

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7565271号
(P7565271)

(45)発行日 令和6年10月10日(2024.10.10)

(24)登録日 令和6年10月2日(2024.10.2)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	5/0783(2010.01)	C 1 2 N	5/0783
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09 Z
C 0 7 K	14/725(2006.01)	C 0 7 K	14/725
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28
請求項の数 16 (全115頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-528490(P2021-528490)	(73)特許権者	521035716
(86)(22)出願日	令和1年7月25日(2019.7.25)		オスペダーレ ペディアトリコ バンビー
(65)公表番号	特表2021-532829(P2021-532829		ノ ジェズ
	A)		イタリア・ローマ・00165・ローマ
(43)公表日	令和3年12月2日(2021.12.2)		・ピアッツァ・ディ・サントノフリオ・
(86)国際出願番号	PCT/EP2019/070125		4
(87)国際公開番号	WO2020/021045	(74)代理人	100078282
(87)国際公開日	令和2年1月30日(2020.1.30)		弁理士 山本 秀策
審査請求日	令和4年6月24日(2022.6.24)	(74)代理人	100113413
(31)優先権主張番号	62/703,654		弁理士 森下 夏樹
(32)優先日	平成30年7月26日(2018.7.26)	(74)代理人	100181674
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 飯田 貴敏
		(74)代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
		(74)代理人	230113332
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 ガンマデルタT細胞およびナチュラルキラー細胞の治療的調製物ならびに製造および使用する方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

1または複数の対象からの細胞を含有する試料由来の80～99%のNK細胞を含む組成物を製造する方法であって、

(a) NK細胞およびγδT細胞を含む枯渇細胞集団を生成する条件下で前記試料からαβT細胞を枯渇させること；

(b) 前記枯渇細胞集団を(a)細胞接着分子ポリペプチドCD2に免疫特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片、および(b)NKp46に免疫特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片に接触させることを含む活性化条件に曝露すること；ならびに

(c) 前記枯渇細胞集団をIL-15に接触させることを含む拡大条件に曝露し、それによって80～99%のNK細胞を含む組成物を生成すること

を含む方法。

【請求項2】

前記組成物が、1%～20%のγδT細胞を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記拡大条件が、前記枯渇細胞集団のIL-15の存在下での1週間～6週間のインキュベーションを含む、請求項1～2のいずれか一項に記載の方法。

【請求項4】

前記活性化条件が、前記枯渇細胞集団の、(a)細胞接着分子ポリペプチドCD2に免疫特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片；および(b)NKp46に免疫特異

的に結合する抗体またはその抗原結合性断片の存在下での1時間～1週間のインキュベーションを含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記組成物における総細胞の1%またはそれ未満が $\alpha\beta$ T細胞である、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

前記試料から $\alpha\beta$ T細胞を枯渇させることが、前記試料を $\alpha\beta$ T細胞受容体に免疫特異的に結合する抗体に接触させることを含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記CD2に免疫特異的に結合する前記抗体またはその抗原結合性断片が、モノクローナル抗CD2抗体であり、かつ／または前記NKp46に免疫特異的に結合する前記抗体またはその抗原結合性断片が、モノクローナル抗NKp46抗体である、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項8】

前記抗CD2抗体および／または抗NKp46抗体が可溶性である、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記活性化条件および／または拡大条件が、フィーダー細胞を含まない、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

20

前記活性化条件および／または拡大条件が、ビスホスホネートを含まない、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

前記枯渇細胞集団を活性化条件に曝露する前に、前記枯渇細胞集団を遺伝子改変条件に供することをさらに含む、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記枯渇細胞集団を拡大条件に曝露した後に、前記枯渇細胞集団を遺伝子改変条件に供することをさらに含む、請求項10に記載の方法。

【請求項13】

前記遺伝子改変が、キメラ抗原受容体をコードする外因性ポリヌクレオチドを前記細胞に導入することを含む、請求項11または12に記載の方法。

30

【請求項14】

前記活性化条件および拡大条件が同時に実施される、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

前記活性化条件および拡大条件が逐次的に実施される、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

前記試料が、末梢血、肝組織、骨髄、上皮組織または臍帯血である、請求項1～15のいずれか一項に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連する特許出願

本特許出願は、Concetta QUINTARELLIらを発明者とし、代理人整理番号6474-131400によって示される、タイトル「ガンマーデルタT細胞およびナチュラルキラー細胞の治療的調製物ならびにそれらを作製および使用する方法 (THERAPEUTIC PREPARATIONS OF GAMMA-DELTA T CELLS AND NATURAL KILLER CELLS AND METHODS FOR MAKING AND USING THEM)」の2018年7月26日に出版さ

50

れた米国特許仮出願第 6 2 / 7 0 3 , 6 5 4 号の利益を主張する。全ての本文、表、および図面を含む前述の出願の全内容は、全ての目的に関して参照により本明細書に組み入れられる。

【 0 0 0 2 】

分野

本技術は、一部には治療のための自然免疫細胞組成物、ならびにそのような組成物を作製および使用する方法に関する。

【背景技術】

【 0 0 0 3 】

抗原提示病原体および他の外来抗原提示実体に対する免疫応答は、自然のおよび適応性の防御を含む。自然免疫応答は、宿主において活性で持続的に機能的である第一線の免疫防御である。自然免疫細胞、例えばNK細胞およびガンマ・デルタ ($\gamma\delta$) T細胞は、古典的なHLA抗原を認識しない。適応免疫応答は、抗原提示物質、例えば異物、細胞、または微生物に特異的に適合させる応答であり、しばしば、成熟するまでに数日を要し得る。免疫療法は、天然のまたは改変された（例えば、CAR改変）適応免疫細胞（例えば、アルファ・ベータ ($\alpha\beta$) T細胞、樹状細胞、マクロファージ）を使用する。例えば、 $\alpha\beta$ T細胞は、*in vivo*で抗原提示物質上のリガンドに結合すると拡大する（expand）が、これは数日をまたは数週間をも要し得る。同様に、 $\alpha\beta$ T細胞の結合は、HLA遺伝子複合体によってコードされるMHCクラスIおよびクラスIIリガンドを認識するCD4、CD8、およびT細胞受容体（TCR）を含む1つまたは複数のT細胞表面分子または分子の複合体を通して起こる（Miceli et al., Semin.Immunol., 3(3):133-141 (1991)）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【 0 0 0 4 】

【文献】Miceli et al., Semin.Immunol., 3(3):133-141 (1991)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 5 】

概要

本明細書において、免疫学および医学に関する組成物、そのような組成物を作製する方法、およびそのような組成物を使用する処置の方法を提供する。ある特定の態様では、様々な細胞治療のために、ガンマデルタT細胞 ($\gamma\delta$)、ナチュラルキラー細胞（NK）、または2つの組合せを含む、製品およびキットを含む組成物ならびに方法を提供する。同様に、これらの治療に使用するために遺伝子変更することができるガンマデルタT細胞 ($\gamma\delta$) およびナチュラルキラー細胞（NK）を作製する方法も提供する。代替の態様では、遺伝子変更されたガンマデルタT細胞 ($\gamma\delta$) およびナチュラルキラー細胞（NK）を、キメラ抗原受容体（CAR）または外因性もしくは異種T細胞受容体（TCR）を発現するように改変し、これを使用して任意の細胞表面分子、例えばがん細胞または感染細胞上のマーカーを直接または間接的に標的とすることができる。

【 0 0 0 6 】

ある特定の態様では、NK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された細胞の集団を含有する組成物を製造する方法が提供される。本明細書に提供される方法のある特定の態様では、ドナーから得た試料（例えば、健康な対象または細胞の集団によって処置される患者である対象からの組織、臓器、または血液試料）を、（a）細胞接着ポリペプチドに免疫特異的に結合する少なくとも1種の外因性ポリペプチド、および（b）細胞接着ポリペプチドとは異なるポリペプチドに免疫特異的に結合し、試料の1種または複数種の細胞の表面上に発現される少なくとも1種の外因性ポリペプチドを含む活性化条件に曝露し、試料を少なくとも1種の補助的ポリペプチドに接触させることを含む拡大条件に曝露し、それによってNK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された細胞の集団

を含有する組成物を生成する。試料は時に、活性化条件の次に拡大条件に逐次的に曝露される。本明細書に提供される方法は、集団における細胞の約30%から約40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくはそれより多くの間、または集団における細胞の少なくとも約30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれより多く、最大100%の高レベルの活性化をもたらし得る。

10

【0007】

本明細書に提供される方法に使用される外因性ポリペプチドおよび補助的ポリペプチドは、一部には利用可能な核酸およびアミノ酸配列、ならびに細胞接着分子および他の免疫細胞分子および受容体に関する他の知識に基づいて、容易に同定および単離、合成することができるか、または商業的供給源由来を含むそれ以外の方法で得ることができる。ある特定の態様では、外因性ポリペプチドはヒトである。一部の態様では、外因性ポリペプチドは単離されている。ある特定の態様では、補助的ポリペプチドはヒトである。一部の態様では、補助的ポリペプチドは単離されている。

20

【0008】

本明細書に提供される方法のある特定の態様では、試料は、アルファ・ベータT細胞を枯渇させた後に、活性化および拡大条件に曝露され、次いで得られた枯渇細胞集団は、時に活性化および拡大条件に曝露される。ある特定の態様では、上記の(a)の外因性ポリペプチド、上記の(b)の外因性ポリペプチド、または(a)の外因性ポリペプチドおよび上記の(b)の外因性ポリペプチドの両方が可溶性である。一部の態様では、(a)の外因性ポリペプチドまたは(b)の外因性ポリペプチドは、固相基質に結合している。

【0009】

本明細書に提供される方法の一部の態様では、少なくとも1種の補助的ポリペプチドは、集団におけるガンマ・デルタT細胞の量と比較したNK細胞の量が、少なくとも1種の補助的ポリペプチドの量および／またはタイプに依存的であるように選択される。ある特定の態様では、補助的ポリペプチドは、枯渇細胞集団を少なくとも1種の補助的ポリペプチドに接触させた後、細胞の集団におけるガンマ・デルタT細胞と比較してNK細胞の量を増加または減少させる。ある特定の態様では、試料またはアルファ・ベータT細胞枯渇試料を拡大条件に曝露する期間は、所望のNK細胞のガンマ・デルタT細胞に対する比が得られるように選択される。

30

【0010】

本明細書に提供される方法のある特定の態様では、活性化条件は非ヒト動物由来の血清を含まない。本明細書に提供される方法の一部の態様では、拡大条件は、非ヒト動物由来の血清を含まない。

40

【0011】

本明細書に提供される方法では、高いパーセンテージの細胞が、しばしばフィーダー細胞を使用することなく活性化される。時に、集団における細胞の少なくとも約30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれより多く、最大100%の高レベルの活性化をもたらし得る。

50

1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、またはそれより多く、最大1 0 0 %がフィーダー細胞を使用することなく活性化される。このように、本明細書に提供される方法のある特定の態様では、活性化条件はフィーダー細胞を含まない。本明細書に提供される方法の一部の態様では、拡大条件はフィーダー細胞を含まず、時に活性化条件および拡大条件の両方がフィーダー細胞を含まない。

【0 0 1 2】

任意の供給源の免疫細胞を、本明細書に提供される方法において試料として使用することができる。ある特定の態様では、試料は、骨髓、末梢血、肝組織、上皮組織、および臍帯血から選択される。本明細書に提供される方法の一部の態様では、試料は、胚供給源に由来しない。本明細書に提供される方法のある特定の態様では、試料は末梢血であり、一部の態様では、末梢血試料は、本明細書に提供される方法におけるアルファ・ベータT細胞枯渇に供される前に処理される、処理された試料である。例えば、末梢血試料を、密度勾配遠心分離によって処理し、白血球、血小板、顆粒球等を含有するバフィーコート进行分離および／または単離することができ、次にこれを本明細書に提供される方法に従ってアルファ・ベータT細胞枯渇に供することができる。ある特定の態様では、さらにバフィーコートにF i c o l l密度勾配分離を行って単核細胞（P B M C）を得ることができ、次にこれを本明細書に提供される方法におけるアルファ・ベータT細胞枯渇に供することができる。一部の態様では、末梢血試料にアフエーシスを行って、血漿を細胞から分離することができ、次いで時に細胞を、本明細書に提供される方法におけるアルファ・ベータT細胞枯渇に供する。本明細書に提供される方法のある特定の態様では、試料は臍帯血であり、時に臍帯血は、本明細書に提供される方法におけるアルファ・ベータT細胞枯渇に供される前に処理される、処理された臍帯血である。

【0 0 1 3】

本明細書に提供される方法のある特定の態様では、（b）の外因性ポリペプチドは、NK細胞活性化受容体、ガンマ・デルタT細胞活性化受容体、または両方に免疫特異的に結合する。そのような受容体には、C D 2、C D 3、C D 5 6、N K p 3 0、N K p 4 4、N K p 4 6、N K G 2 A、N K G 2 C、N K G 2 D、K A R受容体、K I R受容体、S I G L E C-7、K I R 3 D S 1、K I R 3 D 5 1、K I R 2 D L 1（抗体：1 1 P B 6）、D N A M 1、N T B A、H L A-D R等が挙げられるがこれらに限定されない。一部の態様では、受容体はN K p 4 6である。本明細書に提供される方法のある特定の態様では、（a）の外因性ポリペプチドはC D 2に免疫特異的に結合する。一部の態様では、（a）もしくは（b）、または（a）および（b）の外因性ポリペプチドは、抗体またはその抗原結合性断片である。本明細書の目的に関して、「抗体」の列挙は、全長の抗体および抗体断片を含むその一部を含む。抗体断片には、F a b断片、F a b'断片、F（a b'）₂断片、F v断片、ジスルフィド結合F v（d s F v）、F d断片、F d'断片、一本鎖F v（s c F v）、一本鎖F a b（s c F a b）、ダイアボディ、抗イディオタイプ（抗I d）抗体、または上記のいずれかの抗原結合性断片が挙げられるがこれらに限定されない。抗体はまた、合成抗体、組換えにより産生された抗体、多特異性抗体（例えば、二特異性抗体）、ヒト抗体、非ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、およびイントラボディも含む。抗体は、任意の免疫グロブリンタイプ（例えば、I g G、I g M、I g D、I g E、I g A、およびI g Y）、任意のクラス（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1、およびI g A 2）、またはサブクラス（例えば、I g G 2 aおよびI g G 2 b）のメンバーを含み得る。

【0 0 1 4】

本明細書に提供される方法のある特定の態様では、活性化条件は、試料または枯渇細胞集団を、少なくとも2種の外因性ポリペプチドに接触させることを含む。一部の態様では、第1の外因性ポリペプチドはC D 2に免疫特異的に結合し、第2の外因性ポリペプチドは、N K p 4 6に免疫特異的に結合する。一部の態様では、活性化条件は、C D 2に免疫特異的に結合する第1の外因性ポリペプチド、およびN K p 4 6に免疫特異的に結合する

第2の外因性ポリペプチドからなるか、またはそれから本質的になる。ある特定の態様では、CD2に免疫特異的に結合する外因性ポリペプチド、NKp46に免疫特異的に結合する外因性ポリペプチド、またはCD2に免疫特異的に結合する外因性ポリペプチドおよびNKp46に免疫特異的に結合する外因性ポリペプチドの両方が、可溶性である。ある特定の態様では、第1の外因性ポリペプチドおよび／または第2の外因性ポリペプチドは、抗体またはその抗原結合性断片である。

【0015】

本明細書に提供される方法のある特定の態様では、拡大条件は、サイトカインである少なくとも1種の補助的ポリペプチド、および／またはガンマ・デルタT細胞上の受容体に免疫特異的に結合するポリペプチド、および／またはガンマ・デルタT細胞上の受容体に免疫特異的に結合するその一部を含む、それからなる、またはそれから本質的になる。ある特定の態様では、サイトカインはインターロイキン、例えばIL-1（例えば、GenBank受託番号BC008678.1を参照されたい）、IL-2（例えば、GenBank受託番号S77834.1を参照されたい）、IL-4（例えば、GenBank受託番号BC070123.1を参照されたい）、IL-7（例えば、GenBank受託番号BC047698.1を参照されたい）、IL-9（例えば、GenBank受託番号BC066285.1を参照されたい）、IL-15（例えば、GenBank受託番号BC100962.1；100963.1；100961.1を参照されたい）、IL-21（例えば、GenBank受託番号LC133256.1を参照されたい）、またはその任意の組合せである。本明細書に提供される方法の一部の態様では、サイトカインは、IL-2、IL-15、またはその組合せである。ある特定の態様では、拡大条件は、IL-2、IL-15、およびガンマ・デルタT細胞上の受容体に免疫特異的に結合するポリペプチドを含む、それからなる、またはそれから本質的になる。ある特定の態様では、ガンマ・デルタT細胞上の受容体はCD3である。一部の態様では、ガンマ・デルタT細胞上のCD3受容体に免疫特異的に結合するポリペプチドは、抗体またはその抗原結合性断片であり、ある特定の態様では、抗体はOKT3である。ある特定の態様では、拡大条件は、試料または枯渇細胞集団を、(a) IL-2ポリペプチド；(b) IL-15ポリペプチド；(c) IL-2ポリペプチドおよびIL-15ポリペプチド；(d) IL-2ポリペプチドおよびCD3に免疫特異的に結合する抗体；または(e) IL-2ポリペプチド、IL-15ポリペプチド、およびCD3に免疫特異的に結合する抗体に接触させることを含む。一部の態様では、CD3に免疫特異的に結合する抗体は、OKT3である。

【0016】

ある特定の態様では、拡大条件は、試料（例えば、供給源試料またはアルファ・ベータT細胞が枯渇された試料細胞集団）を1つより多くの条件セットに逐次的に曝露することを含む。一部の態様では、試料は、2つの拡大条件セットに曝露される。複数の態様では、第1の拡大条件セットに曝露された細胞の集団を洗浄した後、第2の拡大条件セットに曝露する。ある特定の態様では、(a) 第1の条件セットはIL-2を含み、第2の条件セットはIL-15を含む；(b) 第1の条件セットはIL-15を含み、第2の条件セットはIL-2を含む；(c) 第1の条件セットはIL-2およびCD3に免疫特異的に結合する抗体を含み、第2の条件セットはIL-15を含む；または(d) 第1の条件セットはIL-15およびCD3に免疫特異的に結合する抗体を含み、第2の条件セットはIL-2およびCD3に免疫特異的に結合する抗体を含む。

【0017】

本明細書に提供される方法のある特定の態様では、1種または複数種の補助的ポリペプチドを含む第1の拡大条件セットはしばしば、NK細胞のガンマ・デルタT細胞に対する第1の比を含む第1の細胞集団をもたらし、次にこれを第2の拡大条件セットを使用してNK細胞のガンマ・デルタT細胞に対する所望の最終的な比となるように微調整することができ、第1の条件セットは第2の条件セットとは異なる。

【0018】

本明細書に提供される方法では、細胞集団を、活性化条件および拡大条件に同時にまたは任意の順序で逐次的に曝露することができる。さらに、外因性ポリペプチド（複数可）は、補助的ポリペプチド（複数可）として機能することができ、および／またはその逆も起こり得る。

【0019】

本明細書に提供される方法によって得た免疫細胞組成物は、天然（例えば、生体液または組織）における免疫細胞の組成物と比較して、自然免疫細胞であるNK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化されている。天然において、適応免疫細胞であるアルファ・ベータT細胞は、NK細胞およびガンマ・デルタT細胞よりかなり多量に見出される。一方、本明細書に提供される組成物では、アルファ・ベータT細胞は、存在しないか、または無視できる量から少量で存在し、NK細胞およびガンマ・デルタT細胞が主な免疫細胞構成要素である。

【0020】

拡大条件に応じて、本明細書に提供される方法によって得られた自然免疫細胞に関して富化された組成物は、ガンマ・デルタT細胞と比較して異なる量のNK細胞を含有することができる。ある特定の非制限的な例では、（i）補助的ポリペプチドがIL-2である場合、得られたNK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された細胞の集団は、しばしば約25～30%のNK細胞および約70～75%のガンマ・デルタT細胞を含有し；（ii）補助的ポリペプチドがIL-15である場合、得られたNK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された細胞の集団は、しばしば約80～99%のNK細胞および約1～20%のガンマ・デルタT細胞を含有し；（iii）補助的ポリペプチドがIL-2およびCD3に免疫特異的に結合する抗体、例えばOKT3である場合、得られたNK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された細胞の集団は、しばしば約40～45%のNK細胞および約55～60%のガンマ・デルタT細胞を含有し；（iv）補助的ポリペプチドが拡大条件の20日目までIL-2であり、その後30日目までIL-15に切り替えた場合、IL-2単独による処置と比較して、ガンマ・デルタT細胞のパーセンテージはしばしば約50%から約70%に増加し、しばしばそれに対応してNK細胞のパーセンテージが減少し；ならびに（v）補助的ポリペプチドが拡大条件の20日目までIL-15であり、その後30日目までIL-2に切り替えた場合、IL-15単独による処置と比較して、NK細胞のパーセンテージはしばしば約80%から約90%に増加し、しばしばそれに対応してガンマ・デルタT細胞のパーセンテージが減少する。

【0021】

本明細書に提供される方法のある特定の態様では、試料または枯渇細胞集団は、NK細胞またはガンマ・デルタT細胞について選択する条件に曝露されない。一部の態様では、試料または枯渇細胞集団は、アルファ・ベータT細胞以外の細胞を枯渇させる条件に曝露されない。

【0022】

本明細書に提供される方法によって調製される組成物の細胞は、外因性ポリヌクレオチドを、例えば腫瘍壊死因子受容体、キメラ抗原受容体（CAR）、骨髄分化一次応答タンパク質または自然免疫シグナル伝達アダプターなどを発現するようにさらに遺伝子改変することができる。細胞はまた、1種もしくは複数種のポリペプチドを変異させるように、または1種もしくは複数種のポリペプチドを枯渇させるように改変することもできる。

【0023】

本明細書に提供される方法のある特定の態様では、ガンマ・デルタ細胞およびNK細胞を含有する組成物を、それによってNK細胞またはガンマ・デルタ細胞からなる、またはそれから本質的になる組成物が得られる処置に供することができる。処置は、枯渇、例えば抗CD3抗体を使用して全てのガンマ・デルタ（CD3+）細胞を枯渇させることによってNK細胞を得ること、または正の選択、例えば抗CD3抗体を使用してガンマ・デルタT細胞について選択することであり得る。一部の態様では、抗CD3抗体、例えばOKT3抗体を、固相に結合させることができる。

【0024】

本明細書に提供される方法の態様では、活性化条件、拡大条件、または活性化および拡大条件は、試料または枯渇細胞集団の、フィーダー細胞フリー培地中での約1時間、2時間、5時間、10時間、12時間、15時間、20時間、または数日間、例えば1日間、2日間、3日間、4日間、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、25日間、30日間、35日間、40日間、45日間、50日間、55日間、もしくは60日間、もしくはそれより多くの日数、または数週間、例えば約2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、もしくは10週間のインキュベーションを含む。ある特定の態様では、活性化条件は、約1時間、5時間、10時間、12時間、15時間、または20時間から約1日、2日、3日、4日、5日、6日、または1週間までの期間である。一部の態様では、活性化条件は、約12時間、24時間、36時間、もしくは2日から約3日、4日、5日、6日、もしくは1週間までの期間、または約2日から約4日もしくは5日まで、または約3日から約4日までの期間である。ある特定の態様では、拡大条件は、1日間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、または1週間の期間である。ある特定の態様では、拡大条件は、連続サイクルで実施され、各サイクルは独立して約1日間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、または1週間、2週間、3週間、もしくはそれより長い期間実施される。一部の態様では、拡大サイクルの数は、1より大きく、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、またはさらに10サイクルである。ある特定の態様では、各拡大サイクルは約7日間である。一部の態様では、拡大サイクルの数は3である。

10

20

【0025】

一部の態様では、拡大NK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された拡大した細胞の集団は、疲弊した細胞を含まない。ある特定の態様では、拡大NK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された拡大した細胞の集団は、拡大条件の60日後に疲弊した細胞を含まない。

【0026】

ある特定の態様では、本明細書に提供される方法によって得られたNK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された細胞の集団は、80%またはそれより多くの自然免疫細胞を含有する。一部の態様では、細胞の約80%から約100%の間、または少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはそれより多く、最大100%が自然免疫細胞である。

30

【0027】

本明細書に提供される方法の一部の態様では、活性化条件、拡大条件、または活性化条件および拡大条件の両方は、ビスホスホネートを含まない。例示的なビスホスホネートの例には、クロドロネート、エチドロネート、アレンドロネート、パミドロネート、ゾレドロネート（ゾレドロン酸）、ネリドロネート等が挙げられるがこれらに限定されない。

【0028】

本明細書に提供される方法のある特定の態様では、本明細書に提供される方法によって得られた組成物は、V・デルタ・1およびV・デルタ・2発現に関してポリクローナルであるガンマ・デルタT細胞を含有する。V・デルタ・1およびV・デルタ・2細胞の相対量は、拡大条件、例えばビスホスホネートの非存在、補助的ポリペプチドの選択、および試料または枯渇細胞集団を拡大条件に供する期間のうちの1つまたは複数によって調整することができる。ある特定の非制限的な例では、拡大条件がIL-2およびCD3に免疫特異的に結合するポリペプチド（例えば、OKT3）を含む場合、(i) V・デルタ・1細胞は、ガンマ・デルタT細胞の約75%から約95%の間、時にガンマ・デルタT細胞の約80%から約90%の間であり得、(ii) V・デルタ・2細胞は、ガンマ・デルタT細胞の約10%から約25%の間、時にガンマ・デルタT細胞の約10%から約15%の間、または20%であり得る。ある特定の態様では、拡大条件がIL-2を含む（例え

40

50

ば、IL-15を含まず、CD3に免疫特異的に結合するポリペプチドを含まない) 場合、(i) V. デルタ. 1細胞はガンマ. デルタT細胞の約30%から約60%の間、時にガンマ. デルタT細胞の約35%から約55%の間であり得、(ii) V. デルタ. 2細胞は、ガンマ. デルタT細胞の約35%から約60%の間、時にガンマ. デルタT細胞の約40%から約50%の間、または55%であり得る。ある特定の態様では、拡大条件がIL-15を含む(例えば、IL-2を含まず、CD3に免疫特異的に結合するポリペプチドを含まない) 場合、(i) V. デルタ. 1細胞は、ガンマ. デルタT細胞の約10%から約30%の間、時にガンマ. デルタT細胞の約20%から約25%の間であり得、(ii) V. デルタ. 2細胞は、ガンマ. デルタT細胞の約65%から約80%の間、時にガンマ. デルタT細胞の約70%から約75%の間、または80%であり得る。

10

【0029】

本明細書において、ある特定の態様では、複数のNK細胞および複数のガンマ. デルタT細胞を含み、アルファ. ベータT細胞が枯渇されている細胞集団を含有する組成物を提供する。一部の態様では、組成物はフィーダー細胞を含まない。同様にある特定の態様では、本明細書において、複数のNK細胞および複数のガンマ. デルタT細胞を含み、アルファ. ベータT細胞が枯渇されており、フィーダー細胞を含まない細胞集団を含有する組成物を提供する。ある特定の態様では、細胞の集団は、改変された末梢血細胞の集団である。一部の態様では、本明細書に提供される組成物は、(i) 約25%から約45%の間のNK細胞および約55%から約75%の間のガンマ. デルタT細胞；(ii) 約25%から約30%の間のNK細胞および約70%から約75%の間のガンマ. デルタT細胞；

20

【0030】

ある特定の態様では、本明細書に提供される組成物中の細胞の30%またはそれより多くが活性化される。一部の態様では、集団における細胞の約30%から約40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくはそれより多くの間、または集団における細胞の少なくとも約30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはそれより多く、最大100%。

30

【0031】

一部の態様では、本明細書に提供される組成物は、集団における細胞の総数のパーセンテージとして以下の活性化マーカーの1つまたは複数を含む細胞の集団を含有する：(a) 集団における細胞の90%またはそれより多くがKIR5を発現する；(b) 集団における細胞の10%またはそれより多くがSINGLE-7を発現する；(c) 集団における細胞の60%またはそれより多くがKIR3D51を発現する；(d) 集団における細胞の10%またはそれより多くがKIR2DL1を発現する；(e) 集団における細胞の25%またはそれより多くがNKp30、NKp44、および/またはNKp46を発現する；(f) 集団における細胞の35%またはそれより多くがNKG2Dを発現する；(g) 集団における細胞の90%またはそれより多くがDNAM1を発現する；(h) 集団における細胞の85%またはそれより多くがNTBAを発現する；ならびに(i) 集団における細胞の95%またはそれより多くがCD2を発現する。

40

【0032】

ある特定の態様では、本明細書に提供される組成物は、80%またはそれより多くの自

50

然免疫細胞を含有する。一部の態様では、組成物は、C D 5 6 + である活性化細胞傷害性細胞に関して富化されており；ある特定の態様では、細胞の約 8 0 % から約 1 0 0 % の間、または少なくとも約 8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、もしくは 1 0 0 % が C D 5 6 + である。一部の態様では、本明細書に提供される組成物は、C D 5 7 - である活性化細胞傷害性細胞に関して富化されている。ある特定の態様では、本明細書に提供される組成物は、C D 5 6 + C D 5 7 - である活性化細胞傷害性細胞に関して富化されている。一部の態様では、細胞の約 1 0 % から約 4 0 % の間、または少なくとも約 1 0 %、1 1 %、1 2 %、1 3 %、1 4 %、1 5 %、1 6 %、1 7 %、1 8 %、1 9 %、2 0 %、2 1 %、2 2 %、2 3 %、2 4 %、2 5 %、2 6 %、2 7 %、2 8 %、2 9 %、3 0 %、3 1 %、3 2 %、3 3 %、3 4 %、3 5 %、3 6 %、3 7 %、3 8 %、3 9 %、もしくは 4 0 % が C D 1 6 + である。ある特定の態様では、本明細書に提供される組成物中の細胞の 5 % 未満、4 % 未満、3 % 未満、または 2 % 未満が C D 5 7 + である。

10

【0033】

ある特定の態様では、本明細書に提供される組成物は、N K 細胞およびガンマ・デルタ T 細胞以外の細胞を実質的に含まない。一部の態様では、本明細書に提供される組成物は、約 5 % もしくはそれ未満、約 4 % もしくはそれ未満、約 3 % もしくはそれ未満、約 2 % もしくはそれ未満、約 1 % もしくはそれ未満、約 0 . 9 % もしくはそれ未満、約 0 . 8 % もしくはそれ未満、約 0 . 7 % もしくはそれ未満、約 0 . 6 % もしくはそれ未満、約 0 . 5 % もしくはそれ未満、約 0 . 4 % もしくはそれ未満、約 0 . 3 % もしくはそれ未満、約 0 . 2 % もしくはそれ未満、約 0 . 1 % もしくはそれ未満、もしくはそれより少ない N K T 細胞、および／または約 5 % もしくはそれ未満、約 4 % もしくはそれ未満、約 3 % もしくはそれ未満、約 2 % もしくはそれ未満、約 1 % もしくはそれ未満、約 0 . 9 % もしくはそれ未満、約 0 . 8 % もしくはそれ未満、約 0 . 7 % もしくはそれ未満、約 0 . 6 % もしくはそれ未満、約 0 . 5 % もしくはそれ未満、約 0 . 4 % もしくはそれ未満、約 0 . 3 % もしくはそれ未満、約 0 . 2 % もしくはそれ未満、約 0 . 1 % もしくはそれ未満、もしくはそれより少ないアルファ・ベータ T 細胞を含有する。ある特定の態様では、組成物中の N K 細胞のサブセットは、C D 1 6 + 細胞である。一部の態様では、ガンマ・デルタ T 細胞の大多数、または N K 細胞の大多数、またはガンマ・デルタ T 細胞および N K 細胞の両方の大多数が C D 5 7 - 細胞である。

20

30

【0034】

ある特定の態様では、本明細書に提供される組成物のガンマ・デルタ T 細胞は、V . デルタ . 1 および V . デルタ . 2 発現に関してポリクローナルである。一部の態様では、本明細書に提供される組成物のガンマ・デルタ T 細胞集団は：(i) 約 7 5 % から約 9 5 % の間の V . デルタ . 1 細胞、例えば約 8 0 % から約 9 0 % の間の V . デルタ . 1 細胞；および約 5 % から約 2 5 % の間の V . デルタ . 2 細胞、例えば約 1 0 % から約 1 5 % もしくは 2 0 % の間の V . デルタ . 2 細胞；または (i i) 約 3 0 % から約 6 0 % の間の V . デルタ . 1 細胞、例えば約 3 5 % から約 5 5 % の間の V . デルタ . 1 細胞、および約 3 5 % から約 6 0 % の間の V . デルタ . 2 細胞、例えば約 4 0 % から約 5 0 % もしくは 5 5 % の間の V . デルタ . 2 細胞；または (i i i) 約 1 0 % から約 3 0 % の間の V . デルタ . 1 細胞、例えば約 2 0 % から約 2 5 % の間の V . デルタ . 1 細胞、および約 6 5 % から約 8 0 % の間の V . デルタ . 2 細胞、例えば約 7 0 % から約 7 5 % もしくは 8 0 % の間の V . デルタ . 2 細胞を含有する。

40

【0035】

ある特定の態様では、本明細書に提供される組成物の N K 細胞および／またはガンマ・デルタ T 細胞の約 5 0 % から約 9 9 % もしくはそれより多くの間、または約 5 0 % より多くのもしくはそれに等しい、約 5 1 % より多くのもしくはそれに等しい、約 5 2 % より多くのもしくはそれに等しい、約 5 3 % より多くのもしくはそれに等しい、約 5 4 % より多くのもしくはそれに等しい、約 5 5 % より多くのもしくはそれに等しい、約 5 6 % より多

50

くのもしくはそれに等しい、約 57% より多くのもしくはそれに等しい、約 58% より多くのもしくはそれに等しい、約 59% より多くのもしくはそれに等しい、約 60% より多くのもしくはそれに等しい、約 61% より多くのもしくはそれに等しい、約 62% より多くのもしくはそれに等しい、約 63% より多くのもしくはそれに等しい、約 64% より多くのもしくはそれに等しい、約 65% より多くのもしくはそれに等しい、約 66% より多くのもしくはそれに等しい、約 67% より多くのもしくはそれに等しい、約 68% より多くのもしくはそれに等しい、約 69% より多くのもしくはそれに等しい、約 70% より多くのもしくはそれに等しい、約 71% より多くのもしくはそれに等しい、約 72% より多くのもしくはそれに等しい、約 73% より多くのもしくはそれに等しい、約 74% より多くのもしくはそれに等しい、約 75% より多くのもしくはそれに等しい、約 76% より多くのもしくはそれに等しい、約 77% より多くのもしくはそれに等しい、約 78% より多くのもしくはそれに等しい、約 79% より多くのもしくはそれに等しい、約 80% より多くのもしくはそれに等しい、約 81% より多くのもしくはそれに等しい、約 82% より多くのもしくはそれに等しい、約 83% より多くのもしくはそれに等しい、約 84% より多くのもしくはそれに等しい、約 85% より多くのもしくはそれに等しい、約 86% より多くのもしくはそれに等しい、約 87% より多くのもしくはそれに等しい、約 88% より多くのもしくはそれに等しい、約 89% より多くのもしくはそれに等しい、約 90% より多くのもしくはそれに等しい、約 91% より多くのもしくはそれに等しい、約 92% より多くのもしくはそれに等しい、約 93% より多くのもしくはそれに等しい、約 94% より多くのもしくはそれに等しい、約 95% より多くのもしくはそれに等しい、約 96% より多くのもしくはそれに等しい、約 97% より多くのもしくはそれに等しい、約 98% より多くのもしくはそれに等しい、約 99% より多くのもしくはそれに等しい、約 80% より多くのもしくはそれに等しい、約 81% より多くのもしくはそれに等しい、約 82% より多くのもしくはそれに等しい、約 83% より多くのもしくはそれに等しい、約 84% より多くのもしくはそれに等しい、約 85% より多くのもしくはそれに等しい、約 86% より多くのもしくはそれに等しい、約 87% より多くのもしくはそれに等しい、約 88% より多くのもしくはそれに等しい、約 89% より多くのもしくはそれに等しい、約 90% より多くのもしくはそれに等しい、約 91% より多くのもしくはそれに等しい、約 92% より多くのもしくはそれに等しい、約 93% より多くのもしくはそれに等しい、約 94% より多くのもしくはそれに等しい、約 95% より多くのもしくはそれに等しい、約 96% より多くのもしくはそれに等しい、約 97% より多くのもしくはそれに等しい、約 98% より多くのもしくはそれに等しい、約 99% より多くのもしくはそれに等しい、またはその端数、最大 100% が、CD8+ である。一部の態様では、NK 細胞および／またはガンマ・デルタ T 細胞の 2% 未満が CD4+ である。複数の態様では、NK 細胞および／またはガンマ・デルタ T 細胞の 2% 未満が CD8+CD4+ である。ある特定の態様では、NK 細胞の約 15% から約 30% の間および／またはガンマ・デルタ T 細胞の約 55% から 85% の間の端数が CD8-CD4- である。

【0036】

本明細書に提供される組成物のある特定の態様では、集団における細胞の約 30% から約 99% もしくはそれより多くの間、または少なくとも約 30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはその端数、最大 100% が、外因性ポリヌクレオチド、変異ポリヌクレオチド、欠失ポリヌクレオチド、またはその組合せを含む遺伝子改変をさらに含む。一部の態様では、遺伝子改変は外因性ポリヌクレオチ

10

20

30

40

50

ドを含む。外因性ポリヌクレオチドは、時にレトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクター中にあり、時に外因性ポリヌクレオチドは、改変された細胞集団の1種または複数種の細胞のゲノムに組み込まれる。

【0037】

外因性ポリヌクレオチドは、ある特定の態様では外因性または異種T細胞受容体、腫瘍壊死因子受容体、キメラ抗原受容体（CAR）、骨髄分化一次応答タンパク質、および自然免疫シグナル伝達アダプター、または目的の他のタンパク質もしくはポリペプチドをコードすることができ、一部の態様では、プロモーターまたは遺伝子発現の他の調節因子を含むことができる。一部の態様では、外因性ポリヌクレオチドは、調節性配列、例えばプロモーターまたはエンハンサーである。

【0038】

ある特定の態様では、外因性ポリヌクレオチドは、キメラ抗原受容体（CAR）をコードし、組成物中の細胞はCARを含む。CARは、抗原結合機能およびT細胞活性化機能の両方を提供する組換え受容体である（例えば、Sadellain et al., Cancer Discov., 3(4):388-398 (2013)を参照されたい）。免疫細胞、例えばT細胞がCARを発現するように操作（遺伝子改変）されている場合、これは免疫細胞に、目的のタンパク質または抗原を標的とする新規のおよび／または改善された能力を提供する。目的の標的タンパク質または抗原は、ある特定の態様では、がん抗原または感染性疾患抗原であり得、そのいくつかは当技術分野で公知であり、および／または同定可能である。一部の態様では、CARは、CD19（例えば、GenBank受託番号AH005421.2を参照されたい）、GD2（ジシアロガングリオシド；例えば、Schulz et al., Cancer Res., 44(12):5914-5920 (1984)を参照されたい）、HER3（例えば、GenBank受託番号M34309.1を参照されたい）、B7H3（例えば、GenBank受託番号BC062581.1を参照されたい）、CD123（例えば、GenBank受託番号BC035407.1；BX296563.3を参照されたい）、またはCD30（例えば、GenBank受託番号M83554.1；AY498860.1を参照されたい）のうちの1つまたは複数に免疫特異的に結合する結合分子部分を含有する。

【0039】

本明細書に提供される任意の組成物を、ガンマ・デルタT細胞またはNK細胞のいずれかを除去するようにさらに処置し、それによって実質的に全てのNK細胞または実質的に全てのガンマ・デルタT細胞を含有する組成物を生成することができる。例えば、本明細書に提供される組成物を、抗CD3抗体によって処置し、NK細胞およびガンマ・デルタT細胞の混合物からガンマ・デルタT細胞を枯渇させて、実質的に全てもしくは全てのNK細胞を含有する組成物を残すか、または代替的に抗CD3抗体を使用して、混合物から実質的に純粋なガンマ・デルタT細胞集団を単離することができる。

【0040】

ある特定の態様では、複数のガンマデルタT細胞（ $\gamma\delta$ ）；複数のナチュラルキラー細胞（NK）；または $\gamma\delta$ およびNK細胞の組合せを含む細胞の治療的組成物（または治療的組合せ）が提供される。ある特定の態様では、 $\gamma\delta$ および／またはNK細胞は、組換えによって操作されるかまたは遺伝子改変されており、この場合必要に応じて $\gamma\delta$ および／もしくはNK細胞は、外因性もしくは異種タンパク質を細胞外に発現するように組換えによって操作されているかもしくは遺伝子改変されており、必要に応じて外因性、異種、もしくはキメラタンパク質は、キメラ抗原受容体（CAR）もしくは外因性もしくは異種T細胞受容体（TCR）であり、必要に応じて外因性、異種、もしくはキメラタンパク質、もしくはCARは、がん細胞もしくは腫瘍マーカーもしくは感染細胞に対して特異的であり（特異的に結合することができ）、または外因性、異種、もしくはキメラタンパク質もしくはCARは、がん細胞もしくは腫瘍マーカー、もしくは感染細胞、もしくは任意の疾患関連抗原を特異的に標的としてこれに結合することができる抗体に対して特異的である（特異的に結合することができる）。

【0041】

一部の態様では、 $\gamma\delta$ および／またはNK細胞は、ヒト細胞または動物細胞である。ある特定の態様では、治療的組成物（または治療的組合せ）は、静脈内（IV）、髄腔内、筋肉内（IM）、腹腔内（IP）、もしくは腫瘍内（IT）投与、関節腔内へのために製剤化されるか、またはがんもしくは感染症の部位もしくはその近傍に注射もしくは埋め込まれ、または必要に応じて約 10^2 から 10^{12} 個の間の細胞を含む単位剤形で製剤化され、

【0042】

または筋肉内（IM）投与として製剤化され、または必要に応じて約 10^2 から 10^{12} 個の間の細胞を含む単位剤形で製剤化される。

【0043】

一部の態様では、 $\gamma\delta$ および／またはNK細胞は、*in vivo*供給源から単離される。一部の態様では、 $\gamma\delta$ および／またはNK細胞は、培養において拡大されるか、または*in vivo*供給源から単離され、培養において拡大される。ある特定の態様では、 $\gamma\delta$ および／またはNK細胞は、*in vivo*供給源から単離され、培養においていかなるフィーダー細胞も使用することなく、またはフィーダー細胞層を使用することなく拡大され、それによってフィーダー細胞を欠如する拡大された $\gamma\delta$ および／またはNK細胞の集団を生成する。一部の態様では、 $\gamma\delta$ および／またはNK細胞は、*in vivo*供給源から単離され、培養においてフィーダー細胞またはフィーダー細胞層を使用して拡大され、必要に応じてフィーダー細胞が実質的に除去および／または殺滅され、フィーダー細胞を実質的に欠如する拡大された $\gamma\delta$ および／またはNK細胞の集団を生成する。

【0044】

ある特定の態様では、 $\gamma\delta$ および／またはNK細胞の*in vivo*供給源は、自己供給源（必要に応じて $\gamma\delta$ および／またはNK細胞のレシピエントとなる個体に由来）、または外因性、異種、もしくは同種異系供給源に由来する。

【0045】

同様に本明細書において、ある特定の態様では、本明細書に提供される組成物のいずれかおよび薬学的に許容される担体を含有する医薬組成物も提供される。

【0046】

ある特定の態様では、本明細書において、外因性ポリヌクレオチドを本明細書に提供される組成物に添加すること、本明細書に提供される組成物の1種または複数種の細胞においてポリヌクレオチドを変異させること、または本明細書に提供される組成物の1種または複数種の細胞においてポリヌクレオチドを欠失させることによって、遺伝子改変免疫細胞を作製する方法が提供される。一部の態様では、遺伝子改変は、外因性ポリヌクレオチドである。本明細書に提供される組成物を製造するために使用される方法はしばしば、例えばレトロウイルスまたはレンチウイルス形質導入による外因性ポリヌクレオチドの導入を容易にする高い活性化状態の細胞をもたらす。ある特定の態様では、本明細書に提供される遺伝子改変免疫細胞を作製する方法はしばしば、細胞の約30%から約99%もしくはそれより多くの間、または少なくとも約30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはその端数、最大100%が遺伝子改変を含む組成物をもたらす。

【0047】

ある特定の態様では、本明細書において、本明細書に提供される組成物または医薬組成物のいずれか、必要に応じて使用のための指示、および必要に応じてサイトカインを含有

10

20

30

40

50

するキットを提供する。本明細書に提供される組成物、医薬組成物、またはキットは、保存および／または輸送の必要に応じて、冷蔵温度、例えばセ氏10度またはそれより低い温度、例えばセ氏9度、8度、7度、6度、5度、4度、3度、2度、1度、マイナス4度またはそれより低い温度まで、または凍結温度（例えば、マイナス15度、マイナス20度、マイナス25度、マイナス30度、マイナス35度、マイナス40度、マイナス45度、マイナス50度、マイナス55度、マイナス60度、マイナス65度、マイナス70度、マイナス75度、マイナス80度、マイナス85度またはそれより低い温度）で保存することができる。ある特定の態様では、キットは、細胞約 1×10^5 個から細胞約 1×10^{12} 個の間、例えば細胞約 1×10^6 個、細胞 1×10^7 個、細胞 1×10^8 個、細胞 1×10^9 個、または細胞 1×10^{10} 個を含有する。ある特定の態様では、本明細書に提供されるキットは、サイトカインを含み得る。一部の態様では、サイトカインは、TNF（例えば、GenBank受託番号KJ892290.1；AY214167.1を参照されたい）、IFN γ （例えば、GenBank受託番号J00219.1を参照されたい）、インターロイキンIL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10（例えば、GenBank受託番号U16720.1を参照されたい）、IL-12（例えば、IL-12Aに関してはGenBank受託番号AF404773.1；例えば、IL-12Bに関してはGenBank受託番号AF512686.1を参照されたい）、IL-15、IL-18（例えば、GenBank受託番号BC007461.1；BC007007.1を参照されたい）、IL-21、CCL4（例えば、GenBank受託番号CR542119.1；KJ901727.1；KJ901726.1を参照されたい）、RANTES（例えば、GenBank受託番号GQ504011.1を参照されたい）、およびTGF β （例えば、National Center for Biotechnology Information (NCBI) 受託番号NM_000660.7を参照されたい）のうちの1つまたは複数から選択される。ある特定の態様では、キットは、本明細書に提供される組成物または医薬組成物を単位剤形で含有する。

【0048】

ある特定の態様では、本明細書に提供される細胞の治療的組合せを含む、本明細書に提供される方法を実践するための製品およびキットを提供する。ある特定の態様では、製品およびキットは、本明細書に提供される方法を実践するための指示をさらに含む。一部の態様では、製品およびキットは、がん関連、または腫瘍関連、感染症関連、または疾患関連抗原に特異的に結合することが可能な抗体をさらに含む。本明細書に提供される製品は、本明細書に提供される細胞の治療的組合せを含む埋込物を含み得る。

【0049】

同様にある特定の態様では、本明細書において、がんまたは感染症を処置する方法であって、それを必要とする対象に、がんまたは感染症を処置するために有効な量の本明細書に提供される組成物、医薬組成物、またはキットのいずれか1つを投与することによる、方法が提供される。処置は、自己由来の状況または同種異系の状況で投与することができる。一部の態様では、そこから組成物、医薬組成物、またはキットが産生される試料のドナーは、処置のレシピエントである。ある特定の態様では、処置は、2日またはそれより多くの別々の日に投与することができ、ある特定の態様では、処置を複数回投与で投与することができる。ある特定の態様では、処置は、約1単位投薬量から約36またはそれより多くの単位投薬量の間で、約2週間から約4週間の間の間隔で投与される。一部の態様では、処置は、単一単位投薬量として毎日1回、2回、3回、4回、もしくは最大5回、または数日、数週間、もしくは数ヶ月間の間に1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、もしくは10回、もしくはそれより多くの回数、または2日毎、または週に1回、2回、3回、4回、5回、もしくは6回投与される。処置は、静脈内（IV）、髄腔内、または筋肉内（IM）、腹腔内（IP）、胸膜内、関節腔内に投与することができ、またはがんもしくは感染症の部位もしくはその近傍に、対象の体重1キログラムあたり細胞約 10^4 から約 10^{10} 個の間、または対象あたり細胞約 10^6 から約 10^{12} 個の間の単位投薬量で注射されるかもしくは埋め込まれる。ある特定の態様では、単位投薬

量は、対象あたり細胞約 10^{10} 個、または対象の体重 1 キログラムあたり細胞約 10^8 個である。

【0050】

本明細書に提供される処置の方法のある特定の態様では、処置はがんのためである。一部の態様では、がんは、肺がん、黒色腫、乳がん、前立腺がん、結腸がん、腎細胞癌、卵巣がん、神経芽腫、横紋筋肉腫、白血病もしくはリンパ腫、ホジキンリンパ腫もしくは小児急性リンパ芽球性白血病、非ホジキンリンパ腫、肥満細胞腫もしくは肥満細胞腫瘍、卵巣がんもしくは癌、膵臓がん、非小細胞肺がん、小細胞肺がん、肝細胞癌、網膜芽腫、乳腺腫瘍、結腸直腸癌、白血病、リンパ腫、急性リンパ芽球性白血病（ALL）もしくは急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病（AML）、組織球肉腫、脳腫瘍、星状細胞腫、膠芽腫、神経腫、結腸癌、子宮頸癌、肉腫、膀胱腫瘍、細網内皮組織の腫瘍、ウィルムス腫瘍、骨がん、骨肉腫、腎臓がん、または頭頸部がん、口腔がん、喉頭がん、転移疾患、または口腔咽頭がんから選択される。

【0051】

本明細書に提供される処置の方法のある特定の態様では、第2の薬剤は、組成物、医薬組成物、またはキットと共投与される。一部の態様では、第2の薬剤は、がん関連抗原に免疫特異的に結合する抗体である。ある特定の態様では、がん関連抗原は、 α -フェトプロテイン（AFP）、 α -アクチニン-4、A3、A33 抗体に対して特異的な抗原、ART-4、B7、B7-H3、Ba733、BAGE、BrE3-抗原、CA125、CA-MEL、CAP-1、炭酸脱水酵素IX、CASP-8/m、CCL19、CCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD70L、CD74、CD79a、CD79b、CD80、CD83、CD95、CD123、CD126、CD132、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、CTLA4、CXCR4、CXCR7、CXCL12、HIF-1 α 、結腸特異抗原-p（CSAp）、CEA（CEACAM-5）、CEACAM-6、c-Met、DAM、EGFR、EGFRvIII、EGP-1（TROP-2）、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、線維芽細胞成長因子（FGF）、Flt-1、Flt-3、葉酸受容体、G250 抗原、GAGE、gp100、GRO- β 、HLA-DR、HM1.24、ヒト絨毛ゴナドトロピン（HCG）およびそのサブユニット、HER2/neu、HMGB-1、低酸素症誘導因子（HIF-1）、HSP70-2M、HST-2、Ia、IGF-1R、IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IFN- λ 、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、IL-25、インスリン様成長因子1（IGF-1）、KC4 抗原、KS-1 抗原、KS1-4、Le-Y、LDR/FUT、マクロファージ遊走阻止因子（MIF）、GD2、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ESO-1、TRAC-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、MUC13、MUC16、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、膵臓がんムチン、PD1 受容体、胎盤成長因子、p53、PLAGL2、前立腺酸性ホスファターゼ、PSA、PRAME、PSMA、PLGF、ILGF、ILGF-R、L-6、IL-25、RS5、RANTES、T101、SAGE、S100、サバイビン、サバイビン-2B、TAC、TAG-72、テネイシン、TRAIL 受容体、TNF- α 、Tn 抗原、トムソン-フリードライヒ抗原、腫瘍壊死抗原、VEGFR、ED-Bフィブロネクチン、WT-1、17-1A 抗原、補体因子C3、C3a、C3b、C5a、C5、血管新生マーカー、bcl-2、bcl-6、ならびにKrasからなる群から選択される。

【0052】

ある特定の態様では、本明細書に提供される組成物の細胞は、がん関連抗原に結合する抗体を発現するように操作することができる。一部の態様では、抗体は、第2の薬剤と共投与される。ある特定の態様では、がん関連抗原は、hR1（抗IGF-1R）、hPAM4（抗ムチン）、KC4（抗ムチン）、hA20（抗CD20）、hA19（抗CD19）、hIMMU31（抗AFP）、hLL1（抗CD74）、hLL2（抗CD22）、抗CD19/CD22二特異性抗体、RFB4（抗CD22）、hMu-9（抗CSAp）、hL243（抗HLA-DR）、hMN-14（抗CEACAM-5）、hMN-15（抗CEACAM-6）、hRS7（抗TROP-2）、hMN-3（抗CEACAM-6）、CC49（抗TAG-72）、J591（抗PSMA）、D2/B（抗PSMA）、G250（抗炭酸脱水酵素IX）、ジヌツキシマブ（抗GD2）、インフリキシマブ（抗TNF- α ）、セルトリズマブペゴル（抗TNF- α ）、アダリムマブ（抗TNF- α ）、アレムツズマブ（抗CD52）、ベバシズマブ（抗VEGF）、セツキシマブ（抗EGFR）、ゲムツズマブ（抗CD33）、イブリツモマブチウキセタン（抗CD20）、パニツムマブ（抗EGFR）、リツキシマブ（抗CD20）、トシツモマブ（抗CD20）、GA101（抗CD20）、トラスツズマブ（抗HER2/neu）、トシリズマブ（抗IL-6受容体）、バシリキシマブ（抗CD25）、ダクリズマブ（抗CD25）、エファリズマブ（抗CD11a）、ムロモナブ-CD3（抗CD3受容体）、ナタリズマブ（抗 α 4インテグリン）、BWA-3（抗ヒストンH2A/H4）、LG2-1（抗ヒストンH3）、MRA12（抗ヒストンH1）、PR1-1（抗ヒストンH2B）、LG11-2（抗ヒストンH2B）、およびLG2-2（抗ヒストンH2B）から選択される。

10

20

【0053】

本明細書に提供される処置の方法のある特定の態様では、処置は感染症のためである。一部の態様では、感染症は、細菌病原体、真菌病原体、ウイルス病原体、または原虫病原体の存在によって特徴付けられる。本明細書に提供される処置の方法の態様では、感染症は、ヘルペス、エボラ、ウエストナイルウイルス、ワクシニアウイルス、エプスタインバーウイルス、A型肝炎ウイルス（HAV）；B型肝炎ウイルス（HBV）；C型肝炎ウイルス（HCV）；ヘルペスウイルス（例えば、HSV-1、HSV-2、HHV-6、CMV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、水疱性口内炎ウイルス（VSV）、Bacilli、Citrobacter、Cholera、Diphtheria、Enterobacter、Gonococci、Helicobacter pylori、Klebsiella、Legionella、Meningococci、mycobacteria、Pseudomonas、Pneumococci、リケッチア細菌、Salmonella、Serratia、Staphylococci、Streptococci、Tetanus、Aspergillus（A. fumigatus、A. niger等）、Blastomyces dermatitidis、Candida（C. albicans、C. krusei、C. glabrata、C. tropicalis等）、Cryptococcus neoformans、Genus Mucorales（mucor、absidia、rhizopus）、Sporothrix schenckii、Paracoccidioides brasiliensis、Coccidioides immitis、Histoplasma capsulatum、Leptospirosis、Borrelia burgdorferi、蠕虫寄生生物（鉤虫、条虫、吸虫、扁形動物（例えば、Schistosomia）、Giardia lamblia、trichinella、Dientamoeba Fragilis、Trypanosoma brucei、Trypanosoma cruzi、またはLeishmania donovani）からなる群から選択される。

30

40

【0054】

一部の態様では、本明細書においてがん、腫瘍、機能障害細胞、または感染細胞を処置する方法であって、（a）それを必要とする個体に、本明細書に記載される細胞の治療的

50

組成物の治療有効量を投与すること、または (b) (i) 本明細書に記載される (described herein) 細胞の治療的組成物を提供するまたは提供したこと；および (ii) それを必要とする個体に、細胞の治療的組成物の治療有効量を投与するまたは投与したことを含む方法を提供する。

【0055】

本明細書に提供される処置の方法のある特定の態様では、それを必要とする個体は、ヒトまたは動物である。一部の態様では、 $\gamma\delta$ および／またはNK細胞は、*in vivo* 供給源から単離され、必要に応じて $\gamma\delta$ および／またはNK細胞の *in vivo* 供給源は、同系または自己供給源（必要に応じて、 $\gamma\delta$ および／またはNK細胞のレシピエントとなる個体に由来）、または外因性、異種、もしくは同種異系供給源、またはその組合せに由来する。本明細書に提供される方法の態様では、細胞の治療的組成物または組合せは、静脈内（IV）、髄腔内、または筋肉内（IM）に投与され、またはがん、腫瘍、機能障害もしくは感染細胞内またはその近傍（付近）に注射または埋め込まれ、必要に応じて細胞の治療的組成物は、埋込物またはゲルとして送達され、必要に応じてゲルはハイドロゲルである。

【0056】

本明細書に提供される処置の方法の一部の態様では、細胞の治療的組成物または組合せは、単位剤形で投与され、必要に応じて単位投薬量は、細胞約 10^2 から 10^{12} 個の間、または細胞 10^4 から 10^{10} 個の間を含み；または1日投与量は、細胞約 10^2 から 10^{12} 個の間、または細胞 10^4 から 10^{10} 個の間を含む。ある特定の態様では、細胞の治療的組成物または組合せまたは単位剤形は、数日間、数週間、もしくは数ヶ月間の間に、それを必要とする個体に数回（複数回）、または2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、もしくは10回、もしくはそれより多くの回数投与され、必要に応じて、複数の単位剤形の各々は、毎日、2日毎、週に2回、3回、4回、5回、もしくは6回、または週に1回投与される。

【0057】

本明細書に提供される処置の方法のある特定の態様では、処置を必要とする個体は、最初に、それを必要とする個体に、がん関連または腫瘍関連、感染症関連または疾患関連抗原に対する非コンジュゲート抗体を予め投与し、その後本明細書に記載される細胞の治療的組成物を投与することによって、がん、感染症、または疾患に対する免疫応答を開始するように誘導され、細胞の治療的組成物の少なくとも一部は、非コンジュゲート抗体に特異的に結合するポリペプチド、必要に応じてCARをその細胞表面上に発現する。一部の態様では、それを必要とする個体は、がん関連または腫瘍関連、感染症関連または疾患関連抗原に特異的に結合することができる抗体を投与され、その後本明細書に記載される細胞の治療的組成物を投与され、細胞の治療的組成物の少なくとも一部はその細胞表面上に、抗体に特異的に結合するポリペプチド、必要に応じてCARを発現し、必要に応じて抗体は、細胞の治療的組成物の投与の前に、それと共に、またはその後に投与される。

【0058】

本技術のある特定の実施形態の詳細を添付の図面および以下の説明に記載する。本技術の他の特色、目的、および利点は、説明および図面、ならびに特許請求の範囲から明らかとなる。

【0059】

本明細書において引用した全ての刊行物、特許、特許出願は、全ての目的に関して参照により本明細書に明確に組み込まれている。

【0060】

図面は、本技術のある特定の実施形態を例証するものであって、制限するものではない。例証を明快かつ容易にするために、図面は縮尺通りに記載されておらず、一部の例では様々な態様は、特定の実施形態の理解を容易にするために、誇張または拡大して示され得る。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目 1)

NK細胞およびガンマ、デルタT細胞に関して富化された細胞の集団を含む組成物を製造する方法であって、

1 または複数の対象から細胞を含有する試料を得ること；

NK細胞およびガンマ、デルタT細胞を含む枯渇細胞集団を生成する条件下で前記試料からアルファ、ベータT細胞を枯渇させること；ならびに

前記枯渇細胞集団を（a）細胞接着ポリペプチドに免疫特異的に結合する少なくとも1種の外因性ポリペプチド、および（b）前記細胞接着ポリペプチドとは異なるポリペプチドに免疫特異的に結合し、前記試料集団の1種または複数種の細胞の表面上に発現される少なくとも1種の外因性ポリペプチドに接触させることを含む活性化条件に前記枯渇細胞集団を曝露すること；ならびに

前記枯渇細胞集団を少なくとも1種の補助的ポリペプチドに接触させることを含む拡大条件に前記枯渇細胞集団を曝露し、それによってNK細胞およびガンマ、デルタT細胞に関して富化された細胞の集団を含む組成物を生成することを含む方法。

(項目 2)

NK細胞およびガンマ、デルタT細胞に関して富化された細胞の集団を含む組成物を製造する方法であって、

1 または複数の対象から細胞を含有する試料を得ること；

前記試料を（a）細胞接着ポリペプチドに免疫特異的に結合する少なくとも1種の外因性ポリペプチド、および（b）前記細胞接着ポリペプチドとは異なるポリペプチドに免疫特異的に結合し、前記試料集団の1種または複数種の細胞の表面上に発現される少なくとも1種の外因性ポリペプチドに接触させることを含む活性化条件であって、（a）もしくは（b）が可溶性であるか、または（a）および（b）が可溶性である活性化条件に前記試料を曝露すること；ならびに

前記試料を少なくとも1種の補助的ポリペプチドに接触させることを含む拡大条件に前記試料を曝露し、それによってNK細胞およびガンマ、デルタT細胞に関して富化された細胞の集団を含む組成物を生成することを含む方法。

(項目 3)

前記少なくとも1種の補助的ポリペプチドが、前記集団におけるガンマ、デルタT細胞の量と比較したNK細胞の量が前記少なくとも1種の補助的ポリペプチドの量および／またはタイプに依存的であるように選択される、項目1または項目2に記載の方法。

(項目 4)

前記少なくとも1種の補助的ポリペプチドが、前記枯渇細胞集団を前記少なくとも1種の補助的ポリペプチドに接触させた後に、前記細胞の集団におけるガンマ、デルタT細胞と比較してNK細胞の量を増加または減少させる、項目1～3のいずれかに記載の方法。

(項目 5)

前記活性化条件が、非ヒト動物由来の血清を含まない、項目1～4のいずれかに記載の方法。

(項目 6)

前記拡大条件が、非ヒト動物由来の血清を含まない、項目1～5のいずれかに記載の方法。

(項目 7)

前記活性化条件がフィーダー細胞を含まない、項目1～6のいずれかに記載の方法。

(項目 8)

前記拡大条件がフィーダー細胞を含まない、項目1～7のいずれかに記載の方法。

(項目 9)

前記試料が、末梢血、肝組織、骨髄、上皮組織、および臍帯血から選択される、項目1～8のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 1 0)

前記試料が末梢血である、項目 9 に記載の方法。

(項目 1 1)

前記末梢血試料が処理された試料である、項目 1 0 に記載の方法。

(項目 1 2)

前記試料が臍帯血である、項目 9 に記載の方法。

(項目 1 3)

前記臍帯血試料が処理された試料である、項目 1 2 に記載の方法。

(項目 1 4)

(b) における前記少なくとも 1 種の外因性ポリペプチドが、NK 細胞活性化受容体、ガンマ・デルタ T 細胞活性化受容体、または両方に免疫特異的に結合する、項目 1 ～ 1 3 のいずれかに記載の方法。

10

(項目 1 5)

前記受容体が、NK p 3 0、NK p 4 4、または NK p 4 6 である、項目 1 4 に記載の方法。

(項目 1 6)

前記受容体が NK p 4 6 である、項目 1 5 に記載の方法。

(項目 1 7)

(a) における前記外因性ポリペプチドが、CD 2 に免疫特異的に結合する、項目 1 ～ 1 6 のいずれかに記載の方法。

20

(項目 1 8)

(a) もしくは (b)、または (a) および (b) における前記外因性ポリペプチドが、抗体またはその抗原結合性断片である、項目 1 ～ 1 7 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 9)

(a) または (b) のうちの少なくとも 1 つが可溶性である、項目 1 ～ 1 8 のいずれかに記載の方法。

(項目 2 0)

(a) および (b) における前記外因性ポリペプチドの両方が可溶性である、項目 1 ～ 1 9 のいずれかに記載の方法。

(項目 2 1)

(a) における前記外因性ポリペプチドまたは (b) における前記外因性ポリペプチドが基質に結合する、項目 1 ～ 1 9 のいずれかに記載の方法。

30

(項目 2 2)

前記活性化条件が、前記試料または枯渇細胞集団を少なくとも 2 種の外因性ポリペプチドに接触させることを含む、項目 1 ～ 2 1 のいずれかに記載の方法。

(項目 2 3)

第 1 の外因性ポリペプチドが CD 2 に免疫特異的に結合し、第 2 の外因性ポリペプチドが NK p 4 6 に免疫特異的に結合する、項目 2 2 に記載の方法。

(項目 2 4)

前記第 1 の外因性ポリペプチドおよび／または前記第 2 の外因性ポリペプチドが、抗体またはその抗原結合性断片である、項目 2 2 または項目 2 3 に記載の方法。

40

(項目 2 5)

前記活性化条件のポリペプチド構成要素が、

(a) 前記細胞接着ポリペプチド CD 2 に免疫特異的に結合する外因性ポリペプチド；および

(b) (a) における前記外因性ポリペプチドとは異なり、NK p 4 6 に免疫特異的に結合する外因性ポリペプチド

から本質的になるかまたはそれからなる、項目 1 ～ 2 4 のいずれかに記載の方法。

(項目 2 6)

前記少なくとも 1 種の補助的ポリペプチドが、サイトカインおよび／またはガンマ・デ

50

ルタ T 細胞上の受容体に免疫特異的に結合するポリペプチドである、項目 1 ～ 25 のいずれかに記載の方法。

(項目 27)

前記拡大条件が、前記試料または枯渇細胞集団をサイトカインである少なくとも 1 種の補助的ポリペプチド、および必要に応じてガンマ・デルタ T 細胞上の受容体に免疫特異的に結合する補助的ポリペプチドに接触させることを含む、項目 26 に記載の方法。

(項目 28)

前記サイトカインがインターロイキン (IL) である、項目 27 に記載の方法。

(項目 29)

前記少なくとも 1 種の補助的ポリペプチドが、IL-2、IL-4、IL-15、またはその任意の組合せを含む、項目 26 ～ 28 のいずれかに記載の方法。

10

(項目 30)

前記拡大条件が、前記試料または枯渇細胞集団を

(a) IL-2 ポリペプチド、および必要に応じてガンマ・デルタ T 細胞上の受容体に免疫特異的に結合するポリペプチド；

(b) IL-15 ポリペプチド；または

(c) IL-2 ポリペプチドおよび IL-15 ポリペプチド、ならびに必要に応じてガンマ・デルタ T 細胞上の受容体に免疫特異的に結合するポリペプチドに接触させることを含む、項目 26 ～ 29 のいずれかに記載の方法。

(項目 31)

20

前記ガンマ・デルタ T 細胞上の前記受容体が CD3 である、項目 26 ～ 30 のいずれかに記載の方法。

(項目 32)

前記ガンマ・デルタ T 細胞上の受容体に免疫特異的に結合する前記ポリペプチドが、抗体またはその抗原結合性断片である、項目 26 ～ 31 のいずれかに記載の方法。

(項目 33)

前記拡大条件が、前記試料を

(a) IL-2 ポリペプチド；

(b) IL-15 ポリペプチド；

(c) IL-2 ポリペプチドおよび IL-15 ポリペプチド；

30

(d) IL-2 ポリペプチドおよび CD3 に免疫特異的に結合する抗体；または

(e) IL-2 ポリペプチド、IL-15 ポリペプチドおよび CD3 に免疫特異的に結合する抗体

に接触させることを含む、項目 32 に記載の方法。

(項目 34)

CD3 に免疫特異的に結合する前記抗体が OKT3 である、項目 33 に記載の方法。

(項目 35)

前記活性化および拡大条件が同時にまたは任意の順序で逐次的に実施される、項目 1 ～ 34 のいずれかに記載の方法。

(項目 36)

40

前記少なくとも 1 種の外因性ポリペプチドが補助的ポリペプチドとしても機能することができる；または

前記少なくとも 1 種の補助的ポリペプチドが外因性ポリペプチドとしても機能することができる；または

前記少なくとも 1 種の外因性ポリペプチドが補助的ポリペプチドとしても機能することができ、かつ前記少なくとも 1 種の補助的ポリペプチドが外因性ポリペプチドとしても機能することができる、項目 1 ～ 35 のいずれかに記載の方法。

(項目 37)

(i) 前記拡大条件が、前記試料または枯渇細胞集団を IL-2 ポリペプチドに接触させることを含む；

50

(i i) 得られた、NK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された前記細胞の集団が、約25～30%のNK細胞および約70～75%のガンマ・デルタT細胞を含む、項目33～36のいずれかに記載の方法。

(項目38)

(i) 前記拡大条件が、前記試料または枯渇細胞集団をIL-15ポリペプチドに接触させることを含み；

(i i) 得られた、NK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された前記細胞の集団が、約80～99%のNK細胞および約1～20%のガンマ・デルタT細胞を含む、項目33～36のいずれかに記載の方法。

(項目39)

(i) 前記拡大条件が、前記試料または枯渇細胞集団をIL-2ポリペプチドおよびCD3に免疫特異的に結合する抗体に接触させることを含み；

(i i) 得られた、NK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された前記細胞の集団が、約40～45%のNK細胞および約55～60%のガンマ・デルタT細胞を含む、項目33～36のいずれかに記載の方法。

(項目40)

前記拡大条件が、
前記試料または枯渇細胞集団を、1種または複数種の補助的ポリペプチドを含む第1の条件セットに接触させ、NK細胞のガンマ・デルタT細胞に対する第1の比を含む第1の細胞集団をもたらすこと；および

前記第1の細胞集団を、1種または複数種の補助的ポリペプチドを含む第2の条件セットに接触させ、NK細胞のガンマ・デルタT細胞に対する所望の最終的な比を含む第2の細胞集団をもたらすことを含み、前記第1の条件セットが前記第2の条件セットとは異なる、項目1～39のいずれかに記載の方法。

(項目41)

前記第1の細胞集団が前記第2の条件セットとの接触前に洗浄される、項目40に記載の方法。

(項目42)

前記第1の条件セットがIL-2を含み、前記第2の条件セットがIL-15を含む；
前記第1の条件セットがIL-15を含み、前記第2の条件セットがIL-2を含む；
前記第1の条件セットがIL-2およびCD3に免疫特異的に結合する抗体を含み、前記第2の条件セットがIL-15を含む；または
前記第1の条件セットがIL-15およびCD3に免疫特異的に結合する抗体を含み、前記第2の条件セットがIL-2およびCD3に免疫特異的に結合する抗体を含む、項目40または項目41に記載の方法。

(項目43)

CD3に免疫特異的に結合する前記抗体がOKT3である、項目42に記載の方法。

(項目44)

前記試料を前記活性化および拡大条件に曝露する前に、前記試料からアルファ・ベータT細胞を枯渇させ、それによって枯渇細胞集団を生成すること；ならびに

前記枯渇細胞集団を前記活性化および拡大条件に供すること
をさらに含み、
それによってNK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された細胞の集団を含む組成物が得られる、項目2～43のいずれかに記載の方法。

(項目45)

活性化および拡大の前に、前記試料または前記枯渇細胞集団が、NK細胞またはガンマ・デルタT細胞について選択する条件にも、前記アルファ・ベータT細胞以外の細胞を枯渇させる条件にも曝露されない、項目1～44のいずれかに記載の方法。

(項目46)

活性化および拡大の前に、前記試料または前記枯渇細胞集団が、前記試料または前記枯

10

20

30

40

50

渴細胞集団の全てのCD3+細胞を枯渇させる条件に曝露されない、項目1～45のいずれかに記載の方法。

(項目47)

前記試料または枯渇細胞集団の細胞が、活性化および拡大の前、間、または後に外因性核酸を含まない、項目1～46のいずれかに記載の方法。

(項目48)

前記試料または枯渇細胞集団の細胞が、活性化および拡大の前、間、または後に腫瘍壊死因子受容体も、キメラ抗原受容体(CAR)も、骨髄分化一次応答タンパク質も、自然免疫シグナル伝達アダプターをコードする外因性核酸も含まない、項目1～46のいずれかに記載の方法。

(項目49)

前記試料または枯渇細胞集団の細胞が、活性化および拡大の前、間、または後に遺伝子改変されない、項目1～48のいずれかに記載の方法。

(項目50)

NK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された前記細胞の集団を、それによって前記ガンマ・デルタ細胞が枯渇される処置に供することをさらに含み、得られた集団がNK細胞から本質的になるかまたはそれからなる、項目1～49のいずれかに記載の方法。

(項目51)

NK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された前記細胞の集団を、それによって前記NK細胞が枯渇される処置に供することをさらに含み、得られた集団がガンマ・デルタT細胞から本質的になるかまたはそれからなる、項目1～49のいずれかに記載の方法。

(項目52)

NK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された前記細胞の集団を、NK細胞についての正の選択に供することをさらに含み、それによってNK細胞から本質的になるかまたはそれからなる細胞集団が得られる、項目1～50のいずれかに記載の方法。

(項目53)

NK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された前記細胞の集団を、ガンマ・デルタ細胞についての正の選択に供することをさらに含み、それによってガンマ・デルタ細胞から本質的になるかまたはそれからなる細胞集団が得られる、項目1～49および51のいずれかに記載の方法。

(項目54)

前記拡大条件が、前記試料または枯渇細胞集団のフィーダー細胞フリー培地中での約1週間から約10週間のインキュベーションを含み、それによってNK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された拡大した細胞の集団を含む組成物が得られる、項目1～53のいずれかに記載の方法。

(項目55)

前記培養条件が、前記試料または枯渇細胞集団のフィーダー細胞フリー培地中での約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、25日間、30日間、35日間、40日間、45日間、50日間、55日間、もしくは60日間もしくはそれより多くの日数、または約2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、もしくは10週間のインキュベーションを含む、項目54に記載の方法。

(項目56)

前記NK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された細胞の集団が、前記拡大条件下の30日間で約2logより大きく拡大される、項目1～55のいずれかに記載の方法。

(項目57)

前記細胞の集団が、前記拡大条件下の30日間で約3logより大きく拡大される、項

10

20

30

40

50

目 5 6 に記載の方法。

(項目 5 8)

N K 細胞およびガンマ．デルタ T 細胞に関して富化された前記拡大した細胞の集団が、
疲弊した細胞を含まない、項目 1 ～ 5 7 のいずれかに記載の方法。

(項目 5 9)

N K 細胞およびガンマ．デルタ T 細胞に関して富化された前記拡大した細胞の集団が、
前記拡大条件の 6 0 日後に疲弊した細胞を含まない、項目 1 ～ 5 8 のいずれかに記載の方
法。

(項目 6 0)

N K 細胞およびガンマ．デルタ T 細胞に関して富化された前記拡大した細胞の集団にお
ける N K 細胞の 5 % 未満、4 % 未満、3 % 未満、または 2 % 未満が P D - 1 マーカを含
み、および／または前記拡大した集団における総細胞もしくは前記拡大した集団における
前記ガンマ．デルタ T 細胞の約 2 0 %、1 5 %、1 0 %、またはそれ未満が前記 P D - 1
マーカを含む、項目 1 ～ 5 9 のいずれかに記載の方法。

(項目 6 1)

N K 細胞およびガンマ．デルタ T 細胞に関して富化された前記細胞の集団が、前記集団
における総細胞数のパーセンテージとして以下の活性化マーカ：

(a) 9 0 % またはそれより多くの K I R 5 ；

(b) 1 0 % またはそれより多くの S I G L E C - 7 ；

(c) 6 0 % またはそれより多くの K I R 3 D 5 1 ；

(d) 1 0 % またはそれより多くの K I R 2 D L 1 ；

(e) 2 5 % またはそれより多くの N K p 3 0、N K p 4 4、または N K p 4 6 ；

(f) 3 5 % またはそれより多くの N K G 2 D ；

(g) 9 0 % またはそれより多くの D N A M 1 ；

(h) 8 5 % またはそれより多くの N T B A ；

(i) 9 5 % またはそれより多くの C D 2 ；および

(j) 5 5 % またはそれより多くの K I R 3 D S 1

のうちの 1 つまたは複数を含む、項目 1 ～ 6 0 のいずれかに記載の方法。

(項目 6 2)

N K 細胞およびガンマ．デルタ T 細胞に関して富化された前記細胞の集団が、8 0 % ま
たはそれより多くの自然免疫細胞を含む、項目 1 ～ 6 1 のいずれかに記載の方法。

(項目 6 3)

前記細胞の約 7 0 % から約 1 0 0 % の間、または少なくとも約 7 0 %、7 1 %、7 2 %
、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %
、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %
、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、もしくは 1 0 0 % が C D
5 6 + である、項目 6 2 に記載の方法。

(項目 6 4)

前記細胞の約 1 0 % から約 4 0 % の間、または少なくとも約 1 0 %、1 1 %、1 2 %、
1 3 %、1 4 %、1 5 %、1 6 %、1 7 %、1 8 %、1 9 %、2 0 %、2 1 %、2 2 %、
2 3 %、2 4 %、2 5 %、2 6 %、2 7 %、2 8 %、2 9 %、3 0 %、3 1 %、3 2 %、
3 3 %、3 4 %、3 5 %、3 6 %、3 7 %、3 8 %、3 9 %、もしくは 4 0 % が C D 1 6
+ である、項目 6 2 または項目 6 3 に記載の方法。

(項目 6 5)

前記細胞の 5 % 未満、4 % 未満、3 % 未満、または 2 % 未満が C D 5 7 + である、項目
6 2 ～ 6 4 のいずれかに記載の方法。

(項目 6 6)

前記試料または枯渇細胞集団が、活性化および拡大の間または後に C D 4 + C D 8 + 細
胞を含まない、項目 1 ～ 6 5 のいずれかに記載の方法。

(項目 6 7)

前記活性化条件および前記拡大条件がビスホスホネートを含まない、項目 1 ～ 6 6 のいずれかに記載の方法。

(項目 6 8)

前記ビスホスホネートがパミドロネートまたはゾレドロネートである、項目 6 7 に記載の方法。

(項目 6 9)

前記ガンマ・デルタ T 細胞が、V・デルタ・1 および V・デルタ・2 発現に関してポリクローナルである、項目 1 ～ 6 8 のいずれかに記載の方法。

(項目 7 0)

前記ポリクローナルガンマ・デルタ T 細胞が、V・デルタ・1 + および V・デルタ・1 - から選択される少なくとも 1 つの亜集団、ならびに V・デルタ・2 + および V・デルタ・2 - から選択される少なくとも 1 つの亜集団を含む、項目 6 9 に記載の方法。

10

(項目 7 1)

項目 1 ～ 7 0 のいずれかに記載の方法によって得ることができるまたは得られた組成物。

(項目 7 2)

改変された末梢血細胞の集団を含む組成物であって、前記集団が複数の N K 細胞および複数のガンマ・デルタ T 細胞を含み；
アルファ・ベータ T 細胞が枯渇され；
フィーダー細胞を含まない、組成物。

(項目 7 3)

前記細胞の約 2 5 % から約 4 5 % の間が N K 細胞であり、前記細胞の約 5 5 % から約 7 5 % の間がガンマ・デルタ T 細胞である；

前記細胞の約 2 5 % から約 3 0 % の間が N K 細胞であり、前記細胞の約 7 0 % から約 7 5 % の間がガンマ・デルタ T 細胞である；

前記細胞の約 8 0 % から約 9 9 % の間が N K 細胞であり、前記細胞の約 1 % から約 2 0 % の間がガンマ・デルタ T 細胞である；または

前記細胞の約 4 0 % から約 4 5 % の間が N K 細胞であり、前記細胞の約 5 5 % から約 6 0 % の間がガンマ・デルタ T 細胞である、項目 7 2 に記載の組成物。

(項目 7 4)

前記細胞の 3 0 % またはそれより多くが活性化される、項目 7 2 または項目 7 3 に記載の組成物。

30

(項目 7 5)

前記改変された細胞の集団が、前記集団における総細胞数のパーセンテージとして以下の活性化マーカー：

(a) 9 0 % またはそれより多くの K I R 5 ；

(b) 1 0 % またはそれより多くの S I G L E C - 7 ；

(c) 6 0 % またはそれより多くの K I R 3 D 5 1 ；

(d) 1 0 % またはそれより多くの K I R 2 D L 1 ；

(e) 2 5 % またはそれより多くの N K p 3 0、N K p 4 4、または N K p 4 6 ；

(f) 3 5 % またはそれより多くの N K G 2 D ；

(g) 9 0 % またはそれより多くの D N A M 1 ；

(h) 8 5 % またはそれより多くの N T B A ；

(i) 9 5 % またはそれより多くの C D 2 ；および

(j) 5 5 % またはそれより多くの K I R 3 D S 1

のうちの 1 つまたは複数を含む、項目 7 2 ～ 7 4 のいずれかに記載の組成物。

40

(項目 7 6)

前記改変された集団が、8 0 % またはそれより多くの自然免疫細胞を含む、項目 7 2 ～ 7 5 のいずれかに記載の組成物。

(項目 7 7)

前記改変された集団が、C D 5 6 + である活性化細胞傷害性細胞に関して富化されてい

50

る、項目 7 2 ～ 7 6 のいずれかに記載の組成物。

(項目 7 8)

前記改変細胞が、C D 5 7 - である活性化細胞傷害性細胞に関して富化されている、項目 7 2 ～ 7 7 のいずれかに記載の組成物。

(項目 7 9)

前記集団が、C D 5 6 + C D 5 7 - である活性化細胞傷害性細胞に関して富化されている、項目 7 2 ～ 7 8 のいずれかに記載の組成物。

(項目 8 0)

前記細胞の約 8 0 % から約 1 0 0 % の間、または少なくとも約 8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、もしくは 1 0 0 % が C D 5 6 + である、項目 7 7 ～ 7 9 のいずれかに記載の組成物。

10

(項目 8 1)

前記細胞の約 1 0 % から約 4 0 % の間、または少なくとも約 1 0 %、1 1 %、1 2 %、1 3 %、1 4 %、1 5 %、1 6 %、1 7 %、1 8 %、1 9 %、2 0 %、2 1 %、2 2 %、2 3 %、2 4 %、2 5 %、2 6 %、2 7 %、2 8 %、2 9 %、3 0 %、3 1 %、3 2 %、3 3 %、3 4 %、3 5 %、3 6 %、3 7 %、3 8 %、3 9 %、もしくは 4 0 % が C D 1 6 + である、項目 7 7 ～ 8 0 のいずれかに記載の組成物。

(項目 8 2)

前記細胞の 5 % 未満、4 % 未満、3 % 未満、または 2 % 未満が C D 5 7 + である、項目 7 7 ～ 8 1 のいずれかに記載の組成物。

20

(項目 8 3)

N K 細胞およびガンマ・デルタ T 細胞以外の細胞を実質的に含まない、項目 7 2 ～ 8 2 のいずれかに記載の組成物。

(項目 8 4)

5 パーセント未満の N K T 細胞を含む、項目 7 2 ～ 8 3 のいずれかに記載の組成物。

(項目 8 5)

1 パーセント未満の N K T 細胞を含む、項目 7 2 ～ 8 4 のいずれかに記載の組成物。

(項目 8 6)

0 . 1 パーセント未満の N K T 細胞を含む、項目 7 2 ～ 8 5 のいずれかに記載の組成物。

30

(項目 8 7)

2 パーセント未満のアルファ・ベータ T 細胞を含む、項目 7 2 ～ 8 6 のいずれかに記載の組成物。

(項目 8 8)

1 パーセント未満のアルファ・ベータ T 細胞を含む、項目 7 2 ～ 8 7 のいずれかに記載の組成物。

(項目 8 9)

0 . 1 パーセント未満のアルファ・ベータ T 細胞を含む、項目 7 2 ～ 8 8 のいずれかに記載の組成物。

(項目 9 0)

40

前記集団における N K 細胞のサブセットが C D 1 6 + 細胞である、項目 7 2 ～ 8 9 のいずれかに記載の組成物。

(項目 9 1)

大多数のガンマ・デルタ T 細胞が C D 5 7 - 細胞である、項目 7 2 ～ 9 0 のいずれかに記載の組成物。

(項目 9 2)

大多数の N K 細胞が C D 5 7 - 細胞である、項目 7 2 ～ 9 1 のいずれかに記載の組成物。

(項目 9 3)

前記ガンマ・デルタ T 細胞が、V . デルタ . 1 および V . デルタ . 2 発現に関してポリクローナルである、項目 7 2 ～ 9 2 のいずれかに記載の組成物。

50

(項目 9 4)

前記ポリクローナルガンマ・デルタ T 細胞が V・デルタ・1 + および V・デルタ・1 - から選択される少なくとも 1 つの亜集団、ならびに V・デルタ・2 + および V・デルタ・2 - から選択される少なくとも 1 つの亜集団を含む、項目 9 3 に記載の組成物。

(項目 9 5)

大多数のガンマ・デルタ T 細胞が V・デルタ・1 を発現し、少数のガンマ・デルタ T 細胞が V・デルタ・2 を発現する；または
少数のガンマ・デルタ T 細胞が V・デルタ・1 を発現し、大多数のガンマ・デルタ T 細胞が V・デルタ・2 を発現する、項目 7 2 ~ 9 4 のいずれかに記載の組成物。

(項目 9 6)

前記集団における少数の細胞が C D 3 陽性細胞であり、前記集団における大多数の細胞が C D 3 陰性細胞である；または
前記集団における大多数の細胞が C D 3 陽性細胞であり、前記集団における少数の細胞が C D 3 陰性細胞である、項目 7 2 ~ 9 5 のいずれかに記載の組成物。

(項目 9 7)

N K 細胞のガンマ・デルタ T 細胞に対する比が 1 より大きい、項目 7 2 ~ 9 6 のいずれかに記載の組成物。

(項目 9 8)

N K 細胞のガンマ・デルタ T 細胞に対する比が 1 未満である、項目 7 2 ~ 9 6 のいずれかに記載の組成物。

(項目 9 9)

前記改変された細胞の集団が、約 9 8 ~ 9 9 % の N K 細胞および約 1 ~ 2 % のガンマ・デルタ T 細胞を含む、項目 9 7 に記載の組成物。

(項目 1 0 0)

前記改変された細胞の集団が、約 2 5 % から約 4 5 % の間の N K 細胞および約 5 5 % から約 7 5 % の間のガンマ・デルタ T 細胞を含む、項目 9 8 に記載の組成物。

(項目 1 0 1)

前記改変された細胞の集団が、約 2 5 ~ 3 0 % の N K 細胞および約 7 0 ~ 7 5 % のガンマ・デルタ T 細胞を含む、項目 9 8 に記載の組成物。

(項目 1 0 2)

前記改変された細胞の集団が、約 4 0 ~ 4 5 % の N K 細胞および約 5 5 ~ 6 0 % のガンマ・デルタ T 細胞を含む、項目 9 8 に記載の組成物。

(項目 1 0 3)

前記 N K 細胞および／または前記ガンマ・デルタ T 細胞の約 5 0 % から約 9 9 % もしくはそれより多くの間、または約 5 0 % より多くのもしくはそれに等しい、5 1 % より多くのもしくはそれに等しい、5 2 % より多くのもしくはそれに等しい、5 3 % より多くのもしくはそれに等しい、5 4 % より多くのもしくはそれに等しい、5 5 % より多くのもしくはそれに等しい、5 6 % より多くのもしくはそれに等しい、5 7 % より多くのもしくはそれに等しい、5 8 % より多くのもしくはそれに等しい、5 9 % より多くのもしくはそれに等しい、6 0 % より多くのもしくはそれに等しい、6 1 % より多くのもしくはそれに等しい、6 2 % より多くのもしくはそれに等しい、6 3 % より多くのもしくはそれに等しい、6 4 % より多くのもしくはそれに等しい、6 5 % より多くのもしくはそれに等しい、6 6 % より多くのもしくはそれに等しい、6 7 % より多くのもしくはそれに等しい、6 8 % より多くのもしくはそれに等しい、6 9 % より多くのもしくはそれに等しい、7 0 % より多くのもしくはそれに等しい、7 1 % より多くのもしくはそれに等しい、7 2 % より多くのもしくはそれに等しい、7 3 % より多くのもしくはそれに等しい、7 4 % より多くのもしくはそれに等しい、7 5 % より多くのもしくはそれに等しい、7 6 % より多くのもしくはそれに等しい、7 7 % より多くのもしくはそれに等しい、7 8 % より多くのもしくはそれに等しい、7 9 % より多くのもしくはそれに等しい、8 0 % より多くのもしくはそれに等しい、8 1 % より多くのもしくはそれに等しい、8 2 % より多くのもしくはそれに等しい、

10

20

30

40

50

83%より多くのもしくはそれに等しい、84%より多くのもしくはそれに等しい、85%より多くのもしくはそれに等しい、86%より多くのもしくはそれに等しい、87%より多くのもしくはそれに等しい、88%より多くのもしくはそれに等しい、89%より多くのもしくはそれに等しい、90%より多くのもしくはそれに等しい、91%より多くのもしくはそれに等しい、92%より多くのもしくはそれに等しい、93%より多くのもしくはそれに等しい、94%より多くのもしくはそれに等しい、95%より多くのもしくはそれに等しい、96%より多くのもしくはそれに等しい、97%より多くのもしくはそれに等しい、98%より多くのもしくはそれに等しい、99%より多くのもしくはそれに等しい、80%より多くのもしくはそれに等しい、81%より多くのもしくはそれに等しい、82%より多くのもしくはそれに等しい、83%より多くのもしくはそれに等しい、84%より多くのもしくはそれに等しい、85%より多くのもしくはそれに等しい、86%より多くのもしくはそれに等しい、87%より多くのもしくはそれに等しい、88%より多くのもしくはそれに等しい、89%より多くのもしくはそれに等しい、90%より多くのもしくはそれに等しい、91%より多くのもしくはそれに等しい、92%より多くのもしくはそれに等しい、93%より多くのもしくはそれに等しい、94%より多くのもしくはそれに等しい、95%より多くのもしくはそれに等しい、96%より多くのもしくはそれに等しい、97%より多くのもしくはそれに等しい、98%より多くのもしくはそれに等しい、99%より多くのもしくはそれに等しい、またはその端数、最大100%がCD8+である、項目72～102のいずれかに記載の組成物。

(項目104)

前記NK細胞および／または前記ガンマ・デルタT細胞の2%未満がCD4+である、項目103に記載の組成物。

(項目105)

前記NK細胞および／または前記ガンマ・デルタT細胞の2%未満がCD8+CD4+である、項目103または項目104に記載の組成物。

(項目106)

前記NK細胞の約15%から約30%の間および／または前記ガンマ・デルタT細胞の約55%から85%の間の端数がCD8-CD4-である、項目103～105のいずれかに記載の組成物。

(項目107)

前記集団における前記細胞の約30%から約99%もしくはそれより多くの間、または少なくとも約30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはその端数、最大100%が、外因性ポリヌクレオチド、変異ポリヌクレオチド、欠失ポリヌクレオチド、またはその組合せを含む遺伝子改変をさらに含む、項目72～106のいずれかに記載の組成物。

(項目108)

前記集団における前記細胞の少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%が前記遺伝子改変を含むか、または前記集団における前記細胞の約100%もしくは100%が前記遺伝子改変を含む、項目107に記載の組成物。

(項目109)

前記遺伝子改変が外因性ポリヌクレオチドを含む、項目107または項目108に記載の組成物。

(項目110)

前記外因性ポリヌクレオチドがレトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクター中にある、項目109に記載の組成物。

(項目111)

前記外因性ポリヌクレオチドが、前記改変された細胞集団の1種または複数種の細胞のゲノムに組み込まれる、項目109に記載の組成物。

(項目112)

前記集団における前記細胞がキメラ抗原受容体(CAR)を含む、項目107~111のいずれかに記載の組成物。

(項目113)

前記キメラ抗原受容体がCD19、GD2、HER3、B7H3、CD123、またはCD30のうちの1つまたは複数に免疫特異的に結合する結合分子部分を含む、項目112に記載の組成物。

(項目114)

前記複数のNK細胞および前記複数のガンマ・デルタT細胞を含む前記集団が、1より多くの対象の前記末梢血細胞に由来する、項目72~113のいずれかに記載の組成物。

(項目115)

実施形態72~114のいずれかに記載の組成物および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

(項目116)

遺伝子改変免疫細胞を作製する方法であって、

(a) 外因性ポリヌクレオチドを、項目71~106のいずれかに記載の組成物に添加すること；

(b) 項目71~106のいずれかに記載の組成物の1種または複数種の細胞においてポリヌクレオチドを変異させること；または

(c) 項目71~106のいずれかに記載の組成物の1種または複数種の細胞においてポリヌクレオチドを欠失させること

のうちの1つまたは複数を含む方法。

(項目117)

前記遺伝子改変が、レトロウイルス形質導入、レンチウイルス形質導入、電気穿孔、トランスフェクション、CRISPR/Cas9、またはTALENsによる、項目116に記載の方法。

(項目118)

前記遺伝子改変が、(a)でのように外因性ポリヌクレオチドを添加することからなるか、またはそれから本質的になる、項目116または項目117に記載の方法。

(項目119)

前記遺伝子改変が、(a)でのように外因性ポリヌクレオチドを添加すること、および／または(b)でのようにポリヌクレオチドを変異させることを含み、前記外因性ポリヌクレオチドおよび／または前記変異ポリヌクレオチドが前記免疫細胞のゲノムに組み込まれる、項目116~118のいずれかに記載の方法。

(項目120)

前記組み込みが、電気穿孔、トランスフェクション、CRISPR/Cas9、またはTALENsによる、項目119に記載の方法。

(項目121)

前記外因性ポリヌクレオチドがキメラ抗原受容体(CAR)をコードする、項目116~121のいずれかに記載の方法。

(項目122)

前記キメラ抗原受容体が、CD19、GD2、HER3、B7H3、CD123、またはCD30のうちの1つまたは複数に免疫特異的に結合する結合分子部分を含む、項目121の方法。

(項目123)

10

20

30

40

50

前記集団における前記細胞の約30%から約99%もしくはそれより多くの間、または少なくとも約30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはその端数、最大100%が前記遺伝子改変を含む、項目116～122のいずれかに記載の方法。

10

(項目124)

前記遺伝子改変が外因性ポリヌクレオチドを含む、項目123に記載の方法。

(項目125)

前記集団における前記細胞の約100%または100%が前記外因性ポリヌクレオチドを含む、項目124に記載の方法。

(項目126)

項目71～114のいずれかに記載の組成物、または項目115に記載の医薬組成物、必要に応じて使用のための指示、および必要に応じてサイトカインを含むキット。

(項目127)

前記組成物または前記医薬組成物が、セ氏マイナス4度またはそれ未満にある、項目126に記載のキット。

(項目128)

前記組成物または前記医薬組成物が、セ氏約マイナス75度からセ氏約マイナス80度にある、項目127に記載のキット。

(項目129)

細胞約 1×10^5 個から細胞約 1×10^{12} 個を含む、項目126～128のいずれかに記載のキット。

(項目130)

前記サイトカインがインターロイキンポリペプチドである、項目126～129のいずれかに記載のキット。

(項目131)

前記インターロイキンペプチドがIL-2、IL-4、またはIL-15である、項目130に記載のキット。

(項目132)

非ヒト血清を含まないおよび／またはウシ血清を含まない、項目126～131のいずれかに記載のキット。

(項目133)

異種のものを含まない、項目126～132のいずれかに記載のキット。

(項目134)

外因性フィーダー細胞を含まない、項目126～133のいずれかに記載のキット。

(項目135)

単位剤形の、項目126～134のいずれかに記載のキット。

(項目136)

前記単位剤形が、細胞約 1×10^6 個から細胞約 1×10^{12} 個である、実施形態E10に記載のキット。

(項目137)

各々が1または複数のドナー対象に由来する細胞を含む複数の容器を含む、異なるドナー対象に由来する細胞のコレクションであって、各容器が、項目71～114のいずれか一項に記載の組成物、項目115に記載の医薬組成物、または項目126～136のい

20

30

40

50

れかに記載のキットを含む、細胞のコレクション。

(項目 1 3 8)

がんまたは感染症を処置する方法であって、それを必要とする対象に、前記がんまたは感染症を処置するために有効な量の項目 7 1 ~ 1 1 4 のいずれか一項に記載の組成物、項目 1 1 5 に記載の医薬組成物、または項目 1 2 6 ~ 1 3 6 のいずれかに記載のキットを投与することを含み、前記組成物、前記医薬組成物、またはキットにおける細胞が前記対象に対して同種異系である方法。

(項目 1 3 9)

がんまたは感染症を処置する方法であって、それを必要とする対象に、前記がんまたは感染症を処置するために有効な量の項目 7 1 ~ 1 1 4 のいずれか一項に記載の組成物、項目 1 1 5 に記載の医薬組成物、または項目 1 2 6 ~ 1 3 6 のいずれかに記載のキットを投与することを含み、前記組成物、前記医薬組成物、またはキットにおける細胞が前記対象に対して自己である方法。

(項目 1 4 0)

前記組成物を前記対象に 2 日またはそれより多くの別々の日に投与することを含む、項目 1 3 8 または項目 1 3 9 に記載の方法。

(項目 1 4 1)

前記細胞のドナーが前記処置のレシピエントである、項目 1 3 9 または項目 1 4 0 に記載の方法。

(項目 1 4 2)

前記細胞のドナーが前記処置のレシピエントではない、項目 1 3 8 または項目 1 4 0 に記載の方法。

(項目 1 4 3)

前記処置のレシピエントが、前記ドナー由来のアルファ・ベータ T 細胞によって処置した場合に G v H D に罹りやすい、項目 1 4 2 に記載の方法。

(項目 1 4 4)

前記処置が、約 2 週間から約 4 週間の間の間隔で約 1 単位投薬量から約 3 6 またはそれより多くの単位投薬量の間で投与される、項目 1 3 8 ~ 1 4 3 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 4 5)

前記処置が、単一単位投薬量として毎日 1 回、2 回、3 回、4 回、もしくは最大 5 回、または数日間、数週間もしくは数ヶ月間の間に 1 回、2 回、3 回、4 回、5 回、6 回、7 回、8 回、9 回、もしくは 1 0 回もしくはそれより多く、または 2 日毎、または週に 1 回、2 回、3 回、4 回、5 回、もしくは 6 回投与される、項目 1 3 8 ~ 1 4 3 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 4 6)

前記処置が静脈内 (I V)、髄腔内または筋肉内 (I M)、腹腔内 (I P)、胸膜内、関節腔内に投与されるか、または前記がんもしくは感染症の部位もしくはその近傍に注射もしくは埋め込まれる、項目 1 3 8 ~ 1 4 5 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 4 7)

前記単位投薬量が、前記対象の体重 1 キログラムあたり細胞約 10^4 個から細胞約 10^{10} 個の間、または対象あたり細胞約 10^6 個から細胞約 10^{12} 個の間を含む、項目 1 4 4 ~ 1 4 6 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 4 8)

前記単位投薬量が、対象あたり細胞約 10^{10} 個、または前記対象の体重 1 キログラムあたり細胞約 10^8 個である、項目 1 4 7 に記載の方法。

(項目 1 4 9)

前記処置ががんのためである、項目 1 3 8 ~ 1 4 8 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 5 0)

前記がんが、肺がん、黒色腫、乳がん、前立腺がん、結腸がん、腎細胞癌、卵巣がん、神経芽腫、横紋筋肉腫、白血病もしくはリンパ腫、ホジキンリンパ腫もしくは小児急性リ

10

20

30

40

50

ンパ芽球性白血病、非ホジキンリンパ腫、肥満細胞腫もしくは肥満細胞腫瘍、卵巣がんもしくは癌、膵臓がん、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、肝細胞癌、網膜芽腫、乳腺腫瘍、結腸直腸癌、白血病、リンパ腫、急性リンパ芽球性白血病（ALL）もしくは急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病（AML）、組織球肉腫、脳腫瘍、星状細胞腫、膠芽腫、神経腫、結腸癌、子宮頸癌、肉腫、膀胱腫瘍、細網内皮組織の腫瘍、ウィルムス腫瘍、骨がん、骨肉腫、腎臓がん、または頭頸部がん、口腔がん、喉頭がん、転移疾患、または口腔咽頭がんから選択される、項目149に記載の方法。

（項目151）

第2の薬剤が、前記組成物、医薬組成物、またはキットと共投与される、項目149または項目150に記載の方法。

（項目152）

前記第2の薬剤が、がん関連抗原に免疫特異的に結合する抗体である、項目151に記載の方法。

（項目153）

前記がん関連抗原が、 α -フェトプロテイン（AFP）、 α -アクチニン-4、A3、A33抗体に特異的な抗原、ART-4、B7、B7-H3、Ba733、BAGE、BrE3抗原、CA125、CAMEL、CAP-1、炭酸脱水酵素IX、CASP-8/m、CCL19、CCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD70L、CD74、CD79a、CD79b、CD80、CD83、CD95、CD123、CD126、CD132、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、CTLA4、CXCR4、CXCR7、CXCL12、HIF-1 α 、結腸特異抗原-p（CSAp）、CEA（CEACAM-5）、CEACAM-6、c-Met、DAM、EGFR、EGFRvIII、EGP-1（TROP-2）、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、線維芽細胞成長因子（FGF）、Flt-1、Flt-3、葉酸受容体、G250抗原、GAGE、gp100、GRO- β 、HLA-DR、HM1.24、ヒト絨毛ゴナドトロピン（HCG）およびそのサブユニット、HER2/neu、HMGB-1、低酸素症誘導因子（HIF-1）、HSP70-2M、HST-2、Ia、IGF-1R、IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IFN- λ 、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、IL-25、インスリン様成長因子-1（IGF-1）、KC4抗原、KS-1抗原、KS1-4、Le-Y、LDR/FUT、マクロファージ遊走阻止因子（MIF）、GD2、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ESO-1、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、MUC13、MUC16、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、膵臓がんムチン、PD1受容体、胎盤成長因子、p53、PLAGL2、前立腺酸性ホスファターゼ、PSA、PRAME、PSMA、PLGF、ILGF、ILGF-R、L-6、IL-25、RS5、RANTES、T101、SAGE、S100、サバイビン、サバイビン-2B、TAC、TAG-72、テネニン、TRAIL受容体、TNF- α 、Tn抗原、トムソン-フリードライヒ抗原、腫瘍壊死抗原、VEGFR、ED-Bフィブロネクチン、WT-1、17-1A抗原、補体因子C3、C3a、C3b、C5a、C5、血管新生マーカー、bcl-2、bcl-6、およびKrasからなる群から選択される、項目152に記載の方法。

（項目154）

前記抗体が、hR1（抗IGF-1R）、hPAM4（抗ムチン）、KC4（抗ムチン

10

20

30

40

50

)、hA20 (抗CD20)、hA19 (抗CD19)、hIMMU31 (抗AFP)、hLL1 (抗CD74)、hLL2 (抗CD22)、抗CD19/CD22二特異性抗体、RFB4 (抗CD22)、hMu-9 (抗CSAp)、hL243 (抗HLA-DR)、hMN-14 (抗CEACAM-5)、hMN-15 (抗CEACAM-6)、hRS7 (抗TROP-2)、hMN-3 (抗CEACAM-6)、CC49 (抗TAG-72)、J591 (抗PSMA)、D2/B (抗PSMA)、G250 (抗炭酸脱水酵素IX)、ジヌツキシマブ (抗GD2)、インフリキシマブ (抗TNF- α)、セルトリズマブペゴル (抗TNF- α)、アダリムマブ (抗TNF- α)、アレムツズマブ (抗CD52)、ベバシズマブ (抗VEGF)、セツキシマブ (抗EGFR)、ゲムツズマブ (抗CD33)、イブリツモマブチウキセタン (抗CD20)、パニツムマブ (抗EGFR)、リツキシマブ (抗CD20)、トシツモマブ (抗CD20)、GA101 (抗CD20)、トラスツズマブ (抗HER2/neu)、トシリズマブ (抗IL-6受容体)、バシリキシマブ (抗CD25)、ダクリズマブ (抗CD25)、エファリズマブ (抗CD11a)、ムロモナブ-CD3 (抗CD3受容体)、ナタリズマブ (抗 α 4インテグリン)、BWA-3 (抗ヒストンH2A/H4)、LG2-1 (抗ヒストンH3)、MRA12 (抗ヒストンH1)、PR1-1 (抗ヒストンH2B)、LG11-2 (抗ヒストンH2B)、およびLG2-2 (抗ヒストンH2B) から選択される、項目152または項目153に記載の方法。

10

(項目155)

前記処置が感染症のためである、項目138~148のいずれかに記載の方法。

20

(項目156)

前記感染症が、細菌病原体、真菌病原体、ウイルス病原体、または原虫病原体の存在によって特徴付けられる、項目155に記載の方法。

(項目157)

前記感染症が、ヘルペス、エボラ、ウエストナイルウイルス、ワクシニアウイルス、エプスタインバーウイルス、A型肝炎ウイルス(HAV)；B型肝炎ウイルス(HBV)；C型肝炎ウイルス(HCV)；ヘルペスウイルス(例えば、HSV-1、HSV-2、HHV-6、CMV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、Bacilli、Citrobacter、Cholera、Diphtheria、Enterobacter、Gonococci、Helicobacter pylori、Klebsiella、Legionella、Meningococci、mycobacteria、Pseudomonas、Pneumococci、リケッチア細菌、Salmonella、Serratia、Staphylococci、Streptococci、Tetanus、Aspergillus (A. fumigatus、A. niger等)、Blastomyces dermatitidis、Candida (C. albicans、C. krusei、C. glabrata、C. tropicalis等)、Cryptococcus neoformans、Genus Mucorales (mucor、absidia、rhizopus)、Sporothrix schenckii、Paracoccidioides brasiliensis、Coccidioides immitis、Histoplasma capsulatum、Leptospirosis、Borrelia burgdorferi、蠕虫寄生物(鉤虫、条虫、吸虫、扁形動物(例えば、Schistosomia)、Giardia lamblia、trichinella、Dientamoeba fragilis、Trypanosoma brucei、Trypanosoma cruzi、またはLeishmania donovani)からなる群から選択される、項目156に記載の方法。

30

40

(項目158)

複数のガンマデルタT細胞($\gamma\delta$)；複数のナチュラルキラー細胞(NK)；または $\gamma\delta$ 細胞およびNK細胞の組合せを含む細胞の治療的組成物。

(項目159)

50

前記 $\gamma \delta$ および／またはNK細胞が組換えによって操作されるか、または遺伝子改変され、

必要に応じて前記 $\gamma \delta$ および／またはNK細胞が、外因性または異種タンパク質を細胞外に発現するように組換えによって操作されるかまたは遺伝子改変され、

必要に応じて前記外因性、異種、またはキメラタンパク質がキメラ抗原受容体（CAR）または外因性もしくは異種T細胞受容体（TCR）であり、

必要に応じて前記外因性、異種、もしくはキメラタンパク質もしくはCARが、がん細胞もしくは腫瘍マーカーもしくは感染細胞に対して特異的である（特異的に結合することができる）か、または前記外因性、異種、もしくはキメラタンパク質もしくはCARが、がん細胞もしくは腫瘍マーカーもしくは感染細胞もしくは任意の疾患関連抗原を特異的に標的としてこれに結合することができる抗体に対して特異的である（または特異的に結合することができる）、項目158に記載の細胞の治療的組成物。

10

（項目160）

前記 $\gamma \delta$ および／またはNK細胞がヒト細胞または動物細胞である、項目158または項目159に記載の細胞の治療的組成物。

（項目161）

前記治療的組成物が、静脈内（IV）、髄腔内、もしくは筋肉内（IM）投与のために製剤化されるか、または単位剤形で製剤化され、必要に応じて単位投薬量が細胞約 10^2 個から細胞 10^{12} 個の間を含む、項目158～160のいずれかに記載の細胞の治療的組成物。

20

（項目162）

前記 $\gamma \delta$ および／またはNK細胞が *in vivo* 供給源から単離される、項目158～161のいずれかに記載の細胞の治療的組成物。

（項目163）

前記 $\gamma \delta$ および／またはNK細胞が培養において拡大されるか、または *in vivo* 供給源から単離され、培養において拡大される、項目158～162のいずれかに記載の細胞の治療的組成物。

（項目164）

前記 $\gamma \delta$ および／またはNK細胞が、 *in vivo* 供給源から単離され、いかなるフィーダー細胞も使用することなくまたはフィーダー細胞層を使用することなく培養において拡大され、それによってフィーダー細胞を欠如する拡大した $\gamma \delta$ および／またはNK細胞の集団を生成する、項目163に記載の細胞の治療的組成物。

30

（項目165）

前記 $\gamma \delta$ および／またはNK細胞が *in vivo* 供給源から単離され、フィーダー細胞またはフィーダー細胞層を使用して培養において拡大され、必要に応じて前記フィーダー細胞が実質的に除去され、および／または殺滅されて、フィーダー細胞を実質的に欠如する拡大した $\gamma \delta$ および／またはNK細胞の集団を生成する、項目163に記載の細胞の治療的組成物。

（項目166）

前記 $\gamma \delta$ および／またはNK細胞の *in vivo* 供給源が自己供給源に由来する（必要に応じて、前記 $\gamma \delta$ および／またはNK細胞のレシピエントとなる個体に由来する）、または外因性、異種、もしくは同種異系供給源に由来する、項目158～165のいずれかに記載の細胞の治療的組成物。

40

（項目167）

がん、腫瘍、機能障害細胞または感染細胞を処置する方法であって、

（a）それを必要とする個体に、先行項目のいずれかに記載の細胞の治療的組成物の治療有効量を投与すること、または

（b）（i）先行項目のいずれかに記載の細胞の治療的組成物を提供するまたは提供したこと；および

（ii）それを必要とする個体に、前記細胞の治療的組成物の治療有効量を投与すること

50

または投与したこと
を含む方法。

(項目 1 6 8)

それを必要とする前記個体がヒトまたは動物である、項目 1 6 7 に記載の方法。

(項目 1 6 9)

前記 $\gamma \delta$ および／または NK 細胞が *in vivo* 供給源から単離され、必要に応じて前記 $\gamma \delta$ および／または NK 細胞の *in vivo* 供給源が、同系もしくは自己供給源に由来する（必要に応じて、前記 $\gamma \delta$ および／または NK 細胞のレシピエントとなる個体に由来する）、または外因性、異種、もしくは同種異系供給源、またはその組合せに由来する、項目 1 6 7 または項目 1 6 8 に記載の方法。

10

(項目 1 7 0)

前記細胞の治療的組成物が、静脈内 (IV)、髄腔内、もしくは筋肉内 (IM) 投与され、または前記がん、腫瘍、機能障害、もしくは感染細胞にもしくはその近傍に（近くに）注射もしくは埋め込まれ、必要に応じて前記細胞の治療的組成物が埋込物またはゲルとして送達され、必要に応じて前記ゲルがハイドロゲルである、項目 1 6 7 ～ 1 6 9 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 7 1)

前記細胞の治療的組成物が、単位剤形で投与され、必要に応じて単位投薬量が、細胞約 10^2 個から細胞 10^{12} 個の間、または細胞 10^4 個から細胞 10^{10} 個の間を含み；または 1 日投与量が細胞約 10^2 個から細胞 10^{12} 個の間、または細胞 10^4 個から細胞 10^{10} 個の間を含む、項目 1 6 7 ～ 1 7 0 のいずれかに記載の方法。

20

(項目 1 7 2)

前記細胞の治療的組成物または単位剤形が、それを必要とする前記個体に数回（複数回）、または数日間、数週間もしくは数ヶ月間の間に 2 回、3 回、4 回、5 回、6 回、7 回、8 回、9 回、もしくは 10 回またはそれより多く投与され、必要に応じて前記複数の単位剤形の各々が、毎日、2 日毎、週に 2 回、3 回、4 回、5 回、もしくは 6 回、または週に 1 回投与される、項目 1 6 7 ～ 1 7 1 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 7 3)

前記がんまたは腫瘍が、肺がん、黒色腫、乳がん、前立腺がん、結腸がん、腎細胞癌、卵巣がん、神経芽腫、横紋筋肉腫、白血病もしくはリンパ腫、ホジキンリンパ腫もしくは小児急性リンパ芽球性白血病、肥満細胞腫もしくは肥満細胞腫瘍、卵巣がんもしくは癌、膵臓がん、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、肝細胞癌、網膜芽腫、乳腺腫瘍、結腸直腸癌、白血病、リンパ腫、急性リンパ芽球性白血病 (ALL) もしくは急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病 (AML)、組織球肉腫、脳腫瘍、星状細胞腫、膠芽腫、神経腫、結腸癌、子宮頸癌、肉腫、膀胱腫瘍、細網内皮組織の腫瘍、ウィルムス腫瘍、骨がん、骨肉腫、腎臓がん、または頭頸部がん、口腔がん、喉頭がん、または口腔咽頭がんである、項目 1 6 7 ～ 1 7 2 のいずれかに記載の方法。

30

(項目 1 7 4)

それを必要とする前記個体が、最初に、がん関連または腫瘍関連、感染症関連または疾患関連抗原に対する非コンジュゲート抗体を、それを必要とする前記個体に予め投与し、その後先行項目のいずれかに記載の細胞の治療的組成物を投与することによって、がん、感染症、または疾患に対する免疫応答を開始するように誘導され、前記細胞の治療的組成物の少なくとも一部が前記非コンジュゲート抗体に特異的に結合するポリペプチド、必要に応じて CAR をその細胞表面上に発現する、項目 1 6 7 ～ 1 7 3 のいずれかに記載の方法。

40

(項目 1 7 5)

それを必要とする前記個体が、がん関連または腫瘍関連、感染症関連または疾患関連抗原に特異的に結合することが可能な抗体を投与され、その後先行項目のいずれかに記載の細胞の治療的組成物を投与され、前記細胞の治療的組成物の少なくとも一部が前記抗体に特異的に結合するポリペプチド、必要に応じて CAR をその細胞表面上に発現し、

50

必要に応じて前記抗体が、前記細胞の治療的組成物の投与の前に、それと共に、またはその後投与される、項目167～174のいずれかに記載の方法。

(項目176)

前記がん関連または腫瘍関連抗原が、 α -フェトプロテイン (AFP)、 α -アクチニン-4、A3、A33抗体に特異的な抗原、ART-4、B7、B7-H3、Ba733、BAGE、BrE3抗原、CA125、CAMEL、CAP-1、炭酸脱水酵素IX、CASP-8/m、CCL19、CCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD70L、CD74、CD79a、CD79b、CD80、CD83、CD95、CD123、CD126、CD132、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、CTLA4、CXCR4、CXCR7、CXCL12、HIF-1 α 、結腸特異抗原-p (CSAp)、CEA (CEACAM-5)、CEACAM-6、c-Met、DAM、EGFR、EGFRvIII、EGP-1 (TROP-2)、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、線維芽細胞成長因子 (FGF)、Flt-1、Flt-3、葉酸受容体、G250抗原、GAGE、gp100、GRO- β 、HLA-DR、HM1.24、ヒト絨毛ゴナドトロピン (HCG) およびそのサブユニット、HER2/neu、HMGB-1、低酸素症誘導因子 (HIF-1)、HSP70-2M、HST-2、Ia、IGF-1R、IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IFN- λ 、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、IL-25、インスリン様成長因子-1 (IGF-1)、KC4抗原、KS-1抗原、KS1-4、Le-Y、LDR/FUT、マクロファージ遊走阻止因子 (MIF)、GD2 (神経外胚葉起源の腫瘍に発現されるジシアロガングリオシド)、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ESO-1、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、MUC13、MUC16、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、膵臓がんムチン、PD1受容体、胎盤成長因子、p53、PLAGL2、前立腺酸性ホスファターゼ、PSA、PRAME、PSMA、PLGF、ILGF、ILGF-R、L-6、IL-25、RS5、RANTES、T101、SAGE、S100、サバイビン、サバイビン-2B、TAC、TAG-72、テネシシン、TRAIL受容体、TNF- α 、Tn抗原、トムソンフリードライヒ抗原、腫瘍壊死抗原、VEGFR、ED-Bフィブロネクチン、WT-1、17-1A抗原、補体因子C3、C3a、C3b、C5a、C5、血管新生マーカー、bcl-2、bcl-6、およびKrasからなる群から選択される抗原である、項目167～175のいずれかに記載の方法。

(項目177)

前記抗体または前記非コンジュゲート抗体が、hR1 (抗IGF-1R)、hPAM4 (抗ムチン)、KC4 (抗ムチン)、hA20 (抗CD20)、hA19 (抗CD19)、hIMMU31 (抗AFP)、hLL1 (抗CD74)、hLL2 (抗CD22)、RFB4 (抗CD22)、hMu-9 (抗CSAp)、hL243 (抗HLA-DR)、hMN-14 (抗CEACAM-5)、hMN-15 (抗CEACAM-6)、hRS7 (抗TROP-2)、hMN-3 (抗CEACAM-6)、CC49 (抗TAG-72)、J591 (抗PSMA)、D2/B (抗PSMA)、G250 (抗炭酸脱水酵素IX)、インフリキシマブ (抗TNF- α)、セルトリズマブペゴル (抗TNF- α)、アダリムマブ (抗TNF- α)、アレムツズマブ (抗CD52)、ペバシズマブ (抗VEGF)、セツキシマブ (抗EGFR)、ゲムツズマブ (抗CD33)、イブリツモマブチウキセタン (抗CD20)、パニツムマブ (抗EGFR)、リツキシマブ (抗CD20)、トシツ

10

20

30

40

50

モマブ（抗CD20）、GA101（抗CD20）、トラスツズマブ（抗HER2/neu）、トシリズマブ（抗IL-6受容体）、バシリキシマブ（抗CD25）、ダクリズマブ（抗CD25）、エファリズマブ（抗CD11a）、ムロモナブ-CD3（抗CD3受容体）、ナタリズマブ（抗 α 4インテグリン）、BWA-3（抗ヒストンH2A/H4）、LG2-1（抗ヒストンH3）、MRA12（抗ヒストンH1）、PR1-1（抗ヒストンH2B）、LG11-2（抗ヒストンH2B）、およびLG2-2（抗ヒストンH2B）からなる群から選択される、項目174または175に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0061】

【図1】図1は、培養10日目で解析した場合の、細胞を抗体によって活性化してフィーダーフリー培養条件で拡大させた日数の関数としての $\alpha\beta$ TCRneg単核細胞の拡大を示す図である。

10

【図2】図2は、活性化して拡大した $\alpha\beta$ TCRneg単核細胞集団（本明細書において、INNATE-KまたはBINATE細胞集団と呼ぶ）の組成物の解析を示す。

【図3】図3は、フローサイトメトリーによって解析した場合のフィーダーフリーの培養で拡大した活性化 $\alpha\beta$ TCRneg細胞の10日目の試料における $\gamma\delta$ TCR+細胞上のT細胞系列マーカー、CD4（ヘルパー）およびCD8（細胞傷害性）の頻度および分布を示す図である。

【図4】図4は、10日間のCAR.19 INNATE-K細胞の拡大速度の解析を示す図である。

20

【図5】図5は、INNATE-K細胞およびINNATE-CAR.19細胞を、CD19+白血病（221）またはCD19+リンパ腫（Daudi）細胞株と共培養した共培養細胞傷害アッセイからのデータを示す図である。

【図6】図6は、プレートにおいて長期間in vitroで培養した拡大したINNATE-NK細胞集団の総数を示す図である。

【図7】図7は、プレートと、バイオリアクターで拡大させたINNATE-NK集団の総細胞数の比較を示す図である。

【図8】図8は、in vitroでのINNATE-NK拡大の異なる時点でのサブセット細胞組成を示す図である。

【図9】図9は、長期間のin vitro培養におけるINNATE-NK CAR細胞におけるキメラ抗原受容体（CAR）分子発現を示す図である。

30

【図10】図10は、INNATE-NKおよびINNATE-NK CAR集団の拡大後の活性化および細胞溶解分子の発現を示す図である。

【図11】図11は、フィーダーフリーで拡大させたINNATE-NK細胞およびINNATE-NK CAR細胞における疲弊の欠如を示す図である。

【図12】図12は、INNATE-NKまたはINNATE-NK-CAR.19および4つの腫瘍細胞株による細胞傷害性共培養アッセイを示す図である。列A：221、CD19+白血病細胞株；列B：Daudi、CD19+リンパ腫細胞株；列C：BV173、CD19+（を多様に発現する）プレ-B腫瘍細胞株；および列D：KARPAS、CD19-腫瘍細胞株。

40

【図13】図13および図14は、種々の試験実行におけるINNATE-NK細胞およびINNATE-NK-CAR.19細胞集団の両方に関するエフェクター（E）の標的（T）に対する比の関数としての原発性腫瘍細胞の%特異的溶解を示す図である。

【図14】図13および図14は、種々の試験実行におけるINNATE-NK細胞およびINNATE-NK-CAR.19細胞集団の両方に関するエフェクター（E）の標的（T）に対する比の関数としての原発性腫瘍細胞の%特異的溶解を示す図である。

【図15】図15は、原発性CD19+白血病芽球をエフェクター細胞の非存在下で蒔いた対照条件と比較した場合の、エフェクター細胞（INNATE-NK細胞およびINNATE-NK-CAR.19細胞集団）との共培養後のパーセンテージ残存原発性CD19+腫瘍を示す図である。

50

【図16】図16は、INNATE-NKおよびINNATE-NK-CAR. 19細胞を投与した動物の生存曲線を示す図である。

【図17】図17は、経時的な総細胞数によって表記した総BINATE拡大を示す図である（すなわち、フラスコにおけるIL-2またはIL-15のいずれかを補充したBINATE培地中の活性化 $\alpha\beta$ TCRneg細胞の拡大、およびバイオリアクターにおける活性化 $\alpha\beta$ TCRneg細胞集団のIL-15による拡大）。

【図18】図18は、経時的な総細胞数によって表記した総BINATE拡大を示す図である（すなわち、フラスコにおけるIL-2、IL-15、IL-2/OKT3、IL-2/IL-15、またはIL-2/IL-15/OKT3のいずれかを補充したBINATE培地中での活性化 $\alpha\beta$ TCRneg細胞の拡大）。

10

【図19】図19は、IL-15による拡大条件に関するマーカータイプ（活性化、細胞傷害性、および疲弊／未成熟）毎の表現型解析を示す図である。

【図20】図20は、IL-2による拡大条件に関するマーカータイプ（活性化、細胞傷害性、および疲弊／未成熟）毎の表現型解析を示す図である。

【図21】図21は、IL-2/OKT3拡大条件に関するマーカータイプ（活性化、細胞傷害性、および疲弊／未成熟）毎の表現型解析を示す図である。

【図22】図22は、BINATEおよびBINATE.CARGD2集団に関して記録したおよそ7日毎の細胞数を示す図である。

【図23】図23は、マウス血液およびマウス肝臓の両方におけるヒトBINATE細胞のin vivoでの維持を示す図である。

20

【図24】図24は、純粋なNK細胞集団を単離するおよび／または純粋な $\gamma\delta$ T(gd)細胞集団を単離するプロセスの例としての変形形態を例証するフローチャートを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0062】

ある特定の態様では、本明細書において免疫細胞の有意な数または免疫細胞の大多数が自然免疫細胞である治療的免疫細胞組成物を提供する。そのような組成物は、投与後の対象において自然免疫応答を生成することができる。自然免疫系は、宿主において活性で絶えず機能的であり、迅速に応答し（感染後数分から数時間以内）、非特異的に応答して、より広い患者集団に対して「オフザシェルフの(off-the-shelf)」免疫療法として使用される可能性を提供する。自然免疫細胞、例えばNK細胞およびガンマ・デルタ($\gamma\delta$)T細胞は、古典的なHLA抗原を認識せず、したがって移植片対宿主病(GvHD)を軽減しつつオフザシェルフの(同種異系の)状況で使用することができる。自然免疫細胞は、ex vivoで拡大させることができ、それによってサイトカイン放出症候群(CRS)を回避することができる。構成要素（例えば、NK細胞、ガンマ・デルタ($\gamma\delta$)T細胞）および構成要素の量を調整することができる自然免疫細胞組成物を利用して、固形腫瘍および血液のがんを含む多様ながん、感染症等に対する一連の相乗的な攻撃を提供することができる。

30

【0063】

これに対し、本明細書に記載される方法によって生成されないある特定の免疫細胞組成物は、自然免疫細胞の代わりに適応免疫細胞の大多数を含む。細胞の大多数が適応免疫細胞である免疫細胞組成物を利用する場合、認識はHLA抗原を通して行い、特に免疫療法において使用される適応免疫細胞が同種異系供給源に由来する場合、GvHDの有意なリスクが存在する。したがって、そのような組成物において利用される適応免疫細胞は最もしばしば患者／対象（自己）に由来するかまたは指定された「マッチした」ドナーに由来し、このことは、免疫療法のレパートリー、すなわち大規模な患者集団において「オフザシェルフ」の様式でそれを使用する能力を制限する。そのような組成物を利用するほとんどの細胞治療は、自己であるか、または特異性が最も低いドナーに由来する。このことは、各患者の用量をその患者に合わせて個別に調整しなければならないことを意味する。このように、現行のT細胞に基づく治療的組成物、例えばキメラ抗原受容体(CAR)また

40

50

は外因性のT細胞受容体（TCR）（ $\alpha\beta$ T細胞として）を使用する細胞治療は、「オフザシェルフ」で使うことができない。製造プロセスは6週間またはそれより長い期間を要し、その間に患者の疾患、例えばがんまたは感染症が進行し得る。同様に、これらの患者特異的製造実行の一部は、全般的な製造の失敗のみならず、化学療法または放射線療法後の患者ドナー免疫系の枯渇状態による特定の失敗を含む様々な理由により失敗している。加えて、 $\alpha\beta$ T細胞（またはCAR改変、「CAR-T」細胞）の*in vivo*での拡大は、時に血液中へのサイトカインの大量の急速な放出を引き起こし、重度であり得るかまたは生命を脅かし得るCRSをもたらす。

【0064】

したがって、本明細書に記載される治療的免疫細胞組成物は、大多数の適応免疫細胞を含む細胞組成物に対して利点を提供する。本明細書に記載される治療的免疫細胞組成物はまた、対象から得た天然に存在する生物試料と比較して改変または変化している。治療的免疫細胞組成物、製造方法、および治療的使用を、以下に詳細に説明する。

【0065】

自然免疫細胞組成物を製造する方法

本明細書において、自然免疫細胞組成物を製造する方法を提供する。本明細書に提供される方法によって製造される組成物はしばしば、2つの活性化された自然免疫細胞集団：ナチュラルキラー（NK）細胞およびガンマ・デルタT細胞の混合物を含有する。

【0066】

本明細書に提供される方法によって得られる免疫細胞組成物は、天然（例えば、生体液および組織）における免疫細胞の組成物と比較して、自然免疫細胞であるNK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化されている。天然では、適応免疫細胞であるアルファ・ベータT細胞は、NK細胞およびガンマ・デルタT細胞よりかなり多量に見出される。一方、本明細書に提供される組成物では、アルファ・ベータT細胞は、存在しないかまたは無視できる量から少量で存在し、NK細胞およびガンマ・デルタT細胞が主な免疫細胞構成要素である。

【0067】

例えば、ヒト末梢血では、健康なヒトドナーの末梢血において、（i）年齢40歳未満の個体の場合、PBMC中のNK細胞のパーセンテージの中央値は5%であり、T細胞（CD8+およびCD4+集団を合わせたもの、ガンマ・デルタT細胞が典型的にはCD8-CD4-であることから、これはアルファ・ベータT細胞を表す）のパーセンテージの中央値は53%であり；ならびに（ii）年齢40歳より高い個体に関しては、PBMC中のNK細胞のパーセンテージの中央値は10%であり、T細胞（CD8+およびCD4+集団を合わせたもの）のパーセンテージの中央値は37%（Lepone et al., J. Circ. Biomark., 5(5):1-17 (2016)）であることが認められている。このように、末梢血において、年齢40歳より高い個体では、循環中のNK細胞1個毎におおよそ4個の循環中のアルファ・ベータT細胞が存在し、年齢40歳未満の個体では、循環中のNK細胞1個毎におおよそ10個のアルファ・ベータT細胞が存在する。したがって、循環血液中のNK細胞のアルファ・ベータT細胞に対する比は、約1:4から約1:10の範囲である。一方、本明細書に提供される組成物では、NK細胞は組成物の20%またはそれより多く、最大99%を構成するが、アルファ・ベータT細胞は、実際には存在せず、組成物の2%未満を構成し、一般的には組成物のほぼ0%または0.5%未満、0.4%未満、0.3%未満、0.2%未満、または0.1%未満を構成する。このように、本明細書に提供される組成物において、NK細胞のアルファ・ベータT細胞に対する比は、少なくとも10:1であり、一般的には10:1よりかなり高く、例えば約15:1もしくはそれより高く、約20:1もしくはそれより高く、約25:1もしくはそれより高く、約30:1もしくはそれより高く、約35:1もしくはそれより高く、約40:1もしくはそれより高く、約45:1もしくはそれより高く、約50:1もしくはそれより高く、約55:1もしくはそれより高く、約60:1もしくはそれより高く、約65:1もしくはそれより高く、約70:1もしくはそれより高く、約75:1もしくはそれより高く、約

10

20

30

40

50

80 : 1もしくはそれより高く、約85 : 1もしくはそれより高く、約90 : 1もしくはそれより高く、約95 : 1もしくはそれより高く、約100 : 1もしくはそれより高く、約150 : 1もしくはそれより高く、約200 : 1もしくはそれより高く、約250 : 1もしくはそれより高く、約300 : 1もしくはそれより高く、約350 : 1もしくはそれより高く、約400 : 1もしくはそれより高く、約450 : 1もしくはそれより高く、約500 : 1もしくはそれより高く、約550 : 1もしくはそれより高く、約600 : 1もしくはそれより高く、約650 : 1もしくはそれより高く、約700 : 1もしくはそれより高く、約750 : 1もしくはそれより高く、約800 : 1もしくはそれより高く、約850 : 1もしくはそれより高く、約900 : 1もしくはそれより高く、約950 : 1もしくはそれより高く、または約1000 : 1もしくはそれより高い。このように、アルファ・ベータT細胞は、天然ではNK細胞と比較して多量に存在するが、本明細書に提供される組成物では、NK細胞集団はアルファ・ベータT細胞集団と比較して大きく増加している。

【0068】

例えば末梢血中のガンマ・デルタT細胞に関して、T細胞の約10%未満、一般的にはT細胞の約5%がガンマ・デルタT細胞であるが、残りはアルファ・ベータT細胞である(Esin et al., Scand. J. Immunol., 43(5):593-596 (1996); Radestad et al., J. Immunol. Res., Article ID 578741 (2014))。したがって、循環血中のガンマ・デルタT細胞のアルファ・ベータT細胞に対する比は、約1 : 10から約1 : 20の範囲である。一方、本明細書に提供される組成物では、ガンマ・デルタT細胞は、組成物の1%またはそれより多くを構成し、一般的には組成物の2%またはそれより多くから最大70~75%の間を構成するが、アルファ・ベータT細胞は実際には存在せず、組成物の2%未満を構成し、一般的には組成物のほぼ0%または0.5%未満、0.4%未満、0.3%未満、0.2%未満、もしくは0.1%未満を構成する。このように、本明細書に提供される組成物では、ガンマ・デルタT細胞が1%で存在し、アルファ・ベータT細胞が2%で存在する組成物を仮定しても、ガンマ・デルタT細胞のアルファ・ベータT細胞に対する比は少なくとも0.5 : 1である。一般的に、本明細書に提供される組成物中のガンマ・デルタT細胞のアルファ・ベータT細胞に対する比はかなり高く、例えば約5 : 1もしくはそれより高く、約10 : 1もしくはそれより高く、約15 : 1もしくはそれより高く、約20 : 1もしくはそれより高く、約25 : 1もしくはそれより高く、約30 : 1もしくはそれより高く、約35 : 1もしくはそれより高く、約40 : 1もしくはそれより高く、約45 : 1もしくはそれより高く、約50 : 1もしくはそれより高く、約55 : 1もしくはそれより高く、約60 : 1もしくはそれより高く、約65 : 1もしくはそれより高く、約70 : 1もしくはそれより高く、約75 : 1もしくはそれより高く、約80 : 1もしくはそれより高く、約85 : 1もしくはそれより高く、約90 : 1もしくはそれより高く、約95 : 1もしくはそれより高く、約100 : 1もしくはそれより高く、約150 : 1もしくはそれより高く、約200 : 1もしくはそれより高く、約250 : 1もしくはそれより高く、約300 : 1もしくはそれより高く、約350 : 1もしくはそれより高く、約400 : 1もしくはそれより高く、約450 : 1もしくはそれより高く、約500 : 1もしくはそれより高く、約550 : 1もしくはそれより高く、約600 : 1もしくはそれより高く、約650 : 1もしくはそれより高く、約700 : 1もしくはそれより高く、または約750 : 1もしくはそれより高い、またはそれより高い。

【0069】

本明細書において使用される用語「富化された」は、本明細書に提供される組成物中の以下の2つの比：(i) ガンマ・デルタT細胞のアルファ・ベータT細胞に対する比、および(ii) NK細胞のアルファ・ベータT細胞に対する比が、天然における、例えば末梢血などの生物試料中のこれらの比より高いことを意味する。一般的に本明細書で 사용되는場合、「富化された」は、本明細書に提供される組成物中のガンマ・デルタT細胞のアルファ・ベータT細胞に対する比が、生物試料、例えば組織、臍帯血、または末梢血中の比と比較して、少なくとも5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、

10

20

30

40

50

40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、85倍、90倍、95倍、100倍、150倍、200倍、250倍、300倍、350倍、400倍、450倍、500倍、550倍、600倍、650倍、700倍、または750倍、またはそれより大きく増加していることを意味する。NK細胞の場合、一般的に本明細書で使用される場合、「富化された」は、本明細書に提供される組成物中のNK細胞のアルファ・ベータT細胞に対する比が、生物試料、例えば組織、臍帯血、または末梢血中の比と比較して、少なくとも40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、85倍、90倍、95倍、100倍、150倍、200倍、250倍、300倍、350倍、400倍、450倍、500倍、550倍、600倍、650倍、700倍、750倍、800倍、850倍、900倍、950倍、または1000倍、またはそれより大きく増加していることを意味する。ある特定の態様では、用語「富化された」は、本明細書に提供される組成物が、1より大きいNK細胞のアルファ・ベータT細胞に対する比、およびガンマ・デルタT細胞のアルファ・ベータT細胞に対する比を有することを意味する（この比は、一般的に天然では1未満である）。

【0070】

末梢血において、適応免疫細胞であるB細胞およびアルファ・ベータT細胞は、リンパ球の大多数を構成する。一方、本明細書に提供される方法によって製造される組成物は、自然免疫細胞、すなわちNK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化されている。用語アルファ・ベータT細胞および $\alpha\beta$ T細胞は、本明細書において互換的に使用され、適応免疫T細胞を指すが、用語ガンマ・デルタT細胞および $\gamma\delta$ T細胞は、本明細書において互換的に使用され、自然免疫T細胞を指す。

【0071】

自然免疫細胞で構成される免疫療法の組成物は、多様な理由から適応免疫細胞を含有する組成物と比較して有利である。自然免疫応答は、非特異的であり、感染後数分から数時間以内に目的の標的（例えば、がんまたは感染性疾患）に対して開始される。自然免疫細胞は、*ex vivo*で拡大させることができる。本明細書に提供される方法では、拡大条件は、拡大後60日間もの間疲弊しないNK細胞およびガンマ・デルタT細胞の組成物をもたらすことができ、これは長期間の保存（在庫保存および必要な場合再投与に適している）を可能にし、複数回投与を費用効果的に投与することを可能にする。一方、適応免疫細胞は、*in vivo*で標的抗原に結合すると、抗原特異的免疫応答を開始し、拡大するが、これは数日をまたは数週間をも要し得る。さらに、自然免疫とは異なり、適応免疫応答は、HLA抗原に依存することから、GvHD（移植片対宿主病）を最小限または回避するためには、細胞が自己であるかまたはレシピエント患者／対象に「マッチ」する必要がある。本明細書に提供される方法によって作製された組成物中の自然免疫細胞、例えばNK細胞およびガンマ・デルタ（ $\gamma\delta$ ）T細胞を含有する組成物は、殺滅を媒介するためにHLA抗原認識を必要とせず、したがって、より広範囲のオフザシェルフ（同種異系）の状況でGvHDを回避しつつ使用することができる。適応免疫細胞はまた、*in vivo*で拡大させると大量のサイトカインを産生し得て、サイトカイン放出症候群（CRS）をもたらし得るが、自然免疫細胞は*ex vivo*で拡大させることができ、それによってCRSを最小限にするかまたは回避する。

【0072】

本明細書に提供される方法では、細胞、例えば末梢血または臍帯血を含有する試料は対象から得られる。対象は一般的に、健康なドナーであるが、本明細書に提供される方法によって作製された免疫療法組成物による処置を必要とする患者でもあり得る。ある特定の態様では、試料が末梢血である場合、末梢血のユニバーサルドナーバンクを、試料の供給源として使用することができる。試料は時に、活性化条件に供され、これは試料を、（a）細胞接着ポリペプチドに免疫特異的に結合する少なくとも1種の外因性ポリペプチド、および（b）細胞接着ポリペプチドとは異なるポリペプチドに免疫特異的に結合し、試料集団の1種または複数種の細胞の表面上に発現される少なくとも1種の外因性ポリペプチドに接触させることを含む。細胞接着ポリペプチドの例には、CD2（例えば、Gen B

ank 受託番号 K J 9 0 5 1 6 1 . 1 ; K J 8 9 6 5 5 8 . 1 を参照されたい) 、 L F A - 1 (例えば、GenBank 受託番号 B C 0 0 5 8 6 1 . 2 を参照されたい) 、 L F A - 3 (例えば、GenBank 受託番号 B C 0 0 5 9 3 0 . 1 を参照されたい) 、 C D 8 (例えば、C D 8 A に関しては GenBank 受託番号 A H 0 0 3 2 1 5 . 2 ; A Y 0 3 9 6 6 4 . 1 を参照されたい ; 例えば、C D 8 B に関しては GenBank 受託番号 K J 8 9 6 5 6 2 . 1 ; B C 1 0 0 9 1 1 . 1 ; B C 1 0 0 9 1 2 . 2 ; B C 1 0 0 9 1 3 . 1 ; B C 1 0 0 9 1 4 . 1 を参照されたい) 、および C D 4 (例えば、GenBank 受託番号 M 3 5 1 6 0 . 1 ; D Q 8 9 2 0 5 2 . 2 を参照されたい) が挙げられるがこれらに限定されない。試料集団の 1 種または複数種の細胞、例えば NK 細胞および／またはガンマ・デルタ細胞の表面上に発現されるポリペプチドの例には、C D 2 (例えば、GenBank 受託番号 K J 9 0 5 1 6 1 . 1 ; K J 8 9 6 5 5 8 . 1 を参照されたい) 、C D 3 (例えば、C D 3 γ に関しては GenBank 受託番号 A B 5 8 3 1 6 2 . 1 を参照されたい ; 例えば、C D 3 ϵ に関しては GenBank 受託番号 A B 5 8 3 1 3 9 . 1 を参照されたい ; 例えば、C D 3 δ に関しては GenBank 受託番号 A H 0 0 2 6 1 2 . 2 を参照されたい) 、C D 5 6 (例えば、GenBank 受託番号 U 6 3 0 4 1 . 1 ; B C 0 4 7 2 4 4 . 1 ; B C 0 2 9 1 1 9 . 1 を参照されたい) 、N K p 3 0 (例えば、GenBank 受託番号 A B 0 5 5 8 8 1 . 1 を参照されたい) 、N K p 4 4 (例えば、GenBank 受託番号 B C 1 6 6 6 4 7 . 1 を参照されたい) 、N K p 4 6 (例えば、GenBank 受託番号 B C 0 6 4 8 0 6 . 1 ; A Y 3 4 6 3 7 3 . 1 を参照されたい) 、N K G 2 A (例えば、GenBank 受託番号 A F 4 6 1 8 1 2 . 1 ; B C 0 5 3 8 4 0 . 1 を参照されたい) 、P D - 1 (例えば、GenBank 受託番号 L 2 7 4 4 0 . 1 を参照されたい) 、N K G 2 C (例えば、GenBank 受託番号 B C 0 9 3 6 4 4 . 1 ; B C 1 1 2 0 3 9 . 1 を参照されたい) 、N K G 2 D (例えば、GenBank 受託番号 A F 4 6 1 8 1 1 . 1 ; B C 0 3 9 8 3 6 . 1 を参照されたい) 、K A R 受容体、K I R 受容体、S I G L E C - 7 (例えば、GenBank 受託番号 A F 1 9 3 4 4 1 . 1 ; A F 1 7 0 4 8 5 . 1 を参照されたい) 、K I R 3 D S 1 (例えば、GenBank 受託番号 E U 1 5 6 1 7 5 . 1 を参照されたい) 、K I R 2 D L 1 (例えば、GenBank 受託番号 L T 9 8 4 7 9 0 . 1 ; L T 9 8 4 7 9 1 . 1 ; 抗体 : 1 1 P B 6 を参照されたい) 、D N A M 1 (例えば、GenBank 受託番号 B C 0 7 4 7 8 7 . 2 ; U 5 6 1 0 2 . 1 を参照されたい) 、N T B A (例えば、GenBank 受託番号 B C 1 1 4 4 9 5 . 1 ; B C 1 1 3 8 9 3 . 1 を参照されたい) 、H L A - D R (例えば、 α に関しては GenBank 受託番号 A H 0 0 1 5 0 6 . 2 ; β に関しては A H 0 0 2 8 2 4 . 2 を参照されたい) 等が挙げられるがこれらに限定されない。細胞の活性化は、一般的に本明細書に提供される組成物の細胞において自然免疫応答を開始し、これを使用してそのような疾患の処置を必要とする対象における疾患、例えばがんまたは感染性疾患を標的とすることができる。

【0073】

ポリペプチドは、それが代替のエピトープと比較してそのエピトープに対してより頻繁に、より迅速に、より長い期間および／またはより高い親和性で反応または会合する場合、別の分子の領域(すなわちエピトープ)に免疫特異的に結合する。例えば、第 1 のエピトープに免疫特異的に結合するポリペプチド(例えば、抗体またはその抗原結合性断片)は、第 2 のエピトープまたは他のエピトープにそれが結合するより高い親和性、アビディティで、より容易に、および／またはより長い期間、この第 1 のエピトープに結合する抗体である。第 1 の標的に免疫特異的に結合するポリペプチドは、第 2 の標的に特異的または優先的に結合してもしなくてもよく、免疫特異的結合は必ずしも排他的結合ではない。

【0074】

本明細書に提供される方法のある特定の態様では、活性化条件は、試料を、少なくとも 2 種の外因性ポリペプチドに接触させることを含む。一部の態様では、第 1 の外因性ポリペプチドは、C D 2 に免疫特異的に結合し、第 2 の外因性ポリペプチドは、N K p 4 6 に免疫特異的に結合する。一部の態様では、活性化条件は、C D 2 に免疫特異的に結合する

第1の外因性ポリペプチド、およびNKp46に免疫特異的に結合する第2の外因性ポリペプチドからなるか、またはそれから本質的になる。語句「から本質的になる」は、本明細書で使用される場合、列挙した構成要素以外の構成要素が存在しても、列挙した構成要素の活性を実質的に変化させないことを意味する。このように、例えば上記の活性化条件の文脈において、活性化条件は、CD2に免疫特異的に結合する第1の外因性ポリペプチド以外、およびNKp46に免疫特異的に結合する第2の外因性ポリペプチド以外の、第1の外因性ポリペプチドおよび第2の外因性ポリペプチドの活性を実質的に変化させない1種または複数種の構成要素を含んでもよい。ある特定の態様では、第1の外因性ポリペプチドおよび／または第2の外因性ポリペプチドは、抗体またはその抗原結合性断片である。

【0075】

また、試料はしばしば、試料を少なくとも1種の補助的ポリペプチドに接触させ、それによってNK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された細胞の集団を含む組成物を生成することを含む拡大条件に供される。本明細書に提供される方法のある特定の態様では、拡大条件は、サイトカインである少なくとも1種の補助的ポリペプチドおよび／またはガンマ・デルタT細胞上の受容体に免疫特異的に結合するポリペプチドを含む。ある特定の態様では、サイトカインは、インターロイキン、例えばIL-1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15、IL-21、またはその任意の組合せである。本明細書に提供される方法の一部の態様では、サイトカインは、IL-2、IL-15、またはその組合せである。複数の態様では、拡大条件は、IL-2、IL-15、およびガンマ・デルタT細胞上の受容体に免疫特異的に結合するポリペプチドを含む、それからなる、またはそれから本質的になる。ある特定の態様では、ガンマ・デルタT細胞上の受容体はCD3である。一部の態様では、ガンマ・デルタT細胞上のCD3受容体に免疫特異的に結合するポリペプチドは、抗体またはその抗原結合性断片であり、ある特定の態様では、抗体はOKT3である。ある特定の態様では、拡大条件は、試料を、(a) IL-2ポリペプチド；(b) IL-15ポリペプチド；(c) IL-2ポリペプチドおよびIL-15ポリペプチド；(d) IL-2ポリペプチドおよびCD3に免疫特異的に結合する抗体；または(e) IL-2ポリペプチド、IL-15ポリペプチド、およびCD3に免疫特異的に結合する抗体に接触させることを含む、それからなる、またはそれから本質的になる。一部の態様では、CD3に免疫特異的に結合する抗体は、OKT3である。

【0076】

一部の態様では、活性化条件は、試料を、CD2に免疫特異的に結合する第1の外因性ポリペプチドおよびNKp46に免疫特異的に結合する第2の外因性ポリペプチドに接触させることからなるか、またはそれから本質的になり、拡大条件は、試料を、(a) IL-2ポリペプチド；(b) IL-15ポリペプチド；(c) IL-2ポリペプチドおよびIL-15ポリペプチド；(d) IL-2ポリペプチドおよびCD3に免疫特異的に結合する抗体；または(e) IL-2ポリペプチド、IL-15ポリペプチド、およびCD3に免疫特異的に結合する抗体に接触させることからなるか、またはそれから本質的になる。一部の態様では、CD3に免疫特異的に結合する抗体はOKT3である。

【0077】

ある特定の態様では、組成物を製造するための本明細書に提供される方法には、活性化および拡大前に、試料からアルファ・ベータT細胞を枯渇させ、それによって枯渇された細胞集団を生成し、次にそれらに活性化および拡大を行うことが含まれる。例えば、アルファ・ベータT細胞は、アルファ・ベータT細胞受容体、例えばアルファ・ベータTCRに免疫特異的に結合する抗体を使用して試料から枯渇させることができる。用語「枯渇された」は、本明細書で使用される場合、枯渇される構成要素（例えば、アルファ・ベータT細胞）の実質的に全てが試料から除去されている、例えば枯渇される構成要素の少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、またはそれより多く、最大約100%が試料から除去されていることを意味する。一般的に、用

10

20

30

40

50

語「枯渇細胞集団」は、本明細書で使用される場合、試料からアルファ・ベータT細胞を枯渇させた後の試料に由来する細胞の集団を指す。ある特定の態様では、試料は、例えばB細胞受容体に免疫特異的に結合するポリペプチド、例えばCD19を使用してB細胞をさらに枯渇させる。

【0078】

例えば、試料が末梢血試料である場合、試料を、密度勾配遠心分離によって処理し、白血球細胞、血小板、顆粒球等を含有するバフィーコートを分離および／または単離することができ、次にこれを本明細書に提供される方法に従ってアルファ・ベータT細胞枯渇に供することができる。ある特定の態様では、さらにバフィーコートにFicoll密度勾配分離を行って単核細胞(PBMC)を得ることができ、次にこれを本明細書に提供される方法におけるアルファ・ベータT細胞枯渇に供することができる。一部の態様では、末梢血試料にアフエーシスを行って、血漿を細胞から分離することができ(例えば、Terumo Optia機器を使用して)、ある特定の態様では、次に細胞を、本明細書に提供される方法におけるアルファ・ベータT細胞枯渇に供する。アルファ・ベータT細胞枯渇は、当業者に公知の方法によって実施することができる。ある特定の態様では、アルファ・ベータT細胞を、Miltenyi LSカラムを使用して枯渇させることができる。一部の態様では、アフエーシス産物に、Miltenyi Clinimacs分離デバイスを使用してアルファ・ベータT細胞枯渇を行うことができる。枯渇させた細胞集団を、必要な場合、または望ましい場合、凍結保存(例えば、セ氏マイナス70度、マイナス75度、マイナス80度、マイナス85度またはそれより低い温度)することができる、活性化および拡大するまで保存することができる。活性化および拡大のための培養条件の非制限的な例には、NK細胞およびガンマ・デルタ細胞を含有する細胞集団に関して本明細書の実施例の節に記載される活性化および拡大条件、または5%AB血清を補充したNK MACS(商標)培地(#130-107-879(Miltenyi Biotec, Inc., San Diego, CA, USA))または当技術分野で使用される他の培地(例えば、R&D Systems, CellGenix)が挙げられる。

【0079】

ある特定の態様では、細胞集団は、本明細書に記載される活性化および拡大条件の前に、NK細胞について正に選択する条件にも、ガンマ・デルタT細胞について正に選択する条件にも曝露されない。

【0080】

本明細書に提供される方法のある特定の態様では、試料または枯渇細胞集団は、(a)の外因性ポリペプチド、(b)の外因性ポリペプチド、または(a)の外因性ポリペプチドおよび(b)の外因性ポリペプチドの両方が可溶性である活性化条件に供される。複数の態様では、(a)の可溶性の外因性ポリペプチド、(b)の可溶性の外因性ポリペプチド、または(a)および(b)の両方の可溶性の外因性ポリペプチドは、抗体またはその抗原結合性断片である。本明細書において構成要素、例えばポリペプチドに関連して使用される用語「可溶性」は、構成要素が固相や支持体に結合せず、培養条件(例えば、活性化条件、拡大条件)において均一な単一相または乳液の状態であることを意味する。一部の態様では、(a)または(b)の外因性ポリペプチド、例えば抗体は、固相または支持体に結合する。固相支持体の例には、シリカ、ガラス(例えば、ガラス、孔制御ガラス(CPG))、ナイロン、Wang resin、Merrifield resin、Sephadex、Sephacrose、セルロース、磁気ビーズ、Dynabeads、金属表面(例えば、スチール、金、銀、アルミニウム、シリコン、および銅)、プラスチック材料(例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアミド、ポリエステル、ポリフッ化ビニリデン(PVDF))が挙げられるがこれらに限定されない。固相支持体は、ビーズ、チップ、キャピラリー、プレート、膜、ウェーハ、コーム、ピン、実質的に平坦な表面、ピットまたはナノリットルウェルのアレイ、ならびに当業者に公知の他の幾何模様および形状を含むがこれらに限定されない任意の所望の形態であり得る。固相支持体に結合したポリペプチドではなく可溶性の外因性ポリペプチドを使用することは、方法のスケー

ラビリティを増加させながら（例えば、GMP製造のための）立体障害を軽減することができる。ある特定の態様では、第1の外因性ポリペプチドは可溶性抗CD2抗体であり、第2のポリペプチドは可溶性抗NKp46抗体である。ある特定の態様では、抗CD2抗体または抗NKp46抗体のいずれかは固相支持体に結合している。

【0081】

抗体、例えばポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は、標準的な方法を使用して調製することができる（例えば、Kohler et al., Nature 256:495-497 (1975); Kohler et al., Eur. J. Immunol. 6:511-519 (1976); およびWO 02/46455を参照されたい）。例えば、ポリクローナル抗体を生成するために、宿主動物において目的の抗原に対する免疫応答を誘発する。次に宿主動物から血液を収集し、分泌された抗体を含有する血清画分を、当業者に公知の方法を使用して細胞画分から分離する。モノクローナル抗体を生成するために、動物を標準的な方法によって免疫し、抗体分泌体細胞を産生する。次に、これらの細胞を、免疫した動物から取り出して骨髓腫細胞と融合させる。抗体を産生することができる体細胞、特にB細胞を、骨髓腫細胞株と融合させるために使用することができる。これらの体細胞は、プライミングした動物のリンパ節、脾臓、および末梢血に由来し得る。ハイブリドーマ産生融合技法において使用するための特殊な骨髓腫細胞株が、リンパ性腫瘍から作製されている（Kohler and Milstein, Eur. J. Immunol. 6:511-519 (1976); Shulman et al., Nature, 276:269-282 (1978); Volk et al., J. Virol., 42:220-227 (1982)）。これらの細胞株は3つの有用な特性を有する。第1は、ハイブリドーマの成長を支持する選択培地中で成長できないようにする酵素欠損を有することによって、非融合の同様に無限に自己繁殖する骨髓腫細胞からの融合ハイブリドーマの選択をそれらが容易にすることである。第2は、それらが抗体産生能を有し、内因性の軽鎖や重鎖免疫グロブリンを産生できないことである。第3の特性は、それらが他の細胞と効率的に融合することである。ハイブリドーマおよびモノクローナル抗体を産生する他の方法は、当業者に周知である。任意のポリペプチド、例えば免疫細胞集団上の抗原性マーカーに対する抗体を産生することは慣例的である。

【0082】

本明細書に提供される方法のある特定の態様では、活性化条件、拡大条件、または活性化条件および拡大条件の両方は、フィーダー細胞フリーである。用語「フリー」は、本明細書において使用される場合（例えば、フィーダー細胞を含まないまたはフィーダー細胞フリー、血清フリー、非ヒト動物からの血清を含まない、疲弊した細胞を含まない）は、条件が、構成要素（すなわち、フィーダー細胞、血清、疲弊した細胞、または本明細書において言及される他の構成要素）を実質的に含まない、すなわち少なくとも80%、85%、90%、95%、一般的に95%またはそれより多く、例えば、96%、97%、98%、99%、またはそれより多く、最大で100%含まないことを意味する。本明細書に提供される方法のある特定の態様では、試料、活性化条件、拡大条件、または活性化および拡大条件、または前述の全ては、外因性の細胞を含まない、外因性のフィーダー細胞を含まない、放射線照射細胞を含まない、および／または放射線照射フィーダー細胞を含まない。外因性の細胞および外因性のフィーダー細胞は一般的に、試料細胞が得られ、活性化および／または拡大条件に供される対象または対象の部分と比較して、異なる対象に由来する細胞であるか、または対象の異なる部分に由来する細胞である。非制限的な例では、(i) 試料細胞は第1の種の対象に由来し、外因性細胞は第2の種の対象に由来する（例えば、試料細胞はヒトに由来し、外因性細胞は非ヒト動物、例えば齧歯類またはサルに由来する）、および(ii) 試料細胞はヒト対象の末梢血に由来し、外因性細胞は同じ対象の異なる部分に由来する（例えば、同じ対象の臍帯血もしくは臓器に由来するか、または異なるヒト対象に由来する）。組成物は一般的に、試料が以下：活性化および／または拡大前の処理、活性化、ならびに拡大の1つまたは全ての間にある特定の構成要素に接触していない場合、その構成要素を「含まない」。

【0083】

K562細胞などのフィーダー細胞に依存することは、細胞を培養する場所および方法

を制限し得、細胞を培養する費用を有意に増加させ得る。フィーダー細胞の使用はまた、フィーダー細胞に由来する定義されない生物学的因子によって引き起こされる細胞培養のばらつきのために問題となり得る。加えて、フィーダー細胞は、望まれない作用物質 (agent) (例えば、レトロウイルス、他の病原体、および免疫原性の非ヒトシアル酸、例えば Neu5Gc) を、本明細書に提供される方法によって作製される組成物に導入する可能性を有し、このことは、例えば移植などのある特定の応用にとって不都合であり得る。理論に拘束されたくないが、本明細書に提供される方法では、細胞接着ポリペプチドに免疫特異的に結合する外因性ポリペプチドが、「内因性のフィーダー細胞様の層」を生成することができ、それによって外因性のフィーダー細胞を必要とすることなく、有意に活性化して拡大した細胞集団を生成することができる。

【0084】

本明細書に提供される方法のある特定の態様では、拡大条件における補助的ポリペプチド (複数可) および／または拡大時間の選択は、NK細胞およびガンマ・デルタT細胞の所望の相対量に合わせて調整することができる。例えば、相対的により多くのNK細胞および相対的により少ないガンマ・デルタT細胞を含有する組成物は、一般的に固形腫瘍に対してより大きい適用性を有するが、相対的により多くのガンマ・デルタT細胞および相対的により少ないNK細胞を含有する組成物は一般的に、血液悪性疾患に対してより大きい適用性を有する。補助的ポリペプチド (複数可) を選択することができ、ならびに／または拡大反応は、NK細胞およびガンマ・デルタT細胞の所望の比率を有する組成物を得ることを容易にする時間、実施することができる。NK細胞のガンマ・デルタT細胞に対する所望の比率は、特定の拡大条件の選択によって得ることができ、組合せの非制限的な例は、以下の通りである：(i) 補助的ポリペプチドがIL-2である場合、得られたNK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された細胞の集団はしばしば、約25～30%のNK細胞および約70～75%のガンマ・デルタT細胞を含有し；(ii) 補助的ポリペプチドがIL-15である場合、得られたNK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された細胞の集団はしばしば、約80～99%のNK細胞および約1～20%のガンマ・デルタT細胞を含有し；(iii) 補助的ポリペプチドがIL-2およびCD3に免疫特異的に結合する抗体、例えばOKT3である場合、得られたNK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された細胞の集団はしばしば、約40～45%のNK細胞および約55～60%のガンマ・デルタT細胞を含有し；(iv) 補助的ポリペプチドが拡大条件の20日目までIL-2であり、その後30日目までIL-15に切り替えた場合、IL-2単独による処置と比較してガンマ・デルタT細胞のパーセンテージはしばしば約50%から約70%へと増加し、これに対応してNK細胞のパーセンテージは減少し；ならびに(v) 補助的ポリペプチドが拡大条件の20日目までIL-15であり、その後30日目までIL-2に切り替えた場合、IL-15単独による処置と比較して、NK細胞のパーセンテージはしばしば約80%から約90%へと増加し、これに対応してガンマ・デルタT細胞のパーセンテージは減少する。

【0085】

拡大条件の期間 (例えば、12日間と25日間の比較) もまた、本明細書に提供される方法によって作製された組成物中のNK細胞およびガンマ・デルタT細胞の相対量を制御することができる。例えば、拡大条件下でのフィーダー細胞フリー培地中の試料または枯渇細胞集団のインキュベーションの長さは、約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、25日間、30日間、35日間、40日間、45日間、50日間、55日間、もしくは60日間もしくはそれより多くの日数、または約2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、もしくは10週間であり得る。本明細書に提供される方法のある特定の態様では、組成物は、疲弊した細胞を含まず、一部の態様では、組成物は、拡大条件の少なくとも60日後、疲弊した細胞を含まない。疲弊した細胞を実質的に含まない細胞組成物を調製することは、拡大した細胞傷害性細胞組成物の ex vivoでの利用能の増加により、多くの現行の免疫療法 (例えば、アルフ

10

20

30

40

50

ァ．ベータＴ細胞を使用するＣＡＲ－Ｔ）のわずかな費用での即時の処置および複数回投与を可能にする。

【００８６】

本明細書に提供される方法のある特定の態様では、活性化、または拡大、または活性化および拡大条件は、ビスホスホネートを含まず、Ⅴ．デルタ．１およびⅤ．デルタ．２ガンマ．デルタＴ細胞のポリクローナル集団をもたらす。ビスホスホネート、例えばゾレドロネートおよびパミドロネートの使用は、他の集団よりガンマ．デルタＴ細胞の１つのクローン性集団にとって好都合であり得るが、これはある特定の腫瘍および感染症に対する組成物のレパトリを制限し得る。一部の態様では、本明細書に提供される方法にビスホスホネートが存在しないことにより、ガンマ．デルタＴ細胞に関してポリクローナルである組成物が生成され、それによってそれらを免疫療法として投与することができるがんおよび感染性疾患の範囲を増加させる。

【００８７】

本明細書に提供される方法を行うためのステップの概要の非制限的な例は以下の通りである：

（１）ドナーからの試料（例えば、ドナーから直接のまたは血液バンクからの末梢血）を必要に応じて融解し、培養する；（２）望ましい場合、培養物をアルファ．ベータＴ細胞枯渇、必要に応じてＢ細胞枯渇に供する；（３）試料または枯渇後に残っている細胞（枯渇細胞集団）を、活性化条件に３～４日間供し、活性化細胞を生成する；（４）望ましい場合、活性化細胞に、例えばレトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターを使用して外因性ポリヌクレオチドを形質導入する；（５）（３）における活性化後または（４）における形質導入後、細胞を、７日サイクルの拡大条件に供し、サイクル間で洗浄し、一般的に２～３サイクル行い、それによって拡大した細胞を生成し、これを時に直ちに使用するか、またはあるときには冷蔵する、氷中で維持するか、または免疫療法のために必要となるまで輸送および／または保存のために凍結保存する。ＮＫ細胞およびガンマ．デルタＴ細胞の比率は、望ましい場合、７日間サイクルの間の補助的ポリペプチドの切り替えを含む、拡大の間に使用する補助的ポリペプチド（複数可）の選択によって、および拡大時間を制御することによって、調整することができる。

【００８８】

ある特定の態様では、活性化および拡大条件に曝露される試料細胞集団に起因する組成物は、以下の特徴：

（ｉ）１より大きい（例えば、約１．５もしくはそれより大きい、２もしくはそれより大きい、３もしくはそれより大きい、４もしくはそれより大きい、または５もしくはそれより大きい比；約１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２．０、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、３．０、３．２、３．４、３．６、３．８、４．０、４．２、４．４、４．６、４．８、５．０、５．５、６．０、６．５、７．０、７．５、８．０、８．５、９．０、９．５、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、または１００、またはそれより大きい比）ＮＫ細胞のガンマ．デルタＴ細胞に対する比；または

（ｉｉ）１未満（例えば、約０．８またはそれ未満、０．７またはそれ未満、０．６またはそれ未満、０．５またはそれ未満、０．１またはそれ未満、０．０５またはそれ未満、０．０１またはそれ未満の比；約０．９、０．８、０．７、０．６、０．５、０．４、０．３、０．２、０．１、０．０９、０．０８、０．０７、０．０６、０．０５、０．０４、０．０３、０．０２、０．０１、０．００９、０．００８、０．００７、０．００６、０．００５、０．００４、０．００３、０．００２、０．００１またはそれ未満の比）のＮＫ細胞のガンマ．デルタＴ細胞に対する比；

を有し、必要に応じて以下の特徴：

（ｉｉｉ）２より大きい、３より大きい、４より大きい、５より大きい、６より大きい、７より大きい、８より大きい、９より大きい、１０より大きい、２０より大きい、３０よ

り大きい、40より大きい、50より大きい、60より大きい、70より大きい、80より大きい、90より大きい、100より大きい、200より大きい、300より大きい、400より大きい、500より大きい、600より大きい、700より大きい、800より大きい、900より大きい、1000より大きい、またはそれより大きい、NK細胞のアルファ・ベータT細胞に対する比；

(iv) 2より大きい、3より大きい、4より大きい、5より大きい、6より大きい、7より大きい、8より大きい、9より大きい、10より大きい、20より大きい、30より大きい、40より大きい、50より大きい、60より大きい、70より大きい、80より大きい、90より大きい、100より大きい、200より大きい、300より大きい、400より大きい、500より大きい、600より大きい、700より大きい、800より大きい、900より大きい、1000より大きい、またはそれより大きい、ガンマ・デルタT細胞のアルファ・ベータT細胞に対する比；

(v) 20%またはそれより大きいNK細胞の総細胞に対するパーセンテージ；

(vi) 2%、3%、4%、5%、またはそれより大きい、ガンマ・デルタT細胞の総細胞に対するパーセンテージ；

(vii) ガンマ・デルタT細胞の約75%から約95%（例えば、ガンマ・デルタT細胞の約80%から約90%（例えば、約85%））がV・デルタ・1を発現すること；

(viii) ガンマ・デルタT細胞の約10%から約25%（例えば、約10%から約20%（例えば、ガンマ・デルタT細胞の約15%））がV・デルタ・2を発現すること；

(ix) ガンマ・デルタT細胞の約30%から約60%（ガンマ・デルタT細胞の約35%から約55%）がV・デルタ・1を発現すること；

(x) ガンマ・デルタT細胞の約35%から約60%（例えば、ガンマ・デルタT細胞の約40%から約50%または55%）がV・デルタ・2を発現すること；

(xi) ガンマ・デルタT細胞の約10%から約30%（例えば、ガンマ・デルタT細胞の約20%から約25%）がV・デルタ・1を発現すること；

(xii) ガンマ・デルタT細胞の約65%から約80%（例えば、約70%から約80%（例えば、ガンマ・デルタT細胞の約75%））がV・デルタ・2を発現すること；

(xiii) 総細胞の約80%またはそれより多く（例えば、細胞の約90%またはそれより多く）がKIR5を発現すること；

(xiv) 総細胞の約5%またはそれより多く（例えば、細胞の約10%またはそれより多く）がSINGLEC-7を発現すること；

(xv) 総細胞の約50%またはそれより多く（例えば、細胞の約60%またはそれより多く）がKIR3D51を発現すること；

(xvi) 総細胞の約5%またはそれより多く（例えば、細胞の約10%またはそれより多く）がKIR2DL1を発現すること；

(xvii) 総細胞の約20%またはそれより多く（例えば、細胞の約25%またはそれより多く）がNKp30、NKp44、またはNKp46を発現すること；

(xviii) 総細胞の約25%またはそれより多く（例えば、細胞の35%またはそれより多く）がNKG2Dを発現すること；

(xix) 総細胞の約80%またはそれより多く（例えば、細胞の約90%またはそれより多く）がDNAM1を発現すること；

(xx) 総細胞の約75%またはそれより多く（例えば、細胞の約85%またはそれより多く）がNTBAを発現すること；

(xxi) 総細胞の約85%またはそれより多く（例えば、細胞の約95%またはそれより多く）がCD2を発現すること；

(xxii) 総細胞の約80%から約100%（例えば、細胞の少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）がCD56を発現すること；

(xxiii) 総細胞の約51%から約100%（例えば、細胞の少なくとも約51%、

10

20

30

40

50

52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%)がCD57を発現しないこと；

(xxiv) 総細胞の約10%から約40% (例えば、細胞の少なくとも約11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、または40%)がCD16を発現すること；

(xxv) 総細胞の約10%またはそれ未満 (例えば、細胞の約5%またはそれ未満、4%またはそれ未満、3%またはそれ未満、2%またはそれ未満)がCD57を発現すること；

(xxvi) 総細胞の約50%またはそれより多く (例えば、細胞の約55%またはそれより多く)がKIR3DS1を発現すること；

(xxvii) 総細胞の約5%またはそれ未満 (例えば、約4%またはそれ未満、3%またはそれ未満、2%またはそれ未満、1%またはそれ未満、0.9%またはそれ未満、0.8%またはそれ未満、0.7%またはそれ未満、0.6%またはそれ未満、0.5%またはそれ未満、0.4%またはそれ未満、0.3%またはそれ未満、0.2%またはそれ未満、0.1%またはそれ未満)がNKT細胞であること；

(xxviii) 総細胞の約5%またはそれ未満 (例えば、約4%またはそれ未満、3%またはそれ未満、2%またはそれ未満、1%またはそれ未満、0.9%またはそれ未満、0.8%またはそれ未満、0.7%またはそれ未満、0.6%またはそれ未満、0.5%またはそれ未満、0.4%またはそれ未満、0.3%またはそれ未満、0.2%またはそれ未満、0.1%またはそれ未満)がアルファ・ベータT細胞であること；

(xxix) NK細胞および／またはガンマ・デルタ細胞の約50%またはそれより多く (例えば、NK細胞および／またはガンマ・デルタT細胞の約51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはその端数、最大100%)がCD8を発現すること；

(xxx) NK細胞および／またはガンマ・デルタT細胞の約5%またはそれ未満 (例えば、NK細胞および／またはガンマ・デルタT細胞の約4%もしくはそれ未満、約3%もしくはそれ未満、約2%もしくはそれ未満、または約1%もしくはそれ未満)がCD4を発現すること；

(xxxi) NK細胞および／またはガンマ・デルタT細胞の約5%またはそれ未満 (例えば、NK細胞および／またはガンマ・デルタT細胞の約4%もしくはそれ未満、約3%もしくはそれ未満、約2%もしくはそれ未満、または約1%もしくはそれ未満)がCD8およびCD4を発現すること；

(xxxii) NK細胞の約15%から約35% (例えば、NK細胞の16%、17%、18%、19%、20%、22%、24%、26%、28%、30%、32%、34%)がCD8およびCD4を発現しないこと；ならびに

(xxxiii) ガンマ・デルタT細胞の約55%から約85% (例えば、ガンマ・デルタT細胞の約56%、58%、60%、62%、63%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%)がCD8もCD4も発現しないこと

のうちの1つまたは複数を有する。

10

20

30

40

50

【0089】

自然免疫細胞組成物

本明細書に記載される製造方法によって調製されるある特定の組成物は、BINATE組成物と呼ばれる。BINATE組成物は、2つの自然細胞タイプ、すなわちNK細胞およびガンマ・デルタT細胞を含有し、これらの2つの細胞タイプの相対量は、その使用順序および拡大条件の期間を含む適した補助的ポリペプチドまたは複数のポリペプチドを選択することによって、固形腫瘍、血液のがん、または感染性疾患を処置するために調整することができる。

【0090】

一部の態様では、BINATE組成物は、フィーダー細胞を含有せず、しばしばこれらの組成物はフィーダー細胞を含まない（例えば、外因性のフィーダー細胞および／または放射線照射フィーダー細胞を含まない）。ある特定の態様では、活性化および拡大条件は、ビスホスホネートを含まず、それによってポリクローナルガンマ・デルタT細胞は、腫瘍および感染性疾患に対してより広いレパートリーの活性を有するようになる（すなわち、V・デルタ・1およびV・デルタ・2ガンマ・デルタT細胞に関してポリクローナル）。この自然免疫細胞プラットフォームは、本明細書において互換的にBINATE細胞、INNATE細胞、またはINNATE-K細胞と呼ばれ、包括的に腫瘍シグナルおよび受容体の両方に結合することができ、固形腫瘍、血液のがん、および感染症に関して容易に利用可能な汎用性が高い治療を提供する。自然免疫療法の安全性が改善されたことにより、コミュニティホスピタルでの使用が可能となり、医療費を低減させ、より多くの患者に有効な処置をもたらすことができる。

【0091】

ある特定の態様では、本明細書に提供されるBINATE細胞組成物をさらに処置して、目的の細胞集団について積極的に選択する、または望ましくない細胞集団を除去するマーカーを使用して、実質的に全てのNK細胞（本明細書において「INNATE-NK」と呼ばれる）または実質的に全てのガンマ・デルタT細胞を含有する組成物を生成することができる。

【0092】

本明細書に提供されるBINATE組成物は、固形腫瘍および血液の悪性疾患の両方を標的化するために、a) 移植後または他の状況／適応における非遺伝子改変細胞；b) 他の治療剤、例えばがんの処置のための市販の抗体と組み合わせて投与される非遺伝子改変細胞；またはc) 例えば内因性のポリヌクレオチドを変異させることによる、内因性のポリヌクレオチドを欠失させることによる、もしくは外因性の変異ポリヌクレオチド（野生型は非改変細胞にある）を付加することによる、もしくは異種性質の外因性ポリヌクレオチド、例えばCARポリヌクレオチド（BINATE-CAR）を付加することによる遺伝子改変細胞として開発することができる。CAR改変INNATE-K（BINATEと同じ）またはINNATE-NK集団は、本明細書において以下の用語のいずれかによって示される。

【0093】

一般的にCARによって改変された免疫細胞の場合、細胞は、ピリオドまたはハイフンの後に「CAR」接尾子が付いた、例えばINNATE-CAR、INNATE-K-CAR、INNATE-NK-CAR、およびBINATE-CARと呼ばれる；ならびに

【0094】

特定のCAR、例えばCD19を標的とするCARによって改変された免疫細胞の場合、細胞は、ピリオドまたはハイフンの後に「CD19」、「CAR19」、または「CAR-CD19」接尾子が付いた、例えばBINATE-CD19、BINATE-CAR19、またはBINATE-CAR-CD19と互換的に呼ばれる。

【0095】

本明細書に提供される製造方法は、集団における細胞の約30%から約40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくはそれより多くの

間、または集団における細胞の少なくとも約30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれより高い、最大100%の高レベルの活性化を有するB I N A T E細胞集団をもたらす。比較すると、*in vivo*で自然免疫応答を誘発すると、10%またはそれ未満の細胞が活性化される。

10

【0096】

これらの活性化された細胞は非常に細胞傷害性であり、有意な比率のCD56 + CD16 + 細胞（例えば、本明細書に提供される組成物中のNK細胞集団の約40%がCD56 + CD16 + であり得る）を有する。本明細書において使用される場合、細胞上の細胞マーカーの説明に関連する「+」記号、または用語「プラス」は、マーカーが細胞において（または細胞表面上に）発現されることを示しているが、細胞上の細胞マーカーの説明に関連して「-」記号、または用語「マイナス」は、マーカーが存在しないまたは検出されないことを示している。

【0097】

20

本明細書に提供される組成物のB I N A T E細胞の細胞傷害性は高いが、大多数の細胞のCD57マーカーレベルが低い（高いCD57マーカーレベルは、細胞傷害性（cytotoxicity）を示しているが、同様に細胞が老化により近いことも示しており、したがってより短い寿命を有する（Kared et al., Cancer Immunol. Immunotherap., 65(4):441-452 (2016)を参照されたい））ことからその成熟度は低い（すなわち、それらは老化からより離れている）。本明細書において使用される用語「大多数」は、集団における細胞の50%より多く、一般的に50.5%またはそれより多く、例えば51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはその端数、最大100%を意味する。本明細書に提供される製造方法によって作製されたB I N A T E細胞組成物はまた、低レベルの疲弊マーカー、例えばPD-1およびTIM-3を有する。本明細書に提供される製造方法に従って異なる拡大条件下で得られたB I N A T E組成物に関する活性化／細胞傷害性／疲弊マーカー表現型の非制限的な例を、以下に要約する。

30

40

50

【表 A】

	NK 細胞				TCRgd (ガンマデルタ T) 細胞			
	IL-2	IL-2+OKT3	IL-15		IL-2	IL-2+OKT3	IL-15	
拡大条件								
%NKまたはガンマデルタ細胞	27.25%	42.50%	98.75%		72.27%	56.61%	1.23%	
マーカー								
CD16	51.21	65.17	40.88		18.64	29.12	28.87	
KIRs	98.47	96.25	93.37		96.43	92.18	100	
NKG2A	98.43	94.09	99.04		94.81	97.06	93.81	
LIR-1	34.54	49.14	10.14		64.02	50.41	19.59	
CD57	54.99	41.96	2.46		69.14	46.23	35.05	
NKG2C	13.46	23.76	2.18		3.46	2.67	12.37	
p75 (間接 APC-Cy7) インヒビター								
SIGLEC-7	72.81	22.85	97.42		6.19	1.97	56.19	
KIR3DS1アクチベーター	57.03	68.08	69.11		62.4	65.4	69.3	
KIR3DL1 (直接 FITC) インヒビター	11.7	13.24	22.62		3.99	2.99	18.52	
KIR2DL1 (直接 APC) アクチベーター	38.11	47.73	10.14		27.41	37.1	15.79	
11PB6 (直接 V _α ob) KIR2DL1 インヒビター KIR2DS1アクチベーター	24.83	38.73	7.43		9.22	4.35	20.37	
CH-LEO (間接 APC-Cy7) KIR2DL2 KIR2DL3 KIR2DS2	37.94	57.38	35.25		23.96	60.13	25.44	
AZ20 (間接 PE) NKP30	83.62	78.52	99.9		10.37	7.6	54.17	
BAB281 (間接 PE) NKP46	84.45	77.7	99.86		12.96	11.72	19.48	
z231 (間接 PE) NKP44	67.01	60.14	99.58		19.74	6.25	78.35	
ECM217 (間接 APC-Cy7) NKG2D	34.42	48.67	62.13		40.26	54.08	86.46	
GN18 (間接 FITC) DNAM1	90.54	95.66	94.38		96.68	99.77	96.91	
ST39 (間接 FITC) D24	99.19	96.3	99.76		97.26	98.17	96.88	
ON56 (間接 APC-Cy7) NTBA	95.06	75.94	98.47		99.75	95.84	98.7	
EA4 (間接 FITC) LSF1	99.53	95.56	94.34		99.08	99.55	98.7	
TIGIT (間接 APC-Cy7)	26.71	28.21	18.96		19.26	25.07	15.31	
D1.12 (間接 FITC) HLA-DR	68.42	66.16	6.25		97.16	97.67	52.04	
TIM-3 (間接 APC)	0.37	0.31	0.14		0.58	0.61	5.1	
QA196 (間接 APC) CD2	99.82	99.72	98.53		99.08	100	100	
CD8 (間接 APC-Cy7)	58.16	68.02	91.17		45.98	74.48	97.94	

【0098】

ある特定の態様では、本明細書に提供される B I N A T E 組成物の細胞を遺伝子改変することができる。遺伝子改変のある特定の非制限的な例には、(i) 所望の活性を有するポリペプチドをコードする外因性ポリヌクレオチドを付加すること、(i i) 内因性ポリヌクレオチドを変化させるかもしくは付加する、または所望の活性を有する内因性ポリペプチドの発現を調節する外因性の調節性ポリヌクレオチド（例えば、プライマーまたはエンハンサー）を付加すること、(i i i) 所望の活性を有するポリペプチドをコードする内因性ポリヌクレオチドを変化させるおよび／または妨害すること（例えば、挿入変異誘発）、(i v) 所望の活性を有するポリペプチドの発現を調節する調節性ポリヌクレオチ

ドを部分的もしくは完全に欠失させて、それによってその調節を妨害すること、ならびに／または（v）所望の活性を有するポリペプチドをコードするコード配列を部分的もしくは完全に欠失させて、それによって活性を減弱または除去すること（例えば、ノックアウト変異誘発）が挙げられる。

【0099】

一部の態様では、BINATE組成物は、外因性（調節性またはコード配列）ポリヌクレオチドを付加することによって遺伝子改変される。BINATE組成物の高度に活性化された細胞を、高い効率で、しばしば集団における細胞の80%またはそれより高く、一般的には少なくとも約30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはその端数、最大100%を形質導入することができる。この形質導入率は、適応免疫細胞（例えば、アルファ・ベータT細胞では約9%）についてしばしば認められる率よりかなり高い。

【0100】

ある特定の態様では、外因性ポリヌクレオチドは、キメラ抗原受容体（CAR）をコードし、組成物中の細胞はCARを含む（「BINATE・CAR細胞」と呼ぶ）。一部の態様では、CARは、CD19、GD2、HER3、B7H3、CD123、またはCD30のうちの1つまたは複数に免疫特異的に結合する結合分子部分を含有する。

【0101】

本明細書に提供されるBINATE細胞およびBINATE・CAR細胞を使用して、多様ながんおよび感染性疾患（例えば、GD2／HER3／B7H3：肺／気管支、前立腺、乳房、結腸、膵臓、卵巣；CD123：白血病；CD30：非ホジキンリンパ腫；肝臓および肝臓内胆管がん、食道がん、膀胱がん、腎臓および腎盂がん、子宮がん、脳／神経系がんを含む他のがん）を標的とすることができる。GD2、ジシアロガングリオシドもまた、神経外胚葉起源の腫瘍細胞の表面上に発現されることが見出されている。GD2発現を有する腫瘍は、高い死亡率を有する（小児腫瘍－神経芽腫、網膜芽腫、肉腫；成人腫瘍－黒色腫、非小細胞肺癌、乳がん）。現在、治療として試験されているモノクローナル抗体は、神経因性疼痛の毒性により制限を有する。BINATE・CAR・GD2構築物による最初の試験は、NK細胞およびガンマ・デルタT細胞の両方において同等の高レベルの形質導入を示す（NK細胞では約80%、ガンマ・デルタT細胞では約40～60%）；発現は、BINATE培養期間において安定であり、維持される。加えて、固形腫瘍細胞の*in vitro*殺滅が観察された（実施例18）。

【0102】

医薬組成物およびキット

本明細書に提供される組成物のいずれも、薬学的に許容される担体と共に医薬組成物として製剤化することができる。組成物と同様に、本明細書に提供される医薬組成物は、がんおよび感染性疾患を処置するために使用することができる。同様に、本明細書において、本明細書に提供される組成物または医薬組成物、および必要に応じて使用のための指示を含有するキットも提供される。ある特定の態様では、本明細書に提供されるキットは、サイトカインを含み得る。自然免疫細胞は、一部には過多のサイトカインおよびケモカインを放出して他の細胞と連携させ、それによって免疫応答を統合することによって、広範囲のウイルス病原体、真菌病原体、細菌病原体、および寄生生物病原体による日和見侵襲を制御する。

【0103】

医薬組成物またはキットは時に、治療細胞の特定の投薬量を含み、時に医薬組成物またはキットは、治療細胞の単位投薬量を提供する。ある特定の態様では、単位投薬量は、意図される対象の体重1キログラムあたり細胞約 10^4 から約 10^{10} 個、または対象あたり細胞約 10^6 から約 10^{12} 個の間（例えば、対象あたり細胞約 10^{10} 個または意図される対象の体重1キログラムあたり細胞約 10^8 個）である。

【0104】

医薬組成物またはキットは、薬学的に許容される担体を含み得る。用語「薬学的に許容される」は、動物、より詳しくはヒトにおいて使用するために、連邦政府または州政府の規制当局によって承認されていること、または米国薬局方もしくは他の一般的に認識された薬局方に収載されていることを意味する。用語「担体」は、それと共に治療薬が投与される希釈剤、アジュバント（例えば、フロイントアジュバント（完全および不完全）、賦形剤、またはビヒクルを指す。組成物が注入によって投与される場合、これは滅菌の製薬等級の水または食塩水を含む注入ボトルに分配することができる。組成物が注射によって投与される場合、投与前に成分を混合することができるように、注射用滅菌水または食塩水のアンプルを提供することができる。

【0105】

医薬組成物は時に、本明細書に記載の方法によって調製された細胞の治療的組成物を単独でまたはそのような薬学的に許容される担体と共に充填した、1つまたは複数の容器を含む薬学的パックまたはキットとして提供される。加えて、疾患の処置にとって有用な1種または複数種の他の予防剤または治療剤もまた、薬学的パックまたはキットに含めることができる。薬学的パックまたはキットは、本明細書に記載される医薬組成物の1種または複数種の成分を充填した1つまたは複数の容器を含み得る。必要に応じて、医薬品または生物製剤の製造、使用、または販売を規制する政府当局によって規定された書式の通知（notice）をそのような容器（複数可）に関連付けることができ、その通知はヒトでの投与のための製造、使用、または販売に関する当局の承認を反映する。薬学的パックまたはキットは時に、1つまたは複数の容器に疾患の処置にとって有用な1種または複数種の他の予防剤および／または治療剤を含む。

【0106】

細胞を *ex vivo* で拡大させた後に免疫療法として投与する場合、細胞は時に、単独ではサイトカインの十分量を産生しない。本明細書に提供されるキットに必要に応じて追加され得るサイトカインには、TNF、IFN γ 、インターロイキン類、IL-1 β 、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-18、IL-21、CCL4/RANTES、およびTGF β が挙げられるがこれらに限定されない。ある特定の態様では、本明細書に提供される医薬組成物および／またはキットは、必要に応じて、本明細書に提供される組成物と共投与するための第2の薬剤を含む。用語「共投与する（co-administer）」、「共投与する（co-administers）」、「共投与」等は、本明細書において使用される場合、薬剤が、本明細書に提供される自然細胞組成物の前、後、または併せて投与されることを意味する。

【0107】

一部の態様では、第2の薬剤はがん細胞抗原または感染病原体を標的とする抗体である。本明細書に提供される組成物、医薬組成物、およびキットは、保存または輸送のため適宜、マイナス4℃またはそれ未満、または約マイナス75℃から約マイナス80℃で維持することができる。

遺伝子改変された自然細胞組成物を作製する方法

【0108】

本明細書に提供される自然細胞組成物は、適した様式で（例えば、遺伝子または調節性配列である外因性ポリヌクレオチドを付加することによって、内因性遺伝子を変異させることによって、または内因性遺伝子を欠失させることによって）遺伝子改変することができる。遺伝子改変は、最終組成物を得た後、活性化および拡大に続いて実施することができるか、または活性化後で細胞に拡大を行う前に実施することができる。様々な遺伝子改

変を作製する方法の非制限的な例を以下に記載する：

【0109】

(a) CRISPR-CAS9 標的化抑制（永続的な遺伝子／遺伝子座の欠失）

細胞に、CAS9 タンパク質および目的の遺伝子に特異的なガイドRNA (gRNA) の両方を発現するDNAプラスミドをトランスフェクトすることができる。ゲノムにおけるgRNA-CAS9 媒介性の切断は、ドナーDNAプラスミドを使用して修復することができ、これは標的遺伝子の特異的欠失および遺伝子コードタンパク質の永続的かつ完全な喪失を引き起こす。タンパク質発現の喪失は、PCR (DNAレベル)、ノザンブロット／FISH (RNAレベル)、または任意のタンパク質アッセイ、例えばウエスタンブロットもしくはフローサイトメトリーを使用して検証することができる。

10

【0110】

(b) CRISPR-CAS9 標的化発現（永続的な遺伝子／遺伝子座の挿入）

この方法を使用して、細胞ゲノムの特定の位置に目的の遺伝子を挿入することができる。細胞に、特異的挿入位置に対して特異的なCAS9 タンパク質およびガイドRNA (gRNA) の両方を発現するDNAプラスミドをトランスフェクトすることができる。ゲノムにおけるgRNA-CAS9 媒介性の切断は、DNA切断 (cut)／二本鎖切断 (break) の位置の両側で細胞ゲノムの配列に挟まれた挿入された目的の遺伝子を有するドナーDNAプラスミドを使用して修復することができ、ランダムではない特異的ゲノム位置における目的の遺伝子の相同組換え媒介挿入を引き起こす。挿入の成功およびタンパク質発現は、PCR (DNAレベル)、ノザンブロット／FISH (RNAレベル)、または任意の適したタンパク質アッセイ、例えばウエスタンブロットもしくはフローサイトメトリーを使用して検証することができる。

20

【0111】

(c) shRNA／マイクロRNAのレトロウイルス／レンチウイルス／トランスポゾン媒介形質導入によるRNA干渉（永続的な遺伝子抑制）

目的の特異的遺伝子／タンパク質を標的とするshRNA／マイクロRNAを設計し、細胞ゲノムに安定に組み込むためにレトロウイルス／レンチウイルス／トランスポゾンベクターにおいてクローニングすることができる。細胞にベクターを形質導入し、形質導入に成功した細胞を、ベクターがコードする選択マーカーを使用して選択することができる。目的の遺伝子のshRNA媒介抑制を、例えばノザンブロットおよびタンパク質アッセイを使用して評価することができる。

30

【0112】

(d) レンチウイルス／γ-レトロウイルス媒介ランダム／多重コピー遺伝子挿入

目的の特異的遺伝子／タンパク質を設計し、および／または細胞ゲノムへの安定なランダム組み込みのためにレトロウイルスまたはレンチウイルスベクターにおいてクローニングすることができる。細胞にウイルスベクターを形質導入し、形質導入に成功した細胞を、ベクターがコードする選択マーカーを使用して選択することができる。目的の遺伝子のshRNA媒介抑制は、ノザンブロットおよび任意の適したタンパク質アッセイ、例えばウエスタンブロット、フローサイトメトリー等を使用して評価することができる。

40

【0113】

(e) トランスポゾン媒介ランダム／多重コピー遺伝子挿入

目的の特異的遺伝子／タンパク質を設計、および／または哺乳動物トランスポゾンベクター系、例えばPiggyBac (SBI System Biosciences) または等価物においてクローニングした。細胞に、末端逆位反復 (ITR) 配列に挟まれた目的の遺伝子 (cDNA) を有するトランスポゾンベクターおよびトランスポザーゼベクターを共トランスフェクトすることができる。トランスポザーゼ酵素は、目的の遺伝子のTTAA染色体組み込み部位への移入を媒介することができる。形質導入に成功した細胞を必要に応じて、ベクターコード選択マーカーを使用して選択することができる。挿入の成功およびタンパク質の発現は、PCR (DNAレベル)、ノザンブロット／FISH (RNAレベル)、または任意の適したタンパク質アッセイ、例えばウエスタンブロットもし

50

くはフローサイトメトリーを使用して検証することができる。

【0114】

(f) 直接トランスフェクション

目的の遺伝子／タンパク質をコードするmRNAを細胞に直接トランスフェクトすることができる。トランスフェクションは、任意の確立された方法論、例えば塩化カルシウムトランスフェクション、リポフェクション、Xfect、電気穿孔、ソノポレーション、およびcell squeezing（例えば、siRNAを導入する）を使用して実施することができる。

【0115】

処置の方法

同様に、がんまたは感染症を処置する方法であって、それを必要とする対象に、本明細書においてがんまたは感染症を処置するために有効な量の本明細書に提供される組成物、医薬組成物、またはキットのいずれかを投与することによる、方法も提供される。処置は、自己由来の状況または同種異系の状況で投与することができる。組成物、医薬組成物、またはキットが作製される試料のドナーは、処置のレシピエントであり得る。しばしば、組成物、医薬組成物、またはキットは、1人の対象由来の試料から調製され、処置は異なる対象に投与される。ある特定の態様では、処置は、2日またはそれより多くの別々の日に投与することができ、ある特定の態様では、処置を複数回投与で投与することができる。ある特定の態様では、処置は約2週間から約4週間の間の間隔で約1単位投薬量から約36単位またはそれより多くの投薬量の間で投与される。一部の態様では、処置は、単一単位投薬量として毎日1回、2回、3回、4回、もしくは最大5回、または数日間、数週間、もしくは数ヶ月間の間に1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、もしくは10回、もしくはそれより多い回数、または2日毎、または週に1回、2回、3回、4回、5回、もしくは6回投与される。処置は、静脈内（IV）、髄腔内、または筋肉内（IM）、腹腔内（IP）、胸膜内、関節腔内に投与することができ、またはがんもしくは感染症の部位もしくはその近傍に、対象の体重1キログラムあたり細胞約 10^4 から約 10^{10} 個の間、または対象あたり細胞約 10^6 から約 10^{12} 個の間の単位投薬量で、注射されるかもしくは埋め込まれる。ある特定の態様では、単位投薬量は、対象あたり細胞約 10^{10} 個、または対象の体重1キログラムあたり細胞約 10^8 個である。

【0116】

本明細書に提供される処置の方法のある特定の態様では、処置はがんのためである。一部の態様では、がんは固形腫瘍である。複数の態様では、がんは血液のがんである。ある特定の態様では、がんは血液のがんであり、ガンマ・デルタT細胞のNK細胞に対する比は1より大きい。一部の態様では、がんは固形腫瘍であり、NK細胞のガンマ・デルタT細胞に対する比は1より大きい。本明細書に提供される処置の方法のある特定の態様では、第2の薬剤は、組成物、医薬組成物、またはキットと共投与される。一部の態様では、第2の薬剤は、がん関連抗原に免疫特異的に結合する抗体である。

【0117】

本明細書に提供される処置の方法のある特定の態様では、処置は感染症のためである。一部の態様では、感染症は細菌病原体、真菌病原体、ウイルス病原体、または原虫病原体の存在によって特徴付けられる。

【0118】

本明細書に提供される方法のある特定の態様では、組成物、医薬組成物、またはキットは、ガンマ・デルタT細胞（例えば、V・デルタ・1およびV・デルタ・2ガンマ・デルタT細胞に関してポリクローナル）のポリクローナル集団を含有する。

【0119】

本技術を、本明細書に記載される実施例を参照してさらに説明する。しかし、本技術はそのような実施例に限定されないと理解すべきである。

【実施例】

【0120】

10

20

30

40

50

以下に記載の実施例は、ある特定の実施形態を例証するが、本技術を制限するものではない。

【0121】

以下の材料を、以下に記載されるある特定の方法に（例えば、活性化条件、拡大条件、表現型解析）において使用した。

【0122】

以下のモノクローナル抗体 (mAb) は、Ospedale Pediatrico Bambino Gesù (OPBG)、“Cell and Gene Therapy for Pediatric Tumor” 研究所において生成された：

【0123】

c218 (IgG1、抗CD56)、c127 (IgG1、抗CD16)、AZ20およびF252 (それぞれIgG1およびIgM、抗NKp30)、BAB281およびKL247 (それぞれIgG1およびIgM、抗NKp46)、Z231 (IgG1、抗NKp44)、ECM217およびBAT221 (それぞれIgG2bおよびIgG1、抗NKG2D)、KRA236、GN18およびF5 (それぞれIgG1、IgG3およびIgM、抗DNAM-1)、EA4 (IgG2a、抗CD18)、MAR206、MA258およびQA196 (それぞれIgG1、IgG2bおよびIgM、抗CD2)、MA127およびON56 (それぞれIgG1およびIgG2b、抗NTB-A)、PP35、ST39およびCO54 (それぞれIgG1、IgG1aおよびIgM、抗2B4)、z27 (IgG1、抗KIR3DL1/S1)、AZ158 (IgG2a、抗KIR3DL1/L2/S1)、z270、z199およびY9 (それぞれIgG1、IgG2bおよびIgM、抗NKG2A)、6A4およびA6/136 (それぞれIgG1およびIgM、抗HLA-クラスI)、D1/12 (IgG2a、抗HLA-DR)、5A10 (IgG1、抗PVR)、L14 (IgG2a、抗ネクチン-2)、BAM195 (IgG1、抗MICA)。

【0124】

F278 (IgG1、抗CD85j) mAbは、Dr. Daniela Pende、Istituto Giannina Gaslini、Genoa、Italyによって寄贈された (同様に例えば、Costa et al., Aids, 15:965-974 (2001)も参照されたい)。抗NKG2C (IgG2b、134522クローン)、抗ULBP-1 (IgG2a、170818クローン)、抗ULBP-2 (IgG2a、165903クローン)、抗ULBP-3 (IgG2a、166510クローン)、抗CD34-APC (IgG1、QBEnd10クローン)、IgG-APCアイソタイプ対照 (IgG1クローン11711) および抗KIR2DL1-FITCまたは非コンジュゲート (IgG1、143211クローン) mAbは、R&D System Inc (Abingdon, United Kingdom) から購入した。抗KIR2DL1/S1-Viobluまたは-PE (IgG1、11PB6クローン)、抗NKG2C-ViobrightFITC (REA205クローン)、抗KIR3DL1-ビオチンまたは-FITC (IgG1、DX9クローン)、抗CD3-Viogreen (IgG2a、BW264/56クローン)、抗CD57-Vioblu (IgM、TB03クローン)、抗SIGLEC-7-Vioblu (REA214クローン)、抗NKp30-PE (IgG1、AF29-4D12クローン)、抗NKp46-PE (IgG1、9E2クローン)、抗NKp44-PE (IgG1、2.29クローン)、抗ビオチン-PerCPVio700 (REA746クローン)、REA対照Viobright FITC (クローンREA293)、抗PD-1 (IgG2b、PD1.3.1.3クローン) mAbは、Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany) から購入した。抗CD34 (IgG1、QBEnd10クローン)、抗NKG2A-PC7 (z199クローン)、抗KIR3DL1/S1-PE (z27クローン)、抗KIR2DL2/L3/S2-PE (GL183クローン)、抗CD19-FITC (IgG1、J3-119クローン)、抗CD56-PC7 (IgG1、N901クローン)、IgG1-PC7

10

20

30

40

50

または-PEまたは-FITCアイソタイプ対照(679.1Mc7クローン)mAbは、Beckman Coulter、Immunotech(Marseille、France)から購入した。抗KIR2DL2/L3-S2-FITCまたは非コンジュゲート(IgG2b、CHL-クローン)、抗CD107-PE(IgG1、H4A3クローン)、抗CD85j(IgG2b、GHI/75クローン)、抗CD16-PerCpCy5.5(IgG1、3G8クローン)、抗CD56-BV510(IgG2b、NCAM16.2クローン)、IgG1-PEアイソタイプ対照(クローンMOPC-21)mAbおよびBrilliant Stainバッファは、BD Bioscience Pharmingen(San Diego、CA)から得た。抗HLA-Bw6-FITCおよび抗HLA-Bw4-FITC mAbは、ONE LAMBDA INC(Canoga Park、CA)から購入した。抗ヒトHLA-E(IgG1、3D12クローン)および抗ヒトHLA-G(IgG1、MEM-G/9クローン)mAbはそれぞれ、BioLegend(San Diego、CA)およびAbnova(Taipei、Taiwan)から購入した。抗NKG2D(IgG2a、5C6クローン)および抗HLA-C(IgG1、C-8クローン)は、Santa Cruz Biotechnology(Dallas、Texas、USA)から購入した。

【0125】

拡大条件の場合、IL-2、IL-15、およびOKT3は、ビーズに架橋させたまたは結合させた抗CD2および抗Nkp46抗体と同様にMiltenyi Biotec(San Diego、CA、USA)から得た。

【0126】

(実施例1)

$\alpha\beta$ TCRneg細胞集団由来の特定の自然細胞溶解性免疫細胞(INNATE-K)集団の富化および拡大

本実施例は、フィーダーフリー培養条件で、免疫グロブリンサブファミリー表面分子の1種または複数種に対する抗体によって活性化された、出発の $\alpha\beta$ TCRneg細胞集団から主にNKおよび $\gamma\delta$ TCR+T細胞からなる特定の自然細胞溶解性免疫細胞集団(本明細書においてINNATE-KまたはBINATE細胞集団と呼ぶ)を、富化および拡大させるプロセスを記載する(この拡大したT細胞集団の組成の解析に関しては図2を参照されたい;用語INNATE-KおよびBINATEは本明細書において互換的に使用されてもよく、NCR抗体(例えば、抗Nkp46)およびLFA抗体(例えば、抗CD2)の組合せによって活性化され、NK細胞および $\gamma\delta$ T細胞の混合物を含有する本明細書において考察される細胞集団を指す)。

【0127】

1. 大規模ロイコフェレーシスを、G-CSFによって動員されている正常で健常なドナーについて実施した;あるいは、大規模ロイコフェレーシスを、動員を行っていない正常で健常なドナーについて実施するかまたはバフィーコートを使用する。

【0128】

2. Ficoll(商標)による密度勾配細胞分離を、SEPAX(商標)デバイス(Sepax Technologies, Inc.、Newark DE)によって実施し、赤血球、血小板、および顆粒球を除去し、単核細胞浮遊液を得た;Ficoll(商標)勾配分離を実施する代替の方法は、MILTENYI PRODIGY(商標)(Miltenyi Biotec、San Diego、CA)または遠心分離器による手動での分離を含む。

【0129】

3. 単核細胞を、臨床規模のMILTENYI CLINIMACS(商標)(Miltenyi Biotec、San Diego、CA)を使用して製造元の指示に従って $\alpha\beta$ T細胞枯渇に供したか、または実験室規模のMiltenyi LSカラム分離に供した。

【0130】

4. 得られた $\alpha\beta$ TCRneg細胞集団を、フィーダーフリーの培養条件に置き、抗CD2および抗NKp46ビーズ(NK Cell Activation/Expansion Kit (商標)(Miltenyi Biotec, Inc., San Diego, CA, USA))ならびに500IU/mLヒトインターロイキン2(IL-2)(Miltenyi Biotec)によって製造元の指示に従って活性化した。

【0131】

5. 活性化 $\alpha\beta$ TCRneg細胞集団を、24ウェルプレート中 0.25×10^6 個/mLの細胞播種濃度において、5%AB血清および500IU/mLヒトインターロイキン2(IL-2)を補充したNK MACS (商標) 培地(#130-107-879 (Miltenyi Biotec, Inc., San Diego, CA, USA))を用いるフィーダーフリー培養条件でさらに培養拡大させた後、T75フラスコに移した; 代替の培養容器は、バイオリアクター(G-Rex (商標) 25ml, Wilson Wolf Manufacturing, St. Paul MN)を含み得る。

【0132】

6. 培地交換をおよそ3日毎に新鮮な培地および新鮮なIL-2によって、#5に記載の濃度で行い、細胞を 0.25 から 0.5×10^6 個/mLの濃度で播種した。方法のある特定の変形形態では、培地交換はおよそ4日毎に行う。バイオリアクターに播種する場合、培地交換は、目標用量に達するまでおよそ6日または7日毎に行ってもよい。

【0133】

7. 拡大の開始後任意の時間で、得られた富化された特異的自然免疫細胞溶解集団(NKおよび $\gamma\delta$ TCR+T細胞)を、望ましくない集団のCD3+枯渇またはCD56+枯渇をそれぞれ使用して純粋なNKまたは $\gamma\delta$ TCR+T細胞のいずれかに関してさらに富化して純粋な細胞集団を得ることができ、ステップ#5と同様にさらに培養した。

【0134】

8. 拡大の終わりに、INNATE-K細胞を、10%DMSO溶液を含有する無血清凍結培地(CryoStor (商標)、BioLife Solutions, Bothell WA)中で凍結保存する。

【0135】

図1は、培養10日目で解析した場合の、細胞を抗体によって活性化してフィーダーフリー培養条件で拡大させた日数の関数としての $\alpha\beta$ TCRneg細胞の拡大を例証する。グラフは、細胞がおよそ1週間で対数的拡大を達成し始め、拡大し続け、オフザシェルフ治療の成功にとって適した多数の細胞を生じたことを示している。図1では、活性化 $\alpha\beta$ TCRneg細胞を、フィーダーフリー培養条件で培養拡大させた。拡大の日毎の培養物の総細胞数を示し、拡大の有意な増加は培養6日後に認められる。

【0136】

図2は、70%のNK細胞および28%の $\gamma\delta$ TCR+T(GD)細胞を示し、この比率は治療産物にとって適している。細胞をさらに拡大させるとシフトが起こり得る; これらの2つの細胞タイプは、フィーダー細胞培養がなくとも他の細胞が混入することなく多数得られた。図2は、製造プロセスの以下の実施例の様々なステップにおける特定の自然免疫細胞溶解性細胞(INNATE-K)、NK、および $\gamma\delta$ TCR+T細胞、ならびにCD3+CD56+NKT細胞および適応免疫 $\alpha\beta$ TCR+T細胞の富化および表現型を例証する。

【0137】

a) Ficoll密度勾配分離後の単核細胞画分における細胞の頻度は、8%+12%のNK細胞および0.1%+1%の $\gamma\delta$ TCR+T細胞、6%のCD3+CD56+NKT細胞および73%の $\alpha\beta$ TCR+T細胞であった。

【0138】

b) $\alpha\beta$ TCR+T細胞枯渇ステップ後の細胞の頻度は、25%+15%のNK細胞および3.2%+1.2%の $\gamma\delta$ TCR+T細胞(そのうち0.5%がCD56-CD3+および2.7%がCD56+CD3+)および1%またはそれ未満の $\alpha\beta$ TCR+T細胞で

10

20

30

40

50

あった。

【0139】

c) 活性化およびフィーダーフリー培養拡大の10日後、NK細胞頻度は、68%+23%へと実質的に富化され、 $\gamma\delta$ TCR+T細胞は、15.7%+5%へと実質的に富化された(そのうち12.2%がCD56-CD3+および3.5%がCD56+CD3+)。無視できるレベルのCD3+適応免疫細胞が検出された: $\alpha\beta$ TCR+T細胞は0.3%+0.5%、およびNKT細胞は、0.2%+0.3%で検出された。

【0140】

CD56(NK)表面抗原、CD16、およびCD57を共発現する細胞の10日目でのフローサイトメトリー解析(蛍光活性化セルソーター、またはFACS解析)を実施した。CD16は、FC γ 受容体IIIIであり、このようにIgG抗体のFC部分に結合することができる。抗体結合標的細胞の抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)を媒介することができる。CD16は、NK細胞媒介自発的細胞傷害性において役割を有する。CD56+CD16+サブセットは、最も細胞傷害性のサブセットであると考えられ、NK細胞の大多数を構成する(例えば、生理的条件下で)。CD57は、不良な増殖能を有するNK細胞のマーカーであり得る。IL-2による刺激後または標的細胞との共培養後のNK細胞上のCD57の獲得は、CD56+NK細胞サブセットの成熟と相関する。この分化は機能的変化を伴い、CD57-細胞と比較すると、CD57+NK細胞は、IL-2およびIL-15に応答する増殖が不良であり、IL-12およびIL-18に応答してより少ないIFN- γ を産生する。CD56+NK細胞の場合、37%がCD16+であり、63%がCD16-であった;CD56+CD16-細胞の場合、13%がCD57+であり、87%がCD57-であった;ならびにCD56+CD16+細胞の場合、15%がCD57+であり、85%がCD57-であった。フローサイトメトリー表現型の結果は、細胞組成物が、CD56(NK)およびCD16の共発現によって証明されるように、拡大した $\alpha\beta$ TCRneg細胞において高度に細胞傷害性のNK細胞である富化されたNK細胞を含有するが、なおもCD16+およびCD16-NK細胞の両方におけるCD57を発現しないNK細胞の数によって証明されるように、さらにより応答性で細胞傷害性の細胞へとin vivoで成熟する潜在性を有する未成熟表現型を有する細胞も含有することを示した。

【0141】

フローサイトメトリーによって解析した、フィーダーフリーの培養拡大活性化 $\alpha\beta$ TCRneg細胞の10日目の試料の異なる $\gamma\delta$ T細胞サブセットの頻度の分布を測定した。 $\gamma\delta$ T細胞は、MHC拘束 $\alpha\beta$ T細胞とは対照的に、多様ながんをMHC非拘束性に認識および溶解することが可能であり、オフザセルフの同種異系免疫療法に関するその潜在性を強調している。ヒト $\gamma\delta$ T細胞は、 δ 鎖の発現に基づいて3つの主な集団に分割することができる。健康なヒト成人における循環中の $\gamma\delta$ Tリンパ球の大多数、最大50%~90%が、 $\gamma\delta$ 2鎖を発現する。 $\gamma\delta$ 1鎖を発現する $\gamma\delta$ T細胞は、粘膜表面の上皮内層において最も顕著であり、それらはそこで損傷、感染症、または形質転換に直面した場合の上皮組織の完全性の維持に関係しているが、それらはまた末梢血にも出現し得る。 $\gamma\delta$ 3T細胞は、CD4+、CD8+、およびCD4-CD8-サブセットを含む循環中のT細胞の約0.2%を構成する。末梢血ではまれであるが、 $\gamma\delta$ 3T細胞は通常、肝臓においてより高度に発現される。10日目での $\gamma\delta$ TCR+T細胞の分布のパーセンテージ(41%の $\gamma\delta$ 1、50%の $\gamma\delta$ 2、7%の他の $\gamma\delta$)は、繁殖した $\gamma\delta$ T細胞が、それがV δ 1、V δ 2、およびV δ 1negV δ 2negサブセットを発現することから、ポリクローナルであったことを明らかに示している。このポリクローナル性は、腫瘍、変化した細胞、または感染症の自然殺滅における繁殖した $\gamma\delta$ T細胞の関与を確実にする。

【0142】

図3は、フローサイトメトリーによって解析した場合の、フィーダーフリーの培養拡大活性化 $\alpha\beta$ TCRneg細胞の10日目の試料における $\gamma\delta$ TCR+細胞上のT細胞系列マーカー、CD4(ヘルパー)、およびCD8(細胞傷害性)の頻度および分布を例証す

る。γδ1T細胞のほとんどはCD4もCD8も発現しなかったが、小さいパーセンテージ（19%）が細胞傷害性CD8系列マーカーを発現し、これは最大の腫瘍および感染症の殺滅に関して記載され、望ましい自然細胞溶解性免疫集団と一致する。γδ2+細胞は、CD4またはCD8のいずれかを少量発現したが、主にγδ3T細胞で構成される「他のγδTCR+細胞」のほぼ半数が、細胞傷害性CD8系列マーカーを発現した。

【0143】

さらに8日目のフローサイトメトリ表現型解析データが得られ、実験室規模のMiltenyi Biotec, Inc. のαβT細胞枯渇試薬によって枯渇されているフィーダーフリーの培養拡大活性化αβTCRneg細胞からγδT細胞を得た。大規模の枯渇細胞に関して、8日目の培養CD3+T細胞は、主にγδT細胞受容体（αβTCR+細胞は<0.05%）を発現した。表現型解析を実施して、γδT細胞上のマーカーの共発現を解析した。細胞は全てCD3+であり、31.8%がCD16+であった。CD3+γδT細胞上のCD57およびCD16の共発現が観察された。10.7%がCD57およびCD16マーカーを共発現し、このように最も成熟した細胞であった。大多数は、CD57-およびCD16-（57%）であり、このように未成熟な細胞を表した。阻害性および活性化リガンド受容体の発現を解析した。NKG2Dは、NK細胞表面上の活性化受容体である。NKG2Aは、CD94と二量体を形成して阻害性受容体を作製する。細胞は、NKG2Cの発現を欠如し、細胞の55%がNKG2AおよびNKG2Dを共発現した。表現型解析を実施してγδT細胞上のマーカーの共発現を、CD56の共発現に関連して解析した。CD3+およびCD56+を発現した全てのγδ細胞のうち、29%がCD16を共発現した。CD57およびCD16の共発現は、CD3+CD56+γδT細胞において観察された。5%がCD57およびCD16マーカーを共発現し、このように最も成熟した細胞であった。大多数はCD57-およびCD16-（67%）であり、このように未成熟な細胞を表した。阻害性および活性化リガンド受容体の発現を解析した。細胞は、CD3+CD56+細胞上でNKG2Cの発現を欠如し、大多数の細胞（82%）がNKG2Aを発現し、CD3+CD56+細胞の80%がNKG2AおよびNKG2Dを共発現し、これらの細胞がNK細胞に最も一般的に関連する表現型マーカーを発現したこと、および活性な自然免疫細胞集団を示したことを示している。

【0144】

（実施例2）

αβTCRneg細胞集団由来の形質導入された特異的自然細胞溶解性免疫細胞（INNATE-CAR）の拡大

本実施例は、αβTCRneg細胞集団のフィーダーフリー培養条件での活性化培養から拡大された、NKおよびγδTCR+T細胞を含む形質導入された特異的自然細胞溶解性免疫細胞（INNATE-CAR）集団の拡大および産生について記載する。

【0145】

1. 実施例1ステップ#5に記載された活性化され、培養により拡大されたαβTCRneg細胞集団からの細胞のアリコート（あるいは、アリコートは5~15日の間に採取することができる）、ヒトフィブロネクチンコーティングプレート上に 0.25×10^6 個/mLの濃度で500IU/mLヒトインターロイキン2（IL-2）または10ng/mL IL-15の存在下で播種し（あるいは、RetroNectin（商標）（Takara Bio USA, Mountain View CA）コーティングプレートもしくはVECTOFUSIN-1（Miltenyi Biotec）形質導入エンハンサーを使用することができた）、細胞形質導入のマーカーとして使用されるCD34表面抗原の非機能的断片を含有するCD+19キメラ抗原受容体の構築物を含有するガンマレトロウイルス上清によって形質導入した。

【0146】

2. 3日後、細胞を剥離させて、5%AB血清および500IU/mLヒトインターロイキン2（IL-2）を補充したNK MACS（商標）培地（#130-107-879（Miltenyi Biotec, Inc., San Diego, CA, USA））中

10

20

30

40

50

で、24ウェルプレートまたはT75において 0.25×10^6 個/mLの細胞播種濃度でさらに拡大させた；代替の培養容器は、バイオリアクター（G-Rex（商標）25 mL、Wilson Wolf Manufacturing、St. Paul MN）を含み得る。

【0147】

3. 培地交換は3日毎に新鮮な培地および新鮮なIL-2によって、実施例1の#6に記載の濃度で行い、細胞を $0.25 \sim 0.5 \times 10^6$ 個/mLの濃度で播種した；バイオリアクターに播種する場合、培地交換は、目標の用量を達成するまで7日毎に行う。

【0148】

4. 14日目以降のいつでも、INNATE-CAR集団を、NK-CARまたは $\gamma\delta$ -CAR T細胞のいずれかに関してさらに富化し、それぞれ望ましくない集団のCD3+枯渇またはCD56+枯渇を使用して純粋な細胞集団を得ることができ、これをステップ#3と同様にさらに培養した。

【0149】

5. 拡大の終わりに、細胞を、10% DMSO溶液を含有する血清フリーの凍結培地（CryoStor、BioLife Solutions、Bothell, WA）中で凍結保存する。

【0150】

図4は、10日間のCAR-19 INNATE-K細胞の拡大速度の解析を例証する。拡大した非遺伝子改変集団と同様に、培養物は、およそ1週間で始まる対数的拡大を証明し、オフザシェルフのINNATE-CAR産物のロバストな拡大の可能性を表す。図4では、活性化されたINNATE-K細胞を、フィーダーフリー培養条件で培養により拡大し、4日目に、CD19 CARおよび非機能的CD34マーカーを含有するガンマレトロウイルスを形質導入した。

【0151】

INNATE-CAR集団、NK細胞、および $\gamma\delta$ TCR+T細胞の形質導入を比較した（3つの異なる産物で）。具体的には、%CAR-CD19発現を、CAR分子に組み込まれたCD34マーカーを使用して、これらの細胞集団の各々において比較した。明言された細胞サブセットにおけるCD34マーカーの解析によって証明されるように、NKおよび $\gamma\delta$ TCR+T集団の両方が、CAR-CD19レトロウイルスベクターによる有意な形質導入を示した。形質導入効率は、NKおよび $\gamma\delta$ TCR+T細胞に関してそれぞれ、平均で33%および30%であった。フローサイトメトリー解析（蛍光活性化セルソーター、またはFACS解析）を、10日間拡大させてCAR-CD19を有するレトロウイルスベクターを形質導入していないフィーダーフリーのNK細胞について実施したところ、CD56+細胞上でのCD34+染色の特異性を示した。フローサイトメトリー（FACS）解析を、CAR-CD19を有するレトロウイルスベクターによって活性化プロセスから4日目に遺伝子改変し、10日間拡大させたフィーダーフリーのNK細胞について実施した。結果は、CD34+細胞のパーセンテージおよび発現の平均蛍光強度の両方に関して、形質導入後にCD56+細胞におけるCAR発現レベルが有意であることを示した。両方の特色は、非常に効率的な腫瘍の認識に関連する。同じ知見がまた、形質導入して拡大させたINNATE集団に存在するフィーダーフリーの $\gamma\delta$ TCR T細胞の状況についても有効であった。実際に、 $\gamma\delta$ TCR T細胞構成要素は、 $\gamma\delta$ TCR T細胞におけるCD34発現解析によって評価した場合、有意に形質導入された。

【0152】

INNATE-CARプラットフォームは、腫瘍の認識および除去において非常に効率的であり、自然活性とCAR媒介機能性との間に強い相乗性を有する。実際に、図5は、INNATE細胞およびINNATE-CAR-CD19細胞をCD19+白血病（221）またはCD19+リンパ腫（Daudi）細胞株と共培養した共培養細胞傷害性アッセイからのデータをグラフで例証する。異なる細胞エフェクターに関して培養後の%残存腫瘍を上記のグラフに表す。非形質導入NK細胞（INNATE-NK）は、白血病およ

10

20

30

40

50

びリンパ腫腫瘍細胞をそれぞれ、40および29%殺滅したが、NKおよび $\gamma\delta$ TCRT細胞の組合せ集団によって特徴付けられるINNATE-K細胞は、腫瘍細胞をそれぞれ88.4%および96.1%殺滅した。INNATE-NK細胞にCAR-CD19を形質導入すると(INNATE-NK-CAR-CD19)、腫瘍細胞の93%および84%の除去を可能にしたが、INNATE-CAR-CD19の組合せ集団は、ほぼ全ての腫瘍細胞(97%および99%)を殺滅した。

【0153】

(実施例3)

INNATE-NK細胞の代替の富化

本実施例は、INNATE-NK細胞の富化プロセスを記載する：

【0154】

1. NK細胞を、NK DEPLETION KIT (商標) (Miltenyi Biotec, Inc., San Diego, CA, USA) によってバフィーコートから単離した。

【0155】

2. NK細胞を、NK Cell ACTIVATION/EXPANSION KIT (商標) (Miltenyi Biotec, Inc., San Diego, CA, USA) および組換えヒトIL-2 (500 U/mL) によって活性化した。

【0156】

3. 0日目、活性化後、NK細胞を、5% AB血清富化培地 (NK MACS (商標) 培地 (#130-107-879 Miltenyi Biotec, Inc., San Diego, CA, USA) において培養した。

【0157】

4. 4から15日目、細胞のアリコートを、ヒトフィブロネクチンコーティングプレートにおいて 0.25×10^6 個/mLの濃度で500 IU/mLヒトインターロイキン2 (IL-2) の存在下での形質導入に供した。

【0158】

5. 3日後、細胞を剥離させて5% AB血清富化培地および500 IU/mLヒトインターロイキン2 (IL-2) 中、細胞播種濃度 0.25×10^6 個/mLでさらに拡大させた。

【0159】

6. 形質導入後、NK細胞を24ウェルプレートに蒔いた後、Tフラスコまたはバイオリアクターに蒔いた。

【0160】

7. 培地交換は、3日毎に新鮮な培地および新鮮なIL-2によって行い、目標細胞数に達するまで細胞を $0.25 \sim 0.5 \times 10^6$ 個/mL (それらがプレートにある場合) の濃度で播種した。バイオリアクター培養は7日毎に交換した。

【0161】

8. +14日目、5%より多くのT細胞混入がある場合、純粋なNK細胞を得るために、非形質導入およびCAR形質導入INNATE-NK細胞を、CD3+細胞に関して再度枯渇させ、ステップ#7と同様にさらに培養した。

【0162】

自然免疫細胞が90%より多い(>90%) 例示的な高度富化NK集団を、図6~8にグラフで例証するようにプレートおよびバイオリアクターの両方においてロバストに拡大させた。図6は、プレートにおいて数日間拡大させたINNATE-NK細胞集団の総数を示す。図7は、プレートとバイオリアクターで拡大させたINNATE-NK集団の総細胞数を比較する。図8は、*in vitro*での拡大の異なる時点でのサブセット細胞組成を示し、95%より多くのNK細胞および無視できる存在量のCD3+T細胞およびNKT細胞によって表されるINNATE-NKの有意な純度レベルを示す。

【0163】

10

20

30

40

50

CAR形質導入効率のレベルを、CAR・CD19分子に含まれるCD34マーカーを評価するフローサイトメトリー（FACS）解析を使用して実証した。フィーダーフリーで拡大させた非形質導入INNATE-NK細胞は、CD34マーカーを発現しない。INNATE-NK細胞は、CAR・CD19を有するレトロウイルスベクターによって4日目に遺伝子改変した。INNATE-NK CAR細胞は、有意に形質導入され、NK集団（CD56+）におけるCAR+細胞のパーセンテージは高かった。INNATE-NK CAR細胞におけるCAR分子の発現は、図9に示すように長期間の*in vitro*培養の間安定であった。

【0164】

INNATE-NKおよびINNATE-NK CAR集団の拡大後の活性化および細胞溶解性分子の発現の増加を図10に例証し、ここではそれぞれ、INNATE-NKおよびINNATE-NK-CAR・19細胞のフローサイトメトリー解析からのデータをグラフで示す。解析は、自然細胞の活性化および成熟に関連するいくつかのNKマーカーの評価を含んだ。特に、CD16は、高い細胞溶解活性を有するが低い増殖能を有するより成熟したNKサブグループに関連していることから、成熟解析の基本的マーカーとして含めた；CD2、LFA-1、NKp44、NKp30、およびNKp46、およびDNAM-1を含む、NK集団の活性化および増殖のためのシグナル伝達分子および共刺激分子を含めた。これらのマーカーは全て、INNATE-NKおよびINNATE-NK・CAR・19細胞の両方の拡大した集団において有意に増加し、細胞が循環中の末梢血NK細胞と比較して活性化されることを示している。

【0165】

図11は、フィーダーフリーの拡大したINNATE-NK細胞およびINNATE-NK CAR細胞における疲弊の欠如をグラフで例証する。INNATE-NKおよびINNATE-NK-CAR・19細胞を、実施例3に記載されるように生成および拡大させ、20日目および60日目にフローサイトメトリー解析を実施して、細胞の成熟性および疲弊に関するマーカーを評価した。LIR-1は、自然細胞阻害活性のマーカーであり、20日目ではNK集団においてごくわずかな増加を示し、60日目では両方の集団の増加を示した；NKG2cは、シグナル特異的活性および成熟のマーカーであり、培養期間の間、変化しなかった；CD57は、成熟のマーカーであり、増殖能の減少に関連し、このように健康なドナーの末梢血に由来する循環中のNK集団上に発現される。*in vitro*での拡大の20日目および60日目でのフィーダーフリーで拡大したINNATE-NK細胞は、有意に低いパーセンテージのCD57+NK細胞を示し、これらの細胞が*in vivo*での注入の際になおも増殖能を有することを示唆している。プログラム細胞死1分子（PD-1）は、T細胞における細胞の潜在性の減少および「疲弊」のマーカーであるのみならず、最近ではNK細胞においてもチェックポイントインヒビターとして記載された。INNATE-NKおよびINNATE-NK CAR細胞のいずれの集団も、20日目または60日目のいずれかでの、PD-1+細胞サブセットの存在を示さず、細胞は長期間の*in vitro*での培養後に疲弊しないことを示した。

【0166】

図12は、INNATE-NKまたはINNATE-NK-CAR・19、ならびに4つの腫瘍細胞株による細胞傷害性共培養アッセイをグラフで例証する：列A：221、CD19+白血病細胞株；列B：Daudi、CD19+リンパ腫細胞株；列C：BV173、CD19+（可変発現）プレB腫瘍細胞株；ならびに列D：KARPAS、CD19-腫瘍細胞株。図12のパネル1は、INNATE-NK（左のサブパネル）またはINNATE-NK・CAR・19（右のサブパネル）細胞との*in vitro*での共培養後のCD19+細胞の低減を示す。INNATE-NKのパネルにおける左上の区画（枠で囲んだ区画）は、非改変INNATE-NK細胞との共培養後のCD19+腫瘍集団を強調する。INNATE-NK・CAR・19パネルにおける左上の区画（枠で囲んだ区画）はINNATE-NK・CAR・19細胞との共培養後の残存CD19+腫瘍集団を強調する。INNATE-NK・CAR・19細胞は、CD19+221およびDAUD

Ⅰ腫瘍標的に対して有意な腫瘍コントロールを発揮することが可能であり、*in vitro*での共培養の5日後、残存する腫瘍は無視できる量であった。BV173は、認識および除去に対してより高い抵抗性を示したが、CAR-CD19によるINNATE-NK細胞の遺伝子改変は、非改変INNATE-NK細胞と比較して抗腫瘍活性を有意に増加させることができた。10の異なる実験で観察された残存腫瘍の平均値を、共培養実験の各々に関して図12、パネル2に示す。脱顆粒(*in vitro*で3時間の短期共培養後のNK細胞によるCD107aの発現によって解析した)は、INNATE-NKおよびINNATE-NK CARエフェクター細胞の細胞溶解活性を表し、これを図12、パネル3(列A~D)に示す。全ての例において、INNATE-NK-CAR-19細胞は、INNATE-NK細胞より大きい細胞溶解活性を発現し; KARPAS共培養条件によって表される陰性対照では、いずれの集団もCD107a脱顆粒マーカーを発現しなかった。図12、パネル4および5は、リンパ球細胞溶解活性の場合に一般的に産生される調節性サイトカインの産生を示す。これらのサイトカインはいずれも、CD19 CAR T細胞投与の間に非常に上昇しており、サイトカイン放出症候群においておそらく役割を果たすと考えられる。CD19+腫瘍細胞に対するINNATE-NKおよびINNATE-NK CAR活性の場合、IFN α およびTNF α の両方のサイトカイン産生は、20~150 pg/ml/細胞 10^6 個の範囲であり、適応T細胞殺滅のそれより何倍も小さかった。たとえ高い標的殺滅を有する場合であってもサイトカイン分泌の程度は、CAR-Tについて認められたものほど小さくなく(典型的には、100から1,000倍またはそれより高い)、したがっておそらくより毒性が低い治療を表す。

【0167】

図13~15は、INNATE-NKおよびINNATE-NK CAR細胞が、原発性Bcp-ALL芽球に対して有意な抗腫瘍活性を発揮できることをグラフで例証する。図13および14は、異なる実験試行におけるINNATE-NK細胞およびINNATE-NK-CAR-19細胞集団の両方に関するエフェクター(E)の標的(T)に対する比の関数としての原発性腫瘍細胞の%特異的溶解をグラフで例証する; INNATE-NK-CAR-19細胞集団は、E:T範囲の全てにわたってより有効であった。図15は、原発性CD19+白血病芽球をエフェクター細胞の非存在下で蒔いた対照条件と比較して、エフェクター細胞(INNATE-NK細胞およびINNATE-NK-CAR-19細胞集団)との共培養後のパーセンテージ残存原発性CD19+腫瘍をグラフで例証する。INNATE-NK細胞との共培養は、およそ18%の残存腫瘍細胞をもたらし、INNATE-NK-CAR-19細胞集団との共培養は、およそ5%の残存腫瘍細胞をもたらした。

【0168】

一例の*in vivo* CD19+リンパ腫マウスモデルでは、各NGSマウスに、生体蛍光解析によって解析することができるよう、ホタルルシフェラーゼによって遺伝子改変した腫瘍細胞 0.25×10^6 個のIV投与を行った。3日後、注射したマウスにおいて、白血病が確立していることが示され、マウスを 5×10^6 個のINNATE-NKまたはINNATE-NK-CAR-19のIV注入を受けるマウスの処置コホートに無作為化した。動物を、実験の過程においてルシフェラーゼ+腫瘍細胞の存在に関して解析した。データを、同じ設計の別の実験からのデータと比較したが、この実験では、動物に 5×10^6 個の非改変適応T細胞を投与した。

【0169】

(実施例4)

INNATE-NK試験

本実施例は、遺伝子改変を伴わないINNATE-NK細胞の1用量が、適応T細胞の同じ用量と比較して動物が死亡するまでの時間を延長させることができたことを示すデータを記載する。腫瘍細胞 0.25×10^6 個をIV投与し、3日間拡大させた。 5×10^6 個のINNATE-NKまたはINNATE-NK-CARをIV投与し、データを5M適応T細胞による実験からのデータと比較した。INNATE-NK CAR-19を投

与したマウスでは、腫瘍コントロールは完全であり、11日目以降に腫瘍の生体蛍光は検出されず、INNATE-NK-CAR19が72日目（実験の終了日）まで再発することなく腫瘍を根絶したことを実証した。重要なことに、INNATE-NK細胞はまた、異種応答（CAR T細胞の場合、過去にこの時点で認められた）を実証しなかった。データはまた、遺伝子改変を伴わないINNATE-NK細胞の1用量が、適応T細胞の同じ用量と比較して動物の全生存を延長させることができたことを示した（それぞれ、50日目と28日目の比較）。図16は、INNATE-NKおよびINNATE-NK-CAR.19細胞を投与した上記の実験からの動物の生存曲線をグラフによって例証する。INNATE-NK. CAR.19レシピエントのデータ曲線は、非改変INNATE-NK細胞を投与されたレシピエントと比較して生存の改善を実証した。

10

【0170】

（実施例5）

固形腫瘍に対するINNATE-NK細胞

本実施例は、INNATE-NK細胞が、固形腫瘍を処置するための適したプラットフォームであることを実証する。本実施例では、神経芽腫モデルを検討した。INNATE-NKおよびINNATE-NK CAR細胞を、実施例3、ステップ1～8に記載されるように生成した。INNATE-NK細胞を、神経芽腫腫瘍細胞によって発現されるGD2抗原に対して特異的な第3世代CARを有するレトロウイルスベクターによって4日目に遺伝子改変した。結果は、INNATE-NK CAR. GD2世代が、抗イディオタイプ抗体（1A7）による染色によるフローサイトメトリー（FACS）解析によって評価した場合にCD56+細胞において有意なレベルのCAR発現を示すことを実証した。INNATE-NK CAR. GD2産生におけるNK集団の純度を、CD3+細胞の無視できるパーセンテージに関して評価し、一方CAR+細胞のレベルを1A7+細胞として評価した。INNATE-NK CARにおけるCAR. GD2の発現は、長期間の*in vitro*培養の間、安定であった（8日目、15日目、25日目、31日目、35日目に測定）。

20

【0171】

（実施例6）

固形腫瘍の侵入における自然免疫の役割の評価

本実施例は、自然免疫が固形腫瘍に侵入するその能力における自然免疫の役割を評価した。その効果に対して、3-Dの神経芽腫腫瘍細胞のスフェロイドを、MATRIGEL（商標）培養において成長させた後、適応T細胞、INNATE-NK、またはINNATE-NK-CAR. GD2細胞を導入し、それらのスフェロイドへの侵襲能に関して評価した。具体的には、固形3-D腫瘍モデルを、緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現するように遺伝子改変されたSH-SY5Y神経芽腫腫瘍細胞によって作製し、その後、*in vitro*で培養し、固形3-D腫瘍スフェアを形成した。適応末梢血T細胞、非改変INNATE-NK細胞、およびINNATE-NK. CAR. GD2を、赤色蛍光発光細胞マーカーによって標識し、腫瘍スフェアと共にインキュベートした。ニューロスフェアを3つの平面で3-D蛍光顕微鏡法によってアッセイし、腫瘍スフェアにおける細胞の位置および腫瘍に侵襲するその相対的能力を評価した。適応T細胞（赤色）の共焦点顕微鏡画像は、適応T細胞が、3つ全ての平面において観察されたが、腫瘍スフェア（緑色）の外部表面のみに局在したことから3-D腫瘍に能動的に侵入することができず、腫瘍の中心へと遊走しなかったことを示した。さらなる画像は、3つ全ての平面において観察されたように、INNATE-NK細胞（赤色）が、腫瘍スフェアの表面を突破し始めたことを示した；INNATE-NK-CAR. GD2細胞は、腫瘍スフェアの表面を突破し、これらの細胞が3つ全ての平面において観察された腫瘍の中まで何らかの距離遊走する能力を有することを示した。

30

40

【0172】

（実施例7）

架橋または可溶性の活性化

50

実施例1に記載するように、架橋した天然の細胞傷害性受容体（NCR）抗体（例えば抗NKp46）およびリンパ球機能関連抗原（LFA）抗体（例えば、抗CD2）の組合せ（「コーティングしたビーズ」；Miltenyi Biotec）による活性化後に、培養において細胞集団を生成した。NCR抗体（例えば、抗NKp46）およびLFA抗体（例えば、抗CD2）の組合せによって活性化され、NK細胞および $\gamma\delta$ T細胞の混合物を含有する本明細書において考察される細胞集団を、本明細書において「BINATE」細胞集団と呼ぶ（および上記のある特定の実施例では、「INNATE-K」細胞と呼ぶ）。本実施例では、得られたBINATE集団を、1）架橋した抗NKp46（クローン9E2 500 ng/ml；Miltenyi Biotec）および架橋した抗CD2（OKT11 500 ng/ml）の組合せ、または2）可溶性抗NKp46（クローン9E2 500 ng/ml）および可溶性抗CD2（クローンOKT11 500 ng/ml）の組合せのいずれかによる活性化後に解析した。架橋は、実験の開始前に、PBS中の抗体の組合せによってフラスコを24時間コーティングした後、抗体溶液をデカントし、実験時にPBSによってすすぐことによって達成した（本明細書においてコーティングされたプレートと呼ぶ）。

【0173】

1. 正常で健常なドナー由来のバフィーコートに、手動での遠心分離器での分離によって実施するFicoll（商標）による勾配細胞分離を行った（本実施例および本明細書における他の実施例に記載する方法のある特定の變形形態では、正常で健常なドナーに、アフエーシス手順（アフエーシス、一般的にはFicoll（商標）勾配細胞分離を伴わない）を行い、単核細胞産物を標準的な手順、典型的にはTerumo Optia機に従って収集する）。単核細胞を、実験室規模のMiltenyi LSカラム分離を使用する $\alpha\beta$ T細胞枯渇に供した（本実施例および本明細書における他の実施例に記載されるある特定の變形形態では、アフエーシス産物に、CLINIMACS分離デバイスを使用して $\alpha\beta$ T細胞枯渇を行ってもよく；さらなる枯渇は、CD19 B細胞枯渇を含み得る。 $\alpha\beta$ T細胞を枯渇させた単核細胞のアリコートを凍結保存して、拡大のために後に使用してもよい）。得られた $\alpha\beta$ TCR-neg細胞集団を、5% AB血清を補充したBINATE培地（すなわち、NK MACS（商標）培地（#130-107-879（Miltenyi Biotec, Inc., San Diego, CA, USA））（あるいは、他の培地、例えば、Life Technologies, R&D systemsの培地、CELL GENIX培地等を、ヒト血清を使用してまたは使用せずに使用してもよい））、および500 IU/mlヒトインターロイキン2（IL-2）（Miltenyi Biotec）と共に、細胞播種濃度 $0.25\sim0.5\times10^6$ 個/mlで、24ウェルコーティングプレートでは追加の活性化試薬を伴わずに、または24ウェル非コーティングプレートでは500 ng/ml可溶性抗NKp46（クローン9E2）および500 ng/ml抗CD2（クローンOKT11）の組合せ（あるいは、活性化剤の他の濃度を使用してもよく、他の剤を活性化のために添加してもよい）と共に、フィーダーフリー培養において活性化した。

【0174】

2. 活性化 $\alpha\beta$ TCR-neg細胞集団を、BINATE培地および500 IU/ml IL-2を用いて、細胞播種濃度 $0.25\sim0.5\times10^6$ 個/mlでT75フラスコ（あるいは細胞播種濃度は、培養バッグ、フラスコ、または他の大きい培養容器、例えばバイオリアクター（G-Rex）では最大 1×10^6 個/mlまでの範囲であり得る）において、フィーダーフリー培養条件でさらに培養拡大させた。培地交換は、新鮮なBINATE培地およびIL-2を用い、3日毎（バイオリアクターの場合はより少ない頻度（5～7日毎））に行った。本実施例および本明細書における他の実施例の方法のある特定の變形形態では、拡大の1週間、2週間、3週間、4週間、または5週間後に、培養したBINATE細胞を凍結保存してもよい。一例では、拡大したBINATE細胞を洗浄した後、濃縮し、血清フリーの凍結保存培地（BIOLIFE）を添加する。凍結保存したBINATE産物を融解し、さらに培養するために本明細書に記載されるように再度播種し

10

20

30

40

50

てもよく、または融解し、例えばがんもしくはウイルス感染症を有する患者に注入してもよい。

【0175】

3. 15日間の拡大の終わりに、BINATE細胞を、NKおよび $\gamma\delta$ CD3+T細胞含有量、およびそのサブセット、例えばCD56に関して詳細に解析し、可能性のある混入細胞タイプ、例えば $\alpha\beta$ TCR+T細胞のさらなる解析を行った。

【0176】

BINATE細胞の表現型は、総細胞集団のパーセンテージとして報告され、コーティングプレート上でのまたは可溶性抗体による活性化の間で差を示さなかった。NK集団(CD56+CD3-)は、コーティングプレート上で活性化した場合には最終集団の89.1%であったが、これに対し可溶性抗体によって活性化した場合には92%であった。CD3+ $\gamma\delta$ T細胞は、コーティングプレート条件および可溶性抗体条件においてそれぞれ、集団の6.2%および5.5%であった。CD3+CD56+ $\gamma\delta$ T細胞およびCD3+CD56- $\gamma\delta$ T細胞は、コーティングプレートでの活性化培養ではそれぞれ、集団の2.8%および3.4%であり、可溶性抗体による活性化培養ではそれぞれ、集団の3.3%および2.2%であった。 $\alpha\beta$ TCR+CD3+T細胞のパーセントは両方の条件で無視できる程度であり、コーティングプレートでの活性化では0.12%であり、可溶性抗体による活性化では0.41%であった。

【0177】

以前の報告では、架橋した抗体を使用するほうがより大きい活性を有し得ることが示されているが、可溶性抗体の使用はしばしば、例えば培養をより十分に制御できることから架橋した抗体(例えばプレートまたはビーズなどの表面上で使用する場合)より好ましい。可溶性の抗NKp46(クローン9E2、Miltenyi)および可溶性の抗CD2(クローンOKT11)の組合せを使用すると、架橋条件と比較して差がなく、全ての実験をその後、可溶性抗体活性化試薬によって実施した。

【0178】

(実施例8)

様々な量の抗NKp46を使用する活性化および拡大の評価

別々の実験において、異なる抗NKp46(Bab281)試薬を、2つの拡大条件: 1) IL-2(500 IU/mL ヒトインターロイキン2(Miltenyi Biotech))、または2) IL-15(10 ng/mL ヒトインターロイキン15(Miltenyi Biotech))において3つの濃度(10 ng/mL、50 ng/mL、および500 ng/mL)で評価した。

【0179】

1. 正常で健常なドナー由来のバフィーコートに、手動での遠心分離器での分離によって実施するFicoll(商標)による勾配細胞分離を行った。単核細胞を、実験室規模のMiltenyi LSカラム分離を使用する $\alpha\beta$ T細胞枯渇に供した。得られた $\alpha\beta$ TCRneg細胞集団を、24ウェルプレート中0.25~0.5×10⁶個/mLの細胞播種濃度において、500 ng/mL抗CD2(クローンOKT11)および抗NKp46(Bab281)の3つの濃度: 10 ng/mL、50 ng/mL、または500 ng/mLのうちの1つの組合せを有する、BINATE培地およびIL-2またはIL-15を用いるフィーダーフリーの培養条件に置いた。

【0180】

2. 活性化 $\alpha\beta$ TCRneg細胞集団を、BINATE培地および500 IU/mL IL-2または10 ng/mL IL-15を用いて、細胞播種濃度0.25~0.5×10⁶個/mLでT75フラスコ(あるいは細胞播種濃度は、培養バッグ、フラスコ、または他の大きい培養容器、例えばバイオリアクター(G-Rex)では1×10⁶個/mLまでの範囲であり得る)において、フィーダーフリー培養条件でさらに培養拡大させた。培地交換はプレートまたはフラスコの場合、新鮮なBINATE培地およびIL-2またはIL-15を用い、3日毎に(バイオリアクターではより少ない頻度で(5~7日毎))

行った。

【0181】

3. 15日目の拡大の終わりに、BINATE細胞を、NKおよび $\gamma\delta$ CD3+T細胞含有量ならびにそのサブセット、例えばCD56に関して解析し、可能性のある混入細胞タイプ、例えば $\alpha\beta$ TCR+T細胞のさらなる解析を行った。

【0182】

BINATE細胞の表現型は、総細胞集団のパーセンテージとして報告され、培養をIL-15による拡大によって拡大させた場合に、抗NKp46 (Bab281)の3つの濃度の間で有意差を示さなかった。NK集団(CD56+CD3-)は、500 ng/ml抗NKp46 (Bab281)、50 ng/ml抗NKp46 (Bab281)、および10 ng/ml抗NKp46 (Bab281)に関してそれぞれ、84.5%、87%、および87.2%を構成した。 $\gamma\delta$ TCR CD3+集団はそれぞれ、11.4%、8.7%、および8.1%を構成したが、CD3+56+集団はそれぞれ、7.40%、5.40%、および5.30%を構成した。 $\alpha\beta$ TCR+細胞は、全ての濃度で実質的に検出不能であった。

【表1】

表1

総%BINATE表現型	CD56+ CD3-	CD3+	CD3+ CD56+	CD3+ CD56-	$\alpha\beta$ TCR+
Bab281 500 ng/OKT11 500 ng/IL-15	84.50	11.40	7.40	4.00	0.00
Bab281 50 ng/OKT11 500 ng/IL-15	87.00	8.70	5.40	3.30	0.01
Bab281 10 ng/OKT11 500 ng/IL-15	87.20	8.10	5.30	2.80	0.01
Bab281 500 ng/OKT11 500 ng/IL-2	85.70	4.40	2.90	1.40	0.00
Bab281 50 ng/OKT11 500 ng/IL-2	82.80	4.50	3.90	0.60	0.00
Bab281 10 ng/OKT11 500 ng/IL-2	82.40	4.80	4.00	0.80	0.09

【0183】

(実施例9)

活性化および拡大させた細胞のマーカー評価

異なる実験では、医薬品等の製造管理及び品質管理に関する基準 (Good Manufacturing Practice (GMP)) 品質の10 ng/ml抗NKp46 (Bab281)抗体およびGMP品質の500 ng/ml抗CD2 (OKT11)抗体の組合せによる活性化後の2つの拡大条件 (すなわち、IL-2およびIL-15) にお

けるB I N A T E 表現型を比較した。

【0184】

1. 正常で健常なドナー由来のパフィーコートに、手動での遠心分離器での分離によって実施するF i c o l l (商標) による勾配細胞分離を行った。単核細胞を、実験室規模のM i l t e n y i L S カラム分離を使用する $\alpha\beta$ T細胞枯渇に供した。得られた $\alpha\beta$ T C R n e g 細胞集団を、24ウェルプレート中 $0.25\sim0.5\times10^6$ 個/mlの細胞播種濃度において、 500 ng/ml 抗C D 2 (O K T 1 1) および 10 ng/ml 抗N K p 4 6 (B a b 2 8 1) (あるいは、活性化剤の他の濃度を使用してもよく、他の剤を活性化のために添加してもよい) を有する、B I N A T E 培地および 500 IU/ml I L - 2 または 10 ng/ml I L - 1 5 のいずれかを用いる、フィーダーフリー培養条件に置いた。

10

【0185】

2. 活性化 $\alpha\beta$ T C R n e g 細胞集団を、B I N A T E 培地および 500 IU/ml I L - 2 または 10 ng/ml I L - 1 5 を用いて、細胞播種濃度 $0.25\sim0.5\times10^6$ 個/mlでT 7 5 フラスコ (あるいは細胞播種濃度は、培養バッグ、フラスコ、または他の大きい培養容器、例えばバイオリアクター (G - R e x) では 1×10^6 個/mlまでの範囲であり得る) において、フィーダーフリー培養条件でさらに培養拡大させた。培地交換はプレートまたはフラスコの場合、新鮮なB I N A T E 培地およびI L - 2 またはI L - 1 5 を用い、3日毎に (バイオリアクターではより少ない頻度で (5~7日毎)) 行った。

20

【0186】

3. 20日の培養拡大終わりに、B I N A T E 細胞を、自然、細胞傷害性、および疲弊発現細胞の含有量およびそのサブセットのマーカー、例えばC D 5 6、C D 1 6、およびC D 5 7 に関して詳細に解析し、可能性のある混入細胞タイプ、例えば $\alpha\beta$ T C R + T 細胞に関する追加の解析を行った。

【0187】

総B I N A T E 細胞集団は、I L - 1 5 およびI L - 2 による拡大後にそれぞれ、92%および84.3%のC D 5 6 + 自然細胞を含有した。集団は、I L - 1 5 およびI L - 2 による培養拡大後にそれぞれ、33%および12%のC D 5 6 + C D 1 6 + 細胞傷害性自然細胞、76%および59.6%のC D 8 + 細胞傷害性自然細胞、ならびに99%および96.5%のC D 5 6 + C D 5 7 - 未成熟自然細胞を含有した。I L - 1 5 またはI L - 2 のいずれかによる培養拡大後に検出可能な $\alpha\beta$ T C R + T 細胞は認められなかった。N K および $\gamma\delta$ T細胞のC D 4 +、C D 8 +、およびC D 4 - C D 8 - 集団を、以下の表2に提供する。

30

【表2-1】

表 2

	CD4+	CD8+	CD4-CD8-
NK IL-15	0	77.9	22.1
$\gamma\delta$ T細胞IL-15	1.2	20.7	76.1

40

【表2-2】

NK IL-2	0	72.2	27.8
$\gamma\delta$ T細胞IL-2	1.5	35.17	61.36

【0188】

(実施例10)

静止培養およびバイオリアクター培養条件下で拡大させた細胞の評価

別々の実験において、G M P 品質の 50 ng/ml 抗N K p 4 6 (B a b 2 8 1) 抗体

50

およびGMP品質の50 ng/ml抗CD2 (OKT11) 抗体の組合せによる活性化後の2つの拡大条件 (IL-2およびIL-15) における静止およびバイオリアクター培養条件でのBINATE増殖を比較した。

【0189】

1. 正常で健常なドナー由来のバフィーコートに、手動での遠心分離器での分離によって実施するFicoll (商標) による勾配細胞分離を行った。単核細胞を、実験室規模のMiltenyi LSカラム分離を使用する $\alpha\beta$ T細胞枯渇に供した。得られた $\alpha\beta$ TCRneg細胞集団を、24ウェルプレート中 $0.25\sim0.5\times10^6$ 個/mlの細胞播種濃度において、50 ng/ml抗CD2 (OKT11) および50 ng/ml抗NKp46 (Bab281) の組合せ (あるいは、活性化剤の他の濃度を使用してもよく、他の剤を活性化のために添加してもよい) を有する、BINATE培地および500 IU/ml IL-2または10 ng/ml IL-15のいずれかを用いる、フィーダーフリー培養条件に置いた。

10

【0190】

2. 活性化 $\alpha\beta$ TCRneg細胞集団を、BINATE培地および500 IU/ml IL-2または10 ng/ml IL-15を用いて、細胞播種濃度 $0.25\sim0.5\times10^6$ 個/mlでT75フラスコまたはG-Rexベンチトップバイオリアクター (あるいは細胞播種濃度は、培養バッグ、フラスコ、または他の大きい培養容器、例えばバイオリアクター (G-Rex) では 1×10^6 個/mlまでの範囲であり得る) において、フィーダーフリー培養条件でさらに培養拡大させた。培地交換は、プレートまたはフラスコの場合、新鮮なBINATE培地およびIL-15を用い、3日毎に (バイオリアクターではより少ない頻度で (5~7日毎)) 行った。

20

【0191】

3. 活性化 $\alpha\beta$ TCRneg細胞集団をまた、G-Rex培養デバイスにおいてBINATE培地および10 ng/ml IL-15を用い、細胞播種濃度 1×10^6 個/mlで、フィーダーフリー培養条件でさらに培養拡大させた。培地交換は、新鮮なBINATE培地およびIL-15を用い、7日毎に行った。

【0192】

総BINATE拡大を、図17に総細胞数として示す。フラスコにおいてIL-2またはIL-15のいずれかを補充したBINATE培地中の活性化 $\alpha\beta$ TCRneg細胞の拡大は、41日の期間で等価であった。同様に、バイオリアクターにおける最初の21日間での活性化 $\alpha\beta$ TCRneg細胞集団のIL-15による拡大は、フラスコにおけるIL-15による拡大と等価であった。

30

【0193】

(実施例11)

活性化および拡大した細胞のアロ反応性の評価

別々の実験において、IL-2またはIL-15のいずれかにおいて拡大させた活性化BINATE細胞集団のアロ反応性を評価した。

【0194】

1. 正常で健常なドナー由来のバフィーコートに、手動での遠心分離器での分離によって実施するFicoll (商標) による勾配細胞分離を行った。単核細胞を、実験室規模のMiltenyi LSカラム分離を使用する $\alpha\beta$ T細胞枯渇に供した。得られた $\alpha\beta$ TCRneg細胞集団を、24ウェルプレート中 $0.25\sim0.5\times10^6$ 個/mlの細胞播種濃度において、50 ng/ml抗CD2 (OKT11) および50 ng/ml抗NKp46 (Bab281) の組合せ (あるいは、活性化剤の他の濃度を使用してもよく、他の剤を活性化のために添加してもよい) を有する、BINATE培地を用いるフィーダーフリー培養条件に置いた。

40

【0195】

2. 活性化 $\alpha\beta$ TCRneg細胞集団を、BINATE培地および500 IU/ml IL-2または10 ng/ml IL-15のいずれかを用いて、細胞播種濃度 $0.25\sim$

50

0.5 × 10⁶ 個／m l で T 7 5 フラスコにおいて、フィーダーフリー培養条件でさらに培養拡大させた。培地交換はフラスコの場合、新鮮な B I N A T E 培地および I L - 2 または I L - 1 5 を用い、3 日毎に行った。

【0196】

3. B I N A T E 細胞および3人の無作為な健康なドナー (H D) の P B M C に由来する刺激細胞を、一方向混合リンパ球反応 (M L R) において試験した。3人の H D に由来する刺激細胞をプールし、放射線 (30 G y) を照射した後に使用した。B I N A T E 細胞を、100 μ l / ウェル (細胞 1 × 10⁵ 個) で同数の刺激細胞と共に96ウェル平底マイクロタイタープレートにおいて B I N A T E 培地 200 μ l に播種した。5日間インキュベーション後、培養物に 18 k B q³ H - チミジンを12時間パルスし、ガラス繊維フィルター上で回収した。乾燥させたフィルターを、M i c r o b e t a T r i l u x 1 4 5 0 カウンター (W a l l a c, P e r k i n E l m e r) で計数した。結果を S I (抗原による c p m / バックグラウンドの c p m) として表記した。サイトカインを添加しなかった B I N A T E 細胞を陰性対照として使用し、陽性対照は、サイトカイン (I L - 2 または I L - 1 5) と共に播種した B I N A T E 細胞によって表された。

【0197】

混合リンパ球共培養を、増殖の指標である³Hチミジン取り込み (C P M) に関して解析した。I L - 1 5 の実験では、陰性対照は、I L - 1 5 を補充していない非刺激 B I N A T E 細胞からなり、³Hチミジン取り込みは1144であり、本質的に増殖していないことを示した。放射線照射したプールした健康ドナー細胞 (H D) は、³Hチミジン取り込みが1194であり、これも増殖していないことを示した。陽性対照は、I L - 1 5 による増殖刺激を含み、³Hチミジン取り込みは15558であり、陰性対照と比較して14倍の増加であった。I L - 1 5 における拡大を受けた活性化 B I N A T E 細胞は、³Hチミジン取り込みが942であり、本質的にバックグラウンドと差がなかった。

【0198】

I L - 2 の実験では、陰性対照は、I L - 2 を補充していない非刺激 B I N A T E 細胞を含み、³Hチミジン取り込みは834であり、本質的に増殖していないことを示した。放射線照射したプールしたヒトドナー細胞 (H D) は、³Hチミジン取り込みが1194であり、これも増殖していないことを示した。陽性対照は、I L - 2 による増殖刺激を含み、³Hチミジン取り込みは18834であり、陰性対照と比較して22倍の増加であった。I L - 1 5 における拡大を受けた活性化 B I N A T E 細胞は、³Hチミジン取り込みが1245であり、本質的にバックグラウンド対照と差がなかった。

【0199】

M L R 応答が存在しなかったことは、α β T C R + T 細胞の非存在による可能性があり、自然 B I N A T E 細胞集団にアロ反応性が欠如していることを裏付ける。アロ反応性が存在しないことは、細胞が移植片対宿主応答をもたらす能力を欠如することを裏付けることから、臨床的に重要である。

【0200】

(実施例12)

異なる拡大条件下での細胞増殖および表現型の評価

別々の実験において、G M P 品質の抗 N K p 4 6 (B a b 2 8 1) 抗体 (50 n g / m l) (C a p r i c o) および G M P 品質の抗 C D 2 (O K T 1 1) 抗体 (50 n g / m l) (C a p r i c o) による活性化後の増殖能および B I N A T E 表現型を5つの異なる拡大条件において比較した。

【0201】

1. 正常で健康なドナー由来のバフィーコートに、手動での遠心分離器での分離によって実施する F i c o l l (商標) による勾配細胞分離を行った。単核細胞を、実験室規模の M i l t e n y i L S カラム分離を使用する α β T 細胞枯渇に供した。得られた α β T C R n e g 細胞集団を、24ウェルプレート中 0.25 ~ 0.5 × 10⁶ 個 / m l の細胞播種濃度において、50 n g / m l 抗 C D 2 (O K T 1 1) および 50 n g / m l 抗 N K

p 4 6 (B a b 2 8 1) の組合せ (あるいは、活性化剤の他の濃度を使用してもよく、他の剤を活性化のために添加してもよい)、ならびに以下の拡大補助剤:

- a. 500 IU/mL IL-2 (Miltenyi Biotec)
- b. 10 ng/mL IL-15 (Miltenyi Biotec)
- c. 500 IU/mL IL-2およびIL-15 10 ng/mLの組合せ (IL-2 / IL-15)
- d. 500 IU/mL IL-2および10 ng/mL OKT3クローン抗CD3抗体 (Miltenyi Biotec)の組合せ (IL-2 / OKT3)
- e. IL-15 10 ng/mLおよび500 IU/mL IL-2および10 ng/mL OKT3の組合せ (IL-2 / IL-15 / OKT3)

のうちの1つを有するBINATE培地を用いるフィーダーフリー培養条件に置いた。

【0202】

2. 活性化 $\alpha\beta$ TCRneg細胞集団を、BINATE培地を用いて、細胞播種濃度 $0.25 \sim 0.5 \times 10^6$ 個/mLでT75フラスコ (あるいは細胞播種濃度は、培養バッグ、フラスコ、または他の大きい培養容器、例えばバイオリアクター (G-Rex) では 1×10^6 個/mLまでの範囲であり得る) において、上記に列挙した5つの拡大条件のうちの1つを用いてフィーダーフリー培養条件でさらに培養拡大させた。培地交換はプレートまたはフラスコの場合、3日毎に (バイオリアクターではより少ない頻度で (5~7日毎)) 新鮮なBINATE培地によって行い、最初の培養活性化および拡大相の間、同じ拡大条件を使用した。

【0203】

総BINATE拡大を、図18に総細胞数として示す。フラスコにおけるIL-2、IL-15、またはIL-2 / OKT3のいずれかを補充したBINATE培地中の活性化 $\alpha\beta$ TCRneg細胞の拡大は、40日間にわたって等価であった。フラスコにおけるIL-2 / IL-15またはIL-2 / IL-15 / OKT3のいずれかを補充したBINATE培地中の活性化 $\alpha\beta$ TCRneg細胞の拡大は、26日間の期間にわたって等価であったが、その後増殖は遅くなり、全細胞数は、培養26日から41日までは他の3群と比較して少なかった。

【0204】

以下の表3に示すように、培養拡大の7、20、および30日目では、5つの条件の各々からのBINATE細胞は、フローサイトメトリーによってNKまたは $\gamma\delta$ T細胞であると決定された。表4に示すように、7、20、および30日での条件の各々からの細胞を同様に、フローサイトメトリーによって細胞上の自然、細胞傷害性、および疲弊の特異的マーカー、および未成熟発現、ならびに $\gamma\delta$ T細胞における特異的VdTCRの使用に関して解析した。

10

20

30

40

50

【表 3 - 1】

表 3

	CD56+CD3-	CD3+CD56+	CD3+CD56-	CD3+ 全体
	NK	$\gamma\delta$ T 細胞	$\gamma\delta$ T 細胞	$\gamma\delta$ T 細胞
IL-15				
7 日目	56.25	21.65	14.55	36.2
20 日目	83.45	12.55	3.7	16.25
30 日目	99.3	0.6	0.1	1.0
IL-2				
7 日目	62.4	11.85	12.55	24.4
20 日目	56.55	22.95	15.3	38.25
30 日目	85.95	12.65	1.15	13.8
IL-2/IL-15				
7 日目	52.4	24.15	15.2	39.35
20 日目	51.7	36.85	11	47.85
30 日目	49.15	49.55	1.15	50.7
IL-2/OKT3				
7 日目	29.15	9.4	42.55	51.95
20 日目	26.65	26.3	43.25	69.55
30 日目	58.9	29.2	5.55	34.75

【表 3 - 2】

	CD56+CD3-	CD3+CD56+	CD3+CD56-	CD3+ 全体
	NK	$\gamma\delta$ T 細胞	$\gamma\delta$ T 細胞	$\gamma\delta$ T 細胞
IL-2/IL-15/OKT3				
7 日目	29.8	26.3	43.95	70.25
20 日目	36.6	47.5	15.35	62.85
30 日目	53.6	44.15	2.15	46.3

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4

拡大条件	CD56+ CD3- 細胞中の %CD16+	CD56+ CD3- 細胞中の %CD57+	CD3+ CD56- 細胞中の %CD16+	CD3+ CD56- 細胞中の %CD57+	CD3+ CD56- 細胞中の %CD16+	CD3+ CD56- 細胞中の %CD57+	CD3+ CD56- 細胞中の %CD16+	CD3+ CD56- 細胞中の %CD57+	CD3+ CD56- 細胞中の %Vd1	CD3+ CD56+ 細胞中の %Vd1-Vd2	CD3+ CD56- 細胞中の %Vd2+	CD3+ CD56- 細胞中の %Vd1-Vd2
IL-15												
7日目	54.75	25.30	0.60	27.10	2.70	24.05	10.15	87.30	30.55	2.50	66.70	2.60
20日目	43.45	6.85	26.45	30.80	2.60	10.60	20.00	67.80	11.90	11.85	84.10	2.50
30日目	27.95	5.55	23.50	18.70	1.95	10.60	17.10	27.15	9.60	5.65	36.05	3.85
IL-2												
7日目	52.75	29.65	3.00	48.10	1.60	34.85	42.60	47.75	52.95	8.95	39.30	7.60
20日目	46.50	15.20	22.90	31.40	3.85	17.95	85.15	4.15	76.80	9.45	16.30	6.65
30日目	17.10	5.65	24.15	36.80	3.05	24.00	72.20	9.65	73.35	19.40	14.80	11.50
IL-2/IL-15												
7日目	55.75	27.10	5.40	41.80	0.00	8.60	28.00	69.30	20.05	2.35	76.55	3.50
20日目	56.60	14.35	35.85	22.15	12.55	22.05	52.20	41.60	35.65	5.35	54.40	9.20
30日目	33.35	26.55	21.70	37.65	1.75	11.70	82.50	9.80	71.45	7.20	16.40	11.70
IL-2/OKT3												
7日目	57.70	31.95	1.65	24.50	0.00	7.90	62.15	26.65	42.95	9.80	37.45	19.30
20日目	55.40	14.55	29.05	27.70	4.10	14.00	81.40	5.75	72.75	13.80	14.40	10.75
30日目	43.25	25.15	27.65	34.70	1.95	21.15	70.55	17.15	52.25	6.05	34.90	12.15
IL-2/IL-15/ OKT3												
7日目	53.85	29.80	2.45	31.60	0.00	4.05	42.55	46.90	44.50	9.80	38.10	17.25
20日目	48.70	17.65	12.25	17.80	13.00	16.55	49.05	32.60	43.35	16.70	38.75	15.40
30日目	31.40	29.90	14.70	22.85	2.55	19.15	54.30	29.20	50.25	16.10	26.25	22.60

【0205】

細胞疲弊の指標であるPD-1発現は、低いことが示された。30日目に、IL-15による拡大条件は総BINATE集団において2.7%の発現を示し、CD56+CD3-NK細胞では2%の発現、CD3+CD56- γ δ T細胞では10.6%の発現、およびCD3+CD56+ γ δ T細胞では17.05%の発現を示し、疲弊の欠如を実証した。IL-2による拡大条件下では、PD-1発現は、フローサイトメトリーによって決定した場合にIL-2による拡大条件では総BINATE集団の14.2%の低さであることが示され、CD56+CD3-NK細胞は2%PD-1を発現し、CD3+CD56- γ δ T細胞およびCD3+CD56+ γ δ T細胞はそれぞれ、62.9%および78.3

%を発現した。

【0206】

(実施例13)

CD107a細胞傷害性

実施例12の5つの拡大条件の各々からの30日目の細胞を、IMR32、SH-SY5Y（神経芽腫細胞株）、およびK562（B細胞白血病細胞株）を含む腫瘍細胞株と共培養した。3日間培養後、細胞傷害性の顆粒放出の尺度（measurement）であるCD107aの発現を、基底BINATE細胞およびそれぞれの腫瘍細胞株と共培養したBINATE細胞においてフローサイトメトリー解析によって測定した。表5は、5つの拡大条件（IL-2、IL-2/OKT3、IL-15、IL-2/IL-15、およびIL-2/IL-15/OKT3）の各々において、各腫瘍細胞株および各BINATEサブセット（CD56+CD3-NK細胞、およびCD3+CD56+γδT細胞、およびCD3+CD56-γδT細胞）に関する基底値を差し引いた腫瘍刺激発現間の差を示す。統計学的有意性をT検定によるp値として報告する。

【表5-1】

表5

CD56+CD3- NK	IMR32 マイナス 基底値	P 値	SH-SY5Y マイナス 基底値	P 値	K562 マイナス 基底値	P 値
IL-2	8.60	0.042	29.30	0.069	48.55	0.023
IL-2/OKT3	6.60	0.022	40.55	0.025	57.05	0.005
IL-15	29.60	0.103	35.10	0.050	54.90	0.049
IL-2/IL-15	8.25	0.058	25.90	0.122	50.55	0.045
IL-2/IL-15/OKT3	3.70	0.020	45.35	0.037	47.55	0.079
CD3+CD56+ γδT	IMR32 マイナス 基底値	P 値	SH-SY5Y マイナス 基底値	P 値	K562 マイナス 基底値	P 値
IL-2	22.05	0.015	21.05	0.066	25.05	0.045
IL-2/OKT3	30.75	0.227	44.40	0.057	35.75	0.259
IL-15	23.45	0.127	45.20	0.033	57.55	0.039
IL-2/IL-15	26.90	0.102	14.90	0.321	28.35	0.024
IL-2/IL-15/OKT3	33.15	0.068	22.70	0.184	35.25	0.199
CD3+CD56-	IMR32	P 値	SH-SY5Y	P 値	K562	P 値

【表5-2】

γδT	マイナス 基底値		マイナス 基底値		マイナス 基底値	
IL-2	1.35	0.012	-2.70	0.024	2.85	0.007
IL-2/OKT3	-1.70	0.259	5.05	0.296	3.05	0.405
IL-15	4.15	0.14	22.90	0.192	8.90	0.088
IL-2/IL-15	-7.05	0.277	-4.25	0.264	-1.20	0.433
IL-2/IL-15/OKT3	-0.20	0.443	3.05	0.278	9.70	0.345

【0207】

(実施例14)

異なる拡大条件下での表現型マーカーの評価

実施例12における3つの拡大条件（条件IL-2、IL-15、およびIL-2/OKT3）からの20日目の細胞を、特異的活性化、細胞傷害性、および疲弊マーカーに関

して解析した。図19は、IL-15による拡大条件に関するマーカータイプ（活性化、細胞傷害性、および疲弊／未成熟）毎の表現型解析を示す。図20は、IL-2による拡大条件に関するマーカータイプ（活性化、細胞傷害性、および疲弊／未成熟）毎の表現型解析を示す。図21は、IL-2／OKT3拡大条件に関するマーカータイプ（活性化、細胞傷害性、および疲弊／未成熟）毎の表現型解析を示す。全ての条件下で、BINATE細胞は、一般的に高い活性化および細胞傷害性、ならびに低い疲弊を示した。

【0208】

（実施例15）

in vitro 腫瘍殺滅の評価

異なる実験では、10 ng/ml 抗NKp46（Bab281）抗体および500 ng/ml 抗CD2（OKT11）抗体の組合せによる活性化後の2つの拡大条件（IL-2 およびIL-15）におけるBINATE細胞の*in vitro* 腫瘍殺滅を比較した。

【0209】

1. 正常で健常なドナー由来のバフィーコートに、手動での遠心分離器での分離によって実施するFicoll（商標）による勾配細胞分離を行った。単核細胞を、実験室規模のMiltenyi LSカラム分離を使用するαβT細胞枯渇に供した。得られたαβTCRneg細胞集団を、24ウェルプレート中0.25～0.5×10⁶個/mlの細胞播種濃度において、500 ng/ml 抗CD2（OKT11）および10 ng/ml 抗NKp46（Bab281）の組合せ（あるいは、活性化剤の他の濃度を使用してもよく、他の剤を活性化のために添加してもよい）を有する、BINATE培地および500 IU/ml IL-2または10 ng/ml IL-15のいずれかを用いる、フィーダーフリー培養条件に置いた。

【0210】

2. 活性化αβTCRneg細胞集団を、BINATE培地および500 IU/ml IL-2または10 ng/ml IL-15と共に、細胞播種濃度0.25～0.5×10⁶個/mlでT75フラスコ（あるいは細胞播種濃度は、培養バッグ、フラスコ、または他の大きい培養容器、例えばバイオリアクター（G-Rex）では1×10⁶個/mlまでの範囲であり得る）において、フィーダーフリー培養条件でさらに培養拡大させた。培地交換はプレートまたはフラスコの場合、新鮮なBINATE培地およびIL-2またはIL-15を用い、3日毎に（バイオリアクターではより少ない頻度で（5～7日毎））行った。

【0211】

3. 20日間の培養拡大の終了後、BINATE細胞を、腫瘍共培養実験に5～7日間置いた。以下の表6に示した実験は、白血病細胞株を、6ウェル培養皿において2 ml 培地／培養ウェル中で1：1のエフェクターの標的に対する比（すなわち、0.5 MのBINATE細胞（エフェクター）と共に0.5 Mの腫瘍細胞（標的））で培養することを伴った。

【0212】

以下の表7に示す実験は、固形腫瘍細胞株（神経芽腫、肉腫、および結腸腫瘍株）を、6ウェル培養皿において2 ml 培地／培養ウェル中で2：1のエフェクターの標的に対する比（すなわち、0.5 MのBINATE細胞（エフェクター）と共に0.25 Mの腫瘍細胞（標的））で培養することを伴った。腫瘍およびエフェクター細胞の共培養は、サイトカインの非存在下で実施した。共培養を顕微鏡法およびフローサイトメトリーによって3～7日目に評価した。

【0213】

共培養実験において残存腫瘍を調べると、表6から、IL-2またはIL-15のいずれかの存在下で拡大させた活性化BINATE細胞が、全ての細胞株の50%またはそれより多くの腫瘍細胞、AML細胞株の4～5つでは75%より多くの根絶に成功したことが示される。表6では、全ての細胞株の短期間の共培養は、全ての221白血病細胞、>80%のDaudi白血病細胞、およびしばしば自然殺滅に対して抵抗性であると考えら

10

20

30

40

50

れている K a r p a s 細胞株の最大 5 0 % を殺滅する B I N A T E 細胞をもたらした。

【表 6】

表6-BINATE細胞との共培養後の残存腫瘍細胞

急性骨髄性白血病細胞株	IL-2による拡大	IL-15による拡大
OCI-AML	2.3	0.8
697	16.7	9.4
MV4:11	4.2	22.8
RS4;11	35.5	54.2
Molm-1	1	22.8
THP1	0.5	1.1
急性リンパ球性白血病細胞株		
Daudi	5.10	9.3
221	1.05	0.85
Karpas	87.6	71.4

【0214】

共培養実験において残存腫瘍を調べる場合、表7は、IL-2またはIL-15のいずれかによって拡大させた活性化BINATE細胞が、短期間の共培養実験において神経芽腫腫瘍の根絶に成功したことを示している。IL-2による拡大BINATE細胞は、結腸がんとの共培養において試験しなかったが、IL-15による拡大BINATE細胞は、肉腫および結腸がんに対して活性を示した。

【表 7】

表7-BINATE細胞との共培養後の残存腫瘍細胞

	BINATE IL-15	BINATE IL-2
神経芽腫		
SH-SY5Y	0.9	4.5
IMR32	0.2	18.7
SKNSH	18.5	27.05
CHLA	3.85	14.75
LAN-1	6.5	10.8
SKNSKBeC	6.8	35.6
肉腫		
RD	1.7	15.3
A673	0.6	0.7
CT10	0.2	0.7
G401	0.2	ND*
結腸		
SW480	4.6	ND
DLD1	8.3	ND

*決定していない

【0215】

(実施例16)

i n v i t r o 形質導入効率の評価

別々の実験において、形質導入の安定性を評価するために、第3世代GD2キメラ抗原受容体(CAR)をコードするレトロウイルス構築物によるBINATE細胞の初期および後期*in vitro*形質導入効率を、 10 ng/ml 抗NKp46(Bab281)抗体および 500 ng/ml 抗CD2(OKT11)抗体の組合せによる活性化後に比較した。

【0216】

1. 正常で健常なドナー由来のバフィーコートに、手動での遠心分離器での分離によって実施するFicoll(商標)による勾配細胞分離を行った。単核細胞を、実験室規模のMiltenyi LSカラム分離を使用する $\alpha\beta\text{T}$ 細胞枯渇に供した。得られた $\alpha\beta\text{T}$ CRneg細胞集団を、24ウェルプレート中 $0.25\sim0.5\times10^6$ 個/mlの細胞播種濃度において、 500 ng/ml 抗CD2(OKT11)および 10 ng/ml 抗NKp46(Bab281)の組合せ(あるいは、活性化剤の他の濃度を使用してもよく、他の剤を活性化のために添加してもよい)を有する、BINATE培地および 500 IU/ml IL-2を用いる、フィーダーフリー培養条件に置いた。

【0217】

2. 本明細書に記載される任意のBINATE、CARの生成のために、活性化した培養拡大 $\alpha\beta\text{T}$ CRneg細胞集団からの細胞のアリコートを、4~15日目に採取し、特異的キメラ抗原受容体の構築物を含有するガンマレトロウイルス上清の存在下、 0.25×10^6 個/mlの濃度でヒトフィブロネクチンコーティングプレートまたは代替的に培養バッグ(Gobain))に播種した。3から4日後、細胞を洗浄し、拡大または凍結保存のいずれかを含み得るプロセスを非形質導入細胞に関しても継続する。拡大条件は、 500 IU/ml ヒトインターロイキン2(IL-2)または 10 ng/ml IL-15を含有し得るが、本明細書において言及したいいずれかの条件の組合せを含有し得る。本明細書で使用されるキメラ抗原受容体(CAR)構築物は、CAR、GD2、CAR、123、およびCAR、CD19を含み、これは非機能的マーカー、例えばCD34表面抗原の断片または変異体CD19断片を含有する(ある特定の構築物の説明に関しては実施例25を参照されたい)。本明細書における方法のある特定の変形形態では、レトロウイルストランスフェクションを補助するために、RETRONECTINの代わりにVECTOFUSION-1(Miltenyi Biotec)を使用してもよく、遺伝子改変は、選択される任意の抗原の他のCAR構築物の遺伝子改変または他の分子による改変を含み得る。この例に関して、5日目での活性化 $\alpha\beta\text{T}$ CRneg細胞集団を、ヒトフィブロネクチンコーティングプレート(または代替的に培養バッグ(Gobain))に 0.25×10^6 個/mlの濃度で、GD2キメラ抗原受容体(CAR)の構築物を含有するガンマレトロウイルス上清の存在下に置いた。GD2構築物は、選択および追跡マーカーとしてCD34受容体の変異体断片を含有した。

【0218】

3. 3日後、形質導入細胞を洗浄し、BINATE培地および 500 IU/ml IL-2を用いて細胞播種濃度 $0.25\sim0.5\times10^6$ 個/mlでT75フラスコ(あるいは細胞播種濃度は、培養バッグ、フラスコ、または他の大きい培養容器、例えばバイオリアクター(G-Rex)では 1×10^6 個/mlまでの範囲であり得る)において、フィーダーフリー培養条件でさらに培養拡大させた。培地交換はプレートまたはフラスコの場合、新鮮なBINATE培地およびIL-2を用い、3日毎(バイオリアクターの場合はより少ない頻度で(5~7日毎))に行った。

【0219】

4. 形質導入の3日後および15日後、BINATE細胞サブセットならびに $\gamma\delta\text{T}$ 細胞のVdTCRサブセットを、変異体CD34受容体(形質導入効率の指標)の発現に関して解析した。3日目および15日目に、CD56+CD3-NK細胞の形質導入効率はそれぞれ、82.4%および82.4%であった。3日目および15日目に、CD3+56+細胞の形質導入効率はそれぞれ、43.2%および62.4%であった。3日目および15日目に、CD3+CD56- $\gamma\delta\text{T}$ 細胞の形質導入効率はそれぞれ、37.3%およ

び56.8%であった。遺伝子改変は培養期間の間安定であり、このことは高度の形質導入および永続的な組み込みを可能にする高度に活性化された集団であることを意味した。

【0220】

類似の実験において、BINATE亜集団の形質導入は、GD2 CAR構築物の高い形質導入、ならびにVd1およびVd2 TCR $\gamma\delta$ T細胞の両方のポリクローナル形質導入を示した。CD56+CD3-NK細胞は69%で形質導入されたが、CD3+ $\gamma\delta$ T細胞は39%で形質導入された。Vd1 TCR集団は67%の形質導入効率を有し、Vd2 TCR集団は34%の形質導入効率を有した。

【0221】

(実施例17)

GD2 CARの*in vitro*形質導入後の増殖の評価

別々の実験において、50 ng/ml抗NKp46 (Bab281) 抗体および50 ng/ml抗CD2 (OKT11) 抗体の組合せによる活性化後の、第3世代GD2 CARをコードするレトロウイルス構築物によるBINATE細胞の*in vitro*形質導入後の増殖能を、IL-2およびIL-15による拡大条件において非改変BINATE細胞と比較した。

【0222】

1. 正常で健常なドナー由来のバフィーコートに、手動での遠心分離器での分離によって実施するFicoll (商標) による勾配細胞分離を行った。単核細胞を、実験室規模のMiltenyi LSカラム分離を使用する $\alpha\beta$ T細胞枯渇に供した。得られた $\alpha\beta$ TCRneg細胞集団を、24ウェルプレート中0.25~0.5 $\times 10^6$ 個/mlの細胞播種濃度において、50 ng/ml抗CD2 (OKT11) および50 ng/ml抗NKp46 (Bab281) の組合せ (あるいは、活性化剤の他の濃度を使用してもよく、他の剤を活性化のために添加してもよい) を有する、BINATE培地および500 IU/ml IL-2または10 ng/ml IL-15を用いる、フィーダーフリー培養条件に置いた。

【0223】

2. 活性化非遺伝子改変 $\alpha\beta$ TCRneg細胞集団を、BINATE培地および500 IU/ml IL-2または10 ng/ml IL-15を用いて、細胞播種濃度0.25~0.5 $\times 10^6$ 個/mlでT75フラスコ (あるいは細胞播種濃度は、培養バッグ、フラスコ、または他の大きい培養容器、例えばバイオリアクター (G-Rex) では1 $\times 10^6$ 個/mlまでの範囲であり得る) において、フィーダーフリー培養条件でさらに培養拡大させた。培地交換はプレートまたはフラスコの場合、新鮮なBINATE培地およびIL-2またはIL-15を用い、3日毎に (バイオリアクターではより少ない頻度で (5~7日毎)) 行った。

【0224】

3. 5日目に、活性化 $\alpha\beta$ TCRneg細胞集団を、ヒトフィブロネクチンコーティングプレートまたは培養バッグ (Gobain) において0.25 $\times 10^6$ 個/mlの濃度でGD2キメラ抗原受容体 (CAR) の構築物を含有するガンマレトロウイルス上清の存在下に置いた。GD2構築物は、選択および追跡マーカーとしてCD34受容体の変異体断片を含有した。

【0225】

4. 5日後、形質導入細胞を洗浄し、BINATE培地および500 IU/ml IL-2または10 ng/ml IL-15を用いて、細胞播種濃度0.25~0.5 $\times 10^6$ 個/mlでT75フラスコ (あるいは細胞播種濃度は、培養バッグ、フラスコ、または他の大きい培養容器、例えばバイオリアクター (G-Rex) では1 $\times 10^6$ 個/mlまでの範囲であり得る) において、フィーダーフリー培養条件でさらに培養拡大させた。培地交換はプレートまたはフラスコの場合、新鮮なBINATE培地およびIL-2またはIL-15を用い、3日毎に (バイオリアクターではより少ない頻度で (5~7日毎)) 行った。

10

20

30

40

50

【0226】

5. 細胞数を7日毎にBINATEおよびBINATE・CAR GD2集団に関して記録した。

【0227】

非改変BINATE細胞およびBINATE・CAR GD2細胞を、形質導入の前に拡大させた(図22における縦線によって表される)。形質導入後の拡大を、異なる条件に関して図22における斜線によって表す。遺伝子改変細胞または非改変細胞の間に有意差はなく、全細胞数に関してもIL-2またはIL-15による拡大に差はなかった。

【0228】

(実施例18)

固形腫瘍のin vitro殺滅の評価

別々の実験において、第3世代のGD2 CARをコードするレトロウイルス構築物による活性化BINATEの形質導入後の2つの拡大条件(IL-2およびIL-15)における固形腫瘍のin vitro殺滅を比較した。

【0229】

1. 正常で健常なドナー由来のバフィーコートに、手動での遠心分離器での分離によって実施するFicoll(商標)による勾配細胞分離を行った。単核細胞を、実験室規模のMiltenyi LSカラム分離を使用する $\alpha\beta$ T細胞枯渇に供した。得られた $\alpha\beta$ TCRneg細胞集団を、24ウェルプレート中 $0.25\sim0.5\times10^6$ 個/mlの細胞播種濃度において、 500 ng/ml 抗CD2(OKT11)および 10 ng/ml 抗NKp46(Bab281)の組合せ(あるいは、活性化剤の他の濃度を使用してもよく、他の剤を活性化のために添加してもよい)を有する、BINATE培地および 500 IU/ml IL-2または 10 ng/ml IL-15を用いる、フィーダーフリー培養条件に置いた。

【0230】

2. 5日目、活性化 $\alpha\beta$ TCRneg細胞集団を、GD2キメラ抗原受容体の構築物を含むガンマレトロウイルス上清の存在下、 0.25×10^6 個/mlの濃度でヒトフィブロネクチンコーティングプレートまたは培養バッグ(Gobain)に置いた。GD2構築物は、選択および追跡マーカーとしてCD34受容体の変異体断片を含有した。

【0231】

3. 3日後、形質導入細胞を洗浄し、BINATE培地および 500 IU/ml IL-2または 10 ng/ml IL-15を用いて、細胞播種濃度 $0.25\sim0.5\times10^6$ 個/mlでT75フラスコ(あるいは細胞播種濃度は、培養バッグ、フラスコ、または他の大きい培養容器、例えばバイオリアクター(G-Rex)では 1×10^6 個/mlまでの範囲であり得る)において、フィーダーフリー培養条件でさらに培養拡大させた。培地交換はプレートまたはフラスコの場合、新鮮なBINATE培地およびIL-2またはIL-15を用い、3日毎(バイオリアクターの場合はより少ない頻度で(5~7日毎))に行った。

【0232】

4. 20日の培養拡大の終わりに、BINATE細胞を、5~7日間、腫瘍の共培養実験に置いた。実験は、6ウェル培養皿において2ml培地/培養ウェル中で1:1のエフェクターの標的に対する比で(すなわち、 0.5 M BINATE細胞またはBINATE・CAR GD2細胞(エフェクター)を 0.5 M 腫瘍細胞(標的)と共に)培養することを伴った。腫瘍およびエフェクター細胞の共培養は、サイトカインの非存在下で実施した。共培養は、3~7日目に顕微鏡法およびフローサイトメトリーによって評価した。

【0233】

表8は、腫瘍の、非改変BINATE IL-2またはBINATE IL-15、またはCAR GD2改変BINATE IL-2またはCAR GD2改変BINATE IL-15のいずれかとの共培養後の残存腫瘍のパーセンテージに関する共培養からのデータを示す。対照における残存腫瘍を100%として測定した。BINATE IL-2お

10

20

30

40

50

よびBINATE IL-15はいずれも有意な腫瘍殺滅を示した。CAR-GD2改変BINATE IL-2およびBINATE IL-15も同様に、有意な殺滅を示した。

【表 8】

表8-BINATE細胞およびBINATE.CAR.GD2細胞との共培養後の残存腫瘍細胞

	BINATE IL-2	BINATE.CARGD2 IL-2	BINATE IL-15	BINATE.CARGD2 IL-15
SH-SY5Y	47.53	41.1	8	18.85
LAN-1	43.5	5.5	14.7	15.9
CHLA	56.9	41.6	44.35	21.9
IMR-32	59.9	60.9	2.7	2.1

【0234】

(実施例19)

骨髓白血病細胞株の*in vitro*殺滅の評価

別々の実験において、第3世代CD123CARをコードするレトロウイルス構築物による活性化BINATEの形質導入後の長期間の共培養における骨髓白血病細胞株の*in vitro*殺滅を評価した。

【0235】

1. 正常で健常なドナー由来のバフィーコートに、手動での遠心分離器での分離によって実施するFicoll (商標) による勾配細胞分離を行った。単核細胞を、実験室規模のMiltenyi LSカラム分離を使用する $\alpha\beta$ T細胞枯渇に供した。得られた $\alpha\beta$ TCRneg細胞集団を、24ウェルプレート中 $0.25 \sim 0.5 \times 10^6$ 個/mlの細胞播種濃度において、 50 ng/ml 抗CD2 (OKT11) および 50 ng/ml 抗NKp46 (Bab281) の組合せ (あるいは、活性化剤の他の濃度を使用してもよく、他の剤を活性化のために添加してもよい) を有する、BINATE培地および 10 ng/ml IL-15を用いる、フィーダーフリー培養条件に置いた。

【0236】

2. 5日目、活性化 $\alpha\beta$ TCRneg細胞集団を、CD123キメラ抗原受容体 (CAR) の構築物を含むガンマレトロウイルス上清の存在下、 0.25×10^6 個/mlの濃度でヒトフィブロネクチンコーティングプレートに置いた。CD123構築物は、選択および追跡マーカーとしてCD19受容体の変異体断片を含有した。

【0237】

3. 3日後、形質導入細胞を洗浄し、BINATE培地および 10 ng/ml IL-15を用いて、細胞播種濃度 $0.25 \sim 0.5 \times 10^6$ 個/mlでT75フラスコ (あるいは細胞播種濃度は、培養バッグ、フラスコ、または他の大きい培養容器、例えばバイオリアクター (G-Rex) では 1×10^6 個/mlまでの範囲であり得る) において、フィーダーフリー培養条件でさらに培養拡大させた。培地交換は、プレートまたはフラスコの場合、新鮮なBINATE培地およびIL-15を用い、3日毎 (バイオリアクターの場合はより少ない頻度で (5~7日毎)) に行った。

【0238】

4. 20日の培養拡大の終わりに、BINATE細胞およびBINATE.CAR123を、7日間またはそれより多くの日数の間、腫瘍の共培養実験に置いた。実験は、6ウェル培養皿において2ml培地/培養ウェル中で1:1のエフェクターの標的に対する比で (すなわち、 0.5×10^6 個のBINATEまたはBINATE.CAR123細胞 (エフェクター) を 0.5×10^6 個の腫瘍細胞 (標的) と共に) 培養することを伴った。腫瘍およびエフェクター細胞の共培養は、サイトカインの非存在下で実施した。共培養は、3~7日目に顕微鏡法およびフローサイトメトリーによって評価した。

【0239】

10

20

30

40

50

BINATE. CD123細胞は、65%の効率で形質導入された。共培養で評価した骨髓性白血病腫瘍株は、THP1、MOLM3、およびOCI AML細胞株を含んだ。データは、腫瘍と非改変BINATEまたはBINATE. CAR. CD123のいずれかとの共培養後の残存腫瘍のパーセンテージを含んだ。対照における残存腫瘍を100%として測定した。BINATE細胞は、最初の短期間の殺滅後の残存腫瘍の持続的な成長により、骨髓性白血病細胞の根絶に成功しなかった。BINATE. CAR. CD123細胞は、THP1およびMOLM3細胞株との共培養において殺滅に成功して腫瘍フリー培養を維持することができ、OCI AML細胞株では対照の>70%であった。

【0240】

(実施例20)

白血病細胞のin vivo殺滅の評価

別々の実験において、第2世代CD19 CARをコードするレトロウイルス構築物による活性化BINATE細胞の形質導入後の白血病細胞のin vivo殺滅を評価した。

【0241】

1. 正常で健常なドナー由来のバフィーコートに、手動での遠心分離器での分離によって実施するFicoll (商標) による勾配細胞分離を行った。単核細胞を、実験室規模のMiltenyi LSカラム分離およびMiltenyi NK選択キットを使用するNK富化に供した。NKおよび $\gamma\delta$ T細胞集団を、24ウェルプレート中 $0.25 \sim 0.5 \times 10^6$ 個/mlの細胞播種濃度において、500 ng/ml抗CD2抗体 (クローンLT2、Miltenyi) および10 ng/ml抗NKp46の組合せ (あるいは、活性化剤の他の濃度を使用してもよく、他の剤を活性化のために添加してもよい) を有する、BINATE培地および500 IU/ml IL-2を用いる、フィーダーフリー培養条件に置いた。

【0242】

2. 5日目、活性化集団を、CD19キメラ抗原受容体の構築物を含有するガンマレトロウイルス上清の存在下、 0.25×10^6 個/mlの濃度でヒトフィブロネクチンコーティングプレートに置いた。CD19構築物は、選択および追跡マーカーとしてCD34受容体の変異体断片を含有した。

【0243】

3. 3日後、形質導入細胞を洗浄し、BINATE培地および500 IU/ml IL-2を用いて、細胞播種濃度 $0.25 \sim 0.5 \times 10^6$ 個/mlでT75フラスコ (あるいは細胞播種濃度は、培養バッグ、フラスコ、または他の大きい培養容器、例えばバイオリアクター (G-Rex) では 1×10^6 個/mlまでの範囲であり得る) において、フィーダーフリー培養条件でさらに培養拡大させた。培地交換はプレートまたはフラスコの場合、新鮮なBINATE培地およびIL-2を用い、3日毎 (バイオリアクターの場合はより少ない頻度で (5~7日毎)) に行った。拡大の終わりに、BINATE細胞を洗浄し、マウスにIV投与するためにPBS溶液中で製剤化した。

【0244】

異種in vivo白血病モデル

NOD/SCID IL-2R γ null (NSG) 異種移植マウスに、DAUDI細胞を注入し、CAR形質導入細胞の抗腫瘍効果をin vivoで評価した。マウスの実験は、倫理上の国際要件、EUの要件、および国内要件に従って行い、イタリア保健省 (N°88/2016-PR) の承認を受けた。NGSマウス (5週齢; The Jackson Laboratory, USA) に、ホタルルシフェラーゼ標識Daudi細胞 (FF-Daudi) (0.25×10^6 個) を-3日目に接種した。マウスに 50×10^6 個のBINATE細胞またはBINATE. CAR19細胞を、IV注射によって0日目に注射し、毎週の生体発光イメージング (IVIS System, Perkin Elmer, USA) に供した。

【0245】

BINATE細胞またはBINATE. CD19細胞の3つの用量を0日目に動物モデ

10

20

30

40

50

ルに注入した。非遺伝子改変 B I N A T E 細胞は、部分的応答を生じることができ、マウスは 42 日目まで生存した。C A R . C D 19 によって遺伝子改変した B I N A T E 細胞は、用量効果応答を実証し、最低用量の 1×10^6 個の B I N A T E 細胞は、非形質導入細胞より 1 週間長く動物を維持することができたが、 5×10^6 個または 10×10^6 個の B I N A T E . C A R . C D 19 細胞を投与した動物ほど長く維持することはできなかった。このモデルは、毎週 2 回の I L - 2 皮下注射によって裏付けられた。C A R - T C D 19 遺伝子改変 $\alpha \beta$ T 細胞とは異なり、動物は、90 日目に 殺するまで生存し、I L - 2 投与にもかかわらず、サイトカイン放出症候群 (C R S) や同種異系もしくは異種反応性の証拠はなく、自然細胞の安全性の改善を裏付けた。動物を 90 日目に 殺し、組織を末梢血および肝臓におけるヒト C D 45 + 細胞 (B I N A T E) の存在に関して評価した後、% N K および $\gamma \delta$ T サブセットをそれぞれ、各組織において調べた。図 23 に示すように、血液および組織の両方において B I N A T E 細胞が維持され、i n v i v o の環境で B I N A T E 細胞集団の生存および拡大の可能性を実証した。

【0246】

(実施例 21)

固形腫瘍 (神経芽腫) の i n v i v o 殺滅の評価

別々の実験において、第 3 世代の G D 2 C A R をコードするレトロウイルス構築物による活性化 B I N A T E 細胞の形質導入後の固形腫瘍、神経芽腫の i n v i v o 殺滅を評価した。

【0247】

1. 正常で健常なドナー由来のバフィーコートに、手動での遠心分離器での分離によって実施する F i c o l l (商標) による勾配細胞分離を行った。単核細胞を、実験室規模の M i l t e n y i l S カラム分離を使用する $\alpha \beta$ T 細胞枯渇に供した。得られた $\alpha \beta$ T C R n e g 細胞集団を、24 ウェルプレート中 $0.25 \sim 0.5 \times 10^6$ 個 / m l の細胞播種濃度において、 50 ng / ml 抗 C D 2 (O K T 11) および 50 ng / ml 抗 N K p 46 (B a b 281) の組合せ (あるいは、活性化剤の他の濃度を使用してもよく、他の剤を活性化のために添加してもよい) を有する、B I N A T E 培地および 10 ng / ml I L - 15 を用いる、フィーダーフリー培養条件に置いた。

【0248】

2. 5 日目、活性化 $\alpha \beta$ T C R n e g 細胞集団を、G D 2 キメラ抗原受容体の構築物を含むガンマレトロウイルス上清の存在下、 0.25×10^6 個 / m l の濃度でヒトフィブロネクチンコーティングプレートに入れた。G D 2 構築物は、選択および追跡マーカーとして C D 34 受容体の変異体断片を含有した。

【0249】

3. 3 日後、形質導入細胞を洗浄し、B I N A T E 培地および 10 ng / ml I L - 15 を用いて、細胞播種濃度 $0.25 \sim 0.5 \times 10^6$ 個 / m l で T 75 フラスコ (あるいは細胞播種濃度は、培養バッグ、フラスコ、または他の大きい培養容器、例えばバイオリアクター (G - R e x) では 1×10^6 個 / m l までの範囲であり得る) において、フィーダーフリー培養条件でさらに培養拡大させた。培地交換は、3 日毎に (バイオリアクターの場合はより少ない頻度で (5 ~ 7 日毎)) 行った。20 日目に細胞を洗浄し、投与のために P B S 中で製剤化した。

【0250】

異種 i n v i v o 神経芽腫モデル

N O D / S C I D I L - 2 R y n u l l (N S G) 異種移植マウスに、S H - S Y 5 Y 細胞を注入し、C A R 形質導入細胞の抗腫瘍効果を i n v i v o で評価した。マウスの実験は、倫理上の国際要件、E U の要件、および国内要件に従って行い、イタリア保健省 (N ° 88 / 2016 - P R) の承認を受けた。N G S マウス (5 週齢; T h e J a c k s o n L a b o r a t o r y, U S A) に、ホタルルシフェラーゼ標識 S H - S Y 5 Y 細胞 (0.75×10^6 個) を - 3 日目に腹腔内に接種した。マウスに 30×10^6 個の B I N A T E 細胞または B I N A T E . C A R G D 2 細胞を、腹腔内注射によって 2

10

20

30

40

50

週間毎に3用量を注射し、毎週の生体発光イメージング (I V I S System、P e r k i n E l m e r、U S A) に供した。

【0251】

非遺伝子改変B I N A T E細胞は、およそ18日目に末梢腫瘍塊の消失を伴う部分応答を示したが、マウスはその後局所進行を示した。C A R . C D G D 2による遺伝子改変B I N A T E細胞は、末梢腫瘍塊の有意な除去を実証したが、局所病巣を殺滅することはできなかった。このモデルは、毎週2回のI L - 2皮下注射によって裏付けられた。

【0252】

(実施例22)

固形腫瘍(神経芽腫)のi n v i t r o殺滅およびNK細胞によるA D C C抗体の評価
別々の実験において、固形腫瘍、神経芽腫の自然NK細胞または自然NK . C A R . G D 2細胞によるi n v i t r o殺滅を評価した。

【0253】

1. 正常で健常なドナー由来のバフィーコートに、手動での遠心分離器での分離によって実施するF i c o l l (商標)による勾配細胞分離を行った。単核細胞を、実験室規模のM i l t e n y i L Sカラム分離およびM i l t e n y i NK選択キットを使用するNK富化に供した。得られた集団を、24ウェルプレート中0.25~0.5×10⁶個/mlの細胞播種濃度において、500ng/ml抗CD2抗体(クローンLT2、M i l t e n y i)および10ng/ml抗NKp46の組合せ(あるいは、活性化剤の他の濃度を使用してもよく、他の剤を活性化のために添加してもよい)を有する、B I N A T E
培地および500IU/ml I L - 2を用いる、フィーダーフリー培養条件に置いた。

【0254】

2. 5日目、活性化集団を、GD2キメラ抗原受容体(CAR)の構築物を含有するガンマレトロウイルス上清の存在下、0.25×10⁶個/mlの濃度でヒトフィブロネクチンコーティングプレートに置いた。GD2構築物は、選択および追跡マーカーとしてCD34受容体の変異体断片を含有した。

【0255】

3. 3日後、形質導入細胞を洗浄し、B I N A T E培地および500IU/ml I L - 2を用いて、細胞播種濃度0.25~0.5×10⁶個/mlでT75フラスコ(あるいは細胞播種濃度は、培養バッグ、フラスコ、または他の大きい培養容器、例えばバイオリアクター(G-Rex)では1×10⁶個/mlまでの範囲であり得る)において、フィーダーフリー培養条件でさらに培養拡大させた。培地交換はプレートまたはフラスコの場合、新鮮なB I N A T E培地およびI L - 2を用い、3日毎(バイオリアクターの場合はより少ない頻度で(5~7日毎))に行った。

【0256】

4. 20日の培養拡大の終わりに、B I N A T E細胞およびB I N A T E . C A R G D 2細胞を、7日間またはそれより多くの日数の間、腫瘍の共培養実験に置いた。実験は、6ウェル培養皿において2ml培地/培養ウェル中で1:1のエフェクターの標的に対する比で(すなわち、0.5×10⁶個の自然NKまたは自然NK . C A R . G D 2(エフェクター)を0.5×10⁶個のSH-SY5Y腫瘍細胞(標的)と共に)培養することを伴った。抗GD2抗体(10μg、14.G2aモノクローナル抗体)を共培養群の各々に添加し、活性化細胞のA D C C能を評価した。腫瘍およびエフェクター細胞の共培養を、サイトカインの非存在下で実施した。共培養は、3~7日目に顕微鏡法およびフローサイトメトリーによって評価した。

【0257】

データは、腫瘍を非改変の自然NKまたは自然NK . C A R . G D 2と共に、14.G2a A D C C抗体の存在下または非存在下で共培養後の残存腫瘍のパーセンテージを含んだ。対照における残存SH-SY5Y腫瘍を、99.5%として測定した。14.G2a抗体をSH-SY5Y腫瘍細胞に添加しても、対照(98.5%)と比較して差はなかった。非改変活性化自然NK細胞を、SH-SY5Y腫瘍細胞に添加すると、残存腫瘍は

10

20

30

40

50

22%であった。14G.2a抗体を、自然NK細胞およびSH-SY5Y腫瘍細胞の組合せに添加すると、より少ない残存腫瘍パーセンテージ(14.5%)をもたらした。自然NK.CAR.GD2細胞をSH-SY5Y腫瘍細胞に添加すると、40.9%の残存腫瘍パーセンテージをもたらした。自然NK.CAR.GD2細胞、SH-SY5Y腫瘍細胞、および14.G2a抗体を共培養した場合、残存腫瘍パーセンテージは8.7%に低下した。FcγIIII受容体発現を有する細胞、例えば活性化自然細胞の存在下では、抗体によるADCC活性は腫瘍殺滅を増強した。

【0258】

(実施例23)

別々の実験において、拡大の間のサイトカインの切り替えが細胞含有量に及ぼす効果を評価した。

【0259】

1. 正常で健常なドナー由来のバフィーコートに、手動での遠心分離器での分離によって実施するFicoll(商標)による勾配細胞分離を行った。

【0260】

2. 単核細胞を、実験室規模のMiltenyi LSカラム分離を使用するαβT細胞枯渇に供した。

【0261】

3. 得られたαβTCRneg細胞集団を、5%AB血清を補充したNK MACS(商標)培地(#130-107-879(Miltenyi Biotec, Inc., San Diego, CA, USA)(あるいは、他の培地、例えばR&D systemsの培地、CELL GENIX培地等を使用してもよい)を用いるフィーダーフリー培養条件に置いた。

【0262】

4. 活性化は、CapricoによるGMP精製された10ng/ml抗NKp46(クローンBab281)および10ng/ml抗CD2(クローンOKT11)または50ng/ml抗NKp46(クローンBab281)および50ng/ml抗CD2(クローンOKT11)(あるいは、活性化剤の他の濃度を使用してもよく、他の剤を活性化のために添加してもよい)のいずれかの組合せによって達成された。活性化αβTCRneg細胞集団を、24ウェルプレート中0.25×10⁶個/mlの細胞播種濃度において、5%AB血清を補充したNK MACS(商標)培地(#130-107-879(Miltenyi Biotec, Inc., San Diego, CA, USA)(あるいは、他の培地、例えばR&D systemsの培地、CELL GENIX培地等を使用してもよい)を用い、以下の条件:

a. 500IU/mlヒトインターロイキン2(IL-2)(Miltenyi Biotec)

b. 10ng/mlヒトインターロイキン15(IL-15)(Miltenyi Biotec)

c. 500IU/ml IL-2および10ng/ml IL-15の組合せ

d. 500IU/ml IL-2および10ng/ml OKT3(Miltenyi Biotec)の組合せ

e. 10ng/ml IL-15および500IU/ml IL-2および10ng/ml OKT3の組合せ

の1つを用いる、フィーダーフリー培養条件で培養拡大した後、T75フラスコに移した。

【0263】

5. 培地交換は、新鮮な培地および上記に列挙した条件の1つを用い、3日毎に(バイオリアクターの場合はより少ない頻度で(5~7日毎))行った。

【0264】

6. 細胞を、0.25~0.5×10⁶個/ml(あるいは細胞播種濃度は、培養バッグ、フラスコ、または他の大きい培養容器、例えばバイオリアクター(G-Rex)では1

10

20

30

40

50

× 10⁶ 個／m l までの範囲であり得る) の濃度で播種した。

【0265】

7. さらに、最初の25日間IL-2によって最初に拡大させた細胞を次に洗浄し、培養終了のとき(30日目)までIL-15を補充した。IL-15によって最初に拡大させた細胞を、25日目に洗浄した後、30日目の培養終了のときまでIL-2を補充した(サイトカイン切り替え条件と呼ぶ)。一部の例では、最初の20日間IL-2によって最初に拡大させた細胞を次に洗浄し、培養終了のとき(30日目)までIL-15を補充した。最初にIL-15によって拡大させた細胞を、20日目に洗浄した後、30日目の培養終了のときまでIL-2を補充した。代替の組合せまたは他のサイトカイン、例えばIL-7、IL-12、IL-18、IL-21、OKT3、OKT11、および抗NCRを切り替え条件に使用してもよい。

10

【0266】

8. 拡大の終わりに、BINATE細胞を、NKおよびγδCD3+T細胞含有量に関して解析し、フローサイトメトリーを介して細胞上の受容体発現によって特徴付けた。

【0267】

本実施例では、単一のサイトカインを切り替え条件と比較し(IL-2と、IL-2のIL-15への切り替えと比較する)、IL-2とIL-2/IL-15との比較の場合、γδT細胞数は、IL-15を添加するとIL-2単独と比較して増加した(それぞれ、70%対50%)。IL-15とIL-15/IL-2との比較の場合、NK集団は、切り替え条件ではIL-15単独と比較して増加した(それぞれ、90%対80%)。IL-2およびIL-15はいずれも細胞上のIL-2受容体との相互作用を通して作用することから、データは、特定のサイトカインによる最初の拡大条件に都合がよい集団の拡大が、他のサイトカインへの切り替えによって増強されることを示している。

20

【0268】

(実施例24)

純粋なNK細胞または純粋なγδT細胞の単離

本実施例では、純粋なNK細胞集団を単離するプロセスおよび純粋なγδT細胞集団を単離するプロセスを記載する。本プロセスの例としての変形形態を例証するフローチャートを図24に表す。

【0269】

1. 正常で健常なドナー由来のバフィーコートに、手動での遠心分離器での分離によって実施するFicoll(商標)による勾配細胞分離を行う; Percoll勾配、SEPAx、Cobe2991、またはエルトリエーションシステムも同様に使用してもよい。あるいは、アフエーシス、臍帯血単位、骨髓、または体液、例えば腹水、CSF、もしくは胸水を、勾配遠心分離を行ってまたは行うことなく細胞供給源として使用してもよい。

30

【0270】

2. 単核細胞を、直接使用するか、もしくは勾配分離後に使用するか、またはさらなる細胞選択、例えばFicoll(商標)MNC、抗体枯渇、NKの正の選択、NKの負の選択、γδT細胞の負の選択、および/またはCD3+の正の選択などに供する。ある特定の例では、単核細胞を、Miltenyi磁気ビーズに基づく方法または他の細胞選択技術を使用してCD56+NK細胞の正の選択または負の選択に供する。あるいは、細胞を、Miltenyi磁気ビーズに基づく技術または他の細胞選択技術を使用してγδTCR+の正の選択に供してもよい。あるいは、細胞を、Miltenyi磁気ビーズに基づく技術または他の細胞選択技術を使用してCD3+細胞枯渇に供してもよい。

40

【0271】

3. 次に、得られた細胞集団を、可溶性または架橋した抗LFAおよび抗NCR抗体の存在下、BINATE培地(5%AB血清を補充したNK MACS(商標)培地#130-107-879 Miltenyi Biotec, Inc., San Diego, CA, USA(あるいは、他の培地、例えばR&D systems培地、CELLGEN Ix培地等を使用してもよい))、または、ヒト血清補充ありまたは無しの、他の動物成

50

分フリーの培養培地、例えば *In Vivo* または *R&D Systems*、または *Cell Genix* を用いる、フィーダーフリー培養において活性化する。

【0272】

4. 細胞拡大は、T75 フラスコにおいて $0.25 \sim 5 \times 10^6$ 個/mL の細胞播種濃度（あるいは細胞播種濃度は、培養バッグ、フラスコ、または他の大きい培養容器、例えば バイオリアクター（*G-Rex*）では 1×10^6 個/mL までの範囲であり得る）で、IL-2、IL-15、IL-12、IL-18 およびその組合せなどのサイトカインを補充することによって行う。培地交換は、3 日毎（バイオリアクターの場合はより少ない頻度で（5～7 日毎））に成長培地およびサイトカインによって行う。

【0273】

5. 得られた 7、20、30、45、および 60 日目の培養物は、NK および $\gamma\delta$ T 細胞の混合物の *BINATE* 集団を含み得て、次にこれを投与のために凍結保存する。あるいは、得られた細胞集団に、さらなる拡大後細胞選択ステップ、例えば NK CD56+ 枯渇を行ってもよく、それによって純粋な $\gamma\delta$ T 細胞集団を得てもよい。あるいは、細胞に、 $\gamma\delta$ T 細胞の正の除去または負の選択を行って純粋な NK 集団を得てもよく、または CD16 の正の選択を行って高度に富化された *ADCC FcγRIII* 受容体+集団を生じる。あるいは、細胞に NK 枯渇を行った後に *ADCC γδ* T 細胞集団についての CD16 選択を行ってもよい。

【0274】

（実施例 25）

レトロウイルス構築物

本実施例では、上記のある特定の例において使用したレトロウイルスベクター *CARGD2*、*CARCD123*、および *CARCD19* を記載する。

【0275】

ベクター骨格

以下に記載される構築物は、*SFG* 骨格を含み、これはモロニー Maus 白血病ウイルス（*MoMLV*）に基づくレトロウイルスベクターを使用する。パッケージング配列（*psi*）を除く全ての *env* および *gag-pol* を除去した。その結果、ベクターは複製インコンピテントである。

【0276】

産生細胞株

以下のレトロウイルス構築物を産生するためのパッケージング細胞株を、*OPBG*、*Cell and Gene Therapy for Pediatric Tumor* 研究所の実験室の環境において専用の層流フードおよび CO_2 インキュベーター、ならびにガンマ線照射した *Pharmagrade* の *FBS*（*EuroClone*、カタログ *EC S0172L*、ロット *EUS0131906GI*）を除き非動物由来材料を使用して生成した。パッケージング細胞株は、*BioVec Pharma* から受領した *cGMP* に基づいて寄託されたヒトベースの *293VEC RD114* 産生株から生成した。特に、*293VEC RD114* 細胞は、それがヒト起源の細胞であり、大規模臨床等級の産生にとって適した高いベクター力価の産生を可能にすることから、パッケージング細胞株として選択した。

【0277】

CARGD2

iC9-CARGD2、*CD28.41bb*、*CD3* ゼータ（*OPBG-91* ベクター）レトロウイルスベクターを、*Ospedale Pediatrico Bambino Gesù*（*OPBG*）、“*Cell and Gene Therapy for Pediatric Tumor*” 研究所において構築した。2つのトランスジーン、すなわち誘導型カスパーゼ 9（*iC9*）および *CARGD2*（*iC9-CARGD2*、*CD28.41bb*、*CD3* ゼータ）の同時発現を可能にするバイシストロニックベクターを使用した。単一細胞クローニングを実施し、最高力価を産生した（上清中のベクターの存在に関して *PCR* 解析を使用して）*293VEC RD114* クローン（すなわち、*OPBG-91*

10

20

30

40

50

ー 7) を拡大させ、Officina Farmaceutica OPBG に寄託し、無菌性およびマイコプラズマに関して試験した後、c GMP 条件下でレトロウイルス産生のために使用した。

【0278】

i C 9 構成要素において、細胞内に発現される Casp9 タンパク質の触媒ドメインを、F 3 6 V 変異を有するヒト FK 5 0 6 結合タンパク質 (FKBP 1 2) に由来する薬物結合ドメインに融合する。抗原結合後に活性化シグナルを形質導入するために CD 2 8 膜貫通ドメインおよびそのエンドドメイン、4. 1 b b 共刺激ドメインおよび CD 3 ζ 細胞質ドメインとインフレーションの、ヒト抗原 GD 2 に対して特異的なモノクローナル抗体 1 4. G 2 A の融合 V H - V L 領域の一本鎖に基づく CAR 分子を、アプローチの安全性態様を改善するためにレトロウイルスベクターにおいて i C 9 の配列を含む遺伝子カセット後にクローニングした。

10

【0279】

i C 9. CAR GD 2. CD 2 8. 4 1 b b. CD 3 z の発現および活性に関するある特定の機能的および構造的構成要素を以下の表 9 に要約し、本明細書に列挙する：

【0280】

・ 5' LTR - ベクターの 5' 末端のレトロウイルス長末端反復配列 (プロモーター配列として機能する)。

【0281】

・ ψ - レトロウイルスカプシド化シグナル (psi ; RNA をビリオン粒子にパッケージングするために必要)。

20

【0282】

・ SA - スプライスアクセプター部位。

【0283】

・ i Casp9 - 誘導型カスパーゼ 9 発現カセット。i Casp9 は、6 アミノ酸の Gly-Ser リンカーを介して改変 CARD ドメイン欠失ヒトカスパーゼ 9 に接続された、F 3 6 V 変異を有するヒト FK 5 0 6 結合タンパク質 (FKBP 1 2) で構成される。

【0284】

・ FKBP 1 2 - F 3 6 V - AP 1 9 0 3 に対する結合親和性を最適にするために F 3 6 V 変異を含有する操作された FK 5 0 6 結合タンパク質。FKBP 1 2 - F 3 6 V タンパク質ドメインは、連結した治療タンパク質の薬物結合／オリゴマー化ドメインとして役立つ。FKBP 1 2 - F 3 6 V は、カスパーゼ 9 の調節因子として機能する。AP 1 9 0 3 の非存在下では、i Casp9 は最少の活性を有し；AP 1 9 0 3 が FKBP 1 2 - F 3 6 V に結合すると、二量体化を促進し、2 つのカスパーゼ 9 分子を並置させてアポトーシスを開始する。このように、FKBP 1 2 - F 3 6 V 部分は、Apaf-1 関連オリゴマー化を媒介するカスパーゼ 9 の内因性の二量体化／活性化モジュール (カスパーゼ活性化および動員ドメイン；CARD) を機能的に交換する。

30

【0285】

・ リンカー - 切り替え調節因子配列をカスパーゼ 9 に融合するために使用される合成 Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly ペプチドリンカー。

40

【0286】

・ カスパーゼ 9 - ヒトカスパーゼ 9 cDNA 配列 (重要なアポトーシス促進性の調節因子) および構築物の治療構成要素 (調節された自殺遺伝子)。自然発生 Apaf 1 結合を低減させ、したがってバックグラウンド殺滅を低減させるために、内因性の二量体化／活性化モジュール (カスパーゼ活性化および動員ドメイン；CARD) を欠失させた。

【0287】

・ 2A - Thosea asigna 昆虫ウイルス由来の合成の 20 アミノ酸のペプチドをコードし、これはカスパーゼ 9 タンパク質と CAR タンパク質との間の切断可能なリンカーとして機能する。

50

【0288】

・ シグナルペプチド - 小胞体から細胞膜への分泌タンパク質の正確な移動を可能にする短いアミノ酸配列。

【0289】

・ CAR - CD28TMおよび共刺激ドメイン、4.1bb共刺激ドメインおよびCD3ζ細胞質ドメインとインフレイムの、ヒト抗原GD2に対して特異的なモノクローナル抗体14.G2Aの融合VH-VL領域の一本鎖に基づくCAR分子。

【0290】

・ 3'LTR - ベクターの3'末端でのレトロウイルス長末端反復配列（ターミネーター配列／ポリアデニル化配列として機能する）。

【表9-1】

表9

構成要素	開始	終止
------	----	----

【表9-2】

構成要素	開始	終止
LTR	1	590
iCasp9 カセット	1880	3085
FKBP12-F36V	1880	2218
リンカーペプチド	2219	2236
Casp9	2237	3085
2A ペプチド	3086	3145
CAR	3146	4723
シグナルペプチド	3146	3208
scFv	3209	4000
CH2-CH3 ヒンジ	4001	4055
CD28TM	4056	4135
CD28 共刺激	4136	4258
4.1bb 共刺激	4259	4384
CD3ζ	4385	4723
LTR	4896	5485
Amp ^R マーカー	6780	7640

【0291】

参照の電子ベクター配列を、ベクター構築物の各構成要素のDNA配列ファイルを組み合わせるによってアセンブルした。レトロウイルスゲノムはRNAに基づくことから、293VEC細胞株へのトランスフェクションのために使用したプラスミドDNAに関して配列解析を実施した（レトロウイルス産物調製における最初のステップ）。Ospedale Pediatrico Bambino GesùにおいてOPBG-91ベクター全体について双方向シーケンシングを実施した。シーケンシングランを、SnapGeneソフトウェアを使用してアセンブルした。理論的な参照電子配列と比較してミスマッチ塩基は同定されなかった。

【0292】

CARCD123

ΔCD19-2A-CAR-CD123-ΔCD34、CD8.41bb、CD3ゼータ(OPBG-242ベクター)レトロウイルスベクターを、Ospedale Pediatric Bambino Gesù(OPBG)、“Cell and Gene Therapy for Pediatric Tumor”研究所において構築した。2つのトランスジーン、すなわちΔCD19およびCARCD123の同時発現を可能にするバイシストロニックベクター(ΔCD19-2A-CAR-CD123-ΔCD34、CD8.41bb、CD3ゼータ)を使用した。単一細胞クローニングを実施し、最高の力価を産生したクローン(上清中のベクターの存在に関するPCR解析を使用して)を、上記のように拡大させて寄託した。

10

【0293】

ΔCD19は、膜貫通部分に連結したヒトCD19の細胞外ドメインを表す。これは、遺伝子改変細胞の選択および表現型特徴付けを助けるために二重の機能を有する。抗原結合後の活性化シグナルの形質導入のためにCD8膜貫通ドメインおよびそのエンドドメイン、4.1bb共刺激ドメインおよびCD3ζ細胞質ドメインとインフレイムの、ヒト抗原CD123に対して特異的なモノクローナル抗体7G3の融合VH-VL領域の一本鎖に基づくCAR分子を、レトロウイルスベクターにおいて2A配列の使用を通してΔCD19の配列を含む遺伝子発現カセット後にクローニングした。

20

【0294】

ΔCD19-2A-CAR-CD123-ΔCD34、CD8.41bb、CD3z発現および活性のためのある特定の機能的および構造的構成要素を以下の表10に要約し、本明細書に列挙する：

【0295】

・ 5'LTR - ベクターの5'末端のレトロウイルス長末端反復配列(プロモーター配列として機能する)。

【0296】

・ ψ - レトロウイルスカプシド化シグナル(psi; RNAをビリオン粒子にパッケージングするために必要)。

【0297】

・ SA - スプライスアクセプター部位。

30

【0298】

・ ΔCD19 - 最適化ヒト細胞外ドメインおよび膜貫通ドメインを含む。

【0299】

・ 2A - Thosea asigna昆虫ウイルス由来の合成の20アミノ酸のペプチドをコードする。

【0300】

・ シグナルペプチド - 小胞体から細胞膜への分泌タンパク質の正確な移動を可能にする短いアミノ酸配列。

【0301】

・ ΔCD34 - 形質導入後のCAR+ T細胞を検出する助けとなる、ヒトCD34に由来する短いペプチドを含む。

40

【0302】

・ CAR - CD8TMおよび共刺激ドメイン、4.1bb共刺激ドメインおよびCD3ζ細胞質ドメインとインフレイムの、ヒト抗原CD123に対して特異的なモノクローナル抗体7G3の融合VH-VL領域の一本鎖に基づくCAR分子。

【0303】

・ 3'LTR - ベクターの3'末端でのレトロウイルス長末端反復配列(ターミネーター配列/ポリアデニル化配列として機能する)。

50

【表 10】

表 10

構成要素	開始	終止
LTR	397	990
dCD19	2282	3280
SvFv 7G3	3404	3745
2A ペプチド	3746	3769
SvFv 7G3	3770	4123
ΔCD34	4124	4183
CD8 ストーク	4184	4309
CD8TM	4310	4372
CD8 Cyt	4373	4420
4.1bb 共刺激	4427	4552
CD3ζ	4553	4891
3' LTR	5069	5635
Amp ^R プロモーター	6848	6952
Amp ^R	6953	7813

【0304】

参照の電子ベクター配列をベクター構築物の各構成要素のDNA配列ファイルを組み合わせることによってアセンブルした。レトロウイルスゲノムはRNAに基づくことから、293VEC細胞株へのトランスフェクションのために使用したプラスミドDNAに関して配列解析を実施した（レトロウイルス産物調製における最初のステップ）。Ospedale Pediatrico Bambino GesùにおいてOPBG-242ベクター全体について双方向シーケンシングを実施した。シーケンシングランを、SnapGeneソフトウェアを使用してアセンブルした。理論的な参照電子配列と比較してミスマッチ塩基は同定されなかった。

【0305】

CARCD19

治療的レトロウイルス構築物SFG-iC9-Car.CD19.41bbは、マウス抗原CD19、4.1bb共刺激ドメインに対して特異的なモノクローナル抗体の融合VH-VL領域の一本鎖に連結された合成リガンド誘導型ヒトカスパーゼ-9cDNAをコードする。アセンブリは、それが第2世代であることを除き、上記のCARGD2と同じである。レトロウイルスベクターを、EU Cell and Gene Therapy Laboratoryにおいて構築した。単一細胞クローニングを実施し、最高の力価を産生したクローン（上清中のベクターの存在に関するPCR解析を使用して）を拡大させ、cGMP施設に寄託し、無菌性およびマイコプラズマに関する試験の後、cGMP条件下でのレトロウイルス産生のために使用した。

【0306】

SFG-iC9-Car.CD19.41bb発現および活性のためのある特定の機能のおよび構造的構成要素を以下に列挙する：

【0307】

- ・ 5' LTR - ベクターの5'末端のレトロウイルス長末端反復配列（プロモーター配

列として機能する)。

【0308】

・ Ψ — レトロウイルスカプシド化シグナル (p s i ; RNAをビリオン粒子にパッケージングするために必要)。

【0309】

・ SA — スプライスアクセプター部位。

【0310】

・ i C a s p 9 — 誘導型カスパーゼ-9発現カセット。i C a s p 9は、6アミノ酸 G l y - S e r リンカーを介して改変CARDドメイン欠失ヒトカスパーゼ-9に接続された、F36V変異を有するヒトFK506結合タンパク質 (F K B P 1 2) で構成される。

【0311】

・ F K B P 1 2 - F 3 6 V — A P 1 9 0 3 に対する結合親和性を最適にするために F 3 6 V 変異を含有する操作された F K 5 0 6 結合タンパク質。F K B P 1 2 - F 3 6 V タンパク質ドメインは、連結した治療タンパク質の薬物結合／オリゴマー化ドメインとして役立つ。F K B P 1 2 - F 3 6 V は、カスパーゼ9の調節因子として機能する。A P 1 9 0 3 の非存在下では、i C a s p 9 は最少の活性を有し；A P 1 9 0 3 が F K B P 1 2 - F 3 6 V に結合すると、二量体化を促進し、2つのカスパーゼ-9分子を並置させてアポトーシスを開始する。このように、F K B P 1 2 - F 3 6 V 部分は、A p a f - 1 関連オリゴマー化を媒介するカスパーゼ-9の内因性の二量体化／活性化モジュール (カスパーゼ活性化および動員ドメイン；CARD) を機能的に交換する。

【0312】

・ リンカー — 切り替え調節因子配列をカスパーゼ-9に融合するために使用される合成 S e r - G l y - G l y - G l y - S e r - G l y ペプチドリンカー。

【0313】

・ カスパーゼ-9 — ヒトカスパーゼ-9 cDNA配列 (重要なアポトーシス促進性の調節因子) および構築物の治療構成要素 (調節された自殺遺伝子)。自然発生 A p a f 1 結合を低減させ、したがってバックグラウンド殺滅を低減させるために、内因性の二量体化／活性化モジュール (カスパーゼ活性化および動員ドメイン；CARD) を欠失させた。

【0314】

・ 2A — T h o s e a A s i g n a 昆虫ウイルス由来の合成20アミノ酸のペプチドをコードし、これはカスパーゼ-9タンパク質とCARDタンパク質との間の切断可能なリンカーとして機能する。

【0315】

・ シグナルペプチド — 小胞体から細胞膜への分泌タンパク質の正確な移動を可能にする短いアミノ酸配列。

【0316】

・ CAR — マウス抗原CD19、4.1bb共刺激ドメインに対して特異的なモノクローナル抗体の融合VH-VL領域の一本鎖に基づくCAR分子。

【0317】

・ 3'LTR — ベクターの3'末端でのレトロウイルス長末端反復配列 (ターミネーター配列／ポリアデニル化配列として機能する)。

【0318】

(実施例26)

ある特定の非制限的な実施形態の例

以下に本技術のある特定の実施形態の非制限的な例を列挙する。

【0319】

A1. NK細胞およびガンマ. デルタT細胞に関して富化された細胞の集団を含む組成物を製造する方法であって、

10

20

30

40

50

1 または複数の対象から細胞を含有する試料を得ること；

NK細胞およびガンマ・デルタT細胞を含む枯渇細胞集団を生成する条件下で試料からアルファ・ベータT細胞を枯渇させること；ならびに

枯渇細胞集団を（a）細胞接着ポリペプチドに免疫特異的に結合する少なくとも1種の外因性ポリペプチド、および（b）細胞接着ポリペプチドとは異なるポリペプチドに免疫特異的に結合し、試料集団の1種または複数種の細胞の表面上に発現される少なくとも1種の外因性ポリペプチドに接触させることを含む活性化条件に枯渇細胞集団を曝露すること；ならびに

枯渇細胞集団を少なくとも1種の補助的ポリペプチドに接触させることを含む拡大条件に枯渇細胞集団を曝露し、それによってNK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された細胞の集団を含む組成物を生成することを含む方法。

【0320】

A1. 1. NK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された細胞の集団を含む組成物を製造する方法であって、

1 または複数の対象から細胞を含有する試料を得ること；

試料を（a）細胞接着ポリペプチドに免疫特異的に結合する少なくとも1種の外因性ポリペプチド、および（b）細胞接着ポリペプチドとは異なるポリペプチドに免疫特異的に結合し、試料集団の1種または複数種の細胞の表面上に発現される少なくとも1種の外因性ポリペプチドに接触させることを含む活性化条件であって、（a）もしくは（b）が可溶性であるか、または（a）および（b）が可溶性である活性化条件に試料を曝露すること；ならびに

試料を少なくとも1種の補助的ポリペプチドに接触させることを含む拡大条件に試料を曝露し、それによってNK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された細胞の集団を含む組成物を生成することを含む方法。

【0321】

A2. 少なくとも1種の補助的ポリペプチドが、集団におけるガンマ・デルタT細胞の量と比較したNK細胞の量が少なくとも1種の補助的ポリペプチドの量および／またはタイプに依存的であるように選択される、実施形態A1またはA1.1に記載の方法。

【0322】

A2. 1. 少なくとも1種の補助的ポリペプチドが、枯渇細胞集団を少なくとも1種の補助的ポリペプチドに接触させた後に、細胞の集団におけるガンマ・デルタT細胞と比較してNK細胞の量を増加または減少させる、実施形態A1、A1.1またはA2に記載の方法。

【0323】

A3. 活性化条件が、非ヒト動物由来の血清を含まない、実施形態A1、A1.1、A2またはA2.1のいずれかに記載の方法。

【0324】

A4. 拡大条件が、非ヒト動物由来の血清を含まない、実施形態A1～A3のいずれかに記載の方法。

【0325】

A5. 活性化条件がフィーダー細胞を含まない、実施形態A1～A4のいずれかに記載の方法。

【0326】

A6. 拡大条件がフィーダー細胞を含まない、実施形態A1～A5のいずれかに記載の方法。

【0327】

A7. 試料が、末梢血、肝組織、上皮組織、骨髄、および臍帯血から選択される、実施形態A1～A6のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

【0328】

A 8．試料が末梢血である、実施形態 A 7 に記載の方法。

【0329】

A 9．末梢血試料が処理された試料である、実施形態 A 8 に記載の方法。

【0330】

A 10．試料が臍帯血である、実施形態 A 7 に記載の方法。

【0331】

A 11．臍帯血試料が処理された試料である、実施形態 A 10 に記載の方法。

【0332】

A 12．(b)における外因性ポリペプチドが、NK細胞活性化受容体、ガンマ・デルタ T細胞活性化受容体、または両方に免疫特異的に結合する、実施形態 A 1～A 11 のいずれかに記載の方法。

10

【0333】

A 13．受容体が、NK p 30、NK p 44、またはNK p 46である、実施形態 A 12 に記載の方法。

【0334】

A 14．受容体がNK p 46である、実施形態 A 13 に記載の方法。

【0335】

A 15．(a)における外因性ポリペプチドが、CD 2 に免疫特異的に結合する、実施形態 A 1～A 14 のいずれかに記載の方法。

20

【0336】

A 16．(a)もしくは(b)、または(a)および(b)における外因性ポリペプチドが、抗体またはその抗原結合性断片である、実施形態 A 1～A 15 のいずれかに記載の方法。

【0337】

A 17．(a)または(b)のうちの少なくとも1つが可溶性である、実施形態 A 1～A 16 のいずれかに記載の方法。

【0338】

A 17.1．(a)および(b)における外因性ポリペプチドの両方が可溶性である、実施形態 A 1～A 17 のいずれかに記載の方法。

30

【0339】

A 18．(a)における外因性ポリペプチドまたは(b)における外因性ポリペプチドが基質に結合する、実施形態 A 1～A 16 のいずれかに記載の方法。

【0340】

A 19．活性化条件が、試料または枯渴細胞集団を少なくとも2種の外因性ポリペプチドに接触させることを含む、実施形態 A 1～A 18 のいずれかに記載の方法。

【0341】

A 20．第1の外因性ポリペプチドがCD 2 に免疫特異的に結合し、第2の外因性ポリペプチドがNK p 46 に免疫特異的に結合する、実施形態 A 19 に記載の方法。

【0342】

A 21．第1の外因性ポリペプチドおよび／または第2の外因性ポリペプチドが抗体またはその抗原結合性断片である、実施形態 A 19 またはA 20 に記載の方法。

40

【0343】

A 22．活性化条件のポリペプチド構成要素が、

(a)細胞接着ポリペプチドCD 2 に免疫特異的に結合する外因性ポリペプチド；および
(b) (a)における外因性ポリペプチドとは異なり、NK p 46 に免疫特異的に結合する外因性ポリペプチド

から本質的になるかまたはそれからなる、実施形態 A 1～A 21 のいずれかに記載の方法。

【0344】

A 23．補助的ポリペプチドが、サイトカインおよび／またはガンマ・デルタ T細胞上の

50

受容体に免疫特異的に結合するポリペプチドである、実施形態 A 1 ～ A 2 2 のいずれかに記載の方法。

【0345】

A 2 4 . 拡大条件が、試料または枯渇細胞集団をサイトカインである少なくとも 1 種の補助的ポリペプチド、および必要に応じてガンマ・デルタ T 細胞上の受容体に免疫特異的に結合する補助的ポリペプチドに接触させることを含む、実施形態 A 2 3 に記載の方法。

【0346】

A 2 5 . サイトカインがインターロイキン (I L) である、実施形態 A 2 4 に記載の方法。

【0347】

A 2 6 . 少なくとも 1 種の補助的ポリペプチドが、 I L - 2 、 I L - 4 、 I L - 1 5 、またはその任意の組合せを含む、実施形態 A 2 3 ～ A 2 5 のいずれかに記載の方法。

【0348】

A 2 7 . 拡大条件が、試料または枯渇細胞集団を

(a) I L - 2 ポリペプチド、および必要に応じてガンマ・デルタ T 細胞上の受容体に免疫特異的に結合するポリペプチド；

(b) I L - 1 5 ポリペプチド；または

(c) I L - 2 ポリペプチドおよび I L - 1 5 ポリペプチド、ならびに必要に応じてガンマ・デルタ T 細胞上の受容体に免疫特異的に結合するポリペプチドに接触させることを含む、実施形態 A 2 3 ～ A 2 6 のいずれかに記載の方法。

【0349】

A 2 8 . ガンマ・デルタ T 細胞上の受容体が C D 3 である、実施形態 A 2 3 ～ A 2 7 のいずれかに記載の方法。

【0350】

A 2 9 . ガンマ・デルタ T 細胞上の受容体に免疫特異的に結合するポリペプチドが、抗体またはその抗原結合性断片である、実施形態 A 2 3 ～ A 2 8 のいずれかに記載の方法。

【0351】

A 3 0 . 拡大条件が、試料を

(a) I L - 2 ポリペプチド；

(b) I L - 1 5 ポリペプチド；

(c) I L - 2 ポリペプチドおよび I L - 1 5 ポリペプチド；

(d) I L - 2 ポリペプチドおよび C D 3 に免疫特異的に結合する抗体；または

(e) I L - 2 ポリペプチド、 I L - 1 5 ポリペプチドおよび C D 3 に免疫特異的に結合する抗体

に接触させることを含む、実施形態 A 2 9 に記載の方法。

【0352】

A 3 1 . C D 3 に免疫特異的に結合する抗体が O K T 3 である、実施形態 A 3 0 に記載の方法。

【0353】

A 3 2 . 活性化および拡大条件が同時にまたは任意の順序で逐次的に実施される、実施形態 A 1 ～ A 3 1 のいずれかに記載の方法。

【0354】

A 3 3 . 少なくとも 1 種の外因性ポリペプチドが補助的ポリペプチドとしても機能することができる；または

少なくとも 1 種の補助的ポリペプチドが外因性ポリペプチドとしても機能することができる；または

少なくとも 1 種の外因性ポリペプチドが補助的ポリペプチドとしても機能することができ、かつ少なくとも 1 種の補助的ポリペプチドが外因性ポリペプチドとしても機能することができる、実施形態 A 1 ～ A 3 2 のいずれかに記載の方法。

【0355】

A 3 4 . (i) 拡大条件が、試料または枯渇細胞集団を I L - 2 ポリペプチドに接触させ

10

20

30

40

50

ることを含み；

(i i) 得られた、NK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された細胞の集団が、約25～30%のNK細胞および約70～75%のガンマ・デルタT細胞を含む、実施形態A30～A33のいずれかに記載の方法。

【0356】

A35. (i) 拡大条件が、試料または枯渇細胞集団をIL-15ポリペプチドに接触させることを含み；

(i i) 得られた、NK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された細胞の集団が、約80～99%のNK細胞および約1～20%のガンマ・デルタT細胞を含む、実施形態A30～A33のいずれかに記載の方法。

【0357】

A36. (i) 拡大条件が、試料または枯渇細胞集団をIL-2ポリペプチドおよびCD3に免疫特異的に結合する抗体に接触させることを含み；

(i i) 得られた、NK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された細胞の集団が、約40～45%のNK細胞および約55～60%のガンマ・デルタT細胞を含む、実施形態A30～A33のいずれかに記載の方法。

【0358】

A37. 拡大条件が、

試料または枯渇細胞集団を、1種または複数種の補助的ポリペプチドを含む第1の条件セットに接触させ、NK細胞のガンマ・デルタT細胞に対する第1の比を含む第1の細胞集団をもたらすこと；および

第1の細胞集団を、1種または複数種の補助的ポリペプチドを含む第2の条件セットに接触させ、NK細胞のガンマ・デルタT細胞に対する所望の最終的な比を含む第2の細胞集団をもたらすことを含み、第1の条件セットが第2の条件セットとは異なる、実施形態A1～A36のいずれかに記載の方法。

【0359】

A38. 第1の細胞集団が第2の条件セットとの接触前に洗浄される、実施形態A37に記載の方法。

【0360】

A39. 第1の条件セットがIL-2を含み、第2の条件セットがIL-15を含む；

第1の条件セットがIL-15を含み、第2の条件セットがIL-2を含む；

第1の条件セットがIL-2およびCD3に免疫特異的に結合する抗体を含み、第2の条件セットがIL-15を含む；または

第1の条件セットがIL-15およびCD3に免疫特異的に結合する抗体を含み、第2の条件セットがIL-2およびCD3に免疫特異的に結合する抗体を含む、実施形態A37またはA38に記載の方法。

【0361】

A40. CD3に免疫特異的に結合する抗体がOKT3である、実施形態A39に記載の方法。

【0362】

A41. 試料を活性化および拡大条件に曝露する前に、試料からアルファ・ベータT細胞を枯渇させ、それによって枯渇細胞集団を生成すること；ならびに

枯渇細胞集団を活性化および拡大条件に供すること

をさらに含み、

それによってNK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された細胞の集団を含む組成物が得られる、実施形態A1.1およびA2～A40のいずれかに記載の方法。

【0363】

A41.1. 活性化および拡大の前に、試料または枯渇細胞集団が、NK細胞またはガンマ・デルタT細胞について選択する条件にも、アルファ・ベータT細胞以外の細胞を枯渇させる条件にも曝露されない、実施形態A1～A41のいずれかに記載の方法。

【0364】

A41.2. 活性化および拡大の前に、試料または枯渇細胞集団がCD3+細胞を枯渇させる条件に曝露されない、実施形態A41.1の方法。

【0365】

A42. 試料または枯渇細胞集団の細胞が、活性化および拡大の前、間、または後に外因性核酸を含まない、実施形態A1～A41.1のいずれかに記載の方法。

【0366】

A43. 試料または枯渇細胞集団の細胞が、活性化および拡大の前、間、または後に腫瘍壊死因子受容体も、キメラ抗原受容体(CAR)も、骨髄分化一次応答タンパク質も、自然免疫シグナル伝達アダプターをコードする外因性核酸も含まない、実施形態A1～A41.1のいずれかに記載の方法。

10

【0367】

A44. 試料または枯渇細胞集団の細胞が、活性化および拡大の前、間、または後に遺伝子改変されない、実施形態A1～A43のいずれかに記載の方法。

【0368】

A45. NK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された細胞の集団を、それによってガンマ・デルタ細胞が枯渇される処置に供することをさらに含み、得られた集団がNK細胞から本質的になるかまたはそれからなる、実施形態A1～A44のいずれかに記載の方法。

【0369】

A46. NK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された細胞の集団を、それによってNK細胞が枯渇される処置に供することをさらに含み、得られた集団がガンマ・デルタT細胞から本質的になるかまたはそれからなる、実施形態A1～A44のいずれかに記載の方法。

20

【0370】

A47. NK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された細胞の集団を、NK細胞についての正の選択に供することをさらに含み、それによってNK細胞から本質的になるかまたはそれからなる細胞集団が得られる、実施形態A1～A45のいずれかに記載の方法。

【0371】

A48. NK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された細胞の集団を、ガンマ・デルタ細胞についての正の選択に供することをさらに含み、それによってガンマ・デルタ細胞から本質的になるかまたはそれからなる細胞集団が得られる、実施形態A1～A44およびA46のいずれかに記載の方法。

30

【0372】

A49. 拡大条件が、試料または枯渇細胞集団のフィーダー細胞フリー培地中での約1週間から約10週間のインキュベーションを含み、それによってNK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された拡大した細胞の集団を含む組成物が得られる、実施形態A1～A48のいずれかに記載の方法。

【0373】

A50. 培養条件が、試料または枯渇細胞集団のフィーダー細胞フリー培地中での約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、25日間、30日間、35日間、40日間、45日間、50日間、55日間、もしくは60日間もしくはそれより多くの日数、または約2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、もしくは10週間のインキュベーションを含む、実施形態A49に記載の方法。

40

【0374】

A51. NK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された細胞の集団が、拡大条件下の30日間で約2logより大きく拡大される、実施形態A1～A50のいずれかに記載の方法。

50

【0375】

A52. 細胞の集団が、拡大条件下の30日間で約3logより大きく拡大される、実施形態A51に記載の方法。

【0376】

A53. NK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された拡大した細胞の集団が、疲弊した細胞を含まない、実施形態A1～A52のいずれかに記載の方法。

【0377】

A54. NK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された拡大した細胞の集団が、拡大条件の60日後に疲弊した細胞を含まない、実施形態A1～A53のいずれかに記載の方法。

【0378】

A55. NK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された拡大した細胞の集団におけるNK細胞の5%未満、4%未満、3%未満、または2%未満がPD-1マーカを含み、および／または拡大した集団における総細胞もしくは拡大した集団におけるガンマ・デルタT細胞の約20%、15%、10%、またはそれ未満がPD-1マーカを含む、実施形態A1～A54のいずれかに記載の方法。

【0379】

A56. NK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された細胞の集団が、集団における総細胞数のパーセンテージとして以下の活性化マーカ：

- (a) 90%またはそれより多くのKIR5；
- (b) 10%またはそれより多くのSIGLEC-7；
- (c) 60%またはそれより多くのKIR3D51；
- (d) 10%またはそれより多くのKIR2DL1；
- (e) 25%またはそれより多くのNKp30、NKp44、またはNKp46；
- (f) 35%またはそれより多くのNKG2D；
- (g) 90%またはそれより多くのDNAM1；
- (h) 85%またはそれより多くのNTBA；
- (i) 95%またはそれより多くのCD2；および
- (j) 55%またはそれより多くのKIR3DS1

のうちの1つまたは複数を含む、実施形態A1～A55のいずれかに記載の方法。

【0380】

A57. NK細胞およびガンマ・デルタT細胞に関して富化された細胞の集団が、80%またはそれより多くの自然免疫細胞を含む、実施形態A1～A56のいずれかに記載の方法。

【0381】

A58. 細胞の約70%から約100%の間、または少なくとも約70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%がCD56+である、実施形態A57に記載の方法。

【0382】

A59. 細胞の約10%から約40%の間、または少なくとも約10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、もしくは40%がCD16+である、実施形態A57またはA58に記載の方法。

【0383】

A60. 細胞の10%未満、5%未満、4%未満、3%未満、または2%未満がCD57+である、実施形態A57～A59のいずれかに記載の方法。

【0384】

A 6 1 . 試料または枯渇細胞集団が、活性化および拡大の間または後に C D 4 + C D 8 + 細胞を含まない、実施形態 A 1 ~ A 6 0 のいずれかに記載の方法。

【 0 3 8 5 】

A 6 2 . 活性化条件および拡大条件がビスホスホネートを含まない、実施形態 A 1 ~ A 6 1 のいずれかに記載の方法。

【 0 3 8 6 】

A 6 3 . ビスホスホネートがパミドロネートまたはゾレドロネートである、実施形態 A 6 2 に記載の方法。

【 0 3 8 7 】

A 6 4 . ガンマ . デルタ T 細胞が、 V . デルタ . 1 および V . デルタ . 2 発現に関してポリクローナルである、実施形態 A 1 ~ A 6 3 のいずれかに記載の方法。

10

【 0 3 8 8 】

A 6 5 . ポリクローナルガンマ . デルタ T 細胞が、 V . デルタ . 1 + および V . デルタ . 1 - から選択される少なくとも 1 つの亜集団、ならびに V . デルタ . 2 + および V . デルタ . 2 - から選択される少なくとも 1 つの亜集団を含む、実施形態 A 6 4 に記載の方法。

【 0 3 8 9 】

A 6 6 . 実施形態 A 1 ~ A 6 5 のいずれかに記載の方法によって得ることができるまたは得られた組成物。

【 0 3 9 0 】

B 1 . 改変された末梢血細胞の集団を含む組成物であって、その集団が複数の N K 細胞および複数のガンマ . デルタ T 細胞を含み；
アルファ . ベータ T 細胞が枯渇され；
フィーダー細胞を含まない、組成物。

20

【 0 3 9 1 】

B 2 . 細胞の約 2 5 % から約 4 5 % の間が N K 細胞であり、細胞の約 5 5 % から約 7 5 % の間がガンマ . デルタ T 細胞である；

細胞の約 2 5 % から約 3 0 % の間が N K 細胞であり、細胞の約 7 0 % から約 7 5 % の間
がガンマ . デルタ T 細胞である；

細胞の約 8 0 % から約 9 9 % の間が N K 細胞であり、細胞の約 1 % から約 2 0 % の間
がガンマ . デルタ T 細胞である；または

30

細胞の約 4 0 % から約 4 5 % の間が N K 細胞であり、細胞の約 5 5 % から約 6 0 % の間
がガンマ . デルタ T 細胞である、実施形態 B 1 に記載の組成物。

【 0 3 9 2 】

B 3 . 細胞の 3 0 % またはそれより多くが活性化される、実施形態 B 1 または B 2 に記載の組成物。

【 0 3 9 3 】

B 4 . 改変された細胞の集団が、集団における総細胞数のパーセンテージとして以下の活性化マーカー：

(a) 9 0 % またはそれより多くの K I R 5 ；

(b) 1 0 % またはそれより多くの S I G L E C - 7 ；

40

(c) 6 0 % またはそれより多くの K I R 3 D 5 1 ；

(d) 1 0 % またはそれより多くの K I R 2 D L 1 ；

(e) 2 5 % またはそれより多くの N K p 3 0 、 N K p 4 4 、 または N K p 4 6 ；

(f) 3 5 % またはそれより多くの N K G 2 D ；

(g) 9 0 % またはそれより多くの D N A M 1 ；

(h) 8 5 % またはそれより多くの N T B A ；

(i) 9 5 % またはそれより多くの C D 2 ； および

(j) 5 5 % またはそれより多くの K I R 3 D S 1

のうちの 1 つまたは複数を含む、実施形態 B 1 ~ B 3 のいずれかに記載の組成物。

【 0 3 9 4 】

50

B 5 . 改変された集団が、80%またはそれより多くの自然免疫細胞を含む、実施形態 B 1 ~ B 4 のいずれかに記載の組成物。

【0395】

B 6 . 改変された集団が、CD56+である活性化細胞傷害性細胞に関して富化されている、実施形態 B 1 ~ B 5 のいずれかに記載の組成物。

【0396】

B 7 . 改変された集団が、CD57-である活性化細胞傷害性細胞に関して富化されている、実施形態 B 1 ~ B 6 のいずれかに記載の組成物。

【0397】

B 8 . 集団が、CD56+CD57-である活性化細胞傷害性細胞に関して富化されている、実施形態 B 1 ~ B 7 のいずれかに記載の組成物。

10

【0398】

B 9 . 細胞の約80%から約100%の間、または少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%がCD56+である、実施形態 B 6 ~ B 8 のいずれかに記載の組成物。

【0399】

B 10 . 細胞の約10%から約40%の間、または少なくとも約10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、もしくは40%がCD16+である、実施形態 B 6 ~ B 9 のいずれかに記載の組成物。

20

【0400】

B 11 . 細胞の5%未満、4%未満、3%未満、または2%未満がCD57+である、実施形態 B 6 ~ B 10 のいずれかに記載の組成物。

【0401】

B 12 . NK細胞およびガンマ・デルタT細胞以外の細胞を実質的に含まない、実施形態 B 1 ~ B 11 のいずれかに記載の組成物。

【0402】

B 13 . 5パーセント未満のNK T細胞を含む、実施形態 B 1 ~ B 12 のいずれかに記載の組成物。

30

【0403】

B 14 . 1パーセント未満のNK T細胞を含む、実施形態 B 1 ~ B 13 のいずれかに記載の組成物。

【0404】

B 15 . 0.1パーセント未満のNK T細胞を含む、実施形態 B 1 ~ B 14 のいずれかに記載の組成物。

【0405】

B 16 . 2パーセント未満のアルファ・ベータT細胞を含む、実施形態 B 1 ~ B 15 のいずれかに記載の組成物。

40

【0406】

B 17 . 1パーセント未満のアルファ・ベータT細胞を含む、実施形態 B 1 ~ B 16 のいずれかに記載の組成物。

【0407】

B 18 . 0.1パーセント未満のアルファ・ベータT細胞を含む、実施形態 B 1 ~ B 17 のいずれかに記載の組成物。

【0408】

B 19 . 集団におけるNK細胞のサブセットがCD16+細胞である、実施形態 B 1 ~ B 18 のいずれかに記載の組成物。

【0409】

50

B 2 0 . 大多数のガンマ . デルタ T 細胞が C D 5 7 - 細胞である、実施形態 B 1 ~ B 1 9 のいずれかに記載の組成物。

【 0 4 1 0 】

B 2 1 . 大多数の N K 細胞が C D 5 7 - 細胞である、実施形態 B 1 ~ B 2 0 のいずれかに記載の組成物。

【 0 4 1 1 】

B 2 2 . ガンマ . デルタ T 細胞が、 V . デルタ . 1 および V . デルタ . 2 発現に関してポリクローナルである、実施形態 B 1 ~ B 2 1 のいずれかに記載の組成物。

【 0 4 1 2 】

B 2 3 . ポリクローナルガンマ . デルタ T 細胞が、 V . デルタ . 1 + および V . デルタ . 1 - から選択される少なくとも 1 つの亜集団、ならびに V . デルタ . 2 + および V . デルタ . 2 - から選択される少なくとも 1 つの亜集団を含む、実施形態 B 2 2 に記載の組成物。

10

【 0 4 1 3 】

B 2 4 . 大多数のガンマ . デルタ T 細胞が V . デルタ . 1 を発現し、少数のガンマ . デルタ T 細胞が V . デルタ . 2 を発現する ; または
少数のガンマ . デルタ T 細胞が V . デルタ . 1 を発現し、大多数のガンマ . デルタ T 細胞が V . デルタ . 2 発現を発現する、実施形態 B 1 ~ B 2 3 のいずれかに記載の組成物。

【 0 4 1 4 】

B 2 5 . 集団における少数の細胞が C D 3 陽性細胞であり、集団における大多数の細胞が C D 3 陰性細胞である ; または
集団における大多数の細胞が C D 3 陽性細胞であり、集団における少数の細胞が C D 3 陰性細胞である、実施形態 B 1 ~ B 2 4 のいずれかに記載の組成物。

20

【 0 4 1 5 】

B 2 6 . N K 細胞のガンマ . デルタ T 細胞に対する比が 1 より大きい、実施形態 B 1 ~ B 2 5 のいずれかに記載の組成物。

【 0 4 1 6 】

B 2 7 . N K 細胞のガンマ . デルタ T 細胞に対する比が 1 未満である、実施形態 B 1 ~ B 2 5 のいずれかに記載の組成物。

【 0 4 1 7 】

B 2 8 . 改変された細胞の集団が、約 9 8 ~ 9 9 % の N K 細胞および約 1 ~ 2 % のガンマ . デルタ T 細胞を含む、実施形態 B 2 6 に記載の組成物。

30

【 0 4 1 8 】

B 2 9 . 改変された細胞の集団が、約 2 5 % から約 4 5 % の間の N K 細胞および約 5 5 % から約 7 5 % の間のガンマ . デルタ T 細胞を含む、実施形態 B 2 7 に記載の組成物。

【 0 4 1 9 】

B 3 0 . 改変された細胞の集団が、約 2 5 ~ 3 0 % の N K 細胞および約 7 0 ~ 7 5 % のガンマ . デルタ T 細胞を含む、実施形態 B 2 7 に記載の組成物。

【 0 4 2 0 】

B 3 1 . 改変された細胞の集団が、約 4 0 ~ 4 5 % の N K 細胞および約 5 5 ~ 6 0 % のガンマ . デルタ T 細胞を含む、実施形態 B 2 7 に記載の組成物。

40

【 0 4 2 1 】

B 3 2 . N K 細胞および / またはガンマ . デルタ T 細胞の約 5 0 % から約 9 9 % もしくはそれより多くの間、または約 5 0 % より多くのもしくはそれに等しい、 5 1 % より多くのもしくはそれに等しい、 5 2 % より多くのもしくはそれに等しい、 5 3 % より多くのもしくはそれに等しい、 5 4 % より多くのもしくはそれに等しい、 5 5 % より多くのもしくはそれに等しい、 5 6 % より多くのもしくはそれに等しい、 5 7 % より多くのもしくはそれに等しい、 5 8 % より多くのもしくはそれに等しい、 5 9 % より多くのもしくはそれに等しい、 6 0 % より多くのもしくはそれに等しい、 6 1 % より多くのもしくはそれに等しい、 6 2 % より多くのもしくはそれに等しい、 6 3 % より多くのもしくはそれに等しい、 6 4 % より多くのもしくはそれに等しい、 6 5 % より多くのもしくはそれに等しい、 6 6 % よ

50

り多くのもしくはそれに等しい、67%より多くのもしくはそれに等しい、68%より多くのもしくはそれに等しい、69%より多くのもしくはそれに等しい、70%より多くのもしくはそれに等しい、71%より多くのもしくはそれに等しい、72%より多くのもしくはそれに等しい、73%より多くのもしくはそれに等しい、74%より多くのもしくはそれに等しい、75%より多くのもしくはそれに等しい、76%より多くのもしくはそれに等しい、77%より多くのもしくはそれに等しい、78%より多くのもしくはそれに等しい、79%より多くのもしくはそれに等しい、80%より多くのもしくはそれに等しい、81%より多くのもしくはそれに等しい、82%より多くのもしくはそれに等しい、83%より多くのもしくはそれに等しい、84%より多くのもしくはそれに等しい、85%より多くのもしくはそれに等しい、86%より多くのもしくはそれに等しい、87%より多くのもしくはそれに等しい、88%より多くのもしくはそれに等しい、89%より多くのもしくはそれに等しい、90%より多くのもしくはそれに等しい、91%より多くのもしくはそれに等しい、92%より多くのもしくはそれに等しい、93%より多くのもしくはそれに等しい、94%より多くのもしくはそれに等しい、95%より多くのもしくはそれに等しい、96%より多くのもしくはそれに等しい、97%より多くのもしくはそれに等しい、98%より多くのもしくはそれに等しい、99%より多くのもしくはそれに等しい、またはその端数、最大100%がCD8+である、実施形態B1～B31のいずれかに記載の組成物。

【0422】

B33. NK細胞および／またはガンマ・デルタT細胞の2%未満がCD4+である、実施形態B32に記載の組成物。

【0423】

B34. NK細胞および／またはガンマ・デルタT細胞の2%未満がCD8+CD4+である、実施形態B32またはB33に記載の組成物。

【0424】

B35. NK細胞の約15%から約30%の間および／またはガンマ・デルタT細胞の約55%から85%の間の端数がCD8-CD4-である、実施形態B32～B34のいずれかに記載の組成物。

【0425】

B36. 集団における細胞の約30%から約99%もしくはそれより多くの間、または少なくとも約30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはその端数、最大100%が、外因性ポリヌクレオチド、変異ポリヌクレオチド、欠失ポリヌクレオチド、またはその組合せを含む遺伝子改変をさらに含む、実施形態B1～B35のいずれかに記載の組成物。

【0426】

B36. 1 複数のNK細胞および複数のガンマ・デルタT細胞を含む、実施形態B36に記載の組成物。

【0427】

B37. 集団における細胞の少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%が遺伝子改変を含むか、または集団における細胞の約100%もしくは100%が遺伝子改変を含む、実施形態B36またはB36. 1に記載の組成物。

【0428】

B38. 遺伝子改変が外因性ポリヌクレオチドを含む、実施形態B36、B36. 1またはB37のいずれかに記載の組成物。

【0429】

B39. 外因性ポリヌクレオチドがレトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクター中にある、実施形態B38に記載の組成物。

【0430】

B40. 外因性ポリヌクレオチドが、改変された細胞集団の1種または複数種の細胞のゲノムに組み込まれる、実施形態B38に記載の組成物。

【0431】

B41. 集団における細胞がキメラ抗原受容体(CAR)を含む、実施形態B36～B40のいずれかに記載の組成物。

【0432】

B42. キメラ抗原受容体がCD19、GD2、HER3、B7H3、CD123、またはCD30のうちの1つまたは複数に免疫特異的に結合する結合分子部分を含む、実施形態B41に記載の組成物。

【0433】

B43. 複数のNK細胞および複数のガンマ・デルタT細胞を含む集団が、1より多くの対象の末梢血細胞に由来する、実施形態B1～B42のいずれかに記載の組成物。

【0434】

C1. 実施形態B1～B43のいずれか1つに記載の組成物および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【0435】

D1. (a) 外因性ポリヌクレオチドを、実施形態A66およびB1～B35のいずれかの組成物に添加すること

(b) 実施形態A66およびB1～B35のいずれかの組成物の1種または複数種の細胞においてポリヌクレオチドを変異させること；または

(c) 実施形態A66およびB1～B35のいずれかの組成物の1種または複数種の細胞においてポリヌクレオチドを欠失させること

のうちの1つまたは複数を含む、改変された免疫細胞を作製する方法。

【0436】

D2. 遺伝子改変が、レトロウイルス形質導入、レンチウイルス形質導入、電気穿孔、トランスフェクション、CRISPR/cas9、またはTALENsによる、実施形態D1に記載の方法。

【0437】

D3. 遺伝子改変が、(a)でのように外因性ポリヌクレオチドを添加することからなるか、またはそれから本質的になる、実施形態D1またはD2に記載の方法。

【0438】

D4. 遺伝子改変が、(a)でのように外因性ポリヌクレオチドを添加すること、および／または(b)でのようにポリヌクレオチドを変異させることを含み、外因性ポリヌクレオチドおよび／または変異ポリヌクレオチドが免疫細胞のゲノムに組み込まれる、実施形態D1～D3のいずれかに記載の方法。

【0439】

10

20

30

40

50

D 5 . 組み込みが、電気穿孔、トランスフェクション、C R I S P R / c a s 9、または T A L E N S による、実施形態 D 4 に記載の方法。

【 0 4 4 0 】

D 6 . 外因性ポリヌクレオチドがキメラ抗原受容体 (C A R) をコードする、実施形態 D 1 ~ D 5 のいずれかに記載の方法。

【 0 4 4 1 】

D 7 . キメラ抗原受容体が、C D 1 9、G D 2、H E R 3、B 7 H 3、C D 1 2 3、または C D 3 0 のうちの 1 つまたは複数に免疫特異的に結合する結合分子部分を含む、実施形態 D 6 に記載の方法。

【 0 4 4 2 】

D 8 . 集団における細胞の約 3 0 % から約 9 9 % もしくはそれより多くの間、または少なくとも約 3 0 %、3 1 %、3 2 %、3 3 %、3 4 %、3 5 %、3 6 %、3 7 %、3 8 %、3 9 %、4 0 %、4 1 %、4 2 %、4 3 %、4 4 %、4 5 %、4 6 %、4 7 %、4 8 %、4 9 %、5 0 %、5 1 %、5 2 %、5 3 %、5 4 %、5 5 %、5 6 %、5 7 %、5 8 %、5 9 %、6 0 %、6 1 %、6 2 %、6 3 %、6 4 %、6 5 %、6 6 %、6 7 %、6 8 %、6 9 %、7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、もしくはその端数、最大 1 0 0 % が遺伝子改変を含む、実施形態 D 1 ~ D 7 のいずれかに記載の方法。

【 0 4 4 3 】

D 8 . 1 集団における細胞が、複数の N K 細胞および複数のガンマ . デルタ T 細胞を含む、実施形態 D 8 に記載の方法。

【 0 4 4 4 】

D 9 . 遺伝子改変が外因性ポリヌクレオチドを含む、実施形態 D 8 または D 8 . 1 に記載の方法。

【 0 4 4 5 】

D 1 0 . 集団における細胞の約 1 0 0 % または 1 0 0 % が外因性ポリヌクレオチドを含む、実施形態 D 9 に記載の方法。

【 0 4 4 6 】

E 1 . 実施形態 A 6 6 および B 1 ~ B 4 3 のいずれか 1 つに記載の組成物、または実施形態 C 1 に記載の医薬組成物、必要に応じて使用のための指示、および必要に応じてサイトカインを含むキット。

【 0 4 4 7 】

E 2 . 組成物または医薬組成物が、セ氏マイナス 4 度またはそれ未満にある、実施形態 E 1 に記載のキット。

【 0 4 4 8 】

E 3 . 組成物または医薬組成物が、セ氏約マイナス 7 5 度からセ氏約マイナス 8 0 度にある、実施形態 E 2 に記載のキット。

【 0 4 4 9 】

E 4 . 細胞約 1×10^5 個から細胞約 1×10^{12} 個を含む、実施形態 E 1 ~ E 3 のいずれかに記載のキット。

【 0 4 5 0 】

E 5 . サイトカインがインターロイキンポリペプチドである、実施形態 E 1 ~ E 4 のいずれかに記載のキット。

【 0 4 5 1 】

E 6 . インターロイキンペプチドが I L - 2、I L - 4、または I L - 1 5 である、実施形態 E 5 に記載のキット。

【 0 4 5 2 】

10

20

30

40

50

E 7. 非ヒト血清を含まないおよび／またはウシ血清を含まない、実施形態 E 1～E 6 のいずれかに記載のキット。

【0453】

E 8. 異種のもを含まない、実施形態 E 1～E 7 のいずれかに記載のキット。

【0454】

E 9. 外因性フィーダー細胞を含まない、実施形態 E 1～E 8 のいずれか 1 つに記載のキット。

【0455】

E 10. 単位剤形の実施形態 E 1～E 9 のいずれか 1 つに記載のキット。

【0456】

E 11. 単位剤形が、細胞約 1×10^6 個から細胞約 1×10^{12} 個である、実施形態 E 10 に記載のキット。

【0457】

F 1. 各々が 1 または複数のドナー対象に由来する細胞を含む複数の容器を含む、異なるドナー対象に由来する細胞のコレクションであって、各容器が、実施形態 A 66 および B 1～B 43 のいずれか 1 つに記載の組成物、実施形態 C 1 に記載の医薬組成物、または実施形態 E 1～E 11 のいずれかに記載のキットを含む、細胞のコレクション。

【0458】

G 1. がんまたは感染症を処置する方法であって、それを必要とする対象に、がんまたは感染症を処置するために有効な量の実施形態 A 66 および B 1～B 43 のいずれか 1 つに記載の組成物、実施形態 C 1 に記載の医薬組成物、または実施形態 E 1～E 11 のいずれかに記載のキットを投与することを含み、組成物、医薬組成物、またはキットにおける細胞が対象に対して同種異系である方法。

【0459】

G 2. がんまたは感染症を処置する方法であって、それを必要とする対象に、がんまたは感染症を処置するために有効な量の実施形態 A 66 および B 1～B 43 のいずれか 1 つに記載の組成物、実施形態 C 1 に記載の医薬組成物、または実施形態 E 1～E 11 のいずれかに記載のキットを投与することを含み、組成物、医薬組成物、またはキットにおける細胞が対象に対して自己である方法。

【0460】

G 3. 組成物を対象に 2 日またはそれより多くの別々の日に投与することを含む、実施形態 G 1 または実施形態 G 2 に記載の方法。

【0461】

G 4. 細胞のドナーが処置のレシピエントである、実施形態 G 2 または実施形態 G 3 に記載の方法。

【0462】

G 5. 細胞のドナーが処置のレシピエントではない、実施形態 G 1 または実施形態 G 3 に記載の方法。

【0463】

G 6. 処置のレシピエントが、ドナー由来のアルファ・ベータ T 細胞によって処置した場合に G v H D に罹りやすい、実施形態 G 5 に記載の方法。

【0464】

G 7. 処置が、約 2 週間から約 4 週間の間の間隔で約 1 単位投薬量から約 36 またはそれより多くの単位投薬量の間で投与される、実施形態 G 1～G 6 のいずれかに記載の方法。

【0465】

G 8. 処置が、単一単位投薬量として毎日 1 回、2 回、3 回、4 回、もしくは最大 5 回、または数日間、数週間もしくは数ヶ月間の間に 1 回、2 回、3 回、4 回、5 回、6 回、7 回、8 回、9 回、もしくは 10 回もしくはそれより多く、または 2 日毎、または週に 1 回、2 回、3 回、4 回、5 回、もしくは 6 回投与される、実施形態 G 1～G 6 のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

【0466】

G9. 処置が静脈内（IV）、髄腔内または筋肉内（IM）、腹腔内（IP）、胸膜内、関節腔内に投与されるか、またはがんもしくは感染症の部位もしくはその近傍に注射もしくは埋め込まれる、実施形態G1～G8のいずれかに記載の方法。

【0467】

G10. 単位投薬量が、対象の体重1キログラムあたり細胞約 10^4 個から細胞約 10^{10} 個の間、または対象あたり細胞約 10^6 個から細胞約 10^{12} 個の間を含む、実施形態G8またはG9に記載の方法。

【0468】

G11. 単位投薬量が、対象あたり細胞約 10^{10} 個、または対象の体重1キログラムあたり細胞約 10^8 個である、実施形態G10に記載の方法。

【0469】

G12. 処置ががんのためである、実施形態G1～G11のいずれかに記載の方法。

【0470】

G13. がんが、肺がん、黒色腫、乳がん、前立腺がん、結腸がん、腎細胞癌、卵巣がん、神経芽腫、横紋筋肉腫、白血病もしくはリンパ腫、ホジキンリンパ腫もしくは小児急性リンパ芽球性白血病、非ホジキンリンパ腫、肥満細胞腫もしくは肥満細胞腫瘍、卵巣がんもしくは癌、脾臓がん、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、肝細胞癌、網膜芽腫、乳腺腫瘍、結腸直腸癌、白血病、リンパ腫、急性リンパ芽球性白血病（ALL）もしくは急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病（AML）、組織球肉腫、脳腫瘍、星状細胞腫、膠芽腫、神経腫、結腸癌、子宮頸癌、肉腫、膀胱腫瘍、細網内皮組織の腫瘍、ウィルムス腫瘍、骨がん、骨肉腫、腎臓がん、または頭頸部がん、口腔がん、喉頭がん、転移疾患、または口腔咽頭がんから選択される、実施形態G12に記載の方法。

【0471】

G14. 第2の薬剤が、組成物、医薬組成物、またはキットと共投与される、実施形態G12またはG13に記載の方法。

【0472】

G15. 第2の薬剤が、がん関連抗原に免疫特異的に結合する抗体である、実施形態G14に記載の方法。

【0473】

G16. がん関連抗原が、 α -フェトプロテイン（AFP）、 α -アクチニン-4、A3、A33抗体に特異的な抗原、ART-4、B7、B7-H3、Ba733、BAGE、BrE3抗原、CA125、CAMEL、CAP-1、炭酸脱水酵素IX、CASP-8/m、CCL19、CCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD70L、CD74、CD79a、CD79b、CD80、CD83、CD95、CD123、CD126、CD132、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、CTLA4、CXCR4、CXCR7、CXCL12、HIF-1 α 、結腸特異抗原-p（CSAp）、CEA（CEACAM-5）、CEACAM-6、c-Met、DAM、EGFR、EGFRvIII、EGP-1（TROP-2）、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、線維芽細胞成長因子（FGF）、Flt-1、Flt-3、葉酸受容体、G250抗原、GAGE、gp100、GRO- β 、HLA-DR、HM1.24、ヒト絨毛ゴナドトロピン（HCG）およびそのサブユニット、HER2/neu、HMGB-1、低酸素症誘導因子（HIF-1）、HSP70-2M、HST-2、Ia、IGF-1R、IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IFN- λ 、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-1

10

20

30

40

50

7、IL-18、IL-23、IL-25、インスリン様成長因子-1 (IGF-1)、KC4抗原、KS-1抗原、KS1-4、Le-Y、LDR/FUT、マクロファージ遊走阻止因子 (MIF)、GD2、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ESO-1、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、MUC13、MUC16、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、膵臓がんムチン、PD1受容体、胎盤成長因子、p53、PLAGL2、前立腺酸性ホスファターゼ、PSA、PRAME、PSMA、PLGF、ILGF、ILGF-R、L-6、IL-25、RS5、RANTES、T101、SAGE、S100、サバイビン、サバイビン-2B、TAC、TAG-72、テネイシン、TRAIL受容体、TNF- α 、Tn抗原、トムソンフリードライヒ抗原、腫瘍壊死抗原、VEGFR、ED-Bフィブロネクチン、WT-1、17-1A抗原、補体因子C3、C3a、C3b、C5a、C5、血管新生マーカー、bcl-2、bcl-6、およびKrasからなる群から選択される、実施形態G15に記載の方法。

【0474】

G17. 抗体が、hR1 (抗IGF-1R)、hPAM4 (抗ムチン)、KC4 (抗ムチン)、hA20 (抗CD20)、hA19 (抗CD19)、hIMMU31 (抗AFP)、hLL1 (抗CD74)、hLL2 (抗CD22)、抗CD19/CD22二特異性抗体、RFB4 (抗CD22)、hMu-9 (抗CSAp)、hL243 (抗HLA-DR)、hMN-14 (抗CEACAM-5)、hMN-15 (抗CEACAM-6)、hRS7 (抗TROP-2)、hMN-3 (抗CEACAM-6)、CC49 (抗TAG-72)、J591 (抗PSMA)、D2/B (抗PSMA)、G250 (抗炭酸脱水酵素IX)、ジヌツキシマブ (抗GD2)、インフリキシマブ (抗TNF- α)、セルトリズマブペゴル (抗TNF- α)、アダリムマブ (抗TNF- α)、アレムツズマブ (抗CD52)、ベバシズマブ (抗VEGF)、セツキシマブ (抗EGFR)、ゲムツズマブ (抗CD33)、イブリツモマブチウキセタン (抗CD20)、パニツムマブ (抗EGFR)、リツキシマブ (抗CD20)、トシツモマブ (抗CD20)、GA101 (抗CD20)、トラスツズマブ (抗HER2/neu)、トシリズマブ (抗IL-6受容体)、バシリキシマブ (抗CD25)、ダクリズマブ (抗CD25)、エファリズマブ (抗CD11a)、ムロモナブ-CD3 (抗CD3受容体)、ナタリズマブ (抗 α 4インテグリン)、BWA-3 (抗ヒストンH2A/H4)、LG2-1 (抗ヒストンH3)、MRA12 (抗ヒストンH1)、PR1-1 (抗ヒストンH2B)、LG11-2 (抗ヒストンH2B)、およびLG2-2 (抗ヒストンH2B) から選択される、実施形態G15またはG16に記載の方法。

【0475】

G18. 処置が感染症のためである、実施形態G1～G11のいずれかに記載の方法。

【0476】

G19. 感染症が、細菌病原体、真菌病原体、ウイルス病原体、または原虫病原体の存在によって特徴付けられる、実施形態G18に記載の方法。

【0477】

G20. 感染症が、ヘルペス、エボラ、ウエストナイルウイルス、ワクシニアウイルス、エプスタインバーウイルス、A型肝炎ウイルス (HAV) ; B型肝炎ウイルス (HBV) ; C型肝炎ウイルス (HCV) ; ヘルペスウイルス (例えば、HSV-1、HSV-2、HHV-6、CMV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、水疱性口内炎ウイルス (VSV)、Bacilli、Citrobacter、Cholera、Diphtheria、Enterobacter、Gonococci、Helicobacter pylori、Klebsiella、Legionella、Meningococci、mycobacteria、Pseudomonas、Pneumococci、リケッチア細菌、Salmonella、Serratia、Staphylococci、Streptococci、Tetanus、Aspergillus (A. fumi

10

20

30

40

50

gatus、A. niger等)、Blastomyces dermatitidis、Candida (C. albicans、C. krusei、C. glabrata、C. tropicalis等)、Cryptococcus neoformans、Genus Mucorales (mucor、absidia、rhizopus)、Sporothrix schenckii、Paracoccidioides brasiliensis、Coccidioides immitis、Histoplasma capsulatum、Leptospirosis、Borrelia burgdorferi、蠕虫寄生生物(鉤虫、条虫、吸虫、扁形動物(例えば、Schistosoma)、Giardia lamblia、trichinella、Dientamoeba fragilis、Trypanosoma brucei、Trypanosoma cruzi、またはLeishmania donovani)からなる群から選択される、実施形態G19に記載の方法。

【0478】

本明細書においてそれにより参照された各特許、特許出願、刊行物、および文書の全体は、参照により本明細書に組み込まれている。上記の特許、特許出願、刊行物、および文書の引用は、前述のいずれかが関連する先行技術であることを認めたわけではなく、これらの刊行物または文書の内容または日時に対するいかなる承認とも見なされない。それらの引用は関連する開示について検索したことを示すものである。文書の日付または内容に関する全ての声明は、入手可能な情報に基づいており、その精度または正確性に関する承認ではない。

【0479】

本技術の基本的態様から逸脱することなく、前述に変更を行うことができる。本技術を、1つまたは複数の特定の実施形態を参照して実質的に詳細に記載してきたが、当業者は、本出願に特に開示した実施形態に変更を行ってもよく、それでもこれらの変更および改善が本技術の範囲および精神の範囲内であることを認識する。

【0480】

本明細書において例示的に記載される技術は、適切には本明細書に具体的に開示されない任意の要素の非存在下で実践され得る。このように、例えば本明細書における各々の例において、用語「含む」、「から本質的になる」、および「からなる」のいずれかを、他の2つの用語のいずれかと交換してもよい。使用されている用語および表現は、説明の用語として使用されており、制限のためではなく、そのような用語および表現の使用は、示され、記載される特色またはその一部のいかなる均等物も除外せず、特許請求される技術の範囲内で様々な改変が可能である。用語「1つの(a)」または「1つの(an)」は、文脈から1つの要素または1つより多くの要素のいずれかが記載されていることが明らかである場合を除き、それが修飾する要素の1つまたは複数を指すことができる(例えば、「1つの試薬」は1つまたは複数の試薬を意味することができる)。用語「約」は、本明細書で使用される場合、基礎となるパラメーターの10%以内の値(すなわち、プラスマイナス10%)を指し、一連の値の最初にある用語「約」の使用は、値の各々を修飾する(すなわち、「約1、2、および3」は、約1、約2、および約3を指す)。例えば、「約100グラム」の重量は、90グラムから110グラムの間の重量を含むことができる。さらに、値の列挙が本明細書において記載されている場合(例えば、約50%、60%、70%、80%、85%、または86%)、列挙は全ての間値およびその端数の値(例えば、54%、85.4%)を含む。このように、本技術を代表的な実施形態によって具体的に開示してきたが、本明細書に開示した概念の必要に応じた特色、改変、および変形形態を、当業者が頼りにしてもよく、そのような改変および変形形態は本技術の範囲内であると見なされると理解すべきである。

【0481】

本技術のある特定の実施形態を以下の特許請求の範囲に記載する。

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1】

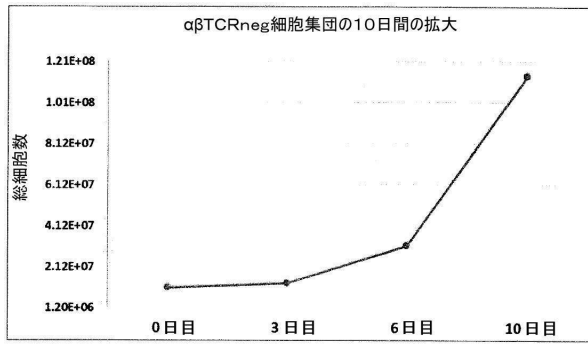


Fig. 1

【図 2】

自然細胞溶解性免疫細胞 (INNATE-K) の富化

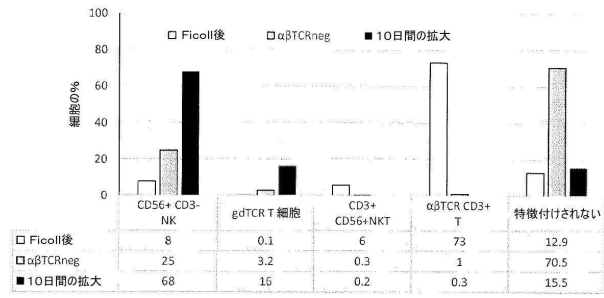


Fig. 2

【図 3】

10日目のγδT細胞系列表現型の結果

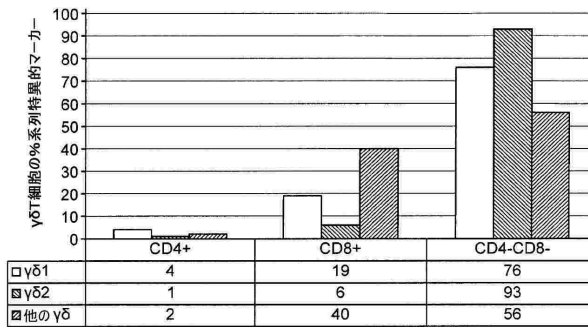


FIG. 3

【図 4】

CAR. 19αβTCRneg細胞の10日目の細胞拡大結果

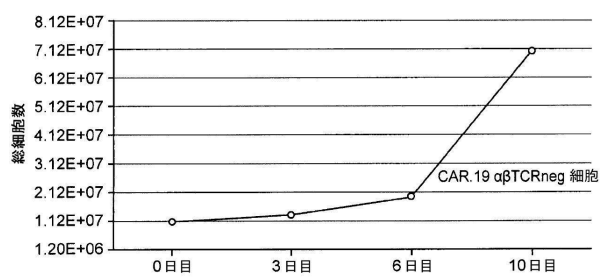


FIG. 4

【図 5】

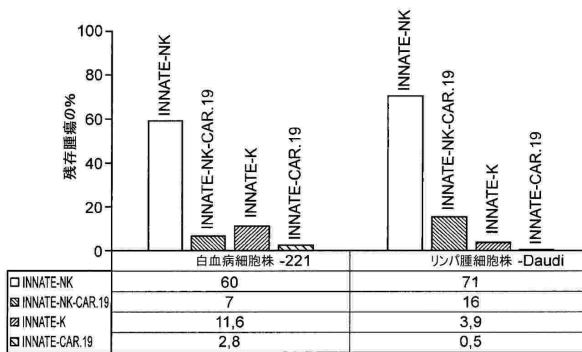


FIG. 5

【図 6】

プレートにおけるINNATE-NKの拡大

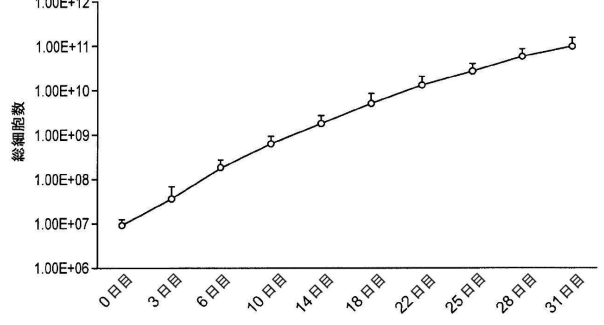


FIG. 6

10

20

30

40

50

【図 7】

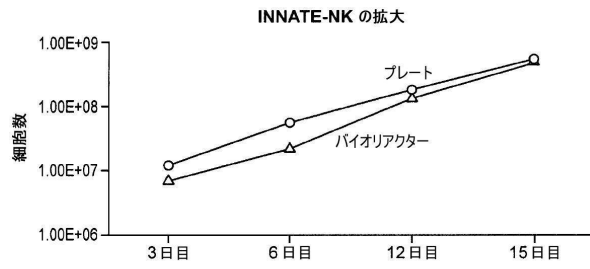


FIG. 7

【図 8】

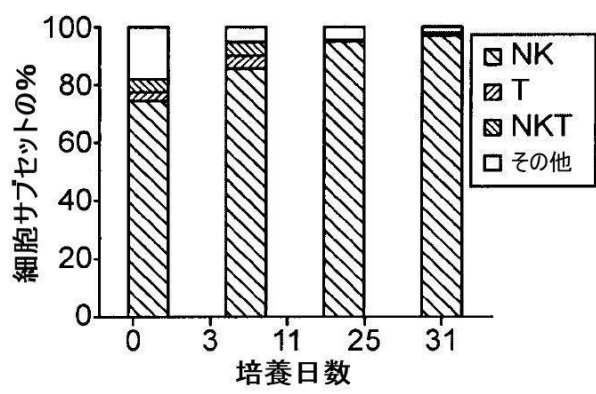


FIG. 8

【図 9】

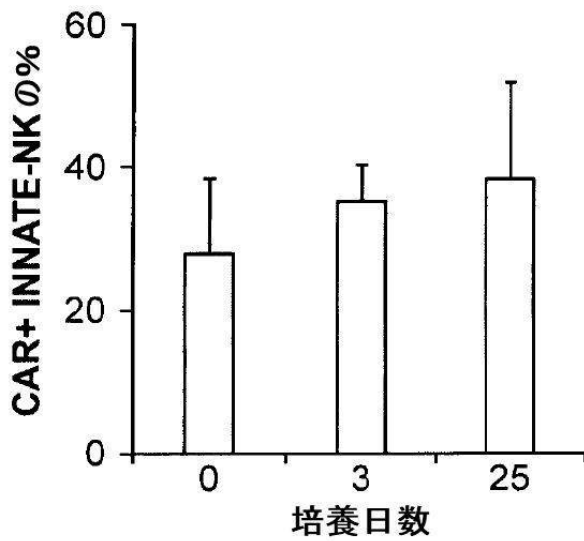


FIG. 9

【図 10】

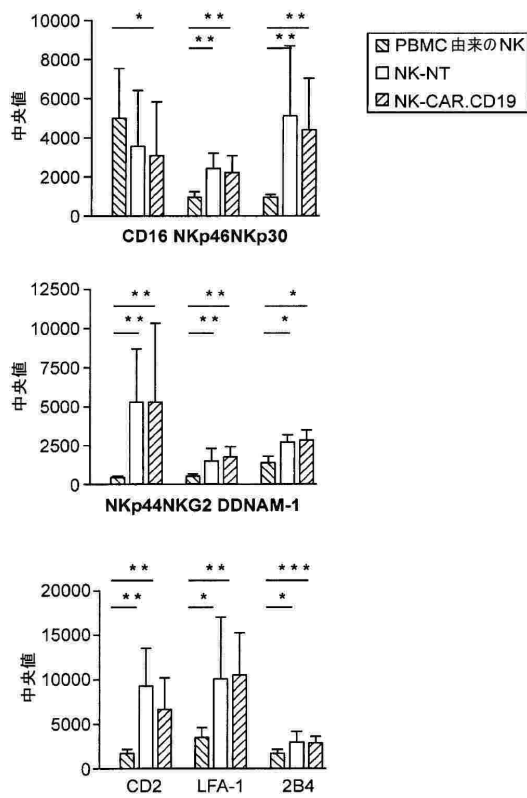


FIG. 10

10

20

30

40

50

【図 1 1】

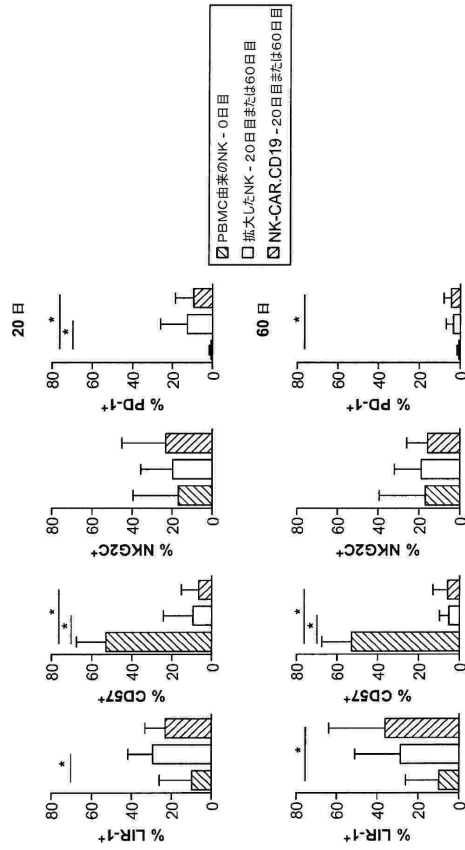


FIG. 11

【図 1 2】

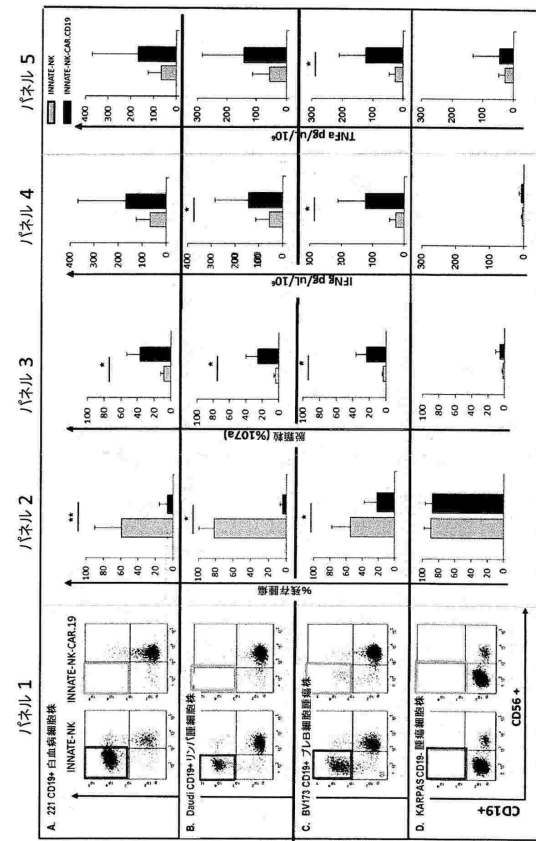


Fig. 12

【図 1 3】

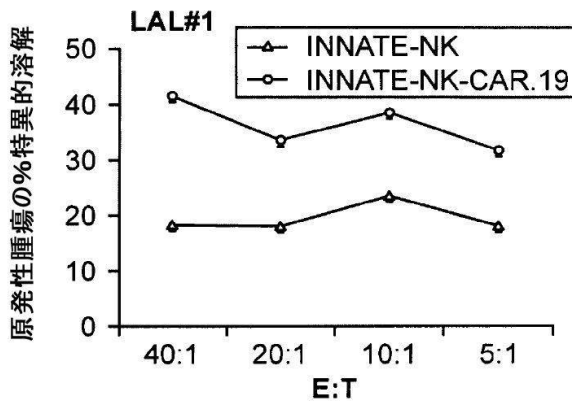


FIG. 13

【図 1 4】

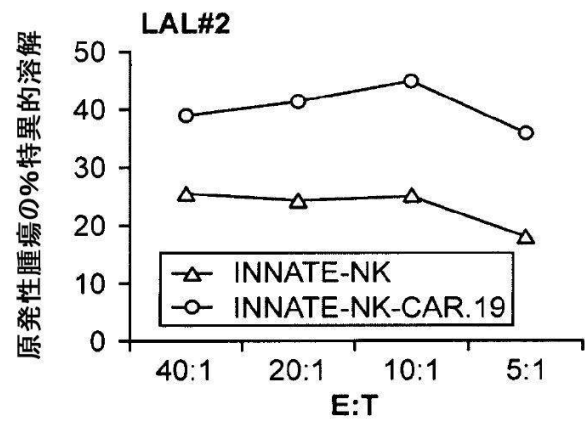


FIG. 14

10

20

30

40

50

【図 15】

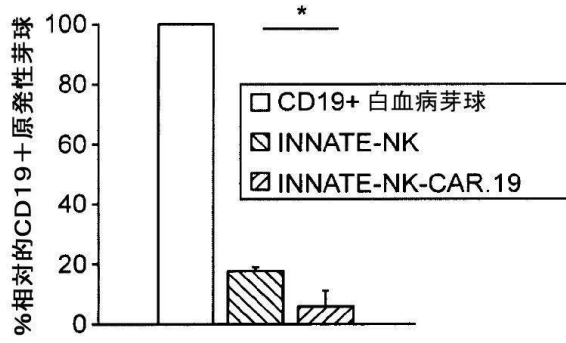


FIG. 15

【図 16】

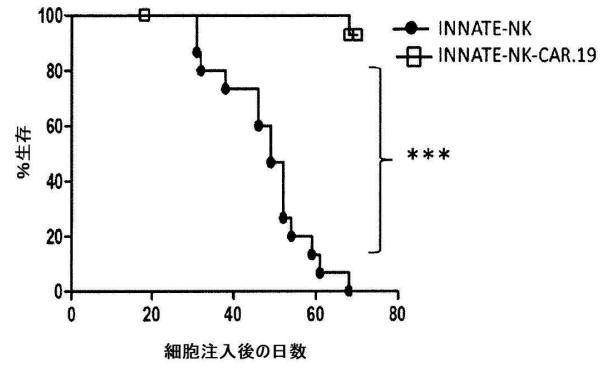


FIG. 16

【図 17】

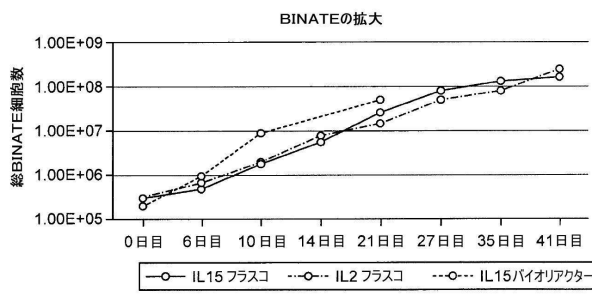


FIG. 17

【図 18】

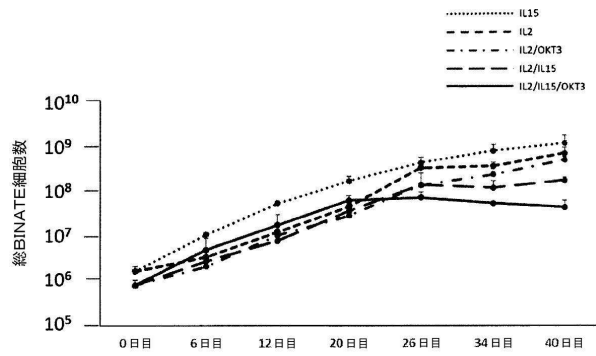


FIG. 18

10

20

30

40

50

【図 19】

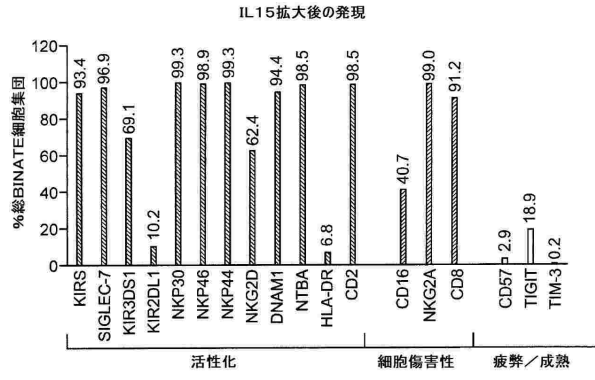


FIG. 19

【図 20】

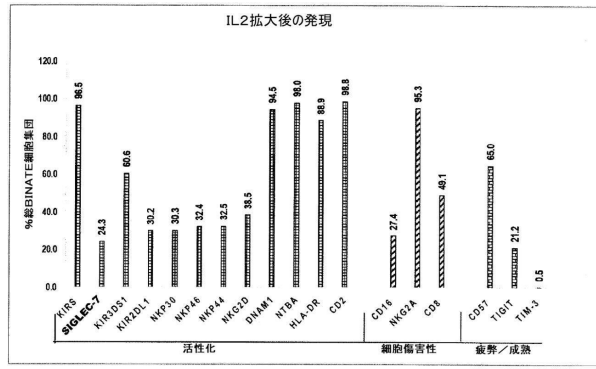


Fig. 20

【図 21】

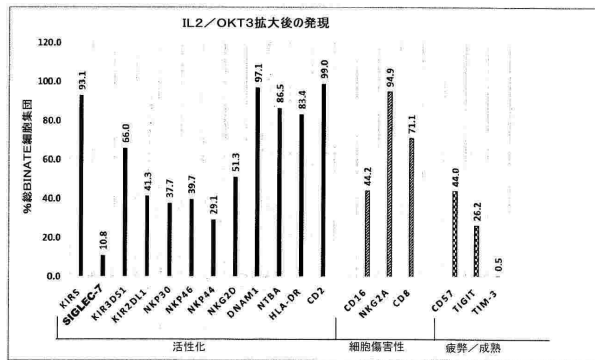


Fig. 21

【図 22】

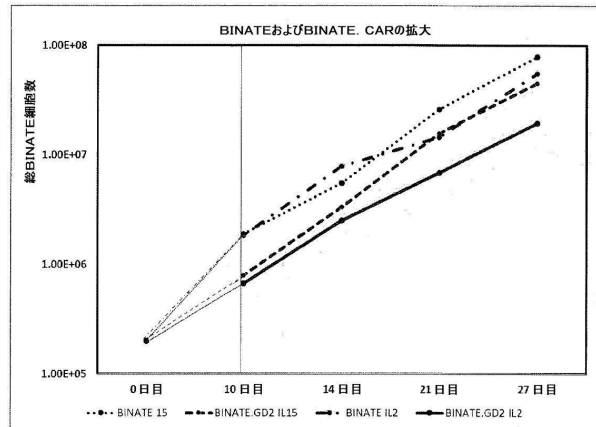


Fig. 22

10

20

30

40

50

【図 2 3】

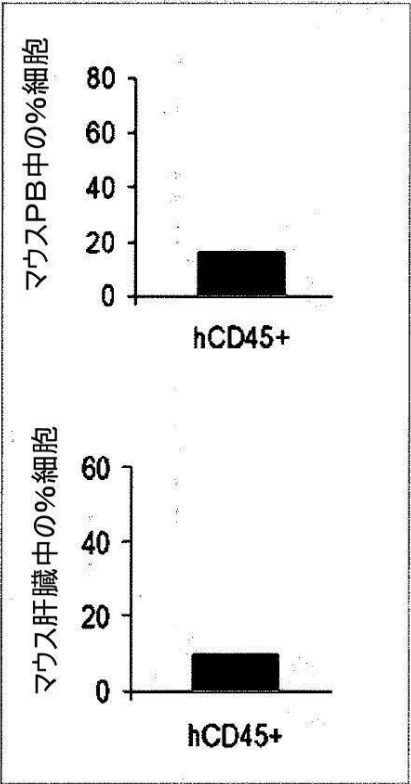


Fig. 23

【図 2 4】

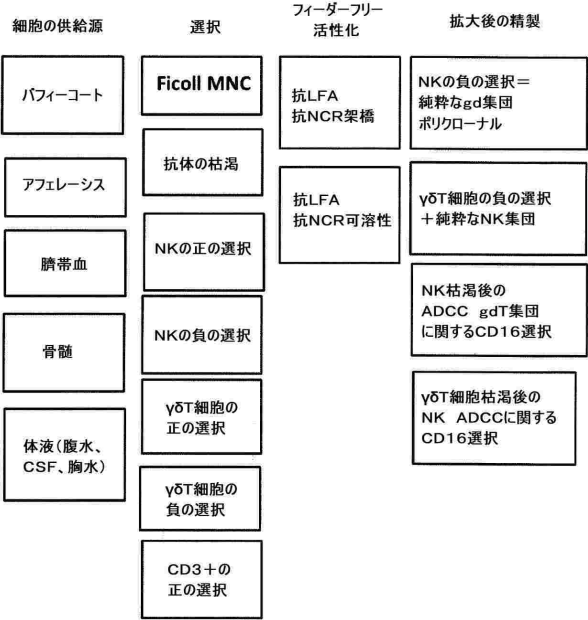


Fig. 24

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 0 7 K 14/54 (2006.01)

F I

C 0 7 K 14/54

弁護士 山本 健策

(72)発明者 キンタレッリ, コンチェッタ

イタリア国 0 0 1 4 2 ローマ, ヴィア ジャナ アングイッソラ 5 5 (インテルノ 7)

(72)発明者 デ アンジェリス, ビアージョ

イタリア国 0 0 1 4 2 ローマ, ヴィア ジャナ アングイッソラ 5 5 (インテルノ 7)

(72)発明者 ロカテッリ, フランコ

イタリア国 2 0 0 6 2 コスタヴォルピーノ, ヴィア フラテッリ ペッレグリーニ エンネ 9

審査官 松田 芳子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 7 / 1 9 7 3 4 7 (WO, A 1)

国際公開第 2 0 0 8 / 1 5 3 1 5 0 (WO, A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 5 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)