免疫調節物質）をコードするポリヌクレオチドを含有する組換えウイルス粒子を産生する。プロデューサー細胞は、外来遺伝子、例えば、ＣＡＲなどの抗原受容体をコードするポリヌクレオチドを含有する組換えウイルス粒子を産生する。プロデューサー細胞は、外来遺伝子（例えば、サイトカインのような免疫調節物質をコードするポリヌクレオチド）を含む組換えウイルス粒子を産生する。プロデューサー細胞は、外来遺伝子、例えば、ＣＡＲなどの抗原受容体、及びサイトカインなどの免疫調節物質をコードするポリヌクレオチドを含有する組換えウイルス粒子を産生する。組換えウイルス粒子を培養培地から回収し、当業者によって使用される標準的な方法によって滴定する。組換えレンチウイルスビヒクルは、ｇ－ＮＫ細胞又はｇ－ＮＫ細胞が濃縮された細胞の組成物もしくは集団などの標的細胞に感染させるために使用することができる。

【０２６０】

高力価レンチウイルス粒子を産生するために使用され得る細胞としては、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞、２９３Ｇ細胞、ＳＴＡＲ細胞（Ｒｅｌａｎｄｅｒ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２００５，１１：４５２－４５９）、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ（商標）２９３ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）、及び他のＨＥＫ２９３Ｔベース産生細胞株（例えば、Ｓｔｅｗａｒｔ ｅｔ ａｌ．Ｈｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２０１１，２，２（３）：３５７～３６９、Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｂｉｏｅｎｇ，２０１２，１０９９６）：１５５１－１５６０；Ｔｈｒｏｍ ｅｔ ａｌ．Ｂｌｏｏｄ．２００９，１１３（２１）：５１０４－５１１０）が含まれるが、これらに限定されない。

【０２６１】

いくつかの態様では、エンベロープタンパク質は、水疱性口内炎ウイルスＧタンパク質（ＶＳＶ Ｇ）又はバキュロウイルスｇｐ６４エンベロープタンパク質などの、他のウイルス由来の異種エンベロープタンパク質であってもよい。ＶＳＶ－Ｇ糖タンパク質は、特に、ベシクロウイルス属に分類される種の中から選択することができる。カラジャスウイルス（ＣＪＳＶ）、チャンディプラウイルス（ＣＨＰＶ）、コカルウイルス（ＣＯＣＶ）、イスファハンウイルス（ＩＳＦＶ）、マラバウイルス（ＭＡＲＡＶ）、ピリウイルス（ＰＩＲＹＶ）、水疱性口炎Ａｉａｇｏａｓウイルス（ＶＳＡＶ）、水疱性口炎インディアナウイルス（ＶＳＴＶ）及び水疱性口炎ニュージャージーウイルス（ＶＳＮＪＶ）及び／又はベシクロウイルス属においてソウギョラブドウイルス、ＢｅＡｎ １５７５７５ウイルス（ＢｅＡｎ １５７５７５）、Ｂｏｔｅｋｅウイルス（ＢＴＫＶ）、Ｃａｌｃｈａｑｕｉウイルス（ＣＱＦＶ）、アメリカウナギウイルス（ＥＶＡ）、グレイロッジウイルス（ＧＬＯＶ）、Ｊｕｒｏｎａウイルス（ジュリー）、クラマスウイルス（ＫＬＡＶｊ）、クワッタウイルス（ＫＷＡＶ）、ラホヤウイルス（ＬＪＶ）、マパリススプリングウイルス（ＭＳＰＶ）、マウントＥｌｇｏｎコウモリウイルス（ＭＥＢ Ｖ）、Ｆｅｒｉｎｅｔウイルス（ＰＥＲＶ）、パイクフライラブドウイルス（ＰＦＲＶ）、ポートンウイルス（ＰＯＲＶ）、ラジウイルス（ＲＡＤＩＶ）、コイ春ウイルス血症ウイルス（ＳＶＣＶ）、Ｔｕｐａｉａウイルス（ＴＵＰＶ）、潰瘍性疾患ラブドウイルス（ＵＤＲＶ）及びＹＵＧ Ｂｏｇｄａｎｏｖａｃウイルス（ＹＢＶ）として暫定的に分類される株。ｇｐ６４又は他のバキュロウイルスエンベロープタンパクは、Ａｕｔｏｇｒａｐｈａ ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃａ ｎｕｃｌｅｏｐｏｌｙｈｅｄｒｏｖｉｒａｓ（ＡｃＭＮＰＶ）、Ａｎａｇｒａｐｈａ ｆａｌｃｉｐｈｅｒａ核多角体病ウイルス、Ｂｏｍｂｙｘ ｍｏｒｉ核多角体病ウイルス、Ｃｈｏｒｉｓｔｏｎｅｕｒａ ｆｉｉｍｉｆｅｒａｎａ ｎｕｃｌｅｏｐｏｌｙｈｅｄｒｏｖｉｒａｓ、Ｏｒｇｙｉａ ｐｓｅｕｄｏｔｓｕｇａｔａ単一カプシド核多角体病ウイルス、Ｅｐｉｐｈｙａｓ ｐｏｓｔｖｉｔｔａｎａ ｎｕｃｌｅｏｐｏｌｙｈｅｄｒｏｖｉｒａｓ、Ｈｙｐｈａｒｉｔｒｉａ ｎｕｃｌｅｏｐｏｌｙｈｅｄｒｏｖｉｒａｓ、ガレリアメロネラ核多角体病ウイルス、Ｄｈｏｒｉウイルス、Ｔｈｏｇｏｔｏウイルス、Ａｎｔｈｅｒａｅａ ｐｅｍｙｉ ｎｕｃｌｅｏｐｏｌｙｈｅｄｒｏｖｉｒａｓ又はＢａｔｋｅｎウイルスに由来し得る。

【０２６２】

レンチウイルス粒子中に提供される更なるエレメントは、５’又は３’末端のいずれかのレトロウイルスＬＴＲ（長い末端反復）、レトロウイルス輸送エレメント、任意選択でレンチウイルス逆応答エレメント（ＲＲＥ）、プロモータ又はその活性部分、及び遺伝子座制御領域（ＬＣＲ）又はその活性部分を含み得る。他のエレメントとしては、非分裂細胞における形質導入効率を改善するための中央ポリプリントラクト（ｃＰＰＴ）配列、ウッドチャック肝炎ウイルス（ＷＨＰ）、導入遺伝子の発現を増強し、力価を増加させる転写後調節エレメント（ＷＰＲＥ）が挙げられる。

【０２６３】

組換えレンチウイルス粒子を産生するための方法は、当業者に公知であり、例えば、米国特許第８，８４６，３８５号、同第７，７４５，１７９号、同第７，６２９，１５３号、同第７，５７５，９２４号、同第７，１７９，９０３号、及び同第６，８０８，９０５

号を参照）。使用されるレンチウイルスベクターは、ｐＬＶＸ、ｐＬｅｎｔｉ、ｐＬｅｎｔｉ６、ｐＬＪＭｌ、ＦＵＧＷ、ｐＷＰＸＬ、ｐＷＰＩ、ｐＬｅｎｔｉ　ＣＭＶ　ｐｕｒｏ　ＤＥＳＴ、ｐＬＪＭｌ－ＥＧＦＰ、ｐＵＬＴＲＡ、ｐＩｎｄｕｃｅｒ２Ｑ、ｐＨＩＶ－ＥＧＦＰ、ｐＣＷ５７．１、ｐＴＲＰＥ、ｐＥＬＰＳ、ｐＲＲＬ、及びｐＬｉｏｎＩＩから選択され得るが、これらに限定されない。（米国特許第９，２６０，７２５号、同第９，０６８，１９９号、同第９，０２３，６４６号、同第８，９００，８５８号、同第８，７４８，１６９号、同第８，７０９，７９９号、同第８，４２０，１０４号、同第８，３２９，４６２号、同第８，０７６，１０６号、同第６，０１３，５１６号、及び同第５，９９４，１３６号、国際特許公開第ＷＯ２０１２０７９０００号を参照）。

【０２６４】

他のレトロウイルスベクターを使用して、ｇ－ＮＫ細胞又はｇ－ＮＫ細胞が濃縮された細胞の組成物もしくは集団への送達のための異種薬剤（例えば、ＣＡＲ及び／又はサイトカインなどの免疫調節物質）をパッケージングすることもできる。他のレトロウイルスベクターもまた、ｇ－ＮＫ細胞又はｇ－ＮＫ細胞において濃縮された細胞の組成物もしくは集団への送達のために、ＣＡＲなどの抗原受容体をパッケージングするために使用され得る。他のレトロウイルスベクターもまた、ｇ－ＮＫ細胞又はｇ－ＮＫ細胞において濃縮された細胞の組成物もしくは集団への送達のために、免疫調節物質（例えば、サイトカイン）をパッケージングするために使用され得る。他のレトロウイルスベクターもまた、ｇ－ＮＫ細胞又はｇ－ＮＫ細胞において濃縮された細胞の組成物もしくは集団への送達のために、ＣＡＲなどの抗原受容体及びサイトカインなどの免疫調節物質をパッケージングするために使用され得る。レトロウイルスベクター（ＲＶ）は、標的細胞における導入遺伝子の永続的な組込みを可能にする。複雑なＨＩＶ１／２に基づくレンチウイルスベクターに加えて、単純なγ－レトロウイルスに基づくレトロウイルスベクターは、治療遺伝子を送達するために広く使用されており、広範囲の細胞型を形質導入することができる最も効率的かつ強力な遺伝子送達系の１つとして臨床的に実証されている。ガンマレトロウイルスの種の例としては、マウス白血病ウイルス（ＭＬＶ）及びネコ白血病ウイルス（ＦｅＬＶ）が挙げられる。

【０２６５】

いくつかの実施形態では、マウス白血病ウイルス（ＭＬＶ）などの哺乳動物ガンマレトロウイルスに由来するガンマレトロウイルスベクターは、組換えである。ガンマレトロウイルスのＭＬＶファミリーには、エコトロピック、両栄養性、異種栄養性及び多栄養性サブファミリーが含まれる。エコトロピックウイルスは、ｍＣＡＴ－１受容体を用いてマウス細胞のみに感染することができる。エコトロピックウイルスの例は、モロニーＭＬＶ及びＡＫＶである。両種指向性ウイルスは、Ｐｉｔ－２受容体を介してマウス、ヒト及び他の種に感染する。両種指向性ウイルスの一例は、４０７０Ａウイルスである。異種栄養性及び多指向性ウイルスは、同じ（Ｘｐｒ　１）受容体を利用するが、それらの種指向性が異なる。ＮＺＢ－９－１などどの異種指向性ウイルスは、ヒト及び他の種に感染するが、マウス種には感染せず、一方、多指向性ウイルス（例えば、フォーカス形成ウイルス（ＭＣＦ））は、マウス、ヒト及び他の種に感染する。

【０２６６】

γ－レトロウイルスベクターは、レトロウイルス構造及び酵素（ｇａｇｐｏｌ）ポリタンパク質をコードするプラスミド、エンベロープ（ｅｎｖ）タンパク質をコードするプラスミド、ならびに新たに形成されたウイルス粒子にパッケージングされる異種薬剤（例えば、ＣＡＲ及び／又はサイトカインなどの免疫調節物質）をコードするポリヌクレオチドを含むベクターｍＲＮＡをコードするプラスミドを含むいくつかのプラスミドで細胞を同時トランスフェクトすることによって、パッケージング細胞において産生され得る。γ－レトロウイルスベクターは、レトロウイルス構造及び酵素（ｇａｇｐｏｌ）ポリタンパク質をコードするプラスミド、エンベロープ（ｅｎｖ）タンパク質をコードするプラスミド、ならびに新たに形成されたウイルス粒子にパッケージングされるＣＡＲなどの抗原受容体をコードするポリヌクレオチドを含むベクターｍＲＮＡをコードするプラスミドを含む

いくつかのプラスミドで細胞を同時トランスフェクトすることによって、パッケージング細胞において産生され得る。γ－レトロウイルスベクターは、レトロウイルス構造及び酵素（ｇａｇｐｏｌ）ポリタンパク質をコードするプラスミド、エンベロープ（ｅｎｖ）タンパク質をコードするプラスミド、及び新たに形成されたウイルス粒子にパッケージングされるサイトカインなどの免疫調節物質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターｍＲＮＡをコードするプラスミドを含むいくつかのプラスミドで細胞を同時トランスフェクトすることによって、パッケージング細胞において産生され得る。γ－レトロウイルスベクターは、レトロウイルス構造及び酵素（ｇａｇｐｏｌ）ポリタンパク質をコードするプラスミド、エンベロープ（ｅｎｖ）タンパク質をコードするプラスミド、ならびにＣＡＲなどの抗原受容体及び新たに形成されたウイルス粒子にパッケージングされるサイトカインなどの免疫調節物質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターｍＲＮＡをコードするプラスミドを含むいくつかのプラスミドで細胞を同時トランスフェクトすることによって、パッケージング細胞において産生され得る。

【０２６７】

いくつかの態様では、組換えガンマレトロウイルスベクターは、他のウイルス由来のエンベロープタンパク質でシュードタイプ化される。エンベロープ糖タンパク質は、細胞指向性を増加／変更することができるウイルス粒子の外側脂質層に組み込まれる。例示的なエンベロープタンパク質としては、テナガザル白血病ウイルスエンベロープタンパク質（ＧＡＬＶ）もしくは水疱性口内炎ウイルスＧタンパク質（ＶＳＶ－Ｇ）、又はサル内在性レトロウイルスエンベロープタンパク質、又は麻疹ウイルスＨ及びＦタンパク質、又はヒト免疫不全ウイルスｇｐ１２０エンベロープタンパク質、又はコーカルベシクロウイルスエンベロープタンパク質が挙げられる（例えば、米国特許出願公開第２０１２／１６４１１８号を参照）。他の態様において、エンベロープ糖タンパク質は、標的化／結合リガンドをガンマレトロウイルスベクターに組み込むように遺伝子改変されてもよく、結合リガンドとしては、ペプチドリガンド、一本鎖抗体及び成長因子が挙げられるが、これらに限定されない（Ｗａｅｈｉｅｒ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｇｅｎｅｔ．２００７，８（８）：５７３－５８７）。これらの操作された糖タンパク質は、ベクターをそれらの対応する標的部分を発現する細胞に再標的化することができる。他の態様において、「分子架橋」は、ベクターを特定の細胞に指向するために導入され得る。分子架橋は二重特異性を有する：一方の末端はウイルス糖タンパク質を認識することができ、他方の末端は標的細胞上の分子決定基に結合することができる。このような分子架橋（例えば、リガンド受容体、アビジン－ビオチン、及び化学的結合、モノクローナル抗体及び操作された融合タンパク質）は、形質導入のための標的細胞へのウイルスベクターの結合を指向し得る（Ｙａｎｇ ｅｔ ａｌ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｂｉｏｅｎｇ．，２００８，１０１（２）：３５７－３６８、及びＭａｅｔｚｉｇ ｅｔ ａｌ．Ｖｉｒｕｓｅｓ，２０１１，３，６７７－７１３）。

【０２６８】

いくつかの実施形態では、組換えガンマレトロウイルスベクターは、自己不活性化（ＳＩＮ）ガンマレトロウイルスベクターである。ベクターは複製不能であってもよい。ＳＩＮベクターは、最初にエンハンサー／プロモータ活性を含む３’Ｕ３領域内に欠失を保有し得る。更に、５’Ｕ３領域は、サイトメガロウイルスもしくはＲＳＶに由来する強力なプロモータ（パッケージング細胞株において必要とされる）、又は選択された内部プロモータ、及び／又はエンハンサーエレメントで置換され得る。内部プロモータの選択は、特定の目的に必要とされる遺伝子発現の特定の要件に従って行うことができる。

【０２６９】

いくつかの実施形態では、異種薬剤（例えば、ＣＡＲ及び／又はサイトカインなどの免疫調節物質）をコードするポリヌクレオチドは、組換えウイルスゲノム内に挿入される。いくつかの実施形態では、ＣＡＲなどの抗原受容体をコードするポリヌクレオチドは、組換えウイルスゲノム内に挿入される。いくつかの実施形態では、サイトカインなどの免疫調節物質をコードするポリヌクレオチドは、組換えウイルスゲノム内に挿入される。いく

つかの実施形態では、ＣＡＲなどの抗原受容体、及びサイトカインなどの免疫調節物質をコードするポリヌクレオチドは、組換えウイルスゲノム内に挿入される。組換えγ－レトロウイルスベクターのウイルスｍＲＮＡの他の成分は、天然に存在する配列の挿入又は除去（例えば、ＩＲＥＳの挿入、目的のポリペプチド又は阻害性核酸をコードする異種ポリヌクレオチドの挿入、野生型プロモータの代わりの異なるレトロウイルス又はウイルス由来のより有効なプロモータのシャッフリングなど）によって改変され得る。いくつかの例において、組換えガンマレトロウイルスベクターは、改変されたパッケージングシグナル、及び／又はプライマー結合サイト（ＰＢＳ）、及び／又は５’－ロングターミナルリピート（ＬＴＲ）のＵ　３領域における５’－エンハンサー／プロモータエレメント、及び／又は３’－ＬＴＲのＵＳ領域において改変された３’－ＳＩＮエレメントを含み得る。これらの改変は、感染の力価及び能力を増加させ得る。異種薬剤（例えば、ＣＡＲ及び／又はサイトカインなどの免疫調節物質）を送達するのに適したガンマレトロウイルスベクターは、米国特許番号８，８２８，７１８、７，５８５，６７６、７，３５１，５８５、米国特許出願公開番号ＵＳ２００７／０４８２８５、ＰＣＴ出願公開番号ＷＯ２０１０／１１３０３７、ＷＯ２０１４／１２１００５、ＷＯ２０１５／０５６０１４、及び欧州特許番号ＥＰ１７５７７０２、ＥＰ１７５７７０３）に開示されているものから選択することができる。

【０２７０】

いくつかの実施形態では、異種薬剤（例えば、ＣＡＲ及び／又はサイトカインなどの免疫調節物質）をコードするポリヌクレオチドは、組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）ベクター中にパッケージングされ得る。いくつかの実施形態では、ＣＡＲなどの抗原受容体をコードするポリヌクレオチドは、組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）ベクターにパッケージングされ得る。いくつかの実施形態では、サイトカインなどの免疫調節物質をコードするポリヌクレオチドは、組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）ベクターにパッケージングされ得る。いくつかの実施形態では、ＣＡＲなどの抗原受容体及びサイトカインなどの免疫調節物質をコードするポリヌクレオチドは、組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）ベクターにパッケージングされてもよい。このようなベクター又はウイルス粒子は、公知の血清型キャプシド又は血清型キャプシドの組み合わせのいずれかを利用するように設計され得る。血清型カプシドは、任意の同定されたＡＡＶ血清型及びその変異体、例えば、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ２Ｇ９、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ４－４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２及びＡＡＶｒｈ１０に由来するカプシドを含み得る。いくつかの実施形態では、ＡＡＶ血清型は、米国特許出願公開番号ＵＳ２００３０１３８７７２、Ｐｕｌｉｃｈｅｒｌａ　ｅｔ　ａｌ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ．２０１１，１９（６）：１０７０－１０７８；米国特許第６，１５６，３０３号、第７，１９８，９５１号、米国特許出願公開番号ＵＳ２０１５／０１５９１７３及びＵＳ２０１４／０３５９７９９、ならびに国際特許出願公開番号ＷＯ１９９８／０１１２４４、ＷＯ２００５／０３３３２１及びＷＯ２０１４／１４４２２に記載されている配列であってもよく、又はそれを有してもよい。

【０２７１】

ＡＡＶベクターは、一本鎖ベクターだけでなく、自己相補的ＡＡＶベクター（ｓｃＡＡＶ）も含む。ｓｃＡＡＶベクターは、一緒にアニールして二本鎖ベクターゲノムを形成するＤＮＡを含有する。第２鎖合成をスキップすることによって、ｓｃＡＡＶは、細胞における迅速な発現を可能にする。ｒＡＡＶベクターは、ｓｆ９昆虫細胞又はＨＥＫ２９３細胞などのヒト細胞の懸濁細胞培養において、トリプルトランスフェクションなどの当技術分野における標準的な方法によって製造することができる。

【０２７２】

いくつかの実施形態では、非ウイルスベースの方法を使用することができる。例えば、いくつかの態様では、ポリヌクレオチドを含むベクターは、針、エレクトロポレーション、ソノポレーション、ハイドロポレーションなどの物理的方法、化学的担体、例えば無機粒子（例えば、リン酸カルシウム、シリカ、金）及び／又は化学的方法による非ウイルス

法によって細胞に移入され得る。他の態様では、カチオン性脂質、脂質ナノエマルジョン、ナノ粒子、ペプチドベースのベクター、又はポリマーベースのベクターなどの合成又は天然の生分解性薬剤を送達に使用することができる。

【０２７３】

いくつかの実施形態では、異種薬剤（例えば、ＣＡＲ及び／又はサイトカインなどの免疫調節物質）をコードするポリヌクレオチドは、送達のためのメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）として設計される。いくつかの実施形態では、ＣＡＲなどの抗原受容体をコードするポリヌクレオチドは、送達のためのメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）として設計される。いくつかの実施形態では、サイトカインなどの免疫調節物質をコードするポリヌクレオチドは、送達用のメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）として設計される。いくつかの実施形態では、ＣＡＲなどの抗原受容体、及びサイトカインなどの免疫調節物質をコードするポリヌクレオチドは、送達のためのメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）として設計される。

【０２７４】

いくつかの実施形態では、異種薬剤（例えば、ＣＡＲ及び／又はサイトカインなどの免疫調節物質）をコードするｍＲＮＡなどのポリヌクレオチドは、脂質ナノ粒子に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＣＡＲなどの抗原受容体をコードするｍＲＮＡなどのポリヌクレオチドは、脂質ナノ粒子に組み込まれる。いくつかの実施形態では、サイトカインなどの免疫調節物質をコードするｍＲＮＡなどのポリヌクレオチドは、脂質ナノ粒子に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＣＡＲなどの抗原受容体及びサイトカインなどの免疫調節物質をコードするｍＲＮＡなどのポリヌクレオチドは、脂質ナノ粒子に組み込まれる。いくつかの実施形態では、製剤は、少なくとも１つの脂質を含み得るナノ粒子である。脂質は、これらに限定されないが、ＤＬｉｎ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ、９８Ｎ１２－５、Ｃ１２－２００、ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ、ＤＯＤＭＡ、ＰＬＧＡ、ＰＥＧ、ＰＥＧ－ＤＭＧ及びＰＥＧ化脂質から選択され得る。別の態様では、脂質は、限定されないが、ＤＬｉｎ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｄ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＭＣ　３－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ及びＤＯＤＭＡなどのカチオン性脂質であってもよい。

【０２７５】

脂質ナノ粒子は、ｍＲＮＡを含む、カプセル化された又は会合した（例えば、複合体化された）治療剤の送達のために使用され得る。特に、いくつかのナノ粒子組成物は、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、アンチセンスオリゴヌクレオチド、プラスミドＤＮＡ、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、ｍｉＲＮＡ阻害剤（ａｎｔａｇｏｍｉｒ／ａｎｔｉｍｅｒｓ）、メッセンジャーＲＮＡ干渉相補ＲＮＡ（ｍｉｃＲＮＡ）、ＤＮＡ、多価ＲＮＡ、ダイサー基質ＲＮＡ、相補ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）、及び自己増幅ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）を含む核酸の送達に特に有用である。例えば、米国特許第１０，７２３，６９２　Ｂ２号を参照。

【０２７６】

したがって、本明細書において提供される方法の中には、ｇ－ＮＫ細胞又はｇ－ＮＫ細胞において濃縮された細胞の組成物もしくは集団への送達のための異種薬剤（例えば、ＣＡＲ及び／又はサイトカインなどの免疫調節物質）をコードするＤＮＡ、ＲＮＡ、ｍＲＮＡ、及び自己増幅ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）を含む核酸の送達のための方法がある。ｇ－ＮＫ細胞又はｇ－ＮＫ細胞において濃縮された細胞の組成物もしくは集団への送達のための、ＣＡＲなどの抗原受容体をコードするＤＮＡ、ＲＮＡ、ｍＲＮＡ、及び自己増幅ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）を含む核酸の送達のための方法も提供される。ｇ－ＮＫ細胞又はｇ－ＮＫ細胞において濃縮された細胞の組成物もしくは集団への送達のための、サイトカインなどの免疫調節物質をコードするＤＮＡ、ＲＮＡ、ｍＲＮＡ、及び自己増幅ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）を含む核酸の送達のための方法も提供される。ｇ－ＮＫ細胞又はｇ－ＮＫ細胞が濃縮された細胞の組成物もしくは集団への送達のための、ＣＡＲなどの抗原受容体及びサイトカインなどの免疫調節物質をコードするＤＮＡ、ＲＮＡ、ｍＲＮＡ及び自己増幅ＲＮＡ（ｓ

ａＲＮＡ）を含む核酸の送達方法も提供される。いくつかの実施形態では、異種薬剤（例えば、ＣＡＲ及び／又はサイトカインなどの免疫調節物質）は、核酸、例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ｍＲＮＡ、及び自己増幅ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）の送達のために、脂質ナノ粒子にパッケージ化又は組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＣＡＲなどの抗原受容体は、核酸、例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ｍＲＮＡ、及び自己増幅ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）の送達のために、脂質ナノ粒子にパッケージ化又は組み込まれる。いくつかの実施形態では、サイトカインなどの免疫調節物質は、核酸、例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ｍＲＮＡ、及び自己増幅ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）の送達のために、脂質ナノ粒子にパッケージ化又は組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＣＡＲなどの抗原受容体、及びサイトカインなどの免疫調節物質は、核酸、例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ｍＲＮＡ、及び自己増幅ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）の送達のために、脂質ナノ粒子にパッケージングされるか、又は組み込まれる。いくつかの実施形態では、核酸は、ＤＮＡである。いくつかの実施形態では、核酸は、ＲＮＡである。いくつかの実施形態では、核酸はｍＲＮＡである。いくつかの実施形態では、核酸は自己増幅ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）である。

【０２７７】

いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは自己増幅ｍＲＮＡである。自己増幅ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）は、サブゲノムプロモータと共に５’及び３’保存配列エレメント（ＣＳＥ）及びｎｓＰ　１～４遺伝子の存在を通じて自己増幅することができる。例えば、Ｂｌｏｏｍ，ｖａｎ　ｄｅｎ　Ｂｅｒｇ，ａｎｄ　Ａｒｂｕｔｈｎｏｔ，Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ，２０２１を参照。ｉｎ　ｓｉｔｕ翻訳に続いて、ｎｓＰ１－４タンパク質はＲｄＲｐ複合体を形成し、これはフレーキングＣＳＥ配列を認識し、ＲＮＡ内に含まれる配列を増幅する。ｓａＲＮＡの標的細胞への導入は、脂質ナノ粒子送達を介して行うことができる。いくつかの実施形態では、そのような自己増幅ＲＮＡは、国際特許出願公開第ＷＯ２０１１　０５７９９号に教示されるもののいずれかの構造的特徴又は構成要素を有し得る。

【０２７８】

いくつかの実施形態では、提供される方法は、異種薬剤（例えば、ＣＡＲ及び／又はサイトカインなどの免疫調節物質）をコードするｍＲＮＡを含む脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）の使用を含む。いくつかの実施形態では、提供される方法は、ＣＡＲなどの抗原受容体をコードするｍＲＮＡを含む脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）の使用を含む。いくつかの実施形態では、提供される方法は、サイトカインなどの免疫調節物質をコードするｍＲＮＡを含む脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）の使用を含む。いくつかの実施形態では、提供される方法は、ＣＡＲなどの抗原受容体及びサイトカインなどの免疫調節物質をコードするｍＲＮＡを含む脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）の使用を含む。いくつかの実施形態では、異種薬剤（例えば、ＣＡＲ及び／又はサイトカインなどの免疫調節物質）をコードするｍＲＮＡは、インビトロ転写などの当技術分野で公知の方法を使用して産生され得る。いくつかの実施形態では、ＣＡＲなどの抗原受容体をコードするｍＲＮＡは、インビトロ転写などの当技術分野において公知の方法を用いて産生することができる。いくつかの実施形態では、サイトカインなどの免疫調節物質をコードするｍＲＮＡは、インビトロ転写などの当技術分野で公知の方法を使用して産生することができる。いくつかの実施形態では、ＣＡＲなどの抗原受容体及びサイトカインなどの免疫調節物質をコードするｍＲＮＡは、インビトロ転写などの当技術分野において公知の方法を用いて作製することができる。本方法のいくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは５’キャップを含む。いくつかの実施形態では、５’キャップは、メッセンジャーＲＮＡなどの一次転写物の５’末端上の改変されたヌクレオチドである。いくつかの態様では、ｍＲＮＡの５’キャップは、ＲＮＡ安定性及び処理、ｍＲＮＡ代謝、核内のＲＮＡ転写物の処理及び成熟、核から細胞質へのｍＲＮＡの輸送、ｍＲＮＡ安定性、ならびにｍＲＮＡのタンパク質への効率的な翻訳のうちの１つ以上を改善する。いくつかの実施形態では、５’キャップは、天然に存在する５’キャップ、又はｍＲＮＡの天然に存在するキャップとは異なるものであり得る。５’キャップは、当業者に公知の任意の５’キャップであり得る。特定の実施形態では、５’キャップは、抗リバースキャップアナログ（ＡＲＣＡ）キャップ、７－メチル－グアノシン（７ｍＧ）キャップ、ＣｌｅａｎＣａｐ（

登録商標）アナログ、ワクシニアキャップ、及びそれらのアナログからなる群から選択される。例えば、５’キャップは、非限定的に、抗リバースキャップ類似体（ＡＲＣＡ）（米国特許第７０７４５９６号）、７－メチル－グアノシン、ＣｌｅａｎＣａｐ（登録商標）類似体、例えばＣａｐ　１類似体（Ｔｒｉｌｉｎｋ；Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）を含み得、又は例えば、ワクシニアキャッピング酵素などを使用して酵素的にキャッピングされる。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡはポリアデニル化されていてもよい。ｍＲＮＡは、コードされた操作された異種薬剤（例えば、ＣＡＲ及び／もしくはサイトカインなどの免疫調節物質）の発現ならびに／又はｍＲＮＡ自体の安定性を増強するために、様々な５’及び３’非翻訳配列エレメントを含有し得る。ｍＲＮＡは、ＣＡＲなどのコードされた操作された抗原受容体の発現、及び／又はｍＲＮＡ自体の安定性を増強するために、様々な５’及び３’非翻訳配列エレメントを含有し得る。ｍＲＮＡは、コードされた操作された免疫調節物質（例えば、サイトカイン）の発現及び／又はｍＲＮＡ自体の安定性を増強するために、種々の５’及び３’非翻訳配列エレメントを含み得る。ｍＲＮＡは、ＣＡＲなどのコードされた操作された抗原受容体、及びサイトカインなどの免疫調節物質の発現、ならびに／又はｍＲＮＡ自体の安定性を増強するために、様々な５’及び３’非翻訳配列エレメントを含有し得る。このようなエレメントには、例えば、ウッドチャック肝炎ウイルス翻訳後調節エレメントなどの翻訳後調節エレメントが含まれ得る。

【０２７９】

いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、少なくとも１つのヌクレオシド改変を含む。ｍＲＮＡは、天然に存在するヌクレオシドのヌクレオシド類似体への改変を含有し得る。当該分野で公知の任意のヌクレオシドアナログが想定される。このようなヌクレオシド類似体としては、例えば、米国特許第８，２７８，０３６号に記載されているものを挙げることができる。本方法の特定の実施形態では、ヌクレオシド改変は、ウリジンからプソイドウリジンへの改変及びウリジンからＮｌｍｅｔｈｙｌプソイドウリジンへの改変からなる群から選択される。本方法の特定の実施形態において、ヌクレオシド改変は、ウリジンからプソイドウリジンへである。

【０２８０】

本方法において特に有用なＬＮＰは、ＤＬｉｎ－ＤＭＡ（１，２－ジリノレイルオキシ－３－ジメチルアミノプロパン）、ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ（ジリノレイルメチル－４－ジメチルアミノブチラート）、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ（２，２－ジリノレイル－４－（２－ジメチルアミノエチル）－［１，３］－ジオキソラン）、ＤＯＤＭＡ（１，２－ジオレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパン）、ＳＳ－ＯＰ（ビス［２－（４－｛２－［４－（シス－９オクタデセノイルオキシ）フェニルアセトキシ］エチル｝ピペリジニル）エチル］ジスルフィド）、及びそれらの誘導体から選択されるカチオン性脂質を含む。ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ及びその誘導体は、例えば、ＷＯ２０１０１４４７４０に記載されている。ＤＯＤＭＡ及びその誘導体は、例えば、ＵＳ７，７４５，６５１及びＭｏｋ　ｅｔ　ａｌ．（１９９９），Ｂｉｏｃｈｉｍｉｃａ　ｅｔ　Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａ　Ａｃｔａ，４１９（２）：１３７－１５０に記載されている。ＤＬｉｎ－ＤＭＡ及びその誘導体は、例えば、ＵＳ７，７９９，５６５に記載されている。ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ及びその誘導体は、例えば、ＵＳ９，１３９，５５４に記載されている。ＳＳ－ＯＰ（ＮＯＦ　Ａｍｅｒｉｃａ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｗｈｉｔｅ　Ｐｌａｉｎｓ，ＮＹ）は、例えばｗｗｗ．ｎｏｆａｍｅｒｉｃａ．ｃｏｍ／ｓｔｏｒｅ／ｉｎｄｅｘ．ｐｈｐ？ｄｉｓｐａｔｃｈ＝ｐｒｏｄｕｃｔｓ．ｖｉｅｗ　＆ｐｒｏｄｕｃｔ＿ｉｄ＝９６２に記載されている。陽イオン性脂質の更なる非限定的な例としては、メチルピリジルジアルキル酸（ＭＰＤＡＣＡ）、パルミトイル－オレオイル－ノル－アルギニン（ＰＯＮＡ）、グアニジノ－ジアルキル酸（ＧＵＡＤＡＣＡ）、１，２－ジ－Ｏ－オクタデセニル－３－トリメチルアンモニウムプロパン（ＤＯＴＭＡ）、１，２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）、ビス｛２－［Ｎ－メチル－Ｎ－（α－Ｄ－トコフェロールヘミスクシネートプロピル）アミノ］エチル｝ジスルフィド（ＳＳ－３３／３ＡＰ０５）、ビス｛２－［４－（ａ－Ｄ－トコフェロールヘミスクシネートエ

チル）ピペリジル］エチル｝ジスルフィド（ＳＳ３３／４ＰＥ１５）、ビス｛２－［４－（シス－９－オクタデカジエノエートエチル）－１－ピペリジニル］エチル｝ジスルフィド（ＳＳ１８／４ＰＥ１６）、及びビス｛２－［４－（シス，シス－９，１２－オクタデカジエノエートエチル）－１－ピペリジニル］エチル｝ジスルフィド（ＳＳ１８／４ＰＥ１３）が含まれる。更なる実施形態では、脂質ナノ粒子はまた、１つ以上の非カチオン性脂質及び脂質コンジュゲートを含む。

【０２８１】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質のモル濃度は、総脂質モル濃度の約２０％～約８０％、約３０％～約７０％、約４０％～約６０％、約４５％～約５５％、又は約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、又は約８０％であり、総脂質モル濃度は、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、及び脂質複合体モル濃度の合計である。特定の実施形態では、脂質ナノ粒子は、約１～約２０、約２～約１６、約４～約１２、約６～約１０、又は約１、約２、約３、約４、約５、約６、約７、約８、約９、約１０、約１１、約１２、約１３、約１４、約１５、約１６、約１７、約１８、約１９、もしくは約２０のｍＲＮＡに対するカチオン性脂質のモル比を含む。

【０２８２】

いくつかの実施形態では、本開示の方法で利用される脂質ナノ粒子は、少なくとも１つの非カチオン性脂質を含み得る。特定の実施形態では、非カチオン性脂質のモル濃度は、総脂質モル濃度の約２０％～約８０％、約３０％～約７０％、約４０％～約７０％、約４０％～約６０％、約４６％～約５０％、又は約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約４８．５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、又は約８０％である。非カチオン性脂質としては、いくつかの実施形態では、リン脂質及びステロイドが挙げられる。

【０２８３】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の脂質ナノ粒子に有用なリン脂質としては、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）、１，２－ジデカノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＤＰＣ）、１，２－ジエルコイル－ｓｎ－グリセロ－３－リン酸（ナトリウム塩）（ＤＥＰＡ－ＮＡ）、１，２－ジエルコイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＥＰＣ）、１，２－ジエルコイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＥＰＥ）、１，２－ジエルコイル－ｓｎ－グリセロ－３［ホスホ－ｒａｃ－（１－グリセロール）（ナトリウム塩）（ＤＥＰＧ－ＮＡ）、１、２－ジリノレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＬＯＰＣ）、１，２－ジラウロイル－ｓｎ－グリセロ－３－リン酸（ナトリウム塩）（ＤＬＰＡ－ＮＡ）、１，２－ジラウロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＬＰＣ）、１，２－ジラウロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＬＰＥ）、１，２－ジラウロイル－ｓｎ－グリセロ－３［ホスホ－ｒａｃ－（１－グリセロール．．．）（ナトリウム塩）（ＤＬＰＧ－ＮＡ），１，２－ジラウロイル－ｓｎ－グリセロ－３［ホスホ－ｒａｃ－（１－グリセロール）（アンモニウム塩）（ＤＬＰＧ－ＮＨ４）、１，２－ジラウロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホセリン（ナトリウム塩）（ＤＬＰＳ－ＮＡ）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－リン酸（ナトリウム塩）（ＤＭＰＡ－ＮＡ）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＭＰＣ）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３［ホスホ－ｒａｃ－（１－グリセロール）（ナトリウム塩）（ＤＭＰＧ－ＮＡ）、ｌ、２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３［ホスホ－ｒａｃ－（１－グリセロール）（アンモニウム塩）（ＤＭＰＧ－ＮＨ４），１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３［ホスホ－ｒａｃ－（１－グリセロール）（ナトリウム／アンモニウム塩）（ＤＭＰＧ－ＮＨ４／ＮＡ）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホセリン（ナトリウム）塩）（ＤＭＰＳ－ＮＡ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－リン酸（ナトリウム塩）（ＤＯＰＡ－ＮＡ）、１，２－ジオレオイル

－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＯＰＣ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３［ホスホ－ｒａｃ－（１－グリセロール）（ナトリウム塩）（ＤＯＰＧ－ＮＡ）、ｌ、２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホセリン（ナトリウム塩）（ＤＯＰＳ－ＮＡ）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－リン酸（ナトリウム塩）（ＤＰＰＡ－ＮＡ）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＰＰＣ）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３［ホスホ－ｒａｃ－（１－グリセロール）（ナトリウム塩）（ＤＰＰＧ－ＮＡ）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３［ホスホ－ｒａｃ－（１－グリセロール）（アンモニウム塩）（ＤＰＰＧ－ＮＨ４）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホセリン（ナトリウム塩）（ＤＰＰＳ－ＮＡ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－リン酸（ナトリウム塩）（ＤＳＰＡ－ＮＡ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＳＰＥ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３［ホスホ－ｒａｃ－（１－グリセロール）（ナトリウム塩）（ＤＳＰＧ－ＮＡ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３［ホスホ－ｒａｃ－（１－グリセロール）（アンモニウム塩）（ＤＳＰＧ－ＮＨ４）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホセリン（ナトリウム塩）（ＤＳＰＳ）－ＮＡ）、Ｅｇｇ－ＰＣ（ＥＰＣ）、水素添加卵ＰＣ（ＨＥＰＣ）、水素添加大豆ＰＣ（ＨＳＰＣ）、１－ミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＬＹＳＯＰＣＭＹＲＩＳＴＩＣ）、１－パルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＬＹＳＯＰＣＰＡＬＭＩＴＩＣ）、１－ステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＬＹＳＯＰＣステアリック）、１－ミリストイル－２－パルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＭＰＰＣ）、１－ミリストイル－２－ステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＭＳＰＣ））、１－パルミトイル－２－ミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＰＭＰＣ）、１－パルミトイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＰＯＰＣ）、１－パルミトイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、１－パルミトイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３［ホスホ－ｒａｃ－（１－グリセロール）］（ナトリウム塩）（ＰＯＰＧ－ＮＡ）、１－パルミトイル－２－ステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＰＳＰＣ）、１－ステアロイル－２－ミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＳＭＰＣ）、１－ステアロイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＳＯＰＣ）、及び１－ステアロイル－２－パルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＳＰＰＣ）が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、リン脂質は、ＤＳＰＣである。いくつかの実施形態では、リン脂質は、ＤＯＰＥである。いくつかの実施形態では、リン脂質は、ＤＯＰＣである。

【０２８４】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子に含まれる非カチオン性脂質は、１つ以上のステロイドを含む。本明細書に記載の脂質ナノ粒子に有用なステロイドとしては、コレステロールなどのコレスタン、コール酸などのコラン、プロゲステロンなどのプレグナン、テストステロンなどのアンドロスタン、及びエストラジオールなどのエストランが挙げられるが、これらに限定されない。更なるステロイドとしては、コレステロール（ヒツジ）、コレステロール硫酸、デスモステロール－ｄ６、コレステロール－ｄ７、ラトステロール－ｄ７、デスモステロール、スチグマステロール、ラノステロール、デヒドロコレステロール、ジヒドロラノステロール、チモステロール、ラトステロール、チモステロール－ｄ５、１４－デメチル－ラノステロール、１４－デメチル－ラノステロール－ｄ６、８（９）－デヒドロコレステロール、８（１４）－デヒドロコレステロール、ジオスゲニン、ＤＨＥＡ硫酸、ＤＨＥＡ、ラノステオールド６、ジヒドロラノステロール－ｄ７、カンペステロール－ｄ６、シトステロール、ラノステロール－９５、ジヒドロＦＦ－ＭＡＳ－ｄ６、ジモステノール－ｄ７、ジモステノール、シトスタノール、カンペスタノール、カンペステロール、７－デヒドロデスモステロール、プレグネノロン、シトステロール－ｄ　７

、ジヒドロＴ－ＭＡＳ、δ５－アベナステロール、ブラシカステロール、ジヒドロＦＦ－ＭＡＳ、２４－メチレンコレステロール、コール酸誘導体、コレステロールエステル、及びグリコシル化ステロールが挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、脂質ナノ粒子はコレステロールを含む。

【０２８５】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、脂質コンジュゲートを含む。このような脂質複合体には、Ｃ８ＰＥＧ２０００セラミド、Ｃ１６ＰＥＧ２０００セラミド、Ｃ８ＰＥＧ５０００セラミド、Ｃ１６ＰＥＧ５０００セラミド、Ｃ８ＰＥＧ７５０セラミド、Ｃ１６ＰＥＧ７５０セラミド等のセラミドＰＥＧ誘導体、ホスホエタノールアミンＰＥＧ誘導体、例えば、１６：０ＰＥＧ５０００ＰＥ、１４：０ＰＥＧ５０００ＰＥ、１８：０ＰＥＧ５０００ＰＥ、１８：１ＰＥＧ５０００ＰＥ、１６：０ＰＥＧ３０００ＰＥ、１４：０ＰＥＧ３０００ＰＥ、１８：０ＰＥＧ３０００ＰＥ、１８：１ＰＥＧ３０００ＰＥ、１６：０ＰＥＧ２０００ＰＥ、１４：０ＰＥＧ２０００ＰＥ、１８：０ＰＥＧ２０００ＰＥ、１８：１ＰＥＧ２０００ＰＥ１６：０ＰＥＧ１０００ＰＥ、１４：０ＰＥＧ１０００ＰＥ、１８：０ＰＥＧ１０００ＰＥ、１８：１ＰＥＧ１０００ＰＥ、１６：０ＰＥＧ７５０ＰＥ、１４：０ＰＥＧ７５０ＰＥ、１８：０ＰＥＧ７５０ＰＥ、１８：１ＰＥＧ７５０ＰＥ、１６：０ＰＥＧ５５０ＰＥ、１４：０ＰＥＧ５５０ＰＥ、１８：０ＰＥＧ５５０ＰＥ、１８：１ＰＥＧ５５０ＰＥ、１６：０ＰＥＧ３５０ＰＥ、１４：０ＰＥＧ３５０ＰＥ、１８：０ＰＥＧ３５０ＰＥ、及び１８：１ＰＥＧ３５０、ステロールＰＥＧ誘導体、例えば、Ｃｈｏｌ－ＰＥＧ６００、及びＤＭＧ－ＰＥＧ５０００、ＤＳＧ－ＰＥＧ５０００、ＤＰＧ－ＰＥＧ５０００、ＤＭＧ－ＰＥＧ３０００、ＤＳＧ－ＰＥＧ３０００、ＤＰＧ－ＰＥＧ３０００、ＤＭＧ－ＰＥＧ２０００、ＤＳＧ－ＰＥＧ２０００、ＤＰＧ－ＰＥＧ２０００、ＤＭＧ－ＰＥＧ１０００、ＤＳＧ－ＰＥＧ１０００、ＤＰＧ－ＰＥＧ１０００、ＤＭＧ－ＰＥＧ７５０、ＤＳＧ－ＰＥＧ７５０、ＤＰＧ－ＰＥＧ７５０、ＤＭＧ－ＰＥＧ５５０、ＤＳＧ－ＰＥＧ５５０、ＤＰＧ－ＰＥＧ５５０、ＤＭＧ－ＰＥＧ３５０、ＤＳＧ－ＰＥＧ３５０、及びＤＰＧ－ＰＥＧ３５０などのグリセロールＰＥＧ誘導体が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、脂質複合体は、ＤＭＧ－ＰＥＧである。いくつかの実施形態では、脂質複合体は、ＤＭＧ－ＰＥＧ２０００である。いくつかの実施形態では、脂質複合体はＤＭＧ－ＰＥＧ５０００である。

【０２８６】

例えば、選択された脂質の特徴、意図される標的細胞への送達の性質（例えば、ｇ－ＮＫ細胞濃縮組成物）、及び送達されるｍＲＮＡの特徴に基づいて、脂質ナノ粒子を含むカチオン性脂質、非カチオン性脂質及び／又は脂質コンジュゲート、ならびにそのような脂質の互いに対する相対モル比を選択することは、当業者のレベルの範囲内である。更なる考慮事項としては、例えば、アルキル鎖の飽和、ならびに選択された脂質のサイズ、電荷、ｐＨ、ｐＫａ、融合性及び毒性が挙げられる。したがって、各個々の成分のモル比は、それに応じて調整することができる。

【０２８７】

本方法で使用するための脂質ナノ粒子は、当業者に公知の様々な技術によって調製することができる。核酸－脂質粒子及びそれらの調製方法は、例えば、米国特許公開第２００４０１４２０２５号及び同第２００７００４２０３１号に開示されている。

【０２８８】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、約２５～約５００ｎｍの範囲内のサイズを有する。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、約５０ｎｍ～約３００ｎｍ、又は約６０ｎｍ～約１２０ｎｍのサイズを有する。脂質ナノ粒子のサイズは、準電光散乱（ＱＥＬＳ）によって決定でき、Ｂｌｏｏｍｆｉｅｌｄ，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．，１０：４２１Ａ１５０（１９８１）に記載されている。特定のサイズ範囲の脂質ナノ粒子の集団を産生するための様々な方法、例えば、超音波処理又はホモジナイゼーションが当技術分野において公知である。このような方法の１つが米国特許第４，７３７，３２３号に記載されている。

【０２８９】
いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、脂質ナノ粒子をＮＫ細胞、例えばｇ－ＮＫ細胞に選択的に結合させる、脂質ナノ粒子の表面に固定された免疫細胞標的化分子、例えば、標的化リガンド（例えば、抗体、ｓｃＦｖタンパク質、ＤＡＲＴ分子、ペプチド、アプタマーなど）を含む。
【０２９０】
いくつかの実施形態では、核酸の導入は、エレクトロポレーションによって行うことができる。いくつかの実施形態では、核酸は、エレクトロポレーションを介してｇ－ＮＫ細胞に導入される。いくつかの実施形態では、核酸は、ＤＮＡである。いくつかの実施形態では、核酸は、ＲＮＡである。いくつかの実施形態では、ＲＮＡはｍＲＮＡである。いくつかの実施形態では、ＲＮＡは三重特異性である。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡ又はｓａＲＮＡなどの核酸は、エレクトロポレーションによる送達のために脂質ナノ粒子に組み込まれる。
【０２９１】
ＩＩＩ．遺伝子編集
いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、遺伝子編集によって遺伝子操作されて、ｇ－ＮＫ細胞による１つ以上の遺伝子の発現を変化させ（例えば、低下させ）、それによって、ＮＫ細胞の１つ以上の特性又は活性を変化させ得る。例えば、遺伝子編集のための戦略は、ｇ－ＮＫ細胞上の標的抗原の発現に起因するフラトリサイド（自己死滅）を低減する１つ以上の戦略を含むことができる。特に免疫無防備状態のＨＬＡ適合レシピエントに注入された場合、又は場合によってはＨＬＡ不適合レシピエントにも注入された場合に、移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）をもたらし得る望ましくない免疫反応性を低下させ、又は、特に腫瘍微小環境における宿主因子による免疫抑制を減少させる。いくつかの実施形態では、１つ以上の遺伝子編集戦略によって操作されたものを含む、操作されたｇ－ＮＫ細胞は、遺伝子編集を伴わない類似のＮＫ細胞と比較して、増強されたＮＫ細胞応答特性、例えば、増強された標的認識、増強されたＮＫ細胞応答レベル及び／もしくは持続時間、改善されたＮＫ細胞生存、遅延されたＮＫ細胞疲弊、ならびに／又は増強された標的認識を示す。
【０２９２】
いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、ＦｃＲγ鎖をコードする遺伝子を破壊又はノックアウトする遺伝子編集によって産生される。いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞は、ヒトＦｃＲγ鎖タンパク質の発現又は活性を低減又は排除するように遺伝子操作される。いくつかの実施形態では、遺伝子破壊は、オープンリーディングフレーム内のフレームシフト変異及び／又は未成熟終止コドンなどの、遺伝子における挿入、欠失又は変異をもたらす。ＦｃＲのノックアウト又は破壊のための方法γＮＫ細胞における鎖は、ＰＣＴ国際公開番号ＷＯ２０１８／１４８４６２及びＬｉｕ　ｅｔ　ａｌ．ｉＳｃｉｅｎｃｅ，２０２０；２３：１０１７０９に記載されている。
【０２９３】
当業者は、ＦｃＲγ鎖遺伝子を破壊するための多くの適切な方法があることを理解するであろう。例えば、全遺伝子座、例えばＦｃＲγ遺伝子座は欠失していてもよい。場合によっては、遺伝子の一部、例えばエクソン又はドメインを欠失させることも適切である。具体的には、ＦｃＲγのＩＴＡＭシグナル伝達ドメインが欠失していてもよい。あるいは、提供される方法はまた、ＦｃＲγ遺伝子座、例えば不活性化突然変異などの遺伝子座に１つ以上のアミノ酸置換を導入することを含む。いくつかの実施形態では、停止コドンをＦｃＲｍγＲＮＡなどのｍＲＮＡに導入して、ＦｃＲγシグナル伝達アダプターなどの発現遺伝子の切断型及び／又は不活化型を産生することができる。いくつかの実施形態では、ＦｃＲγシグナル伝達アダプターの発現、活性及び／又はシグナル伝達を低下させるために、ＦｃＲγ遺伝子などの遺伝子の調節エレメントを変異又は欠失させることもできる。
【０２９４】

いくつかの実施形態では、遺伝子破壊は、部位特異的エンドヌクレアーゼを使用して哺乳動物細胞において行うことができる。遺伝子の部位特異的欠失を可能にするエンドヌクレアーゼは、当技術分野において公知であり、ＴＡＬヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ（例えば、Ｃａｓ９）、及びアルゴノートを含み得る。操作された部位特異的エンドヌクレアーゼを産生するための方法は、当該分野で公知である。部位特異的エンドヌクレアーゼは、ＦｃＲγ鎖遺伝子などの特定の遺伝子を認識及び欠失又は改変するように操作することができる。

【０２９５】

いくつかの実施形態では、提供されるｇ－ＮＫは、ｇ－ＮＫ細胞のゲノムを編集することによって操作される。いくつかの実施形態では、ゲノムの編集は、ＮＫ細胞の出発試料からｇ－ＮＫ細胞サブセットを濃縮する方法で実施され得る。したがって、提供される方法は、ＦｃＲγ鎖が欠損しているＮＫ細胞について選択されたｇ－ＮＫ細胞のみ（又はｇ－ＮＫ代用マーカープロファイルによって選択又は同定されたもののみ）のゲノムを選択編集することを必要としないが、ｇ－ＮＫ細胞が優先的に増殖又は濃縮される、又は増殖又は濃縮されたＮＫ細胞の組成物の遺伝子編集を伴い得ることが理解される。したがって、ｇ－ＮＫ細胞が濃縮された細胞の最終組成物は、異種抗原受容体（例えば、ＣＡＲ）、異種サイトカイン（例えば、ＩＬ－１５もしくはＩＬ－２１などの分泌型もしくは膜結合型インターロイキン）、又は異種抗原受容体及びサイトカインが導入され、遺伝子編集されたｇ－ＮＫ細胞を含む。ｇ－ＮＫ細胞が濃縮された組成物を調製及び増殖するための例示的な方法は、セクションＶに提供される。

【０２９６】

いくつかの実施形態では、ゲノムの編集は、セクションＶに記載されているような、ｇ－ＮＫ細胞を増殖させる方法中の任意の適切な時点で行われてもよい。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、対象からの細胞の選択（例えば、ＣＤ３^{neg}ＣＤ５７^{pos}又はＣＤ３^{neg}ＣＤ５６^{pos}である細胞の選択又は濃縮）後、ＮＫ細胞の増殖又は増殖のために、選択又は濃縮された細胞をフィーダー細胞（例えば、ＨＬＡ－Ｅ発現フィーダー細胞）と共にインキュベート又は培養する前に行われる。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、フィーダー細胞（例えば、ＨＬＡ－Ｅ発現フィーダー細胞）とのインキュベーション又は培養の後、したがって、選択又は濃縮された細胞が増殖又は増殖した後に行われる。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、抗原受容体（例えば、ＣＡＲ）及び／又は免疫調節物質（例えば、分泌型又は膜結合型インターロイキンなどのサイトカイン、例えば、ＩＬ－１５又はＩＬ－２１）を導入するための方法を用いて、任意の順序で逐次的に行われる。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、ＣＡＲなどの抗原受容体を導入するための方法を用いて、任意の順序で逐次的に行われる。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、サイトカインなどの免疫調節物質を導入するための方法を用いて、任意の順序で連続的に実施される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、ＣＡＲなどの抗原受容体、及びサイトカインなどの免疫調節物質を導入するための方法を用いて、任意の順序で逐次的に行われる。

【０２９７】

標的遺伝子発現をノックアウトするための方法としては、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、Ｔａｌｅ－エフェクタードメインヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、及びＣＲＩＰＳＲ／Ｃａｓ系が挙げられるが、これらに限定されない。このような方法は、典型的には、例えば１つ以上のドナー配列の存在下で、ヌクレアーゼが内因性遺伝子の改変を媒介するように、１つ以上のヌクレアーゼをコードする１つ以上のポリヌクレオチドを細胞に投与することを含み、その結果、ドナーは、ヌクレアーゼによって標的化される内因性遺伝子に組み込まれる。１つ以上のドナー分子の組込みは、相同組換え修復（ＨＤＲ）を介して、又は非相同末端結合（ＮＨＥＪ）関連修復によって生じる。特定の実施形態において、ヌクレアーゼの１つ以上の対が使用され、このヌクレアーゼは、同じ核酸又は異なる核酸によってコードされ得る。

【０２９８】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）を使用して行われる。ＺＦＮは、ＦｏｋＩエンドヌクレアーゼの非特異的切断ドメイン（Ｎ）及びジンクフィンガータンパク質（ＺＦＰ）を含む融合タンパク質である。ＺＮＦの対は、標的遺伝子中の特定の遺伝子座を認識することに関与しており、一方は改変される部位の上流の配列を認識し、他方は下流の配列を認識し、ＺＦＮのヌクレアーゼ部分は特定の遺伝子座で切断し、標的遺伝子のノックアウトを引き起こす。遺伝子発現を減少させるためにＺＦＮを使用する方法は、例えば、米国特許番号９，０４５，７６３、及びＤｕｒａｉ ｅｔ ａｌ.「Ｚｉｎｃ Ｆｉｎｇｅｒ Ｎｕｃｌｅａｓｅｓ：Ｃｕｓｔｏｍ－Ｄｅｓｉｇｎｅｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｓｃｉｓｓｏｒｓ ｆｏｒ Ｇｅｎｏｍｅ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ｏｆ Ｐｌａｎｔ ａｎｄ Ｍａｍｍａｌｉａｎ ｃｅｌｌｓ」Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ３３（１８）：５９７８－５９９０（２００５）に開示されているように、公知であり、その開示はその全体が参照により組み込まれる。

【０２９９】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮＳ）を使用して行われる。ＴＡＬＥＮは、ゲノム部位の周囲に対として結合し、同じ非特異的ヌクレアーゼであるＦｏｋＩに特異的部位でゲノムを切断させるが、ＤＮＡトリプレットを認識する代わりに、各ドメインが単一ヌクレオチドを認識するという点で、ＺＦＮと類似している。遺伝子発現を減少させるためにＺＦＮを使用する方法も公知であり、例えば、米国特許第９，００５，９７３号、及びＣｈｒｉｓｔｉａｎ ｅｔ ａｌ.「Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ＤＮＡ Ｄｏｕｂｌｅ－Ｓｔｒａｎｄ Ｂｒｅａｋｓ ｗｉｔｈ ＴＡＬ Ｅｆｆｅｃｔｏｒ Ｎｕｃｌｅａｓｅｓ」Ｇｅｎｅｔｉｃｓ １８６（２）：７５７－７６１（２０１０）に開示されており、これらの開示は、その全体が参照により組み込まれる。

【０３００】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、ＲＮＡ誘導型ヌクレアーゼを使用して実施される。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ誘導型ヌクレアーゼは、ＲＮＡ誘導型ＤＮＡエンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ誘導型ヌクレアーゼは、ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼである。ＲＮＡ誘導型ヌクレアーゼの非限定的な例としては、ＰＣＴ公開第ＷＯ２０２０／１６８３００号（例えば、その中の表２）に記載されている任意のものが挙げられる。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ誘導型ヌクレアーゼは、Ｃａｓ９又はＣａｓ１２ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ誘導型ヌクレアーゼは、Ｃｐｆｌ （Ｃａｓ１２ａ）である。いくつかの実施形態では、Ｃｐｆ １は、アシダミノコッカス属の種（Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ.）Ｃｐｆｌ（ＡｓＣｐｆｌ）である。

【０３０１】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、ＲＮＡ誘導型ヌクレアーゼ及び誘導ＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を用いて行われる。これらの２つの成分は、特定の核酸配列と会合し、例えば、一本鎖切断（ＳＳＢ又はニック）、二本鎖切断（ＤＳＢ）及び／又は点突然変異のうちの１つ以上を行うことによって、その核酸配列中又はその周囲のＤＮＡを編集することができる複合体を形成する。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、ｃｒＲＮＡと、任意選択で、ｔｒａｃｒＲＮＡとを含む。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ誘導型ヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９又はＣａｓ１２）及び１つ以上のｇＲＮＡは、ｇＲＮＡ（例えば、ｃｒＲＮＡ）の標的化（又はスペーサー）配列に相補的な特定の遺伝子座と会合し（すなわち、標的とし）、切断するリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体を形成する。いくつかの実施形態では、Ｃａｓは、化膿性連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ）由来などのＣａｓ９ヌクレアーゼである。本明細書で使用されるエンドヌクレアーゼは、合成Ｃａｓ９に典型的に使用される化膿性連鎖球菌のＣａｓ９（ＳｐＣａｓ９）に限定されないことが理解される。一態様では、Ｃａｓ９は異なる細菌源に由来し得る。Ｃａｓ９の置換はまた、標的特異性を増加させるために使用することができ、したがって、使

用する必要があるｇＲＮＡが少なくなる。したがって、例えば、Ｃａｓは、黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ）（ＳａＣａｓ９）、アシダミノコッカス属の種（ＡｓＣｐｆ１）、ラクノスピラ科（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃａｓｅ）の細菌に由来（ＬｂＣｐｆ１）するプレボテラ（Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ）及びフランシセラ（Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ）１由来（Ｃｐｆ１）の、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（Ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ　Ｒｅｇｕｌａｒｌｙ　Ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ　Ｓｈｏｒｔ　Ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ　Ｒｅｐｅａｔｓ）、ナイセリア・メニンギティディス（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ　ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）（ＮｍＣａｓ９）、ストレプトコッカス・サーモフィルス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）（ＳｔＣａｓ９）、カンピロバクター・ジェジュニ（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ　ｊｅｊｕｎｉ）（ＣｊＣａｓ９）、ｅｎｈａｎｃｅｄ　ＳｐＣａｓ９（ｅＳｐＣａｓ９）、ＳｐＣａｓ９－ＨＦ１、ＦｏｋＩ－Ｆｕｓｅｄ　ｄＣａｓ９、又はｅｘｐａｎｄｅｄ　Ｃａｓ９（ｘＣａｓ９）に由来し得る。更に、他のＣａｓエンドヌクレアーゼ、例えば、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ、Ｃａｓ　１４、Ｃａｓ４、Ｃｓｎ２、Ｃａｓ１３ａ、Ｃａｓ１３ｂ、Ｃａｓ１３ｃ、Ｃａｓ１３ｄ、Ｃ２ｃ１、もしくはＣ２ｃ３などをＣａｓ９系の代わりに、又はプライム編集を含む任意の他のタイプの操作されたＣａｓタンパク質を使用して使用することができる。

【０３０２】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡ誘導型ヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ）及びｇＲＮＡを含有するゲノム編集システムは、特定の実施形態では、編集される細胞に導入されるタンパク質／ＲＮＡ複合体（リボ核タンパク質、又はＲＮＰ）として実装される。いくつかの実施形態では、ＲＮＰ複合体は、脂質又はポリマーマイクロ粒子もしくはナノ粒子、ミセル、又はリポソームなどのカプセル化剤中で細胞に導入される。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導型ヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ）及びｇＲＮＡを含有するゲノム編集システムは、ＲＮＡ誘導型ヌクレアーゼ及び誘導ＲＮＡ成分をコードする１つ以上の核酸として実装される。例えば、特定の実施形態では、ゲノム編集システムは、そのような核酸を含む１つ以上のベクター、例えば、アデノ随伴ウイルスなどのウイルスベクターとして実装される。

【０３０３】

機能的用語では、ＲＮＡ誘導型ヌクレアーゼは、（ａ）ｇＲＮＡと相互作用し（例えば、との複合体）、（ｂ）ｇＲＮＡと共に、（ｉ）ｇＲＮＡの標的化ドメインに相補的な配列、及び任意選択で、（ｉｉ）「プロトスペーサー隣接モチーフ」又は「ＰＡＭ」と呼ばれる追加の配列を含むＤＮＡの標的領域と会合し、任意選択で切断又は改変するヌクレアーゼとして定義される。ＰＡＭ配列は、ｇＲＮＡ標的化ドメイン（又は「スペーサー」）に相補的な「プロトスペーサー」配列とのその配列関係からその名称をとっている。プロトスペーサー配列と共に、ＰＡＭ配列は、特定のＲＮＡ誘導型ヌクレアーゼ／ｇＲＮＡ組み合わせの標的領域又は配列を規定する。様々なＲＮＡ誘導型ヌクレアーゼは、ＰＡＭとプロトスペーサーとの間の異なる配列関係を必要とし得る。例えば、Ｃａｓ９ヌクレアーゼは、プロトスペーサーの３’側にあるＰＡＭ配列を認識し、一方、Ｃｐｆ　１は、一般に、プロトスペーサーの５’側にあるＰＡＭ配列を認識する。ＰＡＭ及びプロトスペーサーの特定の配列配向を認識することに加えて、ＲＮＡ誘導型ヌクレアーゼは、特定のＰＡＭ配列も認識することができる。黄色ブドウ球菌（Ｓ．ａｕｒｅｕｓ）Ｃａｓ９は、例えば、ＮＮＧＲＲＴ又はＮＮＧＲＲＶのＰＡＭ配列を認識し、Ｎ残基は、ｇＲＮＡ標的化ドメインによって認識される領域のすぐ３’側にある。化膿性連鎖球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）Ｃａｓ９はＮＧＧ　ＰＡＭ配列を認識する。Ｆ．ノビシダＣｐｆ　１は、ＴＴＮ　ＰＡＭ配列を認識する。ＰＡＭ配列は、様々なＲＮＡ誘導型ヌクレアーゼについて同定されており、新規なＰＡＭ配列を同定するための戦略は、Ｓｈｍａｋｏｖ　ｅｌ　ａｌ，２０１５，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｅｌｌ　６０，３８５－３９７，Ｎｏｖｅｍｂｅｒ　５，２０１５に記載されている。

【０３０４】

特定のＣａｓの使用は、Ｃａｓエンドヌクレアーゼ（又は代替物）が標的についてスクリーニングするために使用するＰＡＭ配列を変化させ得ることが理解され、本明細書において企図される。本明細書で使用される場合、好適なＰＡＭ配列は、ＮＧＧ（ＳｐＣａｓ９　ＰＡＭ）ＮＮＧＲＲＴ（ＳａＣａｓ９　ＰＡＭ）ＮＮＮＮＧＡＴＴ（ＮｍＣＡｓ９　ＰＡＭ）、ＮＮＮＮＲＹＡＣ（ＣｊＣａｓ９　ＰＡＭ）、ＮＮＡＧＡＡＷ（Ｓｔ）、ＴＴＴＶ（ＬｂＣｐｆ１　ＰＡＭ及びＡｓＣｐｆ１　ＰＡＭ）、ＴＹＣＶ（ＬｂＣｐｆ１　ＰＡＭ変異体及びＡｓＣｐｆ１　ＰＡＭ変異体）、（式中、Ｎは任意のヌクレオチドであり得る）Ｖ＝Ａ、Ｃ、又はＧ、Ｙ＝Ｃ又はＴであり、Ｗ＝Ａ又はＴ、及びＲ＝Ａ又はＧである。

【０３０５】

いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、細胞内のゲノム配列などの標的配列へのＲＮＡ誘導型ヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９又はＣｐｆ　１などのＣａｓ）の特異的会合（又は「標的化」）を促進する。ｇＲＮＡは、単分子（単一のＲＮＡ分子を含み、代替的にキメラと称される）、又はモジュラー（例えば、通常、例えば、二本鎖化によって互いに関連付けられる、ｃｒｉｓｐｒ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）及びｔｒａｃｒＲＮＡなどの、１つを超える、典型的には２つの別個のＲＮＡ分子を含む）であり得る。誘導ＲＮＡは、単分子であろうとモジュールであろうと、編集が望まれる細胞のゲノム中のＤＮＡ配列などの標的配列内の標的ドメインに完全に又は部分的に相補的である「標的化ドメイン」を含む。例えば、Ｃａｓ９に関連して、ｃｒＲＮＡは、標的ＤＮＡに相補的なヌクレオチド配列である標的化ドメインを提供する誘導ＲＮＡであり、Ｃａｓヌクレアーゼのための結合足場として働くｔｒａｃｒＲＮＡも含み得る。単一のｃｒＲＮＡの誘導下で二本鎖ＤＮＡ切断を誘導するＣｐｆ　１に関連して、ｔｒａｃｒＲＮＡは必要とされず、代わりに、ｃｒＲＮＡは、Ｃｐｆ　１認識に関与する５’－ハンドル及び相補的結合を介して標的ＤＮＡ配列と相互作用する誘導セグメントを含む。標的化ドメインは、典型的には、１０～３０ヌクレオチド長であり、特定の実施形態では、１６～２４ヌクレオチド長（例えば、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３又は２４ヌクレオチド長）である。

【０３０６】

いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡ、場合によってはｃｒＲＮＡは、標的核酸配列とハイブリダイズして標的核酸配列への核酸標的化複合体の配列特異的結合を誘導するのに十分な、標的核酸配列との相補性を有する任意のポリヌクレオチド配列である。いくつかの実施形態では、相補性の程度は、適切なアラインメントアルゴリズムを使用して任意選択でアラインメントされた場合、約５０％、６０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７．５％、９９％又はそれ以上であるか、又はそれより大きい。最適なアラインメントは、配列をアラインメントするための任意の適切なアルゴリズムを使用して決定することができ、その非限定的な例としては、Ｓｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズム、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈアルゴリズム、バローズ－Ｗｈｅｅｌｅｒ　Ｔｒａｎｓｆｏｒｍに基づくアルゴリズム（例えば、バローズＷｈｅｅｌｅｒ　Ａｌｉｇｎｅｒ）、Ｃｌｕｓｔａｌ　１Ｗ、Ｃｌｕｓｔａｌ　Ｘ、ＢＬＡＴ、及び当業者に公知の他のものが挙げられる。核酸標的化複合体の標的核酸配列への配列特異的結合を指示する誘導配列（核酸標的化誘導ＲＮＡ内）の能力は、任意の好適なアッセイによって評価することができる。例えば、核酸標的化複合体を形成するのに十分な核酸標的化ＣＲＩＳＰＲ系の成分は、核酸標的化複合体の成分をコードするベクターでのトランスフェクションなどによって、対応する標的核酸配列を有する宿主細胞に提供され、その後、標的核酸配列内の優先的標的化（例えば、切断）が評価され得る。同様に、標的核酸配列の切断は、標的核酸配列、試験される誘導配列及び試験誘導配列とは異なる対照誘導配列を含む核酸標的化複合体の成分を提供し、試験誘導配列反応と対照誘導配列反応との間で標的配列における結合又は切断速度を比較することによって、試験管中で評価することができる。

【０３０７】

ｇＲＮＡを設計するための方法は、当業者に公知である（例えば、Ｃｕｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０１８）Ｉｎｔｅｒｄｉｓｃｉｐｌｉｎａｒｙ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ：Ｃｏｍｐｕｔ

ａｔｉｏｎａｌ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１０：４５５－４６５）、ＰＣＴ公開第ＷＯ２０１９／０１０３８４号）。標的配列の選択及び検証ならびにオフターゲット分析のための方法は、以前に、例えば、Ｍａｌｉ；Ｈｓｕ；Ｆｕ ｅｔ ａｌ．，２０１４ Ｎａｔ ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ３２（３）：２７９－８４；Ｈｅｉｇｗｅｒ ｅｔ ａｌ．，２０１４ Ｎａｔ ｍｅｔｈｏｄｓ １１（２）：１２２－３；Ｂａｅ ｅｔ ａｌ．（２０１４）Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ３０（１０）：１４７３－５；及びＸｉａｏ Ａ ｅｔ ａｌ．（２０１４）Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ３０（８）：１１８０－１１８２に記載された。非限定的な例として、ｇＲＮＡ設計は、ユーザーの標的配列に対応する潜在的な標的配列の選択を最適化するための、例えば、ゲノムにわたる総オフターゲット活性を最小化するためのソフトウェアツールの使用を含み得る。オフターゲット活性は切断に限定されないが、各オフターゲット配列における切断効率は、例えば、実験的に導出された重み付けスキームを使用して予測することができる。

【０３０８】

例えば、ＲＮＡヌクレオチドの標的化配列を含む誘導ＲＮＡは、ＤＮＡ配列として提供される標的化ドメイン配列に対応するＲＮＡ配列を含み、これはチミジンヌクレオチドの代わりにウラシルを含有する。例えば、ＲＮＡヌクレオチドの標的化ドメイン配列を含み、チミジン分子を含むＤＮＡ配列によって記載される誘導ＲＮＡは、同じであるがチミジンの代わりにウラシルを含む対応するＲＮＡ配列の標的化ドメインを有する。当業者に明らかであるように、そのような標的化配列は、適切な誘導ＲＮＡ足場、例えば、ｃｒＲＮＡ足場配列又はキメラｃｒＲＮＡ／ｔｒａｃｅｒＲＮＡ足場配列に連結される。適切なｇＲＮＡ足場配列は、当業者に公知である。例えば、Ｃｐｆ１の場合、好適な足場配列は、標的化ドメインの５’末端に付加された配列ＵＡ ＡＵＵＵ ＣＵ ＡＣＵＣＵＵ ＧＵＡＧ ＡＵ（配列番号１６）を含む。

【０３０９】

いくつかの実施形態では、ＭＭ抗体を含む抗体に対する臨床的ＡＤＣＣ応答を増強するための努力は、ＮＫ細胞が腫瘍標的と同じで特定の抗原も発現するので困難であった。これらの抗原には、例えば、ＣＤ３８及びＳＬＡＭＦ７が含まれる。したがって、ＮＫ細胞療法を標的抗体と組み合わせる場合（例えば、それぞれＣＤ３８及びＳＬＡＭＦ７を標的とするためのダラツムマブ及びエロツズマブ）、又はＮＫ細胞が標的抗体に対して本明細書で提供されるＣＡＲを発現する場合、療法は、がんを標的とし得るだけでなく、対象のＮＫ細胞集団を枯渇させることもできる。例えば、高いＣＤ３８発現は、特に、ダラツムマブ治療過程の初期にＮＫ細胞の急速な枯渇をもたらし、更により完全な腫瘍根絶を潜在的に駆動し得るこの自然免疫細胞源を大幅に排除する。

【０３１０】

いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞は、ＮＫ細胞によってあるレベルでも発現されることが知られているか、又は疑われる標的抗原の発現を低下させるように編集される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、ＮＫ細胞によってあるレベルで発現されることが公知であるか又は疑われる標的抗原を標的とするｇＲＮＡを用いて実施される。いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞は、ＣＤ３８に対して指向されるＣＡＲを発現し、ＣＤ３８発現は、ＮＫ細胞において低減又は排除される。いくつかの実施形態では、本開示で使用するためのｇＲＮＡは、ＣＤ３８を標的とするｇＲＮＡである（ＣＤ３８を標的とする例示的なｇＲＮＡについては、例えば、国際公開第２０１９／２２２５０３号、国際公開第２０２１／０８７４６６号及び国際公開第２０２１／１１３８５３号を参照）。

【０３１１】

いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、ＮＫ細胞の免疫反応性に関与する分子を標的とする。いくつかの実施形態では、操作されたｇ－ＮＫ細胞の表面上のＨＬＡクラスＩ発現が低減される。ヒト白血球抗原（ＨＬＡ）系は、ヒトにおける主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）タンパク質をコードする遺伝子複合体である。ＨＬＡクラスＩタンパク質は全て、長いα鎖及び短いβ鎖、Ｂ２Ｍを有する。Ｂ２Ｍの非存在下ではほとんどＨＬＡクラスＩを発現することができず、ＨＬＡクラスＩタンパク質が細胞内からペプチドを提示するた

めにはＢ２Ｍの発現が必要である。本開示は、Ｂ３Ｍの発現を低下させるように操作されたｇ－ＮＫ細胞を提供する。したがって、これらの細胞は、免疫監視を回避し、細胞傷害性Ｔ細胞によって付着する。いくつかの実施形態では、本開示で使用するためのｇＲＮＡは、ベータ２ミクログロブリン（Ｂ２Ｍ）を標的とするｇＲＮＡである（Ｂ２Ｍを標的とする例示的なｇＲＮＡについては、例えば、国際公開第２０２０／１６８３００号、国際公開第２０１８／０６４６９４号、国際公開第２０１５／１６１２７６号、又は国際公開第２０１７／１５２０１５号を参照）。

【０３１２】

いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、ＮＫ細胞活性の免疫抑制に関与する分子を標的とする。適切には、操作されたＮＫ細胞は、低下したチェックポイント阻害受容体機能を含むか又はチェックポイント阻害受容体機能を含まない。好適には、機能が低下しているか又は機能がないチェックポイント阻害受容体は、ＣＤ９６（ＴＡＣＴＩＬＥ）、ＣＤ１５２（ＣＴＬＡ４）、ＣＤ２２３（ＬＡＧ－３）、ＣＤ２７９（ＰＤ－１）、ＣＤ３２８（ＳＩＧＬＥＣ７）、ＳＩＧＬＥＣ９、ＴＩＧＩＴ、及び／又はＴＩＭ－３のうちの１つ以上又は全てを含む。好適には、ＮＫ細胞は、２つ以上のチェックポイント阻害受容体に対するチェックポイント阻害受容体機能が低下しているか、又は存在しない。好適には、２つ以上のチェックポイント阻害受容体は、ＣＤ９６（ＴＡＣＴＩＬＥ）、ＣＤ１５２（ＣＴＬＡ４）、又はＣＤ３２８（ＳＩＧＬＥＣ７）又はＣＤ２７９（ＰＤ－１）を含む。

【０３１３】

いくつかの実施形態では、本開示における使用のためのｇＲＮＡは、ＴＩＧＩＴを標的とするｇＲＮＡである（例えば、ＴＩＧＩＴを標的とする例示的なｇＲＮＡについては、国際公開第２０２０／１６８３００号を参照）。いくつかの実施形態では、本開示において使用するためのｇＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とするｇＲＮＡである（ＰＤ－１を標的とする例示的なｇＲＮＡについては、例えば、国際公開第２０１５／１６１２７６号又は国際公開第２０１７／１５２０１５号を参照）。

【０３１４】

いくつかの実施形態では、本開示で使用するためのｇＲＮＡは、アデノシンＡ２ａ受容体（ＡＤＯＲＡ２ａ）などのアデノシン受容体を標的とするｇＲＮＡである（ＡＤＯＲＡ２ａを標的とする例示的なｇＲＮＡについては、例えば、国際公開第２０２０／１６８３００号を参照）。いくつかの実施形態では、本開示において使用するためのｇＲＮＡは、ＴＧＦベータ受容体を標的とするｇＲＮＡ、例えばＴＧＦベータＲ　２である（例えば、ＴＧＦベータＲ　２を標的とする例示的なｇＲＮＡについては国際公開第２０２０／１６８３００号を参照）。いくつかの実施形態では、本開示で使用するためのｇＲＮＡは、サイトカイン誘導性ＳＨ　２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）をコードする遺伝子を標的とするｇＲＮＡである（例えば、ＣＩＳＨを標的とする例示的なｇＲＮＡについては国際公開第２０２０／１６８３００号を参照）。

【０３１５】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡ誘導型ヌクレアーゼをコードするＤＮＡ及び／又はｇＲＮＡをコードするＤＮＡは、例えば、ベクター（例えば、ウイルスベクターもしくは非ウイルスベクター）、非ベクターベースの方法（例えば、裸のＤＮＡもしくはＤＮＡ複合体を使用する）、又はこれらの組み合わせによって送達することができる。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ誘導型ヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ）及び／又はｇＲＮＡをコードする核酸は、ＡＡＶによって送達される。遺伝子編集のための核酸は、例えば、トランスフェクションもしくはエレクトロポレーションによって、裸のＤＮＡもしくはＲＮＡとして細胞に直接送達され得るか、又は標的細胞による取り込みを促進する分子（例えば、Ｎ－アセチルガラクトサミン）にコンジュゲートされ得る。

【０３１６】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡ誘導型ヌクレアーゼ及びｇＲＮＡは、リボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体として細胞に送達される。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ及びｇＲＮＡは別々に精製され、次いでアセンブルされてＲＮＰを形成する。いくつかの実施形態

では、１つ以上のＲＮＰ複合体は、任意の順序で連続して、又は同時に細胞に送達される。いくつかの実施形態では、ＲＮＰ複合体は、エレクトロポレーションによって細胞に送達される。いくつかの実施形態では、ＲＮＰ複合体は、脂質ナノ粒子を使用して細胞に送達される。

【０３１７】

１つの非限定的な例において、ＲＮＰ複合体を作製するために、ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡを約５０μＭ～約５００μＭ（例えば、５０、６０、７０、８０、９０，１００、１２５、１５０、１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５、３７５、４００、４２５、４５０、４７５、又は５００μＭ）、好ましくは１００μＭ～約３００μＭ濃度のｌ：ｌ，２：ｌ、又は１：２の割合で、最も好ましくは約２００μＭの９５℃で約５分間約２００μＭ、混合し、ｔｒａｃｒＲＮＡ複合体（すなわち、誘導ＲＮＡ）を形成することができる。ｃｒＲＮＡ：ｔｒａｃｒＲＮＡ複合体を、次いで、約２０μＭ～約５０μＭ（例えば、２１、２２、２３，２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、又は５０μＭ）の最終希釈のＣａｓエンドヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９など）と混合することができる。

【０３１８】

特定の実施形態において、セクションＶに記載されるようなｇＮＫ細胞について濃縮された増殖ＮＫ細胞などのＮＫ細胞へのＲＮＰ複合体の導入は、エレクトロポレーションによる。エレクトロポレーションは、電場を細胞に印加して細胞膜の透過性を増加させる技術である。電場の印加は、細胞膜を横切って核酸などの荷電分子を引き寄せる膜を横切る電荷勾配を引き起こす。したがって、一態様では、ＮＫ細胞を遺伝子改変する方法であって、ＮＫ細胞における標的ＤＮＡ配列に特異的な誘導ＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を得ることと、及びｂ）ＮＫ細胞のゲノムＤＮＡ内の標的配列にハイブリダイズする対応するＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ誘導ＲＮＡと複合体化されたＣａｓエンドヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９）を含むリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体を、エレクトロポレーションを介して標的ＮＫ細胞に導入することを含む方法が本明細書に開示される。

【０３１９】

いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞の導入（例えば、エレクトロポレーション）に続いて、ここで改変されたＮＫ細胞は、セクションＶに記載されているように、ＨＬＡ発現フィーダー細胞、一般的に照射フィーダー細胞、及びサイトカイン（例えば、ＩＬ－２及びＩＬ－２１）を含む培地中で、例えば、ｇ－ＮＫ細胞が濃縮されたＮＫ細胞の刺激、増殖又は増殖を誘導する条件下で増殖させることができる。したがって、遺伝子操作された細胞は、照射されたフィーダー細胞を使用してエレクトロポレーション後に増殖させることができるので、生存能及び増殖能を保持する。培養期間は、ＲＮＰ複合体の導入後１～１４日、例えばエレクトロポレーション後（すなわち、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、又は１４日）、例えば３～７日、例えば４～６日であり得ることが理解され、本明細書において企図される。いくつかの態様では、操作されたＮＫ細胞を培養するための培地は、セクションＶに記載されているような、例えば、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、及び／又はＩＬ－２１などのサイトカインを更に含むことができる。いくつかの実施形態では、培地は、ＩＬ－２及びＩＬ－２１を含有する。

【０３２０】

ＩＶ．組成物及び医薬製剤

本明細書では、操作されたｇ－ＮＫ細胞を含む組成物が提供される。いくつかの実施形態では、組成物の操作されたｇ－ＮＫ細胞は、ＣＡＲを発現する。組成物は、ＣＡＲを発現する複数のｇ－ＮＫ細胞から構成され得る。

【０３２１】

いくつかの実施形態では、組成物の操作されたｇ－ＮＫ細胞は、分泌型又は膜結合型であり得る免疫調節物質（例えば、サイトカイン）を発現する。組成物は、免疫調節物質を

発現する複数のｇ－ＮＫ細胞から構成され得る。

【０３２２】

いくつかの実施形態では、組成物の操作されたｇ－ＮＫ細胞は、ＣＡＲ又は膜結合型であり得るＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、サイトカイン）を発現する。組成物は、ＣＡＲ及び免疫調節物質の両方を発現する複数のｇ－ＮＫ細胞から構成され得る。いくつかの実施形態では、操作されたＮＫ細胞の５０％超又は約５０％超がｇ－ＮＫ細胞である。いくつかの実施形態では、操作されたＮＫ細胞の６０％超又は約６０％超がｇ－ＮＫ細胞である。いくつかの実施形態では、操作されたＮＫ細胞の７０％超又は約７０％超が、ｇ－ＮＫ細胞である。いくつかの実施形態では、操作されたＮＫ細胞の８０％超又は約８０％超が、ｇ－ＮＫ細胞である。いくつかの実施形態では、操作されたＮＫ細胞の９０％超又は約９０％超が、ｇ－ＮＫ細胞である。いくつかの実施形態では、操作されたＮＫ細胞の９５％超又は約９５％超がｇ－ＮＫ細胞である。

【０３２３】

いくつかの実施形態では、組成物は、５０％超又は約５０％超のｇ－ＮＫ細胞を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、６０％超又は約６０％超のｇ－ＮＫ細胞を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、７０％超又は約７０％超のｇ－ＮＫ細胞を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、８０％超又は約８０％超のｇ－ＮＫ細胞を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、９０％超又は約９０％超のｇ－ＮＫ細胞を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、９５％超又は約９５％超のｇ－ＮＫ細胞を含む。

【０３２４】

いくつかの実施形態では、組成物の複数のＮＫ細胞は、５０％超又は約５０％超のｇ－ＮＫ細胞を構成する。いくつかの実施形態では、組成物の複数のＮＫ細胞は、６０％超又は約６０％超のｇ－ＮＫ細胞を構成する。いくつかの実施形態では、組成物の複数のＮＫ細胞は、７０％超又は約７０％超のｇ－ＮＫ細胞を構成する。いくつかの実施形態では、組成物の複数のＮＫ細胞は、８０％超又は約８０％超のｇ－ＮＫ細胞を構成する。いくつかの実施形態では、組成物の複数のＮＫ細胞は、９０％超又は約９０％超のｇ－ＮＫ細胞を構成する。いくつかの実施形態では、組成物の複数のＮＫ細胞は、９５％超又は約９５％超のｇ－ＮＫ細胞を構成する。

【０３２５】

いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞の２０％超又は約２０％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞の３０％超又は約３０％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞の４０％超又は約４０％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞の５０％超又は約５０％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞の６０％超又は約６０％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞の７０％超又は約７０％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞の８０％超又は約８０％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞の９０％超又は約９０％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞の９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。

【０３２６】

いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の２０％超又は約２０％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の３０％超又は約３０％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の４０％超又は約４０％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の５０％超又は約５０％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の６０％超又は約６０％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の７０％超又は約７０％超が、ＣＡＲをコードする異種核

酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の８０％超又は約８０％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の９０％超又は約９０％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。

【０３２７】

いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞の２０％超又は約２０％超が、免疫調節物質（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞の３０％超又は約３０％超が、免疫調節物質（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞の４０％超又は約４０％超が、免疫調節物質（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞の５０％超又は約５０％超が、免疫調節物質（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞の６０％超又は約６０％超が、免疫調節物質（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞の７０％超又は約７０％超が、免疫調節物質（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞の８０％超又は約８０％超が、免疫調節物質（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞の９０％超又は約９０％超が、免疫調節物質（例えば、記載の分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞の９５％超又は約９５％超が、免疫調節物質（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。

【０３２８】

いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の２０％超又は約２０％超が、免疫調節物質（例えば、記載される分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の３０％超又は約３０％超が、免疫調節物質（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の４０％超又は約４０％超が、免疫調節物質（例えば、記載される分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の５０％超又は約５０％超が、免疫調節物質（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の６０％超又は約６０％超が、免疫調節物質（例えば、記載される分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の７０％超又は約７０％超が、免疫調節物質（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の８０％超又は約８０％超が、免疫調節物質（例えば、記載される分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の９０％超又は約９０％超が、免疫調節物質（例えば、記載される分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の９５％超又は約９５％超が、免疫調節物質（例えば、記載される分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。

【０３２９】

いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞の２０％超又は約２０％超が、ＣＡＲ及び

免疫調節物質（例えば、記載の分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞の３０％超又は約３０％超が、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、記載の分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞の４０％超又は約４０％超が、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、記載の分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞の５０％超又は約５０％超が、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、記載の分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞の６０％超又は約６０％超が、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、記載の分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞の７０％超又は約７０％超が、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、記載の分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞の８０％超又は約８０％超が、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、記載の分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞の９０％超又は約９０％超が、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、記載の分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中の総細胞の９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。

【０３３０】

いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の２０％超又は約２０％超が、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、記載される分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸（複数可）を含む。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の３０％超又は約３０％超が、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、記載される分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の４０％超又は約４０％超が、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の５０％超又は約５０％超が、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、記載される分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の６０％超又は約６０％超が、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、記載される分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の７０％超又は約７０％超が、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、記載される分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の８０％超又は約８０％超が、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、記載される分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の９０％超又は約９０％超が、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、記載される分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中のｇ－ＮＫ細胞の９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、記載される分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。

【０３３１】

特に、提供される組成物の中には、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮された細胞の組成物がある。いくつかの実施形態では、提供される方法において使用するための組成物は、提供される方法のいずれかによって産生されるものなどの増殖ＮＫ細胞であるｇ－ＮＫ細胞を含有する。いくつかの実施形態では、組成物は、ＮＫＧ２Ｃ^{pos}細胞又はそのサブセットを含有する。いくつかの実施形態では、組成物は、ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞又はそのサブセットを含有する。いくつかの実施形態では、組成物は、ＮＫＧ２Ｃ^{pos}／ＮＫＧ２Ａ^{n}

ｅｇ細胞又はそのサブセットを含有する。

【０３３２】

いくつかの実施形態では、組成物は、約５～９９％のＮＫＧ２Ｃｐｏｓ細胞もしくはそのサブセット、又は５％～９９％（両端を含む）の任意の割合のＮＫＧ２Ｃｐｏｓ細胞もしくはそのサブセットを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、細胞が単離された対象に天然に存在する全ＮＫ細胞又は総細胞に対するＮＫＧ２Ｃｐｏｓ細胞又はそのサブセットの割合と比較して、全ＮＫ細胞又は総細胞に対するＮＫＧ２Ｃｐｏｓ細胞又はそのサブセットの増加した又はより大きな割合を含むことができる。いくつかの実施形態では、割合は、少なくとも又は少なくとも約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倍又はそれ以上増加する。

【０３３３】

いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも２０％又は約２０％、少なくとも３０％又は少なくとも約３０％、少なくとも又は少なくとも約４０％、少なくとも５０％又は少なくとも約５０％、少なくとも６０％又は少なくとも約６０％、少なくとも６５％又は少なくとも約６５％、少なくとも７０％又は少なくとも約７０％、少なくとも７５％又は少なくとも約７５％、少なくとも８０％又は少なくとも約８０％、少なくとも８１％又は少なくとも約８１％、少なくとも８２％又は少なくとも約８２％、少なくとも８３％又は少なくとも約８３％、少なくとも８４％又は少なくとも約８４％、少なくとも８５％又は少なくとも約８５％、少なくとも８６％又は少なくとも約８６％、少なくとも８７％又は少なくとも約８７％、少なくとも８８％又は少なくとも約８８％、少なくとも８９％又は少なくとも約８９％、少なくとも９０％又は少なくとも約９０％、少なくとも９１％又は少なくとも約９１％、少なくとも９２％又は少なくとも約９２％、少なくとも９３％又は少なくとも約９３％、少なくとも９４％又は少なくとも約９４％、少なくとも９５％又は少なくとも約９５％、少なくとも９６％少なくとも約９６％、少なくとも９７％又は少なくとも約９７％、少なくとも９８％又は少なくとも約９８％、少なくとも９９％又は少なくとも約９９％、又は実質的に１００％のＮＫＧ２Ｃｐｏｓ細胞又はそのサブセットを含み得る。いくつかの実施形態では、組成物は、５０％超のＮＫＧ２Ｃｐｏｓ細胞又はそのサブセットを含む。別の実施形態において、組成物は、６０％超のＮＫＧ２Ｃｐｏｓ細胞又はそのサブセットを含む。別の実施形態において、組成物は、７０％超のＮＫＧ２Ｃｐｏｓ細胞又はそのサブセットを含む。別の実施形態において、組成物は、８０％超のＮＫＧ２Ｃｐｏｓ細胞又はそのサブセットを含む。いくつかの実施形態では、提供される組成物は、ＮＫＧ２Ｃｐｏｓ細胞又はそのサブセットが、組成物中の細胞又は組成物中のＮＫ細胞の少なくとも６０％もしくは約６０％、少なくとも７０％もしくは約７０％、少なくとも８０％もしくは約８０％、少なくとも８５％もしくは約８５％、少なくとも９０％もしくは約９０％、少なくとも９５％もしくは約９５％又はそれ超を構成する組成物を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＮＫＧ２Ｃｐｏｓ細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＮＫＧ２Ｃｐｏｓ細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、免疫調節物質をコードする異種核酸（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＮＫＧ２Ｃｐｏｓ細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。

【０３３４】

いくつかの実施形態では、組成物は、両端を含めて、約５～９９％のＮＫＧ２Ａｎｅｇ

細胞もしくはそのサブセット、又は５％～９９％（両端を含む）の任意の割合のＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞もしくはそのサブセットを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、細胞が単離された対象に天然に存在する全ＮＫ細胞又は総細胞に対するＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞又はそのサブセットの割合と比較して、全ＮＫ細胞又は総細胞に対するＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞又はそのサブセットの増加した又はより大きな割合を含むことができる。いくつかの実施形態では、割合は、少なくとも又は少なくとも約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倍又はそれ以上増加する。

【０３３５】

いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも２０％又は約２０％、少なくとも３０％又は少なくとも約３０％、少なくとも４０％又は少なくとも約４０％、少なくとも５０％又は少なくとも約５０％、少なくとも６０％又は少なくとも約６０％、少なくとも６５％又は少なくとも約６５％、少なくとも７０％又は少なくとも約７０％、少なくとも７５％又は約７５％、少なくとも８０％又は少なくとも約８０％、少なくとも８１％又は少なくとも約８１％、少なくとも８２％又は少なくとも約８２％、少なくとも８３％又は少なくとも約８３％、少なくとも８４％又は少なくとも約８４％、少なくとも８５％又は少なくとも約８５％、少なくとも８６％又は約８６％、少なくとも８７％又は少なくとも約８７％、少なくとも８８％又は少なくとも約８８％、少なくとも８９％又は少なくとも約８９％、少なくとも９０％又は少なくとも約９０％、少なくとも９１％又は少なくとも約９１％、少なくとも９２％又は少なくとも約９２％、少なくとも９３％又は約９３％、少なくとも９４％又は少なくとも約９４％、少なくとも９５％又は少なくとも約９５％、少なくとも９６％又は少なくとも約９６％、少なくとも９７％又は少なくとも約９７％、少なくとも９８％又は少なくとも約９８％、少なくとも９９％又は少なくとも約９９％、又は実質的に１００％のＮＫＧ２Ａｎｅｇ細胞又はそのサブセットを含み得る。いくつかの実施形態では、組成物は、５０％を超えるＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞又はそのサブセットを含む。別の実施形態において、組成物は、６０％を超えるＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞又はそのサブセットを含む。別の実施形態において、組成物は、７０％を超えるＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞又はそのサブセットを含む。別の実施形態において、組成物は、８０％を超えるＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞又はそのサブセットを含む。いくつかの実施形態では、提供される組成物は、ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞又はそのサブセットが、組成物中の細胞又は組成物中のＮＫ細胞の少なくとも６０％もしくは約６０％、少なくとも７０％もしくは約７０％、少なくとも８０％もしくは約８０％、少なくとも８５％もしくは約８５％、少なくとも９０％もしくは約９０％、少なくとも９５％もしくは約９５％又はそれ超を構成するものを含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、免疫調節物質をコードする異種核酸を含む（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。

【０３３６】

いくつかの実施形態では、組成物は、約５～９９％のＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞もしくはそのサブセット、又は５％～９９％（両端を含む）の任意の割合のＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞もしくはそのサブセットを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、細胞が単離された対象に天然に存在する全ＮＫ細胞又は総細胞に対するＮ

ＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞又はそのサブセットの割合と比較して、全ＮＫ細胞又は総細胞に対するＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞又はそのサブセットの増大した又はより大きな割合を含み得る。いくつかの実施形態では、割合は、少なくとも又は少なくとも約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倍又はそれ以上増加する。

【０３３７】

いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも２０％もしくは約２０％、少なくとも３０％もしくは約３０％、少なくとも４０％もしくは約４０％、少なくとも５０％もしくは約５０％、少なくとも６０％もしくは約６０％、少なくとも６５％もしくは約６５％、少なくとも７０％もしくは約７０％、少なくとも７５％もしくは約７５％、少なくとも８０％もしくは約８０％、少なくとも８１％もしくは約８１％、少なくとも８２％もしくは約８２％、少なくとも８３％もしくは約８３％、少なくとも８４％もしくは約８４％、少なくとも８５％もしくは約８５％、少なくとも８６％もしくは約８６％、少なくとも８７％もしくは約８７％、少なくとも８８％もしくは約８８％、少なくとも８９％もしくは約８９％、少なくとも９０％もしくは約９０％、少なくとも９１％もしくは約９１％、少なくとも９２％もしくは約９２％、少なくとも９３％もしくは約９３％、少なくとも９４％もしくは約９４％、少なくとも９５％もしくは約９５％、少なくとも９６％もしくは約９６％、少なくとも９７％もしくは約９７％、少なくとも９８％もしくは約９８％、少なくとも９９％もしくは約９９％、又は実質的に１００％のＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞又はそのサブセットを含み得る。いくつかの実施形態では、組成物は、５０％を超えるＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞又はそのサブセットを含む。別の実施形態では、組成物は、６０％超のＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞又はそのサブセットを含む。別の実施形態では、組成物は、７０％超のＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞又はそのサブセットを含む。別の実施形態では、組成物は、８０％超のＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞又はそのサブセットを含む。いくつかの実施形態では、提供される組成物は、ＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞又はそのサブセットが、組成物中の細胞又は組成物中のＮＫ細胞の少なくと６０％もしくは約６０％、少なくとも７０％もしくは約７０％、少なくとも８０％もしくは約８０％、少なくとも８５％もしくは約８５％、少なくとも９０％もしくは約９０％、少なくとも９５％もしくは約９５％又はそれ超を構成するものを含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、免疫調節物質をコードする異種核酸を含む（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。

【０３３８】

いくつかの実施形態では、組成物は、約５～９９％のｇＮＫ細胞、又は５％～９９％（両端を含む）の間の任意の割合のｇＮＫ細胞を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、細胞が単離された対象に天然に存在する全ＮＫ細胞又は総細胞に対するｇＮＫの割合と比較して、全ＮＫ細胞又は総細胞に対するｇＮＫ細胞の増加した又はより大きい割合を含み得る。いくつかの実施形態では、割合は、少なくとも又は少なくとも約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倍又はそれ以上増加する。

【０３３９】
いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも２０％もしくは約２０％、少なくとも３０％もしくは約３０％、少なくとも４０％もしくは約４０％、少なくとも５０％もしくは約５０％、少なくとも６０％もしくは約６０％、少なくとも６５％もしくは約６５％、少なくとも７０％もしくは約７０％、少なくとも７５％もしくは約７５％、少なくとも８０％もしくは約８０％、少なくとも８１％もしくは約８１％、少なくとも８２％もしくは約８２％、少なくとも８３％もしくは約８３％、少なくとも８４％もしくは約８４％、少なくとも８５％もしくは約８５％、少なくとも８６％もしくは約８６％、少なくとも８７％もしくは約８７％、少なくとも８８％もしくは約８８％、少なくとも８９％もしくは約８９％、少なくとも９０％もしくは約９０％、少なくとも９１％もしくは約９１％、少なくとも９２％もしくは約９２％、少なくとも９３％もしくは約９３％、少なくとも９４％もしくは約９４％、少なくとも９５％もしくは約９５％、少なくとも９６％もしくは約９６％、少なくとも９７％もしくは約９７％、少なくとも９８％もしくは約９８％、少なくとも９９％もしくは約９９％、又は実質的に１００％のｇＮＫ細胞を含み得る。いくつかの実施形態では、組成物は、５０％超のｇＮＫ細胞を含む。別の実施形態において、組成物は、７０％超のｇＮＫ細胞を含む。別の実施形態において、組成物は、８０％超のｇＮＫ細胞を含む。いくつかの実施形態では、提供される組成物は、ｇＮＫ細胞が、組成物中の細胞又は組成物中のＮＫ細胞の少なくとも６０％もしくは約６０％、少なくとも７０％もしくは約７０％、少なくとも８０％もしくは約８０％、少なくとも８５％もしくは約８５％、少なくとも９０％もしくは約９０％、少なくとも９５％もしくは約９５％又はそれ超を構成するものを含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のｇＮＫ細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のｇＮＫ細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、免疫調節物質（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のｇＮＫ細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。

【０３４０】
いくつかの実施形態では、組成物は、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞サブセットの集団を含み、組成物中の細胞の少なくとも４０％もしくは約４０％、少なくとも５０％もしくは約５０％、少なくとも５５％もしくは約５５％、少なくとも６０％もしくは約６０％、少なくとも６５％もしくは約６５％、少なくとも７０％もしくは約７０％、少なくとも７５％もしくは約７５％、少なくとも８０％もしくは約８０％、少なくとも８５％もしくは約８５％、少なくとも９０％もしくは約９０％、又は少なくとも９５％もしくは約９５％が、ＣＤ５７ｐｏｓであるｇ－ＮＫ細胞代用マーカープロファイルを有する。いくつかの実施形態では、組成物中の細胞の７０％又は約７０％から、９０％又は約９０％は、表現型ＣＤ５７ｐｏｓを有する。いくつかの実施形態では、組成物中の細胞の少なくとも又は約７２％、少なくとも又は約７４％、少なくとも又は約７６％、少なくとも又は約７８％、少なくとも又は約８０％、少なくとも又は約８２％、少なくとも又は約８４％、少なくとも又は約８６％、少なくとも又は約８８％、少なくとも又は約９０％、少なくとも又は約９２％、少なくとも又は約９４％、少なくとも又は約９６％、又は少なくとも又は約９８％は、表現型ＣＤ５７ｐｏｓを有する。提供される実施形態のいずれかの一部において、組成物中の細胞の少なくとも、又は約６０％は、表現型ＣＤ５７ｐｏｓを含む。提供される実施形態のいずれかの一部において、組成物中の細胞の少なくとも、又は約７０％は、表現型ＣＤ５７ｐｏｓを含む。いくつかの実施形態では、表現型は、表面表現型ＣＤ３

ｎｅｇを更に含む。いくつかの実施形態では、表現型は、表面表現型ＣＤ４５ｐｏｓ／ＣＤ３ｎｅｇ／ＣＤ５６ｐｏｓを更に含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＣＤ５７ｐｏｓ細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＣＤ５７ｐｏｓ細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、免疫調節物質をコードする異種核酸（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）を含む。いくつかの実施形態では、表現型は、表面表現型ＣＤ４５ｐｏｓ／ＣＤ３ｎｅｇ／ＣＤ５６ｐｏｓを更に含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＣＤ５７ｐｏｓ細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、表現型は、表面表現型ＣＤ４５ｐｏｓ／ＣＤ３ｎｅｇ／ＣＤ５６ｐｏｓを更に含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＣＤ３ｎｅｇＣＤ５７ｐｏｓ細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＣＤ３ｎｅｇＣＤ５７ｐｏｓ細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、免疫調節物質（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＣＤ３ｎｅｇＣＤ５７ｐｏｓ細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＣＤ５７ｐｏｓＣＤ４５ｐｏｓ／ＣＤ３ｎｅｇ／ＣＤ５６ｐｏｓ細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超は、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＣＤ５７ｐｏｓ／ＣＤ４５ｐｏｓ／ＣＤ３ｎｅｇ／ＣＤ５６ｐｏｓ細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、免疫調節物質（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＣＤ５７ｐｏｓ／ＣＤ４５ｐｏｓ／ＣＤ３ｎｅｇ／ＣＤ５６ｐｏｓ細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、記載される分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。提供される実施形態のいずれかのいくつかにおいて、そのような表現型を有する細胞の５０％超がＦｃＲγｎｅｇであり、任意選択で５０％又は約５０％から、９０％又は約９０％がＦｃＲγｎｅｇである。提供される実施形態のいずれかのいくつかにおいて、そのような表現型を有する細胞の７０％超がＦｃＲγｎｅｇであり、任意選択で７０％又は約７０％から、９０又は約９０％がＦｃＲγｎｅｇである。

【０３４１】

いくつかの実施形態では、組成物は、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞サブセットの集団を含み、組成物中の細胞の少なくとも４０％もしくは約４０％、少なくとも５０％もしくは約５０％、少なくとも５５％もしくは約５５％、少なくとも６０％もしくは約６０％、

少なくとも６５％もしくは約６５％、少なくとも７０％もしくは約７０％、少なくとも７５％もしくは約７５％、少なくとも８０％もしくは約８０％、少なくとも８５％もしくは約８５％、少なくとも９０％もしくは約９０％、又は少なくとも９５％もしくは約９５％が、ＣＤ１６^{pos}／ＣＤ５７^{pos}／ＣＤ７^{dim}／^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}であるｇ－ＮＫ細胞代用マーカープロファイルを有する。いくつかの実施形態では、組成物中の細胞の７０％又は約７０％から、９０又は約９０％は、表現型ＣＤ１６^{pos}／ＣＤ５７^{pos}／ＣＤ７^{dim}／^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}を有する。いくつかの実施形態では、組成物中の細胞の少なくとも又は約７２％、少なくとも又は約７４％、少なくとも又は約７６％、少なくとも又は約７８％、少なくとも又は約８０％、少なくとも又は約８２％、少なくとも又は約８４％、少なくとも又は約８６％、少なくとも又は約８８％、少なくとも又は約９０％、少なくとも又は約９２％、少なくとも又は約９４％、少なくとも又は約９６％、又は少なくとも又は約９８％は、表現型ＣＤ１６^{pos}／ＣＤ５７^{pos}／ＣＤ７^{dim}／^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}を有する。提供される実施形態のいずれかの一部において、組成物中の細胞の少なくとも、又は約６０％は、表現型ＣＤ１６^{pos}／ＣＤ５７^{pos}／ＣＤ７^{dim}／^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}を含む。提供される実施形態のいずれかの一部において、組成物中の細胞の少なくとも、又は約７０％は、表現型ＣＤ１６^{pos}／ＣＤ５７^{pos}／ＣＤ７^{dim}／^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＣＤ１６^{pos}／ＣＤ５７^{pos}／ＣＤ７^{dim}／^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＣＤ１６^{pos}／ＣＤ５７^{pos}／ＣＤ７^{dim}／^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超は、免疫調節物質（例えば、記載される分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＣＤ１６^{pos}／ＣＤ５７^{pos}／ＣＤ７^{dim}／^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超は、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、記載される分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、表現型は、表面表現型ＣＤ３^{neg}を更に含む。いくつかの実施形態では、表現型は、表面表現型ＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}を更に含む。提供される実施形態のいずれかのいくつかにおいて、そのような表現型を有する細胞の５０％超がＦｃＲγ^{neg}であり、任意選択で５０％又は約５０％から、９０％又は約９０％がＦｃＲγ^{neg}である。提供される実施形態のいずれかのいくつかにおいて、そのような表現型を有する細胞の７０％超がＦｃＲγ^{neg}であり、任意選択で７０％又は約７０％から、９０％又は約９０％がＦｃＲγ^{neg}である。

【０３４２】

いくつかの実施形態では、組成物は、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞サブセットの集団を含み、組成物中の細胞の少なくとも４０％もしくは約４０％、少なくとも５０％もしくは約５０％、少なくとも５５％もしくは約５５％、少なくとも６０％もしくは約６０％、少なくとも６５％もしくは約６５％、少なくとも７０％もしくは約７０％、少なくとも７５％もしくは約７５％、少なくとも８０％もしくは約８０％、少なくとも８５％もしくは約８５％、少なくとも９０％もしくは約９０％、又は少なくとも９５％もしくは約９５％が、ＣＤ３８^{neg}である表現型を有する。いくつかの実施形態では、組成物中の細胞の７０％又は約７０％から、９０％又は約９０％は、表現型ＣＤ３８^{neg}を有する。いくつかの実施形態では、組成物中の細胞の少なくとも又は約７２％、少なくとも又は約７４％、少なくとも又は約７６％、少なくとも又は約７８％、少なくとも又は約８０％、少なくとも又は約８２％、少なくとも又は約８４％、少なくとも又は約８６％、少なくとも又は約８８％、少なくとも又は約９０％、少なくとも又は約９２％、少なくとも又は約９４

％、少なくとも又は約９６％、又は少なくとも又は約９８％は、表現型ＣＤ３８^{neg}を有する。提供される実施形態のいずれかの一部において、組成物中の細胞の少なくとも、又は約６０％は、表現型ＣＤ３８^{neg}を含む。提供される実施形態のいずれかの一部において、組成物中の細胞の少なくとも、又は約７０％は、表現型ＣＤ３８^{neg}を含む。いくつかの実施形態では、表現型は、表面表現型ＣＤ３^{neg}を更に含む。いくつかの実施形態では、表現型は、表面表現型ＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}を更に含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＣＤ３８^{neg}細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＣＤ３^{neg}ＣＤ３８^{neg}細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＣＤ３^{neg}ＣＤ３８^{neg}細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超％超が、免疫調節物質（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＣＤ３８^{neg}細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超％超が、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、記載の分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＣＤ３８^{neg}ＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＣＤ３８^{neg}ＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、免疫調節物質（例えば、記載される分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＣＤ３８^{neg}ＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超は、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、記載される分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。提供される実施形態のいずれかのいくつかにおいて、そのような表現型を有する細胞の５０％超がＦｃＲγ^{neg}であり、任意選択で５０％又は約５０％から、９０％又は約９０％がＦｃＲγ^{neg}である。提供される実施形態のいずれかのいくつかにおいて、そのような表現型を有する細胞の７０％超がＦｃＲγ^{neg}であり、任意選択で７０％又は約７０％から、９０％又は約９０％がＦｃＲγ^{neg}である。

【０３４３】

いくつかの実施形態では、組成物は、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞サブセットの集団を含み、組成物中の細胞の少なくとも４０％もしくは約４０％、少なくとも５０％もしくは約５０％、少なくとも５５％もしくは約５５％、少なくとも６０％もしくは約６０％、少なくとも６５％もしくは約６５％、少なくとも７０％もしくは約７０％、少なくとも７５％もしくは約７５％、少なくとも８０％もしくは約８０％、少なくとも８５％もしくは約８５％、少なくとも９０％もしくは約９０％、又は少なくとも９５％もしくは約９５％が、ＣＤ１６^{pos}である表現型を有する。いくつかの実施形態では、組成物中の細胞の７０％又は約７０％から、９０％又は約９０％は、表現型ＣＤ１６^{pos}を有する。いくつかの実施形態では、組成物中の細胞の少なくとも又は約７２％、少なくとも又は約７４

％、少なくとも又は約７６％、少なくとも又は約７８％、少なくとも又は約８０％、少なくとも又は約８２％、少なくとも又は約８４％、少なくとも又は約８６％、少なくとも又は約８８％、少なくとも又は約９０％、少なくとも又は約９２％、少なくとも又は約９４％、少なくとも又は約９６％、又は少なくとも又は約９８％は、表現型ＣＤ１６^{pos}を有する。提供される実施形態のいずれかの一部において、組成物中の細胞の少なくとも、又は約６０％は、表現型ＣＤ１６^{pos}を含む。提供される実施形態のいずれかの一部において、組成物中の細胞の少なくとも、又は約７０％は、表現型ＣＤ１６^{pos}を含む。いくつかの実施形態では、表現型は、表面表現型ＣＤ３^{neg}を更に含む。いくつかの実施形態では、表現型は、表面表現型ＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}を更に含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＣＤ１６^{pos}細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＣＤ１６^{pos}細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、免疫調節物質（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＣＤ３^{neg}ＣＤ１６^{pos}細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＣＤ３^{neg}ＣＤ１６^{pos}細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、免疫調節物質（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＣＤ３^{neg}ＣＤ１６^{pos}細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、記載の分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＣＤ１６^{pos}細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、免疫調節物質（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＣＤ１６^{pos}ＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超は、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＣＤ１６^{pos}／ＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、免疫調節物質（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＣＤ１６^{pos}ＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}細胞の５０％もしくは約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超は、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、記載される分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。提供される実施形態のいずれかのいくつかにおいて、そのような表現型を有する細胞の５０％超がＦｃＲγ^{neg}であり、任意選択で５０％又は約５０％から、９０％又は約９０％がＦｃＲγ^{neg}である。提供される実施形態のいずれかのいくつかにおいて、そのような表現型を有する細胞の７０％超がＦｃＲγ^{neg}であり、任意選択で７０％又は約７０％から、９０％又は約９０％が

ＦｃＲγ^{neg}である。

【０３４４】

いくつかの実施形態では、組成物は、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞サブセットの集団を含み、組成物中の細胞の少なくとも４０％もしくは約４０％、少なくとも５０％もしくは約５０％、少なくとも５５％もしくは約５５％、少なくとも６０％もしくは約６０％、少なくとも６５％もしくは約６５％、少なくとも７０％もしくは約７０％、少なくとも７５％もしくは約７５％、少なくとも８０％もしくは約８０％、少なくとも８５％もしくは約８５％、少なくとも９０％もしくは約９０％、又は少なくとも９５％もしくは約９５％が、ＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}であるｇ－ＮＫ細胞代用マーカープロファイルを有する。いくつかの実施形態では、組成物中の細胞の７０％又は約７０％から、９０％又は約９０％が、表現型ＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}を有する。いくつかの実施形態では、組成物中の細胞の少なくとも又は約７２％、少なくとも又は約７４％、少なくとも又は約７６％、少なくとも又は約７８％、少なくとも又は約８０％、少なくとも又は約８２％、少なくとも又は約８４％、少なくとも又は約８６％、少なくとも又は約８８％、少なくとも又は約９０％、少なくとも又は約９２％、少なくとも又は約９４％、少なくとも又は約９６％、又は少なくとも又は約９８％は、表現型ＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}を有する。提供される実施形態のいずれかの一部において、組成物中の細胞の少なくとも、又は約６０％は、表現型ＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}を含む。提供される実施形態のいずれかの一部において、組成物中の細胞の少なくとも、又は約７０％は、表現型ＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}を含む。いくつかの実施形態では、表現型は、表面表現型ＣＤ３^{neg}を更に含む。いくつかの実施形態では、表現型は、表面表現型ＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}を更に含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、サイトカインなどの免疫調節物質をコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲなどの抗原受容体及びサイトカインなどの免疫調節物質をコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＣＤ３^{neg}ＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＣＤ３^{neg}ＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲなどの抗原受容体及びサイトカインなどの免疫調節物質をコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}／ＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}／ＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６

ｐｏｓ細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超は、サイトカインなどの免疫調節物質をコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}／ＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲなどの抗原受容体及びサイトカインなどの免疫調節物質をコードする異種核酸を含む。提供される実施形態のいずれかのいくつかにおいて、そのような表現型を有する細胞の５０％超がＦｃＲγ^{neg}であり、任意選択で５０％又は約５０％から、９０％又は約９０％がＦｃＲγ^{neg}である。提供される実施形態のいずれかのいくつかにおいて、そのような表現型を有する細胞の７０％超がＦｃＲγ^{neg}であり、任意選択で７０％又は約７０％から、９０％又は約９０％がＦｃＲγ^{neg}である。

【０３４５】

いくつかの実施形態では、組成物は、組成物中のＮＫ細胞の５０％超又は約５０％超が、ｇ－ＮＫ細胞（ＦｃＲγ^{neg}）又はその代用マーカープロファイルを発現するＮＫ細胞である、ＮＫ細胞の集団を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、組成物中のＮＫ細胞の５５％超又は約５５％超が、ｇ－ＮＫ細胞（ＦｃＲγ^{neg}）又はその代用マーカープロファイルを発現するＮＫ細胞である、ＮＫ細胞の集団を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、組成物中のＮＫ細胞の６０％超又は約６０％超が、ｇ－ＮＫ細胞（ＦｃＲγ^{neg}）又はその代用マーカープロファイルを発現するＮＫ細胞である、ＮＫ細胞の集団を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、組成物中のＮＫ細胞の６５％超又は約６５％超が、ｇ－ＮＫ細胞（ＦｃＲγ^{neg}）又はその代用マーカープロファイルを発現するＮＫ細胞である、ＮＫ細胞の集団を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、組成物中のＮＫ細胞の７０％超又は約７０％超が、ｇ－ＮＫ細胞（ＦｃＲγ^{neg}）又はその代替マーカープロファイルを発現するＮＫ細胞である、ＮＫ細胞の集団を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、組成物中のＮＫ細胞の７５％超又は約７５％超が、ｇ－ＮＫ細胞（ＦｃＲγ^{neg}）又はその代用マーカープロファイルを発現するＮＫ細胞である、ＮＫ細胞の集団を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、組成物中のＮＫ細胞の８０％超又は約８０％超が、ｇ－ＮＫ細胞（ＦｃＲγ^{neg}）又はその代用マーカープロファイルを発現するＮＫ細胞である、ＮＫ細胞の集団を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、組成物中のＮＫ細胞の８５％超又は約８５％超が、ｇ－ＮＫ細胞（ＦｃＲγ^{neg}）又はその代用マーカープロファイルを発現するＮＫ細胞である、ＮＫ細胞の集団を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、組成物中のＮＫ細胞の９０％超又は約９０％超が、ｇ－ＮＫ細胞（ＦｃＲγ^{neg}）又はその代用マーカープロファイルを発現するＮＫ細胞である、ＮＫ細胞の集団を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、ＮＫ細胞の集団を含み、組成物中のＮＫ細胞の９５％超又は約９５％超が、ｇ－ＮＫ細胞（ＦｃＲγ^{neg}）又はその代用マーカープロファイルを発現するＮＫ細胞である。代用マーカープロファイルは、本明細書に記載される任意のものであってよい。例えば、代用マーカープロファイルは、ＣＤ１６^{pos}／ＣＤ５７^{pos}／ＣＤ７^{dim}／^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}であってもよい。他の例において、代用マーカープロファイルは、ＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}であってもよい。更なる例において、ｇ－ＮＫ細胞代用マーカープロファイルは、ＣＤ３８^{neg}である。代用表面マーカープロファイルは、表現型ＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}を更に含み得る。

【０３４６】

いくつかの実施形態では、組成物の、又はその特定の割合、例えば、約７０％超のｇ－ＮＫ細胞がパーフォリン及び／又はグランザイムＢについて陽性である。いくつかの実施形態では、組成物中のナチュラルキラー細胞は、パーフォリン及びグランザイムＢについて陽性である細胞が濃縮される。場合によっては、ナチュラルキラー細胞がパーフォリン及びグランザイム　Ｂ　について陽性である。パーフォリンは、ＮＫ　細胞の顆粒に含まれる孔形成細胞溶解タンパク質である。脱顆粒すると、パーフォリンは標的細胞の原形質

膜に結合し、カルシウム依存性の様式でオリゴマー化して、標的細胞上に孔を形成する。グランザイムＢは、ナチュラルキラー細胞及び細胞傷害性Ｔ細胞の顆粒において最も一般的に見出されるセリンプロテアーゼである。グランザイムＢは、パーフォリンと共に分泌されて、標的細胞におけるアポトーシスを媒介する。パーフォリン又はグランザイムＢについて陽性の細胞の数を測定する方法は、当業者に知られている。方法としては、例えば、細胞内フローサイトメトリーが挙げられる。一例では、パーフォリン又はグランザイムＢについて陽性である細胞の割合又は数は、パーフォリン及びグランザイムＢに対する抗体で染色する前に、例えばＭｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ製のＩｎｓｉｄｅ Ｓｔａｉｎ Ｋｉｔを使用して、細胞の透過処理によって決定することができる。次いで、例えばフローサイトメトリーを使用して、細胞染色を分解することができる。

【０３４７】

いくつかの実施形態では、組成物のｇ－ＮＫ細胞の７０％超または約７０％超がパーフォリンについて陽性であり、組成物のｇ－ＮＫ細胞の７０％約７０％超がグランザイムＢについて陽性である。いくつかの実施形態では、組成物のｇ－ＮＫ細胞の７５％超又は約７５％超がパーフォリンについて陽性であり、組成物のｇ－ＮＫ細胞の７５％超又は約７５％超がグランザイムＢについて陽性である。実施形態では、組成物のｇ－ＮＫ細胞の８０％超又は約８０％超がパーフォリンについて陽性であり、組成物のｇ－ＮＫ細胞の８０％超又は約８０％超がグランザイムＢについて陽性である。いくつかの実施形態では、組成物のｇ－ＮＫ細胞の８５％超又は約８５％超がパーフォリンについて陽性であり、組成物のｇ－ＮＫ細胞の８５％超又は約８５％超がグランザイムＢについて陽性である。いくつかの実施形態では、組成物のｇ－ＮＫ細胞の９０％超又は約９０％超がパーフォリンについて陽性であり、組成物のｇ－ＮＫ細胞の９０％超又は約９０％超がグランザイムＢについて陽性である。いくつかの実施形態では、組成物のｇ－ＮＫ細胞の９５％超又は約９５％超がパーフォリンについて陽性であり、組成物のｇ－ＮＫ細胞の９５％超又は約９５％超がグランザイムＢについて陽性である。このような実施形態のいくつかでは、組成物中のグランザイムＢ及びパーフォリンについて陽性である細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超超又は約９５％超は、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のグランザイムＢ及びパーフォリンについて陽性である細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、免疫調節物質（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のグランザイムＢ及びパーフォリンについて陽性である細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲなどの抗原受容体と、免疫調節物質（例えば、記載されている分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。

【０３４８】

いくつかの実施形態、ＮＫ細胞、例えばｇ－ＮＫ細胞によるパーフォリン及びグランザイムＢの発現レベルは、細胞内フローサイトメトリーによって測定することができ、レベルは平均蛍光強度（ＭＦＩ）のレベルに基づいて測定することができる。いくつかの実施形態では、ＭＦＩに基づくパーフォリン及びグランザイムＢの発現レベルは、ｇ－ＮＫ細胞とＦｃＲγ^{pos}である細胞との間で異なる。いくつかの実施形態では、パーフォリンについて陽性である組成物のｇ－ＮＫ細胞は、ＭＦＩレベルに基づいて、ＦｃＲγ^{pos}ＮＫ細胞によって発現されるパーフォリンの平均レベルの少なくとも２倍又は約２倍のパーフォリンの平均レベルを発現する。いくつかの実施形態では、パーフォリンについて陽性である組成物のｇ－ＮＫ細胞は、ＭＦＩレベルに基づいて、ＦｃＲγ^{pos}ＮＫ細胞によって発現されるパーフォリンの平均レベルの少なくとも３倍又は約３倍のパーフォリンの平均レベルを発現する。いくつかの実施形態では、パーフォリンについて陽性である組

成物のｇ－ＮＫ細胞は、ＭＦＩレベルに基づいて、ＦｃＲγｐｏｓＮＫ細胞によって発現されるパーフォリンの平均レベルの少なくとも４倍又は約４倍のパーフォリンの平均レベルを発現する。いくつかの実施形態では、グランザイムについて陽性である組成物のｇ－ＮＫ細胞は、ＭＦＩレベルに基づいて、ＦｃＲγｐｏｓＮＫ細胞によって発現されるグランザイムＢの平均レベルの少なくとも２倍又は約２倍のグランザイムＢの平均レベルを発現する。いくつかの実施形態では、グランザイムＢについて陽性である組成物のｇ－ＮＫ細胞は、ＭＦＩレベルに基づいて、ＦｃＲγｐｏｓＮＫ細胞によって発現されるグランザイムＢの平均レベルの少なくとも３倍又は約３倍のグランザイムＢの平均レベルを発現する。いくつかの実施形態では、グランザイムＢについて陽性である組成物のｇ－ＮＫ細胞は、ＭＦＩレベルに基づいて、ＦｃＲγｐｏｓＮＫ細胞によって発現されるグランザイムＢの平均レベルの少なくとも４倍又は約４倍のグランザイムＢの平均レベルを発現する。

【０３４９】

いくつかの実施形態では、組成物中の細胞の少なくとも又は約５０％がＦｃＲγ欠損ＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ）であり、ｇ－ＮＫ細胞の７０％超又は約７０％超がパーフォリンについて陽性であり、ｇ－ＮＫ細胞の７０％超又は約７０％超がグランザイムＢについて陽性である。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞の８０％超又は約８０％超がパーフォリンについて陽性であり、ｇ－ＮＫ細胞の８０％超又は約８０％超がグランザイム　Ｂ　について陽性である。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞の９０％超又は約９０％超がパーフォリンについて陽性であり、ｇ－ＮＫ細胞の９０％超又は約９０％超がグランザイムＢについて陽性である。ｇ－ＮＫ細胞の９５％超又は約９５％超がパーフォリンについて陽性であり、ｇ－ＮＫ細胞の９５％超又は約９５％超がグランザイムＢについて陽性である。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞はＦｃＲγｎｅｇである。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のパーフォリン及びグランザイムＢについて陽性である細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、ＦｃＲγｎｅｇである。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のパーフォリン及びグランザイムＢについて陽性である細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、免疫調節物質（例えば、記載されているような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、ＦｃＲγｎｅｇである。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中のパーフォリン及びグランザイムＢについて陽性である細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲなどの抗原受容体と、免疫調節物質（例えば、記載されている分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。

【０３５０】

任意の実施形態のいくつかにおいて、パーフォリンについて陽性である細胞のうち、細胞は、細胞内フローサイトメトリーによって測定した場合、すなわち平均蛍光強度（ＭＦＩ）に基づいて、ＦｃＲγｐｏｓである細胞によって発現されるパーフォリンの平均レベルの少なくとも２倍又は約２倍であるパーフォリンの平均レベルを発現する。任意の実施形態の一部では、グランザイムＢについて陽性である細胞のうち、細胞は、細胞内フローサイトメトリーによって測定した場合、すなわち平均蛍光強度（ＭＦＩ）に基づいて、ＦｃＲγｐｏｓである細胞によって発現されるグランザイムＢの平均レベルの少なくとも２倍又は約２倍であるグランザイムＢの平均レベルを発現する。

【０３５１】

いくつかの実施形態では、組成物中のナチュラルキラー細胞は、ＣＤ１０７Ａ、ＩＦＮγ、及びＴＮＦ－αを発現又は産生する細胞において濃縮される。いくつかの場合において、そのような因子の発現もしくは産生、又はある程度の発現もしくは産生は、標的抗原

の非存在下で起こる（すなわち、更なる刺激を伴わない組成物中の細胞に固有である）。いくつかの場合において、発現もしくは産生、又はある程度の発現もしくは産生は、標的抗原及び標的抗原に対する抗体（抗標的抗体）を発現する細胞（標的細胞）の存在下におけるようなものである。いくつかの実施形態では、例えば、標的細胞は、ＣＤ３８を発現する腫瘍細胞株であってもよく、抗体は、抗ＣＤ３８抗体（例えば、ダラツムマブ）である。いくつかの実施形態では、例えば、標的細胞は、ＣＤ２０を発現する腫瘍細胞株であってもよく、抗体は、抗ＣＤ２０抗体（例えば、リツキシマブ）である。

【０３５２】

任意の実施形態の一部では、組成物中の細胞の１０％超は、任意選択でＣＤ１０７ａ発現によって測定される、腫瘍標的細胞に対する脱顆粒が可能であり、任意選択で脱顆粒は、腫瘍標的細胞に対する抗体の非存在下で測定される。任意の実施形態の一部では、組成物中の細胞のうち、１５％超又は約１５％超、２０％超又は約２０％超、３０％超又は約３０％超、４０％超又は約４０％超、又は５０％超又は約５０％超が、標的抗原及び標的抗原に対する抗体（抗標的抗体）を発現する細胞（標的細胞）の存在下で、任意選択でＣＤ１０７ａ発現によって測定される脱顆粒を示す。任意のそのような実施形態のいくつかでは、組成物中の細胞の１０％超が更に、腫瘍標的細胞に対してインターフェロン－γ又はＴＮＦ－αを産生することができ、任意選択で、インターフェロン－γ又はＴＮＦ－αは、腫瘍標的細胞に対する抗体の非存在下で測定される。任意のそのような実施形態のいくつかでは、例えば、標的抗原及び標的抗原に対する抗体を発現する細胞の存在下又は非存在下で測定して、組成物中のＣＤ１０７ａ陽性細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、例えば、標的抗原及び標的抗原に対する抗体を発現する細胞の存在下又は非存在下で測定した場合、組成物中のＣＤ１０７ａについて陽性である細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、免疫調節物質（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、例えば、標的抗原及び標的抗原に対する抗体を発現する細胞の存在下又は非存在下で測定して、組成物中のＣＤ１０７ａ陽性細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲなどの抗原受容体及び免疫調節物質（例えば、記載の分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。いくつかの実施形態では、組成物中の細胞のうち、１５％超又は約１５％超、２０％超又は約２０％超、３０％超又は約３０％超、４０％超又は約４０％超、又は５０％超又は約５０％超が、標的抗原及び標的抗原に対する抗体（抗標的抗体）を発現する細胞（標的細胞）の存在下でエフェクターサイトカインを産生する。いくつかの実施形態では、例えば、標的細胞は、ＣＤ３８を発現する腫瘍細胞株であってもよく、抗体は、抗ＣＤ３８抗体（例えば、ダラツムマブ）である。いくつかの実施形態では、例えば、標的細胞は、ＣＤ２０を発現する腫瘍細胞株であってもよく、抗体は、抗ＣＤ２０抗体（例えば、リツキシマブ）である。

【０３５３】

いくつかの実施形態では、組成物中の細胞の少なくとも５０％又は約５０％はＦｃＲγ欠損（ＦｃＲγ^{neg}）ＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ）であり、ここで組成物中の細胞の１５％超又は約１５％超は、標的抗原及び標的抗原に対する抗体（抗標的抗体）を発現する細胞（標的細胞）の存在下でエフェクターサイトカインを産生する。いくつかの実施形態では、標的抗原及び標的抗原に対する抗体（抗標的抗体）を発現する細胞（標的細胞）の存在下で、２０％超又は約２０％超、３０％超又は約３０％超、４０％超又は約４０％超、又は５０％超又は約５０％超がエフェクターサイトカインを産生する。いくつかの実施形態では、例えば、標的細胞は、ＣＤ３８を発現する腫瘍細胞株であってもよく、抗体は、抗ＣＤ３８抗体（例えば、ダラツムマブ）である。いくつかの実施形態では、例えば、標的細

胞は、ＣＤ２０を発現する腫瘍細胞株であってもよく、抗体は、抗ＣＤ２０抗体（例えば、リツキシマブ）である。任意の実施形態の一部において、エフェクターサイトカインは、ＩＦＮ－γ又はＴＮＦ－αである。任意の実施形態の一部において、エフェクターサイトカインは、ＩＦＮ－γ及びＴＮＦ－αである。任意のそのような実施形態のいくつかでは、例えば、標的抗原及び標的抗原に対する抗体を発現する細胞の存在下又は非存在下で測定して、組成物中の有効サイトカイン（例えば、ＩＦＮ－γ又はＴＮＦ－α）を産生する細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。任意の実施形態の一部において、エフェクターサイトカインは、ＩＦＮ－γ及びＴＮＦ－αである。任意のそのような実施形態のいくつかにおいて、例えば、標的抗原及び標的抗原に対する抗体を発現する細胞の存在下又は非存在下で測定して、組成物中の効果サイトカイン（例えば、ＩＦＮ－γ又はＴＮＦ－α）を産生する細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、免疫調節物質（例えば、記載の分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。任意の実施形態の一部において、エフェクターサイトカインは、ＩＦＮ－γ及びＴＮＦ－αである。任意のそのような実施形態のいくつかでは、例えば、標的抗原及び標的抗原に対する抗体を発現する細胞の存在下又は非存在下で測定して、組成物中の効果サイトカイン（例えば、ＩＦＮ－γ又はＴＮＦ－α）を産生する細胞の５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超は、ＣＡＲなどの抗原受容体及び免疫調節物質（例えば、記載される分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。

【０３５４】

任意の実施形態の一部では、組成物中の細胞のうち、１５％超又は約１５％超、２０％超又は約２０％超、３０％超又は約３０％超、４０％超又は約４０％超、又は５０％超又は約５０％超が、標的抗原及び標的抗原に対する抗体（抗標的抗体）を発現する細胞（標的細胞）の存在下で、任意選択でＣＤ１０７ａ発現によって測定される脱顆粒を示す。いくつかの実施形態では、例えば、標的細胞は、ＣＤ３８を発現する腫瘍細胞株であってもよく、抗体は、抗ＣＤ３８抗体（例えば、ダラツムマブ）である。いくつかの実施形態では、例えば、標的細胞は、ＣＤ２０を発現する腫瘍細胞株であってもよく、抗体は、抗ＣＤ２０抗体（例えば、リツキシマブ）である。

【０３５５】

いくつかの実施形態では、組成物中の細胞の少なくとも５０％超又は約５０％超はＦｃＲγ欠損（ＦｃＲγ^{neg}）ＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ）であり、ここで組成物中の細胞の１５％超又は約１５％超は、標的抗原及び標的抗原に対する抗体（抗標的抗体）を発現する細胞（標的細胞）の存在下で、任意選択でＣＤ１０７ａ発現によって測定される脱顆粒を示す。いくつかの実施形態では、標的抗原及び標的抗原に対する抗体（抗標的抗体）を発現する細胞（標的細胞）の存在下で、２０％超又は約２０％超、３０％超又は約３０％超、４０％超又は約４０％超、又は５０％超又は約５０％超が、任意選択でＣＤ１０７ａ発現によって測定される脱顆粒を示す。いくつかの実施形態では、例えば、標的細胞は、ＣＤ３８を発現する腫瘍細胞株であってもよく、抗体は、抗ＣＤ３８抗体（例えば、ダラツムマブ）である。いくつかの実施形態では、例えば、標的細胞は、ＣＤ２０を発現する腫瘍細胞株であってもよく、抗体は、抗ＣＤ２０抗体（例えば、リツキシマブ）である。

【０３５６】

提供される実施形態のいずれかの一部において、組成物中の細胞の６０％超又は約６０％超は、ｇ－ＮＫ細胞である。提供される実施形態のいずれかの一部において、組成物中の細胞の７０％超又は約７０％超が、ｇ－ＮＫ細胞である。提供される実施形態のいずれかの一部において、組成物中の細胞の８０％超又は約８０％超が、ｇ－ＮＫ細胞である。提供される実施形態のいずれかの一部において、組成物中の細胞の９０％超又は約９０％

超が、ｇ－ＮＫ細胞である。提供される実施形態のいずれかの一部において、組成物中の細胞の９５％超又は約９５％超が、ｇ－ＮＫ細胞である。

【０３５７】

いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、ｇ－ＮＫ細胞代用マーカープロファイルを示す。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞代用マーカープロファイルは、ＣＤ１６^{pos}／ＣＤ５７^{pos}／ＣＤ７^{dim}／^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞代用マーカープロファイルは、ＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞代用マーカープロファイルは、ＣＤ３８^{neg}である。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞代替表面マーカープロファイルは更に、ＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}である。

【０３５８】

前述の実施形態のいずれかの一部では、細胞の６０％超又は約６０％超がｇ－ＮＫ細胞である。前述の実施形態のいずれかの一部では、細胞の７０％超又は約７０％超がｇ－ＮＫ細胞である。前述の実施形態のいずれかの一部において、細胞の８０％超又は約８０％超が、ｇ－ＮＫ細胞である。前述の実施形態のいずれかの一部において、細胞の９０％超又は約９０％超が、ｇ－ＮＫ細胞である。前述の実施形態のいずれかの一部において、細胞の９５％超又は約９５％超が、ｇ－ＮＫ細胞である。

【０３５９】

前述の実施形態のいずれかの一部では、細胞の８０％超又は約８０％超がパーフォリンについて陽性である。前述の実施形態のいずれかの一部では、細胞の９０％超又は約９０％超がパーフォリンについて陽性である。前述の実施形態のいずれかのいくつかでは、パーフォリンについて陽性である細胞の中で、細胞は、細胞内フローサイトメトリーによって測定した場合、すなわち平均蛍光強度（ＭＦＩ）に基づいて、ＦｃＲγ^{pos}である細胞によって発現されるパーフォリンの平均レベルの少なくとも２倍又は約２倍のパーフォリンの平均レベルを発現する。

【０３６０】

前述の実施形態のいずれかにおいて、細胞の少なくとも約８０％以上がグランザイムＢについて陽性である。前述の実施形態のいずれかにおいて、細胞の少なくとも約９０％以上がグランザイムＢについて陽性である。前述の実施形態のいずれかの一部において、グランザイムＢ陽性の細胞のうち、細胞は、細胞内フローサイトメトリーによって測定した場合、すなわち平均蛍光強度（ＭＦＩ）に基づいて、ＦｃＲγ^{pos}である細胞によって発現されるグランザイムＢの平均レベルの少なくとも又は約２倍のグランザイムＢの平均レベルを発現する。

【０３６１】

提供される実施形態のいずれかの一部において、組成物は、10^{6}又は約10^{6}から、10^{12}又は約10^{12}個の細胞を含む。提供される実施形態のいずれかのいくつかにおいて、組成物は10^{6}もしくは約10^{6}から、10^{11}もしくは約10^{11}個の細胞、10^{6}もしくは約10^{6}から、10^{10}もしくは約10^{10}個の細胞、10^{6}もしくは約10^{6}から、10^{9}もしくは約10^{9}個の細胞、10^{6}もしくは約10^{6}から、10^{8}もしくは約10^{8}個の細胞、10^{6}もしくは約10^{6}から、10^{7}もしくは約10^{7}個の細胞、10^{7}もしくは約10^{7}から、10^{12}もしくは約10^{12}個の細胞、10^{7}もしくは約10^{7}から、10^{11}もしくは約10^{11}個の細胞、10^{7}もしくは約10^{7}から、10^{10}もしくは約10^{10}個の細胞、10^{7}もしくは約10^{7}から、10^{9}もしくは約10^{9}個の細胞、又は10^{7}もしくは約10^{7}から、10^{8}もしくは約10^{8}個の細胞、10^{8}もしくは約10^{8}から、10^{12}もしくは約10^{12}個の細胞、10^{8}もしくは約10^{8}から、10^{11}もしくは約10^{11}個の細胞、10^{8}もしくは約10^{8}から、10^{10}もしくは約10^{10}個の細胞、10^{8}もしくは約10^{8}から、10^{9}もしくは約10^{9}個の細胞、10^{9}もしくは約10^{9}から、10^{12}もしくは約10^{12}個の細胞、10^{9}もしくは約10^{9}から、10^{11}もしくは約10^{11}個の細胞、10^{9}もしくは約10^{9}から、10^{10}もしくは約10^{10}個の細胞、10^{10}もしくは約10^{10}から、10^{12}もしく

は約10^{12}個の細胞、10^{10}もしくは約10^{10}から、10^{11}もしくは約10^{11}個の細胞、又は10^{11}もしくは約10^{11}から、10^{12}もしくは約10^{12}個の細胞を含む。

【０３６２】

提供される実施形態のいずれかの一部では、組成物は、少なくとも又は少なくとも約10^{6}個の細胞を含む。提供される実施形態のいずれかのいくつかにおいて組成物は、10^{6}もしくは約10^{6}から、10^{10}もしくは約10^{10}個の細胞、10^{6}もしくは約10^{6}から、10^{9}もしくは約10^{9}個の細胞、10^{6}個もしくは約10^{6}から、10^{8}もしくは約10^{8}個の細胞、10^{6}もしくは約10^{6}から、10^{7}もしくは約10^{7}個の細胞、10^{7}もしくは約10^{7}から、10^{10}もしくは約10^{10}個の細胞、10^{7}もしくは約10^{7}から、10^{9}もしくは約10^{9}個の細胞、10^{7}もしくは約10^{7}から、10^{8}もしくは約10^{8}個の細胞、10^{8}もしくは約10^{8}から、10^{10}もしくは約10^{10}個の細胞、10^{8}もしくは約10^{8}から、10^{9}もしくは約10^{9}個の細胞、又は10^{9}もしくは約10^{9}から、10^{10}もしくは約10^{10}個の細胞を含む。

【０３６３】

提供される実施形態のいずれかの一部では、組成物は、少なくとも又は少なくとも約10^{8}個の細胞を含む。提供される実施形態のいずれかの一部において、組成物は、少なくとも、又は約10^{9}個の細胞を含む。提供される実施形態のいずれかの一部において、組成物は、少なくとも、又は約10^{10}個の細胞を含む。提供される実施形態のいずれかの一部において、組成物は、少なくとも、又は約10^{11}個の細胞を含む。提供される実施形態のいずれかの一部において、組成物は、10^{8}又は約10^{8}から、10^{11}又は約10^{11}個の細胞を含む。提供される実施形態のいずれかの一部において、組成物は、10^{8}又は約10^{8}から、10^{10}又は約10^{10}個の細胞を含む。提供される実施形態のいずれかの一部において、組成物は、10^{8}又は約10^{8}から、10^{9}又は約10^{9}個の細胞を含む。提供される実施形態のいずれかの一部において、組成物は、10^{9}又は約10^{9}から、10^{11}又は約10^{11}個の細胞を含む。提供される実施形態のいずれかの一部において、組成物は、10^{9}又は約10^{9}から、10^{10}又は約10^{10}個の細胞を含む。提供される実施形態のいずれかの一部において、組成物は、10^{10}又は約10^{10}から、10^{11}又は約10^{11}個の細胞を含む。

【０３６４】

提供される実施形態のいずれかの一部において、組成物は、少なくとも、又は約10^{6}個のｇ－ＮＫ細胞を含む。提供される実施形態のいずれかのいくつかにおいて、組成物は10^{6}もしくは約10^{6}から、10^{10}もしくは約10^{10}個のｇ－ＮＫ細胞、10^{6}もしくは約10^{6}から、10^{9}もしくは約10^{9}個のｇ－ＮＫ細胞、10^{6}もしくは約10^{6}から、10^{8}もしくは約10^{8}個のｇ－ＮＫ細胞、10^{6}もしくは約10^{6}から、10^{7}もしくは約10^{7}個のｇ－ＮＫ細胞、10^{7}もしくは約10^{7}から、10^{10}もしくは約10^{10}個のｇ－ＮＫ細胞、10^{7}もしくは約10^{7}から、10^{9}もしくは約10^{9}個のｇ－ＮＫ細胞、10^{7}もしくは約10^{7}から、10^{8}もしくは約10^{8}個のｇ－ＮＫ細胞、10^{8}もしくは約10^{8}から、10^{10}もしくは約10^{10}個のｇ－ＮＫ細胞、10^{8}もしくは約10^{8}から、10^{9}もしくは約10^{9}個のｇ－ＮＫ細胞、又は10^{9}もしくは約10^{9}から、10^{10}もしくは約10^{10}個のｇ－ＮＫ細胞を含む。提供される実施形態のいずれかの一部において、ｇ－ＮＫ細胞は、ＦｃＲγ^{neg}である。提供される実施形態のいずれかの一部において、ｇ－ＮＫ細胞は、ｇ－ＮＫ代替表面マーカープロファイルを有する細胞である。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞代替表面マーカープロファイルは、ＣＤ１６^{pos}／ＣＤ５７^{pos}／ＣＤ７^{dim}／^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞代替表面マーカープロファイルは、ＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である。提供される実施形態のいずれかの一部において、ｇ－ＮＫ細胞又はｇ－ＮＫ代替マーカープロファイルを有する細胞は、表面表現型ＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}を更に含む。提供される実施形態のいずれかの一部において、ｇ－ＮＫ細胞又はｇ－ＮＫ代替マーカープロファイルを有する細胞は、表面表

現型ＣＤ３８^{neg}を更に含む。

【０３６５】

提供される組成物のいずれかの特定の実施形態では、組成物中の細胞は、同じドナーに由来する。したがって、組成物は、１つ以上の異なるドナーからの細胞の混合集団を含まない。本明細書で提供されるように、増殖方法は、特定のＮＫ細胞サブセット、特にｇ－ＮＫ細胞サブセット又はｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーと関連するか又はそれを含むＮＫ細胞サブセット、例えば上記のＮＫ細胞サブセットのいずれかの５００倍以上、６００倍以上、７００倍以上、８００倍以上、９００倍以上、１０００倍以上又はそれ以上の高収率増殖をもたらす。任意の実施形態の一部において、増加は、１０００倍又は約１０００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、２０００倍又は約２０００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、２５００倍又は約２５００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、３０００倍又は約３０００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、５０００倍又は約５０００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、１００００倍又は約１００００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、１５０００倍又は約１５０００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、２００００倍又は約２００００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、２５０００倍又は約２５０００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、３００００倍又は約３００００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、３５０００倍又は約３５０００倍大きい。特定の実施形態では、増殖は、特定のＮＫ細胞サブセット、特に、ｇ－ＮＫ細胞サブセット、又はｇ－ＮＫ細胞代用マーカーと関連するかもしくはそれを含むＮＫ細胞サブセット、例えば、上記のＮＫ細胞サブセットのいずれかの数の１，０００倍又は約１，０００倍の増加をもたらす。特定の実施形態では、増殖は、特定のＮＫ細胞サブセット、特に、ｇ－ＮＫ細胞サブセット又はｇ－ＮＫ細胞の代用マーカーと関連するかもしくはそれを含むＮＫ細胞サブセット、例えば、上記のＮＫ細胞サブセットのいずれかの数の３，０００倍又は約３，０００倍の増加をもたらす。特定の実施形態では、増殖は、特定のＮＫ細胞サブセット、特に、ｇ－ＮＫ細胞サブセット又はｇ－ＮＫ細胞の代用マーカーと関連するかもしくはそれを含むＮＫ細胞サブセット、例えば、上記のＮＫ細胞サブセットのいずれかの数の３５，０００倍又は約３５，０００倍の増加をもたらす。

【０３６６】

いくつかの場合において、単一ドナーから得られたＮＫ細胞の最初の供給源から提供される方法によって達成される増殖は、必要とする対象への投与のための複数の個々の用量を提供するための細胞の組成物を産生することができる。したがって、提供される方法は、同種異系の方法に特に適している。いくつかの場合において、提供される方法に従って、１人のドナーから単離されたＮＫ細胞の開始集団からの単一増殖により、必要な対象への投与のために２０回以上の個別用量又は約２０回以上の個別用量が得られ、例えば、３０回又は約３０回の個別用量、４０回の個別用量、５０回の個別用量、６０回の個別用量、７０回の個別用量、８０回の個別用量、９０回の個別用量、１００回の個別用量、又は前述のいずれかの値である個別用量などである。いくつかの実施形態では、個々の用量は１×１０^{5}細胞／ｋｇ又は約１×１０^{5}細胞／ｋｇから、１×１０^{7}細胞／ｋｇ又は約１×１０^{7}細胞／ｋｇであり、例えば、１×１０^{5}細胞／ｋｇもしくは約１×１０^{5}細胞／ｋｇから、７．５×１０^{6}細胞／ｋｇもしくは約７．５×１０^{6}細胞／ｋｇ、１×１０^{5}細胞／ｋｇもしくは約１×１０^{5}細胞／ｋｇから、５×１０^{6}細胞／ｋｇもしくは約５×１０^{6}細胞／ｋｇ、１×１０^{5}細胞／ｋｇもしくは約１×１０^{5}細胞／ｋｇから、２．５×１０^{6}細胞／ｋｇもしくは約２．５×１０^{6}細胞／ｋｇ、１×１０^{5}細胞／ｋｇもしくは約１×１０^{5}細胞／ｋｇから、１×１０^{6}細胞／ｋｇもしくは約１×１０^{6}細胞／ｋｇ、１×１０^{5}細胞／ｋｇもしくは約１×１０^{5}細胞／ｋｇから、７．５×１０^{5}細胞／ｋｇもしくは約７．５×１０^{5}細胞／ｋｇ、１×１０^{5}細胞／ｋｇもしくは約１×１０^{5}細胞／ｋｇから、５×１０^{5}細胞／ｋｇもしくは約５×１０^{5}細胞／ｋｇ、１×１０^{5}細胞／ｋｇもしくは約１×１０^{5}細胞／ｋｇから、２．５×１０^{5}細胞／ｋｇもしくは約２．５×１０^{5}細胞／ｋｇ、２．５×１０^{5}細胞／ｋｇもしくは約２．５×１０^{5}細胞／ｋｇ

から、１×１０^{7}細胞／ｋｇもしくは約１×１０^{7}細胞／ｋｇ、２．５×１０^{5}細胞／ｋｇもしくは約２．５×１０^{5}細胞／ｋｇから、７．５×１０^{6}細胞／ｋｇもしくは約７．５×１０^{6}細胞／ｋｇ、２．５×１０^{5}細胞／ｋｇもしくは約２．５×１０^{5}細胞／ｋｇから、５×１０^{6}細胞／ｋｇもしくは約５×１０^{6}細胞／ｋｇ、２．５×１０^{5}細胞／ｋｇもしくは約２．５×１０^{5}細胞／ｋｇから、２．５×１０^{6}細胞／ｋｇもしくは約２．５×１０^{6}細胞／ｋｇ、２．５×１０^{5}細胞／ｋｇもしくは約２．５×１０^{5}細胞／ｋｇから、１×１０^{6}細胞／ｋｇもしくは約１×１０^{6}細胞／ｋｇ、２．５×１０^{5}細胞／ｋｇもしくは約２．５×１０^{5}細胞／ｋｇから、７．５×１０^{5}細胞／ｋｇもしくは約７．５×１０^{5}細胞／ｋｇ、２．５×１０^{5}細胞／ｋｇもしくは約２．５×１０^{5}細胞／ｋｇから、５×１０^{5}細胞／ｋｇもしくは約５×１０^{5}細胞／ｋｇ、５×１０^{5}細胞／ｋｇもしくは約５×１０^{5}細胞／ｋｇから、１×１０^{7}細胞／ｋｇもしくは約１×１０^{7}細胞／ｋｇ、５×１０^{5}細胞／ｋｇもしくは約５×１０^{5}細胞／ｋｇから、７．５×１０^{6}細胞／ｋｇもしくは約７．５×１０^{6}細胞／ｋｇ、５×１０^{5}細胞／ｋｇもしくは約５×１０^{5}細胞／ｋｇから、５×１０^{6}細胞／ｋｇもしくは約５×１０^{6}細胞／ｋｇ、５×１０^{5}細胞／ｋｇもしくは約５×１０^{5}細胞／ｋｇから、７．５×１０^{5}細胞／ｋｇもしくは約７．５×１０^{5}細胞／ｋｇ、１×１０^{6}細胞／ｋｇもしくは約１×１０^{6}細胞／ｋｇから、１×１０^{7}細胞／ｋｇもしくは約１×１０^{7}細胞／ｋｇ、１×１０^{6}細胞／ｋｇもしくは約１×１０^{6}細胞／ｋｇから、７．５×１０^{6}細胞／ｋｇもしくは約７．５×１０^{6}細胞／ｋｇ、１×１０^{6}細胞／ｋｇもしくは約１×１０^{6}細胞／ｋｇから、５×１０^{6}細胞／ｋｇもしくは約５×１０^{6}細胞／ｋｇ、１×１０^{6}細胞／ｋｇもしくは約１×１０^{6}細胞／ｋｇから、２．５×１０^{6}細胞／ｋｇもしくは約２．５×１０^{6}細胞／ｋｇ、２．５×１０^{6}細胞／ｋｇもしくは約２．５×１０^{6}細胞／ｋｇから、１×１０^{7}細胞／ｋｇもしくは約１×１０^{7}細胞／ｋｇ、又は２．５×１０^{6}細胞／ｋｇもしくは約２．５×１０^{6}細胞／ｋｇから、７．５×１０^{6}細胞／ｋｇもしくは約７．５×１０^{6}細胞／ｋｇ、２．５×１０^{6}細胞／ｋｇもしくは約２．５×１０^{6}細胞／ｋｇから、５×１０^{6}細胞／ｋｇもしくは約５×１０^{6}細胞／ｋｇ、５×１０^{6}細胞／ｋｇもしくは約５×１０^{6}細胞／ｋｇから、１×１０^{7}細胞／ｋｇもしくは約１×１０^{7}細胞／ｋｇ、５×１０^{6}細胞／ｋｇもしくは約５×１０^{6}細胞／ｋｇから、７．５×１０^{6}細胞／ｋｇもしくは約７．５×１０^{6}細胞／ｋｇ、又は７．５×１０^{6}細胞／ｋｇもしくは約７．５×１０^{6}細胞／ｋｇから、１×１０^{7}細胞／ｋｇもしくは約１×１０^{7}細胞／ｋｇである。いくつかの実施形態では、個々の用量は１×１０^{5}細胞／ｋｇ又は約１×１０^{5}細胞／ｋｇから、１×１０^{8}細胞／ｋｇ又は約１×１０^{8}細胞／ｋｇであり、例えば、２．５×１０^{5}細胞／ｋｇもしくは約２．５×１０^{5}細胞／ｋｇから、１×１０^{8}細胞／ｋｇもしくは約１×１０^{8}細胞／ｋｇ、５×１０^{5}細胞／ｋｇもしくは約５×１０^{5}細胞／ｋｇから、１×１０^{8}細胞／ｋｇもしくは約１×１０^{8}細胞／ｋｇ、７．５×１０^{5}細胞／ｋｇもしくは約７．５×１０^{5}細胞／ｋｇから、１×１０^{8}細胞／ｋｇもしくは約１×１０^{8}細胞／ｋｇ、１×１０^{6}細胞／ｋｇもしくは約１×１０^{6}細胞／ｋｇから、１×１０^{8}細胞／ｋｇもしくは約１×１０^{8}細胞／ｋｇから、２．５×１０^{6}細胞／ｋｇもしくは約２．５×１０^{6}細胞／ｋｇから、１×１０^{8}細胞／ｋｇもしくは約１×１０^{8}細胞／ｋｇから、５×１０^{6}細胞／ｋｇもしくは約５×１０^{6}細胞／ｋｇから、１×１０^{8}細胞／ｋｇもしくは約１×１０^{8}細胞／ｋｇから、７．５×１０^{6}細胞／ｋｇもしくは約７．５×１０^{6}細胞／ｋｇから、１×１０^{8}細胞／ｋｇもしくは約１×１０^{8}細胞／ｋｇから、１×１０^{7}細胞／ｋｇもしくは約１×１０^{7}細胞／ｋｇから、１×１０^{8}細胞／ｋｇもしくは約１×１０^{8}細胞／ｋｇから、２．５×１０^{7}細胞／ｋｇもしくは約２．５×１０^{7}細胞／ｋｇから、１×１０^{8}細胞／ｋｇもしくは約１×１０^{8}細胞／ｋｇから、５×１０^{7}細胞／ｋｇもしくは約５×１０^{7}細胞／ｋｇから、１×１０^{8}細胞／ｋｇもしくは約１×１０^{8}細胞／ｋｇ、又は７．５×１

10^7細胞／ｋｇもしくは約７．５×10^7細胞／ｋｇから、１×10^8細胞／ｋｇもしくは約１×10^8細胞／ｋｇである。いくつかの実施形態では、個々の用量は、５×10^7又は約５×10^7から、１０×10^9又は約１０×10^9であり、例えば、５×10^7もしくは約５×10^7から、５×10^9もしくは約５×10^9、５×10^7もしくは約５×10^7から、１×10^9もしくは約１×10^9、５×10^7もしくは約５×10^7から、５×10^8もしくは約５×10^8、５×10^7もしくは約５×10^7から、１×10^8もしくは約１×10^8、１×10^8もしくは約１×10^8から、１０×10^9もしくは約１０×10^9、１×10^8もしくは約１×10^8から、５×10^9もしくは約５×10^9、１×10^8もしくは約１×10^8から、１×10^9もしくは約１×10^9、１×10^8もしくは約１×10^8から、５×10^8もしくは約５×10^8、５×10^8もしくは約５×10^8から、１０×10^9もしくは約１０×10^9、５×10^8もしくは約５×10^8から、５×10^9もしくは約５×10^9、５×10^8もしくは約５×10^8から、１×10^9もしくは約１×10^9、１×10^9もしくは約１×10^9から、１０×10^9もしくは約１０×10^9、１×10^9もしくは約１×10^9から、５×10^9もしくは約５×10^9、又は５×10^9もしくは約５×10^9から、１０×10^9もしくは約１０×10^9である。いくつかの実施形態では、個々の用量は、５×10^8個の細胞であるか、又は約５×10^8個の細胞である。いくつかの実施形態では、個々の用量は、１×10^9個の細胞であるか、又は約１×10^9個の細胞である。いくつかの実施形態では、個々の用量は、５×10^9個の細胞であるか、又は約５×10^9個の細胞である。いくつかの実施形態では、個々の用量は、１×10^{10}個の細胞であるか、又は約１×10^{10}個の細胞である。上記の実施形態のいずれかにおいて、用量は、上記のＮＫ細胞サブセットのいずれかなどのｇ－ＮＫ細胞の代用マーカーと関連するかもしくはそれを含むｇ－ＮＫ細胞もしくはＮＫ細胞サブセットの細胞数、又は上記のいずれかの生存細胞数として与えられる。上記の実施形態のいずれかにおいて、用量は、
方法によって産生された増殖細胞の組成物中の細胞の数、又は前述のいずれかの生存細胞の数として与えられる。

【０３６７】

組成物の中には、養子細胞療法などの投与のための医薬組成物及び製剤がある。いくつかの実施形態では、操作された細胞は、薬学的に許容される担体と共に製剤化される。

【０３６８】

薬学的に許容される担体は、薬学的投与に適合するすべての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤などを含むことができる（Ｇｅｎｎａｒｏ，２０００，Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ ｐｈａｒｍａｃｙ，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ，Ｗｉｌｌｉａｍｓ＆Ｗｉｌｋｉｎｓ，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ，ＰＡ）。このような担体又は希釈剤の例としては、水、生理食塩水、リンガー溶液、デキストロース溶液、及び５％ヒト血清アルブミンが挙げられるが、これらに限定されない。リポソーム及び非水性ビヒクル（例えば、固定油）もまた使用され得る。補助的な活性化合物も組成物中に組み込むことができる。医薬担体は、生理食塩水、デキストロース溶液又はヒト血清アルブミンを含む溶液などの、ＮＫ細胞に適したものであるべきである。

【０３６９】

いくつかの実施形態では、そのような組成物のための薬学的に許容される担体又はビヒクルは、生きたＮＫ細胞の投与を可能にするのに十分な時間にわたって維持され得るか、又は生存可能なままであり得る、任意の非毒性水溶液である。例えば、薬学的に受容可能な担体又はビヒクルは、生理食塩水溶液又は緩衝化生理食塩水溶液であり得る。薬学的に許容される担体又はビヒクルはまた、ＮＫ細胞の効率を増加させ得る様々な生体材料を含み得る。細胞ビヒクル及び担体は、例えば、多糖類を含み、例えば、メチルセルロース（Ｍ．Ｃ．Ｔａｔｅ，Ｄ．Ａ．Ｓｈｅａｒ，Ｓ．Ｗ．Ｈｏｆｆｍａｎ，Ｄ．Ｇ．Ｓｔｅｉｎ，Ｍ．Ｃ．ＬａＰｌａｃａ Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ２２，１１１３，２００１、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、キトサン（Ｓｕｈ Ｊ Ｋ Ｆ，Ｍａｔｔｈ

ｅｗ Ｈ Ｗ Ｔ．Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ，２１，２５８９，２０００；Ｌａｈｉｊｉ Ａ，Ｓｏｈｒａｂｉ Ａ，Ｈｕｎｇｅｒｆｏｒｄ Ｄ Ｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｂｉｏｍｅｄ Ｍａｔｅｒ Ｒｅｓ，５１，５８６，２０００、それぞれの内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、Ｎ－イソプロピルアクリルアミドコポリマーＰ（ＮＩＰＡＭ－ｃｏ－ＡＡ）（Ｙ．Ｈ．Ｂａｅ，Ｂ．Ｖｅｒｎｏｎ，Ｃ．Ｋ．Ｈａｎ，Ｓ．Ｗ．Ｋｉｍ，Ｊ．Ｃｏｎｔｒｏｌ．Ｒｅｌｅａｓｅ５３，２４９，１９９８；Ｈ．Ｇａｐｐａ，Ｍ．Ｂａｕｄｙｓ，Ｊ．Ｊ．Ｋｏｈ，Ｓ．Ｗ．Ｋｉｍ，Ｙ．Ｈ．Ｂａｅ，Ｔｉｓｓｕｅ Ｅｎｇ．７，３５，２００１、それぞれの内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、ならびにポリ（オキシエチレン）／ポリ（Ｄ，Ｌ－乳酸－ｃｏ－グリコール酸）（Ｂ．Ｊｅｏｎｇ，Ｋ．Ｍ．Ｌｅｅ，Ａ．Ｇｕｔｏｗｓｋａ，Ｙ．Ｈ．Ａｎ，Ｂｉｏｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ ３，８６５，２００２、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、Ｐ（ＰＦ－ｃｏ－ＥＧ）（Ｓｕｇｇｓ Ｌ Ｊ，Ｍｉｋｏｓ Ａ Ｇ．Ｃｅｌｌ Ｔｒａｎｓ，８，３４５，１９９９、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、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、それぞれの内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、ＰＶＡ（Ｃｈｉｈ－Ｔａ Ｌｅｅ，Ｐｏ－Ｈａｎ Ｋｕｎｇ ａｎｄ Ｙｕ－Ｄｅｒ Ｌｅｅ，Ｃａｒｂｏｈｙｄｒａｔｅ Ｐｏｌｙｍｅｒｓ，６１，３４８，２００５、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、コラーゲン（Ｌｅｅ Ｃ Ｒ，Ｇｒｏｄｚｉｎｓｋｙ Ａ Ｊ，Ｓｐｅｃｔｏｒ Ｍ．，Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ２２，３１４５，２００１、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、アルギン酸塩（Ｂｏｕｈａｄｉｒ Ｋ Ｙ，Ａｌｓｂｅｒｇ Ｅ，Ｄａｍｍ Ｋ Ｌ，Ａｎｄｅｒｓｏｎ Ｋ Ｗ，Ｍｏｏｎｅｙ Ｄ Ｊ．Ｂｉｏｔｅｃｈ Ｐｒｏｇ１７，９４５，２００１、Ｓｍｉｄｓｒｄ Ｏ，Ｓｋｊａｋ－Ｂｒａｅｋ Ｇ．，Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｔｅｃｈ，８，７１，１９９０、それぞれの内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

【０３７０】

いくつかの実施形態では、ＮＫＧ２Ｃ^{pos}細胞などのＮＫ細胞又はそのサブセットは、有効量で組成物中に存在することができる。いくつかの実施形態では、組成物は、ＦｃＲγ^{neg}細胞又はそのｇ－ＮＫ代用マーカープロファイルを有する細胞などの有効量のｇＮＫ細胞を含有する。細胞の有効量は、患者、ならびに疾患のタイプ、重症度及び程度に応じて変動し得る。したがって、医師は、対象の健康、疾患の程度及び重症度、ならびに他の変数を考慮した後に、有効量が何であるかを決定することができる。

【０３７１】

特定の実施形態では、組成物中のそのような細胞の数は、治療有効量である。いくつかの実施形態では、量は、動物におけるがん、ウイルス感染、微生物感染、又は敗血症性ショックに関連する重症度、持続期間及び／又は症状を低減する量である。いくつかの実施形態では、治療有効量は、本明細書に記載の組成物を投与された患者又は動物において、組成物を投与されていない患者（又は動物）又は患者（又は動物）群におけるがんの増殖又は拡散と比較して、少なくとも２．５％、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２５％、少なくとも３５％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも７５％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、又は少なくとも９９％のがんの増殖又は拡散の低減をもたらす細胞の用量である。いくつかの実施形態では、治療有効量は、がん、ウイルス及び微生物細胞の増殖を阻害又は低減する活性をもたらす細胞傷害活性をもたらす量である。

【０３７２】

いくつかの実施形態では、組成物は、10^5もしくは約10^5から、10^{12}もしくは約10^{12}個のＮＫＧ２Ｃ^{pos}細胞もしくはそのサブセット、又は10^5もしくは約10^5から、10^8もしくは約10^8個のＮＫＧ２Ｃ^{pos}細胞もしくはそのサブセット、

又は10^6もしくは約10^6から、10^{12}もしくは約10^{12}個のＮＫＧ２Ｃ^{pos}細胞もしくはそのサブセット、又は10^8もしくは約10^8から、10^{11}もしくは約10^{11}個のＮＫＧ２Ｃ^{pos}細胞もしくはそのサブセット、又は10^9もしくは約10^9から、10^{10}もしくは約10^{10}個のＮＫＧ２Ｃ^{pos}細胞もしくはそのサブセットである量のＮＫＧ２Ｃ^{pos}細胞又はそのサブセットを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、10^5個超の、又は10^5個もしくは約10^5個超のＮＫＧ２Ｃｐｏｓ細胞又はそのサブセット、10^6個超の、又は10^6個もしくは約10^6個超のＮＫＧ２Ｃｐｏｓ細胞又はそのサブセット、10^7個超の、又は10^7個もしくは約10^7個超のＮＫＧ２Ｃｐｏｓ細胞又はそのサブセット、10^8個超の、又は約10^8個もしくは約10^8個超のＮＫＧ２Ｃｐｏｓ細胞又はそのサブセット、10^9個超の、又は10^9個もしくは約10^9個超のＮＫＧ２Ｃｐｏｓ細胞又はそのサブセット、10^{10}個超の、又は10^{10}個もしくは約10^{10}個超のＮＫＧ２Ｃｐｏｓ細胞又はそのサブセット、10^{11}個超の、又は10^{11}個もしくは約10^{11}個超のＮＫＧ２Ｃｐｏｓ細胞又はそのサブセット、又は10^{12}個超の、又は10^{12}個もしくは約10^{12}個超のＮＫＧ２Ｃｐｏｓ細胞又はそのサブセットを含む。いくつかの実施形態では、そのような量は、疾患又は状態を有する対象、例えばがん患者に投与することができる。

【０３７３】

いくつかの実施形態では、組成物は、10^5もしくは約10^5から、10^{12}もしくは約10^{12}個のｇ－ＮＫ細胞、10^5もしくは約10^5から、10^8もしくは約10^8個のｇ－ＮＫ細胞、又は10^6もしくは約10^6から、10^{12}もしくは約10^{12}個のｇ－ＮＫ細胞、10^8もしくは約10^8から、10^{11}もしくは約10^{11}個のｇ－ＮＫ細胞、又は10^9もしくは約10^9から、10^{10}もしくは約10^{10}個のｇ－ＮＫ細胞の量のｇ－ＮＫ細胞を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、10^5個超又は10^5個もしくは約10^5個超のｇ－ＮＫ細胞、10^6個超又は10^6個もしくは約10^6個超のｇ－ＮＫ細胞、10^7個超又は10^7個もしくは約10^7個超のｇ－ＮＫ細胞、10^8個超又は10^8個もしくは約10^8ｇ個超のｇ－ＮＫ細胞、10^9個超又は10^9個もしくは約10^9個超のｇ－ＮＫ細胞、10^{10}個超又は10^{10}個もしくは約10^{10}個超のｇ－ＮＫ細胞、10^{11}個超又は10^{11}個もしくは約10^{11}個超のｇ－ＮＫ細胞、又は10^{12}個超又は10^{12}個もしくは約10^{12}個超のｇ－ＮＫ細胞を含む。いくつかの実施形態では、そのような量は、疾患又は状態を有する対象、例えばがん患者に投与することができる。

【０３７４】

いくつかの実施形態では、組成物の体積は、少なくとも又は少なくとも約１０ｍＬ、５０ｍＬ、１００ｍＬ、２００ｍＬ、３００ｍＬ、４００ｍＬ又は５００ｍＬであり、例えば、１０ｍＬ～５００ｍＬ、１０ｍＬ～２００ｍＬ、１０ｍＬ～１００ｍＬ、１０ｍＬ～５０ｍＬ、５０ｍＬ～５００ｍＬ、５０ｍＬ～２００ｍＬ、５０ｍＬ～１００ｍＬ、１００ｍＬ～５００ｍＬ、１００ｍＬ～２００ｍＬ又は２００ｍＬ～５００ｍＬ（それぞれ両端を含む）もしくはそれらの各近似値である。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも又は少なくとも約1×10^5細胞／ｍＬ、5×10^5細胞／ｍＬ、1×10^6細胞／ｍＬ、5×10^6細胞／ｍＬ、1×10^7細胞／ｍＬ、5×10^7細胞／ｍＬ又は1×10^8細胞／ｍＬの細胞密度を有する。いくつかの実施形態では、組成物の細胞密度は、1×10^5細胞／ｍＬ～1×10^8細胞／ｍＬ、1×10^5細胞／ｍＬ～1×10^7細胞／ｍＬ、1×10^5細胞／ｍＬ～1×10^6細胞／ｍＬ、1×10^6細胞／ｍＬ～1×10^7細胞／ｍＬ、1×10^6細胞／ｍＬ～1×10^8細胞／ｍＬ、1×10^6細胞／ｍＬ～1×10^7細胞／ｍＬ、又は1×10^7細胞／ｍＬ～1×10^8細胞／ｍＬもしくはそれらの各近似値の範囲（それぞれ両端を含む）である。

【０３７５】

いくつかの実施形態では、医薬組成物を含む組成物は無菌である。いくつかの実施形態では、細胞の単離、濃縮、又は培養は、エラー、使用者の取り扱い、及び／又は汚染を最小限に抑えるために、閉鎖環境又は無菌環境で、例えば無菌培養バッグ中で行われる。い

くつかの実施形態では、無菌性は、例えば、滅菌濾過膜を通した濾過によって容易に達成され得る。いくつかの実施形態では、培養は、ガス透過性培養容器を使用して行われる。いくつかの実施形態では、培養は、バイオリアクターを使用して行われる。

【０３７６】

提供されるＮＫ細胞を凍結保存するのに適した組成物も本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞は、無血清凍結保存培地中で凍結保存される。いくつかの実施形態では、組成物は抗凍結剤を含む。いくつかの実施形態では、抗凍結剤は、ＤＭＳＯ及び／又はグリセロールであるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、５％又は約５％から、１０％又は約１０％のＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）である。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、５％又は約５％のＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）である。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、６％又は約６％のＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）である。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、７％又は約７％のＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）である。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、８％又は約８％のＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）である。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、９％又は約９％ＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）である。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、１０％又は約１０％のＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）である。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、市販の凍結保存溶液（ＣｒｙｏＳｔｏｒ（商標）ＣＳ１０）を含有する。ＣｒｙｏＳｔｏｒ（商標）ＣＳ１０は、１０％ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を含有する凍結保存培地であるいくつかの実施形態では、凍結保存のために製剤化された組成物は、極低温などの低温で保存することができ、例えば、８０℃±６．０℃又は約８０℃±６．０℃などの－４０℃～－１５０℃の温度範囲で保存することができる。

【０３７７】

いくつかの実施形態では、組成物は、患者への投与前に超低温で保存することができる。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞などのＮＫ細胞サブセットを、提供される方法などに従って単離し、処理し、増殖させ、次いで、対象への投与前に超低温で保存することができる。

【０３７８】

小規模で超低温で保存するための典型的な方法は、例えば、米国特許第６、０１６８，９９１号に記載されている。小規模の場合、細胞は、予め冷却された５％ヒトアルブミン血清（ＨＡＳ）中の低密度懸濁液（例えば、約２００×１０６／ｍｌの濃度）によって超低温で保存することができる。等量の２０％ＤＭＳＯをＨＡＳ溶液に添加することができる。混合物のアリコートをバイアルに入れ、約－８０℃の超低温チャンバー内で一晩凍結することができる。

【０３７９】

いくつかの実施形態では、凍結保存されたＮＫ細胞は、解凍によって投与のために調製される。いくつかの場合において、ＮＫ細胞は、解凍直後に対象に投与され得る。このような実施形態において、組成物は、いかなる更なる処理も伴わずにすぐに使用できる。他の場合において、ＮＫ細胞は、解凍後に、薬学的に許容される担体での再懸濁、活性化剤もしくは刺激剤とのインキュベーションなどによって更に処理されるか、又は対象への投与前に活性化され、洗浄され、薬学的に許容される緩衝液中に再懸濁される。

【０３８０】

Ｖ．ナチュラルキラー細胞サブセットを増殖させるための方法

抗原受容体（例えば、ＣＡＲ）をコードする異種核酸を含む遺伝子操作されたｇ－ＮＫ細胞の集団又は複数を含む組成物を産生する方法も、本明細書に開示される。免疫調節物質（例えば、分泌型もしくは可溶性サイトカイン又は膜結合型サイトカインなどのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む遺伝子操作されたｇ－ＮＫ細胞の集団又は複数を含む組成物を産生する方法も、本明細書に開示される。抗原受容体（例えば、ＣＡＲ）及び免疫調節物質（例えば、分泌型もしくは可溶性サイトカイン又は膜結合型サイトカインなどのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む遺伝子操作されたｇ－ＮＫ細胞の集団又は複数を含む組成物を産生する方法も、本明細書に開示される。いくつかの実施形態では

、本方法は、ｇ－ＮＫ細胞、又はｇ－ＮＫ細胞が濃縮されたもしくはｇ－ＮＫ細胞を増殖させた細胞の組成物もしくは集団に、ＣＡＲをコードする核酸を導入することを含む。

【０３８１】

免疫調節物質（例えば、分泌型もしくは可溶性サイトカイン又は膜結合型サイトカインなどのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む遺伝子操作されたｇ－ＮＫ細胞の集団又は複数を含む組成物を産生する方法も、本明細書に開示される。いくつかの実施形態では、本方法は、ｇ－ＮＫ細胞、又はｇ－ＮＫ細胞が濃縮されたもしくはｇ－ＮＫ細胞を増殖させた細胞の組成物もしくは集団に、免疫調節物質（例えば、分泌型もしくは可溶性サイトカイン又は膜結合型サイトカインなどのサイトカイン）をコードする核酸を導入することを含む。

【０３８２】

抗原受容体（例えば、ＣＡＲ）及び免疫調節物質（例えば、分泌型もしくは可溶性サイトカイン又は膜結合型サイトカインなどのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む遺伝子操作されたｇ－ＮＫ細胞の集団又は複数を含む組成物を産生する方法も、本明細書に開示される。いくつかの実施形態では、本方法は、（ａ）ｇ－ＮＫ細胞、又はｇ－ＮＫ細胞が濃縮されたもしくはｇ－ＮＫ細胞を増殖させた細胞の組成物もしくは集団に、ＣＡＲをコードする核酸を導入することと、（ｂ）ｇ－ＮＫ細胞、又はｇ－ＮＫ細胞が濃縮されたもしくはｇ－ＮＫ細胞を増殖させた細胞の組成物もしくは集団に、免疫調節物質（例えば、分泌型もしくは可溶性サイトカイン又は膜結合型サイトカインなどのサイトカイン）をコードする核酸を導入することとを含み、ステップ（ａ）及び（ｂ）は、同時に又は任意の順序で逐次的に行われる。

【０３８３】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集の１つ以上のステップを実施して、操作された細胞のゲノム中で遺伝子が編集されている、例えばノックアウトされている細胞を産生することもできる。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ誘導型ヌクレアーゼ、例えばＲＮＰ複合体を、ｇ－ＮＫ細胞、又はｇ－ＮＫ細胞が濃縮されたもしくはそれを増殖させた細胞の組成物もしくは集団に導入することなどによる遺伝子編集のための方法は、抗原受容体（例えばＣＡＲ）をコードする異種核酸、免疫調節物質（例えばサイトカイン、例えば分泌型もしくは可溶性サイトカイン又は膜結合型サイトカイン）をコードする異種核酸、又は抗原受容体（例えばＣＡＲ）及び免疫調節物質（例えばサイトカイン、例えば分泌型もしくは可溶性サイトカイン又は膜結合型サイトカイン）をコードする異種核酸を任意の順序で導入することと同時に又は逐次的に行うことができる。

【０３８４】

いくつかの実施形態では、細胞を操作するステップは、対象由来の生体試料からｇ－ＮＫ細胞を濃縮及び増殖させるための方法に関連して行うことができる。ｇ－ＮＫ細胞を濃縮又は増殖させるための方法は、ＰＣＴ公開第ＷＯ２０２０／１０７００２号又はＰＣＴ出願第２０２１／０２８５０４号に記載されている方法を含み得る。ｇ－ＮＫ細胞を濃縮し、そのような細胞を優先的に増殖させるための例示的な方法は、以下に更に詳細に記載される。

【０３８５】

いくつかの態様では、ＣＡＲをコードする核酸は、ゲノムへの安定な組み込みのために、又は一過性発現のために、ｇ－ＮＫ細胞に導入することができる。いくつかの態様では、免疫調節物質をコードする核酸は、ゲノムへの安定な組み込みのために、又は一過性発現のために、ｇ－ＮＫ細胞に導入することができる。いくつかの態様では、ＣＡＲ及び免疫調節物質をコードする核酸は、ゲノムへの安定な組み込みのために、又は一過性発現のために、ｇ－ＮＫ細胞に導入することができる。核酸が安定な組み込みのためにｇ－ＮＫ細胞に導入される場合、それは、核酸が安定に組み込まれ、操作されたＮＫ細胞子孫において増殖されるように、操作されたＮＫ細胞の集団を培養する前に導入され得る。いくつかの実施形態では、ＣＡＲをコードしている核酸は、ゲノムに安定的に組み込まれる。いくつかの実施形態では、免疫調節物質をコードする核酸は、ゲノムに安定的に組み込まれ

る。いくつかの実施形態では、ＣＡＲ及び免疫調節物質をコードする核酸は、ゲノムに安定的に組み込まれる。いくつかの実施形態では、核酸は、ウイルスベクターを介してｇ－ＮＫ細胞に導入される。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。

【０３８６】

いくつかの実施形態では、異種薬剤をＮＫ細胞のゲノムに安定に組み込むためなど、細胞を操作するステップは、更なる増殖のための条件下で濃縮ｇ－ＮＫ細胞を培養又はインキュベートする前に実行される。いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞は、以下のセクションＶ．Ａに記載されるように生体試料から単離され、次いで、セクションＶ．Ｂに記載されるような方法を使用して細胞を増殖させる前に、抗原受容体（例えば、ＣＡＲ）をコードする異種核酸が導入される。いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞は、以下のセクションＶ．Ａに記載されるように生体試料から単離され、次いで、セクションＶ．Ｂに記載されるような方法を使用して細胞を増殖させる前に、免疫調節物質（例えば、分泌型もしくは可溶性サイトカイン又は膜結合型サイトカインなどのサイトカイン）をコードする異種核酸が導入される。いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞は、以下のセクションＶ．Ａに記載されるように生体試料から単離され、次いで、セクションＶ．Ｂに記載されるような方法を使用して細胞を増殖させる前に、免疫調節物質（例えば、分泌型もしくは可溶性サイトカイン又は膜結合型サイトカインなどのサイトカイン）をコードする異種核酸が導入される。いくつかの実施形態では、細胞は、ＣＡＲをコードする核酸を導入することと同時に又は連続して遺伝子編集方法によって更に操作される。いくつかの実施形態では、細胞は、免疫調節物質（例えば、分泌型もしくは可溶性サイトカイン又は膜結合型サイトカインなどのサイトカイン）をコードする核酸を導入することと同時に又は連続して、遺伝子編集方法によって更に操作される。いくつかの実施形態では、細胞は、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、分泌型もしくは可溶性サイトカイン又は膜結合型サイトカインなどのサイトカイン）をコードする核酸の導入と同時に又は逐次的に、遺伝子編集方法によって更に操作される。いくつかの実施形態では、細胞は、セクションＶ．Ｂに記載される増殖方法を実施する前に、遺伝子編集によって操作される。

【０３８７】

いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞のゲノムへの異種薬剤の安定な組込みなどのために細胞を操作するステップは、濃縮されたｇ－ＮＫ細胞をそれらの更なる増殖のための条件下で培養又はインキュベートする間に行われる。例えば、ＮＫ細胞は、以下のセクションＶ．Ａに記載されるように生体試料から単離され、次いで、セクションＶ．Ｂに記載される方法に従って第１の増殖期間に供される。第１の増殖期間は、セクションＶ．Ｂに記載されるように全増殖期間の一部であり、増殖期間の残りの部分は、第２の増殖期間を実施することによって達成される。例えば、第１の増殖期間は、約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日又は１０日間もしくはそれらの前後である。いくつかの実施形態では、第１の増殖期間の後、細胞を収集し、次いで、セクションＶ．Ｂに記載の方法を使用して、第２の増殖期間で細胞を更に増殖する前に、抗原受容体（例えば、ＣＡＲ）をコードする異種核酸を導入する。いくつかの実施形態では、増殖の最初の期間の後、細胞を収集し、次いで、セクションＶ．Ｂに記載されている方法を使用して、第２増殖期の細胞を更に増殖させる前に、免疫調節物質（例えば、分泌性サイトカイン又は可溶性サイトカイン又は膜結合型サイトカインなどのサイトカイン）をコードする異種核酸を導入する。を増殖させる。いくつかの実施形態では、最初の増殖期間の後、細胞を収集し、次に、セクションＶ．Ｂに記載されている方法を使用して、第２増殖期間で細胞を更に増殖する前に、抗原受容体（例えば、ＣＡＲ）及び免疫調節物質（例えば、分泌性又は可溶性サイトカイン、又は膜結合性サイトカインなどのサイトカイン）をコードする異種核酸を導入する。第２の増殖期間は、セクションＶ．Ｂに記載されている全増殖期間の一部であり、例えば、ｇ－ＮＫ細胞が濃縮された細胞の閾値数が増殖するまでである。例えば、第２の増殖期間は、約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日又は１０日間もしくはそれらの前後である。いくつかの実施形態では、細胞は、ＣＡＲをコードする

核酸の導入と同時に又は連続して、遺伝子編集方法によって更に操作される。いくつかの実施形態では、細胞は、免疫調節物質（例えば、分泌型もしくは可溶性サイトカイン又は膜結合型サイトカインなどのサイトカイン）をコードする核酸を導入することと同時に又は連続して、遺伝子編集方法によって更に操作される。いくつかの実施形態では、細胞は、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、分泌型もしくは可溶性サイトカイン又は膜結合型サイトカインなどのサイトカイン）をコードする核酸の導入と同時に又は逐次的に、遺伝子編集方法によって更に操作される。いくつかの実施形態では、細胞は、セクションＶ．Ａに記載されているようにｇ－ＮＫ細胞を濃縮するために生体試料から細胞を単離又は選択した後、かつ第１の増殖を実施する前に、遺伝子編集によって操作される。

【０３８８】

他の実施形態において、ＣＡＲをコードする核酸は、一過性発現のためにｇ－ＮＫ細胞に導入することができる。他の態様では、免疫調節物質をコードする核酸は、一過性発現のためにｇ－ＮＫ細胞に導入され得る。他の態様では、ＣＡＲ及び免疫調節物質をコードする核酸は、一過性発現のためにｇ－ＮＫ細胞に導入され得る。核酸が一過性発現のためにｇ－ＮＫ細胞に導入される場合、一過性に発現された核酸は、十分に長い期間持続しないか、又は培養された集団の全ての細胞に十分に増殖しない可能性があるので、操作されたＮＫ細胞の集団を培養した後に導入することができる。いくつかの実施形態では、ＣＡＲをコードする核酸は、操作されたＮＫ細胞において一過性に発現される。いくつかの実施形態では、免疫調節物質（例えば、分泌型もしくは可溶性サイトカイン又は膜結合型サイトカインなどのサイトカイン）をコードする核酸は、操作されたＮＫ細胞において一過性に発現される。いくつかの実施形態では、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、分泌型もしくは可溶性サイトカイン又は膜結合型サイトカインなどのサイトカイン）をコードする核酸は、操作されたＮＫ細胞において一過性に発現される。いくつかの実施形態では、核酸は、ナノ粒子送達を介して導入される。いくつかの実施形態では、核酸は、エレクトロポレーションを介して導入される。

【０３８９】

したがって、ｇ－ＮＫ細胞を増殖させるいくつかの方法において、濃縮されたＮＫ細胞の集団は、ＣＡＲをコードする核酸を増殖集団のＮＫ細胞に導入する前に、増殖のための条件下で培養されるべきである。ｇ－ＮＫ細胞を増殖させるいくつかの方法において、濃縮されたＮＫ細胞の集団は、増殖のための条件下で培養され、その後、増殖させた集団のＮＫ細胞に、免疫調節物質（例えば、分泌型もしくは可溶性サイトカイン又は膜結合型サイトカインなどのサイトカイン）をコードする核酸が導入されるべきである。ｇ－ＮＫ細胞を増殖させるいくつかの方法において、濃縮されたＮＫ細胞の集団は、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、分泌型もしくは可溶性サイトカイン又は膜結合型サイトカインなどのサイトカイン）をコードする核酸を増殖集団のＮＫ細胞に導入する前に、増殖のための条件下で培養されるべきである。これは、ＣＡＲ又は免疫調節物質が一過性に（例えば、ｍＲＮＡを介して）発現される状況において特に適用可能である。

【０３９０】

ｇ－ＮＫ細胞が濃縮されたＮＫ細胞の増殖のための例示的な方法は、以下のセクションＶ．Ａ及びＢに記載されている。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞を増殖させる方法は、（ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された集団が、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、（ｂ）濃縮されたＮＫ細胞の集団を、（ｉ）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞　対　濃縮ＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び（ｉｉ）ＮＫ細胞を増殖させるための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、ＮＫ細胞を増殖させるための有効量の２つ以上の組換えサイトカインと共に、培地中で培養し、それによって、増殖ＮＫ細胞集団を産生することと、

（ｃ）ＮＫ細胞の増殖集団のＮＫ細胞に、ＣＡＲをコードする核酸を導入することと、を含み、方法は、ＣＡＲで操作されたｇ－ＮＫ細胞が濃縮された操作されたＮＫ細胞の増殖集団を産生する、方法。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞を増殖させる方法は、（ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された集団が、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、（ｂ）濃縮されたＮＫ細胞の集団を、（ｉ）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞　対　濃縮ＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び（ｉｉ）ＮＫ細胞を増殖させるための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、ＮＫ細胞を増殖させるための有効量の２つ以上の組換えサイトカインと共に、培地中で培養し、それによって、増殖ＮＫ細胞集団を産生することと、（ｃ）増殖させたＮＫ細胞集団のＮＫ細胞に、免疫調節物質（例えば、分泌型もしくは可溶性サイトカイン又は膜結合型サイトカインなどのサイトカイン）をコードする核酸を導入することと、を含み、方法は、免疫調節物質（例えば、分泌型もしくは可溶性サイトカイン又は膜結合型サイトカインなどのサイトカイン）で操作されたｇ－ＮＫ細胞が濃縮されている操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する方法。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞を増殖させる方法は、（ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された集団が、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、（ｂ）濃縮されたＮＫ細胞の集団を、（ｉ）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞　対　濃縮ＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び（ｉｉ）ＮＫ細胞を増殖させるための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、ＮＫ細胞を増殖させるための有効量の２つ以上の組換えサイトカインと共に、培地中で培養し、それによって、増殖ＮＫ細胞集団を産生することと、（ｃ）増殖させたＮＫ細胞集団のＮＫ細胞に、（ｉ）ＣＡＲをコードする核酸、及び（ｉｉ）免疫調節物質（例えば、分泌可能もしくは可溶性サイトカイン又は膜結合型サイトカインなどのサイトカイン）をコードする核酸を導入することと、を含み、ステップ（ｉ）及び（ｉｉ）を同時に又は任意の順序で逐次的に実施し、方法は、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、分泌可能もしくは可溶性サイトカイン又は膜結合型サイトカインなどのサイトカイン）で操作されたｇ－ＮＫ細胞が濃縮された、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する。

【０３９１】

いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞のゲノムへの異種薬剤の一過性発現などのために細胞を操作するステップは、濃縮ｇ－ＮＫ細胞をそれらの更なる増殖のための条件下で培養又はインキュベートした後に実施される。いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞は、以下のセクションＶ．Ａに記載されるように生体試料から単離され、セクションＶ．Ｂに記載されるような方法を使用して増殖され、次いで、抗原受容体（例えば、ＣＡＲ）をコードする異種核酸が導入される。いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞は、以下のセクションＶ．Ａに記載されるように生体試料から単離され、セクションＶ．Ｂに記載されるような方法を使用して増殖され、次いで、免疫調節物質（例えば、分泌型もしくは可溶性サイトカイン又は膜結合型サイトカインなどのサイトカイン）をコードする異種核酸が導入される。いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞は、以下のセクションＶ．Ａに記載されるように生体試料から単離され、セクションＶ．Ｂに記載されるような方法を使用して増殖され、次いで、抗原受容体（例えば、ＣＡＲ）及び免疫調節物質（例えば、分泌型もしくは可溶性サイトカイン又は膜結合型サイトカインなどのサイトカイン）をコードする異種核酸と共に導入される。いくつかの実施形態では、細胞は、ＣＡＲ及び／又は免疫調節物質（例えば

、分泌型もしくは可溶性サイトカイン又は膜結合型サイトカインなどのサイトカイン）をコードする核酸の導入と同時に又は逐次的に、遺伝子編集方法によって更に操作される。いくつかの実施形態では、細胞は、セクションＶ．Ｂに記載される増殖方法を実施する前に、遺伝子編集によって操作される。

【０３９２】

Ａ．ｇ－ＮＫ細胞を濃縮するために生体試料から細胞を選択する方法

いくつかの実施形態では、操作されたｇ－ＮＫ細胞を含有する組成物を含むｇ－ＮＫ細胞組成物は、ヒト対象由来の生体試料からのＮＫ細胞のサブセットからのエクスビボでの増殖によってｇ－ＮＫ細胞を濃縮するための方法を含む方法によって産生される。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞組成物を増殖及び産生するための方法は、ヒト対象由来の生体試料からのＦｃＲγ欠損ＮＫ細胞（ｇ$^{-}$ＮＫ）である細胞のサブセットを増殖させる段階を含むことができる。いくつかの実施形態では、本方法は、ヒト対象由来の生体試料からＮＫＧ２Ｃ^{pos}であるＮＫ細胞のサブセットを増殖させることを含むことができる。いくつかの実施形態では、本方法は、ヒト対象由来の生体試料からＮＫＧ２Ａ^{neg}であるＮＫ細胞のサブセットを増殖させることを含むことができる。いくつかの実施形態では、本方法は、ヒト対象由来の生体試料からナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された細胞の集団を単離する段階、ならびにｇ－ＮＫ細胞対象及び／又はｇ－ＮＫ細胞サブセットと細胞外表面マーカーが重複もしくは共有するＮＫ細胞サブセットが優先的に増殖及び／又は増殖する条件下で細胞を培養する段階を含む。例えば、ＮＫ細胞は、フィーダー細胞を使用して、又はサイトカインの存在下で培養されて、ｇ－ＮＫ細胞対象及び／又はｇ－ＮＫ細胞サブセットと重複するかもしくは細胞外表面マーカーを共有するＮＫ細胞サブセットの増殖及び／又は増殖を増強し得る。いくつかの態様では、提供される方法はまた、ＮＫＧ２Ｃ^{pos}及び／又はＮＫＧ２Ａ^{neg}である任意のＮＫ細胞などのＮＫ細胞の他のサブセットを増殖することができる。

【０３９３】

いくつかの実施形態では、試料、例えば生体試料は、ＮＫ細胞集団を含む複数の細胞集団を含有するものである。いくつかの実施形態では、生体試料は、血液細胞、例えば末梢血単核細胞であるか、又はそれを含む。いくつかの態様において、生体試料は、全血試料、アフェレーシス産物又は白血球アフェレーシス産物である。いくつかの実施形態では、試料は、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）の試料である。したがって、提供される方法のいくつかの形態では、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）の集団を得ることができる。ＮＫ細胞集団を含む複数の細胞集団を含有する試料は、提供される方法に従って増殖のためにＮＫ細胞サブセットを濃縮又は選択するための細胞として使用することができる。

【０３９４】

いくつかの実施形態では、生体試料は、健康な対象である対象に由来する。いくつかの実施形態では、生体試料は、疾患又は状態、例えばがんを有する対象に由来する。

【０３９５】

いくつかの実施形態では、細胞は、試料、例えば生体試料、例えば対象、例えば特定の疾患もしくは状態を有する対象、又は細胞療法を必要とする対象、又は細胞療法が投与される対象から得られるか又は由来する試料から単離又は選択される。いくつかの態様において、対象は、ヒト、例えば、細胞が単離され、処理され、及び／又は操作される養子細胞療法などの特定の治療的介入を必要とする患者である対象である。したがって、いくつかの実施形態における細胞は、初代細胞、例えば、初代ヒト細胞である。試料には、対象から直接採取した組織、体液、及び他の試料が含まれる。生体試料は、生物学的供給源から直接得られた試料又は処理された試料であり得る。生体試料としては、体液（例えば、血液、血漿、血清、脳脊髄液、滑液、尿及び汗）、組織試料及び器官試料（これらに由来する処理試料を含む）が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの態様では、試料は、血液もしくは血液由来試料であるか、又はアフェレーシスもしくは白血球アフェレーシス産物であるか、もしくはそれに由来する。

【０３９６】

いくつかの実施形態では、対象の循環血液由来の細胞が得られる。試料は、いくつかの態様では、ＮＫ細胞、Ｔ細胞、単球、顆粒球、Ｂ細胞、他の有核白血球、赤血球、及び／又は血小板を含むリンパ球を含有し、いくつかの態様では、赤血球及び血小板以外の細胞を含有する。いくつかの実施形態では、対象から回収された細胞を洗浄して血漿画分を除去し、後続の処理ステップに適した緩衝液又は培地中に細胞を入れてよい。いくつかの実施形態では、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で細胞を洗浄する。いくつかの実施形態では、洗浄溶液はカルシウムを含まず、及び／又はマグネシウムを含んでいなくてもよく、及び／又は全てではないが多くの二価カチオンを含んでいなくてもよい。特定の実施形態では、血液細胞試料の成分を除去し、細胞を培養培地に直接再懸濁する。いくつかの実施形態では、本方法は、密度に基づく細胞分離方法、例えば、赤血球を溶解し、Ｐｅｒｃｏｌｌ又はＦｉｃｏｌｌ勾配による遠心分離（例えば、Ｈｉｓｔｏｐａｑｕｅ（登録商標）密度遠心分離を使用することによる）によって末梢血から白血球を調製することを含む。

【０３９７】

いくつかの実施形態では、生体試料は、正常な末梢血から収集された濃縮白血球搬出産物に由来する。いくつかの実施形態では、濃縮された白血球搬出産生物は、新鮮な細胞を含み得る。いくつかの実施形態では、濃縮された白血球搬出産物は、提供される方法における使用のために解凍される凍結保存試料である。

【０３９８】

いくつかの実施形態では、生体細胞の供給源には、5×10^5又は約5×10^5から、5×10^8又は約5×10^8個のＮＫ細胞、ｇ－ＮＫ細胞サブセット、又はｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーに関連するか、又はそれを含むＮＫ細胞サブセットが含まれる。いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞の数、又は生体サンプル中の、ｇ－ＮＫ細胞サブセット、又はｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーに関連するか、又はそれを含むＮＫ細胞サブセットは、5×10^5～1×10^8、5×10^5～5×10^7、5×10^5～1×10^7、5×10^5～5×10^6、5×10^5～1×10^6、1×10^6～1×10^8、1×10^6～5×10^7、1×10^6～1×10^7、1×10^6～5×10^6、5×10^6～1×10^8、5×10^6～5×10^7、5×10^6～1×10^7、1×10^7～1×10^8、1×10^7～5×10^7、又は5×10^7～1×10^8もしくはそれらの各近似値の範囲である。

【０３９９】

いくつかの実施形態では、生体試料中のＮＫ細胞のうち、ｇ－ＮＫ細胞、又はｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーと関連するもしくはｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーを含むＮＫ細胞サブセットの割合は、３％又は約３％より大きい。いくつかの実施形態では、生体試料中のＮＫ細胞のうち、ｇ－ＮＫ細胞、又はｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーと関連するもしくはｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーを含むＮＫ細胞サブセットの割合は、５％又は約５％超である。いくつかの実施形態では、生体試料中のＮＫ細胞のうち、ｇ－ＮＫ細胞、又はｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーと関連するもしくはｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーを含むＮＫ細胞サブセットの割合は、１０％又は約１０％より大きい。いくつかの実施形態では、生体試料中のＮＫ細胞のうち、ｇ－ＮＫ細胞、又はｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーと関連するもしくはｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーを含むＮＫ細胞サブセットの割合は、１２％又は約１２％より大きい。いくつかの実施形態では、生体試料中のＮＫ細胞のうち、ｇ－ＮＫ細胞、又はｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーと関連するもしくはｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーを含むＮＫ細胞サブセットの割合は、１４％又は約１４％より大きい。いくつかの実施形態では、生体試料中のＮＫ細胞のうち、ｇ－ＮＫ細胞、又はｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーと関連するもしくはｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーを含むＮＫ細胞サブセットの割合は、１６％又は約１６％より大きい。いくつかの実施形態では、生体試料中のＮＫ細胞のうち、ｇ－ＮＫ細胞、又はｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーと関連するもしくはｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーを含むＮＫ細胞サブセットの割合は、１８％又は約１８％より大きい。いくつかの実施形態では、生体試料中のＮＫ細胞のうち、ｇ－ＮＫ細胞、又はｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーと関連するもしくはｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーを含むＮＫ細胞サブセットの割合は、２０％又は約２０％より大きい。いくつかの実施形態では、生体試料中のＮＫ細胞のうち、ｇ－

ＮＫ細胞、又はｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーと関連するかもしくはそれを含むＮＫ細胞サブセットの割合は、２２％又は約２２％より大きい。いくつかの実施形態では、生体試料中のＮＫ細胞のうち、ｇ－ＮＫ細胞、又はｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーと関連するもしくはｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーを含むＮＫ細胞サブセットの割合は、２４％又は約２４％より大きい。いくつかの実施形態では、生体試料中のＮＫ細胞のうち、ｇ－ＮＫ細胞、又はｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーと関連するもしくはｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーを含むＮＫ細胞サブセットの割合は、２６％又は約２６％より大きい。いくつかの実施形態では、生体試料中のＮＫ細胞のうち、ｇ－ＮＫ細胞、又はｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーと関連するもしくはｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーを含むＮＫ細胞サブセットの割合は、２８％又は約２８％より大きい。いくつかの実施形態では、生体試料中のＮＫ細胞のうち、ｇ－ＮＫ細胞、又はｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーと関連するもしくはｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーを含むＮＫ細胞サブセットの割合は、３０％又は約３０％より大きい。

【０４００】

いくつかの実施形態では、生体試料中のＮＫ細胞のうち、ｇ－ＮＫ細胞、又はｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーと関連するもしくはｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーを含むＮＫ細胞サブセットの割合が３％又は約３％を超える場合、対象が選択される。いくつかの実施形態では、生体試料中のＮＫ細胞のうち、ｇ－ＮＫ細胞、又はｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーと関連するもしくはｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーを含むＮＫ細胞サブセットの割合が５％又は約５％を超える場合、対象が選択される。いくつかの実施形態では、生体試料中のＮＫ細胞のうち、ｇ－ＮＫ細胞、又はｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーと関連するもしくはｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーを含むＮＫ細胞サブセットの割合が、１０％又は約１０％を超える場合、対象が選択される。いくつかの実施形態では、生体試料中のＮＫ細胞のうち、ｇ－ＮＫ細胞、又はｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーと関連するかもしくはそれを含むＮＫ細胞サブセットの割合が、１２％又は約１２％を超える場合、対象が選択される。いくつかの実施形態では、生体試料中のＮＫ細胞のうち、ｇ－ＮＫ細胞、又はｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーと関連するもしくはｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーを含むＮＫ細胞サブセットの割合が、１４％又は約１４％を超える場合、対象が選択される。いくつかの実施形態では、生体試料中のＮＫ細胞のうち、ｇ－ＮＫ細胞、又はｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーと関連するもしくはｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーを含むＮＫ細胞サブセットの割合が１６％又は約１６％を超える場合、対象が選択される。いくつかの実施形態では、生体試料中のＮＫ細胞のうち、ｇ－ＮＫ細胞、又はｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーと関連するもしくはｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーを含むＮＫ細胞サブセットの割合が、１８％又は約１８％を超える場合、対象が選択される。いくつかの実施形態では、生体試料中のＮＫ細胞のうち、ｇ－ＮＫ細胞、又はｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーと関連するもしくはｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーを含むＮＫ細胞サブセットの割合が２０％又は約２０％を超える場合、対象が選択される。いくつかの実施形態では、生体試料中のＮＫ細胞のうち、ｇ－ＮＫ細胞、又はｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーと関連するかもしくはそれを含むＮＫ細胞サブセットの割合が、２２％又は約２２％を超える場合、対象が選択される。いくつかの実施形態では、生体試料中のＮＫ細胞のうち、ｇ－ＮＫ細胞、又はｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーと関連するもしくはｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーを含むＮＫ細胞サブセットの割合が２４％又は約２４％を超える場合、対象が選択される。いくつかの実施形態では、生体試料中のＮＫ細胞のうち、ｇ－ＮＫ細胞、又はｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーと関連するもしくはｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーを含むＮＫ細胞サブセットの割合が２６％又は約２６％を超える場合、対象が選択される。いくつかの実施形態では、生体試料中のＮＫ細胞のうち、ｇ－ＮＫ細胞、又はｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーと関連するもしくはｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーを含むＮＫ細胞サブセットの割合が２８％又は約２８％を超える場合、対象が選択される。いくつかの実施形態では、生体試料中のＮＫ細胞のうち、ｇ－ＮＫ細胞、又はｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーと関連するもしくはｇ－ＮＫ細胞の代替マーカーを含むＮＫ細胞サブセットの割合が、３０％又は約３０％を超える場合、対象が選択される。

【０４０１】

いくつかの実施形態では、生体試料は、ＣＭＶ血清陽性である対象に由来する。ＣＭＶ感染は、増強された抗ウイルス活性を示すＮＫＧ２Ｃを発現するＮＫ細胞の高い画分の発生を含む、ＮＫ細胞の表現型及び機能的分化をもたらし得る。ＮＫＧ２Ｃを発現するＣＭＶ関連ＮＫ細胞は、ＤＮＡメチル化パターンの変化及びＦｃＲγなどのシグナル伝達分子の発現の低下を示す（Ｓｃｈｌｕｍｓら、Ｉｍｍｕｎｉｔｙ（２０１５）４２：４４３－５６）。これらのＮＫ細胞は、従来のＮＫ細胞サブセットと比較して、より強力な抗体依存性活性化、増殖、及び機能に関連している。場合によっては、ＦｃＲγの発現が低下したＮＫ細胞は、一般的にはより低いレベルであるが、ＣＭＶ血清反応陰性個体においても検出することができるので、生体試料は、ＣＭＶ血清反応陰性である対象由来であってもよい。いくつかの場合において、生体試料は、ＣＭＶ血清陽性個体由来であり得る。

【０４０２】

いくつかの実施形態では、対象は、ＮＫＧ２Ｃについて陽性である末梢血試料中のＮＫ細胞の割合に基づいて選択される。いくつかの実施形態では、対象は、末梢血試料中のＮＫ細胞の少なくとも２０％又は約２０％がＮＫＧ２Ｃについて陽性である場合に選択される。いくつかの実施形態では、対象は、末梢血試料中のＮＫ細胞の少なくとも２５％又は約２５％がＮＫＧ２Ｃに陽性である場合に選択される。いくつかの実施形態では、対象は、末梢血試料中のＮＫ細胞の少なくとも３０％又は約３０％がＮＫＧ２Ｃについて陽性である場合に選択される。いくつかの実施形態では、対象は、末梢血試料中のＮＫ細胞の少なくとも３５％又は約３５％がＮＫＧ２Ｃについて陽性である場合に選択される。いくつかの実施形態では、対象は、末梢血試料中のＮＫ細胞の少なくとも４０％又は約４０％がＮＫＧ２Ｃについて陽性である場合に選択される。いくつかの実施形態では、対象は、末梢血試料中のＮＫ細胞の少なくとも４５％又は約４５％がＮＫＧ２Ｃについて陽性である場合に選択される。いくつかの実施形態では、対象は、末梢血試料中のＮＫ細胞の少なくとも５０％又は約５０％がＮＫＧ２Ｃについて陽性である場合に選択される。いくつかの実施形態では、対象は、末梢血試料中のＮＫ細胞の少なくとも５５％又は約５５％がＮＫＧ２Ｃについて陽性である場合に選択される。いくつかの実施形態では、対象は、末梢血試料中のＮＫ細胞の少なくとも６０％又は約６０％がＮＫＧ２Ｃについて陽性である場合に選択される。

【０４０３】

いくつかの実施形態では、対象は、ＮＫＧ２Ａについて陰性又は低発現性の末梢血試料中のＮＫ細胞の割合に基づいて選択される。いくつかの実施形態では、末梢血試料中のＮＫ細胞の少なくとも７０％又は約７０％が、ＮＫＧ２Ａについて陰性又は低発現性である場合に、対象が選択される。いくつかの実施形態では、末梢血試料中のＮＫ細胞の少なくとも７５％又は約７５％が、ＮＫＧ２Ａについて陰性又は低発現性である場合に、対象が選択される。いくつかの実施形態では、末梢血試料中のＮＫ細胞の少なくとも８０％又は約８０％が、ＮＫＧ２Ａについて陰性又は低発現性である場合、対象が選択される。いくつかの実施形態では、末梢血試料中のＮＫ細胞の少なくとも８５％又は約８５％が、ＮＫＧ２Ａについて陰性又は低発現性である場合に、対象が選択される。いくつかの実施形態では、末梢血試料中のＮＫ細胞の少なくとも９０％又は約９０％が、ＮＫＧ２Ａについて陰性又は低発現性である場合に、対象が選択される。

【０４０４】

いくつかの実施形態では、対象は、ＮＫＧ２Ｃについて陽性である末梢血試料中のＮＫ細胞の割合と、ＮＫＧ２Ａについて陰性又は低度である末梢血試料中のＮＫ細胞の割合の両方に基づいて選択される。いくつかの実施形態では、対象は、末梢血試料中のＮＫ細胞の少なくとも２０％又は約２０％がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり、末梢血試料中のＮＫ細胞の少なくとも、又は約７０％がＮＫＧ２Ａについて陰性であるか又は低度である場合に選択される。いくつかの実施形態では、対象は、末梢血試料中のＮＫ細胞の少なくとも３０％又は約３０％がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり、末梢血試料中のＮＫ細胞の少なくとも、又は約７５％がＮＫＧ２Ａについて陰性であるか又は低度である場合に選択される。いくつかの実施形態では、対象は、末梢血試料中のＮＫ細胞の少なくとも４０％又は約

４０％がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり、末梢血試料中のＮＫ細胞の少なくとも８０％又は約８０％がＮＫＧ２Ａについて陰性であるか又は低度である場合に選択される。いくつかの実施形態では、末梢血試料中のＮＫ細胞の少なくとも５０％又は約５０％がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり、末梢血試料中のＮＫ細胞の少なくとも８５％又は約８５％がＮＫＧ２Ａについて陰性であるか又は低度である場合、対象が選択される。いくつかの実施形態では、末梢血試料中のＮＫ細胞の少なくとも６０％又は約６０％がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり、かつ末梢血試料中のＮＫ細胞の少なくとも９０％又は約９０％がＮＫＧ２Ａについて陰性であるか又は低度である場合、対象が選択される。いくつかの実施形態では、末梢血試料中のＮＫ細胞の少なくとも６０％又は約６０％がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり、かつ末梢血試料中のＮＫ細胞の少なくとも９５％又は約９５％がＮＫＧ２Ａについて陰性であるか又は低度である場合、対象が選択される。

【０４０５】

いくつかの実施形態では、対象がＣＭＶ血清陽性であり、かつ対象由来の末梢血試料中のＮＫ細胞のうち、ｇ－ＮＫ細胞の割合が３０％超又は約３０％超であり、ＮＫＧ２Ｃ^{pos}細胞の割合が２０％超又は約２０％超であり、かつＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞の割合が７０％超又は約７０％超である場合、対象は、提供される方法に従う細胞の増殖のために選択される。

【０４０６】

いくつかの実施形態では、対象由来のＮＫ細胞は、ＣＤ１６遺伝子のヌクレオチド５２６［チミジン（Ｔ）→グアニン（Ｇ）］に一塩基多型（ＳＮＰ　ｒｓ３９６９９１）を有し、その結果、成熟（処理）型タンパク質（Ｆ１５８Ｖ）において１５８位のフェニルアラニン（Ｆ）がバリン（Ｖ）にアミノ酸（ａａ）置換される。いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞は、両方の対立遺伝子にＣＤ１６　１５８　Ｖ多型（本明細書では１５８Ｖ／Ｖと呼ぶ）を有する。いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞は、単一対立遺伝子にＣＤ１６　１５８　Ｖ多型（本明細書では１５８Ｖ／Ｆと呼ばれる）を有する。本明細書における１５８　Ｖ＋遺伝子型への言及は、１５８Ｖ／Ｖ遺伝子型及び１５８Ｖ／Ｆ遺伝子型の両方を指すことが理解される。ＣＤ１６　Ｆ１５８Ｖ多型は、ＩｇＧｌ　抗体に対する実質的により高い親和性と関連し、より強固なＮＫ細胞媒介性ＡＤＣＣ応答を開始する能力を有することが見出されている（Ｍｅｌｌｏｒ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）Ｊ．Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｈｅｍａｔｏｌｏｇｙ＆Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，６：１；Ｍｕｓｏｌｉｎｏ　ｅｔ　ａｌ．（２００８）Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，２６：１７８９－１７９６及びＨａｔｊｉｈａｒｉｓｓｉ　ｅｔ　ａｌ．（２００７）Ｂｌｏｏｄ，１１０：２５６１－２５６４）。いくつかの実施形態では、ＣＤ１６　１５８　Ｖ＋／ｇ－ＮＫ細胞の抗体指向性標的化は、ＣＤ１６　１５８　Ｖ＋／ｇ－ＮＫ細胞サブセットの改善された親和性、細胞傷害性及び／又はサイトカイン媒介効果機能に起因して、患者に対する改善された転帰をもたらす。

【０４０７】

いくつかの実施形態では、提供される方法は、ＣＤ１６　１５８Ｖ＋ＮＫ細胞遺伝子型を有すると同定された対象の生体試料からＮＫ細胞又はそのサブセットを濃縮又は単離することを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、ＣＤ１６　１５８Ｖ＋ＮＫ細胞遺伝子型の存在について対象をスクリーニングすることを含む。いくつかの実施形態では、ゲノムＤＮＡは、血液試料又は骨髄試料などの、ＮＫ細胞であるか又はＮＫ細胞を含む対象由来の試料から抽出される。いくつかの実施形態では、試料は、血液細胞、例えば末梢血単核細胞であるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、試料は、単離されたＮＫ細胞であるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、試料は健康なドナー対象からの試料である。試料からＤＮＡを抽出するための任意の方法を用いることができる。例えば、核酸は試料、例えば、グアニジンチオシアネート－フェノール－クロロホルム抽出（Ｃｈｏｍｏｃｙｚｎｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．（１９８７）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１６２：１５６）などの標準技術を使用した細胞から容易に単離できる。Ｗｉｚａｒｄゲノム　ＤＮＡ精製キット（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）などの市販のキットもまた

、ゲノムＤＮＡを抽出するために容易に利用可能である。
【０４０８】
遺伝子型決定は、任意の適切な試料に対して行うことができる。本明細書に記載される実施形態のいずれかにおいて、遺伝子型決定反応は、例えば、パイロシークエンシング反応、ＤＮＡシークエンシング反応、ＭａｓｓＡＲＲＡＹ　ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ、ＲＦＬＰ、対立遺伝子特異的ＰＣＲ、リアルタイム対立遺伝子識別、又はマイクロアレイであり得る。いくつかの実施形態では、ゲノムＤＮＡのＲＴ－ＰＣＲなどのＰＣＲに基づく技術は、多型に対する対立遺伝子特異的プライマーを使用して行われる。試料中の標的核酸配列を増幅するためのＰＣＲ法は、当該分野で公知であり、例えば、Ｉｎｎｉｓら（編）に記載されている。ＰＣＲプロトコル（Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ　１９９０）；Ｔａｙｌｏｒ（１９９１）Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ　ｃｈａｉｎ　ｒｅａｃｔｉｏｎ：ｂａｓｉｃ　ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ａｎｄ　ａｕｔｏｍａｔｉｏｎ，ｉｎ　ＰＣＲ：Ａ　Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ａｐｐｒｏａｃｈ，ｍＣＰｈｅｒｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（ｅｄｓ．）ＩＲＬ　Ｐｒｅｓｓ，Ｏｘｆｏｒｄ；Ｓａｉｋｉ　ｅｔ　ａｌ．（１９８６）Ｎａｔｕｒｅ　３２４：１６３；並びに米国特許第４，６８３，１９５号、同第４，６８３，２０２号及び同第４，８８９，８１８号に記載されており、これらは全て、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【０４０９】
１５８　Ｖ＋多型を検出するためのプライマーは、公知であるか、又は当業者によって容易に設計され得る。ｅ．ｇ．．国際公開ＰＣＴ出願第ＷＯ２０１２／０６１８１４号；Ｋｉｍ　ｅｔ　ａｌ．（２００６）Ｂｌｏｏｄ，１０８：２７２０－２７２５；Ｃａｒｔｒｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（２００２）Ｂｌｏｏｄ，９９：７５４－７５８；Ｋｏｅｎｅ　ｅｔ　ａｌ．（１９９７）Ｂｌｏｏｄ，９０：１１０９－１１１４；Ｈａｔｉｊｈａｒｉｓｓｉ　ｅｔ　ａｌ．（２００７）Ｂｌｏｏｄ，１１０：２５６１－２５６４；Ｓｏｍｂｏｏｎｙｏｓｄｅｃｈ　ｅｔ　ａｌ．（２０１２）Ａｓｉａｎ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃｉｎｅ，６：８８３－８８９）。いくつかの実施形態では、ネステッドプライマーを使用してＰＣＲを行い、その後、対立遺伝子特異的制限酵素消化を行うことができる。いくつかの実施形態では、第１のＰＣＲプライマーは、５’－ＡＴＡ　ＴＴＴ　ＡＣＡ　ＧＡＡ　ＴＧＧ　ＣＡＣ　ＡＧＧ　－３’（配列番号１７）及び５’－ＧＡＣ　ＴＴＧ　ＧＴＡ　ＣＣＣ　ＡＧ　ＴＴＧ　ＡＡ－３’（配列番号１８）を含み、一方、第２のＰＣＲプライマーは、５’－ＡＴＣ　ＡＧＡ　ＴＴＣ　ＧＡＴ　ＣＣＴ　ＡＣＴ　ＴＣＴ　ＧＣＡ　ＧＧＧ　ＧＧＣ　ＡＴ－３’（配列番号１９）及び５’－ＡＣＧ　ＴＧＣ　ＴＧＡ　ＧＣＴ　ＴＧＡ　ＧＴＧ　ＡＴＧ　ＧＴＧ　ＡＴＧ　ＴＴＣ　ＡＣ－３’（配列番号２０）であり、これは、いくつかの場合において、対立遺伝子の性質に依存して９４ｂｐの断片を産生する。いくつかの実施形態では、プライマー対は、配列番号２１（ＣＣＣＡＡＣＴＣＡＡ　ＣＴＴＣＣＣＡＧ　ＴＧ　ＴＧＡＴ）及び配列番号２２（ＧＡＡＡＴＣＴＡＣＣ　ＴＴＴＴＣＣＴＣＴＡ　ＡＴＡＧＧＧＣＡＡＴ）に示される塩基配列を含む。いくつかの実施形態では、プライマー対は、配列番号２１（ＣＣＣＡＡＣＴＣＡＡ　ＣＴＴＣＣＣＡＧＴＧ　ＴＧＡＴ）及び配列番号２３（ＧＡＡＡＴＣＴＡＣＣ　ＴＴＴＴＣＣＴＣＴＡ　ＡＴＡＧＧＧＣＡＡ）に示される塩基配列を含む。いくつかの実施形態では、プライマー対は、配列番号２１（ＣＣＣＡＡＣＴＣＡＡ　ＣＴＴＣＣＣＡＧＴＧ　ＴＧＡＴ）及び配列番号２４（ＧＡＡＡＴＣＴＡＣＣ　ＴＴＴＴＣＣＴＣＴＡ　ＡＴＡＧＧＧＣＡ）に示される塩基配列を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子型判定は、以下のようなプライマー配列を使用したＲＮＡの抽出後の定量的リアルタイムＲＴ－ＰＣＲによって実行することができる。配列番号２５に記載のＣＤ１６センス（５’－ＣＣＡＡＡＡＧＣＣＡＣＡＣＴＣＡＡＡＧＡＣ－３’）及び配列番号２６に記載のアンチセンス（５’－ＡＣＣＣＡＧＧＴＧＧＡＡＡＧＡＡＴＧＡＴＧ－３’）及び配列番号２７に記載のＴａｑＭａｎプローブ（５’－ＡＡＣＡＴＣＡＣＣＡＴＣＡＣＴＣＡＡＧＧＴＴＴＧＧ－３’）。
【０４１０】
遺伝子型決定を確認するために、対立遺伝子特異的増幅を、Ｖ対立遺伝子特異的プライ

マーのセット（例えば、配列番号２８に示されるフォワードプライマー、５’－ＣＴＧ ＡＡＧ ＡＣＡ ＣＡＴ ＴＴＴ ＴＡＣ ＴＣＣ ＣＡＡＡ－３’、及び配列番号２９に記載のリバースプライマー、５’－ＴＣＣ ＡＡＡ ＡＧＣ ＣＡＣ ＡＣＴ ＣＡＡ ＡＧＡ Ｃ－３’）、又はＦ対立遺伝子特異的プライマーのセット（例えば、配列番号３０に記載のフォワードプライマー、５’－ＣＴＧ ＡＡＧ ＡＣＡ ＣＡＴ ＴＴＴ ＴＡＣ ＴＣＣ ＣＡＡＣ－３’、及び配列番号２９に記載のリバースプライマー、５’－ＴＣＣ ＡＡＡ ＡＧＣ ＣＡＣ ＡＣＴ ＣＡＡ ＡＧＡ Ｃ－３’）で使用できる。

【０４１１】

ＣＤ１６ａのゲノム配列は、ＮＣＢＩデータベースにおいてＮＧ＿００９０６６．１で入手可能である。ＣＤ１６Ａの遺伝子ＩＤは２２１４である。遺伝子多型を含むＣＤ１６の配列情報は、ＵｎｉＰｒｏｔ Ａｃｃ番号Ｐ０８６３７で入手可能である。ＣＤ１６（Ｆ１５８）の配列は、配列番号３１に示されている（残基Ｆ１５８は太字で下線が引かれている）。いくつかの実施形態では、ＣＤ１６（Ｆ１５８）は、ＭＷＱＬＬＬＰＴＡＬＬＬＬＶＳＡ（配列番号３２）として示されるシグナルペプチドを更に含む。

GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDA
ATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVT
YLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLFGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPP
GYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWKDHKFKWRKDPQDK（配列番号31）。

【０４１２】

ＣＤ１６ １５８ Ｖ＋の配列（Ｆ１５８Ｖをもたらす多型）は、ＶＡＲ＿００３９６０として公知であり、配列番号３３に記載の配列を有する（１５８ Ｖ＋多型は太字及び下線である）。いくつかの実施形態では、ＣＤ１６（１５８ Ｖ＋）は、ＭＷＱＬＬＬＰＴＡＬＬＬＬＶＳＡ（配列番号３２）として示されるシグナルペプチドを更に含む。

GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFI
DAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTAL
HKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGL**V**GSKNVSSETVNITITQGLAVS
TISSFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWKDHKFKWRKDPQDK
（配列番号33）。

【０４１３】

いくつかの実施形態では、５’末端に蛍光色素標識（例えば、ＦＡＭ又はＶＩＣ）ならびに３’末端にマイナーグルーブバインダー（ＭＧＢ）及び非蛍光クエンチャー（ＮＦＱ）を含有する対立遺伝子特異的プローブ、ならびに非標識ＰＣＲプライマーを使用して、ゲノムデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）試料に対して一塩基多型（ＳＮＰ）分析を使用して、特異的ＳＮＰ標的を検出する。いくつかの実施形態では、アッセイは、プローブと会合した色素の蛍光の変化によって、ＳＮＰの存在を測定又は検出する。このような実施形態において、プローブは、２つの非標識プライマー間で標的ＤＮＡにハイブリダイズし、５’末端上の蛍光色素からのシグナルは、蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）によって、その３’末端上のＮＦＱによってクエンチされる。ＰＣＲの間、Ｔａｑポリメラーゼは、誘導として鋳型を用いて非標識プライマーを伸長し、ポリメラーゼが標識プローブに到達すると、それは、クエンチャーから色素を分離する分子を切断する。いくつかの態様では、ｑＰＣＲ機器は、クエンチされていない標識からの蛍光を検出することができる。例示的な試薬は、市販のＳＮＰアッセイ、例えば、ｒｓ３９６９９１に対するコードＣ＿２５８１５６６６＿１０（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、カタログ番号４３５１３７９、ＣＤ１６におけるＦ１５８ＶのＳＮＰジェノタイピング用）である。

【０４１４】

いくつかの実施形態では、ＣＤ１６　１５８Ｖ（Ｆ１５８Ｖ）多型についてヘテロ接合性又はホモ接合性の対象が同定される。いくつかの実施形態では、ＣＤ１６　１５８Ｖ（Ｆ１５８Ｖ）多型についてホモ接合性の対象が同定される。いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞又はＮＫ細胞サブセットは、ＣＤ１６　１５８Ｖ多型についてヘテロ接合性又はホモ接合性であると同定された対象由来の生体試料から単離又は濃縮される。いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞又はＮＫ細胞サブセットは、ＣＤ１６　１５８Ｖ多型についてホモ接合性であると同定された対象由来の生体試料から単離又は濃縮される。

【０４１５】

いくつかの実施形態では、本方法は、対象から単離又は取得されたＰＢＭＣ集団などの生体試料からＮＫ細胞を濃縮することを含む。いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞について濃縮された細胞の集団は、１つ以上のナチュラルキラー細胞特異的マーカーに基づく単離又は選択によって濃縮される。特定のマーカー又は表面マーカーの組み合わせを選択することは、当業者のレベルの範囲内である。いくつかの実施形態では、表面マーカーは、以下の表面抗原ＣＤ１１ａ、ＣＤ３、ＣＤ７、ＣＤ１４、ＣＤ１６、ＣＤ１９、ＣＤ２５、ＣＤ２７、ＣＤ５６、ＣＤ５７、ＣＤ１６１、ＣＤ２２６、ＮＫＢ１、ＣＤ６２Ｌ、ＣＤ２４４、ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫｐ３０、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ４６、ＮＫＧ２Ａ、ＮＫＧ２Ｃ、ＫＩＲ２ＤＬ１及び／又はＫＩＲ２ＤＬ３のいずれか１つ以上である。いくつかの実施形態では、表面マーカーは、以下の表面抗原：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及び／又はＫＩＲ２ＤＬ３のいずれか１つ以上である。特定の実施形態において、１つ以上の表面抗原は、ＣＤ３と、以下の表面抗原ＣＤ１６、ＣＤ５６又はＣＤ５７のうちの１つ以上とを含む。いくつかの実施形態では、１つ以上の表面抗原は、ＣＤ３、及びＣＤ５７である。いくつかの実施形態では、１つ以上の表面抗原は、ＣＤ３、ＣＤ５６、及びＣＤ１６である。いくつかの実施形態では、１つ以上の表面抗原は、ＣＤ３、ＣＤ５６、及びＣＤ３８である。いくつかの実施形態では、１つ以上の表面抗原は、ＣＤ３、ＣＤ５６、ＮＫＧ２Ａ、及びＣＤ１６１である。いくつかの実施形態では、１つ以上の表面抗原は、ＣＤ３、ＣＤ５７、及びＮＫＧ２Ｃである。いくつかの実施形態では、１つ以上の表面抗原は、ＣＤ３、ＣＤ５７、及びＮＫＧ２Ａである。いくつかの実施形態では、１つ以上の表面抗原は、ＣＤ３、ＣＤ５７、ＮＫＧ２Ｃ、及びＮＫＧ２Ａである。いくつかの実施形態では、１つ以上の表面抗原は、ＣＤ３、及びＣＤ５６である。いくつかの実施形態では、１つ以上の表面抗原は、ＣＤ３、ＣＤ５６、及びＮＫＧ２Ｃである。いくつかの実施形態では、１つ以上の表面抗原は、ＣＤ３、ＣＤ５６、及びＮＫＧ２Ａである。いくつかの実施形態では、１つ以上の表面抗原は、ＣＤ３、ＣＤ５６、ＮＫＧ２Ｃ、及びＮＫＧ２Ａである。このような表面抗原を検出するための試薬（蛍光色素結合体化抗体を含む）は公知であり、当業者に利用可能である。

【０４１６】

いくつかの実施形態では、提供される方法によって試料から単離又は選択などによって濃縮されるＮＫ細胞集団は、表面マーカーなどの１つ以上の特定のマーカーについて陽性であるか（マーカー＋又はマーカー^{pos}）もしくは高レベルを発現する（マーカー^{高}）細胞、又は１つ以上のマーカーについて陰性であるかもしくは比較的低いレベルを発現する（マーカー又はマーカー^{neg}）細胞である。したがって、細胞上又は細胞内で発現されるマーカー又はタンパク質に関する陽性、ｐｏｓ又は＋という用語は、本明細書において互換的に使用されることが理解される。同様に、細胞上又は細胞内で発現されるマーカー又はタンパク質に関する陰性、ｎｅｇ又は－という用語は、本明細書において互換的に使用されることが理解される。更に、本明細書におけるマーカー^{neg}である細胞への言及は、マーカーについて陰性である細胞、ならびに対照又はバックグラウンドレベルと比較して容易に検出可能ではないであろう低レベルなどの比較的低いレベルのマーカーを発現する細胞を指し得ることが理解される。いくつかの場合において、そのようなマーカー

は、ＮＫ細胞の特定の集団上には存在しないか、又は比較的低いレベルで発現されるが、リンパ球の特定の他の集団（Ｔ細胞など）上には存在するか、又は比較的高いレベルで発現されるものである。場合によっては、そのようなマーカーは、ＮＫ細胞の特定の集団上に存在するか、又は比較的高いレベルで発現されるが、リンパ球の特定の他の集団（例えば、Ｔ細胞又はそのサブセット）上には存在しないか、又は比較的低いレベルで発現されるものである。

【０４１７】

いくつかの実施形態では、そのようなマーカーに基づく分離のための任意の公知の方法が使用され得る。いくつかの実施形態では、分離は、親和性又は免疫親和性に基づく分離である。例えば、いくつかの態様における単離は、例えば、そのようなマーカーに特異的に結合する抗体又は結合パートナーとのインキュベーションによる、１つ以上のマーカー、典型的には細胞表面マーカーの発現又は発現レベルに基づく細胞及び細胞集団の分離、続いて一般に洗浄ステップ、及び抗体又は結合パートナーに結合した細胞の、抗体又は結合パートナーに結合しなかった細胞からの分離を含む。いくつかの実施形態では、インキュベーションは静的（混合なし）である。いくつかの実施形態では、インキュベーションは動的である（混合を伴う）。

【０４１８】

このような分離ステップは、試薬に結合した細胞が更なる使用のために保持される陽性選択、及び／又は抗体もしくは結合パートナーに結合しなかった細胞が保持される陰性選択に基づき得る。いくつかの例では、両方の画分が更なる使用のために保持される。分離は、特定の細胞集団又は特定のマーカーを発現する細胞の１００％濃縮又は除去をもたらす必要はない。例えば、特定の型の細胞（例えば、マーカーを発現する細胞）の陽性選択又は濃縮は、このような細胞の数又は割合を増加させることをいうが、マーカーを発現しない細胞の完全な非存在を生じる必要はない。同様に、特定の型の細胞（例えば、マーカーを発現する細胞）の陰性選択、除去、又は枯渇は、このような細胞の数又は割合を減少させることをいうが、全てのこのような細胞の完全な除去を生じる必要はない。例えば、いくつかの態様では、ＣＤ３についての陰性選択は、ＣＤ３^{neg}である細胞の集団について濃縮するが、一部の場合には、濃縮された集団中に依然として存在するＣＤ３^{pos}である細胞のわずかな割合を含み得る、他の非選択細胞のいくらかの残留又はわずかな割合も含有し得る。一部の例では、ＣＤ５７^{pos}又はＣＤ１６^{pos}集団のうちの１つの陽性選択は、前記集団、ＣＤ５７^{pos}又はＣＤ１６^{pos}集団のいずれかを濃縮するが、一部の場合には、濃縮された集団中に依然として存在するＣＤ５７又はＣＤ１６集団のうちの他方を含み得る、いくらかの残りの又はわずかな割合の他の非選択細胞も含有し得る。

【０４１９】

いくつかの例において、複数回の分離ステップが実施され、ここで、１つのステップからの陽性又は陰性選択された画分は、別の分離ステップ（例えば、その後の陽性又は陰性選択）に供される。いくつかの例では、単一の分離ステップは、例えば、陰性選択の対象となるマーカーにそれぞれ特異的な複数の抗体又は結合パートナーと共に細胞をインキュベートすることによって、複数のマーカーを同時に発現する細胞を枯渇させることができる。同様に、種々の細胞型上で発現される複数の抗体又は結合パートナーと共に細胞をインキュベートすることによって、複数の細胞型を同時に陽性選択することができる。

【０４２０】

いくつかの態様では、選択は、ＰＢＭＣ試料由来の細胞などにおける表面抗原の１つ以上の発現に基づく陽性及び／又は陰性選択ステップを含む。いくつかの実施形態では、単離は、ＣＤ５６を発現する細胞、ＣＤ１６を発現する細胞もしくはＣＤ５７を発現する細胞についての陽性選択、及び／又はＣＤ３８を発現する細胞についての陰性選択、及び／又はＴ細胞マーカーなどの非ＮＫ細胞マーカーを発現する細胞についての陰性選択、例えば、ＣＤ３を発現する細胞についての陰性選択（ＣＤ３^{neg}）を含む。例えば、いくつかの実施形態では、単離は、ＣＤ５６を発現する細胞、ＣＤ１６を発現する細胞もしくは

ＣＤ５７を発現する細胞についての陽性選択、及び／又はＴ細胞マーカーなどの非ＮＫ細胞マーカーを発現する細胞についての陰性選択、例えば、ＣＤ３を発現する細胞についての陰性選択（ＣＤ３^{neg}）を含む。いくつかの実施形態では、単離は、ＣＤ５６を発現する細胞、ＣＤ１６を発現する細胞もしくはＣＤ５７を発現する細胞についての陽性選択、及び／又はＣＤ３８を発現する細胞（ＣＤ３８^{neg}）、ＣＤ１６１を発現する細胞（ＣＤ１６１^{neg}）、ＮＫＧ２Ａを発現する細胞（ＮＫＧ２Ａ^{neg}）についての陰性選択、及び／又はＣＤ３を発現する細胞（ＣＤ３^{neg}）についての陰性選択を含む。いくつかの実施形態では、選択は、ＣＤ３について陰性の細胞（ＣＤ３^{neg}）の単離を含む。

【０４２１】

いくつかの実施形態では、単離は、ＣＤ３を発現する細胞についての陰性選択（ＣＤ３^{neg}）及びＣＤ５６を発現する細胞についての陽性選択（ＣＤ５６^{pos}）を含む。いくつかの実施形態では、選択は、ＣＤ３８を発現する細胞についての陰性選択（ＣＤ３８^{neg}）を更に含むことができる。特定の実施形態では、単離又は選択された細胞は、ＣＤ３^{neg}ＣＤ５６^{pos}ＣＤ３８^{neg}である。

【０４２２】

いくつかの実施形態では、選択は、ＣＤ３を発現する細胞についての陰性選択（ＣＤ３^{neg}）、ＣＤ５６を発現する細胞についての陽性選択（ＣＤ５６^{pos}）、続いてＮＫＧ２Ａを発現する細胞についての陰性選択（ＮＫＧ２Ａ^{neg}）及びＣＤ１６１を発現する細胞についての陰性選択（ＣＤ１６１^{neg}）を含む。特定の実施形態では、単離又は選択された細胞は、ＣＤ３^{neg}ＣＤ５６^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}ＣＤ１６１^{neg}である。

【０４２３】

いくつかの実施形態では、選択は、ＣＤ３を発現する細胞についての陰性選択（ＣＤ３^{neg}）及びＣＤ５７を発現する細胞についての陽性選択（ＣＤ５７^{pos}）を含む。特定の実施形態では、単離又は選択された細胞は、ＣＤ３^{neg}ＣＤ５７^{pos}である。

【０４２４】

いくつかの実施形態では、選択は、ＣＤ３を発現する細胞についての陰性選択（ＣＤ３^{neg}）及びＣＤ１６を発現する細胞についての陽性選択（ＣＤ１６^{pos}）を含む。特定の実施形態では、単離又は選択された細胞は、ＣＤ３^{neg}ＣＤ１６^{pos}である。

【０４２５】

いくつかの実施形態では、選択は、ＣＤ３を発現する細胞についての陰性選択（ＣＤ３^{neg}）及びＣＤ５７を発現する細胞についての陽性選択（ＣＤ５７^{pos}）を含む。特定の実施形態では、単離又は選択された細胞は、ＣＤ３^{neg}ＣＤ５７^{pos}である。例えば、ＮＫ細胞は、ＣＤ３^{pos}細胞の枯渇（ＣＤ３^{pos}細胞に対する陰性選択）、その後のＣＤ５７^{pos}細胞選択によって濃縮され得、それによってＣＤ５７^{pos}ＮＫ細胞が単離及び濃縮され得る。分離は、ＭＡＣＳ（商標）マイクロビーズを使用するなど、免疫親和性に基づく方法によって行うことができる。例えば、ＣＤ３マイクロビーズを使用して、ＣＤ３^{neg}細胞についての陰性選択においてＣＤ３^{pos}細胞を枯渇させることができる。続いて、ＣＤ５７マイクロビーズを、ＣＤ３細胞枯渇ＰＢＭＣのＣＤ５７濃縮のために使用することができる。次いで、ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５７^{pos}濃縮ＮＫ細胞を、提供される方法における増殖において使用することができる。

【０４２６】

いくつかの実施形態では、選択は、ＮＫＧ２Ｃを発現する細胞についての陽性選択（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）及び／又は細胞ＮＫＧ２Ａについての陰性選択（ＮＫＧ２Ａ^{neg}）を更に含んでもよい。いくつかの実施形態では、選択には、ＣＤ３を発現する細胞（ＣＤ３^{neg}）についての陰性選択、ＣＤ５７を発現する細胞（ＣＤ５７^{pos}）についての陽性選択、及びＮＫＧ２Ｃを発現する細胞（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）についての陽性選択が含まれる。特定の実施形態では、単離又は選択された細胞は、ＣＤ３^{neg}ＣＤ５７^{pos}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}である。いくつかの実施形態では、選択には、ＣＤ３を発現する細胞（Ｃ

Ｄ３^{neg}）についての陰性選択、ＣＤ５７を発現する細胞（ＣＤ５７^{pos}）についての陽性選択、及びＮＫＧ２Ａを発現する細胞（ＮＫＧ２Ａ^{neg}）についての陰性選択が含まれる。特定の実施形態では、単離又は選択された細胞は、ＣＤ３^{neg}ＣＤ５７^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}である。いくつかの実施形態では、選択には、ＣＤ３を発現する細胞（ＣＤ３^{neg}）についての陰性選択、ＣＤ５７を発現する細胞（ＣＤ５７^{pos}）についての陽性選択、ＮＫＧ２Ｃを発現する細胞（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）についての陽性選択、及びＮＫＧ２Ａを発現する細胞（ＮＫＧ２Ａ^{neg}）についての陰性選択が含まれる。特定の実施形態では、単離又は選択された細胞は、ＣＤ３^{neg}ＣＤ５７^{pos}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}である。

【０４２７】

提供される実施形態のいずれかの一部において、選択は、ＣＤ３８を発現する細胞についての陰性選択（ＣＤ３８^{neg}）を更に含むことができる。特定の実施形態では、単離又は選択された細胞は、ＣＤ３^{neg}ＣＤ５７^{pos}ＣＤ３８^{neg}である。特定の実施形態では、単離又は選択された細胞は、ＣＤ３^{neg}ＣＤ５７^{pos}ＣＤ３８^{neg}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}である。特定の実施形態では、単離又は選択された細胞は、ＣＤ３^{neg}ＣＤ５７^{pos}ＣＤ３８^{neg}ＮＫＧ２Ａ^{neg}である。特定の実施形態では、単離又は選択された細胞は、ＣＤ３^{neg}ＣＤ５７^{pos}ＣＤ３８^{neg}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}である。

【０４２８】

いくつかの実施形態では、選択は、ＣＤ３を発現する細胞についての陰性選択（ＣＤ３^{neg}）及びＣＤ５６を発現する細胞についての陽性選択（ＣＤ５６^{pos}）を含む。特定の実施形態では、単離又は選択された細胞は、ＣＤ３^{neg}ＣＤ５６^{pos}である。いくつかの実施形態では、選択には、ＣＤ３を発現する細胞（ＣＤ３^{neg}）についての陰性選択、ＣＤ５６を発現する細胞（ＣＤ５６^{pos}）についての陽性選択、及びＮＫＧ２Ｃを発現する細胞（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）についての陽性選択が含まれる。特定の実施形態では、単離又は選択された細胞は、ＣＤ３^{neg}ＣＤ５６^{pos}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}である。いくつかの実施形態では、選択には、ＣＤ３を発現する細胞（ＣＤ３^{neg}）についての陰性選択、ＣＤ５６を発現する細胞（ＣＤ５６^{pos}）についての陽性選択、及びＮＫＧ２Ａを発現する細胞（ＮＫＧ２Ａ^{neg}）についての陰性選択が含まれる。特定の実施形態では、単離又は選択された細胞は、ＣＤ３^{neg}ＣＤ５６^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}である。いくつかの実施形態では、選択には、ＣＤ３を発現する細胞（ＣＤ３^{neg}）についての陰性選択、ＣＤ５６を発現する細胞（ＣＤ５６^{pos}）についての陽性選択、ＮＫＧ２Ｃを発現する細胞（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）についての陽性選択、及びＮＫＧ２Ａを発現する細胞（ＮＫＧ２Ａ^{neg}）についての陰性選択が含まれる。特定の実施形態では、単離又は選択された細胞は、ＣＤ３^{neg}ＣＤ５６^{pos}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}である。

【０４２９】

提供される実施形態のいずれかの一部において、選択は、ＣＤ３８を発現する細胞についての陰性選択（ＣＤ３８^{neg}）を更に含むことができる。特定の実施形態では、単離又は選択された細胞は、ＣＤ３^{neg}ＣＤ５６^{pos}ＣＤ３８^{neg}である。特定の実施形態では、単離又は選択された細胞は、ＣＤ３^{neg}ＣＤ５６^{pos}ＣＤ３８^{neg}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}である。特定の実施形態では、単離又は選択された細胞は、ＣＤ３^{neg}ＣＤ５６^{pos}ＣＤ３８^{neg}ＮＫＧ２Ａ^{neg}である。特定の実施形態では、単離又は選択された細胞は、ＣＤ３^{neg}ＣＤ５６^{pos}ＣＤ３８^{neg}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}である。

【０４３０】

提供される実施形態のいずれかの一部において、ｇ－ＮＫ細胞は、ｇ－ＮＫ代替表面マーカープロファイルを有する細胞である。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞代替表面マーカープロファイルは、ＣＤ１６^{pos}／ＣＤ５７^{pos}／ＣＤ７^{dim}／^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞代替表面マーカープロフ

ァイルは、ＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である。任意のそのような実施形態のいくつかでは、ｇ－ＮＫ細胞代替表面マーカープロファイルはＣＤ３８^{neg}である。任意のそのような実施形態のいくつかでは、ＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}は、ＮＫ細胞についての代用表面マーカープロファイルとして使用される。任意のそのような実施形態のいくつかでは、ｇ－ＮＫ細胞代替表面マーカープロファイルは、ＮＫ細胞代替表面マーカープロファイルを更に含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、ｇ－ＮＫ細胞代替表面マーカープロファイルは、ＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}を更に含む。特定の実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞代替表面マーカープロファイルは、ＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}／ＣＤ１６^{pos}／ＣＤ５７^{pos}／ＣＤ７^{dim}／^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}を含む。他の特定の実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞代替表面マーカープロファイルは、ＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}／ＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}を含む。他の特定の実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞代替表面マーカープロファイルは、ＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}／ＣＤ３８^{neg}を含む。

【０４３１】

いくつかの実施形態では、細胞表面マーカーの発現に基づく陽性又は陰性選択などによって細胞を単離、選択及び／又は濃縮する方法は、免疫親和性に基づく選択を含むことができる。いくつかの実施形態では、免疫親和性に基づく選択は、ＰＢＭＣなどの細胞を含有する試料を、１つ以上の細胞表面マーカーに特異的に結合する抗体又は結合パートナーと接触させることを含む。いくつかの実施形態では、抗体又は結合パートナーは、陽性及び／又は陰性選択のための細胞の分離を可能にするために、球体又はビーズ、例えばアガロース、磁気ビーズ又は常磁性ビーズを含むマイクロビーズ、ナノビーズなどの固体支持体又はマトリックスに結合される。いくつかの実施形態では、球体又はビーズをカラムに充填して免疫親和性クロマトグラフィーを行うことができ、ここでＰＢＭＣなどの細胞を含有する試料をカラムのマトリックスと接触させ、続いてそこから溶出又は放出させる。

【０４３２】

インキュベーションは、一般に、磁性粒子又はビーズに付着した抗体又は結合パートナーに特異的に結合する抗体又は結合パートナーが、試料内の細胞上に存在する場合、細胞表面分子に特異的に結合する条件下で実施される。

【０４３３】

いくつかの態様において、試料は磁場に置かれ、磁気応答性粒子又は磁化可能粒子が付着した細胞は磁石に引き付けられ、非標識細胞から分離される。陽性選択では、磁石に引き寄せられた細胞が保持される。陰性選択では、誘引されない細胞（非標識細胞）が保持される。いくつかの態様において、陽性選択及び陰性選択の組み合わせは、同じ選択ステップの間に行われ、ここで陽性画分及び陰性画分が保持され、そして更に処理されるか、又は更なる分離ステップに供される。

【０４３４】

いくつかの実施形態では、磁気応答性粒子は、その後にインキュベート及び／又は培養される細胞に付着したままである。いくつかの態様では、粒子は、患者への投与のために細胞に付着したままである。いくつかの実施形態では、磁化可能又は磁気応答性粒子は、細胞から除去される。磁化可能な粒子を細胞から除去するための方法は公知であり、例えば、競合する非標識抗体、磁化可能な粒子、又は切断可能なリンカーにコンジュゲートされた抗体などの使用を含む。いくつかの実施形態では、磁化可能な粒子は、生分解性である。

【０４３５】

いくつかの実施形態では、親和性に基づく選択は、磁気活性化細胞選別（ＭＡＣＳ）（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ａｕｂｕｒｎ、ＣＡ）によるものである。磁気活性化細胞選別（ＭＡＣＳ）システムは、磁化粒子が付着した細胞を高純度で選択することができる。特定の実施形態において、ＭＡＣＳは、外部磁場の印加後に非標的種及び標的種が順次溶出されるモードで動作する。すなわち、磁化された粒子に付着した細胞は適所に

保持されるが、付着していない種は溶出される。次いで、この第１の溶出ステップが完了した後、磁場内に捕捉され、溶出が防止された種は、それらが溶出及び回収され得るように、何らかの様式で解放される。特定の実施形態では、非標的細胞は標識され、不均一な細胞集団から枯渇される。

【０４３６】

そのような実施形態のいずれかにおいて、方法は、ＮＫ細胞又はそのサブセットを濃縮する、例えば選択及び／又は単離する前に、対象にＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２及び／又はＣＣＬ５を投与することを含む。

【０４３７】

Ｂ．ｇ－ＮＫ細胞について濃縮されたＮＫ細胞を増殖させる方法

提供される方法の実施形態において、濃縮されたＮＫ細胞は、フィーダー細胞の存在下で、例えば、ＮＫ細胞サブセット、特にｇ－ＮＫ細胞サブセットの増殖及び増殖を支持する条件下で、インキュベート又は培養される。

【０４３８】

特定の態様では、フィーダー細胞は、ＮＫＧ２Ｃ^{pos}の増殖を刺激もしくは促進し、及び／又はＮＫＧ２Ａ^{pos}細胞の増殖を阻害する細胞を含む。いくつかの実施形態では、フィーダー細胞は、ＨＬＡ－Ｅ又はＨＬＡ－Ａ２シグナル配列を含有するハイブリッドＨＬＡ－Ｅを発現するか、又はそれでトランスフェクトされた細胞である。例えば、このようなハイブリッドの例は、ＭＨＣクラスＩ（例えば、ＨＬＡ－Ａ２）、プロモータ及びシグナル配列ならびにＨＬＡ－Ｅ成熟タンパク質配列を含むＡＥＨハイブリッド遺伝子であり、これは、いくつかの場合において、ＨＬＡ－Ｅ遺伝子によってコードされる成熟タンパク質と同一であるが、細胞表面上で安定に発現され得る成熟タンパク質を生じ得る（例えば、Ｌｅｅ　ｅｔ　ａｌ．（１９９８）Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，１６０：４９５１－４９６０を参照）。いくつかの実施形態では、細胞は、ＨＬＡ－Ａ２などのＭＨＣクラスＩリーダー配列の存在下で安定化されたＭＨＣ－Ｅ分子を発現するようにトランスフェクトされたＬＣＬ　７２１．２２１、Ｋ５６２細胞又はＲＭＡ－Ｓ細胞である。ＭＨＣクラスＩ（例えば、ＨＬＡ－Ａ２）リーダー配列ペプチドの存在下で安定化された細胞表面ＨＬＡ－Ｅを発現するように操作された細胞株は、当該分野で公知である（Ｌｅｅ　ｅｔ　ａｌ．（１９９８）Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，１６０：４９５１－４９６０；Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　２００５：１３－４６４（４６７）；Ｇａｒｃｉａ　ｅｔ　ａｌ．（２００２）Ｅｕｒ　Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，３２：９３６－９４４）。いくつかの実施形態では、２２１．ＡＥＨ細胞、例えば照射された２２１．ＡＥＨ細胞は、フィーダー細胞として、又は任意の他のＨＬＡ－Ｅ発現細胞株もしくは他の点ではＨＬＡ陰性である照射されたＨＬＡ－Ｅ発現細胞株、例えばＫ５６２として使用することができる。いくつかの実施形態では、細胞株は、ＨＬＡ－Ｅを発現するようにトランスフェクトされ得る。いくつかの実施形態では、膜結合型ＩＬ－１５（Ｋ５６２－ｍｂ１５）又は膜結合型ＩＬ－２１（Ｋ５６２－ｍｂ２１）を発現するＫ５６２細胞をフィーダー細胞として使用することができる。本明細書において提供される方法における使用のためのそのような細胞株の例は、２２１－ＡＥＨ細胞である。

【０４３９】

実施形態では、ＨＬＡ発現フィーダー細胞は凍結保存され、使用前に解凍される。いくつかの実施形態では、細胞が２２１．ＡＥＨ細胞などのＨＬＡ－Ｅを発現するようにトランスフェクトされている場合、細胞は、本方法におけるそれらの使用の前に、例えば血清又は他の適切な血清代替物、及び選択剤を含む適切な栄養素の存在下で増殖させることができる。例えば、２２１．ＡＥＨ細胞の場合、細胞に対する選択圧を維持して高レベルのプラスミドＨＬＡ－Ｅを維持するために、ハイグロマイシンＢ（例えば、０．１％～１０％、例えば、１％又は約１％）を補充した細胞培養培地中で細胞を培養することができる。細胞は、使用するまで１×１０^{5}細胞／ｍＬ～１×１０^{6}細胞／ｍＬの密度で維持することができる。

【０４４０】
特定の実施形態では、培養物に添加されるＨＬＡ－Ｅ発現フィーダー細胞、例えば、２２１．ＡＥＨ細胞は、Ｘ線照射又はガンマ線照射などによって非分裂である。ＨＬＡ－Ｅ発現フィーダー細胞、例えば、２２１．ＡＥＨは、提供される方法におけるそれらの使用の当日又は直前に照射され得る。いくつかの実施形態では、ＨＬＡ－Ｅ発現フィーダー細胞は、細胞分裂を防止するために、約１０００～１００００ｒａｄ、例えば１０００～５０００ｒａｄの範囲のガンマ線で照射される。いくつかの実施形態では、ＨＬＡ－Ｅ発現フィーダー細胞は、細胞分裂を防止するために、約１０　Ｇｙ～１００　Ｇｙ、例えば１０～５０　Ｇｙの範囲のガンマ線で照射される。いくつかの実施形態では、細胞は１００Ｇｙで照射される。他の実施形態では、照射はＸ線照射によって行われる。いくつかの実施形態では、ＨＬＡ－Ｅ発現フィーダー細胞は、細胞分裂を防止するために、約１０　Ｇｙ～１００　Ｇｙ、例えば１０～５０　Ｇｙの範囲のＸ線で照射される。いくつかの実施形態では、Ａ　Ｒａｄ－Ｓｕｒｅ（商標）血液照射インジケータを使用して、照射の肯定的な視覚的検証を提供することができる。提供される方法の態様において、フィーダー細胞は決して除去されない。照射の結果として、ＮＫ細胞はフィーダー細胞に対して直接的に細胞傷害性となり、フィーダー細胞は培養中に死滅する。

【０４４１】
いくつかの実施形態では、濃縮、選択及び／又は単離されたＮＫ細胞は、ＨＬＡ－Ｅ発現フィーダー細胞（例えば、２２１．ＡＥＨ細胞）の存在下でインキュベート又は培養され、ＨＬＡ－Ｅフィーダー細胞（例えば、２２１．ＡＥＨ細胞）よりも大きい、又は約１：１０であるフィーダー細胞対濃縮ＮＫ細胞の比の、その照射された集団などであり、照射を受けた集団から濃縮されたＮＫ細胞まで、例えば、そのようなフィーダー細胞　対　濃縮ＮＫ細胞の比は１：１０又は約１：１０又はから、１０：１又は約１０：１である。

【０４４２】
いくつかの実施形態では、ＨＬＡ－Ｅを発現するフィーダー細胞（例えば、２２１．ＡＥＨ細胞）、例えばその照射された集団の比は、かかるフィーダー細胞　対　濃縮ＮＫ細胞の比が１：１０もしくは約１：１０から、１０：１もしくは約１０：１、１：１０もしくは約１：１０から、５：１もしくは約５：１、１：１０もしくは約１：１０から、２．５：１もしくは約２．５：１、１：１０もしくは約１：１０から、１：１もしくは約１：１、１：１０もしくは約１：１０から、１：２．５もしくは約１：２．５、１：１０もしくは約１：１０から、１：５もしくは約１：５、１：５もしくは約１：５から、１０：１もしくは約１０：１、１：５もしくは約１：５から、５：１もしくは約５：１、１：５もしくは約１：５から、２．５：１もしくは約２．５：１、１：５もしくは約１：５から、１：１もしくは約１：１、１：５もしくは約１：５から、１：２．５もしくは約１：２．５、１：２．５もしくは約１：２．５から、１０：１もしくは約１０：１、１：２．５もしくは約１：２．５から、５：１もしくは約５：１、１：２．５もしくは約１：２．５から、２．５：１もしくは約２．５：１、１：２．５もしくは約１：２．５から、１：１もしくは約１：１、１：１又は約１：１から、１０：１もしくは約１０：１、１：１もしくは約１：１から、５：１もしくは約５：１、１：１もしくは約１：１から、３：１もしくは約３：１、１：１もしくは約１：１から、２．５：１もしくは約２．５：１、２．５：１もしくは約２．５：１から、１０：１もしくは約１０：１、２．５：１もしくは約２．５：１から、５：１もしくは約５：１、又は５：１もしくは約５：１から、１０：１もしくは約１０：１（それぞれ両端を含む）である。

【０４４３】
いくつかの実施形態では、ＨＬＡを発現するフィーダー細胞（例えば、２２１．ＡＥＨ細胞）、例えばその照射された集団の比率は、このようなフィーダー細胞対濃縮されたＮＫ細胞で、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又は５：１又はそれらの各近似値の比率、又は上記のいずれかの値の間の任意の値である。いくつかの実施形態では、その照射

集団などのＨＬＡ発現フィーダー細胞（例えば、２２１．ＡＥＨ細胞）の比率は、そのようなフィーダー細胞対濃縮細胞で、５：１未満又は約５：１未満の比率である。いくつかの実施形態では、ＨＬＡ発現フィーダー細胞（例えば、２２１．ＡＥＨ細胞）、例えば、その照射集団の比率は、１：１～２．５：１又は約１：１～２．５：１の比率（両端を含む）である。いくつかの実施形態では、その照射集団などのＨＬＡ発現フィーダー細胞（例えば、２２１．ＡＥＨ細胞）の比率は、２．５：１又は約２．５：１の比率である。いくつかの実施形態では、ＨＬＡ発現フィーダー細胞（例えば、２２１．ＡＥＨ細胞）、例えば、その）の比率は、２：１又は約２：１の比率である。

【０４４４】

いくつかの場合において、出発ＮＫ細胞集団が増殖前に凍結保存されている場合、すなわち、凍結／解凍に供されている場合、新鮮なＮＫ細胞を使用する方法よりも低い２２１．ＡＥＨ対ＮＫ細胞比を用いることができる。ここで、１：１という２２１．ＡＥＨ対凍結／解凍ＮＫ細胞比は、２．５：１という２２１．ＡＥＨ対新鮮ＮＫ細胞比を含む培養物において同等の増殖をもたらしたことが見出される。いくつかの態様では、より低い比は、より多くの細胞間接触を可能にする培養物中のより多くのＮＫ細胞数を確実にし、これは、初期成長及び増殖の促進において役割を果たし得る。いくつかの実施形態では、試料からのＮＫ細胞の初期濃縮集団が凍結／解凍に供された場合、２：１～１：２又は約２：１～１：２という２２１．ＡＥＨ対凍結／解凍ＮＫ細胞比が使用される。特定の実施形態では、比は１：１である。２．５：１など、より高い２２１．１　ＡＥＨ対凍結／解凍ＮＫ細胞比を使用することができるが、これは、所望の閾値密度又は数に到達するために、より長い培養、例えば、２１日又は約２１日を必要とし得ることが理解される。

【０４４５】

いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞は、培養物に非分裂末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を更に添加することによって増殖される。いくつかの態様では、非分裂フィーダー細胞は、Ｘ線照射されたＰＢＭＣフィーダー細胞を含み得る。いくつかの態様では、非分裂フィーダー細胞は、γ線照射ＰＢＭＣフィーダー細胞を含むことができる。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、細胞分裂を防止するために、約１０００～１００００ｒａｄ、例えば１０００～５０００ｒａｄの範囲のガンマ線で照射される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、細胞分裂を防止するために、約１０　Ｇｙ～１００　Ｇｙ、例えば１０～５０Ｇｙの範囲のガンマ線で照射される。いくつかの態様では、インキュベーションの少なくとも一部の間、照射されたフィーダー細胞は、非分裂（例えば、照射された）ＨＬＡ－Ｅ発現フィーダー細胞と同時に培養培地中に存在する。いくつかの態様では、非分裂（例えば、照射）ＰＢＭＣフィーダー細胞、ＨＬＡ－Ｅ発現フィーダー細胞及び濃縮ＮＫ細胞は、インキュベーションの開始の日などの同日に、例えば、同時又はほぼ同時に培養物に添加される。

【０４４６】

いくつかの実施形態では、インキュベーション又は培養は、フィーダー細胞としての照射されたＰＢＭＣの存在下で更に行われる。いくつかの実施形態では、照射されたＰＢＭＣフィーダー細胞は、濃縮されたＮＫ細胞が単離又は選択された対象にとって自己由来であるか、又はそれと同じ対象に由来する。特定の実施形態では、ＰＢＭＣは、ＮＫ細胞を濃縮するために使用されるのと同じ生体試料、例えば全血又は白血球アフェレーシスもしくはアフェレーシス産物から得られる。一旦得られると、ＰＢＭＣの一部は、上記のようなＮＫ細胞の濃縮の前に照射のために保存される。

【０４４７】

いくつかの実施形態では、照射されたＰＢＭＣは、そのようなフィーダー細胞対濃縮ＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１、１：１０～５：１、１：１０～２．５：１、１：１０～１：１、１：１０～１：２．５、１：１０～１：５、１：５～１０：１、１：５～５：１、１：５～２．５：１、１：５～１：１、１：５～１：２．５、１：２．５～１０：１、１：２．５～５：１、１：２．５～２．５：１、１：２．５～１：１、１：１～１０：１、１：１～５：１、１：１～２．５：１、２．５：１～１０：１、２．５：１～５：１

、又は５：１～１０：１又はそれらの各近似値の範囲で、フィーダー細胞として存在する。

【０４４８】

いくつかの実施形態では、照射されたＰＢＭＣは、そのようなフィーダー細胞対濃縮ＮＫ細胞の比が１：１又は約１：１と５：１又は約５：１との間、例えば、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又は５：１、又はそれらの各近似値、もしくは上記のいずれかの値の間の任意の値で、フィーダー細胞として存在する。いくつかの実施形態では、照射されたＰＢＭＣは、そのようなフィーダー細胞対濃縮細胞の比が５：１又は約５：１で存在する。

【０４４９】

特定の実施形態では、インキュベーションもしくは培養の少なくとも一部の間に、照射されたＰＢＭＣの１つ以上の細胞もしくは細胞型、例えばＴ細胞が活性化され、及び／又はインキュベーションもしくは培養が、ＰＢＭＣフィーダー細胞の１つ以上のＴ細胞の活性化を刺激することができる少なくとも１つの刺激物質の存在下で行われる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの刺激性薬剤は、ＴＣＲ複合体のメンバーに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、少なくとも１種の刺激剤は、ＣＤ３、任意選択でＣＤ３イプシロンに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの刺激剤は、抗ＣＤ３抗体又は抗原結合フラグメントである。例示的な抗ＣＤ３抗体としては、マウス抗ヒトＣＤ３（ＯＫＴ３）が挙げられる。

【０４５０】

いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３抗体又は抗原結合フラグメントは、照射されたＰＢＭＣフィーダー細胞を含むインキュベーションの少なくとも一部の間に存在する。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３抗体又は抗原結合フラグメントは、照射されたＰＢＭＣと同時又はほぼ同時に培養物又はインキュベーションに添加される。例えば、抗ＣＤ３抗体又は抗原結合フラグメントは、インキュベーション又は培養の開始時又はほぼ開始時に添加される。特定の実施形態では、抗ＣＤ３抗体又は抗原結合フラグメントは、培養又はインキュベーションの過程で、例えば培養培地を交換又は洗い流すことによって除去されてもよく、又はその濃度が低減されてもよい。特定の実施形態では、交換又は洗浄後、本方法は、培養培地に抗ＣＤ３抗体又は抗原結合フラグメントを添加又は補充することを含まない。

【０４５１】

いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３抗体又は抗原結合フラグメントは、１０ｎｇ／ｍＬもしくは約１０ｎｇ／ｍＬから、５μｇ／ｍＬもしくは約５μｇ／ｍＬの濃度で添加されるか、又は培養又はインキュベーションの少なくとも一部に存在し、例えば、１０ｎｇ／ｍＬもしくは約１０ｎｇ／ｍＬから、２μｇ／ｍＬもしくは約２μｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬもしくは約１０ｎｇ／ｍＬから、１μｇ／ｍＬもしくは約１μｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬもしくは約１０ｎｇ／ｍＬから、５００ｎｇ／ｍＬもしくは約５００ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬもしくは約１０ｎｇ／ｍＬから、１００ｎｇ／ｍＬもしくは約１００ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬもしくは約１０ｎｇ／ｍＬから、５０ｎｇ／ｍＬもしくは約５０ｎｇ／ｍＬ、５０ｎｇ／ｍＬもしくは約５０ｎｇ／ｍＬから、５μｇ／ｍＬもしくは約５μｇ／ｍＬ、例えば、５０ｎｇ／ｍＬもしくは約５０ｎｇ／ｍＬから、２μｇ／ｍＬもしくは約２μｇ／ｍＬ、５０ｎｇ／ｍＬもしくは約５０ｎｇ／ｍＬから、１μｇ／ｍＬもしくは約１μｇ／ｍＬ、５０ｎｇ／ｍＬもしくは約５０ｎｇ／ｍＬから、５００ｎｇ／ｍＬもしくは約５００ｎｇ／ｍＬ、５０ｎｇ／ｍＬもしくは約５０ｎｇ／ｍＬから、１００ｎｇ／ｍＬもしくは約１００ｎｇ／ｍＬ、１００ｎｇ／ｍＬもしくは約１００ｎｇ／ｍＬから、５μｇ／ｍＬもしくは約５μｇ／ｍＬ、１００ｎｇ／ｍＬもしくは約１００ｎｇ／ｍＬから、２μｇ／ｍＬもしくは約２μｇ／ｍＬ、１００ｎｇ／ｍＬもしくは約１００ｎｇ／ｍＬから、１μｇ／ｍＬもしくは約１μｇ／ｍＬ、１００ｎｇ／ｍＬもしくは約１００ｎ

ｇ／ｍＬから、５００ｎｇ／ｍＬもしくは約５００ｎｇ／ｍＬ、５００ｎｇ／ｍＬもしくは約５００ｎｇ／ｍＬから、５μｇ／ｍＬもしくは約５μｇ／ｍＬ、５００ｎｇ／ｍＬもしくは約５００ｎｇ／ｍＬから、２μｇ／ｍＬもしくは約２μｇ／ｍＬ、５００ｎｇ／ｍＬもしくは約５００ｎｇ／ｍＬから、１μｇ／ｍＬもしくは約１μｇ／ｍＬ、１μｇ／ｍＬもしくは約１μｇ／ｍＬから、５μｇ／ｍＬもしくは約５μｇ／ｍＬ、１μｇ／ｍＬもしくは約１μｇ／ｍＬから、２μｇ／ｍＬもしくは約２μｇ／ｍＬ、又は２μｇ／ｍＬもしくは約２μｇ／ｍＬから、５μｇ／ｍＬもしくは約５μｇ／ｍＬ（それぞれ両端を含む）である。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３抗体又は抗原結合フラグメントの濃度は、１０ｎｇ／ｍＬ、２０ｎｇ／ｍＬ、３０ｎｇ／ｍＬ、４０ｎｇ／ｍＬ、５０ｎｇ／ｍＬ、６０ｎｇ／ｍＬ、７０ｎｇ／ｍＬ、８０ｎｇ／ｍＬ、９０ｎｇ／ｍＬもしくは１００ｎｇ／ｍＬ、あるいはそれらの各近似値、もしくは前述のいずれかの間の任意の値である。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３抗体又は抗原結合フラグメントの濃度は、５０ｎｇ／ｍＬ又は約５０ｎｇ／ｍＬである。

【０４５２】

いくつかの実施形態では、「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン（Ｉｇ）分子の抗原結合部分又は断片すなわち、抗原と特異的に結合する（免疫反応する）抗原結合部位を含有する分子を指す。抗体という用語は、無傷ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体だけでなく、そのフラグメント、例えばｄＡｂ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）又はＦ（ａｂ）ＦｖＦｖ）、一本鎖（ｓｃＦｖ）又は単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）を含む。典型的には、「抗原結合フラグメント」は、目的の抗原の少なくとも１つのエピトープに結合する免疫グロブリン重鎖及び／又は軽鎖の少なくとも１つのＣＤＲを含有する。これに関して、抗原結合フラグメントは、抗原に結合する抗体由来の可変重鎖（ＶＨ）及び可変軽鎖（ＶＬ）配列の１、２、３、４、５、又は６つ全てのＣＤＲ、例えば、ＶＨ及びＶＬを含有する抗体については一般に６つのＣＤＲ（重鎖及び軽鎖のそれぞれについては「ＣＤＲ１」、「ＣＤＲ２」及び「ＣＤＲ３」）、又は単一可変ドメインを含有する抗体については３つのＣＤＲを含み得る。

【０４５３】

「抗体フラグメント」は、無傷抗体が結合する抗原に結合するインタクトな抗体の一部を含む、無傷抗体以外の分子を指す。抗体フラグメントの例としては、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆａｂ’－ＳＨ、Ｆ（ａｂ）ダイアボディ、直鎖状抗体、可変重鎖（V_H）領域、ｓｃＦｖ及び単一ドメインV_H単一抗体などの一本鎖抗体分子、ならびに抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、抗体は、重鎖領域及び／又は可変軽鎖領域を含む一本鎖抗体フラグメント、例えばｓｃＦｖである。

【０４５４】

いくつかの実施形態では、インキュベーション又は培養は、そのような濃縮されたＮＫ細胞、例えば選択及び／又は単離されたＮＫ細胞の存在下で、０．０５×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ又は少なくとも又は約０．０５×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ、０．１×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ又は約０．１×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ、０．２×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ又は約０．２×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ、０．５×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬｍＬ又は約０．５×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ、１．０ｘ10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ又は約１．０ｘ10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬの濃度で開始される。提供される方法の実施形態では、インキュベーション又は培養は、０．０５×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ～１．０×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ、例えば、０．０５×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ～０．７５×10^6、０．０５×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ～０．５×１０６、０．０５×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ～０．２０×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ、０．０５×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ～０．１×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ、０．１×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ～１．０×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ、０．１×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ～０．７５×10^6、０．１×10^6個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ～０．５×10^6、０．１×10^6個の濃

縮ＮＫ細胞／ｍＬ～０．２０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ、０．２０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ～１．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ、０．２０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ～０．７５×１０^{6}、０．２０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ～０．５×１０^{6}、０．５×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ～１．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞、０．５×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ～０．７５×１０^{6}、０．７５×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ～１．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ又はそれらの各近似値の範囲（それぞれ両端を含む）の濃度で、選択及び／又は単離されたＮＫ細胞など、前述の濃縮ＮＫ細胞の存在下で開始される。いくつかの実施形態では、インキュベーション又は培養は、そのような濃縮されたＮＫ細胞、例えば、選択及び／又は単離されたＮＫ細胞の存在下で、０．２×１０^{6}又は約０．２×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬの濃度で開始される。

【０４５５】

このような実施形態のいくつかでは、インキュベーション又は培養の開始時に添加又は存在する、セクションＶ．Ａで上記したようにＰＢＭＣから選択又は単離されたなどの濃縮ＮＫ細胞の量は、少なくとも１×１０^{5}細胞又は少なくとも約１×１０^{5}細胞、少なくとも２×１０^{5}又は少なくとも約２×１０^{5}細胞、少なくとも３×１０^{5}又は少なくとも約３×１０^{5}細胞、少なくとも４×１０^{5}又は少なくとも約４×１０^{5}細胞、少なくとも５×１０^{5}又は少なくとも約５×１０^{5}細胞、少なくとも６×１０^{5}又は少なくとも約６×１０^{5}細胞、少なくとも７×１０^{5}又は少なくとも約７×１０^{5}細胞、少なくとも８×１０^{5}又は少なくとも約８×１０^{5}細胞、少なくとも９×１０^{5}又は少なくとも約９×１０^{5}細胞、少なくとも１×１０^{6}又は少なくとも約１×１０^{6}細胞である。特定の実施形態では、上記のようにＰＢＭＣから選択又は単離されたものなどの濃縮されたＮＫ細胞の量は、少なくとも１×１０^{6}又は少なくとも約１×１０^{6}又は１×１０^{6}又は約１×１０^{6}細胞である。

【０４５６】

いくつかの実施形態では、インキュベーション又は培養の開始時に、濃縮されたＮＫ細胞の集団（例えば、セクションＶ．Ａで上述したように選択又は単離される）は、少なくとも又は約２．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞、少なくとも又は約３．０ｘ１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞、少なくとも約４．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞、少なくとも約５．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞、少なくとも又は約６．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞、少なくとも又は約７．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞、少なくとも又は約８．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞、少なくとも又は約９．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞、少なくとも又は約１．０×１０^{7}個の濃縮ＮＫ細胞、少なくとも又は約５．０×１０^{7}個の濃縮ＮＫ細胞、少なくとも又は約１．０×１０^{8}個の濃縮ＮＫ細胞、少なくとも又は約５．０×１０^{8}個の濃縮ＮＫ細胞、又は少なくとも又は約１．０×１０^{9}個の濃縮ＮＫ細胞を含む。いくつかの実施形態では、濃縮されたＮＫ細胞の集団は、少なくとも、２．０×１０^{5}又は約２．０×１０^{5}個の濃縮ＮＫ細胞を含む。いくつかの実施形態では、濃縮されたＮＫ細胞の集団は、少なくとも、１．０×１０^{6}又は約１．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞を含む。いくつかの実施形態では、濃縮ＮＫ細胞の集団は、少なくとも、又は約１．０×１０^{7}個の濃縮ＮＫ細胞を含む。

【０４５７】

いくつかの実施形態では、セクションＶ．Ａに記載されるように選択又は単離されたような、濃縮ＮＫ細胞の集団のインキュベーション又は培養の開始時に、２．０×１０^{5}個の濃縮ＮＫ細胞～１．０×１０^{9}個の濃縮ＮＫ細胞、２．０×１０^{5}個の濃縮ＮＫ細胞～５．０×１０^{8}個の濃縮ＮＫ細胞、２．０×１０^{5}個の濃縮ＮＫ細胞～１．０×１０^{8}個の濃縮ＮＫ細胞、２．０×１０^{5}個の濃縮ＮＫ細胞～５．０×１０^{7}個の濃縮ＮＫ細胞、２．０×１０^{5}個の濃縮ＮＫ細胞～１．０×１０^{7}個の濃縮ＮＫ細胞、２．０×１０^{5}個の濃縮ＮＫ細胞～５．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞、２．０×１０^{5}個の濃縮ＮＫ細胞～１．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞、１．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞～１．０×１０^{9}個の濃縮ＮＫ細胞、１．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞～５．０×１０^{8}個の濃縮ＮＫ細胞、１．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞～１．０×１０^{8}個の濃縮ＮＫ細胞、１．０×１０^{6}個

の濃縮ＮＫ細胞～５．０×１０^{7}個の濃縮ＮＫ細胞、１．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞～１．０×１０^{7}個の濃縮ＮＫ細胞、１．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞～５．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞、５．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞～１．０×１０^{9}個の濃縮ＮＫ細胞、５．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞～５．０×１０^{8}個の濃縮ＮＫ細胞、５．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞～１．０×１０^{8}個の濃縮ＮＫ細胞、５．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞～５．０×１０^{7}個の濃縮ＮＫ細胞、５．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞～１．０×１０^{7}個の濃縮ＮＫ細胞、１．０×１０^{7}個の濃縮ＮＫ細胞～１．０×１０^{9}個の濃縮ＮＫ細胞、１．０×１０^{7}個の濃縮ＮＫ細胞～５．０×１０^{8}個の濃縮ＮＫ細胞、１．０×１０^{7}個の濃縮ＮＫ細胞～１．０×１０^{8}個の濃縮ＮＫ細胞、１．０×１０^{7}個の濃縮ＮＫ細胞～５．０×１０^{7}個の濃縮ＮＫ細胞、５．０×１０^{7}個の濃縮ＮＫ細胞～１．０×１０^{9}個の濃縮ＮＫ細胞、５．０×１０^{7}個の濃縮ＮＫ細胞～５．０×１０^{8}個の濃縮ＮＫ細胞、５．０×１０^{7}個の濃縮ＮＫ細胞～１．０×１０^{8}個の濃縮ＮＫ細胞、１．０×１０^{8}個の濃縮ＮＫ細胞～１．０×１０^{9}個の濃縮ＮＫ細胞、１．０×１０^{8}個の濃縮ＮＫ細胞～５．０×１０^{8}個の濃縮ＮＫ細胞、又は５．０×１０^{8}個の濃縮ＮＫ細胞～１．０×１０^{9}個の濃縮ＮＫ細胞又はそれらの各近似値の範囲を含む。いくつかの実施形態では、培養又はインキュベーションの開始時に、濃縮ＮＫ細胞の集団は、２．０×１０^{5}個の濃縮ＮＫ細胞～５．０×１０^{7}個の濃縮ＮＫ細胞又はそれらの各近似値の範囲の濃縮ＮＫ細胞を含む。いくつかの実施形態では、培養又はインキュベーションの開始時に、濃縮ＮＫ細胞の集団は、１．０×１０^{6}～１．０×１０^{8}個又はそれらの各近似値の範囲の濃縮ＮＫ細胞を含む。いくつかの実施形態では、培養又はインキュベーションの開始時に、濃縮されたＮＫ細胞の集団は、１．０×１０^{7}～５．０×１０^{8}個又はそれらの各近似値の範囲の濃縮ＮＫ細胞を含む。いくつかの実施形態では、培養又はインキュベーションの開始時に、濃縮されたＮＫ細胞の集団は、１．０×１０^{7}個の濃縮されたＮＫ細胞～１．０×１０^{9}個又はそれらの各近似値の範囲の濃縮ＮＫ細胞を含む。

【０４５８】

いくつかの実施形態では、培養又はインキュベーションの開始時に存在する濃縮ＮＫ細胞の集団中のｇ－ＮＫ細胞の割合は、２０％～９０％、２０％～８０％、２０％～７０％、２０％～６０％、２０％～５０％、２０％～４０％、２０％～３０％、３０％～９０％、３０％～８０％、３０％～７０％、３０％～６０％、３０％～５０％、３０％～４０％、４０％～９０％、４０％～８０％、４０％～７０％、４０％～６０％、４０％～５０％、５０％～９０％、５０％～８０％、５０％～７０％、５０％～６０％、６０％～９０％、６０％～８０％、６０％～７０％、７０％～９０％、７０％～８０％、又は８０％～９０％もしくはそれらの各近似値の範囲である。いくつかの実施形態では、培養又はインキュベーションの開始時における濃縮ＮＫ細胞の集団中のｇ－ＮＫ細胞の割合は、２０％又は約２０％から、９０％又は約９０％である。いくつかの実施形態では、培養又はインキュベーションの開始時における濃縮ＮＫ細胞の集団中のｇ－ＮＫ細胞の割合は、４０％又は約４０％から、９０％又は約９０％である。いくつかの実施形態では、培養又はインキュベーションの開始時における濃縮されたＮＫ細胞の集団中のｇ－ＮＫ細胞の割合は、６０％又は約６０％から、９０％又は約９０％である。

【０４５９】

これらの実施形態のいくつかにおいて、ＮＫ細胞は、増殖因子と共に培養され得る。いくつかの実施形態によれば、少なくとも１つの成長因子は、ＳＣＦ、ＧＳＫ３ｉ、ＦＬＴ３、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－１２、ＩＬ－１８及びＩＬ－２１からなる群から選択される成長因子を含む。いくつかの実施形態によれば、少なくとも１つの成長因子は、ＩＬ－２又はＩＬ－７及びＩＬ－１５である。いくつかの実施形態によれば、少なくとも１つの成長因子は、ＩＬ－２、ＩＬ－２１又はＩＬ－７及びＩＬ－１５である。いくつかの実施形態では、成長因子は、組換えサイトカイン、例えば組換えＩＬ－２、組換えＩＬ－７、組換えＩＬ－２１又は組換えＩＬ－１５である。

【０４６０】

いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞は、１つ以上の組換えサイトカインの存在下で培養

される。いくつかの実施形態では、１つ以上の組換えサイトカインは、ＳＣＦ、ＧＳＫ３ｉ、ＦＬＴ３、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－１２、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２７、又はそれらの組み合わせのいずれかを含む。いくつかの実施形態、１つ以上の組換えサイトカインは、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－１２、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２７、又はそれらの組み合わせのいずれかを含む。いくつかの実施形態では、１つ以上の組換えサイトカインの少なくとも１つは、ＩＬ－２１である。いくつかの実施形態では、１つ以上の組換えサイトカインは、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－１２、ＩＬ－１８、もしくはＩＬ－２７、又はそれらの組み合わせを更に含む。いくつかの実施形態では、１つ以上の組換えサイトカインの少なくとも１つは、ＩＬ－２である。いくつかの実施形態では、１つ以上の組換えサイトカインは、少なくともＩＬ－２、及びＩＬ－２１である。いくつかの実施形態では、１つ以上の組換えサイトカインは、ＩＬ－２１、及びＩＬ－２である。いくつかの実施形態では、１つ以上の組換えサイトカインは、ＩＬ－２１、ＩＬ－２、及びＩＬ－１５である。いくつかの実施形態では、１つ以上の組換えサイトカインは、ＩＬ－２１、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－１８である。いくつかの実施形態では、１つ以上の組換えサイトカインは、ＩＬ－２１、ＩＬ－２、Ｉｌ－１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－１８である。いくつかの実施形態では、１つ以上の組換えサイトカインは、ＩＬ－２１、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、及びＩＬ－２７である。いくつかの実施形態では、１つ以上の組換えサイトカインは、ＩＬ－２１、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、及びＩＬ－２７である。いくつかの実施形態では、１つ以上の組換えサイトカインは、ＩＬ－２、及びＩＬ－１５である。

【０４６１】

特定の実施形態において、提供される方法は、組換えＩＬ－２の存在下での濃縮されたＮＫ細胞及びフィーダー細胞のインキュベーション又は培養を含む。いくつかの実施形態では、インキュベーションの少なくとも一部、例えば、培養の開始時に添加され、任意選択で培養中に１回以上添加される間、組換えＩＬ－２は、１ＩＵ／ｍＬ～５００ＩＵ／ｍＬ、例えば、１ＩＵ／ｍＬ～２５０ＩＵ／ｍＬ、１ＩＵ／ｍＬ～１００ＩＵ／ｍＬ、１ＩＵ／ｍＬ～５０ＩＵ／ｍＬ、５０ＩＵ／ｍＬ～５００ＩＵ／ｍＬ、５０ＩＵ／ｍＬ～２５０ＩＵ／ｍＬ、５０ＩＵ／ｍＬ～１００ＩＵ／ｍＬ、１００ＩＵ／ｍＬ～５００ＩＵ／ｍＬ、１００ＩＵ／ｍＬ～２５０ＩＵ／ｍＬ、又は２５０ＩＵ／ｍＬ～５００ＩＵ／ｍＬ（それぞれ両端を含む）もしくはそれらの各近似値の範囲（それぞれ両端を含む）の濃度で存在する。いくつかの実施形態では、インキュベーションの少なくとも一部の間、例えば、培養の開始時に添加され、任意選択で培養中に１回以上添加される間、ＩＬ－２の濃度は、５０ＩＵ／ｍＬ、６０ＩＵ／ｍＬ、７０ＩＵ／ｍＬ、８０ＩＵ／ｍＬ、９０ＩＵ／ｍＬ、１００ＩＵ／ｍＬ、１２５ＩＵ／ｍＬ、１５０ＩＵ／ｍＬ、２００ＩＵ／ｍＬ、もしくはそれらの各近似値、又は任意の値である上記のいずれかの間である。特定の実施形態では、培養の開始時及び任意選択で培養中に１回以上添加される組換えＩＬ－２の濃度は、１００ＩＵ／ｍＬ又は約１００ＩＵ／ｍＬである。特定の実施形態では、培養開始時及び任意選択で培養中に１回以上添加される組換えＩＬ－２の濃度は、５００ＩＵ／ｍＬであるか、又は約５００ＩＵ／ｍＬである。

【０４６２】

特定の実施形態において、提供される方法は、組換えＩＬ－２１の存在下での濃縮されたＮＫ細胞及びフィーダー細胞のインキュベーション又は培養を含む。いくつかの実施形態では、インキュベーションの少なくとも一部の間、例えば、培養の開始時に添加され、任意選択で培養中に１回以上添加される間、組換えＩＬ－２１は、１ＩＵ／ｍＬ～５００ＩＵ／ｍＬ、例えば、１ＩＵ／ｍＬ～２５０ＩＵ／ｍＬ、１ＩＵ／ｍＬ～１００ＩＵ／ｍＬ、１ＩＵ／ｍＬ～５０ＩＵ／ｍＬ、５０ＩＵ／ｍＬ～５００ＩＵ／ｍＬ、５０ＩＵ／ｍＬ～２５０ＩＵ／ｍＬ、５０ＩＵ／ｍＬ～１００ＩＵ／ｍＬ、１００ＩＵ／ｍＬ～５００ＩＵ／ｍＬ、１００ＩＵ／ｍＬ～２５０ＩＵ／ｍＬ、又は２５０ＩＵ／ｍＬ～５００ＩＵ／ｍＬもしくはそれらの各近似値の範囲（それぞれ両端を含む）の濃度で存在する。いくつかの実施形態では、インキュベーションの少なくとも一部の間、例えば、培養の開始時

に添加され、任意選択で培養中に１回以上添加される間、ＩＬ－２１の濃度は、５０ＩＵ／ｍＬ、６０ＩＵ／ｍＬ、７０ＩＵ／ｍＬ、８０ＩＵ／ｍＬ、９０ＩＵ／ｍＬ、１００ＩＵ／ｍＬ、１２５ＩＵ／ｍＬ、１５０ＩＵ／ｍＬ、２００ＩＵ／ｍＬ、もしくはそれらの各近似値、又は上記のいずれかの間の任意の値である。特定の実施形態では、培養の開始時及び任意選択で培養中に１回以上添加される組換えＩＬ－２１の濃度は、１００ＩＵ／ｍＬ又は約１００ＩＵ／ｍＬである。

【０４６３】

特定の実施形態において、提供される方法は、組換えＩＬ－２１の存在下での濃縮されたＮＫ細胞及びフィーダー細胞のインキュベーション又は培養を含む。特定の実施形態では、培養の少なくとも一部の間の組換えＩＬ－２１の濃度、例えば、培養の開始時に添加され、任意選択で培養中に１回以上添加される組換えＩＬ－２１の濃度は、約１０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約９０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約８０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約７０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約６０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約２０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約９０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約８０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約７０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約６０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約９０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約８０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約７０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約６０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ～約９０ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ～約８０ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ～約７０ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ～約６０ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ～約９０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ～約８０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ～約７０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ～約６０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ～約９０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ～約８０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ～約７０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ～約９０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ～約８０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ～約９０ｎｇ／ｍＬ、又は約９０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ（両端を含む）である。特定の実施形態では、例えば培養の開始時、及び任意選択で培養中に１回以上添加される、培養の少なくとも一部の組換えＩＬ－２１の濃度は、約１０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬである。特定の実施形態では、例えば培養の開始時、及び任意選択で培養中に１回以上添加される、培養の少なくとも一部の間の組換えＩＬ－２１の濃度は、２５ｎｇ／ｍＬ又は約２５ｎｇ／ｍＬである。

【０４６４】

特定の実施形態では、例えば培養の開始時、及び任意選択で培養中に１回以上添加される、培養の少なくとも一部の間の組換えＩＬ－１５の濃度は、約１ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約２０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約１０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約２０ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約１０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約２０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、又は約４０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬである。特定の実施形態では、例えば培養の開始時、及び任意選択で培養中に１回以上添加される、培養の少なくとも一部の間の組換えＩＬ－１５の濃度は、約１ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／

ｍＬである。特定の実施形態では、例えば培養の開始時、及び任意選択で培養中に１回以上添加される、培養の少なくとも一部の間の組換えＩＬ－１５の濃度は、１０ｎｇ／ｍＬ又は約１０ｎｇ／ｍＬである。

【０４６５】

特定の実施形態において、本方法は、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１の存在下での培養を含む。提供される方法の実施形態において、例えば、培養の開始時及び任意選択で培養中に１回以上培養物に添加される組換えサイトカインの濃度は、ＩＬ－２は５０ＩＵ／ｍＬ又は約５０ＩＵ／ｍＬから、５００ＩＵ／ｍＬ又は約５００ＩＵ／ｍＬであり、例えば、１００ＩＵ／ｍＬ又は約１００ＩＵ／ｍＬもしくは５００ＩＵ／ｍＬ又は５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、１ｎｇ／ｍＬ又は約１ｎｇ／ｍＬから、５０ｎｇ／ｍＬ又は約５０ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１５、例えば、１０ｎｇ／ｍＬまたは約１０ｎｇ／ｍＬ、及び１０ｎｇ／ｍＬ又は約１０ｎｇ／ｍＬから、１００ｎｇ／ｍＬ又は約１００ｎｇ／ｍＬのＩＬ－２１、例えば２５ｎｇ／ｍＬ又は約２５ｎｇ／ｍＬである。特定の実施形態では、５００　ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、１０ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１５、及び２５ｎｇ／ｍＬのＩＬ－２１を、培養の少なくとも一部の間に添加し、例えば培養の開始時、及び任意選択で培養中に１回以上添加する。特定の実施形態では、１００　ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、１０ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１５、及び２５ｎｇ／ｍＬのＩＬ－２１を培養の少なくとも一部の間に添加し、例えば、例えば培養の開始時、及び任意選択で培養中に１回以上添加する。

【０４６６】

いくつかの実施形態では、提供される方法は、組換えＩＬ－２１の存在下での濃縮されたＮＫ細胞及びフィーダー細胞のインキュベーション又は培養を含み、組換えＩＬ－２１は、抗ＩＬ－２１抗体との複合体として添加される。いくつかの実施形態では、培養の前に、抗ＩＬ－２１抗体を組換えＩＬ－２１と接触させ、それによってＩＬ－２１／抗ＩＬ－２１複合体を形成し、ＩＬ－２１／抗ＩＬ－２１複合体を培養培地に添加する。いくつかの実施形態では、組換えＩＬ－２１と抗ＩＬ－２１抗体とを接触させてＩＬ－２１／抗ＩＬ－２１複合体を形成させることは、複合体の形成に適した温度及び時間を含む条件下で行われる。いくつかの実施形態では、培養は、３７℃±２で３０分間行われる。

【０４６７】

いくつかの実施形態では、抗ＩＬ－２１抗体は、１００ｎｇ／ｍＬ～５００ｎｇ／ｍＬ、１００ｎｇ／ｍＬ～４００ｎｇ／ｍＬ、１００ｎｇ／ｍＬ～３００ｎｇ／ｍＬ、１００ｎｇ／ｍＬ～２００ｎｇ／ｍＬ、２００ｎｇ／ｍＬ～５００ｎｇ／ｍＬ、２００ｎｇ／ｍＬ～４００ｎｇ／ｍＬ、２００ｎｇ／ｍＬ～３００ｎｇ／ｍＬ、３００ｎｇ／ｍＬ～５００ｎｇ／ｍＬ、３００ｎｇ／ｍＬ～４００ｎｇ／ｍＬ、又は４００ｎｇ／ｍＬ～５００ｎｇ／ｍＬもしくはそれらの各近似値の範囲の濃度で添加される。いくつかの実施形態では、抗ＩＬ－２１抗体は、１００ｎｇ／ｍＬ～５００ｎｇ／ｍＬ又は約１００ｎｇ／ｍＬ～約５００ｎｇ／ｍＬの間の濃度で添加される。いくつかの実施形態では、抗ＩＬ－２１抗体は、２５０ｎｇ／ｍＬの濃度で添加される。

【０４６８】

特定の実施形態では、抗ＩＬ－２１抗体と複合体を形成するために使用される組換えＩＬ－２１の濃度は、約１０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約９０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約８０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約７０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約６０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約２０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約９０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約８０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約７０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約６０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約９０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約８０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約７０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約６０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ

／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ～約９０ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ～約８０ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ～約７０ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ～約６０ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ～約９０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ～約８０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ～約７０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ～約６０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ～約９０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ～約８０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ～約７０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ～約９０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ～約８０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ～約９０ｎｇ／ｍＬ、又は約９０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ（両端を含む）である。特定の実施形態では、抗ＩＬ－２１抗体と複合体を形成するために使用される組換えＩＬ－２１の濃度は、約１０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ（両端を含む）である。特定の実施形態において、抗ＩＬ－２１抗体との複合体を形成するために使用される組換えＩＬ－２１の濃度は、２５ｎｇ／ｍＬ又は約２５ｎｇ／ｍＬである。

【０４６９】

特定の実施形態では、例えば培養の開始時、及び任意選択で培養中に１回以上添加される、培養の少なくとも一部の間の組換えＩＬ－１２の濃度は、約１ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約２０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約１０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約２０ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約１０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約２０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、又は約４０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬである。特定の実施形態では、例えば培養の開始時、及び任意選択で培養中に１回以上添加される、培養の少なくとも一部の間の組換えＩＬ－１２の濃度は、約１ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬである。特定の実施形態では、例えば培養の開始時、及び任意選択で培養中に１回以上添加される、培養の少なくとも一部の間の組換えＩＬ－１２の濃度は、１０ｎｇ／ｍＬ又は約１０ｎｇ／ｍＬである。

【０４７０】

特定の実施形態では、例えば培養の開始時、及び任意選択で培養中に１回以上添加される、培養の少なくとも一部の間の組換えＩＬ－１８の濃度は、約１ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約２０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約１０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約２０ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約１０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約２０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、又は約４０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬである。特定の実施形態では、例えば培養の開始時、及び任意選択で培養中に１回以上添加される、培養の少なくとも一部の間の組換えＩＬ－１８の濃度は、約１ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬである。特定の実施形態では、例えば培養の開始時、及び任意選択で培養中に１回以上添加される、培養の少なくとも一部の間の組換えＩＬ－１８の濃度は、１０ｎｇ／ｍＬ又は約１０ｎｇ／ｍＬである。

【０４７１】

特定の実施形態では、例えば培養の開始時、及び任意選択で培養中に１回以上添加され

る、培養の少なくとも一部の間の組換えＩＬ－２７の濃度は、約１ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約２０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約１０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約２０ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約１０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約２０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、又は約４０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬである。特定の実施形態では、例えば培養の開始時、及び任意選択で培養中に１回以上添加される、培養の少なくとも一部の間の組換えＩＬ－２７の濃度は、約１ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬである。特定の実施形態では、例えば培養の開始時、及び任意選択で培養中に１回以上添加される、培養の少なくとも一部の間の組換えＩＬ－２７の濃度は、１０ｎｇ／ｍＬ又は約１０ｎｇ／ｍＬである。

【０４７２】

いくつかの実施形態では、本方法は、培養培地を交換することを含み、これは、いくつかの実施形態では、細胞を洗浄することを含む。例えば、培養又はインキュベーションの少なくとも一部の間、培養培地は、毎日、１日おき、３日おき、又は週に１回など、断続的に交換又は洗い流すことができる。特定の実施形態では、培養培地は、培養開始後３日～７日以内又は約３日～７日以内、例えば、３日目、４日目、５日目、６日目もしくは７日目又は約３日目、４日目、５日目、６日目もしくは７日目に初めて交換又は洗浄される。特定の実施形態において、培養培地は、５日目の開始時又はほぼ開始時に交換又は洗い流される。例えば、培地を５日目及びその後２～３日毎に交換する。

【０４７３】

培養培地が除去又は洗浄されたら、それを補充する。いくつかの実施形態では、補充された培養培地は、上記のいずれかなどの１つ以上の増殖因子又はサイトカインを含む。したがって、いくつかの実施形態では、組換えＩＬ－２、ＩＬ－１５及び／又はＩＬ－２１などの１つ以上の成長因子又はサイトカインは、インキュベーション又は培養中に断続的に添加される。いくつかのそのような態様では、組換えＩＬ－２、ＩＬ－１５及び／又はＩＬ－２１などの１つ以上の成長因子又はサイトカインは、培養又はインキュベーションの開始時又はほぼ開始時に添加され、その後、培養又はインキュベーション中に断続的に、例えば、培養培地が交換又は洗浄されるたびに添加される。いくつかの実施形態では、組換えＩＬ－２、ＩＬ－１５及び／又はＩＬ－２１などの１つ以上の成長因子又はサイトカインは、０日目（インキュベーションの開始）に開始して培養物又はインキュベーションに添加され、培養培地の各交換又は洗浄時に、組換えＩＬ－２、ＩＬ－１５及び／又はＩＬ－２１などの１つ以上の成長因子又はサイトカインを培養物又はインキュベーションに補充するために更に添加される。いくつかの実施形態では、本方法は、１つ以上の増殖因子又はサイトカイン、例えば組換えＩＬ－２、ＩＬ－１５及び／又はＩＬ－２１を、インキュベーションの開始時（０日目）に、ならびにインキュベーションの期間中の培養培地の各洗浄又は交換時に、例えば培養又はインキュベーションの５日目、７日目、９日目、１１日目、及び１４日目又はその前後に２日又は３日もしくはそれらの付近の日に毎に添加することを含む。

【０４７４】

特定の実施形態では、培養は、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１の少なくとも１つの存在下で行われ、培養培地は、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１の少なくとも１つを含むように補充される。いくつかの実施形態では、培養は、ＩＬ－２及びＩＬ－２１の存在下で行われ、培養培地は、ＩＬ－２及びＩＬ－２１を含むように補充される。いくつかの実施形態では、培養は、ＩＬ－２及びＩＬ－１５の存在下で行われ、培養培地は、ＩＬ－２及びＩＬ－１５を含むように補充される。いくつかの実施形態では、培養は、ＩＬ

－１５及びＩＬ－２１の存在下で行われ、培養培地は、ＩＬ－１５及びＩＬ２１を含むように補充される。いくつかの実施形態では、培養は、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１の存在下で行われ、培養培地は、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１を含むように補充される。いくつかの実施形態では、組換えＩＬ－１８、組換えＩＬ－７、及び／又は組換えＩＬ－１２を含むがこれらに限定されない１つ以上の追加のサイトカインを、ＮＫ細胞の増殖に利用することができる。

【０４７５】

いくつかの実施形態では、補充された培養培地は、組換えＩＬ－２などの１つ以上の増殖因子又はサイトカインを含む。したがって、いくつかの実施形態では、増殖因子又はサイトカイン、例えば組換えＩＬ－２は、インキュベーション又は培養中に断続的に添加される。いくつかのそのような態様では、組換えＩＬ－２などの成長因子又はサイトカインは、培養又はインキュベーションの開始時又はほぼ開始時に添加され、その後、培養又はインキュベーション中に断続的に、例えば、培養培地が交換又は洗浄されるたびに添加される。いくつかの実施形態では、増殖因子又はサイトカイン、例えば組換えＩＬ－２は、０日目（インキュベーションの開始）に開始して培養物又はインキュベーションに添加され、培養培地の各交換又は洗浄時に、培養物又はインキュベーションに増殖因子又はサイトカイン、例えば組換えＩＬ－２を補充するために更に添加される。いくつかの実施形態では、本方法は、インキュベーションの開始時（０日目）に、及びインキュベーションの期間中の培養培地の各洗浄又は交換時に２又は３日毎に、例えば、培養又はインキュベーションの５日目、７日目、９日目、１１日目、及び１４日目又はその前後に、組換えＩＬ－２を添加することを含む。そのような実施形態のいずれかにおいて、組換えＩＬ－２は、１ＩＵ／ｍＬ～５００ＩＵ／ｍＬ、例えば、１ＩＵ／ｍＬ～２５０ＩＵ／ｍＬ、１ＩＵ／ｍＬ～１００ＩＵ／ｍＬ、１ＩＵ／ｍＬ～５０ＩＵ／ｍＬ、５０ＩＵ／ｍＬ～５００ＩＵ／ｍＬ、５０ＩＵ／ｍＬ～２５０ＩＵ／ｍＬ、５０ＩＵ／ｍＬ～１００ＩＵ／ｍＬ、１００ＩＵ／ｍＬ～５００ＩＵ／ｍＬ、１００ＩＵ／ｍＬ～２５０ＩＵ／ｍＬ、又は２５０ＩＵ／ｍＬ～５００ＩＵ／ｍＬ、もしくはそれらの各近似値の範囲（それぞれ両端を含む）、それぞれの濃度で培養物又はインキュベーションに添加される。いくつかの実施形態では、組換えＩＬ－２は、５０ＩＵ／ｍＬ、６０ＩＵ／ｍＬ、７０ＩＵ／ｍＬ、８０ＩＵ／ｍＬ、９０ＩＵ／ｍＬ、１００ＩＵ／ｍＬ、１２５ＩＵ／ｍＬ、１５０ＩＵ／ｍＬ、２００ＩＵ／ｍＬ、又は上記のいずれかの間の任意の値である濃度又は約その濃度で培養物又はインキュベーションに添加される。特定の実施形態において、組換えＩＬ－２の濃度は、１００ＩＵ／ｍＬ又は約１００ＩＵ／ｍＬである。特定の実施形態において、組換えＩＬ－２の濃度は、５００ＩＵ／ｍＬであるか、又は約５００ＩＵ／ｍＬである。

【０４７６】

いくつかの実施形態では、補充された培養培地は、組換えＩＬ－２１などの１つ以上の増殖因子又はサイトカインを含む。したがって、いくつかの実施形態では、増殖因子又はサイトカイン、例えば組換えＩＬ－２１は、インキュベーション又は培養中に断続的に添加される。いくつかのそのような態様では、組換えＩＬ－２１などの成長因子又はサイトカインは、培養又はインキュベーションの開始時又はほぼ開始時に添加され、その後、培養又はインキュベーション中に断続的に、例えば、培養培地が交換又は洗浄されるたびに添加される。いくつかの実施形態では、増殖因子又はサイトカイン、例えば組換えＩＬ－２１は、０日目（インキュベーションの開始）に開始して培養物又はインキュベーションに添加され、培養培地の各交換又は洗浄時に、培養物又はインキュベーションに増殖因子又はサイトカイン、例えば組換えＩＬ－２１を補充するために更に添加される。いくつかの実施形態では、本方法は、インキュベーションの開始時（０日目）に、及びインキュベーションの期間中の培養培地の各洗浄又は交換時に２又は３日毎に、例えば、培養又はインキュベーションの５日目、７日目、９日目、１１日目、及び１４日目又はその前後に、組換えＩＬ－２１を添加することを含む。そのような実施形態のいずれにおいても、組換えＩＬ－２１は、約１０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約９０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約８０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約７０ｎｇ／ｍＬ

、約１０ｎｇ／ｍＬ～約６０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約２０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約９０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約８０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約７０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約６０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約９０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約８０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約７０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約６０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ～約９０ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ～約８０ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ～約７０ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ～約６０ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ～約９０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ～約８０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ～約７０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ～約６０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ～約９０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ～約８０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ～約７０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ～約９０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ～約８０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ～約９０ｎｇ／ｍＬ、又は約９０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ（両端を含む）の濃度で培養物又はインキュベーションに添加される。特定の実施形態では、組換えＩＬ－２１は、約１０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ（両端を含む）の濃度で培養物又はインキュベーションに添加される。組換えＩＬ－２１は、２５ｎｇ／ｍＬ又は約２５ｎｇ／ｍＬの濃度で培養物又はインキュベーションに添加する。

【０４７７】

いくつかの実施形態では、補充された培養培地は、抗ＩＬ－２１抗体などの抗体との複合体として添加された、組換えＩＬ－２１などの１つ以上の増殖因子又はサイトカインを含む。したがって、いくつかの実施形態では、ＩＬ－２１／抗ＩＬ－２１抗体複合体などの複合体は、インキュベーション又は培養中に断続的に添加される。いくつかのそのような態様では、ＩＬ－２１／抗ＩＬ－２１抗体複合体などの複合体は、培養又はインキュベーションの開始時又はほぼ開始時に添加され、その後、培養又はインキュベーション中に断続的に、例えば、培養培地が交換又は洗浄されるたびに添加される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２１／抗ＩＬ－２１抗体複合体などの複合体は、０日目（インキュベーションの開始）に開始して培養物又はインキュベーションに添加され、培養培地の各交換又は洗浄時に、ＩＬ－２１／抗ＩＬ－２１抗体複合体などの複合体を培養物又はインキュベーションに補充するために更に添加される。いくつかの実施形態では、本方法は、インキュベーションの開始時（０日目）に、及びインキュベーションの期間中の培養培地の各洗浄又は交換時に２又は３日毎に、例えば、培養又はインキュベーションの５日目、７日目、９日目、１１日目、及び１４日目又はその前後に、ＩＬ－２１／抗ＩＬ－２１抗体複合体などの複合体を添加することを含む。そのような実施形態のいずれかにおいて、抗ＩＬ－２１抗体を組換えＩＬ－２１と接触させ、それによってＩＬ－２１／抗ＩＬ－２１複合体を形成し、ＩＬ－２１／抗ＩＬ－２１複合体を培養培地に添加する。そのような実施形態のいずれかにおいて、組換えＩＬ－２１と抗ＩＬ－２１抗体とを接触させてＩＬ－２１／抗ＩＬ－２１複合体を形成することは、複合体の形成に適した温度及び時間を含む条件下で行われる。そのような実施形態のいずれかにおいて、培養は、３７℃±２で３０分間行われる。そのような実施形態のいずれかにおいて、抗ＩＬ－２１抗体は、１００ｎｇ／ｍＬ～５００ｎｇ／ｍＬ、１００ｎｇ／ｍＬ～４００ｎｇ／ｍＬ、１００ｎｇ／ｍＬ～３００ｎｇ／ｍＬ、１００ｎｇ／ｍＬ～２００ｎｇ／ｍＬ、２００ｎｇ／ｍＬ～５００ｎｇ／ｍＬ、２００ｎｇ／ｍＬ～４００ｎｇ／ｍＬ、２００ｎｇ／ｍＬ～３００ｎｇ／ｍＬ、３００ｎｇ／ｍＬ～５００ｎｇ／ｍＬ、３００ｎｇ／ｍＬ～４００ｎｇ／ｍＬ、又は４００ｎｇ／ｍＬ～５００ｎｇ／ｍＬ、もしくはそれらの各近似値の範囲の濃度で添加される

。いくつかの実施形態では、抗ＩＬ－２１抗体は、１００ｎｇ／ｍＬ又は約１００ｎｇ／ｍＬから、５００ｎｇ／ｍＬ又は約５００ｎｇ／ｍＬの濃度で添加される。いくつかの実施形態では、抗ＩＬ－２１抗体は、２５０ｎｇ／ｍＬの濃度で添加される。そのような実施形態のいずれかにおいて、抗ＩＬ－２１抗体と複合体を形成するために使用される組換えＩＬ－２１の濃度は、約１０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約９０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約８０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約７０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約６０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約２０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約９０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約８０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約７０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約６０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約９０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約８０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約７０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約６０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ～約９０ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ～約８０ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ～約７０ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ～約６０ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ～約９０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ～約８０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ～約７０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ～約６０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ～約９０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ～約８０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ～約７０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ～約９０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ～約８０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ～約９０ｎｇ／ｍＬ、又は約９０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ（両端を含む）である。特定の実施形態では、抗ＩＬ－２１抗体と複合体を形成するために使用される組換えＩＬ－２１の濃度は、約１０ｎｇ／ｍＬ～約１００ｎｇ／ｍＬ（両端を含む）である。特定の実施形態において、抗ＩＬ－２１抗体との複合体を形成するために使用される組換えＩＬ－２１の濃度は、２５ｎｇ／ｍＬ又は約２５ｎｇ／ｍＬである。

【０４７８】

いくつかの実施形態では、補充された培養培地は、組換えＩＬ－１５などの１つ以上の増殖因子又はサイトカインを含む。したがって、いくつかの実施形態では、増殖因子又はサイトカイン、例えば組換えＩＬ－１５は、インキュベーション又は培養中に断続的に添加される。いくつかのそのような態様では、組換えＩＬ－１５などの成長因子又はサイトカインは、培養又はインキュベーションの開始時又はほぼ開始時に添加され、その後、培養又はインキュベーション中に断続的に、例えば、培養培地が交換又は洗浄されるたびに添加される。いくつかの実施形態では、増殖因子又はサイトカイン、例えば組換えＩＬ－１５は、０日目（インキュベーションの開始）に開始して培養物又はインキュベーションに添加され、培養培地の各交換又は洗浄時に、培養物又はインキュベーションに増殖因子又はサイトカイン、例えば組換えＩＬ－１５を補充するために更に添加される。いくつかの実施形態では、本方法は、インキュベーションの開始時（０日目）に、及びインキュベーションの期間中の培養培地の各洗浄又は交換時に２又は３日毎に、例えば、培養又はインキュベーションの５日目、７日目、９日目、１１日目、及び１４日目又はその前後に、組換えＩＬ－１５を添加することを含む。そのような実施形態のいずれかにおいて、組換えＩＬ－１５は、約１ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約２０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約１０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約２０ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約１０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約

３０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約２０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、又は約４０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬの濃度で培養物又はインキュベーションに添加される。そのような実施形態のいずれかにおいて、組換えＩＬ－１５は、約１ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬの濃度で培養物又はインキュベーションに添加される。そのような実施形態のいずれかにおいて、組換えＩＬ－１５は、１０ｎｇ／ｍＬ又は約１０ｎｇ／ｍＬの濃度で培養物又はインキュベーションに添加される。特定の実施形態では、５００　ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、１０ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１５、及び２５ｎｇ／ｍＬのＩＬ－２１を培養物又はインキュベーションに添加する。

【０４７９】

いくつかの実施形態では、補充された培養培地は、組換えＩＬ－１２などの１つ以上の増殖因子又はサイトカインを含む。したがって、いくつかの実施形態では、増殖因子又はサイトカイン、例えば組換えＩＬ－１２は、インキュベーション又は培養中に断続的に添加される。いくつかのそのような態様では、組換えＩＬ－１２などの成長因子又はサイトカインは、培養又はインキュベーションの開始時又はほぼ開始時に添加され、その後、培養又はインキュベーション中に断続的に、例えば、培養培地が交換又は洗浄されるたびに添加される。いくつかの実施形態では、増殖因子又はサイトカイン、例えば組換えＩＬ－１２は、０日目（インキュベーションの開始）に開始して培養物又はインキュベーションに添加され、培養培地の各交換又は洗浄時に、培養物又はインキュベーションに増殖因子又はサイトカイン、例えば組換えＩＬ－１２を補充するために更に添加される。いくつかの実施形態では、本方法は、インキュベーションの開始時（０日目）に、及びインキュベーションの期間中の培養培地の各洗浄又は交換時に２又は３日毎に、例えば、培養又はインキュベーションの５日目、７日目、９日目、１１日目、及び１４日目又はその前後に、組換えＩＬ－１２を添加することを含む。そのような実施形態のいずれかにおいて、組換えＩＬ－１２は、約１ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約２０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約１０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約２０ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約１０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約２０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、又は約４０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬの濃度で培養物又はインキュベーションに添加される。そのような実施形態のいずれかにおいて、組換えＩＬ－１２は、約１ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬの濃度で培養物又はインキュベーションに添加される。そのような実施形態のいずれかにおいて、組換えＩＬ－１２は、１０ｎｇ／ｍＬ又は約１０ｎｇ／ｍＬの濃度で培養物又はインキュベーションに添加される。

【０４８０】

いくつかの実施形態では、補充された培養培地は、組換えＩＬ－１８などの１つ以上の増殖因子又はサイトカインを含む。したがって、いくつかの実施形態では、増殖因子又はサイトカイン、例えば組換えＩＬ－１８は、インキュベーション又は培養中に断続的に添加される。いくつかのそのような態様では、組換えＩＬ－１８などの成長因子又はサイトカインは、培養又はインキュベーションの開始時又はほぼ開始時に添加され、その後、培養又はインキュベーション中に断続的に、例えば、培養培地が交換又は洗浄されるたびに添加される。いくつかの実施形態では、増殖因子又はサイトカイン、例えば組換えＩＬ－１８は、０日目（インキュベーションの開始）に開始して培養物又はインキュベーションに添加され、培養培地の各交換又は洗浄時に、培養物又はインキュベーションに増殖因子又はサイトカイン、例えば組換えＩＬ－１８を補充するために更に添加される。いくつか

の実施形態では、本方法は、インキュベーションの開始時（０日目）に、及びインキュベーションの期間中の培養培地の各洗浄又は交換時に２又は３日毎に、例えば、培養又はインキュベーションの５日目、７日目、９日目、１１日目、及び１４日目又はその前後に、組換えＩＬ－１８を添加することを含む。そのような実施形態のいずれかにおいて、組換えＩＬ－１８は、約１ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約２０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約１０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約２０ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約１０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約２０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、又は約４０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬの濃度で培養物又はインキュベーションに添加される。そのような実施形態のいずれかにおいて、組換えＩＬ－１８は、約１ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬの濃度で培養物又はインキュベーションに添加される。そのような実施形態のいずれかにおいて、組換えＩＬ－１８は、１０ｎｇ／ｍＬ又は約１０ｎｇ／ｍＬの濃度で培養物又はインキュベーションに添加される。

【０４８１】

いくつかの実施形態では、補充された培養培地は、組換えＩＬ－２７などの１つ以上の増殖因子又はサイトカインを含む。したがって、いくつかの実施形態では、増殖因子又はサイトカイン、例えば組換えＩＬ－２７は、インキュベーション又は培養中に断続的に添加される。いくつかのそのような態様では、組換えＩＬ－２７などの成長因子又はサイトカインは、培養又はインキュベーションの開始時又はほぼ開始時に添加され、その後、培養又はインキュベーション中に断続的に、例えば、培養培地が交換又は洗浄されるたびに添加される。いくつかの実施形態では、増殖因子又はサイトカイン、例えば組換えＩＬ－２７は、０日目（インキュベーションの開始）に開始して培養物又はインキュベーションに添加され、培養培地の各交換又は洗浄時に、培養物又はインキュベーションに増殖因子又はサイトカイン、例えば組換えＩＬ－２７を補充するために更に添加される。いくつかの実施形態では、本方法は、インキュベーションの開始時（０日目）に、及びインキュベーションの期間中の培養培地の各洗浄又は交換時に２又は３日毎に、例えば、培養又はインキュベーションの５日目、７日目、９日目、１１日目、及び１４日目又はその前後に、組換えＩＬ－２７を添加することを含む。そのような実施形態のいずれかにおいて、組換えＩＬ－２７は、約１ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約２０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約１０ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ～約５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約２０ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ～約１０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ～約２０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ～約３０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ～約４０ｎｇ／ｍＬ、又は約４０ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬの濃度で培養物又はインキュベーションに添加される。そのような実施形態のいずれかにおいて、組換えＩＬ－２７は、約１ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬの濃度で培養物又はインキュベーションに添加される。そのような実施形態のいずれかにおいて、組換えＩＬ－２７は、１０ｎｇ／ｍＬ又は約１０ｎｇ／ｍＬの濃度で培養物又はインキュベーションに添加される。

【０４８２】

提供される方法の実施形態において、培養又はインキュベートすることは、ＮＫ細胞の維持に必要又は有用な化学的及び物理的条件（例えば、温度、ガス）を提供することを含

む。ＮＫ細胞の増殖又は増殖を支持し得る化学的条件の例としては、増殖（すなわち、培養）培地中に典型的に提供される緩衝液、栄養素、血清、ビタミン及び抗生物質が挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態において、ＮＫ培養培地は、１０％ＦＣＳを含むＭＥＭα、又は５％ヒト血清／ＬｉｆｏｒＣｅｌｌ（登録商標）ＦＢＳ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（Ｌｉｆｅｂｌｏｏｄ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ）を含むＣｅｌｌＧｒｏ ＳＣＧＭ（Ｃｅｌｌ Ｇｅｎｉｘ）を含む。本発明での使用に適した他の培地としては、Ｇｌａｓｃｏｗ培地（Ｇｉｂｃｏ Ｃａｒｌｓｂａｄ Ｃａｌｉｆ．）、ＲＰＭＩ培地（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ Ｌｏｕｉｓ ＭＯ）又はＤＭＥＭ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ Ｌｏｕｉｓ ＭＯ）が挙げられるが、これらに限定されない。多くの培養培地、例えば、ＭＥＭα（８．１９μＭニコチンアミド）、ＲＰＭＩ（８．１９μＭニコチンアミド）、ＤＭＥＭ（３２．７８μＭニコチンアミド）及びＧｌａｓｃｏｗ培地（１６．３９μＭニコチンアミド）は、ビタミンサプリメントとしてニコチンアミドを含有することに留意されたい。

【０４８３】

いくつかの実施形態では、細胞がヒト対象に導入（又は再導入）される用途などのために、培養は、リンパ球培養のためのＡＩＭ Ｖ（商標）無血清培地、ＭＡＲＲＯＷＭＡＸ（商標）骨髄培地又は無血清幹細胞増殖培地（ＳＣＧＭ）（例えば、ＣｅｌｌＧｅｎｉｘ（登録商標）ＧＭＰ ＳＣＧＭ）などの無血清製剤を使用して行われる。このような培地処方物及び補充物は、商業的供給源から入手可能である。培養物は、最適な生存能力、増殖、機能性及び／又は生存を促進するために、アミノ酸、抗生物質、及び／又は記載されるような他の増殖因子サイトカインを補充され得る。いくつかの実施形態では、無血清培地はまた、低割合のヒト血清、例えば、０．５％～１０％ヒト血清、例えば、５％又は約５％ヒト血清で補充され得る。そのような実施形態において、ヒト血清は、ヒトＡＢ血漿由来のヒト血清（ヒトＡＢ血清）又は自己血清であり得る。

【０４８４】

いくつかの実施形態では、フィーダー細胞、及び任意選択でサイトカイン（例えば、組換えＩＬ－２又はＩＬ－２１）との培養は、ヒトＮＫ細胞の成長又は増殖に適した温度、例えば、少なくとも約２５℃、一般に少なくとも約３０℃、及び一般に３７℃又は約３７℃を含む条件下で行われる。いくつかの実施形態では、培養は、５％CO_2中、３７℃±２で行われる。

【０４８５】

提供される方法の実施形態において、培養することは、ＧＭＰ条件下で行われるインキュベーションを含む。いくつかの実施形態では、インキュベーションは閉鎖系であり、これはいくつかの態様では閉鎖自動化系であってもよい。いくつかの実施形態では、１つ以上の組換えサイトカイン又は成長因子を含有する培養培地は、無血清培地である。いくつかの実施形態では、インキュベーションは、閉鎖自動化システムでは、無血清培地を用いて行われる。

【０４８６】

いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞の増殖は、細胞増殖に適した培養容器中で行われる。いくつかの実施形態では、培養容器は、Ｇ－Ｒｅｘシステム（例えば、Ｇ－Ｒｅｘ １０、Ｇ－Ｒｅｘ １０Ｍ、Ｇ－Ｒｅｘ １００Ｍ／１００Ｍ－ＣＳ又はＧ－Ｒｅｘ ５００Ｍ／５００Ｍ－ＣＳ）などのガス透過性培養容器である。いくつかの実施形態では、培養容器は、閉鎖系における細胞の増殖に適したマイクロプレート、フラスコ、バッグ又は他の培養容器である。いくつかの実施形態では、増殖は、バイオリアクター内で行うことができる。いくつかの実施形態では、増殖は、細胞増殖システムを使用して、バイオリアクター（例えば、Ｘｕｒｉ Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ Ｗ２５（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ））などに接続したガス透過性バッグに細胞を移すことによって実施される。一実施形態では、細胞増殖システムは、約５０ｍＬ、約１００ｍＬ、約２００ｍＬ、約３００ｍＬ、約４００ｍＬ、約５００ｍＬ、約６００ｍＬ、約７００ｍＬ、約８００ｍＬ、約９００ｍＬ、約１Ｌ、約２Ｌ、約３Ｌ、約４Ｌ、約５Ｌ、約６Ｌ、約７

Ｌ、約８Ｌ、約９Ｌ、及び約１０Ｌ、又は上記のいずれかの間の任意の値である体積を有するバッグ、例えばガス透過性細胞バッグなどの培養容器を含む。いくつかの実施形態では、プロセスは自動化又は半自動化される。いくつかの態様において、増殖培養は、静的条件下で行われる。いくつかの実施形態では、増殖培養は揺動条件下で行われる。培地は、ボーラスで添加され得るか、又は灌流スケジュールで添加され得る。いくつかの実施形態では、バイオリアクターは、０．０１Ｌ／分、０．０５Ｌ／分、０．１Ｌ／分、０．２Ｌ／分、０．３Ｌ／分、０．４Ｌ／分、０．５Ｌ／分、１．０Ｌ／分、１．５Ｌ／分、もしくは２．０Ｌ／分、又は２．０Ｌ／分超、これらの値の近似値、又は少なくともこれらの値の定常空気流で、３７℃又はその付近の温度及び５％又はその付近のＣＯ２レベルを維持する。特定の実施形態では、培養の少なくとも一部は、２９０ｍｌ／日、５８０ｍｌ／日、及び／又は１１６０ｍｌ／日の速度などの灌流を用いて行われる。

【０４８７】

いくつかの態様では、灌流が可能な自動閉鎖増殖システムにおいて細胞を増殖させる。灌流により細胞に培地を継続的に追加して、最適な増殖速度を確実に達成できる。

【０４８８】

増殖方法は、閉鎖自動化システム及び無血清培地の使用を含むＧＭＰ条件下で実施することができる。いくつかの実施形態では、本方法のステップのうちのいずれか１つ以上は、閉鎖系では、又はＧＭＰ条件下で実施され得る。特定の実施形態において、全てのプロセス操作は、ＧＭＰスイートにおいて実施される。いくつかの実施形態では、閉鎖系は、細胞療法を製造、産生、又は生産するための方法の他の処理ステップのうちの１つ以上を行うために使用される。いくつかの実施形態では、処理ステップ、例えば、単離、選択及び／又は濃縮、処理、細胞の増殖に関連するインキュベーションを含む培養ステップ、ならびに製剤化ステップのうちの１つ以上又は全ては、統合又は自己完結型システムにおけるシステム、デバイス、又は装置を使用して、及び／又は自動化又はプログラム可能様式で行われる。いくつかの態様では、システム又は装置は、システム又は装置と通信するコンピュータ及び／又はコンピュータプログラムを含み、これは、ユーザが、処理、単離、操作、及び製剤化ステップの様々な態様をプログラムし、制御し、結果を評価し、及び／又は調整することを可能にする。

【０４８９】

提供される実施形態のいずれかの一部では、培養することは、方法が少なくとも２．５０×１０^{8}又は少なくとも約２．５０×１０^{8}個のｇ－ＮＫ細胞の増殖を達成する時間まで実施される。提供される実施形態のいずれかの一部では、培養することは、方法が少なくとも５．０×１０^{8}又は少なくとも約５．０×１０^{8}個のｇ－ＮＫ細胞の増殖を達成する時間まで実施される。提供される実施形態のいずれかの一部では、培養することは、方法が少なくとも１．０×１０^{9}又は少なくとも約１．０×１０^{9}個のｇ－ＮＫ細胞の増殖を達成するまで行われる。提供される実施形態のいずれかの一部では、培養することは、方法が少なくとも５．０×１０^{9}又は少なくとも約５．０×１０^{9}個のｇ－ＮＫ細胞の増殖を達成する時間まで実施される。

【０４９０】

提供される実施形態のいずれかの一部において、培養は、５日間、６日間、７日間、８日間、９日間、１０日間、１１日間、１２日間、１３日間、１４日間、１５日間、１６日間、１７日間、１８日間、１９日間、２０日間、２１日間、２２日間、２３日間、２４日間又は２５日間、又は約５日間、約６日間、約７日間、約８日間、約９日間、約１０日間、約１１日間、約１２日間、約１３日間、約１５日間、約１６日間、約１７日間、約１８日間、約１９日間、約２０日間、約２１日間、約２２日間、約２３日間、約２４日間又は約２５日間、もしくは少なくとも上記の期間行われる。いくつかの実施形態では、培養は、１４日間もしくは約１４日間、又は少なくとも１４日間もしくは約１４日間行われる。いくつかの実施形態では、培養は、２１日間もしくは約２１日間、又は少なくとも２１日間もしくは約２１日間行われる。

【０４９１】

提供される実施形態のいずれかの一部において、提供される方法のいずれかによる培養又はインキュベーションは、５日間、６日間、７日間、８日間、９日間、１０日間、１１日間、１２日間、１３日間、１４日間、１５日間、１６日間、１７日間、１８日間、１９日間、２０日間、２１日間、２２日間、２３日間、２４日間、又は２５日間、もしくは約５日間、約６日間、約７日間、約８日間、約９日間、約１０日間、約１１日間、約１２日間、約１３日間、約１４日間、約１５日間、約１６日間、約１７日間、約１８日間、約１９日間、約２０日間、約２１日間、約２２日間、約２３日間、約２４日間、又は約２５日間、もしくは少なくとも上記の期間行われる。いくつかの実施形態では、培養は、１４日間もしくは約１４日間、又は少なくとも１４日間もしくは約１４日間行われる。いくつかの実施形態では、培養は、２１日間もしくは約２１日間、又は少なくとも２１日間もしくは約２１日間行われる。特定の実施形態では、培養開始時の濃縮されたＮＫ細胞が、以前に凍結又は凍結保存された後に解凍されている場合、より長い培養期間が典型的に必要である。培養開始時の細胞の状態、培養開始時もしくは培養中の細胞の健康もしくは生存率、及び／又は例えば、治療目的で対象に投与される細胞の用量などの細胞の所望の適用に応じた培養終了時の閾値細胞の所望の数などの因子に応じて、細胞を培養する最適な日数を経験的に決定することは、当業者のレベルの範囲内である。

【０４９２】

培養の終わりに、細胞を回収する。細胞の回収は、培養終了後に培養容器から細胞を遠心分離することにより行うことができる。例えば、細胞は、約１４日間の培養後に遠心分離によって回収される。細胞を回収した後、細胞を洗浄する。細胞の試料は、機能又は表現型試験のために収集することができる。機能試験又は表現型試験に使用されない任意の他の細胞は、別々に処方され得る。いくつかの場合において、細胞は、細胞の凍結保存のために抗凍結剤と共に製剤化される。

【０４９３】

いくつかの実施形態では、提供される方法は、単離、選択及び／又は濃縮の前又は後のいずれかに、細胞を凍結する、例えば凍結保存するためのステップを含む。いくつかの実施形態では、提供される方法は、インキュベーション及び／又は培養の前又は後のいずれかに、細胞を凍結する、例えば凍結保存するためのステップを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、抗凍結剤の存在下で細胞を凍結保存し、それによって凍結保存組成物を産生することを含む。いくつかの態様では、本方法は、インキュベートすることの前及び／又は対象に投与することの前に、抗凍結剤を低減又は除去する条件下で凍結保存組成物を洗浄することを含む。いくつかの態様では、様々な既知の凍結溶液及びパラメータのいずれかを使用することができる。いくつかの実施形態では、細胞は、最終濃度が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％、もしくは５．０％ＤＭＳＯ、又は１％～１５％、６％～１２％、５％～１０％、もしくは６％～８％ＤＭＳＯ又はそれらの近似値である培地及び／又は溶液中で凍結、例えば、低温凍結又は低温保存される。特定の実施形態では、細胞は、最終濃度が５．０％、４．５％、４．０％、３．５％、３．０％、２．５％、２．０％、１．５％、１．２５％、１．０％、０．７５％、０．５％、もしくは０．２５％もしくはそれらの近似値のＨＳＡ、又は０．１％～５％、０．２５％～４％、０．５％～２％、もしくは１％～２％のＨＳＡを含む培地及び／又は溶液中で凍結、例えば、低温凍結又は低温保存される。一例は、２０％ＤＭＳＯ及び８％ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）を含有するＰＢＳ、又は他の適切な細胞凍結培地を使用することを含む。次いで、これを培地で１：１に希釈して、ＤＭＳＯ及びＨＳＡの最終濃度をそれぞれ１０％及び４％とする。次いで、細胞は、一般に、毎分約１℃の速度で約－８０℃まで凍結され、液体窒素貯蔵タンクの気相中で貯蔵される。いくつかの実施形態では、細胞は、抗凍結剤を含む無血清凍結保存培地中で凍結される。いくつかの実施形態では、がんは、ＤＭＳＯである。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、５％又は約５％から、１０％又は約１０％のＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）である。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、５％又は約５％のＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）である。いくつかの実施

形態では、凍結保存培地は、６％又は約６％のＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）である。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、７％又は約７％のＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）である。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、８％又は約８％のＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）である。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、９％又は約９％ＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）である。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、１０％又は約１０％のＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）である。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、市販の凍結保存溶液（ＣｒｙｏＳｔｏｒ（商標）ＣＳ１０又はＣＳ５）を含有する。ＣｒｙｏＳｔｏｒ（商標）ＣＳ１０は、１０％ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を含有する凍結保存培地である。ＣｒｙｏＳｔｏｒ（商標）ＣＳ５は、５％ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を含有する凍結保存培地である。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、プラズマライトＡ又はヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）などの１つ以上の追加の賦形剤を含有する。

【０４９４】

いくつかの実施形態では、細胞は、５×１０^{6}～１×１０^{8}細胞／ｍＬの密度で凍結保存される。例えば、細胞は、５×１０^{6}細胞／ｍＬ、１０×１０^{6}細胞／ｍＬ、１５×１０^{6}細胞／ｍＬ、２０×１０^{6}細胞／ｍＬ、２５×１０^{6}細胞／ｍＬ、３０×１０^{6}細胞／ｍＬ、４０×１０^{6}細胞／ｍＬ、５０×１０^{6}細胞／ｍＬ、６０×１０^{6}細胞／ｍＬ、７０×１０^{6}細胞／ｍＬ、８０×１０^{6}細胞／ｍＬ、又は約９０×１０^{6}細胞／ｍＬ、もしくはそれらの各近似値、又は上記のいずれかの間の任意の値の密度で凍結保存される。細胞は、凍結保存容器に適した任意の体積で凍結保存することができる。いくつかの実施形態では、細胞はバイアル中で凍結保存される。凍結保存培地の体積は、１ｍＬ又は約１ｍＬから、５０ｍＬ又は約５０ｍＬ、例えば１ｍＬ～５ｍＬ又は約１ｍＬ～５ｍＬであり得る。いくつかの実施形態では、細胞はバッグ中で凍結保存される。凍結保存培地の体積は、１０ｍＬ又は約１０ｍＬから、５００ｍＬ又は約５００ｍＬ、例えば１００ｍＬ又は約１００ｍＬから、２００ｍＬ又は約２００ｍＬであり得る。採取し増殖させた細胞は、－８０℃～－１９６℃の温度などの低温環境で凍結保存することができる。提供される方法のいずれかの一部において、方法は、培養の開始時と比較して、培養の終了時に増加した数のＮＫＧ２Ｃ^{pos}細胞を産生する。例えば、培養開始時と比較した培養終了時のＮＫＧ２Ｃ^{pos}細胞の増加は、１００倍以上又は約１００倍以上、２００倍以上又は約２００倍以上、３００倍以上又は約３００倍以上、４００倍以上又は約４００倍以上、５００倍以上又は約５００倍以上、６００倍以上又は約６００倍以上、７００倍以上又は約７００倍以上、又は８００倍以上又は約８００倍以上であり得る。任意の実施形態の一部において、増加は、１０００倍又は約１０００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、２０００倍又は約２０００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、２５００倍又は約２５００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、３０００倍又は約３０００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、５０００倍又は約５０００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、１００００倍又は約１００００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、１５０００倍又は約１５０００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、２００００倍又は約２００００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、２５０００倍又は約２５０００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、３００００倍又は約３００００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、３５０００倍又は約３５０００倍大きい。いくつかの実施形態では、提供される方法のいずれかに従った培養又はインキュベーションは、方法が少なくとも２．５０×１０^{8}又は約２．５０×１０^{8}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}細胞、少なくとも３．０×１０^{8}又は約３．０×１０^{8}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}細胞、少なくとも４．０×１０^{8}又は約４．０×１０^{8}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}細胞、少なくとも５．０×１０^{8}又は約５．０×１０^{8}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}細胞、少なくとも６．０×１０^{8}又は約６．０×１０^{8}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}細胞、少なくとも７．０×１０^{8}又は約７．０×１０^{8}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}細胞、少なくとも８．０×１０^{8}又は約８．０×１０^{8}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}細胞、少なくとも９．０×１０^{8}又は約９．０×１０^{8}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}細胞、少なくとも１．０×１０^{9}又は約１．０×１０^{9}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}細胞、少なくとも１．５×１０^{9}又は約１．５×１０^{9}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}細胞、少なくとも２．

０×１０^{9}又は約２．０×１０^{9}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}細胞、少なくとも３．０×１０^{9}又は約３．０×１０^{9}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}細胞、少なくとも４．０×１０^{9}又は約４．０×１０^{9}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}細胞、少なくとも５．０×１０^{9}又は約５．０×１０^{9}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}細胞、少なくとも１．０×１０^{10}又は約１．０×１０^{10}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}細胞、少なくとも１．５×１０^{10}又は約１．５×１０^{10}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}細胞、少なくとも２．０×１０^{10}又は約２．０×１０^{10}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}細胞、少なくとも２．５×１０^{10}又は約２．５×１０^{10}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}細胞以上の増殖を達成する時間まで実施される。

【０４９５】

提供される方法のいずれかの一部において、方法は、培養の開始時と比較して、培養の終了時に増加した数のＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞を産生する。例えば、培養開始時と比較した培養終了時のＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞の増加は、１００倍以上又は約１００倍以上、２００倍以上又は約２００倍以上、３００倍以上又は約３００倍以上、４００倍以上又は約４００倍以上、５００倍以上又は約５００倍以上、６００倍以上又は約６００倍以上、７００倍以上又は約７００倍以上、又は８００倍以上又は約８００倍以上であり得る。任意の実施形態の一部において、増加は、１０００倍又は約１０００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、２０００倍又は約２０００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、３０００倍又は約３０００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、２５００倍又は約２５００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、５０００倍又は約５０００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、１００００倍又は約１００００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、１５０００倍又は約１５０００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、２００００倍又は約２００００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、２５０００倍又は約２５０００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、３００００倍又は約３００００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、３５０００倍又は約３５０００倍大きい。いくつかの実施形態では、提供される方法のいずれかに従った培養又はインキュベーションは、方法が少なくとも２．５０×１０^{8}又は約２．５０×１０^{8}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも３．０×１０^{8}又は約３．０×１０^{8}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも４．０×１０^{8}又は約４．０×１０^{8}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも５．０×１０^{8}又は約５．０×１０^{8}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも６．０×１０^{8}又は約６．０×１０^{8}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも７．０×１０^{8}又は約７．０×１０^{8}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも８．０×１０^{8}又は約８．０×１０^{8}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも９．０×１０^{8}又は約９．０×１０^{8}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも１．０×１０^{9}又は約１．０×１０^{9}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも１．５×１０^{9}又は約１．５×１０^{9}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも２．０×１０^{9}又は約２．０×１０^{9}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも３．０×１０^{9}又は約３．０×１０^{9}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも４．０×１０^{9}又は約４．０×１０^{9}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも５．０×１０^{9}又は約５．０×１０^{9}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも１．０×１０^{10}又は約１．０×１０^{10}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも１．５×１０^{10}又は約１．５×１０^{10}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも２．０×１０^{10}又は約２．０×１０^{10}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも２．５×１０^{10}又は約２．５×１０^{10}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞以上の増殖を達成する時間まで実施される。

【０４９６】

提供される方法のいずれかの一部において、本方法は、培養の開始時と比較して、培養の終了時に増加した数のＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞を産生する。例えば、培養開始時と比較した培養終了時のＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞の増加は、１００倍超又は約１００倍超、２００倍超又は約２００倍超、３００倍超又は約３００倍超、４００倍超又は約４００倍超、５００倍超又は約５００倍超、６００倍超又は約６００倍超、７００倍超又は約７００倍超、８００倍超又は約８００倍超であり得る。任意の実施形態の一部において、増加は、１０００倍又は約１０００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、２０００倍又は約２０００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加

は、２５００倍又は約２５００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、３０００倍又は約３０００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、５０００倍又は約５０００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、１００００倍又は約１００００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、１５０００倍又は約１５０００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、２００００倍又は約２００００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、２５０００倍又は約２５０００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、３００００倍又は約３００００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、３５０００倍又は約３５０００倍大きい。いくつかの実施形態では、提供される方法のいずれかに従った培養又はインキュベーションは、方法が少なくとも２．５０×１０^{8}又は約２．５０×１０^{8}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも３．０×１０^{8}又は約３．０×１０^{8}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも４．０×１０^{8}又は約４．０×１０^{8}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも５．０×１０^{8}又は約５．０×１０^{8}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも６．０×１０^{8}又は約６．０×１０^{8}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも７．０×１０^{8}又は約７．０×１０^{8}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも８．０×１０^{8}又は約８．０×１０^{8}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも９．０×１０^{8}又は約９．０×１０^{8}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも１．０×１０^{9}又は約１．０×１０^{9}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも１．５×１０^{9}又は約１．５×１０^{9}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも２．０×１０^{9}又は約２．０×１０^{9}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも３．０×１０^{9}又は約３．０×１０^{9}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも４．０×１０^{9}又は約４．０×１０^{9}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも５．０×１０^{9}又は約５．０×１０^{9}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも１．０×１０^{10}又は約１．０×１０^{10}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも１．５×１０^{10}又は約１．５×１０^{10}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも２．０×１０^{10}又は約２．０×１０^{10}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞、少なくとも２．５×１０^{10}又は約２．５×１０^{10}ＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}細胞以上の増殖を達成する時間まで実施される。

【０４９７】

提供される方法のいずれかの一部において、本方法は、培養の開始時と比較して、培養の終了時に増加した数のｇ－ＮＫ細胞を産生する。例えば、培養開始時と比較した培養終了時のｇ－ＮＫ細胞の増加は、１００倍以上又は約１００倍以上、２００倍以上又は約２００倍以上、３００倍以上又は約３００倍以上、４００倍以上又は約４００倍以上、５００倍以上又は約５００倍以上、６００倍以上又は約６００倍以上、７００倍以上又は約７００倍以上、又は８００倍以上又は約８００倍以上であり得る。任意の実施形態の一部において、増加は、１０００倍又は約１０００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、２０００倍又は約２０００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、２５００倍又は約２５００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、３０００倍又は約３０００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、５０００倍又は約５０００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、１００００倍又は約１００００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、１５０００倍又は約１５０００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、２００００倍又は約２００００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、２５０００倍又は約２５０００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、３００００倍又は約３００００倍大きい。任意の実施形態の一部では、増加は、３５０００倍又は約３５０００倍大きい。いくつかの実施形態では、提供される方法のいずれかに従った培養又はインキュベーションは、方法が少なくとも２．５０×１０^{8}又は約２．５０×１０^{8}個のｇ－ＮＫ細胞、少なくとも３．０×１０^{8}又は約３．０×１０^{8}個のｇ－ＮＫ細胞、少なくとも４．０×１０^{8}又は約４．０×１０^{8}個のｇ－ＮＫ細胞、少なくとも５．０×１０^{8}又は約５．０×１０^{8}個のｇ－ＮＫ細胞、少なくとも６．０×１０^{8}又は約６．０×１０^{8}個のｇ－ＮＫ細胞、少なくとも７．０×１０^{8}又は約７．０×１

０^{8}個のｇ－ＮＫ細胞、少なくとも８．０×１０^{8}又は約８．０×１０^{8}個のｇ－ＮＫ細胞、少なくとも９．０×１０^{8}又は約９．０×１０^{8}個のｇ－ＮＫ細胞、少なくとも１．０×１０^{9}又は約１．０×１０^{9}個のｇ－ＮＫ細胞、少なくとも１．５×１０^{9}又は約１．５×１０^{9}個のｇ－ＮＫ細胞、少なくとも２．０×１０^{9}又は約２．０×１０^{9}個のｇ－ＮＫ細胞、少なくとも３．０×１０^{9}又は約３．０×１０^{9}個のｇ－ＮＫ細胞、少なくとも４．０×１０^{9}又は約４．０×１０^{9}個のｇ－ＮＫ細胞、少なくとも５．０×１０^{9}又は約５．０×１０^{9}個のｇ－ＮＫ細胞以上、少なくとも１．０×１０^{10}又は約１．０×１０^{10}個のｇ－ＮＫ細胞以上、少なくとも１．５×１０^{10}又は約１．５×１０^{10}個のｇ－ＮＫ細胞以上、少なくとも２．０×１０^{10}又は約２．０×１０^{10}個のｇ－ＮＫ細胞以上、少なくとも２．５×１０^{10}又は約２．５×１０^{10}個のｇ－ＮＫ細胞以上の増殖を達成する時間まで実施される。

【０４９８】

いくつかの実施形態では、提供される方法は、ｇ－ＮＫ細胞の優先的な増殖をもたらす。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、ＮＫ細胞を他のリンパ球又は免疫細胞から区別し、ｇ－ＮＫ細胞を従来のＮＫ細胞から区別する１つ以上の様々なマーカーの表面発現の存在、非存在又はレベルによって同定される。実施形態では、表面発現は、フローサイトメトリーによって、例えば、マーカーに特異的に結合する抗体で染色し、マーカーへの抗体の結合を検出することによって決定することができる。同様の方法を実施して、細胞内マーカーの発現を評価することができるが、そのような方法は、典型的には、フローサイトメトリーによって細胞内タンパク質を検出するための染色前の固定及び透過処理のための方法を含む。いくつかの実施形態では、固定は、ホルムアルデヒド（例えば、０．０１％）を使用して達成され、その後、洗浄剤（例えば、０．１％～１％洗浄剤、例えば、０．５％又は約０．５％）、例えば、Ｔｒｉｔｏｎ、ＮＰ－５０、Ｔｗｅｅｎ　２０、サポニン、ジギトニン又はＬｅｕｃｏｐｅｒｍなどを使用して膜を破壊する。

【０４９９】

抗体及び他の結合実体を使用して、ｇ－ＮＫ細胞を同定、検出、濃縮及び／又は単離するためのマーカータンパク質の発現レベルを検出することができる。適切な抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、断片（例えば、Ｆａｂ断片）、単鎖抗体、及び特異的結合分子の他の形態が挙げられ得る。

【０５００】

いくつかの実施形態では、細胞（例えば、ＮＫ細胞サブセット）は、細胞内マーカー又は表面マーカーであり得る特定のマーカーが細胞上又は細胞内に検出可能に存在する場合、特定のマーカーについて陽性（ｐｏｓ）である。実施形態では、表面発現は、染色が、他の点では同一の条件下でアイソタイプ適合対照を用いて同じ手順を実施して検出される染色よりも実質的に高いレベルで、及び／又はマーカーについて陽性であることが知られている細胞と実質的に同様のレベルで、もしくは場合によってはそれよりも高いレベルで、及び／又はマーカーについて陰性であることが知られている細胞よりも高いレベルで検出可能である場合、陽性である。

【０５０１】

いくつかの実施形態では、細胞（例えば、ＮＫ細胞サブセット）は、細胞内マーカー又は表面マーカーであり得る特定のマーカーの細胞上又は細胞内における検出可能な存在が存在しない場合、特定のマーカーについて陰性（ｎｅｇ）である。実施形態において、表面発現は、他の点では同一の条件下でアイソタイプ適合対照を用いて同じ手順を実施して検出される染色を実質的に上回るレベルで、及び／又はマーカーについて陽性であることが知られている細胞よりも実質的に低いレベルで、及び／又はマーカーについて陰性であることが知られている細胞と実質的に同様のレベルで、染色が検出可能でない場合、陰性である。

【０５０２】

いくつかの実施形態では、細胞（例えば、ＮＫ細胞サブセット）は、マーカーについて陽性であることが知られている細胞と比較して、特定のマーカーの細胞上又は細胞内での

検出可能な存在のレベルがより低い場合、特定のマーカーについて低度である（ｌｏ又はｍｉｎ）。実施形態では、表面発現は、フローサイトメトリーによって、例えば、マーカーに特異的に結合する抗体で染色し、マーカーへの抗体の結合を検出することによって決定することができ、染色がマーカーについて陽性であることが知られている細胞よりも低いレベルである場合、使用される方法に応じて表面又は細胞内のいずれかの発現は低い。

【０５０３】

いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、ＮＫ細胞の表現型を有する細胞（例えば、ＣＤ４５^{pos}、ＣＤ３^{neg}及び／又はＣＤ５６^{pos}）であり、ｇ－ＮＫ細胞サブセットを同定するか、又はそれに関連する１つ以上のマーカーを発現する。

【０５０４】

いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、公開された特許出願公開第２０１３／０２９５０４４号又はＺｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３），１９０：１４０２－１４０６に記載されているように同定される。

【０５０５】

いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、実質的なＦｃＲγを発現しないが、ナチュラルキラー細胞の少なくとも１つのマーカーを発現する細胞である。ＦｃＲγ鎖（Ｈｏｍｏ　ｓａｐｉｅｎｓのアミノ酸配列は、高親和性免疫グロブリンガンマＦｃ受容体Ｉとも呼ばれ）は、ＮＣＢＩデータベースにおいて受託番号ＮＰ＿００４０９７．１（ＧＩ：４７５８３４４）として入手可能であり、以下に配列番号３４として再現される。

ＭＩＰＡＶＶＬＬＬＬＬＬＶＥＱＡＡＡＬＧＥＰＱＬＣＹＩＬＤＡＩＬＦＬＹＧＩＶＬＴ　ＬＬＹＣＲＬＫＩＱＶＲＫＡＡＩＴＳＹＥＫＳＤＧＶＹＴＧＬＳＴＲＮＱＥＴＹＥＴＬＫＨＥＫＰＰＱ　（配列番号３４）。

【０５０６】

いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞のｇ－ＮＫ細胞サブセットは、ＦｃＲγがＮＫ細胞の集団又はＮＫ細胞の亜集団によって発現されるかどうかを観察することによって検出することができる。いくつかの場合において、ｇ－ＮＫ細胞は、ＦｃＲγを発現しない細胞として同定される。ＦｃＲγタンパク質は細胞内タンパク質である。従って、いくつかの態様において、ＦｃＲγの存在又は非存在は、例えば、細胞内タンパク質が検出されることを可能にするための固定及び透過処理によって、細胞の処理後に検出され得る。いくつかの実施形態では、細胞は、細胞内検出の前に、例えば細胞の固定の前に、１つ以上の表面マーカー（ＣＤ４５、ＣＤ３及び／又はＣＤ５６）について更に評価される。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、ＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}／ＦｃＲγ^{neg}である細胞として同定、検出、濃縮及び／又は単離される。

【０５０７】

いくつかの実施形態では、増殖集団中のＮＫ細胞の５０％超又は約５０％超は、ＦｃＲγ^{neg}である。いくつかの実施形態では、増殖集団中のＮＫ細胞の６０％超又は約６０％超は、ＦｃＲγ^{neg}である。いくつかの実施形態では、増殖集団中のＮＫ細胞の７０％超又は約７０％超は、ＦｃＲγ^{neg}である。いくつかの実施形態では、増殖集団中のＮＫ細胞の８０％超又は約８０％超は、ＦｃＲγ^{neg}である。いくつかの実施形態では、増殖集団中のＮＫ細胞の９０％超又は約９０％超は、ＦｃＲγ^{neg}である。いくつかの実施形態では、増殖集団中のＮＫ細胞の９５％超又は約９５％超は、ＦｃＲγ^{neg}である。例えば、本明細書における方法は、一般に、高純度、例えば７０～９０％のｇ－ＮＫ細胞産物をもたらす。

【０５０８】

いくつかの実施形態では、例えば、試料の細胞が細胞選別又は機能アッセイに供される場合など、細胞内染色を使用せずにｇ－ＮＫ細胞の発現を検出することが有用であり得る。ＦｃＲγの細胞内染色を可能にするための処理、例えば固定及び透過処理を使用して、実質的に純粋な細胞集団の同一性を確認することができるが、多くの場合、ｇ－ＮＫ細胞を同定、検出又は単離する際に細胞を損傷することなく検出することができる細胞表面マーカーを使用することができる。したがって、いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は

、ＮＫ細胞のサブセット中のＦｃＲγの欠如と相関する代用マーカープロファイルを使用して同定される。いくつかの実施形態では、ＦｃＲγなどの細胞内タンパク質の存在又は非存在が、細胞の特定の適用に依存して評価することが困難であるか又は不可能である場合、代用マーカープロファイルは特に有用である。

【０５０９】

本明細書において、細胞表面マーカーの特定の組み合わせが、ｇ－ＮＫ細胞表現型、すなわちＦｃＲγの細胞内発現を欠くか又は欠損している細胞と相関し、それによって、細胞を損傷しない様式でｇ－ＮＫ細胞を同定又は検出するための代用マーカープロファイルを提供することが見出される。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるｇ－ＮＫ細胞についての代替マーカープロファイルは、１つ以上のマーカーＣＤ１６（ＣＤ１６^{pos}）、ＮＫＧ２Ｃ（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）もしくはＣＤ５７（ＣＤ５７^{pos}）の陽性表面発現に基づき、ならびに／又は１つ以上のマーカーＣＤ７（ＣＤ７$^{dim/neg}$）、ＣＤ１６１（ＣＤ１６１^{neg}）及び／もしくはＮＫＧ２Ａ（ＮＫＧ２Ａ^{neg}）の低もしくは陰性表面発現に基づく。いくつかの実施形態では、細胞は、ＣＤ４５、ＣＤ３及び／又はＣＤ５６などのＮＫ細胞の１つ以上の表面マーカーについて更に評価される。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、代用マーカープロファイルＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}／ＣＤ１６^{pos}／ＣＤ５７^{pos}／ＣＤ７$^{dim/neg}$／ＣＤ１６１^{neg}を用いて同定、検出、濃縮及び／又は単離することができる。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、代用マーカープロファイルＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}／ＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}を用いて同定、検出、濃縮、及び／又は単離される。いくつかの実施形態では、ＮＫＧ２Ｃ^{pos}及び／又はＮＫＧ２Ａ^{neg}であるｇ－ＮＫ細胞は、同定され、検出され、濃縮され、及び／又は単離される。

【０５１０】

いくつかの実施形態では、増殖集団中のＮＫ細胞の３０％超又は約３０％超が、ＮＫＧ２Ｃについて陽性であり、及び／又は増殖集団中のＮＫ細胞の５０％超又は約５０％超が、ＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である。いくつかの実施形態では、増殖集団中のＮＫ細胞の３５％超又は約３５％超が、ＮＫＧ２Ｃについて陽性であり、及び／又は増殖集団中のＮＫ細胞の６０％超又は約６０％超が、ＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である。いくつかの実施形態では、増殖集団中のＮＫ細胞の４０％超又は約４０％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり、及び／又は増殖集団中のＮＫ細胞の７０％超又は約７０％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である。いくつかの実施形態では、増殖集団中のＮＫ細胞の４５％超又は約４５％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり、及び／又は増殖集団中のＮＫ細胞の８０％超又は約８０％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である。いくつかの実施形態では、増殖集団中のＮＫ細胞の５０％超又は約５０％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり、及び／又は増殖集団中のＮＫ細胞の８５％超又は約８５％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である。いくつかの実施形態では、増殖集団中のＮＫ細胞の５５％超又は約５５％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり、及び／又は増殖集団中のＮＫ細胞の９０％超又は約９０％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である。いくつかの実施形態では、増殖集団中のＮＫ細胞の６０％超又は約６０％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり、及び／又は増殖集団中のＮＫ細胞の９５％超又は約９５％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である。

【０５１１】

いくつかの実施形態では、増殖集団中のｇ－ＮＫ細胞の７０％超又は約７０％超がパーフォリンについて陽性であり、増殖集団中のｇ－ＮＫ細胞の７０％超又は約７０％超がグランザイムＢについて陽性である。いくつかの実施形態では、増殖集団中のｇ－ＮＫ細胞の７５％超又は約７５％超がパーフォリンについて陽性であり、増殖集団中のｇ－ＮＫ細胞の７５％超又は約７５％超がグランザイムＢについて陽性である。いくつかの実施形態では、増殖集団中のｇ－ＮＫ細胞の８０％超又は約８０％超がパーフォリンについて陽性であり、増殖集団中のｇ－ＮＫ細胞の８０％超又は約８０％超がグランザイムＢについて陽性である。いくつかの実施形態では、増殖集団中のｇ－ＮＫ細胞の８５％超又は約８５

％超がパーフォリンについて陽性であり、増殖集団中のｇ－ＮＫ細胞の８５％超又は約８５％超がグランザイムＢについて陽性である。いくつかの実施形態では、増殖させた集団中のｇ－ＮＫ細胞の９０％超又は約９０％超がパーフォリンについて陽性であり、増殖させた集団中のｇ－ＮＫ細胞の９０％超又は約９０％超がグランザイムＢについて陽性である。いくつかの実施形態では、増殖集団中のｇ－ＮＫ細胞の９５％超又は約９５％超がパーフォリンについて陽性であり、増殖集団中のｇ－ＮＫ細胞の９５％超又は約９５％超がグランザイムＢについて陽性である。

【０５１２】

任意のそのような実施形態の一部において、増殖集団中の総細胞の２０％超又は約２０％超、３０％超又は約３０％超、４０％超又は約４０％超、５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、増殖集団中の総細胞の２０％超又は約２０％超、３０％超又は約３０％超、４０％超又は約４０％超、５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、免疫調節物質（例えば、記載の分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、増殖集団中の総細胞の２０％超又は約２０％超、３０％超又は約３０％超、４０％超又は約４０％超、５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、記載されるような分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、増殖集団中のｇ－ＮＫ細胞、又は本明細書に記載のｇ－ＮＫ細胞の代用マーカープロファイルを有する細胞サブセットの２０％超又は約２０％超、３０％超又は約３０％超、４０％超又は約４０％超、５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、増殖集団におけるｇ－ＮＫ細胞又は本明細書に記載のｇ－ＮＫ細胞の代用マーカープロファイルを有する細胞サブセットの２０％超又は約２０％超、３０％超又は約３０％超、４０％超又は約４０％超、５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超は、免疫調節物質（例えば、記載の分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。任意のそのような実施形態のいくつかでは、増殖集団におけるｇ－ＮＫ細胞又は本明細書に記載のｇ－ＮＫ細胞の代用マーカープロファイルを有する細胞サブセットの２０％超又は約２０％超、３０％超又は約３０％超、４０％超又は約４０％超、５０％超又は約５０％超、６０％超又は約６０％超、７０％超又は約７０％超、８０％超又は約８０％超、９０％超又は約９０％超、又は９５％超又は約９５％超は、ＣＡＲ及び免疫調節物質（例えば、記載の分泌型又は膜結合型のいずれかのサイトカイン）をコードする異種核酸を含む。

【０５１３】

提供される方法によって増殖させた細胞は、細胞傷害活性、脱顆粒、サイトカインを産生又は分泌する能力、及び１つ以上の細胞内又は表面表現型マーカーの発現を含むがこれらに限定されない、いくつかの機能的又は表現型活性のいずれかについて評価することができる。このような活性を評価する方法は公知であり、本明細書及び実施例に例示されている。

【０５１４】

いくつかの実施形態では、標的細胞に対する抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）細胞傷害活性を機能性の尺度として使用することができる。ＡＤＣＣ細胞傷害性アッセイのために、増殖からの細胞を、標的細胞上の標的抗原に特異的な抗体の存在下又は非存在下で適切な標的細胞と共培養することができる。例えば、抗骨髄腫細胞傷害性のために、多数の多

発性骨髄腫（ＭＭ）標的細胞（例えば、ＡＭ０１、ＫＭＳ１１、ＫＭＳ１８、ＫＭＳ３４、ＬＰ１又はＭＭ．１Ｓ）のいずれかを使用することができ、アッセイは、抗ＣＤ３８抗体（例えば、ダラツムマブ）又は抗ＣＤ３１９抗体（例えば、エロツズマブ）を用いて行うことができる。細胞死滅は、任意の数の方法によって決定することができる。例えば、細胞をヨウ化プロピジウム（ＰＩ）で染色することができ、ＮＫ細胞、生きた標的細胞、及び死んだ標的細胞の数を、フローサイトメトリーなどによって分解することができる。

【０５１５】

いくつかの実施形態では、増殖集団中のｇ－ＮＫ細胞の１０％超又は約１０％超が、腫瘍細胞に対する脱顆粒が可能である。脱顆粒は、ＣＤ１０７Ａの発現を評価することによって測定することができる。例えば、いくつかの実施形態では、増殖集団中のｇ－ＮＫ細胞の２０％超又は約２０％超が、腫瘍細胞に対する脱顆粒が可能である。いくつかの実施形態では、増殖集団中のｇ－ＮＫ細胞の３０％超又は約３０％超が、腫瘍細胞に対する脱顆粒が可能である。いくつかの実施形態では、増殖集団中のｇ－ＮＫ細胞の４０％超又は約４０％超が、腫瘍細胞に対する脱顆粒が可能である。いくつかの実施形態では、脱顆粒能は、腫瘍細胞に対する抗体の非存在下で測定される。

【０５１６】

いくつかの実施形態では、増殖集団中のｇ－ＮＫ細胞の１０％超又は約１０％超が、腫瘍細胞に対して、インターフェロン－ガンマ又はＴＮＦ－アルファなどのエフェクターサイトカインを産生することができる。いくつかの実施形態では、増殖集団中のｇ－ＮＫ細胞の２０％超又は約２０％超が、腫瘍細胞に対するエフェクターサイトカイン、例えば、インターフェロン－ガンマ又はＴＮＦ－アルファを産生することができる。いくつかの実施形態では、増殖集団中のｇ－ＮＫ細胞の３０％超又は約３０％超が、腫瘍細胞に対するエフェクターサイトカイン、例えば、インターフェロン－ガンマ又はＴＮＦ－アルファを産生することができる。いくつかの実施形態では、増殖集団中のｇ－ＮＫ細胞の４０％超又は約４０％超が、腫瘍細胞に対するエフェクターサイトカイン、例えば、インターフェロン－ガンマ又はＴＮＦ－アルファを産生することができる。いくつかの実施形態では、インターフェロン－γ又はＴＮＦ－αを産生する能力は、腫瘍細胞に対する抗体の非存在下で測定される。

【０５１７】

ｇ－ＮＫ細胞の代用マーカープロファイルを使用することによって、細胞集団を含有する試料中のｇ－ＮＫ細胞を同定又は検出するための方法が本明細書において提供される。いくつかの実施形態では、方法は、細胞の試料を、１つ以上のマーカーＣＤ１６、ＣＤ５７、ＣＤ７、ＣＤ１６１、ＮＫＧ２Ｃ、及び／又はＮＫＧ２Ａに特異的な抗体又は抗原結合性フラグメントなどの結合分子と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、細胞の試料を、ＣＤ４５、ＣＤ３及び／又はＣＤ５６に特異的な抗体又は抗原結合フラグメントなどの結合分子と接触させることを更に含む。本方法のいくつかの実施形態では、１つ以上の結合分子を試料と同時に接触させることができる。方法のいくつかの実施形態では、１つ以上の結合分子を試料と逐次的に接触させることができる。いくつかの実施形態では、接触に続いて、方法は、１つ以上の結合分子に結合した細胞を保持するため、及び／又は未結合の結合分子を試料から分離するための条件下での１つ以上の洗浄を含むことができる。

【０５１８】

いくつかの実施形態では、１つ以上の結合分子、例えば抗体の各々は、マーカーについて陽性又は陰性の細胞の検出のために、標識に直接的又は間接的に付着されていてもよい。例えば、結合分子、例えば抗体は、標識にコンジュゲート、カップリング又は連結されてもよい。標識は、当業者に公知である。本明細書で企図される標識としては、蛍光色素、蛍光タンパク質、放射性同位体、発色団、金属イオン、金粒子（例えば、コロイド金粒子）、銀粒子、強い光散乱特性を有する粒子、磁性粒子（例えば、Ｄｙｎａｂｅａｄｓ（登録商標）磁性ビーズなどの磁性ビーズ粒子）、ポリペプチド（例えば、ＦＬＡＧ（商標）タグ、ヒトインフルエンザ血球凝集素（ＨＡ）タグなど）、ペルオキシダーゼ（例えば

、西洋ワサビペルオキシダーゼ）又はホスファターゼ（例えば、アルカリホスファターゼ）などの酵素、ストレプトアビジン、ビオチン、発光化合物（例えば、化学発光基質）、オリゴヌクレオチド、特異的結合対のメンバー（例えば、リガンド及びその受容体）、ならびに結合分子、例えば、抗体に直接又は間接的に付着した場合に前記抗体を可視化又は検出するために使用される当技術分野で公知の他の標識が挙げられるが、これらに限定されない。

【０５１９】

表面マーカー又はタンパク質の発現レベルを評価するためのいくつかの公知の方法が、例えば、親和性に基づく方法、例えば、免疫親和性に基づく方法による検出、例えば、フローサイトメトリーによるような表面マーカーの状況において使用され得る。いくつかの実施形態では、標識はフルオロフォアであり、ｇ－ＮＫ細胞の検出又は同定のための方法はフローサイトメトリーによる。いくつかの実施形態では、異なる標識が、マルチカラーフローサイトメトリーによって異なるマーカーの各々について使用される。

【０５２０】

いくつかの実施形態では、本方法は、試料を、ＣＤ４５、ＣＤ３、ＣＤ５６、ＣＤ５７、ＣＤ７、及びＣＤ１６１に特異的な結合分子と接触させることを含む。いくつかのそのような実施形態において、ｇ－ＮＫ細胞は、ｇ－ＮＫ細胞代用マーカープロファイルＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}／ＣＤ１６^{pos}／ＣＤ５７^{pos}／ＣＤ７^{dim}／^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}を有する細胞として同定又は検出される。

【０５２１】

いくつかの実施形態では、本方法は、試料を、ＣＤ４５、ＣＤ３、ＣＤ５６、ＮＫＧ２Ａ及びＣＤ１６１に特異的な結合分子と接触させることを含む。いくつかのそのような実施形態において、ｇ－ＮＫ細胞は、ｇ－ＮＫ細胞代用マーカープロファイルＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}／ＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}を有する細胞として同定又は検出される。

【０５２２】

いくつかの実施形態では、提供される方法はまた、提供される方法のいずれかに従って優先的に増殖させたｇ－ＮＫ細胞などのｇ－ＮＫを単離又は濃縮することを含み得る。いくつかのそのような実施形態において、ｇ－ＮＫ細胞の実質的に純粋な集団、例えば、記載されるパネル又はマーカーの組み合わせのいずれかを使用して決定されるような、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、それらの近似値又はそれ以上を超えるｇ－ＮＫ細胞を含有する細胞集団を得ることができる。抗体及び他の結合分子は、ｇ$^{-}$ＮＫ細胞の単離又は濃縮における使用のために、マーカータンパク質の発現レベルの存在又は非存在を検出するために使用され得る。いくつかの実施形態では、単離又は濃縮は、蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣｓ）によって行われる。そのような方法の例において、ｇ－ＮＫ細胞は、複数の細胞表面マーカーについて細胞を染色するための上記の方法を使用してフローサイトメトリーによって同定又は検出され、染色された細胞は、ｇ－ＮＫ細胞に関連するマーカーについて陽性又は陰性である細胞の収集のために流体流中で運ばれる。

【０５２３】

ＶＩ．キット及び製品

本明細書では、ｇ－ＮＫ細胞などの特定のサブセットについて濃縮されたＮＫ細胞を含有する提供される組成物を含む製品及びキットが提供される。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、ＣＡＲなどの抗原受容体をコードする核酸などを用いて操作される。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、サイトカインなどの免疫調節物質をコードする核酸などを用いて操作される。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞は、ＣＡＲなどの抗原受容体及びサイトカインなどの免疫調節物質をコードする核酸などを用いて操作される。組成物中の細胞には、抗原受容体（例えば、ＣＡＲ）をコードする異種核酸を含む操作されたｇ－ＮＫ細胞が含まれる。組成物中の細胞には、免疫調節物質（例えば、サイトカイン）をコードする異種核酸を含む操作されたｇ－ＮＫ細胞がある。組成物中の細胞の

中には、抗原受容体（例えば、ＣＡＲ）及び免疫調節物質（例えば、サイトカイン）をコードする異種核酸を含む操作されたｇ－ＮＫ細胞がある。いくつかの実施形態では、組成物は、提供される方法のいずれかによって産生される。いくつかの実施形態では、キットは、提供される組成物のいずれかと、単剤療法として組成物を投与するための説明書とを含む。

【０５２４】

いくつかの実施形態では、提供される組成物のいずれかと追加の薬剤とを含むキットが本明細書で提供される。例示的な追加の薬剤は、本明細書に記載される任意のものを含む。いくつかの実施形態では、追加の薬剤はＦｃドメインを含む。いくつかの実施形態では、追加の薬剤は、Ｆｃ融合タンパク質又は抗体である。いくつかの実施形態では、追加の薬剤は、抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒト抗体、ヒト化抗体、又はキメラ抗体である。いくつかのこれらの実施形態では、抗体は完全長の抗体である。例示的な抗体は、記載される任意のものを含んだ。

【０５２５】

キットは、任意選択で、使用説明書、デバイス及び追加の試薬（例えば、組成物の希釈及び／又は凍結乾燥タンパク質の再構成のための滅菌水又は生理食塩水溶液）などの１つ以上の構成要素、ならびに方法の実施のためのチューブ、容器及びシリンジなどの構成要素を含むことができる。いくつかの実施形態では、キットは、試料の収集、試料の調製及び処理のための試薬、ならびに／又は試料中の１つ以上の表面マーカーの量を定量化するための試薬、例えば、限定されないが、抗体などの検出試薬、緩衝液、酵素染色のための基質、クロマゲン、又はスライド、容器、マイクロタイタープレートなどの他の材料、及び任意選択で、方法を実施するための説明書を更に含むことができる。当業者は、提供される方法に従って使用され得る多くの他の可能な容器及びプレートならびに試薬を認識する。

【０５２６】

いくつかの実施形態では、キットは、細胞、抗体もしくは試薬、又はそれらの組成物、又は１つ以上の他の成分を包装するための包装材料を含む製品として提供することができる。例えば、キットは、容器、ボトル、チューブ、バイアル、及びキットの成分を分離又は組織化するのに適した任意の包装材料を含むことができる。１つ以上の容器は、ガラス又はプラスチックなどの様々な材料から形成されてよい。いくつかの実施形態では、１つ以上の容器は、本方法において使用するための細胞又は抗体又は他の試薬を含む組成物を保持する。本明細書における製品又はキットは、別々の容器中又は同じ容器中に細胞、抗体又は試薬を含み得る。

【０５２７】

いくつかの実施形態では、組成物を保持する１つ以上の容器は、単回使用バイアル又は複数回使用バイアルであってもよく、これは、場合によっては、組成物の反復使用を可能にし得る。いくつかの実施形態では、製品又はキットは、適切な希釈剤を含む第２の容器を更に含み得る。製品又はキットは、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、治療剤及び／又は使用説明書を含む添付文書を含む、商業的、治療的及び使用者の観点から望ましい他の材料を更に含んでもよい。

【０５２８】

いくつかの実施形態では、キットは、任意選択で、説明書を含むことができる。説明書は、典型的には、細胞組成物、試薬及び／又は抗体、ならびに任意選択で、キットに含まれる他の構成要素、ならびにそのようなものを使用するための方法を説明する具体的な表現を含む。いくつかの実施形態では、説明書は、提供される実施形態のいずれかに従うような、疾患又は状態を処置するために対象に投与するための細胞組成物及び抗体を使用するための方法を示す。いくつかの実施形態では、説明書は、ラベル又は添付文書として提供され、これは容器上にあるか、又は容器に付随する。いくつかの実施形態では、説明書は、組成物の再構成及び／又は使用のための指示を示し得る。

【０５２９】

ＶＩＩ．治療方法

本明細書では、対象における疾患又は状態の治療に使用するための、本明細書に記載のいずれかを含む、提供される操作されたｇ－ＮＫ細胞を含むｇ－ＮＫ細胞組成物（操作されたｇ－ＮＫ細胞組成物とも呼ばれる）に関する使用のための組成物及び方法が提供される。方法及び使用は、セクションＩＶに記載されるもの、又はセクションＩＩもしくはＶに記載される本明細書の方法によって産生されるものを含む、本明細書に記載される任意の組成物の使用を含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるのは、個体における状態を処置する方法であって、それを必要とする個体に、操作されたｇ－ＮＫ細胞を含む提供されるｇ－ＮＫ組成物のいずれかを投与することを含む、方法である。組成物中の細胞には、抗原受容体（例えば、ＣＡＲ）をコードする異種核酸を含む操作されたｇ－ＮＫ細胞が含まれる。組成物中の細胞には、免疫調節物質（例えば、サイトカイン）をコードする異種核酸を含む操作されたｇ－ＮＫ細胞がある。組成物中の細胞の中には、抗原受容体（例えば、ＣＡＲ）及び免疫調節物質（例えば、サイトカイン）をコードする異種核酸を含む操作されたｇ－ＮＫ細胞がある。特定の実施形態では、組成物は、本明細書で提供される方法によって産生される。そのような方法及び使用は、例えば、疾患、状態、又は障害を有する対象への治療用細胞又はそれを含有する組成物の投与を含む、治療方法及び使用を含む。いくつかの実施形態では、疾患又は障害は、腫瘍やがんである。いくつかの実施形態では、疾患又は障害は、ウイルス感染である。いくつかの実施形態では、細胞又はその薬学的組成物は、疾患又は障害の処置をもたらすのに有効な量で投与される。使用には、そのような方法及び処置における、ならびにそのような治療方法を実施するための医薬の調製における細胞又はその医薬組成物の使用が含まれる。いくつかの実施形態では、本方法は、それによって、対象における疾患又は状態又は障害を処置する。

【０５３０】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作されたｇ－ＮＫ細胞を含む提供されるＮＫ細胞組成物の提供される方法及び使用のいずれかは、ＰＣＴ公開第ＷＯ２０２０／１０７００２号又はＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０２１／０２８５０４号に記載される方法及び使用を含み得る。

【０５３１】

いくつかの実施形態では、処置又は使用の方法は、提供される方法によって産生された増殖ＮＫ細胞を含む任意のそのような組成物を含む、本明細書で提供される操作されたｇ－ＮＫ細胞を含有する組成物などの本明細書で提供されるｇ－ＮＫ細胞組成物の細胞の有効量の個体への投与を含む。いくつかの実施形態では、提供される方法によって産生される任意の組成物を含む、本明細書で提供される操作されたＮＫ細胞を含有する組成物などの、本明細書で提供されるそのようなｇ－ＮＫ細胞組成物の細胞が10^5～10^{12}、又は10^5～10^8、又は10^6～10^{12}、又は10^8～10^{11}、又は10^9～10^{10}もしくはそれらの近似値の範囲で、個体に投与される。いくつかの実施形態では、提供される方法によって産生される任意の組成物を含む、本明細書で提供される操作されたＮＫ細胞を含有する組成物などの、本明細書で提供されるそのようなｇ－ＮＫ細胞組成物の細胞を、10^5個超又は約10^5個超、10^6個超又は約10^6個超、10^7個超又は約10^7個超、10^8個超又は約10^8個超、10^9個超又は約10^9個超、10^{10}個超又は約10^{10}個超、10^{11}個超又は約10^{11}個超、又は10^{12}個超又は約10^{12}個超含有する細胞用量で、個体に投与される。

【０５３２】

いくつかの実施形態では、治療方法又は使用は、本明細書に記載される任意の操作されたｇ－ＮＫ細胞組成物を含む、提供されるＮＫ細胞組成物のいずれかの細胞の有効量を個体に投与することを含む。いくつかの実施形態では、操作されたｇ－ＮＫ細胞を含有する提供される組成物のいずれかに由来する、10^5～10^{12}、又は10^5～10^8、又は10^6～10^{12}、又は10^8～10^{11}、又は10^9～10^{10}もしくはそれらの近似値の範囲の細胞が、個々の対象に投与される。いくつかの実施形態では、操作されたｇ－ＮＫ細胞を含有する提供される組成物のいずれかからの細胞を、10^5個超又は約10^5個

超、１０^{6}個超又は約１０^{6}個超、１０^{7}個超又は約１０^{7}個超、１０^{8}個超又は約１０^{8}個超、１０^{9}個超又は約１０^{9}個超、１０^{10}個超又は約１０^{10}個超、１０^{11}個超又は約１０^{11}個超、又は１０^{12}個超又は約１０^{12}個超含有する細胞用量で個体に投与される。いくつかの実施形態では、１ｋｇ当たり、操作されたｇ－ＮＫ細胞を含有する提供される組成物のいずれかのそのような細胞の１０^{6}～１０^{10}又は約１０^{6}～１０^{10}個が、対象に投与される。

【０５３３】

いくつかの実施形態では、操作されたｇ－ＮＫ細胞を含有する組成物は、所定の用量数にわたって週１回投与され得る。

【０５３４】

いくつかの実施形態では、所定数の週１回用量は、１回用量、２回用量、３回用量、４回用量、５回用量、６回用量、７回用量、８回用量、９回用量、１０回用量、１１回用量又は１２回用量である。いくつかの実施形態では、週１回の用量は、４週間、６週間、８週間、１０週間、１２週間、１６週間、２０週間、２４週間、２８週間、３２週間、３６週間又はそれ以上にわたって投与される。いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞組成物の週１回用量が６回投与される。いくつかの実施形態では、週１回の用量は、連続した週で投与される。

【０５３５】

いくつかの実施形態では、週１回の用量は、サイクリングレジメンで投与される。いくつかの実施形態では、サイクリングレジメンは、１４日周期である。いくつかの実施形態では、週１回の用量は、１４日周期に２回投与される。いくつかの実施形態では、１４日周期は２回繰り返される。いくつかの実施形態では、１４日周期は３回繰り返される。

【０５３６】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される操作されたｇ－ＮＫ細胞を含有する開示される細胞又は組成物のいずれかの有効量が、５週間の持続期間にわたって週１回対象に投与される。

【０５３７】

いくつかの実施形態では、操作されたｇ－ＮＫ細胞を含有するｇ－ＮＫ細胞組成物の細胞の各用量は、ｇ－ＮＫ細胞組成物の、１×１０^{8}又は約１×１０^{8}から、５０×１０^{9}又は約５０×１０^{9}個の細胞であってもよい。いくつかの実施形態では、操作されたｇ－ＮＫ細胞を含有するｇ－ＮＫ細胞組成物の細胞の各用量は、ｇ－ＮＫ細胞組成物の５×１０^{8}又は約５×１０^{8}個の細胞であってもよい。いくつかの実施形態では、操作されたｇ－ＮＫ細胞を含有するｇ－ＮＫ細胞組成物の細胞の各用量は、ｇ－ＮＫ細胞組成物の５×１０^{9}個の細胞であってもよく、又は約５×１０^{9}個の細胞であってもよい。いくつかの実施形態では、操作されたｇ－ＮＫ細胞を含有するｇ－ＮＫ細胞組成物の細胞の各用量は、ｇ－ＮＫ細胞組成物の１０×１０^{9}個の細胞であり得るか、又は約１０×１０^{9}の細胞であり得る。

【０５３８】

いくつかの実施形態では、提供される処置方法又は使用のいずれかに従った投与のための用量は、１×１０^{5}細胞／ｋｇ～１×１０^{7}細胞／ｋｇ、例えば１×１０^{5}細胞／ｋｇ～７．５×１０^{6}細胞／ｋｇ、１×１０^{5}細胞／ｋｇ～５×１０^{6}細胞／ｋｇ、１×１０^{5}細胞／ｋｇ～２．５×１０^{6}細胞／ｋｇ、１×１０^{5}細胞／ｋｇ～１×１０^{6}細胞／ｋｇ、１×１０^{5}細胞／ｋｇ～７．５×１０^{5}細胞／ｋｇ、１×１０^{5}細胞／ｋｇ～５×１０^{5}細胞／ｋｇ、１×１０^{5}細胞／ｋｇ～２．５×１０^{5}細胞／ｋｇ、２．５×１０^{5}細胞／ｋｇ～１×１０^{7}細胞／ｋｇ、２．５×１０^{5}細胞／ｋｇ～７．５×１０^{6}細胞／ｋｇ、２．５×１０^{5}細胞／ｋｇ～５×１０^{6}細胞／ｋｇ、２．５×１０^{5}細胞／ｋｇ～２．５×１０^{6}細胞／ｋｇ、２．５×１０^{5}細胞／ｋｇ～１×１０６細胞／ｋｇ、２．５×１０^{5}細胞／ｋｇ～７．５×１０^{5}細胞／ｋｇ、２．５×１０^{5}細胞／ｋｇ～５×１０^{5}細胞／ｋｇ、５×１０^{5}細胞／ｋｇ～１×１０７細胞／ｋｇ、５×１０^{5}細胞／ｋｇ～７．５×１０^{6}細胞／ｋｇ、５×１０^{5}細胞／ｋｇ～５×１０^{6}細胞／ｋｇ、５×１０^{5}細

胞／ｋｇ～２．５×１０６細胞／ｋｇ、５×１０^{5}細胞／ｋｇ～１×１０^{6}細胞／ｋｇ、５×１０^{5}細胞／ｋｇ～７．５×１０^{5}細胞／ｋｇ、１×１０^{6}細胞／ｋｇ～１×１０７細胞／ｋｇ、１×１０^{6}細胞／ｋｇ～７．５×１０^{6}細胞／ｋｇ、１×１０^{6}細胞／ｋｇ～５×１０^{6}細胞／ｋｇ、１×１０^{6}細胞／ｋｇ～２．５×１０^{6}細胞／ｋｇ、２．５×１０^{6}細胞／ｋｇ～１×１０^{7}細胞／ｋｇ、２．５×１０^{6}細胞／ｋｇ～７．５×１０^{6}細胞／ｋｇ、２．５×１０^{6}細胞／ｋｇ～５×１０^{6}細胞／ｋｇ、５×１０^{6}細胞／ｋｇ～１×１０^{7}細胞／ｋｇ、５×１０^{6}細胞／ｋｇ～７．５×１０^{6}細胞／ｋｇ、又は７．５×１０^{6}細胞／ｋｇ～１×１０７細胞／ｋｇ、もしくはそれらの各近似値の範囲である。いくつかの実施形態では、投与のための用量は、１×１０^{5}細胞／ｋｇ～１×１０^{8}細胞／ｋｇ、例えば、２．５×１０^{5}細胞／ｋｇ～１×１０^{8}細胞／ｋｇ、５×１０^{5}細胞／ｋｇ～１×１０^{8}細胞／ｋｇ、７．５×１０^{5}細胞／ｋｇ～１×１０^{8}細胞／ｋｇ、１×１０^{6}細胞／ｋｇ～１×１０^{8}細胞／ｋｇ、２．５×１０^{6}細胞／ｋｇ～１×１０^{8}細胞／ｋｇ、５×１０^{6}細胞／ｋｇ～１×１０^{8}細胞／ｋｇ、７．５×１０^{6}細胞／ｋｇ～１×１０^{8}細胞／ｋｇ、１×１０^{7}細胞／ｋｇ～１×１０^{8}細胞／ｋｇ、２．５×１０^{7}細胞／ｋｇ～１×１０^{8}細胞／ｋｇ、５×１０^{7}細胞／ｋｇ～１×１０^{8}細胞／ｋｇ、又は７．５×１０^{7}細胞／ｋｇ～１×１０^{8}細胞／ｋｇもしくはそれらの各近似値の範囲である。

【０５３９】

いくつかの実施形態では、用量は、本明細書に記載されるＮＫ細胞サブセットのいずれかなどのｇ－ＮＫ細胞のための代用マーカーと関連するか又はそれを含む組成物中のｇ－ＮＫ細胞もしくはＮＫ細胞サブセットの数、又は前述のいずれかの生存細胞の数として与えられる。上記の実施形態のいずれかにおいて、用量は、提供されるような、例えば提供される方法によって産生されるような操作された細胞の組成物中の細胞の数、又は前述のいずれかの生存細胞の数として与えられる。

【０５４０】

いくつかの実施形態では、処置方法又は使用のいずれかに従った投与のための用量は、操作されたｇ－ＮＫ細胞を含むｇ－ＮＫ細胞組成物の５×１０^{7}又は約５×１０^{7}から、１０×１０^{9}又は約１０×１０^{9}、例えば５×１０^{7}～５×１０^{9}、５×１０^{7}～１×１０^{9}、５×１０^{7}～５×１０^{8}、５～×１０^{7}～１×１０^{8}、１×１０８～１０×１０$_{9}$、１×１０^{8}～５×１０^{9}、１×１０^{8}～１×１０^{9}、１×１０８～５×１０^{8}、５×１０^{8}～１０×１０^{9}、５×１０^{8}～５×１０^{9}、５×１０^{8}～１×１０^{9}、１×１０^{9}～１０×１０^{9}、１×１０^{9}～５×１０^{9}、又は５×１０^{9}～１０×１０^{9}、もしくはそれらの各近似値の範囲である。いくつかの実施形態では、投与のための用量は、操作されたｇ－ＮＫ細胞をＮＫ細胞を含有するｇ－ＮＫ細胞組成物の５×１０^{8}又は約５×１０^{8}である。いくつかの実施形態では、投与のための用量は、操作されたｇ－ＮＫ細胞をＮＫ細胞を含有するｇ－ＮＫ細胞組成物の細胞の１×１０^{9}又は約１×１０^{9}である。いくつかの実施形態では、投与のための用量は、操作されたｇ－ＮＫ細胞を含有するｇ－ＮＫ細胞組成物の５×１０^{9}又は約５×１０^{9}個の細胞である。いくつかの実施形態では、投与のための用量は、操作されたｇ－ＮＫ細胞を含有するｇ－ＮＫ細胞組成物の１×１０^{10}又は約１×１０^{10}個の細胞である。上記の実施形態のいずれかにおいて、用量は、提供される方法によって産生される操作された細胞の組成物中の細胞の数、又は前述のいずれかの生存細胞の数として与えられる。いくつかの実施形態では、用量は、ｇ－ＮＫ細胞、又は本明細書に記載されるＮＫ細胞サブセットのいずれかなどのｇ－ＮＫ細胞の代用マーカーと関連するかもしくはそれを含むＮＫ細胞サブセットの数、又は前述のいずれかの生存細胞の数として与えられる。

【０５４１】

いくつかの実施形態では、操作されたｇ－ＮＫ細胞を含有する組成物の細胞の用量は、提供される方法による増殖及び／又は操作の直後に個体に投与される。他の実施形態において、操作されたｇ－ＮＫ細胞を含有するｇ－ＮＫ細胞の組成物は、例えば、上記の方法によって、投与前に保存される。例えば、ＮＫ細胞は、個体への投与前に６、１２、１８

、又は２４ヶ月を超えて保存することができる。

【０５４２】

いくつかの実施形態では、操作されたＮＫ細胞及びそのサブセット、例えばｇ－ＮＫ細胞を含有する提供される組成物は、皮下、筋肉内、静脈内、及び／又は硬膜外投与経路などの非経口経路を含む任意の好都合な経路によって対象に投与することができる。

【０５４３】

特定の実施形態において、提供される組成物は、静脈内注入によって投与される。いくつかの実施形態では、１０×１０^{6}又は約１０×１０^{6}から、１０×１０^{9}又は約１０×１０^{9}個の細胞が、１ｍＬ～１００ｍＬの体積で静脈内注入によって投与される。いくつかの実施形態では、５０×１０^{6}又は約５０×１０^{6}個の細胞が投与される。いくつかの実施形態では、１×１０^{9}又約１×１０^{9}個の細胞が投与される。いくつかの実施形態では、５×１０^{9}又約５×１０^{9}個の細胞が投与される。いくつかの実施形態では、１０×１０^{9}又約１０×１０^{9}個の細胞が投与される。細胞数を投与するために注入する細胞の体積を決定することは、当業者のレベルの範囲内である。一例では、０．５×１０^{9}個の細胞は、２．５×１０^{7}細胞／ｍＬ又は約２．５×１０^{7}細胞／ｍＬの濃度で（例えば、２００ｍＬ中に５×１０^{9}個の細胞又は約５×１０^{9}個の細胞で）製剤化された、解凍した凍結保存組成物などの組成物から、約２０ｍＬの体積の静脈内注入によって投与される。

【０５４４】

提供される操作されたｇ－ＮＫ細胞組成物は、腫瘍もしくは過剰増殖性障害又は微生物感染、例えばウイルス感染、酵母感染、真菌感染、原虫感染及び／もしくは細菌感染を有する個体を処置する方法において使用することができる。提供される操作されたｇ－ＮＫ細胞組成物は、哺乳動物、例えばヒト対象などの動物の処置のために投与することができる。

【０５４５】

一部の例では、本方法は、血液学的悪性疾患又は固形腫瘍などの過剰増殖性障害を処置することを含む。本明細書中に記載される組成物で処置され得るがん及び増殖障害の型の例としては、限定されないが、多発性ミエローマ、白血病（例えば、骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性、赤白血病、慢性骨髄球性（顆粒球性）白血病、及び慢性リンパ球性白血病）、リンパ種（例えば、ホジキン病及び非ホジキン病）、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、血管肉腫、内皮肉腫、ユーイング腫瘍、結腸がん、膵臓がん、乳がん、卵巣がん、前立腺がん、扁平上皮がん、基底細胞がん、腺がん、腎細胞がん、肝がん、ウィルムス腫瘍、頚部がん、子宮がん、精巣腫瘍、肺がん、小細胞肺がん、膀胱がん、上皮がん、グリオーム、アストロサイトーマ、乏突起神経膠腫、メラノーマ、神経芽細胞腫、網膜芽腫、異形成及び過形成が挙げられる。がんの治療及び／又は予防としては、がんに関連する１つ以上の症状の緩和、がんの進行の阻害若しくは低減、がんの退縮の促進、及び／又は免疫応答の促進が挙げられるが、これらに限定されない。

【０５４６】

いくつかの例では、本方法は、体内のウイルスの存在によって引き起こされる感染症などのウイルス感染症を治療することを含む。ウイルス感染は、ＤＮＡ又はＲＮＡウイルスによって引き起こされ得、慢性又は持続性のウイルス感染を含み、これは、宿主に感染し、致死的であると証明される前に、長期間（通常、数週間、数ヶ月又は数年）にわたって宿主の細胞内で増殖することができるウイルス感染である。本発明に従って治療され得る慢性感染症を引き起こすウイルスとしては、例えば、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、単純疱疹ウイルス、及び他のヘルペスウイルス、Ｃ型肝炎・Ｂ型肝炎のウイルス、ならびに他の肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、及び麻疹ウイルスが挙げられ、これらは全て、重要な臨床疾患を生じ得る。長期の感染は、最終的に、例えば、Ｃ型肝炎ウイルス肝臓がんの場合、患者にとって致命的であり得る疾患の誘導をもたらし得る。本発明に従って治療することができる他の慢性としては、エプスタイン・バールウイルス（ＥＢＶ）、ならびに他のウイルス（例えば、腫瘍に関連し得るウイルス）が挙げられる。

【０５４７】
本明細書に記載の組成物及び方法を用いて治療又は予防することができるウイルス感染の例としては、コロナウイルス（例えば、感染がＣＯＶＩＤ－１９であるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）、レトロウイルス（例えば、ヒトＴ細胞性リンパ指向性ウイルス（ＨＴＬＶ）Ｉ型及びＩＩ型ならびにヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ））、ヘルペスウイルス（例えば、単純疱疹ウイルス（ＨＳＶ）Ｉ型及びＩＩ型、エプスタインバールウイルス及びサイトメガロウイルス）、アレナウイルス（例えば、ラッサ熱ウイルス）、パラミクソウイルス（例えば、モルビリウイルス、ＲＳウイルス及びニューモウイルス）、アデノウイルス、ブニヤウイルス（例えば、ハンタウイルス）、コルナウイルス、フィロウイルス（例えば、エボラウイルス）、フラビウイルス（例えば、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ））、オルトミクソウイルス（例えば、センダイウイルス及びインフルエンザウイルスＡ、Ｂ及びＣ）、パポバウイルス（例えば、パピローマウイルス）、ピコルナウイルス（例えば、ライノウイルス、エンテロウイルス及びＡ型肝炎ウイルス）、ポックスウイルス、レオウイルス（例えば、ロタウイルス）、トガウイルス（例えば、風疹ウイルス）及びラブドウイルス（例えば、狂犬病ウイルス）によって引き起こされるウイルス感染が挙げられるが、これらに限定されない。ウイルス感染の治療及び／又は予防は、前記感染に関連する１つ以上の症状の緩和、ウイルス複製の阻害、低減若しくは抑制、及び／又は免疫応答の増強を含むが、これらに限定されない。

【０５４８】
いくつかの実施形態では、操作されたｇ－ＮＫ細胞及び操作されたｇ－ＮＫ細胞を含有する組成物は、酵母又は細菌感染を処置する方法において使用される。酵母菌又は細菌感染の例としては、化膿性連鎖球菌、ストレプトコッカス・ニューモニエ（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、ナイセリア・ゴノレア（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｇｏｎｏｒｒｈｏｅａ）、ナイセリア・メニンギティディス、コリネバクテリウム・ジフテリア（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｄｉｐｈｔｈｅｒｉａｅ）、クロストリジウム・ボツリナム（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ）、クロストリジウム・パーフリンジェンス（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｐｅｒｆｒｉｎｇｅｎｓ）、クロストリジウム・テタニ（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｔｅｔａｎｉ）、ヘモフィルス・インフルエンザ（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ）、クレブシエラ・ニューモニエ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、クレブシエラ・オザエナエ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ ｏｚａｅｎａｅ）、クレブシエラ・リノシェレロモーティス（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ ｒｈｉｎｏｓｃｌｅｒｏｍｏｔｉｓ）、黄色ブドウ球菌、コレラ菌（Ｖｉｂｒｉｏ ｃｈｏｌｅｒａ）、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）、シュードモナス・アエルギノーザ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）、カンピロバクター（ビブリオ）・フェタス（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ （Ｖｉｂｒｉｏ） ｆｅｔｕｓ）、カンピロバクター・ジェジュニ、アエロモナス・ハイドロフィラ（Ａｅｒｏｍｏｎａｓ ｈｙｄｒｏｐｈｉｌａ）、バチルス・セレウス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｃｅｒｅｕｓ）、エドワージエラ・タルダ（Ｅｄｗａｒｄｓｉｅｌｌａ ｔａｒｄａ）、エンテロコリチカ菌（Ｙｅｒｓｉｎｉａ ｅｎｔｅｒｏｃｏｌｉｔｉｃａ）、ペスト菌（Ｙｅｒｓｉｎｉａ ｐｅｓｔｉｓ）、仮性結核菌（Ｙｅｒｓｉｎｉａ ｐｓｅｕｄｏｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、シゲラ・ディセンテリア（Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｄｙｓｅｎｔｅｒｉａｅ）、シゲラ・フレックスネリ（Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｆｌｅｘｎｅｒｉ）、シゲラ・ソネイ（Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｓｏｎｎｅｉ）、サルモネラ・チフィムリウム（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ）、トレポネーマ・パリダム（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｐａｌｌｉｄｕｍ）、トレポネーマ・ペルテヌエ（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｐｅｒｔｅｎｕｅ）、トレポネーマ・カラテニウム（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｃａｒａｔｅｎｅｕｍ）、ボレリア・ビゲネリ（Ｂｏｒｒｅｌｉａ ｖｉｎｃｅｎｔｉｉ）、ボレリア・ブルグドルフェリ（Ｂｏｒｒｅｌｉａ ｂｕｒｇｄｏｒｆｅｒｉ）、黄疸出血性レプトスピラ（Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ ｉｃｔｅｒｏｈｅｍｏｒｒｈａｇｉａｅ）、マイコバクテリウム・ツベルクローシス（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、トキソプラズ

マ・ゴンディ（Ｔｏｘｏｐｌａｓｍａ　ｇｏｎｄｉｉ）、ニューモシスティス・カリニ（Ｐｎｅｕｍｏｃｙｓｔｉｓ　ｃａｒｉｎｉｉ）、フランシセラ・ツラレンシス（Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ　ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ）、ウシ流産菌（Ｂｒｕｃｅｌｌａ　ａｂｏｒｔｓ）、ブタ流産菌（Ｂｒｕｃｅｌｌａ　ｓｕｉｓ）、ヤギ流産菌（Ｂｒｕｃｅｌｌａ　ｍｅｌｉｔｅｎｓｉｓ）、マイコプラズマ属の種（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ　ｓｐｐ．）、発疹チフスリケッチア（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ　ｐｒｏｗａｚｅｋｉ）、リケッチア・ツツガムシ（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ　ｔｓｕｔｓｕｇｕｍｕｓｈｉ）、クラミジア属の種（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ　ｓｐｐ）、ヘリコバクターピロリ（Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ　ｐｙｌｏｒｉ）又はそれらの組み合わせに関する感染が挙げられる。

【０５４９】

いくつかの実施形態では、提供される操作されたｇ－ＮＫ細胞及びその組成物は、疾患又は障害の処置のための単剤療法として使用することができる。

【０５５０】

Ａ．併用療法

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される操作されたｇ－ＮＫ細胞を含有する組成物は、対象における疾患又は状態を処置するための１つ以上の他の薬剤との併用療法で投与され得る。そのような実施形態では、本明細書で提供される操作されたｇ－ＮＫ細胞を含有する組成物は、１つ以上の他の薬剤の投与の前に、それと同時に、又はその後に（後に）投与することができる。

【０５５１】

いくつかの実施形態では、提供される操作されたｇ－ＮＫ細胞及び組成物で対象を処置する開示される方法は、治療用モノクローナル抗体、例えば、抗腫瘍抗原又は抗がん抗体、抗ウイルス抗体又は抗細菌抗体と組み合わせることができる。

【０５５２】

いくつかの実施形態では、操作されたｇＮＫ細胞の細胞の用量は、抗微生物剤、抗ウイルス剤及び他の治療剤と同時に又は連続して投与することができる。いくつかの実施形態では、本方法は、化学療法剤、細胞傷害性剤、又は免疫調節物質を対象に投与することと組み合わせて行われる。

【０５５３】

本明細書に提供されるいくつかの実施形態では、操作されたｇＮＫ細胞又はそれを含有する組成物は、サイトカイン及び／又は増殖因子と組み合わせて個体に投与され得る。サイトカインはＮＫ細胞活性に必要であるので、典型的な方法は、外因性サイトカインサポートとしてのＮＫ細胞療法と組み合わせて対象に外因性サイトカインを投与することを含む。

【０５５４】

例示的な併用療法を以下のサブセクションに記載する。

【０５５５】

１．抗体の組み合わせ

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される操作されたｇＮＫ細胞を含有する組成物は、抗体又はＦｃ含有タンパク質によって活性化された場合、又は抗体又はＦｃ含有タンパク質と接触した場合、例えば、従来のＮＫ細胞と比較して、増強された活性を示す。例えば、ｇＮＫ細胞は、ＣＤ１６の抗体媒介性架橋によって、又は抗体被覆腫瘍細胞によって活性化され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるのは、個体における状態を治療する方法であって、操作されたｇＮＫ細胞又はその組成物及び抗体を対象に投与することを含む、方法である。

【０５５６】

当業者は、例えば個体の特定の疾患又は状態に応じて、提供される操作されたｇＮＫ細胞及び本明細書に記載される組成物と共に対象に投与するための適切な治療用（例えば、抗がん）モノクローナル抗体を選択することができる。適切な抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、断片（例えば、Ｆａｂ断片）、単鎖抗体、及び特異的結

合分子の他の形態が挙げられ得る。

【０５５７】

いくつかの実施形態では、抗体は、ヒト化抗体又はヒト抗体を更に含み得る。非ヒト抗体のヒト化形態は、非ヒトＩｇに由来する最小限の配列を含むキメラＩｇ、Ｉｇ鎖、又は断片（Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２又は抗体の他の抗原結合部分配列など）である。いくつかの実施形態では、抗体は、Ｆｃ断片を含まない。

【０５５８】

一般的に、ヒト化抗体は、非ヒト源から移入された１つ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、典型的には「移入」可変ドメインから取り込まれた「移入」残基と呼ばれることが多い。ヒト化は、齧歯類ＣＤＲ又はＣＤＲ配列をヒト抗体の対応する配列に置換することによって達成される（Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，１９８６、Ｊ．Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，１９８８、Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎら、１９８８）。したがって、このような「ヒト化」抗体は、キメラ抗体（米国特許第１９８９号）であり、完全なものより実質的に小さいヒト可変ドメインが、非ヒト種の対応する配列により置換されている。実際には、ヒト化抗体は、典型的には、いくつかのＣＤＲ残基及び場合によりいくつかのＦＲ残基が、げっ歯類抗体の類似部位由来の残基で置換された、ヒト抗体である。ヒト化抗体として、レシピエントの相補性決定領域（ＣＤＲ）の残基が、所望の特異性、親和性及び能力を有するマウス、ラット、又はウサギなどの非ヒト種（ドナー抗体）のＣＤＲの残基で置換されている、ヒト抗体（レシピエント抗体）が挙げられる。いくつかの例において、対応する非ヒト残基は、ヒト抗体のＦｖフレームワーク残基を置換する。またヒト化抗体は、レシピエント抗体又は移入されたＣＤＲ若しくはフレームワーク配列においても見られない、残基も含んでよい。一般に、ヒト化抗体は、実質的に全ての少なくとも１つ、典型的には２つの可変ドメインを含み、ＣＤＲ領域のすべてではないにしても、ほとんどが、非ヒト免疫グロブリンのものと一致し、ＦＲ領域のすべてではないにしても、ほとんどが、ヒト免疫グロブリンのものである。ヒト化抗体は、最適には、典型的にはヒト免疫グロブリンのものである、免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）の少なくとも一部も含む（Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，１９８６；Ｐｒｅｓｔａ，９９２；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎｅｔ ａｌ．，１９８８）。

【０５５９】

ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリー（Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ ｅｔ ａｌ．，１９９１）Ｍａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．，１９９１）及びヒトｍＡｂの調製（Ｂｏｅｒｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９１；Ｒｅｉｓｆｅｌｄ ａｎｄ Ｓｅｌｌ，１９８５）を含むさまざまな技術を使用して生成することもできる。同様に、内因性抗体遺伝子が部分的又は完全に不活性化されているトランスジェニック動物にヒトＩｇ遺伝子を導入することを利用して、ヒトＡｂを合成することができる。誘発時、遺伝子再配列、集合、及び抗体レパートリーなどの全ての点において、ヒトで見られるものとよく似たヒト抗体産生が観察される（１９９７ａ；１９９７ｂ；１９９７ｃ；１９９７ｄ；１９９７；１９９７；Ｆｉｓｈｗｉｌｄ ｅｔ ａｌ．，１９９６；１９９７；１９９７；２００１；１９９６；１９９７；１９９７；１９９７；Ｌｏｎｂｅｒｇ ａｎｄ Ｈｕｓｚａｒ，１９９５；Ｌｏｎｂｅｒｇら、１９９４；Ｍａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．，１９９２；１９９７；１９９７；１９９７）。

【０５６０】

具体的には、本発明の細胞は、腫瘍関連抗原を認識する抗体を投与することによって腫瘍を標的とすることができる。当業者は、本ｇＮＫ細胞が、腫瘍関連抗原を認識する多種多様な抗体と共に使用するのに適していることを理解するであろう。腫瘍関連抗原の非限定的な例としては、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ３０、ＣＤ３３、ＣＤ３７、ＣＤ３８、ＣＤ４０、ＣＤ５２、ＣＤ５６、ＣＤ７０、ＣＤ７４、ＣＤ１４０、ＥｐＣＡＭ、ＣＥＡ、ｇｐＡ３３、メソテリン、α－フェトプロテイン、ムチン、ＰＤＧＦＲ－α、ＴＡＧ－７２、ＣＡＩＸ、ＰＳＭＡ、葉酸結合タンパク質、散乱因子受容体キナーゼ、ガングリオシド、サイトケラチン、ｆｒｉｚｚｌｅｄ受容体、ＶＥＧＦ、ＶＥＧＦＲ、イン

テグリンαＶβ３、インテグリンα５β１、ＥＧＦＲ、ＥＧＦＬ７、ＥＲＢＢ２（ＨＥＲ２）、ＥＲＢＢ３、フィブロネクチン、ＨＧＦ、ＨＥＲ３、ＬＯＸＬ２、ＭＥＴ、ＩＧＦ１Ｒ、ＩＧＬＦ２、ＥＰＨＡ３、ＦＲ－α、ホスファチジルセリン、シンデカン１、ＳＬＡＭＦ７（ＣＤ３１９）、ＴＲＡＩＬＲ１、ＴＲＡＩＬＲ２、ＲＡＮＫＬ、ＦＡＰ、ビメンチン、又はテネイシンが挙げられる。いくつかの場合では、抗体は抗ＣＤ２０抗体（例えばリツキシマブ）、抗ＨＥＲ２抗体（例えばセツキシマブ）、抗ＣＤ５２抗体、抗ＥＧＦＲ抗体及び抗ＣＤ３８抗体（例えばダラツムマブ）、抗ＳＬＡＭＦ７抗体（例えばエロツズマブ）である。

【０５６１】

ｇ－ＮＫ細胞を含む組成物との組み合わせ療法において提供される方法において使用することができる非限定的な抗体としては、トラスツズマブ（ハーセプチン（登録商標））、ラムシルマブ（Ｃｙｒａｍｚａ（登録商標））、アテゾリズマブ（Ｔｅｃｅｎｔｒｉｑ（商標））、ニボルマブ（Ｏｐｄｉｖｏ（登録商標））、デュルバルマブ（Ｉｍｆｉｎｚｉ（商標））、アベルマブ（Ｂａｖｅｎｃｉｏ（登録商標））、ペンブロリズマブ（Ｋｅｙｔｒｕｄａ（登録商標））、ベバシズマブ（Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標））、エベロリムス（Ａｆｉｎｉｔｏｒ（登録商標））、ペルツズマブ（Ｐｅｒｊｅｔａ（登録商標））、アドートラスツズマブエムタンシン（Ｋａｄｃｙｌａ（登録商標））、セツキシマブ（Ｅｒｂｉｔｕｘ（登録商標））、デノスマブ（Ｘｇｅｖａ（登録商標））、リツキシマブ（Ｒｉｔｕｘｉｍａｂ（登録商標））、アレムツズマブ（Ｃａｍｐａｔｈ（登録商標））、オファツムマブ（Ａｒｚｅｒｒａ（登録商標））、オビヌツズマブ（Ｇａｚｙｖａ（登録商標））、ネシツムマブ（Ｐｏｒｔｒａｚｚａ（登録商標））、イブリツモマブチウキセタン（Ｚｅｖａｌｉｎ（登録商標））、ブレンツキシマブベドチン（Ａｄｃｅｔｒｉｓ（登録商標））、シルツキシマブ（Ｓｉｌｖａｎｔ（登録商標））、ボルテゾミブ（Ｖｅｌｃａｄｅ（登録商標））、ダラツムマブ（Ｄａｒｚａｌｅｘ（商標））、エロツズマブ（Ｅｍｐｌｉｃｉｔｉ（商標））、ジヌツキシマブ（Ｕｎｉｔｕｘｉｎ（商標））、オラツマブ（Ｌａｒｔｒｕｖｏ（商標））、オクレリズマブ、イサツキシマブ、トルキシマ、ブリツィマ、リテムビア、リツゼナ、ヘルズマ、ルキシエンス、ＡＢＰ７９８、カンジンティ、オジヴリー、ＢＩ６９５５００、ノベックス（ＲＴＸＭ８３）、トシツモマブもしくはオントルザント、又はそれらのバイオシミラーが挙げられる。例示的な抗体としては、リツキシマブ、トラスツズマブ、アレツズマブ（ａｌｅｔｕｚｕｍａｂ）、セルツキシマブ（ｃｅｒｔｕｘｉｍａｂ）、ダラツムマブ、ベルツズマブ、オファツムマブ、ウブリツキシマブ、オカラツズマブ、又はエロツズマブが挙げられる。

【０５６２】

いくつかの実施形態では、抗体は、抗ＰＤ－１又は抗ＰＤ－Ｌ　１抗体であり得る。ＰＤ－１又はＰＤ－Ｌ１を標的とする抗体としては、ニボルマブ、ペンブロリズマブ又はアテゾリズマブが挙げられるが、これらに限定されない。

【０５６３】

選択されたがんタイプに特異的な抗体を選択することができ、がんの治療に承認された任意の抗体が含まれる。例としては、乳がんに対するトラスツズマブ（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ）、リンパ腫に対するリツキシマブ（Ｒｉｔｕｘａｎ（登録商標））、及び頭頸部扁平上皮がんに対するセツキシマブ（Ｅｒｂｉｔｕｘ）が挙げられる。当業者は、特定の腫瘍又は疾患抗原に結合することができるＦＤＡ承認モノクローナル抗体に精通しており、そのいずれも、腫瘍又は疾患を治療するために提供される方法に従って使用することができる。

【０５６４】

いくつかの実施形態では、本方法は、胃又は食道胃接合部の腺がんを処置するためのものであり、抗体はトラスツズマブ（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標））又はラムシルマブ（Ｃｙｒａｍｚａ（登録商標））である。

【０５６５】

いくつかの実施形態では、本方法は、膀胱がんを処置するためのものであり、抗体はア

テゾリズマブ（Ｔｅｃｅｎｔｒｉｑ（商標））、ニボルマブ（Ｏｐｄｉｖｏ（登録商標））、デュルバルマブ（Ｉｍｆｉｎｚｉ（商標））、アベルマブ（Ｂａｖｅｎｃｉｏ（登録商標））、又はペンブロリズマブ（Ｋｅｙｔｒｕｄａ（登録商標））である。

【０５６６】

いくつかの実施形態では、本方法は脳がんを治療するためのものであり、抗体はベバシズマブ（アバスチン（登録商標））である。

【０５６７】

いくつかの実施形態では、方法は乳がんを処置するためのものであり、抗体はトラスツズマブ（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標））である。

【０５６８】

いくつかの実施形態では、方法は、子宮頸がんを治療するためのものであり、抗体は、ベバシズマブ（アバスチン（登録商標））である。

【０５６９】

いくつかの実施形態では、本方法は、結腸直腸がんを治療するためのものであり、抗体はセツキシマブ（Ｃｅｔｕｘｉｍａｂ）（Ｅｒｂｉｔｕｘ（登録商標））、パニツムマブ（Ｐａｎｉｔｕｍｕｍａｂ）（Ｖｅｃｔｉｂｉｘ（登録商標））、ベバシズマブ（Ｂｅｖａｃｉｚｕｍａｂ）（Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標））又はラムシルマブ（Ｃｙｒａｍｚａ（登録商標））である。

【０５７０】

いくつかの実施形態では、本方法は、内分泌／神経内分泌腫瘍を治療するためのものであり、抗体はアベルマブ（Ｂａｖｅｎｃｉｏ（登録商標））である。

【０５７１】

いくつかの実施形態では、本方法は、頭頸部がんを治療するためのものであり、抗体はセツキシマブ（Ｅｒｂｉｔｕｘ（登録商標））、ペンブロリズマブ（Ｋｅｙｔｒｕｄａ（登録商標））、ニボルマブ（Ｏｐｄｉｖｏ（登録商標））、トラスツズマブ又はラムシルマブである。

【０５７２】

いくつかの実施形態では、本方法は、骨がんを処置するためのものであり、抗体は、デノスマブ（Ｘｇｅｖａ（登録商標））である。

【０５７３】

いくつかの実施形態では、本方法は、腎臓がんを治療するためのものであり、抗体は、ベバシズマブ（Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標））又はニボルマブ（Ｏｐｄｉｖｏ（登録商標））である。

【０５７４】

いくつかの実施形態では、本方法は、白血病を処置するためのものであり、抗体は、リツキシマブ（Ｒｉｔｕｘａｎ（登録商標））、アレムツズマブ（Ｃａｍｐａｔｈ（登録商標））、オファツムマブ（Ａｒｚｅｒｒａ（登録商標））、オビヌツズマブ（Ｇａｚｙｖａ（登録商標））又はブリナツモマブ（Ｂｌｉｎｃｙｔｏ（登録商標））である。

【０５７５】

いくつかの実施形態では、本方法は、肺がん細胞を治療するためのものであり、抗体はベバシズマブ（アバスチン（登録商標））、ラムシルマブ（Ｃｙｒａｍｚａ（登録商標））、ニボルマブ（Ｏｐｄｉｖｏ（登録商標））、ネシツムマブ（Ｐｏｒｔｒａｚｚａ（商標））、ペンブロリズマブ（Ｋｅｙｔｒｕｄａ（登録商標））又はアテゾリズマブ（Ｔｅｃｅｎｔｒｉｑ（商標））である。

【０５７６】

いくつかの実施形態では、本方法は、はリンパ腫を治療するためのものであり、抗体はイブリツモマブチウキセタン（Ｚｅｖａｌｉｎ（登録商標））、ブレンツキシマブベドチン（Ａｄｃｅｔｒｉｓ（登録商標））、リツキシマブ（Ｒｉｔｕｘａｎ（登録商標））、シルツキシマブ（Ｓｙｌｖａｎｔ（登録商標））、オビヌツズマブ（Ｇａｚｙｖａ（登録商標））、ニボルマブ（Ｏｐｄｉｖｏ（登録商標））又はペンティアム（Ｋｅｙｔｒｕｄ

ａ（登録商標））である。
【０５７７】
いくつかの実施形態では、本方法は、複数の骨髄腫を治療するためのものであり、抗体は、ボルテゾミブ（Ｖｅｌｃａｄｅ（登録商標））、ダラツムマブ（Ｄａｒｚａｌｅｘ（商標））、又はエロツズマブ（Ｅｍｐｌｉｃｉｔｉ（商標））である。
【０５７８】
いくつかの実施形態では、本方法は神経芽細胞腫を治療するためのものであり、抗体はジヌツキシマブ（Ｕｎｉｔｕｘｉｎ（商標））である。
【０５７９】
いくつかの実施形態では、本方法は、卵巣上皮／卵管／原発性腹膜がんを治療するためのものであり、抗体は、ベバシズマブ（アバスチン（登録商標））である。
【０５８０】
いくつかの実施形態では、方法は、膵臓がんを処置するためのものであり、抗体は、セツキシマブ（Ｅｒｂｉｔｕｘ（登録商標））又はベバシズマブ（Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標））である。
【０５８１】
いくつかの実施形態では、方法は、皮膚がんを処置するためのものであり、抗体は、イピリムマブ（Ｙｅｒｖｏｙ（登録商標））、ペンブロリズマブ（Ｋｅｙｔｒｕｄａ（登録商標））、アベルマブ（Ｂａｖｅｎｃｉｏ（登録商標））又はニボルマブ（Ｏｐｄｉｖｏ（登録商標））である。
【０５８２】
いくつかの実施形態では、方法は、軟部組織肉腫を治療するためのものであり、抗体はオララツマブ（Ｌａｒｔｒｕｖｏ（商標））である。
【０５８３】
いくつかの実施形態では、対象は、本明細書に記載されるｇ－ＮＫ細胞の集団及び有効用量の二重特異性抗体を投与される。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体は第１の結合ドメイン及び第２の結合ドメインを含み、第１の結合ドメインは免疫細胞、例えばＮＫ細胞又はマクロファージ上の表面抗原に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、第１の結合ドメインは、ＮＫ細胞又はマクロファージ上の活性化受容体、例えばＣＤ１６（ＣＤ１６ａ）に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、第２の結合ドメインは、腫瘍関連抗原に特異的に結合する。標的とする腫瘍関連抗原は、がんの種類に基づいて選択することができ、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ３０、ＣＤ３３、ＣＤ３７、ＣＤ３８、ＣＤ４０、ＣＤ５２、ＣＤ５６、ＣＤ７０、ＣＤ７４、ＣＤ１４０、ＥｐＣＡＭ、ＣＥＡ、ｇｐＡ３３、メソテリン、α－フェトプロテイン、ムチン、ＰＤＧＦＲ－α、ＴＡＧ－７２、ＣＡＩＸ、ＰＳＭＡ、葉酸結合タンパク質、散乱因子受容体キナーゼ、ガングリオシド、サイトケラチン、縮れた受容体、ＶＥＧＦ、ＶＥＧＦＲ、インテグリンαＶβ３、インテグリンα５β１、ＥＧＦＲ、ＥＧＦＬ７、ＥＲＢＢ２（ＨＥＲ２）、ＥＲＢＢ３、フィブロネクチン、ＨＧＦ、ＨＥＲ３、ＬＯＸＬ２、ＭＥＴ、ＩＧＦ１Ｒ、ＩＧＬＦ２、ＥＰＨＡ３、ＦＲ－α、ホスファチジルセリン、シンデカン１、ＳＬＡＭＦ７（ＣＤ３１９）、ＴＲＡＩＬＲ１、ＴＲＡＩＬＲ２、ＲＡＮＫＬ、ＦＡＰ、ビメンチン又はテネイシンが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、第１の結合ドメインは、ＣＤ１６に特異的に結合し、第２の結合ドメインは、ＣＤ３０に特異的に結合する。
【０５８４】
操作されたｇＮＫ細胞及び追加の薬剤は、連続して又は同時に投与され得る。いくつかの実施形態では、追加の薬剤は、ｇＮＫ細胞の投与前に投与され得る。いくつかの実施形態では、追加の薬剤は、操作されたｇＮＫ細胞の投与後に投与することができる。例えば、操作されたｇＮＫ細胞は、選択されたがん型に特異的な抗体と同時に投与することができる。あるいは、操作されたｇＮＫ細胞は、選択されたがん型に特異的な抗体が投与される時間とは異なる選択された時間に投与することができる。

【０５８５】
特定の例において、対象は、操作されたｇＮＫ細胞を含有する集団の前、後、又は実質的に同時に、有効用量の抗体を投与される。いくつかの例において、対象は、約０．１ｍｇ／ｋｇ～約１００ｍｇ／ｋｇの抗体（例えば、約０．５～１０ｍｇ／ｋｇ、約１～２０ｍｇ／ｋｇ、約１０～５０ｍｇ／ｋｇ、約２０～１００ｍｇ／ｋｇ、例えば、約０．５ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ、約２ｍｇ／ｋｇ、約３ｍｇ／ｋｇ、約４ｍｇ／ｋｇ、約５ｍｇ／ｋｇ、約８ｍｇ／ｋｇ、約１０ｍｇ／ｋｇ、約１６ｍｇ／ｋｇ、約２０ｍｇ／ｋｇ、約２４ｍｇ／ｋｇ、約３６ｍｇ／ｋｇ、約４８ｍｇ／ｋｇ、約６０ｍｇ／ｋｇ、約７５ｍｇ／ｋｇ、又は約１００ｍｇ／ｋｇ）を投与される。抗体の有効量は、特定の抗体、特定の疾患又は状態（例えば、腫瘍又は他の障害）、対象の全身状態、対象が受けている又は以前に受けた任意の追加の治療、及び他の関連因子を考慮に入れて、熟練した臨床医によって選択され得る。対象には、本明細書に記載される操作されたｇＮＫ細胞を含有する集団も投与される。抗体及び操作されたｇＮＫ細胞の集団の両方は、典型的には、非経口的に、例えば静脈内に投与される、しかし、腫瘍もしくは腫瘍の近くへの注射もしくは注入（局所投与）又は腹膜腔への投与も使用することができる。当業者は、適切な投与経路を決定することができる。

【０５８６】
いくつかの実施形態では、ウイルスの処置のための対象は、ウイルスに対する１つ以上の抗体ならびに本明細書に記載されるｇ－ＮＫ細胞の集団の有効用量を投与される。いくつかの実施形態では、１つ以上の抗体は、スパイク糖タンパク質、例えば、ＳＡＲＳ－Ｃｏｖ－２のスパイク糖タンパク質に結合する抗体である。いくつかの実施形態では、対象には、本明細書に記載の操作されたｇ－ＮＫ細胞を含有する集団、ならびに有効用量のＦｃ融合タンパク質、例えば組換えＡＣＥ２－Ｆｃ融合タンパク質が投与される。いくつかの実施形態では、対象に、本明細書に記載のｇ－ＮＫ細胞の集団及びウイルスに対する抗体、例えば、ＳＡＲＳ－Ｃｏｖ－２に対する抗体を含有する血清を投与する。いくつかの実施形態では、血清は、同じウイルスによって引き起こされた感染から回復している患者から収集された回復期血清である。いくつかの実施形態では、同じウイルスによって引き起こされる感染から回復している複数の患者からの回復期血清が収集され、組み合わされ、本明細書に記載される操作されたｇ－ＮＫ細胞を含有する集団と共に、それを必要とする対象に投与される。

【０５８７】
２．サイトカイン及び成長因子
本明細書に提供されるいくつかの実施形態では、操作されたｇＮＫ細胞又はそれを含有する組成物は、サイトカイン及び／又は増殖因子と組み合わせて個体に投与され得る。本明細書に提供されるいくつかの実施形態では、操作されたｇＮＫ細胞又はそれを含有する組成物は、更なる外因的に投与されるサイトカイン及び／又は増殖因子と組み合わせて個体に投与され得る。サイトカインはＮＫ細胞活性に必要であるので、典型的な方法は、外因性サイトカインサポートとしてのＮＫ細胞療法と組み合わせて対象に外因性サイトカインを投与することを含む。

【０５８８】
いくつかの実施形態によれば、少なくとも１つの成長因子又はサイトカインは、ＳＣＦ、ＦＬＴ３、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－１２、ＩＬ－２１、及びＩＬ－２７からなる群から選択される成長因子を含む。

【０５８９】
いくつかの実施形態では、少なくとも１つのサイトカインが、操作されたｇ－ＮＫ細胞又はその組成物の投与と組み合わせて対象に投与される。

【０５９０】
サイトカインは、細胞シグナル伝達において、特に免疫系との関連で重要な役割を果たす広範なクラスのタンパク質である。サイトカインは、免疫調節物質として、自己分泌、パラ分泌、及び内分泌シグナル伝達において役割を果たすことが示されている。サイトカ

インは、免疫媒介性応答を刺激する免疫活性化物質として、又は免疫媒介性応答を弱める免疫抑制物質として機能し得る。サイトカインには、ケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、リンフォンカイン、及び腫瘍壊死因子が含まれるが、一般にホルモン又は成長因子は含まれない。

【０５９１】

いくつかの実施形態では、サイトカインはインターロイキンである。インターロイキンは、一般に分泌タンパク質であり、広範囲の免疫応答を媒介するシグナル分子であるサイトカイン群である。例えば、インターロイキン（ＩＬ）－２は、白血球の活性の調節において役割を果たし、一方、インターロイキン（ＩＬ）－１５は、自然免疫系及び適応免疫系の両方の細胞の活性を調節することによって、微生物の侵入物及び寄生生物に対する炎症性免疫応答及び防御免疫応答の発生において主要な役割を果たす。いくつかの実施形態では、提供されるｇ－ＮＫ細胞を含むＮＫ細胞の１つ以上の活性は、ＩＬ－２、ＩＬ－２１及び／もしくはＩＬ－１５、又は記載される別のサイトカインによって調節される。

【０５９２】

いくつかの実施形態では、インターロイキンは、リンパ球、単球又はマクロファージなどの免疫細胞によって産生されるサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＮＫ細胞の生存、活性化及び／又は増殖の促進など、ＮＫ細胞を誘導するために使用することができる免疫活性化サイトカインである。例えば、ＩＬ－１５又はＩＬ－２１などの特定のサイトカインは、エクスビボ又はインビボで増殖するそれらの能力を改善することなどによって、ＮＫ細胞が老化を受けるのを防止又は低減し得る。いくつかの実施形態では、インターロイキン又はその機能的部分は、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、ＩＬ－１１、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、又はＩＬ－２１のうちの１つ以上の部分ペプチド又は完全ペプチドである。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、Ｆｌｔ３－Ｌ、ＳＣＦ、又はＩＬ－７である。いくつかの実施形態では、サイトカインはＩＬ－２である。いくつかの実施形態では、サイトカインはＩＬ－１２である。いくつかの実施形態では、サイトカインはＩＬ－１５である。いくつかの実施形態では、サイトカインはＩＬ－２１である。いくつかの実施形態、サイトカインは、サイトカインに対するそれぞれの受容体と共に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、操作されたｇ－ＮＫ細胞と共にサイトカインを投与することは、サイトカインシグナル伝達を可能にし、それによって、ＮＫ細胞の細胞成長、増殖、増殖及び／又はエフェクター機能を維持又は改善する。

【０５９３】

特定の実施形態では、組換えＩＬ－２が対象に投与される。他の特定の実施形態では、組換えＩＬ－１５が対象に投与される。他の特定の実施形態では、組換えＩＬ－２１が対象に投与される。

【０５９４】

いくつかの実施形態では、サイトカインはＩＬ－１５又はその機能的部分である。ＩＬ－１５は、ＮＫ細胞の活性化及び増殖を調節するサイトカインである。いくつかの場合において、ＩＬ－１５及びＩＬ－１２は、類似の生物学的活性を共有する。例えば、ＩＬ－１５及びＩＬ－２は、共通の受容体サブユニットに結合し、そして同じ受容体について競合し得る。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、ＪＡＫキナーゼの活性化、ならびに転写活性化剤ＳＴＡＴ３、ＳＴＡＴ５、及びＳＴＡＴ６のリン酸化及び活性化を誘導する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、ＮＫ細胞生存の促進、ＮＫ細胞及びＴ細胞の活性化及び増殖の調節、ならびに造血幹細胞からのＮＫ細胞発生の支持などの、ＮＫ細胞の１つ以上の機能的活性を促進又は調節する。いくつかの実施形態では、機能的部分は、ＮＫ細胞生存の促進、ＮＫ細胞及びＴ細胞の活性化及び増殖の調節、ならびに造血幹細胞からのＮＫ細胞発生の支持などの、全長又は成熟ＩＬ－１５の１つ以上の機能を保持するＩＬ－１５の一部分（例えば、全長ＩＬ－１５のアミノ酸の切断された連続配列を含有する）である。ＩＬ－１５の全部又は機能的部分を対象に投与することができる。

【０５９５】
当業者によって理解されるように、種々のＩＬ－１５分子の配列は、当該分野で公知である。一態様では、ＩＬ－１５は野生型ＩＬ－１５である。いくつかの態様では、ＩＬ－１５は、哺乳動物ＩＬ－１５（例えば、ヒトインターロイキン１５（ＩＬ１５）、転写変異体３、ｍＲＮＡ、ＮＣＢＩ参照配列：ＮＭ＿０００５８５．４、Ｃａｎｉｓ ｌｕｐｕｓ ｆａｍｉｌｉａｒｉｓインターロイキン１５（ＩＬ１５）、ｍＲＮＡ、ＮＣＢＩ参照配列：ＮＭ＿００１１９７１８８．１、Ｆｅｌｉｓ ｃａｔｕｓインターロイキン１５（ＩＬ１５）、ｍＲＮＡ、ＮＣＢＩ参照配列：ＮＭ＿００１００９２０７．１）である。「哺乳動物」の例としては、霊長類（例えば、ヒト）、イヌ、ネコ、げっ歯類、ブタ、反芻動物などが挙げられる。具体例としては、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、モルモット、ラット及びマウスが挙げられる。特定の態様では、哺乳動物ＩＬ－１５はヒトＩＬ－１５である。ヒトＩＬ－１５アミノ酸配列としては、例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＲ＿７５１９１５．１、ＮＰ＿０００５７６．１、ＡＡＩ００９６３．１、ＡＡＩ００９６４．１、ＡＡＩ００９６２．１、ＣＡＡ７１０４４．１、ＡＡＨ１８１４９．１、ＡＡＢ９７５１８．１、ＣＡＡ６３９１４．１、及びＣＡＡ６３９１３．１が挙げられる。

【０５９６】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ヌクレオチド配列は、配列番号９に示されるか、又は配列番号９に対して少なくとも８５％又は少なくとも約８５％、少なくとも９０％又は少なくとも約９０％、少なくとも９５％又は少なくとも約９５％、もしくは少なくとも９８％又は少なくとも約９８％の配列同一性を有する配列である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、シグナルペプチド配列を欠き、いくつかの場合にはプロペプチド配列も欠く成熟形態である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、配列番号２に示されるアミノ酸の配列、又は配列番号２に対して少なくとも８５％又は少なくとも約８５％、少なくとも９０％又は少なくとも約９０％、少なくとも９５％又は少なくとも約９５％、もしくは少なくとも９８％又は少なくとも約９８％の配列同一性を有する配列を有する。

【０５９７】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５分子は、例えば、ヒトＩＬ－１５アミノ酸配列に対する１つ以上のアミノ酸改変、例えば置換を有する、ヒトＩＬ－５の変異体である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５変異体は、例えば、米国特許出願公開第２０１６／０１８４３９９号に記載されているように、４５位、５１位、５２位、又は７２位に突然変異を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５変異体は、Ｎ、Ｓ又はＬからＤ、Ｅ、Ａ、Ｙ又はＰのうちの１つへの置換を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、突然変異は、Ｌ４５Ｄ、Ｌ４５Ｅ、Ｓ５１Ｄ、Ｌ５２Ｄ、Ｎ７２Ｄ、Ｎ７２Ｅ、Ｎ７２Ａ、Ｎ７２Ｓ、Ｎ７２Ｙ、又はＮ７２Ｐ（ヒトＩＬ－１５の配列、配列番号２に関して）から選択される。

【０５９８】
実施形態において、ＩＬ－１５分子は、ＩＬ－１５変異体、例えば、１つ以上のアミノ酸置換を有するヒトＩＬ－１５ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５分子は、７２位に置換、例えば、ＮからＤへの置換を含む。一実施形態では、ＩＬ－１５分子は、配列番号２のＩＬ－１５Ｎ７２Ｄポリペプチド又はアミノ酸配列に対して少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の同一性を有するアミノ酸配列であり、ＩＬ－１５　Ｒα結合活性を有する。

【０５９９】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、ＩＬ－１５受容体アルファ（ＩＬ１５ＲＡ）と共に、例えば、ＩＬ－１５受容体アルファ（ＩＬ１５ＲＡ）との複合体として、又はＩＬ－１５受容体アルファ（ＩＬ１５ＲＡ）との融合体として投与される。ＩＬ１５ＲＡは、非常に高い親和性でＩＬ－１５に特異的に結合し、他のサブユニットから独立してＩＬ１－５に結合することができる。いくつかの態様では、この特性は、ＩＬ－１５が１つの細胞によって産生され、別の細胞によってエンドサイトーシスされ、次いで第３の細胞に

提示されることを可能にする。いくつかの実施形態では、対象は、ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒａを投与される。いくつかの実施形態では、対象にＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒ融合タンパク質を投与する。いくつかの実施形態では、対象は、単鎖ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒ融合タンパク質を投与される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒａは、可溶性ＩＬ１５Ｒａ．ＩＬ１５複合体である（例えば、Ｍｏｒｔｉｅｒ Ｅ ｅｔ ａｌ．，ＪＢＣ ２００６；Ｂｅｓｓａｒｄ Ａ，Ｍｏｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒ．，２００９；及びＤｅｓｂｏｉｓ Ｍ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，２０１６）。

【０６００】

いくつかの実施形態では、サイトカインはＩＬ－２又はその機能的部分である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－９、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１も含むサイトカインファミリーのメンバーである。ＩＬ－２は、アルファ、ベータ及びガンマと呼ばれる３つの鎖からなる受容体複合体を介してシグナル伝達する。γ鎖は、サイトカイン受容体のこのファミリーの全てのメンバーによって共有される。ＩＬ－２は、ＩＬ－１５と同様に、Ｂ細胞によって産生される免疫グロブリンの産生を促進し、ＮＫ細胞の分化及び増殖を誘導する。ＩＬ－２とＩＬ－１５との間の主な差異は、適応免疫応答において見出される。例えば、ＩＬ－２は、免疫記憶の発達の基礎であるため、外来病原体に対する適応免疫に必要である。一方、ＩＬ－１５は、ＣＤ８メモリーＴ細胞の生存を支持することによって高度に特異的なＴ細胞応答を維持するために必要である。ＩＬ－２の全て又は機能的部分は、膜結合ポリペプチド及び／又は分泌ポリペプチドとして発現され得る。当業者によって理解されるように、種々のＩＬ－２分子の配列は、当該分野で公知である。一態様では、ＩＬ－２は野生型ＩＬ－２である。いくつかの態様では、ＩＬ－２は哺乳動物ＩＬ－２である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ はヒトＩＬ－２である。

【０６０１】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、シグナルペプチド配列を欠き、いくつかの場合にはプロペプチド配列も欠く成熟形態である。いくつかの実施形態、ＩＬ－２は、配列番号１に示されるアミノ酸の配列、又は配列番号１に対して少なくとも８５％又は少なくとも約８５％、少なくとも９０％又は少なくとも約９０％、少なくとも９５％又は少なくとも約９５％、もしくは少なくとも９８％又は少なくとも約９８％の配列同一性を有する配列を有する。

【０６０２】

いくつかの実施形態では、サイトカインはＩＬ－２１又はその機能的部分である。ＩＬ－２１は、ＩＬ－２１受容体（ＩＬ－２１ Ｒ）及び共受容体、共通γ鎖（ＣＤ１３２）に結合する。ＩＬ－２１受容体は、ＮＫ細胞、Ｔ細胞及びＢ細胞上で同定されており、ＩＬ－２１が造血系細胞、特にリンパ系前駆細胞及びリンパ系細胞に作用することを示している。ＩＬ－２１は、細胞傷害性Ｔ細胞及びＮＫ細胞の強力なモジュレーターであることが示されている。（Ｐａｒｒｉｓｈ－Ｎｏｖａｋ，ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ ４０８：５７－６３，２０００；Ｐａｒｒｉｓｈ－Ｎｏｖａｋ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｌｅｕｋ．Ｂｉｏ．７２：８５６－８６３，２０２：Ｃｏｌｌｉｎｓ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｓ．２８：１３１－１４０，２００３；Ｂｒａｄｙ，ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１７２：２０４８－５８，２００４）。マウス研究において、ＩＬ－２１は、ＮＫ細胞の成熟及びエフェクター機能を増強する（Ｋａｓａｉａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ １６：５５９－５６９，２００２）。

【０６０３】

当業者によって理解されるように、種々のＩＬ－２１分子の配列は、当該分野で公知である。一態様では、ＩＬ－２１は野生型ＩＬ－２１である。いくつかの態様では、ＩＬ－２１は哺乳動物ＩＬ－２１である。一実施形態では、ＩＬ－２１配列はヒトＩＬ－２１配列である。ヒトＩＬ－２１アミノ酸配列には、例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＡＡＵ８８１８２．１、ＥＡＸ０５２２６．１、ＣＡＩ９４５００．１、ＣＡＪ４７５２４．１、ＣＡＬ８１２０３．１、ＣＡＮ８７３９９．１、ＣＡＳ０３５２２．１、ＣＡＶ３３２

８８．１、ＣＢＥ７４７５２．１、ＣＢＩ７０４１８．１、ＣＢＩ８５４６９．１、ＣＢＩ８５４７２．１、ＣＢＬ９３９６２．１、ＣＣＡ６３９６２．１、ＡＡＧ２９３４８．１、ＡＡＨ６６２５８．１、ＡＡＨ６６２５９．１、ＡＡＨ６６２６０．１、ＡＡＨ６６２６１．１、ＡＡＨ６６２６２．１、ＡＡＨ６９１２４．１、及びＡＢＧ３６５２９．１が含まれる。

【０６０４】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２１は、シグナルペプチド配列を欠き、いくつかの場合にはプロペプチド配列も欠く成熟形態である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２１は、配列番号３に示されるアミノ酸の配列、又は配列番号３に対して少なくとも８５％又は少なくとも約８５％、少なくとも９０％又は少なくとも約９０％、少なくとも９５％又は少なくとも約９５％、もしくは少なくとも９８％又は少なくとも約９８％の配列同一性を有する配列を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２１は、配列番号４に示されるアミノ酸の配列、又は配列番号４に対して少なくとも８５％又は少なくとも約８５％、少なくとも９０％又は少なくとも約９０％、少なくとも９５％又は少なくとも約９５％、もしくは少なくとも９８％又は少なくとも約９８％の配列同一性を有する配列を有する。

【０６０５】

サイトカイン（例えば、ＩＬ－２、ＩＬ１５、又はＩＬ－２１）アミノ酸配列は、成熟サイトカインの任意の機能的部分、例えば、成熟、ＩＬ－２、成熟、ＩＬ－１５、又は成熟ＩＬ－１５の任意の機能的部分を含み得る。機能的部分は、機能的部分がそれぞれのインターロイキン受容体に特異的に結合するという条件で、それが一部であるインターロイキンの隣接アミノ酸を含む任意の部分であり得る。用語「機能的部分」は、インターロイキンに関して使用される場合、インターロイキンの任意の部分又は断片をいい、この部分又は断片は、それがその一部であるインターロイキン（親インターロイキン）の生物学的活性を保持する。機能的部分は、例えば、それぞれのインターロイキン受容体に特異的に結合する能力を保持し、インターロイキンの下流標的を活性化し、及び／又は免疫細胞、例えば、ＮＫ細胞の分化、増殖（又は死）及び活性の１つ以上を親インターロイキンと同様の程度まで、同じ程度まで、もしくはより高い程度まで誘導するインターロイキンの部分を包含する。インターロイキンの機能的部分の生物学的活性は、当該分野で公知のアッセイを使用して測定され得る。親インターロイキンに関して、機能的部分は、例えば、親成熟インターロイキンのアミノ酸配列の約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、約９５％、又はそれ以上を含むことができる。

【０６０６】

提供される実施形態によるサイトカイン又は機能性部分の範囲に含まれるのは、本明細書に記載されるインターロイキンの機能性変異体である。本明細書で使用される「機能的変異体」という用語は、親インターロイキンに対して実質的又は有意な配列同一性又は類似性を有するインターロイキンを指し、この機能的変異体は、それが変異体であるインターロイキンの生物学的活性を保持する。機能的変異体は、例えば、それぞれのインターロイキン受容体に特異的に結合する能力を保持し、インターロイキンの下流標的を活性化し、及び／又は免疫細胞、例えば、ＮＫ細胞の分化、増殖（又は死）及び活性の１つ以上を親インターロイキンと同様の程度まで、同じ程度まで、もしくはより高い程度まで誘導する、本明細書に記載されるインターロイキン（親インターロイキン）の変異体を包含する。親インターロイキンに関して、機能的変異体は、例えば、アミノ酸配列において親インターロイキンと少なくとも約８０％、約９０％、約９５％、約９９％又はそれ以上同一であり得る。

【０６０７】

機能的変異体は、例えば、少なくとも１つの保存的アミノ酸置換を有する親インターロイキンのアミノ酸配列を含み得る。あるいは又は更に、機能的変異体は、少なくとも１つの非保存的アミノ酸置換を有する親インターロイキンのアミノ酸配列を含むことができる。いくつかの実施形態では、アミノ酸置換、例えば保存的又は非保存的アミノ酸置換は、親インターロイキン配列と比較して、機能的変異体の生物学的活性を妨害又は阻害しない

。いくつかの実施形態では、アミノ酸置換、例えば保存的又は非保存的アミノ酸置換は、機能的変異体の生物学的活性が親インターロイキンと比較して増加するように、機能的変異体の生物学的活性を増強し得る。

【０６０８】

いくつかの実施形態では、インターロイキンのアミノ酸置換（複数可）は、保存的アミノ酸置換である。保存的アミノ酸置換は、当技術分野において公知であり、特定の物理的及び／又は化学的特性を有する１つのアミノ酸が、同じ又は類似の化学的又は物理的特性を有する別のアミノ酸と交換されるアミノ酸置換を含む。例えば、保存的アミノ酸置換は、別の酸性／負電荷極性アミノ酸（例えば、Ａｓｐ又はＧｌｕ）に置換された酸性／負電荷極性アミノ酸、非極性側鎖を有する別のアミノ酸に置換された非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、Ａｌａ、Ｇｌｙ、Ｖａｌ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、Ｐｒｏ、Ｔｒｐ、Ｃｙｓ、Ｖａｌなど）、別の塩基性／正電荷極性アミノ酸に置換された塩基性／正電荷極性アミノ酸（例えば、Ｌｙｓ、Ｈｉｓ、Ａｒｇなど）、別の極性側鎖を有する非荷電アミノ酸に置換された極性側鎖を有する非荷電アミノ酸（例えば、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｔｙｒなど）、別のβ分岐側鎖を有するアミノ酸に置換されたβ分岐側鎖を有するアミノ酸（例えば、Ｉｌｅ、Ｔｈｒ、及びＶａｌ）、別の芳香族側鎖を有するアミノ酸に置換された芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、Ｈｉｓ、Ｐｈｅ、Ｔｒｐ、及びＴｙｒ）などであってもよい。

【０６０９】

いくつかの実施形態では、提供される操作されたｇＮＫ細胞組成物及びサイトカイン又は成長因子の用量は、逐次的に投与される。例えば、ｇＮＫ細胞を最初に投与し、続いてサイトカイン及び／又は増殖因子を投与することができる。いくつかの実施形態では、操作されたｇＮＫ細胞を含有する細胞の用量は、サイトカイン又は増殖因子と同時に投与される。

【０６１０】

いくつかの実施形態では、対象は、ＮＫ細胞の生存及び／又は増殖を支持するために、１つ以上のサイトカイン（ＩＬ－２、ＩＬ１５、ＩＬ－２１、ＩＬ－２７、及び／又はＩＬ－１２など）を投与される。サイトカインは、ＮＫ細胞の前、後、又は実質的に同時に投与することができる。いくつかの例は、サイトカインは、ＮＫ細胞の後に投与することができる。１つの具体例において、サイトカインは、ＮＫ細胞の投与の約１～８時間以内（例えば、約１～４時間、約２～６時間、約４～６時間、又は約５～８時間以内）に対象に投与される。

【０６１１】

３．リンパ球枯渇療法の細胞傷害性剤

いくつかの実施形態では、提供される方法はまた、操作されたｇ－ＮＫ細胞を含有する細胞の用量を、別の処置、例えば化学療法剤もしくは細胞傷害性剤又は他の処置と共に投与することを含み得る。

【０６１２】

いくつかの態様では、提供される方法は、操作されたｇ－ＮＫ細胞を含有するｇ－ＮＫ細胞組成物の投与の開始前又は開始と同時などに、１つ以上のリンパ球枯渇療法を投与することを更に含むことができる。いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇療法は、シクロホスファミドなどのホスファミドの投与を含む。いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇療法はフルダラビンの投与を含むことができる。

【０６１３】

いくつかの態様では、対象を免疫枯渇（例えば、リンパ球枯渇）療法でプレコンディショニングすることにより、養子細胞療法（ＡＣＴ）の効果を改善することができる。いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇療法は、シクロスポリン及びフルダラビンの組み合わせを含む。

【０６１４】

そのようなプレコンディショニングは、治療の有効性を弱める可能性がある様々な転帰

のうちの１つ以上のリスクを低減する目的で実行することができる。これらは、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ細胞が、恒常性及び活性化サイトカイン、例えばＩＬ－２、ＩＬ－７、及び／又はＩＬ－１５についてＴＩＬと競合する「サイトカインシンク」として知られる現象、制御性Ｔ細胞、ＮＫ細胞、又は免疫系の他の細胞によるＴＩＬの抑制、腫瘍微小環境における負の調節因子の影響を含む。Ｍｕｒａｎｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｃｌｉｎ　Ｐｒａｃｔ　Ｏｎｃｏｌ．Ｄｅｃｅｍｂｅｒ；３（１２）：６６８－６８１（２００６）。

【０６１５】

したがって、いくつかの実施形態では、提供される方法は、対象にリンパ球枯渇療法を施す段階を更に含む。いくつかの実施形態では、方法は、細胞の用量の投与前に対象にリンパ球枯渇療法を投与する段階を含む。いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇療法は、フルダラビン及び／又はシクロホスファミドなどの化学療法剤を含有する。いくつかの実施形態では、細胞の投与及び／又はリンパ球枯渇療法は、外来患者の分娩を介して行われる。

【０６１６】

いくつかの実施形態では、方法は、細胞の用量の投与前に、プレコンディショニング剤、例えばリンパ球枯渇剤又は化学療法剤、例えばシクロホスファミド、フルダラビン、又はそれらの組み合わせを対象に投与することを含む。例えば、対象は、第１の用量又は後続の用量の少なくとも２日前、例えば、少なくとも３、４、５、６、又は７日前に、プレコンディショニング剤、例えば、リンパ枯渇剤又は化学療法剤、例えば、シクロホスファミド、フルダラビン、又はそれらの組み合わせを投与され得る。いくつかの実施形態では、対象は、細胞の用量の投与の７日前以内、例えば、６、５、４、３、又は２日前以内に、プレコンディショニング剤、例えば、リンパ枯渇剤又は化学療法剤、例えば、シクロホスファミド、フルダラビン、又はそれらの組み合わせを投与される。いくつかの実施形態では、対象は、細胞の用量の投与の１４日前以内、例えば、１３、１２、１１、１０、９又は８日前以内に、プレコンディショニング剤、例えば、リンパ枯渇剤又は化学療法剤、例えば、シクロホスファミド、フルダラビン、又はそれらの組み合わせを投与される。

【０６１７】

いくつかの実施形態では、対象は、２０ｍｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇ又は約２０ｍｇ／ｋｇ～約１００ｍｇ／ｋｇ、例えば４０ｍｇ／ｋｇ～８０ｍｇ／ｋｇ又は約４０ｍｇ／ｋｇ～約８０ｍｇ／ｋｇの用量のシクロホスファミドでプレコンディショニングされる。いくつかの態様において、対象は、６０ｍｇ／ｋｇ又は約６０ｍｇ／ｋｇのシクロホスファミドでプレコンディショニングされる。いくつかの実施形態では、フルダラビンは、単回用量で投与され得るか、又は複数回用量で投与され得る（例えば、毎日、１日おき、又は３日おきに与えられる）。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、１日１回、１日又は２日間投与される。

【０６１８】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇剤がフルダラビンを含む場合、対象にフルダラビンを１ｍｇ／ｍ^2～１００ｍｇ／ｍ^{2}又は約１ｍｇ／ｍ^2～約１００ｍｇ／ｍ^2、例えば１０ｍｇ／ｍ^2～７５ｍｇ／ｍ^{2}又は約１０ｍｇ／ｍ^2～約７５ｍｇ／ｍ^2、１５ｍｇ／ｍ^2～５０ｍｇ／ｍ^{2}又は約１５ｍｇ／ｍ^2～約５０ｍｇ／ｍ^2、２０ｍｇ／ｍ^2～３０ｍｇ／ｍ^{2}又は約２０ｍｇ／ｍ^2～約３０ｍｇ／ｍ^2、もしくは２４ｍｇ／ｍ^2～２６ｍｇ／ｍ^{2}又は約２４ｍｇ／ｍ^2～約２６ｍｇ／ｍ^{2}の用量で投与する。いくつかの例において、対象は、２５ｍｇ／ｍ^{2}のフルダラビンを投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビンは、単回用量で投与され得るか、又は複数回用量で投与され得る（例えば、毎日、１日おき、又は３日おきに与えられる）。いくつかの実施形態では、フルダラビンは、毎日、例えば１～５日間、例えば３～５日間投与される。

【０６１９】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇剤は、シクロホスファミド及びフルダラビンの組み合わせなどの薬剤の組み合わせを含む。したがって、薬剤の組み合わせは、上記のものなどの任意の用量又は投与スケジュールのシクロホスファミド、及び上記のものなどの

任意の用量又は投与スケジュールのフルダラビンを含むことができる。例えば、いくつかの態様では、細胞の投与前に、対象に６０ｍｇ／ｋｇ（約２ｇ／ｍ^2）のシクロホスファミド及び２５ｍｇ／ｍ$_2$のフルダラビンを３～５回投与する。

【０６２０】

いくつかの実施形態では、ｇ－ＮＫ細胞の用量の投与前に、対象はリンパ球枯渇療法を受けている。いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇療法は、フルダラビン及び／又はシクロホスファミドを含む。いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、フルダラビンを対象の体表面積で２０～４０ｍｇ／ｍ^{2}もしくは約２０～約４０ｍｇ／ｍ^2、任意選択で、３０ｍｇ／ｍ^{2}もしくは約３０ｍｇ／ｍ^{2}で、毎日２～４日間投与すること、及び／又はシクロホスファミドを対象の体表面積で２００～４００ｍｇ／ｍ^{2}もしくは約２００～約４００ｍｇ／ｍ^2、任意選択で、３００ｍｇ／ｍ^{2}もしくは約３００ｍｇ／ｍ^{2}で、毎日２～４日間投与することを含む。

【０６２１】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇療法はフルダラビン及びシクロホスファミドを含む。いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇療法は、フルダラビンを対象の体表面積で３０ｍｇ／ｍ^{2}又は約３０ｍｇ／ｍ^{2}で毎日投与し、シクロホスファミドを対象の体表面積で３００ｍｇ／ｍ^{2}又は約３００ｍｇ／ｍ^{2}で毎日、それぞれ２～４日間、任意選択で３日間投与することが含まれる。

【０６２２】

いくつかの実施形態では、細胞の用量の注入前のプレコンディショニング剤の投与は、処置の転帰を改善する。例えば、いくつかの態様では、プレコンディショニング、例えば、リンパ枯渇剤又は化学療法剤、例えば、シクロホスファミド、フルダラビン、又はそれらの組み合わせは、用量による処置の有効性を改善するか、又は対象におけるＮＫ細胞の持続性を増加させる。いくつかの実施形態では、プレコンディショニング処置は、無病生存期間、例えば、生存しており、細胞の投与後の所与の期間後に最小限の残存又は分子的に検出可能な疾患を示さない対象のパーセントを増加させる。いくつかの実施形態では、無病生存期間中央値までの時間が増加する。

【０６２３】

細胞が対象（例えば、ヒト）に投与されると、いくつかの態様における操作された細胞集団の生物学的活性は、いくつかの公知の方法のいずれかによって測定される。評価するパラメータには、例えば画像化によるインビボ、又は例えばＥＬＩＳＡ又はフローサイトメトリーによるエクスビボでの、抗原に対する操作された又は天然のＴ細胞又は他の免疫細胞の特異的結合が含まれる。特定の実施形態では、ＮＫ細胞の標的細胞破壊能は、例えば、Ｋｏｃｈｅｎｄｅｒｆｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ３２（７）：６８９－７０２（２００９）、及びＨｅｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ，２８５（１）：２５－４０（２００４）に記載されている細胞傷害性アッセイなどの、当技術分野で公知の任意の適切な方法を使用して測定することができる。特定の実施形態において、細胞の生物学的活性はまた、特定のサイトカイン又は他のエフェクター分子（例えば、ＣＤ１０７ａ、ＩＦＮγ、及びＴＮＦ）の発現及び／又は分泌をアッセイすることによって測定され得る。いくつかの態様では、生物学的活性は、腫瘍量又は腫瘍負荷の低減などの臨床転帰を評価することによって測定される。いくつかの態様では、毒性転帰、細胞の持続及び／もしくは増殖、ならびに／又は宿主免疫応答の存在もしくは非存在が評価される。

【０６２４】

ＶＩＩＩ．例示的な実施形態

提供される実施形態には以下のものがある。

１．ＦｃＲγ鎖の発現が欠損しており（ｇ－ＮＫ細胞）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする異種核酸を含む、操作されたナチュラルキラー（ＮＫ）細胞。

２．ＣＡＲが、１）抗原結合ドメインと、２）可撓性リンカーと、３）膜貫通領域と、４）細胞内シグナル伝達ドメインと、を含む、実施形態１に記載の操作されたＮＫ細胞。

３．抗原結合ドメインが、腫瘍抗原を標的とする、実施形態２に記載の操作されたＮＫ細胞。

４．抗原結合ドメインが一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）である、実施形態２又は３に記載の操作されたＮＫ細胞。

５．細胞内シグナル伝達ドメインが、一次シグナル伝達ドメイン及び共刺激シグナル伝達ドメインを含む、実施形態２～４のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。

６．細胞内シグナル伝達ドメインが、ＣＤ３ζ、ＤＡＰ１０、ＤＡＰ１２、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、又はＯＸ４０のうちの１つ以上のシグナル伝達ドメインを含む、実施形態２～５のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。

７．細胞内シグナル伝達ドメインが、ＣＤ３ζ、ＤＡＰ１０、ＤＡＰ１２、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、又はＯＸ４０のうちの２つ以上のシグナル伝達ドメインを含む、実施形態２～５のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。

８．ＣＡＲをコードする異種核酸が、細胞のゲノムに安定に組み込まれている、実施形態１～７のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。

９．ＣＡＲをコードする異種核酸が一過性に発現される、実施形態１～７のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。

１０．ｇ－ＮＫ細胞が、ＣＤ１６^{pos}／ＣＤ５７^{pos}／ＣＤ７^{dim}／^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である表面表現型を有する、実施形態１～９のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。

１１．ｇ－ＮＫ細胞が、ＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である表面表現型を更に有する、実施形態１～１０のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。

１２．ｇ－ＮＫ細胞が更にＣＤ３８^{neg}である、実施形態１～１１のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。

１３．ｇ－ＮＫ細胞が、更にＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}である表面表現型を有する、実施形態１～１２のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。

１４．ｇ－ＮＫ細胞が、ＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｖ（Ｖ１５８）を含む、実施形態１～１３のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。

１５．ｇ－ＮＫ細胞が、ＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｆである、実施形態１～１３のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。

１６．実施形態１～１５のいずれか１つに記載の操作されたｇ－ＮＫ細胞を複数含む、組成物。

１７．組成物中のＮＫ細胞又は総細胞の５０％超又は約５０％超が、ｇ－ＮＫ細胞である、実施形態１６に記載の組成物。

１８．組成物中のＮＫ細胞又は総細胞の６０％超又は約６０％超が、ｇ－ＮＫ細胞である、実施形態１６に記載の組成物。

１９．組成物中のＮＫ細胞又は総細胞の７０％超又は約７０％超が、ｇ－ＮＫ細胞である、実施形態１６に記載の組成物。

２０．組成物中のＮＫ細胞又は総細胞の８０％超又は約８０％超が、ｇ－ＮＫ細胞である、実施形態１６に記載の組成物。

２１．組成物中のＮＫ細胞又は総細胞の９０％超又は約９０％超が、ｇ－ＮＫ細胞である、実施形態１６に記載の組成物。

２２．組成物中のＮＫ細胞又は総細胞の９５％超又は約９５％超が、ｇ－ＮＫ細胞である、実施形態１６に記載の組成物。

２３．複数の操作されたｇ－ＮＫ細胞が、２０％超もしくは約２０％超、３０％超もしくは約３０％超、４０％超もしくは約４０％超、５０％超もしくは約５０％超、６０％超もしくは約６０％超、又は７０％超もしくは約７０％超の、ＣＡＲをコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を構成する、実施形態１６～２２のいずれか１つに記載の組成物。

２４．総組成物が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を、２０％超もしくは約２０％超、３０％超もしくは約３０％超、４０％超もしくは約４０％超、５０％超もしくは約５０％超、６０％超もしくは約６０％超、又は７０％超もしくは約７０％超含

む、実施形態１６～２３のいずれか１つに記載の組成物。
２５．ｇ－ＮＫ細胞の７０％超又は約７０％超がパーフォリンについて陽性であり、ｇ－ＮＫ細胞の７０％超又は約７０％超がグランザイムＢについて陽性である、実施形態１６～２４のいずれか１つに記載の組成物。
２６．ｇ－ＮＫ細胞の８０％超又は約８０％超がパーフォリンについて陽性であり、ｇ－ＮＫ細胞の８０％超又は約８０％超がグランザイムＢについて陽性である、実施形態１６～２５のいずれか１つに記載の組成物。
２７．ｇ－ＮＫ細胞の９０％超又は約９０％超がパーフォリンについて陽性であり、ｇ－ＮＫ細胞の９０％超又は約９０％超がグランザイムＢについて陽性である、実施形態１６～２６のいずれか１つに記載の組成物。
２８．ｇ－ＮＫ細胞の９５％超又は約９５％超がパーフォリンについて陽性であり、ｇ－ＮＫ細胞の９５％超又は約９５％超がグランザイムＢについて陽性である、実施形態１６～２７のいずれか１つに記載の組成物。
２９．パーフォリンについて陽性である細胞のうち、細胞は、細胞内フローサイトメトリーによって測定した場合、すなわち平均蛍光強度（ＭＦＩ）に基づいて、ＦｃＲγ^{pos}である細胞によって発現されるパーフォリンの平均レベルの少なくとも２倍又は約２倍である、平均レベルのパーフォリンを発現し、かつ／又は
グランザイムＢについて陽性である細胞のうち、細胞は、細胞内フローサイトメトリーによって測定した場合、すなわち平均蛍光強度（ＭＦＩ）に基づいて、ＦｃＲγ^{pos}である細胞によって発現されるグランザイムＢの平均レベルの少なくとも２倍又は約２倍である、グランザイムＢの平均レベルを発現する、実施形態２５～２８のいずれか１つに記載の組成物。
３０．組成物中の細胞の１０％超が、任意選択でＣＤ１０７ａ発現によって測定される、腫瘍標的細胞に対する脱顆粒が可能であり、任意選択で脱顆粒が、腫瘍標的細胞に対する抗体の非存在下で測定される、実施形態１６～２９のいずれか１つに記載の組成物。
３１．組成物中の細胞の１０％超が、腫瘍標的細胞に対してインターフェロン－γ又はＴＮＦ－αを産生することができ、任意選択で、インターフェロン－γ又はＴＮＦ－αが、腫瘍標的細胞に対する抗体の非存在下で測定される、実施形態１６～３０のいずれか１つに記載の組成物。
３２．組成物中の細胞のうち、１５％超もしくは約１５％超、２０％超もしくは約２０％超、３０％超もしくは約３０％超、４０％超もしくは約４０％超、又は５０％超もしくは約５０％超が、標的抗原及び標的抗原に対する抗体（抗標的抗体）を発現する細胞（標的細胞）の存在下でエフェクターサイトカインを産生する、実施形態１６～３１のいずれか１つに記載の組成物。
３３．組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、３０％超もしくは約３０％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）、かつ／又は５０％超もしくは約５０％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａ ^{neg}）、実施形態１６～３３のいずれか１つに記載の組成物。
３４．組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、３５％超もしくは約３５％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）、かつ／又は６０％超もしくは約６０％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａ ^{neg}）、実施形態１６～３３のいずれか１つに記載の組成物。
３５．組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、４０％超もしくは約４０％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）、かつ／又は７０％超もしくは約７０％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａ^{neg}）、実施形態１６～３４のいずれか１つに記載の組成物。
３６．組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、４５％超もしくは約４５％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）、かつ／又は８０％超もしくは約８０％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａ ^{neg}）、実施形態１６～３５のいずれか１つに記載の組成物。

３７．組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、５０％超もしくは約５０％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）、かつ／又は８５％超もしくは約８５％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａ ^{neg}）、実施形態１６～３４のいずれか１つに記載の組成物。

３８．組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、５５％超もしくは約５５％超が、ＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃ：^{pos}）、かつ／又は９０％超もしくは約９０％超が、ＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａ：^{neg}）、実施形態１６～３４のいずれか１つに記載の組成物。

３９．組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、６０％超もしくは約６０％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）、かつ／又は９５％超もしくは約９５％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａ ^{neg}）、実施形態１６～３４のいずれか１つに記載の組成物。

４０．組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、５０％超もしくは約５０％超、６０％超もしくは約６０％超、７０％超もしくは約７０％超、８０％超もしくは約８０％超、又は９０％超もしくは約９０％超がＣＤ３８^{neg}である、実施形態１６～３９のいずれか１つに記載の組成物。

４１．組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、５０％超もしくは約５０％超、６０％超もしくは約６０％超、７０％超もしくは約７０％超、８０％超もしくは約８０％超、又は９０％超もしくは約９０％超が、ＣＤ１６^{pos}／ＣＤ５７^{pos}／ＣＤ７^{dim}／^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である、実施形態１６～３９のいずれか１つに記載の組成物。

４２．組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、５０％超もしくは約５０％超、６０％超もしくは約６０％超、７０％超もしくは約７０％超、８０％超もしくは約８０％超、又は９０％超もしくは約９０％超が、ＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である、実施形態１６～３９のいずれか１つに記載の組成物。

４３．複数のｇ－ＮＫ細胞が、ＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｖ（Ｖ１５８）である、実施形態１６～４２のいずれか１つに記載の組成物。

４４．複数のｇ－ＮＫ細胞がＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｆである、実施形態１６～４２のいずれか１つに記載の組成物。

４５．少なくとも又は少なくとも約10^8個の細胞を含む、実施形態１６～４４のいずれか１つに記載の組成物。

４６．組成物中のｇ－ＮＫ細胞の数が10^8もしくは約10^8から、10^{12}もしくは約10^{12}個の細胞、10^8もしくは約10^8から、10^{11}もしくは約10^{11}個の細胞、10^8もしくは約10^8から、10^{10}もしくは約10^{10}個の細胞、10^8もしくは約10^8から、10^9もしくは約10^9個の細胞、10^9もしくは約10^9から、10^{12}もしくは約10^{12}個の細胞、10^9もしくは約10^9から、10^{11}もしくは約10^{11}個の細胞、10^9もしくは約10^9から、10^{10}もしくは約10^{10}個の細胞、10^{10}もしくは約10^{10}から、10^{12}もしくは約10^{12}個の細胞、10^{10}もしくは約10^{10}から、10^{11}もしくは約10^{11}個の細胞、又は10^{11}もしくは約10^{11}から、10^{12}もしくは約10^{12}個の細胞である、実施形態１６～４５のいずれか１つに記載の組成物。

４７．組成物中のｇ－ＮＫ細胞の数が、５×10^8もしくは約５×10^8個の細胞、１×10^9もしくは約１×10^9個の細胞、５×10^{10}もしくは約５×10^{10}個の細胞、又は１×10^{10}もしくは約１×10^{10}個の細胞である、実施形態１６～４６のいずれか１つに記載の組成物。

４８．組成物の体積が、５０ｍＬ又は約５０ｍＬから、５００ｍＬ又は約５００ｍＬ、任意選択で２００ｍＬ又は約２００ｍＬである、実施形態１６～４７のいずれか１つに記載の組成物。

４９．組成物中の細胞が、同じ生体試料から増殖させた単一のドナー対象由来である、実施形態１６～４８のいずれか１つに記載の組成物。

５０．組成物が医薬組成物である、実施形態１６～４９のいずれか１つに記載の方法。
５１．薬学的に許容される賦形剤を含む、実施形態１６～５０のいずれか１つに記載の組成物。
５２．抗凍結剤を含む無血清凍結保存培地中に製剤化される、実施形態１６～５１のいずれか１つに記載の組成物。
５３．抗凍結剤がＤＭＳＯであり、凍結保存媒体が５％～１０％ＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）である、実施形態５２に記載の組成物。
５４．抗凍結剤が、１０％ＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）であるか、又は約１０％ＤＭＳＯである、実施形態５３に記載の組成物。
５５．滅菌されている、実施形態１６～５４のいずれか１つに記載の組成物。
５６．実施形態１６～５５のいずれか１つに記載の組成物を含む滅菌バッグ。
５７．バッグが凍結保存適合性バッグである、実施形態５６に記載の滅菌バッグ。
５８．ＦｃＲγ鎖の発現が欠損したＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ細胞）に、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする異種核酸を導入することを含む、遺伝子操作されたｇ－ＮＫ細胞を産生する方法。
５９．ＣＡＲが、１）抗原結合ドメイン、２）可撓性リンカー（スペーサー）、３）膜貫通領域と、４）細胞内シグナル伝達ドメインと、を含む、実施形態１に記載の操作されたＮＫ細胞。
６０．抗原結合ドメインが腫瘍抗原を標的とする、実施形態５９に記載の方法。
６１．抗原結合ドメインが一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）である、実施形態５９又は６０に記載の方法。
６２．細胞内シグナル伝達ドメインが、ＣＤ３ζ、ＤＡＰ１０、ＤＡＰ１２、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、又はＯＸ４０由来の１つ以上のシグナル伝達ドメインを含む、実施形態５９～６１のいずれか１つに記載の方法。
６３．細胞内シグナル伝達ドメインが、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、又はＯＸ４０に由来する２つ以上のシグナル伝達ドメインを含む、実施形態５９～６２のいずれか１つに記載の方法。
６４．ＣＡＲをコードする異種核酸が、ｇ－ＮＫ細胞のゲノムへの安定な組込みのための条件下で導入される、実施形態５８～６３のいずれか１つに記載の方法。
６５．ＣＡＲをコードする異種核酸が、ウイルスベクターに含まれ、形質導入によってｇ－ＮＫ細胞に導入される、実施形態５８～６４のいずれか１つに記載の方法。
６６．ウイルスベクターがレンチウイルスベクターである、実施形態６５に記載の方法。
６７．ＣＡＲをコードする核酸が、ｇ－ＮＫ細胞における一過性発現のための条件下で導入される、実施形態５８～６３のいずれか１つに記載の方法。
６８．ＣＡＲをコードする核酸が非ウイルス送達によって導入される、実施形態５８～６３及び６７のいずれか１つに記載の方法。
６９．ＣＡＲをコードする核酸が、脂質ナノ粒子を介してｇ－ＮＫ細胞に導入される、実施形態５８～６３、６７及び６８のいずれか１つに記載の方法。
７０．ＣＡＲをコードする核酸がＤＮＡである、実施形態５８～６９のいずれか１つに記載の方法。
７１．ＣＡＲをコードする核酸がＲＮＡである、実施形態５８～６３及び６７～７９のいずれか１つに記載の方法。
７２．ＲＮＡがｍＲＮＡである、実施形態７１に記載の方法。
７３．ＲＮＡは自己増幅ｍＲＮＡである、実施形態７２に記載の方法。
７４．核酸が、エレクトロポレーションを介してｇ－ＮＫ細胞に導入される、実施形態５８～６３及び６７～７３のいずれか１つに記載の方法。
７５．ｇ－ＮＫ細胞組成物が、
（ｉ）ＣＤ３について陰性もしくは低度かつＣＤ５７について陽性（ＣＤ３^{neg}ＣＤ５７^{pos}）又は（ｉｉ）ＣＤ３について陰性もしくは低度かつＣＤ５６について陽性（Ｃ

Ｄ３^{neg}ＣＤ５６^{pos}）のいずれかである、対象由来の生体試料から濃縮されたＮＫ細胞
のエクスビボ増殖によって産生され、
濃縮されたＮＫ細胞が、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞及び１つ以上の組換えサイトカインと共に培養される、
実施形態５８～７４のいずれか１つに記載の方法。
７６．１つ以上の組換えサイトカインが、有効量のＳＣＦ、ＧＳＫ３ｉ、ＦＬＴ３、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－１２、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２７、又はこれらの組み合わせから選択される、実施形態７５に記載の方法。
７７．培養が２つ以上の組換えサイトカインの存在下で実施され、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、実施形態７５又は実施形態７６の方法。
７８．導入することが、
ＦｃＲγ欠損ＮＫ（ｇ－ＮＫ）細胞を増殖させるための方法
の間に行われ、前記方法が、
（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された集団が、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、
（Ｂ）操作されたＮＫ細胞の集団を、
（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞対　濃縮されたＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び
（２）ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカイン
と共に、培地中で培養することと
を含み、
ＣＡＲをコードする核酸を導入することが、ステップ（Ａ）の後、かつステップ（Ｂ）の前、間、又は後に行われ、それによって、操作されたＮＫ細胞の集団を産生し、及び
方法は、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮され、かつＣＡＲで操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、
実施形態５８～７７のいずれか１つに記載の方法。
７９．導入することが、
ＦｃＲγ欠損ＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ）を増殖させる方法
の間に行われ、前記方法が、
（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された集団が、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、
（Ｂ）濃縮されたＮＫ細胞の集団に、ＣＡＲをコードする核酸を導入することであって、それによって、操作されたＮＫ細胞の集団を産生する、導入することと、
（Ｃ）操作されたＮＫ細胞の集団を、
（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞対　濃縮ＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び
（２）ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以

上の組換えサイトカイン
と共に、培養培地中で培養することであって、それによって、ＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、培養することと
を含み、及び
方法は、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮され、かつＣＡＲで操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、
実施形態５８～７７のいずれか１つに記載の方法。
８０．導入することが、
ＦｃＲγ欠損ＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ）を増殖させる方法
の間に行われ、前記方法が、
（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された集団が、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、
（Ｂ）濃縮されたＮＫ細胞の集団を、
（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞　対　濃縮されたＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び
（２）ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカイン
と共に、培地中で培養することであって、それにより、ＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、培養することと、
（Ｃ）増殖させたＮＫ細胞集団のＮＫ細胞に、ＣＡＲをコードする核酸を導入することと
を含み、
方法は、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮され、ＣＡＲで操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、
実施形態５８～７７のいずれか１つに記載の方法。
８１．導入することが、
ＦｃＲγ欠損ＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ）を増殖させる方法
の間に行われ、前記方法が、
（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された集団が、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、
（Ｂ）濃縮されたＮＫ細胞の集団を、ＮＫ細胞を増殖させるための条件下で培養培地中で培養することを含む第１の増殖を実施することであって、第１の増殖させたＮＫ細胞集団を産生する、実施することと、
（Ｃ）第１の増殖させたＮＫ細胞集団のＮＫ細胞に、ＣＡＲをコードする核酸を導入することであって、それによって、操作されたＮＫ細胞集団を産生する、導入することと、
（Ｄ）ＮＫ細胞の更なる増殖のための条件下で、操作されたＮＫ細胞の集団を培養することを含む第２の増殖を実施することと
を含み、
第１の増殖及び／又は第２の増殖は、濃縮されたＮＫ細胞の集団を、
（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞　対　濃縮されたＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び
（２）ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少

なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカイン
と共に、培地中で培養することを含み、
方法は、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮され、かつＣＡＲで操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、
実施形態５８～７７のいずれか１つに記載の方法。
８２．ＮＫ細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団が、ヒト対象由来の生体試料から、（ｉ）ＣＤ３について陰性もしくは低度かつＣＤ５７について陽性（ＣＤ３^{neg}ＣＤ５７^{pos}）又は（ｉｉ）ＣＤ３について陰性もしくは低度かつＣＤ５６について陽性（ＣＤ３^{neg}ＣＤ５６^{pos}）のいずれかである細胞を選択することによって得られる、実施形態７５～８１のいずれか１つに記載の方法。
８３．ＮＫ細胞について濃縮された集団が、ＮＫＧ２Ｃについて陽性である細胞（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）について更に選択された細胞である、
ＮＫ細胞について濃縮された集団が、ＮＫＧ２Ａについて陰性又は低度である細胞（ＮＫＧ２Ａ^{neg}）について更に選択された細胞である、又は
ＮＫ細胞について濃縮された集団が、ＮＫＧ２Ｃについて陽性であり、ＮＫＧ２Ａについて陰性又は低度である細胞（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}）について更に選択された細胞である、
実施形態８２に記載の方法。
８４．ヒト対象が、対象由来の末梢血試料中のナチュラルキラー（ＮＫ）細胞の少なくとも２０％又は約２０％がＮＫＧ２Ｃについて陽性　（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）でありかつ末梢血試料中のＮＫ細胞の少なくとも７０％がＮＫＧ２Ａについて陰性又は低度である（ＮＫＧ２Ａ^{neg}）対象である、実施形態７５～８３のいずれか１つに記載の方法。
８５．対象がＣＭＶ血清陽性である、実施形態７５～８４のいずれか１つに記載の方法。
８６．対象由来の生体試料中のＮＫ細胞のうちのｇ－ＮＫ細胞の割合が、５％超もしくは約５％超、１０％超もしくは約１０％超、又は３０％超もしくは約３０％超である、実施形態７５～８５のいずれか１つに記載の方法。
８７．濃縮されたＮＫ細胞の集団中のｇ－ＮＫ細胞の割合が、２０％もしくは約２０％から、９０％もしくは約９０％、４０％もしくは約４０％から、９０％もしくは約９０％、又は６０％もしくは約６０％から、９０％もしくは約９０％である、実施形態７５～８６のいずれか１つに記載の方法。
８８．ＮＫ細胞について濃縮された集団が、ＣＤ３について陰性もしくは低度かつＣＤ５７について陽性である、生体試料から選択された細胞（ＣＤ３^{neg}ＣＤ５７^{pos}）である、実施形態７５～８７のいずれか１つに記載の方法。
８９．ＮＫ細胞について濃縮された集団が、ＣＤ３について陰性もしくは低度かつＣＤ５６について陽性である、生体試料から選択された細胞（ＣＤ３^{neg}ＣＤ５６^{pos}）である、実施形態７５～８７のいずれか１つに記載の方法。
９０．２つ以上の組換えサイトカインが、有効量のＳＣＦ、ＧＳＫ３ｉ、ＦＬＴ３、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－１２、ＩＬ－１８、ＩＬ－２７、又はそれらの組み合わせを更に含む、実施形態７７～８９のいずれか１つに記載の方法。
９１．組換えサイトカインがＩＬ－２１及びＩＬ－２である、実施形態７５～８９のいずれか１つに記載の方法。
９２．組換えサイトカインがＩＬ－２１、ＩＬ－２、及びＩＬ－１５である、実施形態７５～９０のいずれか１つに記載の方法。
９３．組換えＩＬ－２１が、培養の少なくとも一部の間に、１０ｎｇ／ｍＬ又は約１０ｎｇ／ｍＬから、１００ｎｇ／ｍＬ又は約１００ｎｇ／ｍＬの濃度で培養培地に添加される、実施形態７５～９２のいずれか１つに記載の方法。
９４．組換えＩＬ－２１が、培養の少なくとも一部の間に、２５ｎｇ／ｍＬ又は約２５

ｎｇ／ｍＬの濃度で培養培地に添加される、実施形態７５～９３のいずれか１つに記載の方法。

９５．組換えＩＬ－２が、培養の少なくとも一部の間に、１０ＩＵ／ｍＬ又は約１０ＩＵ／ｍＬから、５００ＩＵ／ｍＬ又は約５００ＩＵ／ｍＬの濃度で培養培地に添加される、実施形態７５～９４のいずれか１つに記載の方法。

９６．組換えＩＬ－２が、培養の少なくとも一部の間に、１００ＩＵ／ｍＬ又は約１００ＩＵ／ｍＬの濃度で培養培地に添加される、実施形態７５～９５のいずれか１つに記載の方法。

９７．組換えＩＬ－２が、培養の少なくとも一部の間に、５００ＩＵ／ｍＬ又は約５００ＩＵ／ｍＬの濃度で培養培地に添加される、実施形態７５～９６のいずれか１つに記載の方法。

９８．組換えＩＬ－１５が、培養の少なくとも一部の間に、１ｎｇ／ｍＬ又は約１ｎｇ／ｍＬから、５０ｎｇ／ｍＬ又は約５０ｎｇ／ｍＬの濃度で培養培地に添加される、実施形態７５～９０及び９２～９７のいずれか１つに記載の方法。

９９．組換えＩＬ－１５が、培養の少なくとも一部の間に、１０ｎｇ／ｍＬ又は約１０ｎｇ／ｍＬの濃度で培養培地に添加される、実施形態７５～９０及び９２～９７のいずれか１つに記載の方法。

１００．組換えサイトカインが、培養の開始時又はほぼ開始時に培養培地に添加される、実施形態７５～９９のいずれか１つに記載の方法。

１０１．培養中に培養培地を１回以上交換することを更に含み、培養培地の各交換において、組換えサイトカインを含有する新鮮な培地が添加される、実施形態７５～１００のいずれか１つに記載の方法。

１０２．培養培地の交換が、培養の期間中、２日又は３日毎に行われる、実施形態１０１に記載の方法。

１０３．培地の交換が、最大５日間の培地交換を伴わない第１の増殖の後に行われ、任意選択で、最大５日間の培地交換を伴わない第１の増殖の後に行われる、実施形態１０１又は実施形態１０２に記載。

１０４．ヒト対象が、ＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｖ　ＮＫ細胞遺伝子型又はＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｆ　ＮＫ細胞遺伝子型を有し、任意選択で、生体試料が、ＣＤ１６　１５８Ｖ／ＶＮＫ細胞遺伝子型又はＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｆ　ＮＫ細胞遺伝子型について選択されたヒト対象に由来する、実施形態７５～１０３のいずれか１つに記載の方法。

１０５．生体試料が、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）であるか、又はそれを含み、任意選択で血液試料、アフェレーシス試料又は白血球アフェレーシス試料である、実施形態７５～１０４のいずれか１つに記載の方法。

１０６．ＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞が、ＨＬＡ－Ｅで形質転換されたＫ５６２細胞（Ｋ５６２－ＨＬＡ－Ｅ）である、実施形態７５～１０５のいずれか１つに記載の方法。

１０７．ＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞が２２１．ＡＥＨ細胞である、実施形態７５～１０６のいずれか１つに記載の方法。

１０８．照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞　対　濃縮されたＮＫ細胞の比が１：１～５：１であり、１：１～３：１を含み、任意選択で、２．５：１もしくは約２．５：１、又は２：１もしくは約２：１、又は約１：１である、実施形態７５～１０７のいずれか１つに記載の方法。

１０９．培養の少なくとも一部の間に培養培地に添加される組換えサイトカインが、５００　ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、１０ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１５、及び２５ｎｇ／ｍＬのＩＬ－２１である、実施形態７５～１０８のいずれか１つに記載の方法。

１１０．濃縮されたＮＫ細胞の集団が、2.0×10^{5}個の濃縮ＮＫ細胞もしくは約2.0×10^{5}個の濃縮ＮＫ細胞から、5.0×10^{7}個の濃縮ＮＫ細胞もしくは約5.0×10^{7}個の濃縮ＮＫ細胞、1.0×10^{6}個の濃縮ＮＫ細胞もしくは約1.0×10^{6}個の濃縮ＮＫ細胞から、1.0×10^{8}個の濃縮ＮＫ細胞もしくは約1.0×10^{8}個の濃縮ＮＫ細胞、1.0×10^{7}個の濃縮ＮＫ細胞もしくは約1.0×10^{7}個の濃縮ＮＫ

細胞から、５．０×１０^{8}個の濃縮ＮＫ細胞もしくは約５．０×１０^{8}個の濃縮ＮＫ細胞、又は１．０×１０^{7}個の濃縮ＮＫ細胞もしくは約１．０×１０^{7}個の濃縮ＮＫ細胞から、約１．０×１０^{9}個の濃縮ＮＫ細胞もしくは約１．０×１０^{9}個の濃縮ＮＫ細胞を含み、（それぞれ両端を含む）、任意選択で、濃縮されたＮＫ細胞の前記集団が、１．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞又は約１．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞を含む、実施形態７５～１０９のいずれか１つに記載の方法。

１１１．培養開始時の濃縮されたＮＫ細胞の集団は、０．０５×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬもしくは約０．０５×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬから、１．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬもしくは約１．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ、又は０．０５×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬもしくは約０．０５×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬから、０．５×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬもしくは約０．５×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬの濃度であり、任意選択で、培養開始時の濃縮されたＮＫ細胞の集団は、０．２×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ又は約０．２×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬの濃度を含む、実施形態７５～１１０のいずれか１つに記載の方法。

１１２．少なくとも２．５０×１０^{8}もしくは少なくとも約２．５０×１０^{8}個のｇ－ＮＫ細胞、少なくとも５．００×１０^{8}もしくは少なくとも約５．００×１０^{8}個のｇ－ＮＫ細胞、少なくとも１．０×１０^{9}もしくは少なくとも約１．０×１０^{9}個のｇ－ＮＫ細胞、又は少なくとも５．０×１０^{9}もしくは少なくとも約５．０×１０８^{9}個のｇ－ＮＫ細胞の増殖を方法が達成する時点まで、培養が行われる、実施形態７５～１１１のいずれか１つに記載の方法。

１１３．５日間、６日間、７日間、８日間、９日間、１０日間、１１日間、１２日間、１３日間、１４日間、１５日間、１６日間、１７日間、１８日間、１９日間、２０日間、２１日間、２２日間、２３日間、２４日間、もしくは２５日間、又は約５日間、６日間、７日間、８日間、９日間、１０日間、１１日間、１２日間、１３日間、１４日間、１５日間、１６日間、１７日間、１８日間、１９日間、２０日間、２１日間、２２日間、２３日間、２４日間、もしくは２５日間、又は少なくとも５日間、６日間、７日間、８日間、９日間、１０日間、１１日間、１２日間、１３日間、１４日間、１５日間、１６日間、１７日間、１８日間、１９日間、２０日間、２１日間、２２日間、２３日間、２４日間、もしくは２５日間、又は少なくとも約５日間、６日間、７日間、８日間、９日間、１０日間、１１日間、１２日間、１３日間、１４日間、１５日間、１６日間、１７日間、１８日間、１９日間、２０日間、２１日間、２２日間、２３日間、２４日間、もしくは２５日間、培養が行われる、実施形態７５～１１２のいずれか１つに記載の方法。

１１４．方法によって産生された、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を、収集することを更に含む、実施形態７５～１１３のいずれか１つに記載の方法。

１１５．操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を、薬学的に許容される賦形剤中に製剤化することを更に含む、実施形態７５～１１４のいずれか１つに記載の方法。

１１６．操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を、抗凍結剤を含む無血清凍結保存培地と共に製剤化することを更に含む、実施形態１１５記載の方法。

１１７．抗凍結剤がＤＭＳＯであり、任意選択で抗凍結剤がＤＭＳＯであり、凍結保存媒体が、５％～１０％ＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）であり、任意選択で１０％ＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）又は約１０％ＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）である、実施形態１１６に記載の方法。

１１８．方法によって産生された操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団の中で、集団の５０％超がＦｃＲγ^{neg}である、集団の６０％超がＦｃＲγ^{neg}である、集団の７０％超がＦｃＲγ^{neg}である、集団の８０％超がＦｃＲγ^{neg}である、集団の９０％超がＦｃＲγ^{neg}である、又は集団の９５％超がＦｃＲγ^{neg}である、実施形態７５～１１７のいずれか１つに記載の方法。

１１９．実施形態５８～１１８のいずれか１つに記載の方法によって産生される複数の操作されたＮＫ細胞を含む組成物。

１２０．実施形態１６～５５及び１１９のいずれか１つに記載の組成物の細胞の有効量を、それを必要とする個体に投与することを含む、対象における疾患又は状態を治療する

方法。
１２１．疾患又は状態が、炎症状態、感染症、又はがんからなる群から選択される、実施形態１２０に記載の方法。
１２２．疾患又は状態が、がんであり、がんが、白血病、リンパ腫、又は骨髄腫である、実施形態１２０又は実施形態１２１の方法。
１２３．疾患又は状態が、がんであり、がんが、固形腫瘍を含む、実施形態１２０又は実施形態１２１の方法。
１２４．がんが、胃又は食道胃接合部の腺がん、膀胱がん、乳がん、脳がん、子宮頸がん、結腸直腸がん、内分泌／神経内分泌がん、頭頸部がん、消化管間質がん、骨巨細胞腫瘍、腎臓がん、肝臓がん、肺がん、神経芽細胞腫、卵巣上皮／ファロピウス管／原発性腹膜がん、膵臓がん、前立腺がん、皮膚がん、及び軟部組織がんの中から選択される、実施形態１２３に記載の方法。
１２５．組成物が単剤療法として投与される、実施形態１２０～１２４のいずれか１つに記載の方法。
１２６．ｇ－ＮＫ細胞組成物の、1×10^5又は約1×10^5から、50×10^9又は約50×10^9個の細胞を、個体に投与することを含む、実施形態１２０～１２５のいずれか１つに記載の方法。
１２７．ｇ－ＮＫ細胞組成物の、1×10^8又は約1×10^8から、50×10^9又は約50×10^9個のＮＫ細胞、任意選択で、ｇ－ＮＫ細胞組成物の5×10^8もしくは約5×10^8個の細胞、ｇ－ＮＫ細胞組成物の5×10^9もしくは約5×10^9個の細胞、又はｇ－ＮＫ細胞組成物の10×10^9もしくは約10×10^9個の細胞を、投与することを含む、実施形態１２０～１２６のいずれか１つに記載の方法。
１２８．対象における投与されたＮＫ細胞のインビボでの増殖又は持続を促進するために外因性サイトカインサポートを投与することを更に含み、任意選択で、外因性サイトカインがＩＬ－１５であるか、又はＩＬ－１５を含む、実施形態１２０～１２７のいずれか１つに記載の方法。
１２９．ｇ－ＮＫ細胞の用量の投与前に、対象がリンパ球枯渇療法を受けている、実施形態１２０～１２８のいずれか１つに記載の方法。
１３０．リンパ枯渇療法がフルダラビン及び／又はシクロホスファミドを含む、実施形態１２９記載の方法。
１３１．リンパ球枯渇療法が、フルダラビンを、対象の体表面積で２０～４０ｍｇ／ｍ^{2}又は約２０～４０ｍｇ／ｍ^2、任意選択で３０ｍｇ／ｍ^{2}又は約３０ｍｇ／ｍ^{2}で、毎日、２～４日間にわたって投与し、かつ／又はシクロホスファミドを、対象の体表面積で２００～４００ｍｇ／ｍ^{2}又は約２００～４００ｍｇ／ｍ^2、任意選択で３００ｍｇ／ｍ^{2}又は約３００ｍｇ／ｍ^{2}で、毎日、２～４日間にわたって投与することを含む、実施形態１２９又は実施形態１３０の方法。
１３２．リンパ枯渇療法がフルダラビン及びシクロホスファミドを含む、実施形態１２９～１３１のいずれか１つに記載の方法。
１３３．リンパ枯渇療法が、フルダラビンを対象の体表面積で３０ｍｇ／ｍ^{2}又は約３０ｍｇ／ｍ^{2}で毎日、及びシクロホスファミドを対象の体表面積で３００ｍｇ／ｍ^{2}又は約３００ｍｇ／ｍ^{2}で毎日、それぞれ２～４日間にわたって、任意選択で３日間にわたって投与することを含む、実施形態１２９～１３１のいずれか１つに記載の方法。
１３４．細胞の投与が、リンパ球枯渇療法の開始後２週間以内に、又は２週間もしくは約２週間で開始される、実施形態１２９～１３３のいずれか１つに記載の方法。
１３５．個体がヒトである、実施形態１２０～１６９のいずれか１つに記載の方法。
１３６．組成物中のＮＫ細胞が、個体にとって同種異系である、実施形態１２０～１３５のいずれか１つに記載の方法。
１３７．組成物中のＮＫ細胞が、対象にとって自己由来である、実施形態１２０～１３６のいずれか１つに記載の方法。
【０６２５】

提供される実施形態には以下のものがある。
１．ＦｃＲγ鎖の発現が欠損しており（ｇ－ＮＫ細胞）、免疫調節物質をコードする異種核酸を含む、操作されたナチュラルキラー（ＮＫ）細胞。
２．免疫調節物質が免疫抑制物質である、実施形態１に記載の操作されたＮＫ細胞。
３．免疫調節物質が免疫活性化物質である、実施形態１に記載の操作されたＮＫ細胞。
４．免疫調節物質がサイトカインである、実施形態１又は実施形態３に記載の操作されたＮＫ細胞。
５．サイトカインが、操作されたＮＫ細胞から分泌可能である、実施形態１～４のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。
６．分泌型サイトカインがＩＬ－２もしくはその生物学的部分、ＩＬ－１５もしくはその生物学的部分、又はＩＬ－２１もしくはその生物学的部分、又はそれらの組み合わせである。
７．サイトカインが膜結合型である、実施形態１～５のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。
８．膜結合型サイトカインが膜結合型ＩＬ－２（ｍｂＩＬ－２）、膜結合型ＩＬ－１５（ｍｂＩＬ－１５）、膜結合型ＩＬ－２１（ｍｂＩＬ－２１）、又はそれらの組み合わせである。
９．免疫調節物質をコードする異種核酸が、細胞のゲノムに安定に組み込まれている、実施形態１～８のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。
１０．免疫調節物質をコードする異種核酸が、一過性に発現される、実施形態１～８のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。
１１．ｇ－ＮＫ細胞が、ＣＤ１６^{pos}／ＣＤ５７^{pos}／ＣＤ７^{dim}／^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である表面表現型を有する、実施形態１～１０のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。
１２．ｇ－ＮＫ細胞が、ＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である表面表現型を更に有する、実施形態１～１１のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。
１３．ｇ－ＮＫ細胞が更にＣＤ３８^{neg}である、実施形態１～１２のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。
１４．ｇ－ＮＫ細胞が、更にＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}である表面表現型を有する、実施形態１～１３のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。
１５．ｇ－ＮＫ細胞が、ＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｖ（Ｖ１５８）を含む、実施形態１～１４のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。
１６．ｇ－ＮＫ細胞が、ＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｆである、実施形態１～１４のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。
１７．実施形態１～１６のいずれか１つに記載の操作されたｇ－ＮＫ細胞を複数含む、組成物。
１８．組成物中のＮＫ細胞又は総細胞の５０％超又は約５０％超が、ｇ－ＮＫ細胞である、実施形態１７に記載の組成物。
１９．組成物中のＮＫ細胞又は総細胞の６０％超又は約６０％超が、ｇ－ＮＫ細胞である、実施形態１７に記載の組成物。
２０．組成物中のＮＫ細胞又は総細胞の７０％超又は約７０％超が、ｇ－ＮＫ細胞である、実施形態１７に記載の組成物。
２１．組成物中のＮＫ細胞又は総細胞の８０％超又は約８０％超が、ｇ－ＮＫ細胞である、実施形態１７に記載の組成物。
２２．組成物中のＮＫ細胞又は総細胞の９０％超又は約９０％超が、ｇ－ＮＫ細胞である、実施形態１７に記載の組成物。
２３．組成物中のＮＫ細胞又は総細胞の９５％超又は約９５％超が、ｇ－ＮＫ細胞である、実施形態１７に記載の組成物。
２４．複数の操作されたｇ－ＮＫ細胞が、２０％超もしくは約２０％超、３０％超もしくは約３０％超、４０％超もしくは約４０％超、５０％超もしくは約５０％超、６０％超

もしくは約６０％超、又は７０％超もしくは約７０％超の、免疫調節物質をコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を構成する、実施形態１７～２３のいずれか１つに記載の組成物。

２５．総組成物が、免疫調節物質をコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を、２０％超もしくは約２０％超、３０％超もしくは約３０％超、４０％超もしくは約４０％超、５０％超もしくは約５０％超、６０％超もしくは約６０％超、又は７０％超もしくは約７０％超含む、実施形態１７～２４のいずれか１つに記載の組成物。

２６．ｇ－ＮＫ細胞の７０％超又は約７０％超がパーフォリンについて陽性であり、ｇ－ＮＫ細胞の７０％超又は約７０％超がグランザイムＢについて陽性である、実施形態１７～２５のいずれか１つに記載の組成物。

２７．ｇ－ＮＫ細胞の８０％超又は約８０％超がパーフォリンについて陽性であり、ｇ－ＮＫ細胞の８０％超又は約８０％超がグランザイムＢについて陽性である、実施形態１７～２６のいずれか１つに記載の組成物。

２８．ｇ－ＮＫ細胞の９０％超又は約９０％超がパーフォリンに陽性であり、ｇ－ＮＫ細胞の９０％超又は約９０％超がグランザイムＢに陽性である、実施形態１７～２７のいずれか１つに記載の組成物。

２９．ｇ－ＮＫ細胞の９５％超又は約９５％超がパーフォリンについて陽性であり、ｇ－ＮＫ細胞の９５％超又は約９５％超がグランザイムＢについて陽性である、実施形態１７～２８のいずれか１つに記載の組成物。

３０．パーフォリンについて陽性である細胞のうち、細胞は、細胞内フローサイトメトリーによって測定した場合、すなわち平均蛍光強度（ＭＦＩ）に基づいて、ＦｃＲγ^{pos}である細胞によって発現されるパーフォリンの平均レベルの少なくとも２倍又は約２倍である、平均レベルのパーフォリンを発現し、かつ／又は

グランザイムＢについて陽性である細胞のうち、細胞は、細胞内フローサイトメトリーによって測定した場合、すなわち平均蛍光強度（ＭＦＩ）に基づいて、ＦｃＲγ^{pos}である細胞によって発現されるグランザイムＢの平均レベルの少なくとも２倍又は約２倍である、グランザイムＢの平均レベルを発現する、実施形態２５～２８のいずれか１つに記載の組成物。

３１．組成物中の細胞の１０％超が、任意選択でＣＤ１０７ａ発現によって測定される、腫瘍標的細胞に対する脱顆粒が可能であり、任意選択で脱顆粒が腫瘍標的細胞に対する抗体の非存在下で測定される、実施形態１７～３０のいずれか１つに記載の組成物。

３２．組成物中の細胞の１０％超が、腫瘍標的細胞に対してインターフェロン－γ又はＴＮＦ－αを産生することができ、任意選択で、インターフェロン－γ又はＴＮＦ－αが、腫瘍標的細胞に対する抗体の非存在下で測定される、実施形態１７～３１のいずれか１つに記載の組成物。

３３．組成物中の細胞のうち、１５％超もしくは約１５％超、２０％超もしくは約２０％超、３０％超もしくは約３０％超、４０％超もしくは約４０％超、又は５０％超もしくは約５０％超が、標的抗原及び標的抗原に対する抗体（抗標的抗体）を発現する細胞（標的細胞）の存在下でエフェクターサイトカインを産生する、実施形態１７～３３のいずれか１つに記載の組成物。

３４．組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、３０％超もしくは約３０％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃ：ｐｏｓ）、かつ／又は５０％超もしくは約５０％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａ：ｎｅｇ）、実施形態１７～３３のいずれか１つに記載の組成物。

３５．組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、３５％超もしくは約３５％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）、かつ／又は６０％超もしくは約６０％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａ ^{neg}）、実施形態１７～３３のいずれか１つに記載の組成物。

３６．組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、４０％超もしくは約４０％超が、ＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）、かつ／又は７０

％超もしくは約７０％超が、ＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａ：ｎｅｇ）、実施形態１７～３３のいずれか１つに記載の組成物。

３７．組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、４５％超もしくは約４５％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃｐｏｓ）、かつ／又は８０％超もしくは約８０％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａ　ｎｅｇ）、実施形態１７～３３のいずれか１つに記載の組成物。

３８．組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、５０％超もしくは約５０％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃｐｏｓ）、かつ／又は８５％超もしくは約８５％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａ^{neg}）、実施形態１７～３３のいずれか１つに記載の組成物。

３９．組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、５５％超もしくは約５５％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃｐｏｓ）、かつ／又は９０％超もしくは約９０％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａ　ｎｅｇ）、実施形態１７～３３のいずれか１つに記載の組成物。

４０．組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、６０％超もしくは約６０％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃｐｏｓ）、かつ／又は９５％超もしくは約９５％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａ　ｎｅｇ）、実施形態１７～３３のいずれか１つに記載の組成物。

４１．組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、５０％超もしくは約５０％超、６０％超もしくは約６０％超、７０％超もしくは約７０％超、８０％超もしくは約８０％超、又は９０％超もしくは約９０％超が、ＣＤ３８^{neg}である、実施形態１７～４０のいずれか１つに記載の組成物。

４２．組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、５０％超もしくは約５０％超、６０％超もしくは約６０％超、７０％超もしくは約７０％超、８０％超もしくは約８０％超、又は９０％超もしくは約９０％超が、ＣＤ１６ｐｏｓ／ＣＤ５７ｐｏｓ／ＣＤ７^{dim}／ｎｅｇ／ＣＤ１６１^{neg}である、実施形態１７～４０のいずれか１つに記載の組成物。

４３．組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、５０％超もしくは約５０％超、６０％超もしくは約６０％超、７０％超もしくは約７０％超、８０％超もしくは約８０％超、又は９０％超もしくは約９０％超が、ＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である、実施形態１７～４０のいずれか１つに記載の組成物。

４４．複数のｇ－ＮＫ細胞が、ＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｖ（Ｖ１５８）である、実施形態１７～４３のいずれか１つに記載の組成物。

４５．複数のｇ－ＮＫ細胞がＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｆである、実施形態１７～４４のいずれか１つに記載の組成物。

４６．少なくとも10^8個又は少なくとも約10^8個の細胞を含む、実施形態１７～４５のいずれか１つに記載の組成物。

４７．組成物中のｇ－ＮＫ細胞の数は10^8もしくは約10^8から、10^{12}もしくは約10^{12}個の細胞、10^8もしくは約10^8から、10^{11}もしくは約10^{11}個の細胞、10^8もしくは約10^8から、10^{10}もしくは約10^{10}個の細胞、10^8もしくは約10^8から、10^9もしくは約10^9個の細胞、10^9もしくは約10^9から、10^{12}もしくは約10^{12}個の細胞、10^9もしくは約10^9から、10^{11}もしくは約10^{11}個の細胞、10^9もしくは約10^9から、10^{10}もしくは約10^{10}個の細胞、10^{10}もしくは約10^{10}から、10^{12}もしくは約10^{12}個の細胞、10^{10}もしくは約10^{10}から、10^{11}もしくは約10^{11}個の細胞、又は10^{11}もしくは約10^{11}から、10^{12}もしくは約10^{12}個の細胞である、実施形態１７～４６のいずれか１つに記載の組成物。

４８．組成物中のｇ－ＮＫ細胞の数が、5×10^8もしくは約5×10^8個の細胞、1×10^9もしくは約1×10^9個の細胞、5×10^{10}もしくは約5×10^{10}個の細胞、又は1×10^{10}もしくは約1×10^{10}個の細胞である、実施形態１７から４７のい

ずれか１つに記載の組成物。
４９．組成物の体積が、５０ｍＬ又は約５０ｍＬから、５００ｍＬ又は約５００ｍＬ、任意選択で２００ｍＬ又は約２００ｍＬである、実施形態１７～４８のいずれか１つに記載の組成物。
５０．組成物中の細胞が、同じ生体試料から増殖させた単一のドナー対象由来である、実施形態１７～４９のいずれか１つに記載の組成物。
５１．組成物が医薬組成物である、実施形態１７～５０のいずれか１つに記載の方法。
５２．薬学的に許容される賦形剤を含む、実施形態１７～５１のいずれか１つに記載の組成物。
５３．抗凍結剤を含む無血清凍結保存培地中に製剤化される、実施形態１７～５２のいずれか１つに記載の組成物。
５４．抗凍結剤がＤＭＳＯであり、凍結保存培地が５％～１０％ＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）である、実施形態５３に記載の組成物。
５５．抗凍結剤が、１０％ＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）であるか、又は約１０％ＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）である、実施形態５４に記載の組成物。
５６．滅菌されている、実施形態１７～５５のいずれか１つに記載の組成物。
５７．実施形態１７～５６のいずれか１つに記載の組成物を含む滅菌バッグ。
５８．バッグが凍結保存適合性バッグである、実施形態５７に記載の滅菌バッグ。
５９．ｇ－ＮＫ細胞に、免疫調節物質をコードする異種核酸を導入することであって、それによって、遺伝子操作されたｇ－ＮＫ細胞を産生する、導入すること
を含む、遺伝子操作されたｇ－ＮＫ細胞を産生する方法。
６０．免疫調節物質が、免疫抑制物質である、実施形態５９に記載の方法。
６１．免疫調節物質が、免疫活性化物質である、実施形態５９に記載の方法。
６２．免疫調節物質がサイトカインである、実施形態５９又は実施形態６１に記載の方法。
６３．サイトカインが、操作されたＮＫ細胞から分泌可能である、実施形態６２に記載の方法。
６４．分泌可能なサイトカインが、ＩＬ－２もしくはその生物学的に活性な部分、ＩＬ－１５もしくはその生物学的に活性な部分、ＩＬ－２１もしくはその生物学的に活性な部分、又はそれらの組み合わせである、実施形態６３に記載の方法
６５．サイトカインが膜結合型である、実施形態６２に記載の方法。
６６．膜結合型サイトカインが膜結合型ＩＬ－２（ｍｂＩＬ－２）、膜結合型ＩＬ－１５（ｍｂＩＬ－１５）、又は膜結合型ＩＬ－２１（ｍｂＩＬ－２１）、又はそれらの組み合わせである、実施形態６５に記載の方法
６７．免疫調節物質をコードする核酸が、ｇ－ＮＫ細胞のゲノムへの安定な組み込みのための条件下で導入される、実施形態５９～６６のいずれか１つに記載の方法。
６８．免疫調節物質をコードする核酸が、ウイルスベクターに含まれ、形質導入によってｇ－ＮＫ細胞に導入される、実施形態５９～６７のいずれか１つに記載の方法。
６９．ウイルスベクターがレンチウイルスベクターである、実施形態６８に記載の方法。
７０．免疫調節物質をコードする核酸が、ｇ－ＮＫ細胞における一過性発現のための条件下で導入される、実施形態５９～６６のいずれか１つに記載の方法。
７１．免疫調節物質をコードする核酸が非ウイルス送達によって導入される、実施形態５９～６６及び７０のいずれか１つに記載の方法。
７２．免疫調節物質をコードする核酸が、脂質ナノ粒子を介してｇ－ＮＫ細胞に導入される、実施形態５９～６６、７０及び７１のいずれか１つに記載の方法。
７３．免疫調節物質をコードする核酸がＤＮＡである、実施形態６７～７２のいずれか１つに記載の方法。
７４．免疫調節物質をコードする核酸がＲＮＡである、実施形態７０～７３のいずれか１つに記載の方法。

７５．ＲＮＡがｍＲＮＡである、実施形態７４に記載の方法。
７６．ＲＮＡが自己増幅ｍＲＮＡである、実施形態７５に記載の方法。
７７．免疫調節物質をコードする核酸が、エレクトロポレーションを介してｇ－ＮＫ細胞に導入される、実施形態５９～６６及び７０～７５のいずれか１つに記載の方法。
７８．ｇ－ＮＫ細胞組成物が、
（ｉ）ＣＤ３について陰性もしくは低度かつＣＤ５７について陽性（ＣＤ３^{neg}ＣＤ５７^{pos}）又は（ｉｉ）ＣＤ３について陰性もしくは低度かつＣＤ５６について陽性（ＣＤ３^{neg}ＣＤ５６^{pos}）のいずれかである、対象由来の生体試料から濃縮されたＮＫ細胞
のエクスビボ増殖によって産生され、
濃縮されたＮＫ細胞が、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞及び１つ以上の組換えサイトカインと共に培養される、
実施形態５９～７７のいずれか１つに記載の方法。
７９．１つ以上の組換えサイトカインが、有効量のＳＣＦ、ＧＳＫ３ｉ、ＦＬＴ３、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－１２、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２７、又はそれらの組み合わせから選択される、実施形態７８に記載の方法。
８０．培養が２つ以上の組換えサイトカインの存在下で行われ、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、実施形態７８又は実施形態７９の方法。
８１．導入することが、
ＦｃＲγ欠損ＮＫ（ｇ－ＮＫ）細胞を増殖させるための方法
の間に行われ、前記方法が、
（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された集団が、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、
（Ｂ）操作されたＮＫ細胞の集団を、（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞（フィーダー細胞はＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞　対　濃縮されたＮＫ細胞の比は１：１０～１０：１であり）及び（２）ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカイン（少なくとも１つの組換えサイトカインはインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインはＩＬ－２１である）と共に、培地中で培養することを含み、
免疫調節物質をコードする核酸を導入することが、ステップ（Ａ）の後、かつステップ（Ｂ）の前、間、又は後に行われ、それによって、操作されたＮＫ細胞の集団を産生し、及び
方法は、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮され、免疫調節物質で操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、
実施形態５９～８０のいずれか１つに記載の方法。
８２．導入することが、
ＦｃＲγ欠損ＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ）を増殖させるための方法
の間に行われ、前記方法が、
（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された集団が、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、
（Ｂ）濃縮されたＮＫ細胞の集団に、免疫調節物質をコードする核酸を導入することであって、それによって、操作されたＮＫ細胞の集団を産生する、導入することと、
（Ｃ）操作されたＮＫ細胞の集団を、
（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞　対　濃縮ＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び

（２）ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカイン
と共に、培養培地中で培養することであって、それによって、ＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、培養することとを含み、及び
方法は、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮され、かつ免疫調節物質で操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、
実施形態５９～８０のいずれか１つに記載の方法。
８３．導入することが、
ＦｃＲγ欠損ＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ）を増殖させるための方法
の間に行われ、前記方法が、
（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された集団が、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、
（Ｂ）濃縮されたＮＫ細胞の集団を、
（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞対　濃縮されたＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び
（２）ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカイン
と共に、培地中で培養することであって、それにより、ＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、培養することと、
（Ｃ）増殖させたＮＫ細胞集団のＮＫ細胞に、免疫調節物質をコードする核酸を導入することと
を含み、
方法は、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮され、かつ免疫調節物質で操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、
実施形態５９～８０のいずれか１つに記載の方法。
８４．導入することが、
ＦｃＲγ欠損ＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ）を増殖させるための方法
の間に行われ、前記方法が、
（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された集団が、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、
（Ｂ）濃縮されたＮＫ細胞の集団を、ＮＫ細胞を増殖させるための条件下で培養培地中で培養することを含む第１の増殖を実施することであって、第１の増殖させたＮＫ細胞集団を産生する、実施することと、
（Ｃ）第１の増殖させたＮＫ細胞の集団（免疫調節物質をコードする核酸）をＮＫ細胞に導入することであって、それによって、操作されたＮＫ細胞の集団を産生する、導入することと、
（Ｄ）ＮＫ細胞の更なる増殖のための条件下で、操作されたＮＫ細胞の集団を培養することを含む第２の増殖を実施することと
を含み、
第１の増殖及び／又は第２の増殖は、濃縮されたＮＫ細胞の集団を、
（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞

対　濃縮されたＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び
　（２）ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカイン
と共に、培地中で培養することを含み、
方法は、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮され、かつ免疫調節物質で操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、
実施形態５９～８０のいずれか１つに記載の方法。

８５．ＮＫ細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団が、ヒト対象由来の生体試料から、（ｉ）ＣＤ３について陰性もしくは低度かつＣＤ５７について陽性（ＣＤ３^{neg}ＣＤ５７^{pos}）又は（ｉｉ）ＣＤ３について陰性もしくは低度かつＣＤ５６について陽性（ＣＤ３^{neg}ＣＤ５６^{pos}）のいずれかである細胞を選択することによって得られる、実施形態７８～８４のいずれか１つに記載の方法。

８６．ＮＫ細胞について濃縮された集団が、ＮＫＧ２Ｃについて陽性である細胞（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）について更に選択された細胞である、
ＮＫ細胞について濃縮された集団が、ＮＫＧ２Ａについて陰性又は低度である細胞（ＮＫＧ２Ａ^{neg}）について更に選択された細胞である、又は
ＮＫ細胞について濃縮された集団が、ＮＫＧ２Ｃについて陽性であり、ＮＫＧ２Ａについて陰性又は低度である細胞（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}）について更に選択された細胞である、
実施形態８２に記載の方法。

８７．ヒト対象が、対象由来の末梢血試料中のナチュラルキラー（ＮＫ）細胞の少なくとも２０％又は約２０％がＮＫＧ２Ｃについて陽性　（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）でありかつ末梢血試料中のＮＫ細胞の少なくとも７０％がＮＫＧ２Ａについて陰性又は低度である（ＮＫＧ２Ａ^{neg}）対象である、実施形態７８～８６のいずれか１つに記載の方法。

８８．対象がＣＭＶ血清陽性である、実施形態７８～８７のいずれか１つに記載の方法。

８９．対象由来の生体試料中のＮＫ細胞のうちのｇ－ＮＫ細胞の割合が、５％超もしくは約５％超、１０％超もしくは約１０％超、又は３０％超もしくは約３０％超である、実施形態７８～８８のいずれか１つに記載の方法。

９０．濃縮されたＮＫ細胞の集団中のｇ－ＮＫ細胞の割合が、２０％もしくは約２０％から、９０もしくは約９０％、４０％もしくは約４０％から、９０％もしくは約９０％、又は６０％もしくは約６０％から、９０％もしくは約９０％である、実施形態７８～８９のいずれか１つに記載の方法。

９１．ＮＫ細胞について濃縮された集団が、ＣＤ３について陰性もしくは低度かつＣＤ５７について陽性（ＣＤ３^{neg}ＣＤ５７^{pos}）である、生体試料から選択された細胞である、実施形態７８～９０のいずれか１つに記載の方法。

９２．ＮＫ細胞について濃縮された集団が、ＣＤ３について陰性もしくは低度かつＣＤ５６について陽性である、生体試料から選択された細胞（ＣＤ３^{neg}ＣＤ５６^{pos}）である、実施形態７８～９０のいずれか１つに記載の方法。

９３．２つ以上の組換えサイトカインが、有効量のＳＣＦ、ＧＳＫ３ｉ、ＦＬＴ３、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－１２、ＩＬ－１８、ＩＬ－２７、又はそれらの組み合わせを更に含む、実施形態８０～９２のいずれか１つに記載の方法。

９４．組換えサイトカインがＩＬ－２１及びＩＬ－２である、実施形態７８～９２のいずれか１つに記載の方法。

９５．組換えサイトカインがＩＬ－２１、ＩＬ－２、及びＩＬ－１５である、実施形態７８～９３のいずれか１つに記載の方法。

９６．組換えＩＬ－２１が、培養の少なくとも一部の間に、１０ｎｇ／ｍＬ又は約１０

ｎｇ／ｍＬから、１００ｎｇ／ｍＬ又は約１００ｎｇ／ｍＬの濃度で培養培地に添加される、実施形態７８～９５のいずれか１つに記載の方法。

９７．組換えＩＬ－２１が、培養の少なくとも一部の間に、２５ｎｇ／ｍＬ又は約２５ｎｇ／ｍＬの濃度で培養培地に添加される、実施形態７８～９６のいずれか１つに記載の方法。

９８．組換えＩＬ－２が、培養の少なくとも一部の間に、１０ＩＵ／ｍＬ又は約１０ＩＵ／ｍＬから、５００ＩＵ／ｍＬ又は約５００ＩＵ／ｍＬの濃度で培養培地に添加される、実施形態７８～９７のいずれか１つに記載の方法。

９９．組換えＩＬ－２が、培養の少なくとも一部の間に、１００ＩＵ／ｍＬ又は約１００ＩＵ／ｍＬの濃度で培養培地に添加される、実施形態７８～９８のいずれか１つに記載の方法。

１００．組換えＩＬ－２が、培養の少なくとも一部の間に、５００ＩＵ／ｍＬ又は約５００ＩＵ／ｍＬの濃度で培養培地に添加される、実施形態７８～９９のいずれか１つに記載の方法。

１０１．組換えＩＬ－１５が、培養の少なくとも一部の間に、１ｎｇ／ｍＬ又は約１ｎｇ／ｍＬから、５０ｎｇ／ｍＬ又は約５０ｎｇ／ｍＬの濃度で培養培地に添加される、実施形態７８～９３及び９５～１００のいずれか１つに記載の方法。

１０２．組換えＩＬ－１５が、培養の少なくとも一部の間に、１０ｎｇ／ｍＬ又は約１０ｎｇ／ｍＬである濃度で培養培地に添加される、実施形態７８～９３及び９５～１０１のいずれか１つに記載の方法。

１０３．組換えサイトカインが、培養の開始時又はほぼ開始時に培養培地に添加される、実施形態７８～１０２のいずれか１つに記載の方法。

１０４．培養中に培養培地を１回以上交換することを更に含み、培養培地の各交換時に、組換えサイトカインを含有する新鮮な培地が添加される、実施形態７８～１０３のいずれか１つに記載の方法。

１０５．培養培地の交換が、培養の期間中、２日又は３日毎に行われる、実施形態１０４に記載の方法。

１０６．培地の交換が、最大５日間の培地交換を伴わない第１の増殖の後に行われ、任意選択で、最大５日間の培地交換を伴わない第１の増殖の後に行われる、実施形態１０４又は実施形態１０５に記載の方法。

１０７．ヒト対象が、ＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｖ　ＮＫ細胞遺伝子型又はＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｆ　ＮＫ細胞遺伝子型を有し、任意選択で、生体試料が、ＣＤ１６　１５８Ｖ／ＶＮＫ細胞遺伝子型又はＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｆ　ＮＫ細胞遺伝子型について選択されたヒト対象に由来する、実施形態７８～１０６のいずれか１つに記載の方法。

１０８．生体試料が、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）であるか、又はそれを含み、任意選択で血液試料、アフェレーシス試料又は白血球アフェレーシス試料である、実施形態７８～１０７のいずれか１つに記載の方法。

１０９．ＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞が、ＨＬＡ－Ｅで形質転換されたＫ５６２細胞（Ｋ５６２－ＨＬＡ－Ｅ）である、実施形態７８～１０８のいずれか１つに記載の方法。

１１０．ＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞が２２１．ＡＥＨ細胞である、実施形態７８～１０９のいずれか１つに記載の方法。

１１１．照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞　対　濃縮されたＮＫ細胞の比が、１：１～５：１（両端を含む）であり、１：１～３：１（両端を含む）であり、任意選択で、２．５：１もしくは約２．５：１、又は２：１もしくは約２：１、又は約１：１である、実施形態７８～１１０のいずれか１つに記載の方法。

１１２．培養の少なくとも一部の間に培養培地に添加される組換えサイトカインが、５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、１０ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１５、及び２５ｎｇ／ｍＬのＩＬ－２１である、実施形態７８～１１１のいずれか１つに記載の方法。

１１３．濃縮されたＮＫ細胞の集団が、２．０×10^5個の濃縮ＮＫ細胞もしくは約２．０×10^5個の濃縮ＮＫ細胞から、５．０×10^7個の濃縮ＮＫ細胞もしくは約５．０

×１０^{7}個の濃縮ＮＫ細胞、１．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞もしくは約１．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞から、１．０×１０^{8}個の濃縮ＮＫ細胞もしくは約１．０×１０^{8}個の濃縮ＮＫ細胞、１．０×１０^{7}個の濃縮ＮＫ細胞もしくは約１．０×１０^{7}個の濃縮ＮＫ細胞から、５．０×１０^{8}個の濃縮ＮＫ細胞もしくは約５．０×１０^{8}個の濃縮ＮＫ細胞、又は１．０×１０^{7}個の濃縮ＮＫ細胞もしくは約１．０×１０^{7}個の濃縮ＮＫ細胞から、約１．０×１０^{9}個の濃縮ＮＫ細胞もしくは約１．０×１０^{9}個の濃縮ＮＫ細胞を含み、（それぞれ両端を含む）、任意選択で、濃縮されたＮＫ細胞の前記集団が、１．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞又は約１．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞を含む、実施形態７８～１１２のいずれか１つに記載の方法。

１１４．培養開始時の濃縮されたＮＫ細胞の集団は、０．０５×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬもしくは約０．０５×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬから、１．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬもしくは約１．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ、又は０．０５×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬもしくは約０．０５×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬから、０．５×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬもしくは約０．５×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬの濃度であり、任意選択で、培養開始時の濃縮されたＮＫ細胞の集団は、１ｍＬ当たり０．２×１０^{6}又は約０．２×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞の濃度を含む、実施形態７８～１１３のいずれか１つに記載の方法。

１１５．少なくとも２．５０×１０^{8}もしくは少なくとも約２．５０×１０^{8}個のｇ－ＮＫ細胞、少なくとも５．００×１０^{8}もしくは少なくとも約５．００×１０^{8}個のｇ－ＮＫ細胞、少なくとも１．０×１０^{9}もしくは少なくとも約１．０×１０^{9}個のｇ－ＮＫ細胞、又は少なくとも５．０×１０^{9}もしくは少なくとも約５．０×１０^{9}個のｇ－ＮＫ細胞の増殖を方法が達成する時点まで、培養が行われる、実施形態７８～１１４のいずれか１つに記載の方法。

１１６．５日間、６日間、７日間、８日間、９日間、１０日間、１１日間、１２日間、１３日間、１４日間、１５日間、１６日間、１７日間、１８日間、１９日間、２０日間、２１日間、２２日間、２３日間、２４日間、もしくは２５日間、又は約５日間、６日間、７日間、８日間、９日間、１０日間、１１日間、１２日間、１３日間、１４日間、１５日間、１６日間、１７日間、１８日間、１９日間、２０日間、２１日間、２２日間、２３日間、２４日間、もしくは２５日間、又は少なくとも５日間、６日間、７日間、８日間、９日間、１０日間、１１日間、１２日間、１３日間、１４日間、１５日間、１６日間、１７日間、１８日間、１９日間、２０日間、２１日間、２２日間、２３日間、２４日間、もしくは２５日間、又は少なくとも約５日間、６日間、７日間、８日間、９日間、１０日間、１１日間、１２日間、１３日間、１４日間、１５日間、１６日間、１７日間、１８日間、１９日間、２０日間、２１日間、２２日間、２３日間、２４日間、もしくは２５日間、培養が行われる、実施形態７８～１１５のいずれか１つに記載の方法。

１１７．方法によって産生された、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を、収集することを更に含む、実施形態７８～１１６のいずれか１つに記載の方法。

１１８．操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を、薬学的に許容される賦形剤中に製剤化することを更に含む、実施形態７８～１１７のいずれか１つに記載の方法。

１１９．操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を、抗凍結剤を含む無血清凍結保存培地と共に製剤化することを更に含む、実施形態１１８の方法。

１２０．抗凍結剤がＤＭＳＯであり、任意選択で抗凍結剤がＤＭＳＯであり、凍結保存媒体が、５％～１０％ＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）であり、任意選択で１０％ＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）又は約１０％ＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）である、実施形態１１９に記載の方法。

１２１．方法によって産生された操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団の中で、集団の５０％超がＦｃＲγ^{neg}である、集団の６０％超がＦｃＲγ^{neg}である、集団の７０％超がＦｃＲγ^{neg}である、集団の８０％超がＦｃＲγ^{neg}である、集団の９０％超がＦｃＲγ^{neg}である、又は集団の９５％超がＦｃＲγ^{neg}である、実施形態７８～１２０のいずれか１つに記載の方法。

１２２．実施形態５９～１２１のいずれか１つに記載の方法によって産生される複数の

操作されたＮＫ細胞を含む組成物。
１２３．実施形態１７～５６及び１２２のいずれか１つに記載の組成物の細胞の有効量を、それを必要とする個体に投与することを含む、対象における疾患又は状態を治療する方法。
１２４．疾患又は状態が、炎症状態、感染症、又はがんからなる群から選択される、実施形態１２３に記載の方法。
１２５．疾患又は状態が、がんであり、がんが、白血病、リンパ腫、又は骨髄腫である、実施形態１２３又は実施形態１２４の方法。
１２６．疾患又は状態が、がんであり、がんが、固形腫瘍を含む、実施形態１２３又は実施形態１２４の方法。
１２７．がんが、胃又は食道胃接合部の腺がん、膀胱がん、乳がん、脳がん、子宮頸がん、結腸直腸がん、内分泌／神経内分泌がん、頭頸部がん、消化管間質がん、骨巨細胞腫瘍、腎臓がん、肝臓がん、肺がん、神経芽細胞腫、卵巣上皮／ファロピウス管／原発性腹膜がん、膵臓がん、前立腺がん、皮膚がん、及び軟部組織がんの中から選択される、実施形態１２６の方法。
１２８．組成物が単剤療法として投与される、実施形態１２３～１２７のいずれか１つに記載の方法。
１２９．疾患又は状態を処置するために個体に追加の薬剤を投与することを更に含む、実施形態１２３～１２７のいずれか１つに記載の方法。
１３０．追加の薬剤が抗体又はＦｃ融合タンパク質である、実施形態１２９に記載の方法。
１３１．疾患又は状態が、がんであり、追加の薬剤、任意選択の抗体が、がんに関連する腫瘍抗原を認識する、実施形態１３０に記載の方法。
１３２．ｇ－ＮＫ細胞組成物の、1×10^5又は約1×10^5から、50×10^9又は約50×10^9個の細胞を、個体に投与することを含む、実施形態１２３～１３１のいずれか１つに記載の方法。
１３３．ｇ－ＮＫ細胞組成物の、1×10^8又は約1×10^8から、50×10^9又は約50×10^9個のＮＫ細胞、任意選択で、ｇ－ＮＫ細胞組成物の5×10^8もしくは約5×10^8個の細胞、ｇ－ＮＫ細胞組成物の5×10^9もしくは約5×10^9個の細胞、又はｇ－ＮＫ細胞組成物の10×10^9もしくは約10×10^9個の細胞を、投与することを含む、実施形態１２３～１３２のいずれか１つに記載の方法。
１３４．ｇ－ＮＫ細胞の用量の投与前に、対象がリンパ球枯渇療法を受けている、実施形態１２３～１３３のいずれか１つに記載の方法。
１３５．リンパ枯渇療法がフルダラビン及び／又はシクロホスファミドを含む、実施形態１３４記載の方法。
１３６．リンパ枯渇療法は、フルダラビンを、対象の体表面積で２０～４０ｍｇ／m^2又は約２０～約４０ｍｇ／m^2、任意選択で３０ｍｇ／m^2又は約３０ｍｇ／m^2で、毎日、２～４日間にわたって投与し、かつ／又はシクロホスファミドを、対象の体表面積で２００～４００ｍｇ／m^2又は約２００～約４００ｍｇ／m^2、任意選択で３００ｍｇ／m^2又は約３００ｍｇ／m^2で、毎日、２～４日間にわたって投与することを含む、実施形態１３４又は実施形態１３５の方法。
１３７．リンパ球枯渇療法がフルダラビン及びシクロホスファミドを含む、実施形態１３４～１３６のいずれか１つに記載の方法。
１３８．リンパ球枯渇療法が、フルダラビンを対象の体表面積で３０ｍｇ／m^2又は約３０ｍｇ／m^2で毎日、及びシクロホスファミドを対象の体表面積で３００ｍｇ／m^2又は約３００ｍｇ／m^2で毎日、それぞれ２～４日間にわたって、任意選択で３日間にわたって投与することを含む、実施形態１３４～１３７のいずれか１つに記載の方法。
１３９．ｇ－ＮＫ細胞の用量の投与が、リンパ球枯渇療法の開始後２週間以内に、又は２週間もしくは約２週間で開始される、実施形態１３４～１３８のいずれか１つに記載の方法。

１４０．個体がヒトである、実施形態１２３～１３９のいずれか１つに記載の方法。
１４１．組成物中のＮＫ細胞が、個体にとって同種異系である、実施形態１２３～１４０のいずれか１つに記載の方法。
１４２．組成物中のＮＫ細胞が、対象にとって自己由来である、実施形態１２３～１４０のいずれか１つに記載の方法。
【０６２６】
提供される実施形態には以下のものがある。
１．ＦｃＲγ鎖の発現が欠損しており（ｇ－ＮＫ細胞）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする異種核酸と、免疫調節物質をコードする異種核酸とを含む、操作されたナチュラルキラー（ＮＫ）細胞。
２．免疫調節物質が免疫抑制物質である、実施形態１に記載の操作されたＮＫ細胞。
３．免疫調節物質が免疫活性化物質である、実施形態１に記載の操作されたＮＫ細胞。
４．免疫調節物質がサイトカインである、実施形態１又は実施形態３に記載の操作されたＮＫ細胞。
５．サイトカインが、操作されたＮＫ細胞から分泌可能である、実施形態１～４のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。
６．分泌型サイトカインがＩＬ－２もしくはその生物学的部分、ＩＬ－１５もしくはその生物学的部分、又はＩＬ－２１もしくはその生物学的部分、又はそれらの組み合わせである。
７．サイトカインが膜結合型である、実施形態１～５のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。
８．膜結合型サイトカインが膜結合型ＩＬ－２（ｍｂＩＬ－２）、膜結合型ＩＬ－１５（ｍｂＩＬ－１５）、膜結合型ＩＬ－２１（ｍｂＩＬ－２１）、又はそれらの組み合わせである、実施形態７に記載の操作されたＮＫ細胞。
９．ＣＡＲが、１）抗原結合ドメイン、２）可撓性リンカー、３）膜貫通領域、及び４）細胞内シグナル伝達ドメインを含む、実施形態１～８のいずれかに記載の操作されたＮＫ細胞。
１０．抗原結合ドメインが腫瘍抗原を標的とする、実施形態９に記載の操作されたＮＫ細胞。
１１．抗原結合ドメインが一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）である、実施形態９又は１０に記載の操作されたＮＫ細胞。
１２．細胞内シグナル伝達ドメインが、一次シグナル伝達ドメイン及び共刺激シグナル伝達ドメインを含む、実施形態９～１１のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。
１３．細胞内シグナル伝達ドメインが、ＣＤ３ζ、ＤＡＰ１０、ＤＡＰ１２、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、又はＯＸ４０のうちの１つ以上のシグナル伝達ドメインを含む、実施形態９～１２のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。
１４．細胞内シグナル伝達ドメインが、ＣＤ３ζ、ＤＡＰ１０、ＤＡＰ１２、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、又はＯＸ４０のうちの２つ以上のシグナル伝達ドメインを含む、実施形態９～１２のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。
１５．ＣＡＲをコードする異種核酸が、細胞のゲノムに安定に組み込まれている、実施形態１～１４のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。
１６．ＣＡＲをコードする異種核酸が、一過性に発現される、実施形態１～１４のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。
１７．免疫調節物質をコードする前記異種核酸が、細胞のゲノムに安定に組み込まれている、実施形態１～１６のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。
１８．免疫調節物質をコードする異種核酸が、一過性に発現される、実施形態１～１６のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。
１９．ｇ－ＮＫ細胞が、ＣＤ１６^{pos}／ＣＤ５７^{pos}／ＣＤ７^{dim}／^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である表面表現型を有する、実施形態１～１８のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。

２０．ｇ－ＮＫ細胞が、ＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である表面表現型を更に有する、実施形態１～１９のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。

２１．ｇ－ＮＫ細胞が更にＣＤ３８^{neg}である、実施形態１～２０のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。

２２．ｇ－ＮＫ細胞が、更にＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}である表面表現型を有する、実施形態１～２１のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。

２３．ｇ－ＮＫ細胞が、ＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｖ（Ｖ１５８）を含む、実施形態１～２２のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。

２４．ｇ－ＮＫ細胞が、ＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｆである、実施形態１～２２のいずれか１つに記載の操作されたＮＫ細胞。

２５．実施形態１～２４のいずれか１つに記載の操作されたｇ－ＮＫ細胞を複数含む、組成物。

２６．組成物中のＮＫ細胞又は総細胞の５０％超又は約５０％超が、ｇ－ＮＫ細胞である、実施形態２５に記載の組成物。

２７．組成物中のＮＫ細胞又は総細胞の６０％超又は約６０％超が、ｇ－ＮＫ細胞である、実施形態２５に記載の組成物。

２８．組成物中のＮＫ細胞又は総細胞の７０％超又は約７０％超が、ｇ－ＮＫ細胞である、実施形態２５に記載の組成物。

２９．組成物中のＮＫ細胞又は総細胞の８０％超又は約８０％超が、ｇ－ＮＫ細胞である、実施形態２５に記載の組成物。

３０．組成物中のＮＫ細胞又は総細胞の９０％超又は約９０％超が、ｇ－ＮＫ細胞である、実施形態２５に記載の組成物。

３１．組成物中のＮＫ細胞又は総細胞の９５％超又は約９５％超が、ｇ－ＮＫ細胞である、実施形態２５に記載の組成物。

３２．複数の操作されたｇ－ＮＫ細胞が、２０％超もしくは約２０％超、３０％超もしくは約３０％超、４０％超もしくは約４０％超、５０％超もしくは約５０％超、６０％超もしくは約６０％超、又は７０％超もしくは約７０％超の、ＣＡＲをコードする異種核酸及び免疫調節物質をコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を構成する、実施形態２５～３１のいずれか１つに記載の組成物。

３３．総組成物が、ＣＡＲをコードする異種核酸及び免疫調節物質をコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を、２０％超もしくは約２０％超、３０％超もしくは約３０％超、４０％超もしくは約４０％超、５０％超もしくは約５０％超、６０％超もしくは約６０％超、又は７０％超もしくは約７０％超含む、実施形態２５～３２のいずれか１つに記載の組成物。

３４．複数の操作されたｇ－ＮＫ細胞が、２０％超もしくは約２０％超、３０％超もしくは約３０％超、４０％超もしくは約４０％超、５０％超もしくは約５０％超、６０％超もしくは約６０％超、又は７０％超もしくは約７０％超の、ＣＡＲをコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を構成する、実施形態２５～３３のいずれか１つに記載の組成物。

３５．複数の操作されたｇ－ＮＫ細胞が、２０％超もしくは約２０％超、３０％超もしくは約３０％超、４０％超もしくは約４０％超、５０％超もしくは約５０％超、６０％超もしくは約６０％超、又は７０％超もしくは約７０％超の、免疫調節物質をコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を構成する、実施形態２５～３４のいずれか１つに記載の組成物。

３６．総組成物が、ＣＡＲをコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を、２０％超もしくは約２０％超、３０％超もしくは約３０％超、４０％超もしくは約４０％超、５０％超もしくは約５０％超、６０％超もしくは約６０％超、又は７０％超もしくは約７０％超含む、実施形態２５～３５のいずれか１つに記載の組成物。

３７．総組成物が、免疫調節物質をコードする異種核酸を含むｇ－ＮＫ細胞を、２０％超もしくは約２０％超、３０％超もしくは約３０％超、４０％超もしくは約４０％超、５０％超もしくは約５０％超、６０％超もしくは約６０％超、又は７０％超もしくは約７０

％超含む、実施形態２５～３６のいずれか１つに記載の組成物。
３８．ｇ－ＮＫ細胞の７０％超又は約７０％超がパーフォリンについて陽性であり、ｇ－ＮＫ細胞の７０％超又は約７０％以上がグランザイムＢについて陽性である、実施形態２５～３７のいずれか１つに記載の組成物。
３９．ｇ－ＮＫ細胞の８０％超又は約８０％超がパーフォリンについて陽性であり、ｇ－ＮＫ細胞の８０％超又は約８０％超がグランザイムＢについて陽性である、実施形態２５～３８のいずれか１つに記載の組成物。
４０．ｇ－ＮＫ細胞の９０％超又は約９０％超がパーフォリンについて陽性であり、ｇ－ＮＫ細胞の９０％超又は約９０％超がグランザイムＢについて陽性である、実施形態２５～３９のいずれか１つに記載の組成物。
４１．ｇ－ＮＫ細胞の９５％超又は約９５％超がパーフォリンについて陽性であり、ｇ－ＮＫ細胞の９５％超又は約９５％超がグランザイムＢについて陽性である、実施形態２５～３９のいずれか１つに記載の組成物。
４２．パーフォリンについて陽性である細胞のうち、細胞は、細胞内フローサイトメトリーによって測定した場合、すなわち平均蛍光強度（ＭＦＩ）に基づいて、ＦｃＲγ^{pos}である細胞によって発現されるパーフォリンの平均レベルの少なくとも２倍又は約２倍である、平均レベルのパーフォリンを発現し、かつ／又は
グランザイムＢについて陽性である細胞のうち、細胞は、細胞内フローサイトメトリーによって測定した場合、すなわち平均蛍光強度（ＭＦＩ）に基づいて、ＦｃＲγ^{pos}である細胞によって発現されるグランザイムＢの平均レベルの少なくとも２倍又は約２倍である、グランザイムＢの平均レベルを発現する、実施形態３８～４１のいずれか１つに記載の組成物。
４３．組成物中の細胞の１０％超が、任意選択でＣＤ１０７ａ発現によって測定される、腫瘍標的細胞に対する脱顆粒が可能であり、任意選択で脱顆粒が腫瘍標的細胞に対する抗体の非存在下で測定される、実施形態２５～４２のいずれか１つに記載の組成物。
４４．組成物中の細胞の１０％超が、腫瘍標的細胞に対してインターフェロン－γ又はＴＮＦ－αを産生することができ、任意選択で、インターフェロン－γ又はＴＮＦ－αが、腫瘍標的細胞に対する抗体の非存在下で測定される、実施形態２５～４３のいずれか１つに記載の組成物。
４５．組成物中の細胞のうち、１５％超もしくは約１５％超、２０％超もしくは約２０％超、３０％超もしくは約３０％超、４０％超もしくは約４０％超、又は５０％超もしくは約５０％超が、標的抗原及び標的抗原に対する抗体（抗標的抗体）を発現する細胞（標的細胞）の存在下でエフェクターサイトカインを産生する、実施形態２５～４４のいずれか１つに記載の組成物。
４６．組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、３０％超もしくは約３０％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）、かつ／又は５０％超もしくは約５０％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａ ^{neg}）、実施形態２５～４５のいずれか１つに記載の組成物。
４７．組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、３５％超もしくは約３５％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）、かつ／又は６０％超もしくは約６０％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａ ^{neg}）、実施形態２５～４５のいずれか１つに記載の組成物。
４８．組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、４０％超もしくは約４０％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）、かつ／又は７０％超もしくは約７０％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａ ^{neg}）、実施形態２５～４５のいずれか１つに記載の組成物。
４９．組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、４５％超もしくは約４５％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）、かつ／又は８０％超もしくは約８０％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａ ^{neg}）、実施形態２５～４５のいずれか１つに記載の組成物。

５０．組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、５０％超もしくは約５０％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）、かつ／又は８５％超もしくは約８５％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａ ^{neg}）、実施形態２５～４５のいずれか１つに記載の組成物。

５１．組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、５５％超もしくは約５５％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）、かつ／又は９０％超もしくは約９０％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａ ^{neg}）、実施形態２５～４５のいずれか１つに記載の組成物。

５２．組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、６０％超もしくは約６０％超がＮＫＧ２Ｃについて陽性であり（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）、かつ／又は９５％超もしくは約９５％超がＮＫＧ２Ａについて陰性もしくは低度である（ＮＫＧ２Ａ ^{neg}）、実施形態２５～４５のいずれか１つに記載の組成物。

５３．組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、５０％超もしくは約５０％超、６０％超もしくは約６０％超、７０％超もしくは約７０％超、８０％超もしくは約８０％超、又は９０％超もしくは約９０％超が、ＣＤ３８^{neg}である、実施形態２５～５２のいずれか１つに記載の組成物。

５４．組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、５０％超もしくは約５０％超、６０％超もしくは約６０％超、７０％超もしくは約７０％超、８０％超もしくは約８０％超、又は９０％超もしくは約９０％超が、ＣＤ１６^{pos}／ＣＤ５７^{pos}／ＣＤ７^{dim}／^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である、実施形態２５～５２のいずれか１つに記載の組成物。

５５．組成物中の総細胞のうち、又は組成物中のｇ－ＮＫ細胞のうち、５０％超もしくは約５０％超、６０％超もしくは約６０％超、７０％超もしくは約７０％超、８０％超もしくは約８０％超、又は９０％超もしくは約９０％超が、ＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である、実施形態２５～５２のいずれか１つに記載の組成物。

５６．複数のｇ－ＮＫ細胞が、ＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｖ（Ｖ１５８）である、実施形態２５～５５のいずれか１つに記載の組成物。

５７．複数のｇ－ＮＫ細胞がＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｆである、実施形態２５～５６のいずれか１つに記載の組成物。

５８．免疫調節物質がサイトカインであり、任意選択でＩＬ－２もしくはその生物学的に活性な部分、ＩＬ－１５もしくはその生物学的に活性な部分、又はＩＬ－２１もしくはその生物学的に活性な部分を含む、実施形態２５～５７のいずれか１つに記載の組成物。

５９．サイトカインが、組成物の操作された細胞から分泌可能であるか、又は膜に結合している、実施形態５８の組成物。

６０．少なくとも又は少なくとも約10^8個の細胞を含む、実施形態２５～５９のいずれか１つに記載の組成物。

６１．組成物中のｇ－ＮＫ細胞の数は10^8もしくは約10^8から、10^{12}もしくは約10^{12}個の細胞、10^8もしくは約10^8から、10^{11}もしくは約10^{11}個の細胞、10^8もしくは約10^8から、10^{10}もしくは約10^{10}個の細胞、10^8もしくは約10^8から、10^9もしくは約10^9個の細胞、10^9もしくは約10^9から、10^{12}もしくは約10^{12}個の細胞、10^9もしくは約10^9から、10^{11}もしくは約10^{11}個の細胞、10^9もしくは約10^9から、10^{10}もしくは約10^{10}個の細胞、10^{10}もしくは約10^{10}から、10^{12}もしくは約10^{12}個の細胞、10^{10}もしくは約10^{10}から、10^{11}もしくは約10^{11}個の細胞、又は10^{11}もしくは約10^{11}から、10^{12}もしくは約10^{12}個の細胞である、実施形態２５～６０のいずれかの組成物。

６２．組成物中のｇ－ＮＫ細胞の数が、5×10^8もしくは約5×10^8個の細胞、1×10^9もしくは約1×10^9個の細胞、5×10^{10}もしくは約5×10^{10}個の細胞、又は1×10^{10}もしくは約1×10^{10}個の細胞である、実施形態２５～６１のいずれか１つに記載の組成物。

６３．組成物の体積が、５０ｍＬ又は約５０ｍＬから、５００ｍＬ又は約５００ｍＬ、

任意選択で２００ｍＬ又は約２００ｍＬである、実施形態２５～６２のいずれか１つに記載の組成物。

６４．組成物中の細胞が、同じ生体試料から増殖させた単一のドナー対象に由来する、実施形態２５～６３のいずれか１つに記載の組成物。

６５．組成物が医薬組成物である、実施形態２５～６４のいずれか１つに記載の方法。

６６．薬学的に許容される賦形剤を含む、実施形態２５～６５のいずれか１つに記載の組成物。

６７．抗凍結剤を含む無血清凍結保存培地中に製剤化される、実施形態２５～６６のいずれか１つに記載の組成物。

６８．抗凍結剤がＤＭＳＯであり、凍結保存培地が５％～１０％ＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）である、実施形態６７に記載の組成物。

６９．抗凍結剤が、１０％ＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）であるか、又は約１０％ＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）である、実施形態６８記載の組成物。

７０．無菌である、実施形態２５～６９のいずれか１つに記載の組成物。

７１．実施形態２５～７０のいずれか１つに記載の組成物を含む滅菌バッグ。

７２．バッグが凍結保存適合性バッグである、実施形態７１の滅菌バッグ。

７３．遺伝子操作されたｇ－ＮＫ細胞を産生する方法であって

（ａ）ＦｃＲγ鎖の発現が欠損しているＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ細胞）に、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする異種核酸を導入することと、

（ｂ）ｇ－ＮＫ細胞に、免疫調節物質をコードする異種核酸を導入し、

それによって、遺伝子操作されたｇ－ＮＫ細胞を産生することと

を含み、ステップ（ａ）及び（ｂ）が、同時に又は任意の順序で逐次的に行われる、方法。

７４．免疫調節物質が、免疫抑制物質である、実施形態７３に記載の方法。

７５．免疫調節物質が、免疫活性化物質である、実施形態７３に記載の方法。

７６．免疫調節物質がサイトカインである、実施形態７３又は７５に記載の方法。

７７．サイトカインが、操作されたＮＫ細胞から分泌可能である、実施形態７６に記載の方法。

７８．分泌可能なサイトカインが、ＩＬ－２もしくはその生物学的に活性な部分、ＩＬ－１５もしくはその生物学的に活性な部分、ＩＬ－２１もしくはその生物学的に活性な部分、又はそれらの組み合わせである、実施形態７７に記載の方法。

７９．サイトカインが膜結合型である、実施形態７６に記載の方法。

８０．膜結合型サイトカインが膜結合型ＩＬ－２（ｍｂＩＬ－２）、膜結合型ＩＬ－１５（ｍｂＩＬ－１５）、又は膜結合型ＩＬ－２１（ｍｂＩＬ－２１）、又はそれらの組み合わせである、実施形態７９に記載の方法。

８１．ＣＡＲが、１）抗原結合ドメイン、２）可撓性リンカー（スペーサー）、３）膜貫通領域、及び４）細胞内シグナル伝達ドメインを含む、実施形態７３－８０のいずれか１つに記載の方法。

８２．抗原結合ドメインが腫瘍抗原を標的とする、実施形態８１の方法。

８３．抗原結合ドメインが、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）である、実施形態８１又は８２に記載の方法。

８４．細胞内シグナル伝達ドメインが、ＣＤ３ζ、ＤＡＰ１０、ＤＡＰ１２、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、又はＯＸ４０由来の１つ以上のシグナル伝達ドメインを含む、実施形態８１～８３のいずれか１つに記載の方法。

８５．細胞内シグナル伝達ドメインが、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、又はＯＸ４０に由来する２つ以上のシグナル伝達ドメインを含む、実施形態８１～８４のいずれか１つに記載の方法。

８６．ＣＡＲをコードする異種核酸が、ｇ－ＮＫ細胞のゲノムへの安定な組込みのための条件下で導入される、実施形態７３～８５のいずれか１つに記載の方法。

８７．ＣＡＲをコードする異種核酸が、ウイルスベクターに含まれ、形質導入によって

ｇ－ＮＫ細胞に導入される、実施形態７３～８６のいずれか１つに記載の方法。
８８．ウイルスベクターがレンチウイルスベクターである、実施形態８７に記載の方法。
８９．ＣＡＲをコードする核酸が、ｇ－ＮＫ細胞における一過性発現のための条件下で導入される、実施形態７３～８５のいずれか１つに記載の方法。
９０．ＣＡＲをコードする核酸が非ウイルス送達によって導入される、実施形態７３～８５及び８９のいずれか１つに記載の方法。
９１．ＣＡＲをコードする核酸が、脂質ナノ粒子を介してｇ－ＮＫ細胞に導入される、実施形態７３～８５、８９及び９０のいずれか１つに記載の方法。
９２．ＣＡＲをコードする核酸がＤＮＡである、実施形態７３～９１のいずれか１つに記載の方法。
９３．ＣＡＲをコードする核酸がＲＮＡである、実施形態７３～８５及び８９～９１のいずれか１つに記載の方法。
９４．ＲＮＡがｍＲＮＡである、実施形態９３に記載の方法。
９５．核酸が、エレクトロポレーションを介してｇ－ＮＫ細胞に導入される、実施形態７３～８５及び８９～９４のいずれか１つに記載の方法。
９６．免疫調節物質をコードする核酸が、ｇ－ＮＫ細胞のゲノムへの安定な組み込みのための条件下で導入される、実施形態７３～９５のいずれか１つに記載の方法。
９７．免疫調節物質をコードする核酸が、ウイルスベクターに含まれ、形質導入によってｇ－ＮＫ細胞に導入される、実施形態７３～９６のいずれか１つに記載の方法。
９８．ウイルスベクターがレンチウイルスベクターである、実施形態９７に記載の方法。
９９．免疫調節物質をコードする核酸が、ｇ－ＮＫ細胞における一過性発現のための条件下で導入される、実施形態７３～９５のいずれか１つに記載の方法。
１００．免疫調節物質をコードする核酸が、非ウイルス送達によって導入される、実施形態７３～９５及び９９のいずれか１つに記載の方法。
１０１．免疫調節物質をコードする核酸が、脂質ナノ粒子を介してｇ－ＮＫ細胞に導入される、実施形態７３～９５、９９及び１００のいずれか１つに記載の方法。
１０２．免疫調節物質をコードする核酸がＤＮＡである、実施形態９６～１０１のいずれか１つに記載の方法。
１０３．免疫調節物質をコードする核酸がＲＮＡである、実施形態９９～１０１のいずれか１つに記載の方法。
１０４．ＲＮＡがｍＲＮＡである、実施形態１０３に記載の方法。
１０５．免疫調節物質をコードする核酸が、エレクトロポレーションによってｇ－ＮＫ細胞に導入される、実施形態７３～８５及び９９～１０４のいずれか１つに記載の方法。
１０６．ＲＮＡが自己増幅性ｍＲＮＡである、実施形態９４及び実施形態１０４の方法。
１０７．ＣＡＲをコードする核酸及び免疫調節物質をコードする核酸が同じポリヌクレオチドからコードされ、一緒に導入される、実施形態７３～１０６のいずれか１つに記載の方法。
１０８．ＣＡＲをコードする核酸及び免疫調節物質をコードする核酸が、ポリヌクレオチド配列のマルチシストロン性エレメントによって隔てられている、実施形態１０７の方法。
１０９．マルチシストロン性エレメントが、Ｔ２Ａ、Ｐ２Ａ及びＦ２Ａからなる群から選択される自己切断ペプチドである、実施形態１０８に記載の方法。
１１０．ＣＡＲをコードする核酸及び免疫調節物質をコードする核酸が、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮された集団を増殖させるためのエクスビボプロセス中に同時に導入される、実施形態７３～１０９のいずれか１つに記載の方法。
１１１．ｇ－ＮＫ細胞組成物が、
（ｉ）ＣＤ３について陰性もしくは低度かつＣＤ５７について陽性（ＣＤ３^{neg}ＣＤ５

７ｐｏｓ）又は（ｉｉ）ＣＤ３について陰性もしくは低度かつＣＤ５６について陽性（ＣＤ３ｎｅｇＣＤ５６ｐｏｓ）のいずれかである、対象由来の生体試料から濃縮されたＮＫ細胞
のエクスビボ増殖によって生成され、
濃縮されたＮＫ細胞が、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞及び１つ以上の組換えサイトカインと共に培養される、
実施形態７３～１１０のいずれか１つに記載の方法。
１１２．１つ以上の組換えサイトカインが、有効量のＳＣＦ、ＧＳＫ３ｉ、ＦＬＴ３、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－１２、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２７、又はこれらの組み合わせから選択される、実施形態１１１に記載の方法。
１１３．培養が２つ以上の組換えサイトカインの存在下で行われ、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、実施形態１１１又は実施形態１１２記載の方法。
１１４．導入することが、
ＦｃＲγ欠損ＮＫ（ｇ－ＮＫ）細胞を増殖させるための方法
の間に行われ、前記方法が、
（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された集団が、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、
（Ｂ）操作されたＮＫ細胞の集団を、
（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞対　濃縮されたＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び
（２）ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカイ
と共に、培地中で培養することと
を含み、
ここで、（ｉ）ＣＡＲをコードする核酸及び／又は（ｉｉ）免疫調節物質をコードする核酸を導入することが、ステップ（Ａ）の後、かつステップ（Ｂ）の前、間、又は後に行われ、ここで、ステップ（ｉ）及び（ｉｉ）は、同時に又は任意の順序で逐次的に行われ、それによって、操作されたＮＫ細胞の集団を産生し、そして
方法は、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮され、かつＣＡＲ及び免疫調節物質で操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、
実施形態７３～１１３のいずれか１つに記載の方法。
１１５．導入することが、
ＦｃＲγ欠損ＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ）を増殖させるための方法
の間に行われ、前記方法が、
（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された集団が、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、
（Ｂ）濃縮されたＮＫ細胞の集団に、（ｉ）ＣＡＲをコードする核酸、及び（ｉｉ）免疫調節物質をコードする核酸を導入することであって、ステップ（ｉ）及び（ｉｉ）が同時に又は任意の順序で逐次的に行われ、それによって、操作されたＮＫ細胞の集団を産生する、導入することと、
（Ｃ）操作されたＮＫ細胞の集団を、
（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞

対　濃縮ＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び
（２）ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカイン
と共に、培養培地中で培養することであって、それによって、ＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、培養することと
を含み、かつ
前記方法が、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮され、かつＣＡＲ及び免疫調節物質で操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、
実施形態７３～１１３のいずれか１つに記載の方法。
１１６．導入することが、
ＦｃＲγ欠損ＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ）を増殖させるための方法
の間に行われ、前記方法が、
（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された集団が、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、
（Ｂ）濃縮されたＮＫ細胞の集団を、
（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞対　濃縮されたＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び
（２）ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカイン
と共に、培地中で培養することであって、それにより、ＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、培養することと、
（Ｃ）増殖させたＮＫ細胞集団のＮＫ細胞に、（ｉ）ＣＡＲをコードする核酸、及び（ｉｉ）免疫調節物質をコードする核酸を導入することであって、ステップ（ｉ）及び（ｉｉ）が同時に又は任意の順序で逐次的に行われる、導入することと
を含み、
前記方法が、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮され、かつＣＡＲ及び免疫調節物質で操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、
実施形態７３～１１３のいずれか１つに記載の方法。
１１７．導入することが、
ＦｃＲγ欠損ＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ）を増殖させるための方法
の間に行われ、前記方法が、
（Ａ）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団を得ることであって、ＮＫ細胞について濃縮された集団が、ヒト対象由来の生体試料から選択される、得ることと、
（Ｂ）濃縮されたＮＫ細胞の集団を、ＮＫ細胞を増殖させるための条件下で培養培地中で培養することを含む第１の増殖を実施することであって、第１の増殖させたＮＫ細胞集団を産生する、実施することと、
（Ｃ）第１の増殖させたＮＫ細胞集団のＮＫ細胞に、（ｉ）ＣＡＲをコードする核酸、及び（ｉｉ）免疫調節物質をコードする核酸を導入することであって、ステップ（ｉ）及び（ｉｉ）が同時に又は任意の順序で逐次的に行われ、それによって、操作されたＮＫ細胞の集団を産生する、導入することと、
（Ｄ）ＮＫ細胞の更なる増殖のための条件下で、操作されたＮＫ細胞の集団を培養する

ことを含む第２の増殖を実施することと
を含み、
第１の増殖及び／又は第２の増殖が、濃縮されたＮＫ細胞の集団を、
（１）照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞であって、フィーダー細胞がＨＬＡクラスＩ及びＨＬＡクラスＩＩを欠損しており、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞対　濃縮されたＮＫ細胞の比が１：１０～１０：１である、照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞、及び
（２）ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカインであって、少なくとも１つの組換えサイトカインがインターロイキン（ＩＬ）－２であり、少なくとも１つの組換えサイトカインがＩＬ－２１である、ＮＫ細胞の増殖のための有効量の２つ以上の組換えサイトカイン
と共に、培地中で培養することを含み、
前記方法が、ｇ－ＮＫ細胞について濃縮され、かつＣＡＲ及び免疫調節物質で操作された細胞を含む、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を産生する、
実施形態７３～１１３のいずれか１つに記載の方法。
１１８．ＮＫ細胞について濃縮された初代ヒト細胞の集団が、ヒト対象由来の生体試料から、（ｉ）ＣＤ３について陰性もしくは低度かつＣＤ５７について陽性（ＣＤ３^{neg}ＣＤ５７^{pos}）又は（ｉｉ）ＣＤ３について陰性もしくは低度かつＣＤ５６について陽性（ＣＤ３^{neg}ＣＤ５６^{pos}）のいずれかである細胞を選択することによって得られる、実施形態１１１～１１７のいずれか１つに記載の方法。
１１９．ＮＫ細胞について濃縮された集団が、ＮＫＧ２Ｃについて陽性である細胞（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）について更に選択された細胞である、
ＮＫ細胞について濃縮された集団が、ＮＫＧ２Ａについて陰性又は低度である細胞（ＮＫＧ２Ａ^{neg}）について更に選択された細胞である、又は
ＮＫ細胞について濃縮された集団が、ＮＫＧ２Ｃについて陽性であり、ＮＫＧ２Ａについて陰性又は低度である細胞（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}ＮＫＧ２Ａ^{neg}）について更に選択された細胞である、
実施形態８２に記載の方法。
１２０．ヒト対象が、対象由来の末梢血試料中のナチュラルキラー（ＮＫ）細胞の少なくとも２０％又は約２０％がＮＫＧ２Ｃについて陽性　（ＮＫＧ２Ｃ^{pos}）でありかつ末梢血試料中のＮＫ細胞の少なくとも７０％がＮＫＧ２Ａについて陰性又は低度である（ＮＫＧ２Ａ^{neg}）対象である、実施形態１１１～１２０のいずれか１つに記載の方法。
１２１．対象がＣＭＶ血清陽性である、実施形態１１１～１２０のいずれか１つに記載の方法。
１２２．対象由来の生体試料中のＮＫ細胞のうちのｇ－ＮＫ細胞の割合が、５％超もしくは約５％超、１０％超もしくは約１０％超、又は３０％超もしくは約３０％超である、実施形態１１１～１２１のいずれか１つに記載の方法。
１２３．濃縮されたＮＫ細胞の集団中のｇ－ＮＫ細胞の割合が、２０％もしくは約２０％から、９０％もしくは約９０％、４０％もしくは約４０％から、９０％もしくは約９０％、又は６０％もしくは約６０％から、９０％もしくは約９０％である、実施形態１１１～１２２のいずれか１つに記載の方法。
１２４．ＮＫ細胞について濃縮された集団が、ＣＤ３について陰性もしくは低度かつＣＤ５７について陽性である、生体試料から選択された細胞（ＣＤ３^{neg}ＣＤ５７^{pos}）である、実施形態１１１～１２３のいずれか１つに記載の方法。
１２５．ＮＫ細胞について濃縮された集団が、ＣＤ３について陰性もしくは低度かつＣＤ５６について陽性である、生体試料から選択された細胞（ＣＤ３^{neg}ＣＤ５６^{pos}）である、実施形態１１１～１２３のいずれか１つに記載の方法。
１２６．２つ以上の組換えサイトカインが、有効量のＳＣＦ、ＧＳＫ３ｉ、ＦＬＴ３、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－１２、ＩＬ－１８、ＩＬ－２７、又はそれらの組み合わせを更に含む、実施形態１１３～１２５のいずれか１つに記載の方法。

１２７．組換えサイトカインがＩＬ－２１及びＩＬ－２である、実施形態１１１～１２５のいずれか１つに記載の方法。
１２８．組換えサイトカインが、ＩＬ－２１、ＩＬ－２、及びＩＬ－１５である、実施形態１１１～１２６のいずれか１つに記載の方法。
１２９．組換えＩＬ－２１が、培養の少なくとも一部の間に、１０ｎｇ／ｍＬ又は約１０ｎｇ／ｍＬから、１００ｎｇ／ｍＬ又は約１００ｎｇ／ｍＬである濃度で培養培地に添加される、実施形態１１１～１２８のいずれか１つに記載の方法。
１３０．組換えＩＬ－２１が、培養の少なくとも一部の間に、２５ｎｇ／ｍＬ又は約２５ｎｇ／ｍＬの濃度で培養培地に添加される、実施形態１１１～１２９のいずれか１つに記載の方法。
１３１．組換えＩＬ－２が、培養の少なくとも一部の間に、１０ＩＵ／ｍＬ又は約１０ＩＵ／ｍＬから、５００ＩＵ／ｍＬ又は約５００ＩＵ／ｍＬの濃度で培養培地に添加される、実施形態１１１～１３０のいずれか１つに記載の方法。
１３２．組換えＩＬ－２が、培養の少なくとも一部の間に、１００ＩＵ／ｍＬ又は約１００ＩＵ／ｍＬの濃度で培養培地に添加される、実施形態１１１～１３１のいずれか１つに記載の方法。
１３３．組換えＩＬ－２が、培養の少なくとも一部の間に、５００ＩＵ／ｍＬ又は約５００ＩＵ／ｍＬの濃度で培養培地に添加される、実施形態１１１～１３２のいずれか１つに記載の方法。
１３４．組換えＩＬ－１５が、培養の少なくとも一部の間に、１ｎｇ／ｍＬ又は約１ｎｇ／ｍＬから、５０ｎｇ／ｍＬ又は約５０ｎｇ／ｍＬの濃度で培養培地に添加される、実施形態１１１～１２６及び１２８～１３４のいずれか１つに記載の方法。
１３５．組換えＩＬ－１５が、培養の少なくとも一部の間に、１０ｎｇ／ｍＬ又は約１０ｎｇ／ｍＬの濃度で培養培地に添加される、実施形態１１１～１２６及び１２８～１３４のいずれか１つに記載の方法。
１３６．組換えサイトカインが、培養の開始時又はほぼ開始時に培養培地に添加される、実施形態１１１～１３５のいずれか１つに記載の方法。
１３７．培養中に培養培地を１回以上交換することを更に含み、培養培地の各交換において、組換えサイトカインを含有する新鮮な培地が添加される、実施形態１１１～１３６のいずれか１つに記載の方法。
１３８．培養培地の交換が、培養の期間中、２日又は３日毎に行われる、実施形態１３７に記載の方法。
１３９．培地の交換が、最大５日間の培地交換を伴わない第１の増殖の後に行われ、任意選択で、最大５日間の培地交換を伴わない第１の増殖の後に行われる、実施形態１３７又は実施形態１３８に記載の方法。
１４０．ヒト対象が、ＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｖ　ＮＫ細胞遺伝子型又はＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｆ　ＮＫ細胞遺伝子型を有し、任意選択で、生体試料が、ＣＤ１６　１５８Ｖ／ＶＮＫ細胞遺伝子型又はＣＤ１６　１５８Ｖ／Ｆ　ＮＫ細胞遺伝子型について選択されたヒト対象に由来する、実施形態１１１～１３９のいずれか１つに記載の方法。
１４１．生体試料が、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）であるか、又はそれを含み、任意選択で血液試料、アフェレーシス試料又は白血球アフェレーシス試料である、実施形態１１１～１４０のいずれか１つに記載の方法。
１４２．ＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞が、ＨＬＡ－Ｅで形質転換されたＫ５６２細胞（Ｋ５６２－ＨＬＡ－Ｅ）である、実施形態１１１～１４１のいずれか１つに記載の方法。
１４３．ＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞が、２２１．ＡＥＨ細胞である、実施形態１１１～１４５のいずれか１つに記載の方法。
１４４．照射されたＨＬＡ－Ｅ＋フィーダー細胞　対　濃縮されたＮＫ細胞の比が、１：１～５：１（両端を含む）であり、１：１～３：１（両端を含む）であり、任意選択で、２．５：１もしくは約２．５：１、又は２：１もしくは約２：１、又は約１：１である、実施形態１１１～１４３のいずれか１つに記載の方法。

１４５．培養の少なくとも一部の間に培養培地に添加される組換えサイトカインが、５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、１０ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１５、及び２５ｎｇ／ｍＬのＩＬ－２１である、実施形態１１１～１４４のいずれか１つに記載の方法。

１４６．濃縮されたＮＫ細胞の集団が、２．０×１０^{5}個の濃縮ＮＫ細胞もしくは約２．０×１０^{5}個の濃縮ＮＫ細胞から、５．０×１０^{7}個の濃縮ＮＫ細胞もしくは約５．０×１０^{7}個の濃縮ＮＫ細胞、１．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞もしくは約１．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞から、１．０×１０^{8}個の濃縮ＮＫ細胞もしくは約１．０×１０^{8}個の濃縮ＮＫ細胞、１．０×１０^{7}個の濃縮ＮＫ細胞もしくは約１．０×１０^{7}個の濃縮ＮＫ細胞から、５．０×１０^{8}個の濃縮ＮＫ細胞もしくは約５．０×１０^{8}個の濃縮ＮＫ細胞、又は１．０×１０^{7}個の濃縮ＮＫ細胞もしくは約１．０×１０^{7}個の濃縮ＮＫ細胞から、約１．０×１０^{9}個の濃縮ＮＫ細胞もしくは約１．０×１０^{9}個の濃縮ＮＫ細胞を含み、（それぞれ両端を含む）、任意選択で、濃縮されたＮＫ細胞の集団が、１．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞又は約１．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞を含む、実施形態１１１～１４５のいずれか１つに記載の方法。

１４７．培養開始時の濃縮されたＮＫ細胞の集団は、０．０５×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬもしくは約０．０５×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬから、１．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬもしくは約１．０×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬ、又は０．０５×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬもしくは約０．０５×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬから、０．５×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬもしくは約０．５×１０^{6}個の濃縮ＮＫ細胞／ｍＬの濃度であり、場合により、培養開始時の濃縮されたＮＫ細胞の集団は、１ｍＬ当たり０．２×１０ ^{6}又は約０．２×１０^{6}の濃縮ＮＫ細胞の濃度を含む実施形態１１１～１４６のいずれか１つに記載の方法。

１４８．少なくとも２．５０×１０^{8}もしくは少なくとも約２．５０×１０^{8}個のｇ－ＮＫ細胞、少なくとも５．００×１０^{8}もしくは少なくとも約５．００×１０^{8}個のｇ－ＮＫ細胞、少なくとも１．０×１０^{9}もしくは少なくとも約１．０×１０^{9}個のｇ－ＮＫ細胞、又は少なくとも５．０×１０^{9}もしくは少なくとも約５．０×１０^{9}個のｇ－ＮＫ細胞の増殖を方法が達成する時点まで、培養が行われる、実施形態１１１～１４６のいずれか１つに記載の方法。

１４９．５日間、６日間、７日間、８日間、９日間、１０日間、１１日間、１２日間、１３日間、１４日間、１５日間、１６日間、１７日間、１８日間、１９日間、２０日間、２１日間、２２日間、２３日間、２４日間、もしくは２５日間、又は約５日間、６日間、７日間、８日間、９日間、１０日間、１１日間、１２日間、１３日間、１４日間、１５日間、１６日間、１７日間、１８日間、１９日間、２０日間、２１日間、２２日間、２３日間、２４日間、もしくは２５日間、又は少なくとも５日間、６日間、７日間、８日間、９日間、１０日間、１１日間、１２日間、１３日間、１４日間、１５日間、１６日間、１７日間、１８日間、１９日間、２０日間、２１日間、２２日間、２３日間、２４日間、もしくは２５日間、又は少なくとも約５日間、６日間、７日間、８日間、９日間、１０日間、１１日間、１２日間、１３日間、１４日間、１５日間、１６日間、１７日間、１８日間、１９日間、２０日間、２１日間、２２日間、２３日間、２４日間、もしくは２５日間、培養が行われる、実施形態１１１～１４８のいずれか１つに記載の方法。

１５０．方法によって産生された、操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を、収集することを更に含む、実施形態１１１～１４９のいずれか１つに記載の方法。

１５１．操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を、薬学的に許容される賦形剤中に製剤化することを更に含む、実施形態１１１～１５０のいずれか１つに記載の方法。

１５２．操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団を、抗凍結剤を含む無血清凍結保存培地と共に製剤化することを更に含む、実施形態１５１の方法。

１５３．抗凍結剤がＤＭＳＯであり、任意選択で抗凍結剤がＤＭＳＯであり、凍結保存媒体が、５％～１０％ＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）であり、任意選択で１０％ＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）又は約１０％ＤＭＳＯ（ｖ／ｖ）である、実施形態１５２に記載の方法。

１５４．方法によって産生された操作されたＮＫ細胞の増殖させた集団の中で、集団の

５０％超がＦｃＲγ^{neg}である、集団の６０％超がＦｃＲγ^{neg}である、集団の７０％超がＦｃＲγ^{neg}である、集団の８０％超がＦｃＲγ^{neg}である、集団の９０％超がＦｃＲγ^{neg}である、又は集団の９５％超がＦｃＲγ^{neg}である、実施形態１１１～１５３のいずれか１つに記載の方法。

１５５．実施形態７３～１５４のいずれか１つに記載の方法によって産生される複数の操作されたＮＫ細胞を含む組成物。

１５６．有効量の実施形態２５～７２及び１５５のいずれか１つに記載の組成物の細胞を、それを必要とする個体に投与することを含む、対象における疾患又は状態を治療する方法。

１５７．疾患又は状態が、炎症状態、感染症、又はがんからなる群から選択される、実施形態１５６に記載の方法。

１５８．疾患又は状態が、がんであり、がんが、白血病、リンパ腫、又は骨髄腫である、実施形態１５６又は実施形態１５７の方法。

１５９．疾患又は状態が、がんであり、がんが、固形腫瘍を含む、実施形態１５６又は実施形態１５７の方法。

１６０．がんが、胃又は食道胃接合部の腺がん、膀胱がん、乳がん、脳がん、子宮頸がん、結腸直腸がん、内分泌／神経内分泌がん、頭頸部がん、消化管間質がん、骨巨細胞腫瘍、腎臓がん、肝臓がん、肺がん、神経芽細胞腫、卵巣上皮／ファロピウス管／原発性腹膜がん、膵臓がん、前立腺がん、皮膚がん、及び軟部組織がんの中から選択される、実施形態１５９に記載の方法。

１６１．組成物が単剤療法として投与される、実施形態１５６～１６０のいずれか１つに記載の方法。

１６２．ｇ－ＮＫ細胞組成物の、１×１０^{5}又は約１×１０^{5}から、５０×１０^{9}又は約５０×１０^{9}個の細胞を、個体に投与することを含む、実施形態１５６～１６１のいずれか１つに記載の方法。

１６３．ｇ－ＮＫ細胞組成物の、１×１０^{8}又は約１×１０^{8}から、５０×１０^{9}又は約５０×１０^{9}個の細胞、任意選択で、ｇ－ＮＫ細胞組成物の５×１０^{8}もしくは約５×１０^{8}個の細胞、ｇ－ＮＫ細胞組成物の５×１０^{9}もしくは約５×１０^{9}個の細胞、又はｇ－ＮＫ細胞組成物の１０×１０^{9}もしくは約１０×１０^{9}個の細胞を、投与することを含む、実施形態１５６～１６２のいずれか１つに記載の方法。

１６４．ｇ－ＮＫ細胞の用量の投与前に、前記対象がリンパ球枯渇療法を受けている、実施形態１５６～１６３のいずれか１つに記載の方法。

１６５．リンパ枯渇療法がフルダラビン及び／又はシクロホスファミドを含む、実施形態１６４記載の方法。

１６６．リンパ枯渇療法が、フルダラビンを、対象の体表面積で２０～４０ｍｇ／ｍ^{2}又は約２０～４０ｍｇ／ｍ^{2}、任意選択で３０ｍｇ／ｍ^{2}又は約３０ｍｇ／ｍ^{2}で、毎日、２～４日間にわたって投与し、かつ／又はシクロホスファミドを、対象の体表面積で２００～４００ｍｇ／ｍ^{2}又は約２００～４００ｍｇ／ｍ^{2}、任意選択で３００ｍｇ／ｍ^{2}又は約３００ｍｇ／ｍ^{2}で、毎日、２～４日間にわたって投与することを含む、実施形態１６４又は実施形態１６５の方法。

１６７．リンパ枯渇療法がフルダラビン及びシクロホスファミドを含む、実施形態１６４～１６６のいずれか１つに記載の方法。

１６８．リンパ球枯渇療法が、フルダラビンを対象の体表面積で３０ｍｇ／ｍ^{2}又は約３０ｍｇ／ｍ^{2}で毎日、及びシクロホスファミドを対象の体表面積で３００ｍｇ／ｍ^{2}又は約３００ｍｇ／ｍ^{2}で毎日、それぞれ２～４日間にわたって、任意選択で３日間にわたって投与することを含む、実施形態１６４～１６７のいずれか１つに記載の方法。

１６９．ｇ－ＮＫ細胞の用量の投与が、リンパ球枯渇療法の開始後２週間以内に、又は２週間もしくは約２週間で開始される、態様１６４～１６８のいずれか１つに記載の方法。

１７０．個体がヒトである、実施形態１５６～１６９のいずれか１つに記載の方法。

１７１．組成物中のＮＫ細胞が、個体にとって同種異系である、実施形態１５６～１７０のいずれか１つに記載の方法。
１７２．組成物中のＮＫ細胞が、対象にとって自己由来である、実施形態１５６～１７０のいずれか１つに記載の方法。
【実施例】
【０６２７】
ＩＸ．実施例
以下の実施例は、例示の目的のみのために含まれ、本発明の範囲を限定することを意図しない。
【０６２８】
実施例１：異なるサイトカインの存在下でのｇ－ＮＫ細胞の増殖
ＣＭ　Ｖ血清陽性ドナーからの５０ｍＬの新鮮な全血（それぞれ５６．２４％及び１１．６８％のＮＫＧ２Ｃ^{pos}及びＮＫＧ２Ａ^{neg}ＮＫ細胞割合）をＡＣＤバキュテナーチューブに収集し、ＰＢＳで１：１に希釈した。ＰＢＭＣを、製造者の指示に従ってＨｉｓｔｏｐａｑｕｅ（登録商標）密度遠心分離によって単離した。ＰＢＭＣ含有バフィーコートを回収した後、ＰＢＭＣをＰＢＳで洗浄し、計数した。細胞計数後、磁気ビーズ分離を行って、ｇ－ＮＫ細胞の頻度を増加させた。磁気ビーズ分離は、ＣＤ５７^{pos}ＮＫ細胞を単離するために、ＣＤ３枯渇とそれに続くＣＤ５７濃縮であった。
【０６２９】
トランスジェニックリンパ腫細胞株２２１．ＡＥＨ（Ｌｅｅ　ｅｔ　ａｌ．（１９９８）Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，１６０：４９５１－４９６０）及びトランスジェニック白血病細胞株Ｋ５６２－ｍｂ１５－４１ＢＢＬ（Ｆｕｊｉｓａｋｉ　ｅｔ　ａｌ．（２００９）Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，６９（９）：４０１０－４０１７）を、ＮＫ細胞増殖のためのフィーダー細胞として調製した。フィーダー細胞を新鮮な培養物すなわち、凍結保存されていないストックから採取し、使用前に照射した。２２１．ＡＥＨ及びＫ５６２－ｍｂ１５－４１ＢＢＬ細胞を５×１０^{5}細胞／ｍＬの播種密度及び継代培養密度２×１０^{5}細胞／ｍＬで増殖させた。２２１．ＡＥＨフィーダー細胞を増殖させるために使用した培地は、１０％ＦＢＳ及び２００μｇ／ｍＬのハイグロマイシンＢを含むＲＰＭＩ－１６４０であった。Ｋ５６２－ｍｂ１５－４１ＢＢＬフィーダー細胞を増殖させるために使用した培地は、１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ－１６４０であった。
【０６３０】
非凍結保存ＮＫ細胞を４つの異なる条件下で増殖させた：５００　ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を用いて２：１のＡＥＨ対ＮＫ細胞比、５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を伴う２：１のＫ５６２－ｍｂ１５－４１ＢＢＬ対ＮＫ細胞比、５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を用いて１：１：１のＡＥＨ対Ｋ５６２－ｍｂ１５－４１ＢＢＬ対ＮＫ細胞比で、ならびに５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、１０ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１５、及び２５ｎｇ／ｍＬのＩＬ－２１を用いて２：１のＡＥＨ対ＮＫ細胞比で。全ての増殖は、５％ヒトＡＢ血清及びそれぞれのサイトカインを補充したＣｅｌｌＧｅｎｉｘ　ＧＭＰ　ＳＣＧＭ培地中で行った。共培養細胞を３７℃及び５％CO_2で２１日間培養した$_2$。培地を交換又は補充するたびに（５、７、１０、１３、１６、１９、及び２１日目）細胞を計数し、ｇ－ＮＫの割合を０日目、１３日目、及び２１日目にフローサイトメトリーによって評価した。
【０６３１】
図１Ａ～１Ｂに示すように、増殖培地へのＩＬ－２１の添加は、ｇ－ＮＫ細胞増殖の顕著な増加をもたらした。総ｇ－ＮＫ細胞数（ＦｃεＲ１γが欠損している細胞、本明細書では互換的にＦｃＲγとも呼ばれる）は、ＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞について最も高かった（図１Ａ）。２１日目までのｇ－ＮＫ細胞の増殖倍数もまた、ＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞について最も高かった（図１Ｂ）。
【０６３２】
総合すると、これらの結果は、ＩＬ－２１の存在がｇ－ＮＫ細胞増殖を改善することを

示す。

【０６３３】

実施例２：異なるサイトカインの存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞の細胞エフェクター機能

この研究では、実施例１に記載されるように、ＩＬ－２１の存在下を含む、異なるフィーダー細胞及びサイトカインの存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞において、ＮＫ細胞エフェクター機能を測定した。アッセイは、標的細胞ラインＬＰ１及びＭＭ．１Ｓを０．５：１のＮＫ対ＭＭ細胞比で使用し、抗体ダラツムマブ及びエロツズマブを用いて以下に記載するように実施した。

【０６３４】

Ａ．細胞媒介性細胞傷害

増殖したＮＫ細胞を解凍した後、10^4個のＮＫ細胞を、１：１のＮＫ細胞対ＭＭ細胞比で、１μｇ／ｍＬのダラツムマブ（抗ＣＤ３８）又は１μｇ／ｍＬのエロツズマブ（抗ＣＤ３１９）が存在する状態で、ＭＭ標的細胞と共培養した。CO_2インキュベーター中、３７℃で４時間インキュベートした後、細胞を洗浄し、抗ＣＤ３及びＣＤ５６抗体で染色して、ＮＫ細胞の数を定量した。最後の洗浄後、ヨウ化プロピジウム（ＰＩ）を添加し、４色フローサイトメトリーを使用して、ＮＫ細胞、生存標的細胞、及び死滅標的細胞の数を分析した（Ｂｉｇｌｅｙ　ｅｔ　ａｌ．（２０１６），Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１８５：２３９－２５１）。

【０６３５】

図２Ａ～２Ｂに示すように、ＩＬ－２１の存在下で２１日間増殖させたｇ－ＮＫ細胞は、ＩＬ－２１なしで増殖させたｇ－ＮＫ細胞よりも、ＣＤ３８^{高}ＭＭ細胞株ＬＰ１（図２Ａ）及びＳＬＡＭＦ７^{高}ＭＭ細胞株ＭＭ．１Ｓ（図２Ｂ）に対する細胞媒介性細胞傷害性が大きかった。ＩＬ－２１増殖ｇ－ＮＫ細胞についてのより大きな細胞性細胞傷害性が、ダラツムマブ又はエロツズマブのいずれかの存在と同様に、非存在下で観察された。

【０６３６】

総合すると、これらの結果は、ＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞が、ＩＬ－２１なしで増殖させたｇ－ＮＫ細胞と比較して、腫瘍細胞に対する細胞媒介性細胞傷害性を増強したことを示す。

【０６３７】

Ｂ．脱顆粒

増殖させたＮＫ細胞を解凍すると、２．０×10^{6}ＮＫ細胞は、１μｇ／ｍＬのダラツムマブ又は１μｇ／ｍＬのエロツズマブが存在する状態で、１：１のＮＫ細胞対ＭＭ比でＭＭ標的細胞と共培養した。脱顆粒アッセイのために、２μＬのＶｉｏＧｒｅｅｎコンジュゲート抗ＣＤ１０７ａを共培養物に添加して、CO_2インキュベーター中、３７℃で１時間インキュベートし、その後、モネンシンを含有する４μＬのＢＤ　ＧｏｌｇｉＳｔｏｐを添加した。サイトカイン発現アッセイのために、ブレフェルジンＡを含有する６μＬのＢＤ　ＧｏｌｇｉＳｔｏｐを代わりに添加した。次いで、細胞を、ＣＯ２インキュベーター中、３７℃で更に５時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を回収し、洗浄し、０．５μＬの抗ＣＤ４５抗体、０．５μＬの抗ＣＤ３抗体、及び１μＬの抗ＣＤ５６抗体（すべての抗体はＭｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃから購入）で染色した。次いで、細胞を固定し、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　ＢｉｏｔｅｃからのＩｎｓｉｄｅ　Ｓｔａｉｎ　Ｋｉｔを製造業者の指示に従って使用して固定及び透過処理した。次いで、細胞を、表Ｅ１に記載されるように、１μＬの抗ＦｃＲγ、２μＬの抗パーフォリン、２μＬの抗グランザイムＢ、２μＬのインターフェロン－γ、及び２μＬのＴＮＦ－α抗体で染色した。最後の洗浄後、８色フローサイトメトリーを用いて細胞を分離した。

【０６３８】

（表Ｅ１）機能アッセイのための抗体パネル

チューブ	V1	V2	B1	B2	B3	B4	R1	R2
脱顆粒（細胞傷害性顆粒の放出）								
1	CD45	CD107a	FcRγ	パーフォリン		CD3	Granz B	CD56
サイトカイン発現								
2	CD45	CD107a	FcRγ	IFN－γ		CD3	TNF－α	CD56

【０６３９】
図３Ａ～３Ｄに示すように、増殖１３日後（図３Ａ～３Ｂ）及び２１日後（図３Ｃ～３Ｄ）の両方で、ＩＬ－２１の存在において増殖したｇ－ＮＫ細胞は、ＩＬ－２１なしで増殖したｇ－ＮＫ細胞よりも、ＣＤ３８^{高}ＭＭ細胞株ＬＰ１（図３Ａ及び図３Ｃ）及びＳＬＡＭＦ７^{高}ＭＭ細胞株ＭＭ．１Ｓ（図３Ｂ及び図３Ｄ）に対してより脱顆粒した。ＩＬ－２１増殖ｇ－ＮＫ細胞についてのより大きな顆粒減少が、ダラツムマブ又はエロツズマブのいずれかの存在と同様に、抗体の不在下で観察された。
【０６４０】
まとめると、これらの結果は、ＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞が、ＩＬ－２１なしで増殖させたｇ－ＮＫ細胞と比較して、腫瘍細胞に対する脱顆粒を増強したことを示す。
【０６４１】
Ｃ．パーフォリン及びグランザイムＢの発現
図４Ａ～４Ｄに示されるように、パーフォリン陽性細胞の割合（図４Ａ及び図４Ｃ）及び全パーフォリン発現（ＭＦＩ）（図４Ｂ及び図４Ｄ）の両方によって測定されるように、ＩＬ－２１の存在中で増殖させたｇ－ＮＫ細胞は、増殖の１３日後（図４Ａ～４Ｂ）及び２１日後（図４Ｃ～４Ｄ）の両方で、ＩＬ－２１なしで増殖させたｇ－ＮＫ細胞よりも多くの細胞溶解性タンパク質パーフォリンを発現した。更に、増殖の１３日後及び２１日後の両方において、グランザイムＢ陽性細胞の割合（図４Ａ及び図４Ｃ）ならびに総グランザイムＢ発現（ＭＦＩ）（図４Ｂ及び図４Ｄ）の両方によって測定されるように、ＩＬ－２１の存在において増殖させたｇ－ＮＫ細胞は、ＩＬ－２１なしで増殖させたｇ－ＮＫ細胞よりも多くのアポトーシス促進性プロテイングランザイムＢを発現した。
【０６４２】
まとめると、これらの結果は、ＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞が、ＩＬ－２１なしで増殖させたｇ－ＮＫ細胞と比較して、パーフォリン及びグランザイムＢの発現を増強したことを示す。
【０６４３】
Ｄ．インターフェロン－γの発現
図５Ａ～５Ｄに示すように、ＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞は、増殖の１３日後（図５Ａ～５Ｂ）及び２１日後（図５Ｃ～５Ｄ）の両方で、ＩＬ－２１なしで増殖させたｇ－ＮＫ細胞よりも、ＣＤ３８^{高}ＭＭ細胞株ＬＰ１（図５Ａ及び図５Ｃ）ならびにＳＬＡＭＦ７^{高}ＭＭ細胞株ＭＭ．１Ｓ（図５Ｂ及び図５Ｄ）に対してより多くのインターフェロン－γを発現した。ＩＬ－２１増殖ｇ－ＮＫ細胞についてのより大きなインターフェロン－γ発現が、ダラツムマブ又はエロツズマブのいずれかの存在と同様に、抗体の不在下で観察された。
【０６４４】
まとめると、これらの結果は、ＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞が、ＩＬ－２１なしで増殖させたｇ－ＮＫ細胞と比較して、腫瘍細胞に対するインターフェロン－γ発現を増強したことを示す。
【０６４５】
Ｅ．ＴＮＦ－αの発現
図６Ａ～６Ｄに示されるように、増殖１３日後（図６Ａ～６Ｂ）及び２１日後（図６Ｃ～６Ｄ）の両方において、ＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞は、ＩＬ－２１

なしで増殖させたｇ－ＮＫ細胞よりも、ＣＤ３８^{高}ＭＭ細胞株ＬＰ１（図６Ａ及び図６Ｃ）ならびにＳＬＡＭＦ７^{高}ＭＭ細胞株ＭＭ．１Ｓ（図６Ｂ及び図６Ｄ）に対してより多くのＴＮＦ－αを発現した。ＩＬ－２１増殖ｇ－ＮＫ細胞についてのより大きなＴＮＦ－α発現が、ダラツムマブ又はエロツズマブのいずれかの存在と同様に、抗体の不在下で観察された。

【０６４６】

まとめると、これらの結果は、ＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞が、ＩＬ－２１なしで増殖させたｇ－ＮＫ細胞と比較して、腫瘍細胞に対するＴＮＦ－α発現を増強したことを示す。

【０６４７】

実施例３：追加のサイトカインの存在下でのｇ－ＮＫ細胞の増殖

別の研究では、サイトカイン混合物及び濃度の様々な組み合わせの存在下で増殖させたＮＫ細胞の増殖速度を比較した。実施例１と同じドナーから、上記のようにＮＫ細胞を採取した。ＮＫ細胞を２ｘ１０^{5}細胞／ｍＬの密度及び継代密度で播種し、２：１の２２１．ＡＥＨ対ＮＫ細胞比で照射した２２１．ＡＥＨフィーダー細胞と共培養した。ＮＫ細胞増殖のために、サイトカインを以下の濃度で添加した：１００ＩＵ／ｍＬ（低ＩＬ－２）又は５００ＩＵ／ｍＬ（ＩＬ－２）のＩＬ－２、１０ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１５、２５ｎｇ／ｍＬのＩＬ－２１、１０ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１２、１０ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１８、及び／又は１０ｎｇ／ｍＬのＩＬ－２７。全ての増殖は、５％ヒトＡＢ血清及びそれぞれのサイトカインを補充したＣｅｌｌＧｅｎｉｘ　ＧＭＰ　ＳＣＧＭ培地中で行った。

【０６４８】

図７に示すように、ＩＬ－２１の存在下で増殖させたＮＫ細胞は、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、及びＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２７単独の存在下で増殖させたＮＫ細胞よりも高いｇ－ＮＫ細胞増殖速度を有していた。最も高いｇ－ＮＫ細胞増殖速度をもたらすサイトカインの組み合わせは、ＩＬ－１５の存在下又は非存在下のいずれかにおいて、ＩＬ－２及びＩＬ－２１であった。

【０６４９】

まとめると、これらの結果は、ＩＬ－２１の存在が、他のサイトカイン混合物よりもｇ－ＮＫ細胞増殖速度を改善することを示す。

【０６５０】

実施例４：追加のサイトカインの存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞の細胞エフェクター機能

実施例３に記載されるように、ＩＬ－２１の存在下を含むサイトカインの存在下で１５日間増殖させたｇ－ＮＫ細胞において、ＮＫ細胞エフェクター機能を測定した。０．５：１のＮＫ対ＭＭ比で標的細胞ラインＬＰ１及びＭＭ．１Ｓを使用し、抗体ダラツムマブ及びエロツズマブを用いて、実施例２に記載のようにアッセイを行った。

【０６５１】

Ａ．細胞媒介性細胞傷害性

図８Ａ及び図８Ｂに示すように、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞は、ＣＤ３８^{高}ＭＭ細胞株ＬＰ１（図８Ａ）及びＳＬＡＭＦ７^{高}ＭＭ細胞株ＭＭ．１Ｓ（図８Ｂ）に対して、ＩＬ－２及びＩＬ－１５の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞よりも大きな細胞媒介性細胞傷害性を有した。ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の存在において増殖させたｇ－ＮＫ細胞についてのより大きな細胞性細胞傷害性が、抗体の不在下、ならびにダラツムマブ又はエロツズマブのいずれかの存在において観察された。

【０６５２】

まとめると、これらの結果は、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞が、ＩＬ－２及びＩＬ－１５の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞と比較して、腫瘍細胞に対する細胞媒介性細胞傷害性を増強したことを示す。

【０６５３】

Ｂ．脱顆粒

図８Ｃ及び図８Ｄに示されるように、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の存在下で増殖したｇ－ＮＫ細胞は、ＩＬ－２及びＩＬ－１５の存在下で増殖したｇ－ＮＫ細胞よりも、ＣＤ３８^{高}ＭＭ細胞株ＬＰ１（図８Ｃ）及びＳＬＡＭＦ７^{高}ＭＭ細胞株ＭＭ．１Ｓ（図８Ｄ）に対してより脱顆粒した。ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞についてのより大きな脱顆粒が、抗体の非存在下を含むすべての条件下で観察された。

【０６５４】

まとめると、これらの結果は、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞が、ＩＬ－２及びＩＬ－１５の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞と比較して、腫瘍細胞に対する脱顆粒を増強したことを示す。

【０６５５】

Ｃ．パーフォリン及びグランザイムＢの発現

図８Ｅ及び図８Ｆに示すように、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞は、パーフォリン陽性細胞の割合（図８Ｅ）及び全パーフォリン発現（ＭＦＩ）（図８Ｆ）の両方によって測定されるように、ＩＬ－２及びＩＬ－１５の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞よりも多くの細胞溶解性タンパク質パーフォリンを発現した。更に、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞は、グランザイムＢ陽性細胞の割合（図８Ｅ）及び総グランザイムＢ発現（ＭＦＩ）（図８Ｆ）の両方によって測定されるように、ＩＬ－２及びＩＬ－１５の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞よりも多くのアポトーシス促進性タンパク質グランザイムＢを発現した。増殖培地へのＩＬ－２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＩＬ－２７の添加は、ｇ－ＮＫ細胞によるグランザイムＢ発現を増強した。

【０６５６】

まとめると、これらの結果は、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞が、ＩＬ－２及びＩＬ－１５の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞と比較して、パーフォリン及びグランザイムＢの発現を増強したことを示す。

【０６５７】

Ｄ．インターフェロン－γの発現

図８Ｇ～８Ｈに示すように、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞は、ＩＬ－２及びＩＬ－１５の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞よりも、ＣＤ３８^{高}ＭＭ細胞株ＬＰ１（図８Ｇ）及びＳＬＡＭＦ７^{高}ＭＭ細胞株ＭＭ．１Ｓ（図８Ｈ）に対してより多くのインターフェロン－γを発現した。ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞についてのより大きなインターフェロン－γ発現が、抗体の非存在下を含む全ての条件下で観察された。増殖培地へのＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、及びＩＬ－２１の添加は、抗体の非存在下を含む全ての条件下で、ｇ－ＮＫ細胞によるインターフェロン－γ発現を増強した。増殖培地へのＩＬ－２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＩＬ－２７の添加は、抗体の非存在下を含む全ての条件下で、ｇ－ＮＫ細胞によるインターフェロン－γ発現を増強した。

【０６５８】

まとめると、これらの結果は、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞が、ＩＬ－２及びＩＬ－１５の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞と比較して、腫瘍細胞に対するインターフェロン－γ発現を増強したことを示す。

【０６５９】

Ｅ．ＴＮＦ－αの発現

図８Ｉ～８Ｊに示すように、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞は、ＩＬ－２及びＩＬ－１５の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞よりも、ＣＤ３８^{高}ＭＭ細胞株ＬＰ１（図８Ｉ）及びＳＬＡＭＦ７^{高}ＭＭ細胞株ＭＭ．１Ｓ（図８Ｊ）に対してより多くのＴＮＦ－αを発現した。ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞についてのより大きなＴＮＦ－α発現が、抗体の非

存在下を含むすべての条件下で観察された。増殖培地へのＩＬ－２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＩＬ－２７の添加は、抗体の非存在下を含む全ての条件下で、ｇ－ＮＫ細胞による抗体誘導性ＴＮＦ－α発現を増強した。

【０６６０】

まとめると、これらの結果は、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞が、ＩＬ－２及びＩＬ－１５の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞と比較して、腫瘍細胞に対するＴＮＦ－α発現を増強したことを示す。

【０６６１】

実施例５：ＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞の増殖及び細胞エフェクター機能

この研究では、ＩＬ－２１の存在下で増殖させたＮＫ細胞の増殖速度及びＮＫ細胞エフェクター機能を、ＩＬ－２１の非存在下で増殖させたＮＫ細胞の増殖速度及びＮＫ細胞エフェクター機能と比較した。ヒト末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を、製造業者の指示に従って、ＣＭＶ陽性ヒトドナー由来の全血から、又は比較のためにＣＭＶ血清陰性ドナーから、Ｈｉｓｔｏｐａｑｕｅ（登録商標）密度遠心分離によって単離した。ドナーは、ＣＭＶ血清陽性（ｎ＝８）及びＣＭＶ血清陰性（ｎ＝６）であった（年齢３７．８±１０．６歳、８人の男性及び６人の女性）。

【０６６２】

ＰＢＭＣをバフィーコートから採取し、洗浄し、フローサイトメトリーによって生存ＣＤ４５^{pos}細胞について評価した。Ｔ細胞を除去するためのＣＤ３^{pos}細胞の枯渇（ＣＤ３枯渇、ＣＤ３^{neg}）、又はＣＤ５７^{pos}ＮＫ細胞を濃縮するためのＣＤ３枯渇とそれに続くＣＤ５７についての陽性選択（ＣＤ３^{neg}ＣＤ５７^{pos}）のいずれかによって、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　ＭＡＣＳ（商標）マイクロビーズを使用する免疫親和性ベースの磁気ビーズ分離によって、ＮＫ細胞を濃縮した。増殖前にＣＤ３^{neg}／ＣＤ５７^{pos}細胞について最初に濃縮する後者の方法を、ｇ－ＮＫ細胞を増殖させるためのその後の実験において使用した。更なる比較として、ＮＫ細胞を、ＣＤ３枯渇とそれに続くＣＤ１６（濃縮ＣＤ１６^{pos}　ＮＫ細胞）及び単球（ＣＤ３ｎｅｇＣＤ５７ｐｏｓ）についての陽性選択によって濃縮した。ＮＫ細胞を１ｍＬあたり２×１０^{5}個の細胞の密度で播種し、１ｍＬあたり２×１０^{5}個の細胞の継代密度で播種した。ＮＫ細胞を、２：１の２１．ＡＥＨ：ＮＫ細胞比でガンマ線照射（１００　Ｇｙ）２２１．ＡＥＨフィーダー細胞と共培養し、ＩＬ－２（５００　ＩＵ／ｍＬ）、ＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍＬ）、及びＩＬ－２１（２５ｎｇ／ｍＬ）又はＩＬ－２単独（５００ＩＵ／ｍＬ）の存在下で増殖させた。実施例６に更に記載されるように、ＮＫ細胞の濃縮前にＰＢＭＣが凍結保存されていた場合、１：１の照射２２１．ＡＥＨフィーダー細胞対ＮＫ細胞の比を使用した。全ての増殖は、５％ヒトＡＢ血清及びそれぞれのサイトカインを補充したＣｅｌｌＧｅｎｉｘ　ＧＭＰ　ＳＣＧＭ培地中で行った。ＮＫ細胞を２週間増殖させ、培地を２～５日毎に交換した。増殖させたＮＫ細胞を、機能アッセイにおいて後で使用するために、９０％ＦＢＳ及び１０％ＤＭＳＯを使用して凍結保存した。

【０６６３】

増殖及び細胞エフェクター機能を、増殖の１４日後に評価した。０．５：１のＮＫ対ＭＭ比で標的細胞ラインＬＰ１及びＭＭ．１Ｓを使用し、抗体ダラツムマブ及びエロツズマブを用いて、実施例２に記載のようにアッセイを行った。

【０６６４】

その後の実施例に記載されるいくつかの研究において、ｇ－ＮＫ細胞の表現型及び機能的活性をｃＮＫ細胞と比較した。ＣＭ　Ｖ血清陰性ドナーからのｃＮＫ細胞の不十分な収量及び上記の方法を使用したＣＭＶ血清陽性ドナーからのｇ－ＮＫ細胞の優先的な増殖（以下のセクションＡに記載される結果）に起因して、代替的な方法を使用して、インビトロ機能研究及びインビボ研究のためにｃＮＫ細胞を増殖させた。この増殖方法は、Ｋ６５２－ｍｂＩＬ１５－４１ＢＢＬフィーダー細胞及び５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を使用して、２週間にわたってｃＮＫ細胞を１８０±８９倍（ｎ＝５　ＣＭＶ^{neg}）に増殖させ

た（藤崎ｅｔ　ａｌ．，２００９Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，６８（９）：４０１０－４０１７）。５人のＣＭＶｎｅｇドナー（年齢３８．９±９．８歳）におけるｇ－ＮＫ細胞の割合は、３匹の雄及び２匹の雌）は、増殖前に１．５±０．５％であり、増殖後に１．６±０．４％であった。

【０６６５】

Ａ．ｇ－ＮＫ細胞の増殖速度

培地交換時に細胞を計数し、０日目及び１４日目にフローサイトメトリーによってｇ－ＮＫ細胞の割合を評価した。図９Ａ及び図９Ｂに示されるように、増殖前に最初にＣＤ３^{neg}／ＣＤ５７^{pos}細胞について濃縮され、次いでＩＬ－２１の存在下で増殖させたＮＫ細胞は、同様の条件であるがＩＬ－２１を含まない条件よりも高いｇ－ＮＫ細胞増殖速度を有した。ＦｃＲγの細胞内染色及びフローサイトメトリーを用いて測定した場合、ｇ－ＮＫ細胞の割合（図９Ａ）及び数（図９Ｂ）の両方を測定した場合に、より高いｇ－ＮＫ細胞増殖速度が観察された。

【０６６６】

増殖前に、ＣＭＶ血清陽性ドナーにおけるｇ－ＮＫ細胞の割合は３０．８±３．１％（総ＮＫ細胞の％）であったが、ＣＭＶ血清陰性ドナーにおけるｇ－ＮＫ細胞の割合はわずか１．８±０．３％（総ＮＫ細胞の％）であった。ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５７^{pos}細胞についての最初の濃縮後の増殖に続いて、ｇ－ＮＫ細胞の割合は、ＣＭＶ血清反応陽性ドナーについて８４．０±１．４％に増加したが、ＣＭＶ血清反応陰性ドナーについては変化しなかった（１．５±０．４％）（図９Ｃ）。ＣＭＶ血清陽性ドナー及び血清陰性ドナーにおけるｇ－ＮＫ細胞の割合を示す代表的なフローサイトメトリードットプロット及びヒストグラムを図９Ｅ及び９Ｆに示す。ｇ－ＮＫサブセット内のＮＫＧ２Ｃｐｏｓ／ＮＫＧ２Ａｎｅｇ　ＮＫ細胞の割合は、１．７～５１％（２６．８±１３．９％）の範囲であった。したがって、ｇ－ＮＫとＮＫＧ２Ｃ^{pos}／ＮＫＧ２Ｃ^{neg}ＮＫ細胞との間には表現型の重複が存在するが、それらは同一ではない。

【０６６７】

ｇ－ＮＫ細胞の代表的な増殖を図９Ｄに示し、ここでは、増殖方法が、検出可能なｇ－ＮＫ集団を有するＣＭＶ血清陽性ドナー由来のｇ－ＮＫ細胞の割合を増加させ、全ＮＫ細胞数が少なくとも４００倍増加したことが示される。

【０６６８】

総合すると、これらの結果は、ＩＬ－２１の存在がｇ－ＮＫ細胞増殖を改善することを示す。

【０６６９】

Ｂ．細胞媒介性細胞傷害性

図９Ｇ及び図９Ｈに示されるように、ＩＬ－２１の存在下で増殖させたＮＫ細胞は、ＩＬ－２１なしで増殖させたｇ－ＮＫ細胞よりも、ＣＤ３８^{高}ＭＭ細胞株ＬＰ１（図９Ｇ）及びＳＬＡＭＦ７^{高}ＭＭ細胞株ＭＭ．１Ｓ（図９Ｈ）に対する細胞媒介性細胞傷害性が大きかった。ＩＬ－２１増殖ｇ－ＮＫ細胞についてのより大きな細胞性細胞傷害性が、ダラツムマブ又はエロツズマブのいずれかの存在と同様に、非存在下で観察された。

【０６７０】

総合すると、これらの結果は、ＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞が、ＩＬ－２１なしで増殖させたｇ－ＮＫ細胞と比較して、腫瘍細胞に対する細胞媒介性細胞傷害性を増強したことを示す。

【０６７１】

Ｃ．脱顆粒

図９Ｉ及び図９Ｊに示されるように、ＩＬ－２１の存在下で増殖したｇ－ＮＫ細胞は、ＩＬ－２１なしで増殖したｇ－ＮＫ細胞よりも、ＣＤ３８^{高}ＭＭ細胞株ＬＰ１（図９Ｉ）及びＳＬＡＭＦ７^{高}ＭＭ細胞株ＭＭ．１Ｓ（図９Ｊ）に対してより脱顆粒した。ＩＬ－２１増殖ｇ－ＮＫ細胞についてのより大きな顆粒減少が、ダラツムマブ又はエロツズマブのいずれかの存在と同様に、抗体の不在下で観察された。

【０６７２】
まとめると、これらの結果は、ＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞が、ＩＬ－２１なしで増殖させたｇ－ＮＫ細胞と比較して、腫瘍細胞に対する脱顆粒を増強したことを示す。
【０６７３】
Ｄ．パーフォリン及びグランザイムＢの発現
図９Ｋ及び図９Ｌに示されるように、ＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞は、パーフォリン陽性細胞の割合ではなく（図９Ｋ）、全パーフォリン発現（ＧＭＦＩ）（図９Ｌ）によって測定されるように、ＩＬ－２１なしで増殖させたｇ－ＮＫ細胞よりも多くの細胞溶解性タンパク質パーフォリンを発現した。更に、ＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞は、グランザイムＢ陽性細胞の割合（図９Ｋ）及び総グランザイムＢ発現（ＧＭＦＩ）（図９Ｌ）の両方によって測定されるように、ＩＬ－２１なしで増殖させたｇ－ＮＫ細胞よりも多くのアポトーシス促進性タンパク質グランザイムＢを発現した。
【０６７４】
パーフォリンのベースライン発現（図９Ｍ、左）及びグランザイムＢのベースライン発現（図９Ｍ、右）もまた、ｃＮＫ細胞よりも増殖ｇ－ＮＫ細胞において有意に高かった（ｎ＝５）。ＮＫ及びｃＮＫ細胞についてのパーフォリン及びグランザイムＢ発現の代表的なヒストグラムを図９Ｎに示す。
【０６７５】
総合すると、これらの結果は、ＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞が、ＩＬ－２１なしで増殖させたｇ－ＮＫ細胞と比較して、腫瘍細胞に対するパーフォリン及びグランザイムＢの発現を増強したことを示す。
【０６７６】
Ｅ．インターフェロン－γの発現
図９Ｏ及び図９Ｐに示すように、ＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞は、ＩＬ－２１なしで増殖させたｇ－ＮＫ細胞よりも、ＣＤ３８^{高}ＭＭ細胞株ＬＰ１（図９Ｏ）及びＳＬＡＭＦ７^{高}ＭＭ細胞株ＭＭ．１Ｓ（図９Ｐ）に対してより多くのインターフェロン－γを発現した。ＩＬ－２１増殖ｇ－ＮＫ細胞についてのより大きなインターフェロン－γ発現が、ダラツムマブ又はエロツズマブのいずれかの存在と同様に、抗体の不在下で観察された。
【０６７７】
まとめると、これらの結果は、ＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞が、ＩＬ－２１なしで増殖させたｇ－ＮＫ細胞と比較して、腫瘍細胞に対するインターフェロン－γ発現を増強したことを示す。
【０６７８】
Ｆ．ＴＮＦ－αの発現
図９Ｑ及び図９Ｒに示すように、ＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞は、ＩＬ－２１なしで増殖させたｇ－ＮＫ細胞よりも、ＣＤ３８^{高}ＭＭ細胞株ＬＰ１（図９Ｑ）及びＳＬＡＭＦ７^{高}ＭＭ細胞株ＭＭ．１Ｓ（図９Ｒ）に対してより多くのＴＮＦ－αを発現した。ＩＬ－２１増殖ｇ－ＮＫ細胞についてのより大きなＴＮＦ－α発現が、ダラツムマブ又はエロツズマブのいずれかの存在と同様に、抗体の不在下で観察された。
【０６７９】
まとめると、これらの結果は、ＩＬ－２１の存在において増殖させたｇ－ＮＫ細胞が、ＩＬ－２１なしで増殖させたｇ－ＮＫ細胞と比較して、腫瘍細胞に対する増強されたＴＮＦ－α発現を有することを示す。
【０６８０】
Ｇ．ｇ－ＮＫドナー間のエフェクター機能の比較
ｇ－ＮＫ細胞及びｃＮＫ細胞を記載のように増殖させ、エフェクター活性を異なるドナー間で比較した。０．５：１のＮＫ細胞対ＭＭ比で標的細胞株ＭＭ．１Ｓを使用し、抗体ダラツムマブ及びエロツズマブを用いて、実施例２に記載されるようにアッセイを行った

。共培養後、細胞を固定し、透過処理し、インターフェロン－ガンマ（ＩＦＮγ）及びＴＮＦ－アルファ（ＴＮＦα）に対する細胞内サイトカイン染色によって分析した。図９Ｓ（ＩＦＮγ）及び図９Ｔ（ＴＮＦα）に示される結果は、ｇ－ＮＫドナー間のドナー変動性が低く、ｍＡｂ依存性ＩＦＮγ及びＴＮＦα応答について標準誤差が５未満であることを示す。他のエフェクター機能についても同様の結果が見られた。結果は、全てのｇ－ＮＫドナーのエフェクター機能が、試験した全てのｃＮＫドナーよりも優れていることを示した。

【０６８１】

実施例６：ＩＬ－２１／抗ＩＬ－２１複合体の存在下でのｇ－ＮＫ細胞の増殖

凍結保存されたＰＢＭＣを解凍し、磁気選別によって$CD3^{neg}CD57^{pos}$ＮＫ細胞について濃縮した。これらのＮＫ細胞の増殖の前に、ＩＬ－２１と抗ＩＬ－２１抗体とを組み合わせることによって、ＩＬ－２１／抗ＩＬ－２１複合体を形成した。ＩＬ－２１及び抗ＩＬ－２１抗体をそれぞれ３７℃で及び２５ｎｇ／ｍＬ及び２５０ｎｇ／ｍＬの濃度で３０分間共インキュベートした。Ｃ。次いで、複合体を、５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２及び１０ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１５と共に、ＮＫ細胞増殖培地に添加した。ＮＫ細胞を、照射した２２１．ＡＥＨフィーダー細胞と、１：１のＮＫ対２２１．ＡＥＨフィーダー細胞比で共培養した。比較のために、ＮＫ細胞を、それぞれ５００ＩＵ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ、及び２５ｎｇ／ｍＬの濃度のＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の存在下でも増殖させた。

【０６８２】

図１０に示すように、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１／抗ＩＬ－２１複合体の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞は、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞よりも高い増殖速度を有した。

【０６８３】

実施例７：凍結保存後のｇ－ＮＫ細胞エフェクター機能の維持

以前に凍結保存したｇ－ＮＫ細胞のＮＫ細胞エフェクター機能を、新たに濃縮したすなわち、凍結保存していないｇ－ＮＫ細胞のものと比較した（ｎ＝４）。$CD3^{neg}$／$CD57^{pos}$濃縮ＮＫ細胞を、照射した２２１．ＡＥＨフィーダー細胞と２：１の２２１．ＡＥＨ対ＮＫ細胞比で、５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、１０ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１５、及び２５ｎｇ／ｍＬのＩＬ－２１の存在下で共培養した。増殖後、ＮＫ細胞を新鮮な状態で機能的に評価するか、又は１０％ＤＭＳＯを含む９０％ＦＢＳ中、凍結保存培地１．８ｍｌ当たり２０００万細胞の濃度で凍結保存した。ＬＰ１及びＭＭ．１Ｓ細胞ラインに対するＮＫ細胞エフェクター機能を、１μｇ／ｍＬダラツムマブ又は１μｇ／ｍＬエロツズマブの存在と同様に、抗体なしで評価した。

【０６８４】

Ａ．脱顆粒

図１１Ａ及び図１１Ｂに示されるように、予め凍結保存されたｇ－ＮＫ細胞は、$CD38^{高}$ＭＭ細胞株ＬＰ１（図１１Ａ）及び$SLAMF7^{高}$ＭＭ細胞株ＭＭ．１Ｓ（図１１Ｂ）に対して、新鮮なｇ－ＮＫ細胞の脱顆粒レベルに匹敵する脱顆粒レベルを有した。同等の脱顆粒レベルが、ダラツムマブ又はエロツズマブのいずれかが存在する場合と同様に、抗体が存在しない場合でも観察された。

【０６８５】

総合すると、これらの結果は、多発性骨髄腫標的細胞に応答したｇ－ＮＫ細胞脱顆粒が凍結保存後に維持されることを示す。

【０６８６】

Ｂ．パーフォリン及びグランザイムＢの発現

図１１Ｃ及び図１１Ｄに示されるように、以前に凍結保存されたｇ－ＮＫ細胞は、新鮮なｇ－ＮＫ細胞のものに匹敵するパーフォリン（図１１Ｃ）及びグランザイムＢ発現（図１１Ｄ）を有した。まとめると、これらの結果は、ｇ－ＮＫ細胞パーフォリン及びグランザイムＢ発現が凍結保存後に維持されることを示す。

【０６８７】
Ｃ．インターフェロン－γの発現
図１１Ｅ及び図１１Ｆに示されるように、予め凍結保存されたｇ－ＮＫ細胞は、ＣＤ３８高ＭＭ細胞株ＬＰ１（図１１Ｅ）及びＳＬＡＭＦ７高ＭＭ細胞株ＭＭ．１Ｓ（図１１Ｆ）に対して、新鮮なｇ－ＮＫ細胞のインターフェロン－γ発現レベルに匹敵するインターフェロン－γ発現レベルを有した。同等のインターフェロン－γ発現が、ダラツムマブ又はエロツズマブのいずれかが存在する場合と同様に、存在しない場合でも観察された。
【０６８８】
総合すると、これらの結果は、多発性骨髄腫標的細胞に応答したｇ－ＮＫ細胞インターフェロン－γ発現が凍結保存後に維持されることを示す。
【０６８９】
Ｄ．ＴＮＦ－αの発現
図１１Ｇ及び図１１Ｈに示されるように、以前に凍結保存されたｇ－ＮＫ細胞は、ＣＤ３８高ＭＭ細胞株ＬＰ１（図１１Ｇ）及びＳＬＡＭＦ７高ＭＭ細胞株ＭＭ．１Ｓ（図１１Ｈ）に対して、新鮮なｇ－ＮＫ細胞のＴＮＦ－α発現レベルと比較して減少したＴＮＦ－α発現レベルを有した。減少したＴＮＦ－α発現は、ダラツムマブ又はエロツズマブのいずれかの存在と同様に、抗体の不在下で観察された。
【０６９０】
総合すると、これらの結果は、多発性骨髄腫標的細胞に応答したｇ－ＮＫ細胞ＴＮＦ－α発現が凍結保存後に減少することを示す。
【０６９１】
実施例８：ｃＮＫ細胞と比較したインビボでのｇ－ＮＫ細胞の持続性の評価
実質的に実施例５に記載されるように増殖させたＮＫ細胞をマウスに注射し、生体試料をフローサイトメトリーを使用する分析に供して、それらの持続性を評価した。
【０６９２】
実施例５に記載されるように、ｇ－ＮＫ細胞を、凍結保存されたＰＢＭＣからのＣＤ３ｎｅｇ／ＣＤ５７ｐｏｓ細胞について最初に濃縮した後に増殖させ、続いて、ＩＬ－２（５００　ＩＵ／ｍＬ）、ＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍＬ）、及びＩＬ－２１（２５ｎｇ／ｍＬ）刺激性サイトカインの存在下で、照射された２２１．ＡＥＨフィーダー細胞を１：１２２１．ＡＥＨ対ＮＫ細胞比で用いて増殖させた。ＣＭ　Ｖ血清陰性ドナーからのｃＮＫ細胞の収量が不十分であったため、実施例５に記載の代替方法を用いてｃＮＫ細胞を増殖させた。トランスジェニック白血病細胞株Ｋ５６２－ｍｂ１５－４１ＢＢＬ及びＩＬ－２を用いて、ｃＮＫ細胞を２週間増殖させた。全ての細胞を、凍結保存ＰＢＭＣ及び凍結保存フィーダー細胞から増殖させた。凍結保存細胞用の凍結培地は、ＣＳ－１０（Ｂｉｏｌｉｆｅ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎｓ，Ｂｏｔｈｅｌ，ＷＡ，ＵＳＡ）であった。凍結保存された細胞産生物を、マウスに投与する前に湯浴中で急速に解凍した（３７℃）。
【０６９３】
単回用量の１×１０^{7}個の増殖させたＮＫ細胞（新鮮ｇ－ＮＫ、凍結保存ｇ－ＮＫ、又は凍結保存ｃＮＫ細胞）を、尾静脈を介して雌ＮＯＤ．Ｃｇ－ＰｒｋＤｃｓｃｉｄＩＬ２ｒｇｔｍ１Ｗｊｌ／ＳｚＪ（ＮＳＧ）マウスに静脈内注射した（ｎ＝９、１群当たり３）。ＮＫ細胞支持を提供するために、約２μｇ／マウスのヒト組換えＩＬ－１５を、３日毎にＩ．Ｐ．経路を介して投与した（表２を参照）。注入後６、１６、２６、及び３１日目に採取した血液を、フローサイトメトリーによって直ちに分析した。マウスを３１日目に殺し、骨髄及び脾臓を即時フローサイトメトリー分析のために採取した。
【０６９４】
（表２）持続性研究設計

グループ番号	アーム	マウスの数	NK投与の日	採血の日
1	IL－15＋新鮮14日目g－NK	3	1	6、16、26、31(袋)
2	IL－15＋Cryo 14日目g－NK	3	1	6、16、26、31(袋)
3	IL－15＋Cryo 14日目cNK	3	1	6、16、26、31(袋)

【０６９５】

図１２Ａ～Ｃは、末梢血中のｃＮＫ細胞（図１２Ａ）、脾臓（図１２Ｂ及び骨髄（Ｆ図１２Ｃ）と比較して、新鮮なｇ－ＮＫ細胞及び凍結保存されたｇ－ＮＫ細胞の増強された持続性を示す。凍結保存されたｇ－ＮＫ細胞の持続性は、複数の時点で末梢血において（ｐ＜０．００１）（図１２Ａ）、ならびに３１日目の　殺時に脾臓（ｐ＜０．００１）（図１２Ｂ）及び骨髄（ｐ＜０．０５）（図１２Ｃ）において（ｐ＜０．００１）、凍結保存されたｃＮＫ細胞で見られたものよりも＞９０％高かった。図１２Ａはまた、新鮮なｇ－ＮＫ細胞及び凍結保存されたｇ－ＮＫ細胞のレベルが、試験の少なくとも２６日目まで同等のレベルで持続したことを示す。

【０６９６】

結果は、ｇ－ＮＫ細胞が有意に改善された持続性を示すという観察と一致する。これらの結果は、ｍＡｂ　ＡＤＣＣを増強するための実行可能な既製の細胞療法としての新鮮な又は凍結保存されたｇ－ＮＫの有用性を実証する。

【０６９７】

実施例９：ｇ－ＮＫ細胞におけるＣＤ３８及びＳＬＡＭＦ７の評価ならびにｇ－ＮＫ細胞のフラトリサイド活性

本実施例は、部分的に、標的表面マーカーの欠如による抗体からのｇ－ＮＫ細胞の保護を実証する。

【０６９８】

ｇ－ＮＫ細胞を、特定の例外を除いて実施例５に記載される方法によって実質的に増殖させた。１）２２．ＡＥＨ標的細胞対ＮＫ細胞の比は、２．５：１（実施例５における２：１比と比較して）であり、２）ＮＫ細胞は、より低いレベルのＩＬ－２（実施例５における５００ＩＵ／ｍｌと比較して１００ＩＵ／ｍｌ）に曝露され、３）増殖中にＩＬ－２１は存在しなかった。およそ２．０×10^5個のＮＫ細胞及び／又はＭＭ．１Ｓもしくは Ｒａｊｉ細胞をフローチューブに分注し、表Ｅ３に記載されるように、２μＬの７－ＡＡＤ生存性色素ならびに２μＬの抗ＣＤ４５、２μＬの抗ＣＤ２０、２μＬの抗ＣＤ３８、２μＬの抗ＣＤ３、１０μＬの抗ＳＬＡＭＦ　７、及び２μＬの抗ＣＤ５６抗体で染色した。４℃で１０分間インキュベートした後、細胞を洗浄し、抗ＦｃｅＲＩ抗体（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を用いて細胞内染色を行った。染色プロセスの完了後、ｇ－ＮＫ、ｃＮＫ、及びＭＭ．１Ｓ又はＲａｊｉ細胞を発現するＣＤ２０、ＣＤ３８、及びＳＬＡＭＦ７の割合を８色フローサイトメトリー（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　ＭＡＣＳＱｕａｎｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　１０）によって評価した。

【０６９９】

（表Ｅ３）ＮＫ、ＭＭ、及びＲａｊｉ細胞上のＣＤ２０、ＣＤ３８、及びＳＬＡＭＦ７発現を決定するためのフローサイトメトリーパネル

条件	V1	V2	B1	B2	B3	B4	R1	R2
NKのみ	CD45	CD20	*FcRg	CD38	7－AAD	CD3	SLAMF7	CD56
NKのみCD20 FMO	CD45		*FcRg	CD38	7－AAD	CD3	SLAMF7	CD56
NKのみCD38 FMO	CD45	CD20	*FcRg		7－AAD	CD3	SLAMF7	CD56
NKのみSLAM F7 FMO	CD45	CD20	*FcRg	CD38	7－AAD	CD3		CD56
NK＋MM	CD45	CD20	*FcRg	CD38	7－AAD	CD3	SLAMF7	CD56
NK＋MM CD 38 FMO	CD45	CD20	*FcRg		7－AAD	CD3	SLAMF7	CD56
NK＋MM SL AMF7 FMO	CD45	CD20	*FcRg	CD38	7－AAD	CD3		CD56
MMのみ	CD45	CD20		CD38	7－AAD		SLAMF7	
MMのみ CD38 FMO	CD45	CD20			7－AAD		SLAMF7	
MMのみSLA MF7 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
Rajiのみ	CD45	CD20			7－AAD			
RajiのみCD2 0 FMO	CD45				7－AAD			

＊ＦｃＲｇは細胞内エピトープである。

【０７００】

ｇ－ＮＫ、ｃＮＫ、及びＭＭ．１Ｓ細胞上のＣＤ２０、ＣＤ３８、及びＳＬＡＭＦ７の発現を図１３Ａ～１３Ｄに示す。ｇ－ＮＫ及びｃＮＫの両方は、Ｒａｊｉリンパ腫細胞上で高度に発現されたＣＤ２０の発現を欠いていた（図１３Ａ）。ｇ－ＮＫによるＣＤ３８の発現は、ｃＮＫ及びＭＭ．１Ｓ細胞よりもはるかに少なかった（図１３Ｂを参照、ｐ両方について＜０．００１）。ＳＬＡＭＦ７の発現は、ｇ－ＮＫとｃＮＫとの間で異ならなかったが（ｐ＝０．９）、ｇ－ＮＫ及びｃＮＫの両方が、ＭＭ．１Ｓ細胞よりもはるかに低いＳＬＡＭＦ７の発現を示した（図１３Ｃを参照、ｐ両方について＜０．００１）。増殖させたｃＮＫと比較した場合、増殖させたｇ－ＮＫにおいてもＣＤ３８^{pos}ＮＫ細胞の割合の減少が見られた（図１３Ｄを参照、ｐ＜０．００１）。更に、ＣＤ３８発現の強度（ＭＦＩ）は、ＣＤ３８　ｐｏｓｃＮＫ及びＭＭ１／Ｓ細胞と比較してて、ＣＤ３８　ｐｏｓｇ－ＮＫ細胞上で減少した（図１３Ｅ、ｐ＜０．００１）。ｃＮＫ及びＭＭ．１Ｓ細胞に対するｇ－ＮＫ細胞のＣＤ３８発現の低下を示す代表的なヒストグラムを図１３Ｆに示す。

【０７０１】

ｇ－ＮＫによるＣＤ２０、ＣＤ３８、又はＳＬＡＭＦ７発現の欠如は、リツキシマブ（抗ｍＡｂ　２０）、ダラツムマブ（抗ｍＡｂ　３８）、又はエロツズマブ（抗ｍＡｂ　ＳＬＡＭＦ７）によるｍＡｂ誘導性のフラトリサイドからの保護をもたらした。全体として、このデータは更に、特にｄａｒａｔｕｍａｍａｂなどの治療用抗体が存在する場合に、ｃＮＫと比較してｇ－ＮＫがどのように持続性の利点を有するかを示している。

【０７０２】

同様の結果が、ＩＬ－２１の存在下で実施例５に記載される増殖方法によって観察され、これは、ＩＬ－２１を用いて又は用いずに増殖させたｇ－ＮＫ細胞間でＣＤ３８又はＳＬＡＭＦ７発現に差がないことを示す。更なる評価において、増殖したｇ－ＮＫ細胞のフラトリサイド速度を増殖したｃＮＫ細胞のフラトリサイド速度と比較した。図１３Ｂ及び１３　Ｄ～１３　Ｆに示されるように、ＣＤ３８発現は、ｃＮＫ細胞よりもｇ－ＮＫ細胞

上で著しく低く、図１３Ｃに示されるように、同等に低いレベルのＳＬＡＭＦ７がｇ－ＮＫ及びｃＮＫ細胞上に存在した。これらの結果は、ＮＫ細胞がｍＡｂ標的を発現する場合、ＡＤＣＣ活性が、腫瘍に加えて、フラトリサイドによるＮＫ細胞の排除をもたらし得るので、これらの標的に対するｇ－ＮＫ細胞によるフラトリサイド効果の欠如の可能性を示す。ｃＮＫ細胞が高レベルのＣＤ３８を発現するという知見は、患者におけるダラツムマブ治療後に９０％超のＣＤ３８^{高}ＮＫ細胞が急速に枯渇することを示唆する以前の結果と一致している（Ｃａｓｎｅｕｆら、２０１７　Ｂｌｏｏｄ　Ａｄｖ，１（２３）：２１０５－２１１４）。

【０７０３】

実質的に実施例５に記載の方法を使用して、６人のユニークドナーを使用して増殖ｇ－ＮＫ（６　ＣＭＶ＋、３　Ｍ、３Ｆ、３９±７歳）を作製し、８人のユニークドナーを使用してｃＮＫ（８　ＣＭＶ－、４　Ｍ、４　Ｆ、３８±９歳）を増殖させた。ｇ－ＮＫの割合は、ｇ－ＮＫドナーについては８５±４％であり、ｃＮＫドナーについては２±１％であった。

【０７０４】

フラトリサイドを評価するために、約１×１０^{4}個の増殖したＮＫ細胞（ｇ－ＮＫ又はｃＮＫ）を、１μｇ／ｍＬのダラツムマブ（抗ＣＤ３８）の存在下で培養した。５％ＣＯ２インキュベーター中で、３７℃で４時間インキュベートした後、細胞を洗浄し、抗ＣＤ３及び抗ＣＤ５６抗体で染色して、ＮＫ細胞の数を定量した。最終洗浄後、ヨウ化プロピジウム（ＰＩ）を添加し、生ＮＫ細胞と死ＮＫ細胞の数は３カラーフローサイトメトリーを使用して解析された（Ｂｉｇｌｅｙ　ｅｔ　ａｌ．（２０１６），Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１８５：２３９－２５１）。図１３Ｇに示すように、ｇ－ＮＫ細胞は、ｃＮＫよりも１３倍低いフラトリサイドを有する。エロツズマブを用いて行われた同様の実験は、エロツズマブで処理されたｇ－ＮＫ又はｃＮＫについては、フラトリサイドが検出されなかったことを示した。

【０７０５】

ＩＬ－２１の非存在下で増殖させたｇ－ＮＫ細胞の結果と合わせて、これらの結果は、ｇ－ＮＫ細胞が、フラトリサイド関連枯渇に罹患することなく、ＭＭにおいて増強されたｍＡｂ抗腫瘍活性を付与する能力と一致する。

【０７０６】

実施例１０：多発性骨髄腫の播種性同所性異種移植片ＭＭ．１Ｓモデルにおけるインビボ有効性

ダラツムマブと組み合わせたＮＫ細胞（増殖ｇ－ＮＫ細胞又はｃＮＫ細胞）のインビボ有効性を、多発性骨髄腫のマウスモデルにおける腫瘍阻害及び生存を測定することによって評価した。ｇ－ＮＫ細胞を、凍結保存されたＰＢＭＣからのＣＤ３^{ｎｅｇ}／ＣＤ５７^{ｐｏｓ}細胞について最初に濃縮した後、実施例５に記載されるように増殖させ、続いて、ＩＬ－２（５００ＩＵ／ｍＬ）、ＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍＬ）、及びＩＬ－２１（２５ｎｇ／ｍＬ）刺激性サイトカインの存在下で、照射された２２１．ＡＥＨフィーダー細胞を１：１　２２１．ＡＥＨ対ＮＫ細胞比で用いて増殖させた。ＣＭ　Ｖ血清陰性ドナーからのｃＮＫ細胞の収量が不十分であったため、実施例５に記載の代替方法を用いてｃＮＫ細胞を増殖させた。トランスジェニック白血病細胞株Ｋ５６２－ｍｂ１５－４１ＢＢＬ及びＩＬ－２を用いて、ｃＮＫ細胞を２週間増殖させた。全ての細胞を、凍結保存ＰＢＭＣ及び凍結保存フィーダー細胞から増殖させた。

【０７０７】

約５×１０^{5}ルシフェラーゼ標識ＭＭ．１Ｓヒト骨髄腫細胞を雌ＮＳＧマウスの尾静脈に静脈内注射し、１４日間増殖させた。モノクローナル抗体ダラツムマブは、Ｉ．Ｐ．経路を介して投与され、６．０ｘ１０^{6}個の増殖したｇ－ＮＫ細胞又はｃＮＫ細胞を毎週、５週間にわたって静脈内投与することと組み合わせる。腫瘍投与の２週間後に開始して、２μｇ／マウスヒト組換えＩＬ－１５を、Ｉ．Ｐ．経路を介して３日毎に投与して、ＮＫ細胞支持を提供した。表４は、研究において処置されたマウスの群を要約する。

【０７０８】
生物発光画像化（ＢＬＩ）を週に２回実施して、腫瘍量をモニターした。マウスを不快感及び忍容性の徴候について毎日チェックし、腫瘍接種の１週間後に開始して週２回体重を測定した。マウスを、１５０ｍｇ／ｋｇのＤ－ルシフェリンの皮下注射の１５分後に画像化した。Ｌｉｖｉｎｇ　Ｉｍａｇｅソフトウェア（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）を使用して、マウス全体の総フラックス（光子／秒）を定量化した。腫瘍を有するマウスは、後麻痺肢、グルーミング、及び／又は無気力などの症状のある骨髄腫の発症時に　殺した。殺までの時間を生存の代用として使用した。全ての生存マウスを、組織収集のために最初のＮＫ細胞投与の４３日後に　殺した。研究の完了時に、フローサイトメトリーを使用して、生体試料由来のｇ－ＮＫ、ｃＮＫ、及びＭＭ．１Ｓ（ＣＤ１３８ｐｏｓ／ＣＤ４５ｎｅｇ）細胞を定量して、腫瘍負荷及びＮＫ細胞生存を決定した。

【０７０９】
（表Ｅ４）ＭＭ有効性研究設計

グループ番号	アーム	マウスの数	抗体投与の日	NK細胞投与の日
1	ビヒクル対照	8	該当せず	該当せず
2	g－NK I. V. ＋10μg ダラツムマブI. P. ＋IL－15 I. P. *	7	14、21、28、35、42	14、21、28、35、42
3	cNK I. V. ＋10μgダラツムマブI. P. ＋IL－15 I. P. *	7	14、21、28、35、42	14、21、28、35、42

【０７１０】
ｇ－ＮＫ及びダラツムマブの同時投与は、ｃＮＫ及びダラツムマブによる治療と比較して、有意な腫瘍阻害及び生存率の向上をもたらした。図１４Ａに示されるように、ｇ－ＮＫ細胞＋ダラツムマブは、５週間の処置後のＢＬＩ画像化によって証明された７匹のマウスのうち５匹において骨髄腫腫瘍負荷を排除した。定量的ＢＬＩ分析は、ｇ－ＮＫ＋ダラツムマブが持続的かつ統計的に有意な腫瘍退縮を誘導したことを示した（図１４Ｂ）。カプラン・マイヤー生存分析は、ｇ－ＮＫ＋ダラツムマブ処置マウスの全生存確率が、ビヒクル又はｃＮＫ及びダラツムマブで処置したマウスよりも有意に良好であったことを示した（ｐ＜０．０００１）（図１４Ｃ）。ｇ－ＮＫ細胞を投与された全てのマウスは、研究の終了時に体重減少も毒性も観察されず、活力があったが、一方、全ての対照マウス又はｃＮＫ細胞及びダラツムマブで処置されたマウスは、重度の体重減少を有し、研究の終了前に骨髄腫で死亡した（図１４Ｄ）。興味深いことに、ｇ－ＮＫ細胞で処置したマウスの１匹は、マウスの１匹の麻酔誘発性窒息のため、腫瘍接種後２１日目まで投与されず、このマウスは、ｇ－ＮＫマウスの最高ピークＢＬＩを有していたにもかかわらず、研究の終了時に検出可能な腫瘍ＢＬＩを有していなかった（図１４Ａ、＃と標識されたマウス）。ｇ－ＮＫ細胞を投与された７匹のマウスのうち、２匹のみが最小検出量の残存腫瘤ＢＬＩを有していた。

【０７１１】
骨髄のフローサイトメトリー分析により、検出可能な腫瘍ＢＬＩを有さない５　ｇ－ＮＫ処置マウスは、実際に腫瘍がない（骨髄中にＣＤ１３８　ｐｏｓ細胞がない）ことが確認された。全ての７ｇ－ＮＫ処置マウスについての平均腫瘍量は、ｃＮＫ及びダラツムマブで処置したマウスと比較して９９％を超えて減少した（ｐ＜０．００１、図１４Ｅ）骨髄中の腫瘍負荷及び持続性ＮＫ細胞を示す代表的なフローサイトメトリードットプロットを図１４Ｆに示す。研究の過程にわたって撮影したＢＬＩ画像の全てを図１４Ｇに示す。
殺前に全てのマウスからＸ線画像を取得し、対照マウス又はｃＮＫ細胞及びダラツムマブで処置したマウスは後肢骨の骨折及び奇形を有したが、ｇ－ＮＫ細胞及びダラツムマブで処置したマウスのうちの１匹は何らかの骨変形を有したことが決定された（図１４Ｈ）。

【０７１２】
血液、脾臓及び骨髄中のＮＫ細胞の分析は、ｃＮＫ細胞と比較して、ダラツムマブ処置マウスにおけるｇ－ＮＫ細胞の持続性の大幅な増加を実証した（図１５Ａ～Ｃ）。注目すべきことに、ｇ－ＮＫ細胞数は、血液中でｃＮＫ細胞より＞９０％高く（図１５Ａ）、脾臓中で＞９５％高く（図１５Ｂ）、骨髄中で＞９９％高かった（図１５Ｃ）。
【０７１３】
総合すると、これらの結果は、インビボでのｍＡｂ効果の増強に関する、ｃＮＫ細胞と比較した場合を含めたｇ－ＮＫ細胞の優位性を更に支持し、ダラツムマブと組み合わせて投与されたｇ－ＮＫ細胞がＭＭを治癒する可能性があることを示唆している。更に、これらの結果は、向上した生存及びフラトリサイドに対する耐性が、優れた抗腫瘍効果及びｇ－ＮＫ細胞の持続性をもたらすことを支持する。
【０７１４】
実施例１１：ｇ－ＮＫ代替表面マーカーの同定
細胞内マーカーＦｃεＲ１γについて陰性である（ＦｃＲγ^{neg}）ｇ－ＮＫ細胞を同定するための代用表面マーカーとして使用することができる細胞外表面マーカーの組み合わせを同定するための研究を行った。ｇ－ＮＫ細胞サブセットＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}／ＦｃＲγ^{neg}を同定するために、ＦｃεＲ１γについての細胞内染色ならびにＣＤ４５、ＣＤ３及びＣＤ５６についての細胞外染色によるフローサイトメトリーによって、ヒト末梢血試料中のｇ－ＮＫ細胞の割合を決定した。図１６に示すように、試料中のｇ－ＮＫ細胞のうち、ＮＫ細胞表現型がＣＤ４５^{pos}／ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}であり、細胞外表面表現型がＣＤ１６^{pos}／ＣＤ５７^{pos}／ＣＤ７^{dim}／^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}又はＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}である細胞は、試料中のｇ－ＮＫ細胞の存在と高い相関を示した。具体的には、ＣＤ１６^{pos}／ＣＤ５７^{pos}／ＣＤ７^{dim}／^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}又はＮＫＧ２Ａ^{neg}／ＣＤ１６１^{neg}ＮＫ細胞サブセット内のｇ－ＮＫ細胞の割合は、両方とも８０％超であった。
【０７１５】
実施例１２：ＣＤ２０　ＣＡＲを用いたｇ－ＮＫ細胞の形質導入の実現可能性及び細胞傷害性効果
ｇ－ＮＫ細胞において操作されたキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）の発現及び効力を評価するために研究を行った。Ｇ－ＮＫ細胞を、実質的に実施例５に記載されるように、５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、１０ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１５、及び２５ｎｇ／ｍＬのＩＬ－２１の存在下で、２：１の２２１．ＡＥＨ：ＮＫ細胞比での照射２２１．ＡＥＨフィーダー細胞との共培養によって、末梢血由来の濃縮ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５７^{pos}ＮＫ細胞から増殖させた。Ｎｅｏｎ（商標）トランスフェクションシステムを用いて細胞をエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションの前に細胞をＰＢＳで洗浄し、４．８×１０７／ｍＬの細胞密度でＯｐｔｉ－ＭＥＭ（商標）培地に再懸濁した。１００μＬの細胞を、１４．４μｇの１ｍｇ／ｍＬ　ＧＦＰ　ｍＲＮＡ又はＣＡＲ－ＣＤ２０　ｍＲＮＡと混合した。ＣＡＲ－ＣＤ２０は、ＣＤ２０ポリペプチド（配列番号３７）に結合するマウス抗ＣＤ２０（Ｌｅｕ１６）ｓｃＦｖ、ＩｇＧ４　Ｆｃスペーサー（配列番号３８）、ＣＤ２８膜貫通ドメイン（配列番号３９）、ＣＤ２８細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン（配列番号３９）、及びＣＤ３ζ一次シグナル伝達ドメイン（配列番号４１）から構成された。ＣＡＲのアミノ酸配列は配列番号４２（ＧｅｎＢａｎｋ番号ＫＸ０５５８２９．１）に記載されており、これも５’末端にＨＡタグを有して作製された。抗ＣＤ２０　ｍＲＮＡは、配列番号４５に示される。
【０７１６】
ｇ－ＮＫ細胞及びｍＲＮＡの混合物を、１８２０　Ｖ（２０　ｍｓ）の第１のパルス、続いて５００　Ｖ（１００　ｍｓ）の第２のパルスで電気ショックに供した。次いで、細胞を、５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、１０ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１５、及び２５ｎｇ／ｍＬのＩＬ－２１を含む２ｍＬのＮＫ　ＭＡＣＳ（登録商標）培地中で培養した。細胞を３７℃、５％CO_2で２４時間インキュベートした。

【０７１７】
インキュベーション後、細胞をフローサイトメトリーによって分析して、ＧＦＰ及びＣＡＲ－ＣＤ２０発現のレベルを評価した。異なるドナーを使用する２つの別々の実験からのｇ－ＮＫ細胞によるＧＦＰ及びＣＤ２０－ＣＡＲの形質導入後発現を図１７に示す。ＧＦＰ又はＣＡＲ－ＣＤ２０陽性細胞の割合を、ＧＦＰ又はＣＡＲ－ＣＤ２０を発現する生存細胞の割合として報告する。
【０７１８】
ＣＡＲ－ＣＤ２０を伴う又は伴わないｇ－ＮＫ細胞（エフェクター）の細胞傷害性を、細胞を６０，０００個のＲａｊｉリンパ腫細胞（標的）と様々なエフェクター対標的（Ｅ：Ｔ）比でリツキシマブ（Ｒｉｔｕｘａｎ（登録商標））の存在下又は非存在下でのインキュベートすることによって分析した。使用したリツキシマブ（Ｒｉｔｕｘａｎ（登録商標））の濃度は５μｇ／ｍｌであった。Ｒａｊｉ細胞をＡＰＣ結合マウス抗ヒトＣＤ１９ｍＡｂで前染色した。残留色素を、１０％ＦＢＳ及び１％ペニシリン－ストレプトマイシンを含むＲＰＭＩ　１６４０培地（アッセイ培地）で洗浄することで洗浄することによって除去した。予め染色したＲａｊｉ細胞をフローサイトメトリーによって検証して、全ての標的細胞が首尾よく標識されたことを確認した。
【０７１９】
１７日目に増殖させたｇ－ＮＫ細胞又はエレクトロポレーションの３６時間後のＣＡＲ－ＣＤ２０　ｇ－ＮＫ細胞を、１ｍＬのアッセイ培地中、Ｅ：Ｔ比０．５：１、２．５：１、及び５：１で、予め染色したＲａｊｉ標的細胞と混合した。混合物を３００　ｇで５分間ペレット化し、次いで５％ＣＯ　２と共に３７℃で４時間インキュベートした$_2$。４色フローサイトメトリーを使用して細胞傷害性を評価した。ＮＫ細胞（ＣＤ３^{neg}／ＣＤ５６^{pos}）を同定するために、ＰＥ結合マウス抗ヒトＣＤ５６　ｍＡｂ及びＦＩＴＣ結合マウス抗ヒトＣＤ３　ｍＡｂを使用した。生きた標的細胞（ＣＤ１９^{pos}／ＰＩ^{neg}）と死んだ標的細胞（ＣＤ１９^{pos}／ＰＩ^{pos}）を区別するために、ヨウ化プロピジウム（ＰＩ）を使用した。
【０７２０】
図１８は、リツキシマブ（Ｒｉｔｕｘａｎ（登録商標））の存在下又は非存在下における、Ｒａｊｉリンパ腫細胞に対する、ＣＤ２０－ＣＡＲを伴う又は伴わないｇ－ＮＫ細胞の効力を示す。ＣＤ２０－ＣＡＲの添加は、単剤療法としてのｇ－ＮＫ細胞の効力を増強する。リツキシマブ（Ｒｉｔｕｘａｎ）の添加もまた、ＣＤ２０－ＣＡＲが発現されるか否かにかかわらず、ｇ－ＮＫ細胞の効力を同様のレベルまで増強した。
【０７２１】
この結果は、ＣＡＲが、ＦｃＲγ鎖の発現が欠損しているｇ－ＮＫ細胞において機能的であることを実証する。この結果は、ＣＡＲの添加が、ＩｇＧ１　ｍＡｂによるＣＤ１６結合を介したｇ－ＮＫ細胞ＡＤＣＣ機構を損なわないという驚くべき発見を更に確認する。したがって、ＣＡＲ操作ｇ－ＮＫ細胞単剤療法の活性に加えて、これらの結果は、ｍＡｂとは異なるＣＡＲ標的化抗原を使用するアプローチを含む、ＣＡＲ及びＩｇＧ１　ｍＡｂなどのＦｃ標的化剤で操作されたｇ－ＮＫ細胞による併用療法を支持する。このような二重標的化戦略は、潜在的に、腫瘍の抗原発現及び起こり得る抗原喪失に依存して、機能的に相加的又は代償的であり得る。
【０７２２】
本発明は、例えば、本発明の様々な態様を例示するために提供される特定の開示された実施形態に範囲を限定することを意図していない。記載される組成物及び方法に対する種々の改変は、本明細書中の記載及び教示から明らかになる。そのような変形形態は、本開示の真の範囲及び趣旨から逸脱することなく実施され得、本開示の範囲内に入ることが意図される。
【０７２３】
配列の表

#	配列	注釈
1	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYM PKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	ヒトIL－2（成熟、UniProt P60568）。
2	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLE LQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEE KNIKEFLQSFVHIVQMFINTS	ヒトIL－15（成熟、UniProt P40933）。
3	HKSSSQGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVET NCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGR RQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGS EDS	ヒトIL－21（成熟、UniProt Q9HBE4）。
4	QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWS AFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHR LTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS	IL－21
5	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATL YTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANN SLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSESKY GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL GKMALIVLGGVAGLLLFIGLGIFF	膜結合型IL－15（mbIL－15）
6	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVND LVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIK KLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQ KVSTLSFIESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSLGKMALIVLGGVAGLLLFIGLGIFF	膜結合型IL－21（mbIL－21）
7	MALPVTALLLPLALLLHAARPNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLY TESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNS LSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSTTTPA PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAP LAGTCGVLLLSLVITLYC	膜結合型IL－15（mbIL－15）
8	MALPVTALLLPLALLLHAARPNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLY TESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNS LSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSTTTPA PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAP LAGTCGVLLLSLVSPFTA	膜結合型IL－15（mbIL－15）
9	ATGAGAATTTCGAAACCACATTTGAGAAGTATTTCCATCCAGTGC TACTTGTGTTTACTTCTAAACAGTCATTTTCTAACTGAAGCTGGCA TTCATGTCTTCATTTTGGGCTGTTTCAGTGCAGGGCTTCCTAAAAC AGAAGCCAACTGGGTGAATGTAATAAGTGATTTGAAAAAAATTGA AGATCTTATTCAATCTATGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAA AGTGATGTTCACCCCAGTTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTT CTCTTGGAGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGT ATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACAACAGT TTGTCTTCTAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGT GAGGAACTGGAGGAAAAAAATATTAAAGAATTTTTGCAGAGTTTT GTACATATTGTCCAAATGTTCATCAACACTTCTTGA	IL－15ヌクレオチド

#	配列	注釈
10	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVV GGVLACYSLLVTVAFIIFWVR	CD28膜貫通ドメイン
11	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	CD8膜貫通ドメイン
12	MALPVTALLLPLALLLHAARP	CD 8アルファシグナルペプチド
13	MLLLVTSLLL CELPHPAFLL IP	GM－CSFRaシグナルペプチド
14	MRLPAQLLGL LMLWVPGSSG	IgKシグナルペプチド
15	MALIVLGGVAGLLLFIGLGIFF	CD4膜貫通ドメイン
16	UAAUUUCUACUCUUGUAGAU	Cpf 1 crRNAスキャフォールド配列
17	ATATTTACAGAATGGCACAGG	プライマー
18	GACTTGGTACCCAGGTTGAA	プライマー
19	ATCAGATTCGATCCTACTTCTGCAGGGGGCAT	プライマー
20	ACGTGCTGAGCTTGAGTGATGGTGATGTTCAC	プライマー
21	CCCAACTCAACTTCCCAGTGTGAT	プライマー
22	GAAATCTACCTTTTCCTCTAATAGGGCAAT	プライマー
23	GAAATCTACCTTTTCCTCTAATAGGGCAA	プライマー
24	GAAATCTACCTTTTCCTCTAATAGGGCA	プライマー
25	CCAAAAGCCACACTCAAAGAC	プライマー
26	ACCCAGGTGGAAAGAATGATG	プライマー
27	AACATCACCATCACTCAAGGTTTGG	プライマー
28	CTGAAGACACATTTTTACTCCCAAA	プライマー
29	TCCAAAAGCCACACTCAAAGAC	プライマー
30	CTGAAGACACATTTTTACTCCCAAC	プライマー
31	GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQW FHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHI GWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKY FHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLFGSKNVSSETVNITITQGLAV STISSFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWKD HKFKWRKDPQDK	CD16(F158)
32	MWQLLLPTALLLLVSA	シグナルペプチド
33	GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQW FHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHI GWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKY FHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQGLAV STISSFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWKD HKFKWRKDPQDK	CD16(V158又は158 V＋)
34	MIPAVVLLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFLYGIVLT LLYCRLKI QVRKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ	FcRγ
35	IVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKP WIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQW SFNPPTFGGGTKLEIK	抗CD 20(Leu16) VL
36	GAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAI YPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYC ARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSSLD	抗CD 20(Leu16) VH

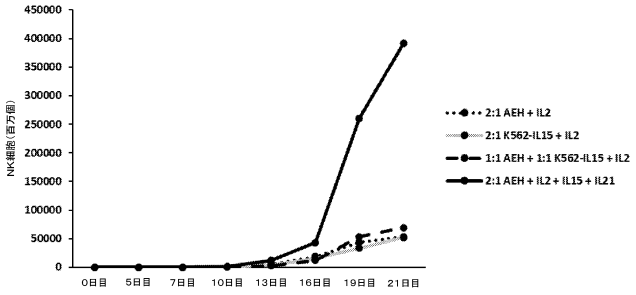
#	配列	注釈
37	IVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKP WIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQW SFNPPTFGGGTKLEIKGSTSGGGSGGGSGGGGSSEVQLQQSGAE LVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPG NGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCAR SNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSSLD	抗CD20 （Leu16）scFv
38	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLGKM	IgG4 Fcスペーサー
39	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28膜貫通ドメイン
40	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	CD28共刺激シグナル伝達ドメイン
41	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3ゼータシグナル伝達ドメイン
42	IVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKP WIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQW SFNPPTFGGGTKLEIKGSTSGGGSGGGSGGGGSSEVQLQQSGAE LVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPG NGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCAR SNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSSLDESKYGPPCPPCPAPEFLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKMFWVLVVVGGV LACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQ PYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	抗CD20 CSR Genbank番号KX055829．1。
43	METDTLLLWVLLLWVPGSTGD	IgKシグナルペプチド
44	YPYDVPDYA	HAタグ

#	配列	注釈
45	atggagacagacacactcctgctatgggtgctgctgctctgggttccaggttccacaggtgactacccatacgatgttccagattacgctattgtgctgacccaatctccagctatcctgtctgcatctccaggggagaaggtcacaatgacttgcagggccagctcaagtgtaaattacatggactggtaccagaagaagccaggatcctcccccaaaccctggatttatgccacatccaacctggcttctggagtccctgctcgcttcagtggcagtgggtctgggacctcttactctctcacaatcagcagagtggaggctgaagatgctgccacttattactgccagcagtggagttttaatccacccacgttcggaggggggaccaagctggaaataaaaggcagtactagcggtggtggctccgggggcggttccggtgggggcggcagcagcgaggtgcagctgcagcagtctggggctgagctggtgaagcctggggcctcagtgaagatgtcctgcaaggcttctggctacacatttaccagttacaatatgcactgggtaaagcagacacctggacagggcctggaatggattggagctatttatccaggaaatggtgatacttcctacaatcagaagttcaaaggcaaggccacattgactgcagacaaatcctccagcacagcctacatgcagctcagcagcctgacatctgaggactctgcggactattactgtgcaagatctaattattacggtagtagctactggttcttcgatgtctggggcgcagggaccacggtcaccgtctcctcactcgacgaatctaagtacggaccgccctgccccccttgccctgccccgagttcctgggcggacccagcgtgttcctgttccccccaagcccaaggacaccctgatgatcagccggaccccgaggtgacctgcgtggtggtggacgtgagccaggaagatcccgaggttccagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggaacagttcaacagcacctaccgggtggtgtctgtgctgaccgtgctgcaccaggactggctgaacggcaaagaatacaagtgcaaggtgtccaacaagggcctgcccagcagcatcgaaaagaccatcagcaaggccaagggccagcctcgcgagccccaggtgtacaccctgcctcccagggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgcctggtgaagggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccctcccgtgctggacagcgacggcagcttcttcctgtacagccggctgaccgtggacaagagccggtggcaggaaggcaacgtctttagctgcagcgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacccagaagagcctgagcctgtcctctgggcaagatgttctgggtgctggtggtggtgggcggggtgctggcctgctacagcctgctggtgacagtggccttcatcatcttttgggtgcggagcaagcggagcagaggcggccacagcgactacatgaacatgacccccagacggcctggccccacccggaagcactaccagccctacgccccacccagggactttgccgcctacagaagccgggtgaagttcagcagaagcgccgacgcccctgcctaccagcagggccagaatcagctgtacaacgagctgaacctgggcagaagggaagagtacgacgtcctggataagcggagaggccgggacccctgagatgggcggcaagcctcggcggaagaaccccaggaaggcctgtataacgaactgcagaaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcggcatgaagggcgagcggaggcggggcaagggccacgacggcctgtatcagggcctgtccaccgccaccaaggatacctacgacgccctgcacatgcaggccctgcccccaaggtga	抗CD20 CSR（トリリンクRNAについて）
46	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAFGGTFSSYAISWVR QAPGQGLEWMGRIIRFLGIANYAQKFQGRVTLIADKSTN TAYMELSSLRSEDTAVYYCAGEPGERDPDAVDIWGQGT MVTVSS	抗CD38 VH
47	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFSNYWIGWVR QMPGKGLEWMGIIYPHDSDARYSPSFQGQVTFSADKSIS TAYLQWSSLKASDTAMYYCARHVGWGSRYWYFD LWGRGTLVTVSS	抗CD38 VH
48	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKP DQSPKLLIKYASQSFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAE DAATYYCHQSSSLPYTFGQGTKLEIK	抗CD38 VL
49	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWFQQK PGKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK	抗CD38 VL
50	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3ゼータ
51	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	4－1BB共刺激ドメイン
52	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	CD28共刺激ドメイン
53	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT	抗CD19 VL

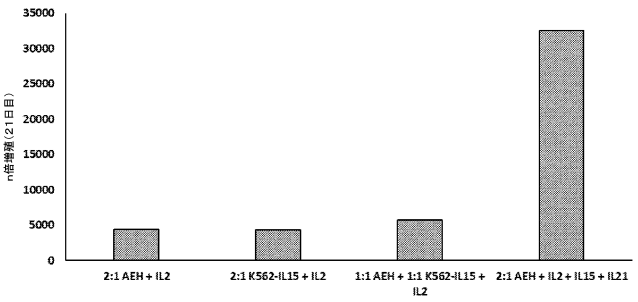
#	配列	注釈
54	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	抗CD19 VH
55	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Whitlowリンカー
56	GGGGSGGGGSGGGGS	GSリンカー
57	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	抗CD19 scFv
58	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	抗CD19 scFv
59	ESKYGPPCPPCP	IgG4ヒンジ
60	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE	CD8ヒンジ
61	ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	CD8膜貫通
62	DIVLTQSPASLAMSLGKRATISCRASESVSVIGAHLIHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLETGVPARFSGSGSGTDFTLTIDPVEEDDVAIYSCLQSRIFPRTFGGGTKLEIK	抗BCMA C11D5.3 VL
63	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAPGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLKYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGTSVTVSS	抗BCMA C11D5.3 VH
64	DIVLTQSPASLAMSLGKRATISCRASESVSVIGAHLIHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLETGVPARFSGSGSGTDFTLTIDPVEEDDVAIYSCLQSRIFPRTFGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAPGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLKYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGTSVTVSS	抗C11D5.3 scFv
65	DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIYWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGTKLEIK	抗BCMA C12A3.2 VL
66	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFRHYSMNWVKQAPGKGLKWMGRINTESGVPIYADDFKGRFAFSVETSASTAYLVINNLKDEDTASYFCSNDYLYSLDFWGQGTALTVSS	抗BCMA C12A3.2 VH
67	DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIYWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFRHYSMNWVKQAPGKGLKWMGRINTESGVPIYADDFKGRFAFSVETSASTAYLVINNLKDEDTASYFCSNDYLYSLDFWGQGTALTVSS	抗BCMA C12A3.2 scFv
68	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAPGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLKYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQG TSVTVSS	抗BCMA BCMA02 VH
69	DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGTKLEI K	抗BCMA BCMA02 VL
70	DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAPGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLKYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGTSVTVSS	抗BCMA02 scFv

【図面】

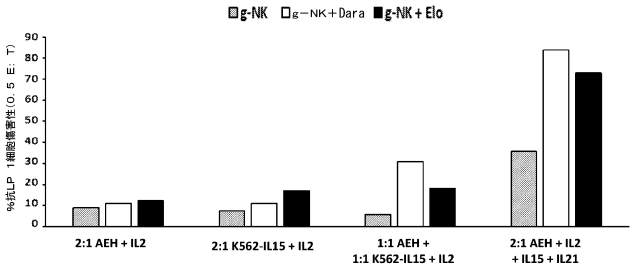
【図１Ａ】



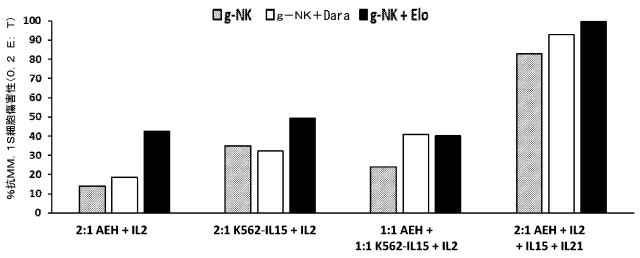
【図１Ｂ】



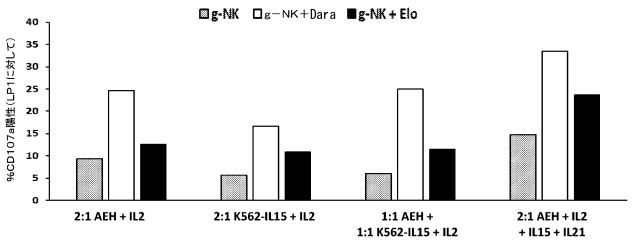
【図２Ａ】



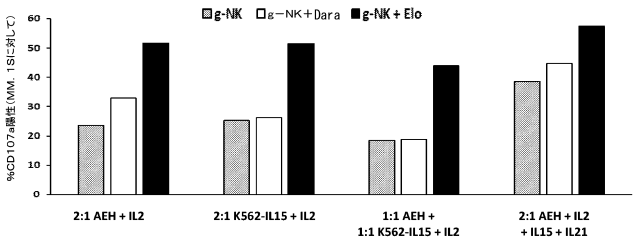
【図２Ｂ】



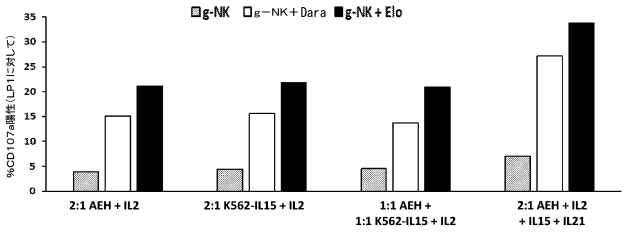
【図３Ａ】



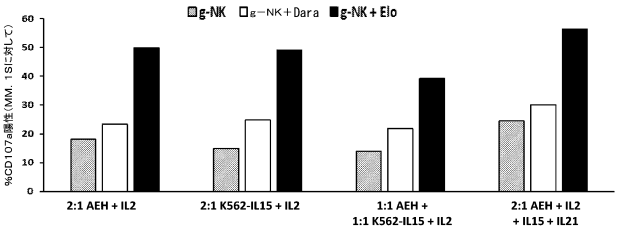
【図３Ｂ】



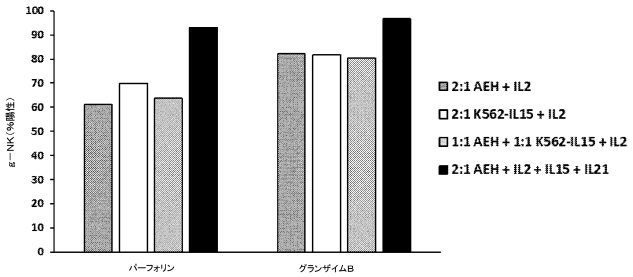
【図３Ｃ】



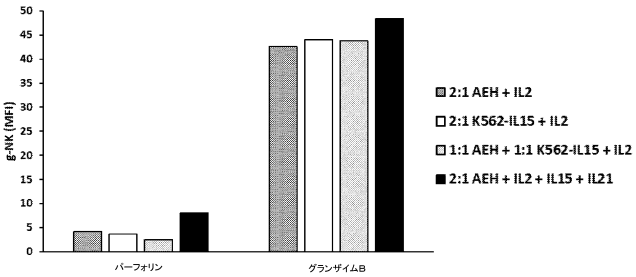
【図３Ｄ】



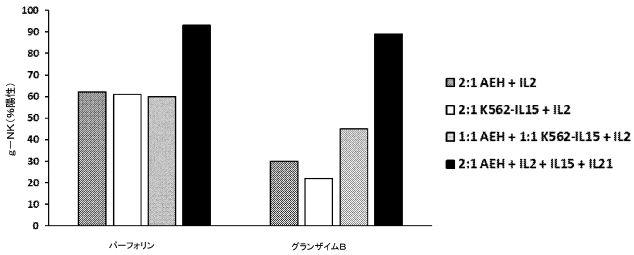
【図４Ａ】



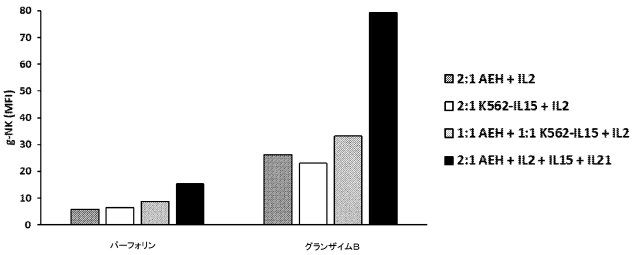
【図４Ｂ】



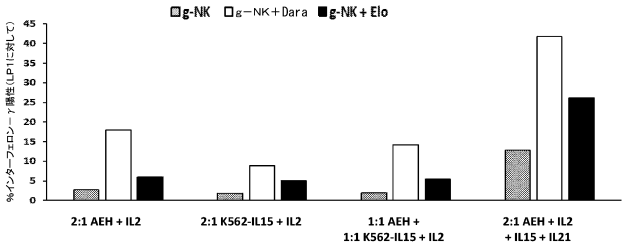
【図４Ｃ】



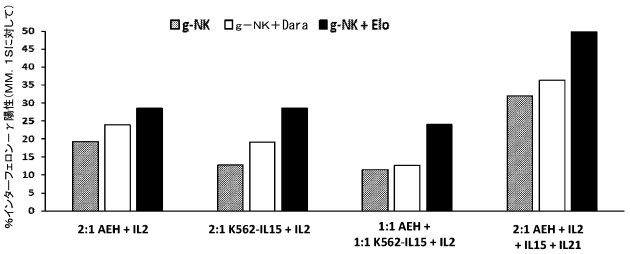
【図４Ｄ】



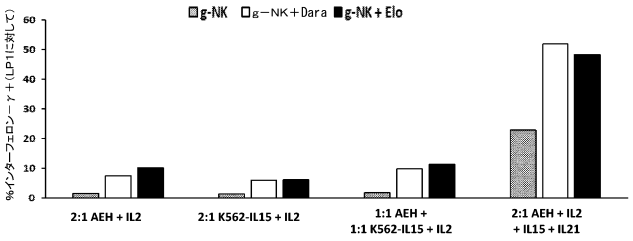
【図５Ａ】



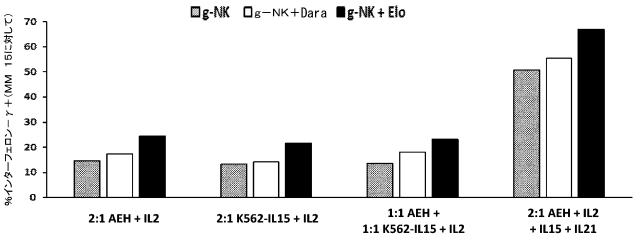
【図５Ｂ】



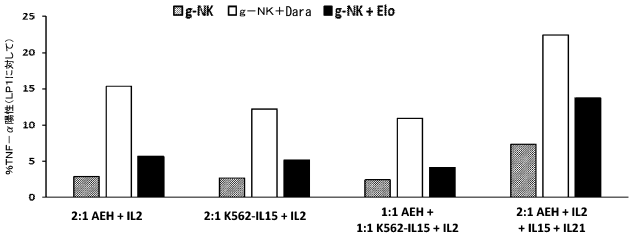
【図５Ｃ】



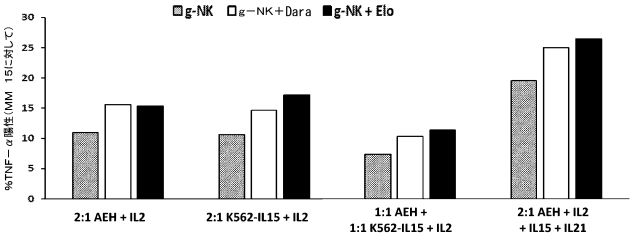
【図５Ｄ】



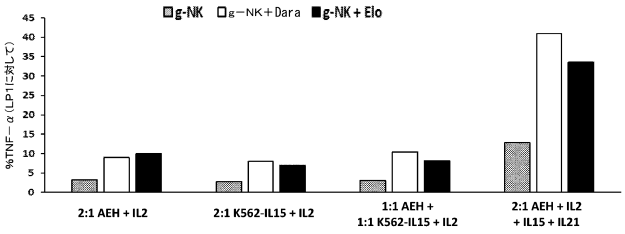
【図６Ａ】



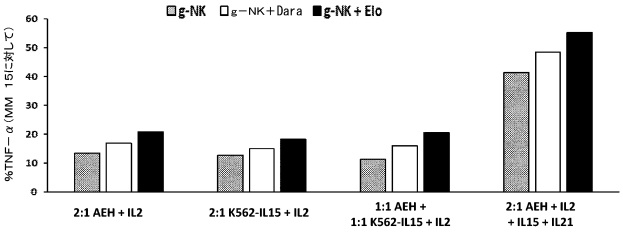
【図６Ｂ】



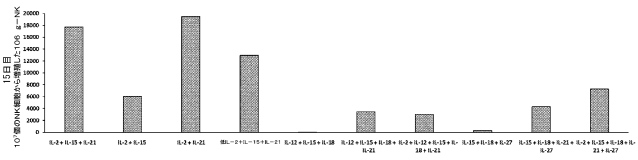
【図６Ｃ】



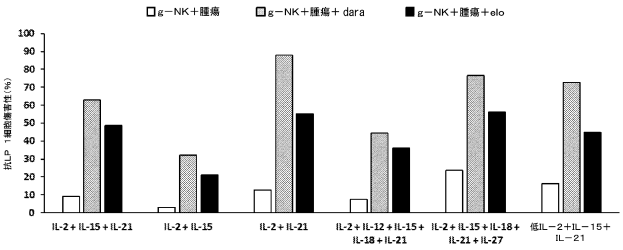
【図６Ｄ】



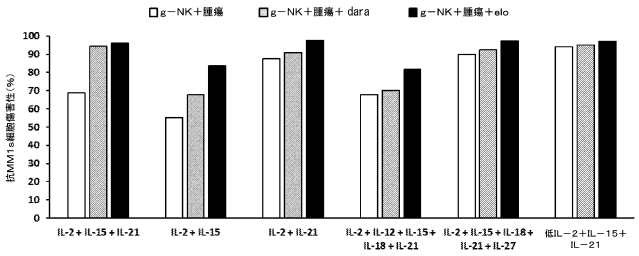
【図７】



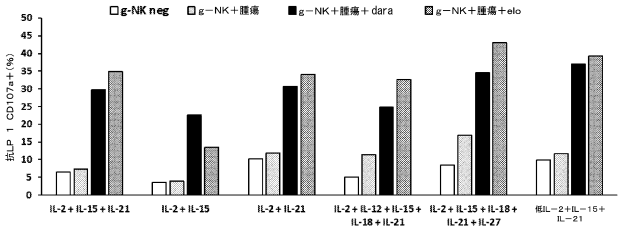
【図８Ａ】



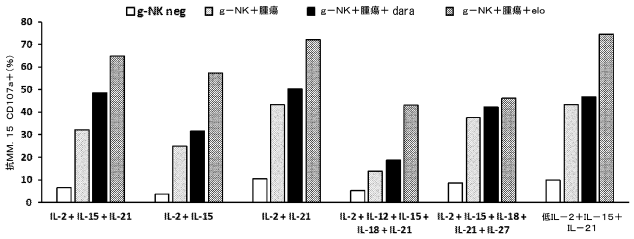
【図８Ｂ】



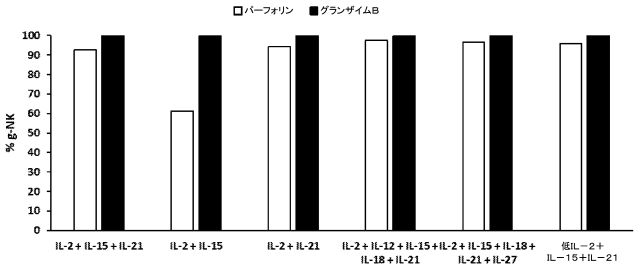
【図８Ｃ】



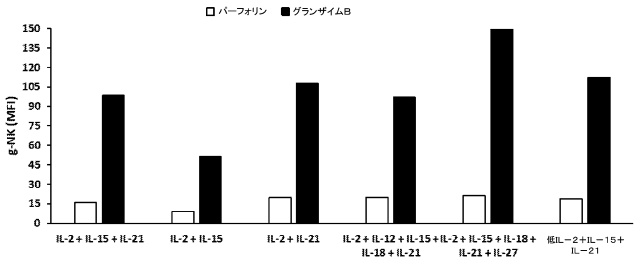
【図８Ｄ】



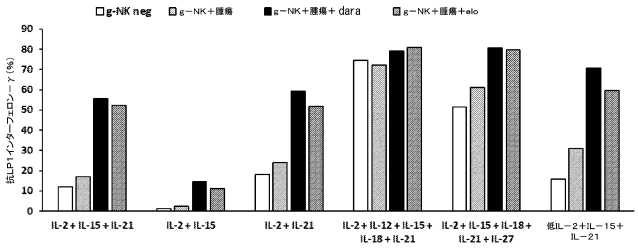
【図８Ｅ】



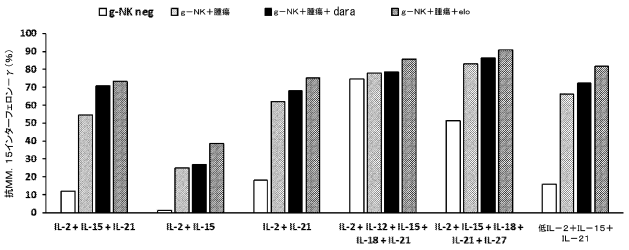
【図８Ｆ】



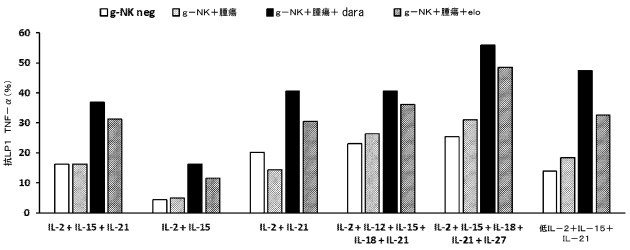
【図８Ｇ】



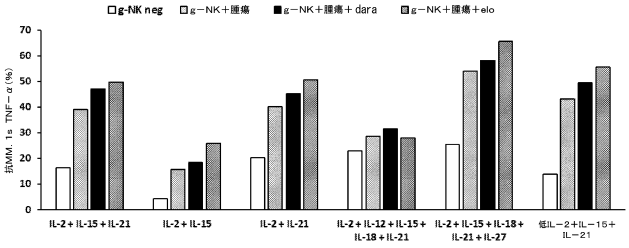
【図８Ｈ】



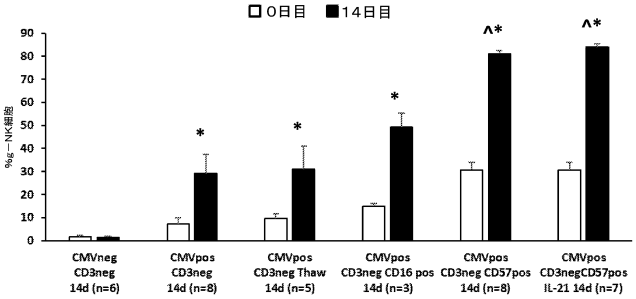
【図８Ｉ】



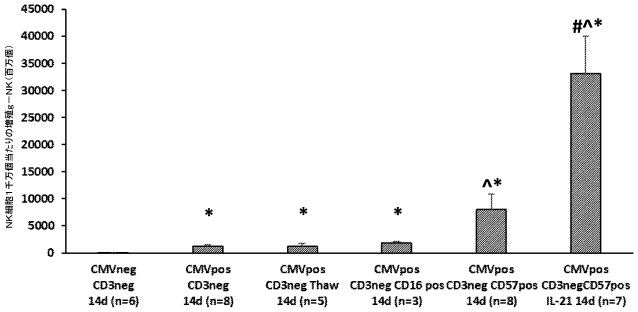
【図８Ｊ】



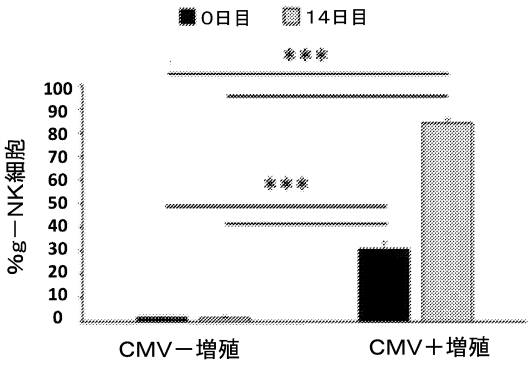
【図９Ａ】



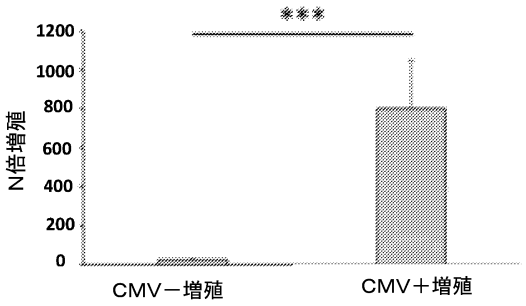
【図９Ｂ】



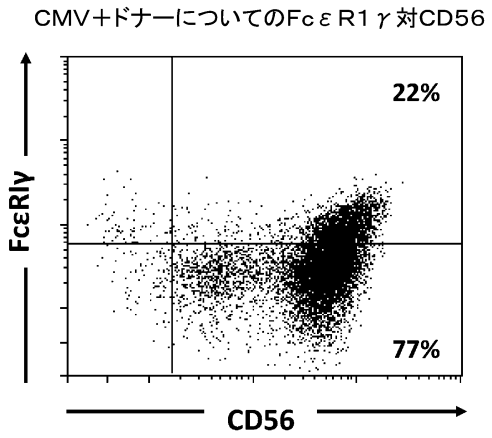
【図９Ｃ】



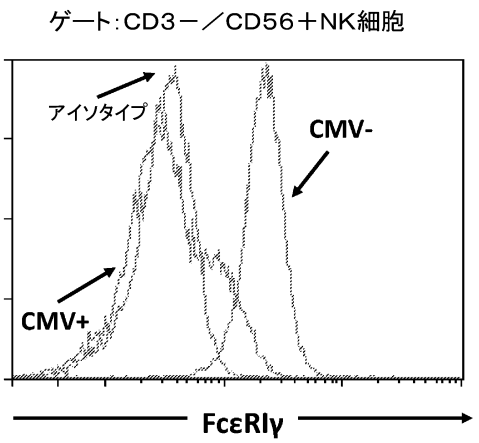
【図９Ｄ】



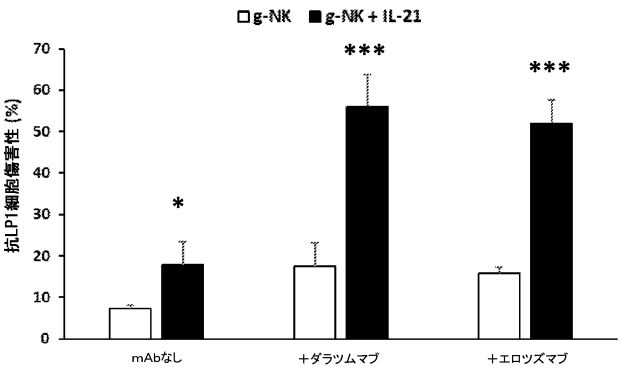
【図９Ｅ】



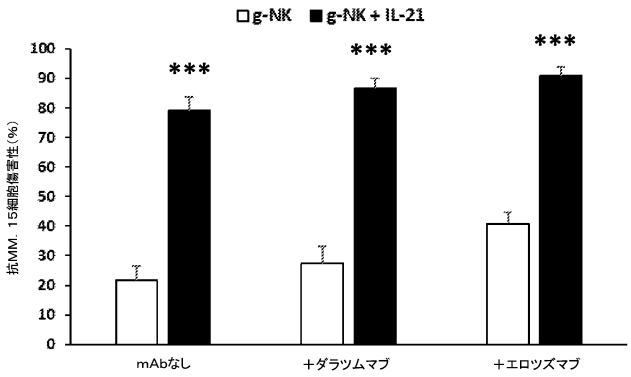
【図９Ｆ】



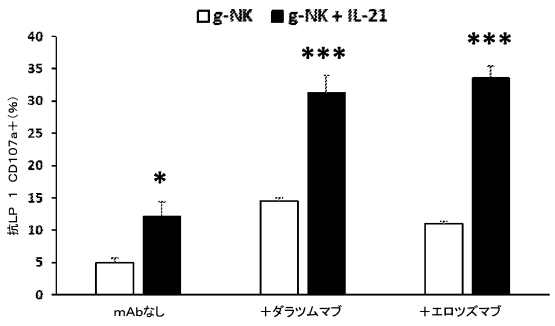
【図９Ｇ】



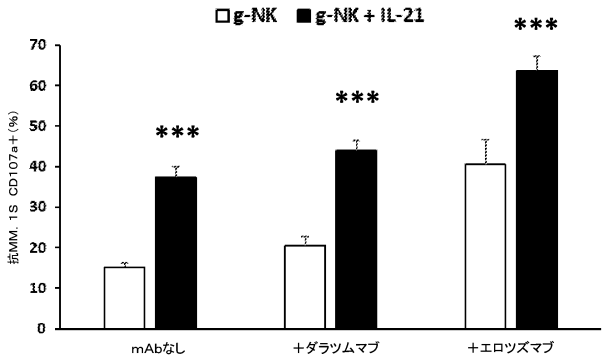
【図９Ｈ】



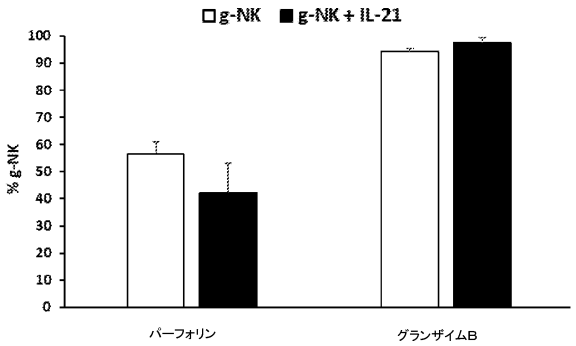
【図９Ｉ】



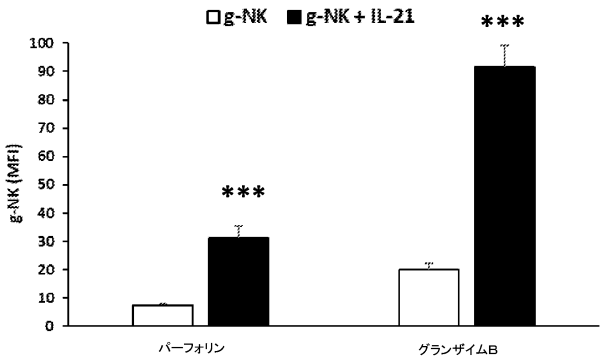
【図９Ｊ】



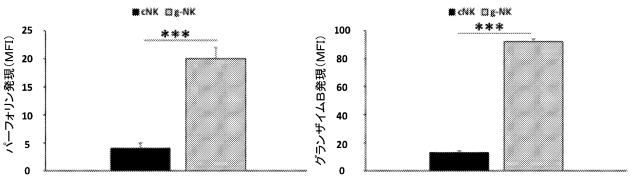
【図９Ｋ】



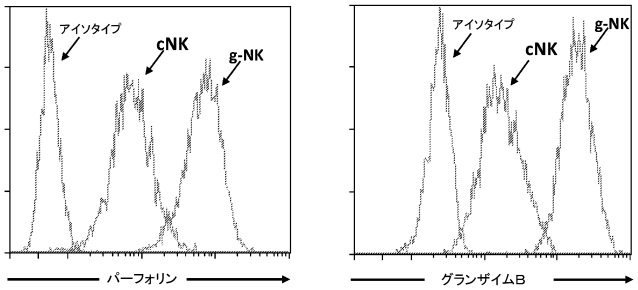
【図９Ｌ】



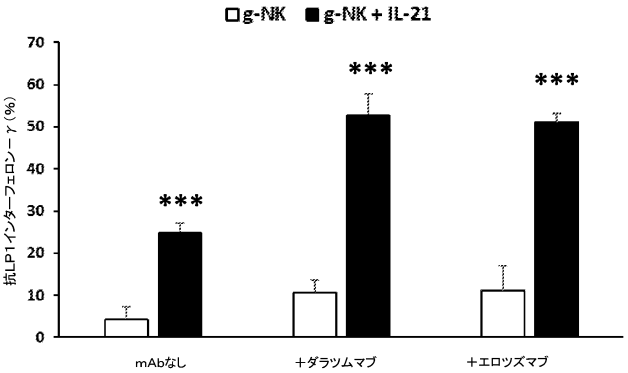
【図９Ｍ】



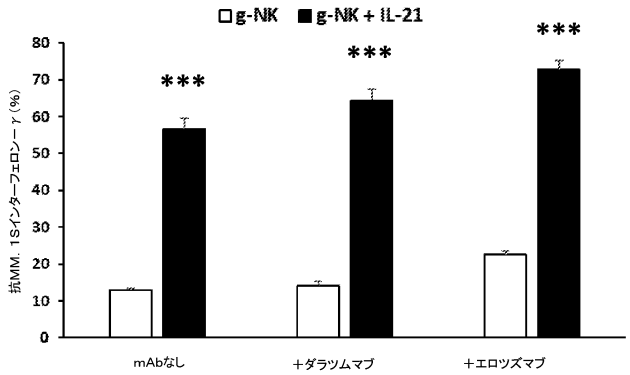
【図９Ｎ】



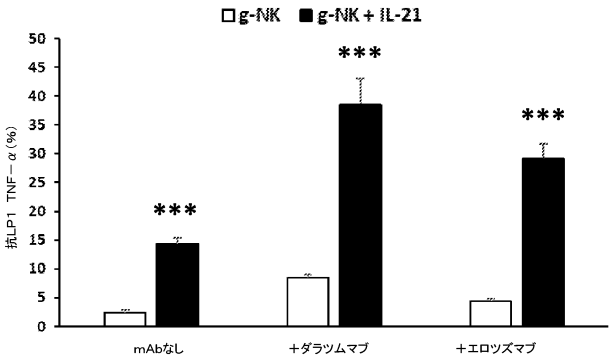
【図９Ｏ】



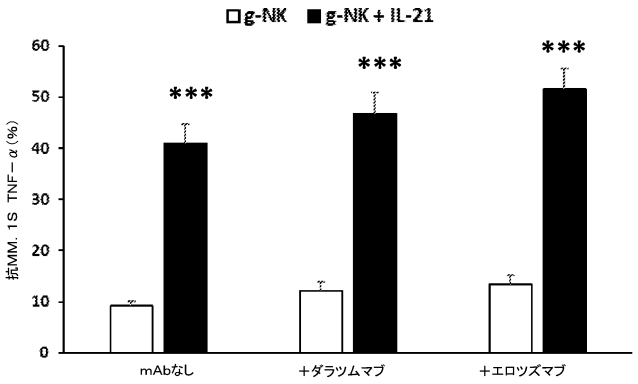
【図９Ｐ】



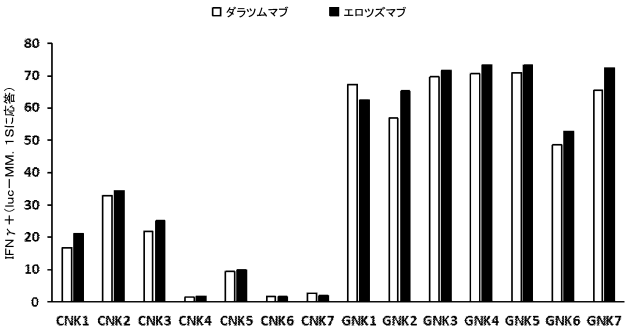
【図９Ｑ】



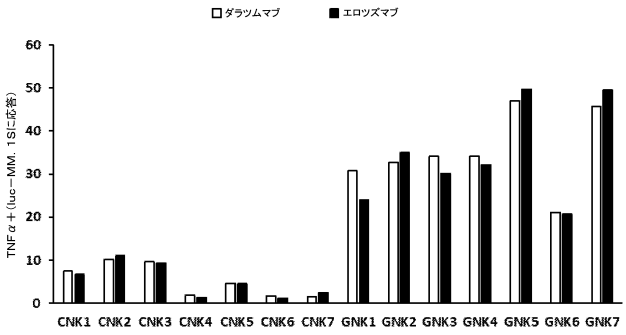
【図９Ｒ】



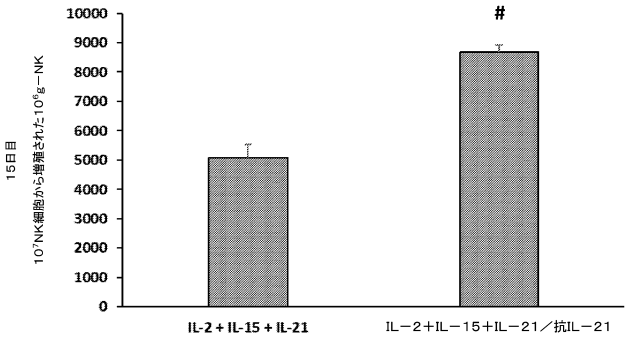
【図９Ｓ】



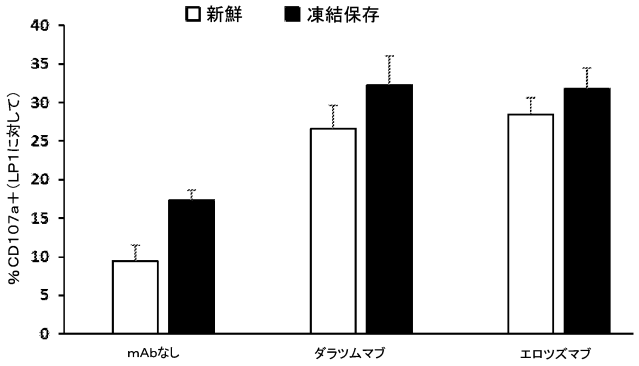
【図９Ｔ】



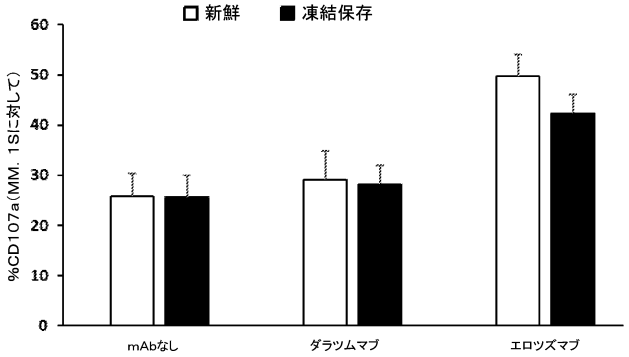
【図１０】



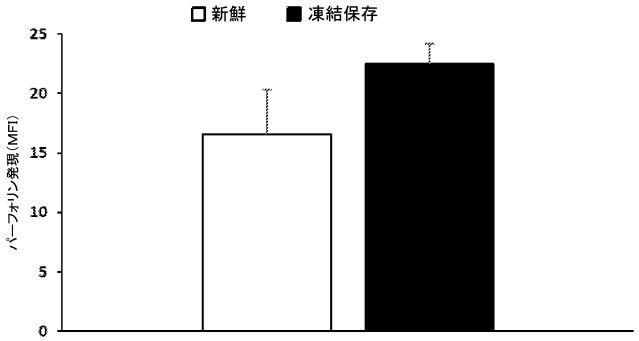
【図１１Ａ】



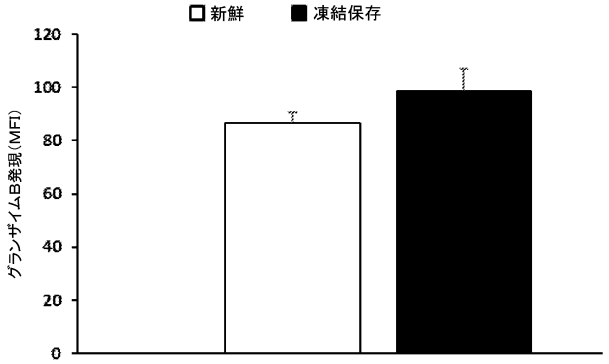
【図１１Ｂ】



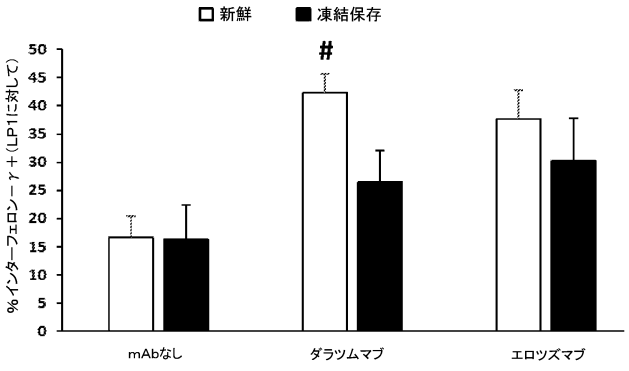
【図１１Ｃ】



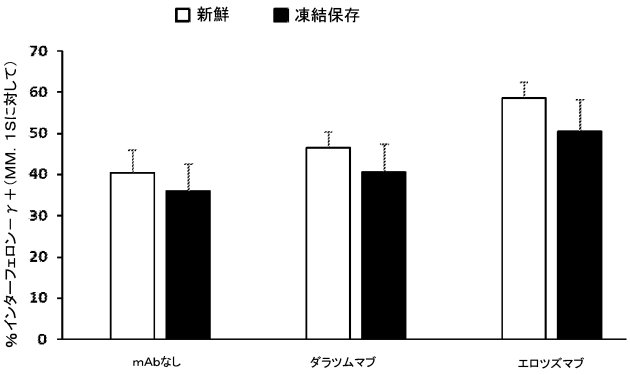
【図１１Ｄ】



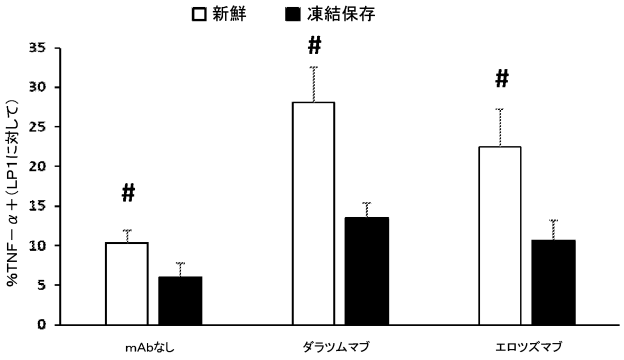
【図１１Ｅ】



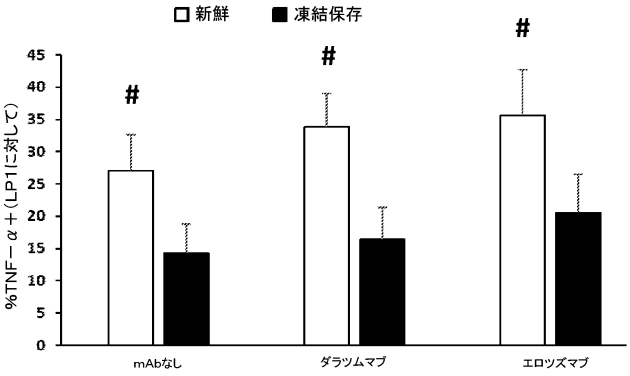
【図１１Ｆ】



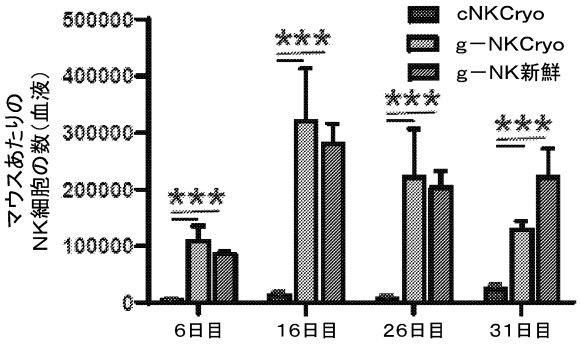
【図１１Ｇ】



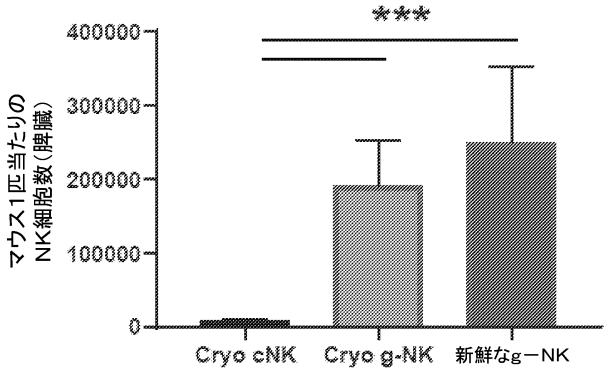
【図１１Ｈ】



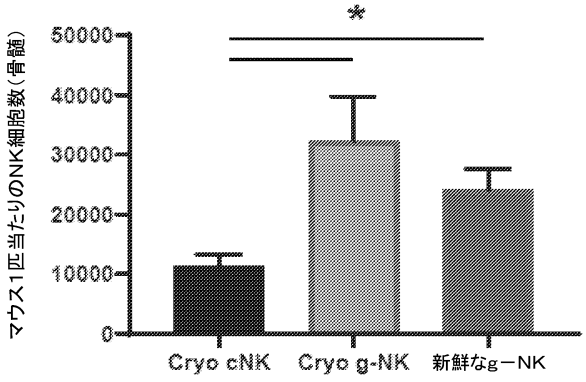
【図１２Ａ】



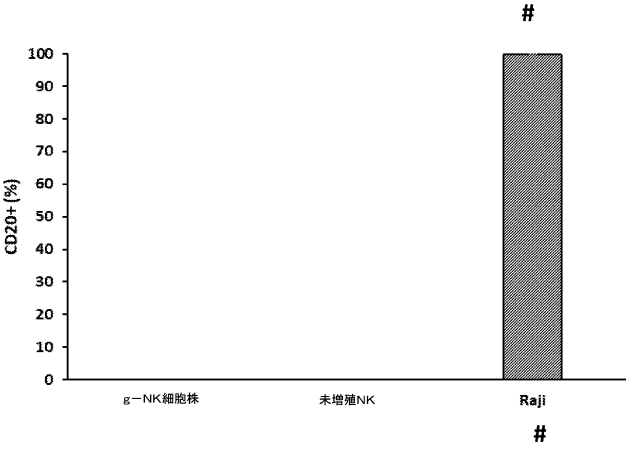
【図１２Ｂ】



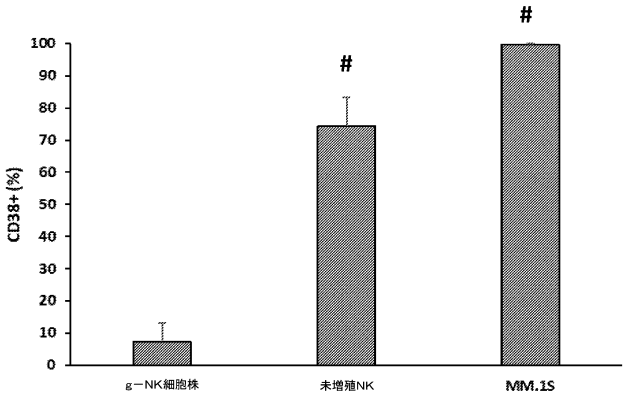
【図１２Ｃ】



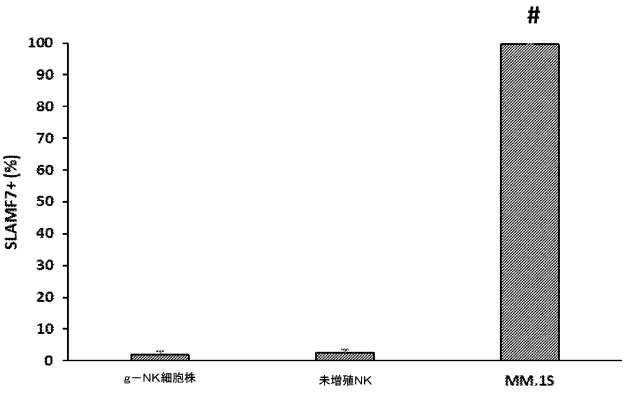
【図１３Ａ】



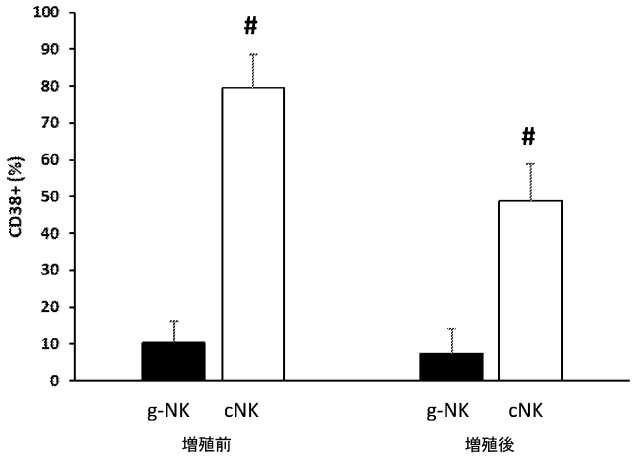
【図１３Ｂ】



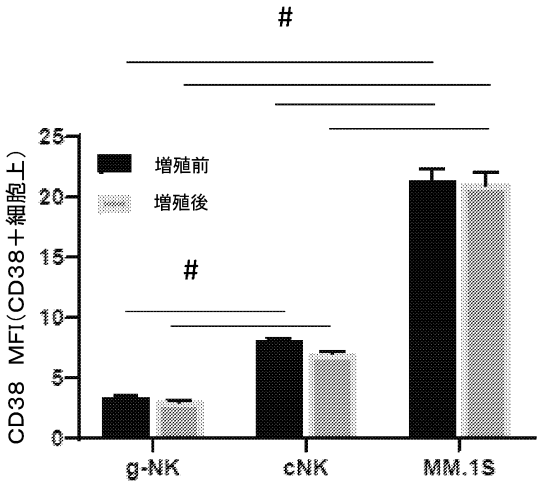
【図１３Ｃ】



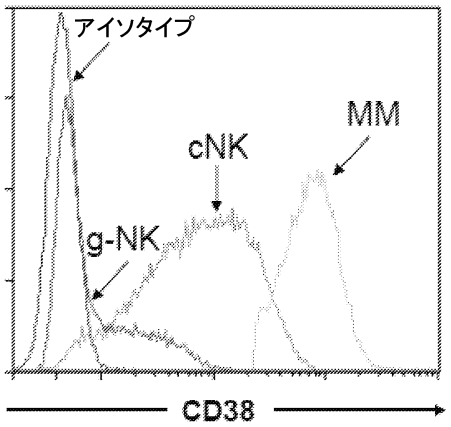
【図１３Ｄ】



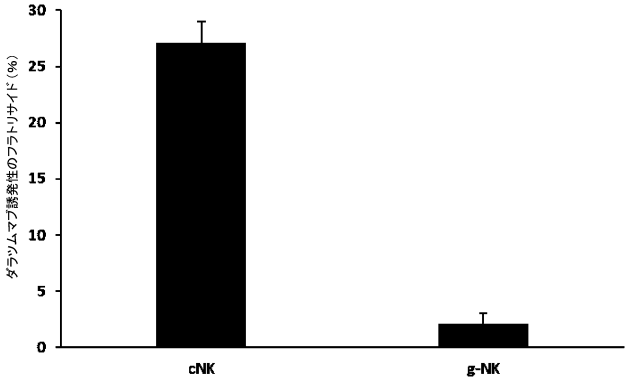
【図１３Ｅ】



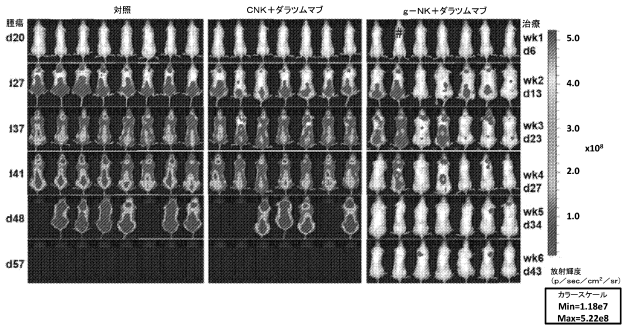
【図１３Ｆ】



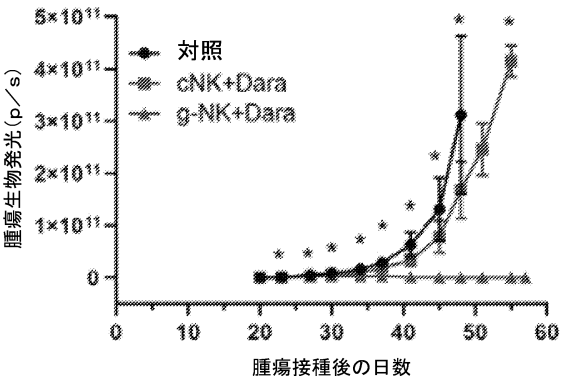
【図１３Ｇ】



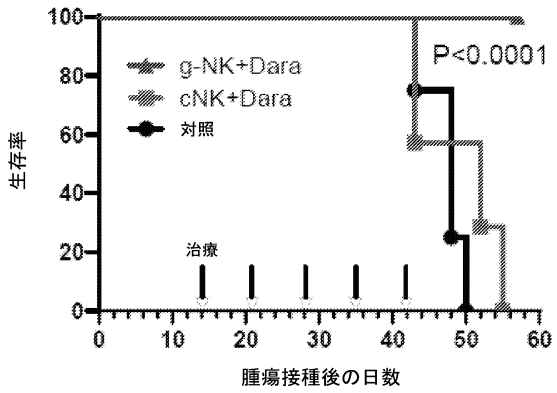
【図１４Ａ】



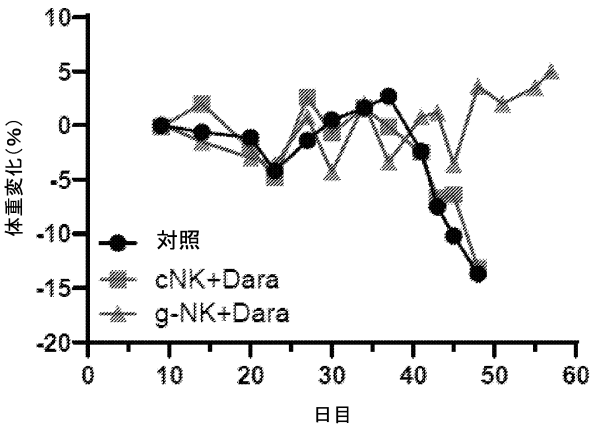
【図１４Ｂ】



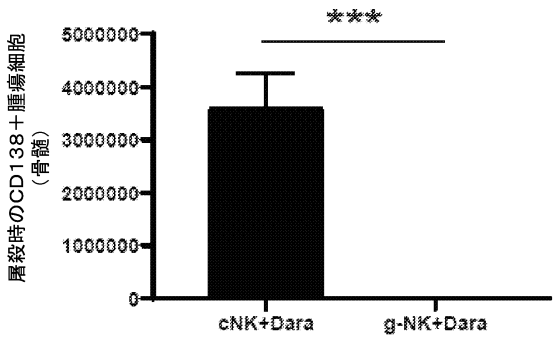
【図１４Ｃ】



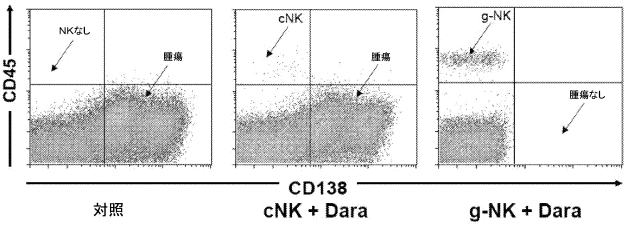
【図１４Ｄ】



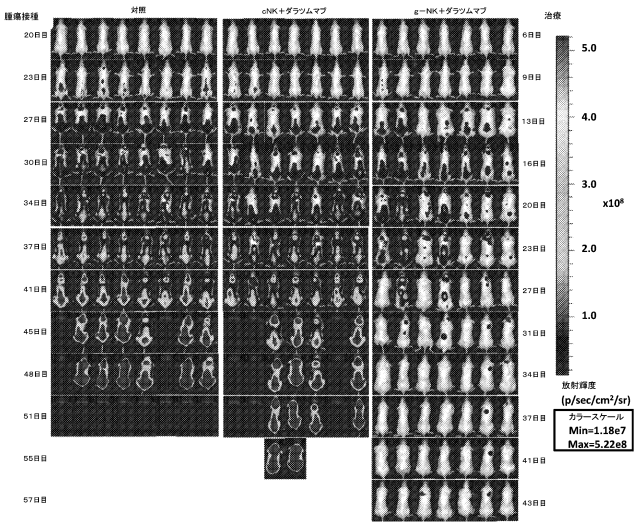
【図１４Ｅ】



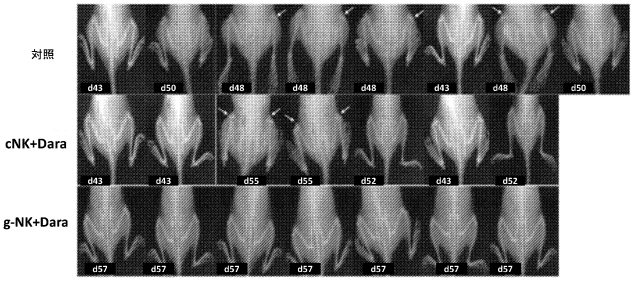
【図１４Ｆ】



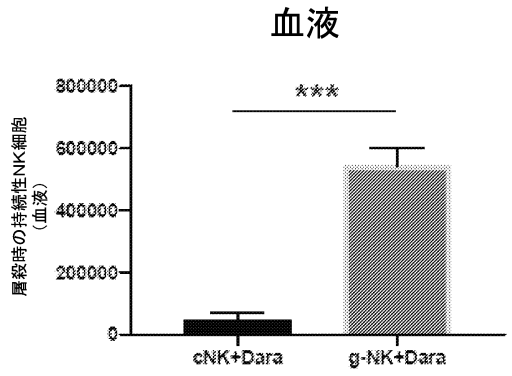
【図１４Ｇ】



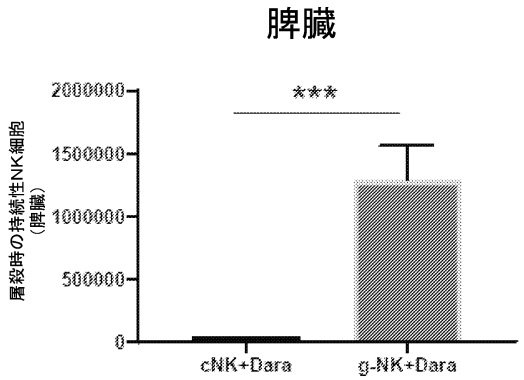
【図１４Ｈ】



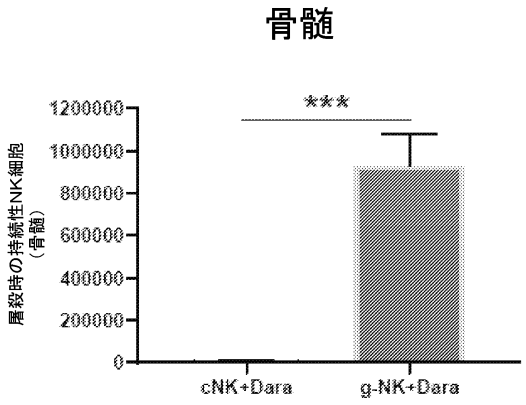
【図１５Ａ】



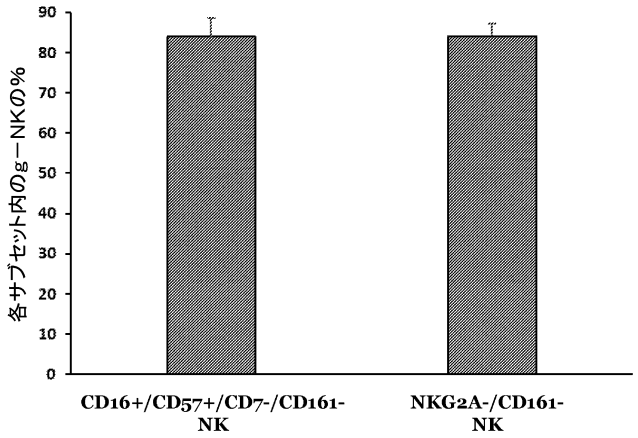
【図１５Ｂ】



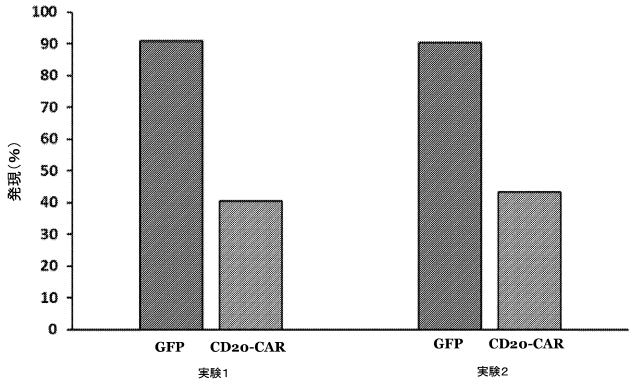
【図１５Ｃ】



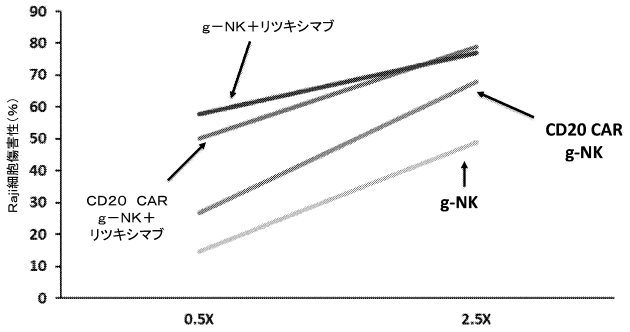
【図１６】



【図１７】



【図１８】



【配列表】

2024527559000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/035884

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K35/17 A61P35/00 C07K14/725 C12N5/0783
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C07K A61P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, COMPENDEX, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2020/247392 A1 (NKARTA INC [US]) 10 December 2020 (2020-12-10) claims 1-67 -----	1-197
Y	Anonymous: "NK Cell Genetic Engineering Service", , 14 June 2021 (2021-06-14), XP055979174, Retrieved from the Internet: URL:http://web.archive.org/web/20210614110517/https://www.creative-biolabs.com/car-t/nk-cell-genetic-engineering.htm [retrieved on 2022-11-08] page 1 ----- -/--	1-197

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C.
[x] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 November 2022	21/11/2022

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer
Wiesner, Martina

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/035884

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MASARU IMAMURA ET AL: "Autonomous growth and increased cytotoxicity of natural killer cells expressing membrane-bound interleukin-15", BLOOD, vol. 124, no. 7, 14 August 2014 (2014-08-14), pages 1081-1088, XP055309476, US ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2014-02-556837 the whole document	1-197
Y	HWANG I. ET AL: "Identification of human NK cells that are deficient for signaling adaptor FcR and specialized for antibody-dependent immune functions", INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, vol. 24, no. 12, 1 December 2012 (2012-12-01), pages 793-802, XP055822382, GB ISSN: 0953-8178, DOI: 10.1093/intimm/dxs080 Retrieved from the Internet: URL:https://watermark.silverchair.com/dxs080.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kkhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAtswggLXBgkqhkiG9w0BBwagggLIMIICxAIBADCCAr0GCSqGSIb3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMVDaBrDn1LxXnyjy0AgEQgIICjrFLv8EpuXXkyLqAEGocE3WrFfA5ZqJf8dKC7_Ei634AvVrpzs_tLCXig_EzzIT5TqXPTGjlxkfblffR5-BIOF1e8aOjZ> abstract	1-197
Y	BIGLEY AUSTIN BASIL ET AL: "Abstract 1630: FceR1g negative NK-cells (g-NK) enhance antibody-dependent cellular cytotoxicity and in vivo efficacy of therapeutic monoclonal antibodies against hematologic malignanices", CANCER RESEARCH, vol. 80, no. 16_Supplement, 15 August 2020 (2020-08-15), pages 1630-1630, XP055965327, 2019 San Antonio Breast Cancer Symposium, San Antonio, Texas ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/1538-7445.AM2020-1630 Retrieved from the Internet: URL:https://aacrjournals.org/cancerres/article/80/16_Supplement/1630/641449/Abstract-1630-FceR1g-negative-NK-cells-g-NK> abstract	1-197

-/--

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/035884

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2020/135870 A1 (PERSONGEN BIOTHERAPEUTICS SUZHOU CO LTD [CN]) 2 July 2020 (2020-07-02) claims 1-10	1-197
Y	ISLAM RASA ET AL: "Enhancing a Natural Killer: Modification of NK Cells for Cancer Immunotherapy", CELLS, vol. 10, no. 5, 29 April 2021 (2021-04-29), page 1058, XP055979184, DOI: 10.3390/cells10051058 the whole document	1-197
Y	WO 2018/148462 A1 (INDAPTA THERAPEUTICS INC [US]) 16 August 2018 (2018-08-16) cited in the application claims 1-103	1-197
Y	US 2013/295044 A1 (KIM SUNGJIN [US] ET AL) 7 November 2013 (2013-11-07) cited in the application claims 1-23	1-197

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

International application No.
PCT/US2022/035884

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2022/035884

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020247392 A1	10-12-2020	AU 2020288829 A1	02-12-2021
		CA 3140393 A1	10-12-2020
		CN 114174325 A	11-03-2022
		EP 3980450 A1	13-04-2022
		JP 2022535429 A	08-08-2022
		US 2022233593 A1	28-07-2022
		WO 2020247392 A1	10-12-2020
WO 2020135870 A1	02-07-2020	CN 109652379 A	19-04-2019
		WO 2020135870 A1	02-07-2020
WO 2018148462 A1	16-08-2018	AU 2018219895 A1	29-08-2019
		CA 3052473 A1	16-08-2018
		CN 110546265 A	06-12-2019
		EP 3580341 A1	18-12-2019
		JP 2020507349 A	12-03-2020
		US 2019376036 A1	12-12-2019
		WO 2018148462 A1	16-08-2018
US 2013295044 A1	07-11-2013	US 2013295044 A1	07-11-2013
		US 2019010457 A1	10-01-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/87 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/87	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/88 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/88	Ｚ	
Ａ６１Ｋ	*35/17 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/17		
Ａ６１Ｐ	*29/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00		
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｐ	*35/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/02		
Ａ６１Ｐ	*31/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/00		
Ａ６１Ｐ	*43/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１２１	
Ａ６１Ｋ	*45/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00		

(32)優先日　令和3年7月1日(2021.7.1)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＴＲＩＴＯＮ
２．ＴＷＥＥＮ

弁理士　井上 隆一
(74)代理人　100148699
弁理士　佐藤 利光
(74)代理人　100188433
弁理士　梅村 幸輔
(74)代理人　100128048
弁理士　新見 浩一
(74)代理人　100129506
弁理士　小林 智彦
(74)代理人　100114340
弁理士　大関 雅人
(74)代理人　100214396
弁理士　塩田 真紀
(74)代理人　100121072
弁理士　川本 和弥
(74)代理人　100221741
弁理士　酒井 直子
(74)代理人　100114926
弁理士　枝松 義恵
(72)発明者　ディピエロ ガイ
アメリカ合衆国 ７７０２３ テキサス州 ヒューストン ガルフ フリーウェイ ５０００ ビルディング ５ ルーム １４２
(72)発明者　ビグリー オースティン
アメリカ合衆国 ７７０２３ テキサス州 ヒューストン ガルフ フリーウェイ ５０００ ビルディング ５ ルーム １４２

Fターム（参考） 4B064 AG02 CA19 CC24 DA01
4B065 AA94X AB01 BA02 BB19 BC50 BD39 CA44
4C084 AA19 MA02 NA14 ZB11 ZB26 ZB27 ZB31 ZC751
4C087 AA01 AA02 BB63 NA14