



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202039833 A

(43)公開日：中華民國 109 (2020) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：108143607

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 11 月 29 日

(51)Int. Cl. : C12N5/0783 (2010.01)

A61K35/17 (2015.01)

(30)優先權：2018/11/29 美國

62/773,132

(71)申請人：美國德州系統大學評議委員會(美國) BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (US)

美國

(72)發明人：瑞分尼 凱蒂 REZVANI, KATY (US)；須帕爾 依麗莎白 J SHPALL, ELIZABETH J. (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：78 項 圖式數：4 共 105 頁

(54)名稱

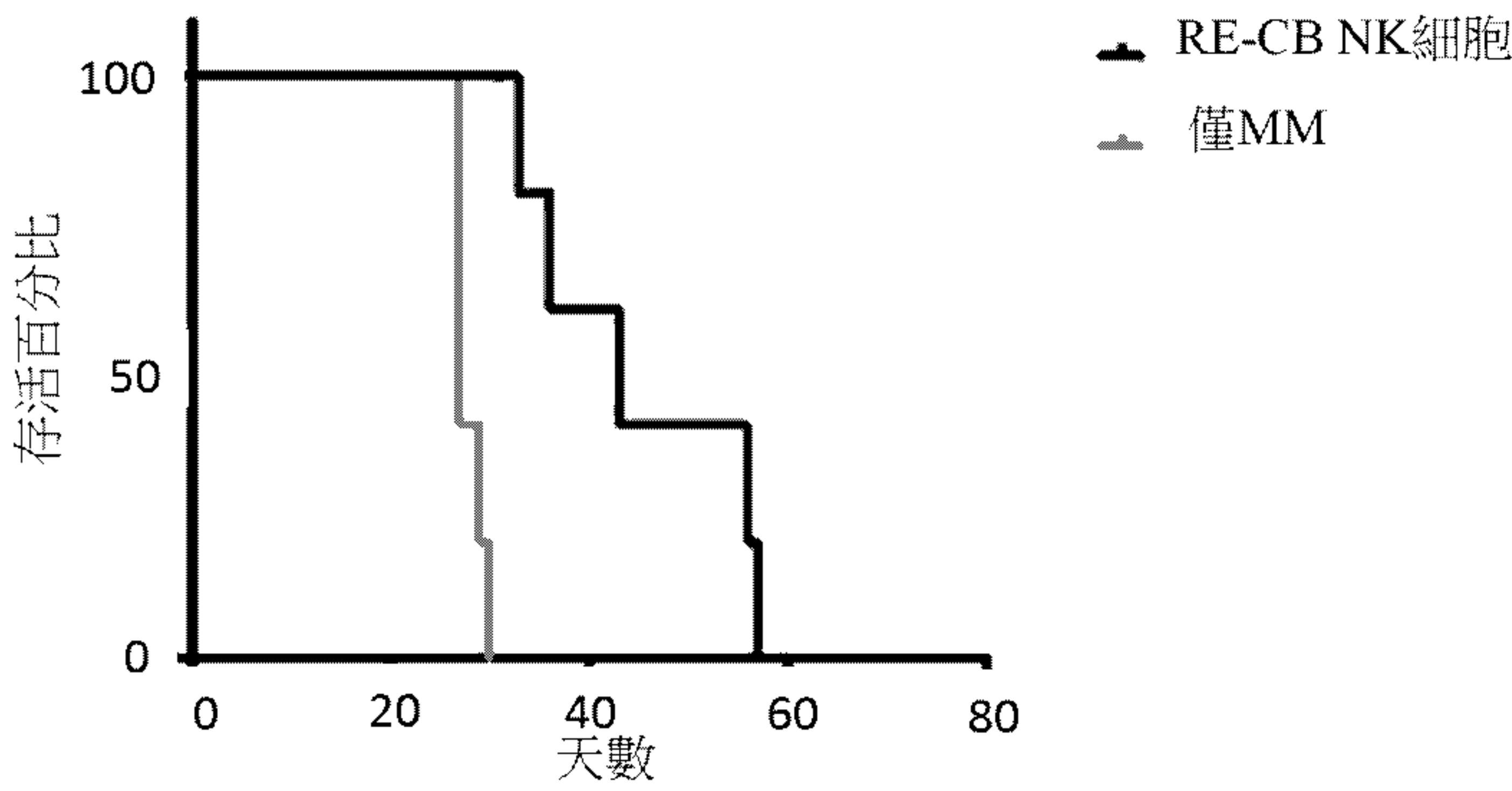
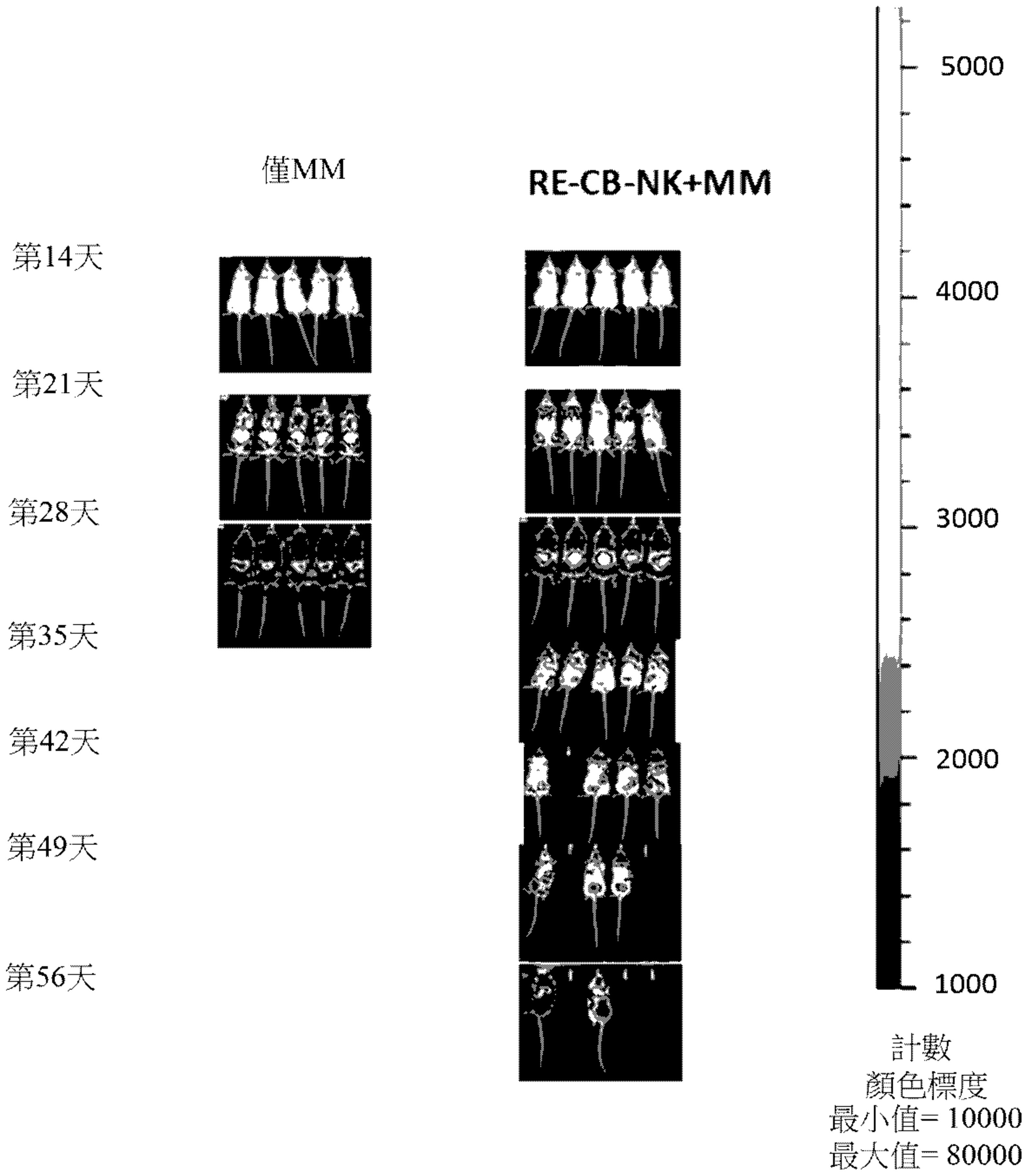
用於體外擴增天然殺手細胞之方法及其用途

(57)摘要

本文提供用於擴增臍帶血衍生之自然殺手細胞之體外方法以及其使用方法。實施例之實例包括：在抗原呈現細胞(APC)及 IL-2 存在下刺激來自臍帶血之單核細胞；以及用 APC 再刺激該等細胞以產生經擴增之 NK 細胞。在特定實施例中，該方法未利用人白血球抗原(HLA)匹配。

Provided herein are ex vivo methods for the expansion of cord blood-derived natural killer cells and methods of their use. Examples of embodiments include stimulating mononuclear cells from cord blood in the presence of antigen presenting cells (APCs) and IL-2 and re-stimulating the cells with APCs to produce expanded NK cells. In specific embodiments, the method does not utilize human leukocyte antigen (HLA) matching.

指定代表圖：



【圖4】



202039833

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於體外擴增天然殺手細胞之方法及其用途

【英文發明名稱】

METHODS FOR EX VIVO EXPANSION OF NATURAL KILLER
CELLS AND USE THEREOF

【中文】

本文提供用於擴增臍帶血衍生之自然殺手細胞之體外方法以及其使用方法。實施例之實例包括：在抗原呈現細胞(APC)及IL-2存在下刺激來自臍帶血之單核細胞；以及用APC再刺激該等細胞以產生經擴增之NK細胞。在特定實施例中，該方法未利用人白血球抗原(HLA)匹配。

【英文】

Provided herein are *ex vivo* methods for the expansion of cord blood-derived natural killer cells and methods of their use. Examples of embodiments include stimulating mononuclear cells from cord blood in the presence of antigen presenting cells (APCs) and IL-2 and re-stimulating the cells with APCs to produce expanded NK cells. In specific embodiments, the method does not utilize human leukocyte antigen (HLA) matching.

【指定代表圖】

圖4

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於體外擴增天然殺手細胞之方法及其用途

【英文發明名稱】

METHODS FOR EX VIVO EXPANSION OF NATURAL KILLER
CELLS AND USE THEREOF

【技術領域】

【0001】 本發明大體上係關於細胞生物學、分子生物學、免疫學及醫學之領域。更特定言之，本發明係關於用於擴增自然殺手(NK)細胞之方法及其用途。

【先前技術】

【0002】 對於罹患數種不同的血液惡性腫瘤及實體瘤的患者而言，自然殺手(NK)細胞正成為細胞免疫療法令人興奮的來源；然而，大部分使用授受轉移之NK細胞的研究受以下因素限制：需要自體性、人類白血球抗原(HLA)匹配供者或單倍體相合供者；擴增程序冗長且複雜；經輸注細胞存留不足且在體內擴增性差；以及不如人意的抗腫瘤活性。

【0003】 用於產生NK細胞的理想細胞源尚未完全明瞭。來自患者的末梢血液NK細胞(PB-NK細胞) (亦即，自體細胞)或來自成人同種異體供者的末梢血液NK細胞係最常用的；然而，此方法需要與進行白細胞去除術之受者最少3/6 HLA分子匹配的有意願的供者。成人PB NK細胞的另一缺點係授受轉移之後的次佳體內增殖及存留。因此，臍帶血(CB)是造血細胞產生NK細胞的具吸引力之來源，因為全世界CB銀行中超過一百萬CB單位係經冷凍且隨時可用之龐大全球庫存。

【0004】 已顯示CB-NK細胞具有固有特性，包括與細胞週期、細胞分裂及DNA複製有關的基因的較高表現，該等固有特性使得針對授受療法而言，CB-NK細胞優於自末梢血液擴增之NK細胞。廣泛使用CB之阻礙係難以以臨床相關的劑量自冷凍CB單元擴增功能性NK細胞。因此，仍然需要自CB擴增NK細胞的經改良方法。

【發明內容】

【0005】 在一個實施例中，本發明提供一種用於擴增自然殺手(NK)細胞之體外方法，其包含：在抗原呈現細胞(APC)及IL-2存在下刺激來自臍帶血之單核細胞(MNC)；以及用APC再刺激該等細胞以產生經擴增之NK細胞，其中在至少一些情況下，該方法在生物反應器中進行。刺激步驟可將MNC導向NK細胞。再刺激步驟可或可不包含IL-2之存在。在特定態樣中，該方法不包含在刺激步驟期間移除或添加任何培養基組分。在特定態樣中，該方法在某一時間範圍內進行，諸如少於15天，例如14天。

【0006】 在某一實施例中，本發明提供一種用於擴增自然殺手(NK)細胞之體外方法，其包含：(a)自臍帶血獲得單核細胞(MNC)之起始群體；(b)在抗原呈現細胞(APC)及IL-2存在下刺激MNC；以及(c)用APC再刺激該等細胞以產生經擴增之NK細胞，其中該方法在生物反應器中進行且符合良好作業規範(GMP)。步驟(b)之刺激可將MNC導向NK細胞。步驟(c)可或可不包含IL-2之存在。在特定態樣中，該方法不包含在步驟(b)期間移除或添加任何培養基組分。在特定態樣中，該方法係進行少於15天，諸如進行14天。

【0007】 在一些態樣中，該方法進一步包含使針對一或多種特定標記物(諸如CD3)呈陽性之細胞耗盡。在某些態樣中，耗盡步驟在步驟(b)與

(c)之間進行。在一些態樣中，自生物反應器移除細胞以進行CD3耗盡，且將細胞放入生物反應器中以進行步驟(c)。

【0008】 在某些態樣中，自臍帶血獲得MNC之起始群體包含在聚葡萄糖、人血清白蛋白(HSA)、DNAse及/或氯化鎂存在下解凍臍帶血。在特定態樣中，自臍帶血獲得MNC之起始群體包含在聚葡萄糖及/或DNase存在下解凍臍帶血。在特定態樣中，在5%至20%，諸如10%聚葡萄糖存在下洗滌臍帶血。在某些態樣中，在諸如100至300 mM，尤其200 mM之濃度之氯化鎂存在下使臍帶血懸浮。在一些態樣中，獲得步驟包含進行菲科爾(ficoll)密度梯度離心以獲得單核細胞(MNC)。

【0009】 在某些態樣中，生物反應器為透氣式生物反應器。在特定態樣中，透氣式生物反應器為G-Rex100M或G-Rex100。在一些態樣中，步驟(b)之刺激在3至5 L之培養基，諸如3、3.5、4、4.5或5 L之培養基中進行。

【0010】 在一些態樣中，APC經 γ 輻照。在某些態樣中，APC經工程改造成表現膜結合型IL-21 (mbIL-21)。在特定態樣中，APC經工程改造成表現IL-21、IL-15及/或IL-2。在一些態樣中，MNC及APC以1:2之比率進行培養。在一些態樣中，IL-2之濃度為50至200 IU/mL，諸如100 IU/mL。在特定態樣中，每2至3天補給一次IL-2。

【0011】 在特定態樣中，步驟(b)進行持續6至8天，諸如7天。在一些態樣中，步驟(c)進行持續6至8天，諸如7天。在一些態樣中，步驟(c)不包含使細胞進行分裂。在特定態樣中，在步驟(c)期間向細胞中添加兩次IL-2，且在特定情況下，在步驟(c)期間不添加或移除其他培養基組分。

【0012】 在一些態樣中，該方法包含使用3、4、5或6個生物反應

器。在特定態樣中，該方法包含使用少於10個生物反應器。

【0013】 在特定態樣中，NK細胞擴增至至少500倍、800倍、1000倍、1200倍、1500倍、2000倍、2500倍、3000倍或5000倍。在特定態樣中，與靜態液體培養相比，在生物反應器中培養NK細胞產生超過1000倍的NK細胞。

【0014】 在某些態樣中，該方法不包含人白血球抗原(HLA)匹配。在一些態樣中，NK細胞之起始群體並非獲自單倍體相合供者。

【0015】 在一些態樣中，經擴增之NK細胞與自末梢血液擴增之NK細胞相比具有增強的抗腫瘤活性。在某些態樣中，與自末梢血液擴增之NK細胞相比，經擴增之NK細胞具有一或多種細胞週期基因、一或多種細胞分裂基因及/或一或多種DNA複製基因之較高表現。在一些態樣中，經擴增之NK細胞與自末梢血液擴增之NK細胞相比具有較高增殖能力。在一些態樣中，經擴增之NK細胞並未顯示耗竭。在某些態樣中，藉由量測穿孔蛋白、顆粒酶、CD57、KLRG1及/或PD1之表現來偵測耗竭。在一些態樣中，經擴增之NK細胞具有穿孔蛋白及/或顆粒酶之高表現。在某些態樣中，經擴增之NK細胞具有CD57、KLRG1及/或PD1之低表現或不表現。

【0016】 在一些態樣中，經擴增之NK細胞包含臨床相關劑量。在某些態樣中，臍帶血為冷凍臍帶血。在特定態樣中，已針對一或多種感染性疾病測試冷凍臍帶血，該一或多種感染性疾病諸如A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、克氏錐蟲(*Trypanosoma cruzi*)、HIV、人類T淋巴細胞白血病毒、梅毒、茲卡病毒(Zika virus)等等。在一些態樣中，臍帶血為經彙集之臍帶血，諸如來自3、4、5、6、7或8個個體臍帶血單元。

【0017】 在一些態樣中，NK細胞並非自體的，諸如相對於接受者

個體而言並非自體的。在某些態樣中，NK細胞並非同種異體的，諸如相對於接受者個體而言並非同種異體的。

【0018】 在一些態樣中，APC為通用抗原呈現細胞(uAPC)。在某些態樣中，uAPC經工程改造成表現(1) CD48及/或CS1 (CD319)；(2)膜結合型介白素-21 (mbIL-21)；及(3) 41BB配位體(41BBL)。在一些態樣中，uAPC表現CD48。在某些態樣中，uAPC表現CS1。在特定態樣中，uAPC表現CD48及CS1。在一些態樣中，uAPC基本上不表現內源性HLA I類、HLA II類及/或CD1d分子。在某些態樣中，uAPC表現ICAM-1 (CD54)及/或LFA-3 (CD58)。在特定態樣中，uAPC進一步定義為源自白血病細胞之aAPC，諸如K562細胞。

【0019】 在額外態樣中，該方法進一步包含冷凍保存經擴增之NK細胞。

【0020】 本文進一步提供一種醫藥組合物，其包含：由實施例(例如(a)自臍帶血獲得單核細胞(MNC)之起始群體；(b)在抗原呈現細胞(APC)及IL-2存在下刺激MNC；以及(c)用APC再刺激該等細胞以產生經擴增之NK細胞，其中該方法在生物反應器中進行且符合GMP)產生之NK細胞群體；及醫藥學上可接受之載劑。

【0021】 另一實施例提供一種適用於治療個體之疾病或病症的組合物，該組合物包含有效量的由實施例(例如(a)自臍帶血獲得單核細胞(MNC)之起始群體；(b)在抗原呈現細胞(APC)及IL-2存在下刺激MNC；以及(c)用APC再刺激該等細胞以產生經擴增之NK細胞，其中該方法在生物反應器中進行且符合GMP)產生之NK細胞。

【0022】 另一實施例提供一種組合物之用途，其用於治療個體之免

疫相關病症，該組合物包含有效量的由實施例(例如(a)自臍帶血獲得單核細胞(MNC)之起始群體；(b)在抗原呈現細胞(APC)及IL-2存在下刺激MNC；以及(c)用APC再刺激該等細胞以產生經擴增之NK細胞，其中該方法在生物反應器中進行且符合GMP)產生之NK細胞。

【0023】 在另一實施例中，提供一種用於治療疾病或病症之方法，其包含向個體投與有效量的根據實施例(例如(a)自臍帶血獲得單核細胞(MNC)之起始群體；(b)在抗原呈現細胞(APC)及IL-2存在下刺激MNC；以及(c)用APC再刺激該等細胞以產生經擴增之NK細胞，其中該方法在生物反應器中進行且符合GMP)之經擴增NK細胞。

【0024】 在額外態樣中，該方法進一步包含投與化學療法。在一些態樣中，該化學療法在經擴增NK細胞之前投與。在特定態樣中，該化學療法係清髓性的。在其他態樣中，該化學療法係非清髓性的。在一些態樣中，該化學療法為淋巴細胞耗盡化學療法。在特定態樣中，該淋巴細胞耗盡化學療法為基於氟達拉賓之淋巴細胞耗盡化學療法。在特定態樣中，該化學療法為來那度胺(lenalidomide)。

【0025】 在特定態樣中，該方法不包含進行HLA匹配。在特定態樣中，個體並未出現移植物抗宿主疾病或其他毒性。

【0026】 在一些態樣中，該疾病或病症為免疫相關病症。在某些態樣中，該免疫相關病症為自體免疫病症、移植物抗宿主疾病、同種異體移植排斥反應或發炎性病況。在一些態樣中，該疾病或病症為癌症，諸如多發性骨髓瘤。

【0027】 在額外態樣中，該方法進一步包含投與至少第二治療劑。在一些態樣中，至少第二治療劑包含化學療法、免疫療法、手術、放射線

療法或生物療法。在一些態樣中，NK細胞及/或至少第二治療劑係經靜脈內、腹膜內、氣管內、瘤內、肌內、內窺鏡方式、病灶內、經皮、皮下、區域性投與或藉由直接注射或灌注來投與。

【0028】 本發明之其他目的、特徵及優勢將自以下[實施方式]而變得顯而易知。然而，應理解，[實施方式]及特定實例雖然指示本發明之較佳實施例，但僅以說明方式給出，因為熟習此項技術者將由此[實施方式]而變得顯而易知本發明的精神及範疇內的各種改變及修改。

【圖式簡單說明】

【0029】 以下圖式形成本說明書之部分且包括在內以進一步展示本發明中之某些態樣。參考此等圖式中之一或多者，結合本文中呈現之特定實施例之詳細描述，可更好地理解本發明之方法及組合物。

【0030】 圖1A至圖1E：臍帶血(CB) NK細胞中與細胞增殖(1A)、細胞活化(1B)、細胞黏附(1C)、細胞週期(1D)及DNA複製(1E)有關的基因相比於末梢血液(PB) NK細胞中該等基因的較高表現。

【0031】 圖2：CB NK細胞相比於PB-NK細胞具有較高增殖能力。

【0032】 圖3：快速體外擴增的CB NK細胞(RE-CB NK細胞)並未展現耗竭的表現型證據。

【0033】 圖4：如BLI成像(右側圖)及存活率(左側圖)所展示，RE-CB NK細胞在多發性骨髓瘤(MM)之免疫缺陷小鼠模型中誘導出穩定的抗腫瘤活性。

【實施方式】

【0034】 本申請案主張2018年11月29日申請之美國臨時專利申請案第62/773,132號之優先權，該申請案以全文引用的方式併入本文中。

【0035】 在某些實施例中，本發明提供用於體外擴增NK細胞之方法。本發明方法提供由CB單元(諸如冷凍的CB單元)製造符合良好作業規範(Good Manufacturing Practice；GMP)且具有高度功能性的NK細胞的穩定且快速的擴增方案。因此，本發明方法可在沒有活供者的情況下進行。穩定的NK細胞亦可由新鮮或冷凍的末梢血液細胞產生。該方法可包含在抗原呈現細胞(APC)存在下進行擴增，該等抗原呈現細胞諸如可具有或可不具有NK細胞特異性擴增能力的通用抗原呈現細胞(uAPC)。快速體外擴增的CB NK細胞(RE-CB NK細胞)可新鮮輸注，或可使用最佳條件冷凍保存使得該等細胞可在日後使用。重要的係，該方法提供以臨床劑量大規模擴增NK細胞。

【0036】 NK細胞之擴增可在諸如生物反應器之封閉系統中進行。本發明研究表面，與靜態液體培養系統相比，CB-NK細胞可在更一致且穩定擴增的情況下產生，諸如超過1,000倍。

【0037】 在一些態樣中，本發明符合GMP的程序包括使用已針對第一週及第二週NK細胞培養最佳化的特定培養條件。增加培養基體積且由此降低培養物中之細胞濃度對擴增之規模、進行培養所需的時間及數理邏輯以及過程成本具有顯著影響。如針對前七天培養之表2A及針對第二週培養之表2B中所展示，與較少培養基及較高細胞濃度(G-Rex100)相比，在較大培養基體積及降低之細胞濃度(G-Rex100M)的情況下達成顯著更好的倍數擴增。最佳程序需要更少生物反應器，且產生相同或較高NK細胞劑量需要較少細胞。此情形展示於第7天，舉例而言，此時需要少四倍的細胞來接種各G-Rex 100M以達成相同劑量。在第0至7天，不需要干預培養物，諸如不用如先前方法中一般向細胞中加料。使用最佳程序，在第7

至14天，細胞不需要分裂且僅向其中加料兩次(但在替代方案中，向細胞中加料一次、三次或四次或更多次)。使用較少培養基及細胞介素以及較少技術人員時間，從而節省金錢且改良數理邏輯。重要的係，在第7至14天，培養物中需要最少干預(例如，僅添加兩次IL2)，此不僅節省技術時間而且明顯降低微生物污染的可能性。此情形與現今使用的當前NK細胞擴增程序不同，在當前NK細胞擴增程序中，培養物通常在反覆加料的情況下每隔一天分裂，從而增加了微生物污染風險。如表2C中所概述，最佳方法將技術人員時間減少29%。

【0038】 本發明研究表明，快速體外擴增的CB NK細胞(RE-CB NK)可在沒有任何毒性或移植物抗宿主疾病風險的情況下，甚至在沒有任何HLA匹配的情況下安全輸注。亦證實，在輸注RE-CB NK細胞之前，投與化學療法，諸如在存在或不存在幹細胞移植的情況下投與清髓、非清髓或降低強度或者投與淋巴細胞耗盡化學療法，有助於CB-NK細胞之體內生長及活化。此等細胞由此成為真正「現成的」免疫療法產物，從而允許針對在輸注之前可能需要額外療法的患者具有最大靈活性。

【0039】 因此，本發明進一步提供用於治療諸如血液科惡性疾病及實體腫瘤之癌症的方法。該治療可包含投與NK細胞及化學療法，該化學療法諸如在存在或不存在幹細胞移植的情況下投與清髓、非清髓或降低強度或投與淋巴細胞耗盡化學療法。化學療法可在輸注NK細胞之前投與。NK細胞可與靶向NK細胞受體之治療劑(諸如CD16)組合投與，從而將細胞重新導向至標靶，由此增加針對不同腫瘤之反應。靶向NK細胞受體之治療劑(諸如CD16)可為單株抗體、雙特異性抗體或三特異性抗體。在特定情況下，NK細胞並不與化學療法及/或其他免疫療法組合。

I. 定義

【0040】如本文所用，關於指定組分「基本上游離」在本文中用於意謂指定組分中無一者有目的地調配入組合物中及/或僅作為污染物或以痕量存在。由組合物之任何非預期污染產生的指定組分總量因此遠低於0.05%，較佳低於0.01%。在特定情況下，存在用標準分析方法未偵測到指定組分之量的組合物。

【0041】如本說明書中所使用，「一(a/an)」可意謂一或多個。如申請專利範圍中所使用，當與字語「包含」結合使用時，字語「一(a/an)」可意謂一或多於一個。

【0042】儘管本發明支持指代僅替代及「及/或」之定義，但除非明確指示為指代僅替代或替代相互排斥，否則術語「或」在申請專利範圍中之使用用於意謂「及/或」。如本文中所用，「另一」可意謂至少第二個或更多個。術語「約」、「大致上」及「大約」一般意謂所陳述值加或減5%。

【0043】「免疫病症」、「免疫相關病症」或「免疫介導之病症」係指其中免疫反應在疾病之發展或進展中起關鍵作用之病症。免疫介導之病症包括自體免疫病症、同種異體移植排斥反應、移植物抗宿主疾病及發炎性病況以及過敏性病況。

【0044】「治療(treating/treatment)」疾病或病況係指執行方案，其可包括致力於減輕疾病之跡象或症狀而向患者投與一或多種藥物。所需治療作用包括降低疾病進展速率、改善或減輕疾病病況及緩解或改良預後。減輕可在疾病或病況之跡象或症狀出現之前以及在其出現之後發生。因此，「治療(treating/treatment)」可包括「預防

(preventing/prevention) 」疾病或非所需病況。另外，「治療 (treating/treatment) 」不需要完全減輕跡象或症狀，不需要治癒，且確切而言包括僅對患者具有邊際效應之方案。

【0045】 如在整個本申請中使用之術語「治療效益」或「治療上有效之」係指相對於此病況之醫學治療促進或增強個體之健康的任何事物。此包括但不限於疾病跡象或症狀之頻率或嚴重程度之降低。舉例而言，癌症治療可涉及例如腫瘤尺寸減小、腫瘤侵襲性降低、癌症生長速率降低或癌轉移預防。癌症治療亦可指延長患有癌症之個體之存活期。

【0046】 「個體」及「患者」係指人類或諸如靈長類動物、哺乳動物及脊椎動物之非人類。在特定實施例中，個體為人類。

【0047】 片語「醫藥學上或藥理學上可接受之」係指在按需要向諸如人類之動物投與時不產生不良、過敏或其他不適當反應之分子實體及組合物。熟習此項技術者將依據本發明而得知包含抗體或額外活性成分之醫藥組合物之製備。此外，對於動物(例如人類)投與，應理解，製備應滿足如FDA生物標準辦公室(FDA Office of Biological Standards)所要求之無菌性、發熱性、一般安全性及純度標準。

【0048】 如本文所用，「醫藥學上可接受之載劑」包括任何及所有水溶劑(例如水、醇/水溶液、鹽水溶液、非經腸媒劑，諸如氯化鈉、林格氏溶液(Ringer's dextrose)右旋糖等)、非水溶劑(例如丙二醇、聚乙二醇、植物油及諸如油酸乙酯之可注射有機酯)、分散介質、包衣、界面活性劑、抗氧化劑、防腐劑(例如抗細菌或抗真菌劑、抗氧化劑、螯合劑及惰性氣體)、等張劑、吸收延遲劑、鹽、藥物、藥物穩定劑、凝膠、黏合劑、賦形劑、崩解劑、潤滑劑、甜味劑、調味劑、染料、流體及營養補充

劑，諸如物質以及其組合，如一般熟習此項技術者將已知。根據熟知參數調整醫藥組合物中之各種組分之pH及準確濃度。

【0049】術語「單倍型分型」、「HLA匹配」或「組織分型」係指用於例如藉由判定特定個體之淋巴細胞上表現何種HLA基因座(*locus/loci*)來鑑別個體之單倍型或組織型之方法。然而，在特定實施例中，該方法不包含人白血球抗原(HLA)匹配。HLA基因位於作為染色體6之短臂上之區域的主要組織相容性複合體(MHC)中，且參與細胞與細胞相互作用、免疫反應、器官移植、癌症發展及易感疾病。在移植中存在六個重要基因座，名為HLA-A、HLA-B、HLA-C及HLA-DR、HLA-DP及HLA-DQ。在各基因座處，可存在若干不同對偶基因中之任一者。廣泛用於單倍型分型之方法使用聚合酶鏈反應(PCR)以比較個體之DNA與編碼MHC抗原之基因之已知區段。此等基因區域之可變性決定個體之組織型或單倍型。血清學方法亦用於偵測細胞表面上之血清學上定義之抗原。可藉由已知血清學技術來量測HLA-A、HLA-B及HLA-C決定子。簡言之，將來自個體之淋巴細胞(與新鮮末梢血液分離)與識別所有已知HLA抗原之抗血清一起培育。使細胞鋪展於具有含有各種抗血清之微觀孔之盤中。將細胞培育30分鐘，隨後再補充培育60分鐘。若淋巴細胞在其表面上具有由抗血清中之抗體識別之抗原，則淋巴細胞溶解。可添加染料以顯示細胞膜滲透性之變化及細胞死亡。由溶解破壞之細胞圖案指示組織學不相容性之程度。舉例而言，若在含有用於HLA-A3之抗血清之孔中來自測試HLA-A3之個人的淋巴細胞受到破壞，則對於此抗原群組，測試為陽性的。

【0050】術語「抗原呈現細胞(APC)」係指能夠呈現呈可藉由免疫系統之特定效應細胞識別之肽-MHC複合物形式的一或多種抗原，且藉此

誘導相對於呈現之一或多種抗原之有效細胞免疫反應的一類細胞。術語「APC」涵蓋諸如巨噬細胞、B細胞、內皮細胞、活化T細胞及樹突狀細胞之完整全細胞，或諸如與 $\beta 2$ -微球蛋白複合之純化MHC I類分子之能夠呈現抗原之自然存在或合成分子。

【0051】術語「功能性封閉」係指藉由氣密密封整個系統或藉由在與收集系統之所有連接處提供無菌屏障過濾器來密封系統以確保流體無菌性。

【0052】術語「生物反應器」係指在封閉無菌系統中為細胞提供營養物且移除代謝物，並且提供有利於細胞生長之物理化學環境的大規模細胞培養系統。在特定態樣中，生物學及/或生物化學過程在受監測及控制之環境及操作條件下出現，該等條件例如pH、溫度、壓力、營養物供應及廢料移除。根據本發明，適合於與本發明方法一起使用的生物反應器之基本類型包括中空纖維生物反應器。

II. NK細胞擴增

【0053】在某些態樣中，本發明係關於自CB擴增NK細胞。NK細胞可具有獨特優勢，該等優勢與涉及細胞週期、細胞分裂及DNA複製之基因之較高表現(如圖1中所展示)有關。由此，本發明方法提供用於增殖源自CB之NK細胞之符合GMP的快速擴增方案。

【0054】在例示性方案中，將臍帶血單元(例如，20%或完整臍帶血單元)解凍，且藉由使用菲科爾密度梯度離心來分離單核細胞而獲得NK細胞。可在解凍之後以及單核細胞分離之後進行洗滌。隨後將細胞與IL-2 (100 U/mL)及APC一起培育，該等APC諸如經 γ 輻照(100 Gy)之aAPC (例如，純系9膜結合型IL-21 (mbIL-21) aAPC)或uAPC。生物反應器(諸如G-

Rex生物反應器)中NK細胞與aAPC之比例可為2:1。在第2天，向細胞培養物中加入IL-2並監測擴增比率。在第6或7天，可諸如藉由使用Miltenyi XS管柱及SuperMACS™分離器來排除CD3+細胞。隨後將細胞與IL-2 (100 U/mL)一起培育，添加IL-2，且隨後在第14天收集細胞。

【0055】 解凍可在37°C水浴中，在無菌不良物中進行。培養基可包含含L-麩醯胺酸之RPMI 1640、Clicks培養基及人AB (例如10%)血清。可藉由在450xG下離心10分鐘來進行洗滌。洗滌溶液可包含0.1%至10% (諸如0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%) HSA DPBS、10%聚葡萄糖DPBS、DNase及氯化鎂。

【0056】 可藉由甚至將經洗滌CB細胞之部分成層至試管中之Ficoll-Paque上來進行單核分離。接著可對細胞進行離心，且移除上層受到污染的血漿及血漿。可進一步對細胞進行離心，移除上清液，且將細胞再懸浮於培養基中。

【0057】 在特定態樣中，在整個過程中藉由執行細胞計數分析、生存率分析、嵌合分析、免疫表型分型分析、無菌性分析、菌質PCR分析、格蘭氏染色(gram stain)分析、內毒素分析、鉻檢定分析及細胞介素檢定分析來進行品質控制。

【0058】 NK細胞可在經工程改造之飼養細胞(諸如APC)存在下擴增。APC可表現用於活化NK共刺激分子及細胞介素之配位體。舉例而言，APC可為表現CD48、CS1、IL-21、IL-2及/或IL15之UAPC。

【0059】 在某些實施例中，藉由此項技術中熟知之方法由臍帶血衍生出NK細胞。在特定實施例中，自CB (彙集之CB)分離免疫細胞。特定言之，本發明之快速擴增方案可涉及自冷凍且解凍之CB單元或自選自臨

床CB庫之新鮮CB單元分離並擴增NK細胞。可自2、3、4、5、6、7、8、10個或更多個單元彙集CB。NK細胞可為自體的或同種異體的。經分離NK細胞可為經匹配以用於待投與細胞療法之個體之單倍型。然而，在特定態樣中，NK細胞並非自體的或HLA匹配的。NK細胞可藉由人體內之特定表面標記物，諸如CD16、CD56及CD8偵測。

【0060】 在某些態樣中，NK細胞之起始群體可藉由使用菲科爾密度梯度離心來分離單核細胞而獲得。可去除細胞培養物中表現CD3、CD14及/或CD19細胞之任何細胞，且可對細胞培養物進行表徵以判定CD56⁺/CD3⁻細胞或NK細胞之百分比。

【0061】 可在存在本發明之APC（諸如UAPC）的情況下擴增細胞。擴增可持續約2至30天，諸如3至20天，確切言之12至16天，諸如12、13、14、15、16、17、18或19天，特定言之約14天。NK細胞及APCS可以約3:1至1:3，諸如2:1、1:1、1:2，特定言之約1:2之比率存在。擴增培養物可進一步包含細胞介素以促進擴增，該等細胞介素諸如IL-2、IL-21及/或IL-18。細胞介素可以約10 U/mL至500 U/mL，諸如100 U/mL至300 U/mL，特定言之約200 U/mL之濃度存在。可在擴增培養物中諸如每2至3天補給一次細胞介素。可至少再次向培養物中添加APC，諸如在CAR轉導之後再次添加。

【0062】 在擴增之後，可立即輸注NK細胞或可諸如藉由低溫保存來儲存NK細胞。在某些態樣中，當主體群體在約1、2、3、4、5天內繁殖時，NK細胞可體外繁殖數天、數週或數月。

【0063】 經擴增NK細胞可分泌諸如干擾素- γ 、腫瘤壞死因子- α 及顆粒細胞-巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)之I型細胞介素，該等I型細胞介

素活化先天性免疫細胞及自適應免疫細胞兩者以及其他細胞介素及趨化激素。此等細胞介素量測可用於測定NK細胞之活化狀態。另外，此項技術中已知之用於測定NK細胞活化之其他方法可用於表徵本發明之NK細胞。

A. 生物反應器

【0064】 NK細胞可在諸如生物反應器之功能性封閉系統中擴增。可在可透氣的生物反應器，諸如G-Rex細胞培養裝置中進行擴增。生物反應器可支持平均體積450 mL的 1×10^9 至 3×10^9 個總細胞。

【0065】 生物反應器可根據一般類別進行分組，包括：靜態生物反應器、攪拌燒瓶式生物反應器、旋轉壁容器式生物反應器、中空纖維生物反應器及直接灌注式生物反應器。在生物反應器內，細胞可自由或固定化接種在多孔3維支架(水凝膠)上。

【0066】 中空纖維生物反應器可用於提高培養期間的質量轉移。中空纖維生物反應器係基於中空纖維之3D細胞培養系統，該等中空纖維係以平行陣列配置的較小半透性毛細管膜，其典型分子量截斷(molecular weight cut-off；MWCO)範圍為10至30 kDa。此等中空纖維膜通常捆綁且容納於管狀聚碳酸酯外殼內，從而形成中空纖維生物反應器濾筒。亦裝配有入口埠及出口埠之濾筒內有兩個隔室：中空纖維內之毛細管內(IC)空間以及包圍中空纖維之毛細管外(EC)空間。

【0067】 由此，本發明之生物反應器可為中空纖維生物反應器。中空纖維生物反應器可將細胞嵌入在纖維之管腔內，在管腔外空間灌注培養基；或替代地，中空纖維生物反應器可經由中空纖維提供氣體及培養基灌注，而細胞在管腔外空間內生長。

【0068】 中空纖維應適合於在生物反應器中遞送營養物以及移除廢

料。中空纖維可呈任何形狀，例如可呈圓形及管狀或呈同心環之形式。中空纖維可由可再吸收或不可再吸收的膜製成。舉例而言，中空纖維之適合組分包括聚對二氧環己酮、聚乳酸交酯、聚乳酸羥基乙酸、聚乙醇酸、聚乳酸、聚乙醇酸/碳酸三亞甲酯、纖維素、甲基纖維素、纖維素聚合物、纖維素酯、再生纖維素、普洛尼克(pluronic)、膠原蛋白、彈性蛋白及其混合物。

【0069】 生物反應器可在接種細胞之前預致敏。預致敏可包含用諸如PBS之緩衝液沖洗。預致敏亦可包含用諸如纖維結合蛋白之細胞外基質蛋白塗佈生物反應器。接著可用諸如 α MEM之培養基洗滌生物反應器。

【0070】 在特定實施例中，本發明方法使用GRex生物反應器。GRex燒瓶之底部為透氣膜，細胞駐留在該透氣膜上。因此，細胞處於高度氧化環境中，從而允許細胞生長至高密度。系統容易擴大規模，且需要較低頻率的培養操作。GRex燒瓶與標準組織培養恆溫箱及細胞實驗室設備相容，從而減少開始授受細胞療法(ACT)程序所需要的專用設備及資本投資。

【0071】 細胞可以如下密度接種在生物反應器中：每平方厘米約100至1,000個細胞，諸如每平方厘米約150個細胞，每平方厘米約200個細胞，每平方厘米約250個細胞，每平方厘米約300個細胞，諸如每平方厘米約350個細胞，諸如每平方厘米約400個細胞，諸如每平方厘米約450個細胞，諸如每平方厘米約500個細胞，諸如每平方厘米約550個細胞，諸如每平方厘米約600個細胞，諸如每平方厘米約650個細胞，諸如每平方厘米約700個細胞，諸如每平方厘米約750個細胞，諸如每平方厘米約800個細胞，諸如每平方厘米約850個細胞，諸如每平方厘米約900個細

胞，諸如每平方厘米約950個細胞，或每平方厘米約1000個細胞。特定言之，細胞可以每平方厘米約400至500個細胞，諸如每平方厘米約450個細胞之細胞密度接種。

【0072】 接種於生物反應器中之細胞的總數目可為約 1.0×10^6 至約 1.0×10^8 個細胞，諸如約 1.0×10^6 至 5.0×10^6 、 5.0×10^6 至 1.0×10^7 、 1.0×10^7 至 5.0×10^7 、 5.0×10^7 至 1.0×10^8 個細胞。在特定態樣中，接種於生物反應器中之細胞的總數目為約 1.0×10^7 至約 3.0×10^7 ，諸如約 2.0×10^7 個細胞。

【0073】 細胞可接種於任何適合的培養細胞之培養基中，許多此類培養基係可商購的。例示性培養基包括DMEM、RPMI、MEM、培養基199、HAMS及其類似者。在一個實施例中，培養基為 α MEM培養基，特定言之補充有L-麩醯胺酸之 α MEM。培養基可補充有以下中之一或多者：生長因子、細胞介素、激素、或B27、抗生素、維生素及/或小分子藥物。特定言之，培養基可不含血清。

【0074】 在一些實施例中，可在室溫下培育細胞。恆溫箱可加濕，且具有約5% CO_2 及約1% O_2 之氛圍。在一些實施例中， CO_2 濃度可介於約1%至20%、2%至10%或3%至5%之範圍內。在一些實施例中， O_2 濃度可介於約1%至20%、2%至10%或3%至5%之範圍內。

B. 抗原呈現細胞

【0075】 抗原呈現細胞包括巨噬細胞、B淋巴細胞及樹突狀細胞，其藉由其特定MHC分子之表現區分。APC內化抗原且與其外部細胞膜上之MHC分子一起再表現彼抗原之部分。MHC為具有多個基因座之較大遺傳複合物。MHC基因座編碼兩個主要類別之MHC膜分子，稱為I類及II

類。T輔助淋巴細胞一般識別與MHC II類分子關聯之抗原，且T細胞毒性淋巴細胞識別與MHC I類分子關聯之抗原。MHC在人類中稱為HLA複合物且在小鼠中稱為H-2複合物。

【0076】 在某些情況下aAPC適用於製備實施例之治療組合物及細胞療法產物。關於製備及使用抗原呈現系統之一般指導參見例如美國專利第6,225,042號、第6,355,479號、第6,362,001號及第6,790,662號；美國專利申請公開案第2009/0017000號及第2009/0004142號；以及國際公開案第WO2007/103009號。

【0077】 aAPC系統可包含至少一種外源性輔助分子。可採用任何適合之輔助分子之數目及組合。輔助分子可選自諸如共刺激分子及黏附分子之輔助分子。例示性共刺激分子包括CD86、CD64 (FcγRI)、41BB配位體及IL-21。黏附分子可包括：碳水化合物結合糖蛋白，諸如選擇素；跨膜結合糖蛋白，諸如整合素；鈣依賴性蛋白，諸如鈣黏素；以及單程跨膜免疫球蛋白(Ig)超家族蛋白，諸如細胞間黏附分子(ICAM)；該等黏附分子促進例如細胞與細胞或細胞與基質之接觸。例示性黏附分子包括LFA-3及ICAM，諸如ICAM-1。適用於選擇、選殖、製備及表現包括共刺激分子及黏附分子之例示性輔助分子的技術、方法及試劑例示於例如美國專利第6,225,042號、第6,355,479號及第6,362,001號中。

C. 通用抗原呈現細胞

【0078】 本發明之一些實施例係關於通用抗原呈現細胞(UAPC)之生產及用途。UAPC可用於擴增諸如NK細胞及T細胞之免疫細胞。UAPC可工程改造成表現膜結合型IL-21 (mbIL-21)及41BBL (CD137配位體)。

【0079】 UAPC可工程改造成表現CD137配位體及/或膜結合型細胞

介素。膜結合型細胞介素可為mIL-21或mIL-15。在特定實施例中，UAPC工程改造成表現CD137配位體及mIL-21。APC可來源於諸如白血病細胞之癌細胞。APC可不表現內源性HLA I類、HLA II類或CD1d分子。APC可表現ICAM-1 (CD54)及LFA-3 (CD58)。特定言之，APC可為K562細胞，諸如工程改造成表現CD137配位體及mIL-21之K562細胞。APC可經輻照。工程化可藉由此項技術中已知之任何方法來進行，諸如反轉錄病毒轉導。

【0080】 細胞介素對整個種類之免疫細胞(包括NK細胞)施加極強力之控制，影響細胞命運、活性及細胞反應功效。用於活化NK細胞之細胞介素刺激力證實其「自然」效應功能高度易受環境干預影響，且預致敏可調節體內NK細胞行為。

【0081】 為解決獲取臨床上相關量之NK細胞之問題，本發明之方法使用介白素(IL-21)作為用於本發明之UAPC平台技術中之NK細胞擴增之驅動子。在人體內，利用IL-10及IL-21進行之NK細胞刺激以STAT3依賴性方式誘導NKG2D表現。雖然細胞介素受體共用多種免疫細胞中之類似細胞信號傳導組分，但NK細胞特異性信號傳導視用於增殖之IL-21受體-STAT3連接而定。

【0082】 細胞介素信號傳導對於維持淋巴細胞存活及增殖為關鍵的。在體內，IL-2投與為唯一經FDA批准之用於擴增NK細胞之方法。另一強力NK細胞活化因子IL-15作為IL-2之可能替代物進行I期臨床試驗，但預期在全身性投與之後具有相當大之毒性。除相當大之毒性之外，此等細胞介素亦誘導T細胞增殖，同時限制NK細胞存留。儘管共用用於信號轉導之同一受體，但IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15及IL-21受體對多種多

樣之細胞具有獨特且特殊之作用。

1. 膜結合型IL-21

【0083】 在某些實施例中，對於特異性地給NK細胞供應能量，IL-21可用於生產本發明之UAPC。IL-21受體(IL21R)在經活化人類NK細胞(準備觸發之細胞)中上調，此情形與能夠經由其與共同細胞介素受體 γ 鏈($\gamma(c)$)之二聚合反應轉導信號之IL-2受體 β 鏈緊密相關。雖然I型細胞介素IL-21可調節T細胞、B細胞及NK細胞功能，但吾人發現僅人類NK細胞經由活化IL21受體信號傳導路徑而經歷顯著擴增(在21天內擴增1000倍)。相對而言，IL21在CD8+ve T細胞收縮中起重要作用¹。

【0084】 IL21R信號傳導主要由作為高度強力之細胞增殖活化因子之STAT3供以動力。IL21R-STAT3連接由與GAS結合之IL-21誘導之STAT3 DNA及如藉由利用抗磷酸酪胺酸抗體進行之免疫沈澱法及西方墨點法驗證之順式可誘導元件(cis-inducible element)驅動²。IL21介導之增殖之分子基礎可特異性追溯至介導IL-21誘導之STAT1及STAT3磷酸化的IL21R上的酪胺酸510 (Y510) ³。此機制係由Stat1/Stat3雙基因剔除小鼠中之經抑制IL-21反應而得到強調。

【0085】 IL21R信號傳導對於NK細胞毒性為重要的。人類IL21R缺乏症係與⁵¹Cr標記之K562靶細胞之細胞溶解受損有關，同時抗體依賴性細胞毒性未受到影響⁴。單基因性非胚致死性缺陷(IL21R之功能損失型突變)呈現極佳之機會描繪，且因此適用於建模、增強及塑形先天性NK細胞溶解反應。

【0086】 即使CD56^暗細胞群體及CD56^亮細胞群體兩者均具有類似數目之表面IL21R，IL-21信號傳導亦選擇性地模製NK細胞子集。相對於

CD56暗NK細胞，在CD56亮NK細胞中STAT1及STAT3磷酸化之IL-21誘導更高。相比之下，IL-21對作為亦驅動T細胞擴增之IL-2活化路徑之STAT5活化無作用。除STAT3活化之外，IL-21信號傳導亦涉及MAPK及PI3K路徑，且誘導NK細胞中包括IFN- γ 、T-bet、IL-12R β 2及IL-18R之先天性免疫反應基因之表現，對其預致敏以殺滅腫瘤細胞。

【0087】對於IL-21之有效利用，mbIL-21表現可用於集中且定位與NK細胞上之IL21R之反式相互作用。mbIL21膜接近性確保需要其之情況下之易獲得性，因此，其可保持在無大量及大濃度之外源供應IL-21之情況下之理想細胞增殖。與經輻照K562-mb15-41BBL一起之共培養物誘導來自末梢血液之CD56+CD3- NK細胞之中值21.6倍擴增。此擴增與僅用來自包括單獨或組合之IL-2、IL-12、IL-15、IL-21之共用 γ c家族之可溶性細胞介素進行的刺激相比更高。藉由比較，本發明之UAPC可在14至21天內擴增NK細胞至少1000倍(3-log)。UAPC上之mbIL21表現亦可排除對外源性臨床級細胞介素之需求。

2. 4-1BBL (4-1BB配位體、CD137配位體、CD137L、TNFSF9)

【0088】除NK細胞功能之細胞介素預致敏之概念外，與NK細胞中之活化分子之直接物理相互作用引起增強之細胞增殖反應。CD137 (4-1BB)為介導細胞增殖、分化及計劃性細胞死亡(細胞凋亡)之腫瘤壞死受體(TNF-R)基因家族之成員。首先表徵鼠受體，隨後表徵人類同系物，該人類同系物在胺基酸量下共用60%一致性，且在細胞質/信號傳導域中相當保守。CD137主要表現於活化T細胞及NK細胞中，且在發炎部位處之胸腺細胞、骨髓細胞及內皮細胞中具有不同可偵測之量。經由以下介導生理學CD137信號傳導：1) NF- κ B，其經由Bcl-XL活化促進存活；及2)

PI3K/ERK1/2路徑，其特異性驅動細胞週期進程。

【0089】在活化NK細胞中，CD137為細胞介素可誘導之共刺激分子，其之後藉由增加細胞增殖及IFN- γ 分泌來驅動NK細胞中之抗腫瘤反應。使用CD137L-/-基因剔除小鼠進行之研究闡明CD137/CD137L信號傳導在發展抗腫瘤免疫細胞中之重要性。與對照小鼠相比，CD137-/-基因剔除小鼠之腫瘤癌轉移頻率高4倍。

【0090】作為TNF超家族之34 kDa糖蛋白成員之CD137配位體(CD137L，4-1BB配位體)主要在包括B細胞、巨噬細胞及樹突狀細胞之活化抗原呈現細胞(APC)上經受偵測，且在活化T細胞上以低量瞬時表現。與鼠對應物相比，人類CD137L僅具有36%同源性¹⁰。與促效性CD137抗體之抗腫瘤功效一致，已顯示CD137L結合引發CTL及抗腫瘤活性。

【0091】因此，本發明之UAPC可工程改造成表現4-1BB配位體，其為用於理想刺激之針對CD137之生理學反受體。

3. SLAM/CD48

【0092】除細胞介素調整及4-1BBL共刺激之外，NK細胞與靶細胞之間的直接物理相互作用亦影響細胞反應，亦即靶細胞殺滅。廣泛表現於免疫系統中且在其中起關鍵作用之信號傳導淋巴細胞性活化分子(SLAM，先前亦稱為CD2超家族)家族同源免疫球蛋白受體在細胞間相互作用方面尤其重要。

【0093】因此，本發明之UAPC可表現一或多種SLAM家族抗原。SLAM家族成員包括CD2、CD48、CD58 (LFA-3)、CD244 (2B4)、CD229 (Ly9)、CD319 (CS1 (CD2子集1)；CRACC (CD2樣受體活化細胞毒性細胞))及CD352 (NTB-A (NK-T-B抗原))。在特定態樣中，UAPC表

現CD48及/或CS1。NK細胞表現SLAM家族(SLAMF)之至少三個成員。該等成員為2B4；NK細胞、T細胞及B細胞抗原(NTB-A)；及CD2樣受體活化細胞毒性細胞(CRACC)，此等成員識別其在靶細胞上及可能地其他NK細胞上之各別配位體CD48、NTB-A及CRACC。SLAMF1、SLAMF3、SLAMF5、SLAMF6、SLAMF7、SLAMF8及SLAMF9均為嗜同性(自配位體)受體，而SLAMF2及SLAMF4為彼此之反受體(嗜異性)。已知嗜同性親和力(解離常數Kd為<1 μM至200 μM)中之寬範圍(三個數量級)指向用於針對SLAM糖蛋白之重疊但獨特之信號傳導機制的機理基礎。

【0094】 表1：SLAM家族成員結合親和力。

SLAMF	CD	名稱	別名	相互作用	反受體	親和力
1	150	SLAM	SLAMF1， CD150， CDw150	嗜同性		200
2	48	CD48	BCM1， BLAST， BLAST1， MEM-102	嗜異性	CD2（嚙齒動物）	>500
				嗜異性	2B4	8
3	229	LY9	hly9，m淋 巴細胞抗原 9	嗜同性		
4	244	2B4	NAIL， NKR2B4， Nmrk	嗜異性	CD48	8
5	84	CD84	LY9B	嗜同性		<1
6	352	NTB-A	KALI， KALib， Ly108， NTBA， SF2000	嗜同性		2
7	319	CRACC	CS1，19A	嗜同性		
8	353		BLAME， SBBI42	嗜同性		
9			CD2F10， CD84H1， SF2001， CD2F-10， CD84-H1	嗜同性		

【0095】在特定實施例中，本發明之UAPC工程改造成表現CD48以支持細胞與細胞相互作用，從而增強NK細胞反應。CD48為NK細胞、T細胞、單核細胞及嗜鹼性細胞之表面上所發現之糖磷脂醯肌醇錨定蛋白質(GPI-AP)，且參與此等細胞中之黏附及活化路徑。儘管其缺失細胞內域，但CD48刺激誘導脂筏(lipid raft)中之信號傳導因子重排、Lck激酶活性及酪胺酸磷酸化。作為黏附及共刺激分子，CD48誘導B淋巴細胞及T淋巴細胞、NK細胞、肥胖細胞及嗜酸性細胞中之諸多效應。在人類NK細胞中，CD48為用於作為NK細胞之重要活化因子之2B426之反受體。認為嗜異性相互作用競爭CD244與MHC-I之相互作用。因此，2B4/CD48相互作用誘導人類NK細胞中之活化信號，然而在鼠NK細胞中，其傳送抑制性信號。

【0096】當同一群體之細胞之間的2B4-CD48相互作用(亦即NK細胞-NK細胞相互作用或T細胞-T細胞相互作用)藉由在諸如通常不含CD48之K562骨髓細胞株之APC上表現CD48來引起經增強活化時，UAPC可在NK細胞上以反式形式開啟強力2B4信號傳導路徑。

4. SLAM/CS1

【0097】在一些實施例中，本發明之UAPC工程改造成表現CS1(SLAM家族之另一成員)作為用以開啟NK細胞殺滅能力之共刺激分子。與反結合至2B4之CD48不同，CS1相互作用為嗜同性的，且可在順式對反式相互作用之情形下進行表徵。通常不含CS1之K562細胞可工程改造成表現CS1。

III.經基因工程改造之抗原受體

【0098】可基因工程改造本發明之NK細胞以表現諸如經工程改造

之TCR及/或CAR之抗原受體。舉例而言，NK細胞經修飾以表現具有針對癌症抗原之抗原特異性的TCR。諸如對於不同抗原的多種CAR及/或TCR可添加至NK細胞。

【0099】修飾之適合方法在此項技術中已知。參見例如見上文Sambrook及Ausubel。舉例而言，細胞可使用Heemskerk等人，2008及Johnson等人，2009中所描述之轉導技術轉導以表現具有針對癌症抗原之抗原特異性的TCR。

【0100】編碼全長TCR α 及 β (或 γ 及 δ)鏈之RNA之電穿孔可用作替代方案，以克服關於反轉錄病毒轉導及內源性TCR鏈之配對所引起的自體反應性的長期問題。即使此替代配對在瞬時轉染策略中出現，可能產生的自體反應性T細胞亦將在一定時間之後失去此自體反應性，此係由於所引入的TCR α 及 β 鏈僅暫時表現。當引入的TCR α 及 β 鏈表現減弱時，僅正常的自體T細胞留下。當藉由穩定反轉錄病毒轉導來引入全長TCR鏈時情況並非如此，穩定反轉錄病毒轉導永遠不會失去所引入的TCR鏈，從而在患者中引起始終存在的自體反應性。

【0101】在一些實施例中，細胞包含編碼一或多種抗原受體之一或多種經由基因工程改造引入之核酸，及此類核酸之經基因工程改造之產物。在一些實施例中，核酸為異源核酸，亦即通常不存在於細胞或自該細胞獲得之樣品中的核酸，諸如自另一生物體或細胞獲得之核酸，此類核酸例如在經工程改造之細胞及/或此類細胞所來源之生物體中通常未發現。在一些實施例中，核酸並非天然產生，諸如未在自然界中發現之核酸(例如嵌合核酸)。

【0102】在一些實施例中，CAR含有特異性結合於抗原之細胞外抗

原識別域。在一些實施例中，抗原係表現於細胞之表面上之蛋白質。在一些實施例中，CAR係TCR樣CAR且抗原係經處理之肽抗原，諸如細胞內蛋白質之肽抗原，其類似TCR，在主要組織相容複合體(MHC)分子之情形下在細胞表面上識別。

【0103】 包括CAR及重組TCR之例示性抗原受體以及用於工程改造且將受體引入細胞內之方法包括描述於例如以下中之彼等者：國際專利申請公開案第WO200014257號、第WO2013126726號、第WO2012/129514號、第WO2014031687號、第WO2013/166321號、第WO2013/071154號、第WO2013/123061號、美國專利申請公開案第US2002131960號、第US2013287748號、第US20130149337號、美國專利第6,451,995號、第7,446,190號、第8,252,592號、第8,339,645號、第8,398,282號、第7,446,179號、第6,410,319號、第7,070,995號、第7,265,209號、第7,354,762號、第7,446,191號、第8,324,353號及第8,479,118號以及歐洲專利申請案第EP2537416號，及/或Sadelain等人，2013；Davila等人，2013；Turtle等人，2012；Wu等人，2012所描述之彼等者。在一些態樣中，經基因工程改造之抗原受體包括如美國專利第7,446,190號中所描述之CAR，及國際專利申請公開案第WO/2014055668 A1號中所描述之彼等者。

A. 嵌合抗原受體

【0104】 在一些實施例中，CAR包含：a)細胞內信號傳導域、b)跨膜域及c)包含抗原結合區之細胞外域。

【0105】 在一些實施例中，經工程改造之抗原受體包括CAR，該等CAR包括活化或刺激CAR、共刺激CAR (參見WO2014/055668)及/或抑制

性CAR (iCAR，參見Fedorov等人, 2013)。CAR通常包括在一些態樣中經由連接子及/或跨膜域連接至一或多種細胞內信號傳導組分之細胞外抗原(或配位體)結合域。此類分子通常模仿或近似穿過天然抗原受體之信號、穿過此類受體與共刺激受體之組合之信號及/或單獨穿過共刺激受體之信號。

【0106】 本發明之某些實施例係關於核酸之用途，包括編碼抗原特異性CAR多肽之核酸，包括已經人類化以降低免疫原性之CAR (hCAR)，包含細胞內信號傳導域、跨膜域及包含一或多種信號傳導基元之細胞外域。在某些實施例中，CAR可識別包含一或多種抗原之間的共用空間之抗原決定基。在某些實施例中，結合區可包含單株抗體之互補決定區、單株抗體之可變區及/或其抗原結合片段。在另一實施例中，該特異性來源於結合至受體之肽(例如細胞介素)。

【0107】 預期人類CAR核酸可為用於增強用於人類患者之細胞免疫療法之人類基因。在一特定實施例中，本發明包括全長CAR cDNA或編碼區。抗原結合區或抗原結合域可包含源於特定人類單株抗體之單鏈可變片段(scFv)之V_H及V_L鏈之片段，諸如美國專利7,109,304中所描述之彼等者，該專利以引用之方式併入本文中。該片段亦可為人類抗原特異性抗體之任何數目的不同抗原結合域。在更特定實施例中，該片段係抗原特異性scFv，該抗原特異性scFv係由針對用於在人類細胞中表現之人類密碼子使用最佳化的序列所編碼。

【0108】 配置可為多聚的，諸如雙功能抗體或多聚體。多聚體最可能由輕鏈及重鏈之可變部分交叉配對為雙功能抗體形成。構築體之鉸鏈部分可具有多種選擇，從完全缺失至維持第一半胱胺酸、至脯胺酸取代而非

絲胺酸取代、至截斷至第一半胱胺酸。Fc部分可缺失。穩定及/或二聚化之任何蛋白質均可供用於此目的。可僅使用Fc域中之一者，例如來自人類免疫球蛋白之CH2域或CH3域。亦可使用已經修飾以改良二聚化之人類免疫球蛋白之鉸鏈區、CH2區及CH3區。亦可僅使用免疫球蛋白之鉸鏈部分。亦可使用CD8 α 之部分。

【0109】 在一些實施例中，CAR核酸包含編碼其他共刺激受體之序列，該等共刺激受體諸如跨膜域及經修飾之CD28細胞內信號傳導域。其他共刺激受體包括(但不限於) CD28、CD27、OX-40 (CD134)、DAP10、DAP12及4-1BB (CD137)中之一或多者。除藉由CD3 ζ 引發之初級信號以外，藉由插入於人類CAR中之人類共刺激受體提供之額外信號對於NK細胞之完全活化具有重要性且可幫助改良授受免疫療法之體內持久性及治療成效。

【0110】 在一些實施例中，CAR經構築具有針對特定抗原(或標記物或配位體)之特異性，諸如在待由授受療法靶向之特定細胞類型中表現之抗原，例如癌症標記物；及/或意欲誘導抑制反應之抗原，諸如在正常或非病變細胞類型上表現之抗原。因此，CAR在其細胞外部分中通常包括一或多種抗原結合分子，諸如一或多種抗原結合片段、域或部分，或一或多種抗體可變域及/或抗體分子。在一些實施例中，CAR包括抗體分子之一或多個抗原結合部分，諸如來源於單株抗體(mAb)之可變重鏈(VH)及可變輕鏈(VL)的單鏈抗體片段(scFv)。

【0111】 在嵌合抗原受體之某些實施例中，受體之抗原特異性部分(其可稱為包含抗原結合區之細胞外域)包含腫瘤相關抗原或病原體特異性抗原結合域。抗原包括藉由模式識別受體，諸如凝集素-1識別之碳水化合物

物抗原。腫瘤相關抗原可為任何種類，只要其表現於腫瘤細胞之細胞表面上。腫瘤相關抗原之例示性實施例包括CD19、CD20、癌胚抗原、 α 胎蛋白、CA-125、MUC-1、CD56、EGFR、c-Met、AKT、Her2、Her3、上皮腫瘤抗原、黑素瘤相關抗原、突變p53、突變ras，諸如此類。在某些實施例中，當存在低量之腫瘤相關抗原時，CAR可與細胞介素共表現以改良持久性。舉例而言，CAR可與IL-15共表現。

【0112】 編碼嵌合受體之開放閱讀框架之序列可獲自基因組DNA源、cDNA源，或可經合成(例如經由PCR合成)，或其組合。視基因組DNA之尺寸及內含子之數目而定，可能需要使用cDNA或其組合，此係因為發現內含子使mRNA穩定。此外，可進一步有利地使用內源性或外源性非編碼區來使mRNA穩定。

【0113】 預期嵌合構築體可以裸DNA形式或在適合之載體中引入至免疫細胞中。藉由電穿孔使用裸DNA穩定轉染細胞之方法為此項技術中已知的。參見例如美國專利第6,410,319號。裸DNA一般係指編碼嵌合受體之DNA，該嵌合受體以對於表現適當之定向包含於質體表現載體中。

【0114】 或者，病毒載體(例如反轉錄病毒載體、腺病毒載體、腺相關病毒載體或慢病毒載體)可用於將嵌合構築體引入至免疫細胞中。根據本發明方法使用之適合之載體在免疫細胞中為非複製的。已知大量載體係基於病毒，其中維持於細胞中之病毒的複本數足夠低以維持細胞活力，諸如基於HIV、SV40、EBV、HSV或BPV之載體。

【0115】 在一些態樣中，抗原特異性結合或識別組分連接至一或多個跨膜及細胞內信號傳導域。在一些實施例中，CAR包括融合至CAR之細胞外域之跨膜域。在一個實施例中，使用與CAR中之一個域天然相關之

跨膜域。在一些情況下，跨膜域經選擇或由胺基酸取代修飾以避免此類域結合至相同或不同表面膜蛋白質之跨膜域，以使與受體複合物之其他成員的相互作用降至最低。

【0116】 在一些實施例中，跨膜域來源於天然或合成來源。在天然來源的情況下，在一些態樣中，域來源於任何膜結合型蛋白或跨膜蛋白。跨膜區包括來源於以下(亦即至少包含以下之一或多個跨膜區)之彼等：T細胞受體之 α 、 β 或 ζ 鏈、CD28、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD 16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD 134、CD137、CD154、ICOS/CD278、GITR/CD357、NKG2D及DAP分子。或者，在一些實施例中，跨膜域為合成的。在一些態樣中，合成性跨膜域主要包含疏水性殘基，諸如白胺酸及纈胺酸。在一些態樣中，將在合成性跨膜域之各端處發現苯丙胺酸、色胺酸及纈胺酸之三聯體。

【0117】 在某些實施例中，本文所揭示的用於遺傳修飾免疫細胞，諸如NK細胞之平台技術包含(i)使用電穿孔裝置(例如核轉染儀)之非病毒基因轉移，(ii)經由胞內域(例如CD28/CD3- ζ 、CD137/CD3- ζ 或其他組合)傳導信號之CAR，(iii)將抗原識別域連接至細胞表面之細胞外域的具有可變長度的CAR，及在一些情況下，(iv)能夠穩健地且在數值上擴增CAR⁺免疫細胞之衍生自K562之人工抗原呈現細胞(aAPC) (Singh等人, 2008；Singh等人, 2011)。

B. T細胞受體(TCR)

【0118】 在一些實施例中，經基因工程改造之抗原受體包括重組TCR及/或自天然產生之T細胞選殖之TCR。「T細胞受體」或「TCR」係

指含有可變 α 及 β 鏈(亦分別稱為TCR α 及TCR β)或可變 γ 及 δ 鏈(亦分別稱為TCR γ 及TCR δ)且能夠特異性結合於與MHC受體結合之抗原肽的分子。在一些實施例中，TCR呈 $\alpha\beta$ 形式。

【0119】 通常，呈 $\alpha\beta$ 及 $\gamma\delta$ 形式存在之TCR一般結構上類似，但表現該等TCR之T細胞可具有不同結構位置或功能。TCR可發現於細胞表面上或呈可溶性形式。一般而言，TCR發現於一般負責識別與主要組織相容複合體(MHC)分子結合之抗原之T細胞(或T淋巴細胞)的表面上。在一些實施例中，TCR亦可含有恆定域、跨膜域及/或短胞質尾區(參見例如Janeway等人，1997)。舉例而言，在一些態樣中，TCR之各鏈可具有一個N端免疫球蛋白可變域、一個免疫球蛋白恆定域、跨膜區及C端末端處之短胞質尾區。在一些實施例中，TCR與涉及介導信號轉導之CD3複合物之恆定蛋白相關。除非另外說明，否則術語「TCR」應理解為涵蓋其功能TCR片段。術語亦涵蓋完整或全長TCR，包括呈 $\alpha\beta$ 形式或 $\gamma\delta$ 形式之TCR。

【0120】 因此，出於本文之目的，TCR之提及包括任何TCR或功能片段，諸如結合於在MHC分子中結合之特定抗原肽，亦即結合於MHC-肽複合物之TCR的抗原結合部分。可互換使用之TCR之「抗原結合部分」或「抗原結合片段」係指含有TCR之結構域之部分但結合完全TCR所結合之抗原(例如MHC-肽複合物)的分子。在一些情況下，抗原結合部分含有足以形成用於結合至特異性MHC-肽複合物之結合位點(諸如一般各鏈含有三個互補決定區之位置)之TCR的可變域，諸如TCR之可變 α 鏈及可變 β 鏈。

【0121】 在一些實施例中，TCR鏈之可變域締合以形成環或類似於免疫球蛋白之互補決定區(CDR)，其藉由形成TCR分子之結合位點賦予抗原識別且測定肽特異性且測定肽特異性。通常，如免疫球蛋白，CDR由框

架區(FR)分離(參見例如Jores等人, 1990 ; Chothia等人, 1988 ; Lefranc等人, 2003)。在一些實施例中, CDR3係負責識別經處理抗原之主要CDR, 儘管 α 鏈之CDR1亦已展示與抗原肽之N端部分相互作用, 而 β 鏈之CDR1與肽之C端部分相互作用。認為CDR2識別MHC分子。在一些實施例中, β 鏈之可變區可含有另一高變(HV4)區。

【0122】 在一些實施例中, TCR鏈含有恆定域。舉例而言, 如免疫球蛋白, TCR鏈(例如 α 鏈、 β 鏈)之細胞外部分可含有兩個免疫球蛋白域, 亦即N端處之可變域(例如, V_a 或 V_p ; 通常為基於Kabat編號之胺基酸1至116; Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 第5版)及靠近細胞膜之一個恆定域(例如, α 鏈恆定域或 C_a , 通常為基於Kabat之胺基酸117至259; β 鏈恆定域或 C_p , 通常為基於Kabat之胺基酸117至295)。舉例而言, 在一些情況下, 藉由兩個鏈形成之TCR之細胞外部分含有兩個近膜恆定域及兩個含有CDR之遠膜可變域。TCR域之恆定域含有短連接序列, 其中半胱胺酸殘基形成二硫鍵, 在兩個鏈之間產生連接。在一些實施例中, TCR在 α 及 β 鏈中之每一者可具有另一半胱胺酸殘基, 使得TCR在恆定域中含有兩個二硫鍵。

【0123】 在一些實施例中, TCR鏈可含有跨膜域。在一些實施例中, 跨膜域帶正電。在一些情況下, TCR鏈含有胞質尾區。在一些情況下, 結構允許TCR與如同CD3之其他分子締合。舉例而言, 含有具有跨膜區之恆定域的TCR可將蛋白質錨定在細胞膜中且與CD3信號傳導設備或複合物之恆定亞基締合。

【0124】 一般而言, CD3係可具有哺乳動物中之三個不同鏈(γ 、 δ 及

ϵ)及 ζ 鏈之多蛋白質複合物。舉例而言，在哺乳動物中，複合物可含有CD3 γ 鏈、CD3 δ 鏈、兩個CD3 ϵ 鏈及CD3 ζ 鏈之均二聚體。CD3 γ 、CD3 δ 及CD3 ϵ 鏈係含有單一免疫球蛋白域之免疫球蛋白超家族之高度相關細胞表面蛋白質。CD3 γ 、CD3 δ 及CD3 ϵ 鏈之跨膜區帶負電，其特徵在於使此等鏈與帶正電之T細胞受體鏈締合。CD3 γ 、CD3 δ 及CD3 ϵ 鏈之細胞內尾區各含有稱為基於免疫受體酪胺酸之活化基元或ITAM之單一保守基元，而各CD3 ζ 鏈具有三個保守基元。一般而言，ITAM涉及TCR複合物之信號傳導能力。此等輔助分子具有帶負電跨膜區且在將信號自TCR傳播至細胞中起作用。CD3鏈及 ζ 鏈與TCR一起形成為T細胞受體複合物。

【0125】 在一些實施例中，TCR可為兩個鏈 α 及 β (或視情況 γ 及 δ)之雜二聚體或其可為單鏈TCR構築體。在一些實施例中，TCR係含有諸如藉由一或多個二硫鍵連接之兩個獨立鏈(α 及 β 鏈或 γ 及 δ 鏈)之雜二聚體。在一些實施例中，鑑別靶抗原(例如癌症抗原)之TCR且將其引入細胞中。在一些實施例中，編碼TCR之核酸可諸如藉由公開可用之TCR DNA序列之聚合酶鏈反應(PCR)擴增而獲自各種來源。在一些實施例中，TCR係獲自生物來源，諸如獲自細胞，諸如獲自T細胞(例如，細胞毒性T細胞)、T細胞融合瘤或其他公開可用的來源。在一些實施例中，T細胞可獲自體內分離之細胞。在一些實施例中，可自患者分離高親和力T細胞純系，且分離TCR。在一些實施例中，T細胞可為經培養T細胞融合瘤或純系。在一些實施例中，靶抗原之TCR純系已在用人類免疫系統基因(例如人白血球抗原系統或HLA)工程改造之轉殖基因小鼠中產生。參見例如腫瘤抗原(參見例如Parkhurst等人，2009及Cohen等人，2005)。在一些實施例中，噬菌體呈現用於分離TCR與靶抗原(參見例如Varela-Rohena等人，2008及Li，

2005)。在一些實施例中，TCR或其抗原結合部分可由TCR序列之瞭解合成產生。

C. 抗原

【0126】 在藉由基因工程改造抗原受體靶向之抗原中包括在經由授受細胞療法靶向之疾病、病況或細胞類型之情況下表現之彼等。在疾病及病況中包括增生性、贅生性及惡性疾病及病症，包括癌症及腫瘤，包括血液癌、免疫系統癌症，諸如淋巴瘤、白血病及/或骨髓瘤，諸如B、T及骨髓白血病、淋巴瘤及多發性骨髓瘤。在一些實施例中，相比於正常或非靶向細胞或組織，抗原選擇性地表現或過度表現於疾病或病況細胞，例如腫瘤或病原細胞上。在其他實施例中，抗原表現於正常細胞上及/或表現於工程改造細胞上。

【0127】 任何適合之抗原可用於本發明方法中。例示性抗原包括但不限於來自感染物之抗原分子、自體/自身抗原、腫瘤/癌症相關抗原及腫瘤新抗原(Linnemann等人, 2015)。在特定態樣中，抗原包括NY-ESO、EGFRvIII、Muc-1、Her2、CA-125、WT-1、Mage-A3、Mage-A4、Mage-A10、TRAIL/DR4及CEA。在特定態樣中，針對兩種或更多種抗原受體之抗原包括(但不限於) CD19、EBNA、WT1、CD123、NY-ESO、EGFRvIII、MUC1、HER2、CA-125、WT1、Mage-A3、Mage-A4、Mage-A10、TRAIL/DR4及/或CEA。此等抗原之序列係此項技術中已知的，例如(所有均為 GenBank® 之寄存編號) CD19 (寄存編號 NG_007275.1)、EBNA (寄存編號 NG_002392.2)、WT1 (寄存編號 NG_009272.1)、CD123 (寄存編號 NC_000023.11)、NY-ESO (寄存編號 NC_000023.11)、EGFRvIII (寄存編號 NG_007726.3)、MUC1 (寄存編號

NG_029383.1)、HER2 (寄存編號NG_007503.1)、CA-125 (寄存編號NG_055257.1)、WT1 (寄存編號NG_009272.1)、Mage-A3 (寄存編號NG_013244.1)、Mage-A4 (寄存編號NG_013245.1)、Mage-A10 (寄存編號NC_000023.11)、TRAIL/DR4 (寄存編號NC_000003.12)及/或CEA (寄存編號NC_000019.10)。

【0128】 腫瘤相關抗原可衍生自前列腺癌、乳癌、結腸直腸癌、肺癌、胰臟癌、腎癌、間皮瘤、卵巢癌或黑素瘤。例示性腫瘤相關抗原或腫瘤細胞衍生抗原包括MAGE 1、MAGE 3及MAGE 4 (或其他MAGE抗原，諸如國際專利公開案第WO99/40188號中所揭示之彼等MAGE抗原)；PRAME；BAGE；RAGE，Lage (亦稱為NY ESO 1)；SAGE；及HAGE或GAGE。腫瘤抗原之此等非限制性實例表現於大範圍之腫瘤類型，諸如黑素瘤、肺癌、肉瘤及膀胱癌中。參見例如美國專利第6,544,518號。前列腺癌腫瘤相關抗原包括例如前列腺特異性膜抗原(PSMA)、前列腺特異性抗原(PSA)、前列腺酸磷酸鹽、NKX3.1及前列腺六次跨膜上皮抗原(STEAP)。

【0129】 其他腫瘤相關抗原包括Plu-1、HASH-1、HasH-2、Cripto及Criptin。另外，腫瘤抗原可為自身肽激素，諸如全長促性腺激素釋放激素(GnRH)，一種適用於治療許多癌症之長度為10個胺基酸的短肽。

【0130】 腫瘤抗原包括衍生自藉由腫瘤相關抗原表現，諸如HER-2/neu表現表徵之癌症的腫瘤抗原。所關注之腫瘤相關抗原包括譜系特異性腫瘤抗原，諸如黑色素細胞-黑素瘤譜系抗原MART-1/Melan-A、gp100、gp75、mda-7、酪胺酸酶及酪胺酸酶相關蛋白。說明性腫瘤相關抗原包括(但不限於)衍生自或包含以下中之任何一或多者之腫瘤抗原：

p53、Ras、c-Myc、細胞質絲胺酸/蘇胺酸激酶(例如A-Raf、B-Raf及C-Raf、細胞週期蛋白依賴性激酶)、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A10、MAGE-A12、MART-1、BAGE、DAM-6、DAM-10、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-8、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7B、NA88-A、MART-1、MC1R、Gp100、PSA、PSM、酪胺酸酶、TRP-1、TRP-2、ART-4、CAMEL、CEA、Cyp-B、hTERT、hTRT、iCE、MUC1、MUC2、磷酸肌醇3-激酶(PI3K)、TRK受體、PRAME、P15、RU1、RU2、SART-1、SART-3、威耳姆士腫瘤抗原(Wilms' tumor antigen；WT1)、AFP、-連環蛋白/m、凋亡蛋白酶-8/m、CEA、CDK-4/m、ELF2M、GnT-V、G250、HSP70-2M、HST-2、KIAA0205、MUM-1、MUM-2、MUM-3、肌球蛋白/m、RAGE、SART-2、TRP-2/INT2、707-AP、磷脂結合蛋白II、CDC27/m、TPI/mbcr-abl、BCR-ABL、干擾素調節因子4 (IRF4)、ETV6/AML、LDLR/FUT、Pml/RAR、腫瘤相關鈣信號轉導蛋白1 (TACSTD1) TACSTD2、受體酪胺酸激酶(例如表皮生長因子受體(EGFR)(特定言之EGFRvIII)、血小板衍生生長因子受體(PDGFR)、血管內皮生長因子受體(VEGFR))、細胞質酪胺酸激酶(例如src-家族、syk-ZAP70家族)、整合素連接激酶(ILK)、轉錄之信號轉導蛋白及活化因子STAT3、STATS及STATE、低氧誘導因子(例如HIF-1及HIF-2)、核因子- κ B(NF-B)、Notch受體(例如Notch1-4)、c-Met、雷帕黴素(rapamycin)之哺乳動物標靶(mTOR)、WNT、細胞外信號調節激酶(ERK)及其調節亞基、PMSA、PR-3、MDM2、間皮素、腎細胞癌-5T4、SM22- α 、碳酸酐酶I(CAI)及IX (CAIX) (亦稱為G250)、STEAD、TEL/AML1、GD2、蛋白酶

3、hTERT、肉瘤易位斷點、EphA2、ML-IAP、EpCAM、ERG (TMPRSS2 ETS融合基因)、NA17、PAX3、ALK、雄激素受體、細胞週期蛋白B1、聚唾液酸、MYCN、RhoC、GD3、岩藻糖基GM1、間皮素、PSCA、sLe、PLAC1、GM3、BORIS、Tn、GLoboH、NY-BR-1、RGsS、SART3、STn、PAX5、OY-TES1、精子蛋白17、LCK、HMWMAA、AKAP-4、SSX2、XAGE 1、B7H3、豆莢蛋白、TIE2、Page4、MAD-CT-1、FAP、MAD-CT-2、fos相關抗原1、CBX2、CLDN6、SPANX、TPTE、ACTL8、ANKRD30A、CDKN2A、MAD2L1、CTAG1B、SUNC1、LRRN1及個體基因型。

【0131】 抗原可包括抗原決定基區或抗原決定基肽，其衍生自腫瘤細胞中突變之基因或相比於正常細胞在腫瘤細胞中以不同位準經轉錄之基因，諸如端粒酶、存活素、間皮素、突變ras、bcr/abl重排、Her2/neu、突變或野生型p53、細胞色素P450 1B1，及異常表現之內含子序列，諸如N-乙醯胺基葡萄糖轉移酶-V；在骨髓瘤及B細胞淋巴瘤中產生獨特個體基因型之免疫球蛋白基因之純系重排；包括衍生自癌病毒過程之抗原決定基區或抗原決定基肽之腫瘤抗原，諸如人類乳頭狀瘤病毒蛋白E6及E7；艾巴二氏病毒蛋白(Epstein bar virus protein) LMP2；具有腫瘤選擇性表現之非變異癌胚蛋白，諸如癌胚抗原及 α -胎蛋白。

【0132】 在其他實施例中，抗原獲自或衍生自病原微生物或條件性病原微生物(在本文中亦稱作感染性疾病微生物)，諸如病毒、真菌、寄生蟲及細菌。在某些實施例中，衍生自此類微生物之抗原包括全長蛋白。

【0133】 其抗原預期用於本文所述之方法的說明性病原性生物體包括人類免疫缺乏病毒(HIV)、單純疱疹病毒(HSV)、呼吸道融合病毒

(RSV)、細胞巨大病毒(CMV)、艾-巴二氏病毒(EBV)、A型、B型及C型流感、水泡性口炎病毒(VSV)、水泡性口炎病毒(VSV)、多瘤病毒(例如BK病毒及JC病毒)、腺病毒、包括抗甲氧西林金黃色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ; MRSA)之葡萄球菌屬(*Staphylococcus*)物種及包括肺炎鏈球菌(*Streptococcus pneumoniae*)之鏈球菌屬(*Streptococcus*)物種。如熟習此項技術者將理解，衍生自此等及其他病原性微生物的適用作如本文所描述之抗原的蛋白質及編碼該等蛋白質之核苷酸序列可在公開案及公開資料庫，諸如GENBANK®、SWISS-PROT®及TREMBL®中鑑別。

【0134】 衍生自人類免疫缺乏病毒(HIV)之抗原包括以下中之任一者：HIV病毒粒子結構蛋白(例如gp120、gp41、p17、p24)、蛋白酶、反轉錄酶或由tat、rev、nef、vif、vpr及vpu編碼之HIV蛋白。

【0135】 衍生自單純疱疹病毒(例如HSV 1及HSV2)之抗原包括(但不限於)表現自HSV晚期基因之蛋白質。晚期基因組主要編碼形成病毒粒子之蛋白質。此類蛋白質包括形成病毒衣殼之來自(UL)之五種蛋白質：UL6、UL18、UL35、UL38及主要衣殼蛋白UL19、UL45及UL27，其各自可用作如本文所述之抗原。預期用作本文中之抗原的其他說明性HSV蛋白包括ICP27 (H1、H2)、醣蛋白B (gB)及醣蛋白D (gD)蛋白。HSV基因組包含至少74個基因，各自編碼可潛在地用作抗原之蛋白質。

【0136】 衍生自細胞巨大病毒(CMV)之抗原包括CMV結構蛋白、在病毒複製之即刻早期及早期期間表現之病毒抗原、醣蛋白I及III、衣殼蛋白、鞘蛋白、低基質蛋白pp65 (ppUL83)、p52 (ppUL44)、IE1及IE2 (UL123及UL122)、來自UL128-UL150基因集群之蛋白質產物(Rykman等

人, 2006)、包膜醣蛋白B (gB)、gH、gN及pp150。如熟習此項技術者將理解, 適用作本文所述之抗原的CMV蛋白可在公開資料庫, 諸如GENBANK®、SWISS-PROT®及TREMBL®中鑑別(參見例如Bennekov等人, 2004; Loewendorf等人, 2010; Marschall等人, 2009)。

【0137】 預期用於某些實施例之衍生自艾-巴二氏病毒(EBV)之抗原包括EBV溶解蛋白gp350及gp110、在潛伏週期感染期間產生之EBV蛋白, 包括艾-巴二氏核抗原(EBNA)-1、EBNA-2、EBNA-3A、EBNA-3B、EBNA-3C、EBNA-前導蛋白(EBNA-LP)及潛伏膜蛋白(LMP)-1、LMP-2A及LMP-2B (參見例如Lockey等人, 2008)。

【0138】 預期用於本文中之衍生自呼吸道融合病毒(RSV)之抗原包括由RSV基因組編碼之十一種蛋白質中之任一者, 或其抗原片段: NS1、NS2、N (核衣殼蛋白)、M (基質蛋白) SH、G及F (病毒外殼蛋白)、M2 (第二基質蛋白)、M2-1 (延長因子)、M2-2 (轉錄調節)、RNA聚合酶及磷蛋白P。

【0139】 預期使用之衍生自水泡性口炎病毒(VSV)之抗原包括由VSV基因組編碼之五種主要蛋白中之任一者, 及其抗原片段: 大蛋白(L)、醣蛋白(G)、核蛋白(N)、磷蛋白(P)及基質蛋白(M) (參見例如Rieder等人, 1999)。

【0140】 預期用於某些實施例之衍生自流感病毒之抗原包括血球凝集素(HA)、神經胺糖酸苷酶(NA)、核蛋白(NP)、基質蛋白M1及M2、NS1、NS2 (NEP)、PA、PB1、PB1-F2及PB2。

【0141】 例示性病毒抗原亦包括(但不限於)腺病毒多肽、 α 病毒多肽、杯狀病毒多肽(例如杯狀病毒衣殼抗原)、冠狀病毒多肽、犬瘟熱病毒

多肽、伊波拉(Ebola)病毒多肽、腸病毒多肽、黃病毒多肽、肝炎病毒(AE)多肽(B型肝炎核心或表面抗原、C型肝炎病毒E1或E2醣蛋白、核心或非結構蛋白)、疱疹病毒多肽(包括單純疱疹病毒或水痘帶狀疱疹病毒醣蛋白)、感染性腹膜炎病毒多肽、白血病毒多肽、馬堡(Marburg)病毒多肽、正黏液病毒多肽、乳頭瘤病毒多肽、副流感病毒多肽(例如血球凝集素及神經胺糖酸苷酶多肽)、副黏液病毒多肽、小病毒多肽、瘟病毒多肽、病毒科病毒多肽(例如脊髓灰白質炎病毒衣殼多肽)、痘病毒多肽(例如痘瘡病毒多肽)、狂犬病病毒多肽(例如狂犬病病毒醣蛋白G)、里奧病毒(reovirus)多肽、反轉錄病毒多肽及輪狀病毒多肽。

【0142】 在某些實施例中，抗原可為細菌抗原。在某些實施例中，所關注之細菌抗原可為分泌多肽。在其他某些實施例中，細菌抗原包括具有暴露於細菌之外細胞表面上之多肽之一或多個部分的抗原。

【0143】 預期使用之衍生自包括抗甲氧西林金黃色葡萄球菌(MRSA)之葡萄球菌屬物種之抗原包括毒性調節劑，諸如Agr系統、Sar及Sae、Arl系統、Sar同系物(Rot、MgrA、SarS、SarR、SarT、SarU、SarV、SarX、SarZ及TcaR)、Srr系統及TRAP。可充當抗原之其他葡萄球菌屬蛋白質包括Clp蛋白質、HtrA、MsrR、烏頭酸酶、CcpA、SvrA、Msa、CfvA及CfvB (參見例如*Staphylococcus: Molecular Genetics*, 2008 Caister Academic Press, Jodi Lindsay編)。金黃色葡萄球菌之兩個物種(N315及Mu50)之基因組已定序且公開可用，例如在PATRIC (PATRIC: The VBI PathoSystems Resource Integration Center, Snyder 等人, 2007)。如熟習此項技術者將理解，用作抗原之葡萄球菌蛋白質亦可在其他公開資料庫，諸如GenBank®、Swiss-Prot®及TrEMBL®中鑑別。

【0144】 預期用於本文所述之某些實施例的衍生自肺炎鏈球菌之抗原包括肺炎鏈球菌溶血素、PspA、膽鹼-結合蛋白A (CbpA)、NanA、NanB、SpnHL、PavA、LytA、Pht及菌毛蛋白(RrgA；RrgB；RrgC)。肺炎鏈球菌之抗原性蛋白質亦為此項技術中已知的且可在一些實施例中用作抗原(參見例如Zysk等人, 2000)。肺炎鏈球菌之毒性病毒株之完整基因組序列已定序且如熟習此項技術者應理解, 本文中所用之肺炎鏈球菌蛋白質亦可在其他公開資料庫, 諸如 GENBANK®、SWISS-PROT® 及 TREMBL®中鑑別。用於根據本發明之抗原的尤其相關之蛋白質包括預測暴露於肺炎球菌(*pneumococci*)表面之毒性因子及蛋白質(參見例如Frolet等人, 2010)。

【0145】 可用作抗原之細菌抗原之實例包括但不限於放線菌屬(*Actinomyces*)多肽、芽孢桿菌屬(*Bacillus*)多肽、擬桿菌屬(*Bacteroides*)多肽、鮑特氏菌屬(*Bordetella*)多肽、巴爾通體屬(*Bartonella*)多肽、疏螺旋體屬(*Borrelia*)多肽(例如伯氏疏螺旋體(*B. burgdorferi*) OspA)、布氏桿菌屬(*Brucella*)多肽、曲狀桿菌屬(*Campylobacter*)多肽、二氧化碳嗜纖維菌屬(*Capnocytophaga*)多肽、披衣菌屬(*Chlamydia*)多肽、棒狀桿菌屬(*Corynebacterium*)多肽、考克斯氏體屬(*Coxiella*)多肽、潛蚤屬(*Dermatophilus*)多肽、腸球菌屬(*Enterococcus*)多肽、艾利希體屬(*Ehrlichia*)多肽、艾氏菌屬(*Escherichia*)多肽、弗朗西斯氏菌屬(*Francisella*)多肽、梭桿菌屬(*Fusobacterium*)多肽、血巴爾通氏體屬(*Haemobartonella*)多肽、嗜血桿菌屬(*Haemophilus*)多肽(例如流感嗜血桿菌(*H. influenzae*) b型外膜蛋白質)、螺旋桿菌屬(*Helicobacter*)多肽、克雷伯氏菌屬(*Klebsiella*)多肽、L-形式細菌多肽、鉤端螺旋體屬

(*Leptospira*) 多肽、李斯特菌屬 (*Listeria*) 多肽、分枝桿菌屬 (*Mycobacteria*) 多肽、黴漿菌屬 (*Mycoplasma*) 多肽、奈瑟氏菌屬 (*Neisseria*) 多肽、新立克次體屬 (*Neorickettsia*) 多肽、諾卡菌屬 (*Nocardia*) 多肽、巴氏桿菌屬 (*Pasteurella*) 多肽、消化球菌屬 (*Peptococcus*) 多肽、消化鏈球菌屬 (*Peptostreptococcus*) 多肽、肺炎球菌屬 (*Pneumococcus*) 多肽(亦即肺炎鏈球菌(*S. pneumoniae*)多肽)(參見本文描述)、變形桿菌屬 (*Proteus*) 多肽、假單胞菌屬 (*Pseudomonas*) 多肽、立克次體屬 (*Rickettsia*) 多肽、羅克利馬體屬 (*Rochalimaea*) 多肽、沙門氏菌屬 (*Salmonella*) 多肽、志賀桿菌屬 (*Shigella*) 多肽、葡萄球菌屬 (*Staphylococcus*) 多肽、A組鏈球菌屬 (*streptococcus*) 多肽(例如化膿性鏈球菌(*S. pyogenes*) M蛋白)、B組鏈球菌屬(無乳鏈球菌(*S. agalactiae*))多肽、密螺旋體屬 (*Treponema*) 多肽及耶爾森菌屬 (*Yersinia*) 多肽(例如鼠疫耶爾森菌(*Y. pestis*) F1及V抗原)。

【0146】 真菌抗原之實例包括(但不限於)犁頭黴屬 (*Absidia*) 多肽、枝頂孢屬 (*Acremonium*) 多肽、交鏈孢屬 (*Alternaria*) 多肽、麴菌屬 (*Aspergillus*) 多肽、蛙糞黴菌屬 (*Basidiobolus*) 多肽、平臍蠕孢屬 (*Bipolaris*) 多肽、芽生菌屬 (*Blastomyces*) 多肽、念珠菌屬 (*Candida*) 多肽、粗球菌 (*Coccidioides*) 多肽、耳黴屬 (*Conidiobolus*) 多肽、隱球菌屬 (*Cryptococcus*) 多肽、彎孢黴屬 (*Curvalaria*) 多肽、表皮癬菌 (*Epidermophyton*) 多肽、外瓶黴屬 (*Exophiala*) 多肽、地絲菌 (*Geotrichum*) 多肽、組織漿菌 (*Histoplasma*) 多肽、馬杜拉分支菌屬 (*Madurella*) 多肽、馬拉色氏黴菌屬 (*Malassezia*) 多肽、小芽孢菌 (*Microsporum*) 多肽、小叢梗孢屬 (*Moniliella*) 多肽、被孢黴屬 (*Mortierella*) 多肽、白黴菌屬 (*Mucor*)

多肽、擬青黴菌屬(*Paecilomyces*)多肽、青黴菌屬(*Penicillium*)多肽、單胞瓶黴屬(*Phialemonium*)多肽、瓶黴屬(*Phialophora*)多肽、原壁菌屬(*Prototheca*)多肽、假埃希氏菌屬(*Pseudallescheria*)多肽、假小托菌屬(*Pseudomicrodochium*)多肽、腐黴菌(*Pythium*)多肽、鼻孢子蟲屬(*Rhinosporidium*)多肽、根黴菌屬(*Rhizopus*)多肽、線狀擔子菌屬(*Scolecobasidium*)多肽、孢子絲菌屬(*Sporothrix*)多肽、匍柄黴屬(*Stemphylium*)多肽、發癬菌(*Trichophyton*)多肽、毛芽胞酵母(*Trichosporon*)多肽及木絲黴屬(*Xylohypha*)多肽。

【0147】 原蟲寄生蟲抗原之實例包括(但不限於)巴倍蟲屬(*Babesia*)多肽、腸袋蟲屬(*Balantidium*)多肽、貝諾孢子蟲屬(*Besnoitia*)多肽、隱孢子蟲屬(*Cryptosporidium*)多肽、艾美球蟲屬(*Eimeria*)多肽、腦胞內原蟲屬(*Encephalitozoon*)多肽、內阿米巴屬(*Entamoeba*)多肽、梨形鞭毛蟲屬(*Giardia*)多肽、哈蒙德蟲屬(*Hammondia*)多肽、肝簇蟲屬(*Hepatozoon*)多肽、等孢子球蟲屬(*Isospora*)多肽、利什曼原蟲屬(*Leishmania*)多肽、微孢子蟲目(*Microsporidia*)多肽、新孢子蟲屬(*Neospora*)多肽、小孢子蟲屬(*Nosema*)多肽、五鞭毛蟲屬(*Pentatrichomonas*)多肽、瘧原蟲屬(*Plasmodium*)多肽。寄生蠕蟲抗原之實例包括(但不限於)棘唇屬(*Acanthocheilonema*)多肽、貓圓線蟲屬(*Aelurostrongylus*)多肽、鉤蟲屬(*Ancylostoma*)多肽、血管圓線蟲屬(*Angiostrongylus*)多肽、蛔蟲屬(*Ascaris*)多肽、布魯線蟲屬(*Brugia*)多肽、仰口線蟲屬(*Bunostomum*)多肽、毛細線蟲屬(*Capillaria*)多肽、夏氏線蟲屬(*Chabertia*)多肽、古柏線蟲屬(*Cooperia*)多肽、環體線蟲屬(*Crenosoma*)多肽、網尾線蟲屬(*Dictyocaulus*)多肽、膨結線蟲屬(*Dioctophyme*)多肽、雙板線蟲屬

(*Dipetalonema*)多肽、裂頭條蟲屬(*Diphyllobothrium*)多肽、複孔條蟲屬(*Diplydium*)多肽、絲蟲屬(*Dirofilaria*)多肽、龍線屬(*Dracunculus*)多肽、住腸線蟲屬(*Enterobius*)多肽、類絲蟲屬(*Filaroides*)多肽、血矛線蟲屬(*Haemonchus*)多肽、兔唇蛔屬(*Lagochilascaris*)多肽、羅阿線蟲屬(*Loa*)多肽、曼森線蟲屬(*Mansonella*)多肽、繆勒線蟲屬(*Muellerius*)多肽、侏形吸蟲屬(*Nanophyetus*)多肽、鉤蟲屬(*Necator*)多肽、細頸線蟲屬(*Nematodirus*)多肽、結節線蟲屬(*Oesophagostomum*)多肽、盤尾絲蟲屬(*Onchocerca*)多肽、後睪吸蟲屬(*Opisthorchis*)多肽、奧斯特線蟲屬(*Ostertagia*)多肽、副絲蟲屬(*Parafilaria*)多肽、並殖吸蟲屬(*Paragonimus*)多肽、副蛔蟲屬(*Parascaris*)多肽、泡翼線蟲屬(*Physaloptera*)多肽、原圓屬(*Protostrongylus*)多肽、狗尾草屬(*Setaria*)多肽、旋尾線蟲屬(*Spirocerca*)多肽、迭宮條蟲屬(*Spirometra*)多肽、冠絲蟲屬(*Stephanofilaria*)多肽、類圓線蟲屬(*Strongyloides*)多肽、圓線蟲屬(*Strongylus*)多肽、吸吮線蟲屬(*Thelazia*)多肽、蛔線蟲屬(*Toxascaris*)多肽、弓蛔蟲屬(*Toxocara*)多肽、旋毛蟲屬(*Trichinella*)多肽、毛樣圓蟲屬(*Trichostrongylus*)多肽、鞭蟲屬(*Trichuris*)多肽、鉤蟲屬(*Uncinaria*)多肽及吳策線蟲屬(*Wuchereria*)多肽。(例如惡性瘧原蟲(*P. falciparum*)環子孢子(PfCSP))、子孢子表面蛋白2 (PfSSP2)、肝狀態抗原1之羧基末端(PfLSA1 c-term)及輸出蛋白1(PfExp-1)、肺囊蟲(*Pneumocystis*)多肽、肉孢子蟲(*Sarcocystis*)多肽、住血吸蟲屬(*Schistosoma*)多肽、泰累爾犁漿蟲屬(*Theileria*)多肽、弓蟲屬(*Toxoplasma*)多肽及錐蟲屬(*Trypanosoma*)多肽。

【0148】 外部寄生蟲抗原之實例包括(但不限於外部寄生蟲抗原之實

例包括(但不限於)來自以下之多肽(包括抗原以及過敏原)：跳蚤；蜚，包括硬蜚及軟蜚；蒼蠅，諸如蠓、蚊子、白蛉、黑蠅、馬蠅、角蠅、鹿蠅、舌蠅、腐蝕蠅、引起蠅蛆病之蒼蠅及庫蠓；螞蟥；蜘蛛、虱；蟎；以及蝨，諸如床虱及接吻蟲。

D. 自殺基因

【0149】 本發明之免疫細胞之CAR可包含一或多種自殺基因。如本文所用，術語「自殺基因」定義為在投與前藥時實現基因產物向殺滅其宿主細胞之化合物之轉變的基因。可使用之自殺基因/前藥組合之實例為單純疱疹病毒-胸苷激酶(HSV-tk)及更昔洛韋(ganciclovir)、阿昔洛韋(acyclovir)或FIAU；氧化還原酶及環己醯亞胺；胞嘧啶脫胺酶及5-氟胞嘧啶；胸苷激酶胸苷酸激酶(Tdk::Tmk)及AZT；以及去氧胞苷激酶及胞嘧啶阿拉伯糖苷。

【0150】 大腸桿菌(*E.coli*)嘌呤核苷磷酸化酶，所謂的自殺基因，其將前藥6-甲基嘌呤去氧核糖苷轉化為有毒嘌呤6-甲基嘌呤。與前藥療法一起使用之自殺基因之其他實例為大腸桿菌胞嘧啶脫胺酶基因及HSV胸苷激酶基因。

【0151】 例示性自殺基因包括CD20、CD52、EGFRv3、利米多賽(rimiducid)或誘導性凋亡蛋白酶9。在一個實施例中，EGFR變體III(EGFRv3)之截短型式可用作可藉由西妥昔單抗(Cetuximab)切除之自殺抗原。可用於本發明中之此項技術中已知之其他自殺基因包括：嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)、細胞色素p450酶(CYP)、羧肽酶(CP)、羧酸酯酶(CE)、硝基還原酶(NTR)、鳥嘌呤核糖基轉移酶(XGRTP)、糖苷酶、甲硫胺酸- α,γ -解離酶(MET)及胸苷磷酸化酶(TP)。

E. 遞送方法

【0152】 熟習此項技術者將充分配備以經由用於表現本發明之抗原受體的標準重組技術來構築載體(參見例如Sambrook等人, 2001及Ausubel等人, 1996, 兩者均以引用的方式併入本文中)。載體包括(但不限於)質體、黏質體、病毒(噬菌體、動物病毒及植物病毒)及人工染色體(例如, YAC), 諸如反轉錄病毒載體(例如, 來源於莫洛尼鼠類白血病毒載體(MoMLV)、MSCV、SFFV、MPSV、SNV等之載體)、慢病毒載體(例如, 來源於HIV-1、HIV-2、SIV、BIV、FIV等之載體)、腺病毒(Ad)載體(包括其複製勝任形式、複製缺陷形式及無腸形式)、腺相關病毒(AAV)載體、猴病毒40 (SV-40)載體、牛乳頭瘤病毒載體、艾-巴二氏病毒載體、疱疹病毒載體、痘瘡病毒載體、哈維鼠肉瘤病毒(Harvey murine sarcoma virus)載體、鼠類乳房腫瘤病毒載體、勞斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus)載體、小病毒載體、小兒麻痺病毒載體、水泡性口炎病毒載體、馬拉巴病毒(maraba virus)載體及B組腺病毒恩那希瑞(enadenotucirev)載體。

a. 病毒載體

【0153】 本發明之某些態樣中可提供編碼抗原受體之病毒載體。在生成重組病毒載體時, 通常用異源(或非天然)蛋白質之基因或編碼序列來替換非必需基因。病毒載體係利用病毒序列將核酸且有可能蛋白質引入細胞中的一類表現構築體。某些病毒經由受體介導之內飲作用感染細胞或進入細胞並整合至宿主細胞基因組中並且穩定且有效表現病毒基因的能力使其成為用於將外源核酸轉移至細胞(例如, 哺乳動物細胞)中的優良候選者。下文描述可用於遞送本發明之某些態樣之核酸的病毒載體的非限制性實例。

【0154】 慢病毒為複合反轉錄病毒，除常見反轉錄病毒基因*gag*、*pol*及*env*以外，慢病毒亦含有其他具有調節或結構性功能之基因。慢病毒載體為此項技術中所熟知的(參見例如美國專利6,013,516及5,994,136)。

【0155】 重組慢病毒載體能夠感染非分裂細胞，且可用於體內及體外基因轉移及核酸序列表現。舉例而言，美國專利5,994,136中描述了能夠感染非分裂細胞之重組慢病毒，其中適合的宿主細胞經兩個或更多個具有包裝功能(亦即*gag*、*pol*及*env*以及*rev*及*tat*)之載體轉染，該專利以引用之方式併入本文中。

b. 調節元件

【0156】 包括於適用於本發明之載體中的表現卡匣尤其含有(在5'至3'方向上)可操作地連接於蛋白質編碼序列之真核轉錄啟動子、包括介入序列之剪接信號及轉錄終止/聚腺苷酸化序列。控制真核細胞中之蛋白質編碼基因之轉錄的啟動子及強化子由多個基因元件構成。細胞機構能夠聚集及整合由各元件輸送之調節資訊，從而允許不同基因演進出不同的、常常複合的轉錄調節模式。在本發明之上下文中所使用之啟動子包括組成性、誘導性及組織特異性啟動子。

(i) 啟動子/強化子

【0157】 本文所提供之表現構築體包含驅動抗原受體之表現的啟動子。啟動子一般包含用於定位RNA合成之起始位點的序列。此之最佳已知實例為TATA盒，但在不具有TATA盒之一些啟動子，諸如哺乳動物末端去氧核苷酸轉移酶基因之啟動子及SV40晚期基因之啟動子中，上覆於起始位點本身之離散元件有助於固定起始之位置。額外啟動子元件調節轉錄起始頻率。通常，此等元件位於起始位點上游30110 bp區域中，但許多啟

動子已顯示亦含有起始位點下游之功能元件。為「在啟動子控制下」引入編碼序列，將轉錄閱讀框架之轉錄起始位點之5'端置於所選擇的啟動子之「下游」(亦即3'端之下游)。「上游」啟動子刺激DNA之轉錄且促進經編碼RNA之表現。

【0158】 啟動子元件之間的間距通常為靈活的，使得當元件相對彼此倒置或移動時保留啟動子功能。在tk啟動子中，啟動子元件之間的間距可在活性開始下降之前增加至相隔50 bp。視啟動子而定，個別元件似乎可合作地或獨立地起活化轉錄作用。啟動子可或可不與「強化子」結合使用，強化子係指涉及核酸序列之轉錄活化的順式作用調節序列。

【0159】 啟動子可為天然與核酸序列相關的一種啟動子，如可藉由分離位於編碼區段及/或外顯子上游之5'端非編碼序列獲得。此類啟動子可稱為「內源」的。類似地，強化子可為天然與核酸序列相關，位於彼序列下游或上游之一種強化子。或者，某些優勢將藉由將編碼核酸區段置於重組或異源啟動子控制下來獲得，重組或異源啟動子係指在其天然環境中通常不與核酸序列相關之啟動子。重組或異源強化子亦係指在其天然環境中通常不與核酸序列相關之強化子。此類啟動子或強化子可包括其他基因之啟動子或強化子，及自任何其他病毒或原核或真核細胞分離之啟動子或強化子，及非「天然存在」之啟動子或強化子，亦即含有不同轉錄調節區之不同元件及/或改變表現之突變。舉例而言，最常用於重組DNA構築之啟動子包括 β -內醯胺酶(青黴素酶)、乳糖及色胺酸(trp-)啟動子系統。除合成地產生啟動子及強化子之核酸序列以外，可結合本文所揭示之組合物使用重組選殖及/或核酸擴增技術(包括PCR™)產生序列。此外，預期亦可採用引導非核細胞器(諸如粒線體、葉綠體及其類似物)內之序列之轉錄及/或表

現之控制序列。

【0160】 自然地，使用有效引導經選擇用於表現之細胞器、細胞類型、組織、器官或生物體中之DNA區段之表現的啟動子及/或強化子將為重要的。熟習分子生物學技術者一般知道使用啟動子、強化子及細胞型組合進行蛋白質表現(參見例如Sambrook等人1989，其以引用的方式併入本文中)。所用啟動子可為組成性的、組織特異性的、誘導性的及/或適用於在適當條件下引導所引入之DNA區段的高水準表現，諸如在重組蛋白質及/或肽的大規模產生方面有利。啟動子可為異源或內源的。

【0161】 另外，任何啟動子/強化子組合(根據例如真核啟動子資料庫(Eukaryotic Promoter Data Base) EPDB，經由全球資訊網epd.isb-sib.ch/)亦可用於驅動表現。使用T3、T7或SP6細胞質表現系統為另一可能實施例。若提供適當細菌聚合酶，則真核細胞可支援自某些細菌啟動子之細胞質轉錄，作為遞送複合物之一部分或作為額外基因表現構築體。

【0162】 啟動子之非限制性實例包括早期或晚期病毒啟動子，諸如SV40早期或晚期啟動子、細胞巨大病毒(CMV)即刻早期啟動子、勞斯肉瘤病毒(RSV)早期啟動子；真核細胞啟動子，諸如 β 肌動蛋白啟動子、GADPH啟動子、金屬硫蛋白啟動子；及串聯反應元件啟動子，諸如環狀AMP反應元件啟動子(cre)、血清反應元件啟動子(sre)、佛波醇酯啟動子(TPA)及靠近最小TATA盒之反應元件啟動子(tre)。亦有可能使用人類生長激素啟動子序列(例如Genbank，寄存編號X05244，核苷酸283-341處所描述之人類生長激素最小啟動子)或小鼠乳房腫瘤啟動子(可購自ATCC，目錄號ATCC 45007)。在某些實施例中，啟動子為CMV IE、凝集素-1(dectin-1)、凝集素-2、人類CD11c、F4/80、SM22、RSV、SV40、Ad

MLP、 β -肌動蛋白、MHC I類或MHC II類啟動子，然而適用於驅動治療性基因表現之任何其他啟動子可適用於實踐本發明。

【0163】 在某些態樣中，本發明之方法亦係關於強化子序列，亦即增加啟動子活性且具有以順式方式起作用之潛能的核酸序列，且不考慮該等核酸序列之定向，甚至跨越相對較長距離(與標靶啟動子相距多達幾千鹼基)。然而，強化子功能不一定受限於此類長距離，因為其亦可非常接近於給定啟動子起作用。

(ii) 起始信號及連接表現

【0164】 特定起始信號亦可用於本發明中所提供之表現構築體中以便有效轉譯編碼序列。此等信號包括ATG起始密碼子或相鄰序列。可能需要提供包括ATG起始密碼子之外源性轉譯控制信號。一般熟習此項技術者將容易地能夠判定此情形且提供必需信號。熟知起始密碼子必須在所編碼序列之閱讀框架「框內」，以確保整個插入物之轉譯。外源性轉譯控制信號及起始密碼子可為天然或合成的。表現效率可藉由包括適當轉錄強化子元件來增強。

【0165】 在某些實施例中，使用內部核糖體入口位點(IRES)元件之用途產生多基因或多順反子訊息。IRES元件能夠繞過5'甲基化封端依賴性轉譯之核糖體掃描模型且在內部位點開始轉譯。已描述來自小核糖核酸病毒家族(小兒麻痺及腦心肌炎)之兩個成員的IRES元件以及來自哺乳動物訊息之IRES。IRES元件可連接至異源開放閱讀框架。多個開放閱讀框架可轉錄在一起，各自藉由IRES分離，產生多順反子訊息。藉助於IRES元件，各開放閱讀框架可接近核糖體以便有效轉譯。可使用單一啟動子/強化子轉錄單一訊息來有效表現多個基因。

【0166】 另外，某些2A序列元件可用於在本發明中所提供之構築體中產生基因之連接表現或共表現。舉例而言，裂解序列可用於藉由連接開放閱讀框架以形成單一順反子來共表現基因。例示性裂解序列為F2A (口蹄疫病毒2A)或「2A樣」序列(例如，明脈扁刺蛾β四體病毒(*Thosea asigna* virus) 2A；T2A)。

(iii) 複製起點

為了在宿主細胞中傳播載體，其可含有一或多個複製位點起點(常常稱為「ori」)，例如，對應於如上文所描述之EBV之oriP，或在程式化中具有類似或較高功能的經基因工程改造之oriP的核酸序列，其為複製起始之特定核酸序列。或者，可採用如上文所述之其他超染色體複製病毒或自主複製序列(ARS)之複製起點。

c. 選擇及可篩選標記物

【0167】 在一些實施例中，含有本發明之構築體之細胞可藉由在表現載體中包括標記物來體外或體內鑑別。此類標記物將賦予細胞可鑑別之變化，允許容易地鑑別含有表現載體之細胞。一般而言，選擇標記物為賦予允許選擇之特性的一種標記物。陽性選擇標記物為其中標記物之存在允許其選擇之一種標記物，而陰性選擇標記物為其中其存在阻止其選擇之一種標記物。陽性選擇標記物之實例為抗藥性標記物。

【0168】 通常，包括藥物選擇標記物有助於選殖及鑑別轉化子，例如賦予新黴素、嘌呤黴素、潮黴素、DHFR、GPT、吉歐黴素(zeocin)及組胺醇抗性之基因為適用的選擇標記物。除了賦予允許基於條件之實施區分轉化子之表型的標記物之外，亦涵蓋其他類型之標記物，包括基於比色分析之可篩選標記物，諸如GFP。或者，可利用可篩選酶作為陰性選擇標

記物，諸如單純疱疹病毒胸苷激酶(*tk*)或氯黴素乙醯基轉移酶(CAT)。熟習此項技術者亦將知道如何使用免疫標記物，可能結合FACS分析。所用標記物不被認為是重要的，只要其能夠與編碼基因產物之核酸同時表現即可。選擇及可篩選標記物之其他實例為熟習此項技術者所熟知的。

d. 核酸遞送之其他方法

【0169】 除病毒遞送編碼抗原受體之核酸以外，以下為至給定宿主細胞之重組基因遞送的其他方法，且由此被視為在本發明中。

【0170】 如本文所描述或如一般熟習此項技術者將知曉，可使用任何適合的用於轉化細胞之核酸遞送方法來將諸如DNA或RNA之核酸引入本發明之免疫細胞中。此類方法包括(但不限於)藉由以下方式直接遞送DNA，諸如：體外轉染；注射，包括顯微注射；電穿孔；磷酸鈣沈澱；使用DEAE-聚葡萄糖，接著使用聚乙二醇；直接音波加載；脂質體介導之轉染及受體介導之轉染；微彈轟擊；與碳化矽纖維一起進行攪拌；農桿菌(*Agrobacterium*)介導之轉化；乾化/抑制介導之DNA攝取；及此類方法之任何組合。經由應用諸如此等方法之技術，細胞器、細胞、組織或生物體可穩定或暫時地轉型。

IV. 治療方法

【0171】 本發明方法可有助於自臍帶血或末梢血液產生大量高度功能性NK細胞，以用於NK細胞免疫療法。本發明方法亦可用於增強CAR-NK細胞療法之功能性。由此，本文提供用於治療疾病之方法，其係藉由授受輸注僅NK細胞或NK細胞與單株、雙特異性及三特異性抗體之組合，該等抗體結合CD16或NK細胞上之其他受體且將細胞重新導向至標靶，從而增加針對不同腫瘤之反應。

【0172】 在一些實施例中，本發明提供用於免疫療法之方法，其包含投與有效量的本發明之NK細胞。在一個實施例中，醫學疾病或病症係藉由轉移引發免疫反應之NK細胞群體來治療。在本發明之某些實施例中，癌症或感染係藉由轉移引發免疫反應之NK細胞群體來治療。本文提供治療或延遲個體中癌症之進展的方法，其包含向個體投與有效量的NK細胞療法。本發明方法可適用於治療免疫病症、實體癌症、血液癌及病毒感染。

【0173】 本發明之治療方法適用之腫瘤包括任何惡性細胞類型，諸如發現於實體腫瘤或血液腫瘤中之彼等惡性細胞。例示性實體腫瘤可包括(但不限於)選自由以下組成之群之器官的腫瘤：胰臟、結腸、盲腸、胃、大腦、頭部、頸部、卵巢、腎、喉、肉瘤、肺、膀胱、黑素瘤、前列腺及乳房。例示性血液腫瘤包括骨髓腫瘤、T細胞或B細胞惡性疾病、白血病、淋巴瘤、母細胞瘤、骨髓瘤及其類似者。可使用本文所提供之方法治療的癌症之其他實例包括(但不限於)肺癌(包括小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌及肺鱗狀癌)、腹膜癌、胃癌(gastric/stomach cancer) (包括胃腸癌及胃腸基質癌)、胰臟癌、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜癌或子宮癌、唾液腺癌、腎癌(kidney/renal cancer)、前列腺癌、外陰癌、甲狀腺癌、各種類型之頭頸癌及黑素瘤。

【0174】 癌症可特定為以下組織學類型，但不限於此等：惡性贅瘤；癌瘤；未分化癌瘤；巨細胞及梭形細胞癌；小細胞癌；乳頭狀癌；鱗狀細胞癌；淋巴上皮癌；基底細胞癌；毛母質癌；轉移細胞癌；乳頭狀轉移細胞癌；腺癌；惡性胃泌素瘤；膽管癌；肝細胞癌；組合之肝細胞癌及

膽管癌；小樑腺癌；腺樣囊性癌症；腺瘤息肉中之腺癌；家族性結腸息肉
 病腺癌；實體癌瘤；惡性類癌；細支氣管肺泡腺癌；乳頭狀腺癌；難染細
 胞癌；嗜酸性癌；嗜氧性腺癌；嗜鹼性癌；透明細胞腺癌；粒狀細胞癌；
 濾泡腺癌；乳頭狀及濾泡腺癌；無包膜硬化性癌；腎上腺皮質癌；子宮內
 膜樣癌；皮膚附屬器癌；頂泌腺癌；皮脂腺癌；耵聍腺癌；黏液表皮樣癌
 瘤；囊腺癌；乳頭狀囊腺癌；乳頭狀的漿液性囊腺癌；黏液性囊腺癌；黏
 液性腺癌；戒環細胞癌；浸潤性導管癌；髓樣癌；小葉癌；炎性癌；乳房
 佩吉特氏病(paget's disease)；腺泡細胞癌；腺鱗癌；腺癌伴鱗狀化生；
 惡性胸腺瘤；惡性卵巢基質腫瘤；惡性泡膜細胞瘤；惡性粒層細胞腫瘤；
 惡性睪丸母細胞瘤；塞特利氏(sertoli)細胞癌；惡性雷迪格(leydig)細胞腫
 瘤；惡性脂質細胞腫瘤；惡性副神經節瘤；惡性乳腺外副神經節瘤；嗜鉻
 細胞瘤；血管球肉瘤；惡性黑素瘤；無黑色素性黑素瘤；淺表擴散性黑素
 瘤；雀斑惡性黑素瘤；肢端雀斑狀黑素瘤；結節性黑素瘤；巨大色素痣內
 惡性黑素瘤；上皮狀細胞黑素瘤；惡性藍痣；肉瘤；纖維肉瘤；惡性纖維
 性組織細胞瘤；黏液肉瘤；脂肉瘤；平滑肌肉瘤；橫紋肌肉瘤；胚胎性橫
 紋肌肉瘤；肺泡橫紋肌肉瘤；基質肉瘤；惡性混合腫瘤；苗勒混合腫瘤
 (mullerian mixed tumor)；腎母細胞瘤；肝母細胞瘤；癌肉瘤；惡性間質
 瘤；惡性布倫納氏腫瘤(brenner tumor)；惡性葉狀腫瘤；滑膜肉瘤；惡性
 間皮瘤；無性細胞瘤；胚胎性癌；惡性畸胎瘤；惡性卵巢甲狀腺瘤；絨毛
 膜癌；惡性中腎瘤；血管肉瘤；惡性血管內皮瘤；卡波西氏肉瘤(kaposi's
 sarcoma)；惡性血管外皮瘤；淋巴管肉瘤；骨肉瘤；皮質旁骨肉瘤；軟骨
 肉瘤；惡性軟骨母細胞瘤；間葉質軟骨肉瘤；骨巨細胞瘤；尤文氏肉瘤
 (ewing's sarcoma)；惡性牙源性腫瘤；成釉細胞牙肉瘤；惡性成釉細胞

瘤；成釉細胞纖維肉瘤；惡性松果體瘤；脊索瘤；惡性神經膠質瘤；室管膜瘤；星形細胞瘤；原生質星形細胞瘤；纖維型星形細胞瘤；星形母細胞瘤；神經膠母細胞瘤；少突神經膠質瘤；成少突神經膠質細胞瘤；原始神經外胚層；小腦肉瘤；成神經節細胞瘤；神經母細胞瘤；視網膜母細胞瘤；嗅覺神經性腫瘤；惡性腦膜瘤；神經纖維肉瘤；惡性神經鞘瘤；惡性粒狀細胞瘤；惡性淋巴瘤；霍奇金氏病(hodgkin's disease)；霍奇金氏；類肉芽腫；小淋巴細胞性惡性淋巴瘤；大細胞瀰漫性惡性淋巴瘤；濾泡性惡性淋巴瘤；蕁樣黴菌病；其他指定非霍奇金氏淋巴瘤；B細胞淋巴瘤；低級/濾泡性非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)；小淋巴細胞性(SL) NHL；中級/濾泡性NHL；中級瀰漫性NHL；高級免疫母細胞性NHL；高級淋巴母細胞性NHL；高級小非裂解細胞NHL；巨大腫塊NHL；套細胞淋巴瘤；AIDS相關淋巴瘤；瓦爾登斯特倫氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)；惡性組織細胞增多病；多發性骨髓瘤；肥大細胞肉瘤；免疫增殖性小腸疾病；白血病；淋巴白血病；漿細胞白血病；紅白血病；淋巴肉瘤細胞白血病；骨髓白血病；嗜鹼性白血病；嗜伊紅血球白血病；單核細胞性白血病；肥大細胞白血病；巨核母細胞白血病；骨髓肉瘤；毛細胞白血病；慢性淋巴細胞性白血病(CLL)；急性淋巴母細胞白血病(ALL)；急性骨髓性白血病(AML)；及慢性骨髓母細胞白血病。

【0175】 特定實施例係關於白血病之治療方法。白血病為血液癌症或骨髓癌症且特徵在於血球(通常白血球(white blood cell/leukocyte))之異常增殖(倍增產生)。其為稱為血液贅瘤之廣泛群組之疾病的一部分。白血病為廣義術語，涵蓋一系列疾病。白血病在臨床上及病理上分成其急性及慢性形式。

【0176】 在本發明之某些實施例中，NK細胞遞送至有需要之個體，諸如患有癌症或感染之個體。隨後，細胞增強個體之免疫系統以攻擊各別癌細胞或病原性細胞。在一些情況下，向個體提供一或多次劑量之免疫細胞。在向個體提供兩次或更多次劑量之免疫細胞的情況下，投藥之間的持續時間應足以允許在個體中傳播之時間，且在特定實施例中，劑量之間的持續時間為1、2、3、4、5、6、7天或更多天。

【0177】 本發明之某些實施例提供治療或預防免疫介導之病症之方法。在一個實施例中，個體患有自體免疫疾病。自體免疫疾病之非限制性實例包括：斑禿、僵直性脊椎炎、抗磷脂症候群、自體免疫性艾迪森氏病(Addison's disease)、腎上腺之自體免疫疾病、自體免疫性溶血性貧血、自體免疫性肝炎、自體免疫性卵巢炎及睪丸炎、自體免疫性血小板減少症、白塞氏病(Behcet's disease)、大皰性類天疱瘡、心肌病、口炎性腹瀉-皮炎、慢性疲勞免疫功能障礙症候群(CFIDS)、慢性發炎性脫髓鞘性多發性神經病、徹奇-斯全司症候群(Churg-Strauss syndrome)、癍痕性類天疱瘡、CREST症候群、冷凝集素病、克羅恩氏病(Crohn's disease)、盤狀狼瘡、原發性混合型冷凝球蛋白血症、纖維肌痛-纖維肌炎、絲球體腎炎、格雷夫氏病(Graves' disease)、格林-巴利(Guillain-Barre)、橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、特發性肺部纖維化、特發性血小板減少性紫癍(ITP)、IgA神經病變、青少年關節炎、扁平苔癬、紅斑狼瘡、梅尼爾氏病(Meniere's disease)、混合性結締組織病、多發性硬化症、1型或免疫介導性糖尿病、重症肌無力、腎病症候群(諸如微小病變疾病、局灶性腎小球硬化或膜性腎病)、尋常天疱瘡、惡性貧血、結節性多動脈炎、多軟骨炎、多腺症候群、風濕性多肌痛、多發性肌炎及皮肌炎、原發性無 γ 球蛋白

白血症、原發性膽汁性肝硬化、牛皮癬、牛皮癬性關節炎、雷諾氏現象(Raynaud's phenomenon)、萊特爾氏症候群(Reiter's syndrome)、類風濕性關節炎、類肉瘤病、硬皮病、休格連氏症候群(Sjogren's syndrome)、僵直人症候群、全身性紅斑性狼瘡症、紅斑狼瘡、潰瘍性結腸炎、葡萄膜炎、血管炎(諸如結節性多動脈炎、高安氏動脈炎(takayasu arteritis)、顱動脈炎/巨大細胞動脈炎或疱疹樣皮炎血管炎)、白斑病及韋格納氏肉芽腫病(Wegener's granulomatosis)。由此，可使用本文中所揭示之方法進行治療的自體免疫疾病之一些實例包括(但不限於)多發性硬化症、類風濕性關節炎、全身性紅斑狼瘡、I型糖尿病、克羅恩氏病；潰瘍性結腸炎、重症肌無力、絲球體腎炎、僵直性脊椎炎、血管炎或牛皮癬。個體亦可能患有諸如哮喘之過敏性病症。

【0178】 在另一實施例中，個體為移植器官或幹細胞之接受者，且NK細胞用來預防及/或治療排斥反應。移植體可為複合移植體，諸如面部組織。NK細胞可在移植之前、與移植同時或在移植之後投與。在一些實施例中，在移植前，諸如在移植前至少1小時、至少12小時、至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少1週、至少2週、至少3週、至少4週或至少1個月投與NK細胞。在一個特定非限制性實例中，治療有效量之NK細胞之投與在移植之前3至5天發生。

【0179】 在一些實施例中，可在NK細胞療法之前向個體投與非清髓性淋巴細胞耗盡化學療法。非清髓性淋巴細胞耗盡化學療法可為任何適合之此類療法，其可藉由任何適合之途徑投與。非清髓性淋巴細胞耗盡化學療法可包含例如投與環磷醯胺及氟達拉賓，尤其在癌症係可為轉移性之黑素瘤時。投與環磷醯胺及氟達拉賓之例示性途徑係靜脈內投與。同樣

地，可投與任何適合劑量之環磷醯胺及氟達拉賓。在特定態樣中，持續兩天投與約60 mg/kg環磷醯胺，其後持續五天投與約25 mg/m²氟達拉賓。

【0180】 在某些實施例中，與NK細胞同時或在NK細胞之後向個體投與促進NK細胞生長及活化之生長因子。免疫細胞生長因子可為促進NK細胞生長及活化之任何適合之生長因子。適合之免疫細胞生長因子之實例包括介白素(IL)-2、IL-7、IL-15及IL-12，其可單獨或以各種組合使用，諸如IL-2及IL-7；IL-2及IL-15；IL-7及IL-15；IL-2、IL-7及IL-15；IL-12及IL-7；IL-12及IL-15；或IL-12及IL2。

【0181】 治療有效量之NK細胞可藉由多種途徑投與，包括非經腸投藥，例如靜脈內、腹膜內、肌肉內、胸骨內或關節內注射或輸注。

【0182】 用於授受細胞療法之NK細胞之治療有效量為在所治療之個體中實現所要作用之量。舉例而言，此可為抑制自體免疫或同種免疫疾病進展，或使其消退必需之NK細胞之量，或其能夠緩解由自體免疫疾病引起之症狀，諸如疼痛及發炎。其可為緩解與發炎相關之症狀，諸如疼痛、水腫及高溫必需之量。其亦可為減輕或預防移植器官之排斥反應必需之量。

【0183】 NK細胞群體可以符合疾病之治療方案投與，例如經一天至若干天投與單一劑量或若干劑量以改善疾病狀態，或經延長時間投與週期性劑量以抑制疾病進展及預防疾病復發。待用於調配物中之精確劑量亦將視投藥途徑及疾病或病症之嚴重程度而定，且應根據醫師之判斷及各患者之情況來決定。NK細胞之治療有效量將視治療之個體、病痛之嚴重度及類型以及投與方式而定。在一些實施例中，可用於治療人類個體之劑量介於每平方米至少 3.8×10^4 、至少 3.8×10^5 、至少 3.8×10^6 、至少 3.8×10^7 、

至少 3.8×10^8 、至少 3.8×10^9 或至少 3.8×10^{10} 個NK細胞之範圍內。在某一實施例中，用於治療人類個體之劑量介於每平方米約 3.8×10^9 至約 3.8×10^{10} 個NK細胞之範圍內。在其他實施例中，NK細胞之治療有效量可在每公斤體重約 5×10^6 個細胞至每公斤體重約 7.5×10^8 個細胞之範圍內變化，諸如每公斤體重約 2×10^7 個細胞至約 5×10^8 個細胞，或每公斤體重約 5×10^7 個細胞至約 2×10^8 個細胞。熟習此項技術者基於個體之年齡、體重、性別及生理條件容易確定NK細胞之精確量。有效劑量可自來源於體外或動物模型測試系統之劑量反應曲線外推得到。

【0184】 NK細胞可與一或多種其他治療劑組合投與以治療免疫調節病症。組合療法可包括(但不限於)一或多種抗微生物劑(例如抗生素、抗病毒劑及抗真菌劑)、組合療法可包括(但不限於)一或多種抗微生物劑(例如抗生素、抗病毒劑及抗真菌劑)、抗腫瘤劑(例如氟尿嘧啶、甲胺喋呤、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、氟達拉賓、依託泊苷(etoposide)、阿黴素(doxorubicin)或長春新鹼(vincristine))、免疫耗乏劑(例如氟達拉賓、依託泊苷、阿黴素或長春新鹼)、免疫抑制劑(例如硫唑嘌呤或糖皮質激素，諸如地塞米松(dexamethasone)或潑尼松(prednisone))、消炎劑(例如糖皮質激素，諸如氫皮質酮、地塞米松或潑尼松，或非類固醇消炎劑，諸如乙醯水楊酸、布洛芬(ibuprofen)或萘普生鈉(naproxen sodium))、細胞介素(例如介白素-10或轉型生長因子- β)、激素(例如雌激素)或疫苗。另外，可投與免疫抑制劑或耐受劑，包括(但不限於)鈣調神經磷酸酶抑制劑(例如環孢素及他克莫司(tacrolimus))；mTOR抑制劑(例如雷帕黴素(Rapamycin))；黴酚酸嗎啉乙酯，抗體(例如識別CD3、CD4、CD40、CD154、CD45、IVIG或B細胞)；化學治療劑(例如甲胺喋呤、曲奧舒凡

(Treosulfan)、白消安(Busulfan))；輻照；或趨化激素、介白素或其抑制劑(例如BAFF、IL-2、抗IL-2R、IL-4、JAK激酶抑制劑)。此類其他藥劑可取決於所需效應而在投與NK細胞之前、期間或之後投與。細胞及藥劑之此投與可藉由相同途徑或藉由不同途徑，且在相同位點或在不同位點。

B. 醫藥組合物

【0185】 本文亦提供包含NK細胞及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物及調配物。

【0186】 如本文所述之醫藥組合物及調配物可藉由以下方式製備：混合具有所需純度之活性成分(諸如抗體或多肽)與一或多種視情況選用之醫藥學上可接受之載劑(Remington's Pharmaceutical Sciences 第22版, 2012)，呈凍乾調配物或水溶液形式。醫藥學上可接受之載劑在所使用之劑量及濃度下對於接受者而言通常係無毒的，且包括(但不限於)：緩衝劑，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(諸如氯化十八烷基二甲基苯甲基銨；氯化六羥季銨；氯化苯甲烴銨；苄索氯銨；酚醇、丁醇或苯甲醇；對羥基苯甲酸烷酯，諸如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間甲酚)；低分子量(小於約10個殘基)多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯啉酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、雙醣及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，諸如EDTA；糖，諸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇；成鹽抗衡離子，諸如鈉；金屬錯合物(例如，Zn-蛋白質錯合物)；及/或非離子界面活性劑，諸如聚乙二醇(PEG)。本文中之例示性醫藥學上可接受之載劑進一步

包括間質藥物分散劑，諸如可溶性中性活性玻尿酸酶糖蛋白(sHASEGP)，例如人類可溶性PH-20玻尿酸酶糖蛋白，諸如rHuPH20(HYLENEX[®], Baxter International, Inc.)。某些例示性sHASEGP(包括rHuPH20)及使用方法描述於US專利公開案第2005/0260186號及第2006/0104968號中。在一個態樣中，sHASEGP與一或多種其他葡萄糖胺聚糖酶，諸如軟骨素酶組合。

C. 組合療法

【0187】 在某些實施例中，本發明實施例之組合物及方法涉及與至少一種其他療法組合之NK細胞群體。其他療法可為放射線療法、手術(例如乳房腫瘤切除術及乳房切除術)、化學療法、基因療法、DNA療法、病毒療法、RNA療法、免疫療法、骨髓移植、奈米療法、單株抗體療法或前述各者之組合。其他療法可呈輔助或新輔助療法形式。

【0188】 在一些實施例中，其他療法為投與小分子酶抑制劑或抗轉移性藥劑。在一些實施例中，其他療法為投與副作用限制劑(例如意欲減少治療副作用之出現及/或嚴重程度的藥劑，諸如抗噁心劑等)。在一些實施例中，其他療法為放射線療法。在一些實施例中，其他療法為手術。在一些實施例中，其他療法為放射線療法與手術之組合。在一些實施例中，其他療法為 γ 輻照。在一些實施例中，其他療法係靶向PBK/AKT/mTOR路徑之療法、HSP90抑制劑、微管蛋白抑制劑、細胞凋亡抑制劑及/或化學預防劑。其他療法可為此項技術中已知之化學治療劑中之一或多者。

【0189】 NK細胞療法相對於另一癌症療法，諸如免疫檢查點療法可在其之前、期間、之後或以各種組合投與。投藥可呈在同時至數分鐘至數天至數週範圍內之間隔。在其中免疫細胞療法與另一治療劑分開提供給

患者之實施例中，一般將保證在每一次遞送之時間段之間未停用大量時間，使得兩種化合物將仍能夠對患者發揮有利的組合效果。在此類情況下，預期可在距彼此約12小時至24小時或72小時內(且更特定言之，在距彼此約6小時至12小時內)向患者提供抗體療法及抗癌療法。在某些情況下，可能需要延長時段以進行顯著治療，其中在各別投藥之間會流逝若干天(2、3、4、5、6或7天)至若干週(1、2、3、4、5、6、7或8週)。

【0190】 可採用各種組合。針對下文實例，NK細胞療法為「A」且抗癌療法為「B」：

- A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B
- B/A/B/B
- B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A
- B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

【0191】 考慮到藥劑之毒性(若存在)，向患者投與本發明實施例之任何化合物或療法將遵循用於投與此類化合物之一般方案。因此，在一些實施例中，存在監測可歸因於組合療法之毒性的步驟。

1. 化學療法

【0192】 根據本發明實施例可使用各種化學治療劑。術語「化學療法」係指使用藥物治療癌症。「化學治療劑」用於表示在癌症治療中投與之化合物或組合物。此等藥劑或藥物藉由其在細胞內之活性模式分類，例如其是否且在哪一階段影響細胞週期。或者，藥劑可基於其直接交聯DNA、插入DNA中或藉由影響核酸合成來誘導染色體及有絲分裂失常之能力表徵。

【0193】 化學治療劑之實例包括烷基化劑，諸如噻替派(thiotepa)及

環磷醯胺；磺酸烷基酯，諸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶(aziridine)，諸如苯佐替派(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、美妥替派(meturedopa)及烏瑞替派(uredopa)；乙烯亞胺及甲基蜜胺(methylamelamine)，包括六甲蜜胺(altretamine)、三伸乙基蜜胺(triethylenemelamine)、三伸乙基磷醯胺、三伸乙基硫代磷醯胺及三甲密胺(trimethylolomelamine)；多聚乙醯(acetogenin) (尤其布拉他辛(bullatacin)及布拉他辛酮(bullatacinone))；喜樹鹼(包括合成類似物拓朴替康(topotecan))；苔蘚抑素(bryostatin)；卡利他汀(callystatin)；CC-1065 (包括其阿多來新(adozelesin)、卡折來新(carzelesin)及比折來新(bizelesin)合成類似物)；念珠藻環肽(cryptophycin) (特定言之念珠藻環肽1及念珠藻環肽8)；海兔毒素(dolastatin)；倍癌黴素(duocarmycin) (包括合成類似物KW-2189及CB1-TM1)；軟珊瑚醇(eleutherobin)；水鬼蕉鹼(pancratistatin)；匍枝珊瑚醇(sarcodictyin)；海綿抑制素(spongistatin)；氮芥，諸如苯丁酸氮芥、蔡氮芥、氯磷醯胺、雌氮芥、異環磷醯胺、二氯甲基二乙胺、氧化二氯甲基二乙胺鹽酸鹽、美法侖(melphalan)、新氮芥、苯芥膽甾醇(phenesterine)、潑尼氮芥(prednimustine)、曲洛磷胺(trofosfamide)及尿嘧啶氮芥(uracil mustard)；亞硝基脲，諸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)及雷莫司汀(ranimustine)；抗生素，諸如烯二炔抗生素(例如卡奇黴素(calicheamicin)，尤其卡奇黴素 γ II及卡奇黴素 ω II)；達內黴素(dynemicin)，包括達內黴素A；雙膦酸鹽，諸如氯屈膦酸鹽(clodronate)；埃斯培拉黴素(esperamicin)；以及新抑癌蛋白

(neocarzinostatin)發色團及相關色蛋白烯二炔抗生素發色團、阿克拉黴素(aclacinomycin)、放射菌素(actinomycin)、胺茴黴素(authrarnycin)、偶氮絲胺酸、博來黴素(bleomycins)、放線菌素C (cactinomycin)、卡拉比辛(carabycin)、洋紅黴素(carminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色黴素(chromomycinis)、放線菌素d、道諾黴素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-側氧基-L-正白胺酸、阿黴素(包括N-嗎啉基-阿黴素、氰基-N-嗎啉基-阿黴素、2-吡咯啉基-阿黴素及去氧阿黴素)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、艾達黴素(idarubicin)、麻西羅黴素(marcellomycin)、絲裂黴素(mitomycins) (諸如絲裂黴素C)、黴酚酸(mycophenolic acid)、諾拉黴素(nogalarnycin)、橄欖黴素(olivomycins)、培洛黴素(peplomycin)、潑非黴素(potfiromycin)、嘌呤黴素(puromycin)、奎那黴素(quelamycin)、羅多比星(rodorubicin)、鏈黑黴素(streptonigrin)、鏈脲菌素(streptozocin)、殺結核菌素(tubercidin)、烏苯美司(ubenimex)、淨司他丁(zinostatin)及左柔比星(zorubicin)；抗代謝物，諸如甲胺喋呤(methotrexate)及5-氟尿嘧啶(5-FU)；葉酸類似物，諸如迪諾特寧(denopterin)、蝶羅呤(pteropterin)及曲美沙特(trimetrexate)；嘌呤類似物，諸如氟達拉賓、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤(thiamiprine)及硫鳥嘌呤(thioguanine)；嘧啶類似物，諸如安西他濱(ancitabine)、阿紮胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、雙去氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依諾他濱(enocitabine)及氟尿苷(floxuridine)；雄激素，諸如卡普翠酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、環硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiothane)及翠內酯

(testolactone)；抗腎上腺藥物，諸如米托坦(mitotane)及曲洛司坦(trilostane)；葉酸補充劑，諸如亞葉酸；乙醯葡醛酯(aceglatone)；醛磷醯胺糖苷(aldophosphamide glycoside)；胺基乙醯丙酸；恩尿嘧啶(eniluracil)；安吡啶(amsacrine)；貝斯布西(bestrabucil)；比生群(bisantrene)；依達曲沙(edatraxate)；地磷醯胺(defofamine)；地美可辛(demecolcine)；地吡醌(diaziquone)；艾福米辛(elformthine)；依利醋鉍(elliptinium acetate)；埃博黴素；依託格魯(etoglucid)；硝酸鎂；羥基脲；磨菇多糖(lentinan)；氯尼達明(lonidainine)；類美登素(maytansinoid)，諸如美登素(maytansine)及安絲菌素(ansamitocin)；丙脒脞(mitoguazone)；米托蒽醌(mitoxantrone)；莫哌達醇(mopidamol)；尼曲吡啶(nitracrine)；噴司他丁(pentostatin)；苯來美特(phenamet)；吡柔比星(pirarubicin)；洛索蒽醌(losoxantrone)；鬼臼酸(podophyllinic acid)；2-乙基醯肼；丙卡巴肼(procarbazine)；PSK多醣複合物；雷佐生(razoxane)；根黴素(rhizoxin)；西索菲蘭(sizofiran)；鍺螺胺(spirogermanium)；細交鏈孢菌酮酸(tenuazonic acid)；三亞胺醌(triaziquone)；2,2',2''-三氯三乙胺；單端孢黴烯(trichothecene)（尤其T-2毒素、黏液黴素A (verracurin A)、桿孢菌素A (roridin A)及蛇形菌素(anguidine)）；尿烷(urethan)；長春地辛(vindesine)；達卡巴嗪(dacarbazine)；甘露醇氮芥(mannomustine)；二溴甘露醇；二溴衛矛醇(mitolactol)；哌泊溴烷(pipobroman)；加西托星(gacytosine)；阿拉伯糖苷(「Ara-C」)；環磷醯胺；類紫杉醇(taxoid)，例如太平洋紫杉醇及多烯紫杉醇吉西他濱(docetaxel gemcitabine)；6-硫鳥嘌呤；巯基嘌呤；鉑配位錯合物，諸如順鉑(cisplatin)、奧沙利鉑(oxaliplatin)及卡鉑

(carboplatin)；長春鹼(vinblastine)；鉑；依託泊苷(etoposide) (VP-16)；異環磷醯胺；米托蒽醌(mitoxantrone)；長春新鹼；長春瑞濱(vinorelbine)；諾安托(novantrone)；替尼泊甙(teniposide)；依達曲沙(edatrexate)；柔紅黴素(daunomycin)；胺基喋呤(aminopterin)；希羅達(xeloda)；伊班膦酸鹽(ibandronate)；伊立替康(irinotecan) (例如，CPT-11)；拓撲異構酶抑制劑RFS 2000；二氟甲基鳥胺酸(DMFO)；類視黃素，諸如視黃酸；卡培他濱(capecitabine)；卡鉑、丙卡巴肼(procarbazine)、光輝黴素(plicomycin)、吉西他濱(gemcitabien)、溫諾平(navelbine)、法呢基蛋白轉移酶抑制劑、反鉑(transplatinum)及以上各者中之任一者之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物。

2. 放射線療法

【0194】造成DNA損傷且已廣泛使用之其他因素包括通常稱為 γ 射線、X射線及/或將放射性同位素定向遞送至腫瘤細胞之彼等。亦涵蓋DNA損傷因素之其他形式，諸如微波、質子束輻照(美國專利5,760,395及4,870,287)及UV輻照。最可能之情形為，所有此等因素對DNA、DNA之前驅物、DNA之複製及修復，及染色體之組裝及維持造成多種破壞。X射線之劑量範圍在延長之時間段(3至4週)期間50至200倫琴日劑量至2000至6000倫琴之單次劑量範圍內。放射性同位素之劑量範圍變化極大，且視同位素之半衰期、所發出之輻射強度及類型，及贅生性細胞之吸收情況而定。

3. 免疫療法

【0195】熟練技術人員應瞭解，其他免疫療法可與實施例之方法組合或結合使用。在癌症治療之情形下，免疫治療劑一般依賴於使用免疫效

應細胞及分子來靶向及摧毀癌細胞。利妥昔單抗(RITUXAN®)係此類實例。免疫效應子可為例如對腫瘤細胞表面上之一些標記物具有特異性之抗體。單獨的抗體可充當療法之效應子或其可募集其他細胞以實際上影響細胞殺滅。抗體亦可結合於藥物或毒素(化學治療劑、放射性核種、蓖麻毒素A鏈、霍亂毒素、百日咳毒素等)且用作靶向劑。或者，效應子可為攜帶直接或間接與腫瘤細胞標靶相互作用之表面分子的淋巴細胞。各種效應細胞包括細胞毒性T細胞及NK細胞。

【0196】 抗體-藥物結合物已作為癌症治療劑之研發之突破性方法出現。癌症係世界上死亡主要原因中之一者。抗體-藥物結合物(ADC)包含共價連接至細胞殺滅藥物之單株抗體(MAb)。此方法組合MAb對其抗原標靶之高特異性與高度有效之細胞毒性藥物，產生將有效負載物(藥物)遞送至具有富集含量之抗原之腫瘤細胞的「武裝」MAb。藥物之靶向遞送亦將其在正常組織中之暴露量減至最少，使得毒性降低且治療指數提高。FDA對兩種ADC藥物，2011年之ADCETRIS®(貝倫妥單抗維多汀(brentuximab vedotin))及2013年之KADCYLA®(曲妥珠單抗恩他新(trastuzumab emtansine)或T-DM1)的批准證實了所述方法。目前在用於癌症治療之臨床試驗之各階段存在超過30種ADC候選藥物(Leal等人, 2014)。隨著抗體工程改造及連接子-有效負載物優化變得愈來愈成熟，新的ADC之發現及研發日益視適合於此方法之新的標靶之鑑別及驗證以及靶向MAb之產生而定。ADC標靶之兩個準則係腫瘤細胞中之上調/高程度表現及穩固內化。

【0197】 在免疫療法之一個態樣中，腫瘤細胞必須攜帶一些適合於進行靶向，亦即大多數其他細胞上不存在之標記物。存在許多腫瘤標記物

且此等標記物中之任一者可適用於在本發明實施例之情形下進行靶向。常見腫瘤標記物包括CD20、癌胚抗原、酪胺酸酶(p97)、gp68、TAG-72、HMFG、Sialyl Lewis抗原、MucA、MucB、PLAP、層黏連蛋白受體、erb B及p155。免疫療法之替代態樣為組合抗癌作用與免疫刺激作用。亦存在免疫刺激分子，包括：細胞介素，諸如IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、 γ -IFN；趨化激素，諸如MIP-1、MCP-1、IL-8及生長因子，諸如FLT3配位體。

【0198】目前所研究或在使用中之免疫療法之實例係免疫佐劑，例如牛分支桿菌 (*Mycobacterium bovis*)、惡性瘧原蟲 (*Plasmodium falciparum*)、二硝基氯苯及芳族化合物(美國專利 5,801,005 及 5,739,169；Hui及Hashimoto, 1998；Christodoulides等人, 1998)；細胞介素療法，例如干擾素 α 、 β 及 γ 、IL-1、GM-CSF及TNF (Bukowski等人, 1998；Davidson等人, 1998；Hellstrand等人, 1998)；基因療法，例如TNF、IL-1、IL-2及p53 (Qin等人, 1998；Austin-Ward及Villaseca, 1998；美國專利5,830,880及5,846,945)；以及單株抗體，例如抗CD20、抗神經節苷脂GM2及抗p185 (Hollander, 2012；Hanibuchi等人, 1998；美國專利5,824,311)。預期一或多種抗癌療法可與本文所描述之抗體療法一起使用。

【0199】在一些實施例中，免疫療法可為免疫檢查點抑制劑。免疫檢查點增強信號(例如共刺激分子)或減弱信號。可由免疫檢查點阻斷靶向之抑制性免疫檢查點包括腺苷A2A受體(A2AR)、B7-H3 (亦稱為CD276)、B及T淋巴細胞弱化子(BTLA)、細胞毒性T淋巴細胞相關蛋白4 (CTLA-4，亦稱為CD152)、吡啶胺2,3-二加氧酶(IDO)、殺手細胞免疫球

蛋白(KIR)、淋巴細胞活化基因-3 (LAG3)、計劃性死亡1 (PD-1)、T細胞免疫球蛋白域及黏蛋白域3 (TIM-3)及T細胞活化之V域Ig抑制因子(VISTA)。特定言之，免疫檢查點抑制劑靶向PD-1軸及/或CTLA-4。

【0200】 免疫檢查點抑制劑可為諸如小分子之藥物、配位體或受體之重組形式，或特定言之抗體，諸如人類抗體(例如國際專利公開案WO2015016718；Pardoll, *Nat Rev Cancer*, 12(4): 252-64, 2012；二者均以引用之方式併入本文中)。可使用免疫檢查點蛋白或其類似物之已知抑制劑，尤其可使用抗體之嵌合、人類化或人類形式。如熟練人員將知曉，替代及/或等效名稱可用於在本發明中提及之某些抗體。此類替代及/或等效名稱在本發明之上下文中可互換。舉例而言，已知拉立珠單抗(lambrolizumab)亦以替代及等效名稱 MK-3475 及派立珠單抗(pembrolizumab)已知。

【0201】 在一些實施例中，PD-1結合拮抗劑為抑制PD-1與其配位體結合搭配物結合之分子。在一特定態樣中，PD-1配位體結合搭配物為PDL1及/或PDL2。在另一實施例中，PDL1結合拮抗劑為抑制PDL1與其結合搭配物結合之分子。在一特定態樣中，PDL1結合搭配物為PD-1及/或B7-1。在另一實施例中，PDL2結合拮抗劑為抑制PDL2與其結合搭配物結合之分子。在一特定態樣中，PDL2結合搭配物為PD-1。拮抗劑可為抗體、其抗原結合片段、免疫黏附素、融合蛋白質或寡肽。例示性抗體描述於美國專利第US8735553號、第US8354509號及第US8008449號中，其皆以引用之方式併入本文中。用於本文所提供之方法之其他PD-1軸拮抗劑為此項技術中已知的，諸如描述於美國專利申請案第US20140294898號、第US2014022021號及第US20110008369號中，其皆以引用之方式併

入本文中。

【0202】 在一些實施例中，PD-1結合拮抗劑為抗PD-1抗體(例如人類抗體、人類化抗體或嵌合抗體)。在一些實施例中，抗PD-1抗體係選自由納武單抗(nivolumab)、派立珠單抗(pembrolizumab)及CT-011組成之群。在一些實施例中，PD-1結合拮抗劑為免疫黏附素(例如包含融合至恆定區(例如免疫球蛋白序列之Fc區)之PDL1或PDL2之細胞外或PD-1結合部分的免疫黏附素)。在一些實施例中，PD-1結合拮抗劑為AMP-224。納武單抗，亦稱為MDX-1106-04、MDX-1106、ONO-4538、BMS-936558及OPDIVO[®]，為WO2006/121168中所述之抗PD-1抗體。派立珠單抗，亦稱為MK-3475、Merck 3475、拉立珠單抗(lambrolizumab)、KEYTRUDA[®]及SCH-900475，為WO2009/114335中所描述之抗PD-1抗體。CT-011，亦稱為hBAT或hBAT-1，為WO2009/101611中所描述之抗PD-1抗體。AMP-224，亦稱為B7-DCIg，為WO2010/027827及WO2011/066342中描述之PDL2-Fc融合可溶受體。

【0203】 可在本文中提供之方法中靶向之另一免疫檢查點為細胞毒性T淋巴細胞相關蛋白4 (CTLA-4)，亦稱為CD152。人類CTLA-4之完整cDNA序列具有Genbank寄存編號L15006。CTLA-4發現於T細胞之表面上且在結合於抗原呈現細胞之表面上之CD80或CD86時充當「關閉」開關。CTLA4係表現於輔助T細胞之表面上之免疫球蛋白超家族的成員且將抑制性信號傳輸至T細胞。CTLA4類似於T細胞共刺激蛋白質CD28，且兩種分子均結合於抗原呈現細胞上亦分別稱為B7-1及B7-2之CD80及CD86。CTLA4將抑制性信號傳輸至T細胞，而CD28傳輸刺激性信號。細胞內CTLA4亦發現於調節性T細胞中且對其功能可為重要的。經由T細胞受體

及CD28之T細胞活化導致B7分子之抑制性受體CTLA-4之表現提高。

【0204】 在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係抗CTLA-4抗體(例如人類抗體、人類化抗體或嵌合抗體)、其抗原結合片段、免疫黏附素、融合蛋白質或寡肽。

【0205】 適用於本發明方法之抗人類CTLA-4抗體(或自其衍生之VH及/或VL域)可使用此項技術中熟知之方法產生。或者，可使用此項技術中公認之抗CTLA-4抗體。舉例而言，以下文獻中所揭示之抗CTLA-4抗體可用於本文所揭示之方法：US 8,119,129、WO 01/14424、WO 98/42752；WO 00/37504 (CP675,206，亦稱為曲美木單抗(tremelimumab)；以前稱替西單抗(ticilimumab))、美國專利第6,207,156號；Hurwitz等人(1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95(17): 10067-10071；Camacho等人(2004) *J Clin Oncology* 22(145): 摘要編號2505 (抗體CP-675206)；以及Mokyr等人(1998) *Cancer Res* 58:5301-5304。前述公開案中之每一者之教示內容以引用之方式併入本文中。亦可使用與用於結合於CTLA-4之此等此項技術中公認之抗體中的任一者競爭之抗體。舉例而言，人類化CTLA-4抗體描述於國際專利申請案第WO2001014424號、第WO2000037504號及美國專利第8,017,114號中；其皆以引用之方式併入本文中。

【0206】 例示性抗CTLA-4抗體係伊匹單抗(ipilimumab) (亦稱為10D1、MDX-010、MDX-101及Yervoy®)或其抗原結合片段及變體(參見例如WO 01/14424)。在其他實施例中，抗體包含伊匹單抗之重鏈及輕鏈CDR或VR。因此，在一個實施例中，抗體包含伊匹單抗之VH區之CDR1、CDR2及CDR3域，及伊匹單抗之VL區之CDR1、CDR2及CDR3

域。在另一實施例中，抗體競爭與同上文所提及之抗體相同之CTLA-4上的抗原決定基結合及/或結合於同上文所提及之抗體相同之CTLA-4上的抗原決定基。在另一實施例中，抗體與上文所提及之抗體具有至少約90%可變區胺基酸序列一致性(例如與伊匹單抗具有至少約90%、95%或99%可變區一致性)。

【0207】 用於調節CTLA-4之其他分子包括諸如描述於美國專利第US5844905號、第US5885796號及國際專利申請案第WO1995001994號及第WO1998042752號中之CTLA-4配位體及受體，所有文獻皆以引用之方式併入本文中；及諸如描述於美國專利第US8329867號中之免疫黏附素，該文獻以引用之方式併入本文中。

4. 手術

【0208】 約60%患有癌症的人將經歷一些類型之手術，其包括預防性、診斷性或階段性、治癒性及姑息性手術。治癒性手術包括切除，其中所有或一部分癌組織經物理移除、切除及/或破壞，且可與其他療法結合使用，諸如本發明實施例之治療、化學療法、放射線療法、激素療法、基因療法、免疫療法及/或替代療法。腫瘤切除係指物理移除腫瘤之至少一部分。除腫瘤切除以外，手術治療亦包括雷射手術、冷凍手術、電手術及顯微鏡控制手術(莫氏手術(Mohs' surgery))。

【0209】 在切除一部分或所有癌細胞、組織或腫瘤後，可在體內形成空腔。治療可藉由用額外抗癌療法對該區域灌注、直接注射或局部施用而實現。可例如每1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天、或每1週、2週、3週、4週及5週或每1個月、2個月、3個月、4個月、5個月、6個月、7個月、8個月、9個月、10個月、11個月或12個月重複此類治療。此等治

療亦可具有不同劑量。

5. 其他藥劑

【0210】 預期其他藥劑可與本發明實施例之某些態樣組合使用以改善治療之治療功效。此等其他藥劑包括影響細胞表面受體及GAP連接之上調之試劑、細胞生長抑制劑及分化劑、細胞黏附抑制劑、提高過度增殖性細胞對細胞凋亡誘導物之靈敏度之藥劑或其他生物藥劑。藉由升高GAP連接之數目增加細胞間信號傳導將增加對相鄰過度增殖性細胞群體之抗過度增殖性效應。在其他實施例中，細胞生長抑制劑或分化劑可與本發明實施例之某些態樣組合使用以改善治療之抗過度增殖性功效。涵蓋細胞黏附抑制劑以改善本發明實施例之功效。細胞黏附抑制劑之實例為局部黏著斑激酶(FAK)抑制劑及洛伐他汀(Lovastatin)。另外預期增加過度增殖性細胞對細胞凋亡之敏感度的其他藥劑，諸如抗體c225，可與本發明實施例之某些態樣組合使用以改善治療功效。

V. 製品或套組

【0211】 本文亦提供包含NK細胞之製品或套組。製品或套組可進一步包含藥品說明書，其包含使用NK細胞來治療個體中之癌症或延遲其進展或增強患有癌症之個體之免疫功能的說明。本文所描述之抗原特異性NK細胞中之任一者可包括在製品或套組中。適合的容器包括例如瓶、小瓶、袋及注射器。容器可由多種材料形成，諸如玻璃、塑膠(諸如聚氯乙烯或聚烯烴)或金屬合金(諸如不鏽鋼或赫史特合金(hastelloy))。在一些實施例中，容器裝有調配物，且容器上或與容器系連之標籤可指示使用說明。製品或套組可進一步包括自商業及使用者角度來看合乎需要之其他材料，包括具有使用說明書之其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針、注射器及

封裝插件。在一些實施例中，製品進一步包括一或多種另一藥劑(例如化學治療劑及抗贅生劑)。用於一或多種藥劑之適合容器包括例如瓶、小瓶、袋及注射器。

VI. 實例

【0212】 包括以下實例以展示本發明之較佳實施例。熟習此項技術者應瞭解，以下實例中所揭示之技術表示本發明人所發現之在本發明實踐中起良好作用之技術，且因此可視為構成用於其實踐之較佳模式。然而，根據本發明，熟習此項技術者應瞭解，在不背離本發明之精神及範疇的情況下可對所揭示之特定實施例作出許多改變且仍獲得相同或類似結果。

實例1 - NK細胞之擴增

【0213】 已研究NK細胞作為潛在的抗腫瘤效應子，但許多障礙限制其治療性利用，主要與該等NK細胞之數目較少有關，因此需要體外擴增以用於授受免疫療法。來自患者的末梢血液NK細胞(PB-NK細胞)或來自成人同種異體供者的末梢血液NK細胞係最常用的；然而，此方法需要與進行白細胞去除術之受者最少3/6 HLA分子匹配的有意願的供者。成人PB NK細胞的另一缺點係授受轉移之後的次佳體內增殖及存留。

【0214】 本發明研究顯示，由CB產生之NK細胞可具有獨特優勢，該等優勢與涉及細胞增殖、細胞活化、細胞黏附、細胞週期及DNA複製之基因之較高表現(圖1A至圖1E)有關。因此，研發出符合GMP的快速擴增方案，以用於使用經工程改造之餵養細胞(諸如表現4-1 BB配位體、IL21或IL-15之餵養細胞)及活化NK共刺激分子之配位體(諸如CD48或CS1)來增殖源自CB之NK細胞。

【0215】 自冷凍並解凍之CB單元或自選自臨床CB庫之新鮮CB單元

分離且擴增NK細胞。本發明策略之獨特態樣係不要求供者與受者之間HLA匹配，從而允許得到真正「現成」的細胞療法產品。在可能的情況下，基於與受者之KIR-配位體錯配來選擇CB單元。

【0216】如圖2中所展示，在2週培養期內，達成中值803倍擴增(範圍346至5547)，此擴增倍數顯著高於用PB NK細胞達成之擴增倍數(中值380倍，範圍99至1515； $P = 0.036$)，表明CB-NK細胞具有固有增殖特性。RE-CB NK細胞呈現功能性表型(圖3)，沒有耗竭之證據，如穿孔蛋白及顆粒酶之高表現以及CD57、KLRG1及PD1之表現缺乏所展示。

【0217】RE-CB NK細胞針對體外腫瘤細胞株具有高度細胞毒性，且在輻照之後的免疫缺陷小鼠中誘導出穩定的抗腫瘤活性(圖4)。另外，在高劑量化學療法聯合自體幹細胞移植，清髓性、非清髓性或降低強度化學療法聯合同種異體幹細胞移植以及基於氟達拉賓之淋巴細胞耗盡化學療法之後，向超過60個患有血液癌之患者投與RE-CB NK細胞產物(1/6至5/6 HLA對偶基因匹配)，且並未展示移植物抗宿主疾病或其他毒性。

【0218】本發明方法經最佳化，以改良進行培養所需之時間及數理邏輯且降低程序之成本。最佳化包含增加培養基體積且由此降低中細胞之濃度。如針對前七天培養之表2A及針對第二週培養之表2B中所展示，與較少培養基及較高細胞濃度(G-Rex100)相比，在較大培養基體積及降低之細胞濃度(G-Rex100M)的情況下達成顯著更好的倍數擴增。最佳程序需要更少生物反應器，且產生相同或較高NK細胞劑量需要較少細胞。在第7天表現出此情形，此時需要少四倍的細胞來接種各G-Rex 100M以達成相同劑量。在第0至7天，不需要干預培養物(與先前程序至少需要加料兩次相比)。

【0219】 利用最佳程序，在第7至14天，細胞不需要分裂且僅加料兩次。使用較少培養基及細胞介素以及較少技術專家時間，其皆節省金錢且改良數理邏輯。另外，在第7至14天，培養物中需要最少干預(僅添加兩次IL2)，此不僅節省技術時間而且明顯降低微生物污染的可能性。此情形與現今使用的最新NK細胞擴增程序不同，在最新NK細胞擴增程序中，培養物通常在反覆加料的情況下每隔一天進行分裂，從而增加了微生物污染風險。如表2C中所概述，最佳方法將技術人員時間減少29%。

表2A. 第0至7天(CB-NK)											
TNC 接種 /G- Rex第 0天(x 10e6)	G-Rex 100						G-Rex 100M				
	TNC 第7天 (x 10e6)	擴增 倍數	所使用之試劑及供應物				擴增 倍數	得到與G-Rex 100相同的TNC所需之 試劑及供應物			
			G-Rex 100編號	培養基 (L)	血清 (mL)	IL-2 (x 1000單 元)		G-Rex 100 M 編號	培養基 (L)	血清 (mL)	IL-2 (x 1000單 元)
40	9450	39	6	2.7	270	810	56	4	4.0	400	400
40	10500	44	6	2.7	270	810	87	3	3.0	300	300
40	5908	30	5	2.5	250	675	53	3	3.0	300	300

表2B. 第7至14天

輸注 X2所 需的 TNC (X 10E6)	TNC 接種 /G- Rex第 7天(x 10e6)	擴 增 倍 數	G-Rex 100				TNC 接種 /G- Rex第 7天(x 10e6)	擴 增 倍 數	G-Rex 100M			
			所使用之試劑及供應物						所使用之試劑及供應物			
			G- Rex 100編 號	培 養 基 (L)	血清 (mL)	IL-2 (x 1000 單 元)			所 需 的G- Rex 100M 編號	培 養 基 (L)	血清 (mL)	IL-2 (x 1000 單 元)
			CB-NK (第7至14天)									
18164	200	53	12	11	1100	1370	50	82	5.0	5	500	500
15006	200	37	14	10	1000	1270	50	58	5.0	5	500	500
16708	200	57	15	11	1100	1370	50	96	4.0	4	400	400

表2C			
程序	技術時間(小時)		節省之技術時 間(小時)%
	G-Rex 100	G-Rex 100M	
CB-NK	70	50	29

【0220】 除經最佳化之培養數理邏輯、成本及微生物污染風險降低以外，本發明方法亦具有若干其他新穎且重要的特徵。如圖2中所展示，在2週培養期內，達成中值803倍擴增(範圍346至5547)，此擴增倍數顯著高於用PB NK細胞達成之擴增倍數(中值380倍，範圍99至1515；P = 0.036)，表明CB-NK細胞具有固有增殖特性。RE-CB NK細胞呈現功能性表型(圖3)，沒有「耗竭」之證據，如穿孔蛋白 α 及顆粒酶之高表現以及CD57、KLRG1及PD1之表現缺乏所展示。RE-CB NK細胞針對體外腫瘤細胞株具有高度細胞毒性，且在輻照之後的免疫缺陷小鼠中誘導出穩定的抗腫瘤活性(圖4)。另外，在高劑量化學療法聯合自體幹細胞移植，清髓性、非清髓性或降低強度化學療法聯合同種異體幹細胞移植以及基於氟達拉賓之淋巴細胞耗盡化學療法之後，向超過80個患有血液癌之患者投與快速擴增之(RE)-CB NK細胞產物(1/6至5/6 HLA對偶基因匹配)，其不具有移植物抗宿主疾病或其他毒性。更特定言之，60個患有多發性骨髓瘤之患者安全地接受了與化學療法(美法侖及來那度胺)及自體移植結合之CB-NK細胞。如表3中所示，42個接受CB NK細胞的患有多發性骨髓瘤(MM)之患者及高風險MM患者(參加方案2011-0379)相比於153個接受標準護理(SOC)與美法侖及自體移植之MM及HRMM患者經歷較高的 $\geq$ 極好部分反應(VGPR)及完全反應(CR)率。

表3. 多發性骨髓瘤及高風險多發性骨髓瘤患者之反應率

反應	MM患者 (2011-0379與SOC)	HRMM患者 (2011-0379與SOC)
$\geq$ VGPR (%)	69與54 (p=0.07)	80與42 (p=0.01)
sCR/CR (%)	29與15 (p=0.04)	20與5 (p=0.07)

【0221】 單株抗體埃羅妥珠單抗(elotuzamab)刺激NK細胞且使該等NK細胞靶向多發性骨髓瘤細胞，如下：

- 埃羅妥珠單抗經由CD16結合且藉由直接連接NK細胞上之SLAMF7而增強NK細胞抗體依賴性細胞毒性(ADCC)
- 體外擴增之NK細胞相比於非擴增細胞展示較高的埃羅妥珠單抗介導之細胞毒性
- 向來那度胺添加埃羅妥珠單抗進一步增強針對SLAMF7hi抗NK細胞骨髓瘤細胞株之CB-NK ADCC

【0222】 基於此資料，向化學療法製劑(美法侖及來那度胺)中添加埃羅妥珠單抗，且用CB NK細胞來治療15個其他HRMM患者。如表4中所展示，與並未接受NK細胞之患者相比，接受NK細胞之此等高風險患者之≥VGPR及CR率更高，且接受NK細胞加埃羅妥珠單抗之彼等患者之≥VGPR及CR率甚至更高。在第100天，針對接受NK細胞之兩個組而言，骨髓切片檢查之微小殘留病(MRD)陰性反應率亦係優異的。迄今為止，所有15個患者均存活，且僅一個患者在移植一年時具有進行性骨髓瘤跡象；此患者係在第100天時骨髓呈MRD陽性之極少患者中的一個。15個患者中十四個保持沒有進展。顯而易見，本發明之基於CB NK之療法對於患有高風險多發性骨髓瘤之患者有效。

表4. 接受含或不含埃羅妥珠單抗之NK細胞之患者的反應率

HRMM患者 D ₁₀₀	SOC ASCT (n=66)	1/2期 不含埃羅妥珠單抗 (n=15)	2期實驗 含埃羅妥珠單抗 (n=15)
≥ VGPR (%)	42*	80*	93
sCR/CR (%)	5	20**	73**
MRD陰性(%)	26	53	73

* p值= 0.011；** p值= 0.0092

【0223】 針對另一試驗(2015-0751)，14個患有難治癒/復發性非霍奇金淋巴瘤之患者在不考慮與患者之HLA匹配的情況下接受經擴增之CB

NK細胞。所有此等患者均安全地接受了CB NK細胞，不具有輸注性或其他毒性且不具有任何GVHD。超過一半的此等難治癒患者(57%)達成完全緩解，且在此治療後一年保持無進展。此等結果強調了如下事實：此等CB NK細胞可用作現成的產物，而無需對患者或CB單元進行耗時且昂貴的HLA分型。針對第三試驗(2012-0819)，19個患者接受了與同種異體移植結合之CB NK細胞。彼等患者對此等細胞產物之耐受極佳，且看起來與接受類似治療但未接受CB NK細胞之患者相比具有更少的白血病復發。此等資料證實經擴增之CB NK細胞在各種不同臨床配置中之安全性及功效。

【0224】 因此，本發明方法可用於擴增來自臍帶血之NK細胞，以獲得符合GMP之臨床劑量。

* * *

【0225】 本文所揭示及主張之所有方法可在不依據本發明進行不當實驗之情況下進行及執行。雖然已根據較佳實施例描述本發明之組合物及方法，但熟習此項技術者將顯而易見，變化可在不背離本發明之概念、精神及範疇的情況下應用於本文所描述之方法中及方法之步驟或步驟順序中。更確切而言，顯而易知化學上及生理學上均相關之某些藥劑可取代本文所描述之藥劑，同時達成相同或類似結果。對熟習此項技術者顯而易見的所有此類類似取代及修改視為在由隨附申請專利範圍所定義之本發明之精神、範疇及概念內。

參考文獻

以下參考文獻特定地以引用的方式併入本文中，以便其對本文所述內容提供例示性程序或其他細節補充。

Austin-Ward and Villaseca, *Revista Medica de Chile*, 126(7):838-845, 1998.

Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994.

Bennekov *et al.*, *Mt. Sinai J. Med.* 71 (2): 86-93, 2004.

Bukowski *et al.*, *Clinical Cancer Res.*, 4(10):2337-2347, 1998.

Camacho *et al.* *J Clin Oncology* 22(145): Abstract No. 2505 (antibody CP-675206), 2004.

Chothia *et al.*, *EMBO J.* 7:3745, 1988.

Christodoulides *et al.*, *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-3037, 1998.

Cohen *et al.* *J Immunol.* 175:5799-5808, 2005.

Davidson *et al.*, *J. Immunother.*, 21(5):389-398, 1998.

Davila *et al.* *PLoS ONE* 8(4): e61338, 2013.

European patent application number EP2537416

Fedorov *et al.*, *Sci. Transl. Medicine*, 5(215), 2013.

Frolet *et al.*, *BMC Microbiol.* 10:190 (2010).

Gaj *et al.*, *Trends in Biotechnology* 31(7), 397-405, 2013.

Hanibuchi *et al.*, *Int. J. Cancer*, 78(4):480-485, 1998.

Heemskerk *et al.* *Hum Gene Ther.* 19:496-510, 2008.

Hellstrand *et al.*, *Acta Oncologica*, 37(4):347-353, 1998.

Hollander, *Front. Immun.*, 3:3, 2012.

Hui and Hashimoto, *Infection Immun.*, 66(11):5329-5336, 1998.

Hurwitz *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* 95(17): 10067-10071, 1998.

International Patent Publication No. WO1995001994

International Patent Publication No. WO1998042752

International Patent Publication No. WO2000037504

International Patent Publication No. WO200014257

International Patent Publication No. WO2001014424

International Patent Publication No. WO2006/121168

International Patent Publication No. WO2007/103009

International Patent Publication No. WO2009/101611

International Patent Publication No. WO2009/114335

International Patent Publication No. WO2010/027827

International Patent Publication No. WO2011/066342

International Patent Publication No. WO2012/129514

International Patent Publication No. WO2013/071154

International Patent Publication No. WO2013/123061

International Patent Publication No. WO2013/166321

International Patent Publication No. WO2013126726

International Patent Publication No. WO2014/055668

International Patent Publication No. WO2014031687

International Patent Publication No. WO2015016718

International Patent Publication No. WO99/40188

Janeway *et al*, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 433, 1997.

Johnson *et al*. *Blood* 114:535-46, 2009.

- Jores *et al.*, *PNAS U.S.A.* 87:9138, 1990.
- Kim *et al.*, *Nature Biotechnology* 31, 251-258, 2013.
- Leal, M., *Ann N Y Acad Sci* 1321, 41-54, 2014.
- Lefranc *et al.*, *Dev. Comp. Immunol.* 27:55, 2003.
- Linnemann, C. *et al.* *Nat Med* 21, 81-85, 2015.
- Lockey *et al.*, *Front. Biosci.* 13:5916-27, 2008.
- Loewendorf *et al.*, *J. Intern. Med.* 267(5):483-501, 2010.
- Marschall *et al.*, *Future Microbiol.* 4:731-42, 2009.
- Mokyr *et al.* *Cancer Res* 58:5301-5304, 1998.
- Pardoll, *Nat Rev Cancer*, 12(4): 252-64, 2012
- Parkhurst *et al.* *Clin Cancer Res.* 15: 169-180, 2009.
- Qin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24):14411-14416, 1998.
- Rieder *et al.*, *J. Interferon Cytokine Res.* (9):499-509, 2009.
- Rykman, *et al.*, *J. Virol.* 80(2):710-22, 2006.
- Sadelain *et al.*, *Cancer Discov.* 3(4): 388-398, 2013.
- Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed.,
Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001.
- Singh *et al.*, *Cancer Research*, 68:2961-2971, 2008.
- Singh *et al.*, *Cancer Research*, 71:3516-3527, 2011.
- Turtle *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.*, 24(5): 633-39, 2012.
- U.S. Patent No. 4,870,287
- U.S. Patent No. 5,739,169
- U.S. Patent No. 5,760,395

U.S. Patent No. 5,801,005
U.S. Patent No. 5,824,311
U.S. Patent No. 5,830,880
U.S. Patent No. 5,844,905
U.S. Patent No. 5,846,945
U.S. Patent No. 5,885,796
U.S. Patent No. 5,994,136
U.S. Patent No. 6,013,516
U.S. Patent No. 6,103,470
U.S. Patent No. 6,207,156
U.S. Patent No. 6,225,042
U.S. Patent No. 6,355,479
U.S. Patent No. 6,362,001
U.S. Patent No. 6,410,319
U.S. Patent No. 6,416,998
U.S. Patent No. 6,544,518
U.S. Patent No. 6,790,662
U.S. Patent No. 7,109,304
U.S. Patent No. 7,442,548
U.S. Patent No. 7,446,190
U.S. Patent No. 7,598,364
U.S. Patent No. 7,989,425
U.S. Patent No. 8,008,449

U.S. Patent No. 8,017,114
U.S. Patent No. 8,058,065
U.S. Patent No. 8,071,369
U.S. Patent No. 8,119,129
U.S. Patent No. 8,129,187
U.S. Patent No. 8,183,038
U.S. Patent No. 8,268,620
U.S. Patent No. 8,329,867
U.S. Patent No. 8,354,509
U.S. Patent No. 8,546,140
U.S. Patent No. 8,691,574
U.S. Patent No. 8,735,553
U.S. Patent No. 8,741,648
U.S. Patent No. 8,900,871
U.S. Patent No. 9,175,268
U.S. Patent Publication No. 2010/0210014
U.S. Patent Publication No. 12/478,154
U.S. Patent Publication No. 2002131960
U.S. Patent Publication No. 2003/0211603
U.S. Patent Publication No. 2005/0260186
U.S. Patent Publication No. 2006/0104968
U.S. Patent Publication No. 2009/0004142
U.S. Patent Publication No. 2009/0017000

U.S. Patent Publication No. 2009/0246875

U.S. Patent Publication No. 2011/0104125

U.S. Patent Publication No. 2011/0301073

U.S. Patent Publication No. 20110008369

U.S. Patent Publication No. 2012/0276636

U.S. Patent Publication No. 2013/0315884

U.S. Patent Publication No. 20130149337

U.S. Patent Publication No. 2013287748

U.S. Patent Publication No. 2014/0120622

U.S. Patent Publication No. 2014022021

U.S. Patent Publication No. 20140294898

Varela-Rohena *et al.* *Nat Med.* 14: 1390-1395, 2008.

Wu *et al.*, *Cancer*, 18(2): 160-75, 2012.

Zysk *et al.*, *Infect. Immun.* 68(6):3740-43, 2000.

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種用於擴增自然殺手(NK)細胞之體外方法，其包含：

(a)自臍帶血獲得單核細胞(MNC)之起始群體；

(b)在抗原呈現細胞(APC)及IL-2存在下刺激該等MNC；以及

(c)用APC再刺激該等細胞以產生經擴增之NK細胞，其中該方法在生物反應器中進行且符合良好作業規範(GMP)。

【請求項2】

如請求項1之方法，其中該方法進一步包含使針對CD3呈陽性之細胞耗盡。

【請求項3】

如請求項2之方法，其中該耗盡步驟在步驟(b)與(c)之間進行。

【請求項4】

如請求項3之方法，其中該等細胞自該生物反應器移除。

【請求項5】

如請求項1之方法，其中自臍帶血獲得MNC之該起始群體包含在聚葡萄糖、人血清白蛋白(HSA)、DNAse及/或氯化鎂存在下解凍臍帶血。

【請求項6】

如請求項1之方法，其中自臍帶血獲得MNC之該起始群體包含在聚葡萄糖及DNAse存在下解凍臍帶血。

【請求項7】

如請求項5之方法，其中該臍帶血在10%聚葡萄糖存在下經洗滌。

【請求項8】

如請求項5或7之方法，其中該臍帶血在氯化鎂存在下懸浮。

【請求項9】

如請求項8之方法，其中該氯化鎂之濃度為200 mM。

【請求項10】

如請求項1至9中任一項之方法，其中獲得步驟包含進行菲科爾(ficoll)密度梯度離心以獲得單核細胞(MNC)。

【請求項11】

如請求項1至10中任一項之方法，其中該方法不包含在步驟(b)期間移除或添加任何培養基組分。

【請求項12】

如請求項1至11中任一項之方法，其中該生物反應器為透氣式生物反應器。

【請求項13】

如請求項12之方法，其中該透氣式生物反應器為G-Rex100M。

【請求項14】

如請求項13之方法，其中步驟(b)之該刺激步驟在3至5 L之培養基中進行。

【請求項15】

如請求項1至13中任一項之方法，其中該等APC經 γ 輻照。

【請求項16】

如請求項15之方法，其中該等APC經工程改造成表現膜結合型IL-21(mbIL-21)。

【請求項17】

如請求項1至16中任一項之方法，其中該等APC經工程改造成表現IL-21、IL-15、IL-7、IL-18及/或IL-2。

【請求項18】

如請求項1至16中任一項之方法，其中該等MNC及APC以1:2之比率進行培養。

【請求項19】

如請求項1至18中任一項之方法，其中該IL-2之濃度為50至200 IU/mL。

【請求項20】

如請求項19之方法，其中該IL-2之濃度為100 IU/mL。

【請求項21】

如請求項1至20中任一項之方法，其中該IL-2每2至3天補給一次。

【請求項22】

如請求項1至20中任一項之方法，其中步驟(b)進行持續6至8天。

【請求項23】

如請求項22之方法，其中步驟(b)進行持續7天。

【請求項24】

如請求項1至23中任一項之方法，其中步驟(b)不包含使該等細胞進行分裂。

【請求項25】

如請求項24之方法，其中向該等細胞中添加兩次IL-2。

【請求項26】

如請求項1至25中任一項之方法，其中該方法包含使用3、4、5或6個

生物反應器。

【請求項27】

如請求項26之方法，其中該方法包含使用少於10個生物反應器。

【請求項28】

如請求項1至27中任一項之方法，其中該等NK細胞擴增至至少500倍、800倍、1000倍、3000倍或5000倍。

【請求項29】

如請求項1至28中任一項之方法，其中與靜態液體培養相比，在該生物反應器中培養該等NK細胞產生超過1000倍的NK細胞。

【請求項30】

如請求項1至29中任一項之方法，其中該方法不包含人白血球抗原(HLA)匹配。

【請求項31】

如請求項30之方法，其中NK細胞之該起始群體並非獲自單倍體相合供者。

【請求項32】

如請求項1至31中任一項之方法，其中該方法係進行少於15天。

【請求項33】

如請求項32之方法，其中該方法係進行14天。

【請求項34】

如請求項1至33中任一項之方法，其中該等經擴增之NK細胞與自末梢血液擴增之NK細胞相比具有增強的抗腫瘤活性。

【請求項35】

如請求項34之方法，其中該等經擴增之NK細胞與自末梢血液擴增之NK細胞相比具有細胞週期、細胞分裂及/或DNA複製基因之較高表現。

【請求項36】

如請求項1至34中任一項之方法，其中該等經擴增之NK細胞與自末梢血液擴增之NK細胞相比具有較高增殖能力。

【請求項37】

如請求項1至36中任一項之方法，其中該等經擴增之NK細胞並未顯示耗竭。

【請求項38】

如請求項37之方法，其中該耗竭藉由量測穿孔蛋白、顆粒酶、CD57、KLRG1及PD1之表現來偵測。

【請求項39】

如請求項38之方法，其中該等經擴增之NK細胞具有穿孔蛋白及顆粒酶之高表現。

【請求項40】

如請求項38之方法，其中該等經擴增之NK細胞具有CD57、KLRG1及PD1之低表現或不表現。

【請求項41】

如請求項1至40中任一項之方法，其中該等經擴增之NK細胞包含臨床相關劑量。

【請求項42】

如請求項1至41中任一項之方法，其中該臍帶血為冷凍臍帶血。

【請求項43】

如請求項42之方法，其中該冷凍臍帶血業經針對感染性疾病進行測試。

【請求項44】

如請求項1至43中任一項之方法，其中該臍帶血為彙集臍帶血。

【請求項45】

如請求項44之方法，其中該臍帶血由3、4、5、6、7或8個個體臍帶血單元彙集。

【請求項46】

如請求項1至45中任一項之方法，其中該等NK細胞並非自體的。

【請求項47】

如請求項1至46中任一項之方法，其中該等NK細胞並非同種異體的。

【請求項48】

如請求項1至47中任一項之方法，其中該等APC為通用抗原呈現細胞(uAPC)。

【請求項49】

如請求項48之方法，其中該等uAPC經工程改造成表現(1) CD48及/或CS1 (CD319)；(2)膜結合型介白素-21 (mbIL-21)；及(3) 41BB配位體(41BBL)。

【請求項50】

如請求項48之方法，其中該等uAPC表現CD48。

【請求項51】

如請求項48之方法，其中該等uAPC表現CS1。

【請求項52】

如請求項48之方法，其中該等uAPC表現CD48及CS1。

【請求項53】

如請求項48之方法，其中該等uAPC基本上不表現內源性HLA I類、HLA II類或CD1d分子。

【請求項54】

如請求項48之方法，其中該等uAPC表現ICAM-1 (CD54)及LFA-3 (CD58)。

【請求項55】

如請求項1至54中任一項之方法，其中該等uAPC進一步定義為白血病細胞衍生之aAPC。

【請求項56】

如請求項55之方法，其中該等白血病細胞衍生之aAPC進一步定義為K562細胞。

【請求項57】

如請求項1至56中任一項之方法，其進一步包含冷凍保存該等經擴增之NK細胞。

【請求項58】

一種醫藥組合物，其包含由請求項1至57中任一項所產生之NK細胞群體及醫藥學上可接受之載劑。

【請求項59】

一種組合物，其包含有效量的由請求項1至57中任一項產生之NK細胞，該組合物適用於治療個體之疾病或病症。

【請求項60】

一種包含有效量的由請求項1至57中任一項所產生之NK細胞之組合物的用途，其用於治療個體之免疫相關病症。

【請求項61】

一種用於治療疾病或病症之方法，其包含向個體投與有效量的如請求項1至57中任一項之經擴增之NK細胞。

【請求項62】

如請求項61之方法，其進一步包含投與化學療法。

【請求項63】

如請求項62之方法，其中該化學療法在該等經擴增之NK細胞之前投與。

【請求項64】

如請求項62或63之方法，其中該化學療法係清髓性的。

【請求項65】

如請求項62或63之方法，其中該化學療法係非清髓性的。

【請求項66】

如請求項62或63之方法，其中該化學療法為淋巴細胞耗盡化學療法。

【請求項67】

如請求項66之方法，其中該淋巴細胞耗盡化學療法為基於氟達拉賓(fludarabine)之淋巴細胞耗盡化學療法。

【請求項68】

如請求項62至67中任一項之方法，其中該化學療法為來那度胺

(lenalidomide)。

【請求項69】

如請求項62至68中任一項之方法，其中該方法不包含進行HLA匹配。

【請求項70】

如請求項62至69中任一項之方法，其中該疾病或病症為免疫相關病症。

【請求項71】

如請求項70之方法，其中該免疫相關病症為自體免疫病症、移植物抗宿主疾病、同種異體移植排斥反應或發炎性病況。

【請求項72】

如請求項61至69中任一項之方法，其中該疾病或病症為癌症。

【請求項73】

如請求項72之方法，其中該癌症為多發性骨髓瘤。

【請求項74】

如請求項61至73中任一項之方法，其中該個體並未出現移植物抗宿主疾病或其他毒性。

【請求項75】

如請求項61至74中任一項之方法，其進一步包含投與有效量的至少第二治療劑。

【請求項76】

如請求項75之方法，其中該至少第二治療劑包含化學療法、免疫療法、手術、放射線療法或生物療法。

【請求項77】

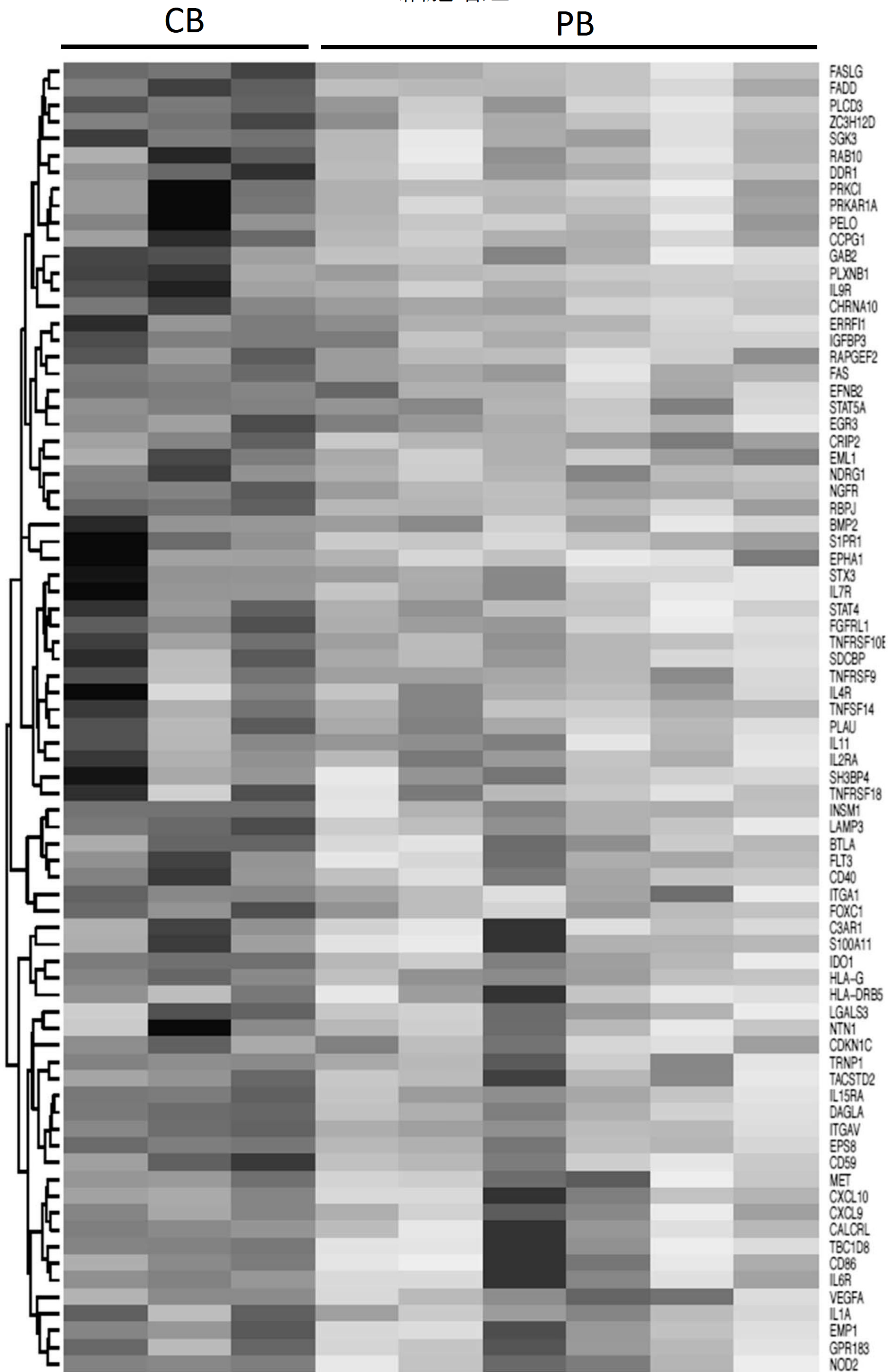
如請求項75之方法，其中該等NK細胞及/或該至少第二治療劑係經靜脈內、腹膜內、氣管內、瘤內、肌內、內窺鏡方式、病灶內、經皮、皮下、區域性投與或藉由直接注射或灌注來投與。

【請求項78】

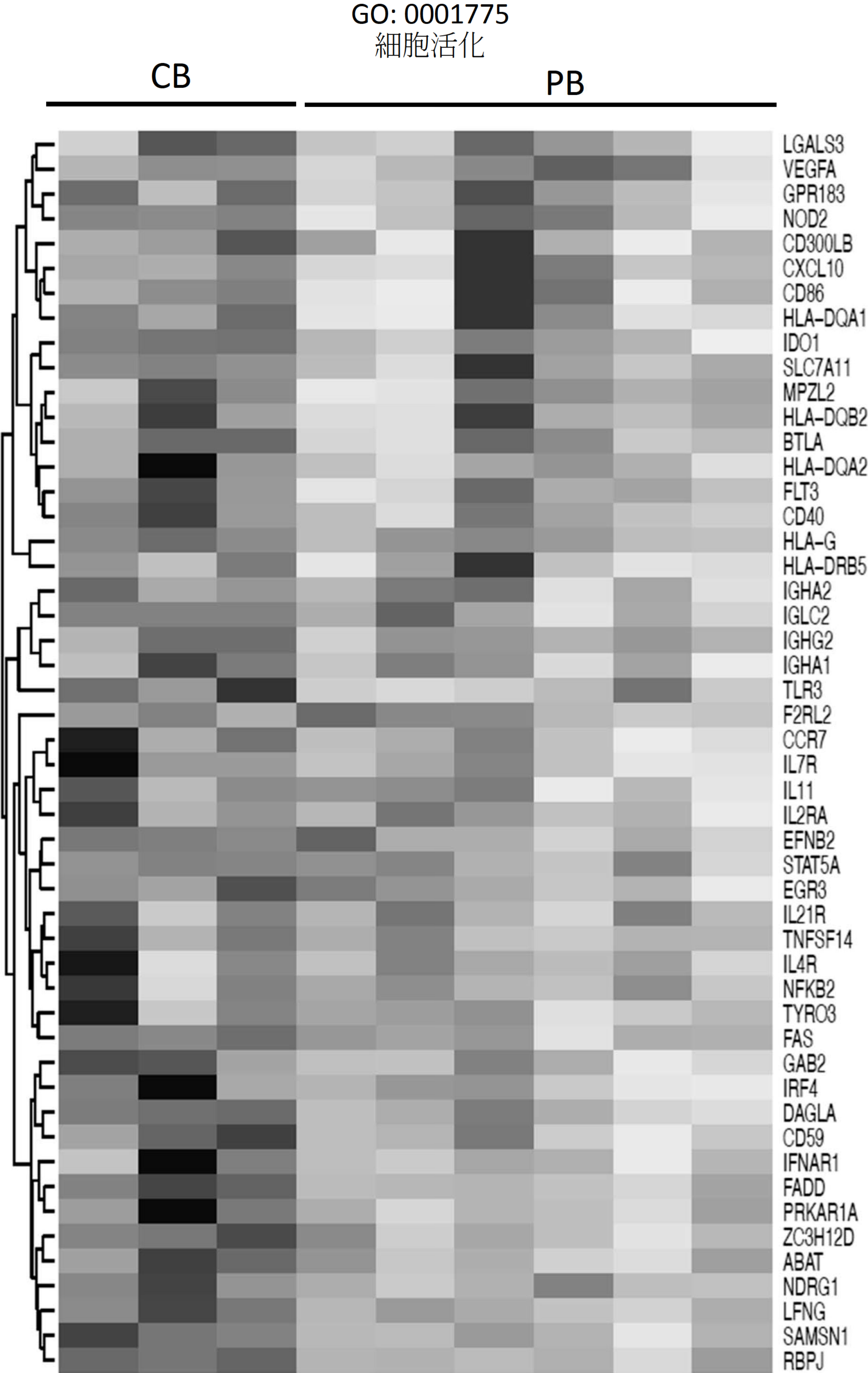
如請求項75至77中任一項之方法，其中該第二治療劑包含埃羅妥珠單抗(elotuzamab)。

【發明圖式】

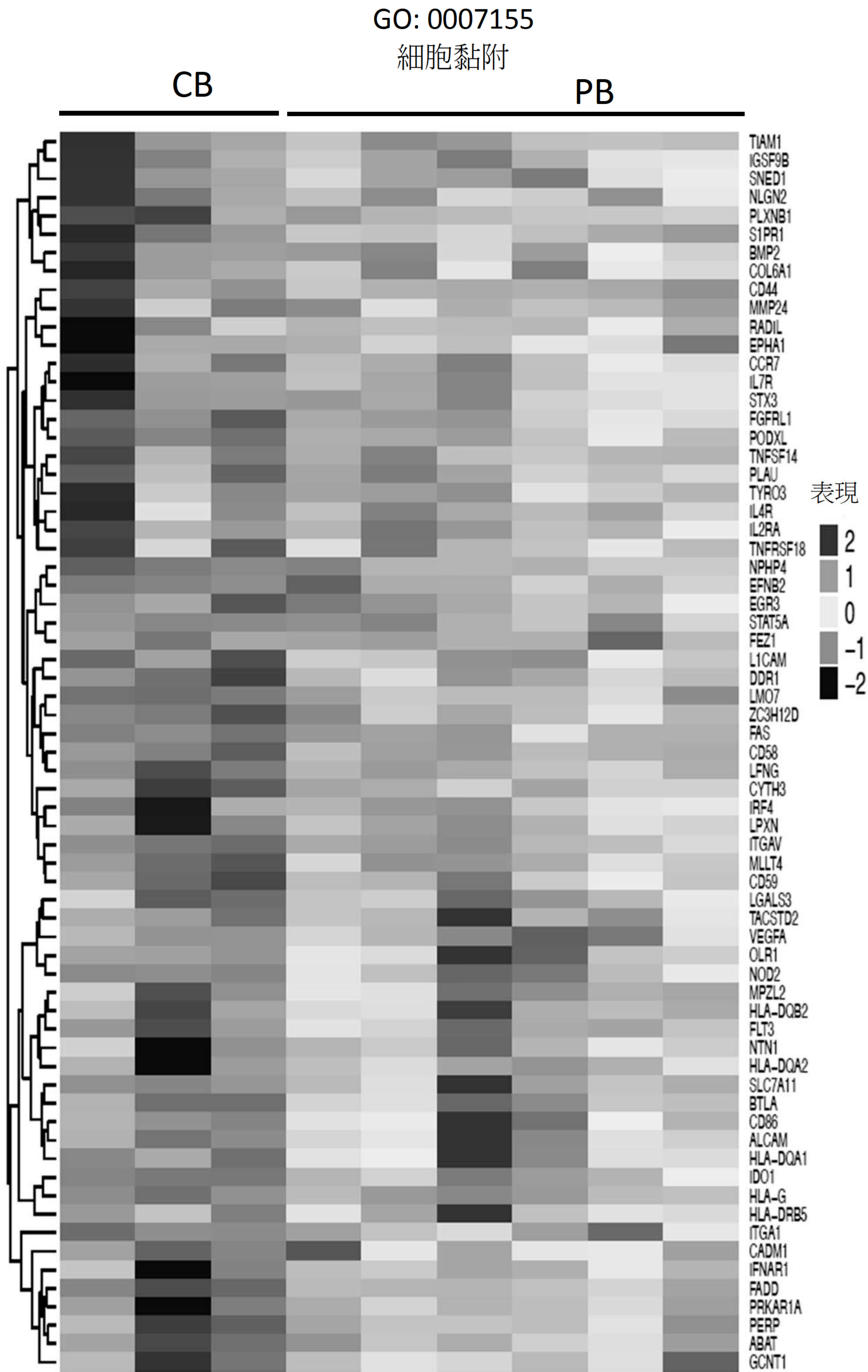
GO: 0008283
細胞增殖



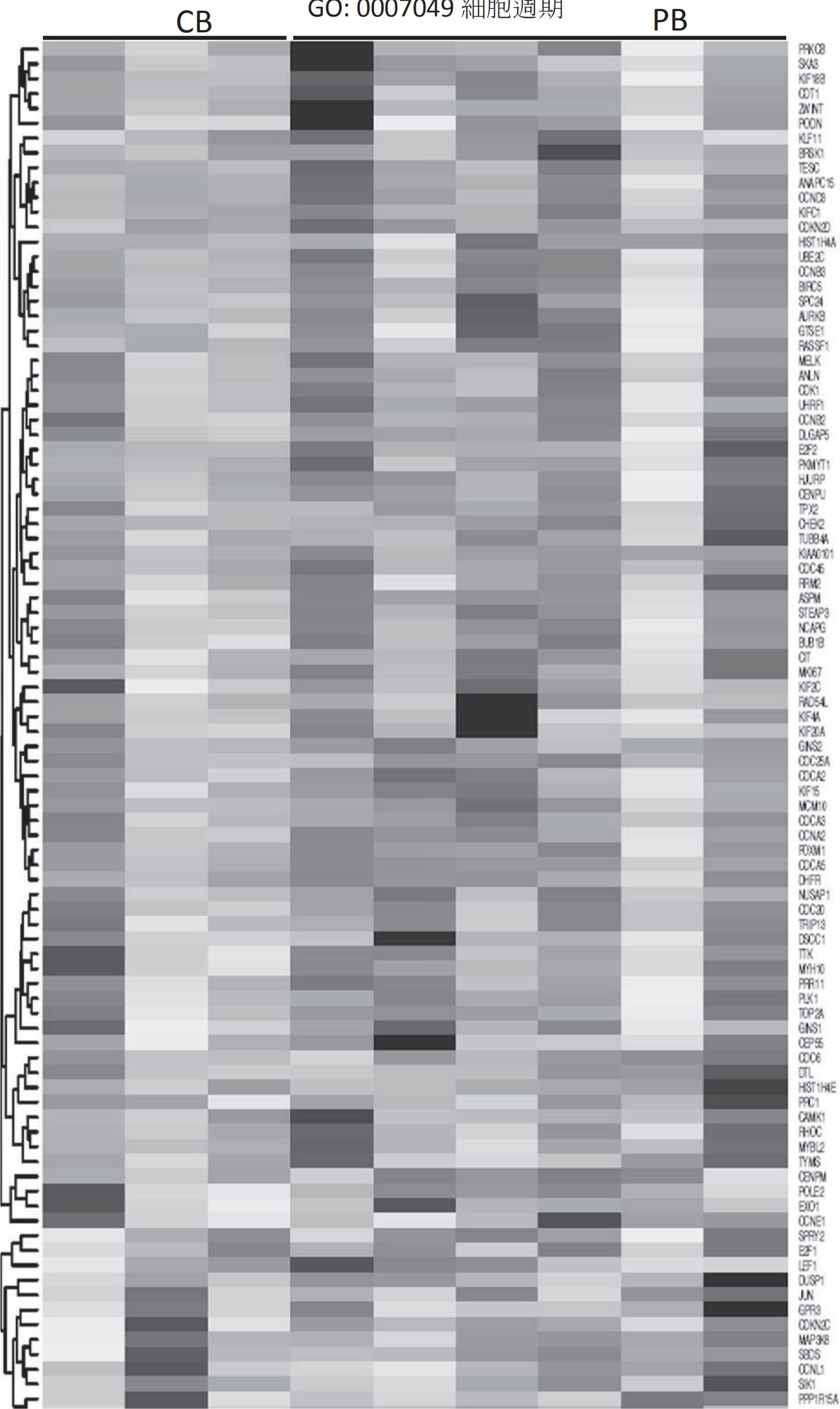
【圖1A】



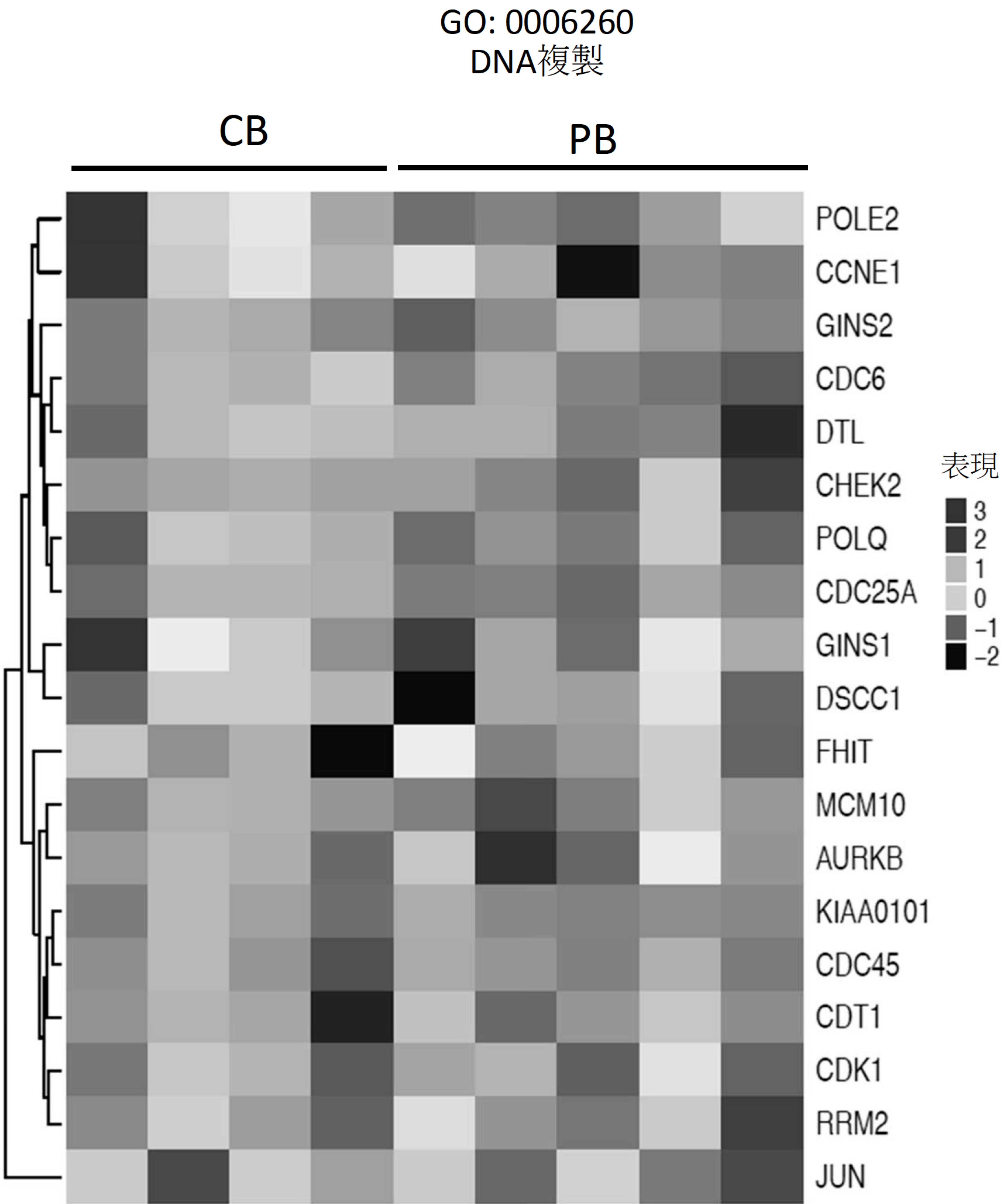
【圖1B】



【圖1C】

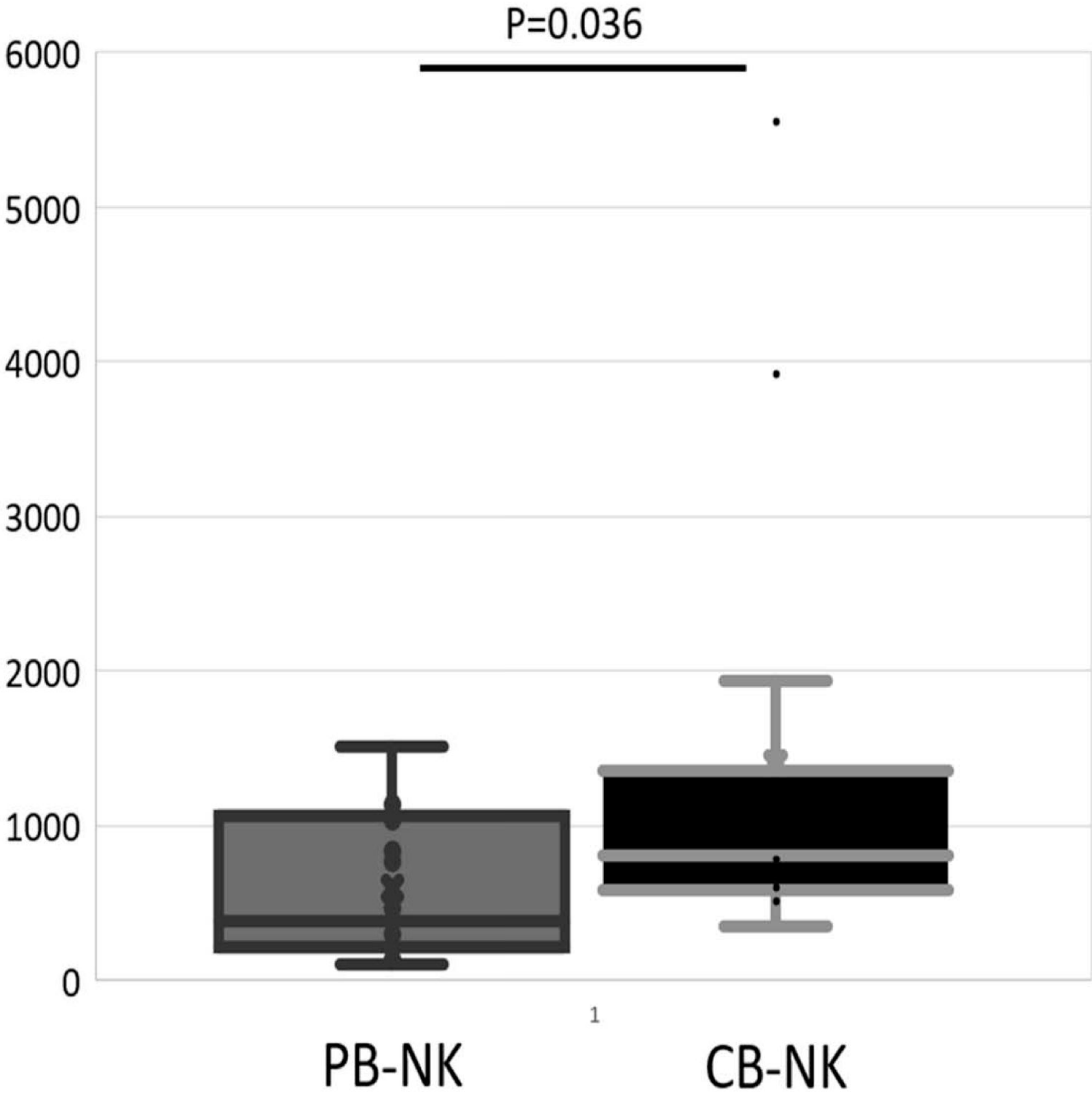


【圖1D】



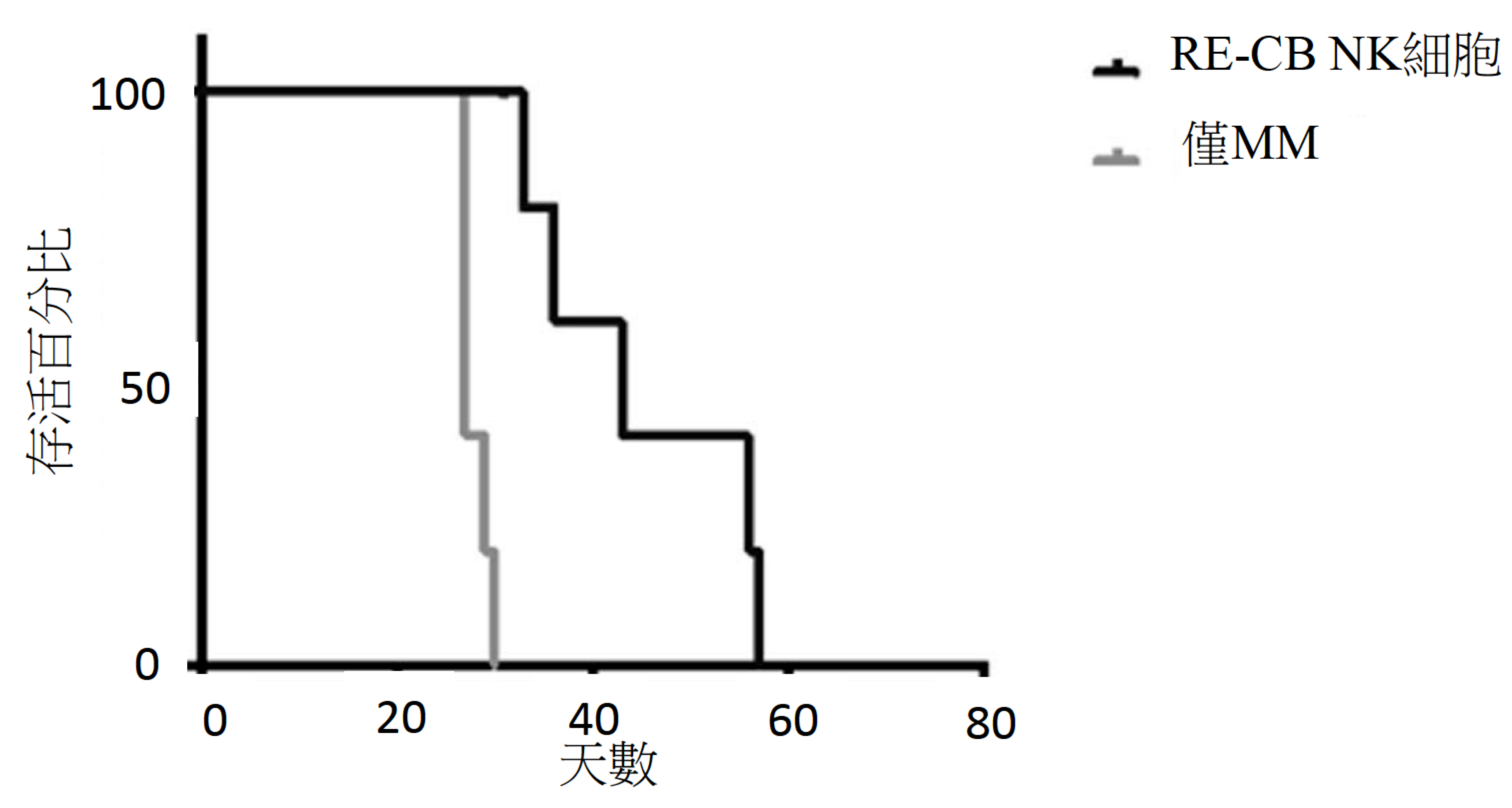
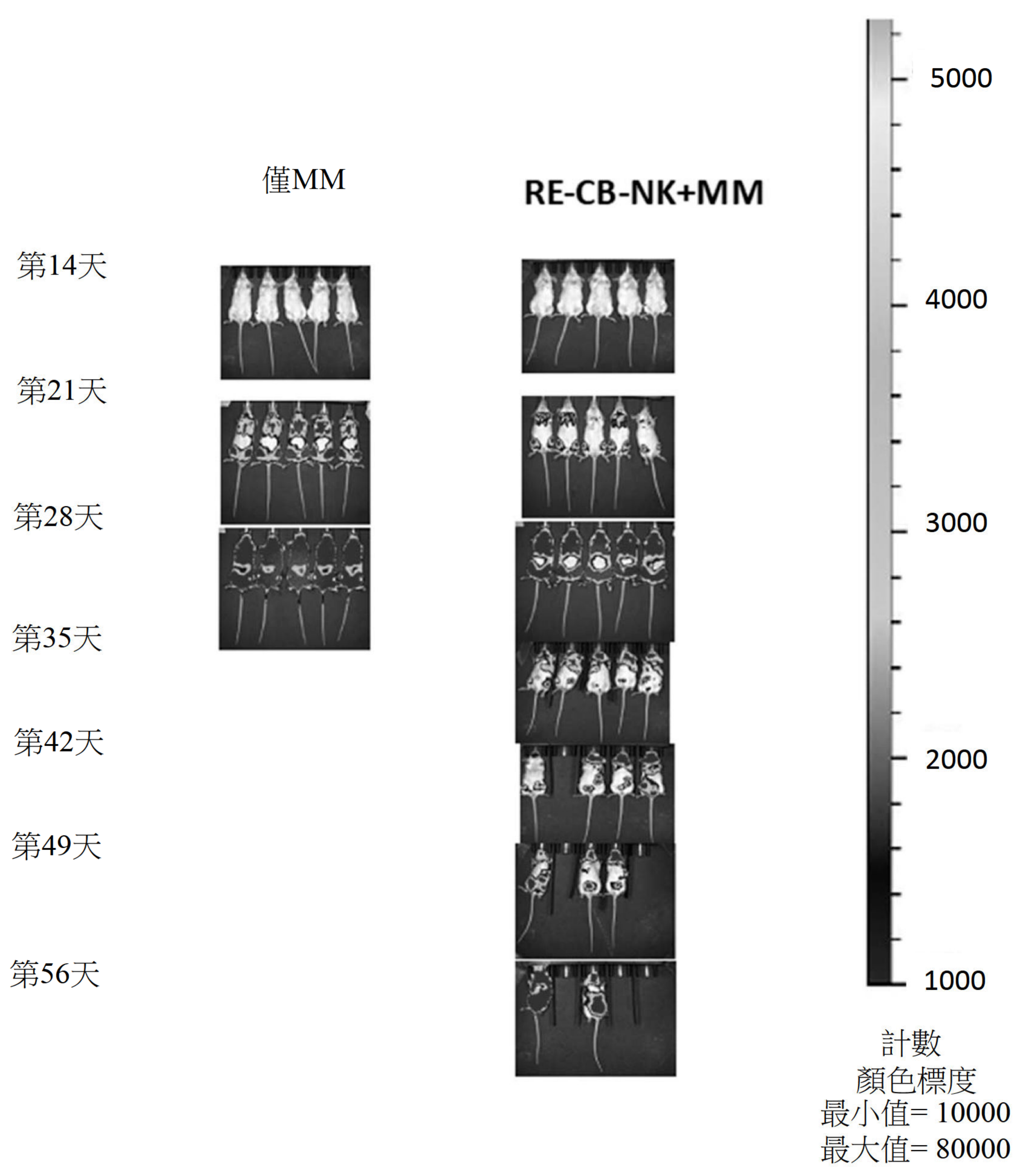
【圖1E】

擴增倍數



【圖2】





【圖4】

【發明說明書】**【中文發明名稱】**

用於體外擴增天然殺手細胞之方法及其用途

【英文發明名稱】

METHODS FOR EX VIVO EXPANSION OF NATURAL KILLER
CELLS AND USE THEREOF

【技術領域】

【0001】 本發明大體上係關於細胞生物學、分子生物學、免疫學及醫學之領域。更特定言之，本發明係關於用於擴增自然殺手(NK)細胞之方法及其用途。

【先前技術】

【0002】 對於罹患數種不同的血液惡性腫瘤及實體瘤的患者而言，自然殺手(NK)細胞正成為細胞免疫療法令人興奮的來源；然而，大部分使用授受轉移之NK細胞的研究受以下因素限制：需要自體性、人類白血球抗原(HLA)匹配供者或單倍體相合供者；擴增程序冗長且複雜；經輸注細胞存留不足且在體內擴增性差；以及不如人意的抗腫瘤活性。

【0003】 用於產生NK細胞的理想細胞源尚未完全明瞭。來自患者的末梢血液NK細胞(PB-NK細胞) (亦即，自體細胞)或來自成人同種異體供者的末梢血液NK細胞係最常用的；然而，此方法需要與進行白細胞去除術之受者最少3/6 HLA分子匹配的有意願的供者。成人PB NK細胞的另一缺點係授受轉移之後的次佳體內增殖及存留。因此，臍帶血(CB)是造血細胞產生NK細胞的具吸引力之來源，因為全世界CB銀行中超過一百萬CB單位係經冷凍且隨時可用之龐大全球庫存。

【0004】 已顯示CB-NK細胞具有固有特性，包括與細胞週期、細胞分裂及DNA複製有關的基因的較高表現，該等固有特性使得針對授受療法而言，CB-NK細胞優於自末梢血液擴增之NK細胞。廣泛使用CB之阻礙係難以以臨床相關的劑量自冷凍CB單元擴增功能性NK細胞。因此，仍然需要自CB擴增NK細胞的經改良方法。

【發明內容】

【0005】 在一個實施例中，本發明提供一種用於擴增自然殺手(NK)細胞之體外方法，其包含：在抗原呈現細胞(APC)及IL-2存在下刺激來自臍帶血之單核細胞(MNC)；以及用APC再刺激該等細胞以產生經擴增之NK細胞，其中在至少一些情況下，該方法在生物反應器中進行。刺激步驟可將MNC導向NK細胞。再刺激步驟可或可不包含IL-2之存在。在特定態樣中，該方法不包含在刺激步驟期間移除或添加任何培養基組分。在特定態樣中，該方法在某一時間範圍內進行，諸如少於15天，例如14天。

【0006】 在某一實施例中，本發明提供一種用於擴增自然殺手(NK)細胞之體外方法，其包含：(a)自臍帶血獲得單核細胞(MNC)之起始群體；(b)在抗原呈現細胞(APC)及IL-2存在下刺激MNC；以及(c)用APC再刺激該等細胞以產生經擴增之NK細胞，其中該方法在生物反應器中進行且符合良好作業規範(GMP)。步驟(b)之刺激可將MNC導向NK細胞。步驟(c)可或可不包含IL-2之存在。在特定態樣中，該方法不包含在步驟(b)期間移除或添加任何培養基組分。在特定態樣中，該方法係進行少於15天，諸如進行14天。

【0007】 在一些態樣中，該方法進一步包含使針對一或多種特定標記物(諸如CD3)呈陽性之細胞耗盡。在某些態樣中，耗盡步驟在步驟(b)與

(c)之間進行。在一些態樣中，自生物反應器移除細胞以進行CD3耗盡，且將細胞放入生物反應器中以進行步驟(c)。

【0008】 在某些態樣中，自臍帶血獲得MNC之起始群體包含在聚葡萄糖、人血清白蛋白(HSA)、DNAse及/或氯化鎂存在下解凍臍帶血。在特定態樣中，自臍帶血獲得MNC之起始群體包含在聚葡萄糖及/或DNase存在下解凍臍帶血。在特定態樣中，在5%至20%，諸如10%聚葡萄糖存在下洗滌臍帶血。在某些態樣中，在諸如100至300 mM，尤其200 mM之濃度之氯化鎂存在下使臍帶血懸浮。在一些態樣中，獲得步驟包含進行菲科爾(ficoll)密度梯度離心以獲得單核細胞(MNC)。

【0009】 在某些態樣中，生物反應器為透氣式生物反應器。在特定態樣中，透氣式生物反應器為G-Rex100M或G-Rex100。在一些態樣中，步驟(b)之刺激在3至5 L之培養基，諸如3、3.5、4、4.5或5 L之培養基中進行。

【0010】 在一些態樣中，APC經 γ 輻照。在某些態樣中，APC經工程改造成表現膜結合型IL-21 (mbIL-21)。在特定態樣中，APC經工程改造成表現IL-21、IL-15及/或IL-2。在一些態樣中，MNC及APC以1:2之比率進行培養。在一些態樣中，IL-2之濃度為50至200 IU/mL，諸如100 IU/mL。在特定態樣中，每2至3天補給一次IL-2。

【0011】 在特定態樣中，步驟(b)進行持續6至8天，諸如7天。在一些態樣中，步驟(c)進行持續6至8天，諸如7天。在一些態樣中，步驟(c)不包含使細胞進行分裂。在特定態樣中，在步驟(c)期間向細胞中添加兩次IL-2，且在特定情況下，在步驟(c)期間不添加或移除其他培養基組分。

【0012】 在一些態樣中，該方法包含使用3、4、5或6個生物反應

器。在特定態樣中，該方法包含使用少於10個生物反應器。

【0013】 在特定態樣中，NK細胞擴增至至少500倍、800倍、1000倍、1200倍、1500倍、2000倍、2500倍、3000倍或5000倍。在特定態樣中，與靜態液體培養相比，在生物反應器中培養NK細胞產生超過1000倍的NK細胞。

【0014】 在某些態樣中，該方法不包含人白血球抗原(HLA)匹配。在一些態樣中，NK細胞之起始群體並非獲自單倍體相合供者。

【0015】 在一些態樣中，經擴增之NK細胞與自末梢血液擴增之NK細胞相比具有增強的抗腫瘤活性。在某些態樣中，與自末梢血液擴增之NK細胞相比，經擴增之NK細胞具有一或多種細胞週期基因、一或多種細胞分裂基因及/或一或多種DNA複製基因之較高表現。在一些態樣中，經擴增之NK細胞與自末梢血液擴增之NK細胞相比具有較高增殖能力。在一些態樣中，經擴增之NK細胞並未顯示耗竭。在某些態樣中，藉由量測穿孔蛋白、顆粒酶、CD57、KLRG1及/或PD1之表現來偵測耗竭。在一些態樣中，經擴增之NK細胞具有穿孔蛋白及/或顆粒酶之高表現。在某些態樣中，經擴增之NK細胞具有CD57、KLRG1及/或PD1之低表現或不表現。

【0016】 在一些態樣中，經擴增之NK細胞包含臨床相關劑量。在某些態樣中，臍帶血為冷凍臍帶血。在特定態樣中，已針對一或多種感染性疾病測試冷凍臍帶血，該一或多種感染性疾病諸如A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、克氏錐蟲(*Trypanosoma cruzi*)、HIV、人類T淋巴細胞白血病毒、梅毒、茲卡病毒(Zika virus)等等。在一些態樣中，臍帶血為經彙集之臍帶血，諸如來自3、4、5、6、7或8個個體臍帶血單元。

【0017】 在一些態樣中，NK細胞並非自體的，諸如相對於接受者

個體而言並非自體的。在某些態樣中，NK細胞並非同種異體的，諸如相對於接受者個體而言並非同種異體的。

【0018】 在一些態樣中，APC為通用抗原呈現細胞(uAPC)。在某些態樣中，uAPC經工程改造成表現(1) CD48及/或CS1 (CD319)；(2)膜結合型介白素-21 (mbIL-21)；及(3) 41BB配位體(41BBL)。在一些態樣中，uAPC表現CD48。在某些態樣中，uAPC表現CS1。在特定態樣中，uAPC表現CD48及CS1。在一些態樣中，uAPC基本上不表現內源性HLA I類、HLA II類及/或CD1d分子。在某些態樣中，uAPC表現ICAM-1 (CD54)及/或LFA-3 (CD58)。在特定態樣中，uAPC進一步定義為源自白血病細胞之aAPC，諸如K562細胞。

【0019】 在額外態樣中，該方法進一步包含冷凍保存經擴增之NK細胞。

【0020】 本文進一步提供一種醫藥組合物，其包含：由實施例(例如(a)自臍帶血獲得單核細胞(MNC)之起始群體；(b)在抗原呈現細胞(APC)及IL-2存在下刺激MNC；以及(c)用APC再刺激該等細胞以產生經擴增之NK細胞，其中該方法在生物反應器中進行且符合GMP)產生之NK細胞群體；及醫藥學上可接受之載劑。

【0021】 另一實施例提供一種適用於治療個體之疾病或病症的組合物，該組合物包含有效量的由實施例(例如(a)自臍帶血獲得單核細胞(MNC)之起始群體；(b)在抗原呈現細胞(APC)及IL-2存在下刺激MNC；以及(c)用APC再刺激該等細胞以產生經擴增之NK細胞，其中該方法在生物反應器中進行且符合GMP)產生之NK細胞。

【0022】 另一實施例提供一種組合物之用途，其用於治療個體之免

疫相關病症，該組合物包含有效量的由實施例(例如(a)自臍帶血獲得單核細胞(MNC)之起始群體；(b)在抗原呈現細胞(APC)及IL-2存在下刺激MNC；以及(c)用APC再刺激該等細胞以產生經擴增之NK細胞，其中該方法在生物反應器中進行且符合GMP)產生之NK細胞。

【0023】 在另一實施例中，提供一種用於治療疾病或病症之方法，其包含向個體投與有效量的根據實施例(例如(a)自臍帶血獲得單核細胞(MNC)之起始群體；(b)在抗原呈現細胞(APC)及IL-2存在下刺激MNC；以及(c)用APC再刺激該等細胞以產生經擴增之NK細胞，其中該方法在生物反應器中進行且符合GMP)之經擴增NK細胞。

【0024】 在額外態樣中，該方法進一步包含投與化學療法。在一些態樣中，該化學療法在經擴增NK細胞之前投與。在特定態樣中，該化學療法係清髓性的。在其他態樣中，該化學療法係非清髓性的。在一些態樣中，該化學療法為淋巴細胞耗盡化學療法。在特定態樣中，該淋巴細胞耗盡化學療法為基於氟達拉賓之淋巴細胞耗盡化學療法。在特定態樣中，該化學療法為來那度胺(lenalidomide)。

【0025】 在特定態樣中，該方法不包含進行HLA匹配。在特定態樣中，個體並未出現移植物抗宿主疾病或其他毒性。

【0026】 在一些態樣中，該疾病或病症為免疫相關病症。在某些態樣中，該免疫相關病症為自體免疫病症、移植物抗宿主疾病、同種異體移植排斥反應或發炎性病況。在一些態樣中，該疾病或病症為癌症，諸如多發性骨髓瘤。

【0027】 在額外態樣中，該方法進一步包含投與至少第二治療劑。在一些態樣中，至少第二治療劑包含化學療法、免疫療法、手術、放射線

療法或生物療法。在一些態樣中，NK細胞及/或至少第二治療劑係經靜脈內、腹膜內、氣管內、瘤內、肌內、內窺鏡方式、病灶內、經皮、皮下、區域性投與或藉由直接注射或灌注來投與。

【0028】 本發明之其他目的、特徵及優勢將自以下[實施方式]而變得顯而易知。然而，應理解，[實施方式]及特定實例雖然指示本發明之較佳實施例，但僅以說明方式給出，因為熟習此項技術者將由此[實施方式]而變得顯而易知本發明的精神及範疇內的各種改變及修改。

【圖式簡單說明】

【0029】 以下圖式形成本說明書之部分且包括在內以進一步展示本發明中之某些態樣。參考此等圖式中之一或多者，結合本文中呈現之特定實施例之詳細描述，可更好地理解本發明之方法及組合物。

【0030】 圖1A至圖1E：臍帶血(CB) NK細胞中與細胞增殖(1A)、細胞活化(1B)、細胞黏附(1C)、細胞週期(1D)及DNA複製(1E)有關的基因相比於末梢血液(PB) NK細胞中該等基因的較高表現。

【0031】 圖2：CB NK細胞相比於PB-NK細胞具有較高增殖能力。

【0032】 圖3：快速體外擴增的CB NK細胞(RE-CB NK細胞)並未展現耗竭的表現型證據。

【0033】 圖4：如BLI成像(右側圖)及存活率(左側圖)所展示，RE-CB NK細胞在多發性骨髓瘤(MM)之免疫缺陷小鼠模型中誘導出穩定的抗腫瘤活性。

【實施方式】

【0034】 本申請案主張2018年11月29日申請之美國臨時專利申請案第62/773,132號之優先權，該申請案以全文引用的方式併入本文中。

【0035】 在某些實施例中，本發明提供用於體外擴增NK細胞之方法。本發明方法提供由CB單元(諸如冷凍的CB單元)製造符合良好作業規範(Good Manufacturing Practice；GMP)且具有高度功能性的NK細胞的穩定且快速的擴增方案。因此，本發明方法可在沒有活供者的情況下進行。穩定的NK細胞亦可由新鮮或冷凍的末梢血液細胞產生。該方法可包含在抗原呈現細胞(APC)存在下進行擴增，該等抗原呈現細胞諸如可具有或可不具有NK細胞特異性擴增能力的通用抗原呈現細胞(uAPC)。快速體外擴增的CB NK細胞(RE-CB NK細胞)可新鮮輸注，或可使用最佳條件冷凍保存使得該等細胞可在日後使用。重要的係，該方法提供以臨床劑量大規模擴增NK細胞。

【0036】 NK細胞之擴增可在諸如生物反應器之封閉系統中進行。本發明研究表面，與靜態液體培養系統相比，CB-NK細胞可在更一致且穩定擴增的情況下產生，諸如超過1,000倍。

【0037】 在一些態樣中，本發明符合GMP的程序包括使用已針對第一週及第二週NK細胞培養最佳化的特定培養條件。增加培養基體積且由此降低培養物中之細胞濃度對擴增之規模、進行培養所需的時間及數理邏輯以及過程成本具有顯著影響。如針對前七天培養之表2A及針對第二週培養之表2B中所展示，與較少培養基及較高細胞濃度(G-Rex100)相比，在較大培養基體積及降低之細胞濃度(G-Rex100M)的情況下達成顯著更好的倍數擴增。最佳程序需要更少生物反應器，且產生相同或較高NK細胞劑量需要較少細胞。此情形展示於第7天，舉例而言，此時需要少四倍的細胞來接種各G-Rex 100M以達成相同劑量。在第0至7天，不需要干預培養物，諸如不用如先前方法中一般向細胞中加料。使用最佳程序，在第7

至14天，細胞不需要分裂且僅向其中加料兩次(但在替代方案中，向細胞中加料一次、三次或四次或更多次)。使用較少培養基及細胞介素以及較少技術人員時間，從而節省金錢且改良數理邏輯。重要的係，在第7至14天，培養物中需要最少干預(例如，僅添加兩次IL2)，此不僅節省技術時間而且明顯降低微生物污染的可能性。此情形與現今使用的當前NK細胞擴增程序不同，在當前NK細胞擴增程序中，培養物通常在反覆加料的情況下每隔一天分裂，從而增加了微生物污染風險。如表2C中所概述，最佳方法將技術人員時間減少29%。

【0038】 本發明研究表明，快速體外擴增的CB NK細胞(RE-CB NK)可在沒有任何毒性或移植物抗宿主疾病風險的情況下，甚至在沒有任何HLA匹配的情況下安全輸注。亦證實，在輸注RE-CB NK細胞之前，投與化學療法，諸如在存在或不存在幹細胞移植的情況下投與清髓、非清髓或降低強度或者投與淋巴細胞耗盡化學療法，有助於CB-NK細胞之體內生長及活化。此等細胞由此成為真正「現成的」免疫療法產物，從而允許針對在輸注之前可能需要額外療法的患者具有最大靈活性。

【0039】 因此，本發明進一步提供用於治療諸如血液科惡性疾病及實體腫瘤之癌症的方法。該治療可包含投與NK細胞及化學療法，該化學療法諸如在存在或不存在幹細胞移植的情況下投與清髓、非清髓或降低強度或投與淋巴細胞耗盡化學療法。化學療法可在輸注NK細胞之前投與。NK細胞可與靶向NK細胞受體之治療劑(諸如CD16)組合投與，從而將細胞重新導向至標靶，由此增加針對不同腫瘤之反應。靶向NK細胞受體之治療劑(諸如CD16)可為單株抗體、雙特異性抗體或三特異性抗體。在特定情況下，NK細胞並不與化學療法及/或其他免疫療法組合。

I. 定義

【0040】如本文所用，關於指定組分「基本上游離」在本文中用於意謂指定組分中無一者有目的地調配入組合物中及/或僅作為污染物或以痕量存在。由組合物之任何非預期污染產生的指定組分總量因此遠低於0.05%，較佳低於0.01%。在特定情況下，存在用標準分析方法未偵測到指定組分之量的組合物。

【0041】如本說明書中所使用，「一(a/an)」可意謂一或多個。如申請專利範圍中所使用，當與字語「包含」結合使用時，字語「一(a/an)」可意謂一或多於一個。

【0042】儘管本發明支持指代僅替代及「及/或」之定義，但除非明確指示為指代僅替代或替代相互排斥，否則術語「或」在申請專利範圍中之使用用於意謂「及/或」。如本文中所用，「另一」可意謂至少第二個或更多個。術語「約」、「大致上」及「大約」一般意謂所陳述值加或減5%。

【0043】「免疫病症」、「免疫相關病症」或「免疫介導之病症」係指其中免疫反應在疾病之發展或進展中起關鍵作用之病症。免疫介導之病症包括自體免疫病症、同種異體移植排斥反應、移植物抗宿主疾病及發炎性病況以及過敏性病況。

【0044】「治療(treating/treatment)」疾病或病況係指執行方案，其可包括致力於減輕疾病之跡象或症狀而向患者投與一或多種藥物。所需治療作用包括降低疾病進展速率、改善或減輕疾病病況及緩解或改良預後。減輕可在疾病或病況之跡象或症狀出現之前以及在其出現之後發生。因此，「治療(treating/treatment)」可包括「預防

(preventing/prevention) 」疾病或非所需病況。另外，「治療(treating/treatment)」不需要完全減輕跡象或症狀，不需要治癒，且確切而言包括僅對患者具有邊際效應之方案。

【0045】 如在整個本申請中使用之術語「治療效益」或「治療上有效之」係指相對於此病況之醫學治療促進或增強個體之健康的任何事物。此包括但不限於疾病跡象或症狀之頻率或嚴重程度之降低。舉例而言，癌症治療可涉及例如腫瘤尺寸減小、腫瘤侵襲性降低、癌症生長速率降低或癌轉移預防。癌症治療亦可指延長患有癌症之個體之存活期。

【0046】 「個體」及「患者」係指人類或諸如靈長類動物、哺乳動物及脊椎動物之非人類。在特定實施例中，個體為人類。

【0047】 片語「醫藥學上或藥理學上可接受之」係指在按需要向諸如人類之動物投與時不產生不良、過敏或其他不適當反應之分子實體及組合物。熟習此項技術者將依據本發明而得知包含抗體或額外活性成分之醫藥組合物之製備。此外，對於動物(例如人類)投與，應理解，製備應滿足如FDA生物標準辦公室(FDA Office of Biological Standards)所要求之無菌性、發熱性、一般安全性及純度標準。

【0048】 如本文所用，「醫藥學上可接受之載劑」包括任何及所有水溶劑(例如水、醇/水溶液、鹽水溶液、非經腸媒劑，諸如氯化鈉、林格氏溶液(Ringer's dextrose)右旋糖等)、非水溶劑(例如丙二醇、聚乙二醇、植物油及諸如油酸乙酯之可注射有機酯)、分散介質、包衣、界面活性劑、抗氧化劑、防腐劑(例如抗細菌或抗真菌劑、抗氧化劑、螯合劑及惰性氣體)、等張劑、吸收延遲劑、鹽、藥物、藥物穩定劑、凝膠、黏合劑、賦形劑、崩解劑、潤滑劑、甜味劑、調味劑、染料、流體及營養補充

劑，諸如物質以及其組合，如一般熟習此項技術者將已知。根據熟知參數調整醫藥組合物中之各種組分之pH及準確濃度。

【0049】 術語「單倍型分型」、「HLA匹配」或「組織分型」係指用於例如藉由判定特定個體之淋巴細胞上表現何種HLA基因座(locus/loci)來鑑別個體之單倍型或組織型之方法。然而，在特定實施例中，該方法不包含人白血球抗原(HLA)匹配。HLA基因位於作為染色體6之短臂上之區域的主要組織相容性複合體(MHC)中，且參與細胞與細胞相互作用、免疫反應、器官移植、癌症發展及易感疾病。在移植中存在六個重要基因座，名為HLA-A、HLA-B、HLA-C及HLA-DR、HLA-DP及HLA-DQ。在各基因座處，可存在若干不同對偶基因中之任一者。廣泛用於單倍型分型之方法使用聚合酶鏈反應(PCR)以比較個體之DNA與編碼MHC抗原之基因之已知區段。此等基因區域之可變性決定個體之組織型或單倍型。血清學方法亦用於偵測細胞表面上之血清學上定義之抗原。可藉由已知血清學技術來量測HLA-A、HLA-B及HLA-C決定子。簡言之，將來自個體之淋巴細胞(與新鮮末梢血液分離)與識別所有已知HLA抗原之抗血清一起培育。使細胞鋪展於具有含有各種抗血清之微觀孔之盤中。將細胞培育30分鐘，隨後再補充培育60分鐘。若淋巴細胞在其表面上具有由抗血清中之抗體識別之抗原，則淋巴細胞溶解。可添加染料以顯示細胞膜滲透性之變化及細胞死亡。由溶解破壞之細胞圖案指示組織學不相容性之程度。舉例而言，若在含有用於HLA-A3之抗血清之孔中來自測試HLA-A3之個人的淋巴細胞受到破壞，則對於此抗原群組，測試為陽性的。

【0050】 術語「抗原呈現細胞(APC)」係指能夠呈現呈可藉由免疫系統之特定效應細胞識別之肽-MHC複合物形式的一或多種抗原，且藉此

誘導相對於呈現之一或多種抗原之有效細胞免疫反應的一類細胞。術語「APC」涵蓋諸如巨噬細胞、B細胞、內皮細胞、活化T細胞及樹突狀細胞之完整全細胞，或諸如與 $\beta 2$ -微球蛋白複合之純化MHC I類分子之能夠呈現抗原之自然存在或合成分子。

【0051】術語「功能性封閉」係指藉由氣密密封整個系統或藉由在與收集系統之所有連接處提供無菌屏障過濾器來密封系統以確保流體無菌性。

【0052】術語「生物反應器」係指在封閉無菌系統中為細胞提供營養物且移除代謝物，並且提供有利於細胞生長之物理化學環境的大規模細胞培養系統。在特定態樣中，生物學及/或生物化學過程在受監測及控制之環境及操作條件下出現，該等條件例如pH、溫度、壓力、營養物供應及廢料移除。根據本發明，適合於與本發明方法一起使用的生物反應器之基本類型包括中空纖維生物反應器。

II. NK細胞擴增

【0053】在某些態樣中，本發明係關於自CB擴增NK細胞。NK細胞可具有獨特優勢，該等優勢與涉及細胞週期、細胞分裂及DNA複製之基因之較高表現(如圖1中所展示)有關。由此，本發明方法提供用於增殖源自CB之NK細胞之符合GMP的快速擴增方案。

【0054】在例示性方案中，將臍帶血單元(例如，20%或完整臍帶血單元)解凍，且藉由使用菲科爾密度梯度離心來分離單核細胞而獲得NK細胞。可在解凍之後以及單核細胞分離之後進行洗滌。隨後將細胞與IL-2 (100 U/mL)及APC一起培育，該等APC諸如經 γ 輻照(100 Gy)之aAPC (例如，純系9膜結合型IL-21 (mbIL-21) aAPC)或uAPC。生物反應器(諸如G-

Rex生物反應器)中NK細胞與aAPC之比例可為2:1。在第2天，向細胞培養物中加入IL-2並監測擴增比率。在第6或7天，可諸如藉由使用Miltenyi XS管柱及SuperMACS™分離器來排除CD3+細胞。隨後將細胞與IL-2 (100 U/mL)一起培育，添加IL-2，且隨後在第14天收集細胞。

【0055】 解凍可在37°C水浴中，在無菌袋中進行。培養基可包含含L-麩醯胺酸之RPMI 1640、Clicks培養基及人AB (例如10%)血清。可藉由在450xG下離心10分鐘來進行洗滌。洗滌溶液可包含0.1%至10% (諸如0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%) HSA DPBS、10%聚葡萄糖DPBS、DNase及氯化鎂。

【0056】 可藉由甚至將經洗滌CB細胞之部分成層至試管中之Ficoll-Paque上來進行單核分離。接著可對細胞進行離心，且移除上層受到污染的血漿及血漿。可進一步對細胞進行離心，移除上清液，且將細胞再懸浮於培養基中。

【0057】 在特定態樣中，在整個過程中藉由執行細胞計數分析、生存率分析、嵌合分析、免疫表型分型分析、無菌性分析、菌質PCR分析、格蘭氏染色(gram stain)分析、內毒素分析、鉻檢定分析及細胞介素檢定分析來進行品質控制。

【0058】 NK細胞可在經工程改造之飼養細胞(諸如APC)存在下擴增。APC可表現用於活化NK共刺激分子及細胞介素之配位體。舉例而言，APC可為表現CD48、CS1、IL-21、IL-2及/或IL15之UAPC。

【0059】 在某些實施例中，藉由此項技術中熟知之方法由臍帶血衍生出NK細胞。在特定實施例中，自CB (彙集之CB)分離免疫細胞。特定言之，本發明之快速擴增方案可涉及自冷凍且解凍之CB單元或自選自臨

床CB庫之新鮮CB單元分離並擴增NK細胞。可自2、3、4、5、6、7、8、10個或更多個單元彙集CB。NK細胞可為自體的或同種異體的。經分離NK細胞可為經匹配以用於待投與細胞療法之個體之單倍型。然而，在特定態樣中，NK細胞並非自體的或HLA匹配的。NK細胞可藉由人體內之特定表面標記物，諸如CD16、CD56及CD8偵測。

【0060】 在某些態樣中，NK細胞之起始群體可藉由使用菲科爾密度梯度離心來分離單核細胞而獲得。可去除細胞培養物中表現CD3、CD14及/或CD19細胞之任何細胞，且可對細胞培養物進行表徵以判定CD56⁺/CD3⁻細胞或NK細胞之百分比。

【0061】 可在存在本發明之APC (諸如UAPC)的情況下擴增細胞。擴增可持續約2至30天，諸如3至20天，確切言之12至16天，諸如12、13、14、15、16、17、18或19天，特定言之約14天。NK細胞及APCS可以約3:1至1:3，諸如2:1、1:1、1:2，特定言之約1:2之比率存在。擴增培養物可進一步包含細胞介素以促進擴增，該等細胞介素諸如IL-2、IL-21及/或IL-18。細胞介素可以約10 U/mL至500 U/mL，諸如100 U/mL至300 U/mL，特定言之約200 U/mL之濃度存在。可在擴增培養物中諸如每2至3天補給一次細胞介素。可至少再次向培養物中添加APC，諸如在CAR轉導之後再次添加。

【0062】 在擴增之後，可立即輸注NK細胞或可諸如藉由低溫保存來儲存NK細胞。在某些態樣中，當主體群體在約1、2、3、4、5天內繁殖時，NK細胞可體外繁殖數天、數週或數月。

【0063】 經擴增NK細胞可分泌諸如干擾素- γ 、腫瘤壞死因子- α 及顆粒細胞-巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)之I型細胞介素，該等I型細胞介

素活化先天性免疫細胞及自適應免疫細胞兩者以及其他細胞介素及趨化激素。此等細胞介素量測可用於測定NK細胞之活化狀態。另外，此項技術中已知之用於測定NK細胞活化之其他方法可用於表徵本發明之NK細胞。

A. 生物反應器

【0064】 NK細胞可在諸如生物反應器之功能性封閉系統中擴增。可在可透氣的生物反應器，諸如G-Rex細胞培養裝置中進行擴增。生物反應器可支持平均體積450 mL的 1×10^9 至 3×10^9 個總細胞。

【0065】 生物反應器可根據一般類別進行分組，包括：靜態生物反應器、攪拌燒瓶式生物反應器、旋轉壁容器式生物反應器、中空纖維生物反應器及直接灌注式生物反應器。在生物反應器內，細胞可自由或固定化接種在多孔3維支架(水凝膠)上。

【0066】 中空纖維生物反應器可用於提高培養期間的質量轉移。中空纖維生物反應器係基於中空纖維之3D細胞培養系統，該等中空纖維係以平行陣列配置的較小半透性毛細管膜，其典型分子量截斷(molecular weight cut-off; MWCO)範圍為10至30 kDa。此等中空纖維膜通常捆綁且容納於管狀聚碳酸酯外殼內，從而形成中空纖維生物反應器濾筒。亦裝配有入口埠及出口埠之濾筒內有兩個隔室：中空纖維內之毛細管內(IC)空間以及包圍中空纖維之毛細管外(EC)空間。

【0067】 由此，本發明之生物反應器可為中空纖維生物反應器。中空纖維生物反應器可將細胞嵌入在纖維之管腔內，在管腔外空間灌注培養基；或替代地，中空纖維生物反應器可經由中空纖維提供氣體及培養基灌注，而細胞在管腔外空間內生長。

【0068】 中空纖維應適合於在生物反應器中遞送營養物以及移除廢

料。中空纖維可呈任何形狀，例如可呈圓形及管狀或呈同心環之形式。中空纖維可由可再吸收或不可再吸收的膜製成。舉例而言，中空纖維之適合組分包括聚對二氧環己酮、聚乳酸交酯、聚乳酸羥基乙酸、聚乙醇酸、聚乳酸、聚乙醇酸/碳酸三亞甲酯、纖維素、甲基纖維素、纖維素聚合物、纖維素酯、再生纖維素、普洛尼克(pluronic)、膠原蛋白、彈性蛋白及其混合物。

【0069】 生物反應器可在接種細胞之前預致敏。預致敏可包含用諸如PBS之緩衝液沖洗。預致敏亦可包含用諸如纖維結合蛋白之細胞外基質蛋白塗佈生物反應器。接著可用諸如 α MEM之培養基洗滌生物反應器。

【0070】 在特定實施例中，本發明方法使用GRex生物反應器。GRex燒瓶之底部為透氣膜，細胞駐留在該透氣膜上。因此，細胞處於高度氧化環境中，從而允許細胞生長至高密度。系統容易擴大規模，且需要較低頻率的培養操作。GRex燒瓶與標準組織培養恆溫箱及細胞實驗室設備相容，從而減少開始授受細胞療法(ACT)程序所需要的專用設備及資本投資。

【0071】 細胞可以如下密度接種在生物反應器中：每平方厘米約100至1,000個細胞，諸如每平方厘米約150個細胞，每平方厘米約200個細胞，每平方厘米約250個細胞，每平方厘米約300個細胞，諸如每平方厘米約350個細胞，諸如每平方厘米約400個細胞，諸如每平方厘米約450個細胞，諸如每平方厘米約500個細胞，諸如每平方厘米約550個細胞，諸如每平方厘米約600個細胞，諸如每平方厘米約650個細胞，諸如每平方厘米約700個細胞，諸如每平方厘米約750個細胞，諸如每平方厘米約800個細胞，諸如每平方厘米約850個細胞，諸如每平方厘米約900個細

胞，諸如每平方厘米約950個細胞，或每平方厘米約1000個細胞。特定言之，細胞可以每平方厘米約400至500個細胞，諸如每平方厘米約450個細胞之細胞密度接種。

【0072】 接種於生物反應器中之細胞的總數目可為約 1.0×10^6 至約 1.0×10^8 個細胞，諸如約 1.0×10^6 至 5.0×10^6 、 5.0×10^6 至 1.0×10^7 、 1.0×10^7 至 5.0×10^7 、 5.0×10^7 至 1.0×10^8 個細胞。在特定態樣中，接種於生物反應器中之細胞的總數目為約 1.0×10^7 至約 3.0×10^7 ，諸如約 2.0×10^7 個細胞。

【0073】 細胞可接種於任何適合的培養細胞之培養基中，許多此類培養基係可商購的。例示性培養基包括DMEM、RPMI、MEM、培養基199、HAMS及其類似者。在一個實施例中，培養基為 α MEM培養基，特定言之補充有L-麩醯胺酸之 α MEM。培養基可補充有以下中之一或多者：生長因子、細胞介素、激素、或B27、抗生素、維生素及/或小分子藥物。特定言之，培養基可不含血清。

【0074】 在一些實施例中，可在室溫下培育細胞。恆溫箱可加濕，且具有約5% CO₂及約1% O₂之氛圍。在一些實施例中，CO₂濃度可介於約1%至20%、2%至10%或3%至5%之範圍內。在一些實施例中，O₂濃度可介於約1%至20%、2%至10%或3%至5%之範圍內。

B. 抗原呈現細胞

【0075】 抗原呈現細胞包括巨噬細胞、B淋巴細胞及樹突狀細胞，其藉由其特定MHC分子之表現區分。APC內化抗原且與其外部細胞膜上之MHC分子一起再表現彼抗原之部分。MHC為具有多個基因座之較大遺傳複合物。MHC基因座編碼兩個主要類別之MHC膜分子，稱為I類及II

類。T輔助淋巴細胞一般識別與MHC II類分子關聯之抗原，且T細胞毒性淋巴細胞識別與MHC I類分子關聯之抗原。MHC在人類中稱為HLA複合物且在小鼠中稱為H-2複合物。

【0076】 在某些情況下aAPC適用於製備實施例之治療組合物及細胞療法產物。關於製備及使用抗原呈現系統之一般指導參見例如美國專利第6,225,042號、第6,355,479號、第6,362,001號及第6,790,662號；美國專利申請公開案第2009/0017000號及第2009/0004142號；以及國際公開案第WO2007/103009號。

【0077】 aAPC系統可包含至少一種外源性輔助分子。可採用任何適合之輔助分子之數目及組合。輔助分子可選自諸如共刺激分子及黏附分子之輔助分子。例示性共刺激分子包括CD86、CD64 (FcγRI)、41BB配位體及IL-21。黏附分子可包括：碳水化合物結合糖蛋白，諸如選擇素；跨膜結合糖蛋白，諸如整合素；鈣依賴性蛋白，諸如鈣黏素；以及單程跨膜免疫球蛋白(Ig)超家族蛋白，諸如細胞間黏附分子(ICAM)；該等黏附分子促進例如細胞與細胞或細胞與基質之接觸。例示性黏附分子包括LFA-3及ICAM，諸如ICAM-1。適用於選擇、選殖、製備及表現包括共刺激分子及黏附分子之例示性輔助分子的技術、方法及試劑例示於例如美國專利第6,225,042號、第6,355,479號及第6,362,001號中。

C. 通用抗原呈現細胞

【0078】 本發明之一些實施例係關於通用抗原呈現細胞(UAPC)之生產及用途。UAPC可用於擴增諸如NK細胞及T細胞之免疫細胞。UAPC可工程改造成表現膜結合型IL-21 (mbIL-21)及41BBL (CD137配位體)。

【0079】 UAPC可工程改造成表現CD137配位體及/或膜結合型細胞

介素。膜結合型細胞介素可為mIL-21或mIL-15。在特定實施例中，UAPC工程改造成表現CD137配位體及mIL-21。APC可來源於諸如白血病細胞之癌細胞。APC可不表現內源性HLA I類、HLA II類或CD1d分子。APC可表現ICAM-1 (CD54)及LFA-3 (CD58)。特定言之，APC可為K562細胞，諸如工程改造成表現CD137配位體及mIL-21之K562細胞。APC可經輻照。工程化可藉由此項技術中已知之任何方法來進行，諸如反轉錄病毒轉導。

【0080】 細胞介素對整個種類之免疫細胞(包括NK細胞)施加極強力之控制，影響細胞命運、活性及細胞反應功效。用於活化NK細胞之細胞介素刺激力證實其「自然」效應功能高度易受環境干預影響，且預致敏可調節體內NK細胞行為。

【0081】 為解決獲取臨床上相關量之NK細胞之問題，本發明之方法使用介白素(IL-21)作為用於本發明之UAPC平台技術中之NK細胞擴增之驅動子。在人體內，利用IL-10及IL-21進行之NK細胞刺激以STAT3依賴性方式誘導NKG2D表現。雖然細胞介素受體共用多種免疫細胞中之類似細胞信號傳導組分，但NK細胞特異性信號傳導視用於增殖之IL-21受體-STAT3連接而定。

【0082】 細胞介素信號傳導對於維持淋巴細胞存活及增殖為關鍵的。在體內，IL-2投與為唯一經FDA批准之用於擴增NK細胞之方法。另一強力NK細胞活化因子IL-15作為IL-2之可能替代物進行I期臨床試驗，但預期在全身性投與之後具有相當大之毒性。除相當大之毒性之外，此等細胞介素亦誘導T細胞增殖，同時限制NK細胞存留。儘管共用用於信號轉導之同一受體，但IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15及IL-21受體對多種多

樣之細胞具有獨特且特殊之作用。

1. 膜結合型IL-21

【0083】 在某些實施例中，對於特異性地給NK細胞供應能量，IL-21可用於生產本發明之UAPC。IL-21受體(IL21R)在經活化人類NK細胞(準備觸發之細胞)中上調，此情形與能夠經由其與共同細胞介素受體 γ 鏈($\gamma(c)$)之二聚合反應轉導信號之IL-2受體 β 鏈緊密相關。雖然I型細胞介素IL-21可調節T細胞、B細胞及NK細胞功能，但吾人發現僅人類NK細胞經由活化IL21受體信號傳導路徑而經歷顯著擴增(在21天內擴增1000倍)。相對而言，IL21在CD8+ve T細胞收縮中起重要作用¹。

【0084】 IL21R信號傳導主要由作為高度強力之細胞增殖活化因子之STAT3供以動力。IL21R-STAT3連接由與GAS結合之IL-21誘導之STAT3 DNA及如藉由利用抗磷酸酪胺酸抗體進行之免疫沈澱法及西方墨點法驗證之順式可誘導元件(cis-inducible element)驅動²。IL21介導之增殖之分子基礎可特異性追溯至介導IL-21誘導之STAT1及STAT3磷酸化的IL21R上的酪胺酸510 (Y510) ³。此機制係由Stat1/Stat3雙基因剔除小鼠中之經抑制IL-21反應而得到強調。

【0085】 IL21R信號傳導對於NK細胞毒性為重要的。人類IL21R缺乏症係與⁵¹Cr標記之K562靶細胞之細胞溶解受損有關，同時抗體依賴性細胞毒性未受到影響⁴。單基因性非胚致死性缺陷(IL21R之功能損失型突變)呈現極佳之機會描繪，且因此適用於建模、增強及塑形先天性NK細胞溶解反應。

【0086】 即使CD56^暗細胞群體及CD56^亮細胞群體兩者均具有類似數目之表面IL21R，IL-21信號傳導亦選擇性地模製NK細胞子集。相對於

CD56暗NK細胞，在CD56亮NK細胞中STAT1及STAT3磷酸化之IL-21誘導更高。相比之下，IL-21對作為亦驅動T細胞擴增之IL-2活化路徑之STAT5活化無作用。除STAT3活化之外，IL-21信號傳導亦涉及MAPK及PI3K路徑，且誘導NK細胞中包括IFN- γ 、T-bet、IL-12R β 2及IL-18R之先天性免疫反應基因之表現，對其預致敏以殺滅腫瘤細胞。

【0087】 對於IL-21之有效利用，mbIL-21表現可用於集中且定位與NK細胞上之IL21R之反式相互作用。mbIL21膜接近性確保需要其之情況下之易獲得性，因此，其可保持在無大量及大濃度之外源供應IL-21之情況下之理想細胞增殖。與經輻照K562-mb15-41BBL一起之共培養物誘導來自末梢血液之CD56+CD3- NK細胞之中值21.6倍擴增。此擴增與僅用來自包括單獨或組合之IL-2、IL-12、IL-15、IL-21之共用 γ c家族之可溶性細胞介素進行的刺激相比更高。藉由比較，本發明之UAPC可在14至21天內擴增NK細胞至少1000倍(3-log)。UAPC上之mbIL21表現亦可排除對外源性臨床級細胞介素之需求。

2. 4-1BBL (4-1BB配位體、CD137配位體、CD137L、TNFSF9)

【0088】 除NK細胞功能之細胞介素預致敏之概念外，與NK細胞中之活化分子之直接物理相互作用引起增強之細胞增殖反應。CD137 (4-1BB)為介導細胞增殖、分化及計劃性細胞死亡(細胞凋亡)之腫瘤壞死受體(TNF-R)基因家族之成員。首先表徵鼠受體，隨後表徵人類同系物，該人類同系物在胺基酸量下共用60%一致性，且在細胞質/信號傳導域中相當保守。CD137主要表現於活化T細胞及NK細胞中，且在發炎部位處之胸腺細胞、骨髓細胞及內皮細胞中具有不同可偵測之量。經由以下介導生理學CD137信號傳導：1) NF- κ B，其經由Bcl-XL活化促進存活；及2)

PI3K/ERK1/2路徑，其特異性驅動細胞週期進程。

【0089】在活化NK細胞中，CD137為細胞介素可誘導之共刺激分子，其之後藉由增加細胞增殖及IFN- γ 分泌來驅動NK細胞中之抗腫瘤反應。使用CD137L-/-基因剔除小鼠進行之研究闡明CD137/CD137L信號傳導在發展抗腫瘤免疫細胞中之重要性。與對照小鼠相比，CD137-/-基因剔除小鼠之腫瘤癌轉移頻率高4倍。

【0090】作為TNF超家族之34 kDa糖蛋白成員之CD137配位體(CD137L，4-1BB配位體)主要在包括B細胞、巨噬細胞及樹突狀細胞之活化抗原呈現細胞(APC)上經受偵測，且在活化T細胞上以低量瞬時表現。與鼠對應物相比，人類CD137L僅具有36%同源性¹⁰。與促效性CD137抗體之抗腫瘤功效一致，已顯示CD137L結合引發CTL及抗腫瘤活性。

【0091】因此，本發明之UAPC可工程改造成表現4-1BB配位體，其為用於理想刺激之針對CD137之生理學反受體。

3. SLAM/CD48

【0092】除細胞介素調整及4-1BBL共刺激之外，NK細胞與靶細胞之間的直接物理相互作用亦影響細胞反應，亦即靶細胞殺滅。廣泛表現於免疫系統中且在其中起關鍵作用之信號傳導淋巴細胞性活化分子(SLAM，先前亦稱為CD2超家族)家族同源免疫球蛋白受體在細胞間相互作用方面尤其重要。

【0093】因此，本發明之UAPC可表現一或多種SLAM家族抗原。SLAM家族成員包括CD2、CD48、CD58 (LFA-3)、CD244 (2B4)、CD229 (Ly9)、CD319 (CS1 (CD2子集1)；CRACC (CD2樣受體活化細胞毒性細胞))及CD352 (NTB-A (NK-T-B抗原))。在特定態樣中，UAPC表

現CD48及/或CS1。NK細胞表現SLAM家族(SLAMF)之至少三個成員。該等成員為2B4；NK細胞、T細胞及B細胞抗原(NTB-A)；及CD2樣受體活化細胞毒性細胞(CRACC)，此等成員識別其在靶細胞上及可能地其他NK細胞上之各別配位體CD48、NTB-A及CRACC。SLAMF1、SLAMF3、SLAMF5、SLAMF6、SLAMF7、SLAMF8及SLAMF9均為嗜同性(自配位體)受體，而SLAMF2及SLAMF4為彼此之反受體(嗜異性)。已知嗜同性親和力(解離常數Kd為<1 μM至200 μM)中之寬範圍(三個數量級)指向用於針對SLAM糖蛋白之重疊但獨特之信號傳導機制的機理基礎。

【0094】 表1：SLAM家族成員結合親和力。

SLAMF	CD	名稱	別名	相互作用	反受體	親和力
1	150	SLAM	SLAMF1， CD150， CDw150	嗜同性		200
2	48	CD48	BCM1， BLAST， BLAST1， MEM-102	嗜異性	CD2（噬齒動物）	>500
				嗜異性	2B4	8
3	229	LY9	hly9，m淋 巴細胞抗原 9	嗜同性		
4	244	2B4	NAIL， NKR2B4， Nmrk	嗜異性	CD48	8
5	84	CD84	LY9B	嗜同性		<1
6	352	NTB-A	KALI， KALib， Ly108， NTBA， SF2000	嗜同性		2
7	319	CRACC	CS1，19A	嗜同性		
8	353		BLAME， SBI42	嗜同性		
9			CD2F10， CD84H1， SF2001， CD2F-10， CD84-H1	嗜同性		

【0095】 在特定實施例中，本發明之UAPC工程改造成表現CD48以支持細胞與細胞相互作用，從而增強NK細胞反應。CD48為NK細胞、T細胞、單核細胞及嗜鹼性細胞之表面上所發現之糖磷脂醯肌醇錨定蛋白質(GPI-AP)，且參與此等細胞中之黏附及活化路徑。儘管其缺失細胞內域，但CD48刺激誘導脂筏(lipid raft)中之信號傳導因子重排、Lck激酶活性及酪胺酸磷酸化。作為黏附及共刺激分子，CD48誘導B淋巴細胞及T淋巴細胞、NK細胞、肥胖細胞及嗜酸性細胞中之諸多效應。在人類NK細胞中，CD48為用於作為NK細胞之重要活化因子之2B426之反受體。認為嗜異性相互作用競爭CD244與MHC-I之相互作用。因此，2B4/CD48相互作用誘導人類NK細胞中之活化信號，然而在鼠NK細胞中，其傳送抑制性信號。

【0096】 當同一群體之細胞之間的2B4-CD48相互作用(亦即NK細胞-NK細胞相互作用或T細胞-T細胞相互作用)藉由在諸如通常不含CD48之K562骨髓細胞株之APC上表現CD48來引起經增強活化時，UAPC可在NK細胞上以反式形式開啟強力2B4信號傳導路徑。

4. SLAM/CS1

【0097】 在一些實施例中，本發明之UAPC工程改造成表現CS1(SLAM家族之另一成員)作為用以開啟NK細胞殺滅能力之共刺激分子。與反結合至2B4之CD48不同，CS1相互作用為嗜同性的，且可在順式對反式相互作用之情形下進行表徵。通常不含CS1之K562細胞可工程改造成表現CS1。

III.經基因工程改造之抗原受體

【0098】 可基因工程改造本發明之NK細胞以表現諸如經工程改造

之TCR及/或CAR之抗原受體。舉例而言，NK細胞經修飾以表現具有針對癌症抗原之抗原特異性的TCR。諸如對於不同抗原的多種CAR及/或TCR可添加至NK細胞。

【0099】 修飾之適合方法在此項技術中已知。參見例如見上文Sambrook及Ausubel。舉例而言，細胞可使用Heemskerk等人，2008及Johnson等人，2009中所描述之轉導技術轉導以表現具有針對癌症抗原之抗原特異性的TCR。

【0100】 編碼全長TCR α 及 β (或 γ 及 δ)鏈之RNA之電穿孔可用作替代方案，以克服關於反轉錄病毒轉導及內源性TCR鏈之配對所引起的自體反應性的長期問題。即使此替代配對在瞬時轉染策略中出現，可能產生的自體反應性T細胞亦將在一定時間之後失去此自體反應性，此係由於所引入的TCR α 及 β 鏈僅暫時表現。當引入的TCR α 及 β 鏈表現減弱時，僅正常的自體T細胞留下。當藉由穩定反轉錄病毒轉導來引入全長TCR鏈時情況並非如此，穩定反轉錄病毒轉導永遠不會失去所引入的TCR鏈，從而在患者中引起始終存在的自體反應性。

【0101】 在一些實施例中，細胞包含編碼一或多種抗原受體之一或多種經由基因工程改造引入之核酸，及此類核酸之經基因工程改造之產物。在一些實施例中，核酸為異源核酸，亦即通常不存在於細胞或自該細胞獲得之樣品中的核酸，諸如自另一生物體或細胞獲得之核酸，此類核酸例如在經工程改造之細胞及/或此類細胞所來源之生物體中通常未發現。在一些實施例中，核酸並非天然產生，諸如未在自然界中發現之核酸(例如嵌合核酸)。

【0102】 在一些實施例中，CAR含有特異性結合於抗原之細胞外抗

原識別域。在一些實施例中，抗原係表現於細胞之表面上之蛋白質。在一些實施例中，CAR係TCR樣CAR且抗原係經處理之肽抗原，諸如細胞內蛋白質之肽抗原，其類似TCR，在主要組織相容複合體(MHC)分子之情形下在細胞表面上識別。

【0103】 包括CAR及重組TCR之例示性抗原受體以及用於工程改造且將受體引入細胞內之方法包括描述於例如以下中之彼等者：國際專利申請公開案第WO200014257號、第WO2013126726號、第WO2012/129514號、第WO2014031687號、第WO2013/166321號、第WO2013/071154號、第WO2013/123061號、美國專利申請公開案第US2002131960號、第US2013287748號、第US20130149337號、美國專利第6,451,995號、第7,446,190號、第8,252,592號、第8,339,645號、第8,398,282號、第7,446,179號、第6,410,319號、第7,070,995號、第7,265,209號、第7,354,762號、第7,446,191號、第8,324,353號及第8,479,118號以及歐洲專利申請案第EP2537416號，及/或Sadelain等人，2013；Davila等人，2013；Turtle等人，2012；Wu等人，2012所描述之彼等者。在一些態樣中，經基因工程改造之抗原受體包括如美國專利第7,446,190號中所描述之CAR，及國際專利申請公開案第WO/2014055668 A1號中所描述之彼等者。

A. 嵌合抗原受體

【0104】 在一些實施例中，CAR包含：a)細胞內信號傳導域、b)跨膜域及c)包含抗原結合區之細胞外域。

【0105】 在一些實施例中，經工程改造之抗原受體包括CAR，該等CAR包括活化或刺激CAR、共刺激CAR (參見WO2014/055668)及/或抑制

性CAR (iCAR，參見Fedorov等人, 2013)。CAR通常包括在一些態樣中經由連接子及/或跨膜域連接至一或多種細胞內信號傳導組分之細胞外抗原(或配位體)結合域。此類分子通常模仿或近似穿過天然抗原受體之信號、穿過此類受體與共刺激受體之組合之信號及/或單獨穿過共刺激受體之信號。

【0106】 本發明之某些實施例係關於核酸之用途，包括編碼抗原特異性CAR多肽之核酸，包括已經人類化以降低免疫原性之CAR (hCAR)，包含細胞內信號傳導域、跨膜域及包含一或多種信號傳導基元之細胞外域。在某些實施例中，CAR可識別包含一或多種抗原之間的共用空間之抗原決定基。在某些實施例中，結合區可包含單株抗體之互補決定區、單株抗體之可變區及/或其抗原結合片段。在另一實施例中，該特異性來源於結合至受體之肽(例如細胞介素)。

【0107】 預期人類CAR核酸可為用於增強用於人類患者之細胞免疫療法之人類基因。在一特定實施例中，本發明包括全長CAR cDNA或編碼區。抗原結合區或抗原結合域可包含源於特定人類單株抗體之單鏈可變片段(scFv)之V_H及V_L鏈之片段，諸如美國專利7,109,304中所描述之彼等者，該專利以引用之方式併入本文中。該片段亦可為人類抗原特異性抗體之任何數目的不同抗原結合域。在更特定實施例中，該片段係抗原特異性scFv，該抗原特異性scFv係由針對用於在人類細胞中表現之人類密碼子使用最佳化的序列所編碼。

【0108】 配置可為多聚的，諸如雙功能抗體或多聚體。多聚體最可能由輕鏈及重鏈之可變部分交叉配對為雙功能抗體形成。構築體之鉸鏈部分可具有多種選擇，從完全缺失至維持第一半胱胺酸、至脯胺酸取代而非

絲胺酸取代、至截斷至第一半胱胺酸。Fc部分可缺失。穩定及/或二聚化之任何蛋白質均可供用於此目的。可僅使用Fc域中之一者，例如來自人類免疫球蛋白之CH2域或CH3域。亦可使用已經修飾以改良二聚化之人類免疫球蛋白之鉸鏈區、CH2區及CH3區。亦可僅使用免疫球蛋白之鉸鏈部分。亦可使用CD8 α 之部分。

【0109】 在一些實施例中，CAR核酸包含編碼其他共刺激受體之序列，該等共刺激受體諸如跨膜域及經修飾之CD28細胞內信號傳導域。其他共刺激受體包括(但不限於) CD28、CD27、OX-40 (CD134)、DAP10、DAP12及4-1BB (CD137)中之一或多者。除藉由CD3 ζ 引發之初級信號以外，藉由插入於人類CAR中之人類共刺激受體提供之額外信號對於NK細胞之完全活化具有重要性且可幫助改良授受免疫療法之體內持久性及治療成效。

【0110】 在一些實施例中，CAR經構築具有針對特定抗原(或標記物或配位體)之特異性，諸如在待由授受療法靶向之特定細胞類型中表現之抗原，例如癌症標記物；及/或意欲誘導抑制反應之抗原，諸如在正常或非病變細胞類型上表現之抗原。因此，CAR在其細胞外部分中通常包括一或多種抗原結合分子，諸如一或多種抗原結合片段、域或部分，或一或多種抗體可變域及/或抗體分子。在一些實施例中，CAR包括抗體分子之一或多個抗原結合部分，諸如來源於單株抗體(mAb)之可變重鏈(VH)及可變輕鏈(VL)的單鏈抗體片段(scFv)。

【0111】 在嵌合抗原受體之某些實施例中，受體之抗原特異性部分(其可稱為包含抗原結合區之細胞外域)包含腫瘤相關抗原或病原體特異性抗原結合域。抗原包括藉由模式識別受體，諸如凝集素-1識別之碳水化合物

物抗原。腫瘤相關抗原可為任何種類，只要其表現於腫瘤細胞之細胞表面上。腫瘤相關抗原之例示性實施例包括CD19、CD20、癌胚抗原、 α 胎蛋白、CA-125、MUC-1、CD56、EGFR、c-Met、AKT、Her2、Her3、上皮腫瘤抗原、黑素瘤相關抗原、突變p53、突變ras，諸如此類。在某些實施例中，當存在低量之腫瘤相關抗原時，CAR可與細胞介素共表現以改良持久性。舉例而言，CAR可與IL-15共表現。

【0112】 編碼嵌合受體之開放閱讀框架之序列可獲自基因組DNA源、cDNA源，或可經合成(例如經由PCR合成)，或其組合。視基因組DNA之尺寸及內含子之數目而定，可能需要使用cDNA或其組合，此係因為發現內含子使mRNA穩定。此外，可進一步有利地使用內源性或外源性非編碼區來使mRNA穩定。

【0113】 預期嵌合構築體可以裸DNA形式或在適合之載體中引入至免疫細胞中。藉由電穿孔使用裸DNA穩定轉染細胞之方法為此項技術中已知的。參見例如美國專利第6,410,319號。裸DNA一般係指編碼嵌合受體之DNA，該嵌合受體以對於表現適當之定向包含於質體表現載體中。

【0114】 或者，病毒載體(例如反轉錄病毒載體、腺病毒載體、腺相關病毒載體或慢病毒載體)可用於將嵌合構築體引入至免疫細胞中。根據本發明方法使用之適合之載體在免疫細胞中為非複製的。已知大量載體係基於病毒，其中維持於細胞中之病毒的複本數足夠低以維持細胞活力，諸如基於HIV、SV40、EBV、HSV或BPV之載體。

【0115】 在一些態樣中，抗原特異性結合或識別組分連接至一或多個跨膜及細胞內信號傳導域。在一些實施例中，CAR包括融合至CAR之細胞外域之跨膜域。在一個實施例中，使用與CAR中之一個域天然相關之

跨膜域。在一些情況下，跨膜域經選擇或由胺基酸取代修飾以避免此類域結合至相同或不同表面膜蛋白質之跨膜域，以使與受體複合物之其他成員的相互作用降至最低。

【0116】 在一些實施例中，跨膜域來源於天然或合成來源。在天然來源的情況下，在一些態樣中，域來源於任何膜結合型蛋白或跨膜蛋白。跨膜區包括來源於以下(亦即至少包含以下之一或多個跨膜區)之彼等：T細胞受體之 α 、 β 或 ζ 鏈、CD28、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD 16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD 134、CD137、CD154、ICOS/CD278、GITR/CD357、NKG2D及DAP分子。或者，在一些實施例中，跨膜域為合成的。在一些態樣中，合成性跨膜域主要包含疏水性殘基，諸如白胺酸及纈胺酸。在一些態樣中，將在合成性跨膜域之各端處發現苯丙胺酸、色胺酸及纈胺酸之三聯體。

【0117】 在某些實施例中，本文所揭示的用於遺傳修飾免疫細胞，諸如NK細胞之平台技術包含(i)使用電穿孔裝置(例如核轉染儀)之非病毒基因轉移，(ii)經由胞內域(例如CD28/CD3- ζ 、CD137/CD3- ζ 或其他組合)傳導信號之CAR，(iii)將抗原識別域連接至細胞表面之細胞外域的具有可變長度的CAR，及在一些情況下，(iv)能夠穩健地且在數值上擴增CAR⁺免疫細胞之衍生自K562之人工抗原呈現細胞(aAPC) (Singh等人, 2008；Singh等人, 2011)。

B. T細胞受體(TCR)

【0118】 在一些實施例中，經基因工程改造之抗原受體包括重組TCR及/或自天然產生之T細胞選殖之TCR。「T細胞受體」或「TCR」係

指含有可變 α 及 β 鏈(亦分別稱為TCR α 及TCR β)或可變 γ 及 δ 鏈(亦分別稱為TCR γ 及TCR δ)且能夠特異性結合於與MHC受體結合之抗原肽的分子。在一些實施例中，TCR呈 $\alpha\beta$ 形式。

【0119】通常，呈 $\alpha\beta$ 及 $\gamma\delta$ 形式存在之TCR一般結構上類似，但表現該等TCR之T細胞可具有不同結構位置或功能。TCR可發現於細胞表面上或呈可溶性形式。一般而言，TCR發現於一般負責識別與主要組織相容複合體(MHC)分子結合之抗原之T細胞(或T淋巴細胞)的表面上。在一些實施例中，TCR亦可含有恆定域、跨膜域及/或短胞質尾區(參見例如Janeway等人，1997)。舉例而言，在一些態樣中，TCR之各鏈可具有一個N端免疫球蛋白可變域、一個免疫球蛋白恆定域、跨膜區及C端末端處之短胞質尾區。在一些實施例中，TCR與涉及介導信號轉導之CD3複合物之恆定蛋白相關。除非另外說明，否則術語「TCR」應理解為涵蓋其功能TCR片段。術語亦涵蓋完整或全長TCR，包括呈 $\alpha\beta$ 形式或 $\gamma\delta$ 形式之TCR。

【0120】因此，出於本文之目的，TCR之提及包括任何TCR或功能片段，諸如結合於在MHC分子中結合之特定抗原肽，亦即結合於MHC-肽複合物之TCR的抗原結合部分。可互換使用之TCR之「抗原結合部分」或「抗原結合片段」係指含有TCR之結構域之部分但結合完全TCR所結合之抗原(例如MHC-肽複合物)的分子。在一些情況下，抗原結合部分含有足以形成用於結合至特異性MHC-肽複合物之結合位點(諸如一般各鏈含有三個互補決定區之位置)之TCR的可變域，諸如TCR之可變 α 鏈及可變 β 鏈。

【0121】在一些實施例中，TCR鏈之可變域締合以形成環或類似於免疫球蛋白之互補決定區(CDR)，其藉由形成TCR分子之結合位點賦予抗原識別且測定肽特異性。通常，如免疫球蛋白，CDR由框

架區(FR)分離(參見例如Jores等人, 1990 ; Chothia等人, 1988 ; Lefranc等人, 2003)。在一些實施例中, CDR3係負責識別經處理抗原之主要CDR, 儘管 α 鏈之CDR1亦已展示與抗原肽之N端部分相互作用, 而 β 鏈之CDR1與肽之C端部分相互作用。認為CDR2識別MHC分子。在一些實施例中, β 鏈之可變區可含有另一高變(HV4)區。

【0122】 在一些實施例中, TCR鏈含有恆定域。舉例而言, 如免疫球蛋白, TCR鏈(例如 α 鏈、 β 鏈)之細胞外部分可含有兩個免疫球蛋白域, 亦即N端處之可變域(例如, V_a 或 V_p ; 通常為基於Kabat編號之胺基酸1至116; Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 第5版)及靠近細胞膜之一個恆定域(例如, α 鏈恆定域或 C_a , 通常為基於Kabat之胺基酸117至259; β 鏈恆定域或 C_p , 通常為基於Kabat之胺基酸117至295)。舉例而言, 在一些情況下, 藉由兩個鏈形成之TCR之細胞外部分含有兩個近膜恆定域及兩個含有CDR之遠膜可變域。TCR域之恆定域含有短連接序列, 其中半胱胺酸殘基形成二硫鍵, 在兩個鏈之間產生連接。在一些實施例中, TCR在 α 及 β 鏈中之每一者可具有另一半胱胺酸殘基, 使得TCR在恆定域中含有兩個二硫鍵。

【0123】 在一些實施例中, TCR鏈可含有跨膜域。在一些實施例中, 跨膜域帶正電。在一些情況下, TCR鏈含有胞質尾區。在一些情況下, 結構允許TCR與如同CD3之其他分子締合。舉例而言, 含有具有跨膜區之恆定域的TCR可將蛋白質錨定在細胞膜中且與CD3信號傳導設備或複合物之恆定亞基締合。

【0124】 一般而言, CD3係可具有哺乳動物中之三個不同鏈(γ 、 δ 及

ϵ)及 ζ 鏈之多蛋白質複合物。舉例而言，在哺乳動物中，複合物可含有CD3 γ 鏈、CD3 δ 鏈、兩個CD3 ϵ 鏈及CD3 ζ 鏈之均二聚體。CD3 γ 、CD3 δ 及CD3 ϵ 鏈係含有單一免疫球蛋白域之免疫球蛋白超家族之高度相關細胞表面蛋白質。CD3 γ 、CD3 δ 及CD3 ϵ 鏈之跨膜區帶負電，其特徵在於使此等鏈與帶正電之T細胞受體鏈締合。CD3 γ 、CD3 δ 及CD3 ϵ 鏈之細胞內尾區各含有稱為基於免疫受體酪胺酸之活化基元或ITAM之單一保守基元，而各CD3 ζ 鏈具有三個保守基元。一般而言，ITAM涉及TCR複合物之信號傳導能力。此等輔助分子具有帶負電跨膜區且在將信號自TCR傳播至細胞中起作用。CD3鏈及 ζ 鏈與TCR一起形成為T細胞受體複合物。

【0125】 在一些實施例中，TCR可為兩個鏈 α 及 β (或視情況 γ 及 δ)之雜二聚體或其可為單鏈TCR構築體。在一些實施例中，TCR係含有諸如藉由一或多個二硫鍵連接之兩個獨立鏈(α 及 β 鏈或 γ 及 δ 鏈)之雜二聚體。在一些實施例中，鑑別靶抗原(例如癌症抗原)之TCR且將其引入細胞中。在一些實施例中，編碼TCR之核酸可諸如藉由公開可用之TCR DNA序列之聚合酶鏈反應(PCR)擴增而獲自各種來源。在一些實施例中，TCR係獲自生物來源，諸如獲自細胞，諸如獲自T細胞(例如，細胞毒性T細胞)、T細胞融合瘤或其他公開可用的來源。在一些實施例中，T細胞可獲自體內分離之細胞。在一些實施例中，可自患者分離高親和力T細胞純系，且分離TCR。在一些實施例中，T細胞可為經培養T細胞融合瘤或純系。在一些實施例中，靶抗原之TCR純系已在用人類免疫系統基因(例如人白血球抗原系統或HLA)工程改造之轉殖基因小鼠中產生。參見例如腫瘤抗原(參見例如Parkhurst等人，2009及Cohen等人，2005)。在一些實施例中，噬菌體呈現用於分離TCR與靶抗原(參見例如Varela-Rohena等人，2008及Li，

2005)。在一些實施例中，TCR或其抗原結合部分可由TCR序列之瞭解合成產生。

C. 抗原

【0126】 在藉由基因工程改造抗原受體靶向之抗原中包括在經由授受細胞療法靶向之疾病、病況或細胞類型之情況下表現之彼等。在疾病及病況中包括增生性、贅生性及惡性疾病及病症，包括癌症及腫瘤，包括血液癌、免疫系統癌症，諸如淋巴瘤、白血病及/或骨髓瘤，諸如B、T及骨髓白血病、淋巴瘤及多發性骨髓瘤。在一些實施例中，相比於正常或非靶向細胞或組織，抗原選擇性地表現或過度表現於疾病或病況細胞，例如腫瘤或病原細胞上。在其他實施例中，抗原表現於正常細胞上及/或表現於工程改造細胞上。

【0127】 任何適合之抗原可用於本發明方法中。例示性抗原包括但不限於來自感染物之抗原分子、自體/自身抗原、腫瘤/癌症相關抗原及腫瘤新抗原(Linnemann等人, 2015)。在特定態樣中，抗原包括NY-ESO、EGFRvIII、Muc-1、Her2、CA-125、WT-1、Mage-A3、Mage-A4、Mage-A10、TRAIL/DR4及CEA。在特定態樣中，針對兩種或更多種抗原受體之抗原包括(但不限於) CD19、EBNA、WT1、CD123、NY-ESO、EGFRvIII、MUC1、HER2、CA-125、WT1、Mage-A3、Mage-A4、Mage-A10、TRAIL/DR4及/或CEA。此等抗原之序列係此項技術中已知的，例如(所有均為 GenBank® 之寄存編號) CD19 (寄存編號 NG_007275.1)、EBNA (寄存編號 NG_002392.2)、WT1 (寄存編號 NG_009272.1)、CD123 (寄存編號 NC_000023.11)、NY-ESO (寄存編號 NC_000023.11)、EGFRvIII (寄存編號 NG_007726.3)、MUC1 (寄存編號

NG_029383.1)、HER2 (寄存編號NG_007503.1)、CA-125 (寄存編號NG_055257.1)、WT1 (寄存編號NG_009272.1)、Mage-A3 (寄存編號NG_013244.1)、Mage-A4 (寄存編號NG_013245.1)、Mage-A10 (寄存編號NC_000023.11)、TRAIL/DR4 (寄存編號NC_000003.12)及/或CEA (寄存編號NC_000019.10)。

【0128】 腫瘤相關抗原可衍生自前列腺癌、乳癌、結腸直腸癌、肺癌、胰臟癌、腎癌、間皮瘤、卵巢癌或黑素瘤。例示性腫瘤相關抗原或腫瘤細胞衍生抗原包括MAGE 1、MAGE 3及MAGE 4 (或其他MAGE抗原，諸如國際專利公開案第WO99/40188號中所揭示之彼等MAGE抗原)；PRAME；BAGE；RAGE，Lage (亦稱為NY ESO 1)；SAGE；及HAGE或GAGE。腫瘤抗原之此等非限制性實例表現於大範圍之腫瘤類型，諸如黑素瘤、肺癌、肉瘤及膀胱癌中。參見例如美國專利第6,544,518號。前列腺癌腫瘤相關抗原包括例如前列腺特異性膜抗原(PSMA)、前列腺特異性抗原(PSA)、前列腺酸磷酸鹽、NKX3.1及前列腺六次跨膜上皮抗原(STEAP)。

【0129】 其他腫瘤相關抗原包括Plu-1、HASH-1、HasH-2、Cripto及Criptin。另外，腫瘤抗原可為自身肽激素，諸如全長促性腺激素釋放激素(GnRH)，一種適用於治療許多癌症之長度為10個胺基酸的短肽。

【0130】 腫瘤抗原包括衍生自藉由腫瘤相關抗原表現，諸如HER-2/neu表現表徵之癌症的腫瘤抗原。所關注之腫瘤相關抗原包括譜系特異性腫瘤抗原，諸如黑色素細胞-黑素瘤譜系抗原MART-1/Melan-A、gp100、gp75、mda-7、酪胺酸酶及酪胺酸酶相關蛋白。說明性腫瘤相關抗原包括(但不限於)衍生自或包含以下中之任何一或多者之腫瘤抗原：

p53、Ras、c-Myc、細胞質絲胺酸/蘇胺酸激酶(例如A-Raf、B-Raf及C-Raf、細胞週期蛋白依賴性激酶)、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A10、MAGE-A12、MART-1、BAGE、DAM-6、DAM-10、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-8、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7B、NA88-A、MART-1、MC1R、Gp100、PSA、PSM、酪胺酸酶、TRP-1、TRP-2、ART-4、CAMEL、CEA、Cyp-B、hTERT、hTRT、iCE、MUC1、MUC2、磷酸肌醇3-激酶(PI3K)、TRK受體、PRAME、P15、RU1、RU2、SART-1、SART-3、威耳姆士腫瘤抗原(Wilms' tumor antigen；WT1)、AFP、-連環蛋白/m、凋亡蛋白酶-8/m、CEA、CDK-4/m、ELF2M、GnT-V、G250、HSP70-2M、HST-2、KIAA0205、MUM-1、MUM-2、MUM-3、肌球蛋白/m、RAGE、SART-2、TRP-2/INT2、707-AP、磷脂結合蛋白II、CDC27/m、TPI/mbcr-abl、BCR-ABL、干擾素調節因子4 (IRF4)、ETV6/AML、LDLR/FUT、Pml/RAR、腫瘤相關鈣信號轉導蛋白1 (TACSTD1) TACSTD2、受體酪胺酸激酶(例如表皮生長因子受體(EGFR)(特定言之EGFRvIII)、血小板衍生生長因子受體(PDGFR)、血管內皮生長因子受體(VEGFR))、細胞質酪胺酸激酶(例如src-家族、syk-ZAP70家族)、整合素連接激酶(ILK)、轉錄之信號轉導蛋白及活化因子STAT3、STATS及STATE、低氧誘導因子(例如HIF-1及HIF-2)、核因子- κ B(NF-B)、Notch受體(例如Notch1-4)、c-Met、雷帕黴素(rapamycin)之哺乳動物標靶(mTOR)、WNT、細胞外信號調節激酶(ERK)及其調節亞基、PMSA、PR-3、MDM2、間皮素、腎細胞癌-5T4、SM22- α 、碳酸酐酶I(CAI)及IX (CAIX) (亦稱為G250)、STEAD、TEL/AML1、GD2、蛋白酶

3、hTERT、肉瘤易位斷點、EphA2、ML-IAP、EpCAM、ERG (TMPRSS2 ETS融合基因)、NA17、PAX3、ALK、雄激素受體、細胞週期蛋白B1、聚唾液酸、MYCN、RhoC、GD3、岩藻糖基GM1、間皮素、PSCA、sLe、PLAC1、GM3、BORIS、Tn、GLoboH、NY-BR-1、RGsS、SART3、STn、PAX5、OY-TES1、精子蛋白17、LCK、HMWMAA、AKAP-4、SSX2、XAGE 1、B7H3、豆莢蛋白、TIE2、Page4、MAD-CT-1、FAP、MAD-CT-2、fos相關抗原1、CBX2、CLDN6、SPANX、TPTE、ACTL8、ANKRD30A、CDKN2A、MAD2L1、CTAG1B、SUNC1、LRRN1及個體基因型。

【0131】 抗原可包括抗原決定基區或抗原決定基肽，其衍生自腫瘤細胞中突變之基因或相比於正常細胞在腫瘤細胞中以不同位準經轉錄之基因，諸如端粒酶、存活素、間皮素、突變ras、bcr/abl重排、Her2/neu、突變或野生型p53、細胞色素P450 1B1，及異常表現之內含子序列，諸如N-乙醯胺基葡萄糖轉移酶-V；在骨髓瘤及B細胞淋巴瘤中產生獨特個體基因型之免疫球蛋白基因之純系重排；包括衍生自癌病毒過程之抗原決定基區或抗原決定基肽之腫瘤抗原，諸如人類乳頭狀瘤病毒蛋白E6及E7；艾巴二氏病毒蛋白(Epstein bar virus protein) LMP2；具有腫瘤選擇性表現之非變異癌胚蛋白，諸如癌胚抗原及 α -胎蛋白。

【0132】 在其他實施例中，抗原獲自或衍生自病原微生物或條件性病原微生物(在本文中亦稱作感染性疾病微生物)，諸如病毒、真菌、寄生蟲及細菌。在某些實施例中，衍生自此類微生物之抗原包括全長蛋白。

【0133】 其抗原預期用於本文所述之方法的說明性病原性生物體包括人類免疫缺乏病毒(HIV)、單純疱疹病毒(HSV)、呼吸道融合病毒

(RSV)、細胞巨大病毒(CMV)、艾-巴二氏病毒(EBV)、A型、B型及C型流感、水泡性口炎病毒(VSV)、水泡性口炎病毒(VSV)、多瘤病毒(例如BK病毒及JC病毒)、腺病毒、包括抗甲氧西林金黃色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ; MRSA)之葡萄球菌屬(*Staphylococcus*)物種及包括肺炎鏈球菌(*Streptococcus pneumoniae*)之鏈球菌屬(*Streptococcus*)物種。如熟習此項技術者將理解，衍生自此等及其他病原性微生物的適用作如本文所描述之抗原的蛋白質及編碼該等蛋白質之核苷酸序列可在公開案及公開資料庫，諸如GENBANK®、SWISS-PROT®及TREMBL®中鑑別。

【0134】 衍生自人類免疫缺乏病毒(HIV)之抗原包括以下中之任一者：HIV病毒粒子結構蛋白(例如gp120、gp41、p17、p24)、蛋白酶、反轉錄酶或由tat、rev、nef、vif、vpr及vpu編碼之HIV蛋白。

【0135】 衍生自單純疱疹病毒(例如HSV 1及HSV2)之抗原包括(但不限於)表現自HSV晚期基因之蛋白質。晚期基因組主要編碼形成病毒粒子之蛋白質。此類蛋白質包括形成病毒衣殼之來自(UL)之五種蛋白質：UL6、UL18、UL35、UL38及主要衣殼蛋白UL19、UL45及UL27，其各自可用作如本文所述之抗原。預期用作本文中之抗原的其他說明性HSV蛋白包括ICP27 (H1、H2)、醣蛋白B (gB)及醣蛋白D (gD)蛋白。HSV基因組包含至少74個基因，各自編碼可潛在地用作抗原之蛋白質。

【0136】 衍生自細胞巨大病毒(CMV)之抗原包括CMV結構蛋白、在病毒複製之即刻早期及早期期間表現之病毒抗原、醣蛋白I及III、衣殼蛋白、鞘蛋白、低基質蛋白pp65 (ppUL83)、p52 (ppUL44)、IE1及IE2 (UL123及UL122)、來自UL128-UL150基因集群之蛋白質產物(Rykman等

人, 2006)、包膜醣蛋白B (gB)、gH、gN及pp150。如熟習此項技術者將理解, 適用作本文所述之抗原的CMV蛋白可在公開資料庫, 諸如GENBANK®、SWISS-PROT®及TREMBL®中鑑別(參見例如Bennekov等人, 2004; Loewendorf等人, 2010; Marschall等人, 2009)。

【0137】 預期用於某些實施例之衍生自艾-巴二氏病毒(EBV)之抗原包括EBV溶解蛋白gp350及gp110、在潛伏週期感染期間產生之EBV蛋白, 包括艾-巴二氏核抗原(EBNA)-1、EBNA-2、EBNA-3A、EBNA-3B、EBNA-3C、EBNA-前導蛋白(EBNA-LP)及潛伏膜蛋白(LMP)-1、LMP-2A及LMP-2B (參見例如Lockey等人, 2008)。

【0138】 預期用於本文中之衍生自呼吸道融合病毒(RSV)之抗原包括由RSV基因組編碼之十一種蛋白質中之任一者, 或其抗原片段: NS1、NS2、N (核衣殼蛋白)、M (基質蛋白) SH、G及F (病毒外殼蛋白)、M2 (第二基質蛋白)、M2-1 (延長因子)、M2-2 (轉錄調節)、RNA聚合酶及磷蛋白P。

【0139】 預期使用之衍生自水泡性口炎病毒(VSV)之抗原包括由VSV基因組編碼之五種主要蛋白中之任一者, 及其抗原片段: 大蛋白(L)、醣蛋白(G)、核蛋白(N)、磷蛋白(P)及基質蛋白(M) (參見例如Rieder等人, 1999)。

【0140】 預期用於某些實施例之衍生自流感病毒之抗原包括血球凝集素(HA)、神經胺糖酸苷酶(NA)、核蛋白(NP)、基質蛋白M1及M2、NS1、NS2 (NEP)、PA、PB1、PB1-F2及PB2。

【0141】 例示性病毒抗原亦包括(但不限於)腺病毒多肽、 α 病毒多肽、杯狀病毒多肽(例如杯狀病毒衣殼抗原)、冠狀病毒多肽、犬瘟熱病毒

多肽、伊波拉(Ebola)病毒多肽、腸病毒多肽、黃病毒多肽、肝炎病毒(AE)多肽(B型肝炎核心或表面抗原、C型肝炎病毒E1或E2醣蛋白、核心或非結構蛋白)、疱疹病毒多肽(包括單純疱疹病毒或水痘帶狀疱疹病毒醣蛋白)、感染性腹膜炎病毒多肽、白血病毒多肽、馬堡(Marburg)病毒多肽、正黏液病毒多肽、乳頭瘤病毒多肽、副流感病毒多肽(例如血球凝集素及神經胺糖酸苷酶多肽)、副黏液病毒多肽、小病毒多肽、瘟病毒多肽、病毒科病毒多肽(例如脊髓灰白質炎病毒衣殼多肽)、痘病毒多肽(例如痘瘡病毒多肽)、狂犬病病毒多肽(例如狂犬病病毒醣蛋白G)、里奧病毒(reovirus)多肽、反轉錄病毒多肽及輪狀病毒多肽。

【0142】 在某些實施例中，抗原可為細菌抗原。在某些實施例中，所關注之細菌抗原可為分泌多肽。在其他某些實施例中，細菌抗原包括具有暴露於細菌之外細胞表面上之多肽之一或多個部分的抗原。

【0143】 預期使用之衍生自包括抗甲氧西林金黃色葡萄球菌(MRSA)之葡萄球菌屬物種之抗原包括毒性調節劑，諸如Agr系統、Sar及Sae、Arl系統、Sar同系物(Rot、MgrA、SarS、SarR、SarT、SarU、SarV、SarX、SarZ及TcaR)、Srr系統及TRAP。可充當抗原之其他葡萄球菌屬蛋白質包括Clp蛋白質、HtrA、MsrR、烏頭酸酶、CcpA、SvrA、Msa、CfvA及CfvB (參見例如*Staphylococcus: Molecular Genetics*, 2008 Caister Academic Press, Jodi Lindsay編)。金黃色葡萄球菌之兩個物種(N315及Mu50)之基因組已定序且公開可用，例如在PATRIC (PATRIC: The VBI PathoSystems Resource Integration Center, Snyder 等人, 2007)。如熟習此項技術者將理解，用作抗原之葡萄球菌蛋白質亦可在其他公開資料庫，諸如GenBank®、Swiss-Prot®及TrEMBL®中鑑別。

【0144】 預期用於本文所述之某些實施例的衍生自肺炎鏈球菌之抗原包括肺炎鏈球菌溶血素、PspA、膽鹼-結合蛋白A (CbpA)、NanA、NanB、SpnHL、PavA、LytA、Pht及菌毛蛋白(RrgA；RrgB；RrgC)。肺炎鏈球菌之抗原性蛋白質亦為此項技術中已知的且可在一些實施例中用作抗原(參見例如Zysk等人, 2000)。肺炎鏈球菌之毒性病毒株之完整基因組序列已定序且如熟習此項技術者應理解，本文中所用之肺炎鏈球菌蛋白質亦可在其他公開資料庫，諸如 GENBANK®、SWISS-PROT® 及 TREMBL®中鑑別。用於根據本發明之抗原的尤其相關之蛋白質包括預測暴露於肺炎球菌(pneumococci)表面之毒性因子及蛋白質(參見例如Frolet等人, 2010)。

【0145】 可用作抗原之細菌抗原之實例包括但不限於放線菌屬(*Actinomyces*)多肽、芽孢桿菌屬(*Bacillus*)多肽、擬桿菌屬(*Bacteroides*)多肽、鮑特氏菌屬(*Bordetella*)多肽、巴爾通體屬(*Bartonella*)多肽、疏螺旋體屬(*Borrelia*)多肽(例如伯氏疏螺旋體(*B. burgdorferi*) OspA)、布氏桿菌屬(*Brucella*)多肽、曲狀桿菌屬(*Campylobacter*)多肽、二氧化碳嗜纖維菌屬(*Capnocytophaga*)多肽、披衣菌屬(*Chlamydia*)多肽、棒狀桿菌屬(*Corynebacterium*)多肽、考克斯氏體屬(*Coxiella*)多肽、潛蚤屬(*Dermatophilus*)多肽、腸球菌屬(*Enterococcus*)多肽、艾利希體屬(*Ehrlichia*)多肽、艾氏菌屬(*Escherichia*)多肽、弗朗西斯氏菌屬(*Francisella*)多肽、梭桿菌屬(*Fusobacterium*)多肽、血巴爾通氏體屬(*Haemobartonella*)多肽、嗜血桿菌屬(*Haemophilus*)多肽(例如流感嗜血桿菌(*H. influenzae*) b型外膜蛋白質)、螺旋桿菌屬(*Helicobacter*)多肽、克雷伯氏菌屬(*Klebsiella*)多肽、L-形式細菌多肽、鉤端螺旋體屬

(*Leptospira*) 多肽、李斯特菌屬 (*Listeria*) 多肽、分枝桿菌屬 (*Mycobacteria*) 多肽、黴漿菌屬 (*Mycoplasma*) 多肽、奈瑟氏菌屬 (*Neisseria*) 多肽、新立克次體屬 (*Neorickettsia*) 多肽、諾卡菌屬 (*Nocardia*) 多肽、巴氏桿菌屬 (*Pasteurella*) 多肽、消化球菌屬 (*Peptococcus*) 多肽、消化鏈球菌屬 (*Peptostreptococcus*) 多肽、肺炎球菌屬 (*Pneumococcus*) 多肽(亦即肺炎鏈球菌(*S. pneumoniae*)多肽) (參見本文描述)、變形桿菌屬 (*Proteus*) 多肽、假單胞菌屬 (*Pseudomonas*) 多肽、立克次體屬 (*Rickettsia*) 多肽、羅克利馬體屬 (*Rochalimaea*) 多肽、沙門氏菌屬 (*Salmonella*) 多肽、志賀桿菌屬 (*Shigella*) 多肽、葡萄球菌屬 (*Staphylococcus*) 多肽、A組鏈球菌屬 (*streptococcus*) 多肽(例如化膿性鏈球菌(*S. pyogenes*) M蛋白)、B組鏈球菌屬(無乳鏈球菌(*S. agalactiae*))多肽、密螺旋體屬 (*Treponema*) 多肽及耶爾森菌屬 (*Yersinia*) 多肽(例如鼠疫耶爾森菌(*Y. pestis*) F1及V抗原)。

【0146】 真菌抗原之實例包括(但不限於)犁頭黴屬 (*Absidia*) 多肽、枝頂孢屬 (*Acremonium*) 多肽、交鏈孢屬 (*Alternaria*) 多肽、麴菌屬 (*Aspergillus*) 多肽、蛙糞黴菌屬 (*Basidiobolus*) 多肽、平臍蠕孢屬 (*Bipolaris*) 多肽、芽生菌屬 (*Blastomyces*) 多肽、念珠菌屬 (*Candida*) 多肽、粗球菌 (*Coccidioides*) 多肽、耳黴屬 (*Conidiobolus*) 多肽、隱球菌屬 (*Cryptococcus*) 多肽、彎孢黴屬 (*Curvalaria*) 多肽、表皮癬菌 (*Epidermophyton*) 多肽、外瓶黴屬 (*Exophiala*) 多肽、地絲菌 (*Geotrichum*) 多肽、組織漿菌 (*Histoplasma*) 多肽、馬杜拉分支菌屬 (*Madurella*) 多肽、馬拉色氏黴菌屬 (*Malassezia*) 多肽、小芽孢菌 (*Microsporum*) 多肽、小叢梗孢屬 (*Moniliella*) 多肽、被孢黴屬 (*Mortierella*) 多肽、白黴菌屬 (*Mucor*)

多肽、擬青黴菌屬(*Paecilomyces*)多肽、青黴菌屬(*Penicillium*)多肽、單胞瓶黴屬(*Phialemonium*)多肽、瓶黴屬(*Phialophora*)多肽、原壁菌屬(*Prototheca*)多肽、假埃希氏菌屬(*Pseudallescheria*)多肽、假小托菌屬(*Pseudomicrodochium*)多肽、腐黴菌(*Pythium*)多肽、鼻孢子蟲屬(*Rhinosporidium*)多肽、根黴菌屬(*Rhizopus*)多肽、線狀擔子菌屬(*Scolecobasidium*)多肽、孢子絲菌屬(*Sporothrix*)多肽、匍柄黴屬(*Stemphylium*)多肽、發癬菌(*Trichophyton*)多肽、毛芽胞酵母(*Trichosporon*)多肽及木絲黴屬(*Xylohypha*)多肽。

【0147】 原蟲寄生蟲抗原之實例包括(但不限於)巴倍蟲屬(*Babesia*)多肽、腸袋蟲屬(*Balantidium*)多肽、貝諾孢子蟲屬(*Besnoitia*)多肽、隱孢子蟲屬(*Cryptosporidium*)多肽、艾美球蟲屬(*Eimeria*)多肽、腦胞內原蟲屬(*Encephalitozoon*)多肽、內阿米巴屬(*Entamoeba*)多肽、梨形鞭毛蟲屬(*Giardia*)多肽、哈蒙德蟲屬(*Hammondia*)多肽、肝簇蟲屬(*Hepatozoon*)多肽、等孢子球蟲屬(*Isospora*)多肽、利什曼原蟲屬(*Leishmania*)多肽、微孢子蟲目(*Microsporidia*)多肽、新孢子蟲屬(*Neospora*)多肽、小孢子蟲屬(*Nosema*)多肽、五鞭毛蟲屬(*Pentatrichomonas*)多肽、瘧原蟲屬(*Plasmodium*)多肽。寄生蠕蟲抗原之實例包括(但不限於)棘唇屬(*Acanthocheilonema*)多肽、貓圓線蟲屬(*Aelurostrongylus*)多肽、鉤蟲屬(*Ancylostoma*)多肽、血管圓線蟲屬(*Angiostrongylus*)多肽、蛔蟲屬(*Ascaris*)多肽、布魯線蟲屬(*Brugia*)多肽、仰口線蟲屬(*Bunostomum*)多肽、毛細線蟲屬(*Capillaria*)多肽、夏氏線蟲屬(*Chabertia*)多肽、古柏線蟲屬(*Cooperia*)多肽、環體線蟲屬(*Crenosoma*)多肽、網尾線蟲屬(*Dictyocaulus*)多肽、膨結線蟲屬(*Dioctophyme*)多肽、雙板線蟲屬

(*Dipetalonema*)多肽、裂頭條蟲屬(*Diphyllbothrium*)多肽、複孔條蟲屬(*Diplydium*)多肽、絲蟲屬(*Dirofilaria*)多肽、龍線屬(*Dracunculus*)多肽、住腸線蟲屬(*Enterobius*)多肽、類絲蟲屬(*Filaroides*)多肽、血矛線蟲屬(*Haemonchus*)多肽、兔唇蛔屬(*Lagochilascaris*)多肽、羅阿線蟲屬(*Loa*)多肽、曼森線蟲屬(*Mansonella*)多肽、繆勒線蟲屬(*Muellerius*)多肽、侏形吸蟲屬(*Nanophyetus*)多肽、鉤蟲屬(*Necator*)多肽、細頸線蟲屬(*Nematodirus*)多肽、結節線蟲屬(*Oesophagostomum*)多肽、盤尾絲蟲屬(*Onchocerca*)多肽、後睪吸蟲屬(*Opisthorchis*)多肽、奧斯特線蟲屬(*Ostertagia*)多肽、副絲蟲屬(*Parafilaria*)多肽、並殖吸蟲屬(*Paragonimus*)多肽、副蛔蟲屬(*Parascaris*)多肽、泡翼線蟲屬(*Physaloptera*)多肽、原圓屬(*Protostrongylus*)多肽、狗尾草屬(*Setaria*)多肽、旋尾線蟲屬(*Spirocerca*)多肽、迭宮條蟲屬(*Spirometra*)多肽、冠絲蟲屬(*Stephanofilaria*)多肽、類圓線蟲屬(*Strongyloides*)多肽、圓線蟲屬(*Strongylus*)多肽、吸吮線蟲屬(*Thelazia*)多肽、蛔線蟲屬(*Toxascaris*)多肽、弓蛔蟲屬(*Toxocara*)多肽、旋毛蟲屬(*Trichinella*)多肽、毛樣圓蟲屬(*Trichostrongylus*)多肽、鞭蟲屬(*Trichuris*)多肽、鉤蟲屬(*Uncinaria*)多肽及吳策線蟲屬(*Wuchereria*)多肽。(例如惡性瘧原蟲(*P. falciparum*)環子孢子(PfCSP))、子孢子表面蛋白2 (PfSSP2)、肝狀態抗原1之羧基末端(PfLSA1 c-term)及輸出蛋白1(PfExp-1)、肺囊蟲(*Pneumocystis*)多肽、肉孢子蟲(*Sarcocystis*)多肽、住血吸蟲屬(*Schistosoma*)多肽、泰累爾犁漿蟲屬(*Theileria*)多肽、弓蟲屬(*Toxoplasma*)多肽及錐蟲屬(*Trypanosoma*)多肽。

【0148】 外部寄生蟲抗原之實例包括(但不限於外部寄生蟲抗原之實

例包括(但不限於)來自以下之多肽(包括抗原以及過敏原)：跳蚤；蜚，包括硬蜚及軟蜚；蒼蠅，諸如蠓、蚊子、白蛉、黑蠅、馬蠅、角蠅、鹿蠅、舌蠅、腐蝕蠅、引起蠅蛆病之蒼蠅及庫蠓；螞蟥；蜘蛛、虱；蟎；以及蝨，諸如床虱及接吻蟲。

D. 自殺基因

【0149】 本發明之免疫細胞之CAR可包含一或多種自殺基因。如本文所用，術語「自殺基因」定義為在投與前藥時實現基因產物向殺滅其宿主細胞之化合物之轉變的基因。可使用之自殺基因/前藥組合之實例為單純疱疹病毒-胸苷激酶(HSV-tk)及更昔洛韋(ganciclovir)、阿昔洛韋(acyclovir)或FIAU；氧化還原酶及環己醯亞胺；胞嘧啶脫胺酶及5-氟胞嘧啶；胸苷激酶胸苷酸激酶(Tdk::Tmk)及AZT；以及去氧胞苷激酶及胞嘧啶阿拉伯糖苷。

【0150】 大腸桿菌(*E. coli*)嘌呤核苷磷酸化酶，所謂的自殺基因，其將前藥6-甲基嘌呤去氧核糖苷轉化為有毒嘌呤6-甲基嘌呤。與前藥療法一起使用之自殺基因之其他實例為大腸桿菌胞嘧啶脫胺酶基因及HSV胸苷激酶基因。

【0151】 例示性自殺基因包括CD20、CD52、EGFRv3、利米多賽(rimiducid)或誘導性凋亡蛋白酶9。在一個實施例中，EGFR變體III(EGFRv3)之截短型式可用作可藉由西妥昔單抗(Cetuximab)切除之自殺抗原。可用於本發明中之此項技術中已知之其他自殺基因包括：嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)、細胞色素p450酶(CYP)、羧肽酶(CP)、羧酸酯酶(CE)、硝基還原酶(NTR)、鳥嘌呤核糖基轉移酶(XGRTP)、糖苷酶、甲硫胺酸- α , γ -解離酶(MET)及胸苷磷酸化酶(TP)。

E. 遞送方法

【0152】 熟習此項技術者將充分配備以經由用於表現本發明之抗原受體的標準重組技術來構築載體(參見例如Sambrook等人, 2001及Ausubel等人, 1996, 兩者均以引用的方式併入本文中)。載體包括(但不限於)質體、黏質體、病毒(噬菌體、動物病毒及植物病毒)及人工染色體(例如, YAC), 諸如反轉錄病毒載體(例如, 來源於莫洛尼鼠類白血病毒載體(MoMLV)、MSCV、SFFV、MPSV、SNV等之載體)、慢病毒載體(例如, 來源於HIV-1、HIV-2、SIV、BIV、FIV等之載體)、腺病毒(Ad)載體(包括其複製勝任形式、複製缺陷形式及無腸形式)、腺相關病毒(AAV)載體、猴病毒40 (SV-40)載體、牛乳頭瘤病毒載體、艾-巴二氏病毒載體、疱疹病毒載體、痘瘡病毒載體、哈維鼠肉瘤病毒(Harvey murine sarcoma virus)載體、鼠類乳房腫瘤病毒載體、勞斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus)載體、小病毒載體、小兒麻痺病毒載體、水泡性口炎病毒載體、馬拉巴病毒(maraba virus)載體及B組腺病毒恩那希瑞(enadenotucirev)載體。

a. 病毒載體

【0153】 本發明之某些態樣中可提供編碼抗原受體之病毒載體。在生成重組病毒載體時, 通常用異源(或非天然)蛋白質之基因或編碼序列來替換非必需基因。病毒載體係利用病毒序列將核酸且有可能蛋白質引入細胞中的一類表現構築體。某些病毒經由受體介導之內飲作用感染細胞或進入細胞並整合至宿主細胞基因組中並且穩定且有效表現病毒基因的能力使其成為用於將外源核酸轉移至細胞(例如, 哺乳動物細胞)中的優良候選者。下文描述可用於遞送本發明之某些態樣之核酸的病毒載體的非限制性實例。

【0154】 慢病毒為複合反轉錄病毒，除常見反轉錄病毒基因*gag*、*pol*及*env*以外，慢病毒亦含有其他具有調節或結構性功能之基因。慢病毒載體為此項技術中所熟知的(參見例如美國專利6,013,516及5,994,136)。

【0155】 重組慢病毒載體能夠感染非分裂細胞，且可用於體內及體外基因轉移及核酸序列表現。舉例而言，美國專利5,994,136中描述了能夠感染非分裂細胞之重組慢病毒，其中適合的宿主細胞經兩個或更多個具有包裝功能(亦即*gag*、*pol*及*env*以及*rev*及*tat*)之載體轉染，該專利以引用之方式併入本文中。

b. 調節元件

【0156】 包括於適用於本發明之載體中的表現卡匣尤其含有(在5'至3'方向上)可操作地連接於蛋白質編碼序列之真核轉錄啟動子、包括介入序列之剪接信號及轉錄終止/聚腺苷酸化序列。控制真核細胞中之蛋白質編碼基因之轉錄的啟動子及強化子由多個基因元件構成。細胞機構能夠聚集及整合由各元件輸送之調節資訊，從而允許不同基因演進出不同的、常常複合的轉錄調節模式。在本發明之上下文中所使用之啟動子包括組成性、誘導性及組織特異性啟動子。

(i) 啟動子/強化子

【0157】 本文所提供之表現構築體包含驅動抗原受體之表現的啟動子。啟動子一般包含用於定位RNA合成之起始位點的序列。此之最佳已知實例為TATA盒，但在不具有TATA盒之一些啟動子，諸如哺乳動物末端去氧核苷酸轉移酶基因之啟動子及SV40晚期基因之啟動子中，上覆於起始位點本身之離散元件有助於固定起始之位置。額外啟動子元件調節轉錄起始頻率。通常，此等元件位於起始位點上游30110 bp區域中，但許多啟

動子已顯示亦含有起始位點下游之功能元件。為「在啟動子控制下」引入編碼序列，將轉錄閱讀框架之轉錄起始位點之5'端置於所選擇的啟動子之「下游」(亦即3'端之下游)。「上游」啟動子刺激DNA之轉錄且促進經編碼RNA之表現。

【0158】 啟動子元件之間的間距通常為靈活的，使得當元件相對彼此倒置或移動時保留啟動子功能。在tk啟動子中，啟動子元件之間的間距可在活性開始下降之前增加至相隔50 bp。視啟動子而定，個別元件似乎可合作地或獨立地起活化轉錄作用。啟動子可或可不與「強化子」結合使用，強化子係指涉及核酸序列之轉錄活化的順式作用調節序列。

【0159】 啟動子可為天然與核酸序列相關的一種啟動子，如可藉由分離位於編碼區段及/或外顯子上游之5'端非編碼序列獲得。此類啟動子可稱為「內源」的。類似地，強化子可為天然與核酸序列相關，位於彼序列下游或上游之一種強化子。或者，某些優勢將藉由將編碼核酸區段置於重組或異源啟動子控制下來獲得，重組或異源啟動子係指在其天然環境中通常不與核酸序列相關之啟動子。重組或異源強化子亦係指在其天然環境中通常不與核酸序列相關之強化子。此類啟動子或強化子可包括其他基因之啟動子或強化子，及自任何其他病毒或原核或真核細胞分離之啟動子或強化子，及非「天然存在」之啟動子或強化子，亦即含有不同轉錄調節區之不同元件及/或改變表現之突變。舉例而言，最常用於重組DNA構築之啟動子包括 β -內醯胺酶(青黴素酶)、乳糖及色胺酸(trp-)啟動子系統。除合成地產生啟動子及強化子之核酸序列以外，可結合本文所揭示之組合物使用重組選殖及/或核酸擴增技術(包括PCR™)產生序列。此外，預期亦可採用引導非核細胞器(諸如粒線體、葉綠體及其類似物)內之序列之轉錄及/或表

現之控制序列。

【0160】 自然地，使用有效引導經選擇用於表現之細胞器、細胞類型、組織、器官或生物體中之DNA區段之表現的啟動子及/或強化子將為重要的。熟習分子生物學技術者一般知道使用啟動子、強化子及細胞型組合進行蛋白質表現(參見例如Sambrook等人1989，其以引用的方式併入本文中)。所用啟動子可為組成性的、組織特異性的、誘導性的及/或適用於在適當條件下引導所引入之DNA區段的高水準表現，諸如在重組蛋白質及/或肽的大規模產生方面有利。啟動子可為異源或內源的。

【0161】 另外，任何啟動子/強化子組合(根據例如真核啟動子資料庫(Eukaryotic Promoter Data Base) EPDB，經由全球資訊網epd.isb-sib.ch/)亦可用於驅動表現。使用T3、T7或SP6細胞質表現系統為另一可能實施例。若提供適當細菌聚合酶，則真核細胞可支援自某些細菌啟動子之細胞質轉錄，作為遞送複合物之一部分或作為額外基因表現構築體。

【0162】 啟動子之非限制性實例包括早期或晚期病毒啟動子，諸如SV40早期或晚期啟動子、細胞巨大病毒(CMV)即刻早期啟動子、勞斯肉瘤病毒(RSV)早期啟動子；真核細胞啟動子，諸如 β 肌動蛋白啟動子、GADPH啟動子、金屬硫蛋白啟動子；及串聯反應元件啟動子，諸如環狀AMP反應元件啟動子(cre)、血清反應元件啟動子(sre)、佛波醇酯啟動子(TPA)及靠近最小TATA盒之反應元件啟動子(tre)。亦有可能使用人類生長激素啟動子序列(例如Genbank，寄存編號X05244，核苷酸283-341處所描述之人類生長激素最小啟動子)或小鼠乳房腫瘤啟動子(可購自ATCC，目錄號ATCC 45007)。在某些實施例中，啟動子為CMV IE、凝集素-1 (dectin-1)、凝集素-2、人類CD11c、F4/80、SM22、RSV、SV40、Ad

MLP、 β -肌動蛋白、MHC I類或MHC II類啟動子，然而適用於驅動治療性基因表現之任何其他啟動子可適用於實踐本發明。

【0163】 在某些態樣中，本發明之方法亦係關於強化子序列，亦即增加啟動子活性且具有以順式方式起作用之潛能的核酸序列，且不考慮該等核酸序列之定向，甚至跨越相對較長距離(與標靶啟動子相距多達幾千鹼基)。然而，強化子功能不一定受限於此類長距離，因為其亦可非常接近於給定啟動子起作用。

(ii) 起始信號及連接表現

【0164】 特定起始信號亦可用於本發明中所提供之表現構築體中以便有效轉譯編碼序列。此等信號包括ATG起始密碼子或相鄰序列。可能需要提供包括ATG起始密碼子之外源性轉譯控制信號。一般熟習此項技術者將容易地能夠判定此情形且提供必需信號。熟知起始密碼子必須在所要編碼序列之閱讀框架「框內」，以確保整個插入物之轉譯。外源性轉譯控制信號及起始密碼子可為天然或合成的。表現效率可藉由包括適當轉錄強化子元件來增強。

【0165】 在某些實施例中，使用內部核糖體入口位點(IRES)元件之用途產生多基因或多順反子訊息。IRES元件能夠繞過5'甲基化封端依賴性轉譯之核糖體掃描模型且在內部位點開始轉譯。已描述來自小核糖核酸病毒家族(小兒麻痺及腦心肌炎)之兩個成員的IRES元件以及來自哺乳動物訊息之IRES。IRES元件可連接至異源開放閱讀框架。多個開放閱讀框架可轉錄在一起，各自藉由IRES分離，產生多順反子訊息。藉助於IRES元件，各開放閱讀框架可接近核糖體以便有效轉譯。可使用單一啟動子/強化子轉錄單一訊息來有效表現多個基因。

【0166】 另外，某些2A序列元件可用於在本發明中所提供之構築體中產生基因之連接表現或共表現。舉例而言，裂解序列可用於藉由連接開放閱讀框架以形成單一順反子來共表現基因。例示性裂解序列為F2A (口蹄疫病毒2A)或「2A樣」序列(例如，明脈扁刺蛾 β 四體病毒(*Thosea asigna* virus) 2A；T2A)。

(iii) 複製起點

為了在宿主細胞中傳播載體，其可含有一或多個複製位點起點(常常稱為「ori」)，例如，對應於如上文所描述之EBV之oriP，或在程式化中具有類似或較高功能的經基因工程改造之oriP的核酸序列，其為複製起始之特定核酸序列。或者，可採用如上文所述之其他超染色體複製病毒或自主複製序列(ARS)之複製起點。

c. 選擇及可篩選標記物

【0167】 在一些實施例中，含有本發明之構築體之細胞可藉由在表現載體中包括標記物來體外或體內鑑別。此類標記物將賦予細胞可鑑別之變化，允許容易地鑑別含有表現載體之細胞。一般而言，選擇標記物為賦予允許選擇之特性的一種標記物。陽性選擇標記物為其中標記物之存在允許其選擇之一種標記物，而陰性選擇標記物為其中其存在阻止其選擇之一種標記物。陽性選擇標記物之實例為抗藥性標記物。

【0168】 通常，包括藥物選擇標記物有助於選殖及鑑別轉化子，例如賦予新黴素、嘌呤黴素、潮黴素、DHFR、GPT、吉歐黴素(zeocin)及組胺醇抗性之基因為適用的選擇標記物。除了賦予允許基於條件之實施區分轉化子之表型的標記物之外，亦涵蓋其他類型之標記物，包括基於比色分析之可篩選標記物，諸如GFP。或者，可利用可篩選酶作為陰性選擇標

記物，諸如單純疱疹病毒胸苷激酶(*tk*)或氯黴素乙醯基轉移酶(CAT)。熟習此項技術者亦將知道如何使用免疫標記物，可能結合FACS分析。所用標記物不被認為是重要的，只要其能夠與編碼基因產物之核酸同時表現即可。選擇及可篩選標記物之其他實例為熟習此項技術者所熟知的。

d. 核酸遞送之其他方法

【0169】 除病毒遞送編碼抗原受體之核酸以外，以下為至給定宿主細胞之重組基因遞送的其他方法，且由此被視為在本發明中。

【0170】 如本文所描述或如一般熟習此項技術者將知曉，可使用任何適合的用於轉化細胞之核酸遞送方法來將諸如DNA或RNA之核酸引入本發明之免疫細胞中。此類方法包括(但不限於)藉由以下方式直接遞送DNA，諸如：體外轉染；注射，包括顯微注射；電穿孔；磷酸鈣沈澱；使用DEAE-聚葡萄糖，接著使用聚乙二醇；直接音波加載；脂質體介導之轉染及受體介導之轉染；微彈轟擊；與碳化矽纖維一起進行攪拌；農桿菌(*Agrobacterium*)介導之轉化；乾化/抑制介導之DNA攝取；及此類方法之任何組合。經由應用諸如此等方法之技術，細胞器、細胞、組織或生物體可穩定或暫時地轉型。

IV. 治療方法

【0171】 本發明方法可有助於自臍帶血或末梢血液產生大量高度功能性NK細胞，以用於NK細胞免疫療法。本發明方法亦可用於增強CAR-NK細胞療法之功能性。由此，本文提供用於治療疾病之方法，其係藉由授受輸注僅NK細胞或NK細胞與單株、雙特異性及三特異性抗體之組合，該等抗體結合CD16或NK細胞上之其他受體且將細胞重新導向至標靶，從而增加針對不同腫瘤之反應。

【0172】 在一些實施例中，本發明提供用於免疫療法之方法，其包含投與有效量的本發明之NK細胞。在一個實施例中，醫學疾病或病症係藉由轉移引發免疫反應之NK細胞群體來治療。在本發明之某些實施例中，癌症或感染係藉由轉移引發免疫反應之NK細胞群體來治療。本文提供治療或延遲個體中癌症之進展的方法，其包含向個體投與有效量的NK細胞療法。本發明方法可適用於治療免疫病症、實體癌症、血液癌及病毒感染。

【0173】 本發明之治療方法適用之腫瘤包括任何惡性細胞類型，諸如發現於實體腫瘤或血液腫瘤中之彼等惡性細胞。例示性實體腫瘤可包括(但不限於)選自由以下組成之群之器官的腫瘤：胰臟、結腸、盲腸、胃、大腦、頭部、頸部、卵巢、腎、喉、肉瘤、肺、膀胱、黑素瘤、前列腺及乳房。例示性血液腫瘤包括骨髓腫瘤、T細胞或B細胞惡性疾病、白血病、淋巴瘤、母細胞瘤、骨髓瘤及其類似者。可使用本文所提供之方法治療的癌症之其他實例包括(但不限於)肺癌(包括小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌及肺鱗狀癌)、腹膜癌、胃癌(gastric/stomach cancer) (包括胃腸癌及胃腸基質癌)、胰臟癌、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜癌或子宮癌、唾液腺癌、腎癌(kidney/renal cancer)、前列腺癌、外陰癌、甲狀腺癌、各種類型之頭頸癌及黑素瘤。

【0174】 癌症可特定為以下組織學類型，但不限於此等：惡性贅瘤；癌瘤；未分化癌瘤；巨細胞及梭形細胞癌；小細胞癌；乳頭狀癌；鱗狀細胞癌；淋巴上皮癌；基底細胞癌；毛母質癌；轉移細胞癌；乳頭狀轉移細胞癌；腺癌；惡性胃泌素瘤；膽管癌；肝細胞癌；組合之肝細胞癌及

膽管癌；小樑腺癌；腺樣囊性癌症；腺瘤息肉中之腺癌；家族性結腸息肉病腺癌；實體癌瘤；惡性類癌；細支氣管肺泡腺癌；乳頭狀腺癌；難染細胞癌；嗜酸性癌；嗜氧性腺癌；嗜鹼性癌；透明細胞腺癌；粒狀細胞癌；濾泡腺癌；乳頭狀及濾泡腺癌；無包膜硬化性癌；腎上腺皮質癌；子宮內膜樣癌；皮膚附屬器癌；頂泌腺癌；皮脂腺癌；耵聍腺癌；黏液表皮樣癌瘤；囊腺癌；乳頭狀囊腺癌；乳頭狀的漿液性囊腺癌；黏液性囊腺癌；黏液性腺癌；戒環細胞癌；浸潤性導管癌；髓樣癌；小葉癌；炎性癌；乳房佩吉特氏病(paget's disease)；腺泡細胞癌；腺鱗癌；腺癌伴鱗狀化生；惡性胸腺瘤；惡性卵巢基質腫瘤；惡性泡膜細胞瘤；惡性粒層細胞腫瘤；惡性睪丸母細胞瘤；塞特利氏(sertoli)細胞癌；惡性雷迪格(leydig)細胞腫瘤；惡性脂質細胞腫瘤；惡性副神經節瘤；惡性乳腺外副神經節瘤；嗜鉻細胞瘤；血管球肉瘤；惡性黑素瘤；無黑色素性黑素瘤；淺表擴散性黑素瘤；雀斑惡性黑素瘤；肢端雀斑狀黑素瘤；結節性黑素瘤；巨大色素痣內惡性黑素瘤；上皮狀細胞黑素瘤；惡性藍痣；肉瘤；纖維肉瘤；惡性纖維性組織細胞瘤；黏液肉瘤；脂肉瘤；平滑肌肉瘤；橫紋肌肉瘤；胚胎性橫紋肌肉瘤；肺泡橫紋肌肉瘤；基質肉瘤；惡性混合腫瘤；苗勒混合腫瘤(mullerian mixed tumor)；腎母細胞瘤；肝母細胞瘤；癌肉瘤；惡性間質瘤；惡性布倫納氏腫瘤(brenner tumor)；惡性葉狀腫瘤；滑膜肉瘤；惡性間皮瘤；無性細胞瘤；胚胎性癌；惡性畸胎瘤；惡性卵巢甲狀腺瘤；絨毛膜癌；惡性中腎瘤；血管肉瘤；惡性血管內皮瘤；卡波西氏肉瘤(kaposi's sarcoma)；惡性血管外皮瘤；淋巴管肉瘤；骨肉瘤；皮質旁骨肉瘤；軟骨肉瘤；惡性軟骨母細胞瘤；間葉質軟骨肉瘤；骨巨細胞瘤；尤文氏肉瘤(ewing's sarcoma)；惡性牙源性腫瘤；成釉細胞牙肉瘤；惡性成釉細胞

瘤；成釉細胞纖維肉瘤；惡性松果體瘤；脊索瘤；惡性神經膠質瘤；室管膜瘤；星形細胞瘤；原生質星形細胞瘤；纖維型星形細胞瘤；星形母細胞瘤；神經膠母細胞瘤；少突神經膠質瘤；成少突神經膠質細胞瘤；原始神經外胚層；小腦肉瘤；成神經節細胞瘤；神經母細胞瘤；視網膜母細胞瘤；嗅覺神經性腫瘤；惡性腦膜瘤；神經纖維肉瘤；惡性神經鞘瘤；惡性粒狀細胞瘤；惡性淋巴瘤；霍奇金氏病(hodgkin's disease)；霍奇金氏；類肉芽腫；小淋巴細胞性惡性淋巴瘤；大細胞瀰漫性惡性淋巴瘤；濾泡性惡性淋巴瘤；蕈樣黴菌病；其他指定非霍奇金氏淋巴瘤；B細胞淋巴瘤；低級/濾泡性非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)；小淋巴細胞性(SL) NHL；中級/濾泡性NHL；中級瀰漫性NHL；高級免疫母細胞性NHL；高級淋巴母細胞性NHL；高級小非裂解細胞NHL；巨大腫塊NHL；套細胞淋巴瘤；AIDS相關淋巴瘤；瓦爾登斯特倫氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)；惡性組織細胞增多病；多發性骨髓瘤；肥大細胞肉瘤；免疫增殖性小腸疾病；白血病；淋巴白血病；漿細胞白血病；紅白血病；淋巴肉瘤細胞白血病；骨髓白血病；嗜鹼性白血病；嗜伊紅血球白血病；單核細胞性白血病；肥大細胞白血病；巨核母細胞白血病；骨髓肉瘤；毛細胞白血病；慢性淋巴細胞性白血病(CLL)；急性淋巴母細胞白血病(ALL)；急性骨髓性白血病(AML)；及慢性骨髓母細胞白血病。

【0175】 特定實施例係關於白血病之治療方法。白血病為血液癌症或骨髓癌症且特徵在於血球(通常白血球(white blood cell/leukocyte))之異常增殖(倍增產生)。其為稱為血液贅瘤之廣泛群組之疾病的一部分。白血病為廣義術語，涵蓋一系列疾病。白血病在臨床上及病理上分成其急性及慢性形式。

【0176】 在本發明之某些實施例中，NK細胞遞送至有需要之個體，諸如患有癌症或感染之個體。隨後，細胞增強個體之免疫系統以攻擊各別癌細胞或病原性細胞。在一些情況下，向個體提供一或多次劑量之免疫細胞。在向個體提供兩次或更多次劑量之免疫細胞的情況下，投藥之間的持續時間應足以允許在個體中傳播之時間，且在特定實施例中，劑量之間的持續時間為1、2、3、4、5、6、7天或更多天。

【0177】 本發明之某些實施例提供治療或預防免疫介導之病症之方法。在一個實施例中，個體患有自體免疫疾病。自體免疫疾病之非限制性實例包括：斑禿、僵直性脊椎炎、抗磷脂症候群、自體免疫性艾迪森氏病(Addison's disease)、腎上腺之自體免疫疾病、自體免疫性溶血性貧血、自體免疫性肝炎、自體免疫性卵巢炎及睪丸炎、自體免疫性血小板減少症、白塞氏病(Behcet's disease)、大皰性類天疱瘡、心肌病、口炎性腹瀉-皮炎、慢性疲勞免疫功能障礙症候群(CFIDS)、慢性發炎性脫髓鞘性多發性神經病、徹奇-斯全司症候群(Churg-Strauss syndrome)、癩痕性類天疱瘡、CREST症候群、冷凝集素病、克羅恩氏病(Crohn's disease)、盤狀狼瘡、原發性混合型冷凝球蛋白血症、纖維肌痛-纖維肌炎、絲球體腎炎、格雷夫氏病(Graves' disease)、格林-巴利(Guillain-Barre)、橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、特發性肺部纖維化、特發性血小板減少性紫癜(ITP)、IgA神經病變、青少年關節炎、扁平苔癬、紅斑狼瘡、梅尼爾氏病(Meniere's disease)、混合性結締組織病、多發性硬化症、1型或免疫介導性糖尿病、重症肌無力、腎病症候群(諸如微小病變疾病、局灶性腎小球硬化或膜性腎病)、尋常天疱瘡、惡性貧血、結節性多動脈炎、多軟骨炎、多腺症候群、風濕性多肌痛、多發性肌炎及皮肌炎、原發性無 γ 球蛋白

白血症、原發性膽汁性肝硬化、牛皮癬、牛皮癬性關節炎、雷諾氏現象(Raynaud's phenomenon)、萊特爾氏症候群(Reiter's syndrome)、類風濕性關節炎、類肉瘤病、硬皮病、休格連氏症候群(Sjogren's syndrome)、僵直人症候群、全身性紅斑性狼瘡症、紅斑狼瘡、潰瘍性結腸炎、葡萄膜炎、血管炎(諸如結節性多動脈炎、高安氏動脈炎(takayasu arteritis)、顱動脈炎/巨大細胞動脈炎或疱疹樣皮炎血管炎)、白斑病及韋格納氏肉芽腫病(Wegener's granulomatosis)。由此，可使用本文中所揭示之方法進行治療的自體免疫疾病之一些實例包括(但不限於)多發性硬化症、類風濕性關節炎、全身性紅斑狼瘡、I型糖尿病、克羅恩氏病；潰瘍性結腸炎、重症肌無力、絲球體腎炎、僵直性脊椎炎、血管炎或牛皮癬。個體亦可能患有諸如哮喘之過敏性病症。

【0178】 在另一實施例中，個體為移植器官或幹細胞之接受者，且NK細胞用來預防及/或治療排斥反應。移植體可為複合移植體，諸如面部組織。NK細胞可在移植之前、與移植同時或在移植之後投與。在一些實施例中，在移植前，諸如在移植前至少1小時、至少12小時、至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少1週、至少2週、至少3週、至少4週或至少1個月投與NK細胞。在一個特定非限制性實例中，治療有效量之NK細胞之投與在移植之前3至5天發生。

【0179】 在一些實施例中，可在NK細胞療法之前向個體投與非清髓性淋巴細胞耗盡化學療法。非清髓性淋巴細胞耗盡化學療法可為任何適合之此類療法，其可藉由任何適合之途徑投與。非清髓性淋巴細胞耗盡化學療法可包含例如投與環磷醯胺及氟達拉賓，尤其在癌症係可為轉移性之黑素瘤時。投與環磷醯胺及氟達拉賓之例示性途徑係靜脈內投與。同樣

地，可投與任何適合劑量之環磷醯胺及氟達拉賓。在特定態樣中，持續兩天投與約60 mg/kg環磷醯胺，其後持續五天投與約25 mg/m²氟達拉賓。

【0180】 在某些實施例中，與NK細胞同時或在NK細胞之後向個體投與促進NK細胞生長及活化之生長因子。免疫細胞生長因子可為促進NK細胞生長及活化之任何適合之生長因子。適合之免疫細胞生長因子之實例包括介白素(IL)-2、IL-7、IL-15及IL-12，其可單獨或以各種組合使用，諸如IL-2及IL-7；IL-2及IL-15；IL-7及IL-15；IL-2、IL-7及IL-15；IL-12及IL-7；IL-12及IL-15；或IL-12及IL2。

【0181】 治療有效量之NK細胞可藉由多種途徑投與，包括非經腸投藥，例如靜脈內、腹膜內、肌肉內、胸骨內或關節內注射或輸注。

【0182】 用於授受細胞療法之NK細胞之治療有效量為在所治療之個體中實現所要作用之量。舉例而言，此可為抑制自體免疫或同種免疫疾病進展，或使其消退必需之NK細胞之量，或其能夠緩解由自體免疫疾病引起之症狀，諸如疼痛及發炎。其可為緩解與發炎相關之症狀，諸如疼痛、水腫及高溫必需之量。其亦可為減輕或預防移植器官之排斥反應必需之量。

【0183】 NK細胞群體可以符合疾病之治療方案投與，例如經一天至若干天投與單一劑量或若干劑量以改善疾病狀態，或經延長時間投與週期性劑量以抑制疾病進展及預防疾病復發。待用於調配物中之精確劑量亦將視投藥途徑及疾病或病症之嚴重程度而定，且應根據醫師之判斷及各患者之情況來決定。NK細胞之治療有效量將視治療之個體、病痛之嚴重度及類型以及投與方式而定。在一些實施例中，可用於治療人類個體之劑量介於每平方米至少 3.8×10^4 、至少 3.8×10^5 、至少 3.8×10^6 、至少 3.8×10^7 、

至少 3.8×10^8 、至少 3.8×10^9 或至少 3.8×10^{10} 個NK細胞之範圍內。在某一實施例中，用於治療人類個體之劑量介於每平方米約 3.8×10^9 至約 3.8×10^{10} 個NK細胞之範圍內。在其他實施例中，NK細胞之治療有效量可在每公斤體重約 5×10^6 個細胞至每公斤體重約 7.5×10^8 個細胞之範圍內變化，諸如每公斤體重約 2×10^7 個細胞至約 5×10^8 個細胞，或每公斤體重約 5×10^7 個細胞至約 2×10^8 個細胞。熟習此項技術者基於個體之年齡、體重、性別及生理條件容易確定NK細胞之精確量。有效劑量可自來源於體外或動物模型測試系統之劑量反應曲線外推得到。

【0184】 NK細胞可與一或多種其他治療劑組合投與以治療免疫調節病症。組合療法可包括(但不限於)一或多種抗微生物劑(例如抗生素、抗病毒劑及抗真菌劑)、組合療法可包括(但不限於)一或多種抗微生物劑(例如抗生素、抗病毒劑及抗真菌劑)、抗腫瘤劑(例如氟尿嘧啶、甲胺喋呤、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、氟達拉賓、依託泊苷(etoposide)、阿黴素(doxorubicin)或長春新鹼(vincristine))、免疫耗乏劑(例如氟達拉賓、依託泊苷、阿黴素或長春新鹼)、免疫抑制劑(例如硫唑嘌呤或糖皮質激素，諸如地塞米松(dexamethasone)或潑尼松(prednisone))、消炎劑(例如糖皮質激素，諸如氫皮質酮、地塞米松或潑尼松，或非類固醇消炎劑，諸如乙醯水楊酸、布洛芬(ibuprofen)或萘普生鈉(naproxen sodium))、細胞介素(例如介白素-10或轉型生長因子- β)、激素(例如雌激素)或疫苗。另外，可投與免疫抑制劑或耐受劑，包括(但不限於)鈣調神經磷酸酶抑制劑(例如環孢素及他克莫司(tacrolimus))；mTOR抑制劑(例如雷帕黴素(Rapamycin))；黴酚酸嗎啉乙酯，抗體(例如識別CD3、CD4、CD40、CD154、CD45、IVIG或B細胞)；化學治療劑(例如甲胺喋呤、曲奧舒凡

(Treosulfan)、白消安(Busulfan))；輻照；或趨化激素、介白素或其抑制劑(例如BAFF、IL-2、抗IL-2R、IL-4、JAK激酶抑制劑)。此類其他藥劑可取決於所需效應而在投與NK細胞之前、期間或之後投與。細胞及藥劑之此投與可藉由相同途徑或藉由不同途徑，且在相同位點或在不同位點。

B. 醫藥組合物

【0185】 本文亦提供包含NK細胞及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物及調配物。

【0186】 如本文所述之醫藥組合物及調配物可藉由以下方式製備：混合具有所需純度之活性成分(諸如抗體或多肽)與一或多種視情況選用之醫藥學上可接受之載劑(Remington's Pharmaceutical Sciences 第22版, 2012)，呈凍乾調配物或水溶液形式。醫藥學上可接受之載劑在所使用之劑量及濃度下對於接受者而言通常係無毒的，且包括(但不限於)：緩衝劑，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(諸如氯化十八烷基二甲基苯甲基銨；氯化六羥季銨；氯化苯甲烴銨；苄索氯銨；酚醇、丁醇或苯甲醇；對羥基苯甲酸烷酯，諸如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間甲酚)；低分子量(小於約10個殘基)多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯啶酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、雙醣及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，諸如EDTA；糖，諸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇；成鹽抗衡離子，諸如鈉；金屬錯合物(例如，Zn-蛋白質錯合物)；及/或非離子界面活性劑，諸如聚乙二醇(PEG)。本文中之例示性醫藥學上可接受之載劑進一步

包括間質藥物分散劑，諸如可溶性中性活性玻尿酸酶糖蛋白(sHASEGP)，例如人類可溶性PH-20玻尿酸酶糖蛋白，諸如rHuPH20(HYLENEX[®], Baxter International, Inc.)。某些例示性sHASEGP (包括rHuPH20)及使用方法描述於US專利公開案第2005/0260186號及第2006/0104968號中。在一個態樣中，sHASEGP與一或多種其他葡萄糖胺聚糖酶，諸如軟骨素酶組合。

C. 組合療法

【0187】 在某些實施例中，本發明實施例之組合物及方法涉及與至少一種其他療法組合之NK細胞群體。其他療法可為放射線療法、手術(例如乳房腫瘤切除術及乳房切除術)、化學療法、基因療法、DNA療法、病毒療法、RNA療法、免疫療法、骨髓移植、奈米療法、單株抗體療法或前述各者之組合。其他療法可呈輔助或新輔助療法形式。

【0188】 在一些實施例中，其他療法為投與小分子酶抑制劑或抗轉移性藥劑。在一些實施例中，其他療法為投與副作用限制劑(例如意欲減少治療副作用之出現及/或嚴重程度的藥劑，諸如抗噁心劑等)。在一些實施例中，其他療法為放射線療法。在一些實施例中，其他療法為手術。在一些實施例中，其他療法為放射線療法與手術之組合。在一些實施例中，其他療法為γ輻照。在一些實施例中，其他療法係靶向PBK/AKT/mTOR路徑之療法、HSP90抑制劑、微管蛋白抑制劑、細胞凋亡抑制劑及/或化學預防劑。其他療法可為此項技術中已知之化學治療劑中之一或多者。

【0189】 NK細胞療法相對於另一癌症療法，諸如免疫檢查點療法可在其之前、期間、之後或以各種組合投與。投藥可呈在同時至數分鐘至數天至數週範圍內之間隔。在其中免疫細胞療法與另一治療劑分開提供給

患者之實施例中，一般將保證在每一次遞送之時間段之間未停用大量時間，使得兩種化合物將仍能夠對患者發揮有利的組合效果。在此類情況下，預期可在距彼此約12小時至24小時或72小時內(且更特定言之，在距彼此約6小時至12小時內)向患者提供抗體療法及抗癌療法。在某些情況下，可能需要延長時段以進行顯著治療，其中在各別投藥之間會流逝若干天(2、3、4、5、6或7天)至若干週(1、2、3、4、5、6、7或8週)。

【0190】可採用各種組合。針對下文實例，NK細胞療法為「A」且抗癌療法為「B」：

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B
B/A/B/B

B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A
B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

【0191】考慮到藥劑之毒性(若存在)，向患者投與本發明實施例之任何化合物或療法將遵循用於投與此類化合物之一般方案。因此，在一些實施例中，存在監測可歸因於組合療法之毒性的步驟。

1. 化學療法

【0192】根據本發明實施例可使用各種化學治療劑。術語「化學療法」係指使用藥物治療癌症。「化學治療劑」用於表示在癌症治療中投與之化合物或組合物。此等藥劑或藥物藉由其在細胞內之活性模式分類，例如其是否且在哪一階段影響細胞週期。或者，藥劑可基於其直接交聯DNA、插入DNA中或藉由影響核酸合成來誘導染色體及有絲分裂失常之能力表徵。

【0193】化學治療劑之實例包括烷基化劑，諸如噻替派(thiotepa)及

環磷醯胺；磺酸烷基酯，諸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶(aziridine)，諸如苯佐替派(benzodopa)、卡波醯(carboquone)、美妥替派(meturedopa)及烏瑞替派(uredopa)；乙烯亞胺及甲基蜜胺(methylamelamine)，包括六甲蜜胺(altretamine)、三伸乙基蜜胺(triethylenemelamine)、三伸乙基磷醯胺、三伸乙基硫代磷醯胺及三甲密胺(trimethylolomelamine)；多聚乙醯(acetogenin) (尤其布拉他辛(bullatacin)及布拉他辛酮(bullatacinone))；喜樹鹼(包括合成類似物拓朴替康(topotecan))；苔蘚抑素(bryostatin)；卡利他汀(callystatin)；CC-1065 (包括其阿多來新(adozelesin)、卡折來新(carzelesin)及比折來新(bizelesin)合成類似物)；念珠藻環肽(cryptophycin) (特定言之念珠藻環肽1及念珠藻環肽8)；海兔毒素(dolastatin)；倍癌黴素(duocarmycin) (包括合成類似物KW-2189及CB1-TM1)；軟珊瑚醇(eleutherobin)；水鬼蕉鹼(pancratistatin)；匍枝珊瑚醇(sarcodictyin)；海綿抑制素(spongistatin)；氮芥，諸如苯丁酸氮芥、萘氮芥、氮磷醯胺、雌氮芥、異環磷醯胺、二氯甲基二乙胺、氧化二氯甲基二乙胺鹽酸鹽、美法侖(melphalan)、新氮芥、苯芥膽甾醇(phenesterine)、潑尼氮芥(prednimustine)、曲洛磷胺(trofosfamide)及尿嘧啶氮芥(uracil mustard)；亞硝基脲，諸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)及雷莫司汀(ranimustine)；抗生素，諸如烯二炔抗生素(例如卡奇黴素(calicheamicin)，尤其卡奇黴素 γ II及卡奇黴素 ω I1)；達內黴素(dynemicin)，包括達內黴素A；雙膦酸鹽，諸如氯屈膦酸鹽(clodronate)；埃斯培拉黴素(esperamicin)；以及新抑癌蛋白

(neocarzinostatin)發色團及相關色蛋白烯二炔抗生素發色團、阿克拉黴素(aclacinomycin)、放射菌素(actinomycin)、胺茴黴素(authrarnycin)、偶氮絲胺酸、博來黴素(bleomycins)、放線菌素C (cactinomycin)、卡拉比辛(carabycin)、洋紅黴素(carminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色黴素(chromomycinis)、放線菌素d、道諾黴素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-側氧基-L-正白胺酸、阿黴素(包括N-嗎啉基-阿黴素、氰基-N-嗎啉基-阿黴素、2-吡咯啉基-阿黴素及去氧阿黴素)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、艾達黴素(idarubicin)、麻西羅黴素(marcellomycin)、絲裂黴素(mitomycins) (諸如絲裂黴素C)、黴酚酸(mycophenolic acid)、諾拉黴素(nogalarnycin)、橄欖黴素(olivomycins)、培洛黴素(peplomycin)、潑非黴素(potfiromycin)、嘌呤黴素(puromycin)、奎那黴素(quelamycin)、羅多比星(rodorubicin)、鏈黑黴素(streptonigrin)、鏈脲菌素(streptozocin)、殺結核菌素(tubercidin)、烏苯美司(ubenimex)、淨司他丁(zinostatin)及左柔比星(zorubicin)；抗代謝物，諸如甲胺喋呤(methotrexate)及5-氟尿嘧啶(5-FU)；葉酸類似物，諸如迪諾特寧(denopterin)、蝶羅呤(pteropterin)及曲美沙特(trimetrexate)；嘌呤類似物，諸如氟達拉賓、6-巰基嘌呤、硫咪嘌呤(thiamiprine)及硫鳥嘌呤(thioguanine)；嘧啶類似物，諸如安西他濱(ancitabine)、阿紮胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、雙去氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依諾他濱(enocitabine)及氟尿苷(floxuridine)；雄激素，諸如卡普翠酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、環硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)及翠內酯

(testolactone)；抗腎上腺藥物，諸如米托坦(mitotane)及曲洛司坦(trilostane)；葉酸補充劑，諸如亞葉酸；乙醯葡醛酯(aceglatone)；醛磷醯胺糖苷(aldophosphamide glycoside)；胺基乙醯丙酸；恩尿嘧啶(eniluracil)；安吡啶(amsacrine)；貝斯布西(bestrabucil)；比生群(bisantrene)；依達曲沙(edatraxate)；地磷醯胺(defofamine)；地美可辛(demecolcine)；地吡醌(diaziquone)；艾福米辛(elformthine)；依利醋鉍(elliptinium acetate)；埃博黴素；依託格魯(etoglucid)；硝酸鎂；羥基脲；磨菇多糖(lentinan)；氯尼達明(lonidainine)；類美登素(maytansinoid)，諸如美登素(maytansine)及安絲菌素(ansamitocin)；丙脒脞(mitoguazone)；米托蒽醌(mitoxantrone)；莫哌達醇(mopidamol)；尼曲吡啶(nitracrine)；噴司他丁(pentostatin)；苯來美特(phenamet)；吡柔比星(pirarubicin)；洛索蒽醌(losoxantrone)；鬼臼酸(podophyllinic acid)；2-乙基醯肼；丙卡巴肼(procarbazine)；PSK多醣複合物；雷佐生(razoxane)；根黴素(rhizoxin)；西索菲蘭(sizofiran)；鍺螺旋胺(spirogermanium)；細交鏈孢菌酮酸(tenuazonic acid)；三亞胺醌(triaziquone)；2,2',2''-三氯三乙胺；單端孢黴烯(trichothecene) (尤其T-2毒素、黏液黴素A (verracurin A)、桿孢菌素A (roridin A)及蛇形菌素(anguidine))；尿烷(urethan)；長春地辛(vindesine)；達卡巴嗪(dacarbazine)；甘露醇氮芥(mannomustine)；二溴甘露醇；二溴衛矛醇(mitolactol)；哌泊溴烷(pipobroman)；加西托星(gacytosine)；阿拉伯糖苷(「Ara-C」)；環磷醯胺；類紫杉醇(taxoid)，例如太平洋紫杉醇及多烯紫杉醇吉西他濱(docetaxel gemcitabine)；6-硫鳥嘌呤；巯基嘌呤；鉑配位錯合物，諸如順鉑(cisplatin)、奧沙利鉑(oxaliplatin)及卡鉑

(carboplatin)；長春鹼(vinblastine)；鉑；依託泊苷(etoposide) (VP-16)；異環磷醯胺；米托蒽醌(mitoxantrone)；長春新鹼；長春瑞濱(vinorelbine)；諾安托(novantrone)；替尼泊甙(teniposide)；依達曲沙(edatrexate)；柔紅黴素(daunomycin)；胺基喋呤(aminopterin)；希羅達(xeloda)；伊班膦酸鹽(ibandronate)；伊立替康(irinotecan) (例如，CPT-11)；拓撲異構酶抑制劑RFS 2000；二氟甲基鳥胺酸(DMFO)；類視黃素，諸如視黃酸；卡培他濱(capecitabine)；卡鉑、丙卡巴肼(procarbazine)、光輝黴素(plicomycin)、吉西他濱(gemcitabien)、溫諾平(navelbine)、法呢基蛋白轉移酶抑制劑、反鉑(transplatinum)及以上各者中之任一者之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物。

2. 放射線療法

【0194】造成DNA損傷且已廣泛使用之其他因素包括通常稱為 γ 射線、X射線及/或將放射性同位素定向遞送至腫瘤細胞之彼等。亦涵蓋DNA損傷因素之其他形式，諸如微波、質子束輻照(美國專利5,760,395及4,870,287)及UV輻照。最可能之情形為，所有此等因素對DNA、DNA之前驅物、DNA之複製及修復，及染色體之組裝及維持造成多種破壞。X射線之劑量範圍在延長之時間段(3至4週)期間50至200倫琴日劑量至2000至6000倫琴之單次劑量範圍內。放射性同位素之劑量範圍變化極大，且視同位素之半衰期、所發出之輻射強度及類型，及贅生性細胞之吸收情況而定。

3. 免疫療法

【0195】熟練技術人員應瞭解，其他免疫療法可與實施例之方法組合或結合使用。在癌症治療之情形下，免疫治療劑一般依賴於使用免疫效

應細胞及分子來靶向及摧毀癌細胞。利妥昔單抗(RITUXAN®)係此類實例。免疫效應子可為例如對腫瘤細胞表面上之一些標記物具有特異性之抗體。單獨的抗體可充當療法之效應子或其可募集其他細胞以實際上影響細胞殺滅。抗體亦可結合於藥物或毒素(化學治療劑、放射性核種、蓖麻毒素A鏈、霍亂毒素、百日咳毒素等)且用作靶向劑。或者，效應子可為攜帶直接或間接與腫瘤細胞標靶相互作用之表面分子的淋巴細胞。各種效應細胞包括細胞毒性T細胞及NK細胞。

【0196】 抗體-藥物結合物已作為癌症治療劑之研發之突破性方法出現。癌症係世界上死亡主要原因中之一者。抗體-藥物結合物(ADC)包含共價連接至細胞殺滅藥物之單株抗體(MAb)。此方法組合MAb對其抗原標靶之高特異性與高度有效之細胞毒性藥物，產生將有效負載物(藥物)遞送至具有富集含量之抗原之腫瘤細胞的「武裝」MAb。藥物之靶向遞送亦將其在正常組織中之暴露量減至最少，使得毒性降低且治療指數提高。FDA對兩種ADC藥物，2011年之ADCETRIS® (貝倫妥單抗維多汀(brentuximab vedotin))及2013年之KADCYLA® (曲妥珠單抗恩他新(trastuzumab emtansine)或T-DM1)的批准證實了所述方法。目前在用於癌症治療之臨床試驗之各階段存在超過30種ADC候選藥物(Leal等人, 2014)。隨著抗體工程改造及連接子-有效負載物優化變得愈來愈成熟，新的ADC之發現及研發日益視適合於此方法之新的標靶之鑑別及驗證以及靶向MAb之產生而定。ADC標靶之兩個準則係腫瘤細胞中之上調/高程度表現及穩固內化。

【0197】 在免疫療法之一個態樣中，腫瘤細胞必須攜帶一些適合於進行靶向，亦即大多數其他細胞上不存在之標記物。存在許多腫瘤標記物

且此等標記物中之任一者可適用於在本發明實施例之情形下進行靶向。常見腫瘤標記物包括CD20、癌胚抗原、酪胺酸酶(p97)、gp68、TAG-72、HMFG、Sialyl Lewis抗原、MucA、MucB、PLAP、層黏連蛋白受體、erb B及p155。免疫療法之替代態樣為組合抗癌作用與免疫刺激作用。亦存在免疫刺激分子，包括：細胞介素，諸如IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、 γ -IFN；趨化激素，諸如MIP-1、MCP-1、IL-8及生長因子，諸如FLT3配位體。

【0198】 目前所研究或在使用中之免疫療法之實例係免疫佐劑，例如牛分支桿菌 (*Mycobacterium bovis*)、惡性瘧原蟲 (*Plasmodium falciparum*)、二硝基氯苯及芳族化合物(美國專利 5,801,005 及 5,739,169；Hui及Hashimoto, 1998；Christodoulides等人, 1998)；細胞介素療法，例如干擾素 α 、 β 及 γ 、IL-1、GM-CSF及TNF (Bukowski等人, 1998；Davidson等人, 1998；Hellstrand等人, 1998)；基因療法，例如TNF、IL-1、IL-2及p53 (Qin等人, 1998；Austin-Ward及Villaseca, 1998；美國專利5,830,880及5,846,945)；以及單株抗體，例如抗CD20、抗神經節苷脂GM2及抗p185 (Hollander, 2012；Hanibuchi等人, 1998；美國專利5,824,311)。預期一或多種抗癌療法可與本文所描述之抗體療法一起使用。

【0199】 在一些實施例中，免疫療法可為免疫檢查點抑制劑。免疫檢查點增強信號(例如共刺激分子)或減弱信號。可由免疫檢查點阻斷靶向之抑制性免疫檢查點包括腺苷A2A受體(A2AR)、B7-H3 (亦稱為CD276)、B及T淋巴細胞弱化子(BTLA)、細胞毒性T淋巴細胞相關蛋白4 (CTLA-4，亦稱為CD152)、吡啶胺2,3-二加氧酶(IDO)、殺手細胞免疫球

蛋白(KIR)、淋巴細胞活化基因-3 (LAG3)、計劃性死亡1 (PD-1)、T細胞免疫球蛋白域及黏蛋白域3 (TIM-3)及T細胞活化之V域Ig抑制因子(VISTA)。特定言之，免疫檢查點抑制劑靶向PD-1軸及/或CTLA-4。

【0200】 免疫檢查點抑制劑可為諸如小分子之藥物、配位體或受體之重組形式，或特定言之抗體，諸如人類抗體(例如國際專利公開案WO2015016718；Pardoll, *Nat Rev Cancer*, 12(4): 252-64, 2012；二者均以引用之方式併入本文中)。可使用免疫檢查點蛋白或其類似物之已知抑制劑，尤其可使用抗體之嵌合、人類化或人類形式。如熟練人員將知曉，替代及/或等效名稱可用於在本發明中提及之某些抗體。此類替代及/或等效名稱在本發明之上下文中可互換。舉例而言，已知拉立珠單抗(lambrolizumab)亦以替代及等效名稱 MK-3475 及派立珠單抗(pembrolizumab)已知。

【0201】 在一些實施例中，PD-1結合拮抗劑為抑制PD-1與其配位體結合搭配物結合之分子。在一特定態樣中，PD-1配位體結合搭配物為PDL1及/或PDL2。在另一實施例中，PDL1結合拮抗劑為抑制PDL1與其結合搭配物結合之分子。在一特定態樣中，PDL1結合搭配物為PD-1及/或B7-1。在另一實施例中，PDL2結合拮抗劑為抑制PDL2與其結合搭配物結合之分子。在一特定態樣中，PDL2結合搭配物為PD-1。拮抗劑可為抗體、其抗原結合片段、免疫黏附素、融合蛋白質或寡肽。例示性抗體描述於美國專利第US8735553號、第US8354509號及第US8008449號中，其皆以引用之方式併入本文中。用於本文所提供之方法之其他PD-1軸拮抗劑為此項技術中已知的，諸如描述於美國專利申請案第US20140294898號、第US2014022021號及第US20110008369號中，其皆以引用之方式併

入本文中。

【0202】 在一些實施例中，PD-1結合拮抗劑為抗PD-1抗體(例如人類抗體、人類化抗體或嵌合抗體)。在一些實施例中，抗PD-1抗體係選自由納武單抗(nivolumab)、派立珠單抗(pembrolizumab)及CT-011組成之群。在一些實施例中，PD-1結合拮抗劑為免疫黏附素(例如包含融合至恆定區(例如免疫球蛋白序列之Fc區)之PDL1或PDL2之細胞外或PD-1結合部分的免疫黏附素)。在一些實施例中，PD-1結合拮抗劑為AMP-224。納武單抗，亦稱為MDX-1106-04、MDX-1106、ONO-4538、BMS-936558及OPDIVO[®]，為WO2006/121168中所述之抗PD-1抗體。派立珠單抗，亦稱為MK-3475、Merck 3475、拉立珠單抗(lambrolizumab)、KEYTRUDA[®]及SCH-900475，為WO2009/114335中所描述之抗PD-1抗體。CT-011，亦稱為hBAT或hBAT-1，為WO2009/101611中所描述之抗PD-1抗體。AMP-224，亦稱為B7-DCIg，為WO2010/027827及WO2011/066342中描述之PDL2-Fc融合可溶受體。

【0203】 可在本文中提供之方法中靶向之另一免疫檢查點為細胞毒性T淋巴細胞相關蛋白4 (CTLA-4)，亦稱為CD152。人類CTLA-4之完整cDNA序列具有Genbank寄存編號L15006。CTLA-4發現於T細胞之表面上且在結合於抗原呈現細胞之表面上之CD80或CD86時充當「關閉」開關。CTLA4係表現於輔助T細胞之表面上之免疫球蛋白超家族的成員且將抑制性信號傳輸至T細胞。CTLA4類似於T細胞共刺激蛋白質CD28，且兩種分子均結合於抗原呈現細胞上亦分別稱為B7-1及B7-2之CD80及CD86。CTLA4將抑制性信號傳輸至T細胞，而CD28傳輸刺激性信號。細胞內CTLA4亦發現於調節性T細胞中且對其功能可為重要的。經由T細胞受體

及CD28之T細胞活化導致B7分子之抑制性受體CTLA-4之表現提高。

【0204】 在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係抗CTLA-4抗體(例如人類抗體、人類化抗體或嵌合抗體)、其抗原結合片段、免疫黏附素、融合蛋白質或寡肽。

【0205】 適用於本發明方法之抗人類CTLA-4抗體(或自其衍生之VH及/或VL域)可使用此項技術中熟知之方法產生。或者，可使用此項技術中公認之抗CTLA-4抗體。舉例而言，以下文獻中所揭示之抗CTLA-4抗體可用於本文所揭示之方法：US 8,119,129、WO 01/14424、WO 98/42752；WO 00/37504 (CP675,206，亦稱為曲美木單抗(tremelimumab)；以前稱替西單抗(ticilimumab))、美國專利第6,207,156號；Hurwitz等人(1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95(17): 10067-10071；Camacho等人(2004) *J Clin Oncology* 22(145): 摘要編號2505 (抗體CP-675206)；以及Mokyr等人(1998) *Cancer Res* 58:5301-5304。前述公開案中之每一者之教示內容以引用之方式併入本文中。亦可使用與用於結合於CTLA-4之此等此項技術中公認之抗體中的任一者競爭之抗體。舉例而言，人類化CTLA-4抗體描述於國際專利申請案第WO2001014424號、第WO2000037504號及美國專利第8,017,114號中；其皆以引用之方式併入本文中。

【0206】 例示性抗CTLA-4抗體係伊匹單抗(ipilimumab) (亦稱為10D1、MDX-010、MDX-101及Yervoy®)或其抗原結合片段及變體(參見例如WO 01/14424)。在其他實施例中，抗體包含伊匹單抗之重鏈及輕鏈CDR或VR。因此，在一個實施例中，抗體包含伊匹單抗之VH區之CDR1、CDR2及CDR3域，及伊匹單抗之VL區之CDR1、CDR2及CDR3

域。在另一實施例中，抗體競爭與同上文所提及之抗體相同之CTLA-4上的抗原決定基結合及/或結合於同上文所提及之抗體相同之CTLA-4上的抗原決定基。在另一實施例中，抗體與上文所提及之抗體具有至少約90%可變區胺基酸序列一致性(例如與伊匹單抗具有至少約90%、95%或99%可變區一致性)。

【0207】 用於調節CTLA-4之其他分子包括諸如描述於美國專利第US5844905號、第US5885796號及國際專利申請案第WO1995001994號及第WO1998042752號中之CTLA-4配位體及受體，所有文獻皆以引用之方式併入本文中；及諸如描述於美國專利第US8329867號中之免疫黏附素，該文獻以引用之方式併入本文中。

4. 手術

【0208】 約60%患有癌症的人將經歷一些類型之手術，其包括預防性、診斷性或階段性、治癒性及姑息性手術。治癒性手術包括切除，其中所有或一部分癌組織經物理移除、切除及/或破壞，且可與其他療法結合使用，諸如本發明實施例之治療、化學療法、放射線療法、激素療法、基因療法、免疫療法及/或替代療法。腫瘤切除係指物理移除腫瘤之至少一部分。除腫瘤切除以外，手術治療亦包括雷射手術、冷凍手術、電手術及顯微鏡控制手術(莫氏手術(Mohs' surgery))。

【0209】 在切除一部分或所有癌細胞、組織或腫瘤後，可在體內形成空腔。治療可藉由用額外抗癌療法對該區域灌注、直接注射或局部施用而實現。可例如每1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天、或每1週、2週、3週、4週及5週或每1個月、2個月、3個月、4個月、5個月、6個月、7個月、8個月、9個月、10個月、11個月或12個月重複此類治療。此等治

療亦可具有不同劑量。

5. 其他藥劑

【0210】 預期其他藥劑可與本發明實施例之某些態樣組合使用以改善治療之治療功效。此等其他藥劑包括影響細胞表面受體及GAP連接之上調之試劑、細胞生長抑制劑及分化劑、細胞黏附抑制劑、提高過度增殖性細胞對細胞凋亡誘導物之靈敏度之藥劑或其他生物藥劑。藉由升高GAP連接之數目增加細胞間信號傳導將增加對相鄰過度增殖性細胞群體之抗過度增殖性效應。在其他實施例中，細胞生長抑制劑或分化劑可與本發明實施例之某些態樣組合使用以改善治療之抗過度增殖性功效。涵蓋細胞黏附抑制劑以改善本發明實施例之功效。細胞黏附抑制劑之實例為局部黏著斑激酶(FAK)抑制劑及洛伐他汀(Lovastatin)。另外預期增加過度增殖性細胞對細胞凋亡之敏感度的其他藥劑，諸如抗體c225，可與本發明實施例之某些態樣組合使用以改善治療功效。

V. 製品或套組

【0211】 本文亦提供包含NK細胞之製品或套組。製品或套組可進一步包含藥品說明書，其包含使用NK細胞來治療個體中之癌症或延遲其進展或增強患有癌症之個體之免疫功能的說明。本文所描述之抗原特異性NK細胞中之任一者可包括在製品或套組中。適合的容器包括例如瓶、小瓶、袋及注射器。容器可由多種材料形成，諸如玻璃、塑膠(諸如聚氯乙烯或聚烯烴)或金屬合金(諸如不鏽鋼或赫史特合金(hastelloy))。在一些實施例中，容器裝有調配物，且容器上或與容器系連之標籤可指示使用說明。製品或套組可進一步包括自商業及使用者角度來看合乎需要之其他材料，包括具有使用說明書之其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針、注射器及

封裝插件。在一些實施例中，製品進一步包括一或多種另一藥劑(例如化學治療劑及抗贅生劑)。用於一或多種藥劑之適合容器包括例如瓶、小瓶、袋及注射器。

VI. 實例

【0212】 包括以下實例以展示本發明之較佳實施例。熟習此項技術者應瞭解，以下實例中所揭示之技術表示本發明人所發現之在本發明實踐中起良好作用之技術，且因此可視為構成用於其實踐之較佳模式。然而，根據本發明，熟習此項技術者應瞭解，在不背離本發明之精神及範疇的情況下可對所揭示之特定實施例作出許多改變且仍獲得相同或類似結果。

實例1 - NK細胞之擴增

【0213】 已研究NK細胞作為潛在的抗腫瘤效應子，但許多障礙限制其治療性利用，主要與該等NK細胞之數目較少有關，因此需要體外擴增以用於授受免疫療法。來自患者的末梢血液NK細胞(PB-NK細胞)或來自成人同種異體供者的末梢血液NK細胞係最常用的；然而，此方法需要與進行白細胞去除術之受者最少3/6 HLA分子匹配的有意願的供者。成人PB NK細胞的另一缺點係授受轉移之後的次佳體內增殖及存留。

【0214】 本發明研究顯示，由CB產生之NK細胞可具有獨特優勢，該等優勢與涉及細胞增殖、細胞活化、細胞黏附、細胞週期及DNA複製之基因之較高表現(圖1A至圖1E)有關。因此，研發出符合GMP的快速擴增方案，以用於使用經工程改造之餵養細胞(諸如表現4-1 BB配位體、IL21或IL-15之餵養細胞)及活化NK共刺激分子之配位體(諸如CD48或CS1)來增殖源自CB之NK細胞。

【0215】 自冷凍並解凍之CB單元或自選自臨床CB庫之新鮮CB單元

分離且擴增NK細胞。本發明策略之獨特態樣係不要求供者與受者之間HLA匹配，從而允許得到真正「現成」的細胞療法產品。在可能的情況下，基於與受者之KIR-配位體錯配來選擇CB單元。

【0216】如圖2中所展示，在2週培養期內，達成中值803倍擴增(範圍346至5547)，此擴增倍數顯著高於用PB NK細胞達成之擴增倍數(中值380倍，範圍99至1515； $P = 0.036$)，表明CB-NK細胞具有固有增殖特性。RE-CB NK細胞呈現功能性表型(圖3)，沒有耗竭之證據，如穿孔蛋白及顆粒酶之高表現以及CD57、KLRG1及PD1之表現缺乏所展示。

【0217】RE-CB NK細胞針對體外腫瘤細胞株具有高度細胞毒性，且在輻照之後的免疫缺陷小鼠中誘導出穩定的抗腫瘤活性(圖4)。另外，在高劑量化學療法聯合自體幹細胞移植，清髓性、非清髓性或降低強度化學療法聯合同種異體幹細胞移植以及基於氟達拉賓之淋巴細胞耗盡化學療法之後，向超過60個患有血液癌之患者投與RE-CB NK細胞產物(1/6至5/6 HLA對偶基因匹配)，且並未展示移植物抗宿主疾病或其他毒性。

【0218】本發明方法經最佳化，以改良進行培養所需之時間及數理邏輯且降低程序之成本。最佳化包含增加培養基體積且由此降低細胞之濃度。如針對前七天培養之表2A及針對第二週培養之表2B中所展示，與較少培養基及較高細胞濃度(G-Rex100)相比，在較大培養基體積及降低之細胞濃度(G-Rex100M)的情況下達成顯著更好的倍數擴增。最佳程序需要更少生物反應器，且產生相同或較高NK細胞劑量需要較少細胞。在第7天表現出此情形，此時需要少四倍的細胞來接種各G-Rex 100M以達成相同劑量。在第0至7天，不需要干預培養物(與先前程序至少需要加料兩次相比)。

【0219】 利用最佳程序，在第7至14天，細胞不需要分裂且僅加料兩次。使用較少培養基及細胞介素以及較少技術專家時間，其皆節省金錢且改良數理邏輯。另外，在第7至14天，培養物中需要最少干預(僅添加兩次IL2)，此不僅節省技術時間而且明顯降低微生物污染的可能性。此情形與現今使用的最新NK細胞擴增程序不同，在最新NK細胞擴增程序中，培養物通常在反覆加料的情況下每隔一天進行分裂，從而增加了微生物污染風險。如表2C中所概述，最佳方法將技術人員時間減少29%。

表2A. 第0至7天(CB-NK)											
TNC 接種 /G- Rex第 0天(x 10e6)	G-Rex 100						G-Rex 100M				
	TNC 第7天 (x 10e6)	擴增 倍數	所使用之試劑及供應物				擴增 倍數	得到與G-Rex 100相同的TNC所需之 試劑及供應物			
			G-Rex 100編號	培養基 (L)	血清 (mL)	IL-2 (x 1000單 元)		G-Rex 100 M 編號	培養基 (L)	血清 (mL)	IL-2 (x 1000單 元)
40	9450	39	6	2.7	270	810	56	4	4.0	400	400
40	10500	44	6	2.7	270	810	87	3	3.0	300	300
40	5908	30	5	2.5	250	675	53	3	3.0	300	300

表2B. 第7至14天												
輸注 X2所 需的 TNC (X 10E6)	TNC 接種 /G- Rex第 7天(x 10e6)	擴 增 倍 數	G-Rex 100				TNC 接種 /G- Rex第 7天(x 10e6)	擴 增 倍 數	G-Rex 100M			
			所使用之試劑及供應物						所使用之試劑及供應物			
			G- Rex 100編 號	培 養 基 (L)	血清 (mL)	IL-2 (x 1000 單 元)			所需 的G- Rex 100M 編號	培 養 基 (L)	血清 (mL)	IL-2 (x 1000 單 元)
CB-NK (第7至14天)												
18164	200	53	12	11	1100	1370	50	82	5.0	5	500	500
15006	200	37	14	10	1000	1270	50	58	5.0	5	500	500
16708	200	57	15	11	1100	1370	50	96	4.0	4	400	400

表2C			
程序	技術時間(小時)		節省之技術時間(小時)%
	G-Rex 100	G-Rex 100M	
CB-NK	70	50	29

【0220】 除經最佳化之培養數理邏輯、成本及微生物污染風險降低以外，本發明方法亦具有若干其他新穎且重要的特徵。如圖2中所展示，在2週培養期內，達成中值803倍擴增(範圍346至5547)，此擴增倍數顯著高於用PB NK細胞達成之擴增倍數(中值380倍，範圍99至1515；P = 0.036)，表明CB-NK細胞具有固有增殖特性。RE-CB NK細胞呈現功能性表型(圖3)，沒有「耗竭」之證據，如穿孔蛋白 α 及顆粒酶之高表現以及CD57、KLRG1及PD1之表現缺乏所展示。RE-CB NK細胞針對體外腫瘤細胞株具有高度細胞毒性，且在輻照之後的免疫缺陷小鼠中誘導出穩定的抗腫瘤活性(圖4)。另外，在高劑量化學療法聯合自體幹細胞移植，清髓性、非清髓性或降低強度化學療法聯合同種異體幹細胞移植以及基於氟達拉賓之淋巴細胞耗盡化學療法之後，向超過80個患有血液癌之患者投與快速擴增之(RE)-CB NK細胞產物(1/6至5/6 HLA對偶基因匹配)，其不具有移植物抗宿主疾病或其他毒性。更特定言之，60個患有多發性骨髓瘤之患者安全地接受了與化學療法(美法侖及來那度胺)及自體移植結合之CB-NK細胞。如表3中所示，42個接受CB NK細胞的患有多發性骨髓瘤(MM)之患者及高風險MM患者(參加方案2011-0379)相比於153個接受標準護理(SOC)與美法侖及自體移植之MM及HRMM患者經歷較高的 $\geq$ 極好部分反應(VGPR)及完全反應(CR)率。

表3. 多發性骨髓瘤及高風險多發性骨髓瘤患者之反應率

反應	MM患者 (2011-0379與SOC)	HRMM患者 (2011-0379與SOC)
$\geq$ VGPR (%)	69與54 (p=0.07)	80與42 (p=0.01)
sCR/CR (%)	29與15 (p=0.04)	20與5 (p=0.07)

【0221】 單株抗體埃羅妥珠單抗(elotuzamab)刺激NK細胞且使該等NK細胞靶向多發性骨髓瘤細胞，如下：

- 埃羅妥珠單抗經由CD16結合且藉由直接連接NK細胞上之SLAMF7而增強NK細胞抗體依賴性細胞毒性(ADCC)
- 體外擴增之NK細胞相比於非擴增細胞展示較高的埃羅妥珠單抗介導之細胞毒性
- 向來那度胺添加埃羅妥珠單抗進一步增強針對SLAMF7hi抗NK細胞骨髓瘤細胞株之CB-NK ADCC

【0222】 基於此資料，向化學療法製劑(美法侖及來那度胺)中添加埃羅妥珠單抗，且用CB NK細胞來治療15個其他HRMM患者。如表4中所展示，與並未接受NK細胞之患者相比，接受NK細胞之此等高風險患者之≥VGPR及CR率更高，且接受NK細胞加埃羅妥珠單抗之彼等患者之≥VGPR及CR率甚至更高。在第100天，針對接受NK細胞之兩個組而言，骨髓切片檢查之微小殘留病(MRD)陰性反應率亦係優異的。迄今為止，所有15個患者均存活，且僅一個患者在移植一年時具有進行性骨髓瘤跡象；此患者係在第100天時骨髓呈MRD陽性之極少患者中的一個。15個患者中十四個保持沒有進展。顯而易見，本發明之基於CB NK之療法對於患有高風險多發性骨髓瘤之患者有效。

表4. 接受含或不含埃羅妥珠單抗之NK細胞之患者的反應率

HRMM患者 D ₁₀₀	SOC ASCT (n=66)	1/2期 不含埃羅妥珠單抗 (n=15)	2期實驗 含埃羅妥珠單抗 (n=15)
≥ VGPR (%)	42 [*]	80 [*]	93
sCR/CR (%)	5	20 ^{**}	73 ^{**}
MRD陰性(%)	26	53	73

* p值= 0.011；** p值= 0.0092

【0223】 針對另一試驗(2015-0751)，14個患有難治癒/復發性非霍奇金淋巴瘤之患者在不考慮與患者之HLA匹配的情況下接受經擴增之CB

NK細胞。所有此等患者均安全地接受了CB NK細胞，不具有輸注性或其他毒性且不具有任何GVHD。超過一半的此等難治癒患者(57%)達成完全緩解，且在此治療後一年保持無進展。此等結果強調了如下事實：此等CB NK細胞可用作現成的產物，而無需對患者或CB單元進行耗時且昂貴的HLA分型。針對第三試驗(2012-0819)，19個患者接受了與同種異體移植結合之CB NK細胞。彼等患者對此等細胞產物之耐受極佳，且看起來與接受類似治療但未接受CB NK細胞之患者相比具有更少的白血病復發。此等資料證實經擴增之CB NK細胞在各種不同臨床配置中之安全性及功效。

【0224】 因此，本發明方法可用於擴增來自臍帶血之NK細胞，以獲得符合GMP之臨床劑量。

* * *

【0225】 本文所揭示及主張之所有方法可在不依據本發明進行不當實驗之情況下進行及執行。雖然已根據較佳實施例描述本發明之組合物及方法，但熟習此項技術者將顯而易見，變化可在不背離本發明之概念、精神及範疇的情況下應用於本文所描述之方法中及方法之步驟或步驟順序中。更確切而言，顯而易知化學上及生理學上均相關之某些藥劑可取代本文所描述之藥劑，同時達成相同或類似結果。對熟習此項技術者顯而易見的所有此類類似取代及修改視為在由隨附申請專利範圍所定義之本發明之精神、範疇及概念內。

參考文獻

以下參考文獻特定地以引用的方式併入本文中，以便其對本文所述內容提供例示性程序或其他細節補充。

Austin-Ward and Villaseca, *Revista Medica de Chile*, 126(7):838-845, 1998.

Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994.

Bennekov et al., *Mt. Sinai J. Med.* 71 (2): 86-93, 2004.

Bukowski et al., *Clinical Cancer Res.*, 4(10):2337-2347, 1998.

Camacho et al. *J Clin Oncology* 22(145): Abstract No. 2505 (antibody CP-675206), 2004.

Chothia et al., *EMBO J.* 7:3745, 1988.

Christodoulides et al., *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-3037, 1998.

Cohen et al. *J Immunol.* 175:5799-5808, 2005.

Davidson et al., *J. Immunother.*, 21(5):389-398, 1998.

Davila et al. *PLoS ONE* 8(4): e61338, 2013.

European patent application number EP2537416

Fedorov et al., *Sci. Transl. Medicine*, 5(215), 2013.

Frolet et al., *BMC Microbiol.* 10:190 (2010).

Gaj et al., *Trends in Biotechnology* 31(7), 397-405, 2013.

Hanibuchi et al., *Int. J. Cancer*, 78(4):480-485, 1998.

Heemskerk et al. *Hum Gene Ther.* 19:496-510, 2008.

Hellstrand et al., *Acta Oncologica*, 37(4):347-353, 1998.

Hollander, *Front. Immun.*, 3:3, 2012.

Hui and Hashimoto, *Infection Immun.*, 66(11):5329-5336, 1998.

Hurwitz et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(17): 10067-10071, 1998.

International Patent Publication No. WO1995001994

International Patent Publication No. WO1998042752

International Patent Publication No. WO2000037504

International Patent Publication No. WO200014257

International Patent Publication No. WO2001014424

International Patent Publication No. WO2006/121168

International Patent Publication No. WO2007/103009

International Patent Publication No. WO2009/101611

International Patent Publication No. WO2009/114335

International Patent Publication No. WO2010/027827

International Patent Publication No. WO2011/066342

International Patent Publication No. WO2012/129514

International Patent Publication No. WO2013/071154

International Patent Publication No. WO2013/123061

International Patent Publication No. WO2013/166321

International Patent Publication No. WO2013126726

International Patent Publication No. WO2014/055668

International Patent Publication No. WO2014031687

International Patent Publication No. WO2015016718

International Patent Publication No. WO99/40188

Janeway *et al*, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 433, 1997.

Johnson *et al*. *Blood* 114:535-46, 2009.

- Jores *et al.*, *PNAS U.S.A.* 87:9138, 1990.
- Kim *et al.*, *Nature Biotechnology* 31, 251-258, 2013.
- Leal, M., *Ann N Y Acad Sci* 1321, 41-54, 2014.
- Lefranc *et al.*, *Dev. Comp. Immunol.* 27:55, 2003.
- Linnemann, C. *et al.* *Nat Med* 21, 81-85, 2015.
- Lockey *et al.*, *Front. Biosci.* 13:5916-27, 2008.
- Loewendorf *et al.*, *J. Intern. Med.* 267(5):483-501, 2010.
- Marschall *et al.*, *Future Microbiol.* 4:731-42, 2009.
- Mokyr *et al.* *Cancer Res* 58:5301-5304, 1998.
- Pardoll, *Nat Rev Cancer*, 12(4): 252-64, 2012
- Parkhurst *et al.* *Clin Cancer Res.* 15: 169-180, 2009.
- Qin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24):14411-14416, 1998.
- Rieder *et al.*, *J. Interferon Cytokine Res.* (9):499-509, 2009.
- Rykman, *et al.*, *J. Virol.* 80(2):710-22, 2006.
- Sadelain *et al.*, *Cancer Discov.* 3(4): 388-398, 2013.
- Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed.,
Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001.
- Singh *et al.*, *Cancer Research*, 68:2961-2971, 2008.
- Singh *et al.*, *Cancer Research*, 71:3516-3527, 2011.
- Turtle *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.*, 24(5): 633-39, 2012.
- U.S. Patent No. 4,870,287
- U.S. Patent No. 5,739,169
- U.S. Patent No. 5,760,395

U.S. Patent No. 5,801,005

U.S. Patent No. 5,824,311

U.S. Patent No. 5,830,880

U.S. Patent No. 5,844,905

U.S. Patent No. 5,846,945

U.S. Patent No. 5,885,796

U.S. Patent No. 5,994,136

U.S. Patent No. 6,013,516

U.S. Patent No. 6,103,470

U.S. Patent No. 6,207,156

U.S. Patent No. 6,225,042

U.S. Patent No. 6,355,479

U.S. Patent No. 6,362,001

U.S. Patent No. 6,410,319

U.S. Patent No. 6,416,998

U.S. Patent No. 6,544,518

U.S. Patent No. 6,790,662

U.S. Patent No. 7,109,304

U.S. Patent No. 7,442,548

U.S. Patent No. 7,446,190

U.S. Patent No. 7,598,364

U.S. Patent No. 7,989,425

U.S. Patent No. 8,008,449

U.S. Patent No. 8,017,114

U.S. Patent No. 8,058,065

U.S. Patent No. 8,071,369

U.S. Patent No. 8,119,129

U.S. Patent No. 8,129,187

U.S. Patent No. 8,183,038

U.S. Patent No. 8,268,620

U.S. Patent No. 8,329,867

U.S. Patent No. 8,354,509

U.S. Patent No. 8,546,140

U.S. Patent No. 8,691,574

U.S. Patent No. 8,735,553

U.S. Patent No. 8,741,648

U.S. Patent No. 8,900,871

U.S. Patent No. 9,175,268

U.S. Patent Publication No. 2010/0210014

U.S. Patent Publication No. 12/478,154

U.S. Patent Publication No. 2002131960

U.S. Patent Publication No. 2003/0211603

U.S. Patent Publication No. 2005/0260186

U.S. Patent Publication No. 2006/0104968

U.S. Patent Publication No. 2009/0004142

U.S. Patent Publication No. 2009/0017000

U.S. Patent Publication No. 2009/0246875

U.S. Patent Publication No. 2011/0104125

U.S. Patent Publication No. 2011/0301073

U.S. Patent Publication No. 20110008369

U.S. Patent Publication No. 2012/0276636

U.S. Patent Publication No. 2013/0315884

U.S. Patent Publication No. 20130149337

U.S. Patent Publication No. 2013287748

U.S. Patent Publication No. 2014/0120622

U.S. Patent Publication No. 2014022021

U.S. Patent Publication No. 20140294898

Varela-Rohena *et al.* *Nat Med.* 14: 1390-1395, 2008.

Wu *et al.*, *Cancer*, 18(2): 160-75, 2012.

Zysk *et al.*, *Infect. Immun.* 68(6):3740-43, 2000.